

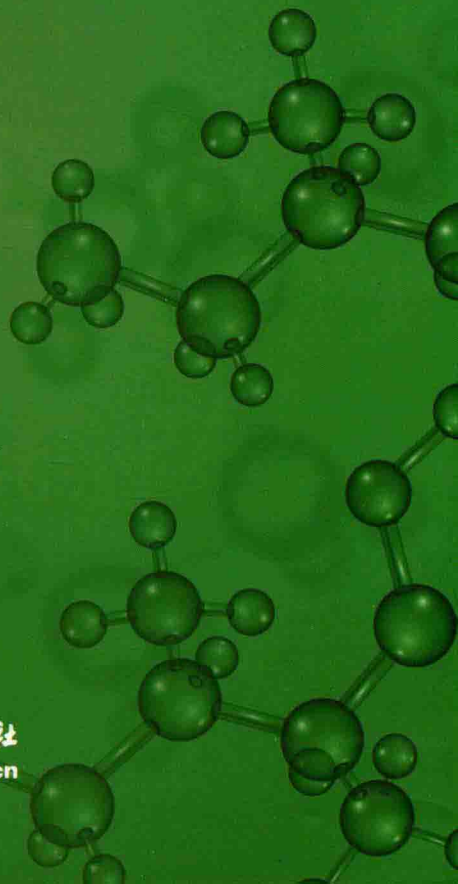
SHENGWU GONGCHENG XIAYOU JISHU ZHI FENLI YU CHUNHUA

生物工程下游技术之 分离与纯化

陶永清◎著



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn



生物工程下游技术之 分离与纯化

陶永清◎著



中国水利水电出版社
www.waterpub.com.cn

·北京·

内 容 提 要

分离纯化是生物技术产业的瓶颈。下游加工过程的费用占全部产品研发费用的50%以上;在成本构成中,分离与纯化部分占产品成本的比例很高。开发新的分离和纯化工艺是降低成本、提高经济效益的重要途径。本书主要阐述了各种分离纯化技术的基本原理、预处理技术、萃取技术等。

全书结构合理,条理清晰,内容丰富新颖,具有较强的可读性,可供相关行业技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

生物工程下游技术之分离与纯化/陶永清著. —北

京:中国水利水电出版社,2019.4

ISBN 978-7-5170-7635-3

I. ①生… II. ①陶… III. ①生物工程—分离②生物工程—提纯 IV. ①Q81

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2019)第 079698 号

书 名	生物工程下游技术之分离与纯化 SHENGWU GONGCHENG XIAYOU JISHU ZHI FENLI YU CHUNHUA
作 者	陶永清 著
出版发行	中国水利水电出版社 (北京市海淀区玉渊潭南路1号D座100038) 网址:www.waterpub.com.cn E-mail:sales@waterpub.com.cn 电话:(010)68367658(营销中心)
经 售	北京科水图书销售中心(零售) 电话:(010)88383994,63202643,68545874 全国各地新华书店和相关出版物销售网点
排 版	北京亚吉飞数码科技有限公司
印 刷	三河市华晨印务有限公司
规 格	170mm×240mm 16开本 12印张 215千字
版 次	2019年6月第1版 2019年6月第1次印刷
印 数	0001—2000册
定 价	58.00元

凡购买我社图书,如有缺页、倒页、脱页的,本社营销中心负责调换

版权所有·侵权必究

前 言

现代生物技术是新技术革命的重要力量,正逐步实现产业化,且已渗透到各个行业,其产品的主要成分——生物物质对人类生活的应用日益突出,应用也越来越广泛。生物物质的生产包括上游工程和下游工程。下游工程是生物物质的分离纯化过程,其中涉及的技术统称为生物分离与纯化技术。

生物分离与纯化是一门既古老又年轻的学科,是食品、生物工业下游技术的核心组成部分,其涉及的相关技术是生物类相关产业中使用最普遍的技术,也是从事生物制品生产和加工必须掌握的基本技术。

本书主要内容以社会需求为导向,以生物物质的基本制备过程为主线,阐述了预处理技术,萃取技术,固相析出分离技术,吸附分离与离子交换分离技术,色谱分离技术,过滤与膜分离技术,浓缩、结晶与干燥技术等分离纯化技术的基本原理,在结合生产实践的基础上介绍了生物技术的应用以及相关设备的使用,并介绍了有关的新知识、新技术、新方法和新工艺。

