

生物反应器系统及其应用

技术领域

本申请涉及一种用于细胞培养，特别是适用于无细胞壁细胞如动物细胞的培养的生物反应器系统，以及使用该生物反应器系统进行细胞培养的方法。本申请中涉及的生物反应器系统能够实现高细胞存活率的细胞培养和增殖。

背景技术

哺乳动物细胞表达的产品已经在生物制药产业中占有绝对优势，成为生物制药的主流和趋势。而以生物反应器为主体的生产线及细胞培养工艺则是推动动物细胞大规模培养技术革新和工艺改进的硬件推动力，也是提升生物制品的生产效率、生产规模、产品质量的基础。国内外现已商品化的动物细胞生物反应器有搅拌式生物反应器、中空纤维式生物反应器、气升式生物反应器以及袋式生物反应器。

一方面，由于动物细胞没有细胞壁，对培养环境如剪切力、渗透压等比较敏感，要求反应器的传氧效率高、混合性能好、剪切效应低。因此，作为动物细胞培养关键设备的生物反应器，主要解决的共性问题是要按细胞生长的要求，使反应器具备低的剪切效应、良好的传质和混合效果。但现有的生物反应器大多采用底部通气和机械搅拌的方式实现氧气的供给和培养液混合，由此产生的强剪切力、高浓度氧气泡沫以及其气泡破裂，给动物细胞造成较大损伤，并导致细胞培养密度的大大降低。

另一方面，生物反应器的设备开发和生物反应过程工艺研究，需要先在小型设备中进行摸索和试验，再逐渐放大到较大规模的设备中进行工艺放大试验和商业化生产。然而实践中往往是在小型反应器中进行科学实验所取得的数据、工艺和规律，并不能完全在大型反应器中取得同样或更好的效果。因此，生物反应器尺度设计无法通过简单的等比例放大来满足动物细胞的工业化规模培养需要。目前，依据对已有生物反应器的操作经验所建立起的一些规律而进行放大的方法，多半是定性的，仅有一些简单的、粗糙的定量概念，放大比例通常较小，并且不够精确。为此，在未获得完整的理论体系解析前，对生物反应器进行尺度放大设计，还需根据经验和实用的原则进行反应器的设计和放大。

发明内容

鉴于上述问题，本申请的发明人采用计算流体力学（CFD）来仿真模拟工作状态下的生物反应器，探索可以满足不同规模培养所需的生物反应器理论模型，并在实际细胞培养中进行验证。利用该理论模型，可以得到满足不同规模下动物细胞培养和增殖的生物反应器系统，并使动物细胞存活率保持在 85.0% 以上。CFD 指使用数值方法在计算机

中对流体力学的控制方程进行求解，从而可预测流场的流动。目前有多种商业 CFD 软件问世，比如 FLUENT、CFD-ACE+ (CFDRC)、Phoenics、CFX、Star-cd 等。使用 CFD 软件进行流场模拟是本领域技术人员所熟知的。

一方面，本申请涉及一种用于培养细胞，特别是无细胞壁细胞培养的生物反应器系统，其包含：

- 容器，该容器含有直径 D1 且高度 H1 的中空圆柱，以及上直径 D2、下直径 D3 且高度 H2 的中空圆台，其中该中空圆柱与中空圆台的顶面连接，D1=D2；
- 振荡器，设置成使容器按照一定的偏心距和转速做偏心运动；
- 通气装置，设置成从容器上部向容器内通入含氧气体，和
- 填充在容器中的培养液，其顶面暴露于含氧气体，

其中，振荡器设置成使容器处于偏心运动，使运动稳态时的培养液液体总表面积 S 与培养液体积 V 的比值 (S/V) 处于 5.65 以上，湍动能处于 $2.73\text{E-}03 \text{ m}^2/\text{s}^2$ 以上，且流场剪切率处于 20.27/s 以下，其中液体总表面积为培养液与容器内壁面接触面积和培养液与容器内气体接触面积之和。在一些实施方式中，S/V 值、湍动能和流场剪切率经 CFD 模拟得出。

CFD 模拟可以经 FLUENT 软件实现。运动稳态时的培养液 S/V 值与容器形状、培养液体积 V、容器转速以及偏心距 R 相关，可通过 CFD 模拟得到。容器内产生的剪切率与容器形状、转速和偏心距相关，可通过 CFD 模拟得到。容器内的湍动能与容器转速和偏心距相关，可通过 CFD 模拟得到。

生物反应器系统还可以包含设置在容器中的用于容纳培养液的一次性培养袋，该一次性培养袋具有多功能盖板，该多功能盖板连接到培养袋的顶部以密封培养袋，并且设置多个通向一次性培养袋内部的接孔。该一次性培养袋可以是柔性培养袋，或由硬质材料制成，且在展开时具有与容器相对应的形状。该一次性培养袋可以设置有将其固定于容器的装置。上述多功能盖板上的接孔具有良好的密封性，可以在需要时接入探测电极、导管等。在一些实施方式中，各接孔通过气密性好的螺纹进行密封。在一些实施方式中，通过任意接孔接入各探测电极，对细胞培养过程的温度、溶氧、pH 等环境参数进行实时监测。在一些实施方式中，通过接孔接入导管，进行细胞培养接种以及培养液添加、取样、回收、丰收、换气等各种操作，以便进一步的优化培养条件，提高细胞培养密度。同时，可应用于各种一次性培养袋的多功能盖板的各接孔均使用统一标准的螺纹接口，气密性好，可根据细胞培养的需要进行灵活的取舍操作。特定培养过程中不需要的接孔可以容易地密封。

在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 400-4000 mm，D3 为 40-400 mm，H1 为 100-1500 mm，H2 为 40-1200 mm。

在一些实施方式中，D1:D3 或 D2:D3 的值为约 5 至约 16 区间内的任一数值，或为 5 至 16 区间内的任一数值。在一些实施方式中，D1:D3 或 D2:D3 的值为约 5、约 7.37、约 7.89、约 8.89、约 10.27 或约 15.77。在一些实施方式中，D1:D3 或 D2:D3 的值

为 5、7.37、7.89、8.89、10.27 或 15.77。“约”在本文中的意思为所述数值的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 18\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 12\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.5\%$ 的范围，所述范围包括所述范围的端点及所述范围内的任一数值。

在一些实施方式中，D1:H1 或 D2:H1 的值为约 2 至约 5 区间内的任一数值，或为 2 至 5 区间内的任一数值。在一些实施方式中，D1:H1 或 D2:H1 的值为约 2.68、约 3、约 3.55、约 3.74、约 3.66 或约 3.46。在一些实施方式中，D1:H1 或 D2:H1 的值为 2.68、3、3.55、3.74、3.66 或 3.46。

在一些实施方式中，D1:H2 或 D2:H2 的值为约 4 至约 5 区间内的任一数值，或 4 至 5 区间内的任一数值。在一些实施方式中，D1:H2 或 D2:H2 的值为约 4.08、约 4.94、约 4.95、约 4.87、约 4.20 或约 4.51。在一些实施方式中，D1:H2 或 D2:H2 的值为 4.08、4.94、4.95、4.87、4.20 或 4.51。

在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 400-约 2997 mm，D3 为约 80-约 190 mm，H1 为约 149-约 867 mm，H2 为约 98-约 664 mm，含有约 5-约 3000 L 的细胞培养液，振荡器的转速为约 55-约 24 rpm，偏心距为约 30-约 65 mm。在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 400-2997 mm，D3 为 80-190 mm，H1 为 149-867 mm，H2 为 98-664 mm，含有 5-3000 L 的细胞培养液，振荡器的转速为 55-24 rpm，偏心距为 30-65 mm。

在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 400 mm，D3 为约 80 mm，H1 为约 149 mm，H2 为约 98 mm，含有约 5 L 细胞培养液，振荡器的转速为约 55 rpm，偏心距为约 30 mm。在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 400 mm，D3 为 80 mm，H1 为 149 mm，H2 为 98 mm，含有约 5 L 细胞培养液，振荡器的转速为 55 rpm，偏心距为 30 mm。

在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 840 mm，D3 为约 114 mm，H1 为约 280 mm，H2 为约 170 mm，含有约 50 L 细胞培养液，振荡器的转速为约 40 rpm，偏心距为约 40 mm。在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 840 mm，D3 为 114 mm，H1 为 280 mm，H2 为 170 mm，含有 50 L 细胞培养液，振荡器的转速为 40 rpm，偏心距为 40 mm。

