بهبود بهره وری و راهبری مبتنی بر تأثیر هیدرودینامیک و موازنهٔ جـرم در فرایند تولید اسیـد گلوتامیک

مینا طباطبائی رضا روستا آزاد

منوچهر وثوقی

دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی شریف

چکیده

تولید گلوتامیك اسید به روش تخمیری توسط باکتری Corynebacterium glutamicum مورد بررسی قرار گرفت. در این راستا، تاثیر نوع محیط کشت، میزان هوادهی و نیز نوع بیوراکتور، اعم از فلاسك گردان، بیوراکتور همزن دارو بیوراکتـور Airlift تحلیل شد. در بیوراکتـور همزن دار، بهترین نتیجه در روش Mixed Fed Batch در شرایط بهینه یعنی میزان هوادهـی ۲vvm / ۱ و دور همزن ۵۰۰ rpm برابر g/ ۱۰۱ گلوتامیك اسید بدست آمد.

در مرحله بعد، نتایج حاصل از بیوراکتور همزن دار با میزان تولید در بیوراکتورهای ایرلیفت مقایسه گردید. در راکتور ایرلیفت در حوزه هوادهی ۳vvm-۲ / ۱، بهترین میزان تولید در هوادهـی ۳vvm معـادل ۱۸g/l و بهترین میزان تولید به ازای انرژی مصرفی، در هـوادهـی ۲vvm معادل g/W ۱۹۸/۳۴ بدست آمد. در نرخ هوادهی ۲vvm، محیط کشتهای مبتنی بر ملاس چغندر قند و نیشکر در راکتور ایرلیفت مورد مقایسه قرار گرفت و بهترین نتیجه در محیط ملاس نیشکر با میزان تولید g/l ۳۰ حاصل شد.

کلمات کلیدی

گلوتامیك اسید، فرمانتاسیون - باکتری - کرینه باکتربوم گلوتامیکم بیوراکتور همزن دار - ایرلیفت.

Improving the Yield Operation Based on the Effect of Hydrodynamics in Glutamic Acid Fermentation

M. Tabatabaie R. Roosta azad

M. Vossoughi

Chemical Engineering Department, Sharif University Of Technology

Abstract

Production of Glutamic acid via fermentation of C. glutamicum was studied. Among the parameters which affect the bacterial growth and GA production, are the medium compositttion, dissolved oxygen and hydrodynamics. Therefore, effect of change in the broth constituents, rate of aeration and type of the bioreactor including shake flask, stirred bioreactors and airlift were investigated. At the first stage, in the shake flask, sugar consumption and biomass production was checked in the media based on beet and cane molasses. In the next step, a fed batch protocol in which a 12% ammonia solution was used to set the pH was studied in the stirred bioreactor. Following this, due to the too low sugar concentration at the onset of the production phase, double and mixed fed batch modes of operation in which aside from ammonia, molasses was fed to the fermenter at the specific rate was tested. In the stirred bioreactor, the best result in the mixed fed batch and at the optimum conditions namely aeration rate of 1.2 vvm and rotation speed of 500pm was as high as 10g/l of Glutamic acid. At the 3rd stage, result of the stirred bioreactor was compared against that of an Airlift fermenter. In the ALF. in the aeration rates from 1.2-3vvm, the best production was achieved in the maximum aeration as 18/l and the best production vs. energy Consumption was at the 2vvm aeration as 198g/energy. At the 2vvm aeration, production in the beet and cane molasses based media were compared in the ALF. The best result was obtained in the medoum based on cane molasses which was as high as 30g/l.

