



Separation Equipments and Technology Examples
for Bioproducts Manufacturing

生物产品 分离设备与工艺实例

刘俊果 主编

赵国群 副主编



化学工业出版社

图例安装目录 (CIP) 数据

生物工程分离设备与工艺实例 / 刘俊果主编. — 北京: 化学工业出版社, 2008.10

ISBN 978-7-132-03870-4

Separation Equipments and Technology Examples

for Bioproducts Manufacturing

生物产品 分离设备与工艺实例

刘俊果 主编

赵国群 副主编

责任编辑: 刘俊果
封面设计: 刘俊果

责任编辑: 刘俊果
封面设计: 刘俊果

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区黄厂大街13号 邮政编码100011)

印 刷: 北京市白城印刷有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张20 字数250千字 2008年1月北京第1版第1次印刷



化学工业出版社

· 北京 · 如有缺页、漏页、错页、倒页、空白页等质量问题, 本社负责调换

图书在版编目 (CIP) 数据

生物产品分离设备与工艺实例/刘俊果主编. —北京:
化学工业出版社, 2008.10

ISBN 978-7-122-03670-4

I. 生… II. 刘… III. 生物制品-分离 IV. TQ464

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 135537 号

品产主

例实艺工已备对离分

主 编 刘俊果

主 审 魏国栋

责任编辑: 傅四周
责任校对: 徐贞珍

文字编辑: 史 懿
装帧设计: 刘丽华

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 装: 北京市白帆印务有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 20 字数 550 千字 2009 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 59.00 元

版权所有 违者必究

前 言

自 2006 年 5 月人类基因图谱解码后, 生物技术成为明星产业。全球生物产业市场每年以 10% 以上的速度成长。大力发展生物技术及其产业已成为世界各国经济发展的战略重点。2005 年, 全球生物药品销售额达到 600 多亿美元, 占整个医药工业的比重从 1995 年的不到 4% 迅速提高到 11%; 全球范围内正在研制的 2000 多种生物药物 80% 已进入临床试验。预计到 2020 年, 生物医药占全球药品的比重将超过 1/3, 生物质能源占世界能源消费的比重将达到 5% 左右, 生物基材料将替代 10%~20% 的化学材料。

追溯历史可以发现, 生物产业, 也就是人类利用各种生物加工自身需要产品的产业, 具有很悠久的历史。历史最久的要算各种中外酿造酒精饮料 (比如白酒、葡萄酒、啤酒等) 以及各种中外发酵食品及调味品, 如酱油、醋等。而纵观当今社会的人类生活, 生物产业的产品遍布于我们的周围。例如每日烹调必需的味精, 饮料中常见的酸味剂柠檬酸, 很多临床药物 (比如青霉素、头孢菌素、维生素 C 等), 林林总总, 数不胜数。

与化学合成反应显著不同的是, 利用各种生物生产的各种生物产品, 都存在于成分非常复杂的生物反应体系中, 目标产物浓度低, 杂质多, 杂质与目标产物性质结构接近, 发酵液黏度大, 所有这些特点都决定了生物产品的分离纯化过程比一般化学产品的提取过程要复杂得多。对一般生物产品, 如抗生素、维生素、氨基酸、有机酸等, 下游提取纯化过程的成本约占总成本的 40%~60%, 而基因重组蛋白质药物的分离纯化成本高达总成本的 80%~90%。生物分离技术已经发展成为泛生物技术或泛生物化工领域中一个重要的独立的技术领域。

本书系统地阐述了各种生物产品分离方法的原理及相关设备, 如过滤与离心、萃取、吸附与离子交换、制备性色谱和电泳、结晶、干燥等, 并以大量不同类型生物产品的分离实例说明了这些分离技术和设备的应用, 内容上注重实用性, 并注意从实例个案中分析共性问题, 旨在让读者从这些实例中获得更多的启发, 对读者的具体工作具有较强的指导意义。

在本书的编写过程中, 作者深入生产实际, 获得大量第一手资料, 并参考了大量国内外文献。本书可供从事生物工程技术设备及产品的研究开发人员和生产企业的科研人员, 以及大专院校生物、工程相关专业的师生参考。

本书由河北科技大学生物科学与工程学院河北省发酵工程技术中心刘俊果博士担任主编。全书共分为 10 章, 各章的具体编写分工为: 刘俊果博士编写第一章、第二章、第四章、第六章, 赵国群博士编写第三章, 杨福廷教授编写第五章, 张春晓博士编写第七章, 赵星杰工程师编写第八章, 刘树中副教授编写第九章, 郝建雄和肖宵副教授编写第十章。

受水平和经验的限制, 书中难免有错漏和不足之处, 敬请读者批评指正, 作者将不胜感激。主编的电子邮箱为 happyliu1997@yahoo.com.cn。

目 录

第一章 绪论	1
一、生物反应及生物产品	1
二、生物产品分离的一般工艺过程	3
三、生物产品分离过程的关键技术	4
四、生物产品分离技术的发展趋势	5
参考文献	6
第二章 过滤和离心	7
第一节 过滤和离心的基本原理与技术	7
一、过滤的基本原理与技术	7
二、离心的基本原理与技术	12
第二节 过滤和离心的主要设备	18
一、过滤设备	18
二、离心设备	25
第三节 工艺实例	33
一、青霉素发酵液的过滤	33
二、链霉素发酵液的过滤	34
三、土霉素发酵液的过滤	35
四、离心法纯化乙型肝炎疫苗	36
五、离心法生产脑膜炎球菌多糖体菌苗	36
参考文献	37
第三章 膜分离	38
第一节 膜分离的基本原理	38
一、微滤	38
二、超滤	38
三、反渗透	39
四、纳滤	40
五、电渗析	40
第二节 膜及膜的选择	40
一、膜的种类	40
二、膜的材料	41
三、膜的选择	41
第三节 膜分离设备	42
一、常用膜组件的结构与特点	42
二、膜系统的其他组件	44
第四节 膜分离过程中常见问题与对策	47
一、膜的劣化	47
二、膜的污染	48
三、膜的劣化和污染的控制	48
第五节 膜分离的应用实例	51
一、核苷酸、氨基酸的分离纯化	51
二、抗生素的分离和精制	54
三、酶及蛋白质的分离纯化	59
四、酒的澄清、除菌	61
五、发酵液预处理及菌体分离	64
六、天然产物的分离、提纯	68
参考文献	71
第四章 萃取	73
第一节 溶剂萃取的基本过程与有关理论基础	73
一、溶剂萃取的基本过程	73
二、理论基础	73
第二节 几种萃取流程及其理论收率	75
一、单级接触萃取	75
二、多级错流萃取	75
三、多级逆流萃取	76
四、微分接触逆流萃取	76
第三节 溶剂萃取设备	76
一、混合设备	76
二、分离设备	78
三、兼有混合和分离功能的萃取机	82
四、萃取设备的选择	89
第四节 萃取操作过程中常面临的问题	90
一、乳化	90
二、破乳化	90

