



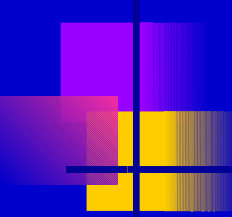
# 培养基和设备灭菌

---



# 一、染菌造成的不良后果

- 使生物反应的基质或产物，因杂菌的消耗而损失，造成生产能力的下降。
- 杂菌也会产生代谢产物，这就使产物的提取更加困难，造成得率降低，产品质量下降。
- 有些杂菌会分解产物，使生产失败。
- 杂菌大量繁殖后，会改变反应液的 **pH** 值，使反应异常。
- 如发生噬菌体污染，生产菌细胞将被裂解，使生产失败。



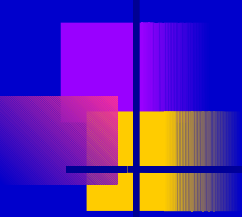
# 发酵生产中的具体措施

- 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。



## 二、培养基灭菌的定义

- 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。
-

- 
- 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。



# 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



## 三、灭菌的方法

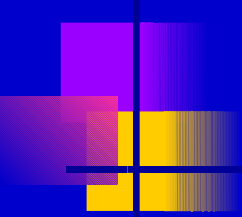
- 可分为物理化学两大类，工业上常用的灭菌方法主要有热灭菌（又分为干热灭菌和湿热灭菌）、射线灭菌（包括紫外线、 $\alpha$ 射线、 $\gamma$ 射线等）、介质过滤除菌和化学药剂灭菌四类方法，其中最有效的方法是热灭菌。



# 培养基灭菌

- 利用高温使微生物细胞的蛋白质变性，从而起到杀灭微生物的作用。
- 影响热灭菌效果的因素有（1）微生物的种类和数量，（2）培养基的性质，浓度和成分，（3）灭菌温度与时间等。

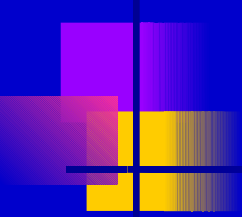


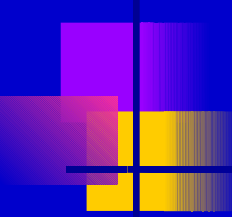
- 
- 升高一定温度，微生物的死亡率变得很大，而营养物的破坏率变化不太大。因此高温灭菌时，微生物可在短时间被杀死，而时间越短，营养物质破坏率越小。有一组实验数据很能说明这一点。



# 灭菌温度与时间对营养成分破坏的比较

灭菌温度(°C)	灭菌时间(min)	营养成分破坏率(%)
100	400	99.3
110	36	67
120	15	50
130	4	27
140	0.5	8
145	0.06	2
150	0.01	<1

- 
- 可见理论推导与实验数据都证明高温灭菌不但会使灭菌时间缩短，而且会减少培养基成分的破坏，所以说高温短时灭菌是一种最佳灭菌方式。但是，话说回来，温度太高，则蒸汽压强越大，要求设备就越严，造价就越高。温度太高，灭菌时间太短，也不易掌握与控制，操作反倒不便，故一般常采用  $120^{\circ}\text{C}$  下灭菌。



