

高等学校生物技术、生物工程系列教材

*Experiment in Bioseparation Engineering*

# 生物分离工程实验

(第2版)

刘叶青 主编



高等教育出版社

高等学校生物技术、生物工程系列教材

014035624

Q81-33

26-2

Experiment in Bioseparation Engineering

# 生物分离工程实验

(第2版)

刘叶青 主编

曹学君 主审



编著者 刘叶青 曹学君 主审者 曹学君 责任编辑 曹学君 封面设计 曹学君

地址 北京航空航天大学图书馆  
<http://www.buaa.edu.cn>  
<http://www.bjfu.com.cn>  
<http://www.lantern.com.cn>  
<http://www.fantasia.com.cn>

第1次印刷 2014年3月第1版  
 第2次印刷 2014年3月第2版  
 第3次印刷 2014年3月第3版  
 定价 28.00元

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第083493号  
 ISBN 978-7-04-039212-9  
 I. ①刘... II. 曹... III. ①刘... IV. ①O81...  
 北京航空航天大学图书馆藏  
 地址 北京市海淀区学院路  
 邮编 100120  
 电话 010-62412118  
 网址 <http://www.buaa.edu.cn>  
 010-62412118

Q81-33  
26-2



北航 C1723028

高等教育出版社·北京  
HIGHER EDUCATION PRESS BEIJING

SHENGWU FENLI GONGCHENG SHIYAN

## 内容提要

《生物分离工程实验》第2版是在保持第1版主要内容和特色基础上修订而成,根据学科发展和教学需要,第2版增删了一些实验内容,为部分实验制作了配套的教学课件。全书分为三篇,第一篇为生物物质分离纯化技术的基本原理,简明扼要地叙述了各种分离技术的基本原理;第二篇为13个生物分离工程基础实验,重点强调各种分离技术的参数测定及基本实验技能的训练;第三篇设计了16个大型综合实验,着重培养学生科研思维与技能。

本书内容丰富,涉及面广,实验内容不仅有常用的传统生物分离技术,如沉淀法、有机溶剂萃取法、离子交换和大网格树脂吸附法,还涉及近年来发展的各种新分离技术,包括新型的萃取技术,膜分离技术,层析(色谱)技术和电泳技术。涉及的实验材料不仅有微生物发酵液和基因工程菌的细胞培养液,还有动植物天然产物;不仅包括了中、小分子物质的分离过程,还有蛋白质和酶等生物大分子物质的分离纯化技术。

本书主要适于生物技术和生物工程专业本科生使用,也适于相关专业研究生选用,还可供科研人员查阅参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物分离工程实验/刘叶青主编. —2版. —北京:高等教育出版社,2014.3

ISBN 978-7-04-039215-9

I. ①生… II. ①刘… III. ①生物工程-分离-实验-高等学校-教材 IV. ①Q81-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第028345号

策划编辑 王莉

责任编辑 单冉东

封面设计 张楠

责任印制 张福涛

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街4号  
邮政编码 100120  
印 刷 北京市白帆印务有限公司  
开 本 787mm×1092mm 1/16  
印 张 15.25  
字 数 370千字  
购书热线 010-58581118  
咨询电话 400-810-0598

网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landracom.com>  
<http://www.landracom.com.cn>  
版 次 2007年8月第1版  
2014年3月第2版  
印 次 2014年3月第1次印刷  
定 价 26.00元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换  
版权所有 侵权必究  
物料号 39215-00

长，玉容新出香粉味，个国大汽望条新竟，空兼风马少文里下可野游因年并，平水春能千期

好景皆空出秀

春 誠

華大工要濟中元代訂平 2705

## 第2版前言

生化物质分离技术是生物工程学科中的一个重要组成部分，是生物技术、生物工程等专业学生的一门主要课程，而生物分离工程实验教学不仅能使学生更深入理解和消化课堂理论教学的知识，而且还能提高学生的实践动手能力、分析问题和解决问题的能力，同时对培养学生的科研思维能力和创新能力也大有好处，是整个教学环节中必不可少的部分。

在当今生物工程和生物技术飞速发展的时代，生物分离技术更凸显其独特的重要地位和作用。学科的飞速发展促进教学改革更上一层楼，经过不断探索和实践，我校生物分离工程课程已于2008年入选上海市精品课程，2010年入选国家级精品课程，2013年入选国家级精品资源共享课立项项目，在教学内容和教学方法上已有较大的提升。生物分离工程实验多年来也持续进行了改革，为了及时将一些新技术和新的实验教学内容体现在实验教材中，有必要将第1版教材进行修订和调整。