三、溶剂回收	91
第五节 萃取纯化过程实例	91
一、青霉素的萃取纯化过程	91
二、红霉素的萃取纯化过程	95

第五章 吸附与离子交换

第一节 吸附和离子交换基本原理与过程	108
一、吸附的原理和类型	108
二、影响吸附的因素	109
三、离子交换的基本原理	110
四、离子交换工艺过程	111
五、影响离子交换的因素	113
第二节 吸附与离子交换操作及设备	116
一、吸附操作及设备	116
二、离子交换操作及设备	118
三、离子交换树脂的选择	121
第三节 吸附剂与离子交换树脂	122

第六章 制备性色谱

第一节 概述	141
一、色谱分离的基本概念	141
二、色谱分离的基本原理	141
第二节 常见的几种制备性色谱技术	142
一、凝胶过滤色谱法	142
二、离子交换色谱法	144
三、亲和色谱法	146
四、疏水性相互作用色谱	148
五、反相色谱	150
六、羟基磷灰石色谱	152
第三节 色谱分离路线的确定	153
一、色谱纯化过程	154
二、纯化路线设计	155
第四节 色谱分离过程的放大	157
一、线性放大原理	157
二、影响线性放大的因素	157
第五节 中试及工业级别的柱色谱设备	158

第七章 制备性电泳

第一节 电泳的理论基础	181
一、电荷的来源与等电点的概念	181
二、电泳迁移率	181
第二节 影响电泳迁移率的因素	182
一、电场强度	182

第六节 新型萃取技术	96
一、反胶团萃取技术	96
二、双水相萃取技术	100
参考文献	107

一、疏水或非极性吸附剂	122
二、亲水或极性吸附剂	123
三、大孔网状聚合物吸附剂	123
四、吸附树脂	124
五、离子交换树脂	125
第四节 吸附与离子交换技术的应用	128
一、灵菌红素的分离提取	128
二、谷氨酸的分离提取	129
三、柠檬酸的分离提取	135
四、头孢菌素 C 的分离提取	136
五、谷氨酰胺的分离提取	138
参考文献	140
一、工业色谱系统	141
二、模拟移动床色谱	165
三、环状旋转色谱	169
四、阵列式柱色谱	170
第六节 应用实例	172
一、重组人促红细胞生成素的分离纯化	172
二、大肠杆菌表达的人重组干扰素- γ	174
三、纯化酵母表达的重组人血清白蛋白	175
四、重组 (CHO 细胞) 乙肝疫苗的分离与纯化	176
五、模拟移动床色谱分离卡波前列素甲酯	177
六、模拟移动床分离甘露糖与葡萄糖的工艺	178
参考文献	179

二、溶液的 pH	182
三、溶液的离子强度	183
四、电渗现象	183
五、支持物的影响	184
六、焦耳热对电泳的影响	184

第三节 电泳的类型	184	二、电泳仪的相关装置	199
一、电泳类型概述	184	第六节 连续电泳	201
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳	185	一、连续洗脱电泳	201
三、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	187	二、连续自由流电泳	202
四、等电聚焦电泳	188	第七节 应用 Gradiflow BF400 仪器	
五、双向电泳	190	纯化蛋白质	206
六、毛细管电泳	192	一、Gradiflow BF400 仪器	206
七、逆向作用色谱电泳	193	二、Gradiflow BF400 仪器分离原理	207
第四节 样品的制备	194	三、Gradiflow BF400 仪器分离	
一、生物材料的选择	194	蛋白质注意事项	208
二、细胞的破碎	195	第八节 应用实例	209
三、生物大分子的提取	195	一、多克隆抗体的制备	209
第五节 制备性电泳系统的构成	196	二、纤维蛋白原的纯化	211
一、电泳仪	196	参考文献	211
第八章 蒸馏与精馏			
第一节 蒸馏过程及分类概述	213		213
第二节 蒸馏与精馏原理	213	一、分子蒸馏	231
一、双组分溶液气液平衡原理	213	二、水蒸气蒸馏的原理与设备	234
二、蒸馏原理	217	三、其他特殊蒸馏	236
三、精馏	218	第五节 应用实例	237
第三节 精馏设备	228	一、酒精生产中的蒸馏技术	237
一、板式塔	228	二、天然药物分离与纯化中的蒸馏	
二、填料塔	229	技术	240
第四节 特殊蒸馏	230	三、溶剂回收中的蒸馏技术	244
		参考文献	246
第九章 结晶技术			
第一节 结晶过程的基本理论	248		248
第二节 结晶的操作特性	249	第四节 生物制品结晶常面临的问题	
一、影响结晶的因素	249	与对策	265
二、晶垢现象与防止	250	一、生物体系的特点及结晶时	
三、晶习修改剂的作用与选择	250	相应的对策	265
第三节 结晶设备	251	二、影响结晶产品纯度和粒度	
一、结晶设备的分类	251	分布的因素及相应的对策	265
二、几种主要的通用结晶器	256	第五节 应用实例	268
三、结晶器的选择	262	一、青霉素的结晶过程	268
四、设计结晶设备应注意的条件	263	二、味精的结晶过程	271
五、结晶设备的新动向	264	参考文献	278
第十章 干燥技术			
第一节 干燥技术与设备	280		280
一、冷冻干燥技术与设备	280	一、药品冷冻干燥	307
二、喷雾干燥技术与设备	291	二、冻干生物制品的工艺流程	308
三、微波干燥技术与设备	296	三、冻干食品的工艺流程	308
四、流化床干燥技术与设备	299	四、酶制剂的喷雾干燥流程实例	310
第二节 应用实例	307	参考文献	311

