تأثير درجات الحرارة المختلفة في كمية حامض الايتاكونيك المنتج من مولاس القصب بواسطة سلالة محلية من الفطر *Aspergillus terreus*

اسماعيل طالب ابراهيم المتيوتي
معهد أعداد المعلمات – الموصل

تاريخ الاستلام	تاريخ القبول
2005/6/9	2006/10/24

ABSTRACT

This research covered a determination of itaconic acid produced from cane molasses by a local strain of ***Aspergillus terreus*** by the influence of different degrees of temperature depending on the optimum conditions of growth & productivity of the microorganism including the 5th day of incubation , 12.5% sugar concentration in the production medium , 0.35% of urea as nitrogen source , 0.20% of potassium dihydrogen phosphate , 0.15% of both of magnesium sulphate and calcium chloride , 100 RPM of rotating shaker , these values which refer to the optimum conditions of growth & productivity of itaconic acid gave an optimum amount of acid produced equal to (812) mg\100ml of the medium.

The acid produced was determined according to Friedken method & separated by using thin layer chromatography technique (TLC) , finally the acid produced was identified by using the Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR).

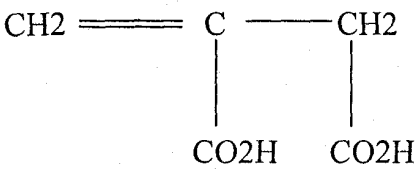
الخلاصة

تناول البحث تأثير درجات الحرارة المختلفة على كمية حامض الأيتاكونيك المنتج من مولاس القصب بواسطة سلالة محلية من الفطر ***Aspergillus terreus*** إذ اعتمدت الظروف المختبرية المثلى، فقد اعتمد اليوم الخامس للتحضين بوصفه افضل فترة زمنية و12.5 % بوصفه افضل تركيز للسكر في وسط الإنتاج وضبط الرقم الهيدروجيني الاولي عند 3.75 كأفضل رقم هيدروجيني واليوريا كأفضل مصدر نيتروجيني بتركيز (0.35 %) وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكبريتات المغنيسيوم وكلوريد الكالسيوم بتراكيز (0.02%، 0.15%، 0.15%) على التوالي، وبسرعة تدوير 100 دورة /دقيقة وقد تم الحصول على أفضل كمية منتجة من الحامض وهي (812)ملغم/100 مل من الوسط الزرعي، قدرت كمية الحامض المنتج بطريقة Friedken وقد استخلص الحامض باستخدام تقنية كروماتوكرافيا

الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatochraphy وشخص الحامض باستخدام جهاز قياس طيف الرنين النووي المغناطيسي (NMR) Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer .

المقدمة

يعود حامض الايتاكونيك إلى الأحماض العضوية ثنائية الكاربوكسيل، الأليفاتية غير المشبعة، وصيغته الكيميائية:



يترسب هذا الحامض بشكل بلورات بيضاء، يذوب بشكل جيد في الماء والكحول والأسيتون والكلوروفورم، كثافته 1.632 غم/لتر ووزنه الجزيئي130،1 ودرجة انصهاره 161- 162 م° (1)، انتج الحامض حيويا أول مرة سنة 1929في اليابان إذ وجد الحامض مع المانيتول في الوسط الغذائي المخمر باحد انواع الفطر ***Aspergillus*** ، شخص فيما بعد باسم ***Aspergillus itaconicus*** (2)، كما لوحظ الحامض سنة 1931 بوصفه ناتجا ايضيا للفطر ***A. itaconicus*** كذلك ومنه اكتسب هذه التسمية بفضل اكتشاف إنتاجه حيويا لأول مرة من تخمرات الفطر المذكور (3). ثم توالت الدراسات والبحوث التي أكدت قابلية اكثر من نوع من الأحياء المجهرية على إنتاج هذا الحامض باستخدام أوساط غذائية مختلفة فقد تبين أن عددا من الخمائر التي تعود إلى جنسي ***Candida*** و ***Rhodotorula*** لها القدرة على إنتاج الحامض وأن عددا من الأعفان لها القدرة على إنتاجه مثل ***Ustilago zeae*** و ***Hilicobasidium mompa*** و ***Penicillium chrlesii*** (3)، لكن سلالات معينة من الفطر ***Aspergillus terreus*** أظهرت قدرة عالية على إنتاج الحامض فأصبح الفطر ذا أهمية كيموحيوية لهذا السبب، ويعود امكان استخدام الفطر ***Aspergillus terreus*** في إنتاج حامض الأيتاكونيك إلى امتلاك خلاياه للأنزيمات الضرورية كافة لبناء المركبات الوسطية لدورة الأحماض العضوية ثلاثية الكاربوكسيل (2). وأكد العديد من الباحثين إمكان إنتاج حامض الأيتاكونيك من تخمرات هذا الفطر بكمية أكبر مما تنتجه تخمرات الأحياء المجهرية الأخرى (4- 8) .

