

## تولید میکروبی لایزین با استفاده از آب پنیر و ملاس

مرضیه موسوی نسب<sup>۱\*</sup> - نازنین داراب زاده<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱

تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۶

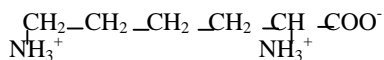
### چکیده

لایزین<sup>۲</sup> اسید آمینه‌ای ضروری در تغذیه انسان‌ها و حیوانات است که به صورت بیولوژیکی در بدن سنتز نمی‌شود و بایستی به منظور بهبود کیفیت پروتئین، به غذا و مکمل‌های غذایی افزوده شود. لایزین دارای کاربردهای دارویی در فرموله کردن رژیم‌هایی با ترکیب اسیدهای آمینه به میزان مشخص نیز می‌باشد. فرایندهای شیمیایی، آنزیمی و بیوتکنولوژیکی برای تولید لایزین مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به نظر می‌رسد، روش بیوتکنولوژیکی (تخمیر) اقتصادی‌ترین و قابل اجرا ترین روش در تولید لایزین باشد. در پژوهش حاضر، تولید لایزین توسط بروی باکتریوم لیننس<sup>۳</sup> با استفاده از آب پنیر و ملاس، با هدف استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان مواد اولیه ارزان قیمت برای تولید محصولات با ارزش افزوده، مورد مطالعه قرار گرفت. آماده سازی آب پنیر از طریق هیدرولیز لاکتوز به وسیله اسید کلریدریک و آماده سازی ملاس از طریق افزودن مواد شیمیایی به آن صورت گرفت. ارزیابی کمی و کیفی لایزین تولیدی توسط روش کروماتوگرافی لایه نازک بالا رونده<sup>۴</sup> و استفاده از اسپکتروفوتومتری انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت لایزین با گذشت زمان به صورت معنی داری در هر دو محیط افزایش یافت. بیشترین مقدار لایزین تولیدی ۱۱/۸ و ۱۰/۵ گرم در لیتر به ترتیب در محیط حاوی آب پنیر یا ملاس به دست آمد. با افزایش میزان لایزین pH در محیط حاوی ملاس، افزایش و در محیط حاوی آب پنیر، کاهش یافت. در روز ششم، میزان لایزین تولیدی در محیط آب پنیر در مقایسه با ملاس به صورت معنی داری بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: لایزین، تخمیر، بروی باکتریوم لیننس، آب پنیر، ملاس

مقدمه ۲۱ ۵۴۳

موقعیت زنجیر آلیفاتیک خود دارد که فرمول آن بصورت زیر می‌باشد (۷):



این اسید آمینه در انسان و دیگر پستانداران سنتز نمی‌شود. از آنجا که کودکان و حیوانات در حال رشد، نیاز زیادی به لایزین جهت تشکیل استخوان دارند، این اسید آمینه ضروری باید از طریق قسمتی از رژیم غذایی این موجودات تامین شود. با توجه به کمبود این اسید آمینه در بسیاری از غلات و سبزیجات، بایستی رژیم غذایی را با لایزین غنی سازی نمود (۳ و ۷).

تولید جهانی L- لایزین برای تامین نیازها، بیش از ۳۸۰۰۰۰ تن در سال بوده که در سال ۲۰۰۱ این مقدار به ۵۵۰۰۰۰ تن رسیده است و بیش از ۹۰۰۰۰ تن از این مقدار از طریق تخمیر مستقیم میکروبی و روش‌های تغییر شکل زیستی تولید می‌گردد. مقدار باقیمانده آن از طریق سنتز شیمیایی تولید می‌شود. تولید لایزین به روش شیمیایی دارای یک ایراد عمده است زیرا مخلوطی از ایزومرهای D و L سنتز می‌شود ولی بدن فقط L- لایزین را مصرف می‌نماید. از این رو

امروزه بسیاری از فراورده‌های حاصل از تخمیرهای میکروبی به عنوان افزودنی و مکمل به مواد غذایی اضافه می‌شوند. این مواد شامل آنتی اکسیدانها، مواد طعم دهنده، رنگها، مواد نگهدارنده، مواد شیرین کننده و ویتامین‌ها همچنین اسیدهای آلی، پلی ساکاریدها و اسیدهای آمینه می‌باشند. اخیرا کل مصرف سالیانه جهانی اسیدهای آمینه به بیش از ۲ میلیون تن رسیده است و رشد سالانه آن حدود ۱۰ درصد تخمین زده شده است (۵ و ۸). لایزین یکی از اسید آمینه‌های ضروری تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که گروه R آن دارای بار مثبت است (اسید آمینه بازی) و یک گروه آمین اول دیگر در

