



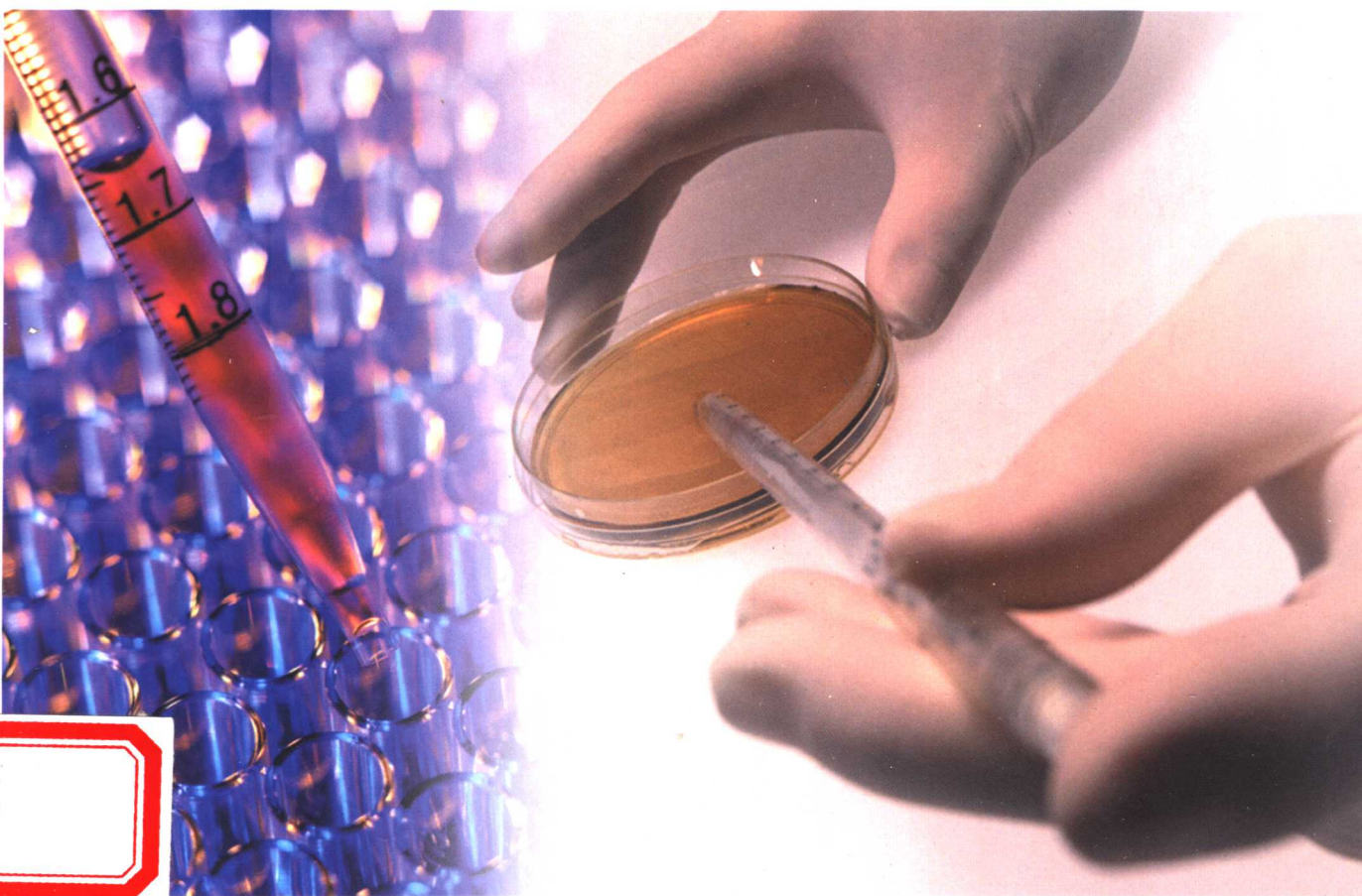
教育部职业教育与成人教育司推荐教材
生物技术类教材系列



北京市高等教育精品教材立项项目

生物分离与纯化技术

■ 主编 辛秀兰



 科学出版社
www.sciencep.com



教育部职业教育与成人教育司推荐教材
生物技术类教材系列



北京市高等教育精品教材立项项目

生物分离与纯化技术

主 编 辛秀兰

副主编 兰 蓉 刘晓芳

参 编 徐 晶 陈红梅 王晓杰
张 宓 贡汉坤 王传荣



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书从基础理论和实验技术两个角度介绍生物分离与纯化技术。首先介绍了生物分离与纯化技术的概况,然后介绍了生物制品的预处理及固-液分离、萃取、固相析出分离、吸附分离、离子交换分离、色谱分离、膜分离、液膜分离技术,最后介绍了浓缩及产品干燥技术,同时还附有 20 个实验以巩固学生的学习。

