

普通高等教育“十五”国家级规划教材

生物分离工程

SHENGWU FENLI GONGCHENG

第三版

孙彦 著



化学工业出版社

普通高等教育“十五”国家级规划教材

生物分离工程

第三版

孙彦 著



化学工业出版社

·北京·

本书以生物大分子分离纯化技术为核心,系统介绍了生物产物分离纯化的基本原理、分离操作、过程理论及应用。本书共11章,即绪论、细胞分离与破碎、初级分离、膜分离、萃取、吸附分离技术和理论基础、色谱、亲和色谱、蛋白质复性、结晶和干燥等。其中第2章和第3章主要介绍了生物分离过程的前处理以及沉淀分级和泡沫分离等初级分离技术;第4章介绍了各种膜分离方法、特点及其在生物分离中的应用;第5章介绍了各种萃取方法,特别是可用于生物大分子分离纯化的双水相萃取和反胶团萃取技术;第6章至第9章阐述了吸附(包括离子交换)、色谱和蛋白质复性等生物分离过程的核心技术的基本原理、特点、基础理论和应用,内容包括近年来该领域的最新研究进展,是本书的核心部分;最后两章介绍了结晶和干燥的基础理论及其在生物分离中的应用。

本书主要作为高等院校生物工程和生物技术等相关专业本科生的教材,也可供相关专业研究生以及生物技术、生物化工和生物制药领域的科研、技术和管理人员使用和参考。

图书在版编目(CIP)数据

生物分离工程/孙彦著. —3版. —北京:化学工业出版社,
2013.5

普通高等教育“十五”国家级规划教材
ISBN 978-7-122-16840-5

I. ①生… II. ①孙… III. ①生物工程-分离-高等学校-教材
IV. ①Q81

中国版本图书馆CIP数据核字(2013)第058881号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:周 侗

责任校对:吴 静

装帧设计:尹琳琳

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:三河市延风印装厂

787mm×1092mm 1/16 印张17 字数419千字 2013年10月北京第3版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:36.00元

版权所有 违者必究

第三版前言

近十年来,我国生物工程高等教育发展迅速。据报道,截至2012年中国大陆已有290个高等院校设立了“生物工程”本科专业,与其密切相关的“生物技术”本科专业更多,达到345个高校。随着生物工程一级学科的设立,生物工程本科教育所面临的主要课题将是整合资源,提高教育教学质量,满足社会需求。教材建设是其中重要的一环。

本书初版于1998年面世,距今已过去14年,多年来,本书得到了有关教育界和科技界的关注。期间,国内各大学从事“生物分离工程”教学的同事们向作者提出了许多宝贵的意见和建议,使作者受到很大启发。同时,作者在教学和科研工作中也发现了一些问题和不足。例如,本书涉及的部分理论内容难度较高,主要适用于研究生教学参考;有些内容涉及的生物分离技术处在研究发展阶段,并未在生产实践中应用。这些内容并不适合本科生学习掌握。因此,本书第三版除整体内容的更新外,还重点进行了以下4个方面的修订。

(1) 删除部分理论性较强的内容,包括大部分模型的推导、第5章中部分与萃取动力学相关的内容、第6章的吸附过程传质动力学理论、第7章的置换色谱理论、第8章的亲合色谱过程分析等。

(2) 删除或简化了对某些分离方法的介绍,如删除了第二版的第9章“电泳和电色谱”和第8章的“其他亲和分离技术”一节;简化了对第6章中“膨胀床吸附”以及第7章中“流通色谱”和“置换色谱”的讲解。

(3) 补充和更新了部分内容,如第5章中的双水相胶团系统,第9章中的荷电粒子促进同电荷蛋白质复性等内容。

(4) 在每章的最后,增加“本章总结”一节,概括一章的重点和有关分离技术的关键点,并展望有关生物分离技术和理论的发展。其中所引的文献可供教师在教学中参考使用,或方便学生进一步阅读学习。

在第三版即将付梓之际,作者衷心感谢清华大学沈忠耀教授!14年前沈先生为本书初版撰写的序言,至今仍然激励着作者积极投身于生物分离工程研究和教学工作。同时,感谢我在天津大学和国内其他单位的同事、同行、学长和领导多年来的支持和鼓励。此外,我要感谢过去近20年从本实验室毕业的一百多名研究生以及目前正在读的三十多名研究生。除了感谢他们中的部分人(见前两版的前言)对本书第三版所做的付出外,还要感谢他们所有人对实验室的发展和生物分离工程研究所做的贡献!最后,仍然需要特别感谢我的家人多年来对我的关怀和支持,使我有充足的时间和精力投身于教学科研工作。

