

# 琼胶素与珠状琼胶素凝胶的研制\*

史升耀 刘万庆 (中国科学院海洋研究所)

石光汉 朱光福 (青岛海洋渔业公司水产品加工厂)

琼胶是从石花菜或江蓠等海藻中提取出来的一种胶质。由于具有形成透明半固体状凝胶的独特性能,多年来被广泛用于食品、医药、生化和科研等方面。1961年瑞典学者S. Hjerten<sup>[1]</sup>从琼胶中分离出琼胶素,性能比琼胶更好,因而对琼胶素的研究日益增多,发展很快,欧美一些国家已先后开始工业生产。我们根据国内的需要也开始了国产琼胶素的研制工作。

琼胶素英文名为 Agarose,有的译为琼胶糖或琼脂糖。它是组成琼胶的两个主要组分之一。曾经对琼胶作过多年研究的荒木<sup>[2]</sup>等人认为琼胶素是一种中性多糖,主要由D-半乳糖和3,6-内醚-L-半乳糖二者交替连接而成的高分子多糖,其结构式如图1:

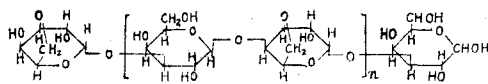


图1 琼胶素的结构式

琼胶中的另一主要组分是琼胶酯,英文名称为Agaropectin。它是一种带电荷的多糖,除象琼胶素一样含有D-半乳糖和3,6-内醚-L-半乳糖外,还带有硫酸根和丙酮酸等,结构比琼胶素复杂。其中的硫酸根和羧基是造成琼胶电渗大、对蛋白质有吸附作用和凝固性能差等缺点的主要原因。制备琼胶素的方法,便是利用琼胶素与琼胶酯之间由于组成和结构上的不同所造成二者间物理化学性质的差异,而使之分离的。

精制的琼胶素与琼胶相比具有:(1)纯度高、灰分低、硫酸基和羧基含量甚微;(2)电渗小;(3)对一些蛋白质等不吸附;(4)凝胶强度大,机械性能好;(5)无色,透明高等优点。因此,现在琼胶素广泛用于电

泳、凝胶扩散、固相酶、亲和层析和凝胶层析等领域<sup>[3a]</sup>。在临床检验(如肝炎、肝癌和冠心病等的化验),生化分析,蛋白质、酶、核酸、抗原、抗体、病毒和多糖的分离纯化,以及高级药物的制备等方面都已应用。

制备琼胶素的方法较多,我们对比了一些主要方法,并作了一些改进和创新,现将研制的情况,简单报告如下:

## 一、测定方法

(1) 凝胶强度 样品加水配成1%浓度,加热溶化后倒入小烧杯中,室温放冷凝固,4小时后用凝胶强度测定器<sup>[3b]</sup>测定将单位面积凝胶压破所能承受的重量,以克/厘米<sup>2</sup>表示。

(2) 血清电泳 配制1%样品溶液,取10毫升加在15×3厘米玻板上,凝固后打孔(为原点),加入血清,放电泳仪中常法进行电泳,控制电流每片8mA,电泳2.5小时,取出,用溴酚兰染色,再用1%醋酸浸洗3—4次,显出兰色斑点,测量原点两端兰色斑点的长度,由原点向正极一端为A,向负极一端为B,以A/B的比值表示电渗的大小。

(3) 聚乙二醇电泳<sup>[4]</sup> 制凝胶玻板上,打孔后加入1%聚乙二醇溶液,同样电泳2.5小时,取出,放入15%三氯醋酸中,浸约10分钟,在负极一端出现一白色小斑点,测量此斑点至原点的距离,以毫米表示。

