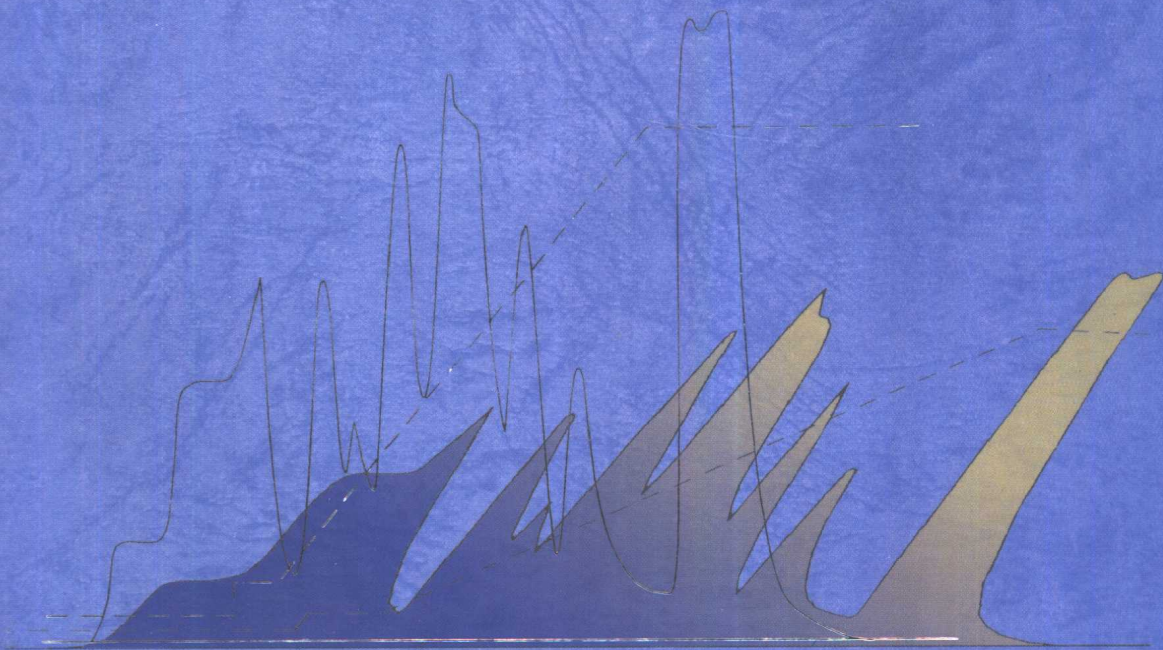




高 ◆ 等 ◆ 学 ◆ 校 ◆ 教 ◆ 材

生物分离工程

孙彦 编著



化学工业出版社



(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

生物分离工程/孙彦编著. —北京: 化学工业出版社,
1998.10 (2001.3 重印)
高等学校教材
ISBN 7-5025-2120-8

I. 生… I. 孙… III. 生物工程-分离-高等学校-教材
IV. Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (98) 第 21091 号

高等学校教材
生物分离工程
孙彦 编著
责任编辑: 骆文敏
责任校对: 蒋宇
封面设计: 田彦文

*

化学工业出版社出版发行
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)
发行电话: (010) 64918013
<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
北京市燕山印刷厂印刷
三河市前程装订厂装订

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 18¼ 字数 444 千字
1998 年 10 月第 1 版 2001 年 3 月北京第 2 次印刷
印数: 3001—5000

ISBN 7-5025-2120-8/G·608

定价: 27.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序

生物技术是一门历史渊源的技术。本世纪六、七十年代原生质体融合技术和 DNA 重组技术的出现，赋予了生物技术以崭新的内涵，使它迅猛地发展成为一门集现代生物科学和工程技术于一身的新兴学科，成为当前世界各国高新技术发展的主要领域。它已能从分子和细胞的水平上改造已有的物种和创建新的物种，为人类健康和社会生产服务。它的进一步发展将会在下一世纪引起一场新的技术革命的浪潮。

生物技术必须实现产业化才能造福于人类，才能得到社会效益和经济效益。近 20 年来的实践使人们认识到：在生物技术产业化的进程中，其“下游技术”往往成为技术和经济的关键。它不仅直接关系到产品的产量和质量，而且其成本常常占总成本的 60%~90%。因此愈来愈受到人们的关注。

生物技术的“下游技术”包括细胞的大规模培养、产物的分离纯化、产品的成型加工和质量监控等一系列单元操作和过程中的主要技术。其中，生化产物的分离和纯化是其最重要的核心内容。

