

微生物酶分离纯化研究进展

阎金勇, 丁 双, 杨江科, 闫云君

(华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074)

摘要:在对常规的微生物酶分离纯化方法如沉淀法、疏水层析、凝胶过滤、离子交换层析及亲和层析等特点、原理及应用进行介绍的基础上,概述了膜处理技术、免疫纯化技术、双水相体系萃取等新颖微生物酶分离纯化技术。指出常规方法和新颖方法的结合为微生物酶带来了高效的分离纯化效果,开发先进、灵活的蛋白质化学技术分离纯化天然酶、重组酶、人工模拟酶及杂合酶势在必行。

关键词:微生物酶;分离;纯化

中图分类号:Q939

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2007)06-0019-05

Advances in process for microbial enzymes separation and purification

YAN Jin-yong, DING Shuang, YANG Jiang-ke, YAN Yun-jun

(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: The characteristics, principle and application of different methods for the purification of microbial enzymes, including conventional techniques such as the precipitation, hydrophobic interaction chromatography, gel filtration, ion exchange chromatography, and affinity chromatography and novel technologies such as membrane processes, aqueous two-phase extraction and immunopurification, are introduced. Schemes for enzymes purification are made via multi-step strategies and the combination of these novel methods with the conventional chromatographic processes can indeed be expected to yield rapid and high recovery. Affinity for cofactors and substrate analogues which gradually comes to the forefront in the purification technologies should be fully exploited for purification of native enzymes, recombined enzymes, enzymes of artificial imitation and hybrid enzymes.

Key words: microbial enzymes; separation; purification

微生物酶作为生物催化剂,因具备底物特异性、位置特异性、立体特异性等催化特点,在油脂加工、去污剂与脱脂、食品加工与饲料、精细化工、医药、造纸业、化妆业、皮革加工、生物柴油、生物降解等诸多领域有着广泛的应用^[1]。绝大多数工业微生物酶都来源于真菌和细菌等微生物发酵,相对动植物来源的酶,微生物酶大规模发酵工艺简单;而且微生物易于培养,遗传操作容易,利用微生物基因工程和蛋白质工程可实现重组酶的高水平表达及筛选新特性或高活力的酶。随着临床治疗药物蛋白和工业用酶的应用日益广泛,对大规模纯化酶的需求日益增加;发酵工程、酶工程与基因工程技术的发展和生物技术产品的开发,使微生物酶制品的大规模分离纯化成为当前生物工程中的关键技术问题。

1 常规分离纯化技术

1.1 预分离

对于微生物胞外酶,发酵液经离心或过滤除掉

细胞,上清液用超滤、硫酸铵沉淀或有机溶剂抽提等方法浓缩;胞内酶则需进行细胞破碎再分离,大多数采用硫酸铵沉淀的浓缩方法,也有采用乙醇、丙酮或酸(通常是盐酸)沉淀的方法。沉淀用于纯化早期粗分离,为了获得更高的纯度,还要用凝胶过滤或亲和层析等方法进行细分离。硫酸铵浓度会影响纯化酶的活力^[2]。与层析相比,沉淀工序受非蛋白质物质干扰的程度较小,而且能够分离得到大量蛋白质。不能忽视发酵条件的重要性,因为发酵条件与蛋白质纯化有关。培养介质的性质和抗泡沫剂可影响酶的抽提,而收获细胞的时间常决定细胞壁强度和蛋白水解酶的含量。

1.2 层析

酶的常规分离纯化方法有凝胶过滤、离子交换层析、疏水层析和亲和层析等^[3],它们的技术特点及用途比较见表 1。

单一的层析方法难以达到理想的分离效果,因此蛋白质分离纯化中常采用几种层析联合的方法。

收稿日期:2007-03-16

基金项目:国家高技术研究发展计划“863”资助项目(2003AA214061)

作者简介:阎金勇(1979-),男,博士生,从事微生物脂肪酶方面的研究, yjiny@126.com;闫云君(1969-),男,博士,教授,博士生导师,从事能源生物技术研究,通讯联系人, 027-87792214, yanyunjun@tom.com。

