

41

41ZHONG SHENGWU HUAXUE CHANPIN
SHENGCHAN JISHU

41种生物化学产品 生产技术



金盾出版社

41 种生物化学产品生产技术

陈来同 唐 运 编著

金 盾 出 版 社

(京)新登字 129 号

内 容 提 要

本书选编了凝血酶、超氧化物歧化酶(SOD)、胸腺素、胸腺肽、蜗牛酶、辣根过氧化物酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶、菠萝蛋白酶、透明质酸、鹅去氧胆酸、人工牛黄、辣椒红色素以及各种生物激素、食用蛋白和食用色素等 41 种实用生物化学产品的生产技术。这些产品都以动物脏器及生物材料为原料,采用土洋结合、简单易行的生产技术,可以变废为宝,提高经济价值,具有成本低、见效快、销路好的特点。本书融科学性、技术性、通俗性、实用性于一体,可供生物化学生产技术人员开发新产品、新技术参考,亦可供生物化学科技人员及大专院校师生阅读。

图书在版编目(CIP)数据

41 种生物化学产品生产技术/陈来同,唐运编著. —北京:金盾出版社, 1994. 10

ISBN 7-80022-865-7

I. 实… II. ①陈… ②唐… III. 生物制品-生产工艺 IV. TQ464.8

金盾出版社出版、总发行

北京太平路 5 号(地铁万寿路站往南)

邮政编码:100036 电话:8214030 8218137

传真:8214032 电挂:0234

封面印刷:文物出版社印刷厂

正文印刷:2207 工厂

各地新华书店经销

开本:787×1092 1/32 印张:10.5 字数:233 千字

1994 年 10 月第 1 版 1994 年 10 月第 1 次印刷

印数:1—11000 册 定价:7.00 元

(凡购买金盾出版社的图书,如有缺页、
倒页、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

近年来,生物化学产品在国内外发展非常迅速,不少科研及生产单位都投入大量资金去开发实用生物化学药品及生物制品,以满足医药、食品及日用化工等行业的需求。生物化学药品及生物制品之所以受到人们如此重视和青睐,其主要原因是这些产品是以动物脏器及生物材料为原料生产出的,生物化学药品及生物制品的毒性一般较小,副作用少,容易被机体吸收,并有独特的医疗价值。同时,利用动物脏器及生物材料生产有用的生物化学产品,可以变废为宝,提高其经济价值,也为废弃物的深加工开辟了新途径。

为满足广大生物化学科技人员及生产专业人员对实用生物化学产品生产技术的需要,作者根据多年科研生产经验,结合我国的实际情况,编著了本书。本书力求融科学性、技术性、通俗性、实用性于一体,共选编了 41 种生产工艺简便、经济效益高的生物化学产品的生产技术。本书对产品用途、原料、生产工艺、操作步骤及分析方法,都作了较详细的阐述,并对部分市场前景日益看好的产品列出了几种不同的生产工艺,以供读者在不同条件下应用。

本书在编写过程中参阅了许多国内外的最新工艺著述,但由于生物化学产品的开发日新月异,发展迅速,加之作者水平有限,难免有不妥之处,敬请广大读者批评指正。

陈来同

于北京大学生命科学学院

1994 年 2 月

目 录

一、凝血酶的提取	(1)
二、超氧化物歧化酶(SOD)的制备	(8)
三、血红蛋白的制备	(18)
四、唾液酸的提取	(28)
五、胸腺素的提取	(31)
六、从小牛胸腺制备胸腺肽	(35)
七、人尿促性腺激素的提取	(38)
八、绒毛膜促性激素的提取	(44)
九、促黄体激素和促卵泡激素的提取	(58)
十、从男性尿液中提取尿激酶	(64)
十一、从胰脏提取胰酶	(80)
十二、蜗牛酶的制备	(91)
十三、从辣根中提取辣根过氧化物酶	(97)
十四、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的提取	(101)
十五、胰蛋白酶抑制剂的提取	(110)
十六、菠萝蛋白酶的制备	(115)
十七、从猪肾中提取蛋白酶——酰化酶 I	(120)
十八、从猪胰脏提取弹性蛋白酶	(124)
十九、复合磷酸酯酶的提取	(128)
二十、溶菌酶的提取	(130)

