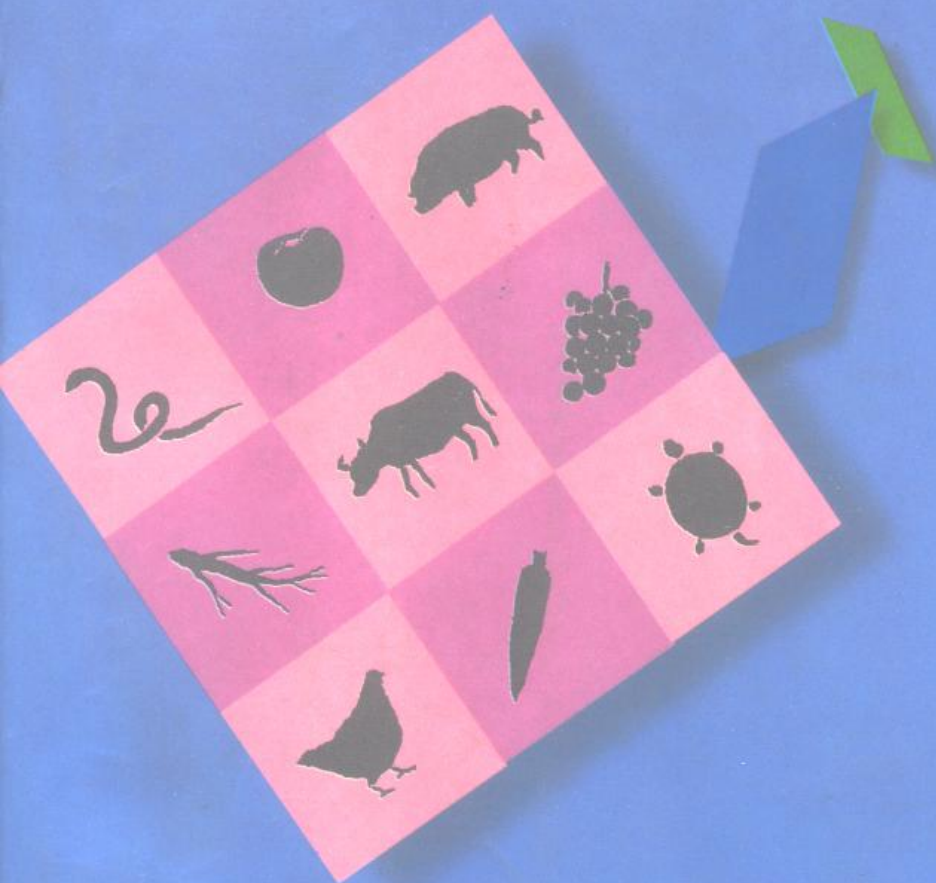


生化工艺学

陈来同 徐德昌 编著



北京大学出版社

生 化 工 艺 学

陈来同 徐德昌 编著

北京大学出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

生化工艺学/陈来同、徐德昌编著. — 北京:北京大学出版社,1997

ISBN 7-301-03033-9

I.生… II.①陈… ②徐… III.生物制品-化学加工-工艺学 IV.TQ464

书 名: 生化工艺学

著作责任者: 陈来同 徐德昌

责任编辑: 李宝屏

标准书号: ISBN 7-301-03033-9/Q·70

出版者: 北京大学出版社

地 址: 北京市海淀区中关村北京大学校内 100871

电 话: 出版部 62752015 发行部 62559712 编辑部 62752032

排 印 者: 北京经纬印刷厂

发 行 者: 北京大学出版社

经 销 者: 新华书店

787×1092 毫米 32 开本 10.5 印张 250 千字

1997 年 4 月第一版 1997 年 4 月第一次印刷

定 价: 13.60 元

前 言

生化工艺学是用化学、物理、生物化学的原理和方法从动物、植物、微生物等生物体提取药用和食用制品,并研究其含量、纯度的一门新型边缘学科。它是理论与应用相结合的桥梁,可使学生拓宽知识面,增强应变能力,以此适应当前市场经济发展的需求。

