

## 制备方法对琼脂糖得率和质量的影响

杨远帆 蔡慧农 李利君 倪辉 陈申如\*

(集美大学生物工程学院, 厦门 361021)

**摘要** 研究了聚乙二醇法、硫酸铵法、EDTA- $\text{Na}_2$  法及尿素法提取的琼脂糖在得率和品质上的差异。结果表明, 4 种方法提取的琼脂糖在得率和品质方面都具有较大的差别; EDTA- $\text{Na}_2$  法琼脂糖的得率最高, 为 62.3%; 聚乙二醇法琼脂糖中的硫酸根和灰分含量最低, 分别为 1.39% 和 0.42%; 尿素法琼脂糖的结晶紫电泳性能最好, 其电泳长度为 8.6cm; EDTA- $\text{Na}_2$  法琼脂糖的聚乙二醇电泳性能最好, 电泳长度为 3.9cm。随着聚乙二醇法提取次数的增加, 琼脂糖纯度和质量显著提高。用聚乙二醇法提取 3 次所获得的琼脂糖的各项质量指标比其他 3 种方法获得的琼脂糖都好。

**关键词** 琼脂糖 制备方法 得率 质量

**中图分类号** Q539 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)06-0138-05

## Effect of processing method on the productivity and quality of agarose

YANG Yuan-fan CAI Hui-nong LI Li-jun NI Hui CHEN Shen-ru\*

(School of Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021)

**ABSTRACT** Study on agarose processing method is important for realizing domestic agarose production. Four methods, including polyethylene glycol, ammonia sulfate, EDTA- $\text{Na}_2$  and urea were used to extract agarose. The four methods showed significant differences in agarose productivity and quality, among which the EDTA- $\text{Na}_2$  method obtained the highest agarose productivity of 62.3%, the polyethylene glycol method produced agarose containing the least sulfate (1.39%) and ash (0.42%), the urea method produced agarose with the best electrophoresis characteristics of crystal violet which showed an electrophoresis length of 8.6 cm, while the EDTA- $\text{Na}_2$  method produced agarose with the best electrophoresis characteristics of polyethylene glycol which displayed an electrophoresis length of 3.9 cm. With the polyethylene glycol method, the longer the extraction time, the greater the purity and quality of agarose. Triple polyethylene glycol extractions obtained better agarose than those of other methods. These results would provide a reference for optimizing agarose production methods.

**KEY WORDS** Agarose Producing method Productivity Quality

琼脂糖是琼胶经过分离除去硫琼胶部分而获得的琼胶深加工产品, 其硫酸基和灰分的含量都很低, 在生物

集美大学博士科研启动基金项目资助

\* 通讯作者。E-mail: srchen@jmu.edu.cn, Tel: (0592)6181915

收稿日期: 2012-10-29; 接受日期: 2012-11-30

作者简介: 杨远帆(1971-), 女, 副教授, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: yuanfan@jmu.edu.cn, Tel: (0592)6181915

化学、医学方面具有广泛的用途,需求量日增(陈申如等 2002)。

国内学者对琼脂糖的研究主要侧重于琼脂糖改性方面(刘力等 2003;吴立根等 2008;林楠等 2009;周鑫等 2006;赵彦鼎等 2009;赵瑞芳等 2010;袁志坚等 2010;揭油平等 2010;韩德艳等 2006),在琼脂糖提取及纯化方面的研究极少(陈申如等 2002;姚美君等 2003;Hu *et al.* 2007),国产琼脂糖质量往往不尽如人意。而国外对琼脂糖系列产品制备的研究起步很早,对其性质方面的研究较多,也较为深入(Renn 1984; Rochas *et al.* 1986,1989; Serwer 1983; Xiong *et al.* 2005)。近30年来,对琼脂糖的开发和应用发展很快,美国、瑞典等国制出的琼脂糖已经得到广泛的应用。由于进口产品质量好,而且专一性强,针对不同用途,琼脂糖都有各自的规格标准,使用效果好,因此很受国人的欢迎,但进口琼脂糖价格较贵。

因此,研究琼脂糖的提取及纯化技术,建立国产化的琼脂糖生产技术,将能有效地解决国内琼脂糖依靠进口产品的现状。本研究用几种不同的提取方法提取琼脂糖并对其质量进行检测,为琼脂糖提取的进一步研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料

