

XIANDAI
SHENGHUA FENLI JISHU JI YINGYONGYANJIU

现代生化分离 技术及应用研究

余兰兰 张二芳 罗杨合 编 著



吉林大学出版社

XIANDAI



现代生化分离 技术及应用研究

余兰兰 张二芳 罗杨合 编 著



吉林大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

现代生化分离技术及应用研究 / 余兰兰, 张二芳,
罗杨合编著. -- 长春: 吉林大学出版社, 2011. 12

ISBN 978-7-5601-7939-1

I. ①现… II. ①余… ②张… ③罗… III. ①生物化
学—分离—研究 IV. ①TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 256708 号

书 名: 现代生化分离技术及应用研究
作 者: 余兰兰 张二芳 罗杨合 编著

责任编辑、责任校对: 孟亚黎 樊俊恒

吉林大学出版社出版、发行

开本: 787×1092 毫米 1/16

印张: 16.75 字数: 407 千字

ISBN 978-7-5601-7939-1

封面设计: 王菊红

北京市登峰印刷厂 印刷

2011 年 12 月第 1 版

2011 年 12 月第 1 次印刷

定价: 36.00 元

版权所有 翻印必究

社址: 长春市明德路 421 号 邮编: 130021

发行部电话: 0431-88499826

网址: <http://www.jlup.com.cn>

E-mail: jlup@mail.jlu.edu.cn

前言

随着工业的不断发展,生产技术领域发生了显著变化。传统技术不断更新,新技术不断出现,生化分离技术作为产物制备过程中的重要工程技术,也在不断的变化革新。目前研究出来的理论知识基本上具备在国内领先,与国际接轨,密切结合企业实际,高职特色等优点。

生物技术是发展国民经济的关键技术之一,近年来由于全球能源和资源的短缺、生态环境的恶化等问题日益突出,人类的健康和长期发展受到威胁。因此只有依赖生物技术产业,才能实现以可再生生物质资源为原料的清洁化生产,制备出各种化学品、材料以及能源。这种新型工业模式将更好地保障社会的可持续发展。

生物化学及其相关学科应用的各种技术统称为生化技术,主要是指生物体内物质及其代谢产物,特别是生物大分子的分离、检测、制备与改造技术。现代生化技术不仅是生物化学工作者进行研究工作必不可少的手段,也是其他相关学科进行基础研究的重要工具,还与生物工程、生物化工、微生物工程、发酵工程等紧密相关。

本书主要内容以工业需要为导向,及时地吸纳行业的新知识、新工艺、新技术和新方法。在加强介绍普遍应用的分离技术的同时,也注重介绍新的分离技术。具体内容从生化产品分离岗位一线工作出发,以分离岗位所需的知识、技能为导向,设计合理的理论知识,突出实践性,强调创新性。

全书共分12章,第1章简要介绍生化分离技术的一些概念性知识。第2章到第11章主要介绍工业常用的生化分离技术,如固液分离、细胞破碎、生物产品萃取分离、沉淀和共沉淀分离、吸附与离子交换分离、膜分离、层析分离、电泳分离、离心分离以及蒸馏、精馏与干燥等技术。最后一章提出几种新型生化分离技术,如泡沫分离技术、分子印迹分离技术、高梯度磁分离技术、结晶分离技术等。在每章中会重点介绍该分离技术的分离种类和原理,以及每种分离技术的特点和应用。

全书由余兰兰、张二芳、罗杨合撰写,其具体分工如下:

第5章~第7章、第10章、第11章第1节:余兰兰(东北石油大学);

第4章,第8章,第9章1~2节:张二芳(吕梁学院);

第1~3章,第9章第3~4节,第11章2~3节,第12章:罗杨合(贺州学院)。

为了使内容更加丰富,在撰写本书时,查阅了大量国内外同类书籍。本着严谨的态度认真研究相关资料,精心安排各章内容,成稿后再进行反复修改。然而由于作者能力有限,不当之处,敬请批评指正。

作者

2011年11月

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 生化分离技术的发展历史	1
1.2 生物技术产品与生化分离过程	2
1.3 生物分离的一般过程及单元操作	4
1.4 生物分离技术的应用及发展趋势	8
第 2 章 固液分离技术	10
2.1 发酵液的预处理技术	10
2.2 固液分离分析	16
第 3 章 细胞破碎技术	27
3.1 概述	27
3.2 细胞壁的结构与组成	28
3.3 常用细胞破碎方法研究	30
3.4 包含体	38
第 4 章 生物产品萃取分离技术	43
4.1 固体浸取技术	43
4.2 溶剂萃取技术	47
4.3 双水相萃取技术	56
4.4 反胶团萃取技术	63
4.5 超临界流体萃取技术	70
4.6 其他萃取分离技术	79
第 5 章 沉淀和共沉淀分离技术	86
5.1 沉淀分离的原理	86
5.2 常规沉淀分离技术	89
5.3 均相沉淀与共沉淀分离技术	104
5.4 新型沉淀分离技术	110
5.5 沉淀和共沉淀分离技术的应用	112
第 6 章 吸附与离子交换分离技术	115
6.1 吸附	115
6.2 离子交换的基本原理	126
6.3 离子交换树脂	133
6.4 离子交换动力学	140