二十一、从毛发中提取胱氨酸	(141)
二十二、从提取胱氨酸的母液中制备精氨酸、 赖氨酸和组氨酸	(151)
二十三、鞣酸蛋白的制备	(156)
二十四、用猪血及血粉制备食用蛋白	(159)
二十五、冠心舒的制备	(163)
二十六、透明质酸的制备	(167)
二十七、甲壳质和脱乙酰几丁的制备	(175)
二十八、肝素钠的提取	(181)
二十九、胆红素的提取	(199)
三十、猪脱氧胆酸的提取	(220)
三十一、胆固醇的提取	(224)
三十二、胆酸的提取	(228)
三十三、鹅去氧胆酸的制备	(231)
三十四、人工牛黄的制备	(235)
三十五、油酸的制备	(239)
三十六、豆磷脂的制备	(243)
三十七、卵磷脂的提取	(246)
三十八、兔肝浸膏的制备	(251)
三十九、果胶的制备	(253)
四十、从辣椒中提取辣椒红色素	(258)
四十一、几种食用色素的制备	(264)
附录 生化产品提取和制备的基本技术	(270)

一、凝血酶的提取

凝血酶是机体凝血系统中的天然成分,它由两条肽链组成,多肽链之间以二硫键相连接。凝血酶在体内以凝血酶原形式存在,在一定条件下凝血酶被激活并转化为有活性的一种蛋白质水解酶。分子量 335800,白色无定形粉末,溶于水,不溶于有机溶剂。

目前国内主要从动物血浆及人血浆中制备凝血酶,再经激活物激活而成为凝血酶。它可催化血纤维蛋白原中血纤维肽 A 和 B 的断裂,转变成不溶性血纤维蛋白凝块。凝血酶在临床上应用广泛,常以干粉或溶液局部涂于伤口及手术处,控制毛细血管血液渗出,多用于骨出血、扁桃腺摘除和拔牙时出血等。有时也可口服,用于胃和十二指肠出血。凝血酶局部止血效果好,且无副作用。目前凝血酶的应用范围正日渐扩大,由单纯的局部外敷发展到外科手术、耳鼻喉、口腔、妇产、泌尿及消化道等部位出血的止血,亦可作为多种外用止血药物的重要原料,其止血效果优于“对氨基苯甲酸”、“止血环酸”、“止血敏”等通过注射后须经血管收缩而起止血作用的药物,故深受广大用户欢迎,将广泛应用于临床。由于临床使用该药日渐广泛,将使目前十分紧俏的凝血酶更趋紧缺,因此生产前景看好,只要原料有保证,技术过关,就可获得产品。

(一)原料及试剂

1. 动物血液 需选用新鲜的动物血液,防止混入其它杂质。盛血液的器具一定要干净。

2. **柠檬酸三钠**($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 又称枸橼酸钠。无色晶体或粒状粉末。相对密度 1.857。150℃时失去结晶水,温度再高则分解。溶于水,难溶于乙醇。本工艺中主要作抗凝血剂用,防止血液凝固。选用化学纯试剂。

3. **醋酸** 学名乙酸。无色澄清液体,有刺激气味。相对密度 1.049,沸点 118℃。溶于水、乙醇和乙醚。用于调节 pH 值,选用化学纯试剂。

4. **氯化钠** 白色立方晶体或细小结晶粉末。相对密度 2.165,熔点 801℃。味咸,中性。有杂质时易潮解。溶于水和甘油,难溶于乙醇。选用一级工业品。

5. **氯化钙** 白色立方晶体,易潮解,相对密度 2.15,熔点 782℃,沸点大于 1600℃,溶于水、乙醇。本工艺中用作激活剂,选用分析纯试剂。

6. **丙酮** 无色易挥发、易燃液体。有微香气味。相对密度 0.7893,沸点 56.5℃。与水、甲醇、乙醇、乙醚、氯仿等混溶。能溶解油、脂肪、树脂和橡胶。其蒸气与空气形成爆炸性混合物,化学性质活泼。本工艺中用作沉淀剂,选用化学纯试剂。

