

## 过氧化氢脱硫辅助聚乙二醇法制备高凝胶性琼脂糖

吴孝兰<sup>1</sup>, 刘琴<sup>2</sup>, 肖安风<sup>\*3</sup>, 肖琼<sup>3</sup>

(1. 国药集团化学试剂有限公司, 上海 200002;

2. 华东理工大学 生物工程学院 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

3. 集美大学 海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 琼脂糖是一种从石花菜、江蓠等红藻中提取的线性多糖, 在生物、医药等领域具有广泛应用。但目前国内琼脂糖的制备工艺较为复杂、成本较高且各批次琼脂糖的质量稳定性较差, 使得国内科研机构及生物、医药行业过度依赖进口琼脂糖。利用过氧化氢辅助聚乙二醇法可对琼脂进行绿色脱硫与对制备的琼脂糖进行提纯, 通过单因素实验优化得出过氧化氢脱硫的最佳条件为: 无水乙醇浓度 70%, 过氧化氢添加量 15 mL, 反应时间 2 h, 反应 pH 9, 反应温度 50 °C。在此条件下制备得到过氧化氢改性琼脂的硫酸根含量为 0.21%、凝胶强度为 966.6 g/cm<sup>2</sup>。再用聚乙二醇法对过氧化氢改性的琼脂进行提纯, 制备的琼脂糖的硫酸根含量为 0.19%, 凝胶强度为 1 244.9 g/cm<sup>2</sup>。开发的过氧化氢辅助聚乙二醇法是一种简单、快速、高效、低成本、环保的琼脂糖制备方法, 将有助于解决国内琼脂糖“卡脖子”的问题。

**关键词:** 琼脂; 脱硫; 过氧化氢; 聚乙二醇

**中图分类号:** O65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)11-0067-07

**DOI:** 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0420

**Preparation of High Gelatinous Agar Using Hydrogen Peroxide Dehydrogenation Assisted by Polyethylene Glycol** WU Xiao-lan<sup>1</sup>, LIU Qin<sup>2</sup>, XIAO An-feng<sup>\*3</sup>, XIAO Qiong<sup>3</sup> (1. Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd, Shanghai 200002, China; 2. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. College of Food and Biological Engineering, JiMei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Agarose is a linear polysaccharide extracted from red algae such as Gelidium and Gracilaria, and it has widespread applications in biology, pharmaceuticals, and other fields. However, the domestic preparation process for agarose is complex, costly, and characterized by poor quality stability across different batches, leading to an excessive reliance on imported agarose by domestic research institutions and the biopharmaceutical industry. The use of hydrogen peroxide-assisted polyethylene glycol method can greenly desulfurize agar and purify the prepared agarose. Through single-factor experiments, the optimal desulfurization conditions using hydrogen peroxide were determined to be: anhydrous ethanol concentration at 70%, hydrogen peroxide addition amount at 15 mL, reaction time of 2 h, reaction pH at 9, and reaction temperature at 50 °C. Under these conditions, the sulfate content of hydrogen peroxide-modified agar was approximately 0.21%, with the gel strength of 966.6 g/cm<sup>2</sup>. Furthermore, the purification of the hydrogen peroxide-modified agar using the polyethylene glycol method resulted in agarose with a sulfate content of 0.19% and a gel strength of 1 244.9 g/cm<sup>2</sup>. The developed hydrogen peroxide-assisted polyethylene glycol method is a simple, rapid, efficient, low-cost, and environmentally friendly method for agarose preparation, which will help solve the “bottleneck” issue of domestic agarose production.

**Key words:** agar; desulfurization; hydrogen peroxide; polyethylene glycol

琼脂主要是从石花菜、江蓠、鸡毛菜等红藻中提取的一种多糖。一般包括琼脂糖和琼脂胶两部分, 其基本结构均为重复交替的 1,3-连接的  $\beta$ -吡喃半乳糖和 1,4-连接的 3,6-脱水- $\alpha$ -L-吡喃半乳糖, 琼脂糖含有很低含量的硫酸基团, 呈电中性, 是形成凝胶的重要组分, 而琼脂胶为含有硫酸基、丙酮酸、甲氧基的酸性多糖, 不会形成凝胶<sup>[1]</sup>。琼脂的凝胶性质使琼脂在食品加工及化妆品等行业得到广泛应用, 常被用作胶凝剂、增稠剂、稳定剂等<sup>[2]</sup>。其中, 硫酸基团是影响琼脂凝胶性能的