本书是以综合性大学、师范、农林等院校相关专业师生为主要对象,也可供从事生化工艺的科技人员参考。本书共分八章,主要包括:生化制备的基本原理和方法,蛋白质和酶的提取分离,氨基酸的提取分离,核酸的提取分离,脂类化合物的提取分离,粘多糖的提取,饮料和食用色素生产工艺及样品的保存。本书力求融最新生化工艺理论与实用技术于一体,以理论与实际相结合为出发点,在每一章节中都对有关理论给出了较详细的阐述,并编入了一些生化产品的制备工艺及测定方法。在具体工艺过程中,采用较实用的方法和简明的工艺流程,力求全面培养学生,使他们能正确理解生化工艺学原理和较好地掌握生化工艺学技术及方法,从中体会生化工艺学的理论意义及应用范围。

为了适应生物化学的发展趋势,促进生物化学与实际相结合,我们根据生化工艺学发展和实际的需要,结合我们多年的科研及生产经验,编写了本书。在编写过程中参考了许多国内外最新工艺著述,以使本书以较新的面孔与读者见

面,但由于生物化学发展迅速,加之我们水平有限,一定有不少缺点和错误,恳请使用本书的教师、学生及其他读者批评指正。

本书由陈来同副教授(北京大学生命科学学院)和徐德昌教授(宁夏农学院生物系)共同编写。承蒙我们的老师,北京大学生命科学学院生物化学及分子生物学系茹炳根教授审定全书,并提出许多宝贵意见,在此表示衷心的感谢。

编 者

目 录

第一章 生化制备方法和基本原理	1
第一节 提取	1
第二节 等电点沉淀法	7
第三节 盐析法	9
第四节 有机溶剂的分级沉淀法	13
第五节 结晶和重结晶作用	16
第六节 酶解法	19
第七节 透析和超滤	23
第八节 层析法	28
第九节 凝胶层析法	34
第十节 离子交换层析法	45
第十一节 亲和层析法	55
第十二节 浓缩与干燥	61
第二章 蛋白质和酶的提取分离	69
第一节 蛋白质的理化性质和提取分离方法	70
第二节 酶的提取分离方法	78
第三节 凝血酶的提取	82
第四节 超氧化物歧化酶(SOD)的制备	87
第五节 胰酶的提取	98
第六节 尿激酶的提取	108
第七节 细胞色素 c 的提取	122

第八节	用猪血及血粉制备食用蛋白	134
第三章	氨基酸的提取分离	141
第一节	氨基酸的理化性质及其应用	141
第二节	氨基酸的提取分离方法	146
第三节	胱氨酸的提取	149
第四节	从提取胱氨酸的母液中制备精氨酸、 赖氨酸和组氨酸	158
第四章	核酸的提取分离	162
第一节	核酸的理化性质	162
第二节	动物脏器 DNA 的提取分离	166
第三节	植物总 DNA 和核 DNA 的提取分离	173
第五章	脂类化合物的提取分离	178
第一节	脂类化合物的提取分离方法	179
第二节	胆红素的提取	182
第三节	猪脱氧胆酸的提取	203
第四节	胆固醇的提取	207
第五节	血红素的制备	211
第六章	粘多糖的提取	221
第一节	粘多糖的提取纯化方法	222
第二节	肝素提取	227
第七章	果蔬原汁和食用色素生产工艺	249
第一节	果蔬原汁生产工艺	249
第二节	胡萝卜原汁生产工艺	258
第三节	食用色素提取工艺	264
第八章	生物材料和生化产品的保藏	269
第一节	生化产品保存的一般方法	269

第二节 各类生化产品的保存	271
第三节 几种药用动物的采集与处理	281
附 录	288
一、常用仪器的使用	288
二、常用数据表	296
三、常用缓冲溶液的配制方法	310
四、常用酸碱指示剂	315
五、层析法常用数据表	316
六、各类化合物的色谱溶剂系统	320
七、各种离子交换剂的特性表	323

