

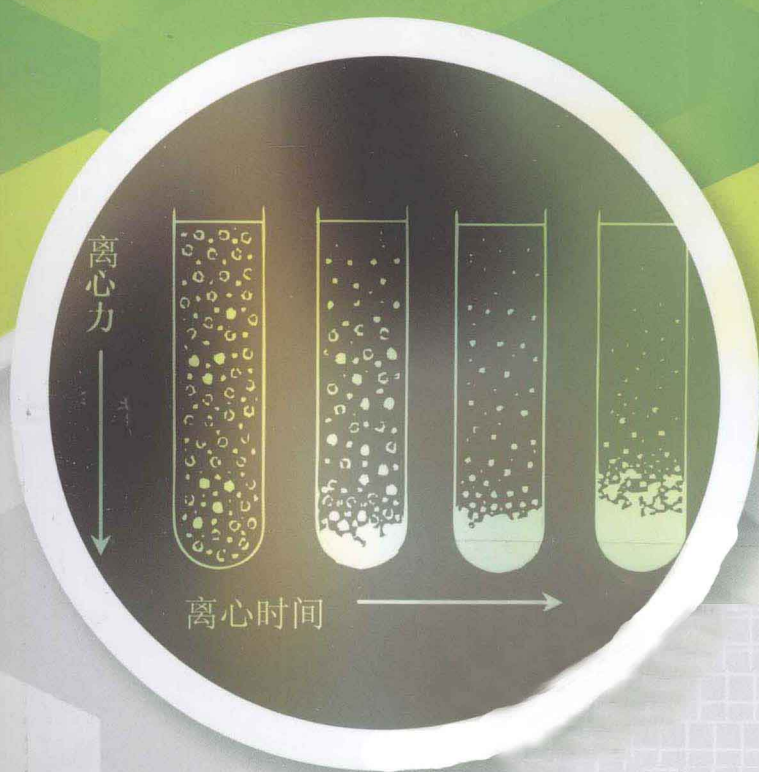
高职高专“十二五”规划教材



生化分离技术

SHENGHUA
FENLI
JISHU

张爱华 王云庆 主编
孙志嘉 主审



 化学工业出版社

高职高专“十二五”规划教材

生化分离技术

张爱华 王云庆 主编

孙志嘉 主审



化学工业出版社

·北京·

本教材是为了适应高等职业教育发展和改革的需要,并根据生物制药技术专业的培养目标,以生产实际中典型药物分离纯化任务为载体,采用教学做一体化模式分项目编写。全书共分七个项目、22个任务,涉及发酵液的预处理、有机物质的萃取、生物大分子的沉淀与结晶、膜分离、药物的高度纯化、药物的干燥等生化分离基本技术和氨基酸类、多肽和蛋白类、核酸类、酶类、糖类、脂类、抗生素与维生素类等生化药物提取分离的综合技术。

本书可作为高职高专院校制药类和生物技术类及相关专业的教材,也可作为制药生产企业员工岗位培训的教材。

图书在版编目(CIP)数据

生化分离技术/张爱华,王云庆主编. —北京:
化学工业出版社,2012.8
高职高专“十二五”规则教材
ISBN 978-7-122-14944-2

I. 生… II. ①张…②王… III. 生物化学-分
离-高等教育-教材 IV. TQ033

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第166509号

责任编辑:刘阿娜 李植峰 梁静丽
责任校对:宋 玮

装帧设计:史利平

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 刷:北京市振南印刷有限责任公司

装 订:三河市宇新装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张15. 字数386千字 2012年10月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址:<http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:29.00元

版权所有 违者必究

《生化分离技术》编审人员

主 编 张爱华 王云庆

副主编 赵立斐

编写人员 (按姓名汉语拼音排序)

胡秋杰 (黑龙江生物科技职业学院)

刘克丹 (黑龙江生物科技职业学院)

王春花 (黑龙江农业经济职业学院)

王云庆 (黑龙江农垦职业学院)

张爱华 (黑龙江生物科技职业学院)

赵立斐 (黑龙江农业经济职业学院)

主 审 孙志嘉 (哈药集团制药总厂)

前言

本书是以高职高专生物制药技术专业的培养目标为基本出发点，针对高职教育培养学生的学习能力、职业能力和综合素质的定位及培养目标，将“以就业为导向，重视教学过程的实践性、开放性和职业性，走校企合作、工学结合道路，培养高素质技能型人才”作为教材编写的指导思想。依据生化产品和生化药品生产中下游分离纯化关键工序的技术要求，结合高职高专基于工作过程课程体系改革的实践，按照“必需、够用”为原则，以生产实际中典型药物分离纯化任务为载体，采用教学做一体化模式分项目编写。

