

## اثر آرد دانه بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) و اجزای آن در تولید کلاولانیک اسید توسط *Streptomyces clavuligerus*

جواد حامدی<sup>\*</sup>، حسن تیرانداز و امیر صالحی نجف آبادی  
بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران  
آدرس الکترونیکی: [jhamedi@khayam.ut.ac.ir](mailto:jhamedi@khayam.ut.ac.ir)  
(دریافت: ۸۵/۴/۵؛ پذیرش: ۸۷/۳/۱)

### چکیده

اثر آرد دانه بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L. cv. Astaneh) و اجزای مختلف آن بر رشد *Streptomyces clavuligerus* و تولید کلاولانیک اسید در محیط کمپلکس دارای آردسویا، آرد مالت و نمک های معدنی بررسی شد. بهترین غلظت آرد دانه بادام زمینی برای رشد *S. clavuligerus* و تولید کلاولانیک اسید به ترتیب ۵ و ۱ گرم بر لیتر بوده، که به ترتیب موجب ۳۵٪ و ۴۰٪ افزایش بیوماس و تولید کلاولانیک اسید شده است. بیشترین تولید کلاولانیک اسید در محیطهای حاوی آرد دانه بادام زمینی، کنجاله بادام زمینی، روغن بادام زمینی، گلیسرول، کنجاله بادام زمینی+گلیسرول، بخش پروتئینی بادام زمینی+گلیسرول و محیط کشت شاهد به ترتیب ۶۵۷، ۳۹۱، ۴۵۹، ۴۶۳، ۶۱۴، ۶۶۸ و ۴۶۷ (میلی لیتر) بود. بیشترین تولید کلاولانیک اسید در محیط های کشت حاوی پروتئین بادام زمینی+گلیسرول و آرد دانه بادام زمینی به دست آمد که تولید کلاولانیک اسید در این محیط ها به ترتیب ۴۳ و ۴۰ درصد بیشتر از شاهد بود. نتایج پژوهش نشان می دهد که آرد دانه بادام زمینی و اجزای مختلف آن منبع کربن و نیتروژن و یا تحریک کننده مناسبی برای تولید کلاولانیک اسید هستند.

واژه های کلیدی: آرژینین، بادام زمینی (*Arachis hypogaea*)، روغن، کلاولانیک اسید، *Streptomyces clavuligerus*

### مقدمه

باکتری *Streptomyces clavuligerus* حداقل ۲۱ متابولیت ثانویه تولید می کند که مهمترین آنها کلاولانیک اسید است (Wang et al., 2005). کلاولانیک اسید یک مهارکننده قوی  $\beta$ -لاکتاماز است و علیه بسیاری از  $\beta$ -لاکتامازهای کروموزومی و پلاسمیدی در باکتری های گرم منفی و گرم مثبت فعالیت دارد (Finlay et al., 2003). بهینه سازی ترکیبات محیط کشت روشی کارآمد برای افزایش بازده فراورده های بیوتکنولوژیک است. فراورده های کشاورزی در بسیاری از فرایندهای بیوتکنولوژیک به عنوان سوبسترای ارزان قیمت مورد استفاده قرار می گیرد. این مواد تاثیر بسیار متفاوتی در تولید آنتی بیوتیک ها مختلف دارد. چون *S. clavuligerus* قادر به استفاده از کربوهیدرات های ساده مانند گلوکز نیست منبع کربن و نیتروژن مناسب برای تولید کلاولانیک اسید روغن ها (Large et al., 1998) و آرد سویا (Gouveia et al., 1999) است.

بادام زمینی (*Arachis hypogaea*) حاوی ۲۴ درصد پروتئین غنی از آرژینین بوده و یکی از مهمترین منابع پروتئین گیاهی در بسیاری از مناطق جهان است (Jain 2004). همچنین این دانه یکی از مهمترین دانه های روغنی بوده و حاوی ۵۰ درصد

روغن است (Salunkhe et al., 1992). با این وجود تا کنون مطالعه ای بر روی اثر آرد دانه بادام زمینی و اجزای آن در تولید کلاولانیک اسید انجام نشده است. بنابراین در این پژوهش اثر آرد دانه بادام زمینی و اجزای مختلف آن بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلاولانیک اسید، در محیط کشت دارای آرد سویا و آرد مالت به عنوان ترکیب های اصلی، بررسی شده است.

