

机械搅拌式动物细胞反应器不同桨型组合的 CFD 数值模拟与优化

丁宁¹, 李超¹, 白力¹, 郭美锦^{1,2}, 庄英萍^{1,2}, 张嗣良¹

1 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237

2 上海生物制造技术协同创新中心, 上海 200237

丁宁, 李超, 白力, 等. 机械搅拌式动物细胞反应器不同桨型组合的 CFD 数值模拟与优化. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1209–1215.

Ding N, Li C, Bai L, et al. Numerical simulation and optimization of impeller combination used in stirred bioreactor. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1209–1215.

摘要: 生物反应器已成为哺乳动物细胞生产治疗性抗体药物和疫苗的核心。文中采用 CFD 数值模拟方法对目前常用的机械搅拌式生物反应器在不同的搅拌形式下的流场进行了分析, 获得了 5 种搅拌桨型组合条件下的速率矢量、持气率、含气率和剪切力分布的特征。通过构建的重组 CHO 细胞在不同搅拌形式条件下的流加分批培养发现, 细胞密度和抗体表达水平与反应器内的最大剪切率直接相关, 在 FBMI3 搅拌形式下细胞密度和抗体表达水平均最高。结果表明该 CHO 细胞在悬浮培养时对剪切环境比较敏感, 且最大剪切力是工业规模放大的关键因素。

关键词: 生物反应器, 搅拌桨组合, 数值模拟, CHO 细胞培养

Numerical simulation and optimization of impeller combination used in stirred bioreactor

Ning Ding¹, Chao Li¹, Li Bai¹, Meijin Guo^{1,2}, Yingping Zhuang^{1,2}, and Siliang Zhang¹

1 State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2 Shanghai Biological Manufacturing Technology Innovation Center, Shanghai 200237, China

Abstract: Bioreactors have been central in monoclonal antibodies and vaccines manufacturing by mammalian cells in suspension culture. Numerical simulation of five impeller combinations in a stirred bioreactor was conducted, and characteristics of velocity vectors, distributions of gas hold-up, distributions of shear rate in the bioreactor using 5 impeller combinations were numerically elucidated. In addition, genetically engineered CHO cells were cultivated in bioreactor installed with 5 different impeller combinations in fed-batch culture mode. The cell growth and antibody level were directly

Received: October 14, 2019; **Accepted:** January 9, 2020

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA021201).

Corresponding authors: Siliang Zhang. Tel/Fax: +86-21-64251131; E-mail: siliangz@ecust.edu.cn

Meijin Guo. E-mail: guo_mj@ecust.edu.cn

国家高技术研究与发展计划 (863 计划) (No. 2012AA021201) 资助。

related to the maximum shear rate in the bioreactor, and the highest viable cell density and the peak antibody level were achieved in FBMI3 impeller combination, indicating that CHO cells are sensitive to shear force produced by impeller movement when cells were cultivated in bioreactor at large scale, and the maximum shear rate would play key roles in scaling-up of bioreactor at industrial scale.

Keywords: bioreactor, impeller combination, numerical simulation, CHO culture

由哺乳动物细胞培养表达的治疗性单克隆抗体 (Monoclonal antibody, MAB) 因其特异性强和耐受性好等特点, 已成为最好的治疗肿瘤药物之一^[1]。自 2018 年 6 月国家药品监督管理局正式批准“PD-1 抗体药物”在中国上市^[2], 抗体药物已从研发阶段进入到大规模生产和市场应用阶段, 从而使抗体药物生产的技术瓶颈已由抗体表达系统构建转移到抗体大规模生产制备技术, 其中由以前的升级培养规模放大到千升级是最关键的制备技术^[3]。因此, 适用于大规模细胞悬浮培养性能的生物反应器 (Bioreactor) 是核心装置之一。

