
第五章

培养基及设备的灭菌

本章讲述的内容

第一节 培养基灭菌的目的、要求和
方法

第二节 湿热灭菌的理论基础

第三节 培养基灭菌的工程设计

第一节 培养基灭菌的目的、要求和方法

一、定义

1, 培养基灭菌的定义

- 是指从培养基中杀灭有生活能力的细菌营养体及其孢子，或从中将其除去。工业规模的液体培养基灭菌，杀灭杂菌比除去杂菌更为常用。

2, 灭菌与消毒的区别

- **灭菌**: 用物理或化学方法杀死或除去环境中所有微生物, 包括营养细胞、细菌芽孢和孢子
- **消毒**: 用物理或化学方法杀死物料、容器、器皿内外的病原微生物。

二、培养基灭菌的目的

1, 在发酵过程中夹杂其它杂菌造成的后果:

- 生产菌和杂菌同时生长, 生产菌丧失生产能力;
- 在连续发酵过程中, 杂菌的生长速度有时会比生产菌生长得更快, 结果使发酵罐中以杂菌为主;
- 杂菌及其产生的物质, 使提取精制发生困难
- 杂菌会降解目的产物;
- 杂菌会污染最终产品, 杂菌会污染最终产品;
- 发酵时如污染噬菌体, 可使生产菌发生溶菌现象

。

2, 工业上具体措施包括:

- 1) 使用的培养基和设备须经灭菌;
- 2) 好氧培养中使用的空气应经除菌处理;
;
- 3) 设备应严密, 发酵罐维持正压环境;
- 4) 培养过程中加入的物料应经过灭菌;
- 5) 使用无污染的纯粹种子。

3, 培养基灭菌的目的

- 杀灭培养基中的微生物，为后续发酵过程创造无菌的条件。

4, 培养基灭菌的要求

- 达到要求的无菌程度 (10^{-3})
- 尽量减少营养成分的破坏, 在灭菌过程中, 培养基组分的破坏, 是由两个基本类型的反应引起的:
 - 培养基中不同营养成分间的相互作用;
 - 对热不稳定的组分如氨基酸和维生素等的分解。

4, 灭菌的方法

- 化学法
 - 化学药品灭菌法
- 物理法
 - 干热灭菌法
 - 湿热灭菌法
 - 射线灭菌法

5， 湿热灭菌的原理

- 每一种微生物都有一定的最适生长温度范围。当微生物处于最低温度以下时，代谢作用几乎停止而处于休眠状态。当温度超过最高限度时，微生物细胞中的原生质胶体和酶起了不可逆的凝固变性，使微生物在很短时间内死亡，加热灭菌即是根据微生物这一特性而进行的。

6, 湿热灭菌中的相关定义

- 杀死微生物的极限温度称为**致死温度**。在致死温度下，杀死全部微生物所需的时间称为**致死时间**；在致死温度以上，温度愈高，致死时间愈短。
- **微生物的热阻**：是指微生物在某一特定条件（主要是温度和加热方式）下的致死时间。**相对热阻**是指某一微生物在某条件下的致死时间与另一微生物在相同条件下的致死时间的比值。

各种微生物对湿热的相对热阻

微生物	相对热阻
营养细胞和酵母	1.0
细菌芽孢	3×10^6
霉菌孢子	2~10
病毒和噬菌体	1~5

7, 湿热灭菌的优点

- 蒸汽来源容易, 操作费用低, 本身无毒;
;
- 蒸汽有强的穿透力, 灭菌易于彻底;
- 蒸汽有很大的潜热;
- 操作方便, 易管理。

第二节 湿热灭菌的理论基础

一，培养基湿热灭菌需解决的工程问题

- 将培养基中的杂菌总数 N_0 杀灭到可以接受的总数 N (10^{-3})，需要多高的温度、多长的时间为合理。
- 灭菌温度和时间确定取决于：
 - 杂菌孢子的热灭死动力学
 - 反应器的形式和操作方式
 - 培养基中有效成分受热破坏的可接受范围

二、微生物的热死灭动力学方程

- 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，即：

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad (1)$$

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})

