



高等职业教育“十二五”规划教材



生物反应及制药单元 操作技术

王玉亭 主编



中国轻工业出版社 | 全国百佳图书出版单位

高等职业教育“十二五”规划教材

生物反应及制药 单元操作技术

王玉亭 主编



中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生物反应及制药单元操作技术/王玉亭主编. —北京:
中国轻工业出版社, 2014. 9

高等职业教育“十二五”规划教材

ISBN 978-7-5019-9789-3

I. ①生… II. ①王… III. ①生物工程—化学反应工
程—高等职业教育—教材②制药工业—化工单元操作—高
等职业教育—教材 IV. ①Q81②TQ460.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 196826 号

责任编辑:江 娟 策划编辑:江 娟 责任终审:劳国强
封面设计:锋尚设计 版式设计:王超男 责任监印:张 可

出版发行:中国轻工业出版社(北京东长安街6号,邮编:100740)

印 刷:三河市万龙印装有限公司

经 销:各地新华书店

版 次:2014年9月第1版第1次印刷

开 本:720×1000 1/16 印张:18.5

字 数:370千字

书 号:ISBN 978-7-5019-9789-3 定价:37.00元

邮购电话:010-65241695 传真:65128352

发行电话:010-85119835 85119793 传真:85113293

网 址:<http://www.chlip.com.cn>

Email: club@chlip.com.cn

如发现图书残缺请直接与我社邮购联系调换

120801J2X101ZBW

前 言

高职教学应体现“工学结合”,以“必需”“够用”为原则,积极适应行业技术发展。目前高职生物制药、生物技术及应用类专业多为理科专业,学生的工科基础薄弱,而行业的发展将越来越多的生物技术及产品制备推向规模化、工业化,要求行业从业人员有一定的工程概念和操作技能。在理科药学类专业中开展工程技术及操作技能的教学活动日益重要。

以往,这类教学活动多是通过轻工类专业的“化工原理”或“化工基础”类课程来讲授。但这类课程属于工科类课程,含有大量的公式推导和设计计算,对药学类的理科专业并不适用;另一方面,药学类等理科专业所开设的“生物制药设备”“生物工程设备”类课程,多偏重于设备的结构特征,与工艺、工程的结合并不紧密,而对高职教学来说,“设备”课程的实质性内容是设备的操作与维护。显然,原有的课程并不完全适合行业的发展需求。

本教材注重通用工艺过程中的单元操作共性,体现相关行业、企业的岗位技能要求,围绕当前生物制药、生物技术及应用领域的产业化特征,按照工程化内容进行设计、编写,同时设计了部分实用、可行的技能训练,侧重于培养学生的动手能力和实操技能,强化工程操作概念。各校可根据实际情况和教学计划灵活选用。

本教材由广东食品药品职业学院王玉亭主编,参与本教材编写的有黑龙江农垦科技职业学院李旭颖(编写模块一、模块二和模块五)、黑龙江农业职业技术学院孙佳(编写模块三、模块十一)、杨凌职业技术学院刘彦超(编写模块四、模块六)、开封大学化学工程学院占桂荣(编写模块七、模块八和模块九)、内蒙古农业大学职业技术学院王燕荣(编写模块十)。在编写过程中得到了编者所在院校领导的大力支持和帮助。本书参考了一些已发表的文献资料,在此向相关作者和提供帮助的同志表示由衷感谢!

由于时间仓促,编者水平有限,书中难免存在不足之处,敬请同仁与广大读者批评指正。

王玉亭

2014年6月

目 录

绪论	(1)
模块一 灭菌与清洗	(6)
项目一 概述	(6)
项目二 湿热灭菌	(8)
项目三 其他灭菌方法	(16)
项目四 设备清洗	(19)
技能要点	(25)
思考与练习	(25)
模块二 生物反应	(27)
项目一 生物反应基本知识	(27)
项目二 无菌培养与操作	(32)
项目三 发酵罐	(39)
项目四 细胞反应器	(44)
项目五 发酵过程的检测控制	(48)
技能要点	(55)
思考与练习	(56)
模块三 细胞破碎	(57)
项目一 细胞壁的结构与组成	(57)
项目二 细胞破碎方法与设备	(59)
项目三 包涵体	(67)
技能要点	(71)
思考与练习	(71)
模块四 非均相分离	(72)
项目一 非均相分离的目的	(72)
项目二 过滤操作	(73)
项目三 离心操作	(82)
技能要点	(88)
思考与练习	(88)
模块五 膜分离	(90)
项目一 概述	(90)
项目二 膜分离设备	(95)