粉末状江蕨琼胶,2010年购于环球琼胶工业有限公司,4℃保存于集美大学生物工程学院备用。

#### 1.1.2 主要试剂

盐酸、乙醇、EDTA- $\text{Na}_2$ 、聚乙二醇、丙酮、乙醚、尿素、柠檬酸、柠檬酸钠、氯化钡、硫酸铵、山梨醇、三氯乙酸、氨水、氢氧化铵、硫酸钾、巴比妥、巴比妥钠、结晶紫等药品为分析纯,均为国药集团化学试剂有限公司生产的产品。活性炭为化学纯,广东汕头市西陇化工厂产品。

#### 1.1.3 主要仪器设备

FA1004 电子天平(上海精科天平有限公司)、HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)、D2F-250 小型真空干燥箱(郑州长城科工贸有限公司)、TD2-4DB 台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司)、SKZ-III 循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂)、DYCP-31D 小型水平电泳槽(北京市六一仪器厂)、6E300-0330 恒流恒压电泳仪(上海天龙科技有限公司)、721 型可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)、DHG-9146A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)、PHS-2C 精密酸度计(上海雷磁仪器厂)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 主要试剂的配制

10mol/L 尿素溶液(pH 6.2):量取 0.1mol/L 柠檬酸溶液 8.2 ml,与 0.1mol/L 柠檬酸钠溶液 11.8 ml 混合,配成 pH 5.0 的柠檬酸缓冲液,缓慢加入 10mol/L 尿素溶液中,使 pH 为 6.2。巴比妥缓冲液(0.05mol/L, pH 8.6):准确称取 1.84g 巴比妥和 10.3g 巴比妥钠,溶于蒸馏水中,定容至 1 000ml。1% 结晶紫溶液:准确称取 0.1g 结晶紫,溶解在 10ml 的无水乙醇中。1% 聚乙二醇溶液:准确称取 0.1g 聚乙二醇,溶解在 10ml 的蒸馏水中。

#### 1.2.2 琼脂糖的提取

参考金骏等(1993)的方法并略有改进。

##### 1.2.2.1 聚乙二醇法

称取 12g 琼胶,按固液比 1:25 加水,放沸水浴中,搅拌至溶解,在 80℃ 时加入 300ml 80℃ 的 40% 的聚乙二醇(分子量为 6 000)溶液,搅拌混合,在 3~5min 内便产生沉淀,用 200 目筛绢布过滤。由于琼脂糖不溶于醇的水溶液,而高硫酸根酸性组分在醇的水溶液中的浓度高于在原琼胶复合物中的浓度,溶解度的差异使琼脂糖与硫酸琼胶得以分离。沉淀用 40℃ 温水洗 2~3min,洗去硫酸琼胶,再转移到 15℃ 的水中充分洗涤。浸洗过夜,以除去大部分的聚乙二醇,然后再用丙酮洗,乙醚洗,40℃ 真空干燥。即得提取 1 次之琼脂糖。

将按前面步骤提取的琼脂糖溶于水,使其浓度为4%,再加聚乙二醇进行沉淀,操作同上。得提取两次之琼脂糖。再重复一次,即得提取3次之琼脂糖。将提取不同次数的琼脂糖分别放入干燥器中待测。

#### 1.2.2.2 硫酸铵法

将12g琼胶加水,加热溶化,配成2%浓度的溶液,取250ml 80℃饱和硫酸铵加到热的琼胶溶液中,同时搅拌,在热水浴中放置30min,使硫琼胶溶解出来而琼脂糖不溶,然后用预热的离心管在2500r/min转速下离心5min,分离去上清液,沉淀物即为琼脂糖。将沉淀放在布氏漏斗上,用冷水洗,再将沉淀放烧杯中加水250ml,加热使溶解,加入两倍体积的丙酮,产生沉淀,在4℃放置过夜。取出沉淀,用水洗去沉淀中的硫酸铵,再用丙酮脱水,滤去丙酮,沉淀室温干燥,得琼脂糖。放入干燥器中待测。