本书的内容选取对应于生化产品和生化药品生产企业岗位的职业活动，重点是生化药品生产中下游加工技术，包括发酵液的预处理、有机物质的萃取、生物大分子的沉淀与结晶、膜分离、药物的高度纯化、药物的干燥等生化分离基本技术和氨基酸类、多肽和蛋白类、核酸类、酶类、糖类、脂类、抗生素与维生素类等生化药物提取分离的综合技术。实训内容由多所院校与多家企业共同开发，通过整合教学内容，突出职业技能的培养。为扩大学生的知识面和自我检测，书中还设置了知识拓展、技能拓展、项目自测等内容，有利于培养学生创新思维能力，体现了“以就业为导向，以能力为核心”，实现了职业教育教学过程与工作过程的融合。

全书共分七个项目、22个任务，项目一至项目六为必修的生化分离基本单元技术；项目七是由7类生化药物提取分离任务组成，是可以根据就业岗位要求有选择性学习的分离纯化综合应用技术。为便于增强学生预习、自我收集工作信息、自我设计实际操作流程以及教师实施教学做一体化教学的需要，书中的附录列出了项目学习指南及实例训练任务单的参考格式，同时配备了所有项目学习指南和实例训练任务单电子版的信息，供学生及教师下载使用（化学工业出版社教学资源网 <http://www.cipedu.com>）。

书中项目一、项目七的任务十六由张爱华编写；项目二、项目六和项目七的任务二十一由胡秋杰编写；项目三和项目七的任务十九、任务二十二由赵立斐编写；项目四由王云庆编写；项目五和项目七的任务二十由王春花编写；项目七的任务十七、任务十八由刘克丹编写。全书由张爱华统稿，孙志嘉主审。在编写中，广泛参考和借鉴了众多专家与学者的研究成果，在此一并致以诚挚的谢意。