项目三 膜分离操作维护	(107)
技能要点	(110)
思考与练习	(110)
模块六 萃取与浸取	(112)
项目一 概述	(112)
项目二 萃取原理	(113)
项目三 萃取设备	(119)
项目四 萃取工艺	(124)
项目五 萃取操作中常见的问题及处理	(126)
项目六 浸取	(127)
项目七 双水相萃取	(137)
项目八 超临界萃取	(139)
技能要点	(142)
思考与练习	(142)
模块七 离子交换与吸附	(144)
项目一 吸附技术	(144)
项目二 离子交换	(158)
技能要点	(178)
思考与练习	(178)
模块八 色谱与电泳	(180)
项目一 色谱的基本原理	(180)
项目二 色谱操作	(186)
项目三 电泳分离技术	(198)
技能要点	(208)
思考与练习	(208)
模块九 蒸馏	(210)
项目一 蒸馏的原理	(210)
项目二 蒸馏操作方式	(215)
项目三 蒸馏塔的类型	(218)
项目四 蒸馏过程的控制	(224)
技能要点	(231)
思考与练习	(231)
模块十 结晶与干燥	(233)
项目一 结晶技术	(233)
项目二 干燥技术	(241)
技能要点	(260)

思考与练习	(260)
模块十一 制水	(262)
项目一 概述	(262)
项目二 原水预处理	(262)
项目三 纯化水制备	(267)
项目四 蒸馏水器	(272)
技能要点	(278)
思考与练习	(279)
附录 通用式发酵罐设计参考资料	(280)
参考文献	(282)

绪 论

一、课 程 介 绍

本课程是以培养生物反应及制药单元操作技能为目标的专业技能课程，是生物制药技术、生物化工技术、生物技术与应用、功能食品加工等专业的核心技能课程之一。

在生物工程反应及制药生产中，需要大量的工程技术手段。一般来说，这些工程技术手段主要由各个工段（或生产车间）组成，如菌种选育、种子培养、细胞培养、微生物发酵、培养/发酵液分离与纯化、成型加工、制剂加工等。此外，还需要空调、制水、动力等辅助车间。相应的设备主要有原材料的粉碎、原料液配制与输送、空气净化与调节、换热、生物反应、细胞破碎、分离纯化、蒸发浓缩、干燥结晶、制剂加工、工艺用水等。

本课程为原“生物制药设备”和“生物化工基础”两门课程整合后的改革课程，以生物技术产品生产制备所涉及的生物工程反应、分离及制药过程中涉及的工艺流程、设备为核心内容，讲授灭菌与清洗、生物反应、细胞破碎、非均相分离、膜分离、蒸馏、萃取与浸取、离子交换与吸附、制水、色谱与电泳、结晶与干燥、固体与液体制剂等生物反应与制药应用单元操作技术。

二、生物反应与生物技术产品

1. 生物技术产品特性

生物技术产品是指在生产过程中应用微生物发酵技术、酶反应技术、动植物细胞培养技术等生物技术而制得的产品，包括常规的生物技术产品，如发酵生产的有机溶剂、氨基酸、有机酸、蛋白质、酶、多糖、核酸、维生素和抗生素等；以及现代生物技术产品，如用基因工程技术生产的医疗性多肽和蛋白质等。这些产品的生产不同于一般的化学产品生产，产品本身又具有许多特殊性。有的是细胞内产物，如胰岛素、干扰素等；有的是细胞外产物，如抗生素、胞外酶等；有的是分子质量较小的物质，如抗生素、有机酸、氨基酸等；有的是分子质量很大的物质，如酶、多糖、多肽、重组蛋白等。概括起来，生物技术产品主要有以下几方面特性：

（1）生物技术产品具有不同的生理功能，其中有些是生物活性物质，如蛋白质、酶、核酸等。这些生物活性物质都有复杂的空间结构，而维系这种特定三维结构的主要是氢键、盐键和二硫键、疏水作用及范德华力等。这些生物活性物

