

· 专论与综述 ·

动植物细胞或组织生物反应器悬浮培养过程中的通气方式 *

黄娜 陈思晔 齐瀚实

(上海交通大学细胞工程中心 上海 200240)

摘要: 通气在动植物细胞或组织生物反应器培养过程中起着至关重要的作用,而同时通过程所产生的机械损伤力亦可对细胞造成直接的伤害,因此,通气方式是动植物细胞或组织生物反应器培养过程设计与工程放大的关键技术之一。本文综述了动植物细胞或组织生物反应器悬浮培养过程中三种主要通气(异养培养时又称供氧)方式的结构特点,及其对气液传质、生物量、代谢产物量和细胞损伤的影响,以及改进的新型通气方式和几种通气方式的融合并用。

关键词: 生物反应器;动植物细胞或组织培养;通气;气体传质;剪切力

中图分类号: Q813.1 **文献标识码:** A **论文编号:** 1673-6273(2007)02-0273-07

Aeration Techniques of Animal/Plant Cell or Tissue Suspension Cultures in Bioreactor

HUANG Na, CHEN Si-ye, QI Han-shi

(Center of Cell Culture and Bioprocess Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT: Aeration (or oxygenation) is a key technique in bioreactor cultures of animal/plant cells or tissues. The design or scale up of bioreactor processes for animal/plant cell or tissue cultures is challengeable due to the sensitivity of cells to the various detrimental forces resulted from aeration. The structures and characteristics of three main aeration techniques are reviewed and their effects on the gas transfer, biomass accumulation, metabolic activities and cell damage are discussed. The modified aeration techniques as well as their combinations in application are presented.

Key words: Bioreactor; Animal/plant cell or tissue cultures; Aeration; Gas transfer; Shear force

Chinese Library Classification (CLC): Q813.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2007)02-0273-07

前言

动植物细胞或组织培养是由局部(或针对性)培养获得目标产物,如生物量本身、重要次生代谢产物(如黄酮、类萜、甾体及其甙、生物碱等)或生物制品(如酶、干扰素、生长因子、抗体等)的培养方式^[1-2]。生物反应器则可在人为可控条件下,为细胞生长提供适宜的环境,以达到增殖细胞和生成产物的目的^[3]。悬浮培养利于动植物细胞均匀地接受营养物质、气体、光照等。自1959年 Tulecke 和 Nickell 首次使用生物反应器进行植物细胞悬浮培养以来,利用生物反应器进行动植物细胞或组织的大规模悬浮培养工作便逐步展开^[4]。

在动植物细胞或组织悬浮培养过程中需要不断通气,一方面,作为细胞生长及代谢的物质来源,同时移除代谢废气。另一方面,通气是细胞得以悬浮培养的重要动力来源。气泡破碎会产生剪切力,剪切力对细胞培养的积极作用表现为:增加通气,保持良好的混合状态和细胞分散性,在适合的条件下,甚至可以提高细胞产率,增加次生代谢产物产量^[5]。但若通气速率过大,剪切力的消极作用渐显,表现为:造成细胞损伤,影响细胞

形态、聚集状态、代谢及细胞存活率等^[5],同时会造成培养基内易挥发气体的逃逸。气体作用的两面性以及剪切力损伤因细胞不同而异的特点,导致了动植物细胞培养和控制的复杂化,使得通气方式成为生物反应器设计、优化与放大的重点和难点^[6]。

目前,生物反应器悬浮培养动植物细胞的主要通气方式有:表面曝气、气体喷射(鼓泡式和气升式)、膜供氧,和几种方式的融合^[7]。对于某种特定的细胞或组织培养,确定采用何种通气方式的基本原则是在成本和能耗一定的情况下,最大程度的提高气体传质效果,同时将细胞损伤程度降到最低。

本文综述了上述几种重要通气方式的结构特点、气液传质能力、对细胞的损伤及其改良发展,为该领域合理选择和改进生物反应器的通气模式提供一定的借鉴和启示。

1 表面曝气式(surface aeration)

在搅拌型反应器中,通过搅拌桨对液体的剧烈搅动,使液体上方的气体借助液体表面的湍动,由液相表面吸入至液相主体,这一类型的反应器按通气方式分类可称为表面曝气式反应器^[8-9]。该通气方式具有结构简单、气液传质效率高、适用范围广

* 基金项目: 863 计划资助项目[2002AA629070]

作者简介: 黄娜, (1982-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 动植物细胞生物反应器

通讯作者: 齐瀚实, Email: biotech@sjtu.edu.cn

(收稿日期: 2006- 接受日期: 2006-)

等优点^[10]。Hu^[11]最早将表面曝气装置运用到动物细胞培养中,利用双层桨低速旋转进行表面曝气,不产生气泡和泡沫,在提高液体混合程度的同时,没有对细胞造成剪切力损伤。Jolicoeur^[12]曾利用表面曝气成功地培养了对剪切力敏感的长春花(*Catharanthus roseus*)细胞,数据表明:在 120rpm 转速下,氧传质速率 kLa 可达 45h-l。

1.1 搅拌桨(impeller)

表面曝气生物反应器,主要依靠搅拌桨旋转来完成整个曝气过程,搅拌桨的作用主要体现在,吸入气体并将大气泡剪切成细小气泡,以及产生液体的整体循环,使气泡均匀分散。搅拌桨是影响该类反应器气泡分散状态和气体传质速率的主要因素之一,同时也是造成细胞剪切损伤的重要因素。

