انتخاب مدلهای سینتیکی مناسب برای بررسی رشد و تولید محصول در استرپتومایسسها

رضا عبدی*[۱]، فرشته نعیم پور[۲]

۱. کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

۲. عضو هیات علمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران

r_abdi@mail.iust.ac.ir

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

بر اساس مرفولوژی استرپتومایسسها در محیط کشت غوطه ور مدلهای سینتیکی غیر ساختاری Contois و Logistic برای بررسی رشد آنها انتخاب شدند. پارامترهای این مدلها از شکل انتگرال گیری شده آنها و به کمک رگراسیون غیر خطی به دست آمده است. این مدلها برای بررسی رشد سه گونه استرپتومایسس: S. noursei، S. spp6621، S. tenda بکار رفته اند. نتایج نشان داده است که مدل سینتیکی Logistic به دلیل آنکه می تواند فاز سکون استرپتومایسسها را بررسی نماید مناسب تر از مدل Contois می باشد. مدلهای تولید محصولات آنها (آنتی بیوتیکها) نیز بر اساس مدل Logistic تعیین شده اند. این مدلها برای بررسی تولید آنتی بیوتیکهای Nystatin ، Cephamycin c و Nikkomycin که محصولات این گونه های استرپتومایسس می باشند بکار رفته اند. در این مورد نیز انطباق خوبی بین مدلهای سینیکی و داده های آزمایشگاهی وجود داشته است.

کلمات کلیدی: مدل سینتیکی، استرپتومایسسها، رشد، محصولات میکروبی

مقدمه

استرپتومایسسها از لحاظ طبقه بندی جزء باکتریها می باشند، اما از لحاظ مرفولوژی شبیه قارچها هستنند. این میکروارگانیسمها بیش از $\frac{2}{3}$ کل آنتی بیوتیکهای میکروبی را تولید می کنند بنابراین اهمیت صنعتی بسیار زیادی دارند. مدلهای سینتیکی یکی از مهمترین روشها جهت بهینه سازی فرایندهای بیولوژیکی می باشند. مدلهای سینتیکی همچنین برای پیش بینی و کنترل فرایندهای بیولوژیکی و طراحی بیوراکتورها بکار می روند [۱،۲]

مدلهای سینتیکی به چهار دسته: مدلهای سینتیکی غیر ساختاری[۱]، ساختاری[۲]، مجزاء شده[۳] و مجزاء نشده[۴] تقسیم بندی می شوند. در مدلهای غیر ساختاری تغییرات ساختمانی و درونی سلول مورد بررسی قرار نمی گیرد اما در مدلهای ساختاری تغییرات درونی و ساختمانی سلول مورد بررسی قرار می گیرد. به دلیل آنکه مدلهای سینتیکی غیر ساختاری پارامترهای کمتری نسبت به مدلهای سینتیکی ساختاری دارند به دست آوردن آنها آسانتر می باشد. به همین دلیل متداولتر از مدلهای سینتیکی ساختاری می باشند و کاربرد صنعتی بیشتری دارند. مدلهای مجزاء نشده تفاوت خواص سلولهای موجود در یک فرایند بیولوژیکی را در نظر نمی گیرند اما مدلهای مجزاء شده این تفاوتها را در نظر می گیرند [۳،۴،۵]. مطالعات نشان می دهد که استرپتومایسسها از لحاظ ساختمانی مورد تحقیق و بررسی زیادی قرار گرفته اند اما از لحاظ فرایندی به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته اند. گونه های مختلف استرپتومایسس بسیار متفاوت با یکدیگر رشد می کنند از اینرو بررسی همه آنها با مدلهای سینتیکی مشترک مشکل اما بسیار مهم می باشد[۲]. در این تحقیق سعی شده است که این میکروارگانیسمها با مدلهای سینتیکی غیر ساختاری مشترک مورد بررسی قرار گیرند.