孙彦

2012年初冬于天津大学

第二版前言

近 30 年来,以基因工程为标志的现代生物技术迅速发展,成为影响世界经济的主要科学技术之一。进入 21 世纪,随着人类基因组工程取得巨大成就,生物技术步入了后基因组时代。蛋白质组学、药物基因组学、生物信息学和系统生物学研究蓬勃兴起,为生物技术的发展注入了巨大的生机和活力。生物技术的主要目标是生物物质的高效生产,而分离纯化过程是生物产品工程的重要环节。因此,生物分离工程是生物技术的重要组成部分,在生物技术研究 and 产业发展中发挥着重要作用。生物分离工程的根本任务是设计和优化分离过程,提高分离效率,降低过程成本;而研究开发大容量、高速度和高分辨率的新技术、新介质和新设备则是生物分离工程发展的主要目标。

《生物分离工程》出版 6 年来,得到了有关教育界和科技界的广泛关注,多次重印。但是,初版中多有不完备之处;同时,与生物技术同步,近年来生物分离工程研究也取得了长足的发展。因此,有必要重新修订,以提高其作为生物工程及相关学科领域本科生与研究生教材的水平,并充分反映生物分离工程研究的最新进展。

本书第二版保留了初版的大部分内容。除文字方面的全面修订、部分章节标题的改动和章节次序的改变外,主要修订工作集中在以下 4 点。

(1) 在第 2 章中删除了“包含体的分离和蛋白质的复性”一节,新增“蛋白质复性”一章(第 10 章),以突出蛋白质复性在生物分离过程中的重要性。

(2) 吸附和色谱是生物分离过程的核心技术,为加强有关部分的系统性,对第 6 章至第 8 章进行了重点修订。在第 6 章中增加了“吸附平衡理论”和“吸附过程传质动力学”的内容,充实了近年来发展较快的“膨胀床吸附”部分的内容;在第 7 章中增加了“置换色谱”一节,充实了“流通色谱”(原名“灌注层析”)一节的内容;将第 8 章标题改为“亲和色谱”,突出了色谱方法作为亲和分离纯化技术主体的重要地位,并增加了亲和吸附平衡方面的内容。

(3) 第 9 章更名为“电泳和电色谱”,对内容也进行了部分修订,强调了电场存在下的色谱方法在生物分离技术中的重要性。

(4) 第 3 章更名为“初级分离”,将“沉淀”部分合并为一节,新增“泡沫分离”一节。

在第二版即将付梓之际,作者对国家自然科学基金委员会、国家教育部、天津市科委和天津市教委等部门多年来提供的基金资助表示诚挚的谢意,该书中有关作者的研究成果都是在上述多项基金资助下取得的。同时,作者衷心感谢国家教育部将此书列为国家“十五”规划教材并提供基金资助;天津大学也对本书出版提供了大力支持,激励作者尽最大努力完成了修订工作。史清洪博士在繁忙的教学科研工作之余通读了书稿,提出许多修改意见,作者对其敬业精神和辛勤劳动深表谢意。在书稿整理过程中,本室研究生杨征、杨坤、施扬、佟晓冬和孙国勇等同学在文献整理和绘图等方面提供了大力协助,在此一并表示感谢。最后,特别感谢我的家人多年来对我的关怀和支持,使我有充足的时间和精力投身于教学科研工作。

孙彦

2004 年 9 月于天津大学

初版前言

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研界瞩目的焦点，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、色谱、电泳和亲和分离纯化技术等。对于涉及“化工原理”教材中较多的内容，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，其中第 4 章至第 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 章介绍了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，介绍了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 章介绍结晶原理、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