### مواد و روش کار

#### تهیه آرد دانه بادام زمینی و اجزای آن

دانه های بادام زمینی نژاد آستانه (*Arachis hypogaea* L. cv. Astaneh) با عمر یک سال و دارای ۵/۲٪ رطوبت به وسیله آسیاب کاملاً آرد شد. برای تهیه روغن و کنجاله بادام زمینی طبق روش (Hamilton & Folch 1992) ۲۵ گرم آرد دانه بادام زمینی با ۱۰۰۰ میلی لیتر حلال کلروفرم، متانول و آب (به نسبت حجمی ۲:۱:۳) به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط و به شدت هم زده شد. فاز جامد به وسیله فیلتر از مخلوط جدا شد و به عنوان کنجاله بادام زمینی مورد استفاده قرار گرفت. فاز مایع شامل ۲ فاز آبی و آلی بود. فاز آلی (حاوی روغن) به وسیله دکانتور از فاز آبی جدا و حلال آن در فشار پایین و دمای

کلولانیک اسید از محیط پیش‌کشت به میزان ۵٪ در فلاسک‌های ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی لیتر دارای ۵۰ میلی لیتر محیط تخمیر تلقیح و در ۲۸ °C به مدت ۷۲ ساعت در شیکر دوار با ۲۲۰ دور بر دقیقه گرم‌گذاری شد.

### سنجش‌ها

**بیوماس:** به علت رشد رشته‌ای اکتینومیست‌ها و کدورت محیط کشت، سنجش بیوماس به روش‌های متداول مانند کدورت‌سنجی یا شمارش باکتری‌های زنده در پلیت امکان‌پذیر نبود. از این رو بر اساس روش اصلاح شده (Porter & Jones (۱۹۹۸) از نسبت وزن رسوب سلولی به وزن محیط کشت به عنوان تخمینی از رشد میسلومی استفاده شد. برای این کار نمونه مایع تخمیر به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ و درصد وزن تر سلولی در ارزیابی کشتهای پیش‌کشت و تخمیر استفاده شد.

**کلولانیک اسید:** غلظت کلولانیک اسید موجود در مایع تخمیر به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بر اساس روش Foulstone و Reeding (۱۹۸۲) تعیین گردید. اساس این روش اندازه‌گیری میزان جذب مشتق ایمیدازولی کلولانیک اسید در ۳۱۱ نانومتر است. به این منظور پس از جداسازی بیوماس، pH محلول رویی در ۰/۱ ± ۳/۰ تنظیم و پروتئین‌های موجود در مایع تخمیر به کمک سانتریفوژ از مایع تخمیر جدا شد. به ۲ میلی لیتر از رقت مناسب از مایع تخمیر، ۰/۵ میلی لیتر معرف ایمیدازول [(w/v) ۲۰/۶۲ در ۵ N HCl] با pH ۶/۸ اضافه شد. محلول حاصل به هم زده شد و به مدت ۱۵ دقیقه برای انجام واکنش در دمای اتاق قرار گرفت. سپس محلول حاصل به منظور حذف ذرات جامد از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC Cecil، ساخت انگلیس) مجهز به دکتور UV (مدل CE4200; Cecil) و ستون فاز معکوس C18 تزریق شد. فاز متحرک شامل متانول (۳۰٪)، سرعت جریان ۰/۱۴۷ میلی لیتر بر دقیقه) و بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (۷۰٪)، سرعت جریان ۰/۳۴۸ میلی لیتر بر دقیقه) بود. دمای آون ۲۷ °C و طول موج آشکارساز ۳۱۱ نانومتر بود. پتاسیم کلولانات مورد استفاده برای تهیه منحنی استاندارد، از شرکت داروسازی کوثر (تهران، ایران) تهیه شد.

### نتایج و بحث

در این پژوهش اثر آرد دانه بادام زمینی و اجزای مختلف آن بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلولانیک اسید در کشت‌های بسته *S. clavuligerus* DSMZ 738 بررسی شده است. هر آزمایش ۳ بار تکرار شده و در هر کشت، هر غلظت شامل ۳

۳۵ °C تبخیر شد و باقیمانده به عنوان روغن بادام‌زمینی استفاده شد. برای تهیه پروتئین بادام‌زمینی، کنجاله بادام‌زمینی در محلول قلیایی (pH ۸/۰ ± ۰/۱) مخلوط و بشدت هم زده شد و اجزای نامحلول آن با سانتریفوژ جدا گردید. pH فاز رویی در ۰/۱ ± ۴/۰ تنظیم و بعد از سانتریفوژ پروتئین‌ها جدا شد و پس از خشک شدن مورد استفاده قرار گرفت (Desai 2000).