《生物分离工程实验》教材自2007年出版以来，被越来越多的学校在教学和科研中使用参考。本次再版，在原有基础上新增了亲和沉淀、再生型两水相萃取、金属螯合层析等新内容（见第三篇实验一、实验四和实验十六），这些新实验均来自科研成果转化而来，其内容更贴近研究和应用。为了加强学生的工程能力和操作动手能力，新增了中试规模的实验内容和放大计算，使实验更贴近于生产实际（见第三篇实验十）。另外，原第三篇实验一“四环素的沉淀法提取及鉴定”，鉴于四环素是老产品，现在已很少生产，故将其删除，其中涉及的薄层层析分离技术在新增设的第二篇实验十一中加以体现。

本书实验内容中涉及的原理主要体现在第一篇中，新增了亲和沉淀法（第一篇第四章第五节）、再生型两水相萃取（第一篇第七章第六节）和离子交换设备与过程的放大（第一篇第十一章第六节）。每个实验后的思考题中均有“预习”和“实验结果和讨论”两部分，以便于学生预习和思考。本次修订，力求选材广泛，加强实用性和可操作性，文字表达简明扼要，适合于教学和科研工作中选择使用。

为了便于学生和教师更好地理解和掌握实验内容，我们将部分实验的教学内容放在与书配套的数字课程网站上，供学生和教师参考。

参加本版编写和修订工作的编者除第1版人员外，徐环昕编写了第一篇第十一章的第六节和第三篇综合实验十；马小雷编写了第二篇基础实验十一；丁兆阳编写了第三篇综合实验一和第一篇第四章的第五节；万俊芬编写了第三篇综合实验十六；刘晶晶对第三篇综合实验四做了部分工作。此外，龚小雁、赵延斌、徐环昕等老师对本书的再版提供了部分数字资源。在本书的再版过程中曹学君教授给予了大力支持，并提供了一些素材。高等教育出版社为本书的修订再版做了大量工作，给予了许多帮助，在此一并表示衷心的感谢。

限于编者水平，书中的错误和不足之处在所难免，真诚希望广大同行和读者批评指正，并提出宝贵建议。

编者

2013年12月于华东理工大学

# 前言

本书以“十二五”期间我国经济社会发展为背景，以“十二五”规划为纲，系统阐述了我国物流业的发展现状、趋势和对策。本书共分五章，第一章为绪论，第二章为物流业的发展现状，第三章为物流业的发展趋势，第四章为物流业的对策，第五章为物流业的展望。

本书在编写过程中，参考了大量的文献资料，并得到了有关领导和专家学者的帮助。由于编者水平有限，书中难免存在不足之处，敬请读者批评指正。

编者  
2013年12月于华东理工大学

## 第1版前言

当前,在世界高新技术产业中,生物工程占据了显著的地位,在人们的生产实践和日常生活中起着越来越重要的作用。近年来,随着生物工程的飞速发展,作为生物工程学科中必不可少的“下游技术”——生物分离工程,也得到了迅猛发展,出现了许多适合大分子生化物质(如蛋白质、酶等)分离纯化的新技术,如新型的萃取技术(两水相萃取、反胶束萃取、超临界流体萃取、液膜萃取和微波萃取等),膜分离技术(微滤、超滤、纳滤和反渗透等),层析(色谱)技术(凝胶层析、亲和层析、离子交换层析和疏水层析等)和电泳技术(凝胶电泳、等电聚焦电泳等)。同时还开发和研制了新材料和先进的分离设备及仪器,以适应这些分离技术的发展。可以预料,随着生物技术产业的更迅速发展,生物分离技术的研究和开发必将更深入和广泛。因此,在生物技术和生物工程等专业建设中,生物分离工程已成为越来越重要的一门课程。

生物分离工程的不断进步,无疑给这门课程的教育改革工作带来了机遇和挑战。近年来,随着实验室建设和实验教学改革的深入开展,本专业实验教学已从原先传统分离技术的实验内容扩展到现代分离技术的实验内容,从原先单一的基本技能训练扩展到基本技能和综合性实验以及创新实验几大板块,生物分离工程实验教学已增添了许多新的内涵,本书就是在这样的背景下诞生的。近年来,国内已出版了数部有关生物分离工程方面的理论书,但是,与本门课程相配套的生物分离工程实验教材却较为匮乏,为此,作者在多年教学实践和实验室建设工作的基础上,总结了以往教学改革和科研工作的成果,编写了此书,以奉献给生物工程、生物技术专业的师生和对生物分离技术实验感兴趣的读者。希望本书对本科生(或研究生)的实验教学改革能起到启发和推进作用,使实验课程更上一个台阶。

本书内容涉及面广,实验内容基本涵盖了常见的生物分离技术,不仅保留了目前还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。涉及的实验对象不仅有微生物发酵液和基因工程菌的细胞培养液,还有动、植物天然产物的分离纯化过程;不仅包括了中、小分子物质的分离过程,还有蛋白质和酶等生物大分子物质的分离纯化过程。由于本书中的许多实验已经过校内教学试用,有些实验甚至开设过多次,有些实验是从科研成果中转化而来,因此,实验操作方法比较可靠,可操作性强。为了对实验的操作过程有更直观的认识,本书对实验所涉及的典型(或较先进)仪器设备采用了较多的插图照片,力争做到图文并茂,增添了实验操作的直观性。

