

SHENGWU

HUAXUE CHANPIN

ZHIBEI JISHU

生物化学产品

制备技术 ①

■ 陈来同 唐运 编著

 科学技术文献出版社

生物化学产品制备技术

(1)

陈来同 唐 运 编著

科学技术文献出版社

Scientific and Technical Documents Publishing House

北 京

图书在版编目(CIP)数据

生物化学产品制备技术(1)/陈来同等编著.-北京:科学技术文献出版社,2003.5

ISBN 7-5023-4232-X

I. 生… II. 陈 III. 生物化学-化工产品-制备 IV. TQ072

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 000824 号

出 版 者:科学技术文献出版社

地 址:北京市复兴路 15 号(中央电视台西侧)/100038

图书编务部电话:(010)68514027,(010)68537104(传真)

图书发行部电话:(010)68514035(传真),(010)

邮 购 部 电 话:(010)68515381,(010)68515

网 址:<http://www.stdph.com>

E-mail:stdph@istic.ac.cn;stdph@public.sti.a

策 划 编 辑:张金水

责 任 编 辑:张金水

责 任 校 对:唐 炜

责 任 出 版:王芳妮

发 行 者:科学技术文献出版社发行 全国各地新华书店经销

印 刷 者:三河市富华印刷包装有限公司

版 (印) 次:2003 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

开 本:787×960 16 开

字 数:533 千

印 张:29.75

印 数:1~5000 册

定 价:45.00 元

© 版权所有 违法必究

购买本社图书,凡字迹不清、缺页、倒页、脱页者,本社发行部负责调换。

(京)新登字 130 号

内 容 简 介

全书共分八章,包括基本技术、氨基酸生化产品、多肽及蛋白质类生化产品、酶类生化产品、核酸类生化产品、糖类生化产品、脂类生化产品、生化产品的保藏。全面系统地论述了生化产品所涉及的理论、技术和工艺,详细介绍了蚕蛹复合氨基酸、降钙素、豆磷脂、水蛭素、猪苓多糖、促黑色素细胞素、蚯蚓纤溶酶、白蛋白等多种最新生化产品的化学结构和性质、采用的原料、制备工艺、技术路线及工艺讨论等。

这些最新生化产品都以动植物材料为原料,采用土洋结合,简单易行的制备技术,可以变废为宝,提高其经济价值。本书内容丰富,可操作性强,特别是对近几年人们关注的生化产品做了论述,为一本实用的、有指导作用的工具书,可供生物化学产品生产企业、科研单位的技术人员及相关人员参考使用,也可作为大专院校有关专业的教科书。

科学技术文献出版社是国家科学技术部系统唯一一家中央级综合性科技出版机构,我们所有的努力都是为了
使您增长知识和才干。

前 言

生物化学产品是以生物材料为原料,采用现代生物化学分离纯化技术制备的具有活性的“生化物质”。这类活性物质副作用少、毒性小;不仅对人体有营养价值,而且还有独特的医疗价值,故此研发生化产品受到人们的极大重视。

随着生化技术的普及和推广,为了满足广大读者的要求,作者结合多年的科研、教学和生产经验,全面系统地论述了生化产品所涉及的理论 and 工艺,同时详细地介绍了一些生化产品的化学结构与性质、采用的原料来源、技术路线及工艺讨论等,以满足不同读者的需求。

本书共分八章,包括生化产品制备基本技术、氨基酸类生化产品制备技术、多肽及蛋白质类生化产品制备技术、酶类生化产品制备技术、核酸类生化产品制备技术、糖类生化产品制备技术、脂类生化产品制备技术、生化产品的保藏等。本书力求融科学性、先进性和实用性于一体。对所列生化产品,注重其生产的代表性和生产的可行性;对制备工艺本着科学性、准确性及产品生产的可操作性原则,采用了土洋结合和简单易行的技术路线。可供综合大学相关专业的师生以及生化产品制备专业技术人员参考。

由于生物化学产品是一种附加值高、利润大而又需要高技术的一类产品,因此要求生产者必须具备一定的专业知识和技术水平。在选择生产前要对自身的技术水平、原料来源、市场前景做认真的调研、分析和论