本书在撰写过程中,参考了大量有价值的文献与资料,吸取了许多人的宝贵经验,在此向这些文献的作者表示敬意。此外,本书的撰写还得到了出版社领导和编辑的鼎力支持和帮助,同时也得到了学校领导的支持和鼓励,在此一并表示感谢。由于作者自身水平及时间有限,书中难免有错误和疏漏之处,敬请广大读者和专家给予批评指正。

作者

2019年2月

目 录

前言

第 1 章 引言	1
1.1 生物分离与纯化技术概述	1
1.2 生物分离与纯化技术的发展史	1
1.3 生物分离与纯化的一般工艺流程	2
1.4 生物分离与纯化技术的发展趋势	4
第 2 章 预处理技术	6
2.1 凝聚和絮凝技术	6
2.2 细胞破碎技术	9
2.3 离心技术	20
第 3 章 萃取技术	27
3.1 概述	27
3.2 溶剂萃取技术	27
3.3 双水相萃取技术	35
3.4 超临界流体萃取技术	41
3.5 反胶团萃取技术	50
3.6 固体浸取技术	53
第 4 章 固相析出分离技术	58
4.1 盐析法	58
4.2 有机溶剂沉淀法	66
4.3 等电点沉淀法	70
4.4 其他沉淀法	72
第 5 章 吸附分离与离子交换分离技术	76
5.1 吸附分离技术	76
5.2 离子交换分离技术	82

第 6 章 色谱分离技术	96
6.1 概述	96
6.2 吸附色谱法	103
6.3 离子交换色谱法	118
6.4 凝胶色谱法	123
6.5 亲和色谱法	131
6.6 高效液相色谱法	136
第 7 章 过滤与膜分离技术	143
7.1 过滤技术	143
7.2 膜与膜组件	148
7.3 微滤技术	155
7.4 超滤技术	158
7.5 反渗透技术	160
7.6 透析技术	163
第 8 章 浓缩、结晶与干燥技术	167
8.1 浓缩	167
8.2 结晶	171
8.3 干燥	178
参考文献	185

第 1 章 引 言

1.1 生物分离与纯化技术概述

生物分离与纯化技术是指从含有目的产物的发酵液、酶反应液或动植物细胞培养液中提取、精制并加工成高纯度的、符合规定要求的各种产品的生产技术,又称为生物下游加工技术。

生物分离与纯化是生物工程产品生产中的基本技术环节。生物产品的自身特征、生产过程的条件限制以及生物产品的特殊性对产品纯度及杂质含量提出了很高的要求,探索高效的生物分离和纯化技术成为生物工程技术领域的一个重要研究方向。

生物分离与纯化技术是现代生物技术产业下游工艺过程的核心,是决定产品的安全、效力、收率和成本的技术基础。分离与纯化过程所产生的成本约占整个生产成本的 70%,而对于纯度更高的生物产品,其分离与纯化的成本更高达生产成本的 85%左右。

1.2 生物分离与纯化技术的发展史

生物物质的分离纯化是随着化学分离与纯化工程技术的发展而发展起来的,大体上来讲,它主要经历了三个主要发展时期。

1. 原始分离纯化时期

从 19 世纪 60 年代开始,传统发酵技术进入了近代发酵工业产业化阶段。到 20 世纪上半叶,还逐步开发了用发酵法生产乙醇、丙酮、丁醇等产品的技术。这些产品大多属于厌氧发酵过程的产物,化学结构比较简单,主要采用压滤、蒸馏或精馏等设备分离。

2. 传统化学工业分离纯化方法在生物产品生产中的推广使用时期

第二次世界大战以后, 抗生素、氨基酸、有机酸等一大批用发酵技术制造的产品进入了工业化生产阶段。这些产品类型多, 分子结构较为复杂, 不但有初级代谢产物, 也出现了次级代谢产物, 产品的多样性对分离纯化方法的多样性提出了更高的要求。很多用于传统化学工业的分离纯化方法在生物产品的生产中得到推广使用。

3. 分离纯化技术的快速发展时期

自 20 世纪 70 年代中期以来, 由于基因工程、酶工程、细胞工程、发酵工程及生化工程的迅速发展, 国际上也注意到了发展下游加工过程对现代生物技术及其产业化的重要性, 许多发达国家的生产企业纷纷加强研究力量, 增加投入, 组建专门研究机构, 不断推出一代又一代的新产品, 使得分离纯化技术得到迅速发展。