本书扼要地叙述了生物分离工程实验相关的各种分离技术的基本原理,对分离技术中的各种实验技能和方法做了重点阐述。全书共分三篇,第一篇为生化物质分离纯化技术的基本原理,第二篇为生物分离工程基础实验,第三篇为生物分离工程大型综合实验。每篇的内容都以生物分离技术为主线,基础实验重点在于各种分离技术的参数测定,着重基本实验技能的训练;大型综合实验着重于工艺性研究,属于科研型的实验较多,一般都要制备得到最后产品,

对培养学生的科研思维能力和实验室动手能力大有好处。基础实验相对实验时间较短,而大型综合实验时间较长,通常应集中实验时间。对于有多个工艺条件的实验,可将学生分组,各组做不同的条件,实验结束时,将数据汇总,并进行分析和讨论,可取得很好的教学效果。为了方便实验操作的进行,本书最后的附录部分汇总了多种物性参数和常用缓冲溶液的配制方法。

本教材主要适于生物技术和生物工程专业本科生使用,也适合于相关专业研究生选择使用,还可供科研工作参考。各校可根据具体条件选择其中的部分内容进行实验。

参加本书编写工作的还有赵延斌(第三篇实验九)和沈亚领(第三篇实验十三),他们都是长期在教学和科研第一线工作的有经验教师。另外,研究生何洁敏、陈霖杰、郁晓娟、宋庆荣、王金枝和尹芳分别在第二篇实验十、第三篇实验四、实验五、实验六、实验十和实验十二中做了许多基础工作。曹学君教授在本教材的编写中给予了大力支持和帮助,并精心审校了全部书稿,在此一并表示衷心的感谢。同时也要感谢高等教育出版社在本书的出版中给予的许多帮助和认真仔细的审阅。

由于水平有限,书中错误和不足之处,敬请读者批评指正。

编者

2006年12月于华东理工大学

# 目 录

## 第一篇 生化物质分离纯化技术的基本原理

第一章 培养液的预处理 .....	3	平衡 .....	24
一、凝聚和絮凝 .....	4	三、影响萃取操作的因素 .....	25
二、加沉淀剂 .....	4	第七章 两水相萃取 .....	27
三、调节培养液的 pH .....	4	一、基本概念 .....	27
四、吸附作用 .....	5	二、成相系统 .....	28
第二章 细胞破碎 .....	5	三、分配平衡 .....	28
一、机械法 .....	6	四、影响分配系数 $K_d^*$ 的因素 .....	29
二、非机械法 .....	7	五、亲和分配 .....	30
第三章 基因工程菌包含体的分离纯化 .....	8	六、再生型两水相萃取 .....	31
一、包含体的洗涤和目标蛋白的变性 溶解 .....	9	第八章 反胶束萃取 .....	31
二、目标蛋白的复性 .....	10	一、基本概念和反胶束相系统 .....	32
第四章 沉淀法 .....	11	二、反胶束萃取过程 .....	34
一、盐析法沉淀蛋白质 .....	11	三、影响反胶束萃取的因素 .....	35
二、等电点沉淀法 .....	14	四、亲和反胶束萃取 .....	36
三、有机溶剂沉淀法 .....	15	第九章 超临界流体萃取 .....	37
四、其他沉淀方法 .....	15	一、超临界流体的特性 .....	37
五、亲和沉淀法 .....	15	二、超临界流体的溶解性能 .....	39
第五章 膜分离技术 .....	17	三、超临界流体萃取的基本操作和 设备 .....	39
一、膜分离技术的分类 .....	17	四、夹带剂对超临界 CO <sub>2</sub> 流体萃取的 强化作用 .....	40
二、膜的性能参数 .....	18	五、超临界萃取的特点和应用 .....	41
三、膜的结构和材料 .....	19	第十章 微波萃取技术 .....	41
四、膜组件型式和操作方式 .....	20	一、基本原理 .....	42
五、浓差极化 .....	21	二、微波萃取的特点 .....	42
六、影响膜分离的因素 .....	22	三、影响微波萃取的因素 .....	43
七、膜的污染和清洗 .....	23	四、微波萃取设备 .....	44
八、膜亲和过滤法 .....	23	五、微波萃取技术的应用 .....	45
第六章 有机溶剂萃取法 .....	24	第十一章 离子交换法 .....	45
一、基本原理和操作 .....	24		
二、分配系数和弱电解质的分配			