证。对于技术可行的产品,也要经过实验或试制,取得经验后再扩大生产,切忌草率行事,这样方能达到预期的目的。

本书虽数易其稿,但由于生物化学产品涉及面广,品种繁多,新的制备技术日新月异,加之作者水平有限,仍可能有疏漏或不足之处,敬请读者批评指正,使其日臻完善,作者不胜感谢。

陈来同

于北京大学生命科学学院

2003年1月

目 录

第一章 生化产品制备基本技术	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 原料选择和预处理	(3)
第三节 原料的粉碎	(5)
第四节 提取	(7)
第五节 生化产品的分离纯化技术	(16)
第六节 等电点沉淀法	(20)
第七节 盐析法	(21)
第八节 有机溶剂的分级沉淀法	(29)
第九节 其他沉淀法	(31)
第十节 酶解法	(37)
第十一节 透析法和超滤法	(39)
第十二节 吸附法	(43)
第十三节 层析法	(52)
第十四节 凝胶层析法	(56)
第十五节 离子交换层析法	(73)
第十六节 亲和层析法	(88)
第十七节 离心分离技术	(105)
第十八节 结晶和重结晶作用	(108)

第十九节 浓缩与干燥	(110)
第二十节 生化产品制备中试放大技术	(115)
第二章 氨基酸类生化产品制备技术	(119)
第一节 概述	(119)
第二节 氨基酸的分类	(120)
第三节 氨基酸的理化性质	(121)
第四节 氨基酸的主要用途	(124)
第五节 氨基酸的提取分离方法	(128)
第六节 氨基酸的提取分离技术	(130)
一、蚕蛹复合氨基酸的制备	(130)
二、胱氨酸的提取	(136)
三、精氨酸、赖氨酸和组氨酸的制备	(143)
第三章 多肽及蛋白质类生化产品制备技术	(149)
第一节 概述	(149)
第二节 多肽及蛋白质的性质	(151)
第三节 多肽及蛋白质的作用与用途	(155)
第四节 多肽及蛋白质的提取分离方法	(156)
第五节 蛋白质浓度的测定	(161)
第六节 蛋白质纯度的鉴定	(164)
第七节 多肽及蛋白质的提取分离技术	(165)
一、蛋白胨的制备	(165)
二、无蛋白血清的制备	(168)
三、生物蛋白钙的制备	(171)
四、人丙种球蛋白的制备	(173)

五、从蚕沙提取叶蛋白	(183)
六、白蛋白的制备	(184)
七、水蛭素的提取	(193)
八、降钙素的提取	(196)
九、促黑色素细胞素的提取	(200)
第四章 核酸类生化产品制备技术	(204)
第一节 概述	(204)
第二节 核酸的理化性质	(205)
第三节 核酸的作用和用途	(210)
第四节 动物脏器核酸的提取分离方法	(212)
第五节 核酸生化产品的提取分离技术	(215)
一、转移因子的制备	(215)
二、辅酶 A 的提取	(219)
三、复合辅酶的提取	(223)
四、从啤酒酵母中提取 RNA(新胺法工艺)	(227)
五、从茶叶废料中提取咖啡碱	(234)
第五章 酶类生化产品制备技术	(238)
第一节 概述	(238)
第二节 酶的组成及分类	(239)
第三节 酶的应用	(240)
第四节 酶类生化产品的提取分离方法	(242)
第五节 酶类生化产品的提取分离技术	(248)
一、纤溶酶的制备	(248)
二、降纤酶的制备	(252)

三、皱胃酶的制备	(258)
四、人尿激肽释放酶的提取	(260)
五、糜蛋白酶的提取	(269)
六、细胞色素 C 的提取	(274)
七、SOD 的制备	(286)
第六章 糖类生化产品制备技术	(299)
第一节 概述	(299)
第二节 糖类的分类	(300)
第三节 糖类的性质	(301)
第四节 糖类的作用与用途	(301)
第五节 糖类生化产品的提取分离方法	(303)
第六节 糖类生化产品的提取分离技术	(306)
一、猪蹄壳提取物的制备	(306)
二、硫酸软骨素的提取	(310)
三、猪苓多糖的提取	(318)
四、向日葵花盘果胶的提取	(321)
五、从柑橘皮提取果胶	(324)
六、柠檬酸钙的制备	(327)
七、木糖的制备	(331)
八、甘露醇的提取	(334)
第七章 脂类生化产品制备技术	(338)
第一节 脂类的概述	(338)
第二节 脂类的分类	(339)
第三节 脂类的结构与性质	(339)

