



高等学校教材

新编

生物工艺学

下册

● 俞俊棠

唐孝宣

邬行彦

李友荣

金青萍



化学工业出版社
教材出版中心

高等学校教材

新编生物工艺学

下册

俞俊棠 唐孝宣 邬行彦 李友荣 金青萍

化学工业出版社
教材出版中心
·北京·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

新编生物工艺学 (下册)/俞俊棠等. —北京: 化学工业出版社, 2003.6
高等学校教材
ISBN 7-5025-4218-3

I. 新… II. 俞… III. 工艺学-高等学校-教材
IV. TB18

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 035737 号

高等学校教材

新编生物工艺学

下册

俞俊棠 唐孝宣 邬行彦 李友荣 金青萍

责任编辑: 骆文敏 赵玉清

责任校对: 郑捷

封面设计: 蒋艳君

*

化学工业出版社
教材出版中心 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)64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京管庄永胜印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

*

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 17½ 字数 429 千字

2003 年 6 月第 1 版 2003 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4218-3/Q·49

定 价: 29.00 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

内 容 提 要

生物技术是当前优先发展的高新技术之一，它的快速发展和有效应用已给当前的工农业生产、人民健康、社会进步带来了明显的影响，并对人类和加速发展带来了积极的效益。由于生物技术发展势头很快，因此作为生物工程专业的专业课程的生物工艺学的教材亟须不断加以更新。本书由 27 位老、中、青年教师或专职科研骨干人员，历时两年编写完成。

本书以产品生产中共性工艺技术的理论和实践为纲，同时选取若干典型生产过程具体介绍，内容包括成熟的和较新的生物过程的基本原理。全书分上、下两册，上册包括绪论和生物反应过程篇（共 11 章），下册包括生物物质分离和纯化原理篇（共 11 章）以及典型生物过程篇（共 6 章）。

本书可做工科生物工程专业的教材，理科生物科学和生物技术专业教学参考书；也可供从事生物技术生产、科研、管理人员的参考阅读。

前 言

利用生物的机体、组织、细胞或其所产生的酶来生产各种传统的、近代的以至现代的生物技术产品的过程可统称为生物生产过程。当然，现代的生物技术产品与传统的或近代生物技术产品在类别和技术先进性上有了很大的差异和进步，但还是有其共同性，即利用生物催化剂和在常温常压下进行生产等特点，且其应用面广、品种繁多，被列为新世纪优先发展的技术之一。

目前，在我国的高等教育专业分类中设立了三个与生命科学相关的专业，即：生物学、生物技术和生物工程。前两者归属于理科，后者则归属于工科。这三个专业对我国的生物技术的研究、开发、生产方面各有所侧重，大致是：生物学和生物技术专业偏重于生物技术上游的理论研究和新产品的研究；生物工程专业偏重于生物产品的过程开发，包括生物技术新产品的研制和老产品生产过程的改进。三者之间相辅相成，各有所重。

为了编写一本适用于生物工程专业的工艺学教科书，我们在1991年及1992年分别编写和出版了《生物工艺学》的上、下册，由当时的华东化工学院出版社出版。该书出版后，师生都感到教和学兼便、教学质量有所保证，非但在本校采用，还被兄弟院校同一专业师生在较广范围内所采用。由于生物技术发展十分迅速，原出版的《生物工艺学》内容已跟不上当前的发展和需要，为此，决定重编此教材，定名为《新编生物工艺学》。1997年，此重编教材被教育部化学工业教学指导委员会生物化工指导小组列入了“规划教材编写计划”；为此，此新编教材就移至化学工业出版社予以出版。

新编的生物工艺学仍是不以具体产品为纲，而以产品生产中共性工艺技术的理论和实践为纲，但也选取了若干典型生产过程为例在第三篇作专章介绍。因此，本书分上、下两册，除绪论外，分为三篇：生物反应过程原理篇（上册）；生物物质分离和纯化过程篇（下册）；典型生物过程篇（下册）。

参加本书编写的有（基本上以章排列先后为序）：俞俊棠（第1章）、叶蕊芳（第2章）、李友荣（第3章及第7章）、宫衡（第4章、第25章及第27章）、陆兵（第5章）、谢幸珠（第6章）、叶勤（第8章）、张元兴（第10章）、钟建江（第11章）、邬行彦（第13章、第16章、第17章、第19章及第23章）、刘叶青（第14章及第15章）、严希康（第18章及第21章）、储炬（第24章）、唐孝宣（第26章）、章学钦（第28章）、金青萍（第29章）；两人或两人以上合编写的有：庄英萍、陈长华（第9章）、李元广、王永红、李志勇（第12章）、刘坐镇、宁方红、邬行彦（第20章）、曹学君、楼一心（第22章）。他（她）们都是从事（或曾从事）生物化工教学或科研第一线的骨干教师（部分已离休或退休）。负责对全书确定编写计划和约稿、审稿的是俞俊棠、邬行彦、李友荣、唐孝宣和金青萍。其中唐孝宣

同志审了较多的初稿，金青萍同志为全书的统一规格、整理和打印定稿做了很多具体工作。此外，乌锡康同志为本书稿体例的统一、规范花费了不少精力和时间，在此特表示衷心的感谢。

由于生物技术发展得很快，有许多生物技术的新发展、成果还来不及消化吸收将其编入教材，加上编写者的水平及时间的原因，错误和不足之处在所难免，诚恳地希望读者给予批评指正，以便在重印时更正。

