



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102973961 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201210480338. 2

(22) 申请日 2012. 11. 22

(71) 申请人 华侨大学

地址 362000 福建省泉州市丰泽区城东华侨  
大学

申请人 石家庄乾丰生物科技有限公司

(72) 发明人 杨素萍 赵春贵 孟宁生 张永军

(74) 专利代理机构 泉州市文华专利代理有限公司  
35205

代理人 廖仲禧

(51) Int. Cl.

A61L 2/20(2006. 01)

A61L 101/10(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧  
灭菌方法

(57) 摘要

本发明公开了一种规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,将光生物反应器和光合细菌培养基的灭菌过程彼此分离,光生物反应器采用臭氧灭菌,培养基采用传统的高压蒸汽的方式灭菌,将灭菌后的培养基移入灭菌后的光生物反应器中进行光合细菌的高纯度培养。采用臭氧对难以进行高温灭菌的非金属透光材料设计制造的光生物反应器进行灭菌,利用臭氧的强氧化性对光生物反应器内部、连接的所有管道和阀门进行彻底灭菌。该方法操作简单方便、节能环保且成本低廉,为光合细菌规模化高纯度培养奠定基础。

1. 规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,光生物反应器采用非金属透光材料制造,其特征在于:在光生物反应器上安装臭氧发生器,利用臭氧对光生物反应器内部、连接的管道和阀门内部进行灭菌。

2. 如权利要求1所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:光生物反应器,包括罐体、内置光源及其套管、罐体组装的垫圈、热交换器、加热器及驱动循环泵;阀门内部包括密封胶垫;内置光源及套管安装在罐体内部;热交换器、加热器及驱动循环泵安装在罐体外部。

3. 如权利要求2所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:罐体和内置光源管主体的材质采用有机玻璃、玻璃或石英玻璃;罐体组装的垫圈材质为硅橡胶;热交换器和加热器材质为石英、不锈钢或玻璃;驱动循环泵为电磁泵;连接管道的材质为PVC、PPR或不锈钢;阀门的材质为塑料或不锈钢;阀门内部的密封胶垫材质为聚四氟乙烯。

4. 如权利要求1所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:臭氧发生器与光生物反应器底部进气口通过管道和阀门连接,反应器罐体上排气口安装净化气体交换器和阀门,通过净化气体交换器的阀门与通向室外的管道连接;光生物反应器上的连接管道,通过阀门控制安装于臭氧发生器上,连接管道另一端连接到相应的气体交换器。

5. 如权利要求4所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:若干臭氧发生器连接在金属储气罐罐上,通过储气罐的出口与光生物反应器连接;储气罐通过阀门控制和管道,与至少一个光生物反应器连接;通过储气罐阀门控制和臭氧发生器电源的开关,控制一台以上的臭氧发生器轮流工作。

6. 如权利要求1所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:臭氧灭菌有两种方式,一种方式是臭氧直接通入光生物反应器中灭菌,另一种是先将光生物反应器抽真空,再通入臭氧灭菌。

7. 如权利要求6所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:臭氧直接通入光生物反应器中灭菌的具体方法:开启臭氧控制器阀门和光生物反应器排气阀门,将臭氧气体通入光生物反应器、连接管道和相应的气体交换装置内部,臭氧通气量达到反应器容积的4~8倍时,排气口臭氧浓度不低于15ppm,继续通气60min~80min,先关闭气体排出阀,再关闭臭氧气体进入阀,反应器内部的臭氧气体在反应器中保持40min~60min,灭菌后残余的臭氧气体通过气体交换器排出室外。

8. 如权利要求6所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,其特征在于:反应器抽真空通入臭氧灭菌的具体方法:关闭相关阀门,开启真空泵和抽真空控制阀门,将光反应器内部抽真空,真空度达到0.05MPa~0.08MPa,关闭抽真空控制阀门和真空泵开关。开启臭氧发生器管道控制阀门,通入臭氧气体,臭氧通气量达到反应器容积的4~8倍,开启排气阀门,排气口臭氧浓度不低于15ppm,继续通入臭氧气体40min~60min,关闭排气阀门和臭氧进气控制阀门,臭氧在光生物反应器中保持20min~40min,灭菌后残余的臭氧气体通过气体交换器排出室外。

9. 如权利要求1所述的规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法的应用,其特征在于:用于光生物反应器排空后残留微生物菌体的灭菌,以及清洗后进入无菌培养

