



教育部高职高专规划教材

生化分离技术

于文国 卞进发 主编

乔德阳 主审



化学工业出版社
教材出版中心

教育部高职高专规划教材

生化分离技术

于文国 卞进发 主编

乔德阳 主审



化学工业出版社
教材出版中心

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

生化分离技术/于文国, 卞进发主编. —北京: 化学工业出版社, 2006
教育部高职高专规划教材
ISBN 7-5025-8244-4

I. 生… II. ①于…②卞… III. 生物化学-分离-高等学校: 技术学院-教材 IV. TQ033

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 017237 号

教育部高职高专规划教材

生化分离技术

于文国 卞进发 主编

乔德阳 主审

责任编辑: 于 卉

文字编辑: 周 侗

责任校对: 李 林

封面设计: 于 兵

*

化学工业出版社 出版发行
教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

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

*

新华书店北京发行所经销

北京市兴顺印刷厂印装

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 12½ 字数 294 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8244-4

定 价: 20.00 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

出版说明

高职高专教材建设工作是整个高职高专教学工作中的重要组成部分。改革开放以来，在各级教育行政部门、有关学校和出版社的共同努力下，各地先后出版了一些高职高专教育教材。但从整体上看，具有高职高专教育特色的教材极其匮乏，不少院校尚在借用本科或中专教材，教材建设落后于高职高专教育的发展需要。为此，1999年教育部组织制定了《高职高专教育专门课课程基本要求》（以下简称《基本要求》）和《高职高专教育专业人才培养目标及规格》（以下简称《培养规格》），通过推荐、招标及遴选，组织了一批学术水平高、教学经验丰富、实践能力强的教师，成立了“教育部高职高专规划教材”编写队伍，并在有关出版社的积极配合下，推出一批“教育部高职高专规划教材”。

“教育部高职高专规划教材”计划出版500种，用5年左右时间完成。这500种教材中，专门课（专业基础课、专业理论与专业能力课）教材将占很高的比例。专门课教材建设在很大程度上影响着高职高专教学质量。专门课教材是按照《培养规格》的要求，在对有关专业的人才培养模式和教学内容体系改革进行充分调查研究和论证的基础上，充分汲取高职、高专和成人高等学校在探索培养技术应用型专门人才方面取得的成功经验和教学成果编写而成的。这套教材充分体现了高等职业教育的应用特色和能力本位，调整了新世纪人才必须具备的文化基础和技术基础，突出了人才的创新素质和创新能力的培养。在有关课程开发委员会组织下，专门课教材建设得到了举办高职高专教育的广大院校的积极支持。我们计划先用2~3年的时间，在继承原有高职高专和成人高等学校教材建设成果的基础上，充分汲取近几年来各类学校在探索培养技术应用型专门人才方面取得的成功经验，解决新形势下高职高专教育教材的有无问题；然后再用2~3年的时间，在《新世纪高职高专教育人才培养模式和教学内容体系改革与建设项目计划》立项研究的基础上，通过研究、改革和建设，推出一大批教育部高职高专规划教材，从而形成优化配套的高职高专教育教材体系。

本套教材适用于各级各类举办高职高专教育的院校使用。希望各用书学校积极选用这批经过系统论证、严格审查、正式出版的规划教材，并组织本校教师以对事业的责任感对教材教学开展研究工作，不断推动规划教材建设工作的发展与提高。

教育部高等教育司

2001年4月3日

前 言

生物技术产业作为 21 世纪的“朝阳产业”，正在迅猛地发展。近年来，中国生物技术产业也正经历着前所未有的技术变革，并呈现出良好的发展态势。随着中国生物技术产业的稳步发展，对适应生产第一线的应用型高素质人才的需求也逐年递增。因此，开发适应高等职业技术教育的教材是搞好职业教育所必需的，是人才培养的基石。中国高等职业教育还处在一个起步阶段，适合于职业教育的相关教材种类少，特别是生物技术类专业教材更是非常匮乏。因此，加强此类教材建设是职业教育的迫切需要。本教材正是在这种形势下，经全国多所职业技术学院共同讨论研究下开发的，用以适应高等职业生物技术类人才培养的教学需要。

