
国家计量技术规范规程制订

《生物发酵罐性能测试规范》

（征求意见稿）

编制说明

南京市计量监督测试院

中国计量科学研究院

2022年9月

《生物发酵罐性能测试规范》

(征求意见稿)

编写说明

一、任务来源

根据国家市场监管总局 2019 年国家计量技术法规计划立项，由南京计量监督检测院、中国计量科学研究院承担《生物发酵罐性能测试规范》的制定工作。

二、规范制定的必要性

生物发酵是指利用生物原理（通常是微生物或者细胞），在适宜的条件下，将原质经过特定的代谢途径转化为人类所需要的产物的过程。生物发酵工程作为生物工程的主要组成部分，广泛应用医药工业，食品工业，能源工业，化学工业，农业中。

生物发酵罐是为一个特定生物化学过程的操作提供良好而满意的环境的容器，是生物发酵过程中的核心器件。通过控制罐体内温度、压力、转速、pH 值、溶氧等参数达到对生物发酵条件的严格控制，从而寻求最好的发酵效率，追求目标产物产率的最大化。所以如何科学地、准确地控制发酵罐中的相关参数，对于生物发酵过程是十分关键的。然而目前由于相关技术规范的缺失，生物发酵企业无法对发酵罐中的控制参数进行校准溯源，导致实际的测量参数准确性无法保证。目前生物发酵罐根据用途和容量不同，分为容量为 1L~50L 的实验室用生物发酵罐、容量为 50L~5000L 的中试用生物发酵罐、容量大于 5000L 的生产用的生物发酵罐。从实验室到中试到生产，是生物发酵企业常规发展模式。如果前置阶段的参数控制不准确，会直接导致发酵工艺的错误，导致企业无法获得最优的发酵工艺，造成直接经济损失。

欧盟标准化组织早在 2001 年就颁布了生物反应器的相关标准：BS EN 13311-4:2001 Biotechnology-Performance criteria for vessels。其中第四部分就是关于生物发酵罐的相关参数。关于目前国内并没有生物发酵罐相关的标准和技术规范，急需编写相关校准规范弥补国内的空白。

三、《生物发酵罐性能测试规范》制定过程

1、2019 年国家市场监督管理总局计量司批准全国生物计量技术委员会关于《生物

发酵罐性能测试规范》的立项，南京市计量监督检测院、中国计量科学研究院为主要起草单位，项目正式启动。

2、2019年4月 南京计量监督检测院《生物发酵罐性能测试规范》起草组就规范的架构设定、校准项目、具体指标等广泛听取了仪器生产厂家和相关领域专家的建议和意见。

3、2020年10月 根据实验数据，规范起草小组在南京举行中期会议，中对规范的进展进行讨论，最终确定规范主要技术依据和项目指标。

4、2021年10月 规范起草小组完成规范初稿的编写。

5、2022年9月 规范起草小组完成征求意见稿编写，广泛争取各领域专家意见。

四、规范制定的主要技术依据及原则

4.1 技术依据

由于生物发酵罐涉及多项发酵关键参数，故该规范主要参照了 JJG119 《实验室 pH（酸度）计》、JJG291 《溶解氧测定仪》、JJG1871 《磁电式转速传感器》、JJF1101 《环境试验设备温度、湿度参数校准规范》及现行生物发酵罐相关技术文件进行编写。

4.2 制定原则

4.2.1 架构

架构上按照 JJF1071-2010 《国家计量校准规范编写规则》的要求，分为引言、范围、引用文件、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔 10 个部分制定《生物发酵罐性能测试规范》。

4.2.2 术语与计量单位的选择

术语和计量单位、计量特性、通用技术要求与校准项目和校准方法、原则上与 JJF 1071-2010 国家计量校准规范编写规则保持一致。

术语方面，对生物发酵及生物发酵罐的定义给出明确的定义。

计量单位方面，本规范涉及的主要计量单位为酸度（pH值，pH）、溶解氧（毫克每升，mg/L）、流量（毫升每分钟，mL/min）、温度（摄氏度，℃）转速（转每分钟，r/min）。

4.2.3 计量特性确定原则

根据生物发酵罐在实际应用中的主要功能和性能指标，并结合一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的生物发酵罐上的实验，形成本规范确定的计量特性。

生物发酵罐主要由酸度控制系统、溶解氧控制系统、温度控制系统、转速控制系统、气液加料控制系统和罐体及管路组成。主要的计量特性是针对生物发酵罐的温度控制系统、酸度控制系统、溶解氧控制系统、转速控制系统、气液加料控制系统。

