

• 工业生物技术 •

用于红霉素生产的 500 m³ 生物反应器的理性设计

谭鑫^{1,2}, 李超¹, 郭美锦¹

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 上海健启生物科技有限公司, 上海 201400

谭鑫, 李超, 郭美锦. 用于红霉素生产的 500 m³ 生物反应器的理性设计. 生物工程学报, 2022, 38(12): 4692-4704.

TAN X, LI C, GUO MJ. Rational design of a 500 m³ fermenter for erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea*. Chin J Biotech, 2022, 38(12): 4692-4704.

摘要: 红霉素 (erythromycin) 是由绛红色糖多胞菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 发酵生产的次级代谢产物, 其生产水平不仅受发酵工艺的影响, 也受反应器结构影响。为解决红霉素发酵过程放大问题, 本研究采用时间常数法和计算流体力学 (computational fluid dynamics, CFD) 数值模拟验证相结合的方法设计了 500 m³ 超大规模红霉素耗氧发酵生物反应器。首先, 通过对 50 L 反应器红霉素发酵过程研究, 发现溶氧是关键性限制因素, 通过氧消耗速率 (oxygen uptake rate, OUR) 等参数分析计算得到设备的氧供应时间常数 t_{mi} 需小于 6.25 s。然后, 基于时间常数法和经验关联式理性设计 500 m³ 反应器搅拌桨叶组合方式, 即底层 BDT8 桨叶+两层 MSX4 桨叶的搅拌桨组合, 并通过经验公式及 CFD 方法对设计结果进行了模拟验证。两种验证方法结果均表明 500 m³ 反应器采取底层 BDT8 桨叶+两层 MSX4 桨叶的组合方式时设备的氧供应时间常数小于 6.25 s, 且反应器内流场特性 (如持气率、剪切率和速度矢量等) 均能满足红霉素大规模发酵的需要。经实际发酵验证, 设计的生物反应器能够满足红霉素的工业规模发酵应用。

关键词: 红霉素发酵; 生物反应器设计; 计算流体力学模拟; 耗氧速率; 时间常数法

Received: April 13, 2022; Accepted: June 15, 2022

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2021YFC2101100)

Corresponding authors: LI Chao. E-mail: leechao1111@163.com

GUO Meijin. E-mail: guo_mj@ecust.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2021YFC2101100)

Rational design of a 500 m³ fermenter for erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea*

TAN Xin^{1,2}, LI Chao¹, GUO Meijin¹

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 Shanghai Jianqi Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 201400, China

Abstract: Erythromycin is a macrolide antibiotic produced by *Saccharopolyspora erythraea*. Its yield is greatly affected by the fermentation conditions and the bioreactor configurations. In this study, a novel scale-up method for erythromycin fermentation was developed based on computational fluid dynamics (CFD) and time constant analysis. Firstly, the dissolved oxygen (DO) was determined as a key parameter according to the physiological properties of *S. erythraea* cultivated in a 50 L bioreactor. It was found that the time constant of oxygen supply (t_{mt}) in a 500 m³ bioreactor should be less than 6.25 s in order to satisfy the organism's oxygen uptake rate (OUR). Subsequently, a 500 m³ bioreactor was designed using the time constant method combined with empirical correlations. The impeller combination with one BDT8 impeller at bottom and two MSX4 impellers at upper part was determined, and then validated by numerical simulation. The results indicated that the t_{mt} of the bioreactor (<6.25 s) and the fluid properties, including gas hold-up, shear stress and fluid vector, met the requirements of erythromycin fermentation. Finally, the industrial production of erythromycin in the 500 m³ showed the design method was applicable in large scale fermentation.

Keywords: erythromycin fermentation; stirred tank bioreactor; computational fluid dynamics; oxygen uptake rate; time constant analysis

设计满足发酵工艺条件的大规模反应器是发酵过程放大的主要内容之一, 包括确定操作条件、操作方式和反应器结构等。放大原则是使放大后的工业规模反应器发酵特性与实验小试规模反应器的发酵特性基本保持一致性, 即提供相似的微生物发酵状态环境, 特别是发酵水平、底物浓度分布与剪切等相似。目前常用的放大方法有基于化学工程的经验逐步放大法和基于生理特性与流场特性相结合的放大方法等^[1], 但是, 对于巨型高耗氧的生物反应器设计与放大的复杂性, 目前放大方法仍然难以全面满足放大的要求。

时间常数法 (time constant method) 是一种

以发酵过程机理研究为基准的放大研究方法^[1]。过程机理分析的目的主要是确定发酵反应系统是发酵生理限制、传质限制、还是流体的混合限制等, 找出整个过程的限制因素。理性的发酵过程放大需要先在实验室规模进行发酵的关键因素研究, 然后进行放大反应器的理性设计, 最后通过计算流体力学 (computational fluid dynamics, CFD) 的方法对理性设计的反应器进行性能评估, 以实现设计方案的验证或调整优化。本文以红色糖多胞菌 (*Saccharopolyspora erythraea*) 发酵红霉素过程放大为研究对象, 采用理性化的时间常数法设计 500 m³ 工业规模的生物反应器, 并进行试验

验证, 研究结果可为今后工业规模反应器的设计提供新的方法与实践。

1 材料与amp;方法

1.1 实验菌种

菌种: 红色糖多胞菌 (*S. erythraea*) E3, 由国家生化工程技术研究中心 (上海) 保存。

1.2 培养基

一级种子培养基 (g/L): 玉米淀粉 20, 糊精 20, 葡萄糖 10, 玉米浆 6, 硫酸铵 2, 氯化钠 5, 碳酸钙 3, 豆油 11, 消泡剂 0.1, 氢氧化钠调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 30 min。

发酵培养基 (g/L): 玉米淀粉 50, 黄豆饼粉 33, 玉米浆 22, 硫酸铵 2, 氯化钠 2, 碳酸钙 6, 豆油 6, 消泡剂 0.2, 氢氧化钠调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 30 min。