Keywords

glutamic acid-Fermeatation-Corynebacterium Glutamican- Airlift-Beffled Bioreactor

مقدمه

گلوتامیک اسید که از اجزاء ساختاری پروتئینها می باشد، مصرف عمده ای در صنایع غذایی و داروئی به عنوان چاشنی و مطبوع کننده طعم دارد. نمک سدیم این اسید آمینه یعنی منو سدیم گلوتامیک در مواد غذایی کنسرو شده و سوپهای آماده، انواع ماکارونی، صنایع بیسکویت سازی و سوسیس و کالباس قابل استفاده است. علاوه بر آن کاربردهای متنوع دیگری نیز در صنایع آرایشی و بهداشتی و صنایع شیمیایی برای گلوتامیک اسید و مشتقات آن ذکر شده است [۱]. از نظر تاریخی، تولید تخمیری گلوتامیک اسید پایه گذار صنعت تولید اسیدهای آمینهٔ دیگر بوده است و با تولید گلوتامیک اسید در سال ۱۹۶۲، تحقیقات وسیعی برای تولید انواع دیگر اسیدهای آمینه و تولید صنعتی آنها آغاز شد. [۲] روش تولید صنعتی در حال حاضر، روش فرمانتاسیون می باشد و تولید سالانه آن معادل ۶۰۰ هزار تن است. [۳]

علیرغم سابقهٔ تاریخی طولانی صنعت تخمیری در حوزهٔ تولید گلوتامیک اسید، بررسی تأثیر شرایط هیدرودینامیکی و از جمله مقایسهٔ عملکرد این کشت در بیوراکتورهای ایرلیفت و همزن دار در منابع منتشره ناچیز است. بنابراین به دلیل محاسن زیادی که برای بیوراکتورهای ایرلیفت وجود دارد. از جمله: عدم وجود قسمتهای متحرک مکانیکی، شدت تنش کم، تجهیزات و طراحی ساده مخصوصاً در هنگام بزرگ سازی مقیاس، کارکرد آسان در شرایط استریل با توجه به طراحی ساده آن، سطح تماس مخصوص زیاد در انرژی ورودی کم (بازده خوب انرژی)، سعی شد نتایج حاصل در بیوراکتورهای همزن دار با میزان تولید در بیوراکتورهای ایرلیفت مقایسه شود. علاوه بر آن، در تحقیقاتی که اخیراً در این حوزه صورت گرفته [۴] نتایج جالبی در رابطه با نظام راهبری Fed Batch (MFB) Mixed پیشنهاد گردیده ولی آزمایشات جهت تحقیق این فرضیه ارائه نشده است. لذا در تحقیق حاضر ضمن بررسی مسائل عمومی تخمیر گلوتامیک اسید، روش MFB و نیز عملکرد مقایسه ای بیوراکتورهای ایرلیفت و همزن دار مورد نظر قرار گرفته است. بخصوص تولید گلوتامیک اسید از دیدگاه مصرف انرژی کمتر و تولید بیشتر مورد توجه قرار گرفت. بنابراین تولید در دو بیوراکتور همزن دار و ایرلیفت با استفاده از محیط کشتهای طبیعی مبتنی بر ملاس چغندر قند و نیشکر در نظام

جدول (۱) ترکیب محیط پیش کشت و کشت اصلی با استفاده از ملاس چغندر قند.

ترکیب مواد	پیش کشت (g/L)	کشت اصلی (g/L)
ملاس نیشکر	۱۰۰	۱۰۰
KH_2PO_4	۲	۲/۵
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۵	۰/۵
$MnSO_4.7H_2O$	—	۰/۰۰۵
$FeSO_4.7H_2O$	—	۰/۰۰۵
اوره	۸	—

جدول (۲) ترکیب محیط پیش کشت و کشت اصلی با استفاده از ملاس نیشکر.

ترکیب مواد	پیش کشت (g/L)	کشت اصلی (g/L)
ملاس چغندر قند	۱۰۰	۱۰۰
عصارهٔ مخمر	۵	۰/۵
$(NH_4)_2SO_4$	—	۴
KH_2PO_4	۰/۷۵	۰/۷۵
K_2HPO_4	۰/۷۵	۰/۷۵
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۴	۰/۴
$MnSO_4.H_2O$	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲
$FeSO_4.7H_2O$	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲

عملیاتی MFB با یکدیگر مقایسه گردید. در این بررسی ها به عنوان مبنای مقایسه از میزان تولید به ازای واحد توان مصرفی استفاده شد.