一、离子交换剂 .....	46	第十三章 色层分离法 .....	57
二、离子交换树脂的分类 .....	46	一、基本概念 .....	57
三、离子交换树脂几个主要的物理参数 .....	48	二、凝胶层析 .....	60
四、离子交换树脂的交换能力和选择性 .....	49	三、离子交换层析 .....	62
五、离子交换树脂和操作条件的选择 .....	50	四、亲和层析 .....	64
六、离子交换设备与过程的放大 .....	51	第十四章 电泳技术 .....	66
第十二章 大网格(大孔)树脂吸附法 .....	54	一、基本原理 .....	66
一、大网格树脂吸附剂的结构和类型 .....	54	二、凝胶电泳 .....	67
二、吸附等温线 .....	56	三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 .....	68
三、大网格树脂吸附法提取生化物质工艺 条件的选择 .....	56	四、等电聚焦电泳 .....	69
		参考文献 .....	72

## 第二篇 生物分离工程基础实验

实验一 絮凝技术预处理发酵液及滤饼的质量 比阻测定 .....	77	实验八 考马斯亮蓝比色法测定蛋白质 含量 .....	90
实验二 碱性蛋白酶的盐析沉淀 .....	78	实验九 离子交换树脂总交换容量的测定 .....	92
实验三 Folin 法测定碱性蛋白酶活性 .....	81	实验十 大网格吸附树脂的吸附等温线的 制作 .....	95
实验四 有机溶剂萃取法中 pH 对表观分配系数 的影响 .....	83	实验十一 薄层层析法分离鉴定熊去氧胆酸和 鹅去氧胆酸 .....	98
实验五 反胶束萃取法 pH 对萃取率的影响 .....	85	实验十二 凝胶层析法测定蛋白质相对分子 质量 .....	101
实验六 PEG/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 两水相系统的 相图 .....	87	实验十三 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳 测定蛋白质的等电点 .....	104
实验七 两水相系统中蛋白质分配系数的 测定 .....	89		

## 第三篇 生物分离工程大型综合实验

实验一 亲和沉淀法纯化牛血清白蛋白 .....	111	II 大网格树脂吸附法提取红霉素的 工艺研究 .....	122
I 亲和配基的连接 .....	111	III 比色法测定红霉素效价 .....	125
II 亲和沉淀法纯化牛血清白蛋白的工艺 研究 .....	114	实验四 可再生型两水相体系萃取红霉素的 研究 .....	127
实验二 用超滤技术浓缩和分离碱性蛋 白酶 .....	116	I 无机盐对再生型两水相体系萃取红霉 素分配系数的影响 .....	127
实验三 用两种分离技术提取红霉素的工艺 比较 .....	120	II 可再生两水相体系萃取红霉素及高 聚物的回收 .....	131
I 有机溶剂萃取法制备硫酸红霉素 的工艺研究 .....	120	实验五 用反胶束萃取技术提取胰蛋白酶 .....	133

I 反胶束萃取法提取胰蛋白酶的工艺研究..... 133	II 亲和层析法纯化目标蛋白 ..... 183
II 胰蛋白酶酶活和比活的测定方法..... 135	III SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定相对分子质量及纯度 ..... 185
<b>实验六 超临界法萃取青蒿素和高效液相色谱法检测</b> ..... 138	<b>实验十四 基因工程血管生长抑素包含体的变性和复性工艺研究</b> ..... 189
I 超临界 CO <sub>2</sub> 流体萃取青蒿素 ..... 138	I 菌体的细胞破碎和洗涤 ..... 190
II 用高效液相色谱 (HPLC) 鉴定青蒿素纯度..... 141	II 目标蛋白的变性溶解和凝胶层析纯化的工艺研究 ..... 192
<b>实验七 用微波萃取和大网格树脂吸附法提取茶多酚</b> ..... 144	III 目标蛋白的复性工艺研究 ..... 194
I 微波萃取和常规萃取提取茶多酚的工艺比较 ..... 144	IV 四唑盐 (MTT) 比色法检测细胞活性 ..... 197
II 大网格树脂吸附法精制茶多酚 ..... 147	<b>实验十五 包含体 TRAIL 蛋白的复性和纯化</b> ..... 200
III 酒石酸亚铁分光光度法测定茶多酚含量..... 149	I 包含体 TRAIL 蛋白复性的前处理 ..... 201
<b>实验八 用两种分离技术提取柠檬酸的工艺比较</b> ..... 151	II 包含体复性方法的研究 ..... 203
I 钙盐沉淀法提取柠檬酸 ..... 152	III 用亲和层析和离子交换层析法分离纯化目标蛋白复性液 ..... 206
II 离子交换法提取柠檬酸 ..... 155	<b>实验十六 金属螯合亲和层析纯化重组内酰胺酶</b> ..... 210
<b>实验九 离子交换法提取抗生素的工艺研究</b> ..... 158	I $\beta$ -内酰胺酶的诱导表达和菌体的收集破碎 ..... 210
<b>实验十 从甜菊叶中提取甜菊糖苷的小试及放大工艺</b> ..... 161	II 金属螯合亲和层析法纯化 $\beta$ -内酰胺酶 ..... 212
I 从甜菊叶中提取甜菊糖苷的小试工艺..... 162	III 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定纯度 ..... 214
II 从甜菊叶中提取甜菊糖苷的中试生产工艺..... 167	IV 酶催化反应测定酶活 ..... 215
<b>实验十一 离子交换法制备纯水</b> ..... 170	<b>附录</b> ..... 217
<b>实验十二 凝胶层析法纯化胰激肽原酶</b> ..... 174	一、实验室常用酸碱的密度和浓度 ..... 217
I Sephadex G-75 凝胶层析法纯化胰激肽原酶 ..... 174	二、一些常见蛋白质相对分子质量参考值 ..... 217
II 紫外分光光度法测定胰激肽原酶活性 ..... 178	三、一些常见蛋白质的等电点参考值 ..... 218
<b>实验十三 重组人酸性成纤维细胞生长因子的分离和纯化</b> ..... 180	四、部分常见氨基酸的等电点参考值 ..... 219
I 菌体的细胞破碎和前处理 ..... 180	五、硫酸铵饱和度计算表 ..... 220
	六、酸度计标准缓冲溶液的配制方法 ..... 221
	七、常用缓冲溶液的配制方法 ..... 222