基料前的灭菌。

## 规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物学技术领域,具体涉及一种规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法。

### 背景技术

[0002] 光合细菌作为一类重要的生物资源,在农业、畜牧业、水产养殖、环境修复和治理、医药保健以及能源等领域已有深入的研究,并且在菌种资源、生产设备、制剂和产品、以及应用等方面取得了重要进展。但针对生产实践和发展的要求,仍需要着力开发光合细菌菌种资源,规模化生产专一性好、效果稳定、高质量、高稳定性的产品和制剂。实现光合细菌制剂规模化生产离不开生产光合细菌的设备和装置,自 1980 年以来,随着光合微生物规模化应用的需求和发展,国内外对光生物反应器的研究和开发取得了很大进展,使生产规模有了很大提高,虽然“光”是光合细菌光生物反应器设计的核心问题,但无菌操作和彻底灭菌也是生产高纯度高活性微生物制剂成败的关键环节。若生产过程中达到严格无菌要求,一旦某个环节控制不严而发生杂菌污染,不仅使生产效率降低,也使液态菌剂不纯,产品在包装、储存和运输过程中杂菌繁殖,甚至导致产品变质,将严重影响产品质量。

[0003] 光生物反应器及其与反应器连接的装置和连接管线能否彻底灭菌,是光合细菌纯培养的关键。黄遵锡等(CN 2575103Y)为代表的采用金属材料制备的反应器,光照采用耐高温玻璃窗光照设计,虽然反应器和培养基能够采用行业上公认的高温方式灭菌,达到高纯度培养,但其采用外置光源,光利用率低,由于受光源的限制,罐容积不能太大,否则反应器内部出现暗区,而且也没有解决光合细菌趋光贴壁影响光传递效率的问题。目前,绝大多数大型光生物反应器和内置光源管光生物反应器都采用非金属透光材料设计制造,其优点是光源利用率高,也可以直接利用太阳光,光利用率高,生产规模大。但采用传统的高温蒸汽灭菌很不安全,甚至损坏反应器。虽然这些透光材料化学性质稳定,具有很强的抗腐蚀性,可以使用常规的化学消毒剂消毒,但消毒留有死角,很难达到整个反应器彻底灭菌的要求,而且消毒剂有残留,污染环境。因而采用这类光生物反应器,灭菌不彻底,通常采用加大菌种接种量,培养优势菌群,因而很难达到高纯度培养的要求。如何解决灭菌的问题,是光生物反应器高效、高纯度纯培养光合细菌的关键。因此,建立一种适合于现有透光材料制造的光生物反应器、操作简便、节能的灭菌方法是非常必要的。

[0004] 臭氧具有强烈的杀菌作用。早在 1991 年,我国卫生部颁布的“消毒技术规范”中,对臭氧的杀菌作用,使用范围及使用方法都有明确的规定。明确肯定了臭氧的杀菌作用,其杀菌原理是:臭氧在常温常压下很不稳定,很快分解成  $O_2$  和活性氧原子,活性氧原子具有很强的氧化杀菌作用,多余的活性氧重新结合形成  $O_2$ ,因此,臭氧是一种无有害残留的绿色杀菌剂。臭氧又是一种光谱的杀菌剂,可杀灭细菌、霉菌、芽孢、病毒和真菌等。我国的“消毒技术规范”充分说明了臭氧灭菌的原理和特点,为制药厂选用臭氧灭菌工艺提供了依据,也极大地推动了臭氧发生器制造工业的发展。尽管我国在 GMP 认证过程中早已推荐了臭氧灭菌方法,但臭氧在药品生产中的应用是在近些年才热起来,比较成功地应用在容器的灭