مواد و روشها

باکتری مورد استفاده Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 می باشد که به صورت هوازی بر روی اسلنت آگار مغذی رشد می کند. محیط پیش کشت و کشت اصلی مطابق جدول ۱ و ۲ است [۵].

شرایط محیط پیش کشت و کشت اصلی در فلاسک گردان، دمای $32^{\circ}C$، دور ۲۰۰rpm و pH= ۷/۶ و زمان رشد ۲۰-۱۶ ساعت برای پیش کشت می باشد که پس از این زمان، تلقیح به میزان (V/V)٪۱۰ از محیط پیش کشت به کشت اصلی انجام می شد. به دلیل اینکه از محیط کشتهای طبیعی ملاس به عنوان منبع کربنی استفاده شد و این محیطها حاوی مقدار نسبتاً بالای بیوتین می باشند، بنابراین در زمانی که رشد سلولی به حد (gdw/L) ۷/۵-۷/۷ [۴] می رسید، برای اینکه رشد متوقف و محصول گلوتامیک اسید به محیط برون سلولی ترشح شود، محلول پنی سیلین که به وسیلهٔ آب مقطر استریل تهیه می گردید، به میزان $۶\frac{unit}{ml}$ [۵] به محیط کشت تزریق می شد.

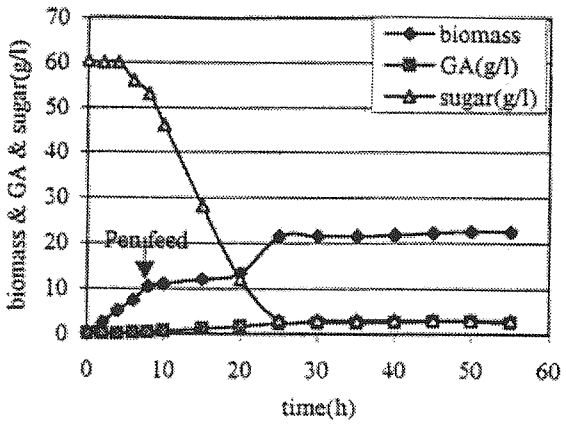
دانسیتهٔ سلولی به روش کدورت سنجی در طول موج ۶۱۰nm و استفاده از منحنی استاندارد رشد سلولی بدست آمد [۶] اندازه گیری میزان گلوتامیک اسید تولیدی از روش آنزیمی در ناحیهٔ UV و با استفاده از آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (GIDH, EC (GIDH. Boehringer mannheim, Germany) 1.4.1.2) انجام شد [۷]. روش سنجش قند موجود به روش رنگ سنجی نلسون - سوموژی و با استفاده از منحنی استاندارد صورت گرفت. [۸]

نتایج و بحث

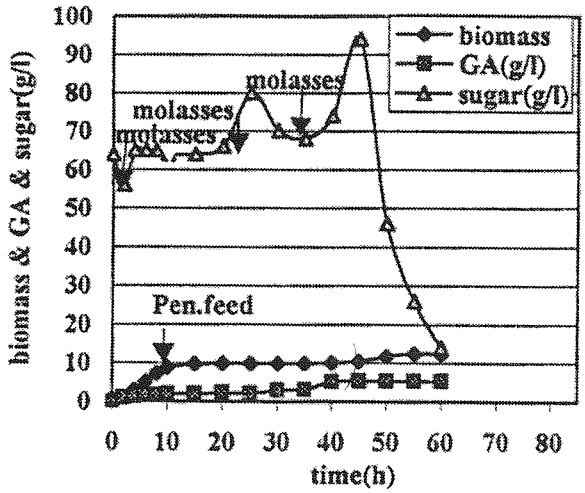
برای بررسی میزان تولید محصول گلوتامیک اسید، بیوراکتور همزن دار در حالت fed batch در شرایط هوادهی ۱/۲vvm و دور ۵۰۰rpm در pH=۷/۶ راه اندازی شد که در آن از آمونیاک ۱۲٪ تنظیم pH استفاده شد. نتایج این بررسی در شکل ۱ آمده است.

