

高等学校教材

SHENGHUA FENLI JISHU  
YUANLI JI YINGYONG

# 生化分离技术 原理及应用

杜翠红 邱晓燕 主编  
曹敏杰 主审



化学工业出版社

# 生化分离技术原理及应用

杜翠红 邱晓燕 主编

曹敏杰 主审



化学工业出版社

·北京·

本书系统介绍了生物分离工程中所涉及的各种单元操作和关键技术。包括生物分离工程中的四大模块：不溶物的去除、产品粗分离、产品纯化及产品精制。主要涉及十个单元操作：发酵液预处理及液固分离技术、细胞破碎技术、沉淀、结晶、膜分离技术、萃取技术、色谱分离技术、电泳技术、磁性分离技术、溶剂去除与干燥技术等。每个单元操作均包括基本原理、特点及应用范围、操作过程及其影响因素、常用设备及应用实例。

本书可作为从事生物技术、生物化工、生物制药等方面科研工作的科研人员及高校生物工程专业师生的实用参考书。

### 图书在版编目 (CIP) 数据

生化分离技术原理及应用/杜翠红, 邱晓燕主编.  
北京: 化学工业出版社, 2011. 8  
ISBN 978-7-122-11719-9

I. 生… II. ①杜…②邱… III. 生物化学-分离  
IV. TQ33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 129816 号

---

责任编辑: 路金辉

文字编辑: 焦欣渝

责任校对: 洪雅姝

装帧设计: 周 遥

---

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: 化学工业出版社印刷厂

720mm×1000mm 1/16 印张 13¼ 字数 261 千字 2011 年 10 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: 38.00 元

版权所有 违者必究

# 前 言

生化分离技术是生物产品生产过程中下游加工过程的重要组成部分。随着现代生物工业技术的不断进步，对下游加工过程的分离纯化技术提出了新的要求，从而促进其不断发展。其发展趋势为：一是传统分离技术的提高和完善；二是多种分离纯化技术相结合，形成新型的融合技术。

本书在编者多年的教学和科研的基础上，系统介绍了生物分离工程中所涉及的各种单元操作和关键技术。包括生物分离工程中的四大模块：不溶物的去除、产品粗分离、产品纯化及产品精制。主要涉及十个单元操作：发酵液预处理及液固分离技术、细胞破碎技术、沉淀、结晶、膜分离技术、萃取技术、色谱分离技术、电泳技术、磁性分离技术、溶剂去除与干燥技术等。每个单元操作均包括基本原理、特点及应用范围、操作过程及其影响因素、常用设备及应用实例。

本书在讲述各种单元操作基础理论的同时，更注重理论联系实际。根据实际情况介绍产品分离纯化的典型实例与工艺设计策略。尤其是色谱分离技术一章，编者结合本课题组的科研工作，列举了有关蛋白质和酶等生物大分子物质及重组蛋白的柱色谱分离技术典型实例与工艺设计策略，使其具有较强的实用性。通过本书的学习，使读者能够针对不同的生化产品的特性，独立运用所学的有关生化分离技术方面的知识，设计合理的提取或精制的工艺路线和改造现有工艺。

