

第五届全国生物化工 学术会议论文集

PROCEEDINGS OF THE FIFTH
NATIONAL CONFERENCE
ON BIOCHEMICAL ENGINEERING

何鸣鸿 刘大陆 刘德华 编

化 学 工 业 出 版 社

71218083
306(5)
= 1993
C.3

第五届全国生物化工 学术会议论文集

PROCEEDINGS OF THE FIFTH
NATIONAL CONFERENCE
ON BIOCHEMICAL ENGINEERING

何鸣鸿 刘大陆 刘德华 编

/

化 学 工 业 出 版 社

1993 年 9 月 13-16 日 北京

(京)新登字 039 号

第五届全国生物化工学术会议论文集
Proceedings of the Fifth National Conference on Biochemical Engineering

何鸣鸿 刘大陆 刘德华 编

责任编辑: 侯奎荣

封面设计: 于廉泉

*

化学工业出版社出版

(北京朝阳区惠新里 3 号, 100029)

*

开本 787×1092 1/16 印张 27.5 字数 748 千字

1993 年 9 月第 1 版 1993 年 9 月北京第 1 次印刷

印数: 1-300

统一书号: ISBN 7-5025-1270-5/ TQ·723

定价: 55.00 元 (成本价)

第五届全国生物化工学术会议论文集

Proceedings of the Fifth National Conference
on Biochemical Engineering

主办单位: 中国化工学会生物化工专业委员会

承办单位: 中国科学院化工冶金研究所

筹备组成员

组 长: 刘大陆
副组长: 刘德华
成 员: 于廉泉 王启梅 王雅丽 朱维型 何鸣鸿
(按姓氏笔划排列)

审稿组成员 (按姓氏笔划排列)

王法曾 刘大陆 刘德华 李佐虎 沈忠耀 何鸣鸿
欧阳藩 俞俊棠 莫锡荣 黄汝增 韩钟淇

中国化工学会生物化工专业委员会成员

主任委员: 俞俊棠 沈寅初 赵树杰 沈忠耀 欧阳藩
秘 书 长: 黄汝增
委 员: (按姓氏笔划排列)
卜华祥 王正林 王佳兴 王法曾 王绍坤
王福源 尹淑媛 冯朴荪 刘永晖 江 宁
朱永新 李宝璋 李道棠 李蜀生 张蓓蕾
陈建元 陈洪钊 金树人 郑华志 欧阳平凯
郭 勇 莫锡荣 姚 恕 徐重建 陶康明
董海宝 韩钟淇 虞星矩

前 言

第五届全国生物化工学术会议于 1993 年 9 月 13 ~ 16 日在北京召开。会议由中国化工学会生物化工专业委员会主办, 由中国科学院化工冶金研究所生化工程研究部和生化工程国家重点实验室具体承办。

会议从 1992 年 7 月开始酝酿并于同年 11 月正式成立会议筹备组。为了更好地开展学术交流, 在学会的支持下, 会议筹备组决定参照国际学术会议惯例, 在会前正式编辑文集。会议从 1992 年 11 月起开始征稿, 在 1993 年 2 月召开了审稿会议, 在 1993 年 3 月和 4 月寄出第二轮通知和论文排版格式要求。截至 1993 年 8 月 15 日付印之即, 从来稿中收集了 91 篇质量较高的论文编辑成论文集并由化学工业出版社正式出版。所有论文共分为 6 类, 其中生物反应器 17 篇、发酵工艺与固定化 23 篇、生化分离 22 篇、动植物细胞培养 7 篇、生化过程检测与计算机应用 15 篇、其它 7 篇。论文署名作者来自国内 39 个院校、科研单位和生化企业(学校的系、所按同一个单位计)。

本次会议得到了学会和众多专家与学者的热忱支持。中国化工学会潘连生理事长和中国化工学会生物化工专业委员会黄汝增秘书长对本次会议的筹备工作非常关心。中国化工学会生物化工专业委员会主任委员俞俊棠教授为会议文集撰写了序言。会议筹备阶段还得到了其它各界人士的大力支持。中国科学院化工冶金研究所为会议筹备工作提供了便利条件。在此, 向他们表示衷心的感谢。

为了保证出版时间, 本文集采取了激光照排和胶版印刷的方式, 稿件原版由作者自行按要求排版以减少排印过程出错。但由于各地条件不一, 每篇文章的格式、字体等难以达到完全统一, 谨在此向读者们致以歉意。此外, 由于时间紧迫和编者能力有限, 文集中难免有所疏漏, 敬请读者予以指正。

编 者

1993.8.16

序 言

中国化工学会生物化工专业委员会建立至今已有五年了。在这期间共举行了五次全国性的学术会议。五次会议，虽然主题不尽相同，但从总体上，即论文的质量、参加人员的代表性和会议的组织工作等方面讲，一次比一次开得更好。这次会议又是属于综合性学术交流会，报名参加和投稿相当踊跃，论文的质量也较高，其中一部分是与“七五”和“八五”攻关课题或自然科学基金资助项目相关的，一部分是经多年研究或实践后写出的论文。中国科学院化工冶金研究所的领导和有关同志欧阳藩、李佐虎、刘大陆、刘德华等对筹备这次会议十分重视，并不遗余力地为提高会议的质量和效果做了大量工作，其中一件大好事，也是过去历次会议没做到的就是编印了这一本会议论文集，并由化学工业出版社正式出版。相信这本论文集将会对提高这次会议以至今后会议的质量，加深交流效果，检阅研究成果，丰富科技资料起着积极的作用。

