

目 录

1 绪论	1
1.1 生物技术下游加工过程的特点及其重要性.....	1
1.2 生物技术下游加工过程的一般步骤.....	2
1.3 生物技术产品及其下游加工过程的沿革.....	2
1.4 生物技术下游加工过程的发展动向.....	7
2 发酵液的预处理和过滤	11
2.1 发酵液的预处理	11
2.2 发酵液的过滤	13
2.3 细胞的破碎与分离	16
3 溶剂萃取法	19
3.1 萃取过程的理论基础	19
3.2 萃取方式和理论计算	22
3.3 乳化与去乳化	26
4 双水相萃取法	29
4.1 双水相体系	29
4.2 双水相萃取过程的理论基础	30
4.3 影响物质分配平衡的因素	32
4.4 双水相萃取技术的应用	33
4.5 双水相萃取技术的进展	36
5 反胶束萃取法	39
5.1 反胶束溶液形成的条件和特征	39
5.2 反胶束萃取蛋白质的基本原理	42
5.3 影响反胶束萃取蛋白质的主要因素	43
5.4 反胶束萃取蛋白质的应用	46
6 凝胶萃取法	49
6.1 凝胶萃取分离过程	49
6.2 凝胶萃取的理论基础	51
6.3 凝胶萃取的应用	53

7	超临界流体萃取法	55
7.1	超临界流体的性质	55
7.2	超临界流体萃取的热力学基础方程	59
7.3	超临界流体萃取过程	61
7.4	超临界流体萃取的应用	62
8	树脂法	65
8.1	树脂的分类	65
8.2	吸附树脂	67
8.3	离子交换树脂	72
9	色层分离法	80
9.1	色层分离法的产生和发展	80
9.2	色层分离法的分类	81
9.3	色层分离法的基本原理	96
10	膜分离技术	99
10.1	膜分离技术的类型和定义	100
10.2	膜及其组件	101
10.3	膜过滤的基本概念和理论	104
10.4	膜分离过程在生物工程中的应用及其发展	108
11	纳米膜过滤技术	110
11.1	概论	110
11.2	纳滤膜的性质与特点	111
11.3	纳米过滤的应用	115
12	膜亲和过滤法	121
12.1	亲和膜分离技术	121
12.2	亲和膜分离技术的应用	126
12.3	亲和膜过滤	127
13	渗透蒸发	133
13.1	渗透蒸发的原理和特点	134
13.2	渗透蒸发膜及膜材料的选择	137
13.3	渗透蒸发的应用	140

14	其他膜分离过程	147
14.1	膜蒸馏	147
14.2	膜萃取	154
15	液膜分离法	160
15.1	液膜及其分类	161
15.2	液膜分离的机理	162
15.3	液膜材料的选择与液膜分离的操作过程	164
15.4	液膜分离技术的应用	167
16	泡沫分离法	172
16.1	泡沫分离法的分类	172
16.2	泡沫分离技术的基本原理	173
16.3	泡沫分离的操作方式及其影响因素	175
16.4	泡沫分离的应用	178
17	沉淀法	181
17.1	等电点法	181
17.2	盐析法	187
17.3	有机溶剂沉淀法	190
18	形成包结化合物的分离方法	193
18.1	包结化合物及其分离原理	193
18.2	包结化合物分离技术的应用	198
19	结晶	203
19.1	结晶的基本原理	203
19.2	结晶过程的步骤	205
19.3	结晶过程的应用	207
20	成品干燥	209
20.1	生物材料水分的性质及基本计算	209
20.2	生物产品的干燥方法	211
20.3	对流干燥	212
20.4	喷雾干燥	214
20.5	升华干燥	216
	参考文献	221

1 绪 论

生物物质的分离、提取、精制是生物化学工程的一个重要组成部分,指的是从发酵液或酶反应液或动植物细胞培养液中分离、纯化生物产品的过程或称后处理技术,它是生物技术转化为生产力时所不可缺少的重要环节,它的技术进步对于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。为表明其在生物化学工程中的地位和作用,常称它为生物技术下游加工过程(Downstream Processing)。

1.1 生物技术下游加工过程的特点及其重要性

生物技术产品的生产不同于一般的化学品的生产,而有其自身的特点。

a. 生物技术产品一般是从杂质含量大大多于产物的悬浮液中开始进行产品的分离纯化的,而最后的产品都是要求高纯度的。在这种悬浮液中,不但目的产物含量很低(如青霉素仅为3.6%,庆大霉素为0.2%,胰岛素仅为0.001%),稳定性差,对热、pH值、某些酶以及机械剪切力等都很敏感,稍不注意就会引起失活和分解,而且悬浮液中的固体,可能包含完整的有机体、菌丝碎片、介质成分中的其他不溶物、残存底物、超短纤维等;悬浮液中的液体,可能包含残存的可溶底物、中间代谢产物和其他不希望有的产物,因此是一个复杂的多相体系。唯有经过分离和纯化等下游加工过程,才能制得符合使用要求的产品。因此产品的分离纯化是生物技术工业化的必需手段,具有不可缺少或取代的作用。

b. 下游加工过程的进行是十分艰难且是代价很大的,这是由于特殊的稀溶液原料和高度的纯产物之间的巨大变化和差异造成的。其回收率不会高,像抗生素一般要损失20%。分离、纯化的方法也是十分复杂和昂贵的,从现有的资料分析可知,在大多数生物产品的开发研究中,下游加工过程的研究费用占全部研究费用的50%以上,在产品的成本构成中,分离与纯化部分占总成本的40%~80%,精细、药用产品的比例更高,生产过程中下游加工过程的人力、物力占全部过程的70%~90%。显然开发新的分离和纯化工艺是提高经济效益或减少投资的重要途径。

总之生物技术产品原料的特点给下游加工过程提出了特殊的要求;生物技术产业没有下游加工过程的配套就不可能有工业化的结果,没有下游加工过程的进步就不可能有工业化的经济效益。

