

低凝固温度琼脂糖的制备与表征

王江林, 张学勤, 叶静, 黄雅燕, 赵鹏*, 肖美添*

(华侨大学化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要:以琼脂糖为原料, 环氧乙烷为改性剂, 制备低凝固温度琼脂糖。通过单因素实验, 确定最佳反应体系: 环氧乙烷用量为 3.0 mL (8 g 琼脂糖), 氢氧化钠质量分数为 5.0%, 反应温度为 60℃, 反应时间为 30 min。根据此条件制备的羟乙基琼脂糖, 凝固温度为 (28.0 ± 0.3)℃, 融化温度为 (64.0 ± 0.4)℃, 凝胶强度为 (308.7 ± 6.1) g/cm², 与 Amresco 同类产品性能基本一致。通过红外光谱 (FTIR)、热重分析 (TGA)、X 射线衍射仪 (XRD)、透射电镜 (TEM) 和 DNA 电泳对琼脂糖以及改性后的琼脂糖进行表征, 结果表明: 羟乙基基团成功引入琼脂糖骨架, 与未改性琼脂糖相比, 经化学改性后的琼脂糖分离核酸能力增强, 凝胶形态无明显变化, 结晶度和热稳定性有所下降。该制备工艺简单、成本低, 制备的羟乙基琼脂糖符合低凝固温度琼脂糖要求 (凝固温度为 26 ~ 30℃, 融化温度 ≤ 65℃, 凝胶强度 ≥ 250 g/cm²)。

关键词: 羟乙基琼脂糖; 低凝固温度; 改性; 表征

中图分类号: TQ95

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2017)02-0120-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2017.02.027

Preparation and characterization of agarose with low gelling temperature

WANG Jiang-lin, ZHANG Xue-qin, YE Jing, HUANG Ya-yan, ZHAO Peng*, XIAO Mei-tian*

(School of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Hydroxyethylagarose with low gelling temperature (LGT) is prepared by using agarose extracted from *Gracilaria* as raw material and ethylene oxide as modification agent. Through a series of single factor experiments, the optimal reaction system as determined as follows: 3.0 mL (3.0 mL EO/8 g agarose) of ethylene oxide, 5.0% of alkali concentration, 60℃ of reaction temperature and 30 minutes of reaction time. Under this condition, the as-prepared hydroxyethylagarose has the gelling temperature (T_g) of 28.0 ± 0.3℃, the melting temperature (T_m) of 64.0 ± 0.4℃ and the gel strength (G_s) of 308.7 ± 6.1 g/cm². These properties are basically identical with that of Amresco LGT. FTIR, TGA, XRD, TEM and DNA electrophoresis are used to characterize agarose before and after modification. The results show that hydroxyethyl group is successfully introduced into agarose chain. There is no obvious changes in the morphology of the gel. And the crystallinity and thermal stability of agarose are decreased after modification. Good separation ability of nucleic acid is exhibited in modified agarose gels. All results show that the hydroxyethylagarose reaches the specifications for LGT ($T_g = 26 \sim 30$, $T_m \leq 65.0$ ℃, $G_s \leq 250$ g/cm²), and the process is simple and cost-efficient.

Key words: hydroxyethylagarose; LGT; modification; characterization

琼脂是从江蓠、石花菜等海洋红藻中提取的一种具有凝胶特性的线性多糖, 主要由中性的琼脂糖 (Agarose) 与带电的琼胶酯组成。琼脂糖是由 1, 3-β-D-吡喃半乳糖和 1, 4-3, 6-内醚-α-L-吡喃半乳糖交替连接的共聚物, 琼胶酯的基本骨架与其相同, 但连接有不同的残基, 如羧基、硫酸基等负电基团^[1]。从天然海藻中提取的琼脂和琼脂糖的凝固温度为 35 ~ 40℃, 许多生物热敏物质在该温度的环境中失去生物活性, 并且天然的琼脂糖能形成较大孔径的凝胶, 能够分离一些大分子核酸片段。经改性后, 凝胶的孔径变小, 分辨率提高, 凝固温度以及融化温度降低^[2]。低凝固温度琼脂糖的凝固温度