本书适合高等职业院校生物化学、药物化学等专业的学生选用。

图书在版编目(CIP)数据

生物分离与纯化技术/辛秀兰主编. —北京:科学出版社,2005

教育部职业教育与成人教育司推荐教材. 北京市高等教育精品教材立项项目. 生物技术类教材系列

ISBN 7-03-015686-2

I. 生… II. 辛… III. ①生物分解—高等学校—教材 ②生物制品—化学成分—提纯—高等学校—教材 IV. ①Q503 ②TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 062507 号

责任编辑:沈力匀 吴伶伶 王国华 / 责任校对:陈丽珠

责任印制:安春生 / 封面设计:陈 敬

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年8月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2005年8月第一次印刷 印张: 16 3/4

印数: 1—3 500 字数: 380 000

定价: 25.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换(环伟))

《生物技术类教材系列》编委会

主 编 陆寿鹏

副主编 温守东 张安宁 翟 敏 逯家富
廖湘萍 江建军 侯建平

编 委 徐清华 赵金海 蔡功禄 赵 辉
李宏高 杨天英 翁鸿珍 廖世荣
武 运 何 惠 胡文浪 万 萍
陆正清 王传荣 葛 亮 辛秀兰
宇文威胜

出版说明

进入 21 世纪, 国际竞争日趋激烈, 竞争的焦点是人才的竞争, 是全民素质的竞争。人力资源在国家综合国力的增强方面, 发挥着越来越重要的作用, 而人力资源的状况归根结底取决于教育发展的整体水平。

教育部在《2003~2007 年教育振兴行动计划》中明确了今后 5 年将进行六大重点工程建设: 一是“新世纪素质教育工程”, 进一步全面推进素质教育; 二是“就业为导向的职业教育与培训工程”, 增强学生的就业、创业能力; 三是“高等学校教学质量与教学改革工程”, 进一步深化高等学校的教学改革; 四是“教育信息化建设工程”, 加快教育信息化基础设施、教育信息资源建设和人才培养; 五是“高校毕业生就业工程”, 建立更加完善的高校毕业生就业信息网络和指导、服务体系; 六是“高素质教师和管理队伍建设工程”, 完善教师教育和终身学习体系, 进一步深化人事制度改革。

职业教育事业的各项改革中也在加速发展, 其为经济建设和社会发展的服务能力显著增强。各地和各级职业院校坚持以服务为宗旨, 以就业为导向, 大力实施“制造业与现代服务业技能型紧缺人才培养培训计划”和“农村劳动力转移培训计划”, 密切与企业、人才、劳务市场的合作, 进一步优化资源配置和布局结构, 同时深化管理体制和办学体制改革。

为配合教育部职业教育与成人教育司 2004~2007 年推荐教材的出版计划, 科学出版社本着“高水平、高质量、高层次”的“三高”精神和“严肃、严密、严格”的“三严”作风, 集中相关行业专家、各职业院校双优型教师, 编写了高职高专层次的基础课、公共课教材; 各类紧缺专业、热门专业教材; 实训教材、引进教材等特色教材。其中包括:

1. 高职高专基础课、公共课教材

- (1) 基础课教材系列
- (2) 公共课教材系列

2. 高职高专专业课教材

- (1) 紧缺专业教材系列
 - 软件类专业系列教材
 - 数控技术专业系列教材
 - 护理类专业系列教材
- (2) 热门专业教材系列
 - 电子信息类专业系列教材
 - 交通运输类专业系列教材
 - 财经类专业系列教材
 - 旅游类专业系列教材