در ادامه این بررسی، به دلیل میزان قند ناچیز در ابتدای فاز تولید، از روش double fed batch استفاده شد که در آن علاوه بر آمونیاک، ملاس هم که به صورت محلول استریل ۵۰٪ تهیه شده بود، در زمانهایی که افت قند ایجاد می شد، بصورت جداگانه تزریق می گردید. این نتایج در شکل (۲) آمده است.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، کنترل میزان قند مصرفی با نمونه گیری متوالی علاوه بر مشکلات عملیاتی که دارد، از دقت خوبی هم بر خوردار نیست. زیرا امکان دارد در زمانهایی میزان قند بیش از حد بهینه شود. بنابراین اثر بازدارندگی سوبسترا مشاهده می شود. برای رفع مشکلات ذکر شده، یعنی جبران افت قند در فاز تولید میکروارگانیسم و همینطور



شکل (۱) منحنی رشد و تولید محصول و کاهش قند در روش fed batch (هوادهی ۱/۲vvm، دور ۵۰۰rpm، دما $32^{\circ}C$، pH= ۷/۶، حجم محیط کشت ۳/۳ لیتر)



شکل (۲) منحنی رشد و تولید محصول گلوتامیک اسید و کاهش قند در روش double fed batch (شرایط عملیاتی مانند شکل ۱)

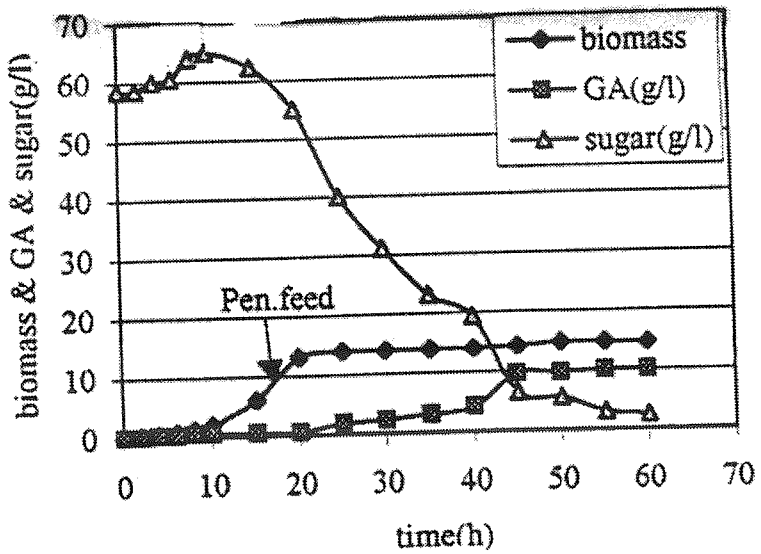
از بین بردن اثر بازدارندگی سوبسترا در اثر افزودن ناگهانی خوراک ملاس، بررسی دیگری انجام شد تا در صورت امکان بتوان بدون نیاز به سنسوری خاص، میزان قند تزریقی را کنترل کرد. برای این منظور با توجه به مراجع [۹] و با توجه به رابطه استوکیومتری در فاز تولید که مقدار توده سلولی در آن ثابت است داریم:

$C_{12}H_{22}O_{11}+2NH_3+1.5O_2 \rightarrow 2C_5H_9O_4N+2CO_2+6H_2O$ $2C_5H_9O_4N+2NH_3 \rightarrow 2C_5H_{12}O_4N_2$: در pH حدود ۶/۷ آمونیوم گلوتامات

معادلهٔ کلی: $C_{12}H_{22}O_{11}+4NH_3+1.5O_2 \rightarrow 2C_5H_{12}O_4N_2+2CO_2+6H_2O$

و از اینجا نسبت قند به آمونیاک مصرفی برابر ۵ بدست می آید که با مقدار تجربی یعنی ۳ [۴] حدود ۲ واحد تفاوت دارد که این تفاوت تا حدودی می تواند به تبخیر آمونیاک در فرایند مربوط باشد. بنابراین در عملیات بعدی امکان ایجاد سیستم Mixed Fed Batch فراهم شد که در آن ملاس و آمونیاک به نسبتی که میزان قند ملاس به آمونیاک مصرفی برابر ۳ باشد و در ضمن در اثر وارد کردن خوراک به فرمانتور، ریق سازی محیط کشت هم رخ ندهد، به فرمانتور وارد می شد و مقدار افت قند هم با توجه به این نسبت به طور اتوماتیک به وسیلهٔ حس گر pH، کنترل می شد.