温度、溶解氧、酸度等参数对发酵或者培养的影响很大。无论何种发酵罐，在整个发酵过程中，应采用一个比较适合的培养温度，使得到的产物产量最高，否则产量直接受到影响。对于好氧发酵，溶解氧浓度是最重要的参数之一，微生物深层培养时，需要适量的溶解氧以维持其呼吸代谢和某些产物的合成，氧的不足会造成代谢异常，产量降低。发酵过程中，pH 值的变化取决于所用的菌种、培养基的成分和培养条件。培养基中的营养物质的代谢，是引起 pH 值变化的重要原因，发酵液的 pH 值变化乃是菌体产酸和产碱的代谢反应的综合结果。每一类微生物都有其最适的和能耐受的 pH 值范围，而且微生物生长阶段和产物合成阶段的最适 pH 值往往不一样，需要根据实验结果来确定。

生物发酵罐在酸度和溶解氧控制系统方面，要根据不同菌种、培养基的成分和培养条件和可能造成的 pH 和溶氧变化，实时监测酸度值和溶解氧值，平衡至所需产量的发酵系统。酸度和溶解氧的实时监测分别参照 JJG119 《实验室 pH（酸度）计》、JJG291 《溶解氧测定仪》，设置了示值误差和测量重复性参数。酸度示值误差为不超过 ± 0.1 pH，酸度重复性不大于 0.05pH，溶解氧浓度示值误差不超过 ± 0.5 mg/L，溶解氧重复性。

温度控制系统方面，生物发酵罐根据最适宜培养温度的原则，控制相应的温度为 $\pm 5.0^{\circ}\text{C}$ ，部分仪器会控制在 $\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 。温度是生物发酵罐最重要的计量特性，罐体内物料通过长时间搅拌温度处于平衡状态，故在计量特性中针对温度设置了温度示值误差参数。在计量性能指标方面，根据目前主流生物发酵罐厂家出厂说明书及实际需要，将温度示值误差设置为 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 。

转速控制系统为加速物料的混合和培养，同时也关系到系统的溶氧参数，有效的控制转速不仅可以保证充分混合，更可以配合溶氧参数的控制，故在计量特性中针对转速设置了转速示值误差，并根据相关规范要求，误差限为不超过 $\pm 3\%$ 。

气液加料控制系统为发酵罐加料用流量控制部分，针对不同的加料，根据常用气相和液相，对流量进行检测，分别设置液体流量设定误差和流量稳定性、气体流量示值误差，误差限为不超过 $\pm 5\%$ 。

此外根据现行发酵罐灭菌功能，对其进行灭菌性能和无菌性能测试，将温度测量装置分布于罐体内，测得相应的灭菌指标，而后通入无菌培养基进入发酵程序，并培养观察无菌效果。

故在计量特性选择过程中，有针对性对于酸度控制系统、溶解氧控制系统、温度控制系统、转速控制系统、气液加料控制系统设置了计量特性。并专门设置了灭菌和无菌性能测试作为计量性能指标，保证发酵罐的工作性能。

4.2.4 校准设备及标准物质选择的原则

根据选择的计量特性，规范中给出了不同的计量器具。

针对酸度模块，选用经政府计量行政部门批准的 pH 有证标准物质，不确定度不大于 0.01pH ($k=3$)，覆盖 pH 值范围 (1-14) pH。

针对溶氧模块，选用饱和溶解氧发生装置，恒温范围 ($5.0\sim 50.0$) $^{\circ}\text{C}$ ，温度波动范围不大于 0.2°C ，均匀性不超过 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ，溶解氧发生稳定。

针对温度模块，选用温度测量设备，测量范围 ($5.0\sim 80.0$) $^{\circ}\text{C}$ ，最大允许误差 $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ，传感器选用四线制铂电阻温度计(精度不低于 0.01°C)，传感器通道数量不少于 6 个，并能满足校准要求。

针对转速模块，选用带有反光转速贴片的转速测量装置转速测量范围 ($0\sim 5000$) rpm，不确定度不大于 2% ($k=2$)。

针对流量模块，液体流量校准为称重方式，容量瓶和天平，气体流量校准采用流量测量装置（电子流量计），流量测量范围 ($0.5\sim 20$) L/min，不确定度不大于 2% ($k=2$)。