生化分离技术作为生物技术的一个分支体系，是利用待分离的物系中的目标组分与共存杂质之间在物理、化学及生物学性质上的差异进行分离的技术。本教材根据教育部高职高专生物技术类专业人才培养方案及指导性教学大纲而编写，是生物技术类专业开设的一门主干专业课。本书以生化产品生产中共性分离工艺技术的理论和实践为主线，兼顾典型产品分离等内容进行编写，编写内容突出实用性，尽量避免过多的理论分析及复杂计算。

本教材重点介绍了生产普遍应用的生化分离技术的基本原理、基本方法、基本工艺、操作要点、影响因素、问题分析及其处理手段等，对用于科研或正在工业化的生化分离技术进行简要介绍。教材中未介绍分离技术中所用到的相关设备知识，有关设备的内容重点在配套教材《生化设备》一书中介绍。因此，在工艺专业的教学中两本教材要配套使用。

全书共分十二章，绪论、第一章、第五章、第十一章由于文国编写，第二章、第三章由焦明哲编写，第六章、第七章、第八章由卞进发编写，第四章、第九章、第十章由李勤编写。全书由于文国统稿，乔德阳主审。

书中不妥之处敬请广大读者批评指正。

编 者

2005 年 10 月

生物技术类专业规划教材编审委员会

主任委员：王红云

副主任委员：张义明 杨百梅 赵玉奇 陈改荣 于文国

委员：（按姓氏汉语拼音排序）

卞进发 蔡庄红 陈改荣 陈剑虹 程小冬

高平 高兴盛 胡本高 焦明哲 李文典

李晓华 梁传伟 刘书志 罗建成 盛成乐

孙祎敏 王世娟 杨百梅 杨艳芳 于文国

员冬梅 藏晋 张苏勤 周凤霞

内 容 提 要

本书主要介绍了固液分离技术、细胞破碎技术、萃取和浸取技术、沉淀技术、吸附及离子交换技术、膜分离技术、层析技术、电泳技术、结晶技术、蒸发与干燥技术的基本原理、基本方法、基本工艺、操作要点、影响因素、分离中常见问题及其处理手段等，同时也介绍了典型产品青霉素及维生素 C 的分离与纯化工艺。

本书可作为高职高专生物技术类专业的教材，也可作为相关生产企业职业培训的教材，还可作为从事生化分离技术生产、科研开发等工作的有关技术人员的参考资料。

目 录

绪论	1
第一节 生物技术产品与生化分离过程	1
一、生物技术产品的特性	1
二、生化分离过程的重要性及其特点	2
第二节 生化分离的一般过程及单元操作	3
一、生化分离的一般工艺过程	4
二、发酵液的预处理和固液分离	4
三、细胞破碎和其碎片的分离	5
四、初步纯化(提取)	5
五、高度纯化(精制)	7
六、成品加工	7
思考题	8
第一章 固液分离技术	9
第一节 发酵液的预处理技术	9
一、预处理的原理及方法	9
二、发酵液的相对纯化	12
第二节 固液分离	13
一、发酵液的过滤	13
二、离心分离	16
三、其他固液分离方法	16
四、预处理及固液分离技术应用实例	17
思考题	18
第二章 细胞破碎技术	19
第一节 细胞壁的结构与组成	19
一、细菌	20
二、真菌和酵母	20
三、藻类	21
第二节 细胞壁的破碎	21
一、球磨法	21
二、高压匀浆法	22
三、超声波破碎法	23
四、酶溶法	24
五、化学渗透法	24
六、其他方法	25

