

# 生物反应器的研究及其相关问题思考

郑之明

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程重点实验室, 合肥 230031)

**摘要** 分析了生物反应器工程的研究现状,探讨了研究中存在的一些问题并提出了解决这些问题的研究思路。

**关键词** 生化工程 生物反应器 传质

## 1 生化工程学概述

生化工程是生物化学工程的简称,它是以生物技术从实验室规模扩大至生产规模为目的,以生物生产过程中带有共性的工程技术问题为核心的一门由生物科学与化学工程相结合的交叉学科。它既是生物技术的一个重要组成部分,又是化学工程的一个分支学科。上世纪四十年代,青霉素深层培养新技术的成功,是生化工程学科形成的标志,生化工程学贯穿于生物生产的全过程。

众所周知,化学工程学科的发展极大的推动了化学工业的发展,各种化工产品的高度集约化、规模化生产,有效的降低了生产成本,对化学产品为人类服务起到了革命性作用(如联碱、联胺、联苯、尿素等一系列成套技术的成熟和使用)。生物技术作为一门前沿学科,在医药、化工、农业、食品、冶金等许多领域得到了广泛应用。随着生物技术及其产品不断市场化的需求,其工程化和工业化问题,引起了化学工程师极大的兴趣和关注,希望借助于化学工程的理论和方法,对生物反应过程进行研究,以提高生物反应过程的效率。由此产生了一些尖端的课题包括基本生物作用的模拟、复杂生物系统的表面传递、工程分析、放大设计、评价和优化选择等等,有力地推动了生化工程学科的发展,使生化工程学科在科学和社会发展中凸显出越来越重要的作用。

生化工程包括生化反应工程、生化分离工程、生化过程控制等内容。本文重点介绍生物反应器研究的进展。

## 2 生物反应器基本原理

### 2.1 生物反应体系

生化反应工程研究对象是生物反应过程,包括微生物发酵和动植物组织细胞培养体系。生物反应过程与常规的化学反应过程有本质性区别,这决定了生化反应工程研究的复杂性和艰巨性,可以说,生化反应工程目前尚处于探索和发展阶段。

工业发酵中应用的微生物包括一定品系的细菌、放线菌、霉菌和酵母菌。工业微生物发酵按目的产物不同有四种类型:微生物细胞(或称生物量);微生物生命活

动过程中的产生的大分子化合物,如酶、多糖、核酸、蛋白质等;微生物代谢的转化产物,如氨基酸、维生素、核苷酸、抗生素、生物碱、霉素、色素等。基因工程技术产生的各种基因工程菌的发酵过程,也是生化反应工程研究的重要对象。用于生产上述各种产物的微生物表现出多种多样的生理学特性。

动植物细胞是比微生物细胞更高级的生命形式,其培养过程也更有其复杂的特点,因而动植物细胞的培养比微生物细胞的培养对环境有更高的要求,这给生物反应器设计与放大提供了新的挑战 and 机遇。

### 2.2 生物反应器工程基本原理

生物反应器工程基本原理是指研究体系的传质、传热、动量传递和反应动力学四个方面,包括①从微观角度研究酶动力学、发酵细胞生长、产物形成、基质消耗动力学,即本征动力学;②从宏观角度研究生化反应动力学,即考虑混合、传质、传热等因素对生化反应动力学所产生的影响;③将反应器的混合传质、传热等性能(冷模试验),与具体生物产品在反应器的应用效果(热模试验)相结合,研究反应器的结构、操作条件,为生物生产过程的优化和反应器设计放大服务。生化反应工程的核心是生物反应器技术。

### 2.3 生物反应体系的传递现象

生化反应都在多相体系中进行的,绝大多数生物反应体系都包括气液固三相,即有空气或 CO<sub>2</sub> 等气体产物、液体培养基和生物细胞及其载体颗粒。也有一些生物反应涉及三相以上的多相体系。氧气的需求是生物反应过程的重要特征。因此,生物反应必须不断的通气和搅拌,使培养液具有一定的溶氧浓度,以满足生物细胞生长的需要。因此,在许多生物反应体系中,生物的生长往往受到液相中氧浓度的限制,因此,氧从气相向微生物细胞的传递至关重要。但另一方面,长期以来,由于人们的研究关注以氧传递为核心的气液传递过程,尤其对于好氧发酵,特别重视溶氧率和液体中氧传递速率,但在高浓度发酵和高密度细胞培养系统中,细胞(菌体)

与液体之间的传递将上升为主要阻力,这种传递过程,完全套用化工上的液固传递已不适合,需要深入研究这种固体“反应器”与液体之间的传递过程,建立准确的定量模型。但到目前为止,还没有形成较理想的研究结果(特别是大分子物质的传递),所以在传质方面主要还是以氧的传递为核心。

