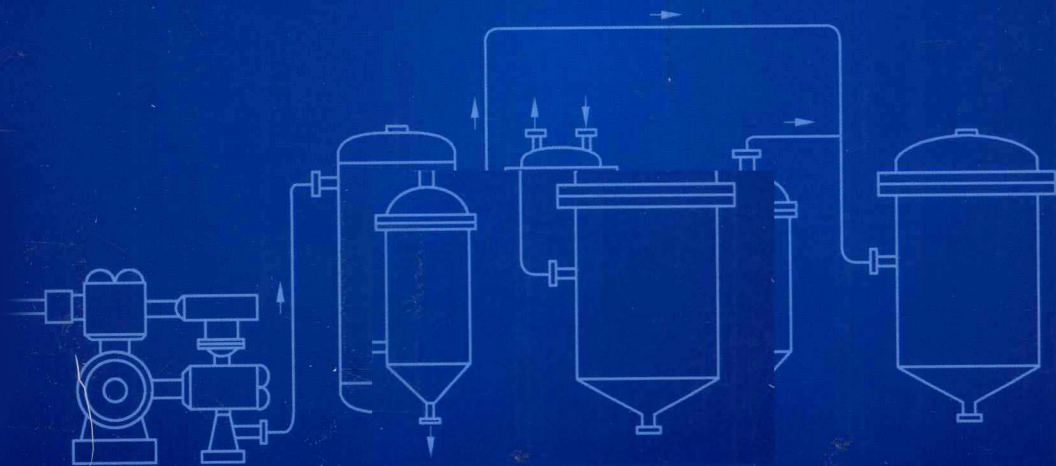


# 生化工程

刘晓兰 主编



# 生化工程

刘晓兰 主编

清华大学出版社

北京

## 内 容 简 介

生化工程是生物学与化学工程相互渗透而逐步形成的一门新学科,它研究和解决生物反应过程中具有共性的工程技术问题。本书系统阐述了生化工程的基本理论与知识,内容包括培养基灭菌、空气除菌、通气和搅拌、培养技术与理论、生物反应器、生物反应器的比拟放大、固定化酶(细胞)反应原理与技术、生物反应过程的质量和能量衡算。

本书可作为普通高等院校生物工程及相关专业的教材,也可供相关领域的科技人员参考。

版权所有,侵权必究。侵权举报电话:010-62782989 13701121933

### 图书在版编目(CIP)数据

生化工程/刘晓兰主编. --北京:清华大学出版社,2010.8

ISBN 978-7-302-23342-8

I. ①生… II. ①刘… III. ①生物工程:化学工程 IV. ①Q939.97

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 151672 号

责任编辑:柳 萍 洪 英

责任校对:赵丽敏

责任印制:孟凡玉

出版发行:清华大学出版社

地 址:北京清华大学学研大厦 A 座

<http://www.tup.com.cn>

邮 编:100084

社 总 机:010-62770175

邮 购:010-62786544

投稿与读者服务:010-62776969, [c-service@tup.tsinghua.edu.cn](mailto:c-service@tup.tsinghua.edu.cn)

质 量 反 馈:010-62772015, [zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn](mailto:zhiliang@tup.tsinghua.edu.cn)

印 装 者:北京鑫海金澳胶印有限公司

经 销:全国新华书店

开 本:170×230 印 张:18.5 字 数:351 千字

版 次:2010 年 8 月第 1 版 印 次:2010 年 8 月第 1 次印刷

印 数:1~3000

定 价:32.00 元

---

产品编号:021175-01

# 目 录

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 第 1 章 引言                   | 1  |
| 参考文献                       | 5  |
| 第 2 章 培养基灭菌                | 6  |
| 提要                         | 6  |
| 2.1 湿热灭菌原理                 | 8  |
| 2.1.1 微生物菌体热死灭动力学          | 8  |
| 2.1.2 影响灭菌的其他因素            | 14 |
| 2.2 间歇灭菌                   | 14 |
| 2.2.1 间歇灭菌的操作              | 15 |
| 2.2.2 间歇灭菌的设计              | 16 |
| 2.3 连续灭菌                   | 23 |
| 2.3.1 连续灭菌典型流程             | 23 |
| 2.3.2 连续灭菌反应器的流体流动模型       | 26 |
| 2.3.3 连续灭菌设计计算             | 33 |
| 习题                         | 35 |
| 符号说明                       | 36 |
| 参考文献                       | 37 |
| 第 3 章 空气除菌                 | 39 |
| 提要                         | 39 |
| 3.1 通风培养对无菌空气的要求           | 40 |
| 3.1.1 空气中的微生物              | 40 |
| 3.1.2 通风培养对空气无菌程度的要求       | 41 |
| 3.2 空气除菌方法                 | 41 |
| 3.3 空气过滤除菌的预处理             | 44 |
| 3.3.1 空气的预处理方法             | 44 |
| 3.3.2 空气压缩、冷却、加热过程中状态参数的变化 | 47 |
| 3.3.3 典型空气预处理流程及分析         | 51 |

