

黄原胶分子形貌的电镜研究*

王德润 于宪潮

(南开大学中心实验室,天津)

赵大健 曹武雄 樊廷玉

(南开大学生物系,天津)

摘 要

本文用扫描电镜研究了温度、超声波处理及浓度对黄原胶分子形貌的影响,并用透射电镜研究了黄原胶单分子的形貌及分子量。认为黄原胶分子在一般情况下具有较规则的二、三、四级结构,论述了其初、高级结构之间的关系,得出了黄原胶分子是由40余个亚基组成的右手双螺旋这一结论,计算出其分子量为 6×10^6 至 25×10^6 。

关键词 黄原胶、形貌、结构、亚基分子量

黄原胶是细菌 *Xanthanomas campestris* 产生的一种胞外多糖。由于黄原胶作为食品增粘剂^[1]及在二次采油^[2]等多方面的应用,其分子结构也引起人们的广泛注意。

Lindberg 等^[3]首先证明黄原胶分子一级结构为梳状,分子量很大,是具有 $\beta(1 \rightarrow 4)$ 连键的吡喃葡萄糖聚合物。相间的葡萄糖残基的 C_3 上连有三糖侧链,上有丙酮酸及乙酸侧基(图1)。

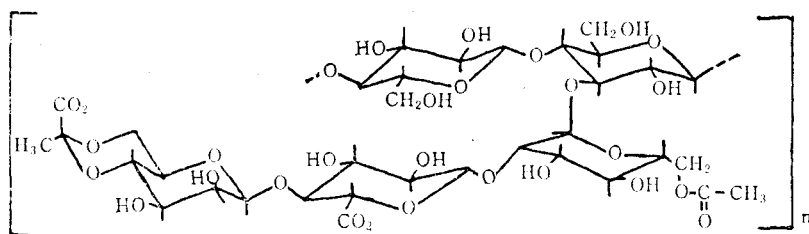


图1 黄原胶分子的结构式

X-衍射的研究认为黄原胶分子为五折的单螺旋结构^[4]。粘度测定^[5],旋光光度法或圆二色性^[6]及 NMR^[7] 对其溶液的研究认为黄原胶分子存在一种热诱导的由原始的棒状向变性的屈曲状结构的转变^[8]。G. Holzwarth 等^[8]利用透射电镜通过对黄原胶变性与复性的研究认为其原始结构为二股或三股的右手螺旋。

本文以扫描电镜观察了黄原胶分子在不同温度、有无超声波处理和不同浓度情况下聚集态的变化,得出了黄原胶分子具有规则的三、四结构的结论。另外用透射电镜(分辨率 $1.4 \text{ \AA}$)研究了黄原胶单分子的二、三级结构,非常直观地利用半变性的黄原胶样品观察

* 国家自然科学基金资助课题;本刊于1988年7月5日收到。

到了其多亚基的右手双螺旋二级结构。从而精确地证明和深化了 G. Holzwarth 的假设。据此还可分析出黄原胶分子一、二、三、四级结构之间关系及其概貌。这一论述未见文献报道。

材 料 和 方 法

1. 黄原胶样品

黄原胶样品为自制, 并经纯化: 乙醇粗提 → 透析 → 超速离心去蛋白质及菌体等杂质 → 沉淀 → 干燥 → 粉碎。

2. 水溶液配制

配成 4%, 3%, 1%, 6×10^{-5} g/l, 1.2×10^{-5} g/l 浓度的水溶液。

3. 超声波处理

将离心所得样品的一部分以功率为 63W, 频率为 20kHz 的 W-225 型超声波发生器处理 8 小时 (5℃左右)。纯化后配成浓度分别为 6×10^{-5} g/l, 1.2×10^{-5} g/l 溶液备用。

4. 扫描电镜 (HITACHI X60) 观察

将 4%, 3%, 2%, 1% 及部分 6×10^{-5} g/l, 1.2×10^{-5} g/l 的原样溶液及超声波处理过的溶液以 56℃ 水浴半小时后观察; 而另一部分 6×10^{-5} g/l, 1.2×10^{-5} g/l 的原样及超声波处理过样品溶液直接涂片观察 (离子溅射镀膜机上制样)。

5. 透射电镜观察

1.2×10^{-5} g/l 的原样溶液经 60℃ 水浴 60 分钟后, 立即沾于有碳膜铜网上, 7° 角喷涂钨合金, 然后以 PHILIPS 4EM 400ST 透射电镜观察 (以金为参照得知电镜分辨率为 1.4 Å)。透射电镜照片以 OPTON MORPHOMAT 10 测量分子主链长度以计算分子量。