生物反应器内的流场特性是其使用性能的决定因素, 通常有两种研究方式。一种是实验方法, 如粒子图像测速法 (Particle image velocimetry, PIV) 研究方法^[1-3]; 另一种是计算流体力学 (Computational fluid dynamics, CFD) 数值模拟方法^[4-7], 即通过模型化和数值分析对反应器内的流场特性进行研究。实验方法适用于实验规模的小型反应器研究, 且研究方法具有一定的限制, 如 PIV 方法仅适用于单向流或者极低气含率条件下的流场研究。而 CFD 方法不受反应器大小或操作条件的限制, 具有通用性。但 CFD 方法的主要问题是建模过程中各种模型或模型参数的选择对结果的影响较大。实际研究过程中, 首先用实验室规模获得的流场数据对 CFD 模型进行验证和优化, 然后用优化的 CFD 模型对大型或工业规模的反应器内流场特性进行分析^[8-10]。

在进行 CFD 模拟过程中, 影响流场模拟准确性的因素很多, 包括网格大小、湍流模型、两相间相互作用力模型、气泡聚并破碎模型等等^[11-12]。对于动物细胞培养, 由于生物反应器通气量通常

较低, 生物反应器的流场特性主要由搅拌决定。因此, 在模型验证阶段, 可以用 PIV 方法获取的单相流流场数据对 CFD 结果进行验证和优化。如洪厚生等^[11]在 30 L 搅拌罐中研究了 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。但是, 该文只是对在单层桨体系、不通气和小体积 (30 L) 特定条件进行了考察, 而在大规模细胞培养时所需要的多搅拌组合条件, 即既要满足反应器内培养液混合均匀, 又要满足搅拌系统运动时产生尽量小的剪切力, 如 0.1–0.5 Pa。至今尚未有该方面报道。

本文根据我们以前建立的标准 $k-\varepsilon$ 模型^[12-13]对生物反应器内流场模拟, 分析了 5 种常用的动物细胞悬浮培养轴流型搅拌桨在通气条件下的流场特性, 确定了用于细胞培养的最佳搅拌桨组合, 并将该型搅拌桨用于动物细胞培养过程, 验证其实际应用效果。

1 材料与方法

1.1 细胞株和培养基

中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO 细胞) 由杭州安普生物公司提供, 表达 VEGFR1-Fc-IL-1ra 抗体。基础培养基和流加培养基分别为 AMP B001 和 AMP F001。

1.2 细胞培养方法

分别用设计的生物反应器进行流加批式 (Fed-batch) 培养, 密度为 1×10^6 cells/mL, 恒定转速为 50 r/min, 通过四气控制系统调节氧分压, 保证过程中溶氧在 40%, 温度控制在 37 °C, 分别在第 7 天和第 8 天流加培养基, 速率约为 45 mL/d。在培养过程中每 24 h 取样一次, 用于细胞计数等分析。

1.3 细胞培养生物反应器搅拌桨和 CFD 数值模拟方法

动物细胞反应器搅拌桨一般采用轴向流而不是径向流搅拌桨,前者具有较低的剪切力和良好的混合性能,符合细胞对剪切力敏感和悬浮培养的特点。本文选用三窄叶变截面螺旋桨式搅拌器(HBMI3)、四斜叶涡轮搅拌器(PBT4)、三宽叶螺旋桨式搅拌器(FBMI3)、三叶大倾角桨式搅拌器(LPBI3)和二叶大倾角桨式搅拌器(LPBI2)为研究对象,详细结构见图1。反应器底部通过单管进行通气。

针对以上常见的5种轴流型搅拌桨,分别模拟了5种双层搅拌桨组合情况下反应器内的流场情况。所采用的流场模拟软件为ANSYS CFX 15.0,搅拌桨的旋转采用多重参考系(Multiple reference frame, MRF)方法进行模拟,计算网格划分采用ANSYS ICEM CFD 15.0进行,其中桨区的网格进行局部加密,桨区网格数约60万,每