- 取边界条件 $t_0=0$, $N=N_0$, 对 (1) 积分得

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K \cdot t \quad (2)$$

或

$$N = N_0 \cdot e^{-Kt} \quad (3)$$

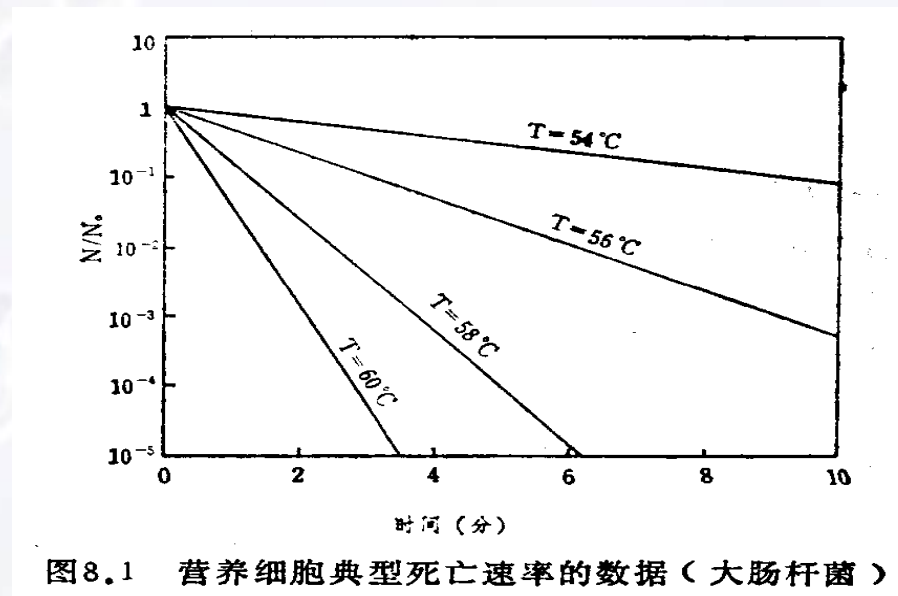


图8.1 营养细胞典型死亡速率的数据（大肠杆菌）

- 实验还证明，细菌孢子的热杀灭动力学与营养细胞的有所不同。它表现为非对数的死亡动力学。这可能与孢子壁的化学成分及结构有关。但当温度超过 120°C 时，热阻极强的嗜热脂肪芽孢杆菌孢子的热杀灭动力学也接近对数死亡动力学即符合一级反应规律。

三、温度对K的影响

- 微生物的热死灭动力学接近一级反应动力学
- 它的比热死灭速率常数K与灭菌温度T的关系可用阿累尼乌斯方程表征

$$K = A \cdot e^{-\Delta E / RT} \quad (4)$$

A: 频率因子 (min^{-1})

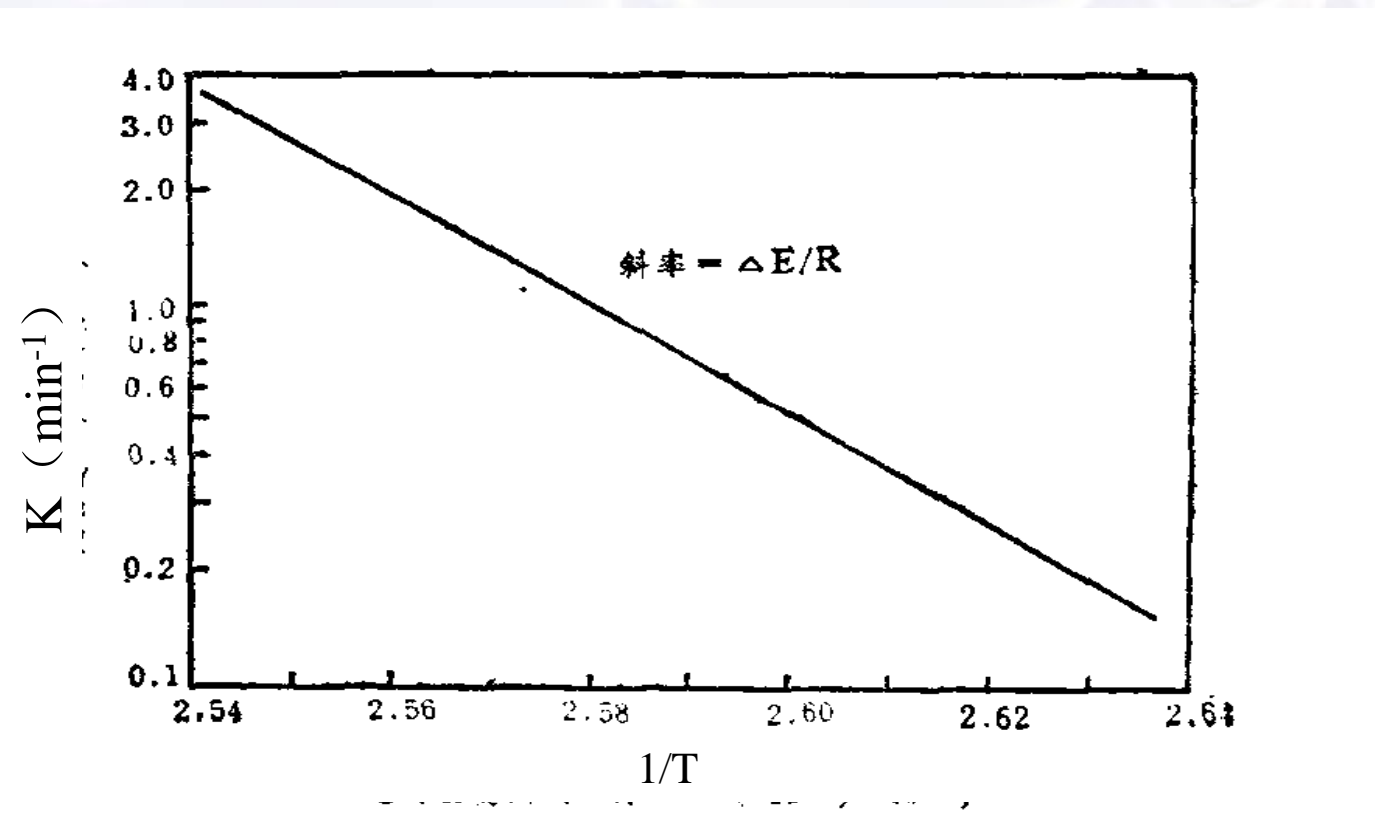
ΔE : 活化能 (J/mol)

R: 通用气体常数 [$\text{J}/(\text{mol}\cdot\text{k})$]