生物化工可以认为是生物产品生产工艺和生物化学工程的统称。本次会议所交流的论文，从性质看可分两大部分：一部分是直接与生物技术产品的生产工艺和设备有关的；另一部分是属应用基础研究的生化工程范围的。前者以实用性为主，可直接转化为生产力，后者则以学术性为主，具有普遍意义和应用潜力。应该说都是为生物技术的发展服务的。虽说这次会议中提出的有关实用性的论文比以往有所增多，但尚感不够。为此希望生产单位今后在不影响技术机密的情况下尽可能写些与生产实践有关的论文；也希望上游研究单位和生产单位能多与中下游研究开发单位进行协作和联合，使我国生物技术高新产品更多、更快、更好地进入市场。这本论文集集中的不少论文的第一作者是青年学者，这是十分可喜的，也说明生物化工界的好形势。希望新老生物化工工作者团结一致，更多地写出一些高水平的论文在国际学术会议和刊物中发表。

衷心希望本次学术交流会开得圆满成功！

俞俊棠 于华东理工大学

目 录

一、 生物反应器

1. 生物反应器工程研究的进展近况 俞俊棠 (1)
2. 生物反应和产物分离耦合过程研究进展 岑沛霖、栾善东、丁新华、郑重鸣 (8)
3. 设计生物反应器的一个新原理 李佐虎 (12)
4. 流态化技术在生化工程中的应用 欧阳藩 (18)
5. 固态发酵生物反应器 白仲虎、李元广、曹竹安 (27)
6. 表面活性剂对三相生化环流反应器传氧特性的影响研究
..... 李旭东、石炎福、余华瑞 (33)
7. 气升式生物反应器中的氧浓度分布模型 李国庆、杨守志、蔡昭铃、陈家镛 (38)
8. 中心管和环流方向对搅拌式环流反应器中固相悬浮的影响 毛在砂、栾美琅 (42)
9. 气升式环流反应器连续培养面包酵母生产的工程研究
..... 阮文权、陈 坚、吴佩琮、陆文清、伦世仪 (46)
10. 气升环流反应器内部构件——自旋筛板研究 娄贵昌、李佐虎 (50)
11. 喷射式环流反应器在不同操作状态下的传质特性
..... 刘德华、韩孝文、杜旭江、欧阳藩 (54)
12. 氨氮废水在气升式反应器中的硝化研究—— I. 气升式反应器的启动、载体的筛选
及废水浓度、温度冲击的影响 王德成、贺诗毅、王 舟、龚 敏 (59)
13. 氨氮废水在气升式反应器中的硝化研究—— II. pH、废水流量、空气流量对硝化
作用的影响及工业废水的硝化 王德成、贺诗毅、张晓蓉、谢 鲲 (64)
14. 搅拌罐内石油发酵体系中油滴分散规律的研究 李元广、曹竹安、袁乃驹 (69)
15. 十三碳二元酸发酵体系中油滴分散规律的研究
..... 李元广、曹竹安、袁乃驹、丁国清、佟明友、杨 东、许晓增 (77)
16. UASB 反应器中厌氧污泥的颗粒化过程 李春生、陈 坚、伦世仪 (84)
17. USB 法废水反硝化研究 王德成、贺诗毅、杨 格、李 东 (89)

二、 发酵工艺与固定化

1. 提高麦迪霉素有效组分的工艺研究 刘瑞芝、张素平、曹竹安 (95)
2. 发酵法生产衣康酸的研究 夏 勇、刘宝顺 (101)
3. 短梗霉多糖发酵工艺研究 王长海、贺红军、王新力、赵艾霞、谢联合 (105)

4. 玉米渣皮混合固态发酵过程研究	李元广、施亚钧、李道棠、黄瑞珊、郭海鹰	(110)
5. 关于蜡状芽孢杆菌活菌制剂 (促生素) 固体培养的研究	杨淑兰、苏辉煌、柳书菲、张宗诚、李佐虎、黄炳昌	(118)
6. 接种方法对苏云金杆菌固态发酵的影响	张 怡、李佐虎	(121)
7. 基因工程人 α 心钠素发酵研究	陶坚铭、叶 勤、戚良华、张嗣良、蔡海波、包卫国、李育阳	(125)
8. 抗生素与表面活性剂对谷氨酸生产菌细胞壁及产率的影响	朱惠玲、陈建新、田忠厚、李佐虎、章宇飞、胡庆堂、吴延陵	(129)
9. L-乳酸发酵——离子交换分离耦合过程的研究	栾善东、周 凡、丁新华、岑沛霖	(134)
10. 柠檬酸发酵过程的动力学	候文华、周 定	(139)
11. 青霉素球状发酵过程菌体形态变化规律及发酵动力学	陈建新、李 强、曹竹安	(143)
12. 苏云金杆菌发酵动力学研究	马天良、谢幸珠、张覃华、孙祥明	(148)
13. 混合糖发酵生产酒精及动力学研究	郑重鸣、丁新华、岑沛霖	(153)
14. 絮凝颗粒酵母连续发酵生产酒精新工艺的中试试验研究	白风武、冯朴荪、史今兰、吕松云	(157)
15. 葡萄糖母液酒精发酵试验	黄海洪	(161)
16. 黄原胶发酵过程流变学、功耗、传质和传热性能的研究	赵学明、胡宗定、A.W. Nienow、C.A. Kent、S. Chatwin	(165)
17. 黄原胶发酵过程特征的研究	郑之明、杨守志、蔡昭铃	(169)
18. 云芝悬浮培养诱导生产木质素降解酶的研究	冯朴荪、崔 黎、赵 岩	(175)
19. 番木瓜细胞培养过程中形态变化与蛋白酶积累过程的研究	李弘剑、郭 勇、张 毅、彭志英	(179)
20. 农作物桔杆微生物转化单细胞蛋白研究	高春满、刘 春	(184)
21. 固定化甲烷氧化菌 Z201 催化丙烯合成环氧丙烷	陆仕灿、朱 阳、陶坚铭、邱蔚然、俞俊棠	(188)
22. 虫荧光素酶的固定化及其应用	蔡 谨、杨歧生、王顺光、吉鑫松	(192)
23. 甘油发酵后期菌体消耗甘油规律的研究	刘德华、魏文毅、欧阳藩	(196)