- 生物技术类专业系列教材
- 食品类专业系列教材
- 精细化工类专业系列教材
- 艺术设计类专业系列教材
- 土建类系列教材
- 水利类系列教材
- 制造类系列教材
- 材料与能源类系列教材

3. 高职高专特色教材

(1) 高职高专实训教材系列教材

(2) 国外职业教育优秀系列教材

本套教材建设的宗旨是以学校的选择为依据,以方便教师授课为标准,以理论知识为主体,以应用型职业岗位要求为中心,以素质教育、创新教育为基础,以学生能力培养为本位,力求突出以下特色:

(1) 理念创新:秉承“教学改革与学科创新引路,科技进步与教材创新同步”的理念,根据新时代对高等职业教育人才的需求,出版一系列体现教学改革最新理念,内容领先、思路创新、突出实训、成系配套的高职高专教材。

(2) 方法创新:摒弃“借用教材、压缩内容”的滞后方法,专门开发符合高职特点的“对口教材”。在对职业岗位所需求的专业知识和专项能力进行科学分析的基础上,引进国外先进的课程开发方法,以确保符合职业教育的特色。

(3) 特色创新:加大实训教材的开发力度,填补空白,突出热点,积极开发紧缺专业、热门专业的教材。对于部分教材,提供“课件”、“教学资源支持库”等立体化的教学支持,方便教师教学与学生学习。对于部分专业,组织编写“双证教材”,注意将教材内容与职业资格、技能证书进行衔接。

(4) 内容创新:在教材的编写过程中,力求反映知识更新和科技发展的最新动态。将新知识、新技术、新内容、新工艺、新案例及时反映到教材中来,更能体现高职教育专业设置紧密联系生产、建设、服务、管理一线的实际要求。

欢迎广大教师、学生在教材的使用中提出宝贵意见,以便我们进一步做好教材的修订工作,出版更多的精品教材。

科学出版社

前 言

本书为教育部职业教育与成人教育司推荐教材之一，同时被北京市教育委员会作为北京市高等教育精品教材立项项目。

“生物分离与纯化技术”是生物工程与新医药类专业的必修课程之一，本书编写的宗旨是使本教材与国际接轨，在国内领先，密切结合企业实际，具有高职特色。本书主要内容以社会需求为导向，及时地吸纳行业的新知识、新工艺、新技术和新方法；教材的设计与传统的本科教材有所不同，理论知识的选择以“必需、够用”为原则，不仅阐述了基本原理，详细说明了生物分离与纯化技术的实验方法，而且每一章都有配套的、针对性强的实验，以利于理论与实践的密切结合。

全书共分两篇：第一篇是基础理论，重点介绍了预处理及固-液分离技术、萃取技术、固相析出分离技术、吸附分离技术、离子交换分离技术、色谱分离技术、膜分离技术、液膜分离技术、浓缩及成品干燥等常用的生物分离与纯化技术；第二篇是实验技术，根据第一篇基础理论的要求，共设计了20个操作性强、实验效果好的分离与纯化实验，以利于学生巩固基本理论知识。

北京轻工职业技术学院的辛秀兰、兰蓉、徐晶、陈红梅与王晓杰老师和山东商业职业技术学院的刘晓芳老师，浙江省金华职业技术学院的邵玲莉老师，北京城市学院的张宓老师及江苏食品职业技术学院的贡汉坤、王传荣老师共同完成了本书的编写和审稿工作。

为了使本书适应行业发展及高职教育的需要，我们参考了大量国内外有关书籍和文献，并结合自己的教学和实验经验进行了编撰，但由于作者水平有限，难免会有错误与不妥之处，敬请广大读者与同仁批评指正。

目 录

出版说明

前言

第一篇 基础理论

第 1 章 绪论	3
第 2 章 预处理及固-液分离	11
2.1 发酵液(培养液)的预处理	11
2.2 细胞破碎	14
2.3 固-液分离	21
第 3 章 萃取技术	33
3.1 概述	33
3.2 溶剂萃取技术	34
3.3 双水相萃取	41
3.4 超临界流体萃取	47
3.5 其他萃取技术	55
第 4 章 固相析出分离技术	60
4.1 盐析法	60
4.2 有机溶剂沉淀法	64
4.3 其他沉淀法	68
4.4 结晶法	71
第 5 章 吸附分离技术	82
5.1 吸附过程的理论基础和常用的吸附剂	82
5.2 大网格聚合物吸附剂	89
5.3 影响吸附的因素	91
第 6 章 离子交换分离技术	94
6.1 离子交换树脂的结构和分离机理	94
6.2 离子交换树脂的分类和性能	97
6.3 离子交换过程的理论基础	103
6.4 离子交换操作方法	106