1.3 发酵方法

50 L 实验规模培养采用一级种子发酵培养方法, 向茄子瓶斜面内注入 50 mL 无菌水, 刮下所有孢子, 将孢子液接种到 30 L 一级种子培养基中, 转速 220 r/min, 温度为 34 °C, 培养 62 h 后按照 15% 的接种量接种到 50 L 发酵罐中培养 168 h, 温度 34 °C。发酵过程中在线监控温度、转速、pH 值、溶解氧 (dissolved oxygen, DO)、氧消耗速率 (oxygen uptake rate, OUR) 等参数变化, 离线监控还原糖、总糖、氨基氮、化学效价、红霉素 A 组分等参数, 通过控制空气流量和搅拌速率维持溶解氧浓度不低于 25%。每隔 12 h 取样检测菌浓 (packed mycelium volume, PMV)、氨基氮、葡萄糖浓度和效价等参数。

葡萄糖流加方式 (pH 闭环控制): 制备好 30% 葡萄糖无菌溶液, 根据补加工工艺选择起始补加时间, 维持 pH 在 7.0 左右, 发酵 40 h 后由 pH 值反馈闭环控制补加速率。

豆油流加方式: 豆油在红霉素发酵过程中作为碳源和消泡剂, 在整个发酵过程中匀速补加, 补加总量控制总发酵液体积的 1.0%–2.5%。

正丙醇前体流加方式: 正丙醇在红霉素发酵过程中作为碳源和前体, 在整个发酵过程中匀速补加, 补加总量控制在总发酵液体积的 1.0%–2.0%。

无菌水及基础料补加方式: 根据需要补加, 维持合适的发酵液黏度和体积。

1.4 实验设备及分析方法

发酵罐: FUS-30 L–50 L 高级发酵罐 (上海国强生化工程装备有限公司), 具有在线 pH、DO、温度、转速、空气流量、罐压、称重、补料及 OUR、二氧化碳释放速率 (carbon-dioxide evolution rate, CER)、呼吸熵 (respiratory entropy, RQ) 等参数在线检测;

采用显色法对红霉素化学效价进行测定^[2], 高效液相测定组分 (高效液相色谱仪: Agilent1100 Series (安捷伦公司), 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 5 μm (250 mm×4.6 mm), 流动相: 0.025 mol/L 磷酸氢二钾缓冲溶液: 乙腈=60:40, 检测流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 215 nm, 柱温: 35 °C, 检测时间: 50 min);

利用流变仪 (DV-II+ Pro, Brookfield) 对发酵液流变特性进行测定。

1.5 时间常数分析法^[1]

本文中时间常数分析法是通过对比发酵过程中生理代谢参数的特征时间与反应器内混合、传质等特征时间, 在工业放大以后如果某关键生理代谢参数的特征时间明显小于反应器相应的特征时间, 则说明反应器不能满足发酵需求, 导致放大不能达到目标或失败。红霉素发酵在放大过程中的氧气传递速率 (oxygen transfer rate, OTR) 是关键因素之一。因此, 在 500 m³ 反应器的设计时, 供氧速率是首要考虑

因素。在放大过程中,要考虑反应器“供给型”关键时间常数-氧传递时间常数 (t_{mt}) 与关键的发酵过程“消耗型”关键时间常数-氧消耗时间常数 (t_{oc}) 之间的关系:

$$t_{mt} = 1/k_L a \quad (1)$$

$$t_{oc} = c_{O_2}^*/r_{O_2} \quad (2)$$

其中, $k_L a$ 为体积氧气传质系数 (s^{-1}), $c_{O_2}^*$ 为饱和氧浓度 (mmol/L), r_{O_2} 为氧消耗速率 (mmol/L)。根据 50 L 发酵罐小试研究得到发酵过程的 OUR 值可计算出上述时间常数。在放大设计时,要使反应器“供给型”时间常数小于发酵“消耗型”时间特征参数才能满足反应器内氧的供应,同时“消耗型”时间特征参数应小于混合时间 t_{mt} ,才能使反应器内没有明显的氧浓度梯度差异。即要满足以下要求:

$$t_{mt} < t_{oc} \quad (3)$$

$$t_m < t_{oc} \quad (4)$$

1.6 红霉素发酵液流变特性的研究分析

发酵液的流变特性是反应器放大设计时要考虑的重要因素,对 50 L 反应器上对红霉素发酵液的流变特性进行研究。文献报道放线菌多属于非牛顿流体,对于非牛顿流体,由 Ostwald-de Waele 模型可建立表观黏度与剪切率的关联式^[3]:

$$\eta_a = K \times \gamma^{n-1} \quad (5)$$

其中 K 为稠度系数 ($N \cdot S^n \cdot m^{-2}$), γ 为剪切率 (s^{-1}), n 为流动特性指数。

1.7 反应器搅拌系统设计方法

1.7.1 搅拌功率及电机功率的设计

采用搅拌式生物反应器,在非通气条件下,搅拌功率用以下公式计算:

$$P = N_p \rho N^3 D^5 \quad (6)$$

其中 P 为非通气条件下的搅拌功率 (kW); N_p 为无量纲的功率准数, ρ 为发酵液密度 (kg/m^3); N 为搅拌转速 (s^{-1}); D 为搅拌叶直径

(m)。公式中 N_p 与流体性质和设备结构相关, Holland 和 Bragg 通过量纲分析,不通气条件下桨叶组合的功率准数可以关联为:

$$N_p = C_1 Re^{C_2} Fr^{C_3} \quad (7)$$

公式中 C_1 、 C_2 、 C_3 为无量纲系数;在通气条件下搅拌功率通常会下降,通常将其与流量准数 (Fl_G) 和弗鲁德数 (Fr) 关联^[4-5]:

$$P_G / P = C_1 Fl_G^{C_2} Fr^{C_3} \quad (8)$$

$$Fl_G = Q_G / ND^3 \quad (9)$$

$$Fr = N^2 D / g \quad (10)$$

其中 P_G 为通气后的搅拌功率, C_1 、 C_2 、 C_3 为无量纲系数, Q_G 为通气流量 (m^3/s)。根据特定桨型组合获取的模型系数^[3-4]确定以上参数即可计算出通气后搅拌功率,通过通气后搅拌功率可以计算出电机所需的额定功率 (P_M):