ولابد من الإشارة إلى أن استخدام الحاضنة الهزازة في تخمرات الفطر كأي كائن مجهري آخر يزيد من نمو الفطر وإنتاجه للحامض(9)، كما أن الأوكسجين يعد ضروريا بوصفه محفزا للنمو والإسراع في عملية الانقسام وزيادة الكتلة الحيوية (3) والقيام الفعاليات الحيوية جميعا (10).

كما يؤثر نوع الوسط الغذائي المستخدم في إنتاج الحامض فقد أثبت العديد من الباحثين صلاحية المولاس بنوعيه (القصب والبنجر) بوصفه مصدرا كاربونيا بدلا من مصادر السكر التقليدية في إنتاج حامض الايتاكونيك من تخمرات الفطر ***Aspergillus terreus*** (4) (11) (12) (13) ، وللرقم

الهيدروجيني الأمثل تأثير مهم كذلك في نمو الفطر وانتاج الحامض (2) (14) (15)، ونظرا لاحتواء المولاس على نسبة قليلة جدا من المواد النتروجينية المهمة لبناء الخلايا فانه يحتاج الى اضافة مصدر نتروجيني أمثل بأفضل تركيز لجعله أكثر ملاءمة لنمو الفطر وانتاج الحامض (11) مثلما ان اضافة المغذيات اللاعضوية (مثل الفسفور والكبريت) يعد ضروريا للتوازن الأيوني وبناء التراكيب الخلوية وعدد من الأنزيمات (16)، فإذا أضيف الفوسفور بشكل فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين فأنه يزيد من كمية حامض الأيتاكونيك المنتج (15) (17) (18)، كما أن اضافة الكبريت ضرورية لأنه يدخل في تركيب عدد من الأحماض الأمينية مثل المثيونين Methionine والسيستين Cystein وفي تركيب عدد من الفيتامينات كالبايوتين Biotin والثايمين Thiamine وعدد من الأنزيمات مثل الفريدوكسين Ferrydoxine (3) وتحتاج الخلايا الحية الى المغنيسيوم بسبب دخوله في عمليات تخليق الطاقة أي في تحولات ATP ADP كما يساعد في تثبيت الرايبوسومات (3) وينشط أنزيمات التخمر (19) ويدخل البوتاسيوم في عمليات أيض الكاربوهيدرات ويكون عاملا متمما لعدد من الأنزيمات (3) (15) (17)، وللكالسيوم أهمية كبيرة في المحافظة على الموازنة الايونية عبر الأغشية الخلوية وتثبط عمل الأنزيم Itaconic acid oxidase مما يزيد في كمية الحامض الناتج (1) (20)، فضلا عن أن لحامض الأيتاكونيك استخدامات عدة تزيد من أهمية إنتاجه حيويا كاستخدامه في الصناعات البلاستيكية والألياف المطاطية وصناعة اللواصق والمنظفات والمواد الطبية والصيدلانية إذ يستخدم مادة لاصقة لحشوة الأسنان، وأن إنتاجه حيويا أفضل من إنتاجه كيمياويا من حيث الكمية المنتجة للحامض ومن حيث تكاليف الإنتاج. ويمكن إنتاج الحامض حيويا بعدة طرائق منها (3):

1. تحويل حامض الستريك Citric acid إلى حامض الأيتاكونيك باستخدام الفطر ***Aspergillus terreus*** أو خلاصة خلاياه، مما يشير إلى أن حامض الستريك هو إحدى المراحل الوسطية التي يمر بها حامض الأيتاكونيك خلال عمليات تخليقه ويوجد عدد قليل من الأنظمة التجارية التي تنتج هذا الحامض، منها اثنان في أوربا الغربية وواحد في كل من الأمريكتين ، واحد في روسيا وآخر في اليابان (1).
2. استخدام التخمرات المباشرة وذلك بإنماء كائن مجهري على وسط غذائي حاو على السكريات إذ يقوم الكائن المجهري بتحويل السكر الى حامض الايتاكونيك.

