



全国高职高专教育“十一五”规划教材

# 生物分离技术

■ 刘冬 主编  
王妍 副主编





## 内容提要

本书是全国高职高专教育“十一五”规划教材。

本书以生物技术职业岗位为导向,重点阐述生物分离工艺过程中各典型单元操作的基本原理、重要设备和基本操作技术,突出实践性和实用性。主要内容包括:生物材料的预处理技术、固液分离技术、细胞破碎技术、萃取技术、浓缩技术、沉淀技术、结晶技术、干燥技术、膜分离技术、层析分离技术、分子蒸馏技术和生物分离技术实训。

本书用于应用性、技能型人才培养,可作为生物技术、生物制药、食品类专业及相关专业的教学用书,也可作为生物技术、生物制药及食品工作人员的参考书。

## 图书在版编目(CIP)数据

生物分离技术/刘冬主编. —北京:高等教育出版社, 2007.12

ISBN 978 - 7 - 04 - 022714 - 7

I. 生… II. 刘… III. 生物分解 - 高等学校: 技术学校 - 教材 IV. Q503

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 182515 号

策划编辑 张庆波 责任编辑 田 军 封面设计 张 楠 责任绘图 尹 莉  
版式设计 马敬茹 责任校对 刘 莉 责任印制 朱学忠

出版发行 高等教育出版社  
社 址 北京市西城区德外大街 4 号  
邮政编码 100011  
总 机 010-58581000  
经 销 蓝色畅想图书发行有限公司  
印 刷 北京明月印务有限责任公司

购书热线 010-58581118  
免费咨询 800-810-0598  
网 址 <http://www.hep.edu.cn>  
<http://www.hep.com.cn>  
网上订购 <http://www.landaco.com>  
<http://www.landaco.com.cn>  
畅想教育 <http://www.widedu.com>

开 本 787×1092 1/16  
印 张 14  
字 数 330 000

版 次 2007 年 12 月 1 版  
印 次 2007 年 12 月第 1 次印刷  
定 价 17.90 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

版权所有 侵权必究

物料号 22714-00

## 郑重声明

高等教育出版社依法对本书享有专有出版权。任何未经许可的复制、销售行为均违反《中华人民共和国著作权法》，其行为人将承担相应的民事责任和行政责任，构成犯罪的，将被依法追究刑事责任。为了维护市场秩序，保护读者的合法权益，避免读者误用盗版书造成不良后果，我社将配合行政执法部门和司法机关对违法犯罪的单位和个人给予严厉打击。社会各界人士如发现上述侵权行为，希望及时举报，本社将奖励举报有功人员。

反盗版举报电话：(010)58581897/58581896/58581879

传 真：(010)82086060

E - mail: dd@hep.com.cn

通信地址：北京市西城区德外大街4号

高等教育出版社打击盗版办公室

邮 编：100011

购书请拨打电话：(010)58581118

# 高职高专教育生物技术类专业教材 编写委员会

## 主任委员

李世敏(深圳职业技术学院)

## 副主任委员

胡虹文(信阳农业高等专科学校)

侯建平(包头轻工职业技术学院)

闫丽霞(天津生物工程职业技术学院)

## 委员

刘大程(长春医学高等专科学校)

刘冬(深圳职业技术学院)

王德芝(信阳农业高等专科学校)

王衍安(山东农业大学)

庞俊兰(北京城市学院)

# 前 言

生物分离技术也常称为生物技术下游加工过程，是由一系列的生物分离纯化单元操作技术组成，各个单元操作技术具有各自的分离理论，适用于不同的分离纯化阶段。生物分离技术是生物技术的重要组成部分，其技术水平对于保持和提高各国在生物技术领域的竞争力具有至关重要的作用。生物分离技术也是高职高专生物技术类专业的必修主干课。本教材是根据2006年3月在深圳召开的全国高等职业教育生物技术类专业教材审纲会通过的《生物分离技术》编写大纲编写的。教材编写中，突出高职教育的特点，根据生物技术行业特点介绍职业岗位(群)技术操作人员所需的知识和对能力的要求，对理论则以能满足实践需要为度，突显技术的实践性和实用性。

本教材系统讲述了生物分离过程各种单元操作技术的基本原理、操作技术和重要设备，同时也介绍了现代生物工程下游技术一些最新应用成果。为便于学习，每一章都列出知识目标、能力目标和思考题。书后还精选了十一个涵盖生物分离过程各重要操作环节、重要设备和操作技术的实训项目，供各个学校根据自身条件选用。