# 第一篇

## 生物物质分离纯化技术的基本原理



人类所需的生物化工产品（如生化药物）常通过微生物发酵、酶反应、动植物机体和它们的细胞、组织大量培养而获得，但是从上述过程得到的发酵液、反应液或培养液中含有大量的杂质，人们必须通过各种分离、精制方法使所需的生物活性物质脱离原来的环境，提高纯度，从而获得达到一定质量标准的产品，以满足人们的需求，这就是生物物质的分离纯化过程。

分离纯化技术是生物工程中重要的、必不可少的组成部分，属于生物工程的下游加工过程，又称“后处理工程”或“下游工程”。因为它与产品密切相关，纯化纯度决定了产品的质量，纯化收率决定了产品的产量和成本，因此其重要性并不亚于上游工程。由于生物产品的特殊性、复杂性和对生物产品要求的严格性，导致后处理过程成本往往要占整个生物加工过程成本的大部分。例如，基因工程药物和精制蛋白质产品的纯化过程要占80%~90%，这主要是因为纯度要求高，分离难度大，步骤多。能否设计一条合理的分离纯化工艺路线关系到整个生物加工过程的成败，它常常是生物技术产品能否产业化、走向市场的关键。因此，人们逐渐认识到现代生物技术的发展是与下游分离技术的进步紧密相关的，生物分离技术已受到越来越多的重视。

20世纪80年代以来，生物技术产业迅猛发展，特别是基因工程和细胞融合等现代生物技术的惊人进步，使有限量的天然存在的生物活性物质可以通过细胞大量培养，进行商业化的规模生产。生物技术发生了质的飞跃，产品数量越来越多，出现了许多具有显著应用价值的精细生化药物，例如，用DNA重组体菌种生产的胰岛素、干扰素、白细胞介素、疫苗以及用杂交瘤技术生产的单克隆抗体等，这就促使分离纯化技术迅速发展，许多节省能耗、高分辨特性和较温和的分离技术大量涌现，使低成本、高收率、高纯度地纯化目标产物成为现实。

分离纯化过程由多个单元操作组成，可分四个阶段：预处理和过滤，初步分离，精细分离，成品加工。预处理和过滤的目的是除去对后步分离有影响的杂质，设法使生物物质转移到液相中并进行固液分离。初步分离（或称提取）过程是采取各种分离技术，除去大部分杂质，浓缩产品，制取粗制品或浓缩液。精细分离（或称精制）过程是采用高选择性的分离技术（如色谱分离技术），将产物与性质相近的杂质尽量分离，制得高纯度产物。成品加工是采用浓缩、结晶、干燥等手段，制得最终产品（浓缩液或晶体）。所以，整个分离纯化过程是一个不断浓缩、不断纯化的过程，最后得到符合要求的产品。

由于生物物质通常稳定性较差，在分离纯化过程中，应注意操作条件要相对温和，如较低的温度、适宜的pH条件等。还应采取相应措施防止产物受到空气的氧化、酶的降解和微生物污染。整个操作过程应尽可能快速。

