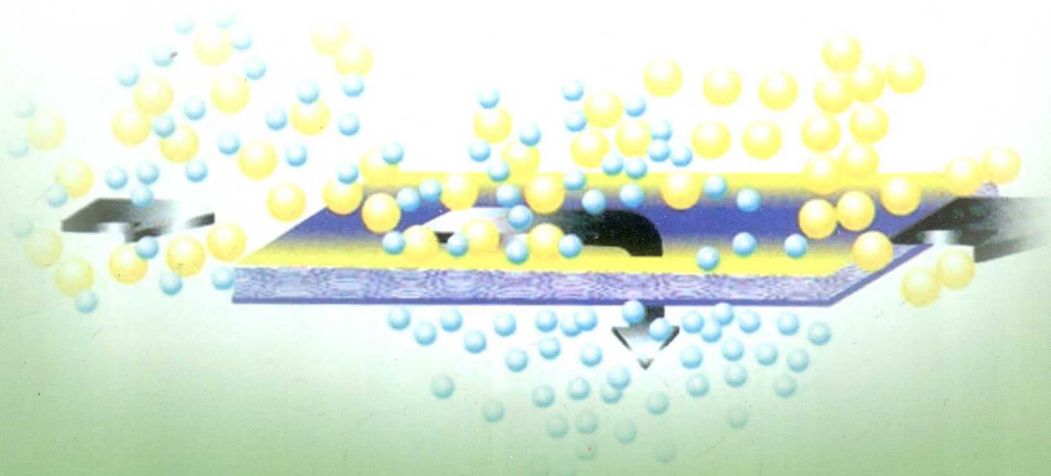



精细化学品生产技术专业（群）重点建设教材

国家骨干高职院校项目建设成果

# 生化分离技术

张惠燕 主编



 ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

精细化学品生产技术专业(群)重点建设教材  
国家骨干高职院校项目建设成果

# 生化“六六”术

主 编 张惠燕  
副主编 陈 郁 朱 军  
参编人员 于文博 朱海东  
俞卫平 饶君凤

## 图书在版编目(CIP)数据

生化分离技术 /张惠燕主编. —杭州:浙江大学出版社,2015.1  
ISBN 978-7-308-14272-4

I. ①生… II. ①张… III. ①生物化学—分离—教材  
IV. ①TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 303534 号

## 生化分离技术

张惠燕 主编

---

责任编辑 石国华  
封面设计 刘依群  
出版发行 浙江大学出版社  
(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)  
(网址: <http://www.zjupress.com>)  
排 版 杭州星云光电图文制作有限公司  
印 刷 富阳市育才印刷有限公司  
开 本 710mm×1000mm 1/16  
印 张 9.75  
字 数 197 千  
版 印 次 2015 年 1 月第 1 版 2015 年 1 月第 1 次印刷  
书 号 ISBN 978-7-308-14272-4  
定 价 25.00 元

---

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式:0571-88925591;<http://zjdxcb.tmall.com>

## 丛书编委会

主 任 谢萍华 何 艺

成 员 (按姓氏笔画排序)

干雅平 马占青 朱海东

吴 健 吴 霜 张永昭

张惠燕 陈 郁 林忠华

俞卫阳 俞铁铭 饶君凤

徐明仙 童国通 童鲁海

# 总 序

2008年,杭州职业技术学院提出了“重构课堂、联通岗位、双师共育、校企联动”的教改思路,拉开了教学改革的序幕。2010年,学校成功申报为国家骨干高职院校建设单位,倡导课堂教学形态改革与创新,大力推行项目导向、任务驱动、教学做合一的教学模式改革与相应课程建设,与行业企业合作共同开发紧密结合生产实际的优质核心课程和校本教材、活页教材,取得了一定成效。精细化学品生产技术专业(群)是骨干校重点建设专业之一,也是浙江省优势专业建设项目之一。在近几年实施课程建设与教学改革的基础上,组织骨干教师和行业企业技术人员共同编写了与专业课程配套的校本教材,几经试用与修改,现正式编印出版,是学校国家骨干校建设项目和浙江省优势专业建设项目的教研成果之一。