- 从（4）可以看出：
 - 活化能 ΔE 的大小对 K 值有重大影响。其它条件相同时， ΔE 越高， K 越低，热死灭速率越慢。
 - 不同菌的孢子的热死灭反应 ΔE 可能各不相同。
 - 对（4）两边取对数，得（5）
 - K 是 ΔE 和 T 的函数， K 的对 T 的变化率与 ΔE 有关，对（5）两边对 T 的导数，得（6）

$$K = A \cdot e^{-\Delta E / RT} \quad (4)$$

$$\ln K = -\frac{\Delta E}{RT} + \ln A \quad (5)$$



– K是 ΔE 和T的函数，K的对T的变化率与 ΔE 有关，对（5）两边对T的导数，得（6）

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta E}{R \cdot T^2} \quad (6)$$

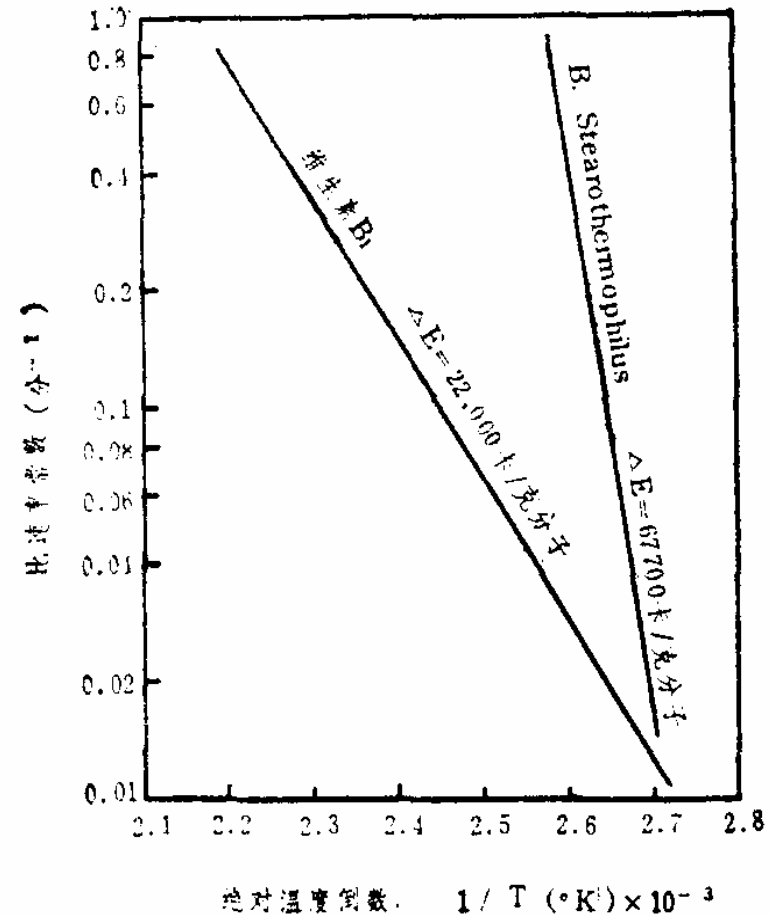
由（6）可得出结论：

反应的 ΔE 越高， $\ln K$ 对T的变化率越大，即T的变化对K的影响越大

- 试验表明，细菌孢子热死灭反应的 ΔE 很高，而某些有效成分热破坏反应的 ΔE 较低。
- 将温度提高到一定程度，会加速细菌孢子的死灭速度，缩短灭菌时间，由于有效成分的 ΔE 很低，温度的提高只能稍微增大其破坏速度，但由于灭菌时间的显著缩短，有效成分的破坏反而减少

受热物质	ΔE (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
枯草杆菌孢子	317984

- $\Delta E_{BS} = 67000 \times 4.184$
(J/mol)
- $\Delta E_{VB} = 22000 \times 4.184$
(J/mol)
- 将灭菌温度从105°C提高到127°C
- K_{VB} 从0.02 (min^{-1}) 提高到0.06 (min^{-1})
- K_{BS} 从0.12 (min^{-1}) 提高到40.0 (min^{-1})



嗜热脂肪芽孢杆菌孢子和
维生素B₁的lnk-1/T图

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

灭菌温度 (°C)	达到灭菌程度的时间 (min)	维生素B ₁ 的损失 (%)
100	843	99.99
110	75	89
120	7.6	27
130	0.851	10
140	0.107	3
150	0.015	1

