✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۳، تابستان ۱۳۷۸

تعیین فاکتورهای بهینه در رشد مخمر *Kluyveromyces fragilis* به منظور تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز

● رسول مدنی ● جلیل وندیوسفی ● فرشید زمانی ● فریبا گلچین‌فر
مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، بخش بیوتکنولوژی و میکروب‌شناسی
تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۷۸

چکیده
آب پنیر به عنوان محیط پایه‌ای حاوی لاکتوز جهت رشد مخمر *Kluyveromyces fragilis* و تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز انتخاب شده است. با توجه به رشد مخمر در محیط سنتزی (پیش‌کشت) و محیط کشت اصلی (آب پنیر) مشخص شد که سلولها باید در پایان فاز لگاریتمی و ابتدای فاز ساکن (که به بیشترین تعداد خود رسیده‌اند) به محیط کشت اصلی منتقل شوند، که این امر پس از گذشت حدود ۱۸ الی ۲۰ ساعت از ابتدای رشد انجام می‌گیرد. با بررسی‌های انجام شده، شرایط بهینه در محیط کشت اصلی شامل ۰/۵ درصد (وزنی - حجمی) آمونیوم سولفات، ۰/۳ درصد (وزنی - حجمی) دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات و ۰/۷ درصد (حجمی - حجمی) فاکتور رشد (Corn Steep Liquor) می‌باشد. در خصوص تأثیر شرایط محیطی در راستای بهینه‌سازی محیط کشت اصلی می‌توان به دما، pH و میزان هوادهی (سرعت همزدن) اشاره نمود که دمای ۳۰ درجه سانتیگراد، pH=۶/۸ و میزان هوادهی (سرعت همزدن) ۱۰۰rpm به عنوان مناسب‌ترین مقادیر انتخاب شد. مخمر مورد نظر در محیط شامل ۱۰٪ لاکتوز (به عنوان منبع کربنی) بالاترین مقدار آنزیم بتا-گالاکتوزیداز بیوسنتز شده را تولید می‌نماید. بهترین زمان استخراج آنزیم، ۲۳ ساعت پس از شروع کشت در محیط کشت اصلی می‌باشد، که زمانی مطلوب جهت پایان فرآیند کشت مخمر است در این زمان آنزیم بیوسنتز شده در بالاترین مقدار موجود می‌باشد.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 43
PP: 70-74

Determination of improved factorsf or growth of *k. fragilis* to produce β-galactosidase

By: Madani R., Vand Yousefi J., Zamani F., Golchinfar F.; Razi Vaccine and serum research institute, P.O.Box, 11365-1558. Tehran-IRAN.

Whey as main culture media which contain lactose were choosen for yeast to produce the enzyme. It was seen that cells should transfer to main media after 18 to 20 hours, at the end of logarithmic and starting stationary phase. The improved factors of culture media were determined as 0.5% (W/v) ammonium sulphate, 0.3% (W/v) dipotassium hydrogen phosphate and 0.7% (W/v) corn steep liqour as growth factor. The effect of physical factors determined as temp. 30 ح, pH=6.8 and velocity of rotation 100 rpm. This yeast produced ح-galactosidase at highest level when the media contain 10% lactose (as the source of carbon).

مقدمه

آنزیم بتا - گالاکتوزیداز سبب هیدرولیز لاکتوز به اجزای سازنده آن یعنی گلوکز و گالاکتوز می‌گردد. آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در بسیاری از گیاهان، میوه‌جات و جانوران یافت می‌شود، ولی منبع اصلی جهت تهیه و تولید آنزیم، میکروارگانیسم‌هایی همچون مخمرها، قارچها و باکتریها می‌باشند و هر یک از میکروارگانیسم‌ها بنابه شرائط خاصی که نیاز دارند جهت تولید آنزیم استفاده می‌شوند با در نظر گرفتن قدرت زیاد سازشی میکروارگانیسم‌ها با محیط‌های مختلف می‌توان به تعیین و تشکیل آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در شرایط خاص اشاره نمود. در هر صورت لاکتوز به عنوان یک سوبسترای القاء کننده (محرک) بیوسنتز آنزیم در یک سطح وسیع در محیط کشت ضروری و لازم می‌باشد. (۱، ۳ و ۷).

در خصوص اهمیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز، چنین می‌توان بیان کرد که هضم دی ساکاریدها در سلولهای مخاطی و در لایه بیرونی روده باریک انجام می‌شود. ترشحات مخاط روده محتوای مقادیر قابل توجهی آلفا-اولیگوساکارید از سه نوع بتا-اولیگوساکاریداز است. چنانچه یکی از آنزیمهای مالتاز، سوکراز و یا لاکتاز (بتا-گالاکتوزیداز) که جزء دسته یاد شده می‌باشند چه به طور اکتسابی و چه به طور مادرزادی در سلولهای مخاطی روده باریک ساخته نشوند، عوارض شدید گوارشی برای شخص به دنبال خواهد داشت. با کمبود بتا-گالاکتوزیداز یک عدم تحمل لاکتوز توسط شخص بوجود خواهد آمد. با توجه به مشکلاتی که شیر حاوی لاکتوز برای افراد مذکور ایجاد می‌کند، تهیه شیر بدون لاکتوز در جهان امروز ضرورت پیدا کرده است، که این عمل با تجزیه لاکتوز توسط آنزیم بتا-گالاکتوزیداز، انجام‌پذیر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

