

# 野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) L4 胞外多糖的理化分析\*

崔文华 王修垣

(中国科学院微生物研究所, 北京)

本文报道野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) L4 以蔗糖为底物在 2 吨发酵罐中生产的胞外多糖的理化分析结果, 并与美国的商品黄单胞菌多糖 (Xanthan) 相比较。两种多糖纯化后单糖组分的气相色谱分析表明, 它们均含有 D-葡萄糖和 D-甘露糖, 克分子比为 1:1。糖醛酸含量相同, 为 19%。L4 多糖和 Xanthan 的丙酮酸含量也相当, 分别为 4.23% 和 4.66%。元素分析和红外光谱分析表明, 它们有相似的元素组成和基团吸收。L4 多糖的沉降系数  $S_{0,w}^0$  为 11.5—11.9S, 比美国商品高 (10.10S)。L4 多糖的特性粘度  $[\eta] = 11.8$  dl/g, 偏比容  $\bar{v} = 0.55$  ml/g, 分子量为 2 225 600 — 3 783 000。

**关键词** 野油菜黄单胞菌; 黄单胞菌多糖

在微生物胞外多糖中, 黄单胞菌多糖 (Xanthan, 缩写为 XC) 是国际上生产量最大、在食品和其它工业中应用最广的一种。它是由野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 以糖质原料进行生产的<sup>[1,2]</sup>。国内近几年也在进行该多糖的研究和开发。已有的报导<sup>[3,4]</sup>都是以淀粉为底物。我们分离筛选到一株以蔗糖为底物产生发酵液粘度和多糖量都较高的菌株 L4。经鉴定, 该菌株可列入 *Xanthomonas campestris* 的同一种, 并已进行了两吨罐中试和 20 吨罐的生产性试验及其在石油工业中应用的室内研究。这些结果表明, L4 多糖具有投产和应用的良好前景。本文报道该多糖的理化分析结果。

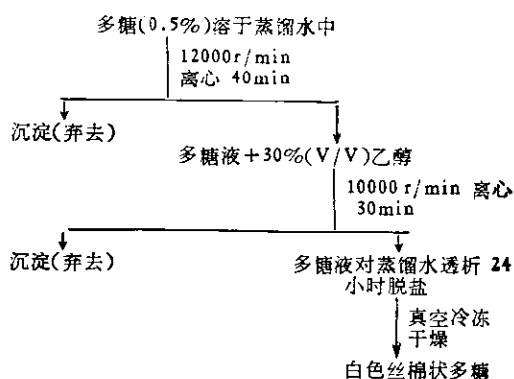
## 材料和方法

### (一) 多糖样品

L4 多糖系 2 吨罐发酵得到的酒精沉淀产品。发酵在国产通用式不锈钢发酵罐中进行, 机械搅拌, 转速为 180 r/min。通

气量 0.5—1.0:1.0 (V/V), 28—30℃, 接种量 5.0%。发酵周期 72 小时。五罐次的发酵结果为, 发酵液粘度达到 8340 至 12000cp, 多糖产量对底物的转化率平均为 62.45%, 均达到国际上的生产水平。

美国的 XC 系 Kelco 公司商品。两种多糖均按下列程序纯化处理。



### (二) 分析方法

聚丙烯酰胺凝胶电泳采用不连续盘状

本文于 1989 年 4 月 1 日收到。

\* 国家“七五”重点科技攻关项目。

电泳<sup>[5]</sup>, 分离胶浓度为 3.5%, 3mA/管, 电泳两小时。沉降分析用 HITACHI 282 型超速分析离心机, 每分钟转速为 55000, 温度 20℃。偏比容用比重瓶测定。特性粘度用奥氏粘度计在 20℃ 下测定。

多糖的单糖组份用 Shimadzu GC-9A 气相色谱仪进行分析。多糖经 2mol/L HCl 水解 3 小时, 按 Sawardeker 法<sup>[6]</sup>进行乙酰酯化。丙酮酸含量用酶法测定<sup>[7]</sup>。总糖醛酸用改进的呋唑法<sup>[8]</sup>。红外光谱分析用 KBr 压片、在 SPECORD 75 型红外光谱仪上进行。N、C 和 H 用 Hevaeus 快速测定仪测定, O 用 ST-02 G.C 进行分析。中性糖和糖醛酸的纸层析用苯胺-邻苯二甲酸显色<sup>[9]</sup>。

## 结果和讨论

纯化后的两个多糖样品 (L4 和 XC) 用于下列分析。

### (一) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

电泳结束, 用甲醇固定, 用阿尔仙蓝 (Alcian blue) 染色。L4 多糖和美国的 XC 均显示一条天蓝色带, 迁移率相同, 表明它们是均一的(图 1 中 L4 + XC)。