در این فرایند، مسئله دیگری که مطرح شد، بالا رفتن غلظت بیوتین در محیط کشت در اثر تزریق خوراک ملاس بود که باعث رشد شدید باکتریها وعدم نفوذ پذیری آنها در جهت ترشح گلوتامیک اسید به محیط برون سلولی می گردید. برای رفع این مشکل، پس از طی شدن فاز رشد و تزریق پنی سیلین به محیط کشت، به خوراک ورودی نیز با توجه به حجم خوراک، در حد بهینه پنی سیلین تزریق می شد تا اثر سوء ناشی از بیوتین بالا را از بین ببرد. بهترین نتیجه برای بیوراکتور همزن دار با خوراک ملاس چغندر قند با شرایط هوادهی ۱/۲vvm و دور همزن ۵۰۰rpm برابر (g/L) ۱۰ گلوتامیک اسید بدست آمد. نتایج در شکل(۳) آمده است.



شکل (۳) منحنی رشد و تولید محصول و کاهش قند در بیوراکتور همزن دار به روش Mixed fed Batch (شرایط عملیاتی مانند شکل ۱).

در مطالعات مربوط به راکتور ایرلیفت، به دلیل حذف همزن مکانیکی در سیستم، لازم بود میزان هوادهی برای رشد و تولید و ایجاد همزدگی مناسب، با استفاده از تجربهٔ حاصل دربیوراکتور همزن دار تعیین شود.

در مورد بیوراکتور همزده، عمده توان مصرفی مربوط به همزن می باشد که محاسبهٔ مقدار آن به صورت زیر است:

توان مصرفی برای بیوراکتور همزده بدون هوادهی [۱۰]:

$$P_{no} = \frac{\rho\, g_c}{P\, N^3\, i\, D_i^5} \quad \text{و} \quad g_c = 1\ \frac{kg.\ m}{N.\ s^2}$$

(رابطهٔ ۱)

$$\begin{cases} \rho = 1/117 \times 10^{3}\ \frac{kg}{m^3} \\ \mu = 1/75CP = 1/25 \times 10^{-3}\ \frac{kg}{m.s} \\ N_i = 500rpm = 8/3s^{-1} \quad Re = \frac{\rho N_i D_i^2}{\mu} = 4/7 \times 10^{4} \xrightarrow{\text{(با توجه به منحنی های توان [10])}} p_{no} = 6 \\ D_i = 8cm = 1/8m \end{cases}$$

$P12/55W \Rightarrow$ با توجه به رابطهٔ (۱)

وقتی که تانک همزده هوادهی هم شود، توان مصرفی برای همزن کاهش می یابد. پس داریم:

$$N_a = \frac{F_g}{N_i D_i^3} \qquad \text{(رابطهٔ ۲)}$$

$$\begin{cases} \text{هوادهی} = 1/2vvm \\ \text{حجم} = 3/3L \end{cases} \Rightarrow F_g = 6/6 \times 10^{-5}\ m^{3/s} \Rightarrow N_a = 1/57 \times 10^{-2} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{P_a}{P} = 0/91 \Rightarrow P_a = 11/42W \Rightarrow \text{(با توجه به منحنی های توان [10])}$$

انرژی مصرفی برای انبساط آدیاباتیک گاز در مخزن به صورت زیر محاسبه می شود [۱۰]

$$P_g = \rho F_g \left[\frac{RT}{MW} Ln \frac{P_1}{P_2} + 0/06 \frac{U_0^2}{2} \right] \qquad \text{(رابطه ۳)}$$

$$P_g = (1/1)(6/6 \times 10^{-5})(10^3)$$

$$= 9/517 \times 10^{-2} W \ \left(\frac{8/314 \times 305}{28/8} Ln 1/015 \right)$$