6.5	离子交换分离的操作方法	141
6.6	柱上离子交换分离法	144
6.7	离子交换分离技术的应用	145
6.8	离子交换技术的发展	148
第7章	膜分离技术	150
7.1	概述	150
7.2	膜及其膜组件	152
7.3	膜分离过程分析	157
7.4	膜分离过程中的问题及其处理	161
7.5	各种膜分离技术的应用	164
第8章	层析分离技术	171
8.1	概述	171
8.2	凝胶过滤层析	173
8.3	离子交换层析	180
8.4	疏水作用层析	186
8.5	亲和层析	190
8.6	反相层析	194
第9章	电泳分离技术	198
9.1	概述	198
9.2	常用电泳分离技术	201
9.3	毛细管电泳分离技术	212
9.4	电泳分离技术的应用	219
第10章	离心分离技术	221
10.1	概述	221
10.2	离心设备及其用途	223
10.3	离心分离的基本原理及其计算	225
10.4	超离心技术	230
10.5	应用实例分析	234
第11章	蒸馏、精馏与干燥技术	236
11.1	蒸馏技术	236
11.2	精馏技术	241
11.3	干燥技术	245
第12章	其他生化分离技术研究	249
12.1	泡沫分离技术	249
12.2	分子印迹分离技术	253
12.3	高梯度磁分离技术	255
12.4	结晶分离技术	258
参考文献		261

第 1 章 绪论

生化分离过程是生物技术转化为生产力所不可缺少的重要环节,生化分离技术是描述生物产品分离过程原理和方法的一个术语,是从动植物组织培养液或微生物发酵液中分离、纯化生物产品的过程中所采用的方法和手段的总称,其技术的进步程度对于生物技术的发展有着举足轻重的作用,为突出其在生物技术领域中的地位和作用,常称它为生物技术的下游工程。

该技术在生物科学与生物工程的基础研究、应用研究和实际生产中是广泛利用和不可缺少的手段。生化分离技术有许多种,而本书重点介绍的是固液分离、细胞破碎、生物产品萃取分离、沉淀、吸附、离子交换、膜分离、层析分离、电泳分离、离心分离等分离技术。

1.1 生化分离技术的发展历史

分离与纯化过程几乎涉及生物技术所有的工业和研究领域,生物技术产品不断开发与发展的同时伴随相应分离纯化过程的研究与开发。

生物分离技术至今已有几百年的历史了,16 世纪人们就发明了用水蒸汽蒸馏从植物中提取天然香料,从牛奶中提取奶酪。从 19 世纪 60 年代到 20 世纪上半叶,由于开发了微生物纯种培养技术,生物技术产业的发展进入了新时期,此阶段的生物技术产品的下游工艺,主要采用压滤、蒸馏等手段,分离产品以经验为依据,可称为手工业式的,属原始分离纯化时期,可看作生化分离纯化技术发展的第一阶段。20 世纪 40 年代,抗生素、氨基酸、有机酸、核酸、酶制剂、单细胞蛋白等一大批用发酵技术制造的产品投入了大规模深层发酵工业生产。这一时期的特点是产品类型多,不但有初级代谢产物,而且还出现了次级代谢产物,且反应粗产物的纯度较低。产品的多样性对分离、纯化的方法和技术提出了更高的要求,此时在实验室阶段出现了离子交换及电泳技术,这可看作生化分离纯化技术发展的第二阶段。

进入 21 世纪,以细胞融合技术和 DNA 重组技术为主,包括酶工程、基因工程、发酵工程、细胞工程和蛋白质工程在内的生物技术的发展,使生物技术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。特别是其中基因技术的发展使人们基本可以按照自己的意愿来设计和生产生物制品,但是众多实践表明,从低纯度的产物中获取高纯度的生物制品远非易事,因此生物分离工程的研究应运而生。生物分离与纯化技术对生物制品的质量控制和生产成本控制起着十分关键的作用,然而由于历史原因,生物工程下游分离纯化过程的研究投入远较上游的少,使得下游处理过程的研究明显滞后,成为生物技术整体优化的瓶颈。因此,当前生物分离工程已经日渐引起学术界和工业

界的重视。世界各国都注意到发展下游技术对现代生物技术及其产业化的重要性,纷纷加强研究力量,增加投入,组织专门研究机构,一些著名的生产分离设备和色谱填料的公司在竞争中不断成长。此时的生化分离技术已进入了高速发展的第三阶段。除实验室开发出各种色谱技术,如亲和色谱、疏水作用色谱、反相色谱等,还发展了生化分离分析技术方面较为优越的各种电泳技术,包括双向电泳和分辨率很高的毛细管电泳等技术,各种膜过滤及凝胶色谱和离子交换等技术实现了工业规模的应用。