7. **乙醇** 又称酒精,无色透明易挥发、易燃的液体。有酒味和刺激辛辣滋味。相对密度 0.789。沸点 78.4℃。溶于水、甲醇、乙醚、氯仿等。有吸湿性,能与水形成共沸混合物。其蒸气与空气形成爆炸性混合物。本工艺中用来洗涤凝血酶,选用工业乙醇。

8. **乙醚** 又称二乙醚。是易流动的无色透明液体。有令人爽快的特殊气味,其蒸气能使人失去知觉,甚至死亡。相对密度 0.7135,沸点 34.5℃。难溶于水,易溶于乙醇和氯仿等溶剂,极易挥发和着火。与空气组成的混合物极易爆炸。常用作溶剂和麻醉剂。本工艺主要用于洗涤凝血酶,选用化学纯试

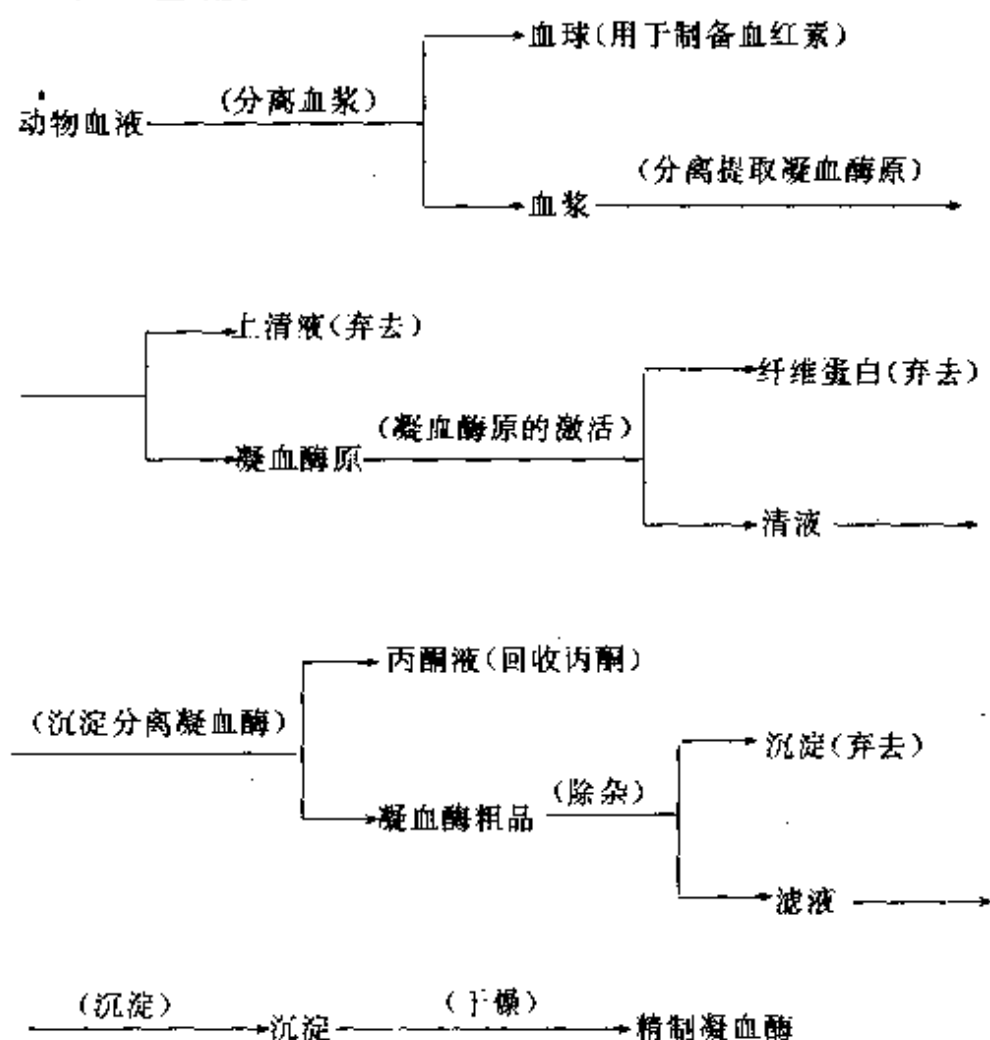
剂。使用时,操作人员应注意防护,避免吸入,周围应杜绝明火并保持空气流通。

9. 草酸钾 又名乙二酸钾。这里用于测定凝血酶活性,选用分析纯试剂。

10. 标准纤维蛋白原 这里用于测定凝血酶效价,选购药检部门提供的标准品。

(二)凝血酶的提取工艺

1. 工艺流程



2. 操作步骤

(1)分离血浆,提取凝血酶原:取动物血液,按每千克动物血液加 3.8 克柠檬酸三钠投料,搅拌均匀,装入离心管中,以 3000 转/分的速度离心 15 分钟,分出血球(可供制备血红蛋白),收集血浆。把血浆溶于 10 倍的蒸馏水中,用 1%浓度的醋酸调节 pH 值至 5.3,在离心机上离心 15 分钟,弃去上清液,收集的沉淀物即为凝血酶原。

(2)凝血酶原的激活:在 30℃条件下,将凝血酶原溶于 1~2 倍的 0.9%氯化钠溶液中,搅拌均匀,加入占凝血酶原重量 1.5%的氯化钙,搅拌 15 分钟,在 4℃下放置 1.5 小时左右,保证凝血酶原转化为凝血酶。

(3)沉淀分离凝血酶:将激活的凝血酶溶液用离心机离心 15 分钟,弃去沉淀。上清液移入搪瓷桶中,加入等量的预冷至 4℃的丙酮,搅拌均匀,在冷处静置过夜,然后用离心机分离,收集沉淀,上清液可供回收丙酮。沉淀用丙酮洗涤并研细,在冷处静置 3 天左右,然后过滤,沉淀分别用乙醇和乙醚洗涤一次,放置在下燥器或石灰缸中干燥,即得凝血酶粗品。

