

25L发酵罐及其配套装置的设计与制作

郭显章、袁冷安、张筱玉、胡津、赵允麟

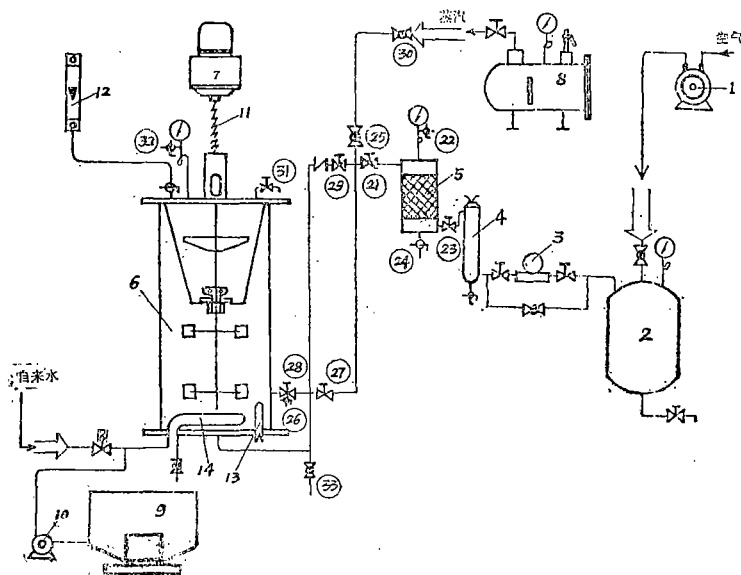
(发酵系) (自动化系) (机械厂) (发酵系)

一、前言

25L发酵罐是属一种生物反应器的小型实验设备,它业已成为生物科学技术中一个不可少的工具。由于生物工程研究的兴起和发展,一些国家如美国、日本等都在从事这类发酵罐的研究与制造^[1,2]。

我们在试制本样机的过程中,解决了总体设备流程装置,25L发酵罐的罐体结构,灭菌操作管路,蒸汽供源以及发酵过程的参数测定、记录与控制等技术,这些与同类国外进口机相比,具有一定特色。且整机的绝大部分元件是国产品。

25L发酵罐及其配套装置经二年多的运转说明,它具有运转稳定可靠,元件易得,维修改制方便,操作安全等优点,且在酶产品的实验研究中应用^[3,4]已取得很好的结果。



1—空气压缩机; 2—储气桶; 3—空气流量计; 4—空气加热器; 5—空气过滤器; 6—发酵罐; 7—电动机; 8—电热锅炉; 9—冰水器; 10—泵; 11—挠性轴

图1 25L发酵罐总体装置流程图

二、25L发酵罐总体设备装置

25L发酵罐总体设备流程如图1所示,它具有独立完整体系的发酵罐装置系统,由罐体

本身6及传动装置7, 无菌空气供应系统及空气泵1, 供蒸汽系统及电热锅炉8, 温控系统及加热棒13和冰水器9以及仪表屏等所组成。利用所配置的管路系统, 发酵罐又可在现场作实罐灭菌。因此, 它是一个独立的完整体系。

今将图1中的设备装置系统说明如下:

为了能将本装置适合在大专院校和科研单位的实验室中应用, 附加配置了无菌空气源和蒸汽源。无菌空气是由空气泵1将空气压入贮气桶2, 通过流量计3或直接经加热器4加热到40—50℃以降低空气的相对湿度, 然后进入棉花或PVA(聚乙烯醇)介质过滤器5, 取得无菌空气供给发酵罐。空气流量也可用排出口处的转子流量计12计量。蒸汽源采用电热蒸汽发生器8, 后文详细叙述。

为了使发酵罐制作方便, 控制简单, 它的保温未采用夹层而采用电热棒加热13和蛇形管14冷却的方式。搅拌器由联轴软管带动, 借助调速马达7其转速可作任意调节。

图中配制的阀门②到③以及管路连接系统是为了发酵罐能在现场作实罐灭菌之用。取样口设在操作正面, 视镜下部, 即在搅拌桨叶下部, 可以随时取得具有代表性的样品。取样管口平时以少量蒸汽或无菌空气进行密封。

