Polymerization
Quarterly, 2015
Volume 5, Number 4
Pages 16-28
ISSN: 2252-0449

Effect of Aeration Intensity, Agitation Speed, Temperature and pH Parameters on Production of a Microbial Polysaccharide

Mojtaba Khani*, Ali Bahrami, and Asma Chegeni
Institute of Science Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

Received: 12 April 2014, Accepted: 1 June 2015

Abstract

According to biochemists, biopolymers are biological macromolecules comprised of numerous subunits having the same structure and bonded covalently to form a long chain. Having been derived naturally from the living organisms such as plants, animals and microorganisms, biopolymers are biodegradable. Examples of biopolymers include nucleic acids, proteins, polysaccharides, polyhydroxyalkanoate, polyphenols, and polysulfone. In order to use biopolymers in industry it is necessary to commercialize and optimize the production of biopolymers. According to studies on optimization of the production of biopolymers, it is specifically noted that in addition to the important nutritional factors such as sources of carbon, nitrogen, phosphorous and sulfur, the physical factors are very effective in producing biopolymers. In this study, the parameters such as aeration intensity, agitation speed, temperature and pH have been investigated to achieve an optimal condition for commercially producing biopolymer. According to literature, the optimum values of the aeration rate, agitation speed, temperature and pH for producing polysaccharides are in the range of given order: 0.5-3 vvm, 200-800 rpm, 27-32 °C and 8-5.

Keywords

microbial biopolymer,
microbial polysaccharide,
aeration rate,
agitation speed,
temperature

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: khani.bioeng@gmail.com

بسپارش
فصلنامه علمی- ترویجی
سال پنجم، شماره ۴
صفحه ۲۸-۱۶، ۱۳۹۴
ISSN: 2252-0449

اثر پارامترهای سرعت هوادهی، دما، سرعت همزن و pH بر تولید پلی‌ساکاریدهای میکروبی

مجتبی خانی*، علی بهرامی، اسماء چگنی
تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، گروه مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی

دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۳، پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۱۱

چکیده

زیست‌پلیمر از نظر زیست‌شیمی‌دان‌ها عبارت از درشت‌مولکول زیستی است که از زنجیر بلندی از زیرواحدهای کوچک متعدد و مشابه متصل به هم تشکیل شده است. اتصال این واحدها به هم از نوع اتصالات کووالانسی است. با توجه به اینکه زیست‌پلیمرها از موجودات زنده از قبیل گیاهان، جانداران و میکروارگانیسم‌ها به‌طور طبیعی تولید می‌شوند و از لحاظ زیست‌محیطی نیز تجزیه‌پذیرند، برای کاربرهای مختلف بسیار مناسب هستند. انواع زیست‌پلیمرها شامل نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها، پلی‌فنول‌ها، پلی‌فسفات‌ها و پلی‌سولفات‌ها هستند. به‌منظور استفاده از زیست‌پلیمرها در صنایع، نیاز به تجاری کردن فرایند تولید و بهینه کردن آن است. با توجه به مطالعات انجام شده درباره بهینه‌سازی شرایط تولید زیست‌پلیمر مشخص شده است، افزون بر اثر عوامل تغذیه‌ای مهم در فرایند تولید زیست‌پلیمرها از قبیل منابع کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد و غیره عوامل فیزیکی و غیرتغذیه‌ای نیز در فرایند تولید زیست‌پلیمرها بسیار اثرگذارند. در این مطالعه، اثر پارامترهایی نظیر سرعت هوادهی و همزدن، دما و pH بر تولید بهینه پلی‌ساکاریدهای میکروبی که از مهم‌ترین و پرکاربردترین زیست‌پلیمرها هستند، بررسی شده است. باتوجه به نتایج، در اکثر منابع بررسی‌شده برای تولید مقدار بهینه از پلی‌ساکارید، شرایط مناسب برای سرعت هوادهی ۰/۵-۳ vvm، همزدن ۲۰۰-۸۰۰ rpm، دما ۲۷-۳۲°C و pH ۵-۸ در نظر گرفته شده است.

مجتبی خانی

علی بهرامی

اسماء چگنی

واژگان کلیدی

زیست‌پلیمر میکروبی،
پلی‌ساکاریدهای میکروبی،
سرعت هوادهی،
سرعت همزدن،
دما

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
khani.bioeng@gmail.com

مقدمه

زیست‌پلیمر ازنظر زیست‌شیمی‌دان‌ها عبارت از درشت‌مولکول زیستی است که از زنجیر بلندی از زیرواحدهای کوچک متعدد و مشابه متصل به هم تشکیل شده است. اتصال این واحدها به هم از نوع اتصالات کووالانسی است.

زیست‌پلیمرها خود به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند:

۱- زیست‌پلیمرهایی که توسط سامانه‌های زیستی مانند میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات تولید می‌شوند.

۲- زیست‌پلیمرهایی که به‌طور شیمیایی سنتز شده، ولی از مواد زیستی مانند اسیدهای آمینه، قندها، چربی‌ها یا روغن‌ها به‌دست می‌آیند.

همان‌طور که اشاره شد، این مواد توسط انواع موجودات زنده سنتز شده و بخش مهمی از اعمال اکوسیستم را برعهده دارند. این پلیمرها به دلیل زیست‌تخریب‌پذیری، مجددا توسط خود موجودات مصرف می‌شوند. به عبارتی، طی روش‌های حفاظتی و اکولوژیکی مانند تولید کود، جذب در خاک و عمل‌آوری‌های زیستی، تجزیه می‌شوند. درواقع زیست‌پلیمرها، چرخه تولید و تجزیه را طی می‌کنند (شکل ۱). سرعت و نوع تجزیه پلیمرها براساس انرژی مورد نیاز برای شکست پیوند و موقعیت آن، متفاوت است. پلیمرها با پیوندهای کووالانسی (C-C) بدون گروه‌های آبکافتی به زمان زیاد یا کاتالیزور برای تجزیه احتیاج دارند.

در جدول ۱ مهم‌ترین زیست‌پلیمرها، ساختار شیمیایی واحدهای مونومری و کاربرد آن‌ها در ارگانیسم زنده، ذکر شده است. به عنوان مثال، DNA که اطلاعات ژنتیکی سامانه‌های زنده را حمل می‌کند، کوپلیمری خطی متشکل از چهار مونومر نوکلئوتیدی است.

شکل ۱- پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر [۲].

نوکلئوتیدها در یک ستون مارپیچ حاوی قند و فسفات با یکدیگر جفت می‌شوند. در حال حاضر، DNA از نظر صنعتی خیلی مورد توجه نیست، اگرچه پژوهش‌هایی در زمینه تولید ترکیبات نانو به کمک این زیست‌پلیمر شروع شده است. در سال‌های اخیر، تحقیقات نشان داده است، پلی‌پپتیدهای متنوعی یافت شده که شبیه پروتئین‌های طبیعی است [۱]. پروتئین‌ها یا پلی‌پپتیدها، کوپلیمرهای پیچیده حاوی ۲۰ نوع اسید آمینه مختلف هستند. هر پروتئین دارای ترکیب شیمیایی و ساختار سه‌بعدی منحصر به فردی است. واحدهای آمینواسیدی براساس کد ژنتیکی موجود در DNA، با پیوند آمیدی به دنبال یکدیگر قرار می‌گیرند.

پلی‌ساکاریدها، پلیمرها یا درشت‌مولکول‌های حاوی قندهای ساده هستند. این ترکیبات دو وظیفه عمده دارند. بعضی مانند نشاسته انرژی را برای فعالیت سلولی ذخیره کرده و بقیه از جمله سلولوز نقش ساختاری ایفا می‌کنند. پس از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها بیشترین و پیچیده‌ترین گروه زیست‌پلیمرها را تشکیل می‌دهند. زیرا پیوندهای موجود میان مونومرها، در وضعیت‌های مختلف قرار

جدول ۱- زیست‌پلیمرهای طبیعی و عملکرد آن‌ها [۱].