با بررسی مدلهای غیر ساختاری که در مورد میکروارگانیسمهای رشته ای به دست آمده است و نیز بر اساس مرفولوژی استرپتومایسسها در کشت غوطه ور مدلهای سینتیکی غیر ساختاری Contois و Logistic برای بررسی رشد آنها انتخاب شده است. مطالعات نشان داده است که مدل Logistic می تواند رشد میکروارگانیسمها را در کشت بسته بررسی نماید اما مدل Contois می تواند رشد میکروارگانیسمها در کشت پیوسته بررسی نماید. اگر بخواهیم این مدل را در مورد کشت بسته به کار ببریم باید پارامترهای آنرا از آزمایشات چند کشت به دست آوریم[۶،۷،۸،۹]. در اینجا مدل Contois به صورت رابطه ای بر حسب X و t نوشته می شود و با استفاده از این رابطه می توان پارامترهای مدل Contois را از یک کشت بسته به دست آورد. به همین دلیل به دست آوردن پارامترهای مدل Contois با استفاده از این رابطه به کار آزمایشگاهی و محاسباتی کمتری نیاز دارد.

[1]- Unstructured
[2]- Structured
[3]- Segragated
[4]- Unsegragated

با توجه به اینکه بین رشد و تولید محصول در میکروارگانیسمها می توان روابط استوکیومتری به دست آورد. مدلهای سینتیکی تولید آنتی بیوتیکها که توسط استرپتومایسسها تولید می شوند را می توان بر اساس مدلی که برای رشد تعیین می شود به دست آورد[۴،۵،۱۰].

تئوری

از مشخصات تخمیری میکروارگانیسمهای رشته ای بویژه استرپتومایسسها تشکیل پلت در محیط کشت غوطه ور می باشد، با افزایش قطر پلت محدودیتهای نفوذ اکسیژن و سایر مواد مغذی به درون آنها به وجود می آید. سلولهای سطح پلت مواد مغذی که به سطح پلت می رسند را مصرف می نمایند و مانع از این می شوند که این مواد مغذی به اندازه کافی در دسترس سلولهای مرکز پلت قرار بگیرد. Bajpai و Reub در سال 1980 ثابت نمودند که محدودیتهای نفوذی مواد مغذی بوجود آمده به خاطر افزایش در مقدار ظاهری ثابت اشباع (K_S) می باشد که با افزایش مقدار X مقدار آن نیز افزایش می یابد. این رفتار با مدل مونود نمی تواند بررسی شود. به دلیل آنکه در مدل مونود (رابطه ۱) ثابت اشباع K_S، ثابت است در صورتیکه در این تخمیر ها مقدار آن تغییر می کند[۷].

$$\mu = \frac{\mu_{max}.S}{K_S + S} \qquad (۱)$$

مدلی که برای بیان این رفتار پیشنهاد شده است، مدل Contois می باشد:

$$\mu = \frac{\mu_{max}.S}{K_c.X + S} \qquad (۲)$$

در این مدل اثرات مهارکنندگی غلظت سلولی در نظر گرفته شده است. به همین دلیل این مدل می تواند سینتیک رشد میکروارگانیسم های رشته ای که در آنها نیز مهار کنندگی سلولی مشاهده شده است را بررسی نماید. مطالعات هم نشان داده است که مدل Contois توانسته است سینتیک رشد قارچها را بررسی نماید[۶،۷].

دومین مدلی که برای بررسی سینتیک رشد استرپتومایسسها مورد بررسی قرار می گیرد، معادله Logistic می باشد.

$$\mu = \mu_{max}(1 - \frac{X}{X_m}) \qquad (۳)$$

در این معادله سرعت رشد ویژه به صورت خطی با افزایش غلظت توده سلولی کاهش یابد. پس در این مدل توده سلولی عامل مهار کننده رشد سلولی در نظر گرفته شده است. این معادله برای بررسی فرایندهای تخمیری پلی ساکاریدها که توسط میکروارگانیسمهای مختلف رشته ای صورت می گیرند بکار رفته است[۸،۱۱،۱۲].