质对外界条件非常敏感，酸、碱、高温、重金属、剧烈的振荡和搅拌、空气和阳光等都可能导致生物活性丧失。

(2) 生物技术产品有些是胞内产物，有些是胞外产物。胞外产物直接由细胞产生，直接分泌至培养液中。而胞内产物较为复杂，有些是游离在胞浆中，有些是结合在质膜上或存在于细胞器内。对于胞内物质的提取，要先破碎细胞，对于膜上物质，则要选择适当的溶剂，使其从膜上溶解下来。

(3) 生物技术产品通常是从产物浓度很低的发酵液或培养液中提取的。除少数特定的生化系统，如酶在有机相中的催化反应外，在其他大多数生化反应中，溶剂全部是水。产物（溶质和悬浮物）在溶剂水中的浓度很低，原因主要是受到细胞本身代谢活动限制及外在条件对传质传热的影响。而杂质的浓度很高，并且这些杂质有很多与目标产物的性质很相近。有的还是同分异构体，如手性药物的制备。

(4) 发酵液或培养液是多组分的混合物，且是复杂的多相系统，固液分离很困难。细胞本身的组成成分也非常复杂，不同的细胞具有不同的组成，细胞在培养过程中由于衰老和死亡，使细胞本身自溶而将相应组成成分释放到培养液中，这些混合物中既有大分子的核酸、蛋白质、多糖、类脂、磷脂和脂多糖等，还包含了低分子质量的氨基酸、有机酸等，不仅有可溶性物质，还有以胶体悬浮液和粒子形态存在的组分，如细胞和细胞碎片、培养基残余组分、沉淀物等。组分总数大，不可能做到精确的测定，且各组分的含量和性质还会随着细胞所处环境的变化而变化。

在生物工程下游加工过程中，处理发酵液时，还会添加化学品或其他物理、化学和生物方面的原因而引起培养液组分的变化及发酵液流体力学性质的改变。分散在培养液中的固体和胶体物，具有可压缩性，其密度又与液体接近，加上黏度很大，属于非牛顿性液体，使得从培养物中分离固体很困难。

(5) 生物技术产品的稳定性较差，容易随时间变化。如容易受空气氧化、微生物污染、蛋白质水解等。产物失活的主要机制是化学降解，或因微生物引起的降解。蛋白质的稳定性一般都很窄，只能在较小的范围内保持温度和 pH 的恒定。超过这个范围，蛋白质将发生功能的变性和活性丧失。

(6) 生物技术产品的生产多为分批操作。生物变异性大，各批发酵液或培养液不尽相同。另外，由于生物技术产品多数是医药、生物试剂或食品等精细产品，必须达到药典、试剂标准和食品规范的要求，对最终产品的质量要求很高。

2. 生物工程产品分离精制的特点

产物的分离精制是从复杂体系中获得最终产品所必须的过程。生物技术产品的特点导致其分离精制过程的实施十分困难。据统计，生物工程产品的分离精制过程成本在产品总成本中占据的比例越来越高，例如，化学合成药物的分离精制成本是合成反应成本的 1 ~ 2 倍；抗生素药物的分离精制费用为发酵部分的

3~4 倍；对维生素和氨基酸产品的分离精制费用而言为 1.5~2 倍；对于新开发的基因药物和各种生物制品，其分离精制费用可占整个生产费用的 80%~90%。分离精制技术直接影响着产品的总成本，制约着产品生产的规模化和工业化进程。生物工程产品分离精制呈现着以下几方面特征：

(1) 成分复杂 发酵液或细胞培养液中的成分复杂，确切组分不能准确预测，这给后续产品的分离精制工艺设计带来很大困难。对成分数据的缺乏是现在下游加工过程中的共同障碍。

(2) 起始浓度低 从生产成本来看，生物工程最终产品的浓度越高越好。但发酵液或细胞培养液、提取液中的产物浓度往往不是很高，在应用多种分离精制技术过程中，产物的浓度不是很高，例如，发酵液中抗生素产品的质量分数为 1%~3%，酶为 0.1%~0.5%，维生素 B₁₂ 为 0.002%~0.005%，胰岛素不超过 0.01%，单克隆抗体不超过 0.0001%，而杂质含量却很高，并且杂质往往与目的组分有相似的结构，加大了分离难度。对这一类目标产物的分离精制就要应用多种分离技术，进行多步的分离，这势必增大了过程当中的损耗和加工成本，降低产物的最终收率。