全书共分十三章，刘冬编写第一章、第二章、第六章、第十章、第十二章和实训三、实训七、实训八，王妍编写第三章、第十一章和实训一、实训九、实训十、实训十一，刘柱明编写第四章、第七章和实训二、实训四，汤文浩编写第五章，徐清华编写第八章、第九章和实训五、实训六。全书由刘冬统稿，梁世中主审。

本书在编写过程中，得到了高等教育出版社梁琦、张庆波，深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院李世敏教授的大力支持和帮助，在此表示衷心地感谢。

由于生物分离技术发展迅速，编者水平有限，内容难免有错漏之处，敬请批评指正。

编 者  
2007年8月

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1	<b>第八章 结晶技术</b> .....	82
第一节 生物分离技术在生物产品生产中的地位 .....	1	第一节 结晶原理 .....	82
第二节 生物分离过程的特点 .....	2	第二节 结晶方法与设备 .....	84
第三节 生物分离一般工艺流程及单元操作 .....	3	<b>第九章 干燥技术</b> .....	92
第四节 分离纯化方法选择的依据 .....	6	第一节 干燥基本原理 .....	92
第五节 生物分离技术的发展趋势 .....	6	第二节 加热干燥与设备 .....	94
<b>第二章 生物材料的预处理技术</b> .....	8	第三节 冷冻干燥与设备 .....	97
第一节 凝聚和絮凝技术 .....	8	<b>第十章 膜分离技术</b> .....	102
第二节 其他去除杂质的技术 .....	11	第一节 膜分离过程分类和特点 .....	102
<b>第三章 固液分离技术</b> .....	14	第二节 膜分离机理简介 .....	106
第一节 过滤技术 .....	14	第三节 分离膜与膜性能 .....	108
第二节 离心分离技术 .....	19	第四节 膜分离工艺 .....	112
<b>第四章 细胞破碎技术</b> .....	30	第五节 膜分离在生物分离技术中的应用 .....	122
第一节 细胞壁的组成与结构 .....	31	<b>第十一章 层析技术</b> .....	125
第二节 细胞破碎方法 .....	32	第一节 层析技术概述 .....	125
第三节 破碎率的评价和破碎方法选择依据 .....	37	第二节 吸附层析技术 .....	134
第四节 基因工程包含体的纯化方法 .....	38	第三节 凝胶层析技术 .....	139
<b>第五章 萃取技术</b> .....	42	第四节 离子交换层析技术 .....	145
第一节 溶剂萃取技术 .....	42	第五节 亲和层析技术 .....	158
第二节 双水相萃取技术 .....	47	第六节 疏水层析技术 .....	168
第三节 超临界流体萃取技术 .....	50	<b>第十二章 分子蒸馏技术</b> .....	175
<b>第六章 浓缩技术</b> .....	56	第一节 分子蒸馏基本理论 .....	175
第一节 蒸发浓缩 .....	56	第二节 分子蒸馏流程及设备 .....	177
第二节 冷冻浓缩 .....	66	第三节 分子蒸馏技术在生物分离工艺中的应用 .....	179
第三节 其他浓缩方法简介 .....	68	<b>第十三章 生物分离技术实训</b> .....	181
<b>第七章 沉淀技术</b> .....	69	实训一 离心机的安装与维护 .....	181
第一节 盐析沉淀法 .....	69	实训二 酶法结合超声波破碎法破碎大肠杆菌 .....	182
第二节 有机溶剂沉淀法 .....	75	实训三 CO <sub>2</sub> 超临界萃取大豆油 .....	184
第三节 其他沉淀法 .....	77	实训四 硫酸铵盐析沉淀法和乙醇沉淀法沉淀乳清蛋白 .....	185

---

实训五 谷氨酸等电点结晶技术 .....	187	实训十 离子交换柱层析分离氨基酸 .....	197
实训六 酸奶粉冷冻干燥 .....	188	实训十一 亲和层析分离 GST 蛋白 .....	198
实训七 超滤设备使用与维护 .....	189	附录 .....	200
实训八 超滤法浓缩真菌多糖 .....	194	主要参考文献 .....	212
实训九 凝胶层析法乳清蛋白脱盐 .....	195	后记 .....	213