消泡加油, 控制pH加酸加碱以及补加发酵培养基等物借助蠕动泵进行。

本样机单独运行电源为220V和380V两种, 且有不间断水, 缺空气, 缺蒸汽影响的特点。

25L发酵罐的规格如表1。

表1 25 L发酵罐的规格

公称容积(L)	25
罐内径(mm)	250
罐高(mm)	500
桨叶直径(mm)	125
功率(kw)	0.6
回转数(r/min)	120—1200
加热棒功率(w)	300
温度控制范围(℃)	5—50(精度 $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$)
通风量(l/min)	5—20
操作	
正常压力(atm)	0.5
灭菌最高压力(atm)	1.5—2.0
pH控制	2—12(精度 ± 0.2)

三、25L发酵罐的罐体结构

10L以下的发酵罐罐体一般采用玻璃为材料, 故常称玻璃罐。由于玻璃质量较难确保, 装卸或操作不当易出事故。25L罐体充分考虑操作安全和铁离子的影响因素, 故本设计的罐体全部采用不锈钢材料, 其各部结构和尺寸如图2所示。

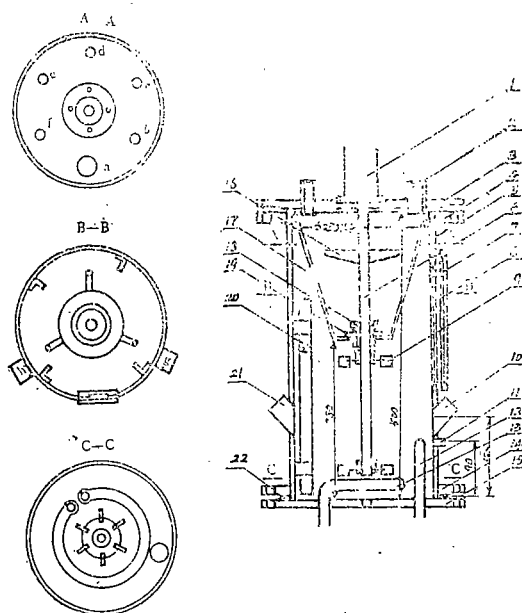


图2 25L发酵罐结构示意图

1—轴封机构；2—投料口；3—上盖；4—上法蓝；5—罐身；6—轴；7—视镜法蓝；8—视镜片；9—搅拌器；10—pH插口；11—取样口；12—加热器；13—冷却管；14—下法蓝；15—下盖底；16—消泡器；17—中间轴承支架；18—四氟乙烯轴承；19—轴承座；20—档板；21—温度计插口；22—螺钉螺母；a—投料口；b—温度计；c—排气口；d—加油、补料口；e—消泡电极；f—压力表；g—pH电极；h—温度电极。

1. 罐盖

采用12mm厚的不锈钢平板，板中央装置机械密封座，周边开设5个接口和1个接种兼投料口，各口孔的反面均与盖面焊牢。机械密封座用螺钉固定于板中央，反面螺钉孔也以电焊补满以防漏气。盖与罐体之间填一层橡皮圈，并以 $\phi 16\text{mm}$ 螺钉螺母按法蓝方式连接，保证绝不会漏气。

2. 罐体

采用 $\phi 250\text{mm}$ 不锈钢管子(或用4mm厚不锈钢板卷成焊接)，各焊缝处均以砂轮磨光再进行抛光。罐体正面开一水位计长孔作为观察镜(用耐高温水位玻璃)，使光线透过水位玻璃来看清罐内液面及其变动情况。玻璃视镜的正下方焊制取样口，两侧再各焊一斜孔口，以备插入温度传感器或pH电极。

罐体两端焊制大法蓝，法蓝周边钻 $\phi 16\text{mm}$ 孔8个，与罐盖、罐底相连接，罐内装备4块档板。

3. 罐底

采用平板，中央处有倾斜坡，设置放料口(兼空气进口)，中央的一侧有冷却蛇管进出口，另一侧有加热棒的孔口。罐底与罐体之间填一层橡皮圈，同样以法蓝方式连接，保证绝不漏气、液。