谨将本书作为祝贺华东理工大学建校五十周年（1952.10.25～2002.10.25）的一份献礼。

俞俊棠

2002.5

目 录

生物物质分离和纯化过程篇

13 下游加工过程概论	1	15.2.3 选择破碎方法的依据	31
13.1 下游加工过程在生物技术中的地位	1	15.2.4 破碎技术研究的方向	32
13.2 传统生化产品和基因工程产品回收方法的比较	1	15.3 破碎率的测定	32
13.3 生物技术下游加工过程的特点	2	15.3.1 直接测定	32
13.4 生物技术下游加工过程的一般流程和单元操作	4	15.3.2 测定释放的蛋白质量或酶的活力	33
13.4.1 一般工艺流程	4	15.3.3 测定导电率	33
13.4.2 发酵液的预处理和固液分离	4	15.4 基因工程包涵体的纯化方法	33
13.4.3 细胞破碎及其碎片的分离	5	15.4.1 包涵体的洗涤和目标蛋白的变性溶解	33
13.4.4 初步纯化(提取)	5	15.4.2 目标蛋白的复性	34
13.4.5 高度纯化(精制)	7	16 沉淀法	37
13.4.6 最后纯化	8	16.1 盐析法	37
13.5 选择纯化方法的依据	9	16.1.1 Cohn 方程式	37
13.6 非蛋白质类杂质的去除	9	16.1.2 pH 和温度的影响	38
13.7 目标蛋白质的表征和分析方法	10	16.1.3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析法实际应用时的注意点	38
13.8 发展趋向	10	16.1.4 起始浓度的影响	40
14 发酵液的预处理和固液分离方法	13	16.1.5 盐析的机理	41
14.1 发酵液的预处理	13	16.2 等电点沉淀法	42
14.1.1 凝聚和絮凝技术	13	16.3 有机溶剂沉淀法	42
14.1.2 杂蛋白质的其他去除方法	17	16.4 非离子型聚合物沉淀法	44
14.1.3 高价无机离子的去除方法	17	16.5 聚电解质沉淀法	44
14.2 发酵液的固液分离	18	16.6 金属离子沉淀法	45
14.2.1 影响固液分离的因素	18	17 膜过滤法	46
14.2.2 过滤	19	17.1 膜材料和膜的制造	46
14.2.3 离心分离	20	17.1.1 膜材料	47
14.3 全发酵液提取	21	17.1.2 膜的制造	47
15 细胞破碎	24	17.2 表征膜性能的参数	49
15.1 细胞壁的组成和结构	24	17.2.1 水通量	49
15.1.1 微生物细胞壁的化学组成和结构	24	17.2.2 截留率和截断分子量	49
15.1.2 植物细胞壁的化学组成和结构	26	17.2.3 孔道特征	50
15.2 细胞破碎技术	27	17.2.4 完整性试验	50
15.2.1 机械法	27	17.3 分离机理和膜中迁移方程式	51
15.2.2 非机械法	29	17.3.1 毛细管流动模型	51
		17.3.2 溶解扩散模型	51

17.3.3	优先吸附-毛细孔流动模型	52	18.5.1	单级萃取	77
17.3.4	纳滤	53	18.5.2	多级错流萃取	77
17.4	膜两侧溶液间的传递方程式	54	18.5.3	多级逆流萃取	78
17.4.1	浓差极化-凝胶层模型	54	18.5.4	萃取计算诺模图	79
17.4.2	阻力模型	56	18.6	离子对/反应萃取	82
17.4.3	管状收缩效应的影响	57	18.6.1	一般介绍	82
17.5	影响膜过滤的各种因素	57	18.6.2	离子对/反应萃取的应用	83
17.5.1	压力	57	19	两水相分配法	85
17.5.2	浓度	58	19.1	两水相的形成	85
17.5.3	温度	58	19.2	相图	86
17.5.4	流速	58	19.3	分配理论	87
17.5.5	其他因素	59	19.3.1	表面能的影响	87
17.6	膜的污染	59	19.3.2	电荷的影响	87
17.6.1	减轻污染的方法	60	19.3.3	综合考虑	88
17.6.2	清洗方法	60	19.4	影响分配的参数	89
17.7	膜过滤装置的型式及其适用范围	61	19.4.1	成相聚合物的相对分子质量	89
17.8	操作方法	63	19.4.2	成相聚合物的浓度	89
17.8.1	分批操作	63	19.4.3	盐类的影响	90
17.8.2	透析过滤	64	19.4.4	pH值	90
17.8.3	连续操作	64	19.4.5	温度	91
17.9	应用	65	19.4.6	荷电 PEG 作为成相聚合物	91
17.9.1	发酵液的过滤与细胞的收集	65	19.5	应用	92
17.9.2	纯化	65	19.5.1	工艺方面的问题	92
17.9.3	浓缩	66	19.5.2	工程方面的问题	93
17.9.4	去热原	66	19.5.3	在小分子分离和纯化中的 应用	94
17.9.5	缓冲液变换	66	19.6	亲和和分配	95
18	溶剂萃取法	68	19.7	两水相生物转化反应	95
18.1	分配定律	68	20	离子交换法	98
18.1.1	分配定律的导出	68	20.1	基本概念	98
18.1.2	弱电解质在有机溶剂-水相间的 分配平衡	69	20.1.1	强酸性阳离子交换树脂	99
18.2	溶剂的选择	70	20.1.2	弱酸性阳离子交换树脂	99
18.3	水相条件的影响	71	20.1.3	强碱性阴离子交换树脂	100
18.3.1	pH值	71	20.1.4	弱碱性阴离子交换树脂	100
18.3.2	温度	71	20.1.5	树脂性能的比较	100
18.3.3	盐析	72	20.1.6	其他类型的树脂	101
18.3.4	带溶剂	72	20.1.7	树脂的命名	101
18.4	乳化和去乳化	72	20.2	离子交换树脂的合成	102
18.4.1	乳浊液的形成	72	20.2.1	苯乙烯-二乙烯苯型磺酸基 树脂	103
18.4.2	乳浊液的稳定条件和乳浊液的 类型	73	20.2.2	苯乙烯-二乙烯苯型胺基 树脂	104
18.4.3	乳浊液的破坏	75	20.2.3	丙烯酸-二乙烯苯型羧基 树脂	105
18.4.4	常用的去乳化剂	75			
18.5	萃取方式和理论收得率的计算	76			

