

适用于动物细胞培养的搅拌桨及其数值模拟

颜旭¹, 张志强¹, 顾承真¹, 洪厚胜^{1,2*}

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 211816;

2. 南京汇科生物工程设备有限公司, 江苏 南京 210009)

摘要:提出了一种方法考察桨叶在动物细胞培养上的适用性,应用计算流体力学软件 CFX 综合比较在 30 L 搅拌槽中 4 种不同桨叶的流场、剪切率、Kolmogorov 尺度和混合时间,并进行 PIV 实验验证。结果表明,在单层搅拌体系 80 r/min 转速下,象耳桨和螺旋桨性能能满足细胞培养要求,Rushton 桨在细胞培养罐放大时可以考虑,45° 四折叶桨能够适用于细胞培养,但效果不如象耳桨与螺旋桨,PIV 实验验证了模拟结果可行性。

关键词:动物细胞培养;搅拌桨;数值模拟;PIV

中图分类号:Q813.11

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)10-0162-05

Cell culture of impeller suitable for animals and its numerical simulation

YAN Xu¹, ZHANG Zhi-qiang¹, GU Cheng-zhen¹, HONG Hou-sheng^{1,2*}

(1. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China;

2. Nanjing Huike Bioengineering Equipment Corporation, Nanjing 210009, China)

Abstract: Computational fluid dynamics software CFX is used to investigate the applicability of the impeller in animal cell culture by comparing four different impeller properties in 30L vessel such as flow field, shear rate, the Kolmogorov scale and mixing time. The PIV experiment is also performed to verify the simulation results. The results show that in the single impeller system with 80 r/min speed, Elephant Ear impeller and Propeller impeller can satisfy the requirement of cell culture. Rushton impeller can be considered in scale-up animal cell reactor. 45° Four-pitched-blade-impeller can be suitable for cell culture but the effect is less than Elephant Ear impeller and Propeller impeller. The feasibility of the simulation results is verified by PIV experiment.

Key words: animal cell culture; impeller; numerical simulation; PIV

由于微生物中的原核细胞缺乏蛋白质转录后修饰能力,目前基因工程技术采用动物细胞作为表达系统应用于各种蛋白质药物研究^[1],动物细胞大规模培养技术推动了疫苗、单克隆抗体及组织工程领域的迅速发展,成为生物产业关键技术之一^[2-5]。

动物细胞在很多方面是不同于原核细胞和真菌的,例如较低的生长率、较高的剪切敏感性以及较低的气泡耐受性,这些特性会对工业上动物细胞反应器的设计产生一定的影响。搅拌式反应器由于其应用范围广、操作控制简单、规模放大容易等特点,常用于动物细胞或微载体悬浮培养。在动物细胞培养工艺中加入非离子性表面活性剂 Pluronic F-68 可减少通气后气泡破裂对细胞带来的损伤^[6],搅拌桨则应该尽量避免细胞受到损伤,同时将细胞及其培养液快速混合均匀。从国外各动物细胞反应器商品化公司如美国 NBS、德国 Sartorius stedim、瑞士比欧,以及各专利^[7]文献[8-10]报导来看,目前常用于

培养动物细胞的搅拌器有三叶推进式桨(螺旋桨)、Elephant Ear 桨(象耳桨)、六直叶涡轮桨(Rushton 桨)、45°四折叶桨。本文中不考虑通气状态对细胞带来的剪切损伤,提出一种方法考察桨叶在动物细胞培养中的适用性,采用计算流体力学(CFD)中商业 ANSYS CFX 软件对这 4 种桨叶进行单项模拟研究,考察并比较不同桨叶在 30 L 反应器中速度场分布、剪切率分布、Kolmogorov 尺度分布和混合时间,并对象耳桨的流场模拟结果进行 PIV 实验验证。

1 搅拌槽结构与实验方法

1.1 搅拌槽结构

图 1 给出了象耳桨搅拌槽结构图,其他桨叶也参考此结构做实验,槽体容积约 30 L,内径 T 为 300 mm,有机玻璃材质,平底圆柱形,4 层挡板,搅拌槽内置于有机玻璃方形槽,这样在激光照射下减少壁面对光线的折射作用。装液高度 $H/T=1$,桨叶直

