تأثیر نوع زیست‌واکنشگاه در تولید زیست‌بسپارهای میکروبی زیست تخریب‌پذیر

مجتبی خانی[1]، علی بهرامی[2*]

۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۰۴

پیام نگار :a_bahrami@mut.ac.ir

چکیده

زیست‌بسپار بزرگ‌مولکولهای زیستی‌اند که از تعداد زیادی زیر واحد کوچک و شبیه به هم ساخته می‌شوند که اتصال کووالانسی بین آنها پیوند برقرار می‌کنند و زنجیره‌ای طولانی تشکیل می‌دهند. زیست‌بسپارها از موجودات زنده از قبیل گیاهان، جانداران و ریزاندامگانها به طور طبیعی تولید می‌شوند و از لحاظ زیست محیطی نیز تجزیه‌پذیرند؛ امروزه مواد زیست‌بسپاری در شکل‌های گوناگونی تولید شده‌اند؛ بنابراین، از ظرفیت استفاده در صنایع گوناگون برخوردارند. به منظور استفاده از زیست‌بسپارها در صنایع، نیاز به تجاری کردن فرایند تولید و نیز بهینه‌سازی تولید آن‌ها حس می‌شود. نقش عمدهٔ زیست‌واکنشگاه مطلوب نیز در فراهم کردن محیطی کنترل شده به منظور دستیابی به شرایط بهینهٔ رشد و یا تولید محصول درخور توجه است. نوع زیست‌واکنشگاه مورد استفاده نیز در تولید زیست‌بسپار تاثیر گذار است. در این مقاله، ضمن مروری بر زیست‌بسپارها، و انواع زیست‌واکنشگاه به بررسی زیست‌واکنشگاه مناسب برای تولید زیست‌بسپارهای میکروبی پرداخته می‌شود.

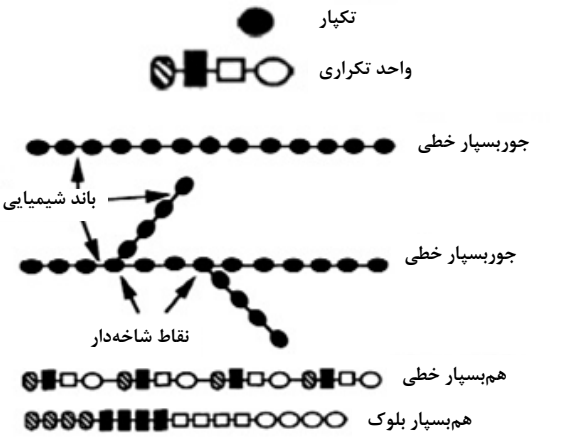
کلیدواژه‌ها: زیست‌بسپار، زیست‌تخریب‌پذیر، زیست‌واکنشگاه

۱. مقدمه

پلیمر (بسپار) واژه‌ای یونانی، متشکل از "پلی" به معنای تعداد زیاد (بَس) و "مر" به معنای پاره و جزء است. در واقع، بسپارها گروهی از مولکول‌های درشت شامل واحدهای ساختمانی‌اند که به منظور تولید زنجیره‌های بلند، از طریق پیوند کووالانسی، به یکدیگر متصل می‌شوند. این واحدهای ساختمانی تکپار نامیده می‌شوند. بسپارها به صورت خطی، شاخهٔ شبکه‌ای یا سه بعدی در مقیاس میکروسکوپی ظاهر می‌شوند (شکل (۱)). بسپارهای خطی شبیه به مخلوط اسپاگتی و نامنظم‌اند؛ بسپارهای شاخه‌ای یا منشعب غالباً خوشه‌ای‌اند و انواع مشبک آنها، موهای کرک مانندی‌اند که دانه‌هایی درون آنها استقرار یافته‌اند. تعدادی از بسپارها قادرند به هر دو شکل خطی و شاخه‌ای و منشعب وجود داشته باشند که این خاصیت تنها به روش سنتز آن‌ها بستگی دارد. ساده‌ترین نوع بسپار شکل خطی آن است که از تکرار متناوب زیر واحدها تشکیل شده است. زیر واحدها می‌توانند یکسان، جوربسپار یا متفاوت، ناجوربسپار و هم‌بسپار باشند. برهم‌بسپار وقتی تشکیل می‌شود که دو یا چند تکپار مختلف، به یکدیگر متصل شوند. مطابق شکل (۱)، هم‌بسپار از

* تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی

اتصال چهار تکپار تشکیل شده است. بسپارهای معمولی امروزی از نفت خام ساخته می‌شوند که با توجه به محدود بودن منابع نفتی و نیز مشکلات زیست محیطی ناشی از آن‌ها، باید به تدریج جای خود را به زیست‌بسپارها بسپارند که از منابع تجدیدپذیر ساخته می‌شوند.



شکل ۱. ساختارهای پایه بسپارها.

زیست‌بسپار از دیدگاه زیست شیمیدانان عبارت است از درشت مولکولهای زیستی که از تعداد زیادی زیر واحد کوچک و شبیه به هم ساخته شده‌اند که اتصال کووالانسی بین آنها پیوند برقرار کرده و یک زنجیره طولانی را ایجاد می‌کنند. در روند طبیعی، زیست‌بسپارها و یا همان درشت مولکولها، ترکیبات داخل سلولی‌اند که قابلیت زنده ماندن را در شرایط سخت محیطی به اندمگان می‌دهند. مواد زیست‌بسپاری در شکل‌های گوناگونی تولید شده‌اند؛ بنابراین، ظرفیت مصرف در صنایع گوناگون را دارند. گسترش دامنهٔ مواد زیست‌بسپاری به چند دلیل اهمیت دارد. اولاً، این مواد بر خلاف بسپارهای امروزی که از فراورده‌های نفتی به دست می‌آیند، به محیط زیست برگشت‌پذیرند؛ بنابراین، موادآلوده‌کننده محیط زیست به شمار نمی‌آیند. در این خصوص مواد زیست‌بسپاری در ساخت پلاستیک‌ها به دو صورت مصرف می‌شوند. یکی، مصرف از پلاستیک‌هایی که درآن‌ها یک ماده تجزیه‌پذیر (مانند نشاسته) به یک پلاستیک متداول (مانندپلی اتیلن) اضافه می‌شود، در نتیجه، این ماده به افزایش سرعت تجزیهٔ پلاستیک کمک می‌کند. از ورود این مواد به بازار چند سالی می‌گذرد و با آن‌که کمک زیادی به کاهش زباله‌های پلاستیکی کرده‌اند، اما به دلیل این که در آن‌ها از همان پلاستیک‌های متداول تجزیه‌ناپذیر استفاده می‌شود، و مصرف مقدار زیادی مواد تجزیه‌پذیر در پلاستیک خاصیت آن را تضعیف می‌کند، موقعیت چندان محکمی ندارند. ثانیاً، مصرف پلاستیک‌های تجزیه‌پذیر ذاتی است که به دلیل ساختمان شیمیایی خاص، به وسیله باکتری‌ها، آب یا آنزیم‌ها در طبیعت تجزیه می‌شوند و خیلی سریع‌تر از نوع اول به محیط زیست بر می‌گردند. مورد مهم دیگر این‌که، مواد زیست‌بسپاری را موجودات زنده می‌سازند و در نتیجه در چرخه ساخت و تجزیه مواد زیستی قرار می‌گیرند؛ پس منابع آن محدود نیست و هیچگاه تمام نمی‌شود، در حالی که مواد بسپاری و پلاستیکی امروزی از سوخت‌های فسیلی ساخته می‌شود که منابع آن محدود و تمام شدنی است. سومین مزیت زیست‌بسپارها، به صرفه بودن این مواد است؛ زیرا تولید زیست‌بسپارها نیاز زیادی به کارخانه و صنعت پیشرفته ندارد و با حداقل امکانات می‌توان به تولید آن مبادرت ورزید. همچنین، قیمت بالای نفت خام، کشورها را به سوی مصرف این مواد سوق داده است. زیست‌بسپارها خود به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند:

۱. زیست‌بسپارهایی که سامانه‌های زیستی مانند ریزاندامگانها، گیاهان و جانداران آنها را تولید می‌کنند.