本书可作为高职高专院校制药类和生物技术类及相关专业教材，也可作为制药生产企业员工岗位培训的教材。

由于编者水平有限，加上编写时间仓促，疏漏之处在所难免，敬请广大读者批评指正。

编者

2012年5月

目录

1

► 项目一 发酵液的预处理

任务一 微生物细胞破碎 /1

知识目标 技能目标 /1

必备知识 /1

一、细胞破碎的方法 /2

二、选择破碎方法的依据 /6

知识拓展 微生物的细胞壁 /7

实训 1 利用机械和非机械细胞破碎法提取

任务二 发酵液的预处理 /10

知识目标 技能目标 /10

必备知识 /10

发酵液的预处理方法 /10

知识拓展 发酵液的组成 /14

实训 2 维生素 C 发酵液的预处理 /15

任务三 发酵液的固-液分离 /16

知识目标 技能目标 /16

必备知识 /16

一、粗滤 /16

二、离心分离 /19

知识拓展 生化分离的一般过程及单元操作 /24

实训 3 蔗糖密度梯度离心法提取叶绿体 /27

多酚氧化酶 /8

一、准备工作 /8

二、操作过程 /9

三、结束工作 /9

技能拓展 细胞破碎率的测定 /9

一、准备工作 /15

二、操作过程 /15

三、结束工作 /16

一、准备工作 /28

二、操作过程 /28

技能拓展 低速大容量冷冻离心机标准操作规程 /29

项目自测 /30

► 项目二 有机物质的萃取

33

任务四 有机溶剂萃取有机小分子物质 /33

知识目标 技能目标 /33

必备知识 /33

一、萃取的类型及原理 /33

二、有机溶剂萃取 /35

知识拓展 反胶团萃取及液膜萃取 /38

一、反胶团萃取 /38

二、液膜萃取 /39

实训 4 有机溶剂萃取红霉素 /40

一、准备工作 /41

二、操作过程 /41

三、结束工作 /41

技能拓展 液-固萃取 /42

任务五 双水相萃取生物大分子物质 /42

知识目标 技能目标 /42

必备知识 /42

一、双水相萃取的基本原理 /43

二、双水相体系的种类 /43

三、双水相萃取的影响因素 /43

四、双水相萃取操作 /44

五、双水相萃取的特点及应用 /45

知识拓展 超临界萃取 /45

实训 5 双水相萃取细胞色素 C /47

一、准备工作 /47

二、操作过程 /48

三、结束工作 /48

技能拓展 双水相萃取操作中多聚物及盐的后处理 /48

项目自测 /49

项目三 生物大分子的沉淀与结晶

任务六 盐析法分级分离蛋白质 /51

知识目标 技能目标 /51

必备知识 /51

盐析 /51

知识拓展 /56

一、有机溶剂沉淀 /56

二、血浆蛋白 /58

任务七 等电点沉淀法分离蛋白质 /60

知识目标 技能目标 /60

必备知识 /61

等电点沉淀 /61

知识拓展 /62

一、有机聚合物沉析 /62

二、金属离子沉析 /63

三、有机酸沉析 /63

任务八 结晶法提纯蛋白质 /66

知识目标 技能目标 /66

必备知识 /66

结晶 /66

知识拓展 /72

胃液成分 /72

实训 8 结晶法提纯胃蛋白酶 /73

实训 6 硫酸铵盐析法分级分离血浆中的 IgG /59

一、准备工作 /59

二、操作步骤 /60

三、结束工作 /60

四、牛奶中的蛋白质 /64

实训 7 等电点沉淀法分离牛乳中的酪蛋白 /65

一、准备工作 /65

二、操作过程 /65

三、结束工作 /66

一、准备工作 /73

二、操作过程 /74

三、结束工作 /74

技能拓展 结晶设备 /75

项目自测 /76

51

项目四 膜分离

任务九 超滤法分离生物大分子 /79

知识目标 技能目标 /79

必备知识 /80

一、膜的分类及性能 /80

二、膜分离过程的类型 /81

三、膜组件 /81

四、浓差极化与消除措施 /83

知识拓展 膜污染的清除 /83

79

实训 9 超滤法浓缩明胶蛋白水溶液 /84

一、准备工作 /84

二、操作过程 /85

三、结束工作 /86

技能拓展 中空纤维式超滤膜组件的完整性检测 /86

任务十 透析法除生物大分子中的无机盐 /87

知识目标 技能目标 /87

必备知识 /87

一、透析原理 /87

二、透析袋 /88

知识拓展 膜的消毒与保存 /88

实训 10 透析法去除蛋白质溶液中的无机

盐 /88

一、准备工作 /89

二、操作过程 /89

三、结束工作 /90

项目自测 /90

项目五 药物的高度纯化

92

任务十一 离子交换色谱纯化药物 /92

知识目标 技能目标 /92

必备知识 /92

离子交换色谱 /92

一、色谱 /92

二、离子交换色谱 /95

知识拓展 吸附 /99

任务十二 凝胶色谱纯化药物 /102

知识目标 技能目标 /102

必备知识 /102

一、色谱分离中凝胶的分类 /103

二、柱色谱凝胶的选择 /104

三、凝胶柱色谱的操作 /104

知识拓展 疏水柱色谱 /105

实训 12 凝胶柱色谱纯化蛋白质类

任务十三 亲和色谱纯化药物 /108

知识目标 技能目标 /108

必备知识 /108

一、亲和色谱的基本原理 /109

二、亲和吸附剂 /109

三、亲和色谱的操作 /112

四、亲和色谱的应用 /114

知识拓展 /116

一、气相色谱 /116

任务十四 电泳法纯化药物 /120

知识目标 技能目标 /121

必备知识 /121

一、电泳的凝胶介质 /121

二、电泳分离的检测方法 /122

实训 11 离子交换色谱分离混合氨基酸 /100

一、准备工作 /100

二、操作过程 /101

三、结束工作 /102

药物 /105

一、准备工作 /106

二、操作过程 /106

三、结束工作 /107

技能拓展 薄层色谱 /107

二、高效液相色谱 /117

实训 13 亲和色谱纯化胰蛋白酶 /117

一、准备工作 /117

二、操作过程 /118

三、结束工作 /119

技能拓展 纸色谱 /120

三、电泳系统的构成 /123

四、电泳分析常用方法 /126

知识拓展 双向电泳 /127

实训 14 蛋白质的醋酸纤维薄膜电泳 /127

- 一、准备工作 /128
- 二、操作过程 /128

三、结束工作 /129
项目自测 /129

▶ 项目六 药物的干燥

任务十五 药物的干燥 /131

知识目标 技能目标 /131

必备知识 /131

- 一、真空干燥法 /132
- 二、喷雾干燥法 /133
- 三、冷冻干燥法 /135

知识拓展 /138

- 一、远红外线干燥 /138

二、微波干燥 /138

实训 15 人工牛黄的真空干燥 /139

- 一、准备工作 /139
- 二、操作过程 /139
- 三、结束工作 /140

项目自测 /140

▶ 项目七 生化药物的提取分离

任务十六 氨基酸类药物的提取分离 /142

知识目标 技能目标 /142

必备知识 /143

- 一、氨基酸类药物的分类 /143
- 二、氨基酸的理化性质 /145
- 三、氨基酸类药物生产方法 /145
- 四、氨基酸类药物的分离方法 /147

知识拓展 /149

- 一、生物药物的类型 /149
- 二、《中国药典》记载的氨基酸类药物 /151

实训 16 L-胱氨酸的提取分离 /151

- 一、准备工作 /152
- 二、操作过程 /152
- 三、结束工作 /153

实训 17 L-亮氨酸的提取分离 /153

- 一、准备工作 /154
- 二、操作过程 /154

项目自测 /155

任务十七 多肽和蛋白类药物的提取分离 /156

知识目标 技能目标 /156

必备知识 /156

- 一、多肽类药物 /157
- 二、蛋白类药物 /158
- 三、多肽与蛋白类药物的主要生产方法 /158

实训 18 胰岛素的提取分离 /161

- 一、准备工作 /162
- 二、操作过程 /163
- 三、结束工作 /164

- 一、准备工作 /165
- 二、操作过程 /165
- 三、结束工作 /165

实训 20 胸腺肽的提取分离 /166

- 一、准备工作 /166
- 二、操作过程 /166
- 三、结束工作 /167

项目自测 /167

实训 19 谷胱甘肽的提取分离 /164

任务十八 核酸类药物的提取分离 /168

知识目标 技能目标 /168

必备知识 /168

- 一、核酸类药物的分类 /169
- 二、核酸类药物分离纯化的要求 /169
- 三、核酸类药物的生产方法 /170
- 四、核酸类药物的分离方法 /170
- 五、重要核酸类药物的制备 /172

