إنتاج سكر الزانثان من عزلات برية لبكتريا *Xanthomonas campestris* ودراسة الظروف المثلى لإنتاجه

عبد الجبار عمر قوجة
قسم الصناعات الغذائية
كلية الزراعة / جامعة صلاح الدين
أربيل – العراق

موفق محمود أحمد
قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية
كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل
الموصل – العراق

الخلاصة

شملت الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *Xanthomonas campestris* من أوراق وأزهار وجذور نبات القرنبيط المصابة والتربة التي زرع فيها النبات. اختبرت قابلية العزلات على إنتاج الزانثان وتم دراسة تأثير مكونات الوسط الزرعي وتأثير درجة حرارة الحضن والأس الهيدروجيني للوسط وسرعة التحريك لمعرفة أفضل الظروف الملائمة للإنتاج. امتازت أربعة عزلات من البكتريا *X. campestris* من بين ٢٠ عزلة بمقدرتها على إنتاج الزانثان وبكمية تراوحت ٧ – ٩.٤ غم / لتر من الوسط Luria-bertani medium (LBG) الحاوي على ٢.٥% كلوكوز و٠,٥% خلاصة الخميرة وذو أس هيدروجيني أولي ٧ وبسرعة تحريك بلغت ٢٠٠ دورة/الدقيقة وعلى درجة حرارة حضن ٢٨ ْم ولمدة ٧٨ ساعة،تميزت الأوساط بعد انتهاء مدة الحضن باللزوجة العالية مع ارتفاع في الأس الهيدروجيني بنسبة تراوحت بين ١٥.٧ – ١٨.٦% للعزلات الأربعة كما تميز الزانثان الناتج بقابليته على تكوين هلام مطاطي مع صمغ الخرنوب (Locust bean gum) وتراوحت نسبة ارتباط البايروفيت بالزانثان المتكون ١.٢٥ – ١.٤٠% .

المقدمة

بكتريا *Xanthomonas campestris* هي بكتريا عصوية الشكل وسالبة لصبغة كرام وهوائية وتتحرك باسواط أحادية القطب . مستعمراتها ناعمة ولزجة وصفراء اللون لوجود صبغة Xanthomnadine الذائبة بالدهون التي تحمي البكتريا من أشعة الشمس (Holt وآخرون، ١٩٩٤). تصيب البكتريا النباتات مثل القرنبيط واللهانة وتعد من الممرضات النباتية الشائعة (Ignatov وآخرون،٢٠٠٣) . كما أنها تعد مهمة صناعياً كونها تنتج السكر المكوثرالخارجي الزانثان والذي يدخل في الكثير من الصناعات الغذائية. الزانثان هو سكر مكوثر وهو أول سكر مكوثر من اصل بكتيري تم إنتاجه بنجاح وبشكل تجاري باستخدام التخمرات (Casas و آخرون، ٢٠٠٠ : Papaganni وآخرون، ٢٠٠١). تتكون السكريات المكوثرة المكروبية من سكريات أحادية وسكريات أمينية وأحماض سكرية وهي المسؤولة عن إعطاء الشحنة السالبة لهذه السكريات (Sutherland ، ٢٠٠٢ : Becker ، ٢٠٠٤). كما تحتوي هذه السكريات على البايروفيت والخلات وهما مسؤولان عن تكوين الأواصر الأسترية في هذه السكريات. بدأ في عام ١٩٦٠ أول إنتاج صناعي للزانثان وفي عام ١٩٦٤ انتجت هذه المادة بشكل تجاري، وأعطي في عام ١٩٦٩ ترخيص باستعمالها في الأغذية المعلبة والمجمدة والمشروبات الخفيفة المطعمة بالفواكه من قبل دائرة الأغذية والعقاقير الأمريكية (FDA) وأعطي الترخيص نفسه في فرنسا عام ١٩٧٨ ورخص استعمالها في عام ١٩٨٢ في عموم أوربا في الأغذية تحت رقمE415 (Karin وآخرون، ٢٠٠٠).

تتمكن الأحياء المجهرية من تحويل مختلف مصادر الكربون مثل الكربوهيدرات والأحماض الأمينية والدهنية والهيدركربونات ونواتج التمثيل الحيوي إلى السكريات المكوثرةويعتمد تركيب هذه السكريات بشكل عام على مصدر الكاربون المستعمل والذي يؤثر بالتالي في نوعية الإنتاج (Vandam وآخرون، ١٩٩٧). أما مصادر النتروجين التي تستعمل في إنتاج السكريات المكوثرة هي أملاح الأمونيا والأحماض الأمينية والنترات (Souw و Demain ، ١٩٧٩)ويجب إضافة هذه المصادر بتراكيز متوازنة مع مصادر الكاربون لزيادة قابلية البكتريا على إنتاج الزانثان. يعد الأوكسجين عاملاً هاماً في تحديد قابلية البكتريا على إنتاج الزانثان. إن بكتريا *X. campestris* هي هوائية وأن إنتاج الزانثان هي عملية هوائية أيضاً لذا فمن الضروري توفير الأوكسجين من خلال

تحريك الوسط وبالأخص في المراحل النهائية للإنتاج عندما يزداد تركيز الزانثان وترتفع لزوجة الوسط فتسبب إعاقة انتقال الأوكسجين إلى الخلايا البكتيرية (Patel و Bellmer ، ٢٠٠١).

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.
تاريخ تسلم البحث ٢ / ٣ / ٢٠٠٥ وقبوله ١٥ / ٦ / ٢٠٠٥ .

تزداد الكتلة الحيوية ومعدل إنتاج الزانثان بارتفاع درجة الحرارة لحد ٢٨°م (Casas وآخرون، ٢٠٠٠) وعند هذه الدرجة فأن نسبة البايروفيت والخلات المرتبطتان في الزانثان تصلان إلى أعلى مستوى لهما ويكونان أقل ما يمكن عند حرارة ٣٤°م (Shu وآخرون، ١٩٩٠)، كما وجد أن تركيز الزانثان ووزنه الجزيئي يرتفعان بزيادة مدة التخمر (Shu وآخرون، ١٩٩٢ : Flores وآخرون، ١٩٩٤). من العوامل الأخرى التي تؤثر في إنتاج سكر الزانثان هو الأس الهيدروجيني (pH) للوسط إذ تلعب حموضة الوسط دوراً مهماً في المراحل الإنتاجية، وقد وجد بأن أفضل pH لوسط الإنتاج يتراوح بين ٦.٠ – ٧.٥ (Lella و Sharma، ٢٠٠٠).

استهدفت الدراسة عزل وتشخيص البكتريا *X. campestris* من أوراق وأزهار وجذور نبات القرنبيط فضلاً عن التربة التي زرع فيها النبات واختبار قابلية العزلات على إنتاج الزانثان ومعرفة الظروف المثالية لإنتاجه من خلال دراسة تأثير مكونات الوسط من مصادر الكربون والنتروجين والظروف الفيزيائية مثل درجة الحرارة والأس الهيدروجيني للوسط ومدة الحضن والتحريك. كما هدف البحث أيضاً دراسة المعالم الحركية للزانثان المنتج.

مواد وطرق البحث

عزل بكتريا *X. campestris* : عزلت البكتريا من أوراق القرنبيط التي حدث فيها اسمرار ومن الأزهار والجذور وكذلك من التربة التي زرع فيها النبات في محافظة أربيل. وضع ٥ غم من العينات في دوارق احتوت على٢٠٠ مل من المرق المغذي (Nutrient broth) وحضنت على حرارة ٢٨°م لمدة ٧٢ ساعة ثم أخذ ١مل وتم فرشه على وسط الآكار المغذي (Nutrient agar). حضنت الأطباق على حرارة ٢٧ – ٢٨°م لمدة ٣-٤ أيام ثم عزلت المستعمرات ذات القوام اللزج (Mucoid) واللون أصفر على وسط الآكار المغذي المائل.

الفحوصات التشخيصية للعزلات: أجريت فحوصات تشخيصية على عزلات البكتريا وشملت الاختبارات المذكورة في Holt وآخرون (١٩٩٤) وهي: صبغة كرام وصفات المستعمرات على وسط الآكار المغذي والحاوي ٥ % كلوكوز وإختبارات الحركة وإختزال النترات والاوكسيديز (Oxidase test) والكاتليز (Catalase test) وتحلل النشأ والجلاتين وإنتاج كبريتيد الهيدروجين وتحمل الملوحة (٢-٥ %) وتخمر السكريات وشملت سكريات الأرابنوس والمانوز والكالاكتوز والسيللوبايوز والفركتوز واجريت هذه الفحوصات استناداً إلى ما جاء في Bradshaw (١٩٧٩).