پلیمر	مونومرها	عملکرد (ها)
نوکلئیک اسیدها	نوکلئوتیدها	حامل اطلاعات ژنتیکی عمومی شناخته‌شده در همه ارگانیسم‌ها،
پروتئین‌ها	اسیدهای‌آمینه	زیست‌کاتالیزورها (آنزیم‌ها)، عامل‌های رشد، پذیرنده، هورمون‌ها (انسولین)، توکسین، پادتن
پلی‌ساکاریدها	قندها	ساختار گیاهان و ارگانیسم‌های عالی، ذخیره انرژی، ترشحات باکتریایی
پلی‌هیدروکسی آلکانوات	اسیدهای چرب	ذخیره انرژی میکروبی
پلی‌فنول	فنول‌ها	ساختار گیاهی، ترکیبات خاک، سازوکار دفاعی گیاهان
پلی‌فسفات	فسفات‌ها	ذخیره انرژی معدنی
پلی‌سولفات	سولفات‌ها	ذخیره انرژی معدنی

جدول ۲- زیست‌پلیمرهای کاربردی [۲].

پلی‌استرها	پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها، پلی‌لاکتیک اسید
پروتئین‌ها	ابریشم، کلاژن-ژلاتین،الاستین، رزیلین، چسب‌ها، پلی‌آمینواسیدها، سویا، زئین، گلوتن گندم، کازئین، سرم آلبومین
پلی‌ساکاریدها (میکروبی)	زانتان، دکستران، ژلان، لوان، کشک یان (Curd Ian)، پلی‌گالاکتوزآمین، سلولوز (میکروبی)
پلی‌ساکاریدهای (قارچی)	پولولان، الزینان (elsinan)، مخمر گلوکان
پلی‌ساکاریدهای(گیاهی)	نشاسته (آمیلوز-آمیلو پکتین)، سلولوز،آگار، آلژینات، کاراژنان، پکتین، کنجاک (konjac)، انواع صمغ‌ها (مانند گوار)
پلی‌ساکاریدهای (حیوانی)	کیتین-کیتوسان، هیالورونیک اسید
لیپیدها- مواد فعال در سطح	استوگلیسریدها، موم‌ها، مواد فعال در سطح امولسیونی
پلی‌فنول	لیگنین، تانین، هیومیک اسید
پلیمرهای خاص	لاک شفاف (shellac)، پلی(گاما گلوتامیک اسید)، لاستیک طبیعی، پلیمرهای سنتزی از چربی‌ها و روغن‌های طبیعی، مانند نایلون از روغن کرچک

می‌گیرند. بیشتر پلی‌ساکاریدها، ساختارهای انشعابی دارند و در اثر افزودن سایر مولکول‌ها، تحت تغییرات شیمیایی قرار می‌گیرند [۱].

همان‌طور که اشاره شد، زیست‌پلیمرها می‌توانند با چند سازوکار مختلف تولید شوند. آن‌ها می‌توانند از سامانه‌های میکروبی مشتق شوند. همچنین، از موجودات عالی مانند گیاهان و حیوانات نیز استخراج شده یا به‌طور شیمیایی از واحدهای مونومری زیستی سنتز شوند. با توجه به سازوکار تولیدی، زیست‌پلیمرها کاربردهای وسیعی را دربرمی‌گیرند. این مواد در پزشکی، بسته‌بندی، مواد آرایشی، افزودنی‌های غذایی، پارچه لباس، مواد شیمیایی تصفیه آب، پلاستیک‌های صنعتی، جاذب‌ها، حسگرهای زیستی و حتی عناصر ذخیره‌سازی اطلاعات توسعه یافته‌اند. در جدول ۲ فهرست جزئی از زیست‌پلیمرهای استفاده شده در حال حاضر، آورده شده است [۲].

زیست‌پلیمرهای میکروبی

میکروارگانیسم‌های تولید کننده زیست‌پلیمرها در حدود ۸۰ سال پیش شناسایی شدند که برای نخستین بار زیست‌پلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات از باکتری باسیلوس مگاتریوم تولید شد. از آن پس دانشمندان به دنبال یافتن راه‌هایی هستند که تولید زیست‌پلیمرهای باکتریایی را توسعه دهند و به حالت تجاری درآورند [۳].

زیست‌پلیمرهای تولیدی توسط سلول‌های باکتریایی که از آن‌ها جداسازی شده‌اند، عبارتند از: پلی‌هیدروکسی آلکانوات، پلی‌لاکتیک اسید و پلی‌هیدروکسی بوتیرات. این زیست‌پلیمرها از نظر خواص فیزیکی به پلیمرهای پلی‌استیلن و پلی‌پروپیلن شبیه هستند. زیست‌پلیمرهای میکروبی در طبیعت به عنوان ترکیبات داخل سلولی میکروب‌ها یافت می‌شوند و بیشتر زمانی که باکتری‌ها در شرایط نامساعد محیطی قرار می‌گیرند، اقدام به تولید این مواد می‌کنند. این مواد در حالت طبیعی به عنوان منبع انرژی راحت و فراهم عمل می‌کنند [۴]. همچنین، هنگامی که محیط اطراف باکتری غنی از کربن باشد و از نظر سایر مواد غذایی استفاده شده باکتری دچار کمبود باشد، باکتری اقدام به ساخت زیست‌پلیمرهای یاد شده می‌کند.

باکتری‌ها برای ساختن زیست‌پلیمرهایی مانند پلی‌هیدروکسی آلکانوات و پلی‌هیدروکسی بوتیرات از واکنش‌های تخمیری استفاده می‌کنند، در این واکنش‌ها نیز از مواد خام گوناگونی استفاده می‌شود. پلی‌هیدروکسی بوتیرات با یک باکتری به نام استافیلوکوکوس اپیدرمیس ساخته می‌شود که روی تفاله‌های حاصل از واکنش‌های روغن‌گیری دانه‌های کنجد رشد می‌کند و این زیست‌پلیمر را می‌سازد. پلی‌هیدروکسی بوتیرات در درون سیتوپلاسم باکتری به شکل دانه‌های ذخیره‌ای ذخیره می‌شود که این مواد را با مرکزگریزی و واکنش‌های شست‌وشوی چندمرحله‌ای می‌توان استخراج، خالص‌سازی و از آن استفاده کرد [۵].

زیست‌پلیمرهای تولیدی توسط میکروب‌ها با توجه به محل

جدول ۳- برخی زیست‌پلیمرها به همراه گونه‌های تولیدکننده آن‌ها [۱۶-۱۲].

زیست‌پلیمر	گونه میکروبی	نام لاتین
سلولوز	استوباکتر زیلیوم	*Acetobacter xillium*
پولولان	آئروبازیدیوم پولولانس	*Auerobasidium pullulans*
زانتان	زانتاموناس کمپستریس	*Xanthomonas compestris*
لوان	زیموناس موبایلیس	*Zymonas mobilis*
ژلان	سودوموناس الودئاو	*Pseudomonas elodea*
دکستران	لئوکوموستوک	*Leucomostoc*
کوردلان	آگروباتریوم رادیوباکتر	*Agrobacterium radiobacter*
آلژینات	سودوموناس آئروژینا	*Pseudomonas aeruozhyna*
هیالورونیک اسید	استرپتوکوکوس زوئه پیدمیکوس	*Streptococcus zooepidemicus*

اقامت آن‌ها در سلول به سه گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند [۶]:

- زیست‌پلیمرهای سیتوپلاسمی: کربن و انرژی لازم سلول را فراهم می‌کنند.
- زیست‌پلیمرهای تشکیل دهنده دیواره سلولی: پپتید و گلیکان‌ها، تیکوئید اسید و لیپوپلی‌ساکاریدها.
- اگزوزیست‌پلیمرها: که از سلول به محیط ترشح می‌شوند.

اکثر زیست‌پلیمرهای تولیدی، خارج سلولی هستند. زیست‌سنتز اگزوزیست‌پلیمرها را می‌توان به سه فاز اصلی تقسیم کرد [۷]:

- جذب یک زمینه کربنی،
- سنتز درون‌سلولی زیست‌پلیمر و
- ترشح زیست‌پلیمر تولیدشده از سلول به محیط.

