

从产物分离纯化看生物技术和过程优化

孙万儒

(中国科学院微生物研究所, 北京)

近20年, 生物技术有了很大发展。DNA重组和细胞融合技术的发展为构建具有特殊生产能力的新物种开辟了广阔天地。生物技术之所以受到广泛注意, 是因为它能依照人们的意愿, 高效率地生产人类所必需的产品。但是, 对于大多数生物技术产品来说, 必须经过分离纯化, 即所谓后处理过程, 达到一定的质量标准后, 才是可用产品。根据目前经验, 大多数生物技术产品的研究开发中, 约40—80%的资金用于后处理过程。而精细产品, 基因工程产品比例更高。另外, 分离纯化技术不仅影响产品质量, 在一定程度上也影响着产量。分离纯化技术已成为生物技术领域中的关键技术之一。

不论我国还是发达国家, 分离纯化技术的发展与其他生物技术的发展相比是不平衡的。生物技术实验室研究成果转化为产品的比例之低, 与后处理技术发展缓慢、落后有直接关系。实际上, 后处理技术的落伍已拖了生物技术发展的后腿。如不及时解决这个问题, 生物技术的发展将面临严重危机。近年许多国家已经认识到这点, 纷纷投资, 建立专门研究机构, 开展研究, 企图迅速赶上。我国目前也正在解决这一问题。

造成以上局面的主要原因有:

1. 对发展分离纯化技术在生物技术发展中的重要性认识不足。目前, 在生物技术研究和发展中, 人们偏重于DNA重组和细胞融合、细胞培养和发酵技术等方面的研究和开发, 而对分离纯化技术重视不够, 经费不足, 从事这方面研究的专业人员和人才培养比例失调, 据估计两者比例约为25:1, 甚至更低。这是导致实验室研究成果难于变为社会所需的产品的重要原因之一。另外, 认为分离纯化技术不能独

立研究开发, 只能作为上游工作的附属。许多分离纯化研究是由其他专业人员附带进行, 由于专业背景不同, 难于在这个领域作出重大突破和发展。

2. 对分离纯化的特殊性和难度认识不足。利用生物技术, 比如发酵、细胞培养和酶反应产生的产物都比较复杂, 往往副产物与目的产物在结构和物理化学性质, 甚至生物学特性上相似, 要将目的产物从含有多种组分的培养液中分离纯化十分困难。许多生物技术产品是用于治疗或分析目的, 对产品纯度要求很高。因此, 必须严格控制生产条件, 选择试剂, 以及用水的标准。需使用高精度的技术。分离纯化技术面对的是生物产品结构复杂、种类繁多、特别是多数产品是具有生物活性的不稳定性物质, 在分离纯化过程中不能损害其生物活性。因此许多化工单元操作, 比如加热, 强酸碱变化, 有机溶剂处理等方法均不适用。需发展结合生物产品特性、温和、专一的精密技术。由于生物产品的多样性, 使分离纯化技术通用性差。一个产品往往需要若干专一的精密的又能互相适应和协调的技术组成一套完整的分离纯化工艺。因此, 从事分离纯化技术研究, 开发和应用的专业人员需具备扎实的本专业知识和技术, 同时也需要有广泛的其他学科方面的知识。

3. 学科和阶段之间的协调和配合不够。分离纯化技术是在生物学、细胞学、生物化学、化学、化学工程、物理化学、机械和电子等学科的有关技术的基础上发展起来的, 需要多学科和技术合作。另外, 分离纯化过程作为生物技术产品生产过程中的下游过程也需要其他环节, 特别是上游过程的配合。目前, 学科之

本文于1988年6月15日收到。

间、环节之间的协作和配合比较困难，各部分片面强调本部分的优化，而不考虑相互间的影响，因此整个过程的优化是不可能的。

实际上，在产品开发研究和生产过程中，上游的许多因素直接影响着产物的分离纯化。从事上游工作（包括研究开发和生产）的人把注意力集中在如何提高本阶段的水平无疑是正确的，但也希望能同时关心可能给产物回收、纯化带来的影响。事实上，生产过程的最优化，并不是各阶段和环节的最优化的加合。各阶段或环节的优化一定要服从整体生产过程，以整体生产过程的最优化为前提。因此必须认真考虑整体过程的各个阶段或环节，不同技术之间的相互作用和影响。

基因工程表达产物是生物技术的主要产品，广泛用于临床诊断和治疗。由于产物含量低，对技术要求高，这类产物不仅存在分离纯化问题，同时还存在产物结构上的修饰和改造，后处理更加复杂。后处理工艺和纯化难易程度直接与DNA重组方式有关。需上、下游的充分合作。