教材是学生学习的主要工具,也是教师教学的主要载体。好的教材能够提纲挈领,举一反三,授人以渔。而工学结合的项目化教材则要求更高,不仅要有广深的理论,更要有鲜活的案例、科学的课题设计以及可行的教学方法与手段。编写者在编写的过程中以自身教学实践为基础,吸取了相关教材的经验并结合时代特征而有所创新,使教材内容与经济社会发展需求的动态相一致。

本套教材在内容取舍上摒弃求全、求系统的传统,在结构序化上,首先明确学习目标,随之是任务描述、任务实施步骤,再是结合任务需要进行知识拓展,体现了知识、技能、素质有机融合的设计思路。

本套教材涉及精细化学品生产技术、生物制药技术、环境监测与治理技术3个专业共9门课程,由浙江大学出版社出版发行。在此,对参与本套教材的编审人员及提供帮助的企业表示衷心的感谢。

限于专业类型、课程性质、教学条件以及编者的经验与能力,难免存在不妥之处,敬请专家、同仁提出宝贵意见。

谢萍华

2014年12月

# 前 言

随着生物工程技术的飞速发展,作为生物工程学科中必不可少的生化分离技术也得到了迅猛的发展,出现了许多适合大分子生化物质分离纯化的新技术,如膜技术、萃取技术和层析技术等,其技术水平对于保持和提高各国在生物技术领域的竞争力具有至关重要的作用。本教材打破了传统的按章节讲授理论知识教材体系,根据高职教育的教学模式和人才培养目标要求,以服务为宗旨,以就业为导向,突出“在做中学、在学中做”的特点,理论知识以“必需、够用”为原则,按岗位职业能力为目标,实行项目化教学的特点进行编写。

本教材编写者在多年教学实践和课程建设工作的基础上,总结教学改革和科研成果,认真编写了相关内容,以奉献给对生物工程、生化分离技术感兴趣的师生读者。本书内容涉及面广,不仅包括了目前应用较多的传统分离技术,也包括了近年来发展起来的各种新技术和新方法。全书共分八个部分,编写分工如下:绪论(饶君凤副教授);项目一利用固相析出技术(沉淀及结晶)对物质进行分离(朱海东讲师);项目二利用萃取及浓缩技术对物质进行分离(陈郁教授);项目三利用膜分离技术对物质进行分离及综合项目蔗糖酶的分离纯化及活力测定(张惠燕副教授);项目四利用吸附及离子交换技术对物质进行分离(朱军讲师);项目五利用层析技术对物质进行分离(俞卫平讲师);项目六利用蒸发和干燥技术对物质进行分离(于文博讲师)。

在本书的编写过程中,我们参考了大量的相关文献,得到了浙江大学出版社的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢!

由于生化分离技术发展迅速和高职高专教学模式正在进行改革试点,故教材编写难度很大,又由于编者水平有限,内容难免存在不妥之处,敬请广大读者和同仁批评指正。

编 者

2014年12月

# 目 录

绪 论 .....	( 1 )
项目一 利用固相析出技术(沉淀及结晶)对物质进行分离 .....	( 6 )
第一节 固相析出技术概述 .....	( 6 )
第二节 任务书 .....	( 7 )
第三节 知识介绍 .....	( 7 )
第四节 工作任务 .....	( 19 )
任务一 从牛奶中分离酪蛋白和乳糖结晶 .....	( 19 )
任务二 动物肝脏 DNA 的提取 .....	( 21 )
项目二 利用萃取及浓缩技术对物质进行分离 .....	( 25 )
第一节 萃取及浓缩技术概述 .....	( 25 )
第二节 任务书 .....	( 27 )
第三节 知识介绍 .....	( 27 )
第四节 工作任务 .....	( 42 )
任务一 从茶叶中提取茶多酚并进行旋转蒸发浓缩 .....	( 42 )
任务二 用乙醇萃取环孢素菌渣 .....	( 43 )
项目三 利用膜分离技术对物质进行分离 .....	( 46 )
第一节 膜分离技术概述 .....	( 46 )
第二节 任务书 .....	( 47 )
第三节 知识介绍 .....	( 48 )
第四节 工作任务 .....	( 64 )
任务一 蛋白质的透析 .....	( 64 )
任务二 香菇多糖提取与精制 .....	( 66 )
项目四 利用吸附及离子交换技术对物质进行分离 .....	( 69 )
第一节 离子交换技术概述 .....	( 69 )
第二节 任务书 .....	( 71 )