زیست‌پلیمرها در موارد مختلفی به سلول‌ها کمک می‌کنند. آن‌ها از سلول در برابر فشارهای زیستی مانند رقابت و همچنین فشارهای غیرزیستی مانند دما، سرعت نور و pH محافظت می‌کنند. تنوع گسترده زیست‌پلیمرهای میکروبی با خواص فیزیکی و شیمیایی متنوع، شرایط امیدبخشی را برای صنعت فراهم آورده است. تنها دو زیست‌پلیمر خارج سلولی زانتان و ژلان برای استفاده در صنایع غذایی در آمریکا و اروپا مجاز شناخته شده‌اند.

با توجه به علاقه رو به رشد استفاده از منابع تجدیدپذیر، پژوهش‌های صنعتی، به‌ویژه در بخش سوخت‌های زیستی که به تولید زیست‌اتانول می‌انجامد، به‌طور فزاینده‌ای با ترکیب و استفاده از زیست‌پلیمرها مرتبط است. برخی میکروارگانیسم‌ها قابلیت تولید و ترشح بیش از $40\ gL^{-1}$ زیست‌پلیمرها را در شرایط تنش دارند [۸].

تولید زیست‌پلیمر توسط میکروب‌ها مزیت‌های زیر را دارد:

۱- مقدار زیست‌پلیمری که در طول ۳ تا ۶ ماه از گیاه می‌توان استحصال کرد، در یک روز توسط میکروارگانیسم قابل تولید است.

۲- در مقایسه با تولید توسط میکروجلبک، به انرژی خورشید نیاز ندارد.

۳- امکان استفاده از منابع کربن ارزان‌قیمت مانند گلیسرول، هیدروکربن‌های باقی‌مانده و CO_2 وجود دارد [۹].

۴- زمین‌های زراعی اشغال نمی‌شود.

۵- محصول، به دلیل ترشح طبیعی زیست‌پلیمر توسط اغلب میکروب‌های تولیدکننده به آسانی بازیابی می‌شود [۱۰].

معایب یا عامل‌های اصلی محدود کننده تولید زیست‌پلیمر توسط میکروارگانیسم‌ها مربوط به اقتصاد فرایند است. هزینه‌های اصلی فرایند مربوط به خرید زمینه گران‌قیمت در برخی موارد و دستیابی به زیرساخت‌های موردنیاز فرایند مانند خرید زیست‌راکتور و حفظ شرایط سترون است [۱۱].

در جدول ۳ برخی زیست‌پلیمرها به همراه گونه‌های تولید کننده آن‌ها درج شده‌اند.

تولید زیست‌پلیمر میکروبی

برای تولید زیست‌پلیمر میکروبی نیاز است تا باکتری تولید کننده آن زیست‌پلیمر خاص در محیط مناسبی کشت شود و با دادن زمان به فرایند کشت، زیست‌پلیمر موردنظر تولید می‌شود. زیست‌پلیمرها معمولا بعد از فاز رشد میکروبی شروع به تجمع و تشکیل می‌کنند. از جلمه میکروارگانیسم‌های تولید کننده زیست‌پلیمرها می‌توان به استوباکترها، استرپتوکوکوس، آگروباکتریوم‌ها، برخی گونه‌های سودوموناس و زانتاموناس‌ها اشاره کرد.

به‌طورکلی، مراحل تولید زیست‌پلیمر از گونه‌های میکروبی به ترتیب زیر است:

- تهیه مایه تلقیح از میکروارگانیسم مولد زیست‌پلیمر،
- تهیه محیط کشت پایه تولید زیست‌پلیمر،
- سترون‌سازی محیط کشت،
- تلقیح،
- نهفتگی (incubation)،
- استخراج محصول،
- جداسازی سلول‌ها از محیط و
- جداسازی محصول از محیط کشت.

کاهش قیمت تمام شده محصول، به استفاده از محیط کشت ارزان و انجام فرایند در وضعیت بهینه (از نظر رشد یا تولید محصول) نیاز دارد. با توجه به مطالعات انجام شده در باره بهینه‌سازی شرایط تولید زیست‌پلیمر مشخص‌شده است، علاوه بر تأثیر عوامل تغذیه‌ای مهم در فرایند تولید زیست‌پلیمر از قبیل منابع کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد و غیره عوامل فیزیکی و غیرتغذیه‌ای نیز بر فرایند تولید زیست‌پلیمر بسیار مؤثرند.

پلی ساکارید های میکروبی

پلی‌ساکاریدها یا گلیکان‌ها مولکول‌های بزرگی هستند که از چند ده یا هزار واحد مونوساکاریدی مختلف متصل به هم با پیوندهای گلیکوزیدی مختلف (آلفا یا بتا ۴←۱، ۶←۱،۱←۳ و غیره) تشکیل یافته‌اند. پلی‌ساکاریدها، زیست‌پلیمرهای با وزن مولکولی زیادند که از چند مونوساکارید تشکیل شده‌اند. به پلی‌ساکاریدها در مقایسه با خویشاوندان خود یعنی نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها، به‌طور معمول کمتر توجه شده است. این مواد ابتدا به عنوان مواد ساختاری و منبع انرژی متابولیک شناخته شدند. با مطالعات انجام شده درباره شیمی پلی‌ساکاریدها در اوایل قرن ۲۰، نقش اساسی این زیست‌پلیمر در عملکردهای زیستی مشخص شد. با توجه به تنوع بسیار زیاد پلی‌ساکاریدهای باکتریایی در این قسمت، بیشتر روی نمونه‌های تجاری این دسته از پلی‌ساکاریدها تمرکز می‌شود. پلی‌ساکاریدهای تولید شده با باکتری‌ها به سه دسته زیر تقسیم می‌شوند:

- اگزوپلی‌ساکاریدها، مثل زانتان، دکستران، آلژینات، سلولوز، هیالورونیک اسید (HA) و کولانیک اسید که می‌توانند ترشح شده یا به‌طور خارج سلولی با آنزیم‌های چسبیده به دیواره ترشح شوند.
- پلی‌ساکاریدهای درون‌سلولی، مثل گلیکوژن و
- پلی‌ساکاریدهای کپسولی، پادژن K30.

پلی‌ساکاریدها را براساس واحدهای سازنده به گروه‌های زیر تقسیم می‌کنند:

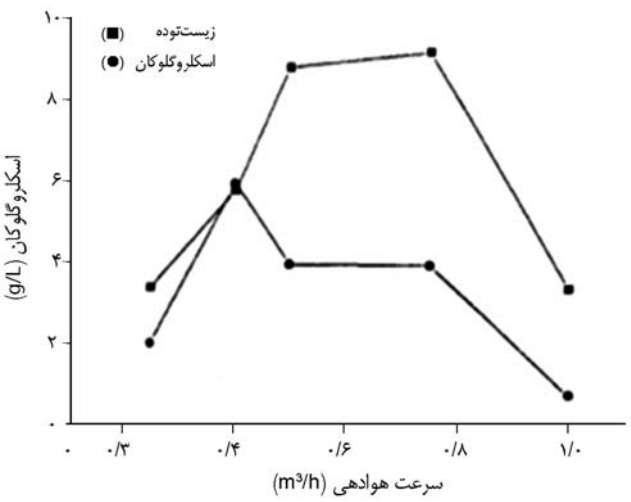
- پلیمرهای با واحدهای تکراری، مثل زانتان و پادژن K30،
- پلیمرهای تکرارشونده، مثل سلولوز و
- پلیمرهای غیرتکرارشونده، مثل آلژینات [۲۶-۲۳].

تشکیل پلی‌ساکاریدها با چنین ساختارهای متفاوت (جدول ۴)، ترکیبات مورد نیاز برای به‌کارگیری آنزیم‌ها و پروتئین‌های لازم برای سازمان‌دهی زیست‌سنتز آن‌ها در خوشه‌های ژنی منعکس‌شده است [۲۲].

با توجه به پژوهش‌ها مشخص شده که پارامترهای فیزیکی از قبیل سرعت هوادهی، سرعت همزدن، دما، pH اثر بسزایی در تولید بهینه زیست‌پلیمر دارند. در ادامه، اثر این پارامترها روی طیف خاصی از پلی‌ساکاریدهای میکروبی بررسی می‌شود.