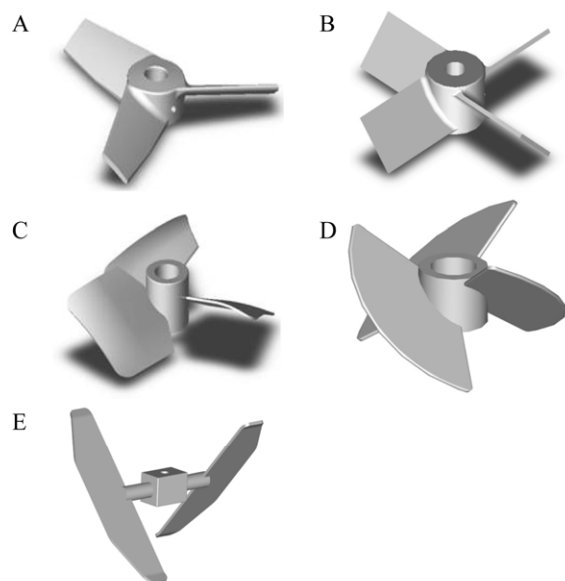


图1 五种机械轴流式搅拌桨

Fig. 1 Five commonly used axial flow impellers. (A) Hydrofoil blade mixing impeller (HBMI3). (B) Pitched blade turbine (PBT4). (C) Fluid foil blade mixing impeller (FBMI3). (D) Large pitched blade impeller (LPBI3). (E) Large pitched blade impeller (LPBI2).

个模型总网格数约150万。计算模型采用Euler双流体气液两相模型,湍流模型应用标准 $k-\varepsilon$ 湍流模型,采用优化的曳力模型对气液相间作用力进行描述^[14-15]。气泡的分布采用群平衡模型(Population balance model, PBM)进行描述^[8]。模型残差收敛标准为残差小于 10^{-4} 且桨叶扭矩和反应器内的气含率达到稳定。所模拟的动物细胞反应器几何尺寸及操作参数信息如表1所示。

2 结果与分析

本文采用计算流体力学(CFD)方法对通气条件下5种搅拌桨组合在生物反应器内的流场进行数值模拟,并进行CHO细胞培养应用验证,结果如下。

2.1 速度矢量场比较

从图2速度矢量场来看,5种搅拌桨组合的流型各不相同。从中可见PBT4桨组合下速度矢量较为规整,说明该桨组合流场控制能力较强,主要是由于其叶片较HBMI3号桨组合要宽,所以表现出较规整的流型。FBMI3、LPBI3搅拌桨组合有个共同的特点就是桨周围大速度梯度范围较其他桨要大,但是最大速度有所下降。说明这种桨组合的混合能力要好(桨的影响范围大)。LPBI2

表1 模拟采用的反应器参数

Table 1 Parameters of bioreactor used in simulation

Parameters	Values
Volume	24.5 L
Internal diameter	250 mm
Liquid level	400 mm
Impeller type	HBMI3/PBT4/FBMI3/LPBI3 LPBI2
Impeller diameter	130 mm
Shaft diameter	20 mm
Agitation speed	50 r/min
Filling ratio	70%
Head height	62.5 mm
Number of impeller	2
Impeller interval	170 mm
Bottom impeller clearance	90 mm
Aeration ratio	0.1 vvm