收稿日期:2014-05-05

作者简介:颜旭(1990-),男,硕士生;洪厚胜(1965-),男,教授,研究方向为生化工程及生化反应设备,通讯联系人,025-83403940, hhs@njtech.edu.cn。

径 $D/T=1/3$, 挡板宽度 $W/T=1/10$, 挡板距壁面长度为 $T/100$, 搅拌桨叶安装高度 $C/T=1/3$ 。

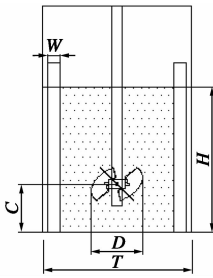


图1 象耳桨搅拌槽实验装置示意图

1.2 实验方法

PIV 实验主要验证 CFD 模拟模型选择及预测结果可行性。实验操作介质为自来水, 装液高度 300 mm, 并加入适量二氧化硅粉末作为示踪粒子使其跟随性良好, 安装桨叶为象耳桨, 下吸式搅拌, 转速 80 r/min。实验采用的 PIV 系统是美国 TSI 公司第二代系统, 以激光器作为光源, 通过对撒播粒子的流场连续 2 次照明, 用 CCD 相机 (PIVCAM14-10) 记录 2 次曝光粒子图像, 综合多个瞬态粒子轨迹求平均值得到相应粒子速度值, 再经软件处理得到速度场分布。

2 模拟方法

2.1 网格划分

参考 PIV 30 L 容器建模, 其中 4 种桨叶依据标准规格自行设计, 桨叶形状如图 2 所示。用 ICEM 软件对各个几何体进行网格划分, 采用非结构化的四面体网格。经过网格无关性考察, 不同网格量对

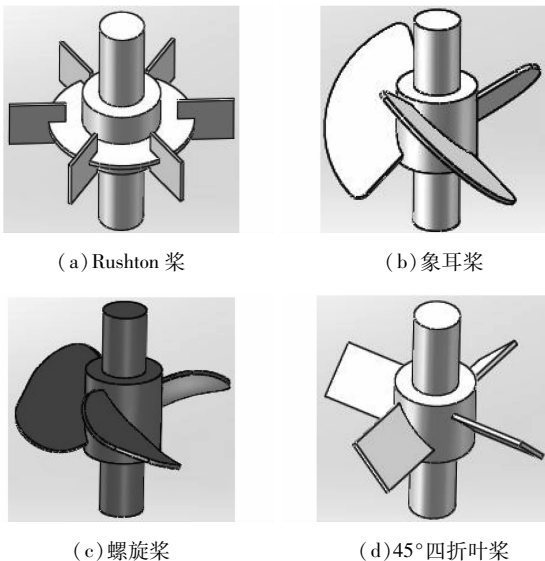


图2 4种桨叶

各参数值变化不大, 4 种桨叶模拟时网格数接近, 其中旋转区域网格均为 38 万左右, 通用的静止区域网格为 150 万。

2.2 Kolmogorov 涡旋

多项研究表明, Kolmogorov 涡旋与细胞间相互作用是细胞损伤的主要原因, 并且表征了反应器中湍流扩散过程。当 Kolmogorov 涡旋尺寸大于细胞直径时, 这种涡旋能包容整个细胞, 而且很快将细胞加速到相同速度, 所以它们对细胞只起输送作用; 当 Kolmogorov 涡旋尺寸小于或接近细胞直径时, 这样的涡旋无法将细胞或微载体加速到其同样的速度, 并将动能耗散在细胞上, 它们之间的高速流体剪切会使细胞破裂而导致细胞死亡。如果采用微载体悬浮培养细胞时, 一般认为, Kolmogorov 涡旋尺寸大于微载体直径的 $1/2 \sim 2/3$, 则可避免由于湍流所引起的对细胞的损伤^[11-12]。Kolmogorov 涡旋尺寸见公式(1):

