نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۹، ص. ۱۰۴-۱۰۰

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 6, No. 2, Summer, 2010, p. 100-104

تولید میکروبی لایزین با استفاده از آب پنیر و ملاس

مرضیه موسوی نسب [۱*] – نازنین داراب زاده [۲]

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱
تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۶

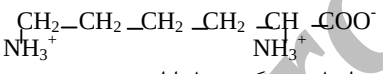
چکیده

لایزین[۳] اسیدآمینه‌ای 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 رژیم هایی با ترکیب اسیدهای آمینه به میزان مشخص نیز می‌باشد. فرایندهای شیمیایی، آنزیمی و بیوتکنولوژیکی برای تولید لایزین مورد استفاده قرار گرفته اند. به نظر می‌رسد، روش بیوتکنولوژیکی (تخمیر) اقتصادی ترین و قابل اجرا ترین روش در تولید لایزین باشد. در پژوهش حاضر، تولید لایزین توسط *بروی باکتریوم لینس*[۴] 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[۵] 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.

واژه های کلیدی: لایزین، تخمیر، *بروی باکتریوم لینس*، آب پنیر، ملاس

مقدمه

امروزه بسیاری از فراورده های حاصل از تخمیرهای میکروبی به عنوان افزودنی و مکمل به مواد غذایی اضافه می شوند. این مواد شامل آنتی اکسیدانها، مواد طعم دهنده، رنگها، مواد نگهدارنده، مواد شیرین کننده و ویتامین ها همچنین اسیدهای آلی، پلی ساکاریدها و اسیدهای آمینه می باشند. 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 آمینه های ضروری تولید شده توسط میکروارگانیسم ها می باشد که گروه R آن دارای بار مثبت است (اسید آمینه بازی) و یک گروه آمین اول دیگر در موقعیت ε زنجیر آلیفاتیک خود داردکه فرمول آن بصورت زیر می‌باشد (۷):



این اسیدامینه در انسان و دیگر پستانداران سنتز نمی شود. از آنجا که کودکان و حیوانات در حال رشد، نیاز زیادی به لایزین جهت تشکیل استخوان دارند، این اسیدآمینه ضروری باید از طریق قسمتی از رژیم غذایی این موجودات تامین شود. با توجه به کمبود این اسیدآمینه در بسیاری از غلات و سبزیجات، بایستی رژیم غذایی را با لایزین غنی سازی نمود (۴ 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 روش های تغییر شکل زیستی تولید می گردد. مقدار باقیمانده آن از طریق سنتز شیمیایی تولید می شود. تولید لایزین به روش شیمیایی دارای یک ایراد عمده است زیرا مخلوطی از ایزومرهای D و L سنتز می شود ولی بدن فقط L– لایزین را مصرف می نماید. از این رو

۱ و ۲ 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

Archive of SID
www.SID.ir

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 اسیدآمینه مواجه هستند، بکار می رود. به نظر می‌رسد 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 *آرتروباکتر گلوبیفورمیس*[1] 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*[2]، در مدت زمان ۴ روز ۴۵ گرم در لیتر لایزین تولید کردند. سن و چاترجی (۱۲) مطالعاتی بر روی تاثیر ویتامین ب و عناصر جزئی[3] 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 ب و عناصر جزئی به محیط بهینه، سبب ترغیب رشد باکتری و افزایش میزان لایزین تولیدی گردید. حاجیّ 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 ابتا (۲۰۰۵) یک باکتری بازیافت شده از خاک را برای تولید لایزین مورد مطالعه قرار دادند. این باکتری *باسیلوس مگاتریوم اس پی ۱۴*[4] 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

مواد و روش ها

تولید لایزین با استفاده از آب پنیر توسط بروی *باکتریوم لینس*

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 ۳۰°C، به مدت ۲ روز فعال گردید و پس از آن برای تلقیح در محیط پیش کشت جهت تکثیر باکتری به نسبت ۱:۱۰(v/v) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱)(۱۴).

جدول ۱ میزان ترکیبات موجود در محیط پیش کشت[5]

ترکیبات	غلظت (g/l)	ترکیبات	غلظت (g/l)
Glucose	۲۰	K_2HPO_4	۱
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۲۵	NaCl	۲/۵
KH_2PO_4	۱	yeast extract	۱۰
peptone water	۱۰	$MnSO_4.H_2O$	۰/۱

پس از آماده سازی، محیط پیش کشت استریل شده (۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه) و باکتری فعال شده در آن تلقیح شد و به مدت ۱۸ ساعت در اینکوباتور لرزان[6] با ۱۲۰ =rpm، در دمای ۳۰°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 عمدتا 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)[7] 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 ۶۰°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).

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

Archive of SID

www.SID.ir

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 براث[1] انجام شده، باکتری های این جنس توانایی مصرف لاکتوز به عنوان سوبسترا 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 سوبسترا (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.