本书可作为从事生物技术、生物化工、生物制药等方面科研工作的科技人员及高校生物工程专业师生的实用参考书。

书稿在编写过程中得到曹敏杰教授的总体指导和审阅，另外蔡秋风老师、张凌晶老师及本课题组的几位在读研究生也收集和提供了大量资料，对他们的辛苦工作一并表示感谢！

最后特别感谢化学工业出版社的大力支持，使本书得以顺利出版。

由于编者水平有限，书中难免存在不足之处，真诚希望得到同行及广大读者的批评指正。

编者

2011年4月

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1
一、生化分离工程的特点.....	1
二、生化分离工程的一般流程.....	2
三、生化分离过程的选择原则.....	4
四、生化分离过程的发展方向.....	7
思考题.....	8
参考文献.....	8
<b>第二章 发酵液预处理及固液分离</b> .....	9
<b>第一节 发酵液的预处理</b> .....	9
一、发酵液的特性.....	9
二、发酵液的预处理方法.....	9
三、去除杂质的方法.....	12
<b>第二节 固液分离</b> .....	13
一、过滤.....	13
二、离心.....	15
思考题.....	20
参考文献.....	21
<b>第三章 细胞破碎</b> .....	22
<b>第一节 细胞壁结构和化学组成</b> .....	22
一、细菌细胞壁.....	22
二、真菌及酵母菌细胞壁.....	23
三、植物细胞壁.....	24
四、细胞壁结构与细胞破碎.....	26
<b>第二节 破碎缓冲液组成</b> .....	27
<b>第三节 细胞破碎方法</b> .....	27
一、机械法.....	28
二、非机械法.....	32
<b>第四节 影响破碎率的因素和检测破碎率的方法</b> .....	35
一、影响细胞破碎率的因素.....	35

二、检测细胞破碎率的方法 .....	35
思考题 .....	36
参考文献 .....	36
<b>第四章 沉淀与结晶 .....</b>	<b>37</b>
<b>第一节 沉淀 .....</b>	<b>37</b>
一、盐析沉淀法 .....	38
二、有机溶剂沉淀法 .....	42
三、等电点沉淀法 .....	46
四、聚合物沉淀法 .....	46
五、选择性变性沉淀法 .....	47
六、生成盐类复合物的沉淀法 .....	47
七、亲和沉淀法 .....	48
八、SIS 聚合物与亲和沉淀法 .....	48
<b>第二节 结晶 .....</b>	<b>48</b>
一、结晶过程 .....	49
二、提高晶体质量的方法 .....	53
三、结晶操作与结晶设备 .....	55
思考题 .....	60
参考文献 .....	60
<b>第五章 膜分离技术 .....</b>	<b>61</b>
<b>第一节 概述 .....</b>	<b>61</b>
一、膜分离技术发展的历史 .....	61
二、膜的概念 .....	61
三、膜分离的基本定义 .....	61
四、膜分离技术的特点 .....	62
<b>第二节 膜的分类 .....</b>	<b>62</b>
一、根据膜相态分类 .....	62
二、根据膜来源分类 .....	62
三、根据固体膜的外形分类 .....	63
四、根据膜断面的物理形态分类 .....	63
五、根据膜的孔径大小和功能分类 .....	63
<b>第三节 膜分离过程 .....</b>	<b>63</b>
一、微滤 .....	64
二、超滤 .....	64

三、纳滤 .....	65
四、反渗透 .....	66
五、透析 .....	66
六、电渗析 .....	67
七、渗透蒸发 .....	67
第四节 膜污染 .....	68
一、膜污染的类型 .....	68
二、膜污染的影响因素 .....	69
三、膜污染的控制方法 .....	69
四、膜的清洗和再生 .....	69
第五节 膜组件 .....	70
一、管式膜组件 .....	70
二、平板式膜组件 .....	71
三、螺旋卷式膜组件 .....	71
四、中空纤维膜组件 .....	72
第六节 膜分离技术的应用 .....	73
一、实验室规模的应用 .....	73
二、工业生产中的应用 .....	73
三、工业生产中的应用实例 .....	74
第七节 新型膜分离技术 .....	76
一、亲和膜分离 .....	76
二、亲和超滤 .....	77
思考题 .....	79
参考文献 .....	79
<b>第六章 萃取技术 .....</b>	<b>80</b>
<b>第一节 溶剂萃取 .....</b>	<b>80</b>
一、概述 .....	80
二、基本概念 .....	80
三、萃取方式 .....	82
四、影响溶剂萃取的因素 .....	84
五、萃取设备 .....	86
六、应用实例 .....	88
<b>第二节 双水相萃取 .....</b>	<b>90</b>
一、简介 .....	90
二、双水相的形成 .....	90