为 27 ~ 30℃, 融化温度小于 65℃, 凝胶强度大于 250 g/cm²^[3]。琼脂糖的化学修饰程度决定了凝固温度、融化温度和凝胶强度, 主要用于细胞包埋、病毒空斑、小片段 DNA/RNA 的分离以及纯化等方面^[4-5]。

目前低凝固温度琼脂糖的制备方法有烷基化、羟烷基化、酰基化以及链烯基化等, 通过引入中性基团, 降低双链之间的氢键作用, 从而降低凝固温度、融化温度以及凝胶强度。刘力等^[6]采用硫酸二甲酯进行甲基化, 但是硫酸二甲酯剧毒, 市面禁售, 不利于工业化生产。Guiseley 等^[7]采用酸酐进行酰化, 但是酰化的条件苛刻, 操作繁杂。

收稿日期: 2016-08-29

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项经费项目 (201305015-2, 201505026-5); 福建省高校产学研合作重大科技项目 (2015N5005); 华侨大学研究生科研创新能力培育计划资助项目; 泉州市科技计划重点项目 (2013Z13, 2014Z100); 福建省教育厅中青年教育科研项目 (JA14017)

作者简介: 王江林 (1989-), 男, 硕士生, 主要从事海洋生物资源高值化利用的研究, 120647101@qq.com; 赵鹏 (1975-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为天然产物的提取与精制, 通讯联系人, zhaopeng@hqu.edu.cn; 肖美添 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向为海洋功能产品开发, 通讯联系人, mt Xiao@hqu.edu.cn。

采用环氧乙烷衍生化法制备低凝固温度琼脂糖,反应速度较快,对反应后琼脂糖溶液进行反复冻融数次,可以达到分离纯化的目的,整个工艺流程除环氧乙烷外,几乎不使用其他有机试剂,与传统醇沉相比,该法原料无毒、价廉,工艺简单,有利于工业化生产,且制备的产品基本符合实际需求。

1 材料和方法

1.1 实验试剂与仪器

试剂:琼脂糖,实验室自制^[8];乙酸、硼氢化钠、氢氧化钠、环氧乙烷,国药集团化学试剂有限公司生产;去离子水,实验室自制。

仪器:凝胶强度仪,泉州万达实验仪器设备公司生产;RT-25 气流式超细粉碎机,北京燕山正德机械设备有限公司生产;TANON-1600 凝胶成像系统,上海天能科技有限公司生产;DYY-8C 电泳仪,北京六一仪器厂生产;FTIR-84,岛津公司生产;TEM 透射电镜。

1.2 羟乙基琼脂糖的制备

称取 8.0 g 琼脂糖粉末,加热溶解于 300 mL 去离子水中,配制琼脂糖溶液,待溶液冷却,加 NaBH_4 ,恒温下处理 10 ~ 15 min,加 NaOH 溶液,冷却,加入环氧乙烷进行反应,反应时间为 30 min,将反应升温至 50℃ 后,采用乙酸逐滴加入,直至溶液的 $\text{pH} = 7.0$ 。室温冷却至完全成胶,进行冷冻,解冻,压榨脱水,重复 3 ~ 4 次,干燥,粉碎^[9]。其反应式如图 1 所示。

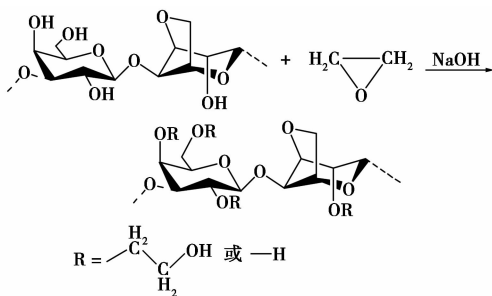


图 1 琼脂糖羟乙基化反应式

1.3 琼脂糖的表征

1.3.1 物理性质表征

配制 1.5% 的琼脂糖溶液,按照 Craigie 等^[10]所述方法测定凝固温度、融化温度。配制 1.0% 的琼脂糖溶液,在 10℃ 下成胶 2.0 h,利用凝胶强度测定仪检测凝胶强度^[11]。电内渗测定采用人血清白蛋白与葡聚糖 T_{500} ,在 pH 为 8.6 的巴比妥溶液中电泳 3.0 h,蛋白到点样圆孔的距离为 OA ,葡聚糖到点样圆孔的距离为 OD ,电内渗计算式为:

$$EEO(-m_r) = OA/(OA + OD)$$

式中: EEO 为电内渗的值; $-m_r$ 为相对迁移率。

1.3.2 3,6-内醚-半乳糖质量分数的测定

3,6-内醚-半乳糖质量分数采用间苯二酚法进行测定^[12]。

1.3.3 取代度的测定

利用改良的 Zeisel 裂解法测定取代度^[13]。理论上,琼脂糖有 4 个羟基氢(半乳糖 2,4,6 位,3,6-内醚-半乳糖的 2 位)被亲核试剂取代,如果 4 个位置全都被取代则取代度为 4,取代度计算式为:

$$\Delta DS = (306 \times w\%) / \{ (100 \times M) - [(M - 1) \times w\%] \}$$

式中: ΔDS 为取代度增加量;306 为琼脂二糖的分子质量; M 为羟乙基的分子质量; $w\%$ 为羟乙基质量分数。

1.3.4 红外光谱分析

将改性后的琼脂糖粉末置于 50℃ 真空烘箱中,烘 48 h,称取 3.0 mg 样品和 300 mg KBr 研磨 5 ~ 10 min,然后压成透明薄片,在波长为 400 ~ 4 000 cm^{-1} 的条件下扫描 32 次。

1.3.5 TEM 分析

将琼脂糖粉末进行特殊处理,并在透射电子显微镜下进行观察。

1.3.6 XRD 分析

将琼脂糖粉末在 $\text{Smar}/\text{Smart La X}$ -射线粉末衍射仪上扫描,扫描范围为 10 ~ 60°,扫描速度为 5($^\circ$)/min。

1.3.7 热重分析

取琼脂糖样品 15 ~ 20 mg,温度范围为 30 ~ 600℃,10℃/min 进行程序升温, N_2 氛围,进行热重分析。

1.3.8 DNA 电泳

以 TAE(三羟甲基氨基甲烷、乙酸和乙二胺四乙酸)为缓冲液,配制一定浓度的琼脂糖凝胶,对 20 bp DNA Ladder Marker 进行凝胶电泳。

2 结果与讨论

2.1 工艺条件的选择

由反应工艺可以看出,反应体系的环氧乙烷用量、氢氧化钠质量分数、反应温度以及反应时间对反应结果产生影响,因此本实验通过一系列的单因素实验分别确定最佳反应体系中环氧乙烷用量、氢氧化钠质量分数、反应温度和反应时间等因素,将原料琼脂糖加水溶解可使反应在均一液相中进行从而提高反应效率。结果如图 2 所示。

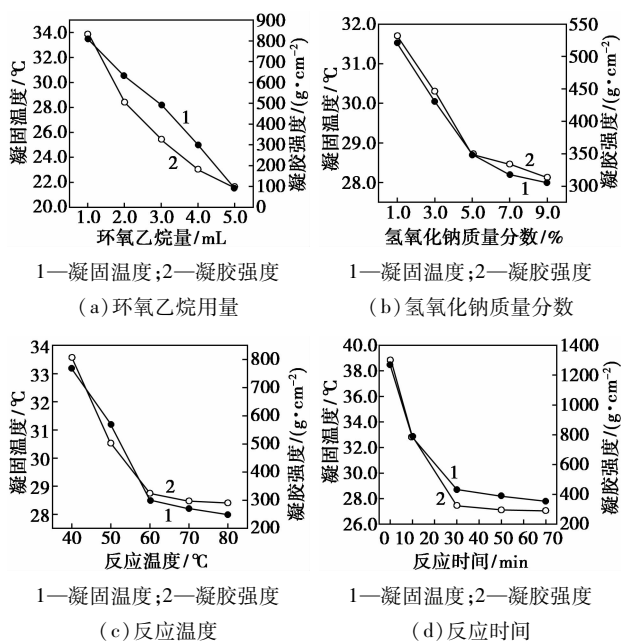


图 2 各因素对凝固温度、凝胶强度的影响

由图 2(a) 可知,随着改性剂添加量增加,凝固温度和凝胶强度均下降,添加量为 3.0 mL 时,凝胶强度大于 $250 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$,如果继续添加环氧乙烷,则凝胶强度无法满足需求。所以,改性剂最佳添加量为 3.0 mL。

