

生物工程基础

第四章 生物反应器的操作特性

连续操作

- 连续操作的分类特点
- 单级恒化器法连续操作
- 多级连续操作

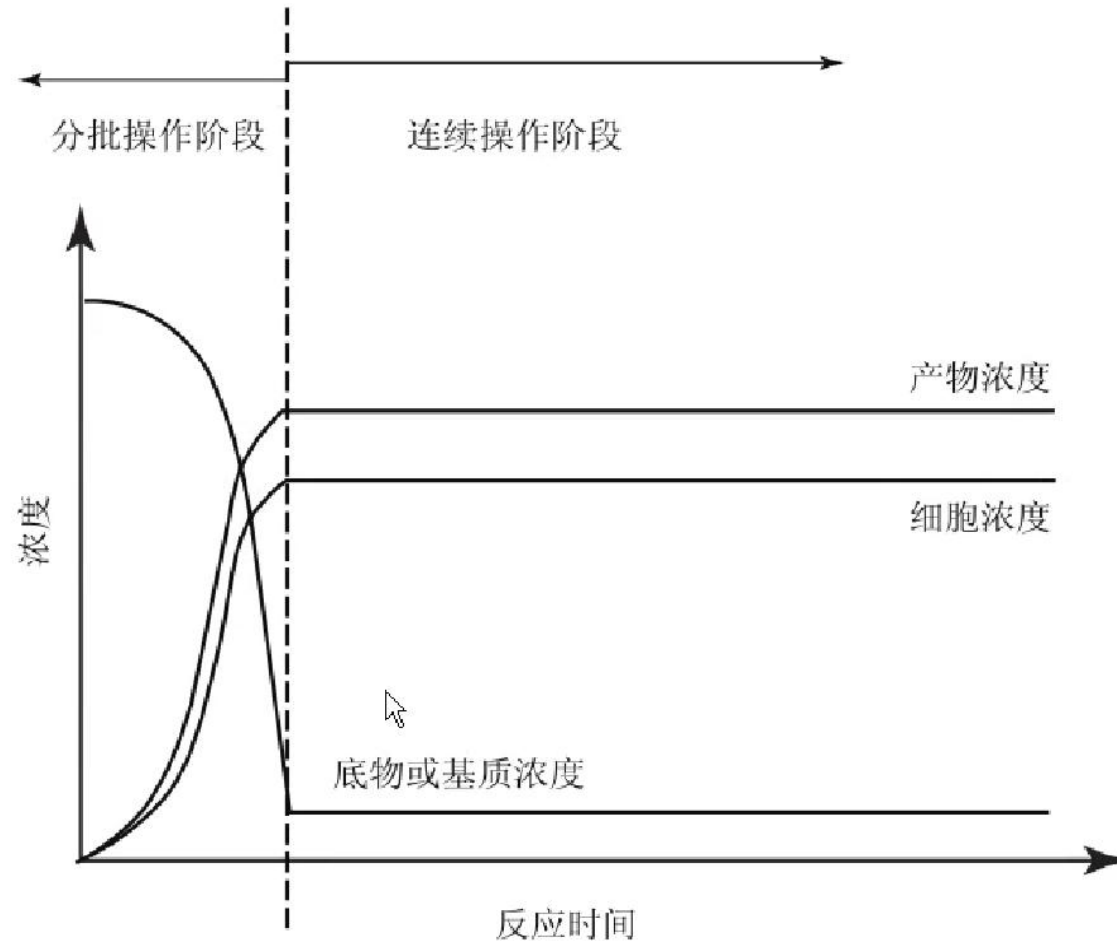
学习目的：了解连续操作基本目的，掌握连续操作基本方法。

连续操作

- 采用连续操作的反应器叫做连续式反应器。原料连续输入反应器，反应产物则连续地从反应器中流出。反应器内任何部位的物系组成均不随时间而变，故连续操作反应器多属于稳态操作。具有如下特点：反应速度容易控制；可提高生产率；产品质量稳定、劳动强度低、生产率高等。
- 可以对微生物施加一个特定的强制力(比生长速率、温度、pH或培养基组成)来提供特殊的生长条件，从而筛选出所需的微生物。
- 各过程变量可以独立改变，故特别适用于研究微生物的生理特性，使细胞的某些生化活性组份增加或减少。
- 染菌和微生物突变的风险大。

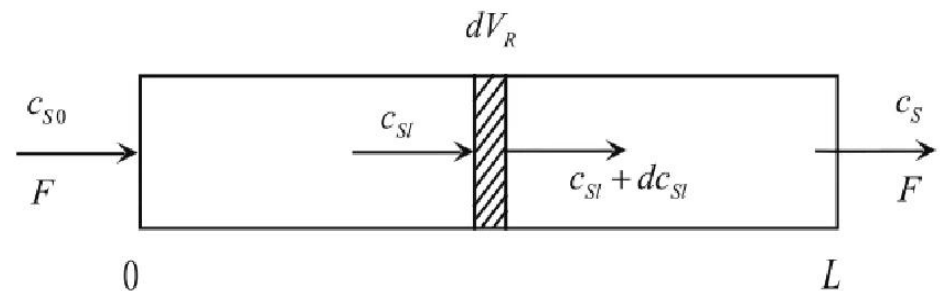
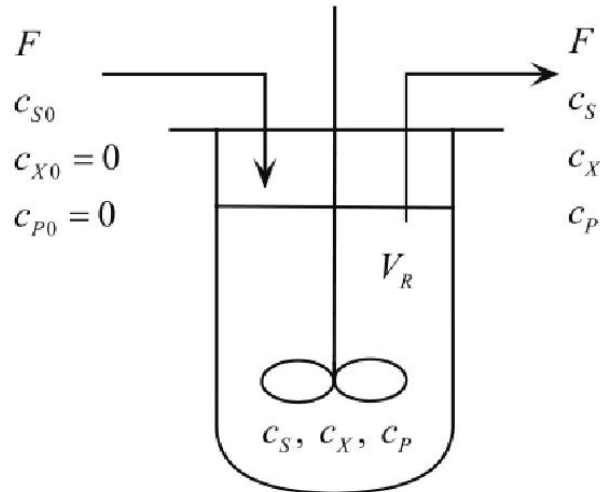
只适用于生产能力大，微生物变异小，酶活稳定，产品需连续处理的工业体系。仅限用于纯培养要求不高的情况。

连续操作反应器中组分浓度变化



连续操作的分类及特点

连续操作有两大类: **CSTR** (Continuous stirred tank reactor)
CPFR (Continuous plug flow reactor)



