

黄原胶生物合成的研究进展

The research progress of biosynthesis on xanthan gum

胡德亮 李柏林 陈有容

(上海水产大学食品学院, 200090)

Hu Deliang, Li Bailin, Chen Yourong

(College of Food Science, SFU, 200090)

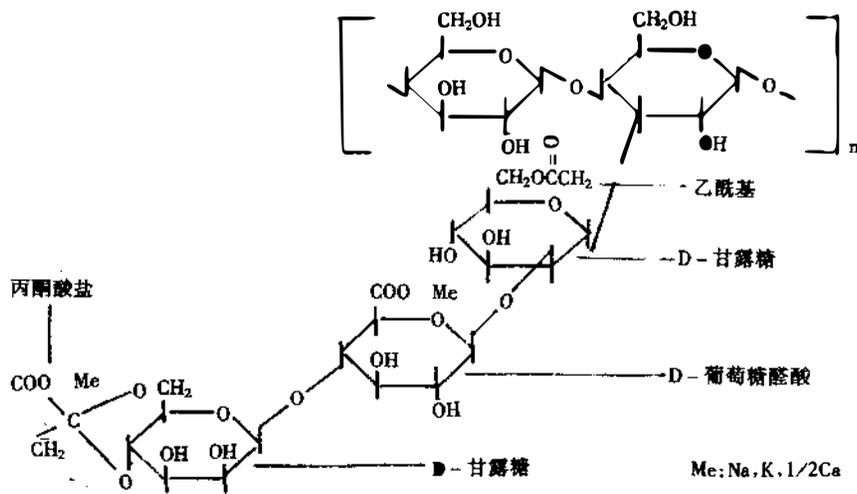
关键词 黄原胶, 生物合成, 发酵

KEYWORDS xanthan gum, biosynthesis, fermentation

中图分类号 TS201.3

黄原胶是由野生黄单胞菌以碳水化合物为主要底物,经发酵产生的一种酸性胞外杂多糖^[1],其分子的基本构成为D-葡萄糖、D-甘露糖、D-葡萄糖醛酸、乙酸以及丙酮酸^[2]。其中前三者的比率接近3:3:2^[3]。

黄原胶的分子结构如下:



从其分子结构^[4]可以看出,主链与纤维素基本相同,其显著差别仅在于三糖侧链在无水葡萄糖单位之间交替出现。每两个经由β-1,4-D-糖苷键连接而成的葡萄糖分子上,含有一条由一个D-葡萄糖醛酸连接两个D-甘露糖组成的侧链,上面连接有乙酰基和丙酮酸盐。

第一作者简介:胡德亮,男,1971年11月生,本校1997级硕士研究生,从事黄原胶培养基的优化及代谢过程中酶的研究。
收稿日期:1999-04-13

1 菌种改良

1.1 突变菌株

菌株的筛选是发酵过程的第一步,能否选取具有优良生产性能的菌株,是发酵过程成败的关键因素之一。传统的菌株筛选方法,多采用某些物理化学因子如紫外线、化学诱变剂等处理菌株,使其DNA双螺旋结构受到损伤或破坏,如DNA链的断裂、脱嘌呤等,致使其某些正常功能受到影响。这种筛选方法没有明确的方向性,不稳定性大,目的菌株产生的几率较小。而且诱变后的菌株,由于上面叙及的一些变化,可能会造成基因缺陷,如乙酰化酶I、II和转移酶V缺陷等,由此类菌株所生产出的黄原胶的分子侧链中,内部的甘露糖是经过乙酰化修饰的,而外部的甘露糖分子是经过乙酰化和丙酮酸化修饰的,但此种胶体的粘度、稳定性、盐溶性和耐温性都有所提高^[5]。而且杨国平等^[6]通过试验发现,经过诱变处理后,可以使一些产色基因受到抑制或根本不能表达,从而能够使产品的白度得到较好的改善,产品的质量也因此而提高。

