

---

# 第十二章

## 产物的提取与精制

---

# 第一节 概论

## 一、下游加工过程在发酵工程中的地位

### 1, 下游加工过程的定义

发酵产品系通过微生物发酵过程、酶反应过程或动植物细胞大量培养获得。从上述发酵液、反应液或培养液中分离、精制有关产品的过程称为下游加工过程(Down stream processing)。它由一些化学工程的单元操作组成,但由于生物物质的特性,有其特殊要求,而且其中某些单元操作一般化学工业中应用较少。

---

## 2, 地位

- 传统发酵工业(如抗生素、乙醇、柠檬酸), 分离和精制部份占整个工厂投资费用的60%。
- 对重组DNA发酵、精制蛋白质的费用可占整个生产费用的80%~90%。

---

## 二、发酵下游加工过程的特点

- 培养液(或发酵液)是复杂的多相系统，含有细胞、代谢产物和未用完的培养基等。分散在其中的固体和胶状物质，具可压缩性，其密度又和液体相近，加上粘度很大，属非牛顿性液体，使从培养液中分离固体很困难。
- 培养液中所欲提取的生物物质浓度很低，但杂质含量却很高，特别是利用基因工程方法产生的蛋白质常常伴有大量性质相近的杂质蛋白质。
- 另一个特点是欲提取的生物物质通常很不稳定、遇热、极端pH、有机溶剂会引起失活或分解。
- 发酵或培养都是分批操作、生物变异性大，各批发酵液不尽相同，要求下游加工有一定的弹性。

---

## 三、分离过程的机理与分离操作

### 1, 物理性质

- 力学性质：重力、离心力、筛分；
- 热力学性质：状态变化、相平衡；
- 传质性质：粘度、扩散、热扩散；
- 电磁性质：电泳、电渗析、磁化；

---

## 2, 化学性质

- 化学热力学：化学平衡；
- 反应动力学：反应速率；
- 光化学性质：激光激发、离子化；

---

### 3, 生物学性质

- 分子识别：生物亲和作用、生物学识别；
- 输送性质：生物膜输送；
- 反应、响应、控制：酶反应、免疫系统。



# 生物操作机理及其分离机理

| 单元操作  | 分离机理  | 分离对象举例   |
|---|---|--|
| 膜分离<br>微滤<br>超滤<br>反渗透<br>透析<br>电渗析<br>渗透气化       | 压力差、筛分<br>压力差、筛分<br>压力差、筛分<br>浓度差、筛分<br>电荷、筛分<br>汽液相平衡、筛分 | 菌体、细胞<br>蛋白质、多糖、抗生素<br>糖、氨基酸<br>盐、蛋白质<br>氨基酸、有机酸<br>乙醇 |
| 萃取<br>有机溶剂萃取<br>双水相<br>液膜萃取<br><br>反胶团萃取<br>超临界萃取 | 液液相平衡<br>液液相平衡<br>液液相平衡<br><br>液液相平衡<br>相平衡               | 有机酸、抗生素<br>蛋白质、抗生素<br>氨基酸、有机酸、抗生素<br>氨基酸、蛋白质<br>香料、脂质  |



| 单元操作  | 分离机理   | 分离对象举例  |
|---|--|---|
| 层析 凝胶过滤层析<br>反相层析<br>离子交换层析<br><br>亲和层析<br>疏水相互作用<br>层析聚焦 | 浓度差、筛分<br>分配平衡<br>电荷、浓度差<br><br>生物亲和作用<br>疏水作用<br>电荷、浓度差 | 脱盐、分子分级<br>甾醇、维生素、肽<br>蛋白质、氨基酸、抗生素、核酸、有机酸<br>蛋白质、核酸<br>蛋白质<br>蛋白质 |
| 电泳 凝胶电泳<br>等电点电泳<br>等速电泳<br>区带电泳                          | 筛分、电荷<br>筛分、电荷、浓度差<br>筛分、电荷、浓度差<br>筛分、电荷、浓度差             | 蛋白质、核酸<br>蛋白质、氨基酸<br>蛋白质、氨基酸<br>蛋白质、核酸                            |
| 离心 离心过滤<br>离心沉降<br><br><del>超离心</del>                     | 离心力、筛分<br>离心力<br><br><del>离心力</del>                      | 菌体、菌体碎片<br>菌体、细胞<br><br><del>蛋白质、核酸、糖类</del>                      |

---

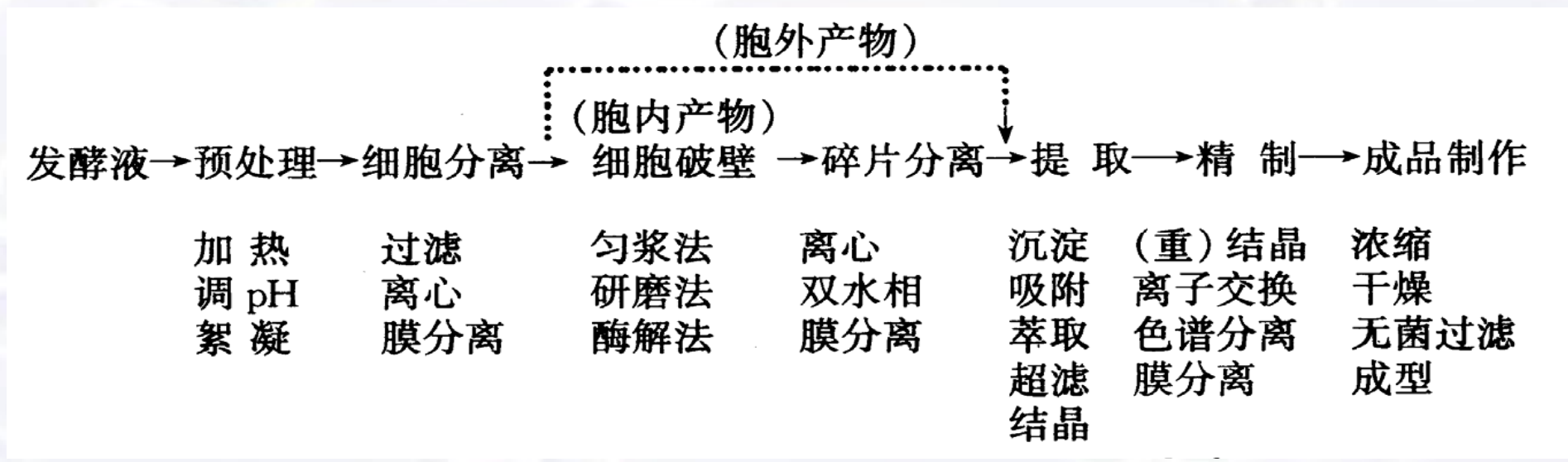
#### 四、发酵工业下游技术的一般工艺过程

- 下游加工过程由各种化工单元操作组成。

由于生物产品品种多，性质各异，故用到的单元操作很多，其中如蒸馏、萃取、结晶、吸附、蒸发和干燥等属传统的单元操作，理论比较成熟，而另一些则为新近发展起来的单元操作，如细胞破碎、膜过程和色层分离等，缺乏完整的理论，介于两者之间的有离子交换过程等。

# 1, 一般工艺过程

- 一般说来, 下游加工过程可分为4个阶段: 培养液(发酵液)的预处理和固液分离; 初步纯化(提取); 高度纯化(精制); 成品加工。



---

## 2, 工艺过程的划分:

- 预处理和固液分离：目的是除去发酵液中的菌体细胞和不溶性固体杂质。
- 初步分离：目的是除去与产物性质差异较大的杂质，为后道精制工序创造有利条件
- 高度纯化：去除与产物的物理化学性质比较接近的杂质。
- 成品制作：成品形式由产品的最终用途决定。

---

### 3, 选择下游加工工艺的原则:

- 是胞内产物还是胞外产物
- 原料中产物和主要杂质浓度
- 产物和主要杂质的物理化学特性及差异
- 产品用途和质量标准
- 产品的市场价格
- 废液的处理方法等

---

## 第二节 发酵液的预处理和固液分离

### 目 的

- 分离菌体和其他悬浮颗粒(细胞碎片、核酸和蛋白质的沉淀物);
- 除去部分可溶性杂质和改变滤液性质，以利于提取和精制的顺利进行。

---

# 一、发酵液的预处理

- 采用理化方法设法增大悬浮液中固体粒子的大小、或降低粘度，以利于过滤。
- 去除会影响后续提取的高价无机离子。



---

# 预处理的方法

- 1, 高价无机离子的去除方法
- 2, 杂蛋白质的去除
- 3, 发酵液的凝聚和絮凝

---

## 1, 高价无机离子的去除方法

- 钙离子, 可用草酸。
- 镁离子, 可用三聚磷酸钠, 它和镁离子形成可溶性络合物, 用磷酸盐处理, 也能大大降低钙离子和镁离子的浓度。此法可用于环丝氨酸的提取。
- 铁离子, 可加入黄血盐, 使形成普鲁士蓝沉淀。

---

## 2, 杂蛋白质的去除方法

- 热变性
- 沉淀
- 大幅度改变pH

---

### 3, 发酵液的凝聚和絮凝

#### 机 理

- 电解质将胶体粒子表面上的电荷中和，减少存在于胶体粒子间的静电斥力，使伦敦·范德华(London—Vander waals)吸引力占优势，这样胶体就会凝聚成较大、较密实的粒子，或在某些高分子絮凝剂存在下，基于架桥作用，使胶粒形成粗大的絮凝团使之更容易过滤。

#### 方 法

- 在稀溶液中加入电解质以促进凝聚和絮凝。试剂包括酸、碱、简单电解质和合成的高分子电解质。

#### 常用的絮凝剂

- 聚丙烯酰胺、聚乙烯亚胺、聚胺衍生物、氯化钙、磷酸氢二钠

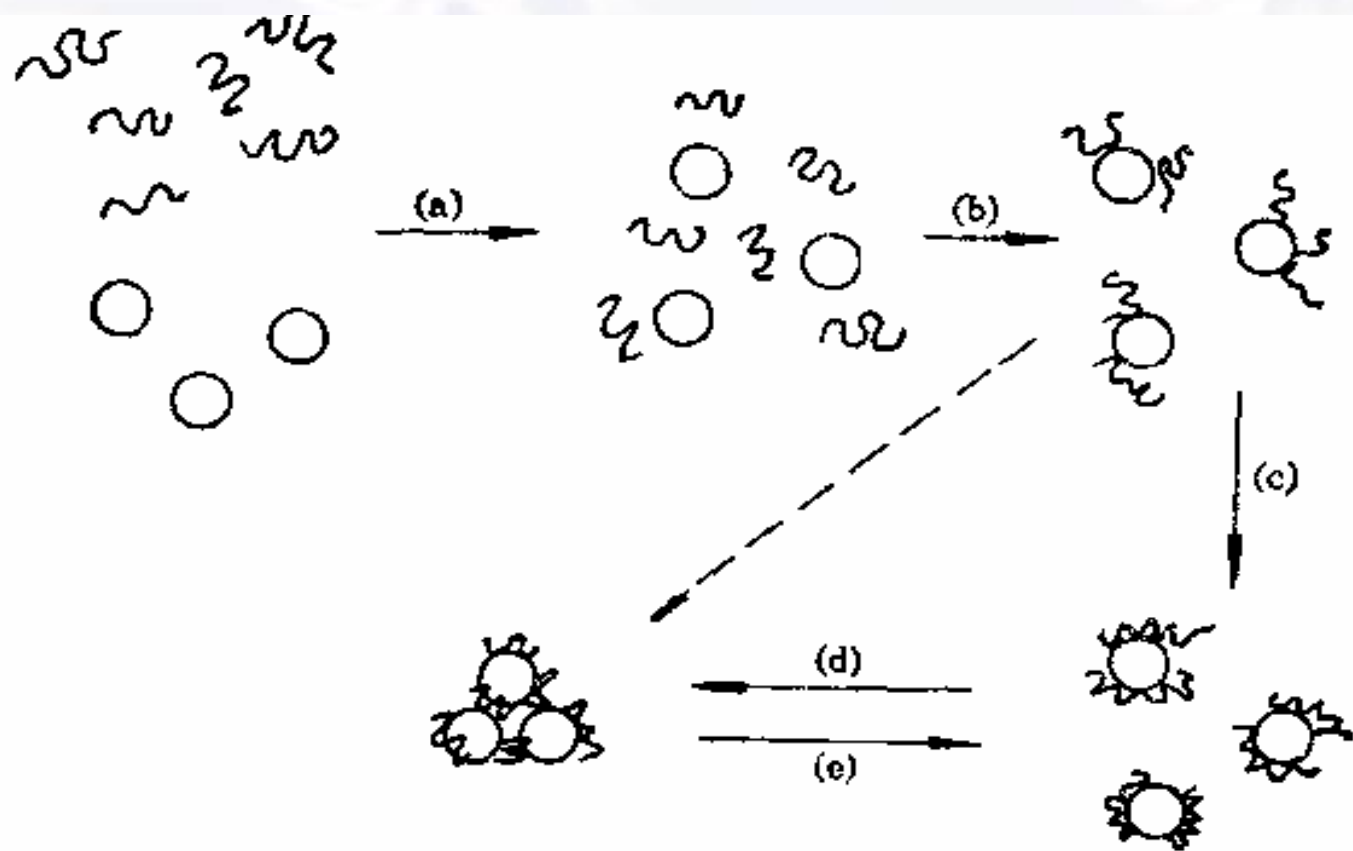


图 14-2 高分子絮凝剂的混和、吸附和絮凝作用示意图

- (a) — 聚合物分子在液相中分散、均匀分布在粒子之间;
- (b) — 聚合物分子链在粒子表面的吸附;
- (c) — 被吸附链的重排, 高分子链包围在胶粒表面, 产生保护作用, 是架桥作用的平衡构象;
- (d) — 脱稳粒子互相碰撞, 形成架桥絮凝作用;
- (e) — 絮团的打碎

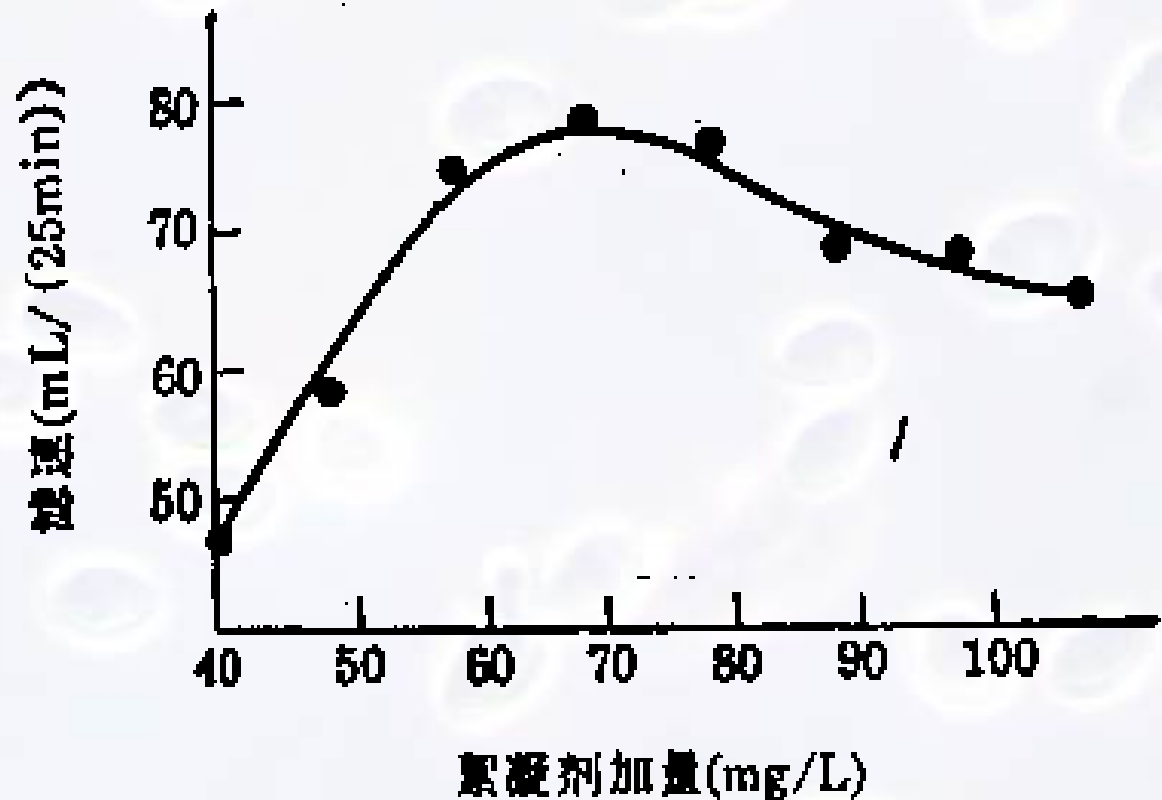
---

# 影响絮凝的因素

- 絮凝剂的添加量
- 发酵液的pH
- 絮凝剂的分子量
- 搅拌转速
- 搅拌时间

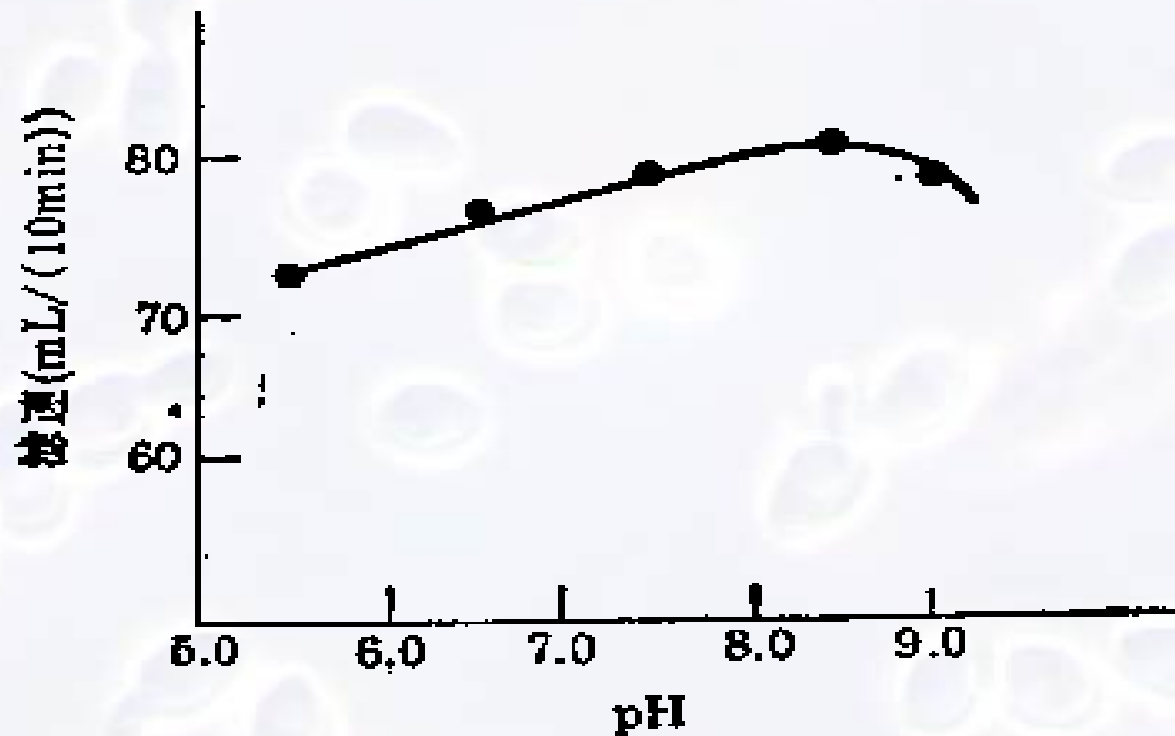
## 絮凝剂加量对絮凝效果(滤速)的影响

料液中，絮凝剂浓度增加有助于架桥充分，但是过多的加量反而会引起吸附饱和，在每个胶粒上形成覆盖层而使胶粒产生再次稳定现象。





发酵液pH对阴离子聚丙烯酰胺絮凝效果的影响  
溶液pH的变化常会影响离子型絮凝剂中功能团的电离度，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。