### سویه باکتریایی و محیط‌های کشت

باکتری *Streptomyces clavuligerus* DSM 738، سویه مولد کلولانیک اسید از کلکسیون کشتهای میکروبی آلمان خریداری و در تولید کلولانیک اسید مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت باکتری در محیط جامد از محیط کشت اسپورزای ISP2 استفاده شد. ترکیب محیط پیش‌کشت (seeding medium) به شرح زیر بوده است: پپتون ۱۰ g/l، گلیسرول ۲۰ g/l و عصاره مالت ۱۰۰۰ میلی‌لیتر. pH محیط پیش‌کشت با پتاس ۳ نرمال در ۰/۱ ± ۷/۰ تنظیم شده است. برای تهیه عصاره مالت ۳۰ g پودر مالت (شرکت بهنوش ایران، تهران، ایران) به ۱ لیتر آب مقطر اضافه و در ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. سپس به کمک دکانتور محلول از مواد جامد جدا شده و به عنوان عصاره مالت مورد استفاده قرار گرفت. برای محیط تخمیر پایه (محیط شاهد) از محیط کشت دارای ترکیبات زیر استفاده شد (g/l): پودر مالت ۳۰، آرد سویا ۵، سولفات آهن ۷ آبه ۰/۰۱ و سولفات منگنز ۱ آبه ۰/۰۱. غلظت‌های مختلف آرد دانه بادام‌زمینی و اجزای آن به این محیط کشت افزوده شد و pH محیط کشت با پتاس ۳ نرمال در ۰/۱ ± ۶/۸ تنظیم شد.

### شرایط کشت

ابتدا *Streptomyces clavuligerus* DSM 738 در محیط ISP2 کشت و در ۲۸ °C تا ۱۴ روز گرم‌گذاری شد. از این کشت یک سوسپانسیون تهیه شد. غلظت‌های لازم از سوسپانسیون اسپور حاصل در سطح محیط ISP2 آگار گسترانیده و پلیت‌های حاصل تا ظهور کلنی‌ها (معمولاً ۴ روز) در ۲۸ °C گرم‌گذاری شد. در صورت لزوم غلظت سوسپانسیون اسپور در  $10^8 - 10^7$  اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شد (لازم به ذکر است که طی این مدت سوسپانسیون در یخچال نگهداری شده و آزمایش‌های انجام شده نشان می‌دهد که سوسپانسیون اسپور بدون تغییر در میزان بقاء سویه و یا میزان تولید آنتی‌بیوتیک تا ۲ هفته در این شرایط قابل نگهداری است). ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپوری حاصل در فلاسک‌های ارلن‌مایر با حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط پیش‌کشت تلقیح و به مدت ۲۲-۲۰ ساعت در شیکر دوار با ۲۲۰ دور بر دقیقه در ۲۸ °C گرم‌گذاری شد. برای تولید

### اثر توام کنجاله بادام زمینی و گلیسرول بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلانولانیک اسید

گلیسرول یکی از اجزای روغن ها بوده و در بیوسنتز کلانولانیک اسید نقش مهمی دارد. Elson و Oliver (۱۹۷۸) نشان دادند که اسکلت کربنی حلقه  $\beta$ -لاکتام موجود در کلانولانیک اسید از گلیسرول مشتق می شود. همچنین مشخص شده است که افزودن گلیسرول به محیط کشت تخمیر تولید کلانولانیک اسید را افزایش می دهد (Romero et al. 1984). Chen et al. (2002) ولی غلظت های بالای گلیسرول موجب کاهش تولید می شود (Roubos et al. 2002). در این پژوهش، افزودن ۵ گرم بر لیتر گلیسرول به محیط کشت تخمیر تاثیری بر تولید کلانولانیک اسید نداشت و تفاوت معنی داری بین محیط پایه و محیط پایه حاوی ۵ گرم بر لیتر گلیسرول دیده نشد ( $p > 0.05$ )، ولی گلیسرول موجب افزایش رشد *S. clavuligerus* DSM 738 شد و میزان تولید بیوماس در محیط حاوی گلیسرول نسبت به شاهد ۲۴ درصد افزایش یافت (شکل ۱-ت، شاهد ۲).