收稿日期: 2024-09-27; 网络首发日期: 2024-10-31

基金项目: 生物医药用琼脂类试剂的高值化关键技术研发项目(21142201500)。

作者简介: 吴孝兰(1979-), 女, 上海人, 学士, 正高级工程师, 主要研究方向为药用辅料制备、生物医药专用试剂纯化。

通讯作者: 肖安风, E-mail: xxaaffeng@jmu.edu.cn。

引用本文: 吴孝兰, 刘琴, 肖安风, 等. 过氧化氢脱硫辅助聚乙二醇法制备高凝胶性琼脂糖[J]. 化学试剂, 2024, 46(11): 67-73。

主要因素。硫酸根含量高时,凝胶强度会降低。这是由于琼脂 L-半乳糖 C6 的硫酸基团会在螺旋链中产生一个“扭结”阻碍螺旋的形成造成的<sup>[3]</sup>。因此,需要通过去除硫酸根来达到增加凝胶强度的目的。工业上除硫酸根是通过碱处理琼脂的传统方法,此方法能够将琼脂的大部分硫酸根脱除。用碱处理可以去除琼脂 L-半乳糖 C6 位上的硫酸基团,形成更稳定的结构 3,6-内醚,从而提高凝胶强度。另外,有机溶剂也可脱除硫酸根。Alfred 等<sup>[4]</sup>使用二甲基亚砷、三甲基氯硅烷等化学方法能够除去藻类多糖存在的硫酸酯,且多糖骨架未发生显著降解,这一发现为琼脂的脱硫研究奠定了基础。近期有文献报道了酶法脱硫的方法,Wang 等<sup>[5]</sup>使用酶处理琼脂,经红外、核磁、GC-MS、甲基分析等方法证实了酶法可以脱除琼脂 D-半乳糖 C4、C6 和 L-半乳糖 C6 位的硫酸根。Shukla 等<sup>[6]</sup>从江蓠中提取出来的硫酸水解酶在 pH 8、温度 35 ℃ 达到最大活力,经酶处理琼脂后硫酸盐的清除率可达到 60% 以上,且琼脂具有更高的交联度和刚度。但目前酶法脱除硫酸盐的方法成本高,迫切需要开发一种成本低的脱硫方法。

过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )是一种环保型试剂,广泛应用于造纸、电子、医药、环境处理、食品、航天等领域。在造纸行业中,过氧化氢作为漂白剂应用于纸浆漂白及藻类漂白中,其分解的  $\text{HOO}^\cdot$  是极强的亲核试剂,可以和色素反应,达到漂白目的<sup>[7-10]</sup>。过氧化氢分解后产生极自由基具有很强的氧化性,此性质在多糖改性中得到了广泛的应用,Yu 等<sup>[11]</sup>通过控制过氧化氢与催化剂用量、反应的温度和时间来制备不同氧化程度的淀粉,并将其应用于皮革制造行业;Zhu 等<sup>[12]</sup>通过控制过氧化氢的用量制备了不同氧化程度的卡拉胶,发现其微观结构由粗糙变光滑,并研究了其对革兰氏细菌的抗菌性;Zhang 等<sup>[13]</sup>利用过氧化氢制备了不同氧化程度的氧化琼脂,发现其性质发生了不同程度的改变。在石油工业,为了防止石油燃烧产生二氧化硫污染大气,过氧化氢也常被用作脱硫剂减少污染<sup>[14]</sup>。前期研究中发现,过氧化氢对碱处理提取出来的琼脂粉有显著的脱硫效果,使琼脂的品质也得到了提升。

琼脂糖的制备主要是分离去除琼脂中琼脂胶的过程,目前分离纯化琼脂制备琼脂糖的方法主要有乙酰化法、季铵盐法、DEAE 纤维素法、

EDTA- $\text{Na}_2$  法、离子交换法、聚乙二醇法等,但乙酰化法过程操作复杂且会造成琼脂糖的降解和变色;季铵盐法则会导致引入的复聚物难以与琼脂糖溶液分离;而 DEAE 纤维素法仅适用于试验室规模的琼脂糖提纯,且价格昂贵,难以适用工业化生产<sup>[15]</sup>。

聚乙二醇(PEG)及其衍生物在生物制药领域应用前景广阔,PEG 是美国食品药品监督管理局(FDA)批准能够直接用于人体临床注射的极少数聚合物之一<sup>[16]</sup>,是一种绿色的化学溶剂。聚乙二醇法由于其操作简便、在提取与分离过程中成本低、提取产品纯度高且对环境污染小的特点,可以广泛应用于工业化生产。肖笛等<sup>[15]</sup>研究发现聚乙二醇沉淀法可有效分离精制琼脂糖,而孙宁等<sup>[17]</sup>使用聚乙二醇法从江蓠琼脂中提取了各项性能指标接近于 Sigma 琼脂糖的高品质琼脂糖。