إختبار قابلية العزلات على إنتاج الزانثان: اختبرت قابلية العزلات والبالغة ٢٠ عزلة من المصادر المختلفة على إنتاج الزانثان وذلك بتحضير المزرع الخزين (Stock culture) من العزلات وذلك بزرع البكتريا على وسط MacConky agar والحضن لمدة ٢-٣ يوماً على حرارة ٢٨°م. أخذت مستعمرة ونقلت إلى دورق احتوى ٢٠٠ مل من الوسط LBG ذو أس هيدروجيني ٧ ثم حضنت على ٢٨°م لحين وصول الكثافة الضوئية إلى ٠.٨ باستخدام جهاز المطياف (Spectrophotometer) نوع Shemadzu (اليابان) على طول موجة ٦٠٠ نانوميتر. وضع ١٠٠ مل من وسط الإنتاج LBG (pH=٧) والحاوي على ١.٥% كلوكوز، ثم لقح بعد التعقيم والتبريد بإضافة ١٠مل من المزرع الخزين ثم حضنت على حرارة ٢٨°م لمدة ٧٢ ساعة (Papagnni وآخرون، ٢٠٠١). تم استخلاص الزانثان المنتج باستخدام الكحول الأثيلي (٩٥ %) وذلك بإضافة ٣ حجوم منه إلى حجم واحد من المزرعة وجمع الراسب باستخدام جهاز الطرد المركزي (LABO FUGE 1) (٥٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ٢٠ دقيقة) ووضع في كأس معلوم الوزن.جفف الراسب بالفرن على حرارة ٨٠°م ثم وزن الناتج،تم حساب معامل الإنتاج (Yield coefficient, Yp) لكل عزلة بالمعادلة الآتية:

$$Yp = \text{Xanthan produced (g)} / \text{glucose consumed (g)}$$

على افتراض أن البكتريا استهلكت جميع الكلوكوز والبالغة كميته ١٥غم / لتر من الوسط الزرعي (Vandam وآخرون، ١٩٩٧). اتبعت طريقة Codex (٢٠٠٢) للكشف عن الزانثان المنتج وذلك بوضع ٣٠٠ مل ماءً مقطراً في كأس وسخن إلى حرارة ٨٠ْم مع التحريك بالخلاط المغناطيسي ثم أضيف ١.٥ غم من النموذج و ١.٥غم من صمغ الخرنوب (Locust bean gum) المجهز من شركة Alpha الهندية واستمر الخلط لمدة نصف ساعة (درجة الحرارة خلال العملية لم تنخفض عن ٦٠ ْم)، بعدها ترك المحلول ليبرد إلى درجة حرارة الغرفة، ثم لوحظ تكون هلام مطاطي قوي (Firm rubbery gel) عندما انخفضت درجة الحرارة إلى اقل من ٤٠ ْم.

دراسة الظروف المثالية لإنتاج الزانثان :

١- تأثير مكونات الوسط الزرعي:

أ- نوع وتركيز مصدر الكربون: حضر ١٠٠مل من وسط LBG (pH=٧) بتراكيز صفر و٠.٥ و١.٠ و١.٥ و٢.٠ و٢.٥ و٣.٠ و ٣.٥ و٤.٠ % من كل من الكلوكوز والكالاكتوز والسكروز والمالتوز والمانوز واللاكتوز والنشا. لقحت الأوساط بإضافة ١٠مل من المزرو الخزين ثم حضنت على حرارة ٢٨ْم لمدة ٧٢ ساعة واستخلص وقدر الزانثان المنتج.

ب- نوع وتركيز مصدر النتروجين: حضر ١٠٠ مل (لكل مصدر نتروجين) من وسط LBG (pH=٧) بتراكيز ٠.١ و٠.٢ و٠.٣ و٠.٤ و٠.٥ % من كل من خلاصة الخميرة وكبريتات الأمونيوم ونترات الصوديوم واليوريا مع تثبيت تركيز سكر الكلوكوز (٢.٥ %) ثم لقحت الأوساط بإضافة ١٠ مل من المزرو الخزين وحضنت على حرارة ٢٨ْم لمدة ٧٢ ساعة وبعدها استخلص وقدر الزانثان المنتج.

ت- مدة الحضن: حضر ١ لتر من الوسط LBG (pH=٧) باستخدام ٢.٥ % من الكلوكوز و ٠.٥ % خلاصة الخميرة ولقح الوسط بإضافة ١٠٠مل من المزرو الخزين وحضن على حرارة ٢٨ْم ثم أخذت عينات بكمية ٥٠ مل من المزرعة البكتيرية بعد كل ٦ ساعات وأستخلص الزانثان المنتج فيها ولغاية ٧٢ ساعة من بداية التلقيح.

ث- درجة حرارة الحضن: حضر ١٠٠ مل (لكل درجة حرارة) من الوسط LBG (pH=٧) باستخدام ٢.٥ % من الكلوكوز و ٠.٥ % خلاصة الخميرة ولقحت الأوساط بإضافة ١٠مل من المزرو الخزين ثم حضنت على درجات حرارة ٢٤ و٢٦ و٢٨ و٣٠ و٣٢ ْم لمدة ٧٢ ساعة ثم استخلص وقدر الزانثان المنتج .

ج- الأس الهيدروجيني الأولي للوسط: حضر ١٠٠ مل من الوسط LBG لكل من قيم الأس الهيدروجيني ٥ و ٦و ٧ و٨ و ٩ (استخدم حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز ١٠% لتعديل الأس الهيدروجيني) ولقحت الأوساط بإضافة ١٠مل من المزرو الخزين ثم حضنت على حرارة ٢٨ ْم لمدة ٧٢ ساعة ثم استخلص وقدر الزانثان المنتج.

ح- التحريك: حضر ١٠٠ مل (لكل معاملة) من الوسط LBG (pH=٧) باستخدام ٢.٥% من الكلوكوز و ٠.٥ % خلاصة الخميرة ثم لقحت الأوساط بإضافة ١٠مل من المزرو الخزين وحضنت في حمام مائي هزاز نو GFL type 1083 (شركة TDV الألمانية) بسر تحريك ٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠ و٢٠٠ دورة/دقيقة وعلى حرارة ٢٨ ْم لمدة ٧٢ ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن استخلص وقدر الزانثان المنتج.

المعالم الحركية للعزلات المنتخبة: حضر ١ لتر من الوسط LBG (pH=٧) ولقح بإضافة ١٠٠ مل من المزرو الخزين ثم حضن على حرارة ٢٨ْم في الحمام المائي الهزاز و بسرعة ٢٠٠ دورة في الدقيقة ولمدة ٧٨ ساعة. أخذت نماذج بكمية ٥٠ مل من المزرعة كل ٦ ساعات وقدر فيها الزانثان ونسبة البايروفيت المرتبطة بالزانثان ولزوجة الوسط فضلاً عن تقدير كمية الكلوكوز المستهلك وقياس الأس الهيدروجيني والعدد الحي للخلايا.

تقدير تركيز الكلوكوز: حضر المنحنى القياسي للكلوكوز حسب الطريقة المذكورة في Allen (2002) وتم تقدير تركيز الكلوكوز في المزرعة البكتيرية بإضافة ٢ مل من محلول الفينول (٤%) و٥ مل من حامض الكبريتيك المركز إلى ١ مل من المزرعة وبعد ترك المحلول مدة ٢٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة تم قياس الامتصاص بالمطياف الضوئي SP6-300 (شركة PYE UNICAM الإنكليزية) على طول موجي ٤٨٨ نانوميتر. وبالاستعانة بالمنحنى القياسي المحضر تم

حسا تركيز السكر المتبقي والمستهلك وحسا سرعة استهلاك سكر الكلوكوز استناداً إلى المعادلة الآتية:

سرعة استهلاك الكلوكوز = تركيز الكلوكوز في الوقت صفر/الوقت اللازم لاستهلاك الكلي للسكر

قياس اللزوجة: تم قياس اللزوجة باستخدام ماصة Ostwald (نو Kapillar- Viskosimeter – Schott & Gen., Mainz, West Germany) وعلى درجة حرارة ٢٥مْ وذلك بحسا الزمن اللازم لجريان المحلول من العلامة الأولى إلى العلامة الثانية، وحسبت اللزوجة استناداً إلى المعادلة: $\eta = tk$

إذ تمثل η اللزوجة وt تمثل الزمن اللازم لجريان المحلول بين العلامتين و K ثابت وقيمة هذا الثابت تختلف من ماصة إلى أخرى إذ استخدمت ماصات ذات ثابت ٣٨ و ٢٦ .

تقدير العدد الحي للخلايا: وضع ١ مل من التخفيفات العشرية للمزرعة البكتيرية في أطباق معقمة وصـ عليها الوسط LBG agar بدرجة حرارة ٤٠مْ وبعد تحريك الطبق تركت الأطباق لتتصل وبعدها حضنت على حرارة ٢٨ ْم لمدة ٣ -٤أيام ثم حسـ عدد المستعمرات باستخدام عداد المستعمرات نو Funke-Gerber Colony star 8502-1096 ثم ضر عدد المستعمرات في مقلو التخفيف للحصول على العدد الحي للخلايا .

تقدير محتوى البايرو يت ي الزانثان: اتبعت الطريقة المذكورة في Codex (٢٠٠٢) في تقدير محتوى الزانثان من البايروفيت، إذ تم تحضير منحنى قياسي للبايروفيت المجهز من قبل شركة Alpha-chemika الهندية. وتم تحضير عينات الزانثان واستخلص البايروفيت وتم تقدير الامتصاص (Absorbance) باستخدام المطياف الضوئي المذكور آنفاً وبطول موجي ٣٧٥ نانوميتر وأستخدم محلول كاربونات الصوديوم ٥ % كمحلول معايرة (Blank).