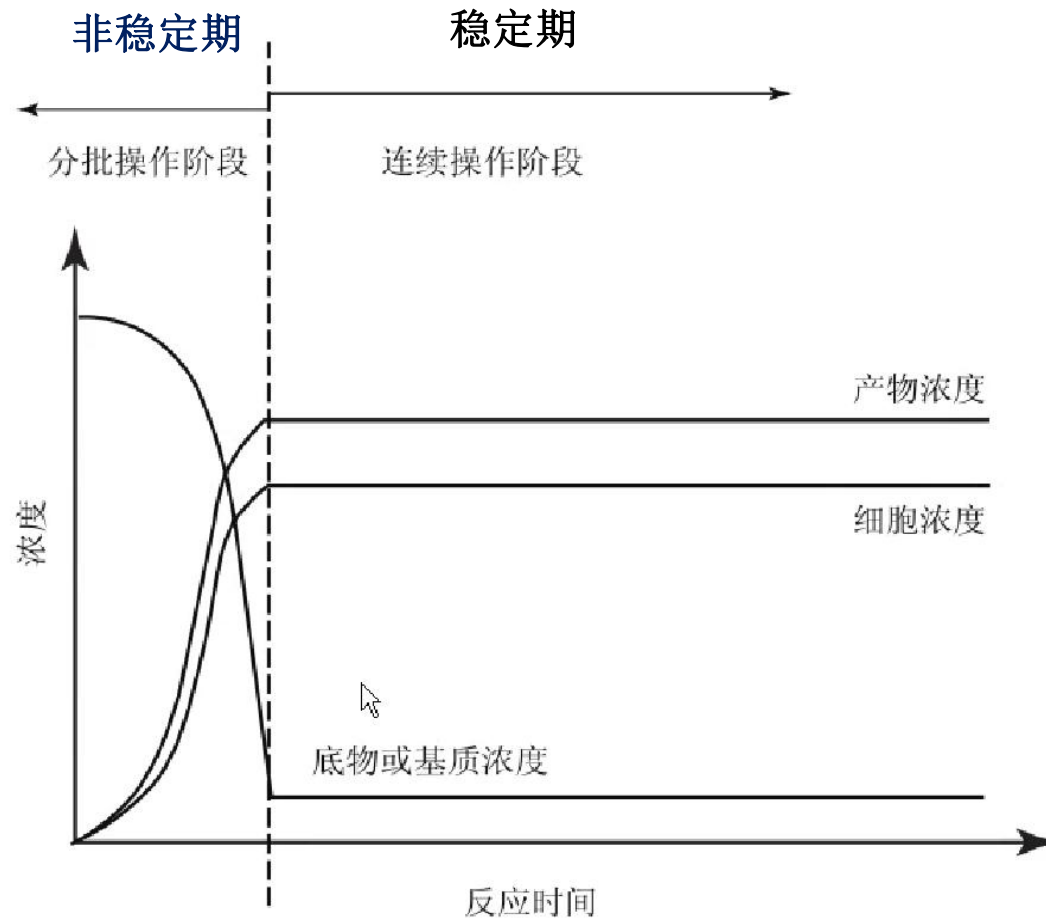
连续操作的特点

	优点	缺点
设备方面	易机械化、自动化	设备投资高，同一套设备无法生产多种产品
操作方面	易于管理，能够缩短生产总周期，减少操作带来的污染	要求相关的工作连续化
生产能力方面	有利于减少能耗，节约劳动力，中间或终产物质量稳定。	得率或产物浓度低于分批操作，易污染，易突变。
生物方面	是分析微生物生理、生态及反应机理的好助手。	可能出现杂菌污染或菌种变异，环境因素使生物反应复杂化。

连续操作的特点

- 在**CSTR**中，只要反应器中有一定**含量的菌体**，在一定的进料范围内，可以实现**稳态操作**；
- 但在平推**流CPFR**反应器中，若流入物料中**不含有微生物**，就不能实现连续操作。
- 因此，**微生物纯培养**的连续操作主要采用**CSTR**，而**平推流**反应器**CPFR**不能在培养微生物中单独使用，必须与其它型式的反应器**串联**使用。

连续操作的特点



连续操作的分类

- **恒化器**：设定培养液体积 V_R 为定值，通过检测培养液体积对设定值的偏差，改变加料速率 F 以使培养液体积 V_R 不变。
- **恒浊器**：在反应器体积 V_R 一定时，通过测量反应器中的细胞浓度 C_x ，调节加料速率 F ，控制细胞浓度在设定值。
- **恒pH法**：将葡萄糖等生理酸性物质与控制pH的酸或碱溶液分开加料。测量培养液中的pH，用反馈控制方式调节生理酸性物质的加料速率 F ，使pH保持恒定。
- **恒定产物浓度法**：通过测量培养液中产物浓度，用反馈控制方式调节加料速率 F ，使产物浓度保持定值。
- 由于控制简单，实际应用中**恒化器**占大多数。

连续操作的控制方式

恒化器方式较适用于**底物浓度较低**的情况。原因是当底物浓度较低时，对它的数值难以精确测量，且 F 改变时， C_x 对其响应不明显，但是当 **D 值较小**时， C_s 与 D 基本呈**线性关系**，通过改变 F 或 D ，可以**控制 C_s 恒定**。

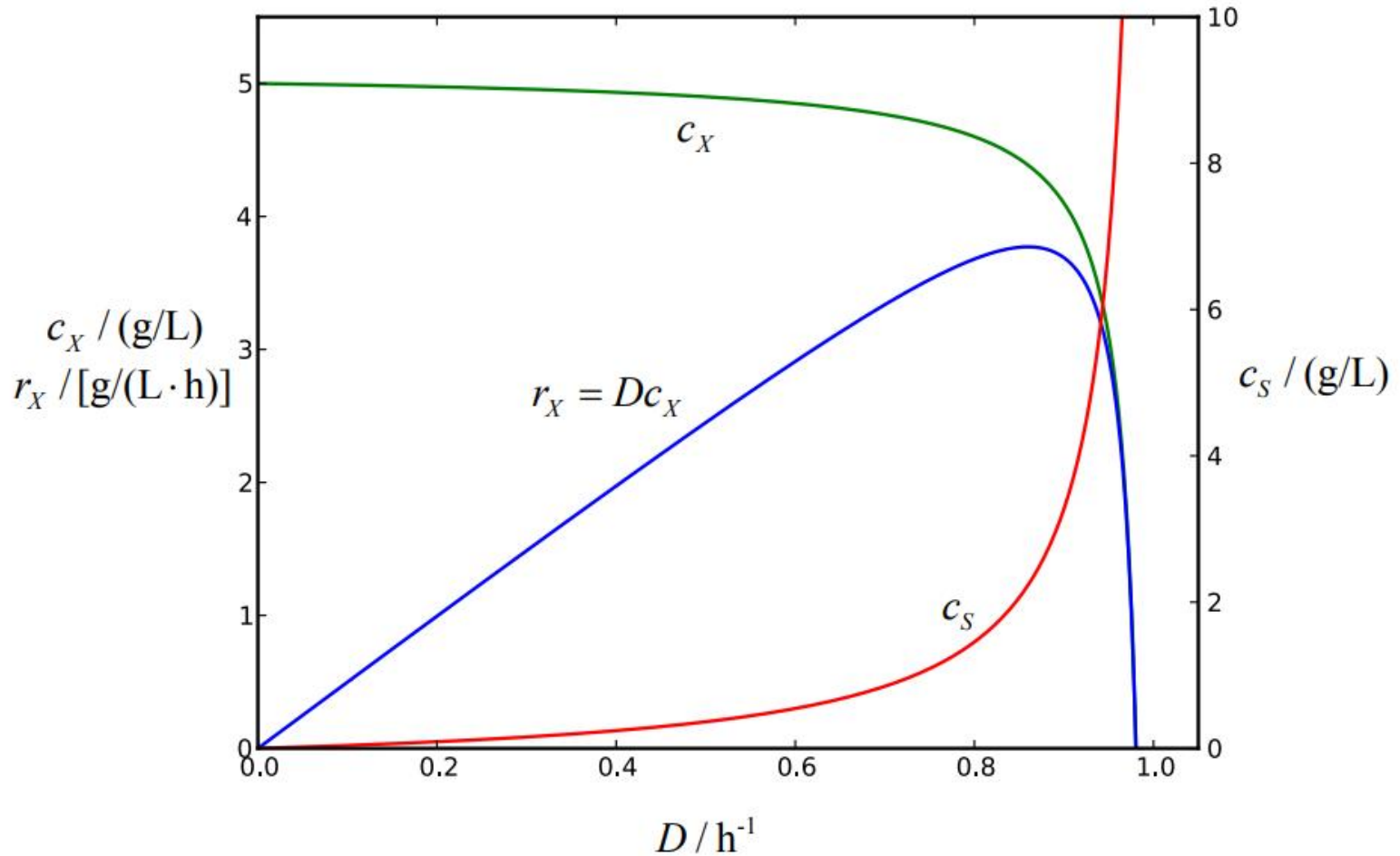
在 **D 值较高**时，特别是在**临界稀释率 D_c** 附近时，底物浓度快速上升，细胞浓度快速下降，此时**恒浊器**适用。 **D 的较小改变可引起 C_x 的较大改变**。

