الفصل الأول

تاريخ التقنية الحيوية الصناعية

HISTORY OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY

أرنولد ل. ديمان

Arnold L. Demain

(١ , ١) التاريخ المبكر Early History

إن ممارسة التقنية الحيوية الصناعية لها جذورها العميقة في العصور القديمة. فقد تم استخدام الكائنات الدقيقة قبل وقتٍ طويل من "اكتشافها" لتلبية احتياجات ورغبات البشر، على سبيل المثال للحفاظ على الحليب والفواكه والخضروات، وتحسين نوعية الحياة من خلال إنتاج المشروبات، والجبن، والخبز، والأطعمة المملحة، والخل. ويعود استخدام الخمائر إلى العصور القديمة. وقد استخدمت أقدم طرق التخمير في سومر وبابل في بدايات عام ٧٠٠٠ قبل الميلاد لتحويل السكر إلى الكحول بواسطة الخمائر. وفي عام ٤٠٠٠ قبل الميلاد، اكتشف المصريون أن ثاني أكسيد الكربون الناتج بفعل خميرة الخبز يمكن أن يرفع الخبز. ومن المعروف أيضاً أن الشعوب القديمة صنعت الجبن باستخدام الفطريات والبكتيريا.

واستخدام الكائنات الدقيقة في الغذاء له أيضاً تاريخ طويل. ففي عام ١٠٠ قبل الميلاد[1]، وجد في روما القديمة أكثر من ٢٥٠ مخبزاً والتي كانت تصنع الخبز المخمر. وبوصفها وسيلة من وسائل الحفظ، تم تخمير اللبن الحليب إلى حمض اللاكتيك لصناعة الزبادي، كما تم تحويله إلى الكفير والكوميس باستخدام سلالة الكليفيروميسس في آسيا. ويرجع استخدام الفطريات لتخمير الأرز في عملية إنتاج الكوجي إلى عام ٧٠٠ بعد الميلاد على الأقل. وفي القرن الرابع عشر الميلادي، شاع أسلوب تقطير المشروبات الروحية الكحولية من الحبوب المخمرة في كثيرٍ من أنحاء العالم، وإن كان يعتقد نشأته في الصين أو الشرق الأوسط. وقد بدأت صناعة الخل في نيو أورليانز، وفرنسا، في نهاية القرن الرابع عشر وتعرف التقنية السطحية المستخدمة بطريقة أورليانز.

(١) تم حذف ترجمة فقرة من الكتاب الأصلي؛ لمخالفتها للعقيدة الإسلامية.

وفي القرن السابع عشر، قام أنطوني فان ليوفينهويك، وهو تاجر هولندي بدون أي تدريب جامعي ولكنه هاوٍ ذو اهتمام ببناء المجاهر، بتحويل عدسته البسيطة لفحص المياه، والمواد المتحللة وكشطات من أسنانه. وهكذا سجل وجود كائنات دقيقة متحركة أقل من الألف من حجم حبة الرمل، وأطلق عليها "جزيئات حيوانية". وقد يكون عدم اتصال ليوفينهويك بالجامعة سبباً في عدم الاعتراف باكتشافاته، من قبل الجمعية الملكية في إنجلترا وأمينها، هنري أولدنبورغ، الذي كان يتراسل مع هواة العلم في أوروبا. ومن ١٦٧٣-١٧٢٣م، قام ليوفينهويك بإرسال ملاحظاته كمتخصص مجهري للجمعية في سلسلة من الخطابات.

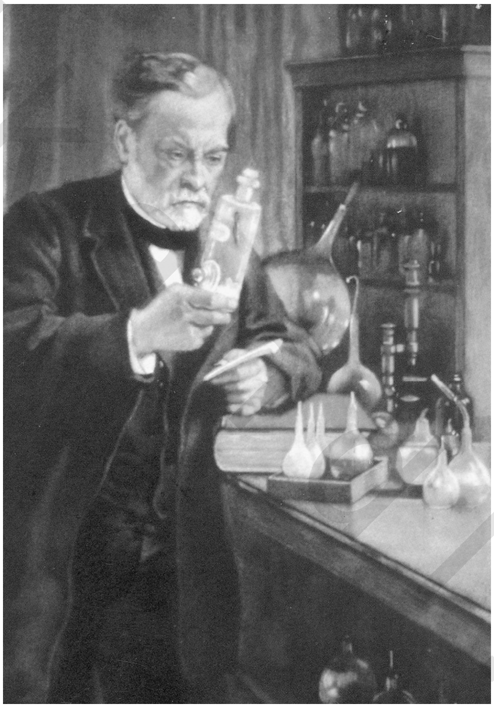
وقد اعتقد معظم العلماء في ذلك الوقت أن الميكروبات تنشأ تلقائياً من المادة غير الحية. وتبع ذلك ١٠٠ عام من النقاش حول تلقائية النشوء، والذي سمي بجدارة "بحرب حقن السوائل". وقد ادعى أنصار النظرية في وقتٍ سابق أن اليرقات تنشأ من اللحوم المتحللة، وقد نازع الطبيب الإيطالي فرانشيسكو ريدي هذه النظرية. وفي هذا الوقت، فقدت نظرية النشوء التلقائي، والتي وضعت من قبل أرسطو وآخرين، مصداقيتها فيما يتعلق بأشكال الحياة الأرقي، ولذلك ركز أنصارها حججهم على البكتيريا. وقد فسَّرت النظرية بالفعل كيفية تعكر محلول رائق عبر نمو أعدادٍ كبيرة من "الكائنات الدقيقة الناشئة تلقائياً" مع مرور الوقت. ومع ذلك، يعتقد آخرون أن الكائنات الحية الدقيقة جاءت فقط من ميكروبات موجودة سابقاً، وبأن وجودها في كل مكان في الهواء هو السبب في أنها تنمو في المحاليل العضوية بعد الوصول إلى هذه السوائل الغنية.

وفي أوائل القرن التاسع عشر، اقترح ثلاثة محققين مستقلين، تشارلز كاجنيارد دي لا تور من فرنسا، وثيودور شوان، وفريدريش تراوجوت كوتسينج من ألمانيا، أن منتجات التخمير، وعلى رأسها الإيثانول وثاني أكسيد الكربون، تنتج من قبل أشكال حياة مجهرية. وقد عارض الكيميائيون الرائدون في هذه الفترة بشدة هذا المفهوم (مثل جونز جاكوب بيرزيليوس، جوستوس فون ليبج، وفريدريش فوهلر) والذين اعتقدوا أن التخمير هو تفاعل كيميائي بحت؛ وقد اتفقوا على أن الخميرة في محاليل التخمير هي مادة متحللة وغير حية.

وكانت الكيمياء العضوية مزدهرة في ذلك الوقت، ونجح هؤلاء المعارضون لنظرية الأصول الميكروبية الحية في البداية نجاحاً كبيراً في طرح وجهات نظرهم. وقد أدى الاهتمام بآليات هذه التخميرات إلى أبحاث لويس باستور اللاحقة (الشكل رقم ١ ,١)، والتي لم تؤدِ فقط إلى تطور الميكروبيولوجي كتخصص متميز، ولكنها أدت أيضًا إلى تطوير اللقاحات ومفاهيم الصحة والنظافة، والتي أحدثت ثورة في ممارسة الطب.

وفي عام ١٨٥٠م، اكتشفت كازيمير دافيان أشكال عصوية في دم الأغنام المصابة بالجمرة الخبيثة، وكان قادراً على إحداث المرض في الأغنام السليمة من خلال حقنها أو تلقيحها بهذا الدم. وفي السنوات الـ ٢٥ التالية، هدم كل من باستور في فرنسا وجون تيندال في بريطانيا أخيراً مفهوم النشأة التلقائية، وأثبتا أن الحياة الميكروبية الموجودة جاءت من حياةٍ سابقة.

وبدأت أعمال باستور في عمله باعتباره كيميائياً يعمل على دراسة التركيب الفراغي. وفي خمسينيات القرن السابع عشر، اكتشف باستور نوعين من الكحول الأميلي، وهما الصورة (دي) و(إل)، لكنه لم يكن قادراً على الفصل بين الاثنين. ولهذا السبب بدأ بدراسة الميكروبات الحية التي تقوم بالتخمير، والتي أدت إلى استنتاجه، في عام ١٨٥٧م، بأن التخمير هي عملية حية للخميرة. وفي عام ١٨٦١م، أثبت باستور وجود الجراثيم في الهواء، مما أدى إلى التشكيك في نظرية النشأة التلقائية للميكروبات، وعند هذه النقطة تمت ولادة مفهوم ميكروبيولوجيا التخمير. ومع ذلك، استغرق الأمر ما يقرب من عقدين من الزمن، حتى عام ١٨٦١م، لدحض النظرية الكيميائية لبيرزيليوس، وليبج، وفوهلر (أي أن التخمير ينتج من الاتصال مع مواد متحللة).

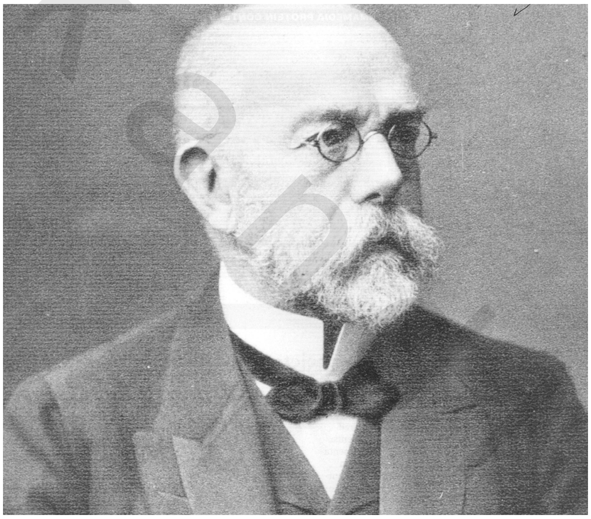


الشكل رقم (١ , ١). لويس باستور.

وفي عام ١٨٧٦م، أثبت عالم الميكروبيولوجي الألماني الكبير روبرت كوخ (الشكل رقم ٢ , ١) أن البكتيريا من عدوى مرض الجمرة الخبيثة كانت قادرة على التسبب في المرض. وقد قادت إسهاماته المنطوية على نمو الميكروبات في المزرعة النقية إلى انخفاض نظرية تعدد الأشكال، والتي افترضت أن شكل واحد من البكتيريا تطور إلى شكل آخر. ويعدُّ عمل كوخ هو الأساس الذي أدى إلى قبول فكرة أن أمراضاً معينة تنتج من كائنات محددة، لكل منها شكل خاص ووظيفة محددة. وفي عام ١٨٨٤م، تمكن طلابه جافكي ولوفلر من تأكيد الدور الممرض للبكتيريا المعدية في حمى التيفود والدفتيريا.

وقد استدعي باستور من قبل المقطرين في شركة ليلي لمعرفة لماذا تصبح محتويات براميل التخمير لديهم حامضة. وباستخدام مجهره الخاص، لاحظ أن محلول التخمير لا يحتوي فقط على خلايا الخميرة، ولكن أيضاً على البكتيريا، وكان يعرف مسبقاً أن هذه يمكن أن تنتج حامض اللاكتيك. وقد أدت هذه الملاحظة إلى اقتراحه بأنه يمكن منع هذه الحامضية باستخدام معالجة حرارية معتدلة، والتي أصبحت تعرف فيما بعد باسم "البسترة".

ومن أعظم إسهامات باستور إثبات أن كل نوع من أنواع التخمير يتم بواسطة كائن حي دقيق محدد. علاوةً على ذلك، برهن على وجود أشكال للحياة والتي كانت لاهوائية تمامًا، وذلك في دراسة أجريت لتحديد سبب تدني نوعية البيرة الفرنسية عن البيرة الألمانية. وقد أدى الاهتمام في آليات هذه التخميرات إلى الأبحاث اللاحقة من قبل باستور، والتي لم تؤدِ فقط إلى تقدم علم الميكروبيولوجي بوصفه تخصصاً متميزاً، ولكن أيضاً أدت إلى تطوير اللقاحات ومفاهيم النظافة والصحة العامة والتي أحدثت ثورة في ممارسة الطب.



الشكل رقم (٢, ١). روبرت كوخ.

ومع تأسيس نظرية الجراثيم في الأمراض عن طريق باستور وكوخ، فقد اتسم النصف الثاني من القرن التاسع عشر بمكافحة المرض، وكان اهتمام علماء الميكروبيولوجي موجهاً نحو جوانب الميكروبيولوجي المعنية بالدواء والصحة العامة. وأدى ذلك إلى اكتشاف أن جسم الإنسان له دفاعاته الخاصة في مكافحة الجراثيم المسببة للأمراض. ووجد باستور وكوخ، من بين آخرين، أنه عند الغزو بالبكتيريا تتكون بروتينات (الأجسام المضادة)، والتي يمكنها معادلة أو إزالة تأثير الكائن الغازي. وهكذا، تأسس علم المناعة. وعن طريق الحقن إما بأشكال ميتة وإما بأخرى تم إضعافها من البكتيريا المسببة للمرض، تمكن باستور من تقوية مناعة الفرد ضد المرض. واحتل إنتاج هذه اللقاحات الكثير من البحوث الأولية في الميكروبيولوجي.

وأثناء حياة باستور، تم إدخال استخدام المطهرات. وقد ثبت في عام ١٨٤٦م من قبل إيجانز سيملويس أن الكلور يمكن أن يكافح العدوى، وفي عام ١٨٦٥م، أثبت جوزيف ليستر أنه يمكن القيام بالشيء نفسه باستخدام مع حمض الكربوليك. وفي وقتٍ لاحق، استخدم بول إرليش الأصباغ الاصطناعية وأسس مفهوم "الرصاصة السحرية". وقرب نهاية القرن التاسع عشر، بدأ إيرليش فـي اختبار الكثير من المركبات الـمخلقة. وقد حقق النجاح فـي عام ١٩٠٩م، فـي علاج الحمى الانتكاسية، والزهري، وداء المثقبيات باستخدام منتج زرنيخي أطلق عليه سالفرسان أو مركب ٦٠٦؛ (لأنها كانت محاولته رقم ٦٠٦ لإنتاج مركب زرنيخي لقتل جرثومة الزهري داخل الجسم دون الإضرار بالعائل). وكان هذا هو أول علاج كيماوي يكتشف، وقـد صاغ مصطلح "العلاج الكيميائي".

وقد فتح استخدام العقاقير السامة بشكلٍ انتقائي للطفيل وبدون ضرر للعائل حقلاً جديداً تماماً لعلاج أمراض الإنسان. ففي عام ١٩٢٧م، استكمل جيرهارد دوماك في ألمانيا هذا العمل [١] مع معاونيه ميتش وكلارر. وكانوا يعملون في شركة آي جي لصناعة الأصباغ، والتي كانت نتيجة لعملية اندماج في ١٩٢٤م بين شركتي باير وباسف. وقد أدى عملهم إلى تطوير المركب الأحمر "برونتوسيل الأحمر". وكان هذا المركب نشطاً في الفئران ضد البكتيريا العنقودية، ولكن الغريب أنه كان غير نشطٍ خارج الفئران في المختبر. ثم في عام ١٩٣٥م، اكتشف تريفويل وزملاؤه في فرنسا أن الصبغة الحمراء يتم تكسيرها في الحيوان إلى السلفانيلاميد عديمة اللون والمثبطة. وقد أدى هذا إلى نشأة المفهوم المهم أن المواد الكيميائية يمكن أن تقتل أو تثبط البكتيريا بدون سمية للإنسان. وعلى الرغم من أن الحكومة النازية رفضت السماح لدوماك بقبول جائزة نوبل في عام ١٩٣٩م، إلا أنه قبلها لاحقاً في عام ١٩٤٧م. وقـد اكتسبت الكثير من العقاقير الكيميائية المخلقة استخداماً واسع النطاق على مدى سنوات، بما في ذلك هيدرازيد حمض الأيزونيكوتينيك وحمض البارا-أمينوساليسيليك، واللذان استخدما لعلاج السل.

وقد ارتبط اكتشاف آخر في القرن التاسع عشر بالطريقة التي تتفاعل بها الكائنات الدقيقة مع بعضها بعضاً. فقد استخدم الجبن المتعفن، واللحوم والخبز لآلاف السنين في الطب الشعبي لتضميد الجروح. وفي عام ١٨٧٠م، لاحظ كلٌ من تيندال، وباستور، وويليام روبرتس، وهو طبيب بريطاني، التأثير المضاد لكائن حي دقيق على كائن آخر. واقترح باستور، ببصيرته المميزة، أن هذه الظاهرة قد يكون لها بعض الإمكانات العلاجية. وعلى مدى السنوات الخمسين المقبلة، تمت تجربة الكثير من المستحضرات الميكروبية المختلفة كأدوية، ولكنها كانت إما سامة جداً وإما غير نشطة في الحيوانات الحية. وقد أدى هذا إلى اللحظة المحورية في تاريخ الميكروبيولوجي، عندما اكتشف الكسندر فليمنغ البنسيلين في عام ١٩٢٧م (انظر القسم ٢ , ١).

في عام ١٨٧٧م، اقترح موريتز تراوبه أن: (أ) تحفز مواد شبه بروتينية التفاعلات التخميرية والتفاعلات الكيميائية الأخرى و(ب) وأنها لا تدمر عند القيام بمثل هذه الأمور. وكانت هذه هي بداية الاعتراف بما نسميه

اليوم الإنزيمات. واقترح أيضًا أن عملية التخمير تتم من خلال تفاعلات متعددة المراحل، والتي يتم فيها نقل الأوكسجين من جزء واحد من جزيء السكر إلى جزءٍ آخر، مما يكون في النهاية بعض المركبات المتأكسدة (مثل ثاني أكسيد الكربون) ومركبات مختزلة (مثل الكحول).

وتم تأسيس مجال الكيمياء الحيوية في عام ١٨٩٧م عندما وجد إدوارد بوخنر أن مستخلصات الخميرة الخالية من الخلايا الكاملة، يمكنها تحويل السكروز إلى الإيثانول. وعليه، تم تعديل وجهات نظر باستور، وأصبح مفهوماً أن عمليات التخمير يمكن أيضاً أن تتم في غياب الخلايا الحية.

وخلال الحرب العالمية الأولى، أسفرت الحاجة إلى الجلسرين المستخدم في صناعة الذخيرة، إلى استخدام الخميرة لتحويل السكريات إلى الجلسرين. وقد أدى هذا التطور بعد الحرب إلى الدراسة المستفيضة من قبل نويبرغ لكيفية عمل هذه التفاعلات المشاركة في تحويل السكريات إلى الإيثانول. تبع هذا دراسات العلماء الهولنديين في دلفت لبحث تفاعلات الأكسدة/ الاختزال وحركية التفاعلات التي يتم تحفيزها بالإنزيمات.

الشكل رقم (١,٣). حاييم وايزمان.

أيضًا أثناء الحرب العالمية الأولى، استخدم حاييم وايزمان (الشكل رقم ١,٣) في جامعة مانشستر بكتيريا حمض البيوتيريك المستخدمة لقرونٍ مضت في تعطين الكتان والقنب، في إنتاج الأسيتون والبيوتانول. وكان استخدامه لبكتيريا الكلوستريديم لإنتاج الأسيتون والبيوتانول هو التطوير الأول لعملية تخمير غير غذائية للإنتاج

obeikandi.com

على نطاقٍ واسع؛ وخـلال ذلك ظهرت مشكلات التلوث الفيروسي والميكروبي، والتي كـان لا بد من حلها. وعلى الرغم من أن استخـدام عملية التخمير هـذه قد تلاشى لعدم قدرتها على منافسة الطرق الكيميائية في إنتاج المذيبات، إلا أنها وفرت قاعدة من الخبرة لتطوير عملية زراعة الفطريات على نطاقٍ واسع لإنتاج حمض الستريك. وبعد وقتٍ قصير مـن الحرب العالمية الأولى، ابتكرت عملية تخمير هوائية استخدم فيها فطر الأسبرجلس نيجر. ولم تـمر سنوات كثيرة، حتى بشرت اكتشافات البنسيلين والستربتوميسين وتطوراتها التجارية ببداية عصر المضادات الحيوية.

(٢ , ١) قصة البنسيلين The Penicillin Story

بدأ العصر الذهبي للمضادات الحيوية مع اكتشاف الكسندر فليمينج البنسيلين بالصدفة عام ١٩٢٩م في إنجلترا [٢]. حيث لاحظ أن بعض أطباقه والتي بها الميكروب العنقودي ستافيلوكوكس أوريوس كانت ملوثة بالفطر بنسيليوم نوتاتام، وقد فوجئ برؤية أن أيّاً من المستعمرات البكتيرية لم تتمكن من النمو بالقرب من الفطر. واستنتج أن الفطر كان ينتج نوعاً ما من العوامل المثبطة. ولاحظ أيضاً أن رشيح الفطر حلل الخلايا العنقودية، كما كان غير سام للحيوانات. وأطلق على هذا العامل اسم البنسيلين. وبسبب أن هذا النشاط كان غير مستقر للغاية، وبسبب عدم تمكن فليمينج من الحصول على أي تشجيع من زملائه العلماء بشأن جدوى مثل هذه المواد، فقد تم التخلي عن المشروع.

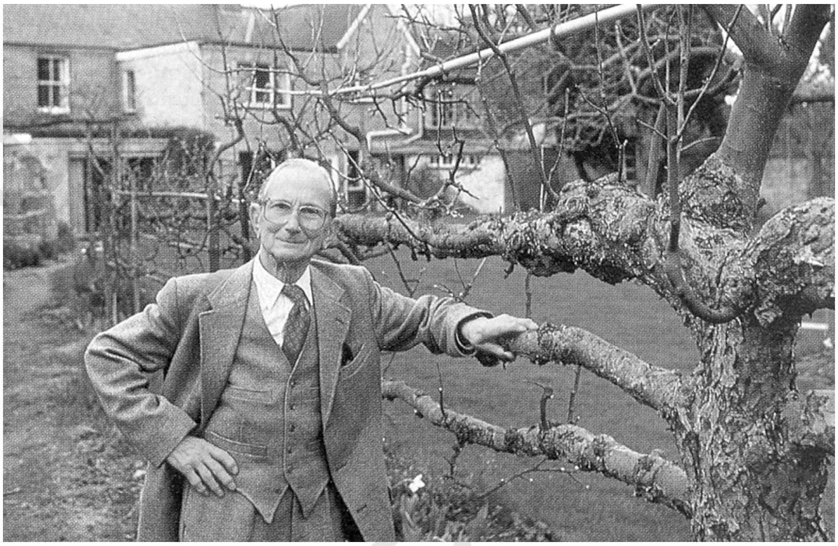
الشكل رقم (١ , ٤). هوارد فلوري.

الشكل رقم (١,٥) إرنست شاين.

كان لاكتشاف فليمينج للبنسيلين أهمية، بوصفه أول علاج كيميائي ناجح ينتج بواسطة ميكروب، ومن ثمَّ حفز البدء في العصر الذهبي للعقاقير المعجزة. إلاَّ أن الطريق لتطوير البنسيلين كعلاجٍ ناجح لم يكن بالمهمة السهلة. فقد ظل بمثابة الفضول المعملي لعقدٍ من الزمن، وكان هذا الفضول غير مستقر كذلك. وجرت محاولات لعزل البنسيلين في عام ١٩٣٠م من جانب عدد من الكيميائين البريطانين، ولكن عدم استقرار المادة أحبط جهودهم. وعندما بدأت الحرب العالمية الثانية، ومات الكثير من الجنود البريطانيين في ساحة المعركة من الالتهابات البكتيرية بعد إصابتهم بالجروح، بدأت دراسة البنسيلين في عام ١٩٣٩م في مدرسة السير وليام دان لعلم الأمراض في جامعة أكسفورد بواسطة هوارد فلوري (الشكل رقم ١,٤)، وإرنست شاين (الشكل رقم ١,٥)، ونورمان هيتلي (الشكل رقم ١,٦)، وإدوارد أبراهام، وزملائهم. وأدى هذا الجهد إلى النجاح في إعداد مستحضر لنموذج مستقر للبنسيلين، والتدليل على نشاطه المضاد للبكتيريا اللافت للنظر وعدم سميته في الفئران.

وللأسف، كان إنتاج البنسيلين من سلالة بنسيليوم نوتاتام بطيئاً جداً بحيث إنه استغرق أكثر من سنة لجمع ما يكفي من المادة لإجراء التجارب السريرية على البشر [٣]. وعندما نجحت الاختبارات السريرية، أصبح الإنتاج على نطاقٍ كبير شيئاً أساسياً، مما دفع فلوري وزملاؤه للذهاب إلى الولايات المتحدة في صيف عام ١٩٤١م لطلب المساعدة. وهناك أقنعوا مختبر البحوث الشمالية الإقليمية (NRRL) في وزارة الزراعة الأمريكية (USDA) في

بيوريا، إلينوي، والكثير من شركات الأدوية الأمريكية (بما في ذلك شركة ميرك، وسكويب، وفايزر) لتطوير الإنتاج التجاري للبنسيلين. وظل هيتلي لفترة في الـ NRRL للعمل مع موير وكوجيل [٤]. وهكذا بدأ جهد تعاوني بين الجامعة والمختبرات الصناعية في الولايات المتحدة، والمؤسسات الأكاديمية في المملكة المتحدة، والتي استمرت طوال الحرب.



الشكل رقم (١,٦). نورمان هيتلي.

وكانت النتيجة إنقاذ آلاف الأرواح، داخل وخارج ميدان المعركة. وكان اكتشاف وتطوير المضادات الحيوية من مجموعة البيتا لاكتام بين أقوى الإنجازات للعلم الحديث والتقنية. وتبع اكتشاف فليمنج للفطر المنتج للبنسيلين بالصدفة سنوات من التقدم المطرد، واليوم تعد مجموعة مركبات البيتا لاكتام واحدة من أكثر الأمثلة الناجحة لتطبيقات المنتجات الطبيعية والعلاج الكيميائي.

وفي أربعينيات القرن الماضي بدأت فترة من التطوير المكثف في علم الوراثة الميكروبية [٥]. فعلى الرغم من أن السلالة الأصلية لفليمنج أنتجت كميات ضئيلة من البنسيلين، فقد صنعت "القوة الغاشمة" للتلاعب الجيني قفزات هائلة في القدرة الإنتاجية، وأدت إلى تقنية جديدة تعرف باسم "تحسين السلالة". وركزت هذه الدراسات الوراثية الأولية إلى حدٍ كبير على إنتاج الكائنات المطفرة أو المعدلة وراثياً، ودراسة خواصها. وقد اجتذبت السهولة التي يمكن بها التغيير "الدائم" لخصائص الكائنات الحية الدقيقة عن طريق التطفير، وكذلك بساطة أسلوب التطفير علماء الميكروبيولوجي بدرجة كبيرة. وتأسس برنامج تعاوني لاختيار السلالة بين العاملين في وزارة الزراعة الأميركية في بيوريا، ومؤسسة كارنيجي، وجامعة ستانفورد، وجامعة ويسكنسن.

بدأ اختيار السلالة بالبنسليوم كريزوجينوم NRRL1951، السلالة المعروفة والمعزولة من شمام متعفن من سوق بيوريا. وكانت هذه السلالة قادرة على إنتاج ٦٠ ميكروجرام/ مل. وأدت زراعة الطفرات التلقائية وزراعة الجرثومة الواحدة إلى سلالات أكثر إنتاجية من NRRL1951. واحدة منها NRRL1951-1325 أنتجت ١٥٠ ميكروجرام/ مل. وتم تعريضها بعد ذلك لأشعة إكس بواسطة ديميريك في معهد كارنيجي في كولد سبرنج هاربور، نيويورك، وتم الحصول على الطفرة. X-1612 وهذه أنتجت ٣٠٠ ميكروجرام/ مل. وحصل العاملون في جامعة ويسكونسن على سلالات ديميريك الناتجة بالتطفير بأشعة إكس. وأصبح واحد منها، Q-176، والذي أنتج ٥٥٠ ميكروجرام/ لتر، الأصل لجميع السلالات المستخدمة في الصناعة. وأصبحت "عائلة ويسكونسن" من السلالات المتفوقة معروفة جيداً في جميع أنحاء العالم، وبعضها ينتج أكثر من ١٨٠٠ ميكروجرام/ مل. وأصبح الجهد لتطوير البنسيلين هو بداية لانخراطٍ طويلٍ بين علم الوراثة وعلم الميكروبيولوجيا الصناعية، والتي أثبتت في النهاية أن الطفرة كانت العامل الرئيس المتسبب في الزيادة التي تقدر بمائة إلى ألف ضعف في إنتاجية منتجات الأيض الميكروبي.

وتم إنتاج البنسيلين بصفةٍ أساسية في المزارع النامية بالطريقة السطحية، ولكن وجد أن معدلات الإنتاج كانت منخفضة جداً. وسرعان ما أصبحت الزراعة بالطريقة المغمورة هي الأسلوب المفضل. وتمت زيادة الإنتاجية بمائة ضعف في غضون بضع سنوات عن طريق استخدام تحسين السلالة وتحويرات البيئة الغذائية مثل استخدام شراب منقوع الذرة كمادة مضافة. وقد تحقق قدر كبير من الفهم لفيسيولوجية فطر البنسيليوم كريزوجينوم فيما يتعلق بإنتاج البنسيلين بواسطة البروفيسور مارفن جونسون (الشكل رقم ١,٧) وطلابه في جامعة ويسكونسن. وقد ظهرت أيضاً نجاحات علاجية أخرى في كلٍ من المملكة المتحدة والولايات المتحدة، وأخيراً، في عام ١٩٤٣م، تم استخدام البنسيلين لعلاج الجرحى في المعركة.

وفي الخمسينيات، تم إدراك أن فطر البنسيليوم كريزوجينوم يمكن أن يستخدم مركبات أسيل إضافية كمرادفات جانبية السلسلة (عدا حمض الفينيل أسيتيك لإنتاج البنسيلين ج) وتنتج بنسيلينات جديدة، وحقق واحد من هذه، البنسيلين في (فينوكسي ميثيل بنسيلين)، نجاحاً تجارياً. ونتج تطبيقه التجاري من ثباته في الأحماض مما سمح بتناوله عن طريق الفم، وهذه كانت ميزة كبيرة له على البنسيلين ج (بنزيل بنسيلين). وأصبح البنسيلين ج وفي أهم البنسيلينات التجارية. وفي الإنتاج التجاري، كانت البيئة الغذائية المعتادة معقدة، وتتكون من الجلوكوز، وشراب منقوع الذرة، والمرادفات جانبية السلسلة (حمض الفينيل أسيتيك للبنسيلين ج، أو حمض الفينوكسي أسيتيك للبنسيلين في)، والأملاح المعدنية. وكان الاكتشاف الأول بأن الجلوكوز كان له أثرٌ سلبيٌ على تكوين البنسيلين عن طريق جونسون وطلابه [٦، ٧]. حيث وجدوا أن الجلوكوز كان ممتازاً للنمو ولكنه غير جيد لتكوين

obeikandi.com

البنسيلين، بينما أظهر سكر اللاكتوز النمط المعاكس، واقترحوا بيئة غذائية تحتوي كلاً منهما، حيث يحدث النمو باستخدام الجلوكوز، وعندما يتم استهلاك الجلوكوز فإن كتلة الخلايا تبدأ في إنتاج المضاد الحيوي باستخدام اللاكتوز. وخلافاً للجلوكوز، فإن اللاكتوز يستهلك ببطء، ولا يظهر كبح الكربون الهدمي في العملية. وبعد ذلك، وجد ديفي وجونسون [٨] أن التغذية المتقطعة أو المستمرة للجلوكوز الأقل تكلفة يمكن أن تحل محل تغذية اللاكتوز على دفعات. وقد مثل هذا ولادة مفهوم التخمير دفعي التغذية، والذي يعد شائعاً في صناعة التخمير اليوم.