第一章 生化制备方法和基本原理

生化工艺学(Biochemical Technology)是用化学、物理、生化的原理和方法从微生物、植物、动物等生物体中提取生化产品,并研究其含量、纯度的一门边缘学科。

生化产品主要包括氨基酸、多肽、蛋白质、酶、辅酶、激素、维生素、多糖、脂类、核酸及其降解产物等。以上这些生化产品具有不同的生理功能,其中有些是生物活性物质如蛋白质、酶、核酸等。这些生物活性物质都有复杂的空间结构,而维系这种特定的三维结构主要靠氢键、盐键、二硫键、疏水作用力和范德华力等。这些生物活性物质对外界条件非常敏感,过酸、过碱、高温、剧烈的振荡等都可能導致活性丧失,这是生化产品不同于其他产品的一个突出特点。因此,在整个分离、纯化工艺中,要选择十分温和的条件,尽量在低温条件下操作。同时还要防止体系中的重金属离子及细胞自身酶系的作用。为了得到高纯度的生化产品,必须要认真掌握生化制品提取分离的基本原理和方法。

第一节 提 取

利用一种溶剂对不同物质溶解度的差异,从混合物中分离出一种或几种组分的过程称为提取(extraction),提取又称

1107544

1

萃取或抽提,其含义基本相同。提取是分离纯化的前期,先将经过处理或破碎的组织置于一定条件下的溶剂中,让被提取的生化产品充分释放出来。用冷溶剂从固体物质提取的过程可称为浸渍 (maceration); 用热溶剂者可称为浸提 (digestion), 也称浸煮。提取通常贯穿在分离纯化过程中, 包括生化产品与细胞固体成分或其他相结合物质由固相转移到液相中, 或从细胞内的生理状态转入外界特定的溶液中。提取可分为两类: 一类是对固体的提取, 也称液-固提取, 被处理的原料为固体; 另一类是对液体的提取, 也称液-液提取 (习惯上多称为萃取), 被处理的原料为液体。在对固体的提取中, 溶质首先溶于溶剂, 然后由两相的界面扩散到溶剂中。在对液体的提取中, 溶剂与被处理的液体互不混溶, 但对液体中的组分, 却有不同的溶解能力, 因而可经由两液相间的界面, 由一相扩散到另一相中。

通过提取而得到的物质还需进一步处理, 用蒸发、盐析、沉淀、结晶或干燥等方法除去提取用的溶剂。此溶剂一般都可回收重用。

一、影响生化提取的主要因素

1. 温度

一般讲, 温度升高有利于提取的进行, 因为提高温度可以增加物质的溶解度和溶解速度。对耐热成分加热提取是最常用的方法。但温度对一些活性物质的影响是很大的, 特别是在水溶液中, 蛋白质、酶和核酸等生物大分子更容易受热而变性, 失去生物活性。提取酶的过程, 一般都在 $0 \sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下进行, 但有的酶在短时间以较高温度处理时, 由于

组织的自溶作用而促进提取。对那些能耐较高温度的酶,在提高温度的条件下,可使杂蛋白变性,有利于酶的提取和纯化。在提取核酸类物质时,一般在低温下进行,这样可抑制某些酶的作用,防止生物大分子的降解。当用有机溶剂提取时,低温可减少有机溶剂引起的蛋白质和酶的变性作用。脂类生化产品的提取一般应避免加热,以防止脂质的氧化、聚合或水解。糖类的提取一般在室温下进行。