مواد العمل وطرائقه

استخدمت في البحث سلالة محلية من الفطر ***Aspergillus terreus*** ، تم الحصول عليها من قسم الصناعات الغذائية في كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل والمصنفة في (IMI) International Mycological Institute في المملكة المتحدة.

الأوساط الغذائية

1- **وسط إدامة السلالة وتنشيطها:** أديمت السلالة الفطرية بإنمائها على وسط مولاس القصب المصلب بالأجار ونشطت بإعادة زرعها Subculture على الوسط المذكور كل أسبوعين وحضنت بدرجة حرارة 28 ± 1 م°.

2- **حفظ السلالة:** بعد نمو السلالة الفطرية نموا جيدا على وسط مولاس القصب الصلب مدة (5-6) أيام، وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 م°.

3- **وسط الإنتاج:** استخدم مولاس القصب بوصفه مادة خاما لتحضير وسط الإنتاج وقد اظهر تحليله الجزئي احتواءه على المكونات الآتية:

Total sugars	42.3
Reducing sugars	6.25
Total nitrogen	1.18
Ash contents	9.12
Total solids	82.91

4- **ضبط الرقم الهيدروجيني Adjustment and measurement of pH** : ضبط الرقم الهيدروجيني الأمثل لوسط الإنتاج قبل إضافة اللقاح بواسطة جهاز قياس الرقم الهيدروجيني p H meter من طراز PW9421 Philips وكذلك الحال في قياس الرقم الهيدروجيني النهائي لوسط الإنتاج بعد نمو الفطر وانتاج الحامض.

5- **تحضير اللقاح:** حضر اللقاح بطريقة تحضير وسط الإنتاج نفسها.

6- **تقدير كمية الحامض المنتجة Determination of itaconic acid produced:** قدرت كمية الحامض الناتج اعتمادا على (21) وقد تطلبت عملية تقدير كمية الحامض الناتج تحضير المحاليل الآتية :

أ- **ماء البرومين Bromine Water .**

ب- **محلول يوديد البوتاسيوم Potassium iodide solution.**

ج- **محلول حامض الهيدروكلوريك N HCL (0.1).**

د-محلول ثايوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulphate (0.1 N)

ه-محلول دليل النشأ Starch Indicator solution.

و- **محلول قياسي:** (2مل) لكل مرة تقدر فيها كمية الحامض المنتج.

وبعد تحضير المحاليل في أعلاه قدرت كمية الحامض الناتج بتطبيق العلاقة:

كمية الثايوكبريتات المستهلك بالتسحيح مع المحلول القياسي — حجم الثايوكبريتات المستهلك بالتسحيح مع النموذج = 0.0065 X غم من حامض الأيتاكونيك من النموذج المأخوذ للتحليل وهو (2)مل

تقدير الكتلة الحيوية: قدرت الكتلة الحيوية للفطر في وسط الإنتاج باستخدام ميزان حساس من نوع (متلر طراز PC 180).

تقدير كمية السكر الأولي والمتبقي : Determination of initial & Residual sugar

قدرت كمية السكر الأولى والمتبقي في وسط المولاس اعتمادا على (22) باستخدام الكلوكوز كسكر قياسي.

استخلاص الحامض وتشخيصه

استخلص الحامض المنتج باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatochraphy (TLC) (23) وشخص الحامض باستخدام جهاز قياس طيف الرنين النووي المغناطيسي Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR).