目 录

1 绪论	1
1.1 生物技术与生物分离	1
1.2 生物物质和生物分离	1
1.2.1 生物物质	1
1.2.2 生物分离过程	2
1.3 生物分离过程的特点	3
1.4 生物分离技术和原理	5
1.4.1 物理性质	5
1.4.2 化学性质	5
1.4.3 生物学性质	5
1.5 生物分离效率	7
1.5.1 分离方法和设备	7
1.5.2 分离过程和产品	7
1.6 本章总结	8
参考文献	9
2 细胞分离与破碎	10
2.1 细胞分离	10
2.1.1 重力沉降	10
2.1.2 离心沉降	11
2.1.3 过滤	15
2.2 细胞破碎	18
2.2.1 细胞的结构	18
2.2.2 细胞破碎和产物释放	19
2.2.3 细胞破碎技术	20
2.2.4 目标产物的选择性释放	25
2.3 本章总结	26
习题	26
参考文献	26
3 初级分离	28
3.1 沉淀分级	28
3.1.1 蛋白质的表面特性	28
3.1.2 盐析沉淀	29
3.1.3 等电点沉淀	32
3.1.4 有机溶剂沉淀	33
3.1.5 热沉淀	33
3.1.6 其他沉淀法	33
3.2 泡沫分离	34
3.2.1 泡沫分离原理	34
3.2.2 泡沫分离设备和过程	35
3.2.3 泡沫分离的应用	37
3.3 本章总结	39
习题	39
参考文献	39
4 膜分离	41
4.1 各种膜分离法及其原理	41
4.1.1 反渗透	41
4.1.2 超滤和微滤	44
4.1.3 透析	45
4.1.4 电渗析	45
4.1.5 渗透汽化	46
4.2 膜材料及其特性	47
4.2.1 膜材料	47
4.2.2 膜的结构	47
4.2.3 水通量	49
4.3 膜组件	50
4.3.1 管式膜组件	50
4.3.2 平板式膜组件	50
4.3.3 螺旋卷式膜组件	50
4.3.4 中空纤维(毛细管)式膜组件	50
4.4 操作特性	52
4.4.1 浓度极化模型	52
4.4.2 超滤膜的分子截留作用	53
4.5 影响膜分离速度的主要因素	54
4.5.1 操作形式	54

4.5.2	流速	54	4.8.1	菌体分离	62
4.5.3	压力	55	4.8.2	小分子发酵产物的回收	62
4.5.4	料液浓度	55	4.8.3	蛋白质的回收、浓缩与纯化	62
4.6	膜分离过程	56	4.8.4	膜生物反应器	63
4.6.1	分离操作	56	4.9	本章总结	64
4.6.2	错流过滤过程的流体力学	59	习题		64
4.7	膜的污染与清洗	60	参考文献		65
4.8	应用	62			

5 萃取 66

5.1	基本概念	66	5.5.4	双水相萃取操作	91
5.1.1	萃取	66	5.6	液膜萃取	95
5.1.2	反萃取	67	5.6.1	液膜的种类	95
5.1.3	物理萃取和化学萃取	67	5.6.2	液膜萃取机理	96
5.2	分配定律与分配平衡	68	5.6.3	液膜萃取操作	98
5.3	有机溶剂萃取	69	5.7	反胶团萃取	102
5.3.1	弱电解质的分配平衡	70	5.7.1	反胶团及其基本性质	102
5.3.2	化学萃取平衡	71	5.7.2	反胶团的溶解作用	104
5.3.3	溶剂萃取操作	72	5.7.3	反胶团萃取操作	106
5.4	液液萃取操作	75	5.8	液固萃取(浸取)	110
5.4.1	混合-澄清式萃取	75	5.8.1	液固萃取操作及设备	111
5.4.2	多级错流接触萃取	76	5.8.2	浸取剂	111
5.4.3	多级逆流接触萃取	77	5.9	超临界流体萃取	112
5.4.4	分馏萃取	77	5.9.1	超临界流体的性质	112
5.4.5	微分萃取	78	5.9.2	超临界流体萃取操作	114
5.5	双水相萃取	84	5.9.3	应用	114
5.5.1	双水相系统	85	5.10	本章总结	115
5.5.2	双水相中的分配平衡	86	习题		116
5.5.3	影响分配系数的各种因素	89	参考文献		117

6 吸附分离技术和理论基础 119

6.1	吸附分离介质	119	6.5	固定床吸附过程理论	139
6.1.1	吸附剂	119	6.5.1	表面吸附速率控制	140
6.1.2	离子交换剂	121	6.5.2	液膜扩散速率控制	141
6.2	吸附平衡	124	6.5.3	内扩散速率控制	141
6.2.1	吸附等温线	124	6.6	其他吸附操作	141
6.2.2	离子交换的计量置换模型	127	6.6.1	膨胀床吸附	141
6.2.3	空间质量作用模型	130	6.6.2	移动床和模拟移动床吸附	144
6.3	吸附过程传质动力学	131	6.6.3	搅拌釜吸附	145
6.3.1	液相扩散	131	6.7	本章总结	146
6.3.2	固相扩散	133	习题		146
6.4	固定床吸附	136	参考文献		147