24

第三节 培养基灭菌的工程设计

一、无菌的标准

- 根据微生物热死灭方程，要求灭菌后达到绝对无菌是很难做到的，也是不必要的。因此在工程设计中常取 $N=10^{-3}$

二、分批灭菌

1, 分批灭菌的设计

- 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、降温三个过程

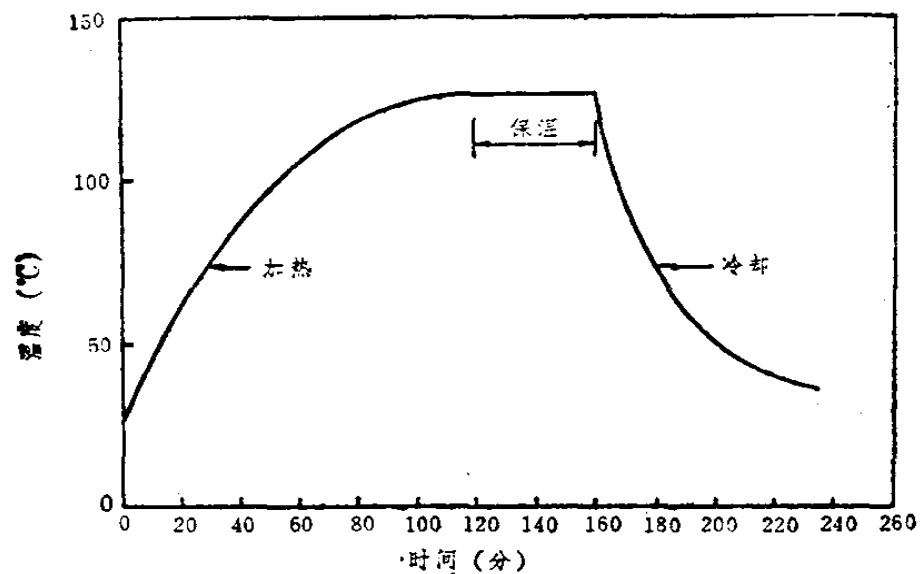


图8.6 分批消毒周期典型的加热、保温和冷却阶段温度-时间变化关系图

- 孢子热死亡的规律符合

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N$$

$$\ln \frac{N_0}{N} = K \cdot t$$

$$\ln \frac{N_0}{N} = \ln \left(\frac{N_0}{N} \times \frac{N_1}{N_2} \times \frac{N_2}{N} \right) = \ln \frac{N_0}{N} + \ln \frac{N_1}{N_2} + \ln \frac{N_2}{N}$$

- 因为升温、冷却阶段T是时间t的函数，K不是常数，所以：

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

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

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

式中 K_h 是保温阶段的孢子比热死亡速度常数

• 分批灭菌中几种换热方式的温度-时间变化关系

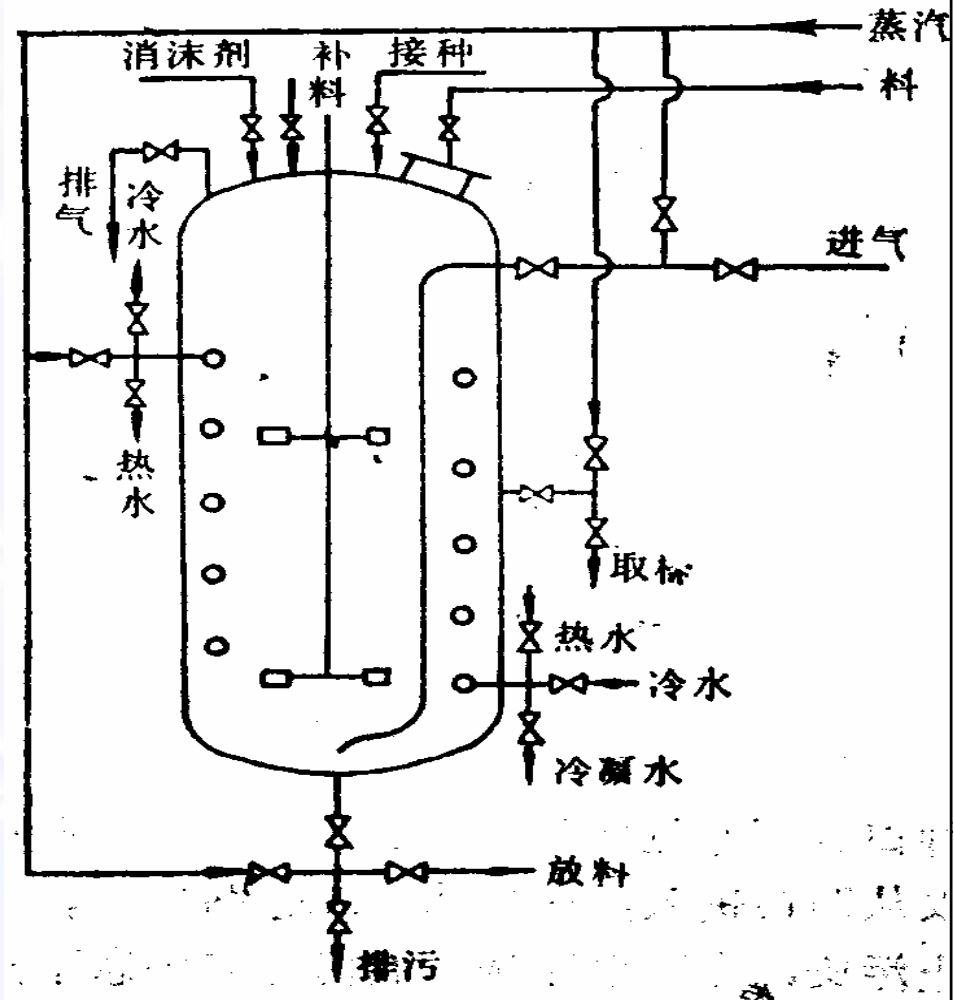
加热或者冷却的型式	温度-时间变化关系	常数
直接蒸汽鼓泡	$T = T_0 \left[1 + \left(\frac{\alpha t}{1 + \delta t} \right) \right]$	$\alpha = \frac{hs}{MC_p T_0} \quad \delta = \frac{S}{M}$
间接加热	$T = T_H (1 + \beta e^{-\alpha t})$	$\alpha = \frac{UA}{MC_p} \quad \beta = \frac{T_0 - T_H}{T_H}$
电加热	$T = T_0 (1 + \alpha t)$	$\alpha = \frac{q}{MC_p T_0}$
盘管冷却	$T_c = T_{c0} (1 + \beta^{-\alpha t})$	$\alpha = \left(\frac{WC_p'}{MC_p} \right) (1 - e^{-uA/wc'p})$ $\beta = \frac{T_0 - T_{c0}}{T_{c0}}$