- 
- 絮凝技术预处理发酵液的优点不仅在于过滤速度的提高，还在于能有效地去除杂蛋白质和固体杂质，如菌体、细胞和细胞碎片等，提高了滤液质量

---

## 二、 发酵液的过滤

- 微生物发酵液中含有大量菌体、细胞或细胞碎片以及残余的固体培养基成分。过滤就是将悬浮在发酵液中的固体颗粒与液体进行分离的过程。
- 在过滤操作中，要求滤速快，滤液澄清并且有高的收率。

---

# 1，影响过滤速度的因素

过滤速度和以下因素有关

- 菌种。
- 发酵条件。
  - 培养基的组成
  - 未用完培养基的数量
  - 消沫油
  - 发酵周期

---

# 菌种对过滤速度影响

- 真菌的菌丝比较粗大，如青霉菌的菌丝直径可达 $10\ \mu\text{m}$ ，发酵液容易过滤，不需特殊处理。其滤渣呈紧密饼状物，很容易从滤布上刮下来，故可采用鼓式真空过滤机过滤。
- 放线菌发酵液菌丝细而分枝，交织成网络状。如链霉素发酵液菌丝仅 $0.5\sim 1.0\ \mu\text{m}$ 左右，还含有很多多糖类物质，粘性强，过滤较困难，一般需经预处理，以凝固蛋白质等胶体。
- 细菌发酵液的菌体更细小，因此，过滤十分困难，如不用絮凝等方法预处理发酵液，往往难以采用常规过滤的设备来完成过滤操作。

---

# 培养基的组成对过滤速度影响

- 用黄豆粉、花生粉作氮源、淀粉作碳源会使过滤困难；
- 发酵后期加消泡油或剩余大量未用完的培养基也会使过滤困难。

---

# 发酵周期对过滤的影响

- 正确选择发酵终止时间对过滤影响很大。在菌体丝自溶前必须放罐，因为细胞自溶后的分解产物一般很难过滤。有时延长发酵周期虽能使发酵单位有所提高，但严重影响发酵液质量，使色素和胶状杂质增多、过滤困难，最终造成成品质量降低。



---

## 2, 改善过滤性能的方法

- 等电点
- 蛋白质变性
- 吸附
- 凝聚和絮凝
- 加入助滤剂
- 直接在发酵液中形成填充-凝固剂
- 酶解作用

---

# 过滤助剂

- 助滤剂是一种不可压缩的多孔微粒，它能使滤饼疏松，滤速增大。
- 过滤助剂可解决两个问题
  - 滤饼的可压缩性问题
  - 小粒子如菌丝碎片和细菌细胞，会渗入到转鼓真空过滤预覆盖层内部。使得预覆盖层的部分孔被堵塞，影响了渗透性。加入助滤剂可以解决这一问题
- 常用的过滤助剂  
硅藻土、珍珠岩、磨碎的木浆、淀粉

- 
- 助滤剂的加入有两种方法：
    - 在滤布上预先铺一层助滤剂(1~2mm)，该方法，会使滤速降低，但滤液透明度高。
    - 直接加入发酵液中（助滤剂的用量，有一条经验规则可供参考，即助滤剂用量若等于悬浮液中固体含量时，滤速最快。）。

## 填充-凝固剂

- 改善过滤性能较好的方法是加入一些反应剂，它们能相互作用，或和某些溶解性盐类发生反应生成不溶解的沉淀( $\text{CaSO}_4$ ， $\text{AlPO}_4$ 等)。生成的沉淀能防止菌丝体粘结，使菌丝具有块状结构，沉淀本身既可作为助滤剂，并且还能使胶状物和悬浮物凝固，如新生霉素发酵液中加入氯化钙和磷酸钠，生成的磷酸钙可作为填充-凝固剂。一方面作为助滤剂，另一方面还可使某些蛋白质凝固。正确选择反应剂和反应条件，能使过滤速度提高3~10倍。

---

# 酶解作用

- 如发酵液中有不溶解的多糖存在则最好用酶将它转化为单糖，以提高过滤速度。例如万古霉素用淀粉作培养基，加入淀粉酶后，能使过滤速度加快。

---

## 3，固-液分离设备的选择

- 不同性状的发酵液应选择不同的固-液分离设备。常用于发酵液的分离设备有：
  - ✓ 板框压滤机
  - ✓ 鼓式真空过滤机
  - ✓ 离心沉降分离机



## • 板框压滤机

### ✓ 优点:

- 板框压滤机的过滤面积大;
- 过滤推动力(压力差)能较大幅度地进行调整,并能耐受较高的压力差;
- 结构简单,价格低,
- 动力消耗少等优点。

### ✓ 缺点

- 不能连续操作,设备笨重,劳动强度大,
- 卫生条件差,
- 非生产的辅助时间长,阻碍了过滤效率的提高。

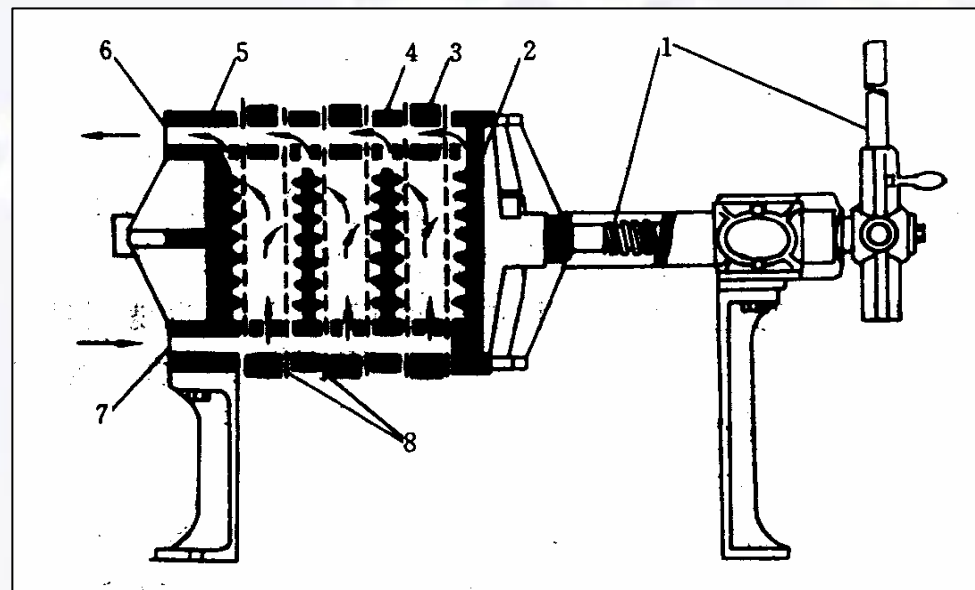


图 4-20 板框压滤机

1——压紧装置 2——可动头 3——滤框 4——滤板 5——固定头  
6——滤液出口 7——滤浆进口 8——滤布





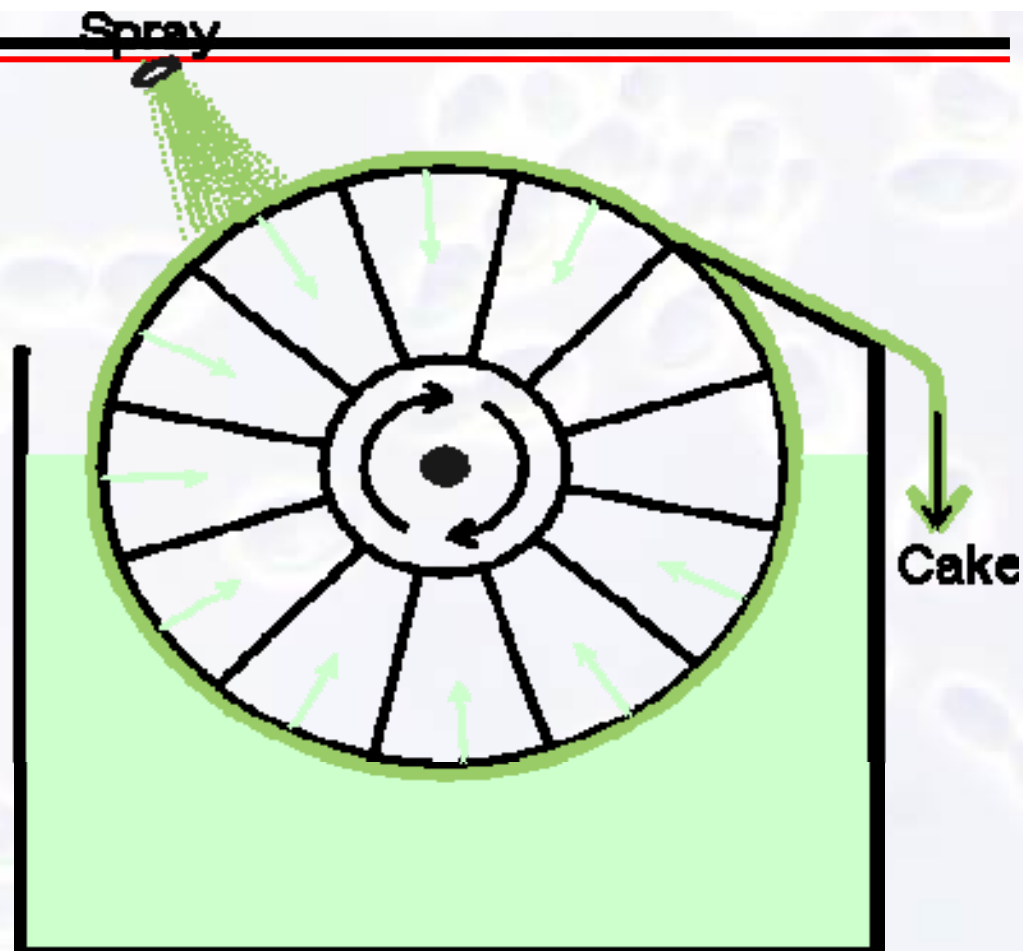
- 鼓式真空过滤机

- ✓ 优点

- 能连续操作，
- 能实现自动化控制

- 缺点

- 压差较小，主要适用于霉菌发酵液的过滤



- 离心分离
- 优点
  - 分离速度快，效率高，
  - 操作时卫生条件好等优点，
  - 适合于大规模的分选过程。
- 缺点
  - 投资费用高，
  - 能耗较大。

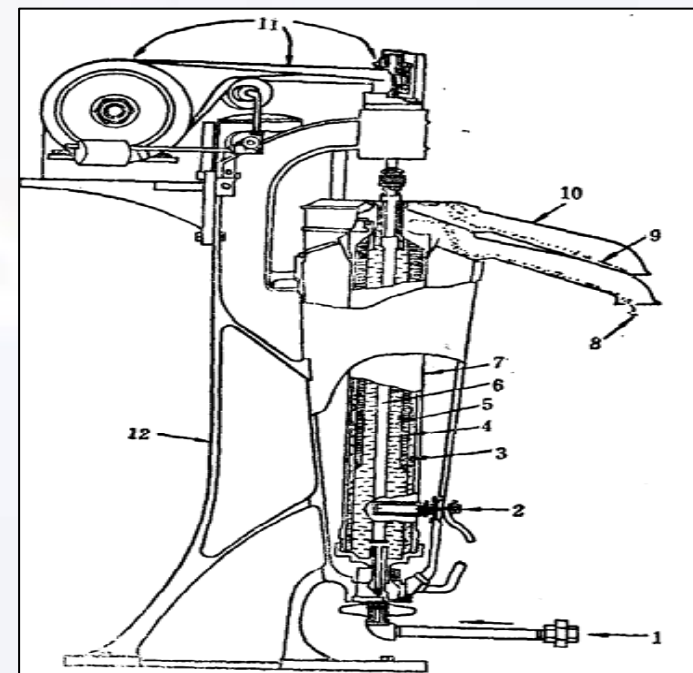
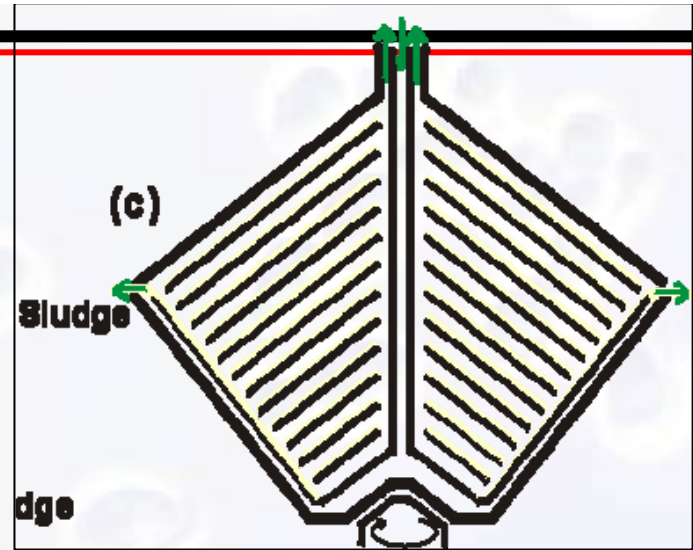


图 3-32 管式超速离心机  
 1—液体进口；2—制动器；3—重液；4—固体；  
 5—轻液；6—空气；7—转鼓（管）；8—重液出口；  
 9—轻液出口；10—出口盖；11—带动机构；  
 12—机架

---

## 三、微生物细胞的破碎

- 微生物的代谢产物有的分泌到细胞或组织之外，例如细菌产生的碱性蛋白酶，霉菌产生的糖化酶等，称为胞外产物。
- 还有许多是存在于细胞内，例如青霉素酰化酶，碱性磷酸酯酶等，称为胞内产物。
- 对于胞外产物只需直接将发酵液预处理及过滤，获得澄清的滤液，作为进一步纯化的出发原液，
- 对于胞内产物，则需首先收集菌体进行细胞破碎，使代谢产物转入液相中，然后，再进行细胞碎片的分离。

表 4-1 各种微生物细胞壁的结构与组成

| 微生物   | 革兰氏阳性细菌  | 革兰氏阴性细菌   | 酵母菌   | 霉菌                            |
|-------|--|---|---|-------------------------------|
| 壁厚/nm | 20~80  | 10~13   | 100~300   | 100~250                       |
| 层次    | 单层   | 多层  | 多层  | 多层                            |
| 主要组成  | 肽聚糖<br>(40%~90%)<br>多糖<br>胞壁酸<br>蛋白质<br>脂多糖<br>(1%~4%) | 肽聚糖<br>(5%~10%)<br>脂蛋白<br>脂多糖<br>(11%~22%)<br>磷脂<br>蛋白质 | 葡聚糖<br>(30%~40%)<br>甘露聚糖<br>(30%)<br>蛋白质<br>(6%~8%)<br>脂类<br>(8.5%~13.5%) | 多聚糖<br>(80%~90%)<br>脂类<br>蛋白质 |

---

## 4, 微生物细胞的破碎技术

- 机械方法
  - 球磨机
  - 高压匀浆器
  - X-press法
  - 超声波破碎
- 非机械方法
  - 酶解
  - 渗透压冲击
  - 冻结和融化
  - 干燥法
  - 化学法

---

- 球磨机

研磨是常用的一种方法，它将细胞悬浮液与玻璃小珠、石英砂或氧化铝一起快速搅拌或研磨，使达到细胞的某种程度破碎。这些装置的主要缺点是在破碎期间样品温度迅速升高，通过用二氧化碳来冷却容器可得到部分解决。



- 高压匀浆器

采用高压匀浆器是大规模破碎细胞的常用方法，利用高压迫使细胞悬浮液通过针形阀，由于突然减压和高速冲击撞击环造成细胞破裂

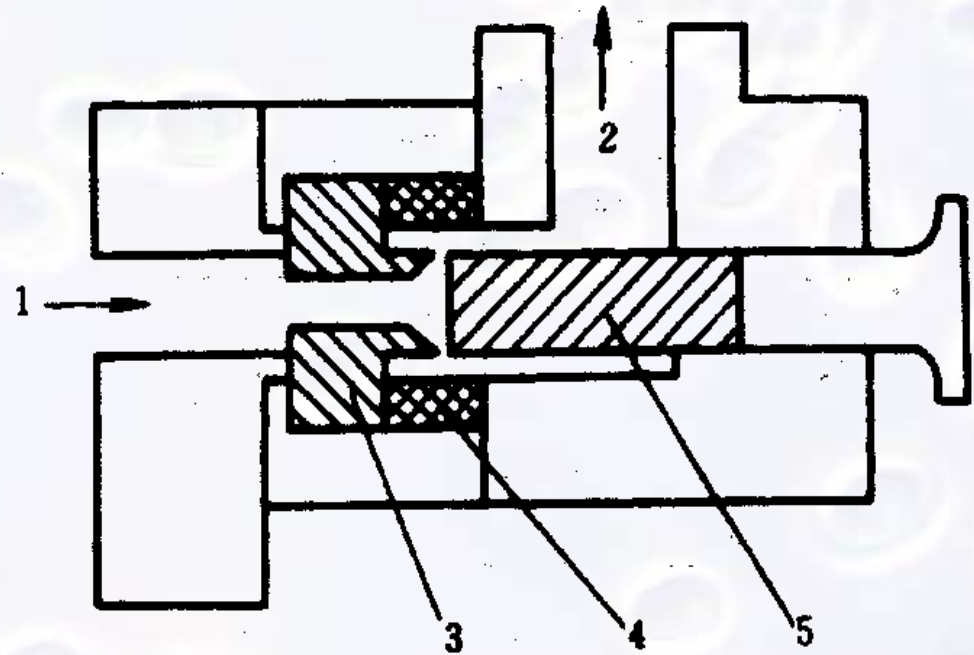


图 4-3 高压匀浆阀结构示意图

1—细胞悬浮液 2—加工后的细胞匀浆液

3—阀座 4—碰撞环 5—阀杆

高压匀浆的排出阀



表 15-1 各种菌体一次通过高压匀浆器的破碎率

| 菌 体                    | 压 力(MPa) | 破碎率(%) |
|------------------------|----------|--------|
| 面包酵母 <sup>[15]</sup>   | 53       | 62     |
| 啤酒酵母 <sup>[16]</sup>   | 55       | 61     |
| 大肠杆菌 <sup>[17]</sup>   | 53       | 67     |
| 解脂假丝酵母 <sup>[18]</sup> | 55       | 43     |

---

- X-press法

- ✓ 一种改进的高压方法是将浓缩的菌体悬浮液冷却至 $-25^{\circ}\text{C}$ 至 $-30^{\circ}\text{C}$ 形成冰晶体，利用500 MPa以上的高压冲击，冷冻细胞从高压阀小孔中挤出。细胞破碎是由于冰晶体的磨损，包埋在冰中的微生物的变形所引起的。
- ✓ 该法的优点是适用的范围广，破碎率高，细胞碎片的粉碎程度低以及活性的保留率高，
- ✓ 该法对冷冻-融解敏感的生化物质不适用。

---

- 超声波法

- ✓ 细胞的破碎是由于超声波的空穴作用，从而产生一个极为强烈的冲击波压力，由它引起的粘滞性旋涡在介质中的悬浮细胞上造成了剪切应力，促使细胞内液体发生流动，从而使细胞破碎。
- ✓ 对于不同菌种的发酵液、超声波处理的效果不同，杆菌比球菌易破碎、革兰氏阴性菌细胞比革兰氏阳性菌细胞容易破碎，对酵母菌的效果极差。
- ✓ 该法不适于大规模操作，因为放大后，要输入很高的能量来提供必要的冷却，这是困难的。

---

- 酶解法

- ✓ 利用酶反应，分解破坏细胞壁上特殊的键，从而达到破壁的目的。
- ✓ 优点：专一性强，发生酶解的条件温和。
- ✓ 缺点：酶水解费用较贵，一般只适用于小规模的研究。
- ✓ 溶菌酶是应用最多的酶，它能专一地分解细胞壁上糖蛋白分子的  $\alpha$ -1, 4糖苷键，使脂多糖解离，经溶菌酶处理后的细胞移至低渗溶液中使细胞破裂。

- 
- 自溶作用
    - ✓ 是酶解的另一种方法，所需溶胞的酶是由微生物本身产生的。
    - ✓ 影响自溶过程的因素有温度、时间、pH缓冲液浓度、细胞代谢途径等。
    - ✓ 自溶法在一定程度上能用于工业规模，但是，对不稳定的微生物容易引起所需蛋白质的变性，自溶后的细胞培养液过滤速度也会降低。