## 四、灭菌工艺与应用

---

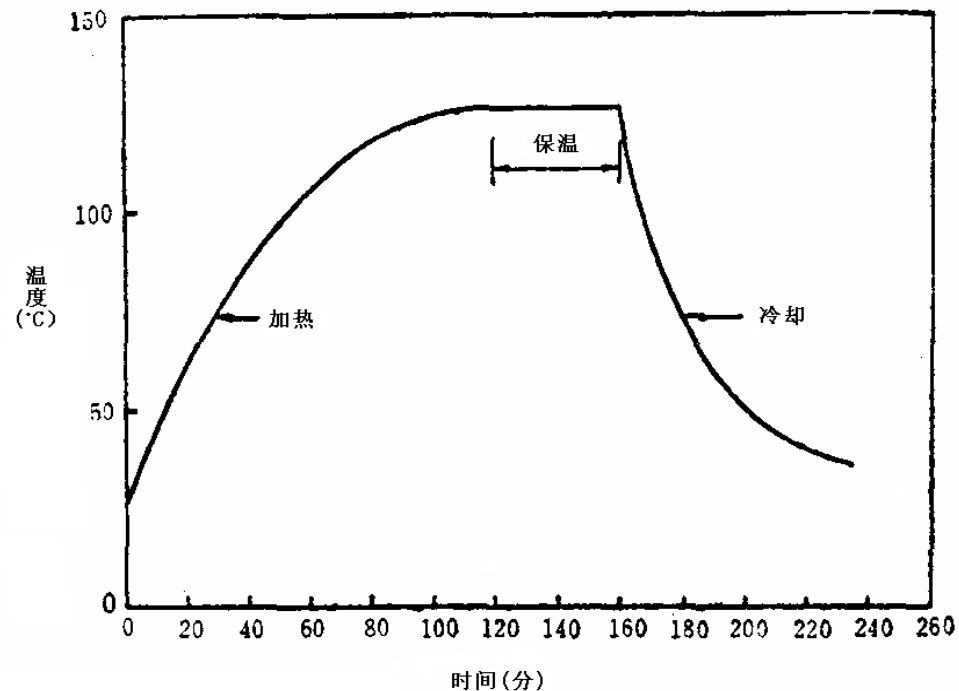
- 根据灭菌方式，灭菌工艺可分为两种，即分批灭菌和连续灭菌。



# 1. 分批灭菌

- 概念：配料、预热、加热、冷却的灭菌过程都在发酵罐中进行的灭菌方式。
- 特点：加热和冷却的时间长，营养成分破坏较多，操作麻烦，劳动强度大。只适用于小型发酵罐的生产需要。
- 工艺流程：要点是三路进汽，活蒸汽灭菌，无菌空气保压后再冷却。