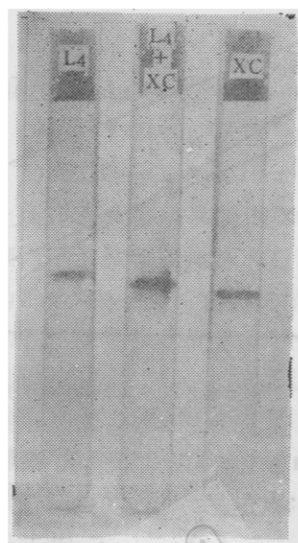


图 1 L4 多糖和 XC 的聚丙烯酰胺凝胶电泳  
Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of the polysaccharide L4 and xanthan

### (二) 超离心分析

两种多糖分别以各种不同浓度的溶液进行沉降分析, 均分别显出一个峰(图 2, XC 的略)。将所得的  $S_{20,w}$  对多糖浓度作图, 外推至零<sup>[10]</sup>, 得 L4 多糖和 XC 的沉降系数  $S_{20,w}^0$  分别为 11.9 (L4-I 为摇瓶样品, 15.0) 和 10.10 (图 3)。

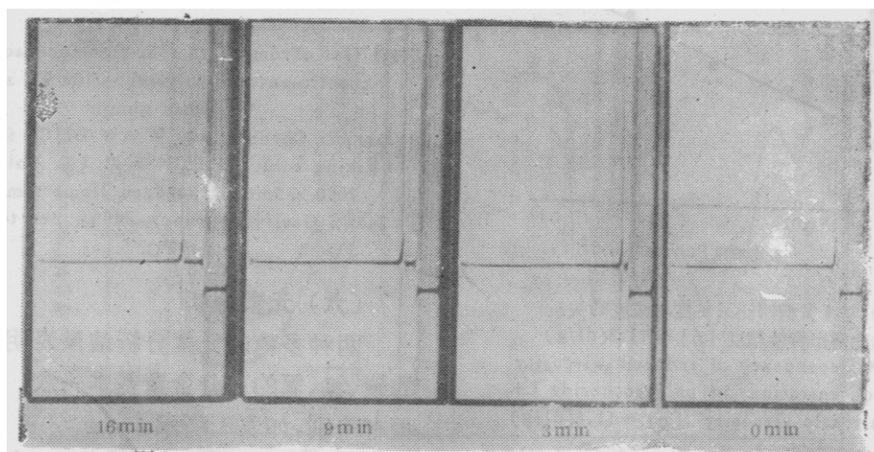


图 2 L4 多糖的沉降图谱

(将多糖溶在 0.2mol/L NaCl 中, 使其浓度为 0.0175%, 于 55000r/min 拍摄,  $S_{20,w} = 7.49$ )  
Fig. 2 Sedimentation patterns of purified polysaccharide L4 (0.0175% polysaccharide in 0.2mol/L NaCl, centrifugated at 55000r/min,  $S_{20,w} = 7.49$ )

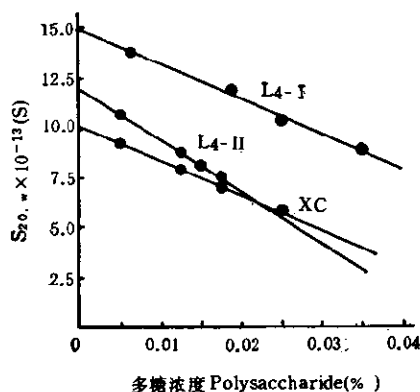


图3 L4 多糖和 XC 的沉降系数与浓度的关系

$S_{20,w}$ : L4-I = 15.0S; L4-II = 11.9S;  
XC = 10.1S

Fig. 3 The dependence of sedimentation coefficient on concentrations of polysaccharide

### (三) 特性粘度

按文献[10]的方法,以 0.2mol/L 的 NaCl 溶液,配制 5 种不同浓度的 L4 多糖溶液,在 20℃ 测定其粘度,外推至零浓度时的特性粘度值为 11.8dl/g(图 4)。