三、 生化分离

1. 生化分离工程的进展	苏志国	(200)
2. 发酵与分离相结合的过程及其在乙醇生产中的应用	刘 芳、沈忠耀	(206)
3. 化学配基亲和层析的动力学研究	姜 炜、苏志国	(211)
4. 胱氨酸二次中和沉淀物中酪氨酸和胱氨酸的回收利用	施跃峰	(215)
5. 脂质体型亲和载体特性的研究	孙 彦、徐晓燕、王绍亭	(217)
6. 蛋白质在微孔膜中阻滞传递特性初探	何志敏、张海洋、余国琮	(221)
7. 反胶团萃取 α -淀粉酶的优化试验	黄 杰、高广达、朱 军、吴冀川	(225)

8. 亲和膜分离纯化人 γ - 免疫球蛋白 .. 鲍时翔、石国君、修志龙、姜 炜、苏志国 (229)
9. 用高聚物 / 高聚物双水相体系从地衣芽孢杆菌发酵液中提取碱性蛋白酶
..... 谭天伟、沈忠耀 (233)
10. 喷雾—循环流化床干燥短梗霉多糖—— II. 传热、传质研究 刘大陆、吴林有 (237)
11. 电分流分离技术研究 刘 铮、陆卫东、朱德权、丁富新、袁乃驹 (243)
12. 制备型高效液相色谱分离过程的研究——质量超载
..... 王志祥、何志敏、韩振为、余国琮 (247)
13. 生化反应色谱分离耦和过程研究 吴金川、何志敏、韩振为、余国琮 (251)
14. 尿激酶酸性复合物的解离和双水相系统分离的组合研究
..... 王 炜、朱自强、梅乐和 (255)
15. 谷氨酸提取新工艺的研究 郑连英、姚 恕、俞 峰 (259)
16. 溶液 pH 对泡载分离谷氨酸菌体的影响 王立新、王雅丽、刘朝辉、欧阳藩 (262)
17. 泡载分离器的特性及其应用于谷氨酸菌体分离的研究
..... 王立新、刘朝辉、王雅丽、欧阳藩 (266)
18. 离子交换法提取谷氨酸的研究 沈金玉、汪泰宇 (270)
19. 添加微细晶种的谷氨酸结晶法 张文会、云逢霖、姚汝华 (276)
20. 用双水相分配技术提纯抗生素工艺的研究—— 1. 乙酰螺旋霉素在聚乙二醇 / 盐双
水相系统中的分配行为 关怡新、花 强、朱自强、梅乐和 (280)
21. 聚乙二醇 / 无机盐双水相系统粘度及密度的测定和关联
..... 林东强、梅乐和、朱自强、韩兆熊 (284)
22. 珠状 DEAE- 葡甘聚糖离子交换剂的研究 刘秀琴、王佳兴、肖 旭、付韵华 (289)

四、 动植物细胞培养

1. 关于植物细胞大量培养生产次生代谢物质的综述性讨论 叶和春、李国风 (293)
2. 抗小鼠肺癌单克隆抗体 IgG_{2a} 的分离纯化
..... 周 燕、陈志宏、杨 青、刘蕴兰、张元兴、陈因良 (301)
3. VERO 细胞微载体系统的高密度培养—— VERO 细胞从 Cytodex₁ 到
Cytodex₁ 的直接转移 (2) 宋家骊、王国政 (305)
4. 离体植物器官—组织相互转化关系的数值模拟 元英进、杨玉敏、胡宗定 (308)
5. 长春花细胞表面固定化技术研究 元英进、胡宗定 (312)
6. 生物反应器两段法培养长春花丛生芽研究 元英进、张 瑛、胡宗定 (316)
7. 剪切对处于生化反应器中的紫苏植物细胞生长和次级代谢产物的生产的定量影响
..... 钟建江、俞俊棠、吉田梅臣 (320)

五、 生化过程检测与计算机应用

1. 计算机图象识别辅助菌种筛选及对菌体激素微生物酶反应的研究
..... 段世铎、阳 葵、王积分、刘 宏、安 中 (324)

2. 人工神经网络方法在生化工程中应用初探—— 1. 发酵工艺影响的定量分析
.....何鸣鸿、欧阳藩、包 宏 (329)
3. 人工神经网络方法在生化工程中应用初探—— 2. 发酵工艺模式识别
.....何鸣鸿、欧阳藩、包 宏 (335)
4. 神经元网络用于建立 BT 固态发酵水平预报模型 聂峰光、张 怡 (342)
5. 井岗霉素发酵工艺计算机优化
.....倪正刚、吴 捷、许 坚、孙忠明、许真雄、邓明荣、叶福根、沈祖志 (346)
6. 发酵过程的单片机控制 吴蓓琦、冯卫星、陈智胜 (353)
7. Fed-Batch *Bacillus Thuringiensis* 发酵系统控制模型的分析与测定 钱梓文 (358)
8. 差分式 BOD 微生物传感器系统的研制
..... 孟绍田、李子明、袁继连、薛 勇、王 分 (363)
9. YQ-W 系列溶解氧测定仪器的研制及其在生化工程中应用
..... 孟绍田、袁继连、薛 勇、李子明、王 分 (367)
10. 双酶修饰的石墨片介体电极的研制
..... 赵裕蓉、王雅琴、周 莉、贺 群、莫锡荣、黎高翔 (376)
11. 高效毛细管电泳在蛋白质分析上的应用 李红旗、沈忠耀 (380)
12. 谷氨酸发酵液还原糖的测定中 d- 无水葡萄糖与一合葡萄糖的实验研究 .. 田忠厚 (384)
13. 物料失重法测定固态发酵生物量的研究 陈洪章、刘传盈 (387)
14. HBsAg ELISA 定量检测模型
... 聂峰光、戚艺华、朱希灿、石红、欧阳藩、苏启东、常毅刚、许允立、李雪莲 (391)
15. 模拟预生物化学过程合成核酸碱基—— I. HPLC 分析核酸碱基研究
..... 何裕建、戚生初 (395)