表 1 酶的常规层析纯化技术

分离原理	分离方法	特点	用途
分子大小	凝胶过滤	分辨率适中,分级分离时流速较慢,脱盐时流速快;容量受样品体积限制	适用于纯化的后期阶段,脱盐可用于任何阶段,特别是步骤衔接时的缓冲液更换
电荷	离子交换	分辨率较高,视支持物不同流速可很快;容量很大,不受样品体积限制	最适用于大体积样品且蛋白纯度较低的样品早期纯化,可分批操作
疏水极性	疏水层析	分辨率较高,流速快;容量很大,不受样品体积限制	适用于纯化的任何阶段,特别适用于离子强度较高的样品,如沉淀、离子交换后的样品
生物亲和性	亲和层析	分辨率极高,流速很快;容量视配体可大可小,不受样品体积限制	适用于纯化的任何阶段,特别是样品浓度小、杂质含量多时,可以减少纯化步骤
等电点	聚焦层析	分辨率较高,流速快;容量大,不受样品体积限制	最适用于纯化的最后阶段

纯化方法的选择很大程度上取决于它在整个纯化方案中的特殊次序位置。为了获得最大纯化倍数和回收率,工艺次序及层析分离次序的选择至关重要。

工艺次序的选择策略包括:应选择不同机制的分离单元组成一套工艺;应将含量多的杂质先分离去除;尽早采用高效的层析分离手段;将最昂贵、最费时的分离单元放在最后阶段。通常先运用非特异、低分辨的操作单元,如沉淀、超滤和吸附等,这一阶段的主要目的是尽快缩小样品体积,提高目的蛋白浓度,去除最主要的杂质(包括非蛋白质类杂质),随后是高分辨的操作单元,如具有高选择性的离子交换层析和亲和层析,而将凝胶过滤层析这类分离规模小、分离速率慢的操作单元放在最后,这样可以提高分离效益。

层析分离次序的选择同样重要,一个优化的层析次序组合不仅能够获得高的纯化倍数和回收率,而且使分离纯化顺畅,改变很少的条件即可进行各步骤间的衔接。离子交换、疏水层析和亲和层析通常可起到蛋白质的浓缩效应,而凝胶过滤色谱常常使样品稀释。在离子交换色谱之后进行疏水层析,不必经过缓冲液的更换,因为多数蛋白质在高离子强度下与疏水介质结合能力较强,凝胶过滤层析最后进行又可以直接过渡到适当的缓冲体系中以利产品成型保存。但在包涵体重组蛋白的纯化中,凝胶过滤层析可作为首选步骤。如原核基因工程重组细胞因子的相对分子质量大多为 15 000 ~ 20 000,而包涵体蛋白质相对分子质量通常大于 30 000,因此选用凝胶过滤层析可很容易获得高纯度产品^[4]。

2 新颖的分离纯化技术

得到回收率 30%、总纯化倍数 320 的蛋白质通常需要 4 ~ 5 个纯化步骤,常规的纯化方法耗时,得

率低。因此,开发出一些新的分离纯化技术,如膜处理技术、免疫纯化技术、活性环氧连接臂作为配体的疏水层析、聚乙二醇-琼脂糖凝胶和聚乙烯醇作为固相的柱层析、双水相体系及界面亲和层析技术等。

2.1 膜处理技术

错流膜过滤中微生物发酵液以横过膜表面的方式流动,液流可清扫膜表面的溶质层,使溶质无法在膜表面处积聚,从而截留微生物细胞和浓缩含酶发酵液,在下游处理技术中常有应用。Sztajer 等^[5]用毛细管超滤膜纯化 *Pseudomonas fluorescens* 脂肪酶。他们比较了 2 种毛细管超滤膜:内径 1.1 mm 截断相对分子质量为 10 000 聚丙烯腈(PAN)和聚砜(PS)。通过 2 种膜的脂肪酶滤液都得到浓缩,尤其是亲水的 PAN 膜,浓缩 15 倍;PS 浓缩 3 倍。对 PS 而言,仅观察到浓缩效果,适合浓缩酶;而 PAN 除了浓缩,还除去杂蛋白而应用于初分离。PAN 膜吸附了 15% 总蛋白和 30% 总活力,而 PS 膜吸附 30% 总蛋白和 40% 总活力,2 种膜损失 15% ~ 30% 总蛋白和 30% ~ 40% 总活力。

2.2 免疫纯化技术

免疫纯化技术是一种高效选择性的蛋白质纯化技术。通过一步纯化,纯化倍数可达 1 000 ~ 10 000^[6]。高特异性的抗体能够高效区分相似的抗原,解决常规方法分离的困难。

免疫纯化技术大部分是应用单克隆抗体和多克隆抗体,选择性依赖于单克隆抗体对目标蛋白的特异性程度及对杂蛋白的影响。Bandmann 等^[7]在所有突变体的 N 末端引入 IgG 结合位点,构建融合蛋白,利用 IgG 与靶位点特异性结合的免疫方法纯化了 *Escherichia coli* 表达的脂肪酶突变体角酯酶。