20.2.4	酚醛型树脂	106	21.1.5	影响吸附过程的因素	144
20.2.5	多乙烯多胺-环氧氯丙烷树脂	106	21.2	大网格聚合物吸附剂	145
20.3	离子交换树脂的理化性能和测定方法	107	21.2.1	大网格聚合物吸附剂的类型和结构	145
20.4	离子交换过程的理论基础	110	21.2.2	大网格聚合物吸附剂的合成	147
20.4.1	离子交换平衡方程式	110	21.2.3	大网格聚合物物理性能的测定	149
20.4.2	离子交换速度	112	21.2.4	大网格聚合物吸附剂的应用	150
20.4.3	离子交换过程的运动学	114	21.3	其他类型的吸附	153
20.5	离子交换过程的选择性	116	21.3.1	疏水作用吸附	153
20.5.1	离子的水化半径	116	21.3.2	盐析吸附	153
20.5.2	离子的化合价	117	21.3.3	亲和吸附	153
20.5.3	溶液的酸碱度	117	21.3.4	染料配位体吸附	154
20.5.4	交联度、膨胀度和分子筛	118	21.3.5	免疫吸附	154
20.5.5	树脂与交换离子之间的辅助力	118	21.3.6	固定金属亲和吸附	154
20.5.6	有机溶剂的影响	119	21.3.7	羟基磷灰石吸附	154
20.6	大网格离子交换树脂	119	22	色层分离法	157
20.7	偶极离子吸附	120	22.1	色层法基本概念	157
20.8	树脂和操作条件的选择及应用举例	121	22.2	亲和层析	161
20.8.1	树脂和操作条件的选择	121	22.2.1	基质	161
20.8.2	应用举例	122	22.2.2	柱操作系统	165
20.9	软水和无盐水的制备	124	22.3	染料层析	168
20.9.1	软水制备	125	22.4	疏水层析	168
20.9.2	无盐水制备	125	22.5	固定化金属离子亲和层析	169
20.9.3	有机物污染问题	126	22.6	共价层析	170
20.9.4	再生方式	126	22.7	离子交换层析	172
20.10	离子交换法提取蛋白质	127	22.8	羟基磷灰石层析	173
20.10.1	亲水性离子交换剂	127	22.9	凝胶层析法	174
20.10.2	离子交换剂的交换容量	127	22.9.1	基本原理	174
20.10.3	吸附机理	128	22.9.2	葡聚糖凝胶的理化性质	175
20.10.4	应用举例	129	22.9.3	凝胶层析操作	176
20.11	离子交换膜和电渗析技术	129	22.10	电泳法	177
20.11.1	离子交换膜	129	22.10.1	原理	177
20.11.2	膜电位	130	22.10.2	聚丙烯酰胺凝胶电泳	178
20.11.3	电渗析制备无盐水	130	23	结晶法	183
20.11.4	极化和沉淀	132	23.1	结晶过程的实质	183
21	吸附法	138	23.2	过饱和溶液的形成	184
21.1	吸附过程的理论基础	138	23.2.1	过饱和溶液的形成方法	184
21.1.1	基本概念	138	23.2.2	工业生产实例	185
21.1.2	吸附的类型	139	23.3	晶核的形成	185
21.1.3	吸附力的本质	139	23.4	晶体的生长	188
21.1.4	吸附等温线	142	23.5	提高晶体质量的途径	188
			23.5.1	晶体的大小	189
			23.5.2	晶体的形状	190

23.5.3 晶体的纯度	190	23.5.5 重结晶	191
23.5.4 晶体的结块	191	23.6 蛋白质的结晶	191

典型生物过程篇

24 基因工程菌产品的生产与研究

概况	193
24.1 引言	193
24.2 干扰素	193
24.2.1 高密度细胞培养的策略	193
24.2.2 重组菌的高密度培养和 α -干扰素的表达	194
24.2.3 酿酒酵母的高密度培养及 人免疫干扰素的表达	194
24.3 源自克隆基因的蛋白	195
24.3.1 胰岛素	196
24.3.2 生长激素	196
24.3.3 促红细胞生成素	196
24.4 外源蛋白酵母表达系统	196
24.4.1 甲醇营养型毕赤酵母的优势	197
24.4.2 巴斯德毕赤酵母表达系统研究 进展	197
24.4.3 甲醇营养型毕赤酵母的特征	197
24.4.4 表达产物的糖基化	198
24.5 疟疾疫苗	198
24.6 重组人血清白蛋白——人血清白蛋白 基因的合成及其在酵母中的表达	200
24.7 氨基酸	200
24.7.1 基因技术在氨基酸生产方面的 应用成果	200
24.7.2 利用重组大肠杆菌生产色 氨酸	202
24.8 肌苷酸和鸟苷酸	203
24.9 微生物多糖	203