T: 介质温度 (K); T_0 : 介质初温 (K); t: 时间 (min);
h: 蒸汽相对于介质的热焓 (kJ/kg); s: 蒸汽的重量流率 (kg/min)
M: 介质重量(kg); C_p : 介质比热[kJ/(kg.K)]; T_H : 热源温度(K)
U: 总传热系数[kJ/(m².min.K)]; q: 传热速率 (kJ/min)
 C'_p : 冷却剂比热; W: 冷却剂流率; T_{c0} : 冷却剂温度

- 计算举例
- 参见
 - 《微生物工程工艺原理》 P226
 - 伦世仪主编 《生化工程》 P13。

2, 保证间歇灭菌成功的要素

- 内部结构合理(主要是无死角), 焊缝及轴封装置可靠, 蛇管无穿孔现象
- 压力稳定的蒸汽
- 合理的操作方法。



发酵罐的接管图

3, 培养基间歇灭菌过程中应注意的问题

- 温度和压力的关系
- 泡沫问题
- 投料过程中, 麸皮和豆饼粉等固形物在罐壁上残留的问题
- 灭菌结束后应立即引入无菌空气保压

三、连续灭菌的设计

1, 连续灭菌的流程

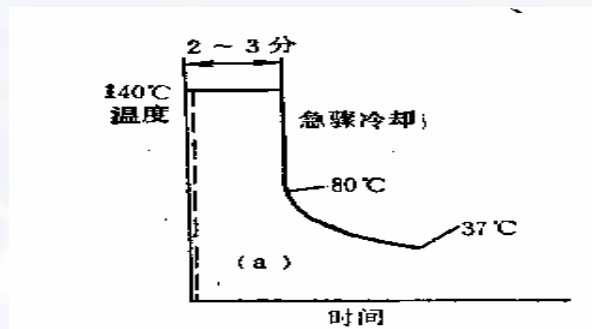


图 5.10 典型的蒸汽喷射式 (a) 和
间曲线图 (A)