在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 840 mm，D3 为约 114 mm，H1 为约 280 mm，H2 为约 170 mm，含有约 18 L 细胞培养液，振荡器的转速为约 37-约 39 rpm，偏心距为约 40 mm。在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 840 mm，D3 为 114 mm，H1 为 280 mm，H2 为 170 mm，含有 18 L 细胞培养液，振荡器的转速为 37-39 rpm，偏心距为 40 mm。

在一些实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 840 mm，D3 为约 114 mm，H1 为约 280 mm，H2 为约 170 mm，含有约 18 L 细胞培养液，振荡器的转速为约 39 rpm，偏心距为约 40 mm。在一个实施方式中，生物反应器系统中容器的 D1 和 D2

为 840 mm, D3 为 114 mm, H1 为 280 mm, H2 为 170 mm, 含有 18 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 39 rpm, 偏心距为 40 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1500 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 422 mm, H2 为约 303 mm, 含有约 18 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 37-约 39 rpm, 偏心距为约 40 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 为 422 mm, H2 为 303 mm, 含有 18 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 37-39 rpm, 偏心距为 40 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1500 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 422 mm, H2 为约 203 mm, 含有约 200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 30 rpm, 偏心距为约 60 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 为 422 mm, H2 为 203 mm, 含有 200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1500 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 422 mm, H2 为约 203 mm, 含有约 205 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 30 rpm, 偏心距为约 60 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 为 422 mm, H2 为 203 mm, 含有 205 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1500 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 422 mm, H2 为约 203 mm, 含有约 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 30 rpm, 偏心距为约 60 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 是 422 mm, H2 是 203 mm, 含有 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1690 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 452 mm, H2 为约 347 mm, 含有约 500 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 28 rpm, 偏心距为约 65 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1690 mm, D3 为 190 mm, H1 为 452 mm, H2 为 347 mm, 含有 500 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 28 rpm, 偏心距为 65 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1952 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 533 mm, H2 为约 465 mm, 含有约 1200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 25 rpm, 偏心距为约 65 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1952 mm, D3 为 190 mm, H1 为 533 mm, H2 为 465 mm, 含有 1200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 25 rpm, 偏心距为 65 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1952 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 533 mm, H2 为约 465 mm, 含有约 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 30 rpm, 偏心距为约 65 mm。 在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1

和 D2 为 1952 mm, D3 为 190 mm, H1 为 533 mm, H2 为 465 mm, 含有 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 65 mm。

在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为约 1952 mm, D3 为约 190 mm, H1 为约 533 mm, H2 为约 465 mm, 含有约 330 L 细胞培养液, 振荡器的转速为约 30 rpm, 偏心距为约 65 mm。在一些实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1952 mm, D3 为 190 mm, H1 为 533 mm, H2 为 465 mm, 含有 330 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 65 mm。

在一些实施方式中, 使用 D1 和 D2 为约 2997 mm、D3 为约 190 mm、H1 为约 867 mm、H2 为约 664 mm、含有约 3000 L 细胞培养液, 生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为约 24rpm, 偏心距设置为约 65 mm。在一些实施方式中, 使用 D1 和 D2 为 2997 mm、D3 为 190 mm、H1 为 867 mm、H2 为 664 mm、含有 3000 L 细胞培养液, 生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为 24rpm, 偏心距设置为 65 mm。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 400 mm, D3 为 80 mm, H1 为 149 mm, H2 为 98 mm, 含有 5 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 55 rpm, 偏心距为 30 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X, 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 50.48, 湍动能为 $2.73\text{E-}03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 10.18/s。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 840 mm, D3 为 114 mm, H1 为 280 mm, H2 为 170 mm, 含有 50 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 40 rpm, 偏心距为 40 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X, 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 26.61, 湍动能为 $5.29\text{E-}03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 7.02/s。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 840 mm, D3 为 114 mm, H1 为 280 mm, H2 为 170 mm, 含有 18 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 37-39 rpm, 偏心距为 40 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X, 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统中振荡器的转速为 37 rpm, CFD 模拟得出的运动稳态 S/V 值为 43.34, 湍动能为 $4.71\text{E-}03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 6.8056/s。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 840 mm, D3 为 114 mm, H1 为 280 mm, H2 为 170 mm, 含有 18 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 39 rpm, 偏心距为 40 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X, 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 47.89, 湍动能为 $5.35\text{E-}03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 7.1149/s。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 是 422 mm, H2 是 303 mm, 含有 200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X, 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运

动稳态 S/V 值为 18.46, 湍动能为 $9.91E-03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $5.9707/\text{s}$ 。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 1500 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 是 422 mm, $H2$ 是 303 mm, 含有 205 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X , 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s 。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 18.24, 湍动能为 $9.89E-03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $5.7476/\text{s}$ 。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 1500 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 是 422 mm, $H2$ 是 303 mm, 含有 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X , 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s 。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 15.98, 湍动能为 $9.30E-03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $5.4623/\text{s}$ 。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 1690 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 是 452 mm, $H2$ 是 347 mm, 含有 500 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 28 rpm, 偏心距为 65 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X , 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s 。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 10.61, 湍动能为 $7.59E-03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $4.66/\text{s}$ 。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 1952 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 为 533 mm, $H2$ 为 465 mm, 含有 1200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 25 rpm, 偏心距为 65 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 6.60, 湍动能为 $9.30E-03 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $4.42/\text{s}$ 。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 1952 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 为 533 mm, $H2$ 为 465 mm, 含有 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 65 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X , 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s 。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 20.96, 湍动能为 $1.46E-02 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $6.0922/\text{s}$ 。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 1952 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 为 533 mm, $H2$ 为 465 mm, 含有 330 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 65 mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X , 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s 。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 18.09, 湍动能为 $1.52E-02 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $6.3173/\text{s}$ 。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 $D1$ 和 $D2$ 为 2997 mm, $D3$ 为 190 mm, $H1$ 为 867 mm, $H2$ 为 664 mm, 含有 3000 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 24rpm, 偏心距为 65mm, CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 X , 湍动能为 $X \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 X/s 。在一个实施方式中, 所述生物反应器系统经 CFD 模拟得出的培养液运动稳态 S/V 值为 5.65, 湍动能为 $2.48E-02 \text{ m}^2/\text{s}^2$, 流场剪切率为 $3.98/\text{s}$ 。

另一方面, 本申请涉及一种使用生物反应器系统培养细胞, 特别是无细胞壁细胞, 的方法, 该生物反应器系统包含:

- 容器，该容器含有直径 D_1 且高度 H_1 的中空圆柱，以及上直径 D_2 、下直径 D_3 且高度 H_2 的中空圆台，其中该中空圆柱与中空圆台的顶面连接， $D_1=D_2$ ；
- 振荡器，能够设置成使容器按照一定的偏心距和转速做偏心运动；
- 通气装置，设置成从容器上部向容器内通入含氧气体，和
- 填充在容器中的培养液，其顶面暴露于含氧气体，

细胞培养方法包括：

- 根据生物反应器系统的形状和培养液体积，经 CFD 模拟算出培养液在偏心运动达稳态时培养液液体总表面积 S 与培养液体积 V 的比值 S/V 在 5.65 以上、湍动能在 $2.73E-03 \text{ m}^2/\text{s}^2$ 以上、且流场剪切率在 20.27/秒以下所需的振荡器转速和偏心距，其中培养液液体总表面积为培养液与反应器壁面接触面积和培养液与气体接触面积之和；以及
- 在生物反应器系统中加入培养液和接种细胞，并根据计算出的振荡器转速和偏心距来设定振荡器，进行细胞培养。

可以使用 FLUENT 软件进行 CFD 模拟。

根据生物反应器系统的工作总功率，振荡器的转速随容器体积增大而减小。根据生物反应器系统的工作效率，振荡器的偏心距随容器体积增大而增大。

例如，最大工作体积为 5L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 45-70 rpm 范围内，偏心距可以设置为约 30 mm；最大工作体积为 50 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 40-60 rpm 范围内，偏心距可以设置为约 40 mm；最大工作体积为 500 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 25-30 rpm 范围内，偏心距可以设置为约 65 mm；最大工作体积为 1200 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 20-30 rpm 范围内，偏心距可以设置为约 65 mm；最大工作体积为 3000 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 24-26 rpm 范围内，偏心距可以设置为约 65 mm。