الشكل رقم (١,٧). مارفن جونسون.

وقد تمت دراسة التخليق الحيوي للبنسيلين من مرادفاته (السيستين، الفالين، حمض الفينيل أسيتيك) بنشاط خلال الخمسينيات والستينيات والسبعينيات. وكانت العلاقة بين الليسين وتكوين البنسيلين ذات أهمية كبيرة. ففي عام ١٩٤٧م، لاحظ ديفيد بونر أن ٢٥٪ من السلالات الأوكسوتروف بالنسبة لليسين التي أنتجها من فطر البنسيليوم كريزوجينوم، فشلت في إنتاج البنسيلين، وتوقع أن (أ) هناك علاقة ما بين المضاد الحيوي والحمض الأميني، و(ب) يوجد مرادف مشترك بين المركبين. وبعد عشر سنوات ثبت أنه كان على صواب تماماً، عندما وجد دومان [٩] أن الليسين مثبط قوي لإنتاج البنسيلين. وقادت حقيقة أن التثبيط يمكن عكسه باستخدام حمض ألفا-أمينوأديبيك إلى الفرضيات [١٠] أن (أ) حمض ألفا أمينوأديبيك كان ضالعاً في تكوين البنسيلين على الرغم من أنه

obeikandl.com

لا يدخل في جزيء البنسيلين النهائي، (ب) أن البنسيلين يشتق من ألفا-كيتوجلوتارات وأسيتيل-العامل المساعد (أ) بواسطة المسار التخليقي لليسين في الفطر، و(ج) أن تثبيط الليسين لإنتاج البنسيلين يرجع إلى التثبيط الرجعي لليسين لتكوينه نفسه، مما يحد من تكوين حمض ألفا-أمينوأديبيك. وبصورةٍ مستقلة، اكتشف آرنشتاين وزملاؤه [١١] ثلاثي الببتيد-جاما-ألفا-أمينوأديبيل-سيستينيل فالين كمركب داخل الخلايا في فطر البنسيليوم كريزوجينوم. وأثبتت النتائج في مختبرات عديدة أهمية حمض الفا-أمينوأديبيك كمرادف لجميع أنواع البنسيلين. وسرعان ما أثبت أن جاما-ألفا-أمينوأديبيل-سيستينيل فالين هو وسيط مصيري لتكوين البنسيلين. وقد ثبت في وقت لاحق أن حساسية التفاعل للتثبيط الرجعي بالليسين هي الخطوة الأولى لتكوين الليسين في الفطريات، وهو ما عرف بتفاعل الهوموسيترات سينسيز [١٢، ١٣].

خلال الخمسينيات، أصبح مستقبل البنسيلين مشكوكاً فيه بسبب ظهور سلالات مقاومة من البكتيريا العنقودية ستافيلوكوكس أوريوس في المستشفيات. وكونت سلالة الستافيلوكوكس مقاومة البنسيلين عن طريق اختيار السلالات المنتجة لإنزيم البنسيلينيز المحلل للبنسيلين، ولذلك كانت هناك حاجة واضحة لدواء جديد لمكافحة هذه السلالات المقاومة. وكانت البنسيلينات المستخدمة حتى هذه اللحظة قابلة للذوبان في المذيبات، وأظهرت درجة عالية من النشاط ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام، ولكن كانت أقل نشاطاً بكثيرٍ ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام. ولحسن الحظ، حدث تطوران أديا إلى إعادة الاهتمام بالبنسيلين والمضادات الحيوية ذات الصلة. كان الأول عام ١٩٥٩م في اليابان بواسطة كويشي كاتو، وهو اكتشاف تراكم "نواة البنسيلين" في محاليل مزارع فطر البنسيليوم كريزوجينوم، والتي لم يضاف إليها أي مرادفات جانبية السلسلة [١٤]. وعزل باتشيلور وآخرون في المملكة المتحدة [١٥] مركب حمض ٦-أمينو بنسيلانيك (6-APA) والذي كان "نواة البنسيلين" التي اكتشفها كاتو. واستعمل 6-APA لإنتاج البنسيلينات "شبه المخلقة" (تحورات كيميائية للمضاد الحيوي الطبيعي)، مع الخصائص المفيدة لمقاومة إنزيم البنسيلينيز والحامض، بالإضافة إلى النشاط واسع المدى المضاد للبكتيريا.

وكان التطور الثاني هو اكتشاف نوع مختلف تماماً من البنسيلين، وهو نوع يذوب في الماء، والذي أظهر نشاطاً مماثلاً ضد كلٍ من نوعي الكائنات الدقيقة (البنسيلين ن). وتم اكتشاف هذا المركب بشكلٍ مستقل من قبل مجموعتين من العلماء. ففي عام ١٩٤٨م نشر بروتزو أعماله [١٦] في مجلة علمية غير معروفة في سردينيا عن عزل سلالة منتجة لمضاد حيوي من فطر سيفالوسبوريم أكريمونيوم (أعيد تصنيفها فيما بعد كأكريمونيوم كريزوجينوم) من مياه الصرف الصحي. ولعدم قدرته على تنقية المضاد الحيوي، فقد بعث السلالة إلى فلوري في أكسفورد حيث كان فطر البنسيليوم نوتاتام منذ نحو عشر سنوات سابقاً في مرحلةٍ مماثلة في التاريخ. بينما كان العلماء البريطانيون يدرسون مكونات مركب هذا المضاد الحيوي، أعلن الباحثون في وزارة الصحة بميتشيجان في الولايات المتحدة

[١٧] أن سلالة من تيلاكليديم أنتجت مضاداً حيوي جديد أطلقوا عليها اسم "سينيماتين". وبعد إعادة تصنيف السلالة كسيفالوسبوريم سالموسينينيماتم [١٨]، تبين أن السينيماتين كان مركباً من جزيئين، أ وب. ولم ينشر شيء على الإطلاق تقريباً على الجزيء أ، وليس لدينا اليوم معرفة عن علاقته التركيبية بالجزيء ب. وعندما كان هذا العمل يجري في ميتشيجان، أعلن البريطانيون [١٩، ٢٠] أن سلالة بروتزو أنتجت مضادين حيويين، وهما "السيفالوسبورين بي"، والنشط فقط ضد الكائنات الموجبة لصبغة جرام، و"السيفالوسبورين إن"، والذي كان نشطاً ضد كلٍ من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام. ووجد أن "السيفالوسبورين بي" له طبيعة ستيرويدية وليس بيتا-لاكتام على الإطلاق. ومن ناحيةٍ أخرى، وجد أبراهام وزملاؤه (الشكل رقم ١,٨) [٢١] أن "السيفالوسبورين إن" هو بنسيلين حقيقي يحتوي على سلسلة جانبية من ألفا-د-أمينوأديبيل، وكان مماثلاً تماماً للسينيماتين ب [٢٢]. وتمت إعادة تسميته ليكون "البنسيلين ن" وكان بالمقارنة مع البنسيلين ج نشطاً فقط بمقدار ١٪ فقط ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام، ولكن كان له نشاطٌ مساويٌ أو أكبر قليلاً للنشاط ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام. وترجع طبيعة الذوبان في الماء للبنسيلين "ن" ونشاطه المتساوي تقريباً ضد البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام إلى وجود مجموعة الكربوكسيل في السلسلة الجانبية.

الشكل رقم (١,٨). جاي نيوتن وإدوارد إبراهام.

ولم يؤد النجاح الهائل الذي تحقق في المعركة ضد المرض باستخدام البنسيلين ج فقط إلى منح جائزة نوبل لفليمينج، وفلوري، وشاين، ولكن أيضاً لحقلٍ جديد في أبحاث المضادات الحيوية، وصناعة جديدة للمضادات

الحيوية. ومهد البنسيلين الطريق لتطوير مضادات حيوية أخرى كثيرة، ولا يزال الأكثر نشاطاً وواحد من أقل هذه المركبات سمية. واليوم، يستخدم حوالي ١٠٠ مضاد حيوي لمكافحة العدوى في البشر والحيوانات والنباتات.

(١,٣) قدوم السيفالوسبورين The Coming of the Cephalosporins

يعدُّ إنتاج سلالة بروتزو من سلالة أ. كريزوجينزم لمضاد حيوي ثاني، والذي تم في معمل إدوارد إبراهام في جامعة أكسفورد، تطوراً مهماً. فبعد إسهاماته المهمة كجزء من فريق فلوري للبنسيلين، أسس إبراهام مختبراً مستقلاً في جامعة أكسفورد. ووجد إبراهام ونيوتن [٢٣] أن المركب الجديد يرتبط بالبنسيلين ن في أنه يتكون من حلقة بيتا-لاكتام مرتبطة بسلسلة جانبية والتي كانت مطابقة للبنسيلين ن، وهذا هو حمض د-ألفا-أمينوأديبيك. ويختلف عن البنسيلينات، مع ذلك، في احتوائه على حلقة سداسية من داي هيدروسيازين بدلاً من حلقة السيازوليدين الخماسية للبنسيلينات. وأطلق عليه السيفالوسبورين سي. وهكذا، بدأت حقبة السيفالوسبورين.

وسميت نواة السيفالوسبورين سي بحمض ٧-أمينو سيفالوسبورانيك (7-ACA). ويمتص السيفالوسبورين سي الأشعة فوق البنفسجية بقوة، وكان لا يتأثر بالأحماض ولا بإنزيم البنسيلين-بيتا-لاكتاميز، وغير سام، وله نشاط داخل جسم الفئران الحية. وكانت كيفية تأثيره مثل البنسيلين، أي، تثبيط تكوين جدار الخلية البكتيرية. وعلى الرغم من أن كلاً من البنسيلين ن والسيفالوسبورين سي لم ينتجا على نطاقٍ تجاري، فقد أديا إلى معرفة مهمة عن تخليق هذه المركبات وتطوير الكثير من السيفالوسبورينات شبه المخلقة الاصطناعية ذات الفائدة الكبيرة في مجال الطب.

وكانت خاصية عدم تأثير السيفالوسبورين سي بالأحماض جذابة للغاية. وكان العيب الرئيس للجزيء نشاطه الضعيف، كان له فقط ١,٠٪ من نشاط البنسيلين ج ضد البكتيريا العنقودية الحساسة، على الرغم من أن نشاطه ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام كان مساوياً لنشاط البنسيلين ج. ومع ذلك، تم الحصول على مركب شبه مخلق مقاوم لإنزيم البنسيلينيز، والذي كان ١٠٠ مرة أكثر نشاطاً من السيفالوسبورين سي، عن طريق إزالة السلسلة الجانبية من حمض دي-ألفا-أمينوأديبيك واستبدالها بحمض فينيل أسيتيك. وتم الحصول على سيفالوسبورينات أخرى جديدة ذات مدى واسع مضاد للبكتيريا واسع في السنوات التي تلت ذلك، على سبيل المثال، سيفالوتين، وسيفالوريدين وسيفالوغليسين، مما جعل السيفالوسبورينات شبه المخلقة أهم مجموعة من المضادات الحيوية في ذلك الوقت. وكانت مقاومة السيفالوسبورينات لإنزيم البنسيلينيز؛ بسبب حلقة الداي هيدروسيازين حيث (١) أن السلسلة الجانبية لحمض دي-ألفا-أمينوأديبيك لم تمنع مهاجمة البنسيلين ن و(٢) إن إزالة مجموعة الأسيتوكسي من سيفالوسبورين سي لم تقلل من مقاومته لإنزيم البنسيلينيز. وقد منع سيفالوسبورين سي تأثير إنزيم البنسيلينيز على البنسيلين ج في البكتيريا باسيلس سيريوس بصورة تنافسية. وعلى الرغم من أنه لم

يكن له تأثير مماثل على إنزيم بكتيريا ستافيلوكوككس أوريوس، إلا أن بعض مشتقاته أثرت. وكانت الميزة الأخرى في إمكانية إعطاء السيفالوسبورينات لبعض المرضى الذين كان عندهم حساسية للبنسيلين.

من الناحية التخليقية، كانت العلاقة بين البنسيلين ن والسيفالوسبورين سي ذات أهمية كبرى. وكان العمل على المستوى تحت الخلوي، والذي قام به إبراهام وزملاؤه من أكسفورد في السبعينيات، [٢٤] تطوراً مهماً والذي أدى إلى تقدمٍ سريع في هذا المجال. حيث استخدموا المحتوى البروتوبلازمي لخلايا أكريمونيوم كريزوجينوم بعد تحليلها لتحويل الحمض الأميني الفالين المعلم بالنظائر المشعة إلى البنسيلين. وأدى هذا إلى اكتشاف تفاعل تمدد الحلقة في معهد ماساتشوستس للتكنولوجيا في عام ١٩٧٦م [٢٥]، والذي تم تحفيزه بإنزيم "الإكسبانديز" (دي أسيتوكسي سيفالوسبورين سي سينسيز، DAOCS). وقد أعتقد لسنواتٍ عديدة أن البنسيلين ن والسيفالوسبورين سي كانا منتجين مختلفين لأفرع تخليقية مختلفة في أكريمونيوم كريزوجينوم. ومع ذلك، أظهر اكتشاف تفاعل تمدد الحلقة أن السيفالوسبورينات تنتج من البنسيلين. وأكد يوشيدا وآخرون هذا في عام ١٩٧٨م [٢٦]، حيث أثبتوا أن إنزيم تمدد الحلقة حول البنسيلين ن إلى دي أسيتوكسي سيفالوسبورين سي. وفشلت مستخلصات الطفرات التي أنتجت تخميرياً فقط البنسيلين ن وليس السيفالوسبورينات في أن تؤدي هذا التفاعل، في حين قامت الطفرات التي أعترضت مبكراً (سالبة بالنسبة لإنتاج كلٍ من البنسيلين ن والسيفالوسبورينات) بتوسيع الحلقة بالفعل.

ومن السبعينيات إلى الثمانينيات، تراكمت المعرفة المتعلقة بتخمير وإنتاج السيفالوسبورين سي. وعلى قدرٍ كبيرٍ من الأهمية كان (١) التحفيز بواسطة دي-إل-ميثيونين عبر آلية تنظيمية لا علاقة لها بقدرتها على المساهمة بذرة الكبريت في المضاد الحيوي [٢٧]، (٢) استخدام الخلات كمرادفات لمجموعة الأسيتوكسي [٢٨]، (٣) إل-سيستين وإل-فالين [٢٩] كمرادفات لنواة المركب، و(٤) حمض ألفا-إل-أمينوأديبيك كمرادفات للسلسلة الجانبية دي-ألفا-أمينوأديبيل في سيفالوسبورين سي [٣٠]. ووفر بانكو وآخرون [٣١] خطوة مهمة إلى الأمام عندما أوضحوا أن نشاط الإنزيم من خلايا أكريمونيوم كريزوجينوم كون المرادف ثلاثي الببتيد المهم لكل البنسيلينات والسيفالوسبورينات، وهو جاما-إل-ألفا-أمينوأديبيل-إل-سيستينيل-دي-فالين (LLD-ACV). وقد ثبت أن الإنزيم المخلق لـ ACV هو إنزيم وحيد متعدد الوظائف يعمل على حمض إل-ألفا-أمينوأديبيك، وإل-سيستين وإل-فالين لينتج LLD-ACV. وكان أيضاً عزل هولاندر وآخرون [٣٢] للإنزيم النقي المخلق للأيزوبنسيلين ن ("سيكليز")، والذي يحول LLD-ACV إلى أيزوبنسيلين ن مهماً.

وانهارت فكرة أن البيتا-لاكتامات تنتج فقط بواسطة الفطريات بعد تقرير من شركة ميرك أن أحد الإستربتوميسيتات أنتج البنسيلين ن [٣٣]. وقدمت هذه النتيجة المثيرة في الاجتماع السنوي للجمعية الاميركية للميكروبيولوجي عام ١٩٦٢م، ونشرت فقط كملصق علمي. وعلى الرغم من أن كثيراً من الشك ألقي بظلاله على

هذا التقرير، نشرت شركة ايلي ليلي، وشركة ميرك تقريرين نحو ٩ إلى ١٠ سنوات لاحقاً [٣٤، ٣٥] أفادا أن الأنواع المختلفة من الإستربتوميسيتات والنوكارديا أنتجت السيفالوسبورينات المعدلة عند ذرة الكربون رقم ٧ (السيفاميسين)، وكذلك مع/ أو على السلسلة الجانبية المرتبطة بذرة الكربون رقم ٣. وأدى اكتشاف السيفاميسين سي إلى الكثير من البحث والتطوير في مجال السيفالوسبورينات المنتجة من الكائنات بدائية النواة، حيث جعل وجود مجموعة الميثوكسي على حلقة البيتا-لاكتام المركب أكثر نشاطاً ضد البكتيريا المرضة السالبة لصبغة جرام واللا هوائية وأكثر مقاومة لإنزيمات البيتا-لاكتاميز من الكائنات السالبة لصبغة جرام. وأتيحت مركبات للمرة الأولى في تاريخ البيتا-لاكتامات، والتي أظهرت درجة عالية من الثبات تجاه هذه الإنزيمات المزعجة نوعاً ما. ومثل السيفالوسبورينات سي الفطرية، لم يستخدم السيفاميسين سي أبداً سريرياً، ولكن استخدم للتركيب شبه التخليقي للعديد من المركبات المفيدة طبياً. وتم تسويق السيفامسين آخر شبه تخليقي أكثر قوة، السيفوكسيتين، بصورة أسرع بواسطة شركة ميرك، والذي أتبعه في وقتٍ لاحق السيفميتازول، والتيموسيلين، والسيفوتيتان والسيفالوسبورينات شبه التخليقية الأخرى.

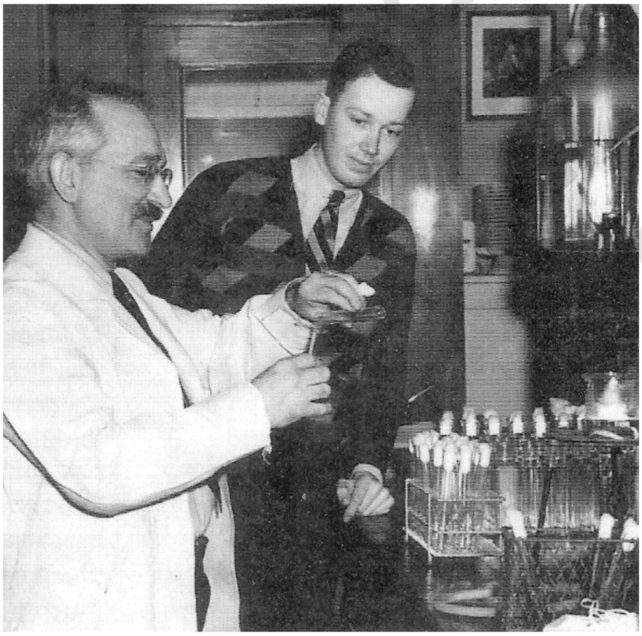
ومن السبعينيات إلى الثمانينيات، تطورت المسارات إلى البنسيلينات والسيفالوسبورينات، بما فيها السيفاميسين سي، وخاصةً بعد إتاحة الأنظمة الخالية من الخلايا [٢٤، ٣٦]. وفي أواخر السبعينيات، ظهرت تقارير عن إنتاج المضادات الحيوية البيتا-لاكتام، والتي لم تكن بنسيلينات ولا سيفالوسبورينات. وكان الأهم هو حمض الكلافيولانيك من الإستربتوميسيتات، والذي امتلك نشاطاً ضعيفاً كمضاد حيوي، ولكنه كان مثبطاً ممتازاً للبيتا-لاكتاميز (انظر القسم ١,٨,١). وأصبح مركباً مطلوباً لكونه يوصف مجتمعاً مع البنسيلينات شبه التخليقية واسعة المدى، والتي تتأثر بالبيتا-لاكتاميز، على سبيل المثال، مع الأموكسيسيلين، وعرفت هذه التركيبة بالأوجمنتين.

وكان اكتشاف شركة ميرك للكاربابينيمات تطوراً آخر مهماً في تاريخ المضادات الحيوية البيتا-لاكتام. تم اكتشاف الأول، الثيناميسين، بواسطة كاهان وآخرون [٣٧] باستخدام نظام فحص على أساس تثبيط تخليق الببتيدوجليكان. وتم إنتاج المضاد الحيوي من الإستربتوميسس كاتليا، والذى ينتج أيضاً السيفاميسين سي. وتشبه الكاربابينيمات البنسيلينات في وجود حلقة بيتا-لاكتام متحدة بحلقة خماسية. وتختلف في أن الحلقة الخماسية كانت غير مشبعة وتحتوي على ذرة كربون بدلاً من الكبريت. وكان الكبريت، على الرغم من ذلك، موجوداً في موقع آخر في جميع الكاربابينيمات المنتجة بواسطة الإستربتوميسيتات. وذكر عدد كبير من الكاربابينيمات، ولكن كان الثيناميسين الأكثر أهمية. وفي الواقع، كان المركب المضاد للبكتيريا الأكثر قوة، والأوسع طيفاً، وغير السام الذي وجد على الإطلاق. وهو يثبط تركيب الجدار الخلوي، كما تفعل البنسيلينات والسيفالوسبورينات، وكان مقاوماً نسبياً لإنزيمات للبيتا-لاكتاميز الميكروبية.

ومهد تطوير تقنية العملية التجارية لنواة البنسيلين (6-APA) ونواة السيفالوسبورين (7-ACA) الطريق للأسيلة الكيميائية بالكثير من السلاسل الجانبية، منتجاً الكثير من البنسيلينات والسيفالوسبورينات شبه التخليقية المطورة ذات مدى أوسع ضد البكتيريا وخواص دوائية أفضل. وأصبحت البنسيلينات والسيفالوسبورينات واسعة المدى أفضل المضادات البكتيرية مبيعاً في الساحة الدوائية.

(١,٤) حقبة واكسمان The Waksman Era

زامن مجيء البنسيلين، والذي ألمح إلى بداية عصر المضادات الحيوية، في الأربعينيات اكتشافات سيلمان واكسمان (الشكل رقم ١,٩)، وهو خبير في ميكروبيولوجي الأراضي في جامعة روتجرز. ونجح وطلابه، وخصوصاً بويد وودروف، وألبرت شاتس، وهوبير ليشيفالير، في اكتشاف الكثير من المضادات الحيوية الجديدة من البكتيريا الخيطية، الأكتينوميسيتات، مثل الأكتينوميسين دي، النيوميسين، والأكثر شهرة منها "الدواء المعجزة" الستربتوميسين. وحدثت هذه الاكتشافات لقدرة الأكتينوميسيتات على إنتاج المضادات الحيوية قبل التطورات المذكورة قبلاً عن إنتاج البكتيريا الخيطية للبيتا-لاكتامات. ونشر واكسمان و وودروف عام ١٩٤٠م عن اكتشافات الأكتينوميسينات، والتي كانت كروموأوليجوببتيدات [٣٨]. وتم استخدام مركب واحد من هذا القبيل، الأكتينوميسين دي، لسنواتٍ لمكافحة ورم ويلمس في الأطفال، وأصبح أداة مهمة جداً في تطوير البيولوجيا الجزيئية كمثبط لإنزيم بلمرة الحمض النووي الريبوزي.



الشكل رقم (١,٩). سيلمان واكسمان و بويد وودروف.

تم استخدم الستربتوميسين، بعد اكتشافه التاريخي في عام ١٩٤٤م من قبل واكسمان، وشاتس، وبوجي [٣٩] بوصفه منتجاً من الإستربتوميسس جريسيوس، ضد السل الناتج من ميكوباكتريم توبركلوزيس وأيضاً ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام؛ وعولج أيضاً التهاب السحايا البكتيري بالإستربتوميسين. واعترف بتأثيره الكبير على الطب بمنح جائزة نوبل لواكسمان عام ١٩٥٢م. ومهد هذا الأمينوجليكوزيد، كأول مضاد حيوي تجاري ناجح ينتج من أكتينوميسيت، الطريق إلى الاعتراف بهذه الكائنات كأكثر منتجي المضادات الحيوية وفرة. وقدم الستربتوميسين أيضاً أداة قيمة لدراسة وظيفة الخلية. وبعد فترة من الوقت، والذي كان يظن خلالها أنه يعمل عن طريق تغيير النفاذية، تم الاعتراف بأن تداخله في تخليق البروتين هو تأثيره الأساسي. وقدم تفاعله مع الريبوسومات الكثير من المعلومات عن بنيتها ووظيفتها، فهو لم يثبط عملها فقط ولكنه سبب أيضاً القراءة الخاطئة للشفرة الوراثية، وكان مطلوباً لوظيفة الريبوسومات في السلالات المطفرة المعتمدة على الستربتوميسين.

ونشر واكسمان مع ليشيفالبير عن اكتشاف النيوميسين في عام ١٩٤٨م [٤٠]، والكانديسيدين في عام ١٩٥٣م [٤١]. واستخدم النيوميسين، وهو أمينوجليكوزيد ينتج بواسطة إستربتوميسس فريدي، بوصفه مضاداً حيوياً موضعياً للبكتيريا، والكانديسيدين عديد الروابط الثنائية، المنتج بواسطة إستربتوميسس غريسيوس، كمضاد حيوي موضعي للفطريات.

وأدى التعاون في تطوير العمليات الصناعية بين جامعة روتجرز، وجامعة برنستون، وجامعة كولومبيا، وشركة ميرك إلى ولادة مجال الهندسة الحيوية. وتمكن واكسمان، عن طريق حقوق ملكية الستربتوميسين المدفوعة إلى جامعة روتجرز من قبل شركة ميرك المصنعة، من بناء المعهد العالمي الشهير للميكروبيولوجي.

وأثرت اكتشافات الأمينوجليكوزيدات في روتجرز في عصر المضادات الحيوية، وأسفرت عن اكتشاف الكثير من "العقاقير المعجزة" مثل الكلورامفينيكول في عام ١٩٤٧م [٤٢]، والتتراسيكلينات في عام ١٩٤٨م [٤٣]، والماكروليدات مثل الاريثروميسين في عام ١٩٥٢م [٤٤]، والجليكوببتيدات مثل الفانكوميسين في عام ١٩٥٦م [٤٥]، والأمينوجليكوزيدات الإضافية مثل الجنتاميسين في عام ١٩٦٣م [٤٦]، البيتا-لاكتامات مثل السيفاميسينات في عام ١٩٧٠م [٣٤ ، ٣٥]، والكاربابينيمات في عام ١٩٧٩م [٣٧]، الأنزاميسينات مثل الريفاميسن في عام ١٩٥٧م [٤٧]، والماكروليدات عديد الروابط الثنائية مثل النيستاتين في عام ١٩٥٠م [٤٨]. وقد تم اكتشاف حوالي ١٥٠٠٠ منتجٍ للأيض الثانوي الميكروبية، ومنها حوالي ١٢٠٠٠ من المضادات الحيوية. وشمل تركيبها الكيميائي غير العادي حلقات البتا-لاكتام، والببتيدات الحلقية المحتوية على أحماض أمينية "غير طبيعية" وغير بروتينية، وسكريات ونيكليوزيدات غير عادية، وعديدة الروابط الثنائية، والماكرولايدات كبيرة الحلقات. وعلى الرغم من أن معظمها كان عديم الفائدة بالنسبة للبشر، كونها إما سامة جداً وإما غير نشط في

الكائنات الأرقى، فقد أنقذ غيرها الحياة. كانت المضادات الحيوية عملياً العقاقير الوحيدة المستخدمة في العلاج الكيميائي ضد الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض وكانت حاسمة في زيادة متوسط العمر المتوقع في الولايات المتحدة من ٤٧ سنة في عام ١٩٠٠م إلى ٧٤ سنة للرجال و٨٠ سنة للنساء في عام ٢٠٠٠م.

ولسببٍ ما، كانت الأكتينوميسيتات مثمرة بصورةٍ مذهلة في عدد المضادات الحيوية التي يمكن أن تنتجها. وتم الحصول تقريباً على حوالي ٧٠٪ من جميع المضادات الحيوية من هذه الكائنات الخيطية بدائية النواة، و٧٥٪ من هذه بدورها أنتجت من جنس واحدة، الإستربتوميسيس. ومن المدهش جداً أن سلالات من الإستربتوميسيس هيجروسكوبيكوس أنتجت أكثر من ١٨٠ من منتجات الأيض الثانوي المختلفة. وتنتج البكتيريا وحيدة الخلية نحو ١٠٪ من المضادات الحيوية، وتنتج الفطريات حوالي ٢٠٪ [٤٩]. وتم اكتشاف منتجات بيولوجية نشطة جديدة من الميكروبات بوتيرة مذهلة: من ٢٠٠-٣٠٠ في العام في أواخر السبعينيات، وزادت إلى ٥٠٠ سنوياً في التسعينيات. وصاحبت المضادات الميكروبية المخلقة مثل الكينولونات والفلوروكينولونات المضادات الحيوية المنتجة طبيعياً في الساحة الدوائية. وحتى هذه المواد التخليقية يرجع اكتشافها إلى منتج طبيعي، وهو الكينين. وقد تم نمذجة الكينولون الأول، حمض الناليديكسيك، على غرار الكينين. ومع ذلك، تباطأ الاستخدام التجاري للمضادات الحيوية في الثمانينيات، وتم التسويق التجاري لثلاثة فقط، الدابتوميسين، خلات الكاسبوفنجين، والأوكسازوليدينون المخلق، في العقود التي تلت ذلك.

(١ , ٥) تحسين السلالة Strain Improvement

لقد أدت الخبرات المذكورة سابقاً، والتي تم فيها تطفير وفرز السلالات المنتجة للبنسيلين لتحسين الإنتاج، إلى الاستخدام الواسع النطاق لعلم الوراثة لتحسين قدرة الإنتاج [٥٠]. فمنذ بداية الخمسينيات، استعيض عن المعالجة الجينية مثل التطفير/ الفرز بالتطفير/ الاختيار/ الفرز، والتي استخدمت فيها طرق إنتقاء مختلفة لتقليل عدد السلالات التي يجب فرزها لتحسين الإنتاج. ووجد بعد ذلك أن مشتقات جديدة، وبعضها أفضل من الجزيء الأم أو الأصلي، يمكن إنتاجها بواسطة السلالات المطفرة. وكان أول من اكتشف هذا كيلنر في عام ١٩٤٩م [٥١]، ولكن لم يتم عزل وتعريف المشتقات الأكثر نشاطاً. ومع ذلك، فقد اكتشفت نواتج الأيض دي ميثيل تيتراسيكلين [٥٢] والدوكسوروبيسين [٥٣] المفيدة طبياً لاحقاً عن طريق تطفير السلالات المنتجة للتراسيكلين والداونوميسين، على التوالي. وفي عام ١٩٦٩م، تم ابتكار تقنية "التخليق التطفيري الحيوي" بواسطة أساتذة جامعة إلينوي كينيث رينيهارت وديفيد غوتليب والطالب و.ت. شير [٥٤]. في هذه العملية، تم تغذية سلالة مطفرة بعد اعتراض الأيض الثانوي لها، على نظائر الشاردة والتي تم اعتراض تخليقها. وفي حال النجاح، تنتج

السلالة الطفرة (تسمى إيديوتروف) ناتج أيض ثانوي جديد. وقد استخدم التخليق التطفيري الحيوي لاكتشاف الكثير من نواتج الأيض الثانوي الجديدة. وكان الأكثر شهرة طارد الديدان التجاري الدورامكتين، واستخدم في إنتاجه السلالة المطفرة ستربتوميسيس أفيرميتيليس المنتجة للأفيرميكتين [٥٥] (انظر القسم ٥ ,٨ ,١).