تخمین پارامترها در کشت بسته

یکی از متداولترین روشها برای تخمین پارامترهای مدل Contois تبدیل این معادله به شکلی است که بتوان به کمک رگراسیون خطی پارامترهای آنرا تعیین نمود. در این روش از چند کشت بسته متوالی با غلظتهای اولیه متفاوت سوبسترا استفاده می شود و رشد میکروبی و مصرف سوبسترا در آنها نسبت به زمان اندازه گیری می شود.

$$\frac{1}{\mu}=\frac{K_c}{\mu_{max}}.\frac{X}{S}+\frac{1}{\mu_{max}} \qquad (۴)$$

با رسم $\frac{1}{\mu}$ در مقابل $\frac{X}{S}$ می توان $\frac{1}{\mu_{max}}$ را از عرض از مبدا این خط و $\frac{K_c}{\mu_{max}}$ را از شیب آن به دست آورد. بنابراین می توان مقادیر پارامترهای (μ_{max} و K_c) را از روش رگراسیون خطی تعیین نمود [7]. این یک روش بسیار ساده برای تخمین پارامترهاست اما نیازمند دانستن اطلاعات مربوط به رشد توده سلولی و مصرف سوبسترا از چند آزمایش کشت بسته متوالی با غلظتهای اولیه متفاوت سوبسترا می باشد که کار محاسباتی و آزمایشات زیادی باید انجام شود [7,13] .

در سال ۱۹۴۲ مونود ثابت نمود که چنانچه رشد در یک کشت بسته منحصرا بوسیله مقدار غلظت اولیه سوبسترا محدود شود، می توان منحنی رشد میکروبی را با استفاده از مدل مونود (رابطه ۱) که به صورت رابطه ای بر حسب X و t نوشته شود، بررسی نمود[۱۴]. مدل Contois نوع اصلاح شده ای از مدل مونود می باشد به همین دلیل می توان با تبدیل S به X رابطه ای برای X بر حسب t به دست آورد که با استفاده از آن رابطه رفتار رشد در یک کشت بسته را مورد بررسی قرار داد. S را می توان از رابطه زیر بر حسب X نوشت.

$$Y=\frac{X-X_0}{S-S_0} \qquad (۵)$$

در این رابطه ،Y، راندمان تبدیل سوبسترا به توده سلولی می باشد. با جایگزینی معادله (۵) در معادله (۲) رابطه زیر به دست می آید.

$$\frac{dX}{Xdt}=\frac{\mu_{max}(S_0+\frac{X_0}{Y}-\frac{X}{Y})}{K_cX+(S_0+\frac{X_0}{Y}-\frac{X}{Y})} \qquad (۶)$$

با فرض اینکه در زمان صفر مقدار توده سلولی برابر با X_0 باشد. با انتگرالگیری از معادله (۶) رابطه زیر به دست می آید.

$$\frac{1}{\mu_{max}}ln\frac{X}{X_0}-\frac{K_cY}{\mu_{max}}ln(\frac{S_0+X_0/Y-X/Y}{S_0})=t \qquad (۷)$$

معادله (۷) یک معادله غیر خطی است. برای تخمین پارامترهای این معادله از الگوریتم Levenberg-Marquardt استفاده می شود (در اینجا از نرم افزار sigma plot استفاده شده است) [۱۵]. برای تخمین پارامتر معادله (۳) از این معادله انتگرالگیری می شود. با فرض اینکه در زمان t=0 غلظت توده سلولی برابر با X_0 باشد، انتگرال معادله (۳) رابطه زیر می باشد.