7 色谱 149

7.1 色谱原理与分类	149	7.5.4 离子交换色谱的应用及特点	171
7.1.1 原理	149	7.6 疏水性相互作用色谱	171
7.1.2 分类	149	7.6.1 原理	171
7.2 色谱过程理论基础	151	7.6.2 疏水性吸附剂	172
7.2.1 平衡模型	151	7.6.3 色谱操作	173
7.2.2 理论板模型	153	7.6.4 疏水性相互作用色谱的特点	174
7.2.3 传质速率模型	154	7.7 色谱聚焦	174
7.3 分离度	156	7.7.1 原理与操作	174
7.4 凝胶过滤色谱	158	7.7.2 多缓冲剂与多缓冲离子交换剂	175
7.4.1 原理与操作	158	7.7.3 色谱聚焦的应用	175
7.4.2 凝胶过滤色谱介质	159	7.8 反相色谱	175
7.4.3 影响分离的因素	161	7.9 羟基磷灰石色谱	176
7.4.4 凝胶过滤色谱的应用	164	7.10 流通色谱	177
7.4.5 凝胶过滤色谱的特点	164	7.11 置换色谱	178
7.5 离子交换色谱	165	7.12 本章总结	181
7.5.1 原理与操作	165	习题	181
7.5.2 线性梯度洗脱色谱	167	参考文献	182
7.5.3 逐次洗脱色谱	170		

8 亲和色谱 184

8.1 生物亲和作用	184	8.4.2 色素亲和吸附平衡	196
8.1.1 亲和作用的本质	184	8.5 亲和色谱过程和应用	197
8.1.2 影响亲和作用的因素	186	8.5.1 亲和色谱过程	197
8.1.3 亲和作用体系	187	8.5.2 亲和色谱的应用	199
8.2 亲和色谱原理	188	8.6 亲和膜色谱	205
8.3 亲和色谱介质	189	8.6.1 原理和特点	205
8.3.1 亲和配基	189	8.6.2 应用	207
8.3.2 亲和吸附剂及其制备方法	192	8.7 本章总结	208
8.3.3 间隔臂的作用	195	习题	209
8.4 亲和吸附平衡	196	参考文献	209
8.4.1 亲和吸附等温线	196		

9 蛋白质复性 211

9.1 包含体的形成和性质	211	9.3.1 稀释复性	215
9.1.1 包含体的形成	211	9.3.2 辅助因子的作用	217
9.1.2 包含体的性质	212	9.3.3 分子伴侣和人工分子伴侣	218
9.1.3 包含体的胞内抑制	213	9.3.4 复性色谱	219
9.2 包含体的纯化和溶解	213	9.3.5 反胶团溶解复性	222
9.2.1 包含体的分离纯化	213	9.3.6 荷电粒子促进同电荷蛋白质 复性	222
9.2.2 包含体的溶解	214	9.4 本章总结	223
9.3 蛋白质复性	214		

习题	223	参考文献	223
10 结晶			226
10.1 结晶原理	226	10.4 结晶器	240
10.1.1 溶解度	226	10.4.1 冷却结晶器	240
10.1.2 过饱和溶液与介稳区	227	10.4.2 蒸发结晶器	241
10.1.3 成核	228	10.5 结晶操作及其应用	243
10.2 结晶的生长	230	10.5.1 结晶操作特性	243
10.2.1 生长速率	230	10.5.2 应用	246
10.2.2 ΔL 定律	232	10.6 本章总结	248
10.3 结晶过程设计基础	232	习题	249
10.3.1 晶体粒度分布	232	参考文献	249
10.3.2 粒数衡算方程	234		
11 干燥			250
11.1 干燥速度	250	11.4.1 盘架干燥器	258
11.1.1 传导干燥	250	11.4.2 冷冻干燥器	258
11.1.2 对流干燥	251	11.4.3 传送带式干燥器	258
11.2 湿空气和物料中水分的性质	252	11.4.4 转筒干燥器	259
11.2.1 湿空气的性质	252	11.4.5 气流干燥器	259
11.2.2 物料中的水分	253	11.4.6 流化床干燥器	259
11.3 干燥过程	254	11.4.7 喷雾干燥器	259
11.3.1 盘架传导干燥	255	11.5 本章总结	260
11.3.2 球形粒子对流干燥	256	习题	261
11.4 干燥设备及其应用	258	参考文献	261
部分习题答案			262

1 绪论

1.1 生物技术与生物分离

生物技术 (biotechnology) 即有机体的操作和应用有机体生产有用物质、改善人类生存环境的技术。

1953 年, Watson 和 Crick 提出了脱氧核糖核酸 (DNA) 的双螺旋结构模型, 阐明了 DNA 是生物遗传信息 (基因) 的携带者, 开辟了现代分子生物学的新纪元, 为生物技术及其产业的发展开辟了广阔的空间。20 世纪 70 年代, 重组 DNA (recombinant DNA, rDNA) 技术^[1]和细胞融合技术^[2]相继建立, 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, 生物技术迎来了日新月异的高速发展阶段。进入 21 世纪, 人类基因组研究取得巨大成就, 各染色体测序工作逐步完成^[3,4], 迎来了生物技术的后基因组时代, 蛋白质组学^[5]、药物基因组学、生物信息学、系统生物学和合成生物学研究蓬勃兴起, 为生物技术的发展不断注入巨大的生机和活力。