$$\lambda = (\nu^3/\varepsilon)^{1/4} \times 10^6 \quad (1)$$

式中, λ 为 Kolmogorov 长度, μm ; ν 为运动黏度, m^2/s ; ε 为单位质量流体能量耗散率, m^2/s^3 。

2.3 模拟参数设置

常保安^[13]利用 R/S 流变仪对 CHO 细胞在不同成长阶段培养液进行测定, 通过与水相对比发现, 在培养初期, CHO 细胞培养液流变性接近水的流变特性, 因为本次模拟实验采用水相, 并参考细胞培养常用温度进行水相 37°C 模拟, 定义的模型参数如表 1。采用多重参考系 (MRF) 方法处理动静区域, 湍流模型采用标准 $k-\varepsilon$ 模型, 边界条件近壁面采用标准壁面函数处理, 搅拌转速参考 30 L CHO 细胞培养罐常用转速 (80 r/min ^[14]), 对螺旋桨、象耳桨、Rushton 桨、 45° 四折叶桨进行单相模拟, 先求解稳态计算, 再将稳态结果导入瞬态模拟计算混合时间。

表1 30 L 搅拌槽计算模型的参数

几何模型参数	参数值	物性参数	水
搅拌槽直径 D/m	0.3	温度 $T/^\circ\text{C}$	37
装液高度 H/m	0.3	动力黏度 $\mu/(\text{Pa}\cdot\text{s})$	0.686×10^{-3}
桨叶安装高度 C/m	0.1	密度 $\rho/(\text{kg}\cdot\text{m}^{-3})$	993.3

3 模拟结果与讨论

3.1 速度流场分布

各桨叶在 80 r/min 转速下液相流场竖直平面分布如图 3 所示, 带斜叶式搅拌桨都采用下吸式排液方式, 有利于将罐底沉淀的微载体与细胞悬浮起

来。从速度流场分布比较,浆叶安装高度 C/T 为 $1/3$ 时,除了 Rushton 浆叶呈现径向混合外,另外 3 种浆叶都表现出明显的轴向混合性能,象耳浆与 45° 四折叶浆流形相似;从各区域速度大小比较,各浆叶在旋涡处液相速度较小, Rushton 浆表现最明显,并且呈现 2 个旋涡流体循环不利于各营养物混合,单层浆体系不适用于动物细胞培养;螺旋浆在左上角处液相速度小,循环效果差,缺少物质交换; 45° 四折叶浆与象耳浆相比在低速区域表现更明显,并且象耳浆速度梯度小,浆叶下倾式转动时,向下输送的速度较大,有利于及时将罐底的物料或微载体悬浮起来。从整体速度场分布比较,在单层浆搅拌体系,各浆叶适用性结果为象耳浆 $> 45^\circ$ 四折叶浆 $>$ 螺旋浆 $>$ Rushton 浆。