生化分离技术作为生物技术的下游技术,在整个生物技术中扮演的角色和所处的地位被人们越来越深刻地认识。生物技术产业以日新月异的速度在迅速发展着,特别是在医药、食品、食品添加剂以及化妆品方面,由于生物技术产品多数是与人类生活密切相关的物质,通常要求严格控制有害物质和管理生产过程,在最终产品中往往不允许极微量的有害杂质存在,使得生物产品的分离纯化在整个生产过程中显得尤为重要。一些新的功能性生物产品物质的研究和开发,在得到应用之前对其构效需有清楚的认识,此时就需通过一系列分离技术将之纯化到相当高的纯度,才能消除干扰,从而能正确分析结构与功能、特性等。但是,此部分的研究成本和代价一般比较高,却又是必不可少的。此外,对实际得到应用的生物产品,由于其具有的特殊性和复杂性,往往导致生化分离下游技术的成本占整个生产过程成本的比例较大。

一般地,大多数酶的回收纯化过程成本约占 70%,基因工程表达产物的回收纯化过程成本一般占 85%~90%以上。所以,下游技术质量往往决定整个生物加工过程的成败,合理设计和优化后的生化分离下游技术将使目标产品的生产成本大大降低,有利于实现大规模商业化生产。

1.2 生物技术产品与生化分离过程

1.2.1 生物产品技术

生物技术产品是指在生产过程中应用微生物发酵技术、酶反应技术、动物细胞培养技术等生化反应技术制得的产品。它包括常规生物技术产品和现代生物技术产品,如用发酵生产的有机溶剂、氨基酸、有机酸、蛋白质、酶、多糖的等属于常规生物技术产品,基因工程技术生产的医疗多肽和蛋白质等属于现代生物技术产品。它们的生产不同于一般的化学品,且它们本身具有许多特殊性质,其主要特性主要有以下几个方面。

(1)具有特殊的生理功能。很多生化产品是具有生物活性的物质,如蛋白质、酶、核酸等,它们都具有复杂的空间结构。通常主要是靠氢键、离子键、二硫键、疏水作用和范德华力等来维持这种特定的三维结构的。据观察,这些生物活性物质对外界条件非常敏感,高温、强酸强碱等都可导致其活性丧失。

(2)有些是胞内产品,有些是胞外产品。胞外产品直接由细胞产生并分泌到培养液中,胞内产物有些是游离在胞浆中的,有些是结合于质膜上,而有些存在于细胞器内。由此可知,若要提取膜上的物质,就必须先用适当的溶剂使其从膜上脱离下来,提取胞内物质就必须先破碎

细胞。

(3)一般由产物浓度很低的发酵液或培养液提取而来的。除少数生化反应系统外,如酶在有机相中的催化反应,其他大多数生化反应的溶剂都是水。反应所产生的生成物一般在溶剂中的浓度很低,这主要是因为反应在很大程度上受细胞本身代谢活动和外界条件的影响。但是,溶剂中杂质的浓度很高,并且这些杂质的性质与许多目标后产物相似,甚至有的是同分异构体。

(4)发酵液或培养液通常都是多组分的混合物,且是复杂的多相系统,使固液分离非常困难。复杂的代谢活动导致在生产的过程中会产生许多复杂的副产物。此外,细胞本身组成成分也相当复杂,细胞在培养过程中由于衰老和死亡使其自溶而将自身物质释放到溶剂中。释放的物质除了包含小分子和大分子物质外,还包含以胶体悬浮液和粒子形态存在的组分,如细胞碎片、培养基残余组分、沉淀物等。总之,组分的种类相当多,即使是一个特定体系,也不能对他们进行精确测定,况且各组分的含量是随细胞的生理活动不断发生变化的。

此外,在对发酵液进行与处理时,由于添加化学品或其它物理、生物、化学等原因引起培养液组分的变化及流体力学特性的改变,分散在培养液中的固体和胶状物质,具有可压缩性,又其密度与液体相近,且粘度很大,使其从培养中分离固体很困难。

(5)稳定性差。升华产物随时间很容易发生变化,如受空气氧化、微生物受到污染、蛋白质发生水解等。产物失活的主要机制是化学降解或生物降解。通常产物只能在一定的温度和 pH 范围内保持稳定,由于蛋白质的稳定范围很小,因此极易受外界环境的变化而发生变性或失活。然而小分子生化产物因其结构特性,只有在极端 pH 条件下才会受损。对于手性分子的生化产物而言,在 pH、温度或溶液中某些物质的作用下被外消旋,从而导致其活性大量损失。生物降解是由于产品被自身的代谢所破坏,或由于污染杂菌而被其它的微生物的代谢活动所分解。

(6)生产操作多为分批操作,生物变异性大,不同产品所需的培养液也各不相同。由于产品多为医药、生物试剂或食品等精细产品,必须达到药典、试剂标准和食品规范的要求,即对产品质量的要求非常高。

1.2.2 生化分离过程

要想从各种杂质的总含量远大于目标产物的悬浮液中提取出所需要的产品,必须经过必要的分离纯化过程才能实现。因此,生物分离是针对生化产品的分离、纯化过程,是将生物技术转化为生产力所不可缺少的重要环节。生物分离技术的进步程度对保持和提高各国在生物技术领域内的经济竞争力是至关重要的。为突出其在生物技术领域中的地位 and 作用,常称它为生物技术下游加工过程。