由于生物反应是常温下的温和反应,所以在研究生物反应过程本身时,热传递并不是研究的热点,但也要看到建立在傅立叶定律基础上的热传递研究在生化工程的下流技术即生物分离和纯化技术中是非常重要的。

### 3 生物反应器的设计与放大

生物反应器是生物生产过程中的关键设备,它应能满足不同规模的生物反应系统的要求,为细胞的增殖、酶的催化反应和产物形成提供良好的环境条件,即不引起污染、不伤害细胞,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功率输入情况下,提供足够的混合、传质、传热速率;从操作条件看,要求弹性大,可适合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、加料一分批、灌注、连续操作等需要。由于不同的生物技术产品所采用的生物反应条件各不相同,生物反应器如何在结构型式、操作方式和具体操作上满足其特殊要求,这些也就是生物反应器研究的内容。

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还是机械搅拌式生物反应器(简称搅拌发酵罐)。搅拌发酵罐常用的搅拌器有涡轮式、螺旋桨式、平桨式,其中以涡轮式使用最为广泛。

现用的搅拌发酵罐出现在上世纪 40 年代抗生素工业发展阶段。50 年代初期搅拌浆开始广泛采用带有圆盘的六平叶涡轮搅拌浆(Rushton Turbine 简称 RT),认为这种搅拌浆对气体的破碎作用大,且属于径向流型搅拌浆,有利于增加气体在反应器中的停留时间,故至今还被较普遍的采用。同时,为了避免气泡在阻力较小的搅拌器中心沿着轴上升逸出,在搅拌浆中央常带有圆盘。但随着对 RT 的深入研究,发现也存在不少缺点,如此种搅拌浆的泵送能力不强,即在整个反应器中混合效果欠佳,特别是在多个 RT 串在一个转轴上时,容易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,尤其不太适合于粘性发酵液的混合。英国伯明翰大学生化工程中心的 A.W.Nienow 的研究表明,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  $N_p = \text{外力} / \text{惯性力} = P / (N^3 D^5 \rho)$  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%,从而限制了体系的混合和氧的传递效率。针对上述问题,发展了一种称之为 6SRGT 的浆型,以抛物线曲面叶片代替 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。气体对搅拌浆的液泛(Flooding)问题也是衡量搅拌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浆无法正常工作的现象。此时,在搅拌浆周围形成了一个夹有大片羽毛状空气—培养液的环隙,搅拌功率大幅度下降。一个好的搅拌浆应该能允许较大的气流速度通过,而功率吸收仍能维持较高的水平。实践证明,6SRGT 在克服液泛方面优于 RT;在主体混合(Bulk Blending)方面,一般认为在相同功率输入的情况下,大直径低功率准数值的搅拌浆优于小直径高功率准数值的搅拌浆,在高黏度培养液中混合尤为明显。为了改善反应器中自上而下的混合,采用低功率准数下向轴流型搅拌浆在非通气情况下是十分满意的;但在通气时引起液泛并使泵流量减小而使功率剧烈下降,下向的液流被上升的气泡所干扰使操作出现不稳定。液泛和功率下降问题在一定程度上被一种新型搅拌浆—水翼(Hydrofoil)浆所克服,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)的搅拌器,其液冷流速较高,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。若采用上向轴流浆或斜叶涡轮浆则无上述两种不稳定性,液泛流速也较大。另一种新型浆—Ekata Inter Mig 浆,因在其搅拌转臂上具有不同倾角的叶片,在不通气时,这种浆既能产生上向的、也能产生下向液流,一般同时装置两个;当通气操作时,主要产生径向液流,因为有空穴的产生,此外,也会产生震动现象。研究证明,采用大直径、低功率消耗的搅拌浆代替 RT,可使在通气情况下所发生的功率吸收下降、液泛的产生改善,并有利于流体的混合及传热、传质。大气泡周期性地从叶轮中逸出,是产生震动的主要原因;提高转速和降低通气量是使气体处于完全分散状态以及采用直径大于浆叶的通气环是避免和减少震动的方法。

气升罐及鼓泡塔应用日益扩大,它不但可以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的流体动力学性能。针对一般气升罐虽然有着良好的气液传质特性,还避免了机械搅拌剪切力对菌体的损伤,但实际使用效果往往不比传统

发酵罐好的事实,分析其根本原因,可以认为,在同样功率消耗下,机械搅拌罐的液固传质优于气体搅拌罐,虽然有机剪切力对菌体损伤的弊端,但总体发酵效果不差。因此,我们认为,新型气环流生物反应器的研究方向在于:①强化气体环流反应器的液固传质,而不增大剪切损伤有利于细胞的生长生产。②以法向力为动力源的传递过程有利于细胞内外的液固传质。系统内一定幅度的压力波动,是产生法向力动力源的一种手段。③一定范围内的外界条件周期刺激,使微生物处于亢进状态,有利于刺激生物反应过程,是一种普遍的优化控制手段,这种周期刺激可以是温度、浓度、压力、光、电、磁、声等。