第四节 脂类的作用与用途	(343)
第五节 脂类的提取分离方法	(346)
第六节 脂类的提取分离技术	(349)
一、豆磷脂的制备	(349)
二、EPA、DHA 的制备	(356)
三、菜油磷脂的制备	(365)
四、甘油的制备	(367)
五、羊毛脂的提取	(369)
六、血红素的制备	(374)
七、血卟啉的制备	(381)
八、茶皂素的制备	(387)
九、蚕沙叶绿素和叶绿素铜钠盐的制备	(389)
十、高粱红色素的制备	(392)
十一、茶红色素的提取	(394)
第八章 生化产品的保藏	(396)
第一节 生化产品保存的一般方法	(396)
第二节 各类生化产品的保存	(401)
第三节 几种药用动物的采集与处理	(405)
附录	(409)
I. 生化产品的安全生产和防护	(409)
II. 常用仪器的使用	(416)
III. 常用数据表	(423)
IV. 常用缓冲溶液的配制方法	(433)
V. 常用酸碱指示剂	(441)

VI. 层析法常用数据表	(443)
VII. 各类化合物的色谱溶剂系统	(448)
VIII. 各种离子交换剂的特性表	(451)
参考文献	(462)

生化产品制备基本技术

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导致活性丧失,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,必须认真掌握生化产品提取分离的基本原理和方法。

第一节 概 述

生化产品制备技术就是把生物体内的生化基本物质,既保持原来的结构和功能,又能在含有多种物质的液相或固相中,较高纯度地分离出来。它是一项严格、细致、复杂的工艺过程,涉及到物理、化学、生物学等方面的知识和操作技术。第一章主要介绍生化产品制备入门,必须掌握的基本技术。

由于各种生化产品的结构和理化性质的不同,分离方法也不一样,就是同一类生化产品,其原料不同,使用的方法差别也很大,不可能有一个统一的标准方法。

如果研制新品种,在实验前要充分查阅有关文献资料,对分离纯化的生化产品的理化性质、生物活性等都要事先了解,再着手实验工作。对于一个未知结构及性质的试样,进行创造性的分离提纯时,要经过各种方法的比较和摸索,才能找到一些工作规律和获得预期的效果。在分离提纯前,常需建立相应的分析鉴定方法,正

确指导分离提纯的顺利进行。全过程都要认真做好实验记录。

一般从天然生物材料制作生化产品的过程大体可分为六个阶段:

1. 原料的选择和预处理。
2. 原料的粉碎。
3. 提取 即从原料中经溶剂分离有效成分,制成粗品的工艺过程。
4. 纯化 即粗制品经盐析、有机溶剂沉淀、吸附、层析、透析、超离心、膜分离、结晶等步骤进行精制的工艺过程。
5. 干燥及保存。
6. 成品及制剂 即半成品或原料药经精细加工制成片剂、口服液、针剂、冻干剂等供饮用或临床应用。

不是每个生化产品的制备都完整地具备以上六个阶段,也不是每个阶段都截然分开。选择性提取,包含着分离纯化;沉淀分离包含着浓缩;从发酵液中分离胞外酶,则不用粉碎细胞。离心过滤去菌体后,就可以直接进行分离纯化。选择分离纯化的方法及各种方法的先后次序也因材料而异。选择性溶解和沉淀是经常交替使用的方法,贯彻整个制造过程中。各种柱层析常放在纯化的后阶段,结晶则只有产品达到一定纯度后才能进行,才能收到良好的效果。不论是哪个阶段,使用哪种操作技术,都必须注意在操作中保存生化产品的完整性,防止变性和降解的发生。