结 果 与 讨 论

经扫描电镜观察, 以 6×10^{-5} g/l 的样品最清晰, 可以看出其形貌上的规律。浓度太高分辨不出形状; 太低则视野中难以找到目标。所以以浓度为 6×10^{-5} g/l 样品的结果进行讨论。

1. 温度对黄原胶分子的影响

图 2 至 4 均为浓度为 6×10^{-5} g/l 的原样溶液的扫描电镜照片, 样品未经温热处理。图 3、4 是图 2 的 10 倍放大, 其中图 3 采用微分照相以加大反差。图 5 为同一样品经温热处理, 56℃ 30 分钟后的观察结果。放大倍数同图 4。

从图 2 可见, 黄原胶在极稀的水溶液中若不加热, 呈很典型的菊花状聚集态。图 3、4 为这种聚集态的放大, 可以从中看出这种菊花状聚集态是由许多分子或分子集团或多或少地围绕一个中心呈放射状卷曲排列而成。从图 2 可看出这一形状的普遍性, 重复实验也得出了同一结果。因此可以认为这是黄原胶分子在一般情况下的极稀溶液中所固有的一种高级结构形式。而在 1% 以上的浓溶液中无此现象。

这一论点也可从图 5 得到反证。从图 5 可看出, 加热后黄原胶的聚集态明显散开, 变

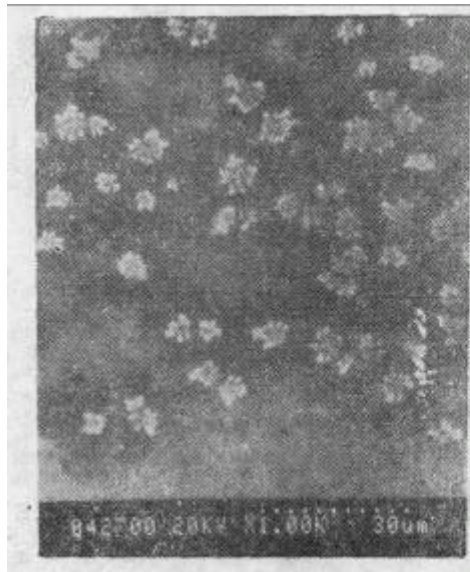


图2 浓度 $6 \times 10^{-3} \text{g/l}$ 的原样溶液扫描电镜照片(未加热) $\times 1000$



图3 同图2
(微分照相) $\times 10000$

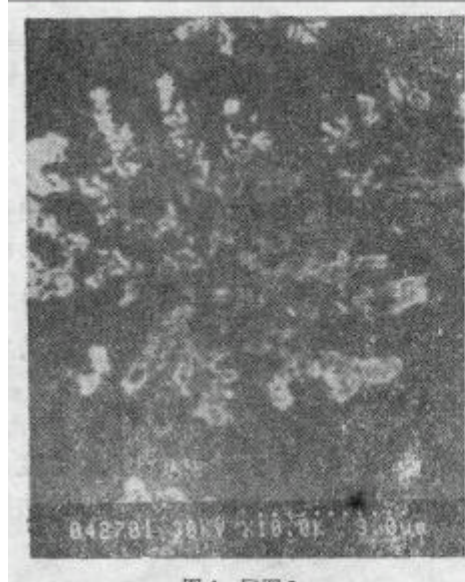


图4 同图2
($\times 10000$)

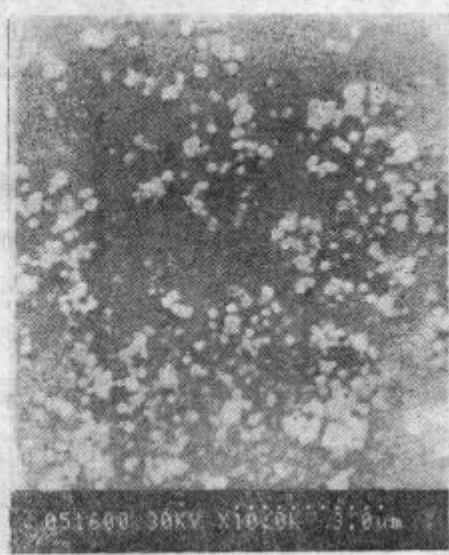


图5 浓度 $6 \times 10^{-3} \text{g/l}$ 原样经温热后扫描电镜照片($\times 10000$)