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、冷却三个过程



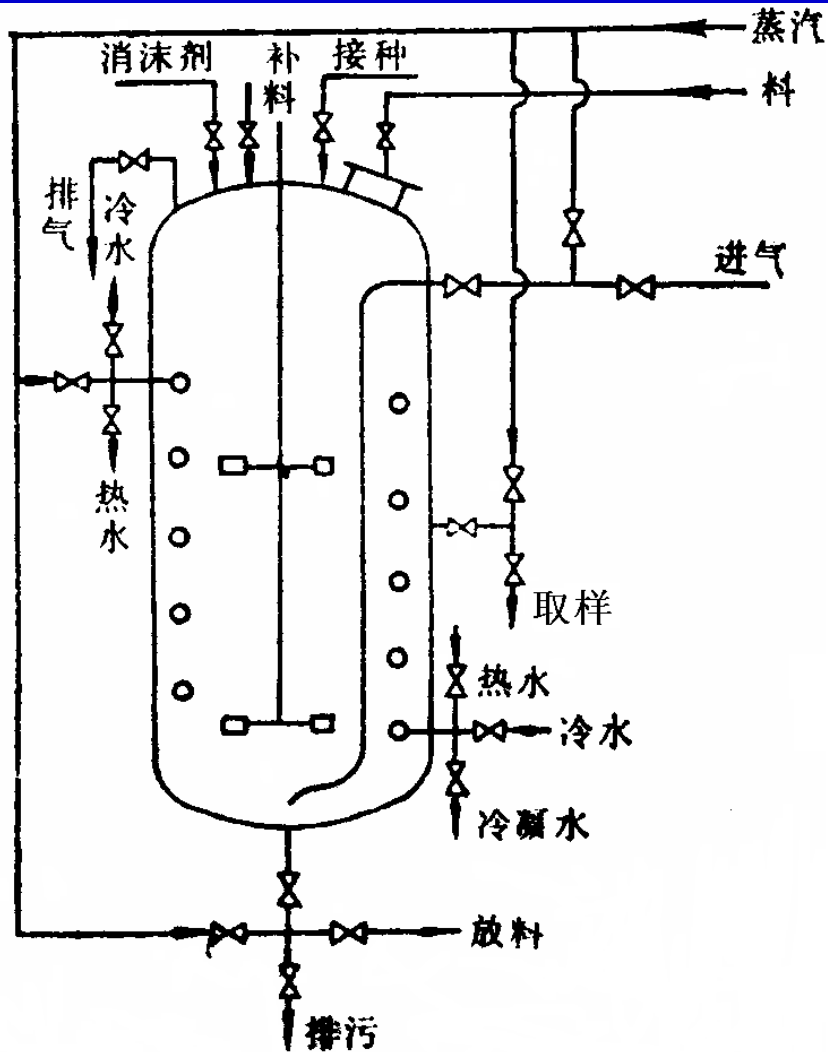
分批消毒周期典型的加热、保温和冷却阶段温度-时间变化关系图



# 保证灭菌成功的要素

- 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。

# 发酵罐的管路图







# 培养基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



# 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。

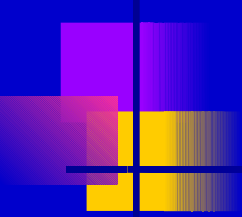