25 氨基酸生产工艺

25.1 概况	205
25.1.1 氨基酸的用途	205
25.1.2 氨基酸的生产方法	205
25.2 氨基酸合成的代谢调控与育种	206
25.2.1 氨基酸生物合成的代谢调控	206
25.2.1.1 反馈抑制与优先合成	206
25.2.1.2 其他特殊的控制机制	207
25.2.1.3 氨基酸合成调节机制实例—— 天门冬氨酸族氨基酸生物合	

成的调节机制	207
25.2.2 氨基酸菌种的定向选育	208
25.2.2.1 解除反馈调节——结构 类似物抗性株的选育	208
25.2.2.2 切断支路代谢——营养缺陷型 的选育	209
25.2.2.3 优先合成的转换——渗漏缺陷 型的选育	210
25.2.2.4 选育温度敏感突变株	210
25.2.2.5 改善细胞膜的通透性能	210
25.3 氨基酸发酵的工艺控制	211
25.3.1 培养基	211
25.3.2 pH值对氨基酸发酵的影响及其 控制	212
25.3.3 温度对氨基酸发酵的影响及 其控制	213
25.3.4 氧对氨基酸发酵的影响及其 控制	213
25.4 谷氨酸发酵	214
25.4.1 淀粉水解糖的制备	215
25.4.2 菌种扩大培养	215
25.4.3 谷氨酸发酵	216
25.4.4 谷氨酸提取	217

26 抗生素生产工艺

26.1 抗生素概述	218
26.2 抗生素的发展	218
26.3 抗生素的分类	219
26.3.1 根据抗生素的生物来源分类	219
26.3.2 根据抗生素的作用分类	219
26.3.3 根据抗生素的化学结构分类	219
26.3.4 根据抗生素的作用机制分类	220
26.3.5 根据抗生素的生物合成途径 分类	220
26.4 抗生素的应用	220
26.4.1 抗生素在医疗上的应用	220
26.4.2 抗生素在农牧业中的应用	220
26.5 抗生素生产的工艺过程	221
26.5.1 菌种	221
26.5.2 孢子制备	221
26.5.3 种子制备	221

26.5.4	培养基的配制	221	28 维生素生产工艺	240
26.5.5	发酵	222	28.1 概况	240
26.5.6	发酵液的过滤和预处理	223	28.1.1 维生素的分类	240
26.5.7	抗生素的提取	224	28.1.2 维生素的特性和生化功能	241
26.5.8	抗生素的精制	224	28.1.3 维生素的生产方法	241
26.5.9	抗生素生产实例	225	28.2 维生素 C 生产工艺	242
26.6	半合成抗生素	227	28.2.1 维生素 C 的合成方法	242
27 微生物酶制剂生产工艺		229	28.2.2 二步发酵法生产工艺	244
27.1 概述		229	28.2.2.1 二步发酵法反应步骤	245
27.1.1 微生物酶工业的发展概况		229	28.2.2.2 二步发酵法生产维生素 C 的工艺流程	245
27.1.2 酶制剂的应用		229	28.2.2.3 二步发酵菌种及发酵 工艺	247
27.1.3 酶制剂的生产		230	28.3 生物合成法生产维生素的前景	248
27.2 酶生物合成的代谢调节及育种		230	29 污水生化处理技术	250
27.2.1 酶生物合成的代谢调节		230	29.1 污水处理概述	250
27.2.2 酶制剂生产菌种的选育		231	29.1.1 水污染概述	250
27.3 酶制剂发酵生产的工艺控制		233	29.1.2 衡量水质污染的指标及国家 允许的排放标准	250
27.3.1 培养基		233	29.1.3 污水处理的基本方法	252
27.3.2 pH 值对酶生产的影响及其 控制		235	29.2 好氧生化处理技术	253
27.3.3 酶生产的温度控制		235	29.2.1 活性污泥法	253
27.3.4 通气搅拌对酶生产的影响		235	29.2.2 生物膜法	259
27.3.5 酶的提取技术		236	29.3 厌氧生化处理技术	262
27.4 微生物酶制剂生产工艺举例—— α -淀粉酶生产工艺		237	29.3.1 厌氧生化处理的一般概念	263
27.4.1 米曲霉固态法 α -淀粉酶生产 工艺		238	29.3.2 污泥消化	264
27.4.2 枯草杆菌 BF-7658 深层液体 发酵 α -淀粉酶生产工艺		239	29.3.3 高浓度废水的厌氧发酵	266
			29.4 A/O 系统处理污水技术	267

生物物质分离和纯化过程篇

13 下游加工过程概论

13.1 下游加工过程在生物技术中的地位

下游加工过程是生物工程的一个组成部分。生物化工产品通过微生物发酵过程、酶反应过程或动植物细胞大量培养获得,从上述发酵液、反应液或培养液中分离、精制有关产品的过程称为下游加工过程(downstream processing)。它由一些化学工程的单元操作组成,但由于生物物质的特性,有其特殊要求,而且其中某些单元操作在一般化学工业中应用较少。