اثر سرعت هوادهی

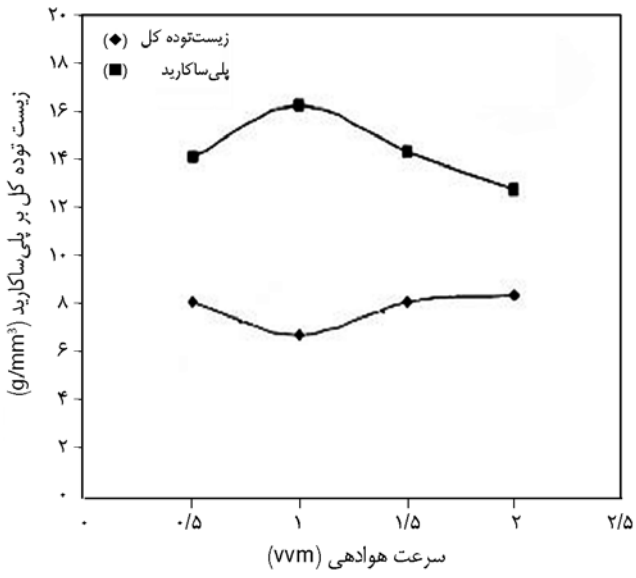
اثر سرعت هوادهی در تولید زیست‌پلیمر اسکلروگلوکان در سال ۲۰۰۰ توسط Kang و همکاران [۱۷] در یک زیست‌راکتور هواران (airlift) بررسی شد. همان‌طور که در نمودار شکل ۲ مشخص است، با افزایش سرعت جریان هوا در محدوده ۰/۲۵ m^3/h تا ۰/۵ m^3/h، چگالی سلولی نهایی افزایش می‌یابد. غلظت زیست‌توده وقتی سرعت جریان هوا بین ۰/۵ m^3/h تا ۰/۷۵ m^3/h به بیشینه مقدار خود می‌رسد (۱۰/۷۸ g/L تا ۱۰/۹۵ g/L). پس از رسیدن سرعت جریان هوا به ۰/۷۵ m^3/h، غلظت بیشینه سلول کاهش می‌یابد، چون با افزایش سرعت جریان هوا ناحیه‌ای با تنش برشی زیاد ایجاد می‌شود که به سلول آسیب می‌رساند. همان‌طور که در شکل ۲



شکل ۲- اثر سرعت‌جریان هوا بر بیشینه غلظت زیست‌توده و اسکلروگلوکان [۱۷].

جدول ۴- طبقه‌بندی پلی‌ساکاریدهای باکتریایی و مشخصات آن‌ها.

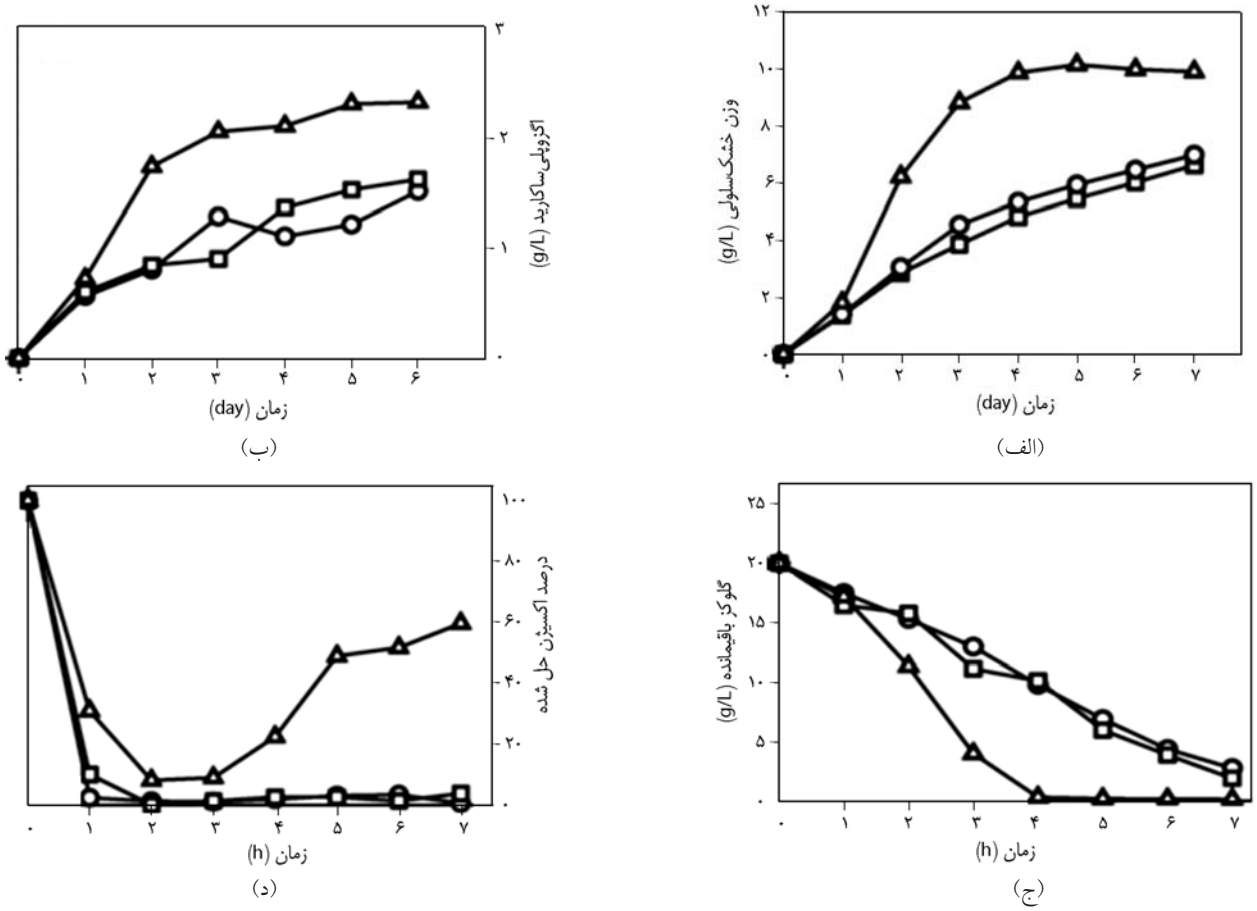
پلیمر	جایگاه پلیمر	ساختار اولیه	ترکیبات اصلی	پیش‌سازها	آنزیم پلیمرکننده	تولیدکننده	کاربرهای صنعتی
گلیکوژن	داخل سلولی	پلیمر همگون با پیوندهای (۱,۴)-α و شاخه‌های با پیوندهای (۱,۶)-α	گلوکوز	ADP-گلوکوز	گلیکوژن سنتتاز (GlgA)	باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها	نامعلوم
آلژینات	خارج سلولی	پلیمر ناهمگون غیرتکراری با پیوندهای(۱,۴)-β	مانورونیک اسید، گلوکورونیک اسید	GDP-مانورونیک اسید	گلیکوزیل ترانسفراز (Alg8)	گونه‌های سودوموناس و آزوباکتر	زیست مواد، به‌عنوان داربست و رهایش کنترل‌شده داروها
زانتان	خارج سلولی	پلیمر ناهمگون با پیوندهای (۱,۴)-β تشکیل‌شده از واحدهای پنتاساکارید	گلوکوز، مانوز و گلوکورونات	UDP-گلوکوز، GDP-مانوز و UDP-گلوکورونات	زانتان پلیمراز (GumE)	گونه‌های زانتوموناس	افزودنی‌های غذایی (به‌عنوان قوام دهنده یا امولسیون کننده)
دکستران	خارج سلولی	پلیمر همگون با پیوندهای(۱,۶)-α و شاخه‌هایی با پیوندهای (۱,۲)-α، (۱,۳)-α و (۱,۴)-α	گلوکوز	ساکاروز	دکستران ساکراز (DsrS)	گونه‌های لئوکونوستوک و استرپتوکوکوس	توسعه‌دهنده پلاسما خون و محیط کروماتوگرافی
کوردلان	خارج سلولی	پلیمر همگون با پیوندهای(۱,۳)-β	گلوکوز	UDP-گلوکوز	کوردلان سنتتاز (CrdS)	گونه‌های آگروباکتریوم، ریزوبیوم و سلولوموناس	افزودنی‌های غذایی (به‌عنوان قوام دهنده یا عوامل ژل کننده)
ژلان	خارج سلولی	پلیمر ناهمگون با پیوندهای (۱,۳)-β تشکیل‌شده از واحدهای تتراساکارید	گلوکوز، رامنوز و گلوکورونات	UDP-گلوکوز، dTDP-رامنوز و UDP-گلوکورونات	ژلان سنتتاز (GelG)	گونه‌های *Sphingomonas*	افزودنی‌های محیط کشت و غذایی (به‌عنوان عامل ژل کننده، مشارکت در فرایندهای کپسولی کردن)
کولانیک اسید	خارج سلولی	پلیمر ناهمگون با پیوندهای (۱,۴)-β تشکیل‌شده از واحدهای هگزاساکارید	فوکوز، گلوکوز، گلوکورونات و گالاکتوز	D-UDP-گلوکوز D-UDP-گالاکتوز D-UDP-گلوکورونات L-GDP فوکوز	کولانیک اسید پلیمراز (WcaD)	گونه‌های اشرشیاکلی، سالمونلا، *Shigella* و *Enterobacter*	نامعلوم
پادژن K30	کپسولی	پلیمر ناهمگون با پیوندهای (۱,۲)-β تشکیل‌شده از واحدهای تتراساکارید	مانوز، گالاکتوز و گلوکورونات	D-UDP-گلوکوز D-UDP-گالاکتوز D-UDP-گلوکورونات	پلی ساکارید پلیمراز(Wzy)	اشرشیاکلای	نامعلوم
سلولوز	خارج سلولی	پلیمر همگون با پیوندهای(۱,۴)-α	D-گلوکوز	D-UDP-گلوکوز	سلولوزسنتاز (BcsA)	باکتری‌های آلفاپروتئو، بتاپروتئو، گاماپروتئو و باکتری‌های گرم مثبت	مواد غذایی، دیافراگم مبدل صوتی و ترمیم‌کننده زخم‌ها
هیالورونیک اسید	خارج سلولی	پلیمر ناهمگون با پیوندهای (۱,۴)-β تشکیل‌شده از واحدهای دی ساکارید	گلوکورونات و *N*- استیل گلوکوز آمین	D-UDP- گلوکورونات و N-UDP-استیل گلوکوز آمین	هیالوران سنتتاز (HasA)	گونه‌های استرپتوکوکوس و پاستئورلامالتوسیدا	آرایشی بهداشتی، مکمل‌های گرانرو، ترمیم‌کننده بافت‌ها و رهایش کنترل‌شده داروها