1.1.1 常用搅拌桨 用于动植物细胞培养的生物反应器常用 Rushton 桨(图 1-1)和平桨(图 1-2)。培养对剪切力敏感的细胞时,搅拌桨的特点是桨叶较大,能引起层流流动,是产生的剪切力较小且混合效果较好。按桨叶与水平面的倾斜角度,搅拌桨又可分为直叶(图 1-1(a)、1-2(a))和斜叶(图 1-1(b)、1-2(b))。直叶桨具有较好的粉碎气泡,增大气含率(gas holdup)的能力,但同时产生较高的剪切力。斜叶桨产生的流场存在一定的轴向分速度,有利于整体循环,同时产生的剪切力较小^[13]。

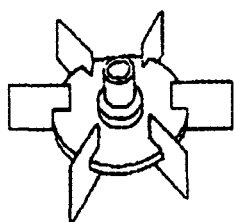


图 1-1a 直叶 Rushton 桨

Figure 1-1a Straight Rushton disk turbine

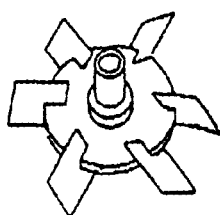


图 1-1b 斜叶 Rushton 桨

Figure 1-1b Pitched Rushton disk turbine

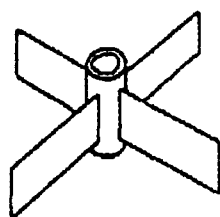


图 1-2a 直叶透平桨

Figure 1-2a Straight blade turbine

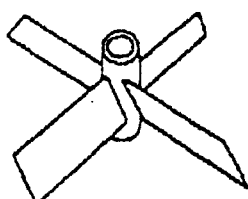


图 1-2b 斜叶透平桨

Figure 1-2b Pitched blade turbine

1.1.2 搅拌桨的位置 在单位液相体积功耗一定的情况下,kLa 随搅拌桨浸没深度减小而增大^[14]。但减小浸没深度,会降低反应器内气泡的整体循环和分散效果,在反应器底部产生气泡无法到达的“死区”^[13]。因此当液面较高时,往往采用多层桨(multiple impellers)(即在同一轴上相隔一定距离的两个或多个搅拌桨)搅拌。Wu^[14]的研究表明,双层桨可以促进气相在边壁区的分散,保证反应器内良好的混合,但装置的气液传质性能有所下降。

1.2 新型表面曝气式

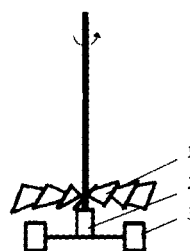
对于表面曝气式,搅拌桨附近周期性转动引起的涡流力的变化和反应器主体内随时间变化的层切力是造成细胞损伤的主要因素,分别由漩涡长度和搅拌速度决定^[15]。为了减小细胞损伤程度,同时提高气液传质速率,研究者们设计出新型装置

用于表面曝气式生物反应器。其中,应用最广的是挡板(baffle)和导流装置(flow guide system)。

挡板可以阻碍凹液面的形成,加快吸气速率(gas uptake),破坏原本的流体流型而产生湍流漩涡,增加液相的混合程度^[16]。Kamen^[17]研究表明,挡板的加入的表面曝气式更适合培养对剪切力敏感的植物或昆虫细胞。禹耕之^[18]利用新型自旋浮挡板(self-rotating and floating baffle,SRFB)(图 1-3)辅助 Rushton 单层桨进行表面曝气,将 kLa 提高了 30%-68%。同固定挡板相比,自旋浮挡板更有效地提高了吸气速率和气泡破碎能力。王爱华^[14]则进一步研究了挡板的倾角和直径对气液传质速率的影响。

导流装置能改变反应器内的流场,使吸入的气泡更均匀的分散于整个反应器内^[13]。毛在砂^[13,19]设计了新型自旋导流(self-rotating flow guide,SRFG)装置,将其运用到多层桨表面曝气系统中(图 1-4),从而消除了槽底及四周气泡无法到达的“死区”,同时可缩短混合时间、减小搅拌功率,气液传质速率也得以提高。

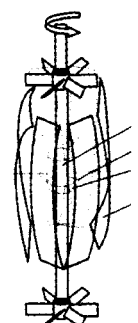
各种新型表面曝气生物反应器的设计,在一定程度上提高了 kLa、降低了能耗,同时增强了混合循环效果和固相的悬浮能力;在 kLa 相同的情况下,可降低搅拌速率和剪切力,这对动植物细胞或组织很有意义。但挡板和导流装置的加入会带来贴壁生长、分化等新问题^[20],在一定程度上限制了其在悬浮培养方面的应用,因此表面曝气通气方式一般与其它类型通气方式联合使用。



1-自旋浮挡板 2-限位环 3-Rushton 桨
1-Self-rotating and floating baffle
2-Spacing ring 3-Rushton disk turbine

图 1-3 自旋浮挡板搅拌装置

Figure 1-3 Configuration of the SRFB surface aeration system



1-支承轴套 2-支承臂
3-限位件 4-弧形导流片
1-Supporting shaft sleeve 2-Supporting arms
3-Stopper 4-Self-rotating flow guide blade

图 1-4 自旋导流搅拌装置

Figure 1-3 Configuration of the SRFG surface aeration system

2 气体喷射式(gas sparging)

气体喷射是借助位于生物反应器底部的气体喷射器将气体喷射入体系的一种常用的通气方式^[21],在气泡上升的过程中,同时实现反应体系的搅动和培养气体的供给。其优点主要表现为:气液界面大,传质阻力小,传质速率大;结构简单,易于放大^[7];无动态部件,易于操作和维修;与表面曝气相比,剪切力小,动能消耗小^[22]。气体喷射可作为 2L 至 100L 生物反应器的通气系统^[7]。

