

超滤法及其应用

中国科学院上海生物化学研究所三室

超滤法是一种根据溶液中分子的大小和形态,在埃(10^{-8} 厘米)数量级选择性过滤的技术。这种方法,在一定的压力下(外源N₂压或真空泵压),使溶剂和较小分子的溶质能通过一定孔径的薄膜,大分子的溶质则不能透过,从而可以使高分子物质脱盐、脱水 and 浓缩;在一定的条件下,还可以起到分离和纯化的作用。从另一角度来看,超滤也可以认为具有溶液相的分子筛作用,根据所用超滤膜的型号不同,可以在分子量500—100,000内进行筛分。

超滤主要作为一种浓缩蛋白质和酶的方法,具有三大优点:(1)在整个工作过程中,条件温和。与蒸发、冻干等其它方法相比,没有相的变化,可以维持原来的pH和离子强度,并可在低温下操作,这样就不致使蛋白质和酶在浓缩过程中变性、失活或自溶。因此对不稳定酶的浓缩尤其适用。(2)应用过程中不需添加任何化学试剂,设备和运转费用均较低廉,是一种比较经济的方法。(3)在浓缩的同时还可以除去一些低分子量的物质,具有一定的纯化作用。如果在分级分离的方法学方面获得较大的进展,可以预见,超滤法在蛋白质和酶的分离提纯上,将会起相当大的作用。

近年来,超滤法越来越多地为生物制品工业、食品工业、多聚物工业以及三废处理等方面广泛地采用。当然,超滤法也有一定的局限性,例如它和其他浓缩方法相比,不能直接得到干粉制剂,对于蛋白质溶液一般只能得到10—50%的浓度。

膜

膜在超滤技术中是一个关键的部分。膜有各种不同的类型和规格,可根据工作的需要来选用。目前常用的一些膜的规格见表1。

1. 膜的结构

早期的膜是各向同性的均匀膜,即现在常用的膜滤技术中使用的微孔薄膜。Millipore公司生产的各种微孔薄膜的孔径见图1。其中0.05微米和0.025微米孔径的膜曾经用作超滤。近几年来发展了一些各向异性的不对称超滤膜。一种各向异性扩散膜是由一层非常薄的、具有一定孔径的多孔“皮肤层”(厚约0.1—1.0微米),和一层相对厚得多的(约1毫米)更易通渗的、作为支撑用的“海绵层”组成(图2b)。皮肤层决定了膜的选择性,而海绵层增加了机械强度。由于皮肤层非常

表1 常用各向异性超滤膜

型 号	制造单位 ¹⁾	组 成	水 通 透 性 100 psi ²⁾ 时的流速 (毫升/厘米 ² /分)	分 子 量 截 止 值 (保留80—100%)
	1	纤维型		
Diaflo UM-05	2	高分子电解质络合物	0.05	350 (蔗糖)
Diaflo UM-2	2	高分子电解质络合物	0.1	600 (棉子糖)
Diaflo UM-10	2	高分子电解质络合物	0.3	10,000 (葡聚糖 10)
Diaflo PM-10	2	芳香族多聚物	0.5	10,000 (细胞色素 C)
Diaflo PM-30	2	芳香族多聚物	0.7	30,000 (卵白蛋白)
Diaflo XM-50	2	烯类物质	0.7	50,000 (白蛋白)
Diaflo XM-100	2	烯类物质	0.9	100,000 (7s 球蛋白)
Diaflo XM-300	2	烯类物质	1.1	300,000 (脱铁蛋白)
HFA-100	3	醋酸纤维	0.07	10,000 (葡聚糖 10)
HFA-200	3	醋酸纤维	0.40	20,000 (葡聚糖 20)
HFA-300	3	醋酸纤维	1.40	70,000 (白蛋白)
PSAC	4	纤维型	1.2	1,000 (溴甲酚绿)
PSFD	4	纤维型	0.75	25,000 (α -胰凝乳蛋白酶)
PSDM	4	纤维型	1.0	40,000 (卵白蛋白)

1) 1—上海医药工业研究院; 2—Amicon Corp.; 3—Abcor Inc.; 4—Millipore Corp.