菌、洁净区域净化、车间等空间的消毒灭菌、物品表面的消毒灭菌、水的消毒灭菌以及非无菌液体制剂微生物控制中用于生产设备、工具、容器、贮罐和输液、输料管道对产品的污染等方面。除了在药品生产中的应用以外,由于臭氧具有广谱、高效、快速、安全的杀毒灭菌作用和特有的除臭和清洁空气的作用,目前在工业、农业、食品和饮料、医疗卫生、环境污染的治理、饮用水处理、污水处理、畜牧养殖、水产养殖等各个领域广泛应用,甚至应用于家庭。市场上也有发酵罐消毒臭氧发生器的供应,并初步应用于传统的金属制发酵罐的消毒和灭菌,而且绿色、环保、节能,可以说是发酵行业灭菌的一场革命。发酵罐上连接很多管道和阀门,如何使臭氧灭菌不留死角,彻底灭菌是臭氧灭菌需要解决的关键问题。规模化发酵,发酵罐很多且体积较大,要求使用的臭氧发生器规模大,臭氧浓度高。若像传统的蒸汽灭菌一样,灭菌过程中将阀门适当开启,使臭氧气体流动,有利于臭氧灭菌,但臭氧排出,厂房内臭氧浓度过高,即使厂房通风,长期作业对操作人员身体有害,如何解决这一问题,也是臭氧在发酵行业上应用的基础。再者,目前所使用的发酵罐材质多为金属材质,抗腐蚀、抗氧化能力强,尤其是不锈钢材质内胆抛光发酵罐,对培养光合细菌而言,光利用率低,臭氧在发酵罐上使用的方法和参数工艺尚不明确的情况下,是否能用于有机玻璃等非金属透光材料制作的光生物反应器系统的灭菌,是否对光生物反应系统有损坏作用,造成罐体、连接管线和阀门的腐蚀和渗漏。

[0005] 有鉴于此,本发明人对非金属透光材料制作的光生物反应器系统的臭氧灭菌方法进行了研究和改进,本案由此产生。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,针对非金属高透光材料制备的光生物反应器难以采用传统高温蒸汽灭菌技术的一种灭菌补充,实现了对非金属透光材料设计制造的光生物反应器的彻底灭菌,克服了化学消毒剂灭菌不彻底和消毒剂有害残留的问题,操作简单,节能环保。

[0007] 为了达成上述目的,本发明的解决方案是:

[0008] 规模化培养光合细菌的光生物反应器的臭氧灭菌方法,将光生物反应器和光合细菌培养基的灭菌过程彼此分离,光生物反应器采用臭氧灭菌,培养基采用传统的方式灭菌,将灭菌的培养基移入灭菌的光生物反应器中进行光合细菌的高纯度培养。采用臭氧对难以进行高温灭菌的非金属透光材料设计制造的光生物反应器内部进行灭菌,臭氧发生器安装在光生物反应器上,对光生物反应器内部、连接的所有管道和阀门内部进行彻底灭菌,用于光合细菌的高纯度培养。

[0009] 进一步,对非金属透光材料制造的光生物反应器采用臭氧方法灭菌,要求反应器与臭氧接触的材质具有耐臭氧氧化的能力,包括罐体、内置光源及其套管、罐体组装的垫圈、热交换器、加热器及驱动循环泵;阀门内部包括密封胶垫;内置光源套管安装在罐体内部;热交换器、加热器及驱动循环泵安装在罐体外部。

[0010] 进一步,非金属透光材料为耐臭氧氧化的材质,包括有机玻璃、玻璃和石英玻璃为主体设计制造的光生物反应器的罐体和内置光源管;要求反应器安装所需要的密封垫和圈为硅橡胶材质;要求连接管道为 PVC 或 PPR 管或不锈钢管和相应的连接管件;阀门为优质塑料和不锈钢材质;阀门内部胶垫一律更换为聚四氟乙烯材料的垫片;要求驱动循环泵为

电磁泵；热交换器和加热器材质为石英、不锈钢或玻璃。

[0011] 进一步，臭氧发生器与光生物反应器底部进气口通过管道和阀门连接，上排气口安装净化气体交换器和阀门，通过净化气体交换器的阀门与通向室外的管道连接，使臭氧气体排出室外；光生物反应器上的连接管道，通过阀门控制安装于臭氧发生器上，连接管道另一端连接到相应的气体交换器。保持臭氧灭菌过程中，反应器和管道内部臭氧气体的流动，使灭菌彻底。

[0012] 进一步，多台臭氧发生器连接在一个小型金属储气罐罐上，通过储气罐的出口与光生物反应器连接；一个储气罐通过阀门控制和管道，可以与多组光生物反应器连接，由于臭氧发生器连续使用，产生臭氧的效率会下降，因此每台臭氧发生器可以独立工作，以便轮流使用。

[0013] 进一步，1~3 台臭氧发生器连接在一个小型金属储气罐进气口上，储气罐的出口与光生物反应器连接，通过连接管道可以连接到光生物反应器上。通过阀门控制和臭氧发生器电源的开关，控制两台或三台臭氧发生器可轮流使用。

