



GAODENG XUEXIAO ZHUANYE JIAOCAI

• 高等学校专业教材 •

[高校教材]

生化工程

(第二版)

主编 伦世仪

副主编 堵国成

BIOCHEMICAL ENGINEERING



中国轻工业出版社

高等学校专业教材

生化工程（第二版）

主 编 伦世仪

副主编 堵国成

 中国轻工业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

生化工程/伦世仪主编. —2 版. —北京: 中国轻工业出版社, 2008. 8

高等学校专业教材

ISBN 978-7-5019-6446-8

I. 生… II. 伦… III. 工业发酵-微生物学-高等学校-教材 IV. TQ920.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 070260 号

责任编辑: 白 洁

策划编辑: 白 洁 责任终审: 唐是雯 封面设计: 锋尚设计

版式设计: 王超男 责任校对: 李 靖 责任监印: 胡 兵 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: 三河市世纪兴源印刷有限公司

经 销: 各地新华书店

版 次: 2008 年 8 月第 2 版第 1 次印刷

开 本: 787×1092 1/16 印张: 17.25

字 数: 392 千字

书 号: ISBN 978-7-5019-6446-8/Q·054 定价: 30.00 元

读者服务部邮购热线电话: 010-65241695 85111729 传真: 85111730

发行电话: 010-85119845 65128898 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读者服务部联系调换

50129J4X201ZBW

第一版代序

科学技术就是先进的生产力，科技人才则是科学技术的“宿主”，是最活跃、最积极的根本因素。毫不例外，发酵学科高级技术人才的培养，对我国发酵工业的现代化、提高其科学水平、缩短其与国际水平的差距，必将发挥决定性作用。

发酵工程学，作为我国发酵工程学科专业的高年级主修课，内容如何选材极为重要，也相当困难。发酵工程学是现代生物工程科学的组成部分，它由早期的酿造工艺衍化至今，已进入高科技领域，其间经历了观念更新和不断变革，来之不易。今日面对浩瀚的科技资料，欲简约概括，选其精义，以奉献于青年学子，加强其基础，引导其方法，使之进窥发酵科学研究与技术开发之门径，而不使误入歧途，则尤为不易。

自20世纪60年代初，发酵工程设备通用教材之编写至今已历两届，而限于历史条件，无论内容或体系均远不能令人满意。所幸今日之事，已彻底破除因循守旧之思想，决意使工程理论与设备实体分别设课，自成体系，并引入生物工程科学的新成就，加深了发酵工程科学理论。内容涉及细胞组成及其生化反应机理，无不与生化反应动力学、反应工程学以及质量、能量衡算的运用互相关联、贯穿始终，从而使发酵动力学由现象分析进入综合探索、由定性到定量、由表及里，将大有助于微观透视。把一个细胞的代谢作为一座发酵工厂来探讨的研究方法开始引入发酵工程专业教材，必将促进发酵工程科学的发展。由于此书始终贯穿着强化理论体系，以新概念为准绳，并以此体系带动和指导生产实践，若名之“新概念发酵工程学”亦无不可。

以新观点编写新书，要依靠编者，本书主编伦世仪教授从事发酵工程学研究，积累多年教学经验，包括指导博士研究生的心得，其他参加编写诸君亦皆发酵教育界有识之士，可谓“深庆得人”。

吾人常设想发酵通用教材必须推陈出新，而久未实现，有如负欠之累，今承编者出示书稿，顿觉耳目一新，欣幸之余，谨赘数言，兼志贺忱。

王鸿祺

第一版导言

本书为发酵工程专业本科生而写。除基础之外，其主要前修课程为微生物学、生物化学、物理化学和化工原理。

早期的发酵工业只提供很少种类的产品，其中厌氧发酵产品居多，如酒类、乙醇、乳酸、丙酮、丁醇等。厌氧发酵由于不需供应空气，沾染杂菌导致生产失败的机会较少，因而深层液体厌氧发酵早就具有相当大的规模。当时只有少数好氧发酵产品采用了深层液体发酵生产法，如面包酵母、醋酸等。前者因为酵母的比生长速率较高，后者因为醋酸的生成导致发酵液中 pH 降低，使随空气进入的杂菌不能增殖。

20 世纪 40 年代前期，为了适应第二次世界大战救治伤员的迫切需要，亟待将早在 1928 年就发明的青霉素投入工业化生产，为此发酵工业界遇到了空前的难题。青霉素生产菌株比生长速率很低，在前期生长及后期合成青霉素的长达 100h 以上的发酵过程中需要溶解氧的不断供应以及严格的无杂菌状态。由于菌丝体的繁殖，发酵液的流变特性显著改变，空气中氧气溶入液体的速率本已十分缓慢，此时更极度下降，为此增大通气流量，使无杂菌状态更难维持。