六、 其 他

1. 溶液中铅离子生物吸附的研究 牛 慧、许学书、王建华 (399)
2. 大蒜超氧化物歧化酶的特性研究 张 毅、郭 勇、李弘剑、姚汝华 (403)
3. 低温超高压灭菌法在果蔬原汁工业生产中的应用 何裕建、戚生初 (408)
4. 魔芋葡甘聚糖珠状凝胶合成及性能研究
..... 肖 旭、王劲松、费丽云、韩宇建、王佳兴 (412)
5. 农用抗生素厂热力系统改造探讨 许真雄、许 坚、倪正刚、王亚伟、吴 捷 (416)
6. 大豆浓缩蛋白挤压质构化的过程模拟和参数优化 陈 莹、朱海俊、刘复光 (424)
7. 陈朠米酶法液化糖化工艺研究 孙 燕、张子秀、王会生、刘德华、欧阳藩 (428)

生物反应器工程研究的进展近况

俞俊棠

(华东理工大学生化工程研究所, 上海梅陇路, 200237)

摘 要 本综述主要取材于“为二十一世纪备马待发的生物技术”一书 (Harnessing Biotechnology for 21st Century——第九次国际生物技术讨论会论文集, 1992.8 于美国水晶城) 中的第五部分。综述内容分为生物反应器中的传递现象、微生物发酵和动物细胞培养三大部分。

近年来在生物技术领域中出现了生物反应器工程 (Bioreactor Engineering) 这一名词, 它包括生物反应器的结构、操作条件与混合、传质、传热的关系, 生物反应器的设计、放大等属于生物工程范围内的研究; 也包括在生物反应器中进行微生物发酵、动植物细胞培养和酶反应中结合反应器的类型、生物催化剂与培养基的特性研究生物反应器的优化操作方式的条件, 包括对过程的检测与控制进行必要的考虑等属于发酵工程范围内的有关内容。因此说, 生物反应器工程在生物生产过程 (Bioprocess) 中当于“中游加工”过程的位置, 它与“上游加工” (Upstream Processing) —— 原材料的预处理 (包括灭菌)、生物催化剂的制备以及“下游加工” (Down Stream Processing) —— 发酵 (培养) 液的提取精制, 连同对过程进行必要检测和控制共同构成生物生产过程的全部内容。上述生物反应器工程的各别具体研究内容并没有什么新的内容, 但是生物反应器工程把生物反应器的特征与目标产物的反应特征联系起来进行研究, 这将对生物技术的实验室研究成果加速投产以及提高现有生物生产过程的生产能力是十分有利和十分必要的。

本综述将主要取材于 1992 年在美国水晶城召开的第九次国际生物技术讨论会论文集 —— “为二十一世纪备马待发的生物技术”一书的第五部分 —— 生物反应器工程的内容。

一、生物反应器的传递现象与放大

生物反应器是生物生产过程中的关键设备, 它应能在不同要求的规模上为细胞的增殖、酶的催化反应和产物的形成提供良好的环境条件, 即不引起污染, 不伤害细胞或固定化生物催化剂的固有特性, 易于改变操作条件, 使之能在优化条件下进行生化生理反应; 从能量消耗角度看, 良好的生物反应器应在尽量减少单位体积所需功率输入情况下, 提供足够的混合、传质、传热速率; 从操作角度看, 要求弹性大, 可适应生产过程中不同周期或不同类型产品生产的需要, 并可考虑满足不同操作方式, 如分批‘加料 — 分批 (Fed-Batch)、灌注 (Perfusion)、连续操作等需要。由于不同的生物技术产品所采用生物催化剂及反应条件各不相同, 生物反应器如何在结构型式、操作方式和操作上满足其特殊要求, 这些也就是生物反应器工程研究者所必须回答的问题。

在纯种培养情况下进行好气性微生物的发酵或细胞培养, 最常用的生物反应器型式是机械搅拌式生物反应器 (简称搅拌发酵罐)。气升式和鼓泡式生物反应器 (气升罐和鼓泡塔) 近年来