۲. زیست‌بسپارهایی که به صورت شیمیایی سنتز شده، ولی از مواد زیستی مانند اسیدهای آمینه، قندها، چربی‌ها یا روغن‌ها به دست می‌آیند.

چنان‌که گفتیم، این مواد را انواع موجودات زنده سنتز می‌کنند و بخش مهمی از کنشهای بوم‌سازگانی را برعهده دارند. این بسپارها را، به دلیل قابلیت تجزیه زیستی[1]، مجدداً خود موجودات زنده مصرف می‌کنند. به بیان دیگر، در خلال روندهای حفاظتی و بوم‌شناختی مانند تولید کود، جذب در خاک و تیمارهای زیستی، تجزیه می‌شوند. در واقع، این مواد، یک چرخه تولید و تجزیه می‌پیمایند. سرعت و نوع تجزیه بسپارها بر اساس انرژی مورد نیاز برای شکستن پیوند و موقعیت پیوند، متفاوت است. بسپارها با پیوندهای کووالانسی (C-C) بدون گروه‌های هیدرولیز شونده به زمان زیاد یا کاتالیزور برای تجزیه شدن[2]، نیاز دارند.

در جدول (۱)، مهمترین زیست‌بسپارها، ساختار شیمیایی واحدهای تکپاری و کاربردشان در اندام زنده، ذکر شده است. مثلاً، DNA که اطلاعات ژنتیکی سامانه‌های زنده را حمل می‌کند،

1. Biodegradable
2. Degrade

یک هم‌بسپار خطی متشکل از چهار تکپار نوکلئوتیدی است. نوکلئوتیدها در یک ستون مارپیچ حاوی قند و فسفات، با یکدیگر جفت می‌شوند. در حال حاضر، DNA از نظر صنعتی خیلی مورد توجه نیست، اگرچه تحقیقاتی در زمینه تولید ترکیبات نانو به کمک این زیست‌بسپار شروع شده است. در سال‌های اخیر، تحقیقات نشان داده‌اند که پلی‌پپتیدهای متنوعی که شبیه پروتئین های طبیعی‌اند، یافت شده‌اند[۱].

جدول ۱. زیست‌بسپارهای طبیعی و عملکرد آنها.

بسپار	مونومرها	عملکرد(ها)
اسیدهای نوکلوئیک	نوکلوئتیدها	حامل اطلاعات ژنتیکی عام شناخته شده در همه اندامگانها
پروتئین‌ها	اسیدهای آمینه	کاتالیست‌های زیستی (آنزیم‌ها)، فاکتورهای رشد، پذیرنده، هورمون‌ها (انسولین)، توکسین، پادتن
پلی‌ساکاریدها	قندها	ساختار گیاهان و اندامگانهای عالی، ذخیره انرژی، ترشحات باکتریایی
پلی‌هیدروکسی آلکانوات	اسیدهای چرب	ذخیره انرژی میکروبی
پلی‌فنول	فنول‌ها	ساختار گیاهی، ترکیبات خاک، سازوکار دفاعی گیاهان
پلی‌فسفات	فسفات‌ها	ذخیره انرژی معدنی
پلی‌سولفات	سولفات‌ها	ذخیره انرژی معدنی

پروتئین‌ها یا پلی‌پپتیدها، هم‌بسپارهای پیچیده حاوی ۲۰ نوع اسید آمینه مختلف‌اند. هر پروتئین دارای ترکیب شیمیایی و ساختار سه بعدی منحصر به فرد است. واحدهای آمینواسیدی بر اساس کد ژنتیکی موجود در DNA، از طریق پیوند آمیدی، به دنبال یکدیگر قرار می‌گیرند.

پلی‌ساکاریدها، بسپارها یا ریزمولکول‌هایی حاوی قندهای ساده‌اند. دو وظیفهٔ عمده بر عهدهٔ این ترکیبات نهاده شده است. بعضی مانند نشاسته انرژی را برای فعالیت سلولی ذخیره می‌کنند و بقیه از جمله سلولز نقش ساختاری ایفا می‌کنند. بعد از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها بیشترین و پیچیده ترین گروه زیست‌بسپار تشکیل می‌دهند. زیرا پیوندهای موجود میان تکپارها، در وضعیت های مختلفی قرار می‌گیرند. بیشتر پلی‌ساکاریدها، ساختارهای شاخه‌ای دارند و بر اثر افزودن سایر مولکول‌ها، تحت تغییرات شیمیایی قرار می‌گیرند[۱]

همانطور که اشاره شد، زیست‌بسپارها می‌توانند از طریق چند سازوکار مختلف تولید شوند. آنها می‌توانند از سامانه‌های میکروبی مشتق شوند. همچنین، می‌توانند از موجودات عالی مانند گیاهان و جانوران استخراج شوند، و یا به صورت شیمیایی از واحدهای تکپاری زیستی سنتز شوند. با توجه به سازوکار تولید، زیست‌بسپارها کاربردهای گسترده‌ای دارند. زیست‌بسپارهای در پزشکی، صنایع بسته‌بندی، تولید مواد آرایشی، افزودنی‌های غذایی، پارچه، مواد شیمیایی تصفیه آب، پلاستیک‌های صنعتی، مواد جاذب، حسگرهای زیستی و حتی عناصر ذخیره‌سازی اطلاعات به‌کار گرفته می‌شوند. در جدول (۲)، فهرست مفصلی از زیست‌بسپارها را درج کرده‌ایم که در حال حاضر به‌کار گرفته می‌شوند[۲].

۲. زیست‌بسپارهای میکروبی

ریزاندامگانهای تولیدکننده زیست‌بسپارها درحدود ۸۰ سال قبل شناسایی شدند که برای نخستین بار زیست‌بسپار پلی‌هیدروکسی بوتیرات از باکتری باسیلوس مگاتریوم تولید شد. ازآن پس، کارشناسان زیست‌بسپار، به دنبال یافتن راه‌هایی‌اند که زیست‌بسپار باکتریایی را به تولید تجارتی برسانند[۳]. زیست‌بسپارهایی که سلول‌های باکتریایی قادر به تولید آنهایند، و از آن‌ها جدا شده‌اند، عبارتند از: پلی‌هیدروکسی آلکانوات، پلی لاکتیک اسید و پلی هیدروکسی بوتیرات. این زیست‌بسپارها از نظر خواص فیزیکی به بسپارهای پلی استیلن و پلی پروپیلن شبیه‌اند. زیست‌بسپارهای میکروبی در طبیعت به عنوان ترکیبات داخل سلولی میکروب‌ها یافت می‌شوند و بیشتر مدت زمانی که باکتری‌ها در شرایط نامساعد محیطی قرار می‌گیرند، اقدام به تولید این مواد می‌کنند. این مواد در حالت طبیعی به عنوان یک منبع انرژی راحت و قابل دسترس عمل می‌کنند[۴]. همچنین، هنگامی که محیط پیرامون باکتری غنی از

کربن باشد و از نظر سایر مواد غذایی مصرفی باکتری دستخوش کمبود باشد، باکتری اقدام به ساخت زیست‌بسپارهای یاد شده می‌کند. باکتری‌ها برای ساختن زیست‌بسپارهایی چون پلی هیدروکسی آلکانوات و پلی هیدروکسی بوتیرات از واکنش‌های تخمیری استفاده می‌کنند که در این واکنش‌ها نیز ازمواد خام گوناگونی استفاده می‌شود. پلی هیدروکسی بوتیرات را یک باکتری به نام استافیلوکوکوس اپیدرمیس می‌سازد که روی تفاله‌های حاصل از واکنش‌های روغن گیری دانه‌های کنجد رشد می‌کند و این زیست‌بسپار را می‌سازد. پلی هیدروکسی بوتیرات در درون سیتوپلاسم باکتری به صورت دانه‌های ذخیره‌ای (گنجیده) ذخیره می‌شود که این مواد را به وسیله سانتریفیوژ و واکنش‌های شست وشوی چند مرحله‌ای می‌توان استخراج و خالص‌سازی و آنها را مصرف کرد[۵]. زیست‌بسپارهای تولیدشده توسط میکروب‌ها با توجه به مکانشان در سلول به سه گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند[۶]:

۱. زیست‌بسپارهای سیتوپلاسمی: این زیست‌بسپارها کربن و انرژی لازم سلول را فراهم می‌آورند.