实训 21 DNA 的提取分离 /173

- 一、准备工作 /173

任务十九 酶类药物的提取分离 /177

知识目标 技能目标 /177

必备知识 /177

- 一、酶类药物的性质及特性 /177
- 二、酶类药物的分类 /178
- 三、药用酶原料来源及选择 /179
- 四、酶类药物的提取和纯化 /180

实训 23 溶菌酶的提取分离 /184

- 一、准备工作 /185

任务二十 糖类药物的提取分离 /190

知识目标 技能目标 /190

必备知识 /190

- 一、糖类药物的分类 /190
- 二、多糖的药理作用 /192
- 三、糖类药物的性质 /193
- 四、糖类药物的提取方法 /193
- 五、糖类药物的分离纯化方法 /194

知识拓展 多糖含量测定与纯度检验方法 /195

实训 25 银耳多糖制备及鉴定 /196

- 一、准备工作 /196

任务二十一 脂类药物的提取分离 /203

知识目标 技能目标 /203

必备知识 /203

- 一、脂类药物的分类 /203
- 二、脂类的性质 /203
- 三、脂类药物的临床应用 /204
- 四、脂类药物生产方法 /205
- 五、脂类药物的分离方法 /206

实训 27 卵磷脂的提取分离 /206

- 一、准备工作 /207

任务二十二 抗生素与维生素类药物的提取分离 /210

知识目标 技能目标 /210

必备知识 /210

二、操作过程 /173

三、结束工作 /174

实训 22 ATP 的提取分离 /174

- 一、准备工作 /175
- 二、操作过程 /175
- 三、结束工作 /176

项目自测 /176

二、操作过程 /185

三、结束工作 /187

实训 24 凝血酶的提取分离 /187

- 一、准备工作 /187
- 二、操作过程 /188
- 三、结束工作 /188

项目自测 /188

二、操作过程 /197

三、结束工作 /198

四、注意事项 /198

技能拓展 多糖常用提取方案与程序 /198

实训 26 硫酸软骨素的提取分离 /199

- 一、准备工作 /200
- 二、操作过程 /200
- 三、结束工作 /201

项目自测 /202

二、操作过程 /207

三、结束工作 /208

实训 28 猪去氧胆酸的提取分离 /208

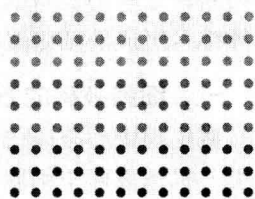
- 一、准备工作 /208
- 二、操作过程 /208
- 三、结束工作 /209

项目自测 /209

一、抗生素类药物的提取分离 /210

二、维生素类药物的提取分离 /218	一、准备工作 /223
实训 29 青霉素的提取分离 /220	二、操作过程 /223
一、准备工作 /221	三、结束工作 /224
二、操作过程 /221	项目自测 /224
三、结束工作 /222	
实训 30 维生素 B ₂ 的提取分离 /222	
附录 1 项目学习指南参考格式 /226	
附录 2 实例训练任务单参考格式 /228	

► 参考文献



项目一

发酵液的预处理

生化分离是从生物材料、微生物的发酵液、生物反应液或动植物细胞的培养液中分离并纯化有关生化产品（如具有药理活性作用的生物药物等）的过程，又称为下游加工过程。一般采取如下工艺流程：

发酵液→预处理→细胞分离→(细胞破碎→细胞碎片分离)→初步纯化→高度纯化→成品加工

在发酵液（或培养液）中，除含有微生物胞外产物和大量的菌体（含胞内产物）外，还有大量的不参与发酵过程的可溶性杂质和不溶性悬浮物、未用完的培养基、高价态的金属离子、各种杂蛋白以及中间代谢产物等杂质。一般胞内产物需经细胞破碎，细胞碎片的固液分离等步骤；而胞外产物可直接将细胞固液分离除去。对于体积较大的菌体、细胞和悬浮颗粒的发酵液（或培养液），可直接采用常规过滤（粗滤）或离心等固液分离的方法；而对于个体微小的菌体（黏度大）以及含有杂蛋白、高价态的金属离子等发酵液（或培养液），很难直接采用常规过滤（粗滤）或离心的方法进行固液分离，还会影响后序的萃取、离子交换等操作的效果，所以必须经过发酵液（或培养液）的预处理，以提高固液分离的效率，同时保证后序提取和精制过程的顺利进行。

任务一 微生物细胞破碎

细胞破碎即破坏细胞壁和细胞膜，使胞内产物获得最大程度的释放。很多生化物质（尤其是基因工程的产物）都位于细胞内部（称胞内酶），必须在纯化以前先将细胞破碎，使胞内产物释放到液相中，然后再进行提纯。