|                                          |           |
|------------------------------------------|-----------|
| 3.4 空气过滤设计 .....                         | 54        |
| 3.4.1 过滤介质 .....                         | 54        |
| 3.4.2 空气过滤除菌机理 .....                     | 57        |
| 3.4.3 空气过滤器设计 .....                      | 61        |
| 习题 .....                                 | 67        |
| 符号说明 .....                               | 68        |
| 参考文献 .....                               | 68        |
| 阅读书目 .....                               | 69        |
| <br>                                     |           |
| <b>第4章 通气和搅拌 .....</b>                   | <b>70</b> |
| 提要 .....                                 | 70        |
| 4.1 细胞对氧的需求 .....                        | 73        |
| 4.1.1 耗氧速率 .....                         | 73        |
| 4.1.2 临界溶氧浓度 .....                       | 74        |
| 4.1.3 影响细胞需氧量的因素 .....                   | 76        |
| 4.2 液体培养过程中氧传递及速率 .....                  | 77        |
| 4.2.1 氧气的溶解度 .....                       | 77        |
| 4.2.2 氧传递过程 .....                        | 78        |
| 4.2.3 氧传递速率(双膜理论) .....                  | 79        |
| 4.3 体积溶氧系数 $K_L a$ 的测定方法 .....           | 81        |
| 4.3.1 亚硫酸钠氧化法 .....                      | 81        |
| 4.3.2 氧的物料衡算法 .....                      | 83        |
| 4.3.3 动态溶氧电极法 .....                      | 83        |
| 4.4 搅拌器轴功率的计算 .....                      | 85        |
| 4.4.1 搅拌器的型式及流型 .....                    | 85        |
| 4.4.2 牛顿型流体搅拌功率的计算 .....                 | 87        |
| 4.4.3 非牛顿型流体特性及其对搅拌功率计算的影响 .....         | 93        |
| 4.5 影响 $K_L a$ 的因素 .....                 | 99        |
| 4.5.1 反应器结构参数和操作变量对 $K_L a$ 的影响 .....    | 99        |
| 4.5.2 反应器结构参数和操作变量与 $K_L a$ 之间的关联式 ..... | 99        |
| 4.5.3 液体性质和其他因素对 $K_L a$ 的影响 .....       | 102       |
| 4.6 培养液中传氧速率的调节 .....                    | 105       |
| 4.7 传氧效率 .....                           | 107       |
| 习题 .....                                 | 107       |

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| 符号说明                  | 108        |
| 参考文献                  | 109        |
| 阅读书目                  | 110        |
| <b>第5章 培养技术与理论</b>    | <b>111</b> |
| 提要                    | 111        |
| 5.1 微生物反应过程概论         | 111        |
| 5.1.1 微生物反应过程的主要特征    | 112        |
| 5.1.2 微生物反应过程的计量关系    | 113        |
| 5.1.3 微生物反应动力学的描述方法   | 117        |
| 5.2 微生物分批培养及动力学       | 120        |
| 5.2.1 微生物生长的不同时期      | 120        |
| 5.2.2 微生物生长速率与底物浓度的关系 | 125        |
| 5.2.3 有抑制的细胞生长        | 126        |
| 5.2.4 基质的消耗           | 128        |
| 5.2.5 产物的生成           | 130        |
| 5.3 微生物连续培养及动力学       | 131        |
| 5.3.1 单级恒化器           | 131        |
| 5.3.2 部分菌体再循环的单级恒化器   | 135        |
| 5.3.3 多级连续培养          | 136        |
| 5.3.4 连续培养的应用         | 138        |
| 5.4 补料分批培养            | 143        |
| 5.4.1 恒速流加            | 144        |
| 5.4.2 指数流加            | 146        |
| 5.4.3 限制性底物浓度线性增加     | 147        |
| 习题                    | 149        |
| 符号说明                  | 149        |
| 参考文献                  | 150        |
| 阅读书目                  | 151        |
| <b>第6章 生物反应器</b>      | <b>152</b> |
| 提要                    | 152        |
| 6.1 生物反应器的设计目标和原则     | 152        |
| 6.2 生物反应器的分类          | 154        |