[0014] 进一步，采用光生物反应器直接通入臭氧和光生物反应器抽真空通入臭氧两种方式灭菌。

[0015] 进一步，光生物反应器直接通入臭氧的方式灭菌的方法为：开启臭氧控制器阀门和光生物反应器排气阀门，将臭氧气体通入光生物反应器、连接管道和相应的气体交换装置内部，臭氧通气量达到反应器容积的 4~8 倍时，排气口臭氧浓度不低于 15ppm，继续通气 60min~80min。先关闭气体排出阀门，再关闭臭氧气体进入阀门，反应器内部的臭氧气体继续在反应器中保持 40min~60min，即可达到彻底灭菌，灭菌后残余的臭氧气体通过气体交换器排出室外。在实际操作过程中，适当延长臭氧通气灭菌时间，延长臭氧在反应器中保持时间，对设备和光合细菌的培养未见异常影响。

[0016] 进一步，光生物反应器抽真空通入臭氧灭菌的方法为：关闭相关阀门，开启真空泵和抽真空控制阀门，将光生物反应器内部抽真空，真空度达到 0.05MPa~0.08MPa，关闭抽真空控制阀门和真空泵开关。开启臭氧发生器管道控制阀门，通入臭氧气体，臭氧通气量达到反应器容积的 4~8 倍，开启排气阀门，排气口臭氧浓度不低于 15ppm，继续通入臭氧气体 40min~60min，关闭排气阀门和臭氧进气控制阀门，臭氧在光生物反应器中保持为 20min~40min，即可达到彻底灭菌，灭菌后残余的臭氧气体通过气体交换器排出室外。在实际操作过程中，适当延长臭氧通气灭菌时间，延长臭氧在反应器中保持时间，对设备和光合细菌的培养未见异常影响。

[0017] 本发明针对非金属高透光材料制备的光生物反应器难以采用传统高温蒸汽灭菌技术的一种灭菌方法，用于光生物反应器菌悬液排空后残留微生物菌体的灭菌，以及清洗后进入无菌培养基料前的灭菌。

[0018] 本发明的基本思路是将光生物反应器和光合细菌培养基的灭菌过程彼此分离，光生物反应器采用臭氧灭菌，培养基采用传统的方式灭菌，将灭菌的培养基移入灭菌的光生物反应器中进行光合细菌的高纯度培养。本发明的灭菌方法，克服了现有常规化学消毒剂消毒，消毒剂只能消毒其达到的部位能，留有死角，很难达到整个反应器彻底灭菌的要求，而且有消毒剂残留，甚至导致二次污染的问题。该方法弥补了非金属高透光材料制备的光生物反应器难以采用传统高温蒸汽灭菌技术灭菌的难题，操作简单、节能环保、无有害残

留。

## 具体实施方式

[0019] 实施例 1

[0020] 直接臭氧灭菌方法

[0021] 八联单控圆柱型光生物反应器, 反应器罐体内径为 0.40m, 高为 2.0m, 8 个反应器以串联的方式用管道连通, 总容积约为 2m<sup>3</sup>。罐体和内置光源套管材质为有机玻璃, 上封头和下封头靠法兰与罐体连接, 连接处密封垫材质为硅橡胶, 主要连接管道为 PVC 管和相应的连接管件, 阀门为优质塑料材质, 阀门内部胶垫一律更换为聚四氟乙烯材料的垫片。驱动循环泵为 MP-100RM-380 电磁泵。热交换器为玻璃材质, 加热管为石英材质。选用臭氧产量为 100g/h, 流量约为 0.5~0.8m<sup>3</sup>/min 的臭氧发生器灭菌。关闭或开启反应器其它相关阀门, 开启臭氧控制器阀门和光生物反应器排气阀门, 将臭氧气体通入光生物反应器、连接管道和相应的气体交换装置内部, 臭氧通气量分别达到反应器容积的 4 和 8 倍时, 排气口臭氧浓度均大于 15ppm, 排气口排出的臭氧浓度已达到灭菌要求。反应器中连续通入臭氧 2 小时, 停止灭菌。无菌操作将无菌水移入反应器中, 接种沼泽红假单胞菌菌种 10L, 开启循环泵 10min, 排空反应器。采用臭氧方法灭菌。灭菌结束后, 将灭菌的无菌水泵入反应器内, 开启循环泵, 使液体在反应器中循环 10 分钟, 无菌操作从反应器中取 50ml 液体, 加入 500ml 蓝盖培养瓶中, 加满沼泽红假单胞菌培养基, 间隔 1 分钟取样, 重复取样 6 次, 于 2000lux 培养箱中 30℃ 培养 10 天, 观察培养液是否浑浊、变红。