小,呈无规则的大小不一的团状。因而从反面说明了在常温下黄原胶的极稀溶液中存在一种以非共价键^[8]互相结合而形成的聚集态。温度的升高可以破坏非共价键,从而破坏了这一高级结构。

那么,黄原胶分子的这种四级结构是如何得以维系的呢?作者推测,一方面黄原胶分子之间存在许多非共价结合力^[8]。根据其分子量大($2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$)^[9],及其结构特点(图2),可知黄原胶分子之间存在着形成氢键及范德华力的可能。而分子之间的交错可以满足距离小于1 nm这一形成非共价结合力的条件。另一方面,溶剂的挥发过程也可能影响这一四级结构的形成。另外,也许还有一些不知道的作用力可以引起这种菊花状结

构的形成,这就有待于进一步的研究。而加热则会破坏上述维系其四级结构的因素,使分子之间以无规则状态存在。因为这时黄原胶作为聚电解质其静电斥力占了上风。

总之,作者认为黄原胶极稀溶液中存在一种菊花状四级结构。而温度的升高可以破坏这种四级结构。这可以部分解释黄原胶溶液粘度随温度升高而略有变大这一现象^[13]。

2. 超声波对黄原胶分子形貌的影响

图 6 为经超声波处理过的样品溶液的观察结果。样品浓度,水浴时间,放大倍数均与图 5 相同。比较两图,可以发现样品经超声波处理后,分子大小均匀,较为舒展,且不象原样紧密聚集。作者认为这主要因为超声波破坏了分子内非共价键甚至共价键的结果。这样使分子变得大小均一,分子量也下降了。这与粘度测定^[10],凝胶色谱^[11]等实验结果一致。可见超声波处理是切断黄原胶分子主链的有效方法。

更重要的是:在图 6 中观察到了变小了的菊花状聚集态。在升温和超声波这些不利于非共价键的因素存在下,菊花状结构的出现,说明其形成主要不是由于非共价结合力(指范德华力及氢键)而是由于溶剂的挥发过程或其它尚不了解的因素。而分子量的变小似乎可以加强这些因素的作用,有利于其四级结构的形成。

3. 黄原胶单分子形貌观察

作者认为,图 7 至 10 所示均为黄原胶单分子链。因为黄原胶分子量为 $2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ ^[9],与核酸(质粒)相近。而质粒在电镜下清晰可辨。再则,黄原胶分子由于侧链较

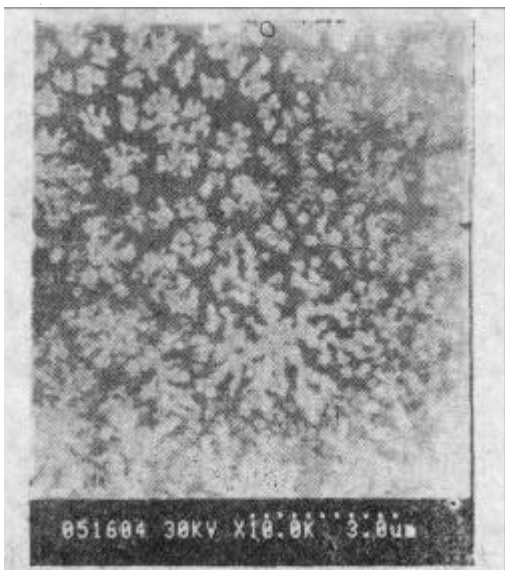


图 6 经超声波处理过的样品扫描电镜照片
(浓度 6×10^{-4} g/l, 水浴)($\times 10000$)