在这种形势下，有许多化学工程学者介入了这一难题的攻关，其中最为重要的首次突破大概就是 Elmer L. Gaden, Jr. 在美国哥伦比亚大学化学工程系系主任 Arthur W Hixon 教授的指导下于 1946—1948 年完成的通风搅拌传质问题的博士论文。人们认为这篇论文是关于通气搅拌发酵罐设计的第一次理性尝试，也标志着生化工程学的诞生。生化工程学首次国际会议于 1949 年举行。

抗生素的投产和生化工程学的诞生开创了发酵工业的新纪元，好氧发酵产品得以迅速开发和工业化。后若干年又有愈来愈多学科的学者参与了这一领域的相互渗透与交融，大大拓宽了它的研究领域，因而现在要给生化工程学一个简洁明确的定义比过去更加困难。

培养基灭菌、空气除菌、通气搅拌、比拟放大等前四章的内容是生化工程学所研究的焦点之一，它涉及发酵产品开发过程从小试放大到工业生产、保持发酵体系必需的溶解氧浓度和无杂菌状态的系统的理论和技术，理所当然的是发酵工程从业人员应该具备的最基本的生化工程知识。

微生物的连续培养是 20 世纪 50 年代以来发展起来的新的培养技术。由于连续运转过程中的无杂菌状态难以长时间保持，以及高度诱变过的生产菌株在长期运转过程中难免出现回复突变株，而后者的高比生长速率往往使生产归于失败，所以在近代发酵工业中应用连续发酵的例子不多。然而在某些特殊的情况下，如使用高比生长速率的野生菌株为生产菌株，或在发酵环境的物理化学条件不易造成杂菌污染的条件下，连续培养技术则充分显示出其对于分批培养的明显优势而获得大规模的应用。如单细胞蛋白的连续培养，以甲醇为唯一碳源的单只反应器的容积超过 1500m^3 ；特别是废水的好氧及厌氧生物处理，最完整地实践了连续培养的恒化器理论及部分细胞浓缩反馈理论。20 世纪 70 年代末期以来先

后开发的所谓“第二代”和“第三代”厌氧生物处理反应器，其中上流式厌氧颗粒污泥床反应器的最大单只容积超过 5500m^3 。废水的生物处理，实质上就是利用好氧或厌氧微生物群体的连续培养降解其中的有机污染物，在扩大的意义上也可以说是一种连续发酵。

连续培养反应器中必然会发生不同程度的返混。这就不能用平均水力停留时间代入分批反应动力学计算达到一定转化率所需要的反应器体积，因为它还决定于返混的程度。由于培养基的连续灭菌首先遇到了返混问题，故将返混的形成、影响及工程上处理这一问题的方法纳入第二章是比较合理的。

20 世纪 70 年代初，第一次国际酶工程学术会议召开。酶工程的宗旨在于有效地利用酶。在此前后，用固定化的酰化氨基酸水解酶光学拆分化学合成法生产的混旋的 D-氨基酸、L-氨基酸（1969），用固定化葡萄糖异构酶将葡萄糖异构化为果糖（1973），以及用固定化微生物死细胞中的延胡索酸酶将延胡索酸转化成 L-苹果酸（1974）等相继投入工业化生产。然而许多发酵工业产品是借活细胞中的许多种酶，将基质通过一定顺序的许多步酶催化反应而生成的，往往需要 ATP 及多种辅酶的参与和再生，这需要将活的微生物细胞固定化。从 20 世纪 70 年代末期以来，利用固定化活细胞生产乙醇、有机酸、氨基酸、抗生素以及分解某些毒性化合物的研究获得很大的发展，可以根据催化反应的特点使固定化细胞分别处于生长、静止或死亡状态。由于发酵过程的本质是酶催化反应，因而作为更有效地利用酶的理论和技术必将为传统的发酵技术提供改革和创新的机会，这也必然会导致发酵过程和设备的革新。