---

- 渗透压冲击

- ✓ 是较温和的一种破碎方法，将细胞放在高渗透压的介质中(如一定浓度的甘油或蔗糖溶液)，入达到平衡后，介质被突然稀释，或者将细胞转入水或缓冲液中，由于渗透压的突然变化，水迅速进入细胞内，引起细胞壁的破裂。
- ✓ 渗透压冲击的方法仅对细胞壁较脆弱的菌，或者细胞壁预先用酶处理，或合成受抑制而强度减弱时才是合适的。



---

- 冻结-融化法

- ✓ 将细胞放在低温下突然冷冻和室温下融化，反复多次而达到破壁作用。
- ✓ 对于细胞壁较脆弱的菌体，可采用此法。但通常破碎率很低即使反复循环多次也不能提高收率。另外，还可能引起对冻融敏感的某些蛋白质的变性。



---

- 干燥法

- ✓ 可采用空气干燥，真空干燥，喷雾干燥和冷冻干燥等。
- ✓ 空气干燥主要适用于酵母菌。真空干燥适用于细菌的干燥。冷冻干燥适用于较不稳定的生化物质。
- ✓ 干燥法条件变化较剧烈，容易引起蛋白质或其它组织变性。

---

- 化学法

- ✓ 用酸碱及表面活性剂处理，可以使蛋白质水解，细胞溶解或使某些组分从细胞内渗漏出来。
- ✓ 某些脂溶性溶剂也能作为化学处理的方法，如丁醇、丙酮、氯仿及尿素等。但是，这些试剂容易引起生化物质破坏，还会带来分离和回收化学物质的问题。

表 4-2

细胞破碎方法分类

| 分 类              | 作 用 机 理   | 适 应 性                                       |
|------------------|-----------|---|
| 机<br>械<br>法      | 珠磨法       | 固体剪切作用<br>可达较高破碎率，可较大规模操作，大分子目的产物易失活，浆液分离困难 |
|                  | 高压匀浆法     | 液体剪切作用<br>可达较高破碎率，可大规模操作，不适合丝状菌和革兰氏阳性菌      |
|                  | 超声破碎法     | 液体剪切作用<br>对酵母菌效果较差，破碎过程升温剧烈，不适合大规模操作        |
|                  | X-press 法 | 固体剪切作用<br>破碎率高，活性保留率高，对冷冻敏感目的产物不适应          |
| 非<br>机<br>械<br>法 | 酶溶法       | 酶分解作用<br>具有高度专一性，条件温和，浆液易分离，溶酶价格高，通用性差      |
|                  | 化学渗透法     | 改变细胞膜的渗透性<br>具一定选择性，浆液易分离，但释放率较低，通用性差       |
|                  | 渗透压法      | 渗透压剧烈改变<br>破碎率较低，常与其他方法结合使用                 |
|                  | 冻结融化法     | 反复冻结-融化<br>破碎率较低，不适合对冷冻敏感的目的产物              |
|                  | 干燥法       | 改变细胞膜渗透性<br>条件变化剧烈，易引起大分子物质失活               |

---

# 破碎方法的选择

- 选择合适的破碎方法需要考虑下列因素：
  - 细胞的数量；
  - 所需要的产物对破碎条件(温度、化学试剂、酶等)的敏感性；
  - 要达到的破碎程度及破碎所必要的速度，
  - 尽可能采用最温和的方法；
  - 具有大规模应用潜力的生化产品应选择适合于放大的破碎技术。

---

## 第三节 沉淀法

- 沉淀法是最古老的分离和纯化生物物质的方法。由于其浓缩作用常大于纯化作用，因而沉淀法通常作为初步分离的一种方法，用于从去除了菌体或细胞碎片的发酵液中沉淀出生物物质，然后再利用色层分离等方法进一步提高其纯度。
- 沉淀法由于成本低、收率高(不会使蛋白质等大分子失活)、浓缩倍数高和操作简单等优点，是下游加工过程中应用广泛的值得注意的方法。

- 
- 根据所加入的沉淀剂的不同，沉淀法可以分为：
    - ✓ 盐析法；
    - ✓ 等电点沉淀法；
    - ✓ 有机溶剂沉淀法；
    - ✓ 非离子型聚合物沉淀法；
    - ✓ 聚电解质沉淀法；
    - ✓ 高价金属离子沉淀法。

---

## 第四节 吸附法

- 在发酵工业的下游加工过程中，吸附法应用于发酵产品的除杂、脱色、有毒物质和抗生素的提纯精制。



---

# 一、吸附法的原理

- 吸附法是利用吸附剂与杂质、色素物质、有毒物质、产品之间分子引力的差异，从而起到分离的作用。

---

## 二、吸附的目的

- 将产品吸附浓缩于吸附剂上；
- 将杂质、色素等需要从发酵液中去除的物质吸附于吸附剂上。

---

## 三、吸附法的优缺点

- 优点：
  - 可不用或少用有机溶剂；
  - 操作简便、安全、设备简单；
  - 生产过程中pH变化小，适用于稳定性较差的生化物质。
- 缺点：
  - 吸附法选择性差、收率不高。
  - 无机吸附剂性能不稳定，不能连续操作，劳动强度大。
  - 炭粉等吸附剂影响环境卫生。
- 凝胶类吸附剂、大网格聚合物吸附剂

---

## 四、吸附的类型

- 物理吸附：吸附剂和吸附物通过分子力(范德华力)产生的吸附。
- 化学吸附：化学吸附是由于吸附剂在吸附物之间的电子转移，发生化学反应而产生的，属于库仑力范围。
- 交换吸附：吸附剂表面如为极性分子或离子所组成则它会吸引溶液中带相反电荷的离子而形成双电层。这种吸附又称为极性吸附。

表 21-1 物理吸附与化学吸附的特点

| 项 目   | 物 理 吸 附     | 化 学 吸 附    |
|-------|-------------|------------|
| 作用力   | 范德华力        | 化学键力       |
| 吸附热   | 较小，接近液化热    | 较大，接近反应热   |
| 选择性   | 几乎没有        | 有选择性       |
| 吸附速度  | 较快，需要的活化能很小 | 慢，需要一定的活化能 |
| 吸附分子层 | 单分子或多分子层    | 单分子        |

---

## 五、吸附剂的基本要求

- 吸附剂要求颗粒密度小，表面积大，但孔隙也不能太多，否则被吸附物质不易被洗脱。
- 吸附剂的颗粒大小要均匀。
- 吸附剂的吸附能力要大，但不能影响洗脱。

---

## 六、吸附剂的种类

- 疏水或非极性吸附剂（活性炭）
- 亲水或极性吸附剂（硅胶、氧化铝）
- 离子交换树脂吸附剂



---

# 七、影响吸附过程的因素

## 1, 吸附剂的性质

吸附剂的理化性质对吸附的影响很大。吸附剂的性质与其原料、合成方法和再生条件有关。一般要求吸附容量大，吸附速度快和机械强度高。

- 吸附剂的吸附容量除其它外界条件外，主要与比表面积有关。比表面大，空隙度高，吸附容量就越大。
- 吸附速度主要与颗粒度和孔径分布有关，颗粒度越小，吸附速度就越快，但压头损失要增大。孔径适当，有利于吸附物向空隙中扩散。
- 吸附剂的机械强度则影响其使用寿命。

---

## 2, 吸附物的性质

有下列一些规则可用来预测吸附的相对量。

- 能使表面张力降低的物质, 易为表面吸附;
- 溶质从较易溶解的溶剂中吸附时, 吸附量较少。
- 极性吸附剂易吸附极性物质, 非极性吸附剂易吸附非极性物质。
- 对于同系列物质, 吸附量的变化是有规则的。如按极性减小的次序排列, 次序越在后面的物质, 极性越差, 因而越易为非极性吸附剂所吸附而越难为极性吸附剂所吸附。

---

### 3, 溶液pH值的影响

pH值影响某些化合物的离解度。

### 4, 温度的影响

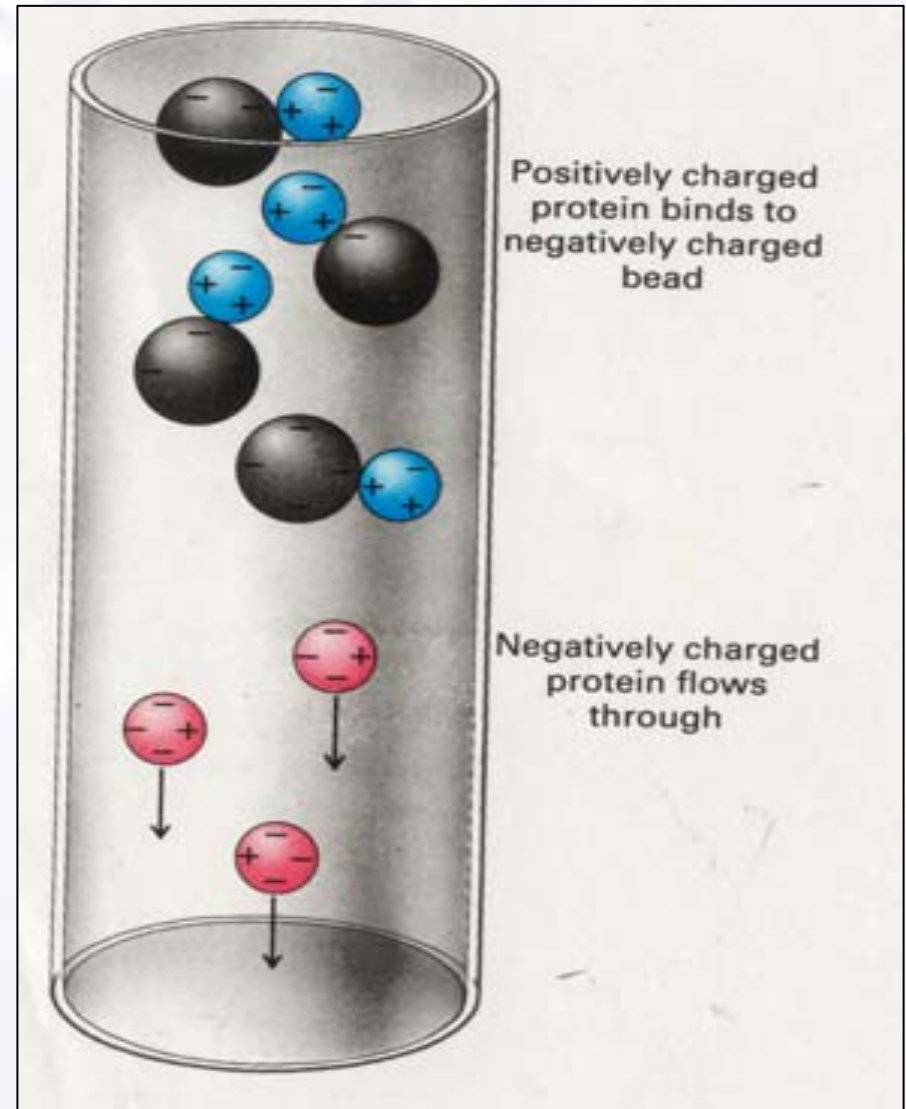
吸附热越大, 则温度对吸附的影响越大。

### 5, 其它组分的影响

当从含有两种以上组分的溶液中吸附时, 根据溶质的性质可以互相促进, 干扰或互不干扰。一般说来, 对混合物的吸附较纯物质的吸附为差。

## 第五节 离子交换法

- 离子交换作用：是指一个溶液中的某一种离子与一个固体中的另一种具有相同电荷的离子互相调换位置，即溶液中的离子跑到固体上去，把固体上的离子替换下来。这里溶液称流动相，而固体称固定相。
- 蛋白质、氨基酸、核酸、酶、抗生素。



# 一、基本原理

- 离子交换剂通常是一种不溶性高分子化合物，它的分子中含有可解离的基团，这些基团在水溶液中能与溶液中的其它阳离子或阴离子起交换作用。
- 交换反应都是平衡反应，但在层析柱上进行时，由于连续添加新的交换溶液，平衡不断按正方向进行，所以可以把离子交换剂上的原子离子全部洗脱下来，同时溶液中的离子全部被交换并吸附在树脂上。
- 如果有两种以上的成分被交换吸着在离子交换剂上，用洗脱液洗脱时，其被洗脱的能力则决定于各自洗脱反应的平衡常数。
- 离子交换过程有两个阶段——吸附和解吸附。吸附在离子交换剂上的物质可以通过改变pH使吸附的物质失去电荷而达到解离但更多的是通过增加离子强度，使加入的离子与被吸附物质竞争离子交换剂上的电荷位置，使被吸附物质与离子交换剂解开。不同物质与离子交换剂之间形成电键数目不同，即亲和力大小有差异，因此只要选择适当的洗脱条件便可将混合物中的组分逐个洗脱下来，达到分离纯化的目的。



---

## 二、离子交换剂的分类

- 阳离子交换剂:磺酸( $-\text{SO}_3\text{H}$ )、磷酸( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ )、羧酸( $-\text{COOH}$ )和酚羟基( $-\text{OH}$ )
  - 强酸型
  - 中酸型
  - 弱酸型
- 阴离子交换剂:伯胺、( $-\text{NH}_2$ )、仲胺( $-\text{NHCH}_3$ )、叔胺[ $\text{N}-(\text{CH}_3)_2$ ]和季胺[ $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]
  - 强碱性
  - 中碱性
  - 弱碱性

- 
- 两性离子交换剂
  - 选择性离子交换剂
  - 吸附树脂
  - 电子交换树脂



---

## 三、影响离子交换速度的因素

- 树脂颗粒的大小；
- 树脂的交联度；
- 溶液中离子浓度；
- 温度；
- 离子的大小；
- 离子价；
- 树脂强弱。

---

## 四、离子交换的操作方式

- 分批法
- 固定床法
- 流动床法

---

## 第六节 膜分离过程

- 1748年法国学者Abbe Nollet首次提出了膜分离现象，经过近二个世纪的摸索、研究，20世纪50年代膜分离技术才逐渐发展成为一门新兴高技术边缘学科。
- 1963年第一个膜渗析器的诞生开创了膜分离技术的新纪元，二、三十年来得到了迅猛的发展，在各个工业领域及科研中得到大规模应用，出现了各种有价值的微滤、超滤、纳滤和反渗透等分离膜。

---

# 膜分离技术的优点

- 适用范围广；
- 膜分离过程为物理过程，不需加入化学药剂；
- 膜分离技术分离装置简单，占地面积小，系统集成容易；
- 膜分离过程系统简单、操作容易，且易控制，便于维修，有利于生产自动化的推广与普及。

# 一、膜分离方法的分类

- 透析
- 超滤
- 反渗透
- 微滤
- 电渗析
- 液膜技术
- 气体渗透
- 渗透蒸发

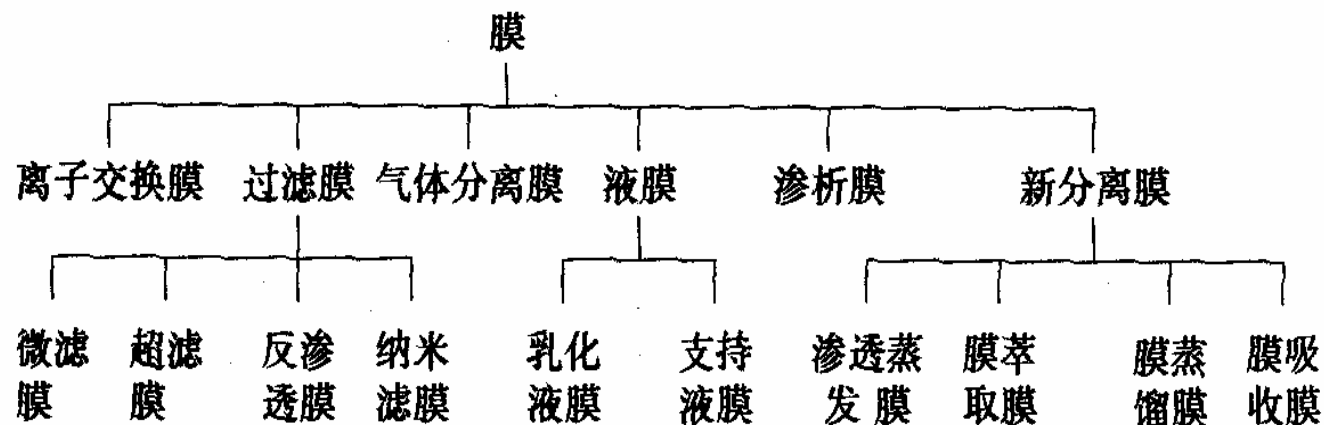


图 1-2 膜技术家族图

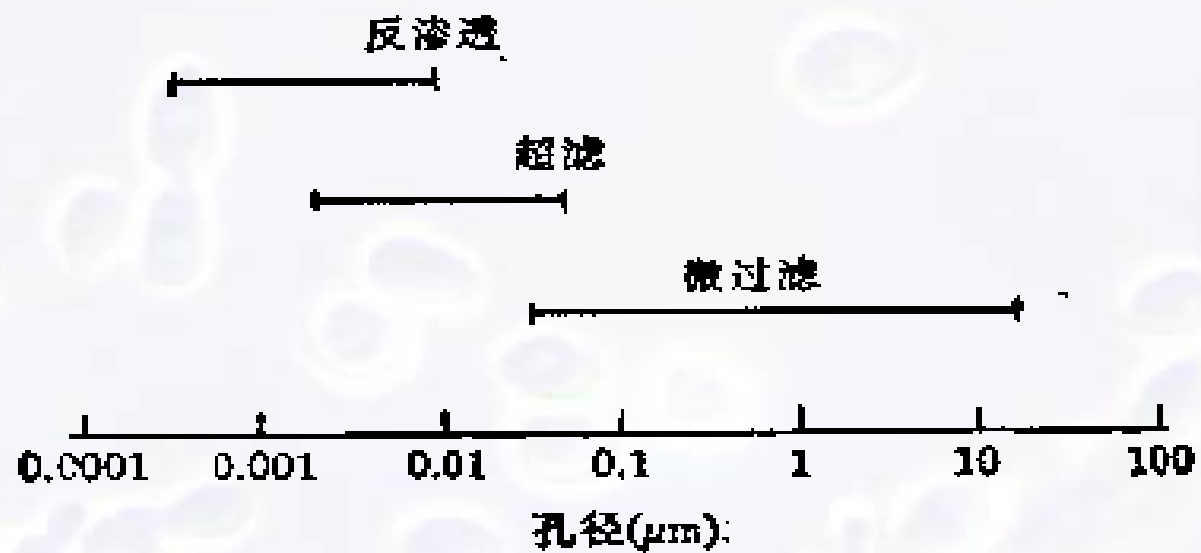
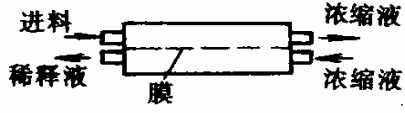
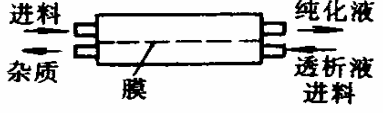
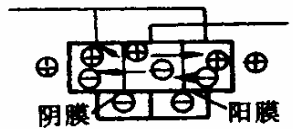
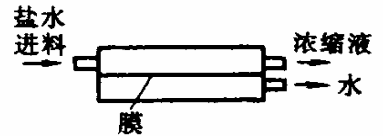
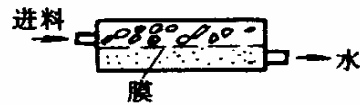
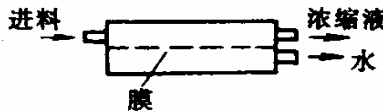
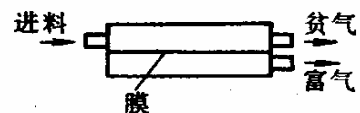