针对灭菌和无菌模块，采用无线温度测量装置，温度测量范围 ($0\sim 140$) $^{\circ}\text{C}$ ，不确定度不大于 0.2°C ($k=2$)，测量罐体内部温度。

五、规范制定说明

《生物发酵罐性能测试规范》共分为引言、范围、引用文件、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔 10 个部分

5.1 范围

本规范适用于容量为 1L~50L 的实验室用生物发酵罐、容量为 50L~300L 的中试用生物发酵罐和生产用的容量大于 300L 的生物发酵罐的性能参数的校准。。

5.2 引用文献

《生物发酵罐性能测试规范》主要依据本规范引用了下列文件：

JJG119 实验室 pH（酸度）计

JJG291 溶解氧测定仪

JJG1871 磁电式转速传感器

JJF 1265 生物计量术语及定义

JJF1001 通用计量术语及定义

JJF1101 环境试验设备温度、湿度参数校准规范

JJF 1265 生物计量术语及定义

。

5.3 术语和计量单位

生物发酵 Biological Fermentation

生物发酵是指利用生物原理（通常是微生物或者细胞），在适宜的条件下，将原琼经过特定的代谢途径转化为人类所需要的产物的过程。

生物发酵罐 Biological fermenter

生物发酵罐是为一个特定生物化学过程的操作提供良好而满意的环境的容器。

5.4 概述

在概述部分，主要对生物发酵罐的用途、原理和仪器组成进行了简要介绍。

5.5 计量特性

在计量特性部分，主要针对生物发酵罐的特点，选择一定数量的、不同型号

的仪器进行试验测试。通过分析在一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的生物发酵罐实验数据的基础上,综合生物发酵罐在实际应用中的主要功能和性能指标,考虑其具体应用的要求,形成本规范确定的计量项目,包括酸度示值误差、酸度重复性、溶解氧浓度示值误差、溶解氧重复性、温度示值误差、转速示值误差、液体流量示值误差、流量稳定精度、气体流量示值误差、灭菌性能、无菌性能。

5.6 校准条件

在校准的环境条件条件部分,主要针对生物发酵罐的使用状况,规定了相关使用环境条件,并规定了校准用计量标准器。

5.7 校准项目和校准方法

根据计量特性部分确定的计量项目,确定相关计量校准方法。

检查待校生物发酵罐铭牌标识是否完好。将待校生物发酵罐开机预热,并确认发酵罐各传感器工作正常。

5.7.1 酸度测量示值误差

发酵罐用一种标准溶液校准后(对具有两点校准或多点校准式仪器,应选用两种或多种溶液校准,校准溶液与测量溶液的 pH 之差以不超过 3pH 单位为宜),测量另一种标准溶液(依据常用点选择)。重复操作 6 次,取平均值作为仪器示指 $\overline{\text{pH}}_{\text{测量}}$, 此示值与该溶液在测定温度下的标准值之差为该发酵罐的 pH 计示值误差值 ΔpH 。(测量时应注意温度平衡及温度修正)。

$$\Delta\text{pH} = \overline{\text{pH}}_{\text{测量}} - \text{pH}_{\text{标准}} \quad (1)$$

式中: $\overline{\text{pH}}_{\text{测量}}$ —— 三次测量平均值, pH;

$\text{pH}_{\text{标准}}$ —— 缓冲液标准值, pH;

ΔpH —— 仪器示值误差, pH。

5.7.2 酸度测量重复性

取 7.1 中 6 次测量数据,按式(2)计算酸度重复性 S_{pH}

$$S_{\text{pH}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{pH}_i - \overline{\text{pH}})^2}{n-1}} \quad (2)$$

式中: $\overline{\text{pH}}$ —— 6 次测量平均值, pH;

pH_i —— 待测标准溶液的测量值, pH;

n——测量次数，6次。

5.7.3 溶解氧浓度测量示值误差

用饱和溶解氧发生装置制备出的氧饱和水溶液（选择量程20%，50%，80%点或实际使用点），分别用生物发酵罐溶解氧传感器测量不同浓度的氧饱和水溶液6次，用测量绝对误差值中的最大值表示该生物发酵罐的溶解氧误差。