本文以碱处理方法提取的琼脂粉为原料,采用过氧化氢为改性剂,以硫酸根含量为主要指标,凝胶强度为辅助指标,探究不同反应条件下(乙醇浓度、反应 pH、 $\text{H}_2\text{O}_2$  添加量、反应时间和反应温度)过氧化氢的脱硫效果,优化最佳反应条件,然后以该琼脂为原料,采用聚乙二醇法进一步提纯琼脂糖,并与原琼脂粉做比较,分析基本性质(硫酸根含量、灰分、透明度、胶凝温度、融化温度、白度等)的变化,为脱硫琼脂应用到实际生产中提供理论支持。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

FE20K2 型酸度计(瑞士梅特勒-托利多公司);BS233S 型电子天平(德国赛多利斯公司);HH-4 型电热恒温水浴锅(江苏金坛鸿科仪器厂);7200 型分光光度计(尤尼柯(上海)仪器有限公司);AI-SITE 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

琼脂(食品级,绿新(福建)食品有限公司);乙醇、盐酸、果糖、硫酸钾、氯化钡、间苯二酚(国药集团化学试剂有限公司);过氧化氢、氢氧化钠、明胶、乙缩醛(西陇科学股份有限公司);聚乙二醇 6000(天津光复精细化工研究所)。除标注外,所用试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 琼脂脱硫工艺流程

配制 250 mL 一定体积分数的乙醇溶液,置于

磁力搅拌器上,待溶液温度达到设定温度后加入 25 g 琼脂粉,添加一定量的 30% 过氧化氢溶液,调节琼脂溶液 pH 即为反应 pH,反应结束后,添加 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液 pH 至碱性(pH 8),纱布过滤,加入 1 000 mL 蒸馏水搅拌 8 min,再过滤,反复洗涤至溶液 pH 接近中性,用过氧化氢检测试纸检测不到过氧化氢残留为止,55 ℃ 烘干,粉碎,过 80 目筛,得到样品。

### 1.2.2 琼脂脱硫工艺单因素试验

#### 1.2.2.1 乙醇浓度

反应物琼脂添加量为 25 g,过氧化氢的添加量为 10 mL,反应温度为 30 ℃,反应时间为 2 h,反应 pH 9,考察反应体系乙醇浓度对琼脂脱硫效率的影响。将琼脂分别加入 40%、55%、70%、85%、100% 乙醇浓度体系中进行反应,对反应后的样品进行凝胶强度及硫酸根含量测定。

#### 1.2.2.2 $H_2O_2$ 添加量

反应物琼脂添加量为 25 g,乙醇浓度体系为 70%,反应温度为 30 ℃,反应时间为 2 h,反应 pH 9,考察过氧化氢添加量对琼脂脱硫效率的影响。分别加入 5、10、15、20、25 mL 过氧化氢进行反应,对反应后的样品进行凝胶强度及硫酸根含量测定。

#### 1.2.2.3 反应时间

反应物琼脂添加量为 25 g,乙醇浓度体系为 70%,过氧化氢的添加量为 15 mL,反应温度为 30 ℃,反应 pH 9,考察反应时间对琼脂脱硫效率的影响,分别反应 1、1.5、2、2.5、3 h,对反应后的样品进行凝胶强度及硫酸根含量测定。

#### 1.2.2.4 反应 pH

反应物琼脂添加量为 25 g,乙醇浓度体系为 70%,过氧化氢的添加量为 15 mL,反应温度为 30 ℃,反应时间为 2 h,考察反应 pH 对琼脂脱硫效率的影响。分别调节反应 pH 3、5、7、9、11,对反应后的样品进行凝胶强度及硫酸根含量测定。

#### 1.2.2.5 反应温度

反应物琼脂添加量为 25 g,乙醇浓度体系为 70%,过氧化氢的添加量为 15 mL,反应 pH 9,时间为 2 h,考察反应温度对琼脂脱硫效率的影响。分别控制温度为 30、40、50、60、70 ℃,对反应后的样品进行凝胶强度及硫酸根含量测定。

