

根瘤农杆菌生产琥珀酰多糖发酵条件的优化

郑素娅, 弋伊, 王金霞, 牛延宁, 贾彩凤, 金明飞, 常忠义, 高红亮* (华东师范大学生命科学学院, 上海 200241)

摘要 [目的]优化根瘤农杆菌产琥珀酰多糖的发酵培养条件。[方法]通过单因素试验和正交试验优化根瘤农杆菌产琥珀酰多糖的发酵培养条件。[结果]最终得到的优化培养条件为:蔗糖 70 g/L, 酵母粉 6 g/L, CaCO₃ 10 g/L, MgSO₄ 1.5 g/L, KH₂PO₄ 0.025 g/L, 发酵时间 4 d, 种子接种量 2.5%, 培养基初始 pH 7.2, 发酵温度 30 ℃, 摇瓶转速 250 r/min。在上述最优方案下, 根瘤农杆菌琥珀酰多糖产量达 18.550 g/L, 比其初始条件下产量(8.010 g/L)明显提高。[结论]该研究为利用根瘤农杆菌生产琥珀酰多糖提供了理论依据。

关键词 根瘤农杆菌; 琥珀酰多糖; 发酵

中图分类号 S182 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)26-0015-03

Optimization of Fermentation Conditions for Succinoglucon Production by *Agrobacterium tumefaciens*

ZHENG Su-ya, YI Yi, WANG Jin-xia, GAO Hong-liang* et al (School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241)

Abstract [Objective] The aim was to optimize the fermentation conditions for succinoglucon production by *Agrobacterium tumefaciens*. [Method] We optimized the fermentation conditions for succinoglucon production by *Agrobacterium tumefaciens* through orthogonal experiment and single-factor test. [Result] The optimal medium consisted of 70 g/L sucrose, 6 g/L yeast extract, 10 g/L CaCO₃, 1.5 g/L MgSO₄ and 0.025 g/L KH₂PO₄, and the optimal fermentation conditions included the incubation time of 4 d, inoculum amount of 2.5%, initial pH of 7.2, culture temperature of 30 ℃ and shaking speed of 250 r/min. Under these conditions, the yield of succinoglucon from *Agrobacterium tumefaciens* was obviously improved to 18.550 g/L, compared with the initial 8.010 g/L. [Conclusion] The study can provide reliable basis for utilizing this *Agrobacterium* strain to make a further research into succinoglucon and to potentially produce succinoglucon in an industrial scale.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*; Succinoglucon; Fermentation

根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)是一种革兰氏阴性土壤杆菌^[1],属于 α -变形菌纲根瘤菌科农杆菌属,是一种普遍存在的土壤微生物^[2]。除了其在基因工程领域的广泛应用外,早在1999年就有报道说明利用根瘤农杆菌发酵提取琥珀酰多糖^[3]。琥珀酰多糖由D-半乳糖、D-葡萄糖(1:7)八糖重复单元构成,含 β -1,3- β -1,4- β -1,6糖苷键,是一类酸性的可溶性胞外多糖^[4-5]。经过自然发酵产生的或化学修饰的琥珀酰多糖具有在高温、高压、极端pH或高剪切作用下表现出高稳定性的特性^[6],并且琥珀酰多糖具有很高的可溶性和黏性等特性,其可以作为增稠剂、稳定剂、乳化剂等^[6]、医药^[7]、化妆品^[8-9]等领域广泛应用。

据报道,琥珀酰多糖可以由根瘤菌属、土壤杆菌属、产碱杆菌属、假单胞菌属等属的细菌产生,土壤农杆菌属(*Agrobacterium*)菌株被认为最具有工业化潜力^[3],其中根瘤农杆菌有关遗传与代谢方面的研究较多^[2,10-11]。但目前关于利用根瘤农杆菌生产琥珀酰多糖的研究多集中于多糖结构性质^[5,12-14]与菌体代谢机制^[15-16]方面,而对其发酵生产仅有 Stredansky 等^[17]分别进行了培养基优化、相关性探究^[18]和分批补料研究^[3]。鉴于此,笔者对根瘤农杆菌 AT01 发酵生产琥珀酰多糖的发酵条件进行了优化,以提高其产量,为其进一步工业化生产奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 菌种。根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) AT01, 由华东师范大学生命科学学院微生物与发酵实验室保存。