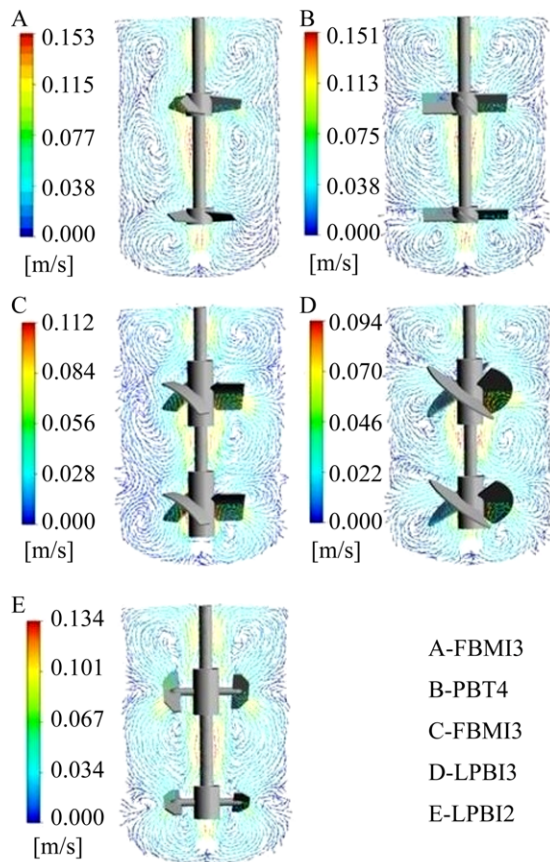


图 2 不同桨型组合得到的速度矢量图

Fig. 2 Velocity vectors in the bioreactor using different impeller combinations.

号桨叶片面积虽然相对较小,但是也表现出较佳的排出能力,从而形成较为完整的轴向循环。

2.2 气含率分布比较

如图 3 所示,所试搅拌桨组合的持气能力都较差,在当前操作条件下均表现为气泛状态。这与动物细胞反应器的设计原理直接相关:细胞对剪切较敏感,搅拌桨和转速的设计过程中需要充分平衡物料混合、细胞悬浮、剪切和氧传质的关系。因此设计过程中搅拌桨通常只起细胞悬浮和物料混合的作用,且需控制尽量低的剪切;而气液传质或气泡的分散主要通过气体分布器实现,反应器内气泡聚并和破碎较少。本文采用的 5 种轴流桨本身气体分散能力差,且采用单管通气,故呈现气泛特征。

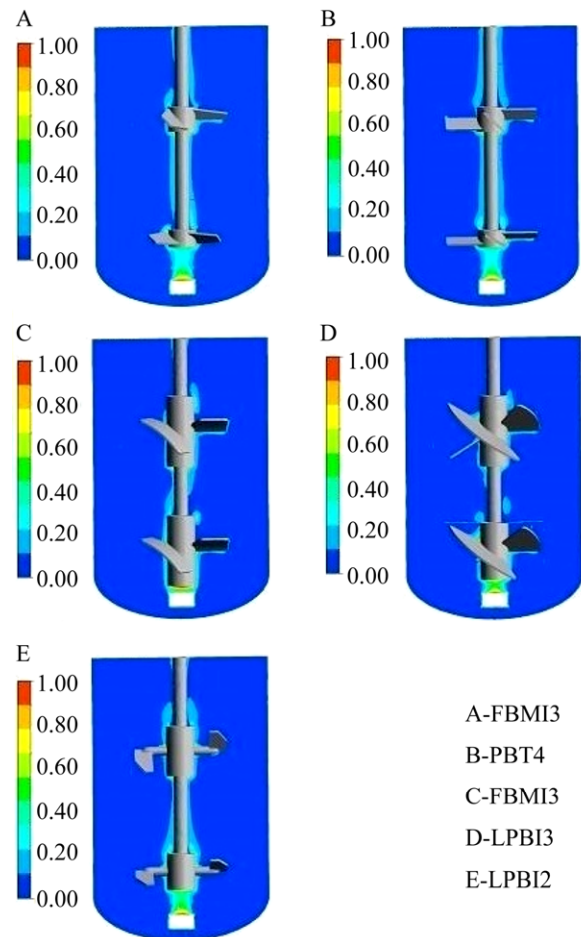


图 3 不同桨型组合得到的气含率分布图

Fig. 3 Distributions of gas hold-up in the bioreactor using different impeller combinations.