溶解氧浓度与温度呈函数关系，温度对其影响很大。若溶解氧传感器自带温度补偿，必须在温度误差低于±0.2℃情况下进行，否则溶解氧的温度自动补偿不能认可。（依据生物发酵罐的说明书执行）

$$\Delta C = \bar{C} - C_{\text{标准}} \quad (3)$$

式中： \bar{C} ——仪器测量平均值，mg/L；

$C_{\text{标准}}$ ——溶解氧标准值，mg/L；

ΔC ——溶解氧示值误差，mg/L。

5.7.4 溶解氧测量重复性

取7.4中6次测量数据，按式（4）计算溶解氧重复性 S_C

$$S_C = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2}{n-1}} \quad (4)$$

式中： \bar{C} ——6次测量平均值，mg/L；

C_i ——待测标准溶液的测量值，mg/L；

n——测量次数，6次。

5.7.5 温度示值误差

分别设置温度测量装置中水浴温度在发酵罐满量程温度的20%，50%，80%的温度点处，将发酵罐的温度探头取出放入水浴锅内，与标准数字温度计靠近放置于水浴锅同一水平面内，在设定的温度点，同时分别读取 $T_{\text{罐}}$ 和 $T_{\text{标准}}$ 三次测量值，

取各自的三次平均值为该温度点的 $\overline{T_{\text{罐}}}$ 、 $\overline{T_{\text{标准}}}$ ，按式（5）计算 ΔT

公式：

$$\Delta T = \overline{T_{\text{罐}}} - \overline{T_{\text{标准}}} \quad (5)$$

式中： $\overline{T_{\text{标准}}}$ ——标准数字温度计平均值；

$\overline{T_{\text{罐}}}$ ——生物发酵罐的温度探头平均值；

ΔT ——温度误差值；

5.7.6 转速示值误差

将反光转速贴片贴于搅拌器旋转叶片上，在测量范围内设置4档转速，分别为50 r/min、200 r/min、500r/min、1000 r/min。用光电转速表对准反光贴片位置测量实际转速，每档转速下测量3次，取平均值 $x_{\text{标准}}$ ，通过计算相对误差值得到不同转速下的转速误差，其中最大值即为该生物发酵罐的转速误差。

公式：

$$\delta_L = \frac{x_i - x_{\text{标准}}}{x_{\text{标准}}} \times 100\% \quad (6)$$

式中： δ_L ——转速相对误差；

x_i ——转速设定值，r/min；

$x_{\text{标准}}$ ——转速测量平均值，r/min。

5.7.7 液体流量设定值误差和流量稳定性

用专用管路连接仪器的出口、入口，以脱过气的水做流动相，通过管路冲洗系统，使系统中充满水。将温度计插入流动相内，测量试验温度。设定适当的流量，当输液泵运行稳定后，在泵测量范围中均匀取三个测量点，用合适的干燥的容量瓶（事先清洗、干燥后称重）分别接收规定时间流出的流动相。测量次数、时间、使用容量瓶规格如下表所示。将测量得到的容量瓶分别在分析天平上称重，重复三次，按公式(7)计算流量的实测值，按公式(8)计算流量设定值误差SS，按公式(9)计算流量稳定性误差SR。

表2 泵流速测定参数表

泵流速设定值 (mL/min)	0.2~1.0	1.0~10	10~100
测量次数	3	3	3
流动相收集时间 (min)	10~20	5~10	5
使用容量瓶大小 (ml)	25	100	1000

$$F_m = (W_2 - W_1) / (\rho_t \times t) \quad (7)$$

式中： F_m ——流量实测值，mL/min；

W_2 ——容量瓶加流动相的质量，g；

W_1 ——容量瓶的质量，g；

ρ^t ——实验温度下流动相的密度，g/cm³，(不同温度下流动相的密度参见附录 C)；

t ——收集流动相的时间，min。

$$S_s = \frac{\overline{F_m} - F_s}{F_s} \times 100\% \quad (8)$$

式中：

S_s ——流量示值误差，%；

$\overline{F_m}$ ——同一设定流量 3 次测量值的算术平均值，mL/min；

F_s ——流量设定值，mL/min。

$$S_R = \frac{F_{\max} - F_{\min}}{\overline{F_m}} \times 100\% \quad (9)$$

式中：

S_R ——流量稳定性，%；

F_{\max} ——同一设定流量 3 次测量值的最大值，mL/min；

F_{\min} ——同一设定流量 3 次测量值的最小值，mL/min；

$\overline{F_m}$ ——同一设定流量 3 次测量值的算术平均值，mL/min。

5.7.8 气体流量示值误差

选取用户常用的气体介质，将气体流量测量装置串联入气体流路中，将气体流量测量装置选择合适的气体介质。将发酵罐气体流量计选择用户常用的流量使用点，连续测量 3 次，记录每次的测定值 Z_i ，计算得平均值 $\overline{Z_i}$ ，并根据公式 (10) 计算气体流量示值误差值 ΔZ