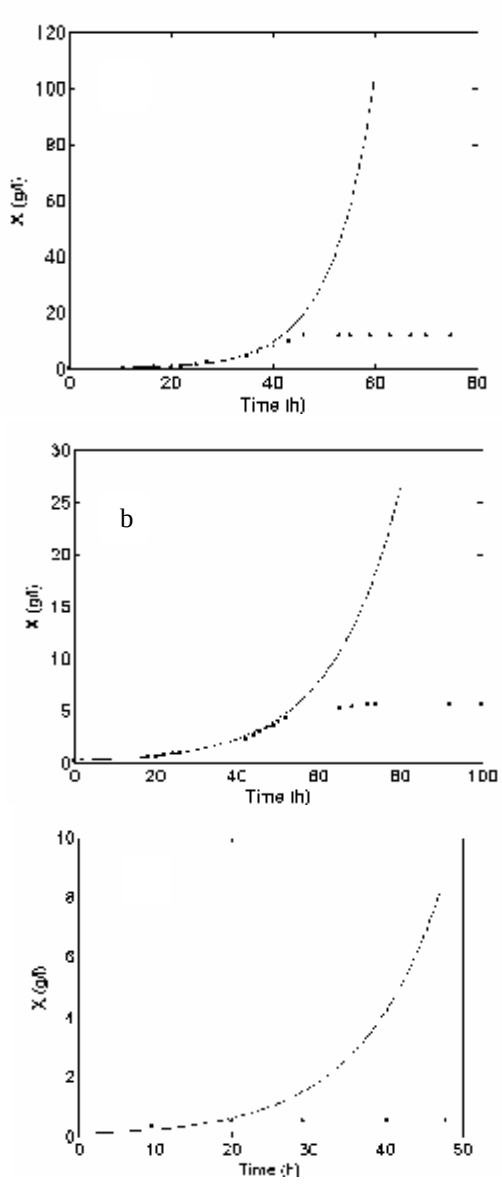
$$X = \frac{X_0 e^{\mu_{max} t}}{1 - \frac{X_0}{X_m}(1 - e^{\mu_{max} t})} \qquad (۸)$$

در این رابطه X_0 غلظت اولیه توده سلولی و X_m حداکثر غلظت سلولی می باشد. این معادله می تواند از ابتدای کشت سلولها تا انتهای فاز سکون را بررسی نماید[۸].. در اینجا برای بررسی قابلیت کاربرد معادلات (۷) و (۸) برای بررسی رشد استرپتومایسسها آنها را با داده های آزمایشگاهی رشد توده سلولی سه گونه استرپتومایسس۱ - S. noursei تولید کننده آنتی بیوتیک Nystatin ۲- S. spp6621 تولید کننده آنتی بیوتیک Cephamycin c ۳- S. tenda تولید کننده آنتی بیوتیک Nikkomycin در کشت بسته انطباق داده شدند[۱۶،۱۷،۱۸].

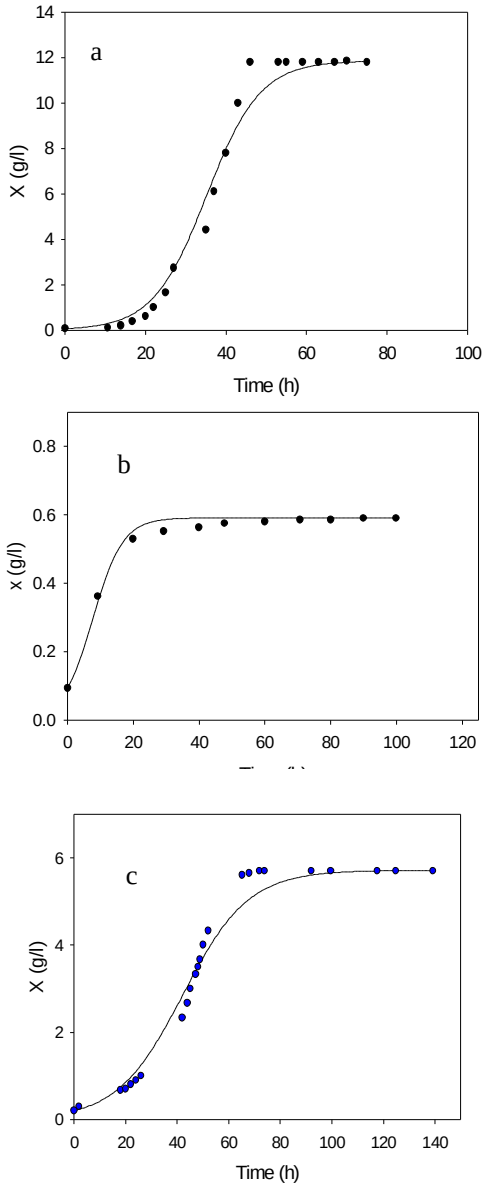
جدول ۱- مقادیر پارامترهای معادلات (۷) و (۸) برای گونه های استرپتومایسس مورد تحقیق و مقادیر ضریب همبستگی این مدلها (بر اساس داده های آزمایشگاهی فاز لگاریتمی)