由于质子的生成与细胞密度相关，产物浓度受稀释率影响较大，因此在 **D_c 附近**，**恒pH法和恒定产物浓度法**较为适用。

恒化器的控制较为**简单**，不依靠任何反馈控制机构。

而对**恒浊器**，**恒pH法和恒定产物浓度法**，需要通过传感器作参数检测以控制加料，需要**配置反馈控制机构**，它们都属于**反馈控制**方式的类型。反馈控制方式还可以通过测定溶氧浓度，排气中 CO_2 含量等参数来实现。

单级CSTR中连续培养基本模型

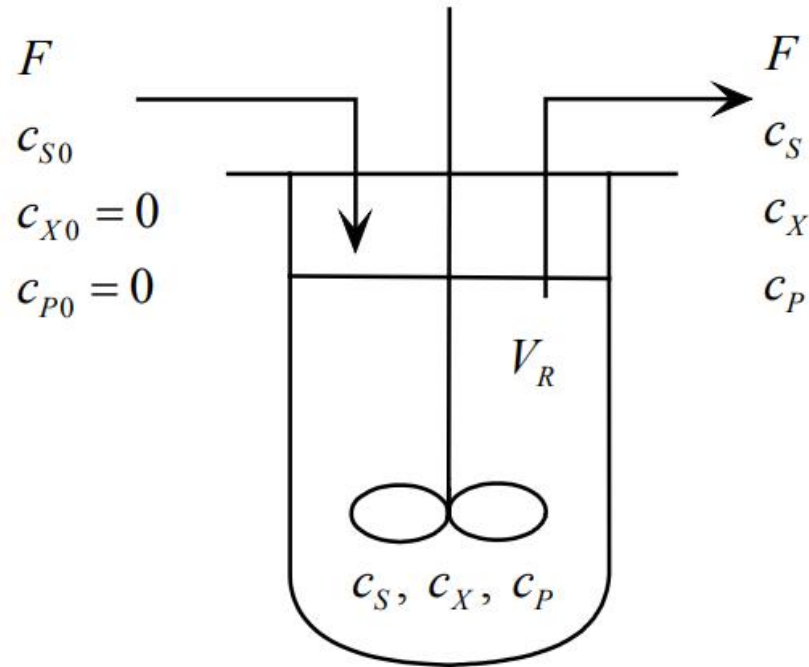


CSTR连续培养的操作特性

单级CSTR中的连续培养

单级CSTR培养体系中，流入液体中仅有一种成分为微生物生长的限制性因子，其它成分在不发生抑制的条件下不充分存在。

基本模型



单级CSTR中连续培养基本模型

影响操作特性的主要变量：

- 稀释率 D
- 加料中限制性底物浓度 C_{S0} 和培养基组成
- 培养条件 (μ_{\max} , K_S , Y_{XS})

单级CSTR中连续培养基本模型

状态参数

生物量作衡算: $V_R \frac{dC_X}{dt} = F(C_{X0} - C_X) + \mu C_X V_R = 0, C_{X0} = 0$

$$D = \frac{F}{V_R}$$

整理得: $\mu = D$

假设符合Monod方程: $\mu = \mu_{max} \frac{C_S}{K_S + C_S}$

$$C_S = \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}$$

$$C_S = f(K_S, \mu_{max}, D)$$

单级CSTR中连续培养基本模型

由Cs推导下式: $C_X = C_{X0} + Y_{XS}(C_{S0} - C_S), C_{X0} = 0$

则:
$$C_X = Y_{XS}\left(C_{S0} - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right)$$

由
$$C_P = C_{P0} + Y_{PS}(C_{S0} - C_S), C_{P0} = 0$$

$$C_P = Y_{PS}\left(C_{S0} - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right)$$

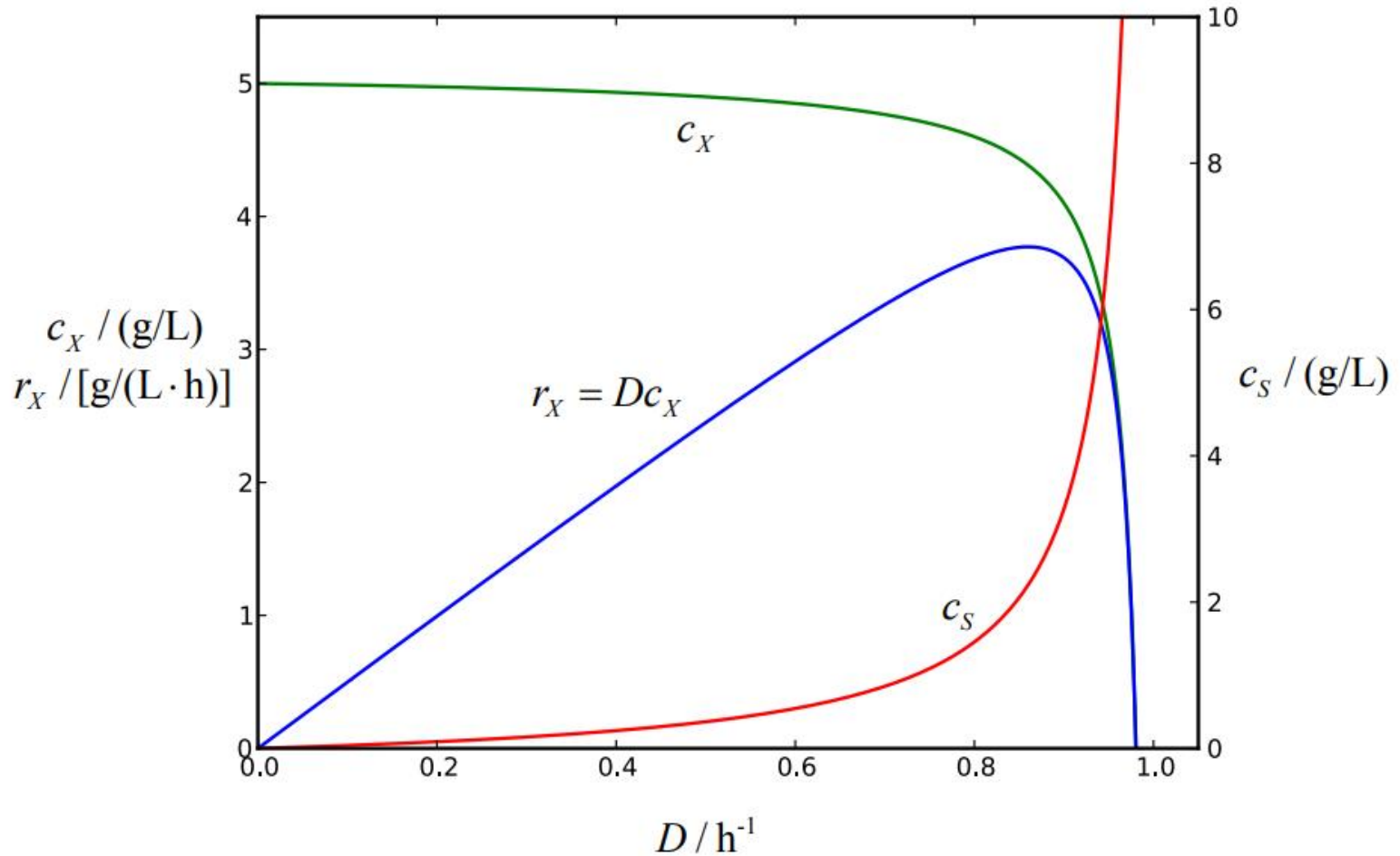
单位时间单位反应器的细胞产率:

$$r_X = \mu C_X = D C_X = Y_{XS} D \left(C_{S0} - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right)$$

$$C_X, C_P, r_X = f(Y, \mu_{max}, K_S, D, C_{S0})$$

当 $\left(C_{S0} - \frac{K_S D}{\mu_{max} - D}\right) > 0$ 时, C_X, C_P, r_X 随 C_{S0} 增大而增大。