生物反应器系统还可以包含设置在容器中的用于容纳培养液的一次性培养袋，该一次性培养袋具有多功能盖板，该多功能盖板连接到培养袋的顶部以密封培养袋，并且设置有多通向一次性培养袋内部的接孔。该一次性培养袋可以是柔性培养袋，或由硬质材料制成，且在展开时具有与容器相对应的形状。该一次性培养袋可以设置有将其固定于容器的装置。上述多功能盖板上的接孔具有良好的密封性，可以在需要时接入探测电极、导管等。在一些实施方式中，各接孔通过气密性好的螺纹进行密封。在一些实施方式中，通过任意接孔接入各探测电极，对细胞培养过程的温度、溶氧、pH 等环境参数进行实时监测。在一些实施方式中，通过接孔接入导管，进行细胞培养接种以及培养液添加、取样、回收、丰收、换气等各种操作，以便进一步的优化培养条件，提高细胞培养密度。同时，可应用于各种一次性培养袋的多功能盖板的各接孔均使用统一标准的螺纹接口，气密性好，可根据细胞培养的需要进行灵活的取舍操作。特定培养过程中不需要的接孔可以容易地密封。

在一个实施方式中, 使用 D1 和 D2 为 400 mm、D3 为 80 mm、H1 为 149 mm、H2 为 98 mm、且含有 5 L 细胞培养液的生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为 55 rpm, 偏心距设置为 30 mm。

在一个实施方式中, 使用 D1 和 D2 为 840 mm、D3 为 114 mm、H1 为 280 mm、H2 为 170 mm、且含有 50 L 细胞培养液的生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为 40 rpm, 偏心距设置为 40 mm。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 为 422 mm, H2 为 303 mm, 含有 18 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 37-39 rpm, 偏心距为 40 mm。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 是 422 mm, H2 是 203 mm, 含有 200 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 是 422 mm, H2 是 203 mm, 含有 205 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm。在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1500 mm, D3 为 190 mm, H1 是 422 mm, H2 是 203 mm, 含有 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 60 mm。

在一个实施方式中, 使用 D1 和 D2 为 1690 mm、D3 为 190 mm、H1 为 452 mm、H2 为 347 mm、且含有 500 L 细胞培养液的生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为 28 rpm, 偏心距设置为 65 mm。

在一个实施方式中, 使用 D1 和 D2 为 1952 mm、D3 为 190 mm、H1 为 533 mm、H2 为 465 mm、含有 1200 L 细胞培养液的生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为 25 rpm, 偏心距设置为 65 mm。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1952 mm, D3 为 190 mm, H1 为 533 mm, H2 为 465 mm, 含有 250 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 65 mm。

在一个实施方式中, 生物反应器系统中容器的 D1 和 D2 为 1952 mm, D3 为 190 mm, H1 为 533 mm, H2 为 465 mm, 含有 330 L 细胞培养液, 振荡器的转速为 30 rpm, 偏心距为 65 mm。

在一个实施方式中, 使用 D1 和 D2 为 2997 mm、D3 为 190 mm、H1 为 867 mm、H2 为 664 mm、含有 3000 L 细胞培养液的生物反应器进行细胞培养, 振荡器转速设置为 24rpm, 偏心距设置为 65 mm。

在本申请的生物反应器系统中, 培养液做偏心运动时产生较低的剪切力, 对细胞的损伤较小, 特别适用于无细胞壁的细胞, 例如动物细胞的培养; 而且当偏心运动时培养液的稳态 S/V 值和湍动能控制在一定范围内时, 溶氧和扩氧效率较高, 不会因为氧气分布不均造成氧浓度过高时的氧毒性或者氧浓度过低时细胞生长和增殖受限, 可以较好地支持细胞高密度生长。当使用本申请中的方法培养细胞时, 不管是较小规模, 还是大规

模的培养,细胞生长和增殖效率均较高,且细胞成活率保持在 90.0%、95.0% 甚至 99.0% 以上。特别当配合使用一次性培养袋时,可避免交叉污染、缩短批间处理周期,无需复杂管道等附属设施、无需清洗、消毒、验证,极大地提高了工作效率。

附图说明

图 1 示出本申请生物反应器系统中容器的结构示意图。

图 2 示出偏心运动时容器上任一点的运动轨迹示意图。

图 3 示出 CUR300L 在工作体积 300 L、转速 28 rpm 时转动一周的自由液面变化模拟图。

图 4 示出 CUR300L 在工作体积 300 L、转速 30 rpm 时转动一周的自由液面变化模拟图。

图 5 示出 CUR300L 在工作体积 175 L、转速 28 rpm 时转动一周的自由液面变化模拟图。

图 6 示出 CUR300L 在工作体积 175 L 且转速 30 rpm 时转动一周的自由液面变化模拟图。

具体实施方式

当进行细胞,特别是无细胞壁细胞,例如动物细胞的培养时,最理想的状况是反应器对细胞造成的物理损伤很小,同时反应器能够及时地提供足够的氧气来支持细胞的生长和增殖。这需要生物反应器系统产生较小的剪切力,且提供较高的溶氧和扩氧效率。而本申请的目的是提供一种有如上所述效果的生物反应器系统。

而在生物反应器的设备开发和生物反应过程工艺研究中,往往需要先在小型设备中进行摸索和试验,再逐渐放大到较大规模的设备中进行工艺放大试验和商业化生产。然而实践中往往是在小型反应器中进行科学实验所取得的数据、工艺和规律,并不能完全在大型反应器中取得同样或更好的效果,生物反应器尺度设计无法通过简单的等比例放大来满足动物细胞的工业化规模培养需要。

因此,本申请的发明人通过计算流体力学(CFD)仿真模拟各种规模的工作状态下的生物反应器,重点考察了 CUR2.5L、CUR50L、CUR300L、CUR1200L、CUR3000L 等 5 种型号不同体积反应器在振荡器沿着垂直轴线作偏心运动的工况下,培养液的相对位置变化、气液交界面面积、液体总表面积、液体湍动能、湍动能耗散率、湍流强度和剪切力变化等。当综合选择其中的一些参数组合并将其应用于实际细胞培养时,发现不管是采用 5 L 还是 1200 L 的生物反应器系统,均可以实现细胞的稳定增长,且细胞成活率在 90.0%、95.0% 甚至 99% 以上。

本申请中的生物反应器系统主要包含容器和振荡器。容器由上部的中空圆柱加下部的中空圆台构成,容器围绕着相等半径的偏心距作等速圆周运动。通过将偏心运动稳态

时培养液液体总表面积与体积的比值 S/V 、湍动能以及流场剪切率控制在一定范围内，可以实现细胞的稳定增长，且将细胞成活率保持在高水平。

振荡器进行“偏心运动”，是指振荡器中的电机通过皮带带动一个皮带轮同时转动，皮带轮和三个曲柄连接在一起，带动动平台运动，动平台上每一点都绕着相等半径的偏心做等速圆周运动，且动平台上任何一点的运动轨迹相同，在任一时刻每个点的速度和加速度都相同。生物反应器系统的容器固定在振荡器的动平台上，容器的运动是在水平面上的平动，只需测容器上任一点的运动轨迹，即可以确定其他部分的运动轨迹，如图2所示。

“溶氧”是指培养液顶面与含氧气体接触，将气体带入培养液中，以及当振荡器带动生物反应器系统的容器作偏心运动时，使培养液产生缓慢运动，不断冲刷容器表面，制造具有纳米级可溶微气泡，拖带气体进入培养液中。“扩氧”是指通过培养液的湍流扩散等将带入液体的含氧气体传递到培养液内部。

培养液的“液体总表面积”是指培养液与反应器壁面接触面积和培养液与气体接触面积之和，简称为 S ，其与培养液体积之比称为 S/V 比。在本文中，培养液与气体接触面积简称为 A 。培养液的顶面与氧气直接接触，会溶解一部分氧。同时，反应器容器内壁黏附的液膜的气体更新速度可能异于液相主体，旋转至此的液体与液膜接触可能影响主体气体成分。当生物反应器系统处于偏心运动时，培养液会不同程度地偏离反应器容器的中心轴，转速越高，液体受到的离心力越大，偏离程度越明显，液体被挤压得越薄，与空气接触的界面凹陷得越明显。从而，处于偏心运动时，培养液与生物反应器壁面接触的面积、以及培养液顶面与气体接触面积均会有不同程度的增加，从而使得运动稳态时培养液的液体总表面积以及 S/V 比增大。