知识目标

- 了解细胞壁组成和结构；
- 熟悉细胞破碎的基本原理和方法。

技能目标

- 能够独立完成细胞破碎的具体操作；
- 熟知细胞破碎所用设备的操作规程。

必备知识

不同的生物体或同一生物体的不同部位的组织，其细胞破碎的难易不一，使用的方法也

不相同，如动物脏器的细胞膜较脆弱、容易破碎，植物和微生物由于具有较坚固的纤维素、半纤维素组成的细胞壁，要采取专门的细胞破碎方法。

一、细胞破碎的方法

微生物细胞破碎的方法有很多，按照是否存在外加作用力，可分为机械法和非机械法两大类。机械破碎中细胞所受的机械作用力主要有压缩力和剪切力，非机械破碎主要利用化学或生化试剂（如酶）改变细胞壁或细胞膜的结构而释放胞内物质。

1. 机械破碎法

通过机械运动所产生剪切力的作用，使细胞破碎的方法称为机械破碎法。机械破碎法是工业规模细胞破碎的主要手段，具有处理量大、破碎效率高、速度快等特点，适用于植物材料和细菌细胞的破碎。常用的破碎机械有组织捣碎机、球磨机、高压匀浆器、超声波发生器等。按照所使用的破碎机械的不同，可以分为捣碎法、球磨法、高压匀浆法和超声波破碎法等。因为各种机械破碎法的作用机理不尽相同，有各自的适用范围和处理规模。所以，针对目标物质的性质选择细胞破碎设备并确定适宜的破碎操作条件是非常重要的。

(1) 捣碎法 利用组织捣碎机高速旋转叶片所产生的剪切力将组织细胞破碎，通常达到12000r/min，物料在玻璃杯中通过电机旋转驱动旋刀同时进行劈裂、碾碎、掺和等过程，使物料搅拌捣碎，组织捣碎机体积小、消耗功率少、工作效率高，但对黏度高的液体和质料硬的物质（如骨头等）均不适宜。为了防止发热和升温过高，通常是转10~20s，停10~20s，可反复多次。

捣碎法适用于动物组织、内脏、植物种子、嫩菜叶、较柔软的果蔬等材料的破碎。但由于旋转刀片的机械剪切力较大且破碎过程中温度易迅速上升，不适于核酸、酶等生物大分子的提取。

(2) 球磨法 球磨机是破碎微生物细胞的常用设备，一般有立式（见图1-1）和卧式（见图1-2）两种，在磨腔中装入小玻璃球或小钢球，由电动机带动搅拌碟片高速搅拌微生物细胞悬浮物和小磨球之间的研磨作用，使细胞获得破碎。

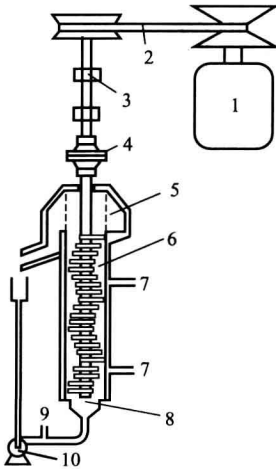


图 1-1 Netzsch Molinex KE5 搅拌磨机

- 1—电动机；2—三角皮带；3—轴承；
- 4—联轴节；5—筒状筛网；6—搅拌碟片；
- 7—降温夹套冷却水进出口；8—底部筛板；
- 9—温度测量口；10—循环泵

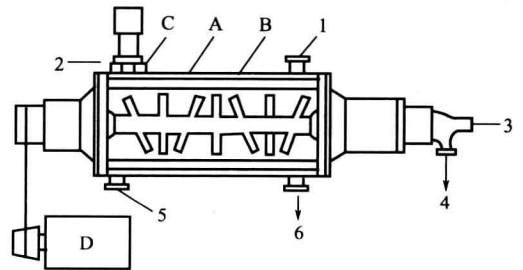


图 1-2 Netzsh LM20 砂磨机

- A—带有冷却夹套的研磨筒；B—带有冷却转轴及圆盘的搅拌器；C—环状震动分离器；
- D—变速电动机；1，2—物料进出口；
- 3，4—搅拌器冷却剂进出口；5，6—外筒冷却剂进出口

该法适用于绝大多数微生物细胞的破碎。如采用高速湿法球磨分离纯化重组人肿瘤坏死因子时，菌体经间歇式球磨机破碎 3min，玻璃珠直径为 0.25~0.50mm，装珠量为破碎室总体积的 85%，搅拌转速 1500r/min，破碎液于 4℃，15000r/min 离心 15min 后去除细胞碎片。在以上条件下，目标蛋白回收率可达 90.3%，活性回收率为 85.8%。