## 2 生化分离技术

第三节 知识介绍 .....	( 71 )
第四节 工作任务 .....	( 92 )
任务一 离子交换树脂交换容量的测定 .....	( 92 )
任务二 阿卡波糖发酵液的脱盐操作 .....	( 95 )
<b>项目五 利用层析技术对物质进行分离 .....</b>	<b>( 99 )</b>
第一节 层析分离技术的概述 .....	( 99 )
第二节 任务书 .....	(100)
第三节 知识介绍 .....	(101)
第四节 工作任务 .....	(114)
任务一 大孔树脂 AB-8 的预处理及装柱 .....	(114)
任务二 AB-8 树脂对茶黄素柱层析分离 .....	(117)
<b>项目六 利用蒸发和干燥技术对物质进行分离 .....</b>	<b>(121)</b>
第一节 蒸发和干燥技术概述 .....	(121)
第二节 任务书 .....	(122)
第三节 知识介绍 .....	(123)
第四节 工作任务 .....	(136)
任务一 乳糖的喷雾干燥 .....	(136)
任务二 香菇多糖的冷冻干燥 .....	(137)
<b>综合项目 蔗糖酶的分离纯化及活力测定 .....</b>	<b>(141)</b>
第一节 任务书 .....	(141)
第二节 工作任务 .....	(142)
任务一 蔗糖酶的提取及初提纯 .....	(142)
任务二 蔗糖酶的纯化——QSepharose—柱层析法 .....	(144)
任务三 蔗糖酶活力的测定 .....	(146)



# 绪 论



## 知识目标

- 熟悉分离纯化技术、生化分离技术的含义；
- 了解生化分离技术的特点和重要性；
- 了解学习生化分离技术的目的；
- 熟悉生化分离技术的基本步骤；
- 熟悉生化分离技术的基本原理和类别；
- 了解生化分离技术的发展历史和发展趋势。

## 一、生化分离技术概述

### (一)分离纯化技术的含义

分离纯化过程就是通过物理、化学或生物等手段,或将这些方法结合,将某混合物系分离纯化成为两个或多个彼此不同的产物的过程。通俗地讲,就是将某种或某类物质从复杂的混合物中分离出来,被分离纯化的混合物可以是原料、反应产物、中间体、天然产物、生物下游产物或废物料等。在工业中通过适当的技术手段与装备,耗费一定的能量来实现混合物的分离过程,研究实现这一分离纯化过程的科学技术称为分离纯化技术。

### (二)生化分离技术的含义

生化分离技术是指从含有目标产物的发酵液、酶反应液或动植物细胞培养液中,提取、精制并加工制成高纯度的、符合规定要求的各种生物技术产品的技术,又称为下游加工技术。有别于一般的化学分离过程,它是依据生物技术产品的特殊性而采取的一定技术处理手段的加工过程。

### (三)生物技术产品的种类和来源

**种类:**氨基酸及其衍生物类、活性多肽类、蛋白质、酶类、核酸及其降解物、糖、脂类、动物器官或组织制剂、小动物制剂、菌体制剂。

**来源:**动物器官与组织、植物器官与组织、微生物及其代谢产物、细胞培养产物、血液、分泌物及其代谢物。

## 2 生化分离技术

### (四)生化分离技术的特点

#### 1. 产物稳定性差

利用生化分离技术得到的产物为满足其生物活性的要求,易变质、易失活、易变性,对温度、pH 值、重金属离子、有机溶剂、剪切力、表面张力等非常敏感,在高温、pH、金属离子等环境下会变性;同时,也增加了分离的难度。