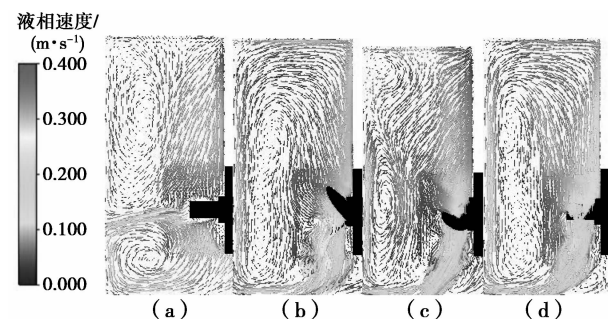


图 3 4 种浆叶液相流场矢量图

3.2 剪切率分布

动物细胞没有细胞壁,对剪切非常敏感,所以在动物细胞反应器中应该选择剪切力小并且剪切温和的搅拌浆。Begley 提出,细胞生长的最佳状态时的剪切应力数量级约为 $0.1 \text{ Pa}^{[15]}$,但是目前能够通过实验直接测量不同浆叶剪切应力很难,只能通过数值模拟软件进行预测与估计。本文中采用 37°C 时的水相为参考,做单相模拟忽略气泡对细胞带来的剪切损伤,水为牛顿流体,剪切应力计算见公式(2),动力黏度是个定值,所以可以由剪切率大小来评估不同浆叶的剪切力数值。如表 2 给出了 4 种浆叶在不同剪切率范围的对比情况,在 80 r/min 时模拟结果最大剪切率没有超过 80 s^{-1} ,本文中定义 37°C 水相的动力黏度为 0.686×10^{-3} ,即 4 种浆叶剪切力都没超过 0.055 Pa ,这 4 种浆叶在转速 80 r/min 时都可适用;另外从表 2 看出, Rushton 浆高剪切率占比重大,低剪切率占比重小,象耳浆尽管在低剪切率占比重与 Rushton 浆接近,但是在剪切率范围 $5 \sim 20 \text{ s}^{-1}$ 所占比重多些,其他 2 种浆叶比较来看螺旋浆在低剪切率范围最多,在剪切率 $20 \sim$

40 s^{-1} 内更小。从总体剪切率分布来看,4 种浆叶的剪切力评估优良性为螺旋浆 $> 45^\circ$ 四折叶浆 $>$ 象耳浆 $>$ Rushton 浆。

$$\tau = \mu\gamma \quad (2)$$

式中, τ 为剪切应力, Pa ; μ 为动力黏度, $\text{Pa}\cdot\text{s}$; γ 为剪切率, s^{-1} 。

表 2 4 种浆叶在不同剪切率范围的百分比

剪切率/ s^{-1}	Rushton 浆/%	象耳浆/%	螺旋浆/%	45° 四折叶浆/%
0.1 ~ 5	52.89260	53.67150	65.46350	64.63130
5 ~ 10	28.13500	30.58820	23.04830	24.51580
10 ~ 20	11.81950	12.85210	10.24650	9.10746
20 ~ 40	5.42888	2.75132	1.20396	1.67148
40 ~ 80	1.72397	0.13691	0.03762	0.07394

3.3 Kolmogorov 尺寸分布

Kolmogorov 涡旋是由搅拌浆叶湍动所产生,大旋涡产小旋涡,小旋涡进一步产生更小的旋涡,能量逐步耗散下去, Kolmogorov 尺寸定义为最小的旋涡大小,参见公式(1),它与细胞生长状况密切相关,当 Kolmogorov 尺寸比细胞直径小,或者 Kolmogorov 尺寸比微载体直径的 $1/2 \sim 2/3$ 小时,细胞将会受到损害。细胞的直径一般为 $10 \sim 15 \mu\text{m}^{[11]}$,微载体的直径一般为 $60 \sim 250 \mu\text{m}^{[6]}$,本文中以最大微载体直径 $250 \mu\text{m}$ 为参考,相应微载体直径 $1/2$ 与 $2/3$ 尺寸分别为 $125 \mu\text{m}$ 和 $167 \mu\text{m}$ 。如图 4 所示,搅拌转速 80 r/min ,在浆叶安装高度为 100 mm 相对应的横截