图 17-3 反渗透、超滤和微过滤膜的孔径范围

表 9-1

膜分离过程<sup>(3)</sup>

| 过程                     | 示意图  | 透过物质                 | 推动力                      | 截留物质                    |
|------------------------|--|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| 渗透<br>Osmosis          |    | 水                    | 浓度差                      | 溶质                      |
| 透析<br>Dialysis         |    | 离子和小分子<br>有机化合物(尿素等) | 浓度差                      | 相对分子质量 > 1000 的溶质或悬浮物   |
| 电渗析<br>Electrodialysis |    | 离子                   | 电位差<br>通常每一电池对为 1~2V     | 非离子和大分子化合物              |
| 反渗透<br>Reverse Osmosis |    | 水                    | 压力差,<br>通常为 1~8MPa       | 溶解或悬浮物质                 |
| 微过滤<br>Microfiltration |   | 水和溶解物质               | 压力差,<br>通常为 0.1MPa       | 悬浮物质(硅石、细菌等)。截断粒子大小可以变化 |
| 超滤<br>Ultrafiltration  |  | 水和盐                  | 压力差,<br>通常为 0.1 ~ 0.6MPa | 生物大分子,胶体物质。截断分子量可以变化    |
| 气体透过<br>Gas permeation |  | 气体和蒸汽                | 压力差,<br>通常为 0.1 ~ 10MPa  | 不透过膜的气体 and 蒸汽          |



---

## 二、表征膜性能的参数

- 孔的性质(包括孔径、孔分布和孔隙度)
- 水通量
- 截留率的截断分子量
- 抗压能力
- pH适用范围
- 对热和溶剂的稳定性。

---

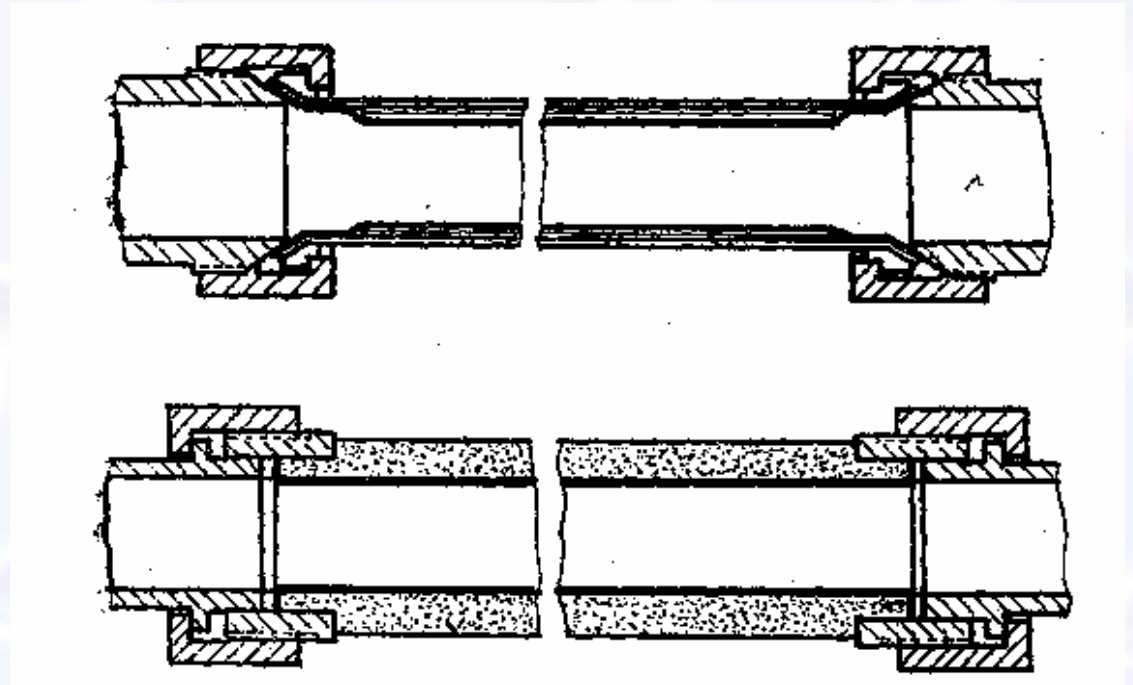
## 三、膜分离设备

1, 选择膜分离设备应考虑以下因素:

- ✓ 分离类型
- ✓ 生产量
- ✓ 操作时的应变性
- ✓ 保养难易程度
- ✓ 操作方便与否

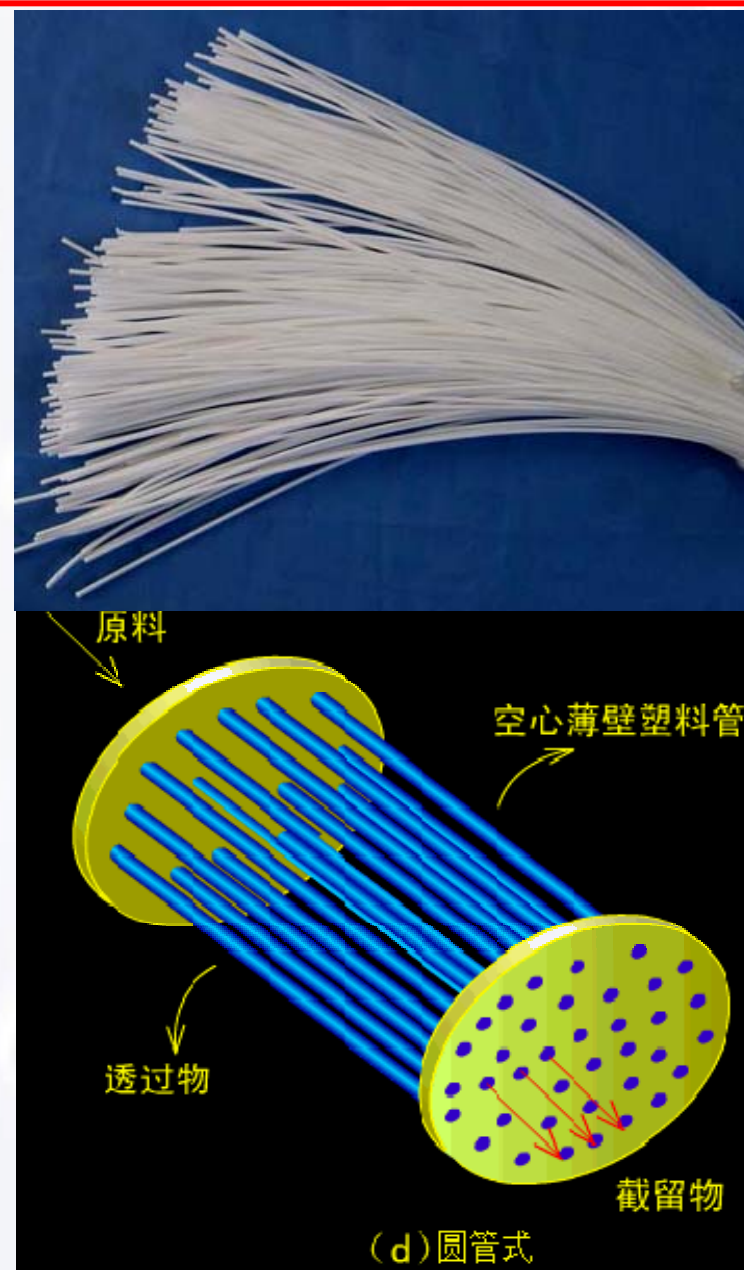
## 2, 常用的膜分离设备

- 管式过滤器
  - 内压式
  - 外压式



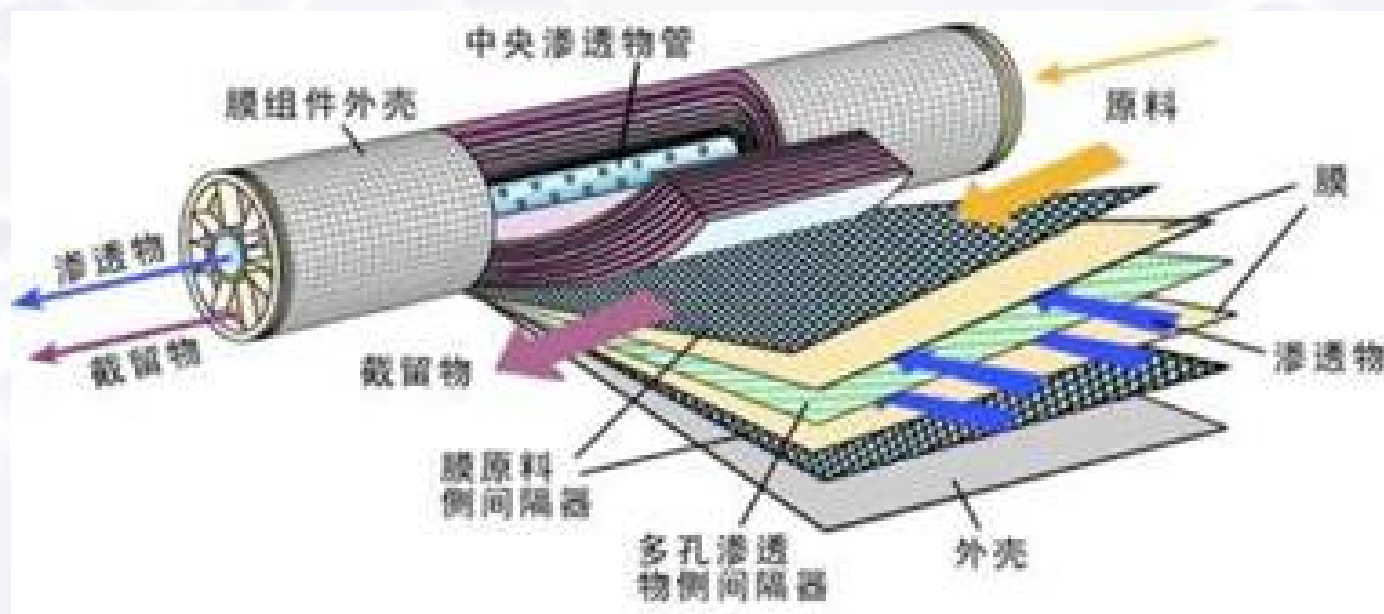
- 中空式过滤器

中空纤维膜组件用粗的中空纤维膜组装成用于超过滤的膜组件，它具有类似于单管程管壳式换热器的结构。所用的中空纤维，在内壁或内、外壁形成表层。内压式膜组件适合于管内流过料液，管间汇集渗滤液，外压式膜组件相反，管间走料液，管内汇集渗滤液。



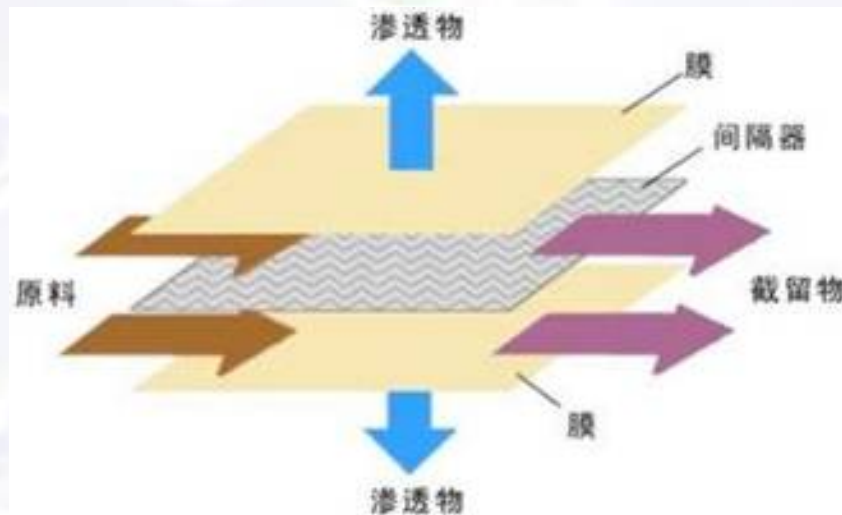
- 螺旋卷式过滤器

卷式膜组件是用平面膜卷制而成的。将两张超过滤膜叠在一起，表层各自向外，在三条边上相互粘合，形成一长信封式的膜袋，在此袋内插入一张挠性的多孔薄板。用一管壁钻有许多小孔、两端带有连接件的管子，作为膜组件的中心管。先将伸出膜袋口外的多孔薄板卷绕中心管一圈，再将膜袋开口粘合。然后将一隔网叠在膜袋上，一起卷绕在中心管上，形成螺旋卷，最后将外缘封固。



- 平板式过滤器

板式膜组件用平面膜组成。用它所组装的超过滤器在结构上与压滤机相近，而差别有二：其一是压滤机有料液进口和滤液出口，须拆卸机体才能取出滤饼；而超过滤器内不生成滤饼，设备不需经常拆卸，除了料液进口、渗滤液出口外，还须有滤余液出口。其二是超过滤器须迫使料液作高速流动以减轻浓度极化的影响，而压滤机无此要求。因之，在设备内超过滤用串联流道，压滤用并联流道。





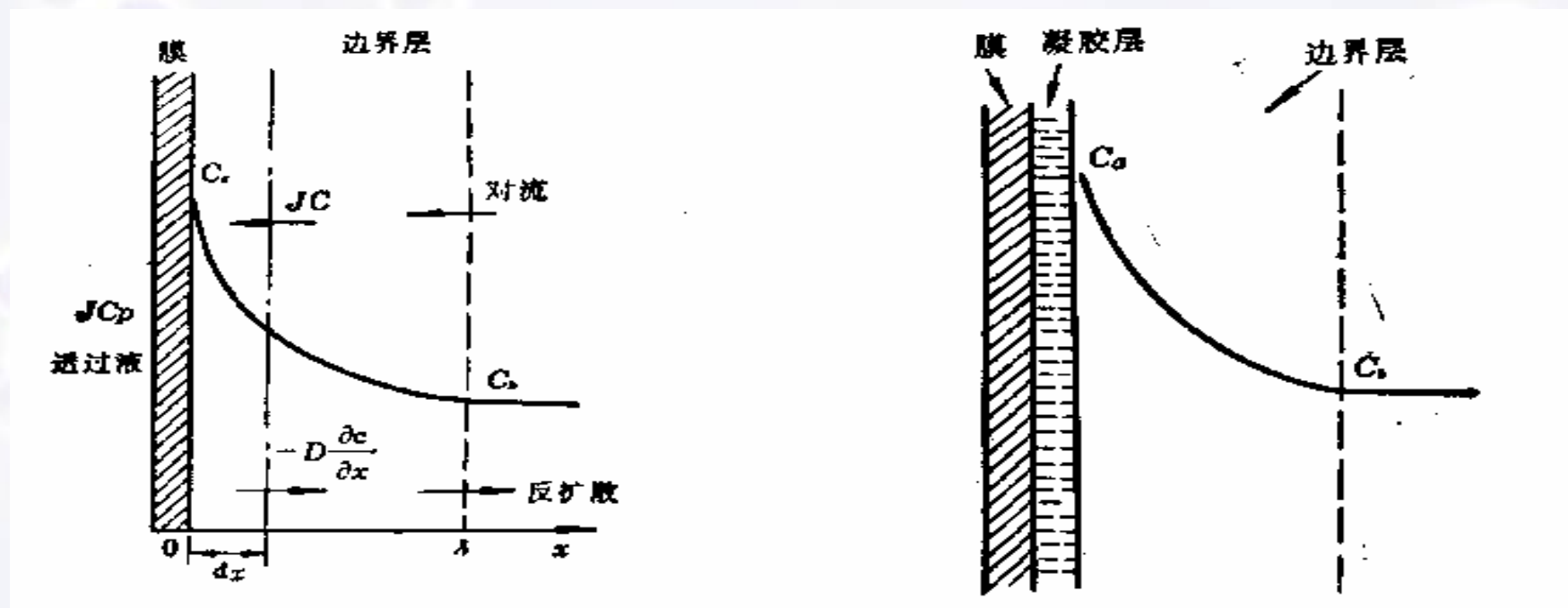
# 各种膜分离设备性能的比较

| 型 式   | 优 点  | 缺 点                      |
|-------|--|--------------------------|
| 管 式   | 易清洗，无死角适宜于处理含固体较多的料液，单根管子可以调换                      | 保留体积大，单位体积中所含过滤面积较小，压力降大 |
| 中空纤维式 | 保留体积小，单位体积中所含过滤面积大，可以逆洗，操作压力较低(小于 0.25 MPa)，动力消耗较低 | 料液需要预处理，单根纤维损坏时，需调换整个模块  |
| 螺旋卷绕式 | 单位体积中所含过滤面积大，换新膜容易                                 | 料液需要预处理，压力降大，易污染，清洗困难    |
| 平板式   | 保留体积小，能量消耗界于管式和螺旋卷绕式之间                             | 死体积较大                    |



## 四、操作特性

- 浓差极化：当溶剂透过膜，而溶质留在膜上，因而使膜面浓度增大，并高于主体中浓度这种浓度差导致溶质自膜面反扩散至主体中，这种现象称为浓差极化。
- 凝胶层：当膜面浓度增大时，通量降低。当膜面浓度增大到某一值时，溶质成最紧密排列，或析出形成凝胶层。



浓差极化示意图

凝胶层的形成

## 五、膜分离过程在发酵工业中的应用

| 需去除物 | 分子量           | 尺寸 ( $\mu m$ ) | 选用设备  |
|------|---------------|----------------|-------|
| 菌体   |               | 100~10000      | MF UF |
| 胶体   |               | 10~1000        | MF UF |
| 蛋白质  | 5000~1000000  |                | UF    |
| 多糖   | 10000~1000000 |                | UF    |
| 酶    | 5000~1000000  |                | UF    |
| 单糖   | 200~400       |                | NF RO |
| 有机酸  | 100~500       |                | NF RO |
| 无机离子 | 10~100        |                | NF RO |

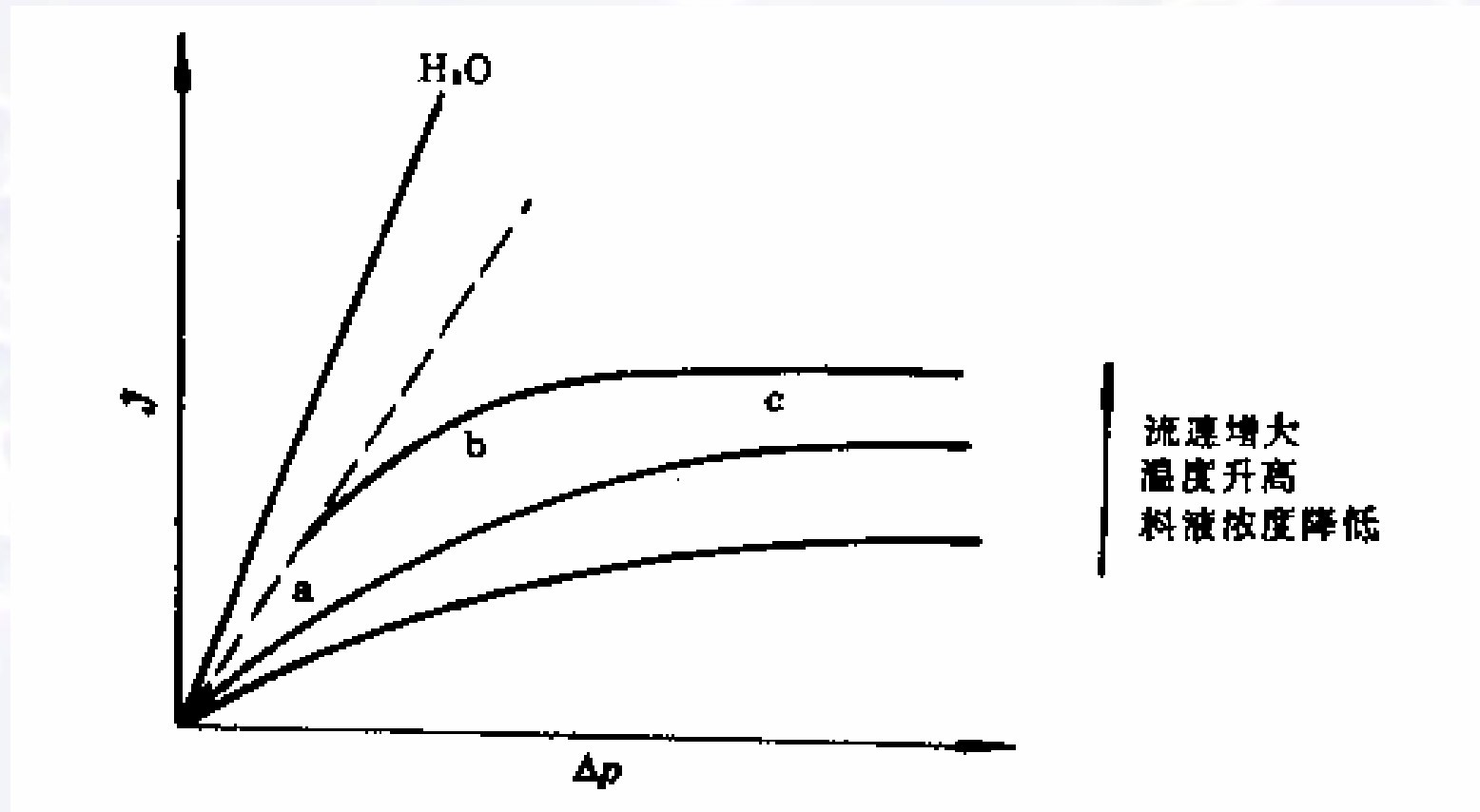
微滤 (MF) 膜、超滤 (UF) 膜、纳滤 (NF) 膜、反渗透 (RO) 膜