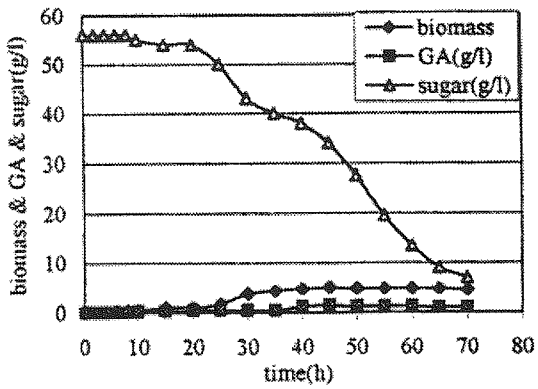
$$\text{کل } P = 11/42 + 9/517 \times 10^{-2} = 11/515W$$

برای فرمانتور ایرلیفت توان مصرفی تنها مربوط به قسمت هوادهی و انبساط آدیاباتیک گاز می شود. بنابراین با در نظر گرفتن مقدار انرژی مصرفی برابر با تانک همزده دارای هوادهی، مقدار هوای ورودی برای این بیوراکتور تخمین زده شد. برای این منظور در رابطهٔ (۳) داریم:

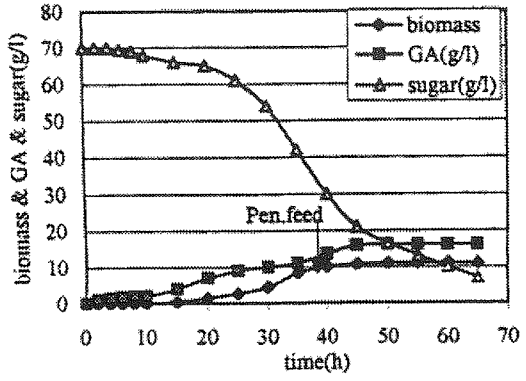
$$11/515 = (1/1) F_g (10^3)$$

$$\left(\frac{8/314 \times 305}{28/8} Ln 1/025 \right) \Rightarrow \begin{cases} F_g = 4/8 \times 10^{-3}\ m^3/s \\ V_{AIF} = 6\ lit \end{cases} \Rightarrow \text{هوادهی} = 48\ vvm$$

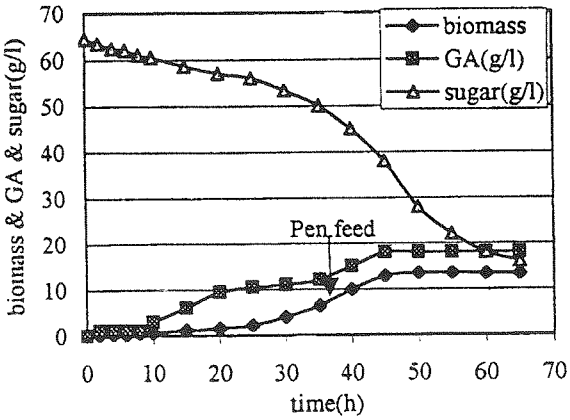
که با این میزان هوادهی، مقدار انباشتگی (hold up) فوق العاده بالا است و سیستم از حوزهٔ sparging خارج و به حوزهٔ pneumatic conveying وارد می شود. بنابراین این فرضیه بوجود می‌آید که با هوادهی کمتر، بتوان مقدار تولید را داشت که این امر بسیار مطلوب است. پس در حوزهٔ هوادهی ۲ـ۳vvm / ۱ میزان تولید در ایرلیفت مقایسه گردید که این نتایج در شکلهای (۴) و (۵) و (۶) آمده است:



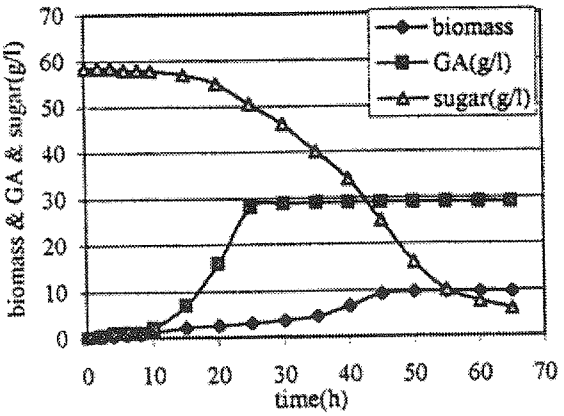
شکل (۴) منحنی رشد و تولید محصول و کاهش قند در بیوراکتور ایرلیفت در هوادهی پائین (۱/۲ vvm) ۶ / ۷=pH، حجم کل ۶ لیتر، دما ۳۲°C).