2.3 剪切力比较

表 2 比较了 5 种搅拌桨组合形成的流场中平均剪切力与最大剪切力,表明 HBMI3 搅拌桨组合形成的平均剪切力最小为 0.4 Pa,相比较而言 FBMI3 与 LPBI3 形成的平均剪切力最大约为 0.53 Pa。最大剪切力的比较发现,LPBI2 搅拌桨组合形成的最大剪切力最大为 26.95 Pa,是其他搅拌桨组合的 3-8 倍,FBMI3 搅拌桨组合形成的最大剪切力最小为 3.85 Pa。之所以 FBMI3 与 LPBI3 形成的最大剪切力较小而平均剪切力相对较大是由于这两种搅拌桨在搅拌桨周围形成的高剪切应变率(速度梯度)的范围较大,使得搅拌桨区的平均剪切力增大造成的,这从剪切力分布云图(图 4)也可证明。

表 2 搅拌桨组合下反应器流场中平均剪切率与最大剪切率比较

Table 2 Comparison of shear rates under different impeller combination conditions

Impeller combination	Averaged shear force (Pa)	Maximum shear force (Pa)
HBMI3	0.401 5	9.092
PBT4	0.474 0	9.137
FBMI3	0.525 2	3.853
LPBI3	0.527 6	5.886
LPBI2	0.438 2	26.95

表 3 重组 CHO 细胞在不同搅拌组合培养结果

Table 3 Growth and EGFR antibody production by CHO cells cultured in bioreactor using different impeller combinations

Impeller combination	Cell density ($\times 10^6$ cells/mL)	Viability (%)	EGFR Conc. (g/L)
HBMI3	6.70 \pm 0.02	92.2 \pm 1.5	1.80 \pm 0.16
PBT4	6.52 \pm 0.10	90.3 \pm 2.1	1.65 \pm 0.04
FBMI3	7.10 \pm 0.15	98.5 \pm 1.0	2.21 \pm 0.12
LPBI3	7.01 \pm 0.08	98.3 \pm 0.8	2.10 \pm 0.08
LPBI2	6.21 \pm 0.21	75.6 \pm 4.3	0.85 \pm 0.10

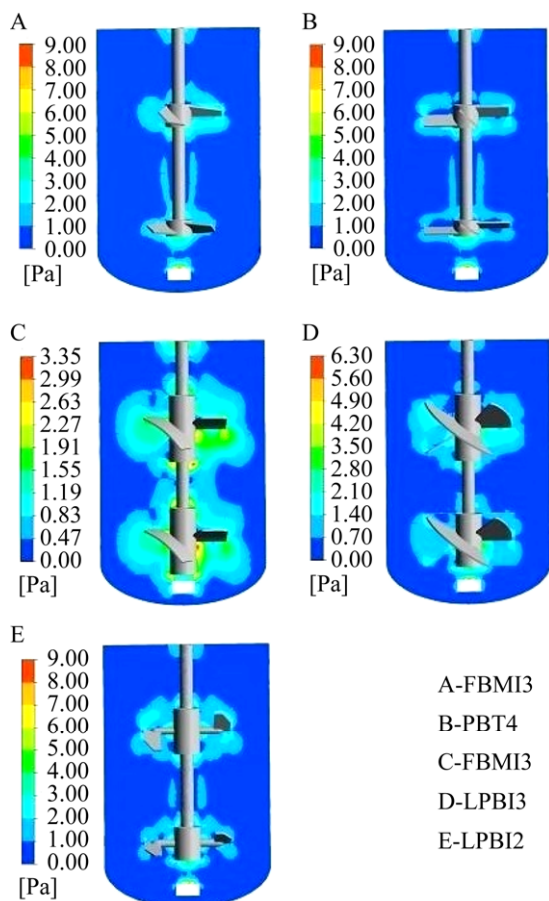


图 4 不同桨型组合得到的剪切率分布图

Fig. 4 Distributions of shear rate in the bioreactor using different impeller combinations.