发酵过程的优化控制、生产强度的提高均离不开动力学研究。这涉及提高生产过程经济效益的一个重要方面。本书除在各章中加强动力学的概念之外，在最后两章又分别讨论了微生物生化反应的动力学问题。微生物生化反应伴随着物质间的转化以及物质与能量间的转化。第八章微生物生化反应过程的质量和能量衡算，着重用质量及能量衡算建立起这种质、能间转化的动力学，并用实验法求出有关的质-质转化系数及质-能转化系数。微生物的生长代谢过程尽管非常复杂，但仍存在一定的规律性，这些系数对一定的发酵系统分别接近为定值，因而这些系数对于综合评价不同菌株、不同基质发酵生产同一产物的技术经济性能是非常重要的。

第九章微生物生长及发酵过程的数学模型及计算机的应用，着眼于反应过程中的质-质转化，对微生物在常见条件下的生长动力学及产物生成动力学加以分类描述。建模的方法多以实验结果为依据，并模拟具有相似本质的机制模型。Monod 模型是在实验的基础上建立的微生物生长动力学模型，它与根据反应机制推导出的 Michaelis-Menten 酶催化反应动力学模型形式上相似，存在抑制条件下的生长动力学则多是 Monod 动力学的修饰式。本章所列谷氨酸发酵过程中菌体生长及产物生成的动力学则是在假定的反应机制的基础上建立模型的例子。

发酵过程中应用计算机在线收集和分析数据进行反馈控制是生化工程的重要课题之一。迄今为止，由于微生物过程的一些重要参数的传感器难以符合实用在线测量的要求，使采用计算机对发酵过程实现在线控制遇到了重大障碍。第九章列举了一些避开在线难以直接测量的参数，采用在线碳、氧衡算及能量衡算等方法，间接计算、追踪关键参数的反馈控制的实用例子。

总之，本书在需要与可能的条件下所精选的以上八章（第二至第九章）的内容，只是生化工程学的基础知识，但它必将大大有助于发酵工程技术人员提高其涉猎当代专业文献的能力，有益于他们进一步深化对不断发展中的生化工程技术理论的学习以及在为提高生产过程经济效益的努力中获得成绩。

编 者

1992 年 5 月

再 版 前 言

本书初版于1992年，迄今已15年之久。当时的书稿是手写的，字体欠规范，铅字排版差错多，匆促出版发行后虽经过一次校正，但仍有几处失误遗留。这次再版，不仅更新了大多数章节，还使原主编有机会就上述的失误向原书的读者致以歉意。

原版的作者之一高孔荣教授多年前不幸离世。另一作者夏友坤博士出国改业IT。应邀参与本次再版的新作者是三位各具博士学位的中青年教授，他们是：李建科（南昌大学）、堵国成（江南大学）、华兆哲（江南大学）。

再版全书由伦世仪教授任主编，堵国成教授任副主编。

书中第一、三、四章由伦世仪主笔，第二、十章由李建科主笔，第五、九章由华兆哲主笔，第六、七章由堵国成主笔，第八章由吴佩琮教授主笔。

根据目前生物工程学科发展，在本书第一章“培养基灭菌”中增加了实现培养基“高温短时间灭菌”的技术；在本书第二章“空气除菌”中，增加并突出了目前工厂生产中广泛应用的膜过滤的内容；在第三章“通气与搅拌”中，增加了对一些新型搅拌器的描述，对其他内容也进行了相应的调整；在第四章“发酵罐的比拟放大”中，增加了对发酵罐放大新方法的展望；在第五章“固定化酶、固定化细胞”中，增加了固定化酶和固定化细胞技术在国内成功应用的新实例；将第一版书中第六章“连续培养的基本原理”和第九章“微生物生长及发酵反应的数学模型和计算机的应用”合并改为第六章“典型发酵过程动力学及模型”，并对其中内容进行了相应的调整；将原来第九章中涉及计算机应用的内容扩展为本书第九章“发酵过程的计算机在线控制”；第八章的内容保持原貌。第九章“发酵过程在线测量仪表”及第十章“发酵工程下游技术”是新增加的两章，前章响应发酵过程自动化的需要，后章是许多发酵产品分离、纯化过程节能减排的新手段。