(4)除杂,沉淀,干燥:把粗品溶于适量(1 倍左右)的 0.9%氯化钠溶液中,在 0℃放置 6 小时以上,然后用滤纸过滤,滤出的沉淀再用 0.9%氯化钠溶液溶解,在 0℃放置 6 小时以上,过滤,合并两次滤液,用 1%醋酸溶液调节 pH 值为 5.5。然后离心,弃去沉淀,收集上层清液。在清液中加入 2 倍量预冷至 4℃的丙酮,静置 3 小时,离心 30 分钟,收集沉淀。沉淀再浸泡于冷丙酮中,静置过夜,然后过滤,沉淀分别用无水乙醇、乙醚各洗涤一次,干燥即得产品。

(三)凝血酶效价测定

1. 标准纤维蛋白测定法 凝血酶的单位定义为活度量,

即 1 毫升标准纤维蛋白原溶液在 28℃、15 秒钟内产生凝集的量为一个单位。具体做法是：将凝血酶样品配成适当浓度，取 0.2 毫升加入 0.8 毫升 0.125% 纤维蛋白原溶液，于 28℃ 测定其凝结时间（先将凝血酶配成一定浓度，测得的凝结时间去除 15，再乘以溶液浓度），得到每毫克样品所含单位的估算值。再按估算值配成 0.2 毫升含 1 个单位的凝血酶溶液，取 0.2 毫升加入 0.8 毫升 0.125% 纤维蛋白原溶液中，凝结时间需为 15 秒。

2. 草酸盐牛血清测定法 即 1 毫升草酸盐牛血清在 28℃、15 秒钟内产生凝集则含凝血酶 2.25 单位。具体做法是：7 份牛血清与 1 份等渗草酸钾溶液（1.85%）混合，离心分离得草酸盐牛血清（-40℃ 只能保存两个星期）。取几只试管，各加 0.9 毫升草酸盐牛血清，依次加入不同稀释度的凝血酶样品溶液 0.1 毫升，通过反复试验，确定适宜的稀释度，使之在 15 秒钟内产生凝集。同前面的定义一样，在 15 秒钟出现凝集的试管含 2.25 单位凝血酶。估量稀释度后，很快就可确定凝血酶原液的滴定度及每毫升或每毫克凝血酶的单位。

（四）工艺评价

国外已有报道以牛血浆为原料制备凝血酶，也可用猪血浆为原料分离制备凝血酶，以达到充分利用我国丰富的猪血资源之目的。

猪血中，血浆与血球之体积比为 55 : 45，通常 1000 毫升全血用离心机分离只能得到 500 毫升血浆。新鲜猪血不能立即进行分离，需尽快冷至 15℃ 以下（时间太长猪血会发生腐败），再进行分离。温度愈低，血浆、血球愈容易分离。用以上工艺，每 1000 毫升血浆可制得凝血酶粗品约 10 克，凝血酶精