ولتحسين السلالة، تم عملياً تجاهل التعديل الوراثي في الصناعة قبل عام ١٩٧٥م، وذلك يرجع أساساً إلى انخفاض معدل التعديل، منخفض مثل $١٠^{-٦}$. ومع ذلك، فقد غير استخدام اندماج محتوى الخلية البروتوبلازمي في الأكتينوميسيتات بوساطة البولي إيثيلين جليكول عن طريق أوكانيشي وآخرون [٥٦] الموقف بشكلٍ ملحوظ. فقد سرع عمل أوكانيشي في تكوين واندماج وتجديد محتوى الخلية البروتوبلازمي من استخدام التعديل الوراثي. ومنذ ذلك الحين، كان هناك اهتمام متزايد في تطبيق التعديل الوراثي في إنتاج المنتجات الميكروبية المهمة. وزادت معدلات التعديل إلى أكبر من $١٠^{-١}$ في بعض الحالات. وبعد عام ١٩٨٥م، اشتمل الكثير من برامج تحسين السلالة بشكل روتيني على (١) التطفير التحويلي، (٢) الحذف الاستهدافي والتضعيف عن طريق الهندسة الوراثية، و(٣) التعديل الوراثي باندماج محتوى الخلية البروتوبلازمي والتحول البلازميدي. وعرف الكثير عن علم الوراثة والتنظيم في الإكتينوميسيتات؛ بسبب البحوث الجيدة على ستريبتوميسيس كوليكولور بواسطة ديفيد هوبوود، وكيث شاتر، وميرفين بيب، وزملائهم في معهد جون إينيس في نورفيتش، إنجلترا (الذي يشار إليه أحياناً بمعبد "وراثة الإستربتوميسيتات") [٥٧]. وأنتج كائنهم المفضل ما لا يقل عن خمسة نواتج للأيض الثانوي (جزيء شبيه بالعامل أ، والمضادات الحيوية أكتينورودينات، أنديسيل بروديجيوسين، ميثيل نيوميسين أ، والمضاد الحيوي المعتمد على "الكالسيوم" أو CDA).

وكشفت هذه الجهود وغيرها بواسطة علماء الوراثة في الأوساط الأكاديمية والصناعة فـي جميع أنحاء العالم في السبعينيات والثمانينيات أن الجينات التي تشفر معظم مسارات التخليق للمضادات الحيوية تتجمع في أوبيرونات، مما يسهل نقل المسارات كلها من كائن إلى آخر. وقد وجد أيضاً أن هذه التجمعات تشمل جينات تنظيمية ومقاومة. وتمت ولادة علم "التخليق الحيوي الاندماجي" في عام ١٩٨٥م [٥٨]. وأسفرت الجهود الدولية من المملكة المتحدة، واليابان، والولايات المتحدة عن استنساخ مسار من أحد الإستربتوميسيتات الذي ينتج المضاد الحيوي الأيزو كرومانكينوني أكتينورودين في سلالات تنتج الجراناتيسين، والداي هيدرو جراناتيسين، والميديروميسين (والتي هي أيضاً أيزوكرومانكينونات). وأسفر ذلك عن اكتشاف مضادين حيويين هجينين جديدين، الميديررودين أ و الداي هيدروجراناتيرودين. وأصبح التخليق الحيوي الاندماجي تقنية تستخدم على نطاقٍ واسع لاكتشاف أدوية جديدة هجينة [٥٩] عن طريق تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل (rDNA). وخلقت أيضاً مضادات حيوية جديدة من خلال تغيير ترتيب الجينات لمسار مفرد في العائل الأصلي.

Obeikandl.com

وقد شمل التقدم في تحسين السلالة مؤخراً الاستخدام الواسع لتقنيات وراثية جديدة مثل (١) الهندسة الأيضية، مما أدى إلى التحديد الكمي والتحكم في تدفق الأيض، ومتضمنةً الهندسة الأيضية العكسية وتحليلات التعبير النسخي، مثل التحليل الارتباطي والتسلسل التوقيعي المتماثل الضخم؛ (٢) التطور الموجه (انظر القسم ١١,١)، (٣) التكاثر الجزيئي بما في ذلك خلط الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي وخلط الخريطة الوراثية الكاملة (الجينوم)، و(٤) التخليق الحيوي الاندماجي. وتسهل هذه الجهود ليس فقط عزل سلالات محسنة، ولكن أيضاً توضيح وتحديد أهداف وراثية جديدة لاستخدامها في اكتشاف المنتج.

(١,٦) المضادات الحيوية شبه المخلقة لمكافحة الميكروبات المقاومة

Semi-Synthetic Antibiotics to Combat Resistante Microbes

على الرغم من وجود شعور عبر عنه كثيرون في أواخر السبعينيات بأن عصر اكتشاف منتجات للأمراض البكتيرية ينتهي، فقد استمرت المعركة ضد الميكروبات المقاومة وظهرت بعض التطورات المثيرة للدهشة. وشملت هذه: (١) التغييرات شبه التخليقية للمضادات الحيوية القديمة (الكيتوليدات، والكلاريثروميسين، والأزيثروميسين، والجليسيل جليسينات)؛ (٢) المضادات الحيوية القديمة غير المستغلة (تيكوبلانين)، (٣) مشتقات جديدة للمضادات الحيوية السابقة محدودة المدى (ستربتوجرامينات)؛ و(٤) عدد قليل من العوامل الحديثة المضادة للميكروبات (كاسبوفونجين، ودابتوميسين، والإيبوثيلونات التخليقية).

وكان تطوير الإريثروميسينات شبه المخلقة نجاحاً كبيراً [٦٠]. وشملت هذه الكلاريثروميسين، والروكسيثروميسين، والأزيثروميسين، والكيتوليد تيليثروميسين. وفي حين أظهر الأولان تحسناً في مقاومة الأحماض والتوفر الحيوي عن الاريثروميسين أ، فلم يظهرا أي تحسن ضد السلالات المقاومة. ومن ناحيةٍ أخرى، عمل الأزيثروميسين والتيليثروميسين ضد البكتيريا المقاومة للماكروليدات. وكانت كل هذه الإريثروميسينات شبه المخلقة فعالة ضد التهابات الجهاز التنفسي العلوي، ويمكن أن تعطى حقناً أو عن طريق الفم. وكان التيليثروميسين مثبطاً للبكتيريا، يعطى عن طريق الفم، وبالدرجة الأهم للالتهابات التنفسية المكتسبة في المجتمع. وكانت قدرته المنخفضة للطفرات المقاومة وكذلك لحث المقاومة المنتقلة على درجة خاصة من الأهمية. كما أنه لم يحفز مقاومة الـ MLS_B، والتي هي مشكلة في الماكروليدات الأخرى.

لأكثر من ٣٥ سنة، كان الجليكوببتيدان الفانكوميسين والتيكوبلانين تقريباً المضادان الحيويان الطبيعيان الوحيدان الفعالان ضد البكتيريا الموجبة لصبغة جرام المقاومة للأدوية المتعددة. وقد تم تقليل استخدامهما؛ بسبب زيادة المقاومة للأدوية المتعددة. وأنقذ الموقف ظهور عدد من المضادات الحيوية شبه المخلقة، ومنها السينيرسيد. وتكون السينيرسيد من زوج تعاوني (بمائة ضعف) من الستربتوجرامينات ضيق المدى، وهما الكينوبرستين

والدالفوبرستين، وكلاهما يتم تصنيعه شبه تخليقياً من المركبات الطبيعية المنتجة من سلالة واحدة من إستربتوميسيس برستينسبيراليس [٦١]. ويتكون الزوج من (مجموعة أ) عديد ماكرولاكتون غير مشبع يحتوي على حلقة أوكسازول غير عادية وجزء داي إينيل أميد، و(مجموعة ب) هيكسا ديبسي ببتيد حلقية تحتوي على جزء ٣-هيدروكسي بيكولينويل خارج الحلقة. وعلى الرغم من أن الستربتوجرامينات الطبيعية كانت سيئة الذوبان في الماء ولا يمكن أن تستخدم عن طريق الوريد، إلا أن مكونات السينيرسيد كانت قابلية للذوبان في الماء. وقد منعا تخليق البروتين، وكانا نشطين ضد الإنتيروكوكس فاشيم المقاومة للفانكوميسين (VREF)، والستافيلوكوكسس أوريوس المقاومة للميثيسلين (MRSA)، والستافيلوكوكسس أوريوس المقاومة للجليكوببتيد، والستافيلوكوكسس نيمونيا المقاومة للبيتا-لاكتام. ويرجع الفعل التعاوني للستربتوجرامينات إلى حقيقة أن الجزء ب منع ارتباط مركبات أمينو أسيل الحمض النووي الريبوزي الناقل بالريبوسوم، في حين أن الجزء أ منع تكوين الرابطة الببتيدية وشوه الريبوزوم، محفزاً ارتباط الجزء ب. وقد أجيز السينيرسيد من قبل هيئة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) في عام ١٩٩٩م.

وقد تم تطوير تتراسيكلين شبه مخلق، وهو الجليسيل جليسين بنجاح، لاستخدامه ضد البكتيريا المقاومة للتتراسيكلين [٦٢]. وكان ٩-رباعي البيوتيل جليسيل أميدو المشتق من المينوسيكلين، والذي يدعى التيجيسيكلين، نشطاً ضد البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام المقاومة، والبكتيريا اللاهوائية التي تمتلك آلية مقاومة حماية الريبوسوم أو آلية نشطة للتخلص من المضادات الحيوية.

(١,٧) منتجات الأيض الابتدائية The Primary Metabolites

حدد تطوير تخمير البنسيلين في الأربعينيات البداية الحقيقية لما يمكن أن يطلق عليه العصر الذهبي لعلم الميكروبيولوجيا الصناعية. وأشارت أعمال لويس باستور إلى أهمية نشاط الميكروبات غير الممرضة في النبيذ والبيرة لإنتاج الكحول. وأنتج هذا الإدراك عدد كبير من منتجات الأيض الابتدائي الميكروبي ذات الأهمية التجارية والتي تم إنتاجها بواسطة التخمير. يتضمن الأيض الابتدائي سلسلة مترابطة من التفاعلات الهدمية، والهدمية البنائية، والبنائية التي تتم بواسطة الإنزيمات، والتي توفر المركبات الوسيطة المخلقة حيوياً والطاقة، وتحول المرادفتن المخلقة حيوياً إلى جزيئات كبيرة أساسية، مثل الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي، والحمض النووي الريبوزي، والبروتينات، والدهون. وتتسم بالتوازن الدقيق ونادراً ما تتراكم المنتجات الوسيطة. وعن طريق الإخلال بتنظيم الأيض الابتدائي، تحققت زيادة إنتاجية مفرطة في الكثير منتجات الأيض الابتدائي في صناعة التخمير. تجارياً، كانت الأحماض الأمينية، والفيتامينات، ونيوكليوتيدات النكهة، والأحماض العضوية والكحولات أهم منتجات الأيض الابتدائي.

obeikandi.com

(١,٧,١) الأحماض الأمينية Amino Acids

بلغ إنتاج الأحماض الأمينية ٢,٣ مليون طن في عام ٢٠٠٢م. وكانت أكثر الأحماض أهمية والمصنعة على الأقل جزئياً عن طريق وسائل حيوية هي الجلوتامات (١,٦ مليون طن سنوياً)، حمض الليسين-هيدروكلوريك (٧٠٠٠٠٠ طن)، والثريونين (٧٠٠٠٠ طن)، والفينيل ألانين (١٣٠٠٠ طن، بما في ذلك عن طريق التخليق الكيميائي)، وحمض الأسبارتيك (١٠٠٠٠ طن مصنعة إنزيمياً)، والتربتوفان (٣٠٠٠ طن، بما في ذلك المصنعة إنزيمياً). وقد تحققت معدلات عالية بواسطة التخمير (على سبيل المثال، ١٧٠ جم/لتر حمض إل-ليسين-هيدروكلوريك).

تستخدم الجلوتامات أحادية الصوديوم (MSG) كمحسن قوي للنكهة. وقد اكتشف كينوشيتا، وأوداكا، وشيمونو في شركة كيوا هاكو كوجيو تخمير حمض الجلوتاميك في اليابان في عام ١٩٥٧م [٦٣]. ومن المثير للاهتمام أن مؤسس الشركة (الدكتور بنزابورو كاتو)، والذي كان مهتماً بالنظام الغذائي لسكان اليابان وحاول تقليل الاعتماد على الأرز، كلف كينوشيتا بمهمة إنتاج بروتينات قابلة للأكل عن طريق التخمير. وبدلاً من ذلك، جاء الباحثون بعملية تخمير تنتج حمض أميني خارج الخلية من مواد غير بروتينية. وكان هذا الاكتشاف الرئيس حاسماً بالنسبة لتطوير صناعة تخمير الأحماض الأمينية. وقد تم تصنيع الجلوتامات أحادية الصوديوم باستخدام أجناس عديدة من الكورينيباكتريوم والبريفيباكتريوم.

عادة، لا يتوقع حدوث زيادة إنتاجية مفرطة من حمض الجلوتاميك؛ بسبب التنظيم الرجعي. وتشمل ضوابط الجلوتامات الرجعية كبح إنزيمات الـ PEP-كربوكسيليز، السترات سينسيز، والـ NADP-غلوتامات ديهيردوجينيز، ويتم تثبيط الإنزيم الأخير أيضاً بالجلوتامات. ومع ذلك، فعن طريق خفض فعالية حاجز المرور إلى خارج الخلايا، تم ضخ الجلوتامات خارج الخلية، ومن ثمَّ السماح باستمرار تكوينها دون انقطاع. ويحرر إفراز الجلوتامات مسار التكوين من التنظيم الرجعي حتى تتراكم المستويات المفرطة.

وقد تم التأثير عمداً على إفراز الجلوتامات عن طريق معالجات مختلفة، مثل الحد من البيوتين في الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم، وكانت كل السلالات المنتجة للجلوتامات بإفراط غير قادرة على إنتاج البيوتين. والبيوتين هو عامل مساعد لإنزيم أسيتيل-العامل المساعد أ كربوكسيليز وهو ضروري لتخليق الأحماض الدهنية. وقاد التقرير المفاجئ [٦٤] بأن إضافة البنسيلين إلى الخلايا المزروعة في تركيز عالٍ من البيوتين أدى إلى إفراز حمض الجلوتاميك شيو وزملاؤه [٦٥] لإفتراض (١) أن نمو البكتيريا المنتجة للجلوتامات بإفراط في وجود مستويات غير محدودة من البيوتين ينتج عنه حاجز نفاذية بغشاء الخلية يمنع نقل الحمض الأميني خارج الخلية، و(٢) أن تثبيط البنسيلين لتكوين جدار الخلية يغير خصائص نفاذية غشاء الخلية ويسمح للجلوتامات بالمرور خارج الخلية.

وقد تم اكتشاف القواسم المشتركة في مختلف المعالجات التي تنتج مستويات عالية من حمض إل-جلوتاميك ، وهي (١) الحد من البيوتين، (٢) إضافة البنسيلين، أو (٣) الأحماض الدهنية المقللة للتوتر السطحي (مثل توين-٦٠) إلى الخلايا في مرحلة النمو الإطرادي، وتم تدعيم آلية النفاذية بقوة [٦٦]. وعلى ما يبدو، أدت كل هذه المعالجات إلى غشاء سيتوبلازمي يفتقر إلى الدهون الفوسفاتية، والتي تحفز الخروج النشط للجلوتامات من الخلية. وقد تم تأييد هذا الرأي أيضاً باكتشاف أن الحد من الأوليئات في سلالة غير قادرة على إنتاج الأوليئات [٦٧]، والحد من الجلسرين في سلالة غير قادرة على إنتاج الجلسرين [٦٨] أسفرا عن إفراز الجلوتامات. وكان كل من الجلسرين والأوليئات مرادفات للدهون الفوسفاتية. ووجد لاحقاً أن الخلايا المنتجة للجلوتامات لديها انخفاض كبير في نسبة الدهون في الخلايا، وخاصة الدهون الفوسفاتية [٦٩]. وهكذا أصبح واضحاً أن إفراز مستويات عالية من الجلوتامات يتطلب (١) تثبيط النمو في وجود مصادر غير محدودة من الكربون والطاقة و(٢) التغير في جهد الغشاء نتيجة نقص البيوتين، أو الأوليئات أو الجلسرين، أو إضافة لعوامل معينة.

على الرغم من الأدلة المذكورة أعلاه، فقد تم نقض فرضية غشاء البلازما الراشح بواسطة بعض العلماء لصالح نظام محدد لإفراز الجلوتامات يتم تنظيمه بحالة الطاقة في الخلية. ويعزى عمل البيوتين إلى التأثير على عملية الأيض الوسيط، المرتبطة بنشاط الإنزيمات المخلقة للأحماض الدهنية. وأرجعت آراء إضافية ناقضة لفرضية النفاذية الإنتاج المفرط للجلوتامات إلى انخفاض نشاط إنزيم ألفا-كيتوغلوتارات ديهيدروجينيز نتيجة الحد من البيوتين أو عن طريق إضافة البنسيلين أو مواد التوتر السطحي. وفي عام ٢٠٠١م، تم تأييد فرضية تغيير النفاذية. وأظهرت المعالجات المختلفة المؤدية إلى الإنتاج المفرط للجلوتامات أنها تسبب زيادة نفاذية طبقة حمض الميكوليك في جدار الخلية [٧٠]. وتتميز البكتيريا المنتجة للجلوتامات بإفراط بغلاف خلوي خاص يحتوي على أحماض الميكوليك والذي يحيط بالخلية بأكملها كطبقة تركيبية، ويعتقد أنها تشارك في نفاذية المواد المذابة. وشكلت أحماض الميكوليك المؤسترة بالأرابينوجالاكتان ومشتقات حمض الميكوليك المرتبطة لا تساهمياً طبقة دهنية ثانية، وشكل الغشاء السيتوبلازمي الطبقة الأولى. وكما ذكر هؤلاء المؤلفون، تأخذ الآن "مفاهيم نفاذية جدار الخلية " كما استعملت في الأبحاث الأولى لإنتاج إل-جلوتامات لأكثر من أربعين عاماً مضت، معنى جديداً. وقدم نامبوثيري [٧١] الأدلة على أن التعبير المفرط أو عدم نشاط الجينات المشاركة في تخليق الدهون قد غير آلية إفراز الجلوتامات بشكلٍ كبير، وغير الخصائص الكيميائية والفيزيائية للغشاء السيتوبلازمي، وأن هذا كان ضرورياً لإفراز إل-جلوتامات. وقد أشاروا إلى "إن تغيير محتوى الدهون الفوسفاتية وحده يكفي لفعيل آلية إفراز إل-جلوتامات". وذكر أيضاً بوركوفيسي وكريمر [٧٢] أنه "ليس هناك شك في أن تحفيز إفراز الجلوتامات في الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم يرتبط بصورة مباشرة أو غير مباشرة بالغشاء و/ أو كمال جدار الخلية".

حيث إن الجزء الأكبر من الحبوب المستهلكة في العالم يفتقر إلى إل-ليسين، أصبح هذا الحمض الأميني الأساسي منتجاً صناعياً مهماً. ويتم التحكم في مسار تخليق الليسين بشدة في كائن مثل بكتيريا إيشيريشيا القولون، ويتضمن هذا المسار ثلاثة إنزيمات أسبارتات كينيز، ويتم تنظيم كلٍ منها بمنتج نهائي مختلف (الليسين، الثريونين، والميثيونين). بالإضافة إلى ذلك، بعد كل نقطة تفرع في المسار، يتم تثبيط الإنزيمات الأولية بالمنتج النهائي لكلٍ منها. ومع ذلك، في الكائنات المخمرة لليسين (على سبيل المثال، طفرات الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم وأنسابها)، يوجد أسبارتات كينيز واحد فقط، والذي تم تنظيمه من خلال التثبيط الرجعي المنسق بالثريونين والليسين. وبالإزالة الجينية لإنزيم هوموسيرين ديهيدروجينيز، تم تحويل سلالة برية من الكورينيباكتريوم المنتجة للجلوتامات إلى طفرة منتجة لليسين بإفراط، والتي لا يمكن أن تنمو إلا إذا تم إضافة الميثيونين والثريونين إلى البيئة الغذائية [٧٣].

وتم تشييد سلالات من إيشيريشيا القولون ببلازميدات تحمل أوبيرونات لتخليق الأحماض الأمينية. وقد تم أيضاً إنجاز التحول البلازميدي في الكورينيباكتريوم، والبريفيباكتريوم، والسيراتشيا بحيث أمكن استخدام تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل لتحسين هذه السلالات المنتجة للأحماض الأمينية التجارية [٧٤]. وكان مفهوم الهندسة الأيضية مفيداً بشكلٍ خاصٍ، أي التحسين المباشر لتكوين المنتج أو خصائص الخلية من خلال تعديل تفاعلات كيميائية حيوية معينة أو إدخال أخرى جديدة باستخدام تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل [٧٥، ٧٦]. وكان جوهرها هو دمج الأساليب التحليلية لقياس التدفقات والسيطرة على التدفقات بواسطة تقنيات حيوية جزيئية لتنفيذ التعديلات الوراثية المقترحة. وكشف تحليل التحكم الأيضي أن التدفق الشامل من خلال مسار أيضي يعتمد على عدة خطوات، وليس فقط تفاعل واحد محدد للمعدل [٧٧]. وأظهرت نتائج التدفق الأيضي لسلالة أصلية من الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم وأربع طفرات محسنة منتجة لليسين زيادة الإنتاجية في سلسلة من ٢ , ١ – ٩ , ٢٤٪ بالنسبة لتدفق الجلوكوز [٧٨]. وتبين أن (١) مسار فوسفات البنتوز قد زاد، (٢) تدفق المسار الوسطي الكلي زاد ضعفين تقريباً عن طريق التنظيم المنسق لإضافة الكربوكسيل على المركبات ثلاثية الكربون ونزع الكربوكسيل من المركبات رباعية الكربون، (٣) التدفق النسبي لإنزيم أيزوسترات ديهيدروجينيز انخفض من ٨٣ إلى ٦٠٪، و(٤) زاد المطلوب من فوسفات نيكوتين أميد أدينين داي نيكليوتيد المختزل (NADPH) من ١٠٩ إلى ١٧٢٪.

ويمكن تقدير قيمة الهندسة الوراثية في المثال التالي في الإنتاج المفرط للثريونين. فعن طريق إدخال إنزيم الثريونين ديهيدراتيز المقاوم للتثبيط الرجعي وإدخال نسخ إضافية من الجينات المشفرة للإنزيمات المخلقة للأحماض الأمينية المتفرعة، حولت مجموعات مختلفة سلالاتها المنتجة لليسين أو الثريونين إلى سلالات منتجة

لـ إل-أيزوليوسين. فقد أنتجت سلالة معدلة من إيشيريشيا القولون (عن طريق تطفير سلالة لا تنتج الأيزوليوسين، واستنساخ أوبيرون الـ thrABC في نسخ إضافية، وتعطيل جين الـ tdh المحلل للثريونين، والتطفير لمقاومة التركيزات العالية من إل-ثريونين و إل-هوموسيرين) ٨٠ جم/لتر إل-ثريونين في ١,٥ أيام بإنتاجية قدرها ٥٠٪ [٧٩].

(١,٧,٢) النيكليوتيدات Nucleotides

تطور الاهتمام التجاري بتخمير النوكليوتيدات؛ بسبب اكتشاف كونيناكا في اليابان أن بعض البيورينات ريبونوكليوزيد-َ٥-أحادية الفوسفات، مثل حمض الجوانيليك (GMP)، وحمض الإينوزينيك (IMP)، وحمض الزانثيليك (XMP) حسنت نكهة الأغذية والمشروبات والتوابل [٨٠، ٨١]. ومن المثير للاهتمام، أن الـ AMP ليس له أي نشاط من هذا القبيل. وتفوقت كثافة تحسين النكهة باستخدام هذه المركبات على الـ MSG بعدة مرات. وكان للمزيج من نوكليوتيدات النكهة مع MSG تأثيراً تآزرياً على تحسين النكهة. وقد تم تصنيع النيوكليوتيدات أساساً بالتحلل الإنزيمي للحمض النووي الريبوزي للخميرة، ولكن كانت هذه عملية مكلفة. ثم وجد أن طفرات سلالة الكورينيباكتريوم جلوتاميكوم المنتجة لحمض الجلوتاميك تنتج IMP، XMP [٨٢، ٨٣]. وبمزيدٍ من التطفير للسلالة المنتجة للـ IMP، فقد تم الحصول على سلالة يمكن أن تنتج مزيج من النيوكليوتيدات الأكثر قوة، IMP وGMP [٨٤]. وأصبح التخمير المباشر الطريقة المفضلة لهذه الصناعة [٨٥]، على الرغم من أن بعض الشركات أنتجت النيوكليوزيدات (الإينوزين والجوانوزين) عن طريق التخمير ثم حولتها إنزيمياً (عن طريق حفز الفسفوكينيز) إلى َ٥-النيوكليوتيدات. وبلغ إنتاج َ٥-نيوكليوتيدات النكهة حوالي ٤٠ جم/لتر.

(١,٧,٣) الفيتامينات Vitamins

يتم تصنيع الفيتامينات بمعدل ٧٠٠٠٠ طن سنوياً بالتخليق الكيميائي والتخمير. وينتج الريبوفلافين بواسطة هاتين الطريقتين بمعدل سنوي قدره ٤٠٠٠ طن. وتنتج معظم الفطريات الريبوفلافين (فيتامين ب٢) بما يكفي لتلبية متطلبات نموها، ولكن القليل منها ينتج هذا الفيتامين بصورة مفرطة طبيعياً. وقد وجدت هذه القدرة على الإنتاج غير المحكوم للريبوفلافين في المقام الأول في نوعين من الفطريات، إريموثيكيوم أشبي وأشبيا جوسيبي. وقد تم اكتشاف الإنتاج الإفراطي في سلالات الأشبيا الطبيعية في عام ١٩٣٥م بواسطة جوليرموند وزملاؤه [٨٦]. وأشاروا إلى اللون الأصفر من مستعمرات كلٍ من الفطرين، مع كونه أكثر كثافة في حالة الإريموثيكيوم أشبي. في خلال مرحلة النمو الثابتة، تصبح تجويفات الخلية صفراء، وفي بعض الفجوات، لوحظت

نجيمات إبرية الشكل من بلورات الريبوفلافين. وأدى هذا إلى استخدام إريموثيكيوم أشبي للإنتاج الصناعي للريبوفلافين في مكونات علف الحيوان [٨٧].

في عام ١٩٤٣م، تلقى ويكرهام وزملاؤه في بيوريا NRRL/ مختبر وزارة الزراعة الأميركية سلالة أشبيا جوسيبي من روبنز، مدير الحديقة النباتية في نيويورك، وأعطوها الرمز NRRL Y-1056. وأنتجت هذه السلالة مستعمرات صفراء باهتة، ولكن في عام ١٩٤٤م، لاحظ ويكرهام وزملاؤه سلالة مختلفة ذات مستعمرات برتقالية لامعة [٨٨]. واستبدلت سلالة إريموثيكيوم أشبي في الصناعة بسلالة أشبيا جوسيبي الأكثر استقراراً [٨٩] والتي أنتجت، بعد المعالجة الجينية، أكثر من ٢٠ جم/ لتر من الفيتامين.

وقد تم تطوير عملية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل للريبوفلافين في الكورينيباكتريوم أمونياجينز عن طريق الاستنساخ والتعبير المفرط لجينات تخليق الريبوفلافين الخاصة بالكائن وتسلسلات جيناته البادئة [٩٠]. وأنتجت السلالة الناتجة ١٥ جم/ لتر ريبو فلافين في ثلاثة أيام. وأدت الهندسة الوراثية لسلالة باسيلس ساتليس التي تحتوي بالفعل على طفرات مقاومة لنظائر البيورين إلى إنتاج ١٥ جم/ لتر ريبوفلافين [٩١]. وتم إنتاج هذه السلالة من باسيلس ساتلس الرقيقة عن طريق إدخال نسخ متعددة من أوبيرون rib في موضعين مختلفين في الكروموسوم أو الصبغي، وتعبير هذه الأوبيرونات من البادئات القوية الموجودة في النهاية ٥' في موقع داخلي في الأوبيرون، مما جعل الطفرات المقاومة لنظائر البيورين تزيد من إنتاج الجوانوزين ثلاثي الفوسفات (GTP؛ مرادف) وطفرة مقاومة لنظير الريبوفلافين (روزفلافين) في rib، الذى أخل بتنظيم المسار بأكمله [٩٢]. وقد وجد أن الجين المحدد في هذه السلالة هو ribA، الذي يرمز كلٍ من ٣،٤-داي هيدروكسي-٢-بيوتانون-٤-فوسفات سينسيز (نصف النهاية-إن من RibA) وGTP-سيكلوهيردوليز (مجال النهاية-سي) [٩٣]. وزادت نسخة إضافية واحدة من RibA إنتاج الريبوفلافين بكثير عن ١٥ جم/ لتر ورفعت أيضاً العائد من السكر بنسبة ٢٥٪. ونتيجة لهذه الجهود، أصبحت سلالة باسيلس ساتلس مهمة للإنتاج الصناعي من الريبوفلافين.

يشكل تكوين فيتامين ب١٢ من البكتيريا ظاهرة قديمة جداً. ويعود المسار اللاهوائي إلى حوالي ٤ مليار سنة في حين تطور المسار الهوائي عندما أصبح غلافنا الجوي مخصباً بالأكسجين منذ حوالي ٢ مليار سنة [٩٤]. في أواخر الأربعينيات، اكتشف عالم في شركة ميرك [٩٥] أن سلالتي إستربتوميسس جريسيوس وبسودوموناس دينيتريفيكانس يمكنهما تكوين فيتامين ب١٢ [٩٦]. وأظهرت دراسات أخرى أنه يمكن أيضاً إنتاج الفيتامين من سلالة بروبيونيباكتريوم شيرماني، فضلاً عن غيرها من البكتيريا. أصبحت بسودوموناس دينيتريفيكانس وبروبيونيباكتريوم شيرماني هي الكائنات المنتجة صناعياً. وبلغ إنتاج فيتامين ب١٢ مستويات أعلى من ٢٠٠ ملجم/ لتر باستخدام بسودوموناس دينيتريفيكانس. وقد استخدم التخمير حصرياً بمعدل ١٢ طن/ السنة في

بداية عام ٢٠٠٠م. ويمكن أن يبدو هذا رقماً صغيراً، ولكن لا حاجة لأكثر منه، حيث إن فيتامين ب١٢ جزيء قوي جداً.

وفي وقتٍ ما، تم إنتاج حمض الأسكوربيك (فيتامين ج) عن طريق عزله من الليمون. واستبدل هذا عام ١٩٣٣م بتخليق رايخشتاين المكون من سبع خطوات [٩٧]، والتي شملت خطوة تخليقية. بعد التحويل الكيميائي للدي-الجلوكوز إلى دي-سوربيتول، استخدمت سلالة جلوكونوباكتر أوكسيدانس لتحويل هذا الأخير إلى إل-سوربوز. وبعد هذا تم تحويل إل-سوربوز في عدة خطوات كيميائية إلى حمض ٢-كيتو-إل-جولونيك (2-KLGA). ثم تم تحويل الـ 2-KLGA كيميائياً بواسطة حامض أو قاعدة لحمض الأسكوربيك. وكان العائد من الجلوكوز إلى 2-KLGA هو ٥٠٪. وقد تم استخدام عملية رايخشتاين لمدة ٧٠ عاماً، ولكن أصبحت عمليات التخمير المطورة حديثاً التي تحول الدي-جلوكوز، والدي-سوربيتول، أو إل-سوربوز إلى 2-KLGA تنافسية [٩٨].