影响球磨法破碎率的因素主要有：①搅拌器速率增加，剪切力增大，细胞破碎量增大，但是能量消耗多、热量产生多、磨球的磨损以及因剪切力易引起产物失活，实际生产中，搅拌器外缘速率控制在 5~15m/s；②最佳的细胞浓度由实验来确定。如 Netzsh LM20 砂磨机破碎酵母或细菌时，细胞浓度控制在 40% 左右；③磨球越小，细胞破碎速率越快，但难以停留在磨腔中，在工业化规模操作中，球径大于 0.4mm，且不同的细胞，应选择不同的球径。球粒的体积占研磨机腔体自由体积的百分比同样影响破碎效果，一般控制在 80%~90%；④为控制磨室温度，在搅拌器和磨室外筒分别设计有冷却夹套，通过冷却剂来调节磨室的温度，操作温度一般控制在 5~40℃ 范围内；⑤高流量有利于降低能耗、降低细胞的破碎程度和释放蛋白质的产量；⑥微生物不同处理效果不同，酵母比细菌细胞处理效果好。因为细菌细胞仅为酵母细胞的 1/10，而且细菌细胞的机械强度比酵母要高。

(3) 高压匀浆法 高压匀浆法是液体剪切破碎方法中的一种，其破碎原理是：细胞悬浮液在高压作用下从阀座与阀之间的环隙高速喷出后撞击到碰撞环上，细胞在受到高速撞击作用后，急剧释放到低压环境，从而在撞击力和剪切力等的综合作用下破碎。高压匀浆器的结构见图 1-3。

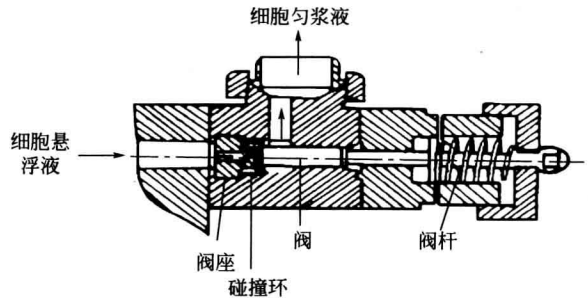


图 1-3 高压匀浆器结构

本法适合于酵母和细菌，如酵母菌、大肠杆菌、巨大芽孢杆菌和黑曲菌等，但某些高度分枝的微生物，如团状菌和丝状菌易造成高压匀浆器堵塞，使操作发生困难，一般不宜使用本法。

高压匀浆法中影响细胞破碎的因素主要有温度和压力，在工业生产中，为了控制温度的升高，可在进口处用干冰调节温度，使出口温度调节在 20℃ 左右。操作压力通常采用 55~70MPa。在操作方式上，可以采用单次通过匀浆器或多次循环通过等方式。

(4) 超声波破碎法 超声波破碎是采用超声波破碎机在 15~25kHz 的频率下进行细胞破碎。是另一种液相剪切破碎法，由于超声波具高频率、短波长、定向传播等特点，其在液体中传播时使液体中某点某瞬间受到巨大的压力，而另一瞬间压力又迅速消失，介质中的悬浮细胞在极强的局部附加压强（达几万个大气压）作用下产生一种应力促使内部液体流动而使细胞达到破碎。

影响超声波破碎的因素主要有超声波的声强、频率，液体的温度、压强和破碎时间等，此外，介质的离子强度、pH 值和细胞浓度、种类等对破碎效果也会有影响。不同的微生物，用超声波处理的效果也不同，杆菌比球菌易破碎，革兰阴性菌比革兰阳性菌易破碎，酵母菌效果较差。各种细胞所需破碎时间主要靠经验来决定。超声波破碎时细胞浓度一般在 20% 左右。

超声波能通过探头向悬浮液传递能量，当产生的气泡破裂时，释放出的绝大部分能量都以热的形式被液体吸收，为避免高温，在破碎池中设计了冷却水夹套，并在开始时先把悬浮

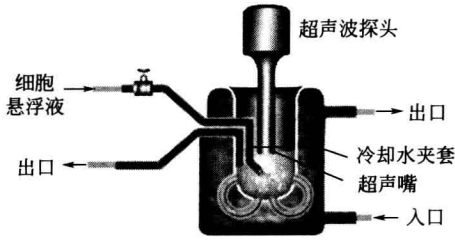


图 1-4 连续超声波破碎池结构简图

核心部分是由一个带夹套的烧杯组成，其内有 4 根内环管，由于超声波振荡能量会泵送细胞悬浮液循环，将细胞悬浮液进出口管插入到烧杯内部去，就可以实现连续操作。

超声波破碎最主要的问题是热量的产生，因此该法仅适用于实验室规模的微生物细胞破碎，不适于大规模生产。实验室处理的样品体积一般为 1~400mL。

2. 非机械破碎法

细胞破碎中常用的非机械破碎法有酶溶法、化学渗透法、冻融法、渗透压冲击法、干燥法、冷热交替法等。

非机械破碎方法的处理条件一般比较温和，有利于目标物质的高活力释放回收，但这些方法破碎效率较低、产物释放速度较慢，处理时间较长，多局限于实验室规模的小批量应用。

(1) 酶溶法 酶溶法是利用细胞壁水解酶进行酶反应，分解破坏细胞壁上特殊的化学键（如肽聚糖分子中的 N -乙酰胞壁酸与 N -乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4 糖苷键，甘露聚糖分子中的 1,6-磷酸二酯键等），从而达到破碎细胞的目的，酶溶法可以在细胞悬浮液中加入选用特定的溶解酶，也可以采用自溶作用。