品约 0.4 克。即粗品收率约百分之一,精品收率约万分之四。

原有的凝血酶制备方法,获得的凝血酶效价最高约每毫克干重 950 单位,即每毫克氮约 6600 单位。沃尔特等报道,经过改进的凝血酶制备方法,其分离获得效价为每毫克氮约 12000 单位的凝血酶组分。并由溶解度曲线表明制剂含有两个明显不同溶解度的活性组分,它们的效价分别是每毫克氮 10086 单位及 13365 单位,从而推断凝血酶有两个活性组分,即存在两个天然凝血酶分子。

采用一般方法制备的凝血酶通常为灰白色粉末,将其溶于生理盐水中通常得到的是半透明胶状悬浊液。这是因为含有杂质的缘故。若制备过程中采取了透析及硫酸铵进行分级分离等步骤处理,凝血酶的纯度将大大提高。其精品色雪白,极易溶于水,水溶液澄清透明,医疗价值更高。因此根据需要,可制备凝血酶制剂和高纯度凝血酶无菌冻干品。

我国猪血资源十分丰富,血浆原料充足(平均每头猪可回收血浆 1 升),血球可作为制备超氧化物岐化酶及血卟啉类等的原料,且凝血酶局部止血效果良好,具有医用价值。因此,由猪血制备凝血酶的前景是令人乐观的。

(五) 市场分析

据了解,目前国际上仅有英、美、日等少数发达国家能在低温状态下从人或牛血液的人工提取凝血酶,但因受其生产环境、血源等因素制约,其产量很小,远远满足不了市场需要,其产品主要用于生化制药产品的鉴定,很少直接用于临床,因其价格十分昂贵,很难被用户接受。当前我国主要从猪血中提取凝血酶,产品已应用于临床,但由于技术原因、原料分散等因素的制约,故产量也比较小,远远满足不了国内临床的需

求。随着凝血酶应用的不断推广,用量迅速扩大。加之世界一些地区战乱,伤病人员增加,对高效局部止血药的需求量更难以估计,产供矛盾也将更为突出,市场价格有增无减,国内外市场前景相当广阔。

凝血酶是以凝血酶原的形式存在于人或动物血液中,而我国人口众多,属于食肉大国,其动物血源均白白流失,成为污染环境的一大公害。提取凝血酶既可变废为宝,为国家创汇,而且还可解决环境污染问题,所以生产前景是乐观的。

(六) 注意事项

(1)动物血液一定要新鲜,要防止血液凝固、溶血。

(2)所用器具一定要干净,以防影响产品的纯度。

(3)试剂配制及 pH 值调节一定要准确,方可保证产品产量及质量。

(4)生产温度应控制在规定的条件下,低温提取,方可保证酶不失活。

(七) 生产设备及器具

离心机	1 台
搅拌机	1 台
布氏漏斗(9 毫米)	2 个
搪瓷桶(20 升)	4 只
温度计(0~100℃)	1 支
干燥器	2 个
天平(万分之一)	1 台
pH 试纸(1~14)	2 本

烧杯(2000 毫升)	1 只
(1000 毫升)	1 只
(100 毫升)	2 只
(50 毫升)	2 只
量筒(1000 毫升)	1 只
(500 毫升)	1 只
(100 毫升)	1 只

二、超氧化物歧化酶(SOD)的制备

超氧化物歧化酶,简称 SOD(Superoxide dismutase),是一种广泛存在于动、植物及微生物中的金属酶,至少可分为三种类型:第一种类型-Cu·Zn-SOD,呈蓝绿色,主要存在于真核细胞的细胞浆内,分子量在 32000 左右,由两个亚基组成,每个亚基含 1 个铜和 1 个锌。第二种类型-Mn-SOD,呈粉红色,其分子量随来源不同而异。来自原核细胞的分子量约为 4000,由两个亚基组成,每个亚基各含 1 个锰;来自真核细胞线粒体的-Mn-SOD,由 4 个亚基组成,分子量约为 80000。第三种类型-Fe-SOD,呈黄色,只存在于真核细胞中,分子量在 38000 左右,由两个亚基组成,每个亚基各含 1 个铁。此外,在牛肝中还存在一种-Co·Zn-SOD。