第一章 绪论

近年来,基因工程和细胞工程等高新技术的发展,使得利用各种生物细胞生产各种各样的生物活性产品已经或可能成为现实,例如,1982年美国 Lilly 公司首先将重组胰岛素投放市场,标志着第一个重组蛋白质药物的诞生。1989年美国 Amgen 公司的基因重组药物 Epo 获得 FDA 的批准,目前已经过了专利保护期,但全球的销售额仍然可以达到 25 亿美元。它们无形之中起到了示范作用,使越来越多的人意识到了现代生物技术与工程的巨大潜力。

从理论上来说,利用现代生物技术可以创建很多可以完成某种特定的生物合成或生物转化的微生物新菌种以及动物或植物的新细胞株。将这些新菌种或动植物细胞进行产业化发酵或细胞培养,再经由提取纯化过程,最终能够得到人类需要的产品。由此可以看出,生物产品的提取与纯化过程是大多数生物技术产业化、商品化过程中必须经历的一个重要环节。这个过程通常也称为下游技术,包括细胞分离、细胞破碎和澄清、高效分离纯化、制剂过程。研究表明,为了生产出高活性、高纯度生物制品,生物工程技术研究经费的 30% 需花费在分离纯化工艺过程的研究上,即使这样,利用现有的纯化技术,在基因工程产品的纯化分离阶段的生产费用仍占产品总生产成本的 80%,这个问题在纯化蛋白质和核酸类生物医药时显得特别突出。

一、生物反应及生物产品

广义来说,生物反应过程是指利用生物催化剂从事生物技术产品的生产过程。当利用游离微生物细胞为生物催化剂时,一般称此过程为发酵过程、微生物培养过程、微生物转化过程等;当利用动植物细胞为催化剂时,常称为动植物细胞培养过程;当利用游离或固定化酶作为生物催化剂时,此过程称为酶反应过程。

通过各种生物反应过程生产的生物产品可以大致分为三类。一为小分子类,分子量通常为几十到几百,如氨基酸、有机酸、维生素、低聚糖、抗生素、激素及其他精细化学品。二为大分子类,分子量从 1000 到几十万,甚至上亿,如蛋白质类,核酸类和多糖类生物工程产品。三为颗粒类,主要是各种细胞或细胞器,如活性干酵母、各种益生菌活菌制剂、基因治疗中使用的病毒等。生物产品的这种多样性决定了生物分离技术的多样性。

(一) 小分子类生物产品

(1) 氨基酸类 可用做调味剂、营养强化剂和药物。谷氨酸一钠,俗称味精,是亚洲人喜欢的鲜味剂,目前国内年产量在 150 万吨左右,是生产量最大的氨基酸产品。甘氨酸可作甜味剂。DL-甲硫氨酸和 L-赖氨酸是非常重要的饲料添加剂。多种氨基酸的混合液是重要的急救药,用于补液。个别氨基酸也可药用。高纯的氨基酸及其衍生物是合成肽的原料,是重要的试剂。氨基酸的生产分生物合成(发酵)法、酶法和蛋白水解法三类。目前几乎找到了生产所有蛋白质中所含氨基酸的发酵菌,其中有生产价值的有十几种,如 L-谷氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-缬氨酸、L-苏氨酸等。酶法生产利用某些酶催化底物转变成相应的氨基酸。例如天冬氨酸酶可催化富马酸反丁烯二酸二铵盐转变成 L-天冬氨酸。也可利用此酶来生产 L-天冬氨酸。酶法的原料都比较昂贵,而微生物发酵大多用碳水化合物等便宜的原料,

但是酶法的产物容易提纯，因此依旧有竞争能力。L-天冬氨酸、L-甲硫氨酸、L-色氨酸及L-赖氨酸都可用酶法生产。个别氨基酸（如半胱氨酸）使用蛋白水解法。

(2) 抗生素类 抗生素是由微生物在繁殖过程中所产生的一类具有杀灭或抑制微生物生长的物质。目前抗生素的种类已达几千种。在临床上常用的亦有几百种。其中大多数是从微生物的培养液中提取的或者采用半合成方法制造的。分子量一般为几百。

(3) 有机酸类 目前国内可以利用生物合成法生产的有机酸有柠檬酸、乙酸、乳酸、苹果酸、衣康酸、葡萄糖酸、曲酸、丙酮酸、乙醛酸。其中柠檬酸是最重要的食品酸味剂，我国是世界第一柠檬酸生产和出口大国。L-苹果酸也是一种酸味剂，也用于合成洗涤剂、合成材料领域。丙酮酸是一种新型医药、农药和日化产品中间体。曲酸应用于化妆品与食品方面，可以消除人体内的自由基，具有增强白细胞活力等作用，有利于人体健康。

(4) 有机溶剂类 生物合成法生产的规模最大的溶剂是酒精。酒精是制作食用酒、医用酒精的主要原料。另外，燃料酒精作为可再生能源，不会枯竭。生物酒精作为石油的替代物，在国内外，都已经形成了相当的产业规模。其他的发酵有机溶剂有丙酮、丁醇等。

(5) 核苷酸类 核苷酸近年来被广泛用于营养强化剂、奶粉添加剂，医药原料等。5'-肌核苷酸（IMP）和5'-鸟苷酸钠（GMP）是重要的鲜味增强剂。目前核苷酸采用两种形式生产，即化学法和RNA降解法。RNA降解法是制造核苷酸较为通用的安全的方法。基本过程大约是培养酵母、提取RNA、酶解RNA、分离核苷酸、纯化核苷酸等过程。

(6) 维生素类 能够利用发酵法生产的维生素有维生素C，核黄素（维生素B₂），维生素B₁₂，维生素B₆。目前我国已成为全世界屈指可数的能够生产迄今发现的所有维生素品种的极少数国家之一，同时也是全球最大的维生素出口国之一，相当一些产品的生产工艺及产品质量在国际上处于领先地位。