(4) 结晶紫电泳 制凝胶玻板上,打孔后加入1%结晶紫溶液,同样电泳2.5小时,

\* 承中国科学院生物化学研究所 东风试剂厂、上海生物制品研究所、上海第六人民医院检验组和北京首都医院协助化验,曾呈奎和纪明候教授审阅,特此致谢。

取出，测量结晶紫移动的距离与形状，以++，++，+和-表示对结晶紫吸附的大小。

(5) 电泳灵敏度 以对流免疫电泳法检查肝炎的灵敏度表示。

(6) 灰分 600°C烧灰，常法测定。

(7) 细胞色素C吸附量 样品制成4%溶液，喷珠，洗过筛、装入小层析柱中，用0.01M pH4.1醋酸铵缓冲液平衡，加入定量的细胞色素C通过柱，再将多余未被吸附的细胞色素C洗脱，定量，计算被吸附的量，以1.5毫升珠状琼胶素凝胶吸附细胞色素C的毫克数或以干重百分数表示。

产品质量以凝胶强度高、细胞色素C吸附

少、血清电泳比值大，聚乙二醇电泳距离短、结晶紫电泳和电泳灵敏度好(+++)、灰分少者为佳。

## 二、试制方法和结果

### (1) 二甲基亚砷法<sup>[5]</sup>

称取粉末琼胶，加五十倍二甲基亚砷，在70°C搅拌使琼胶素溶于二甲基亚砷中，琼胶酯不溶，过滤，滤液减压浓缩后倾入丙酮中，得白色琼胶素沉淀，再用丙酮洗，干燥。产品分析结果见表1。凝胶强度比英国B.D.H.厂的产品好，但细胞色素C吸附量和电泳性能则不如英国的产品。

表1 二甲基亚砷法，聚乙二醇法和十六烷氯化吡啶法产品的分析

编号	方法	细胞色素C mg/1.5ml.	血清电泳	结晶紫 电泳	聚乙二醇 电泳	凝胶强度	电泳 灵敏度	灰分%	产率%
1	二甲基亚砷法	1.47	3.4	+	14.5	>500	++		54.3
2	聚乙二醇法	1.77				>500	++		49.7
3	十六烷氯化吡啶法	1.23				>500	+++		66.7
	英国B.D.H.	1.10	3.8	+++	12.5	400	+++	0.24	
	瑞典Sephrose	1.32							
	对照琼胶	>5.0	0.8	-	28.0	480		2.28	

### (2) 聚乙二醇法<sup>[4,6,7]</sup>

称取琼胶，加入20倍1%柠檬酸钠，加热溶化，冷至75°C左右，加入琼胶重2.5倍的聚乙二醇(分子量6,000)，使琼胶素沉淀出来，过滤、水洗、丙酮洗。再重复用聚乙二醇处理一次，然后用丙酮洗，乙醚洗，干燥。产品分析结果见表1。对细胞色素C的吸附量比二甲基亚砷法还多，其它与二甲基亚砷法相似。

### (3) 十六烷氯化吡啶法<sup>[8,9]</sup>

称取琼胶24克，沙菜胶4.8克(加沙菜胶的作用是帮助使琼胶酯沉淀)，加水1,600毫升，加热溶化，加入5%十六烷氯化吡啶400毫升，使带有硫酸基的琼胶酯等沉淀，加硅藻土，过滤，滤液倾入丙酮中，得出白色琼胶素沉淀，再经乙醇洗，丙酮洗，干燥。产品分析结果见表1。产品质量比前两种方法好，凝胶强度比英国的产品高，电泳灵敏度与英国的相同，细

胞色素C的吸附量接近英国的，而比瑞典Pharmacia厂的Sephrose好。

### (4) 磷酸盐法和乙二胺四乙酸二钠法

磷酸盐法<sup>[10]</sup>：琼胶用磷酸盐缓冲液(0.03M, pH6.8)加热溶化，凝固后推条，凝胶条用同样的缓冲液室温浸洗数次，再用水洗，压榨脱水，干燥。

乙二胺四乙酸二钠法<sup>[11]</sup>：琼胶加0.65—1.0%EDTA-Na<sub>2</sub>在50—60°C处理约4小时，过滤，水洗、压榨脱水、干燥。测定结果见表2。