从事优良种系、工程菌、微生物菌种工作的同志都在利用DNA重组、细胞融合及遗传学方法等，尽可能提高菌株的生产能力，这是问题的主要方面。如果同时考虑利用这些技术减少可能产生的杂质，比如色素、类似物、毒素、引起产物降解和其他反应的酶类，以及干扰分离纯化的物质的产生，可大大减轻产物后处理的负担。以抗生素和多糖生产为例，如果利用遗传学手段得到不产色素的菌种，即使其产量略低于产色素的菌种，由于省去大量脱色工艺，可提高产品产量和质量，成本也可降低。

利用遗传工程的方法对目的产物，主要是蛋白质的组成予以改变或对某些部分加以修饰，以使某些性质改变，使之有利于分离纯化如利用遗传工程的方法，将凝聚因子引入，使细胞在培养过程中凝聚，以便容易进行细胞分离。

同样，在发酵和细胞培养时，培养基组成和培养条件也会影响到产物分离纯化。例如，我们有时为提高发酵水平，降低发酵成本，往往采用高浓度的天然培养基，如玉米粉，豆饼粉，麸皮、

玉米浆，酵母膏等。由于液化不好大量菌体和未利用的培养基残留在发酵液中，要从这样的物料中分离细胞几乎不可能，即使分离发酵液中的产物也十分困难。目前， α -淀粉酶和蛋白酶发酵产物分离之所以困难，主要原因就在于此。国际上广泛使用的絮凝技术对主要成分为可溶性物质的液体培养基的发酵物的处理很有效，但对含有大量固型物的发酵物却十分困难。因此，目前食品级酶制剂的生产问题很大。如果改用可溶性液体培养基，可能发酵成本会提高，还需做些菌种工作，但酶的提取工艺简化，分离纯化收率提高，其总成本不一定增加许多，但产品质量提高了。

在一些精细产品的生产中，为提高发酵产率，有时要使用玉米浆、酵母膏，蛋白水解液等，它们会带来大量的有色物质，在分离纯化中会增加脱色负担，造成产物的损失。其损失如果等于或大于因加入这种成分而提高的产量，则不加或改用其他代用物更为合适。

另外，在某些情况下为提高发酵和培养阶段的产率，采用延长时间的办法，有时会给后处理带来麻烦。老的细胞在营养物质缺乏条件下会发生自溶，使细胞产量降低，胞内物质释放，会影响细胞分离和收率。释放的胞内物质会增加胞外物质的分离纯化负担。

在发酵和培养过程中，由于培养基组分和代谢物的作用，在通风搅拌下，可能产生大量泡沫。若不及时消泡会发生逃液，引起污染。泡沫表面张力会引起生物活性物质失活。为控制泡沫需加入消泡剂。除使用油以外，其他大部分为离子型或非离子型的表面活性剂，有些具有很高的分子量。如果不能为生物代谢掉，会残留在发酵液或培养液中，且较难用一般方法除去。它们会吸附在各种层析材料和超滤或微孔过滤膜上，降低其效率。因此，严格控制消泡剂用量和类型对产物分离纯化是很重要的。

在发酵和培养时，为满足细胞增殖和代谢的需要，在培养基中需加入一些无机盐，有时为了控制过程的pH，需加入酸或碱，均会增加盐浓度。当进行浓缩时，浓度大大提高。高浓度的盐也会影响到使用的技术，比如离子交换、亲和层析、双水相提取等技术。为适应这些技

术,需加以稀释,处理体积增加,设备加大,操作时间延长,这对某些不稳定产物的分离纯化是不利的。

实际上,以上许多影响下游过程的因素也是上游工作本身必需加以考虑的需优化的因素。因此,在优化的过程中需同时考虑对两个方面的影响。目的在于使整体工艺过程优化。

为达到下游过程优化目的,需同时发展精度高,通用性强的(如絮凝、细胞破碎、膜分离、层析、双水相提取、连续电泳、逆流分配等技术)和专一、高效的技术(如亲和层析和沉淀,染料亲和层析和分配,连续萃取等技术),同时也要发展常规的化工单元操作技术。

以便为分离各种不同产物组成合理、高效、简便、精确的后处理工艺。另外需对组成后处理工艺的各种技术的衔接和相互协调进行研究,目的在于以最少技术步骤和最短的时间达到最高效率。为保证工艺过程的高效,还需进行有关工程、设备及使用材料的研究。因此,就后处理技术本身也需多方面的合作和配合。

综上所述,上游与下游的配合,各方面和阶段之间的充分理解、协调和合作,从全局观点出发,才能使整体生产过程达到最优化,才能生产出高质量、低成本的产品。只有这样才能推动生物技术的发展,使之尽快工业化。