

动物细胞培养用生物反应器设计原理

谭文松 戴千策 陈因良

(华东理工大学生化工程研究所 上海 200237)

摘要 动物细胞培养用生物反应器设计和放大的关键问题是细胞破损与供氧和混合的矛盾,在分析细胞破损机理基础上,提出了动物细胞培养生物反应器的设计原理——设计模型和有关设计条件,从而清楚地确立了细胞死亡速度与培养基组成、反应器设计和操作参数间的定量关系,以及反应器设计应遵循的保证细胞生长和满足传质要求的条件。还对强化传质和抑制细胞破损这一矛盾作了简要分析和讨论。

关键词 动物细胞培养, 生物反应器设计, 细胞死亡率, 气液传质

动物细胞培养技术是生物技术中发展最为迅速的研究领域之一,应用动物细胞体外大规模培养技术可以生产大量结构复杂的生物制品,如各类疫苗、干扰素、激素、酶、生长因子、病毒杀虫剂以及各类单克隆抗体等,目前全世界一半以上的现代生物技术产品的销售收入来自动物细胞培养技术^[1]。在大规模动物细胞培养过程中,为保证细胞生长和存活必须提供足够的溶氧和混合均一的培养环境,而最有效和切实可行的途径是采用机械搅拌和/或直接气体鼓泡,然而,由于动物细胞的脆弱性,生物反应器中的机械搅拌和通气鼓泡将不可避免地伤害和破损细胞^[2~5]。因此,动物细胞培养生物反应器的设计所面临的关键问题是如何解决细胞破损与供氧和混合的矛盾。

1 动物细胞破损机理

动物细胞易于破损是动物细胞体外培养技术及其生物反应器研究的一个特殊科学问题,只有充分认识了细胞破损的机理,才有可能揭示出正确的生物反应器设计、放大规律,实现动物细胞的大规模培养过程。为此,国内外许多学者对生物反应器中导致细胞破损的基本因素及其作用机理做了大量基础研究,取得了很大进展。

大量研究结果表明^[2~8],无论是机械搅拌式生物反应器还是鼓泡式生物反应器,导致细胞损伤和破损的原因主要是气泡现象(搅拌时的气体卷吸和气泡夹带以及直接气体鼓泡),而在没有气泡存在时,悬浮动物细胞能适应很高的机械搅拌强度,流体主体湍流剪切只有在极高转速下当 Kolmogorov 湍流涡旋尺度与细胞大小相当或小于细胞时才能对细胞产生破损作用。Tramper^[2,9]、Handa-Corrigan^[7]、Jobses^[8]及其他们的合作者研究证明在鼓泡柱生物反应器中绝大部分的细胞破损发生在液面上的气泡释放区,在该区域内气泡发生液膜排液、聚并和破裂。最近,Oh 等人^[10]、Yang 等^[11]的研究结果说明,在搅

本文部分工作获上海市科学技术发展基金和“863”计划的资助。
本文于 1995 年 1 月 12 日收到。

拌生物反应器中培养基主体及桨叶区的气泡分裂与聚并也是导致细胞破损的一个区域。Bavarian 等⁽¹²⁾应用高速显微摄像技术观察到了昆虫细胞与气泡间的非特异性粘附以及这些被气泡吸附的细胞向泡沫区的迁移。随后, Gacia-Briones 等⁽¹³⁾采用盖玻片捕捉气泡破裂时上升射流分裂的微小液滴, 发现在这种射滴中存在大量细胞, 且其中 90% 以上的细胞已遭破损而死亡。谭文松等人⁽¹⁴⁾应用泡沫分馏原理对细胞在气泡表面的吸附作了定量研究, 发现在 2.2~2.6mm 直径的气泡上每 cm^2 的气泡表面所吸附的细胞数可达 1500 个左右。一系列流体力学分析^(15,16)表明气泡破裂过程中产生的流体剪切力足可以使粘附于气泡表面或存在于气泡液膜中的细胞破损。由此可见, 气泡对细胞的破损作用首先发生的是细胞在气泡表面的吸附, 细胞破损将是一个面积过程, 细胞死亡速率将与细胞在气泡表面的吸附程度以及气泡表面发生聚并、排液和破裂的速率有关。