### 1.2.3 聚乙二醇法提取琼脂糖

#### 1.2.3.1 琼脂糖提纯流程

取过氧化氢改性琼脂粉及原琼脂粉各 15 g,

另取 375 mL 蒸馏水在磁力搅拌器上加热至 50 ℃ 后,将原琼脂及改性琼脂加入到蒸馏水中搅拌溶解,继续加热至 80 ℃,使琼脂粉完全溶解至溶液状。在 80 ℃ 恒温条件下,向溶解好的琼脂溶液中加入等体积(375 mL)的 40% 聚乙二醇 6000 溶液,搅拌混匀 5 min 产生沉淀,用干净纱布过滤,留沉淀。用 40 ℃ 温水洗 2~3 次,洗去硫琼胶。常温的蒸馏水洗涤,浸洗 8 h 以除去聚乙二醇,用无水乙醚洗涤 10 min,过滤,留沉淀;放入烘箱 55 ℃ 干燥。重复以上步骤 2 次即得原琼脂糖及改性琼脂糖。

#### 1.2.3.2 琼脂糖产率

琼脂糖产率是指经过聚乙二醇法处理后中得到琼脂糖的质量比。

$$\text{产率} = (m_2/m_1) \times 100\% \quad (1)$$

式中:产率为经过聚乙二醇沉淀处理后中得到琼脂糖的质量比,%; $m_1$  为加入聚乙二醇醇沉的琼脂质量,g; $m_2$  为聚乙二醇醇沉后所得琼脂糖质量,g。

#### 1.2.4 硫酸根含量的测定

利用明胶-氯化钡法进行测定<sup>[18]</sup>。得到硫酸根含量计算的标准曲线方程为: $Y = 3.5984X + 0.0021$ ,  $R^2 = 0.9998$ 。

称取 0.3 g 琼脂样品于 25 mL 比色管中,加入 25 mL(1 mol/L) 盐酸,于 100 ℃ 水浴消化 5 h 后冷却至室温,活性炭脱色,过滤得澄清样品溶液待用。利用标准曲线方程计算琼脂中硫酸根含量,硫酸根计算公式为:

$$\text{硫酸根含量}(\%) = [2.5(A - b)/(mk)] \times 100\% \quad (2)$$

式中: $A$  为样品吸光度值; $b$  为标准曲线方程的截距; $k$  为标准曲线方程斜率; $m$  为消化样品质量,g。

#### 1.2.5 凝胶强度的测定

配制 1.5% 琼脂溶液,微波溶解 3 min,结束时补水恒重,冷却后盖保鲜膜,室温下静置过夜。将培养皿放在托盘天平的左方,将截面积为 1 cm<sup>2</sup> 的柱塞恰好接触凝胶表面后固定,天平右方放置烧杯,匀速加入蒸馏水,当凝胶表面破裂后立即停止加水,记录蒸馏水的总重量。

$$\text{凝胶强度}(\text{g/cm}^2) = M/S \quad (3)$$

式中: $M$  为蒸馏水的总重量,g; $S$  为柱塞截面积,cm<sup>2</sup>。

#### 1.2.6 白度的测定

样品先过 80 目筛,白度色度计提前预热 30 min,用黑板调黑,再用白板调白,之后测量样品,记录白度值。

#### 1.2.7 透明度的测定

配制 1% 的琼脂溶液,配制完毕后立即倒入

比色皿中,室温静置过夜,于 700 nm 下测定琼脂凝胶的透明度。

### 1.2.8 胶凝温度及融化温度的测定

配制 1.5% 的琼脂溶液,取 10 mL 加入放有玻璃珠的试管中,上下倾斜直至玻璃珠不再移动,立即插入温度计记录胶凝温度;融化温度是在已经形成凝胶的试管上放置一个钢柱,置于水浴锅中,从 50 ℃ 以 1 ℃/min 升温,直至钢柱掉落,记录温度。

### 1.2.9 灰分含量的测定

参考 GB 5009.4—2010《食品安全国家标准:食品中灰分的测定》<sup>[19]</sup>测定琼脂中的灰分:1) 坩埚用 1 mol/L 的盐酸溶液浸泡 24 h, 105 ℃ 烘干 4 h,放入干燥器冷却至室温;2) 坩埚称重,记为  $m_2$  (精确到 0.000 1 g),加样 3 g 左右,再次称重,记为  $m_3$ ;3) 用电炉对样品进行炭化至无烟;4) 将坩埚放入马弗炉中,在 550 ℃ 下灼烧 4 h,冷却至 200 ℃ 取出,放入干燥器中,冷却至室温后称重,记为  $m_1$ ;5) 琼脂中的灰分含量计算公式如下:

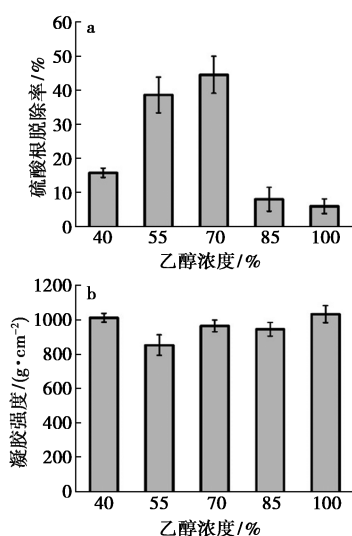
$$\text{灰分含量}(\%) = [(m_1 - m_2) / (m_3 - m_2)] \times 100\% \quad (4)$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 过氧化氢改性琼脂脱硫效果单因素条件优化