近年来，国内出版了不少有关生物技术的专著或科普读物，但有关生物下游工程的书籍并不多见，而适合作为教科书的更为罕见。这可能与生物下游工程涉及的面太广和下游过程的多样性，以及写一本好的书，尤其教科书不易有关。

《生物分离工程》正是应这一迫切需要应运而生的一本较好的教科书和技术参考书。此书系统和比较详尽地介绍了生物下游工程的主要技术，如：细胞的分离和破碎、生化产物提取的各种技术、产品纯化的主要方法等。书中各章既有独立性，又相互呼应，使读者对生物下游工程有一个比较全面的了解。

本书的书写深入浅出，既重视对原理的叙述，又介绍其实际应用。使其不仅适合作为高等院校有关专业的教材，而且可以作为从事生物工程的科研和技术人员的参考书。我相信，此书的出版将会受到从事生物技术的广大师生和科技人员的欢迎。

清华大学 沈忠耀
1998 年 7 月于清华园

前 言

分离过程贯穿于人们的日常生活以及社会的生产实践中,在化学工业、生物工业、资源开发和环境保护等领域发挥着重要作用。就生产实践而言,分离过程的重要性在于,天然的以及化学和生物过程所产生的物质,均不同程度地与其他物质以混合物的形式存在。有用物质的最终产品需要达到较高的纯度,而有害物质需要充分净化和妥善处理,这些都必须借助各种分离操作加以实现。混合物的分离不能自发进行,需要外界能量。这种能量可以储存于分离介质中,或者通过分离设备以热能和(或)机械能的形式提供。因此,高效分离介质、分离技术与设备的开发和设计是生产实践的重要环节。对于生物物质,由于其性质和用途的特殊性,需要特殊的分离技术和更多步骤的分离过程,进一步增加了分离操作的难度,使分离过程在生物技术产业中的地位愈显重要。近30年来,高效生物分离技术的研究开发一直是产学界瞩目的焦点,取得了许多重要研究成果。可以预计,随着21世纪生物技术产业的飞速发展,生物分离技术的研究开发将得到更广泛的重视,人才需求将不断增长,竞争更趋激烈。因此,生物化工高等教育面临着更大的机遇和挑战。

作者从1993年春开始为天津大学生物化工专业硕士研究生开设“高等生物分离工程”学位课,其间深感由于教学资料零散给学生掌握授课内容带来的困难。有鉴于此,从1993年夏起,作者结合科研工作,着手“生物分离工程”讲义的编写。1995年以后,由于生物化工专业本科生“生化分离工程”教学的需要,又对原讲义内容做了全面充实,加强了内容的系统性和完整性,形成本书的初稿。后经反复增删,并请资深教授审阅,最终完成了本书的修改工作。与此同时,书稿经过近年本科生和研究生课教学实践的检验,收到了良好的教学效果。因此,本书的大部分章节可作为本科生教材,部分章节可用于研究生的教学参考书。

本书重点阐述了近年来生物物质、特别是蛋白质类生物大分子的分离技术和理论的重要发展,如新型液液萃取、膜分离、层析(色谱)、电泳与亲和分离纯化技术等。对于《化工原理》教材中涉及较多的内容,如离心分离、过滤和干燥等从简介绍,仅针对其在生物过程中的应用背景略做阐述。

全书共分11章,其中4至9章是本书的核心。第1章概述生物分离过程(生物下游加工过程)、分离操作和各种生物物质;第2章介绍细胞分离和破碎的主要方法,以及基因重组包含体蛋白质的复性;第3章以盐析沉淀为主,简述蛋白质的各种沉淀分级方法和动力学;第4章阐述了萃取的原理和萃取过程的设计基础,萃取方法既包括传统的溶剂萃取和浸取,也包括双水相萃取、液膜萃取、反胶团萃取和超临界流体萃取等新型萃取技术;第5章以超滤和微滤为中心,介绍各种膜分离技术的原理、特点和应用;第6章以固定床吸附过程理论为重点,介绍主要吸附剂和离子交换剂、吸附和离子交换平衡、膨胀床和流化床等新型吸附分离方法;第7章以凝胶过滤和离子交换层析为重点,介绍层析过程的基本理论和各种层析方法的原理、层析介质、特点和应用;第8章阐述了生物亲和作用的本质,重点介绍了亲和层析的相关技术和过程理论,并概述了近年来不断发展的其他亲和纯化技术的原理和研究现状;第9章介绍了蛋白质的各种电泳分离方法;第10章结晶原理、结晶动力学、主要工业结晶器和结晶操作与应用;第11章简要介绍干燥的一般原理、干燥过程的基础理论和生物过程中的主