生化分离技术是产品制备过程中必要的技术手段,但由于生化产品的特点导致生化分离过程的实施相当复杂,从而导致其投入相当大。由此可知,分离与纯化技术直接影响产品的总成本,制约着产品生产工业化的进程。开发和研究先进的、适合于不同产品的分离纯化技术和过程是提高经济效益及顺利实现工业化的重要途径。

1. 生物分离的特点

在分离与纯化过程中,分离具有步骤多、加工周期长、影响因素复杂、控制条件严格、生产过程中不确定性较大、收率低且重复性差等缺点,就必须运用多种现代分离与纯化技术手段,才能保证产品的有效性、稳定性、均一性和纯净度,使产品质量符合标准要求。由此,生物分离过程表现出以下几个特点。

(1)初产品多数是目标产物含量很低的水溶液,要想获得高纯度产物,就必须应用多种分离技术,才能对目标产物进行高度浓缩或纯化。然而,多种技术的应用必然会导致加工成本大,且使产物的最终收率很低。

(2)发酵液或培养液是复杂的多相系统,生化分离实际上是利用各种物质的性质差异进行分离的,其不确切的组分给生化分离过程的设计造成很大困难。

(3)由于生化产物的稳定性较差,则生物分离过程通常要求有十分温和的反应条件,以免在外界因子强烈的作用下丧失产品的活性。生物产品是以生物的活性来衡量的,然而生化产品多为热敏性物质,操作温度稍有不慎,即会导致其分解变质,从而降低其活性。另外,料液中有效组分的性质不稳定,及以发生水解,使其生物活性丧失。因此,对生化分离过程的操作条件应严格限制,同时尽可能缩短加工时间。

(4)对最终产品的质量要求很高。由于生化产品多数为医药、生物制剂、食品等精细产品,这些产品质量的优劣直接关系到人民的身体健康和生命安全,因此必须达到药典、试剂标准和食品规范的要求。

(5)发酵和培养很多是分批操作的,生物变异性大,各批发酵液也不尽相同。因此要求下游加工设备具有一定的操作弹性,特别是对染菌的的批号要能进行处理。发酵液的放罐时间、除沫剂的加入都会对其产生影响。另外,换罐后用另一条途径发酵时,可能会引起杂菌感染。因此,在整个提取过程中既要防菌,又要缩短发酵液存放的时间。此外,发酵废液量越大,需氧量就越高,就必须经过生物处理后才能排放。

由于生化产品生产所用原料的多样性,反应过程的复杂性,产品质量要求的高标准性,使生化分离技术发展迅速,许多新型分离技术应运而生,成为生化制品生产技术的重要组成部分之一。因此,为了更好地从事生化产品的生产工作,掌握一定的生化分离技术是尤为必要的。

1.3 生物分离的一般过程及单元操作

生化分离技术按其分离原理可分为机械分离与传质分离两大类。机械分离是针对非均混合物的,根据物质的大小、密度的差异,依靠外力作用,将两相或多相分开,此过程的特点是相间不传质,如过滤、沉降、膜分离等分离过程。而传质分离是针对均相混合物,也包括非均相混合物,通过加入分离剂,使原混合物体系形成新相,在推动力的作用下,物质从一相转移到另一相,达到分离与纯化的目的,此过程的特点是相间发生了物质传递。

在分离过程中,分离所依靠的推动力是有多种的。某些传质分离过程利用溶质在两相中的浓度与达到相平衡时的浓度之差为推动力进行分离,称为平衡分离过程,如蒸馏、萃取、结晶

等分离纯化过程。某些传质分离过程依据溶质在某种介质中移动速率的差异,在压力、化学位、浓度、电势等梯度所造成的推动力下进行分离,称为速率控制分离过程,如超滤、反渗透、电泳等分离纯化过程。有些传质分离过程还要经过机械分离才能实现物质的最终分离,如萃取、结晶等传质分离过程都需经离心分离来实现液液、固液两相的分离。由此可知,机械分离的好坏也会直接影响到传质分离速率和效果,必须同时掌握传质分离和机械分离的原理和方法,合理运用各种分离技术,才能优化产品生产工艺过程。

图 1-1 表示了分离纯化过程的一般原则。原料是某种混合物,产品为不同组分或相的物流。分离剂是分离过程的辅助物质或推动力,它可以是某种形式的能量,也可以是某一种物质。



图 1-1 分离纯化过程的一般原则

根据原料来源的不同,则对分离程度的要求、所选用分离剂、分离装置也不同。另外,对于某一特定分离要求的混合物,有时用一种分离方法就能完成,但大多数情况下,需要用两种甚至多种分离方法才能实现分离;有时分离技术上可行,但经济上不一定可行,需要将几种分离技术优化组合,才能达到高效分离的目的。综上所述,对于某一混合物的分离过程,其分离工艺和设备是多种多样的。

一般来说,生化分离过程主要包括 4 个方面:①原料液的预处理和固液分离;②初步纯化,即提取过程;③高度纯化,即精制过程;④成品加工。实际上,具体产品的提取和精制工艺要根据发酵液的特点和产品的要求来决定,下游加工的一般工艺过程如图 1-2 所示。