#### 2.1.1 乙醇浓度对琼脂脱硫的影响

乙醇浓度对琼脂脱硫的影响结果如图 1 所示。



a. 乙醇浓度对硫酸根脱除率影响; b. 乙醇浓度对凝胶强度影响

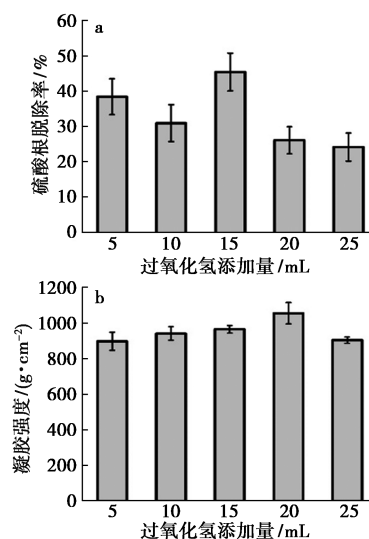
图 1 乙醇浓度对琼脂脱硫的影响

Fig.1 Effect of ethanol concentration on agar desulfurization

由图 1 可知,随着无水乙醇浓度的增加,琼脂硫酸根的脱除率呈先增加后下降的趋势。主要原因是琼脂的多羟基结构导致琼脂颗粒在水中时,琼脂分子之间的间隙会被水分子填充,发生溶胀,限制了过氧化氢与其接触反应。因此,适当增加乙醇浓度有利于琼脂颗粒在体系中分散,增大与过氧化氢接触机率,进而有效进行硫酸根的脱除。而凝胶强度随乙醇浓度的增加呈先下降后上升的趋势,这可能与过氧化氢在不同浓度的乙醇中分解的程度和速率有关,分解速率过快,导致部分参与氢键合成的羟基被氧化,氢键作用被破坏,减少了分子间的交联,从而降低凝胶的强度。当乙醇浓度为 70% 时,硫酸根脱除率最高,这可能与乙醇对过氧化氢的分解产物羟自由基 ( $\text{HO}\cdot$ ) 的猝灭作用有关<sup>[20]</sup>。而当乙醇浓度 > 70%, 过高的乙醇浓度会抑制过氧化氢的分解,影响过氧化氢与琼脂的脱硫反应,进而导致琼脂的凝胶强度在乙醇浓度 100% 下达到最大值,硫酸根脱除率最低。以硫酸根含量为主要质量指标,结合凝胶强度指标。故选取乙醇浓度 70% 进行下一个单因素的优化。

#### 2.1.2 过氧化氢添加量对琼脂脱硫的影响

过氧化氢添加量对琼脂脱硫的影响结果如图 2 所示。



a. 过氧化氢添加量对硫酸根脱除率影响;

b. 过氧化氢添加量对凝胶强度影响

图 2 过氧化氢添加量对琼脂脱硫的影响

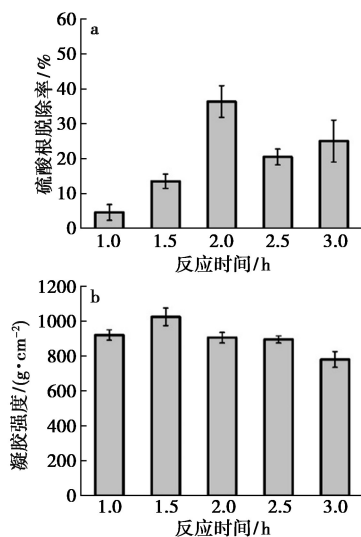
Fig.2 Effect of hydrogen peroxide dosage on agar desulfurization

由图 2 可知,随着过氧化氢添加量的增加,琼脂的硫酸根脱除率先上升后下降,这是因为在弱

碱性条件下,随着过氧化氢添加量的增加,产生的  $\text{HO}\cdot$  增加,与琼脂分子中的硫酸根接触机率增加,脱硫效果就越好。在过氧化氢添加量为 15 mL 条件下,琼脂的硫酸根脱除率最高,达到 45.4%。凝胶强度则随过氧化氢添加量的增加而上升,当过氧化氢添加量为 20 mL 时,凝胶强度达到最大值。继续添加过氧化氢时,可能会产生降解,副反应明显,硫酸根脱除率降低,凝胶强度也随之降低,这是由于过氧化氢的氧化性较强,易与琼脂分子中的糖苷键发生反应,造成琼脂降解,导致琼脂的凝胶强度下降。因此,综合硫酸根脱除率和凝胶强度指标,过氧化氢改性琼脂的最佳过氧化氢添加量为 15 mL。