(3) 操作条件温和 生物工程技术产品的分离精制一般都需要在十分温和的条件下操作，以避免因外界的强烈干扰而使产品丧失活性。同时，生产过程要尽可能短。从某种程度上说，生物技术产品不是用物质质量的多少来衡量，而是生物活性的量化。高温、极端 pH、有机溶剂等都会引起失活或分解。如蛋白质的生物活性与一些辅助因子、金属离子的存在和分子空间构型有关。剪切力会影响蛋白质的空间构型，从而影响其活性。这些都是分离精制过程中需要考虑的。

(4) 发酵和培养很多都是分批操作，生物变异性大，各批次的发酵液不尽相同。这就要求下游加工工艺有一定的操作弹性，特别是对染菌的批次，也要能够后处理。发酵液的放罐时间、发酵过程中消泡剂的加入，都对提取有影响。另外，发酵液放罐后，由于条件的改变，还会继续按另一条途径发酵，同时也容易感染杂菌，破坏产品。所以，发酵结束后要尽量缩短发酵液存放时间。发酵废液量比较大，BOD 值较高，必须经过生物处理后才能排放。

(5) 某些产品在分离精制过程中，还要求无菌操作以除去对人体有害的物质。如基因工程产品，应特别注意生物安全问题，即在密闭的环境下操作，防止因生物体扩散而对环境造成危害。

3. 生物工程产品分离精制的原理

生物反应产物一般是由细胞、有利的细胞外代谢产物、细胞内代谢产物、残存底物及惰性组分等组成的混合体系。要想从这些混合液中得到目标产物，必须利用混合液中目标组分与共存杂质之间在物理、化学以及生物学性质上的差异，选择合理的分离精制技术，使目标产物与杂质在分离操作中具有不同的传质速率或平衡状态，从而实现分离精制。这些物理性质包括：分子质量、粒度、密度、

相态、黏度、溶解度、电荷形式、极性、稳定性、沸点和蒸气压等。化学性质包括：等电点、化学平衡、反应速率、离子化程度、酸性、碱性、氧化与还原性等；生物学性质主要包括：疏水性、亲和作用、生物大分子间的相互作用、酶促反应等。

分离精制技术按照原理可分为机械分离与传质分离两大类。机械分离针对非均相混合物，根据物质大小、密度差异，依靠外力作用，将两相或多相分开。此过程的特点是相间不发生物质的传递，如过滤、沉降、膜分离等。传质分离针对均相混合物，也包括非均相混合物，通过加入分离剂（能量或物质），使原混合物体形成新相，在推动力作用下，物质从一相转移至另一相，达到分离精制的目的。此过程的特点是相间发生了物质的传递。

某些传质分离过程利用溶质在两相中的浓度与达到平衡时的浓度之差为推动力进行分离，称为平衡分离过程。如蒸馏、蒸发、吸收、吸附、萃取、结晶、离子交换等。某些传质分离过程依据溶质在某种介质中移动速度的差异，在压力、化合价、浓度、电势和磁场等梯度所造成的推动力下进行分离，称为速率控制分离过程，如超滤、反渗透、电渗析、电泳等。有些传质分离过程还要经过机械分离才能实现物质的最终分离，如萃取、结晶等传质分离精制过程都需要经离心分离来实现液-液、固-液两相的分离。此时，机械分离的效果直接影响到传质分离的速度和效果，必须同时掌握传质分离和机械分离的原理和方法，进行合理的运用。

简而言之，对于生物工程技术产品的分离精制，其分离工艺和设备是多种多样的，往往需要将几种分离技术进行优化组合，才能达到高效分离精制的目的。

三、分离精制技术的发展

随着技术的不断进步发展，对生物工程技术产品及药品的分离精制技术也提出了越来越高的要求。近年来，不断有新的分离精制技术出现。简单说，分离精制技术主要呈现以下发展方向：