1.2 基因工程菌

基因工程是近10余年来发展起来的一种比较先进的现代生物技术,具有一定的方向性,它可将所需的基因通过一定的方式导入受体菌,然后筛选目的基因能够表达的菌株。到目前为止,已有许多黄原胶生产菌株是通过诱变或基因工程技术所获得。这些菌株中,大都扩大了碳源种类,不仅能以葡萄糖作为碳源,也可以蔗糖或乳糖作为碳源^[7-9]。Pollock等^[10]将与黄原胶的分泌和乙酰基、丙酮酸、多聚体等的合成有关的12个基因(gumBCDEFGHIJKLM)导入不同种属的黄原胶生产菌株中,所产黄原胶的特性和原先的基本相同。这就意味着,如果将目的基因导入不同的菌株,就可能生产出功能特性类似的产品,因此使菌株的选择范围更加广泛。Chou等^[11]曾研究过gumD基因,认为其与色素合成有关,由此可以设想,能否采用适当的方法将其切除,以获得无色黄原胶。XanA和xanB基因与UDP-葡萄糖和GDP-甘露糖的合成有关^[12],这两者均为黄原胶侧链的组成部分,其含量的高低,必然影响黄原胶分子量的大小,而分子量的大小又与黄原胶的流体力学、粘度等特性紧密相关。其它还有一些基因也有人作过研究,如与黄单胞菌的胞外酶及多糖的合成有关的结构基因与调控基因等^[13-16],在此不一一赘述。但由此我们可以了解,诱变和基因工程是一个复杂但极富发展前景的研究领域。

2 发酵过程代谢调控

2.1 发酵方式的选择

微生物培养的基本类型有三种,即分批培养、分批补料培养和连续培养。对于一个具体的发酵工艺来说,应选择哪一种类型,是由所用微生物的代谢特点以及最佳工艺条件决定的。Amanullah等^[17]在研究不同的葡萄糖添加方式对黄原胶产量的影响时,采用了补料分批发酵。Oh等^[18]也对补料分批发酵作过一些研究,其实验结果也证实此种发酵方式是较为理想的。此外,通过研究细胞生长速率的变化,探讨连续和分批发酵过程中的动力学,结果表明,连续发酵中,黄原胶的代谢不受稀释率的影响;对分批培养,当稀释率为0.03~0.1/h时,代谢变化和生长速率成直线关系,超出此范围,葡萄糖会积累,黄原胶产量也会下降,表明有底物抑制现象^[19]。

分批培养时,整个发酵过程的底物浓度会随着时间的进行而逐渐减少。连续培养时,由于整个发酵过程中底物浓度基本保持不变,所以,一般情况下,不会出现底物缺乏的现象,这是对菌体生长有利的一面,而另一方面则有可能引发底物抑制,导致最终产率的下降。而补料分批培养就可以解决这个矛盾。它可以依据不同生长阶段细胞生长特性的不同来决定添加何种物质以及添加量等,力求营造一个适于细胞生长的最适生理环境。

2.2 培养基组分的影响

2.2.1 基本组分

任何发酵过程所用的培养基,都具有一般微生物生长所需要的最基本成分,即碳源、氮源、水分、微量元素等,有的还需要维生素,需氧菌则需供应氧气。通过试验发现,碳源在黄原胶发酵过程中属于显著性因子。黄原胶发酵所使用的碳源,多为价廉易得的玉米糖浆。但也有研究表明,在比例适当的培养基组成中,蔗糖糖蜜、乳糖糖蜜均可成为良好的碳源^[20-23]。如果这方面的技术广泛用于工业生产,则可以充分利用有关工业下脚料,不失为废物利用的一条有效途径。

黄单胞杆菌最易直接利用的碳源是葡萄糖,但其成本太高,工业化生产时多作为中间补加的碳源。近年来的研究发现,高糖发酵可以大大提高黄原胶的产量^[6]。用25%的蔗糖,在空气与培养基之比为3:2的情况下,所得黄原胶的最高产量可达70.5g/L^[22]。在使用葡萄糖作碳源时,有一点值得注意:用3%的葡萄糖异构化产物取代葡萄糖,黄原胶的产量可提高约34%^[24]。众多的研究结果均表明,提高碳氮比,可以提高碳源的转化率,从而提高黄原胶的产量^[22,25]。发酵过程中常用的氮源多为铵盐、豆饼粉、棉子粉、花生饼粉等,但使用酒精发酵时作为副产品的液体玉米釜馏物作为氮源和微量元素的来源,发现其葡萄糖的转化率可达60%以上^[26]。有许多试验发现,有机氮源和无机氮源结合,对黄原胶的合成更为有利,但不同的菌株之间会存在差异。

微量元素类,尤其一些金属离子,如 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等离子对黄原胶的某些特性如分子量、稳定性及分层现象、生长速度等有重要影响。它们有的是某些酶类的激活剂,如 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 等则是细胞膜上 Na^+ 、 K^+ 泵的组成成分,这些泵类可以协助某些细胞中的大分子物质的转运。所以,添加的离子种类和适当浓度,必然会促进黄原胶的生产。此外,为了调节发酵液的pH值而常用的缓冲盐类,如磷酸盐、柠檬酸盐、多聚磷酸盐、铵盐等会影响黄原胶的产量和发酵液的粘度等特性。