1.2 生物技术下游加工过程的一般步骤

由于人们所需的生物技术产品不同(如菌体或酶或代谢产物),用途各异,对产品的质量(纯度)要求也可以是多方面的,所以分离与纯化步骤可有不同的组合,提取和精制的方法也是

多种多样的,但大多数生物技术下游加工过程常常按生产过程的顺序分为四个类似步骤,见图 1-1。

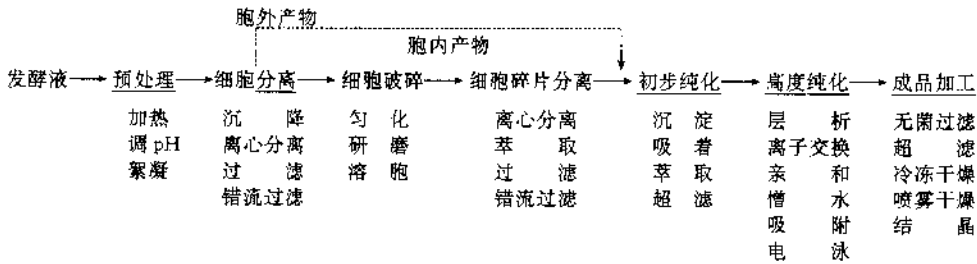


图 1-1 生物技术下游加工过程的阶段和各阶段的单元操作

a. 发酵液的预处理与固液分离(或称不溶物的去除):在这一步骤中,过滤和离心是基本的单元操作,为了加速两相分离,采用了凝聚和絮凝等技术;为了减少过滤介质的阻力,采用了错流膜过滤技术,但这一步对产物浓缩和产物质量的改善作用很小。

如果是胞内产物还须进行细胞的破碎及碎片的分离。

b. 初步纯化:这一步骤没有特定的方法,主要是除去与目标产物性质有很大差异的物质,一般会发生显著的浓缩和产物质量的增加。典型的分离方法有吸附、萃取等。

c. 高度纯化:这类过程,技术对产物有高度的选择性,用于除去有类似化学功能和物理性质的不纯物。典型的方法有层析、电泳等。

d. 成品加工(精制):产物的最终用途决定了最终的加工方法,结晶常常是关键,大多数产品也必须经过干燥。

其中各阶段都有若干单元操作可以选用,应根据具体情况而定。为便于技术选择,将各种主要的单元操作的原理、特点,列于表 1-1。

1.3 生物技术产品及其下游加工过程的沿革

分离与纯化过程几乎渗入到所有的工业和研究领域,并与反应过程相辅相成。随着对物质纯度提出愈来愈高的要求,以及科学技术的发展,分离与纯化过程也不断地得到发展;新技术、新工艺不断脱颖而出,新原理、新概念层出不穷,经历着一个诞生和发展的过程。生物技术下游加工过程同样也经历着这样的过程。

如果将生物技术定义为“直接或间接地利用生物体的机能来生产物质的技术”,则可将生物技术产业的历史追溯到古代的酿造产业。古老的生物技术产品包括酿酒、制造酱油、醋、酸奶、干酪等等,当时还谈不上下游加工过程,产物基本上不经后处理而直接使用。

a. 传统(第一代)生物技术产品的出现要从 19 世纪 60 年代算起,由于弄清了微生物是引起发酵的原因,随后又发现了微生物的有关功能,开发了纯种培养技术,从而使生物技术产业的发展进入了近代酿造产业的阶段,到本世纪上半叶时,除了原有酿造业产品的生产技术有了不少改进外,还逐步开发了用发酵法生产酒精、丙酮、丁醇等产品。上述产品的特点是大多数属于嫌气发酵过程的产物,产物的化学结构比起原料来更为简单,主要采用压滤、蒸馏或精馏等设备,生产以经验为依据,可称为手工业式的,属原始分离、纯化时期。

b. 第二代生物技术产品出现于本世纪 40 年代,第二次世界大战以后,随着青霉素、链霉

表 1-1 主要单元操作的原理与特点

序号	技术名称	原理	设备	特点	缺点
1	絮凝	利用电荷中和及大分子桥联作用形成更大的粒子	连续式、批式	使固形物颗粒增大,容易沉降,过滤、离心,提高固液分离速度和液体澄清度	条件严苛,放大困难,引入的絮凝剂可能干扰以后分离细化
2	离心	在离心产生的重力场作用下颗粒沉降速度加快而沉淀	高速冷冻离心机	适于粒度小、热不稳定的物质回收,适于实验室应用	容量小,连续操作困难,大规模工业应用性差
			碟片式离心机	适于大规模工业应用,可连续,也可批式操作,操作稳定性较好,易放大、推广	半连续或批式操作时,出渣清洗烦杂;连续操作固形物含水量高,总的分离效率低
			管式离心机	批式操作,转速高,固形分离效果较好,含水量低,易放大推广	容量有限,处理量小,拆装频繁,噪声大
			倾析式离心机	连续操作,易放大,易工业应用,操作稳定	对很小颗粒固形物回收困难,设备投资高
3	过滤	依据过滤介质的孔隙大小进行分离	板框式过滤器 平板(真空)过滤器 真空旋转过滤器 管式过滤器 蜂窝式过滤器 深层过滤器 涂层过滤器	设备简单,操作容易,适合大规模工业应用	批式操作或半连续操作,转速低,分离效果较差,操作繁重,离心的设备投资高,操作成本高
			微孔过滤: 平板、卷曲、中空纤维、管式过滤器	主要用于分离细胞,操作简便,效果好,可无菌操作,适用性好,易放大	分离速度低,分离效果受物料性质变化的影响,劳动强度大
4	膜分离	依据被分离的分子大小和膜孔大小进行分离	超滤: 平板、卷曲、中空纤维、管式过滤器	用于粗分离,脱盐、浓缩更换缓冲系统,可无菌,批式或连续操作,适用性好,易放大	较易污染,分离效果与操作技巧关系密切,需精心保养、清洗,不适合精确分离
			反渗透: 平板、卷曲、中空纤维膜过滤器	主要用于无盐、无热源的水的制备和小分子物质浓缩	膜易污染,分离效果与物料处理及性质密切相关,需精心保养、清洗
			电渗析: 半透膜型 离子交换膜型	需要高压操作,对设备要求高,其它同上	电渗过程产生热量,对生物活性有影响