NaOH 在该反应体系中不仅可以作催化剂,而且可以降低反应体系的黏度,使琼脂糖溶液在低温下保持流动状态,在氢氧化钠质量分数较低条件下,琼脂糖链与链之间的相互作用较大,表现为体系黏度较大^[14],导致反应缓慢。由图 2(b) 可知,在氢氧化钠质量分数为 1.0 ~ 5.0% 时,随着氢氧化钠质量分数增加,体系的取代度增大,凝固温度和凝胶强度均降低。当氢氧化钠质量分数为 5.0% 时,环氧乙烷基本反应完全,凝固温度和凝胶强度基本达到一个稳定值,凝固温度为 28.5°C ,凝胶强度为 $310 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。继续增加氢氧化钠质量分数,凝固温度和凝胶强度略有下降,这是由于氢氧化钠质量分数的增加使琼脂糖发生解聚反应^[6]。因此,该反应体系最佳氢氧化钠质量分数为 5.0%。

由图 2(c) 可知,随着反应温度的增加,凝固温度和凝胶强度均呈现逐渐下降的趋势,当反应温度为 60°C 时,凝胶强度为 $312 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$,如果继续增加反应的温度,副反应发生如环氧乙烷的自聚反应、水解反应等,琼脂糖降解程度也增加。所以,该反应的最佳反应温度为 60°C 。

由图 2(d) 可知,在 0 ~ 30 min 内随着时间的增加,凝固温度和凝胶强度逐渐降低;当反应 30 min

以后,环氧乙烷完全反应,凝固温度和凝胶强度均趋于稳定。因此,反应的最佳时间为 30 min。

2.2 产品分析

琼脂糖物化性质如表 1 所示。由表 1 可知,相比于改性前,由于羟乙基的引入,琼脂糖氢键受到破坏,从而影响琼脂糖分子的空间构象,导致凝胶状态发生变化,因此琼脂糖的凝固温度、融化温度以及凝胶强度都有不同程度的下降。电内渗是衡量琼脂糖质量高低的一个重要指标,琼脂糖原料中会或多或少含有硫酸根等负电离子基团,这样会导致琼脂糖的电内渗增高^[15],羟乙基化反应体系在氢氧化钠碱性条件下反应,琼脂糖分子在氢氧化钠处理时发生结构转变,6 位的硫酸基与 3 位羟基形成 3,6 内醚键,如图 3 所示,其他位置上硫酸基会被羟基所取代,因此会导致改性后的琼脂糖硫酸根质量分数以及电内渗会有所降低。在反应前经 NaBH_4 处理之后,琼脂糖端基的酮基或醛基等基团被还原为羟基,同样也可以导致电内渗的降低。由于在琼脂糖骨架侧链上引入羟乙基基团,琼脂糖的分子质量也有所增加,琼脂糖中 3,6-内醚半乳糖相对质量分数降低。改性后的产品与 AmrescoLGT 进行比较发现,两者性质相当。

表 1 琼脂糖物化性质比较

项目	Amresco 产品	羟乙基琼脂糖	未改性琼脂糖
取代度 (DS)		0.469 ± 0.040	0
分子质量 $M_w/10^5 (\text{g}\cdot\text{mol}^{-1})$		18.41	16.32
3,6-内醚半乳糖 (AG)/%	48.6 ± 0.6	45.5 ± 0.2	51.2 ± 0.3
凝固温度 (T_g) (1.5%)/ $^\circ\text{C}$	28.5 ± 0.5	28.0 ± 0.29	37.8 ± 0.5
融化温度 (T_m) (1.5%)/ $^\circ\text{C}$	64.0 ± 0.5	64.0 ± 0.4	90.5 ± 0.5
凝胶强度 (S_g) (1.0%)/ ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	252 ± 12	308.7 ± 6.11	1321.0 ± 25.0
硫酸根质量分数/%	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.15 ± 0.04
灰分/%	0.50 ± 0.02	0.52 ± 0.02	0.74 ± 0.03
电内渗	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.03