三、双水相萃取的基本概念 .....	91
四、双水相萃取过程 .....	93
五、影响双水相萃取的因素 .....	94
六、双水相萃取技术的应用 .....	95
第三节 反胶团萃取 .....	97
一、概述 .....	97
二、反胶团的形成及其基本性质 .....	98
三、反胶团萃取原理 .....	99
四、反胶团萃取的影响因素 .....	100
五、反胶团萃取操作 .....	102
第四节 超临界流体萃取 .....	104
一、概述 .....	104
二、超临界流体的特性 .....	104
三、超临界流体萃取的影响因素 .....	105
四、超临界流体操作方式 .....	106
五、超临界流体萃取技术在工业中的应用 .....	107
思考题 .....	111
参考文献 .....	111
<b>第七章 色谱分离技术</b> .....	<b>112</b>
第一节 色谱分离技术基本理论 .....	112
一、色谱分离的基本概念及其特点 .....	112
二、色谱分离的分类及其基本原理 .....	113
三、色谱理论 .....	116
四、色谱过程和仪器设备 .....	123
第二节 常用柱色谱分离技术 .....	127
一、凝胶过滤色谱 .....	127
二、离子交换色谱 .....	136
三、亲和色谱 .....	142
四、疏水作用色谱 .....	147
五、反向色谱 .....	152
第三节 柱色谱分离的工艺设计策略及典型实例 .....	155
一、柱色谱分离的工艺设计策略 .....	155
二、柱色谱分离的典型实例 .....	158
思考题 .....	173
参考文献 .....	174



<b>第八章 电泳与磁性生物分离技术</b> .....	176
<b>第一节 电泳技术</b> .....	176
一、电泳技术简介.....	176
二、影响蛋白质电泳迁移率的因素.....	176
三、几种典型的电泳技术.....	177
<b>第二节 磁性生物分离</b> .....	186
一、磁性分离技术的基本原理.....	186
二、磁性分离需要的材料和装置.....	187
三、磁性生物分离的应用.....	187
<b>思考题</b> .....	190
<b>参考文献</b> .....	190
<b>第九章 溶剂去除与干燥</b> .....	192
<b>第一节 蒸发</b> .....	192
一、蒸发的基本概念.....	192
二、蒸发过程及系统组成.....	192
三、蒸发的操作方法.....	192
<b>第二节 干燥</b> .....	193
一、干燥的基本概念.....	193
二、干燥的基本过程.....	193
三、干燥的方法.....	195
四、生物工业常用的干燥技术.....	196
<b>思考题</b> .....	201
<b>参考文献</b> .....	201

# 第一章 绪 论

在生物技术领域，一般将生物产品的生产过程称为生物加工过程 (bioprocessing)，具体将其分为 3 个过程：上游加工过程 (upstream bioprocessing)、中游加工过程 (midstream bioprocessing) 和下游加工过程 (downstream bioprocessing)。上游加工过程主要涉及优良生物物种的选育、定向进化及基因工程改造等；中游加工过程涉及生物反应过程，包括酶催化反应、动植物细胞培养、微生物发酵等；下游加工过程又称为生物 (化) 分离工程 (bioseparation engineering)，涉及目标产物的分离纯化、加工及精制过程。下游加工过程主要由一些化工的分离单元操作组成，但由于生物物质的特性有其特殊要求 (如生物活性或热敏性)，因此还需要一些特殊的分离技术。

下游加工过程是生物制品产业化的必经之路和关键所在，它直接影响产品的纯度、收率和成本。对于某些基因工程产品，其下游技术的成本甚至占总成本的 70%~90%。因此，在生物大分子药物生物加工过程中，分离过程的质量往往决定整个生物加工过程的成败。生化分离技术的进步程度对企业保持和提高生物技术领域的经济竞争力是至关重要的。

## 一、生化分离工程的特点

生物产品大多具有生物活性，在分离纯化过程中必须根据目标产物的特点，在保持其生物活性的前提下进行分离纯化。因此，生物分离不同于一般化工产品的分离纯化，具有以下显著特点：