单级CSTR中连续培养基本模型



CSTR连续培养的操作特性

单级CSTR中连续培养基本模型

稀释率的影响

临界稀释率 D_c : 在加料速率达到一定值后，反应器中培养基全部被加料中的新鲜培养基置换，达到“洗出状态”。

此时， $C_S = C_{S0}, C_X = 0$

$$D_c = \mu_{max} \frac{C_{S0}}{K_S + C_{S0}}$$

最佳稀释率: D_{opt} : 细胞产率达到最大时的稀释率。

单级CSTR中连续培养基本模型

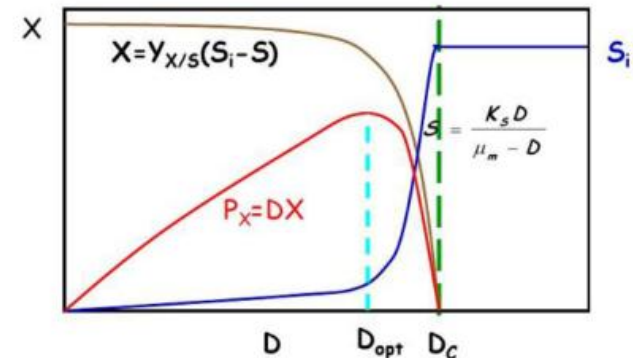
$$\frac{dr_x}{dD} = 0$$

$$D_{opt} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{K_S + C_{S0}}} \right)$$

$$C_{X,opt} = Y_{XS} [C_{S0} + K_S - \sqrt{K_S(K_S + C_{S0})}]$$

$$r_{X,max} = D_{opt} C_{X,opt} = Y_{XS} \mu_{max} (\sqrt{K_S + C_{S0}} - \sqrt{K_S})^2$$

$$D_C, C_{X,opt}, r_{X,max} \sim f(C_{S0})$$



单级CSTR中连续培养基本模型

加料中底物浓度的影响

加料中的底物浓度 C_{S0} 既影响上述各种参数，也影响最优稀释率下的各个性能参数。Lenvenspie 给出了一种算法，概括出这些关系。

$$\begin{aligned}N &= \sqrt{1 + \frac{C_{S0}}{K_S}} \\D_C &= \mu_{max} \frac{N^2 - 1}{N^2} \\D_{OPT} &= \mu_{max} \frac{N - 1}{N} \\C_{X,OPT} &= Y_{XS} C_{S0} \frac{N}{N + 1} \\C_{S,OPT} &= C_{S0} \frac{1}{N + 1} \\r_{X,max} &= Y_{XS} \mu_{max} C_{S0} \frac{N - 1}{N + 1}\end{aligned}$$

单级CSTR中连续培养基本模型

对于反应组分或者产物而言，其物料平衡关系为：

变化速率=输入速率-输出速率+生成速率

对于细胞做质量衡算：

细胞质量增加速率=加入细胞速率-流出细胞速率+细胞生长速率-细胞死亡速率

$$\text{活细胞: } \frac{d(V_R c_X)}{dt} = V_R r_X - V_R r_d + F_{in} c_{X_0} - F_{out} c_X$$

$$\text{非活细胞: } \frac{d(V_R c_{X_d})}{dt} = V_R r_d + F_{in} c_{X_{d0}} - F_{out} c_{X_d}$$

$$\text{产物: } \frac{d(V_R c_P)}{dt} = V_R r_P + F_{in} c_{P_0} - F_{out} c_P$$

$$\text{底物: } \frac{d(V_R c_S)}{dt} = -V_R (r_{SX} + r_{Sm} + r_{SP}) + F_{in} c_{S_0} - F_{out} c_S$$

$$\text{总体积: } \frac{dV_R}{dt} = F_{in} - F_{out}$$

单级CSTR中连续培养基本模型

连续培养在稳态下操作，体积为常数， $F_{\text{in}}=F_{\text{out}}=F$ ， $D=F/V$ ，

操作方程简化为

$$\text{活细胞: } \frac{dc_X}{dt} = r_X - r_d + D(c_{X_0} - c_X) = 0$$

$$\text{非活细胞: } \frac{dc_{X_d}}{dt} = r_d + D(c_{X_{d0}} - c_{X_d}) = 0$$

$$\text{产物: } \frac{dc_P}{dt} = \alpha r_X + \beta c_X + D(c_{P_0} - c_P) = 0$$

$$\text{底物: } \frac{dc_S}{dt} = -\left(\frac{r_X}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha r_X + \beta c_X}{Y_{P/S}} + mc_X\right) + D(c_{S_0} - c_S) = 0$$

$$\text{总体积: } \frac{dV_R}{dt} = 0$$

单级CSTR中连续培养基本变量

$$c_S = \frac{K_S(D + k_d)}{\mu_m - (D + k_d)}$$

$$c_X = \frac{D(c_{S0} - c_S)}{(D + k_d)/Y_{X/S} + m + [\alpha(D + k_d) + \beta]/Y_{P/S}}$$

$$c_{Xd} = \frac{k_d c_X}{D}$$

$$c_P = \frac{[\alpha(D + k_d) + \beta]c_X}{D}$$

由此，便建立了**操作变量**与**状态变量**之间的对应关系式。

只要给出操作条件，便知连续培养能够达到的状态。

基于单级CSTR的连续培养优化设计

设计型优化目标函数：细胞产率 $r_X = \mu C_X$

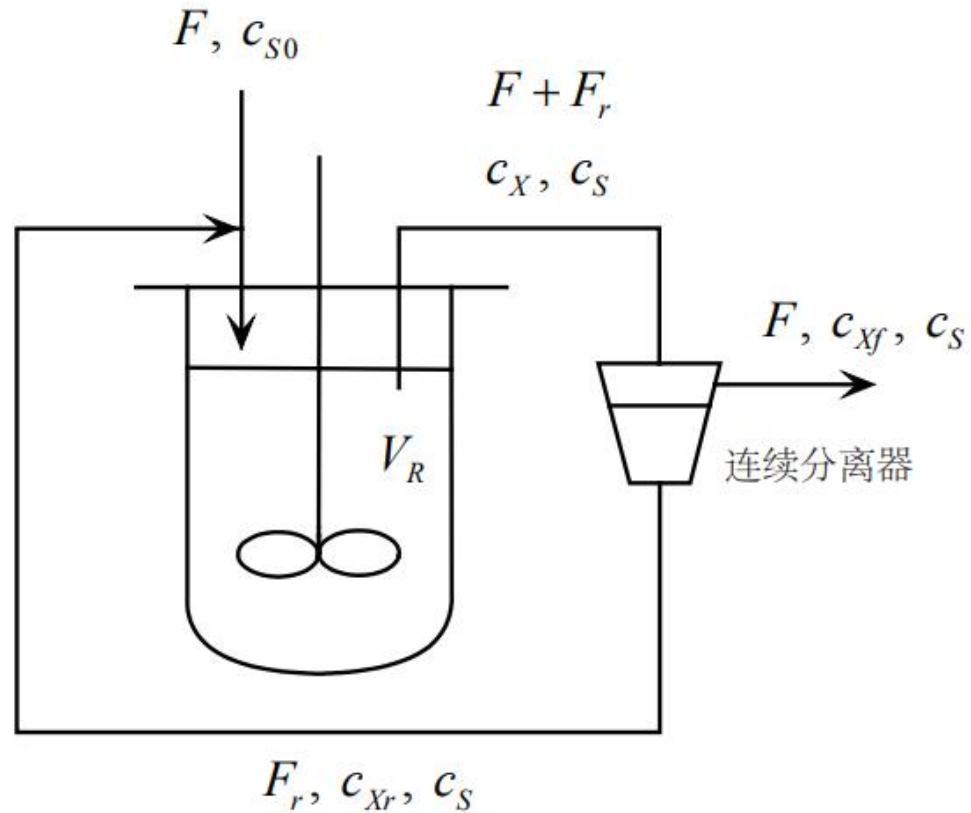
- 增大反应器系统的**平均细胞浓度水平**。对于单级CSTR采用带**浓缩细胞回流**CSTR反应器的设计，利用自催化特性。