用EDTA-Na<sub>2</sub>法制成的比磷酸盐法稍好些，电渗和灰分小，凝胶强度较高。用酸性的EDTA-Na<sub>2</sub>处理，电渗和灰分更小些，但凝胶强度减弱。先后用两种方法处理，效果不见改善。

### (5) 海藻原料的碱处理和琼胶的碱处理<sup>[12,13,14]</sup>

海藻的碱处理：石花菜或江蓠用不同浓度

的氢氧化钠在不同条件下处理，然后水洗至中性，煮胶，过滤，凝固推条，压榨脱水，干燥。

琼胶的碱处理：琼胶（由石花菜制的）加碱处理，水洗至中性，漂白，水洗，加热溶化，过滤，凝固推条，压榨脱水，干燥。

碱处理石花菜显著改善了产品的结晶紫电泳性能，但对血清电泳和聚乙二醇电泳性能改善不大。而碱处理的产品，正好与此相反，血清电泳和聚乙二醇电泳显著提高，结晶紫电泳提高不大。

碱处理时的温度，影响处理效果。室温处理效果差，以50—60℃左右效果较好。

江蓼的采期对产品质量影响很大。从不同时期青岛采的三份江蓼所得的结果（见表3的

9—11号）显示：6月比4月的好，8月又比6月的好。青岛地区，江蓼自6月开始成熟，由此表明，产品质量与江蓼的成熟与否有密切关系，成熟者碱处理后产品质量好。6月和8月采的血清电泳、聚乙二醇电泳和凝胶强度均超过英国产品。

用碱处理琼胶，效果比处理石花菜好些（见表3的12和13号）。

碱处理后的产物若再经DEAE-纤维素处理，则能得到高质量的琼胶素。血清电泳比值11.5以上，凝胶强度750克/厘米<sup>2</sup>以上，远远超过英国的产品。

### (6) 加压处理法

琼胶加水成1%浓度，放压力锅中，加压

表2 磷酸盐法和乙二胺四乙酸二钠法产品的分析

编号	方 法	血清电泳	结晶紫电泳	聚乙二醇电泳	凝胶强度	灰分%	产率%
1	磷酸盐处理	1.5	+++	23	180	1.88	65.5
2	EDTA-Na <sub>2</sub> , pH4-5处理	2.6		18	170	0.66	66.0
3	中性EDTA-Na <sub>2</sub> 处理	1.9	+	21	480	1.01	64.8
4	无磷酸盐, 再中性EDTA-Na <sub>2</sub> 处理	2.6	++	20	480	1.11	62.7

表3 不同碱处理法产品的分析

编号	方 法	血清电泳	结晶紫电泳	聚乙二醇电泳	凝胶强度	灰分
1	石花菜浓碱室温浸2个月	1.0	+++	29	505	1.46
2	石花菜浓碱37℃浸7天	1.2	++	25	250	
3	石花菜8%碱液, 60—65℃, 3小时	1.2			400	
4	石花菜5%碱液, 沸水浴中2小时	2.3	+++	18.5	900	0.94
5	上述产物再用1:1.5纤维素处理	16.6	+++	5.5	915	0.24
6	石花菜浓碱, 沸水浴中2小时	1.2	+++	26.5	510	1.07
7	湛江江蓼浓碱38℃浸9天	3.6	-	14.0	505	
8	湛江江蓼浓碱40—70℃浸12天	5.3	++	8.5	680	
9	青岛麦岛4月采江蓼浓碱50—60℃浸8天	2.5	+	15.0	395	
10	青岛麦岛6月采江蓼浓碱50—60℃浸3天	4.9	-	11.0	845	
11	青岛麦岛8月采江蓼浓碱50—60℃浸3天	6.3	-	7.5	590	
12	琼胶30%碱室温浸10天	1.9	++	24.0	630	1.45
13	琼胶5%碱60—65℃4小时	2.3	++	17.0	940	
14	上述产物再用纤维素处理	11.5	+++	5.5	753	