### 1. 原料液中目标产物浓度低

大多数产物在原料液中的浓度在 0.001~10g/L，因此，要从庞大体积的原料液中分离纯化目标产物，就需对原料液进行高度浓缩，这是造成生物分离成本高的原因之一。而且原料中目标产物浓度越低，所需能耗越高，分离过程成本越高。

### 2. 目标产物稳定性差

大部分生物产品都具有生物活性，离开生物体环境，容易变性，分子结构易被破坏。在分离过程中，过酸、过碱、高温、高压、重金属离子及剧烈的搅拌和机体自身酶的作用都会破坏这些分子的生物活性，因此，在分离过程中，要注意选择合适的操作条件保护其活性。一般情况下，选择温和的条件，并尽可能在较低温度和洁净的环境中进行。

### 3. 产品质量要求高

许多生物产品是药品、生物试剂或食品，必须达到药典、试剂标准和食品规范

的要求。特别是用于注射的生物制品，要求在生产过程中去除热原及具有免疫原性的异体蛋白等有害物质，并且需防止这些物质在分离操作过程中从外界进入。

#### 4. 原料液成分复杂

首先，生物体自身组分十分复杂，其不仅包含核酸、蛋白质和多糖等生物大分子，还包含氨基酸、有机酸和有机碱等小分子代谢产物，这些物质形状、大小、分子量和理化性质各不相同，有些还是未知物质；其次，在发酵或细胞培养过程中，配制培养基时，加入的各种营养成分增加了原料成分的复杂性。因此，需要采用多种分离技术和多个分离步骤完成一个目标产物的分离纯化任务。

#### 5. 具有经验性

生化分离几乎都在溶液中进行，各种参数（温度、pH、离子强度等）对溶液各组分的综合影响常无法固定，以致许多实验的设计理论性不强，实验结果有很大的经验成分。因此，一个实验的重复性建立，从材料到方法直至各种环境条件、使用的试剂药品，都必须严格加以规定。

#### 6. 均一性的相对性

生化分离得到的产物均一性的证明与化学上纯度的概念不完全相同，不是绝对纯度，而是具有相对性。这主要是由于生物分子对环境反应十分敏感，结构与功能关系较复杂，纯度鉴定的某一种方法往往只利用其一方面性质，因此常需采用不同的分离方法来判断其纯度，最后才能给出相对的“均一性”结论。例如：某样品用 SDS-PAGE 电泳证明是纯的，但通过高效液相色谱却可分为多种组分。前者称为电泳级纯度；若通过后者可得到单一组分则称为色谱级纯度。另外，遗传工程产品的鉴定中，又常发现 N 端是不均一的，存在微观不均一性。例如，新型 IL-2(Ser-125) 的 N 端，部分是 Ala—Pro—Thr—Ser—Ser…，部分携有 Met，故其序列是 Met—Ala—Pro—Thr—Ser—Ser…，但不影响其生物活性，仍认为是均一的。

#### 7. 生物变异性大

发酵和培养很多是分批操作，各批发酵液不尽相同，这要求下游分离纯化设备具有一定的操作弹性，特别是对染菌的批号也能处理。此外，发酵液放罐后，由于条件改变，细胞可能还会继续按另一条途径发酵，菌体也可能自溶，且容易染菌，破坏产品，所以需尽快分离纯化目标产物。

## 二、生化分离工程的一般流程

生化分离工程的一般流程如图 1-1 所示。原料液首先经过固液分离操作将细胞与培养液上清分开。如果目标产物为胞外产品，则可省去细胞破碎和二次固液分离操作，直接经过初步纯化、高度纯化及成品加工，即可得到产品（路线 2）。如果目标产物为胞内产品，则需要首先进行细胞破碎后，再经过二次固液分离操作将可溶性部分与沉淀（细胞碎片及包涵体）分开（路线 1）。如果目标产物为可溶性产品，则可直接进行进一步分离纯化（路线 1a）；如果目标产物为包涵体（多为大肠

杆菌表达的重组蛋白),则需要将包涵体溶解、复性后方可进行进一步分离纯化(路线1b)。由此可见,在对产品进行分离纯化之前,首先需要对目标产物的理化特性及其在原材料中的定位有所了解,从而确定其纯化路线。但是,不论选择路线1或路线2,其一般流程均包括:固液分离、初步纯化、高度纯化及成品加工等过程。