### ► 知识目标

- 了解生物分离单元操作技术选择的一般思路。
- 了解生物分离技术的发展趋势。
- 理解生物分离技术在生物技术中的地位。
- 理解生物分离一般工艺流程。
- 掌握生物分离过程的特点。

### ► 能力目标

- 能针对本课程特色设计学习目标和自学计划。

生物分离技术(bioseparation technology)是指从动植物细胞、微生物代谢产物和酶反应产物等生物物料中分离、纯化目的组分的技术。也常称为生物技术下游加工过程(downstream processing)。生物分离技术是由一系列的生物分离纯化单元操作技术组成。各个单元操作技术具有各自的分离理论和适应于不同的分离纯化阶段。生物分离技术是生物技术的重要组成部分,其技术水平对于保持和提高各国在生物技术领域的竞争力具有至关重要的作用。

## 第一节 生物分离技术在生物产品生产中的地位

生物代谢物分离纯化目的在于从生物物料中分离并纯化出符合质量要求的各种生物产品。生物技术的最新进展主要集中在利用基因工程技术改造生物原材料或重构出新型生物原材料,在生物反应器和发酵技术等方面也进展较快。而对于如何从生物物料中高效、经济地分离纯化出目的组分却未给予足够的重视。

生物物料的组成是复杂多样的,包括微生物细胞、菌体、代谢产物、未耗用的培养基以及各种降解产物等。其中生物活性物质的浓度通常很低(例如抗生素含量为 $10 \sim 30 \text{ kg/m}^3$ ,维生素 $\text{B}_{12}$ 为 $0.02 \text{ kg/m}^3$ ,酶为 $2 \sim 5 \text{ kg/m}^3$ ),而杂质含量却很高,并且某些杂质又具有非常相似的化学结构和理化性质,加上生物活性物质通常很不稳定,遇热或某些化学试剂会引起失活或分解,某些产品还要求无菌操作,因此从发酵液或生物材料中制取生物活性物质不是一件容易的工作。据资料统计,分离纯化过程所需的费用要占产品总成本的很大比例,按产品不同,对抗生素生产而言,分离纯化部分的投资费用约为发酵部分的4倍;对有机酸或氨基酸生产而言,则为1.5倍;对基因工程药物,分离纯化技术的要求更高,如重组蛋白质精制的费用可占整个

生产费用的 80%~90%，甚至更多。由此人们逐渐认识到下游工程的落后有可能会阻碍生物技术的发展，引起了各国相关部门对发展生物分离技术的重视。英国政府工业部于 1983 年发起生物分离计划(BIOSEP)，专门研究下游加工过程，有 7 个国家、50 家公司参加。1987 年英国化学工业会召开了专门讨论下游加工过程的国际会议。美国工程基金会(Engineering Foundation)从 1981 年开始连续 9 年召开生物产品回收会议。我国也于 1989 年召开了第一次专门会议。近十余年，生物分离技术的研究报道越来越多，这正反映了生物分离技术以前研究的薄弱和目前日益受到重视的发展趋势。

## 第二节 生物分离过程的特点

### 一、生物物料的特性

生物技术产品既包括常规的生物技术产品，如有机酸、氨基酸、蛋白质、酶、糖类、核酸、维生素、色素和抗生素等，又包括现代生物技术产品，如重组蛋白、重组多肽、抗体等。这些产品有些来源于胞内，有些来源于胞外。含目的组分的生物物料液，一般具有以下特性：

(1) 组成复杂，含有细胞、代谢产物和未用完的培养基成分等。分散在其中的固体和胶状物质具可压缩性，其密度又和液体相近，加上黏度很大，属非牛顿性液体。

(2) 所含欲分离的目的物质浓度很低，但杂质含量却很高。几种不同类型产品的浓度见表 1-1。

表 1-1 典型目的组分在发酵液中的含量

目的产物	目的产物浓度(质量分数/%)
细菌或酵母	1~8
真菌(柠檬酸、青霉素生产)	1~3
动物细胞(哺乳动物细胞培养)	0.1~5
植物细胞培养	0.1~5
醋酸	0.2~5
柠檬酸	5~10
乳酸	8~10
胞外酶	0.5~1.0
维生素	0.005~0.1
抗体	1~5
乙醇	7~12

