

# 双水相萃取分离技术的评价和展望

谭 天 伟

(北京化工大学化工系, 北京 100029)

沈 忠 耀

(清华大学化工系, 北京 100084)

自1956年瑞典伦德大学的 Albertsson 发现双水相体系<sup>[1]</sup>到1979年德国 GBF 的 Kula 等人将双水相萃取分离技术应用于生物产品分离<sup>[2]</sup>, 虽然只有20多年历史, 但由于其条件温和, 容易放大, 目前已成功地应用于蛋白质、核酸和病毒等生物产品的分离纯化<sup>[2]</sup>。双水相体系也已被成功地应用到生物转化及生物分析中<sup>[3]</sup>。国内自80年代起已开展了双水相萃取技术的研究<sup>[4]</sup>。

## 1 双水相萃取与传统方法的比较

在生物发酵产品制备中, 细胞或细胞碎片的除去是整个分离纯化的第一步。传统分离方法主要采用离心法及过滤法。这两种方法在实际应用中都有一定的缺点, 如离心法能耗高, 过

滤法膜孔容易堵塞<sup>[5]</sup>。双水相萃取法, 整个操作可以连续化, 除去细胞(细胞碎片)的同时, 还可以纯化蛋白质2~5倍。表1是在除去细胞碎片时, 各种方法的比较<sup>[5]</sup>。在除去细胞碎片时, 双水相萃取分离技术是传统的过滤法和离心法所无法比拟的。

和传统的酶粗分离方法(如盐析或有机溶剂沉淀)相比, 双水相萃取分离技术也有很大的优势。表2是在 $\beta$ -半乳糖苷酶纯化中, 沉淀法和双水相萃取的比较<sup>[5]</sup>。

一般说来, 传统的分离方法达到与双水相萃取相同处理量时, 需要比双水相萃取多3到10倍的设备, 而且传统分离方法放大困难。

表1 不同方法除去细胞碎片的比较

| 方法                       | 细胞量<br>(kg) | 体积<br>(L) | 浓度<br>(kg/l) | 处理量<br>(l/h) | 时空产量<br>(kg/l.h) | 收率<br>(%) | 浓缩<br>倍数 | 时间<br>(h) | 成本<br>(\$) |
|--------------------------|-------------|-----------|--------------|--------------|------------------|-----------|----------|-----------|------------|
| 双水相萃取碟式                  |             |           |              |              |                  |           |          |           |            |
| 离心机连续分离                  | 100         | 330       | 0.3          | 120          | 0.11             | 90        | 3~5      | 3         | 7.800      |
| 碟式离心机间歇离心                |             |           |              |              |                  |           |          |           |            |
| $\Sigma: 7000\text{m}^2$ | 100         | 1000      | 0.1          | 100          | 0.01             | 85        | 1        | 10        | 30.000     |
| 转鼓式过滤器                   |             |           |              |              |                  |           |          |           |            |
| A: $1.5\text{m}^2$       | 100         | 500       | 0.2          | 60           | 0.02             | 85        | 1        | 8.3       | 46.000     |
| 中空纤维错流过滤                 |             |           |              |              |                  |           |          |           |            |
| A: $10\text{m}^2$ (a)    | 100         | 200       | 0.05         | 200          | 0.005            | 85        | 1        | 10        | 25.000     |
| $20\text{m}^2$ (b)       | 100         | 400       | 0.03         | 400          | 0.003            | 85        | 1        | 10        | 40.000     |

(a) 酶滞留比  $R=0$  (b) 酶滞留比 0.7

近年来, 亲和双水相萃取的出现, 大大地提高了双水相萃取的选择性, 而且亲和双水相萃取比双水相萃取具有更大潜力, 因其传质阻力

小, 处理量大等。目前延胡索酸脱氢酶<sup>[6]</sup>和乳

酸脱氢酶的双水相萃取纯化工艺<sup>[7]</sup>,均已达到中试规模。

表2  $\beta$ -半乳糖苷酶不同纯化方法比较

| 方法     | 步骤数 | 流量<br>(kg/h) | 酶收率<br>(%) | 纯化<br>倍数 | 总纯度<br>(%) |
|--------|-----|--------------|------------|----------|------------|
| 沉淀法    | 3   | 0.77         | 63         | 3.5      | 23         |
| 双水相萃取法 | 1   | 10~15        | 77         | 12.8     | 43         |