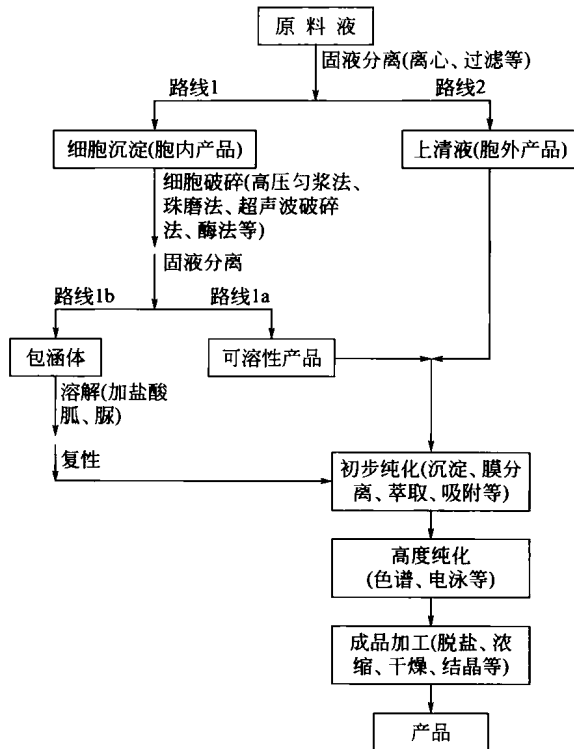


图 1-1 生化分离工程的一般流程

## 1. 固液分离

生物产品的起始分离材料中含有可溶性及不可溶性、大分子和小分子多种成分,生物分离的第一步就是固液分离,将菌体细胞或不溶性成分从溶液中分离出来,从而得到澄清液体,然后进行后续操作。如果目标产物在细胞内,还要进行细胞破碎,释放出产物,再进行进一步的处理。固液分离所用的单元操作主要有离心、过滤、沉降等分离技术。

## 2. 初步纯化(提取)

初步纯化主要是去除大量杂质,同时能浓缩样品和保证样品处于稳定的环境中,一般采用的分离操作步骤有盐析、有机溶剂沉淀、化学沉淀、吸附、膜分离及萃取等。初步纯化使样品体积大幅度减小,这样后续使用的分离纯化设备体积可减小,投资成本及操作成本也可降低。

### 3. 高度纯化（精制）

精制主要是去除微量杂质，使最后产品获得高纯度。这些微量杂质往往与目标产物物理化学性质比较接近，所以常采用分辨率高或对目标产物具有高度选择性的分离技术，如各种色谱技术及电泳技术。结晶特别是重结晶通常也能获得纯度高的产物。

### 4. 成品加工

纯化后的生物产品，通常需进一步加工处理，提高浓度，或者制成品状或粉状固体。产品的规格和用途决定了成品加工方法。工业上常用的一些加工步骤有浓缩、无菌过滤和去热原、结晶、干燥、加入稳定剂等。

## 三、生化分离过程的选择原则

当设计一个生物产品下游加工过程时，不仅考虑到高产率、低成本的总体目标，还应考虑到以下几点：

### 1. 采用步骤数最少

生物产品的分离纯化都是由多步骤组合完成，但尽可能采用最少步骤。由于每一步分离操作的回收率都不能达到 100%，整个分离过程的总回收率为：

$$Y_T = \prod_i Y_i$$

式中， $Y_i$  为第  $i$  步操作的回收率； $Y_T$  为总回收率。所以，多操作使产品的最终回收率很低，过程成本显著增大。为提高最终产品的回收率，可从两方面进行：一是提高每步操作的回收率；二是尽量减少操作步骤。