在无细胞壁细胞，如动物细胞的培养中，由于细胞壁的缺失，细胞对流场内的力学环境比较敏感，外力对细胞造成的机械损伤是动物细胞生物反应器设计和使用过程中一个不可忽略的因素。在生物反应器中细胞受到的剪切力分为三大类：培养液内部的相对运动产生的流场剪切力，流场剪切力的大小和速度梯度、培养液的运动粘度成正比；气泡在培养液中上升及表面破裂时产生的剪切力；细胞与反应器内壁的碰撞，以及细胞间的相互碰撞所产生的剪切力。

当选择本申请的生物反应器系统时，由于采用表面传氧方式，没有气泡分布器因而产生的气泡极少，因此气泡产生的剪切力伤害可以忽略不计。而且，本申请的生物反应器系统为中空圆柱加中空圆台结构，当其做偏心运动时，生物反应器中培养液以及其中的细胞所接触到的反应器壁十分地平滑，因而产生的碰撞剪切力也较小。

因此，本申请生物反应器内剪切力主要是流场剪切力。流场剪切力对细胞的破坏跟流体湍动所产生的最小涡流尺寸密切相关，培养液在罐体内贴着壁面转动，产生湍动漩涡，大漩涡逐渐发展成小漩涡，小漩涡发展成更小的漩涡，这个过程中伴随着能量的传递，培养液机械能变为热能，使其温度升高。在漩涡逐渐变化的过程中，当漩涡的尺寸与细胞的尺寸接近的时候，漩涡把能量传递给细胞，从而导致细胞的破裂。在 CFD 模

拟中,发现在同一生物反应器内,平均剪切力或平均剪切率随转速增大而增大,培养液体积对其影响较小;而体积较大的生物反应器中产生的剪切力可能会更小。当选用本申请的生物反应器系统时,不论容器形状规格、培养液体积、振荡器转速和偏心距如何,产生的平均剪切率均很低,和杀伤中华仓鼠癌细胞(CHO)的水中剪切率阈值($391.41s^{-1}$)相差一个数量级。因此,在设置生物反应器系统时,可以不用特别考虑剪切力这一参数。

培养液的溶氧和扩氧效率与培养液的表面积、湍动能、湍流强度等有关。当溶氧和扩氧效率较高、足以支持细胞的生长和增殖时,就无需使用氧浓度特别高的气体。根据以往经验,氧浓度特别高的气体,尤其是纯氧,容易造成氧毒性。

培养液的溶氧效率主要和培养基接触含氧气体的表面积有关。当生物反应器系统的容器处于偏心运动时,培养液的顶面以及和容器壁的接触面都可能接触含氧气体。因此,相比静态时的总表面积或 S/V 比,运动稳态时的总表面积或 S/V 比更具有参考价值。在 CFD 模拟中,发现不同容器规格、培养液体积和振荡器转速等均会影响运动稳态时的 S/V 比。通常而言, S/V 比越大,溶氧效率会越高。在使用本申请构造的容器时,在 S/V 比值较低的情况下,仍能达到细胞稳定生长和增殖且细胞成活率较高的效果。

培养液的扩氧效率主要和培养液的湍动能、湍流强度等有关。

流体微团的运动可以表示为随主体流动的平均速度与随机波动的脉动速度的叠加。微团的随机波动造成了湍流流动。输入功率随转速升高而增加,使得携带较高能量地流体微团比例增大,能够产生有效碰撞传递能量的微观漩涡数量增加,即表现为湍动能平均值的增大。从 CFD 模拟来看,在工作体积不变的情况下,转速越高,湍动能越高,因此容器内物质传递和混合效果越好。此外,微团的随机波动造成了湍流扩散。微团间的速度波动剧烈,相互作用越强烈,能量的传递和分散作用也越显著。因此,湍流强度越大,液相内物质传递与混合的效果也越好。随着转速增加,湍流强度呈增大趋势,转速提高使得输入流体内的能量增加,造成了流体微团的动能增加,脉动速度加快,湍流强度也相应增加。湍动能、湍流强度主要与流体平均速度以及湍流脉动速度相关,且和振荡器转速呈一定的正相关。在考虑培养液的扩氧效率时,可以只考虑其中之一。

通过 CFD 模拟,可以针对一定的生物反应器选择合适的培养液体积、振荡器转速和偏心距,以达到剪切效应小、溶氧和扩氧效率高的效果。

由于生物反应器的自重随体积增大而增大,在考虑生物反应器系统的工作总功率的前提下,可以针对大反应器选择较小的转速。在另一方面,从生物反应器的工作效率方面考虑,需要根据生物反应器的体积来选择偏心距。通常而言,振荡器的偏心距随容器体积增大而增大。

例如,最大工作体积为 5L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 45-70 rpm 范围内,偏心距可以设置为约 30 mm;最大工作体积为 50 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 45-60 rpm 范围内,偏心距可以设置为约 40 mm;最大工作体积为 500 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 25-30 rpm 范围内,偏心距可以设置为约

65 mm；最大工作体积为 1200 L 的生物反应器系统可以将振荡器转速设置在 20-30 rpm 范围内，偏心距可以设置为约 65 mm。

在下文中，将通过具体的实施例来进一步阐述本申请的内容，但是本申请并不限于以下实施例。

实施例 1 生物反应器的计算机模拟仿真实验

通过 CFD 软件——FLUENT 软件模拟各总不同工作体积反应器在不同转速下容器内流场的特性。重点考察了 CUR2.5L、CUR50L、CUR300L、CUR1200L、CUR3000L 等 5 种型号不同体积反应器容器在振荡器沿着垂直轴线作偏心运动的工况下，培养液的相对位置变化、气液交界面面积、液体总表面积、液体湍动能、湍动能耗散率、湍流强度和剪切力变化，具体发明步骤、方法和结果如下：

一、生物反应器系统的仿真模型的建立

1.提出假设

为了实验能够顺利进行，更好地控制变量，在建立模型前对实验对象及初始条件进行了简化，假设以下几点：

- 1.1 生物反应器系统的容器为刚体，表面无褶皱且在运动中不产生形变；
- 1.2 工作环境为标准大气压、常温；
- 1.3 容器内培养液的物理特性与水一致。

2.建立模型

2.1 几何参数

生物反应器系统中容器的结构示意图如图 1 所示，几何参数列于表 1 中。

表 1 各生物反应器系统中容器的几何参数

规格	D1、D2（mm）	D3（mm）	H1（mm）	H2（mm）
CUR2.5L	269	80	81.5	57
CUR50L	840	114	280	170
CUR300L	1500	190	422	303
CUR1200L	1952	190	533	465
CUR3000L	2997	190	867	664

2.2 转速、工作体积及对应的初始液面高度

根据各规格的最佳转速范围及工作体积，确定了各规格反应器的 3 种转速和 3 种工作体积（其中 CUR3000L 确定了满载工况下的 2 种转速），共计 38 组数据，具体数值如表 2 所示。

表 2 各规格体积反应器对应的工况示意图

规格	转速 (rpm)	工作 体积 (L)	初始液面高度 (m) 以圆柱底面为 z=0	规格	转速 (rpm)	工作 体积 (L)	初始液面高度 (m) 以圆柱底面为 z=0
CUR2.5L	45/57/70	0.5	-0.024	CUR300L	25/28/30	175	-0.017
CUR2.5L	45/57/70	1.5	0.000	CUR300L	25/28/30	300	0.054
CUR2.5L	45/57/70	2.5	0.018	CUR1200L	20/25/30	150	-0.173
CUR50L	40/50/60	15	-0.05	CUR1200L	20/25/30	675	0.054
CUR50L	40/50/60	32	-0.008	CUR1200L	20/25/30	1200	0.229
CUR50L	40/50/60	50	0.025	CUR3000L	24/26	3000L	0.189
CUR300L	25/28/30	50	-0.130				

2.3 网格划分

本次实验采用的是非结构化四面体网格，网格信息如表 3 所示。

表 3 各规格反应器非结构化四面体网格信息

规格	网格最大尺寸 (m)	节点数 (Node)	网格数 (Element)	最小网格质量 (Min.)	平均网格质量 (mean)
CUR2.5L	0.016	4173	23934	0.3729	0.8407
CUR50L	0.064	2145	12149	0.3138	0.8223
CUR300L	0.128	1336	7500	0.4007	0.8073
CUR1200L	0.128	2803	15966	0.3562	0.8429
CUR3000L	0.256	1314	7334	0.2344	0.8160