واستخدمت بعض عمليات إنتاج فيتامين ج ميكروبيولوجياً سلالات مفردة مثل أنواع الجلوكونوباكتر، والأسيتوباكتر أو البسودوموناس. وشملت عمليات الزراعة المشتركة عملية تم تطويرها في الصين تعود إلى عام ١٩٦٩م، وتستخدم على نطاقٍ واسع هناك لتحويل دي-سوربيتول إلى 2-KLGA. وفي عملية أخرى، تم تحويل دي-جلوكوز إلى حمض ٢،٥-داي كيتو-د-جلوكونيك بواسطة سلالة إيروينيا أو أسيتوباكتر، والذي تم تحويله بعد ذلك إلى 2-KLGA بواسطة سلالة الكورينيباكتريوم [٩٩]. وشملت عملية أخرى مماثلة طفرات من الجلوكونوباكتر أوكسيدانس والباسيلس ميجاتيريوم [١٠٠]. وأنتجت سلالة مهندسة وراثياً من إيروينيا هيربيكولا ١٢٠ جم/لتر من 2-KLGA [١٠١]، في حين أن الجلوكونوباكتر أوكسيدانس المعدلة وراثياً أنتجت ١٣٠جم/لتر [١٠٢]. ويستخدم حمض الأسكوربيك في الصناعات الدوائية، والغذائية، وصناعة المشروبات، والأعلاف. ويصل الإنتاج السنوي إلى ١١٠٠٠٠ طن عن طريق التخليق والتخمير.

(٤, ٧, ١) الأحماض العضوية Organic Acids

لقد كانت الأحماض العضوية منتجاً مهماً للتقنية الحيوية. ويمكن العثور على الكثير من المعلومات عن تاريخ تخمير الأحماض العضوية في مقالات ميال [١٠٣]، وماتيي [١٠٤]، وروهر [١٠٥]، وماجنوسون و لازور [١٠٦]. وأهم الأحماض العضوية التجارية هي حمض الستريك وحمض الخليك وحمض اللاكتيك. وتوجد أيضاً عمليات تخمير لإنتاج حمض السكسينيك، والجلوكونيك، والأوكسالوجلوكونيك، والبيروفيك، والإيتاكونيك، والشيكيميك، والماليك، والبروبيونيك، والبيوتيريك، والأوكساليك، والكوجيك، والفوماريك،

والإريثروبيك، والترانس-إيبوكسي سكسينيك، والطرطريك، والأحماض ألفا- وأوميجا- ثنائية الكربوكسيل طويلة السلسلة.

ولإنتاج حمض الستريك أهمية تاريخية؛ نظراً لأنه كان عملية التخمير الأولى التي تم تطويرها. وقد أنتج حصرياً عن طريق العزل من الليمون. في عام ١٩١٦م، وصف إنتاج حمض الستريك بفطريات الأسبرجلس السوداء بواسطة تشارلز، وكوري [١٠٧]. وانضم كوري إلى شركة فايزر في بروكلين، نيويورك، وطور عملية إنتاج تجارية في عام ١٩٢٣م. وكانت براءات الاختراع المسجلة من فيرن باخ وآخرون [١٠٨، ١٠٩] عام ١٩٢٧م هي أساس إنتاج حمض السيتريك في إنجلترا في شركة جون وستيرج المحدودة. وقد تم تحسين العملية في الثلاثينيات بواسطة مجموعة رايستريك [١١٠] وبواسطة دوجلار وبريسكوت [١١١]. وقد تمت دراسة متطلبات سلالة أسبرجليس نيجر من المعادن المهمة بواسطة عدد من المجموعات بما فيها توملينسون وزملائه [١١٢]، وأديجا وآخرون [١١٣].

خلال السنوات الأولى، تم إنتاج الحمض فقط بطريقة الزراعة السطحية في دوارق للدراسات المختبرية وصواني للإنتاج التجاري. ومع ذلك، وجد أميلونج [١١٤]، وكلوفر وبيركين [١١٥] أن طريقة الزراعة المغمورة كانت أفضل. واعتمد المزيد من تطوير تخمير حمض الستريك إلى حدٍ كبير على عمل البروفيسور مارفن جونسون مع زميله ديفيد بيرلمان [١١٦]، وبينغ شو [١١٧] في جامعة ويسكونسن خلال السنوات نفسها التي ساهم فيها جونسون بشكلٍ كبير جداً في تطوير تخمير البنسيلين. وكان استخدام الدبس العكسي (دبس عالي الاختبار)، والمعالج للحد من محتواه من الحديد، رائداً من قبل مختبرات مايلز. وتم الحصول على طفرات منتجة لتركيزات أعلى من قبل مختبرات مايلز [١١٨]، وجيمس وآخرون [١١٩]، وهانان وآخرون [١٢٠].

ويتم إنتاج حوالي ١,٥ مليون طن من حمض الستريك من أسبرجليس نيجر سنوياً. وتستخدم العملية التجارية أسبرجليس نيجر في بيئات غذائية تفتقر إلى الحديد والمنجنيز. وقد ارتبط إنتاج المستوى العالي من حمض الستريك أيضاً بزيادة تركيز الفركتوز-٢،٦-ثنائي الفوسفات داخل الخلايا، وهو منشط لتحلل الجلوكوز. وهناك عوامل أخرى تساهم في زيادة إنتاج حمض الستريك مثل تثبيط إنزيم أيزوسترات ديهيدروجينيز بواسطة حمض الستريك، وانخفاض درجات الرقم الهيدروجيني المثلي للبيئة (١,٧-٢,٠). وفي ما يقرب من ٤-٥ أيام، تم تحويل الجزء الأكبر (٨٠٪) من السكر الموجود إلى حمض الستريك، وبلغت الإنتاجية نحو ١٠٠ جم/ لتر. وقد تم تطوير عمليات بديلة لإنتاج حمض الستريك من خميرة الكانديدا، وخاصة من المواد الهيدروكربونية. وكانت هذه الخمائر قادرة على تحويل إن-بارافينات إلى حمضي الستريك والأيزوستريك بإنتاجية عالية جداً (١٥٠-١٧٠٪ على أساس الوزن). وقد تم التوصل إلى إنتاجية تصل إلى ٢٣٠ جم/ لتر.

بكتيريا حمض الخليك هي بكتيريا سالبة لصبغة الجرام، وهوائية إجبارياً، وتضم أنواعاً من الأسيتوباكتر، والجلوكونوباكتر، والفراتوريا. وقد كان نشاطها كعوامل متلفة للنبيذ مشكلة منذ ما لا يقل عن ١٠٠٠٠ قبل الميلاد. ويعود استخدم الأسيتوباكتر سابأوكسيدانس في إنتاج الخل إلى ٤٠٠٠ قبل الميلاد. وفي الواقع، فإن الكلمة اللاتينية "خل" تعني النبيذ الحامض أو الحاد. ويتم إنتاج الخل، المحلول المائي لحمض الخليك، بطريقة أفضل بسلالات الجلوكونوباكتر والأسيتوباكتر [١٢١]. وقد تم تحويل محلول من الإيثانول إلى حمض الخليك حيث تعرض ٩٠-٩٨٪ من الإيثانول للهجوم، منتجاً محلولاً من الخل يحتوي على ١٢-١٧٪ من حمض الخليك. وقد تم إجراء الإنتاج الصناعي لحمض الخليك فقط عن طريق تحويل السكر حتى أواخر القرن السابع عشر عندما أصبح تقطير الخشب منافساً لعملية التخمير. ثم أصبح البترول مصدراً رئيساً لحمض الخليك المخلق. وتم تأسيس أول مصنع كيميائي لحمض الخليك في عام ١٩١٦م. واستخدم حمض الخليك المصنع تخميرياً في صناعة الأغذية. وبلغ إنتاج حمض الخليك ٧,٥ مليون طن سنوياً بواسطة التخليق والتخمير.

حالياً تتم عملية تخمير حمض الخليك فـي خطوتين حيث تحول خميرة سكاروميسس سيرفيسي الجلوكوز إلـى الإيثانول، وتنتج بكتيريا الأسيتوباكتر أسيتي حمض الخليك من الإيثانول. وزاد استنساخ إنزيم ألدهيد ديهيدروجينيز من الأسيتوباكتر بولي أوكسوجينز على ناقل بلازميدي إلى الأسيتوباكتر أسيتي زيلينوم معدل إنتاج حمض الخليك بنسبة تزيد على ١٠٠٪ (١,٨ جم/لتر لكل ساعة إلى ٤ جم/لتر لكل ساعة)، والإنتاجية بنسبة ٤٠٪ (٦٨-٩٧ جم/لتر) [١٢٢].

وقد استخدمت مجموعة أخرى من الكائنات الحية لإنتاج حمض الخليك، وهي الكائنات اللاهوائية، واللاهوائية النامية في درجة حرارة عالية من جنس الكلوستريديوم. وفي عام ١٩٤٠م، عزل ويرينجا سلالة كلوستريديوم أسيتيكوم [١٢٣] والتي فقدت في وقتٍ لاحق. ولكن في عام ١٩٤٢م، عزل فونتين وآخرون [١٢٤] سلالة كلوستريديوم ثيرموأسيتيكوم والتي حولت السكر كمياً إلى حمض الخليك عبر مسار إيمبدين-مايرهوف إلى البيروفات، والتي تحولت بعد ذلك إلى الخلات. ونتيجة لذلك تم تحويل ١ مول من الجلوكوز إلى ٣ مولات خلات. وأظهرت التجربة مع هذا التخمير أن ٠,٨٥ جرام من حمض الخليك يمكن أن تنتج من ١ جرام من الجلوكوز [١٢٥] وتم تحقيق إنتاجية تبلغ ٨٣-١٠٢ جم/لتر باستخدام الطفرات المحسنة [١٢٦]. وقد جرى استعراض الإنتاج بواسطة كلوستريديوم ثيرموأسيتيكوم من قبل شيريان وآخرون [١٢٧].

وقد استخدم إنتاج حامض اللاكتيك لتأخير تلف الأغذية لعدة قرون، ولكن لم تعرف الطريقة التي يفعل هذا حتى اكتشاف باستور في عام ١٨٥٧م أن سبب هذا النشاط المناسب هو الكائنات الحية الدقيقة. وفي عام ١٨٧٨م، عزل جوزيف ليستر [١٢٨] المزرعة النقية البكتيرية الأولى على وجه الاطلاق والتي سماها باكتريوم

obeikandi.com

لاكتيس، والتي أعيد تسميتها لاحقاً لاكتوباسيلاس لاكتيس لاكتيس. وبكتيريا حمض اللاكتيك هي لاهوائيات موجبة لصبغة جرام، تنتج وتفرز حامض اللاكتيك فـي البيئة. وكانت بين أول الميكروبات المستخدمة فـي تصنيع الأغذية. حالياً، يستخدم حامض اللاكتيك فـي الصناعات الغذائية بوصفها مادةً حافظةً ومحسناً للنكهة، وكذلك فـي الصناعات الكيميائية والصيدلانية. ومن التطبيقات المهمة لحمض إل-لاكتيك صناعة البولي أكتيد (انظر القسم ١,٧,٦)، وكذلك مذيب الإيثيل لاكتات الحميد بيئياً. ويتم إنتاج حوالي ٢٥٠٠٠٠ طن من حامض اللاكتيك سنوياً.

وبالإضافة إلى بكتيريا حمض اللاكتيك، فإن الفـطر ريزوباس هو أيضاً منتج للحمض. ويفضل أحياناً لأنه لا يتطلب إضافات مثل مستخلص الخميرة، ومنقوع شراب الذرة، أو الشرش، والتي تجعل استرداد المنتج مكلفاً. أيضاً، يخلق فطر الريزوباس أورايزي فقط الصيغة إل-(+) من حمض اللاكتيك، في حين تنتج معظم بكتيريا اللاكتوباسيلي صيغ مختلطة من الحمض. ويمكن لبعض اللاكتوباسيلي المعدلة إنتاج صيغ مفردة ولكن الإنتاجية تكون منخفضة. وأدى برنامج سداسي الخطوة لتحسين السلالة إلى سلالة ريزوباس أورايزي تنتج أكثر من ١٣٠ جم/ لتر من حمض إل-(+)-اللاكتيك، واقترب العائد من الجلوكوز من ٩٠٪ [١٢٩].

على الرغم من أن معظم اللاكتوباسيلي تنتج صيغ مختلطة، إلا أنه تم عزل سلالة من لاكتوباسيلاس لاكتيس تنتج ١٩٥ جم/ لتر من حمض إل-اللاكتيك من ٢٠٠ جم/ لتر جلوكوز [١٣٠]. وتنتج سلالة معدلة من إيشيريشيا كولاي الصيغة البصرية النقية من حمض دي-لاكتيك من الجلوكوز مع عائد تقريباً مماثل للعائد النظري الأقصى (أي جزيئين من جزيء واحد من الجلوكوز) [١٣١]. وقد تم هندسة الكائن الحي عن طريق منع الجينات للمسارات المتنافسة والتي تشفر إنزيمات الفومارات ريدكتيز، الكحول/ ألدهيد ديهيدروجينيز، والبيروفات فورمات ليز، وكذلك بطفرة في جين الأسيتات كينيز.

(١,٧,٥) الكحولات Alcohols

إن إنتاج الإيثانول هـو علـى الأرجح أقدم عملية تخمير معروفة. وقد كان تحويل السكر في الفواكه والحبوب لإنتاج الإيثانول عملية مهمة قبل ٦٠٠٠ سنة منذ أيام السومريين والمصريين. وقد استخدمت بشكل رئيس حتى الثمانينيات لصناعة المشروبات الكحولية، وقـد أصبحت فـي السنوات الأخيرة مصدراً أولياً ووقود مهماً ونظيفاً، وخصوصاً للسيارات. والإيثانول أيضاً له تطبيقات مثل: (١) مذيب فـي الـمختبر، والأدوية ومستحضـرات التجميل، (٢) مادة مقللة للتوتر السطحـي مساعدة فـي مستحلبات المياه-الزيت، و(٣) عامـل مطهر ومعقم.

obeikandl.com

وكان جاي لوساك، في عام ١٨١٠م، الأول الذي ذكر الإيثانول وثاني أكسيد الكربون كمنتجات رئيسة لتكسير السكر بالخميرة (انظر المقالة الرائعة لشلينك [١٣٢]). وفي عام ١٨٣٧م، وصف الفيزيائي شارل كاجنيارد-لاتور خصائص خلايا الخميرة الموجودة في المشروبات المخمرة، بما في ذلك شكلها، وتكاثرها، وحاجتها لكلٍ من الكربوهيدرات المخمرة ومصدراً نيتروجينياً للتضاعف، والاختلاف بين خمائر إنتاج النبيذ وخمائر عملية تصنيع البيرة. وفي نفس الوقت تقريباً، وجد ثيودور شوان، الذين تدرب على الطب، أن الخمائر كانت مطلوبة للتخمير الكحولي. وقد تم تأكيد أعمال كاجنيارد-لاتور وشوان من قبل فريدريش تراوجوت كوتسينج، وهو صيدلي ومدرس جامعي. ومع ذلك، فقد تم رفض أعمال هؤلاء الرواد من قبل الكيميائيين بيرزيليوس، وليبيج، وفوهلر، والذين اعتقدوا أن العملية في الطبيعة هي تفاعل كيميائي بحت. ومن المثير للاهتمام، أن واحداً من أشد المنتقدين للكيميائيين كان موريتز تراوبه، الذي كان طالباً لليبيج. واقترح أن التخمير يتم بواسطة المكونات الخلوية المؤكسدة والمختزلة والتي وصفها بأنها "متخمرات". وكان باستور في عام ١٨٦٠م هو الذي أثبت أن هناك حاجة تامة لخلايا الخميرة لتنفيذ سلسلة من التفاعلات الكيميائية (الحيوية). أخيراً، استطاع إدوارد بوخنر في عام ١٨٩٧م، بمساعدة شقيقه هانز، تخليق الإيثانول بدون خلايا، باستخدام مستخلصات الخميرة. ولهذا، فقد فاز بجائزة نوبل في الكيمياء عام ١٩٠٧م.

ويتم إنتاج الكحول الإيثيلي عن طريق تخمير السكريات (أو السكريات العديدة التي يمكن أن تتحلل إلى سكريات قابلة للتخمير) بواسطة سكاروميسس سيرفيسي في حالة السكريات السداسية، وكليفيروميسس فراجيليس أو أنواع الكانديدا الهشة مع سكر اللاكتوز أو سكر خماسي، على التوالي.

وقد تم اختيار سكاروميسس سيرفيسي وخمائر أخرى وتكييفها لتخمرات خاصة للإيثانول. وتضمنت خميرة الخباز (سلالات مختلفة للخميرة المضغوطة والجافة النشطة)، وخمائر النبيذ (بما في ذلك سلالات خاصة متجمعة لإنتاج الشمبانيا والسلالات المكونة لطبقات رقيقة لإنتاج نبيذ شيري فلور)، وخميرة الساكي، سلالات تخمير البيرة العلوي والسفلي (تتفاوت في درجة التجمع التي تحدث أثناء التخيمر)، وسلالات التقطير المستخدمة لإنتاج الكحول من حبوب النشا. ويتم إنتاج حوالي مليوني طن من الخميرة سنوياً للتقطير، والتخمير وصناعات الخبز. وقد اقتصر إنتاج المشروبات الكحولية على استخدام الكائنات الحية الدقيقة (مثل الخميرة) ولكن بالنسبة للكحول الصناعي والوقود فعادةً ما يتم عن طريق التخليق الكيميائي من النفط، وقد تغير هذا في نهاية المطاف لصالح الخمائر. وتحت الظروف المثلى، فإنه يتم الحصول على ما يقرب من ١٠-١٢٪ إيثانول من حيث الحجم من تخمير الخميرة في غضون خمسة أيام. وأدى هذا التركيز المرتفع إلى إبطاء النمو وتوقف عملية التخمير. وباستخدام خمائر خاصة (الساكي)، يمكن أن يستمر التخمير لتركيزات كحول تصل إلى٢٠٪ من حيث الحجم، ولكن تحققت هذه التركيزات فقط بعد أشهر من التخمير.

في عام ١٩٧٧م، كان إنتاج الخميرة للمشروبات، والوقود، ووقود الكحول ٢٠٪ أقل عنه بالتخليق الكيميائي. ومع ذلك، بحلول عام ١٩٨٤م، قدمت الخمائر الإيثانول بـ ٨٧٪ أكثر مما فعل التخليق الكيميائي. وواصلت نسبة الكحول الكلي المنتج بالخمائر الزيادة على مر السنين. بحلول عام ٢٠٠٦م، تم إنتاج ١٣,٢ مليون طن من الإيثانول من الذرة سنوياً في الولايات المتحدة عن طريق التخمير مقارنة مع ٠,٦٥ مليون طن بالتخليق الكيميائي. ونتيجةً لإزالة الرصاص من البنزين، تم استبدال الإيثانول كمزيج البنزين لرفع درجة الأوكتان للبنزين. وفي وقتٍ لاحق، تمت إضافته إلى البنزين كمركب أوكسجيني للحد من انبعاث ثاني أكسيد الكربون من خلال تحسين الأكسدة والأداء العام للبنزين. ويعزى ذلك إلى التخلص التدريجي من استخدام ميثيل-رباعي-بيوتيل الاثير (MTBE) كمركب أوكسجيني، كما قرر الكثير من المجالس التشريعية للولايات في الولايات المتحدة. وقد أنتج الكحول الإيثيلي في البرازيل من قصب السكر بمعدل يزيد على ٤ بلايين جالون سنوياً، وكان يستخدم إما كمزيج ٢٥٪ وإما كوقود نقي.

ويجري النظر في وقود الإيثانول المنتج من الكتلة الحيوية بوصفها وسيلة للمساعدة في الحد من تلوث الهواء الناجم عن استخدام البنزين من دون المساهمة في ظاهرة الاحتباس الحراري [١٣٣]، ولإنهاء اعتماد الولايات المتحدة على المصادر الأجنبية للنفط. ويمكن أن توفر المواد الخام في الولايات المتحدة ٢٠ مليار جالون من وقود الإيثانول. وقد تم تطوير عمليات جديدة لتحويل الكتلة الحيوية إلى الإيثانول وقد استخدمت تقنية الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل لتحويل إيشيريشيا القولون والسلالات وثيقة الصلة بها إلى منتجين أكفاء للإيثانول (عائد ٤٣٪، حجم/ حجم) [١٣٤]. وقد تم إدخال جينات إنزيمات الكحول ديهيدروجينيز الثاني والبيروفات دي كربوكسيليز من بكتيريا الزيموموناس موبيليس في إيشيريشيا القولون، وأصبحت النظام السائد لتجديد نيكوتين أميد داي نيكليوتيد (NAD). ومثل الإيثانول أكثر من ٩٥٪ من منتجات التخمر في السلالة المهندسة وراثياً. وأنتجت بعض سلالات إيشيريشيا القولون المهندسة وراثياً مايقرب من ٦٠ جم/ لتر من الإيثانول. وعن طريق استنساخ وتعبير الجينين نفسهما في بكتيريا كليبسيلا أوكسيتوكا، تمكنت السلالة المعدلة من تحويل السيليولوز البلوري إلى الإيثانول بعائد مرتفع عند إضافة إنزيم السيليوليز الفطري [١٣٥]. وكان العائد النظري الأقصى ٨١-٨٦٪، والإنتاجية مرتفعة حيث تم إنتاج ٤٧ جم/ لتر من الإيثانول من ١٠٠ جم/ لتر من السيليولوز.

وقد تم إعادة فحص البكتيريا مثل الكلوستريديا والزيموموناس لاستخدامها في إنتاج الإيثانول بعد سنواتٍ من الإهمال. ويحول الكلوستريديوم ثيموسيللوم، وهو بكتيريا لاهوائية تنمو في درجة حرارة عالية، سليولوز المخلفات (أي الكتلة الحيوية)، و السليولوز البلوري مباشرةً إلى الإيثانول، دون الحاجة لإنزيم السليوليز الفطري [١٣٦-١٣٩].

والبيوتانول هو كحول آخر يمكن أن يساعد في حل الاعتماد المتزايد على البترول كوقود السيارات [١٤٠، ١٤١]. وأدى استنساخ جينات adc للأوبيرون ace (التي تشفر إنزيم أسيتوأسيتات ديكربوكسيليز)، ctfA و ctfB (جينين يرمزان لإنزيم العامل المساعد-أ-ترانسفيراز) على بلازميد يحتوي على بادئ adc في كلوستريديوم أسيتوبوتيليكوم إلى زيادة تقدر بـ ٩٥٪ في إنتاج الأسيتون، وزيادة ٣٧٪ في البيوتانول، وزيادة ٩٠٪ في الإيثانول، وزيادة ٥٠٪ في عائد المذيبات من الجلوكوز، وإنتاج أقل من الأحماض بـ ٢٢-ضعف [١٤٢].

وقد تم تطوير سلالة إيشيريشيا قولون والتي تنمو على الجلوكوز وتنتج ١،٣-بروبان دايول (PDO؛ جليكول ثلاثي الميثيلين؛ 3G) بحوالي ١٣٥ جم/لتر، مع عائد قدره ٥١٪ وبمعدل ٣,٥ جم/لتر لكل ساعة [١٤٣]. وقد بذل هذا الجهد المشترك بواسطة علماء من جينينكور الدولية ودوبونت وقد تحقق عن طريق إدخال ثمانية جينات جديدة لتحويل فوسفات الديهيدروكسي أسيتون (DHAP) إلى PDO. وشملت هذه جينات الخميرة التي تحول الديهيدروكسي أسيتون إلى الجلسرين، وجينات الكلبسيلا نيمونيا التي تحول الجلسرين إلى PDO. وحسن الباحثون الإنتاج في السلالة المعدلة من خلال تعديل ١٨ جين لإيشيريشيا القولون، بما في ذلك الجينات التنظيمية. وكان الـ PDO هو الوحدة البنائية المستخدمة للتخليق الكيميائي لألياف البولي يوريثان والبوليستر Serono™ بواسطة دوبونت (انظر القسم ٦,٧,١). كما استخدم الـ PDO كمادة تشحيم شبيهة بالبولي جليوكول وكمذيب.

والكحولات الأخرى التي يمكن أن تنتج عن طريق التخمير هي الجلسرين، والإريثريتول، والمانيتول، والألسوربيتول، والزيليتول.

(٦,٧,١) البوليمرات Polymers

يتم إنتاج ثلاثين ألف طن من السكر العديد الزنثان سنوياً لاستخدامها في مجال النفط، والصيدلانيات، ومستحضرات التجميل، والورق، والطلاء، والصناعات النسيجية. وزادت المعالجة الوراثية من إنتاجية الزنثان بضعفين، وزاد محتوى البيروفات بنسبة ٤٥٪ [١٤٤]. وزاد استنساخ الجينات التي أكملت طفرات الزنثان السالبة في السلالة الأصلية زانثوموناس كامباستريس من إنتاج الزنثان بنسبة ١٥٪ [١٤٥].

وقد تم تقديم حل لآثار التلوث بالمواد البلاستيكية المنتجة كيميائياً بواسطة مجموعة من المواد البلاستيكية القابلة للتحلل الطبيعي والمنتجة ميكروبياً، والمعروفة باسم بولي هيدروكسي ألكانوات (PHAs). وأصبح واحد من الـ PHA، البولي هيدروكسي بيوتيرات، متوفراً من الكائنات الحية الدقيقة في الثمانينيات [١٤٦]. وتتراكم الـ PHAs داخل الخلية إلى مستويات تصل إلى ٣٠-٨٠٪ من الوزن الجاف للخلايا الخلية وتصل تحت ظروف معينة في سلالة ألكاليجينس أوتروفس إلى ٩٦٪ من مادة الخلية [١٤٧].

ومن البلاستيكات الحيوية الجديدة البولي تراي ميثيلين تيرفثالات (البوليستر 3GT؛ +3G)، المصنع بتفاعل حمض التيرفثاليك مع الـ PDO المنتج تخميرياً [١٤٨]. والـ +3G هو بوليستر جديد صديق للبيئة. والبولي أكتيد هو من البلاستيكات الأخرى الصديقة للبيئة ويصنع كيميائياً من حمض إل-(+)-لاكتيك المنتج تخميرياً [١٤٩].

(١,٧,٧) السكريات التخصصية، وكحولات السكر، إل-سكريات، سكريات الأوليجو، السكريات العديدة الجديدة التي تفرز خارج الخلية، الصبغات الحيوية، مستحضرات التجميل بما في ذلك العطور، والإنزيمات الميكروبية للتخليق الفراغي وغيرها من التطبيقات

Specialty Sugars, Sugar Alcohols, L-Sugars, Oligosugars, Novel Extracellular Polysaccharides, Biopigments, Cosmetics Including Fragrants, and Microbial Enzymes for Chiral Synthesis and Other Applications

يعد إل-ريبولوز من السكريات التخصصية المهمة [١٥٠] والذي يمكن تصنيعه بالتحويل الحيوي، أي نزع الهيدروجين من الريبيتول. ثم يتم تحويل هذا المركب إلى إل-ريبوز الذي يستخدم لتخليق نظائر الينوكليوزيدات كعوامل مضادة للفيروسات. والدكستران هو سكر عديد متماثل من الجلوكوز، يتم إفرازه بواسطة سلالات الليوكونوستوك، والإستربتوكوككس، واللاكتوباسيلس. ويمكن إنتاج الدكستران باستخدام إنزيم الدكستران سكريز [١٥١]. وقد استخدمت مستحضرات التجميل (منتجات العناية الشخصية) بواسطة قدماء المصريين، والإغريق، والرومان، والأنكا والأزتيك منذ قرون، وتستخدم على نطاقٍ واسع اليوم [١٥٢]. وهي تشمل حمض الهيالورونيك، والكيتوزان، والزانثان، والسيراميدات، والأحماض الأمينية، والإكتوينات، والبروفيتامينات، وثنائي هيدروكسي الأسيتون، وسم الكلوستريديوم بوتيولينوم، والأحماض العضوية، والدكسترينات الحلقية، والمستحلبات الحيوية، وصبغة الإنديجو، والصبغات الحيوية، والأحماض الدهنية، والإنزيمات الميكروبية. ومن الصبغات الحيوية المهمة الريبوفلافين، وبيتا-كاروتين، والأزتاكسانثين، والزياكسانثين، والموناسين. وتشمل العطور الحيوية رائحة الخوخ ٤-ديكالاكتون، ورائحة الزبدة أر-جاما-دوديكانوليد، وروائح الجبن حمض البيوتيريك وإستراته الإيثيلية [١٥٣]. وقد استخدم التحفيز الحيوي (انظر الأقسام ١٢, ١ و١٣, ١) على نطاقٍ واسعٍ في مجالات المواد الكيميائية الدقيقة والضخمة، وكذلك في القطاع البيئي [١٥٤، ١٥٥].

(١,٨) التحول من المضادات الحيوية إلى العوامل الدوائية

The Shift from Antibiotics to Pharmacologic Lagents

لقد طورت الطبيعة خلال الثلاث مليارات عام التي استوطنت فيها البكتيريا الأرض كيمياء فريدة من نوعها في شكل مئات الآلاف من نواتج الأيض الثانوي الجديدة المعرفة والمعزولة. وقد حققت هذه المنتجات

obeikandl.com

الطبيعية، بتركيباتها الفراغية الأكثر تعقيداً من تلك المواد الكيميائية المخلقة، نجاحاً ساحقاً في استخدامها من قبل البشر. وقد قللت نواتج الأيض الثانوي للكائنات الحية الدقيقة من الألم والمعاناة، وحققت ثورة في الطب. وقد كانت المنتجات الطبيعية أهم العوامل المضادة للعدوي والمضادة للسرطان. وتمت نمذجة مثبطات إنزيمات الترانسكريبتيز العكسي والبروتييز لفيروس نقص المناعة البشرية والمستخدمة معاً لمكافحة الإيدز بناءً على الإرشادات التي تم الحصول عليها من المنتجات الطبيعية في المعهد الوطني للسرطان في الولايات المتحدة. وتم الحصول على العامل المضاد للجدري الأسيكلوفير والسيتارابين، ودواء الأورام اللمفاوية غير-الهودجكينية، من الإسفنج. وفي مطلع هذا القرن، كان أكثر من نصف الأدوية المعتمدة المتاحة إما منتجات طبيعية وإما مرتبطة بها، وتلك التي لم تشمل حتى مواد حيوية مثل اللقاحات والأجسام المضادة أحادية النسيلة.

ومن بين جميع المنتجات التقليدية المنتجة تخميرياً، فإن نواتج الأيض الثانوي (الإيديوليتات) تعدُّ هي الأكثر أهمية لصحة الإنسان. وهي (١) غالباً ما تنتج في مرحلة تطويرية تالية للنمو في مزرعة على دفعة واحدة (الإيديوفيز، مرحلة إنتاجها) (٢) ليس لها وظيفة في النمو، (٣) يتم إنتاجها من قبل مجموعات تصنيفية ضيقة من الكائنات الحية، (٤) لديها تركيبات كيميائية غير عادية ومتنوعة، و(٥) غالباً ما تتشكل كخليط من مركبات عائلة كيميائية مرتبطة ارتباطاً وثيقاً. وفي الطبيعة تعمل وظائفها على بقاء السلالة، ولكن عند نمو الكائنات الحية المنتجة في مزرعة نقية، فإنه ليس لنواتج الأيض الثانوي أي دور من هذا القبيل. وهكذا، يتم فقدان القدرة على الإنتاج في الصناعة بسهولة بواسطة الطفرة ("تحلل السلالة"). وبشكلٍ عام، فإن نواتج الأيض الابتدائي والثانوي ذات الاهتمام التجاري لها أوزان جزيئية منخفضة نسبياً، أي أقل من ١٥٠٠ دالتون.