例如，干扰素的纯化采用了以下工艺：

工艺 1 醋酸锌盐析（83.0%）→离子交换色谱（62.7%）→硫酸铵盐析（96.2%）→铜螯合色谱（46.0%）→疏水作用色谱（78.3%）→凝胶电泳（88.9%）⇒总回收率 = 83.0% × 62.7% × 96.2% × 46.0% × 78.3% × 88.9% = 16%

工艺 2 硫酸铵盐析（96.0%）→免疫亲和色谱（93.2%）→阳离子交换色谱（85.3%）⇒总回收率 = 96.0% × 93.2% × 85.3% = 76.3%

由于工艺 2 减少了操作步骤，使其总回收率大大提高。

### 2. 采用的步骤的次序要合理

在生物产品下游加工过程的 4 大步骤中，固液分离、高度纯化和成品加工选用的技术范围小，次序不是问题。但是，在初步纯化时，对于不同特性的产品，纯化步骤表面上看无明显次序，实际上还是存在一些确定的次序被生产和科研上广泛采用。

Bonnerjia 等对已经发表的有关蛋白质和酶的分离纯化方法及它们的多步骤特征进行了分析，发现常用的纯化方法出现频率分别为：离子交换色谱 75%、亲和色谱 60%、沉淀技术 57%、凝胶过滤色谱 50%、其他 < 33%。通过每种方法在纯

化阶段中所起的作用来确定其次序的先后,可得到如下顺序:均质化(或细胞破碎)→沉淀→离子交换→亲和色谱→凝胶过滤。关于这个顺序的说明为:沉淀能处理大量的物质,且其受到干扰物质影响的程度比吸附或色谱分离小;离子交换色谱用来除去对后续分离产生影响的化合物;亲和色谱常在流程的后阶段使用,以避免因非专一性作用而引起亲和系统性能降低;凝胶过滤用于蛋白质聚集体的分离和脱盐,由于凝胶过滤介质的容量比较小,所以过程的处理量小,一般常在纯化过程的最后一道处理中应用。

### 3. 产品质量及相应的法规要求

产品的最终质量是确定产品纯化程度及选择下游加工方案的主要依据。如果是产品纯度要求低,那么一个简单的分离纯化流程就可达到要求,例如用于动物饲料的赖氨酸纯度要求低,其通过以下分离纯化步骤即可达到要求:

发酵液→离心或过滤→调 pH→吸附→蒸发→调 pH→干燥→饲料级赖氨酸

但是,如果产品是食品级的赖氨酸,其纯度要求较高,其分离纯化步骤也比较复杂,而且生产过程也需符合相应的食品法规:

发酵液→离心或过滤→调 pH→吸附→蒸发→调 pH→过滤→结晶→过滤→干燥→食品级赖氨酸

对于注射类药物,产品纯度要求更高,去除的杂质类型和数量更多,需采用高分辨率的分离纯化技术才能达到纯度要求,而且一般选用凝胶过滤去除热原。为防止微生物污染和延长保存期,冷冻干燥前需无菌过滤。此外,整个生产过程必须符合药品生产质量管理规范(Good Manufacture Practice, GMP)要求。例如注射用的重组人干扰素 $\alpha 1b$ 型(rHuIFN $_{\alpha 1b}$ )的制备:

发酵液→离心收集菌体→高压匀浆→离心取上清→硫酸铵盐析→溶解沉淀透析→调 pH=2 酸化处理→离心去杂蛋白→离子交换色谱→亲和色谱→凝胶过滤色谱→合并、稀释、加保护剂、除菌过滤→rHuIFN $_{\alpha 1b}$ 成品

高价值或中等价值的生物产品,例如药品、食品,其生产必须符合相应的法律法规。法律法规的限制也会影响生物分离设备的选择,例如,一些产品在生产过程中需保持一定的清洁度或无菌环境,则应选择专用的设备,且这些设备价格昂贵。法律法规除了监督产品质量,同时也关注一些产品生产过程中的安全性操作,例如,利用基因改变的微生物或病原微生物生产目的产物时,一般其分离过程处于封闭环境,目的是尽量减少危险物质的排放。许多利用溶剂进行分离的下游加工过程需选择适当设计及具有正确的防爆功能的设备及设施。