6.5	多糖基离子交换剂	109
6.6	离子交换分离技术的应用	113
第7章	色谱分离技术	117
7.1	概述	117
7.2	吸附色谱法	120
7.3	分配色谱法	131
7.4	离子交换色谱法	134
7.5	凝胶色谱法	138
7.6	高效液相色谱法	147
7.7	亲和色谱法	158
第8章	膜分离技术	167
8.1	概述	167
8.2	膜和膜组件	170
8.3	微滤	173
8.4	超滤	177
8.5	反渗透	184
第9章	液膜分离技术	189
9.1	概述	189
9.2	液膜分离的传质机理	193
9.3	液膜分离的工艺操作及应用	195
第10章	浓缩及成品干燥	201
10.1	浓缩	201
10.2	渗透蒸发	204
10.3	成品干燥	210

第二篇 实验技术

实验1	酵母细胞的破碎及破碎率的测定	221
实验2	细胞核与线粒体的分级分离	222
实验3	青霉素的萃取与萃取率的计算	223
实验4	双水相萃取分离酿酒酵母中延胡索酸酶	225
实验5	胰凝乳蛋白酶的制备	227
实验6	牛奶中酪蛋白和乳蛋白素粗品的制备	229

实验 7 吸附法制备细胞色素 c 粗品	230
实验 8 吸附法提取分离葛根素	232
实验 9 离子交换法提取 L-精氨酸	233
实验 10 薄层色谱法鉴定果汁中的糖	236
实验 11 薄层色谱法鉴定土霉素	237
实验 12 分配柱层析测定吐根中吐根碱和吐根酚碱	238
实验 13 发酵液中柠檬酸的提取	239
实验 14 离子交换柱层析分离氨基酸	241
实验 15 Sephadex G-50 分离蓝葡聚糖 2000、细胞色素 c 和溴酚蓝	243
实验 16 凝胶层析法分离纯化蛋白质	245
实验 17 HPLC 法测定复方磺胺甲唑片中的磺胺甲噁唑和甲氧苄啶	247
实验 18 重氮法固定胰蛋白酶及亲和层析法提取抑肽酶	248
实验 19 蛋白质的透析	250
实验 20 冻干干燥酸奶粉的研制	251
参考文献	255

第一篇 基础理论

第 1 章

绪 论

学习目标

1. 生物分离与纯化技术的基本概念。
2. 生物材料的来源和加工特性。
3. 生物分离与纯化的一般工艺过程。
4. 生物分离与纯化方法的选择依据。

生物分离与纯化是生物工程产品生产中的基本技术环节。如图 1-1 所示,生物产品生产流程的主要步骤是各类分离操作。生物产品的自身特征、生产过程的条件限制以及产品的特殊性对产品纯度及杂质含量方面提出了很高的要求,发展高效生物分离和纯化技术成为生物工程技术领域的一个重要研究方向。生物分离与纯化的目的是从微生物发酵液、酶反应产物、动植物细胞培养和生物体本身分离并纯化对人类有用的、符合质量要求的各种生物药物和生物制品。药品和生物制品的质量优劣直接关系到人们的身体健康和生命安全,同时也是衡量生物制品工业生产水平的重要标志之一。进入 20 世纪 90 年代,生物科学、生物技术基础研究与化工分离科学、材料科学等相关学科的进步极大推动了新型高效生物分离技术的发展,同时生物分离过程特性的研究也逐渐被人们所重视。本章主要介绍生物分离与纯化的研究概况,并对其发展方向和前景进行讨论。