ولی هنگامی که غلظت های مختلف کنجاله بادام زمینی به محیط شاهد حاوی ۵ گرم بر لیتر گلیسرول، که هیچکدام به تنهایی موجب افزایش تولید نشده اند، افزوده شد، تولید کلانولانیک اسید افزایش یافت. همانگونه که در شکل (۱-ت) نشان داده شده است بیشترین اثر افزایش در محیط حاوی ۰/۵ گرم بر لیتر کنجاله بادام زمینی مشاهده شده است و تولید کلانولانیک اسید در این محیط نسبت به شاهد ۳۲ درصد افزایش نشان می دهد. در این محیط رشد میکروارگانیسم ۲۵/۷ درصد بیشتر از شاهد بود.

### اثر پروتئین بادام زمینی بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلانولانیک اسید

اثر پروتئین بادام زمینی بر رشد *S. clavuligerus* DSM 738 و تولید کلانولانیک اسید در شکل (۱-ث) نشان داده شده است. این آزمایش در محیط پایه حاوی ۵ گرم بر لیتر گلیسرول انجام شد. افزودن پروتئین بادام زمینی به این محیط موجب افزایش رشد *S. clavuligerus* DSM 738 و تولید کلانولانیک اسید شده است. بیشترین غلظت کلانولانیک اسید در محیط حاوی ۰/۵ گرم بر لیتر پروتئین بادام زمینی به دست آمده و میزان تولید آنتی بیوتیک در این محیط نسبت به شاهد ۴۳ درصد افزایش نشان می دهد. در این محیط رشد میکروارگانیسم ۴۴ درصد بیشتر از محیط شاهد بود.

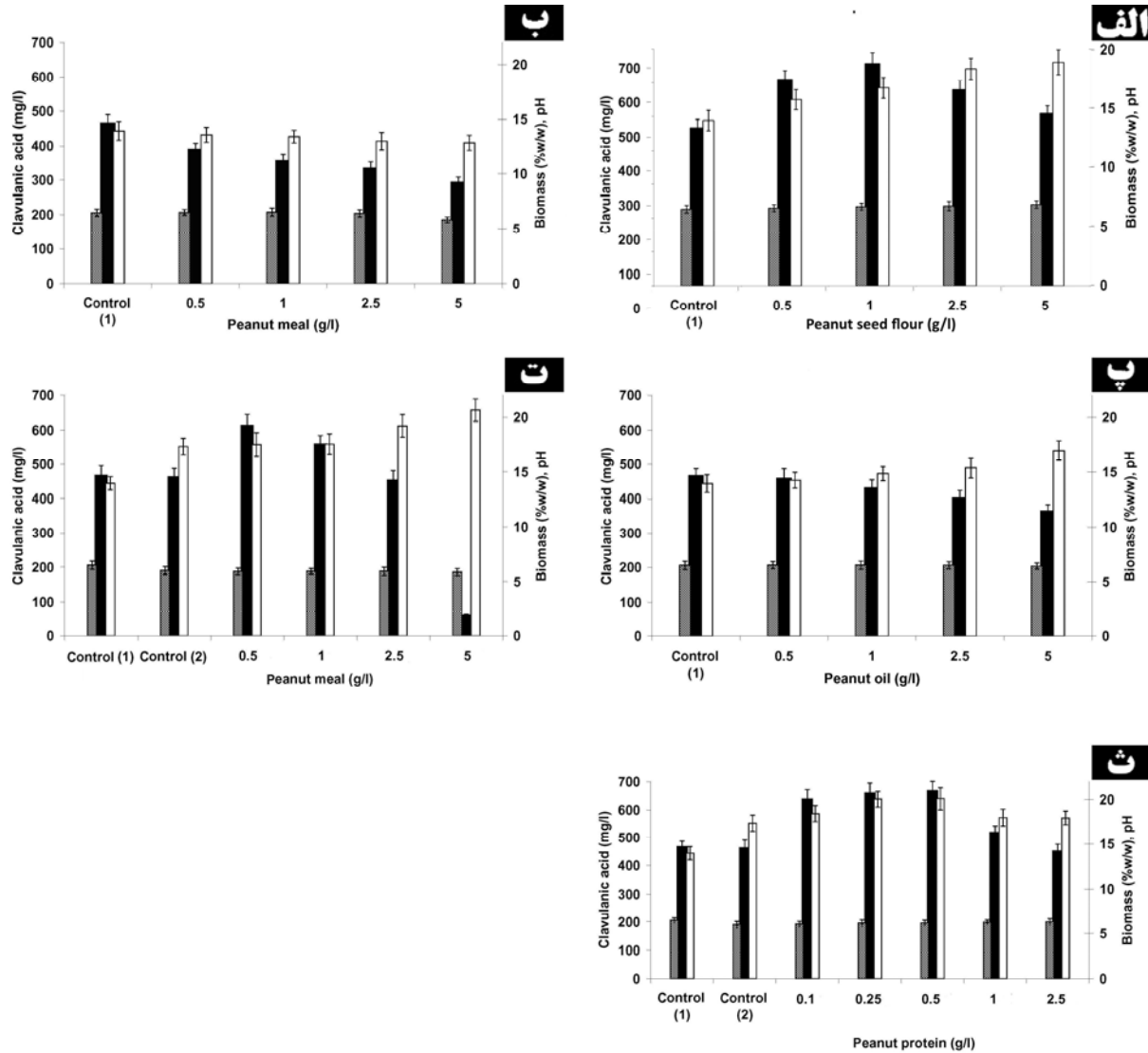
فلاسک بوده است. نتایج ارائه شده حاصل میانگین ۹ تکرار پس از آنالیز واریانس یکطرفه است. ضمناً غلظت روغن و پروتئین در آرد بادام زمینی به ترتیب ۵۱٪ و ۲۵٪ وزن خشک بوده است.