虽然双水相萃取技术在蛋白质分离中具有很大潜力,但目前真正工业化的例子却很少。主要原因是大规模分离时,双水相萃取的成本较高,使得其技术上的优势下降。大规模分离中,双水相萃取总成本中主要是原料成本(90%以上)。原料成本和生产规模成正比,因而随着生产规模的加大,总成本增加很大。传统的分离方法中,总成本中主要是设备投资,而设备投资并不与生产规模成正比。因而使得大规模分离时,双水相萃取没有优势可言。

降低双水相萃取体系的原料成本,是发挥其技术优势的关键,即在选择实用的双水相体系时,必须考虑成相组分的价格及后续纯化工艺中成相组分的回收。

## 2 高聚物/高聚物体系和PEG/盐体系的比较

目前已有的十余种双水相体系,可分为两大类:高聚物/高聚物体系,高聚物/低分子物质体系。PEG/盐体系由于价廉而成为最为常见的高聚物/低分子物质体系。但随着研究的深入,也发现了PEG/盐体系中的一些问题,下面就这两类体系作一全面的比较。

### 2.1 分配特性的比较: PEG/盐体系中,细胞及细胞碎片主要分配在盐相中,但在高聚物/高聚物体系中,细胞可能分配在上相、下相或两相界面上。蛋白质在两相中的分配取决于很多因素如高聚物分子量、浓度、pH及盐浓度等。在PEG/盐体系中,由于盐分子具有很强的亲水性及较高的两相界面电位差(上相为正,下相为负)。一般蛋白质主要分配在下相,只有疏水性很强的蛋白质或等电点较低的蛋白质,才有可能分配在上相中。

亲和分配一般不能在PEG/盐体系中进行<sup>[8]</sup>,由于高盐浓度减弱了亲和配基和蛋白质之间的亲和作用。亲和分配可在高聚物/高聚物体系中进行,因而高聚物/高聚物体系具有更大的通用性。

### 2.2 后续纯化工艺的比较: 蛋白质产品的纯度要求都较高,而双水相萃取一步的纯化倍数只有2~5倍,因此如何将蛋白质从上相中分离出来,进一步纯化也是一个值得研究的课题。常用的方法有反萃、膜分离和有机溶剂沉淀。反萃是在PEG相中加入另一盐相,形成新的双水相体系,将蛋白质萃入盐相,回收PEG,方法虽简单,但并没有解决蛋白质的纯化问题。用膜分离可以分离PEG和蛋白质,如Strandberg用超滤技术分离 $\beta$ -半乳糖苷酶和PEG获得成功<sup>[9]</sup>。但PEG分子对膜孔有堵塞作用。有机溶剂沉淀可分离PEG和蛋白质,但分离效率不高。

目前蛋白质纯化方法中最为有效的方法是层析,其中离子交换层析又是最常用的方法。对于PEG/盐体系,由于盐浓度太高,无论是PEG相或盐相都不能直接上柱。Hustedt等人研究了用超滤方法脱盐,然后上柱纯化普鲁兰酶<sup>[10]</sup>,但此工艺过于复杂。

高聚物/高聚物体系可以直接用离子交换柱处理。谭天伟等人采用PEG/Reppal PES体系结合DEAE-Sephrose Fast Flow离子交换层析成功地从黄豆中提取了磷酸甘油酸激酶(PGK)和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)<sup>[11]</sup>,离子交换层析一步可纯化酶20倍以上,而且回收了高聚物,使成本大大降低。