#### 2. 组分复杂

原料液中常存在与目标分子形成难分离的混合物,因此要求利用特殊高效分离技术纯化产品。

#### 3. 对最终产品的质量要求很高

很多情况下,特别是药品和作为生物试剂用的产品,与人类生命息息相关,因此对其纯度的要求很高。

#### 4. 成本高

原料液中目标产物的浓度一般都很低,提取时所耗费的能量越大,费用也就越高,产品的价格也越高。

### (五)生化分离技术的重要性

生物技术产品一般存在于一个复杂的多相体系中。唯有经过分离和纯化等下游加工过程,才能制得符合使用要求的产品。因此产品的分离纯化是生物技术工业化的必需手段。在生物产品的开发研究中,分离过程的费用占全部研究费用的 50% 以上;在产品的成本构成中,分离与纯化部分占总成本的 40%~80%;精细、药用产品的比例更高达 70%~90%。显然开发新的分离和纯化工艺是提高经济效益或减少投资的重要途径。

### (六)学习生化分离技术的目的

生化分离技术是实现生物工程产业化的关键。通过本课程的学习,对当前生化分离技术领域的大分子物质提取、分离及纯化技术、沉淀技术、浓缩技术、膜分离技术、生物反应器技术、各种色谱技术、各种电泳技术等较全面、较详细的了解,并掌握一些主要技术的方案设计和实际操作。

## 二、生化分离的一般步骤

一般说来,生化分离过程主要包括四个方面:①原料液的预处理和固液分离,常用加热、调 pH、凝聚和絮凝等方法;②初步纯化(提取),主要任务是提高产品的浓度和质量,常用沉淀、吸附、萃取、超滤等单元操作;③高度纯化(精制),去除与产品有类似化学性质和物理性质的杂质,大大提高产品的纯度,常选用色谱分离技术;④成品加工,有浓缩、结晶和干燥等技术。如图 0-1 所示。

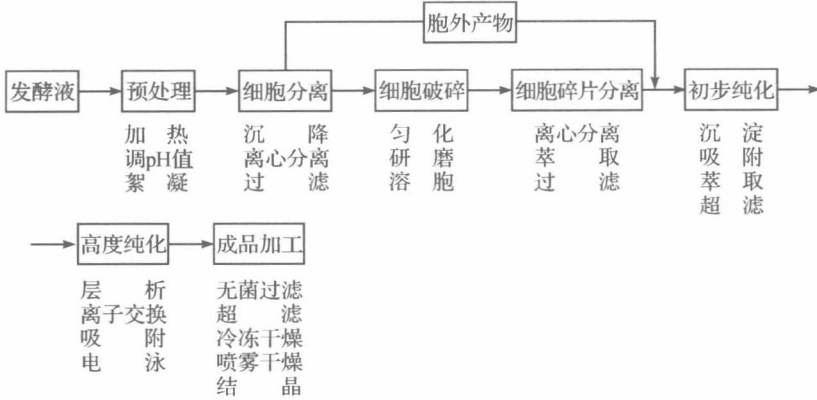


图 0-1 分离纯化的基本步骤

### 三、分离纯化基本原理

分离纯化的基本原理主要是依据混合物中不同组分间物理、化学和生物学性质的差别,即不同组分间离心力、分子大小(筛分)、浓度差、压力差、电荷效应、吸附作用、静电作用、亲和作用、疏水作用、溶解度、平衡分离等差别,利用能够识别这些差别的分离介质或扩大这些差别的分离设备来实现组分间的分离或目标产物的纯化。如表 0-1 所示。

表 0-1 分离纯化基本原理

原理	分离纯化技术	产物举例
带电性	电泳 离子交换色谱 等电点沉淀	蛋白质、核酸、氨基酸 氨基酸、有机酸、抗生素、蛋白质、核酸 蛋白质、氨基酸
化学性质	电渗析 离子交换色谱 亲和色谱	氨基酸、有机酸、盐、水 氨基酸、有机酸、抗生素、蛋白质、核酸 蛋白质、核酸
生物功能特性	亲和色谱 疏水色谱	蛋白质、核酸 蛋白质、核酸
分子大小形状	离心 超滤 微滤 透析 渗析 凝胶色谱	菌体、细胞碎片、蛋白质 蛋白质、多醣、抗生素 菌体、细胞 尿素、盐、蛋白质 氨基酸、有机酸、盐、水 盐、分子大小不同的蛋白质
溶解度挥发性	萃取 盐析 结晶 蒸馏 等电点沉淀 有机溶剂沉淀	氨基酸、有机酸、抗生素、蛋白质、香料 蛋白质、核酸 氨基酸、有机酸、抗生素、蛋白质 乙醇、香精 蛋白质、氨基酸 蛋白质、核酸