1.1.2 主要仪器。sigma 2-16KL 冷冻离心机为 Sartorius 公司产品;QUintix 型电子天平(精密度 0.1 mg)为 Sartorius 公司产品;SZ-CR21N 型日立离心机为 HITACHI 公司产品;ZQZY-BF 型全温恒温培养摇床为上海知楚仪器有限公司产品。

1.1.3 培养基。斜面培养基:葡萄糖 10 g/L, 牛肉膏 3 g/L, 蛋白胨 5 g/L, NaCl 5 g/L, 玉米浆 1.5 g/L, 琼脂 20 g/L, pH 7.0。种子培养基:蔗糖 20 g/L, 酵母粉 A802 5 g/L, 蛋白胨 5 g/L, pH 7.0。基础发酵培养基:蔗糖 50 g/L, 酵母粉 A902 5 g/L, CaCO₃ 10 g/L, pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 种子培养。挑取 1 环斜面种子接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 ℃、250 r/min 摇床培养 16 h。

1.2.2 摇瓶发酵。以 5% 接种量将种子液接入装有 50 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 30 ℃、250 r/min 摇床培养 96 h。

1.2.3 测定方法。

1.2.3.1 发酵液的预处理。称取 5 mL 发酵液, 加入 20 mL 蒸馏水稀释, 室温 12 000 r/min 离心 20 min, 分离上清液和沉淀备用。

1.2.3.2 琥珀酰多糖的测定。取预处理后的发酵液上清于 50 mL 离心管中, 加入 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀多糖, 9 000 r/min 离心 10 min, 重复 2 次, 取沉淀于培养皿上, 在 80 ℃ 烘箱中过夜烘干, 称重, 测定多糖含量。

1.2.3.3 生物量的测定。取预处理后的 50 mL 发酵液的沉淀, 加入 20 mL 1 mol/L 盐酸溶液并搅拌, 12 000 r/min 离心 10 min, 加入 20 mL 蒸馏水洗涤菌体沉淀 2 次, 取沉淀在锡纸上 60 ℃ 过夜烘干, 称重, 测生物量。

1.2.4 单因素试验。

1.2.4.1 蔗糖浓度的初步确定。把质量浓度为 10、30、50、

基金项目 国家自然科学基金青年项目(31100109)。

作者简介 郑素娅(1996—), 女, 河南驻马店人, 本科生, 专业: 生物医学。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事微生物学及其应用研究。

收稿日期 2017-06-30

70、90 g/L 的蔗糖添加到基础发酵培养基中,按照“1.2.2”方法发酵后,检测多糖产量。

1.2.4.2 不同种类酵母粉对琥珀酰多糖产量的影响。选取 A802、A902、A408、A803 以及 Sangon 多种酵母粉按照 5 g/L 的浓度添加到基础发酵培养基中,按照“1.2.2”方法发酵后,检测多糖产量。

1.2.4.3 接种量对多糖产量的影响。对基础发酵培养基分别接入 1.0%、2.5%、5.0%、7.5% 和 10.0% 种子液,按照“1.2.2”方法发酵后,检测多糖产量。

1.2.4.4 无机盐对琥珀酰多糖产量的影响。在基础发酵培养基中添加不同浓度的 NaCl 或者 KH_2PO_4 或者 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 后,按照“1.2.2”方法发酵后,检测多糖产量和其他相关参数。

1.2.5 正交试验。通过单因素试验,发现对根瘤农杆菌产琥珀酰多糖影响较显著的 4 个因素分别为蔗糖、酵母粉、 KH_2PO_4 和 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,选取该 4 个因素作为正交试验因子,以最适宜条件为参考,设置 3 个水平(表 1),进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。