对于一个新研制的生化产品,从查阅文献开始,到探索实验、条件考察等都要严格做好实验记录,真实地表达客观实际,正确地传达信息,总结制定工艺规程,再进行中试放大,全面考察工艺是否成熟、是否稳定等。如选育新的菌种,在摇瓶中生长很好,收率很高,可是上罐则不长或是收率比较低,所以需要经中试放大,进一步完善工艺,再投入工业大生产。

利用生化制备技术从生物材料中获得特殊的生物活性物质,如蛋白质、酶、激素、核酸等生化产品时,通常要注意以下几个问题:

1. 生物材料的组成成分非常复杂,有数百种甚至更多,各种化合物的形态、大小、相对分子质量和理化性质都各不相同,有的迄今还是未知物,而且这些化合物在分离时仍在不断的代谢变化中。
2. 在生物材料中,有些化合物含量很低或极微,有的只有 $1/10000$,甚至更少。制备时,原材料用量很大,得到产品很少,与投料量相比“微乎其微”。近年来,用所谓“钓鱼法”,利用某些分子特有的专一亲和力,将某一化合物从极复杂的体系中“钓”出来,与其他化学分离技术相比具有很大的优越性。
3. 许多生物活性物质,一旦离开了生物体内环境,很易变性或被破坏,应十分

注意保护这些化合物的生物活性,常选择十分温和的条件,尽可能在较低温度和洁净环境中进行。一般来说,制备的操作时间长、手续较繁琐。因为许多大分子在分离过程中,过酸、过碱、重金属离子、高温、剧烈的机械作用、强烈的辐射和机体内自身酶的作用,均可破坏这些分子的结构或生理活性。

4. 生化分离制备过程几乎都是在溶液中进行的,各种温度、pH、离子强度等参数,对溶液中各种组成的综合影响,常常无法固定,有些实验或工艺的设计理论性不强,常带有很大的经验成分。因此,要建立重复性好的成熟工艺,对生物材料、各种试剂及其辅助材料等都要严格地加以规定。

5. 生化制备方法最后均一性的证明与化学上纯度的概念并不完全相同,这是由于生物分子对环境反应十分敏感,结构与功能的关系比较复杂,评定其均一性时,要通过不同角度测定,才能得出相对“均一性”结论,只凭一种方法所得纯度的结论,往往是片面的,甚至是错误的。

第二节 原料选择和预处理

选什么样的原材料应视生产目的而定。一般要注意以下几个方面:

1. 要选择有效成分含量高的新鲜材料。
2. 来源丰富易得。
3. 制造工艺简单易行。
4. 成本比较低。
5. 经济效果要好。

有时,以上几个方面的条件不一定同时具备,如含量丰富而来源困难;当含量、来源都比较理想,而分离纯化手续繁琐时,用含量略低的原材料容易得到纯品。因此,必须全面分析,综合考虑,抓住主要矛盾决定取舍。如表 1-1,用不同的猪脏器可提取不同的生化产品。

表 1-1 猪脏器的生长部位、含量和用途

名称	生长部位	色泽	平均重/头(g)	主要用途
血液	血管	红色	2000~2500	制造氨基酸、蛋白质、酶、血叶啉
骨			7000~8000	骨胶
脑髓	颅腔内	粉红色	100	P 物质、磷脂、胆固醇
脊髓	椎骨内	灰白色	60~80	P 物质、磷脂、胆固醇

续表

名称	生长部位	色泽	平均重/头(g)	主要用途
肺	胸腔内	粉红色	1000	胰肽酶、肝素
心	胸腔内	粉红色	1000	细胞色素、CoQ ₁₀ 、人工心瓣膜
胆囊	肝胆囊窝中		5.2	人工牛黄、胆酸、胆膜素
肝	腹腔内	栗红色	1500~2500	CoA、RNA
肾	腹腔内	栗红色	200~250	多种生化试剂
胰	腹腔内,靠近 十二指肠处为一 长形粉红色器官	灰白色	50	胰岛素、胰酶等多种激素和酶
脾	腹腔底	栗红色	80	核酸类、转移因子
胃		灰白色	500~700	胃酶、胃膜素
松果体	第三脑室顶部	红棕色	米粒大	松果体激素
甲状腺	气管上端	深红色	4~8	降钙素
副甲状腺	两侧甲状腺上	棕红色	半米粒大	副甲状腺素
胸腺	幼畜胸、颈部位 (颈部气管两侧、 可延伸到喉部)	粉红色	30	胸腺素,胸腺多肽,胸腺生成素 I、II, 胸腺液体因子
睾丸		粉红色	30~50	透明质酸
脑垂体		粉红色	0.5~1	神经脑垂体