ردیف	مدل	گونه استرپتومایسس	ضریب همبستگی	مقادیر پارامترها
۱	Logistic	S. noursei	0.99	$m_{max} = 0.1197$ $K_c = 0.6841$ $Y = 0.324$
۲	Contois	S. noursei	0.98	$\mu_{max} = 0.2016$
۳	Logistic	S. spp6621	0.98	$m_{max} = 0.2619$ $K_c = 130$ $Y = 0.01$
۴	Contois	S. spp6621	0.987	$\mu_{max} = 0.216$
۵	Logistic	S. tenda	0.98	$m_{max} = 0.0611$ $K_c = 0.1266$ $Y = 0.48$
۶	Contois	S. tenda	0.97	$\mu_{max} = 0.0784$

در جدول (۱) پارامترهای مدلهای (۷) و (۸) برای گونه های استرپتومایسس مورد بررسی به دست آمده است. مقادیر پارامترهای در مدلها جایگزین شده اند و این مدلها رسم شده اند. سپس منحنی های به دست آمده از این مدلها با داده های آزمایشگاهی مقایسه شده اند.



شکل۱- مقایسه مدل(۷) با داده های آزمایشگاهی رشد (a) S. noursei (b) S. tenda (c) S.spp6621 (داده های آزمایشگاهی ٠ مدل (۷) –)



شکل۲- مقایسه مدل (۸) با داده های آزمایشگاهی رشد(a) S. noursei (b) S. spp6621 (c) S. tenda (داده های آزمایشگاهی ٠ مدل (۸) –)

نتایج

یج کاربرد معادلات (۷) و (۸) (با توجه به مقادیر ضریب همبستگی که در جدول (۱) ارائه شده است و نیزمقایسه شکلهای (۱) و (۲) با داده های آزمایشگاهی) نشان می دهد که مدل (۷) می تواند رشد گونه های استرپتومایسس مورد تحقیق را تا انتهای فاز لگاریتمی بررسی نماید. اما مدل (۸) به خوبی می تواند فاز لگاریتمی و سکون استرپتومایسسها را بررسی نماید. استرپتومایسسها اغلب آنتی بیوتیکها را تولید می کنند و آنتی بیوتیکها متابولیتهای ثانویه هستند و در فاز سکون تولید می شوند. به دلیل آنکه مدل (۸) به خوبی فاز

سکون استرپتومایسسها را بررسی می نماید. برای بررسی رشد استرپتومایسسها در کشت بسته استفاده می شود.

اهمیت مدل (۷) در این است که می توان با استفاده از این مدل پارامترهای پارامترهای مدل Contois را از یک کشت بسته را به دست آورد، بدون آنکه نیاز به چند آزمایش کشت بسته داشته باشیم. چون این مدل به خوبی فاز لگاریتمی استرپتومایسسها را بررسی می نماید.

بررسی تولید آنتی بیوتیکهای Nystatin و Cephamycin c

استرپتومایسسها تولید کننده آنتی بیوتیکها (محصولات متابولیکی ثانویه) هستند. بنابراین باید تولید محصول در آنها غیر مرتبط با رشد باشد. اما مشاهده شده است که در برخی از گونه های استرپتومایسس همزمان با رشد نیز محصول تولید می کنند. مشاهدات آزمایشگاهی تولید آنتی بیوتیک Nystatin که توسط گونه S. noursei در کشت بسته تولید می شود و نیز تولید آنتی بیوتیک Cephamycin c توسط S. sp.p6621 در کشت بسته نشان می دهد، که تولید این محصولات علاوه بر فاز سکون در فاز رشد نیز صورت می گیرد. در این میکروارگانیسم ها هنگامی که تولید آنتی بیوتیک صورت می گیرد، تکثیر سلولها متوقف می شود، اما جرم آنها در اثر ذخیره کردن ترکیبات ذخیره ای مانند گلیکوژن افزایش می یابد و تا مدتی رشد ادامه می یابد[۱۶]. بنابراین سینتیک تولید این محصول بر اساس معادله زیر می باشد.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\frac{dX}{dt} + \beta X \qquad (۹)$$