喷射加热-真空冷却流程

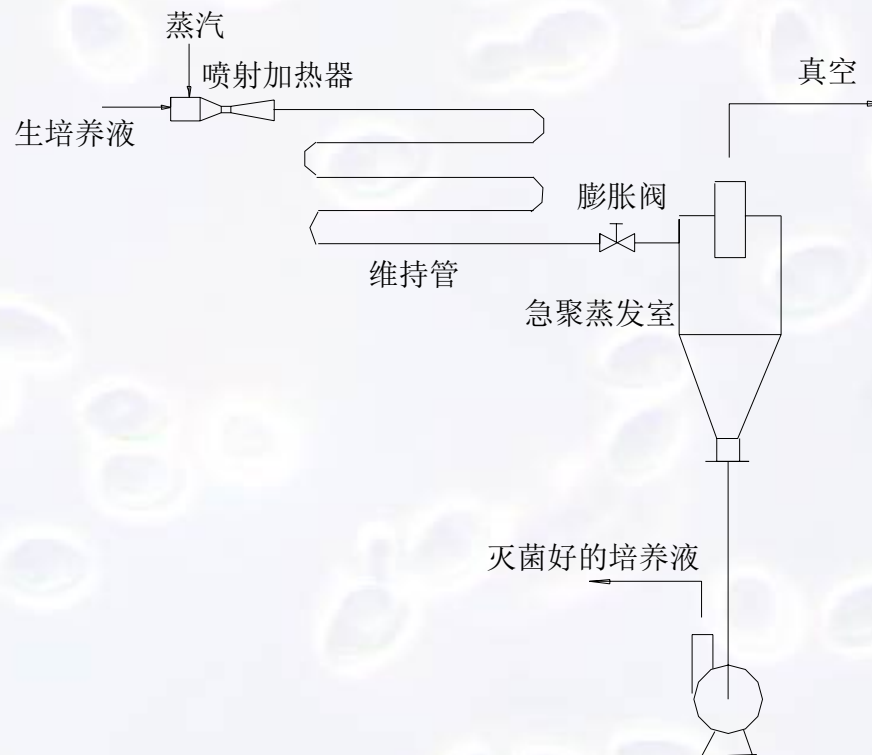


图2-5 加热-真空冷却连续灭菌流程

板式换热器灭菌流程

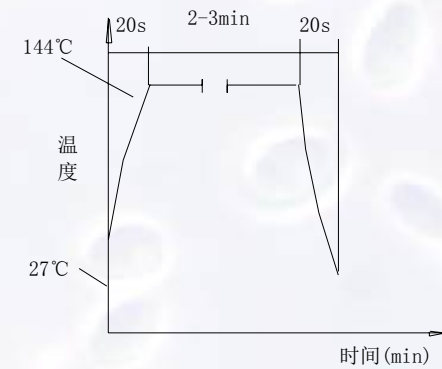
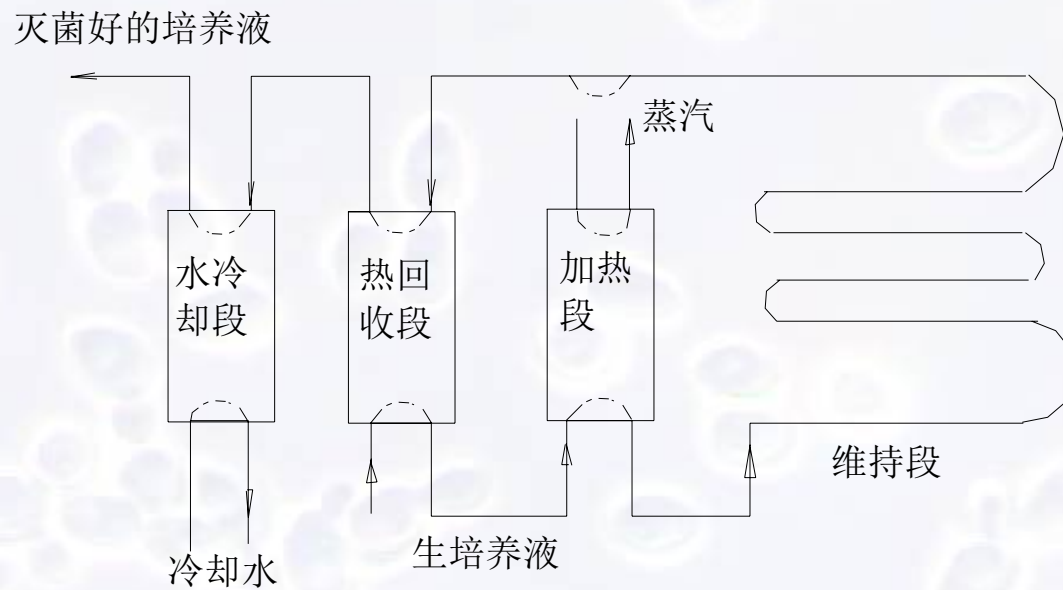


图2-3 培养基连续灭菌过程中温度的变化

图2-6 薄板换热器连续灭菌流程

连消塔-喷淋冷却连续灭菌流程

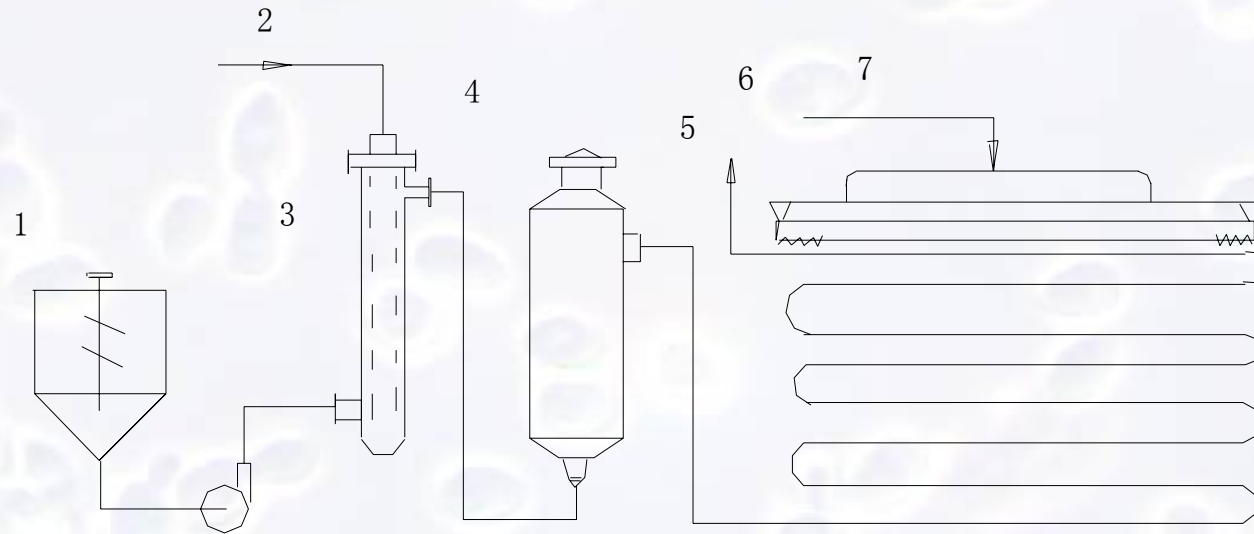


图2-4 连续灭菌设备流程示意图

1-配料罐（拌料罐） 2-蒸汽入口 3-连消塔 4-维持罐
5-培养基出口 6-喷淋冷却 7-冷却水

2, 连续灭菌设计及计算举例

- 参见

- 《微生物工程工艺原理》 P228
- 伦世仪主编《生化工程》 P22。

3, 连续灭菌设备的结构

(1) 设备结构:

- 是培养液高温短时间连续灭菌设备, 它与维持罐组成连续灭菌系统, 分套管式和汽液混合式两类。

套管式连消塔

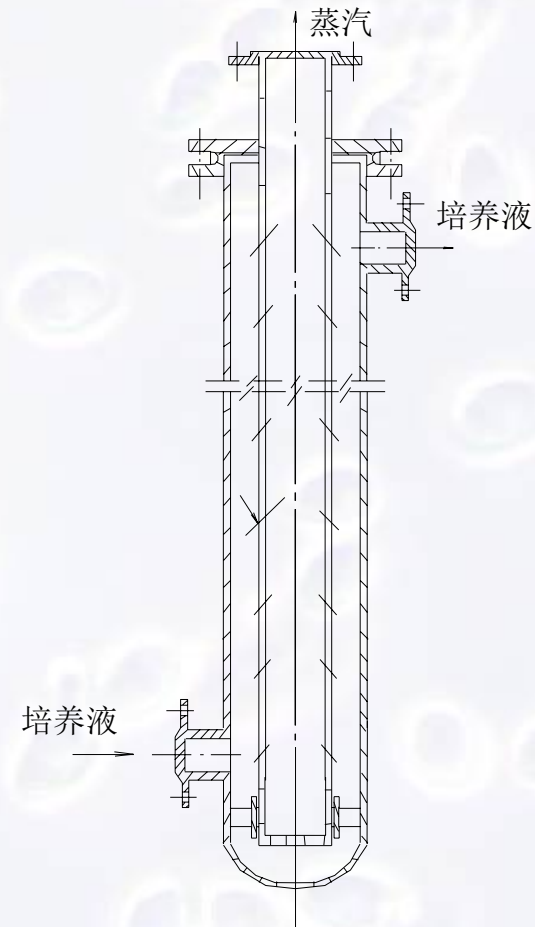


图2-7 连消塔的构造

- 汽液混合式连消塔

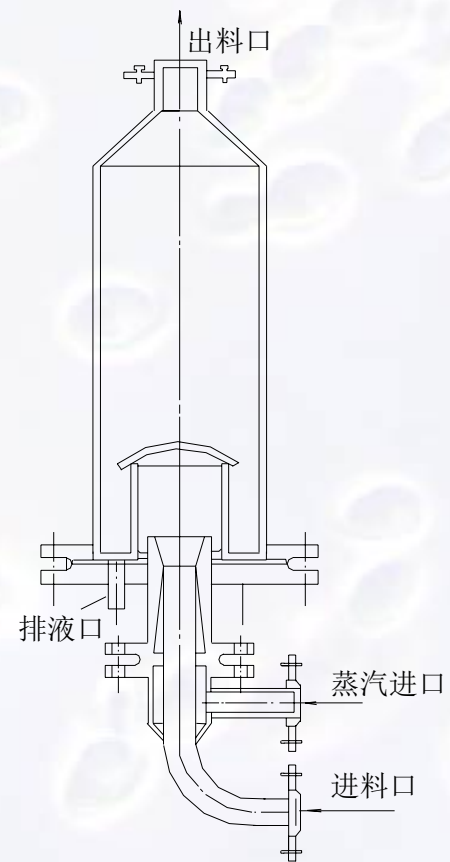


图2-8 连消器的构造

- 维持罐
 - 灭菌系统中的维持设备，主要是使加热后的培养基在维持设备中保温一段时间，以达到灭菌的目的，也称保温设备

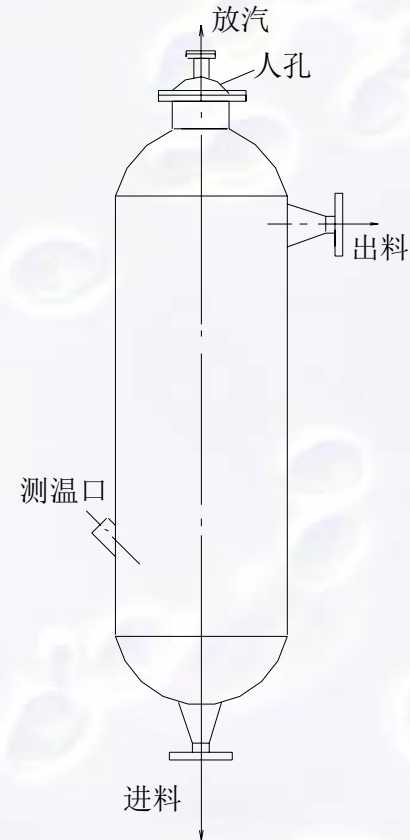


图2-9 维持罐的外形

- 喷射加热器
- 可使料液和蒸汽迅速接触，充分混合，加热是在瞬时内完成的。

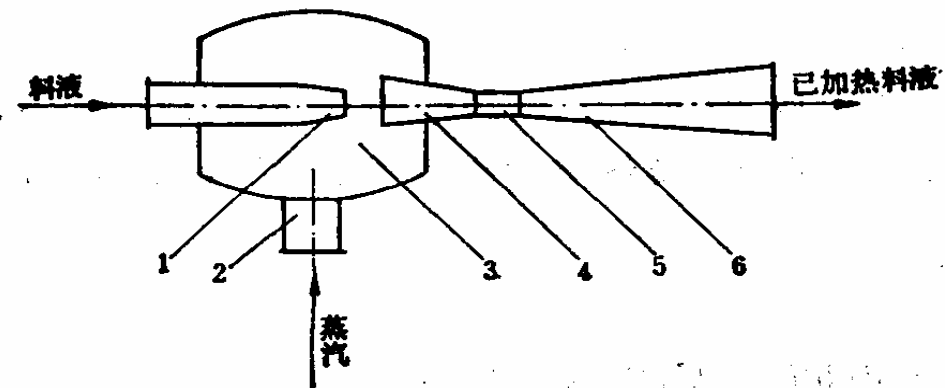
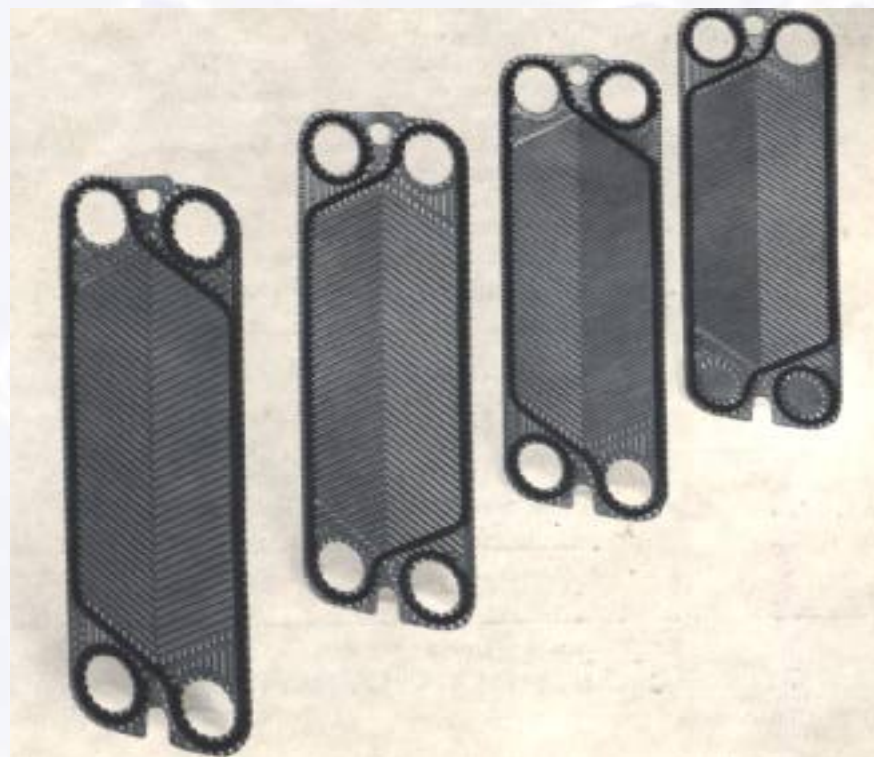


图 2-19 喷射加热器示意图

1—喷嘴 2—吸入口 3—吸入室 4—混合喷嘴
5—混合段 6—扩大管

- 薄板换热器



(2) 连消塔计算

- 参见《发酵工程与设备》P53

四、连续灭菌与间歇灭菌的比较

1, 连续灭菌的优缺点

- 优点

- 保留较多的营养质量
- 容易放大
- 较易自动控制;
- 糖受蒸汽的影响较少;
- 缩短灭菌周期;
- 在某些情况下, 可使发酵罐的腐蚀减少;
- 发酵罐利用率高;
- 蒸汽负荷均匀。

- 缺点

- 设备比较复杂, 投资较大。

2, 分批灭菌的优缺点

- 优点

- 设备投资较少
- 染菌的危险性较小
