

低凝固温度琼脂糖的制备方法研究

刘 力 李智恩 徐祖洪

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 以石花菜分级得到的琼脂糖为原料,采用甲基化方法制备低凝固温度琼脂糖。所得到的低凝固温度琼脂糖产品的凝固温度为 30.1 ℃(1.5 %浓度),融化温度为 64.8 ℃(1.5 %浓度),凝胶强度为 264 g/cm²(1.0 %浓度),主要质量标准与 Sigma 公司的低凝固温度琼脂糖产品接近,符合低凝固温度琼脂糖产品的质量要求。

关键词 琼脂糖,甲基化反应,凝固温度,凝胶强度

中图分类号 Q539 **文献标识码** A **文章编号** 1000 - 3096(2003)12 - 0071 - 04

在琼脂糖的应用中,特别是现代生物技术研究,都需要低凝固温度琼脂糖。从天然原藻中提取的琼脂和琼脂糖的凝固温度在 35 ~ 36 ℃左右,许多生物热敏物质在 35 ~ 36 ℃的环境中会失去生物活性。琼脂糖凝胶达到一定的凝胶强度才有实际应用价值。因而,制备低凝固温度而又具有一定凝胶强度的琼脂糖对于推进生物技术研究的发展十分必要。Guiseley 发明了利用烷基化、羟烷基化、链烯基化、酰基化反应制备低凝固温度琼脂糖的方法^[1]。但是目前国内还没有此类研究的报道。本文以石花菜分级得到的琼脂糖为原料,探讨了甲基化反应条件对制备低凝固温度琼脂糖的影响,确定了甲基化反应制备低凝固温度琼脂糖的最佳反应条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

琼脂糖由本实验室自制^[2]。其他实验材料为:冰醋酸(AR),硼氰化钠(AR),医用酒精(95%),低凝固温度琼脂糖(A4018,美国 Sigma 公司)。

1.2 低凝固温度琼脂糖的制备

取 2 g 琼脂糖粉末,加 75 mL 蒸馏水,室温下溶胀 1.5 h,在压力锅中加热至 0.05 kPa 恒压 30 min,配成 2.6 %的琼脂糖热溶液。待琼脂糖溶液冷却至 80 ℃,加入 0.12 g NaBH₄,80 ℃下恒温 10 ~ 15 min。然后加入 13 % NaOH 溶液调节反应体系的 pH 值,滴加甲基化试剂硫酸二甲酯,恒温下进行甲基化反应。反应后,冷却至 60 ℃,边搅拌边逐滴加入 0.5 mol/L CH₃COOH,调节 pH ≈ 7。用 4 倍体积的 95 %乙醇沉淀,放置过夜,260 目筛绢过滤,红外灯下烘干,得到

低凝固温度琼脂糖。

$$\text{产率} = \frac{\text{低凝固温度琼脂糖的质量}}{\text{琼脂糖原料的质量}} \times 100\%$$

1.3 凝胶强度的测定

称取一定量的实验样品粉末加蒸馏水,室温下溶胀 1.5 h,在压力锅中加热至 0.05 kPa 恒压 30 min,配成 1 %的热溶液。实验样品完全溶解后趁热倒入称量瓶中(高 25 mm,直径 40 mm),放置过夜。测量前 30 ℃恒温 1 h,用凝胶强度测定仪测定凝胶强度^[3]。

1.4 凝固温度与融化温度

凝固温度测定^[4]: 1.5 %胶液的配制同凝胶强度测定方法。溶解后取 10 mL 倒入内径 15 mm 的试管中,插入温度计,使其水银球在液面以下。使胶液温度慢慢下降(约 1 ℃/min),至试管倾斜 90°角,液面凝固不流动时的温度即为凝固温度。