## 4 生化分离技术

各种分离纯化技术可简单归类如下：

**沉淀分离：**盐析、有机溶剂沉淀、选择性变性沉淀、非离子聚合物沉淀等。

**层析分离：**吸附层析、凝胶层析、离子交换层析、疏水层析、反相层析、亲和层析及层析聚焦等。

**电泳分离：**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、双向电泳、毛细管电泳等。

**离心分离：**低速、高速、超速(差速离心、密度梯度)离心分离技术等。

**膜分离技术：**透析、微滤、超滤、纳滤、反渗透等。

### 四、生化分离技术发展的历史

#### (一)古代酿造业

最早的生物技术可追溯到古老的酿造业,包括酿酒、制酱(油)、醋、酸奶和干酪等,都是家庭作坊式的,产物基本不经过后处理而直接使用。

#### (二)原始分离纯化时期(第一代生物技术产品)

主要指 19 世纪 60 年代到 20 世纪 40 年代青霉素等抗生素出现之前的生物技术产业。从 19 世纪 60 年代起,人们搞清了微生物是引起发酵的原因,开发了纯种培养技术,并逐步开发了发酵法生产酒精、丙酮等产品的生产技术,生产以经验为主,称为手工业式的第一代生物技术。

#### (三)传统分离纯化方法推广使用时期(传统第二代生物技术产品)

第二代生物技术产品出现在 20 世纪 40 年代,随着青霉素、链霉素等抗生素工业生产的扩大、化工单元操作的引进,酿造业逐渐扩展成为发酵产业。产品类型开始增多,不但有初级代谢产物,还出现了次级代谢产物,产品的多样性对分离纯化提出了更高的要求,出现了离子交换色谱及电泳技术。

#### (四)快速发展时期(第三代生物技术产品)

20 世纪 70 年代中期以来,随着重组 DNA 技术即基因工程技术和细胞融合技术等现代生物技术的飞速发展,推动了第三代生物技术的发展,使天然存在的极微量的生物物质得以通过大量细胞培养进行商业规模生产,也使生物产物从原料到产品的发展,由低成本、高收率地纯化目标产物成为现实。

### 五、生化分离技术的发展趋势

#### (一)多种分离、纯化技术相结合

膜分离与亲和配基、离子交换基团相结合,形成了亲和膜过滤技术。

离心分离与膜分离过程结合,形成了膜离心分离过程。这类将两种及以上的技术的优势结合,往往具有选择性好、分离效率高、步骤简化、能耗低等优点。

## (二)生化分离技术(下游技术)与发酵工艺(上游技术)相结合

它是指上游技术和下游技术的改良要紧密联系,通过改进上游因素,简化下游分离提取过程;把发酵—分离作为一个偶合的过程来进行。

## (三)生化分离技术规模化工程问题的研究

它是指生物技术产品的工业化往往需要将实验室技术进行放大,借助化学工程中基本理论,结合生化分离过程特点,研究大型生化分离装置中的流变学特性、热量和质量传递规律,改善设备结构,掌握放大方法,最终提高分离的目的。



### 自测训练

#### 一、选择题(单选或多选)

- 青霉素等抗生素生物技术产品属于( )。
  - 第一代生物技术产品
  - 第二代生物技术产品
  - 第三代生物技术产品
  - 第四代生物技术产品
- 利用等电性原理进行的分离纯化技术有( )。
  - 电泳
  - 离子交换色谱
  - 电渗析
  - 等电点沉淀
- 离子交换色谱可利用其( )原理进行分离。
  - 带电性
  - 分子大小、形状
  - 化学性质
  - 生物功能特性
- 在精制环节,经常采用的分离纯化技术是( )。
  - 结晶
  - 膜分离技术
  - 色谱分离技术
  - 沉淀

#### 二、问答题

- 生化分离技术的含义是什么?
- 生化分离技术的特点有哪些?
- 生化分离的一般步骤包括哪些环节及技术?