应用上述原理设计的气升式双环流生物反应器,体系内形成周期供氧与周期变压的脉动状态。无菌空气由塔底气体分布管进入,气泡在导流筒内上升,形成液相视密度差,液体沿导流筒外侧和回流管下降,分别形成局部环流和整体环流。局部环流在导流筒内完成,其目的是为了强化气液混合传质。在每段导流筒内还设有两层筛板,以改善塔内径向气体分布,促进气泡分散。整体环流由一使上液层与塔底相通的循环管组成,发酵液中所有菌体均匀的、周期性的从塔顶经循环管到塔底,然后上升到塔顶。循环管可设置在塔体的外侧,称外循环管,也可设置在塔体的中心,称中心循环管。循环管中的回流速度大于 0.5 米/秒,有气泡夹带,但总体还是处于缺氧状态,通过循环管的供氧不足的菌体在塔底部得到充分供氧,进入导流管内上升,从而实现了菌体摄氧的周期波动同时,菌体所经受的液向静压力也出现周期变化。由于压力波动要有一定振幅,才能产生强化液固传质的法向力,故气升式双环流生物反应器必须具备一定高度。实践证明  $H > 25$  米才能显出明显效果。

20m<sup>3</sup> 压力脉动固体发酵新型生物反应器的研制和应用也采纳了压力脉动强化传质的手段。其结构原理是对密闭反应器内气相压力施以周期脉动,并对气相施以强制环流,通过快速泻压方式使潮湿颗粒因颗粒间气体的快速膨胀而发生松动,从而达到强化气相与固态料层间均匀传质、传热过程的目的。气相压力的周期脉动,还会引发多种外界环境参数对细胞膜的周期刺激作用,如氧浓度、内外渗透压差、温度波动等,这些波动会强化体系的传递过程,加速细胞代谢、生长、繁殖。

压力脉动固体发酵罐的主要操作是通过无菌压缩空气对罐压施以周期性脉动并对气相实施强制环流,压力脉动过程中,一般峰压值 1.5~3.5kgf/cm<sup>2</sup>,谷压值为 0.1~0.3 kgf/cm<sup>2</sup>。充压时间较长,曲线上升平缓,一般为 1~5min,由

气源决定。泻压时间要求尽可能短,一般在 1min 之内,尤其是开始 10sec,泻压速度要快,使固体培养基潮湿颗粒之间的液体发生突然膨胀而使料层松动。峰压时间和谷压时间,人为设定,自动控制。

压力脉动固体发酵与一般固体发酵相比优势在于:①纯种培养;②易工程放大;③发酵水平提高 2~3 倍;④发酵周期缩短 1/3。压力脉动固体发酵与液体发酵相比优势在于:①无大量废水;②能耗低 6~7 倍;③投资低 2~3 倍;④原料要求更粗放,生产成本低。1999 年 12 月由李季伦、沈寅初院士等著名专家组成的鉴定委员会给予“压力脉动固体发酵新技术”高度评价:压力脉动固体发酵及其设备是固体发酵技术的一个新发展,该项技术具有较普遍的应用价值,其中压力脉动固体发酵新技术及其发酵设备的成果处于国际领先水平。

关于生物反应器的放大问题,美国的生化工程前辈 A.E.Humphrey 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,解决生物反应器的合理放大问题,是生化工程的努力方向。荷兰人 K.Van't Riet 认为,目前有四种放大方法,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,但在参数变量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  $P/V, k_L a, V_{up}$ , (叶段线速度) 或  $P_{O_2}$  为常数进行放大,是最常用的,也是较可靠的,但不可能要求多个准则都为常数,如维持  $P/V$  为常数,  $k_L a$  可以为常数,但混合时间  $t_m$  在放大后则增大。综合机理的方程式是不存在的,因为发酵过程中变量太多,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。时间常数法是一种新的放大方法。时间常数是某一变量与其变化速率之比,如搅拌浆有效区溶氧浓度  $C_{O_2}$ ,与摄氧率 OUR (可视不随时间变化)之比称为溶氧的临界时间常数  $t_{cO_2}$ 。在反应器中的氧传递只发生在搅拌浆的有效搅拌区,若液相混合所需时间  $t_m$  高于  $t_{cO_2}$ ,则反应器中将出现局部氧耗尽现象。此时应该提高  $C_{O_2}$  值;然而对氧的传递而言,  $C_{O_2}$  值越低,氧传递的推动力越大。此两者是矛盾的,只能取折中值。由于小型罐混合情况优于大型罐,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。这是应该在放大中加以考虑的。一般可取流体单元的循环时间  $t_c = (1/4) t_m$ 。