（二）大分子类生物产品

(1) 蛋白质类大分子生物产品 蛋白质药物是生物医药产业的主体。美国是世界生物医药产业的龙头，目前已批准近150种蛋白质药物上市，蛋白质药物的产值和销售额已超过200亿美元。如促红细胞生长素（EPO），从1989年投入市场以后，已经为开发商Amgen公司带来了超过100亿美元的利润。主要采用动物细胞或微生物细胞培养的方法来生产。其提取纯化过程以色谱为核心的纯化手段。酶制剂是另外一类蛋白类生物产品，其应用在于催化各种化学反应，改良生产工艺。例如蛋白酶、淀粉酶、糖化酶、核酸酶、葡萄糖异构酶等。

(2) 多糖类大分子生物产品 采用生物合成的方法已经生产出很多种性能优异的多糖。如黄原胶，目前产销量最大的发酵多糖，在低浓度高温下都可以表现出高黏度；结冷胶，具有优异的凝胶性能；普鲁兰多糖，具有优良的成膜性、阻气性、可塑性、黏性。这些多糖可应用于：①医药行业、化妆品的填充料和黏结成形剂；②食品品质的改良剂和增稠剂；③用于防止氧化的水溶性的包装材料；④主食、糕点的低热能食品原料。

(3) 核酸类大分子 利用特种酵母发酵，可以制得RNA（核糖核酸）。而RNA是制造核苷酸的关键原料之一。

（三）细胞颗粒类

行业规模最大的细胞颗粒类生物产品是活性干酵母，它以粉末固体形式存在，是以活性酵母细胞为主要成分的产品。活性干酵母具有性能稳定、易于运输等优点，被广泛地应用于发酵面食加工和酿酒领域。酵母成为目前世界上唯一年产量超过百万吨的微生物。另一大类细胞颗粒类产品是益生菌类，以口服液、片剂或粉末的形式存在，如乳酸菌、双歧杆菌、酵母菌、纳豆芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等。对于人，可以防治腹泻等肠道疾病。应用于水产养殖，便于在水体中建立良好的微生物种群环境，有效抑制致病微生物，保持水体的生态平

衡,提高鱼、虾等种苗成活率;改善养殖体的肠道环境,减少肠道疾病的发生。应用于畜禽养殖,可防治腹泻和便秘,提高饲料利用率。

二、生物产品分离的一般工艺过程

生物分离技术是绝大多数生物技术从实验室走向工业化生产的必经环节。随着越来越多的高新生物技术进入商业化生产阶段,生物分离技术已经发展成为泛生物技术或泛生物化工领域中一个重要的独立的技术领域。生物产品的分离过程就是指从原始生物反应液中浓缩、提取和纯化目标生物产品的过程。由于目标产品质量要求的差异,以及目标物质对微生物生理的差异,比如有的为菌体细胞,有的为初级代谢产物,有的为次级代谢产物,所以生物产品的分离纯化工艺有多种组合。通常包括初步分离、粗提取、纯化和精制四个步骤。

(1) 初步分离 目的是搜集细胞或去除细胞、细胞碎片或其他不溶物。主要采用的技术手段有絮凝、沉淀、过滤、吸附等。如果是胞内产物还需要进行细胞的破碎和碎片的分离。原料液中常存在降解目标产物的杂质,如可水解目标蛋白质的蛋白酶。因此在此阶段要求用快速的分离纯化方法除去影响目标产物稳定性的杂质。

同传统的化工分离过程相比,发酵液也就是生物分离过程的原始料液,通常都是高黏度的非牛顿型流体。例如生产单细胞蛋白的发酵液,细胞干重含量为 30g/L,而以细胞湿体积计时,细胞含量则为 600g/L。另外发酵液的产物浓度非常低(见表 1-1)。所以这个步骤要避免使用能量消耗比较大的技术手段,注意产物富集,减少料液体积。比如维生素 B₁₂ 发酵液在初步分离阶段的浓缩比可以达到 1000 倍。如果发酵液的黏度很大,无法完成固液分离操作,也应做必要的稀释,比如土霉素在提取过程中要首先进行稀释。

表 1-1 发酵液中产物的一般浓度/kg·m⁻³

产 品	浓 度	产 品	浓 度
抗生素(青霉素 G)	10~30	有机酸(柠檬酸,乳酸)	40~100
酶制剂	2~5	核黄素	10~15
乙醇	70~120	维生素 B ₁₂	0.02

(2) 粗提取 目的在于初步提取目标产物,除去性质和目标物质差异较大的各种杂质。产物浓度很低时,该步骤还要起到浓缩富集的作用。主要采用的技术手段有萃取、离子交换与吸附、超滤或纳滤、选择性沉淀等。对于一个待分离的原料,一般利用原料中目标产物和共存杂质之间在物理、化学及生物学性质上的差异,使其在分离操作中具有不同的传质速率和平衡状态,从而实现分离的目的。对于特定的目标产物,要根据其自身的性质和共存杂质的特性,选择合适的分离方法,以获得最佳分离效果。即在保证目标产物的生物活性不受或少受损失的同时,达到所需的纯度和对回收率的要求,并使回收成本最小,以适应大规模商业生产的需要。

(3) 纯化 目的在于除去性质和目标物质性质差异不大而较难除去的杂质,显著提高产物的纯度。主要采用的技术手段有结晶、亲和分离、色谱等方法。

(4) 精制与产品定型 产物的最终用途决定了最终的加工方法,结晶以及重结晶是提高纯度的重要手段。大分子药用蛋白类产品常以一种色谱手段完成精制。大多数固态产品须经过干燥过程。

生物产品分离过程具有以下特点。

① 生物物质的生理活性对高温、pH 的改变及某些化学物质的存在很敏感,易造成活性的降低或丧失。因此,对分离纯化过程的操作条件有严格的限制。

② 生物分离过程的成本很高,这是由于特殊的稀溶液原料和高度的纯产物之间的巨大

变化和差异造成的。

③ 原料液中常存在与目标分子在结构、构成成分等理化性质上极相似的分子及异构体，形成用常规方法难以分离的混合物。因此，一般要利用特殊的高效分离技术纯化目标产物。

④ 生物产物一般用作医药、食品和化妆品，与人类生命息息相关。因此，要求分离纯化过程必须除去原料液中含有的热源及具有免疫原性的异体蛋白等有害人体健康的物质，但是允许对人体无害的少量杂质的存在。