融化温度测定^[4]: 1.5 %胶液的配制同凝胶强度测定方法。溶解后取 15 mL 倒入 22 mm 的试管中,插入温度计,使其水银球在液面以下,液面水平放置凝固。次日,在凝胶表面放 1 粒直径 3 mm 的不锈钢珠,将试管放在水浴中加热,使凝胶温度渐渐上升,观察钢珠突然落至试管底部时的温度即为融化温度。

第一作者:刘力,出生于 1976 年,硕士,研究方向:海洋天然产物。E-mail:liuli@ms.qdio.ac.cn

收稿日期:2002 - 09 - 19;修回日期:2002 - 12 - 10

2 结果与分析

2.1 反应条件的确定

本实验通过一系列的单因子变量实验,分别确定最佳反应体系 pH 值、反应时间、温度和修饰试剂

用量等因素。将原料琼脂加水融化,可使反应在均一液相中进行,从而提高反应效率。

2.1.1 反应体系的 pH 值对凝固温度、凝胶强度和产率的影响 首先固定加入 1.0 mL 硫酸二甲

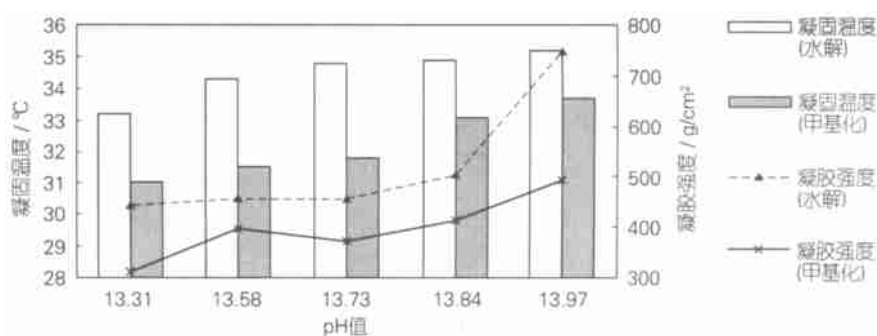


图 1 反应体系的 pH 值对凝固温度和凝胶强度的影响

Fig.1 Influence of pH on gelling points and gel strength

酯,反应时间 1 h,反应温度 80 °C,以确定反应体系的最佳 pH 值。琼脂糖分子的降解和甲基化都可以使凝固温度降低,但同时也会引起凝胶强度的降低。反应体系的 pH 值对凝固温度和凝胶强度的影响见图 1。从图 1 可知,未加硫酸二甲酯的情况下,随着 13 % NaOH 溶液用量的增加,反应体系的 pH 值越大,琼脂糖水解释的越少,水解引起的凝固温度降低越少。加硫酸二甲酯的情况下,当 13 % NaOH 溶液用量为 5 mL 时,凝固温度出现最低值。

下,当 13 % NaOH 溶液用量为 15 mL 时,扣除水解因素引起的凝固温度的降低,仅由甲基化引起的凝固温度的降低出现最大值。因琼脂糖凝胶强度小于 250 g/cm² (1.0 % 浓度) 时无实际应用价值,所以选择所得琼脂糖的凝胶强度为 414 g/cm² (1.0 % 浓度) 的反应条件,即加入 20 mL 13 % NaOH 溶液时的 pH 作为反应体系的最佳 pH 值。甲基化反应的产率结果见图 3,从图 3 可以看出,产率随反应体系的 pH 值增大而增大。

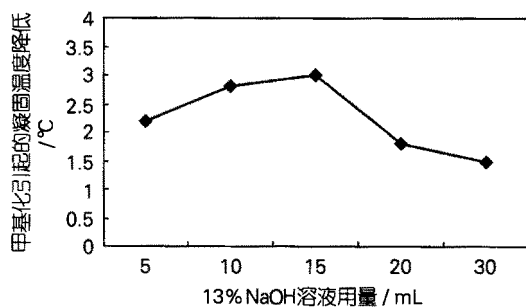


图 2 反应体系的 pH 值对甲基化引起的凝固温度降低的影响

Fig.2 Influence of pH on lowering of gelling points by reason of methylation reaction