应用也日益增多。此外,还有机械或喷嘴自吸式生物反应器;前者用特殊蔽式搅拌桨吸气,后者靠泵为动力将罐内培养液通过装有吸气喷嘴的外循环管进行循环并吸气。

现用搅拌发酵罐出现在本世纪 40 年代抗生素工业发展期间。50 年代初期搅拌桨开始广泛采用带有圆盘的六平叶涡轮搅拌桨 (Rushton Turbine, 简称 RT), 因认为种搅拌桨对气体的破碎作用大, 且属径向流型搅拌桨, 有利于增加气体在反应器中的停留时间, 故至今还被较普遍地采用。但随着对 RT 的深入研究, 发现其也存在不少缺点, 如此种搅拌桨的泵送能力不强, 即在整个反应器中的混合效果欠佳, 特别是在多个 RT 串在一个转轴上时, 可使整个液体分隔成多个彼此几乎隔离的混合区, 缺少自上而下的混合, 特别感到不太适用于粘性发酵液的混合。为此, 在 80 年代中不断出现若干新型桨叶, 以取代 RT。英国伯明翰大学生化工程中心的 A.W.Nienow 在“新型搅拌桨与 Rushton 涡轮桨对于传递的比较”的综述^[1]中述及 RT 在运转时, 在其每一叶片的背面都会形成两个低压尾旋涡。在不通气时, 由于尾旋涡的存在, 导致扭矩的增大, 并使功率准数, N_p 值很大。在通气时, 空气被浓集在上述低压区中, 形成局部压力增高的空气腔而使功率下降约 50%, 这就使氧传递的潜在能力受到严重的损失。针对上述问题, 出现了一种新型 Scaba 6SRGT 搅拌桨, 它以抛物线形的曲面叶片代替 RT 的垂直平叶片 (旋转时凹面向前), 可基本消除上述尾旋涡和空气腔现象。另 I.C.I. Gasfoil 桨是介于 6SRGT 和 RT 之间的搅拌桨。气体对搅拌桨的液泛 (Flooding) 问题也是衡量搅抖器是否适用于生物反应器的一个指标。液泛是指气流速度大于某一值后使搅拌桨无法正常工作, 此时在搅拌桨周围形成了一个夹有大片羽毛状空气—培养液的空隙, 搅拌功率大幅度下降。一个好的搅抖桨应能允许较高的气速通过而功率吸收仍能保持在一个较高的水平。实验证明, 6SRGT 在克服液泛方面优于 RT。在主体混和 (Bulk Blending) 方面, 一般认为在相同功率输入情况下, 大直径的低功率准数值的搅拌桨优于小直径的高功率准数值的搅拌桨; 在高粘度培养液中主流混合尤为重要。生物反应器中的传热一般并不构成什么问题, 除非在很大的反应器中进行明显剪切致稀 (假塑性) 物料发酵的场合, 因会在剪切集中区产生一个低粘度的空穴, 使传热情况复杂化。为了改善反应器中自上而下的混和, 采用低功率准数下向轴流搅拌桨在非通气情况下是十分满意的; 但在通气时易引起液泛并因泵流量的减小而使功率剧烈下降, 也因为下向的液流被上升的气泡所干扰, 使操作出现不稳定性。液泛及功率下降问题在一定程度上被一种新型搅拌桨—水翼 (Hydrofoil) 桨所克服, 这是一种具有较高密实比 (Solidity, 其值等于叶片水平投影面积 / 叶片的横扫面积) 的搅拌桨, 其液泛气速较高。另二种新型桨 Prochem Mixflo T 及 Lightnin A315 的密实比也均大于 0.9。存在的问题是由于流动和扭矩的不稳定性, 会引起反应器的震动。若采用上向轴流桨或斜叶涡轮桨则无上述两种不稳定性, 液泛气速也较大。另一种新型桨—Ekato InterMig 桨, 它是在不通气时, 既能产生上向, 也能产生下向液流的桨, 因在其搅拌转臂上具有不同倾角的叶片。这种桨一般至少装置两个。当通气操作时则主要产生径向液流, 因为有空穴产生, 特别是在粘性液体中。此外也会产生震动现象。方夏虹等在研究轴流翼形桨的震动后认为大气泡周期性地从叶轮中逸出是产生震动的主要原因, 特别是在粘稠介质中。提高转速和降低通气量是使气体处于完全分散状况以及采用直径大于桨叶的通气环是避免或减少震动的方法^[2]。Nienow 在综述搅拌罐的体积氧传递系数 k_La 及气含率时述及用不同方法对不同类型的搅拌桨对低粘度的液体进行 k_La 值的测定结果, 发现只要单位体积的功率, P/V 及气流速度 u_g 相同, 以及对所试验的液体都具有相同的凝集性能时, 其 k_La 值和气含量值都是相同的。当液体是粘性或剪切稀化时, 具有低功率准数值的搅抖桨有可能在较高转速下运转, 这有利于降低粘度和获得较高的 k_La 值 ($k_La \propto \mu^{-0.5}$)。最近研究结果表明, 用高气体循环的搅拌桨, 如 Maxflo T 有利于制止气泡的凝聚而增加气含率。他在结论中提出: 采用大直径, 低功率消耗的搅拌桨代替 RT,