### اثر آرد دانه بادام زمینی بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلانولانیک اسید

همانگونه که در شکل (۱-الف) نشان داده شده است همه غلظت های مطالعه شده آرد دانه بادام زمینی (۵-۰ گرم بر لیتر) موجب افزایش رشد *S. clavuligerus* DSM 738 و تولید کلانولانیک اسید در مقایسه با محیط شاهد شده است. بیشترین تولید در محیط حاوی ۱ گرم در لیتر آرد بادام زمینی به دست آمده و میزان تولید آنتی بیوتیک در این محیط نسبت به شاهد ۴۰ درصد افزایش داشته است. بیشترین تولید بیوماس در محیط حاوی ۵ گرم بر لیتر آرد بادام زمینی به دست آمده و میزان تولید بیوماس در این محیط نسبت به شاهد ۳۵ درصد افزایش داشته است.

### اثر کنجاله بادام زمینی و روغن بادام زمینی بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلانولانیک اسید

اثر کنجاله بادام زمینی در شکل (۱-ب) و اثر روغن بادام زمینی در شکل (۱-پ) نشان داده شده است. افزودن کنجاله بادام زمینی و روغن بادام زمینی به محیط شاهد در همه غلظت های مطالعه شده نه فقط موجب افزایش معنی دار تولید نشده، بلکه در مواردی موجب کاهش تولید نیز شده است. این امر می تواند به دو دلیل باشد: ۱) از دست رفتن فاکتور(های) افزایش دهنده تولید کلانولانیک اسید موجود در آرد دانه بادام زمینی ضمن فرایند استخراج روغن و ۲) اثر سینرژیک دو جزء کنجاله و روغن موجود در آرد دانه بادام زمینی در تولید کلانولانیک اسید، که توأمأ موجب افزایش تولید کلانولانیک اسید شده اند (این دلایل در بخش های بعدی مورد آزمون قرار گرفته است). افزودن کنجاله بادام زمینی به محیط شاهد موجب کاهش رشد *S. clavuligerus* DSM 738 شده ولی افزودن روغن بادام زمینی به محیط شاهد موجب افزایش رشد *S. clavuligerus* DSM 738 شده است. بیشترین تولید بیوماس در محیط حاوی ۵ گرم بر لیتر آرد بادام زمینی به دست آمده است. در این محیط میزان تولید بیوماس نسبت به شاهد ۲۱/۷ درصد افزایش داشته است.