要干燥设备。

清华大学沈忠耀教授、天津大学王世昌教授和王静康教授在百忙中审阅了本书稿，提出许多宝贵的修改意见和建议。沈忠耀教授欣然为本书作序，体现了老一代科学家对青年教师的热情支持与鼓励。作者谨向三位先生表示崇高的敬意和衷心的感谢。作者还特别感谢天津市教委和天津大学分别将本书作为重点教材立项，使其得以顺利出版。

在本书整理过程中，本研究室历届研究生何利中、史清洪、李凌燕、李玉龙和金仙华等同学参与了部分书稿的计算机文字处理工作。化学工业出版社领导对本书的出版给予了大力支持，在此谨向他们表示真诚的谢意。另外，借此机会，作者向各界朋友、老师、学长、同事以及天津大学各级领导多年来给予作者的支持、鼓励和教诲表示感谢。

生物分离工程是蓬勃发展中的学科领域，由于作者知识和经验有限，加之时间较短，书中错误和不足之处在所难免，敬请读者给予批评指正。如果本书能激发更多青年学子投身于生物工程研究和生产实践，并成为生物工程研究和教育工作者的实用参考书，将是作者编著此书的最大收获。

孙彦

1998年盛夏于天津大学

内 容 提 要

本书主要介绍生物产物分离纯化的原理、方法、过程理论及应用。生物产物的分离纯化过程又称生物下游加工过程,是生物技术产品产业化的关键。全书内容共分11章,即绪论、细胞分离与胞内产物的溶解、沉淀、萃取、膜分离、吸附和离子交换、层析、亲和纯化、电泳、结晶和干燥等。其中4至9章是本书的核心,重点阐述了近年来生物物质、特别是蛋白质类生物大分子的分离纯化技术的重要发展。

本书主要用作高等院校生物化工专业及其相关专业本科生和研究生的教材,也可作为从事生物技术、生物化工和生物制药等方面科学研究和教学的科技人员和教育工作者的实用参考书。

目 录

1 绪 论	1
1.1 生物下游加工技术	1
1.2 生物下游加工过程的特点	2
1.3 分离机理与分离操作	4
1.4 生物物质	5
1.5 分离效率的评价	6
引用文献	7
2 细胞的分离与胞内产物的溶解	8
2.1 细胞分离	8
2.1.1 重力沉降	8
2.1.2 离心沉降	9
2.1.3 过滤	13
2.2 细胞破碎	16
2.2.1 细胞的结构	16
2.2.2 细胞破碎和产物释放原理	17
2.2.3 细胞破碎法	18
2.2.4 目标产物的选择性释放	23
2.3 包含体的分离和蛋白质复性	23
2.3.1 包含体的形成	24
2.3.2 包含体的分离和蛋白质的复性	24
习题	26
引用文献	26
3 沉淀	28
3.1 蛋白质表面特性	28
3.2 盐析沉淀	29
3.2.1 原理	29
3.2.2 影响盐析的因素	30
3.2.3 盐析操作	31
3.2.4 应用	32
3.3 等电点沉淀	32
3.4 有机溶剂沉淀	33
3.5 热沉淀	33
3.6 其他沉淀法	34
3.7 沉淀生成动力学	35
3.7.1 扩散控制过程	35

3.7.2	剪切作用生长过程	36
	习题	36
	引用文献	37
4	萃取	38
4.1	基本概念	38
4.2	分配定律与分配平衡	40
4.3	有机溶剂萃取	41
4.3.1	弱电解质的分配平衡	41
4.3.2	化学萃取平衡	43
4.3.3	溶剂萃取操作	44
4.4	液液萃取设备及其设计的理论基础	46
4.4.1	混合-澄清式萃取	46
4.4.2	多级错流接触萃取	47
4.4.3	多级逆流接触萃取	49
4.4.4	分馏萃取	50
4.4.5	微分萃取	53
4.5	双水相萃取	59
4.5.1	双水相系统	59
4.5.2	双水相中的分配平衡	60
4.5.3	影响分配系数因素（操作条件）的综合考察	63
4.5.4	双水相萃取操作	65
4.6	液膜萃取	69
4.6.1	液膜的种类	70
4.6.2	液膜萃取机理	71
4.6.3	液膜萃取过程分析	73
4.6.4	液膜萃取操作	77
4.7	反胶团萃取	84
4.7.1	反胶团及其基本性质	84
4.7.2	反胶团的溶解作用	85
4.7.3	萃取及反萃取动力学	87
4.7.4	反胶团萃取操作	89
4.8	液固萃取（浸取）	96
4.8.1	浸取速度	96
4.8.2	液固萃取操作及设备	97
4.8.3	浸取剂	98
4.9	超临界流体萃取	98
4.9.1	超临界流体的性质	98
4.9.2	超临界流体中的溶解度	99
4.9.3	超临界流体萃取操作	101
4.9.4	应用	101