#### 参考文献

- 严希康主编.生化分离工程.北京:化学工业出版社,2001.
- 俞俊棠主编.新编生物工艺学.北京:化学工业出版社,2003.
- 孙彦主编.生物分离工程.北京:化学工业出版社,2005.
- 刘国詮主编.生物工程下游技术(第二版).北京:化学工业出版社,2003.
- 欧阳平凯,胡永红主编.生物分离原理及技术.北京:化学工业出版社,1999.

# 项目一 利用固相析出技术(沉淀及结晶)对物质进行分离



## 知识目标

固相析出技术的定义和特点；  
常见的固相析出技术方法及原理；  
固相析出技术的应用。



## 能力目标

了解固相析出技术特点及其在行业企业中的地位；  
能根据不同情况选择固相析出技术方法；  
能比较好地分析出现问题的原因；  
能熟练解决生产中固相析出技术过程碰到的困难。



## 素质目标

能独立完成规定的分离要求；  
培养诚实守信、吃苦耐劳的品德；  
实事求是，不抄袭、不编造数据；  
具有良好的团队意识和沟通能力，能进行良好的团队合作；  
具有良好的5S管理意识和安全意识。

## 第一节 固相析出技术概述

固相析出分离法是指生物物质目的物经常作为溶质存在于溶液中，通过改变溶液条件，使它以固体形式从溶液中分离的操作技术。固相析出法是最古老的分离和纯化生物物质的方法，但目前仍广泛应用在工业上和实验室中。该分离技术常在发酵液经过过滤和离心(除去不溶性杂质及细胞碎片)以后进行，得到的沉析物可直接干燥制得成品或经进一步提纯，如透析、超滤、层析或结晶制得高纯度生化产品。固相析出法不仅用于实验室中，因其不需专门设备，且易于放大，也广泛用于生产的制备过程，是分离纯化生物大分子，特别是制备蛋白质和酶时最常用的方法。该法具有操作简单、经济、浓缩倍数高的优点，但在针对复杂体系的时候，存在分离度不高、选择性不强的缺点。

## 第二节 任务书

表 1-1 “牛奶中分离酪蛋白和乳糖”项目任务书

工作任务	利用固相析出技术,从牛奶中分离获得酪蛋白和乳糖
任务描述	<p>牛奶中主要的蛋白质是酪蛋白,含量约为 35g/L。酪蛋白在乳中是以酪蛋白酸钙—磷酸钙复合体胶粒存在。胶粒直径约为 20~800nm,平均为 100nm。在酸或凝乳酶的作用下酪蛋白会沉淀,加工后可制得干酪或干酪素。本项目中利用加酸,调节牛奶的 pH 值达到酪蛋白等电点 <math>pI=4.7</math> 时,蛋白质所带正、负电荷相等,呈电中性,此时酪蛋白的溶解度最小,酪蛋白将以沉淀的形式从牛奶中析出。</p> <p>牛奶中含有 40%~60% 的乳糖,乳糖是一种二糖,它由一分子半乳糖及一分子葡萄糖通过 <math>\beta</math>-1,4-糖苷键连接,乳糖是还原性二糖。脱脂乳中除去酪蛋白后剩下的液体为乳清,在乳清中含有乳白蛋白和乳球蛋白,还有溶解状态的乳糖,乳中糖类的 99.8% 以上是乳糖,可通过浓缩、结晶制取乳糖。</p>
目标要求	通过本工作任务的学习,能掌握沉淀和结晶等相关的固相析出方法和原理,熟练运用相关技术,解决固相析出过程中存在的问题,成功地从牛奶中提取酪蛋白和乳糖等物质。
操作人员	生物制药技术专业学生分组进行实训,教师考核检查。