自从 1973 年 Weisiger 等在鸡肝中发现二种 SOD 以来,至今已采用了各种分离及分析方法,成功地从各种动物肝脏及血液中,分离纯化了 SOD。同时发现 SOD 的存在可能与机体衰老、肿瘤发生、自身免疫性疾病和辐射防护等有关。目前

临床上主要用于延缓人体衰老,防止色素沉着,消除局部炎症,特别是治疗风湿性关节炎、慢性多发性关节炎及放射治疗后的炎症,无抗原性,毒副作用较小,是很有临床价值的治疗酶。SOD 不仅在临床上大显身手,而且近年来又被广泛地应用于日用化工行业。含有 SOD 的化妆护肤品,对抗衰老及去除脸面雀斑等有显著作用。添加 SOD 的化妆护肤品倍受女士的青睐,其产品具有很强的竞争力。如市场上销售的奥琪、大宝、紫罗兰、永芳等高级护肤化妆品,都因添加了 SOD 而成为抢手货。随着 SOD 被广泛应用于护肤霜、洗面奶、香皂等领域及活性氧、疾病诊断和抗辐射等方面的研究,SOD 将成为广大药厂和日用化工厂的原料。目前我国大规模生产 SOD 厂家屈指可数,市场需求量大,在今后一段时间内供应将趋紧,因此充分利用动物废弃物,生产 SOD 是大有发展前途的。

(一)原料及试剂

1. **牛血或猪血** 动物血液一定要保证新鲜,无污染。
2. **氯化钠** 见“一、凝血酶的提取”。这里用于配制生理盐水,选用一级工业品。
3. **乙醇** 见“一、凝血酶的提取”。这里作溶剂用,选用工业乙醇。
4. **丙酮** 见“一、凝血酶的提取”。这里作溶剂用,选用工业丙酮。
5. **氯仿** 又称三氯甲烷。无色透明易挥发的液体。稍有甜味。相对密度 1.49,沸点 61.2℃。不易燃烧,微溶于水,溶于乙醇、乙醚、苯、石油醚等。在光的作用下,能被空气中的氧氧化成氯化氢和剧毒的光气。这里用作溶剂,选用化学纯试剂。

6. 磷酸氢二钾(K_2HPO_4)-磷酸二氢钾(KH_2PO_4)缓冲液 配制方法如下:

(1) 2.5 微摩尔/升磷酸氢二钾溶液的配制:一般市售的化学试剂其分子式为 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 称取 0.569 克溶解在 1000 克蒸馏水中, 搅拌均匀。

(2) 2.5 微摩尔/升磷酸二氢钾溶液的配制:如市售的化学试剂分子式为 KH_2PO_4 , 则在 1000 克蒸馏水中加入 0.34 克, 搅拌均匀。如果分子式为 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 则在 1000 克水中加入 0.43 克, 搅拌均匀。

(3) 缓冲溶液的配制:按上述方法配好 2.5 微摩尔/升磷酸氢二钾溶液和 2.5 微摩尔/升磷酸二氢钾溶液后, 将磷酸二氢钾溶液缓慢地倒入磷酸氢二钾溶液中, 直至调整溶液的 pH 值至 7.6 为止。

(4) 50 微摩尔/升磷酸氢二钾-磷酸二氢钾缓冲液的配制:完全照(一)6. 之(1)~(3)项进行, 只是分别将磷酸氢二钾、磷酸二氢钾的量加大 20 倍即可。

7. DEAE-Sephadex A-50 它的全称为二乙胺乙基葡聚糖凝胶离子交换剂, 具有离子交换和分子筛的双重作用。其结构多孔、疏松, 非特异性吸附很少, 层析流速易控制, 特别适用于蛋白质、酶、激素、多核苷酸等的分离纯化以及生化制剂的除热原。DEAE-Sephadex A-50 是一种阴离子交换剂, 各地生化试剂商店均有出售。