#### 1.2.2.3 EDTA-Na<sub>2</sub>法

在250ml水中加2g EDTA-Na<sub>2</sub>,溶解,放入12g琼胶,加热至60℃,水浴维持4h。这时EDTA-Na<sub>2</sub>使硫琼胶溶解出来而琼脂糖不溶,从而与琼脂糖分离。沉淀取出后用水洗去EDTA-Na<sub>2</sub>和硫琼胶,40℃真空干燥得琼脂糖。放入干燥器中待测。

#### 1.2.2.4 尿素法

取12g琼胶加入300ml 10mol/L尿素溶液(加柠檬酸缓冲液使pH为6.2),放在圆底烧瓶中,加热溶化,冷却至40℃,加入乙醇,每分钟加10ml,成细流状加入,同时搅拌,加至乙醇的浓度达到55%(v/v),此时溶液混浊,琼脂糖与硫琼胶分离。在40℃,温和的搅拌下平衡15h。用离心机分离琼脂糖沉淀。40℃真空干燥,得琼脂糖。放入干燥器中待测。

### 1.2.3 琼脂糖质量的检测

#### 1.2.3.1 得率的测定

将干燥器中的琼脂糖取出,称重,计算得率。

$$\text{得率}(\%) = \frac{\text{琼脂糖质量}(\text{g})}{\text{原琼胶质量}(\text{g})} \times 100$$

#### 1.2.3.2 硫酸根的测定

用比色法进行测定(金骏等1993)。

#### 1.2.3.3 灰分的测定

用灰化法进行测定(GB5009.4-2010)。

#### 1.2.3.4 结晶紫电泳的测定

称取0.8g琼脂糖样品,加入80ml已稀释5倍的0.05mol/L、pH8.6巴比妥缓冲液中,配成1%的琼脂糖溶液,加热溶解。趁热倒入12cm×12cm胶板上,放上齿梳,齿梳底部距离胶板约1mm。胶体凝固后,轻轻拔掉齿梳,将已凝固的胶板放入电泳槽中,加入已稀释5倍的0.05mol/L、pH8.6的巴比妥缓冲液,液面没过胶板不超过1mm。用可调式移液器取1%结晶紫溶液5μl,上样。室温下,设置电流50mA,电泳2.5h。取出,测量结晶紫移动的距离。

#### 1.2.3.5 聚乙二醇电泳的测定

制胶及电泳方法同上,移取1%聚乙二醇溶液5μl,上样,电泳2.5h。取出后放入15%三氯乙酸溶液中,浸约10min,在负极一端出现一白色小斑点,测量此斑点至原点的距离。

## 2 结果和讨论

### 2.1 琼脂糖得率

4种方法提取的琼脂糖得率如图1所示。由图1可知,EDTA-Na<sub>2</sub>法提取琼脂糖的得率最高(62.3%),依次是硫酸铵法、聚乙二醇法和尿素法。

### 2.2 琼脂糖的硫酸根及灰分含量

4种方法提取的琼脂糖及原琼胶的硫酸根及灰分含量如表1所示。由表1可知,聚乙二醇法提取的琼脂

糖的硫酸根含量最低(1.39%),其去除硫酸根的效果最好,依次是硫酸铵法、EDTA- $\text{Na}_2$ 法和尿素法;灰分含量最低的也是聚乙二醇法提取的琼脂糖(0.42%),依次是尿素法、EDTA- $\text{Na}_2$ 法和硫酸铵法。

### 2.3 琼脂糖的结晶紫电泳测定

4种方法提取的琼脂糖及原琼胶的结晶紫电泳结果如表2所示。由表2可知,尿素法提取的琼脂糖的结晶紫电泳性能最好,距离最长(8.6 cm),依次是聚乙二醇法、EDTA- $\text{Na}_2$ 法和硫酸铵法。