(3) 容易腐败变质。一般生物物料液营养成分丰富，易受外界微生物污染或自身酶的作用而腐败变质。

(4) 欲分离的生物活性物质通常很不稳定, 遇热、极端 pH、有机溶剂等会引起失活或分解, 特别是蛋白质的生物活性与一些辅因子、金属离子的存在和分子的空间构型有关。剪切力会影响空间构型, 稍不注意就会引起失活和降解, 对蛋白质的生物活性影响很大。

(5) 不同批次间物料成分组成和特性不尽相同。

(6) 对于食用或药用的生物产品要求有毒有害成分残留达到允许的范围内。

## 二、生物分离过程的特点

生物物料的特性决定了生物分离过程的特点:

(1) 分离纯化操作步骤多, 不易获得高收率。假如一个产品包含六步分离纯化操作, 每步操作都较完善, 收率达到 90%, 此时总收率也只有 54%。特别是基因工程产生的蛋白质常常伴有大量性质相近的杂蛋白质, 其收率达到 30%~40% 就已经是相当不错了。由此可见, 尽量减少步骤是很重要的。

(2) 分离纯化工艺的选择和操作要注意保持目的组分的生物活性。要尽量做到操作条件温和(温度低、pH 适中等)、时间短、勤洗消毒(包括厂房、设备、管路, 特别注意死角); 同时注意选择的操作条件和引入的试剂不会产生有毒有害物质的超标准残留。

(3) 分离纯化工艺条件要有一定弹性。

(4) 对基因工程产品, 应注意生物安全性, 即要防止菌体扩散, 一般要求在密封环境下操作。例如用密封操作的离心机进行菌体分离等。

## 第三节 生物分离一般工艺流程及单元操作

### 一、一般工艺流程

一般说来, 生物分离过程可分为 4 个阶段: ①生物物料料液的预处理和固液分离; ②初步纯化(提取); ③高度纯化(精制); ④最后纯化。生物分离过程一般工艺流程见图 1-1 所示。实际工艺过程决定于产品的性质和要求达到的纯度。如产品为菌体本身, 则工艺比较简单, 只需过滤得到菌体, 再经干燥即可(如单细胞蛋白的生产); 如可以从发酵液直接提取, 则可省去固液分离步骤; 如为胞外产物则可省去细胞破碎步骤。

### 二、生物分离工艺过程中各种单元操作

生物分离工艺过程用到的单元操作很多, 其中浸提、萃取、离心、过滤、蒸馏、蒸发浓缩、吸附、沉淀、结晶、干燥等属于传统的单元操作, 而细胞破碎、膜分离、层析则是近来新发展起来的单元操作。这些单元操作按处理规模, 可分为实验室规模和工业生产规模。本课程重点讨论工业生产规模的单元操作的技术原理、设备及操作条件选择。以下根据生物分离过程的 4 个阶段对各单元操作技术作以简单介绍。