表 1 正交试验因素与水平

水平 Levels	蔗糖(A) Sucrose	酵母粉(B) Yeast extract	KH_2PO_4 (C)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (D)
1	50	4	0.025	1.0
2	70	5	0.050	1.5
3	90	6	0.075	2.0

1.3 数据统计 所有试验做 3 个平行,利用 Excel 和 SPSS 软件对试验结果进行分析。

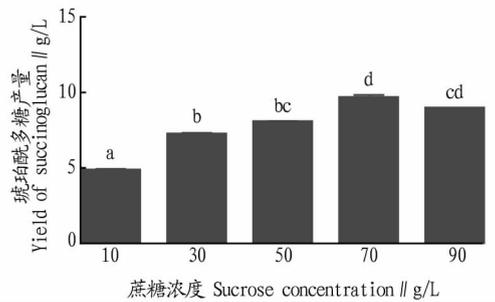
2 结果与分析

2.1 单因素试验初步确定发酵条件

2.1.1 蔗糖浓度对琥珀酰多糖产量的影响。由图 1 可知,随着蔗糖浓度的增加,琥珀酰多糖产量不断提高。当蔗糖浓度为 50 g/L 时,琥珀酰多糖产量为 8.01 g/L;当蔗糖浓度为 70 g/L 时,琥珀酰多糖产量达到最高值,为 9.60 g/L,之后随着蔗糖浓度上升,琥珀酰多糖产量开始有所下降。这可能是当蔗糖浓度超过 70 g/L 时,菌体繁殖旺盛,导致发酵液中菌体浓度过高,对发酵过程中氧的消耗增加,限制了菌体产糖过程^[19]。

2.1.2 不同种类酵母粉对琥珀酰多糖产量的影响。由图 2 可知,不同种类酵母粉对琥珀酰多糖产量的影响很大,即使同为 A 公司产品的不同种类酵母粉差异也很大。其中,使用 A802 酵母粉组分的终产量达 14.97 g/L, Sangon 的酵母粉组分产量达 15.16 g/L,二者远高于其他种类氮源添加组分中琥珀酰多糖产量。综合产量和经济因素,最终确定最佳酵母粉种类为 A802,后续试验酵母粉均使用 A802。

2.1.3 接种量对琥珀酰多糖产量的影响。由图 3 可知,接种量为 1.0%、2.5% 和 5.0% 时,琥珀酰多糖产量最高,分别为 15.11、15.79 和 14.26 g/L,差异不显著。之后增大接种量,琥珀酰多糖产量反而有所下降,这是因为过高的接种量



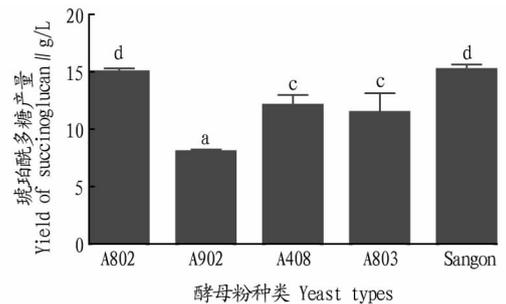
注:柱上不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicated that there were significant differences among treatments at 0.05 level

图 1 蔗糖浓度对琥珀酰多糖产量的影响

Fig. 1 Effect of sucrose concentration on the yield of succinoglucon

造成基质缺乏,生长过快,进而影响产物合成^[20]。因此,应控制接种量在 1.0%~5.0%,该试验确定接种量为 2.5%。

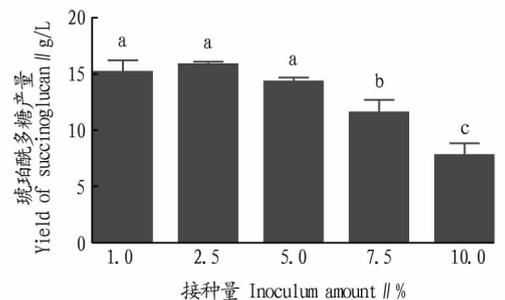


注:柱上不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicated that there were significant differences among treatments at 0.05 level

