

جداسازی باکتریهای مولد اسیداستیک از سرکه‌های خانگی و ارزیابی پایداری گرمایی آنها

فوزیه مقدمی^۱، محمدرضا صعودی*^۱، محمدرضا رضوانیانزاده^۲، شایسته سپهر^۱^۱ دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی^۲ سازمان انرژی اتمی، آزمایشگاههای جابربین حیان

(دریافت: ۸۳/۸/۱۹؛ پذیرش: ۸۳/۱۰/۲۶)

چکیده

دسترسی به سویه‌های خانواده استوباکتراسه با تحمل حرارتی بالا اهمیت فراوانی در افزایش کارایی تبدیل زیستی الکل‌ها به مشتقات آلدیدی و اسیدی آنها دارد. در جستجوی باکتری‌های اسیداستیک ۷۰ نمونه سرکه خانگی از ۴ شهر تاکستان، تهران، قزوین و ابر جمع‌آوری شد. باکتریهای مولد اسید استیک از این سرکه‌ها جداسازی و سویه‌های جدا شده براساس سن سرکه و اقلیم آن طبقه‌بندی شدند. در بررسی برهم‌کنش سن و اقلیم بیشترین تعداد جدایه‌ها از سرکه‌های تاکستان ۱۲-۸ ماهه به دست آمد. در شناسایی جنس جدایه‌ها از میان ۳۹ سویه جدا شده ۲۳ جدایه از جنس استوباکتر (بدون تمایز از گلوکونواستوباکترها) و ۱۶ جدایه گلوکونوباکتر بودند. از آنجا که نیمی از سویه‌های *Gluconobacter* قادر به اکسیداسیون استات در محیط کشت EOM بودند (ویژگی گلوکونوباکترهای ترموتالرننت) جهت شناسایی این دو جنس تنها به پاسخ جدایه‌ها در محیط کشت LOM (اکسیداسیون لاکتات) استناد شد. در حالی که دمای بینه رشد سویه‌های استوباکتراسه به طور معمول بین ۳۳-۳۰ °C و بیشینه آن کمتر از ۳۷ °C است، یک سوم از جدایه‌ها قادر به رشد در دمای ۱±۰ °C بودند. جدایه‌های اخیر ترموتالرننت محسوب می‌شوند. بنابراین بنظر می‌رسد که ویژگی مقاومت به دما کم و بیش در میان فلور میکروبی ایران صفتی شایع است. این داده‌ها نسبت به نتایج به دست آمده در سایر کشورهای آسیایی نظیر ژاپن و تایلند متفاوت است و اثرات آب و هوایی ممکن است علت اصلی آن باشد. این صفت به لحاظ صنعتی اهمیت دارد زیرا سویه‌های مولد می‌توانند به راحتی تغییرات فصلی دما را تحمل نمایند.

واژه‌های کلیدی: *Gluconobacter*, *Acetobacter*. باکتریهای مولد اسید استیک، مقاوم گرما.

مقدمه

قدمت تولید سرکه حداقل به ۴۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح می‌رسد (Deppenmeier, 2002)، و فرآیند تولید آن به لحاظ فیزیولوژیک نوعی واکنش اکسیداسیون ناقص می‌باشد. اولین توصیف درباره تولید سرکه توسط پاستور در ۱۸۶۲ انجام گرفت. او دریافت که مادر سرکه توده‌ایی از ارگانیزمهای زنده است که عامل اکسیداسیون اتانول به اسید استیک می‌باشد. باکتری‌های *G.suboxy* و *A. aceti* به ترتیب توسط Beijerinck در ۱۸۹۸ و de Leeuw و Kluyver در ۱۹۲۴ توصیف شدند (Moonmangmee, 2000). Asai در ۱۹۳۴ و بار دیگر در ۱۹۶۸، این باکتریها را به دو جنس اصلی استوباکتر (*Acetobacter*) و گلوکونوباکتر (*Gluconobacter*) رده‌بندی کرد (Higgins, 1990). این دو جنس با تغییراتی همچنان بخشی از خانواده Acetobacteraceae را با ۱۲ جنس به خود اختصاص داده‌اند.