如有不妥之处，敬请读者批评指正。

伦世仪

2008年3月

目 录

第一章 培养基灭菌	(1)
第一节 分批灭菌	(1)
第二节 连续灭菌	(8)
参考文献	(16)
第二章 空气除菌	(18)
第一节 空气中的微生物	(18)
第二节 空气除菌方法	(19)
第三节 空气过滤设计	(20)
第四节 膜过滤器	(26)
第五节 空气除菌典型流程	(31)
参考文献	(33)
第三章 通气与搅拌	(34)
第一节 搅拌器的形式和轴功率计算	(34)
第二节 通气发酵罐中溶解氧速率与通气及搅拌的关系	(48)
参考文献	(61)
第四章 发酵罐的比拟放大	(63)
第一节 发酵罐比拟放大法的进展	(63)
第二节 以 $k_L a$ (或 k_d) 为基准的比拟放大法	(64)
第三节 以 $\frac{P_0}{V}$ 相等为基准的比拟放大法	(68)
第四节 比拟放大的其他校核基准	(69)
第五节 发酵罐的比拟缩小	(73)
参考文献	(74)
第五章 固定化酶、固定化细胞	(75)
第一节 概述	(75)
第二节 酶、细胞的固定化方法及固定化后的性质	(75)
第三节 固定化酶、固定化细胞的应用	(78)
第四节 固定化酶、固定化细胞反应动力学	(89)
第五节 固定化酶、固定化细胞反应器	(96)
参考文献	(104)
第六章 典型发酵过程动力学及模型	(106)
第一节 分批发酵动力学	(106)
第二节 细胞反应动力学模型的建立	(121)
第三节 补料分批发酵过程动力学	(129)

第四节 连续发酵过程动力学	(139)
参考文献	(150)
第七章 发酵过程参数的在线测量及仪表	(151)
第一节 概述	(151)
第二节 发酵过程 pH 的检测及其传感器	(156)
第三节 发酵过程中溶解氧的检测与溶解氧电极	(161)
第四节 氧化还原电位电极	(170)
第五节 菌体浓度和生物量的检测	(173)
参考文献	(184)
第八章 微生物生化反应过程的质量和能量衡算	(185)
第一节 概述	(185)
第二节 微生物生化反应过程的碳素衡算	(185)
第三节 微生物生化反应过程 ATP 和氧的衡算	(192)
第四节 微生物生化反应过程的能量衡算	(205)
参考文献	(214)
第九章 发酵过程的计算机在线控制	(215)
第一节 概述	(215)
第二节 发酵过程控制的特征、参数及其测量	(217)
第三节 发酵过程的计算机控制策略	(221)
第四节 发酵过程计算机控制实例	(229)
参考文献	(236)
第十章 发酵工程下游技术	(237)
第一节 概述	(237)
第二节 细胞破碎	(242)
第三节 传统过滤 (死端过滤)	(245)
第四节 离心分离	(247)
第五节 膜过滤 (错流过滤)	(251)
第六节 溶剂萃取	(257)
参考文献	(259)

第一章 培养基灭菌

绝大多数发酵过程需要在无杂菌条件下进行，因此培养基的灭菌必须合理地设计，使之既能达到所需要的无菌程度，又能保证培养基中有效成分的破坏在允许的范围之内。

培养基的灭菌系指杀灭培养基中有生活能力的细菌营养体及其孢子，或除去培养基中的细菌营养体及其孢子。工业规模上的液体培养基灭菌，杀灭杂菌比除去杂菌更为常用，其中热灭菌法最为简便、有效和经济。

培养基灭菌程度的要求因所服务的发酵系统而异。实际上，绝对的无菌不但难以做到，也是不必要的。

对于液体培养基的热灭菌，工程上所要解决的课题是：将培养基中的杂菌总数 (N_0) 杀灭到可以接受的总数 (N)，需要多高的温度、多长的时间最为合理？这取决于杂菌孢子的热死灭动力学、反应器的形式和操作方法，还取决于培养基中有效成分受热破坏的可接受范围。

第一节 分批灭菌

一、微生物的热死灭动力学

1. 热死灭动力学方程

实验证明，微生物营养细胞的均相热死灭动力学符合化学反应的一级反应动力学规律，即

$$-\frac{dN}{dt} = KN \quad (1-1)$$

式中 N ——任一时刻的活细菌浓度，个/L

t ——时间，min

K ——比热死速率常数， min^{-1}

对式 (1-1) 积分，取边界条件 $t_0 = 0$ ， $N = N_0$ ，得

$$\ln \frac{N}{N_0} = -Kt \quad (1-2)$$

或
$$N = N_0 e^{-Kt} \quad (1-3)$$

维持灭菌温度 T 不变，经历不同的灭菌时间 t ，检测相应的 N 。采用半对数坐标作图：在对数刻度的纵轴上标出 $\frac{N}{N_0}$ 值，在普通坐标的横轴上标出对应的灭菌时间 t ，如图1-1所示。直