۲. زیست‌بسپارهای تشکیل‌دهنده دیواره سلولی: پپتید و گلیکان‌ها، تیکوئید اسید و لیپوپلی ساکاریدها.

۳. زیست‌بسپارهای برونادی: زیست‌بسپارهایی‌اند که از سلول به محیط ترشح می‌شوند.

اکثر زیست‌بسپارهای تولیدی، برون سلولی‌اند که زیست‌سنتز زیست‌بسپارهای برونداد را می توان به سه فاز اصلی تقسیم کرد[۷]:

۱. جذب یک رشدمایهٔ کربنی

۲. سنتز درون سلولی زیست‌بسپار

۳. ترشح زیست‌بسپار تولید شده، از سلول به محیط

زیست‌بسپارها در موارد مختلفی به سلول‌ها کمک می‌کنند، آن‌ها از سلول در مقابل فشارهای زیستی مانند رقابت، و نیز فشارهای نازیستی مانند دما، شدت نور و pH محافظت می‌کنند. تنوع گسترده زیست‌بسپارهای میکروبی با خواص فیزیکی و شیمیایی متنوع شرایط امید بخشی را برای آینده صنعت فراهم آورده است. تنها دو زیست‌بسپار خارج سلولی برای مصرف در صنایع غذایی در آمریکا و اروپا مجاز شناخته می‌شوند که زانتان و ژلان هستند.

جدول ۲. زیست‌بسپارهای کاربردی.

پلی‌استرها	پلی‌ساکاریدهای(گیاهی)
پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها	نشاسته (آمیلوز/ آمیلو پکتین)
پلی‌لاکتیک اسید	سلولز
پروتئین‌ها	آگار
ابریشم	آلژینات
کلاژن/ ژلاتین	کاراژنان
الاستین	پکتین
رزیلین	کنجاک[4]
چسب‌ها[1]	انواع صمغ‌ها (مانند گوار)
پلی‌آمینو اسیدها	پلی‌ساکاریدهای (حیوانی)
سویا، زین، گلوتن گندم، کازئین، سرم آلبومین	کیتین/کیتوسان
پلی‌ساکاریدها (میکروبی)	هیالورونیک اسید
زانتان	لیپیدها/سورفکتانت‌ها
دکستران	استوگلیسریدها، موم ها، سورفکتانت‌ها امولسان
ژلان	پلی‌فنول
لوان	لیگنین
کشک یان[2]	تانین
پلی‌گالاکتوزآمین	هیومیک اسید
سلولز (میکروبی)	بسپارهای خاص
پلی‌ساکاریدهای (قارچی)	لاک مخصوص الکل[5]
پولولان	پلی گاما گلوتامیک اسید
الزینان[3]	لاستیک طبیعی
مخمر گلوکان	بسپارهای سنتزی از چربی ها و روغن های طبیعی (مانند، نایلون از روغن)

1. Adhesives 2. Curd Ian 3. Elsinan 4. Konjac 5. Shellac

با توجه به گرایش رو به رشد مصرف منابع تجدیدپذیر، تحقیقات صنعتی به ویژه در بخش زیست‌سوخت‌ها، که به تولید اتانول زیستی می‌انجامد، به طور فزاینده‌ای با ترکیب کردن و مصرف زیست‌بسپارها مرتبط است. برخی ریزاندامگانها توانایی تولید و ترشح بیش از $40 g. L^{-1}$ زیست‌بسپار را در شرایط بحرانی دارند[۸].

تولید زیست‌بسپار توسط میکروب‌ها از مزیت‌های زیر برخوردارخواهد بود:

۱. مقداری از زیست‌بسپار که در طول ۳ تا ۶ ماه از گیاه می‌توان استحصال کرد، در یک روز می‌شود توسط ریزاندامگان تولید کرد.
۲. نیاز به انرژی خورشید در مقایسه با تولید توسط ریزجلبک
۳. امکان مصرف منابع کربن ارزان قیمت مانند گلیسرول، هیدروکربن‌های باقی مانده و CO_2[۹].
۴. عدم اشغال زمین‌های زراعی
۵. بازیابی آسان محصول به دلیل ترشح طبیعی زیست‌بسپار توسط اغلب میکروب‌های تولید کننده[۱۰].

معایب و یا عوامل عمدهٔ محدودکننده تولید زیست‌بسپار توسط ریزاندامگانها به اقتصاد فرایند مربوط می‌شود. هزینه‌های عمدهٔ فرایند مربوط به خرید رشدمایهٔ گران قیمت در برخی موارد، و دستیابی به زیرساخت‌های مورد نیاز فرایند مانند خرید زیست‌واکنشگاه و حفظ شرایط استریل است[۱۱]. در جدول (۳) گونه‌های میکروبی تولیدکننده چند زیست‌بسپار مهم و کاربردی درج شده است[۱۶-۱۲].

جدول ۳. زیست‌بسپارهای عمدهٔ تولید شده توسط میکروب‌ها.

زیست‌بسپار	گونه میکروبی
سلولز	استوباکتر زیلیوم[۱]
پولولان	آئروبازیدیوم پولولانس[۲]
زانتان	زانتاموناس کمپستریس[۳]
لوان	زیموناس موبایلیس[۴]
ژلان	سودوموناس الودئاو[۵]
دکستران	لئوکوموستوک[۶]
کوردلان	آگروباتریوم رادیوباکتر[۷]
آلژینات	سودوموناس آئروژینا[۸]
هیالورونیک اسید	استرپتوکوکوس زوئه پیدمیکوس[۹]

1. Acetobacter Xillium
2. Auerobasidium Pullulans
3. Xanthomonas Compestris
4. Zymonas Mobilis
5. Pseudomonas Elodea
6. Leucomostoc
7. Agrobacterium Radiobacter
8. Pseudomonas Auerozhyna
9. Streptococcus Zooepidemicus

با توجه به اینکه زیست‌واکنشگاه کانون مرکز انجام اکثر فرایندهای زیست‌شیمیایی است، یکی از محیط‌های مناسب و کنترل شده برای کشت ریزاندامگانها و تولید محصولات زیستی به شمار می‌آید. به‌خصوص، در تولید محصولات زیست‌بسپاری که باعث افزایش گرانروی محیط کشت می‌شود، کاربرد زیست‌واکنشگاهها برای اکسیژن‌رسانی بهتر و یکنواختی محیط بسیار مناسب است. با توجه به اهمیت زیست‌واکنشگاهها در فرایندهای زیست‌شیمیایی، در ادامه به شرح مختصر زیست‌واکنشگاهها و انواع آنها می‌پردازیم و در پایان نیز به تاثیر نوع زیست‌واکنشگاه در تولید زیست‌بسپار میکروبی می‌پردازیم.

۳. زیست‌واکنشگاهها

واژه زیست‌واکنشگاه به هر ظرفی گفته می‌شود که در آن فرایند شیمیایی زیستی مصرف‌کنندهٔ از سلول گیاهی، جانوری، میکروبی یا بخشی از موجود زنده مانند آنزیم برای تولید اقتصادی صورت پذیرد[۱۷].