2.4 CHO 细胞培养结果

将 CHO 细胞分别在以上 5 种生物反应器中进行培养 15 d, 细胞密度和抗体的表达水平结果如表 3。CHO 细胞在 FBMI3 搅拌型式下细胞密度和抗体表达水平均最高, 其可能原因是该细胞对

反应器内的最大剪切力比较敏感, 且在该条件下最大剪切力为 3.853 Pa, 比其他搅拌组合明显小(表 2)。因此, 细胞的活率较高, 也保证了细胞正常的生理代谢状态, 使得表达外源抗体能力最高。结果还发现, 当最大剪切力约超过 6.0 Pa 后, 细胞成活率和抗体浓度均显著降低。本试验 CHO 细胞在剪切力 26.95 Pa 条件下, 细胞的活率下降至 75.6%, 抗体浓度下降至 0.85 g/L。结果说明 CHO 细胞对反应器内的最大剪切力比较敏感, 最大剪切过大会使细胞生长受损。需指出的是, 由于该反应器采用的是单管通气, 气泡直径较大, 而搅拌桨打散气泡的能力较差(见图 3), 因此在反应器内气泡聚并和破碎概率较小, 且气泡直径较大, 在其离开液面破碎时产生的剪切力较小, 因此本文通过 CFD 模拟并没有考虑气泡离开液面破碎时产生的剪切。

3 讨论

动物细胞培养生物反应器已经成为现代生物药物如治疗性单克隆抗体和疫苗制备的重要设备。影响哺乳动物细胞大规模悬浮培养技术应用主要是生物反应器流场特性, 尤其是对剪切力 (Shear force) 高敏感特性的悬浮培养细胞^[13-14]。本文对 5 种常见的轴流式搅拌桨的 5 种组合进行了 CFD 数值模拟, 评估了不同组合下在 0.1 vvm 通气率下的生物反应器的流场特性, 并对 5 组搅拌桨组合进行了 CHO 细胞的培养试验, 发现平均剪切率与细胞生长和抗体的表达无显著相关性,

而局部最大剪切力越小的搅拌桨组越有利于细胞的生长和抗体的高效表达(表2和表3)。

悬浮培养的动物细胞在搅拌条件下由于在生物反应器内的运动而承受较大的剪切力,尤其是经过搅拌桨叶尖线速度大而产生的剪切效应。最早报道^[16],只要培养时表面通气避免气泡进入和避免气液界面处气泡的破裂,在搅拌速度100至450 r/min中,三种杂交瘤细胞系在不同搅拌速度下生长细胞的存活力和抗体产量是相当的。但是对于工业规模动物细胞培养如CHO细胞,细胞密度通常大于 10^7 cells/mL,必须在培养时进行深层通气,包括空气、氧气和CO₂等气体。当气体通入到培养液时,气泡的形成、聚并和破碎将对过程产生重要影响。当生物反应器内流体涡流的不稳定性引起气泡夹带时,在200 r/min转速时可以观察到细胞损伤^[16],并且在低转速下其涡流的形成取决于生物反应器系统几何形状和细胞悬浮液的体积。Chisti^[17]阐明了叶轮类型、直径、转速和罐直径等参数与细胞损伤的相关性,并提出了一种在无挡板生物反应器中增强混合的方法。通常,细胞生长的最佳状态时的剪切应力数量级约为0.1–0.5 Pa,但是,很难通过实验设备来直接测量不同桨叶剪切应力,尤其是大规模生物反应器。此外,在实际的剪切敏感型细胞的放大过程中,不同细胞采用的剪切放大参数可能不同,如最大剪切率、平均剪切率、能量耗散率、EDCF等^[14–16,18],且采用传统的经验公式计算得到的单一剪切参数通常无法准确描述反应器内的真实剪切环境^[17,19]。而通过数值模拟方法对反应器内的剪切环境进行全面评估,并将各剪切参数与细胞培养结果进行关联分析,可以高效确定特定剪切敏感型细胞放大的关键剪切参数和剪切阈值,为大规模生物反应器的设计和放大提供了一种理性的方法。

REFERENCES

[1] Lai YF, Suo SZ, Wang RB, et al. Trends involving monoclonal antibody (mAb) research and

commercialization: a scientometric analysis of IMS Lifecycle R&D Focus Database (1980–2016). *Human Vacc Immunother*, 2018, 14(4): 847–855.