磁性微粒(MMS)是用高分子材料和金属离子为原料聚合而成的一种以金属离子为核心、外层均匀

地包裹高分子聚合体的固相微粒。在液相中,受外加磁场的吸引作用,MMS可快速沉降而自行分离,无需进行离心沉淀。由特异性抗体包埋制备的免疫MMS,能与待分离样品中的抗原结合形成免疫MMS-靶向分子复合体,通过外加磁场的作用即可与其他成分分离开来。再以适当方式使复合体解离,在磁场吸引下除去游离的免疫MMS,即可获得纯化的靶向分子^[8]。

免疫纯化技术是昂贵的纯化技术,然而,单克隆抗体技术的推广和成本的下降加快了免疫纯化技术的大规模应用。

2.3 活化环氧间隔臂作为配体,聚乙二醇固定在琼脂糖上的疏水层析

Queiroz等^[9]研究了活化环氧间隔臂作为配体的 *Chromobacterium viscosum* 脂肪酶疏水层析。研究表明,脂肪酶的吸附量随流动相盐离子强度的增强而提高。质量分数为20%的硫酸铵洗脱液可以使所有脂肪酶吸附在柱内,经0.01 mol/L磷酸盐缓冲液洗脱,蛋白质回收率79%,脂肪酶活性回收率89%。Queiroz等^[10]报道聚乙二醇-琼脂糖疏水层析纯化 *Chromobacterium viscosum* 脂肪酶。研究表明,脂肪酶的吸附量受盐、离子强度、pH的影响,不受聚乙二醇分子质量的影响。pH为7.0、质量分数为15%的磷酸钾盐缓冲液可以使大部分脂肪酶吸附于柱内,0.01 mol/L磷酸盐缓冲液具有洗脱回收75%的蛋白和79%的酶活力。Diogo等^[11]用聚丙烯-乙二醇琼脂糖凝胶纯化 *Chromobacterium viscosum* 脂肪酶,研究发现,脂肪酶的吸附量受流动相中盐浓度的影响,随流动相中离子强度的增强而增强。流动相pH的改变对脂肪酶吸附量无太大影响,向磷酸盐缓冲液中加入质量分数为20%的硫酸铵可使柱内脂肪酶解吸附。

2.4 以聚乙烯醇作为固定相的柱层析

Battinelli等^[12]用十二碳酸酯化的聚乙烯醇交联的疏水层析纯化 *Candida rugosa* 商品粗酶制剂,通过逐步增加HEPES-EDTA洗脱缓冲液(pH为7.6)中二甲胺内盐(CHAPS)的浓度来洗脱柱内吸附的蛋白质。

2.5 双水相体系萃取

当2种水溶性聚合物或者是聚合物与盐混合时,由于聚合物水溶液的疏水性差,易发生相分离而形成双水相。常用的双水相体系有聚乙二醇(PEG)-葡聚糖(Dex)、PEG-磷酸钾、PEG-硫酸镁体系。双水相体系萃取法是近年发展起来的具有工业

开发潜力的分离技术之一,于1978年由Kula等提出,主要用于酶和蛋白质的萃取。PEG和葡聚糖这类无毒聚合物可作为蛋白质和酶的稳定剂,且形成的两相均含质量分数为70%以上的水,为蛋白质的溶解和抽提提供了适宜的环境,即使在常温下操作,蛋白质和酶活力也不易损失。所需设备简单,仅需一个可使粗提液与两相系统充分混合及放置的储罐和一个离心力不高的普通离心机或使两相迅速分离的分离器。开始此法仅用于粗提取液的处理,现已用于后处理工艺的精制,即经几次连续的双水相抽提,使产品达到相当高的纯度;不仅可用于澄清发酵液的酶分离,而且特别适用于直接从含有固体细胞的原始发酵液和带有细胞碎片的细胞匀浆液中提取纯化目的酶。此法不要求特殊处理就可与后续提纯步骤相衔接,可使提纯工艺更为有效、连续与经济。目前已使用双水相体系萃取法较大规模地从微生物碎片中分离纯化了甲酸脱氢酶等一系列酶,处理量已达50 kg湿细胞、150 g酶蛋白,收率在90%以上,纯化倍数可达1~8^[13]。