图 2 不同种类酵母粉对琥珀酰多糖产量的影响

Fig. 2 Effect of several different yeast types on the yield of succinoglucon



注:柱上不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicated that there were significant differences among treatments at 0.05 level

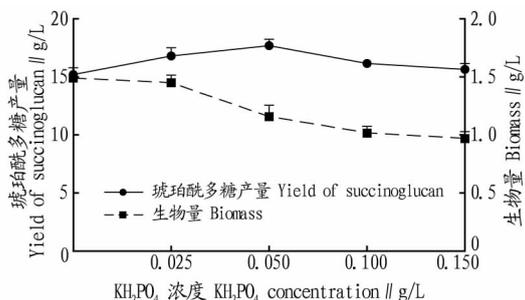
图 3 不同接种量对琥珀酰多糖产量的影响

Fig. 3 Effect of inoculum amount on the yield of succinoglucon

2.1.4 无机盐对琥珀酰多糖产量的影响。文献报道一些无机盐也会对琥珀酰多糖的产量造成影响,如 KH_2PO_4 、NaCl、 MgSO_4 等^[14]。

2.1.4.1 KH_2PO_4 对琥珀酰多糖产量的影响。由图 4 可知,添加不同浓度的 KH_2PO_4 对琥珀酰多糖的产量有一定影响。随着 KH_2PO_4 浓度的增加,多糖产量逐渐增加,当 KH_2PO_4 浓

度为 0.050 g/L 时,多糖产量达到最大,为 17.71 g/L。当 KH_2PO_4 浓度大于 0.050 g/L 时,随着质量浓度的升高产量逐渐下降。因此,选取 0.050 g/L KH_2PO_4 进行后续试验。



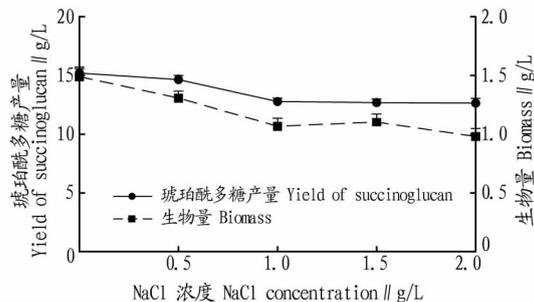
注:柱上不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicated that there were significant differences among treatments at 0.05 level

图 4 KH_2PO_4 浓度对琥珀酰多糖产量的影响

Fig. 4 Effect of KH_2PO_4 concentration on the yield of succinoglucon

2.1.4.2 NaCl 对琥珀酰多糖产量的影响。由图 5 可知,随着 NaCl 浓度的增加,琥珀酰多糖产量与无添加 NaCl 的对照相比逐渐减少。在微生物细胞中, Na^+ 与 K^+ 一般互为拮抗作用,共同存在,维持渗透压环境的稳定,只添加 NaCl 可能会打破细胞本身的渗透压平衡,不利于琥珀酰多糖的合成。



注:柱上不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicated that there were significant differences among treatments at 0.05 level

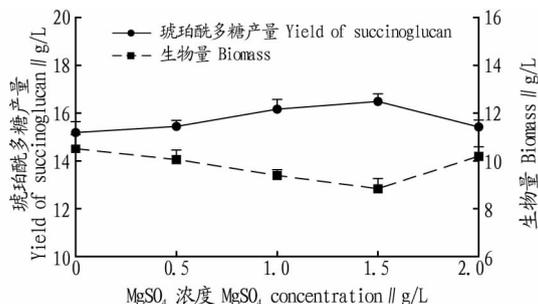
图 5 NaCl 浓度对琥珀酰多糖产量的影响

Fig. 5 Effect of NaCl concentration on the yield of succinoglucon

2.1.4.3 MgSO_4 对琥珀酰多糖产量的影响。由图 6 可知,琥珀酰多糖产量随着 MgSO_4 浓度的增加而逐渐增加, MgSO_4 添加量在 1.5 g/L 时达到最大值,为 16.49 g/L,随后琥珀酰多糖产量随着 MgSO_4 浓度的增加略有下降。镁是许多重要酶的激活剂和启动器,所以其用量的选择也非常关键^[21]。因此,选取 1.5 g/L MgSO_4 进行后续试验。