رشد مخمر در پیش‌کشت

مخمرها قبل از اینکه وارد محیط کشت اصلی بشوند لازم است ابتدا درون پیش‌کشت رشد داده شوند و به تعداد معینی برسند (۳ و ۵). پیش‌کشت استفاده شده پس از مطالعات انجام شده شامل ۲٪ (وزنی - حجمی) لاکتوز، ۰/۳٪ (وزنی - حجمی) دی پتاسیم هیدروژن فسفات و pH محیط برابر با ۷ بود. پس از آماده سازی سوسپانسیونی از مخمر *K. fragilis* CBS397 که از بخش میکروب‌شناسی مؤسسه رازی تهیه شد، حدود ۲٪ حجمی از این سوسپانسیون را به ml ۱۰۰ پیش‌کشت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد اضافه کرده و در شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و سرعت rpm ۱۰۰ در ارلن به حجم سه برابر محیط کشت قرار داده و براساس منحنی رشد، بعد از گذشت ۱۸ الی ۲۰ ساعت عمل انتقال به کشت اصلی انجام شد.

رشد مخمر در محیط کشت اصلی

پس از رشد مخمرها در پیش‌کشت و رسیدن به انتهای فازلگاریتمی که سلولها بیشترین تعداد خود را دارا می‌باشند آماده انتقال به محیط کشت اصلی، که آب

پنیر محیط پایهٔ آن بوده، می‌باشد. نهایتاً جهت استفاده باید پروتئین‌های آن جدا شود. آب پنیر مورد استفاده از نوع شیرین بوده و pH اولیه آن برابر ۶/۶-۵/۸ است.

اندازه‌گیری مقدار لاکتوز موجود در آب پنیر به روش فنل-اسیدسولفوریک انجام گرفته است که در این روش به ۲ میلی لیتر از یک محلول آبی حاوی ۱۰۰ میکروگرم لاکتوز، ۵۰ میکرولیتر از معرف فنل (۸۰ گرم فنل در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) افزوده و بلافاصله ۵ میلی‌لیتر از اسیدسولفوریک غلیظ را نیز اضافه نموده و خوب مخلوط کرده، سپس نمونه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرارداده، رنگ زرد مایل به قهوه‌ایی ظاهر می‌شود، بعد از گذشت این زمان، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت می‌گردد و سپس محاسبه غلظت لاکتوز در نمونه‌ها انجام می‌شود. جهت حذف پروتئین‌ها از آب پنیر، دما را به ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه رسانده و در این شرایط مقداری از پروتئین‌ها رسوب می‌کند، جهت کامل شدن عمل پروتئین زدائی، حرارت را به ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه رسانده بعد از این عملیات نمونه‌ها را تا دمای محیط سرد کرده و pH با اسید به ۴/۸ می‌رسد، سپس توسط فیلتراسیون لخته‌های پروتئینی از نمونه جدا می‌شود پس از این مرحله، جهت غنی‌سازی آب پنیر به عنوان محیط کشت اصلی مواد مکمل بدان افزوده می‌شود که عبارتند از آمونیوم سولفات، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات و فاکتور مؤثر در رشد (Corn steep liquor). به عنوان ظروف کشت از بالن‌های ۲ لیتری استفاده شده است به طوری که یک پنجم از حجم کل ظرف را محیط کشت اشغال نماید، سپس pH محیط کشت را تنظیم نموده و آنها را جهت عمل استریلیزاسیون وارد اتوکلاو نموده، که این عمل در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه جهت از بین بردن هر گونه آلودگی انجام می‌شود.

پس از اینکه محیط‌های کشت استریل به دمای محیط رسیدند عمل تلقیح انجام می‌گیرد. در این عمل ۵٪ از محیط پیش‌کشت به محیط کشت اصلی انتقال می‌یابد. ظروف کشت حاوی مخمرها پس از گذراندن کلیه مراحل یاد شده وارد شیکر می‌شوند و با تنظیم دما و سرعت چرخش، شرایط جهت رشد مخمرها و بیوسنتز آنزیم فراهم می‌گردد.

در طول مدت کشت به منظور تعیین درصد رشد سلولها، تغییر تغلیظ سوبسترا و pH در فواصل زمانی ۲ ساعته از محیط مذکور نمونه‌برداری کرده و در اوایل فاز ساکن، سلولها را جهت استخراج آنزیم از محیط کشت جدا می‌نمایند.

انتخاب محیط کشت بهینه

بهینه‌سازی منبع ازت

از آنجائی که میکروارگانیسم مورد نظر جهت رشد و بیوسنتز آنزیم، احتیاج به نیتروژن دارد لذا از آمونیوم سولفات به منظور تأمین کننده نیتروژن استفاده می‌شود. در این راستا جهت به دست آوردن مقدار مناسب این عامل مقادیر ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ درصد (وزنی - حجمی) از آن را استفاده کرده و اثرات آن مورد بررسی قرار گرفته است (طبق دستورالعمل به کار رفته در منابع ۶، ۷ و ۹).