习题	103
引用文献	104
5 膜分离	106
5.1 各种膜分离法及其原理	106
5.1.1 反渗透	106
5.1.2 超滤和微滤	109
5.1.3 透析	110
5.1.4 电渗析	111
5.1.5 渗透气化	111
5.2 膜及其特性	112
5.2.1 膜材料	112
5.2.2 膜的结构特性	112
5.2.3 水通量	113
5.3 膜组件	115
5.4 操作特性	117
5.4.1 浓度极化模型	117
5.4.2 超滤膜的分子截留作用	118
5.5 影响膜分离速度的因素	119
5.6 膜分离过程	121
5.6.1 分离操作	121
5.6.2 错流过滤过程的流体力学	124
5.7 膜的污染与清洗	125
5.8 应用	126
5.8.1 菌体分离	127
5.8.2 小分子生物产物的回收	127
5.8.3 蛋白质的回收、浓缩与纯化	127
5.8.4 膜生物反应器	128
习题	130
引用文献	130
6 吸附和离子交换	132
6.1 吸附剂与离子交换剂	132
6.1.1 吸附剂	132
6.1.2 离子交换剂	133
6.2 吸附平衡	136
6.3 离子交换平衡	137
6.4 固定床吸附操作	139
6.5 固定床吸附过程理论基础	141
6.5.1 表面吸附速率控制	142
6.5.2 液膜扩散速率控制	142
6.5.3 内扩散速率控制	142

6.5.4	简化的速率方程	145
6.5.5	恒定图式假设	149
6.6	膨胀床吸附操作	152
6.6.1	膨胀床的形成	153
6.6.2	膨胀床吸附操作	154
6.7	流化床吸附操作	155
6.8	移动床和模拟移动床吸附操作	156
6.9	搅拌釜吸附操作	157
	习题	160
	引用文献	160
7	层析	162
7.1	层析原理与分类	162
7.1.1	原理	162
7.1.2	分类	162
7.2	层析过程理论基础	164
7.2.1	平衡模型	164
7.2.2	理论板模型	165
7.2.3	轴向扩散模型	167
7.3	分离度	169
7.4	凝胶过滤层析	170
7.4.1	原理与操作	170
7.4.2	凝胶过滤介质	171
7.4.3	影响分离特性的因素	172
7.4.4	GFC 的应用及特点	175
7.5	离子交换层析	176
7.5.1	原理与操作	176
7.5.2	线性梯度洗脱过程	178
7.5.3	逐次洗脱过程	182
7.5.4	IEC 的应用及特点	182
7.6	疏水性相互作用层析	183
7.6.1	原理	183
7.6.2	疏水性吸附剂	183
7.6.3	HIC 操作	184
7.7	层析聚焦	186
7.7.1	原理与操作	186
7.7.2	多缓冲剂与多缓冲离子交换剂	187
7.7.3	层析聚焦的应用	187
7.8	反相层析	187
7.9	羟基磷灰石层析	189
7.10	超临界流体层析	189

7.11 灌注层析.....	190
习题.....	191
引用文献.....	192
8 亲和纯化	193
8.1 生物亲和作用	193
8.1.1 亲和作用的本质	193
8.1.2 影响亲和作用的因素	195
8.1.3 亲和作用体系	195
8.2 亲和层析	196
8.2.1 原理与操作	196
8.2.2 亲和吸附介质	197
8.2.3 亲和层析过程及其理论分析	204
8.2.4 应用举例	208
8.3 亲和膜	213
8.3.1 原理和特点	213
8.3.2 应用	214
8.4 亲和错流过滤	215
8.4.1 原理和特点	215
8.4.2 应用	216
8.5 亲和双水相分配	219
8.6 亲和反胶团萃取	221
8.7 亲和沉淀	224
习题.....	226
引用文献.....	226
9 电泳	229
9.1 电泳速度	229
9.1.1 自由溶液中的电泳速度	229
9.1.2 凝胶中的电泳速度	230
9.2 凝胶电泳	231
9.3 不连续凝胶电泳	232
9.3.1 浓缩层内的等速电泳	232
9.3.2 不连续凝胶电泳过程分析	233
9.3.3 分离操作及其特性	234
9.4 等电点聚焦	235
9.5 二维电泳	237
9.6 逆向作用层析电泳	237
9.7 毛细管电泳	239
9.8 连续电泳操作	239
9.8.1 Hannig 型连续自由流电泳	240
9.8.2 利用多孔膜的连续自由流电泳	240