2) 14.70 psi = 1 大气压

薄,因此高效、通透性好、流量大,且不易被溶质阻塞而导致流速下降。Amicon 公司生产的各种 Diaflo 薄膜即

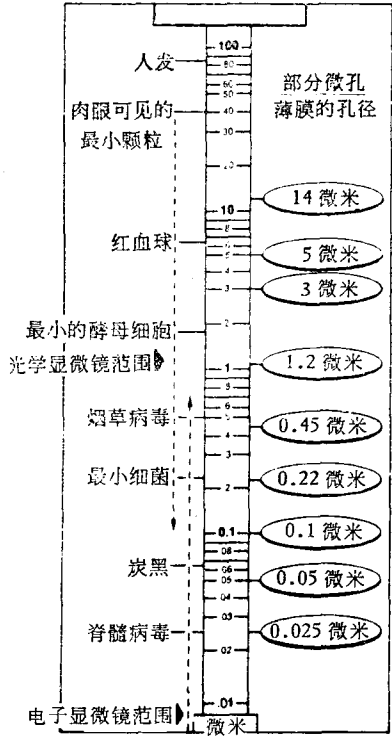


图1 微孔薄膜孔径和细菌、微粒子大小的比较

属于这种类型,它的型号参见表1和表2。另一类各向异性的微孔膜,如 Abcor 公司生产的各种 HFA 型超滤膜(图 2c),它的纵切面呈喇叭口型。显然它也要比毛细管型的各向同性超滤膜性能好,流量大,亦不易被溶质阻塞。

上述各种膜有不同的大小(直径由 13 毫米到数百

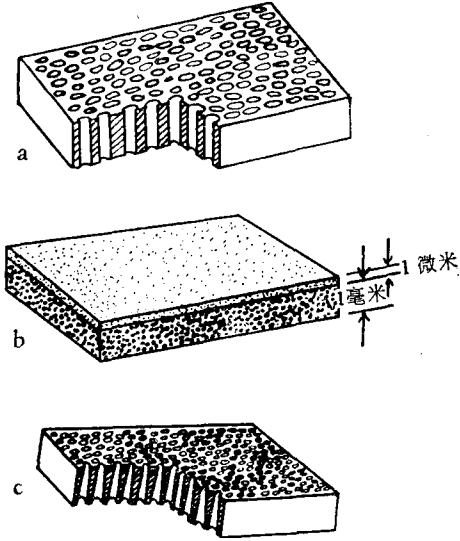


图2 不同类型超滤膜的纵切面模式图

a——各向同性微孔膜; b——各向异性扩散膜; c——各向异性微孔膜

表2 Diaflo 超滤膜的溶质分子保留百分数(%)

溶 质	分子量	UM-05*		UM-2	UM-10	PM-10	PM-30	XM-50	XM-100
		pH 5	pH 10						
D-丙氨酸	89	80	15	0	0	0	0	0	0
DL-苯丙氨酸	165	90	15—20	0	0	0	0	0	0
色氨酸	204	80	15—20	0	0	0	0	0	0
蔗 糖	342	80	80	60	10	0	0	0	0
棉子糖	594	90	90	80	50	5	0	0	0
杆菌肽	1,400	75	75	60	50	35	20	0	0
细胞色素C	12,400	>95	>95	>95	90	90	0	0	0
聚乙二醇	16,000	>95	>95	>95	80	—	—	—	—
肌红蛋白	17,800	~100	>95	>95	<95	90	65	0	0
α-胰凝乳蛋白酶	24,500	~100	~100	~100	>95	70	—	0	0
胃蛋白酶	35,000	~100	~100	~100	~100	>95	85	80	0
卵白蛋白	45,000	~100	~100	~100	~100	~100	>95	80	0
血红蛋白	64,000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	90	0
人血清白蛋白	67,000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	90	10
葡聚糖 110	110,000	~100	~100	~100	~100	30	20	10	0
醛缩酶	142,000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	>95	20
γ-球蛋白	160,000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100	90
脱铁蛋白	480,000	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100