高温处理数小时，然后过滤、凝固、压榨脱水、干燥。如此反复处理数次，最后一次经漂白、水洗、压榨脱水、干燥。结果见表4。

血清电泳随处理的次数，逐步提高，而凝胶强度则逐步下降。经处理三次后血清电泳比值为4.1，超过英国的3.8，凝胶强度仍较好。

此法简单易行，但受起始原料的质量和处理的条件影响较大。如果起始原料凝胶强度不够高或处理不当时，最后产物凝胶强度便可能太弱。

#### (7) DEAE-纤维素法<sup>[10,15]</sup>

初步纯化的琼胶，加水加热溶化，浓度1%—2%，加入DEAE-纤维素，保温搅拌处理一段时间，过滤、凝固推条，压榨脱水、

干燥。结果见表5。

琼胶素的质量与纤维素的加入量关系很大（见表5的1号至5号），纤维素用量愈多，产品质量愈好。

纤维素处理时的温度、时间和pH对产品质量也有影响。处理温度要适中，以75℃左右较好，过高时凝胶强度受破坏，过低时电泳性能提高的差些（见表5的6—8号）。处理时间太短者效果不好，以1小时到1.5小时较好。处理时的pH宜在中性，如在酸性下处理，则也会降低凝胶强度（见表5的12和13号）。

此外，琼胶以DEAE-葡聚糖凝胶<sup>[16]</sup>用相似的方式处理，也能得到良好的琼胶素（见表5的14）。

表4 加压处理法产品的分析

编号	方 法	血清电泳	凝胶强度
1	琼胶以0.9公斤压力处理第1次4小时	2.5	600
2	琼胶以0.9公斤压力处理第2次4小时	3.2	540
3	琼胶以0.9公斤压力处理第3次4小时	4.1	450
4	琼胶以0.7公斤压力处理第4次2小时	4.9	345

表5 DEAE-纤维素法和DEAE-葡聚糖凝胶法产品的分析

编号	方 法	血清电泳	结晶紫电泳	聚乙二醇电泳	凝胶强度	灰分	产率
1	琼胶加1:0.25纤维素(新的)70℃90分钟	3.9	++	11.5	640	0.72	70.0
2	琼胶加1:0.5纤维素(新的)70℃90分钟	5.5	+++	11.0	798	0.47	61.7
3	琼胶加1:0.75纤维素(新的)70℃90分钟	6.3	+++	9.5	575	0.31	65.7
4	琼胶加1:1纤维素(新的)70℃90分钟	8.2	+++	6.5	663	0.44	56.3
5	琼胶加1:2纤维素(新的)70℃90分钟	14.3	+++	5.0	565	0.43	50.0
6	琼胶加1:2纤维素(再生的)90℃	9.3	+++	6.0	450		
7	琼胶加1:2纤维素(再生的)75℃	8.9	+++	6.0	960		
8	琼胶加1:2纤维素(再生的)60℃	8.3	+++	6.5	835		
9	琼胶加1:1纤维素(新的)70℃10分钟	5.5	+++	9.5	730		
10	琼胶加1:1纤维素(新的)70℃30分钟	5.9	+++	9.0	700		
11	琼胶加1:1纤维素(新的)70℃60分钟	7.0	+++	8.5	680		
12	琼胶加1:2纤维素(再生的)pH5	9.1	++	5.5	380		
13	琼胶加1:2纤维素(再生的)pH7	9.3	+++	6.0	545		
14	琼胶加1:1葡聚糖凝胶70℃1小时	11.6	+++	6.0	720		

### 三、珠状琼胶素凝胶的 试制方法和结果

珠状琼胶素凝胶是用上述方法制成的干粉末状琼胶素，再以搅拌法或喷珠法制成小圆珠状微粒，以便于柱层析用。

(1) 搅拌法<sup>[17]</sup> 琼胶素加水，放500毫升园底烧瓶中，加热溶解，配成4%胶液130毫升，待胶液凉至70—80℃时，将200毫升甲苯、60毫升四氯化碳和1.2克司本80预热至约65℃的混合物，倾入园底烧瓶中与胶液混合，并立即开始激烈搅拌5分钟，然后烧瓶外面用冷水冷却，继续搅拌6分钟停止。布氏漏斗抽滤，乙醚洗3—4次，水洗4—5次，再用60目和120目筛子流水过筛，筛去大于60目和小于120目的粒子，得大小为60—120目的珠状琼胶素凝胶。