9.8.3 利用多孔膜的连续等电点聚焦	240
9.8.4 旋转柱连续电泳和连续电泳层析	240
习题	242
引用文献	242
10 结晶	243
10.1 结晶原理	243
10.1.1 溶解度	243
10.1.2 过饱和溶液与介稳区	243
10.1.3 成核	245
10.2 结晶的生长	247
10.2.1 生长速率	247
10.2.2 ΔL 定律	248
10.3 结晶过程设计基础	249
10.3.1 晶体粒度分布	249
10.3.2 粒数衡算方程	250
10.4 结晶器	257
10.4.1 冷却结晶器	257
10.4.2 蒸发结晶器	257
10.5 结晶操作及其应用	259
10.5.1 结晶操作特性	259
10.5.2 应用	261
习题	264
引用文献	264
11 干燥	265
11.1 干燥速度	265
11.2 湿空气和物料中水分的性质	267
11.3 干燥过程	269
11.3.1 盘架传导干燥	269
11.3.2 对流干燥	270
11.4 干燥设备及其应用	272
习题	275
引用文献	275
习题答案	276

1 绪 论

1.1 生物下游加工技术

以 1973 年第一个外源基因重组质粒在细菌内增殖成功^[1]和 1975 年细胞融合技术的建立^[2]为重要标志,重组 DNA (recombinant DNA, rDNA) 技术即基因工程技术和细胞融合技术等现代生物技术步入了崭新的发展时期。1980 年前后,世界主要发达国家先后实施生物技术发展计划,80 年代以来,生物技术产业以日新月异的步伐迅速发展,特别是在与医药、食品、食品添加剂以及化妆品等有关的生物产物生产方面,不仅产品种类繁多,而且数量也不断增长。毫无疑问,导致生物技术产业迅速发展的主要原因是:基因工程和细胞融合等现代生物技术的惊人进步,使天然存在的极微量有用生物物质得以通过大量细胞(微生物、动物及植物细胞)培养进行商业规模生产。此外,生物产物从原料(培养液或细胞)生产到产品的后处理技术(分离纯化技术)的发展,使低成本、高收率地纯化目标产物成为现实。由于生物技术产品多数是与人类生活密切相关的物质,对有害物质有严格的控制,生产过程也要求有严格的管理,在最终产品中往往不允许极微量的有害杂质存在。这就使生物产物的分离纯化过程在整个生产过程中显得极为重要。

一般生物产物的生产过程称为生物加工过程 (Bioprocess),包括优良生物物种的选育和生物反应(酶反应、微生物发酵、动植物细胞培养等)生产粗原料的过程及其之后的目标产物的分离纯化过程,即下游加工过程 (Downstream processing)。下游加工过程包括目标产物的提取、浓缩、纯化及成品化等过程。下游加工过程的重要性主要体现在生物产物的特殊性、复杂性和对生物产品要求的严格性上,导致下游加工过程的成本往往占整个生物加工过程成本的大部分。例如,大多数酶的回收纯化过程成本约占 70%,对纯度要求高的医用酶如天门冬酰胺酶 (asparaginase) 的生产,回收过程的成本高达 85%,基因工程表达产物的回收纯化过程成本一般占 85%~90%以上,而青霉素回收过程成本约占 50%,乙醇的回收过程成本仅占 14%^[3]。因此,下游加工过程的质量往往决定整个生物加工过程的成败,设计合理的下游加工过程可大大降低目标产品的生产成本,实现大规模商业化生产。

生物反应的产物一般是由细胞、游离的细胞外代谢产物、细胞内代谢产物、残存底物及惰性组分组成的混合液,生物下游加工过程所应用的分离纯化技术取决于产物所存在的位置(细胞内或细胞外)及产物分子的大小、疏水性、电荷形式和溶解度等。不仅如此,生物加工过程自身的规模和目标产物的商业价值也是选择分离纯化技术的重要因素。例如,各种形式的层析分离法多应用于价格昂贵的医药产品和生理活性物质(如酶、荷尔蒙、抗体和细胞因子等)的分离纯化,但其分离过程成本较高,并且规模放大困难,不适用于低价格生物产物的分离纯化。