|                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3 好氧微生物细胞反应器 .....                                                             | 156 |
| 6.3.1 机械搅拌通风罐式反应器 .....                                                          | 156 |
| 6.3.2 机械搅拌自吸式反应器 .....                                                           | 160 |
| 6.3.3 气升环流式反应器 .....                                                             | 163 |
| 6.3.4 鼓泡塔反应器 .....                                                               | 164 |
| 6.3.5 通风固体发酵设备 .....                                                             | 166 |
| 6.4 嫌气发酵设备 .....                                                                 | 168 |
| 6.4.1 乙醇发酵设备 .....                                                               | 168 |
| 6.4.2 啤酒发酵设备 .....                                                               | 169 |
| 习题 .....                                                                         | 170 |
| 符号说明 .....                                                                       | 171 |
| 参考文献 .....                                                                       | 171 |
| 阅读书目 .....                                                                       | 171 |
| <br>第7章 生物反应器的比拟放大 .....                                                         | 173 |
| 提要 .....                                                                         | 173 |
| 7.1 生物反应器比拟放大的特点 .....                                                           | 174 |
| 7.2 生物反应器比拟放大的一般方法 .....                                                         | 175 |
| 7.2.1 相似的放大方法 .....                                                              | 175 |
| 7.2.2 量纲分析法 .....                                                                | 176 |
| 7.2.3 数学模型法 .....                                                                | 176 |
| 7.2.4 经验准则放大 .....                                                               | 178 |
| 7.3 机械搅拌式反应器的比拟放大 .....                                                          | 179 |
| 7.3.1 几何尺寸的放大 .....                                                              | 179 |
| 7.3.2 空气流量的放大 .....                                                              | 180 |
| 7.3.3 搅拌转速和搅拌轴功率的放大 .....                                                        | 183 |
| 7.3.4 搅拌液流速度压头 $H$ 、搅拌液流循环流量 $Q_L$ 、 $Q_L/V_L$<br>以及 $Q_L/H$ 对生物反应器放大设计的影响 ..... | 189 |
| 7.4 气升式生物反应器的比拟放大 .....                                                          | 190 |
| 7.4.1 影响气升式生物反应器性能的结构参数 .....                                                    | 190 |
| 7.4.2 气升式生物反应器的能量消耗及溶氧传质 .....                                                   | 191 |
| 7.4.3 气升式生物反应器的放大 .....                                                          | 193 |
| 7.5 管式反应器的比拟放大 .....                                                             | 194 |
| 7.5.1 多管并联放大 .....                                                               | 195 |

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| 7.5.2 多管串联放大               | 195        |
| 7.5.3 几何相似放大               | 197        |
| 7.5.4 恒压降放大                | 199        |
| 7.6 生物反应器的比拟缩小             | 199        |
| 习题                         | 200        |
| 符号说明                       | 201        |
| 参考文献                       | 202        |
| 阅读书目                       | 202        |
| <b>第8章 固定化酶(细胞)反应原理与技术</b> | <b>204</b> |
| 提要                         | 204        |
| 8.1 酶(细胞)的固定化方法            | 205        |
| 8.1.1 固定化酶(细胞)的定义          | 205        |
| 8.1.2 固定化酶(细胞)的优缺点         | 206        |
| 8.1.3 固定化酶(细胞)的方法          | 206        |
| 8.2 固定化酶(细胞)的性质            | 210        |
| 8.2.1 固定化酶(细胞)的活力          | 210        |
| 8.2.2 固定化酶(细胞)的稳定性         | 211        |
| 8.2.3 固定化酶的催化特性            | 212        |
| 8.3 固定化酶(细胞)的应用            | 213        |
| 8.3.1 L-氨基酸的生产             | 213        |
| 8.3.2 果葡糖浆的生产              | 216        |
| 8.3.3 酶传感器                 | 216        |
| 8.3.4 生产乙醇和啤酒              | 217        |
| 8.3.5 抗体和抗原的提纯             | 218        |
| 8.4 固定化酶(细胞)反应动力学          | 219        |
| 8.4.1 均相酶反应动力学             | 219        |
| 8.4.2 固定化酶(细胞)反应动力学        | 225        |
| 8.5 固定化酶(细胞)反应器            | 235        |
| 8.5.1 酶反应器的操作参数            | 235        |
| 8.5.2 理想的均相酶反应器系统的动力学      | 237        |
| 8.5.3 存在抑制剂时酶反应器的特性        | 243        |
| 8.5.4 固定化酶反应器动力学           | 246        |
| 8.5.5 固定化酶反应器的选择           | 249        |