۱ و ۴ به ترتیب استادیار و دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

\* نویسنده مسئول: (Email: mousavi@shirazu.ac.ir)

- 3- Lysine
- 4- *Brevibacterium linens*
- 5- Ascending thin layer chromatography

## مواد و روش ها

### تولید لایزین با استفاده از آب پنیر توسط بروی باکتریوم لیننس

**آماده سازی باکتری:** باکتری (PTCC 1603) *Brevibacterium linens* از پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. این باکتری در محیط Nutrient Broth در دمای  $30^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۲ روز فعال گردید و پس از آن برای تلقیح در محیط پیش کشت جهت تکثیر باکتری به نسبت ۱:۱۰ (۷/۷) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱) (۱۴).

جدول ۱- میزان ترکیبات موجود در محیط پیش کشت °

ترکیبات	غلظت (g/l)	ترکیبات	غلظت (g/l)
Glucose	۲۰	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	۱
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	۰/۲۵	NaCl	۲/۵
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	۱	yeast extract	۱۰
peptone water	۱۰	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	۰/۱

پس از آماده سازی، محیط پیش کشت استریل شده ( $121^{\circ}\text{C}$ ) به مدت ۱۵ دقیقه) و باکتری فعال شده در آن تلقیح شد و به مدت ۱۸ ساعت در اینکوباتور لرزان<sup>۶</sup> با  $120 \text{ rpm}$  در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد (۱۴). پس از گذشت ۱۸ ساعت، باکتری وارد محیط اصلی تخمیر حاوی سوبسترا گردید که آماده سازی آن به شرح زیر بود:

**آماده سازی محیط کشت تخمیر حاوی سوبسترا (آب پنیر):** ترکیب اصلی تشکیل دهنده محیط کشت، آب پنیر UF بوده که عمدتاً حاوی بیش از ۱/۲۵ درصد لاکتوز و ۰/۲۵ درصد پروتئین شیر می باشد (۱). در این تحقیق، آب پنیر از شرکت پگاه فارس با مشخصات ذیل تهیه گردید: اسیدیته ۸ درجه دورنیک، pH ۶/۴ چربی صفر، پروتئین ۰/۲۵ درصد و ماده خشک ۵/۵ تا ۶ درصد که قسمت عمده آن لاکتوز می باشد.

برای تهیه محیط کشت باید ابتدا لاکتوز موجود در آب پنیر را توسط اسید هیدرولیز کرد (AHWP)<sup>۷</sup> بدین منظور ۶۰۰ میلی لیتر از آب پنیر برداشته شد و ۶۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۱/۲ نرمال به آن افزوده شد و به مدت ۲۴ ساعت در حمام آبی در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. سپس سریعاً سرد شده و اسید اضافی از طریق افزودن سود (NaOH) ۱ نرمال خنثی شد و pH محیط در حدود ۷ تنظیم گردید (۶).

