

哺乳动物细胞培养中搅拌系统的研究进展

周梦娇¹, 郑翔², 张琼琼², 张珊珊², 刘煜^{1*}

¹中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京

²上海药明生物技术有限公司细胞培养工艺开发部门, 上海

收稿日期: 2023年1月6日; 录用日期: 2023年2月27日; 发布日期: 2023年3月6日

摘要

近年来, 全球肿瘤发病率逐年上升, 以单克隆抗体为代表的重组蛋白受到越来越多的关注和应用, 推动了搅拌釜式生物反应器在哺乳动物细胞培养工艺开发中的研究和发展。搅拌釜式生物反应器是以通过鼓泡分布器供氧, 通过搅拌装置加速传质及实现微环境均一性为特征的一类反应器, 广泛应用于重组蛋白生产, 反应规模从10 mL到25,000 L不等。其中搅拌系统作为细胞培养中最关键的部分之一, 其引导的流体混合特性及带来的剪切应力与细胞表现、代谢产品产量及质量息息相关。针对哺乳动物细胞培养工艺中搅拌系统的选择与设计目前已取得许多研究成果, 故本文从常见叶轮类型、桨叶数量、桨叶安装方式、搅拌辅助配件、搅拌转速设计等方面展开论述, 综述了搅拌系统的研究现状, 以期细胞培养工艺的反应器优化和规模缩放提供参考。

关键词

搅拌釜式生物反应器, 细胞培养, 叶轮, 挡板, 搅拌转速

Research Progress of Stirring System in Mammalian Cell Culture

Mengjiao Zhou¹, Xiang Zheng², Qiongqiong Zhang², Shanshan Zhang², Yu Liu^{1*}

¹College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu

²Cell Culture Process Development Department, WuXi Biologics (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai

Received: Jan. 6th, 2023; accepted: Feb. 27th, 2023; published: Mar. 6th, 2023

Abstract

In recent years, with the rising of the global tumor incidence rate, recombinant proteins, represented

*通讯作者。

文章引用: 周梦娇, 郑翔, 张琼琼, 张珊珊, 刘煜. 哺乳动物细胞培养中搅拌系统的研究进展[J]. 生物过程, 2023, 13(1): 7-18. DOI: 10.12677/bp.2023.131002

by monoclonal antibodies, are gaining more and more attention and clinical application, which has promoted the research and development of the stirred tank bioreactor in mammalian cell culture. The stirred tank bioreactor, a type of reactor featured with a stirring device for enhancing mass transfer and achieving micro environment uniformity, and bubbling spargers for oxygen supply, has been widely used in the production of recombinant proteins, with reaction scales ranging from 10 mL to 25,000 L. The mixing system is one of the most critical parts of culture. Cell performance, yield and quality of metabolic products are closely related to this system and the fluid mixing characteristics and shear stress induced by it. Achievements have been made in the selection and design of stirring system in mammalian cell culture process. Here, the types, number, installation modes of impellers, auxiliary accessories, and stirring speed setting were reviewed and discussed to provide reference for the bioreactor optimization, and scaling up and down of the cell culture process.

Keywords

Stirred Tank Bioreactor, Cell Culture, Impeller, Baffle, Stirring Speed

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

抗体药物是现代生物医药产业的主力军, 因其靶向性强、疗效好、副作用小的特性已成为癌症、免疫介导的疾病及神经系统疾病等难治性疾病的临床治疗模式[1]。该类药物以具有翻译后修饰特别是糖基化能力的哺乳动物细胞表达系统为主要生产载体[2], 以搅拌釜式生物反应器(Stirred Tank Bioreactor, STR)为小试工艺研究、中试和工业大规模生产中的主要细胞培养系统[3] [4]。STR 主要通过气体分布器进行鼓泡供氧, 通过搅拌装置在反应器内诱导以湍流为主的流体运动以加强传质过程; 实现培养液在 pH、溶解氧浓度(Dissolved Oxygen, DO)、渗透压、温度等方面的均匀化[4], 确保细胞能摄取到足够的氧气和营养以供呼吸及生长代谢等生命活动所需, 同时维持适当水平的二氧化碳去除速率。

然而由于搅拌和曝气, 不具有刚性细胞壁的哺乳动物细胞在这类反应器中难以避免会受到剪切损伤, 通常认为该损伤存在三个主要来源: 直接叶轮区的高能量耗散; 液面与顶空气体交界处的气泡破裂; 分布器出气孔的高气体入口速度(Gas Entrance Velocity, GEV) [5]。这些剪切损伤可能导致细胞坏死、凋亡, 或者一些亚致死性反应如葡萄糖消耗速率和乳酸产生速率的增大[6]及产品糖基化模式的改变[7]。而上述这三个剪切来源均直接或间接受到搅拌系统设计的影响。

本文章主要综述了用于哺乳动物细胞培养的 STR 中搅拌系统的选择与设计对培养体系的混合效果、传质效率、微环境均一性及剪切应力方面的影响, 在一定程度上指出了其与细胞的生物学表现之间的相互关系, 以期细胞培养工艺在反应器硬件设计上的改良优化和工艺缩小模型的建立提供参考。

2. 叶轮的种类

在 STR 中, 叶轮的类型决定了反应器内液相的流体特性, 根据搅拌过程中液体的主要流动方向, 叶轮可分为三类: 径流式叶轮、轴流式叶轮和混合流式叶轮[8], 分别以 Rushton 桨叶、螺旋桨叶和象耳桨叶为代表(图 1)。

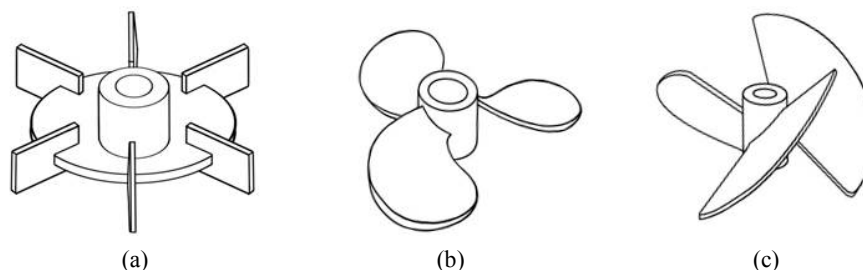


Figure 1. Rushton turbine (a), propeller impeller (b) and elephant ear impeller (c)
图 1. Rushton 桨叶(a), 螺旋桨叶(b)和象耳桨叶(c)