استفاده از توانایی‌های ریزاندامگانها در خدمت به بشر به هزاران سال پیش بر می‌گردد. شاید نخستین کاربرد ریزاندامگانها را بتوان به تولید آب‌جو توسط سومریان در ۶۰۰۰ سال قبل از میلاد نسبت داد[۱۸]. در آن زمان انسان بدون آن‌که از مفهوم واکنش زیستی[۱۰] آگاه باشد، از آن بهره می‌برد. تولید نان، پنیر، شراب و آب‌جو از طریق تخمیر سنتی بیشتر مدیون تصادف بود تا طراحی منطقی. لوئی پاستور[۱۱]، شیمیدان و میکروب‌شناس فرانسوی، اولین کسی بود که توانست دانشمندان را نسبت به نقش انکارناپذیر ریزاندامگانها در فرایند تخمیر الکلی متقاعد کند. او پی برد که تخمیر در نتیجهٔ فعالیت یک موجود زنده ذره‌بینی به نام مخمر[۱۲] انجام می‌شود و وجود میکروب‌های ناخواسته در تولید الکل اختلال پدید می‌آورند. او با حذف این میکروب‌های ناخواسته تولید الکل را بهبود بخشید. کار پاستور را می‌توان پایه و اساس طراحی زیست‌واکنشگاهها دانست، زیرا شناسایی و درک فرایند، لازمه کنترل فرایند است[۱۹]. نقش عمدهٔ زیست‌واکنشگاهی با طراحی مطلوب، فراهم آوردن یک محیط کنترل شده به منظور دستیابی به شرایط بهینه‌ی رشد و یا تولید محصول است. محصولات زیست‌واکنشگاهها ناشی از یکی از

10. Bioreaction
11. Louis Pasteur
12. Yeast

سه فرایند عمدهٔ قرار زیر است:

۱. فرایندهایی که در آن محصول توسط سلول به صورت داخل سلولی یا خارج سلولی تولید می‌شود. محصولات سلولی برحسب زمان تولیدشان به دو دسته عوامل سوخت‌وسازی اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند.

۲. فرایندهایی که در آن‌ها کشت سلول و زیست توده[1] هدف است.

۳. فرایندهایی که در آن‌ها ترکیب افزوده شده به زیست واکنشگاه تغییر داده می‌شود. این فرایندها دگرگون‌سازی[2] زیستی نامیده می‌شود. دگرگون‌سازی زیستی غالباً به اعتبار توانایی آنزیمی ذاتی سلول‌ها انجام می‌شود. انواع سلول‌ها می‌توانند برای کاتالیز زیستی دگرگون‌سازی یک ماده‌ی خاص از طریق آب‌زدایی، اکسایش، هیدروکسیل‌دار کردن، آمین‌دار کردن، همپارسازی و طرق دیگر مصرف شوند[۲۱-۱۹].

نخستین زیست‌واکنشگاه استاندارد پذیرفته شده، یک مخزن همزن‌دار بود که در شرایط سترون اجرا می‌شد[۲۰]. در فاصلهٔ سال‌های ۱۹۰۰ تا ۱۹۴۰، محصولات عمدهٔ تولید شده شامل: زیست توده مخمر، گلیسرول، اسید سیتریک و دیگر محصولات بود. عمده‌ترین پیشرفت در این سال‌ها تولید مخمر نان و حلال‌های آلی بوده است. در خلال جنگ جهانی دوم و با توجه به ضرورت‌های آن دوره، تولید آنتی‌بیوتیک در شرایط غوطه‌ور و به طور کامل سترون انجام شد. تولید پنی‌سیلین فرایندی هوازی و نسبت به آلودگی بسیار حساس و آسیب‌پذیر است. پس از مدت‌ها تلاش، اولین واحد صنعتی تولید پنی‌سیلین به روش تخمیر غوطه‌ور راه افتاد. موفقیت‌های به‌دست آمده در زمینهٔ‌تولید پنی‌سیلین، پایه و اساس گسترش فرایندهای جدید و تولید محصولات نوی چون: سایر آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، ژیبرلین، اسیدهای آمینه و آنزیم‌ها شد و به تدریج تجهیزات واحد نیمه صنعتی[3] به منظور آزمودن روشها و فرایندهای جدید در مقیاس نیمه صنعتی راه‌اندازی شد. توسعهٔ روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی، بیان ژن‌های انسانی و پستانداران را در ریزاندامگانها ممکن کرد و به این ترتیب تولید پروتئین‌های انسانی در مقیاس انبوه ممکن شد[۲۲].

در زیست‌واکنشگاهها، از گسترهٔ وسیعی از اندامگانها یا کشت بافت‌ها که از نظر نیازهای رشد و تولید متفاوت‌اند، استفاده می‌شود. برآورده کردن این نیازها و شرایط خاص گاهی می‌تواند مشکل‌ساز باشد.

1. Biomass
2. Biotransformation
3. Pilot-Plant Facilities

علاوه براین، نتایج مقیاس آزمایشگاهی نیاز به بزرگ‌نمایی[4] برای حجم‌های زیاد دارد که با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی، بهداشتی و ایمنی و دیگر ملاحظات همواره به راحتی انجام‌شدنی نیست. زیست‌واکنشگاه را نباید یک واحد مجزا در نظر گرفت، بلکه باید به عنوان بخشی از عملیات واحد دارای فرایندهای بالادستی و پایین‌دستی به حساب آورده شود[۱۹]. عملکرد هر زیست‌واکنشگاه تابع عوامل گوناگونی چون غلظت زیست توده، شرایط سترون، هوادهی، اختلاط، تبادل گرما و عوامل دیگر است. فرایند بهینه‌سازی هر سامانه با درک بیشتر زیست‌شیمی و فیزیولوژی اندامگان، استفاده از رایانه برای پردازش داده‌ها، کنترل و ایجاد مدل‌های مناسب، بهبود می‌یابد[۲۶-۲۱]. در طراحی زیست‌واکنشگاه باید نیازها و ویژگی‌های هر اندامگان در نظر گرفته شود. مثلاً، باکتری‌ها و مخمرها غالباً به اکسیژن زیادی نیاز دارند، قارچ‌ها، از جمله استرپتومایست‌ها، به دلیل رشد منشعب و رشته‌ای در همزدن مشکل ایجاد می‌کنند؛ جلبک‌ها اغلب به نور زیادی نیاز دارند، بافت‌های گیاهی و جانوری به تنش بسیار حساسند[۲۰و۱۸]. انواع زیست‌واکنشگاهها در دو گروه مطابق شکل (۲) طبقه‌بندی می‌شوند. رایج‌ترین نوع زیست‌واکنشگاه هوازی امروزی، زیست‌واکنشگاه مخزن همزن‌دار مطابق شکل (۳) است[۱۹]. این نوع زیست‌واکنشگاه نسبت به زیست‌واکنشگاههایی که با نیروی گاز (اغلب هوا) کار می‌کنند، می‌توانند نیروی بیشتری را بر محیط وارد آورند که این امر به اختلاط و انتقال جرم بهتر مواد در محلول‌های گرانرو ناشی از غلظت بالای سلولی و دیگر دلایل منجر می‌شود. ولی در کنار این آثار مثبت، همزن مکانیکی تنش برشی نسبتاً زیادی ایجاد می‌کند که برای سلول‌ها زیانبار است.