تولید میکروبی دارای این مزیت است که فقط فرم ایزومری L را تولید می نماید. قسمت عمده ای از لایزین تولیدی برای غذای حیوان کاربرد دارد و در صنایع غذایی لایزین برای غنی سازی غذاهایی که با فقدان این اسیدآمین ه مواجه هستند، بکار می رود. به نظر می رسد در میان روش های تولیدی، تخمیر، روش عملی و اقتصادی برای تولید لایزین است (۱، ۲ و ۴). تا کنون مطالعات زیادی در مورد تولید لایزین توسط باکتری ها صورت گرفته است. سن و چاترجی (۱۱) اظهار داشتند که در pH و منابع کربن و نیتروژن بهینه، یک زیرگونه مصرف کننده هیدروکربن از باکتری *آرتوباکتر گلوبیفورمیس*<sup>۱</sup> ۳/۴ گرم در لیتر لایزین تولید کرد و افزودن آنتی بیوتیک و مواد مغذی باعث افزایش بازده لایزین شد. پلاچیز و اولبرت (۹) با استفاده از یک گونه جهش یافته باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم<sup>۲</sup>، در مدت زمان ۴ روز ۴۵ گرم در لیتر لایزین تولید کردند. سن و چاترجی (۱۲) مطالعاتی بر روی تاثیر ویتامین B و عناصر جزئی<sup>۳</sup> بر تولید لایزین توسط یک زیر گونه خاص از میکروکوکوس انجام دادند. این باکتری در شرایط معمول ۲/۶ گرم در لیتر لایزین تولید می کرد که افزودن ویتامین B و عناصر جزئی به محیط بهینه، سبب ترغیب رشد باکتری و افزایش میزان لایزین تولیدی گردید. حاجی ساسی و همکاران (۳) تاثیر غلظت اولیه گلوکز از ۶۰ تا ۲۳۳ گرم در لیتر را بر تولید لایزین توسط گونه های کورینه باکتریوم گزارش کردند. حداکثر میزان تولید لایزین در غلظت ۱۶۵ گرم در لیتر گلوکز به دست آمد. شاه و همکاران (۱۳) تولید میکروبی لایزین را به وسیله یک زیرگونه جهش یافته جدید از کورینه باکتریوم گلوتامیکوم افزایش دادند. اکویلر و ایتا (۲۰۰۵) یک باکتری بازیافت شده از خاک را برای تولید لایزین مورد مطالعه قرار دادند. این باکتری باسیلوس مگاتریوم/اس پی ۱۴<sup>۴</sup> نام داشت که در مدت ۹۶ ساعت ۳/۵۶ میلی گرم در میلی لیتر لایزین تولید می کرد. نتایج نشان داد اگر ۸ درصد گلوکز و ۴ درصد کلرید آمونیوم به عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده شوند، سبب افزایش میزان تولید لایزین خواهد شد. در تحقیقی که توسط موسوی نسب و همکاران (۱۰) انجام شد، تولید لایزین توسط کورینه باکتریوم گلوتامیکوم بر روی منابع کربنی مختلف از ضایعات کشاورزی در مقایسه با گلوکز بررسی شد و همچنین اثر منابع نیتروژنی مختلف بر تولید لایزین تعیین گردید. نتایج نشان داد که بالاترین بازده تولید مربوط به ملاس و بهترین منبع نیتروژنی سولفات آمونیوم بود. در پژوهش حاضر، هدف کاربرد باکتری ها در استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان مواد اولیه ارزان قیمت (ملاس و آب پنیر) جهت تولید محصولات با ارزش افزوده، مانند لایزین بود.

- 1- *Arthobacter globiformis*
- 2- *Corynebacterium glutamicum*
- 3- Trace elements
- 4- *Bacillus megaterium* SP 14

- 5- Seed culture
- 6- Shaker incubator
- 7- Acid hydrolyzed whey permeate

### اندازه گیری های کیفی و کمی

برای اندازه گیری میزان لایزین تولید شده، از روش کروماتوگرافی لایه نازک بالارونده استفاده شد. سیستم حلال به کار برده شده در این پژوهش، n-butanol:acetic acid:water (۷/۷۱:۲:۴) بود. محلول نینهیدرین (محلول ۰/۵ درصد در اتانول) بر روی صفحات اسپری شد و محل لکه های لایزین به رنگ آبی نمایان گردید. برای تعیین میزان لایزین تولید شده در ارلن ها، لکه های لایزین تراشیده شده و در یک لوله میکروسانتریفیوژ حاوی ۴ میلی لیتر اتانول ریخته شد. پس از مخلوط کردن، به مدت ۵ دقیقه با rpm=۵۰۰۰ سانتریفیوژ شده و پس از آن مایع شفاف رویی جداسازی شده و با استفاده از اسپکتروفوتومتر، جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از منحنی استاندارد غلظت لایزین محاسبه گشته و اعداد بر حسب گرم در لیتر سوپسترا گزارش شد (۱۴). همچنین pH نمونه ها در طول زمان، به منظور بررسی تغییرات مواد محیط اندازه گیری شد.

### آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام شده و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و گروه بندی به طریق دانکن در سطح معنی داری  $p < 0/05$  انجام شد. همچنین برای بررسی و مقایسه غلظت لایزین تولید شده در ارلن های حاوی آب پنیر و ملاس به عنوان سوپسترا از آنالیز آماری با روش Independent-T Test استفاده شد.