2.1. 径流式叶轮

径流式叶轮主要引导液体产生水平环流, 其中 Rushton 桨叶是最典型的径流式叶轮[9]。Rushton 桨叶是最早从化工及微生物培养工艺中化用至哺乳动物细胞培养的搅拌装置, 以垂直分布的六个平面叶片为结构特征[10], 按照是否将叶片安插于圆盘中可分为平叶及蝶式涡轮两种形式[11]。该类叶轮搅拌时将液体近乎垂直地推向罐体内壁, 液体触壁后发生急剧速度变化并分别在桨叶上下方循环分布[12], 故而易形成独立流场, 缺乏整体混合[13]; 作用范围明显集中于桨叶径向区域[14], 能够发生充分混合的区域仅占总体积的 20%~40% [15]; 在分散气体时每个叶片后会形成气穴而降低搅拌功率, 这类叶轮常被认为不利于物质的良好交换[16]。另一方面, 该类叶轮流场中较大的剪切力及触壁后速度梯度可能对哺乳动物细胞造成严重的剪切损伤[12], 故这类叶轮现已基本不作为哺乳动物细胞培养的主流选择。

不过由于这类叶轮转动时能够产生较高的剪切力破碎气泡[9], 因而具有相较于轴流式叶轮更高的氧传质速率[17], 实验中将其与轴流式叶轮搭配使用时能够产生较优的综合效果[18]。此外, 赵学明等[15]通过磁粒子流动跟踪法发现在常见于哺乳动物细胞培养的 300 r/min 转速下, 高粘度介质中的 Rushton 桨叶相较于轴流式搅拌桨具有更优的混合效果和更低的功耗。对于其固有缺陷, 也得到了一些突破。安笑辉[9]基于 Rushton 涡轮改进后的错位涡轮桨可增强循环间的相互作用, 并能够进一步提高氧传质效率, 且在低转速低通气量条件下, 优势愈加明显。通过将直叶片改为弯曲叶片如半管结构可以有效抑制气穴的形成, 现已被成功设计并应用[19]。近年来追求更小规模、更高密度的哺乳动物细胞培养工艺的发展趋势或许能为径流式叶轮的优化和应用提供新的契机。

2.2. 轴流式叶轮

螺旋桨叶是一类以产生轴向流为主的搅拌器, 叶片通常为弧形, 叶片背面被设计为凸面, 可以很好地产生轴向流[14], 在一些欧美的商品化生物反应器中均有配备[20]。螺旋桨叶产生的剪切力较小, 混合效率较 Rushton 叶轮更优, 被认为是适宜用于动物细胞培养的一类叶轮[21]。不过该类叶轮也被指出对靠近壁面的液体带动效果较弱, 可能使得反应器内整体混合效果不甚理想[14]。

2.3. 混合流式叶轮

象耳叶轮是最常用的一类混合流式叶轮, 属于斜叶叶轮, 因叶片面积大而薄且形似象耳而得名[22]。由于其叶片与转动方向成一定的角度, 在转动产生部分水平环流的同时产生更多的轴向分流[23], 能够引导良好的整体循环, 从而产生较好的传质效果[24]。这类桨叶在保证混合效果的前提下, 流场剪切力也较小[25] [26], 且周志玮[11]指出当叶片与主轴成 45° 安装时, 优势最为明显。赵晓伟[22]通过数值模拟研究表明, 象耳叶轮叶片数目越多混合效果越好, 均匀性越强, 但同时流场中也将产生更大的剪切力, 以三叶片设计为佳。相同桨叶直径和搅拌转速条件下, 相较于 Rushton 叶轮和螺旋桨叶, 象耳叶轮总流场平

均剪切率和搅拌区平均剪切率最低, 剪切特性最为温和[11]。目前该类叶轮在哺乳动物细胞培养工艺中常作为首选。

3. 叶轮的数量

对于较大规模或高径比大于 2 的生物反应器, 单个搅拌器的有效作用范围有限, 一般采用两个或三个搅拌器组合使用, 称为组合桨[18] [27]。Arjunwadkar 等[28]和 Nocentini 等[29]研究表明, 组合桨结构具有比单桨结构更强的载气能力, 在相同的搅拌功率输入时, 组合桨能处理更多的气体, 气相在气液混合物中的体积比更大, 即气含率更高。此外, 与单叶轮系统相比, 多叶轮系统还具有更高效的气体分布、更长的气体停留时间、更强的液体推动、更均匀的能量耗散以及单个叶轮更低的功耗需求等特性[27]。

组合桨可以是相同或不同的叶轮, 后者一般是下层径流式叶轮和上层轴流式叶轮的搭配, 以充分发挥径流式叶轮的优良气液分散能力和轴流式良好的整体循环优势, 提高传质效率[19], 并已被成功应用至一些大规模的商品化 STR 中。潘傲[17]发现在较高的等搅拌转速和通气速率的情况下, 不同的组合桨之间的氧传质效率会出现明显差异, 其中双层径流桨高于上层轴流 - 下层径流组合桨远高于双层轴流桨。在实际应用中桨叶组合的选择往往还需综合考虑剪切损伤, 对于一些需氧量大的哺乳动物细胞培养工艺, 剪切水平稍低的上层轴流式 - 下层径流式组合桨或许是值得尝试的搭配。

对于径流式叶轮, 由于其搅拌时形成独立循环流场的特性, 因此在多桨系统中其流型敏感依赖于叶轮间距, 产生的混合效果与相应的功耗损失情况也极为复杂[27]。对于轴流式叶轮, 相同通气速率与输入功率下, 通过传质模型预测双桨的传质效率将始终高于单个轴流桨叶[17]。也有研究发现桨叶数量并非越多越好, Sieblist 等[4]通过软件仿真提出, 在相同的总输入功率及表观气速条件下, 单叶轮系统有比三叶轮系统显著更高的氧传质系数数值, 这是因为单叶轮系统将输入功率集中在形成气泡的区域, 该区域更高的局部功率耗散密度导致了更优的传质。