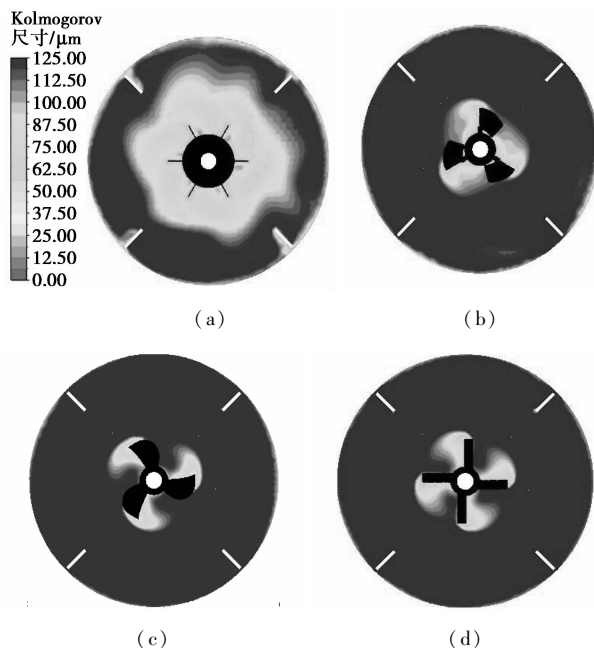


图 4 4 种浆叶 Kolmogorov 尺寸分布云图

面上的 Kolmogorov 尺寸分布云图,定义最大 Kolmogorov 尺寸为 $125\ \mu\text{m}$,从4个云图可以看出,最小的 Kolmogorov 尺寸都比细胞直径大,较小的涡旋都分布在桨叶尖端附近,并随着转速方向呈现一定梯度,Rushton 桨为径向混合桨,在此云图显现出有较大范围的 Kolmogorov 尺寸 $< 125\ \mu\text{m}$ 。

从表3中分析,4种桨叶在总体搅拌槽内的 Kolmogorov 尺寸分布,以4种范围 Kolmogorov 尺寸为参考,4种桨叶 Kolmogorov 尺寸在 $0\sim 15\ \mu\text{m}$ 内不占比重,这与图4结果一样,从其他范围比重结果来看,以 $125\ \mu\text{m}$ 和 $167\ \mu\text{m}$ 为最大值作为参考,4种桨叶所反应的结果不一样。实际在动物细胞培养工艺中,一方面为了减小微载体相互碰撞时对细胞带来的损伤,微载体直径不宜过大;另一方面增大微载体覆盖面积有利于高密度培养,微载体控制的适宜直径为 $100\sim 200\ \mu\text{m}$ 。因此本文中采用 $125\ \mu\text{m}$ 为最大值进行比较,在 $0\sim 125\ \mu\text{m}$ 范围内占比重最大的是 Rushton 桨,最小的是螺旋桨,这个结果与图4中一样。综合上述分析来看,单就 Kolmogorov 尺寸分布来比较,4种桨叶的适用性优良为螺旋桨 $> 45^\circ$ 四折叶桨 $>$ 象耳桨 $>$ Rushton 桨。

表3 4种桨叶在不同范围 Kolmogorov 尺寸的百分比

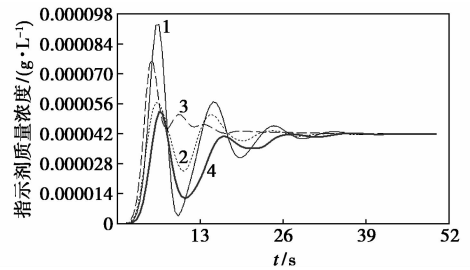
Kolmogorov 尺寸/ μm	Rushton 桨/%	象耳桨/ %	螺旋桨/ %	45° 四折叶桨/ %
0~15	0	0	0	0
15~125	18.7615	16.8284	8.10856	9.11404
125~167	21.2325	40.0126	25.87670	33.12510
167~1000	60.0060	43.1590	66.01470	57.76090

3.4 混合时间

在动物细胞培养工艺中评估搅拌方法的标准是混合时间,因为动物细胞无菌要求远远严格于微生物培养,接种后搅拌桨能迅速将细胞种子液混合均匀,补料后搅拌桨能尽快将营养物混合均匀,细胞及时补充营养,细胞与氧的传递交换也和混合程度相关。本次模拟实验考察混合时间仅仅是对各桨叶评估多一种方法,对于容积小且配单层搅拌体系反应器意义不大,只是对细胞大规模培养反应器作为参考。

影响混合时间的因素是混合程度和观察点,混合度和搅拌槽结构搅拌桨操作因素相关,所评估各桨叶桨径一样,在相同转速、相同搅拌材料下混合,混合时间更取决于观察点。本模拟实验研究混合时间方法和电导法相似,混合时间被定义为加入混合