气体喷射生物反应器内,影响气体传质效果的通气参数主要有^[21]:气泡大小(bubble size)、气含率(gas holdup)、有效气体组分(gas composition)等。气泡越小,气含率越大,气体传质速

率越大^[23]。另外,可通过提高有效气体组成来提高气体传质速率,Ziv^[21]在波士顿蕨类植物(*Nephrolepis exaltata Bostoniensis*)组织生物反应器培养中测得通气组分中 O_2 浓度由 21% 上升为 80% 的过程中比生长速率由 0.61 升至 0.92。

2.1 气体喷射器(sparger)

气体喷射器是气体喷射式生物反应器的重要部件,可由多种材料制成,主要包括不锈钢(stainless steel)^[7]、玻璃(glass)^[24]、陶瓷(ceramic)^[7]、纱纺(spining)^[25]、橡胶膜(rubber membrane)^[26]、中空纤维膜(hollow-fiber membrane)^[27]等。不同材料可制成不同类型的喷射器^[28],如单孔(single-orifice)、多孔(multiple-orifice)、球形(balloon-type)、环形(ring sparger)、臂形(arm sparger)。

气体喷射器的孔径和出气速度(vent velocity)决定气体传质速率和对细胞损伤的大小。一般情况下,孔径越小,出气速度越快,产生的气泡越小,kLa 越大^[29]。Nehring^[7]和 Son^[29]的研究表明,采用微孔气体喷射器,获得的 kLa 是一般孔径的 3 倍。大多数研究表明^[7,30],孔径越小,产生的气泡直径分布(bubble size distribution)越集中,对动物细胞损伤越小^[7]。但也有研究表明^[31,32],小气泡会增加细胞-气泡碰撞次数,对细胞造成损伤更大。孔的位置分布^[27]和数量^[33]也会影响细胞生长。

2.2 典型气体喷射式

2.2.1 鼓泡柱式(bubble column) 鼓泡柱(图 2-1)是典型的气体喷射式反应器,其最大特点为高径比大,因此具有许多优点,比如气体滞留时间(dwel time)长,气液传质性能好^[34];结构简单紧凑,占地面积小,适合平行试验的进行^[35]。目前已广泛用于动植物细胞或组织培养^[36]。

利用鼓泡柱式生物反应器高径比大、光径短的优点,人们设计了增加外置照明系统的鼓泡柱式光生物反应器^[35],多用于微藻及大型海藻等自养型光合植物细胞或组织的培养,可使反应器内部光强和温度相对均匀。

2.2.2 气升式(airlift) 在鼓泡柱式的基础上改进得到的气升式,能在通气的时候,利用其独特的回路循环装置使液相达到循环^[37]。其主体是由气含率较高的上升区(flow-upward zone)和气含率较低的下降区(flow-downward zone)两部分组成,两区域之间的压力差造成液相的循环^[38]。与鼓泡柱式相比,气升式能达到更好的混合和循环效果。Gouveia^[37]和 Gavrilescu^[39-41]研究了气升式生物反应器内,液面高度(liquid high)、上升管/下降管径(riser/downcomer diameter)、顶/底隙(top/bottom clearance)对于气含率、kLa、液体循环等方面的影响。

气升式生物反应器有外循环(external-loop)(图 2-2)和内循环(internal-loop)(图 2-3、2-4)和两种结构。内循环气升式反应器,结构较紧凑,最常见的为管道(draft-tube)或板柱(split-cylinder)内循环气升式生物反应器(图 2-3、2-4)。外循环气升式反应器,将下降管置于反应器外部,可用于高细胞浓度灌注培养。Su^[42]用外循环气升式反应器灌注培养牛舌草药(*Anchusa officinalis*)细胞,利用挡板防止细胞流失,获得干细胞浓度 27.2 g l^{-1} ,胞外蛋白质浓度 1.11 g l^{-1} 。

根据 Merchuk^[43]的研究,气升式相比鼓泡柱式,能获得更具规则的流体流动,而且气泡和剪切力的分布更为均匀。Zhang^[43]

用两种典型气体喷射式生物反应器培养裙带菜(*Undaria pinnatifida*)配子体,结果表明,气升式可以获得更高的最大生长速率(maximal growth rates) r_{max} 和生物量浓度。



图 2-1 鼓泡柱式生物反应器

Figure 2-1 Bubble column

bioreactor

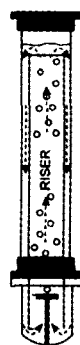


图 2-4 板柱内循环气升式生物反应器

Figure 2-4 Split-cylinder
internal-loop airlift bioreactor

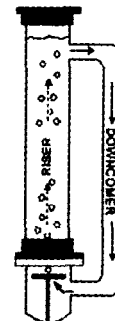


图 2-2 外循环气升式生物反应器

Figure 2-2 External-loop airlift

bioreactor



图 2-3 管道内循环气升式生物反应器

Figure 2-3 Draft-tube
internal-loop airlift bioreactor

2.3 新型气体喷射式生物反应器

气泡破裂产生的剪切力会对细胞造成一定程度的损伤,Jöbses^[45]认为,气泡在液体表面的破碎是造成该损伤的最主要原因。通过改进气体喷射式结构,可减小气泡对细胞的损伤。