4. 叶轮安装方式

4.1. 象耳叶轮的上排式和下吸式安装

象耳叶轮由于叶片与转动方向成倾斜角度, 故安装涉及上排式和下吸式两种方式, 可通过调整搅拌轴转动方向或分别使用呈镜面对称的两种叶轮, 如向上泵送象耳叶轮和向下泵送象耳叶轮[30]实现(图 2)。

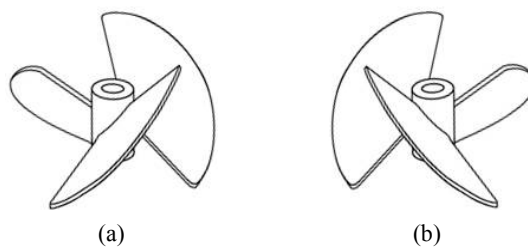


Figure 2. Up-pumping elephant ear impeller, EEU (a) and Down-pumping elephant ear impeller, EED (b). Impellers both rotate clockwise from the top

图 2. 向上泵送象耳叶轮(a)和向下泵送象耳叶轮(b), 叶轮为从上往下看顺时针旋转

桨叶转动时, 如果其表面流体沿桨叶表面向反应器底部运动, 则为下吸式, 反之则为上排式。两者导致的液体流动模式不同, 上排式安装会将整个流场分成较独立的上下两个循环, 而下吸式安装可以使整个流场为一个循环, 极大地避免速度死区[13]。周志玮[11]指出桨叶下吸式安装的流场中液体循环速率

均偏高，在相同输入功率下更加有利于物质的交换。因此在实际应用中也多采用下吸式安装。

4.2. 同心式和偏心式安装

搅拌器转轴沿反应器中心垂直放置被称为“同心式安装”，“偏心式安装”则指将搅拌轴安装在容器的非中心位置进行液相的搅拌。后者利用搅拌轴偏离容器中心轴线以打破原本中心流场的对称性，促进了各流体循环之间的相互作用，从而增加了液层间的湍动，增强了搅拌的混合效果[14]，并减弱了原本搅拌导致的表面中心漩涡[4]，同理也有研究提出了斜插式安装法[14]。

在大型反应器中，除非是挡板不方便安装的情况，一般仍会采用添加挡板来实现上述目的，这是因为偏心安装易造成设备在运转时发生振动现象[31]，且这种结构需要更大的功率输入才能达到与同心轴结构相同的混合时间[32]。但在以过渡流而非湍流混合为主的微型搅拌釜式反应器[33]，偏心式安装较同心式安装可能更好[34]，并已被成功应用至 Ambr 15™ (Sartorius Stedim Biotech, UK)，对于这种一次性微型反应器来说，偏心式无挡板的设计在保留与常见实验室和生产规模类似的混合特性的基础上简化了结构，节省了制造成本[35]，更能匹配其高通量的优势。

5. 搅拌辅助配件

在搅拌器同心式安装的生物反应器中，挡板常被视为重要的搅拌辅助配件。挡板通常为垂直分布在壁面附近的直型部件，大多成对出现，与叶轮共同工作以保证充分混合。在无挡板的情况下，输入流体的大部分能量将出现在围绕叶轮轴的循环运动中，而不会产生良好混合所需的湍流运动[36]，不利于营养物质的交换和细胞的生长代谢[11]；此外在较高转速情况下会在表面形成强烈的中心漩涡[37]，这不仅可能会导致液面下陷露出桨叶而对细胞造成更大剪切损伤[12]，还会使得顶部空间中的气体不受控地扩散到培养液中，从而影响体系中 DO 的稳定并产生更多泡沫[4]。挡板能够改变流体速度方向，将径向流更多地变成轴向流[11]，增强罐内流体的整体湍动效果[38]，且在壁侧会产生局部涡流，可改善 Rushton 桨叶在近壁处的简单切向流情况[12]，并消除搅拌时的打漩现象[15]。

Myers 等[39]表明，各种叶轮的功率数敏感地依赖于挡板，随挡板系数的增大而增大。挡板系数表示为[40]：

$$K_B = (B/D)^{1.2} n_b \quad (1)$$

式中， K_B 为挡板系数， B 为挡板宽度(m)， D 为罐体直径(m)， n_b 指挡板数量。因此，对于特定搅拌器，在相同搅拌速度下，仅仅增加挡板数量和宽度便可提高输入到罐中的功率[41]，但当挡板系数增大到 $K_B = 0.35$ 时，功率基本保持恒定不会再随之进一步增大，即搅拌功率达到饱和，这时称为“全挡板条件”。在实际应用中全挡板条件并非为最优选择，稍低的挡板系数的所提供的流型已经能够带动反应器内的最佳混合，该状态被认为是“充分挡板化”，而过多的挡板数目则被认为是“过挡板化”，反而将减少整体流动，导致更多的局部循环情况[40]。

常用挡板宽度 B 为 $D/10$ 或 $D/12$ ，被称为“标准挡板”，后者在工业生产上使用得更多[42]。研究表明 4 块 $D/10$ 宽度的挡板，已足够充分改善搅拌效果[42]。亦有研究提出相较于 4 块 $D/10$ 宽度的挡板，6 块挡板能够导致更均匀的速度分布，体系中几乎不再存在零速区和低速区[11]。除去挡板宽度和数量外，挡板结构也可进行优化，如沈春银等[42]提出在挡板上设计栅缝使之形成开槽挡板能更有效地提高搅拌的混合效率。

6. 搅拌转速

在 STR 中，搅拌转速对培养液的湍流强度、气泡破裂和聚并平衡十分重要。当搅拌转速不够高时，

相应带来的问题有：① 液相主体中湍流强度较低，导致混合时间过长、传热速率下降，不利于体系的均匀性[4]；② 出现气泛现象，分布器喷射的气泡易聚集成大气泡且具有较短的停留时间，难以在培养液中得到较好的分布[43]，不利于细胞供氧和二氧化碳去除；③ 体系中气含率对通气量的依赖很高[17]，进而为满足细胞氧气需求而导致出现更高的 GEV，加重对细胞的剪切损伤；④ 高通气量往往伴随过多泡沫[44]，更多的细胞被长期保留在泡沫中[45]，会增加自由液面处气泡破裂对细胞造成剪切损伤的风险。