生物技术的主要目标是生物物质的高效生产, 而分离纯化是生物产品工程 (bioproduct engineering) 的重要环节。因此, 生物分离工程 (bioseparations engineering) 是生物技术的重要组成部分^[6]。在生物技术领域, 一般将生物产品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、基因工程、细胞工程、生物反应过程 (酶反应、微生物发酵、动植物细胞培养等) 及目标产物的分离纯化过程, 后者又称下游生物加工过程 (downstream bioprocessing)。生物分离过程包括目标产物的提取 (isolation)、浓缩 (concentration)、纯化 (purification) 及成品化 (product polishing) 等过程。生物分离过程特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, 其结果导致分离过程成本往往占整个生产过程成本的大部分^[7]。例如, 大多数工业酶 (enzyme) 的分离过程成本约占生产过程的 70%, 而对纯度要求更高的医用酶如天冬酰胺酶 (asparaginase), 分离过程成本高达生产过程的 85%; 基因重组蛋白质药物的分离过程成本一般占 85%~90% 以上。与此相比, 小分子生物产物的分离成本较低, 如青霉素的分离过程成本约占 50%, 而乙醇的分离过程成本仅占 14%。因此, 在生物大分子药物的生产过程中, 分离过程的质量往往决定整个生物加工过程的成败。开发高效的分离技术、设计合理的生物分离过程可大幅度降低生物加工过程成本, 提高产品的市场竞争力, 促进人类健康水平和生活质量的提高以及社会经济的发展。

1.2 生物物质和生物分离

1.2.1 生物物质

生物物质种类繁多, 包括小分子化合物、生物大分子、超大分子、细胞和具有复杂结构与构成成分的生物体组织, 在大小、形态和性质上具有广泛的分布。生物物质的

来源包括自然界存在的各种生物资源，但现代生物技术主要通过生物反应过程生产各种有用生物物质，如生物医药、疫苗、诊断试剂、精细生物化学品、大宗生物化学品、生物材料、生物能源（生物制氢、生物柴油）、人工器官、药物输送载体、功能食品和添加剂、饲料、化妆品等。常见的生物制品有抗生素、有机酸、氨基酸、多肽、蛋白质（包括酶、抗体）、核苷酸、聚核苷酸、核酸、病毒、糖类、脂类、生物碱、糖苷等，其中与人类健康直接相关的生物大分子类治疗药物（蛋白质、核酸）和疫苗是现代生物分离工程研究的主要内容。

现代生物技术产品的主体是蛋白质药物^[8~10]，包括细胞因子（如干扰素、生长因子、红细胞生成素）、激素（如胰岛素、生长激素）、抗体药物（单克隆抗体、抗体片段、基因工程抗体）、酶类药物、溶血栓药物（如尿激酶、组织纤溶酶原激活剂）等。在功能基因组学和蛋白质组学研究的推动下，蛋白质药物将获得更大发展。近年来，基因工程疫苗、反义核酸药物和核酸疫苗研究进展迅速^[9~12]，为治疗和预防各种疑难疾病开辟了新的发展空间。同时，随着2004年初第一个基因治疗药物获得生产批文^[13]，基因治疗^[14]也进入了新的发展时期。基因治疗药物的主体是目的基因的载体（vector）。基因治疗载体包括病毒载体（如腺病毒、逆转录病毒）和非病毒载体（如质粒DNA），其相对分子质量（或颗粒尺寸）均远大于蛋白质（相对分子质量 $10^6\sim 10^7$ 数量级，尺寸 $30\sim 1000\text{nm}$ ），可称作超大生物分子，其大规模分离纯化为生物分离工程的发展带来了新的机遇和挑战。在各种蛋白质药物中，单克隆抗体药物种类繁多，社会需求和市场规模巨大，因而其分离纯化技术受到国际生物技术产学界的广泛关注^[15]。

1.2.2 生物分离过程

生物分离的原料主要来源于生物反应过程。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。常见生物药物和天然药物（中药）的分离制备过程已编辑成书或手册可供参考^[16,17]。图1.1是通过细胞（包括微生物和动植物细胞）培养生产生物物质的分离过程的一般流程。首先，将细胞与培养液分离开来。若目标产物存在于细胞内（胞内产物），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）；若胞内目标产物是以包含体（inclusion bodies, IB）形式存在的蛋白质，则需利用盐酸胍等变性剂溶解包含体，然后进行蛋白质的体外折叠复性（*in vitro* refolding），获得具有活性的目标蛋白质（路线1b），再进行后续的分选纯化操作。若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，则可在除去细胞后直接对上清液进行浓缩、分离和纯化处理，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。