شکل ۳- اثر سرعت هوادهی بر تولید پولولان و زیست‌توده کل [۱۸].

مشخص است، غلظت اسکلروگلوکان با افزایش سرعت‌جریان هوا از $0/25\ m^3/h$ تا $0/4\ m^3/h$ افزایش و سپس با افزایش سرعت‌جریان هوا کاهش می‌یابد. بیشینه مقدار اسکلروگلوکان در سرعت هوادهی $0/4\ m^3/h$ برابر $7/93\ g/L$ بوده و با افزایش سرعت هوادهی در $1\ m^3/h$ به مقدار $2/75\ g/L$ رسیده است. در اینجا هم به دلیل افزایش سرعت هوادهی به سلول آسیب می‌رسد، درنتیجه سلول‌ها قابلیت کمتری برای تولید اسکلروگلوکان دارند [۱۷].

در سال ۲۰۰۵، Gaidhani [۱۸] اثر سرعت هوادهی را روی تولید زیست‌پلیمر پولولان در یک زیست‌راکتور نوسانی مانع‌دار مطالعه کرد. سرعت‌های هوادهی بررسی شده ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ vvm بود. شکل ۳ اثر هوادهی‌های مختلف را بر تولید زیست‌پلیمر پولولان و همچنین زیست‌توده کلی را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۵ vvm تا ۱ vvm زیست‌توده به کمینه مقدار خود یعنی $6/68\ g/dm^3$ رسیده و سپس با افزایش سرعت هوادهی تا ۲ vvm به دلیل اکسیژن‌رسانی بهتر، زیست‌توده بیشتری تولید می‌شود. همچنین، تولید پولولان برعکس زیست‌توده بوده و با افزایش سرعت هوادهی از ۰/۵ vvm تا ۱ vvm به بیشینه



شکل ۴- نمودار غلظت: (الف) وزن خشک سلولی، (ب) EPS، (ج) گلوکوز باقی‌مانده و (د) DO% در سرعت‌های هوادهی (□) ۰/۵، (○) ۱ و (Δ) ۲ vvm در راکتور STR [۱۹].

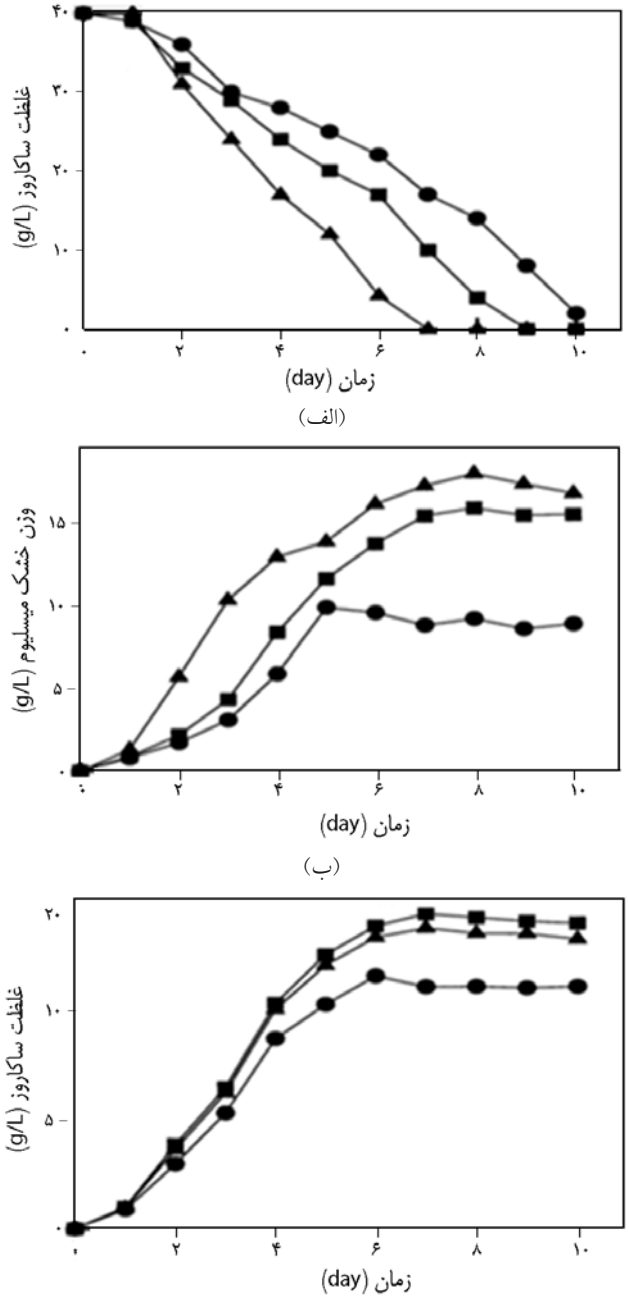
مقدار خود یعنی ۱۶/۱۷ g/dm^3 می‌رسد. سپس، با افزایش سرعت هوادهی تا vvm ۲ کاهش یافته است. دلیل اینکه تولید پولولان با سرعت هوادهی بیشتر از vvm ۱ کاهش می‌یابد، این است که سلول‌ها با افزایش هوادهی ساکاروز بیشتری مصرف می‌کنند (به علت تنفس سلولی زیاد) که منجر به کاهش ساکاروز موجود برای سنتز پولولان می‌شود. دلیل دیگر اینکه محدودیت اکسیژن عامل محرکی برای تولید پولولان است. شاید دلیل تولید زیاد پولولان در vvm ۱ نسبت به vvm ۱/۵ و vvm ۲ همین مسئله باشد. بنابراین نتیجه نشان می‌دهد، بهینه سرعت هوادهی vvm ۱ است [۱۸].