表 1-2 “动物肝脏 DNA 的提取”项目任务书

工作任务	利用固相析出技术,提取动物肝脏中的 DNA
任务描述	<p>在浓氯化钠(1~2mol/L)溶液中,脱氧核糖核蛋白的溶解度很大,核糖核蛋白的溶解度很小。在稀氯化钠(0.14mol/L)溶液中,脱氧核糖核蛋白的溶解度很小,核糖核蛋白的溶解度很大。因此,可利用不同浓度的氯化钠溶液,将脱氧核糖核蛋白和核糖核蛋白从样品中分别抽提出来。</p> <p>将抽提得到的核蛋白用 SDS(十二烷基磺酸钠)处理,DNA(或 RNA)即与蛋白质分开,可用氯仿—异戊醇将蛋白质沉淀除去,而 DNA 则溶解于溶液中。向溶液中加入适量乙醇,DNA 即析出。为了防止 DNA(或 RNA)酶解,提取时加 EDTA(乙二胺四乙酸)。</p>
目标要求	通过本工作任务的学习,能掌握沉淀和结晶等相关的固相析出方法和原理,熟练运用相关技术,解决固相析出过程中存在的问题,成功地从动物肝脏中提取 DNA。
操作人员	生物制药技术专业学生分组进行实训,教师考核检查。

## 第三节 知识介绍

固相析出技术主要分为两种:一是沉淀法;二是结晶法。两种方法的区别在于:前者在固相析出过程中,析出物为无定形固体;后者在固相析出过程中,析出物

为晶体。而沉淀法按照使用方法不同主要有盐析法、有机溶剂沉淀法、等电点沉淀法等。现对以上涉及的各种固相析出技术分别做介绍。

### 一、盐析法

盐析法是利用各种生物分子在浓盐溶液中溶解度的差异,通过向溶液中引入一定数量的中性盐,使目的物或杂蛋白以沉淀析出,达到纯化目的的方法。该法具有简单、经济、容易操作等优点;但也存在分辨率不高,沉淀含大量盐析剂,要除盐等缺点。血浆的盐析法如图 1-1 所示。

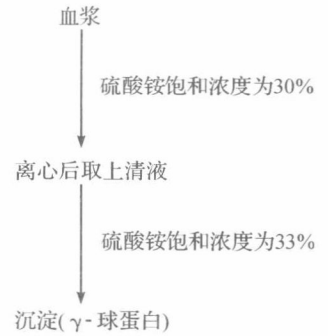


图 1-1 血浆的盐析

盐析法存在两种不同的现象:一种称为盐溶,指的是在低盐情况下,随着盐离子强度的增高,蛋白质溶解度逐步增大。另一种称为盐析,指的是在高盐条件下,随着盐离子强度增加,蛋白质溶解度逐步减小析出。

#### (一) 盐析法基本原理

盐析法主要通过破坏蛋白质等物质的双电层和水化层,从而达到使目的物质逐步析出的方法。破坏双电层一般是指在高盐溶液中,带大量电荷的盐离子中和蛋白质表面的电荷,使蛋白质分子之间电排斥作用相互减弱而能相互聚集起来。而破坏水化层一般指中性盐的亲水性比蛋白质大,盐离子在水中发生水化而使蛋白质脱去了水化膜,暴露出疏水区域,由于疏水区域的相互作用,使其沉淀。盐析法的基本原理见图 1-2。

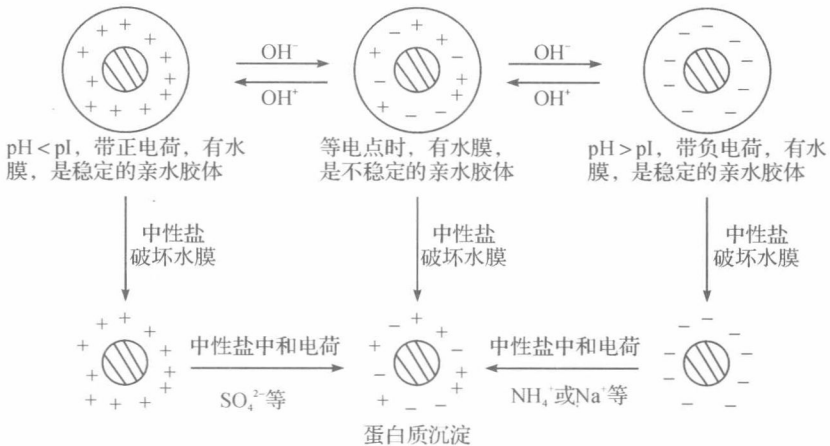


图 1-2 盐析法的基本原理

如图 1-3 所示,盐离子浓度与蛋白质溶解度关系曲线,在盐析区,符合公式

$$\log S = \beta - K_s \mu$$

其中:S——蛋白质溶解度(g/L);