酶溶法专一性强，在选择酶系统时，必须根据细胞壁的结构和化学组成来选择。革兰阳性菌、放线菌的细胞壁以肽聚糖为主要成分，常采用溶菌酶裂解细胞壁；酵母菌和真菌的细胞壁主要是纤维素、葡聚糖、几丁质等，常用蜗牛酶、纤维素酶、多糖酶等；植物细胞壁的主要成分是纤维素，常采用纤维素酶和半纤维素酶裂解。例如从某些细菌细胞提取质粒 DNA 时，可采用溶菌酶（来自蛋清）破细胞壁，而在破碎酵母细胞时，常采用蜗牛酶（来自蜗牛），将酵母细胞悬于 0.1mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液（pH5.4）中，加 1% 蜗牛酶，在 30℃ 处理 30min，即可使大部分细胞壁破裂，如同时加入 0.2% 巯基乙醇效果会更好。

酶溶法条件温和，能选择性的释放产物，胞内核酸等泄出量少，细胞外形较完整，便于后步分离等，但水解酶价格高，故小规模应用较广。

(2) 化学渗透法 用某些化学试剂溶解细胞壁或抽提细胞中某些组分的方法称为化学渗透法。常用酸、碱、表面活性剂和有机溶剂等化学试剂。

酸或碱可用来调节溶液的 pH，改变两性目标产物（如蛋白质）的电荷性质，使目标产物之间或目标产物与其他物质之间的作用力降低而溶解到液相中去，便于后面工序的提取。如工业化生产西索米星抗生素时，常采用酸化处理的方式进行细胞破壁。调发酵液 pH 值至 1.8~2.0 进行酸化处理，西索米星释放率可达 90% 左右。而采用 1% 的溶菌酶 37℃ 酶解 30min、超声波破碎处理 30min（振荡 20s 停 10s）或 1%（十二烷基硫酸钠 SDS）处理 10min 时，西索米星释放率均不足 50%。

表面活性剂分子中同时具有憎水基团和亲水基团，当表面活性剂溶质或溶剂中的浓度达到一定值时，它的分子会产生聚集，生成胶束，憎水端向内，亲水端向外。憎水基团聚集在

胶束内部，将溶解的脂蛋白包在中心，而亲水基团则向外层，使膜的通透性改变或使细胞壁溶解，从而使胞内物质释放到水相中。此法特别适用于膜结合蛋白酶的溶解。常用离子型表面活性剂有 SDS、脱氧胆酸钠等；非离子型表面活性剂有 Tween-80（吐温）、TritonX-100（特里顿或曲拉通）等。例如，对胞内的异淀粉酶，可加入 0.1% SDS 或 0.4% TritonX-100 于酶液中，30℃ 振荡 30h，就能较完全地将异淀粉酶抽提出来，且酶的比活力较机械破碎法高。又如从大肠杆菌中提取 L-天冬酰胺酶时，常用 2% Triton X-100 和 12.5% K_2HPO_4 溶液处理菌体，可释放 70% 以上的酶。

有机溶剂被细胞壁吸收后，会使细胞壁膨胀或溶解，导致破裂，把胞内产物释放到水相中去。选用溶剂的基本原则是，以与细胞壁中脂质类似的溶解度参数的溶剂作为细胞破碎的溶剂。如存在于大肠杆菌细胞内的青霉素酰化酶可利用醋酸丁酯来溶解细胞壁上的脂质，使酶释放出来。常用的有机溶剂有丁酯、丁醇、丙酮、氯仿和甲苯等。为了防止酶的变性失活，操作时应当在低温条件下进行。

(3) 冻融法 冻融法是将细胞放在 $-15\sim-20^\circ\text{C}$ 条件下突然冷冻令其凝固，然后在室温（或 40°C ）下令其融化，冷冻时膜的疏水键被破碎而疏水性增强，胞内水形成冰晶粒而使细胞内盐分浓度加大，反复冻融多次，而达到破壁的作用。此法适用于细胞壁较脆弱的菌体、动物性细胞的破碎或释放某种细胞成分，对于存在于细胞质周围靠近细胞膜的胞内产物释放较为有效，但通常破碎率较低。另外，还可能引起对冻融敏感的某些蛋白质的变性。

(4) 渗透压冲击法 菌体细胞膜是天然半透膜，把待破碎的细胞在高渗溶液（如一定浓度的甘油或蔗糖溶液）平衡一段时间后，细胞脱水，细胞质变稠，发生质壁分离，然后转入到水溶液或缓冲溶液中，细胞快速吸水膨胀而破裂。该法是一种实验规模常用的破碎方法，仅对细胞壁较脆弱的细胞，如动物细胞和革兰阴性菌，或者细胞壁先用酶处理，或合成受抑制而强度减弱时的细胞才是合适的。用此法处理大肠杆菌时，可使磷酸酯酶、核糖核酸酶和脱氧核酸酶等释放到溶液中。蛋白质释放量一般为菌体蛋白质总量的 4%~7%。但本法不适用于革兰阳性菌。