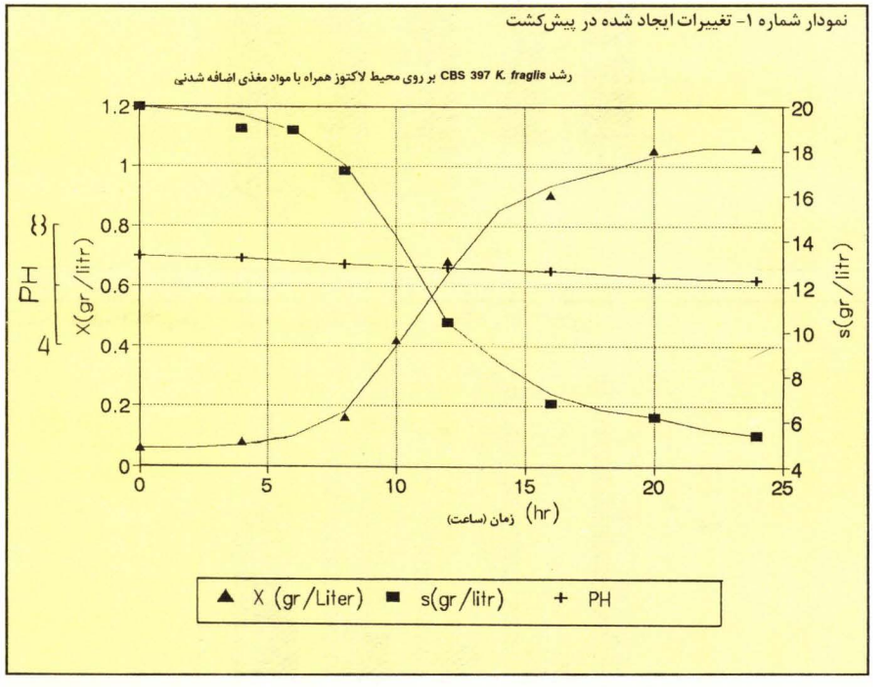
بهینه‌سازی منبع فسفات

به منظور انتخاب بهترین مقدار از دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات به عنوان منبع فسفات، مقادیر ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۰/۹ درصد (وزنی - حجمی) از آن را در محیط کشت اصلی حاوی تمام مقادیر قبلی به کار برده و اثرات آن بر روی نحوه رشد و نهایتاً مقدار آنزیم بیوسنتز شده بررسی شد (طبق عملکرد منابع ۶، ۷ و ۹).

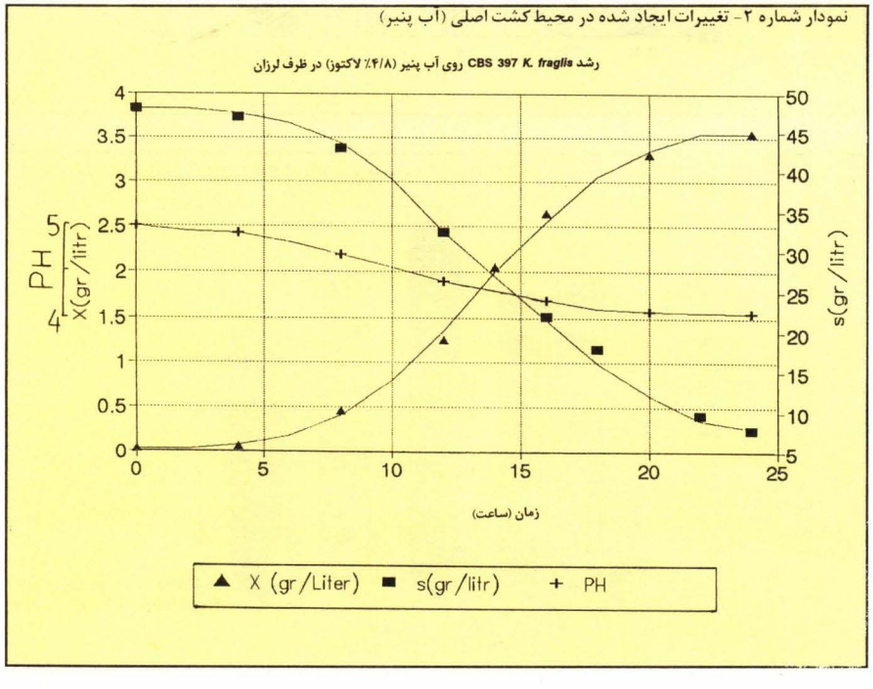
بهینه‌سازی فاکتور رشد (Corn steep liquor)

به جهت تأمین موادضروری و مورد نیاز رشد مخمر از عواملی به نام فاکتور رشد که همان Corn steep liquor باشد، استفاده می‌گردد. برای به دست آوردن مقدار بهینه از فاکتور رشد، مقادیر ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۰/۹ و ۱/۱ درصد (حجمی - حجمی) از Corn Steep liquor در محیط کشت اصلی اضافه شد (طبق روشهای استفاده شده در منابع ۶ و ۹).