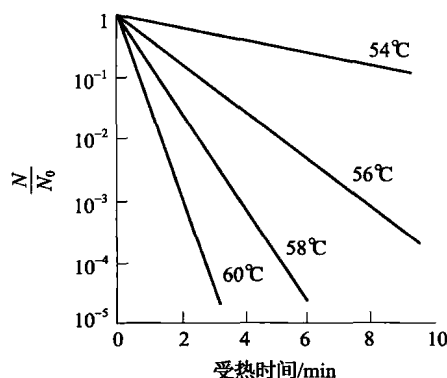


图1-1 大肠杆菌营养细胞在缓冲液中的存活率与受热时间的关系^[1]

线的斜率为 K 。

K 除了取决于菌体的抗热性能，还明显地受灭菌温度 T 的影响。

实验还证明，细菌孢子的热死灭动力学与营养体细胞的有显著不同，如图 1-2 所示。对此现象，不同学者提出了不同的解释，但无论如何，当温度超过 120°C 时，热阻极强的嗜热脂肪芽孢杆菌孢子及营养体的热死灭动力学基本上都符合一级反应动力学规律。

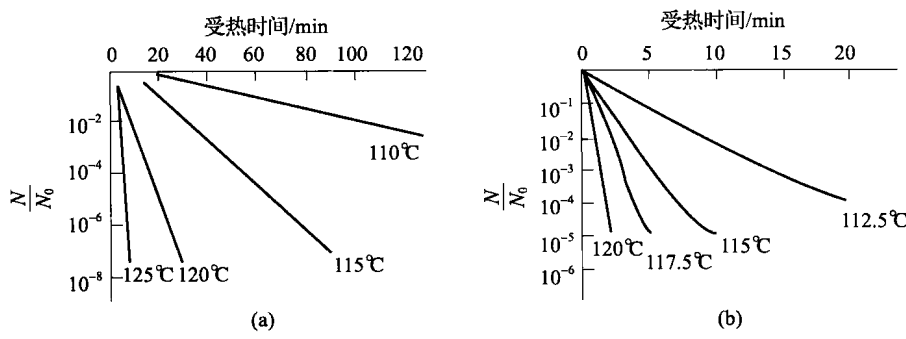


图 1-2 嗜热脂肪芽孢杆菌营养体及孢子的存活率与受热时间的关系^[2]
(a) 孢子 (b) 细胞

早年，U. Kan 提出了关于微生物对湿热灭菌的相对热阻的概念，典型发酵环境中几种微生物对湿热灭菌的相对热阻见表 1-1。从表 1-1 可以看出，细菌孢子具有较大的相对热阻，而细菌的营养体、酵母及病毒和噬菌体的相对热阻均小很多，且在同一数量级。

表 1-1 典型发酵环境中几种微生物对湿热灭菌的相对热阻^[3]

微生物类型	相对热阻
营养细胞和酵母	1.0
细菌孢子（芽孢杆菌属和梭菌属）	3×10^6
霉菌孢子	2 ~ 10
病毒与噬菌体	1 ~ 5

如以平均的相对热阻来表征不同类型微生物对热死灭的抵抗力，可以看出，对培养基进行热灭菌，必须以细菌孢子为杀灭对象。

营养细胞易于受热死灭，表明其比热死速率常数 K 值很高，在 120°C 灭菌，其 K 值可大至 10^{10} min^{-1} 数量级，而细菌孢子的 K 值在 120°C 时只有 10^0 min^{-1} 数量级。

K 除了取决于菌体的种类及其存在形式之外，还是热力学温度 T 的函数。因此 T 对 K 的影响是热灭菌工程设计中的核心问题之一。

2. T 对 K 的影响

微生物的比热死速率常数 K 与灭菌热力学温度 T 的关系，实验表明可用 Arrhenius 方

程来表征，即

$$K = Ae^{-\frac{\Delta E}{RT}}$$

(1-4)

式中 A ——频率因子, $7.94 \times 10^{38}, \text{min}^{-1}$

ΔE ——活化能, J/mol

R ——通用气体常数, $8.28\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$

从式 (1-4) 可以看出:

(1) 活化能 ΔE 的大小对 K 值有重大影响。其他条件相同时, ΔE 愈高, K 值愈低, 热死速率愈慢。

(2) 不同菌的孢子的热死灭反应 ΔE 可能各不相同, 在相同 T 条件下灭菌, 尚不能肯定 ΔE 值低的孢子的热死灭速率一定比 ΔE 值高的快, 因为 K 值并不唯一地取决于 ΔE , 还与 T 有关。