反应体系的 pH 值对甲基化引起的凝固温度降低的影响如图 2。由图 2 可知,加硫酸二甲酯的情况

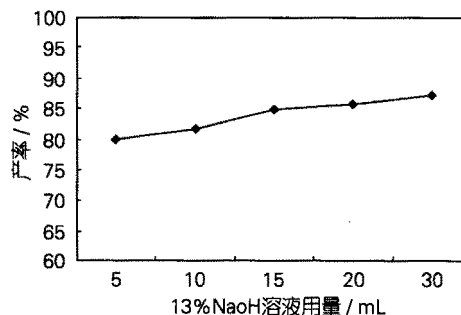


图 3 反应体系的 pH 值对产率的影响

Fig.3 Influence of pH on yield

2.1.2 反应时间对凝固温度降低的影响 在上述同样条件下,确定加入 20 mL 13 % NaOH 作为反应体系最佳 pH 值。从图 4 可知,反应时间小于 75

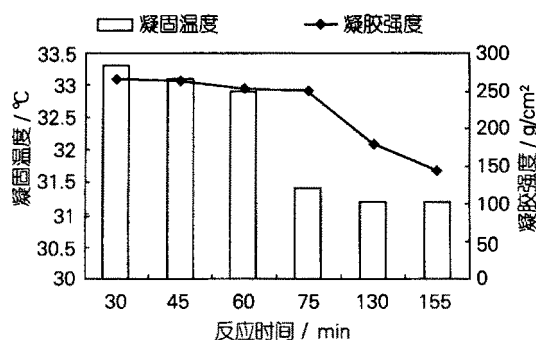


图4 反应时间对凝固温度和凝胶强度的影响

Fig.4 Influence of time on gelling points and gel strength

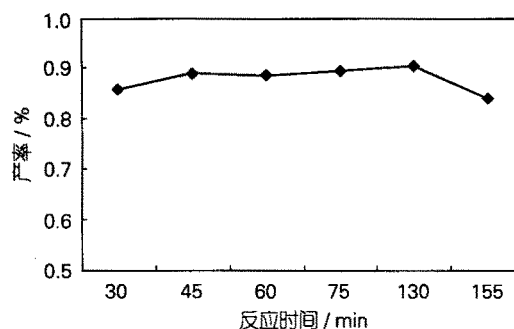


图5 反应时间对产率的影响

Fig.5 Influence of time on yield

min时,随着反应时间的延长,甲基化反应进行的越彻底,甲基化后琼脂糖的凝固温度越低,即凝固温度降低得越多。但反应时间超过75 min后,产品的凝固温度变化不大,凝胶强度继续降低。反应时间对产率影响见图5,反应时间30~45 min时,产率随时间增加;45~130 min时,产率基本不变;130~155 min时,产率明显下降。因此选择75 min作为最佳反应时间。

2.1.3 反应温度对凝固温度和凝胶强度的影响 在上述同样条件下,确定加入20 mL 3% NaOH作为最佳碱性环境,反应时间75 min,反应温度对凝固温度和凝胶强度的影响见图6。由图6知,随着反应温度的变化,甲基化后琼脂糖的凝固温度变化不大。但是凝固温度在反应温度为78 °C时最低,只有31.8 °C。综合考虑凝胶强度,选择78 °C作为最佳反应温度。

2.1.4 硫酸二甲酯的用量对凝固温度和凝胶强度的影响 硫酸二甲酯是一种有刺激性气味、剧毒的有机化学试剂。为了便于反应后续工艺操作,减少原材料耗损,降低污染,有必要确定硫酸二甲酯的最低用量。在上述同样条件下,确定加入20 mL 3% NaOH作为最佳碱性