باکتری‌های مؤثر در سرکه‌سازی در دمای حدود ۳۰°C بالاترین فعالیت را دارند. تابستانهای گرم باعث افزایش دما بیش از ۳۰°C حتی در شب می‌شود که این امر بر تولید سرکه اثر کاهنده دارد و بنابراین این صنایع نیاز به آب فراوانی جهت خنک کردن فرماتورها برای ثابت نگه داشتن دمای بهینه خواهند داشت که متعاقبا هزینه بالایی را متحمل خواهند شد (Saeki, 1997). تغییر دما حتی در حدود ۳-۲°C، باعث تغییرات شدیدی در سرعت و کارایی اکسیداسیون خواهد شد. یافتن سویه‌های مناسب تولید کننده اسید استیک که بتوانند در دمای بهینه ۳۷-۴۰°C فعالیت کنند، برای کاهش دادن هزینه‌های خنک کردن بسیار مفید است. در صنعت سرکه سازی چنین سویه‌هایی را مقاوم گرما یا ترموتالرنت محسوب می‌شوند. تا قبل از سال ۱۹۹۷ به تولید سرکه با سویه‌های مقاوم گرما توجهی نشده بود. ولی در این سال گروهی از دانشگاه یاماگوشی موفق به یافتن سویه‌هایی از این باکتری‌ها شدند که قادر به رشد در دمای ۳۷-۴۰°C بودند (Saeki, 1997; Moonmangmee, 2000; Adachi, 2003).

بعد از یافتن این سویه‌ها کار بررسی آنها از لحاظ قدرت اکسیداسیون انواع سوپسترا آغاز شد و مشاهده شد که سویه‌های مقاوم گرما علاوه بر تحمل حرارتی دارای تحمل غلظت اسیداستیک تا ۰.۴٪ واتانول تا ۰.۹٪ هستند (Moonmangmee, 2000).

تاکنون سویه‌های Acetobacteraceae بومی ایران بدین لحاظ مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند و اطلاعاتی در مورد فراوانی سویه‌های مقاوم دما در میان باکتریهای مولد اسید استیک بومی ایران وجود ندارد. اگرچه پژوهشهای محدود انجام شده در زمینه باکتری‌های مولد اسید استیک ارزشمند می‌باشد (اله وردی ۱۳۸۰، ثقفی نیا ۱۳۷۷، جعفری ۱۳۸۱).

در بررسی حاضر نسبت به جداسازی باکتری‌های خانواده Acetobacteraceae از سرکه‌های بومی خانگی متعلق به مناطق خاصی از کشور اقدام شد. پس از جداسازی به بررسی ویژگی‌های جدایه‌ها از لحاظ تحمل گرمایی و پایداری سویه‌های بومی در محیط اسیدی و بستگی این ویژگی‌ها به اقلیم پرداخته شد.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه‌های سرکه

حدود ۷۰ نمونه سرکه خانگی از شهرهای تاکستان (۳۰ نمونه)، تهران (۱۵ نمونه)، قزوین (۱۵ نمونه) و ابهر (۱۰ نمونه) جمع‌آوری شد. نمونه‌های سرکه با سنین مختلف (۳ ماه تا ۶ سال) در شیشه‌های دردار ۵۰ ml جمع‌آوری شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید همه نمونه‌ها در دمای اتاق (۲۵ °C) نگهداری شد.

محیط‌های کشت جداسازی

برای جداسازی Acetobacteraceae از سرکه از محیط کشت EM واجد تراکم 1 g l^{-1} ترکیبات (عصاره مخمر ۱۰، کربنات کلسیم ۲۰، آگار ۲۰ در pH=۶) استفاده شد. محیط کشت در حجم ۵۰ ml در فلاسک‌های ۲۵۰ ml شیاردار تهیه گردید. بعد از اتوکلاو در دمای ۴۵-۵۰ °C، ۲۰ ml اتانول مطلق به آن افزوده و در پلیت‌ها توزیع شد. ۰/۲ ml از سرکه‌ها در محیط کشت EM به صورت خطی کشت و در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸ h نگهداری شد. جهت خالص‌سازی جدایه‌ها از محیط GYC واجد تراکم (1 g l^{-1}) از ترکیبات D-گلوکوز ۵۰، عصاره مخمر ۱۰، کربنات کلسیم ۳۰، و آگار ۲۵ در pH=۶ استفاده شد (صعودی ۱۳۷۷).