* 离子交换膜

毫米)。此外,还有螺旋膜、管形膜和空心纤维丝膜^[1]。

2. 膜的化学组成和稳定性

膜一般由醋酸纤维或硝酸纤维或此二者的混合物制成。近年来为适应制药和食品工业上灭菌的需要,发展了非纤维型的各向异性膜。这种膜在pH1—14都是稳定的,且能在90℃下正常工作。超滤膜通常是比较稳定的,若使用恰当,能连续用1—2年。暂时不用,可在1%甲醛溶液或者50%甘油溶液中保存。

仪器设备

现有约十个厂商生产超滤仪器设备,大体上可分为四种类型:静止态型,搅拌或震动型,错流湍动型,错流薄层层流型(图3; Methods in Enzymol., 22, 39, 1971)。Charm和Lai曾对过氧化氢酶用PM-30膜比较了各类仪器流速性能和酶的失活情况(Biotech. Bioeng., 13, 185, 1971)。

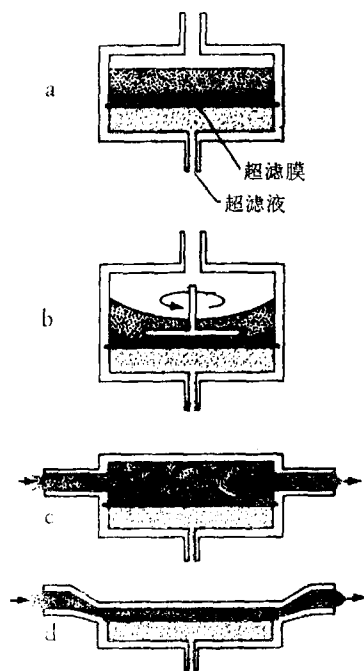


图3 几种类型超滤器的模式图

a——静止态型; b——搅拌型; c——错流湍动型; d——错流薄层层流型

1. 静止态型

这是一种早期的超滤器,类似目前的膜滤技术。它极易形成浓度极化现象而引起流速下降,现在一般已不采用。

2. 搅拌或震动型

膜简单地安置在多孔支持物上,在膜上端有搅拌装置或震动装置,这样能使膜表面累积的大分子层分散到溶液中去,减低了浓度极化现象。在这种系统中,

单位时间内通过液体的体积与可交换面积成正比,压力可加到4—5大气压。这类仪器在实验室最常用。图4是我所仿制产品,超滤杯(3)由聚碳酸酯材料制成,超滤膜(7)放置多孔聚乙烯一类物质的支持片(8)上;搅拌磁芯(9)用聚四氟乙烯或有机玻璃封闭,仪器的顶部(2)和底座(5)由尼龙制成,联结部分均由硅橡胶的环状垫圈(4)借不锈钢的固定架(1)夹住;顶部有一安全阀(6),此处旋开可以进样,工作时拧紧,顶部侧边是N₂压进口装置(10),底座上有超滤液的出口(11)。整个仪器置于电磁搅拌器上工作。超滤杯容量10毫升,搅拌最小有效体积为1毫升,超滤膜直径2.5厘米,有效膜面积3.6平方厘米,最大工作压力约5大气压。这种仪器也可扩大超滤杯容量到数百毫升。

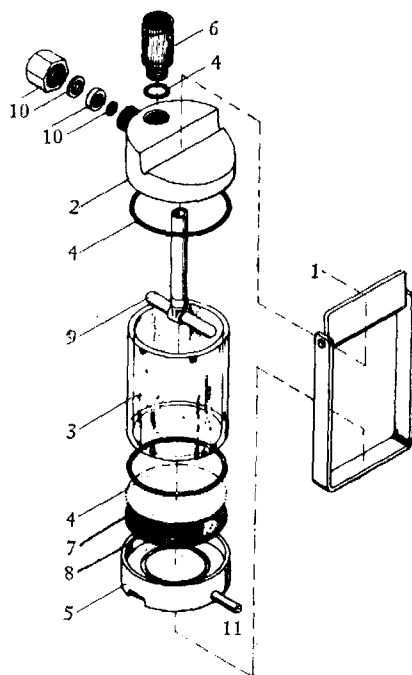


图4 搅拌型超滤器

1——固定架; 2——顶部; 3——超滤杯;
4——环状垫圈; 5——底座; 6——安全
阀; 7——超滤膜; 8——多孔支持片;
9——搅拌磁芯; 10——N₂进口装置;
11——超滤液出口