随着搅拌转速的增加，反应器混合时间减小[46]，气泡被打碎到更小的尺寸，气体得以更好地分散，并伴随明显强化的传质效率[47]。然而，搅拌转速的提高在增强反应器内流场充分混合、物质和能量交换的同时，也增加了剪切力对细胞生长和代谢造成负面影响的风险[14]。在实际生产活动中，剪切力难以直接被测定，故面对搅拌转速的选择问题时，往往利用一些工程参数来衡量：代表体系平均剪切强度的参数，如体系的能量耗散率与单位体积的功率输入；和代表体系中的最大剪切强度的参数，如最大能量耗散率与叶尖速度，理想情况下这两个参数均应通过实际测试来匹配特定细胞能承受的剪切力范围。

6.1. 能量耗散率

在 STR 中，机械能从叶轮传递到液体，然后通过一系列湍流漩涡级联耗散，最终将所有机械能转换为热能，能量耗散是混合的驱动力，也是对细胞产生剪切应力的原因[48]。为了量化体系中剪切应力，通常使用能量耗散率 ε ，这是一个描述动能到热量的不可逆转换的标量值[7]。Rushton 等[49]提出在非通气系统中，搅拌釜中每单位质量的平均能量耗散率 ε (W/Kg)可计算为：

$$\varepsilon = \frac{N_p N^3 D_i^5}{V} \quad (2)$$

式中， N_p 为桨叶功率准数，对于特定叶轮，在湍流状态($Re > 10^4$)下， N_p 可被视为常数； N 为叶轮搅拌转速(r/s)； D_i 为叶轮直径(m)； V 为培养液体积(m^3) [50]。湍流能量耗散率与传质速率成正比，但也与对细胞造成的剪切损伤成正相关关系[51]。

能量耗散率与湍流漩涡尺寸紧密相关。搅拌釜中的液体流动以湍流漩涡的存在为特征，体系中大漩涡逐渐衰变成小漩涡甚至更小的漩涡[52]。但是漩涡尺寸存在下限，Kolmogorov [53]根据各向同性湍流理论估算了最小漩涡直径 λ (m)：

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (3)$$

式中， ν 为流体的运动粘度(m^2/s)， ε 为平均能量耗散率(W/Kg)。研究表明，当漩涡尺寸比细胞或细胞团大或小得多时，湍流不会抑制细胞活力；当小漩涡的尺寸与细胞或细胞团的尺寸相近，能量会通过漩涡传递给细胞或细胞团[12]，细胞便会暴露在破坏性的粘性剪切中而受到损伤[54]。另有研究表明细胞只会在尺寸相近或更小的小漩涡情况下受到剪切损伤，失去活性甚至死亡[55] [56] [57]。但达成共识的是，当细胞或细胞团尺寸小于漩涡尺寸时，细胞在反应器中不会受到湍流带来的剪切伤害，结合公式(2)和公式(3)可知，在特定叶轮配置下，要求较小的搅拌转速。

6.2. 单位体积的功率输入

实际应用中，单位体积的功率输入 P/V (W/m^3)也常见于衡量流体力学应力以确定叶轮搅拌转速，在非通气系统中[4]：

$$\frac{P}{V} = \frac{N_p N^3 D_i^5 \rho}{V} \quad (4)$$

式中, N_p 为桨叶功率准数, 无量纲; N 为叶轮搅拌转速(r/s); D_i 为叶轮直径(m); ρ 为培养液密度(Kg/m³)。在通气系统中, 喷射出的气泡会降低密度, 从而降低功耗。Michel 等[58]表明, 对于牛顿流体, 在通气情况下, 输入功率 $P(W)$:

$$P = \alpha \left(\frac{P_0^2 N D_i^3}{Q^{0.56}} \right)^\beta \quad (5)$$

式中, 常数 α 和 β 取决于搅拌系统中叶轮类型和数量, P_0 为非通气系统的输入功率(W), Q 为通气气体流速(m³/s)。 ε 和 P/V 也常被作为工业和实验室中细胞培养规模缩放的关键参数, 以确定不同规模下叶轮搅拌转速[7]。

6.3. 最大能量耗散率

在 STR 中, 局部能量耗散呈现较大的非均匀性, 能量耗散主要集中在叶轮区域和桨尾流区[59], 叶轮区域虽然只占总体积的 10%左右, 但该区能耗可以占总能耗的 70% [48]。侯仰帅等[60]研究显示, 反应器内的剪切速率在桨叶尖端最大, 显示出最大能量耗散率 ε_{\max} 。 Ghadge 等[61]和 Zhou 等[62]指出对于特定几何形状的搅拌釜和叶轮类型, 最大能量耗散率一方面会影响气泡破裂与聚合, 影响传质[17]; 另一方面, ε_{\max} 决定了特定细胞株所能承受的最大搅拌速度[63]。因此, 当规模缩放时, 叶轮叶尖速度的大小有时也被纳入考虑的参数之一[64]。

6.4. 细胞能承受的剪切范围

特定细胞系所能承受的搅动强度取决于两个因素: 一个是特定搅拌条件产生的最大局部能量耗散情况, 另一个是细胞的剪切力敏感性[48]。

Table 1. Sensitivity of CHO cells to shear in flow field

表 1. CHO 细胞对流动中剪切的敏感程度

参考文献	质量剪切水平	细胞表现
Godoy-Silva 等[72]	ε 在 $10^3 \sim 10^5$ W/kg	细胞坏死
Godoy-Silva 等[48]	$\varepsilon = 60$ W/kg 且细胞频繁暴露该区域	细胞亚致死效应及产品糖基化模式的改变
Sieck 等[7]	平均 $\varepsilon = 0.4$ W/kg 或在 $0.01 \sim 0.4$ W/kg 之间反复	细胞比蛋白生产率下降
侯等[60]	$\varepsilon = 0.08 - 2.20$ W/kg	对细胞生长影响较小
Neunstoecklin 等[73]	流场剪切应力接近或超过 32.4 ± 4.4 Pa	产量下降
Tanzglock 等[74]	流场剪切应力达 2.0 Pa	触发细胞凋亡
Ma [75]	流场剪切应力在 $1 \sim 10$ Pa 或 P/V 在 $10^3 \sim 10^5$ W/m ³	细胞亚致死反应
Sorg 等[66]	流场平均剪切应力约 0.4 Pa	乳酸代谢增加及产量下降
赵[22]	流场剪切应力低于 0.3 Pa	对生长几乎无影响