در سال ۲۰۰۶، Cho و همکاران [۱۹] اثر سرعت هوادهی را روی رشد سلول و EPS تولیدی از گونه ترملا فوسیفورمیس (*Tremellafuciformis*) در زیست‌راکتور همزن‌دار آزمایش کردند. در اینجا بیشترین غلظت جرم سلول (۱۰/۱۲ g/L) و تولید EPS (۲/۳۲ g/L) در هوادهی vvm ۲ است (شکل۴). همچنین درصد اکسیژن حل شده (DO) در هوادهی‌های آزمون شده از ٪۱۰۰ در آغاز کشت به حدود ٪۱۰-۰ پس از h ۳-۲ رسیده است. فقط در سرعت هوادهی vvm ۲، درصد DO به سرعت افزایش یافته است. در اینجا رشد وارد مرحله سکون شده و درصد DO بیش از ٪۵۰ در انتهای کشت مشاهده می‌شود (شکل ۴-د). دیده می‌شود، نگه‌داری درصد زیاد DO هم برای رشد سلول هم برای تولید EPS مهم است [۱۹].

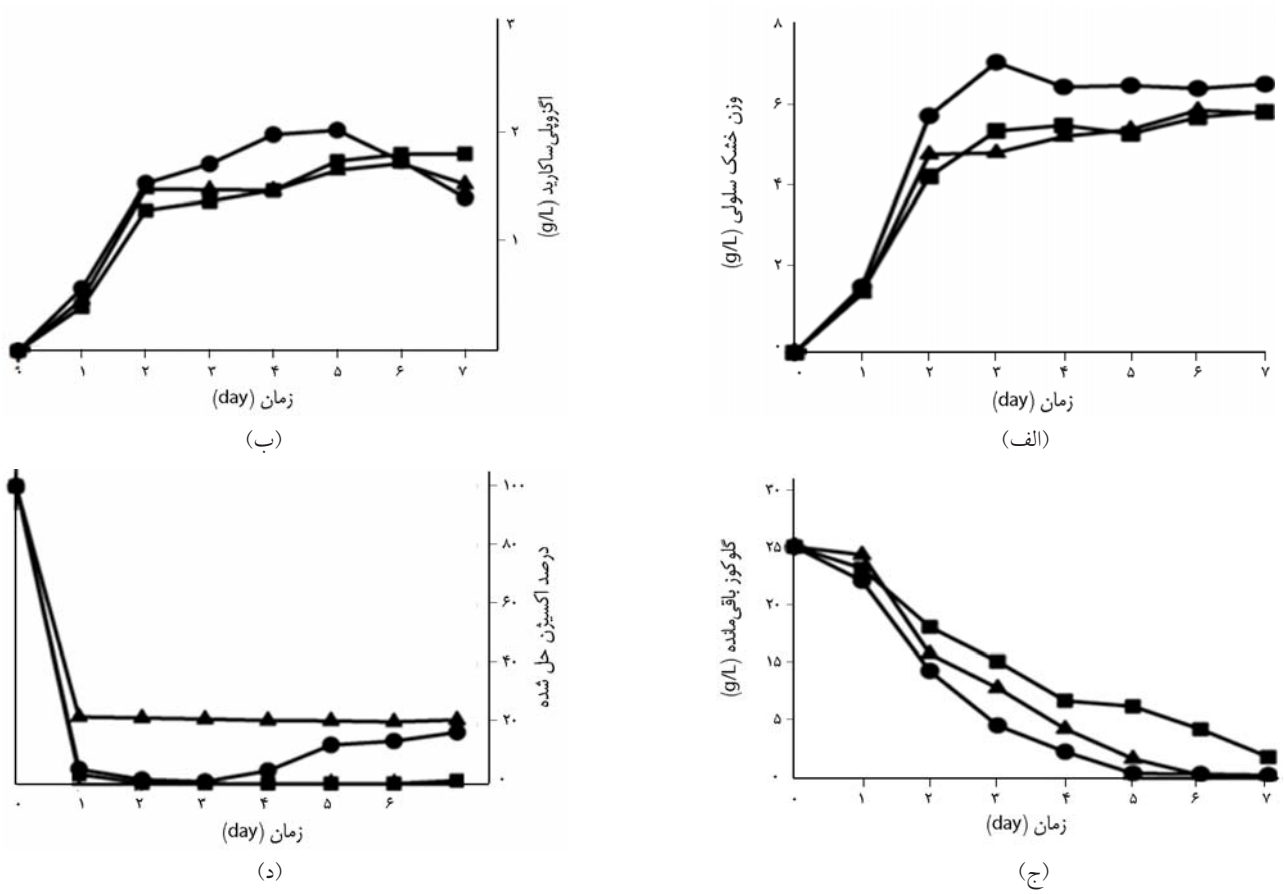
شکل ۵ نتیجه آزمایش‌های Park و همکاران [۲۰] را در سال ۲۰۰۱، روی اثر سرعت هوادهی بر EPS تولیدی از گونه کوردیسپس مایلیتاریس (*Cordycepsmilitaris*) نشان می‌دهد. شکل ۵-الف در سرعت هوادهی‌های مختلف مصرف ساکاروز را برحسب زمان نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشخص است، غلظت ساکاروز باقی‌مانده به سرعت در طول تخمیر کاهش یافته است که متناسب با آن زیست‌توده و تولید اگزوزیست‌پلیمر افزایش می‌یابد. در هوادهی vvm ۴ تقریباً تمام منبع ساکاروز مصرف می‌شود. در حالی که در همین مدت زمان مقادیر ۱۷ و g/L ۱۰ ساکاروز در محیط کشت به ترتیب در هوادهی‌های ۰/۵ و vvm ۲ باقی می‌ماند.

شکل ۵-ب به وضوح نشان می‌دهد، در بیشترین سرعت هوادهی یعنی vvm ۴ رشد میسلی افزایش یافته است. همان‌طور که در شکل مشخص است، بیشینه رشد میسل‌ها در ۰/۵، ۲ و vvm ۴ به ترتیب ۵، ۸ و ۸ روز است و پس از آن ثابت می‌ماند. بیشینه اگزوزیست‌پلیمر (۱۴/۵ g/L) در سرعت هوادهی vvm ۲ است، درحالی‌که افزایش یا کاهش سرعت هوادهی باعث کاهش تولید اگزوزیست‌پلیمر می‌شود (شکل ۵-ج).

شایان ذکر است، ترکیبی از غلظت اکسیژن محلول با شکل‌شناسی مطلوب نقش مهمی در تولید اگزوزیست‌پلیمر دارد. در اینجا سطح DO در سرعت هوادهی vvm ۲ از ٪۱۰۰ اشباع در آغاز تخمیر به حدود ٪۱۵ در ۲ تا ۳ روز رسیده که از این زمان به بعد سطح DO در طول تخمیر در ٪۷۶ باقی‌مانده است [۲۰].



شکل۵- نمودار زمان برحسب: (الف) مصرف ساکاروز، (ب) رشد میسلی و (ج) تولید اگزوزیست‌پلیمر در سرعت هوادهی‌های (●) ۰/۵، (■) ۲ و (▲) vvm ۴ [۲۰].