3. 湍流型

它是在比较大的管道(25.4毫米或更大直径的管道)中与膜平行方向引入高速流动的液体,在管内产生湍流现象(图3c)以减少浓度极化现象。超滤液与膜成垂直方向流出。

4. 薄层层流型

这类设备在实验室和工业生产中应用极广,还可能进一步发展。它是在很薄的管道(约0.5毫米)中与膜平行方向引入高速薄层液体流,流速可达3—30

米/秒，因此这类仪器所能处理的液体量是相当大的。被处理的溶液高速流动，超滤效果可能受到一些影响，但它流过的膜表面积比搅拌型要大得多，同时还可采用循环超滤的方法，所以在总效果上仍优于搅拌型。在处理稀溶液时，达到同样效果，其速度要比搅拌型快2—6倍。在处理高浓度溶液或粘性液体时，优点更加显著。属于这一类型的仪器设备有：

(1) 连续超滤器 其示意图见图5，适用于实验室大量处理样品或小型工业生产。溶液由底部进入，通过浅螺旋形的薄层管，薄层管壁有膜，溶液渗过膜而滤出来，保留的大分子溶质液体由底部薄层管末端流出来，收集后作为浓缩液或供循环超滤用。

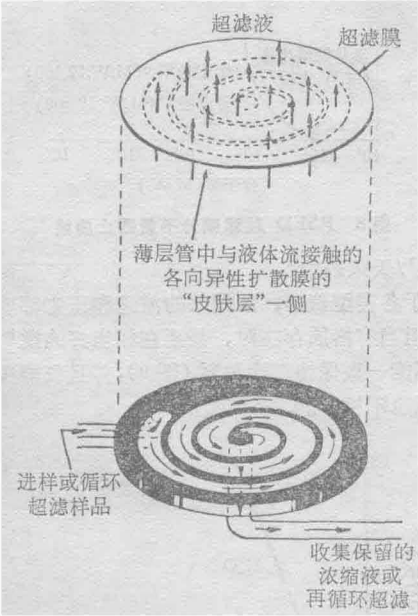
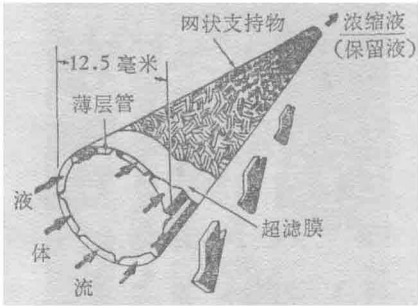


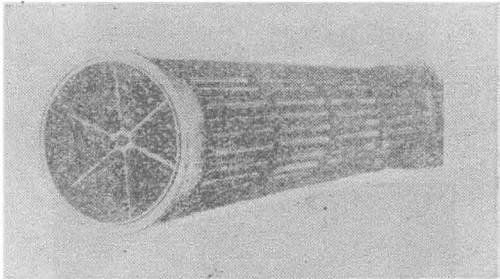
图5 连续超滤器示意图

(2) 大型工业超滤设备^[2,3] 例如 LTC IM 型或 LTC 8M 型，分别由 8 或 34 个套筒组成；每个套筒又由 60 根齿条心支管组成（图6），支管直径仅 12.5 毫米，它的四周有 8 个薄层管（0.5 毫米），超滤膜围在薄层管的四周，膜的外面有网状支持物固定。进料溶液经薄层管超滤，透过膜的滤出液进入套筒，由超滤液出口处泄出，而浓缩了的大分子溶液由齿条心支管另一端流出来。

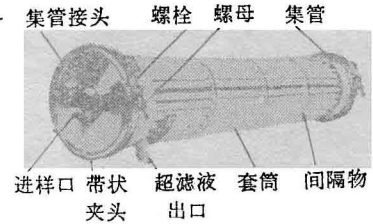
(3) 空心纤维型^[2,3] 如 DC-30 型超滤设备，由三根套筒和其它辅助设备组成，每根套筒内由无数根空心纤维丝的超滤膜束构成（图7），膜表面积 2.7 平方米，在约 3 大气压工作时流量达 1 升/分。其优点是能在各种 pH₂ 和高温（90℃）条件下连续工作，缺点是不适于粘性液体。目前空心纤维膜只有两种（分子量截止值分别为 50,000 和 10,000）；大型的表面积达 148 平方米，可用于生产超纯水。