生物工程的最新进展大多集中在基因工程方面,在生物反应器和发酵技术方面也有不少进展,而对下游加工过程,则没有给予应有的重视。有人称它为生物工程的灰姑娘^[1]。但是在发酵产品的生产中,分离和精制过程所需的费用占成本的很大部分,例如对传统发酵工业(如抗生素、乙醇、柠檬酸),分离和精制部分占整个工厂投资费用的60%,而对重组DNA生产蛋白质、精制的费用可占整个生产费用的80%~90%^[2],而且这种偏向还有继续加剧的趋势。从第一个基因工程药物,人胰岛素在1982年投产后,人们逐渐认识到下游加工过程的落后有可能会阻碍生物技术的发展,特别是当有其他生产方法与其相竞争时。为此,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^[3]。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^[4],以后又召开了两次国际会议。美国Engineering Foundation(现改名为United Engineering Foundation)从1981年开始连续9次召开了生物产品回收的会议。我国也于1989年在济南召开了一次专门会议。人们逐渐取得了共识:现代生物技术的发展是和下游技术的进步紧密相关的。近10年来国内外有关生物分离或蛋白质纯化的专著陆续出版,这也从一个侧面反映了这种情况,其中主要的著作见文献^[5-15]。

13.2 传统生化产品和基因工程产品回收方法的比较

如果以产品具有一定的化学组成作为限制条件,则生物技术约有100年的历史。早期产品为有机酸、有机溶剂等化学品,由于它们比较稳定,提取方法也比较简单。50年前,抗生素成为生物技术的主要产品,此外尚有氨基酸、酵母和工业用酶等。由于抗生素在发酵液中浓度低、性质又不稳定,因而对提取技术提出了较高的要求^[16]。近年来,由于重组DNA和杂交瘤技术的发展,能够获得过去无法得到的、分子结构复杂的大分子物质,更增加了提取和精制的困难,这类复杂物质分离过程的开发和在工业上的放大,是对生化工程师的一个挑战。

传统生化产品和基因工程产品在提取和精制上的差异,主要表现在下列三方面。①传统生化产品都为小分子(工业用酶除外,但它们对纯度要求不高、提取方法较简单),其理化性能(如平衡关系等)数据都为已知,因此放大比较有根据;相反基因工程产品大多为大分子,必要数据缺乏,放大多凭经验。②由于第一代基因工程产品都以*E. Coli*作为宿主,无生物传送系统、故产品处于胞内,提取前需将细胞破碎,细胞内物质释放出来给提取增加

了很多困难；而发酵液中的产物，浓度较低，杂质又多，且一般大分子较小分子不稳定（易失活，如对剪切力），故提取较困难。③大分子（蛋白质）的分离主要困难在于杂蛋白的分离，由于蛋白质都由氨基酸所构成，所以性质相似，分离主要依靠高分辨力的精制方法，如色层分离等。目标蛋白质常以活性单位（u）来表示，而单位质量总蛋白中含有的目标蛋白的单位数称为比活（specific activity），单位为 u/mg；精制前后比活提高的倍数即称为纯化因子（purification factor），表示纯度提高的倍数。小分子的分离通常容易些，但是当杂质和目标物质性质相近时，也需要应用色层分离，例如西索米星的分离（见第 20 章）。

13.3 生物技术下游加工过程的特点

培养液（或发酵液）是复杂的多相系统，含有细胞、代谢产物和未用完的培养基等。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，使从培养液中分离固体很困难。

培养液中所含欲提取的生物物质浓度很低（几种不同类型产品的浓度示于表 13-1 中），但杂质含量却很高，特别是利用基因工程方法生产的蛋白质，常常伴有大量性质相近的杂质蛋白。从低浓度的混合物中分离纯组分，需要较大的能量。例如在恒温、恒压下，将理想溶液分离为纯物质的最小能量为^[18]

$$W = -RT \sum x_i \ln x_i \quad (13-1)$$

式中 x_i 为组分 i 的摩尔分数； R 为气体常数； T 为热力学温度； W 为 1 摩尔理想溶液分离为纯物质所需的最小能量。

表 13-1 几种典型产品发酵液的浓度^[17]

产品	典型浓度/(g/L)	产品	典型浓度/(g/L)
抗生素	25	有机酸	100
氨基酸	100	酶	20
酒精	100	R-DNA 蛋白质	10

由式 (13-1) 可见，所需能量与浓度的负对数成比例；据 1984 年价格统计，产品的售价大致和原始浓度的负对数成比例（见图 13-1），这与上述从热力学理论推得的结果一致。

1985 年开发的人生长激素，1986 年开发的乙肝疫苗和 1987 年开发的组织血纤维蛋白溶酶原活化因子则不在图中直线上，售价要贵 100~1000 倍，可能由于这些相对较新的产品，成本更高的缘故，因此未在图上示出^[10]。

由于起始浓度较低而杂质又较多，最后成品要求达到的纯度又较高，因此常需多步纯化操作。一个包含 6 步操作的纯化过程，即使每步操作都较完善、收率达到 90%，总收率也只有 53%。因此目前基因工程产品的生产，收率达到 30%~40% 就认为已经是相当不错。可见，尽量减少提取步骤是相当重要的。图 13-2 表示提取步骤数和各步收率对总收率的影响。

另一个特点是欲提取的生物物质通常很不稳定、遇热、极端 pH、有机溶剂会引起失活或分解，特别是蛋白质的生物活性与一些辅因子（cofactor）、金属离子的存在和分子的空间构型有关。一般认为剪切力（shear）会影响空间构型和使分子降解，对蛋白质的活性影响很大。最近的研究则表明，当蛋白质分子处于气液交界面上、或与膜结合的蛋白质均对剪切力较敏感，而溶解的蛋白质则受影响较小。