### 4. 生产规模

产品的生产规模也会影响下游加工过程的选择,例如,在细胞破碎时,工业上常用的机械破碎方法为珠磨法或匀浆法,一般比细胞破碎前的固液分离方法在生产能力上小几个数量级,如果生产规模超过机械设备的生产能力,则需要同时使用多台设备,或者考虑结合其他方法提高破碎效率。此外,在色谱或吸附过程中,如果

生产规模大则需考虑到色谱介质的刚性, 因为如果色谱介质强度不够, 其自重及色谱柱内的液流压降都可能破坏介质结构, 影响分离效果。还有, 在生产工艺的最后阶段, 当产品需要干燥时, 冷冻干燥不适合大的生产量, 因其是分批进行且需较长的干燥周期, 此时要考虑其他干燥方法, 如真空干燥或喷雾干燥等。

### 5. 物料组成

在物料中, 如果目标产物浓度高, 则意味着分离过程可能较简单; 如果存在某些化合物与目标产物性质非常相似, 则表明需要一个专一性高的分离过程, 才能制得符合规格的产品。此外, 了解被处理物料的形态学或流变学特性, 有助于分离过程的优选, 如果来自生物反应器的料液是含有丝状微生物的悬浮液, 则选择过滤进行固液分离是合适的, 但是对于中空型膜过滤系统, 因其通道狭窄易堵塞, 因而不适宜。同样, 含有较高浓度干物质的发酵液或高黏度的培养液, 因为粒子的沉降性能差, 很难用离心方法处理。

### 6. 产品的定位及理化性质

在选择分离纯化技术时, 需考虑目标产物的定位(胞内或胞外), 如果是胞内产物, 则在发酵液固液分离时要收集细胞, 进行细胞破碎, 然后再进行后续分离纯化步骤。此外, 还需考虑目标产物的理化性质, 主要有以下几点:

① 溶解度。溶解度受 pH 值、盐等因素影响, 在沉淀、絮凝、吸附、结晶等操作过程可通过改变这些因素控制料液组分溶解度来分离目标产物。

② 分子电荷。蛋白质、核酸、有机酸等是荷电物质, 其荷电量和性质会随 pH 值改变而改变, 依据这一性质可选用离子交换色谱、电泳、离子交换膜分离等技术进行分离。

③ 分子大小。根据分子大小的不同可选择凝胶过滤色谱或膜分离过程等。

④ 功能基团。产物的功能基团能为稳定条件、提取液及亲和色谱介质的选择提供依据。

⑤ 挥发性。挥发性仅是小分子物质选择分离过程的选择依据。

⑥ 稳定性。包括适宜的 pH 范围、温度范围、半衰期等。如果产物蛋白质的活性位点或其他活性基团因存在巯基而易氧化, 则必须排除空气并使用抗氧化剂, 使氧化作用减小到最低程度; 此外, 如果料液中存在蛋白酶, 则在纯化早期阶段需冷却, 降低蛋白酶的速率, 减小产品的损失。

### 7. 废物的产生及处理

在大部分的生物分离过程中, 会产生一些废气、废液及废渣等废物, 这些废物不能未经处理就排放出去。例如, 在抗生素生产过程中, 富含有机溶剂的滤液常通过蒸馏处理来分离水相与有机溶剂, 处理过的水溶液可以达到排放要求, 且有机溶剂可循环利用。

在生产过程中, 具有危险性的生物物质在处理前或排放前, 必须经过灭活处理, 以保证生物体无活体存在。如果生物物质是液态, 则可用热灭活或化学灭活方

法处理；如果是固态物质，则通过高压灭菌法来灭活。

相关的环境法规也会影响生物分离过程，因此在生产过程中允许加入其他的操作步骤来处理废物。

#### 四、生化分离过程的发展方向

##### 1. 传统分离技术的提高和完善

蒸馏、蒸发、过滤、离心、结晶和离子交换等传统技术由于应用面广且相对成熟，对它们的提高和完善将会推动大范围的技术进步。例如 20 世纪 80 年代酒精压差（多效）蒸馏技术工业应用的成功，大幅度降低了成品酒精的能耗，为进一步提高酒精质量打下了基础；各种新型高效的过滤机械和离心机械的问世，也从一个侧面推动生物工业向更大规模方向发展。