2 生物反应器设计原理

2.1 设计模型-细胞死亡速率

通过前面对细胞破损机理的分析, 可以发现生物反应器中细胞破损大致经历了如下 3 个过程: (1) 细胞在气泡表面吸附; (2) 这些细胞被气泡带入泡沫; (3) 细胞被气泡液膜排液、聚并和破裂产生的剪切力所破损或物理损失。除了细胞被气泡带入泡沫区遭破损之外, 若在培养基主体也发生气泡分散与聚并 (尤其是搅拌生物反应器), 那么这些气泡现象也将导致细胞破损。为了建立细胞破损速率与反应器设计和操作参数之间的关系, 不妨先假设 (1) 细胞在反应器中没有生长; (2) 气泡在培养基主体中没有发生聚并与分裂, 气泡表面积的破裂速度等于其生成速率; (3) 气泡在离开液体表面并发生破裂时细胞在其表面的吸附达到平衡状态; (4) 吸附于气泡表面的所有细胞遭到破损而死亡; (5) 不考虑基质和产物抑制对细胞死亡的影响, 则对于体积为 V , 活细胞密度为 c 的鼓泡式生物反应器, 在 dt 时间间隔内对细胞作物料衡算可得:

$$-d(Vc) = \Gamma_c S dt \quad (1)$$

对于一定细胞密度的细胞悬浮液和气泡大小, 细胞在气泡表面的吸附量与其主体浓度符合下列平衡关系⁽¹⁴⁾:

$$\Gamma_c = \alpha c \quad (2)$$

式中 α 可由泡沫分馏实验测定⁽¹⁴⁾。

当培养基主体中没有发生气泡聚并与分裂时, 气泡表面积破裂速率等于其生成速率:

$$S = \frac{F}{\frac{\pi}{6} d_b^3} \cdot \pi d_b^2 = \frac{6F}{d_b} \quad (3)$$

由于生物反应器在操作过程中体积 V 不变, 则将式(2)和式(3)代入式(1)可得:

$$\frac{dc}{dt} = -\alpha \frac{6F}{d_b V} c \quad (4)$$

式中 dc/dt 为活细胞密度随时间的变化率, 当没有细胞生长时即为细胞死亡速率。由上式可见, 细胞死亡速率符合一级反应动力学规律, 一级细胞死亡速率常数 k_d 为:

$$k_d = \alpha \frac{6F}{d_b V} \quad (5)$$

在实际生物反应器中,气泡发生破裂时细胞在其表面的吸附会在某种程度上偏离泡沫分馏实验所测定的平衡值,如细胞密度较低时,细胞在离开液面进入泡沫的气泡上的吸附将偏离平衡;泡沫区中的液膜排液也有可能使原已吸附于气泡表面的细胞离开气泡回到培养基主体而免于破损。当流体主体中也发生气泡聚并与分裂时,这些气泡现象也会造成细胞破损,使细胞死亡速率增加。应特别予以指出的是,运动气泡周围的流体力学环境会对细胞在气泡表面的吸附产生重要影响,使细胞吸附于气泡表面的是亲和力,当细胞粘附于气泡表面时,细胞将受到流体粘性力的作用,而这个粘性力是使细胞离开气泡表面,显然,细胞在气泡表面的吸附程度将决定于这两个力的相对大小。亲和力由细胞与气泡间的疏水作用产生,对给定的细胞和培养基组成,它为常数,而流体对细胞作用的粘性力与运动气泡周围边界层的流体力学条件有关,将直接依赖于气泡大小。因此,细胞在气泡表面的吸附程度将随气泡大小而变化,对于气泡大小影响细胞吸附程度的流体力学基础作者正在研究之中。考虑到实际生物反应器中细胞与气泡相互作用的这种复杂性,引进修正系数 f ,则细胞死亡速率常数变为:

$$k_d = f\alpha \frac{6F}{d_b V} \quad (6)$$

由式可见,细胞破损程度(k_d)与气体鼓泡速率 F 和细胞在气泡表面的吸附系数 α 成正比,而与气泡直径 d_b 和反应器体积 V 成反比。式中 α 代表了培养基组成对细胞破损的影响,而 $f \frac{6F}{d_b V}$ 则代表了反应器参数对细胞破损的影响, f 须由实验予以测定。从反应器设计和操作角度看,降低气体鼓泡速率、增加气泡直径和反应器体积均能使细胞死亡速率下降。式(6)清楚地确立了生物反应器中细胞破损速率与培养基组成、反应器设计和操作参数间的定量关系,而且该模型还同时包含了气泡对细胞破损作用的物理机理。