从图1.1可以看出，生物分离过程的设计应首先考虑目标产物存在的位置（胞内或胞外）和存在形式（活性表达产物或包含体），应用的分离纯化技术则取决于产物分子的大小、疏水性、电荷形式、溶解度和稳定性等。此外，生物加工过程的规模、目标产物的商业价值和对纯度的要求也是选择分离纯化技术的重要因素。例如，色谱技术分离精度很高，多应用于价格较昂贵的生物技术药物和生理活性物质（如激素、抗体、细胞因子等蛋白质药物，疫苗，质粒DNA和病毒等基因治疗载体）的分离纯化，但因其生产规模有限，不适用于低价格产物的大规模分离过程。由于生物技术药物是生物技术产品的核心部分，因此，色谱是生物分离过程的核心技术^[18~20]。

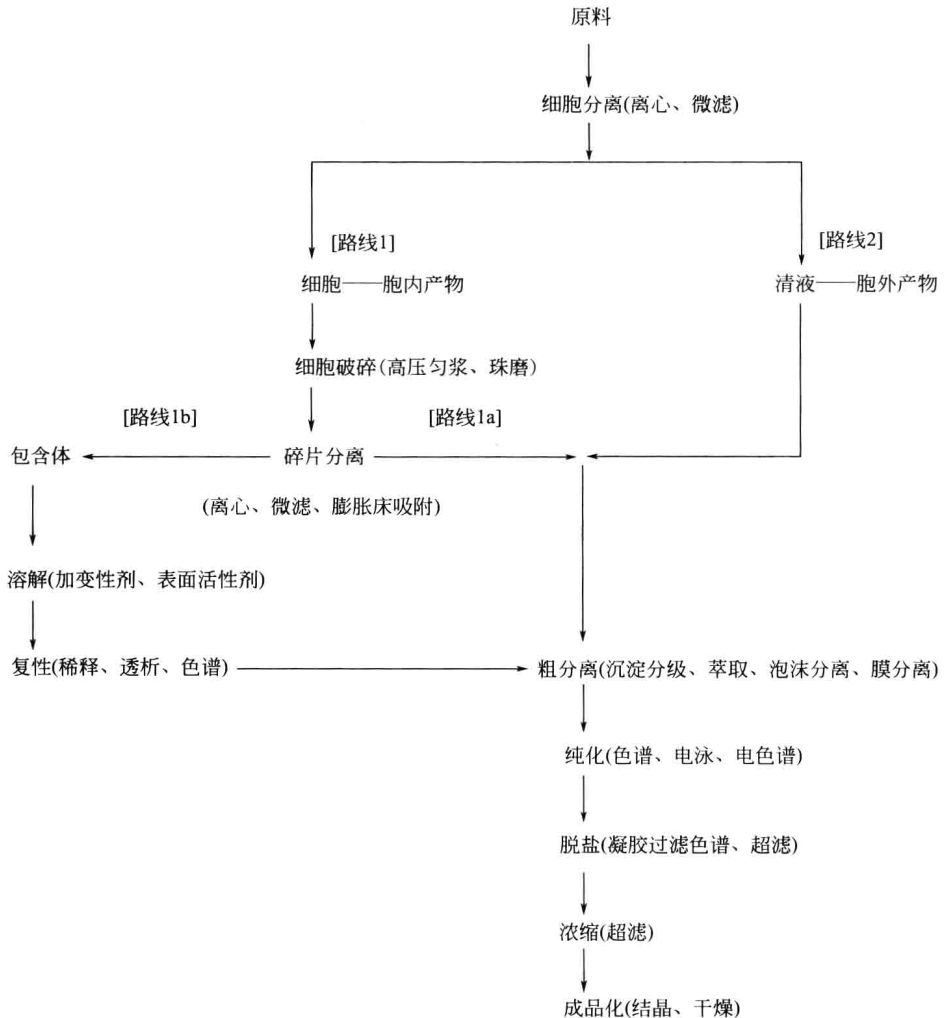


图 1.1 生物分离过程的一般流程

注：括号内为各步骤的主要分离纯化方法

1.3 生物分离过程的特点

生物物质，尤其是生物大分子（蛋白质、核酸和病毒类基因治疗载体等）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，在保持其生物活性和功能的前提下进行分离纯化操作。因此，生物分离具有不同于一般分离过程的显著特点。

① 生物物质的生物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 值的改变以及某些化学药物存在时极不稳定，容易发生活性降低甚至丧失（变性失活）。同时，原料液中常存在降解目标产物的杂质（例如，可水解蛋白质的蛋白酶）。因此，必须设计合理的分离过程和操作条件，实现目标产物的快速分离纯化，获得高活性目标产品。