النتائج

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) حدوث زيادة تدريجية في الوزن الجاف للفطر بازدياد درجة الحرارة، كما أن كمية الحامض المنتج أخذت بالازدياد بارتفاع درجة حرارة الوسط كذلك وصولا الى أعلى كمية من الحامض المنتج عند درجة حرارة 36م°. ولكن أخذ السكر المتبقي في الوسط بالنقصان بازدياد درجة حرارة الوسط على العكس من الرقم الهيدروجيني الذي أخذ بالارتفاع التدريجي واعتبارا من درجة 37 م° استمر الوزن الجاف بالازدياد على حساب كمية الحامض المنتج إذ أصبحت كمية الحامض المنتج في درجة حرارة 40 م° أقل بكثير مما أنتجه الفطر في درجة حرارة 29 م°.

جدول (1) تأثير درجات الحرارة على كمية حامض الايتاكونيك المنتج من مولاس القصب بواسطة سلالة محلية من الفطر ***Aspergillus terreus***

درجة الحرارة م°	الوزن الجاف ملغم/ 100مل	حامض الأيتاكونيك ملغم/100	السكر المتبقي ملغم/ 100مل	الرقم الهيدروجيني النهائي
29	1602(11)	312(5)	3022(8)	3.91
30	1693(21)	423 (17)	2169(15)	4.20
31	1752(19)	490(23)	1135 (10)	4.31
32	1788 (31)	563(16)	982(14)	4.41
33	1882 (33)	671(24)	911(12)	4.57
34	1906 (35)	736(15)	861(13)	4.63
35	1915(24)	785(18)	787(11)	4.72
36	1927(33)	812(25)	712(9)	4.81
37	1953(28)	601(19)	677(16)	4.87
38	1966(22)	412(12)	613(15)	4.90
39	1982(17)	209(26)	598(9)	4.94
40	1995(29)	117(13)	292(13)	4.99

المناقشة

إن لدرجات الحرارة تأثير مهم في نمو الأحياء المجهرية والتركيب الكيميائي والتخليق الحيوي والفعالية الأنزيمية لها، ولكل كائن مجهري درجة حرارة مثلى لنموه وإنتاجيته ، وان الزيادة أو النقصان عن الحد الأمثل لدرجة الحرارة يؤثر تأثيرا سلبيا في النمو والإنتاج (3)، وهذا ما أظهرته نتائج البحث الحالي إذ تم تحديد درجة الحرارة المثلى وهي 36 م° وقد لوحظ أن درجات الحرارة أثرت في الوزن الجاف والذي بدأ يزداد بازدياد درجة الحرارة وصولا الى أعلى حد في درجة الحرارة المثلى ،وهكذا الحال مع كمية الحامض المنتج التي أخذت بالازدياد كذلك بازدياد درجة الحرارة وصولا الى الدرجة المثلى، والسبب في ذلك هو التأثير الإيجابي للظروف المثلى المستخدمة في البحث (16) إذ أن للتركيز الأمثل للسكر في المولاس دورا مهما في نمو الفطر وإنتاجه للحامض (4) (5) (24)، مثلما للفترة الزمنية المثلى للتحضين تأثير مهم للغاية إذ وصل الفطر فيه إلى أعلى نمو وأفضل إنتاج للحامض (8) (15) (17)، تشير الدراسات الى ان أضافه اليوريا الى وسط المولاس تجعله اكثر ملاءمة لانماء الكائنات المجهرية كالبكتريا والفطريات (11) و (25)، ولذا فان أضافة اليوريا كمصدر نيتروجيني امثل إلى وسط