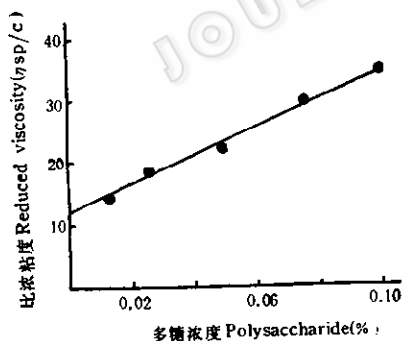


图4 L4 多糖的比浓粘度与浓度的关系

由此得出特性粘度  $[\eta] = 11.8(\text{dl/g})$

Fig. 4 Dependence of reduced viscosity on concentrations of polysaccharide L4  
The intrinsic viscosity  $[\eta] = 11.8(\text{dl/g})$

### (四) 偏比容

用比重瓶测定一定浓度的 L4 多糖的密度的倒数,即偏比容  $\bar{v}$  为 0.55ml/g。

### (五) 组份分析

L4 多糖和美国的 XC 的气相色谱分析(图 5)证明,它们的单糖组份相同,均为 D-葡萄糖和 D-甘露糖,克分子比为 1:1。

用酶法测得 L4 多糖的丙酮酸含量为 4.23%,美国 XC 的丙酮酸含量为 4.66%,均为丙酮酸含量高的产品。多糖经酸水解,纸层析图谱见图 6。

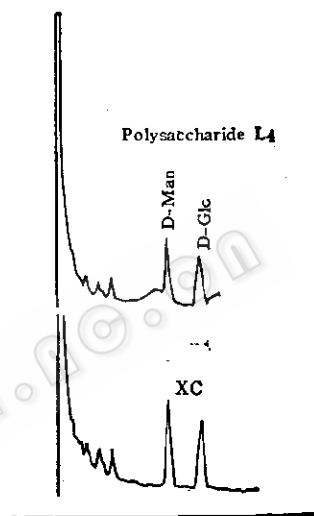


图5 L4 多糖和 XC 的气相色谱

载体: Chromosorb. W AW DMCS 50/80,  
固定液: ECNSS-M 3%,柱: 3×2000mm,  
氢焰温度: 240℃,气化温度: 300℃,柱室温度: 190℃。

Fig.5 Gas chromatogram of the monosaccharide constituents of polysaccharide L4 and xanthan gum

Carrier: Chromosorb. W AW DMCS 50/80,  
Fixing solution: ECNSS-M 3%, Column:  
2000 × 3mm. Hydrogen flame temp.  
240℃, Gasifying temp.: 300℃, Bed temp.: 190℃.

### (六) 元素分析

两种多糖的元素分析结果表明,它们的碳、氢、氧的百分含量基本一致,唯有氮稍有差别,如表 1 所示。

### (七) 红外光谱分析

由 KBr 压片得到两个多糖样品的红外光谱(图 7)相同,均含有下列基团:

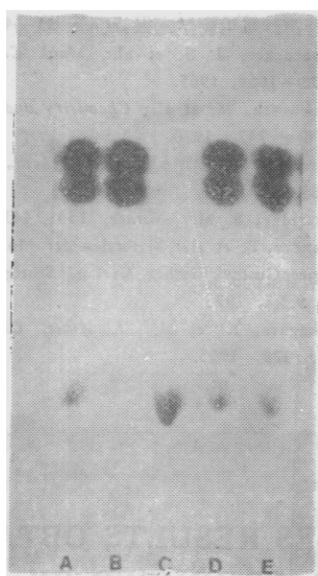


图6 L4多糖酸水解物的纸层析

展开剂: 正丁醇:吡啶:水(5:4:3, V/V) 显色剂:  
邻苯二甲酸-苯胺

A. L4 多糖水解物; B. 标准甘露糖和葡萄糖;  
C. 标准葡萄糖醛酸; D. 标准甘露糖、葡萄糖、  
葡萄糖醛酸; E. XC 水解物

Fig 6 Paper chromatogram of the acid  
hydrolysate of polysaccharide L4

Development with n-butanol: pyridine: water  
(6:4:3v/v), detected by aniline hydrogen  
phthalate reagent.

A. Hydrolysate L4; B. D-mannose+D-glucose  
(standard); C. glycuronic acid (standard); D.  
D-mannose+D-glucose +glycuronic acid; E.  
Hydrolysate of XC

—OH(3400cm<sup>-1</sup>)、—CH(2900cm<sup>-1</sup>)、

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{H} \end{array}$ (2750 cm<sup>-1</sup>)、 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array}$ (2320  
cm<sup>-1</sup>)、C=O(1720cm<sup>-1</sup>)、C=C=O  
(1620cm<sup>-1</sup>) 和 C—O—(1020cm<sup>-1</sup>)。