第三节 包含体	26
一、包含体的形成、分离及洗涤	26
二、包含体的变性溶解	27
三、蛋白质的复性	27
思考题	27
第三章 萃取和浸取技术	29
第一节 溶剂萃取	29
一、溶剂萃取的理论基础	30
二、溶剂萃取的方式	34
三、溶剂萃取过程中的工艺问题及处理	41
第二节 浸取	42
一、浸取理论	42
二、浸取过程	46
三、浸取过程中的问题及其处理	48
第三节 新型萃取技术	49
一、双水相萃取	49
二、超临界流体萃取	52
三、反胶团萃取	55
思考题	59
第四章 沉淀技术	60
第一节 蛋白质沉淀的基本原理	60
一、蛋白质的溶解性	60
二、蛋白质胶体溶液的稳定性	61
三、沉淀动力学	61
第二节 蛋白质沉淀的基本方法及沉淀技术的应用	62
一、基本方法	62
二、沉淀技术的应用	67
思考题	67
第五章 吸附及离子交换技术	68
第一节 吸附	68
一、吸附的基本原理	68
二、常用吸附剂	71
三、吸附技术的应用	72
第二节 离子交换的基本原理	76
一、离子交换平衡	77
二、离子交换选择性	77
三、离子交换过程和离子交换速率	77
四、影响离子交换的因素	78
第三节 离子交换树脂	81
一、离子交换树脂的分类	81

二、离子交换树脂的命名	82
三、离子交换树脂的理化性质	82
四、离子交换树脂的功能特性	84
五、离子交换树脂的选择	86
六、有关计算	87
第四节 离子交换工艺	88
一、离子交换工艺过程	88
二、离子交换操作方式	91
第五节 离子交换技术的工业应用	92
一、离子交换技术在水处理中的应用	92
二、离子交换技术在药物生产中的应用	94
第六节 离子交换技术的发展	95
一、新型离子交换树脂的开发及应用	95
二、离子交换技术与其他分离技术的结合	96
思考题	96
第六章 膜分离技术	98
第一节 膜及其应用	98
一、膜的分类及性能	98
二、膜组件	98
三、膜在生物技术行业中的应用	100
第二节 膜分离过程	101
一、膜分离过程的机理	101
二、膜分离过程的类型	103
第三节 膜分离过程中的问题及处理	104
一、压密作用	104
二、水解作用	105
三、浓差极化	105
四、膜的污染	106
第四节 典型的膜分离技术	107
一、反渗透	107
二、超滤	110
三、微滤	111
四、纳滤	114
五、透析	115
六、电渗析	116
第五节 液膜分离技术	119
一、液膜类型及膜相组成	119
二、乳化液膜的制备及分离机制	121
三、乳化液膜分离工艺流程及应用	122
思考题	124

第七章 层析技术	125
第一节 层析的基本原理及分类	125
一、层析的基本原理.....	125
二、层析分类.....	129
第二节 凝胶过滤层析	129
一、原理与操作.....	129
二、凝胶层析的应用及特点.....	132
第三节 离子交换层析	133
一、原理与操作.....	133
二、离子交换层析的应用及特点.....	134
第四节 疏水性相互作用层析	135
一、原理与操作.....	135
二、疏水性相互作用层析的应用及特点.....	136
第五节 亲和层析	136
一、原理与操作.....	136
二、亲和层析的应用及特点.....	138
第六节 反相层析	138
思考题.....	139
第八章 电泳技术	140
第一节 电泳的基本原理	140
一、电泳的理论基础.....	140
二、影响电泳迁移速率的因素.....	140
第二节 电泳及其应用	141
一、电泳的分类.....	141
二、几种典型的电泳技术.....	142
三、电泳的应用.....	145
四、电泳应用实例.....	145
思考题.....	146
第九章 结晶技术	147
第一节 结晶的基本原理	147
一、饱和与过饱和溶液的形成.....	147
二、成核.....	150
三、晶体生长.....	152
四、晶习及产品处理.....	152
第二节 结晶的类型	154
一、结晶分类.....	154
二、分批结晶.....	155
三、连续结晶.....	155
四、重结晶.....	156
五、分级重结晶.....	157