多项研究观察到, 高搅拌转速会降低哺乳动物细胞的细胞密度和活率[65]、影响乳酸代谢[66] [67]、减少产品产量[7] [66], 还可能提高葡萄糖消耗率[67] [68]和影响产品糖基化模式[48]。Sieck 等[7]对细胞进行组学分析发现, 当在高能量耗散率情况培养时, 与 DNA 损伤和修复机制相关的转录物被上调, DNA

损伤可能是高能量耗散影响细胞的机制之一。多数情况下,湍流剪切力虽不至于直接造成细胞破损,但其长期作用可能会通过影响细胞骨架完整性、表面蛋白含量、对金属离子的通透性及代谢活性等生理特性从而促使细胞死亡[69],且不同生长阶段的细胞对转速增加的敏感性也不尽相同[70][71]。动物细胞对机械搅拌相关的剪切力抵抗性与转速提升的幅度和方式有关,缓慢提升会更有利于培养细胞的适应性[69][70]并能够减少由于速度梯度导致的严重细胞变形和损伤[11]。目前已有许多关于 CHO 细胞对搅拌所致剪切水平的耐受相关的研究结论(表 1)。

另有一些文献指出,在哺乳动物细胞培养过程中,机械搅拌引起的剪切应力不足以在没有气体喷射的情况下损坏细胞[52][65],即使转速高达 600 r/min [76][77]。搅拌和喷射的组合对细胞更有害[52][77],气泡在搅拌所致的湍流流体中的聚结和破裂产生的剪切力被认为是细胞损伤的一个重要机制[75][77]。故而目前在实际细胞培养工艺中,通常在基础培养基内加一定浓度的剪切保护剂如 Pluronic™ F-68,可以很大程度上减少较高转速情况下细胞受到的气泡相关的致命剪切损伤[21][69][76]。

研究表明,次优湍流条件[51]和高能量耗散的强湍流条件均可能导致细胞生长、蛋白产率或产品质量发生变化,以上综述了当前研究中给出的剪切力的可接受范围,以避免严重的细胞损伤,在该范围内应尽可能提供较优的混合条件以满足微环境均一性及对氧气和二氧化碳的传质和移除的要求,从而为细胞生长和代谢创造最有利的环境。

7. 总结与展望

STR 在哺乳动物细胞培养中得到了最广泛的使用,该类生物反应器具有多种优异性能,如:操作简单且性能稳定、气液交界面积大、热传导性能好和培养工艺易规模放大[3][9],并可以相对容易地控制产品质量[78]。近年来,关于 STR 中搅拌系统的叶轮类别优缺点、桨叶数量、桨叶安装方式、挡板、搅拌转速等领域的研究已得到充分的发展,并给出了一些实施有效的建议。本文通过综述当前国内外在搅拌系统取得的研究成果,一方面为追求更高细胞密度的培养模式,如灌流培养(Perfusion)和本人所在研究机构近年来提出的加强型灌流培养(Intensified Perfusion Culture, IPC)[79],从反应器硬件改良的角度为供氧策略的优化提供更多参考;另一方面期望为用于工艺表征(Process Characterization, PC)的更具代表性的缩小模型(Scale-Down Models, SDM)的建立提供一些思路。

然而,除了上文讨论的这些,在 STR 中,对搅拌装置的认知和应用还存在一些亟待解决的问题,比如:① 在细胞培养液中如何更精确地模拟和计算搅拌联合通气对整体剪切力的影响,以更好地对搅拌转速和通气策略进行优化。② 由于不存在搅拌装置所带来的剪切损伤,工艺开发早期用于克隆、培养基、添加剂筛选和工艺初探的摇瓶与摇管的代表性欠佳,能否利用模型预测其差异。③ 由于剪切和功率限制,大规模细胞培养中常见存在混合时间过长的问题,从而导致 pH、DO 和温度梯度,进一步影响细胞表现、产品产量及质量,需要开发剪切力更低、传质效果更好、整体循环更佳的桨叶外形或组合搭配以降低大规模中微环境的不均一性。不过可以预期,随着计算流体力学(Computational Fluid Dynamics, CFD)在细胞培养工艺开发中的广泛研究和应用及计算机运算能力的提高,更贴近实际的数学模型将不断出现,从而帮助我们对 STR 有更深入的理解和认识,以实现哺乳动物细胞培养工艺的精准调控并有效提高工艺的稳健性。

参考文献

- [1] Arena, T.A., Chou, B., Harms, P.D. and Wong, A.W. (2019) An Anti-Apoptotic HEK293 Cell Line Provides a Robust and High Titer Platform for Transient Protein Expression in Bioreactors. *mAbs*, **11**, 977-986. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1598230>
- [2] Walsh, G. (2014) Biopharmaceutical Benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, **32**, 992-1000.