#### 4 生化工程学研究现状中几个问题的思考

(1) 生化工程学是一门年轻的应用基础理论学科, 主要研究生物过程工程问题。它是一门交叉学科, 需要生物学和化学、化工方面的专家共同参与, 有机结合。这种有机结合, 不仅仅是形式上的结合, 而是实质上的结合, 是知识层面的结合, 要求生物学家对化工问题有一个深层次的理解; 而化工专家, 对生物学问题也要有一个深层次的理解, 甚至应该是这两方面的复合型专家。同时, 还需要其它学科的专业知识。例如, 研究传递和分离过程, 需要大量物理知识; 研究模拟与放大过程, 需要现代数学知识等。因此, 生化工程学的研究, 需要多学科专家的共同参与, 并有机结合。从目前国内生化工程学研究现状看, 生物方面和化工方面的有机结合尚处于形成阶段, 还有一个过程。现在的许多成果, 都是从化学工程学科中直接嫁接而来, 针对性不强, 有些问题是知其然不知其所以然, 没有从根本上解决问题, 这是国内生化工程研究水平与国外的差距所在。

(2) 应重视和加强对以生物反应动力学为核心的生化工程基础问题的研究, 实践证明, 抛开生物的本质, 单纯以化学化工的手段和方法, 研究生物反应, 是一种简单化的方法, 不能够深入了解生物反应过程。因此, 应从微观机理着手, 应用现代分子生物学工具和手段, 注重过程研究, 剖析每一个生化反应过程, 然后, 进行高度分析、总结, 得到反应机理的本征动力学模型。只有这样建立的模型, 才能客观反映生物体系新陈代谢的实际情况, 抓住问题的关键和实质, 为进一步的工业化生产, 提供模拟和放大的可靠依据。

(3) 重视液固传质, 是强化生物反应过程的关键。这一点, 已经是业内许多专家的共识。但究竟如何研究液固传质过程呢? 化工上传统的液固传质的研究方法和手段, 显然已不适合于活细胞的生物反应过程。这里的液固传质, 实质上就是细胞内外的物质传递。因此, 生物反应过程的液固传递与其说是化工问题, 毋宁说是分子生物学问题。生物新陈代谢所需要的各种营养物质(包

括碳源、氮源以及其它微量物质) 都来自于液相的基质中, 它们是如何通过细胞膜进行内处传递的, 而发酵过程中产生的各种代谢产物, 又是如何透过细胞膜传递到液相主体的, 各种物质传递的差异性, 传递过程中限制性因素又是什么, 对产物的生成和积累有何影响, 强化传递的手段等等, 都是对发酵调控和放大有重大影响的问题, 值得我们去研究、探索。

(4) 从“七·五”开始, 我国投入了相当的人力、财力, 研究各种生物反应器, 取得了一些科研成果, 但这些成果大多尚未在工业上得到推广应用; 而传统的搅拌式发酵罐, 历经半个多世纪的考验, 在发酵工业上作为主打设备, 常胜不衰。究其原因, 笔者认为, 各种野生型微生物菌株大多生长在土壤、空气、海洋、森林等广泛的自然环境中, 条件恶劣。因而, 微生物菌株对生长环境要求不高, 承受能力较强, 在发酵工业上能够适应搅拌罐相对粗放的生长环境。而一些新型的发醇罐(像气升罐、鼓泡塔) 虽然理论上有利于微生物的生长代谢, 但对微生物发酵过程并不是必不可少的, 权重不大, 相反, 可能还提高了使用成本。因此, 这些反应器在传统发酵工业上难以得到大范围的推广应用就可以理解了。传统发酵工业应把研究的重点放在生成机理的研究和过程的调控与放大上。

同时, 笔者还认为, 和微生物细胞相比, 各种动植物细胞原始生长环境温和, 甚至比较苛刻, 尤其是动物细胞, 强烈的受母体良好的环境保护。因此, 当采用这些细胞为生物源, 进行离体培养时, 一些能够提供温和的优化的生长环境的新型生物反应器将大有用武之地。例如, 已经有各种气升式生物反应器、微载体和中空纤维膜反应器应用于各种动植物细胞、组织、器官的培养过程, 以生产一些稀有的、珍贵的动植物细胞的代谢产物, 如紫杉醇、灵芝、青蒿素等。此外新型生物反应器还适合于一些人工改造的基因工程细胞、杂交瘤细胞的培养需要。□

### Research Development of Bioreactor And The Thoughts of Interrelated Problems

Zheng Zhiming

(Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, ASIPP, Hefei 230031)

**Abstract** This paper analysed recent development of bioreactor engineering, and discussed the existent problems in this field.

**Keywords** biochemical engineering, bioreactor, mass transfer