第三节 结晶操作控制	157
一、过饱和度	158
二、温度	158
三、晶浆浓度	158
四、流速	158
五、结晶时间	158
六、溶剂与 pH	159
七、晶种	159
八、搅拌与混合	159
九、结晶系统的晶垢	159
第四节 结晶技术应用实例	160
一、青霉素 G 盐的结晶工艺	160
二、四环素碱的结晶工艺	160
思考题	161
第十章 蒸发与干燥技术	162
第一节 蒸发	162
一、蒸发过程	162
二、蒸发的操作方法	163
第二节 干燥	165
一、基本原理	165
二、干燥方法	167
三、干燥过程应用实例	171
思考题	172
第十一章 典型产品的分离工艺	173
第一节 青霉素的分离工艺	173
一、青霉素的分离原理	173
二、青霉素的分离工艺	176
第二节 维生素 C 的分离工艺	179
一、2-酮基-L-古龙酸的分离原理	180
二、2-酮基-L-古龙酸的分离工艺	180
思考题	181
附录一 室温 (25℃) 达到预定饱和度时每升硫酸铵原始水溶液应加入固体硫酸铵的质量 (g)	182
附录二 0℃ 下达到预定饱和度时每 100mL 硫酸铵原始水溶液应加入固体硫酸铵的质量 (g)	183
参考文献	184

绪 论

【学习目标】

- ① 了解生化产品及生化分离过程的基本特点；
- ② 熟悉生化分离的一般工艺过程及单元操作。

生化分离技术是指从含有目标产物的发酵液、酶反应液或动植物细胞培养液中，提取、精制并加工制成高纯度的、符合规定要求的各种产品的生产技术，又称为下游加工技术。生化分离过程有别于一般的化学分离过程，它是依据生物产品的特殊性而采取一定技术处理手段的加工过程。

第一节 生物技术产品与生化分离过程

一、生物技术产品的特性

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、动植物细胞培养技术等生化反应技术制得的产品。它包括常规的生物技术产品（如用发酵生产的有机溶剂、氨基酸、有机酸、蛋白质、酶、多糖、核酸、维生素和抗生素等）和现代生物技术产品（如用基因工程技术生产的医疗性多肽和蛋白质等）。它们的生产不同于一般的化学品生产，而产品本身又具有许多特殊性。有的是胞内产物，如胰岛素、干扰素等；有的是胞外产物，如抗生素、胞外酶等；有的是分子量较小的物质，如抗生素、有机酸、氨基酸等；有的是分子量很大的物质，如酶、多肽、重组蛋白等。概括起来生物技术产品主要有以下几方面特性。

① 生化产品具有不同的生理功能，其中有些是生物活性物质，如蛋白质、酶、核酸等。这些生物活性物质都有复杂的空间结构，而维系这种特定三维结构的主要是氢键、盐键、二硫键、疏水作用和范德华力等。这些生物活性物质对外界条件非常敏感，过酸、过碱、高温、重金属、剧烈的振荡和搅拌、空气和日光等都可能导导致生物活性丧失。

② 生化产品有些是胞内产品，有些是胞外产物。胞外产物直接由细胞产生，直接分泌至培养液中。而胞内产物较为复杂，有些是游离在胞浆中，有些结合于质膜上或存在于细胞器内。对于胞内物质的提取要先破碎细胞，对于膜上的物质则要选择适当的溶剂使其从膜上溶解下来。

③ 生化产品通常是由产物浓度很低的发酵液或培养液中提取的，除少数特定的生化反应系统，如酶在有机相中的催化反应外，其他大多数生化反应过程中的溶剂全部是水。产物（溶质和悬浮物）在溶剂水中的浓度很低，原因主要是生化反应过程受到细胞本身代谢活动限制及外在条件对传质传热的影响。而杂质的浓度很高，并且这些杂质有很多与目标产物的性质很相近，有的还是其同分异构体，如手性药物的制备过程。

④ 发酵液或培养液是多组分的混合物，且是复杂的多相系统，固液分离很困难。由于各种细胞代谢活动是非常复杂的网络体系，导致在生产过程中会产生一系列复杂的产品混合物。另外，细胞本身组成成分也非常复杂，不同的细胞具有不同的组成，而细胞在培养过程中由于衰老和死亡，使细胞本身自溶而将相应组成成分释放到培养液中。这些混合物不仅包含了大分子量物质，如核酸、蛋白质、多糖、类脂、磷脂和脂多糖等，而且还包含了低分子量物质，即大量存在于代谢途径中的中间产物，如氨基酸、有机酸和碱。另外，混合物不仅包括可溶性物质，而且也包括了以胶体悬浮液和粒子形态存在的组分，如细胞和细胞碎片、培养基残余组分、沉淀物等。总之，组分的总数相当大，即使是一个特定的体系，也不可能对它们进行精确的测定，何况各组分的含量还会随着细胞所处环境的变化而变化。