<https://doi.org/10.1038/nbt.3040>

- [3] 王佃亮, 韩梅胜. 动物细胞培养用生物反应器及相关技术[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(11): 24-27.
- [4] Sieblist, C., Jenzsch, M., Pohlscheidt, M. and Lubbert, A. (2011) Insights into Large-Scale Cell-Culture Reactors: I. Liquid Mixing and Oxygen Supply. *Biotechnology Journal*, **6**, 1532-1546. <https://doi.org/10.1002/biot.201000408>
- [5] Chaudhary, G., Luo, R., George, M., Tescione, L., Khetan, A. and Lin, H. (2020) Understanding the Effect of High Gas Entrance Velocity on Chinese Hamster Ovary (CHO) Cell Culture Performance and Its Implications on Bioreactor Scale-Up and Sparger Design. *Biotechnology and Bioengineering*, **117**, 1684-1695. <https://doi.org/10.1002/bit.27314>
- [6] Mcdowell, C.L. and Papoutsakis, E.T. (1998) Increased Agitation Intensity Increases CD13 Receptor Surface Content and mRNA Levels, and Alters the Metabolism of HL60 Cells Cultured in Stirred Tank Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **60**, 239-250. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981020\)60:2<239::AID-BIT11>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981020)60:2<239::AID-BIT11>3.0.CO;2-H)
- [7] Sieck, J.B., Cordes, T., Budach, W.E., Rhiel, M.H., Suemeghy, Z., Leist, C., Villiger, T.K., Morbidelli, M. and Soos, M. (2013) Development of a Scale-Down Model of Hydrodynamic Stress to Study the Performance of an Industrial CHO Cell Line under Simulated Production Scale Bioreactor Conditions. *Journal of Biotechnology*, **164**, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.012>
- [8] 李自良, 赵彩红, 王美皓, 王家敏, 乔自林, 李倬. 动物细胞生物反应器研究进展[J]. 动物医学进展, 2020, 41(6): 103-108.
- [9] 安笑辉. 错位桨搅拌生物反应器流场特性及溶氧性能研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2015.
- [10] 黄志坚, 虞培清, 苏扬, 周国忠. 发酵罐用搅拌器的工业应用进展[J]. 医药工程设计, 2004, 25(1): 1-4.
- [11] 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]: [博士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2012.
- [12] 孙庆丰. 搅拌釜式生物反应器设计及优化[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2007.
- [13] 曾昭阳. 生物反应器搅拌桨桨叶优化设计[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2014.
- [14] 林亨特. 斜插式搅拌桨在一次性生物反应器中的应用研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
- [15] 赵学明, 黄霄, 马红武, 樊菽新, 于振生. 搅拌生物反应器的循环时间分布和混合结构模型[J]. 化工学报, 1999, 50(3): 326-336.
- [16] Riet, K.V. and Smith, J.M. (1973) The Behaviour of Gas-Liquid Mixtures near Rushton Turbine Blades. *Chemical Engineering Science*, **28**, 1031-1037. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(73\)80005-3](https://doi.org/10.1016/0009-2509(73)80005-3)
- [17] 潘傲. 基于计算流体力学的搅拌式生物反应器内流场环境对微生物发酵过程的影响研究[D]: [博士学位论文]. 上海: 华东理工大学, 2018.
- [18] 李承拓. 带挡板的锥底振荡生物反应器流场特性研究[D]: [硕士学位论文]. 杭州: 浙江工业大学, 2020.
- [19] 陈光. 笼式通气搅拌生物反应器的结构优化与性能研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2016.
- [20] Pandit, A.B., Rielly, C.D., Niranjana, K. and Davidson, J.F. (1989) The Convex Bladed Mixed Flow Impeller and the Marine Propeller: A Multipurpose Agitator. *Chemical Engineering Science*, **44**, 2463-2474. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(89\)85190-5](https://doi.org/10.1016/0009-2509(89)85190-5)
- [21] Sandadi, S., Pedersen, H., Bowers, J.S. and Rendeiro, D. (2011) A Comprehensive Comparison of Mixing, Mass Transfer, Chinese Hamster Ovary Cell Growth, and Antibody Production Using Rushton Turbine and Marine Impellers. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **34**, 819-832. <https://doi.org/10.1007/s00449-011-0532-0>
- [22] 赵晓伟. 采用 Elephant Ear 桨叶的生物反应器结构优化和细胞剪切特性研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010.
- [23] 任杰. 搅拌反应器流场与动力性能的模拟及实验研究[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 郑州大学, 2007.
- [24] 马鑫. 搅拌桨叶表面应力的测量及分析[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京化工大学, 2000.
- [25] Collignon, M.L., Delafosse, A., Crine, M. and Toye, D. (2010) Axial Impeller Selection for Anchorage Dependent Animal Cell Culture in Stirred Bioreactors: Methodology Based on the Impeller Comparison at Just-Suspended Speed of Rotation. *Chemical Engineering Science*, **65**, 5929-5941. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.08.027>
- [26] Simmons, M.J.H., Zhu, H., Bujalski, W., Hewitt, C.J. and Nienow, A.W. (2007) Mixing in a Model Bioreactor Using Agitators with a High Solidity Ratio and Deep Blades. *Chemical Engineering Research and Design*, **85**, 551-559. <https://doi.org/10.1205/cherd06157>
- [27] Gogate, P.R., Beenackers, A.A. and Pandit, A.B. (2000) Multiple-Impeller Systems with a Special Emphasis on Bioreactors: A Critical Review. *Biochemical Engineering Journal*, **6**, 109-144. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(00\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(00)00081-4)
- [28] Arjunwadkar, S.J., Saravanan, K., Pandit, A.B. and Kulkarni, P.R. (1998) Optimizing the Impeller Combination for