胡显文^[23]利用新型气液双升生物反应器(图 2-5)培养动物细胞,将通气与供氧环节分开,使细胞能在一个低剪切力、无气泡、富氧的环境中生长。

泡沫的形成会降低 kLa, 同时将营养物质挤推到表面,造成细胞供养不足。人们用不锈钢、尼龙网、丝带等多孔物质填充于上升管内,设计出新型填充床气升式生物反应器(图 2-6),可达到有效供养和提高 kLa 的目的。Masahiko^[46]用聚硅醚消泡网填充的气体喷射式生物反应器培养鼠肝细胞瘤细胞(rat ascites hepatoma cell JTC-1)27 天后,即使在后期营养不足的情况下,存活率仍可维持在 90%。Hossein^[47]用少量尼龙网填充外循环气升式反应器上升管,将 kLa 提高了 3.73 倍。Meng^[25]进一步研究了填充床的孔隙率和高度对 KLa 和动能消耗的影响。

3 膜供氧式(Membrane Aeration)

膜供氧以无泡供氧方式居多,被称为膜式无泡供氧(membrane bubbleless aeration, MBR)^[48],是相对传统气体喷射式而言的,气体在膜管内透过膜扩散到外侧的液相中,并不产生肉眼可见气泡。该方式不产生气泡或泡沫,气体以扩散方式

进入生物膜,几乎100%被液相吸收,加之膜表面积大,因此 kLa 大^[49]。该通气方式可以有效地将气体供应和系统混合分开,对细胞损伤小^[50]。目前,已被广泛用于人工心肺器官^[51]、发酵^[52]、大规模动植物细胞培养^[53]和好氧生物的水处理^[54]等领域中。Kilburn^[55]和Eberhard^[56]最早利用薄壁硅橡胶管供气分别培养哺乳动物细胞和昆虫细胞。

3.1 膜供氧材料

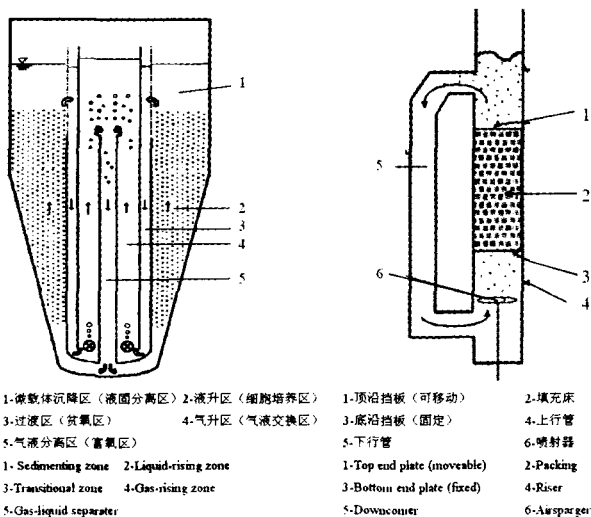


图2-5 新型气流双升生物反应器

Figure 2-5 new air-lift and liquid-lift bioreactor

图2-6 填充床外循环气升式生物反应器

Figure 2-6 External-loop air-lift bioreactor with packed bed

图2-5 新型气流双升生物反应器

Figure 2-5 new air-lift and liquid-lift bioreactor

图2-6 填充床外循环气升式生物反应器

Figure 2-6 External-loop air-lift bioreactor with packed bed

膜供氧中的最典型的膜是透气性致密膜(dense membrane)和多微孔聚合物膜(microporous polymeric membrane)。

透气性致密膜以硅橡胶膜(silicone rubber membrane)为典型,是一种致密无孔的疏水膜,对疏水小分子(例如 O_2 、 CO_2)有较大的渗透力,而对离子和大分子的渗透力很小;因其无孔,不会出现膜堵塞和膜污染问题^[57],特别适用于黏度比较大的植物细胞培养。但是,硅橡胶膜比较昂贵,且传质阻力较大^[51],而且(因为无孔)为了减小传质阻力,必须提高管内压力,这就对管壁厚度存在一定的要求,管壁增厚反过来又增大了传质阻力,所以这种矛盾限制了其放大的潜力。

多微孔聚合物膜中最常用的是多微孔聚丙烯膜(microporous polypropylene membrane)。该膜具有较低的传质阻力^[51]和较强的机械强度。但其泡点 P_{bp} 较低,限制了进气压力和管长,使得反应器不易放大。Winston^[58]提出了解决该问题的几种方法,如增大静流体压力、对膜表面进行化学修饰、分隔膜管、减小膜管直径等。多微孔膜易堵塞,可通过增大培养液流动速度来缓和堵塞现象,当然须考虑细胞的承受力^[57]。

3.2 典型膜供氧生物反应器

典型的膜供氧系统构造主要有以下几种:固定膜线圈(fixed membrane coil)、悬挂式膜线圈(hanged membrane loop)、膜搅拌器(membrane stirrer)和膜纤维组件(membrane fiber modules)。

固定膜线圈(图3-1)结构最简单,即将膜管缠绕在固定的

钢架上。该系统往往同搅拌设备联合使用来实现培养体系的悬浮和混合,但Su^[58]在实验中发现该构造可能使细胞黏附在膜管上而影响氧气传质速率。

为了克服上述缺点,Hvoslef-Eide^[59]自制了一种悬挂式膜供氧装置(图3-2),使膜管自由悬垂于液体中并随液体搅动而摆动,在一定程度上减少细胞的黏附。

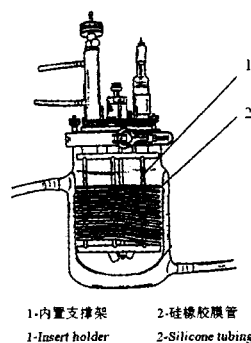


图3-1 固定膜线圈生物反应器

MC-0986-E Figure

Figure 3-1 Biostat MC-0986-E

reactor (produced by B.Braun Biotech Inc.)

