附件2

《生物反应器校准规范》（征求意见稿）

编制说明

一、 任务来源

经湖南省市场监督管理局同意，根据2023年2月下达的《湖南省市场监督管理局关于下达2023年度湖南省地方计量技术规范项目计划的通知》（湘市监计量函〔2023〕27号）要求，由湖南省计量检测研究院制订《生物反应器校准规范》。

归口单位：湖南省市场监督管理局。

起草单位：湖南省计量检测研究院。

二、 规范制定的必要性分析

生物反应器一般是指用于进行是进行相应条件下微生物的培养、发酵，从而获取活体微生物或其所需的代谢产物的相应生产或实验仪器。在实际应用中，一般根据需求，通过调节、设定该设备的相关参数，进行相应条件下微生物的培养、发酵，从而获取活体微生物或其所需的代谢产物。近年来，生物培养技术逐渐渗透到人们日常生活中，包括食品行业、医药行业、农业及相关的科研机构等，而生物反应器由于其产率高、应用便捷、可长时监测等特点，已经作为生物反应工程中的关键设备而得到广泛应用，包括实验室的小试、中试、规模化生产反应器等。我们目前日常接触的如乳酸菌饮品、酸奶及相关菌剂、酒类等各类食品，甾体、抗生素、疫苗等医药产品，农业生产中使用的微生物肥料、农药和菌剂等，都与生物反应器的应用息息相关。

生物反应器控制的pH值、温度、溶解氧、搅拌转速、气体流量、压力、照度等参数的计量溯源对培养结果起着至关重要的作用。然而，目前由于相应的计量技术规范的缺失，相关企业无法对生物反应器中的关键参数进行统一、有效的校准溯源，致使实际测量参数准确性无法保证统一，生物反应和生物培养工作的复现性难以保证，从而导致培养或反应结果参差不齐，相应的科研工作和实际的生产应用结果不准确，容易造成科研错误和经济损失。

欧盟标准化组织在2001年颁布了生物反应器的相关标准BS EN13311-4:2001 Biotechnology-Performance criteria for vessels，其中第四部分即是关于生物反应器的相应描述。国内标准中，2004年曾发布针对葡萄酒酿造使用的轻工机械行业标准QB/T2681-2004《食工业用不锈钢薄壁容器》，2017年发布了国家标准GB/T 33898-2017《膜生物反应器通用技术规范》，在应用中均具有特定性和局限性。具有很大局限性。根据国家计量技术规范全文公开系统查询结果，目前国内尚无统一、规范的国家计量技术规范作为监测仪量值溯源的技术依据，经调研和互联网搜索，也仅有发现南京市计量监督检测院在2022年9月发布的《生物发酵罐性能测试规范（征求意见稿）》，但长期未见相应正式稿。结合生物反应器发展现状和我单位目前已有的硬件设备与人员技术基础，特此制订本规范。本规范主要针对在科研机构和相关企业实验室中用于培养生物质或其代谢产物的搅拌式生物反应器、发酵罐或生化反应器等培养设备，其他相关反应器可参考本项目的规范开展工作。规范的形成可便于统一相应的生物反应器溯源标准，保障实际试验和生产中的数据及结果的统一，减少不稳定因素，降低控制成本，提升经济效益和使用效率。

三、现状分析

生物反应器的国外生产厂家包括瑞士伊孚森、Austar、AB、赛多利斯、艾本德、赛默飞等，生产产品类型多，使用范围广，控制精度高，使用效果好，但价格相比昂贵、维护成本高，目前主要应用于科研工作中。

目前国内的生物反应器产品也已较多，比较常见的生产厂家包括上海保兴生物、镇江东方、上海顾信生物、温州国顺等厂家，使用类型也比较多，主要集中在食品、医药、科研、农业等行业，从实验室科研使用的小型和微型生物反应器，到中试、规模化生产的生物反应器均有广泛应用，主要用于包括细菌、真菌、病毒甚至是细胞的培养与生物质产品或相关代谢产物的生产。

生物反应器由于其可以大大降低人力和物力消耗，增加转化效率，提高生产产量，实现高通量或高密度的培养与生产，设备的应用依然在逐年增加，应用也越来越广泛，设计类型也更加丰富。相比国外生物反应器的市场总体（超过300亿元），国内生物反应器的市场份额依然相对不高，市场占比虽在持续增加，但仍需要更多的技术规范支撑生物反应器的发展与应用。

四、参考标准及规范

因生物反应器涉及的关键参数，本规范主要参考及引用了下列文件：

1. JJG 119 《实验室pH（酸度）计》
2. JJG 291 《溶解氧测定仪》
3. JJG 1871 《磁电式转速传感器》
4. JJF（冀） 146-2018 《恒转速源校准规范》
5. JJF 1030 《恒温槽技术性能测试规范》
6. JJF 1265 《生物计量术语及定义》
7. JJF 1001 《通用计量术语及定义》
8. JJF 1059.1-2012 《测量不确定度评定与表示》
9. JJF 1101 《环境试验设备温度、湿度参数校准规范》
10. JJF 1071 《国家计量校准规范编写规则》
11. HJ 1000 《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》
12. HJ 1190 《水质 灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法》