三、生物产品分离过程的关键技术

生物产品分离过程所使用的技术手段，大部分源自于化学工业，根据生物分离过程的特点进行改造修饰之后应用于生物产品分离过程。下面首先介绍生物产品分离过程最常使用的关键技术。

(1) 过滤 根据分离的固体颗粒的大小来达到分离的目的。过滤常用于发酵液的菌体分离。常用的设备有板框式过滤机、真空转鼓过滤机等。

(2) 离心 根据分离对象的密度和大小来达到分离的目的。离心常用于结晶液的晶体分离等过程。离心技术在生物医药领域常应用于细胞及细胞器的分离。常用的设备有三足式离心机、碟片式离心机、螺旋沉降式离心机、管式离心机等。

(3) 膜分离 基于分离对象的颗粒或分子大小，选用不同的膜，可以实现微滤、超滤、纳滤和反渗透。可用于细胞分离、浓缩、脱盐等操作。主要的膜装置有板式膜、卷式膜、管式膜、毛细管式膜。

(4) 萃取 基于分离对象在不同溶剂体系中的溶解度的不同而达到分离的目的。常用于一些抗生素等有机小分子的提取过程，比如青霉素、红霉素等。主要的萃取设备有混合-沉降槽、碟片式离心机、三相倾析式离心萃取机（工业上称为 Decanter 机）、立式离心萃取机等。

(5) 吸附与离子交换 利用分离对象与吸附介质之间不同的物理化学相互作用而达到分离的目的。常用于具有一定有机酸、有机碱及其他有吸附特异性物质的分离。常用的设备主要是各种离子交换罐。

(6) 工业色谱技术 它也是基于分离对象和分离介质之间相互作用的不同而达到分离目的的。这种相互作用包括分子筛作用、静电相互作用、疏水性相互作用、特异性亲和作用等。主要用于药用蛋白、疫苗、核酸等物质的分离。

(7) 电泳技术 通过外加电场来使荷电性质不同的生物分子的运动速度或方向不同，从而将它们分离。可应用于药用蛋白、抗体等生物产品的纯化。主要的设备有澳大利亚 Gradi-pore 公司的大规模分离生物产品的电泳仪、法国的 RAMSES 连续自由流电泳装置等。

(8) 结晶 是利用分离对象在不同条件下溶解度的变化和差异而从液体中析出固体的一种分离方法。可应用于抗生素、有机酸、维生素等很多有机小产品分子的纯化。主要设备有真空蒸发结晶器、冷却结晶器等。

(9) 干燥 干燥是指控制一定的条件（如温度、压力等）将物料中的水分蒸发而使物料得到干燥的，进而便于保持生物活性，便于储存和运输。通常是将利用生物合成法得到的产品固态化的手段。比如通过喷雾干燥得到酶制剂、冷冻干燥得到固态疫苗制品、造粒干燥技术得到活性干酵母产品等。

(10) 蒸馏与精馏技术 是利用分离对象沸点的不同而进行分离的一种方法。主要用于发酵法生产的有机溶剂的提取、精油的制备以及萃取或沉淀过程中使用的有机溶剂的回收过程。主要的设备有各种类型的精馏塔。

以上这些技术及其相应的设备，在应用到生物工程领域特别是生物医药领域时，要根据生物产品的特殊性进行技术改造，应用于生物医药领域的设备要符合 GMP 生产管理规范。

主要的改造内容包括三个方面。

(1) 设备加工材料 与药品直接接触的设备表面应光洁、平整、易清洗或消毒、耐腐蚀,不与药品发生化学变化或吸附药品。设备所用的润滑剂、冷剂等不得对药品或容器造成污染。

(2) 技术参数 调整设备的结构与尺寸,使之适应生物产品加工的要求。比如应用于抗生素干燥的喷雾干燥设备,要根据抗生素具体品种的耐热性、水含量要求、生产规模等对喷雾干燥设备进行设计。

(3) 设备的易清洁性 设计生产设备时应考虑在定期清洗时方便彻底。

四、生物产品分离技术的发展趋势

从发展趋势来看,生化分离技术研究的目的是要缩短整个下游过程的流程、生产周期和提高单项操作的效率,现行的单元操作技术存在着生产周期长、收率低等特点。

(一) 生物分离过程的高效集成化

生物分离过程的高效集成化的含义在于利用已有的和新近开发的生化分离技术,将下游过程中的有关单元进行有效组合(集成),或者把两种以上的分离技术合成为一种更有效的分离技术,达到提高产品收率、降低过程能耗和增加生产效益的目标。这种只需一种技术就达到完成后处理过程中几步或全部操作的方法,高度体现了过程集成化的优势。具体说来,目前研究开发的热点包括:将双水相分配技术与亲和法结合而形成的效率更高、选择性更强的双水相亲和萃取技术;将亲和色谱及膜分离结合的亲和膜分离技术;将离心的高处理量、超滤的浓缩效能及层析的纯化能力合而为一的膨胀床吸附技术等。新开发的卧式螺旋离心分离机集细胞分离、液液萃取于一体,大大缩短了生产周期,提高了收率。

(二) 生物反应与生物分离过程的耦合

从理论上来说,生物反应和各种分离技术包括吸附、萃取、膜分离、离子交换等的耦合都能使生物反应可以耐受高浓度底物、减少产物抑制,进而提高生物反应的速率和收率,降低能耗。生物反应和分离耦合的技术具有更大的发展潜力。中国发明专利 01131184 公开了一种利用气升式发酵与活性炭吸附分离耦合技术制备酒精的方法和专用设备,发酵产生的含酒精的气体连续由活性炭塔完成吸附和解吸操作,由冷凝器搜集的酒精浓度达到 69%~72%,取代了酒精的一级蒸馏,降低了酒精蒸馏能耗,最终可使酒精生产成本降低 30%以上。中国发明专利 200610053246.0 公开了一种发酵与超滤膜分离耦合制备壳低聚糖和壳寡糖的方法,壳低聚糖产量比间歇发酵提高 5 倍。