2. 酸碱度

提取蛋白质和酶时多采用缓冲溶液,提取溶液的 pH 值常控制在 4 ~ 8,这是因为蛋白质在接近中性时相对比较稳定。一般在偏碱性的条件下很容易引起蛋白质变性,动物材料中的酶与其他物质的离子键结合,常能在酸性 (pH 值 3 ~ 6) 条件下解离而有利于提取,所以多在酸性条件下提取。在酸性溶液中,还会发生细胞破壁作用,这更有利于细胞内酶的提取。在生化提取中,要考虑到蛋白质或酶的溶解问题,在等电点时,蛋白质在溶液中的溶解度最低,故提取溶液的 pH 值一般控制在等电点范围以外。如提取物的等电点在酸性范围内,一般用偏碱的溶液来提取;若提取物的等电点在碱性范围内,则用酸性溶液提取。同时还应注意酸碱浓度对生化产品活性的影响。对于一些多糖类物质,我们常在碱性条件下提取,这是因为碱性条件下多糖较稳定。

3. 盐浓度

低浓度的中性盐可以增加蛋白质的溶解度,这种现象称为盐溶作用。中性盐对球蛋白的溶解度有显著的影响,球蛋白几乎不溶于无盐的溶液中。在生化提取中,某些产品常在一定浓度的氯化钠溶液中提取就是利用盐溶作用。在 DNA

提取过程中,动物、植物组织中的脱氧核糖核蛋白可溶于 1 mol/L 氯化钠溶液中,而在 0.14 mol/L 氯化钠溶液中溶解度很低,而核糖核蛋白则溶于 0.14 mol/L 氯化钠溶液中,利用这些性质可将脱氧核糖核蛋白与核糖核蛋白分开。盐的存在有利于组织中的一些和蛋白质结合在一起的粘多糖游离出来,称为盐解(如肝素钠的制备)。但在某些情况下,用蒸馏水提取反而比盐溶液有效,这可能是低渗破坏了细胞膜结构的缘故。

在生化提取中,通常用的盐溶液有 0.15 mol/L 氯化钠溶液、0.02 ~ 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液和 0.02 ~ 0.05 mol/L 焦磷酸钠缓冲液。焦磷酸钠缓冲液的最大优点是缓冲 pH 值范围大,对氢键和离子键有较强的解离能力,能结合二价离子和对某些酶有保护作用。有时也用柠檬酸缓冲液使提取液维持在酸性范围,它具有焦磷酸钠缓冲液的优点。

二、生化提取采用的溶剂

1. 用酸、碱、盐溶液提取法

除脂类产品外,一般生化产品都可溶于水,通常小分子的产品比大分子产品溶解度大。利用稀酸、稀碱或适当的缓冲液,可以将生化产品从有关原料中提出来。对膜蛋白、核蛋白等较难提取的蛋白质,有时用高浓度的盐类、尿素或盐酸胍为提取溶液。蛋白质或酶在这些溶液中处于松散状态。一旦改变缓冲液,它们又可形成折叠结构,同时恢复其生物活性。

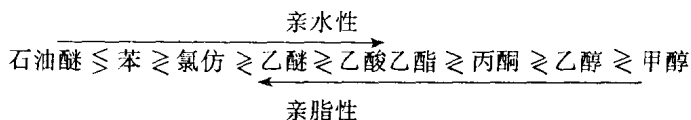
2. 有机溶剂提取法

在提取脂类生化产品时,常用有机溶剂把脂类生化产品从原料中提取出来。原料中的不同成分在有机溶剂中的溶解

度不同,选用对所需要的成分溶解度大、对不需要的成分溶解度小的溶剂,将有效成分从原料中溶解出来。当溶剂加到原料中时,溶剂由于扩散、渗透作用逐渐通过细胞壁透入到细胞内,溶解了可溶性物质,而造成细胞内外的浓度差,于是细胞内的浓溶液不断向外扩散,溶剂又不断进入原料组织细胞中。如此往返,直至细胞内外溶液浓度达到动态平衡时,将此饱和溶液滤出,继续多次加入新溶剂就可以把所需要的成分部分溶出或绝大部分溶出。