将生物特异性配基引入到聚合物上,将双水相体系萃取发展成双水相亲和萃取,使某种蛋白质或酶在某一特定相中的分配更具选择性。如将Cibacron固定到PEG上形成Cibacron-PEG聚合物,只用两步抽提就可将酵母磷酸果糖激酶提纯58倍^[14]。最近又开发一种由多价两性丙烯酸共聚物和聚丙烯醇构成的双水相体系,此体系的特点是:价格便宜、无毒、低浓度即可形成两相,而且结合等电点沉淀法,可迅速有效地分离纯化^[15]。

2.6 界面亲和层析技术

脂肪酶疏水腔有“开”和“关”2种构象,Bastida等^[16]报道在极低离子强度下,商业皱褶假丝酵母脂肪酶制剂(CRL)以一种完全不同于常规疏水吸附的方式被疏水载体吸附。此时,其活性中心周围的疏水腔处于“开”构象,具亲水-疏水界面特性,CRL据此被固定在疏水载体上。由于活性中心周围疏水腔构象上的轻微差异是引起立体选择性差异的主要原因,而该固定化方法又是靠疏水腔与疏水载体表面的亲和作用,因此疏水腔构象上有轻微差异的同工酶其吸附行为可能不同。据此设计出界面亲和层析技术,依据疏水腔开放程度差异将具有不同立体选择性的同工酶分离。通过分析同工酶在组成构象上的差异,提出了一种通过简易的选择吸附步骤同时达到同工酶分离和固定化目的的新方法。

2.7 反微团萃取

反微团萃取是近年涌现出来的另一种新颖萃取方法。反微团又称反胶束,是指当有机溶剂中加入的表面活性剂浓度超过其临界值时,表面活性剂便会在有机溶剂中形成极性头聚集朝内组成的内表面,非极性尾伸向外围有机溶剂,大小为毫米级的稳定聚合体反微团。该反微团的内腔含有水分,在适宜的 pH 环境下,蛋白质与反微团极性头呈相反的电荷,这种静电引力使蛋白质从水相迁移入有机溶剂的反微团内,从而具有溶解诸如蛋白质、核酸等极性物质的能力,实现对蛋白质的有机溶剂萃取。目前用于反微团萃取的主要是阴离子表面活性剂丁二酸-2-乙基己基酯磺酸钠和阳离子表面活性剂氯化三辛基甲基铵,反微团萃取常用的有机溶剂是异辛烷。为了进一步提高反微团萃取分离的选择性,可在反微团表面活性剂的烷基连接对待分离蛋白质具有生物专一性的配基,实现反微团亲和萃取分离^[17]。

2.8 超临界流体萃取

超临界流体萃取不用一般的羟基类溶剂,而是在超临界状态下的液态气体,如超临界液态 CO₂、甲烷、乙烷、乙烯等。尤以超临界液态 CO₂ 最受人瞩目,因为其无毒、不燃、无腐蚀、低黏度、价廉且渗入物质的能力极强,扩散系数大,可获得高的传递速率,容易从产品中分离^[18]。尤其是溶质在液体中的溶解度随温度和压力的变化很大,在超临界液体萃取时,可方便地通过改变温度和压力的方法来进行萃取或回收溶剂。

2.9 高效液相层析和高效液相亲和层析技术

所有普通的层析技术都可以高效液相层析(HPLC)的形式加以利用。由于 HPLC 的柱体积可以加大,可以在同一柱上反复负载样品,所以 HPLC 技术在大规模纯化中的应用潜力巨大。目前已经开发出以克量级纯化蛋白质的 HPLC 技术,用三嗪染料亲和纯化乳酸脱氢酶。每次层析可处理 1.8 g 蛋白质,得到 97 mg 纯酶,收率 46%,耗时 1 h^[19]。

高效液相亲和层析(HPLAC)技术是将亲和层析的高分辨力和 HPLC 的快速结合起来的新型分离纯化技术,用于 HPLAC 的新载体和新配体(特别是单克隆抗体)制备技术的开发及推广,加上自动化操作的设计,使 HPLAC 能够大规模应用于分离工程。最近开发出亚微米无孔硅胶纤维,在此纤维上涂一层连有 NAD 配体的葡聚糖,用 100 g NAD-无孔硅胶纤维的短柱在 30 min 内可从部分纯化的抽提液中吸附 1.5 g 乳酸脱氢酶,洗脱后得到纯度大于 99% 的