可使在通气情况下所发生的功率吸收的下降、液泛的产生改善,并有利于流体混和及传热,对增强低粘度和高粘度的培养液的传质也都是有效的。应加以特别注意的是震动问题。

气升罐及鼓泡塔的应用日益扩大,它不但可用于常规和重组微生物的发酵,也可用于动物细胞(特别是杂交瘤细胞)和植物细胞等对剪切敏感的细胞培养,这是因为这类反应器具有温和流体动力学的性能。英国 Kent 的 Pfizer 公司的 R.Carrington 等^[3]介绍了一种体积为 20m^3 的鼓泡塔($\phi 1.85 \times 7.7\text{m}$),内装有 $\phi 76\text{mm}$ 冷却管卷成的直径为 1.45m 的蛇管,此蛇管的作用犹如一带有多个环形空隙的升液筒,即允许在升液筒内外存在一定的径向混合,因此,也可以认为这是一种气升罐。用此种罐进行高粘性(最高可为 900cp)、非牛顿型的抗生素发酵,获得良好的结果。经测定此种罐的混合时间约为 $14\sim 18\text{sec}$;整个反应器中溶氧浓度均匀,无缺氧区; k_La 值基本上随功率输入(气流速度)直线增加。在操作中还发现在粘性物料中存在着滞留的微气泡,其直径约从 <0.1 至 2mm ,其中氧含量为 $8\sim 15\%$,约有 $1/4$ 的气含率和约 15% 的氧传递是由这些微气泡所贡献的。作者还用无环形空隙的金属筒代替蛇管作升液筒作对照试验,发现氧传递效率和混合时间均不如蛇管气升筒。关于气升罐的设计,加拿大滑铁卢大学的 M.Moo—Young 和 Y.Chisti^[4]提出了较完整的有关流体动力学、气—液和固—液物质传递以及传热的计算方法。他们还介绍了两种特殊气升罐,一是用于杂交瘤培养的,这是在中隔式环流气升罐基础上发展的,即用垂直平板将筒状反应器一隔为二,一半作气升区,另一半中放置惰性填料,如蛭石(Vermiculite)、聚氨酯泡沫塑料等以固定杂交瘤细胞;二是一种适用于高粘度介质的设计,即在升液或降液区内装上静态混合器,使气泡得以被破碎和重新分布(若无静态混合器,介质中存在大气泡)而使 k_La 值有较大的提高。

为了能对生物反应器的性能进行深入的了解,对其混合及传递性能的测定是十分必要的。德国汉诺威大学的 A.Lübbert 在“生物反应器中混合及传质的现代测量技术”一文^[5]中介绍了有关技术:整体气相运动—用氦作为示踪剂,质谱仪作为检测器测定 RTD,并以拟随机试验信号处理信噪比。为了不使离开液面的氦与容器顶部的气体混合,采用了可插在液面下的膜探头靠真空取样;整体液相运动—采用荧光示踪剂和荧光仪测量循环时间和混合时间是较理想的,此外,也可采用可灭菌的流动跟随体(Flow-Follower)测定循环时间分布,如采用可发生 γ -射线的小珠和用闪烁计数器测量更为理想;局部气相性质—最简单的测量气含量的方法是单个电导探头,但多个探头易受电化学影响,所以也可用光探头,然而用超声发射和反射法更为理想,当超声随机通过气泡时,发射会减弱或中断,可用平均衰减率估计气体比表面积;气泡的大小分布可用玻璃毛细管在真空下抽吸含气泡液体的方法求得;局部液相性质—在有气泡情况下采用热膜或多普勒测速仪是困难的,因此推荐用热脉冲方法,以两个探头(一为微热源,一为灵敏温度计,相距数厘米)插入反应器内。

关于生物反应器的放大问题,美国的生化工程前辈 A.E.Humphrey^[6]曾说过,生物反应器的放大至今为止,“与其说它是科学,还不如说它是技巧”,迄今仍是卡脖子的问题,但它并不构成对生物技术生产过程的严重影响,因为反应器的缺陷,可通过工艺及控制的手段来弥补。他认为今后生化工程的努力方向,首先就是解决生物反应器的合理放大问题。荷兰 Wageningen 农业大学的 K.Van't Riet 等在“泡沫、传质、混合在大型发酵罐中的相互关系”一文^[7]中认为目前对放大有四种方法,即因次分析法、经验法则法、综合机理的方程式法以及时间常数法。因次分析法在简单的过程中应用常很有效,但在参数及变数的取舍上往往存在人为因素,同时要在发酵过程中保持所有无因次准数都相同是不可能的。经验法则法常用维持 P/V , k_La , V_{tip} (叶端线速度)或 P_{O_2} 为常数进行放大,是最常用的,也是较可靠的,但不能要多个准则都为常数,如维持 P/V 为常数, k_La 可以为常数,但混合时间 t_m 在放大后则为之增大。综合机

理性方程式是不存在的,因为发酵过程变量太多,相互关系很复杂,但某些经验公式在一定程度、一定场合下还是可取的。作者推荐了一种新的方法——时间常数(Time Constants)法,时间常数是某一变量与其变化速率之比,如搅拌桨有效区的溶氧浓度, C_{O_2} , 与摄氧率, OUR(可视作不随时间变化)之比称为溶氧的临界时间常数, t_{cro} 。作者认为反应器中的氧传递只发生于搅拌桨的有效搅拌区,若液相混合所需时间, t_m 高于 t_{cro} , 则反应器中将出现局部氧耗尽现象。此时应提高 C_{O_2} 值;然而对氧的传递讲, C_{O_2} 值应低一些为好,因维持较大的氧推动力。此两者是彼此矛盾的,只能取一个折中 C_{O_2} 值。由于在小型罐中混合情况往往优于大型罐,即大型罐的混合时间大于小型罐,因此在大型罐中更容易出现局部缺氧情况。这是应该在放大时加以考虑的。一般情况下可取流体单元的循环时间, $t_c=(1/4)t_m$ 。以上概念不适用鼓泡塔,因在鼓泡塔中氧的传递在整个塔中进行。在气升罐中氧的传递则仅发生于升液筒中,若罐高大于10m,在降液区中有可能发生氧缺现象。我们实验室曾设计一种特殊摇瓶,即在瓶壁装上两个氧电极,上面的电极测定气相的氧分压而下面的测定液相的氧浓度^[8],根据扩散原理和物料衡算可以测得培养物的摄氧率和摇瓶在培养过程中的体积氧传递系数,为发酵罐的放大提供工程参数,且可对摇瓶与发酵罐发酵水平的差异进行研究。