野生黄单胞菌是好氧菌,因此,发酵过程中必须不断通氧。就通入的氧气质量看,纯氧可以有效提高产量约40%^[27]。通过研究发现,溶氧分压以及氧气转移速率的高低会影响黄原胶的产量与质量,不仅如此,当溶氧分压占总压力的比例大于40%后,黄原胶分子中的丙酮酸含量虽然比溶氧分压为10%时大,但继续增大时变化非常小^[28,29]。氧气的转移速率以及溶氧状况,不仅会影响黄原胶的产量和质量,还会影响其分子量的大小^[30]。此外,氧气的通入必须根据发酵情况适时调整,因为不同的发酵阶段,菌株对氧气的需要量不同。

2.2.2 特殊组分

许多研究发现,有些物质可以对黄原胶的发酵生产起促进作用,类似于促生长因子。目前已发现的此类物质有有机酸、表面活性剂等。其中有机酸中最重要的是柠檬酸。在实验中发现,柠檬酸的添加量增加,可以提高细胞的生长速率和产物的合成速率^[30,31]。柠檬酸虽然能够促进细胞发育,但其提高生产能力仅是在通氧受限的情况下成立,一旦通氧率较高,则黄原胶的产量不会得到提高^[32]。研究发现,添加不被黄单胞菌代谢的有机酸,如异丁酸,同样可以提高黄原胶的产量,并且可以减少发酵液中的杂质含量,减轻了后提取工艺的负担^[33,34]。发酵工业常用的表面活性剂有吐温40、吐温80、Chaps、Triton X-100等。关于其促进作用机制,现在较为一致的认识,认为是由于其加入而降低了细胞膜的表面张力,影响了细胞膜的正常合成,从而使菌体细胞膜的通透性增大,即其结构变得松散,大分子物质的透过率增大,使得胞内产生的多种酶类可以进入发酵液,因此底物的转化率增加,从而提高了黄原胶的产量。它们的用量较小,一般在几个微克到几十个微克之间,但它们的作用巨大,加入表面活性剂后的黄原胶产量可以增加45%左右,而且在添加表面活性剂的发酵液中,黄单胞菌的菌体变小,发酵液粘度增大^[35]。

3 新型生物反应器的影响

3.1 发酵罐

黄原胶发酵过程中需要什么样的反应器,要综合考虑多种因素,如发酵液的性质、搅拌浆的形状、通气状况、能量消耗等等。由于黄原胶溶液的粘度较大,并且发酵过程中需要充足的氧气,所以,有些反应器就不适用于生产。而空气提升式反应器由于能有效解决黄原胶发酵中的通气和搅拌所带来的热量

问题,减少了能源消耗,所以较为适合连续培养。配备有硫化床的塔式反应器,由于其气泡转移系数较高,在分批发酵中也有应用。用泵式静态混合循环反应器能够增加氧气在高粘度发酵液中的传递速率,从而可以提高黄原胶的产量^[36]。

3.2 搅拌浆形式

选择的反应器要让其充分发挥作用,还必须辅以合适的搅拌浆。通过实验证实,圆盘涡轮式搅拌浆由于能快速破碎气泡,而其本身不会被气泡淹没,所以在发酵工业上使用较为合适^[37]。由于黄原胶发酵液的特殊性质,用普通的搅拌浆如圆盘涡轮式搅拌浆、叶片涡轮式搅拌浆等一般难以达到要求,但它们耗能小。近年来,为了适应高粘度和高通气率的发酵工艺的需要,许多研究人员设计了一些新型的搅拌浆^[38,39]。虽然大部分由普通型式改进而来,但却具有普通型式不可比拟的优越性。还有一些搅拌浆采用复合型式,即将两种具有不同优点的搅拌浆结合在一起,如螺旋(上部)-涡轮式(下端)搅拌浆。其中有两种类型,一种是上下通过一根轴推动,另一种则是分别运行,互不干扰。当上端的螺旋式搅拌浆逆向旋转时,发酵液粘度和产品质量优于顺时针旋转^[37]。现在黄原胶发酵所常用的栅式和窗式搅拌浆,也属于复合形式。所谓的栅式,实际是在搅拌轴的中间用栅形框,然后单独或同时在上面或下面配以一个或多个圆盘涡轮式搅拌浆。而窗式则类似于船用搅拌浆的一种演化形式。