有机溶剂提取法,一般采用“极性物质易溶于极性溶剂中,非极性物质易溶于非极性溶剂”的原则来选择有机溶剂,即为“相似相溶”规律。生化产品的溶解度与溶剂性质有关。溶剂分为亲水性有机溶剂和亲脂性有机溶剂。采用哪一种有机溶剂是和生化产品的分子结构相关的。分子结构中亲水性基团多,其极性大而亲水性强,亲脂性就弱;亲水性基团少,其极性小而亲脂性强,亲水性就弱。

各类溶剂的性质与其分子结构有关。例如甲醇、乙醇是亲水性比较强的溶剂,它们的分子比较小,有羟基存在,与水的结构很近似,所以能够和水任意混合。丁醇和戊醇分子中有羟基,和水有相似之处,所以它们能彼此互溶,但随着相对分子质量的增加,在它们互溶达到饱和状态之后,丁醇或戊醇都能与水分层。氯仿、苯和石油醚是烃类或氯烃衍生物,分子中无氧,属于亲脂性强的溶剂。这些常见溶剂的亲水性或亲脂性的强弱顺序可表示如下:



蛋白质和氨基酸都是两性化合物,有一定程度的极性,所以能溶于水,不溶于或难溶于有机溶剂。葡萄糖、蔗糖分子是比较小的多羟基化合物,具有亲水性,极易溶于水。淀粉虽然羟基数目多,但分子太大,所以难溶解于水。

3. 液-液提取法

液-液提取法简称萃取法,是利用混合物中各成分在两种互不相溶的溶剂中分配系数的不同而达到分离的方法。萃取时各成分在两相溶剂中分配系数相差越大,则分离效率越高。如果在水提取液中的有效成分是亲脂性的物质,一般多用亲脂性有机溶剂,如苯、氯仿或乙醚进行萃取;如果有效成分是偏于亲水性的物质,在亲脂性溶剂中难溶解,就需要改用弱亲脂性的溶剂,例如乙酸乙酯、丁醇等。还可以在氯仿、乙醚中加入适量乙醇或甲醇以增大其亲水性。

在生化产品生产中,用有机溶剂对原材料的水溶液进行提取,被提取的生化产品在两相的分配比和有机溶剂的用量是影响液-液提取的主要因素。增加有机溶剂用量,虽然可以提高提取效率,但溶质浓度降低,不利于下道工序分离纯化进行,而且浪费溶剂,不适合大量生产。所以在实际操作中,常采用分次加入溶剂,连续多次提取的方法。第一次提取时,溶剂要多一些,一般为水提取液的 $1/3$,以后的用量可以少一些,一般为 $1/3 \sim 1/6$,萃取 $3 \sim 4$ 次即可。

对酸性物质的提取,常在酸性条件下进行;对碱性物质的提取,常在碱性条件下进行;对两性物质的提取,则使水溶液的 pH 值在该两性物质的等电点为佳。在水溶液中加入大量盐,可使生化物质在水中的溶解度降低,促使它转入有机溶剂中,而有利于提取。此外,盐的存在还可减少提取物在有机溶

剂中的溶解度,使提取液中的水分含量减少。液-液萃取,常发生乳化作用,使有机溶剂和水相分层困难。常用的去乳化的方法有:离心或过滤分离;较长时间放置或轻轻搅动;改变两相的比例;将乳层稍稍加热;加电解质等。

在实验室进行小量萃取,可在分液漏斗中进行。工业生产中,多在密闭萃取罐内进行大量萃取,用搅拌机搅拌一定时间,使二液充分混匀,再放置待分层。

第二节 等电点沉淀法

氨基酸、多肽、蛋白质和核酸类等两性物质的等电点,是这类溶质在一定介质中其质点的净电荷为零时介质的 pH 值。两性物质在等电点时溶解度最低,易沉淀析出;在偏离等电点时容易溶解,偏离越远,溶解度也越大。等电沉淀法就是调节两性物质溶液的 pH,以达到某一物质的等电点,使其从溶液中沉淀出来。在生化产品的分离纯化过程中,常利用两性物质具有不同的等电点的特性来进行产品的分离纯化。即使在等电点时,有些两性物质仍有一定的溶解度,并不是所有的蛋白质制品在等电点时都能沉淀下来,特别是同一类两性物质的等电点又十分接近时,单独利用等电点来分离生化产品效果不太理想,生产中常与有机溶剂沉淀法、盐析法并用,这样沉淀效果较好。