المولاس عمل على تحفيز نمو الفطر وزيادة إنتاجه للحامض (26- 28) والسبب في ذلك أن المصدر النيتروجيني من العناصر الأساسية لبناء الخلايا الحية ونموها ويدخل في تركيب الأحماض النووية ويشكل حوالي 8-14% من وزن الخلايا الجافة، وتمتلك الخلايا طرائق ومسالك لتمثيل النيتروجين أكثر من تلك الخاصة بالكاربون (3)، ومما يزيد في أهمية اليوريا رخص ثمنها (29)، كما وان وجود تراكيز مثلى من فوسفات الأمونيوم وكبريتات المغنيسيوم يؤدي دورا مهما في نمو الفطر وإنتاجه للحامض لأنهما يحفزان عمل الأنزيم Cis- aconitate decarboxylase الذي يعمل على تحويل ألـ Cis- aconitate الى حامض الأيتاكونيك كما تثبط عمل الأنزيم Itaconic acid oxidase الذي يعمل على تحلل حامض الأيتاكونيك وخاصة في المراحل الأخيرة من نمو الفطر، وجاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل إليه Rychtera(15) ,Ju, (17)Mehrotra, (27). كما أن وجود الكالسيوم يعمل على تثبيط عمل الأنزيم Itaconic acid oxidase كذلك وهكذا تزداد كمية الحامض المنتج، وهذه النتيجة مطابقة لما توصل إليه (1) (20) (30)، ان سرعة التدوير المثلى 100دورة/دقيقة (2) (14) قد ادت دورا مهما في زيادة نمو الفطر وإنتاجه للحامض وهذه النتيجة مطابقة لما توصل إليه Mehrotra (27) لأن التحريك يعمل على سرعة ذوبان الغاز وزيادة تماس الخلايا مع مكونات الوسط الغذائي (3)، كما أن التهوية تحفز نمو الفطر وتسرع من عملية الانقسام والقيام بالفعاليات الفسلجية (10) وزيادة الكتلة الحيوية (3) .

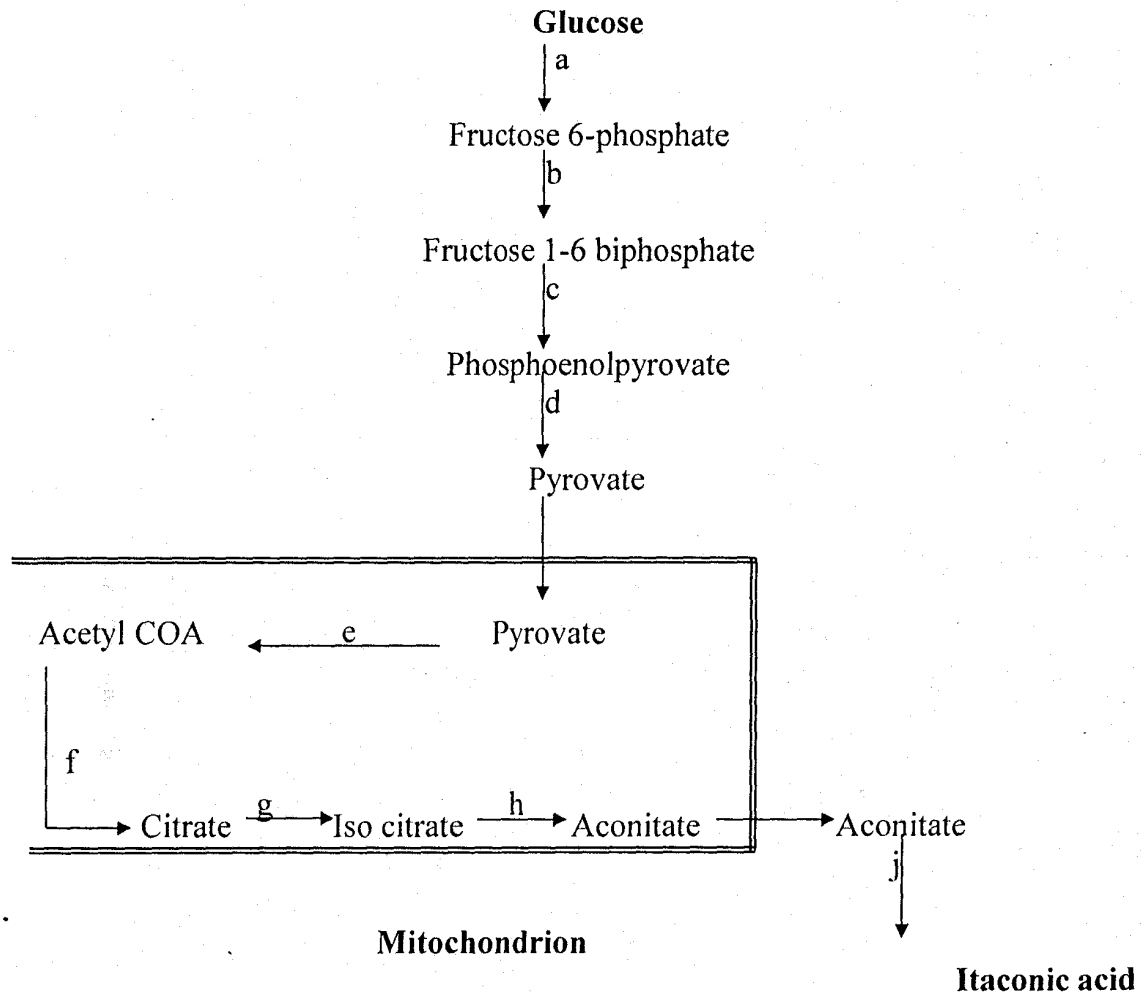
لكن الذي حصل هو أن الوزن الجاف استمر بالازدياد مع زيادة درجة الحرارة وصولا الى الدرجة المثلى بينما أخذت كمية الحامض المنتج بالانخفاض ، وتفسير ذلك أن تجاوز درجة الحرارة المثلى يؤدي إلى الإسراع في عملية التخمر ويحدث نموا غزيرا للغزل الفطري مما يسبب تأكسد كمية أكبر من السكر الذي يتحول إلى غاز ثنائي اوكسيد الكاربون وهذا يقلل كمية الحامض المنتج (3). أما السكر المتبقي في الوسط فقد أخذ بالنقصان بازدياد نمو الفطر (5) (16) وازدياد كمية الحامض المنتج وهذه النتيجة مطابقة لما توصل إليه المتيوتي (16)، واما فيما يخص الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج فقد ارتفع تدريجيا مما تطابق مع ما توصل إليه علاوي (31)، في حين جاءت هذه النتيجة مخالفة لنتائج بعض البحوث التي استخدمت فيها الأوساط الصناعية (32) .