(1) 新技术、新方法的开发及推广应用 近年来，基础理论的探索不断拓展，大量基础数据的获得、数学模型的建立等不断建立和应用。例如，随着膜材料研究的深入，膜技术应用领域也在不断拓展。随着膜本身质量的改进和膜装置性能的改善，在生物技术产品分离过程的各个阶段，将会越来越多地使用膜技术。例如，有报道在研究提取头孢菌素 C 的过程中，利用微滤过滤发酵液；利用超滤去除一些蛋白质杂质和色素；利用反渗透进行浓缩等。另外，如分子蒸馏、双水相萃取、超临界萃取、反胶团萃取、液膜萃取级亲和技术等也逐渐用于工业化生产。

(2) 分离精制过程的高效集成化 目前，应用的单元操作技术，如亲和法、双水相分配技术、反胶团法、液膜法、各类高效色谱法等，都是十分适用于分离

过程的新型分离技术。在高效集成化方面,如将亲和技术和双水相分配技术组合的亲和分配技术;将亲和色谱和膜分离结合的亲和膜分离技术;将离心的处理量、超滤的浓缩效能及色谱的纯化能力合而为一的扩张床吸附色谱技术等;将膜技术和萃取、蒸馏、蒸发技术相结合形成的膜萃取、膜蒸馏及渗透蒸发技术;色谱技术与离子交换技术等结合形成离子交换色谱、等电聚焦色谱等。通过分离技术的集成,利用每种方法的优点,补充其不足,使分离效率更高。

(3) 上下游技术的集成耦合 如很多发酵过程存在着最终产物的抑制作用,近年来,研究开发了各种发酵过程可以消除产物的抑制作用,可以采用蒸发、吸附、萃取、透析、过滤等方法,使过程边发酵边分离。萃取发酵法生产乙醇和丙酮-丁醇,固定化细胞闪蒸式酒精发酵就是典型的范例。

(4) 新型分离介质材料的开发 色谱分离中主要困难之一是色谱介质的机械强度差。色谱介质经历了天然多糖类化合物(纤维素、葡聚糖、琼脂糖)、人工合成化合物(聚丙烯酰胺凝胶、甲基丙烯酸羟乙酯、聚甲基丙烯酸酯)和天然、人造混合型几个阶段,主要着重于开发亲水性、孔径大、机械强度高的介质。特别是,加强了对天然糖类为骨架的介质改进。目前,已研究出高交联度的产品或能与无机介质(如硅藻土)相结合的产品。

(5) 清洁生产 随着人们生活水平的逐步提高,关注环境,减少环境污染、加强清洁生产已经越来越得到社会的认同。开发或应用高效、环境友好的绿色分离技术,使生物技术产品分离过程在保证产品质量的同时,符合环保要求,保证原材料、能源的高效利用,并尽可能确保未反应原料和水的循环利用。

综上所述,生物工程技术产品分离精制的发展方向是解决传统分离技术中存在的分离效率低、步骤多、消耗大、环境污染大等问题,使分离技术从宏观水平向分子水平发展,从多个相互串联的独立技术向集成化技术方向发展,从低选择性朝着高选择性的技术发展,从环境污染向清洁生产方向发展,从上下游独立操作向集成化操作发展,从使用传统分离介质向应用新型高性能介质方向发展。

模块一 灭菌与清洗

学习目标

[学习要求] 了解典型灭菌的概念、原则与方法，以及灭菌的供热原理和 CIP 清洗的概念；掌握高压蒸汽灭菌设备的使用与操作，干热灭菌的工艺流程与操作方法，以及 CIP 清洗的原则与方法，清洗流程和清洗规范；熟悉脉动真空压力灭菌的原理及程序，高压蒸汽灭菌锅、菌种保藏设备、套管式连消塔、蒸汽喷射器等灭菌设备的结构特征及使用。

[能力要求] 了解典型灭菌设备的工作原理；熟悉高压蒸汽灭菌、干热灭菌、CIP 清洗等的工作流程与操作。

项目一 概 述

一、概 念

在生物产品、食品、药品的生产和实验研究中，生物反应及加工过程的设备及管道、培养基的灭菌与清洗都是必不可少的关键步骤，尤其对培养基材料、各种食品、制剂以及生产中需要的操作工具和材料等。生产过程中的灭菌是保证产品安全、没有杂菌污染的必要条件。在生物技术与产品如食品加工和制药行业，都有相关的政府法规来保证严格的卫生要求。