2.4 流场初始条件的设置

采用 VOF 模型 2 相流来追踪气体和液体的交界面，湍流模型选择的是 RNG k-ε 模型。生物反应器的运动轨迹是偏心运动，CUR2.5L、CUR50L、CUR300L、CUR1200L 和 CUR3000L 反应器运动的偏心距分别为 30 mm、40 mm、60 mm、65 mm 和 65 mm。在 FLUENT 软件中利用 smoothing 和 layering 动网格技术，编译 UDF 以定义反应器的运动，影响罐体运动的因素是角速度 ω 和偏心距 R。罐体上某点的运动方程为：

$$V_x = R\omega \cos(\omega t + \varphi_0)$$

$$V_y = -R\omega \sin(\omega t + \varphi_0)$$

其中，

V_x ——该点在 x 方向上的线速度； V_y ——该点在 y 方向上的线速度；

t ——时间； φ_0 ——该点的初始相位角（为了简化计算，该点取为反应器建模时的原点坐标[0, 0, 0]）。

以 CUR300L 在转速为 25rpm 的情况下为例，UDF 文件具体内容如下：

```

#include "udf.h"
#include "math.h"
#include "dynamesh_tools.h"
#define rox 0.1571
#define roy -0.1571
#define ome 2.6180

DEFINE_CG_MOTION(tank_rotation_one, dt, vel, omega,
time, dtime)
{
    vel[0] = rox*cos(ome*time);
    vel[1] = roy*sin(ome*time);
    vel[2] = 0;
}

```

二、实验结果

1. 计算机模拟工作状态下，液体在容器中相对位置和形态变化

本模拟不考虑初始阶段液体的变化情况，只考察培养液在反应器内形状达到相对稳定时的准稳态过程。

从 CUR300L 达到准稳态时反应器转动一周的自由液面变化模拟图（图 3、图 4、图 5、图 6）来看，液体均不同程度地偏离了反应器容器的中心轴。相同体积下，转速越高，液体受到的离心力越大，偏离程度越明显；转速越高，液体被挤压得越薄，与气体接触的界面凹陷得越明显。300L 和 175L 工作体积具有相同的变化趋势。同时，通过观察转动过程中反应器内的自由液面还可以发现，在达到准稳态时，反应器内自由液面的形态变化过程不再发生明显的改变。

2. 计算机模拟工作状态下，液体总表面积、气液交界面积及其与工作体积的比值

由两相传质的双膜理论假设，实际过程中，反应器容器内壁黏附的液膜的气体更新速度可能异于液相主体，旋转至此的液体与液膜接触可能影响主体气体成分。因此，将液体与反应器容器内壁面接触面积（W）与气液界面面积（A）之和表述为液体总表面积（S， $S=W+A$ ）。

表 4 各工作体积反应器中液体总表面积、气液交界面积及其与工作体积比值随转速变化情况

型号	工作体积/L	转速 rpm	液体总表面积/m ²		气液交界面/m ²		液体总表面积/工作体积		气液交界面积/工作体积	
			静态	动态	静态	动态	静态	动态	静态	动态
CUR2.5L	2.5	60	0.1391	0.1419	0.0580	0.0589	55.64	56.76	23.20	23.56

CUR2.5L	2.5	70	0.1391	0.1553	0.0580	0.0618	55.64	62.12	23.20	24.72
CUR5L	5	55	0.2585	0.2624	0.1217	0.1237	51.70	52.48	24.34	24.74
CUR5L	5	65	0.2585	0.2971	0.1217	0.1281	51.70	59.42	24.34	25.62
CUR50L	50	40	1.2316	1.3304	0.5697	0.5796	24.63	26.61	11.39	11.59
CUR50L	50	55	1.2316	1.4863	0.5697	0.6385	24.63	29.73	11.39	12.77
CUR500L	500	28	5.2369	5.3029	2.2920	2.3103	10.47	10.61	4.58	4.62
CUR500L	500	30	5.2369	5.5070	2.2920	2.3341	10.47	11.01	4.58	4.67
CUR1200L	1200	27	7.8114	7.9005	3.0544	3.0843	6.51	6.58	2.55	2.57
CUR1200L	1200	29	7.8114	7.9610	3.0544	3.1061	6.51	6.63	2.55	2.59
CUR3000L	3000	24	16.7168	16.9434	7.2203	7.2921	5.57	5.65	2.41	2.43
CUR3000L	3000	26	16.7168	17.0518	7.2203	7.3522	5.57	5.68	2.41	2.45

从表 4 可以看出，转速提高对 S 的影响程度随工作体积的不同而改变。通过对比各型号反应器不同工作体积反应器的液体总表面积 S 和气液交界面积 A 的变化趋势，发现两者的变化趋势基本上保持一致。转速增加，液体在反应器内旋转的频率随之加快，单位时间内液体扫掠面积增加，使得气液更新速度加快。因此可以简单地用转速大小来粗略衡量气液更新速度。

3. 计算机模拟工作状态下，反应器内的流体湍动能和湍动能耗散率

(1) 湍动能 k 用于表征流体微团脉动过程中所蕴含的能量，公式如下：

$$k = \frac{3}{2} (v_{ave} I)^2$$

其中，

v_{ave} ——流体的平均速度；

I ——湍流强度，大小等于湍流脉动速度均方根 v' 与平均速度 v_{ave} 的比值。

(2) 湍动能耗散率 ε 用于衡量微团碰撞和粘性耗散造成的能量损失速度大小，公式如下：

$$\varepsilon = \rho C_{\mu} \frac{k^2}{\mu} \left(\frac{\mu_1}{\mu} \right)^{-1}$$

其中， ρ 、 μ 、 μ_1 ——流体的密度、黏度、湍流黏度。

流体微团的运动可以表示为随主体流动的平均速度与随机波动的脉动速度的叠加。微团的随机波动造成了湍流流动。从表 5 可以看出，在工作体积不变的情况下，转速越高，湍动能越高，因此反应器内物质传递和混合效果越好，同时 ε 也有不同程度的增大。

输入功率随转速升高而增加，使得携带较高能量的流体微团比例增大，能够产生有效碰撞传递能量的微观漩涡数量增加，即表现为 k 平均值的增大。同时，单位时间内

液体扫过容器内壁的面积随转速的增加而变大，气液接触交换的机会增大，壁面黏附作用和液体内部黏性摩擦也随之增加。高能微团的比例升高造成了更多的微团碰撞和能量传递， k 的传递频率衰减速度加快。由此，湍动能耗散率 ϵ 随着转速升高而加快。

氧气液膜传递系数 k_L 与湍动能耗散率 ϵ 的关系式如下：

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{D_{O_2}} \left(\frac{\epsilon \rho_L}{\mu_L} \right)^{\frac{1}{4}}$$

其中， D_{O_2} 表示氧气扩散系数， ρ_L 和 μ_L 分别表示液相的密度和黏度。以上参数在本次实验条件下均为常数，可以用湍动能耗散率 ϵ 表征气液传递过程的强弱。气液传递随着 ϵ 的增大而变得强烈，近似地，气液传质系数 $k_L a$ 越大。

表 5 各工作体积反应器中的湍动能 k 和湍动能耗散率 ϵ 随转速变化情况

规格	工作体积 (L)	转速 (rpm)	湍动能 k	湍动能耗散率 ϵ
CUR2.5L	0.5	45	3.88E-04	0.0008
	0.5	57	1.50E-03	0.0073
	0.5	70	3.46E-03	0.0266
	1.5	45	7.18E-04	0.0024
	1.5	57	1.43E-03	0.0074
	1.5	70	3.00E-03	0.0241
	2.5	45	4.08E-04	0.0008
	2.5	57	1.33E-03	0.0081
	2.5	70	2.38E-03	0.0213
CUR50L	15	40	7.65E-03	0.0197
	15	50	9.78E-03	0.0326
	15	60	1.24E-02	0.0634
	32	40	5.41E-03	0.0173
	32	50	8.45E-03	0.0310
	32	60	1.04E-02	0.0599
	50	40	4.67E-03	0.0142
	50	50	7.56E-03	0.0200
	50	60	8.37E-03	0.0489
CUR300L	50	25	7.52E-03	0.0103
	50	28	9.64E-03	0.0159
	50	30	1.29E-02	0.0211
	175	25	5.03E-03	0.0088
	175	28	8.06E-03	0.0156
	175	30	9.95E-03	0.0204
	300	25	3.50E-03	0.0049
	300	28	7.15E-03	0.0150
	300	30	9.01E-03	0.0194