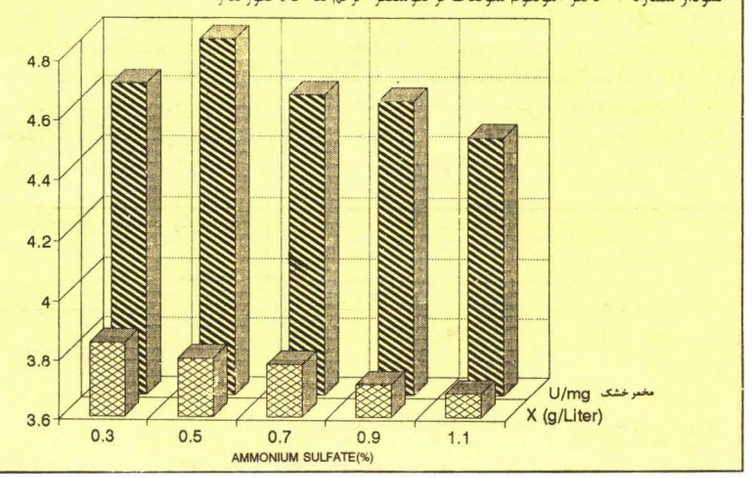
نمودار شماره ۱- تغییرات ایجاد شده در پیش‌کشت



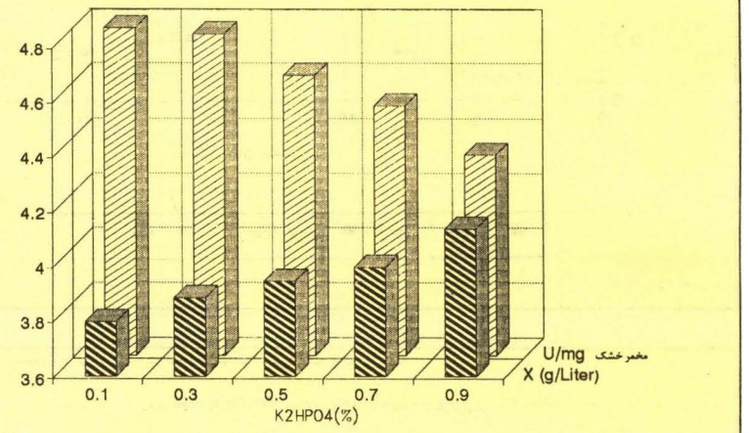
نمودار شماره ۲- تغییرات ایجاد شده در محیط کشت اصلی (آب پنیر)



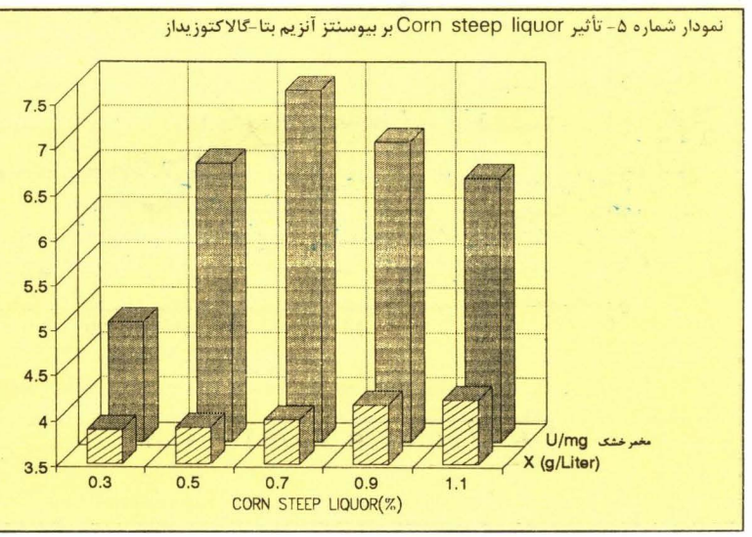
نمودار شماره ۳ تأثیر آمونیوم سولفات بر بیوسنتز آنزیم بتا گالاکتوزیداز



نمودار شماره ۴- تأثیر دی پتاسیم هیدروژن فسفات بر بیوسنتز آنزیم بتا-گالاکتوزیداز



نمودار شماره ۵- تأثیر Corn steep liquor بر بیوسنتز آنزیم بتا-گالاکتوزیداز



بهینه‌سازی عوامل محیطی

pH -۱

در این خصوص pHهای ۵، ۶/۸، ۷ و ۸ استفاده گردید که توسط سود و اسید ۰/۲ نرمال تنظیم شد و اثرات آن بر روی رشد مخمر و بیوسنتز آنزیم کاملاً مشهود بود.

۲- درجه حرارت محیط

در این بررسی از دماهای ۲۵، ۲۸، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد استفاده شد.

۳- میزان هوادهی (سرعت همزدن)

جهت دستیابی به مقادیر مناسب از اکسیژن از شیکری با ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ rpm استفاده شد.