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| 习题.....                          | 253        |
| 符号说明.....                        | 254        |
| 参考文献.....                        | 255        |
| 阅读书目.....                        | 256        |
| <b>第 9 章 生物反应过程的质量和能量衡算.....</b> | <b>258</b> |
| 提要.....                          | 258        |
| 9.1 质量和能量衡算的意义 .....             | 258        |
| 9.2 生物反应过程的元素衡算方程及还原度 .....      | 259        |
| 9.3 生物反应过程中的质量衡算 .....           | 263        |
| 9.3.1 生物反应过程中的碳源和氮源衡算.....       | 264        |
| 9.3.2 生物反应过程中的氧衡算.....           | 269        |
| 9.3.3 生物反应过程中的 ATP 衡算 .....      | 271        |
| 9.4 生物反应过程中的能量衡算 .....           | 274        |
| 9.4.1 热力学基础.....                 | 275        |
| 9.4.2 生物反应过程中的能量衡算.....          | 276        |
| 习题.....                          | 282        |
| 符号说明.....                        | 282        |
| 参考文献.....                        | 284        |
| 阅读书目.....                        | 284        |

# 第 1 章 引 言

生化工程(生物化学工程)是生物化学与化学工程相结合的交叉学科。它以生物化学为理论基础,运用化学工程的原理和方法,将实验室规模的以活的细胞或酶作催化剂的生物技术成果进行工程开发,使之成为工业规模的生物反应过程。生化工程实质上研究和解决的是生物反应过程中带有共性的工程技术问题,如培养基灭菌,空气除菌,搅拌与通风,生化反应器的设计、放大和优化操作,大规模的细胞培养技术及动力学,生物反应产物的分离纯化等问题。因此,生化工程是生物技术产业化的桥梁。

在 20 世纪 40 年代之前,发酵工业生产的产品种类很少,人类还没有掌握保持发酵过程无杂菌状态的技术,对发酵过程的纯培养要求从未严格执行。酒类、乙醇、丙酮、丁醇、乳酸等厌氧发酵中,由于不大量供应空气,加之原料和产物浓度很高,足以抑制大多数杂菌的生长,因而深层液体厌氧发酵早就具有较大的规模。在当时的少数好氧发酵产品的生产,如面包酵母、柠檬酸、醋酸、葡萄糖酸的发酵过程中,酵母的比生长速率高,柠檬酸、醋酸、葡萄糖酸的发酵液 pH 降得很低,使得这些好氧发酵过程都很少发生杂菌污染问题。

20 世纪 40 年代初期,第二次世界大战爆发,急需一种比磺胺药物更有效而毒副作用小的抗细菌药物来治疗战场上大批伤员的创伤引起的感染。早在 1928 年英国细菌学家弗莱明(Fleming)就发现了青霉素,1940 年英国病理学家弗洛里(Florey)和生物化学家钱恩(Chain)提取出了青霉素纯品并经临床证实具有卓越疗效和低毒性质。这时,亟待将青霉素投入工业生产,这对当时的发酵工业来说,任务空前艰巨。青霉素的生产菌株是严格好氧菌,其比生长速率低,青霉素是次级代谢产物,菌体的前期生长和后期青霉素合成的发酵周期达 100h,发酵过程中要不间断供氧,使得保持无杂菌状态非常困难。发酵后期,由于菌丝体的生长繁殖,发酵液流变特性显著变化,不利于氧气向发酵液的传质,为此,需加大通风量,这使得无杂菌状态更难保持。在这种情况下,许多化学工程学者参与到这一难题的攻克中来,他们收集了大量的微生物在工业上应用的资料,进行综合分析总结,创新性地引进化学工程中的一些概念和方法,把发酵过程看做化学上的一种特殊的催化反应。1943 年,经过英、美两国科学家和工程师的共同努力,一个崭新的青霉素深层发酵生产过程诞生了,它包括带有机搅拌和通入无菌空气的密闭式发酵罐系统(初期的发酵罐容积为  $5\text{m}^3$ ),以及包括离心萃取和冷冻干燥在内的青霉素