---

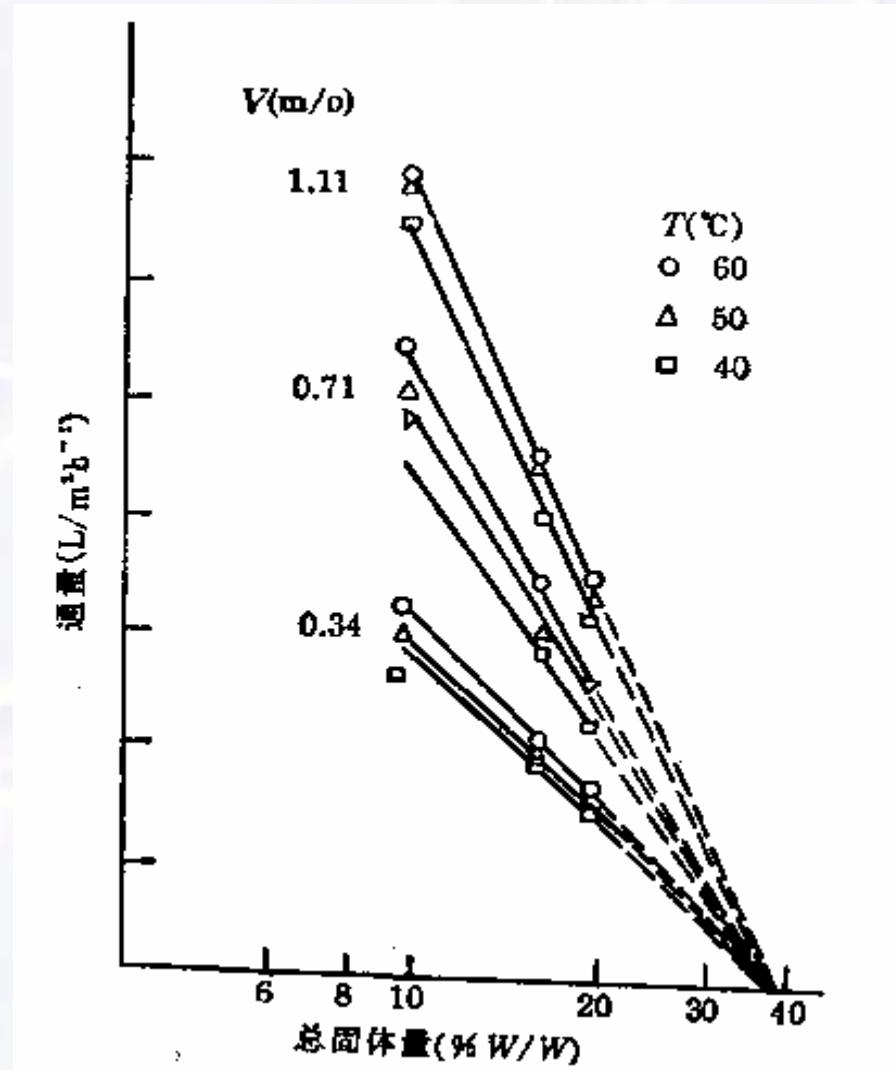
## 六、影响超滤速度的各种因素

- 压力
- 发酵液浓度
- 温度
- 流速

# 膜两侧压力差对通量的影响



## 料液流速、温度和固体浓度对通量的影响



---

## 膜的污染

- 污染：膜在使用中，尽管操作条件保持不变，但通量仍逐渐降低的现象
- 原因：膜与料液中某一溶质的相互作用，或吸附在膜上的溶质和其它溶质的相互作用而引起的。
- 与浓差极化的区别：浓差极化是可逆的。

---

- 减轻膜污染的方法

- 预处理
- 改变膜的表面性质

- 膜的清洗方法

- 机械方法：加海绵球，增大流速，逆洗(对中空纤维超滤器)，脉冲流动，超声波等。

- 化学方法

- 起溶解作用的物质 酸、碱、酶(蛋白酶)，螯合剂，表面活性剂
- 起切断离子结合作用的方法 改变离子强度、pH、电位
- 起氧化作用的物质 过氧化氢、次氯酸盐
- 起渗透作用的物质 磷酸盐、聚磷酸盐



---

## 第七节 萃取

- 溶剂萃取法是20世纪40年代兴起的一项化工分离技术，它是用一种溶剂将产物自另一种溶剂(如水)中提取出来，达到浓缩和提纯的目的。
- 溶剂萃取法比化学沉淀法分离程度高，比离子交换法选择性好，传质快，比蒸馏法能耗低且生产能力大，周期短，便于连续操作、容易实现自动化等。

- 
- 新型的萃取技术
    - 双（两）水相萃取
    - 反相胶束（胶团）萃取
    - 超临界萃取
    - 液膜萃取

---

# 一、萃取的原理

- 利用物质在两种成相的溶剂中溶解度的不同，使所需的目的物质从一种溶剂中转移到另一种溶剂中，从而达到分离纯化的目的。
- 溶剂萃取法是以分配定律为基础的。
- 在萃取中，被提取的溶液称为料液，其中欲提取的物质称为溶质。

- 
- 分配定律：在恒温恒压的条件下，一种物质在两种成相的溶剂（A与B，或上相与下相）的分配浓度之比是一常数，该常数称为分配系数K。

$$\frac{\text{上相 (A) 中溶质的浓度}}{\text{下相 (B) 中溶质的浓度}} = \frac{C_A}{C_B} = K$$

---

## 二、双（两）水相萃取

- 双水相系统是指某些高聚物之间或高聚物与无机盐之间在水中以适当的浓度溶解会形成互不相溶的两水相或多水相系统。通过溶质在相间的分配系数的差异而进行萃取的方法即为双水相萃取。

- 
- 双水相技术最早出现于1955年。
  - 近几年来,双水相技术在动力学研究、双水相亲和分离、多级逆流层析、反应分离耦合等方面都取得了显著的成绩。
  - 到目前为止,双水相技术几乎在所有的生物物质的分离纯化中得到应用:如氨基酸、多肽、核酸、细胞器、细胞膜、各类细胞、病毒等,特别是成功地应用在蛋白质的大规模分离中。

# 典型的两水相系统

|   |              |                                |
|---|--------------|--------------------------------|
| A | 聚丙二醇         | —聚乙二醇<br>—聚烯醇<br>—葡聚糖          |
|   | 聚乙二醇         | —聚乙烯醇<br>—葡聚糖<br>—聚乙烯吡咯烷酮      |
| B | DEAE 葡聚糖·HCl | —聚丙二醇 NaCl<br>—聚乙二醇 $Li_2SO_4$ |
| C | 羧甲基葡聚糖钠盐     | —羧甲基纤维素钠盐                      |
| D | 聚乙二醇         | —磷酸钾                           |
|   | 聚乙二醇         | —硫酸铵                           |
|   | 聚乙二醇         | —硫酸钠                           |

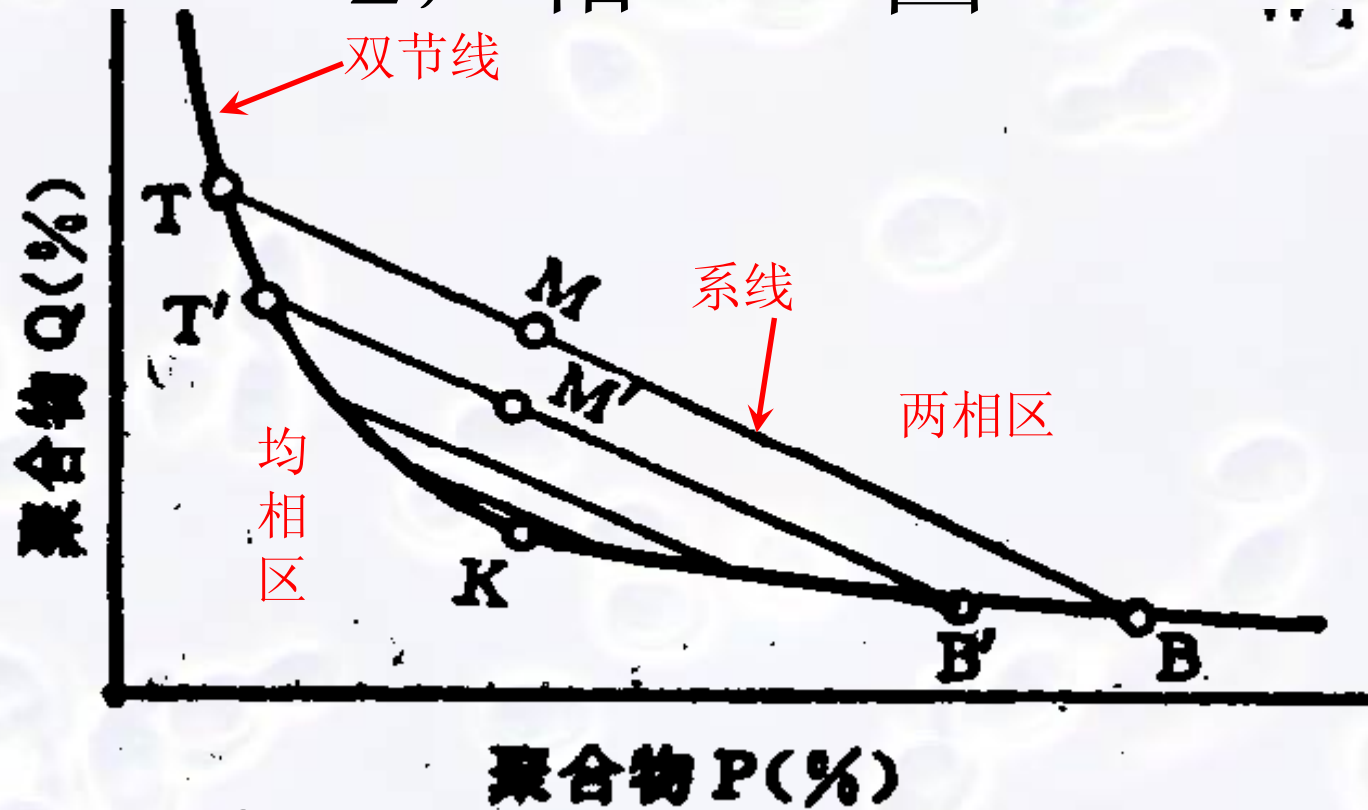


---

# 1, 双水相萃取的优点

- 易于放大
- 双水相系统之间的传质过程和平衡过程快速,因此能耗较小,可以实现快速分离。
- 易于进行连续化操作。
- 相分离过程温和,生化分子如酶不易受到破坏。
- 选择性高、收率高。
- 操作条件温和。

## 2, 相 图



$$\frac{V_T}{V_B} = \frac{\overline{BM} \text{ (B点与M点之间的距离)}}{\overline{MT} \text{ (M点与T点之间的距离)}}$$

- 
- 令  $W_T$ ,  $W_B$ ,  $W_M$  分别代表上相、下相和系统的总重量

$$W_T + W_B = W_M$$

$$W_T P_T + W_B P_B = W_M P_M$$

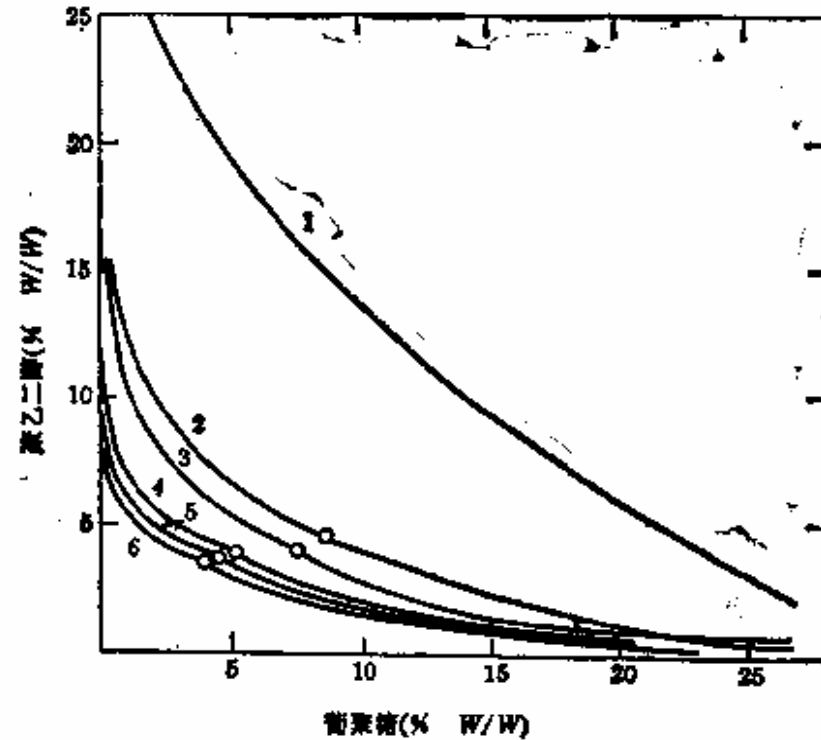
$$W_T (P_T - P_M) = W_B (P_M - P_B)$$

$$\therefore \frac{W_T}{W_B} = \frac{P_B - P_M}{P_M - P_T} = \frac{\overline{BM}}{\overline{MT}}$$

设  $d_T$ ,  $d_B$  分别为上相和下相的密度, 则

$$\frac{V_T d_T}{V_B d_B} = \frac{\overline{BM}}{\overline{MT}}$$

- 当系线向下移动时，长度逐渐减小，这说明两相的差别减小，当达到K点时，系线的长度为零，两相间差别消失，点K称为临界点。
- 双节线的位置与形状与聚合物的分子量有关。聚合物的分子量越高，相分离所需的浓度越低；两种聚合物的分子量相差越大，双节线的形状越不对称。



聚乙二醇-葡聚糖系统的双节线和临界点(O)聚乙二醇的分子量固定(PEG6000)而葡聚糖的分子量如下[1]:

- 1—D 5 ( $\bar{M}_n = 2300, \bar{M}_w = 3400$ );      2—D 17 ( $\bar{M}_n = 23000, \bar{M}_w = 30000$ );  
 3—D 24 ( $\bar{M}_n = 40500$ );      4—D 37 ( $\bar{M}_n = 83000, \bar{M}_w = 179000$ );  
 5—D 48 ( $\bar{M}_n = 180000, \bar{M}_w = 460000$ ); 6—D ( $\bar{M}_n = 63 = 280000, \bar{M}_w = 2300000$ );  
 $\bar{M}_n$ —依颗粒数的平均分子量;  $\bar{M}_w$ —依重量的平均分子量

---

## 3, 双水相萃取的影响因素

- 生物物质在双水相中的分配系数主要由电化学位、疏水作用、生物亲和力、粒子大小和蛋白质的构象效应所决定,这些因素可以分为环境因素和结构因素两个方面。
  - 环境因素: 包括成相高聚物的种类与浓度、高聚物的亲和基团、盐的种类和浓度、成相采用的重力以及温度等;
  - 结构因素: 主要是亲水性的大小和电荷的影响。

---

## (1) 成相高聚物浓度的影响

- 当接近临界点时，蛋白质均匀地分配于两相，分配系数接近于1。
- 如成相聚合物的总浓度或聚合物 / 盐混合物的总浓度增加时，系统远离临界点，系线的长度也增加，此时两相性质的差别也增大，蛋白质趋向于向一侧分配，即分配系数或增大超过1，或减小低于1。

---

## (2) 成相高聚物的分子量的影响

- 当聚合物的分子量降低时，蛋白质易分配于富含该聚合物的相。例如在PEG-DX系统中，PEG的分子量减小，会使分配系数增大，而葡聚糖的分子量减小，会使分配系数降低。这是一条普遍的规律，不论何种成相聚合物系统都适用。



---

### (3) 盐的影响

- 由于各相应保持电中性，因而在两相间形成电位差，因此对于带电荷的蛋白质等物质的萃取来说，盐的存在就会使系统的电荷状态改变，从而对分配产生显著影响。例如加入中性盐可以加大电荷效应，增加分配系数。
- 盐的种类对双水相萃取也有一定的影响，因此变换盐的种类和添加其他种类的盐有助于提高选择性。
- 在不同的双水相体系中盐的作用也不相同。在 PEG/磷酸盐/水中加入氯化钠可以使万古霉素的分配系数由 4 提高到 120，而在 PEG/DEX/水体系中只从 1.55 提高到 5。

---

#### (4) pH的影响

- pH会影响蛋白质中可以离解基团的离解度，因而改变蛋白质所带电荷和分配系数。
- pH也影响磷酸盐的离解程度，若改变 $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 和 $\text{HPO}_4^{2-}$ 之间的比例，也会使相间电位发生变化而影响分配系数。pH的微小变化有时会使蛋白质的分配系数改变2-3个数量级。

---

## (5) 溶质分子的影响

- 溶质分子对双水相系统的影响的研究并不多。在春雷霉素的研究中发现当抗生素的浓度在  $0.05 \sim 1$  AU变化时分配系数几乎保持 4.14不变,可能是由于萃取容量远远超过溶质的浓度。在丙酰螺旋霉素的研究中发现在  $0.8\text{--}1.2$  g/L的浓度范围内提高不仅使分配系数有一定的上升,而且对相比也有显著的影响。

---

## (6) 温度的影响

- 温度影响相图，特别在临界点附近，尤为显著，因而也影响分配系数。

---

## 4, 亲和双水相技术

- 亲和双水相技术是指在成相高聚物上偶联亲和性配基,以提高溶质的分配系数。这种技术已经广泛地运用到蛋白质等生物大分子的分离纯化工艺中。
- 万古霉素可以和二肽 N-乙酰 - D-Ala- D- Ala 形成复合物,当二肽作为配基与活性 MPEG 共价结合后,加入到 PEG/ DEX 系统中,不仅大大提高了系统的选择性,而且分配系数提高了 7 倍。

---

## 5, 全醪液分离技术

- 用萃取法提取发酵产品时,原位全醪液分离工艺,可以大大提高效率,降低成本。但是利用传统的有机溶剂萃取工艺就存在困难,如乳化现象,而且普遍需要萃取、反萃取反复操作才能结晶成为产品。采用双水相技术就可以避免乳化,直接从醪液中提取。细胞、细胞碎片和培养基中的不溶物对分配行为没有显著的影响,所以不同批次的发酵液可以取得几乎相同的结果。而且细胞和产物分离在两相,避免了胞内的降解酶类对产物的破坏作用。