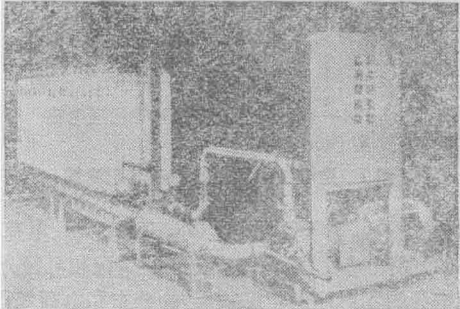
(a) 齿条心支管



(b) 套筒内部(由 60 根齿条心支管组成)



(c) 套筒外形



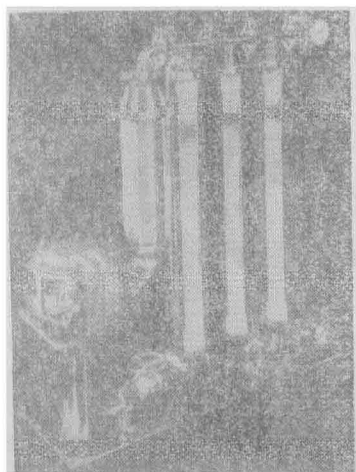
(d) 整套设备(由超滤部分(34 个套筒)、循环泵、冷却器、预过滤器等组成，膜面积约 44.3 平方米(476 平方英尺))

图6 LTC8M 型工业超滤设备

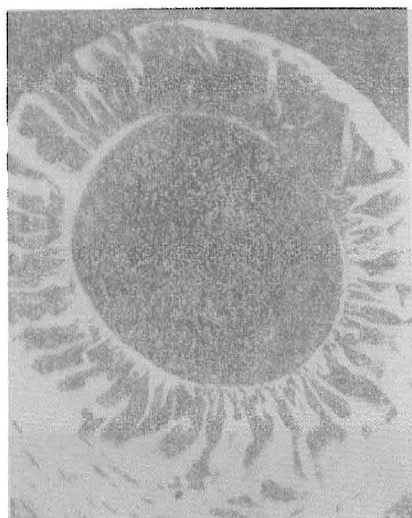
影响超滤的因素

1. 膜的选择性

膜的选择性通常用分子量截止值来表示，即大体上能被膜保留的分子的最小分子量数值。超滤膜一般也是据此来划分级别的。但这是一个极其任意的指标。实际上，选择性和许多因素有关，主要有：(1) 溶



(a) DC-30 型超滤设备



(b) PM- 空心纤维膜横切面的扫描电镜图 (400 倍)

图 7 空心纤维丝超滤器及其超滤膜

质的分子特性,除分子的大小外,还和形状、电荷等有关。(2)膜的特性,除保留大分子的情况和孔径外,尚有膜本身的不对称性、“皮肤层”的分布和电荷等因素。(3)超滤的条件,例如溶质的浓度、采用的压力大小及流体动力学等方面。

PSFD 超滤膜的分子量截止曲线如图 8 所示。一般被分离的两种物质的分子量差别在 5—10 倍时较为有效。因此,超滤对于脱盐或浓缩来讲是非常有效的方法。对于蛋白质或酶的分级分离,为了使效果更好,往往采用串联超滤的方法^[4,5]。