其次，在下游加工过程之前，由于需对发酵液进行预处理，还会由于添加化学品或其他物理、化学和生物方面的原因而引起培养液组分的变化及发酵液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，其密度又与液体接近，加上黏度很大，属于非牛顿型液体。这些因素均使从培养液中分离固体很困难。

⑤ 生化产物的稳定性差。无论是大分子量产物还是小分子量产物都存在着产物的稳定性问题。产物失活的主要机制是化学降解或微生物引起的降解。在化学降解的情况下，产物只能在一定的温度和 pH 范围内保持稳定。蛋白质一般稳定性范围很窄，超过此范围，将发生其变性和失活；对于小分子生化产物，可能由于它们结构上的特性，如青霉素的 β -内酰胺环，在极端 pH 条件下会受损；对于手性分子的产物，可能由于 pH、温度和溶液中存在某些物质等因素而被催化外消旋，导致有活性的产物大量损失。微生物降解是由于产品被自身的代谢酶所破坏，或由于污染杂菌而被其他微生物的代谢活动所分解。

⑥ 生物技术产品的生产多为分批操作，生物变异性大，各批发酵液或培养液不尽相同。另外由于生物技术产品多数是医药、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，因此对最终的产品质量要求很高。

二、生化分离过程的重要性及其特点

要想从各种杂质的总含量大大多于目标产物的悬浮液中制得最终所需的产品，必须经过一系列必要的分离纯化过程才能实现。因此，生化分离技术是生物技术产品制备过程中的必要技术手段，具有十分重要的地位。由于生化产品的特点导致生化分离过程实施十分艰难，且需付出昂贵的代价。据各种资料统计，分离纯化过程的成本在产品总成本中占有的比例越来越高。如化学合成药物的分离成本是合成反应成本的 1~2 倍；抗生素类药物的分离纯化费用约为发酵部分的 3~4 倍；对维生素和氨基酸等药物的分离纯化费用而言，约为 1.5~2 倍；对于新开发的基因药物和各种生物药品，其分离纯化费用可占整个生产费用的 80%~90%。由此可以看出，分离与纯化技术直接影响着产品的总成本，制约着产品生产工业化的进程。没有下游加工过程的配套就不可能有工业化结果，没有下游加工过程的进步就不可能有工业化的经济效益。开发和研究新的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，顺利实现产品工业化的重要途径。

在分离与纯化过程中，要克服分离步骤多、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、收率低且重复性差的弊端，就必须综合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。下游加工过程呈现如下几方面特点。

① 发酵液中杂质成分复杂，它们的确切组分不十分清楚，这给过程设计造成困难。生物分离实际上是利用各种物质的性质差别进行的分离，对成分的数据缺乏是现在下游加工过程共同的障碍。

② 起始浓度低，最终产品要求纯度高，常需多步分离，致使收率较低。例如，发酵液中抗生素的质量分数为 1%~3%、酶为 0.1%~0.5%、维生素 B₁₂ 为 0.002%~0.005%、胰岛素不超过 0.01%、单克隆抗体不超过 0.0001%，而杂质含量却很高，并且杂质往往与目标药物成分有相似的结构，从而加大了分离的难度。如有的产品达到要求要经过 9 步分离操作才能完成，即使每步的收率达 90%，最终的收率也只能达到 38%。

③ 生物物质很不稳定，从某种程度上来说，生物产品不是以量的多少来衡量，而是生物活性的量化，因此对其就还有活性要求。遇热、极端 pH、有机溶剂都会引起生物物质失活或分解，如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。剪切力会影响蛋白质的空间构型，促使其分子降解，从而影响蛋白质活性，这是分离过程中要考虑的。因此，生化分离过程通常在十分温和的条件下操作，以避免因强烈外界因子的作用而丧失产品的生物活性，同时生产要尽可能迅速，缩短加工时间。