续表

序号	技术名称	原理	设备	特点	缺点
5	细胞破碎 X-press	压力释放时液固剪切	压力破碎机	操作简便,可连续操作,适于不同细胞	加压放热需冷却,否则活性物质失活,破碎率较低,压力不稳定,需反复破碎
	珠磨破碎	固体剪切	细胞珠磨破碎机	操作简便稳定,可连续、批式操作,破碎率可控制,易放大,适于工业应用	珠磨放热,需高微冷却,不同细胞的破碎条件不同
	超声破碎	超声造成空穴产生压力冲击	超声破碎机	操作简便,可连续或批式操作	超声产热,需冷却,破碎率低,需反复进行,应用面窄
	渗透休克	渗透压突变造成细胞内压力差引起细胞破碎		适用于位于胞内质的产物释放,细胞破碎率低,但产物释放好,纯度较高	操作比较复杂,条件严格,只适于小量处理,费用高
	有机溶剂法 表面活性剂法	改变细胞壁或膜的通透性,使产物释放		方法简单,细胞内含物释放少,产物较纯,可大规模应用	适用性有限,只适合对有机溶剂、表面活性剂稳定的产物
6	碱或酶处理法	经碱或酶使细胞壁或膜破坏,使产物释放		方法简单,可大规模应用	适用性有限,只适合对碱或酶稳定的产物
	萃取 有机溶剂萃取	依靠在水和有机溶剂中的分配系数差异进行分离	烧杯混合或柱混合离心分相机,离心萃取机,逆流萃取仪	适于有机化合物及结合有脂质或非极性物质的蛋白质;反胶团系统较适于生物活性物质萃取	萃取条件严格,安全性低,活性收率低
	双水相萃取	依靠分离物在不相容性的高分子水溶液形成的两相中的分配系数不同而分离		连续或批式萃取,设备简单,萃取容易,操作稳定,极易放大,适合大规模应用,将离子交换基团,亲和配基,疏水基团结合到高分子体上形成的萃取剂可改进分配系数及萃取专一性	成本较高,纯化倍数较低,适合粗分离
7	超临界萃取	利用某些流体在高于其临界压力和临界温度时具有很高的扩散系数和很低的粘度,但具有与液体相似密度的性质,对一些液体或固体物质进行萃取的方法	超临界萃取机	萃取能力大、速度快,且可通过控制操作压力和温度,使其对某些物质具有选择性,正开始应用于生物工程	设备条件要求高,规模较小
	沉淀法 有机溶剂法	破坏蛋白质分子的水化层,使之聚集或更大的分子团而沉淀		沉淀各种蛋白质,分级沉淀,达到粗分和浓缩的目的,应用广,简便,可大规模应用	需低温下进行,沉淀时会发生蛋白质变性失活
	盐析	破坏蛋白质分子水化层,电荷中和使之聚集或更大分子团		用于蛋白质分级沉淀或沉淀,粗分离及浓缩作用,对活性有保护作用,简便,可广泛大规模应用	蛋白质回收率一般,产生的废水含盐高,对环境有影响

续表

序号	技术名称	原理	设备	特点	缺点
7	化学沉淀法	通过化学试剂与目的产物形成新的化合物,改变溶解度而沉淀		可针对性沉淀目的产物	通用性差,需分离沉淀,回收目的产物
	层析法	利用被分离的各组分电荷性质及数量不同、与离子交换剂的吸附和交换能力不同而达到分离的目的		适于带电荷的大、中、小及生物活性或非生物活性物质分离纯化,纯化效率较高,应用广泛,可用于实验室和工业生产,可柱式操作也可搅拌式操作	操作较复杂,试剂消耗较大,成本高,有稀释作用,放大困难,离子交换剂需再生后方可再用
	吸附层析	依靠范德华力,极性氢键等作用将分离物吸附于吸附剂上然后改变条件洗脱,达到纯化目的		吸附剂种类繁多,可选择范围和适用范围广,吸附和解吸条件温和,不需复杂的再生,可柱式或搅拌式操作	选择性低,柱式操作放大困难
	亲和层析	依据目的物与专性配基的相互作用进行分离		选择性极高,纯化倍数和效率高,生物活性收率高,可从较复杂的混合物直接分离目的产物	成本高,配基亲和和稳定性差,使用寿命有限,亲和和材料制备复杂,放大困难
	染料亲和层析	依据染料分子与目的产物之间的结合专一性进行分离		选择性好,成本低,使用稳定性好,寿命长	有染料配基污染产物的可能,放大困难
	疏水层析	依靠疏水相互作用进行分离		应用广,选择性较好,使用稳定性好	成本较高,放大困难,需较严格控制条件,保证活性收率
	凝胶层析	依据分子大小进行分离		适合生物大分子的分选纯化,分离条件温和,活性收率较高,选择性和分辨率高,应用广,可工业应用	放大较困难,稀释度高,操作不易掌握
9	反相层析	以有机溶剂为固定相,含水的溶剂为流动相所进行的层析分离技术		反相层析可用于分离非极性、极性和离子化合物,分离效果好、速度快,方法的后续处理比较方便	易造成蛋白质构象的变化和失活采用乙醇、甲醇等价格高且具有一定毒性的试剂,使其应用受到限制
	真空干燥	在一定真空度下增加溶剂分子挥发速度	真空干燥器	适合生物活性物质干燥,干燥物性状较差	耗能高、慢
	真空冷冻干燥	在真空度下加速固态水的挥发进行干燥	真空冷冻干燥器	适合生物活性产物干燥,产物不起泡,不粘结、蓬松,易溶,活性收率高	能耗高,过程需控制严格,操作复杂,设备投资高
	流化床干燥	在热气流吹动下固形物半悬浮状态连续干燥	流化床干燥器	干燥速度快,易大规模使用,适于制备颗粒状产物	不适合热稳定性差的产物,设备投资较高
	喷雾干燥	依靠喷雾形成的小液滴,在热气流中迅速干燥	喷雾干燥器	干燥速度快,部分生物活性物质可以干燥,可大规模生产	干燥能力小,占地面积大,产品密度低,粒度小,能耗高