2. 流速

水的通透性一般可以近似地用流速,即在一定压力条件下每分钟通过单位面积膜的液体量来表示。实验室常用毫升/厘米²/分来表示,国外工业上常用加

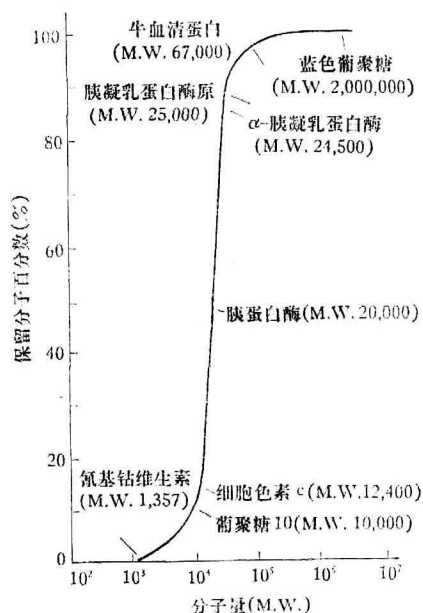


图 8 PSFD 超滤膜分子量截止曲线

仑/英尺²/天来表示*。

对于各类型仪器,蒸馏水的流速和压力都成正比关系;但当有溶质存在时,甚至在相当好的搅拌条件下,也不能一直保持成正比关系(图 9),并且仪器类型不同,情况也不相同。

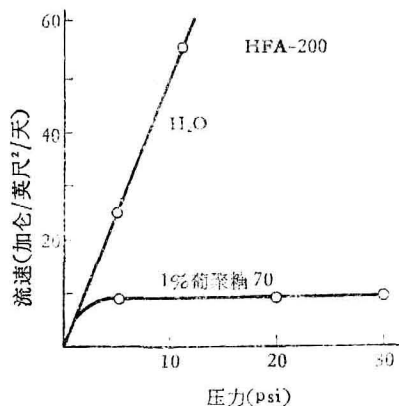


图 9 蒸馏水和 1% 葡聚糖 70 (分子量 70,000) 在不同压力下的流速

14.70psi = 1 大气压

1 加仑/英尺²/天 $\approx$ 40.7 升/米²/天

流速和分子量截止值是两个不同的概念,二者之间不一定存在着平行关系(例如,表 1 中 Millipore 厂产品)。一般各向异性的膜流速要快得多,约 10—50 加仑/英尺²/天,而各向同性的膜流速只有 0.1—0.5 加仑/英尺²/天。

* 1 加仑/英尺²/天 $\approx$ 40.7 升/米²/天

其它的因素,包括温度、时间、阴离子和阳离子等无机盐对超滤流速也有影响。例如低温操作时,比室温超滤时的流速要慢得多。流速的快慢,在一定程度上也会影响到分离的效果。

3. 溶质浓度的影响

在超滤过程中,溶液与膜表面之间总会形成一个浓度梯度,越接近膜表面浓度越高,这种现象称为浓度极化现象(图10)。浓度极化现象会引起流速下降,同

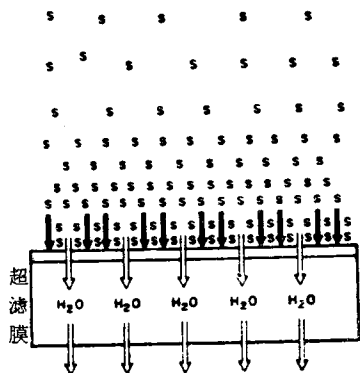


图10 滞留溶质的浓度极化现象

时影响到选择性,因为溶质分子通过膜的情况也依赖于它们在膜表面的浓度。对相同浓度的溶液来讲,浓度极化现象的增强会导致通过膜的溶质量的下降。溶质在膜表面的累积,也可以看作为一层次级膜,降低了分离能力,使选择性变差,直到超过溶解度限度而出现沉淀。这种现象在各向同性的膜中更为严重,甚至会阻塞薄膜的微孔。

实验室用的超滤仪器中,常采用使溶液搅拌或震动的方法减少浓度极化,搅拌速度不同,对超滤效果也有影响。近年来更普遍采用错流(cross-flow)方式以降低极化现象。

4. 其它

由于各种膜的组成不同,因此对溶质分子的吸附也不同,选用的膜对被超滤溶质的吸附作用应尽量地小。此外,吸附作用与选用的缓冲液或pH有关,例如,Diaflo UM型膜不能在高于0.02M的磷酸缓冲液中使用,因为组成膜的多聚物水合后能与某些离子强烈地相互作用而影响溶质的通过。

某些分子在溶液中能够以不同形式存在,设计超滤实验时,可改变pH或添加聚集剂使它们形成二聚体或多聚体,以便采用较大孔径的膜,增加流速。

超滤的实际应用

1. 浓缩和脱盐

自从Blatt等人(1965)开始应用超滤法于生物样品的浓缩后,Wang, D. I. C. 等(1968, 1970)也报告浓缩了几种酶和噬菌体,以后更广泛地应用于许多酶