② 用作医药、食品和化妆品的生物产物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质等有害人类健康

的物质，并且防止这些物质在分离操作过程中从外界混入。

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，一般需要利用具有高度选择性的分子识别技术或高效液相色谱技术纯化目标产物。同时，生物产物的原料构成成分复杂，需要采用多种分离技术和多个分离步骤完成一个目标产物的分离纯化任务，如图 1.1 所示。由于每一步分离操作的回收率都不能达到 100%（一般为 70%~90%），而整个分离过程的总回收率为

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

式中， Y_i 为第 i 步操作的回收率； Y_T 为总回收率。

所以，多步操作使产品的最终回收率很低，过程成本显著增大。从式 (1.1) 可以看出，为了提高最终产品的回收率，一是提高每步操作的回收率，二是减少操作步骤。为实现这些目的，必须优化设计分离过程和各个分离操作，并努力开发和应用新型高效的分离纯化技术。

④ 原料液中目标产物的浓度一般很低，有时甚至是极微量的，因此，往往需要从庞大体积的原料液中分离纯化目标产物，即需要对原料液进行高度浓缩。这也是造成生物分离成本高的原因之一。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分离为纯物质所需的最小功 W_{\min} 与吉布斯自由能变化 ΔG 相等，即

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

式中， i 为组分数； x 为摩尔分数； γ 为活度系数； R 为气体常数； T 为热力学温度。

在稀溶液中，溶剂的摩尔分数近似为 1，故 $\gamma_i = 1$ 。所以，得到纯组分 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，纯化 1mol 组分 i 需要 $-RT \ln x_i$ 的功，即得到单位质量物质 i 需要的能耗与 $\ln(1/x_i)$ 成正比。所以，原料中目标产物浓度越低，所需能耗越高，分离过程成本越大。图 1.2^[21] 为每千克生物产品售价 (P) 与原料液中目标产物质量浓度 (c) 的双

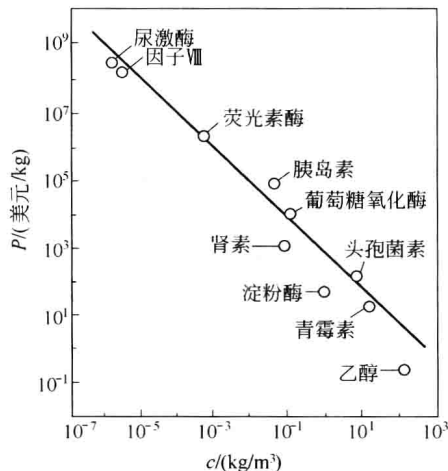


图 1.2 原料液中目标产物质量浓度与产品售价的关系

对数坐标图，从图 1.2 可知， P 和 c 的关系可近似表示为

$$cP = k(\text{常数}) \quad (1.4)$$

或

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

即产品的售价与其在原料液中的质量浓度成反比，反映了原料质量浓度对生产过程成本的显著影响。

1.4 生物分离技术和原理

物质（包括原子、离子、分子、分子复合物、分子聚集体和颗粒，本书中一般统称溶液）分离的本质是有效识别混合物中不同溶质间物理、化学和生物学性质的差别，利用能够识别这些差别的分离介质和（或）扩大这些差别的分离设备实现溶质间的分离或目标组分的纯化。性质不同的溶质在分离操作中具有不同的传质速率和（或）平衡状态，从而可实现彼此分离。这些性质包括以下几个方面。

1.4.1 物理性质

(1) 力学性质 包括溶质密度、尺寸和形状。利用这些力学性质的差别，可进行颗粒（如细胞）的重力沉降、分子或颗粒的离心分离和膜分离（筛分）。

(2) 热力学性质 即溶质的溶解度（液固相平衡）、挥发度（气液相平衡）、表面活性及相间分配平衡行为等性质。利用这些性质的分离方法最多，如蒸馏、蒸发、吸收、萃取、结晶（沉淀）、泡沫分离、吸附和离子交换等。

(3) 传质性质 包括黏度、分子扩散系数和热扩散现象等。利用传质速度的差别也可进行分离，但直接应用较少，而传质现象在分离过程中发挥重要作用。因此，除热力学外，传递过程理论^[22]也是生物分离工程的基础。

(4) 电磁性质 即溶质的荷电特性、电荷分布、等电点和磁性等。电泳、电色谱、电渗析、离子交换、磁性分离等方法利用溶质（或分离介质）的这类性质。

1.4.2 化学性质

化学性质包括化学热力学（化学平衡）、反应动力学（反应速率）和光化学特性（激光激发作用）等。化学吸附和化学吸收是利用化学反应进行分离的典型例证；利用激光激发的离子化作用可进行同位素分离。