CUR1200L	150	20	6.58E-03	0.0102
	150	25	9.20E-03	0.0203
	150	30	1.63E-02	0.0391
	675	20	5.34E-03	0.0101
	675	25	8.73E-03	0.0197
	675	30	1.42E-02	0.0313
	1200	20	5.00E-03	0.0092
	1200	25	9.30E-03	0.0151
	1200	30	9.94E-03	0.0205
CUR3000L	3000	24	2.48E-02	0.0477
	3000	26	3.36E-02	0.0817

4. 计算机模拟工作状态下，反应器内的湍流强度

从微环境角度来说，湍流扩散起主导作用。流体微团的运动可以表示为随主体流动的平均速度与随机波动的脉动速度的叠加。微团的随机波动造成了湍流扩散。微团间的速度波动剧烈，相互作用越强烈。能量的传递和分散作用也越显著。因此，湍流强度越大，液相内物质传递与混合的效果也越好。

可以用 I 来表征流体微团速度波动和相互作用的强烈程度。微团间的速度波动剧烈，相互作用越强烈，能量的传递和分散作用也越显著。因此，湍流强度越大，液相内物质传递与混合的效果也越好。湍流强度 I 的公式为：

$$I = \frac{v'}{v_{avg}}$$

其中， v' 为湍流脉动速度的均方根， v_{avg} 为流体的平均流速。流体微团的运动可以表示为随主体流动的平均速度与随机波动的脉动速度的叠加。微团的随机波动造成了湍流流动。

从表 6 可以得出，在工作体积不变的情况下，随着转速增加， I 呈增大趋势，转速提高使得输入流体内的能量增加，造成了流体微团的动能增加，脉动速度加快，湍流强度也相应增加。

表 6 各工作体积反应器，湍流强度 I 随转速变化情况

规格	工作体 积 (L)	转速 (rpm)	湍流强度 I (%)	规格	工作体 积 (L)	转速 (rpm)	湍流强度 I (%)
CUR2.5L	0.5	45	2.16	CUR50L	15	40	6.76
	0.5	57	3.00		15	50	7.65
	0.5	70	4.62		15	60	9.46
	1.5	45	1.99		32	40	5.67
	1.5	57	2.83		32	50	7.19
	1.5	70	4.24		32	60	8.91
	2.5	45	1.51		50	40	3.00

	2.5	57	2.61		50	50	6.21
	2.5	70	3.63		50	60	7.61
	50	25	5.46		150	20	4.14
	50	28	7.43		150	25	5.62
	50	30	9.06		150	30	10.07
CUR300L	175	25	5.38	CUR1200L	675	20	5.42
	175	28	7.00		675	25	6.92
	175	30	7.85		675	30	9.30
	300	25	4.55		1200	20	4.43
	300	28	6.35		1200	25	5.48
	300	30	7.20		1200	30	8.67
CUR3000L	3000	24	11.56				
	3000	26	13.12				

5. 平均剪切率

动物细胞膜外没有细胞壁，对流场内的力学环境比较敏感，外力对细胞造成的机械损伤是动物细胞生物反应器设计和使用过程中一个不可忽略的因素。

在生物反应器中细胞受到的剪切力分为三大类：培养液内部的相对运动产生的流场剪切力，流场剪切力的大小和速度梯度、培养液的运动粘度成正比；气泡在培养液中上升及表面破裂时产生的剪切力；细胞与反应器内壁的碰撞，以及细胞间的相互碰撞所产生的剪切力。流场剪切力对细胞的破坏跟流体湍动所产生的最小涡流尺寸密切相关，培养液在容器内贴着壁面转动，产生湍动漩涡，大漩涡逐渐发展成小漩涡，小漩涡发展成更小的漩涡，这个过程中伴随着能量的传递，培养液机械能变为热能，使其温度升高。在漩涡逐渐变化的过程中，当漩涡的尺寸与细胞的尺寸接近的时候，漩涡把能量传递给细胞，从而导致细胞的破裂。对于本申请的生物反应器来说由于采用表面传氧，没有气泡分布器因而产生的气泡极少，因此气泡产生的剪切力伤害可以忽略不计。由于生物反应器内罐体内侧壁面比较光滑碰撞剪切力也比较小。通过上述分析可以发激流式生物反应器内剪切力主要是流场剪切力。因此通过仿真检测反应器内部剪切率的平均值对生物反应器的设计具有重要参考价值。

表 7 各工作体积反应器，平均剪切率随转速变化情况

规格	工作体积 (L)	转速 (rpm)	平均剪切率 (s^{-1})	规格	工作体积 (L)	转速 (rpm)	平均剪切率 (s^{-1})
CUR2.5L	0.5	45	4.9853	CUR50L	15	40	7.9708
	0.5	57	10.1582		15	50	8.9876
	0.5	70	20.2738		15	60	9.3835
	1.5	45	6.2612		32	40	7.2709
	1.5	57	10.9229		32	50	8.7364
	1.5	70	19.8577		32	60	9.0551

	2.5	45	4.0946		50	40	6.9012
	2.5	57	10.8802		50	50	8.2140
	2.5	70	17.8340		50	60	8.9004
CUR300L	50	25	4.2551	CUR1200L	150	20	3.8602
	50	28	5.9395		150	25	6.2380
	50	30	6.7627		150	30	6.2714
	175	25	3.9559		675	20	3.2128
	175	28	5.2161		675	25	5.4725
	175	30	5.7067		675	30	5.8422
	300	25	3.3894		1200	20	1.3091
	300	28	4.8398		1200	25	4.4204
	300	30	5.3338		1200	30	4.9002
CUR3000L	3000	24	3.9816				
	3000	26	4.4238				

从表 7 可以得出，运动稳态时的培养液液体流场平均剪切率处于 20.27/s 以下。

平均剪切率是对整个流场区域的剪切率进行体积积分，然后求平均值。其计算公式为，

$$\bar{\tau} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n V_i} \sum_{i=1}^n V_i \cdot \tau_i$$

从表 7 可以看出，对于 CUR2.5L，在工作体积不变的情况下，平均剪切率随着振荡器转速的增大而增大，且工作体积的变化对平均剪切率的影响相对较小。CUR1200L 受到的平均剪切率要比 CUR2.5L 小得多。虽然平均剪切率变小，对细胞的伤害会更小，但是剪切率和混合效果是相互制约的，剪切率变小也就意味着混合效果的变差。

以中华仓鼠癌细胞（CHO）为例，当剪切力大于 0.392Pa，即在水中剪切率大于 391.41s⁻¹ 时，细胞就会受到破坏。而从表 7 中了解到的反应器内平均剪切率要远远低于对细胞构成伤害的剪切率。

三、小结

本实验以 CUR2.5L、CUR50L、CUR300L、CUR1200L 和 CUR3000L 作为模拟对象，采用动网格模型、RNG $k-\epsilon$ 湍流模型结合 VOF 模型分别对 14 种转速、13 种工作体积（共 38 种工况）下容器内液体的流动行为进行了数值分析。结果表明：

1. 达到准稳态时液相形状受转速影响明显，液面随着转速增加弯曲程度加重；
2. 气液交界面面积 A 不随转速增加而线性增加，转速提高对液体总表面积 S 的影响程度随工作体积的不同而改变；

3. 液相额定湍流参数均受到转速和工作体积的双重影响，根据 k_L 与 ϵ 关系式，可以用 ϵ 近似地表征气液传递过程的强弱；

4. 平均剪切率随转速的增加而增大。虽然平均剪切率变小,对细胞的伤害会更小,但是剪切率和混合效果是相互制约的,剪切率变小也就意味着混合效果的变差。反应器内的平均剪切率要远远低于对细胞构成伤害的剪切率。

实施例2 生物反应器系统的混合性能测试

一、CUR5L 生物反应器混合性能试验

1、实验设计

模拟生物反应器细胞培养环境,测定不同工作体积、不同转速下,生物反应器内物料的混合均匀度,验证反应器的混合性能。

设备型号: CUR5L 生物反应器(金仪盛世, D1=400 mm、D3=80 mm、H1=149 mm、H2=98 mm), 工作体积 5 L; 混合所用溶液为 PBS 缓冲液, 加入的试剂为 1 mol/L 的 NaOH。检测仪器: 梅特勒 pH 电极。