2.2 正交试验确定产琥珀酰多糖的最优培养条件 单因素试验优化结果表明,对根瘤农杆菌产琥珀酰多糖影响较为显著的 4 个因素分别为蔗糖、酵母粉、 KH_2PO_4 和 MgSO_4 ,选取这 4 个因素进行正交试验。

由表 2 可知,根据极差(R)得出各因素对琥珀酰多糖产量影响从大到小顺序为 C、A、D、B,即 KH_2PO_4 、蔗糖、 MgSO_4 、酵母粉,综合响应的琥珀酰多糖产量数据,得出 4 个因素的



注:柱上不同字母表示处理间在 0.05 水平差异显著

Note: Different lowercase letters indicated that there were significant differences among treatments at 0.05 level

图 6 MgSO_4 浓度对琥珀酰多糖产量的影响

Fig. 6 Effect of MgSO_4 concentration on the yield of succinoglucon

最佳组合是 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_1\text{D}_2$,即蔗糖 70 g/L,酵母粉 6 g/L, KH_2PO_4 0.025 g/L, MgSO_4 1.5 g/L。按照该最优条件进行 3 次验证试验,得到琥珀酰多糖产量的平均值为 18.550 g/L,是基础培养基产量(8.010 g/L)的 2.32 倍,显著提高了根瘤农杆菌 AT01 的琥珀酰多糖产量。

表 2 正交试验结果

Table 2 The orthogonal design scheme and results analysis

试验号 Test No.	因素 Factors				琥珀酰多糖产量 Yield of succinoglucon // g/L
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	17.780
2	1	2	2	2	17.533
3	1	3	3	3	16.933
4	2	1	2	3	18.027
5	2	2	3	1	16.747
6	2	3	1	2	18.507
7	3	1	3	2	16.380
8	3	2	1	3	17.760
9	3	3	2	1	16.800
k_1	17.415	17.396	18.016	17.109	
k_2	17.760	17.347	17.453	17.473	
k_3	16.980	17.413	16.687	17.573	
R	0.780	0.066	1.329	0.464	

3 结论

通过单因素试验,从培养基主要组成探讨了根瘤农杆菌产琥珀酰多糖的最佳条件,在此基础上选择对琥珀酰多糖产量影响较为显著的蔗糖浓度、酵母粉浓度、 KH_2PO_4 浓度和 MgSO_4 浓度进行 $\text{L}_9(3^4)$ 正交试验。最终得到的最优化培养条件为:蔗糖 70 g/L,酵母粉 6 g/L, CaCO_3 10 g/L, MgSO_4 1.5 g/L, KH_2PO_4 0.025 g/L,发酵时间 4 d,菌液接种量 2.5%,培养基初始 pH 7.2,发酵温度 30 $^\circ\text{C}$,摇瓶转速 250 r/min。在该最优方案下,根瘤农杆菌 AT01 琥珀酰多糖的产量达 18.550 g/L。该结果为今后琥珀酰多糖的进一步研究奠定了基础。

参考文献

- [1] SMITH E F, TOWNSEND C O. A plant-tumor of bacterial origin [J]. Science, 1907, 25 (643): 671-673.
- [2] WOOD D W, SETUBAL J C, KAUL R, et al. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58 [J]. Science, 2001, 294 (5550): 2317-2323.