提取精制系统,使青霉素的产量和质量大幅度提高。青霉素的工业规模好氧深层发酵系统的建立标志着生化工程学的诞生。1947年,生化工程学在世界范围内得到公认,1949年举行了生化工程学的首次国际会议。生化工程学的诞生开创了发酵工业的新纪元,使发酵工业进入了一个崭新的阶段,一方面使发酵工业原有的和新的初级代谢产物的生产有了新的高效生产方式,另一方面开辟了次级代谢产物发酵生产的先河。一大批好氧发酵产品,如氨基酸发酵、酶制剂生产、抗菌素生产得以迅速开发和工业化。

1954年,Hastings首次提到生化工程需要解决的基本问题是深层培养、通风与空气分布方法、搅拌、培养基和设备的灭菌、大量空气的灭菌、发酵设备的冷却方式、过滤以及由于新工艺过程所引起的特殊公害和卫生问题。几十年来,随着生物工业的发展,以生物细胞和酶为生物催化剂的工业生物产品种类和数量不断增加,如抗生素、氨基酸、有机酸、维生素、各种酶制剂、溶剂、多聚物、单细胞蛋白、甾族化合物等的种类和生产规模都在增加,这些产品在生产过程中遇到的工程问题不断出现,因此,生化工程的内容也不断地拓宽,如反应器的放大方法、连续和半连续培养的实践与理论、控制培养环境的反应器自控技术、酶和细胞的固定化技术等已成为生化工程的重要内容。

需要指出的是,尽管近年来一些动植物细胞和组织培养技术受到广泛的重视,但这些培养过程技术的开发多是在考虑了动植物细胞及其产物特点的条件下,结合微生物细胞为生物催化剂的生化工程研究成果而进行的。因此,以微生物细胞作为生物催化剂的生化工程实践与理论在整个生化工程体系中具有核心的地位。

生化工程与化学工程最显著的区别是,生化工程所处理的是以生物活细胞(微生物细胞、动物细胞、植物细胞)或酶为生物催化剂的生物化学反应过程。化学工程目前已发展到了很高的水平,然而,将化学工程原理应用于生物反应的历史还很短,在过去的几十年里已积累了不少基本知识,但随着生物产业的迅猛发展,有待认识和解决的问题还很多。本书精选的如下内容是生化工程的基本知识。

### 1. 培养基灭菌和空气除菌

生物反应过程的细胞培养绝大多数是纯种培养过程,而自然界中的微生物无处不在,微生物培养基中通常都含有比较丰富的营养物质,如果一定数量的杂菌存在于培养系统,就会与生产菌株争夺营养物质,杂菌分泌的代谢产物可能会改变培养基的理化性质,还可能分解目标产物,轻者影响产量和产率,重者导致生产过程失败。因此,生产过程中的原料、设备和空气的灭菌以及无杂菌状态的保持是生化工程的重要内容。本书第2、3章分别系统阐述工业规模培养基灭菌和空气除菌原理与技术。

## 2. 通风与搅拌

好氧发酵系统的微生物需要有溶解氧参与代谢活动,基质的氧化、菌体的生长、产物的合成,均需要大量的氧。然而,氧气是难溶气体,溶解度很低,因此,与向微生物培养体系提供其他营养物质的方式不同,在好氧发酵系统中,必须自始至终不间断地向微生物提供溶解氧。在好氧液体深层发酵的工业生产中,消耗在气体的通入和搅拌等方面的费用占生产成本的比例很大,为了保证溶解氧浓度足够高,如何合理设计反应器并通过搅拌等手段提高氧气向反应液的传递速率一直是生化工程学的重要课题。本书第4章从细胞对氧的需求入手,从液体培养过程中氧传递及速率、搅拌器轴功率的计算、影响氧传递系数的因素等方面系统阐述通风与搅拌的工程问题。