بررسی برای به دست آوردن مدل تولید این آنتی بیوتیکها، طرفین معادله (۹) را در dt ضرب می کنیم سپس با فرض اینکه در زمان t=0 مقدار توده سلولی برابر با X_0 و مقدار محصول تولید شده برابر صفر باشد (P=0)، از این رابطه انتگرالگیری می شود تا رابطه زیر به دست آید.

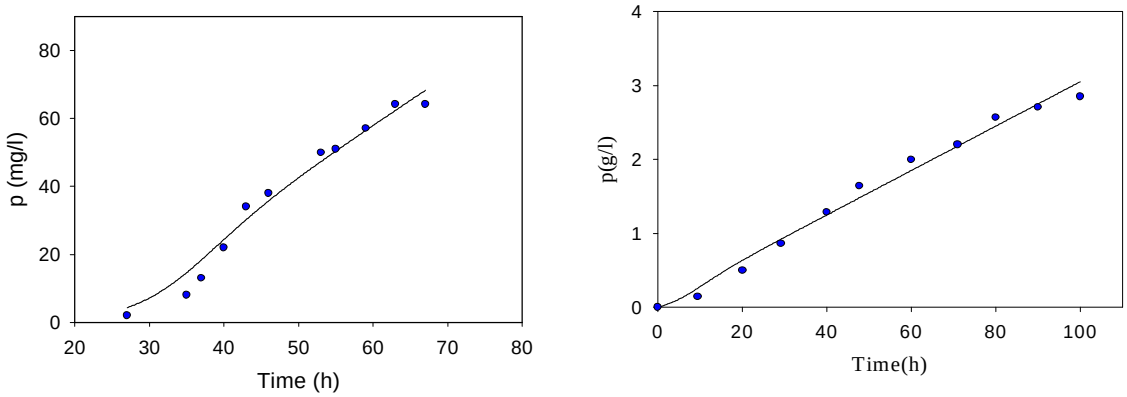
$$P = \alpha(X - X_0) + \beta\int Xdt \qquad (۱۰)$$

همانطور که قبلا گفته شد معادله (۸) برای بررسی سینتیک رشد استرپتومایسسها انتخاب می شود. پس معادله (۸) به جای X در معادله (۱۰) جایگزین می شود که رابطه زیر به دست آید.

$$P = \alpha X_0 \left(\frac{e^{\mu_m t}}{1-\frac{X_0}{X_m}(1-e^{\mu_m t})} - 1\right) + \beta\frac{X_m}{\mu_m} ln\left(1-\frac{X_0}{X_m}(1-e^{\mu_m t})\right) \qquad (۱۱)$$

با استفاده از داده های آزمایشگاهی تولید آنتی بیوتیک های Nystatin و Cephamycin c و رگراسیون غیر خطی می توان مقادیر پارامترها ی α و β را به دست آود. مقادیر α و β برای تولید این آنتی بیوتیکها برای α به ترتیب برابر (1.93 و0.124) و برای β به ترتیب برابر (0.6 و0.05) به دست آمده است. مقدار ضریب همبستگی این مدل برای تولید این آنتی بیوتیکها نیز به ترتیب 0.97 و 0.98 می باشد.

با تعیین پارامترهای معادله (۱۱) برای تولید این آنتی بیوتیکها، شکلهای زیر رسم شده اند و با داده های آزمایشگاهی مقایسه شده است.