#### (一) 生物物料料液的预处理和固液分离

从物料料液中分出固体通常是分离纯化的第一步操作, 由于料液中成分复杂和杂质多等原

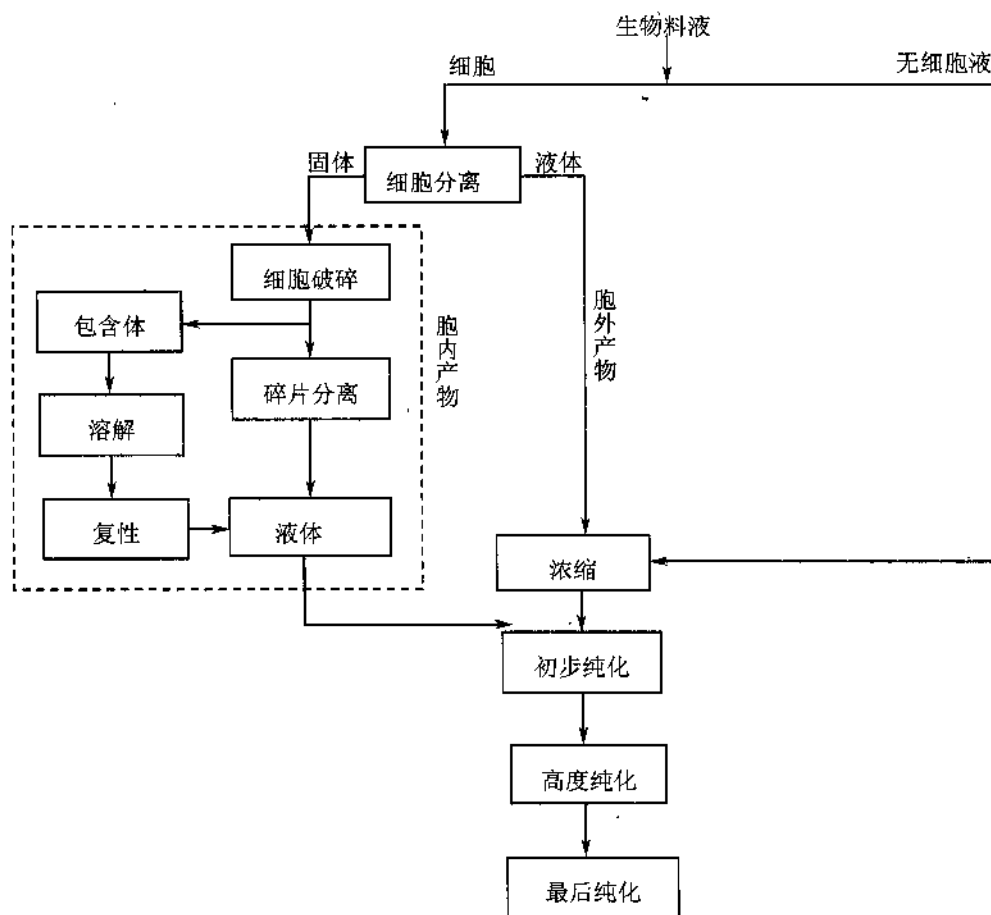


图 1-1 生物分离过程一般工艺流程

因，这是一步很困难的操作。预处理的目的在于改变料液的性质，以利于固液分离和后续操作。预处理方法包括絮凝、凝聚、沉淀、酶解、离子交换等方法。固液分离中主要采用传统过滤和离心等方法，用微滤或超滤技术直接分离细胞等固形物成为当前固液分离工序中的新技术。

### (二) 细胞破碎及碎片分离

细胞破碎的方法有机械法和非机械法两种。大规模生产常用高压匀浆器、球磨机，基因药物生产中也常用超声波结合酶法破碎。细胞碎片的分离可采用离心过滤、膜过滤或双水相萃取等方法。

### (三) 初步纯化(提取)

初步纯化的主要目的是浓缩目的成分，并使其初步纯化。主要单元操作技术包括：

(1) 浸提和萃取法 通过浸提操作使目的组分从固相原材料中转移至水相，依水相为出发点进行分离纯化过程。萃取是利用目的物在两相溶液中分配系数的不同，使其向一相富集并与其他非目的组分初步分离开来。常用的萃取方法有溶剂萃取、双水相萃取、超临界萃取、逆胶束萃取等，分别适用于不同类型组分的萃取过程。

(2) 层析法 主要是利用活性炭、白土、氧化铝、大孔树脂等吸附剂,及离子交换树脂、亲水性离子交换剂等离子交换剂,吸附、富集目的成分。

(3) 沉淀法 利用盐析、有机溶剂等沉淀剂结合等电点沉淀法,使目的蛋白沉淀并得到初步纯化。

(4) 膜过滤法 利用微滤膜、超滤膜、纳滤膜或反渗透膜等选择性透过膜,分别将大小不同的颗粒或分子分离或浓缩。

(5) 蒸发浓缩 利用真空蒸发浓缩去除大部分溶剂及易挥发组分。

(6) 分子蒸馏 对于大分子、沸点高、挥发小、对热不稳定、黏度高或容易爆炸液体材料的分离,分子蒸馏技术特别适合。

#### (四) 高度纯化(精制)

经初步纯化,物料体积已大大缩小,但纯度提高不多,需要进一步精制。大分子物质的精制主要采用层析,而小分子物质的精制常用结晶操作。

(1) 层析 层析是一种高效的分离技术,过去仅用于实验室中,后来规模逐渐扩大而应用于工业上。操作是在柱中进行,包含两个相——固定相和移动相,物质在两相间分配情况不同,在柱中的运动速度也不同而获得分离。层析是一系列相关技术的总称,根据分配机理的不同,制备规模的层析主要包括吸附层析、凝胶层析、离子交换层析、疏水层析、亲和层析等。