测定内容: 向生物反应器中加入 NaOH 试剂后, 用 pH 电极测定混合均匀的时间, 以确定反应器振荡过程中, 加入容器的物料混合均匀所用时长。以时间长短来模拟生物反应器在实际应用过程中, 加入的物料能实际影响培养细胞的能力。

本实验模拟反应器正常培养细胞的条件, 分别设定 50 rpm、55 rpm、60 rpm 三个转速值以及最小工作体积 2 L、最适工作体积 3.5 L、最大工作体积 5 L 等三个不同工作体积。

2、实验准备

(1) 在符合 GMP 标准的环境下, 配置 15 L PBS 缓冲液待用。

(2) 在符合 GMP 标准的环境下, 配置 500 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液作为实验标准液, 配置完之后, 密闭在 500 mL 储液桶中, 以防止溶液变质, 影响实验准确。

(3) pH 传感器置于反应器顶部接口, 通过测量液体的 pH 来反映混合效率。

3、实验步骤

3.1 生物反应器 CUR5L 工作体积 2 L, 在 50、55、60 rpm 转速条件下的混合实验

(1) 向反应器内先加入 2L PBS 缓冲液, 温度控制在 25-27℃, 将反应器转速设定为 50 rpm, 通过振荡器振荡运动, 使反应器运行偏心距为 30 mm。

(2) 待反应器进入稳态运转状态后, 开始从反应器正上方圆心处, 向反应器内注入 3 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。每间隔 5 分钟注入 1 次, 一共注入 3 次。

(3) 将反应器转速设定为 55 rpm, 重复步骤 (2)。

(4) 将反应器转速设定为 60 rpm, 重复步骤 (2)。

3.2 生物反应器 CUR5L 工作体积 3.5 L, 在 50、55、60rpm 转速条件下的混合实验

步骤基本同 3.1, 除向反应器内加入的 PBS 缓冲液为 3.5 L 且每次向反应器内注入的浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液为 5 mL 外。

3.3 生物反应器 CUR5L 工作体积 5 L，在 50、55、60 rpm 转速条件下的混合实验步骤基本同 3.1，除向反应器内加入的 PBS 缓冲液为 5 L 且每次向反应器内注入的浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液为 10 mL 外。

利用 pH 传感器实时监测生物反应器内 pH 变化情况，以及观察两个传感器达到相同 pH 值所用时间，导出传感器图像数据和报表数据，分析两组传感器检测得出的混合均匀所用时长，得出反应器的混合效率。

4、实验结果

溶液 pH 稳定的标准：连续 10 s，pH 稳定在某一个数值，误差范围在±0.01 之间，则认为 pH 值达到稳定。在各条件下 pH 值达到稳定所用的时间总结在以下表 8 中。

表 8 CUR5L 不同工作体积和转速下达到 pH 稳定的时间

工作体积 (L) 混合时间 (s) 转速 (rpm)	2L	3.5L	5L
50 rpm	19	16	25
55 rpm	20	14	19
60 rpm	14	15	13

二、CUR50L 生物反应器混合性能试验

采用 CUR50L 生物反应器（金仪盛世，D1=840 mm、D3=114 mm、H1= 280 mm、H2=170 mm），转速分别设定为 38 rpm、39 rpm、40 rpm 三个转速值以及最小工作体积 15 L、最适工作体积 30 L、最大工作体积 50 L 等三个不同工作体积，偏心距设为 40 mm，温度控制在 25-27℃。

测试方法基本同上。在 15 L 工作体积时，向反应器内加入 15 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 10 mL 浓度为 1mol/L 的 NaOH 溶液。在 30 L 工作体积时，向反应器内加入 30 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 30 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。在 50 L 工作体积时，向反应器内加入 50 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 50 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。结果总结在表 9 中。

表 9 CUR50L 不同工作体积和转速下达到 pH 稳定的时间

工作体积 (L) 混合时间 (s) 转速 (rpm)	15 L	30 L	50 L
38 rpm	50	52	72
39 rpm	35	34	142

40 rpm	32	41	101
--------	----	----	-----

三、CUR500L 生物反应器混合性能试验

采用 CUR500L 生物反应器（金仪盛世，D1=1690 mm、D3=190 mm、H1=452 mm、H2=347 mm），转速分别设定为 25 rpm、27 rpm、29 rpm 三个转速值以及最小工作体积 100 L、最适工作体积 300 L、最大工作体积 500 L 等三个不同工作体积，偏心距设为 65 mm，温度控制在 25-27℃。

测试方法基本同上。在 100 L 工作体积时，向反应器内加入 100 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 50 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。在 300 L 工作体积时，向反应器内加入 300 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 100 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。在 500 L 工作体积时，向反应器内加入 500 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 100 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。结果总结在表 10 中。

表 10 CUR500L 不同工作体积和转速下达到 pH 稳定的时间

工作体积 (L) 混合时间 (s) 转速 (rpm)	100 L	300 L	500 L
25 rpm	86	82	90
27 rpm	97	62	80
29 rpm	40	94	70

四、CUR1200L 生物反应器混合性能试验

采用 CUR1200L 生物反应器（金仪盛世，D1=1952 mm、D3=190 mm、H1=533 mm、H2=465 mm），转速分别设定为 23 rpm、25 rpm、27 rpm 三个转速值以及最小工作体积 300 L、最适工作体积 800 L、最大工作体积 1200 L 等三个不同工作体积，偏心距设为 65 mm，温度控制在 25-27℃。

测试方法基本同上。在 300 L 工作体积时，向反应器内加入 300 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 100 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。在 800 L 工作体积时，向反应器内加入 800 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 800 mL 浓度为 1 mol/L 的 NaOH 溶液。在 1200 L 工作体积时，向反应器内加入 1200 L PBS 缓冲液且每次向反应器内注入 500 mL 浓度为 2 mol/L 的 NaOH 溶液。结果总结在表 11 中。

表 11 CUR1200L 不同工作体积和转速下达到 pH 稳定的时间

工作体积 (L) 混合时间 (s) 转速 (rpm)	300 L	800 L	1200 L
----------------------------------	-------	-------	--------

23 rpm	56	110	679
25 rpm	49	253	174
27 rpm	55	257	72

如表 8-表 11 数据所示，本装置的混合效率是完全可以满足大规模细胞培养过程中的混合与传质要求的。

实施例 3 MDCK 细胞培养

使用实施例 2 中使用的 CUR5L、CUR50L、CUR500L 和 CUR1200L 生物反应器进行 MDCK 细胞的培养。细胞的接种密度为 1.5×10^6 细胞/ml，生长培养基为 CD MDCK SFM（DP304，健顺生物），培养温度为 37℃，溶氧值 DO% 为 35-65。

CUR5L 反应器设置工作体积 5 L，转速 55 rpm，偏心距 30 mm，氧气和空气的导入速率分别设为 100 mL/min 和 200 mL/min。CUR50L 反应器设置工作体积 50 L，转速 40 rpm，偏心距 40 mm，氧气和空气的导入速率分别设为 500 mL/min 和 500 mL/min。CUR500L 反应器设置工作体积 500 L，转速 28 rpm，偏心距 65 mm，氧气和空气的导入速率分别设为 900 mL/min 和 1000 mL/min。CUR1200L 反应器设置工作体积 1200 L，转速 25 rpm，偏心距 65 mm，氧气和空气的导入速率分别设为 1500 mL/min 和 1500 mL/min。

在细胞培养至 48 h 时往反应系统中一次性补加 2 g/L 的葡萄糖，补加葡萄糖溶液的浓度为 200 g/L。另外，生物反应器 pH 值设定在 7.0~7.4 范围内，当系统检测到 pH 值低于 7.0 时，系统会自动补加浓度为 7.5% 的 NaHCO_3 。

细胞培养数据总结在以下表 12 中。

表 12 MDCK 细胞培养数据

设备规格	培养时间 (h)	培养基起始体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)	总耗氧量 (L)
CUR5L	0	5L	1.50	99.2	4.7
	24		3.00	99.5	
	48		5.30	99.2	
	72		8.20	99.4	
CUR50L	0	50L	1.50	99.4	49
	24		2.90	99.3	
	48		6.00	99.5	
	72		7.80	99.6	
CUR500L	0	500L	1.50	99.4	438
	24		2.40	99.2	
	48		4.80	99.8	
	72		7.47	99.6	