第三个特点是发酵或培养都是分批操作，且微生物总有一定的变异性，故各批发酵液不

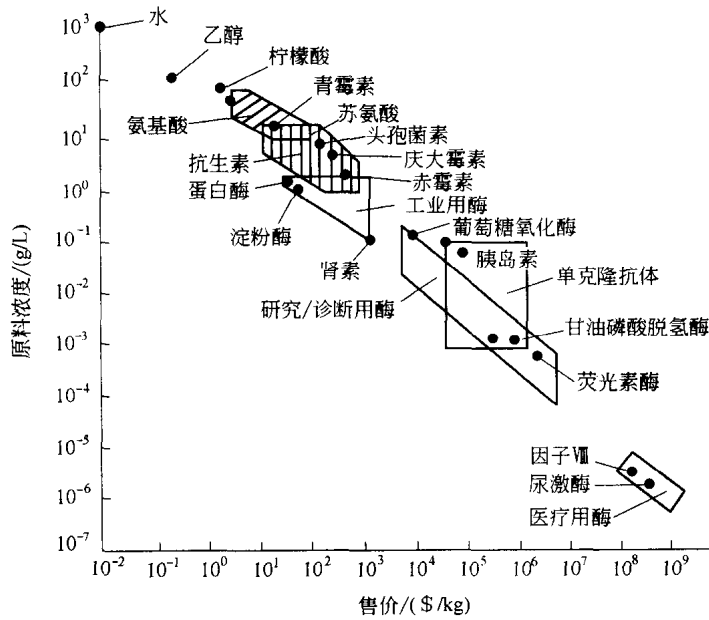


图 13-1 发酵液的浓度和产品价格之间的关系^[19]

尽相同，这就要求下游加工有一定的弹性；特别是对染菌的批号，也要求能处理。发酵液的放罐时间、发酵过程中消沫剂的加入都对提取有影响。

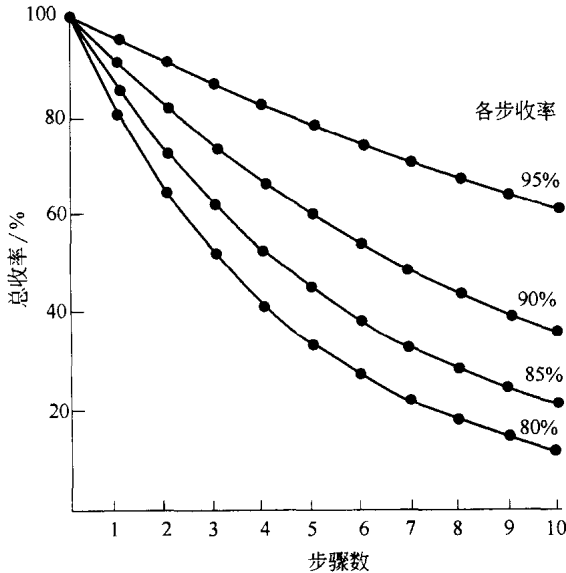


图 13-2 提取步骤数和各步收率对总收率的影响^[2]

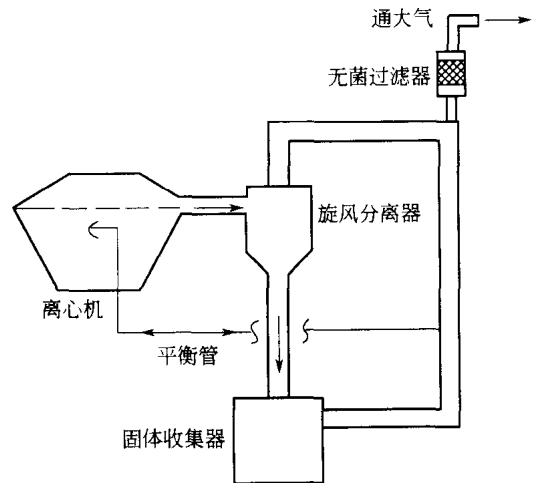


图 13-3 附有密封的固体排放系统的离心机^[20]

发酵液放罐后，由于条件改变，发酵会继续但可能按其他途径代谢从而破坏产品；另一方面，还会感染杂菌，引起产品的破坏；对大分子产品来说，发酵液中存在的蛋白酶或糖苷酶会使目标蛋白破坏，故发酵液不宜存放过久，应尽快进行提取。整个下游加工过程应遵循下列四条原则：①时间短；②温度低；③pH适中（选择在生物物质的稳定范围内）；④严格清洗消毒（包括厂房、设备及管路，特别注意死角），这和传统产品抗生素的生产是一致的^[16]。

发酵废液量很大，BOD 值较高，经生物处理后才能排放。最理想的情况是将废液循环使用，但目前尚未获得成功。

对基因工程产品，还应注意生物安全 (biosafety) 问题，即要防止菌体扩散，特别对前面几步操作，一般要求在密封的环境下操作。例如用密封操作的离心机进行菌体分离 (见图 13-3)。整个机器处在密闭状态，在排气口装有一无菌过滤器，同时有一根空气回路以帮助平衡在排放固体时系统的压力，无菌过滤器用来排放过量的气体和空气，但保证微生物不排出到系统外。