---

## 5, 应用

- 工艺方面的问题

要成功地运用两水相萃取的方法，应满足下列条件：

- 欲提取的产物和细胞应分配在不同的相中
- 产物的分配系数应足够大，使在一定的相体积比时，经过一次萃取，就能得到高的收率
- 两相用离心机很易分离。



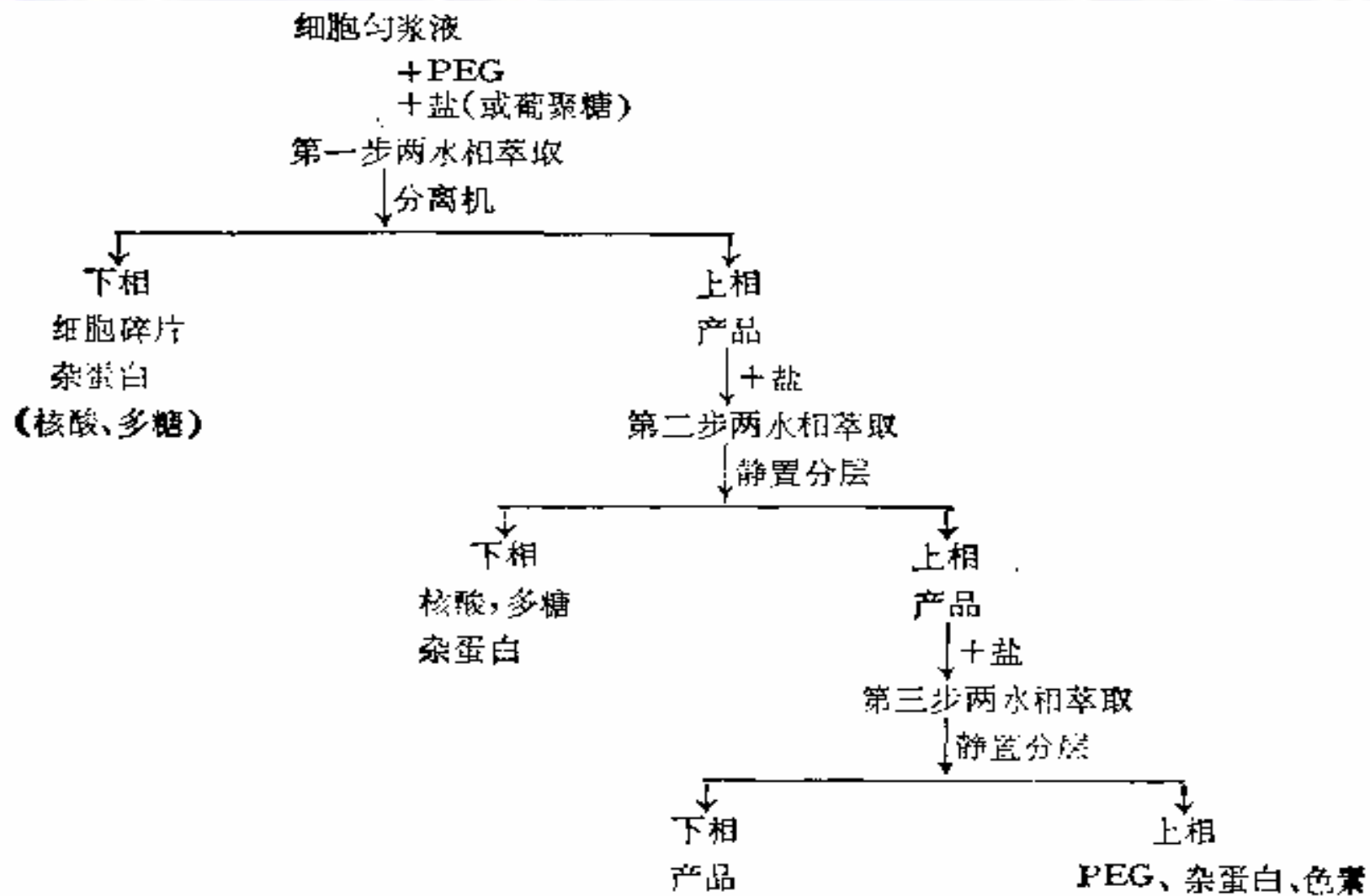


图 19-8 三步两水相萃取酶的流程<sup>[11]</sup>

---

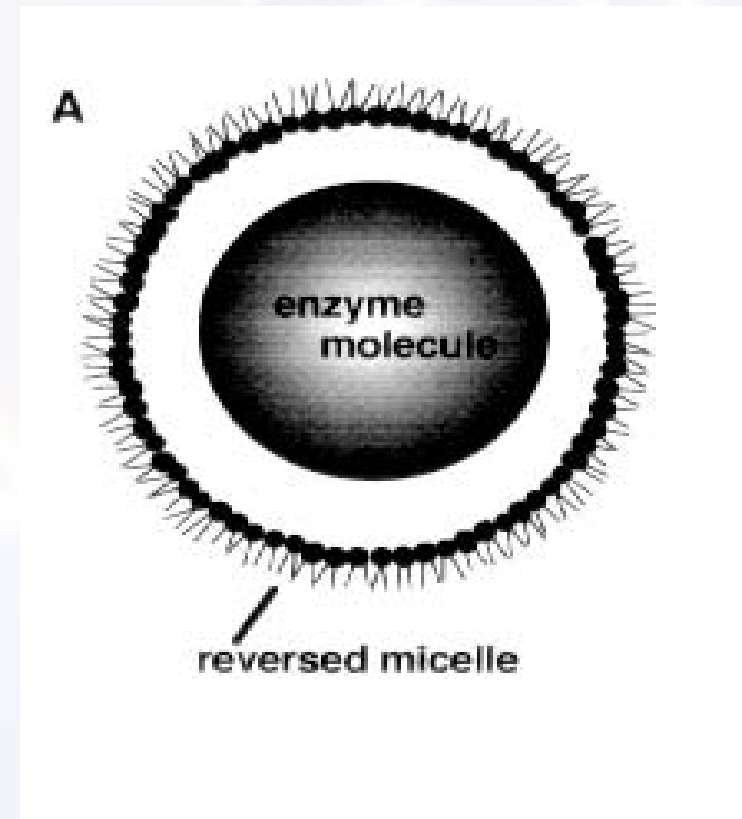
- 工程方面的问题

在进行工业应用时，需考虑达到萃取平衡所需的时间和两相分离的设备。

- 在两水相系统中，表面张力很低。因而进行搅拌时很易分散成微滴，故几秒钟即能达到平衡，且能耗也很少。
- 两相分离则比较困难，这是由于两相密度差低和当处理匀浆液时，粘度较大。由于粘度较高会引起阻塞，可采用自动排渣的喷嘴分离机。

### 三、反相胶束（胶团）

- 反相胶团是表面活性剂分子溶于非极性溶剂中自发形成的聚集体,其中表面活性剂的极性头朝内而非极性头朝外与有机溶剂接触。胶团内可溶解少量水而形成微型水池。反胶团溶液是宏观上透明均一的热力学稳定体系。



---

# 1, 反胶团的萃取原理

- 蛋白质进入反胶团溶液是一协同过程。在有机溶剂相和水相两宏观相界面间的表面活性剂层,同邻近的蛋白质分子发生静电吸引而变形,接着两界面形成含有蛋白质的反胶团,然后扩散到有机相中,从而实现了蛋白质的萃取。改变水相条件(如pH值、离子种类或离子强度),又可使蛋白质从有机相中返回到水相中,实现反萃取过程。

---

## 2, 反相胶团萃取的优点

- 成本低
- 选择性高
- 操作方便
- 放大容易
- 萃取剂 (反胶团相) 可循环利用
- 蛋白质不易变性等优点。

---

## 3, 影响萃取的因素

- 水相的 pH 值
- 离子强度
- 温度
- 蛋白质的分子量和浓度
- 表面活性剂

---

## (1) 表面活性剂

- 表面活性剂的类型

- 目前最常用的反胶团或微乳液是 AOT/异辛烷体系。一是 AOT形成的反胶团较大,有利于蛋白质的萃取;二是 AOT形成反胶团时不需加助表面活性剂。

- 表面活性剂的浓度

- 当其它条件一定时,表面活性剂浓度也存在某临界值。小于此临界值时,增大表面活性剂的浓度可提高蛋白质的萃取率,大于临界值时,则无明显影响。



---

## (2) 水相的 pH 值

pH 对萃取的影响主要体现在改变蛋白质的表面电荷上。

- 在 pH 小于蛋白质的等电点 (PI) 时, 蛋白质表面带正电荷; 大于等电点时, 蛋白质带负电荷。
- AOT 是一种阴离子型表面活性剂, 它所形成的反胶团的内表面带负电荷。
- 当水溶液的 pH 小于蛋白质的等电点 (11.1) 时, 两表面异电荷的吸引力使蛋白质的萃取率接近 100%。当 pH 小于 PI 时, 溶菌酶萃取率急剧下降, 直到接近于零。

---

### (3) 离子强度

离子强度对蛋白质萃取的影响主要体现在两个方面：

- 离子强度增大后使蛋白质与反胶团内表面的静电引力减弱,从而减小了萃取率;
- 离子强度增大后减弱了表面活性剂极性头之间的排斥,使反胶团变小,因而蛋白质难以进入其中。

---

#### (4) 温度

温度是影响蛋白质萃取率的一个重要因素。一般来说,温度的增加将使反胶团的含水量下降,因而不利于蛋白质的萃取。通过提高温度可以实现蛋白质的反萃取。

---

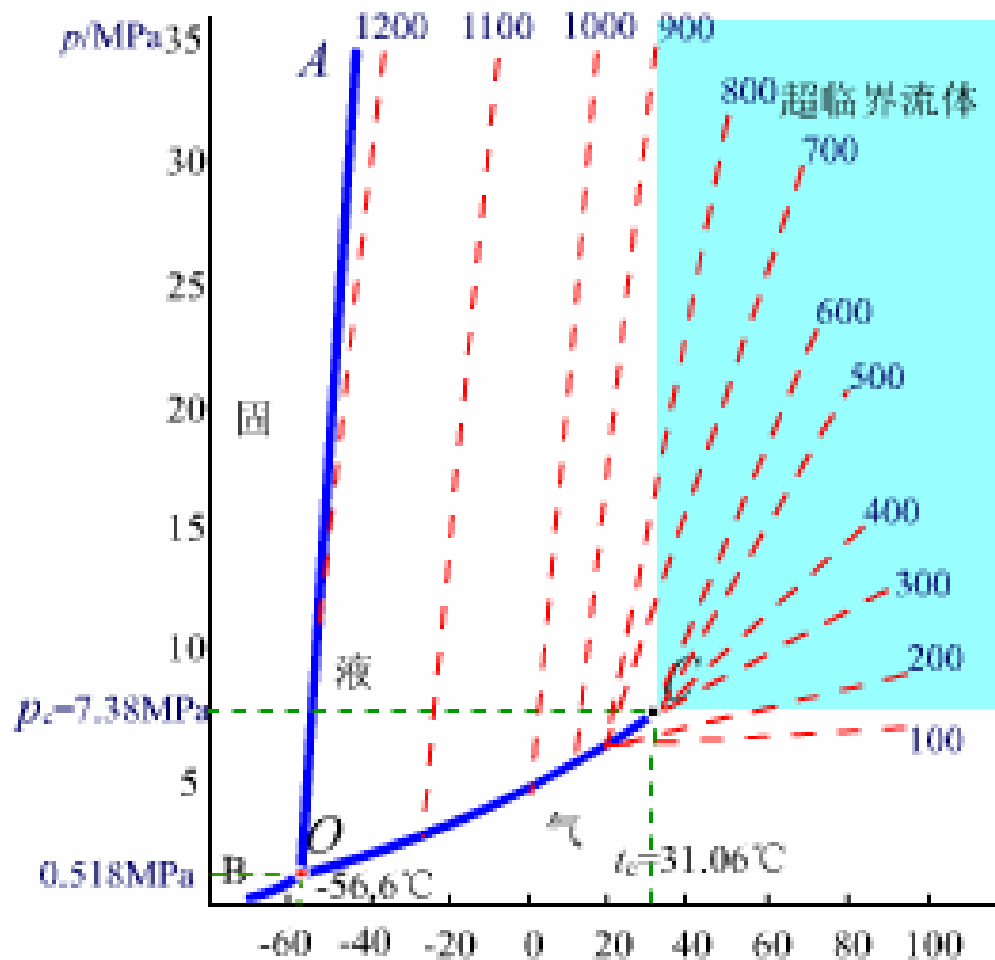
## (5) 蛋白质的分子量和浓度

- 蛋白质的分子量对其萃取率有较大影响。例如溶菌酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶的分子量分别为 14300、23300、35000，AOT/异辛烷反胶团萃取它们的最大萃取率分别约为 100%、90%、30%，表明分子量越大的蛋白质越难萃取。
- 用 AOT反胶团体系萃取血红蛋白时发现，蛋白质浓度高时，萃取率降低；而蛋白质浓度低时，萃取率较高。

# 四、超临界流体萃取

## 1, 原理

- 临界温度( $T_c$ )：当气体的温度高于某一数值时，任何压缩都不能使它变为液体。
- 临界压力 ( $P_c$ )：在临界温度下，气体能被液化的最低压力。
- 超临界状态：当物质所处的温度高于临界温度、压力大于临界压力时



- 超临界流体：在临界点(指在临界温度 $T_c$ 和临界压力 $P_c$ 状态)附近，可以观察到一些有意义的现象：压力和温度的微小变化都会引起气体密度的很大变化。随着向超临界气体加压，气体密度增大达到液态性质，这种状态的流体称为超临界流体。其性质介于气体和液体之间。

### 气体、液体与超临界流体特性比较

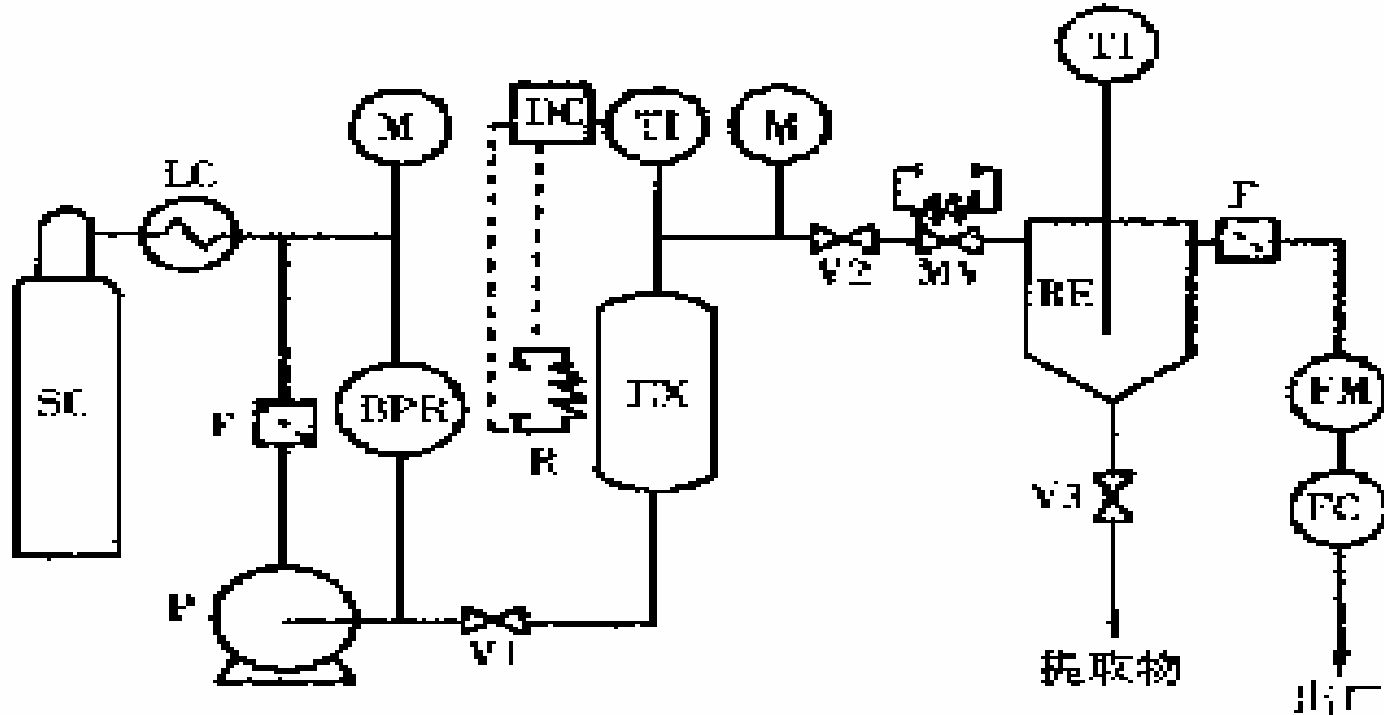
| 物理性质                                   | 气体<br>(常温、常压) | 超临界流体                |                      | 液体<br>(常温、常压)            |
|--|---------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
|  |               | $T_c, P_c$           | $T_c, 4P_c$          |                          |
| 密度 ( $\text{g/cm}^3$ )                 | 0.006-0.002   | 0.2-0.5              | 0.4-0.9              | 0.6-1.6                  |
| 粘度 ( $10^{-5}\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) | 1-3           | 1-3                  | 3-9                  | 20-300                   |
| 扩散系数 ( $10^{-4}\text{m}^2/\text{s}$ )  | 0.1-0.4       | $0.7 \times 10^{-3}$ | $0.2 \times 10^{-3}$ | $(0.2-2) \times 10^{-3}$ |



- 超临界萃取：使用超临界流体作为溶剂的萃取方法，就称为超临界萃取。超临界流体的密度为气体的数百倍，而其流动性和粘度仍接近于气体，扩散系数大约为气体的1%，而较液体的扩散系数大数百倍。因此，物质移动或分配时，均比其在液体溶剂中要快。将温度或压力适宜变化时，可使其溶解度在100~1000倍的范围内变化。
- 一股来讲，超临界流体的密度越大，其溶解度就越大，反之亦然。也就是说，超临界流体中物质的溶解度在恒温下随压力 $P$  ( $P > P_c$ 时)升高而增大，而在恒压下，其溶解度随温度 ( $T > T_c$ 时)增高而下降，这一特性有利于从物质中萃取某些易溶解的成分，而超临界流体的高流动性和扩散能力，则有助于所溶解的各成分之间的分离，并能加速溶解平衡，提高萃取效率。



# 超临界流体萃取系统



SC - CO<sub>2</sub> 钢瓶; LC - 液体冷却器; F - 过滤器; P - 泵;

BPR - 反压调节阀; M - 压力计;

V1, V2, V3 - 截止阀; DC - 温度数字控制器; R - 电阻器;

HX - 萃取器; MV - 计量阀; FM - 汽轮流速计;

FC - 流速计算器; RE - 接受器; TI - 温度指示器

## 常用的超临界萃取溶剂及其临界值

| 流体名称                             | 临界温度,<br>℃ | 临界压力,<br>Mpa | 临界密度,<br>g/cm <sup>3</sup> | 流体名称                       | 临界温度,<br>℃ | 临界压力,<br>Mpa | 临界密度,<br>g/cm <sup>3</sup> |
|----------------------------------|------------|--------------|----------------------------|----------------------------|------------|--------------|----------------------------|
| 乙烷C <sub>2</sub> H <sub>6</sub>  | 32.3       | 4.88         | 0.203                      | 二氧化碳<br>CO <sub>2</sub>    | 31.3       | 7.38         | 0.46                       |
| 丙烷C <sub>3</sub> H <sub>8</sub>  | 96.9       | 4.26         | 0.22                       | 二氧化硫<br>SO <sub>2</sub>    | 157.6      | 7.88         | 0.525                      |
| 丁烷C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> | 152        | 3.8          | 0.228                      | 水H <sub>2</sub> O          | 374.3      | 22.11        | 0.326                      |
| 戊烷C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> | 296.7      | 3.38         | 0.232                      | 笑气N <sub>2</sub> O         | 36.5       | 7.17         | 0.451                      |
| 乙烯C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>  | 9.9        | 5.12         | 0.227                      | 氟里昂<br>13CClF <sub>3</sub> | 28.8       | 3.9          | 0.578                      |
| 氨NH <sub>3</sub>                 | 132.4      | 11.28        | 0.236                      |                            |            |              |                            |