这种发酵罐的罐体结构，强度好，能经受各种操作用具的打击，清洗方便，可耐高温灭菌，不但具有玻璃罐的性能，而且造型美观，结构紧凑，安全度高等特点。

4. 搅拌轴密封

采用耐连续运转的机械密封装置, 结构简单, 详见图3。

机械密封座是以 $4 \times M6$ 螺钉固定于罐盖板的中央, 分为二段。上段为轴承座; 下段为轴封座。上段与下段以阴阳螺纹互相固紧, 装卸非常方便, 结构精巧, 光洁美观, 且不防碍罐盖板操作面。

轴封座对开2个调节窗口, 以便调节弹簧压力和轴封的密封程度。

5. 中间轴承支撑

为了防止轴承的下端径向摆动而引起的轴密封损坏, 故设计中间轴承支撑。中间轴承支撑以三根 $\phi 20\text{mm}$ 的不锈钢元焊接于罐盖板的内面, 参见图2所示。这种设计便于轴中心的调整, 且清洗和维修也方便, 在为解决高转速 $800\text{--}1000\text{r/min}$ 时易产生的密封端面的渗漏, 收到了比预期更佳的效果。

6. 搅拌器

在搅拌轴的中间轴承支撑的下面装置搅拌器, 搅拌器为平桨式带6个桨叶, 搅拌桨叶直径 $\phi 125\text{mm}$, 其位置在轴上可作任意调节(见图2), 轴上端还装有齿状消泡桨叶, 有较好的消泡效果。搅拌轴用 0.6kW JZT系列电磁调速电动机直接连一挠性轴驱动, 作恒转矩的交流无级调速。

7. 清洗和维修

发酵完毕后, 松开挠性轴, 拉开电动机(有固定轨道), 松下罐盖上的螺母后, 便可轻易取下罐盖(连中间轴承和搅拌器一体), 即可放在罐外操作平台上彻底清洗堆积物(若必要时可维修零部件或调节搅拌器的位置), 罐内零部件少(只有档板, 加热管和冷却蛇管等), 极易清洗, 这对避免污染有极大好处。清洗或维修完毕, 回复安装也极方便。

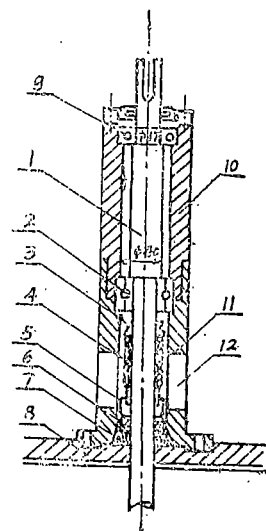


图3 轴封装置

- 1—轴; 2—下轴承;
3—弹簧压盖; 4—弹簧;
5—动环; 6—静环;
7—密封圈; 8—罐盖;
9—上轴承; 10—轴承座;
11—轴封座; 12—调节窗口。

四、蒸汽源

采用电热方式取得蒸汽, 具有体积小, 操作方便, 加热速度快等优点。供汽源同25L发酵

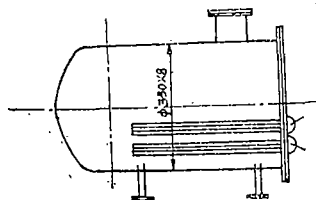


图4 电热锅炉示意图

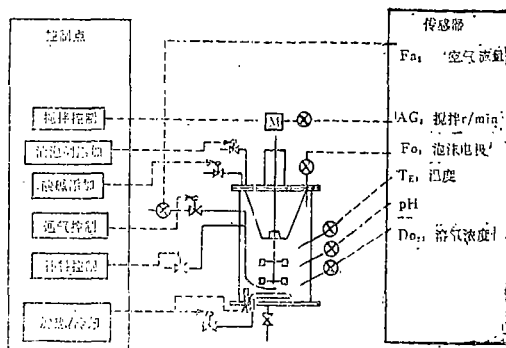


图5 发酵过程的控制点及其传感器

罐配套设计, 供汽压力为3.0atm, 筒体内径 $\phi 350\text{mm}$, 壁厚8mm(如图4), 全部采用不锈钢板制成, 防止非常操作或间歇使用所带来的锅炉水锈和腐蚀, 确保实验使用与安全。