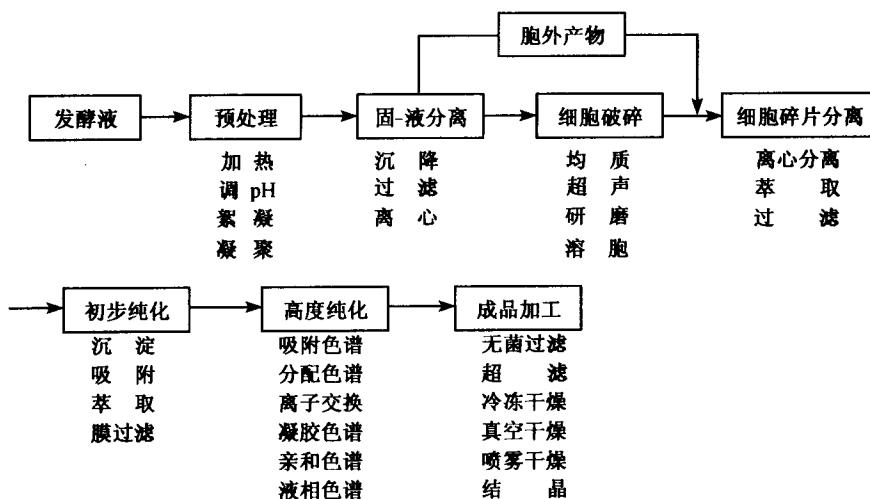


图 1-1 生物分离与纯化的一般工艺过程

1. 生物分离与纯化技术的发展史及其应用

生物分离与纯化技术至今已有几百年的历史。16 世纪人们就发明了用水蒸气蒸馏

从鲜花与香草中提取天然香料的方法，而从牛奶中提取奶酪的历史则更早。近代生物分离与纯化技术是在欧洲工业革命以后逐步发展形成的，最早的开发是由于发酵乙醇以及有机酸分离提取的需要。到 20 世纪 40 年代初，大规模深层发酵生产抗生素，反应粗产物的纯度较低，而最终产品要求的纯度却极高。近年来发展的生物技术包括利用基因工程菌生产人造胰岛素、人与动物疫苗等产品，粗产物的含量极低，而对分离所得的最终产物的要求却更高了。因而，对生物分离与纯化技术与装备的要求越来越高。

生物分离与纯化处理的是复杂的多相体系，含有微生物细胞、菌体、代谢产物、未耗用的培养基以及各种降解产物等。其中生物活性物质的浓度通常很低，如抗生素的质量浓度为 $10\sim 30\text{ kg/m}^3$ 、维生素 B_{12} 为 0.12 kg/m^3 、酶为 $2\sim 5\text{ kg/m}^3$ ，而杂质含量却很高，加之生物活性物质通常很不稳定，分离与纯化条件要求苛刻，因此分离与纯化在生物制品的生产过程中所占产品总成本的比例很大。对于抗生素而言，分离与纯化部分的投资费用约为发酵部分的 4 倍，对于基因工程药物，分离与纯化所占的费用可达到生产费用的 $80\%\sim 90\%$ 。因此，生物分离与纯化对生物制品的质量控制和生产成本控制起着十分关键的作用。

2. 生物材料的来源

生产生物药物和生物制品的主要生物资源是动物、植物、微生物的组织、器官、细胞与代谢产物。其种类主要有以下几种。

1) 动物脏器

以动物组织或器官为原料可制备 100 多种生物药物及生物制品。动物组织或器官的主要来源是猪，其次是牛、羊、家禽和鱼类等的脏器。

2) 血液、分泌物和其他代谢物

血液占体重的 $6\%\sim 10\%$ ，血液中水分占 80% ，干物质占 20% 。血液资源丰富，可用于生产药品、生化试剂、营养食品、医用化妆品及饲料添加剂等。以人血为原料生产的制品有人血制剂、免疫球蛋白、血纤溶酶原、人血白蛋白、SOD 等。以动物为原料生产的制品有凝血酶、血活素、原卟啉、血红蛋白、血红素、SOD 等。