- Maximum Hold-Up with Minimum Power Consumption. *Biochemical Engineering Journal*, **1**, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(97\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(97)00005-3)
- [29] Nocentini, M., Fajner, D., Pasquali, G. and Magelli, F. (1993) Gas-Liquid Mass Transfer and Holdup in Vessels Stirred with Multiple Rushton Turbines: Water and Water-Glycerol Solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **32**, 19-26. <https://doi.org/10.1021/ie00013a003>
- [30] Zhu, H., Nienow, A.W., Bujalski, W. and Simmons, M.J.H. (2009) 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. *Chemical Engineering Research and Design*, **87**, 307-317. <https://doi.org/10.1016/j.chemres.2008.08.013>
- [31] 李美婷, 李威, 李晓光, 杨锋苓. 偏心轴搅拌槽内的层流流场特性[J]. 山东大学学报(工学版), 2019, 49(4): 93-98+107.
- [32] Büche, W. (1937) Leistungsbedarf von Rührwerken. *Zeitschrift des Vereines Deutscher Ingenieure*, **81**, 1065-1069.
- [33] Nienow, A.W., Rielly, C.D., Brosnan, K., Bargh, N., Lee, K., Coopman, K. and Hewitt, C.J. (2013) The Physical Characterisation of a Microscale Parallel Bioreactor Platform with an Industrial CHO Cell Line Expressing an IgG4. *Biochemical Engineering Journal*, **76**, 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.04.011>
- [34] Bulnes-Abundis, D., Carrillo-Cocom, L.M., Araiz-Hernandez, D., Garcia-Ulloa, A., Granados-Pastor, M., Sanchez-Arreola, P.B., Murugappan, G. and Alvarez, M.M. (2013) A Simple Eccentric Stirred Tank Mini-Bioreactor: Mixing Characterization and Mammalian Cell Culture Experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, **110**, 1106-1118. <https://doi.org/10.1002/bit.24780>
- [35] 郭玉蕾, 唐亮, 孙瑞强, 李尤, 陈依军. 高通量微型生物反应器的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2018, 38(8): 69-75.
- [36] Alcamo, R., Micale, G., Grisafi, F., Brucato, A. and Ciofalo, M. (2005) Large-Eddy Simulation of Turbulent Flow in an Unbaffled Stirred Tank Driven by a Rushton Turbine. *Chemical Engineering Science*, **60**, 2303-2316. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.017>
- [37] Kreitmayer, D., Gopireddy, S.R., Matsuura, T., Aki, Y., Katayama, Y., Nakano, T., Eguchi, T., Kakihara, H., Nonaka, K., Profitlich, T., Urbanetz, N.A. and Gutheil, E. (2022) CFD-Based and Experimental Hydrodynamic Characterization of the Single-Use Bioreactor Xcellerex(TM) XDR-10. *Bioengineering (Basel)*, **9**, 22. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9010022>
- [38] 骆海燕, 窦冰然, 姜开维, 洪厚胜. 搅拌式动物细胞反应器研究应用与发展[J]. 生物加工过程, 2016, 14(2): 75-80.
- [39] Myers, K., Reeder, M.E. and Fasano, J.B. (2002) Optimize Mixing by Using the Proper Baffles. *Chemical Engineering Progress*, **98**, 42-47.
- [40] 佟立军. 机械搅拌槽挡板的研究[J]. 有色设备, 2005(3): 17-19+49.
- [41] Lu, W.M., Wu, H.Z. and Ju, M.Y. (1997) Effects of Baffle Design on the Liquid Mixing in an Aerated Stirred Tank with Standard Rushton Turbine Impellers. *Chemical Engineering Science*, **52**, 3843-3851. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)88929-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)88929-4)
- [42] 沈春银, 陈剑佩, 张家庭, 戴干策. 机械搅拌反应器中挡板的结构设计[J]. 高校化学工程学报, 2005, 19(2): 162-168.
- [43] 曹杨. Rushton 搅拌釜式生物反应器的 γ 射线 CT 测量及流体力学模拟计算[D]: [硕士学位论文]. 湘潭: 湘潭大学, 2010.
- [44] Xu, S. and Chen, H. (2016) High-Density Mammalian Cell Cultures in Stirred-Tank Bioreactor without External pH Control. *Journal of Biotechnology*, **231**, 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.019>
- [45] Chisti, Y. (1993) Animal Cell Culture in Stirred Bioreactors: Observations on Scale-Up. *Bioprocess Engineering*, **9**, 191-196. <https://doi.org/10.1007/BF00369402>
- [46] 洪厚胜, 张庆文, 万红贵, 欧阳平凯. 搅拌生物反应器混合特性的数值模拟与实验研究[J]. 过程工程学报, 2005, 5(2): 131-134.
- [47] Lu, W.M. and Ju, S.J. (1987) Local Gas Holdup, Mean Liquid Velocity and Turbulence in an Aerated Stirred Tank Using Hot-Film Anemometry. *The Chemical Engineering Journal*, **35**, 9-17. [https://doi.org/10.1016/0300-9467\(87\)80035-7](https://doi.org/10.1016/0300-9467(87)80035-7)
- [48] Godoy-Silva, R., Chalmers, J.J., Casnocha, S.A., Bass, L.A. and Ma, N. (2009) Physiological Responses of CHO Cells to Repetitive Hydrodynamic Stress. *Biotechnology and Bioengineering*, **103**, 1103-1117. <https://doi.org/10.1002/bit.22339>
- [49] Rushton, J.H., Costich, E.W. and Everett, H.J. (1950) Power Characteristics of Mixing Impeller. *Chemical Engineering Progress*, **46**, 395-404.