شکل ۱- اثر آرد دانه بادام زمینی، کنجاله بادام زمینی، روغن بادام زمینی، کنجاله بادام زمینی + ۵ گرم بر لیتر گلیسرول و پروتئین بادام زمینی + ۵ گرم بر لیتر گلیسرول بر رشد *S. clavuligerus* DSMZ 738 و تولید کلاولانیک اسید در محیط کشت پایه. شاهد (۱): محیط کشت پایه؛ شاهد (۲): محیط کشت پایه + ۵ گرم بر لیتر گلیسرول. ستون خاکستری pH، ستون سیاه کلاولانیک اسید (میلی گرم بر لیتر) و ستون سفید بیوماس (درصد وزن ترسلولی).

استفاده کرد. همانگونه که گفته شد پژوهش دیگری در مورد اثر بادام زمینی و اجزای آن در تولید کلاولانیک اسید انجام نشده است. ولی با استفاده از یافته‌های دیگر محققین در مورد منابع کربن و نیتروژن در تولید کلاولانیک اسید می‌توان مکانیسم اثر مثبت بادام زمینی را تا حدودی دریافت. Chen و همکاران (۲۰۰۳) نشان داده‌اند که در غیاب گلیسرول، افزودن آرژینین و یا اورنیتین به محیط کشت نمی‌تواند

### نتیجه گیری نهایی

یافته اصلی این پژوهش این است که روغن و پروتئین بادام زمینی منابع کربن و نیتروژن مکمل یا تحریک کننده تولید مناسبی برای کلاولانیک اسید هستند. باید تاکید کرد که این دو جزء بادام زمینی بایستی با یکدیگر استفاده شوند تا اثر مثبت داشته باشند. همچنین می‌توان از آرد دانه بادام زمینی به عنوان ترکیب طبیعی این دو جزء

برخی از روغن های گیاهی به عنوان سوبسترای مناسب در تولید کلاولانیک اسید پیشنهاد شده اند. در این پژوهش برای اولین بار اثر بادام زمینی و اجزای آن بر رشد *S. clavuligerus* و تولید کلاولانیک اسید نشان داده شد. مقایسه میزان تولید کلاولانیک اسید در پژوهش کنونی و نیز پژوهش دیگر انجام شده با سویه (S. clavuligerus DSM 738) (Mayer & Decker 1996)، نشان می‌دهد که در محیط دارای پروتئین بادام زمینی، میزان تولید کلاولانیک اسید ۳۳٪ بیشتر از محیط با پایه سویا بوده که در پژوهش محققین فوق به کار رفته است. با توجه به کارایی این ترکیب، هم اکنون پژوهش‌های دیگری در این آزمایشگاه برای بررسی مکانیسم دقیق اثر بادام زمینی و اجزای آن و افزایش کارایی پروتئین‌های بادام زمینی در تولید صنعتی کلاولانیک اسید در دست انجام است.

#### تقدیر و تشکر

این پژوهش با استفاده از اعتبارات طرح پژوهشی مصوب دانشگاه تهران به شماره ۶۱۰۴۰۰۱/۱/۰۱ انجام شده، که بدینوسیله قدردانی و تشکر می‌شود. از شرکت داروسازی کوثر برای در اختیار گذاشتن کلاولانیک اسید استاندارد سپاسگزاری می‌شود.

تولید کلاولانیک اسید را افزایش دهد، در حالیکه افزودن آرژینین و یا اورنیتین به محیط کشت حاوی گلیسرول تولید کلاولانیک اسید را افزایش می‌دهد. با توجه به اطلاعات موجود، احتمالاً اثر مثبت بادام زمینی در تولید کلاولانیک اسید به دلیل غلظت بالای آرژینین (۱۲/۲۸ درصد وزن خشک کنجاله) و اسید آمینه‌های خانواده آسپاراتات (مانند لیزین ۴/۴۹ درصد، ایزولوسین ۳/۲۹ درصد، ترئونین ۳/۳۱ درصد و متیونین ۱/۵۲ درصد) است (Greasham 1993). همچنین آرژینین پیش ساز مستقیم کلاولانیک اسید، در مسیر بیوسنتزی این آنتی بیوتیک است (Jensen & Paradkar 1999). Liras & Rodriguez-Garcia 2000 و *S. clavuligerus* می‌تواند از این اسید آمینه به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کند. به علاوه، آرژینین (Romero et al. 1986) و اسید آمینه های خانواده آسپاراتات (Lynch & Yang 2004) دارای اثر تحریک کنندگی در تولید کلاولانیک اسید به وسیله *S. clavuligerus* هستند. همچنین *S. clavuligerus* مولد لیپاز است (Large et al. 1998) و در نتیجه روغن بادام زمینی به وسیله لیپاز به گلیسرول و اسید چرب هیدرولیز شده که این ترکیبات می‌توانند به عنوان پیش ساز آنتی بیوتیک و منبع کربن و انرژی به وسیله میکروارگانیسم مورد استفاده قرار گیرند. در تحقیق انجام شده به وسیله Maranesi و همکاران (۲۰۰۵) نیز