$$P_M = P_G / \eta \quad (11)$$

其中 P_M 为电机功率 (kW), η 为效率因子。

1.7.2 反应器氧气传递速率 (OTR) 的设计与计算

在实际发酵过程中,微生物对 $k_L a$ 的需求可通过测定其最大 OUR 进行计算,根据氧传递模型理论,在拟稳态时:

$$OUR = OTR = k_L a(C^* - C) \quad (12)$$

其中 C^* 为一定温度下发酵液的饱和氧浓度,饱和溶解度氧浓度计算公式为^[6]:

$$DO_f = 468 / (31.6 + T) \quad (13)$$

根据亨利公式,在不同压力下可表示为:

$$DO_f = P / P_0 \times 468 / (31.6 + T) \quad (14)$$

其中 P 为实际工况压力, P_0 为大气压; C 为溶解氧浓度,在 C 保持在临界氧以上时,取最大 OUR 时的值及对应的溶氧数据,可估算出该发酵过程所需的最大 $k_L a$ 值。

研究资料表明 $k_L a$ 主要与反应器的单位体积输入功率、通气量及微生物发酵液的流体特性相关^[4,7]。常用以下公式计算:

$$k_L a = C_1(P_G/V)C_2V_S C_3\mu_a^{C_4} \quad (15)$$

其中 P_G/V 为通气状态下搅拌系统的单位体积发酵液的输入功率 (kW/m^3), V_S 为表观通气速率, μ_a 为发酵液的表观黏度 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) (对于红霉素发酵液非牛顿型流体需根据流变特性研究结果进行修正计算), C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 为无量纲系数, 通气后的搅拌功率可计算得到反应器的体积氧传递系数。

1.7.3 混合时间的计算

反应器内混合时间 (mixing time) 与反应器的结构和操作工况高度相关, 通气条件下反应器内混合时间可用如下关联式表征^[8-9]:

对于牛顿型流体:

$$t_{95} = C_1(P_G/V)C_2V_S^{C_3} \quad (16)$$

对于非牛顿型流体:

$$t_{95} = C_1(P_G/V)C_2\mu_a^{C_3} \quad (17)$$

μ_a 为有效黏度 ($\text{Pa}\cdot\text{s}$), $\mu_a = K_S\gamma_{\text{eff}}^{n-1}$, γ_{eff} 是有效剪切率 (s^{-1})。

通过 Metzner and Otto 的方法^[3]获得: $\gamma_{\text{eff}} = K_S N$, 根据红霉素发酵液流变特性的研究结果, 本文中 K_S 取全周期平均值。

参照本实验室研究获取的不同组合搅拌浆组合条件下的模型参数^[3], 通过以上公式可估算出反应器内的混合时间。

1.8 CFD 模拟方法及计算条件

采用本课题组前期优化的 CFD 数值模拟方法^[10-11]对设计的工业规模反应器进行数值分析。工业规模 500 m^3 反应器的装液量为 410 m^3 , 搅拌桨叶转速为 $100 \text{ r}/\text{min}$, 每升发酵液的通气速率为 $1.3 \text{ L}/\text{min}$ 。网格划分采用 ANSYS 公司开发的 ANSYS ICEM CFD15.0 软件, 为全四面体网格。为了保证达到网格无关解, 同时减少计算量, 选取网格最大尺寸为 100 mm , 桨叶区域和内部较小的结构采用网格加密, 总网格数约 400 万。

采用 ANSYS CFX 15.0 建模和求解, 气体入口采用进气口速度入口边界, 发酵罐顶部气体出口采用去泡边界条件, 其他均采用无滑移壁面边界条件。求解过程是在 96 核的服务器 (Sugon Co., Ltd.) 上进行。计算过程的收敛标准为残差小于 1×10^{-3} , 且桨叶扭矩和总气含率达到稳定。

2 结果与分析

2.1 红霉素发酵过程关键时间常数的确定

DO 是红霉素高耗氧发酵的关键参数之一, 在 50 L 发酵罐上发酵 3 批次 (001、002、003) 得到红霉素发酵过程 OUR 为 $40\text{--}46 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$, 与文献一致 (图 1)^[12], 发酵水平正常。为了进一步确定培养过程的临界溶氧并探究溶氧对红霉素各个组分的影响, 设计溶氧控制的单因素试验, 将发酵过程的 DO 最低浓度分别控制为 10%、15%、25% 三个梯度水平进行考察, 发酵效价和组分均值结果见表 1。

由表 1 表明溶氧 (DO) 与目标物红霉素 A 组分 (ERY-A) 呈正相关, 而与杂质 ERY-B 组分呈负相关, 根据红霉素 A 生物合成途径^[2]说明高溶氧比较利于 ERY-C 的生成, 即有利于 ERY-C 组分往 ERY-A 方向转化而有利于 ERY-A 的合成。从工艺控制角度出发可以通过提高溶氧 (DO) 而强化 ERY-C 向 ERY-A 转化的代谢通路得到更多的 ERY-A, 因此溶氧浓度是 ERY-A 组分高产发酵的关键因素。在红霉素放大工艺过程中, 发酵体系最低溶氧浓度需控制在 25% 或以上。

在实际发酵中, 不同批次有一定波动性, 考虑溶氧 (DO) 对于红霉素发酵是关键参数, 因此设计中将其最大值放大至 $150 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 为原则, 即 OTR 需要大于 $150 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{h})$ 。红霉素发酵培养温度 $32 \text{ }^\circ\text{C}$, 压力 0.05 MPa , 计算

该工况条件下 $c^*=0.0519$ mg/L (0.345 4 mmol/L); 最低溶氧水平在 25%, 代入公式 (1) 及 (2) 可计算出红霉素发酵对设备氧传递要求的时间常数及氧的消耗时间常数, 计算结果见表 2。

从计算结果可知红霉素发酵要求设备体积氧传递系数 $k_L a > 0.16$ s⁻¹, 即氧传递时间常数 $t_{mt} < 6.25$ s。氧的消耗时间常数为 8.29 s。因此在 500 m³ 大型反应器的设计过程中, 需要保持氧传递时间常数 $t_{mt} < 6.25$ s, 才能保证红霉素发酵过程关键因素氧传递速率 (OTR) 的需要。