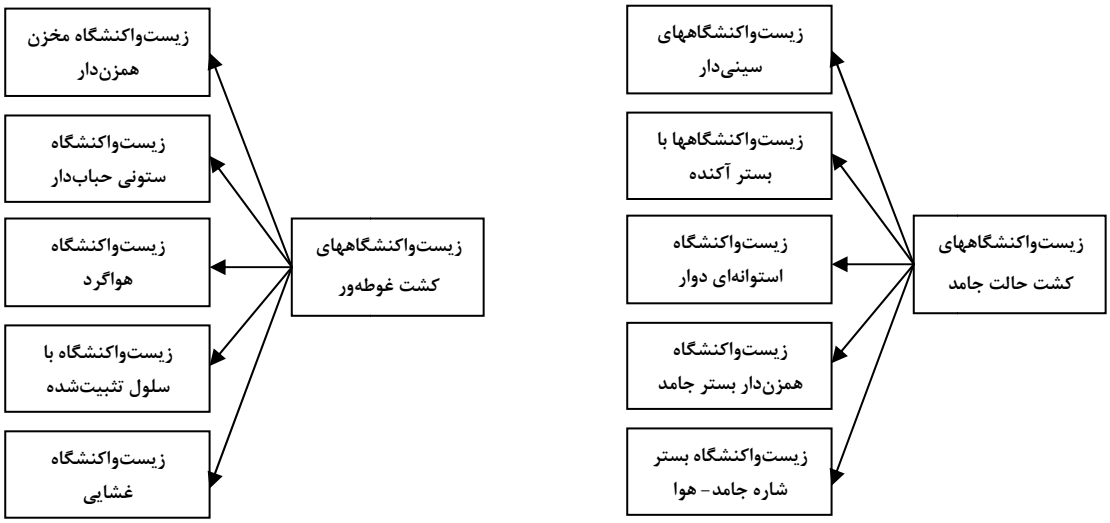
زیست‌واکنشگاه هواگرد یکی از پرکاربردترین زیست‌واکنشگاهها در صنایع نیز به شمار می‌آید. این زیست‌واکنشگاه دارای یک ستون است که به دو ناحیه تقسیم شده است:

۱. ناحیه بالا رونده[5] که در آن گاز فاز مایع را بالا می‌راند.

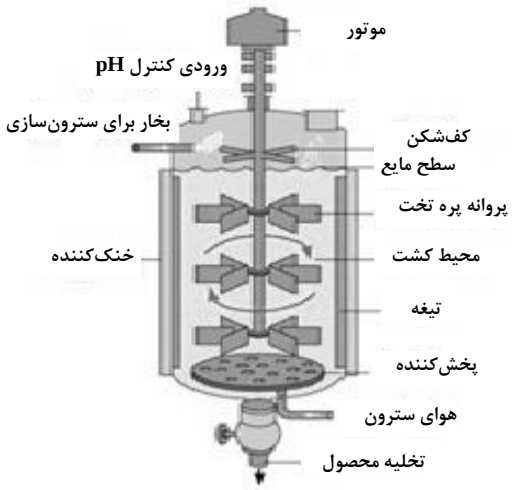
۲. ناحیه پایین‌آورنده[6] که در آن فاز مایع و کمی گاز پایین می‌آید.

زیست‌واکنشگاههای زیستی هواگرد برحسب نوع گردش مایع، مطابق شکل (۴)، به دو دسته با حلقه داخلی[7] (AILR) و *حلقه خارجی*[8] (AELR) تقسیم می‌شوند[۲۵و۱۸].

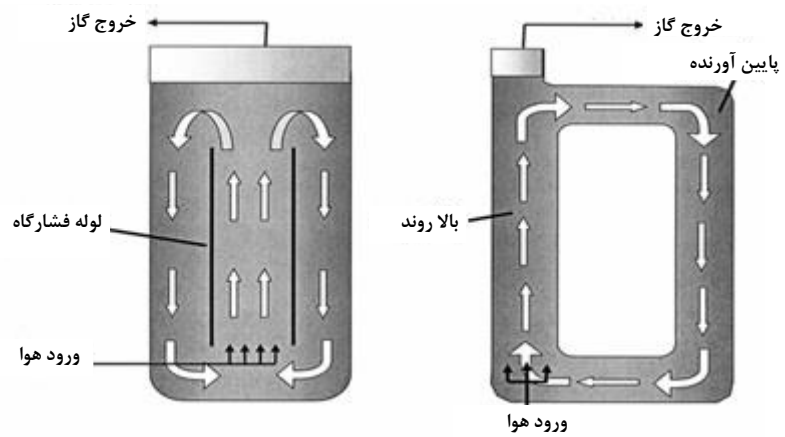
4. Scale-Up
5. Riser
6. Downcomer
7. Airlift Internal Loop Reactor
8. Airlift external Loop Reactor



شکل ۲. انواع زیست‌واکنشگاهها.



شکل ۳. اجزای یک زیست‌واکنشگاه همزن‌دار.



شکل ۴. زیست‌واکنشگاههای زیستی هواگرد: (الف) جریان حلقوی خارجی، (ب) جریان حلقوی داخلی با لوله فشارگاه.

۴. تاثیر نوع زیست‌واکنشگاه در تولید زیست‌بسپار

انتقال از مقیاس ظروف لرزنده[1] به زیست‌واکنشگاهها یک گام بحرانی در فرایندهای افزایش مقیاس است. به‌خصوص، در تولید محصولات زیست‌بسپاری که باعث افزایش گرانروی محیط کشت می‌شود. فرایند تولید مقرون به صرفهٔ زیست‌بسپار نیز علاوه بر ظرفیت تولید گونه خاص به فرایندهای داخل ظرف تخمیر و رشدمایه‌های موجود بستگی دارد. در سال ۲۰۰۴، ال.سلبمن[2] و همکارانش[۲۷] به بررسی تولید زیست‌بسپار بتاگلوکان از طریق سویه بوتریسفایریارئودینا[3] در انواع زیست‌واکنشگاهها پرداختند. در این آزمایش از سه نوع زیست‌واکنشگاه با شرایط عملیاتی زیر بهره گرفته شد:

۱. STR1: واکنشگاه همزن‌دار ۳ لیتری مجهز به دو همزن توربینی ۶ تیغه با قطر mm ۴۵ که تیغه نوع راشتون در ته ظرف و تیغه نوع جریان محوری در بالا، ظرف قرار دارد.

۲. STR2: واکنشگاه با شرایط واکنشگاه STR1 ولی با همزن پروانه‌ای ۳ تیغه با قطر mm ۴۵ و یک لوله فشارگاه با قطر mm ۸۰ بود.

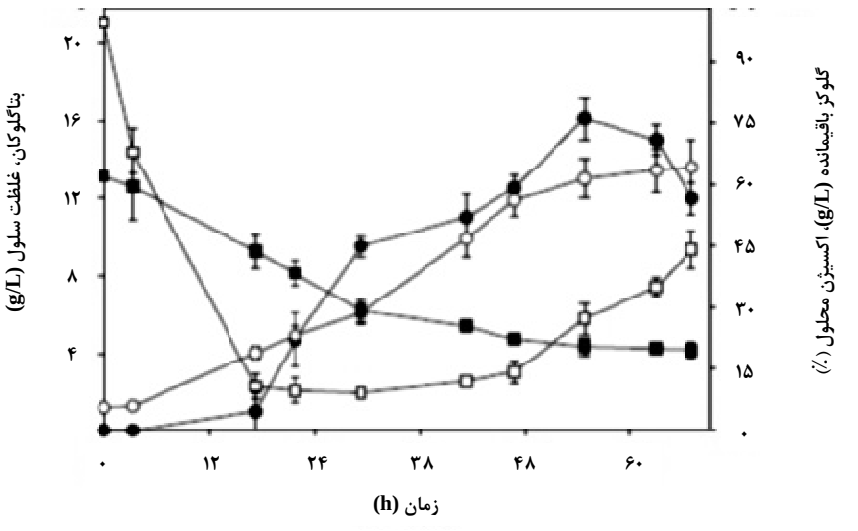
۳. هوا راند : با حلقهٔ خارجی با حجم ۲ لیتر که شامل استوانه شیشه‌ای با قطر mm ۶۵ در پایین و قطر mm ۹۵ در بالا و ارتفاع mm۳۰۰ است.