## 第一章 培养液的预处理

发酵液或细胞培养液中的成分相当复杂，除了目标产物外，还有其他杂质，主要杂质是菌体细胞、细胞碎片、中间代谢产物、杂蛋白、核酸、脂质、糖类和无机盐等。

从各种发酵液或细胞培养液中提取生物物质的第一个必要步骤就是预处理和固液分离，主要包含如下操作：对于胞外产物应采取将部分黏附在菌体表面的目标产物转移到液相，然后固液分离除去悬浮颗粒（如培养基残渣、菌体、细胞或絮凝体等），同时还应尽可能改善滤液的性状，以利后继各步操作。对于胞内产物首先应离心收集细胞（菌体），进行细胞破碎，

使生物物质溶出到液相中，再通过离心或过滤，将目标产物与细胞碎片分离。预处理主要包括除去固体悬浮颗粒、杂蛋白质、重金属离子、色素、热源和毒素等，主要的方法有凝聚和絮凝、加沉淀剂和调节 pH 等。

### 一、凝聚和絮凝

凝聚和絮凝是最常用的预处理方法，能有效改变细胞、细胞碎片和可溶性杂蛋白的分散状态，使其聚集起来，形成大颗粒，从而提高固液分离速度。

凝聚作用是在培养液中加入某些电解质，特别是高价无机离子，促使蛋白质等胶体粒子的扩散双电层结构发生变化，使其排斥电位 ( $\zeta$  电位) 降低，并使其水化膜破坏而聚集成大颗粒。常用的凝聚剂主要是铝盐、铁盐、镁盐和锌盐等高价金属盐。

絮凝作用是加入某些高分子絮凝剂，由于高分子絮凝剂长链的吸附架桥作用，使其聚集成粗大的絮凝团。絮凝剂是一种长链、线状、水溶性的高分子聚合物。如果链上带多价电荷为离子型，不带电荷则为非离子型。它们依靠静电引力、氢键、范德华力的作用，吸附到胶粒表面，因为是长链、线状物，一根链可以分别吸附到不同的胶粒表面上，产生架桥连接，形成粗大的絮团。工业上使用的絮凝剂可分三类：第一类是人工合成的高分子聚合物，如聚丙烯酰胺类（分为阳离子型、阴离子型和非离子型）、聚丙烯酸类（阴离子型）、聚乙烯亚胺和聚苯乙烯类衍生物等；第二类是天然高分子聚合物，如壳聚糖和葡聚糖、海藻酸钠、明胶和骨胶等；第三类是无机高分子聚合物，如聚合铝盐（碱式氯化铝）、聚合铁盐等。絮凝过程中絮凝剂的相对分子质量、盐的加量、溶液的 pH、搅拌速度和时间等因素都会影响絮凝效果，选择絮凝剂时还应注意其毒性。实际使用时，常将凝聚与絮凝结合起来，可大大提高效果。

### 二、加沉淀剂

加蛋白质沉淀剂，使其形成复合物沉淀，也是一种除去杂蛋白的方法。在酸性溶液中，蛋白质能与一些阴离子，如三氯乙酸盐、水杨酸盐、钨酸盐、苦味酸盐、鞣酸盐、过氯酸盐等形成沉淀；在碱性溶液中，蛋白质能与一些阳离子，如  $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  等形成沉淀。

发酵液（培养液）中的钙、镁、铁等金属离子对后继离子交换分离技术有干扰，应在预处理时去除。除去钙离子，可加入草酸（ $\text{HOOC}-\text{COOH}$ ）。但草酸在水溶液中溶解度较小，用量大时，使用可溶性的草酸钠，反应生成的草酸钙沉淀还能促使蛋白质凝固，提高滤液质量。除去镁离子也可用草酸，但草酸镁的溶解度较大，故不能除尽镁离子。可以加入三聚磷酸钠（ $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ ），使它和镁离子形成可溶性络合物而除去。用磷酸盐处理，也能大大降低钙离子和镁离子的浓度。要除去铁离子，可加入黄血盐 [ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]，使其形成普鲁士蓝沉淀。

### 三、调节培养液的 pH

两性电解质处于等电点时溶解度最小，常可使某些杂蛋白质沉淀出来。在抗生素生产中，常将发酵液的 pH 调至 pH 4.0 ~ 5.0 的偏酸性范围或 pH 7.5 ~ 8.5 的偏碱性范围，使蛋白质凝固，一般在酸性条件下除去的杂蛋白较多。通常采用草酸或无机酸、碱来调节 pH。

#### 四、吸附作用

利用吸附作用也可除去杂蛋白质。例如，黄血盐和硫酸锌作用，生成亚铁氰化锌钾  $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$  的胶状沉淀，可吸附杂蛋白质，此法用于四环素类抗生素生产中除杂蛋白，取得了很好的效果。在枯草杆菌发酵液中，常加入氯化钙和磷酸氢二钠，这两者本身生成庞大的凝胶，把杂蛋白质、菌体及其他不溶性粒子吸附并包裹在其中而除去，从而加快了过滤速度。