素等抗生素工业生产的扩大,大型好气发酵装置的开发和化工单元操作的引进,使酿造产业逐渐扩展为发酵产业。抗生素、氨基酸、核酸、有机酸、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,也出现了次级代谢产物如抗生素、多糖等,其分子结构较基质更为复杂,还有生物转化(甾体化合物等)酶反应(6-APA等)产品等,产品的多样性提出了分离、纯化方法多样性的要求。与此同时,一个有利的因素也产生了,化学工程工作者加入了生物反应过程的开发行列;一门反映生物与化工相交叉的学科——生化工程也随之在40年代诞生,并获得迅速发展,这个时期之初,英国的G. E. 戴维斯和美国的A. D. 利特尔等人提出了单元操作的概念,推动了生产技术的发展,并被引入生物技术产品下游加工过程中来(见表1-2),同样也推动了生物产品的生产。从表1-2可见,用于传统化学工业中的分离方法,约有80%在生物技术产品的生产中得到使用。所以在60年代以前生物技术产品下游加工过程基本上是套用化工单元操作或略加改造,已能满足传统和近代发酵产品的工业生产需要,虽然这时也发展了离子交换色谱及电泳技术,但尚处于研究和实验室阶段。

表 1-2 用于生物技术的分离方法类型

分离方法类型	用于传统化学工业中的方法数	用于生物分离中的方法数
物理分离方法	7	7
平衡控制的分离方法	22	18
速率控制的分离方法	13	10
合计	42	35

c. 70年代中期以来,由于基因工程、酶工程、细胞工程、微生物发酵工程及生化工程的迅速发展,特别是在DNA重组技术及细胞融合技术等方面的一系列重大突破,推动了现代生物技术产品即第三代生物技术产品的研究和开发。目前虽然产品还不多(见表1-3,所列为到1992年底生产的品种),但潜力很大,预计到本世纪末或下世纪初,一个门类齐全、品种众多、技术先进、应用广泛的现代生物技术产业将会脱颖而出。

在现代生物技术上游工程发展的同时,70年代国际上也注意到了发展下游加工过程对发展现代生物技术及其产业化重要性,许多发达国家纷纷加强研究力量,增加投入,组建专门研究机构;甚至包括生产公司和厂家,也都展开了激烈的竞争。如瑞典的Biolink公司,它集Alfa-Laval, Chemp, LKB和Pharmacia四家著名公司生物工艺之长组建而成,并不断推出一代又一代新产品。

表 1-3 国外已商品化生产和正在放大的现代生物技术产品

产品类型	产物名称
动物细胞培养生产的产品	EPO, tPA, β -干扰素 OKT 单抗, 乙型肝炎疫苗
植物细胞培养生产的产品	人参皂甙, 长春花碱, 紫草宁, 小檗碱紫杉醇, 迷迭香酸
基因工程发酵产品	人胰岛素, α -干扰素, 人生长因子, HBsAg

正是这种投入,导致了80年代以来下游加工过程的迅速发展,目前已达到工业应用水平的技术主要有以下几种:

a. 回收技术:絮凝、离心、过滤、微过滤。发酵液是非牛顿型流体,所以在一般情况下用普

通的离心和过滤技术,进行固液分离的效率很低。70年代以来把在化工、选矿和水处理上广泛使用的絮凝技术引到发酵物料处理上,大大改善了发酵物料的离心或过滤性能,提高了固液分离效率。

对于传统的离心和过滤技术,多年来在设备性能上作了很大的改进,如采用倾析式离心机(Decanter Centrifuge)和预辅助滤剂层的真空过滤机等。

一种新的过滤方法是利用微滤膜进行错流过滤,它具有耗能低,效率高,特别适用于动植物细胞的收集。

b. 细胞破碎技术:包括球磨破碎、压力释放破碎、冷冻加压释放破碎、化学破碎等,细胞破碎技术的成熟使得大规模生产胞内产物成为可能。

c. 初步纯化技术:开发了酶和蛋白质的各类沉淀法,如盐析法、有机溶剂沉淀法、化学沉淀法及离子交换色谱分离方法;超滤技术的出现,解决了对热、pH、金属离子、有机溶剂敏感的大分子物质的分离、浓缩和脱盐等难题,提供了一种有效的加工技术,它的工业应用,使酶制剂工业生产有了突破性进展。

d. 高度纯化技术:开发了各类层析技术,如亲和层析、疏水层析、聚焦层析等,而用于大生产的主要是离子交换层析和凝胶层析,前一种技术是到60年代以后才逐渐发展成为工业技术的,但真正用于生物大分子的分离是到了70年代以后,各种类型的弱酸、弱碱型离子交换树脂,如DEAE-葡聚糖,DEAE-纤维素,CM-纤维素等材料商品化后才有了迅速的发展,凝胶层析技术的工业应用是从80年代才实现的。

e. 成品加工(精制):主要是干燥与结晶技术。对于生物活性物质可根据其热稳定性采用喷雾干燥、气流干燥、沸腾床干燥、冷冻干燥等技术,特别是冷冻干燥技术在蛋白质产品的干燥上广为应用。但此技术耗能高,设备复杂,操作时间长,因此有待完善和改进;结晶技术主要是解决了放大问题,实现了工业化生产。