目前一些分离纯化技术如回收技术、细胞破碎技术、初步纯化技术、高度纯化技术、干燥与结晶技术等已达到工业应用水平。这些分离纯化技术和设备研究开发的成功, 使现代生物技术的发展取得重大突破, 胰岛素、乙肝疫苗和促红细胞生长素等一批基因工程和细胞工程产品陆续进入了工业化生产阶段, 一些传统发酵产品的经济效益也得到了显著提高。

1.3 生物分离与纯化的一般工艺流程

由于生物原料明显带有生物物质的特征, 因此分离与纯化工艺不能简单地应用化工单元操作。按照生产过程, 生物分离与纯化一般包括原料的选取和预处理、分离提取、精制和成品制作四个过程。

1. 原料的选取和预处理

生物分离与纯化应选取来源丰富的材料, 尽量做到一物多用, 综合利用。首先要根据目的产物的分布, 选择富含有效成分的生物品种。例如, 制备催乳素, 首先, 不要选用鱼类、禽类和微生物, 应以哺乳动物为材料; 其次, 要选择合适的组织器官, 如制备胃蛋白酶最好选用动物胃为原料, 免疫

球蛋白应从血液或富含血液的胎盘组织中提取；此外，生物的生长期也是选择材料需要考虑的因素，因为生长期对生物活性物质的含量影响很大，如凝乳酶只能用哺乳期的小牛、仔羊的第四胃为材料，胸腺素以幼年动物胸腺为原料。

原料的预处理主要用过滤、离心等固-液分离技术。过滤和离心相比，无论是投资费用还是运转费用，前者都小得多，因而首选方法应是过滤。但因发酵液中的不溶性固形物和菌体细胞都是柔性体，细胞个体很小，特别是细菌，过滤时形成的滤饼是高度可压缩的，所以容易造成过滤困难。因此，凝聚和絮凝等是生物原料固-液分离时常用的辅助手段。

2. 分离提取

提取也称为初步分离，其目的是利用制备目的物的溶解特性，将目的物与细胞的固形成分或其他结合成分分离，使其由固相转入液相或从细胞内的生理状态转入特定溶液环境的过程。

提取可以除去与产物性质差异较大的杂质，为纯化操作创造有利条件。提取可选用的技术较多，如萃取、固相析出、膜过滤、吸附等单元操作。

提取分为固-液提取和液-液提取两种。固-液提取包括浸渍（用冷溶剂溶出固体材料中的物质）与浸煮（用热溶剂溶于目的物）。液-液提取是将目的物从某一溶剂系统转入另一溶剂系统，即萃取。

3. 精制

精制也称为高度纯化，其目的是去除与目的产物的物理化学性质比较接近的杂质。通过采用对产物有高度选择性的技术，如色谱分离和结晶技术，从而获得高纯度的目的产物。

4. 成品制作

成品制作主要是根据产品的最终用途把产品加工成一定的形式。浓缩和干燥是成品制作常用的单元操作。

生物分离与纯化的一般工艺流程可用图 1-1 表示。

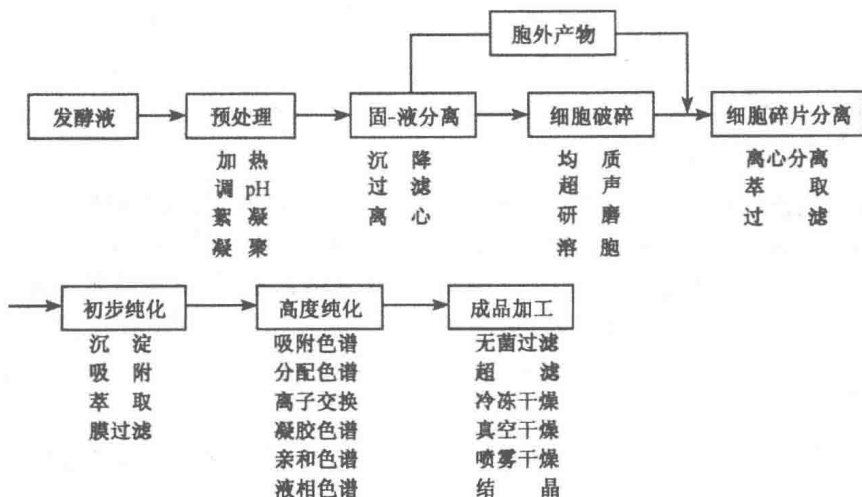


图 1-1 生物分离与纯化的一般工艺流程

1.4 生物分离与纯化技术的发展趋势

目前,生物分离与纯化技术的发展方向主要体现在以下几个方面。

1. 膜分离技术的推广应用

随着膜质量的不断改进以及膜装置性能的不断改善,膜分离技术被越来越多地应用于生物分离与纯化操作过程中。膜分离技术是未来的主要发展方向之一,它具有很多优点,如选择性好、分离效率高、节约能耗等。