حفظ العزلات: حفظت العزلات على الوسط المائل Nutrient agar slant في الثلاجة وجددت أسبوعياً بإعادة الزر على الوسط والحضن على حرارة ٢٨ ْم لمدة ٤٨ ساعة.

النتائج والمناقشة

عزل البكتريا *X. campestris* : تم عزل البكتريا من أوراق نبات القرنبيط وأزهاره وجذوره والتي تميزت بوجود إسمرار فيها وتكوين طبقة لزجة عليها لكون هذه البكتريا مرضية للنبات فقط (Ignatov وآخرون، ٢٠٠٣)كما عزلت من التر التي زر فيها القرنبيط إذ أن هذه البكتريا لها القابلية على إحداث الحالة المرضية للنبات من خلال التربة أيضاً (Lopez وآخرون، ١٩٩٩). تميزت العزلات والبالغة ٢٠ عزلة بأنها سالبة لصبغة كرام وذات شكل عصوي فضلاً عن أن مستعمراتها ذات لون اصفر وذات طبيعة لزجة (Mucoid- appearance) وملمس ناعم (smooth) على الوسط شبه الانتقائي YDC-agar وهذا اتفق مع Bilson وآخرون (٢٠٠٢). كما دلت نتائج الاختبارات التأكيدية لتشخيص البكتريا مثل إختبار الحركة وإختزال النترات والاوكسيديز والكاتليز وتحلل النشأ والجلاتين وإنتاج كبريتيد الهيدروجين وتحمل الملوحة (٢-٥ %) وتخمرالسكريات وشملت سكريات الأرابنوس والمانوز والكالاكتوز والسيللوبايوز والفركتوز على أن البكتريا المعزولة هي بكتريا *X. campestris* وتبين بأن جميع النتائج مطابقة لما جاء في Holt وآخرون (١٩٩٤)كما تم زر العزلات على الوسط MacConky agar وتبين بأن للعزلات تفاوتاً في قابليتها على تخمر سكر اللاكتوز بين الضعيف (تحتاج إلى مدة طويلة) إلى التي لا تخمر السكر، جاء هذا مطابقاً مع Frank و Somkuti (١٩٧٩) الذين أشارا إلى أن إنزيم β-galactosidas للبكتريا *X. Campestris* له ألفة قليلة لمادة الأساس اللاكتوز.

إنتاج الزانثان: يوضح الجدول (١) كمية الزانثان المنتجة من قبل العزلات ومعامل إنتاج كل عزلة والقابلية

الجدول (١): اختبار قابلية عزلات بكتريا *X. campestris* على إنتاج الزانثان وتكوين الهلام.

ت	رمز العزلة	كمية الزانثان المنتجة (غم/ لتر)	معامل الإنتاج(غم زانثان /غم كلوكوز)	القابلية على تكوين الهلام
١	CF-1	٣,٣٢	٠,٢٢	+++
٢	CF-2	٢,١٣	٠,١٤	+
٣	CF-3	٣,٣٨	٠,٢٣	+++

٤	CF-4	٢,٣٥	٠,١٦	+
٥	CF-5	١,٧٥	٠,١٢	+
٦	XS-6	٣,٠٠	٠,٢٠	++
٧	XS-7	١,٢٥	٠,٠٨	+
٨	XS-8	١,٧٠	٠,١١	+
٩	CL-9	٢,٦٠	٠,١٧	++
١٠	CL-10	٣,٠٨	٠,٢١	+++
١١	CR-11	٢,٨٥	٠,١٩	++
١٢	CR-12	٢,٢٥	٠,١٥	+
١٣	CR-13	٢,٤٠	٠,١٦	+
١٤	XS-14	٢,٦٣	٠,١٨	++
١٥	CR-15	٢,٩٠	٠,١٩	++
١٦	CR-16	٢,٤٠	٠,١٦	+
١٧	CR-17	٢,٥٠	٠,١٧	++
١٨	CR-18	٣,٠٠	٠,٢٠	++
١٩	CR-19	٢,٥٥	٠,١٧	++
٢٠	XS-20	٣,٥٠	٠,٢٣	+++

+ : قابلية ضعيفة ، ++ : قابلية متوسطة، +++ : قابلية جيدة على تكوين الهلام .

على تكوين الهلام. يتبين من الجدول بأن هناك تفاوتاً كبيراً في قابلية العزلات على إنتاج الزانثان فقد تراوحت بين ١,٢٥ إلى ٣,٥ غم / لتر من الوسط، وتراوح معامل الإنتاج بين ٠,٠٨ إلى ٠,٢٣غم زانثان /غم كلوكوز. يلاحظ بأن هذه الكميه قليلة مقارنة بالعينات القياسية من البكتريا والتي أنتجت ١٢,٥غم زانثان / لتر من الوسط و معامل إنتاج ٠,٥ غم زانثان / غم كلوكوز (Vandam وآخرون، ١٩٩٧). إن انخفاض قابلية العزلات على إنتاج الزانثان قد يرجع بالدرجة الرئيسة إلى مكونات الوسط وإلى السلالة البكتيرية وإلى ظروف الإنتاج (Katzen وآخرون، ١٩٩٩ : Papaganni وآخرون، ٢٠٠١). كما قد يرجع الإنخفاض أيضاً إلى تغيير البيئة الطبيعية إلى بيئة صناعية مما أدى إلى إحداث بعض التغيرات الفسيولوجية في البكتريا مما أثر سلباً في كفائتها الإنتاجية (Rose، ١٩٧٦). يوضح الجدول أيضاً بأن هناك تفاوتاً في قابلية السكر الناتج على تكوين الهلام المطاطي الصلـ مع صمغ الخرنو بين الضعيفة (العزلات CF-2 و CF-4 وCF-5 و XS-7 و XS-8 وCR-12 وCR-13 و CR-16) و المتوسطة (العزلات XS-6 وCL-9وCR-11وXS-14 وXS-15 وCR-17 و-CR 18 وCR-19) و القوية (العزلات CF-1 وCF-3 و CL-10 وXS-20). كما يظهر من الجدول بأن قابلية تكوين الهلام لها علاقة طردية مع كمية الزانثان المنتجة وتزداد القابلية مع زيادة كميته. واستناداً إلى كمية الزانثان المنتج ومعامل الإنتاج والقابلية على تكوين الهلام استخدمت العزلات الأربعة CF-1 وCF-3 وCL-10 وXS-20 في الدراسات اللاحقة.

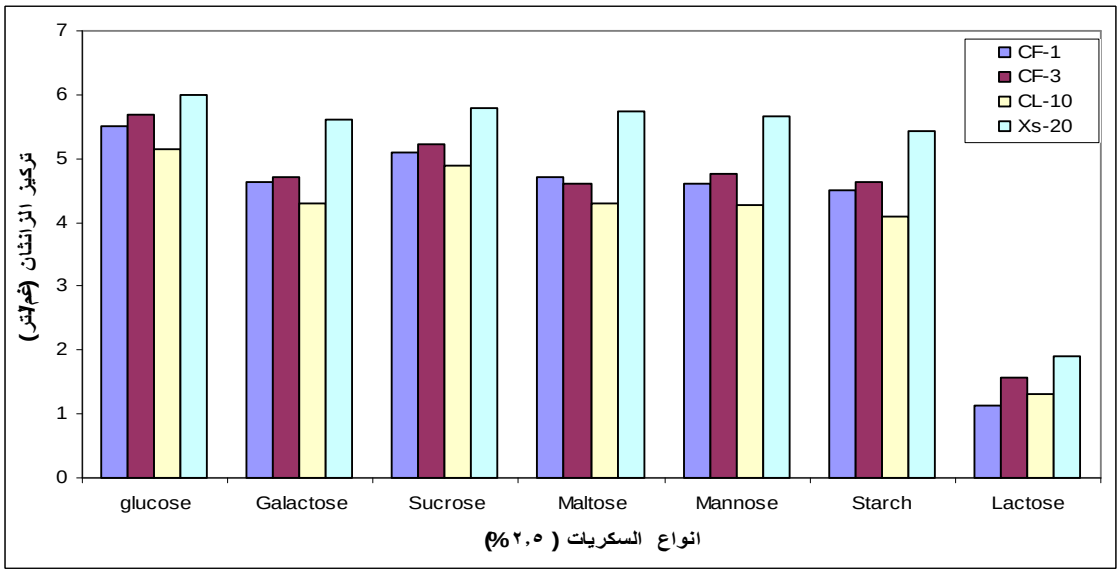
دراسة الظروف المثلى لإنتاج الزانثان:

تأثيرمكونات الوسط الزرعي:

١- نوع مصدر الكربون وتركيزه: درس تأثيرنو مصدر الكربون في قابلية البكتريا *X. campestris*على إنتاج الزانثان من خلال زر البكتريا في وسط الإنتاج LBG الحاوي علىأنوا مختلفة من السكريات. فقد أضيف ٢.٥ غم/ ١٠٠ مل من كل من سكريات الكالاكتوز والسكروز والمالتوز والمانوز والنشا واللاكتوز كل على حدة. يلاحظ من الشكل (١)أن لنو السكريات المضافة إلى الوسط تأثيراً معنوياً في قابلية البكتريا *X. campestris* على إنتاج الزانثان، إذ يتبين بأن العزلات الأربعة المنتخبة تفاوتت في قابليتها في استهلاك السكريات وقد جاء سكر الكلوكوز في المرتبة الأولى لذا أعد سكر الكلوكوز الاختيار الأول في الإنتاج (Stanbury و Whitaker ، ١٩٨٢) فقد تراوحت الكميات المنتجة من الزانثان بين ٥,١٥ غم/ لتر (العزلة CL-10) و ٦,٠٠ غم / لتر (العزلة XS-20) باستخدام سكر الكلوكوز تلاه سكر السكروز وجاء في المرتبة الأخيرة سكر اللاكتوز وكانت إنتاجية جميع العزلات المنتخبة واطئة من الزانثان عند استعمال سكر اللاكتوز كمصدر وحيد للكربون. يلاحظ من الشكل (٢) بأن العزلات الأربعة المنتخبة قد ازدادت إنتاجيتها من الزانثان بزيادة تركيز الكلوكوز لحد ٢٠ إلى ٢٥ غم/لتر من الوسط ثم أبدت نو من الاستقرار في الكمية المنتجة من

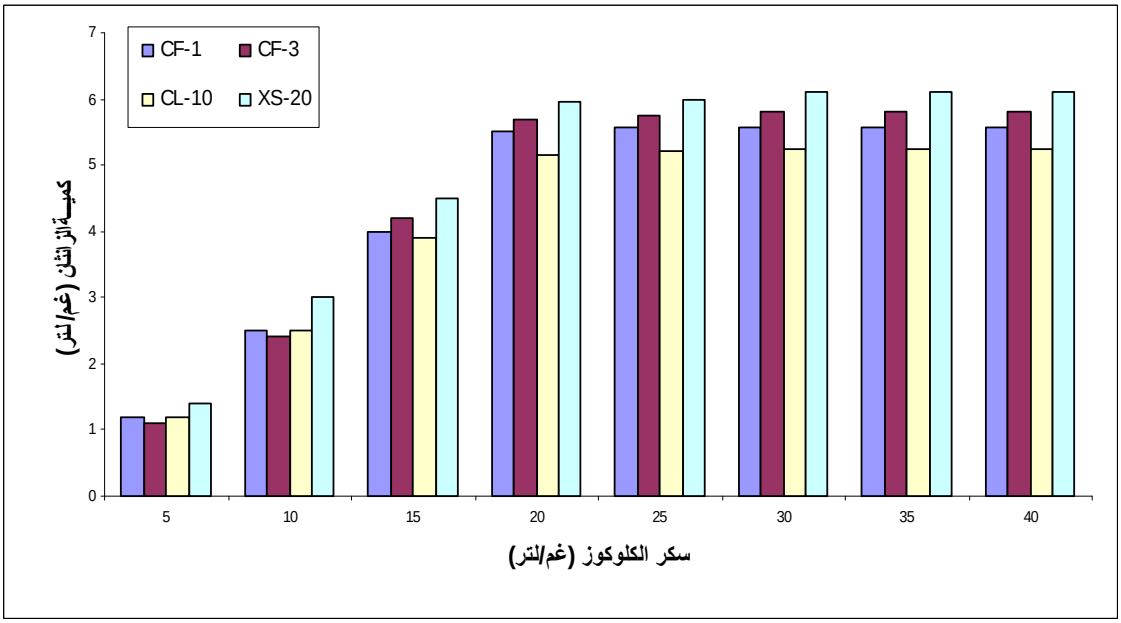
الزانثان إذ تراوحت بين ٥,٢ غم / لتر (العزلة CL-10) إلى ٦,١غم / لتر (العزلة XS-20). جاءت هذه النتائج مطابقة لكل من Vuyst و Vermeire (١٩٩٤) و Lella و Sharma (٢٠٠٠) و-El Saied وآخرون (٢٠٠٢) و Lo وآخرون (٢٠٠٣) عندما أشاروا إلى أن بكتريا *X. campestris* تفاوتت في قابليتها على استهلاك أنوا السكريات في إنتاج الزانثان. يتضح من الشكلين (١) و (٢) بأن لتركيز مصدر الكربون ونوعه أهمية كبيرة في إنتاج الزانثان لاسيما وأن البكتريا المنتجة لهذه المادة تعد من البكتريا التي تستخدم المصادر الكربونية للحصول على الطاقة أي ضمن مجموعة Chemohetrotrophe (Holt *et al.*, 1994) . إن إحداث حالة من التوازن بين النمو وتركيز مصدر الكربون من العوامل المهمة في توجيه تلك الأحياء لغرض الإنتاج دون الكتلة الحيوية (Bio-mass) إذ أن الكربون من العناصر الأساسية للخلية وتصل نسبته إلى ٥٠ % من الوزن الجاف، لذا يجـ تجهيز وسط الإنتاج بكميات متوازنة من مصدر الكربون ليعطي أعلى إنتاجية **(**Vandam وآخرون، ١٩٩٧).

٢- نوع مصدر النتروجين وتركيزه: أما تأثيرنو وتركيز مصدر النتروجين المستعمل فقد تم ذلك من خلال زر البكتريا *X. campestris* في وسط الإنتاج LBG والحاوي على ٢,٥%كلوكوز ونسـ مختلفة من مصادر النتروجين والتي تراوحت بين ٠,١ – ٠,٥ % . يلاحظ من الشكل (٣) أن العزلات الأربعة المنتخبة قد ازدادت إنتاجيتها من الزانثان بزيادة تركيز مصدر النتروجين وبالأخص خلاصة الخميرة وبلغت هذه الزيادة ٩ و١٠,٧ و١١,٧ و ١٥ % للعزلات CF-1 و CF-3 و CL-10 و XS-20 ، على التوالي، وذلك عند تركيز خلاصة الخميرة إلى ٠,٥% ، أما عند استعمال نترات الصوديوم فقد حصل انخفاض في إنتاجية العزلات الأربعة للزانثان



شكل (١)تأثير أنوا السكريات في إنتاج

الزانثان من قبل العزلات الأربعه المنتخبة.



الشكل (٢): تأثير تركيز سكر الكلوكوز في إنتاج الزانثان من قبل العزلات الأربعة المنتخبة.

بنسب وصلت إلى ٢١,٨ و ٣٢,١ و٣٧,٣ و٤٣ %، على التوالي، في حين لم يلاحظ أية زيادة عند استخدام كبريتات الأمونيوم مع العزلات باستثناء العزلة XS-20 إذ بلغت نسبة الزيادة في إنتاجيتها ٣,٣ % عند تركيز ٠,٥ % أما عند استخدام اليوريا فكانت هنالك زيادة بمقدار ٥ % بالنسبة للعزلتين CF-3 و XS-20 فقط، على التوالي. جاءت هذه النتيجة مطابقة لما وجده كل من Souw و Demain (١٩٧٩) و Lo وآخرون (١٩٩٧) و Letisse وآخرون (٢٠٠١) عندما أشاروا إلى أن الأحماض الأمينية alanine و threonine و aspartate و glutamate و proline تعد من أفضل مصادر النتروجين في إنتاج الزانثان والتي تكون خلاصة الخميرة غنية بتلك الأحماض فضلاً عن الفوسفات والكالسيوم والمنغنيسيوم وفيتامين B12 و Nicotinic acid. إن لمصدر النتروجين دوراً أساسياً في عملية النمو والإنتاج لذا من الضروري جداً إحداث التوازن بين تركيز مصدر النتروجين والنمو الخلوي ويعد من العوامل المهمة عند اختيار مصدر النتروجين وتركيزه. أن إضافة مواد سهلة الاستهلاك من قبل البكتريا تؤدي إلى تشجيع عمليات الأيض الأولي وسرعة في النمو الخلوي على حساب إنتاج مواد الأيض الثانوي (Stanbury و Whitaker ، ١٩٨٢).

عند مقارنة نتائج جدول (٢) مع الشكل (٣) يتضح بان هناك زيادة في إنتاج الزانثان بنسبة تراوحت بين ٧٧,٧ % (للعزلة CF-3) إلى ٩٤,٣ % (للعزلة XS-20) مما يدل على أن لمكونات الوسط وتركيزها تأثيراً كبيراً في قابلية البكتريا على إنتاج الزانثان وان إحداث حالة التوازن بين هذه المكونات أيضا لها تأثيراً في إنتاجية البكتريا لكون الزانثان من نواتج الأيض الثانوي من النمو الأول والتي تنتج من تمثيل السكريات الخماسية والسداسية خلال مرحلة النمو أللوغاريتمي (Exponential growth phase) وان زيادة تركيز المواد الأوليةتؤدي إلى موت الخلية البكتيرية بسبب تراكمها في مرحلة ثبات النمو (Stationary phase)، لذا تلجأ البكتريا إلى تحويل هذه المواد ذات الأوزان الجزيئية الواطئة إلى مواد الأيض الثانوي (Rose ، ١٩٧٦).