## 第二章 细胞破碎

细胞破碎是提取胞内产物的关键步骤。细胞破碎的目的就是采用一定的方法，在一定程度上破坏细胞壁和细胞膜，设法使胞内的目标产物最大程度地释放出来，并通过离心（或过滤）方法将细胞碎片与某些杂质分离除去，然后才能将上清液进一步分离纯化。

不同生物的细胞结构、组成和强度不同。动物细胞没有细胞壁，外层为细胞膜，某些动物细胞原生质膜和细胞骨架相对较柔软，采取温和的操作方法，如一般的匀浆器研磨即可破坏，但存在于结缔组织中的动物细胞难分离。许多微生物细胞和植物细胞外层具有细胞壁，细胞壁内是细胞膜，通常细胞壁较坚韧而细胞膜脆弱，细胞膜主要由蛋白质和脂质组成，易受渗透压冲击破碎，所以细胞破碎的主要阻力来自于细胞壁。

细胞破碎前，通常要收集细胞，将其悬浮在一定的介质（如缓冲溶液）中，组成匀浆液，主要作用是：第一，使破碎后的释放物溶解在其中；第二，作为破碎时的冷却介质，避免某些生物高分子物质受热变性；第三，保持生化物质稳定的必要环境（如 pH）。常用的匀浆介质主要成分和作用见表 1.2.1。

表 1.2.1 常用的匀浆介质主要成分和作用

匀浆介质主要成分	作用
缓冲液	保持适宜的 pH，防止释放出来的目标蛋白失活，常用的缓冲液为 Tris 和磷酸盐缓冲液（保持生理 pH7.0~8.0）
蔗糖	防止细胞器（如线粒体、溶酶体）渗透性破裂和提高蛋白质稳定性
无机盐	由于胞内离子强度较高，常用 KCl 和 NaCl 维持其离子强度
$Mg^{2+}$	中和膜磷脂上的阴离子，保持膜系统的完整性
EDTA	螯合并除去某些二价金属离子，如 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 和 $Hg^{2+}$ 等，因为 $Ca^{2+}$ 能激活某些酶，如蛋白酶、脂肪酶和核酸酶，二价金属离子还会与巯基结合而使蛋白质失活
蛋白酶抑制剂	如 PMSF、抑肽酶等，能防止细胞破碎时释放出来的蛋白酶水解蛋白质
还原剂	如 $\alpha$ -巯基乙醇、二硫苏糖醇、半胱氨酸等，能防止蛋白质氧化
去垢剂	如 Triton X-100、SDS 等，有助于使结合在细胞膜上的蛋白质与膜分离并使胞内物质游离出来

为了适应不同类型细胞壁的破碎，已发展了多种细胞破碎方法。可归纳为机械法和非机械法两大类。

## 一、机械法

机械法具有处理量大，破碎速度较快的优点。但是所有的机械操作都会产生热量，容易使蛋白质变性，因此应采取冷却措施。通常料液（匀浆液）应预先进行冷却或破碎设备带有冷却装置，同时尽可能将破碎过程的时间缩短。

### （一）研磨法

研磨法通常是将细胞悬浮液与某些研磨剂一起快速搅拌或研磨，常用的研磨剂是玻璃小珠、石英砂或氧化铝等，利用研磨剂与细胞之间的相互剪切、碰撞，使细胞破碎。高速组织捣碎机和匀浆器是实验室规模的破碎设备。处理量较大的细胞可采用胶体磨。工业规模破碎常采用高速珠磨机，它是利用装在同轴上的圆盘搅拌器高速旋转，使细胞悬浮液和玻璃小珠相互搅动，产生剪切、碰撞而破碎。在料液出口处，玻璃小珠被阻挡，滞留在磨室内不被带出。操作过程中产生的热量，由夹套层中的冷却水带走。

破碎作用是相对于时间变量的一级反应速率过程，与搅拌转速、细胞悬浮液的浓度和循环速度、玻璃小珠的装量和珠体的直径，以及温度等因素有关。通常适当增加玻璃小珠装量、延长细胞悬浮液在磨室中的停留时间、提高搅拌转速等都有利于提高破碎速率，但是应注意控制磨室内的温度。

### （二）高压匀浆法

高压匀浆法是大规模破碎细胞的常用方法。高压匀浆机由可产生高压的正向排代泵和排出阀组成，图 1.2.1 为排出阀的结构简图。细胞浆液在高压作用下进入排出阀内，从小孔中高速冲出，撞击到撞击环上，由于突然减压和高速冲击，使细胞受到高的液相剪切力和撞击力的作用而破碎。如果料液一次通过匀浆机后的破碎率较低，可采用多次循环的方式。