④ 发酵和培养很多是分批操作，生物变异性大，各批发酵液不尽相同，这就要求下游加工设备有一定的操作弹性，特别是对染菌的批号，也要能处理。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。另外，发酵液放罐后，由于条件改变，还会继续按另一条途径发酵，同时也容易感染杂菌，破坏产品，所以在防止染菌的同时，整个提取过程要尽量缩短发酵液存放的时间。另外发酵废液量大，生化需氧量 (BOD) 值较高，必须经过生物处理后才能排放。

⑤ 某些产品在分离与纯化过程中，还要求无菌操作。对基因工程产品，还应注意生物安全问题，即在密闭环境下操作，防止因生物体扩散对环境造成危害。

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尤为必要。

第二节 生化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。机械分离针对非均相混合物，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发生物质传递，如过滤、沉降、膜分离等分离过程。传质分离针对均相混合物，也包括非均相混合物，通过加入分离剂（能量或物质），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。

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。因此，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 0-1 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，如蒸馏过程的分离剂是热能，液液萃取过程的分离剂是萃取剂，离子交换过程的分离剂是离子交换树脂。分离装置主要提供分离场所或分离介质。

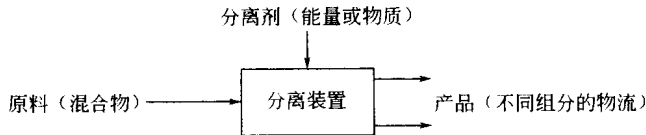


图 0-1 分离纯化过程的一般原则

根据原料来源的不同，对分离程度的要求不同，所选用分离剂的不同，分离装置将有很大差异。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、生化分离的一般工艺过程

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（提取）；③高度纯化（精制）；④成品加工。下游加工的一般工艺过程如图 0-2 所示。但就具体产品其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。如有的可以直接从发酵液中提取，可省去固液分离过程。

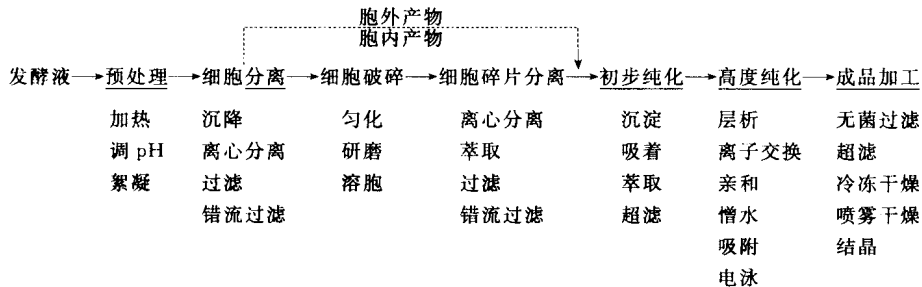


图 0-2 下游加工的一般工艺过程

二、发酵液的预处理和固液分离

发酵液中含有菌（细胞）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。发酵液的预处理和固液分离过程是下游加工的第一步操作。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（如重力和离心

力)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。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,一种新的过滤方法引入固液分离领域,即错流过滤。这种分离方法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。

三、细胞破碎和其碎片的分离

细胞破碎主要是用于提取细胞内的发酵产物。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。细胞破碎的方法按照是否外加作用力可分为机械法和非机械法两大类。大规模生产中常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,一种新的方法——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。

四、初步纯化(提取)

发酵产物存在于发酵液中,要得到纯化的产物必须将其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。吸附法只有在新抗生素生产中或其他方法都不适用时才采用。例如,维生素 B₁₂用弱酸 122 树脂吸附,丝裂霉素用活性炭吸附等。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。如很早用作脱色的酚-甲醛缩合树脂;用来提取某些产物如维生素 B₁₂的丙烯酸-二乙烯苯羧基树脂等。

(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。

离子交换树脂是人工合成的不溶于酸、碱和有机溶剂的高分子聚合物,它的化学性质稳定,并具有离子交换能力。其结构由两部分组成:一部分是固定的高分子基团,构成树脂的骨架,起着保持树脂不溶性和化学稳定性的作用;另一部分为能够移动的活性离子,起着与外界离子交换或吸附的作用。其通式可表示成:R—活性基团。

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。如链霉素是强碱性物质,可用弱酸性树脂来提取,这主要是从容易解吸的角度来考虑的,否则如果采用强酸性吸附树脂,则吸附容易,洗脱困难。

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