وفي حين أن الأيض الابتدائي يكون في الأساس واحداً بالنسبة لجميع الأنظمة الحية، فإن الأيض الثانوي يجري أساساً في النباتات والكائنات الدقيقة، وعادةً ما يكون متخصص للسلالة. وتعد المضادات الحيوية هي أفضل النواتج المعروفة للأيض الثانوي، كما نوقش أعلاه.

في النصف الأخير من القرن العشرين، تم وضع المزيد من الاهتمام على استخدام منتجات الأيض الثانوية الميكروبية كعوامل دوائية. ولم يعد ينظر للمصادر الميكروبية وحدها كحلول محتملة للأمراض الميكروبية. فقد بدأ هاماو أوميزاوا (الشكل رقم ١٠ , ١)، برؤية عظيمة، في الستينيات جهوده الرامية إلى توسيع نطاق الميكروبيولوجيا الصناعية إلى نواتج الأيض الثانوية منخفضة الوزن الجزيئي، والتي كان لها تأثيرات، أخرى/ أو بالإضافة إلى التأثير المضاد للبكتيريا، والمضاد للفطريات، والمضاد للسرطان. وركز وزملاؤه في معهد الكيمياء الميكروبية في طوكيو على مثبطات الإنزيمات [١٥٦، ١٥٧]، وعلى مر السنين، اكتشف، وعزل، ونقي، ودرس النشاط للعديد من هذه المركبات الجديدة في التجارب المعملية وداخل الحيوانات. وأجريت جهود مماثلة في معهد كيتاساتو في طوكيو

obeikandl.com

بواسطة ساتوشي أومورا [١٥٨]. وأعقب هذا التغيير في فلسفة الفرز والاختيار تطبيقات عبقرية للبيولوجيا الجزيئية للكشف عن تأثير المركبات من الميكروبات والنباتات للتطبيقات غير المضادات الحيوية.

الشكل رقم (١٠ , ١). هاماو أوميزاوا.

(١ , ٨ , ١) مثبطات الإنزيمات Enzyme Inhibitors

إن أهم مجموعة من مثبطات الإنزيمات هي الستاتينات، وتستخدم لخفض الكوليستيرول في البشر. ولهذه العوامل الناجحة للغاية أيضاً نشاطاً مضادً للفطريات، وبخاصة ضد الخمائر. واكتشف كلٍ من براون وزملاؤه في المملكة المتحدة [١٥٩] وإندو في اليابان [١٦٠]، بشكلٍ مستقل، أول عضو في هذه المجموعة، الكومباكتين (ميفاستاتين، ML-236B)؛ كمضاد حيوي منتج من البنسليوم بريفيكومباكتوم و البنسليوم سيترينوم. واكتشف إندو وزملاؤه الكومباكتين في المحاليل كمثبط لإنزيم العامل المساعد-أ ٣-هيدروكسي-٣-ميثيل جلوتاريل ريدكتيز، الإنزيم المنظم والمحدد لمعدل تكوين الكوليسترول. وفي وقتٍ لاحق، وبشكلٍ مستقل، اكتشف إندو [١٦١] وألبرتس وزملاؤه [١٦٢] (في شركة ميرك، الولايات المتحدة الأمريكية)، الصورة الميثيلية الأكثر نشاطاً من الكومباكتين المعروفة باللوفاستاتين (موناكولين ك، ميفينولين) في محاليل مزارع الموناسكس روبر والأسبرجلس تيريوس، على التوالي.

وقد أنتج اللوفاستاتين (ميفينولين) بواسطة فطر الأسبرجلس تيريوس وكان مثبطاً تنافسياً قوياً لإنزيم العامل المساعد-أ ٣-هيدروكسي-٣-ميثيل جلوتاريل ريدكتيز من الكبد في صورة حمضه الهيدروكسي (حمض

المفينولينيك). ومهد اللوفاستاتين الطريق إلى تطوير البرافاستاتين، والزوكور (سيمفاستاتين)، والليبيتور (أتورفاستاتين). وقد أنتج البرافاستاتين بواسطة التحويل الحيوي، أي إضافة مجموعة الهيدروكسيل للكومباكتين باستخدام أكتينوميسيتات مثل إستربتوميسيس كاربوفيلوس [١٦٣] ونوع من الأكتينومادورا [١٦٤]. ومن الجدير بالذكر أن الآلية الإنزيمية للسلالتين وجد أنها مختلفة تماماً [١٦٥]. وقد تم تحضير الزوكور شبه تخليقياً من اللوفاستاتين، في حين تم تخليق الليبيتور بالتخليق الكلي، على غرار تركيب الستاتينات الأخرى.

وقد وجد أن الستاتينات تثبط إنتاج الكوليسترول من البداية في الكبد، المصدر الرئيسي لكوليسترول الدم. ويؤي ارتفاع نسبة الكوليسترول في الدم إلى تصلب الشرايين الذي يعد عاملاً مسبباً لأنواع عديدة من أمراض القلب التاجية، وهي سبب رئيس لوفاة الإنسان. وكانت الستاتينات نجاحاً؛ لأنها خفضت الكوليسترول الكلي في البلازما بنسبة ٢٠-٤٠٪، في حين خفضتها الفايبرات المستخدمة سابقاً بنسبة ١٠-١٥٪. ولم تكن الستاتينات فقط مفيدة في خفض خطر الأمراض القلبية الوعائية، ولكنها منعت أيضاً السكتة الدماغية، وقللت من أمراض الأوعية الدموية الطرفية، وكان لها نشاط مضاد للتجلط ومضاد للالتهابات. ولذلك يتضح لنا لماذا أصبحت هذه المجموعة من المركبات الأدوية الرائدة في مجال صناعة الأدوية.

وأدى مسح مضادات الإنزيمات أيضاً إلى اكتشاف السكر الرباعي الزائف الأكاربوز، المثبط الطبيعي لإنزيمات ألفا-جلوكوزيديز والسكريز المعوية [١٦٦]. ويتم إنتاج الأكاربوز بواسطة أكتينوميسيت من جنس أكتينوبلانيس. وهو يخفض ارتفاع سكر الدم وتخليق الجلسرين ثلاثي الأسيل في الأنسجة الدهنية والكبد والجدار المعوي للمرضى الذين يعانون من مرض السكري والسمنة وارتفاع دهون الدم من النوع الرابع. وتشمل مثبطات الإنزيمات القيمة الأخرى الليبستاتين، المستخدم لمكافحة السمنة والسكري عن طريق تثبيط امتصاص الجهاز الهضمي للدهون. وكان مثبطاً لإنزيم الليبيز الذي يفرزه البنكرياس وينتج بواسطة إستربتوميسس توكسيتريسيني. ويدعى المنتج التجاري أورليستات (تيتراهيدروليبستاتين) [١٦٧].

وتم في هذا الوقت اكتشاف مثبط إنزيمي مهم جداً للطب يسمى حمض الكلافيولانيك [١٦٨] (انظر القسم ٣,١)، والكثير منها للزراعة مثل البولي أوكسينات [١٦٩] والفوسفينوثريسينات (انظر القسم ٥,٨,١). والبولي أوكسينات هي عوامل مضادة للفطريات تحول دون تكوين الجدار الخلوي عبر تثبيط إنزيم الكيتين سينثيتيز.

وأصبحت مثبطات امتصاص المعادن أيضاً مهمة. أحدها، ويدعى الديسفيرال، وهو حامل للحديد ينتج بواسطة إستربتوميسس بيلوسوس، وكان يستخدم في مرض تراكم الحديد (هيموكروماتوزيس) وتراكم الألمنيوم في مرضى الغسيل الكلوي [١٧٠].

(٢,٨,١) مثبطات المناعة Immunosuppressants

قادت مفاهيم أوميزاوا أيضاً إلى تطور مثبطات المناعة المهمة للغاية، مثل السيكلوسبورين، والتاكروليماس، والسيروليماس، وحمض الميكوفينوليك، والتي أحدثت ثورة في مجال زراعة الأعضاء. واكتشف السيكلوسبورين (المعروف بدايةً بالسيكلوسبورين أ) أصلاً كببتيد مضاد للفطريات محدود المدى وينتج بالفطر توليبوكلاديوم نيفيوم (سابقاً توليبوكلاديوم إنفلاتوم) [١٧١]. وأدى اكتشاف نشاطه المثبط للمناعة إلى استخدامه في زراعة القلب والكبد والكلى، وإلى النجاح منقطع النظير لمجال زراعة الأعضاء.

وعلى الرغم من أن السيكلوسبورين كان المنتج الوحيد في السوق لسنواتٍ عديدة، إلا أن منتجين آخرين من الأكتينوميسيتات قدما مزيداً من الفرص. وكانا السيروليماس (الراباميسين) والتاكروليماس (FK-506). وكان كلاً منهما عامل متعدد الكيتيدات مضاد للفطريات محدود المدى، وكانا ١٠٠-ضعف أكثر فعالية من السيكلوسبورين كمثبط للمناعة وأقل سمية.

واكتشف السيروليماس بواسطة مجموعة صغيرة من العلماء في مختبرات إيريست في مونتريال، كندا، تحت قيادة كلود فيزينا [١٧٢]. في عام ١٩٦٤م، سافرت بعثة علمية كندية إلى جزيرة الفصح (رابا نوي) في جنوب المحيط الهادئ لجمع عينات من التربة والنباتات. ولحسن الحظ، تبادلوا عينات التربة مع فريق إيريست، وفي عام ١٩٧٢م، عزل الفريق الأخير السيروليماس (وسمي الراباميسين في ذلك الوقت) من إستربتوميسس هيجروسكوبيكس. وأظهر هذا الجزيء الفريد نشاطاً قوياً ضد الخميرة الممرضة كانديدا ألبيكانس والخمائر الأخرى. وبسبب جهود سورين سيجال، فقد وجد لاحقاً أن له نشاطاً كمثبط للمناعة وكمضاد للسرطان [١٧٣]. وتم تسجيل براءة إختراع الراباميسين في عام ١٩٧٥م، ولكن بسبب عدم الاهتمام من الشركات، لم يتم تسويقه كعامل لتسهيل عمليات زرع الأعضاء حتى عام ١٩٩٩م. ولم يظهر السيروليماس سمية السيكلوسبورين والتاكروليماس على الكلى، وكان له نشاطاً تآزرياً مع كلٍ منهما في الفعل المثبط للمناعة. ووجد الدواء استخداماً جديداً في طب القلب عندما استخدم في نقع الدعامات القلبية بسبب أن الدعامات المنقوعة في السيروليماس كانت أقل عرضة للتكاثر والضيق الرجعي، والتي تحدث عادة بعد علاج مرض الشريان التاجي.

وقد ساعدت الاكتشافات في ١٩٩١-١٩٩٣م من قبل بايفا وزملاؤه [١٧٤-١٧٦]، والخاصة بالمرادفات التخليقية للسيروليماس (مثل: الخلات، البروبيونات، الميثونين، حمض البيبيكوليك، حمض الشيكيميك) على تطوير الإنتاج التخميري للسيروليماس وإنتاج نظائر جديدة من هذا الجزيء المتعدد القوة.

اكتشف التاكروليماس من قبل شركة فوجيساوا للأدوية (الآن أستيلاس) [١٧٧]، ولكن تم التخلي عنه تقريباً بعد أن أظهرت الدراسات الأولية على الحيوانات سمية مرتبطة بالجرعة. ومع ذلك، جرب الدكتور توماس

ستارزل من جامعة بيتسبرغ جرعات مخفضة، وذلك بعد أن أدرك أن مثبط المناعة كان ٣٠-١٠٠ مرة أكثر نشاطاً من السيكلوسبورين، والتي كانت فعالة للغاية وغير سامة، وعليه أنقذ الدواء وكثير من المرضى بعد ذلك، خصوصاً الذين لم يستجيبوا للسيكلوسبورين. ومنذ إدخاله عام ١٩٩٣م في اليابان و١٩٩٤م في الولايات المتحدة، استخدم التاكروليماس في زراعة الكبد، والكلى، والقلب، والبنكرياس، والرئة، والأمعاء، وفي منع مرض الدعامة-مقابل-العائل. وقد أظهر مستحضراً موضعياً نشاطاً قوياً ضد التهاب الجلد الإكزيمي وهو المرض الجلدي واسع الانتشار.

ويمتلك مضاد حيوي واسع المدى قديم جداً وهو حمض الميكوفينوليك تاريخاً مدهشاً. وكان بطل القصة المجهول هو الطبيب الإيطالي بارتولوميو جوسيو، الذي اكتشف المركب في عام ١٨٩٣م [١٧٨]. وعزل جوسيو فطر من الذرة الفاسدة، والذي أسماه البنسليوم جلاوكوم، والذي أعيد تصنيفه لاحقاً بنسليوم بريفيكومباكتوم. وعزل بلورات المركب من رشيح المزرعة في عام ١٨٩٦م ووجد أنها تمنع نمو بكتيريا الجمرة الخبيثة. وكانت هذه هي المرة الأولى التي تم فيها بلورة مضاداً حيوي، والمرة الأولى التي أظهر فيها مركباً نقياً نشاطاً مضاداً حيوياً. ودخل العمل في طي النسيان، ولكن لحسن الحظ تم إعادة اكتشاف المركب من قبل آلسبيرغ وبلاك في عام ١٩١٣م [١٧٩]، وأعطى الاسم حمض الميكوفينوليك. واستخدموا سلالة معزولة أصلاً من الذرة الفاسدة في إيطاليا تدعى البنسليوم ستولونيفيرم، مرادفة للبنسليوم بريفيكومباكتوم. وتم توضيح التركيب الكيميائي بعد سنوات عديدة من قبل رايستريك وزملاؤه في إنجلترا. ويمتلك حمض الميكوفينوليك نشاطاً ضد للفطريات، والفيروسات، والسرطان، ومرض الصدفية، وهم مثبط للمناعة. ولم يتم مطلقاً تسويقه بوصفه مضاداً حيوياً؛ بسبب سميته، ولكن تمت إجازة مركبه ٢-مورفلينو إيثيل أستر كمثبط مناعي جديد لعمليات زراعة الكلى في عام ١٩٩٥م وزراعة القلب في عام ١٩٩٨م. ويدعى إستر ميكوفينولات موفتيل (CellCept) وهو دواء مساعد والذي يتحلل لحمض الميكوفينوليك في الجسم.

(١,٨,٣) مضادات السرطان Antitumor Agents

أصبحت المنتجات الطبيعية هي الأدوية الكيميائية الرئيسة ضد السرطان. تم عزل السيتارابين (Cytostar®) المستخدم لعلاج الأورام اللمفاوية غير-الهودجكينية من الإسفنج [١٨٠]. وكانت معظم المركبات المهمة الأخرى المضادة للسرطان منتجات أيض ثانوية ميكروبية. وشملت الأكتينوميسين د، الميتوميسين، البليوميسين، والأنثراسيكلينات الداونوروبيسين والدوكسوروبيسين. وأعطى لحاء شجرة يي الباسيفيكية (تاكسوس بريفيفوليا) التاكسول (باكليتاكسيل)، مثبت الأنيبيبات الدقيقة، والذي اكتشفه وال ووااني [١٨١] وذو النشاط

الممتاز ضد سرطان الثدي والمبيض. وكان إنتاجه أيضاً من قبل الفطريات الداخلية المعزولة من نفس المصدر ذي أهمية خاصة [١٨٢]. وكان التاكسول هو الدواء الأول المضاد للسرطان والذي يعمل من خلال منع تحلل الأنيبيبات الدقيقة. وكان الكامباتوثيسين مركباً نباتياً آخر اكتشفه وال وواني واستخدم لمرضى السرطان [١٨١].

لعددٍ من السنوات، عمل العلماء على مفهوم "الرصاصة السحرية"، والذي يستخدم الأجسام المضادة أحادية النسيلة الخاصة بخلايا الأورام لجلب عوامل العلاج الكيميائي السامة جداً في اتصال حميم مع خلايا الورم، وعليه توفر طريقة محددة، ونأمل أن تكون آمنة، لقتل هذه الخلايا. وشملت المشكلات: التخصصية الأقل من المطلوب، والمضاعفات المناعية، والتغلغل الضعيف لمزيج الجسم المضاد أحادية النسيلة-السم في الخلايا السرطانية. ومع ذلك، كان الجمع بين الأجسام المضادة أحادية النسيلة مع عوامل العلاج الكيميائي واعداً. ففي التسعينيات، تم ربط الدواء المضاد للأورام، كالسيأميسين، السام المنتج ميكروبياً كمركب إينيدين إلى الأجسام المضادة أحادية النسيلة المؤنسنة، وتم الموافقة على استخدامها ضد سرطان الدم النخاعي الحاد (AML) [١٨٣]. وتم تصميم الجسم المضاد أحادي النسيلة لتوجيهه إلى مولد الجسم المضاد CD33، وهو بروتين يعبر في خلايا سرطان الدم النخاعية. وسمي المزيج الميلوتارج (أو جيمتوزوماب أوزوجاميسين). وأصبح منتجاً تسويقياً في مارس عام ٢٠٠١م.

(١,٨,٤) قلويدات الإرجوت Ergot Alkaloids

أدى الفحص الواسع إلى تطوير قلويدات الإرجوت لاستخدامات طبية مختلفة مثل انقباضات الرحم، وارتفاع ضغط الدم، الاضطرابات ذات الصلة بالسيروتونين، والصداع النصفي، وغيرها. كانت هذه القلويدات النباتية تنتج عادةً عن طريق الاستخلاص من الكتلة الصلبة من خيوط الأنواع المتطفلة لجنس الفطر كلافيسيبس. وفي وقتٍ لاحق، أصبحت هذه القلويدات منتجات فطرية للتخميرات التجارية بطريقة الزراعة المغمورة [١٨٤].

(١,٨,٥) المركبات الزراعية Agricultural Compounds

دفعت الجهود الجديدة في علم الصيدلة أيضاً أرباح الأسهم في الزراعة. وشملت المنتجات الجديدة مبيدات الأعشاب الحيوية، العوامل المضادة للطفيليات، ومبيدات الحشرات الحيوية، والعوامل المضادة للفطريات الزراعية، محفزات نمو النبات، والعوامل الإستروجينية الحيوانية.

وقد أثار الاستخدام الزراعي للمواد الكيميائية كمبيدات للأعشاب قلق الكثير من خبراء البيئة، حيث سجل أن الكثير من مبيدات الأعشاب الواسعة الاستخدام تسبب السرطان في الاختبارات الحيوانية طويلة المدى.

obeikandl.com

ولملء الفراغ، تم استخدام المضادات الحيوية كمبيدات للأعشاب الزراعية. ومنها البيالافوس (ن-{٤[هيدروكسي[ميثيل]فوسفينويل] هوموألانيل} ألانيل ألانين)، والذي كان نشطاً ضد أوراق الحشائش العريضة، وتم تطويره في اليابان عام ١٩٧٣م [١٨٥]. وقبل هذا بعام، تم اكتشاف هذا المنتج من إستربتوميسس فيريدوكروموجينز من قبل مجموعة زاهنر في ألمانيا، كمضاد حيوي واسع المدى فعال ضد البكتيريا وفطر البوتريتيس سينيرا [١٨٦]. وكان ناتج تحلله المائي، حمض دل-هوموألانين-٤-يل(ميثيل) فوسفينيك (دل-فوسفينوثريسين) مثبطاً لإنزيم الجلوتامين سينثيتيز، والمصنع بواسطة شركة هويكست كجلوفوسينات (باستا). وكانت سهولة تحليل البيالافوس في البيئة ذات أهمية كبيرة لخبراء البيئة، حيث إن فترة عمر-النصف له ساعتين فقط.

وتنتج الجيبريلينات، محفزات لنمو النبات، تجارياً بفطر الجيبيريلا فوجيكورووي، والطور الجرثومي لفطر الفيوزاريوم مولينيفورمي، وتستخدم كمنظمات نباتية وفي تخمير الشعير في عملية تخمير البيرة [١٨٧]. وهي تزيد عائد الخضروات وتسرع تطور النباتات ثنائية الحول.

وتعدُّ الكوكسيديا من الأمراض الاقتصادية الكبرى في الدواجن، وتسببها أنواع من البروتوزوا الطفيلية إيميريا. لسنواتٍ، كان هذا المرض يعالج فقط بالمواد الكيميائية المخلقة وبالفعل تم فحص المركبات المخلقة فقط للنشاط المضاد للكوكسيديا. وعلى الرغم من أنها كانت فعالة بشكل عام، إلا أن مقاومة الكوكسيديا قد تطورت، وتم السعي نحو تعديلات كيميائية جديدة لمضادات الكوكسيديا الموجودة. ومن المستغرب، أن مضاداً حيوياً سامة ومحدود المدى يؤخذ عن طريق الحقن، وهو المونينزين، كان له قوة هائلة ضد الكوكسيديا [١٨٨]. وقد سيطرت المضادات الحيوية عديدة الإيثير، وخصوصاً المونينزين (المنتج بواسطة إستربتوميسيس سينامونينزيس)، واللاسالوسيد (بواسطة إستربتوميسيس لاسالينزيس)، والسالينوميسين (المنتج بواسطة إستربتوميسيس ألباس)، على المجال التجاري لمضادات الكوكسيديا منذ ذلك الحين.

ويعدُّ اكتشاف الاستخدام الإضافي للمونينزين كمحفز للنمو في الحيوانات المجترة إضافة مثيرة للاهتمام. لسنوات، تم فحص المواد الكيميائية المخلقة للنشاط في وجبات الأبقار والأغنام للقضاء على الإنتاج الزائد للميثان ولزيادة تكوين الأحماض الدهنية الطيارة (خاصة البروبيونات) في الكرش، والتي من شأنها تحسين كفاءة استخدام الأعلاف. وعلى الرغم من أن المبدأ كان رناناً، فلم تظهر أي منتجات مفيدة. وأظهرت التجارب مع المونينزين أن المركبات عديدة الإيثير كان لها هذا النشاط وهي تستخدم الآن على نطاقٍ واسع [١٨٩].

الأفيرميكتين هو عامل آخر مضاد للطفيليات، والذي حل محل المنتجات المخلقة المستخدمة سابقاً مثل طاردات الطفيليات/ الإنديكتوسيدات. وأدى الفحص المباشر لمحاليل التخمير في الفئران ضد الديدان الخيطية إلى اكتشاف النشاط القوي للأفيرميكتينات ضد الطفيليات المسببة للأمراض في الحيوانات. وكان نشاط

الأفيرميكتينات طاردة الديدان أعلى من المركبات المخلقة المطورة سابقاً. وأنتجت مزرعة إستربتوميسس أفيرميتيليس، والتي عزلت من قبل يوكو تاكاهاشي وساتوشي أومورا وزملائهم في معهد كيتاساتو في اليابان (الموصوفة في [١٩٠])، عائلة من نواتج الأيض الثانوية لها نشاط طارد للديدان ومضاد للحشرات، والتي تم تسميتها "بالأفيرميكتينات"، وتم تطويرها بواسطة شركة ميرك في الولايات المتحدة [١٩١]. وهي مشتقات ثنائية السكر من اللاكتونات كبيرة الحلقات ذات نشاط إستثنائي ضد الطفيليات، على الأقل ١٠ مرات أعلى من أي عامل مخلق معروف طارد الديدان. وعلى الرغم من بنيتها الماكروليدية (كبيرة الحلقات)، فليس للأفيرميكتينات نشاط مضاد ضد البكتيريا والفطريات، ولا تمنع تخليق البروتين، وليست أيونوفورات، وبدلاً من ذلك فهي تتداخل مع النقل العصبي في الكثير من اللافقاريات. وكان نشاط الأفيرميكتينات ضد كلٍ من الديدان الخيطية والطفيليات المفصلية في الأغنام، والأبقار، والكلاب، والخيول ١٠٠٠ مرة أعلى من نشاط المركبات المخلقة المستخدمة سابقاً، الثيوبنزول. وقد تم تأسيس مشتق شبه مخلق، إيفيرميكتين، كمنتج بيطري تجاري.

وكان من تداعيات الحظ من العمل مع الأفيرميكتين أن تم اكتشاف نشاط الإيفيرميكتين ضد الذبابة السوداء ناقلة مرض "العمى النهري الإنساني" [١٩٢]. فهو يتداخل مع انتقال ديدان الفيلاريا الخيطية، أونكوسيرا فولفولوس، إلى التجمعات البشرية. وحيث إن ٤٠ مليون شخص أصيبوا بهذا المرض، فقد استقبل قرار شركة ميرك في الثمانينيات بتوريد الإيفيرميكتين مجاناً لمنظمة الصحة العالمية لاستخدامها في معالجة البشر في المناطق الاستوائية بحماسٍ كبير مع الأمل لقهر هذا المرض الطفيلي. والإيفيرميكتين فعال أيضاً في داء الطفيليات الأسطوانية الذي يصيب البشر في آسيا.

واكتشفت عائلة من المبيدات الحيوية للحشرات تدعى سبينوسينس في شركة إيلي ليللي وتم تسويقها من قبل شركة داو للعلوم الزراعية [١٩٣]. وكانت ماكروليدات رباعية الحلقة غير سامة، غير مضادة للبكتيريا، صديقة للبيئة، والتي تنتجها سكاروبولي سبورا سبينوزا، ذات نشاط ضد الحشرات من أوامر مغمدات الأجنحة، ذوات الجناحين، غشائية الأجنحة، متساوية الأجنحة، قشرية الأجنحة، عديمة الأجنحة، ومهدبة الأجنحة.

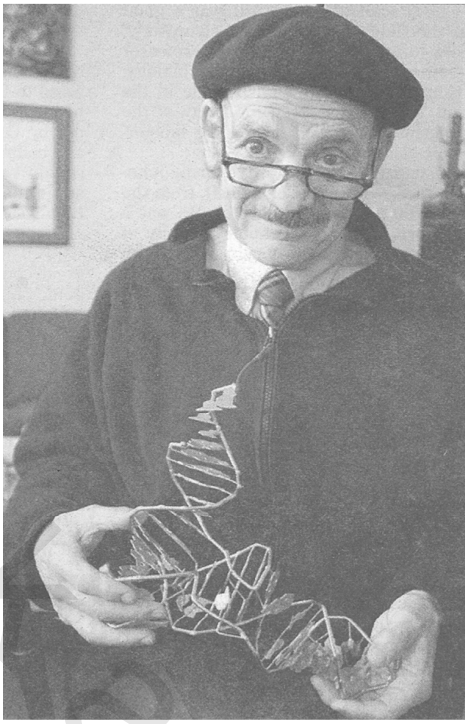
وكان مبيد حشري حيوي آخر مهم هو جزيء كبير غير مضاد للبكتيريا، البروتين المتبلور لبكتيريا باسيلوس ثورينجينسيس. وقد درست السمية الانتقائية لهذا البروتين (دلتا-إندوتوكسين، سم BT) ضد الحشرات قشرية الأجنحة بنجاح في الزراعة، وتعني الانتقائية العالية لسميته تجاه هذا الحشرات أنه لا يضر بالبيئة، وقد تطورت مقاومة قليلة له على مر السنين. وتشمل المنتجات الزراعية التجارية الأخرى النيكوميسين، مجموعة مضادات الفطريات الزراعية المعروفة باسم البولي أوكسينات، والعامل الإستروجيني الحيواني الزياريلانون.

obeikandi.com

(١,٩) الثورة الصيدلانية الحيوية The Biopharmaceutical Revolution

تعدُّ النتائج التي توصل إليها جريجور مندل في منتصف القرن التاسع عشر في وراثة صفات البازلاء من المعالم الرئيسة في علم الوراثة. في عام ١٩٤٤م، اكتشف أفيري، ماككلاود، ومكارتي في معهد روكفلر أن الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي (DNA) هو المادة الوراثية، وكان هذا اكتشافاً كبيراً. بعد ذلك بعامين، اكتشف ليدربيرج وتاتوم الجنس في البكتيريا. واندلعت الثورة في مجال التقنية الحيوية من خلال اكتشاف ١٩٥٣م عن التركيب ثنائي الخيط للحمض النووي من جانب واطسون وكريك (الشكل رقم ١١ , ١). ويعدُّ استخدام الكائنات الحية الدقيقة ومضاداتها الحيوية كأدوات للبحوث الأساسية هو المسؤول الأساسي عن التقدم الملحوظ في مجال البيولوجيا الجزيئية وعلم الوراثة الجزيئية. ولم تأت ثورة التقنية الحيوية فوراً، ولكنتها تطلبت نحو ١٥ عاماً لكي تتم الاكتشافات الأساسية الإضافية من قبل الآخرين في مجال البيولوجيا الجزيئية/ علم الوراثة. ففي عام ١٩٥٦م، سجل ألكسندر ريتش (الشكل رقم ١٢ , ١) وديفيد ديفيس أن جزيئين إثنين من الحمض النووي الريبوزي (RNA) أحادي الخيط يمكن لهما أن ينتظما بشكل مفاجئ لتشكيل اللولب المزدوج. وعلى الرغم من أنه قد تم التشكيك في هذا من قبل آخرين، فقد أدى اللولب المزدوج من الـ RNA، بعد ٤٠ عاماً، إلى اكتشاف الأحماض النووية الريبوزية الدقيقة وتداخل الحمض النووي الريبوزي. وتلقى بيدل وتاتوم جائزة نوبل في عام ١٩٥٨م لتوضيح العلاقة بين الجينات والإنزيمات. بعد ثلاث سنوات، اكتشف مونود وجاكوب تنظيم التعبير الجيني، وفي ١٩٦٢م، وصف سميث وأربور الإنزيمات الداخلية المحللة للنيوكلوتيدات (إندونيكليزيس).

الشكل رقم (١١ , ١). جيمس واطسون وفرانسيس كريج.

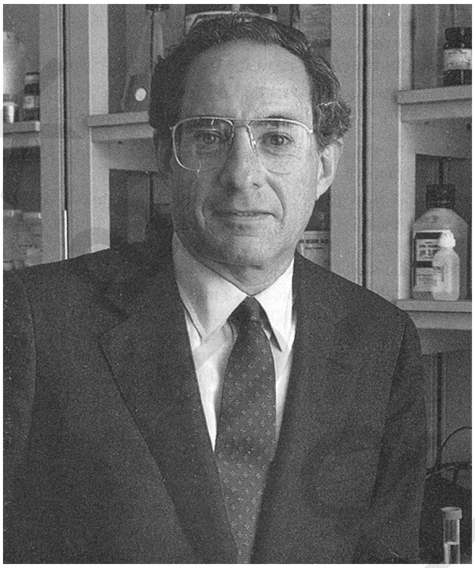


الشكل رقم (١٢, ١). ألكسندر ريتش.