13.4 生物技术下游加工过程的一般流程和单元操作

13.4.1 一般工艺流程

如上所述，下游加工过程由各种化工单元操作组成。由于生物产品品种多、性质各异，

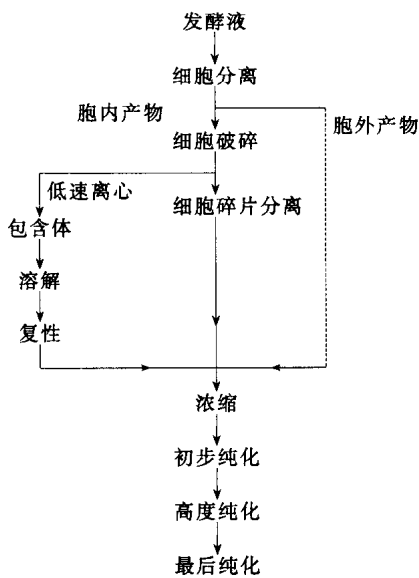


图 13-4 下游加工的工艺流程^[21]

故用到的单元操作很多，其中如蒸馏、萃取、结晶、吸附、蒸发和干燥等属传统的单元操作，理论比较成熟，而另一些则为新近发展起来的单元操作，如细胞破碎、膜过程和色层分离等，缺乏完整的理论，介于两者之间的有离子交换过程等。

一般说来，下游加工过程可分为 4 个阶段：①培养液 (发酵液) 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。一般流程如图 13-4 所示。下游加工的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，只需经过滤、得到菌体，再经干燥就可 (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 (如图 13-4 中虚线所示)。

按上述工艺流程，以下各章将详细地讨论各种单元操作，为便于理解，先按上述 4 个阶段对它们做一简单介绍。

13.4.2 发酵液的预处理和固液分离

从发酵液中分出固体通常是下游加工的第一步操作，正如在 13.3 中所述，这是一步很困难的操作。发酵液预处理的目的是，就在于改变发酵液的性质，以利于固液分离。例如，在活性物质稳定性的范围内，通过酸化、加热、以降低发酵液的黏度。另一种有效的方法是加入絮凝剂，使细胞或溶解的大分子聚结成较大的颗粒。

在固液分离中，传统的板框压滤机和鼓式真空过滤机在某些场合仍在使用，例如处理较粗大的真菌菌丝体时，但在很多场合会遇到困难。一种较好的解决办法是在鼓式真空过滤机转鼓的表面预先铺一层 2~10 cm 厚的助滤剂层，过滤时形成的滤饼不断地用缓慢前进的刮刀，连同极薄的一层助滤剂 (约百分之几毫米厚) 一起刮去 (见图 13-5)，但当滤饼

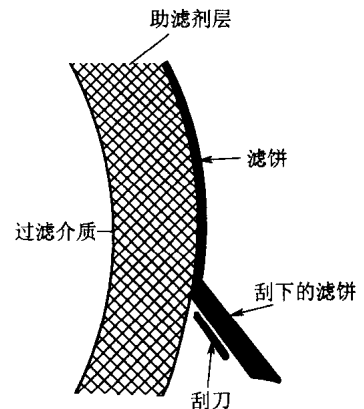


图 13-5 预辅助滤剂层的鼓式过滤机的滤饼去除装置示意图^[22]

用做饲料时，此法就不能采用。此外，离心分离也是常用的方法，较新的装置是倾析式离心机，适用于含固量较多的发酵液。

一种新的过滤方法是利用微滤膜或超滤膜进行错流过滤，此时无滤饼形成，对细菌悬浮液，滤速达 $67 \sim 118 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})^{[23]}$ ，此法的缺点是不能将液固相分离完全。

13.4.3 细胞破碎及其碎片的分离

细胞破碎的方法有机械、生物和化学等方法。大规模生产中常用高压匀浆器 (high pressure homogenizer) 和球磨机 (ball mill)。前者主要利用液相剪切力和与固定表面撞击所产生的应力；后者主要依靠研磨。两者机理不同，可相互补充。

细胞碎片的分离通常用离心分离的方法，但非常困难。一种新的办法是利用两水相萃取法，选择适当的条件，使细胞碎片集中分配在下相。

13.4.4 初步纯化（提取）

经固液分离或细胞破碎及碎片分离后，活性物质存在于滤液中，滤液体积很大，浓度很低，下游加工过程就是浓缩和纯化的过程，常需好几步操作。其中第一步操作最为重要，称为初步纯化或提取，主要目的在于浓缩，也有一些纯化作用，而以后几步操作所处理的体积小，合称为高度纯化或精制。

(1) 吸附法 吸附法主要用于抗生素等小分子物质的提取，系利用吸附剂与抗生素之间的分子引力而将抗生素吸附在吸附剂上。吸附剂有活性炭、白土、氧化铝、各种离子交换树脂等。其中以活性炭应用最广，但有很多缺点：如吸附性能不稳定，即使由同一工厂生产的活性炭，也会随批号不同而改变；选择性不高，即有些杂质被一起吸附，然后又一起洗下来；可逆性差，即常常洗不下来；不能连续操作，劳动强度较大；炭粉还会影响环境卫生。其他吸附剂也在不同程度上存在这些缺点，因此吸附法曾几乎被淘汰，只有对新抗生素提取或其他方法都不适用时，才考虑用吸附法。例如维生素 B_{12} 用弱酸 122 树脂吸附，丝裂霉素用活性炭吸附等。但 1957 年后，随着一种性能优良的新型吸附剂——大网格聚合物吸附剂的合成和应用成功，吸附法又被广泛应用。

(2) 离子交换法 离子交换法也主要用于小分子的提取。离子交换法系利用离子交换树脂和生物物质之间的化学亲和力，有选择性地使生物物质吸附上去，然后以少量的洗脱剂将它洗下来。利用此法时，生物物质必须是极性化合物，即在溶液中能形成离子的化合物。如生物物质为碱性，则可用酸性离子交换树脂去提取；如生物物质为酸性，则可用碱性离子交换树脂来提取（例如链霉素是强碱性物质，可用弱酸性树脂来提取）。