正是以上各种技术和设备研究开发成功,才使现代生物技术的发展取得重大突破,使胰岛素、生长激素、乙肝疫苗和干扰素等一批基因工程和细胞工程产品陆续进入工业化生产阶段,使一些传统发酵产品的生产提高了经济效益。

1.4 生物技术下游加工过程的发展动向

80年代以来,虽然新的分离与纯化方法不断出现,解决了不少生产实际问题,提供了一大批生物技术产品,但无论是高价生物技术产品,还是批量生产的传统产品,随着竞争商的增多和生产规模的扩大,产品的竞争优势最终还是归结于要求低的生产成本和高纯度的质量产品,所以成本控制和质量控制始终是生物技术下游加工过程发展的动力和方向。

此外,有许多实验室技术需要逐步走向工业化,有些过程的理论问题还没有完全弄清楚,甚至属于基本上不了解,新的高效分离、纯化技术还需要探索,所以生物技术下游加工过程的研究与开发是不能停止的,相反,必须继续向高度和深度进军。

从近年来的研究动态分析可知,当前注重于以下三个方面的研究与开发。

A 加强基础理论研究

(1) 研究非理想溶液中溶质与添加物料之间的选择性反应的机理,以及系统外各物理因子对选择性的影响效应,从而研制高选择性的分离剂,改善对溶质的选择性。

(2) 研究界面区的结构、控制界面现象,探求界面现象对传质的影响,从而改善具体单元操作和过程速度,如改善萃取操作和结晶速度。

B 完善、研究、开发新型的和经济高效的下游加工技术

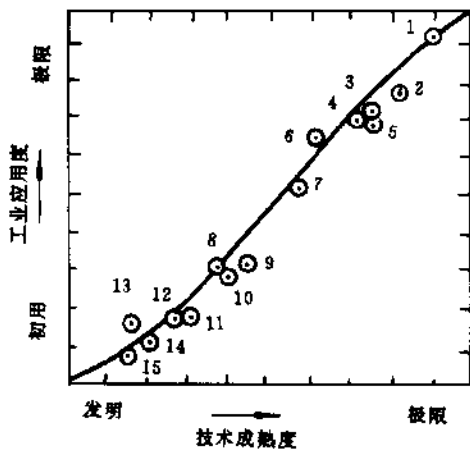


图 1-2 分离技术发展现状示意

- 1—精馏;2—吸收;3—结晶;4—溶剂萃取;5—萃取(共沸)精馏;6—离子交换;7—吸附(气固);8—膜(液相进料);9—吸附(液固);10—膜(气相进料);11—色谱分离法;12—超临界萃取;13—液膜;14—场致分离;15—亲和分离

(1) 正确对待“新”、“老”分离技术,努力推进多种分离纯化技术的结合。

生物技术产品的下游加工过程既包括了历时已 100 余年的若干老的单元操作如精馏、干燥、吸收等,也包括了诸如膜分离、络合反应分离等新的单元操作,其中已得到工业应用的单元操作大体上可借用图 1-2 来说明。

由图 1-2 可以看出各种单元操作目前的“技术成熟度”(横坐标)与“工业应用度”(纵坐标)之间的近似关系。值得注意的是在多种多样的单元操作中,尽管精馏、吸收等传统的单元操作已处于“S”形曲线的顶峰附近,但由于它们属于生产领域中量大面广的技术,对它们的提高与改善将给生产带来极为可观的经济效益,所以不应忽视,相反仍应对它们加强深化研究,使之更加完善。曲线中间涉及的操作,是生物下游加工过程发展历史上基于不同应用场合建立和发展了的

沉淀、结晶、吸附、萃取、离子交换等单元操作,属于迅速发展中的新兴单元操作或分离技术,需要不断地提高其理论深度和扩展其应用的广度。如萃取技术,从用于核燃料提取、分离和纯化开始,扩展到了生物技术产品的分离纯化过程之中,同时得到了发展,派生出了双水相萃取、反胶束萃取、超临界萃取等(图 1-3)。

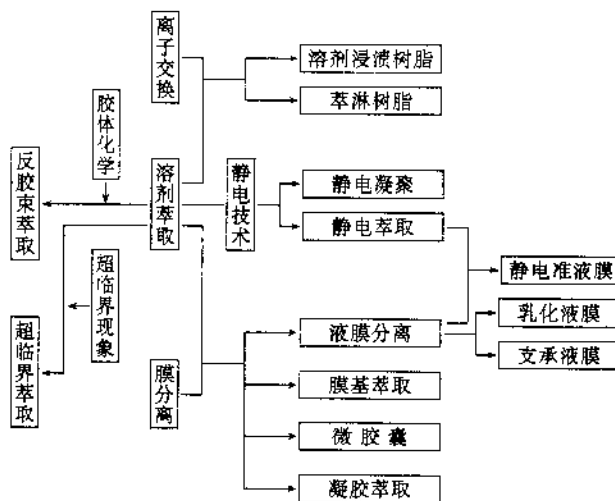


图 1-3 溶剂萃取与一些新兴分离技术之间的关系

除了正确对待新、老技术之外,当前生物技术下游加工过程发展的一个主要倾向是多种分

离纯化技术相结合,也包括新、老技术的相互交叉、渗透与融合,形成所谓融合技术或子代技术。如图 1-3 中的萃取与离子交换相结合,形成了溶剂浸渍树脂和萃淋树脂分离技术;又如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(见图 1-4)。

这类技术具有选择性好,分离效率高,能简化下游加工过程步骤,节约能耗,提高加工过程的水平,是今后的主要发展方向。近年来研究较多而且有较大实用价值的过程有渗透蒸发和膜萃取。