تمایز متابولیسمی سویه‌ها

جهت تمایز متابولیسمی سویه‌ها از دو محیط کشت EOM (واجد تراکم 1 g l^{-1} عصاره مخمر ۳۰، برموزول گرین ۰/۰۲۲، آگار ۲۰ و اتانول ۲۰) و LOM (واجد تراکم 1 g l^{-1} عصاره مخمر ۲۰، لاکتات کلسیم ۲۰، آگار ۱۵) استفاده شد و کشتها در دمای ۳۰ °C به مدت ۴۸ h نگهداری شدند.

آنالیز فراورده‌ها

سوسپانسیون سلول‌های شسته شده باکتری با تراکم معین به مدت ۲۴ ساعت با محلول الکل اتیلیک ۴٪ مجاور شد و پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ rpm مایع رویی با استفاده از دستگاه گاز

کروماتوگرافی گازی (Buck Scientist) با ستون شیشه ای کاپیلاری (Altech) سنجش شد. اندازه ستون (۰/۲۵ mm × ۰/۲۵ mm × ۳۰ m) و از نوع AT Wax با آشکارساز FID بود. دمای injector: ۲۰۰ °C، دمای detector: ۲۵۰ °C، دمای شروع ۷۰ °C و دمای نهایی ۲۰۰ °C در مدت ۵ دقیقه، گاز حامل هلیوم، با فشار سر ستون ۱۳ psi. مقدار تزریق شده از هر نمونه ۳ µl بوده است.

بررسی سویه‌ها از نظر تحمل حرارتی

جهت بررسی تحمل حرارتی سویه‌ها از محیط کشت جامد GYC استفاده شد. کشتها به مدت ۷۲h در دو دمای ۳۶±۱ °C و ۴۰±۱ °C نگهداری شد.

نتایج و بحث

در این بررسی تنها از ۴۷٪ از نمونه های سرکه . باکتری بدست آمد (شکل ۱) و سایر نمونه‌ها واجد باکتری فعال و قابل کشت نبودند. از ۸۰٪ نمونه‌های واجد باکتری فعال تنها یک جدایه و از بقیه دو جدایه بدست آمد. در این میان ۲۲ جدایه از سرکه‌های تاکستان، ۸ جدایه از سرکه‌های قزوین، ۵ جدایه از سرکه‌های تهران و ۴ جدایه هم از سرکه‌های ابهر جدا شد. در این بررسی توانایی باکتریها برای رشد در محیط‌های کشت به کار گرفته شده به عنوان شاخص فعال بودن باکتری در نظر گرفته شد. علاوه بر ارزیابی دوره زمانی دوام باکتریها در سرکه، توانایی آنها برای رشد و مقاومت در دمای بالا بررسی گردید.



شکل ۱- کلنی‌های *Acetobacter* در محیط کشت EM. هاله شفاف ناشی از تولید اسید مشخصه باکتری‌های مولد اسیداستیک است. نشانگرها هاله روشن اطراف کلنی را در محیط کدر نشان می‌دهد.