电热锅炉左侧装有水位计, 上端有蒸汽室, 压力表和安全阀, 下端有排污口(兼进水口), 采取间歇进水, 供发酵罐灭菌时配套使用。

电热元件为三根3kw的加热棒, 可视发酵罐实罐灭菌时的升温, 灭菌和保温操作情况, 切断其中一根或二根电源。由于发酵罐的灭菌操作间歇进行, 故本锅炉也全部采用手工操作。

五、仪表柜

25L发酵罐有控制仪表柜, 监测发酵过程中6个参数, 即温度、pH、溶氧、消泡、空气流量及搅拌转速等, 其传感器和控制点如图5所示。

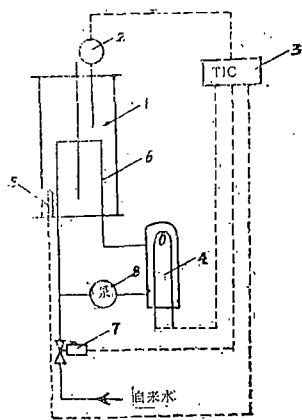


图6 罐温控制系统

1—发酵罐; 2—温度传感器; 3—控制仪; 4—冰水器;
5—加热棒; 6—冷却管; 7—电磁阀; 8—泵

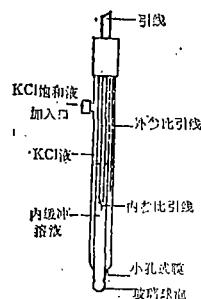


图7 复合玻璃电极

关于电气及控制仪表将有另文报道, 本文只叙述6个参数所采用的传感器及监测、控制原理。

1. 温度

温度传感器为铂电阻, 每 $^{\circ}\text{C}$ 变化在 0.4Ω 左右, 且有线性关系变化的优点。

发酵罐温度控制如图6所示。由铂电阻为一桥臂而组成电桥。当传感器2(铂电阻)感受一实际温度低于选择温度时, 控温桥路3输出讯号(如为负信号), 经放大后输入记录器, 同时由执行机构继电器动作接通加热棒5加热发酵液; 当传感器感受实际温度等于或高于控温选择温度时, 桥路平衡或输出讯号(如正信号), 同样放大后输入记录器, 其时执行机构继电器动作接通冰水泵8或自来水电磁阀7, 将冷水泵入冷却蛇管使发酵液冷却。如此动作, 可使发酵液温度控制在指定范围之内。

2. pH

pH传感器为pH玻璃复合电极, 其构造如图7所示。

根据推导公式知道:

复合电极输出电压为:

$$E = E_c^0 + \frac{RT}{F} \cdot 2.303 \cdot \text{pH}$$

式中

E_c^0 —常数

R —8.313J

T —绝对温度℃

F —96500C

pH—被测溶液pH值

当pH玻璃复合电极插入含酸碱度的溶液中时,由于溶液pH变化引起电极输出电压的变化,这一微小电压变化可用高输入阻抗 10^{11} — $10^{12}\Omega$ 的放大器测量。如果发酵液中pH值超过或低于控制选择pH时,高阻抗放大器将此微弱讯号放大,输入记录器,同时由执行机构继电器启动蠕动泵,进行加酸、加碱或补加培养液,直到pH值处在控制的范围内为止。

3. 溶解氧

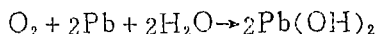
溶氧传感器为溶氧电极,输出为mV信号,其构造如图8所示。

以Pb为阳极,Ag为阴极,反应式为:

阴极: $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + e^- \rightarrow \text{OH}^-$

阳极: $\text{Pb} \rightarrow \text{Pb}^{++} + 2e^-$

全反应式为:



溶氧电极被一层塑料薄膜隔开,溶液中 O_2 能透过膜并与电极反应,输出mV信号。

采用电压放大器放大后输入记录器和进行数字显示。同时由执行机构继电器进行风量控制或轴转速控制。

4. 消泡

消泡传感器系用不锈钢条外包绝缘材料组成(如图9的消泡电极),它与罐体构成电极电路。

工作原理如图9所示。

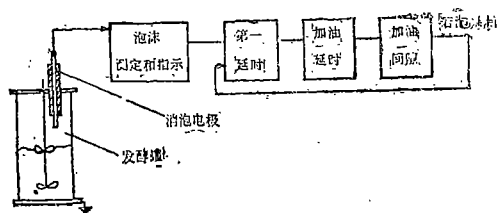


图9 消泡工作原理

当罐内泡沫升降时,引起罐壁和消泡电极之间电阻的变化,检测此电阻值,即可控制泡沫的升降(第一延时作用是抗干扰)。当泡沫升高时,电极电路接通继电器动作,蠕动泵开始



图8 溶解电极

- 1—金属帽盖;2—环氧树脂;
- 3—硼酸盐玻璃;4—电极液;
- 5—硅橡胶管;6—Pb阳极;
- 7—玻璃棉;8—Ag阴极;
- 9—聚四氟乙烯膜;

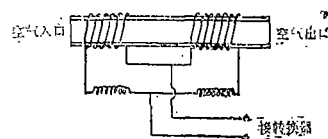


图10 空气流量传感器

进行加油延时和加油间隙,同时将加油延时中某一电压分量输入记录器。若泡沫未降,加油继续进行;当泡沫下降后,电路断路,一切动作均立即停止。

5. 空气流量

传感器为空气流量测定传感器,其结构原理示意图如图10。

利用在一根小口径薄壁测量管的外壁上,绕制二组对称的具有较高温度系数的电阻丝,组成直流惠斯登电桥。电阻丝既是加热元件又是测量元件。当有气体通过时,上游温度下降(电阻值减少 ΔR),下游温度上升(电阻值增加 ΔR)。传感器电桥的电压变化的推导公式为:

$$E = \frac{IR_0\alpha(\theta - \theta_0)CM}{A} = b \cdot C \cdot M$$

式中

I —供给电桥的恒定电流

R_0 —电阻丝的电阻值

α —电阻丝的电阻温度系数

A —各对绕组和周围环境间的总传导系数

θ —测量管中的最高温度

θ_0 —周围环境温度

C —介值比热

M —介值流量

上式

$$\frac{IR_0\alpha(\theta - \theta_0)}{A} = b \quad \text{可为一常数}$$

所以, E 与 CM 的乘积成正比。当气体的比热恒定时,传感器的流量信号(电压变化)(E)与质量流量(M)成正比。

在恒流源电流为70mA下,输出电压变化为0—5mV,再经转换器,输入记录器作0—10mA或4—20mA记录,如图11所示。

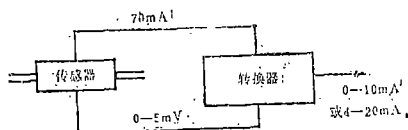


图11 空气流量测量原理

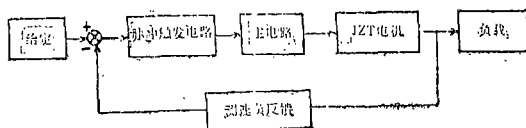


图12 搅拌转速测量原理

6. 搅拌转速

转速测量元件为交流测速发电机。

工作原理如图12所示。

给定电压输入后,使脉冲触发电路产生相应的移相,从而可以改变主电路中的可控硅的导通角来实现控制电机转速。为了使电机运行稳定,引入了测速负反馈装置,同时进行测速。发电机的输出电压经分压后输入记录器记录。

六、发酵罐的实罐灭菌操作

采用本装置中的管道系统可在现场进行发酵罐的实罐灭菌。灭菌用手工操作进行,由于实罐灭菌时各种因素(如培养基原材料、浓度、温度和压力要求等)多变,认真操作就显得十分重要。按图1的流程,顺序叙述如下:

1. 空气过滤器的灭菌

先检查电热锅炉水位,加水到水位红线,然后将电热棒的电闸刀推上,检查三路电热棒是否均有电。待锅炉的蒸汽压力缓缓上升到2.5—3.0atm,按锅炉上的出气顺序一直从阀门⑩⑤开到阀门⑪,关阀门⑫,待过滤器上压力上升,稍开排水阀门⑬和排水阀门⑭,目视蒸汽排出程度。此时应调整过滤器压力表指针在2atm下,并维持1.5—2h进行过滤器的灭菌。