شکل ۵- مقایسه مدل (۱۰) با داده های آزمایشگاهی تولید Nystatin (a) ، Cephamycin c (b) (داده های آزمایشگاهی · مدل (۱۰)

نتایج بررسی ضریب همبستگی و مقایسه مدل با داده های آزمایشگاهی نشان می دهد که مدل (۱۱) برای بررسی تولید آنتی بیوتیکهای Nystatin و Cephamycin c مدل مناسبی می باشد.

بررسی تولید آنتی بیوتیک Nikkomycin

مشاهدات آزمایشگاهی تولید آنتی بیوتیک Nikkomycin توسط گونه S. tenda نشان داده است که تولید این محصول در فاز سکون صورت می گیرد. [18,19]. بنابراین تولید محصول در این حالت غیر مرتبط با رشد می باشد و سینتیک تولید این آنتی بیوتیک از معادله زیر پیروی می کند.

$$\frac{dP}{dt} = \beta X \qquad (۱۳)$$

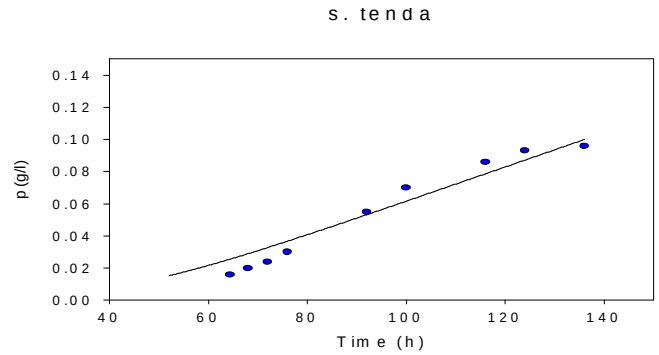
طرفین این معادله را در dt ضرب می کنیم. سپس با فرض اینکه محصول تولید شده (P) در زمان صفر برابر صفر باشد، با انتگرال گیری از معادله (۱۳) رابطه زیر به دست می آید.

$$P = \beta \int X dt \qquad (۱۴)$$

معادله (۸) به جای X جایگزین می شود و با فرض اینکه X ، مقدار توده سلولی تشکیل شده در زمان صفر برابر X_0 باشد، انتگرال معادله (۱۴) رابطه زیر می باشد.

$$p = b\,\frac{X_m}{m_m}\ln\left(1-\frac{X_0}{X_m}(1-e^{m_m t})\right) \qquad (۱۵)$$

با استفاده از داده های آزمایشگاهی و رگراسیون غیر خطی می توان پارامتر β را به دست آورد. مقدار پارامتر β برابر 0.0053 به دست آمده است. مقدار ضریب همبستگی مدل نیز برابر 0.93 به دست آمده است. با رسم مدل (۱۵) برای این آنتی بیوتیک منحنی زیر (شکل ۷) به دست آمده است و با داده های آزمایشگاهی مقایسه شده است.



شکل۷- مقایسه مدل (۱۵) با داده های آزمایشگاهی تولید Nikkomycin (داده های آزمایشگاهی ◦ مدل ۱۵)

مقدار ضریب همبستگی نزدیک به یک است و منحنی به دست آمده از مدل انطباق خوبی با داده های آزمایشگاهی دارد، بنابراین مدل به دست آمده مدل مناسبی می باشد.

نتیجه گیری کلی و بحث

مدل Logistic می تواند سینتیک رشد استرپتومایسسها را در کشت بسته بررسی نماید. نتایج در مورد مدل Contois نشان داده است که این مدل فقط قادر به بررسی فاز لگاریتمی رشد استرپتومایسسها در کشت بسته می باشد.

در اینجا مدلهای تولید آنتی بیوتیک بر اساس روابطی که بین رشد و تولید محصول وجود دارد به دست آمده اند. تولید آنتی بیوتیکها در فازهای مختلف رشد استرپتومایسسها صورت می گیرد که قابل پیش بینی نیست. بنابراین برای بررسی تولید هر آنتی بیوتیک ابتدا باید محدوده فاز رشد میکروارگانیسم که در آنجا محصول تولید می شود از مشاهدات آزمایشگاهی تعیین شود و سپس مدل تولید آنتی بیوتیک بر اساس رابطه ای که با رشد دارد تعیین شود. در اینجا که مدلهای تولید آنتی بیوتیک بر اساس این روش به دست آمده اند نتایج نشان داده است که به خوبی با داده های آزمایشگاهی انطباق دارند.