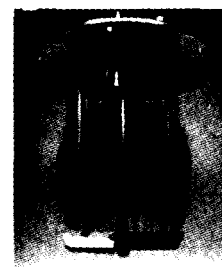


图3-2 悬挂式膜线圈生物反应器

Figure 3-2 Bioreactor with hanged membrane loop

Lehmann^[60]将膜管和搅拌器融合制成膜搅拌器系统(图3-3),使供氧和混合同步进行,成功地培养了鼠细胞系(genetically manipulated mouse cell line)。

Boehm^[61]证明该系统能有效地控制植物七叶树(Aesculus hippocastanum)细胞黏附现象。

膜纤维组件(图3-4)是由几十至几千根极细聚合纤维组成的纤维束外加玻璃管壳构成,具有很大的传质面积和 kLa ;气体可循环利用,特别适用于较昂贵的气体(如纯氧)。Carvalho^[62]用中空纤维膜组件得到的 kLa 是普通鼓泡式的2倍以上,张六六^[48]利用该膜组件得到的 kLa 高达 $278.3h^{-1}$ 。

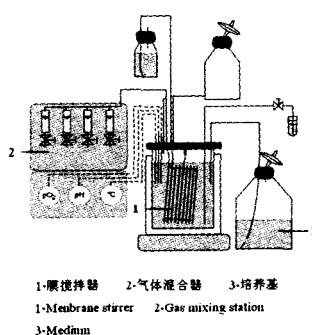


图3-3 膜搅拌器生物反应器

Figure 3-3 Bioreactor equipped with a membrane stirrer

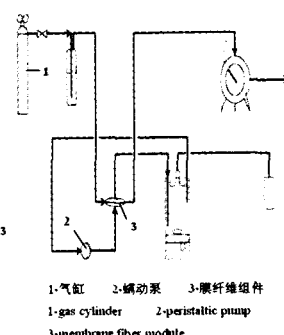


图3-4 膜纤维组件系统

Figure 3-4 membrane fiber modules system

膜供氧生物反应器对动力、安装、清洗、灭菌装置的特殊要求,使得膜通气系统很难有效放大和广泛应用,目前多用于实验室和小规模细胞培养中^[7],用于生产一些稀有的、珍贵的动植物细胞的代谢产物,如紫杉醇、灵芝、青蒿素等;或人工改造的基因工程细胞、杂交瘤细胞等。

4 通气方式间的融合

Pollard^[63]在气升式生物反应器下降管内安装双层桨设计出混合型搅拌气升式生物反应器(图4-1),解决了高径比过大的

气升式反应器内营养物质和氧气供给的轴向梯度和高搅拌速率造成的细胞损伤问题。

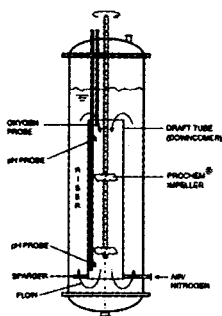


图 4-1 混合型搅拌气升式生物反应器

Figure4-1 Airlift bioreactor equipped with a insert impeller

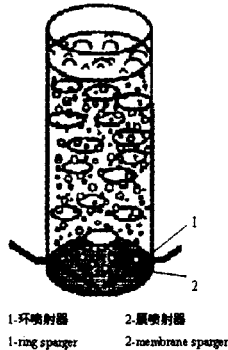


图 4-2 混合型膜-环喷射式生物反应器

Figure4-2 Mixed membrane-ring sparging bioreactor

Poulsen^[64]设计了一种混合型膜-环喷射式生物反应器,即在反应器底部安置膜喷射器,气体透过膜后产生 500 μ m 的小气泡;在膜喷射器上方安装环喷射器,为一环形不锈钢管,管壁上有多个孔,使气体通过后产生 4.4mm 的气泡。大小气泡在上升过程中不会并聚,故可分别完成气体的传质和混合,达到更好的综合效果。该结构有利于平衡两部分能耗,将能耗和剪切力损伤降到最低,且小孔径喷射器可作为危险或昂贵气体的专用供气渠道。

Kanokwan^[77]研究证明,膜供氧和鼓泡式联合使用,同单一鼓泡式相比,生物量增加 32%-65%;在生物量浓度较高时,可带来更大的溶氧浓度。此外,可寻找最佳喷射速率与膜通气速率之比,提高气体传质效率。

5 结语和展望

动植物细胞或组织生物反应器培养,可在人为控制条件下,获得高产的生物量、重要次生代谢产物和生物制品,其中悬浮培养是一种最常用和最普遍的培养模式。体系的悬浮主要由机械动力和气体动力实现。本文阐述的三种通气方式,其中表面曝气和膜供氧均属于机械力悬浮方式,而气体喷射式则由气体的动力来实现体系的悬浮。

表面曝气和气体喷射式相比具有较好的气体传质性能,但剪切力较大的弊端限制了其应用,挡板和导流装置的加入在一定程度上降低了剪切力损伤。气体喷射式具有较好的气体传质效率和较低的机械损伤,填充床的设计解决了气泡破碎引起的细胞损伤和泡沫堆积的问题。膜供氧具有气液界面大和气体传质效率高的优势,但其升级放大仍具有一定局限性。笔者认为该领域未来的研究可从以下几方面着手:

首先,由于需氧量和剪切力敏感程度因细胞或组织不同而异,故可对特定培养材料和最适通气方式作系统而全面的研究,当然最适通气方式并不仅以减小系统的剪切力为评估标准,因为高生物量的获取虽直接取决于低剪切状态,某些重要次生代谢产物的诱导和分离获取离不开高剪切环境的刺激。

其次,进一步改进设备,发展和融合现有通气方式,设计出新型的更温和、更有效的结构和材料,能耗更小、更易放大的生

物反应器。另外,可通过温度、化学物质的添加来达到上述效果,加入表面活性剂 PF-68 或 CMC,可提高气液传质速率。

再次,在培养过程中,可实行动态通气方式,即按体系需氧量随细胞生长时期的变化,动态改变通气方案,具体可通过改变搅拌速率、通气速率以及各种气体比例的方式,来达到最佳气体利用率,避免气体传质速率过低引起的细胞缓慢生长或气速过高造成的细胞损伤。

利用生物反应器悬浮培养动植物细胞或组织的主要目的是为了获得高产的生物量和目标产物量,因此,对于通气方式的研究应更多地着眼于细胞或组织的生长与代谢状态,而非仅仅停留在气液传质、体系混合效果上,进一步系统地研究生物反应器内通气方式如何影响细胞或组织的生长代谢和细胞受损伤的程度,有利于发展更为有效的通气方式。

参考文献(References)

- [1] 董妍玲,潘学武.植物次生代谢产物简介[J].生物学通报,2002,7(11):17-19
DONG YAN-LING, PAN XUE-WU. Brief introduction of plant cell secondary metabolites[J]. Bulletin of Biology, 2002, 7(11): 17-19
- [2] 胡凯,谈锋.药用植物细胞的大规模培养技术[J].植物生理学通讯,2004,40(2):251-259.
HU KAI, TAN FENG. The Technology for Scale-up Cell Culture of Medicinal Plants[J]. Plant Physiology Communications, 2004, 40(2): 251-259
- [3] 张文彦.生物反应器概述[J].甘肃农业,2004,11:114
ZHANG WEN-YAN. Summary of Bioreactor[J]. Gansu Agriculture, 2004, 11: 114
- [4] 边黎明,施季森.植物生物反应器细胞悬浮培养研究进展[J].南京林业大学学报(自然科学版).2004,28(4):101-104
BIAN LI-MING, SHI JI-LIN. Review on Plant Bioreactor for Plant Cell Suspension Culture[J]. Journal of Nanjing Forestry University, 2004, 28(4): 101-104
- [5] 刘春朝,王玉春,郑重,等.剪切力对植物细胞悬浮培养的影响[J].化工冶金,1998,19(4):380-381
LIU CHUN-CHAO, WANG YU-CHUN, ZHENG ZHONG, et al. Effects of shear stress on suspension cultivation of plant cells[J]. Engineering Chemistry and Metallurgy, 1998, 19(4): 380-381
- [6] LIDIJA SAJC, DRAGAN GRUBISIC, GORDANA VUNJAK-Novakovic. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research[J]. Biochem. Eng, 2000(4): 89-99
- [7] NEHRING D, CZERMAK P, VORLOP J, et al. Experimental Study of a Ceramic Microsparging Aeration System in a Pilot-Scale Animal Cell Culture[J]. Biotechnol. Prog, 2004, 20, 1710-1717
- [8] MICHAELS JD, MALLIK AK, PAPOUTSAKIS ET. Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells? [J] Biotechnol. Bioeng, 1996, 51(4): 399-409
- [9] 王爱华.表面曝气反应器化学工程性质的研究[硕士学位论文].北京:中国科学院过程工程研究所,2002.
WANG AI-HUA. Study on the chemical engineering characters of the surface aeration bioreactors [Master's Degree Thesis]. Beijing: Institute of process engineering, Chinese academy of sciences, 2002
- [10] 欧舒.流体混合技术[M].北京:化学工业出版社,1991