2.2 红霉素发酵液稠度系数及流动特性指数

50 L 反应器上对红霉素发酵液的全过程黏度测定结果见表 3。对不同发酵时间点的红霉素发酵液的黏度与切变率进行一元线性回归拟合, 结果见表 4。

表 4 结果验证了红霉素全程发酵液属于非牛顿流体, 其表观黏度与剪切率呈典型指数函数关系, 可以由公式 $\eta_a = K \times \gamma^{n-1}$ 来描述, K 均值为 2.687 N·Sⁿ·m⁻²; 其流动特性指数 $n < 1$, 在 0.1–0.5 之间, 均值为 0.302 1, 这也与文献报道的红霉素发酵液流动特性指数范围 0.2–0.6 基本一致^[2]。

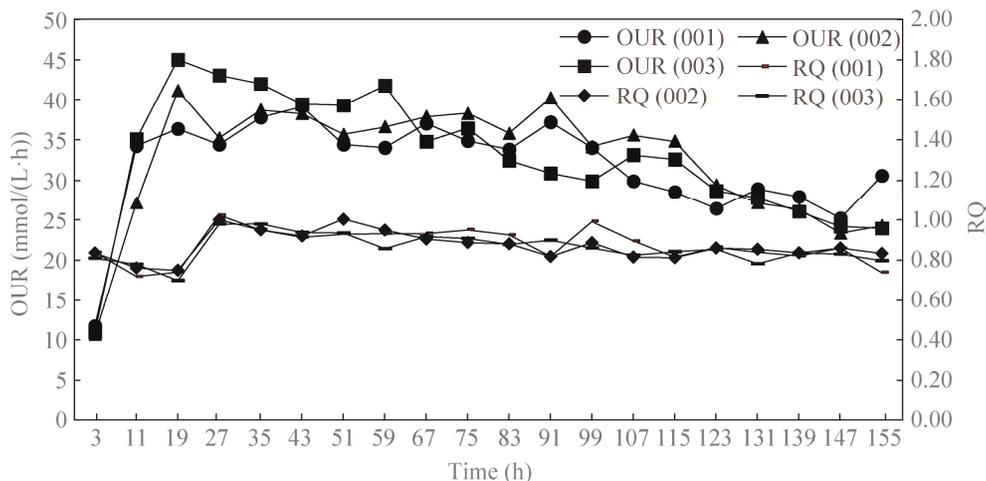


图 1 红霉素发酵过程 OUR 和 RQ 曲线

Figure 1 Time course of OUR and RQ during entire erythromycin fermentation process.

表 1 不同 DO (最低值) 条件下红霉素效价及组分

Table 1 Erythromycin components produced by *S. erythraea* grown at different DO levels

Lowest DO (%)	Titer ($\mu\text{g/mL}$)	Erythromycin A ($\mu\text{g/mL}$)	Erythromycin B ($\mu\text{g/mL}$)	Erythromycin C ($\mu\text{g/mL}$)
25	9 605 \pm 70	7 072 \pm 20	235 \pm 15	675 \pm 31
15	9 355 \pm 73	6 819 \pm 28	234 \pm 12	385 \pm 25
10	7 929 \pm 60	5 601 \pm 23	388 \pm 18	195 \pm 15

表 2 红霉素发酵工艺要求氧传递时间常数和氧消耗时间常数的计算

Table 2 Key parameters of erythromycin fermentation

Maximum OUR (mmol/(L·h))	Critical DO (%)	Volumetric oxygen transfer rate ($k_L a$, s ⁻¹)	Saturated dissolved oxygen concentration (cO_2^* , mmol/L)	Oxygen consumption time constant (t_{oc} , s)	Oxygen transfer time constant (t_{mt} , s)
150	25	0.16	0.345 4	8.29	6.25

表3 红霉素发酵液黏度测定结果

Table 3 Viscosity of erythromycin broth

Shear rate (s ⁻¹)	30 h (Pa·s)	38 h (Pa·s)	80 h (Pa·s)	88 h (Pa·s)	103 (Pa·s)	108 (Pa·s)	115 (Pa·s)	139 (Pa·s)
3.40	1.163 75	1.505 68	1.283 73	1.481 68	1.343 71	1.313 72	1.965 79	0.884 81
6.80	0.689 85	0.859 32	0.734 84	0.796 33	0.734 84	0.745 34	0.569 88	0.485 90
10.20	0.533 89	0.657 86	0.554 88	0.579 88	0.544 88	0.562 88	0.438 91	0.372 92
13.60	0.464 15	0.550 38	0.465 65	0.470 15	0.468 20	0.467 15	0.367 42	0.319 43
17.00	0.402 51	0.476 30	0.409 11	0.398 91	0.399 30	0.399 51	0.322 13	0.284 94

表4 红霉素发酵液稠度系数及流动特性指数的拟合

Table 4 Fitted values of broth consistency index and flow behavior index

Time (h)	K (N·S ⁿ ·m ⁻²)	n	Fitting function	R^2	Average of K (N·S ⁿ ·m ⁻²)	Average of n
30	2.518 3	0.345 1	$\eta_a=2.518 3 \times \gamma^{-0.654 9}$	0.994 0		
38	3.502 2	0.287 9	$\eta_a=3.502 2 \times \gamma^{-0.712 1}$	0.996 0		
80	2.984 4	0.287 4	$\eta_a=2.984 4 \times \gamma^{-0.712 6}$	0.995 3		
88	3.920 0	0.185 4	$\eta_a=3.920 0 \times \gamma^{-0.814 6}$	0.997 6		
103	3.240 7	0.250 4	$\eta_a=3.240 7 \times \gamma^{-0.749 6}$	0.992 6	2.687 0	0.302 1
108	3.160 7	0.263 9	$\eta_a=3.160 7 \times \gamma^{-0.736 1}$	0.997 4		
115	2.175 2	0.317 8	$\eta_a=2.175 2 \times \gamma^{-0.682 2}$	0.996 9		
139	1.998 7	0.294 9	$\eta_a=1.998 7 \times \gamma^{-0.705 1}$	0.987 1		