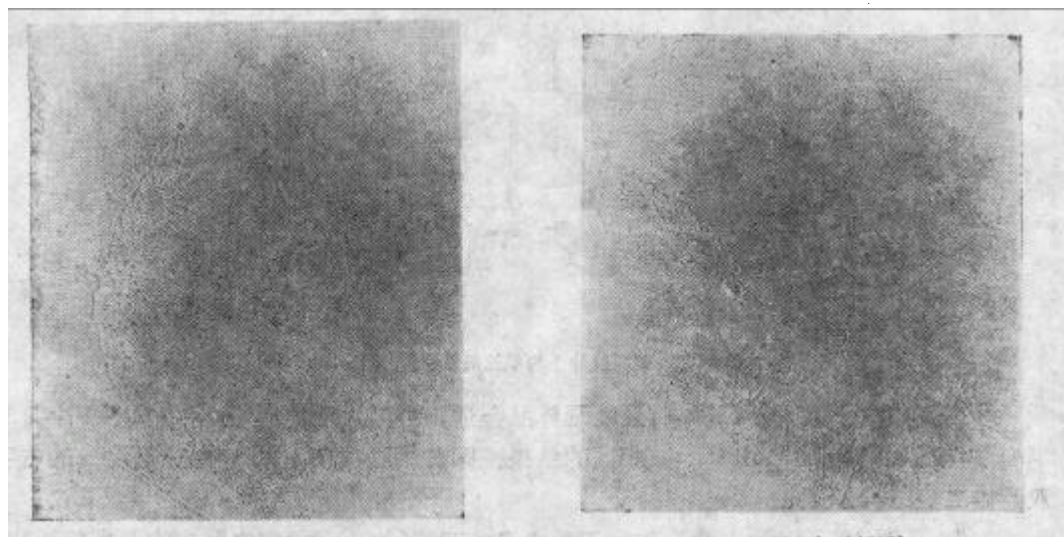
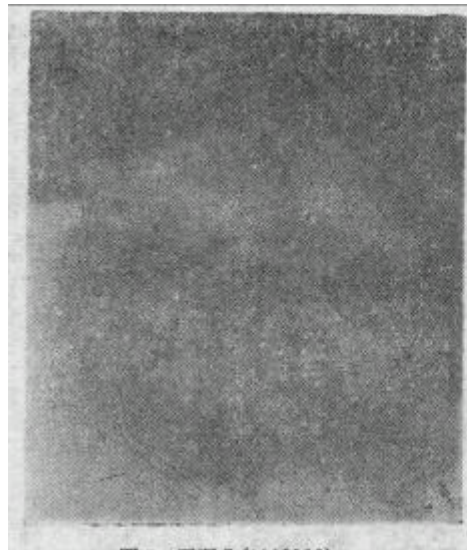


图 7 黄原胶分子透射电镜照片($\times 18000$)

图 8 同图 7 ($\times 14500$)

图9 同图7($\times 18000$)图10 同图7($\times 18000$)

大且成螺旋^[4]，所以分子链较粗，加上小角度喷涂，所以无疑可以分辨出来。另外，G. Holzwarth^[8]的实验也可证明本文所示为黄原胶单分子链。

Holzwarth^[8]曾分别观察了常温下和高温后变性的黄原胶分子，根据变性后形态的变化推测出正常黄原胶分子是由 40 余个亚基组成的直径为 4 nm 的右手双螺旋(图 11)。这种变性后成亚基的结果与凝胶色谱实验结果吻合^[11]。

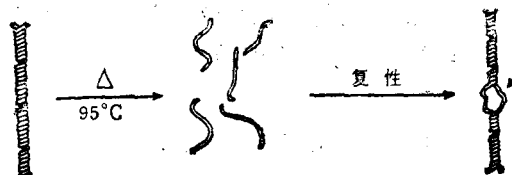


图 11 Holzwarth 实验示意图,箭头所指处与图 7 中箭头所示处相似

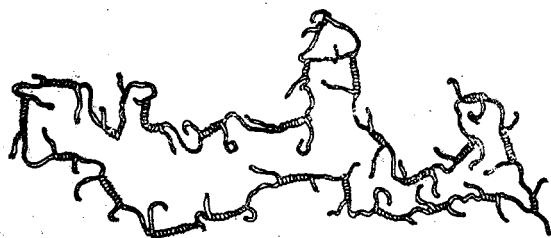


图 12 示黄原胶分子的多亚基双螺旋(示图 10)

而本文中由于电镜分辨率高,且处理样品合适,可以直观地从经 60℃ 水浴 1 小时的半变性样品观察到与 Holzwarth 相同的结果。即黄原胶存在由 40 余个亚基组成的右手双螺旋二级结构。

首先,从图 10 可以看出黄原胶分子是由许多亚基(约 40 个)缠绕而成的双螺旋结构,

如图 12 所示。半变性引起的部分解链使得这种结构十分直观地表现在照片中,并较易数出亚基数为 40 余个。而从图 7 箭头所示处则可看出双螺旋为右手走向(参看图 11)。

这样,只需处理一次样品便可观察到黄原胶分子具有由 40 余个亚基组成的右手双螺旋二级结构。比 Holzwarth 处理两次样品的方法要简单而直观。

从图 7 至 10 还可见,经 60 分钟加热后黄原胶分子三级结构变得较为舒展,与不加热时的紧密聚集相反。可见加热对三级结构有较大影响。另外还可看出,其三级结构与核酸相近有环状(图 10),线状(图 7),发卡状(图 9),无规卷曲等形式。如图 8 中就有许多闭合环状分子,估计形成方式如图 13 所示。