التخليق الحيوي للحامض

تعود قدرة الفطر ***A. terreus*** على إنتاج الحامض أساسا إلى امتلاكه للأنزيم Cis-aconitic decarboxylase الذي هو المفتاح في إنتاج الحامض ، وتعود الزيادة في إنتاج الحامض إلى نشاط هذا الأنزيم الذي يتمركز في سايتوبلازم خلايا الفطر لذا فأن الأكونتيت المتجمع في المايتوكوندريا ينتقل إلى السايتوبلازم ويتحول إلى حامض الأيتاكونيك بفعل الأنزيم آنف الذكر ثم يفرز إلى خارج خلايا الفطر ، كما يتطلب إنتاج الفطر للحامض نشاطا لأنزيمات التحلل السكري وأنزيمات دورة الأحماض ثلاثية الكاربوكسيل ، كما أن عددا من المركبات الوسطية لهذه الدورة تزداد كمياتها في

أثناء إنتاج الحامض وبخاصة الستريت والستريت المشابه والأكونتيت مما يدل على أن الزيادة في كميات هذه المواد هي بداية تكوين الحامض (33).

ويمكن إجمال التخليق الحيوي للحامض بالخطوات الموضحة في الشكل (1):



شكل (1) توضيح خطوات التخليق الحيوي لحامض الأيتاكونيك بواسطة الفطر *A. terreus*

a- Hexokinase
b- Phosphofructokinase
c- Enolase
d- Pyrovate kinase
e- Acetyl-COA carboxylase
f- Citrate synthase
g- h Aconitase
j- Cis-aconitic decarboxylase(16)

المصادر

(1) Crueger W. and Crueger, A. Biotchnology "A Text – book of Industerial Microbiology). Ed. D. B. Thomas. Science Technol. Inc. Sunderland MA 03175 p 125, (1984)".

(2) Hockenhull D. J. D. Progress in Industrial Microbogy. Vol. II. Interscience Publishers. Inc. New York. Pp. 184 – 190, (1960).

(3) الخفاجي، زهرة محمود، التقنية الحيوية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد، (1990).

(4) Nakamura I., Nakagawa M. and Kobayashi T. Effect of organic acids and metal ions in molasses on itaconic acid fermentation with ***A. terreus***. J. Frement. Technol., 53 (7): 435 – 442, (1975).

(5) Nakagawa M., Nakamura I. and Kobyashi T. J. Ferment. Technol., 53 (5): 294 – 30, (1975).

(6) Jakubowska J. Itaconic and itatartaric acid bisynthesis. In.: "Genetics and Physiology of Aspergillus." Eds. J. Smith and J. A. patman. Pub. By: Acadmic press. Inc. (london) ltd., 21: 426 – 451, (1977).