2.2 细胞生长设计条件

在实验培养过程中,动物细胞以一定生长速率生长,其比生长速率为 μ ,考虑到反应器中的细胞破损,间歇培养过程中运动细胞的生长速率为:

$$\frac{dc}{dt} = (\mu - k_d)c \quad (7)$$

由式可见,为保证动物细胞在培养过程中实现净生长,细胞死亡速率常数必须小于细胞比生长速率,即:

$$k_d < \mu \quad (8)$$

对于稀释率为 D 的连续培养过程,细胞生长速率:

$$\frac{dc}{dt} = (\mu - D - k_d)c \quad (9)$$

保证细胞生长,必须满足:

$$k_d \leq \mu - D \quad (10)$$

式中“=”是指培养过程维持稳定状态。式(8)和(10)就是确保动物细胞培养过程正常运行时生物反应器设计和操作所应满足的条件。

2.3 反应器传质设计条件

动物细胞培养生物反应器的设计和操作,除了要抑制细胞破损外,还必须满足细胞对

传质和混合的要求, 其中的控制因素是细胞生长对氧的要求。

在生物反应器中气液界面氧的传递速率 OTR 为

$$OTR = k_L a [c^* (O_2) - CO_2] \quad (11)$$

式中 $k_L a$ 为体积氧传质系数 s^{-1} 。

细胞耗氧速率 OUR 为:

$$OUR = q(O_2) \cdot c \quad (12)$$

对于杂交瘤细胞, $q(O_2)$ 的平均值可取为 $5.8 \times 10^{-17} \text{ mol} \cdot \text{Cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[17]。

当培养基中溶氧浓度达到稳定状态时, $OTR = OUR$; 为了保证培养过程中细胞生长不受体氧的限制, 培养基中溶氧水平必须高于满足细胞生长的最低氧浓度 $c(O_2), \text{min}$; 则氧的传递速度必须大于细胞耗氧速率

$$k_L a [c^* (O_2) - c(O_2), \text{min}] \geq q(O_2) \cdot c \quad (13)$$

对于空气供氧系统, 常压下氧在培养基中的饱和浓度约为 $0.22 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{ml}^{-1}$, 对于杂交瘤细胞当溶氧水平低于 5% ~ 8% 空气饱和度时其生长开始受到抑制^[18, 19], 在此取 $c(O_2), \text{min} = 0.05c^* (O_2)$, 则在活细胞密度为 c 时, 生物反应器体积氧传质系数必须满足下式

$$\begin{aligned} k_L a &\geq 2.78 \times 10^{-10} c && s^{-1} \\ &= 10^{-6} c && h^{-1} \end{aligned} \quad (14)$$

由上式可见, 要支持 $10^6 \text{ Cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的细胞生长, 反应器的传质系数 $k_L a$ 必须大于或等于 $1h^{-1}$, 类似地, 当要支持 $10^7 \text{ Cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的细胞生长时 $k_L a$ 必须大于或等于 $10h^{-1}$ 。

3 讨 论

抑制细胞破损与满足细胞生长对供氧的要求是动物细胞培养生物反应器设计、放大和操作的主要矛盾。对于鼓泡式(鼓泡柱或气升式)生物反应器, 气液界面的传质主要是自然对流传质过程, 强化传质主要通过增加传质比表面积 a 来实现, 如提高气体鼓泡速率和减小气泡直径。当气体流量和培养基物性一定时, 生成的气泡直径主要与气体分布器孔口直径有关, 而且在较低鼓泡速率下流体主体中气泡分散与聚并可以忽略不计。对于机械搅拌式生物反应器, 当转速较高时, 气液界面传质成为强制对流传质过程, 强化传质主要通过提高流体湍流强度和气体分散特性来实现。然而, 由式(6)可知, 提高气体鼓泡速率, 减小气泡直径以及培养其主体中气泡的不断分散与聚并, 都将加剧细胞破损的发生, 导致细胞死亡速率的提高。

实际上, 由于动物细胞生长速率较慢, 其耗氧速率远低于原核微生物, 因此动物细胞对反应器传质的要求要比微生物发酵低得多, 由前面分析可以看到, 支持 $10^7 \text{ Cell} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的细胞生长, 反应器的体积氧传质系数 $k_L a$ 大于 $10h^{-1}$ 就可以满足。另外, 要提高反应器的传质速率还可通过直接通氧以提高氧在培养基中的饱和浓度来部分实现。因此采用气升式生物反应器是可以满足动物细胞生长对溶氧和混合要求的。相反, 如果采用机械搅拌式生物反应器, 在较高转速下使气泡分散以提高传质速率, 然而这种高传质速率对细胞培养而言并无什么益处, 因为这种传质速率的提高是以加剧细胞破损为代价的, 生物反应器的设计与操作只要使其传质速率能满足细胞的要求即可, 任何通过改变气泡分

散特性提高的传质速率都将伴随细胞死亡速率的提高,因此传质速率高于细胞的要求是不足取的。另一方面,如果机械搅拌强度不足以分散气泡,那么在这种情况下,搅拌反应器中的传质过程与鼓泡式(鼓泡柱或气升式)反应器中的就没有什么差别。事实上,大部分动物细胞培养生物反应器就是在这种“温和”情况下操作的。显然,在这种情况下机械搅拌的存在也是多余的,相反它却给生物反应器的设计和操作带来许多麻烦和困难。因此,对于大规模动物细胞培养过程,选择没有机械搅拌的气体鼓泡式生物反应器是非常适宜的。