此外，规范编写还参考了部分文献材料，并询查了部分相关企业的技术资料和实验材料。

五、规范编制的主要内容

本规范按照 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，并提供了相关附录。本编制校准规范内容如下：

1. **范围和概述**

本规范主要适用于实验室用的搅拌式生物反应器的性能参数的校准，适用项目包括温度、溶解氧、pH、搅拌转速、液体流量、气体流量和无菌性能检测相关参数，同时提供了参考性能指标。其他中试用生物反应器、光生物反应器、气升式生物反应器等相关反应器可参照此规范。该范围的选择主要依据适用参数，实际应用中主要和使用单位的适用习惯和需求相结合。

规范中使用的术语和计量单位、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，参考技术资料对生物反应器等相关词汇给出明确的定义，定义主要来源于HJ 1000 《水质 细菌总数的测定 平皿计数法》、HJ 1190 《水质 灭菌生物指示物（枯草芽孢杆菌黑色变种）的鉴定 生物学检测法》等国家、行业标准以及部分文献资料。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）、液体流量（毫升每分钟，mL/min）、气体流量（升每分钟，L/min）、温度（摄氏度，℃）转速（转每分钟，r/min）。

概述中的生物反应器示意图主要为台式单体实验室用搅拌式生物反应器主体部分，其他配件及不同类型的反应器未在此列举。

1. **计量特性**

根据生物反应器在实际应用中主要需要监控的指标参数，以及反应器应用功能中的目的，结合不同厂家型号的生物反应器，确定本规范中的相关项目及性能指标。项目相关指标主要也是微生物培养中的主要环境影响因素。

温度对生物反应影响比较显著，温度的变化会直接影响生物反应中酶的活性，过低温度会导致反应迟缓，过高温度则也会抑制甚至杀死生物活性，导致无法进行生物反应。据此，在计量特性中设置了温度示值参数。在计量性能指标方面，结合目前主流生物反应器型号的技术指标及实际使用需求，将温度示值误差设置为不超过±1.0 ℃。同时，因为生物反应过程一般是长期的过程，短至几小时，长至几周到上月，因而设定了温度波动度的指标，设定参考的性能指标要求为不超过0.5 ℃。实验方法参考JJF 1030 《恒温槽技术性能测试规范》等，方法相对成熟且便于实现现场操作。结果表明，所有试验设备的温度控制结果均满足设定的温度示值误差和温度波动度的要求。

pH值变化也是影响生物反应中酶和生物体活性的重要原因之一。生物反应过程中，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消耗代谢和酸、碱等代谢产物的排出会导致引起 pH 值的变化。每一类微生物的最适和能耐受的 pH 值范围均有所不同。而在实际应用中，同一类微生物在不同的生长阶段和产物合成阶段的适宜pH也有所不同，这对具有获取不同产物目的时，控制pH就会成为关键参数。因此，本规范设定了pH示值误差和pH重复性的项目，指标要求分别为不超过±0.2 pH和0.1 pH。试验操作参照JJG 119 《实验室pH（酸度）计》的仪器示值误差和重复性项目，方法成熟且易实现现场操作。试验结果表明，所有试验设备的pH示值测试结果均满足设定的pH示值误差和pH重复性的要求。

溶解氧浓度的控制因菌种而异。常规生物反应中的微生物对氧气也有不同的敏感程度。对好氧微生物，需要大量的氧气供给用于生长或生产，但对于严格厌氧微生物，少量的氧气就会导致微生物的死亡。同时，同一类微生物对氧气的需求在不同阶段也会有所差异，原本需要氧气代谢的微生物也有可能因为氧气含量减少进行无氧发酵。因而监控溶解氧对不同的微生物来说也有不同的要求。本项目设定了溶解氧浓度示值误差和溶解氧浓度重复性项目，指标分别建议不超过±0.5 mg/L和0.15 mg/L。试验操作方法参考了JJG 291 《溶解氧测定仪》，结合现场实际，大部分使用单位使用温度比较固定，对溶解氧条件有特定的无氧和富氧需求，也为了方便现场操作，确认为依据使用单位需求测定特定温度下饱和溶氧水的操作方法。试验结果表明，所有试验设备的溶解氧示值测试结果均满足设定的溶解氧示值误差和溶解氧重复性的要求。

搅拌式生物反应器一般配备有电机转子，用于在生物反应过程中通过合适的转速搅拌，使培养基与容易沉降的微生物混合均匀。然而，转速的控制得当也对微生物的生长具有不同的效果。过慢的转速会导致培养基和微生物之间无法形成合适的均相，降低培养基的利用效率，减缓生物反应速率，而过快的转速则会导致微生物的菌体、细胞等结构被剪切破坏，也可能导致溶解氧的增加，反而降低最终产率，增加消耗。有效地控制转速可以保持均相的反应状态，也能避免过激的剪切力伤害菌体。本规范对转速设定了示值误差性能指标项目，建议不超过±3%。实际操作参考JJF（冀） 146-2018 《恒转速源校准规范》。试验过程中，使用单位较少使用比较高的转速，且对应单位的转速一般在相对不大的范围内进行调整试验，而现场操作中，转速测量相对易于实现。综合考虑，建议为50 r/min、200 r/min、500 r/min三个转速测试点，或者根据需求选择适用的一个或多个转速测量点。试验结果表明，所有试验设备的转速示值测试结果均满足设定的转速示值误差指标的要求。