(2) 生物技术下游工程与上游工程相结合,即发酵与分离耦合过程的研究,这是当今生物化学工程领域里的热点之一,我国也已于 1992 年将其列为国家自然科学基金的重点研究项目。这一新的技术思路在 70 年代首先用于厌氧发酵——乙醇发酵过程中,取得了令人满意的效果,近年来逐步发展到用于好氧发酵过程中来。

发酵-分离耦合过程的优点是可以解除终产物的反馈抑制效应,同时简化产物提取过程,缩短生产周期,收到一举数得的效果。

(3) 强化化学作用对下游加工过程的影响。这是提高分离过程的选择性和设备效率最有效的一种方法,其中重点研究的内容有两大类:

1) 强化化学作用对体相分离能力的影响。一是选择适当的分离剂,增大分离因子,增加对某一组分的选择性。二是向分离体系投入附加组分,改变原来体系的化学位,从而增大分离因子,如在乙醇水溶液制备无水乙醇时,加入盐溶液,可使醇对水的相对挥发度大大提高,甚至使恒沸点消失,可以在较小回流比下进行乙醇分离,是一种节能的分离方法。

2) 强化化学作用对相界面传质速率的影响。利用一些相转移促进剂来增大相间的传质速率。若把这类相转移促进剂结合在固相的界面上,便形成各类“亲和”分离过程,如亲和层析、亲和吸附、亲和过滤、亲和膜分离等,这是强化分离过程的一个前沿研究方向。

(4) 改进上游因素,简化下游加工过程。着重于两方面的改进:

1) 生物催化剂:菌种选育和工程菌构建是上游工程的主要工作之一,一般以开发新物种和提高目的产物量为目标,现在应该转变观念,从整体出发,除了达到以上目标外,还应设法赋予生物催化剂增加产物的胞外分泌量,减少非目的产物的分泌(如色素、毒素、降解酶及其他干扰性杂质等)以及赋予菌种或产物以某种有益的性质以改善产物的分离特性,从而简化下游加工过程。

2) 培养基和发酵条件:直接决定着输送给下游的发酵液质量,如采用液体培养基,不用酵母膏、玉米浆等有色物质和杂蛋白等为原料,控制比生长速率、消沫剂用量,放罐时间等发酵条

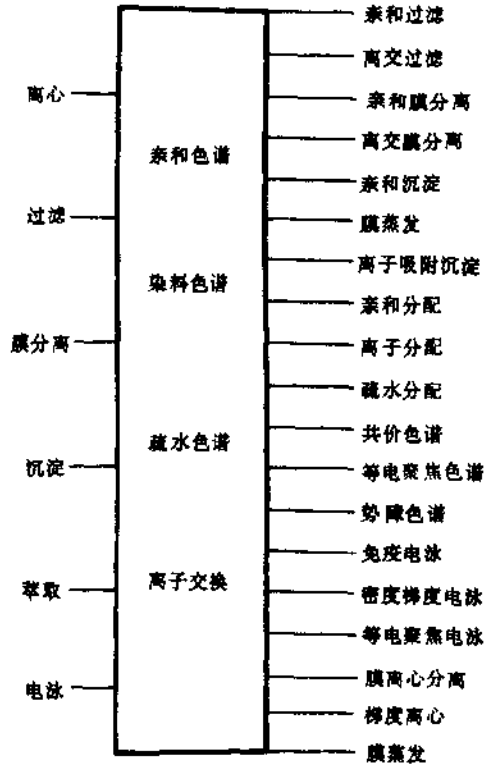


图 1-4 子代分离技术的产生

件,可以使下游加工过程方便、经济。

C 工程问题的研究

应用化学工程中的“放大效应”、返混等概念,结合生化过程的基本原理,研究大型生化分离装置中的流体力学、传热和物质传递规律,探明在设备中的浓度、酸度、固含量、温度等分布不均匀情况,以制定合理的操作规范,改善设备结构,掌握放大方法,达到增强分离因子、减少放大效应,提高分离效果的目的。如从固-液两相流规律的研究来改善大型离子交换柱的分离效率;以流体力学的基本原理来探讨超滤装置、电渗析过程中的浓差极化现象和预防措施;从大型搅拌釜中的流体流动、传热规律的模拟,来揭示盐析、pH 调节、连续结晶和等电点沉淀等过程中有关组分浓度分布和温度场及其对过程结果的影响等。

总之要从两相体系的流动特性研究入手,来解决生化分离装置的设计与放大问题,达到经济地、高分辨率地解决生物产品的分离、纯化问题。

生物物质的分离、纯化过程是生物工程产业化的必要手段和环节,不管它的难度有多大,都必须坚持产品质量第一,努力做到提高收率、过程节能、投资少、效益高,为人类作出更大的贡献。

2 发酵液的预处理和过滤

微生物在合适的培养基、pH、温度和通气搅拌(或厌气)等发酵条件下进行生长和合成生物活性物质,包括菌体、胞外代谢产物或胞内的酶和核酸等。但是,不管人们所需要的产物是胞内的还是胞外的或是菌体本身,都首先要进行发酵液的过滤和预处理,将固、液分离开,然后才谈得上从澄清的滤液中采用物理、化学的方法提取代谢产物,或从细胞出发进行破碎、碎片的分离和提取胞内酶等产物。

2.1 发酵液的预处理

由于所需的产品在发酵液中往往浓度很低并与许多溶解的和悬浮的杂质夹杂在一起,发酵液又属于非牛顿型流体,所以必须进行预处理。

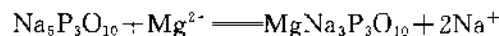
预处理的目的是主要有三个方面。其一是改变发酵液的物理性质,促进从悬浮液中分离固形物的速度,实现工业规模的过滤;其二是尽可能使产物转入便于以后处理的相中(多数是液相);其三是去除发酵液中部分杂质,以利于后继各步操作。