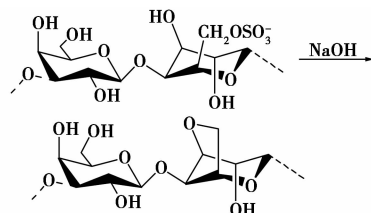
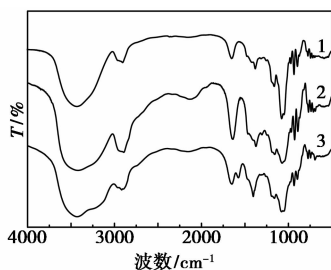


图 3 琼脂糖在氢氧化钠处理时的结构转变

2.3 红外表征

琼脂糖原料、改性后琼脂糖和 Amresco LGT 红外光谱图如图 4 所示。



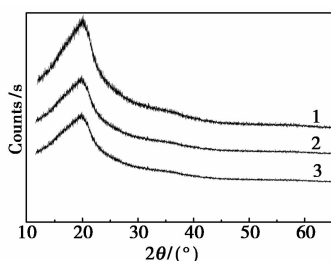
1—琼脂糖原料;2—Amresco LGT;3—改性后琼脂糖

图 4 琼脂糖原料、改性后琼脂糖和 Amresco LGT 红外光谱图

由图 4 可以看出,改性后的琼脂糖与原料相比,基本结构变化不大。在官能团区($4\ 000 \sim 1\ 500\ \text{cm}^{-1}$), $3\ 400\ \text{cm}^{-1}$ 左右为 $-\text{OH}$ 吸收峰,是多糖的特征吸收峰, $2\ 900\ \text{cm}^{-1}$ 为 CH_3-CH_2- 吸收峰,是总糖质量分数的标志;在指纹区($1\ 500 \sim 400\ \text{cm}^{-1}$), $1\ 370\ \text{cm}^{-1}$ 吸收峰表明存在 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$,质量分数明显比改性前有所增加, $1\ 070\ \text{cm}^{-1}$ 为半乳糖化合物吸收, $930\ \text{cm}^{-1}$ 为 3,6-内醚-L-半乳糖吸收峰, $890\ \text{cm}^{-1}$ 为 1,3- β -半乳糖的吸收峰。 $860\ \text{cm}^{-1}$ 为 L-半乳糖-2-硫酸盐吸收峰, $740\ \text{cm}^{-1}$ 为半乳糖吸收。改性与未改性琼脂糖的最大差别在于, $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 左右吸收峰分裂成 $1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 566\ \text{cm}^{-1}$ 2 个峰,这是由于羟乙基直接连接在吡喃糖导致 $\text{C}-\text{O}$ 伸缩振动峰分裂。说明在琼脂糖(半乳糖 2,4,6 位,3,6-内醚-半乳糖的 2 位羟基质子)可能被取代。综上所述,羟乙基成功引入了琼脂糖骨架。

2.4 XRD 分析

琼脂糖的 XRD 谱图如图 5 所示。



1—琼脂糖原料;2—Amresco LGT;3—改性后琼脂糖

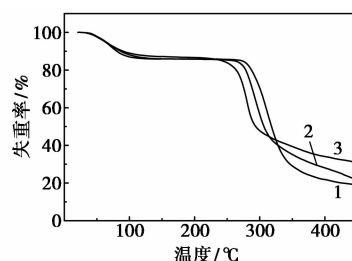
图 5 琼脂糖 XRD 图谱

由图 5 可知,在 $2\theta = 20^\circ$ 时,出现 1 个明显的结晶衍射峰。各样品的出峰位置与峰形没有明显变

化,只是各样品的结晶峰强度不同,而结晶峰强度与结晶强度有关。通过比较发现,各改性方法对琼脂糖结晶区未完全破坏或影响程度不大,改性后仍与原琼脂糖保持较相近的结晶区结构^[16]。对比结晶指数(CI),原料的结晶指数为 12.0,改性后的琼脂糖的结晶指数为 8.1,Amresco 结晶指数为 8.5,表明改性后结晶指数下降,并且改性后的产品与进口产品结晶指数相近。