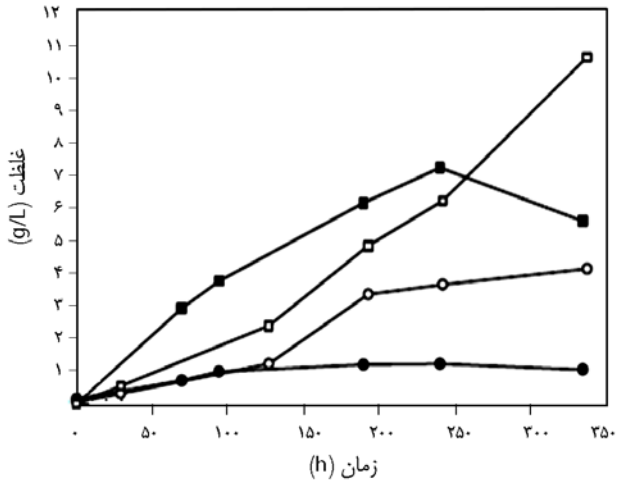
شکل ۶- نمودار غلظت: (الف) وزن خشک سلولی، (ب) EPS، (ج) گلوکوز باقی‌مانده و (د) DO% در سرعت‌های همزدن (■) ۵۰، (●) ۲۰۰ و (▲) ۴۰۰ rpm در راکتور STR [۱۹].

اثر سرعت همزدن

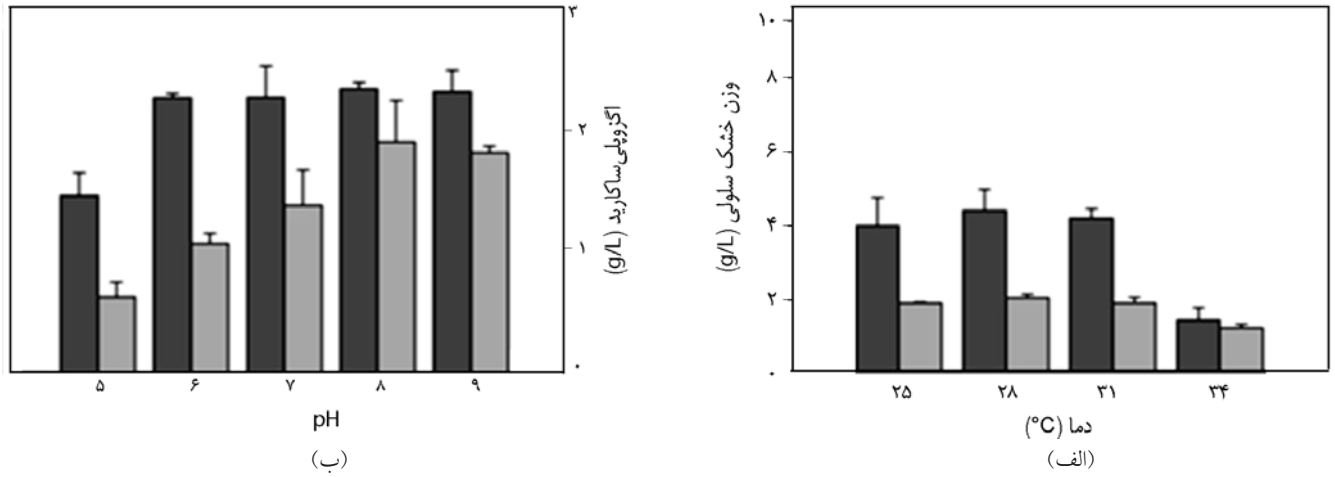
به دلیل پیچیدگی رئولوژیکی محیط تخمیر پلی‌ساکارید، سرعت همزدن بر مقدار حرکت و نیز بر سرعت انتقال اکسیژن اثر می‌گذارد.

در سال ۲۰۰۶، Cho و همکاران [۱۹] اثر سرعت همزدن را روی رشد سلول و EPS تولیدی از گونه ترملا فوسیفورمیس در زیست‌راکتور همزن‌دار مطالعه کردند. برای بررسی اثر سرعت همزدن در زیست‌راکتور STR، میکروارگانیسم تحت سه سرعت همزدن مختلف کشت داده شد. همان‌طور که در شکل ۶ مشخص است، بیشینه غلظت سلول (۷/۰۳ g/L) و بیشینه تولید EPS (۲ g/L) در سرعت همزدن ۲۰۰ rpm به‌دست آمده است. همچنین در زمان‌های ابتدایی کشت، در یک سرعت همزن ۵۰ rpm، DO در سطوح خیلی کم قرار دارد که منجر به بازده تولید کم EPS و جرم سلولی می‌شود (شکل ۶-د). بیشترین تولید EPS و جرم سلولی در ۲۰۰ rpm به‌دست آمده است، جایی که سرعت رشد ویژه (μ) و بازده تولید محصول به مصرف زمینه (Yp/s) به ترتیب $۰/۲۵\ d^{-1}$ و ۰/۰۹ g/g بوده است [۱۹].

در سال ۲۰۰۳، Lopez [۲۱] اثر سرعت همزدن را بر تولید پلی‌ساکارید خارج‌سلولی از گونه ارتروباکترویسکوزوس (Arthro-bacterviscosus) بررسی کرد.



شکل ۷- اثر سرعت‌های همزدن: (□) ۶۰۰ rpm و (■) ۸۰۰ rpm، (○) بر تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی (●) و زیست‌توده [۲۱].



شکل۸- (الف) اثر دما و (ب) pH اولیه روی رشد سلول و تولید EPS [۱۹].

سرعت همزدن هم روی مقدار حرکت در محیط تخمیر پلی‌ساکارید، به دلیل پیچیدگی رئولوژیکی آن و هم بر سرعت انتقال اکسیژن اثر می‌گذارد. برای بررسی اثر سرعت‌های همزدن محیط در اینجا سرعت‌های بین rpm ۸۰۰-۱۰۰ با توجه به مقدار توان زیست‌راکتور به‌کار رفته، انتخاب شده است. افزایش رشد سلول و تولید پلی‌ساکارید خارج‌سلولی در اثر افزایش سطح اکسیژن محلول (DO) است.

شکل ۷ در سرعت همزدن‌های rpm ۶۰۰ و rpm ۸۰۰ مقدار تولید را نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل مشخص است، با افزایش سرعت تا rpm ۸۰۰ مقدار تولید زیست‌پلیمر به حداکثر مقدار خود در مقایسه با rpm ۶۰۰ رسیده است. با توجه به این نتایج می‌توان گفت، تولید زیست‌پلیمر متأثر از سرعت همزدن است [۲۱].

اثر دما و pH

Cho و همکاران [۱۹] اثر دما و pH را بر رشد سلول و EPS تولیدی از گونه ترملا فوسیفورمیس در زیست‌راکتور همزن‌دار مطالعه کردند. برای دست‌یابی به دمای بهینه تولید EPS و رشد سلول، سویه در دماهای ۲۵، ۲۸، ۳۱ و ۳۴°C کشت داده شد.

همان‌طور که در شکل ۸-الف مشخص است، ۲۸°C دمای بهینه برای رشد سلول و تولید EPS است. همچنین در شکل ۸-ب، pHهای مختلف در محدوده ۹-۵ بررسی‌شده‌اند. دیده می‌شود، تفاوت چشم‌گیری در رشد سلول‌ها در pHهای مختلف وجود دارد و بیشترین مقدار تولید EPS در pHهای ۸ و ۹ است.

نتیجه‌گیری

محصولات پلی‌ساکاریدی تولیدی باکتری‌ها گستره وسیعی از مواد باارزش و مقرون به‌صرفه را با کاربردهای متنوع در داروسازی و صنایع غذایی به‌دست می‌دهد که هیچ‌گونه مشکلی از لحاظ سمیت و مضر بودن ندارند. با توجه به این‌که زیست‌پلیمرها از موجودات زنده از قبیل گیاهان، جانداران و میکروارگانیسم‌ها به‌طور طبیعی تولید می‌شوند، از لحاظ زیست‌محیطی نیز تجزیه‌پذیر و بسیار مناسب‌اند. این مواد بخش مهمی از اعمال اکوسامانه‌ای را بر عهده دارند. زیست‌پلیمرها به دلیل قابلیت تجزیه‌زیستی، مجدداً توسط خود موجودات مصرف می‌شوند. به عبارتی، طی روش‌های حفاظتی و اکولوژیکی مانند تولید کود، جذب در خاک و عمل‌آوری‌های زیستی، تجزیه می‌شوند. درواقع این مواد، چرخه تولید و تجزیه را طی می‌کنند. امروزه، مواد زیست‌پلیمری در شکل‌های گوناگونی توسعه‌یافته‌اند. بنابراین، ظرفیت استفاده در صنایع گوناگون را دارند. به منظور استفاده از زیست‌پلیمرها در صنایع، تجاری کردن فرایند تولید و بهینه‌کردن تولید لازم است. تجاری کردن فرایند تخمیر، مستلزم اقتصادی کردن فرایند و کاستن هزینه‌هاست. کاهش قیمت تمام شده محصول، به استفاده از محیط کشت ارزان و انجام فرایند در وضعیت بهینه (از نظر رشد یا تولید محصول) نیاز دارد. با توجه به مطالعات انجام‌شده درباره بهینه‌سازی شرایط تولید زیست‌پلیمر مشخص‌شده است، افزون بر اثر عوامل تغذیه‌ای مهم در فرایند تولید زیست‌پلیمر از قبیل منابع کربن، نیتروژن، فسفر، گوگرد و غیره عوامل فیزیکی و غیرتغذیه‌ای نیز در فرایند تولید زیست‌پلیمر مؤثرند. با توجه به پژوهش‌ها مشخص‌شده است، پارامترهای