2. 提高分离过程的选择性

分离过程的选择主要是应用分子识别与亲和作用来提高大规模分离技术的精度;利用生物亲和作用的高度特异性与其他分离技术相结合,形成新的亲和纯化技术。

3. 强化生物分离过程的研究

生物分离过程的优化可产生显著的经济效益,但目前大多数生物分离过程尚处于经验状态,对其分离机理尚缺乏足够的认识和理解。此外,分离过程还存在失活问题,且新的分离技术不断出现,这就使得准确描述和控制生物分离过程变得很困难。生物分离是一个交叉学科,需要综合运用化学、工程、生物、数学、计算机等多学科的工具和知识才能在该领域取得

突破和进展。

4. 新型分离介质的研制

分离介质的性能对提高分离效率起到关键的作用,特别是工业大生产,介质的机械强度是工艺设计时要考虑的重要因素。在色谱分离技术中,使用的凝胶和天然糖类为骨架的分离介质,由于其强度较弱,实现工业化的大规模生产还有一定的困难。因此,进行新型、高效的分离介质的研制是生物分离与纯化工艺改进的一个热点。

5. 生物工程上游技术与下游技术相结合

生物工程作为一个整体,上、中、下游要互相配合。为了利于目的产物的分离与纯化,上游的工艺设计应尽量为下游的分离与纯化创造有利条件。例如:

(1)设法使用生物催化剂将原来的胞内产物变为胞外产物或处于胞膜间隙。

(2)在细胞中高水平的表达形成细胞质内的包含体,在细胞破碎后,在低离心力下即能沉降,以便实现分离。

(3)减少非目的产物(如色素、毒素、降解酶和其他干扰性杂质等)的分泌。

(4)利用基因工程方法,使尿抑胃素接上几个精氨酸残基,使其碱性增强,从而容易被阳离子交换剂所吸附。

自从DNA重组人胰岛素问世以来,越来越多的生物医药产品不断涌现,生物分离与纯化技术在基因工程、酶工程、细胞工程、发酵工程和蛋白质工程方面的应用日益广泛。人们进一步研究和开发出高效、低成本的分
离与纯化技术,必将有助于推动生物技术产业的高速发展。

第 2 章 预处理技术

2.1 凝聚和絮凝技术

凝聚和絮凝技术是在料液中添加电解质,改变细胞、菌体和蛋白质等物质的分散状态,使其聚集成较大的颗粒,以便于提高过滤速率。另外,还能有效地除去杂蛋白质和固体杂质,提高滤液质量。常用于菌体细小而且黏度大的发酵液的预处理中。

2.1.1 凝聚技术

凝聚是指在某些电解质作用下,破坏细胞、菌体和蛋白质等胶体粒子表面所带的电荷,降低双电层电位,使胶体粒子聚集的过程。这些电解质称为凝聚剂。

1. 凝集原理

通常发酵液中细胞或菌体带有负电荷,由于静电引力的作用使溶液中带相反电荷的粒子(即正离子)被吸附在其周围,在其界面上形成了双电子层(图 2-1)。这种双电层的结构使胶粒之间不易聚集而保持稳定的分散状态。双电层的电位越高,电排斥作用越强,胶体粒子的分散程度也就越大,发酵液过滤就越困难。

2. 凝聚作用

所谓凝聚作用,是指向胶体悬浮液中加入某种电解质,在电解质中异电离子的作用下,胶粒的双电层电位降低,使胶体体系不稳定,胶体粒子间因相互碰撞而产生凝集的现象。

电解质的凝聚能力可用凝聚值来表示。根据 Schuze-Hardy 法则,反离子的价数越高,凝聚值就越小,即凝聚能力越强。阳离子对带负电荷的发酵液胶体粒子凝聚能力的次序为



常用的凝聚电解质有 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (明矾)、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 ZnSO_4 、石灰等。