物料起的时间到测量点(即观察点)的指示剂浓度达到95%或105%的时间。从搅拌槽竖直面看,本模拟实验加入指示剂位置在右上角,则观察点相应选择为与加料点距离较远的左下角,此观察点时的混合时间指示剂浓度分布如图5所示,大概从35s后,各桨叶在此观察点的指示剂浓度开始稳定,通过计算95%或105%混合状态相对应的混合时间,并优先选择更接近稳定期的时间,4种桨叶混合时间结果为 Rushton 桨(14.1 s) $<$ 象耳桨(20.3 s) $<$ 45° 四折叶桨(21.5 s) $<$ 螺旋桨(24.4 s)。

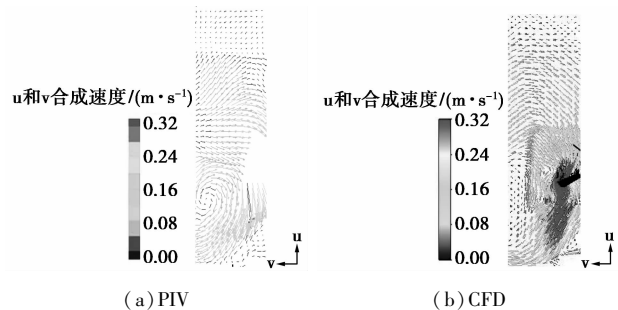


1— 45° 四折叶桨;2—象耳桨;3—Rushton 桨;4—螺旋桨

图5 4种桨叶的混合时间

3.5 PIV 实验验证

PIV 实验用来验证 CFD 模拟的模型选择的可行性以及预测结果的准确性,本文中 PIV 实验选用象耳桨进行验证。如图8(a)中给出了 PIV 实验流场图,CCD 相机所拍照的范围约为 $90\ \text{mm} \times 70\ \text{mm}$,综合拍摄4个截面并合成出相应结果,其中象耳桨桨叶区域的 PIV 结果已切除,液面往下约 $20\ \text{mm}$ 为 PIV 图截面最顶端,PIV 实验测出的速度大小为 u 与 v 方向的合成值。图8(b)给出相应区域模拟结果流场图,从整体流形来看,2个实验的速度流场相似,都呈现轴向混合;从速度值分布来比较,CFD 实验中旋涡区域较大,搅拌桨向下排液区域的速度更大,这个误差可以接受,因为桨叶旋转区流体湍动剧烈,流体力学理论复杂多变,其他大部分区域速度值吻合度高。总之,CFD 模拟结果与 PIV 实验结果接近,PIV 实验验证了 CFD 模拟的可行性。



(a) PIV

(b) CFD

图6 PIV 与 CFD 速度流场矢量图

4 结论

Kolmogorov 理论证明桨叶和通气对细胞带来的剪切损伤往往被高估^[10], 并且单层浆应用在小型种子细胞罐中, 细胞对氧的需求量小, 反应器通气量小。本文中考察在单层浆体系, 不通气时对 4 种桨叶的流场、剪切率分布、Kolmogorov 涡旋尺度分布和混合时间进行数值模拟分析, 综合评估 4 种桨叶在机械搅拌式动物细胞培养反应器上的适用性, 给出一种合理的对比方法。总的来说, 在动物细胞培养工艺常用较低的转速 80 r/min 时, 由 Kolmogorov 涡旋理论可知, 这 4 种桨叶都可适用于动物细胞培养, 但当转速增加并且通气时需要再考察。Rushton 桨剪切力高, 尽管给细胞带来相对较大的损伤, 但混合时间最短, 由于其良好的传质性能广泛应用于微生物培养反应器中, 在动物细胞培养罐较大时, 要实现高密度培养, 要求搅拌系统分散氧能力高, Rushton 桨完全能够应用于多层浆体系, 并且选为底桨; 45° 四折叶桨剪切力低, 混合效果一般, 对细胞带来损伤小, 国外商品化动物细胞培养罐公司较少采用此桨, 在多层浆搅拌体系可以考虑; 螺旋桨开发较早, 与其他桨叶相比剪切力最小, 对细胞带来的湍动伤害小, 在小型单层浆动物细胞培养种子罐应用价值高, 但是其混合传质能力较差, 应用于培养剪切较敏感并且对溶氧要求不高的细胞; 象耳桨在国外动物细胞培养罐应用广泛, 并且研究较多, 适用性高, 对细胞带来的剪切力在可接受范围内, 混合传质能力优于螺旋桨, 在单层浆或多层浆体系都应优先考虑。