فیزیکی از قبیل دما، pH، سرعت هوادهی و همزدن اثر بسزایی در تولید زیست‌پلیمر دارند. از پارامترهای بسیار مهم در تولید زیست‌پلیمرها pH است. پژوهش‌ها نشان می‌دهند، اکثر گونه‌های تولید کننده زیست‌پلیمر در pH خنثی رشد بهینه دارند. این در حالی است که pH بهینه برای تولید زیست‌پلیمرها متمایل به اسیدی است (در محدوده ۸–۵). اکثر گونه‌های تولید کننده زیست‌پلیمر، هوازی هستند، از این‌رو پارامتر مهم دیگر سرعت هوادهی است. در مطالعات مقادیر بین vvm ۳–۰/۵ برای تولید زیست‌پلیمر گزارش شده است. همزدن مناسب نیز باعث ایجاد محیط یکنواخت و در نتیجه انتقال جرم بهتر مواد در محلول‌های گرانرو ناشی از غلظت زیاد سلولی می‌شود. بنابراین، پارامتر سرعت همزدن هم اثر مهمی بر تولید زیست‌پلیمر دارد. در مطالعات مقادیر بین rpm ۸۰۰–۲۰۰ پیشنهاد شده است. با توجه به پژوهش‌ها مشخص‌شده است، اکثر گونه‌های تولید کننده زیست‌پلیمر در دمای بین ۳۲°C–۲۷ رشد بهینه دارند. این در حالی است که دمای بهینه برای تولید زیست‌پلیمرها نیز در همین محدوده است که باید دمای بهینه نیز برای تولید زیست‌پلیمر بررسی شود. بنابراین، باید pH، سرعت همزدن، هوادهی و نیز دمای بهینه برای تولید جست‌وجو شوند.

مراجع

1. Hardman R.C., *Biopolymer: Making Materials Nature's Way,* Office of Technology Assessment, 1993.
2. Kaplan D.L., Swift G., and Narayan R., *Naturally Occurring Biodegradable Polymers, Polymer Systems-Synthesis and Utility*, Hanser, New York, 1994.
3. Jonas R. and Farrah L.F., Production and Application of Microbial Cellulose, *Polym. Degrad. Stabil.*, **59**, 101-106, 1998.
4. Pichavant L., *Syntheseetreactivite de Monomereissus de Resources Renouvelables Pour la Polymerization Radicalaire,* Ph.D Thesis, Technologieet Santé Reims: Universite de Reims Champagne-Ardenne, 259, 2009.
5. Reddy N. and Yang, Y., Biofibers from Agricultural by Products for Industrial Applications, *Trends Biotechnol.*, **23**, 22-27, 2005.
6. Donotaba F., Fontanaab A., Baccoua J.C., and Schorr-Galindo S., Microbial Exopolysaccharides: Main Examples of Synthesis, Excretion, Genetic Sand Extraction, *Carbohyd. Polym.*, **87**, 951-962, 2012.
7. Vandamme E.J., De Baets S., and Steinbuchel E., *Biopolymers, Polysaccharides I: Polysaccharides from Porokaryotes,* Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
8. Lin E.S. and Chen Y.H., Factors Affecting Mycelial Biomass and Exopolysaccharides Production in Submerged Cultivation of Antoridacinnamomea Using Complex Media, *Bioresource Technol.*, **98**, 2511-2517, 2007.
9. López C.G., Fernández F.A., Sevilla J.F., Fernández J.S., García M.C., and Grima E.M, Utilization of the Cyanobacteria Anabaena sp. ATCC33047 in CO_2 Removal Processes, *Bioresource Technol.*, **100**, 5904-5910, 2009.
10. Bejar V., Llamas I., Calvo C., and Quesada E., Charactrization of Exopolysaccahredes Produced by 19 Halophilic Strains of the Species Halomonaseurihalina, *J. Biotechnol.*, **61**, 135-141, 1998.
11. Dudman W.F., *The Role of Surface Polysaccharides in Natural Enviroments, Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell,* Sutherland I.W. (Ed.), 357-454, 1977.
12. Leonardo S.M., Gill M.C., and Delgadillo I., Parcial Charachterisation of Exopolysaccharides Exudated by Planktonic Diatoms Maintained in Batch Calture, *Acta Oecologic*, **24**, 49- 55, 2003.
13. Emtiazi J., Etemadifar Z., and Tavassoli, M., A Novel Nitrogen-fixing Cellulytic Bacterium Associated with Root of Corn is a Candidate for Production of Single Cell Protein, *Biomass Bioenergy*, **25**, 423-426, 2013.
14. Stredansky M., Conti E., Bertocchi C., Matullova M., and Zanetti F., Succinogly can Production by Agrobacterium Tumefaciens, *J. Ferementation Bioenergineerinf*, **85**, 398-403,1998.
15. Shih I.L., Chen L.D., and Wu J.Y., Levan Production Using Bacillus Subtilinatton Cells Immobilized on Alginate, *Carbohyd. Polym.*, **82**, 111-117, 2010.
16. Poly A. et al., High Level Synthesis of Levan by Novel Halomonas Species Growing on Defined Media, *Carbohyd. Polym.*, **78**, 651-657, 2009.
17. Kang X., Wang Y., Harvey L.M., and Mcneil B., Effect of Air Flow Rate on Scleroglucan Synthesis by Sclerotiumglucani-

cum in an Airlift Bioreactor with an Internal Loop, *Bioproc. Eng.,* **23**, 69-74, 2000.

18. Gaidhani H.K., Mcneil B., and Ni X., *Fermentation of Pullulan Using an Oscillatory Baffled Fermenter*, *Chem. Eng. Res. Design.*, **83**, 640-645, 2005.
19. Cho E.J., Oh J.Y., Chang H.Y., and Yun J.W., *Production of Exopolysaccharides by Submerged Mycelial Culture of a Mushroom Tremellafuciformis*, *J. Biotechnol.*, **127**, 129-140, 2006.
20. Park J.P., Kim Y.M., Kim S.W., and Jin Hwang H., *Effect of Aeration Rate on the Mycelial Morphology and Exo-Biopolymer Production in Cordycepsmilitaris. Proces Biochem.,* **37**, 1257-1262, 2002.
21. Lopez E., Ramos I., Sanroman M.A., *Extracellular Polysaccharides Production by Arthrobacterviscosus. J. Food Eng.,* **60**, 463-467, 2003.
22. Rehm, B.H. Bacterial Polymers: Biosynthesis, Modifications and Applications, *Nature Rev. Microbiol.*, **8**, 578-592, 2010.
23. Whitfield C., Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in Escherichia Coli, *Annu. Rev. Biochem.,* **75**, 39-68, 2006.
24. Becker A., Katzen F., Pühler A., and Ielpi, L., Xanthan Gum Biosynthesis and Application: A Biochemical/genetic Perspective, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 145-152, 1998.
25. Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors: Applications and Perspectives, Rehm B.H. (Ed.), Horizon Scientific, UK, 2009.
26. Remminghorst U., and Rehm B.H., Bacterial Alginates: From Biosynthesis to Applications, *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1701-1712, 2006.