尿液、胆汁、蜂毒等也是重要的生物材料。由尿液可制备尿激酶、激肽释放酶、蛋白抑制剂等。由胆汁可生产胆酸、胆红素等。

3) 海洋生物

海洋生物是开发防治常见病、多发病和疑难病的重要生物材料。用于生产生物制品的海洋生物主要有海藻、腔肠动物、鱼类、软体动物等。

4) 植物

药用植物种类繁多，除含有生物碱、强心苷、黄酮、皂苷、挥发油、树脂等有效药理成分外，还含有氨基酸、蛋白质、酶、激素、糖类、脂类等众多生化成分。由植物材

料寻找有效生物药物已逐渐引起重视,品种逐年增加,如伴刀豆蛋白、天花粉蛋白、人参多糖等。

5) 微生物

微生物种类繁多,资源丰富,其代谢产物有1300多种,应用前景很广。以微生物为资源,除了可生产初级代谢产物,如氨基酸和维生素外,还可用于生产许多次级代谢产物,如在抗菌治疗方面有青霉素和四环素等,在抗癌、抗真菌感染方面有丝裂霉素、灰黄霉素等。生物工程中应用的微生物主要有细菌、放线菌、真菌和酵母菌。

3. 生物分离与纯化技术的特点

生物分离与纯化是指从动植物组织、微生物培养产物或细胞培养产物中分离及纯化目的产物的过程。例如,从牛乳中分离乳清、单克隆抗体以及生产疫苗等。这些看似互不关联的产品,其生产过程却有很多共同点。大部分的产物都存在于液相溶液中,而且与其他杂质共存。正是由于存在这一共同特点,才产生了生物分离与纯化这一技术。系统地研究生物分离与纯化过程,能够揭示其内在的分离原理。利用这些原理,我们可以设计目的产物的分离与纯化方法。

由于生物物质具有生理活性或药理作用,因此在分离与纯化的过程中必须根据目标产物的特点,在保持其生物机能的前提下进行分离与纯化操作。生物分离与纯化的特点主要体现在以下几个方面。

1) 目的产物浓度低,纯化难度大

原料液中目的产物的浓度一般都很低,有时甚至是极微量的,如胰腺中脱氧核糖核酸酶的含量为0.04%、胰岛素含量为0.002%、胆红素在胆汁中含量为0.05%~0.08%,但杂质的含量却相对较高,这样就有必要对原料液进行高度浓缩。

2) 活性物质性质不稳定,操作过程容易失活

生物物质的生理活性大多是在生物体内的温和条件下维持并发挥作用的,目的产物大多数对热、酸、碱、重金属、pH以及各种理化因素都比较敏感,容易失活。外部条件不稳定或急剧发生变化,容易引起生物活性的降低或丧失。因此,为维持生物物质的活性,对分离与纯化过程的操作条件有严格的限制。

3) 生物材料中的生化组分数量大,分离困难

目的产物与杂质的理化性质如溶解度、相对分子质量、等电点等都十分相近,所以分离与纯化比较困难。

4) 生物材料容易变质,保存困难

生物材料容易腐败、染菌、被微生物的活动所分解或被自身的酶所破坏,甚至机械搅拌、金属器械、空气、日光等对生物物质的活性都会发生影响。因此,生物分离与纯

化方法的正确选择,对维持目的产物的稳定性起着至关重要的作用。

5) 生物产品质量标准高

生物产品一般用作医药、食品和化妆品,与人类生命息息相关。因此,要求分离与纯化过程必须除去原料液中的热原及具有免疫原性的异体蛋白等有害人体健康的物质,并且防止这些物质在操作过程中从外界混入。

4. 生物分离与纯化的一般工艺过程

由于生物原料明显带有生物物质的特征,因此分离与纯化工艺不能简单地应用化工单元操作。按照生产过程,生物分离与纯化一般包括原料的选取和预处理、分离提取、精制和成品制作四个过程。

生物分离与纯化应选取来源丰富的材料,尽量做到一物多用,综合利用。首先要根据目的产物的分布,选择富含有效成分的生物品种。例如,制备催乳素,首先,不要选用鱼类、禽类和微生物,应以哺乳动物为材料;其次,要选择合适的组织器官,如制备胃蛋白酶只能选用胃为原料,免疫球蛋白从血液或富含血液的胎盘组织中提取;此外,生物的生长期也是选择材料需要考虑的因素,因为生长期对生物活性物质的含量影响很大,如凝乳酶只能用哺乳期的小牛、仔羊的第四胃为材料,提取胸腺素以幼年动物胸腺为原料。

原料的预处理主要用过滤、离心等固-液分离技术。过滤和离心相比,无论是投资费用还是运转费用,前者都小得多,因而首选方法应是过滤。但因发酵液中的不溶性固形物和菌体细胞都是柔性体,细胞个体很小,特别是细菌,过滤时形成的滤饼是高度可压缩的,所以造成过滤困难。因此,凝聚和絮凝等是生物原料固-液分离时常用的辅助手段。