$\mu$ ——盐离子强度,  $\mu = 0.5 \sum_i C_i Z_i^2$ , 其中,  $C_i$  为  $i$  离子浓度 (mol/L),  $Z_i$  为  $i$  离子化合价;

$\beta$ ——常数, 为纵坐标上的截距;

$K_s$ ——盐析常数。

如上所示, 盐析法存在两种操作情况:

(1) 在一定的 pH 和温度下改变离子强度 (盐浓度) 进行盐析, 称作  $K_s$  盐析法。

由于蛋白质对离子强度的变化非常敏感, 易产生共沉淀现象, 因此常用于提取液的前处理。

(2) 在一定离子强度下仅改变 pH 和温度进行盐析, 称作  $\beta$  盐析法。

由于溶质溶解度变化缓慢, 且变化幅度小, 因此分辨率更高, 常用于后期分离 (结晶)。

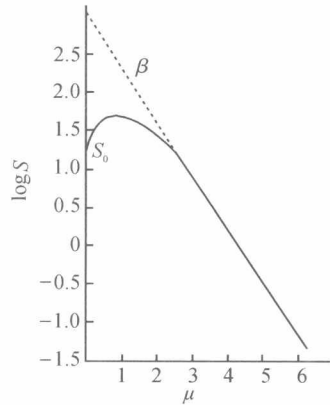


图 1-3 盐离子强度与蛋白质溶解度关系曲线

## (二) 影响盐析的因素

### 1. 无机盐的种类

在相同离子强度下, 盐的种类对蛋白质溶解度的影响有一定差异, 一般的规律为: 半径小的高价离子的盐析作用较强, 半径大的低价离子作用较弱。比如:

**阴离子盐析效果:** 柠檬酸  $> \text{PO}_4^{3-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SCN}^-$

**阳离子盐析效果:**  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ >$  高价阳离子, 而阴离子的影响大于阳离子。

具体选择盐析用盐的时候一般考虑几个方面: 盐析作用要强; 盐析用盐需有较大的溶解度; 盐析用盐必须是惰性的; 来源丰富、经济。盐析中常用的盐: 硫酸铵、硫酸钠、磷酸钾、磷酸钠。而其中, 硫酸铵是最常用的蛋白质盐析沉淀剂, 具有价廉、溶解度大、温度系数小、许多蛋白质可以盐析出来、硫酸铵分段盐析效果也比其他盐好、不易引起蛋白质变性等优点。当然, 实际应用的时候, 也存在水解变酸、高 pH 释氨、腐蚀、残留产品有影响等缺点。

### 2. 蛋白质的浓度

中性盐沉淀蛋白质时, 溶液中蛋白质的实际浓度对分离的效果有较大的影响。通常高浓度的蛋白质用稍低的硫酸铵饱和度即可将其沉淀下来, 但若蛋白质浓度过高, 则易产生各种蛋白质的共沉淀作用, 除杂蛋白的效果会明显下降。对低浓度的蛋白质, 要使用更大的硫酸铵饱和度, 这样共沉淀作用小, 分离纯化效果较好, 但回收率会降低。通常认为比较适中的蛋白质浓度是 2.5%~3.0%, 相当于 25~30mg/mL。

### 3. pH 值

蛋白质所带净电荷越多, 它的溶解度就越大。改变 pH 值可改变蛋白质的带电性质, 因而就改变了蛋白质的溶解度。远离等电点处溶解度大, 在等电点处溶解度小, 因此用中性盐沉淀蛋白质时, pH 值常选在该蛋白质的等电点附近。