(5) 干燥法 将待破碎细胞用不同方法进行干燥，菌体细胞失水，细胞内盐分浓度增大，细胞渗透性发生变化，然后用丙酮、乙醇或缓冲溶液等溶剂抽提胞内物质。干燥方法有空气干燥、真空干燥、冷冻干燥等。对不稳定生化物质进行干燥时，常加入半胱氨酸、巯基乙醇和亚硫酸钠等还原剂进行保护。

(6) 冷热交替法 将待破碎细胞在 90°C 维持数分钟，立即放入冰水浴使之冷却，如此反复多次，绝大部分细胞可以被破碎。从细菌或病毒中提取蛋白质和核酸时可用此法。

以上是各种常用细胞破碎的方法，表 1-1 对常用的细胞破碎方法的作用机理、应用特点等进行了归纳。

表 1-1 常用细胞破碎方法的比较

分类	作用机理	效果	成本	应用特点
机械破碎法	捣碎法	固体剪切作用	适中	适用于动物组织、内脏、植物种子、嫩菜叶、果蔬等材料的破碎，不适于核酸、酶等生物大分子的提取
	球磨法	固体剪切作用	剧烈	可达较高破碎率，可较大规模操作，大分子目的产物易失活，浆液分离困难
	高压匀浆法	液体剪切作用	剧烈	可达较高破碎率，可较大规模操作，不适合丝状菌和革兰阳性菌
	超声波破碎法	液体剪切作用	剧烈	对酵母菌效果较差，破碎过程升温剧烈，不适合大规模操作

分类	作用机理	效果	成本	应用特点	
非机械破碎法	酶溶法	酶分解作用	温和	昂贵	具有高度专一性,条件温和,浆液易分离,溶酶价格高,通用性差
	化学渗透法	细胞膜渗透性改变	活性剂法温和;有机溶剂法适中;酸碱法剧烈	活性剂法适中;有机溶剂法和酸碱法便宜	具有一定选择性,浆液易分离,但释放率较低,通用性差
	渗透压冲击法	渗透压剧烈改变	温和	便宜	破碎率较低,常与其他方法结合使用
	冻融法	反复冻结-融化	温和	便宜	破碎率较低,不适合对冷冻敏感的目的产物
	干燥法	改变细胞膜渗透性	温和	便宜	条件变化剧烈,易引起大分子物质失活
	冷热交替法	改变细胞膜渗透性	温和	便宜	破碎率适中,适合于大部分对热稳定的细胞

二、选择破碎方法的依据

无论是运用机械法还是非机械法,都要既能破坏微生物菌体的细胞壁,又要得到不发生变性的蛋白质产物。所以,选择合理的破碎方法非常重要,通常在选择破碎方法时,应从以下五方面考虑。

1. 细胞的处理量

若需大规模应用的,则采用机械法。若仅需实验室规模,则选择非机械法。

2. 细胞壁的强度和结构

细胞壁的强度除取决于网状高聚物结构的交联程度外,还取决于构成壁的聚合物种类和壁的厚度,如酵母和真菌的细胞壁与细菌相比,含纤维素和几丁质,强度较高,故在选用高压匀浆法时,后者就比较容易破碎。某些植物细胞纤维化程度大、纤维层厚、强度很高,破碎也较困难。在机械破碎法中,破碎的难易程度还与细胞的形状和大小有关,如高压匀浆法对酵母菌、大肠杆菌、巨大芽孢杆菌和黑曲霉等微生物细胞都能很好适用,但对某些高度分枝的微生物,由于会阻塞匀浆器阀而不能适用。在采用化学渗透法和酶溶法破碎时,更应根据细胞的结构和组成选择不同的化学试剂或酶,这主要是因为它们作用的专一性很强。

3. 目标产物对破碎条件的敏感性

生化物质通常稳定性较差,在决定破碎条件时,既要有高的释放率,又必须确保其稳定。例如在采用机械法破碎时,要考虑剪切力的影响;在选择酶溶法时,应考虑酶对目标产物是否具有降解作用;在选择有机溶剂或表面活性剂时,要考虑不能使蛋白质变性。此外,破碎过程中溶液的pH、温度、作用时间等都是重要的影响因素。

4. 破碎程度

在细胞破碎后的固液分离中,细胞碎片的大小是重要因素,太小的细胞碎片很难除去。因此,在选择破碎条件时,既要获得高的产物释放率,又不能使细胞碎片太小。如果要在细胞碎片很小的情况下才能获得高的产物释放率,则这种操作条件就不合适。为提高破碎率,可采用机械法和非机械法相结合的方法。如面包酵母的破碎,可先用细胞壁溶解酶预处理,然后用高压匀浆机在95MPa压力下匀浆4次,总破碎率可接近100%,而单独用高压匀浆机破碎率只有32%。

5. 产物在胞内的位置

提取的产物在细胞质内,选用机械破碎法;在细胞膜附近则可用温和的非机械法;提取的产物与细胞壁或膜相结合时,可采用机械法和化学法相结合的方法,以促进产物溶解度的