(三) 新型高效分离材料的开发

主要是指各种新型色谱分离介质的开发。分子印迹技术提供了一种简单、直接制备具有分子识别能力的分离介质的方法,利用该技术可以制备各种生物分子的亲和配基。已应用于氨基酸及衍生物、单糖、核酸、多肽等物质的分离,特别是在外消旋混合物的手性分离方面得到了广泛的应用。另外一种新型介质是智能高分子材料,外界环境(如温度、pH、离子强度、外加试剂、光、电场或磁场等)发生微小变化时,聚合物分子微观结构会发生快速、可逆的转变,在宏观上表现为水溶液中溶解度的变化或聚合物水凝胶体积和含水量的变化。将这种转变结合到亲和沉淀、色谱分离、双水相萃取等技术中,可以产生令人惊喜的效果。

(四) 新型分离技术的研究与开发

根据生物产品体系的特点,开发新型分离技术。由于蛋白质体系的流变特性因其所含生

物质的种类和浓度变化很大,从拟塑性、黏塑性到胀塑性,剪切方式的变化使动量传递和质量传递的类比关系发生明显变化,传质系数随摩擦系数的增加而增加的趋势要比在普通化工流体中小得多。因此当分离蛋白质组分样品时,过程设计应避免采用加大动量输入的方式,而主要通过增加传质面积,缩短传递路径来强化传质,例如泡沫分离和液膜分离的方法。由于大部分生物产品分子都具有某种荷电特性,在电场作用下即可产生加速运动。因此可利用电场强化传质速率。例如多通道电泳技术颇具有放大前景。这些技术大多还停留在小试或中试的水平上。

参考文献

- [1] 张勋,章银良,刘红伟.生物产品分离工程进展[J].中国食品学报,2002,(4).
- [2] 周加祥,刘铮.生物分离技术与过程研究进展[J].化工进展,2000,(6).
- [3] 江宁.生物液体燃料——燃料酒精[J].自然杂志,2007,(1):30-33.
- [4] 梅乐和,姚善泾,林东强等.生物分离过程研究的新趋势——高效集成化[J].化学工程,1999,(5).
- [5] 詹劲,刘铮.智能聚合物在生物分离工程中的应用现状与展望.精细化工,2001,(09):534-537.
- [6] Roger G Harrison, Paul Todd, et al. Bioseparations Science and Engineering. Oxford University Press, 2003.
- [7] Grandison A S, Lewis M J. Separation processes in the food and biotechnology industries: Principles and Applications. Woodhead Publishing Limited, 1996.
- [8] Flickinger, Drew M C, Stephen W. Encyclopedia of Bioprocess Technology-Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. John Wiley & Sons. 1999.
- [9] 陈洪章,李佐虎.采用气升式发酵分离耦合技术制备酒精的方法和专用设备.中国发明专利01131184. 2004.
- [10] 郑连英,张匡.发酵与分离耦合制备壳低聚糖和壳寡糖的方法.中国发明专利:200610053246.0, 2006.
- [11] 陈洪章,李佐虎.采用气升式发酵分离耦合技术制备酒精的方法和专用设备[P].中国发明专利:01131184, 2003.

第二章 过滤和离心

生物工程产品，一般存在于发酵液、培养液或固体培养基的提取液中，有的为细胞内产物，有的为细胞外产物，为了提取产物，往往必须将悬浮的固体与液相分离。另外，结晶、固液反应的后续操作也都需要进行固液分离。过滤常用于发酵液的菌体分离，而离心常用于结晶液的晶体分离等过程。特别是离心技术可以在密闭环境中进行，具有良好的生物安全性，可以满足行政法规中针对基因重组产品的生产提出的严格要求，因而成为现代生物工程技术中必不可少的重要分离方法。超速离心可用于多组分体系中具有不同密度或沉降系数的物质的分离，这是其他技术所不能实现的。

第一节 过滤和离心的基本原理与技术

一、过滤的基本原理与技术

(一) 基本概念

1. 过滤过程

过滤是在外力作用下，使悬浮液中的液体通过多孔介质的孔道，而悬浮液中的固体颗粒被截留在介质上，从而实现固、液分离的操作，目的可能是为了获得液体产品，也可能是为了得到固体产品。其中多孔介质称为过滤介质；所处理的悬浮液称为滤浆；滤浆中被过滤介质截留的固体颗粒称为滤饼或滤渣；通过过滤介质后的液体称为滤液。驱使液体通过过滤介质的推动力可以有重力、压力（或压差）和离心力，其中以压力差最为常见。一个过滤循环包括过滤、洗涤、卸渣、清理、装合等操作。其中滤饼洗涤的作用在于回收滞留在颗粒缝隙间的滤液或除去滤饼中的可溶性盐，净化构成滤饼的颗粒。

2. 过滤方式

工业上的过滤方法主要有滤饼过滤和深层过滤两种方式。

(1) 滤饼过滤 悬浮液中颗粒的尺寸大多都比介质的孔道大。过滤时悬浮液置于过滤介质的一侧，在过滤操作的开始阶段，会有部分小颗粒进入介质孔道内，并可能穿过孔道而不被截留，使滤液仍然是浑浊的。随着过程的进行，颗粒在介质上逐步堆积，形成了一个颗粒层，称为滤饼。在滤饼形成之后，它便成为对其后的颗粒起主要截留作用的介质。因此，不断增厚的滤饼才是真正有效的过滤介质，穿过滤饼的液体则变为澄清的液体。在实际操作中，常将过滤之初的悬浮液料液槽重新处理。工业生产上，固相含量较高、固相体积分数大于1%的过滤过程多数属于滤饼过滤。

(2) 深层过滤 此时，颗粒尺寸比介质孔道的尺寸小得多，颗粒容易进入介质孔道。但由于孔道弯曲细长，颗粒随流体在曲折孔道中流过时，在表面力和静电力的作用下附着在孔道壁上。因此，深层过滤时并不在介质上形成滤饼，固体颗粒沉积于过滤介质的内部。这种过滤适合于处理固体颗粒含量极少、固相体积分数小于0.1%、且处理量较大的悬浮液的分离，如浑浊药液的澄清、培养基的过滤除菌等。