وكان العام ١٩٦٦م مهماً جداً، حيث تم خلاله فك رموز الشفرة الوراثية بواسطة نيرينبيرج، وماتهاي، وليدر، وكورانا، وأوتشوا. وعزل شابيرو وبيكويز جين في عام ١٩٦٩م، وخلق كورانا كيمائياً جيناً في عام ١٩٧٠م. حتى هذه النقطة، تم الاعتراف بأن التعديل الجيني يحدث فقط بين الكائنات الحية من نفس النوع أو الأنواع ذات الصلة الوثيقة. حتى في المختبرات، كان إدماج البروتوبلاست مقتصراً على الأنواع ذات الصلة وراثياً. جميع الكائنات لها إنزيمات إندونيكليزات تتعرف على الحمض النووي الخارجي وتدمره، وبالتالي لن يحدث "تعديل غير شرعي".

ثم في ١٩٧٢-١٩٧٣م، دشن تطوير الحمض النووي الريبوزي المعدل بواسطة بيرغ، وكوهين، وبوير في جامعة ستانفورد وجامعة كاليفورنيا، بسان فرانسيسكو، ولادة التقنية الحيوية الحديثة [١٩٤]. واكتشف هؤلاء الباحثون كيفية استخدام إنزيمات التقييد لقطع جزيئات الحمض النووي، وكيفية استخدام إنزيم آخر وهو الإنزيم اللاحم للحمض النووي، لإضافة جزيئات الحمض النووي من الكائنات الحية المختلفة، وكيفية إدخال الحمض النووي الريبوزي المعدل عبر وسيلة ما (مثل البلازميد، والفيروس البكتيري: الفاج) في بكتيريا الإيشيريشيا كولاي. وحددوا هكذا طبيعة إجراء التعديل الوراثي عبر حواجز الأنواع المختلفة. ودفع هذا التقنية الحيوية إلى آفاقٍ جديدة وأدى إلى إنشاء صناعة صيدلانية حيوية جديدة في الولايات المتحدة وحول العالم.

ولم يحدث استغلال للاكتشافات الثورية البيولوجية الأساسية، والتي بدأت في عام ١٩٧١م، من فراغ، وإنما اعتمد اعتماداً كبيراً على البنية الصلبة لصناعة التخمير. في ذلك الوقت، تنبأ طبيب (بيتر فارلي)، وكيميائي حيوي (رونالد كاب، الشكل رقم ١٣ , ١)، والفيزيائي الحائز على جائزة نوبل (دونالد جلاسر)، مع عدة أشخاص آخرين، بتسويق تقنية الحمض النووي الريبوزي المعدل تجارياً، وأنشئوا شركة سيتاس في بيركلي، كاليفورنيا، في عام ١٩٧١م. وهكذا بدأت واحدة من المغامرات الأكثر إثارة في تاريخ التقنية الحيوية الصناعية. وقادت هذه الرؤية من قبل مؤسسي سيتاس إلى إنشاء صناعة تقنية حيوية رئيسة، لخدمة احتياجات المرضى في جميع أنحاء العالم، وإحداث ثورة في علم الميكروبيولوجيا الصناعية.



الشكل رقم (١٣ , ١). رونالد كاب.

تم تأسيس ثاني شركة للتقنية الحيوية في عام ١٩٧٦م، عبر الخليج من سيتاس في جنوب سان فرانسيسكو، عن طريق هربرت بوير، وروبرت وسوانسون. في ذلك العام نفسه، تم تعبير جين بشري في البكتيريا، وتم تكرار وتعبير الحمض النووي للخميرة. بحلول عام ١٩٧٨م، طورت شركة جينينتيك الأنسولين البشري ومنشط بلازمينوجين الأنسجة (tPA). أيضاً في عام ١٩٧٨م، تم إدخال الحمض النووي البكتيري بنجاح في كروموسومات الخميرة وتم تأسيس شركة بيوجين في كامبريدج، ماساشوستس. وفي عام ١٩٧٩م، تم تحويل برتوبلاست الخميرة بواسطة هجين بلازميدي من إيشيريشيا القولون/ الخميرة. وتأسست شركة أمجين في جنوب كاليفورنيا عام ١٩٨٠م، وهو العام نفسه الذي وضعت فيه المحكمة العليا الأميركية قاعدة بارزة، مفيدة أن الكائنات الحية يمكن تسجيلها كبراءة اختراع. ويستند ذلك على عمل أناندا شاكرابارتي.

في عام ١٩٨١م، تم تأسيس معهد علم الوراثة، وشركتي تشيرون وجنزايم، ووافقت هيئة الغذاء والدواء على أول عدة تشخيصية للتعديل الوراثي. وفي عام ١٩٨٢م، أصبح الأنسولين البشري المعدل جاهزاً للتسويق كمسعى من جينينتيك/ إيلي ليللي. وسرعان ما تبعه منتجات أخرى: هرمون النمو البشري في عام ١٩٨٣م؛ ألفا-انترفيرون، ولقاح التهاب الكبد بي المعدل في عام ١٩٨٦م؛ منشط بلازمينوجين الأنسجة (tPA) في عام ١٩٨٧م؛ إرثروبويتين (EPO) في عام ١٩٨٩م؛ العامل المحفز للمستعمرة المحببة (G-CSF) في عام ١٩٩١م؛ عامل ثمانية (Factor VIII) في ١٩٩٢م؛ وبيتا-انترفيرون في عام ١٩٩٣م.

وعلى الرغم من أن سيتاس لم تعد موجودة كشركة مستقلة الكيان، بعد أن تم دمجها في شركة تشيرون في عام ١٩٩١م، إلا أنه ينبغي تذكرها لوقتٍ طويل كمؤسس للتقنية الحيوية الحديثة والمطور لتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في عام ١٩٨٥م، وهي تقنية ذات أهمية هائلة اليوم. وفي الواقع، حصل الباحث الرئيس لتقنية الـ PCR، كاري موليس، على جائزة نوبل الوحيدة (منح في عام ١٩٩٣م) التي أعطيت لعالم لعمله في صناعة التقنية الحيوية.

منذ ذلك الحين، تم تأسيس الآلاف من الشركات، بما في ذلك إيمونيكس، وسينتوكور، وميدإيميون، ...إلخ. واستثمر كثير منها في مجال التقنية الحيوية الحديثة مع عدم وجود فكرة واضحة عن المستقبل ولكن مع الإيمان بأن علم الوراثة من شأنه أن يؤدي إلى منتجات لا يمكن حتى تصورها في ذلك الوقت؛ وبالفعل تحقق هذا الحلم بشكلٍ كبير. وأدى هذا إلى انفجار في نشاط الاستثمار في الشركات الجديدة المخصصة أساساً للابتكار من خلال النهج الوراثية. ودخلت شركات أحدث المشهد من مفاهيم مختلفة مثل الهندسة الميكروبيولوجية والمعاملة النهائية.

بحلول عام ١٩٨٨م، كان هناك حوالي ٤٤٠ شركة للتقنية الحيوية و٧٠ شركة كبيرة دوائية، وكيميائية، وشركات للطاقة في الولايات المتحدة، تكرس كل أو جزء من مواردها للتقنية الحيوية. في عام ١٩٩٣م، خدم الميدان المجالات التالية: ٤١٪ الأدوية، والتشخيص ٢٧٪، والمستلزمات ١٥٪، والزراعة ٩٪، والمجالات الكيميائية والبيئية والخدمات بنسبة ٨٪. وارتفع عدد الشركات الأميركية إلى نحو ١٥٠٠ بحلول عام ٢٠٠٣م. وكان عدد موظفي الولايات المتحدة ١٩١٠٠٠ في عام ٢٠٠٢م. ووصل الإنفاق على مجال البحث والتطوير في التقنية الحيوية في الولايات المتحدة عام ٢٠٠٠م إلى ٢١ مليار دولار وكانت الإيرادات ٣٦ مليار دولار.

وتم تأسيس عدد كبير من شركات وأقسام التقنية الحيوية في الشركات الكبرى في أوروبا وآسيا. وبلغ السوق العالمي لمنتجات الحمض النووي المعدل في ٢٠٠٥م حوالي ٤٣ مليار دولار. واليوم، تمتلك الشركات الصيدلانية الكبيرة أجزاءً كبيرة في بعض هذه الشركات، وبلغت العائدات الصيدلانية أكثر من ٦٠ مليار دولار أمريكي.

وتعامل السوق الصيدلاني للحمض النووي المعدل مع أربعة مجالات رئيسة هي: (١) منتجات الدم (محللات الجلطات، إنزيمات الديسميوتيز، أدوية الصدمة الإنتانية، عوامل تخثر الدم، الإرثروبويتين)؛ (٢) منتجات العلاج المناعي (ألفا-، بيتا-، جاما-إنترفيرون، الإنترلوكينات، العوامل المحفزة للمستعمرة)؛ (٣) مقاتلي الأمراض المعدية (لقاح التهاب الكبد بي، لقاح الإيدز)؛ (٤) عوامل النمو للخلايا الثديية (عامل نمو الخلايا الجلدية، عوامل النمو شبيهة الإنسولين، وعوامل نمو الخلايا الليفية، وعوامل النمو المحولة، وعامل النمو المستمد من الصفائح الدموية، عامل إفراز هرمون النمو، مستحلبات الرئة، وعامل الموت الموضعي للورم).

وحققت التقنية الحيوية الكثير من الفوائد للمجتمع [١٩٥]. (١) لم يعد على مرضى السكر أن يخشوا من إنتاج أجسام مضادة للأنسولين الحيواني. (٢) لا يعاني الأطفال المفتقرين إلى هرمون النمو من التقزم أو الخوف من خطر الإصابة بمتلازمة كروتزفيلد-جاكوب. (٣) أصبح الأطفال الذين لديهم مرض الورم الحبيبي المزمن قادرين على التمتع بحياة طبيعية عن طريق أخذ جاما-انترفيرون كعلاج. (٤) يتعافى المرضى الذين يخضعون للعلاج الكيميائي لمرض السرطان أو العلاج الإشعاعي بسرعة أكبر مع عدد أقل من حالات العدوى عند استخدامهم العامل المحفز للمستعمرة المحببة (G-CSF).

ويمكن ملاحظة نجاح الثورة الصيدلانية البيولوجية في البيانات التالية. بين عامي ١٩٩٧- ٢٠٠٢م، جاء ٤٠٪ من الأدوية التي أدخلت في الممارسة الطبية من شركات التقنية الحيوية. رخصت أكبر خمس شركات للأدوية من ٦ إلى ١٠ منتجات من التقنية الحيوية أو الشركات الصيدلانية المتخصصة، مما أعطي ٢٨-٨٠٪ من عائداتها. تم إجازة إثنين من الأدوية/ اللقاحات لصناعة التقنية الحيوية في عام ١٩٨٢م، لا شيء في ١٩٨٣/ ١٩٨٤م، واحد في عام ١٩٨٥م، و٣٢ في عام ٢٠٠٠م! وارتفع عدد براءات الاختراع الممنوحة لشركات التقنية الحيوية من ١٥٠٠ في عام ١٩٨٥م إلى ٩٠٠٠ عام ١٩٩٩م. وفيما يلي نناقش أهم منتجات الصناعة الصيدلانية البيولوجية.

(١, ٩, ١) الإنسولين البشري (نوفولين، هومولين) Human Insulin (Novolin, Humulin)

سوف يتم دائماً تذكر الأنسولين البشري على أنه المنتج الذي دشن الصناعة الصيدلانية البيولوجية. وتم تطوير الأنسولين البشري، أول بروتين معدل أنتج ووافقت عليها هيئة الغذاء والدواء، بواسطة شركة جينينتيك في عام ١٩٧٩م وتم إنتاجه صناعياً في عام ١٩٨٢م من قبل شركة ايلي ليللي. وتطلبت العملية سابقاً الاستخلاص من بنكرياس الماشية والخنازير الميتة، ولم يكن المنتج مطابقاً للأنسولين البشري. وعلاوةً على ذلك، تحتوي المنتجات الحيوانية على شوائب تسبب الحساسية. وتم حل كل هذه المشكلات بالأنسولين البشري المعدل.

(١,٩,٢) الإرثروبوتين (إيبوجين، بروكريت) Erythropoietin (Epogen, Procrit)

الإرثروبويتين (EPO) هو عامل نخاع العظم يستخدم لعلاج إختلال الكلى الوظيفي وعلاج الفشل الكلوي المزمن في مرضى العلاج الكيميائي الذين يستخدمون غسيل الكلى. وهو يعمل على تحسين أنواع معينة من فقر الدم من خلال تحفيز إنتاج وتمايز خلايا الدم الحمراء. ودخل المنتج مرحلة التجارب السريرية في عام ١٩٨٥م وتمت الموافقة عليه في عام ١٩٨٩م. كما أنه أيضاً مفيد لفقر الدم الناجم عن العلاج بالأزيدوثيميدين للإيدز، والعلاج الكيميائي للسرطان. كما يعطى أيضاً للمرضى الذين يريدون استخدام دمائهم الخاصة بدلاً من دماء الآخرين.

(١,٩,٣) الإنترفيرونات Interferons

تم التصريح باستخدام ألفا-إنترفيرون (إنترون-أ، ريفيرون) من قبل هيئة الغذاء والدواء ضد ورم كابوزي الخبيث، وسرطان الدم النخاعي المزمن، والثآليل التناسلية، وسرطان الدم شعري الخلية. وأصبح مفيداً في العلاج المضاد للفيروسات. بحلول عام ١٩٩٢م، تمت الموافقة على استخدامه لعلاج التهاب الكبد بي و سي. وتم التصريح باستخدام بيتا-إنترفيرون ("بيتاسيرون"، إنترفيرونبيتا-١أ المعدل، أفونيكس) من قبل هيئة الغذاء والدواء لعلاج مرض التصلب المتعدد في عام ١٩٩٣م وجاما-انترفيرون في عام ١٩٩٠م لعلاج مرض الورم الحبيبي المزمن.

(١,٩,٤) هرمون النمو البشري (سوماتوتروبين، سوماتروبين؛ هوماتروبين، نوتروبين، بروتروبين، سوماترين، سيروستيم)

Human Growth Hormone (Somatotropin, Somatropin; Humatrope, Nutropin, Protropin, Somatren, Serostim)

كان إنتاج هرمون النمو البشري (hGH)، والذي تم تطبيقه فورياً في علاج الأطفال صغار الحجم غير الطبيعين، محاولةً مبكرةً لمنظمة جينينتيك. حتى عام ١٩٨٤م، تم إنتاج هرمون النمو البشري من الغدد النخامية للجثث البشرية. وكان هذا مكلفاً جداً، وفي بعض الحالات، تلوثت المادة بفيروس كروتزفيلد-جاكوب، مما أدى إلى الوفاة. ومنذ ذلك الحين، تم استبدال المادة النخامية بهرمون النمو البشري المعدل، مما قضى على هذه المشكلة. وعلى الرغم من أن هرمون النمو البشري تمت إجازته أصلاً لعلاج قصر القامة فقط، إلا أنه تمت إجازته لاحقاً لعلاج أحد عشر مرضاً؛ ويباع الكثير منه للحروق وكمنتج مضاد للشيخوخة.

(١,٩,٥) منشط بلازمينوجين الأنسجة (أكتيفيز، ألتيبليز)

Tissue Plasminogen Activator (Activase, Alteplase)

يذيب منشط بلازمينوجين الأنسجة (tPA) جلطات الدم في الشرايين التاجية البشرية، ويوصف للوقف السريع للنوبات القلبية (احتشاء عضلة القلب الحاد)، وجلطة الأوردة العميقة، والجلطة الرئوية، والسكتة

obeikandl.com

الدماغية. وتم إدخاله إلى السوق في أواخر عام ١٩٨٧م. وتم توسيع استخدامه لمرضى السكتة الدماغية في عام ١٩٩٦م.

(١,٩,٦) الإنترلوكينات Interleukins

أظهر الإنترلوكين-٢ (برولوكين، IL-2) نشاطاً ضد سرطان خلايا الكلى، وتمت الموافقة عليه في ١٩٩٢م. وفي أوائل عام ١٩٩٨م وافقت هيئة الغذاء والدواء على إنترلوكين ١١ المعدل، نوميجا (IL-11, Neumega) لعلاج الثرومبوسيتوبينيا المرتبط بالعلاج الكيماوي للسرطان (أي انخفاض عدد الصفائح الدموية)، وذلك بسبب قدرته على تحفيز تكوين الصفائح الدموية.

(١,٩,٧) العامل ثمانية Factor VIII

يتلقى مرضى سيلان الدم تقليدياً منتجات تخثر الدم المشتقة من البلازما البشرية لتصحيح نقص الدم لديهم من عامل تخثر الدم، بروتين العامل ثمانية. وللأسف فقد أصبح ٦٠٪ من هؤلاء المرضى مصابين بفيروس نقص المناعة، أو التهاب الكبد أو الأمراض الأخرى التي تلوث فيروساتها هذه المنتجات. بدأت التجارب السريرية في عام ١٩٨٩م على العامل ثمانية المعدل لاستخدامه في سيلان الدم. وافقت هيئة الغذاء والدواء على المنتج في عام ١٩٩٣م.

(١,٩,٨) العوامل المحفزة للمستعمرة Colony-Stimulating Factors

إن العوامل المحفزة للمستعمرة هي عوامل نخاع العظم التي تستخدم لعلاج إختلال الكلى الوظيفي ومرضى العلاج الكيميائي. وتمت الموافقة على العامل المحفز للمستعمرة المحببة (G-CSF؛ نويبوجين، فيلجراستين، لوكين) في عام ١٩٩١م لعلاج نقص خلايا الدم البيضاء الناتج من العلاج الكيميائي (نويتروبينيا). كما تمت الموافقة عام ١٩٩١م أيضاً على العامل المحفز للمستعمرة المحببة الماكروفاجي (GM-CSF) لتحفيز نمو خلايا الدم البيضاء في زراعات نقل نخاع العظم الذاتية.

(١,٩,٩) إنزيم الدناز البشري (بالموزايم) Human DNase (Pulmozyme)

وافقت هيئة الغذاء والدواء عام ١٩٩٤م على الدناز البشري للتليف الكيسي (CF). وكان أول دواء جديد في ٣٠ عاماً لعلاج التليف الكيسي، وهو المرض الذي يصيب ٣٠٠٠٠ شخص في الولايات المتحدة. وفي التجارب السريرية أظهر الدناز أيضاً فعالية في الالتهاب الشعبي المزمن، وهو المرض الذي يصيب ٢ مليون شخص في الولايات المتحدة.

(١٠, ٩, ١) إنزيم الجلوكوسيريبروسيديز (سيريزيم) Glucocerebrosidase (Cerezyme)

تـمت الموافقة علـى الجلوكوسيريبروسيديز في عام ١٩٩٤م لمرض غوشيه الوراثي (Gaucher's disease). ولا يستطيع المرضى الذين يفتقرون إلى هذا الإنزيم منع تراكم الدهون في الأجهزة الحيوية والعظام.

(١١, ٩, ١) الأجسام المضادة أحادية النسيلة Monoclonal Antibodies

تم اكتشاف الأجسام المضادة أحادية النسيلة (mAbs) من قبل جورج كولتر وميلشتاين سيزار في المملكة المتحدة في عام ١٩٧٥م [١٩٦]، حيث دمجوا خلية سرطان جلد للفأر ("المايلوما") مع خلية دم بيضاء منتجة للأجسام المضادة. كانت النتيجة خلية هجينة ("الهايبريدوما، ورم هجين") والتي أنتجت أجسام مضادة متخصصة نقية. ومنح عالما المناعة جائزة نوبل في عام ١٩٨٤م. سابقاً، استخدمت الأجسام المضادة متعددة النسائل (pAbs)، ولكنها كانت تحتوي على تخصصيات وإنجذابيات متباينة وكانت متغيرة جداً. وكانت تنتج من قبل النظام المناعي الكلي للحيوان، في حين أن الأجسام المضادة أحادية النسيلة تنتج من قبل خلايا مفردة من الجهاز المناعي.

ولإنتاج الأجسام المضادة أحادية النسيلة، تم تلقيح الفئران بمولد أجسام مضادة مفرد، مما يسمح بإظهار رد فعل مناعي، ويتم إزالة طحال الفئران، واستخلاص الخلايا، ودمجها مع خلايا من الخط الخلوي لسرطان الغدد الليمفاوية (خلايا سرطانية خالدة). ثم يتم استنساخ خلايا "الهايبريدوما" المدمجة وتفرز لعزل هذه خلايا الهايبريدوما التي تفرز الجسم المضاد المحدد المطلوب. وحيث إن جسم الإنسان يمكن أن يتفاعل بطريقة غير مرغوبة لتسلسلات الفأر الجينية، فقد تمت "أنسنة" الأجسام المضادة أحادية النسيلة بواسطة تقنيات الهندسة الوراثية. وكانت الفئران معدلة وراثياً بحيث إن الجينات البشرية المشفرة للسلاسل البشرية الثقيلة وسلسلة كابا البشرية الخفيفة استبدلت جينات الفأر ذات الصلة، والتي تم نبذها. ويمكن تكوين أحاديات النسيلة أيضاً في الخلايا المناعية البشرية. وكانت تستخدم لربط أو منع ارتباط البروتين المستهدف كـ"رصاصة سحرية"، والتي يتم فيها جلب الدواء أو النظير المشع إلى هدف معين.

بعد عام ٢٠٠٠م، أصبحت mAbS فئة البروتينات العلاجية الأسرع نمواً، ووصلت إلى سوق من ٦,٨ مليار دولار في عام ٢٠٠٦م. وكان الريوبرو (ReoPro) أول جسم مضاد أحادي النسيلة علاجي ناجح، حيث تم التصريح به عام ١٩٩٤م لمنع تجمع الصفائح الدموية (تخثر الدم). ومنع بنجاح مضاعفات القسطرة مثل الموت، والنوبة القلبية، والحاجة إلـى تكرار القسطرة. وتبع ذلك أربعـة أجسام مضادة أحادية النسيلة في عام ١٩٩٨م: (١) إنفليكسيماب (ريميكيد) المثبط لعامل الموت الموضعي للورم (TNF) والذي صرح به لعلاج مرض كرون (Crohn's disease) وأيضاً لالتهاب المفاصل الروماتويدي؛ (٢) بازيليكسيماب (سيموليكت) الـمستخدم مع

السيكلوسبورين والكورتيكوسترويدات للوقاية من رفض الأعضاء الحاد في مرضى زراعة الكلى؛ (٣) تراستوزوماب (هيرسيبتين) استهدف الجين الورمي لبروتين مستقبلات عامل النمو HER2 الجلدي، واستخدم لعلاج سرطان الثدي المتأخر في ٢٥-٣٠٪ من النساء المصابات بهذا المرض واللاتي تعبر أورامها الـ HER2 بإفراط؛ (٤) باليفيزوماب (سيناجيس، MEDI-493) للوقاية من أمراض الجهاز التنفسي السفلي نتيجة فيروس المخلوي التنفسي. وكان هذا أول جسم مضاد أحادي النسيلة ضد الأمراض المعدية، واستخدم لوقف الفيروس المخلوي التنفسي (RSV) الذي يؤدي إلى أمراض خطيرة بالجهاز التنفسي السفلي في الأطفال المرضى. وقد تم التصريح باستخدام أداليموماب (هوميرا) في عام ٢٠٠٣م لالتهاب المفاصل الروماتويدي. واستخدم أحادي نسيلة آخر مهم جداً، وهو الريتوكسيماب (الريتوكسان)، في علاج الأورام اللمفاوية الغير-هودجكينية.

(١٢ , ٩ , ١) مستحضرات صيدلانية بيولوجية إضافية Additional Biopharmaceuticals

تشمل المنتجات المهمة الأخرى: (١) الإيتانرسيبت (إينبريل)، المصرح به في عام ١٩٩٨م لالتهاب المفاصل الروماتويدي عبر ارتباطه وتثبيطه للـ TNF، وهو بروتين يشارك في الالتهاب؛ و(٢) الإيماتينيب (جيليفيك، جليفيك)، وهو فعال ضد سرطان الدم النقوي المزمن (CML). وهو مرض يسببه تغيير وراثي في المكان بين الصبغيات ٩ و٢٢، مولداً بروتيناً غير طبيعياً، Brc-Ab1، والذي يسبب تكاثر غير منتظم لخلايا الدم البيضاء مما يؤدي إلى سرطان الدم. ويمنع الإيماتينيب عملBrc-Ab1 وهو أيضاً فعال ضد الأورام اللحمية المعدية المعوية (GIST).

(١٠ , ١) العوائل المعدلة وراثياً Recombinant Hosts

وصلت تخميرات الكائنات الدقيقة عالية الكثافة من الخلايا إلى مستويات من ٢٣٣ جرام وزن خلية جاف/ لتر بالنسبة للبكتيريا و٢٦٨ جرام وزن خلية جاف/ لتر بالنسبة للخمائر [١٩٧]. ويتم إنتاج البروتينات الكثيرة الثديية في هذه الميكروبات بمستويات تصل إلى ٧٠٪ من بروتين الخلية وتركيزات مرتفعة تصل إلى ١٥ جم/ لتر.

(١ , ١٠ , ١) إيشيريشيا القولون (إيشيريشيا كولاي) *E. coli*

كانت إيشيريشيا القولون (إيشيريشيا كولاي) أول نظام بكتيري أكثر شعبية لإنتاج البروتينات المعدلة. في وقت مبكر من حقبة المستحضرات الصيدلانية البيولوجية تبين أن نفس كميات الملليجرامات من البروتينيات الثديية التي يجري إنتاجها في بضعة لترات من محاليل إيشيريشيا القولون المعدلة كان لابد سابقاً أن تستخرج من أنسجة المخ لنصف مليون خروف. وشملت فوائد إيشيريشيا القولون كعائل معدل بالإضافة إلى الكثافة العالية

لنمو الخلايا والإنتاجية المرتفعة ما يلي: (١) كان من السهل تعديل الجينوم بسرعة وبدقة؛ (٢) كان النمو سريعاً؛ (٣) كانت ظروف النمو بسيطة؛ (٤) تم تخفيض نشاط إنزيم البروتييز بسهولة؛ (٥) أمكن تجنب إدراج نظائر الأحماض الأمينية؛ (٦) سهولة التحكم في البادئ؛ (٧) يمكن تغيير عدد نسخ البلازميد بسهولة؛ (٨) لم يكن تغيير تدفق كربون الأيض مشكلة؛ (٩) سهولة تكوين الروابط ثنائية الكبريت داخل الخلايا؛ (١٠) بلغ تراكم البروتينات غير المتماثلة نحو ٥٠٪ من وزن الخلية الجاف؛ (١١) إمكانية البقاء على قيد الحياة في مجالٍ واسع من الظروف البيئية؛ (١٢) لم تكن هناك حاجة لمكونات بيئية مكلفة؛ و(١٣) إمكانية الحصول على نفس النتائج خصوصاً مع التحكم عن طريق الحاسب الآلي [١٩٥].

وكانت إحدى مشكلات إيشيريشيا القولون هي تكوين البروتينات غير المتشابهة في شكل أجسام مشتملة. وبهذه الطريقة، كانت البروتينات المعدلة غير نشطة، ومتجمعة، وغير قابلة للذوبان، وتحتوي عادة على روابط غير أصلية ثنائية الكبريت داخل الجزيئات وبين الجزئيات، وجزئيات سيستايين حرة بصورة غير عادية. ولإنتاج البروتين النشط فإنه يجب إزالة هذه الأجسام من الخلية بعملية التجانس، والغسيل، والطرد المركزي، ثم الإذابة بواسطة مغيرات الطبيعة (مثل حمض الهيدروكلوريك-جوانيدين، اليوريا وسلفات الصوديوم دوديسيل) التي تكشف البروتين، ثم المعاملة بالعوامل المختزلة التي تكسر الروابط ثنائية الكبريت. ثم، إعادة طي البروتين بإزالة مغيرات الطبيعة والعامل المختزل. وعمليات إعادة الطبيعة المستخدمة كانت (١) الأكسدة بالهواء، (٢) نظام إعادة الأكسدة بالجلوتاثيون، و(٣) خليط ثنائي الكبريت من نظامي بروتين-كبريت-سلفونات والبروتين-كبريت-جلوتاثيون. وتم أيضاً إنتاج البروتينات المعدلة في صورة بيولوجية نشطة قابلة للذوبان عند مستويات عالية بإدماج جيناتها إلى جين الثيوريدوكسين في إيشيريشيا القولون. وتم إنتاج بروتينات بشرية كثيرة على مستويات من ٥-٢٠٪ من مجموع البروتينات كمدمجات في سيتوبلازم إيشيريشيا القولون. واحتفظت بعض المدمجات بخصائص الثيوريدوكسين التي منها (١) يتم إفرازه بالصدمة التناضحية أو طرق التجميد/ الذوبان و(٢) الثبات في درجات الحرارية العالية.

وطريقة أخرى للحد من تكوين الأجسام المشتملة المحتوية على البروتينات غير المتشابهة في إيشيريشيا القولون هي خفض درجة حرارة النمو من ٣٧ إلى ٣٠ درجة مئوية. وتشمل المنتجات المصنعة في إيشيريشيا القولون الإنسولين البشري، وهرمون النمو البشري، وألفا-، وبيتا-، وجاما-إنترفيرون، و G-CSF [١٩٥].

وكانت كل البولي ببتيدات التي تفرزها الكائنات حقيقية النواة جليكوزيلاتية. وتعتمد عملية الارتباط بالجليكوزيل على النوع، والنسيج، والخلية. وللأسف، فإن إيشيريشيا القولون لاتقوم بهذه العملية للبروتينات. وفي بعض الحالات، فإن البروتين الجليكوزيلاتي بصورة طبيعية عادة مايكون نشطاً بدون شاردة الكربوهيدرات،

ويمكن تصنيعه في البكتيريا. وقد وجد أن هذ هو الحال مع جاما-انترفيرون. وفي الحالات التي يكون فيها الارتباط بالجليكوزيل ضروري للاستقرار أو الطي السليم للبروتين (مثل، إرثروبويتين)، فإنه يمكن في كثيرٍ من الأحيان تكوين البروتينات بالخميرة المعدلة، والفطريات، والحشرات، أو الخلايا الثديية.

(٢، ١٠، ١) الخمائر Yeasts

توفر الخمائر مزايا معينة على البكتيريا كعوائل للاستنساخ. (١) يمكنها أن تفرز البروتينات غير المتشابهة إلى المحاليل خارج الخلية عندما يتم إرفاق تسلسلات إشارية سليمة إلى الجينات التركيبية. (٢) يمكنها أن تقوم بربط البروتينات بالجليكوزيل. ومع ذلك، غالباً ما تكون عملية الارتباط بالجليكوزيل بواسطة خميرة سكاروميسس سيرفيسي غير مقبولة للبروتينات الثديية لأن السكريات الأوليجية المرتبطة بالأوكسجين تحتوي فقط على سكر المانوز في أن البروتينات للكائنات حقيقية النواة الأعلى تحتوي على سلاسل مرتبطة بالأوكسجين وتكون سياليلاتية. وعلاوة على ذلك، فإن السكاروميسس سيرفيسي تقوم بعملية الارتباط بالجليكوزيل للمواقع المرتبطة بالنيتروجين والتي أدت إلى انخفاض في كلٍ من النشاط وإرتباط المستقبلات، مما تسبب في مشكلات مناعية.