نحوه استخراج آنزیم داخل سلول

بعد از به پایان رسیدن زمان نهائی کشت، سلولهای مخمر به کمک سانتریفوژ با سرعت ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد از محیط کشت جدا می‌شود. سلولهای جدا شده ۲ مرتبه با آب مقطر شستشو داده و مجدداً سانتریفوژ می‌شوند. سلولهای مرطوب استخراج شده را وزن کرده و به ازاء هر ۱۷۵ میلی‌گرم سلول مرطوب، ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، کلر و منگنز، سولفات منیزیم با pH=۷ می‌باشد.

محلول حاوی سلولهای مخمر و بافر پتاسیم فسفات جهت عمل سونیکه کردن آماده می‌شود. سلولها با ولتاژ ۱۶۰ به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شده و سپس هم حجم محلول از بافر فسفات افزوده و به مدت ۴ ساعت این محلول در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود تا استخراج کامل شود. پس از پایان این زمان، سلولهای شکسته شده را توسط سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm و زمان ۱۵ دقیقه جداکرده و محلول به دست آمده جهت اندازه‌گیری مناسب آنزیم لاکتاز (بتا-گالاکتوزیداز) مورد بررسی قرار می‌گیرد.

تعیین فعالیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز

۰/۱ میلی‌لیتر از محلول آنزیمی را با ۴ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۱M، pH=۶/۶ که شامل ۱/۱۲۵ میلی‌لیتر ارتو نیترو فنیل گالاکتوزید (ONPG) می‌باشد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری کرده و بعد از ۵ دقیقه واکنش را توسط ۱ میلی‌لیتر Na_2CO_3، ۰/۵M متوقف نموده، سپس جذب نمونه در طول موج ۴۲۰nm قرائت می‌شود. با استفاده از محنی استاندارد ارتونیتروفنل (ONP) و با داشتن جذب نمونه، فعالیت آنزیم به دست می‌آید.

یک واحد آنزیمی بنا به تعریف عبارتست از، مقدار آنزیمی که قادر باشد ۱۰ مول ارتونیتروفنل را در مدت یک دقیقه و در ۳۷ درجه سانتیگراد تولید نماید.

نتایج و بحث

پیش‌کشت

نمودار (۱) بیانگر متوسط تغییرات ایجاد شده در

جرم سلولی مخمر *K. fragilis*، میزان مصرف سوبسترا و تغییرات pH در پیش‌کشت می‌باشد. بعد از گذشت ۲۰-۱۸ ساعت مخمر به انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز ساکن رشد خود می‌رسد که زمان انتقال به محیط کشت اصلی می‌باشد. در طول مدت کشت ۷۳٪ از لاکتوز اولیه به مصرف رسیده و pH نیز کاهش جزئی را نشان می‌دهد.

محیط کشت اصلی

در نمودار شماره ۲ متوسط تغییرات ایجاد شده در جرم سلولی در محیط کشت آب پنیر مشاهده می‌گردد. بعد از حدود ۲۲ ساعت رشد میکروارگانیسم به فاز ساکن می‌رسد و با توجه به منابع مختلف بیوسنتز آنزیم، به حداکثر مقدار خود در این زمان می‌رسد. pH محیط کشت نیز در مدت ۲۴ ساعت پس از رشد کاهش جزئی را نشان می‌دهد.

بهینه سازی محیط کشت

۱- آمونیوم سولفات: با توجه به نتایج حاصل از این بررسی که در نمودار شماره ۳ مشخص است با افزایش میزان درصد آمونیوم سولفات جرم ملکولی کاهش می‌یابد به طوری که در ۱/۱ درصد که بالاترین درصد آمونیوم سولفات می‌باشد میزان جرم سلولی به کمترین مقدار می‌رسد و براساس نتایج به دست آمده بالاترین بازدهی آنزیم در محیطی با ۰/۵ درصد آمونیوم سولفات می‌باشد.

این نتایج مطابق با کارهای تحقیقاتی که در منابع ۸ و ۱۰ عنوان شده است، می‌باشد. بالاترین بازدهی آنزیم در محیطی با ۰/۵۴ درصد آمونیوم سولفات و در مرجع شماره ۱۰ در محیطی با ۰/۴۶ درصد آمونیوم سولفات عنوان شده است (۸).