3. 过滤速度与滤饼的比阻

过滤速度指单位时间内通过单位过滤面积的滤液体积,可用下式表达:

$$u = \frac{V}{A d \theta} = \frac{\epsilon^3 \Delta p_1}{2 K_0 S_0^2 (1 - \epsilon)^2 \cdot \mu L} = \frac{\Delta p_1}{r \mu L} = \frac{\text{推动力}}{\text{阻力}} \quad (2-1)$$

式中, u 为瞬时过滤速度, $\text{m}^3/(\text{s} \cdot \text{m}^2)$, m/s ; V 为滤液体积, m^3 ; A 为过滤面积, m^2 ; θ 为过滤时间; ϵ 为滤饼层空隙率; Δp_1 为滤液通过滤饼层时的压力降; K_0 为孔道长度与滤饼厚度的关系系数; S_0 为固体颗粒的比表面积; μ 为滤液黏度; L 为滤饼的厚度。

过滤速度等于滤饼层推动力/滤饼层阻力。滤饼层推动力为滤浆一侧和滤液透过一侧维持一定的压差,而滤饼层阻力由两方面的因素决定,一是滤饼层的性质及其厚度,二是滤液的黏度。 $\frac{1}{r} = \frac{\epsilon^3}{2 K_0 S_0^2 (1 - \epsilon)^2}$,称为滤饼的比阻,指滤液通过单位滤饼厚度的阻力;其值完全取决于滤饼的性质。当滤饼不可压缩时,过滤速度与过滤压力成正比。但是当滤饼具有可压缩性时,大多数发酵液都是具有可压缩性的,过滤压力增加,滤饼层阻力也增加,当过滤压力超过某一个数值后,继续增加压力,滤饼层阻力也同倍增加,故过滤速度不会增加。发酵液过滤时,原则上应在很低的压力下进行,压力的提高应缓慢逐步地调整,最适的压力应根据实验确定的滤饼的比阻与压力的关系式来决定,大概的范围不应超出 2~3 个大气压。最忌一开始就加大过滤压力,这样就会在滤布表面上形成一层紧密的滤饼层,使过滤速度很快就无可挽回地降低下来。

为了提高过滤速度,降低滤饼的比阻,工业上采用向料液中添加絮凝剂和过滤时使用助滤剂的方法。

(二) 絮凝剂

1. 发酵液过滤前使用絮凝剂的必要性

发酵液体中的细菌菌体及其他大量存在的胶体粒子,尺寸大多在 $10\mu\text{m}$ 以下,因此滤饼的比阻是相当高的。另外,悬浮固体粒子表面上发生的表面现象也会影响滤饼比阻,如胶体粒子表面上吸引了许多水分子,这些水分子在毛细管壁面上形成不流动的液体层,导致毛细管有效横截面积的减小,使滤饼比阻增加。向滤浆中加入絮凝剂,目的在于使滤浆中的微小固体颗粒聚集,形成较大的固体颗粒,导致毛细管孔道横截面积的增大,固体颗粒硬度也有所增加,滤浆的比阻就会下降,过滤速度加快。

2. 无机盐类絮凝剂

菌体细胞壁面上有羧基和氨基,在中性液体中,酵母、细菌、霉菌等微生物表面上一般带负电荷。发酵液中所含的蛋白质类大分子物质也通常带有电荷。因此一般可在发酵液中添加无机盐电解质,中和表面上的电荷,并使小粒子得以互相碰撞聚集成大的颗粒。还有另外一种作用机制,是用无机盐生成的庞大的沉淀物,把液体中的悬浮粒子机械地包着吸附在其中。例如在发酵液中加氯化钙和磷酸氢二钠,两者立即生成庞大的凝胶状沉淀,多余的钙离子又和发酵液中菌体自溶放出的、使液体浑浊的核酸类物质生成不溶性钙盐,庞大的磷酸钙凝胶就把这些和其他粒子机械地包着在其中。也可以使用有机聚合电解质。

3. 高分子合成絮凝剂

高分子合成絮凝剂有非离子型、阳离子型、阴离子型和两性型四种。高分子絮凝剂的分子很大,它的各个区段上具有特殊的吸附作用,它可以与悬浮的粒子起桥联作用,形成大的絮团而起到絮凝作用。高分子电解质絮凝剂,还可以通过中和颗粒上的电荷而有利于絮凝。因此高分子电解质絮凝剂的效果比非电解质高分子合成絮凝剂往往更好,比单纯无机盐类絮凝剂效果也好一些。而阳离子型、阴离子型和两性型分别适用于发酵液中的固体颗粒主要为阴离子、阳离子、阴阳离子差距不大三种情况。

高分子电解质絮凝剂的添加浓度一般很低，在 2% 以下。高分子絮凝剂的使用效果与许多因素有关，其中最重要的因素是，添加的浓度、pH、搅拌的雷诺数和在一一定的搅拌雷诺数时的搅拌时间。最合适的条件只能根据实验进行优化。絮凝剂添加浓度从零开始增加时，悬浮粒子被絮凝的量也随之增加，但超过一定浓度后，已絮凝的粒子又发生分散。絮凝剂与悬浮粒子接触是发生絮凝的前提条件，必须搅拌，但生成的絮凝物是很脆弱的，过分的搅拌使絮状物的破碎大于絮状物的生成。

常用有机高分子絮凝剂有：聚丙烯酰胺（PAM）、聚丙烯酸钠、聚氧乙烯、聚乙烯胺、聚乙烯磺酸盐等，其中聚丙烯酰胺的应用最多，占合成高分子絮凝剂的 80% 左右。然而这一类絮凝剂由于存在着一定量的残余单体丙烯酰胺，不可避免地带来毒性，所以限制了它的应用。

(三) 过滤介质和助滤剂

1. 对过滤介质要求

(1) 过滤介质对固体颗粒的捕集能力 捕集能力就是能截留的最小颗粒尺寸。捕集能力取决于介质本身的孔隙大小及分布情况。

(2) 渗透率 过滤介质的渗透率反映了它对滤液流动的阻力，它影响过滤机的生产强度和过滤推动力——压强差。过滤介质的渗透率与介质本身的空隙率有关。常用过滤介质的空隙率如表 2-1。