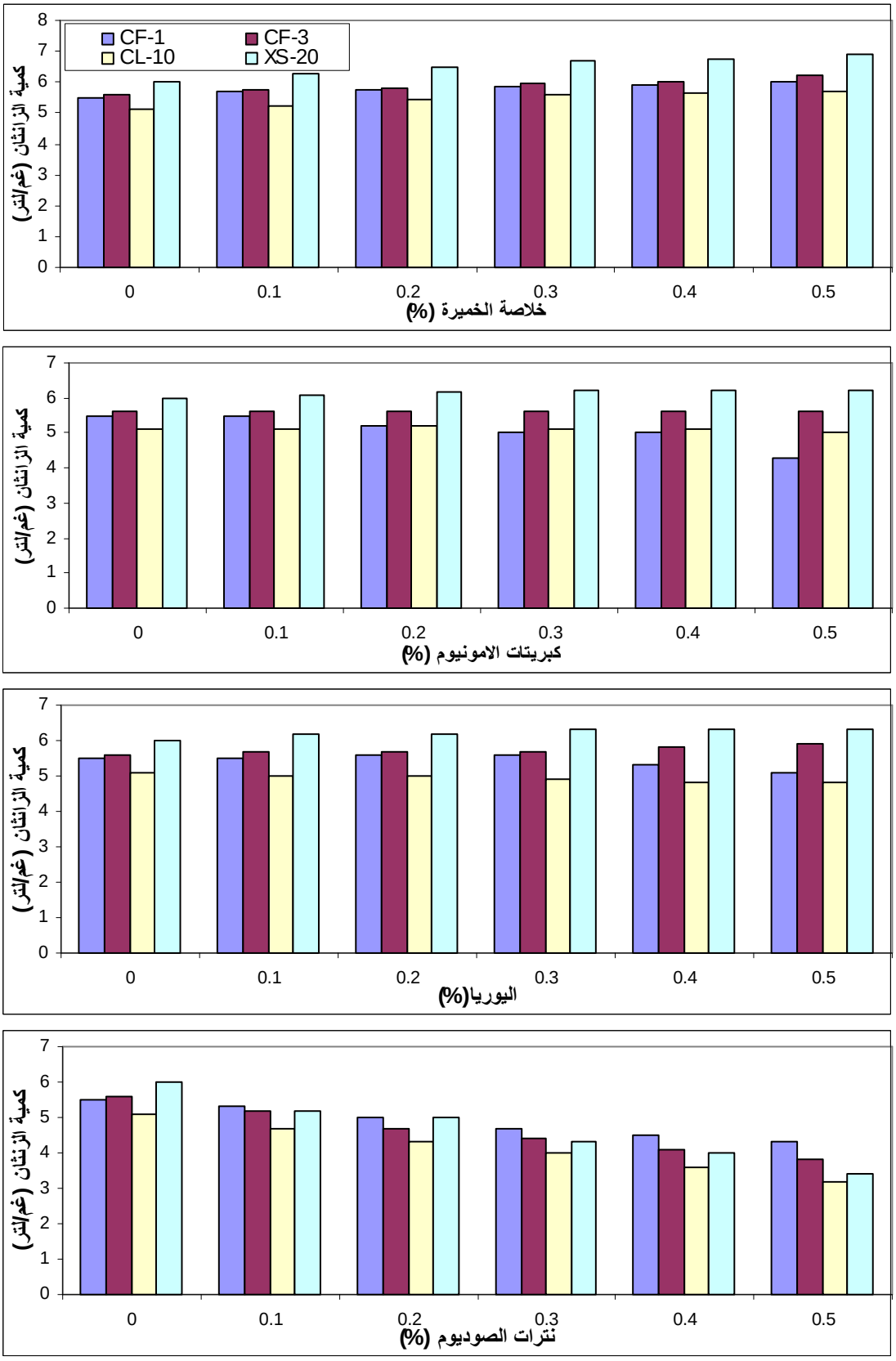
دراسة الظروف الفيزيائية:

١- **تأثير درجة الحرارة الحضن:** يبين الشكل (٤) تأثير درجة حرارة الحضن في إنتاج الزانثان من قبل العزلات الأربعة إذ يتضح بان لدرجة الحرارة تأثيراً في إنتاج الزانثان من خلال زيادة الكمية المنتجة بارتفاع درجة الحرارة إلى ٢٨ ْم ولم يحصل فرق كبير في كمية الزانثان المنتج عندما ارتفعت الحرارة إلى ٣٢ ْم، في حين يلاحظ من الشكل نفسه بأن نسبة البايروفيت المرتبطة بالزانثان وصلت إلى أعلى

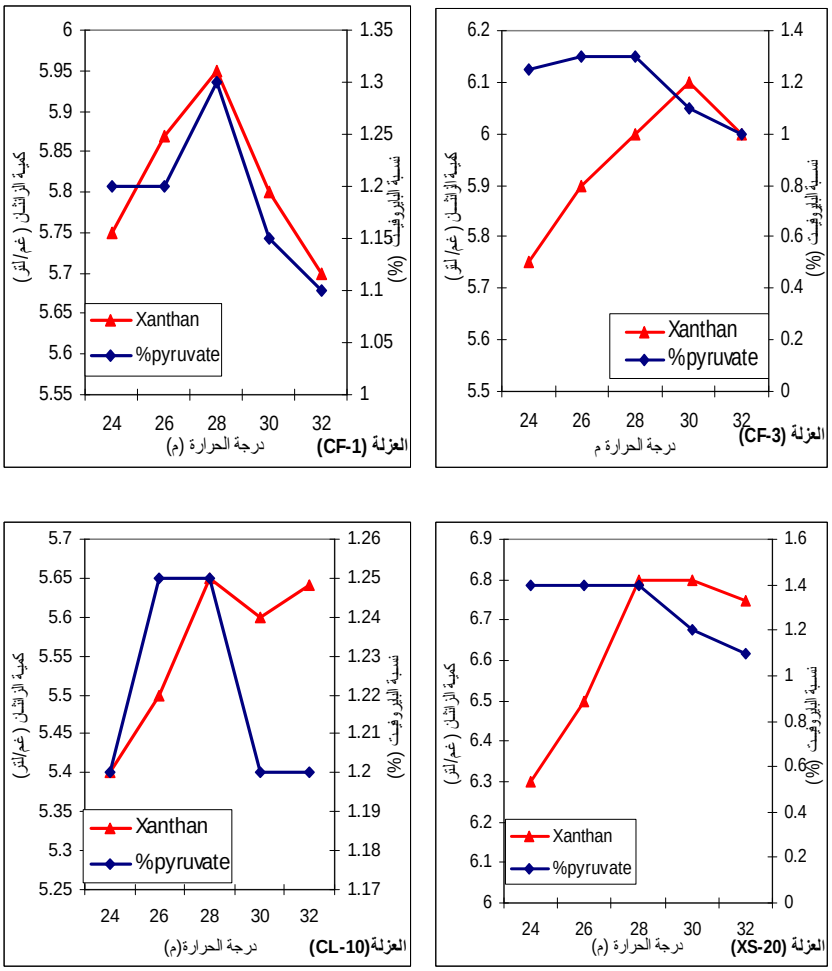
نسبة لها عندما كانت الحرارة ٢٨ ْم وبدأت بالانخفاض لتصل إلى أدنى مستوى عند حرارة ٣٢ ْم. إن هذه النتائج جاءت مطابقة لما توصل إليه كل من Suh وآخرون (١٩٩٢) و Peter وآخرون (1993) و Flores وآخرون (١٩٩٤) و Cacik وآخرون (٢٠٠١).وقد يعزى سبب انخفاض نسبة البايروفيت المرتبطة إلى أن درجة الحرارة دون المثالية تؤدي إلى تعطيل بعض الإنزيمات المسؤولة عن ارتباط البايروفيت بالسكر الناتج. كما قد تودي الحرارة العالية إلى تعطيل المورث *gum L* المسؤول عن تشفير الإنزيم Ketal pyruvate transferase الذي يقوم بإضافة البايروفيت إلى السلسلة السكرية المتكونة (Marzocca وآخرون، ١٩٩١).أما سبب بقاء كمية الزانثان المتكونة دون انخفاض بازدياد درجة الحرارة فقد يعزى إلى أن التركيب الأساس للزانثان لا يتغير مع عوامل النمو والظروف المحيطة بها وإنما تتغير المجاميع التي ترتبط به مثل مجاميع البايروفيت والخلات إذ بدورهما يغيران تركيب الزانثان الناتج (Karin وآخرون، ٢٠٠٠).