براساس آنالیز فراورده‌ها، رخداد فرایند اکسیداسیون اتانول و تشکیل اسید استیک و استالیدیید به عنوان تنها ترکیب‌های حاصل از واکنش در مورد همه جدایه‌ها به تأیید رسید. لذا همه سویه‌های بدست آمده به عنوان باکتری‌های مولد اسید استیک شناخته شدند. با توجه به خاستگاه سویه‌ها، و بر اساس ویژگی‌های متابولیسمی این سویه‌ها بطور موقت درجنس‌های استوباکتر و گلوکونوباکتر قرار داده شدند. این تقسیم‌بندی تنها به لحاظ کاربردی اهمیت دارد و ارزش تاکسونومیک ندارد، زیرا گلوکونواستوباکترها را (که به لحاظ متابولیسمی تفاوتی با استوباکترها ندارند، ولی) به واسطه دارا بودن یوبیکینون-۱۰ از استوباکترها متمایز می‌شوند (Yamada, et al., 1997)، جدا نمی‌کند. در ویرایش نهم کتاب سیستماتیک باکتریها، باکتریهای مولد اسید استیک متعلق به خانواده استوباکتراسه به ۴ جنس استوباکتر، گلوکونوباکتر، فراچوریا (*Fratutria*) و اسیدوموناس (*Acidomonas*)، تقسیم‌بندی شدند (Holt, 1994). در ویرایش دهم بر اساس قرابت فیلوژنتیک ۱۲ جنس در این خانواده جای داده شد (Boone and Castenholz, 2001). مهمترین جنس‌هایی که در سرکه سازی دخالت دارند عبارتند از: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconoacetobacter*. فعالیت کتوزنیک و تشکیل کتوگلوکونات در *Gluconobacter* قوی و در *Acetobacter* ضعیف است. بر خلاف، تولید اسید استیک از اتانول در *Acetobacter* قوی‌تر است (Adachi, 1978a, 1978b). گلوکونوباکترها قدرت اکسیداسیون فراتر استات و لاکتات را ندارند. در مقابل استوباکترها استات و لاکتات را اکسید می‌کنند و آنزیمهای چرخه تری کربوکسیلیک را دارا هستند (Higgins 1990).

با توجه به بکارگیری یک روش جداسازی معین برای تمام نمونه‌ها و تعداد متفاوت نمونه‌های واجد باکتری در هر ناحیه، فراوانی نسبی باکتری‌های مقاوم مشخص گردید (جدول ۱). این بررسی نشان می‌دهد که سویه‌های بومی ساکن سرکه‌های تاکستان در دوره زمانی طولانی‌تری فعالیت خود را حفظ می‌کنند. مطابق رابطه زیر "طول عمر نسبی" باکتری‌های مولد سرکه متعلق به هر یک از نواحی تعریف شد. این کمیت تنها برای مجموعه آزمون‌های همسان معنی‌دار است و مطلق نمی‌باشد.

$$A_r = \bar{A} (n_a / n_t)$$

A_r : طول عمر نسبی

\bar{A} : میانگین طول عمر نمونه‌های واجد باکتری فعال

n_a : تعداد نمونه های سرکه واجد باکتری فعال

n_t : تعداد کل نمونه های سرکه

جدول ۱- مقاومت سویه‌های بومی Acetobacteraceae در اقلیم‌های مختلف بر حسب طول عمر نسبی آنها

محل جداسازی	تعداد نمونه سرکه	تعداد سویه جدا شده	طول عمر نسبی
تاکستان	۳۰	۲۲	۶/۶۱
قزوین	۱۵	۸	۵/۸۷
ابه‌ر	۱۰	۴	۶/۳
تهران	۱۵	۵	۳/۱۹

علاوه بر اقلیم، سن سرکه‌ها به عنوان یک عامل مستقل در نظر گرفته شد و نشانگر پایداری باکتری در شرایط اسیدی می‌باشد. نمونه‌ها به دو گروه سنی مختلف تقسیم‌بندی گردیده و تعداد سویه‌های جدا شده در هر سن بررسی شد. طبق این بررسی ۷۶/۹۲٪ از جدایه‌ها از سرکه‌های با سن زیر یک سال و ۲۳/۰۷٪ از جدایه‌ها از سرکه‌های ۱-۳ ساله بدست آمد. این بدان معناست که بهترین سن سرکه برای جداسازی Acetobacteraceae تا ۱۲ ماهگی می‌باشد. در طی این دوره زمانی مخمرها به کندی فعال هستند و به تولید فاکتورهای مناسب رشد و نیز اتانول از گلوکز موجود اشتغال دارند. پس از آن توقف فعالیت مخمرها بالا رفتن تراکم اسید و رسوب سلولهای باکتریایی و در دسترس نبودن اکسیژن موجب مرگ یا غیر فعال شدن باکتری می‌گردد (Holt, 1994). با این حال جداسازی باکتریها از سرکه‌های تا سن سه سال، مقاومت سویه‌ها نسبت به شرایط محیطی را نشان می‌دهد. هرچند که در این بررسی از نمونه‌های سرکه با سن بیش از سه سال باکتری جدا نشد. بررسی برهم کنش دو پارامتر سن و اقلیم به طور توأمان نشان داد که میان سویه‌های مقاوم و اقلیم آنها ارتباط وجود دارد (جدول ۲)، به طوری که برای مثال طول عمر نسبی باکتریها در سرکه‌های ناحیه تاکستان بالاتر بوده و بیشترین تعداد سویه‌های مقاوم را دارا بوده است.