4 细胞固定化和酶法合成

4.1 细胞固定化

通过细胞的固定化,可以进行黄原胶的发酵生产。固定化时采用的载体有多种,但常用且效果较好的多为聚酯塑料和纤维类物质。据文献^[40]报导,聚酯塑料作载体,葡萄糖转化率可达58%,而对照组只有35%,并且用聚亚安酯塑料做载体,以马铃薯为底物时,产量可达56g/L。实验证实,用棉花做细胞载体生产黄原胶比用聚酯的吸附效率高30%~40%^[41]。

4.2 酶法合成

黄原胶的合成,基于诸多酶的协同作用。Sutherland^[42]认为是己糖激酶、磷酸葡萄糖变位酶、葡萄糖转移酶、甘露糖转移酶以及C55-Lipid-pp磷酸化酶等约17种酶类。我们可以在适当的时机添加适宜的物质,使细胞内的酶充分溶出,以有效分解底物,合成终产物。关于这方面的工作,目前主要通过表面活性剂来实现。此外,基于酶类在黄原胶的发酵生产中起关键作用,而非菌体本身,同时,菌体的存在又会给搅拌和后续的提取工艺带来一定的困难,也难免会影响产品的质量,因此,黄原胶的发酵还有一种两步法,即在主要酶类的产生时间结束后(基本在指数生长后期),采用溶菌酶(一般在中后期,大约发酵24h)作用于菌体细胞壁的肽聚糖,将细胞壁部分溶解,从而使其内部的酶类释出,充分作用于底物,提高底物的转化率。而由于细胞壁的溶解,又可以减轻后续提取工艺,可谓一举两得之法。

在两步法中,可以在前期降低碳氮比,以减缓产物的合成,从而促进菌体的生长,以便合成更多的酶类,而在第二步中则加大碳氮比,使第一步合成的酶类有足够的底物以产生尽可能多的胶体。通过此途径,不仅可以合成更多的黄原胶,而且可以将菌体提前除去,简化了后续工艺。所以,这是一种值得探讨和研究的新方法。

基于上述的论述,我们也可以采用其它方法控制黄原胶的生物合成。黄单胞菌利用基质合成黄原胶的过程中,各种酶类的变化必然有一定的规律性,即出现的先后顺序以及数量的变化。由此,我们可以利用电泳图谱凝胶成像分析系统来对整个发酵过程中出现的各种酶类定性定量。最终确定在黄原胶的生物合成中到底是哪些酶类起关键性作用。明确以后,我们就可以对发酵过程进行控制,使其向有利于产物合成的方向进行。关于这方面的工作,目前国内外报道的较少。

5 展望

5.1 丙酮酸

丙酮酸是黄原胶分子侧链中的一个组成部分。它的存在,可以赋予黄原胶许多优良的性能。在国标及 FDA 中,它都是检测黄原胶质量的一项重要指标。黄原胶分子中的丙酮酸含量会影响其分子的空间排列,从而引起黄原胶溶液的粘度、耐温性和分子量的变化^[43,44]。此外,丙酮酸还是黄原胶合成水平的一个重要标志,其含量的高低,间接的显示出黄原胶合成的情况以及发酵条件的控制情况。但是丙酮酸的确切作用还不清楚,许多这方面的实验还仅仅处于探索阶段。如果将其作用机制研究清楚,那么,黄原胶在不同发酵条件下引起的粘度、分子量的变化等现象必然会得到更合理的解释,也会有利于其发酵过程的调控。

5.2 无色黄原胶

脱色是黄原胶在实际生产时需要解决的一个技术问题。在后道提取工艺中,生产厂家要花费大量的财力和精力来进行脱色,而且,现有的脱色工艺一般都用漂白剂,如食品工业常用的还原性漂白剂,如亚硫酸盐、亚硫酸氢盐及其与其它物质的复合物;氧化性漂白剂如过氧化氢等。这其中存在几个问题:一是黄原胶的黄色是由 β -胡萝卜素引起的,而还原性漂白剂对之不起漂白作用;二是氧化性漂白剂或多或少会对黄原胶的某些特性产生影响。要解决这些问题,最根本的方法便是利用基因工程手段,找出编码 β -胡萝卜素的基因,并将其切除,然后再将所得到的基因工程菌培养、筛选,以求得到理想的菌株。这方面已有人着手进行研究。利用基因工程菌生产无色黄原胶,必将是黄原胶生产中的一个广阔的发展领域。