提取也称初步分离,其目的是利用制备目的物的溶解特性,将目的物与细胞的固形成分或其他结合成分分离,使其由固相转入液相或从细胞内的生理状态转入特定溶液环境的过程。提取可以除去与产物性质差异较大的杂质,为纯化操作创造有利条件。提取可选用的技术较多,如萃取、固相析出、膜过滤、吸附等单元操作。提取分为固-液提取和液-液提取两种。固-液提取包括浸渍(用冷溶剂溶出固体材料中的物质)与浸煮(用热溶剂溶于目的物)。液-液提取是将目的物从某一溶剂系统转入另一溶剂系统,即萃取。

精制也称高度纯化,其目的是去除与目的产物的物理化学性质比较接近的杂质。通常采用对产物有高度选择性的技术,如色谱分离和结晶技术通常能获得高纯度的目的产物。

成品制作主要是根据产品的最终用途把产品加工成一定的形式。浓缩和干燥是成品制作常用的单元操作。生物分离与纯化的一般工艺过程可用图 1-1 表示。

5. 生物分离与纯化方法的选择依据

生物分离与纯化的工艺过程首先取决于产品是胞内产物还是胞外产物。胞内产物是

指不被分泌到体外的产品,如胰岛素、干扰素、重组蛋白质产品。胞外产物是在细胞内产生,然后又分泌到胞外的产物,如抗生素、 α -淀粉酶等。另外,选择分离与纯化方法时还要考虑产品的类型、分子大小、产品的溶解度等。

生物产品中有大相对分子质量的产品,如蛋白质、酶、多糖、核酸等,所需分离过程不同于化学工业中的传统单元操作;小相对分子质量的产品包括类脂、氨基酸和次级代谢产物,如抗生素,所需分离过程在许多方面可以借鉴传统单元操作进行设计,或根据分子本身和所处系统的特殊性,在选择、设计生化产品的分离纯化工艺时,主要应考虑以下因素。

1) 生产成本

据各种资料统计,分离与纯化过程所需的费用占产品总成本的很大比例,尤其对于基因工程药物,有时分离与纯化费用占生产成本的比例可达80%~90%。因此,为了提高经济效益,产率和成本是生产企业要考虑的首要因素。

2) 原料的组成和性质

目的物在原料中的浓度高低、目的物是胞内产物还是胞外产物以及目的物的溶解性等理化性质是影响工艺条件的重要因素。生物物质的分离都是在液相中进行的,所以在选择分离方法时首先要考虑物质的分配系数、相对分子质量、离子电荷性质及数量、挥发性等因素。如果某些杂质在各种条件下带电荷性质与目的物相似,但相对分子质量、形状和大小与目的物差别大,可以考虑用离心或膜过滤或凝胶色谱法分离除去相对分子质量相差较大的杂质,然后在一定pH和离子强度范围下,使目的物变成有利的离子状态,便能有效地进行色谱分离。

3) 分离与纯化的步骤

任何产品的分离与纯化都不可能一步完成,都是多种步骤的组合。在实际生产中,要尽可能采用最少步骤,因为步骤的多少,不仅影响到产品的回收率,而且还会影响到投资和操作成本。为了提高总回收率,可以采用两种方法:一是提高各步的回收率;二是减少回收流程所需的步骤。对于某些生物大分子产品,分离与纯化可采用离子交换色谱、凝胶过滤等多种单元操作的组合,但如果采用亲和层析,虽然分离材料的投资成本会增加,但产品的一次纯化效率很高,这样会大大地降低生产成本,提高生产效率。

4) 各种分离与纯化方法的使用程序

在对生物产品进行分离与纯化时,要根据产品的特点设计各个步骤的先后次序。例如,在盐析后采取吸附法,必然会因离子过多而影响吸附效果,如果增加透析除盐,使操作复杂化。如果将步骤倒过来进行,即先吸附后盐析就比较合理。从植物材料中提取极性较大的天然活性成分,可先考虑用极性小的有机溶剂进行回流,除去低极性的脂溶性杂质,然后选择合适的有机溶剂进行萃取,分离水溶性杂质和脂溶性目的物,最后选