٢- تأثير الأس الهيدروجيني الأولي: يبين الشكل (٥) تأثير الأس الهيدروجيني الأولي للوسط في قابلية البكتريا لإنتاج الزانثان. إن كمية الزانثان المنتجة تغيرت بشكل ملحوظ وتراوحت بين ٤,٨ غم / لتر للعزلة CF-1 عند pH ٥ إلى ٦,١غم/ لتر للعزلة XS-20 عند pH ٩ ووصل أفضل إنتاج عندما كان pH الوسط بين ٦- ٧ إذ بلغت كميات الزانثان ٥,٩ و ٦ و ٥,٦ و ٦,٨ غم/ لتر للعزلات المنتخبة CF-1 و CF-3 و CL-10 و XS-20 ، على التوالي. جاءت هذه النتيجة مطابقة مع كل من Lella و Sharma (٢٠٠٠) الذين أشاروا إلى أن أفضل pH لوسط إنتاج السكريات المكوثرة يتراوح بين ٦ – ٧,٥ . إن لكل بكتريا مدى معين من قيم الأس الهيدروجيني وأن تغيير هذه القيم قد يؤدي إلى التغير في طبيعة الفعاليات الحيوية التي تحدث في تلك الخلايا البكتيرية (Rose ، ١٩٧٦) لذا فمن الضروري السيطرة على حموضة الوسط وذلك من خلال الاستعمال المتوازن لمصادر الكربون والنتروجين وبالأخص الأحماض الأمينية الموجودة في مصدر النتروجين والتي تمتلك صفات تنظيمية للأس الهيدروجيني للوسط (Stanbury و Whitaker ، ١٩٨٢). كما درس تأثير الأس الهيدروجيني للوسط في نسبة البايروفيت المرتبطة بالزانثان الناتج. يلاحظ من الشكل ٦ بأن للأس الهيدروجيني تأثيراً في نسبة البايروفيت المرتبطة بالزانثان الناتج وأن أعلى نسبة ارتباط كانت عندما كان الأس الهيدروجيني للوسط ٦ - ٧ إذ تراوحت هذه النسبة بين ١,١٧ % للعزلة CL-10 في pH ٦ إلى ١,٤ % للعزلة XS-20 في pH ٧ .وقد يعزى سبب انخفاض هذه النسبة إلى أن الإنزيم المسؤول عن إضافة البايروفيت إلى السلسلة السكرية المكوثرة (Ketal pyruvate-transferase) له أس هيدروجيني مثالي يتراوح بين ٦-٧ إن الارتفاع أو الانخفاض عن هذا المدى من الأس الهيدروجيني قد يؤثر في فعالية الإنزيم مما يقلل من كفاءته في إضافة البايروفيت إلى الزانثان المتكون وبالتالي تقل نسبته.

٣- **تأثير مدة الحضن:** يبين الشكل (٧) أن إنتاج الزانثان وصل أعلى مستوى له بعد ٥٤ ساعة من الحضن إذ بلغت كمية الزانثان المنتجة ٥,٩ و٦,١ و ٥,٦ و٦,٨ غم / لتر للعزلات الأربعة CF-1 و CF-3 و CL-10 و XS-20 ، على التوالي، وقد استقر الإنتاج تقريباً لحين انتهاء مدة التخمر والبالغة ٧٢ ساعة. أما نسبة البايروفيت فأن أعلى نسبة ارتباط بالسكر كانت بعد ٥٤ ساعة ولجميع العزلات باستثناء العزلة XS-20 إذ كانت بعد٤٨ساعةوتراوحت بين ١,٢٥ إلى ١,٤ % . وقد أنهت جميع العزلات طور النمو أللوغاريتمي خلال ٤٨ساعة



الشكل (٣)تأثير نو مصدر النتروجين وتركيزه في إنتاج الزانثان من قبل العزلات الأربعة المنتخبة.

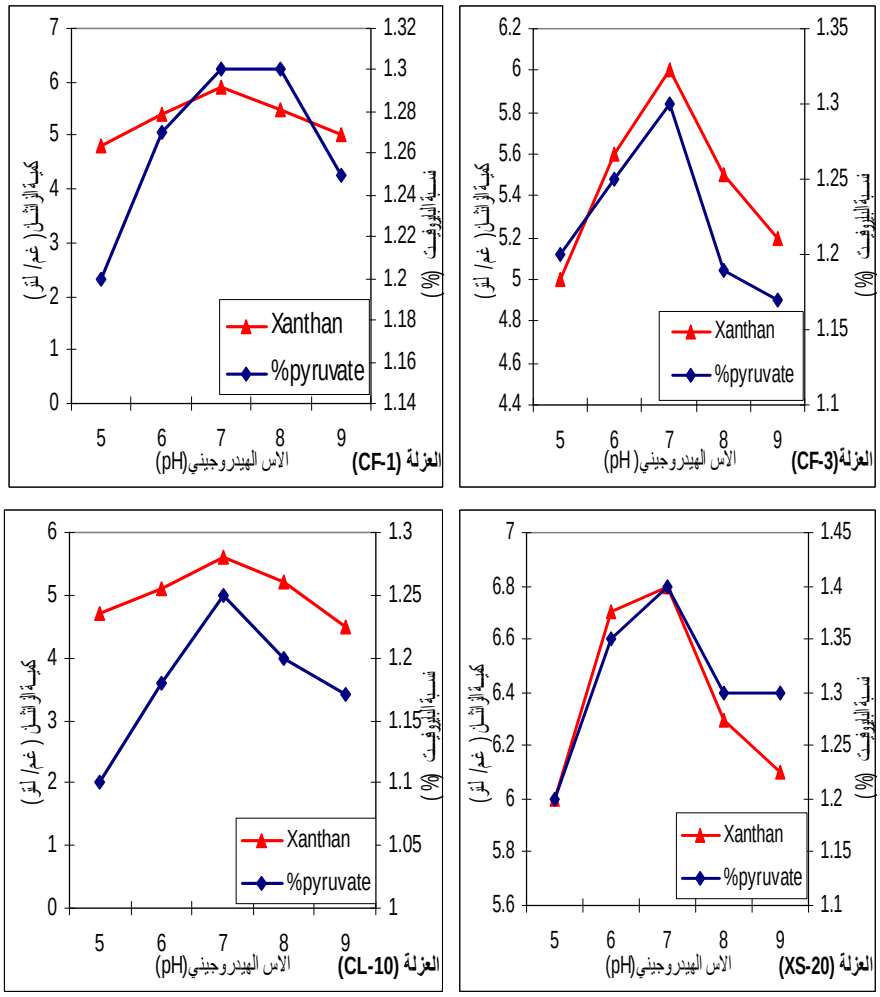


الشكل (٤): تأثير درجة حرارة الحضن في إنتاج الزانثان ونسبة البايروفيت المرتبطة بالزانثان المنتج من قبل العزلات الأربعة المنتخبة.

وتم حسا بعض معالم النمو للبكتريا مثل عدد مرات التضاعف في الساعة الواحدة (ثابت معدل النمو Growth rate constant) وقد تراوح بين ٠,٢٧ إلى ٠,٢٧٨ مرة / ساعة أما زمن الجيل (Generation time) فقد بلغ ساعتين ونصف الساعة للعزلات الأربعة. كما يلاحظ من الشكل أيضاً بأن إنتاج سكر الزانثان ازداد في المراحل الأخيرة من طور النمو أللوغاريتمي وهذا يؤكد بأن السكر الناتج هو احد مكونات الأيض الثانوي للبكتريا إذ إن هذه المكونات تنتج في الأطوار التي يختزل فيها تقريباً معدل النمو ويسمى هذا الطور بطور الإنتاج (Idiophase) (Stanbury و Whitaker ، ١٩٨٢).

٤- **تأثير التحريك:** يبين الشكل ٧ بأن للتحريك تأثيراً ملحوظاً في قابلية البكتريا لإنتاج الزانثان فقد تراوحت نسبة الزيادة في كمية الزانثان عند استخدام السرعة ٥٠ دورة بالدقيقة بين ٠,٨٥ – ٦,٦ % وارتفعت نسبة الزيادة لتصل إلى ٢٥ – ٣٨,٢ % عند سرعة ٢٠٠ دورة/الدقيقة. إن زيادة قابلية العزلات المنتخبة على إنتاج الزانثان بزيادة سرعة التحريك جاءت مطابقة لما أشار إليه Amanullah وآخرون (١٩٩٨). إن أعلى نسبة زيادة حصلت عندما كانت سرعة التحريك ٢٠٠ دورة/الدقيقة وبالأخص للعزلة XS-20 والتي بلغت ٣٨,٢ % وأقل نسبة للعزلة CL-10 والتي بلغت ٢٥ %. إن البكتريا *X. campestris* هي بكتريا هوائية وأن إنتاج الزانثان يتم في ظروف هوائية وعند انخفاض كمية الأوكسجين عند عدم تحريك المزار مما يؤدي إلى الوصول إلى ظروف لاهوائية ويقلل من

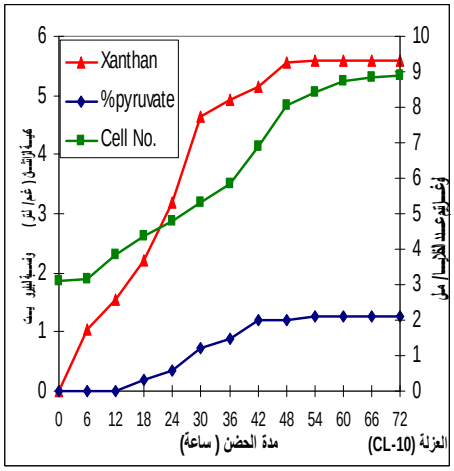
كمية الزانثان المنتجة (Suh وآخرون، ١٩٩٠) ولهذا فان التحريك يعد ضرورياً من أجل زيادة سرعة انتقال الأوكسجين المذا إلى الخلايا وبالتالي زيادة في إنتاجية البكتريا من الزانثان وبالأخص في المراحل النهائية عندما ترتفع لزوجة الوسط والتي قد تسبب إعاقة انتقال الأوكسجين إلى الخلايا. كما أن السر الواطئة ربما قدأدت إلى خفض انتقال المواد الغذائية إلى داخل الخلايا البكتيرية بسبب عمل طبقة لزجة من الزانثان حول الخلايا مما تحول دون انتقال الأوكسجين والمواد الغذائية إلى الخلايا وهذا يسبب انخفاض الفعاليات الحيوية للبكتريا وانخفاض إنتاجيتها من الزانثان (Casas وآخرون، ٢٠٠٠)كما أن استعمال السر العالية في تحريك الوسط قد يودي أيضاً إلى خفض كمية الزانثان المتكونة بسبب زيادة معدل تحطم الخلايا الناجم عن الإجهاد الذي يحدثه التحريك على الخلايا.