二、微生物发酵

美国 Merck 实验室的 B.C.Buckland 在“回归到实践”一文^[9]中述及从本世纪 80 年代以来从发酵获得的医药产品有自然产物(次级代谢产物)、治疗蛋白(DNA 重组技术产物)和疫苗三大类。这里讲的疫苗是指用微生物发酵获得的,如乙肝表面抗原疫苗是靠重组大肠杆菌的发酵制取的;一种预防脑膜炎的结合疫苗是由脑膜双球菌的外膜蛋白与一种嗜血杆菌的膜多糖经化学结合的产物。治疗蛋白可以通过重组的大肠杆菌、酵母及不同动物细胞来制备。因为重组蛋白是高附加值的产品,同时在小规模设备中进行生产,因此常在设备上和生产过程中不惜工本,使一个 3000L 的发酵罐的价格相当于一个 200m³ 生产抗生素的发酵罐。目前以每公斤原料药计的生产成本,重组蛋白(以 1g/L 发酵水平计)约为抗生素(以 10g/L 发酵水平计)的 100 倍。八十年代中也出现了四种被称为“神药”的次级代谢产物,它们是环孢菌素(cyclosporin)——一种免疫调节剂,用于减少器官移植时的排异; Imipenem (Thienamycin 的衍生物, Carbapenem 的改进产品)——一种迄今为止抗菌谱最广的抗生素; Lovastatin 一种降胆固醇的次级代谢产物; Ivermectin (Avermectin 的半合成产品)——一种卓越的兽用杀寄生虫抗生素。这四种次级代谢产物由于其疗效显著,市场需要因此在 80 年代中其总销售相当于同时期所有重组 DNA 产物的总销售额。因此作者认为不要把眼睛专盯着医药工业中很狭小的这一部分——重组蛋白。他在综述中还讲到了 Lovastatin 出现的故事,即自从科学界了解了 β -羟基- β -甲基戊二酸单酰辅酶 A(HMG-CoA) 还原酶是合成胆固醇的关键酶以后,他们公司即化了不少功夫筛选一个优越的能抑制上述酶的酶抑制剂。经几年研究后,终于在一种曲霉(Asp.terreus)的培养物中找到了 Lovastatin。这种真菌在发酵时粘度很大,发酵罐却又是 250m³ 的,氧的供应成为一个难题,在采用了水翼桨以提高总体混合作用,另一方面通过微生物学的工作,使菌体形成小颗粒,并通过培养基的改进,培养物的粘度降低了五倍。对这样大的罐,良好的控制包括离线、在线以至无人操作是不可缺少的。

英国伦敦大学的 M.D.Lilly 等在“发酵罐中的物理环境对抗生素发酵的影响”一文^[10]中认为溶氧强度, DOT 及微生物的形态是影响抗生素产率的两个重要因素。他的观点与前面介绍过的 Van't Riet 的观点一样,即是氧传递速率的时间常数若小于流体流动的混合时间, t_m ,

反应器中将出现垂直方向的溶氧梯度,例如在 112m^3 生产氯霉素及四环素的罐中都发现上述情况,特别是在搅拌桨有效区域中。 $t_m = K \cdot V^{0.3}$, V 为反应器有效体积, m^3 ; K 为常数, $\text{s}/\text{m}^{0.9}$ 。一个 100m^3 罐的 t_m 为 100s 。这样可算出 $h = 25\text{s}/\text{m}^{0.9}$, 10m^3 罐的 $t_m = 50\text{s}$; 1m^3 罐的 $t_m = 25\text{s}$, 即罐增大十倍,混合时间增大一倍。由此可见,大型罐的垂直方向存在溶氧梯度的可能性更大。他介绍了一个 t_m 为 2min 的青霉素发酵罐中,若 DOT 低于 35% 饱和度,青霉素的比生产率 q_p 有下降情况。在绿状菌发酵时,不少学者发现菌的形态变化会影响 DOT 的水平。图象分析为菌丝形态变化的测量提供了一个有力的工具。红霉素发酵液在流变学中符合幂律特性,它在发酵前期的 10 小时及后期的 $50-70$ 小时期间,其稠度指数随菌浓度增大,流动指数在开始 10 小时内从 1 降至 0.2 ,以后即保持此值。在这实例中,菌的形态的流变学关系不明显。但在青霉素发酵中发现搅拌速度、形态学和产物形成的关系很为复杂。此研究是在无固体的合成培养基中进行,共用三个发酵罐— 5 、 100 及 1000L 罐,每个均装有三个涡轮桨。菌丝形态是经稀释后观察的,最长的菌丝出现在对数生长期末,以后 100 小时内,菌丝长度随罐体积及搅拌转速的增大而相应减小。在 5L 罐中,摄氧率及 CO_2 释放率的峰值因高转速 (1300rpm) 而推迟了数小时。平均主要菌丝长为 130μ , 比低转速操作的 300μ 为短;青霉素的开始形成时间也为之推延,在以后的 75 小时内的合成速率也是较低的,作者还发现,若以 $P/D_i^3 \cdot t_c$ (P 为功率, D_i 为搅拌桨直径, t_c 为循环时间) 作为放大准则,对青霉素讲是十分合适的。三种不同规模的罐都得相同的结果,即在 $P/D_i \cdot t_c$ 值为 $50\text{KW}/\text{m}^3 \cdot \text{s}$ 时,青霉素的比形成速率,达到很高的水平— $3750\text{U}/\text{g}$ 干菌体 $\cdot \text{h}$, 随着 $P/D_i \cdot t_c$ 值增大, q_p 即开始下降。