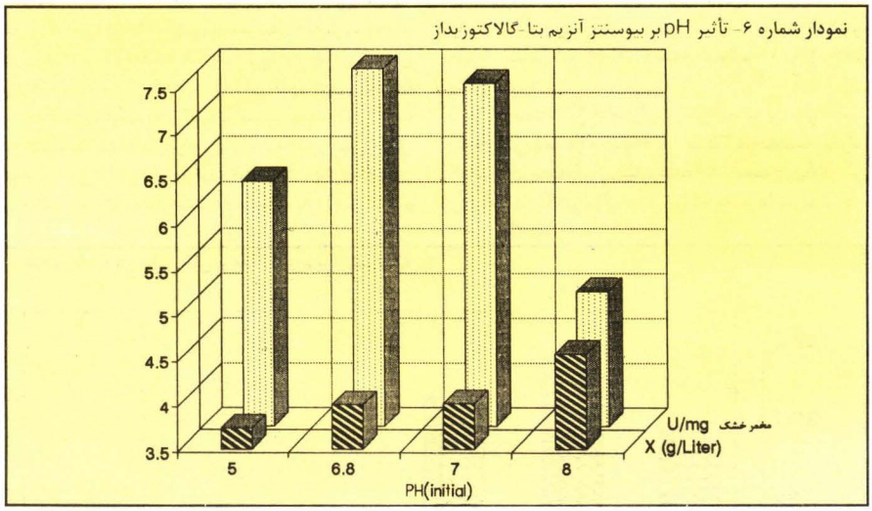
۲- دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات: با افزایش میزان درصد دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات در محیط کشت میزان جرم سلولی افزایش می‌یابد و در واقع غلظت بالا از دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات تنها باعث افزایش در سرعت تکثیر و جرم سلولی می‌شود و بیوسنتز آنزیم کاهش نشان می‌دهد. نمودار شماره ۴ بیانگر مقدار آنزیم بیوسنتز شده می‌باشد که در محیطی با ۰/۳ درصد از این عامل مقدار آنزیم بیوسنتز شده در بالاترین حد خود قرار دارد. این مطلب به خوبی در کار پژوهشگران قبلی نیز مشاهده می‌شود (۳ و ۴). در منابع شماره ۳ و ۴ عنوان شده، که در مقادیر کمتر و بیشتر از ۰/۳۵ درصد مقدار آنزیم بیوسنتز شده کمتر می‌گردد.

۳- فاکتور رشد (Corn steep liquor): اغلب منابع Corn steep liquor را به عنوان فاکتور رشد مخمر معرفی نموده‌اند (منابع ۱۰ و ۸). نتایج حاصل از بررسی روند تولید آنزیم در محیط‌های با غلظت‌های متفاوت از فاکتور رشد، افزایش محسوسی در جرم سلولی مشاهده می‌گردد که این افزایش در ۰/۷ درصد از این عامل به حد مناسبی رسیده و در این مقدار بیوسنتز آنزیم به بالاترین مقدار خود می‌رسد (نمودار شماره ۵).

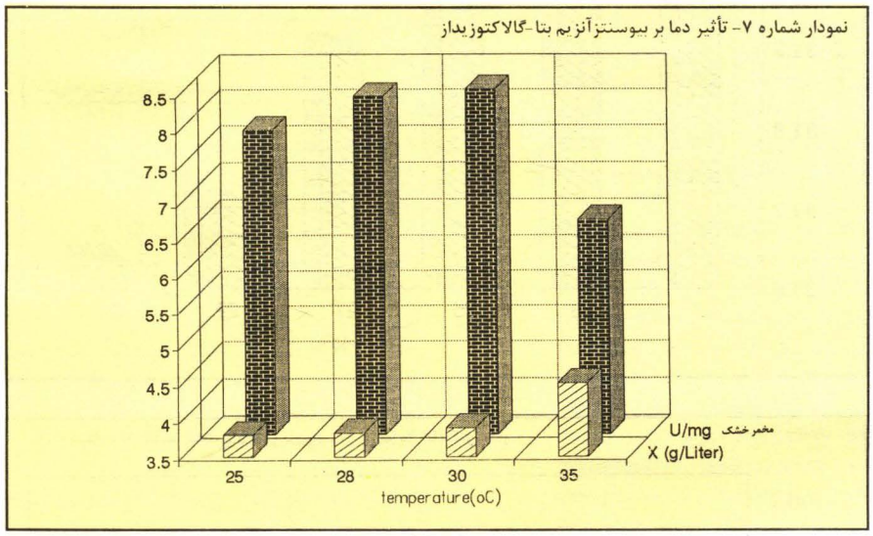
تأثیر عوامل محیطی در راستای بهینه‌سازی محیط کشت

۱- pH: نتایج حاصل بر روی رشد و تکثیر سلولها و نهایتاً بیوسنتز آنزیم در نمودار شماره ۶ آورده شده است.

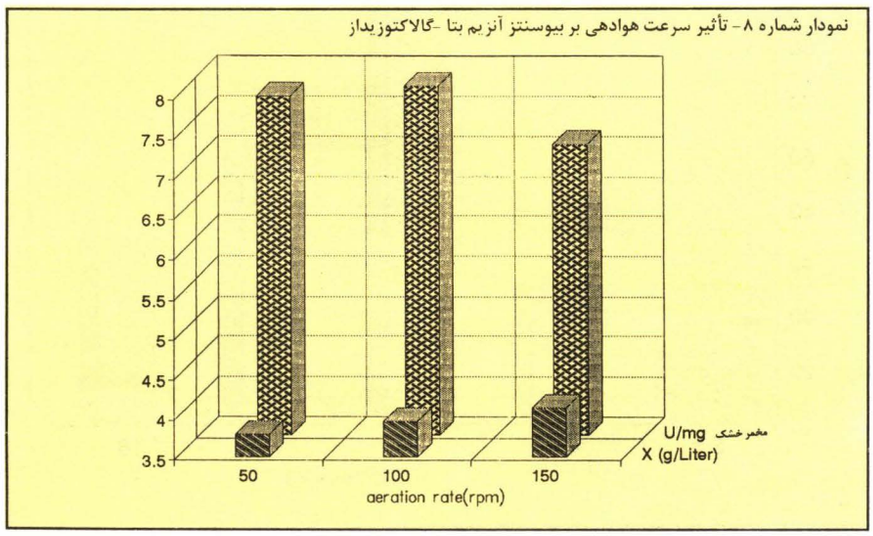
نمودار شماره ۶- تأثیر pH بر بیوسنتز آنزیم بتا-گالاکتوزیداز