CUR1200L	0	1200L	1.50	99.5	2850
	24		2.30	99.2	
	48		5.20	99.6	
	72		7.30	99.4	

从表 12 可以看出, 细胞培养过程中, 尽管细胞密度不断增加, 细胞活率一直保持在 99.0% 以上。

实施例 4 CHO 细胞培养

1. CUR300L 生物反应器培养 CHO 细胞

采用本申请构造的 CUR300 L 生物反应器 (金仪盛世, D1=1500 mm、D3=190 mm、H1=422 mm、H2=303 mm), 采用批次流加 (Fed-batch) 细胞培养工艺, 进行 CHO 细胞的培养。其中, 反应器转速 30 rpm, 偏心距 60 mm, 培养基起始体积分别为 200 L、205 L、250 L, 温度控制在 37°C, 氧气和空气的导入速率分别设为 800 mL/min 和 800 mL/min。初始培养基为甘肃健顺生物有限公司 CHO 细胞专用培养基, 在培养的第 4 天, 补加的培养基为甘肃健顺生物有限公司的 CD Feed002。

CHO 细胞的接种密度为约 1.0×10^6 /mL, 在第 4、6、8、10 天分别加入当前工作体积的 5%、2%、5%、2% 的 CD Feed002, 葡萄糖低于 2.0 g/L 时补加葡萄糖溶液至 8.0 g/L, pH 值设定在 7.0~7.2 范围内, 当 pH 值低于偏离 7.0 时, 系统会自动补加浓度为 7.5% 的 NaHCO_3 。培养共持续 14 天, 每天观察细胞生长的密度、活率、渗透压、氧分压、二氧化碳分压、蛋白表达量等情况。培养过程中的细胞密度和活率具体记载于表 13。

表 13 CHO 细胞培养数据

培养时间 (h)	培养基起始体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)	培养基起始体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)	培养基起始体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)
0	200 L	0.99	95.9	205 L	0.96	97.8	250 L	1.19	98.7
24		1.36	96.3		1.57	98.7		2.13	98.8
48		3.97	97.0		3.22	98.5		4.28	99.2
72		6.82	98.1		5.94	99.1		7.75	98.8
96		10.70	98.8		9.00	97.8		13.07	99.2
120		14.70	97.2		13.90	98.6		16.45	98.9
144		15.70	97.7		14.60	98.7		19.12	98.9
168		14.30	97.1		14.00	97.7		19.09	98.1
192		14.50	95.6		13.70	98.1		18.58	97.5
216		13.50	96.8		13.20	98.2		16.77	96.8
240		13.30	95.3		12.50	98.5		15.17	94.0
264		11.20	94.2		12.00	97.5		16.02	96.5
288		11.60	95.7		11.60	98.3		14.77	91.5
312		11.40	93.3		11.50	96.1		14.73	96.0

336		11.20	96.6		10.80	96.4		15.49	96.0
-----	--	-------	------	--	-------	------	--	-------	------

第 14 天下罐收获时的培养体积分别达到 247 L、256 L、和 312 L，最终蛋白表达量达到 1.133 g/L、1.594 g/L、1.311 g/L。整个培养过程中，细胞的密度最高时达到 15.49×10^6 细胞/mL，细胞始终维持在高活率，保持在蛋白的高表达期，结果较理想。

2. CUR1200L 生物反应器培养 CHO 细胞

采用 CUR1200 L 生物反应器（金仪盛世，D1=1952 mm、D3=190 mm、H1=533 mm、H2=465 mm），以批次流加方式进行 CHO 细胞培养。反应器转速设定为 30 rpm，工作体积取 250 L 和 330 L，偏心距设为 65 mm，温度控制在 37℃。氧气和空气的导入速率分别设为 1500 mL/min 和 1500 mL/min。初始培养基为甘肃健顺生物有限公司 CHO 细胞专用培养基，在培养的第 4 天，补加的培养基为甘肃健顺生物有限公司的 CD Feed002。

接种密度约 1×10^6 /mL，在第 4、6、8、10 天分别加入当前工作体积的 5%、2%、5%、2% 的 CD Feed002，葡萄糖低于 2.0 g/L 时补至葡萄糖溶液至 8.0 g/L，pH 值设定在 7.0~7.2 范围内，当 pH 值低于 7.0 时，系统会自动补加浓度为 7.5% 的 NaHCO_3 。细胞培养持续 14 天，每天观察细胞生长的密度、活率、渗透压、氧分压、二氧化碳分压、蛋白表达量等情况。培养过程中的细胞密度和活率具体记载于表 14。

第 14 天下罐收获时的培养体积分别达到 314 L、417 L，最终蛋白表达量达到 1.481 g/L、1.308 g/L。整个培养过程中，细胞的密度最高时达到 18.51×10^6 /mL，细胞始终维持在高活率，保持在蛋白的高表达期，结果较为理想。

表 14 CHO 细胞培养数据

培养时间 (h)	培养基起始体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)	培养基起始体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)
0	250 L	1.09	99.1	330 L	1.19	99.2
24		2.11	99.0		2.36	98.6
48		5.51	98.6		4.90	98.9
72		9.12	98.4		9.22	98.9
96		15.25	98.7		14.38	98.9
120		19.71	98.2		20.45	99.2
144		20.01	97.4		23.38	98.9
168		18.47	95.0		24.37	97.9
192		17.26	93.5		21.49	96.3
216		18.45	96.2		20.02	95.5
240		17.42	92.8		18.14	94.6
264		17.32	96.1		19.81	94.4
288		16.50	93.0		18.22	94.7
312		16.83	95.3		18.47	94.7
336		15.40	91.3		18.51	93.6

3. CUR50L 生物反应器培养 CHO 细胞

采用本申请构造的 CUR50L 生物反应器（金仪盛世，D1=1500 mm、D3=190 mm、H1=422 mm、H2=303 mm），采用 ATF 灌流（Perfusion）细胞培养工艺，进行 CHO 细胞的培养。其中，生物反应器的转速为 37 rpm（第 1-8 天）转 39 rpm（第 9-20 天），工作体积为 18 L、偏心距为 40 mm，温度控制在 37℃。氧气和空气的导入速率分别设为 500mL/min 和 500mL/min。初始培养基为甘肃健顺生物有限公司 CHO 细胞专用培养基，在培养的第 11 天，补加的培养基为甘肃健顺生物有限公司的 CD Feed。

表 15 CHO 细胞培养数据

培养时间 (h)	取出/添加 体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)	培养时间 (h)	取出/添加 体积 (L)	细胞密度 ($\times 10^6$ /mL)	细胞活率 (%)
0	0	1.1	97.8	264	54	70.9	99.2
24	0	1.4	97.4	288	54	84.9	99.1
48	54	2.4	98.6	312	54	84.6	98.3
72	54	3.7	98.3	336	54	86.7	98.6
96	54	5.5	98.1	360	54	88.5	98.7
120	54	8.2	98.4	384	54	89.4	98.7
144	54	12.6	98.9	408	54	90.1	98.9
168	54	18.1	98.6	432	54	82.7	98.7
192	54	34.3	98.8	456	54	76.8	98.6
216	54	43.7	99.2	480		72.2	98.6
240	54	56.6	99.0				

接种密度约 1×10^6 /mL，第 12-20 天通过 ATF-4 取出部分培养液，并添加同样体积培养液，培养系统中维持葡萄糖浓度不低于 3.0 g/L，pH 值设定在 7.0~7.2 范围内，当 pH 值低于 7.0 时，系统会自动补加浓度为 7.5% 的 NaHCO_3 。细胞培养持续 20 天，每天观察细胞生长的密度、活率、直径、渗透压、乳酸残余量、蛋白表达量等情况。培养过程中的细胞密度和活率具体记载于表 15。

第 20 天下罐收获时的培养体积位 14 L，最终蛋白表达量达到 27 g，这个结果超出预期。整个培养过程中，细胞的密度最高时达到 90.1×10^6 /mL，细胞始终维持在高活率（97%以上）。

从以上可以看出，在使用本申请构造的生物反应器并选取合适的转速、偏心距等时，细胞培养顺利进行，细胞密度逐渐增高，细胞存活率一直保持在较高水平如 90.0% 以上。可见，本申请的生物反应器系统适用于高密度动物细胞培养。