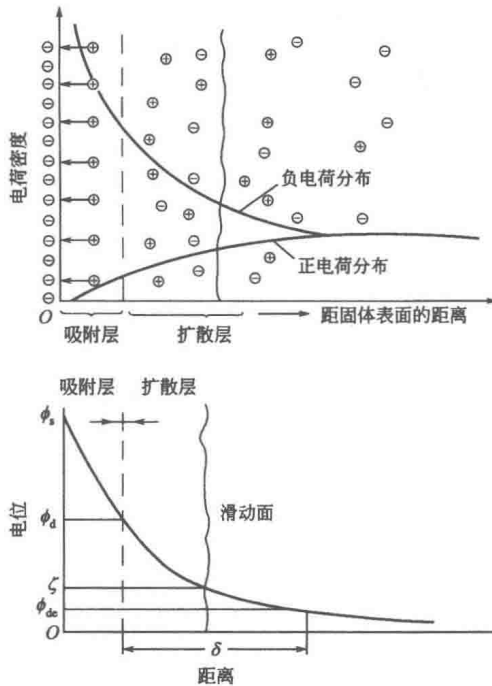


图 2-1 胶粒的双电子层结构

2.1.2 絮凝技术

絮凝是指使用絮凝剂(通常是天然或合成的大相对分子质量的物质),在悬浮粒子之间产生架桥作用而使胶粒形成粗大的絮凝团的过程。

1. 絮凝剂及絮凝作用

絮凝剂是一种能溶于水的高分子聚合物,其相对分子质量可高达数万,甚至 1000 万以上,具长链状结构,其链节上含有许多活性官能团,包括

带电荷的阴离子基团或阳离子基团以及不带电荷的非离子型基团。它们通过静电引力、范德华力或氢键的作用,强烈地吸附在胶粒的表面。当一个高分子聚合物的许多链节分别吸附在不同的胶粒表面上,产生架桥连接时,就形成了较大的絮团,这就是絮凝作用。

2. 对絮凝剂化学结构的一般要求

对絮凝剂化学结构的一般要求如图 2-2 所示。

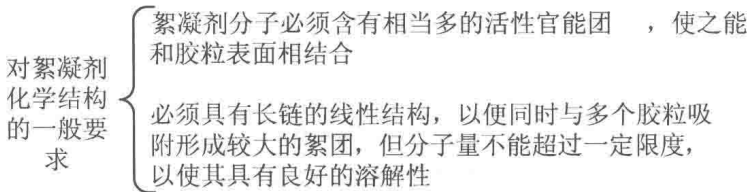


图 2-2 对絮凝剂化学结构的一般要求

3. 絮凝剂的分类及常用絮凝剂

根据絮凝剂活性基团在水中解离情况的不同,絮凝剂可分为非离子型、阴离子型和阳离子型三类。根据其来源的不同,工业上使用的絮凝剂又可分为三类,如图 2-3 所示。

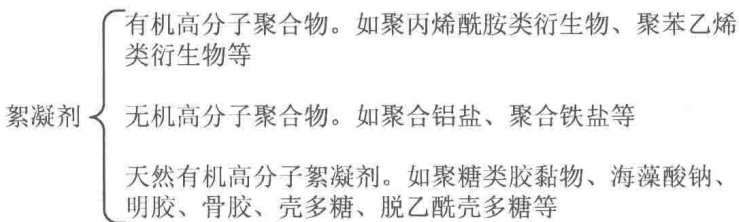


图 2-3 絮凝剂的分类

有机高分子聚合物是目前最为常用的絮凝剂。聚丙烯酰胺类絮凝剂的主要优点是用量少、絮凝体粗大、分离效果好、絮凝速度快等,但是其也有缺点,如阳离子型聚丙烯酰胺具有一定的毒性,因此不适宜应用于食品与医药行业,而随着近年来的发展,聚丙烯酸类阴离子絮凝剂是无毒的。

微生物絮凝剂是由微生物产生的具有絮凝细胞功能的物质,是一种新型絮凝剂。其主要成分是由高分子物质组成,如糖蛋白、黏多糖、纤维素及核酸等。与其他絮凝剂相比,微生物絮凝剂具有安全、无毒、无污染等特点,因此发展很快。

4. 絮凝的影响因素

(1)絮凝剂的相对分子质量。絮凝剂相对分子质量越大,链越长,吸附架桥作用就越明显。但随着相对分子质量的增大,絮凝剂在水中溶解度降低。因此,相对分子质量的选择要适当。