- [50] Garcia-Ochoa, F. and Gomez, E. (2009) Bioreactor Scale-Up and Oxygen Transfer Rate in Microbial Processes: An Overview. *Biotechnology Advances*, **27**, 153-176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- [51] Scully, J., Considine, L.B., Smith, M.T., Mcalea, E., Jones, N., O'connell, E., Madsen, E., Power, M., Mellors, P., Crowley, J., O'leary, N., Carver, S. and Van Plew, D. (2020) Beyond Heuristics: CFD-Based Novel Multiparameter Scale-Up for Geometrically Disparate Bioreactors Demonstrated at Industrial 2kL-10kL Scales. *Biotechnology and Bioengineering*, **117**, 1710-1723. <https://doi.org/10.1002/bit.27323>
- [52] Johnson, C., Natarajan, V. and Antoniou, C. (2014) Verification of Energy Dissipation Rate Scalability in Pilot and Production Scale Bioreactors Using Computational Fluid Dynamics. *Biotechnology Progress*, **30**, 760-764. <https://doi.org/10.1002/btpr.1896>
- [53] Kolmogorov, A.N. (1941) The Local Structure of Turbulence in Incompressible Viscous Fluid for Very Large Reynolds Numbers. *Proceedings of the USSR Academy of Sciences*, **30**, 299-303.
- [54] Mcqueen, A., Meilhoc, E. and Bailey, J.E. (1987) Flow Effects on the Viability and Lysis of Suspended Mammalian Cells. *Biotechnology Letters*, **9**, 831-836. <https://doi.org/10.1007/BF01026191>
- [55] Ahmed, S.U., Ranganathan, P., Pandey, A. and Sivaraman, S. (2010) Computational Fluid Dynamics Modeling of Gas Dispersion in Multi Impeller Bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **109**, 588-597. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.014>
- [56] Martín, M., Montes, F.J. and Galán, M.A. (2010) Mass Transfer Rates from Bubbles in Stirred Tanks Operating with Viscous Fluids. *Chemical Engineering Science*, **65**, 3814-3824. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.03.015>
- [57] Kawase, Y., Halard, B. and Moo-Young, M. (1992) Liquid-Phase Mass Transfer Coefficients in Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 1133-1140. <https://doi.org/10.1002/bit.260391109>
- [58] Michel, B.J. and Miller, S.A. (1962) Power Requirements of Gas-Liquid Agitated Systems. *AIChE Journal*, **8**, 262-266. <https://doi.org/10.1002/aic.690080226>
- [59] 张永震. 搅拌釜式生物反应器的计算流体力学模拟[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津大学, 2005.
- [60] 侯仰帅, 费保进, 梁洪, 杨金亮, 宋春雷, 胡珍霞, 张骞, 黄娟, 向雨秘, 雷韬. 生物反应器不同搅拌速度的计算流体力学模拟及对悬浮培养 CHO 细胞的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(11): 1285-1291.
- [61] Ghadge, R.S., Patwardhan, A.W. and Joshi, J.B. (2006) Combined Effect of Hydrodynamic and Interfacial Flow Parameters on Lysozyme Deactivation in a stirred Tank Bioreactor. *Biotechnology Progress*, **22**, 660-672. <https://doi.org/10.1021/bp050269s>
- [62] Zhou, G. and Kresta, S.M. (1996) Impact of Tank Geometry on the Maximum Turbulence Energy Dissipation Rate for Impellers. *AIChE Journal*, **42**, 2476-2490. <https://doi.org/10.1002/aic.690420908>
- [63] Fries, S., Glazomitsky, K., Woods, A., Forrest, G. and Chartrain, M. (2005) Evaluation of Disposable Bioreactors Rapid Production of Recombinant Proteins by Several Animal Cell Lines. *BioProcess International*, **3**, 36-44.
- [64] Sandner, V., Pybus, L.P., McCreath, G. and Glassey, J. (2019) Scale-Down Model Development in Ambr Systems: An Industrial Perspective. *Biotechnology Journal*, **14**, e1700766. <https://doi.org/10.1002/biot.201700766>
- [65] Oh, S.K.W., Nienow, A.W., Al-Rubeai, M. and Emery, A.N. (1989) The Effects of Agitation Intensity with and without Continuous Sparging on the Growth and Antibody Production of Hybridoma Cells. *Journal of Biotechnology*, **12**, 45-61. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(89\)90128-4](https://doi.org/10.1016/0168-1656(89)90128-4)
- [66] Sorg, R., Tanzeglock, T., Soos, M., Morbidelli, M., Perilleux, A., Solacroup, T. and Broly, H. (2011) Minimizing Hydrodynamic Stress in Mammalian Cell Culture through the Lobed Taylor-Couette Bioreactor. *Biotechnology Journal*, **6**, 1504-1515. <https://doi.org/10.1002/biot.201000477>
- [67] Keane, J.T., Ryan, D. and Gray, P.P. (2003) Effect of Shear Stress on Expression of a Recombinant Protein by Chinese Hamster Ovary Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, **81**, 211-220. <https://doi.org/10.1002/bit.10472>
- [68] Abu-Reesh, I. and Kargi, F. (1991) Biological Responses of Hybridoma Cells to Hydrodynamic Shear in an Agitated Bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, **13**, 913-919. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90108-M](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90108-M)
- [69] 谭文松, 戴干策, 陈志宏, 陈因良. 搅拌生物反应器中杂交瘤细胞生长与破损的初步研究[J]. 生物工程学报, 1996(S1): 190-196.
- [70] Odeleye, A.O., Marsh, D.T., Osborne, M.D., Lye, G.J. and Micheletti, M. (2014) On the Fluid Dynamics of a Laboratory Scale Single-Use Stirred Bioreactor. *Chemical Engineering Science*, **111**, 299-312. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.02.032>
- [71] 张建文, 刘禹, 夏建业, 郭美锦, 王泽建, 庄英萍. 机械搅拌生物反应器的 CFD 模拟及剪切力对红花细胞悬浮培养的影响[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2016, 42(4): 492-498.
- [72] Godoy-Silva, R., Mollet, M. and Chalmers, J.J. (2009) Evaluation of the Effect of Chronic Hydrodynamical Stresses on Cultures of Suspended CHO-6E6 Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**, 1119-1130.

- <https://doi.org/10.1002/bit.22146>
- [73] Neunstoecklin, B., Stettler, M., Solacroup, T., Broly, H., Morbidelli, M. and Soos, M. (2015) Determination of the Maximum Operating Range of Hydrodynamic Stress in Mammalian Cell Culture. *Journal of Biotechnology*, **194**, 100-109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.003>
- [74] Tanzeglock, T., Soos, M., Stephanopoulos, G. and Morbidelli, M. (2009) Induction of Mammalian Cell Death by Simple Shear and Extensional Flows. *Biotechnology and Bioengineering*, **104**, 360-370. <https://doi.org/10.1002/bit.22405>
- [75] Ma, N. (2002) Quantitative Studies of the Bubble-Cell Interactions and the Mechanisms of Mammalian Cell Damage from Hydrodynamic Forces. The Ohio State University, Columbus.
- [76] Zhang, S., Handa-Corrigan, A. and Spier, R.E. (1992) Foaming and Media Surfactant Effects on the Cultivation of Animal Cells in Stirred and Sparged Bioreactors. *Journal of Biotechnology*, **25**, 289-306. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(92\)90162-3](https://doi.org/10.1016/0168-1656(92)90162-3)
- [77] Michaels, J.D., Mallik, A.K. and Papoutsakis, E.T. (1996) Sparging and Agitation-Induced Injury of Cultured Animals Cells: Do Cell-to-Bubble Interactions in the Bulk Liquid Injure Cells? *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, 399-409. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960820\)51:4<399::AID-BIT3>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960820)51:4<399::AID-BIT3>3.0.CO;2-D)
- [78] Wang, D., Liu, W., Han, B. and Xu, R. (2005) The Bioreactor: A Powerful Tool for Large-Scale Culture of Animal Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **6**, 397-403. <https://doi.org/10.2174/138920105774370580>
- [79] Zhou, H., Fang, M.Y., Zheng, X. and Zhou, W.C. (2021) Improving an Intensified and Integrated Continuous Bioprocess Platform for Biologics Manufacturing. *Biotechnology and Bioengineering*, **118**, 3618-3623. <https://doi.org/10.1002/bit.27768>