环境,反应时间75 min,反应温度78 °C,考察不同修饰试剂用量对凝固温度和凝胶强度的影响。硫酸二甲酯用量对凝固温度和产率的影响见图7和图8,随着

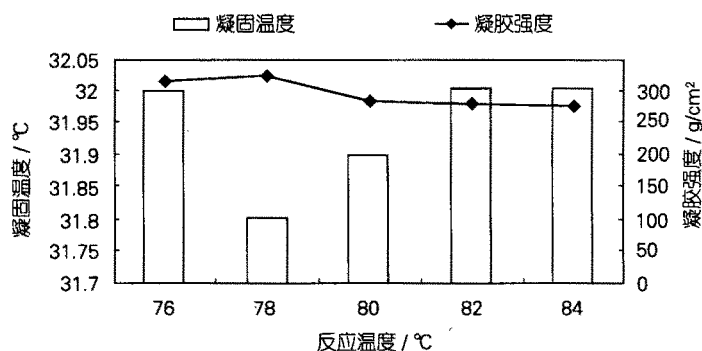


图6 反应温度对凝固温度和凝胶强度的影响

Fig.6 Influence of temperature on gel points and gelling strength

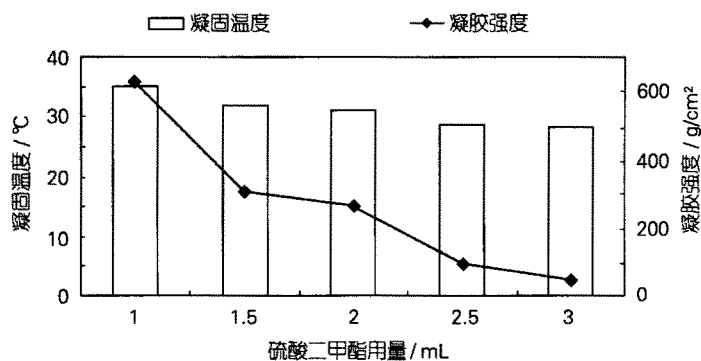


图7 硫酸二甲酯的用量对凝固温度和凝胶强度的影响

Fig.7 Influence of $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ on gel points and gel strength

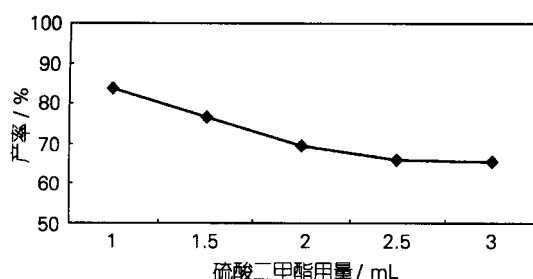


图8 硫酸二甲酯用量对产率的影响

Fig.8 Influence of $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ on yield

硫酸二甲酯用量的增加,甲基化琼脂糖的凝固温度、凝胶强度和产率均呈下降趋势。低凝固温度琼脂糖的制备中,在产品凝胶强度的降低不影响使用的前提下,着重考虑凝固温度的降低。化学修饰试剂用量配比为1.5 mL硫酸二甲酯/2 g琼脂糖和2.0 mL硫酸二甲酯/2 g琼脂糖时,所得低凝固温度琼脂糖的凝胶强度都大于 500 g/cm^2 (1.0%浓度),而且相差不大。所以选择使凝固温度降低较多的试剂用量配比作为最佳化学修饰试剂用量配比,即每2 g琼脂糖加2.0 mL硫酸二甲酯。

2.2 低凝固温度琼脂糖产品的分析

本实验通过一系列的单因子变量实验,分别确定了化学修饰法制备低凝固温度琼脂糖的甲基化反应最佳反应条件:加20 mL 13% NaOH溶液作为最佳pH值;反应时间为75 min;反应温度为78℃;选择2 g琼脂糖加2.0 mL硫酸二甲酯为最佳修饰试剂用量配比。由表1看出,本实验利用甲基化反应得到的低凝固温度琼脂糖产品的凝固温度(1.5%浓度)为30.1℃,融化温度为64.8℃,凝胶强度(1.0%浓度)为 264 g/cm^2 ,其主要质量指标与Sigma公司的低凝固温度琼脂糖产品接近(表1),符合低凝固温度琼脂糖产品的质量要求。