2.5 TGA 分析

通过热重分析来比较改性前后琼脂糖的热稳定性,琼脂糖改性前后 TGA 分析如图 6 所示。



1—琼脂糖原料;2—Amresco LGT;3—改性后琼脂糖

图 6 琼脂糖改性前后 TGA 对比

由图 6 可知,在 $30 \sim 100^\circ\text{C}$,随着温度的升高,水分损失约 10%;大部分质量损失在 $250 \sim 300^\circ\text{C}$,引入羟乙基基团,裂解的温度降低,热稳定性较差,说明引入侧链基团对琼脂糖的热稳定有一定的影响。

2.6 TEM 凝胶结构分析

琼脂糖凝胶性是由其存在的氢键所致,凝胶状态时,无规则卷曲的螺旋链的聚集,形成有序结合区域后构成三维网络结构,胶凝温度、融化温度、胶凝

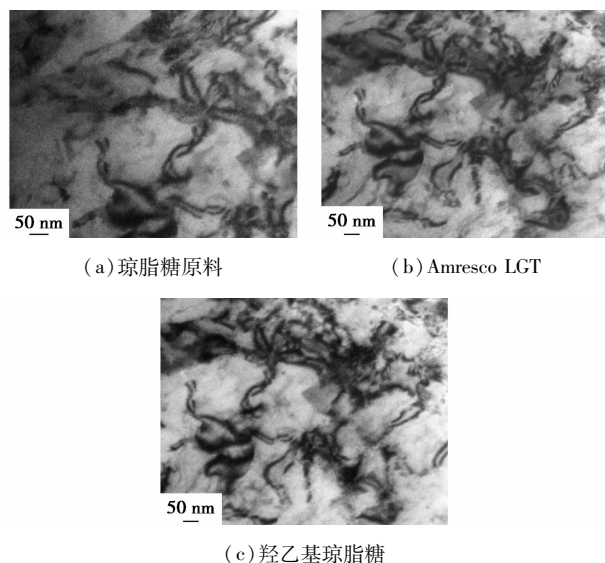


图 7 琼脂糖凝胶 TEM 图

能力等胶凝性质主要由双螺旋链的聚集能力决定,而双螺旋链的聚集能力取决于双螺旋链之间相互靠近的位阻及其协同程度。在琼脂糖的螺旋链当中,3,6-内醚半乳糖的 2 位以及半乳糖 4,6 位羟基指向螺旋外部,而半乳糖的 2 位羟基指向螺旋内部^[17]。因此,在羟基上引入羟乙基,不会破坏螺旋的有序结构,双螺旋的形成能力不受影响。琼脂糖凝胶 TEM 图如图 7 所示。由图 7 可知,经过化学改性后,琼脂糖主链骨架不变,依然保持螺旋结构。

2.7 DNA 电泳

分别以羟乙基琼脂糖凝胶与 Amresco 公司生产的琼脂糖凝胶为电泳介质进行 DNA Marker 电泳实验,结果如图 8 所示。

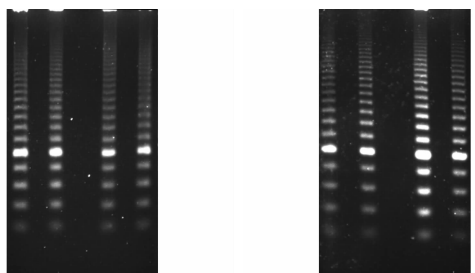


图 8 琼脂糖凝胶电泳结果对比

由图 8 可以看出,自制琼脂糖对 DNA 小片段的分离效果与 Amresco 琼脂糖相当,电泳条带 20、40、60…400 bp DNA Marker 分辨率较高,无拖带现象,具有良好的电泳性能,达到生化实验的要求。