公式：

$$\Delta Z = Z_{\text{设置}} - \overline{Z_i} \quad (10)$$

式中：

$Z_{\text{设置}}$ ——气体流量设置值，L/min；

\bar{Z}_i ——流量测量平均值，L/min；

ΔZ ——气体流量示值误差值。

5.7.9 灭菌性能测试

对于自带原位灭菌功能的生物发酵罐可以进行此项目的测试。在空载条件下，灭菌程序开始前，设置温度测量载体采样速率不低于 15s 一个读数（保证总记录数不少于 10 个）。将生物发酵罐设置灭菌程序，通常为(121℃，30min)，将温度测量载体均匀地布置在发酵罐中，运行灭菌程序。灭菌程序结束后，读取温度测量载体的数据，分别计算温度波动度、温度分布均匀性和灭菌温度带。

5.7.10 无菌性能测试

选择用户常用的培养模式，通入无菌培养基，进行发酵程序 24h。之后取发酵液在 37℃ 培养 24h，观察培养基是否有菌体生成。

6 不确定度评定

生物发酵罐

温度示值误差测量结果的不确定度评定示例

6.1 测量方法

采用温度测量装置对生物发酵罐的温度进行测量，并与生物发酵罐设置温度进行比较。

6.2 测量模型

温度上偏差公式可由公式（6.1）给出

$$\Delta t_{\max} = t_{\max} - t_s \quad (6.1)$$

式中：

Δt_{\max} ——温度上偏差，单位摄氏度（℃）；

t_{\max} ——各测量点规定时间内测量的最高温度，单位摄氏度（℃）；

t_s ——设备设定温度，单位摄氏度（℃）。

6.3 不确定度来源

(1) 摇摆式生物反应器测量重复性引入的不确定度。

(2) 温度测量标准器引入的不确定度。

6.4 不确定度分量的估算

(1) 摇摆式生物反应器测量重复性引入的不确定度 u_c

选定一台摇摆式生物反应器，使用温度测量装置在 22℃ 校准点，连续测量 10 次，得到一组测量值：22.3℃，22.2℃，22.1℃，22.3℃，22.4℃，22.2℃，22.3℃，22.1℃，22.4℃，22.3℃，。

则单次测量结果的实验标准差 $s(x_i)$ ：

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \approx 0.11 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{则 } u_1 = \frac{s(x_i)}{\sqrt{10}} = 0.04 \text{ } ^\circ\text{C}$$

(2) 温度测量标准器引入的不确定度分量 u_c 。

由标准物质引入的不确定度分量 u_c 主要由标准器温度分辨力引入的不确定度，标准器修正值引入的不确定度，标准器稳定性引入的不确定度组成。

标准器分辨力为 0.01℃，不确定度区间半宽 0.005℃，服从均匀分布，则分辨率引入的标准不确定度分量：

$$u_2 = \frac{0.005}{\sqrt{3}} \approx 0.003 \text{ } ^\circ\text{C}$$

标准器温度修正值的不确定度 $U=0.04$ ℃， $k=2$ ，则标准器温度修正值引入的标准不确定度分量：

$$u_3 = U / k = 0.04 / 2 = 0.02 \text{ } ^\circ\text{C}$$

标准器稳定性引入的标准不确定度分量，本标准器相邻两次校准温度修正值最大变化为 0.10℃，由此引入的标准不确定度分量为：

$$u_4 = \frac{0.10}{\sqrt{3}} \approx 0.06 \text{ } ^\circ\text{C}$$

6.5 标准不确定度一览表

标准不确定度一览表见表 B.1。

表 6.1 摇摆式生物反应器温度测定结果标准不确定度一览表

标准不确定度分量 $u(x_i)$	不确定度来源	标准不确定度值
u_1	温度测量重复性	0.04℃
u_2	标准器分辨力	0.003℃
u_3	标准器修正值	0.02℃
u_4	标准器稳定性	0.06℃

6.6 合成标准不确定度 u_c

由于各不确定度输入量不相关，故

$$u_c = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2} = 0.08^\circ\text{C}$$

6.7 扩展不确定度

取 $k=2$ ，则仪器示值误差的扩展不确定度为 $U=2u_c=0.16^\circ\text{C}$ 。

《生物发酵罐性能测试规范》规范制定起草小组

2022 年 9 月