### 2.1.3 反应时间对琼脂脱硫的影响

反应时间对过氧化氢改性琼脂的影响结果如图 3 所示。



a. 反应时间对硫酸根脱除率影响; b. 反应时间对凝胶强度影响

图 3 反应时间对琼脂脱硫的影响

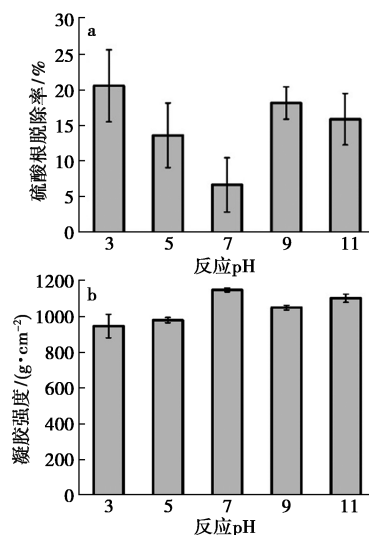
Fig.3 Effect of reaction time on agar desulfurization

反应时间过短会使琼脂分子与过氧化氢分子接触不充分,降低脱硫效率,反应时间过长,反应达到平衡,降低反应效率。由图 3 可知,随着反应时间的增加琼脂硫酸根脱除率增加,凝胶强度随反应时间的延长先上升后趋于稳定最后下降。当反应时间达到 2 h 后,琼脂的硫酸根脱除率最高为 36.4%,此后再延长反应时间琼脂的硫酸根脱除率随之下降,这主要是较短时间内,过氧化氢与琼脂分子的活性基团无法充分结合,反应不完全,此时,过氧化氢分子分解过程中可能产生自由基,自由基能够攻击琼脂分子,造成琼脂分子降解,琼脂凝胶强度降低。适当延长反应时间,过氧化氢

分子与琼脂分子中的活性基团充分结合,随后反应达到平衡状态,因此硫酸根脱除率逐渐增加,琼脂的凝胶强度先增加后趋于稳定。而反应时间过长,琼脂分子在反应液中易溶胀,影响反应进行。综合凝胶强度指标,过氧化氢改性琼脂的最佳反应时间为 2 h。

### 2.1.4 反应 pH 对过琼脂脱硫的影响

过氧化氢在水溶液中易分解成  $\text{H}_2\text{O}$  和  $\text{O}_2$ ,这是多项化学分解和反应的平衡,涉及多种离子和自由基。因此当反应环境酸碱不同时,反应体系离子和自由基比例含量发生变化,导致反应结果存在较大差异。反应 pH 对过琼脂脱硫的影响结果如图 4 所示。



a. pH 对硫酸根脱除率影响; b. pH 对凝胶强度影响

图 4 pH 对琼脂脱硫的影响

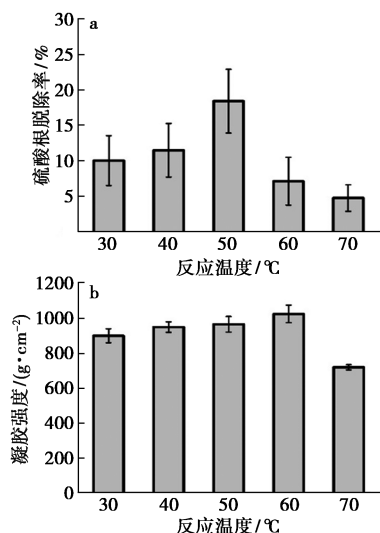
Fig.4 Effect of pH on agar desulfurization

由图 4 可知,在 pH 为酸性或碱性条件下,硫酸根脱除效率较高,在中性条件下,硫酸根脱除率最低,这主要是  $\text{H}_2\text{O}_2$  在酸性或弱碱性条件下易分解,且溶液酸性越强,过氧化氢的分解速率越快<sup>[21]</sup>。因此在 pH 3、9 时硫酸根脱除率最高,分别达到 20.6% 和 19.8%。凝胶强度随 pH 增加而增加,这与琼脂在酸性条件下会发生降解有关。当增加至 pH 11 时,琼脂的硫酸根脱除率下降,其中原因可能是碱性过强时,过氧化氢分解大量的  $\text{HO}_2^-$ ,此基团可以与琼脂分子中的色素反应,达到漂白的效果,但脱除率下降<sup>[7]</sup>。综合考虑,选择 pH 9 作为反应最适 pH。