۴. ۱ تولید بتاگلوکان در STR1

در این نوع واکنشگاه که شامل ۲ تیغه مختلف است، ابتدا دور همزن rev/min ۳۰۰ بررسی و سرعت هوادهی vvm ۱ در دمای $28^{\circ}C$ کنترل شده است. مطابق شکل (۵)، حداکثر مقدار تولید بتاگلوکان در مدت زمان h ۵۴، برابر g/L ۱۶/۱ بوده است. در این نمودار درصد DO به سرعت به حداقل مقدار خود، یعنی ۹/۱٪ کاهش می‌یابد و سپس افزایش پیدا می‌کند که انتظار می‌رود در تطابق با فاز ساکن است.

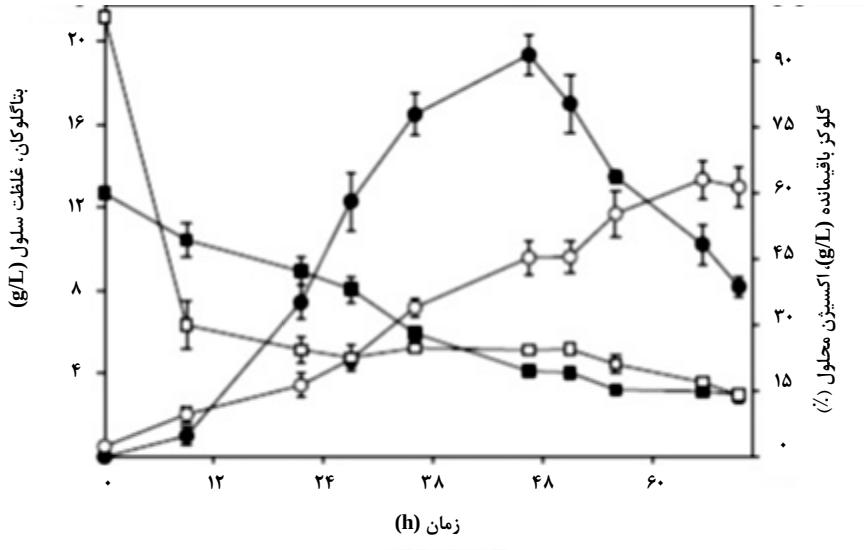
در شکل (۶)، با افزایش دور همزدن به rev/min ۵۰۰، مقدار تولید بتاگلوکان به g/L ۱۹/۴ افزایش یافته است. در اینجا، درصد DO به آهستگی کاهش یافته و در پایان زمان کشت به ۱۰٪ رسیده است.

با افزایش دور همزن از ۵۰۰ به ۷۰۰ دور در دقیقه، تولید محصول کاهش یافته و به g/L ۱۵/۳ رسیده است (شکل (۷)). در این‌جا هم درصد DO به آهستگی کاهش یافته و در پایان زمان کشت به ۱۰٪ رسیده است.

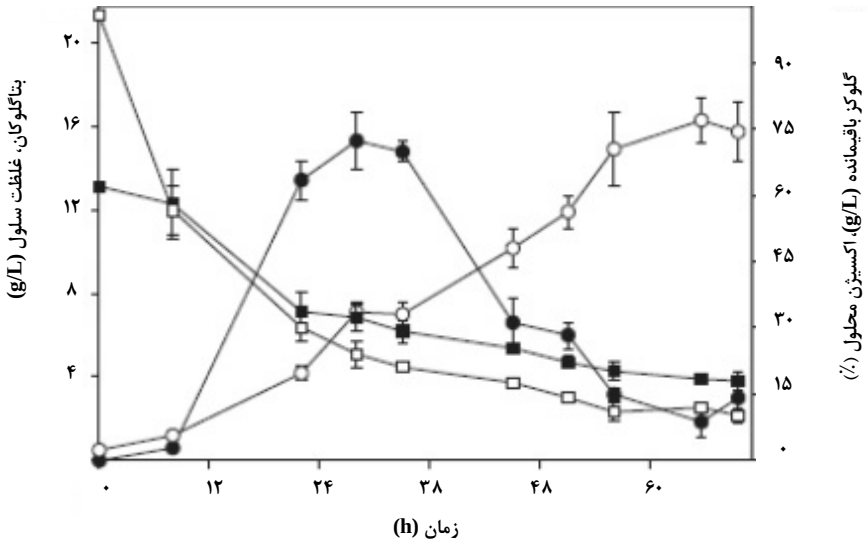


شکل ۵. زمان کشت با دور ۳۰۰rev/min بر حسب غلظت سلول (X، ○) ، بتا گلوکان (P، ●) اکسیژن محلول (DO، □) ، گلوکز باقیمانده (S، ■).

1. Shake Flask
2. L. Selbmann
3. Botryosphaeria Rhodina



شکل ۶. زمان کشت با دور ۵۰۰ rev/min بر حسب غلظت سلول (X، ○)، بتا گلوکان (P، ●)، اکسیژن محلول (DO، □)، گلوکز باقیمانده (S، ■).



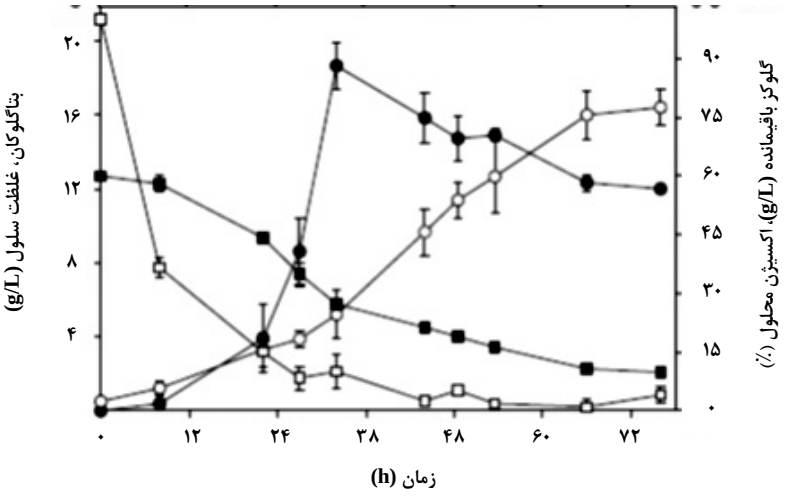
شکل ۷. زمان کشت با دور ۷۰۰ rev/min بر حسب غلظت سلول(X، ○)، بتا گلوکان (P، ●)، اکسیژن محلول(DO، □)، گلوکز باقیمانده (S، ■).

۴. ۲ تولید بتاگلوکان در STR2

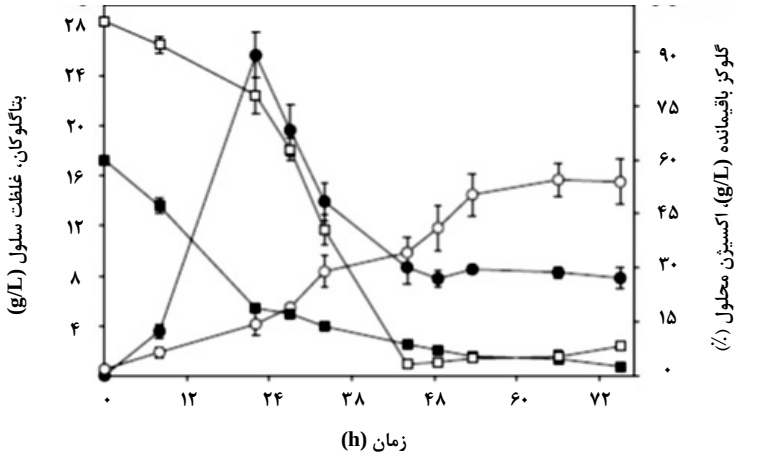
در این نوع واکنشگاه از پروانه ۳ تیغه همراه با لوله فشارگاه استفاده شده است. مطابق شکل (۸)، در دور همزدن ۵۰۰ rev/min تولید بتاگلوکان به ۱۸/۷ g/L رسید، که تقریباً با مقدار محصول STR1 برابر است ولی زمان رسیدن به حداکثر مقدار محصول کوتاه شده و به‌جای ۴۶ ساعت به ۳۲ ساعت رسیده و درصد DO محیط نیز با رشد سلول به زیر ۵٪ کاهش یافته است.