(7) Park Y. S., Ohta N. and Okabe M. Biotechnol. Lett., 15 (6): 583-586, (1993).

(8) Kautola H. Itaconic acid production from xylose in repeated – batch and continous bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33: 7-11, (1990).

(9) الحيالي، ولاء حمدون شكر، رسالة ماجستير، جامعة الموصل، كلية التربية، قسم علوم الحياة، (1996).

(10) البياتي، ميسون خضير، رسالة ماجستير، جامعة بغداد، كلية العلوم، قسم علوم الحياة، (1980).

(11) Reindal F., Neider – Lanker K. and Pfundt R. J. Biochem. Z., 1: 291, (1937).

(12) Kobrina Y. P. J. IZV. Vyssh Vche Buzave Pistch Teknol., 4: 50 – 53, (1970).

(13) Borrows S. Bakers yeast in: "The Yeast" Eds. H. A. Rose and J. S. Harrison. Acadamic Press Inc., (London) pp. 349 – 414, (1970).

(14) Buchta K. Organic acid. In: "Biotchnology", H. J. Rehm, and G. Reed. Germany Vol. III pp. 468 – 469, (1983).

(15) Rychtera M. and Wase D. A. J. Chem. Technol. Biotechnol., 31: 509 - 520, (1981).

(16) الميتوتي، اسماعيل طالب ابراهيم، رسالة ماجستير، جامعة الموصل/ كلية التربية/ قسم علوم الحياة، (1997).

(17) Ju N. and Wang. S. S. Appl. Microbiol. Biotechnical., 23: 311 – 314, (1986).

(18) سرحان، عبد الرضا طه وشريف، فياض محمد، فسلجة الفطريات، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل/ جمهورية العراق، (1988).

(19) Summer J. B. and Somers. G. F. Chemistry and Methods of Enzymes. Academic Press Inc., New York, (1947).
(20) Kautola H., Rymowiz W. Linko Y. Y. and Linko, P. Appl. Biotechnol., 35 (2)P 154 – 158, (1991).
(21) Friedken M. Ind. Eng. Chem. Anal., 17: 638 – 638, (1945).
(22) Dubois M. Gilles K. A., Hamilton P. K., Robers P. A., and Smith F. Anal. Chem., 28 (3): 350 – 365, (1956).
(23) Kirchner J. G. Thin layer chromatography. 2nd Ed. Vol. XIV. Awilley – interscience Publications. pp. 360 – 361, (1978).
(24) Nowakowska – Waszczck A. and Zakowska Z. Studies on the utilization of beet molassas for itaconic acid fermentation. I- molasses purified by ion exchangers., Infuence of anions and cations. Rocz. Technol. Chem. Zywn., 18: 33- 43, (1970).
(25) Imrie F. K. E. J. Sci. Pd. Agrico, 24: 639, (1973).
(26) Righerlato R. C. Growth kinetics of myclial fungi. Vol. 1. Industerial Mycology, John Wiley and Sons, New York., pp. 79 – 103, (1975).
(27) Mehrotra B. S. and Tandon G. D. Antibiot. Bull., 12 (4): 164 – 178, (1970).
(28) Horitsu H., Takahashi Y., Tusda J., Kawai K. and Kawano Y., Eur. J Appl. Biotechnol., 18: 358 – 360, (1983).
(29) Mateles R. I. Production of SCP in: "Single cell protein" 2nd. Eds. S. R. Tannebaun and O. I. C. Wang MIT. Press, Cambridge, (1975).
(30) Lockwood L. B. Production of organic acid by fermentation, In: "Microbiological Technology" Eds. H. Peppler and D. Perlman. Academic Press New York., Vol. I: pp. 353 – 387, (1979).
(31) علاوي، رعد حساني سلطان، رسالة ماجستير، جامعة الموصل، كلية التربية، قسم علوم الحيـــاة، (1996).
(32) Rychtera M. Kavasny- Prum, 23 (7): 159 – 162, (1977).
(33) Jaklitsch W. M. Kubicek C. P. And Scrutton C. J.Gen. Microbiol., 137 (3): 533- 539, (1991).