需要说明一点，灭菌并不等同于消毒。这是两个不同的概念。消毒是指杀灭或清除物品上的病原微生物，使之达到无害化的处理。而灭菌是指用物理或化学的方法杀灭全部微生物，包括致病和非致病微生物以及芽孢，使之达到无菌保障水平。经过灭菌处理后，未被污染的物品，称为无菌物品；未被污染的区域，称为无菌区域。灭菌可包括消毒，而消毒却不能代替灭菌。灭菌是获得纯培养的必要条件，也是食品工业和医药领域中必需的技术。

在工业生产过程中，设备和管道在使用过程中由于生产原料和产品与设备和管道的接触形成物质垢，冷却介质形成水垢等原因形成工业污垢，这些污垢会影响生产的正常运行。严重的污垢沉积，会使设备的生产效率降低，甚至不能正常运行；残留的杂菌会大量消耗营养基质和产物，使生产效率和收率下降，增加生产的能耗和成本等。所以，要经常对设备和管道进行清洗，清洗的目的是维持正常生产，延长设备使用寿命。通过清洗可减少生产中染菌几率，提高生产能力和产品质量，提高原料利用率。减少能耗，降低生产成本。减少生产事故，有利人

体健康。

二、原则与方法

灭菌是用理化方法杀死一定物质中的微生物的微生物学基本技术，也是生物工程反应中必备的一项单元操作过程。灭菌的彻底程度受灭菌时间与灭菌剂强度的制约，也与原始存在的微生物群体密度、种类及其本身的耐受力有关。

不同类型的微生物，对环境变化的耐受力不同。例如，细菌营养体对热较敏感；革兰阴性菌比阳性菌更具有抗化学试剂的耐受性；细菌芽孢对化学试剂和热的耐受性更强；病毒的耐力因种类不同而有很大差异，亲水病毒的耐力较亲脂病毒强；真菌对干燥、日光、紫外线以及多数化学药物耐力较强，但不耐热（60℃、1h 一般即可杀灭）。

常用的灭菌方法很多，有化学试剂灭菌、渗透压灭菌、辐射灭菌、热灭菌等。

（1）化学试剂灭菌 大多数化学药剂在低浓度下具有抑菌作用，高浓度下则起杀菌作用。常用的有 5% 石炭酸、75% 乙醇和乙二醇等。该方法有很大的局限性，比如化学灭菌剂必须有挥发性，以便清除灭菌后材料上残余的药物。

（2）渗透压灭菌 这是利用高渗透压溶液进行灭菌的一种方法。例如，在高浓度的食盐或糖溶液中，细胞因脱水而发生质壁分离，不能进行正常的新陈代谢，结果导致微生物的死亡。

[课堂互动]

想一想 为什么蜜饯、果脯等食品可以在常温下放置很久而不会腐败变质？

（3）辐射灭菌 在一定条件下利用射线，可以杀灭微生物。较常用的射线有紫外线、电离辐射等。波长在 25000 ~ 80000nm 的激光也有强烈的杀菌能力，以波长 26500nm 最有效。辐射灭菌法仅限于某些材料和物品的表面，应用受到一定的限制。

（4）热灭菌 高温能使微生物细胞内的一切蛋白质变性，酶活性消失，致使细胞死亡。依据加热方式的不同，通常可分为干热灭菌、湿热灭菌等方法。

一般来说，应根据不同的灭菌需求，并视待灭菌材料中微生物的种类、污染状况、被污染物品的性质与状态，选用或者合并使用不同的灭菌方法，例如，在实验室可以使用干热灭菌，对于环境可以使用化学试剂灭菌；工业生产中的培养基、管道、设备等，通常采用湿热灭菌方法；无菌培养所需的净化空气，则使用过滤除菌方法。灭菌前，还应对灭菌的条件（如灭菌温度、压力等）进行充分的论证和确认；灭菌后，应进行灭菌效果的确认，以检验是否达到灭菌的目的。通常情况下采用无菌试验法进行判定。

项目二 湿热灭菌

湿热灭菌法是指用饱和水蒸气、沸水或流通蒸汽进行灭菌的方法。湿热灭菌法灭菌可靠、操作简便、易于控制，具有灭菌效率高、经济实用等特点，是目前应用最广泛的一种灭菌方法。常见的湿热灭菌方法包括沸水煮沸、巴氏消毒、高压蒸汽灭菌和间歇蒸汽灭菌等方法。