### 2.3 废水处理比较: 废水处理在双水相萃取分离技术应用到大规模分离纯化时,是一个不可忽视的问题。对于PEG/盐体系,废盐水的处理比较困难,不能直接排入生物氧化池中。Greve等人首先研究了用酒精萃取盐工艺<sup>[12]</sup>,即在盐相中加入酒精萃取盐,然后采用蒸发酒精回收盐。Kula等人研究了利用可生物降解的柠檬酸盐取代传统的硫酸盐和磷酸盐<sup>[13]</sup>,但PEG/柠檬酸盐体系不能用于带有金

属离子辅基的蛋白质分离纯化。与此相比,高聚物/高聚物体系不会造成严重的环境污染,由于成相组分主要为无毒的淀粉或纤维素衍生物,比较易于生物降解。

**2.4 体系成本比较:** PEG/盐体系成本只有高聚物/高聚物体系的1/3到1/5,比较适合工业规模的应用<sup>[14]</sup>。

### 3 双水相萃取分离技术的发展方向

**3.1 新型双水相体系的开发:** 新型双水相体系主要有两类: 廉价高聚物/高聚物体系及新型功能双水相体系。

廉价双水相体系的开发目前主要集中在寻找一些廉价的高聚物取代现用昂贵的高聚物。Krone(1981)首先利用粗 dextran 取代 dextran<sup>[15]</sup>, Folke(1987)用变性淀粉 PPT 取代 dextran<sup>[7]</sup>, David(1988)用麦芽糊精<sup>[16]</sup>, Alka(1989)用阿拉伯树胶取代 dextran<sup>[17]</sup>, Skuse(1992)利用羟丙基纤维素取代 PEG, 获得一定成功<sup>[18]</sup>, 谭天伟(1994)曾对 PEG/高聚物体系进行了系统的比较<sup>[14]</sup>。

新型功能双水相体系是指高聚物易于回收或操作简便的双水相体系。Alred<sup>[19]</sup>采用乙烯基氧(ethylene oxide)与丙烯基氧(propylene oxide)的共聚物(商品名 UCON)和 PEG 可形成温敏性双水相体系。常温下, PEG、UCON 和水混和后为均相体系, 当加热到 40℃ 时, 形成两相体系, 上相为 PEG 和 UCON, 下相主要为水。采用 UCON 作为亲和配基载体, 常温下将目标酶专一性萃入 PEG 相中, 加热后形成新的双水相体系, 此时酶转入水相, 从而可以循环 PEG 和 UCON。

Kula<sup>[20]</sup>等人开发了一种表面活性剂(Triton)和水形成的温敏性双水相体系。当温度高于体系浑浊点(cloud point)时, 表面活性剂和水形成双水相体系, 上相为表面活性剂相, 下相为水。表面疏水性强的蛋白易于分配在表面活性剂相中, 而菌体和亲水性蛋白主要分配在水相中。利用表面活性剂双水相体系纯化胆固醇氧化酶, 酶收率达 90%。

**3.2 后续色谱纯化工艺研究:** 双水相萃取技

术在蛋白质的粗分离纯化中具有很大的技术优势。但若使双水相萃取真正工业化, 还必须解决双水相萃取与层析技术相结合的问题。高聚物/高聚物双水相萃取同离子交换层析结合的成功为这个问题的解决开辟了新路。PEG/盐体系具有价廉和分相容易的优点, 而疏水色谱又可在高盐浓度下操作, 因而 PEG/盐体系与疏水色谱相结合有很大潜力。Schutte<sup>[21]</sup>成功地利用疏水色谱从盐相中分离纯化蛋白质。