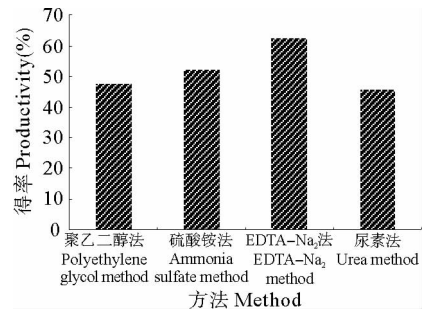


图1 4种方法提取琼脂糖的得率

Fig. 1 Productivity of agarose by four methods

表1 4种方法提取的琼脂糖的硫酸根及灰分含量

Table 1 Sulfate and ash content of agarose produced by four methods

方法 Method	原琼胶 Agar	聚乙二醇法 Polyethylene glycol method	硫酸铵法 Ammonia sulfate method	EDTA- $\text{Na}_2$ 法 EDTA- $\text{Na}_2$ method	尿素法 Urea method
硫酸根 Sulfate (%)	6.42	1.39	1.59	1.68	2.06
灰分 Ash (%)	2.25	0.42	1.88	1.02	0.44

表2 4种方法提取的琼脂糖的结晶紫电泳结果

Table 2 Crystal violet electrophoresis of agarose produced by four methods

方法 Method	原琼胶 Agar	聚乙二醇法 Polyethylene glycol method	硫酸铵法 Ammonia sulfate method	EDTA- $\text{Na}_2$ 法 EDTA- $\text{Na}_2$ method	尿素法 Urea method
电泳长度 Electrophoresis length (cm)	6.5	8.2	7.5	7.8	8.6

### 2.4 琼脂糖的聚乙二醇电泳测定

4种方法提取的琼脂糖及原琼胶的聚乙二醇电泳结果如表3所示。由表3可知,EDTA- $\text{Na}_2$ 法提取的琼脂糖的聚乙二醇电泳性能最好,距离最短(3.9 cm),依次是尿素法、聚乙二醇法和硫酸铵法。

表3 4种方法提取的琼脂糖的聚乙二醇电泳结果

Table 3 Polyethylene glycol electrophoresis of agarose produced by four methods

方法 Method	原琼胶 Agar	聚乙二醇法 Polyethylene glycol method	硫酸铵法 Ammonia sulfate method	EDTA- $\text{Na}_2$ 法 EDTA- $\text{Na}_2$ method	尿素法 Urea method
电泳长度 Electrophoresis length (cm)	8.8	4.5	4.9	3.9	4.3

由4种提取方法可知,用聚乙二醇法提取琼脂糖虽然得率不是最高的,但其提纯效果是最好的(琼脂糖硫酸根和灰分的含量最低),电泳性能也较好,因此,建议采用该法提取琼脂糖。本研究进一步对该法进行了两次和3次提取试验。

### 2.5 聚乙二醇法的两次、3次提取琼脂糖试验

用聚乙二醇法提取琼脂糖时,不同提取次数的结果见表4。由表4可知,随着提取次数的增加,琼脂糖得率逐渐降低;硫酸根含量在提取两次后便不再降低,而灰分则继续降低(可能是因为其中的可溶性盐仍在减少);结晶紫电泳距离随提取次数的增加逐渐变长,聚乙二醇电泳距离则逐渐变短,即电泳性能逐渐变好。说明随着提取次数的增加,琼脂糖提纯效果显著提高。综上所述,可以认为提取3次是较为适宜的。

从表1、表2、表3及表4可以看出,与其他3种方法相比,用聚乙二醇法提取琼脂糖3次后,琼脂糖的各项质量指标均是最好的。

一般情况下,分子量在4 000~8 000的聚乙二醇提取效果较好,分子量在6 000左右的提取效果更好

(刘力等 2001)(本研究采用的是分子量在 6 000 的聚乙二醇)。但聚乙二醇和水溶液的混合速度、温度、水溶液的离子强度等都会影响提取效果,这方面的内容有待于今后进一步研究。

表 4 聚乙二醇法提取琼脂糖不同次数的结果

Table 4 Effects of extracting times on agarose productivity and quality by polyethylene glycol method

	得率 Productivity (%)	硫酸根 Sulfate content(%)	灰分 Ash content(%)	结晶紫电泳长度 Crystal violet electrophoresis length(cm)	聚乙二醇电泳长度 Polyethylene glycol electrophoresis length(cm)
原琼脂 Agar		6.42	2.25	6.5	8.8
提取 1 次的琼脂糖 Extracted once	47.5	1.39	0.42	8.2	4.5
提取 2 次的琼脂糖 Extracted twice	44.1	0.85	0.36	9.0	3.8
提取 3 次的琼脂糖 Extracted three times	42.3	0.85	0.30	9.8	3.4