当过滤器灭菌结束前启动空气泵,待贮气桶上压力逐渐上升到1.5atm左右,可关阀门⑪,速开阀门⑫(不使过滤器上压力下降到零),调节阀门⑬⑭,使阀门⑭少量排气,阀门⑫稍多排气,并保持过滤器压力在1atm左右吹干,时间约需10—12h,吹干时应开电空气加热器4(加热器电源电压约为60—70V)。灭菌结束按倒顺序关阀门,一直关到锅炉排气口上阀门,最后拉下电闸刀。

2. 发酵罐实罐灭菌

先检查罐内清洗程度,如发现有污物堆积应返工重洗,不得马虎。灭菌前,将投料口打开,直接将培养基投入罐内,加油,加水定容约8—8.5L,盖好投料口,启动搅拌器,转速约100—200r/min,不使物料沉淀。

待电热锅炉的蒸汽压力达2.5—3.0atm时,逐渐向发酵罐进汽,先开阀门⑩⑤⑥⑦⑧,待罐内产生一种声音时,再开阀门⑨,产生另一种声音时,表示蒸汽均已进入罐内。待培养液温度升到30—35℃左右时可停止搅拌,从视镜中观察料液翻腾情况,调节阀门⑨⑧⑦,以免电热锅炉的蒸汽压力下降过快。待罐温到120℃,罐内压力约1atm时,再调节阀门⑩⑪⑫,稳定操作后最后用锅炉阀门⑤调节,使发酵罐内的压力保持在1atm下维持30min作为培养液的彻底消毒灭菌。此时电锅炉的汽压始终不应低于1.5—2.0atm为宜。

灭菌完毕,依次先关阀门⑩⑪⑫,再关⑨⑧⑦,然后关⑥⑤④,一直关到锅炉排汽口上阀门,并拉下电闸刀。

发酵罐冷却前,稍开阀门⑩⑪进行排气,待罐内压力缓慢下降到0.5atm时,若此时空气过滤器的压力在1—1.5atm左右,即可打开阀门⑪⑨进入空气保压。最后开冷却水控制器,使罐内培养液冷却到接种温度,接种后便进入发酵时间,同时仪表屏显示,记录各种参数。

七、应用效果

本样机共进行了100余批次试验,如 α -淀粉酶批周期为48h,葡萄糖淀粉酶批周期为120h,加上无菌试验,单机运转等累计已超过5000h以上,运行中经受住寒冷的冬天和炎热的夏天的考验,未发生重大故障。

1. α -淀粉酶发酵试验实例

①供试菌株:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)N796

②发酵培养基: 麦芽糖6%, 豆粕水解液6%, Na_2HPO_4 0.8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, CaCl_2 0.2%, NH_4Cl 0.15%

③培养条件: 桨叶转速500r/min, 通风量500L/h温度37℃

④罐内装料: 12L

结果如下:

培养时间 (h)	pH	总 糖 (%)	还 原 糖 (%)	α -淀粉酶活性 (u/ml)	镜 检
0	5.5	7.65	1.80		
10	6.5	7.02	3.15	13.7	
12	6.5	6.75	3.15		
16	7.0	6.66	4.32	92	整齐、壮
19.5	6.8		4.68	160	整齐、壮
22.5	5.8	5.76	3.96	213	/
33.5	6.1	4.50	3.78	360	整齐、壮
35.5	7.1		2.97	411	少量孢子
36.5	7.2		3.51	432	10%孢子
40.5	8.2	4.32	3.66	432	50%孢子

2. 黑曲糖化酶发酵试验实例

①供试菌株: 黑曲菌(*Aspergillus niger*)AN149

②发酵培养基: 玉米粉10%, 豆饼粉4%, 麸皮1%

③培养条件: 搅拌转速600r/min, 通风量720L/h, 温度31℃

④罐内装料: 12L

结果如下:

培养时间 (h)	pH	总 糖 (%)	还 原 糖 (%)	葡萄糖淀粉酶活性 (u/ml)	镜 检
0	5.4	8.5			
8	5.0	7.96			菌丝有分支
16	4.5		7.20	1272	分枝多
24	4.0		5.85	1972	分枝多
32	3.8		4.81	2478	分枝多
40	3.6		3.83	3672	粗壮
48	3.4		2.79	4500	粗壮
60	3.3		2.00	5508	粗壮
72	3.3		1.62	6420	粗壮
84	3.2		1.27	7150	菌丝变细
92	3.2		1.07	7725	菌丝变细
100	3.5		1.02	8295	菌丝变老
104	3.7		1.02	9000	菌丝变空
110	4.1		1.00	9540	

将以上二例数据比拟放大到20m³罐,已取得同样的效果。由此证实取得模拟数据的可靠性,这可减少研究摸索时间和节省人力物力。

八、经济效益

兹将25L发酵罐及其配套装置的主要设备及仪表清单开列如下:

编 号	设备及仪表名称	数 量 (台)	单 价 (元)	总 价 (元)
1	发酵罐(25L)	2	3500	7000
2	电热锅炉(9kw)	1	3000	3000
3	JZT电磁马达	2	1050	2100
4	空气过滤器及加热器	2	320	640
5	空气泵(进口)	2	600	1200
6	空气流量计(玻璃)	2	200	400
7	贮 气 桶	1	50	50
8	管道及各种阀门			2300
9	转速控制仪	1	500	500
10	溶氧控制仪	1	300	300
11	温度控制仪	1	500	500
12	冰水器	1	1200	1200
13	消泡仪	1	400	400
14	PH控制仪(进口)	1	3000	3000
15	流量控制仪	1	2200	2200
16	蠕动泵	2	800	1600
17	仪表柜	1	500	500
18	记录仪	1	2300	2300
19	各种电线、电气零件			1500
	总 计			30690

从上表看出,如按2台发酵罐作轮流使用或作连续培养使用为计算标准,则每台发酵罐平均价格约1.5万元左右;如按单罐计算,则每台发酵罐约需2.5万元左右。

1984年日本三轮(ミツク)理化学工业公司的报价表,如KMJ—20型(约20L发酵罐的单机每台为350万日元,(约当时人民币为8.4万元),加上温度,转速调节, pH显示,蠕动泵,溶氧电极,三点记录仪(记录温度, pH, Do等)等报价为163.5万日元(约人民币4万元),总价约需12.4万元人民币(尚需外汇)。且与本样相比,尚无空气泵及无菌空气系统,也无电热锅炉等配套装置。

显然,自制发酵罐的成本远比进口的便宜,所有材料和绝大部分电子仪器均可国产化,维修、改进、调整十分省事便利,又可节省大量外汇。

九、小 结

1)25L发酵罐及其配套装置的设计与制作是一个独立的完整系统:只要有电源的情况下,不受缺水源以及缺空气源和缺蒸汽源的限制,具有一定的特色。

2)罐体全用不锈钢材料制造,设计紧凑,布局合理,使用操作方便,有利维修,安全性好。同时附有小型蒸汽发生器,便可模拟大生产操作进行实罐灭菌。

3)本机可显示与记录6个发酵参数,其中PH,温度,消泡等参数还能自控。一旦进入发酵阶段,即能处于自控下工作。培养过程中能随时取样分析,了解发酵过程情况。

4)本机经二年约5000h的运转试验,未产生故障,机械无损伤,仪表指示稳定和可靠。经 α -淀粉酶,葡萄糖淀粉酶的发酵试验所得数据,已比拟放大到大生产罐规模(20m³),取得同样好的效果。

5)本机的绝大部分器材均可国产化,制造成本远较进口机便宜,且可以节约大量外汇。

附:在本机制作过程中还有本院王嘉文老师、方万顺和蔡苏南师傅参加了部分工作。

参考文献

- [1] New Brunswick Scientific: Laboratory and Industrial fermentation equipment, Catalog, 1028, Edison, N.J.08818, U.S.A.(1982)
- [2] B.E.Marubishi: MSJ series Fermenter vessels and its accessories, Catalog, Japan(1983)
- [3] 郭显章等,《生物工程学报》,第2期,1988
- [4] 郭显章等,《无锡轻工业学院学报》,第4期,1—10,1987