酶产品,且柱可再生使用^[20]。用 HPLAC 大规模纯化酶已处于商业化突破的边缘,特别是在用传统层析技术不能得到满意结果时,更显出它的优越性。

2.10 大规模电泳技术

2.10.1 自由流动区带电泳

自由流动电泳是制备规模的连续分离生物分子和颗粒的技术。在自由流动区带电泳(FFZE)技术中,具有一定 pH 和电导的电解质连续导入电泳池顶部的层流中,样品流也连续注入电解质流中。与电解质流垂直的电场按电泳迁移率的差别分离样品。此法已用于从 *Candida boidinii* 抽提液中分离甲酸脱氢酶、甲醛脱氢酶和甲醇氧化酶,可使蛋白质、细胞颗粒及碎片同时得到分离^[21]。如何让这类装置适于工业规模操作正在研究之中。自由流动区带电泳的分辨率不如等电聚焦技术高,当蛋白质的等电点接近时,往往仅得到重叠峰^[22]。

2.10.2 膜固定 pH 梯度等电聚焦法

用普通凝胶电泳分离纯化蛋白质,负载量和回收率较低,而且产品易受未聚合的毒性单体污染。用膜固定 pH 梯度等电聚焦法制备蛋白质,则可克服上述缺点。因为这种电泳法是让样品在 pH 固定的 2 个凝胶面之间循环,只有杂质可以通过凝胶,目的蛋白质由于处于等电点而不进入凝胶中,因此,处理样品的速度快,纯度和回收率高^[23]。

2.11 逆流色谱及置换色谱技术

逆流色谱技术是一种不采用任何固态支撑体(如柱填料、吸附剂、亲和剂等)的新型液-液分配分离技术,它完全排除了支撑体对样品的不可逆吸附、污染、变性、失活等影响^[24]。其分离管柱是很长的聚四氟乙烯螺旋形管柱,在使用时,根据待分离物质的理化特征选择配制一种双水相溶剂体系,用该体系中的上层或下层作为色谱过程的固定相,首先将此相装满管柱,管柱旋转运动形成的离心力场支撑柱内的液态固定相;用溶剂体系中的另一层作为流动相,携带待分离混合物样品由泵的压力推入管柱,样品随着流动相快速地穿过两相对流的整个管柱空间,按其在两相间分配系数的差异而将样品中的各个组分分离。

置换色谱作为一种非线性色谱技术,是指样品输入色谱柱后,用一种与固定相作用力极强的置换剂通入色谱柱,来替代结合在固定相表面的溶质分子。样品在置换剂的推动下沿色谱柱前进,使样品中各组分按作用力强弱次序形成一系列前后相邻的谱带,并在置换剂的推动下流出色谱柱^[25]。

3 结语与展望

一般对工业用酶或蛋白质的纯度要求不高,过度的纯化反而会提高成本并且降低回收率;而对临床医学用酶纯度要求较高,一些理论研究用酶甚至需达到结晶纯。纯化蛋白质与酶所进行的战略设计应考虑纯化量和应用纯度的级别、酶蛋白的来源、纯化设备的可行性、重复性及经济性等。最主要是考虑应用,根据用途不同及酶的性质差异设计不同的策略。通常第一步先从大量样品或复杂样品中将目标蛋白与主要杂质分离;再用高选择性的层析去除绝大部分杂质;最后精细纯化,提供纯度至设定目标。

工业规模分离蛋白质和酶制品需要设备、材料、人力上的大量投资,新型分离材料、高度自动化和人工智能仪器设备的不断涌现以及蛋白质工程等分子生物学技术的引入,推动蛋白质分离化学进入了新的发展阶段。开发先进、灵活的蛋白质化学技术分离纯化天然酶、重组酶、人工模拟酶及杂合酶势在必行。尤其是无活性包涵体蛋白质的复性、酶的空间折叠和二硫键配对、酶的修饰加工及非水酶学的发展,对下游分离纯化工艺及技术提出了更高的要求。

酶的分选纯化是多步策略,一些新技术方法的日趋成熟减少了纯化步骤并提高了回收率,传统方法与新颖方法的结合为酶分离纯化注入了新的活力。基因工程和蛋白质工程对酶纯化产生深刻的影响。随着对酶三维结构的阐明越来越多,基于分子识别可望开发出简易有效的、针对不同酶分子的专一性分离纯化技术。酶-底物、酶-底物类似物、酶-辅因子的亲和层析也是酶分离纯化中亟待开发的技术。