(2) 结晶 结晶可以认为是沉淀的一种特殊情况。结晶的前提条件是溶液要达到过饱和。结晶主要用于低相对分子质量物质的纯化,例如抗生素、氨基酸、有机酸等。

(3) 干燥 干燥是生产固体状生物物质的最后工序。干燥方法很多,但生物物质大多有热敏失活的特性,因此一般选用真空干燥、流化床干燥、气流干燥、喷雾干燥和冷冻干燥等操作形式。

#### (五) 最后纯化

经过上述初步纯化和高度纯化后,一般能符合成品要求,如果这样那就不需最后纯化这一步。反之,则尚需进一步纯化,最好是选择机理不同的另一种高度纯化操作。蛋白质分子在纯化过程中,常会聚集成二聚体或多聚体,特别当浓度较高时;或含有降解产物(由于有蛋白酶的存在);有时亲和层析的配基也会脱落,也必须除去。常用的方法是利用基于分子大小不同的凝胶层析法,这是真正意义上的层析法,其处理量小,所以应用于最后纯化很合适,因为此时体积已很小;也可用高效液相层析法,但费用较高。

注射用药必须无热原质。热原质主要是肠杆菌科所产生的细菌内毒素。内毒素广泛存在,它们是革兰阴性细菌细胞壁的组分——脂多糖,在细菌生长或细胞溶解时会释出来,其性质相当稳定,即使经高压灭菌也不失活性。从蛋白质溶液中去除内毒素是比较困难的,最好的办法是防止产生热原质,整个生产过程在无菌条件下进行。所有层析介质在使用前先除去热原质,操作在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下进行,洗脱液需先经无菌处理,流出的蛋白质溶液也应无菌处理,即通过 $0.2\ \mu\text{m}$ 微滤膜,并在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 下保存。传统的去除热原质的方法不适用于蛋白质生产。用超滤或反渗透的方法去除热原质适用于小相对分子质量的多肽或蛋白质,但对大分子蛋白质无效。

## 第四节 分离纯化方法选择的依据

选择分离纯化方法总体思路是：根据物料中杂质组分和目的组分的理化性质及对产品质量的要求，选择单元操作，通过试验最终确定合适的单元操作及最有效的操作工艺。选择时应考虑的几个因素：

(1) 了解分离对象的组成 即了解生物物料中有哪些组分，要去除哪些组分。

(2) 了解各组分的理化性质 先了解各组分是蛋白质还是糖类或其他化合物。然后了解各组分是极性化合物还是非极性化合物。如是极性化合物，进一步确定是酸性、碱性或两性；如酸性，还应确定它是强酸还是弱酸；如为碱性，则应确定其为强碱还是弱碱，当然最好能知道它的  $pK$  值和化学结构。此外还应知道各组分在各种溶剂中的溶解度，以及  $pH$ 、温度、其他盐类对其溶解度的影响，它和哪些物质能形成不溶性的盐类等。极性和溶解度的了解通常利用纸上层析和纸上电泳的方法。

对于基因工程产品选择分离纯化方法应根据目的蛋白质和杂蛋白质在物理、化学和生物化学方面性质的差异，例如，表面电荷对一些配基的生物特异性、表面疏水性、表面金属离子、糖含量、自由疏水基数目、相对分子质量、 $pI$  值和稳定性等。选用的方法应能充分利用目的蛋白质和杂蛋白间上述性能的差异。当几种方法连用时，最好以不同的分离机制为基础，且前一种方法处理过的液体应能适于作后一种方法的料液。如经盐析后得到的液体含大量盐分，不适宜于离子交换层析，需先经透析或膜分离脱盐，但可直接应用于疏水层析。

(3) 了解各组分的稳定性 要了解它们在什么样的  $pH$  和温度范围易受破坏，酸性和碱性下的降解产物，最好能知道其分解速度。必须注意，在整个分离纯化过程中，要尽量使目的物保持稳定。

有了这些数据后，就可大体决定采用何种方法。例如对于极性较强的抗生素可考虑用离子交换法；能形成沉淀的可考虑用沉淀法。以上方法都不适用时，或进行小规模新抗生素提炼试验时，也可以用吸附法。究竟应选用何种方法，应通过小规模预试验，将各种方法进行比较，并不断改进。现有各种抗生素的分离方法，就是这样逐步确定的。例如青霉素和链霉素的分离方法，开始时都用吸附法，后来逐渐分别改用溶剂萃取法和离子交换法。