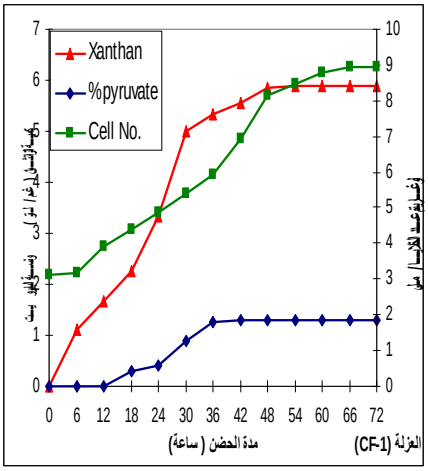


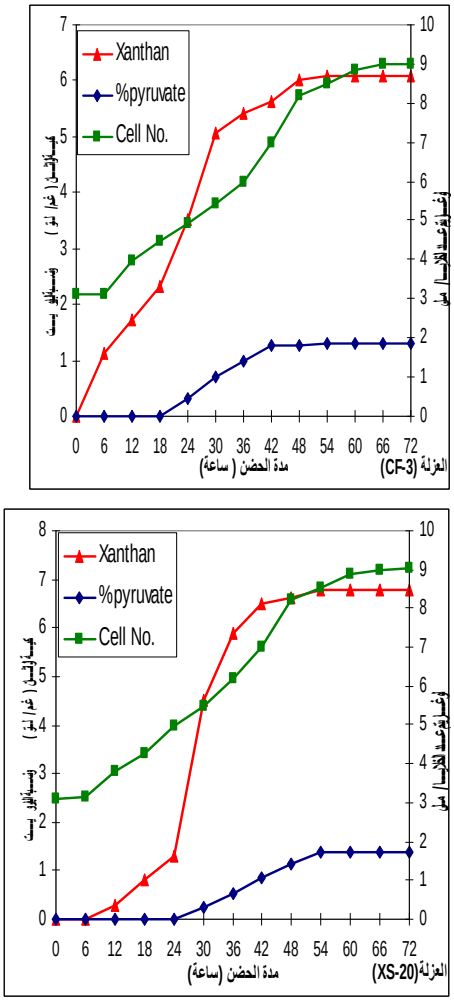
الشكل (٥): تأثير الأس الهيدروجيني في إنتاج الزانثان ونسبة البايروفيت المرتبطة به والمنتج من قبل العزلات الأربعة المنتخبة.

المعالم الحركية لإنتاج الزانثان: من نتائج الأشكال السابقة يتبين بأن الوسط LBG الحاوي على ٢,٥ % كلوكوز و ٠,٥ % خلاصة الخميرة ذات الأس الهيدروجيني ٧ واستخدام التحريك بسرعة ٢٠٠ دورة بالدقيقة ودرجة حرارة ٢٨°م هي أفضل الظروف لإنتاج أعلى كمية من الزانثان إذ تراوحت بين ٧ – ٩,٤ غم / لتر للعزلات الأربعة المنتخبة من البكتريا المعزولة. وباستخدام هذه الظروف تمت دراسة بعض المعالم الحركية مثل قياس كمية الزانثان المتكون خلال فترة حضن ٧٨ ساعة وسرعة استهلاك الكلوكوز وقياس الأس الهيدروجيني خلال الفترة ذاتها فضلاً عن قياس اللزوجة وحسا العدد الحي للخلايا لكل مل من الوسط وحسا النسبة المئوية للبايروفيت في الزانثان المتكون. من الشكل (٨) يلاحظ بأن هناك ارتفاعاً طفيفاً في pH الوسط وبلغ ٨,٣ و ٨.١ و ٨.٣ و ٨.٢ للعزلات CF-1 و CF-3 و CL-10 و XS-20 ، على التوالي، بالرغم من وجود دراسات

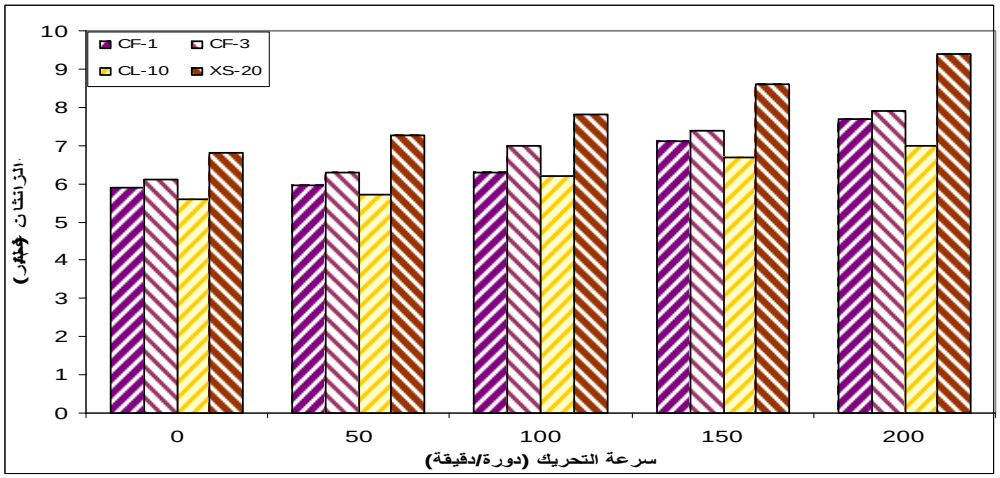
أشارت إلى أن pH وسط إنتاج الزانثان قد انخفض (Lella و Sharma ، ٢٠٠٠)بسبب تكون نواتج تمثيل حامضية فضلاً عن الزانثان، وقد يعزى اتفا الـ pH في هذه الدراسة إلى اختلاف السلالة البكتيرية وإلى تركي الوسط إذ أشار Growthman وآخرون (١٩٩٩)إلى أن الانخفاض أو الارتفا في الأس الهيدروجيني للوسط خلال الإنتاج يعتمد بالدرجة الرئيسة على نو السلالة البكتيرية وعلى تركي الوسط. يلاحظ من الشكل أيضاً بأن زيادة سرعة التحريك قد زادت من قابلية العزلات المنتخبة على استهلاك سكر الكلوكوز، كما يلاحظ بأن انخفاض تركيز السكر تناسبت مع معدل نمو البكتريا وأن تركيزه تلاشى مع دخول البكتريا طور الثبات ووصل إلى الصفر تقريباً بعد ٦٦ ساعة من الحضن. كذلك يلاحظ أيضاً بأن زيادة التحريك أدت إلى زيادة في إنتاج الزانثان والذي زاد من سرعة استهلاك الكلوكوز أيضاً لكون هذا السكر هو مصدر الكربون الوحيد في الوسط، كما إن زيادة سرعة التحريك أدت إلى زيادة عدد الخلايا الحية مقارنة بالعينات التي لم يستخدم فيها التحريك وهذا يشير أيضاً إلى أن التحريك أدى إلى زيادة في الفعاليات الحيوية للبكتريا ومن ثم زيادة في الكتلة