## ■ 缺点

- 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。

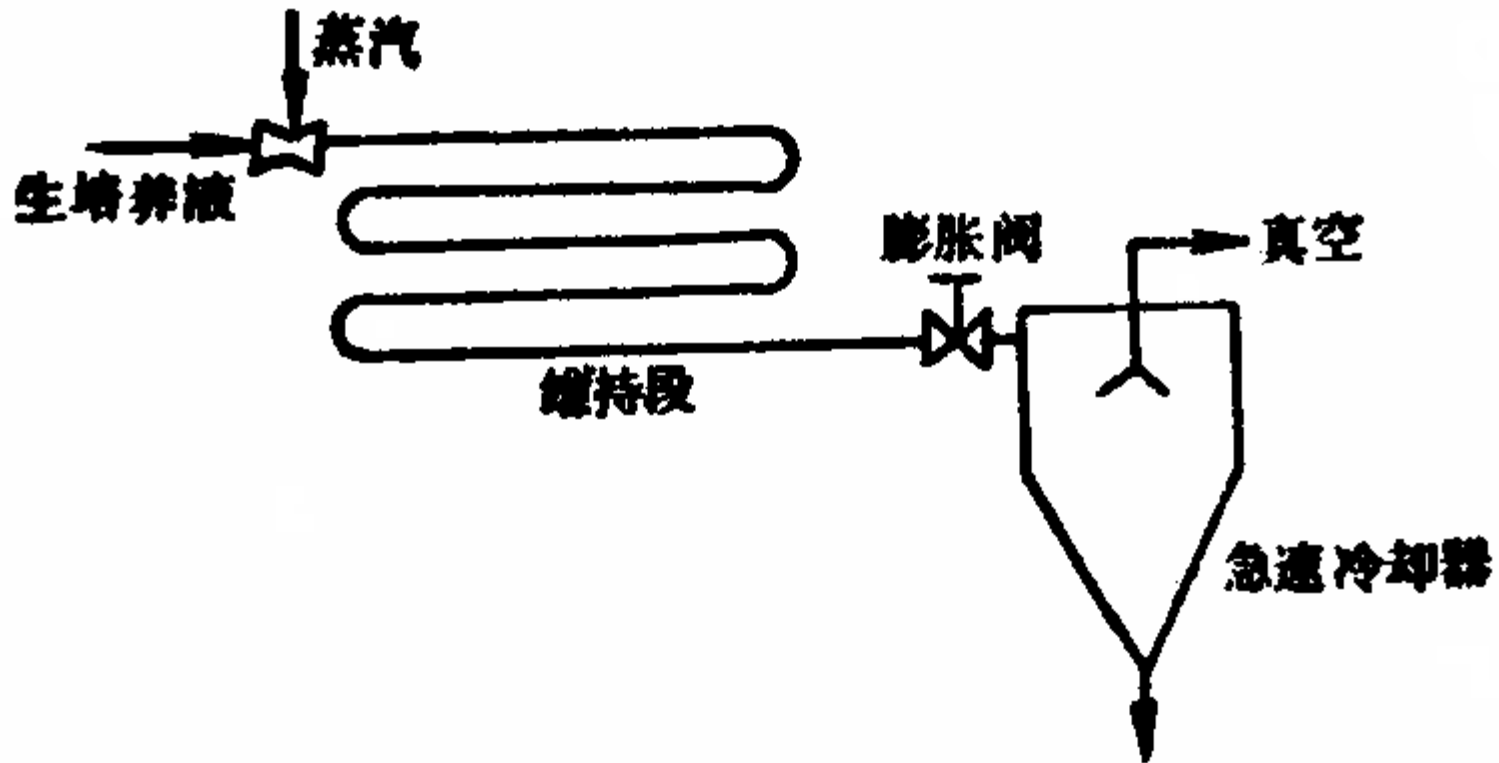


## 2. 连续灭菌

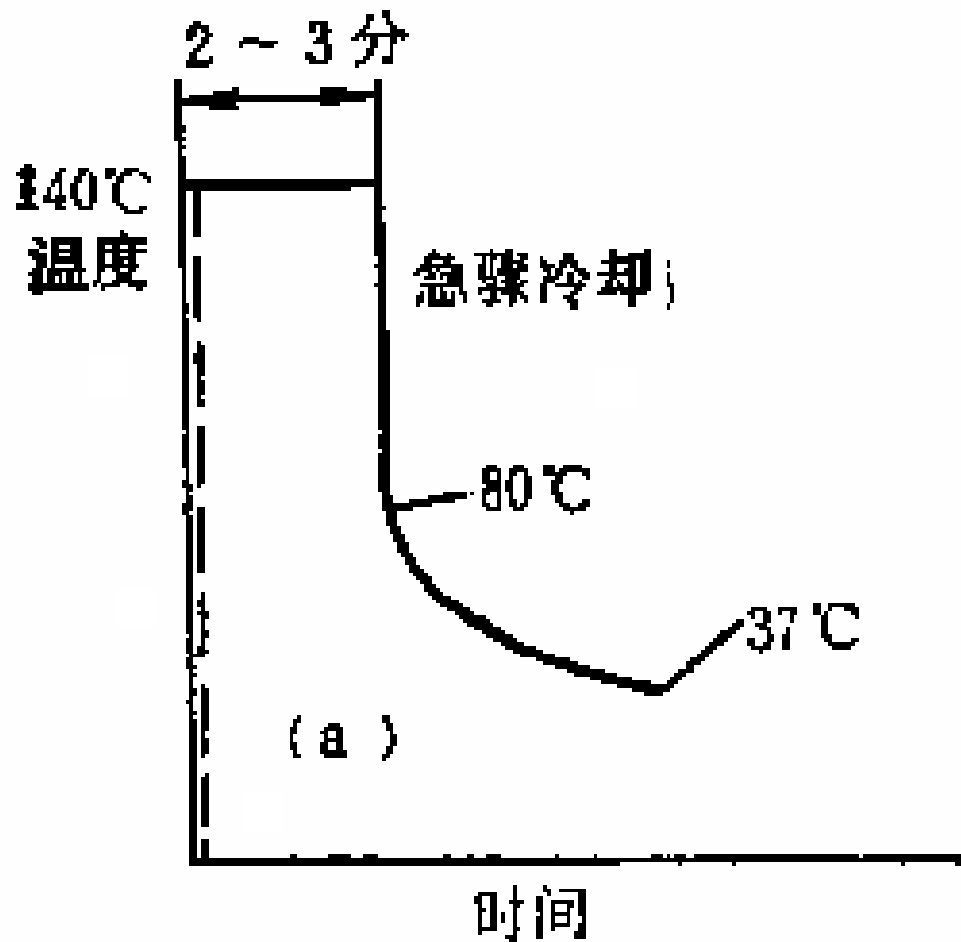
- 概念：是指在发酵罐外连续不断地进行加热、维持和冷却，同时把灭好菌的培养基通入已灭过菌的发酵罐中的灭菌方式。
- 特点：（a）符合高温短时灭菌原则，灭菌后培养基的质量好，（b）灭菌时间短，提高了设备利用率，（c）蒸汽负荷均衡，锅炉工易于操作，（d）适宜采取自动化控制。