### نتایج و بحث

نتایج نشان داد غلظت لایزین در ارلن های حاوی آب پنیر و ملاس، با گذشت زمان به صورت معنی داری افزایش یافت. اما سرعت افزایش در میزان تولید لایزین با گذشت زمان کمتر شده بود. همچنین بیشترین غلظت تولیدی در روز ششم، در محیط حاوی آب پنیر و ملاس به ترتیب ۱۱/۸ و ۱۰/۵ گرم در لیتر بود (جدول ۳ و ۴). در تحقیقی مشابه، موسوی نسب و همکاران (۱۰) لایزین تولید شده به وسیله باکتری کورینه باکتریوم گلوتامیکوم بر روی ضایعات کشاورزی (ملاس و ضایعات خرما) را اندازه گیری نموده و بیان کردند که پس از ۹۶ ساعت فرآیند تخمیر مقدار لایزین تولید شده در محیط های حاوی ملاس، ضایعات خرما و گلوکز به ترتیب ۴۸، ۴۰/۴ و ۳۶ گرم در لیتر بود که بیشترین بازدهی تولید لایزین در محیط حاوی ملاس را نشان داد. این در حالی است که در تحقیقی دیگر بیشترین مقدار لایزین تولید شده توسط بروی باکتریوم لاکتوفرمتوم فقط ۳/۳ گرم در لیتر و pH نهایی محیط ۴/۹ بود زمانی که از مخلوط تراویده

هدف از این کار همانطور که ذکر شد، هیدرولیز لاکتوز موجود در آب پنیر می باشد و دلیل آن این است که با توجه به آزمایش فنول رد لاکتوز برات<sup>۱</sup> انجام شده، باکتری های این جنس توانایی مصرف لاکتوز به عنوان سوپسترا را ندارند. پس از تهیه آب پنیر هیدرولیز شده با اسید و تنظیم pH آن در محدوده خنثی، ۰/۲ درصد عصاره مخمر به محیط افزوده شده و محیط استریل شد. سپس در هر کدام از ارلن ها ۳ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری از محیط پیش کشت تلقیح شد و سپس ارلن ها در اینکوباتور لرزنده با rpm=۱۸۰ در دمای ۳۰°C قرار گرفتند. به منظور انجام آنالیزهای لازم هر ۲۴ ساعت، یک ارلن از اینکوباتور خارج شد و در یخچال قرار گرفت.

### تولید لایزین با استفاده از ملاس توسط بروی

#### باکتریوم لیننس

**آماده سازی باکتری:** باکتری مطابق روشی که در قسمت مربوط به آب پنیر گفته شد، آماده گردید.

**آماده سازی محیط کشت تخمیر حاوی سوپسترا (ملاس):** ترکیب اصلی تشکیل دهنده این محیط کشت ملاس بوده که از کارخانه قند مرودشت تهیه شده و حاوی ۶۰ - ۵۰ درصد کربوهیدرات، که عمدتاً ساکارز است و ۲ درصد مواد نیتروژنی به همراه برخی ویتامین ها و مواد معدنی می باشد (۱). میزان ترکیبات موجود در محیط کشت تخمیر برای رشد باکتری و انجام فرآیند تخمیر در جدول ۲ آورده شده است.

غلظت (g/l)	ترکیبات	غلظت (g/l)	ترکیبات
۴۶	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	۱۰۰	Molasses
۵	Urea	۲/۸۵	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
۰/۵	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	۰/۵	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
۰/۴	L-leucine	۲۰	CaCO <sub>3</sub>

pH با استفاده از NaOH ۱ نرمال به حدود ۷ رسانده شد و محیط در اتوکلاو استریل گردید. از محیط پیش کشت، ۳ میلی لیتر باکتری در هر کدام از ارلن ها تلقیح شد. پس از آن ارلن ها در اینکوباتور لرزنده با rpm=۱۸۰ در دمای ۳۰°C قرار گرفتند. به منظور بررسی اثر زمان بر تولید لایزین، در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، یک ارلن از اینکوباتور خارج شده و در یخچال قرار گرفت تا پس از اندازه گیری های کمی میزان لایزین تولیدی در هر روز تعیین شود (۱۴).