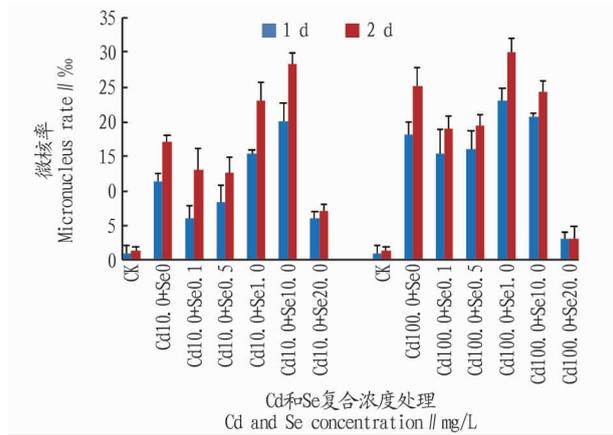


图4 Cd和Se复合处理对微核率的影响

Fig. 4 Effect of Cd and Se combined treatment on micronucleus rate

造成细胞死亡导致。当Cd浓度为100.0 mg/L时,细胞微核率的趋势与Cd浓度为10.0 mg/L时基本一致。综上所述,低浓度的Se能降低Cd污染中细胞微核的形成,有一定的拮抗作用,但是高浓度的Se则会和Cd形成协同作用,毒害细胞并增加细胞微核的产生。

3 结论与讨论

Cd作为一种有毒重金属,对植物有较强的毒性。该研究中,在Cd浓度为1.0~200.0 mg/L时,Cd的浓度越高,大蒜根尖生长受到的抑制作用越大,诱变大蒜根尖细胞形成微核的可能性越大。就Cd对大蒜根的细胞学毒害作用而言,该试验结果与小黑麦^[4]、番茄^[5]、水稻^[6]研究结果类似。植物根系最先与Cd进行接触,也能积累较高的Cd,也最先产生毒害作用^[7]。Cd能维持细胞内自由基产生和清除间的平

衡。过量自由基能损伤酶和DNA,导致细胞分裂受到抑制,进而造成细胞功能紊乱^[8],染色体畸变,微核数量显著增加。

Se是生物的营养元素,其作用效果具有二重性^[9]。该研究发现,低浓度的Se(<0.5 mg/L)对大蒜根生长起促进作用。一定浓度Se能缓解Cd对大蒜的抑制作用,原因可能是Se有抗氧化的作用,有助于降低或消除脂氢过氧化物产生的自由基对膜的攻击能力。Se与其他的重金属也有低浓度拮抗作用高浓度协同作用的特点^[10]。而高浓度的Se(>0.5 mg/L)则对大蒜的根尖产生明显的毒害作用,微核率也随浓度增加而上升。因此,在重金属污染的土壤里施用适量Se,有助于缓解重金属对农作物的毒害,对农业发展有重大意义。

参考文献

- [1] 宋建,金凤媚,薛俊,等.不同番茄品系吸收和积累镉能力的差异[J].安徽农业科学,2016,44(5):33-35.
- [2] 王丽霞.硒元素的植物生理作用及生理机制研究进展[J].安徽农业科学,2010,38(1):31-32.
- [3] 吴笛,张国栋,封少龙,等.两种新型杀虫剂对大蒜及蚕豆根尖细胞微核率影响的研究[J].农业环境保护,2002,21(1):72-73.
- [4] 时雨冉,白丽荣,高汝勇,等.镉胁迫对小黑麦根尖细胞的遗传毒害效应[J].麦类作物学报,2015,35(11):1592-1596.
- [5] 汪亚雯,陈德碧.镉对番茄根尖细胞的遗传毒害效应[J].贵州农业科学,2013,41(1):185-186.
- [6] 何俊瑜,任艳芳,严玉萍,等.镉胁迫对水稻幼苗生长和根尖细胞分裂的影响[J].土壤学报,2010,47(1):138-144.
- [7] 熊愈辉,杨肖娥.镉对植物毒害与植物耐镉机理研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(13):2969-2971.
- [8] 殷欣.镉胁迫下大豆生理生化特性及DNA甲基化变异的研究[D].哈尔滨师范大学,2016.
- [9] 高扬,韩德复,于海芹.硒对大蒜根尖细胞有丝分裂影响的初探[J].长春师范大学学报,2007,26(8):54-57.
- [10] 陈松灿,孙国新,陈正,等.植物硒生理及与重金属交互的研究进展[J].植物生理学报,2014,1(5):612-624.