符 号 说 明

a ——气液传质比表面积 / cm^{-1}	f ——修正系数
c ——活细胞密度 / $\text{Cell} \cdot \text{ml}^{-1}$	k_d ——一级细胞死亡速率常数 / s^{-1}
$c^*(\text{O}_2)$ ——氧在培养基中的饱和浓度 / $\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$	$K_L a$ ——氧传质系数 / $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
$c(\text{O}_2)$ ——氧在培养基中的实际浓度 / $\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$	$q(\text{O}_2)$ ——单位细胞耗氧速 / $\text{mol} \cdot \text{Cell}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$c(\text{O}_2)_{\text{min}}$ ——细胞生长不受限制的最低氧浓度 / $\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$	S ——气泡表面积破裂速率 / $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
D ——连续培养过程稀释率 / s^{-1}	t ——时间 / s
d_s ——气泡平均直径 / cm	V ——反应器体积 / ml
F ——气体鼓泡速率 / $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$	α ——细胞在气泡表面的吸附系数 / cm
	Γ_c ——单位气泡表面吸附的细胞数 / $\text{Cell} \cdot \text{cm}^{-2}$
	μ ——细胞比生长速率 / s^{-1}

参 考 文 献

- [1] Spier R E. In: Sasaki R, Ikura K (eds.), *Animal cell Culture and Production of Biologicals*, Tokyo: Kodansha, 1991, pp. 41~46.
- [2] Tramper J, Williams J B, Vlaskovic J M. *Enzyme Microb Technol*, 1986, 8: 33~36.
- [3] Oh S K W, Nienow A W, Al-Rubeai M *et al.* *J Biotechnol*, 1989, 12: 45~62.
- [4] Gardner A R, Gainer J L, Kirwan D J. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 35: 940~947.
- [5] Tan W S, Chen Y L, Dai G C. In: Nienow A W eds. *Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*, BHR Group Series No. 5, London: Mechanical Engineering Publications, 1993, pp. 153~161.
- [6] Kunas K T, Papoutsakis E T. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36: 476~483.
- [7] Handa-Corrigan A, Emery A N, Spier R E, *Enzyme Microb Technol*, 1989, 11: 230~235.
- [8] Jobses I, Martens D, Tramper J. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37: 484~490.
- [9] Tramper J, Smit D, Straatman J *et al.* *Bioproc Eng*, 1988, 3: 37~44.
- [10] Oh S K W, Nienow A W, Al-Rubeai M *et al.* *J Biotechnol*, 1992, 22: 245~270.
- [11] Yang J-D, Wang N S. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 40: 806~816.
- [12] Bavarian F, Fan L S, Chalmers J J. *Biotechnol Prog*, 1991, 7: 140~150.
- [13] Garcia-Briones M, Chalmers J J, *Ann NY Acad Sci*, 1992, 665: 219~229.
- [14] Tan W S, Dai G C, Chen Y L. *Cytotechnology*, 1994, 15: 321~328.
- [15] Chalmers J J, Bavarian F. *Biotechnol Prog*, 1991, 7: 151~158.
- [16] Cherry R S, Hulle C T. *Biotechnol Prog*, 1992, 8: 11~18.
- [17] Randerson D H. *J Biotechnol*, 1985, 2: 241~255.
- [18] Boraston R, Thompson P W, Garland S *et al.* *Dev Biol Stand*, 1984, 55: 103~111.
- [19] Ozturk S S, Palsso B O. *Biotechnol Prog*, 1990, 6: 437~446.

Principle of the Bioreactor Design for Animal Cell Cultures

Tan Wensong Dai Gance Chen Yinliang

(Research Institute of Biochemical Engineering East

China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract A major problem encountered in the animal cell culture bioreactor design and scale-up is that the animal cells are susceptible to damage in the presence of mechanical agitation and/or gas sparging needed to supply sufficient oxygen and mixing to the cultures. Based on the analysis of the cell damage mechanisms, here the principle of the bioreactor design for suspended animal cell cultures has been developed. Thus, the quantitative relationship of the cell death rate with the media formulations and the bioreactor parameters, and the design conditions which must be held to ensure the cell growth and meet the oxygen requirements in culture processes are established clearly. Finally, the contradiction of the intensification of the gas-liquid mass transfer and the suppression of the cell damage was simply analyzed and discussed.

Key words Animal cell cultures, bioreactor design, cell death rate, gas-liquid mass transfer