当树脂和操作条件选择合适时，虽然杂质的浓度远远超过生物物质的浓度，也能将生物物质有选择性地吸附在树脂上。在洗脱时也具有选择作用。因而经过吸附洗脱后，能达到浓缩和精制的目的。

一般的离子交换树脂的骨架具有疏水性，与蛋白质的疏水部分有吸附作用，而使蛋白质变性失活。以天然糖类为骨架的离子交换剂，由于其骨架具有亲水性，可用来提取蛋白质（例如以纤维素为骨架的离子交换剂可用来提取乳清中的蛋白质）。

(3) 沉淀法 沉淀法广泛用于蛋白质的提取中。它主要起浓缩作用，而纯化的效果较差，一般纯化因子只有 3 左右。本法又可分为下列 5 种类型：

(a) 盐析 加入高浓度的盐使蛋白质沉淀，其机理为蛋白质分子的水化层被除去，而相互吸引。最常用的盐是硫酸铵，加入的量通常应达到 20%~60% 的饱和度。

(b) 加入有机溶剂 其机理为加入有机溶剂会使溶液的介电常数降低，从而使水分子的

溶解能力降低，在蛋白质分子周围，不易形成水化层。缺点是有机溶剂常引起蛋白质失活。

(c) 调 pH 至等电点 此法沉淀能力不强，常同时加入有机溶剂，使沉淀完全。

(d) 加入非离子型聚合物 如 PEG，其机理与加入有机溶剂相似。

(e) 加入聚电解质 如聚丙烯酸，其机理与盐析作用相似。

沉淀法也用于小分子物质的提取中，但具有不同的机理。通常是加入一些无机、有机离子或分子，能和生物物质形成不溶解的盐或复合物，而沉淀在适宜的条件下，又很易分解。例如四环类抗生素在碱性下能和钙、镁、钡等重金属离子或溴化十五烷吡啶形成沉淀，青霉素可与 N, N' -二苄基乙二胺形成沉淀，新霉素可以和强酸性表面活性剂形成沉淀。另外，对于两性抗生素（如四环素）可调节 pH 至等电点而沉淀；弱酸性抗生素如新生霉素，可调节 pH 至酸性而沉淀。

一般发酵单位越高，利用沉淀法越有利，因残留在溶液中的抗生素浓度是一定的，故发酵单位越高、收率就越高。

(4) 溶剂萃取法 由于蛋白质遇有机溶剂会引起变性，故溶剂萃取法一般仅用于抗生素等小分子生物物质的提取。溶剂萃取法的原理在于：当抗生素以不同的化学状态（游离状态或成盐状态）存在时，在水及与水互不相溶的溶剂中有不同的溶解度。例如青霉素在酸性下成游离酸状态，在醋酸丁酯中溶解度较大，因而能从水转移到醋酸丁酯中；而在中性下，成盐状态，在水中溶解度较大，因而能从醋酸丁酯转移到水中。当进行转移时，杂质不能或较少地随着转移，因而能达到浓缩和提纯的目的。有时，一次转移并不能将杂质充分除去，则采用二次萃取（例如红霉素提炼采用二次萃取）。

溶剂萃取法常遇到的困难是分配系数较低。一种解决的方法是利用反应萃取法（reactive extraction）^[24]，即利用一种溶剂（通常是有机磷化合物或脂肪胺），能按一定化学计量关系与生物物质形成特异性的溶剂化键或离子对复合物。例如苏元复等^[25]，利用此法对柠檬酸的提取。又如青霉素通常在 pH 2 时，用醋酸丁酯进行萃取，但在此 pH 下青霉素易失活；利用仲胺或叔胺作为萃取剂，醋酸丁酯作为稀释剂，则可在 pH 5 下进行萃取，青霉素的损失低于 1%。本法过去也称为带溶剂（carrier）法。

(5) 两水相萃取法 两水相萃取法仅适用于蛋白质的提取，近年来也开始研究用于小分子物质。由于聚合物分子的不相容性，两种聚合物的水溶液（含盐或不含盐）可以分成两相。例如聚乙二醇 PEG 与葡聚糖（dextran）的水溶液。一种聚合物如 PEG 和一种盐如磷酸盐也能形成两相。蛋白质分子可在两相间进行分配。影响分配系数的因素很多，如聚合物的种类和浓度、聚合物的分子量、离子的种类、离子强度、pH 和温度等。而且这些因素相互有影响。对这种复杂系统，尚无理论分析，最适条件常需由实验决定。目前已成功地应用在 30 种酶的提取中。

(6) 超临界流体萃取 对一般物质，当液相和气相在常压下成平衡时，两相的物理性质如黏度、密度等相差很显著。在较高压力下，这种差别逐渐缩小，当达到某一温度与压力时，两相差别消失，合并成一相，这时称为临界点，其温度和压力分别称为临界温度和临界压力。当温度和压力略超过或靠近临界点时，其性质介于液体和气体之间，称为超临界流体。例如二氧化碳的临界温度为 31.1 °C，临界压力为 7.3 MPa。

超临界流体的密度和液体相近，黏度和气体相近，溶质在其中的扩散速度可为液体的 100 倍^[26]，这是超临界流体的萃取能力和萃取速度优于一般溶剂的原因。而且流体的密度越大，萃取能力也越大，变化温度和压力可改变萃取能力，使对某物质具有选择性。已用于