(上接第17页)

- [3] STEDANSKY M, CONTI E, BERTOCCHI C, et al. Fed-batch production and simple isolation of succinoglycan from *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Biotechnology techniques, 1999, 13(1): 7-10.
- [4] HISAMATSU M, ABE J, AMEMURA A, et al. Formation of an oligosaccharide, the repeating unit of succinoglycan, by *Alcaligenes faecalis* var. *Myxogènes* [J]. Carbohydrate research, 1978, 66(1): 289-294.
- [5] MISAKI A, SAITO H, ITO T, et al. Structure of succinoglycan and exocellular acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogènes* [J]. Biochemistry, 1969, 8(11): 4645-4650.
- [6] BAKHTIYARI B, MOOSAVI-NASAB M, ASKARI H. Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by *Agrobacterium radiobacter* grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics [J]. Food hydrocolloids, 2015, 45: 18-29.
- [7] FLOCK T, MARCHITTO S. Adhesive Laminates for Rapid Wound Occlusion; US, 20120065672 [P]. 2012-03-15.
- [8] KAZUNOBU S, MISATO S, HIROKAZU I. O/W-TYPE SKIN CARE PREPARATION; JP, JP 2009286757 A [P]. 2009-12-10.
- [9] MIHARU N, MASAOKI I. Composition for external use containing succinoglycan, clay mineral and an alkyl acrylate/methacrylate copolymer; JP, EP 0988854 A3 [P]. 2002-06-19.
- [10] GOODNER B, HINKLE G, GATTUNG S, et al. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58 [J]. Science, 2001, 294(5550): 2323-2328.
- [11] HAO Y A, CHARLES T, GLICK B R. ACC deaminase activity in avirulent *Agrobacterium tumefaciens* D3 [J]. Canadian journal of microbiology, 2011, 57(4): 278-286.
- [12] RUIZ S P, MATTINEZ C O, NOCE A S, et al. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological

characterization of biopolymer [J]. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic, 2015, 122: 15-28.

- [13] ANDHARE P, DELATTRE C, PIERRE G, et al. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample [J]. Food hydrocolloids, 2017, 64: 1-8.
- [14] YOON S, KIM M K, LEE I Y, et al. Production and structural features of a water-soluble polysaccharide from a mutant strain of *Agrobacterium* sp. [J]. Journal of industrial and engineering chemistry, 2008, 14(6): 759-764.
- [15] TOMLINSON A D, RAMEY-HARTUNG B, DAY T W, et al. *Agrobacterium tumefaciens* ExoR represses succinoglycan biosynthesis and is required for biofilm formation and motility [J]. Microbiology, 2010, 156(9): 2670-2681.
- [16] COMISH A, GREENWOOD J A, JONES C W. The relationship between glucose transport and the production of succinoglycan exopolysaccharide by *Agrobacterium radiobacter* [J]. Journal of general microbiology, 1988, 134(12): 3111-3122.
- [17] STEDANSKY M, CONTI E, BERTOCCHI C, et al. Succinoglycan production by *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of fermentation and bioengineering, 1998, 85(4): 398-403.
- [18] SAUDAGAR P S, SINGHAL R S. Fermentative production of curdlan [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2004, 118(1/2/3): 21-31.
- [19] 杨让, 张学欢, 汪喜蛛, 等. 黄原胶发酵及提取工艺的优化研究 [J]. 食品工业, 2008(6): 20-23.
- [20] 陈超, 王君高, 周喜燕, 等. 黄原胶发酵条件优化研究 [J]. 中国酿造, 2009(4): 121-123.
- [21] 赵燕, 陈芳, 李建科, 等. 微生物多糖韦兰胶生产工艺优化 [J]. 食品科学, 2010, 31(23): 219-223.