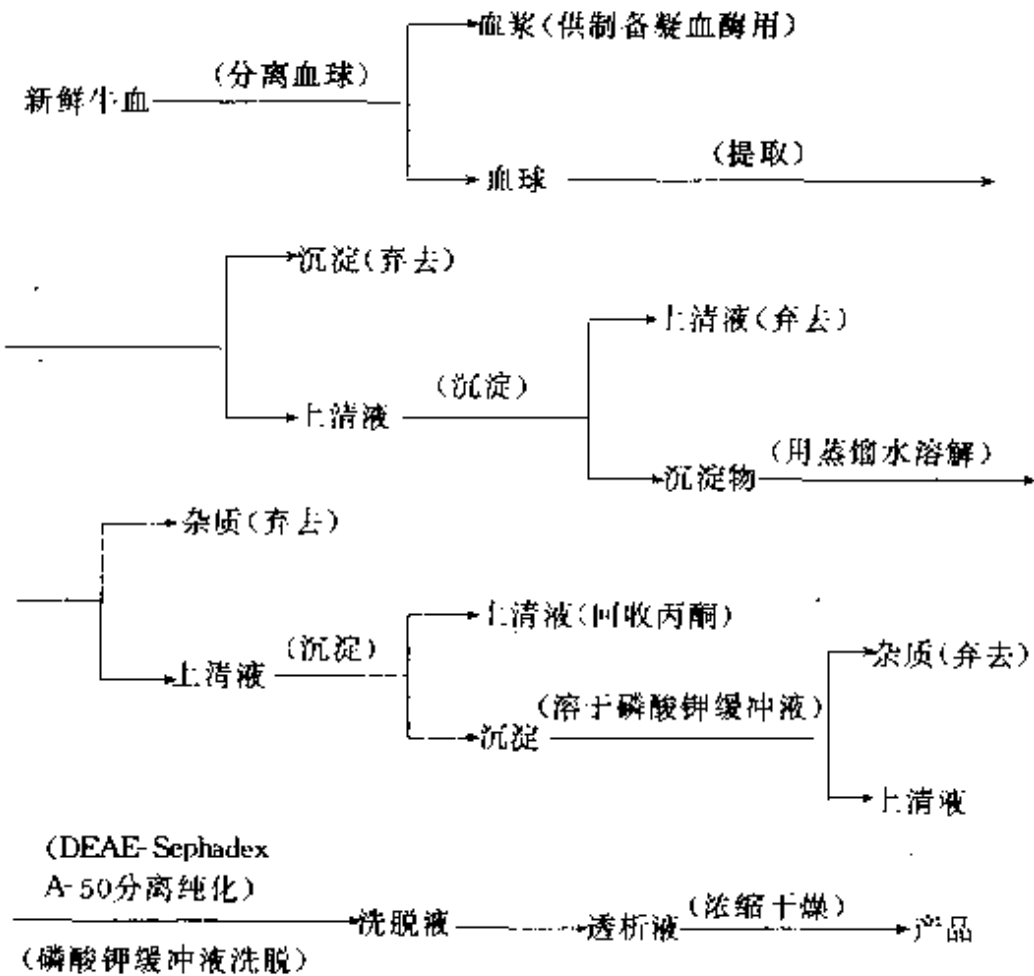
用前应预先处理, 首先将它溶于水中(或 5~10 倍量洗脱剂中), 最好将干胶往水里加, 边加边搅拌, 以防凝胶结块。在室温放置, 完全水化后, 再用水反复洗 3~4 次, 同时沥去水面上漂浮的细粉, 用抽气漏斗抽干。将抽干的胶浸泡于 0.1 摩尔/升的氯化氢溶液中 20 分钟, 滤去氯化氢溶液, 用水洗至中

性。再用 0.1 摩尔/升的氢氧化钠溶液浸泡 20 分钟,滤去氢氧化钠溶液,用水洗至中性。最后再用 0.1 摩尔/升氯化钠溶液浸泡 20 分钟,滤去酸液,用水洗至中性,然后用磷酸缓冲液浸泡平衡即可使用。交换剂使用多次后吸附量降低,可按上述方法处理一遍,以保证交换剂的交换能力不降低。

8. 柠檬酸三钠 见“一、凝血酶的提取”。这里作抗凝剂用,选用化学纯试剂。

(二)从牛血中提取 SOD

1. 加热除杂蛋白工艺流程



2. 操作步骤