نمودار شماره ۷- تأثیر دما بر بیوسنتز آنزیم بتا-گالاکتوزیداز



نمودار شماره ۸- تأثیر سرعت هوادهی بر بیوسنتز آنزیم بتا-گالاکتوزیداز



با افزایش pH از ۵ به ۸ جرم سلولی افزایش می‌یابد، به طوری که در pH، ۶/۸ بهترین شرایط جهت بیوسنتز آنزیم فراهم گردیده و همچنین نتایج حاصل نشان می‌دهند، که میزان کاهش pH در نمونه‌هایی که pH اولیه بالاتری دارند، به مراتب بیشتر از نمونه‌هایی است که pH اولیه آنها پائین‌تر می‌باشد. به طور کلی دلیل اهمیت تأثیر pH را در این‌گونه فرایندها، نقش مهم آن در انتقال ترکیبات از غشاء سلول به داخل آنها و همینطور فعالیت آنزیمها است. منابع ۱، ۹ و ۱۰ این تجربیات را تأیید می‌کنند. منبع شماره ۱ با pH=۶/۵، و منبع شماره ۹ با pH=۶ و منبع شماره ۱۰ با pH=۷ اشاره نموده‌اند.

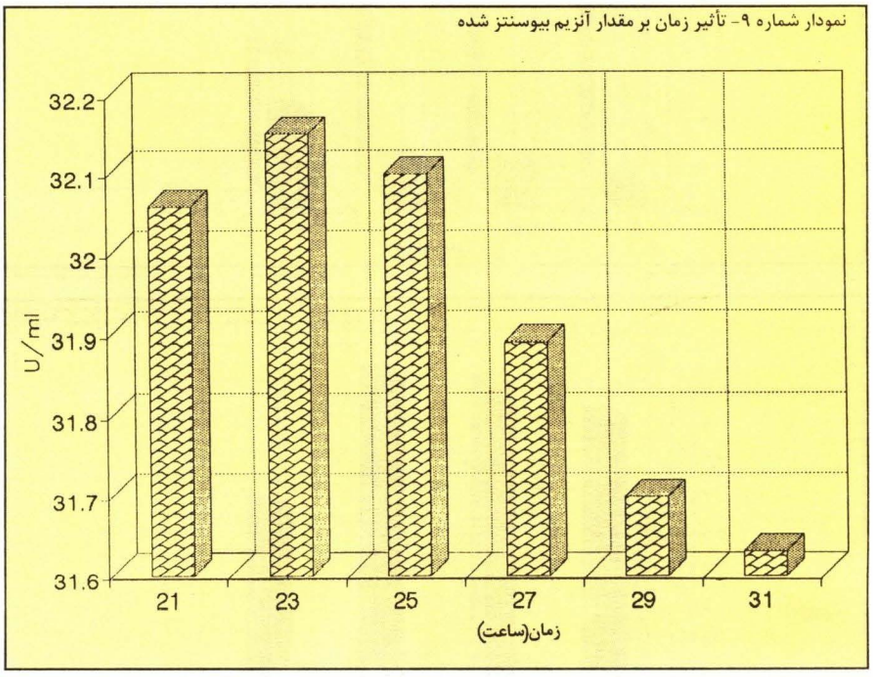
۲- دما: نتایج حاصل از بررسی دما نشان می‌دهند که افزایش دما۱ در محدوده ۲۵ تا ۳۵ درجه سانتیگراد افزایش جرم سلولی را سبب شده است. دمای بالاتر بر روی شدت تکثیر مؤثر بوده زیرا که مخمرها سریعتر فاز تأخیر را پشت سرگذشته و به فاز لگاریتمی می‌روند و تکثیر افزایش می‌یابد. در محدوده یاد شده دمای ۳ درجه سانتیگراد به عنوان مناسب‌ترین دما جهت بیوسنتز آنزیم انتخاب گردیده است (۷) و این نتایج مطابق با پژوهش سایر پژوهشگران می‌باشد (۱، ۶ و ۷).

۳- میزان هوادهی (سرعت چرخش شیکر): نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر هوادهی بر روی بیوسنتز آنزیم، نشانگر آن است که با افزایش شدت هوادهی (سرعت چرخش شیکر) از rpm ۵۰ تا rpm ۱۵۰ افزایش جرم سلولی مشاهده شده است. به طوریکه در شدت هوادهی rpm ۱۰۰ مقدار آنزیم تولیدی به حداکثر رسیده است. با مقادیر بیشتر هوادهی، سیستم متابولیکی سلولها با اکسیژن اشباع شده و عامل محدود کننده‌ایی برای بعضی از سایر انواع فرآیندهای بیوشیمیائی که در داخل سلول انجام می‌شود می‌باشد (نمودار شماره ۸)، مطالب بیان شده مطابق با نتایج حاصل از کار پژوهشگران در منابع ۲ و ۵ می‌باشد.