**3.3 金属亲和双水相萃取技术:** 亲和双水相萃取是一种高效生化分离技术, 目前亲和双水相萃取亲和配基有抗体、活性染料和凝集素等<sup>[6,7]</sup>。这些亲和配基有一个缺点, 即不能在高盐浓度下操作, 使得廉价的 PEG/盐体系不能用于亲和分配。Arnold<sup>[22]</sup>提出了金属离子亲和双水相萃取, 其利用金属离子和蛋白质中精氨酸、组氨酸的亲和作用, 达到分离和纯化蛋白质目的。目前金属离子亲和双水相萃取已应用于多种酶的分离纯化<sup>[23]</sup>。金属亲和双水相萃取和普通亲和双水相相比, 具有以下优点: 亲和配基价廉; 可用于 PEG/盐体系, 成本低; 亲和配基再生容易。

双水相萃取分离技术是一种新型的生物大分子分离技术, 由于其条件温和, 容易放大。但目前双水相萃取技术应用的主要问题是原料成本高及纯化倍数低。开发廉价双水相体系及后续层析纯化工艺, 降低原料成本, 采用新型亲和双水相萃取技术, 提高分离效率将是双水相分离技术的主要发展方向。

### 参 考 文 献

- [1] Albertsson P A. Partition of Cell Particles and Macromolecules, 3rd, Wiley and Son, New York, 1986.
- [2] Kula M R, Krone K H, Hustedt H. Advances in Biochemical Engineering, edited by Fiechte A, Berlin, Heideberg, New York 1982, 24: 73~118.
- [3] Walter H, Brooks D E, Fisher D. Partition in Aqueous Two Phase Systems, Academic Press New York, 1985.
- [4] 谭天伟, 陈晓芦, 沈忠耀. 中国抗生素杂志, 1989, 14(4): 239~242.
- [5] Krone K H, Hustedt H, Kula M R. Process (下转第 363 页)

(上接第 370 页)

Biochemistry, 1984, 119: 170~176.

- [6] Cordes A, Kula M R. J. Chromatography, 1986, 376: 375~384.
- [7] Tjerneld F, Johansson G, Joelsson M. Biotechnology Bioengineering, 1987, 30: 809~816.
- [8] Krone K H, Cordes A, Schelper A *et al.* Affinity Chromatography and Related Techniques, edited by Cribnau T C T, Visser J, Nivard R J. New York, 1982, 491~501.
- [9] Strandberg L, Kohler K, Enfors S O. Process Biochemistry, 1991, 26: 225~234.
- [10] Hustedt H, Krone K H, Starch W *et al.* Biotechnology Bioengineering, 1978, 20: 1989~1995.
- [11] 谭天伟, 沈忠耀. 高校化学工程学报, 增刊, 1994, 8: 77~79.
- [12] Greve A, Kula M R. Bioprocess Engineering, 1991, 6: 173~177.
- [13] Vernau J, Kula M R. Biotech. Appl Biochem, 1990, 12: 397~404.
- [14] Tan Tianwei, Shen Zhongyao. International Sympo-

sium on Thermodynamics in Chemical Engineering and Industry, Beijing, 1994, 171~175.

- [15] Krone K H, Hustedt H, Kula M R. Biotechnology Bioengineering, 1982, 24: 1015~1025.
- [16] David C S, Kenneth A G. Biotechnology Techniques, 1988, 2(4): 277~282.
- [17] Rastogi A, Chand S. Biotechnology Techniques, 1989, 3(1): 33~38.
- [18] Skuse D R, Norris R, Yalpani M *et al.* Enzyme Microb. Technol., 1992, 14: 1785~1790.
- [19] Alfred P A, Tjerneld F, Kozlowski A *et al.* Bioseparation, 1992, 2: 363~373.
- [20] Kula M R. 11st International Enzyme Engineering Conference, Hawaii USA, 1991.
- [21] Schutte H, Papamichael N, Paulsen J *et al.* Proc. 3rd International Conf. on Fundamentals of Absorption Engineering Foundation, New York, 1990.
- [22] Plunkett S D, Arnold F H. Biotechnology Techniques, 1990, 4(1): 45~49.
- [23] Van Dam M E, Wuenschnell G E, Arnold F H. Biotech. Appl. Biochem., 1989, 11: 492~498.