2.3 500 m³ 反应器设计方案

2.3.1 反应器基本尺寸工程参数的选择

由于 500 m³ 反应器体积超大, 反应过程需求通气量也较高, 反应器采用较大的高径比 (H/D) 有利于增加静压强提高罐内溶氧水平和氧滞留时间。因此, 设计反应器时取 $H/D=2.25:1$, 即内径 6.4 m, 直筒高度 14.4 m。大型反应器一般采用蛇管降温, 也起到挡板作用, 实现湍流。

2.3.2 桨叶类型及数量的设计

在设计过程中主要考虑反应器的供氧和混合效果。为满足反应器高供氧需求, 本方案设计中考虑上层采用四宽叶旋桨式搅拌器, 即轴流型桨, 螺旋圆锥曲面叶片; 底层桨叶采用 8 叶抛物线型叶轮, 具有较强的径向排量及分散能力。采用上下不对称结构设计, 上面的叶片略长于下部的叶片, 该设计使得上升的气体

被上面的长叶片盖住, 避免气体过早地从叶轮区域直接上升而逃逸, 而使更多的气体通过叶轮区域在径向被分散, 而对于搅拌层数, 考虑到大型反应器内混合的效果, 宜采用 3 层或 4 层搅拌桨组合。

对于桨叶直径 (d), 一般与罐体直径 (D) 之间关系为: $d/D=1/3$ 。考虑到最大装液量为 60%–80%, 即反应器内装液量为 319.2–425.6 m³, 取装液量最大值计算, 得到装液直筒高为 12.2 m, 取装液量最小值计算, 装液直筒高度为 8.81 m, 顶层搅拌距离液面的距离 (SI), SI/D 最小值通常不低于 1.0, 而底层搅拌位置一般为桨叶直径 (d) 的 0.2–0.5 倍左右, 由此可以确定各桨叶之间的间距。

同时根据小试试验表明红霉素发酵单位体积功率不大于 2 kW/m³, 按该体积功率计算, 同时结合考虑大型减速机选型的限制, 最高转

速设置为 100 r/min。

2.3.3 蛇管换热系统的设计

在大型通用反应器的罐内温度换热系统, 一般均采用内蛇管+外盘管的方式, 主要是内蛇管的温度交换起作用, 外盘管起辅助作用(本文不作展开)。根据 50 L 小罐实验可得到发酵过程 OUR 及热量数据, 计算发酵热约为 22 000 kJ/(m³·h)。根据该数据, 计算出 500 m³ 反应器换热系统的参数。根据以上数据可计算和设计搅拌系统组合方案及反应器的结构参数, 同时结合不同厂家可选的桨叶形式, 设计如下方案: 3 组搅拌桨叶, 底层用 8 叶抛物线径向流搅拌桨, 中层及上层用四叶旋桨式, 搅拌桨叶间距为 1.81 *d*; 500 m³ 反应器结构参数如表 5 所示。

最终设计的反应器结构见图 2。

由公式 (6) 可以看出, 要计算某一特定搅拌桨叶组合方式下的功率准数, 必须先确定无量纲常数 C_1 、 C_2 、 C_3 , 由于没有完全一致的模型数据, 因此本项目结合上述关联式及参考文献资料^[2]以类似设计方案的 HBT+2WHd 桨叶组合方式下的结构系数计算其功率准数, 在 HBT+2WHd 桨叶组合方式下 $C_1=0.196 0$ 、 $C_2=0.247 0$ 、 $C_3=-0.097 9$, 根据该数值计算设计方案下的功率准数 (N_p) 为 3.36。

通气条件下搅拌功率根据公式 (7)、(8)、(9)、(10) 计算, 同样取类似设计方案的 HBT+2WHd 桨叶组合方式下的结构系数, $C_1=0.519 0$ 、 $C_2=-0.132 0$ 、 $C_3=-0.076 2$ 。

通气条件下 $k_L a$ 值根据公式 (15) 计算, 同样取类似设计方案的 HBT+2WHd 桨叶组合方式下的结构系数, $C_1 \times 10^4=4.532$ 、 $C_2=0.500$ 、 $C_3=0.450$ 、 $C_4=-0.780$ 。

利用上节的经验关联式可计算设计方案的功率、混合时间和传质系数, 计算结果见表 6。

表 5 反应器结构参数

Table 5 Configuration of the 500 m³ bioreactor

Items	Designed scheme
Basic size (mm)	
Internal diameter	6 400
Height of head	1 600
Bottom shape	Ellipse
Broth volume (m ³)	319.2–425.6
Shaft radius	φ325×25
Number of impellers	3
Upper impeller	
Type	MSX (four blades)
Diameter	φ2 200
Middle impeller	
Type	MSX (four blades)
Diameter	φ2 200
Bottom impeller	
Type	BDT (eight blades)
Diameter	φ2 200
Air sparger	
Type	Distribution ring
Size	φ456×1 500
Impeller clearance	1.81D
Distance between the bottom impeller and the tank bottom mm	550
Heat-exchange area (m ²)	598.70
Numbers of each group coil	16
Diameter of coil	φ76
Numbers of coil group	20
Stirred speed (r/min)	100
Aeration rate (air flow rate/broth volume, min ⁻¹)	1:1–1.3

可以看出, 设计方案满足红霉素发酵的需求, $k_L a$ 大于 0.16 s⁻¹, 氧传递时间为 4.6 s < 6.25 s, 物料混合时间为 11 s。

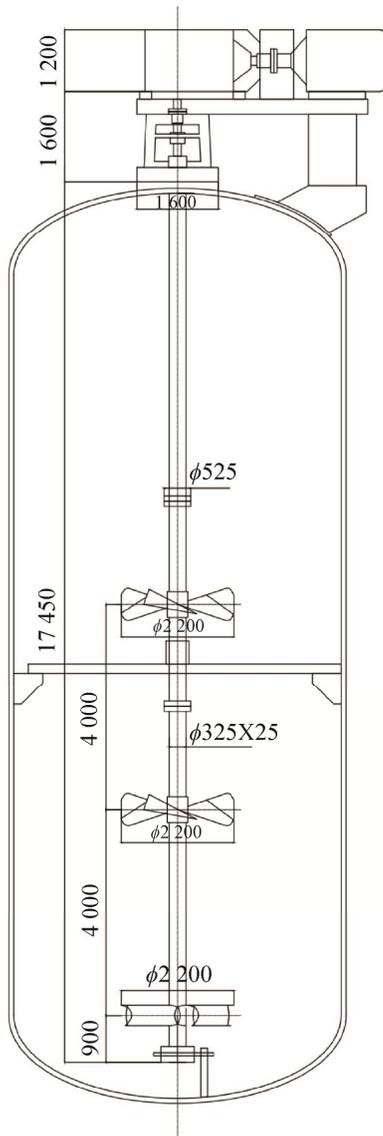


图 2 根据时间常数分析理性设计的反应器基本结构

Figure 2 Designed bioreactor based on time constant analysis.