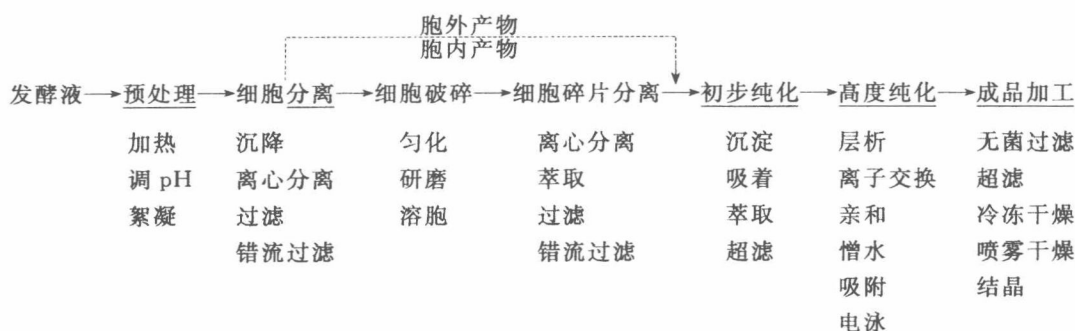


图 1-2 下游加工的一般工艺过程

(1) 发酵液的预处理和固液分离

由于发酵液中含有菌体、胞内外代谢产物、残余的培养基以及发酵过程中加入的一些其他物质等,因此下游加工前要先对发酵液进行预处理和固液分离。常用的预处理方法有酸化、加热、加絮凝剂等。如在活性物质稳定的范围,通过酸化、加热以降低发酵液的黏度。对于杂蛋

白的去除,常采用酸化、加热或在发酵液中加絮凝剂的方法。有的产品其预处理过程更复杂,还包括细胞的破碎、蛋白质复性等。

固液分离方法主要分为两大类:一类是限制液体流动,颗粒在外力场的作用下自由运动,传统方法如浮选、重力沉降和离心沉降等;另一类为颗粒受限,限制不同大小颗粒液体自由运动的分离方法,如过滤等。在发酵液的分离过程中,当前较多使用的还是过滤和离心分离。随着新技术的发展,错流过滤成为一种新的分离技术,它主要采用膜作为过滤介质,具有过滤速率快、收率高、滤液质量好等优点。

提取细胞内的发酵产物时需要细胞破碎,细胞破碎是指选用物理、化学、酶或机械的方法来破坏细胞壁或细胞膜,使产物从胞内释放到周围环境中的过程。在基因工程里,大肠杆菌是最常用的宿主,细胞破碎释放细胞内产物并恢复其生物活性显得尤为重要。细胞破碎的方法可分为机械法和非机械法两大类,通常大规模生产中用高压匀浆器和球磨机,其他方法如超声波破碎法、冻融法、干燥法以及化学渗透法等还停留在实验室基础上。这几年双水相萃取技术引起了广泛的关注,它可以通过选择适当的条件,使细胞碎片集中于一相而达到分离。

(2)初步纯化

要想得到纯化的产物必须将发酵产物从发酵滤液中提取出来,这个过程为初步纯化的过程。初步纯化的方法有很多,常用的有吸附法、离子交换法、沉淀法、溶剂萃取法、双水相萃取、超临界流体萃取、逆胶束萃取、超滤等。

①吸附法是指利用吸附剂与生物物质之间的分子引力而将目标产物吸附在吸附剂上,然后分离洗脱得到产物的过程,主要用于抗生素等小分子物质的提取。常用的吸附剂有活性炭、白土、氧化铝、各种离子交换树脂等。其中以活性炭应用最广,但由于其选择性不高,吸附性能不稳定,可逆性差,影响连续操作等,限制了它的使用。随着大网格聚合物吸附剂的合成和成功应用,吸附又呈现了新的广阔的应用前景。

大网格聚合物是指大网格离子交换树脂去掉功能基团,仅保留其多孔骨架,它不能发生离子交换,其性质与活性炭、硅胶等吸附剂相似。

②离子交换法是指利用离子交换树脂和生物物质之间的化学亲和力,有选择地将目的产物吸附,然后洗脱收集而纯化的过程,也主要用于小分子物质的提取。

采用离子交换法分离的生物物质必须是极性化合物,即能在溶液中形成离子的化合物。如果生物物质为碱性,则可用酸性离子交换树脂提取;如果生物物质为酸性,则可用碱性离子交换树脂来提取。尽管发酵液中生物物质的浓度很低,但是只要选择合适的树脂和操作条件,也能选择性地将目的产物吸附到树脂上,并采用有选择的洗脱来达到浓缩和提纯的目的。