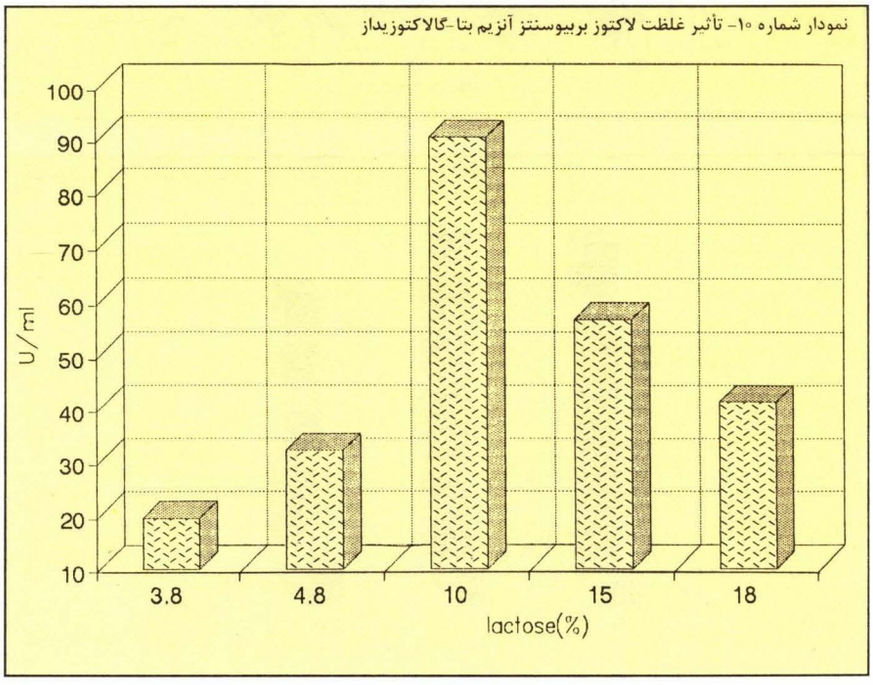
۴- زمان مناسب جهت استخراج آنزیم: با توجه به بررسیهای انجام شده در این مطالعه از ۲۰ ساعت پس از شروع رشد سلولها در محیط کشت اصلی تا مدت ۳۱ ساعت می‌توان عنوان کرد که سلولها در فاز ساکن قرار گرفته‌اند. در خصوص بیوسنتز آنزیم همان‌طور که در منابع هم ذکر شده است (۶ و ۷) می‌توان گفت که بیوسنتز آنزیم از ابتدای فرآیند کشت شروع شده و در فاز ساکن به حداکثر خود می‌رسد. در نتیجه اوایل فاز ساکن، که ۲۳ ساعت پس از شروع کشت می‌باشد مقدار آنزیم بیوسنتز شده به حداکثر مقدار خود می‌رسد (نمودار ۹).

۵- منبع کربن (لاکتوز): نتایج به دست آمده در این پژوهش و با استناد به مرجع شماره ۱ مشخص است که تولید آنزیم با افزایش غلظت لاکتوز از ۳/۸ تا ۱۰٪ ماکزیمم مقدار خود و در ادامه با افزایش بیشتر لاکتوز، تولید آنزیم کاهش یافته است (نمودار شماره ۱۰) از آنجائی که لاکتوز آنزیم را علاوه بر منبع کربن بر عهده دارد، در غلظت‌های پائین لاکتوز عمل‌القاء کمتر صورت گرفته و اساساً در غلظت‌های کم لاکتوز، رشد دچار نقصان می‌گردد.

نمودار شماره ۹- تأثیر زمان بر مقدار آنزیم بیوسنتز شده



نمودار شماره ۱۰- تأثیر غلظت لاکتوز بربیوسنتز آنزیم بتا-گالاکتوزیداز



منابع مورد استفاده

۱-ملک‌زاده، ف. و شهامت، م.، ۱۳۷۱. میکروبیولوژی شهرآب.

2- Bailey J.E. and Ollis D.F., 1987. Biochemical Engineering Fundamentals. Mc Grow Hill.

3- Brokt D., 1980. Biology of micro- organisms, 2end. Prentec Hall, 70.

4- Kockova A. and Kratochvilova A., 1990. Yeast and like organisms. VCH. 82.

5- Moo-Young M., 1985. Comprehensive Biotechnology. 3, 189.

6- Norris J.R. and Ribbons D.W., 1979. Methods in microbiology. Acadieic press. 152.

7- Pelczar M.J., Cham E.C. Send Krieg N., 1986. Microbiology. MC Grow Hill, 112.

8- Reed G., Gerald A., Peppler F., 1973. Yeast technology, AVI. Publishig company 57.

9- Rehm H.J. and Reed G., 1986. Biotechnology enzyme technology VCH 7a, 152.

10- Rose A. H. and Harrison J.S., 1971. The yeast 1, 59.