处理方法完全决定于可分离物质的性质,如对 pH 值和对热的稳定性,是蛋白质还是非蛋白质的本性,分子质量大小等。

在微生物合成的主要部门之一——抗生素生产中,对发酵液的预处理研究得最为深入,此时把发酵液中对提炼影响最大的高价无机离子(Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+})和蛋白质等杂质作了认真的处理,以减少它们对用离子交换法或溶媒萃取法提炼抗生素的影响,具体做法为:

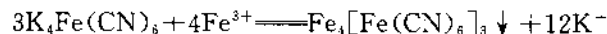
A 控制 pH 和除去无机离子

为了改变发酵液的胶体状态或使产物转入液相,调整它的 pH 值,往往很有价值。一般用草酸酸化,同时草酸还可以除去钙离子;要除去镁离子,可加入三聚磷酸钠,它和镁离子形成可溶性络合物:



用磷酸盐也能大大降低钙、镁离子的浓度,此法用于环丝氨酸等的提炼中。

除去铁离子,可加入黄血盐,使之形成普鲁士蓝沉淀:



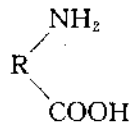
B 可溶性蛋白质的除去及其生化机理

在发酵液中除了上述高价无机离子外,还存在有可溶性蛋白质,一般来讲对于无机或有机酸、碱及其金属盐类,在特定条件下,通过溶媒转相、离子交换等方法可使产物逐步同它们分离。但对于可溶性蛋白质如任其进入滤液,将对以后各步的提炼工作造成极大危害。因此发酵

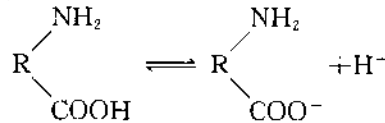
液的预处理,从根本上说,是如何使可溶性蛋白质充分的变性沉淀,以便随同固相物一同除去的问题。要做到这点,正确地认识蛋白质的性质和它的变性理论是重要的。这正是发酵液预处理所依据的生化机理:

a. 水溶性蛋白质溶液是胶体体系。因其分子与水有很大亲合力,所以又是亲水胶体,具有一般胶体体系的动力学和电学性质。它的溶解度与其分子高度水化有关,所以溶解的蛋白质分子周围有水化层。水化层正是胶体体系稳定的必要条件。那么任何破坏这种水化作用的因素,必然降低蛋白质的溶解度,使其沉淀。这就是预处理中加碱金属中性盐作为脱水剂的道理。

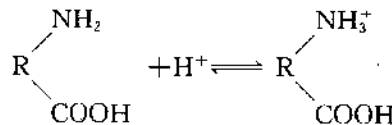
b. 蛋白质是由许多 α -氨基酸分子按一定方式互相联结而成的。氨基酸是有机酸分子中碳链上的一个或几个氢原子被氨基取代生成的化合物。各种氨基酸在蛋白质分子中互相联结时,总有一些自由的羧基和自由氨基,其结构可以用通式表示:



这种结构正表明它是一种两性电解质。羧基解离时,产生 H^+ ,使蛋白质具有弱酸性:



它的氨基能与 H^+ 结合成 $\text{R}-\text{NH}_3^+$,使其具有弱碱性:



蛋白质质点所带电荷,可因溶液 pH 的变化而变化。在酸性溶液中带正电,反之带负电,当溶液处于某一 pH 值时,蛋白质质点所带正、负电荷恰好相等,此时的 pH 值是蛋白质的等电点。处于等电点状态的蛋白质,其总电荷为零,因此失去了作为胶体体系稳定的基本因素。此时蛋白质质点迅速结合成聚集体,极易沉淀析出。根据蛋白质的组成特点,我们不妨把蛋白质分成三种。蛋白质分子中自由羧基和自由氨基的比例为 1:1 的,称为中性蛋白质;是 2:1 的称为酸性蛋白质,是 1:2 的称碱性蛋白质。尽管蛋白质的实际组成绝非如此简单,但对大多数蛋白质来讲,自由羧基和自由氨基的比例大致在此范围之内,根据羧基和氨基的离解度,可算出中性、酸性和碱性蛋白质的等电点分别是 pH6.0、pH5.3 和 pH7.23。这就给出了一个包括绝大多数蛋白质等电点的 pH 范围,在此范围内,加上其他因素(如搅拌、加热、加碱金属或重金属盐等),可使可溶性蛋白质最充分变性。

c. 蛋白质既是亲水胶体,又是两性电解质,不难理解,它肯定是一个很强的缓冲体系。这就要求在预处理中不但对加入物的量要严格规定,而且对规定的 pH 达到值,要有一定的稳定时间,用以消除蛋白质的缓冲作用,达到不可逆变性。在某种意义上讲,这种稳定时间的规定,同加入物同等重要!

d. 蛋白质的另一显著特性是热敏性,有些蛋白质在 50°C 即失去活性并变性。一般的在 70

~80℃则不可逆地变性析出。对一些生化产物,在其本身耐热性允许的范围内,往往采用加热法来处理发酵液,达到除去可溶性蛋白质的目的。抗生素中的链霉素和灰黄霉素都采用加热处理发酵液。

除了上述采用的变性试剂和处理手段外,还可使用表面活性剂、有机溶剂等。

目前在分离、精制生物活性物质时常常使用絮凝剂。无机的絮凝剂有硫酸铝、氯化钙、氯化铁、碱式氯化铝等,它们的加入,可使胶体的排斥电位(ζ)降低而发生聚沉,我们称之为凝聚;有机絮凝剂有聚丙烯酰胺、聚丙烯酸钠、聚季胺酯等中性、阴性和阳性的絮凝剂,依靠这些高分子化合物长链的架桥作用,使胶体成团聚结称之为絮凝。有机絮凝剂不仅是长链的高分子化合物,而且含有很多离子化基团($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ 等)因此分子中电荷密度很高,中和电性能力也很强,所以能同时起到凝聚作用。