شکل (۵) منحنی رشد و تولید محصول و کاهش قند در بیوراکتور ایرلیفت در هوادهی متوسط (۳ vvm) (شرایط عملیاتی مانند شکل ۴).



شکل (۶) منحنی رشد و تولید محصول و کاهش در بیوراکتور ایرلیفت در هوادهی بالا (۲ / ۱ vvm) (شرایط عملیاتی مطابق شکل ۴).



شکل (۷) منحنی رشد، تولید گلوتامیک اسیدو کاهش قند در بیواکتور ایرلیفت با محیط کشت حاوی ملاس نیشکر (هوادهی ۲vvm، حجم کل ۶ لیتر)

در این حالت بهترین میزان تولید در هوادهی ۳ vvm برابر (g/L) ۱۸ بدست آمد.

از طرفی برای فرایند اقتصادی و بالا بازده از دیدگاه مهندسی، مبحث مهم کاهش هزینه های مصرف انرژی می باشد. برای این منظور ابتدا محاسبات انرژی مصرفی برای سیستم همزن دار و ایرلیفت انجام شد و به عنوان یک مبنای اقتصادی برای مقایسه از میزان تولید محصول به ازای واحد توان مصرفی استفاده شد.

$$\text{(بازده اقتصادی) } eff = \frac{\text{میزان تولید گلوتامیک اسید}}{\text{انرژی مصرفی}}$$

$$\text{(بیوراکتور همزن دار) } V = ۳/۳ \text{ lit} \Rightarrow eff = \frac{۱۰ g/L \times ۳/۳ L}{۱۱/۵۱۵ J/S}$$

$$= ۲/۸۶ \frac{g}{W}$$

برای بیواکتور ایرلیفت، میزان انرژی مصرفی در واحد حجم در حوزهٔ هوادهی ۳ـ۲/۱ vvm با توجه به رابطهٔ (۳) محاسبه شد که نتایج به این شرح است: (V_{ALF} = ۶ lit)

$$\text{هوادهی } = ۱/۲ \text{ vvm} \Rightarrow Fg_۱ = ۱/۲ \times ۱۰^{-۴} \text{ m}^۳/\text{s} \Rightarrow P_۱ =$$
$$۰/۲۹ W \Rightarrow eff_۱ = \frac{۱/۴ \times ۶}{۰/۲۹} = ۲۸/۹۶ \text{ g/W}$$

هوادهی $= ۲$ vvm $\Rightarrow Fg_۲ = ۲ \times ۱۰^{-۴}\ m^۳/s \Rightarrow P_۲ =$
$۰/۴۸۴\ W \Rightarrow eff_۲ = \frac{۱۶ \times ۶}{۰/۴۸۴} = ۱۹۸/۳۴\ g/W$

هوادهی$= ۳$ vvm $\Rightarrow Fg_۳ = ۳ \times ۱۰^{-۴}\ m^۳/s \Rightarrow P_۳ =$
$۰/۷۲۶\ W \Rightarrow eff_۳ = \frac{۱۸ \times ۶}{۰/۷۲۶} = ۱۴۸/۷۶\ g/W$

با مقایسهٔ بازده تولید محصول به ازای واحد انرژی مصرفی برای هر دو سیستم مشاهده شد که این عدد برای بیوراکتور ایرلیفت با هوادهی ۲vvm بیشترین است. در نتیجه این سیستم به جز محاسن دیگری که دارد، از نظر مصرف انرژی هم اقتصادی تر است.