#### منابع:

- Chen K.C., Lin Y.H., Tsai C.M., Hsieh CH., Houg J.Y. 2002: Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *S. clavuligerus* with glycerol feeding, *Biotechnol. Lett.*, **24**: 455-458.
- Chen K.C., Lin Y.H., Wu J.Y., Hwang S.C.J. 2003: Enhancement of clavulanic acid production in *S. clavuligerus* with ornithine feeding, *Enzyme. Microb. Technol.*, **32**: 152-156.
- Desai B.B. 2000: Potential proteins, fats, and oils, In: Handbook of nutrition and diet. *Marcel Dekker, New York*, pp271-290.
- Elson S.W., Oliver R.S. 1978: Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. I. Incorporation of <sup>13</sup>C-labelled precursors, *J. Antibiot.*, **31**: 586-592.
- Finlay J., Miller L., Poupard J.A. 2003: A review of the antimicrobial activity of clavulanate, *J. Antimicrob. Chemother.*, **52**: 18-23.
- Foulstone M., Reading C. 1982: Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22(5)**: 753-762.
- Gouveia E.R., Baptista-Neto A., Azevedo A.G., Badino-Jr A.C., Hokka C.O. 1999: Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**: 623-627.
- Greasham R.L. 1993: Media for microbial fermentation, In: Rehm HJ, Reed G (ed) *Bioprocessing. Biotechnology, A comprehensive Treatise*, vol 3. *VCH, Weinheim*, pp127-141.
- Hamilton R.J., Hamilton S. 1992: Lipid analysis-a practical approach, *Oxford University Press, New York*, pp13-64
- Jain A.K. 2004: Cloning and structural analysis of a cDNA clone encoding glycinin (Gly-1) seed storage protein of peanut, *Electron. J. Biotechnol.*, **7(3)**: 224-234.
- Jensen S.E., Paradkar A.S. 1999: Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid, *Antonie van Leeuwenhoek*, **75**: 125-133.
- Jones A.M., Porter M.A. 1998: Vegetable oil in fermentation: beneficial effects of low-level supplementation, *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.*, **21**: 230-207.
- Large K.P., Ison A.P., Williams D.J. 1998: The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, *J. Biotechnol.*, **63**: 111-119.
- Liras p., Rodriguez-Garsia A. 2000: Clavulanic acid, a  $\beta$ -lactamase inhibitor: biosynthesis and molecular genetics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**: 467-475.
- Lynch H.C., Yang Y. 2004: Degradation product of clavulanic acid promote clavulanic acid production in culture of *Streptomyces clavuligerus*, *Enzyme. Microb. Technol.*, **34**: 48-54.

- Maranesi G.L., Baptista-Neto A., Hokka C.O., Badino A.C. 2005: Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 509-514
- Mayer A.F., Decker W.D. 1996: Stimulation production and decomposition of clavulanic acid production during *Streptomyces clavuligerus* cultivation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 41-46.
- Romero J., Liras P., Martin J.F. 1984: Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *S. clavuligerus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20(5)**: 318-325.
- Romero J., Liras P., Martin J.F. 1986: Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52(4)**: 892-897.
- Roubos J.A., Krabben P., de Laat W.T.A.M., Babuska R., Heijnen J.J. 2002: Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* Fed-Batch cultivation, *Biotechno. Prog.*, **18**: 451-457.
- Salunkhe D.K., Adsule R.N., Chavan J.K., Kadam S.S. 1992: Peanut, In: World oil seeds: chemistry, technology, and utilization. *Van Nostrand Reinhold, New York*, pp140-216.
- Wang Y.H., Yang B., Ren J., Dong M.L., Liang D., Xu, A.L. 2005: Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*, *Process Biochem.*, **40**: 1161-1166.