جدول ۲- تعداد سویه‌های جدا شده از باکتریهای خانواده Acetobacteraceae با توجه به سن نمونه‌های سرکه و اقلیم

اقلیم	سن	زیر یک سال	۱-۳ سال	مجموع
تاکستان	۱۸	۴	۲۲	
قزوین	۵	۳	۸	
ابه‌ر	۲	۲	۴	
تهران	۵	۰	۵	
مجموع	۳۰	۹	۳۹	

از میان ویژگیهای مقاومتی *Acetobacteraceae* تحمل گرمایی صفت ارزشمندتری است و در صنعت چنین سویه‌هایی به دلیل نیاز کمتر به کنترل دما و تولید اسید استیک بیشتر ترجیح داده می‌شوند (Saeki, 1997). از میان ۳۹ جدایه بدست آمده ۳۵ جدایه تا دمای $36 \pm 1^\circ\text{C}$ در محیط کشت GYC قادر به رشد و تولید اسید استیک هستند و ۱۳ جدایه توانستند در دمای $40 \pm 1^\circ\text{C}$ به رشد ادامه دهند. از میان این ۱۳ جدایه، ۵ جدایه از جنس *Acetobacter* و ۸ جدایه از جنس *Glauconobacter* تشخیص داده شد. بنا به تعریف سویه‌هایی از استوباکتر "مقاوم گرما" گفته می‌شوند که قادر به رشد در دمای $37-40^\circ\text{C}$ باشند (Adachi, 2003). برای سویه‌های مقاوم گرمای *Glauconobacter* دمای بهینه $30-33^\circ\text{C}$ و حداکثر دمای 37°C گزارش شده است (Moonmangmee, 2000). در حالی که جدایه‌های *Glauconobacter* در این پژوهش قادر به رشد در دمای $40 \pm 1^\circ\text{C}$ نیز بوده اند (جدول ۳).

جدول ۳- دسته بندی سویه‌ها براساس جنس و مقاومت گرمایی

تعداد سویه ها	رشد در دمای $40 \pm 1^\circ\text{C}$	رشد در دمای $36 \pm 1^\circ\text{C}$	اکسیداسیون استات در EOM	دادن هاله در LOM
گروه دارای ویژگی های استوباکتر				
۵	+	+	+	+
۱۴	-	+	+	+
۴	-	-	+	+
گروه دارای ویژگی های گلوکونوباکتر				
۵	+	+	-	-
۱	-	+	-	-
۲	-	-	-	-
گروه دارای ویژگی های گلوکونوباکتر ترموتالرننت				
۳	+	+	+	-
۵	-	+	+	-
۰	-	-	+	-

نسبت جدایه‌های مقاوم گرمای یافت شده با توجه به تعداد جدایه‌های هر شهر برابر است با: تهران ۶۰٪، ابهر ۵۰٪، تاکستان ۳۱/۸۱٪، و قزوین ۱۲/۵٪. این یافته احتمال سازش دمایی باکتریها با اقلیم را تایید می‌کند، زیرا تهران دارای میانگین دمایی بالاتری نسبت به سه شهر دیگر می‌باشد. میانگین دمای سالانه این ۴ شهر در سال ۲۰۰۰ میلادی به ترتیب عبارتند از تهران ۱۶/۵ °C، قزوین ۱۴/۲ °C، تاکستان ۱۳/۶ °C و ابهر ۱۲/۹ °C (سازمان هوا شناسی). بنابراین دمای اولیه جهت تولید سرکه در ایجاد سویه‌های ترموتالرننت مؤثر بوده است.