综上所述, L4 多糖和美国 XC 经纯化后, 在聚丙烯酰胺凝胶电泳和超离心分析中的行为都是均一的。它们的单糖组成、丙酮酸和糖醛酸含量、元素和红外光谱分析的结果也相同, 从而证明菌株 L4 生产的多糖为黄单胞菌多糖。它的沉降系数略高于美国 XC 的沉降系数。

将试验测得的 L4 多糖的有关物理常数代入下式<sup>[1]</sup>:

$$M = 4690 \times [S_{20,w}^1]^{3/2} \cdot [\eta]^{1/2} / (1 - \bar{\nu}\rho)^{3/2}$$

表1 多糖的元素分析结果

Table 1 Elemental analysis of the polysaccharide L4 and XC

多糖 Polysaccharide	元素(%) Element (%)	O	N	C	H
L4 多糖		44.30	<0.30	39.02	5.71
XC		44.28	0.73	39.94	5.71

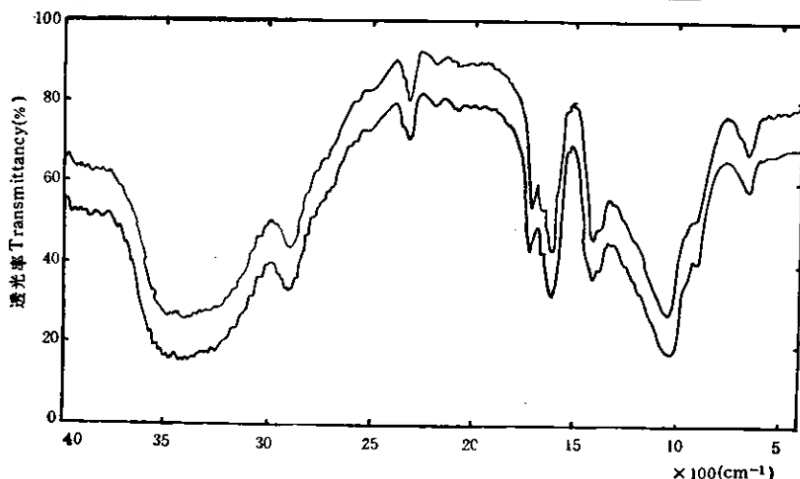


图7 L4多糖和美国 XC 的红外光谱

Fig. 7 IR spectrum of polysaccharide L4 and XC

式中:  $M$  = 分子量,  $\bar{v}$  = 偏比容,  $\rho$  = 溶剂密度,  $[S_{0,w}]$  = 外推至零浓度时的  $S$  值,  $[\eta]$  = 特性粘度。求得它的分子量为 2225600 至 3783000。

### 参 考 文 献

- [1] Kennedy, J. F. et al.: *Progress in Industrial Microbiology*, 19: 319—372, 1984.
- [2] Slodki, M. E. et al.: *Adv. Appl. Microbiol.*, 23: 19—54, 1978.
- [3] 赵大健等: *工业微生物*, 16(3): 11—20, 1986.
- [4] 江伯英等: *生物工程学报*, 4(3): 241—243, 1988.

- [5] 王杨声: *微生物学通报*, 5(6): 33—41, 1978.
- [6] Sawardeker, J. S. et al.: *Anal. Chem.*, 37: 1602—1604, 1965.
- [7] Duckworth, M. et al.: *Chemistry and Industry*, 23(6): 747, 1970.
- [8] Bitter, T. et al.: *Anal. Biochem.*, 4: 330, 1962.
- [9] Partridge, S. M.: *Nature*, 164: 443, 1949.
- [10] Chandra, P. et al.: *Methoden der Molekularbiologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Kapitel 9.3.3, 1973.
- [11] Fukagawa, K. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 75: 179, 1953.

## SOME PHYSICO-CHEMICAL ANALYSES RESULTS OBTAINED FROM EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCED BY *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* L4

Cui Wenhua Wang Xiuyuan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Exopolysaccharide L4 was produced by *Xanthomonas campestris* L4 utilizing sucrose as carbon source in 2 t fermenter. Data obtained from the purified L4 in polyacrylamide gel electrophoresis and in ultracentrifugal analysis showed that it is homogeneous. Its monosaccharide constituents, contents of pyruvic acid and glycuronic acid, elemental analysis, as well as its IR spectrum are similar to those of xanthan from the U.S.A. com-

mercial product. The sedimentation coefficients of polysaccharide L4 range from 11.5 to 11.9 S and higher than that of xanthan (10.10 S). Its intrinsic viscosity is 11.8 dl/g, partial specific volume 0.55 ml/g. Molecular weights range from 2 225 600 to 3 783 000.

### Key words

*Xanthomonas campestris*; Xanthan