缺点：平均营养物水平较比较低。

- 增大**平均比生长速率水平**，即增大**平均营养物浓度水平**，采用**多级CSTR串联系统**。

缺点：串级条件下，**返混小**，不利于细胞生长的**自催化特性**。

浓缩细胞回流的循环式CSTR



CSTR与离心或沉降组合的细胞循环

浓缩细胞回流的循环式CSTR

对于CSTR与离心或沉降组合的细胞循环系统，

- 定义物料循环比: $R = \frac{F_r}{F}$
- 细胞浓缩比: $\beta = \frac{C_{Xr}}{C_X} > 1$

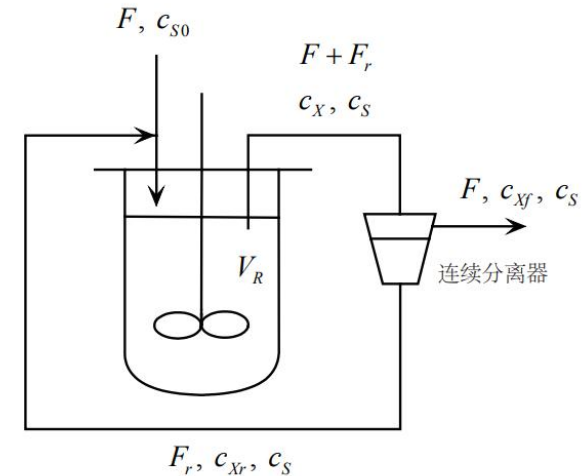
因为, $C_{X0} = 0, F_R = RF, \frac{F}{V_R} = D, C_{Xr} = \beta C_X$

对CSTR作对细胞的质量衡算。

$$FC_{X0} + F_r C_{Xr} + \mu C_X V_R = (F + F_r) C_X$$

$$\text{整理得: } D = \frac{\mu}{1+R-R\beta} = \frac{\mu}{W}, W < 1$$

循环式CSTR: $D > \mu$



CSTR与离心或沉降组合的细胞循环

浓缩细胞回流的循环式CSTR

对底物作质量衡算，可求得：

$$C_X = \frac{Y_{XS}}{W} \left(C_{S0} - \frac{K_S W D}{\mu_{max} - W D} \right)$$

$$C_S = \frac{K_S W D}{\mu_{max} - W D}$$

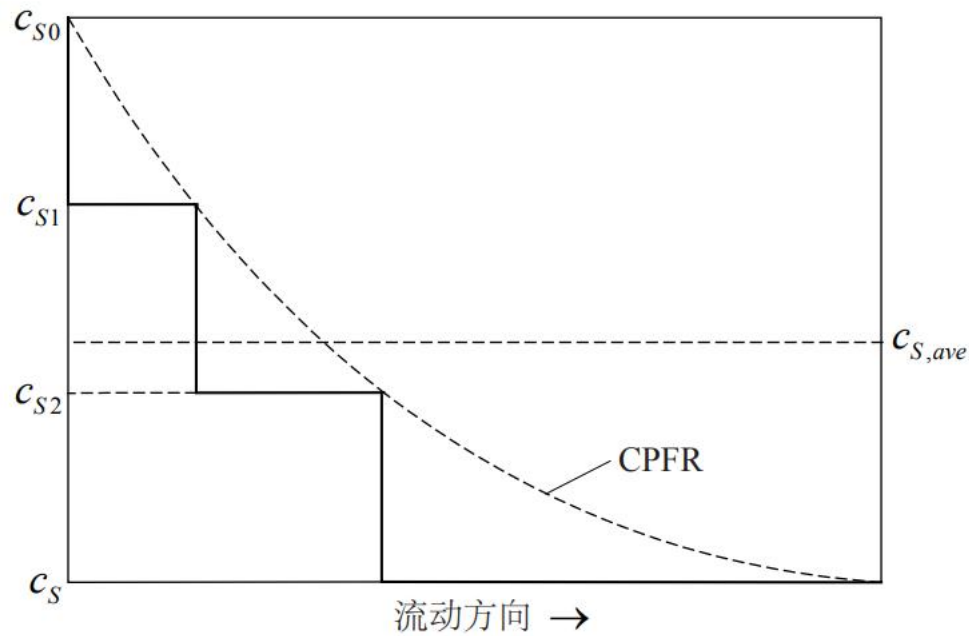
$$D_{Cr} = \frac{1}{W} \frac{\mu_{max} C_{S0}}{K_S + C_{S0}}$$

$$D_{Cr} = \frac{1}{W} D_C$$

$$D_{Cr} > D_C$$

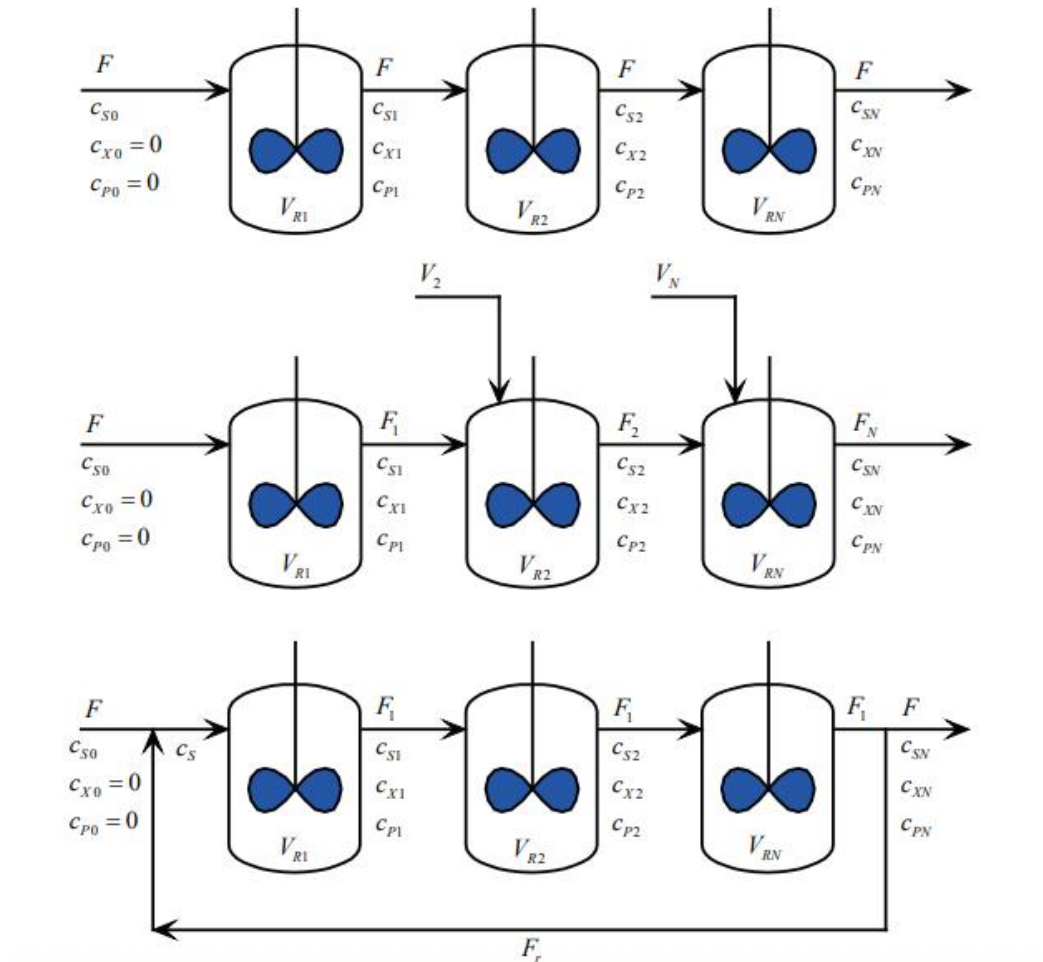
由于有浓缩细胞流的循环，**临界稀释率得以提高**，允许的**加料速率提高**。若加料速率维持不变，则所需的**反应器有效体积可减小**。