(2) 喷珠法<sup>[18]</sup> 琼胶素放烧杯中加水，加热溶化配成4%胶液，倒入具有保温夹套的小型不锈钢缶中，加盖密闭，缶下具活塞，下接粗的注射针头，向缶中通入氮气或压缩空气，压力2—3公斤/厘米<sup>2</sup>。开阀门将胶液喷入冰冷的乙醚中，同时搅拌，喷完用布氏漏斗抽滤，水洗，同上一样过筛，得珠状琼胶素凝胶。

用搅拌法制备者，颗粒的形状和大小，受搅拌速度、表面活性剂的性质和用量，以及甲苯和四氯化碳的数量等因素的影响。此外，与所用琼胶素的凝胶强度和粘度也有关系。强度高粘度大的需要更高的搅拌速度，否则颗粒太大。

用喷珠法制备者，颗粒的形状和大小，主要与琼胶素的凝胶强度和粘度，以及压力和针头的大小有关。强度高粘度大的琼胶素，压力曾使用到5公斤/厘米<sup>2</sup>，而仍喷不好。由此表明，搅拌法比喷珠法好。搅拌法受凝胶强度和粘度的影响较小，而喷珠法受到的影响很大。用搅拌法制成的珠状凝胶全是很圆的珠状微粒。

将试制的珠状凝胶装入内径1.0公分的层析柱，高10公分，测定在不同高度水压下，每10分钟流出水的毫升数。1号是高凝胶强度(1,000克/厘米<sup>2</sup>)的，2号是中凝胶强度

(320克/厘米<sup>2</sup>)的，二者与瑞典 Sepharose 4B (3号)的比较结果见图2。

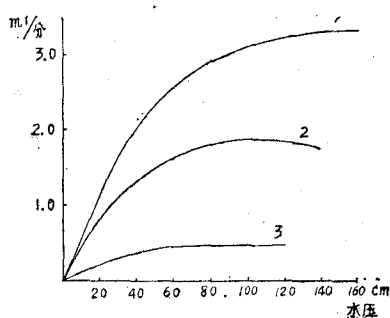


图2 流速

高强度的流速大大优于瑞典的产品，即是中强度的也远比瑞典的好。

### 四、讨 论

琼胶素的制法较多，经过实验证明，不同的方法所得产品的质量相差很大。磷酸盐法和乙二胺四乙酸二钠法效果差。聚乙二醇法、二甲基亚砷法和十六烷氯化吡啶法效果较好。其中尤以十六烷氯化吡啶法最好，产品质量基本达到英国 B. D. H. 的水平，但该法缺点是过滤困难，试剂缺，成本高。碱处理法取决于原料，石花菜不如江蓠效果好，而未成熟的江蓠又不如成熟的江蓠好。这表明石花菜中琼胶的化学组成与江蓠的不同，而成熟的和不成熟的江蓠也不同。原料合适者，用简单的碱处理便能制得价格低廉、质量又不亚于英国产品的琼胶素。加压处理法也不失为一种成本低、方法简单的制造初级琼胶素的方法，但要选好原料和处理条件，否则凝胶强度可能太低。对比起来，在所做的八种方法中以 DEAE-纤维素法最好。根据上述实验的结果，我们提出了一个新的制造琼胶素的方法，即碱-DEAE-纤维素法，此法具有产品质量好、操作工艺简便，成本低等优点。它的工艺流程如下：