(3) 对式 (1-4) 两边取自然对数, 得

$$\ln K = -\frac{\Delta E}{RT} + \ln A$$

(1-5)

按图 1-1, 在不同的 T 条件下做灭菌实验, 求得相应的 K 值, 再按单对数坐标法作图, 从直线的斜率可以求出 ΔE 。嗜热脂肪芽孢杆菌孢子的比热死速率常数 K 与热力学温度 T 的关系图见图 1-3。

(4) K 是 ΔE 和 T 的函数。 K 对 T 的变化率与 ΔE 有关。对式 (1-5) 两边取 T 的导数, 得

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta E}{RT^2}$$

(1-6)

由式 (1-6) 得出的重要结论是: 反应的 ΔE 愈高, $\ln K$ 对 T 的变化率愈大, 亦即 T 的变化对 K 的影响愈大。

培养基灭菌既要杀死杂菌的孢子, 又要保存其中的有效成分。试验表明, 细菌孢子热死灭反应的 ΔE 很高, 而待灭菌培养基中某些有效成分热破坏反应的 ΔE 较低, 如表 1-2 所示, 因而将 T 迅速提高

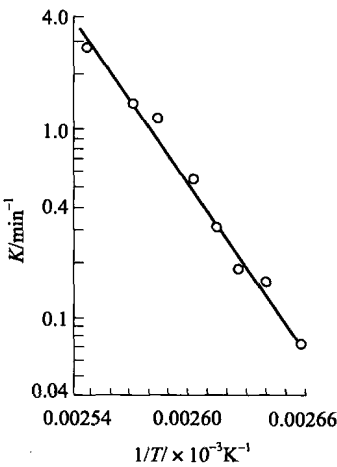


图 1-3 嗜热脂肪芽孢杆菌孢子的 K 与热力学温度 T 的关系

表 1-2 细菌孢子和 B 族维生素热破坏反应的 $\Delta E^{[4]}$

受 热 物 质	$\Delta E/(\text{J/mol})$
维生素 B ₁₂	96232
维生素 B ₁ 盐酸盐	92048
嗜热脂肪芽孢杆菌孢子	283257
肉毒梭菌孢子	343088
枯草芽孢杆菌孢子	317984

到较高的灭菌温度，可以加快细菌孢子的死灭速度，缩短在高温下的灭菌时间。一些有效成分如 B 族维生素热破坏反应的 ΔE 很低，在较高的灭菌温度下虽能增大其热破坏速率，但由于灭菌时间的显著缩短，一般只有数分钟，其结果是有效成分的破坏量反而大为减少。

高温短时间灭菌既能快速地灭菌，又能有效地保存培养基中的一些有效成分，这是灭菌动力学所得出的最重要的结论。

例如，根据对嗜热脂肪芽孢杆菌孢子和维生素 B₁ 的热处理资料，就不同的 T 求得前者的比热死速率常数 K_{BS} 和后者的比破坏速率常数 K_{VB} ，嗜热脂肪芽孢杆菌孢子和维生素 B₁ 的比热死速率常数与热力学温度关系图见图 1-4。

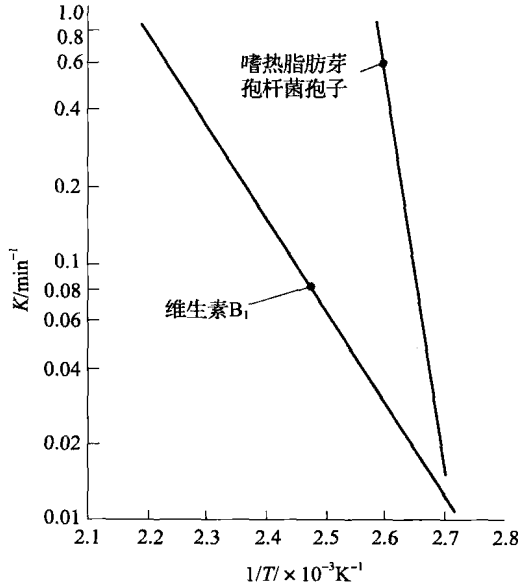


图 1-4 嗜热脂肪芽孢杆菌孢子和维生素 B₁ 的比热死速率常数与热力学温度的关系

由图算出：

$$\Delta E_{BS} = 67000 \times 4.184 = 2.8 \times 10^5 \text{ (J/mol)}$$

$$\Delta E_{VB} = 22000 \times 4.184 = 9.2 \times 10^4 \text{ (J/mol)}$$

根据图 1-4，若把灭菌温度从 105℃ $\left(\frac{1}{T} = 2.64 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}\right)$ 提高到 127℃ $\left(\frac{1}{T} = 2.50 \times 10^{-3} \text{ K}^{-1}\right)$ ，则 K_{VB} 从 0.02 min⁻¹ 增大到 0.06 min⁻¹； K_{BS} 从 0.12 min⁻¹ 增大到 40.0 min⁻¹。换言之，灭菌温度提高 22℃，嗜热脂肪芽孢杆菌孢子的比热死速率增大了 330 倍，而维生素 B₁ 的比热破坏速率仅仅增大了 3 倍^[4]。