由于细胞表面常常带负电,因此处理发酵液常用阳离子絮凝剂,但有时细胞表面也可以吸附阳离子变成带正电的,而用阴离子或非离子絮凝剂来处理,其中絮凝剂的分子量对絮凝效果有很大影响。

絮凝剂与无机电解质或热处理相比较,能在比较“温和”的条件下,进行发酵液的预处理。不仅絮凝效果好,使用剂量小,还能把溶液的色素减少,增加产物的收率等。

C 有色物质的去除及其他

发酵液中有色物质的去除,从提高产物的质量观点来看,具有重要的意义。

发酵液中的色素,可能与使用深色培养基(例如糖蜜、玉米浸出液)有关,也可能是在微生物代谢过程中直接分泌出来的。色素化学性质上的多样性,给脱色方法带来相当大的麻烦。在脱色方法中以使用离子交换剂、离子交换纤维、活性炭等材料的吸附法最为普遍。例如,盐型强碱性阴离子交换剂,使用于解脲酶和果胶酶溶液的脱色,活性损失不超过15%~20%。阴离子交换树脂(AB-16FC和AN-1)对含在糖浆中的有色物质具有强烈的亲和势,被用来进行谷氨酸发酵液的脱色时,树脂的最佳操作型式为磷酸型。

用DEAE-纤维素从含酶溶剂中吸附有色物质,通常可同时除去非活性蛋白质,使主产物纯化2~5倍。

另外用工业酶制剂进行预处理,在净化发酵产物、除去干扰性浑浊物方面的应用不断增加。如用淀粉酶将发酵液中残留的不溶性多糖转为单糖,可以提高过滤速度;用带电胶体如鱼胶添加到浑浊的饮料中以除去悬浮体,等等。

经上述各种凝聚或沉淀方法预处理后的发酵液,还需经离心或压滤器过滤,分离固、液两相,为进一步处理准备好材料。

2.2 发酵液的过滤

发酵液属于非牛顿型液体,要想通过过滤,使固、液两相分离是困难的。主要由发酵液滤饼的比阻力决定的。发酵液滤饼的比阻力与一般可压缩性滤饼相比,有其特殊性。一般的可压缩性滤饼,滤饼比阻力是操作压力差的函数,在不变的压差之下,滤饼比阻力为定值;也就是说,在不变的压力差下过滤,过滤速度的逐渐下降是由于滤饼厚度的逐渐增加而造成的,而作为单位滤饼厚度的过滤阻力,即滤饼比阻力却是不变的。但对于发酵液滤饼,即使在恒定的操作压差之下,当滤饼中所含的固形物浓度达到某一定界限值时,此滤饼的比阻力便突然升高。因此,

过滤速度不但随滤饼厚度的增加而下降,还由于滤饼比阻力的这种突然升高而额外地下降。很久前,奥尔洛夫斯基曾提出过假设,认为这是由于有机成分的胶体粒子借静电吸引而结合的水所造成的。对发酵液进行预处理的目的是为了改善过滤性能,其中也包含降低结合水百分率,提高自由水的百分率。使发酵液滤饼接近一般可压缩性滤饼。

对于可压缩滤饼,如过滤介质的阻力相对较小,可以忽略不计,则恒压下的过滤方程式如下:

$$q^2 = 2 \frac{\Delta p}{\mu r_B X_B} \cdot \tau \quad (2-1)$$

式中 q ——到瞬间 τ ,通过单位过滤面积的滤液量, m ;

Δp ——压力差, Pa ;

μ ——滤液粘度, $Pa \cdot s$;

r_B ——滤饼的重量比阻, m/kg ;

X_B ——通过单位体积滤液,所形成的滤渣重量(干重), kg/m^3 ;

τ ——过滤时间, s 。

重量比阻可根据式(2-2),利用图解法求得。以 τ/q 为纵轴,以 q 为横轴所得的直线斜率为 M ,则 r_B 可按式计算

$$r_B = \frac{2M\Delta p}{\mu X_B} \quad (2-2)$$

发酵液经预处理后,其比阻一般大大降低。例各种抗生素发酵液经不同的预处理方法后,其滤饼的比阻示于表 2-1 中,由表 2-1 可见,放线菌发酵液经预处理后,比阻仍大于真菌发酵液,黄豆粉代替玉米浆,则 r_B 增大等。

表 2-1 经预处理后发酵液的滤饼的平均比阻

抗生素	培养基 (主要成份)	培养基(干重) 浓度, %	预处理方法	重量比阻 r_B $m/kg \times 10^{12}$
链霉素	葡萄糖-黄豆粉	8.5	酸化、热处理	50~70
	葡萄糖-黄豆粉	8.5	在弱碱性液体中形成填充剂	170~200
	葡萄糖-玉米浆	8.5	酸化、热处理	15~20
	葡萄糖-玉米浆	8.5	在弱碱性液体中形成填充剂	3~5
	葡萄糖-黄豆粉	11.3	酸化、热处理	80~100
	葡萄糖-黄豆粉	15.2	酸化、热处理	100~200
四环素	玉米粉	14.5	不同 pH 下酸处理	10~25
土霉素	淀粉-黄豆粉	16.5	酸化、热处理	25~35
红霉素	葡萄糖-玉米粉	17.7	在弱碱性液体中形成填充剂	20~50

降低滤饼比阻的另一类方法,是在待滤的发酵液中加入适当百分率的助滤剂。工业上最常用的助滤剂是硅藻土或珍珠岩粉。使用量一般为液体的 0.5%~10%,最适的添加量应根据实验决定。

提高过滤速度除了上述方法外,改进过滤设备也很重要。目前广泛采用的有鼓式真空过滤