ووجد أن خميرة البيكيا باستوريس التي تستطيع استخدام مركبات الميثيل (ميثيلوتروفيك) تمتلك مزايا أكثر عن السكاروميسس سيرفيسي كعائل للجينات غير المتشابهة. (١) يمكن لهذه الخميرة أن تنمو بكثافات عالية جداً في البيئات الخالية من البروتين. (٢) لها مستوى أعلى من إنتاجية البروتين. (٣) لا تقوم بعملية الارتباط بالجليكوزيل بإفراط. (٤) تم إدخال جينات خارجية في نسخ متعددة في الكروموسوم. (٥) كانت مستويات إنتاج البروتين من قبل هذه الخمائر مرتفعة نسبياً. على سبيل المثال، يمكن أن تنتج البيكيا باستوريس خارج الخلايا ٤ جم/ لتر من إنترلوكين-٢، ٢ جم/ لتر من ألبومين المصل البشري، و١٠ جم/ لتر من الـ TNF، وهذه المواد تنتج عادة داخل الخلايا. (٦) تم بشكلٍ مستقر إدماج شريط التعبير في جينوم العائل في مواقع محددة. (٧) كانت البيكيا باستوريس نصفية العدد الكروموسومي في النواة وقابلة للتطفير التقليدي.

(٣، ١٠، ١) الفطريات Molds

عند إدخال جينات خارجية في الفطريات الخيطية عن طريق البلازميدات، فإنها تندمج بشكلٍ مستقر في الكروموسوم كتكرارات ترادفية. ويمكن ملاحظة ما يصل إلى ١٠٠ نسخة من الجينات. ويصل إنتاج الكيموسين البقري المعدل بواسطة أسبرجلس نيجر أواموري إلى ١ جم/ لتر، واللاكتوفيرين البشري بواسطة أسبرجلس أواموري إلى ٢ جم/ لتر من البروتين خارج الخلية.

(٤ , ١٠ , ١) الخلايا الحشرية Insect Cells

تعدُّ الخلايا الحشرية في الزراعة عائلاً جيداً لإنتاج البروتينات المعدلة [١٩٨]. وتنتج زراعات الخلايا الحشرية المعدلة أكثر من ٢٠٠ من البروتينات المشفرة بواسطة جينات من الفيروسات والبكتيريا والفطريات والنباتات والحيوانات. وقد تم إعداد ناقلات التعبير من الفيروسات العصوية التي تهاجم اللافقاريات وليس الفقاريات أو النباتات، وبالتالي تم تأمين السلامة. والفيروس العصوي الأكثر استخداماً هو فيروس البولي هيدروزيس النووي (أوتوجرافا كاليفورنيكا) الذي يحتوي حمض نووي ريبوزي ثنائي الخيط دائري، وهو بطبيعة الحال معدياً لخلايا الحشرات قشرية الأجنحة، ويمكن بسهولة تنميته في المختبر. ويحتوي الفيروس على جين يشفر بروتين البوليهيدرين والذي يتم إنتاجه عادةً في مستوياتٍ مرتفعة جدا وليس ضرورياً لتكاثر الفيروس. ويتم وضع الجين المراد استنساخه تحت السيطرة القوية لبادئ البوليهيدرين الفيروسي، وتم إنتاج مستويات مناسبة من البروتينات مع الكثير من التعديلات بعد عملية الترجمة للكائنات حقيقية النواة الأرقي، بما في ذلك عملية الفسفرة، والارتباط بالجليكوزيل، وإنقسام الببتيد صحيح الإشارة، وتجهيز البروتين، وعملية الارتباط بالأحماض الدهنية، وعملية الأسيلة.

والعائل المعتاد في زراعة الخلايا المعلقة هو دودة الحشد الخريفية (سبودوبتيرا فراجيبيدا). وبديلاً عن ذلك، يتم استخدام زراعة اليرقات والتي هي أرخص بكثير من زراعة الخلايا. وقد أنتجت أنظمة اليرقات ٦٠٠ ملجم/ لتر من البروتين المعدل.

(٥ , ١٠ , ١) الخلايا الثديية Mammalian Cells

تم البدء باستخدام زراعة الخلايا الثديية (خلايا الحيوانات الثديية)، وبشكلٍ أساسي خلايا مبيض الهامستر الصيني الخالدة (CHO)، للحاجة إلى إنتاج EPO و tPA في بدايات الثمانينيات [١٩٥]. وقد ساهمت التطورات السابقة في تقنية التخمير الميكروبي في تطوير زراعة الخلايا الثديية. وكانت زراعة الخلايا الثديية مفيدة في أن البروتينات تنتج في الصورة السليمة المطوية والمرتبطة بالجليكوزيل، وبالتالي القضاء على الحاجة لإعادة الطبيعة إليها. وتم أيضاً إنتاج البروتينات المعدلة بالخلايا الثديية في خلايا مايلوما الفئران N50، وخلايا كلى جنين الهامستر، وخلايا كلى القرد الأخضر، وخلايا الكلى الجنينية البشرية. وأصبحت زراعة الخلايا الثديية هي المصدر الرئيس للأدوية العلاجية المعدلة، واستخدمت لإنتاج هرمون النمو البشري، GM-CSF، G-CSF، EPO، والبالموزيم، وغيرها. وقد تم تطوير عمليات لخلايا CHO والتي أنتجت ٣-٥ جم/ لتر من البروتين المعدل.

(٦ ,١٠ ,١) الحيوانات المعدلة وراثياً Transgenic Animals

تم تطوير الحيوانات المعدلة وراثياً كنظم إنتاج للببتيدات المعدلة. وتم تصنيع الـ tPA في حليب الماعز المعدلة وراثياً عند مستوى ٣ جم/ لتر. وتنتج الأبقار ٣٠ لتر من الحليب يومياً، وتصل فيها البروتينات إلى ٣٥ جم/ لتر؛ وبالتالي فإن البروتين الكلي المنتج في اليوم الواحد هو ١ كجم. وتصل الإنتاجية إلى ٢ جم/ لتر من مضاد الثرومبين الثالث، و٤ جم/ لتر من هرمون النمو البشري في حليب الفئران، و٥ جم/ لتر من الفيبرينوجين المعدل في حليب الأغنام، و٨ جم/ لتر من ألفا-جلوكوزيديز في حليب الأرانب، ١٤ جم/ لتر من مضاد الثرومبين الثالث في حليب الماعز، و٣٥ جم/ لتر من ألفا-١-مضاد التريبسين في حليب الأغنام، و٤٠ جم/ لتر من الهيموجلوبين في الخنازير؛ وكانت كل الجينات بشرية الأصل.

وفي معظم الحالات، فإن البروتين يكون نشطاً كالبروتين الأصلي. وتنتج الماعز المعدلة وراثياً tPA مع ارتباط بالجليكوزيل مختلف عن ذلك المنتج في زراعة الخلايا الحيوانية وذو فترة عمر-النصف أطول من البروتين الأصلي. وواحدة من النقاط السلبية في إنتاج البروتينات من الحيوانات المعدلة وراثياً هي طول الوقت اللازم لتقييم مستويات الإنتاج. فهذا يستغرق من ٥ ,٣ أشهر في الفئران، ١٥ شهراً في الخنازير، و٢٨ شهراً في الأغنام، و٣٢ شهراً في الأبقار.

(٧ ,١٠ ,١) النباتات المعدلة وراثياً Transgenic Plants

يمكن أيضاً استخدام النباتات المعدلة وراثياً لإنتاج منتجات قيمة، بما في ذلك إنزيم بيتا-جلوكورونيديز (GUS)، والأفيدين، وإنزيم اللاكيز، والتربسين. وقد استخدمت نباتات اللفت زيتية-البذور لإنتاج الإنكيفالين وببتيد عصبي. ويمكن إنتاج البروتينات المعدلة في النباتات المعدلة وراثياً بمستويات عالية بلغت ١٤٪ من إجمالي البروتين القابل للذوبان في التبغ (في حالة الفيتيز من أسبرجلس نيجر) و١٪ من وزن بذور الكانولا (الهيرودين من هيرودو ميديسيناليس). وتشمل المزايا المحتملة ارتباط الجليكوزيل بدرجة مُرضية، والاستهداف، والتقسيم، وطبيعية التخزين المستقرة.

(١١ ,١) الإنزيمات Enzymes

تم صياغة مصطلح "إنزيم" في عام ١٨٧٧م من قبل كوهنه بمعنى "في الخميرة". وعندما ولد مجال الكيمياء الحيوية في عام ١٨٩٧م عن طريق اكتشاف بوخنر أن مستخلصات الخميرة الخالية من الخلايا يمكنها إنتاج الإيثانول من السكر، أشار بوخنر إلى مركب الإنزيم المحلل للجلوكوز بالـ"زيماز"، بمعنى "إنزيم الخميرة

نفسها". وأصبحت الإنزيمات قيمة في التصنيع بسبب عملها بسرعة وكفاءة في تركيزات منخفضة عند قيم رقم هيدروجيني ودرجات حرارة معتدلة، ودرجتها العالية من التخصصية للوسط (التي خفضت تكوين المنتجات الثانوية)، وسميتها المنخفضة، وسهولة إنهاء عملها بمعالجات معتدلة. وأنتجت بعض السلالات الميكروبية تركيزات عالية جداً من الإنزيمات خارج الخلية. فقد أنتجت السلالات الأصلية من باسيلس ليشينيفورميس ٥ جم/ لتر من إنزيم البروتييز، وأنتجت السلالات التجارية ٢٠ جم/ لتر. وأنتجت السلالات عالية الإنتاجية من الأسبرجلس ٢٠ جم/ لتر من إنزيم الجلوكوأميليز.

وكانت الأسباب الإضافية لاستخدام الخلايا الميكروبية كمصادر للإنزيمات على النحو التالي: (١) كانت تخميرات الإنزيم اقتصادية جداً على نطاقٍ واسعٍ بسبب قصر دورة التخمير والبيئات الغذائية غير المكلفة، (٢) كانت إجراءات الفرز بسيطة، ويمكن فحص الآلاف من الزراعات في فترة زمنية قصيرة معقولة، و(٣) أنتجت الأنواع المختلفة إنزيمات مختلفة بعض الشيء والتي تحفز نفس التفاعل، مما يسمح بالمرونة فيما يتعلق بشروط العمل في المفاعلات. وتجلى هذا التنوع من خلال حقيقة أن إنزيم ألفا-أميليز من باسيلس أميلوليكوفاشينس، وهو إنزيم تجاري يستخدم لسنواتٍ في التحليل المائي للنشا في درجة حرارة تصل إلى ٩٠ درجة مئوية، قد أجبر على المنافسة في ١٩٧٢م مع إنزيمٍ مماثلٍ من باسيلس ليشينيفورميس والذي يمكنه أن يعمل في ١١٠ درجة مئوية. وكانت درجات الحرارة المثلى لكلٍ من باسيلس أميلوليكوفاشينس وباسيلس ليشينيفورميس ٧٠ و٩٢ درجة مئوية، على التوالي.

في الثمانينيات والتسعينيات من القرن العشرين استخدمت الإنزيمات الميكروبية على نحوٍ متزايدٍ في التطبيقات التي كانت تستخدم الإنزيمات النباتية والحيوانية تقليدياً. وشملت هذه التحولات الاستبدال الجزئي لـ (١) إنزيمات الأميليز من الشعير المنقوع والقمح في صناعات البيرة، والخبز، والنسيج بالأميليز من الباسيلس والأسبرجلس، (٢) إنزيمات البروتيز النباتية والحيوانية ببروتيز الأسبرجلس للتعتيق البارد للبيرة وتطرية اللحوم، (٣) إنزيمات البروتيز من الأسبرجلس والباسيلس لضرب الجلود ومستحضرات المنظفات، و(٤) منفحة معدة العجل (الكيموسين) بإنزيمات الرينين من فطر الميوكر لصناعة الجبن. وفي وقتٍ لاحقٍ، أصبح استنساخ الكيموسين من الثدييات مهماً لصانعي الجبن، وأظهرت الاختبارات على الجبن المصنوع من الإنزيم المعدل نجاحاً تجارياً. وقد تم التصريح بالكيموسين المعدل في الولايات المتحدة، وكان سعره نصف السعر للكيموسين من العجل الطبيعي. وشملت الإنزيمات الصناعية المهمة التالي: (١) إنزيم مصاوغة الجلوكوز لإنتاج شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز، (٢) البنسيلين أسيليز لصناعة البنسيلينات شبه المخلقة، (٣) البيروكسيديز لصناعة راتنجات الفينول (والتي يمكن أن تستبدل فورمالدهيدات الفينول المخلقة) و(٤) هيدروليز النتريل

obeikandi.com

لإضافة الماء للأكريلونيتريل إلى الأكريلاميد. واستخدم إنزيم مصاوغة الجلوكوز بالتزامن مع ألفا-أميليز وجلوكوأميليز لتحويل النشا إلى مزيجٍ من الجلوكوز والفركتوز المعروفة باسم "شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز". وسمح تطوير إنزيم مصاوغة الجلوكوز لصناعة الطحن الرطب للذرة بالاستحواذ على ٣٠٪ من سوق المواد المحلية من صناعة السكر في السبعينيات. وفي الولايات المتحدة وحدها، يتم إنتاج شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز بحوالي ٣٠ مليار رطل في السنة.

ووصلت سوق الإنزيمات الصناعية ٢ مليار دولار أمريكي في عام ٢٠٠٠م مقسمة إلى مجالات التطبيق التالية: المواد الغذائية ٤٥٪ (تمثل معالجة النشا منها ١١٪)، مواد التنظيف ٣٤٪، المنسوجات ١١٪، الجلود ٣٪، لب الورق والورق ١,٢٪. ولا يشمل هذا الإنزيمات التشخيصية والعلاجية. وكانت السوق العالمية للمنتجات من التفاعلات الإنزيمية على النحو التالي: شراب الذرة عالي المحتوى من سكر الفركتوز بقيمة ١ مليار دولار، الأسبارتام ٨٠٠ مليون دولار، الأكريلاميد ٣٠٠ مليون دولار، حمض ٦-أمينو-بنسيلانيك (6-APA) وحمض ٧-أمينو-ديأسيتوكسي سيفالوسبورانيك (7ADCA) ٢٠٠ مليون دولار.

ويمكن أن تنمو بعض الكائنات الحية الدقيقة "في الظروف القاسية" مثل ١٠٠ درجة مئوية، ٤ درجات مئوية، ضغط جوي ٢٥٠، ودرجة قاعدية ١٠، ودرجة حموضة ٢، ٥٪ كلوريد الصوديوم. و"الإنزيمات العاملة في الظروف القاسية" هي الإنزيمات من هذه الكائنات المتنوعة ولها أهمية صناعية. كمثال تجاري إنزيم السيليوليز ١٠٣ من كائن ينمو في درجات القاعدية العالية. ويكسر الإنزيم الزغب المجهري لألياف السيليلوز والذي يحتفظ بالأوساخ على سطح المنسوجات القطنية. وتم تسويق الإنزيم تجارياً من قبل شركة جينينكور الدولية في عام ١٩٩٧م لاستخدامه في المنظفات الصناعية لإعادة "التجديد" للملابس القطنية حتى بعد الغسيل المتكرر.

ومع تطوير طريقة الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل أصبح من الممكن استنساخ الجينات التي تشفر الإنزيمات الميكروبية وتعبيرها على مستويات أعلى بمئات المرات من تلك التي تنتج بشكلٍ طبيعي. وتبني قطاع الإنزيمات الصناعية أساليب الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي المعدل بشغف لزيادة مستويات الإنتاج ولإنتاج الإنزيمات من كائنات دقيقة غير صناعية في كائنات صناعية، مثل أنواع الأسبرجلس، والترايكوديرما، فضلاً عن الكليفيروميسس لاكتيس، والسكاروميسس سيرفيسي، واليارووينيا ليبوليتيكا، والباسيلس ليشينيفورميس. ويتم إمداد أكثر من ٥٠٪ من السوق من خلال عمليات التهجين. ويتم تزويد ٦٠٪ من منفحة العجل (كيموسين) المستخدمة في صناعة الجبن في الولايات المتحدة من إيشيريشيا القولون المعدلة، وإثنين من إنزيمات الليبيز المستخدمة صناعياً (ليبيز الهوميكولا المنتج في الأسبرجلس، وليبيز البسودوموناس) من

الإنزيمات المعدلة. وتم إنتاج الأميليز الثابت عند درجات الحرارة العالية من الباسيلس ليشينيفورميس في سلالة متضاعفة الجينات من نفس النوع. ويستخدم الفيتيز النباتي (المنتج في أسبرجلس نيجر المعدل) كعلف لـ ٥٠٪ من جميع الخنازير في هولندا. وتم تحقيق زيادة ١٠٠٠ ضعف في إنتاج الفيتيز في أسبرجلس نيجر عن طريق استخدام تقنية التعديل الوراثي. وقد عزل العلماء في نوفو نورديسك ليبيز مرغوب فيه جداً لاستخدامه في المنظفات من جنس من الهوميكولا. ولأغراض الإنتاج، تم استنساخ الجين في أسبرجلس أوريزي حيث إنتج الإنزيم بزيادة قدرها ١٠٠٠ ضعف [١٩٩]. وأصبح منتجاً تجارياً لتنظيف الغسيل، وللأسترة الداخلية للدهون ولأسترة الجلوكوزيدات منتجاً ليبيدات جليكوزيلية لها تطبيقات كمستحلبات حيوية قابلة للتحلل للمنظفات، ومنتجات العناية بالبشرة، والعدسات اللاصقة، وكمستحلبات غذائية.

وتقريباً تحتوي جميع المنظفات الآن على إنزيمات مهندسة وراثياً ويصنع الكثير من الجبن بالميكروبات المهندسة وراثياً. أكثر من ٦٠٪ من الإنزيمات المستخدمة في صناعة المنظفات والمواد الغذائية والصناعات التحويلية للنشا منتجات معدلة [٢٠٠].

وقد تم تغيير خصائص الكثير من الإنزيمات بالوسائل الوراثية. وقد أدى تطفير "بروت فورس" والفحص العشوائي للكائنات الدقيقة على مدى السنوات إلى تغيرات في درجة الحموضة المثلى، والثبات الحراري، والتثبيط الرجعي، وتثبيط مصدر الكربون، وتخصصية وسط التفاعل، وسرعة التفاعل القصوى، وثابت التفاعل، وثابت تثبيط الإنزيم. وقد تم استغلال هذه المعلومات في التقنيات الأكثر منطقية لهندسة البروتين. وقد أسفرت التغييرات المفردة في تسلسل الأحماض الأمينية عن أنواع متشابهة من التغييرات في مجموعة كبيرة من الإنزيمات. فعلى سبيل المثال، زادت درجة تحمل الحرارة لإنزيم البروتيز من الباسيلس ستيروثيرموفيلوس من ٨٦ إلى ١٠٠ درجة مئوية، أي أنه أصبح مقاوماً لدرجة الغليان! وقد تم تطوير الإنزيم بواسطة التطفيرات الموجهه-المكان [٢٠١]. ووجب فقط تعديل ثمانية أحماض أمينية. وزاد الثبات عند ١٠٠ درجة مئوية بمقدار ٣٤٠ ضعف، ولم يقل في درجات الحرارة المنخفضة. وكانت جميع الطفرات الثمانية بعيدة عن الموقع النشط للإنزيم.

وكانت طريقة التطور الموجه (المعروفة أيضاً باسم التطور الجزيئي التطبيقي أو التطور الجزيئي الموجه) طريقة ممتازة لتحسين الإنزيمات [٢٠٢]. وحقق خلط الحمض النووي الديؤكسي ريبوزي، وهو أحد أنواع التطور الموجه، تحسناً كبيراً في النشاط الحفزي، والتخصصية المعدلة، وتحسين ثبات الإنزيمات. وقد أثمرت طريقة تجميع وإعادة توحيد أجزاء من الجينات المماثلة من مختلف الأنواع أو السلالات هذه عن تحسينات ملحوظة في الإنزيمات في فترة قصيرة جداً من الزمن. وتحاكي هذه الطريقة الطبيعة فعلاً في أنها تستخدم الطفرة، والاختيار والتعديل لاستنباط بروتينات عالية التكيف، ولكنها كانت أسرع بكثيرٍ من الطبيعة. وتم تحسين النشاط الإنزيمي

حتى ٣٢٠٠٠ ضعف (بيتا-لاكتاميز TEM-1)، وتخصصية وسط التفاعل بـ ١٠٠٠ ضعف (بيتا-جالاكتوزيديز)، وطي البروتين بـ ٤٨ ضعف (البروتين الأخضر المستشع)، ونشاط الجسم المضاد أكثر من ٤٠٠ ضعف، والتعبير بـ ١٠٠ ضعف، ومقاومة الزرنيخات بـ ٤٠ ضعف، تحلل الأترازين بـ ٨٠ ضعف، ...إلخ [٢٠٣].

ودخلت البروتينات الناتجة من التطور الموجه لأول مرة إلى السوق في عام ٢٠٠٠م. وكانت هذه هي البروتينات الخضراء المستشعة لشركة كلونيتيك ونوفو نورديسك، ليبيز الليبوبرايم®. ووفر التطور الموجه نشاط بيتا-جلوكوزيديز إلى بيتا-جالاكتوزيديز، وحول إنزيم بيتا-جلوكورونيديز إلى إنزيم بيتا-جالاكتوزيديز، وأعطي نشاط إنزيم الفوسفوليبيز إلى الليبيز، وحول إنزيم إندول-٣-جليسرول-فوسفات سينثيز إلى إنزيم مصاوغة الفوسفوريبوزايل أنثرانيليز [٢٠٤].

(١٢ , ١) التحويلات الحيوية Bioconversions

كان أول مثال على استخدام عملية حيوية تنافس عملية كيميائية في صناعة البتروكيماويات هو إنتاج مادة الأكريلاميد، والتي تنتج بـ ٢٠٠٠٠٠ طن سنوياً كمادة متجمعة، وكمكون في الألياف الصناعية، ومنظم للتربة، وكعامل إسترداد في صناعة البترول [٢٠٥]. وكان لاستخدام العملية الكيميائية للتحفيز بأملاح النحاس في الترطيب المائي للأكريلونيتريل بعض المشكلات المرتبطة بها. ونافس التحويل الحيوي التفاعل الكيميائي، حيث تم استخدام البسودوموناس كلورورافيس B23 أو الرودوكوكاس رودوكراس J1، والذي تم فيه حث إنزيم النيتريل هيدراتيز بواسطة ميثأكريلاميد وتم تحفيز الترطيب المائي. وكان العائد التحويل أعلى من ٩٩,٩٩٪، وتم إجرائه عند درجة ١٠ مئوية، واستخدمت الخلايا عدة مرات. وكانت الإنتاجية ٦٥٦ جم/ لتر بعد عشر ساعات. واليوم، تستخدم التحويلات الحيوية على نطاقٍ واسعٍ في الصناعات الكيميائية. كما أنها أصبحت ضرورية للصناعة الكيميائية الدقيقة بسبب الطلب على المركبات الوسيطة وحيدة المصاوغة.

(١٣ , ١) اللقاحات Vaccines

تم تصنيع مولدات الأجسام المضادة البروتينية للقاحات عن طريق استنساخ وتعبير الجينات المشفرة لمولدات الأجسام المضادة السطحية للبكتيريا والفيروسات والطفيليات. كان أول لقاح وحيدي في السوق هو مولد الأجسام المضادة السطحية لفيروس التهاب الكبد باء، والذي أنتج في الخميرة. في عام ١٩٩٤م، وافقت وزارة الزراعة الأميركية على أول لقاح بيطري حي معدل وراثياً. واستخدم لقاح VectorVax FP-N، والمنتج بواسطة شركة سينترو، ناقل فيروس جدري الطيور، والذي تم حذف الجينين المسببين للمرض له، لإنتاج لقاح ضد فيروس جدري الطيور ومرض نيوكاسل.

(١٤ , ١) علم ميكروبيولوجي الأنظمة Systems Microbiology

برز "علم ميكروبيولوجي الأنظمة" كمصطلح وكمجال علمي لوصف المفهوم الذي يستخدم قياسات مدى-الجينوم والقياسات الخلوية الواسعة في توضيح العمليات والآليات التي تقوم بها الخلايا الميكروبية [٢٠٦]. وأمكن النظر للخلية الميكروبية بصورة موسعة بسبب التقدم الهائل في (١) علم الجينوم وغيرها من تقنيات "الأوميات" (على سبيل المثال، البروتيوميات، الميتابولوميتات) و(٢) التقنيات عالية الإنتاجية لقياس الفئات المختلفة من الجزيئات الرئيسة داخل الخلية. ولاكتشاف نواتج أيض ثانوية نشطة جديدة ذات أهمية تجارية، فقد قدم علم الجينوم مجموعة هائلة من الأهداف الجديدة، والتي يتم فحص المنتجات الطبيعية ضدها. ويمتلك الجينوم البشري ٣٠٠٠٠-٣٥٠٠٠٠ من الجينات، وأقل من ٥٠٪ منها لديها وظيفة مفترضة. وتمتلك هذه الجينات القدرة على إنتاج ما يزيد على ١٠٠٠٠٠ من البروتينات. ويتراوح تقدير عدد البروتينات التي تعمل كأهداف مفيدة من ٦٠٠ إلى ١٠٠٠٠.

المراجع References

[١] Dixon, B. (2006) Sulfa's true significance. *Microbe*, **1**, 500–501.

[٢] Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.*, **10**, 226–236.

[٣] Florey, H.W., Chain, E.B., Heatley, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P., and Florey, M.E. (1949) *Antibiotics*, vol. **2**, Oxford University Press, London.

[٤] Moyer, A.J. and Coghill, R.D. (1946) Penicillin. IX. The laboratory scaleproduction of penicillin in submerged cultures by *Penicillium notatum* Westling (NRRL 832). *J. Bacteriol.*, **51**, 79–93.

[٥] Raper, K.B. (1994) The development of improved penicillin-producing molds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **48**, 41–56.

[٦] Jarvis, F.G. and Johnson, M.J. (1947) The role of the constituents of synthetic media for penicillin production. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 3010–3018.

[٧] Johnson, M.J. (1952) Recent advances in the penicillin fermentation. *Bull. World Health Organ.*, **6**, 99–121.

[٨] Davey, Y.F. and Johnson, M.J. (1953) Penicillin production in corn steep media with continuous carbohydrate addition. *Appl. Microbiol.*, **1**, 208–211.

[٩] Demain, A.L. (1957) Inhibition of penicillin formation by lysine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 244–246.

[١٠] Somerson, N.L., Demain, A.L., and Nunheimer, T.D. (1961) Reversal of lysine inhibition of penicillin production by α-aminoadipioc acid or adipic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 238–241.

[١١] Arnstein, H.R.V. and Morris, D. (1960) The structure of a peptide containing α-aminoadipic acid, cysteine and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. J.*, **76**, 357–361.

[١٢] Demain, A.L. and Masurekar, P.S. (1974) Lysine inhibition of *in vivo* homocitrate synthesis in *Penicillum chysogenum*. *J. Gen. Microbiol.*, **82**, 143–151.

[١٣] Friedrich, C.G. and Demain, A.L (1977) Effects of lysine analogs on *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 706–709.

[١٤] Kato, K. (1953) Occurrence of penicillin-nucleus in culture broths. *J. Antibiot. Ser. A*, **6**, 184–185.

[١٥] Batchelor, F.R., Doyle, F.P., Nayler, J.H.C., and Rolinson, G.N. (1959) Synthesis of penicillin: 6-amino-penicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature*, **183**, 257–258.

[١٦] Brotzu, G. (1948) Richerche su di un nova antibiotico. *Lavori delll'Instituto d'Igienee di Cagliari.*, **1,** 1–11.

obeikandl.com

[١٧] GottshallR. Y., Roberts, J.M., Portwood, L.M., and Jennings, J.C. (1951) Synnematin, an antibiotic produced by *Tilachlidium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **76,** 307–311.

[١٨] Roberts, J.M. (1952) Antibiotic substances produced by species of *Cephalosporium* with a description of new species. *Mycologia,* **44,** 292–306.

[١٩] Burton, H.S. and Abraham, E.P. (1951) Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium.* Cephalosporins P1, P2, P3, P4 and P5. *Biochem. J.,* **50,** 168–174.

[٢٠] Crawford, K., Heatley, N.G., Boyd, P.F., Hale, C.W., Kelly, B.K., Miller, G.A., and Smith, N. (1952) Antibiotic production by a species of *Cephalosporium. J. Gen. Microbiol.,* **6,** 47–59.

[٢١] Abraham, E.P., Newton, G.G.F., and Hale, C.W. (1954) Isolation and some properties of cephalosporin N, a new penicillin. *Biochem. J.,* **58,** 94–102.

[٢٢] Abraham, E.P., Newton, G.G.F., Schenck, J.R., Hargie, M.P., Olson, B.H., Schuurmans, D.M., Fisher, M.W., and Fusari, S.A. (1955) Identity of cephalosporin N and synnematin B. *Nature,* **176,** 551.

[٢٣] Abraham, E.P. and Newton, G.G.F. (1961) The structure of cephalosporin C. *Biochem. J.,* **79,** 377–393.

[٢٤] Fawcett, P.A., Usher, J.J., and Abraham, E.P. (1976) Aspects of cephalosporin and penicillin biosynthesis, in *International Symposium on theGenetics of Industrial Microorganisms,* 2nd edn (ed. K.D. MacDonald), Academic Press, New York, pp. 129–138.

[٢٥] Kohsaka, M. and Demain, A.L. (1976) Conversion of penicillin N to cephalosporin(s) by cell-free extracts of *Cephalosporium acremonium. Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **70,** 465–473.

[٢٦] Yoshida, M., Konomi, T., Kohsaka, M., Baldwin, J.E., Herchen, S., Singh, P., Hunt, N.A., and Demain, A.L. (1978) Cell-free ring expansion of penicillin N to deacetoxycephalosporin C by *Cephalosporium acremonium* CW-19 and its mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.,* **75,** 6253–6257.

[٢٧] Miller, G.A., Kelly, B.K., and Newton, G.G.F. (1956) Cephalosporin production, British Patent 759, 624.

[٢٨] Demain, A.L. (1963) L-Valine: a precursor of cephalosporin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **10,** 45–48.

[٢٩] Trown, P.W., Abraham, E.P., Newton, G.G.G., Hale, C.W., and Miller, G.A. (1962) Incorporation of acetate into cephalosporin C. *Biochem. J.,* **84,** 157–166.

[٣٠] Trown, P.W., Sharp, M., and Abraham, E.P. (1963) α-Oxoglutarate as a precursor of the D-α-aminoadipic residue in cephalosporin C. *Biochem. J.,* **86,** 280–284.

[٣١] Banko, G., Demain, A.L., and Wolfe, S. (1987) α-(L-α-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase (ACV synthetase): a multifunctional enzyme with broad substrate specificity for the synthesis of penicillin and cephalosporin precursors. *J. Am. Chem. Soc.,* **109,** 2858–2860.

[٣٢] Hollander, I.J., Shen, Y.-Q., Heim, J., Demain, A.L., and Wolfe, S. (1984) A pure enzyme catalyzing penicillin biosynthesis. *Science,* **224,** 610–612.

[٣٣] Miller, I.M., Stapley, E.O., and Chaiet, L. (1962) Production of synnematin B by a member of the genus *Streptomyces. Bacteriol. Proc.,* **49,** 32.

[٣٤] Nagarajan, R., Boeck, L.D., Gorman, M., Hamill, R.L., Higgens, C.H., Hoehn, M.M., Stark, W.M., and Whitney, J.G. (1971) β-Lactam antibiotics from *Streptomyces. J. Am. Chem. Soc.,* **93,** 2308–2310.

[٣٥] Stapley, E.O., Jackson, M., Hernandez, S., Zimmerman, S.B., Currie, S.A., Mochales, S., Mata, J.M., Woodruff, H.B., and Hendlin, D. (1972) Cephamycins, a new family of β-lactam antibiotics. I. Production by actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp. n. *Antimicrob. Agents Chemother.,* **2,** 122–131.

[٣٦] Bost, P.E. and Demain, A.L. (1977) Studies on the cell-free biosynthesis of β-lactam antibiotics. *Biochem. J.,* **162,** 681–687.