3 讨论

一些直接从原藻中提取的琼脂的甲氧基含量高^[5,6]。虽然由文献报道琼脂糖的凝固温度随其天然形成的甲氧基含量的升高而升高^[7],但是用化学反应向琼脂糖分子中引入甲氧基、烯基、酰基或羟烷基都可以降低琼脂糖的凝固温度^[1]。这可能是由于琼脂糖中天然形成的甲氧基和通过甲基化反应人工引入的

表1 本实验产品与Sigma产品(A4018)的凝固温度、融化温度和凝胶强度比较

Tab.1 The gelling points, melting temperature and gel strength of our product and Sigma product

样品	凝固温度 (℃)	融化温度 (℃)	凝胶强度 (g/cm^2)
本实验产品	30.1	64.8	264
Sigma产品 (A4018)	30	65	250

凝固温度和融化温度试验为1.5%浓度,凝胶强度试验为1%浓度。

甲氧基的位置和化学构象不同,因而对琼脂糖凝固过程和凝固温度的影响也不同。考虑到实验室安全问题,选择甲基化反应制备低凝固温度琼脂糖。甲基化的程度直接影响凝固温度和凝胶强度,而且凝胶强度大于 250 g/cm^2 (1.5%浓度)才有实际应用价值,所以利用甲基化反应制备低凝固温度琼脂糖的制备条件应以反应后的凝固温度、凝胶强度和产率为标准。简单的以甲氧基含量为标准是没有实际意义的。影响凝固温度和凝胶强度的主要条件是反应体系的pH值、反应时间、温度和试剂配比等因素。

参考文献

- Guiseley K B, Union M E. Modified agarose and agar and method of making same. US Patent 3 956 273. 1973.
- 纪明侯. 海藻化学. 北京: 科学技术出版社, 1997. 16-17
- 史升耀, 纪明侯. 江蓠琼胶的研究 III. 琼胶产率与凝胶强度的季节变化. 海洋湖沼通报, 1980, 1: 35-38
- 史升耀, 张燕霞. 江蓠琼胶产率、物理性质和化学组成的季节变化. 海洋与湖沼, 1983, 14(3): 272-277
- Tako M, Higa M, Medonuma K, et al. Characterization of an agar fraction extracted from *Gelidium dum* (Gelidiales, Rhodophyta). Hydrobiologia, 1999, 204/205: 567-571
- 王璐, 刘力, 王艳梅, 等. 几种红藻琼脂的组分结构及理化性质的比较. 海洋与湖沼, 2001, 32(6): 658-664
- Guiseley K B. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. Carbohydr Res, 1970, 13: 247-256

(下转第78页)

(上接第 74 页)

STUDY ON PREPARATION OF LOW GELLING POINT AGAROSE

LIU Li LI Zhi - En XU Zu - Hong

(*Institute of Oceanology , The Chinese Academy of Sciences , Qingdao , 266071*)

Received : Sept .,19 ,2002

Key Words : Agarose , Methylation , Gelling point , Gel strength

Abstract

In the application of agarose , especially to the research of modern biological technology , low gelling point agarose is necessary . Using water fraction of *Gelidium amansii* as raw material , investigations into the preparation of low gelling point agarose by methylation reaction was carried out . A modified agarose containing alkylated agarose to the standard of low gelling point agarose . Its main properties of gel strength (264 g/cm^2 1.0 % gel) , gelling point ($30.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 1.5 %gel) and melting point ($64.8 \text{ }^\circ\text{C}$ 1.5 %gel) are all similar to those produced by Sigma company .

(本文编辑 :张培新)