2.4 500 m³ 反应器设计方案的 CFD 模拟验证

利用计算流体力学方法 (CFD) 对上述设计的 500 m³ 发酵罐的流场混合和传质特性进行了模拟, 获取了对设计的搅拌结构下的流场特性进行了验证, 结果见图 3、图 4 及表 7。

2.4.1 速度场对比分析

从速度矢量图和速度云图来看, 该反应器

表 6 利用经验关联式计算设计方案下的工程参数
Table 6 Engineering parameters calculated based on empirical formula

Item	Designed scheme
V_S (m/s)	0.207
N_p	3.360
P (kW) without aeration	801
P_G (kW) with aeration	777
P_G/V (kW/m ³)	1.830
z_{95} (s) (calculated with data obtained from HBT+2WHd model)	11
$k_L a$ (s ⁻¹)	0.219
t_{mt} (s)	4.600

在底部均形成了较好的径向流场, 而在上部形成较明显的轴向流场, 流型稳定, 底层几乎无气泛。

2.4.2 能量散耗率和气含率分析

从能量耗散率分布来看 (图 4A), 该反应器的能量耗散率较大的区域集中在空气入口和桨叶附近, 而在桨叶排出区形成的能量耗散率最高, 与理论一致。从气含率分布来看 (图 4B), 该反应器搅拌气体分散效果较好, 气体从分布器进入底层搅拌后被迅速分散, 反应器内整体气体分散比较均匀。

2.4.3 工程参数分析

模拟得到的工程参数结果表明: 对于气液传质能力, 设计方案下反应器搅拌组合能提供最大传质系数 $k_L a = 0.1917 \text{ s}^{-1}$, 氧传递时间常数为 5.22 s, 与前面采用关联经验式计算结果接近, 均小于 6.25 s, 能提供发酵过程的最大耗氧需求, 在每升发酵液的通气速率为 1.3 L/min 和最高转速为 100 r/min 时, 流型稳定, 气体分散良好, 且模拟得到的通气条件下的搅拌功率及体积氧传递系数与采用经验关联公式计算得到的结果相近, 传质性能满足设计要求。

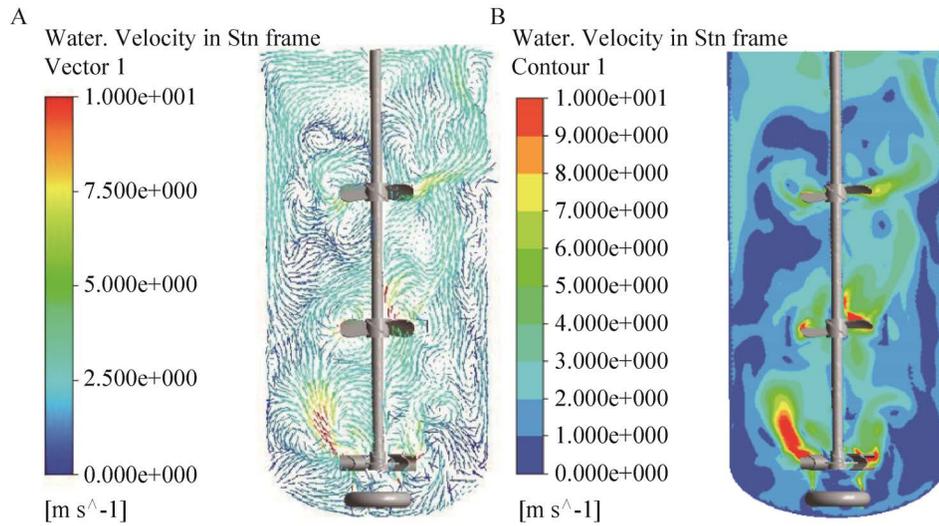


图 3 速度矢量图 (A) 及云图 (B)

Figure 3 Contour plot of vector (A) and flow velocity (B).

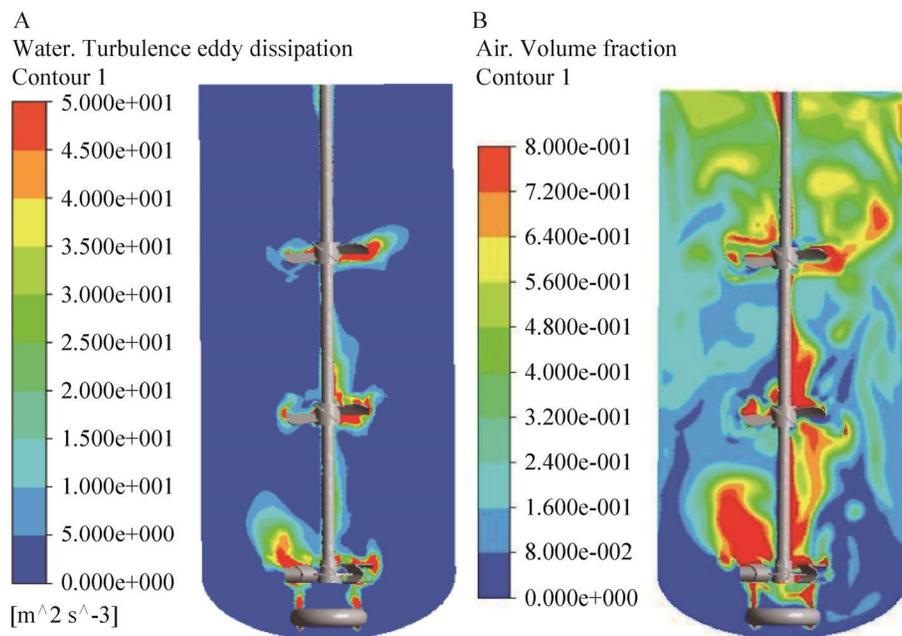


图 4 能量散耗率图 (A) 及气含率分布图 (B)

Figure 4 Contour plot of energy dissipation rates (A) and gas hold-up (B).