图 1.1 是通过细胞培养生产生物物质的下游加工过程的一般流程。首先,将细胞与培养液分离开来。当目标产物存在于细胞内(胞内产物)时,需首先利用细胞破碎等方法将目标产物释放到液相中,除去细胞碎片后进行一系列粗分离和纯化操作(路线 1a);如果胞内目标产物为以包含体 (inclusion bodies, IBs) 形式存在的蛋白质,则需利用盐酸胍等变性剂溶解

包含体后通过除去变性剂等方法使蛋白质复性 (refolding) (路线 1b)。当目标产物为胞外产物, 即在细胞培养过程中已分泌到培养液中, 则除去细胞后直接对培养上清液进行一系列浓缩、分离和纯化, 得到一定纯度的目标产物溶液 (路线 2)。最后经过脱盐、浓缩、结晶和干燥处理, 得到最终产品。

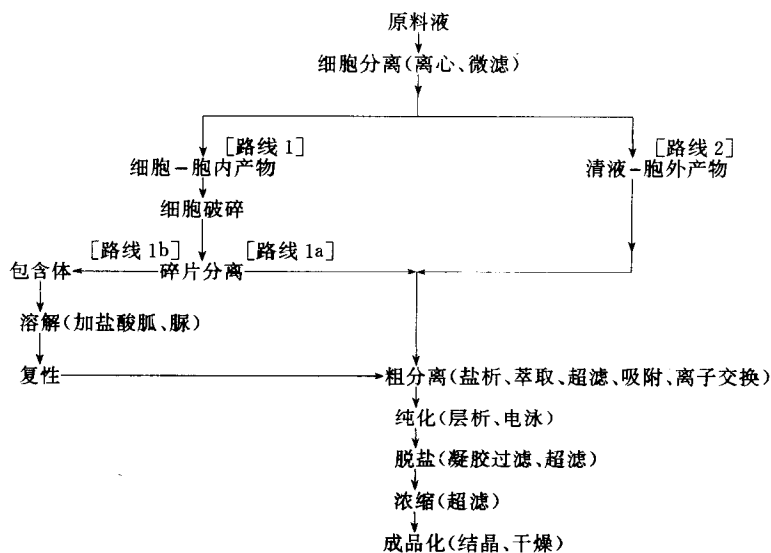


图 1.1 下游加工过程的一般流程

注: () 内为主要的分离纯化方法

可以看出, 为了得到一定纯度的生物产品, 下游加工过程需要采用多种方法、实行多步分离操作。由于每一步分离操作的回收率都不能达到 100% (一般为 70%~90%), 而整个下游加工过程的总回收率为

$$Y_T = \prod_i Y_i \quad (1.1)$$

其中, Y_i 为第 i 步操作的回收率, Y_T 为总回收率。所以, 多步操作使最终产品的回收率很低, 对生产过程是非常不利的。从式 (1.1) 可以看出, 为了提高最终产品的回收率, 一是提高每一步操作的回收率, 二是减少操作步骤。为了达到这些目的, 就要对分离技术及设备进行系统的工程研究, 并努力开发新型高效的分离纯化方法。

人干扰素 (human interferon, hIFN) 是一种重要蛋白质类生物药品, 具有抗癌和治疗肝炎等作用。Yonehara 等^[4]利用醋酸锌盐析 (83.0%) (括号内为回收率, 下同)、离子交换层析 (62.7%)、硫酸铵盐析 (96.2%)、铜螯合层析 (46.0%)、疏水性相互作用层析 (78.3%) 和凝胶电泳 (88.9%) 等六步操作分离纯化人干扰素, 总收率仅为 16%。而 Staehelin 等^[5]利用硫酸铵盐析、免疫亲和层析和阳离子交换层析, 仅三步操作就得到了与 Yonehara 等纯化程度相当的人干扰素产品, 总回收率达到 81.0%。这主要是由于采用了高效率的免疫亲和层析法, 从而减少了分离步骤的缘故。

1.2 生物下游加工过程的特点

由于生物物质, 尤其是蛋白质类生物大分子具有生理活性及药理作用, 在分离纯化过程中必须根据目标产物的特点, 在保持其生物机能的前提下进行分离纯化操作。下面阐述生物下游加工过程的特点和分离纯化操作中需注意的几点事项。

(1) 生物物质的生理活性大多是在生物体内的温和条件下维持并发挥作用的，当遇到高温、pH的改变以及某些化学药物存在等周围环境的急剧变化时极不稳定，容易发生生物活性的降低甚至丧失。因此，对分离纯化过程的操作条件有严格的限制，就是要满足维持生物物质的生物活性的要求。

(2) 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。因此要求采用快速的分离纯化方法除去影响目标产物稳定性的杂质。