5.3 黄原胶合成途径中主要的酶类

既然黄原胶的发酵生产是由酶类起作用,那么就有可能在研究清楚其生产途径中的酶类以及为各种酶类编码的基因后,将起关键作用的酶类基因加以诱变或重组,以期增加该酶的产量,从而也能提高黄原胶的产量。目前,国内外的研究人员已着手这方面的工作。由于菌种诱变与选育的复杂性以及一些技术方面的原因,所以成功者为数甚少。但是,这方面的工作具有重要的实用价值,因此,关于黄原胶的酶类调控基因的研究还有待深入。

参 考 文 献

- 1 赵大健, 王 帆. 黄原胶及其在食品工业上的应用. 食品与发酵工业, 1986, 69(3):48~54
- 2 刁虎欣, 郑双诚. 黄原胶和半乳糖甘露糖分子间的增粘协效性及其应用. 食品与发酵工业, 1992, 1:69~72
- 3 Mochi A C, Scampavini A R P. Xanthan gum production from Brazilian strains. Food Hydrocolloids [Proc Int Conf Ind Exhib], Meeting Date, 1992, 147~150
- 4 Luis I, Roberto O C, Marcelo A D. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the Xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. J Bacteriol, 1993, 175(9):2490~2500
- 5 Oaherty D H, Ferber D M, Marrelli J D, et al. Acetylated and/or pyruvylated xanthan-based polysaccharides manufacture with *Xanthomonas* mutants. WO, A1, 9219753. 1992-11-12
- 6 杨国平, 陈浩明, 徐 进等. 黄原胶高产菌株选育及其发酵培养基的确定. 南京农业大学学报, 1995, 18(增刊):40~44
- 7 Ekateriniadou L V, Papoutsopoulou S V, Kyriakidis D A. High production of xanthan gum by a strain of *Xanthomonas campestris* conjugated with *Lactococcus lactis*. Biotechnology-Letters, 1994, 16(5):517~522
- 8 Fu J F, Chang R Y, Tseng Y H. Construction of stable lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* by chromosomal integration of cloned lac genes using filamentous phage Lf DNA. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37(2):225~229
- 9 Felipe S B, Mareno B, Antunez S. *Xanthomonas campestris* mutant that produces xanthan gum upon cultivation in a lactose-based medium. Eur, A2, 481785. 1992-4-22
- 10 Pollock T J, Yamazaki M. Clarification of microbial polysaccharides with enzymes secreted from *Lysobacter* species. J Ind Microbiol, 1993, 11(3):187~192
- 11 Chou F L, Chou H C, Lin Y S, et al. The *Xanthomonas campestris* gum D gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 233(1):265~269
- 12 Harding N E, Raffio S, Raimondi A, et al. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide

- precursors of xanthan gum. *J Gen Microbiol*, 1993, 139(3):447 ~ 457
- 13 Barrer C C, Barber C E, Daniels. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Int J Biol Macromol*, 1986, 18:372 ~ 374
- 14 Handing N E. Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. *J of Bacteriol*, 1987, 169(6):2854 ~ 2861
- 15 Koepflin R, Arnold W, Hoette B, et al. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose. *J Bacteriol*, 1992, 174(1):191 ~ 199
- 查冬兴, 唐纪勋, 马庆生. 野油菜黄单胞菌野油菜致病型胞外多糖合成有关的 DNA 序列的克隆. *微生物学报*, 1998, 38(4):251 ~ 255
- 2569 A, Sati. *Substrate-dependent Enthalpic and Entropic Contributions to the Binding of the Xanthan Gum to the Cell Wall of Xanthomonas campestris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988:265 ~ 269
- 18 Oh D K, Kim J H, Yoshida T. Production of a high viscosity polysaccharide, xanthan, in a novel bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 54(2):115 ~ 121
- Rosestam J C, Emery A N, Simoes P E, et al. Production of xanthan by in-flow cultures of *Xanthomonas campestris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988:265 ~ 269
- 20 刘秀芳, 王修垣. 野油菜黄单胞菌 L4 生产黄单胞菌多糖的适宜条件. *微生物学报*, 1993, 33(1): 40 ~ 47
- 21 Liakopoulos K M, Tsanakoulis E S, Kiparissidis C, et al. Kinetics of xanthan gum production from whey by constructed strain of *Xanthomonas campestris* in batch fermentations. *Chem Eng Technol*, 1997, 20(5):354 ~ 360
- 22 Abd E M H, Fadel M A, Murali H. Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. *J Biotechnol*, 1994, 33(1):103 ~ 106
- 23 Molina O, Fitzsimons R, Perotti N. Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol Lett*, 1993, 15(5):495 ~ 498
- 24 Proostenberg J C, Beck R H F, Wannemaeker B. Fermentation feedstock. *Eur. Al*, 60:9995. 1984 - 10 - 10
- 25 Rajeshwari K V, Prakash G, Ghosh P. Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. *Lett Appl Microbiol*, 1995, 21(3):173 ~ 175
- 26 Vrbascki L L, Pakic B S, Markov S L, et al. Study of the xanthan gum biosynthesis. *Proc-Fac Technol, Novi Sad*, 1986, 27:271 ~ 279
- 27 Oester M D, Eren S, Gungor S. Growth and energetic parameters of microbial xanthan gum production with *Xanthomonas campestris*. *Environ Sci, 1995*, 19(3):239 ~ 245
- 28 Flores F, Torres L G. *Effect of the Xanthan Gum on the Growth of the Xanthomonas campestris*. *Environ Sci, 1995*, 19(3):239 ~ 245
- 29 Harstad H, Schuurpe A, Dechwer W D. Xanthan production in stirred-tank fermentors: oxygen transfer and scale up. *Chem Eng Technol*, 1992, 15(6):425 ~ 434
- 30 Peters H U, Suh I S, Schuurpe A, et al. Modeling of batchwise xanthan production. *Can J Chem Eng*, 1992, 70(4):742 ~ 750
- 31 Peters H U, Ghosh P, Zaidi A, et al. The continuous production of xanthan gum. *Proc-Eur Congr Biotechnol*, 1990, 5(2):1049 ~ 1052
- 32 Jana A K, Ghosh P. Stimulation of xanthan production by *Xanthomonas campestris* using citric acid. *World J Microbiol Biotechnol*, 1997, 13(3):261 ~ 264
- 33 Pereira R J C, Amaral C M T. Process for producing xanthan using non-metabolizable organic acids. *WO, Al*, 9505476. 1995 - 2 - 23
- 34 Roseiro J C, Esalbedo M E, Emery A N, et al. Technological and kinetic aspects of sublethal acid toxicity in microbial gum production. *J Chem Technol Biotechnol*, 1996, 65(3):258 ~ 264
- 35 Galindo E, Salgado G. *Organic acids improve xanthan yield and polymer quality in cultures of Xanthomonas campestris*. *Enzyme Microb. Technol*, 1996, 19(2):145 ~ 149
- 36 Xu P, Lin J Q, Jing B, et al. Xanthan gum production with pumping static-mixing loop fermentor (PS-Loop Fermentor). *Biotechnol Lett*, 1994, 16(5):523 ~ 526
- 37 Fium R F. Agitation-eration in the laboratory and in industry. *React Rev*, 1954, 18:254 ~ 274
- 38 Buckland B C, Gbowonyo K, Dimassi D, et al. Improved performance in viscous mycelial fermentations by agitator retrofitting. *Biotech Bioeng*, 1988, 31:737 ~ 742
- 39 Nienow A W. New agitators versus Rushton turbines: A critical comparison of transport phenomena. In: Ladisch, Michael R., Bose et al. In *Handbook of Biotechnology for the 21st Century*. Washington: American Chemical Society, 1992, 193 ~ 196
- 40 Anselmo R J, Viana A, Carletti S. Xanthan gum production by immobilized *Xanthomonas campestris*. *Rev Argent Microbiol*, 1992, 24(2):86 ~ 90
- 41 Yang S T, Lo Y M, Devanata C. Production of cell-free xanthan fermentation broth by cell adsorption on fibers. *Biotechnol Prog*, 1998, 14(2):259 ~ 264
- 42 Sutherland I W. In *Extracellular Microbial Polysaccharides*. American Chemical Society Symposium, 1977, 45:40 ~ 57
- 43 Kulicke W M, Van Eikeren A. Determination of the microstructure of the fermentation polymer xanthan. *Makromol Chem, Macromol Symp*, 1992, 61(Aval Polym):75 ~ 93
- 44 Torres L G, Brito E, Galindo E, et al. Viscous behaviour of xanthan solutions from a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *J Ferment Biotech*, 1993, 75(1):58 ~ 64