- 
- 常见的连续灭菌的流程
    - 连消塔—喷淋冷却连续灭菌流程
    - 喷射加热连续灭菌流程
    - 薄板换热器连续灭菌流程

# (1) 喷射加热连续灭菌

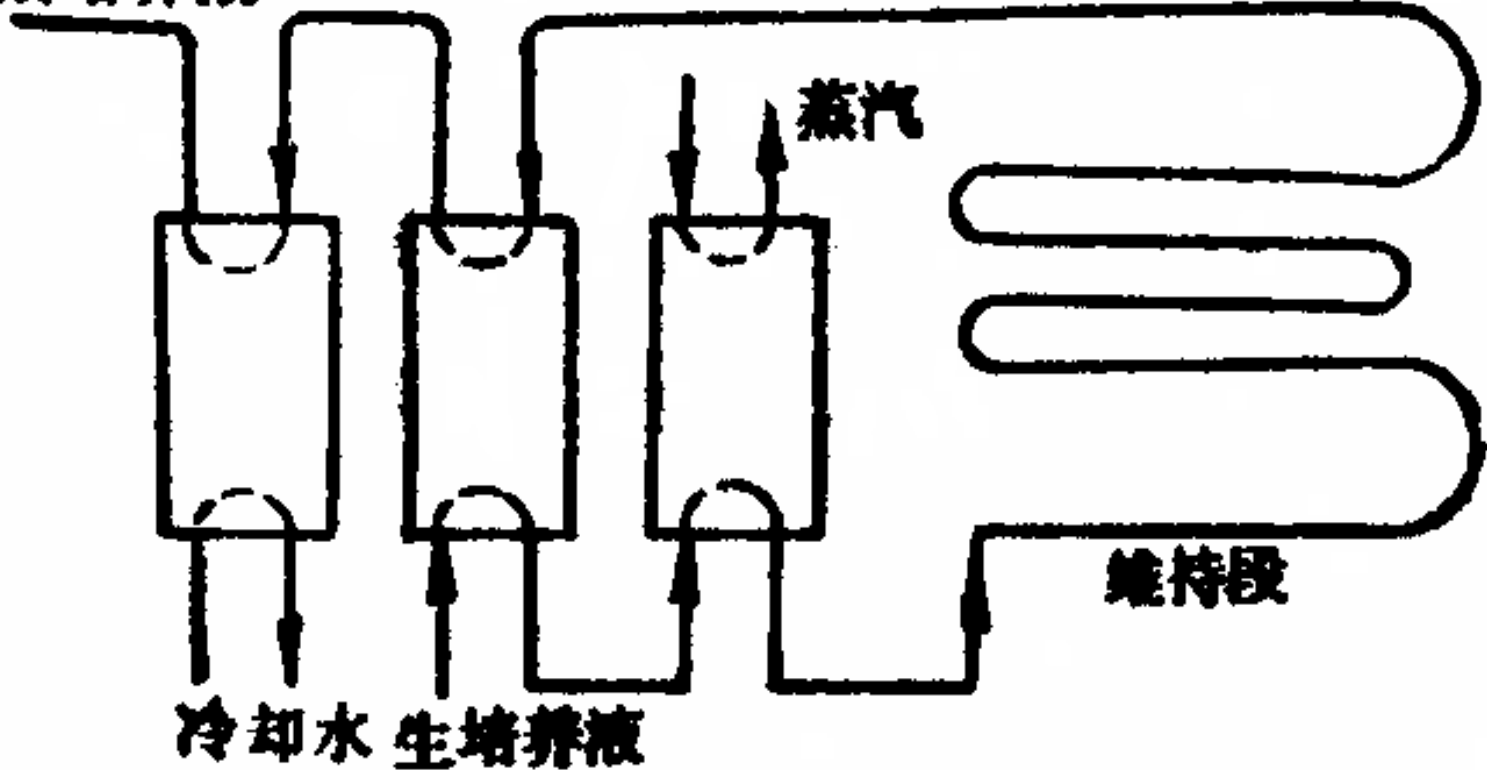


# 典型的喷射加热连续灭菌时的温度 和时间曲线图



## (2) 薄板换热器连续灭菌流程

灭菌后培养液

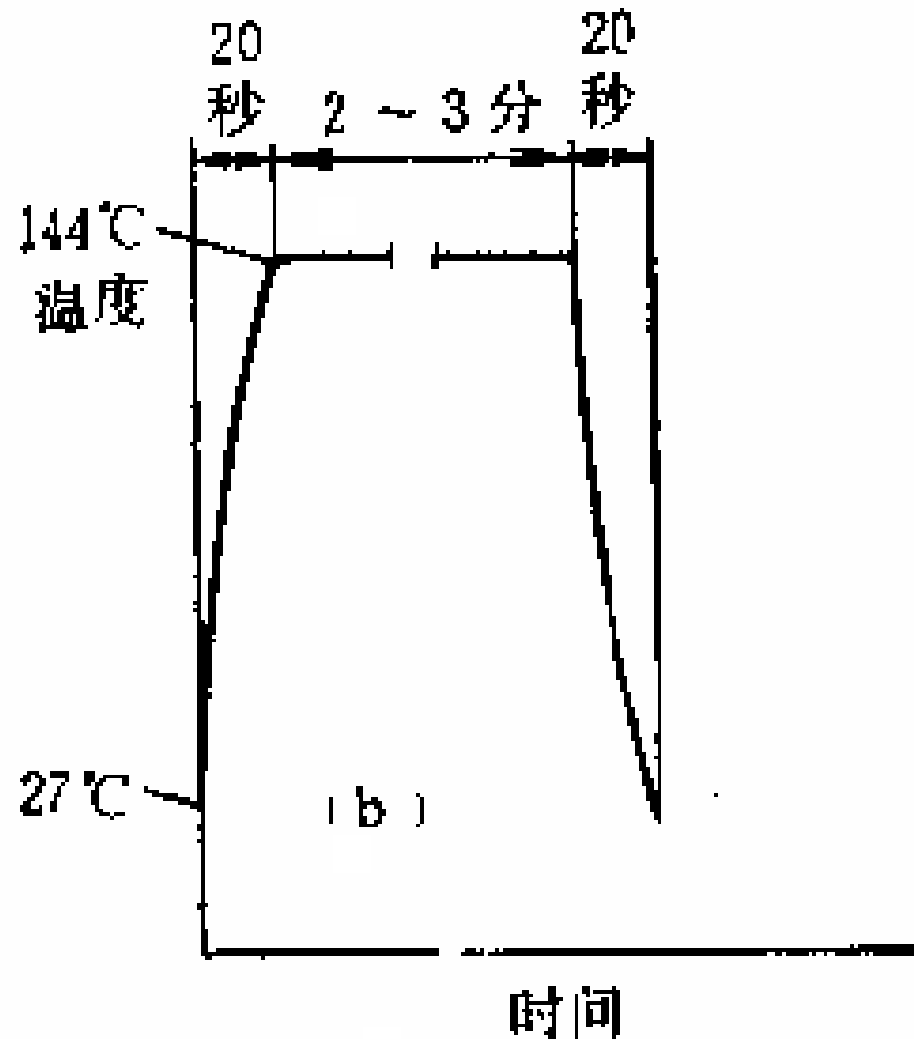


蒸汽

维持段

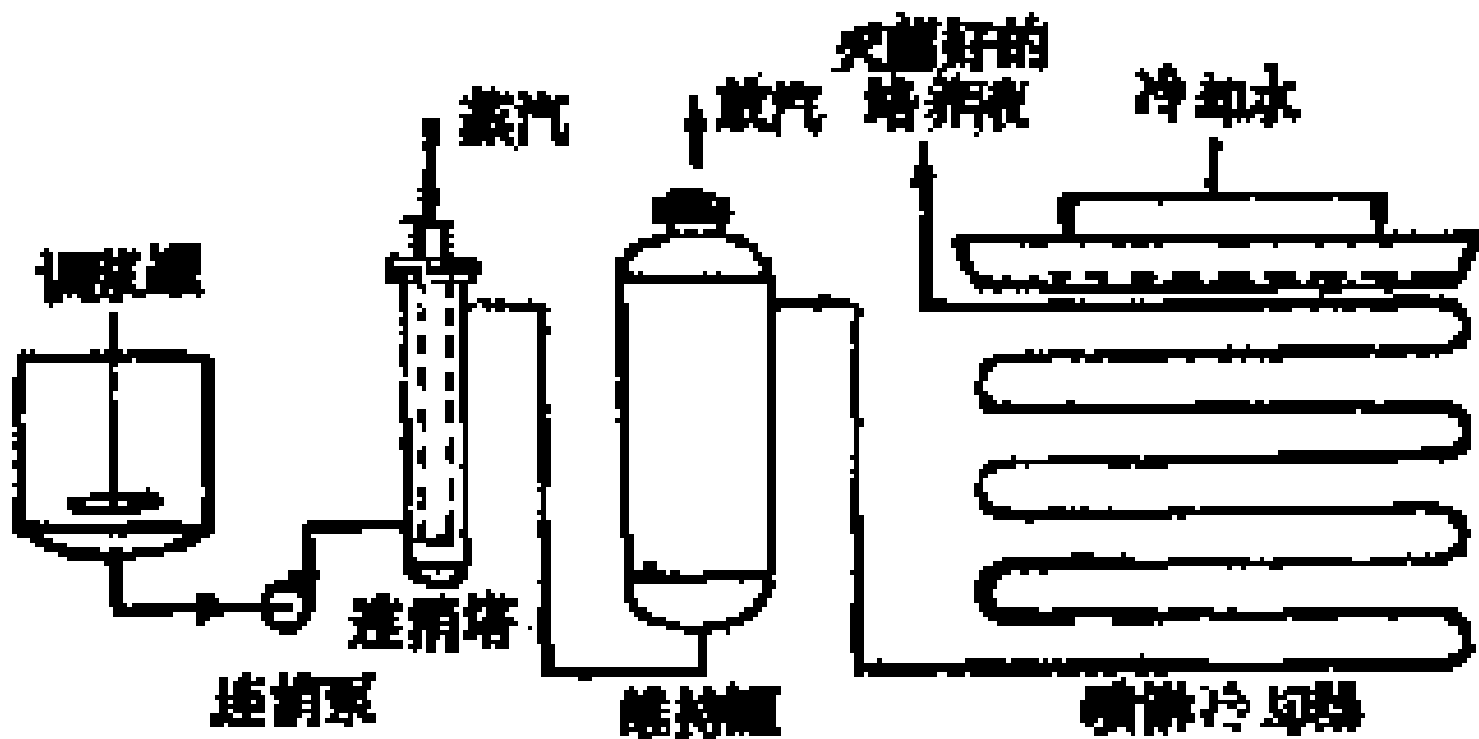
冷却水 生培养液

# 薄板换热器连续灭菌时的温度和时间曲线图





### (3) 喷淋冷却连续灭菌流程





# 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。



## 五、设备灭菌

- 种子罐、发酵罐、计量罐、补料罐等的空罐及管道灭菌从有关管道通入蒸汽，使罐内蒸汽压力达  $0.147\text{MPa}$ ，维持  $45\text{min}$ 。
- 空气总过滤器和分过滤器灭菌
- 维持压力  $0.147\text{MPa}$ ，灭菌  $2\text{h}$ 。



## 消泡剂灭菌

直接加热至  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  ,  $30\text{min}$  。

## 补料罐灭菌

根据料液不同而异, 淀粉质原料  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  维持  $5\text{min}$  。

## 尿素溶液灭菌

$105\text{ }^{\circ}\text{C}$  ,  $5\text{min}$  。