对于不同性质的原料,植物要注意季节性;在微生物生长对数期,酶和核酸含量较高,可获得高产量;动物的生理状态不同也有差异,生物的生长期对生理活性物质的含量影响很大。如凝乳酶只能以哺乳期小牛、崽羊的第四胃为材料,成年牛、羊胃不适用。提取胸腺只有小牛胸腺才有,成年牛已退化了。提取绒毛膜促性腺激素(HCG)要收集孕期1~4个月的孕妇尿。因此,各种生物体和同一生物体不同组织细胞,含有的生化物质的多少和分布情况是不同的。前人的许多工作可以借鉴和参考,也应注意总结和积累自己的实践经验,选择最佳原材料。

材料选定之后,通常要进行预处理,有的原料收集到一定的数量才能生产。动物组织先要剔除结缔组织、脂肪组织等非活性部分;植物种子先去壳除脂;微生物要进行菌体和发酵液的分离等操作。总之,凡是不能及时投入工业化生产的原料,都要进行加工,防止在存放过程中破坏要提取的生化物质,同时也便于贮存和运输。

生产中常用冷冻法处理原料,一般将新采集的原料在 -20°C 冷库中保存,以便抑制酶和微生物的作用,降低化学反应速度。有些原料经速冻,细胞内形成微小冰晶,破坏了细胞结构,使细胞膜易破裂,有利于细胞内物质的提取。也可采用有机溶剂除去水分(动物脏器和组织一般含60%水分),可降低水分至10%以下,延长保存时间。使用有机溶剂时,注意不要破坏有效成分,常用丙酮和乙醇等。经丙酮处理的原料,能脱水脱脂,制成丙酮干燥粉,不仅减少酶的变性失活,同时因使蛋白质与脂质结合的部分化学键打开,促使某些酶易释放到溶液中,有利于有效成分的分​​离提取。

有的原料在收集中必须经过处理。如1kg猪脑仁(脑垂体),要2000多头猪,采集后投入丙酮中浸泡,达到破坏酶、脱水脱脂的目的,有利于原料的贮存和下一步工序的进行。微生物菌体或发酵液,经热处理后,适宜工艺连续化进行,否则也可冷冻和灭菌后贮存。

第三节 原料的粉碎

在提取前先将大块的原料粉碎或绞碎成适用的粒度,或将细胞破碎,使胞内生物活性物质充分释放到溶液中,有利于提取或吸附。不同的生物体或同一生物体不同的组织,其破碎的难易不一样,使用的方法也不完全相同。动物的脏器组织,常用绞肉机机械法粉碎;植物肉质组织可以磨碎;许多微生物均具有坚韧的细胞壁,常用自溶、冷热交替、加砂研磨、超声波、加压处理等破碎方法。如果提取的有效成分是体液或细菌胞外某些多肽激素、酶等,则不需要破碎细胞。

一、机械法

主要通过机械力的作用,使组织粉碎。粉碎少量原料时,可使用高速组织捣碎机(10 000r/min)、匀浆器、研钵、研船等。工业生产上一般常用的粉碎设备有电磨机、球磨机、万能粉碎机、绞肉机、击碎机等。

一般脏器组织的粉碎多用绞肉机,冰冻状态绞碎效果更好。要求达到破碎细胞程度时,可以采用匀浆机。目前生化药厂破碎胰采用刨胰机,将冷冻胰脏切成薄片进行提取,对于提高胰岛素收率有良好效果。此外也可用于其他原料的破碎。