石花菜琼胶→用5%NaOH在60—65℃处理4小时→水洗→漂白→水洗→加水溶化→精滤→凝固→推条→压榨脱水→干燥→加水溶化→在75℃加DEAE

-纤维素处理 1—1.5 小时—→过滤—→凝固—→推条—→压榨脱水—→干燥—→粉碎—→包装。

碱—DEAE-纤维素法比单独的DEAE-纤维素法好的地方是：用碱处理可以先除去大部分的硫酸基，并提高产品的凝胶强度；再进一步用DEAE-纤维素处理，将琼胶酯除去，由于大部分的硫酸基在碱处理时已被除去，故在用DEAE-纤维素处理时可以少用DEAE-纤维素。此法现已用于生产，用这种方法生产的琼胶素具有纯度高、电渗小、而凝胶强度又很高等特点。

制备珠状琼胶素凝胶方面，试验了两种方法，初步看来，搅拌法的适用性较广，故以采用搅拌法生产较好。

在上述实验的基础上，青岛海洋渔业公司

水产品加工厂已开始生产干粉状的琼胶素和珠状琼胶素凝胶。干粉琼胶素根据电渗和凝胶强度等性能的差异分为4号、8号和12号三种规格，产品质量见下表6。8号和12号琼胶素远远超过英国B. D. H.的产品。用12号琼胶素制备的珠状琼胶素凝胶，对细胞色素C的吸附量小于1%，英国B. D. H.的琼胶素吸附4%，瑞典Pharmacia的Sephrose 4 B吸附12.5%。上海生物制品研究所与上海第六人民医院检验组，对比了我们4号和8号琼胶素与英国B. D. H.产品的电泳性能，认为4号琼胶素与英国的相似，8号琼胶素比英国的好。北京首都医院用4号和8号琼胶素做火箭电泳自显影技术检查肝癌，结果认为具有：

(1)电渗小，(8号比4号更小)；(2)敏感度高；(3)结果准确可靠等优点。

表6 生产的琼胶素与英国琼胶素的对比

产 品	血清电泳	聚乙二醇电泳	结晶紫电泳	细胞色素C %	凝胶强度
四号琼胶素	4.9	8.5	+++		350
八号琼胶素	8.2	7.0	+++		1,000
十二号琼胶素	11.8	4.5	+++	< 1.0%	1,000
英国B. D. H. 琼胶素	3.8	12.5	+++	4.0%	400
琼胶(对照)	0.8	28.0	-	19.4%	480

### 参 考 文 献

- [1] Hjerten, S.; Biochim. Biophys. Acta, 53, 514 (1961)
- [2] Araki, C.; Bull. Chem. Soc. Japan, 29, 543 (1956)
- [3a] 中国科学院海洋所海藻化学组; 海洋科学动态, 第24号 (1976)
- [3b] 纪明候; 海洋科学集刊, 第一集, 206(1962)
- [4] Polson, A.; Brit. Pat. 1,023,179(1966)
- [5] 胜浦嘉久次等; 工化, 68, 205(1965)
- [6] Hegenauer, J. C. et al; Biochim. Biophys. Acta, 111, 334(1965)
- [7] Polson, A.; Brit. Pat. 1,006,259(1965)
- [8] Hjerten, S.; Biochim. Biophys. Acta, 62, 445(1962)
- [9] Blethen, J.; U. S. Pat. 3,281,409(1966)
- [10] Hjerten, S.; J. Chromatog. 61, 73(1971)
- [11] Hyland Laboratories; Brit. Pat. 1,070,770(1967)
- [12] Porath, J. et al; J. Chromatog. 60, 167 (1971)
- [13] 田川昭治等; 水产大学研报, 15, 11(1966)
- [14] 纪明候, 史升耀, 刘万庆; 水产学报, 2(2), 1, (1965)
- [15] Zabin, B. A.; U. S. Pat. 3, 423, 396 (1969)
- [16] Duckworth, M. et al; Anal. Biochem. 44, 636(1971)
- [17] Hjerten, S.; Biochim. Biophys. Acta, 79, 393(1964)
- [18] Bengtsson, S., et al; Biochim. Biophys. Acta, 79, 399(1964)