۴. ۳ تولید بتاگلوکان در Air lift

در واکنشگاه بالابر بادی با حلقهٔ خارجی، تولید بتاگلوکان بعد از ۲۲ h به ۲۵/۷ g/L رسیده است. در این مدت زمان ۶۸/۸٪ گلوکز مصرف شده در حالی درصد DO محیط فقط به ۷۸٪ رسیده و بعد از آن DO به سرعت کاهش یافته است (شکل (۹)).



شکل ۸. زمان کشت با دور rev/min ۵۰۰ در STR2 بر حسب غلظت سلول(X، ○)، بتا گلوکان(P، ●)، اکسیژن محلول(DO، □)، گلوکز باقیمانده (S، ■).



شکل ۹. زمان کشت در واکنشگاه بالابر بادی بر حسب غلظت سلول (X، ○)، بتا گلوکان (P، ●) اکسیژن محلول (DO، □)، گلوکز باقیمانده (S، ■).

۴. ۴ نتایج ال.سلبمن و همکارانش

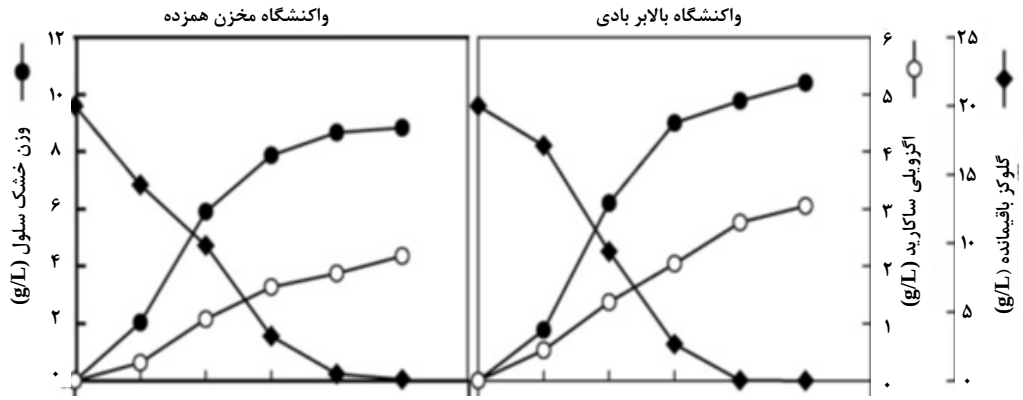
در واکنشگاه STR1، سه دور همزدن متفاوت بررسی شد و نشان داد که افزایش دور تا rev/min ۵۰۰ باعث آزاد شدن گلوکان بیشتری از دیواره سلولی می شود و اختلاط هم به خوبی انجام شده است، اما با افزایش دور تا rev/min ۷۰۰، به تنش زیادی انجامیده و باعث وارد آمدن خسارت به سلول می‌شود، مقدار تولید محصول کاهش یافته است. بنابراین انتخاب دور مناسبی برای همزدن، که در آن هم تنش پایین باشد و هم اختلاط به خوبی انجام شود، ضروری است.

در این مطالعه، همانطور که دیده شد، با افزایش سرعت همزدن تا rev/min ۷۰۰ تولید محصول را زیاد نمی‌کند و در حقیقت مقدار DOکمتر از مقدار جذب شده در دور ۵۰۰ است. در واکنشگاه بالابر بادی در زمان کم نیز محصول زیادی تولید شده و انتقال جرم و همزدن به خوبی انجام شده است. مقدار DO جذب شده به میزان ۷۸٪، نشان‌دهنده اختلاط بسیار خوب است (جدول (۴)). بنابراین، چنین واکنشگاههایی نسبت به نوع STR به علت پیچیدگی مکانیکی کمتر و نیز مصرف انرژی کمتر، مناسب‌ترند[۲۷].

همچنین، یون‌جای‌چو[1] و همکارانش[۲۸] در سال ۲۰۰۶ به مقایسه تولید اگزوپلی‌ساکارید از گونه ترملافوسیفورمیس[2] پرداختند. در اینجا برای مقایسه، از یک واکنشگاه بالابر بادی ۵ لیتری با شرایط یکسان راکتور STR (حجم کاری ۵ لیتر، دمای ۲۸°C، سرعت هوادهی ۲ vvm، سرعت همزدن۲۰۰ rpm و pH=۸) استفاده شده است. در واکنشگاه STR چون از همزن مکانیکی استفاده می‌شود، تنش در محیط ایجاد می‌شود و به سلول آسیب وارد می‌آید و در واکنشگاه بالابر بادی، چون همزن مکانیکی وجود ندارد، آثار تنش کمتر از STR است. مطابق شکل (۱۰)، در واکنشگاه بالابر بادی غلظت سلول و EPS تولیدی به ترتیب ۱۰/۳۰ g/L و ۳/۰۵ g/L در مدت پنج روز بوده است. در جدول (۵) نیز همه پارامترهای جنبشی در واکنشگاه بالابر بادی با STR مقایسه شده است و نتیجه نشان می‌دهد که این پارامترها در بالابر بادی مقادیر بیشتری دارند. در مقایسهٔ بین واکنشگاه STR و بالابر بادی نتایج نشان داده که واکنشگاه بالابر بادی مناسب‌تر است[۲۸].

جدول ۴. نتایج ال.سلبمن و همکارانش.

نوع واکنشگاه	T_{max}(h)	P(g/L)	X(g/L)	r_p(g/L/h)	μ_s (%)	$Y_{p/s}$(g/g)	$Y_{p/x}$(g/g)
STR-1	۴۶	۱۹/۴±۰/۹	۹/۶±۰/۸	۰/۴۲±۰/۰۳	۶۷/۵	۰/۴۸±۰/۰۱	۲/۰۲±۰/۲۵
STR-2	۳۲	۱۸/۷±۱/۲	۵/۵±۰/۶	۰/۵۸±۰/۰۷	۵۴/۶	۰/۵۷±۰/۰۳	۳/۴۰±۰/۲۶
بالابر بادی[3]	۲۲	۲۵/۷±۱/۸	۴/۱±۰/۵	۱/۱۷±۰/۰۹	۶۸/۸	۰/۶۲±۰/۰۵	۶/۲۴±۰/۴۴



شکل ۱۰. نمودار مقایسه غلظت وزن خشک سلولی، EPS، گلوکز باقیمانده در زیست‌واکنشگاه بالابر بادی و STR.

جدول ۵. پارامترهای جنبشی برای راکتور STR و بالابر بادی.