基于单级CSTR的连续培养优化设计



多级CSTR的浓度分布

多级CSTR串联



多级CSTR串联

单股两级CSTR串联系统

假定两个反应器体积相等, $V_{R1} = V_{R2} = V_R$

对第一级, 可得到与单级CSTR相同的操作特性方程。

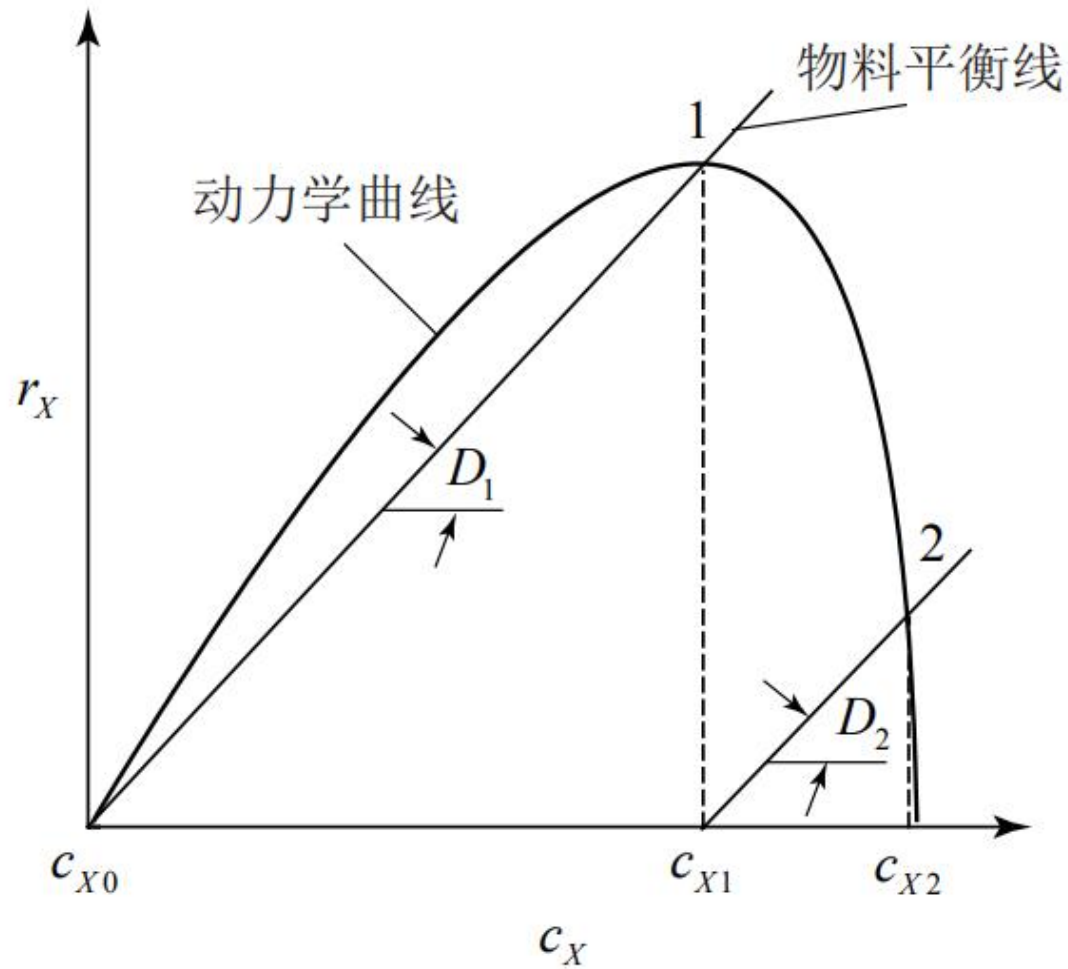
对第二级, 对细胞作质量衡算

$$V_R \frac{dC_{X2}}{dt} = FC_{X1} - FC_{X2} + \mu_2 C_{X2} V_R$$

稳态时, 可得: $\mu_2 = D \frac{C_{X2} - C_{X1}}{C_{X2}} = D(1 - \frac{C_{X1}}{C_{X2}})$, $D = \frac{F}{V_R}$

第一级的稀释率等于比生长速率: $D = \mu_1$ 。但是由于第二级的平均底物浓度小于第一级。则第二级的比生长速率小于第一级: $\mu_2 < \mu_1$ 。因此, 对于第二级: $\mu_2 < D$ 。

多级CSTR串联



NCSTR作图计算

多级CSTR串联

两级CSTR串联系统与单级CSTR的细胞产率的比较

对两级系统, $r_X = DC_{X2} = \mu_1 C_{X2}$

对单级系统, 若作设计型计算与比较, 离开它的物料中的底物浓度和细胞浓度应该为 C_{X2} 和 C_{S2} , 则:

$$r'_X = D' C_{X2} = \mu' C_{X2} = \mu_{max} \frac{C_{S2}}{K_S + C_{S2}} C_{X2} = \mu_2 C_{X2}$$

由于 $\mu_1 > \mu_2$, 所以 $r_X > r'_X$ 。

因此, 为达到相同的物料处理流量和底物转化率, 两级系统比单级系统所需的空时较小。

连续操作的酶反应

CSTR中的均相酶反应:

对于米氏方程, 由CSTR操作特性方程

$$r_{max}\tau_m = (C_{S0} - C_S) + K_m \frac{C_{S0} - C_S}{C_S}$$

$$r_{max}\tau_m = C_{S0}X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S}$$

对于一定的进料底物浓度和转化率, 影响空时的主要变量是**用酶量**。

连续操作的酶反应

CPFR中的均相酶反应

对于米氏方程，由CPFR的空时计算式，积分可得：

$$r_{max}\tau_p = (C_{S0} - C_s) + K_m \frac{C_{S0}}{C_s}$$
$$r_{max}\tau_p = C_{S0}X_s + K_m \frac{1}{1 - X_s}$$

对于一定的进料底物和转化率，影响空时的主要变量是**用酶量**。

由于全混流反应器的返混最大，反应器中的物料对进料底物浓度有稀释作用，也即返混最大。因此，对于米氏反应，**CSTR比CPFR空时要大**。

CPFR与CSTR的比较

反应器中组分浓度分布决定反应速率

A 产物抑制酶反应器的选择

平推流反应器中的平均产物浓度较低和平均底物浓度较高，有利于获得较高的反应速率。这是对此反应选择连续操作的**固定床管式反应器**的原因。

B 用酶量的比较

对于米氏反应，采用**平推流反应器**的空时较小，或反应器器体积较小，单位反应器体积的**用酶量也较小**。

CPFR与CSTR的比较

推导如下:

若F与 C_{s0} 相同, 为达到相同的转化率, 由于 $V_R = Ft$, $r_{\max} = k_2 E / V_R$, 则

$$\frac{V_{R,CSTR}}{V_{R,CPFR}} = \frac{\tau_m}{\tau_p}$$

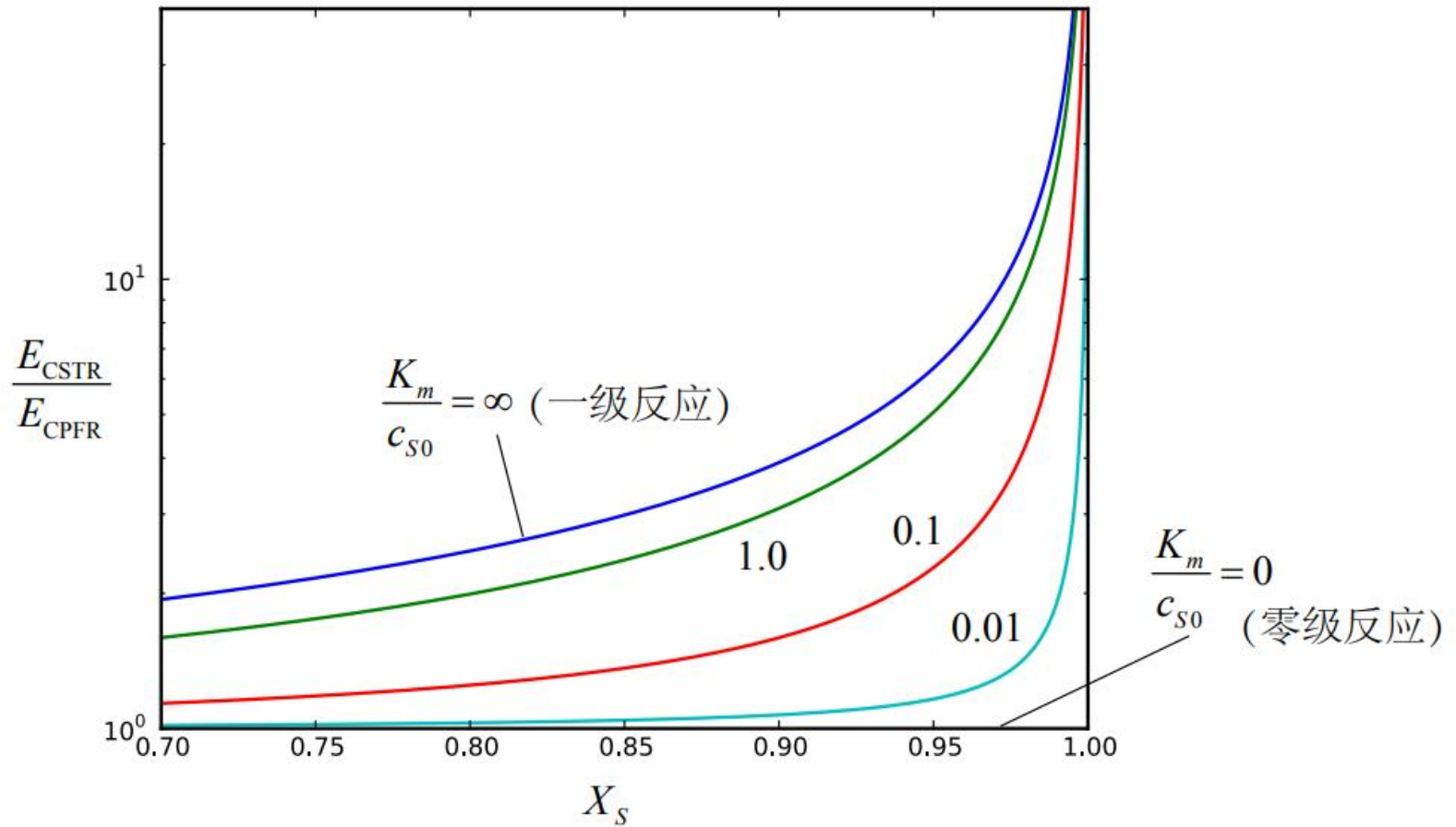
代入CSTR和CPFR操作特性方程中,

$$k_2 \frac{E_{CSTR}}{V_{R,CSTR}} \tau_m = C_{s0} X_S + K_m \frac{X_S}{1 - X_S}$$

$$k_2 \frac{E_{CPFR}}{V_{R,CPFR}} \tau_p = C_{s0} X_S + K_m \frac{1}{1 - X_S}$$

比较以上各式, 可得:
$$\frac{E_{CSTR}}{E_{CPFR}} = \frac{X_S + \frac{K_m}{C_{s0}} \frac{X_S}{1 - X_S}}{X_S + \frac{K_m}{C_{s0}} \frac{1}{1 - X_S}}$$

CSTR和CPFR用酶量的比



填充床反应器中的固定化酶反应

对于管式填充床固定化酶反应器作拟均相简化，由CPFR的操作特性方程：

$$\tau_p = -\frac{1}{1-\varepsilon_L} \int_{C_{S0}}^{C_S} \frac{dC_S}{\eta r_s} = \frac{C_{S0}}{1-\varepsilon_L} \int_0^{X_S} \frac{dX_S}{\eta r_s}$$

对米氏方程，积分得：

$$r_{max}\eta(1-\varepsilon_L)\tau_p = C_{S0}X_S + K_m \ln \frac{1}{1-X_S}$$

对于一定进料底物浓度和转化率，影响空时得主要变量是**用酶量**，与固定化酶颗粒填充密度相关得**液相体积分数**，固定化方法有关得**扩散限制因素**。

填充床反应器中的固定化酶反应

对于管式填充床反应器，在计算出空时后，若确定液体表观线速度 u (m/s)，则床层高度 H 为：

$$\tau_p = \frac{H}{u'}$$

其中 $u = \frac{F}{S}$

F : 进料的体积流量；

S : 床层的截面积；

例一：葡萄糖为限制性基质进行呼吸缺陷型酵母突变株的单级连续培养（恒化器法）。请给出存在乙醇抑制和无抑制两种情况下稀释率D与菌体浓度X、基质浓度S与产物浓度P的关系。已知原料中不含产物乙醇（ $P_{in}=0$ ），基质浓度 $S_{in}=10\text{ g/L}$ 。存在乙醇抑制的生长动力学可用下式表示：

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \frac{K_P}{K_P + P}$$

解：存在乙醇抑制时， $\mu = \frac{\mu_{\max} S_{out}}{K_S + S_{out}} \frac{K_P}{K_P + P}$

连续培养稳态下，

$$D = \mu$$

$$S_{out} = \frac{K_S D}{\frac{\mu_{\max} K_P}{K_P + P} - D}$$

$$X = Y_{X/S} (S_{in} - S_{out}) = Y_{X/S} \left(S_{in} - \frac{K_S D}{\frac{\mu_{\max} K_P}{K_P + P} - D} \right)$$

$$P = Y_{P/S} (S_{in} - S_{out}) = Y_{P/S} \left(S_{in} - \frac{K_S D}{\frac{\mu_{\max} K_P}{K_P + P} - D} \right)$$

无乙醇抑制时,

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S_{out}}{K_S + S_{out}}$$

连续培养稳态下,

$$D = \mu$$

$$S_{out} = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}$$

$$X = Y_{X/S} \left(S_{in} - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right)$$

$$P = Y_{P/S} \left(S_{in} - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right)$$