参考文献

- [1] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235 - 251.
- [2] Mateo C, Corte's E, Guisan J M, et al. One-step purification, covalent immobilization, and additional stabilization of poly-His-tagged proteins using novel heterofunctional chelate-epoxy supports[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 76(3): 269 - 276.
- [3] Hee P, Hoeben M A, vander R G, et al. Strategy for selection of methods for separation of bioparticles from particle mixtures[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(4): 689 - 709.
- [4] 何海波, 张维农, 达世禄, 等. 天然磷脂的色谱法分离纯化研究进展[J]. *分析科学学报*, 2004, 20(1): 97 - 102.
- [5] Sztajer H, Bryjak M. Capillar membranes for purification of *Pseudomonas fluorescens* lipase[J]. *Bioprocess Eng*, 2003, 4: 257 - 259.
- [6] 阎玉涛, 王云龙, 李晨阳, 等. 抗 FLAG 标签单克隆抗体的制备鉴

- 定及初步应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 27(1): 93 - 97.
- [7] Bandmann N, Collet E, Leijen J, et al. Genetic engineering of the *Fusarium solani* pisi lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems[J]. *J Biotechnol*, 2000, 79(2): 161 - 172.
- [8] Xin J Y, Xu Y, Hu X X, et al. Fine separation and characterization of *Candida rugosa* lipase isoenzymes[J]. *J Basic Microbiol*, 2002, 42(5): 355 - 363.
- [9] Queiroz J, Garcia F, Cabral J, et al. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase[J]. *J Chromatogr*, 2005, 707: 137 - 142.
- [10] Queiroz J, Garcia F, Cabral J. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polyethylene glycol immobilized on sepharose[J]. *J Chromatogr*, 2006, 734: 213 - 219.
- [11] Diogo M, Silva S, Cabral J, et al. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilized on sepharose[J]. *J Chromatogr*, 1999, 849(2): 413 - 419.
- [12] Battinelli L, Cernia E, Delbo M, et al. New class of poly(vinyl alcohol) polymers as column chromatography stationary phases for *Candida rugosa* lipase isoforms separation[J]. *J Chromatogr*, 2006, 53: 47 - 55.
- [13] 杜学敏, 武金霞, 张贺迎, 等. 双水相提取糖化酶的研究[J]. *中国酿造*, 2007(1): 7 - 10.
- [14] 郑楠, 刘杰. 双水相萃取技术分离纯化蛋白质的研究[J]. *化学与生物工程*, 2006, 23(1): 7 - 9.
- [15] Wyss A, Stockar U, Marison I W. A novel reactive perstraction system based on liquid-core microcapsules applied to lipase-catalyzed biotransformations[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(1): 28 - 39.
- [16] Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, et al. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports[J]. *Biotechnol & Bioeng*, 1998, 58(5): 486 - 493.
- [17] 许林妹, 彭远宝. CTAB 反微团萃取大豆蛋白[J]. *中国粮油学报*, 2005, 20(3): 48 - 50.
- [18] 周雪晴, 冯玉红, 张冲, 等. 超临界 CO₂ 萃取结合柱色谱分离罗芥木生物碱[J]. *精细化工*, 2007, 24(2): 154 - 158.
- [19] 周铁杨, 周健, 熊继先, 等. 基于等电聚焦 2 反相 HPLC 的虎纹捕鸟蛛毒素组学的初步研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(10): 823 - 831.
- [20] Kalbfuss B, Wolff M, Morenweiser R, et al. Purification of cell culture-derived human influenza A virus by size-exclusion and anion-exchange chromatography[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96(5): 932 - 944.
- [21] 王振玲, 王栋, 朱化彬, 等. 二维电泳分离牛精子蛋白技术[J]. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(9): 61 - 66.
- [22] Xu Q P, Wang L, He Y Z. Preconcentration and separation of tobacco alkaloids by capillary zone electrophoresis[J]. *Journal of University of Science and Technology of China*, 2006, 36(10): 1096 - 1101.
- [23] 钟华, 张扬, 樊惠芝, 等. 液相等电聚焦结合双向凝胶电泳分离碱性蛋白[J]. *高等学校化学学报*, 2006, 27(10): 1830 - 1834.
- [24] 魏云, 曹学丽. 值得关注的分离科学技术: 逆流色谱技术[J]. *世界科学技术: 中药现代化药学前沿*, 2001, 3(5): 18 - 22.
- [25] 祁彦, 黄骏雄. 置换色谱及其在生物分子分离纯化中的研究进展[J]. *化学进展*, 2001, 13(4): 294 - 302. ■