- OU SHU. Technology of hydrodynamic mixing[M]. Beijing: Chemical industry press, 1991
- [11] HU WS, MEIER J, WANG DIC. Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1986, 28 (1): 122-125
- [12] JOLICOEUR M, CHAVARIE C, CARREAU PJ, et al. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high density plant cell suspension culture[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1992, 39 (5): 511-521
- [13] 禹耕之, 毛在砂. 新型自旋导流表面曝气反应器性能的研究[J]. *石油炼制与化工*, 2004, 35 (3): 45-48
- YU GENG-ZHI, MAO ZAI-SHA. Performance of a novel surface aerator with self-rotating flow guide[J]. *Petroleum Processing and Petrochemicals*, 2004, 35 (3): 45-48
- [14] WU H. An issue on application of a disk turbine for gas-liquid mass transfer[J]. *Chem. Eng. Sci.*, 1995, 50 (17): 2801-2811
- [15] 戚以政, 夏杰. 生物反应工程 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 117. B
- QI YI-ZHENG, XIA JIE. *Bioreaction Engineering*[M]. Beijing: Chemical industry press, 2004: 117. B
- [16] MATSUNRA M, Masunaga H, Kobayashi J. Performance of oxygen transfer in a new gas entraining fermentor[J]. *J. Ferment. Technol.*, 1982, 60 (6): 551
- [17] KAMENA AA, CHAVARIEA C, ANDERÉ B G, et al. Design parameters and performance of a surface baffled helical ribbon impeller bioreactor for the culture of shear sensitive cells[J]. *Chem. Eng. Sci.*, 1992, 47 (8): 2375-2380
- [18] YU G, MAO Z, WANG R. A Novel Surface Aeration Configuration for Improving Gas-Liquid Mass Transfer[J]. *Chinese J. Chem. Eng.*, 2002, 10 (1): 39-44
- [19] 毛在砂, 禹耕之, 王蓉. 用于多层搅拌桨的自旋导流装置[P]. 中国发明专利: 00102746.8, 2000.
- MAO ZAI-SHA, YU GENG-ZHI, WANG RONG. Self-rotating flow guide used for multiple impeller agitators[P]. *Chinese Invention Patent*: 00102746.8, 2000
- [20] BUCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken culture[J]. *Biotechnol. Eng. J.*, 2001, 7 (2): 91-98
- [21] ZIV M. Simple bioreactor for mass propagation of plants[J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 81: 277-285
- [22] ILAN A, ZIV M, HALEVY AA. In vitro propagation in liquid culture and acclimatization of *Brodiaea*[J]. *Scientia Hort.*, 63: 101-112
- [23] 胡显文, 李佐虎, 陈建新, 等. 新型气液双升式动物细胞反应器[J]. *生物技术通讯*, 1999, 10 (2): 100-103.
- HU XIAN-WEN, LI ZUO-HU, CHEN JIAN-XIN, et al. A new air-lift and liquid-lift animal cell bioreactor[J]. *Letters in Biotechnology*, 1999, 10 (2): 100-103
- [24] STEVEN DD, KENNY O, JOHN MW, et al. Characterization of Oxygen Transfer in Miniature and Lab-Scale Bubble Column Bioreactors and Comparison of Microbial Growth Performance Based on Constant k_La [J]. *Biotechnol. Prog.*, 2005, 21: 1175-1182
- [25] MENG AX, HILL GA, DALAI AK. Hydrodynamic Characteristics in an External Loop Airlift Bioreactor Containing a Spinning Sparger and a Packed Bed[J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2002, 41: 2124-2128
- [26] POULSEN BR, IVERSEN JLL. Characterization of Gas Transfer and Mixing in a Bubble Column Equipped with a Rubber Membrane Diffuser[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1998, 58 (6): 633-641
- [27] KANOKWAN K, PAULINE MD. Application of Membrane Tubing Aeration and Perfluorocarbon To Improve Oxygen Delivery to Hairy Root Cultures[J]. *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14: 479-486
- [28] LUO X, LEE DJ, LAU R, et al. Maximum stable bubble size and gas holdup in high-pressure slurry bubble columns[J]. *AIChE J.*, 1999, 45 (4): 665-680
- [29] SON SH, CHOI SM, LEE YH, et al. Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19: 628-633
- [30] BOUAIFI M, HEBARD G, Bastoul D, et al. A comparative study of gas holdup, bubble size, interfacial area and mass transfer coefficients in stirred gas-liquid reactors and bubble columns[J]. *Chem. Eng. Process*, 2001, 40 (1): 97-111
- [31] CHISTI Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors[J]. *Trends in Biotechnol.*, 2000, 18 (10): 420-432
- [32] MOLINA GRIMA E, CHISTI Y, MOO-YOUNG M. Characterization of shear rates in airlift bioreactors for animal cell culture[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 54 (3): 195-210
- [33] KWOK KH, DORAN PM. Kinetic and stoichiometric analysis of hairy roots in a segmented bubble column reactor[J]. *Biotechnol. Prog.*, 1995, 11: 429-435
- [34] DALY JG, PATEL JG, BBUKUR DB. Measurement of gas holdups and sauter mean bubble diameters in bubble column reactors by dynamic gas disengagement method[J]. *Chem. Eng. Sci.*, 1992, 47 (13-14): 3647-3654
- [35] ZHI C, RORRER GL. Photolithotrophic cultivation of *Laminaria saccharina* gametophyte cells in a bubble-column bioreactor[J]. *Enzyme Microb Tech.*, 1996, 18 (4): 291-299
- [36] MERCHUK JC, BENN-ZVI S, NIRANJAN K. why use bubble-column bioreactors? [J]. *Trends in Biotechnology*, 1994, 12 (12): 501-511
- [37] GOUVEIA ER, HOKKA CO, BADINO-Jr AC. The effects of geometry and operational conditions on gas holdup, liquid circulation and mass transfer in an airlift reactor[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2003, 20 (4): 363-374
- [38] ZHENG YG, WANG Z, CHEN XL, Zhang CH. Production of Extracellular Protease from Crude Substrates with Dregs in an External-Loop Airlift Bioreactor with Lower Ratio of Height to Diameter[J]. *Biotechnol. Prog.*, 2001, 17: 273-277
- [39] GAVRILESU M, TUDOSE RZ. Concentric-tube Airlift Bioreactors. Part I: Effects of Geometry on Gas Holdup[J]. *Bioprocess Engineering*, 1998, 19: 37-44
- [40] GAVRILESCU M, TUDOSE RZ. Concentric-tube Airlift Bioreactors. Part III: Effects of Geometry on mass bioreactors[J]. *Bioprocess Engineering*, 1998, 19: 175-178
- [41] GAVRILESCU M, TUDOSE RZ. Concentric-tube Airlift Bioreactors. Part II: Effects of Geometry on liquid circulation[J]. *Bioprocess Engineering*, 1998, 19: 103-109
- [42] SU WW, HE BJ, LIANG H, et al. A perfusion air-lift bioreactor for high density plant cell cultivation and secreted protein production[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 50 (2-3): 225-233
- [43] ZHANG X, LI DP, ZHANG YP, et al. Comparison of photobioreac-