德国汉诺威大学的 K.Schügerl 在“不同类型的反应器设计”一文中^[11] 中首先介绍了不同类型反应器的性能。在低粘度培养物和功率输入在 $2.5\text{KW}/\text{m}^3$ 以下时,普通搅拌罐、环流搅拌罐、鼓泡塔、内循环气升罐和外循环气升罐的氧传递速率, OTR 分别为 $1-3.6$, $1.9-2.2$, $0.9-4.8$, $5-8$, $3-10 \text{ kgO}_2/\text{KW} \cdot \text{h}$ 。文中还介绍了两个分别代表低粘度(一种毛发芽孢菌培养物)和高粘度(黄原胶发酵液)计算 $k_L a$ 的关联式,并介绍了细胞生长速率 R_x 、产物形成速率 R_p 等(以上单位为 $\text{kg}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$) 的计算和应用方法。文中还介绍了用 30L 搅拌罐和 100L 外循环气升罐进行青霉素 V 发酵的研究结果。由于发酵液很粘稠,故采用了 Intermig 搅拌桨,结果发现 $k_L a$ 值比采用 RT 时高出一倍。在用球状菌代替丝状菌时,粘度下降了 $3-4$ 倍, $k_L a$ 值则增加了 $3-4$ 倍;此时青霉素的产率在球径小于 0.4mm 时与丝状菌可相持平,但球径在 $0.6-1.2\text{mm}$ 时则下降了一倍。球径的控制在于气升罐中较为容易。

三、动物细胞培养

美国明尼苏达大学的胡维硕 (W.S.Hu) 等在“动物细胞培养中新加料技术”一文^[12] 中针对细胞滞留连续培养(灌注培养)的需要提出了一组较系统的动力学表达形式,另也对培养过程中乳酸的中和、氧的供需、细胞浓度的检测等技术提出了化学计量和在线检测方案。

澳大利亚新南威尔士大学的 P.P.Gray 等在“生物反应器中连续培养动物细胞提高异源蛋白的表达”一文^[13] 中介绍了在 2L 气升式灌注系统中用 CHO 细胞在微载体上进行人生长激素 (r-hGH) 及人促卵泡激素 (r-hFSH) 的表达的研究。在新鲜培养基连续加入同时,适当按需要添加微载体。11 天后,用 Cytodex 2 非多孔微载体的细胞浓度为 5×10^7 个 /ml, 用 Cultisphere G 多孔微载体时为 8.4×10^6 个 /ml, 产物的比形成速率也能维持在一定水平。当稀释率为 0.3 体积 / 10^6 细胞 $\cdot$ 天或更高时, r-hGH 的产率为 $0.78\text{g}/\text{L}$ (反应器体积) $\cdot$ 天。

英国 Kent 大学的 A.T.Bull 等在“CHO 细胞的生理状态和异源蛋白表达”一文^[14] 中介

绍了他们用 CHO 细胞表达 r-IFN- γ 的研究结果。实验是在分批及葡萄糖限制的恒化培养下进行, 采用无血清培养基。实验发现 IFN- γ 糖基化型式与分批培养时间和稀释率有关; 细胞在培养过程有凝聚现象, 培养物中大颗粒的比例随稀释率减小而增多, 可能由于大颗粒对营养和氧的传递较差, IFN- γ 的分泌也受到了限制。

德国 Boehringer 公司的 M.C.Comer 等在“动物细胞工业生产技术”一文^[15]中认为目前用于动物细胞培养的生物反应器虽很多, 有多孔纤维及陶瓷培养系统, 自动化滚瓶、使用微载体的流化床、带有细胞截留装置的搅拌罐等。看来后两种较有可能用于生产和便于放大。除了生物反应器, 工业生产中还应十分重视下游分离过程, 在线检测等技术的开发和应用。

美国 Miles 公司的 D.C.Cohen 等在“大规模动物细胞连续灌注系统”一文^[16]中建议用比灌注速率, (n1/cell-day) 代替一般稀释率 (vol./vol. of bioreactor-day) 的表示法, 因为这样更为科学, 有利于生理分析和过程放大。

参考文献

- 1 A.W.Nienow: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, Amer. Chem. Soc. p.193(1992)
- 2 方夏虹: 华东理工大学博士学位论文 (1993)
- 3 R.Carrington, K.Dixon, A.H.Harrop, G.Macaloney: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.183
- 4 M.Moo-Young, Y.Chisti: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.174
- 5 A. Lübbert: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.178
- 6 A.E.Humphrey: “Biochemical Engineering for 2001—Proceedings of 2nd. Asia—Pacific Biochem. Eng. Conf. Yokohoma, 1992” p.3
- 7 K.Van't Riet, H.M. Van Sonsbeek: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.189
- 8 范代娣, 俞俊棠: “中国生物工程学会成立大会论文集”, p.462(1993)
- 9 B.C.Buckland: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.215
- 10 M.D.Lilly, A.Ison, P.A.Shamlou: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.219
- 11 K.Schügerl: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.232
- 12 W.S.Hu, D.Gryte, Y.S.Kyung, M.V.Peshwa, C.M.Perusich, H.Vits: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.223
- 13 P.P.Gray, K.Jirasripongpan, C.Gebert: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.197
- 14 A.T.Bull, A.J.Baines, P.M.Hayter, I.Salmon: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.206
- 15 M.C.Comer, K.H.Sellinger: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.209
- 16 D.C.Cohen. M.Mered, R.Simmons, A.C.Dadson, C.Figueroa, C.W.Rice: “Harnessing Biotechnology for 21th Century”, p.211

RECENT DEVELOPMENT OF BIOREACTOR ENGINEERING

YU, Juntang

Research Institute of Biochemical Engineering
East China University of Science and Technology
Shanghai, 200237

This review is mainly drawn materials from “Harnessing Biotechnology for 21st Century: Proceedings of the 9th International Biotechnology Symposium and Exposition”, Symposium V: Bioreactor Engineering. There are Three parts: Transport Phenomena in Bioreactor, Microbial Fermentation, and Animal cell Culture.