表 1-3 是将含有维生素 B₁ 的培养基中的嗜热脂肪芽孢杆菌孢子杀灭至 $\frac{N}{N_0} = 10^{-16}$ 时，不同灭菌温度下灭菌所需要的灭菌时间和维生素 B₁ 受热破坏的资料。

表 1-3 嗜热脂肪芽孢杆菌孢子死灭程度为 $\frac{N}{N_0} = 10^{-16}$ 时, 灭菌温度对维生素 B₁ 破坏的影响^[4]

灭菌温度/℃	灭菌时间 ^① /min	维生素 B ₁ 损失 ^② /%
100	843	99.99
110	75	89
120	7.6	27
130	0.851	10
140	0.107	3
150	0.105	1

注: ① 达到灭菌程度为 $\frac{N}{N_0} = 10^{-16}$ 时所需要的灭菌时间。

② B 族维生素的多个成员是葡萄糖代谢过程中几个重要酶的辅酶。

二、分批灭菌的设计

要求绝对的无菌是很难做到的, 也是不必要的。工程实践中只要求使培养基中的杂菌减低到合理的程度, 在此条件下发酵失败的可能性极小, 经济上是合算的。对于周期长、成本高的发酵, 常取灭菌后一罐培养基中残存的活菌孢子数 $N = 10^{-3}$ 个, 也就是说, 灭菌 10^3 次, 存活一个活菌孢子的机会为 1 次。

$\frac{N}{N_0}$ 是灭菌程度的指标。不同的发酵体系可有不同的 $\frac{N}{N_0}$ 。在分批灭菌设计中, 为计算方便, 取 $\ln \frac{N_0}{N}$ 为设计的依据。例如培养基 100m^3 , 含菌 10^5 个/mL, 要求灭菌后活菌数 N 为 10^{-3} 个。

$$\begin{aligned} \text{则} \quad \frac{N}{N_0} &= \frac{10^{-3}}{100 \times 10^6 \times 10^5} = 10^{-16} \\ \ln \frac{N_0}{N} &= 36.8 \end{aligned}$$

在发酵罐中进行实罐灭菌, 是典型的分批灭菌, 全过程包括升温、保温、降温三个阶段。三个阶段分别对孢子的死灭和培养基中有效成分的破坏做出大小不等的贡献。分批灭菌过程典型的升温、保温和降温图 (常见的 $T-t$ 过程) 见图 1-5。

孢子受热死亡规律符合 $-\frac{dN}{dt} = KN$, 故

$$\begin{aligned} \ln \frac{N_0}{N} &= Kt \\ \ln \frac{N_0}{N} &= \ln \left(\frac{N_0}{N_1} \times \frac{N_1}{N_2} \times \frac{N_2}{N} \right) \\ &= \ln \frac{N_0}{N_1} + \ln \frac{N_1}{N_2} + \ln \frac{N_2}{N} \end{aligned}$$

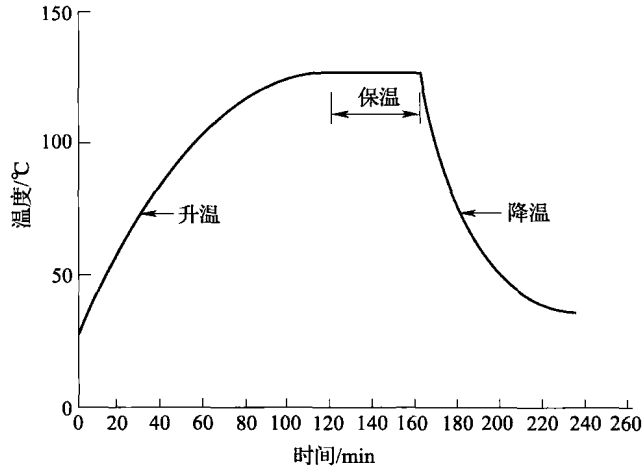


图 1-5 分批灭菌过程典型的升温、保温和降温图

$\ln \frac{N_0}{N}$ 是由三块积分面积 $\ln \frac{N_0}{N_1}$ 、 $\ln \frac{N_1}{N_2}$ 、 $\ln \frac{N_2}{N}$ 合成的。可以合理设计这三块面积的大小，使其和等于 $\ln \frac{N_0}{N}$ 的预定值。然而分批灭菌的 $T-t$ 过程曲线不是任意给定的，它取决于加热的方式、换热面积的大小、传热系数的高低、换热介质的温度及培养基的重量等多种因素。要尽可能加快换热速率，以尽可能缩短升温 and 冷却的时间。