[٣٧] Kahan, F.S., Kahan, F.M., Goegelman, R.T., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O., Miller, T.W., Miller, A.K., Hendlin, D., Mochales, S., Hernandez, S., Woodruff, H.B., and Birnbaum, J. (1979) Thienamycin, a new β-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation, and physical properties. *J. Antibiot.,* **32,** 1–12.

[٣٨] Waksman, S.A. and Woodruff, H.B. (1940) Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomyces. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **45,** 609–614.

[٣٩] Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S.A. (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* 55–66.

[٤٠] Waksman, S.A. and Lechevalier, H.A. (1949) Neomycin, a new antibiotic against streptomycin-resistant bacteria, including tuberculosis organisms. *Science*, **109,** 305–307.

[٤١] Lechevalier, H., Acker, R.F., Corke, C.T., Haenseler, C.M., and Waksman, S.A. (1953) Candicidin, a newantifungal antibiotic. *Mycologia*, **45,** 155–171.

[٤٢] Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M., Joslyn, D.A., and Burkholder, P.R. (1947) Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science*, **106,** 417.

[٤٣] Duggar, B.M. (1948) Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **51,** 177–181.

[٤٤] McGuire, J.M., Bunch, R.L., Anderson, R.C., Boaz, H.E., Flynn, E.H., Powell, H.M., and Smith, J.W. (1952) “ Ilotycin ” a new antibiotic. *Antibiot. Chemother.*, **2,** 281.

[٤٥] McCormick, M.H., Stark, W.M., Pittenger, G.E., Pittenger, R.C., and McGuire, J.M. (1956) Vancomycin, a new antibiotic. 1. Chemical and biologic properties. *Antibiot. Annu.*, **1955/56,** 606.

[٤٦] Weinstein, M.J., Luedemann, G.M., Oden, E.M., Wagman, G.H., Rosselet, J.R., Marquez, J.A., Coniglio, C.T., Charney, W., Herzog, H.L., and Black, J. (1963) Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora. J. Med. Chem.*, **6,** 463.

[٤٧] Sensi, P., Margalith, P., and Timbal, M.T. (1959) Rifomycin, a new antibiotic. Preliminary report. *Il Farmaco (Ed. Sci.)*, **14,** 146–147.

[٤٨] Hazen, E.L. and Brown, R. (1951) Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **76,** 93–97.

[٤٩] Berdy, J. (1995) Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? in *Proceedings of the 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Part 1*, Allerton Press, New York, pp. 3–23.

[٥٠] Demain, A.L. (1973) Mutation and the production of microbial metabolites. *Adv. Appl. Microbiol.*, **16,** 177–202.

[٥١] Kelner, A. (1949) Studies on the genetics of antibiotic formation. 1. The introduction of antibiotic-forming mutants in actinomycetes. *J. Bacteriol.*, **57,** 73–92.

[٥٢] McCormick, J.R.D., Sjolander, N.O., Hirsch, U., Jensen, E., and Doershuk, A.P. (1957) A new family of antibiotics: the demethyltetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.*, **79,** 4561–4563.

[٥٣] Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., and Spalla, C. (1969) 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius. Biotechnol. Bioeng.*, **11,** 1101–1110.

[٥٤] Shier, W.T., Rinehart, K.L., and Gottlieb, D. (1969) Preparation of four new antibiotics from a mutant of *Streptomyces fradiae. Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **63,** 198–204.

[٥٥] McArthur, H.A.I. (1997) The novel avermectin, Doramectin–a successful application of mutasynthesis. Abstract S13 at *5th International Conference on the Biotechnology of Microbial Products. Williamsburg, VA, USA.* p. 20.

[٥٦] Okanishi, M., Suzuki, K., and Umezawa, H. (1974) Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80,** 389–400.

[٥٧] Hopwood, D.A. (1988) Towards an understanding of gene switching in Streptomyces; the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. (Lond.)*, **235,** 121–138.

[٥٨] Hopwood, D.A., Malpartida, F., Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujui, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G., and Omura, S. (1985) Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature*, **314,** 642–644.

[٥٩] Floss, H.G. (2006) Combinatorial biosynthesis–potential and problems. *J. Biotechnol.*, **124,** 242–257.

[٦٠] Dougherty, T.J., and Barrett, J.F. (2001) ABT-773: a new ketolide antibiotic. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **10,** 343–351.

[٦١] Nichterlein, T., Kretschmar, M., and Hof, H. (1996) RP 59500, a streptogramin derivative, is effective inmurine listerosis. *J. Chemother.*, **8,** 107–112.

[٦٢] Petersen, P.J., Jacobus, N.V., Weiss, W.J., Sum, P.E., and Testa, R.T. (1999) *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of a novel glycylcycline, the 9-*t*-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43,** 738–744.

[٦٣] Kinoshita, S., Udaka, S., and Shimono, M. (1957) Amino acid fermentation. I. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **3,** 193–205.

Somerson, N. and Phillips, T. (1961) Belgian Patent No. 593, 807. [٦٤]

Shiio, I., Otsuka, S.I., and Takahashi, M. (1962) Effect of biotin on the bacterial formation of glutamic acid. I. Glutamate formation and cellular permeability of amino acids. *J. Biochem.*, **51,** 109–111. [٦٥]

Demain, A.L. and Birnbaum, J. (1968) Alteration of permeability for the release of metabolites from the microbial cell. *Curr. Top. Microbiol.*, **46,** 1–25. [٦٦]

Kitano, K., Sugiyama, Y., and Kanzaki, T. (1972) L-Glutamate fermentation with acetic acid by an oleic acid requiring mutant. II. Inhibitory factors against the extracellular accumulation of L-glutamate. *J. Ferment. Technol.*, **50,** 182–191. [٦٧]

Nakao, Y., Kikuchi, M., Suzuki, M., and Doi, M. (1972) Microbial production of L-glutamic acid by glycerol auxotrophs and production of L-glutamic acid from *n*-paraffi ns. *Agric. Biol. Chem.*, **36,** 490–496. [٦٨]

Laneelle, G. and Clement, Y. (1986) Glutamate excretion mechanism in *Corynebacterium glutamicum*, in *5th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, Part B.*, Pliva, Eagreb, Croatia, pp. 247–252. [٦٩]

Eggeling, L. and Sahm, H. (2001) The cell wall barrier of *Corynebacterium glutamicum* and amino acid efflux. *J. Biosci. Bioeng.*, **92,** 201–213. [٧٠]

Nampoothiri, K.M., Hoischen, C., Bathe, B., Moeckel, B., Pfefferle, W., Krumbach, K., Sahm, H., and Eggeling, L. (2002) Expression of genes of lipid synthesis and altered lipid composition modulates L-glutamate efflux of *Corynebacterium glutamicum. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58,** 89–96. [٧١]

Burkovski, A. and Kraemer, R. (2002) Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and signifi cance for biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58,** 265–274. [٧٢]

Kinoshita, S., Nakayama, K., and Kitada, S. (1958) L-Lysine production using microbial auxotroph. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **4,** 128–129. [٧٣]

Sahm, H., Eggeling, L., and de Graaf, A.A. (2000) Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum. Biol. Chem.*, **381,** 899–910. [٧٤]

Stephanopoulos, G. (1999) Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metab. Eng.*, **1,** 1–11. [٧٥]

Nielsen, J. (2001) Metabolic engineering . *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55,** 263–283. [٧٦]

Kacser, H. and Acerenza, L. (1993) A universal method for achieving increases in metabolite production. *Eur. J. Biochem.*, **216,** 361–367. [٧٧]

Wittmann, C. and Heinzle, E. (2002) Geneology profling through strain improvement using metabolic network analysis–metabolic flux geneology of several generations of lysine producing corynebacteria. *Appl. Environ.Microbiol.*, **68,** 5843–5859. [٧٨]

Eggeling, L. and Sahm, H. (1999) Amino acid production: principles of metabolic engineering, in *Metabolic Engineering* (eds S.Y. Lee and E.T. Papoutsakis), Marcel Dekker, New York, pp. 153–176. [٧٩]

Kuninaka, A. (1960) Studies on taste of ribonucleic acid derivatives. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **34,** 489–492. [٨٠]

Kuninaka, A., Kibi, M., and Sakaguchi, K. (1964) History and development of flavor nucleotides. *Food Technol.*, **19,** 29–35. [٨١]

Nakayama, K., Suzuki, T., Sato, Z., and Kinoshita, S. (1964) Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes. 5. Accumulation of inosinic acid by an adenine auxotroph of *Micrococcus glutamicus. J. Gen. Appl. Microbiol.*, **10,** 133. [٨٢]

Demain, A.L., Jackson, M., Vitali, R.A., Hendlin, D., and Jacob, T.A. (1965) Production of xanthosine-5 ′-monophosphate and inosine-5 ′-monophosphate by auxotrophic mutants of a coryneform bacterium. *Appl. Microbiol.*, **13,** 757. [٨٣]

Demain, A.L., Jackson, M., Vitali, R.A., Hendlin, D., and Jacob, T.A. (1966) Production of guanosine-5 ′-monophosphate and inosine-5 ′- monophosphate by fermentation. *Appl. Microbiol.*, **14,** 821. [٨٤]

Demain, A.L. (1968) Production of purine nucleotides by fermentation. *Prog. Ind. Microbiol.*, **8,** 35. [٨٥]

Guilliermond, A., Fontaine, M., and Raffy, A. (1935) Sur l'existence dans *l'Eremothecium ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. *Compt. Rend.*, **201,** 1077–1080. [٨٦]

Perlman, D. (1979) Microbial process for ribofl avin production, in *MicrobialTechnology*, vol. **I,** 2nd edn (eds J.H. Peppler and D. Perlman), Academic Press, New York, pp. 521–527. [٨٧]

Wickerham, L.J., Flickinger, M.H., and Johnston, R.M. (1946) The production of riboflavin by *Ashbya gossypii. Arch. Biochem.*, **9,** 95–98. [٨٨]

[٨٩] Demain, A.L. (1972) Ribofl avin oversynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, **26,** 369–398.

[٩٠] Koizumi, S., Yonetani, Y., Maruyama, A., and Teshiba, S. (2000) Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 674–679.

[٩١] Perkins, J.B. and Pero, J. (1993) Biosynthesis of riboflavin, biotin, folic acid and cobalamin, in *Bacillus subtilis and Other Gram Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics* (ed. A.L. Sonenshein), ASM Press, Washington, DC, pp. 319–334.

[٩٢] Perkins, J.B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N.P., Williams, V., II, Rufo, G.A., Jr., Hatch, R., and Pero, J. (1999) Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of ribofl avin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **22,** 8–18.

[٩٣] Huembelin, M., Griesser, V., Keller, T., Schurter, W., Haiker, M., Hohmann, H.-P., Ritz, H., Richter, G., Bacher, G., and van Loon, A.P.G.M. (1999) GTP cyclohydrolase II and 3.4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are the rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **22,** 1–7.

[٩٤] Scott, A.I., and Roessner, C.A. (2002) Biosynthesis of cobalamin (vitamin B 12). *Biochem. Soc. Trans.*, **30,** 613–620.

[٩٥] Long, R. Merck & Co., Inc, personal communication.

[٩٦] Demain, A.L., Daniels, H.J., Schnable, L., and White, F. (1968) Specificity of the stimulatory effect of betaine on the vitamin B 12 fermentation. *Nature*, **220,** 1324–1325.

[٩٧] Reichstein, T., Gruessner, A., and Opppenauer, R. (1933) Die Synthese der D-Ascorbinsaeure (D-Form des C-Vitamins). *Helv. Chim. Acta*, **16,** 561–565.

[٩٨] Bremus, C., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S., and Sahm, H. (2006) The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J. Biotechnol.*, **124,** 196–205.

[٩٩] Sonoyamana, T., Tani, H., Matsuda, K., Kageyama, B., Tanimoto, M., Kobayashi, K., Yagi, S., Kyotani, H., and Mitsushima, K. (1982) Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43,** 1064–1069.

[١٠٠] Xu, A., Yao, J., Yu, L., Lu, S., Wang, J., Yan, B., and Yu, Z. (2004) Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J. Appl. Microbiol.*, **96,** 1317–1323.

[١٠١] Chotani, G., Dodge, T., Hsu, A., Kumar, M., LaDuca, R., Trimbur, D., Weyler, W., and Sanford, K. (2000) The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim. Biophys. Acta,* **1543,** 434–455.

[١٠٢] Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosada, J., and Shimomura, K. (1997) Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbosone dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63,** 454–460.

[١٠٣] Miall, L.M. (1978) Organic acids, in *Economic Microbiology vol. 1 Primary Metabolite* (ed. A.H. Rose), Academic Press, New York, pp. 47–119.

[١٠٤] Mattey, M. (1992) The production of organic acids. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **12,** 87–132.

[١٠٥] Roehr, M. (1998) A century of citric acid fermentation and research. *Food Technol.*, **36,** 163–171.

[١٠٦] Magnuson, J.K. and Lasure, L.L. (2004) Organic acid production by filamentous fungi, in *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture and Medicine* (eds J. Lange and L. Lange), Kluwer, Dordrecht, pp. 307–340.

[١٠٧] Thom, C. and Currie, J.N. (1916) *Aspergillus niger* group. Oxalic acid production of species of *Aspergillus. J. Agric. Res.*, **7,** 1–15.

[١٠٨] Fernbach, A. and Yuill, J.L. (1927) Rowntree and Co., British Patent 266,414.

[١٠٩] Fernbach, A. and Yuill, J.L. (1927)Rowntree and Co., British Patent 266,415.

[١١٠] Clutterbuck, P.W. (1936) Recent developments in the biochemistry of moulds. *J. Soc. Chem. Ind.*, **55,** 55T–67T.

[١١١] Doelger, W.P. and Prescott, S.C. (1934) Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, **26,** 1142.

[١١٢] Tomlinson, V., Campbell, J.J.R., and Trussell, P.C. (1950) The influence of zinc, iron, copper and manganese on the production of citric acid by *Aspergillus niger. J. Bacteriol.*, **59,** 517–527.

Adiga, P.R., Sivarama Sastry, K., Venkatasubramanyam, V., and Sarma, P.S. (1961) Interrelationships [١١٣]
in trace-element metabolism in *Aspergillus niger. Biochem. J.*, **81,** 545–550.

Amelung, H. (1930) Wachstum und Saeurbildung von *Aspergillus* niger. *Chem.-Ztg.*, **54,** 118. [١١٤]

Kluyver, A.J. and Perquin, L.H.C. (1933) Methods for the study of the metabolism of molds. *Biochem.* [١١٥]
Z., **266,** 68–81.

Perlman, D., Dorell, W.W., and Johnson, M.J. (1946) Effect of metallic ions on the production of citric [١١٦]
acid by *Aspergillus niger. Arch. Biochem.*, **10,** 131–143.

Shu, P. and Johnson, M.J. (1948) Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus* [١١٧]
niger.Ind. Eng. Chem, **40,** 1202–1205.

Miles Laboratories (1951) British Patent 653,808. [١١٨]

James, L.V., Rubbo, S.D., and Gardner, J.F. (1956) Isolation of high yielding mutants of *Aspergillus* [١١٩]
niger by a paper culture selection technique. *J. Gen. Microbiol.*, **14,** 223–228.

Hannan, M.A., Rabbi, F., Faizur Rahman, A.T.M., and Choudhury, N. (1973) Analyses of some [١٢٠]
mutants of *Aspergillus niger* for citric acid production. *J. Ferm. Technol.*, **51,** 606–608.

Duppenmeier, U., Hoffmeister, M., and Prust, M.C. (2002) Biochemistry and biotechnological [١٢١]
applications of *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60,** 233–242.

Fukaya, M., Tayama, K., Tamaki, T., Tagami, H., Okumura, H., Kawamura, Y., and Beppu, T. (1989) [١٢٢]
Cloning of the membrane-bound aldehyde dehydrogenase gene of *Acetobacter polyoxogenes* and
improvement of acetic acid production by use of the cloned gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55,** 171–
176.

Wieringa, K.T. (1940) The formation of acetic acid from carbon dioxide and hydrogen by anaerobic [١٢٣]
spore-forming bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **6,** 251–262.

Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J., and Ritter, G.J. (1942) A new type of [١٢٤]
glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. *J. Bacteriol.*, **43,** 701–715.

Wang, D.I.C., Fleischaker, R.J., and Wang, G.Y. (1978) A novel route to the production of acetic acid [١٢٥]
by fermentation. *AIChE Symp. Ser.*, **74,** 105–110.

Parekh, S.R. and Cheryan, M. (1994) High concentrations of acetate with a mutant strain of *C.* [١٢٦]
thermoaceticum. Biotechnol. Lett., **16,** 139–142.

Cheryan, M., Parekh, S., Shah, M., and Witjitra, K. (1997) Production of acetic acid by *Clostridium* [١٢٧]
thermoaceticum. Adv. Appl. Microbiol., **43,** 1–33.

Lister, J. (1878) On the lactic fermentation and its bearing on pathology. *Trans. Path. Soc. London*, **29,** [١٢٨]
425–467.

Ge, C.-M., Gu, S.-B., Zhou, X.-H., Yao, J.-M., Pan, R.-R., and Yu, Z.-L. (2004) Breeding of L (+)- [١٢٩]
lactic acid producing strain by low-energy ion implantation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **14,** 363–366.

Bai, D.-M., Zhao, X.-M., Li, X.-G., and Xu, S.-M. (2004) Strain improvement and metabolic flux [١٣٠]
analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L (+)-lactic acid production.
Biotechnol. Bioeng., **88,** 681–689.

Zhou, S., Causey, T.B., Hasona, A., Shanmugam, K.T., and Ingram, L.O. (2003) Production of [١٣١]
optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli*
W3110. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69,** 399–407.

Schlenk, F. (1985) Early research on fermentation–a story of missed opportunities. *Trends Biochem.* [١٣٢]
Sci., **10,** 252–254.

Lynd, L.R. (1990) Large scale fuel ethanol from lignocellulose: potential, economics, and research [١٣٣]
priorities. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25,** 695.

Ingram, L.O., Conway, T., Clark, D.P., Sewell, G.W., and Preston, J.F. (1987) Genetic engineering of [١٣٤]
ethanol production in *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.*, **53,** 2420–2425.

Doran, J.B. and Ingram, L.O. (1993) Fermentation of crystalline cellulose to ethanol by *Klebsiella* [١٣٥]
oxytoca containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes. *Biotechnol. Prog.*, **9,** 533–538.

Lynd, L.R. (1989) Production of ethanol from lignocellulosic materials using thermophilic bacteria: [١٣٦]
critical evaluation of potential and review. *Adv. Biochem. Eng.*, **38,** 1–52.

Demain, A.L., Newcomb, M., and Wu, J.H.D. (2005) Cellulase, clostridia and ethanol. *Microbiol.* [١٣٧]
Molec. Biol. Rev., **69,** 124–154.

obeikandl.com

Kataeva, I.A., Seidel, R.D., III, Li, X.-L., and Ljungdahl, L.G. (2001) Properties and mutation analysis of the CelK cellulose-binding domain from the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *J. Bacteriol.*, **183,** 1552–1559. [١٣٨]
Shoham, Y., Lamed, R., and Bayer, E.A. (1999) The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends Microbiol.*, **7,** 275–281. [١٣٩]
Qureshi, N., Li, X.-L., Hughes, S., Saha, B.C., and Cotta, M.A. (2006) Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum. Biotechnol. Prog.*, **22,** 673–680. [١٤٠]
Lovitt, R.W., Kim, B.H., Shen, G.-J., and Zeikus, J.G. (1988) Solvent production by microorganisms. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **7,** 107–186. [١٤١]
Mermelstein, L.D., Papoutsakis, E.T., Petersen, D.J., and Bennett, G.N. (1993) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon. *Biotechnol. Bioeng.*, **42,** 1053–1060. [١٤٢]
Sanford, K., Valle, F., and Ghirnikar, R. (2004) Pathway engineering through rational design. Tutorial: designing and building cell factories for biobased production. *Gen. Eng. News,* **24** (2), 44–45. [١٤٣]
Bigelas, R. (1989) Industrial products of biotechnology: application of gene technology, in *Biotechnology,* vol. **7b** (eds G.K. Jacobson and S.O. Jolly), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 230–259. [١٤٤]
Tseng, Y.H., Ting, W.Y., Chou, H.C., Yang, B.Y., and Chun, C.C. (1992) Increase of xanthan production by cloning *xps* genes into wild-type *Xanthomonas campestris. Lett. Appl. Microbiol.*, **14,** 43–46. [١٤٥]
Dawes, E.A. (1988) Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer. *Biosci. Rep.*, **8,** 537–547. [١٤٦]
Pedros-Alio, C., Mas, J., and Guerrero, R. (1985) The infl uence of poly-β-hydoxybutyrate accumulation on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus. Arch. Microbiol.,***143,** 178–184. [١٤٧]
Nakamura, C.E. and Whited, G.M. (2003) Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14,** 1–6. [١٤٨]
Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H., and Frank, J.R. (1995) The technological and economic potential of poly(lactic acid) and its derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.*, **16,** 221–231. [١٤٩]
De Muynck, C., Pereira, C., Soetaert, W., and Vandamme, E. (2006) Dehydrogenation of ribitol with *Gluconobacter oxydans*: production and stability of L-ribulose. *J. Biotechnol.*, **125,** 408–415. [١٥٠]
Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W., and Vandamme, E.J. (2005) *Leuconostoc* dextran sucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **80,** 845–860. [١٥١]
Vandamme, E.J., and Soetaert, W. (2006) Personal care products via fermentation and biocatalysis processes, in *Biotechnology in Personal Care* (ed. R. Lad), Informa/Taylor and Francis, New York, pp. 27–56. [١٥٢]
Soetaert, W. and Vandamme, E. (2006) The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol. J.*, **1,** 756–769. [١٥٣]
Vandamme, E.J., Cerdobbel, A., and Soetaert, W. (2005) Biocatalysis on the rise: part 1-principles. *Chem. Today,* **23** (6), 47–51. [١٥٤]
Vandamme, E.J., Cerdobbel, A., Soetaert, W. (2006) Biocatalysis on the rise: part 2-applications. *Chem. Today,* **24** (1), 57–61. [١٥٥]
Umezawa, H. (1972) *Enzyme Inhibitors of Microbial Origin,* University Park Press, Baltimore. [١٥٦]
Umezawa, H. (1982) Low-molecular-weight inhibitors of microbial origin. *Annu. Rev. Microbiol.*, **36,** 75–99. [١٥٧]
Omura, S. (1992) Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. Ind. Microbiol.*, **10,** 135–156. [١٥٨]
Brown, A.G., Smale, T.C., King, T.J., Hasenkamp, R., and Thompson, R.H. (1976) Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum. J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1,* 1165–1170. [١٥٩]
Endo, A., Kuroda, M., and Tsujita, Y. (1976) ML-236B and ML-236C, new inhibitors of cholesterogenesis produced by *Penicillium citrinin. J. Antibiot.*, **29,** 1346–1348. [١٦٠]
Endo, A. (1979) A new hypocholsterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot.*, **32,** 852–854. [١٦١]

obeikandi.com

[١٦٢] Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers-Schonberg, G., Hensens, O., Hirshfi eld, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., and Springer, J. (1980) Mevinolin, A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* **77,** 3957–3961.

[١٦٣] Serizawa, N. and Matsuoka, T. (1991) A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochem. Biophys. Acta,* **1084,** 35–40.

[١٦٤] Yashphe, J., Davis, J., Peng, Y., Bok, S.H., and Demain, A.L. (1997) New microorganisms which convert compactin to pravastatin. *Actinomycetologica,* **11,** 20–25.

[١٦٥] Peng, Y. and Demain, A.L. (1998) A new hydroxylase system in *Actinomadura* sp. cells converting compactin to pravastatin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.,* **20,** 373–375.

[١٦٦] Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D.D., andWingender, W. (1981) Chemistry and biochemistry of microbial α-glucosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **20,** 744–761.

[١٦٧] Weibel, E.K., Hadvary, P., Hochuli, E., Kupfer, E., and Lengsfeld, H. (1987) Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini. J. Antibiot.,* **40,** 1081–1085.

[١٦٨] Brown, A.G. (1986) Clavulanic acid, a novel β-lactamase inhibitor–a case study in drug discovery and development. *Drug Des. Dev.,* **1,** 1–21.

[١٦٩] Isono, K., Nagatsu, J., Kawashima, Y., and Suzuki, S. (1965) Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. 1. Isolation and characterization of polyoxins A and B. *Agric. Biol. Chem.,* **29,** 848–854.

[١٧٠] Winkelmann, G. (1986) Iron complex products (siderophores), in *Biotechnology* , vol. **4** (eds H.J. Rehm, and G.Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 215–243.

[١٧١] Borel, J.F., Feurer, C., Gabler, H.U., and Stahelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions,* **6,** 468–475.

[١٧٢] Vezina, D., Kudelski, A., and Sehgal, S.N. (1975) Rapamycin (AY 22,989), a new antifungal antibiotic. 1. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot.,* **28,** 721–726.

[١٧٣] Sehgal, S.N., Molnar-Kimber, K., Ocain, T.D., and Weichman, B.M. (1994) Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide. *Med. Res. Rev.,* **14,** 1–22.

[١٧٤] Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1991) Incorporation of acetate, propionate, and methionine into rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus. J. Nat. Prod.,* **54,** 167–177.

[١٧٥] Paiva, N.L., Roberts, M.F., and Demain, A.L. (1993) The cyclohexane moiety of rapamycin is derived from shikimic acid in *Streptomyces hygroscopicus. J. Ind. Microbiol.,* **12,** 423–428.

[١٧٦] Paiva, N.L., Demain, A.L., and Roberts, M.F. (1993) The immediate precursor of the nitrogen-containing ring of rapamycin is free pipecolic acid. *Enzyme Microb. Technol.,* **15,** 581–585.

[١٧٧] Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., and Imanaka, H. (1987) FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces.* 1. Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.,* **40,** 1249–1255.

[١٧٨] Bentley, R. (2001) Bartolomeo Gosio, 1863–1944: an appreciation. *Adv. Appl. Microbiol.,* **48,** 229–250.

[١٧٩] Alsberg, C.L. and Black, O.F. (1913) Contributions to the study of maize deterioration. Biochemical and toxological investigations of *Penicillium puberulum* and *Penicillium stoloniferum,* USDA Bur. Plant Ind., Bull. No. 270, Govt. Printing Ofc. Washington, DC.

[١٨٠] Rayl, A.J.S. (1999) Oceans: medicine chests of the future? *Scientist,* **13** (19), 1–4.

[١٨١] Wall, M.E. and Wani, M.C. (1995) Campothecin and taxol: discovery to clinic. *Cancer Res.,* **55,** 753–760.

[١٨٢] Stierle, A., Strobel, G., and Stierle, D. (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae,* an endophytic fungus of Pacific yew. *Science,* **260,** 214–216.

[١٨٣] Borman, S. (2000) Enediyne research continues apace. *Chem. Eng. News,* **78** (11), 47–49.

[١٨٤] Vining, L.C. and Taber, W.A. (1979) Ergot alkaloids, in *Economic Microbiology, Secondary Products of Metabolism,* vol. **3** (ed. A.H. Rose), Academic Press, London, pp. 389–420.

[١٨٥] Kondo, Y., Shomura, T., Ogawa, Y., Tsuruoka, T., Watanabe, H., Totukawa, K., Suzuki, T., Moriyama, C., Yoshida, J., Inouye, S., and Nida, T. (1973) Studies on a new antibiotic SF-1293. I. Isolation and physico-chemical and biological characterization of SF-1293 substances. *Sci. Rep. Meiji Seika*, **13,** 34–41.

[١٨٦] Bayer, E., Gugel, K.H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., Konig, W.A., and Zahner, H. (1972) Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. Phosphinothricin und phosphinothricylalanin-alanin. *Helv. Chim. Acta*, **55,** 224–239.

[١٨٧] Jefferys, E.G. (1970) The gibberellins fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.*, **13,** 283–316.

[١٨٨] Haney, M.E., Jr and Hoehn, M.M. (1967) Monensin, a new biologically active compound. 1. Discovery and isolation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **7,** 349–352.

[١٨٩] Westley, J.W. (1977) Polyether antibiotics: versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces. Adv. Appl. Microbiol.*, **22,** 177–223.

[١٩٠] Ikeda, H. and Omura, S. (1997) Avermectin biosynthesis. *Chem. Rev.*, **97,** 2591–2609.

[١٩١] Stapley, E.O. (1982) Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolated from a soil in Japan, in *Trends in Antibiotic Research* (eds H. Umezawa, A.L. Demain, R. Hata, and C.R. Hutchinson), Japan Antibiotic Research Association, Tokyo, pp. 154–170.

[١٩٢] Campbell, W.C. (ed.) (1989) *Ivermectin and Abamectin,* Springer-Verlag, New York.

[١٩٣] Kirst, H.A., Michel, K.H., Mynderase, J.S., Chio, E.H., Yao, R.C., Nakasukasa, W.M., Boeck, L.D., Occlowitx, J.L., Paschal, J.W., Deeter, B., and Thompson, G.D. (1992) Discovery, isolation, and structure elucidation of a family of structurally unique, fermentation-derived tetracyclic macrolides, in *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III* (eds D.R. Baker, J.G. Fenyes, and J.J. Steffens), ACS Symposium Series 504, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 214–225.

[١٩٤] Cohen, S.N. (1975) The manipulation of genes. *Sci. Am.*, **233,** 25–33.

[١٩٥] Swartz, J. (1996) *Escherichia coli* recombinant DNA technology, in *Esherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology,* 2nd edn (ed. F.C. Neidhardt), American Society of Microbiology Press, Washington, DC, pp. 1693–1771.

[١٩٦] Koehler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specifi city. *Nature,* **256,** 495–497.

[١٩٧] Riesenberg, D. and Guthke, R. (1999) High-cell density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51,** 422–430.

[١٩٨] Agathos, S.N. (1996) Insect cell bioreactors, in *Insect Cell Cultures: Fundamental and Applied Aspects* (eds J.M. Vlak, C.D. de Gooijer, J. Tramper, and H.G. Miltenburger), Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 173–189.

[١٩٩] Carlsen, S. (1990) Molecular biotechnology in the research and production of recombinant enzymes, in *Industrial Use of Enzymes: Technical and Economic Barriers* (eds B. Wolnak and M. Scher), Bernard Wolnak and Associates, Chicago, pp. 52–69.

[٢٠٠] Cowan, D. (1996) Industrial enzyme technology. *Trends Biotechnol.*, **14,** 177–178.

[٢٠١] Van den Burg, B., Vriend, G., Veltman,O.R., Venema, G., and Eijsink, V.G.H. (1998) Engineering an enzyme to resist boiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*,**95,** 2056–2060.

[٢٠٢] Arnold, F.H. (1998) Design by directed evolution. *Acc. Chem. Res.*, **31,** 125–131.

[٢٠٣] Patten, P.A., Howard, R.J., and Stemmer, W.P. (1997) Applications of DNA shuffling to pharmaceuticals and vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **8,** 724–733.

[٢٠٤] Zhao, H., Chockalingam, K., and Chen, Z. (2002) Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13,** 104–110.

[٢٠٥] Yamada, H., Shimizu, S., and Kobayashi, M. (2001) Hydratases involved in nitrile conversion: screening, characterization and application. *Chem. Rec.*, **1,** 152–161.

[٢٠٦] Buckley, M.R. (2004) Systems microbiology: beyond microbial genomics, in *Report of the American Academy of Microbiology* (ed. M.R. Buckley), American Academy of Microbiology, Washington, DC, pp. 1–15.