# 二氧化碳的特点

- 二氧化碳在常温(31.1℃)时可以达到超临界状态，可以实现低温生产工艺；
- 临界压力为7386.6kPa(72.9atm)，易于达到；
- 因为没有加入空气中的氧，不会因氧化而使制品变质；
- 二氧化碳是惰性气体，没有引燃性、爆炸性和比学反应性；
- 二氧化碳无毒，无色、无味，不会污染制品，也没有任何排放的问题。
- 超临界二氧化碳的高扩散性、低粘性，使其具有传质快和萃取速度高的优点；
- 能选择性地萃取特定成分；
- 资源充足，价格低廉，能从萃取物中挥发掉。

## 2, 超临界流体萃取的特点

表 4-3 超临界流体萃取与普通液体萃取的比较

| 项 目      | 超临界液体萃取             | 液 体 浸 出                 |
|----------|---------------------|-------------------------|
| 溶质与溶剂的分离 | 可彻底分离               | 溶剂的彻底分离较困难              |
| 萃取速度     | 因粘度小扩散系数大, 故快       | 因粘度大扩散系数小, 故慢           |
| 操作温度     | 接近常温, 对热稳定性差的物料也可适用 | 浸出后溶剂和制品分离时, 制品有接触高温的可能 |
| 选择性控制    | 通过温度、压力、气体种类等控制较容易  | 由温度和混合溶剂组分进行控制          |
| 萃取力      | 较小                  | 相对大                     |
| 设备       | 必须高压容器              | 可在常压下操作                 |

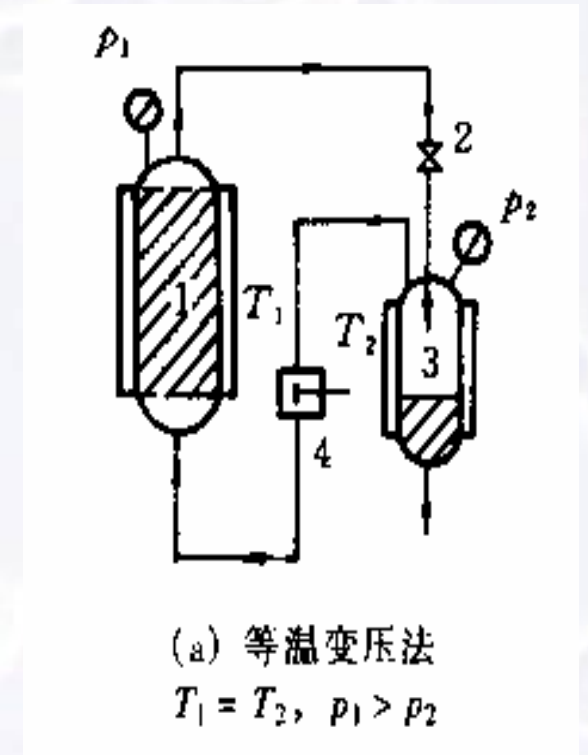
---

## 3, 超临界流体萃取的典型流程

- 根据对过程中超临界流体密度调控的方法不同, 超临界流体萃取的流程可分为
  - 等温变压法
  - 等压变温法
  - 吸附法

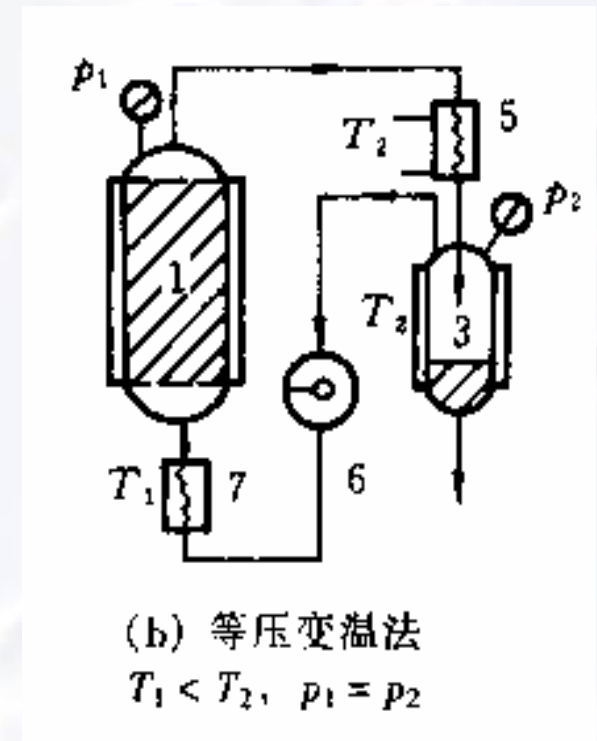
## (1) 等温变压法

- 此种流程通过压力的变化引起超临界流体密度的变化，使得组分从超临界流体中析出分离。萃取剂经压缩达到最大溶解能力的状态点(即超临界状态)后加入到萃取器中与物料接触进行萃取。当萃取了溶质的超临界流体通过膨胀阀进入分离槽后，压力下降，超临界流体的密度也下降，对其中溶质的溶解度跟着下降。溶质于是析出并在槽底部收集取出。



## (2)等压变温法

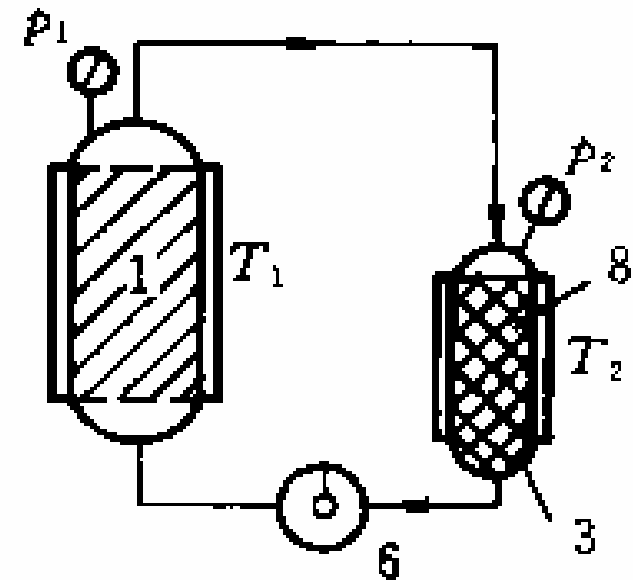
- 等压变温法流程中，超临界流体的压力保持一定，而利用温度的变化，引起超临界流体对溶质溶解度的变化，从而实现溶质与超临界流体分离的过程，降温升压后的萃取剂，处于超临界状态，被送入到萃取槽中与物料接触进行萃取。然后，萃取了溶质的超临界流体经加热器升温后在分离槽析出溶质。作为萃取剂的气体经冷却器等降温升压后送回萃取槽循环使用。





### (3) 吸附法

- 此种流程是将萃取了溶质的超临界流体，再通过一种吸附分离器，这种吸附分离器中装有只吸附溶质而不吸附萃取剂的吸附剂，当萃取了溶质的超临界流体通过这种吸附分离器后，溶质便与萃取剂即超临界流体分离，萃取剂经压缩后循环使用。



(c) 吸附法

$$T_1 = T_2, \quad p_1 = p_2$$

---

# 五、液膜分离技术

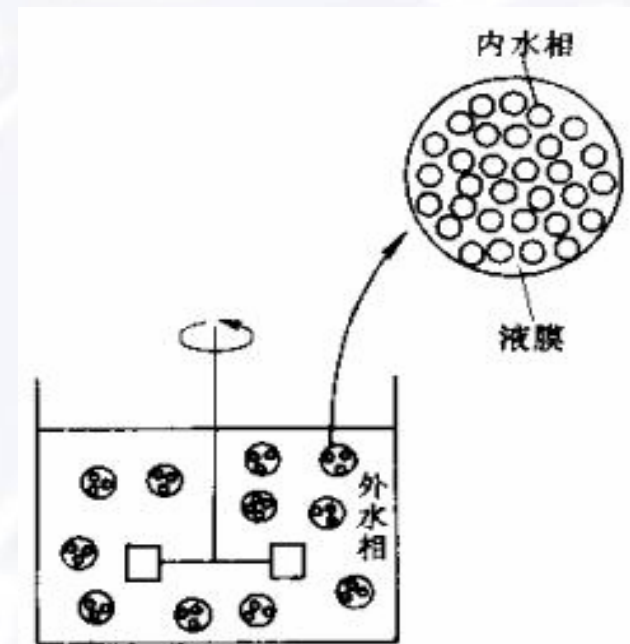
## Liquid membrane separation

- 液膜分离技术是萃取（膜）技术的重要分支，它是通过两液相间形成界面-液相膜，将两种不同但又能混溶的溶液隔开，经选择性渗透，使物质分离提纯。
- 该技术具有膜薄、比表面积大、分离效率高、速度快、过程简单、成本低、用途广等优点。

# 1, 液膜的种类和结构

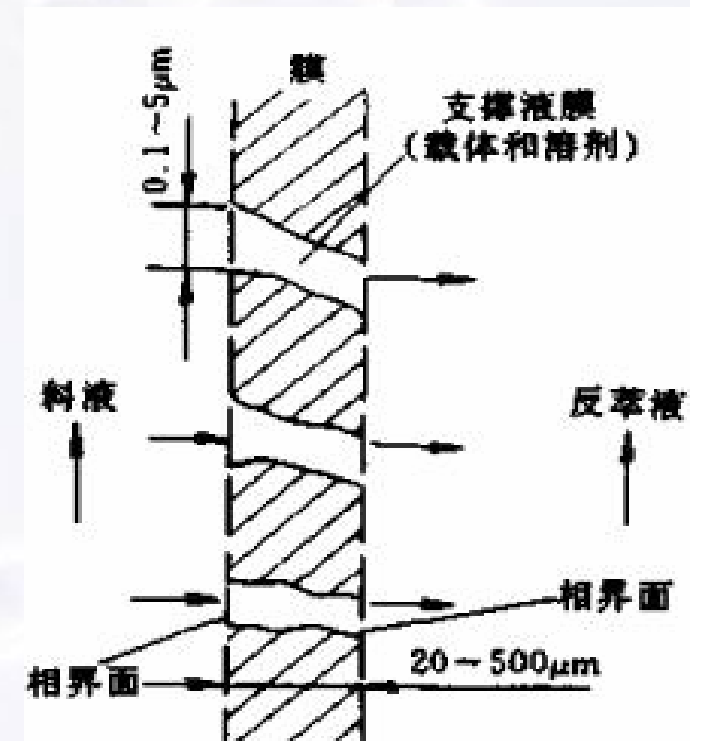
## (1) 乳状液膜

- 乳状液膜根据成膜液体的不同分为
  - (W/O) / W (水/油) 水
  - (O/W) / O (油/水) 油
- 乳状液膜的膜溶液组成
  - 膜溶剂 (90%)
  - 表面活性剂 (1-5%) : 稳定液膜
  - 添加剂



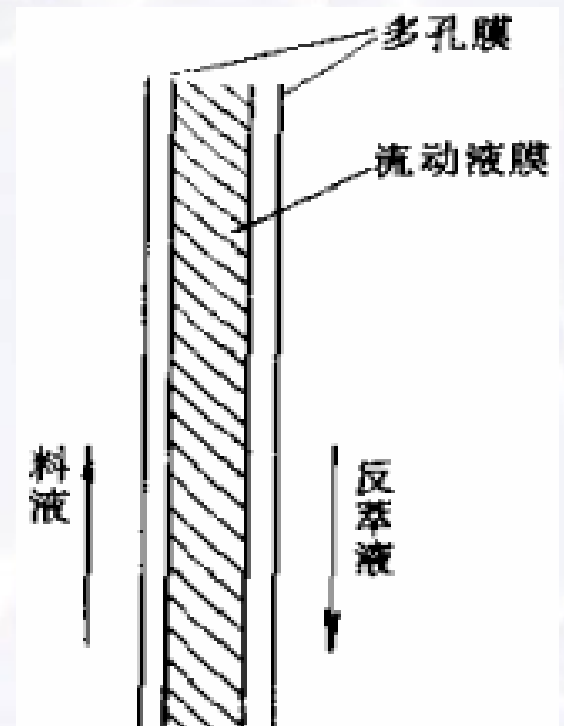
## (2) 支撑液膜

- 将多孔高分子固体膜浸在膜溶剂中，使膜溶剂充满膜的孔隙形成液膜。
- 支撑液膜分隔料液相和反萃相，实现渗透溶质的选择性萃取回收或除去。
- 当液膜为油相时，常用的多孔膜有聚四氟乙烯、聚乙烯和聚丙烯等。



### (3) 流动液膜

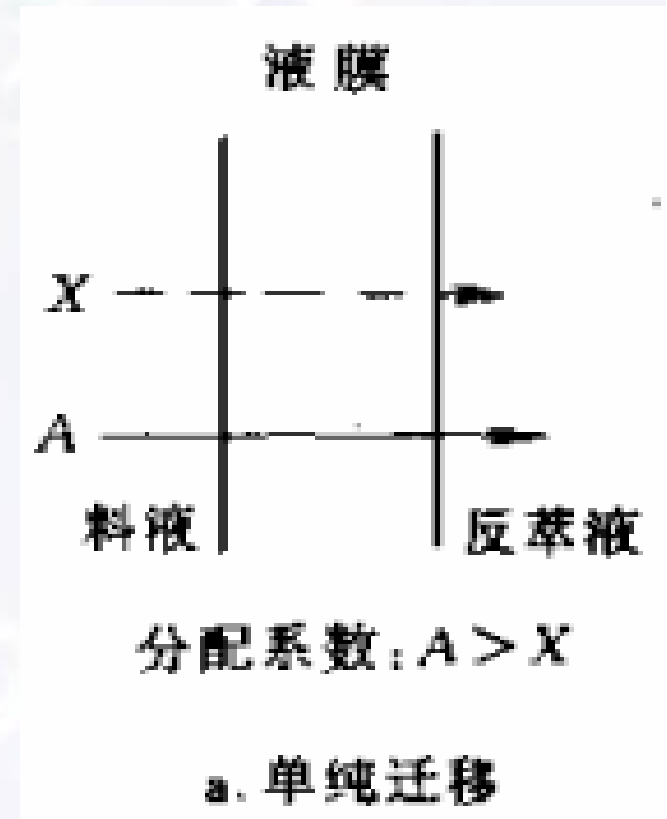
- 也是一种支撑液膜。
- 液膜相可循环流动。
- 液膜相的强制流动或降低流路的厚度可降低液膜相的传质阻力。



## 2, 液膜萃取的机理

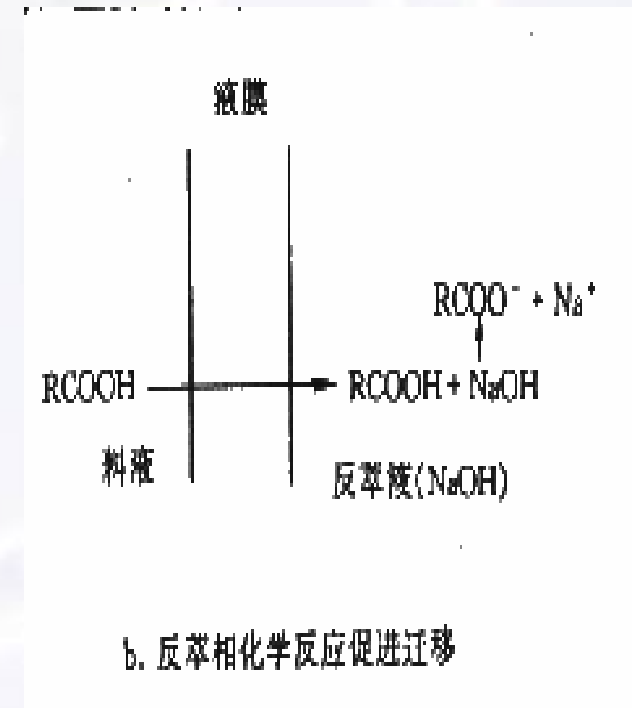
### (1) 单纯迁移 (物理渗透)

- 根据料液中各种溶质在膜相中的溶解度 (分配系数) 和扩散系数的差异进行萃取分离。
- 溶质的扩散系数的差别不大, 主要靠分配系数的差别实现分离。
- 当反萃相中溶质的浓度增大到与料液相相同时, 溶质迁移不再发生。



## (2) 反萃相化学反应促进迁移

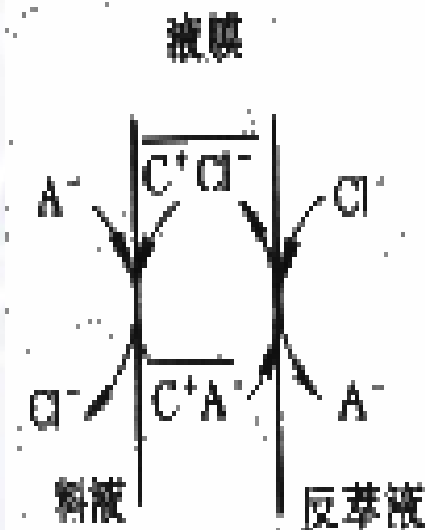
- 在有机酸等弱酸的分离纯化，利用强碱溶液为反萃相，与料液中溶质发生不可逆化学反应生产不溶于膜相的盐。
- 在膜相传质速率为控制步骤时，反萃相中有机酸的浓度接近于零，使膜相两侧保持最大的浓度差，促进有机酸的迁移。



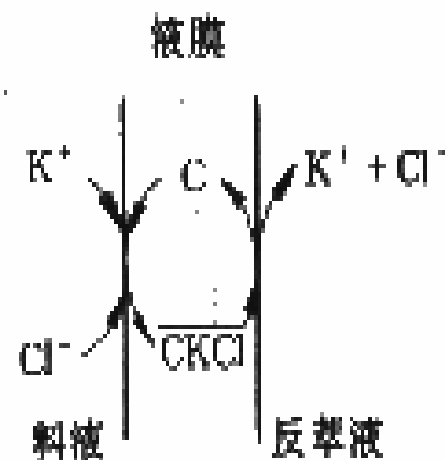


### (3) 膜相载体输送

- 在膜相中加入可与目标产物发生可逆反应的萃取剂C，目标产物与C在料液一侧生成中间产物。
- 利用载体输送可大大提高溶质的渗透性和选择性。

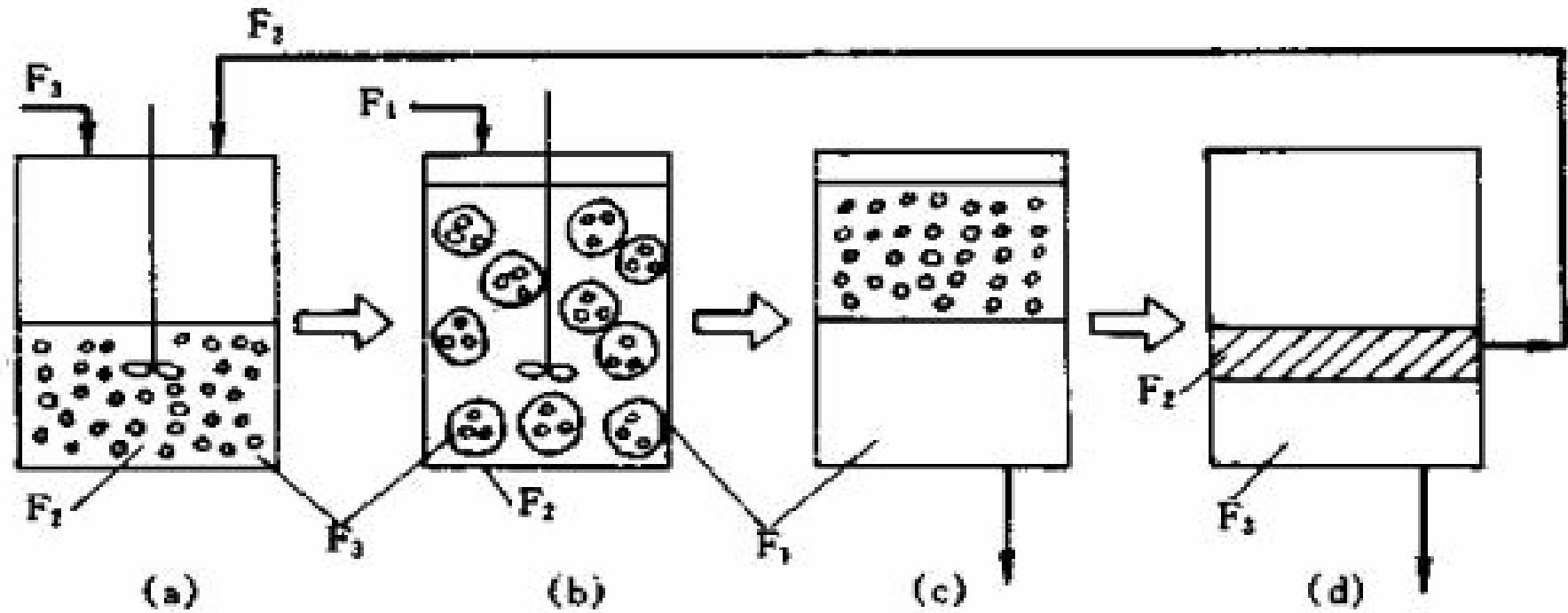


c. 载体输送(反向迁移)



d. 载体输送(同向迁移)