منابع و مراجع

1. Hodgson D.A., Primary Metabolism and Its Control in Streptomyces: A Most Unusual Group or Bacteria, Advances in Microbial Physiology, 42, 47-238, 2000.

2. King R. and Budenbender C., A Structured Mathematical Model for a Class of Organisms: II. Application of the model to other Strains. Journal of Biotechnology, 52, 235-244, 1997.

۳. عبدی رضا، راستیان زهرا، نعیم پور فرشته، بررسی مدلهای سینتیکی رشد و تولید محصولات میکرو ارگانیسمها، سومین همایش ملی بیوتکنولوژی ایران، ۱۳۸۲.

4. Sinclair C.G. and kristiansen B., Fermentation Kinetics and Modeling Open University Press, Edited by BU'Lock J.D., England, 1987.

5. Bailey E.J. and Ollis D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, Mc Graw-Hill, 2nd ed., Singapore, 1986.

۶. عبدی رضا، راستیان زهرا، نعیم پور فرشته ، تعیین یک مدل محاسباتی برای بررسی سینتیک رشد استرپتومایسسها، هشتمین کنگره مهندسی شیمی ایران، ۱۳۸۲.

7. Chetan T.G. and keith A.S., Estimating Growth Kinetics of Penicillum Chrysogenum by Nonlinear Regression, Biochemical Engineering Journal, 1, 191-199, 1998.

8. Constantino Diaz., Philippe Lelong., Pierre Dieu., Claude Feuillerate. and Marc Salome., On-line Anaysis and Modeling of Microbial Growth Using Hybrid System Approach. Process Biochemistry, 34, 39-47, 1999.

9. Nielsen J., Modeling the Morphology of Filamentous Microorganisms. Process Biotechnology, 14, 438-443, 1996.

۱۰. عبدی رضا، راستیان زهرا و نعیم پور فرشته ، تولید محصول در استرپتومایسسها و تعیین مدل سینتیکی برای تولید آنتی بیوتیک توسط آنها در بیوراکتور بسته. چهارمین همایش دانشجویی مهندسی شیمی و دومین همایش دانشجویی مهندسی نفت، ۱۳۸۲.

11. Elibol M. and Mavituna F., A Kinetic Model for Actinorhodin Production by Streptomyces coelicolor A3 (2). Process Biochemistry, 34, 625-631, 1999.

12. Ozergin-Ulgen K. and Mavituna F., Actinorhodin Production by Streptomyces coelicolor A3 (2): Kinetic Parameters Related to Growth, Substrate Uptake and Production. Appl.Microbial.Biotechnol. 40, 457-462, 1993.

13. Robinson J.A, Determining Microbial Kinetic Parameters Using Nonlinear Regression Analysis, in Marshall K.c. (Ed.), Advances in Microbial Ecolog[46] Pirt S.J. (1975), Microbe and Cell Cultivation, John Wiley & Sons. Inc. USA, 1985.

14. Pirt S.J., Microbe and Cell Cultivation, John Wiley & Sons. Inc. USA, 1975.

15. Edgar T.F. and Himmelblau D.M., Optimization of Chemical Processes, Mc Graw-Hill, USA, 1988.

16. Jonsbu E., McIntyre M., and Nielsen J., The Influence of Carbon Sources and Morphology on Nystatin Production by Streptomyces noursei. Journal of Biotechnology, 95, 133-134, 2002.

17. Park E.Y, Ichida M., Kaharp P and Okabe M., Kinetics of Soybean Oil Consumption and Cephamycin C Production in Culture of Streptomyces Sp. Using Mineral Support. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87, 390-393, 1999.

18. King R., A Structured Mathematical Model for a Class of Organisms I.Development of a Model for Streptomyees Tenda and Application of Model-Based control, Journal of Biotechnology, 52,219-234, 1997.