③沉淀法是指通过改变条件或加入某种试剂,使发酵溶液中的溶质由液相转变为固相的过程。沉淀法广泛应用于蛋白质的提取中,主要起浓缩作用,但纯化的效果较差。

根据加入的沉淀剂不同,沉淀法有多种。盐析法加入高浓度的盐类使蛋白质沉淀。其机理为蛋白质分子的水化层被除去,蛋白质的胶体性质被破坏,中和了微粒上的电荷,促使蛋白质等沉淀。最常用的盐类是硫酸铵,加入的量通常应达到饱和浓度。有机溶剂沉淀法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减弱,引起蛋白质产生沉淀,但常常容易引起蛋白质失活。因此,有机沉淀法多用于生物小分子、多糖及核酸等产品的分离纯化。等电点沉淀法是利用两性电解质在电中性时溶解度最低的原理进行分离纯化的过程。抗生

素、氨基酸、核酸等生物大分子物质都是两性电解质。本方法适用于憎水性较强的两性电解质的分离。该法常和盐析法、有机溶剂沉淀法和其他沉淀剂联合使用,以提高沉淀效果。非离子型聚合物沉淀法是通过加入很少量的非离子多聚物沉淀剂,改变溶剂组成和生物大分子的溶解性而使其沉淀的方法。非离子多聚物包括各种不同分子量的聚乙二醇(PEG)、壬苯乙烯化氧(NPEO)、葡聚糖右旋糖酐硫酸钠等。这些多聚物中应用最多的是 PEG。聚电解质沉淀法通过在溶液中加入聚电解物质,如离子型的多糖化合物、阳离子聚合物和阴离子聚合物来沉淀分离蛋白质的方法。其作用方式和机理与絮凝剂类似,同时还具有一定的盐析和简单水化作用。

除以上几类以外,还有生成盐复合物沉淀法、选择性变性沉淀法和针对某一种或某一类物质的沉淀法等。

沉淀法也用于小分子物质的提取中,但具有不同的作用机理。在发酵液中加入一些无机酸、有机离子等,能和生物物质形成不溶解的盐或复合物沉淀,而在适宜的条件下,沉淀又很容易分解。另外,对于两性抗生素可调节 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。

④溶剂萃取法,由于蛋白质遇有机溶剂会引起变性,所以一般仅用于抗生素等小分子生物物质的提取。其原理为:当抗生素以不同的化学状态(游离状态或成盐状态)存在时,在水及与水不互溶的溶剂中有不同的溶解度。

⑤双水相萃取技术又称水溶液两相分配技术,是通在水溶液中加入两种亲水聚合物或者一种亲水性聚合物和盐,到一定浓度时,就会形成两相,利用目标生物物质在两相中分配不同的特性来完成浓缩和纯化的技术。双水相萃取技术可用于细胞碎片除去的固液分离,蛋白质和酶的分离提取。采用与其他分离技术集成进一步完善了双水相技术,如亲水配基的引入等。较典型的双水相分配系统有聚乙二醇(PEG)和葡聚糖(DEX),以及聚乙二醇和磷酸盐系统。该方法的萃取效果取决于目标物质在两相中的分配。影响分配系数的因素很多,如聚合物的种类、浓度、分子量、离子的种类及离子强度、pH 和温度等。

⑥超临界流体萃取。对一般物质,当液相和气相在常压下平衡时,两相的物理性质相差比较显著。压力升高,这种差别将逐渐缩小,当达到某一温度与压力时,差别消失,成为一相,此时即为临界点。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。如 CO_2 的临界温度为 31.1°C ,临界压力为 7.3MPa ,常用作超临界流体萃取技术的萃取剂。适用于萃取非极性物质,对极性物质萃取能力差,但可加入极性的辅助溶剂来补救。

⑦超滤法是利用超滤膜作为分离介质对生物物质进行浓缩和提纯的过程。在小分子物质的提取中,超滤用于去除大分子杂质;在大分子物质的提取中,超滤主要用于脱盐浓缩。和其他膜过滤一样,超滤的主要缺点是浓差极化和膜的污染问题,膜的寿命较短和通量低等。

(3)高度纯化

发酵液经过初步纯化后,体积大大缩小,目标生物物质的浓度已提高,但纯度达不到产品要求,必须进一步进行精制。初步纯化中的某些操作,也可应用于精制中。大分子和小分子物质的精制方法有类似之处,但侧重点有所不同,大分子物质的精制依赖于色层分离,而小分子物质的精制常利用结晶操作。

色层分离是一组相关技术的总称,又叫色谱法、层离法、层析法等,是一种高效的分离技

术。过去仅在实验室中运用,最近来其规模逐渐扩大而应用于工业上。操作是在柱中进行的,包含固定相和移动相,生物物质因在两相间分配情况不同,在柱中的运动速度也不同,从而获得分离。

结晶是指物质从液态中形成晶体析出的过程。结晶的前提条件是溶液要达到过饱和,可用的方法有如下两种。

①加入某些物质,使溶解平衡发生改变,如调 pH。

②将溶液冷却、加入其他溶剂或将溶剂蒸发等。

(4)成品加工

产品的最终规格和用途决定加工方法,经过提取和精制以后,最后还需要一些加工步骤,如浓缩、无菌过滤和去热原、干燥、加入稳定剂等。

浓缩可以采用升膜或降膜式的薄膜蒸发来实现。对热敏性物质,可采用离心薄膜蒸发器,而且可处理黏度较大的物料。膜技术也可应用浓缩,对大分子溶液的浓缩则用超滤膜,对小分子溶液的浓缩则用反渗透膜。