因升温、冷却阶段 T 是时间 t 的函数， K 不是常数，故

$$\ln \frac{N_0}{N_1} = A \int_0^{t_1} e^{-\frac{A\Delta E}{RT}} dt \quad (1-7)$$

$$\ln \frac{N_1}{N_2} = K_b (t_2 - t_1) \quad (1-8)$$

$$\ln \frac{N_2}{N} = A \int_{t_2}^{t_3} e^{-\frac{A\Delta E}{RT}} dt \quad (1-9)$$

式中 K_b ——保温阶段的孢子比热死灭速率常数

Deindorfer 和 Humphrey 提出了各种换热方式的 $T-t$ 关系式，见表 1-4。可将所采用换热方式的 $T-t$ 关系代入式 (1-7)、式 (1-9) 积分，求出相应的 $\ln \frac{N_0}{N_1}$ 及 $\ln \frac{N_1}{N_2}$ ；也可以从设计的 $T-t$ 资料换算成 $K-t$ 资料而予以图解积分，求得 $\ln \frac{N_0}{N}$ ，示例于【例 1-1】。

培养基的传统灭菌采用批式实罐灭菌法，升温、保温、降温三个阶段的时间较长。其实升温 and 冷却阶段对杀灭细菌孢子的贡献很小，相反，对其他不耐热有效营养物的破坏却很大。

表 1-4

几种换热方式的 $T-t$ 关系式^[5]

换热方式	$T-t$ 关系式	常数含义
直接蒸汽喷入	$T = T_0 \left(1 + \frac{\alpha t}{1 + \delta t} \right)$	$\alpha = \frac{h q_m}{m c_p T_0}, \delta = \frac{q_m}{m}$
蒸汽间壁加热	$T = T_H (1 + \beta e^{-\alpha t})$	$\alpha = \frac{UA}{m c_p}, \beta = \frac{T_0 - T_H}{T_H}$
电热	$T = T_0 (1 + \alpha t)$	$\alpha = \frac{q}{m c_p T_0}$
蛇管冷却	$T = T_{co} (1 + \beta^{-\alpha t})$	$\alpha = \frac{q_{mw} c'_p}{m c_p} \left(1 - e^{-\frac{UA}{q_{mw} c_p}} \right),$ $\beta = \frac{T - T_{co}}{T_{co}}$

注: T ——介质温度, K;

T_0 ——介质初始温度, K;

t ——时间, min;

h ——蒸汽相对于介质的热焓, kJ/kg;

A ——换热面积, m²;

q_m ——蒸汽的质量流量, kg/min

m ——介质质量, kg

c_p ——介质比热容, kJ/(kg·K)

U ——总传热系数, kJ/(m²·min·K)

T_H ——热源热力学温度, K

q ——传热速率, kJ/min

c'_p ——冷却剂比热容, kJ/(kg·K)

q_{mw} ——冷却剂质量流量, kg/min

T_{co} ——冷却剂热力学温度, K

【例 1-1】^[1] 发酵培养基 60m³, 杂菌活孢子浓度 10⁵/mL, 要求灭菌后残存活孢子数 N 为 10⁻³个。设计的 $T-t$ 过程如下, 是否达到灭菌要求? 如不能, 应如何改进?

$T/^\circ\text{C}$	30	50	90	100	110	120	120	110	100	90	60	44	30
t/min	0	10	30	36	43	50	55	58	63	70	102	120	140

【解】 K 值可根据已知数据计算。已知

$$A = 7.94 \times 10^{38} \text{ min}^{-1}$$

$$\Delta E = 287441 \text{ J/mol}$$

$$R = 8.28 \text{ J/(mol} \cdot \text{K)}$$

算得: 120℃时, $K = 3.56 \text{ min}^{-1}$

绘出三阶段的 $T-t$ 图和 $K-t$ 图, 如图 1-6 所示。