的浓缩。一般在酶的浓缩工作中回收率可高达90%^[6],同时除去了溶液中的盐和低分子杂质,比活有明显的提高,是一种简单和快速的浓缩方法。Bixber比较了各种浓缩酶方法的经济价值,认为超滤最经济。Keay认为在微生物酶制剂的生产中,采用超滤作为最初的工艺,能大大缩小体积,降低成本,是一种有效且有发展前途的方法。

超滤也广泛地用于酶制剂的脱盐。在超滤过程中,电解质(E)和溶液中可通过膜的溶液(PS)流出了超滤器,大分子溶质(MS)被浓缩,同时部分纯化,即 $\frac{MS}{E + PS}$ 一直在增加。而在脱盐过程中,盐可以认为是一种PS,在简单的超滤中(图11a),它在滤出液和保留液中浓度是相同的,且维持恒定。为了从保留液中完全除去盐,则可采用透滤法(Diafiltration),即在压力源和超滤器之间增加一个体积比超滤器容量大的贮存瓶(图11b),瓶内贮洗涤液(水或低浓度的缓冲

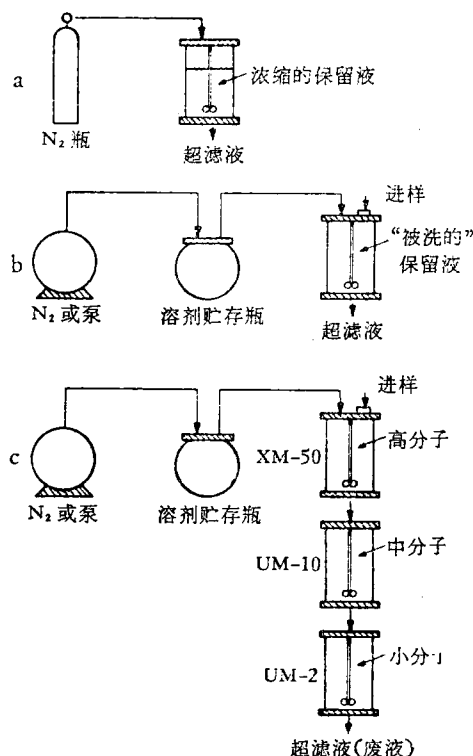


图11 几种超滤用法

a——超滤; b——透滤; c——串联透滤

液),洗涤液不断地压入超滤杯,超滤杯中的溶液体积和大分子溶质(MS)不变,而电解质和其他小分子溶质和盐等(PS)则随着洗涤液而除去,滤出液的电导迅速下降,这样能把小分子物质或盐彻底洗干净。在浓缩样品时,若样品量很大而超滤器容量较小时,也可把样品放在贮存瓶中连续进样。

2. 分离和纯化

Wang, D. I. C. 等 (1970) 曾报告用超滤法纯化胰蛋白酶粗制剂。但更多的报道是把超滤和酶反应联用, 这种联用是基于所利用的酶反应是把大分子多聚物水解成小分子产物, 因而可选择一种膜, 它能够保留底物和酶分子, 而允许产物通过。这样首先可使生产过程连续, 产物纯化简化; 其次由于不断除去了产物, 减少了逆反应, 反应可保持在较高的初速度下进行; 第三, 酶可连续使用, 减少了酶的用量, 未作用的底物也能充分地利用^[7](图 12)。因此, 酶反应和超滤结合可以降低生产成本, 目前已经较为普遍的采用。例如, 大豆的酶解产物分离^[8], α -胰凝乳蛋白酶水解乳清蛋白后的酶解产物分离, 链霉素蛋白酶和胃蛋白酶水解水不溶性的鱼蛋白浓液, 纤维素酶水解纤维素, α -淀粉酶或糖化型淀粉酶水解淀粉等; 尤其是最后一种反应, 用 PM-10 膜能得到非常纯的葡萄糖, 并且连续工作 12 天, 酶活力没有损失^[2, 7]。