جدول ۵ تغییرات pH در محیط حاوی آب پنیر طی فرآیند تخمیر

زمان (h)	pH
۰	۵/۶۵±۰/۰۲ <sup>f</sup>
۲۴	۵/۵۵±۰/۰۶ <sup>e</sup>
۴۸	۵/۴۳±۰/۰۲ <sup>d</sup>
۷۲	۵/۳۳±۰ <sup>c</sup>
۹۶	۵/۲۳±۰/۰۱ <sup>b</sup>
۱۲۰	۵/۲۰±۰/۰۲ <sup>ab</sup>
۱۴۴	۵/۱۶±۰/۰۳ <sup>a</sup>

جدول ۶ تغییرات pH در محیط حاوی ملاس طی فرآیند تخمیر

زمان (h)	pH
۰	۷/۲۶±۰/۰۲ <sup>a</sup>
۲۴	۷/۳۶±۰/۰۴ <sup>b</sup>
۴۸	۷/۴۵±۰ <sup>c</sup>
۷۲	۷/۶۳±۰/۰۳ <sup>d</sup>
۹۶	۷/۶۷±۰/۰۲ <sup>e</sup>
۱۲۰	۷/۸۳±۰ <sup>f</sup>
۱۴۴	۸/۰۳±۰/۰۲ <sup>g</sup>

### نتیجه گیری

با توجه به حجم بالای آب پنیر تولیدی در کشور و نتایج به دست آمده از این مطالعه، یکی از بهترین پیشنهادات برای مصرف بهینه از آب پنیر، استفاده از آن به عنوان سوبسترا و تولید لایزین می باشد. نکته قابل توجه اینکه برای این تولید تنها افزودن ۰/۲ درصد عصاره مخمر به آب پنیر لازم است و نیاز به هیچ ماده اولیه دیگری ندارد. عصاره مخمر شامل ترکیبات خاصی است که تولید لایزین را ترغیب می کند چرا که منبع غنی از ویتامین های ب کمپلکس، اسیدهای امینه آزاد و پپتیدها می باشد (۶). بدین ترتیب علاوه بر حل شدن مشکلات کارخانه های تولید پنیر در زمینه این محصول جانبی و کاهش آلودگی محیط زیست و سودآوری اقتصادی برای کارخانجات، با تولید مقدار زیادی لایزین ارزان قیمت، مشکل کمبود این اسیدآمینه ضروری نیز در کشور از بین خواهد رفت.

همچنین می توان از ملاس که یکی از مهمترین محصولات جانبی در کارخانجات تولید قند و شکر می باشد برای تولید لایزین استفاده نمود. گلوکز و ساکارز خالص عمدتاً به دلیل هزینه زیاد به ندرت در تخمیر های صنعتی به کار می روند. ملاس که یک محصول فرعی تولید قند از چغندر و نیشکر می باشد، ارزان ترین و متداول ترین منبع ساکارز است که می تواند سوبسترای مناسبی برای تولید میکروبی لایزین به شمار آید (۱).

آب پنیر<sup>۱</sup> هیدرولیز شده با اسید و ۰/۲ در صد عصاره مخمر به عنوان سوبسترا استفاده گردید (۶). اختلاف در میزان بازدهی توسط محققان مختلف می تواند در نتیجه استفاده از میکروارگانیسمها و سوبستراهای متفاوت در شرایط تخمیر غیر یکسان جهت تولید لیسین باشد.

اندازه گیری pH نمونه ها نشان داد که pH محیط حاوی ملاس با گذشت زمان افزایش یافت و این امر به دلیل تولید اسیدآمینه لایزین بود (جدول ۵). از آنجایی که لایزین یک اسیدآمینه بازی است، تولید و افزایش مقدار آن سبب افزایش قلیابیت محیط گردید. اما در مورد محیط حاوی آب پنیر pH با گذشت زمان کاهش معنی داری پیدا کرد (جدول ۶). احتمال می رود دلیل این امر مصرف بیشتر قندها (گلوکز و گالاکتوز) توسط باکتری و تولید اسید بیشتر باشد. به نحوی که اسید تولیدی در محیط نسبت به لایزین اولویت یافته و pH محیط را کاهش داده است و علت آن را می توان به هیدرولیز لاکتوز توسط اسید نسبت داد. در اثر این هیدرولیز، لاکتوز به قندهای ساده تر تبدیل شده و بیشتر مورد استفاده باکتری قرار گرفته و اسید بیشتری تولید شده است.