参考文献

- [1] 陈志南, 杨向民. 基于抗体等重组蛋白表达产品的哺乳动物细胞大规模发酵技术[J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(5): 325 - 328.
- [2] 胡显文, 陈惠鹏, 汤仲明, 等. 生物制药的现状和未来(二): 发展趋势与希望[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(1): 86 - 93.

- [3] Spyros I Vernardis, Chetan T Goudar, Maria I Klapa. Metabolic profiling reveals that time related physiological changes in mammalian cell perfusion cultures are bioreactor scale independent[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 19: 1 - 9.
- [4] Jesus M D, Wurm F M. Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78(2): 184 - 188.
- [5] Amal El Wajgali, Geoffrey Esteban, Frantz Fournier, et al. Impact of microcarrier coverage on using permittivity for on-line monitoring high adherent vero cell densities in perfusion bioreactors[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 70: 173 - 179.
- [6] 梅建国, 庄金秋, 王金良, 等. 动物细胞大规模培养技术[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(7): 127 - 132.
- [7] 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司. 搅拌器系统: CN, 201080033027.0 [P]. 2012 - 08 - 15.
- [8] Hui Zhu, Alvin W Nienow, Waldek Bujalski, et al. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up-or a down-pumping 'Elephant Ear' agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2009, 87: 307 - 317.
- [9] Marie-Laure Collignon, Angélique Delafosse, Michel Crine, et al. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors: Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation[J]. *Chemical Engineering Science*, 2010, 65: 5929 - 5941.
- [10] Christian Sieblist, Marco Jenzsch, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, et al. Insights into large-scale cell-culture reactors: 1. Liquid mixing and oxygen supply[J]. *Biotechnology Journal*, 2011, 6: 1532 - 1546.
- [11] 谭文松, 戴干策, 陈志宏, 等. 生物反应器中杂交瘤细胞的物理破损[J]. 华东理工大学学报, 1996, 22(3): 276 - 282.
- [12] 张元兴, 易小萍, 张立, 等. 动物细胞培养工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 142 - 149.
- [13] 常保安. 激流式生物反应器的流场仿真与结构优化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [14] 周志玮. 动物细胞生物反应器关键技术研究及其结构优化[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [15] 吴金辉, 张西正, 郭勇, 等. 用于组织工程化培养生物反应器的研究进展[J]. 国外医学生物医学工程分册, 2003, 26(2): 63 - 68. ■

SABIC 与中科院签署战略合作协议

2014 年 9 月 12 日, 沙特基础工业公司(SABIC)与公共科研教育机构中国科学院签署了一项里程碑式的战略合作协议, 以进一步推动双方在科研、知识交流与人才培养方面的合作。根据该项为期 5 年的合作协议, SABIC 将投资数百万美元用以支持双方在化学品与化学工程领域的联合研究, 以此开发先进技术和解决方案, 并由 SABIC 将合作研究的成果带向市场。

SABIC 和中科院将明确双方合作科研努力的重点领域, 把创新与可持续发展原则应用于原料使用的拓展、纳米

技术潜力的发挥以及复合材料发展的探索, 并把服务产业及造福社会视为终极目标。此外, 合作协议还包含孕育驱动经济增长的本地创新——设立年度沙特基础工业公司—中科院奖学金。该奖学金面向全中国的优秀科学家、工程师与学生, 旨在激励他们对学术成就的追求。

SABIC 将创新和协作视为自己业务发展的核心驱动力, 它们同时也是解决如空气质量、清洁水源、食品安全、能源利用效率及绿色产业增长等迫切社会问题的关键所在。(张璐)