##### 2. 开发新技术、新材料和新设备

如灌注色谱（perfusion chromatography）是 20 世纪 80 年代美国 PE 公司通过填料技术的改进而产生的一种色谱新技术。它第一次给生命科学家快速高效的纯化理念：30s~3min 即可完成高分辨率、高载体的分离。

灌注色谱技术所用的 POROS 填料具有独特的二元孔网络结构，大的穿透孔（直径为 600~800nm）足以使流动相快速流动；小的扩散孔（直径为 80~150nm）提供足够吸附表面积，从而大大加快传质，流速高达 1000~5000cm/h，比使用 HPLC 或传统填料快 10~100 倍。

为满足高效高速分离纯化需要，新材料不断出现，分离纯化设备也在不断开发和更新，许多公司陆续推出一些自动色谱系统，它能自动制备缓冲液，具有多柱转化、自动上样设计、多波长连续检测等功能，且配有专家辅助软件，能更快优化分离条件，更有效地以不同规模纯化不同的生物分子。

##### 3. 多种分离、纯化技术相结合，形成所谓融合技术

如膜分离与亲和配基相结合，形成了亲和膜过滤技术；离心分离与膜分离过程结合，形成膜离心分离过程等。这类融合技术将两种及两种以上技术的优势结合起来，往往具有选择性好、分离效率高、步骤简化、能耗低等优点。

##### 4. 改进上游及中游因素，简化下游加工过程

这可从两方面考虑：一方面是菌种选育和工程菌构建，这两者主要以开发新物种和提高目的产物量为目标，此外，还需设法使菌种增加产物的胞外分泌量，减少非目的产物的分泌，并设法赋予产物某种有益的性质来改善产物的分离特性，例如外源蛋白的可溶性表达及纯化标签的引入，从而降低下游分离技术的困难；另一方面，从培养基和发酵条件考虑，因为它们直接决定了输送给下游进一步分离的发酵液质量，所以人们现在尽量采用液体培养基，提倡清液发酵，少用酵母膏、玉米浆等有色物质为原料，通过控制比生长速率、消泡剂用量、放罐时间等发酵条件，使下游分离过程更为方便、经济。



纵观生化分离工程的发展,其发展趋势主要是要解决大规模分离技术问题:从宏观水平的分离技术向分子水平分离技术发展;从多步串联操作走向集成化、少步骤分离过程;从低选择性向高选择性的技术发展,从环境污染走向环境友好;从一次性使用到循环利用;从实验室走向数学模型、工程化。这些都体现分离技术的不断进行,随着分离技术的不断进步,许多分离工程中的问题会逐步得到解决。

### 思考题

1. 生物产品与普通化工产品有何不同?
2. 简述生化分离工程的一般流程。
3. 设计生物产品的分离工艺应考虑哪些因素?
4. 若每一步纯化产物得率为 90%,共 6 步纯化得到符合要求产品,其总收率是多少?

### 参考文献

- [1] 曹学君主编. 现代生物分离工程. 上海: 华东理工大学出版社, 2007.
- [2] 田亚平等编. 生化分离技术. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [3] Perry C C, Murray M Y. Bioprocessing strategies for cell-factory systems. *Canadian Chemical News*, 2006, 58(9): 14-17.
- [4] 孙彦编著. 生物分离工程. 第二版. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [5] 严希康编著. 生化分离工程. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [6] 李津等主编. 生物制药设备和分离纯化技术. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [7] 刘国詮主编. 生物工程下游技术. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [8] Antonio A G, Matthew R B, Jaime R V, Mariam S, Anil V. *Bioseparation process science*. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [9] Satinder A. *Handbook of bioseparation*. Academic Press, 2000.
- [10] 毛忠贵主编. 生物工业下游技术. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.