[0022] 实验一: 反应器中继续通入臭氧时间分别为 20min、40min、60min、80min, 关闭排气阀和臭氧发生器控制阀, 停止通入臭氧, 反应器中的臭氧在反应器中保持 40min, 分别取样测定, 臭氧通气 60min~80min, 检测瓶中均未见细菌生长。

[0023] 实验二: 反应器中继续通入臭氧通入时间分别为 60min, 关闭排气阀和臭氧发生器控制阀, 停止通入臭氧, 反应器内部的臭氧气体在反应器中保持 0min、20min、40min、60min, 分别取样测定, 臭氧在反应器中保持 20min~60min, 检测瓶中均无菌生长。

[0024] 依据实验结果, 提高灭菌程度的把握, 将通入臭氧时间定为 60min~80min, 臭氧在反应器中保持时间定为 40min~60min。

[0025] 实施例 2

[0026] 反应器抽真空, 臭氧灭菌方法

[0027] 利用实施例 1 的反应器和臭氧灭菌检测方法, 与实施例 1 不同之处, 在于将反应器抽真空后, 再通入臭氧灭菌, 真空度在 0.05MPa~0.08MPa 之间。

[0028] 实验一: 通入臭氧气体, 臭氧通气量分别达到反应器容积的 4 和 8 倍时, 打开排气口阀门, 检测排气口臭氧浓度均大于 15ppm, 排气口排出的臭氧浓度已达到灭菌要求。

[0029] 实验二: 反应器中通入臭氧时间分别为 20min、40min、60min、80min, 关闭排气阀和臭氧发生器控制阀, 停止通入臭氧, 反应器中的臭氧在反应器中保持 40min, 分别取样测定, 臭氧通气 40min~80min, 检测瓶中均无菌生长, 达到灭菌要求。

[0030] 实验三: 反应器中通入臭氧时间为 40min, 关闭排气阀门和臭氧进气控制阀门, 臭氧在光生物反应器中保持为 20min、40min、60min。分别取样测定, 臭氧在反应器中保持 20min~60min, 检测瓶中均无菌生长。

[0031] 依据实验结果,提高灭菌程度的把握,将通入臭氧时间定为 40min~60min,臭氧在反应器中保持 20min~40min。

[0032] 实施例 3

[0033] 光合细菌制剂的无菌检测

[0034] 紫硫细菌 283-1 菌株为厌氧菌,在固体平板上培养,不生长,将菌悬液涂布在固体平板上,若有菌生长,即为杂菌。采用实施例 1 的光生物反应器和臭氧灭菌方法对反应器灭菌,在灭菌罐中高温灭菌紫硫细菌 283-1 菌株的培养基,冷却至约 35℃,无菌操作移入反应器。接种,控制温度 29℃~31℃,光照培养 7 天,常规管理,菌体在反应器中生长良好。取样进行纯度检测,将样品 1ml 涂布在 5 个肉汤琼脂培养基的平皿中,未见杂菌生长,臭氧灭菌效果良好,培养过程中反应器封闭程度良好,反应器内部未被空气污染。经过 12 个月的运行,未见反应器内部和相关附件的腐蚀和渗漏。

[0035] 本发明的灭菌方法将臭氧杀菌应用于光生物反应器的灭菌,实现了对非金属透光材料制备的光生物反应器的彻底灭菌,奠定了光合细菌高纯度培养的基础,克服了现有常规化学消毒剂对反应器灭菌不彻底和消毒剂有害残留的问题,解决了非金属高透光材料制备的光生物反应器难以采用传统高温蒸汽灭菌技术灭菌的难题。与现有化学消毒剂消毒方法相比,操作简单可靠、无有害残留、绿色环保。与微生物发酵行业上,采用传统的高温蒸汽灭菌方法相比,操作更为简单方便、节能环保、成本低廉。

[0036] 以上仅为本发明的具体实施例,但本发明的设计构思并不局限于此,凡利用此构思对本发明进行非实质性的改动,均应属于侵犯本发明保护范围的行为。