湿热灭菌法可在较低的温度下达到与干热灭菌法相同的灭菌效果。这是因为：

- (1) 湿热中蛋白吸收水分，更易凝固变性。
- (2) 水分子的穿透力比空气大，更易均匀传递热能。
- (3) 蒸汽有潜热存在，每 1g 水由气态变成液态可释放出 2.213kJ 热能，可迅速提高物体的温度。

微生物的种类与数量、蒸汽性质、待灭菌材料的性质和灭菌时间等是灭菌的主要影响因素。

由于蒸汽潜热大，穿透力强，容易使蛋白质变性或凝固，所以高压蒸汽灭菌法的灭菌效率较高，是药物制剂生产过程中最常用的灭菌方法。

高压蒸汽灭菌时，蒸汽压力可达到 0.1MPa 左右、温度约 121℃，一般能在 20~30min 内杀死全部的耐热芽孢，但对某些易被高压破坏的物质，如某些糖或有机含氮化合物，应适当降低温度，如 0.06MPa (110℃) 下灭菌 15~30min。如果是产孢子的微生物则应在灭菌后适宜温度下培养几小时，然后再灭菌，以用于杀死刚刚萌发的孢子，如此反复数次，也可达到完全灭菌的目的，即间歇蒸汽灭菌法。

一、常见的蒸汽灭菌器

常用的蒸汽灭菌设备主要有高压蒸汽灭菌器、脉动真空压力灭菌器和蒸汽连续灭菌系统等，灭菌设备的形状包括长方形、圆柱形和管状等。

1. 高压蒸汽灭菌器

高压蒸汽灭菌器是常用的灭菌设备，其原理是以蒸汽为灭菌介质，将一定压力的饱和蒸汽通入灭菌柜内，对待灭菌品进行加热，使微生物的蛋白质及核酸变性导致其死亡，冷凝后的饱和水及过剩的蒸汽可由柜内排出。高压蒸汽灭菌器适用于耐高温高压、不怕潮湿的物品材料，如玻璃容器、金属容器、金属器械、胶塞、溶液、各种培养基、布料、衣物等，广泛应用于各种无菌产品的生产过程，也可用于对干热灭菌不敏感产品的最终灭菌。

高压蒸汽灭菌器属于压力容器，应按照压力容器的使用规范操作，并还应考虑以下因素：

- (1) 选择的生物指示剂应对高温蒸汽灭菌有较强抵抗力，如嗜热芽孢杆菌就是较理想的一种。

(2) 兼顾其他变量对破坏芽孢的影响,如芽孢的繁殖、生物指示剂和培养基之间的影响、蒸汽及灭菌物料的物理特性。

(3) 选择合适的灭菌条件,如灭菌时间和温度。

图 1-1, 图 1-2 所示为一种常用的手动高压灭菌器。带有夹套的灭菌柜内设有摆放待灭菌物品的物品架。灭菌柜顶部的仪表盒上设置有可指示夹套内蒸汽压力、灭菌柜蒸汽压力的压力表和反映灭菌柜内温度的温度表,灭菌柜上方还装有安全阀和排汽阀。在灭菌器的一侧装有一组阀门,包括进汽总阀、灭菌柜进汽阀、夹套排汽阀和夹套放水阀等。操作时,将放置待灭菌物品的物品架推入灭菌柜内后,先打开蒸汽阀和排汽阀,用蒸汽预热(约 10min) 排出冷空气;当柜内温度接近 100℃ 时(排汽孔没有雾状水滴),即可关闭排汽阀,等柜内温度上升至比规定温度低 1~2℃ 时,调节进汽阀,使柜内温度达到要求的灭菌温度;到达灭菌时间后,关闭进汽阀,渐渐打开排汽阀,待表压逐渐下降到零且没有余汽排出时,先将柜门打开稍许,待 10~15min 后再全部打开。冷却后,取出灭菌物品。