[2] Zhou F, Wu CK. Global marketing scale for anti-PD-1/PD-L1 antibody: influence factor analysis and forecast. *Chin J New Drugs*, 2018, 27(6): 619–625 (in Chinese).

周峰, 吴骋抗. PD-1/PD-L1 抗体药物的全球市场规模影响因素分析及市场预测. *中国新药杂志*, 2018, 27(6): 619–625.

[3] Song Y. Analysis of monoclonal antibody drug producing unit and engineering design. *Chem Pharmaceut Eng*, 2018, 39(2): 27–30 (in Chinese).

宋杨. 单克隆抗体药物生产单元与工程设计分析. *化工与医药工程*, 2018, 39(2): 27–30.

[4] Varela S, Balagué I, Sancho I, et al. Functionalised alginate flow seeding microparticles for use in particle image velocimetry (PIV). *J Microencapsul*, 2016, 33(2): 153–161.

[5] Zhou L, Shi WD, Li W, et al. Particle image velocimetry measurements and performance experiments in a Compact return diffuser under different rotating speed. *Exp Tech*, 2016, 40(1): 245–252.

[6] Zhang H, Williams-Dalson W, Keshavarz-Moore E, et al. Computational-fluid-dynamics (CFD) analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in shake flasks. *Biotechnol Appl Biochem*, 2005, 41(1): 1–8

[7] Anderlei T, Mrotzek C, Bartsch S, et al. New method to determine the mass transfer resistance of sterile closures for shaken bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 98(5): 999–1007.

[8] Neubauer P, Junne S. Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 20(1): 114–121.

[9] Singh H, Huttmacher D. Bioreactor studies and computational fluid dynamics//Kasper C, Van Griensven M, Pörtner R, eds. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009: 231–249.

[10] Ekambara K, Dhotre M. CFD simulation of bubble column. *Nucl Eng Des*, 2010, 240(5): 963–969.

[11] Yan X, Zhang ZQ, Gu CZ, et al. Cell culture of impeller suitable for animals and its numerical simulation. *Mod Chem Ind*, 2014, 34(10): 162–166 (in

Chinese).

颜旭, 张志强, 顾承真, 等. 适用于动物细胞培养的搅拌桨及其数值模拟. 现代化工, 2014, 34(10): 162–166.

- [12] Li C, Xia JY, Chu J, et al. CFD analysis of the turbulent flow in baffled shake flasks. *Biochem Eng J*, 2013, 70: 140–150.
- [13] Pan A, Xie MH, Li C, et al. CFD simulation of average and local gas-liquid flow properties in stirred tank reactors with multiple rushton impellers. *J Chem Eng Jpn*, 2017, 50(12): 878–891.
- [14] Collignon ML, Delafosse A, Crine M, 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. *Chem Eng Sci*, 2010, 65(22): 5929–5941.
- [15] Sieblist C, Jenzsch M, Wittenberg ML, et al. In sights into large-scale cell-culture reactors: 1. Liquid mixing and oxygen supply. *Biotechnol J*, 2011, 6(12): 1532–1546.
- [16] Xing ZZ, Kenty B, Li ZJ, et al. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(4): 733–746.
- [17] Chisti Y. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol*, 2000, 18(10): 420–432.
- [18] He C, Ye P, Wang HB, et al. A systematic mass-transfer modeling approach for mammalian cell culture bioreactor scale-up. *Biochem Eng J*, 2019, 141(15): 173–181.
- [19] Wang H, Xia JY, Zheng ZM, et al. Hydrodynamic investigation of a novel shear-generating device for the measurement of anchorage-dependent cell adhesion intensity. *Bioproc Biosyst Eng*, 2018, 41(9): 1371–1382.

(本文责编 陈宏宇)