- 人工操作较方便
- 对培养基中固体物质含量较多时更为适宜

- 缺点

- 灭菌过程中蒸汽用量变化大，造成锅炉负荷波动大，一般只限于中小型发酵装置。

五、影响灭菌的因素

- 培养基成分对灭菌的影响
 - 油脂，糖类及一定浓度的蛋白质可增加微生物的耐热性，另一些物质，如高浓度的盐类，色素等可削弱其耐热性。
- 培养基的物理状态对灭菌的影响
- 培养基中微生物数量对灭菌的影响
- 培养基中氢离子浓度对灭菌的影响
 - 培养基中氢离子浓度直接影响灭菌的效果。培养基的酸碱度越大，所需杀灭微生物的温度越低。

- 微生物细胞中水分对灭菌的影响
 - 细胞含水越多，蛋白质变性的温度越低
- 微生物细胞菌龄对灭菌的影响
 - 老细胞水分含量低、低龄细胞水分含量高
- 空气排除情况对灭菌的影响
- 搅拌对灭菌的影响
- 泡沫对灭菌的影响

六、发酵罐的灭菌

- 培养基的灭菌如果是采用连续灭菌法。则发酵罐应在加入灭菌的培养基前先行单独灭菌。通常是用蒸汽加热发酵罐的夹套或设管并从空气分布管中通入蒸汽，充满整个容器后，再从排气管中缓缓排出。容器内的蒸汽压力保持1公斤，20分钟。在保温结束后，关键是随即通入无菌空气，使容器保持正压，防止形成真空而吸入带菌的空气。

七、补料液的灭菌

- 在发酵过程中，往往要向发酵罐中补入各种不同的料液。这些料液都必需经过灭菌。
- 灭菌的方法则视料液的性质、体积和补料速率而定。
- 如果补料量较大，而具有连续性时，则采用连续灭菌较为合适。
- 也有利用过滤法对另补料液进行除菌。
- 补料液的分批灭菌，通常是向盛有物料的容器中直接通入蒸汽。
- 所有的附属设备和管道都要经过灭菌。