在生物反应过程中，因pH的变化可能需要补充酸液或者碱液以调节适宜的pH，也有可能因为培养基配方和微生物产气的原因需要增加消泡剂减少气体，或者补充培养基维持较高的生物代谢水平。在这种情况下，实验室里一般通过使用蠕动泵实现。目前大部分集成的生物反应器都会将添加的酸液、碱液、补料等设备动作记录为日志，相关日志也已经成为常用的参考数据。然而，该类蠕动泵和泵管若未进行校准，结果一般会相差甚远，失去对照的意义。同时，通过适当的调校，适量的补料操作可以实现调节指征的同时，也能避免过量加料带来的体积基数差异、调节过度降低活性等问题。本规范因此对液体流速设定两个项目，建议液体流量示值误差不超过±5%，液体流量稳定性不超过5%。实际操作方法参考相关液相色谱仪检定规程中的输液系统的计量方法，方法成熟且结果相对准确可靠。然而，一般生物反应器的蠕动泵本身配置及要求相对不高，因而指标要求相应放宽。试验结果表明，所有试验设备的液体流量测试结果均满足设定的指标要求。

针对不同类型的微生物的生长需求，在实际培养中需要通过通气，如二氧化碳、氮气、空气、氧气等气体，以实现适宜微生物反应需要的无氧、富氧、多碳或惰性等环境。同时，部分微生物因结构问题，容易受剪切力影响，部分情况下也可以不通过搅拌而直接通过大量通入气体，作为混合培养基和微生物的一种方式。对于不同的微生物及生长需求，气体流量也不一样。结合搅拌转速、溶解氧监控等方式，控制适当的气体流量，可以避免气体及相关机械配件的工作损耗，保证充分的生物反应的同时，减少浪费。本规范由此对气体流速设定气体流量示值误差项目，建议气体流量示值误差不超过±5%。为易于现场实现操作，本项目参考大气采样器等采样设备计量方法实现气体流量测试。生物反应器的气体流速控制范围一般较广，而实际使用中使用的气流范围较窄或者固定，因而此项建议选择用户常用的气体流量或相应的流量范围测量点。试验结果表明，所有试验设备的气体流量测试结果均满足设定的指标要求。

对于生物反应过程而言，纯培养技术可以减少其他微生物的污染，避免竞争性抑制作用，增加生产效率及产品纯度。实现纯培养的前提，就是无菌操作技术和灭菌性能。对于原位的生物反应器，灭菌一般通过管道蒸汽实现。对于台式生物反应器，可以通过规定的操作方法采用灭菌锅进行灭菌。因而设置无菌性能测试则是对该生物反应器的整体准备、灭菌和实验操作流程下无菌性能的综合验证工作。试验结果表明，所有试验设备在使用、维护正常情况下均未见培养基变化，平板中未见菌落形成。

本次项目实施，协作试验单位包括上海保兴生物设备工程有限公司、上海顾信生物科技有限公司等生产厂家和中国海洋大学海洋食品生物技术与工程研究室、杭州娃哈哈集团有限公司研发中心等使用单位。涵盖不同厂家不同型号的实验室搅拌型生物反应器，也包括厂家生产与使用单位在用的不同年限产品。具体试验结果见试验报告。

综上所述，最后确定的计量性能指标包括温度示值误差、温度波动度、pH示值误差、pH重复性、溶解氧浓度示值误差、溶解氧浓度重复性、转速示值误差、液体流量示值误差、液体流量稳定性、气体流量示值误差、无菌性能测试，并给出了相关的参考性能指标，特性量值和性能指标设置合理。

1. **校准设备及标准物质选择**

校准设备和标准物质主要根据选择的计量特性来确定。

温度测量方面，选择适用的标准温度计，范围覆盖生物反应的常规温度需求。对酸度检测，参照JJG119《实验室pH（酸度）计》选用经政府计量行政部门批准的pH有证标准物质。对溶解氧传感器，选用JJG291《溶解氧测定仪》建议的发生装置和试剂。依据JJF（冀）146-2018《恒转速源校准规范》，针对转速选择适用的带有反光转速贴片的转速测量装置进行测量。液体流量上，使用称重方式，选择合适的容量瓶和天平，气体流量则采用流量范围适用的流量测量装置。针对灭菌和无菌模块，主要通过平板计数方式进行检测。

六、总结

在本规范的制订工作期间，编制组根据大量相关技术资料，依据丰富的实践结果，选择合理、易操作和适用性广泛的参数，结合实际使用的目的，制定了本规范。规范中另外提供了本规范可能使用的附录资料，并在附录E中提供了较为全面的不确定度评定示例。

《生物反应器校准规范》起草小组

2023年11月