جدول ۳ غلظت لایزین تولیدی در زمان های مختلف در محیط

زمان (h)	غلظت لایزین (g/L)
۰	۰±۰ <sup>a*</sup>
۲۴	۲/۴±۰ <sup>b</sup>
۴۸	۴±۰/۲ <sup>c</sup>
۷۲	۷/۱±۰/۱ <sup>d</sup>
۹۶	۱۰±۰/۰۵ <sup>e</sup>
۱۲۰	۱۱/۳۱±۰/۱۲ <sup>f</sup>
۱۴۴	۱۱/۸±۰/۱۳ <sup>g</sup>

آنالیز آماری در سطح  $p < 0.05$  انجام شده و اعداد در گروه های a-g دارای تفاوت معنی دار هستند.

جدول ۴ غلظت لایزین تولیدی در زمان های مختلف در محیط

زمان (h)	غلظت لایزین (g/L)
۰	۰±۰ <sup>a</sup>
۲۴	۲/۱±۰/۳ <sup>b</sup>
۴۸	۴/۹±۰/۴ <sup>c</sup>
۷۲	۶±۰/۲ <sup>d</sup>
۹۶	۸/۶±۰ <sup>e</sup>
۱۲۰	۱۰/۱±۰/۱ <sup>f</sup>
۱۴۴	۱۰/۵±۰/۲ <sup>g</sup>

## قدردانی

که حمایت مالی پروژه را بر عهده داشته اند سپاسگزاری می شود.

بدینوسیله از هسته کارآفرینی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

## منابع

- ۱- مرتضوی، ع.، و آ.، کوچکی. ۱۳۸۳. مقدمه ای بر میکروبیولوژی صنعتی. چاپ اول. دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ۴۹۷ و ۲۹۰ و ۱۷۲.
- 2- Ekwealor, A., and A.N, Obeta. 2005. Studies on lysine production by *Bacillus megaterium*. African Journal of Biotechnology, 4: 633-638.
- 3- Hadj-Sassi, A., M.P Queric., A.M., Deschamps., and J.M., Lebeault. 1988. Optimization of L-lysine production by *Corynebacterium sp.* in fed-batch cultures. Biotechnology Letters, 10: 583-586.
- 4- Haleem Shah, A., A., Hameed., and G., Majidkhan. 2002. Fermentative production of L-lysine: bacterial fermentation-I". Journal of Medical Sciences, 2: 52-157.
- 5- Hermann, T. 2003. Industrial production of amino acids by Coryneform bacteria. Journal of Biotechnology, 104: 155-172.
- 6- Ko, Y.T., and J.R., Chipley. 1983. Microbial production of lysine and threonine from whey permeate. Applied and Environmental Microbiology, 45: 610-615.
- 7- Lehninger, A.L. 1982. Lehninger Principles of Biochemistry. Worth Publishers. New York. USA.
- 8- Lee, B.H. 1996. Fundamentals of Food Biotechnology. Wiley-VHC Publishers. New York. USA.
- 9- Plachys, J., and S. Ulbert, 1985. Preparation of lysine by mutants of *Corynebacterium*. Kvasny prum, 31: 159-160.
- 10- Moosavi-Nasab, M., S, Ansari., and Z, Montazer. 2007. Fermentative production of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum* using different carbon sources. Iran Agricultural Research. 26: 99-106.
- 11- Sen, S.K., and S.P., Chatterjee. 1985. Influence of antibiotics and trace salts on lysine production by *Arthobacter globiformis*. Acta Biotechnologica, 5: 215-218.
- 12- Sen, S.K., and S.P., Chatterjee. 1989. Influence of B. vitamins and trace elements on lysine production by *Micrococcus varians 2fa*. Acta Biotechnologica, 9: 63-67.
- 13- Shah, A.H., A., Hameed., and G.M., Khan. 2002. Improved microbial production of lysine by developing a new auxotrophic mutant of *Corynebacterium glutamicum*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 5: 80-83.
- 14- Weuster-Botz, R, D. Kelle., M., Frantzen., and C., Wandery. 1997. Substrate controlled fed-batch production of L-lysine *Corynebacterium glutamicum*. Biotechnology Progress Journal, 13: 387-393.