در مرحلهٔ آخر، در نرخ هوادهی ۲vvm، محیط کشتهای مبتنی بر ملاس چغندر قندو نیشکر در راکتور ایرلیفت مورد مقایسه قرار گرفت و بهترین نتیجه در محیط ملاس نیشکر با میزان تولید (g/L) ۳۰ گلوتامیک اسید حاصل شد. این نتایج در شکل (۷) آمده است:

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده، روش عملیاتی MFB در حصول بازده بالای گلوتامیک اسید و در عین حال سهولت راهبری فرایند با استفاده از حسگرهای اسیدیته عملی و مؤثر به نظر می رسد. در این روش، با اعمال بهترین شرایط عملیاتی یعنی هوادهی ۱/۲vvm، دور ۵۰۰ rpm، دما ۳۲°C و pH= ۷/۶، بهره وری اسید معادل ۱۰ g/L بدست آمد. با بهره گیری از هیدرودینامیک برتر یعنی استفاده از راکتورهای ایرلیفت، این بهره وری در شرایط هوادهی ۳vvm به ۱۸ g/L ترقی نمود در حالیکه بهترین میزان تولید به ازای انرژی مصرفی در هوادهی ۲vvm معادل ۱۹۸/۳۴g/W بدست آمد. در همین نرخ هوادهی، کشت سلولی و تولید گلوتامیک اسید در محیطهای مبتنی بر ملاس چغندر قند و نیشکر مورد مقایسه قرار گرفت و در نتیجه در محیط مبتنی بر ملاس نیشکر با افزایش تولید حدود ۶۰٪ گلوتامیک اسید با غلظت ۳۰ g/L بدست آمد.

فهرست علائم و اختصارات

P_{on}= عدد توان (بدون بعد)
ρ= جرم حجمی محیط کشت ($kg/m^۳$)
P= توان مصرفی (W)
N_i= دور همزن ($S^{-۱}$)
D_i= قطر همزن (m)
Re= عدد رینولدز (بدون بعد)
μ= ویسکوزیته محیط کشت ($\frac{kg}{m.s}$)
N_a= شدت هوادهی (بدون بعد)

F_g= دبی حجمی گاز ($m^۳/s$)
V= حجم محیط کشت (Lit)
Pa= توان مصرفی مخزن همزن دار در حال هوادهی (W)
Pg= توان مصرفی برای انبساط گاز در مخزن به سبب هوادهی (W)
eff= بازده اقتصادی
$P_۱$= فشار در پائین مخزن (atm)
$P_۲$= فشار در بالای مخزن (atm)
U_0= سرعت ظاهری گاز (m/s)

مراجع

[1] Kirk-Othmer, Encyclopedia of chemical Technology (1984), Vol.2, PP. 156-212.
[2] Yamada, Kinoshita, Tsunoda and Aida (1972), The microbial production of amino acids. PP. 204-364.
[3] Shaoxum Huang, Xingyan Wu, J. chem. Tech. Biotech.(1995), Vol. 64, PP. 109-114.
[۴] جواد زمانی بررسی تاثیر هوادهی در تولید اسید گلوتامیک با استفاده از C.glutamicum پروژه کارشناسی ارشد ـ دانشگاه صنعتی شریف (۱۳۷۷) صفحه ۹۵
[5] Kitsuta. Y., Kishimoto. M. (1994), Biotech. Bioeng., Vol. 44, PP. 87-94.
[6] Kishimoto. M., Kitta. Y., Takeuchi. S. (1991), J. of Ferment. and Bioeng., Vol. 72, No.2, PP. 110-114.
[7] Bermeyer, "Method of enzymatic analysis; Vol.8, PP. 357-376.
[8] Whistler & Wolfrom (1952), "Methods in carbohydrate chemistry". Vol. 1, Pp. 386-388.
[9] Kishimoto. M., Kitta. Y., Takeuchi.S. (1991), J. of Fermentation and Bioeng., Vol. 72, No.2, PP. 110-114.
[10] Bailey. J.F., Ollis.D. (1986), Biochemical Eng. Fundamentals, McGraw-Hill book Co., New York, PP. 457-470.