پارامتر جنبشی	واکنشگاه مخزن همزده	واکنشگاه بالابر بادی
شدت رشد ویژه μ (d^{-1})	۰/۱۹	۰/۲۱
جرم سلول بیشینه X_{max}(g/L)	۸/۸۳	۱۰/۴۰
اگزوپلی ساکارید بیشینه P_{max}(g/L)	۲/۱۸	۳/۰۵
شدت مصرف ویژه سوبسترا $Q_{s/x}$(g/g.d)	۰/۴۰	۰/۴۱
شدت تولید ویژه اگزوپلی ساکارید $P_{p/x}$ (g/g.d)	۰/۰۵	۰/۰۶
بازده اگزوپلی ساکارید بر سوبسترا (g/g)	۰/۱۳	۰/۱۵

1. Airlift
2. E. Jae Cho
3. Tremella Fuciformis

۵. نتیجه‌گیری کلی

بسپارهای متداول امروزی از نفت خام حاصل می‌شوند که با توجه به محدود بودن منابع نفتی، باید به تدریج جای آنها به زیست‌بسپارها سپرده شود که از منابع تجدیدپذیر حاصل می‌شوند. با توجه به این‌که زیست‌بسپارها از موجودات زنده‌ای چون گیاهان، جانوران و ریزاندامگانها به طور طبیعی تولید می‌شوند و از لحاظ زیست محیطی نیز تجزیه‌پذیرند، بسیار مناسب به شمار می‌آیند. این مواد بخش مهمی از نقشهای بوم‌سازگانی را برعهده دارند. زیست‌بسپارها به دلیل قابلیت تجزیه‌زیستی، توسط خود موجودات بازمصرف می‌شوند. به بیان دیگر، طی روش‌های حفاظت زیست محیطی و بوم‌شناختی مانند تولید پوسال، جذب در خاک و تیمارهای زیستی، تجزیه می‌شوند. در واقع، این مواد، یک چرخه تولید و تجزیه را طی می‌کنند. امروزه مواد زیست‌بسپاری در شکل‌های گوناگونی تولید شده‌اند؛ بنابراین ظرفیت مصرف آنها در صنایع گوناگون وجود دارد. به منظور مصرف زیست‌بسپارها در صنایع، تجاری شدن فرایند تولید و نیز بهینه‌سازی تولید آنها ضروری است. تجاری‌سازی فرایند تخمیری، مستلزم اقتصادی کردن فرایند و کاستن هزینه‌هاست. محصولات زیست‌بسپاری تولیدی توسط باکتری‌ها گستره‌ی وسیعی از مواد با ارزش و مقرون به صرفه را با کاربردهای گسترده در داروسازی و صنایع غذایی به دست می‌دهد که هیچ گونه مشکلی از لحاظ سمی و زیانبار بودن آنها شناخته نشده است.

همچنین، باتوجه به اینکه نقش عمدهٔ هر زیست‌واکنشگاه مطلوب، فراهم کردن محیطی کنترل شده به منظور دستیابی به شرایط بهینه رشد و یا تولید محصول است، نوع زیست‌واکنشگاه به‌کار رفته نیز در تولید زیست‌بسپار تاثیر گذار است. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، زیست‌واکنشگاها بالابر بادی مناسب‌ترین زیست‌واکنشگاه برای تولید زیست‌بسپار به‌شمار می‌آید. در واکنشگاه بالابر بادی، چون همزن مکانیکی وجود ندارد، آثار تنش و آسیب‌های وارد بر سلول کمتر است. در نتیجه سلول بیشتر رشد می‌کند و محصول بیشتری تولید می‌شود.

مراجع

[1] Flieger, M., Kantorova, M., Prell, A., Řezanka, T., Votruba, J., "Biodegradable plastics from renewable sources", Folia microbiologica, 48(1), 27-44,(2003).

[2] Nair, L. S., Laurencin, C. T., "Biodegradable polymers as biomaterials", Progress in polymer science, 32(8), 762-798 ,(2007).

[3] Jonas, R., Farrah, L. F., " Production and application of microbial cellulose. Polymer Degradation and Stability", 59,101-106, (1998).

[4] Pichavant, L., "Synthese et reactivite de monomere issus de ressources renouvelables pour la polymerization radicalaire", Ph.D. Thesis. Technologieet Santé (p.259). Reims: Universite de Reims Champagne-Ardenne, (2009).

[5] Reddy, N., Yang, Y., "Biofibers from agricultural by products for industrial applications", Trends in Biotechnology, 23(1), 22-27, (2005).

[6] Donotaba, F., Fontana, A., Baccoua, J. C., Schorr-Galindo, S., "Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, geneticsande-xtraction", Carbohydrate Polymers, 87, 951-962, (2012).

[7] Vandamme, E. J., De Baets, S., Steinbuchel, E., "Biopolymers, Polysaccharides I Polysaccharides from porokaryotes", Belgium ,Wiley-VCH, p. 532, (2002).

[8] Lin, E. S., Chen, Y. H., "Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharides production in submerged cultivation of Antorida cinnamomea using complex media", Bioresource Technology, 98(13), 2511-2517,(2007).

[9] López, C. G., Fernández, F. A., Sevilla, J. F., Fernández, J. S., García, M. C., Grima, E. M., Utilization of the cyanobacteria Anabaena sp. ATCC33047 in CO_2 removal processes", Bioresource Technology, 100(23), 5904-5910,(2009).

[10] Bejar, V., Llamas, I., Calvo C., Quesada E., "Charactrization of exopolysaccahredes produced by 19 halophilic strains of the species Halomonas eurihalina", Journal of biotechnology , 61(2), 135-141, (1998).

[11] Dudman, W. F., "The role of surface polysaccharides in natural enviroments", In I. W. Sutherland (Ed.), Surface carbohydrates of the prokaryotic cell, 357-454, (1977).

[12] Leonardo, S. M., Gill, M. C., Delgadillo, I., "Parcial charachterisation of exopolysaccharides exudated by planktonic diatoms maintained in batch calture", Acta Oecologic, 24, 49- 55,(2003).

[13] Emtiazi, J., Etemadifar, Z., Tavassoli, M., "A novel nitrogen- fixing cellulyticbacterium associated with root of corn is a candidate for production of single cell protein", Biomass and Bioenergy, 25(4), 423-426, (2013).

[14] Stredansky, M., Conti, E., Bertocchi, C., Matullova, M., Zanetti, F., "Succinogly can production by agrobacterium tumefaciens", Journal of ferementation and bioenergineerinf. 85 (4), 398- 403, (1998).

[15] Shih, I. L., Chen, L. D., Wu, J. Y., "Levan production using bacillus subtilinatton cells immobilized on alginate", Carbohidrate polymers. 82(1), 111-117, (2010).

[16] Poli, A., Kazak, H., Gürleyendağ, B., Tommonaro, G., Pieretti, G., Öner, E. T., Nicolaus, B., "High level synthesis of levan by novel halomonas species growing on defined media", Carbohidrate polymers, 78(4), 651-657, (2009).
[17] El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F., Demain, A. L., Allman, A. R., "Fermentation microbiology and biotechnology", Fermentation microbiology and biotechnology. CRC press, (2011).
[18] Scragg, A. H., "Bioreactors in biotechnology, a practical approach", Ellis Horwood series in biochemistry and biotechnology (USA), (1991).
[19] Todaro, C. M., Vogel, H. C., "Fermentation and biochemical engineering handbook", (2nd Edition), New York, William Andrew, (2014).
[20] Williams, J. A., "Keys to bioreactor selection", Chemical engineering progress, 98(3), 34-41, (2002).
[21] Gogate, P. R., Kabadi, A. M., "A review of applications of cavitation in biochemical engineering/ biotechnology", Biochemical Engineering Journal, 44(1), 60-72, (2009).
[22] Spier, R. E., "Encyclopedia of cell technology", (2 volume set), John Wiley and Sons, (2000).
[23] Bailey, J. E., Ollis, D. F., "Biochemical Engineering Fundamental", (2nd Edition), New York, Chemical Engineering Education, (1989).
[24] Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J., "Principles of Fermentation Technology", (2nd Edition), New York, Elsevier, (2013).
[25] Leib, T. M., Pereira, C. J., Villadsen, J., "Bioreactors: a chemical engineering perspective", Chemical engineering science, 56(19), 5485-5497, (2001).
[26] Chisti, Y., Moo-Young, M., "Bioreactors", Encyclopedia of physical science and technology, 2, 247-271, (2002).
[27] Selbmann, L., Crognale, S., Petruccioli, M. "Beta-glucan production by Botryosphaeria rhodina in different bench-top bioreactors", Journal of applied microbiology, 96(5), 1074-1081. (2004).
[28] Cho, E. J., Oh, J. Y., Chang, H. Y., Yun, J. W., "Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom Tremella fuciformis", Journal of biotechnology, 127(1), 129-140, (2006).