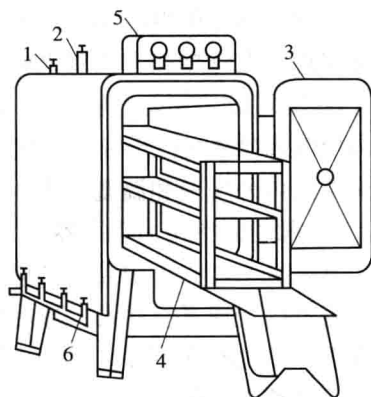


图 1-1 高压蒸汽灭菌器结构图

- 1—灭菌柜排汽阀 2—安全阀
- 3—柜门 4—物品架
- 5—仪表盒(夹套压力表、
温度表、灭菌柜压力表)
- 6—阀门组(总阀、灭菌柜进汽、
夹套排汽与排水)

使用高压灭菌器时应注意以下事项:

(1) 灭菌器的构造、待灭菌品的体积、数量、排布均对灭菌的温度有一定影响,故应先进行灭菌条件试验,确保灭菌效果。



(1) 卧式



(2) 立式

图 1-2 高压蒸汽灭菌器外形图

(2) 必须将灭菌器内的冷空气全部排出, 否则压力表上显示的压力是蒸汽与空气压力之和, 压力虽达到规定值, 但温度达不到要求。

(3) 灭菌时间应从柜内全部待灭菌物品达到所要求的温度时开始计算。通常, 灭菌器显示的温度不是灭菌物品的实际温度, 两者间存在误差。目前的灭菌器多采用全自动模式, 控制灭菌温度和时间。

(4) 灭菌完毕停止加热后, 必须使压力逐渐下降至压力表显示为零时, 才可放出柜内残余蒸汽; 开启灭菌柜时, 应先打开稍许, 待 10 ~ 15min 后再全部打开, 以避免因内外压差和温差过大, 造成灭菌产品从容器中冲出或使玻璃瓶炸裂。

2. 脉动真空压力灭菌器

脉动真空压力灭菌器, 又称为预真空压力灭菌器, 采用真空泵把空气抽出来使灭菌容器内变成真空状态, 然后再导入蒸汽, 通过多次抽真空和多次充蒸汽的交替作用, 使蒸汽在容器内迅速扩散。利用饱和蒸汽冷凝时释放出大量潜热的物理特性, 使待灭菌的物品处于高温和潮湿的状态, 经过一段时间的保温, 达到灭菌目的。

这种灭菌器主要用于对敷料和手术器械等进行高温灭菌, 在制药行业中可对瓶塞、操作工具、大量的工作服等不需降温防爆的布类物品或药品进行灭菌, 也可用于卫生材料、敷料、器械等的灭菌, 或用于固体药材的灭菌、熏蒸和烘干。也常用于食品灭菌。

与高压灭菌器相比, 脉动真空压力灭菌器有着显著的优点:

- (1) 消毒时间为高压蒸汽锅的 1/3。
- (2) 灭菌效果比高压蒸汽更可靠, 且操作方便。
- (3) 破坏消毒物品的程度轻。
- (4) 灭菌后的材料已经接近干燥, 取出后即可使用。

脉动真空压力灭菌器的操作都是自动控制, 一般分为以下几个阶段:

(1) 预热升温 将待灭菌物品装入灭菌室后, 启动设备, 系统自动锁门、自检后, 由水环式真空泵对灭菌室内抽真空; 待灭菌室内压力达到设定值后, 停止抽真空, 引入高温蒸汽至压力达到正压; 停止进蒸汽并自动排出蒸汽, 待灭菌室内压力降至预设压力后, 真空泵再次启动, 重复以上动作, 直至达到预设的脉动次数, 此时灭菌室内所有待灭菌物品均达到灭菌温度值, 转入下一阶段。

(2) 灭菌 进入灭菌阶段后, 开始进行计时。当温度高于或低于设定的灭菌温度时, 则自动停止进蒸汽或自动排汽, 灭菌室内的温度保持在设定的波动范围内 (一般是不低于 1℃、不高于 6℃)。

(3) 真空干燥 灭菌计时完成后, 转入真空干燥阶段, 排汽阀自动打开排出蒸汽, 当灭菌室内的压力降到设定值后, 水环真空泵启动, 持续抽真空, 随着灭菌室内的冷凝水被蒸发、抽出, 灭菌物品逐渐被干燥; 当设定的真空干燥时间结束后, 泵停止工作, 转入平衡阶段。