表 2-1 常用过滤介质的空隙率

过滤介质	硅藻土	石英砂	纸	陶瓷	滤布
空隙率/%	80~90	40	60~95	30~50	30~50

(3) 卸渣和清洗再生性能 卸渣能力就是指过滤结束后能利用滤饼自身性质或压缩空气吹除，机械刮除等措施把滤饼从介质表面除净的能力，这对于转鼓、翻盘、带式真空过滤机等连续过滤机来说是维持正常操作的先决条件。过滤过程中总有少量滤渣颗粒堵塞在介质孔隙中，必须在每个操作循环的卸渣工序结束后用冲洗、吹扫等方法把颗粒从介质表面、孔隙中清洗掉，以维持介质的过滤效率和性能。再生性能主要取决于过滤介质的构成材料和纺织、加工方法（制造工艺）。

(4) 化学稳定性能 由于过滤过程所处理的物料多种多样，它们的化学性质各不相同。有酸性物料、碱性物料、强氧化性物料、有机溶剂类物料等，而且都在一定的温度下过滤。这就要求所选用的过滤介质结构材料能在被处理的物料中具有良好的化学稳定性，耐化学腐蚀，耐温度变化，耐微生物作用。

(5) 材料的物理性能和机械性能 材料的物理性能和机械性能包括吸湿性、耐磨性、机械强度、伸延率等，均影响介质的过滤性能及使用寿命。不同类型结构的过滤机对介质物理、机械性能要求也有差异，如板框式过滤机与叶片过滤机、转鼓过滤机相比，对滤布的机械强度要求更高。带式过滤机对滤布的强度要求比倾覆盘式过滤机高，而且要求一定负荷下延伸率尽可能低。

以各种天然及合成纤维为原料织造的各种滤布在过滤操作中应用最为广泛。目前使用的滤布主要由下列纤维组成：涤纶-聚酯、锦纶-尼龙*（聚丙烯酰胺）、丙纶-聚丙烯、腈纶-维纶-聚乙烯醇、聚丙烯腈；尼龙（聚酰胺）。

各种滤布合成纤维的物理性质见表 2-2。

滤布的编织方法和纱型对过滤也有影响，见表 2-3。

纺织滤布由三种不同类型的纱线织成：单丝、复丝长纤（定长纤维纱）和短丝。单丝—

一般是合成纤维拉成直径 0.16~0.32mm (某些场合甚至为 1) 的单根长丝, 由它织成的滤布具有表面光滑、空隙单纯、比阻小、堵塞性最小、易清洗和最佳卸渣性能等优点, 但它捕集粒子的圈套直径大, 精密过滤时不宜采用。对粒径分布范围较宽的悬浮液分离时, 分离效果受到影响。复丝长纤纱是由两股以上原丝捻纺而成, 用它织成滤布, 布面光滑, 透气性能好, 抗拉强度高, 对颗粒的截留性能较单丝为好, 卸渣性能稍差。短纤是用天然棉、毛纤维或合成短纤维多股捻制而成, 纺成的纱丝带毛, 滤布布面带毛, 因其呈现良好的颗粒截留性能, 密封性也佳, 但缺点是孔隙易被粒子堵塞, 清洗和卸渣性能较差。

表 2-2 各种滤布合成纤维的物理性质

性能	涤纶	锦纶	丙纶	维纶
耐酸性	强	较差	良好	不耐酸
耐碱性	耐弱碱	良好	强	耐强碱
导电性	很差	较好	良好	一般
断裂伸长	30%~40%	18%~45%	大于涤纶	12%~25%
回复性	很好	在伸长 10% 时回复率在 90% 以上	略好于涤纶	较差
耐磨性	很好	很好	好	较好
耐热性	170℃	130℃ 略收缩	90℃ 略收缩	100℃ 有收缩
软化点	230~240℃	180℃	140~150℃	200℃
熔点	255~265℃	210~215℃	165~170℃	220℃

表 2-3 编织法和纱型对过滤的影响

滤布织法	高流量	颗粒保持性	易卸料	滤饼干	堵塞少	寿命长	滤液清
平纹	差	最好	差	差	差	好	最好
斜纹	好	尚好	好	好	好	最好	好
缎纹	最好	差	最好	最好	最好	差	差
单丝	最好	尚好	最好	最好	最好	较好	较好
复丝	好	好	好	好	好	好	好
短丝	尚好	最好	尚好	尚好	尚好	尚好	最好

滤布的编织方法也有三种: 即平纹、斜纹和缎纹。通常, 平纹滤布构造致密、孔隙小, 故颗粒截留性好, 滤液澄清度高, 使用寿命长, 价格也较便宜。缺点是比阻大, 易堵塞, 卸渣性能差。缎纹织布的孔隙最大, 比阻小, 不易堵, 卸渣性能好。但颗粒截留能力低, 穿滤严重, 过滤效果差。斜纹滤布的各项性能居中, 抗摩擦能力很强, 过滤速度也大, 寿命最长, 因而被广泛应用。

为了改善滤布的过滤特性和物理、机械性能, 可以对织成的滤布进行织后精加工。其加工方法有: 研光、起绒、热轧处理三种。研光是将滤布坯布通过一对高压的热滚筒, 把滤布压薄, 使坯布表面光滑, 降低滤布纱线间的空隙率, 以改善滤布对颗粒的捕集性能和卸渣能力。研光后的滤布强度有些降低。起绒是指在滤布坯布的一面或两面用微齿钢梳刷滤布, 使其表面产生细柔的绒毛, 提高滤布截留微小细粒子的能力, 改善分离效果, 提高滤液的澄清度。热轧处理只限于合成纤维滤布, 目的是改善滤布的热稳定性或机械强度, 使之更适于在较高温度下操作。特别是对于单丝织成的滤布必须进行热轧处理。

滤布的选择对过滤效果的好坏很重要, 在压滤机使用过程中, 滤布起着关键的作用。其性能的好坏, 选型是否正确直接影响着过滤效果。选择滤布通常需满足下列条件: 产生清洁的滤液, 滤布不易堵塞、卸饼情况好, 滤布耐清洗, 具有一定的机械强度和化学耐蚀性,