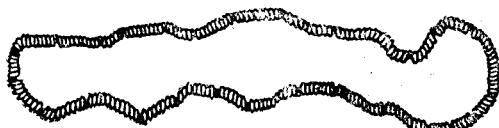


图 13 示黄原胶分子非共价闭合环

4. 黄原胶分子量计算:

对图 8—11 中各分子主链长度测定结果见表 1。

表 1 黄原胶分子量测定

来 源	图中长 (mm)	实际长 (nm)	分子量 (Dalton)
图 7 之环	159.153	8841.8	17.60×10^6
图 8 中小环	44.1003	3041.4	6.06×10^6
图 9 中的环	76.6289	4257.1	8.48×10^6
图 10	560.98	12878.0	25.65×10^6
图 8 中环	69.8726	4818.8	9.60×10^6
范 围			$6.06 \times 10^6 \sim 25.65 \times 10^6$

因为 X-衍射实验^[12]的结果认为黄原胶分子单螺旋为五折,螺距为 4.7nm,所以每个五糖重复单位相当于 0.94nm。而五糖重复单位分子量为 936(钠盐中),所以黄原胶分子单螺旋中每个 nm 相当于分子量为 996。双螺旋则为 1992Dalton/nm。所以整个分子的分子量等于 $1992 \times L$ (Dalton), L 为分子链长度的纳米数。结果列于表 1。

这一计算结果虽然不能代表平均分子量(因为只是随机取了几个分子),但可以看出黄原胶分子量的大致范围。可见在 $2 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ ^[9]之间。

光散射实验^[10]测同样品的分子量为 2×10^6 ,两实验结果吻合较好,从而进一步肯定了本文图 7 至 10 所示为黄原胶单分子。

另外,还可推算出黄原胶亚基分子量约为 10^5 。

参 考 文 献

- [1] Mcneely, W. H. and Kang, K. S., in R. L. Whistler ED, *Industrial Gums*, Academic Press, New York, 1973, p. 476.
- [2] Hirsaki, G. J. and Pope, G. A., *Soc. Pert. Eng. J.*, 1974, 14, 337.
- [3] Janson, P. E., Keme, L. and Lindberg, B., *Carbohydr. Res.*, 1975, 45, 275.
- [4] Moorhouse, R., Walkinshaw, M. D. and Arnott, S., *Extracellular Microbial Polysaccharides, ACS Symp. Ser.*, 1977, 45, 90.
- [5] Jeannes, A., Pittsley, J. E. and Senti, F. R., *J. Appl. Polym. Sci.*, 1961, 5, 519.
- [6] Rees, D. A., *Biochem. J.*, 1972, 126, 257.
- [7] Morris, E. R., in *Extracellular Microbial Polysaccharides*, Sandford P. A. and Laskin, A., Eds (American Chemical Society, Washington D. C., 1977, p. 80.
- [8] Holzwarth, G. and Prestridge, F. G., *Science*, 1977, 197, 757.
- [9] Holzwarth, G. *Carbohydr. Res.*, 1978, 66, 173.
- [10] 赵大健, 于宪潮, *应用化学*, 1989, 6(5), 86.
- [11] 王德润, 于宪潮, 待发表.
- [12] Moorhouse, R., Walkinshaw, M. D., Arnott, S., Abstra. Pap 171st, Meet ACS, 1976, Abstract CELL 097.
- [13] 赵大健等, «精细石油化工», 第一期.

STUDY OF THE APPEARANCE OF XANTHAN MOLECULES

WANG Derun, YU Xianchao

(The Central Lab. of Nankai University, Tianjin)

ZHAO Dajian, CAO Wuxiong and FAN Tingyi

(Department of Biology of Nankai University, Tianjin)

ABSTRACT

A scanning electron-microscope is used to study the effect of temperature, ultrasonic waves and different concentrations on the appearance of xanthan gums. A transmissive electron-microscope is used to study the appearance and molecular weight of the monomolecules of xanthan. A conclusion can be drawn that xanthan molecules have uniform secondary, tertiary and quaternary structures, and that the xanthan molecule is a right-handed double helix made up of 40 subunits. The relation between their primary and senior structures has also been stated. Its molecular weight is from 6,000,000 to 25,000,000.

Key words xanthan, appearance, structure, subunit, molecular weight