3 结论

(1)通过单因素实验,确定羟乙基琼脂糖的最佳制备工艺:环氧乙烷用量为 3.0 mL(8 g 琼脂糖),氢氧化钠质量分数为 5.0%,反应温度为 60℃,反应时间为 30 min。根据此条件制备的羟乙基琼脂糖产品,凝固温度为 $(28.0 \pm 0.3)^\circ\text{C}$,融化温度为 $(64.0 \pm 0.4)^\circ\text{C}$,凝胶强度为 $(308.7 \pm 6.1) \text{ g/cm}^2$,符合低凝固温度琼脂糖要求。

(2)通过测定改性后的琼脂糖的凝固温度、融化温度、凝胶强度、硫酸根含量和灰分等指标,其性能指标与 Amresco LGT 相当。

(3)通过 FTIR、TEM、XRD、TGA 分析表明,琼脂糖上成功引入了羟乙基,化学改性后的琼脂糖凝胶结构没有发生明显变化,结晶度和热稳定性有所下降。

(4)DNA 电泳实验表明,该羟乙基低凝固温度

琼脂糖可以有效分离小片段 DNA。

参考文献

- [1] Araki C. Structure of the agarose constituent of agar-agar[J]. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1956, 29(4): 543-544.
- [2] 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[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(6): 658-664.
- [3] Dumais M, Kusakawa N, White H. Highly derivatized agarose conformational nucleic acid separation; US, 5641626[P]. 1997-01-24.
- [4] Koga D, Nakajima M, Ushiki T. A useful method for observing intracellular structures of free and cultured cells by scanning electron microscopy[J]. Journal of Electron Microscopy, 2012, 61(2): 105-111.
- [5] Palacios G, Rosa A T D, Savji N, et al. Aguacate virus, a new antigenic complex of the genus Phlebovirus (family Bunyaviridae) [J]. Journal of General Virology, 2011, 92(Pt6): 1445-1453.
- [6] 刘力,李智恩,徐祖洪. 低凝固温度琼脂糖的制备方法研究[J]. 海洋科学, 2003, 27(12): 71-74.
- [7] Guiseley K B. Modified agarose and agar and method of making same; US, 3956273[P]. 1976-05-11.
- [8] 肖笛,肖美添,叶静. 聚乙二醇沉淀法从琼脂中分离精制琼脂糖工艺研究[J]. 农业机械, 2011(17): 156-159.
- [9] Meena R, Siddhanta A K, Prasad K, et al. Preparation, characterization and benchmarking of agarose from *Gracilaria dura* of Indian waters[J]. Carbohydrate Polymers, 2007, 69(1): 179-188.
- [10] Craigie J S, Leigh C. Carrageenans and agars. In Hellebust, JA & JS Craigie (eds), Handbook of physiological Methods[M]. UK: Cambridge University, 1978: 109-131.
- [11] Meena R, Prasad K, Siddhanta A K. Studies on "sugar-reactivity" of agars extracted from some Indian agarophytes[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(8): 1206-1215.
- [12] Yaphe W, Arsenault G P. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides [J]. Analytical Biochemistry, 1965, 13(1): 143-148.
- [13] Croon I, Fernö O, Fex H, et al. Partial methylation of some glucose derivatives[J]. Acta Chemica Scandinavica, 1959, 13(6): 1235-1238.
- [14] Guiseley K B. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose[J]. Carbohydrate Research, 1970, 13(2): 247-256.
- [15] Kirkpatrick F H, Guiseley K B, Provonchee R, et al. High gel strength low electroendosmosis agarose; US, 4983268A[P]. 1991-01-08.
- [16] Singh T, Trivedi T J, Kumar A. Dissolution, regeneration and ion-gel formation of agarose in room-temperature ionic liquids[J]. Green Chemistry, 2010, 12(6): 1029-1035.
- [17] Rees D A, Welsh M E J. Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels[J]. Angewandte Chemie International Edition, 1977, 16(4): 214-224. ■