از میان ۳۹ سویه، ۲۳ جدایه متعلق به جنس *Acetobacter* و بقیه متعلق به جنس *Glauconobacter* بودند. البته در میان سویه‌های متعلق به *Glauconobacter*، جدایه‌های مقاوم گرما دارای خصوصیات خاصی هستند، بدین صورت که قادر به اکسیداسیون فراتر استات هستند. ولی نمی‌توانند لاکتات را به CO₂ و H₂O اکسیده کنند (Saeki 1997). نتایج حاصل از بررسی متابولیسمی سویه‌ها در جدول ۳ قابل مشاهده است. در این مطالعه نیز برخی از جدایه‌های *Glauconobacter* (۳ جدایه یعنی ۷/۶۹٪ کل جدایه‌ها) استات را فراتر اکسید نمودند ولی اکسیداسیون لاکتات مشاهده نشد. این بدان معنا نیست که همه سویه‌های مقاوم گرمای *Glauconobacter* دارای این ویژگی هستند زیرا ۱۲/۸٪ از کل جدایه‌ها (۵ جدایه) گلوکونوباکترهای ترموتالرننتی هستند که قدرت اکسیداسیون استات را ندارند. این یافته که نیازمند بررسی‌های بیشتری است با نتایج کار پژوهشگران دیگر نظیر مومنانگمی (Moonmangmee et al., 2000) سازگاری دارد.

References

- Adachi O., Moonmangmee D., Toyama H., Yamada M., Shinagawa E., and Matsushita, K. (2003) *New development in oxidative fermentation*. Applied Microbiology and Biotechnology, **60**, 643-653.
- Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K., and Ameyama, M. (1978a) *Purification and characterization of particulate Alcohol dehydrogenase from Gluconobacter suboxydans*. Agricultural and Biological Chemistry, **42**, 2045-2056.
- Adachi, O., Miagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., and Ameyama, M. (1978b) *Purification and characterization of Particulate Alcohol Dehydrogenase from Acetobacter aceti*. Agricultural and Biological Chemistry, **42**, 2331-2340.
- Best, D.J. (1990) *Chemistry and Biotechnology*. In Biotechnology. Eds. Higgins, I.J, Best, D.J., Jones, J. Pub. Black Well Scientific. pp. 111-162.
- Boone, D.R., and Castenholz, W. (2001) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Ed. in chief: Garrity, G. M., Pub. Springer.

- Deppenmeier, V., Hoffmeister, M., and Prust, C. (2002) *Biochemistry and Biotechnological Applications of Gluconobacter Strains*. Applied Microbiology and Biotechnology, **60**, 233-242.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneeth, P.H.A., Stanley, J.T., and Williams S.T. (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition. Pub. Williams & Wilkins.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragol, G., Lotong, N., and Matsushita, K. (2000) *Isolation and characterization of thermotolerant Gluconobacter strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **64**, 2306-2315.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., and Adachi O., (1997) *Development of Thermotolerant Acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **64**, 138-145.
- Yamada, Y. and Kondo, K. (1984) *Gluconoacetobacter, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus Acetobacter*. Journal of General and Applied Microbiology, **30**, 297-303.
- Yamada, Y., Hoshini, K. and Ishikawa, T. (1997) *The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus Gluconoacetobacter to generic level*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, **61**, 1244-1251.
- اله وردی، ع، قائمی، ن، نوحی، ا، ملک زاده، ف (۱۳۸۰) سینتیک تولید *L* - سوربوز توسط *A.suboxydans TU101 & TU201 & TU301* به طریق *FED-Batch*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم.
- ثقفی‌نیا، ا، ملک‌زاده، ف، (۱۳۷۷) بررسی مشخصات میکروبیولوژی و بیوشیمیایی کامبوچا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم.
- جعفری، پ، قائمی، ن، نوحی، ا. (۱۳۸۱) بیواکسیداسیون *D* - سوربیتول به *L* - سوربوز با استفاده از *G.oxydans*. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده علوم پایه.
- صعودی، م.ر. (۱۳۷۷) مبانی و آزمونهای فرایندهای تخمیری. انتشارات دانشگاه الزهراء. ص: ۱۶۴-۱۳۴.