- tors for cultivation of *Undaria pinnatifida* gametophytes[J]. *Biotechnology Letters*, 2002, 24: 1499-1503
- [44] MERCHUK JC, RONEN M, GIRIS S, et al. Light/dark cycles in the growth of the red microalga *Porphyridium* sp. [J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1998, 59 (6) : 705-713
- [45] JOBSES I. Martens, D. Tramper J. Lethal events during gas sparging in animal cell culture[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1991, 37 (5) : 484-490
- [46] ISHIDA M, HAGA R, NISHIMURA N, et al. High cell density suspension culture of mammalian anchorage independent cells: Oxygen transfer by gas sparging and defoaming with a hydrophobic net[J]. *Cytotechnology*, 1990, 4 (3) : 215-225
- [47] NIKAKHTARI H, HILL GA. Enhanced Oxygen Mass Transfer in an External Loop Airlift Bioreactor Using a Packed Bed[J]. *Ind. Eng. Chem. Res*, 2005, 44, 1067-1072
- [48] 张六六, 许春燕, 牛津立, 等. 中空纤维膜无泡供氧过程的传质性能研究[J]. *膜科学与技术*, 2004, 25 (5) : 16-21
- ZHANG LIU-LIU, XU CHUN-YAN, NIU JIN-LI, et al. Study of mass transfer on hollow fiber membrane bubbleless aeration process[J]. *Membrane Science and Technology*, 2004, 25 (5) : 16-21
- [49] 邓斐, 朱文婷. 生物膜法新工艺—无泡曝气膜生物反应器[J]. *工业用水与废水*, 2004, 35 (3) : 11-14
- DENG FEI, ZHU WEN-TING. A New Technology of Biomembrane Process-Bubble-Free Aeration Membrane Biological Reactor[J]. *Industrial Water & Wastewater*, 2004, 35 (3) : 11-14
- [50] 顾国维, 何以亮. 膜生物反应器—在污水处理中的研究和应用[M]. 北京: 学工业出版社, 2002, 32
- GU GUO-WEI, HE YI-LIANG. Study and application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters [M]. Beijing: Chemical industry press, 2002, 32
- [51] WINSTON W, CARAM HUGO S, HUMPHREY AE. Optimal Design of the Tubular Microporous Membrane Aerator for Shear-Sensitive Cell Cultures[J]. *Biotechnol. Prog.* 1992, 8 (1) : 19-24
- [52] 沈志松, 钱国芬, 王猛, 等. 无泡式中空纤维膜发酵供氧的初步研究[J]. *膜科学与技术*, 1998, 18 (6) : 42-46
- SHEN ZHI-SONG, QIAN GUO-FEN, WANG MENG, et al. Study on the bubbleless hollow fiber membrane aeration in fermentation reaction[J]. *Membrane Science and Technology*, 1998, 18 (6) : 42-46
- [53] 虞星炬. 膜生物反应器研究进展[J]. *化工进展*, 1993, (1) : 11-16.
- YU XING-JU. Membrane Bioreactor and Its Recent Advances[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 1993, (1) : 11-16
- [54] VOSS MA, AHMED T, SEMMENS MJ. Long-term performance of parallel-flow, bubbleless, hollow-fiber-membrane aerators[J]. *Water Environ Res*, 1999, 71(1) : 23-30
- [55] KILBURN DG, MORLEY MA. Method for controlling dissolved oxygen tension and measuring respiration rate in suspension cultures of animal cells[J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1972, 14 : 499-504
- [56] EBERHARD U, SCHUGERL K. Investigations of reactors for insect cell culture[J]. *Dev. Biol. Stand*, 1987, 66 : 325-330
- [57] 黄卫星, 钟月华, 肖泽仪, 等. 硅橡胶膜生物反应器及其用于乙醇连续发酵的研究[J]. *四川大学学报(工程科学版)*, 2003, 35 (1) : 1-7
- WANG WEI-XING, ZHONG YUE-HUA, XIAO ZE-YI, et al. Research on Silicone Rubber Membrane Bioreactor and Its Application to Ethanol Production with Continuous Fermentation[J]. *Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition)*, 2003, 35 (1) : 1-7
- [58] SU WW. Production of plant secondary metabolites from high density perfusion cultures in a membrane aerated bioreactor [D]. Bethlehem: Lehigh University, 1991
- [59] HVOSLEF-Eide AK, OLSEN OAS, LYNGVED R, et al. Bioreactor design for propagation of somatic embryos. *Plant Cell[J]. Tissue and Organ Culture*, 2005, 81 (3) : 265-276
- [60] LEHMANN J, PIEHL GW, SCHULZ R. Bubble free cell culture aeration with porous moving membrane[J]. *Dev Biol Stand*, 1987, 66 : 227-240
- [61] BöhME C, SCHRÖDER MB, JUNG-HEILIGER H, et al. Plant cell suspension culture in a bench-scale fermenter with a newly designed membrane stirrer for bubble-free aeration[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48 (2) : 149-154
- [62] CARVALHO AP, MALCATA FX. Transfer of Carbon Dioxide within Cultures of Microalgae: Plain Bubbling versus Hollow-Fiber Modules[J]. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17 : 265-272
- [63] POLARD DJ, ISON AP, AYAZI SHAMLOU P, LILLY MD. Influence of a propeller on *Saccharomyces cerevisiae* fermentations in a pilot scale airlift bioreactor[J]. *Bioprocess. Eng*, 1997, 16(5): 273-281
- [64] POULSEN BR, IVERSEN JLL. Membrane Sparger in Bubble Column, Airlift, and Combined Membrane-Ring Sparger Bioreactors [J]. *Biotechnol. Bioeng*, 1999, 64 (4) : 452-458