## 第五节 生物分离技术的发展趋势

### 1. 膜分离技术的推广使用

随着膜质量的改进和膜装置性能的改善，在生物分离过程的各个阶段，将会越来越多地使用膜分离技术。例如 Millipore 公司进行研究的提取头孢菌素 C 的过程，利用微滤进行发酵液的过滤，利用超滤去除一些蛋白质杂质和色素，利用反渗透进行浓缩，最后结合 HPLC 进行精制，就可得成品，其纯度达到 93%。此外，还有膜分离过程与亲和配基相结合，形成了亲和膜分离过程，离心分离与膜分离过程相结合，形成了膜离心分离过程，等等。这类技术具有选

择性好、分离效率高、节约能耗等优点，是今后的主要发展方向。

### 2. 亲和技术的推广应用

利用生物亲和力可使分离的选择性大大提高，在下游加工过程的各个阶段，都正在使用或有可能使用亲和技术，除已知的亲和层析外，还有亲和过滤、亲和分配、亲和沉淀、亲和膜分离等。利用单克隆抗体的免疫吸附层析，选择性是最理想的，但介质的价格太高，急需研究改进。

### 3. 优质层析介质的研究

层析分离中主要困难之一是层析介质的机械强度差，对天然糖类为骨架的介质目前已研究出高交联度的产品如 Monoheads 和与无机介质(如硅藻土)相结合的产品。

### 4. 上游技术对下游过程的影响

过去上游技术的发展常不考虑下游方面的困难，致使发酵液浓度提高了，却得不到产品。还强调下游方面要服从上游方面的需要，比较被动。现在发展的要求是，生物工程作为一个整体，上、中、下游要互相配合。上游方面已开始注意为下游分离方便创造条件，例如设法赋予生物催化剂，将原来的胞内产物变为胞外产物或处于胞膜间隙；在细胞中高水平的表达形成细胞质内的包含体，在细胞破碎后，在低离心力下即能沉降，故容易分离；减少非目的产物(如色素、毒素、降解酶及其他干扰性杂质等)的分泌；利用基因工程方法，使尿抑胃素接上几个精氨酸残基，使其碱性增强，而易为阳离子交换剂所吸附。

### 5. 发酵与提取相结合

发酵培养基和发酵条件决定着发酵液的质量，如采用液体培养基，不用酵母膏、玉米浆等有色物质为原料，控制比生长速率、消沫剂用量、放罐时间等发酵条件，使下游加工过程方便、经济。在发酵过程中，把产物除去，以避免反馈抑制作用，既提高转化率，同时也可简化产物提取过程，缩短生产周期，增加产率。其方法很多，如利用半透膜的发酵，在发酵罐中加入吸附树脂等。

## 思考题

1. 简述生物物料液料的性质及生物分离过程特点。
2. 简述生物分离一般工艺流程及主要包括的单元操作技术。
3. 简述选择生物分离单元操作技术的一般思路。

### ► 知识目标

- 理解去除生物材料料液中杂蛋白、杂质多糖和高价金属离子的方法。
- 掌握絮凝法和凝聚法的基本原理、常用絮凝剂和凝聚剂的类型及使用特点。

### ► 能力目标

- 能根据生物材料料液杂质的类型和特点，初步选择适宜的预处理方法。

动植物细胞和微生物的代谢产物是提取生物活性物质的最重要来源。生物物质分离纯化的第一个必要步骤就是以含有目的物的生物原材料为出发点，设法将细胞(菌体)富集或除去，使所需的目标产物转移至液相中，并以含目的物的液相为出发点，进行后续的分离纯化操作。目的物无论是存在于细胞内或细胞外，通常浓度是很低的，而杂质含量却很高。在目的物(通过浸提等操作)转移至液相过程中，杂质也同时转移。杂质主要包括核酸、蛋白、多糖和无机离子。这些杂质的存在会影响后续对目的物的有效提取纯化，如大分子杂质使料液黏度太大影响离心或过滤、产生膜污染，高价无机离子和杂蛋白降低离子交换的吸附能力、萃取时乳化现象严重等。因此必须对转移后的料液进行预处理，除去部分杂质并改变料液的物理性质(pH、黏度等)，使后续分离纯化工序能顺利进行。