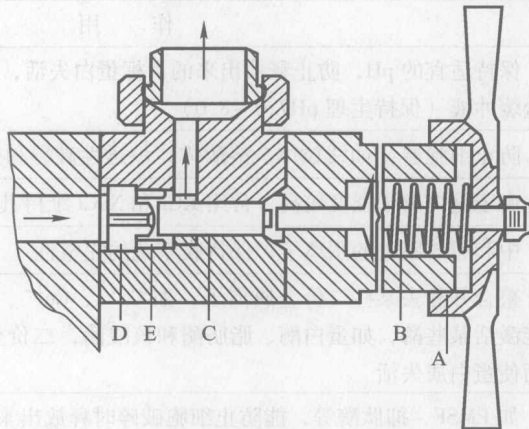


图 1.2.1 高压匀浆机排出阀的结构简图

A. 手轮 B. 阀杆 C. 阀体 D. 阀座 E. 撞击环

破碎属于一级反应速率过程。影响破碎的主要因素是压力、温度和通过匀浆器阀的次数。升



高压有利于破碎，它可以减少细胞的循环次数，使细胞碎片不至过小，从而给随后细胞碎片的分离工作带来好处。但压力也不宜过高，否则易造成匀浆机磨损。工业生产中，通常采用的压力为 55~70 MPa。由于机械法破碎过程中会使温度升高，为了保护目标蛋白的生物活性，常在料液进口处设置冷却措施，以防破碎过程中温度过高，通常控制出口料液温度为 20℃ 左右。

高压匀浆法适用于酵母和大多数细菌细胞的破碎，料液细胞浓度可达 20% 左右。由于团状和丝状真菌容易堵塞小孔，故不适宜采用高压匀浆法破碎细胞。另外，表达产物为包含体的基因工程菌，由于包含体质地坚硬，易损坏匀浆器阀，应谨慎使用。

### (三) 超声波破碎法

超声波破碎法是实验室规模应用较多的一种破碎方法。由于操作简便，料液损失少，在基因工程中，处理大肠杆菌的胞内产物常用该法。超声波振荡器具有频率高、波长短、定向传播等特点，通常在 15~25 kHz 的频率下操作。超声波对细胞的破碎作用与液体中空穴的形成有关。当超声波在液体中传播时，液体中的某一小区域交替重复地产生巨大的压力和拉力，由于拉力的作用，产生一个极为强烈的冲击波压力，由它引起的黏滞性漩涡在悬浮细胞上造成了剪切应力，促使其内部液体发生流动，而使细胞破碎。

破碎作用受声强、频率、处理时间等多种因素的影响。此外，介质的离子强度、pH、菌体的种类和浓度也有很大的影响。不同的菌种，用超声波处理的效果不同，一般杆菌比球菌易破碎，革兰氏阴性菌细胞比阳性菌易破碎，酵母菌效果较差。菌体浓度太高或介质黏度高，均不利于超声波破碎。超声波处理易引起温度急剧上升，料液需用冰水浴冷却。由于大规模操作过程中产生的热量不容易驱散，而且声能传递也有困难，故超声波破碎法一般不适用于大规模的工业操作。

## 二、非机械法

非机械法包括酶解、化学法、渗透压冲击、冻结-融化和干燥法等。

### (一) 酶解法

酶解法是在一定的反应条件（如温度和 pH）下，利用酶促反应特异性水解细胞壁上某些键，达到破碎目的。可以在细胞悬浮液中加入特定的酶，也可以利用自溶作用。

常用的酶有溶菌酶，主要作用于细菌类细胞壁。此外，还有蛋白酶、脂肪酶、核酸酶、透明质酸酶、甘露糖酶、葡聚糖酶、肽链内切酶和壳聚糖酶等，主要对酵母作用。几丁质（壳多糖）酶可处理丝状真菌。常将几种酶混合使用，效果更好。

酶解法的特点是专一性强，在选择酶系统时，必须根据细胞的结构和化学组成来选择。溶菌酶能专一性地分解细胞壁上肽聚糖分子的  $\beta$ -1,4-糖苷键，对某些革兰氏阳性菌，如巨大芽胞杆菌、枯草杆菌、微球菌等效果很好。但是，处理革兰氏阴性菌必须将溶菌酶与螯合剂 EDTA（乙二胺四乙酸）联合使用，主要是因为革兰氏阴性菌结构中肽聚糖含量少，并处于细胞壁内层，外表面含有大量脂质（脂蛋白、脂多糖），而脂多糖层需钙、镁离子才能维持稳定性，故需利用 EDTA 除去钙、镁离子，使脂多糖分子脱落，外层膜出现洞穴，溶菌酶才能透过外膜层进入，从而发挥作用。

酶解法具有条件温和，产物释放的选择性好，细胞外形较完整，不产生细胞碎片，便于后步分离等优点。但由于酶成本较高，一般只适于小规模应用。目前在原生质体融合和基因工程