### 3, 液膜分离的操作过程



乳状液的准备

乳状液与待  
分离液接触

萃余液的分离

乳状液的分层

## 4, 萃取设备

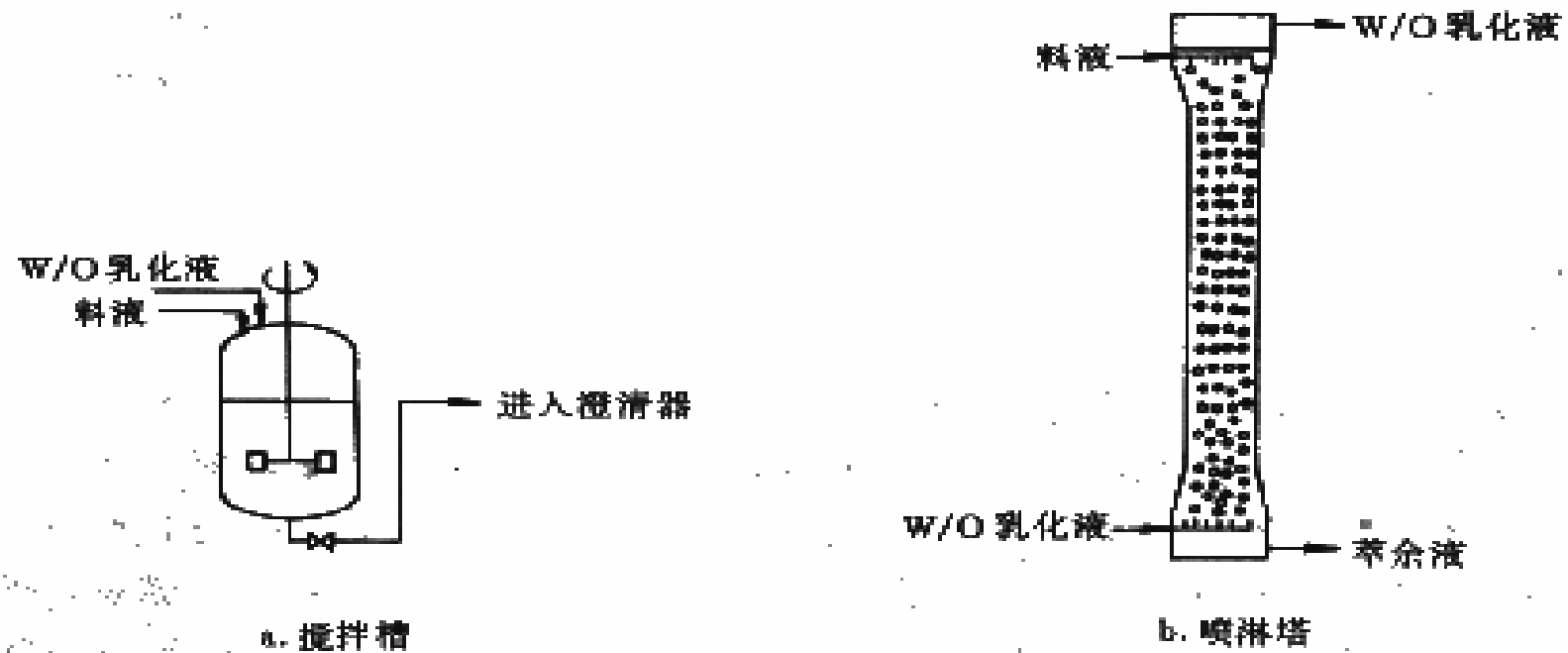


图 4.38 利用乳状液膜的萃取设备

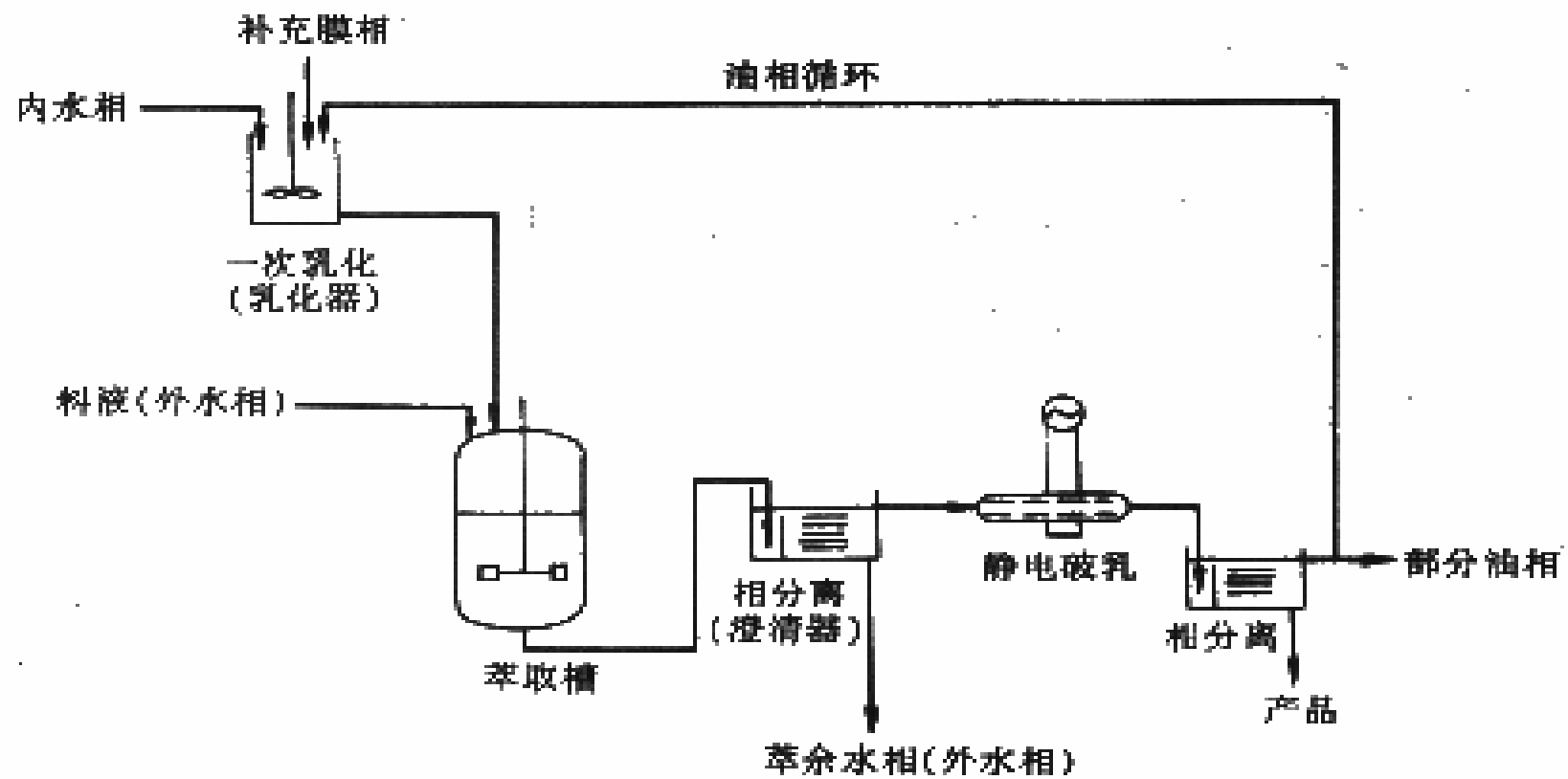
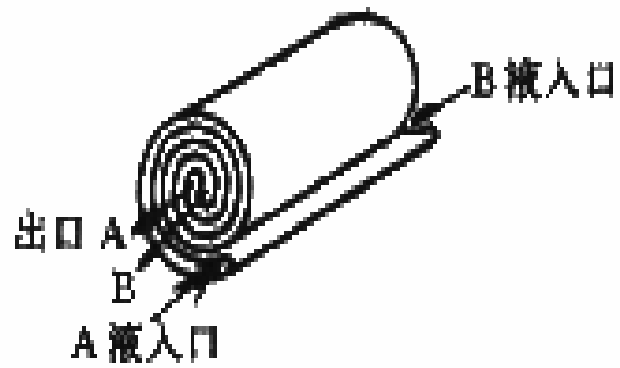


图 4.39 利用搅拌槽的乳状液膜连续萃取过程



a. 平膜组件



b. 螺旋卷式膜组件



c. 中空纤维膜组件

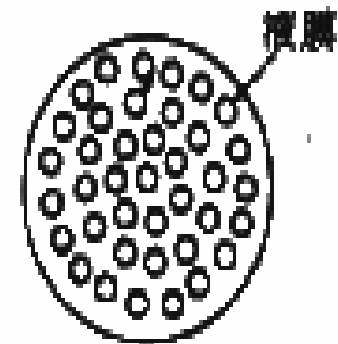
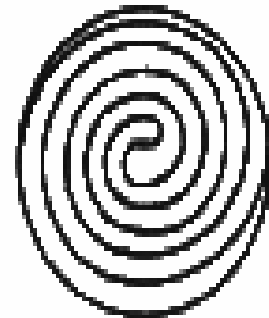
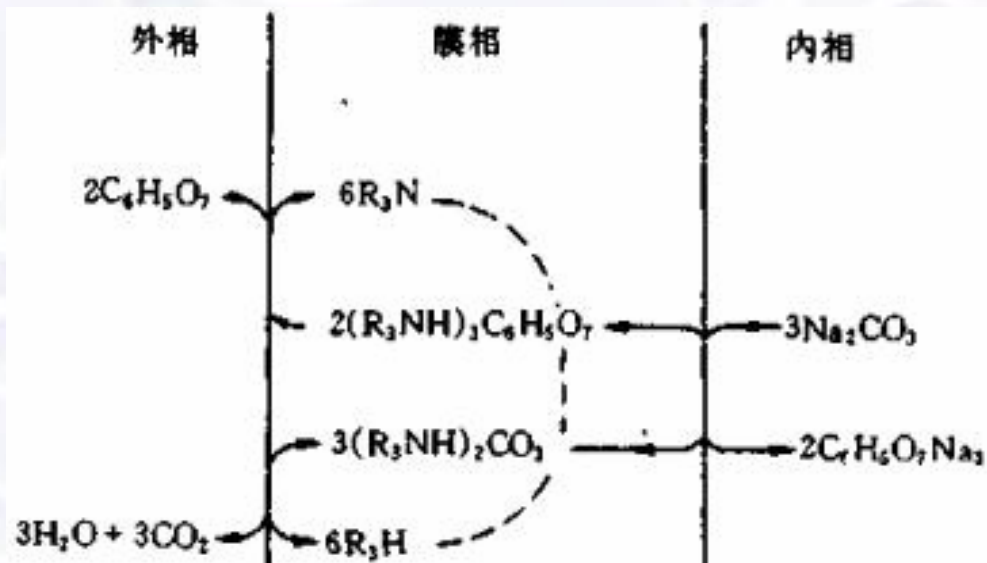
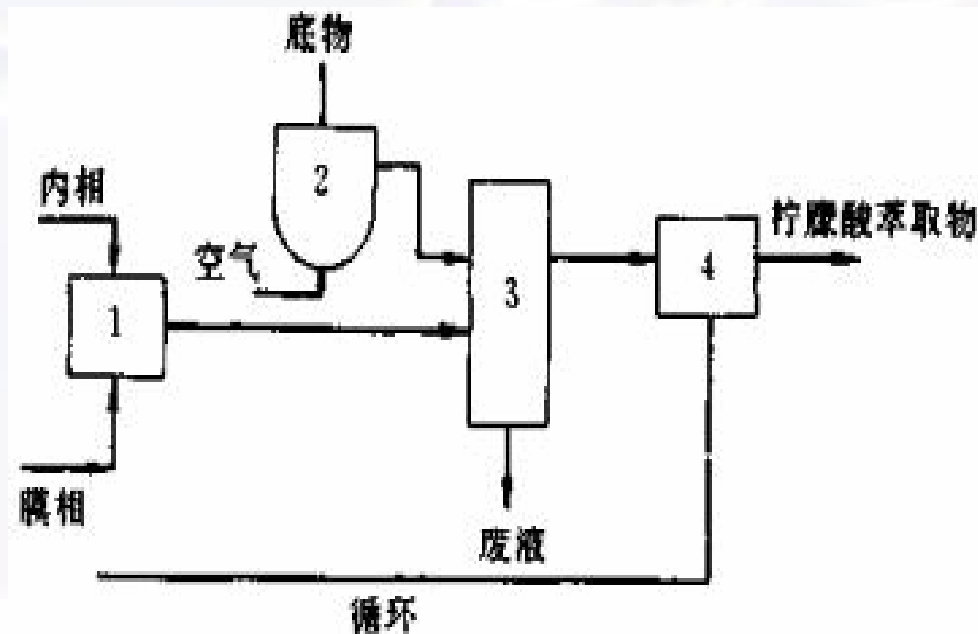


图 4.40 常见的支撑液膜组件

# 5, 液膜分离技术的应用

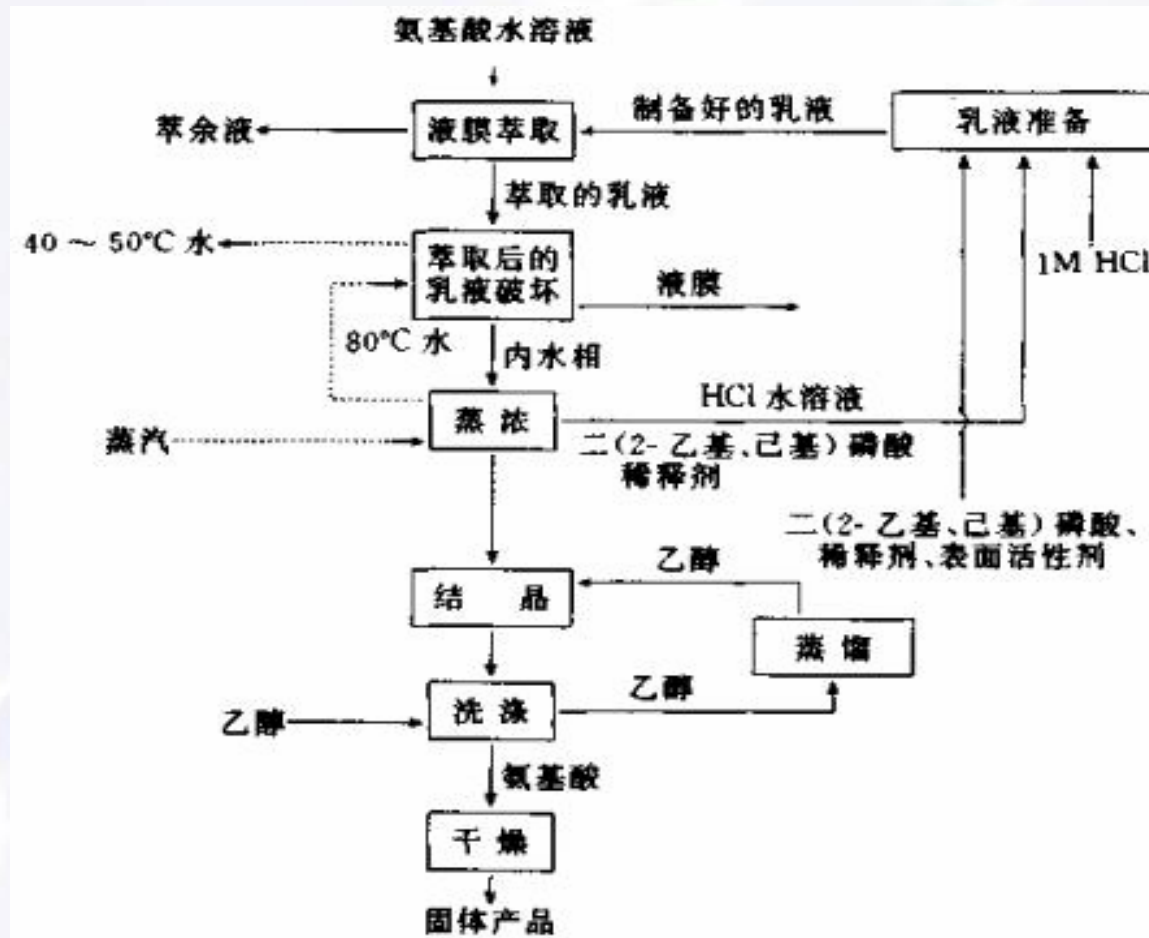
## 液膜分离萃取有机酸

### 萃取柠檬酸的流程



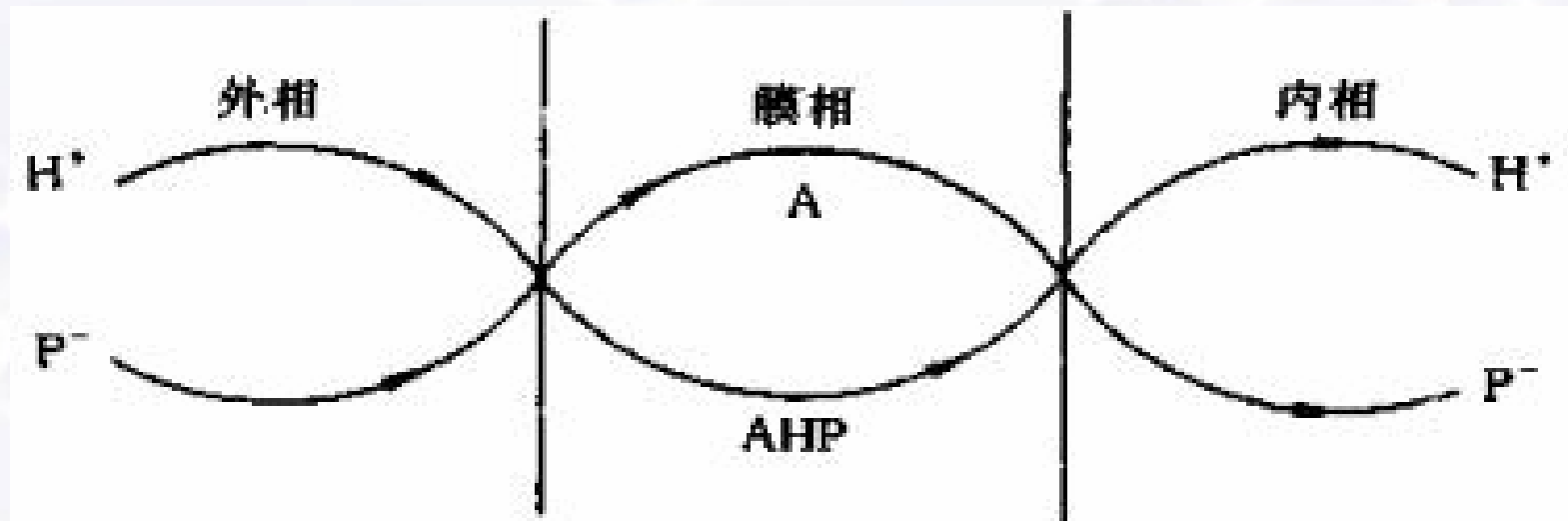
### 萃取柠檬酸的机理

# 液膜分离萃取氨基酸





# 液膜分离萃取抗生素



## 液膜萃取分离青霉素的机制

A—载体；AHP—复合物； $H^+$ —氢离子； $P^-$ —青霉素离子