(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其相似的分子及异构体，形成用常法难于分离的混合物。因此，一般要求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原 (pyrogen) 及具有免疫原性的异体蛋白等有害人类健康的物质，并且防止这些物质在操作过程中从外界混入。但是，允许对人体无害的少量杂质的存在。也就是说，要根据目标产物的使用目的，完全除去妨碍其机能发挥的杂质，但不像电子材料和无机材料那样要求非常高的纯度。

(5) 原料液中目标产物的浓度一般都很低，有时甚至是极微量的。这样就有必要对原料液进行高度浓缩，从而使下游加工过程的成本显著增大。下面从热力学角度说明这个问题。

根据热力学第二定律，混合过程熵增大，是自发过程。所以，两种互溶的物质相互混合时，不需要外界能量。但是，要使混合的物质得到分离，必须补充使熵减小所需的能量。在恒温条件下使混合物中的各组分提纯为纯粹的物质所需的最小功 W_{\min} 与吉布斯自由能变化 ΔG 相等，即

$$W_{\min} = \Delta G = - \sum_i x_i RT \ln \gamma_i x_i \quad (1.2)$$

其中， i 为组分数， x 为摩尔分率、 γ 为活度系数。在稀溶液中，溶剂的摩尔分率近似为 1，故 $\gamma_i = 1$ 。所以，得到纯粹的组分 i 所需最小功为

$$W_{\min, i} = - x_i RT \ln x_i \quad (1.3)$$

从式 (1.3) 可以看出，提纯 1mol 组分 i 需要 $-RT \ln x_i$ 的功，即得到单位质量物质 i 所需的能耗与 $\ln(1/x_i)$ 成正比。所以，原料中目标产物浓度越低，所需能耗越高，分离回收的成本越大。

图 1.2 为 1984 年每千克生物产品售价 P 与原料液中目标产物浓度 c 的双对数坐标图^[6]，从图可知， P 和 c 的关系可近似表示为

$$cP = k \quad (\text{常数}) \quad (1.4)$$

或

$$P = \frac{k}{c} \quad (1.5)$$

即产品的售价与其在原料液中的浓度成反比。

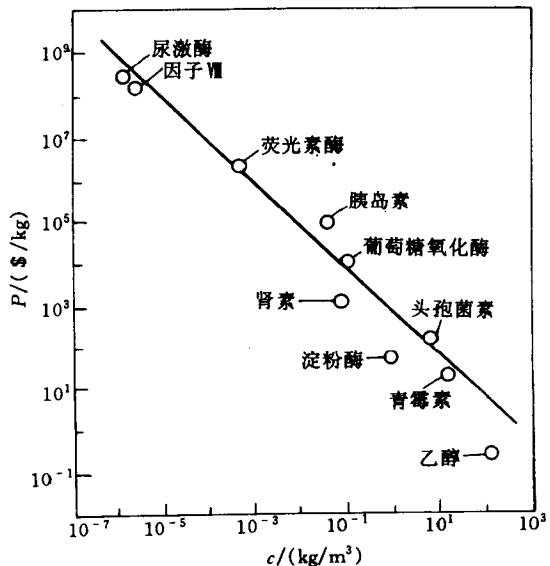


图 1.2 原料液中目标产物浓度与产品售价的关系

1.3 分离机理与分离操作

对于一个待分离的原料，一般利用原料中目标产物与共存杂质之间在物理、化学以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（或）平衡状态，从而实现分离的目的。这些性质包括以下几个方面^[7]。

(1) 物理性质

力学性质：重力、离心力、筛分；

热力学性质：状态变化、相平衡；

传质性质：粘度、扩散、热扩散；

电磁性质：电泳、电渗析、磁化。

(2) 化学性质

化学热力学：化学平衡；

反应动力学：反应速率；

光化学性质：激光激发、离子化。

(3) 生物学性质

分子识别：生物亲和作用、生物学识别；

输送性质：生物膜输送；

反应、响应、控制：酶反应、免疫系统。

利用目标产物与其他杂质之间的性质差异所进行的分离过程，可以是单一因素单独作用的结果，也可以是两种以上因素共同作用的结果，前者为单一过程，后者为复合过程。在生物分离过程中，往往需要同时利用多种分离机理，并且实施多步分离操作的串联。