## 3. 生物反应器与生物反应器的比拟放大

生物反应器是生物反应过程的核心设备,它为细胞的生长代谢或酶反应提供适宜的场所。生物反应器的结构、操作方式和操作条件与产品的质量、产量和能耗有非常密切的关系。生物反应器的设计、放大和操作中存在着一系列带有共性的工程技术问题,如物料的混合与流动、传质与传热、细胞反应动力学、酶反应动力学、反应液的流变学等。一个新的生物反应过程的开发,其最初阶段是发现和认识新的生物反应,然后才进入工程阶段。在工程阶段中,生化工程工作者首先遇到的问题是生物反应器的选型,即选择什么型式的生物反应器来完成这一特定的生物反应。选型确定后,进入操作条件的选择、反应器的放大和工程设计等步骤,这时就需要综合考虑生物反应本身的规律、反应器结构与传质传热规律等因素来解决问题,以达到获得尽量高的生产效率的目的。生物反应器的设计、放大和操作是生化工程的重要内容。本书第6章主要系统阐述生物反应器设计的目标和原则,生物工业中普遍应用的好氧微生物细胞反应器的结构、功能和特点。第7章系统阐述机械搅拌式反应器、气升式反应器以及管式反应器的放大设计中,常用的几何尺寸和主要操作参数的经验和半经验放大方法。

## 4. 固定化酶(细胞)反应原理与技术

酶作为生物催化剂,具有反应条件温和、专一性强、催化效率高等优点,但也有一定的局限性,如酶在催化反应后分离困难,无法重复利用,对热、酸、碱和有机溶剂敏感等。固定化酶(细胞)是将酶(细胞)限制在一定空间内并能连续地反复使用的酶(细胞)。自20世纪50年代末首次制得稳定的、可反复使用的、不溶于水的酶制品以来,固定化酶作为高度专一的、能够用于连续过程的新型非均相催化剂,引

起了生化工程技术人员的高度重视。固定化酶克服了游离酶的诸多弱点,具有可重复利用,与产物分离容易,易实现自控和连续化等优势。20 世纪 70 年代初,第一次酶工程国际会议召开,酶工程的宗旨在于有效地利用酶。在此前后,固定化酶、固定化细胞、固定化增殖细胞技术的研究与工业应用广泛展开,如用固定化葡萄糖异构酶将葡萄糖异构成果糖,利用固定化活细胞生产乙醇、有机酸、氨基酸、抗生素等。由于生物反应过程的本质是酶促反应,因而作为更有效地利用酶的固定化酶(细胞)技术,必将为传统的生物工程技术提供改革和创新机会。因此,固定化酶(细胞)技术是生化工程的重要组成部分。

### 5. 生化反应动力学

生化反应动力学研究生化反应过程的速率及其影响因素,如发酵动力学研究底物消耗速率、细胞生长速率、代谢产物生成速率及其影响因素;酶反应动力学研究酶催化的底物消耗速率、产物生成速率及其影响因素。生化反应动力学应包括两个层次的动力学。第一是微观动力学,它是指没有传质、传热、混合等工程因素影响时,生化反应固有的速率。该速率除了反应本身的特性外,只与各反应组分的浓度、催化剂及溶剂性质有关,而与传递等反应器因素无关。第二是宏观动力学,又可称为反应器动力学,它是指在反应器内所观察到的生物反应的反应速率及其影响因素,这些影响因素包括反应器结构、操作方式、混合状态、传质与传热性质等。生化反应动力学研究是优化与控制反应过程的基础。本书除了在各章中加强动力学的概念之外,第 5 章培养技术与理论中系统阐述间歇发酵、连续发酵和半连续发酵动力学,第 8 章固定化酶(细胞)反应原理与技术系统中系统阐述反应器酶反应动力学。

### 6. 生物反应过程的质量和能量衡算

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,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 9 章着重用质量和能量衡算方法建立起生物反应过程中质量、能量间转化的关系,并用实验法求出有关的多种质量-质量转化系数及质量-能量转化系数。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非常重要。

生物技术在快速发展,生化工程需要解决的问题很多,如新型生物反应器的研究与开发,包括节能型微生物反应器、动植物细胞培养反应器,充分考虑了生物安全性的基因工程菌株生物反应器的开发与设计,有利于反应过程控制的描述生物反应过程的数学模型的建立,生产过程控制手段的改进,特别是能在线反映生物反应器内重要参数的传感器的研制,新型生物分离方法和设备的研究开发等。