热原是指多糖的磷类脂质和蛋白质等物质的结合体,注入体内会使体温升高,因此需要除去。传统的去热原方法是蒸馏或石棉板过滤,但前者只能用于产品能蒸发或冷凝的场合,后者对人体健康和产品质量都有一定问题。当产品相对分子质量在 1 000 以下时,用截留分子量为 1 000 的超滤膜除去热原是有有效的,同时也达到了无菌要求。

干燥是除去残留的水分或溶剂的过程。干燥的方法有真空干燥、红外线干燥、沸腾干燥、气流干燥、喷雾干燥和冷冻干燥等。干燥方法的选择应根据物料性质、物料状况及当时具体的条件而定。

1.4 生物分离技术的应用及发展趋势

生物分离的主要目的是要缩短整个下游过程的流程和提高单项操作的效率及选择性。现在对整个生物分离过程的研究有了一个质的转变,这种转变可以从两个方向着手:一是继续研究和完善一些适用于生化工程的新型分离技术;二是进行各种分离技术的高效集成化。

随着科学技术的发展,对生化分离技术提出了越来越高的要求。近几年,不断有新的分离技术出现,如双水相分配技术、反胶团法、液膜法、各类高效色谱法等就是方向一的研究结果。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,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。目前已形成了许多基于技术、过程和系统集成的生物分离新技术和新工艺。

该领域今后的发展方向将集中在以下几个方面。

(1)提高分离过程的选择性主要应用分子识别与亲和作用来提高大规模分离技术的分离精度,利用生物亲和作用的高度特异性与其他分离技术如膜分离、双水相萃取、反胶团萃取、沉淀分级、色谱和电泳等相结合,相继出现了亲和过滤、亲和双水相萃取、亲和反胶团萃取、亲和沉淀、亲和色谱和亲和电泳等亲和纯化技术。

(2)强化传质过程通过强化生物分离过程中的传质,可以缩短分离时间,增大设备的处理量。

(3)生物分离过程的高效集成化在高效集成化方面,如将亲和技术和双水相分配技术组合的亲和分配技术,将亲和色谱和膜分离结合的亲和膜分离技术,将离心的处理量、超滤的浓缩效能及色谱分离的纯化能力合而为一的扩张床吸附技术,将膜技术和萃取、蒸馏、蒸发技术相结合形成了膜萃取、膜蒸馏及渗透蒸发技术,将色谱技术与离子交换技术等结合形成离子交换色谱、等电聚焦色谱等。通过将不同的分离技术进行集成,利用每种方法的优点,补充其不足,使分离效率更高。

(4)上下游技术集成耦合的很多发酵过程存在着最终产物的抑制作用,近年来研究开发了各种发酵过程来消除产物的抑制作用,可以采用蒸发、吸附、萃取、透析、过滤等方法,使过程边发酵边分离。萃取发酵法生产乙醇和丙酮丁醇,如固定化细胞闪蒸式酒精发酵。

(5)生物分离过程的优化生物分离过程的优化能产生显著的经济效益,但大多数生物分离过程目前尚处于经验状态,使得准确描述和控制生物分离过程变得很困难。生物分离科学是一个交叉学科,需要综合运用化学、工程、生物、数学、计算机等多学科知识和工具,学科间的联合将有助于在该领域取得突破。

(6)在新技术、新方法的开发及推广的这些年里,科学工作者在探索基础理论方面作了大量的工作。如基础数据的获得、数学模型的建立等。随着材料工作者的进入,膜技术应用领域也在不断拓展。随着膜本身质量的改进和膜装置性能的改善,在生化分离过程的各个阶段,将会越来越多地使用膜技术。另外,分子蒸馏、双水相萃取、超临界萃取、反胶团萃取、液膜萃取及亲和技术等也逐渐用于工业化生产。

(7)新型分离介质材料的开发色谱分离中主要的困难之一是色谱介质的机械强度差。色谱介质经历了天然多糖类化合物、人工合成化合物、天然与人造混合型几个阶段,主要着重于开发亲水性、孔径大、机械强度好的介质。特别是,加强了对天然糖类为骨架的介质改进。目前已研究出高交联度的产品或能与无机介质相结合的产品。

(8)清洁生产开发或应用高效、环境友好的绿色分离技术,使生化分离过程在保证产品质量的同时,符合环保的要求,保证原材料、能源的高效利用,并尽可能确保未反应的原料和水的循环利用。

综上所述,生化分离技术的发展方向是解决传统分离技术中存在的分离效率低、步骤多、消耗大、环境污染大等问题,使分离技术从宏观水平向着分子水平发展;从多步串联操作走向集成化方向发展;从低选择性朝着高选择性的技术发展;从环境污染向清洁生产方向发展;从上游独立操作向集成操作发展;从使用传统分离介质向应用新型高性能介质方向发展。