根据目的物在生物原材料中存在的部位和稳定性及杂质的类型、性质和对后续工序的影响，预处理可采用不同的技术，如凝聚和絮凝技术、沉淀技术等，本章重点介绍常用的预处理技术的原理及处理方法。

## 第一节 凝聚和絮凝技术

凝聚和絮凝技术能有效地改变细胞、菌体、蛋白质等胶体粒子的分散状态，使其聚集起来、增大体积，以便于固液分离和降低黏度，常用于细胞(菌体)细小而且黏度大的生物料液的预处理中。

凝聚和絮凝原理不同。凝聚是在中性盐作用下，由于双电层排斥电位的降低而使胶体体系不稳定的现象。絮凝是在高分子絮凝剂的作用下，通过架桥作用，使细胞和蛋白质聚集成粗大的絮凝团的过程。

### 一、凝聚技术

生物材料料液中的细胞、菌体和蛋白质等胶体粒子的表面一般都带有电荷，带电原因很



多，主要是吸附溶液中的离子或自身基团的电离。通常菌体或细胞带负电荷，由于静电引力的作用使溶液中带相反电荷的粒子（即正离子）被吸附在其周围，在界面上形成了双电层。但是这些正离子还受到使它们均匀分布开去的热运动的影响，具有离开胶粒表面的趋势，在这两种相反作用的影响下，双电层就分裂成两部分，在相距胶核表面约一个离子半径的范围以内，正离子被紧密束缚在胶核表面，称为吸附层；在吸附层以外，剩余的正离子则在溶液中扩散开去，距离胶核越远浓度越小，最后达到主体溶液的平均浓度，称为扩散层。这样就形成了扩散双电层的结构模型，如图 2-1 所示。当胶粒在溶液中做相对运动时，总有一薄层液体，随着它一起滑移，这一薄层厚度比吸附层稍大，滑移面在图 2-1 中用波纹线表示。

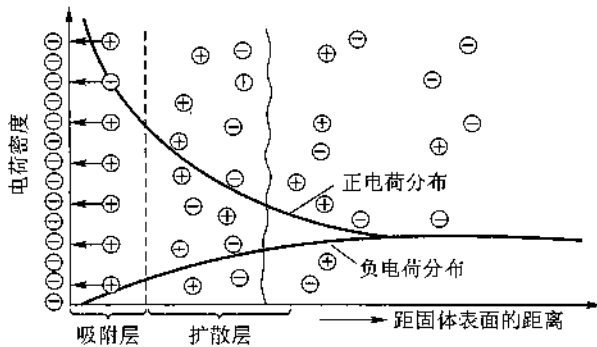


图 2-1 胶体双电层结构

胶粒能保持分散状态的原因主要是带有相同电荷和扩散双电层的结构，一旦由于布朗运动使粒子间距离缩小到它们的扩散层部分重叠时，即产生电排斥作用，使两个粒子分开，从而阻止了粒子的聚集。此外，由于胶粒表面的水化作用，形成了包围粒子周围的水化层，也能阻碍胶粒间的直接聚集。

如果向料液中加入具有相反电性的电解质，就能中和胶粒的电性，降低双电层的排斥力，由于热运动使胶粒互相碰撞而聚集。另外，由于电解质离子的水化作用会破坏胶粒周围的水化层，使其能直接碰撞面聚集起来。

影响凝聚作用的主要因素是无机盐的种类、化合价和用量。阳离子对带负电荷胶粒的凝聚能力次序为： $\text{Al}^{3+} > \text{Fe}^{3+} > \text{H}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ 。常用的凝聚剂有： $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ （明矾）、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{MgCO}_3$  等。

## 二、絮凝技术

采用凝聚方法得到的凝聚体颗粒常比较小，有时还不能有效地进行分离，而采用高分子物质的絮凝法常可形成粗大的絮团。近年来发展了不少种类的高分子聚合物絮凝剂，它们具有长链线状的结构，是一种水溶性的聚合物，相对分子质量可高达数万至 1 000 万以上，在长的链节上含有相当多的活性功能团，可以带有多价电荷（如阴离子或阳离子），也可以不带电性（如非离子型）。它们通过静电引力、范德华引力或氢键作用，强烈地吸附在胶粒的表面，一个高分子聚合物的许多链节分别吸附在不同颗粒的表面上，产生了架桥连接，生成粗大的絮团，这就是絮凝作用。如图 2-2 所示。