2.4.4 500 m³ 反应器上工艺验证结果

在 50 L 小试反应器、5 000 L 中试反应器和本设计的 500 m³ 反应器上进行红霉素发酵培养, 检测发酵过程中 DO、OUR 参数及最终有效组分 ERY-A, 结果见图 5 及表 8。

图 5 表明在 500 m³ 反应器上红霉素 OUR 最高达到 46.8 mmol/(L·h), 全程发酵转速在 100 r/min 以下, 溶氧控制在 25% 以上。这说明反应器供氧能满足微生物发酵代谢需求, 反应器达到设计目标; 同时与 50 L 及 5 000 L 发酵罐上

红霉素代谢曲线 OUR 及过程溶解氧 DO 对比, 50 L 及 5 000 L 反应器上基本相同。表明在 500 m³ 500 m³ 反应器上红霉素发酵 OUR 整体趋势与 反应器上, 红霉素菌体细胞能较好地生长代谢。

表 7 利用 CFD 模拟计算该方案下的反应器工程参数

Table 7 Engineering parameters calculated by CFD simulation

Item	Designed scheme
Gas hold up	0.242
Energy dissipation rate TED (m ² /s ³)	2.720
P/V (kW/m ³)	Calculated by TED
	2.720
	Calculated by torque
	2.260
Bubble size (mm)	32.000
a (m ² /m ³)	55.130
k_L (m/h)	12.518
$k_L a$ (s ⁻¹)	0.191 7

TED is the turbulent energy dissipation rate, which is used to evaluate the shear force.

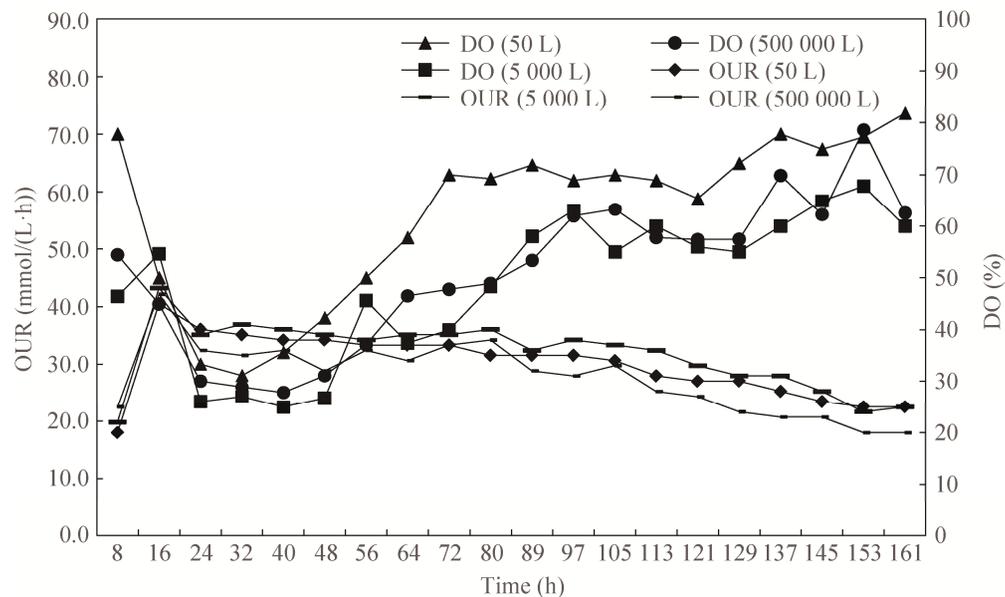


图 5 不同规模反应器中红霉素发酵过程 OUR 和 RQ 曲线

Figure 5 Time course of OUR and RQ during entire fermentation process in different scale bioreactors.

表 8 不同反应器规模下红霉素效价及组分

Table 8 Erythromycin components produced by *S. erythraea* grown in different scale bioreactors

Scale (L)	Titer ($\mu\text{g/mL}$)	Erythromycin A ($\mu\text{g/mL}$)	Erythromycin B ($\mu\text{g/mL}$)	Erythromycin C ($\mu\text{g/mL}$)
50	9 538	7 251	294	530
5 000	9 435	7 189	285	512
500 000	9 505	7 222	313	469

表 8 表明, 500 m³ 反应器上红霉素发酵最终有效组分及化学效价与 50 L 小试规模及 5 000 L 中试规模发酵结果相当, 进一步验证所设计的 500 m³ 反应器满足红霉素高效发酵要求。

3 讨论

红霉素属于典型的高耗氧型次级代谢发酵产物, 本文对其发酵影响的关键参数进行研究, 然后采用时间常数法进行 500 m³ 巨型反应器设计, 结果表明设计的反应器发酵达到了放大的效果。

在小试规模 50 L 发酵研究表明红霉素发酵可分为初级代谢阶段 (0–约 40 h) 及次级代谢阶段 (40 h–发酵结束), 因此红霉素发酵前期 0–40 h 为其最大耗氧阶段 (图 1), 此阶段氧的供应是影响红霉素发酵效率的关键因素^[12] (表 1)。本文通过获取的发酵过程生理参数 OUR 表明其前期最大 OUR 为 40–60 mmol/(L·h), 与前人研究结论一致^[12], 同时此阶段最低溶解氧浓度 (DO) 需控制在 25% 以上, 据此计算其“氧消耗”时间常数, 然后通过理性设计 500 m³ 的反应器并进行 CFD 模拟验证并进行实际发酵生产验证, 结果表明设计的 500 m³ 反应器满足红霉素发酵要求。另外, 在好氧微生物发酵的初级阶段, 影响初级代谢的因素除了氧的供应外, 底物的供应也可能存在限制进而影响微生物的生理代谢, 因此红霉素的反应器设计也可以在满足氧传递需求的基础上结合底物传递需求进一步优化。