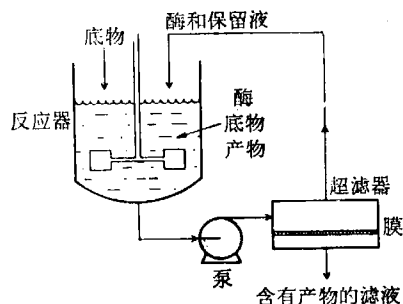


图 12 超滤和酶反应联用

在实际应用中, 有时因酶和产物分子相近, 较难分开。为了克服这个缺点, 近来把酶偶联到高分子量的可溶性多聚物上去, 获得了很好效果。例如胰凝乳蛋白酶结合到可溶性葡聚糖 (分子量 2×10^6) 上^[9], 它对大分子底物酪蛋白和小分子底物 ATEE 的活力分别为游离酶的 81% 和 73%, 这种酶制剂的热稳定性也有很大的提高, 且不易自溶。当选用 XM-100 膜来分离水解酪蛋白的产物时, 20℃ 下连续工作二周, 活力无损失。此法也可用于溶菌酶和一些核酸酶。

还有一种联用方法是把酶包埋到空心纤维丝的膜中, 而底物分子和产物分子都能自由进出, 然后进行产物和底物的分离。例如, 转化酶水解蔗糖成为果糖和葡萄糖, 尿酶分解尿素成为氨和二氧化碳等一类反应。

3. 超滤和发酵联用

微生物是酶制剂最丰富的来源之一。发酵和超滤联用, 能使微生物发酵和酶的制备同时进行, 而且能连续化^[5](图 13)。Wang, D. I. C. 等人 (1970) 利用此

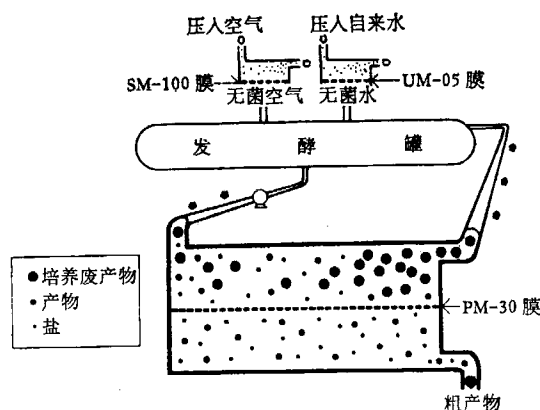


图 13 超滤和发酵联用

法产生的菌体比常规方法高 1.55 倍, 酶活力高 4 倍。

超滤除了上述一些应用外, 在其他生物样品中的用途也是多种多样的。可以浓缩蛋白质、多糖、病毒, 也可以从尿中浓缩蛋白激素。在纯化方面有: 糖中除去蛋白质, 青霉素中除去蛋白质, 生物样品中除去毒素、热原或细菌, 后者即所谓冷灭菌法。蛋白质混合物中的分离应用也很多, 例如在结晶的 α -乳清白蛋白中分离除去白蛋白^[4]。

目前我所工厂试制了一些小型超滤器, 上海医药工业研究院等单位试制了一些微孔薄膜和超滤膜^[10], 不少工厂也开始应用膜滤或超滤技术于微生物分析和制备超纯水, 随着这些使用, 这项新技术必将在我国逐渐推广和发展。

参 考 资 料

- [1] Chian, E. S. K. et al.: *Process Biochem.*, **4**, (9), 47, 1969.
- [2] Porter, M. C.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, No. 3, 115, 1972.
- [3] Altena, C. Van: *Process Biochem.*, **8**, (10), 7, 1973.
- [4] Blatt, W. F. et al.: *Anal. Biochem.*, **18**, 81, 1967.
- [5] Michaels, A. S.: *Chem. Eng. Progr.*, **64**, (12), 31, 1968.
- [6] Wang, D. I. C. et al.: *Biotech. Bioeng.*, **11**, 987, 1969.
- [7] Wang, D. I. C. et al.: *Chem. Eng.*, **76**, (27), 108, 1969.
- [8] Roozen, J. P. et al.: *Process Biochem.*, **8**, (7), 24, 1973.
- [9] O'Neill, S. P. et al.: *Biotech. Bioeng.*, **13**, 319, 1971.
- [10] 刘国良等: 上海医药工业研究院来发表资料, 1974 年。