(2)絮凝剂的用量。料液中絮凝剂的浓度较低时,增加用量有助于架桥充分,絮凝效果提高,但用量过多反而会引起吸附饱和,在每个胶粒表面上形成覆盖层而失去与其他胶粒的架桥作用,使胶粒再次稳定,絮凝效果反而降低。

(3)溶液 pH。溶液 pH 的变化会影响离子型絮凝剂官能团的电离度,从而影响分子链的伸展形态。电离度增大,由于链节上相邻离子基团间的静电排斥作用,而使分子链从卷曲状态变为伸展状态,所以架桥能力提高。

(4)搅拌速度和时间。在加入絮凝剂初期,应高速搅拌,因为液体的湍动和剪切可使絮凝剂迅速分散,不致局部过浓。但接着应低速搅拌,这样有利于絮团形成和长大。如仍高速搅拌,高的剪切力会打碎絮团。因此,操作时搅拌转速和搅拌时间都应控制。

2.2 细胞破碎技术

在生物分离过程中,目的产物有些由细胞直接分泌到细胞外的培养液中,有些则在细胞培养过程中不能分泌到细胞外的培养液中,而保留在细胞内。动物细胞培养的产物,大多分泌在细胞外培养液中;微生物的代谢产物,有的分泌在细胞外,也有许多是存在于细胞内部;而植物细胞产物,多为胞内物质。分泌到细胞外的产物,用适当的溶剂可直接提取,而存在于细胞内的,需要在分离与纯化过程之前先收集细胞并将其破碎,使细胞内的目的产物释放到液相中,然后再进行提纯。细胞破碎就是采用一定的方法,在一定程度上破坏细胞壁和细胞膜,设法使细胞内产物最大程度的释放到液相中,破碎后的细胞浆液经固-液分离除去细胞碎片后,再采用不同的分离手段进一步纯化。可见,细胞破碎是提取胞内产物的关键步骤。

2.2.1 细胞壁的组成与结构

细胞壁的化学组成是非常复杂的,生物类型不同,其细胞壁组成不同,

同一生物处于不同生长阶段时,其细胞壁的组成也会发生变化。

1. 微生物细胞壁的组成与结构

(1)细菌细胞壁的组成。细菌的细胞壁由多糖链借短肽交联而成,具有网状结构,包围在细胞周围,使细胞具有一定的形状和强度(图 2-4)。细菌的细胞壁是由肽聚糖组成的一个难溶于水的大分子复合体。

革兰阳性细菌的细胞壁较厚,只有一层(20~80 nm),主要由肽聚糖组成,占细胞壁成分的 40%~90%,其余是多糖和胞壁酸。其肽聚糖结构为多层网状结构,其中 75%的肽聚糖亚单位相互交联,网格致密坚固。如图 2-4(a)所示。

革兰阴性细菌的细胞壁包括内壁层和外壁层。内壁层较薄(2~3 nm),由肽聚糖组成,占细胞壁成分的 10%左右;外壁层较厚(8~10 nm),主要由脂蛋白和脂多糖组成。革兰阴性菌细胞壁的肽聚糖为单层网状结构,它们只有 30%的肽聚糖亚单位彼此交联,故其网状结构不及革兰阳性细菌的坚固,显得比较疏松。如图 2-4(b)所示。