جدول ۲ میزان ترکیبات موجود در محیط کشت تخمیر

ترکیبات	غلظت (g/l)	ترکیبات	غلظت(g/l)
Molasses	۱۰۰	$(NH_4)_2SO_4$	۴۶
$MgSO_4.7H_2O$	۲/۸۵	Urea	۵
K_2HPO_4	۰/۵	KH_2PO_4	۰/۵
$CaCO_3$	۲۰	L-leucine	۰/۴

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).

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 (v/v۱:۲:۴) 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، لکه‌های 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 سوبسترا 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 معنی‌داری $p< ۰/۰۵$ انجام شد. همچنین برای بررسی و مقایسه غلظت لایزین تولید شده در ارلن های حاوی آب پنیر و ملاس به عنوان سوبسترا 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 (جداول ۳ و۴). 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 لاکتوفرمنتوم*[2] فقط ۳/۳ گرم در لیتر و pH نهایی محیط ۴/۹ بود زمانی که از مخلوط تراویده

1- Phenol red lactose broth

2- *Brevibacterium lactofermentum*

Archive of SID

www.SID.ir

آب پنیر[1] هیدرولیز شده با اسید و ۰/۲ در صد عصاره مخمر بـه عنـوان سوبسترا استفاده گردید (۶). اختلاف در میزان بازدهی توسط محققـان 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 مـلاس با گذشت زمان افزایش یافـت و ایـن امـر بـه دلیـل تولیـد اسـیدآمینه لایزین بود (جدول ۵). از آنجایی کـه لایـزین یـک اسـیدآمینه بـازی است، تولید و افزایش مقدار آن سبب افزایش قلیاییت محـیط گردیـد. اما در مورد محیط حاوی آب پنیر pH با گذشت زمـان کـاهش معنـی داری پیدا کرد (جدول ۶). احتمال می رود دلیل این امر مصرف بیشـتر قندها (گلوکز و گالاکتوز) توسط باکتری و تولید اسید بیشتر باشـد. بـه 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 لاکتـوز توسط اسید نسبت داد. در اثر این هیدرولیز، لاکتوز به قندهای ساده تر تبدیل شده و بیشتر مورد استفاده باکتری قرار گرفته و اسـید بیشـتری تولید شده است.

جدول ۳ غلظت لایزین تولیدی در زمان های مختلف در محیط حاوی آب پنیر

غلظت لایزین (g/L)	زمان (h)
۰±۰[a]*	۰
۲/۴±۰ [b]	۲۴
۴±۰/۲ [c]	۴۸
۷/۱±۰/۱ [d]	۷۲
۱۰±۰/۰۵ [e]	۹۶
۱۱/۳۱±۰/۲ [f]	۱۲۰
۱۱/۸±۰/۳ [g]	۱۴۴

آنالیز آماری در سطح $p< ۰/۰۵$ انجام شده و اعداد در گروه هـای a-g دارای تفاوت معنی دار هستند.

جدول ٤ غلظت لایزین تولیدی در زمان های مختلف در محیط حاوی ملاس

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

1- Whey permeate

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

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

جدول ٦ تغییرات pH در محیط حاوی ملاس طی فرآیند تخمیر

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

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 مصـرف بهینـه از آب پنیر، استفاده از آن به عنوان سوبسترا و تولیـد لایـزین مـی باشـد. نکته قابل توجه اینکه برای این تولید تنها افزودن ۰/۲ درصـد عصـاره مخمر به آب پنیر لازم است و نیاز به هیچ ماده اولیـه دیگـری نـدارد. عصاره مخمر شامل ترکیبات خاصی است که تولید لایـزین را ترغیـب می کند چرا که منبع غنی از ویتـامین هـای ب کمـپلکس، اسـیدهای امینه آزاد و پپتیدها می باشد (۶). بدین ترتیـب عـلاوه بـر حـل شـدن مشکلات کارخانه های تولید پنیـر در زمینـه ایـن محصـول جـانبی و کاهش آلودگی محیط زیست و سودآوری اقتصادی برای کارخانجـات، با تولید مقدار زیادی لایزین ارزان قیمت، مشکل کمبود این اسیدآمینه ضروری نیز در کشور از بین خواهد رفت.

همچنین می توان از مـلاس کـه یکـی از مهمتـرین محصـولات جانبی در کارخانجات تولید قند و شکر می باشـد بـرای تولیـد لایـزین استفاده نمود. گلوکز و ساکارز خالص عمدتاً به دلیـل هزینـه زیـاد بـه ندرت در تخمیر هـای صـنعتی بـه کـار مـی رونـد. مـلاس کـه یـک محصول فرعی تولید قند از چغندر و نیشکر مـی باشـد، ارزان تـرین و متداول ترین منبع ساکارز است که می تواند سوبسترای مناسبی بـرای تولید میکروبی لایزین به شمار آید (۱).

Archive of SID

www.SID.ir

قدردانی

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

بدینوسیله از هسته کارآفرینی دانشکده کشاورزی دانشـگاه شـیراز

منابع

۱- مرتضوی، ع.، و آ.، کوچکی. ۱۳۸۳. مقدمه ای بر میکروبیولوژی صنعتی. چاپ اول. دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ۴۹۷ ۲۹۰ و ۷۵۰ ۱۷۲.

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.

Archive of SID

www.SID.ir