生化工程基础知识的学习、掌握与运用,有益于生物工程技术人员在提高生物产品生产过程效率的工作中取得成绩。

## 参考文献

1. Aiba S, Humphrey A E, Millis N F. Biochemical Engineering. 2nd ed. New York: Academic Press, 1973
2. Blanch Harvey W, Clark Douglas S. Biochemical Engineering. New York: M. Dekker, 1996
3. 合叶修一, 阿瑟·伊·汉弗莱, 南锡·弗·米利斯. 生物化学工程. 徐长晟, 译. 北京: 轻工业出版社, 1981
4. 贾士儒. 生物反应工程原理. 第3版. 北京: 科学出版社, 2008
5. 伦士仪. 生化工程. 第2版. 北京: 中国轻工业出版社, 2008
6. 伦士仪. 生化工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1993
7. 戚以政, 汪叔雄. 生物反应动力学与反应器. 第3版. 北京: 化学工业出版社, 2007
8. 戚以政, 夏杰. 生物反应工程. 北京: 化学工业出版社, 2004
9. 王岁楼, 熊卫东. 生化工程. 北京: 中国医药科技出版社, 2002
10. 俞俊堂, 唐孝宣. 生物工艺学. 上海: 华东理工大学出版社, 1992
11. 俞俊堂, 唐孝宣, 邬行彦, 等. 新编生物工艺学(上). 北京: 化学工业出版社, 2002

## 第 2 章 培养基灭菌

### 提 要

培养基的灭菌是指杀灭培养基中有生活能力的微生物营养体及其孢子的过程。工业规模的培养基灭菌采用蒸汽湿热灭菌法。高温的蒸汽在杀死培养基中杂菌的同时,也会破坏营养成分,所以,培养基灭菌时的温度和时间必须合理设计,使之既能达到细胞培养所需的无菌程度,又能保证有效成分的破坏在允许的范围之内。

培养基湿热灭菌时,微生物的均相死灭速率与残存的微生物数量成正比,即  $-\frac{dN}{dt}=KN$ 。比热死灭速率常数  $K$  随微生物的种类和加热温度而变化。常见的微生物中细菌的芽孢最难杀灭,灭菌时以细菌芽孢的死灭程度为控制指标;随灭菌温度的提高, $K$  值增大。灭菌时,营养物质热分解反应也符合化学反应的一级动力学,即  $-\frac{dc}{dt}=K_d \cdot c$ 。热敏性物质热分解速率常数  $K_d$  随物质种类和温度的不同而不同。营养物质中维生素最容易受热破坏;温度升高, $K_d$  增加。高温短时灭菌方法是灭菌动力学得出的最重要结论之一,它既能快速灭菌,又能使热敏性营养成分的破坏量尽量降低。

进行培养基灭菌设计时,应先选择一个合适的培养基无菌程度( $N/N_0$ )。常取灭菌后残存活孢子浓度  $N=10^{-3}$ ,它的意义是灭菌 1000 次,存活一个活孢子的机会为 1 次。

工业上培养基的灭菌有间歇灭菌和连续灭菌两种基本方式。间歇灭菌是将配好的培养基送入发酵罐,通入蒸汽将培养基和所用的设备一起进行灭菌的操作过程。间歇灭菌包括升温、保温和降温三个阶段,灭菌主要是在保温过程中实现。进行间歇灭菌设计时,可先确定灭菌温度,再根据设备能达到的升温 and 降温速率确定升温 and 降温段灭菌温度与时间的关系,计算灭菌全过程培养基能达到的无菌程度,与既定的培养基无菌程度进行对比,如果没有达到既定的无菌程度,就要调整灭菌温度或时间。间歇灭菌中培养基升温 and 降温时间长,对热敏性营养物质的破坏较多。

培养基的连续灭菌是将配制好的培养基在专门的连续灭菌设备中加热,保温

和冷却,完成灭菌过程。与间歇灭菌相比,其特点是升温和降温所用时间缩短,因此可采用更高的灭菌保温温度,更短的保温时间,这样就有利于减少热敏性营养物质的破坏。连续灭菌培养基的加热和冷却是快速的,培养基保温是在维持罐或维持管内完成的。培养基采用连续灭菌方法时,发酵罐应在连续灭菌开始之前进行空罐灭菌,以容纳经过灭菌的培养基。加热器、维持罐、冷却器和相应的管路也应先进行蒸汽灭菌。