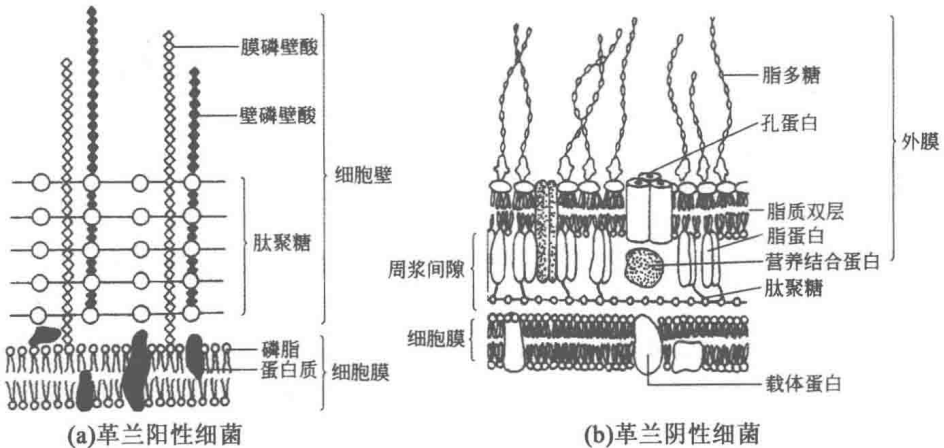


图 2-4 细菌细胞壁的组成与结构

(2)真菌细胞壁的组成。真菌细胞壁厚 100~300 nm,它占细胞干物质的 30%左右。细胞壁的主要成分为多糖,其次为蛋白质、类脂。在不同类群的真菌中,细胞壁多糖的类型不同。真菌细胞壁多糖主要有几丁质、纤维素、葡聚糖、甘露聚糖等,这些多糖都是单糖的聚合物,如几丁质就是由 N-乙酰葡萄糖胺分子,以 β -1,4-葡萄糖苷键连接而成的多聚糖。低等真菌的细胞壁成分以纤维素为主,酵母菌以葡聚糖为主,而高等真菌则以几丁质为主。一种真菌的细胞壁成分并不是固定的,在其不同的生长阶段,细胞壁的成分有明显不同。

1) 霉菌。霉菌的细胞壁主要存在三种聚合物:葡聚糖、几丁质和糖蛋白。最外层是 α -葡聚糖和 β -葡聚糖的混合物;第二层是糖蛋白的网状结构,葡聚糖与糖蛋白结合起来;第三层主要是蛋白质;最内层主要是几丁质,几丁质的微纤维嵌入蛋白质结构中。

2) 酵母菌。酵母菌细胞壁的主要成分是葡聚糖(30%~34%)、甘露聚糖(30%)、蛋白质(6%~8%)、脂类(8.5%~13.5%)。如图 2-5 所示,酵母细胞壁最里层是由葡聚糖的细纤维组成,最外层是甘露聚糖,由 1,6-磷酸二酯键共价连接,形成网状结构。在该层的内部,有甘露聚糖-酶的复合物,它可以共价连接到网状结构上,也可以不连接。

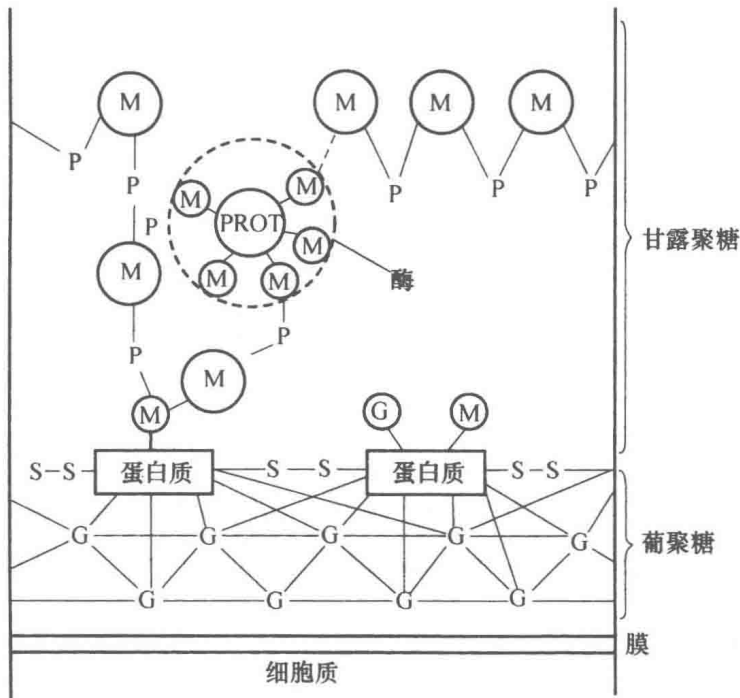


图 2-5 酵母菌细胞壁的组成与结构

2. 植物细胞壁的组成与结构

植物细胞壁主要组成成分包括多糖类(纤维素、半纤维素、果胶等)、蛋白类(结构蛋白、酶、凝聚素等)、多酚类(木质素等)和脂质化合物。较为普遍接受的植物细胞壁模型是经纬模型。该模型认为,细胞壁是由纤维素微纤丝和伸展蛋白质交织而成的网络,悬浮在亲水的果胶-半纤维素胶体中。纤维素微纤丝的排列方向与细胞壁平行,构成了细胞壁的“经”,伸展蛋白环绕在微纤丝周围,排列方向与细胞壁垂直,构成了细胞壁的“纬”,如