### 3 结论

用聚乙二醇法、硫酸铵法、EDTA- $\text{Na}_2$  法及尿素法提取琼脂糖,得率最高的是 EDTA- $\text{Na}_2$  法,为 62.3%;去硫酸根和灰分效果最好的是聚乙二醇法,硫酸根和灰分含量分别为 1.39% 和 0.42%;结晶紫电泳性能最好的是尿素法,电泳长度为 8.6 cm;聚乙二醇电泳性能最好的是 EDTA- $\text{Na}_2$  法,电泳长度为 3.9 cm。聚乙二醇法多次提取琼脂糖的结果表明,随着提取次数的增加,琼脂糖提纯效果显著提高,可以认为提取 3 次是较为适宜的。用聚乙二醇法提取 3 次的琼脂糖,与其他 3 种方法提取的琼脂糖相比,各项质量指标均是最好的。

### 参 考 文 献

- 刘力,李智恩,徐祖洪. 2003. 低凝固温度琼脂糖的制备方法研究. 海洋科学, 27(12): 71-74, 78
- 刘力,苑全云,李智恩. 2001. 低电内渗琼脂糖研究进展. 海洋科学, 25(6): 31-34
- 陈申如,张其标,苏喜荣. 2002. 不同来源琼胶提取琼脂糖的比较. 海洋水产研究, 23(4): 51-55
- 吴立根,王岸娜,毛文君. 2008. 几种低聚琼脂糖的制备和对小鼠血糖的影响研究. 河南工业大学学报(自然科学版), 29(1): 48-51
- 林楠,吴颖,郑国钧,马光辉,苏志国. 2009. 微孔膜乳化法制备大粒径琼脂糖微球. 过程工程学报, 9(5): 953-961
- 周鑫,孙彦,刘铮. 2006. 大孔薄层琼脂糖凝胶-玻璃珠复合介质的合成及其对蛋白质吸附特性. 化工学报, 57(2): 347-352
- 金骏,林美娇. 1993. 海藻利用与加工. 北京: 科学出版社, 184-186
- 赵彦鼎,杨博,张鹏宇,王燕,贺小艳,郭立安,贺浪冲. 2009. 化学改性琼脂糖凝胶的物化性能及其对重组人血白蛋白的纯化应用研究. 离子交换与吸附, 25(3): 218-224
- 赵瑞芳,尤玲玲,汤顺清,黄峻聪. 2010. 琼脂糖醋酸酯的制备方法与表征. 材料导报, 24(2): 108-110
- 姚美君,袁亚辉. 2003. 琼脂糖生产工艺的革新研究. 水产科技情报, 30(6): 275-277
- 袁志坚,包磊,张灵敏,储彬,毛萱,汤顺清. 2010. 大型海藻多糖-琼脂糖的改性及作为皮肤敷料的研究—琼脂糖的降解及其特性. 材料导报, 24(16): 460-462
- 揭油平,尤玲玲,梁婉爱,汤顺清. 2010. 硫酸酯化琼脂糖的抗凝血性能. 中国组织工程研究与临床康复, 14(16): 2907-2910
- 韩德艳,谢长生. 2006. 铁琼脂糖磁性微球的制备和表征. 化学与生物工程, 23(6): 19-21
- Hu RG, Liu XL, Liu L and 3 others. 2007. The preparation of low electroendosmosis agarose and its physico-chemical property. Chin J Oceanol Limnol 25(4): 367-372
- Renn DW. 1984. Agar and agarose: Indispensable partners in biotechnology. Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development 23 (1): 17-21
- Rochas C, Lahaye M, Yaphe W. 1986.  $^{13}\text{C}$ -N. M. R. -spectroscopic investigation of agarose oligomers. Carbohydrate Research 148(2): 199-207
- Rochas C, Lahaye M. 1989. Average molecular weight and molecular weight distribution of agarose and agarose-type polysaccharides. Carbohydrate Polymers 10(4): 289-298
- Serwer P. 1983. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. Electrophoresis 4(6): 375-382
- Xiong JY, Narayanan J, Liu XY and 3 others. 2005. Topology evolution and gelation mechanism of agarose gel. J Phys Chem B 109 (12): 5638-5643