定义流体在连续灭菌反应器中的平均停留时间为反应器的体积除以通过反应器的流体流率。连续灭菌培养基的每一质点并不都在反应器中停留同样的时间,反应器中停留时间不同的物料之间的混合称为返混。返混是一个复杂的现象,目前用数学解析的方法很难阐明。在化学工程中根据返混的程度将连续反应器分为活塞流反应器(plug flow reactor, PFR)和全混流反应器(continuous stirred tank reactor, CSTR)两个理想模型。活塞流模型中,反应器中的物料像活塞一样流动,返混为零;全混流模型中,反应器中所有的物料达到充分的混合,返混为无穷大。实际反应器中的返混程度总是处于这两种理想流动的模型之间。长径比很大的管式反应器接近于活塞流模型,混合良好的搅拌式反应器接近全混流模型。培养基在活塞流反应器和全混流反应器中分别进行灭菌时,培养基能达到的无菌程度( $N/N_0$ )都是比热死灭速率常数  $K$  和灭菌时间的函数。在相同的温度下灭菌,要想达到相同的培养基无菌程度,将活塞流反应器与全混流反应器的灭菌效率进行对比,发现活塞流反应器需要的时间短,全混流反应器需要的时间长,因此,活塞流反应器具有较高的灭菌效率。

在连续灭菌反应器的设计中,确定了灭菌温度后,物料的停留时间是主要的设计参数。工业上常用的连续灭菌流程中,物料被加热到既定温度后,常采用维持管、维持罐或维持塔来保持培养基的温度,完成菌体死灭过程。管式反应器虽然接近活塞流反应器,但仍存在一定程度的返混,罐式反应器和塔式反应器则偏离活塞流反应器更大一些。为了更准确地设计连续灭菌反应器,可以采用扩散模型来描述连续灭菌反应器。扩散模型的基本观点是,流体在管内流动时,由于分子扩散和涡流扩散的作用使一部分流体质点沿轴向返混了回去,这个过程简化为在活塞流流动中叠加了一个与流动方向相反的扩散过程。培养基灭菌的扩散模型中,培养基能达到的无菌程度( $N/N_0$ )不仅是比热死灭速率常数  $K$  和平均停留时间的函数,还与表示扩散的准数  $N_{Pe}$  有很大关系。工程上常用扩散模型来进行连续灭菌反应器的设计。

培养基的灭菌是指杀灭培养基中有生活能力的微生物营养体及其孢子的过程。在绝大多数的微生物培养系统中,只允许生产菌生长繁殖代谢,不允许其他微生物共存,也就是说必须进行纯种培养。微生物培养基中通常含有比较丰富的营

养物质,如果一定数量的杂菌存在于培养系统,就会与生产菌株争夺营养物质,分泌的代谢物可能会改变培养液的理化性质,还可能分解目标产物,轻者影响产量或产率,重者导致生产失败。因此,培养基灭菌最基本的要求是杀灭培养基中混杂的微生物。

工业规模上的培养基灭菌,常常采用有效、简便和经济的蒸汽湿热灭菌法。高温能杀死培养基中的微生物,同时热效应也会破坏培养基中的营养成分。培养基的灭菌必须合理设计,使之既能达到细胞培养所需的无菌程度,又能保证培养基中有效成分的破坏在允许的范围之内。

不同的细胞培养系统,对培养基的无菌程度要求是不同的。在某些培养系统中,培养基中的基质不易被一般微生物利用,或温度、pH 不适于一般微生物的生长,或生产菌株很容易形成优势生长,这时对培养基灭菌无菌程度的要求就相对较低。

对于液体培养基的湿热灭菌,工程上需要解决的问题是,为了将培养基中的杂菌杀灭到可以接受的程度,同时考虑培养基中有效营养成分的热破坏在可接受的范围之内,应该设置多高的灭菌温度和多长的灭菌时间,这取决于杂菌孢子的热死灭动力学、所采用的灭菌反应器型式和操作方法。

## 2.1 湿热灭菌原理

湿热灭菌即利用饱和蒸汽进行灭菌。由于蒸汽有很强大的穿透能力,在冷凝时放出大量的冷凝潜热,在高温和存在水分的条件下,微生物细胞内的蛋白质很容易变性或凝固而引起微生物的死亡。

### 2.1.1 微生物菌体热死灭动力学

对培养基进行湿热灭菌时,培养基中微生物的均相比热死灭速率与体系中残存的微生物数量成正比,符合化学反应的一级反应动力学,即

$$-\frac{dN}{dt} = KN \quad (2-1)$$

式中:  $N$ ——任意时刻培养基中的活微生物浓度,个/L;

$t$ ——灭菌时间,min;

$K$ ——微生物比热死灭速率常数, $\text{min}^{-1}$ 。

比热死灭速率常数  $K$  随微生物的种类和加热温度而变化。