表 1.1 列出了生物物质的分离纯化过程中所利用的主要单元操作及其分离机理和分离对象。根据分离过程的基本原理，分离操作可分机械分离和传质分离两大类。机械分离的对象是非均相物系，根据物质的大小、密度的差异进行分离，如过滤、重力沉降和离心沉降等。传质分离的对象主要是均相物系，又分输送分离和扩散分离两种。输送分离根据溶质在外力作用下产生的移动速度的差异实现分离，又称速度分离法，其传质推动力主要有压力差、电位梯度和磁场梯度等，如超滤、反渗透、电渗析、电泳和磁泳等。扩散分离根据溶质在两相中分配平衡状态的差异实现分离，又称平衡分离法，传质推动力为偏离平衡态的浓度差，如蒸馏、蒸发、吸收、萃取、结晶、吸附和离子交换等。对于特定的目标产物，要根据其自身的性质以及与其共存杂质的特性，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）损伤的同时，达到所需的纯度和对回收率的要求，并使回收过程成本最小，以适应大规模商业生产的需要。

表 1.1 生物分离操作及其分离机理

单元操作	分离机理	分离对象举例
膜分离		
微滤	压力差、筛分	菌体、细胞
超滤	压力差、筛分	蛋白质、多糖、抗生素
反渗透	压力差、筛分	水、盐、糖、氨基酸
透析	浓度差、筛分	尿素、盐、蛋白质
电渗析	电荷、筛分	氨基酸、有机酸、盐、水
渗透气化	汽液相平衡、筛分	乙醇

续表

单元操作	分离机理	分离对象举例
萃取 有机溶剂萃取 双水相萃取 液膜萃取 反胶团萃取 超临界流体萃取	液液相平衡 液液相平衡 液液相平衡 液液相平衡 相平衡	有机酸、抗生素 蛋白质、抗生素 氨基酸、有机酸、抗生素 氨基酸、蛋白质 香料、脂质
层析 凝胶过滤层析 反相层析 离子交换层析 亲和层析 疏水性相互作用层析 层析聚焦	浓度差、筛分 分配平衡 电荷、浓度差 (pH、离子强度) 生物亲和作用 疏水作用 电荷、浓度差 (pH)	脱盐、分子分级 甾醇类、维生素、脂质、肽 蛋白质、氨基酸、抗生素、核酸、有机酸 蛋白质、核酸 蛋白质 蛋白质
电泳 凝胶电泳 等电点聚焦 等速电泳 区带电泳	筛分、电荷 筛分、电荷、浓度差 筛分、电荷、浓度差 筛分、电荷、浓度差	蛋白质、核酸 蛋白质、氨基酸 蛋白质、氨基酸 蛋白质、核酸
离心 离心过滤 离心沉降 超离心	离心力、筛分 离心力 离心力	菌体、菌体碎片 菌体、细胞、血球 蛋白质、核酸、糖类

1.4 生物物质

天然的和通过各种生物反应过程生产的生物物质，从低分子化合物到具有复杂结构和构成成分的生物组织，在大小、形态和性质上具有广泛的分布。本小节介绍主要生物物质及其纯化手段。

1. 氨基酸

氨基酸 (amino acid) 是构成蛋白质的主要成分，许多氨基酸 (如缬氨酸、亮氨酸、丝氨酸、异亮氨酸等) 为人体必需的氨基酸，具有重要的营养和医用价值，常作为食品添加剂和临床输液的主要成分。氨基酸中含有不对称碳原子，具有光学活性。一般 d 体和 l 体氨基酸的生物活性不同，因此氨基酸的光学拆分具有重要的意义。

氨基酸为两性电解质，具有等电点，溶解度受溶液 pH 的显著影响。因此氨基酸的分离纯化常利用其溶解度特性和带电性质来实现，如采用结晶和离子交换法等。

2. 蛋白质和多肽

氨基酸之间经肽键结合构成多肽或蛋白质。与氨基酸类似，蛋白质或多肽均为两性电解质，每一分子上带有多个正负电荷，具有等电点。因此常利用其带电性质进行分离纯化，如离子交换层析、电泳等。

另外，蛋白质的相对分子质量很大，一般以固有的立体结构存在，通过其自身的电荷分布、疏水基分布等特性与某些相对应的分子可发生亲和相互作用 (如抗体与其抗原分子的特异性结合)。利用这种生物亲和作用的亲和层析法已成为重要的蛋白质分离纯化手段。

蛋白质种类繁多，具有多彩的生物机能。如具有生物催化活性的酶，免疫作用的抗体，各种生理和药理作用的干扰素、集落刺激因子 (colony-stimulating factor, CSF)、红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、白细胞介素 (interleukin, IL) 等细胞因子，溶血栓作用的组织型纤溶酶原激活剂 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) 等。酶作为生物催化剂在工业生产和人类的日常生活中发挥着重要的作用，而作为医药品的各种蛋白质类生理活性物质在