传统的反应器经典放大方法如“因次分析法”或“经验法则法”无法从微生物的生理代谢出发分析其对反应器的要求, 只是简单单一参数的放大延伸, 如依据“经验法则法”设计的红霉素 375 m³ 反应器^[13]经模拟测定其 $k_L a$ 为 0.114 s⁻¹, 氧传递时间常数 t_{mt} 大于 6.25 s,

设备的供氧并不能满足发酵条件正常波动情况下最低 25% 溶解氧的供应, 也即无法满足放大后红霉素高效发酵对氧的需求, 本文设计的反应器在规模大幅提高的情况下, 氧传递的时间常数却更小从而满足红霉素发酵的需求; 另一方面, 与目前红霉素发酵先进方法比较^[14], 本文设计的 500 m³ 反应器罐内的气含率分布更为均匀及充分, 在整个罐内不存在明显的不均匀区, 而前人设计^[14] 的反应器存在罐内气体分布不均匀的问题, 表现为整个罐内的气含率分布在底层浆以上均较为充分, 而罐底则相对匮乏, 有迟滞区存在, 有可能对细胞生理代谢产生影响。因此, 本时间常数法是一种有效的巨型发酵罐放大方法, 可为巨型发酵罐设计提供借鉴作用。

4 结论

本文通过研究红霉素细胞代谢生理特征参数的特性, 发现发酵前期氧供应能力是影响红霉素产素的关键因素, 因此将反应器的氧传递能力作为反应器放大设计的关键考虑因素。

(1) 根据时间常数分析法和工程设计理论计算了红霉素发酵过程氧传递时间常数, 并据此进行了 500 m³ 大型反应器几何尺寸、搅拌系统和换热系统进行理性设计。(2) 通过 CFD 方法获取反应器内的各项工程参数并进行分析验证比较, 确认设计方案满足红霉素发酵放大要求, 通过分别在 50 L 小试规模、5 000 L 中试规模和 500 m³ 反应器上红霉素发酵验证了所设计的反应器满足红霉素发酵要求。由此可见, 基于时间常数分析法分析生物反应关键限速因素, 结合反应器理性设计及计算流体力学 (CFD) 验证方法可实现生物发酵的理性放大设计, 该方法可以广泛应用于各种生物发酵类型的反应器放大设计中。

REFERENCES

- [1] Lara AR, Galindo E, Ramírez OT, et al. Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells. *Mol Biotechnol*, 2006, 34(3): 355-382.
- [2] 范代娣, 陈斌, 尚龙安, 等. 红霉素发酵工艺优化研究. *生物工程学报*, 1999, 15(1): 104-108.
Fan DD, Chen B, Shang LA, et al. The improvement of fermentation technical parameters for the erythromycin formation. *Chin J Biotech*, 1999, 15(1): 104-108 (in Chinese).
- [3] 戚以政, 汪叔雄. *生物反应动力学与反应器*. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2007: 292.
Qi YZ, Wang SX. *Biological reaction kinetics and reactors*. 3rd Ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2007: 292. (in Chinese).
- [4] 谢明辉. 多层搅拌式生物反应器内溶液流变性质对流场特性影响的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013.
Xie MH. Study of the effect of the rheology properties on flow fields in stirred bioreactors with multiple impellers [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese).
- [5] Fújasová M, Linek V, Moucha T. Mass transfer correlations for multiple-impeller gas-liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local” $k_L a$ values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chem Eng Sci*, 2007, 62(6): 1650-1669.
- [6] 环境保护部环境工程评估中心. 环境影响评价技术导则与标准. 北京: 中国环境科学出版社, 2016: 96-97.
Environmental engineering assessment center of the Ministry of ecology and environment. *Technical Guidelines for Environmental Impact Assessment*. Beijing: China Environmental Science Press, 2016: 96-97 (in Chinese).
- [7] Garcia-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(2): 153-176.
- [8] 张庆华, 毛在砂, 杨超, 等. 搅拌反应器中液相混合时间研究进展. *化工进展*, 2008, 27(10): 1544-1550.
Zhang QH, Mao ZS, Yang C, et al. Research progress of liquid-phase mixing time in stirred tanks. *Chem Ind Eng Prog*, 2008, 27(10): 1544-1550 (in Chinese).
- [9] 程荡, 程景才, 雍玉梅, 等. 多相搅拌槽内宏观混合研究进展. *化学工程*, 2011, 39(6): 59-64.
Cheng D, Cheng JC, Yong YM, et al. Research progress of macromixing in multiphase stirred vessels. *Chem Eng China*, 2011, 39(6): 59-64 (in Chinese).
- [10] Pan A, Xie MH, Li C, et al. CFD simulation of average and local gas-liquid flow properties in stirred tank reactors with multiple rushton impellers. *J Chem Eng Japan / JCEJ*, 2017, 50(12): 878-891.
- [11] Li C, Tian JT, Wang WF, et al. Numerical and experimental assessment of a miniature bioreactor equipped with a mechanical agitator and non-invasive biosensors. *J Chem Technol Biotechnol*, 2019, 94(8): 2671-2683.
- [12] 庄英萍, 储炬, 张嗣良, 等. 红霉素发酵过程前期参数相关分析及调控. *华东理工大学学报*, 2004, 30(6): 636-639.
Zhuang YP, Chu J, Zhang SL, et al. Parameter correlation analysis and optimization of process in the early period of erythromycin fermentation. *J East China Univ Sci Technol*, 2004, 30(6): 636-639 (in Chinese).
- [13] 李军庆, 蔡子金, 张庆文, 等. CFD 技术用于红霉素发酵罐搅拌系统的设计. *南京工业大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(2): 123-128.
Li JQ, Cai ZJ, Zhang QW, et al. Stirred system design for erythromycin fermentor by CFD. *J Nanjing Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2014, 36(2): 123-128 (in Chinese).
- [14] 邹祥. 基于氮调控的红霉素发酵过程优化与放大规律研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2009.
Zou X. Process optimization and scale-up of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* based on nitrogen regulation[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2009 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)