1.4.3 生物学性质

生物学性质的应用是生物分离所独有的。利用生物分子（或生物分子的聚集体、细胞）间的分子识别作用，可进行生物分子（如细胞、病毒、蛋白质、核酸、寡聚核苷酸）的亲分离，亲和色谱是亲和分离的典型代表。另外，利用酶反应（包括微生物反应）的立体选择性，可对手性分子进行选择性修饰（如脂化、水解、氨解等），增大手性分子间理化性质的差别，为利用常规方法（如色谱）分离手性分子创造条件。

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，但更多的情况是两种以上因素共同发挥作用。在生物分离过程中，为达到要求的产品纯度，往往需要利用基于不同分离机理的多种分离技术，实施多步分离操作的串联（图 1.1）。

表 1.1 列出了生物分离过程中常用的分离技术及其分离原理和分离对象。从分离操作的角度,一般可将分离技术分为两大类,一是基于相间分配平衡差异的平衡分离法,二是外力作用下产生的溶质移动速度差别的差速分离法。

表 1.1 主要生物分离技术和分离原理

分离技术		分离原理	生物分离产物举例
离心	离心过滤	离心力、筛分	菌体、细胞碎片
	离心沉降	离心力	菌体、细胞、血细胞、细胞碎片
	超离心	离心力	蛋白质、核酸、糖类
泡沫分离		气液平衡、表面活性	蛋白质、细胞、细胞碎片
膜分离	微滤	压差、筛分	菌体、细胞
	超滤	压差、筛分	蛋白质、多糖、抗生素
	反渗透	压差、筛分	水、盐、糖、氨基酸
	透析	浓差、筛分	尿素、盐、蛋白质
	电渗析	电荷、筛分	氨基酸、有机酸、盐、水
	渗透汽化	气液相平衡、筛分	乙醇
萃取	有机溶剂萃取	液液平衡	有机酸、抗生素、氨基酸
	双水相萃取	液液平衡	蛋白质、抗生素、核酸
	液膜萃取	液液平衡、载体输送、化学反应	氨基酸、有机酸、抗生素
	反胶团萃取	液液平衡	氨基酸、蛋白质、核酸
	超临界流体萃取	相平衡	香料、脂质、生物碱
色谱	凝胶过滤色谱	浓差、筛分	脱盐、分子分级
	反相色谱	分配平衡	甾醇类、维生素、脂质、蛋白质
	离子交换色谱	静电作用、浓差(pH值、离子强度)	蛋白质、氨基酸、抗生素、核酸、有机酸
	亲和色谱	生物亲和作用	蛋白质、核酸
	疏水性相互作用色谱	疏水作用、浓差(离子强度)	蛋白质、核酸
	色谱聚焦	静电作用、浓差(pH值)	蛋白质
电泳/电色谱	凝胶电泳	筛分、电荷	蛋白质、核酸
	等电点聚焦	筛分、电荷、浓差(pH值)	蛋白质、氨基酸
	等速电泳	筛分、电荷、浓差(pH值)	蛋白质、氨基酸
	二维电泳	筛分、电荷、浓差(pH值)	蛋白质
	电色谱/色谱电泳	电泳、电渗、色谱	蛋白质、核酸、糖、手性拆分
结晶/沉淀	溶液结晶	液固平衡(溶解度)	氨基酸、有机酸、抗生素、蛋白质
	盐析沉淀	液固平衡、疏水作用	蛋白质、核酸
	等电点沉淀	液固平衡、静电作用、疏水作用	氨基酸、蛋白质
	有机溶剂沉淀	液固平衡、静电作用	蛋白质、核酸

(1) 平衡分离 平衡分离法根据溶质在两相(如气液、气固、液液、液固、气固)间分配平衡的差异实现分离。溶质达到分配平衡的推动力仅取决于系统的热力学性质,即溶质偏离平衡态的浓度差(化学位差)。显然,溶质达到相间分配平衡的过程为扩散传质过程,因此,平衡分离又称扩散分离。蒸馏、蒸发、吸收、萃取、结晶(沉淀)、泡沫分离、吸附和离子交换(色谱)等均为典型的平衡分离过程。

(2) 差速分离 差速分离是利用外力(如压力、重力、离心力、电场力、磁力)驱动溶质迁移产生的速度差进行分离的方法。传统的过滤、重力沉降和离心沉降等非均相物系的机械分离方法根据溶质大小、形状和密度差进行分离,也属差速分离的范畴。其他典型的差速分离法包括超滤、反渗透、电渗析、电泳和磁泳等。

在有些情况下,两种分离原理共同发挥作用,促进分离效率的提高。例如,色谱和电泳相结合的色谱电泳(chromatographic electrophoresis)和电色谱(electrochromatography)