第 2 章 固液分离技术

由于所需产品在培养液和菌体中浓度很低,并与许多杂质混在一起,同时发酵液或生物溶液又属于非粘性流体,所以必须进行预处理。固液分离技术是除去料液中固态杂质或得到固体产物的关键技术。生化产品固态杂质多指发酵液中的菌体、细胞、细胞碎片、凝沉后的蛋白质、核酸或盐类等杂质,固体产物多是指结晶后的蛋白质、酶、核酸、小分子有机物或其盐等。一般在进行固液分离之前要对料液进行预处理以改变液体的特性利于固液分离,或者除去料液中部分杂质以利于后序有效成分的提取。

本章将主要介绍发酵液的预处理技术的方法和原理,以及固液分离方法。

2.1 发酵液的预处理技术

2.1.1 预处理的目

对发酵液进行预处理的目通常有:

- (1)改变发酵液的物理性质,促进从悬浮液中分离固形物的速度,提高固液分离器的效率;
- (2)尽可能使产物转入便于后处理的某一相中,且此相多数是液相;
- (3)去除发酵液中部分杂质,以利于后续各步操作。

预处理的方法完全取决于可分离物质的性质,如溶液的 pH 和对热的稳定性,是蛋白质还是非蛋白质本性,相对分子质量和大小等。改变料液的性质主要是采用物理、化学或生物的方法以改善料液的过滤特性。加快悬浮物的沉降主要是通过凝聚或絮凝的方法,使菌体及固体微粒聚集成较大的胶团,以利于固液分离。常见的可溶性杂质主要包括蛋白质、多肽、多糖、脂类或脂蛋白、多酚类、核酸、小分子物质及盐类等。这些杂质成分有些会对进一步的提取分离工艺或对产品质量构成危害,例如发酵液中含有的阳离子和蛋白质,当用离子交换法提取目标产物成分时,由于阳离子和蛋白质的存在,大大降低了离子交换树脂的吸附量;当用溶剂萃取法提取时,蛋白质的存在则会产生乳化现象,使水相和有机溶剂相不易分层,给液液分离带来困难,同时影响产品纯度和收率。因此,在预处理阶段就要根据目标物质成分的性质和分离纯化的要求,结合所含杂质的种类和特点,选用适当的方法将其除去。

2.1.2 预处理方法

1. 降低液体黏度

由流体力学基本知识可知,滤液通过滤饼的速率与液体的黏度成反比,可见降低液体黏度可有效提高过滤速率。降低液体黏度常用的方法有加水稀释法和加热法。

加水稀释法可有效降低液体黏度,但会增加悬浮液的体积,使后处理任务加大,并且只有当稀释后过滤速率提高的百分比大于加水比时,从经济上才能认为有效。如果目标物质的后序分离工艺或时间很长,则稀释有助于降低其浓度,减少其在分离过程中的分解或水解。

加热法是最简单和廉价的预处理方法,即把悬浮液加热到所需温度并保温一定时间,加热可降低悬浮液的强度,恰当的热量能够加速聚集作用以去除某些蛋白质等杂质,降低悬浮液的最终体积,破坏凝胶状结构,增加滤饼的孔隙度,使固液分离变得容易,但此法的关键取决于产品的热稳定性。

加热法常用于黏度随温度变化较大的流体,可控制适当温度和受热时间而使蛋白质凝聚形成较大颗粒,进一步改善发酵液的过滤特性。使用加热法时必须注意:①加热的温度必须控制在不影响目的产物活性的范围内或不会使其发生水解;②对于发酵液,温度过高或时间过长可能造成细胞溶解,胞内物质外溢,从而增加发酵液的复杂性,影响其后的产物分离与纯化。

加热的方法一般有:①让发酵液通过螺旋板、列管等换热器,用热介质进行加热;②如果目标物质受温度变化影响较小,发酵液又需适当稀释时,可在发酵液内直接通入蒸汽或热水进行加热。

2. 调节悬浮液的 pH

溶液的 pH 能直接影响发酵液中某些物质的电离度和电荷性质,适当调节 pH 可改善其过滤特性。对于氨基酸、蛋白质等两性物质作为杂质存在于液体中时,常调节 pH 至等电点使两性物质沉淀。另外,在膜分离中发酵液中的大分子物质易与膜发生吸附,常通过调整 pH,改变易吸附分子的电荷性质,可以减少吸附造成的堵塞和污染。此外,细胞、细胞碎片及某些胶体物质等在某个 pH 下也可能趋于絮凝而形成较大的颗粒,从而有利于固液分离。但是 pH 的确定要保证不会影响目标产物稳定性。

pH 的调节一般是在发酵液中加入一定浓度的酸碱溶液,根据需要也可加入一定量的酸碱缓冲溶液。全细胞的聚集作用高度依赖于 pH 的大小,适当的 pH 能够促进聚集作用。这个方法也很简便,一般用草酸或无机酸或碱来调节。

3. 凝聚和絮凝

凝聚和絮凝的主要作用是为增大混合液中悬浮粒子的体积,提高固液分离速度,同时可除去一些杂质。这两种方法主要用于细胞、菌体、细胞碎片及蛋白质等胶体粒子的去除。

(1) 凝聚作用

凝聚作用是指在某些电解质作用下,使胶体粒子聚集的过程。这些电解质称为凝聚剂。