采用等电点沉淀法时,应注意以下几点:

1. 等电点的改变

两性物质的等电点会因条件不同而改变。当盐存在时,

蛋白质若结合了较多阳离子(如 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子),则等电点向较高的 pH 值偏移。因为结合阳离子后相对地正电荷增多了,只有 pH 值升高才能达到等电状态。例如,胰岛素在水中等电点为 5.3,在含一定浓度锌盐的水-丙酮溶液中等电点约为 6,如果改变锌盐的浓度,等电点也会改变。蛋白质若结合较多的阴离子(如 Cl^- 、 SO_4^{2-} 等),则等电点移向较低的 pH 值,因为负电荷相对地增多了,降低 pH 值才能达到等电状态。

2. 等电点沉淀法去除杂蛋白

用等电点沉淀法可将需要提纯的蛋白质从溶液里沉淀出来,还可将提取液中不需要的杂蛋白通过改变 pH,把它们从溶液中沉淀除去。一般是将 pH 值分别调到需提纯物质等电点的两侧,以除去酸性较强的或碱性较强的杂蛋白。需提纯物质等电点较高时,则先除去低于等电点的杂蛋白。细胞色素 c 的等电点为 10.7,在细胞色素 c 的提取纯化过程中,调 pH 6.0 除去酸性蛋白,调 pH 7.5 ~ 8.0 除去碱性蛋白。若产品成分本身是对热稳定的蛋白质,则等电点沉淀法还往往与加热相配合,以除去无用的杂蛋白。经此法处理后,可使某些脏器提取液易于澄清过滤而提高产品的纯度和透明度。

3. pH 值的调节

在进行等电点 pH 值调节时,如果采用盐酸、氢氧化钠等强酸或强碱,应注意由于溶液局部过酸或过碱所引起蛋白质或酶的变性作用。调节 pH 值所用的酸、碱应同原溶液里的盐或即将加入的盐相适应。例如,溶液里含硫酸铵时,调 pH 值可用硫酸或氨水,如原溶液含的是氯化钠,调 pH 值可用盐酸和氢氧化钠。总之,尽量以原液不增加新物质为原则。

第三节 盐析法

盐析是指在一定的高盐浓度条件下,提取液中各种物质在不同浓度盐溶液中分别从溶液中沉淀析出,以达到分离纯化的目的。在生化制备中,许多物质都可以用盐析法进行沉淀分离,如蛋白质、多肽、多糖、核酸等。盐析作用的原理是由于大量盐的溶入,破坏了高分子物质周围的水膜,同时又中和了电荷,从而降低了溶解度而使高分子物质沉淀析出。

一、影响盐析的因素

1. 盐的性质

进行盐析时,一般常用中性盐如硫酸铵、硫酸镁、硫酸钠、氯化钠、磷酸钠等。常用的是硫酸铵,它的温度系数小,溶解度大,盐析能力强,饱和液浓度大,一般不会使蛋白质变性,而且价廉易得,分段沉淀效果比其他盐好。但对蛋白质含氮量的测定有干扰,且缓冲能力较差,pH 值常在 4.5 ~ 5.5 之间,使用前有时需要用氨水调节 pH 值。不同的盐,其盐析能力是不同的。一般说来,负离子带电荷较多者,盐析能力较强,如硫酸钠的盐析能力大于氯化钠;正离子带电荷较多者,盐析能力较低,如硫酸镁的盐析能力小于硫酸铵。

盐析法的优点是成本低,不需要什么特别昂贵的设备;操作简单、安全;对许多生物活性物质具有稳定作用。

2. pH 值

溶液的 pH 值距蛋白质的等电点越近,蛋白质沉淀所需