### 2.1.5 反应温度对琼脂脱硫的影响

反应温度对琼脂脱硫影响结果较为显著。温度的变化不仅对琼脂结构有影响,而且对过氧化

氢分解速率也有影响。反应温度升高时,反应速率增加,但当温度过高时,琼脂在反应过程中会发生吸水溶胀,不利于反应的进行。反应温度对琼脂脱硫效果的影响结果如图 5 所示。



a. 反应温度对硫酸根脱除率影响; b. 反应温度对凝胶强度影响

图 5 反应温度对琼脂脱硫的影响

Fig.5 Effect of reaction temperature on agar desulfurization

由图 5 可知,当反应温度从 30 °C 提高到 50 °C 时,硫酸根脱除效率大幅度提高,这可能是因为低温环境下分子运动不活跃,导致过氧化氢分子和琼脂分子之间接触效率不高。随着反应温度的提高,分子运动开始变得活跃,过氧化氢分子与琼脂分子的接触反应效率大幅度提高,琼脂的凝胶强度也随之增加。而反应温度升高至 70 °C 时,会造成过氧化氢无效分解,失去其原有的性质,琼脂分子在高温时吸水溶胀现象更加明显,所以在该温度下无法进行氧化脱硫,且温度升高会使部分琼脂分子溶解在水中,发生降解,凝胶强度下降到最低值。因此,选择 50 °C 为最佳反应温度,此时改性琼脂的硫酸根脱除率最高为 18.4%,硫酸根含量最低为 0.21%。

### 2.1.6 聚乙二醇法提取琼脂糖品质分析

通过单因素实验确定了最佳过氧化氢改性琼脂的条件,利用最优工艺改性琼脂。利用聚乙二醇法提纯琼脂糖,测定其产率及主要质量指标。如表 1 所示,与原琼脂相比,改性琼脂的白度提高了 14.38%。白度的增加是因为过氧化氢在反应过程中会分解出过羟基阴离子( $\text{HOO}^-$ ),此离子是一种极强的亲核试剂,能够与琼脂分子中色素的共轭体系发生反应,从而使琼脂的白度增加。

琼脂中的灰分是高温灼烧后残留的无机盐,主要成份是硫酸盐,其含量变化应该与硫酸根是一致的,可以看出,改性琼脂的灰分含量和原琼脂相比显著降低,而经聚乙二醇提纯后的原琼脂糖,硫酸盐及灰分含量进一步降低。经过过氧化氢改性后的琼脂强度略有下降,这主要是琼脂在加热状态下会发生部分降解导致。与原琼脂和改性琼脂相比,使用聚乙二醇法制得的原琼脂糖和改性琼脂糖在硫酸根含量上都有所下降,琼脂糖强度显著增加,胶凝温度及融化温度也有一定程度的提高,且灰分含量显著降低,这说明聚乙二醇法提纯琼脂糖可以有效缓解琼脂在过氧化氢脱硫阶段发生的水解作用,进一步有效提高琼脂糖的强度和纯度。

表 1 琼脂糖和琼脂的质量指标对比

Tab.1 Comparison of quality indicators of agarose and agar

| 理化性质                       | 原琼脂     | 原琼脂糖    | 改性琼脂  | 改性琼脂糖   |
|----------------------------|---------|---------|-------|---------|
| 产率/%                       | —       | 23      | —     | 15.5    |
| 硫酸根含量/%                    | 1.83    | 1.65    | 0.21  | 0.19    |
| 凝胶强度/(g·cm <sup>-2</sup> ) | 1 105.9 | 1 239.1 | 966.6 | 1 244.9 |
| 透明度/%                      | 57.3    | 58.1    | 63.6  | 64.3    |
| 白度/%                       | 53.2    | 53.5    | 60.9  | 61.3    |
| 灰分含量/%                     | 1.28    | 1.03    | 0.34  | 0.22    |
| 胶凝温度/°C                    | 36.5    | 39.1    | 35.6  | 37.5    |
| 融化温度/°C                    | 87.7    | 89.3    | 86.8  | 88.5    |

### 3 结论

以琼脂的硫酸根含量和凝胶强度为指标,通过单因素试验考察无水乙醇浓度、过氧化氢添加量、反应时间、反应 pH、反应温度优化得出过氧化氢改性琼脂的最佳条件为:无水乙醇浓度 70%,过氧化氢添加量 15 mL,反应时间 2 h,反应 pH 9,反应温度 50 °C。在此条件制备得到过氧化氢改性琼脂的硫酸根含量为 0.21%、凝胶强度为 966.6 g/cm<sup>2</sup>。将优化工艺制得的琼脂用于提取琼脂糖,制备的琼脂糖其硫酸根含量为 0.19%,凝胶强度为 1 244.9 g/cm<sup>2</sup>。该结果说明经过过氧化氢改性的琼脂脱硫效果明显、效果稳定,适合用于作为提取琼脂糖的原料,为提取琼脂糖节约了成本,适合扩大生产。

### 参考文献:

- [1] ARMISEN R. World-wide use and importance of Gracilaria[J]. *J. Appl. Phycol.*, 1995, 7(3): 231.