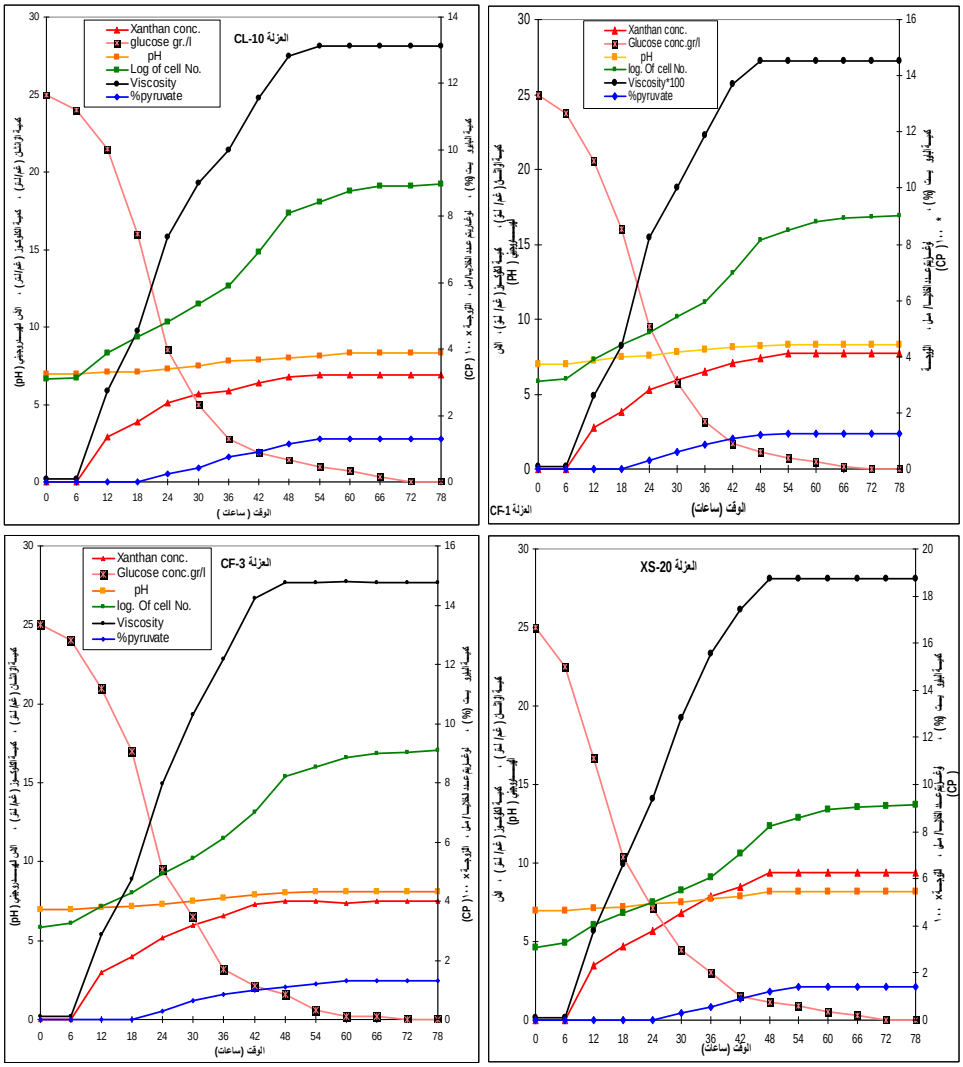
الشكل (٦): تأثير مدة الحضن في إنتاج الزانثان ونسبة البايروفيت المنتجة ولوغارتم عدد الخلايا الحية للعزلات الأربعة المنتخبة.



الشكل (٧): تأثير التحريك في قابلية العزلات الأربعة المنتخبة على إنتاج الزانثان.

الحيوية. أما فيما يخص نسبة ارتباط البايروفيت بالزانثان الناتج فلم يلاحظ أية زيادة في البايروفيت مقارنة بالعينة التي لم يستخدم فيها التحريك وقد بقيت النسبة كما هي تقريباً لجميع العزلات، وقد يرجع

ذلك إلى اختلاف السلالة البكتيرية التي تم عزلها عن بالسلالات البكتيرية الأخرى المستخدمة في بعض الدراسات (Papaganni وآخرون، ٢٠٠١) إذ أن زيادة التحريك فيها أدى إلى ارتفا نسبة البايروفيت المرتبطة بالزانثان الناتج.



الشكل (٨): المعالم الحركية لإنتاج الزانثان من قبل العزلات الأربعة المنتخبة.

XANTHAN PRODUCTIONBY THE WILD TYPE BACTERIA *Xanthomonas campestris* AND STUDY OF PRODUCTION CONDITIONS

A. O. Kocha
College of Agric.
Salah Al-dean Univ., Iraq

Moafak M. Ahmad
College of Agric. and Forestry /
Mosul Univ., Iraq

ABSTRACT

The aim of this study was the isolation and identification of *Xanthomonas campestris* form the leaves, flowers, and roots of califlower, as well as from the soil grown in it. The effect of medium components as well as the effect of incubation temperature, pH, period

of incubation and agitation velocity to determine the optimum conditions for xanthan production were studied. Four isolates among 20 showed ability of xanthan production in the range from 7 to 9.4 g xanthan / l of liquid Luria-bertani medium (LBG) medium containing 2.5% glucose, 0.5% yeast extract, with pH of 7.0 using shaker water bath at 200 rpm and incubation time of 78 hr at a temperature of 28 C. Xanthan produced contained 1.25 – 1.4 % pyruvate with high ability to form firm rubbery gel with locust bean gum.

المصادر

Allen, M. S. (2002). Isolation and characterization of the exopolysacchride produced by Thauera strain MZIT and its role in flocculation. A dissertation presented for the doctor of philosophy degree. The University of Tennessee, USA.

Amanullah, A., L. S. Carreon, B. Castro, E. Galindo and A. W. Nienow (1998). The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentation . J. of Biotechnol. Bioengin., 57: 95-108 .

Becker, A. (2004). Microbial polysaccharide production. http://www.genetik.uni-bie/efelf.de/genetik/exopol/

Bilson, J. V. and B. Zaden (2002). Detection of *Xanthomonas campestris* pv. carotae on carrot. International Seed Health Initiative –Status 3 DRAFT 1 Nov. 2002.

Bradshaw, L. J. (1979). Laboratory Microbiology.(3rd. ed). W. B. Saunders Company, Philadelphia. USA.

Broadbent, J. R., D. J. McMahon and C. J. Oberg (1998). Practical consideration in the use of exoploysaccharide: producing cultures. Marschall Itallian and Specialty cheese seminar 1998- 10 USA.

Cacik, F., G. Dondo and D. Marques (2001). Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum**.** J. Computer Chem. Engin., 25: 409 – 418.

Casas, J. A., V. E. Santos and F. G. Ochoa (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. J. Enzyme and Microbial Technol., 26: 282-291.

Codex (2002). Xanthan gum. Institute of Medicine Food and Nutrition Board Committee on Food Chemicals.

El-Saied, H. M., S. A. Gabr, A. S. Hamed and H. T. M. Hefnawy (2002). Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. http://www.ift.cofex.com/ift/2002/techprogram/paper_10776.html.

Flores, F., L. G.Torres and E. Galindo (1994). Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. campestris* on the production and quality of xanthan gum. J. Bacteriol., 34:165-173.

Frank, J. F. and G. A. Somkuti (1979). General properties of β-galactosidase of *Xanthomonas campestris*. Applied Environ. Microbiol., 38:554-556.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams (1994). Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. William & Wilkins USA.

Ignatov, A., K. Hida and Y. Kuginuki (2003). Black rot of crucifers and sources of resistance in *Brassica* crops . http://ss.jircas.affrc.go.jg/engpage/jarq/32-3/ignatov/igna,html.

Karin, B., V. Langendorff and P. Boulenguer (2000). Xanthan. http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_vo5/bpo/5011-259-269.

Katzen, F., A. Becker, M. V. Ielimin, C. G. Oddo and L. Ielpi (1999). New mobilizable vectors suitable for gene replacement in gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3end of the *Xanthomonas campestris* pv. campestris gum operon. J. Bacteriol., 65: 278-282.

Lella, L. K. and G. Sharma (2000). Studies on xanthan production form *Xanthomonas campestris*. Bioprocess Engin., 23: 687 – 689.

Letisse, F. P. Chevallereau, J. L. Simon and N. D. Lindley (2001). Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources . http://s97_cgi?action=view&vdkvgwkey=%2Fdata%2Fsearch%2Fjour%2F00253%2F

Lo,Y. M., C. H. Hsu (2003). A novel integrated process for pilot-scale production of xanthan gum. Maryland Agricultural Experiment Station 120/Symons Hall, University of Maryland, Collage park, Md 20742.

Lo,Y. M., S. T. Yang and D. M. Min (1997). Effect of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiol. Biotechnol., 47:689-694 .

Lopez, N. I., A. S. Haedo and B. S. Mendez (1999). Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in a soil mocrocosm system. International Microbiol., 2: 111-114.

Marzocca, M. P., N. E. Harding, E. A. Petroni, J. M. Cleary and L. Ielpi (1991). Location and cloning of the Ketal pyruvate transferase gene of *Xanthomonas campestris*. J. Bacteriol., 173: 7519-7524.

Papaganni, M., S. K. Psomas, L. Batsilas, S. V. Pavas, D. A. Kyriakidis and M. L. Kyriakides (2001). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. Process Biochem., 37: 73-80.

Patel, S. and D. Bellmer (2001). Energy efficient xanthan gum fermentation process. http://bioen.okstate.edu/home/pshekha/my_research/xanthan_gum/xanthan_gumhtml.

Peter, H. U., I. Suh, A. Schumpe and W. D. Deckwer (1993). The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. Biotechnol. Letter, 15: 565-566.

Rose, A. H. (1976). Chemical Microbiology. An Introduction to Microbial Physiology. Butterworths: London.

Shu, C. H. and S. T. Yang (1990). Effect of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris* . J. Biotechnol. Bioengin., 35: 454-468.

Souw, P. and A. L. Demain (1979). Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Applied Environm. Microbiol., 37: 1186-1192.

Stanbury, P. F. and A. Whitaker (1982). Principle of Fermentation Technology. Pergamon Press. UK.

Suh, I. S., A. Schumpe and W. D. Deckwer (1992). Xanthan production in bubble column and air lift reactors. J. Biotechnol. Bioengin., 39: 85-94.

Sutherland, I. (2002). A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. Microbiol. Today, 29: 70-71.

Vandam, M. C. E., W. H. Jeu, B. R. Currell and R. A. Patmore (1997). Biotechnological Innovation in Chemical Synthesis. Butterworth: UK.

Vuyst, L. D. and A. Vermeire (1994). Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. Applied Microbiol. Biotechnol., 42: 187-191.