例二：求青霉素连续发酵的稳定状态下最大菌体生成速率 $(DX)_{\max}$ 及此时的稀释率 D_{\max} ，菌体浓度 X 和基质浓度 S_{out} 。已知 $S_{\text{in}} = 30 \text{ g/L}$ ， $Y_{x/s} = 0.45$ ，菌体生长可用 Monod 方程表达， $\mu_{\max} = 0.18 \text{ h}^{-1}$ ， $K_s = 1.0 \text{ g/L}$ 。

解：菌体生长符合 *Monod* 模型，连续培养稳态下达到最大菌体生成速度的稀释率

$$D_{\max} = \mu_{\max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_{\text{in}}}} \right) = 0.18 \times \left(1 - \sqrt{\frac{1.0}{1.0 + 30}} \right) = 0.15 (\text{h}^{-1})$$

$$S_{\text{out}} = \frac{K_s D_{\max}}{\mu_{\max} - D_{\max}} = \frac{1.0 \times 0.15}{0.18 - 0.15} = 5 (\text{g/L})$$

$$X = Y_{x/s} (S_{\text{in}} - S_{\text{out}}) = 0.45 \times (30 - 5) = 11.25 (\text{g/L})$$

$$(DX)_{\max} = D_{\max} X_{\max} = 0.15 \times 11.25 = 1.69 [\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})]$$

连续培养中的杂菌污染

连续培养的周期逾长，菌种变异的可能性愈大；另外，由于营养成分不断流入反应器中，因此也增加了杂菌污染的几率。减少杂菌污染的途径之一时控制环境条件。

例如：

- 1) 有目的地改变pH、温度、营养成分等；
- 2) 使用高温菌可保证不受常温菌的污染；
- 3) 筛选某些耐特殊条件的菌种也有助于防止杂菌的污染。

连续培养中的杂菌污染

连续培养中杂菌污染可分为三种形式，将这三种形式所对应的杂菌记为Y、Z、W。假定在碳源为限制性基质的连续培养系统中，目的微生物为X，有关杂菌的物料衡算式为：

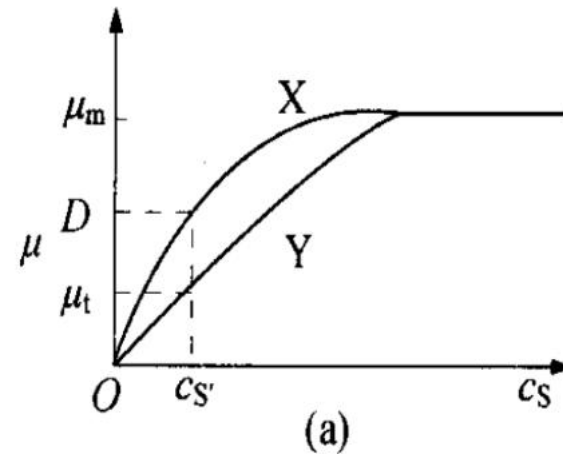
积累量=流入量-流出量+杂菌繁殖量

$$\frac{dX'}{dt} = DX'_{in} - DX'_{out} + \mu X'_{\text{生长}}$$

连续培养中的杂菌污染

如果在限制性基质浓度 S 的条件下，杂菌 Y 仅能以 μ_Y 值得比速率生长，这是 Y 的积累速率为：

$$\frac{dY}{dt} = \mu_Y Y - DY$$



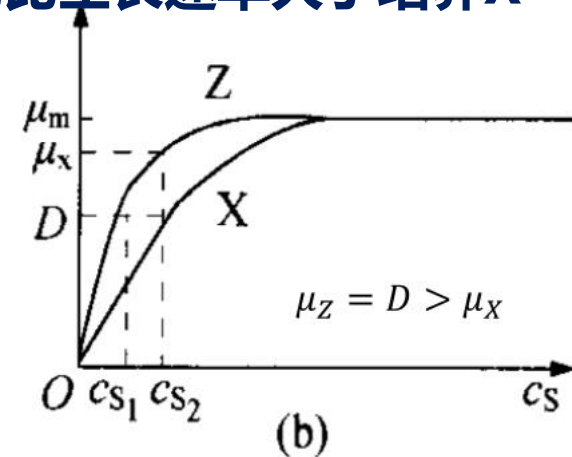
由于 $DY > \mu_Y Y$ ，所以 $dY/dt < 0$ ，就是说伴随培养过程， Y 逐渐被洗出。

连续培养中的杂菌污染

对于杂菌Z，如果 $\mu_Z Z > DZ$ ，即是Z的比生长速率大于培养X的稀释率D

$$\frac{dZ}{dt} = \mu_Z Z - DZ$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_X X - DX$$

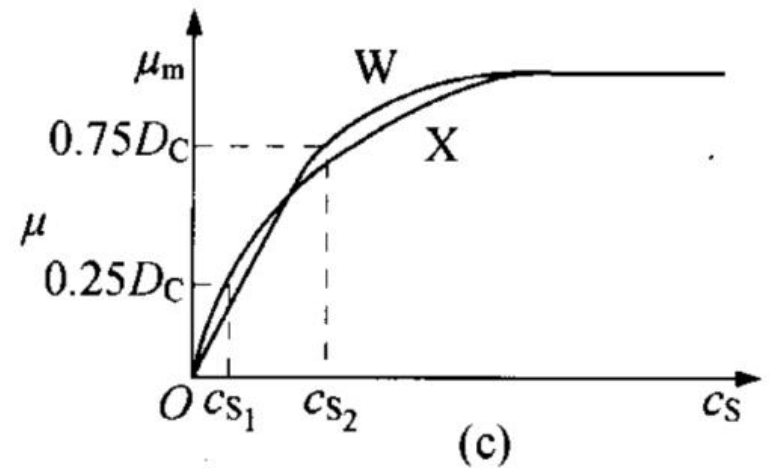


由于 $dZ/dt > 0$ ，杂菌Z将积累，记过基质浓度S下降至 S' ，出现稀释率等于比生长速率的稳定状态。此时X不可能竞争，因为其比生长速率小于稀释率。在经历某一速率时，微生物X将从容器中洗出。

连续培养中的杂菌污染

对于W类杂菌，其繁殖成功与否取决于稀释率。如在 $D=0.25D_{\text{cri}}$ 时，W不能与X竞争，被冲出。

当 $D=0.75D_{\text{cri}}$ 时，X 将同W一样具有竞争优势，并能积累，X 将被冲出。



连续培养中的菌种变异

连续培养为目的的微生物选择了有利的生长环境，提高了竞争的优势，有利于杂菌污染。但是在连续培养过程中，菌种变异问题也是不可轻视的。DNA的复制是一种复杂而精确的过程，虽然出现差错的概率仅为 $1/10^6$ 。但因为每毫升反应液中往往有 10^9 个细胞，所以变异问题显得很重要。

有人研究了工程菌株连续培养的稳定性问题，多数情况下，只要保持一定的选择压力，工程菌株一样可以维持稳定。

小 结

- 连续操作的分类和基本特点;
- 单级恒化器连续培养操作中基本操作方程及其优化;
- 连续培养中的杂菌污染状况分析;

思考题：

1 生物反应器连续操作分分类？

2 生物反应器连续操作的优缺点？

3 CSTR连续操作的分类？

4 单级恒化器法连续操作的定义？

5 单级恒化器法连续操作过程中，稳态时底物、产物和菌体浓度的表达式？

6 稀释率和临界稀释率的定义？

7 单级恒化器法连续操作在稳态条件下的最大细胞生成速率 $(DX)_{\max}$ 和稀释率 D_{\max} 的表达式。

谢谢！