- [2] LEE W, LIM P, PHANG S, et al. Agar properties of Gracilaria species (Gracilariaceae, Rhodophyta) collected from different natural habitats in Malaysia [J]. *Reg. Stud. Mar. Sci.*, 2016, **7**(7): 123-128.
- [3] LI C, AKUTA T, NAKAGAWA M, et al. Agarose native gel electrophoresis for characterization of antibodies [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2020, **151**: 885-890.
- [4] ALFRED P. Fractionation of mixtures of agarose and agaropectin: US3335127 [P]. 1967-08-08.
- [5] WANG X Y, DUAN D L, FU X T. Enzymatic desulfation of the red seaweeds agar by *Marinomonas* arylsulfatase [J]. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, **93**: 600-608.
- [6] SHUKLA M L, KUMAR M, PRASAD K, et al. Partial characterization of sulfohydrolase from *Gracilaria dura* and evaluation of its potential application in improvement of the agar quality [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2011, **85**(1): 157-163.
- [7] AN D, XIAO Q, ZHANG C, et al. Preparation, characterization, and application of high-whiteness agar bleached with hydrogen peroxide [J]. *Food Hydrocolloid.*, 2021, **113**: 106 520.
- [8] ABDULLAH W N W, BAKAR W A W A, ALI R. Catalytic oxidative desulfurization technology of supported ceria based catalyst: Physicochemical and mechanistic studies [J]. *J. Clean. Prod.*, 2017, **162**: 1 455-1 464.
- [9] SHARMA N, BHARDWAJ N, SINGH R. Environmental issues of pulp bleaching and prospects of peracetic acid pulp bleaching: A review [J]. *J. Clean. Prod.*, 2020, **256**: 120 338.
- [10] ZHANG C, AN D, XIAO Q, et al. Preparation, characterization, and modification mechanism of agar treated with hydrogen peroxide at different temperatures [J]. *Food Hydrocolloid.*, 2019, **101**: 105 527.
- [11] YU Y, WANG Y N, DING W, et al. Preparation of highly-oxidized starch using hydrogen peroxide and its application as a novel ligand for zirconium tanning of leather [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2017, **174**: 823-829.
- [12] ZHU M J, GE L M, LYU Y B, et al. Preparation, characterization and antibacterial activity of oxidized  $\kappa$ -carrageenan [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2017, **174**: 1 051-1 058.
- [13] ZHANG X, LIU X, XIA K, et al. Preparation of oxidized agar and characterization of its properties [J]. *Carbohydr. Polym.*, 2014, **112**: 583-586.
- [14] JULIÃO D, MIRANTE F, RIBEIRO S, et al. Deep oxidative desulfurization of diesel fuels using homogeneous and SBA-15-supported peroxophosphotungstate catalysts [J]. *Fuel*, 2019, **241**: 616-624.
- [15] 肖笛, 肖美添, 叶静, 等. 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.
- [16] 张安林, 马宁, 张径, 等. 柱串联凝胶色谱分离表征多分散聚乙二醇羧酸衍生物的方法研究 [J]. *化学试剂*, 2022, **44**(2): 298-305.
- [17] 孙宁, 倪辉, 杨远帆, 等. 聚乙二醇法提取江蓠琼脂中的琼脂糖 [J]. *中国食品学报*, 2015, **15**(9): 110-116.
- [18] DOGSON K, PRICE R. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, 1962, **84**(1): 106.
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中灰分的测定: GB 5009.4—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2016-08-31.
- [20] DANESHVAR N, SALARI D, KHATAEE A R. Photocatalytic degradation of azo dye acid red 14 in water on ZnO as an alternative catalyst to TiO<sub>2</sub> [J]. *J. Photoch. Photobiol. A*, 2004, **162**(2): 317-322.
- [21] WATTS R, FOGET M, KONG S. Hydrogen peroxide decomposition in model subsurface systems [J]. *J. Hazard. Mater.*, 1999, **69**(2): 229-243.