

Mechaniczne uszkodzenia komórek zwierzęcych w bioreaktorach

Tomasz Jankowski¹
Włodzimierz Grajek²

1. Wstęp

Dla swobodnego wzrostu i metabolizmu komórek wymagana jest homogenność składu chemicznego pożywek oraz bardzo precyzyjna regulacja podstawowych parametrów fizyko-chemicznych hodowli, takich jak pH, temperatura, natlenienie, ciśnienie osmotyczne i inne. Utrzymanie tych parametrów na odpowiednim poziomie w całej objętości hodowli wymaga stałego mieszania i napowietrzania pożywek. Zapewnienie właściwych warunków wymiany masy w bioreaktorze przy zachowaniu integralności struktury komórek stanowi główny problem bioinżynieryjny w hodowlach komórek ssaków.

Podstawową barierą w powiększaniu skali hodowli komórkowych jest ich duża wrażliwość na zniszczenie mechaniczne. Wynika to przede wszystkim z braku sztywnej ściany komórkowej. Postawową zewnętrzną otoczką oddzielającą cytoplazmę od środowiska hodowlanego jest błona plazmatyczna o grubości 5 – 10 nm. Ma ona niezwykle wrażliwą strukturę; może ulec zniszczeniu nawet pod wpływem niewielkich różnic ciśnienia osmotycznego między wnętrzem komórki a otoczeniem. Wszelkie działania stabilizujące fizyczną strukturę komórki, odtwarzające jej naturalne warunki rozwoju w tkance, np. poprzez immobilizowanie, chronią ją przed zniszczeniem. Dodatkowym niekorzystnym czynnikiem są duże rozmiary komórek. Średnio długość komórek zwierzęcych wynosi 10-20 μm , lecz wiele z nich osiąga rozmiary ponad 50 μm . Konsekwencją tego jest duża powierzchnia komórki, na którą mogą oddziaływać zewnętrzne siły mechaniczne.

W literaturze światowej występuje prawie zupełny brak informacji na temat mechanicznych właściwości pojedynczych komórek zwierzęcych i rozkładu tych właściwości w odniesieniu do całych populacji komórkowych. Jedyny wyjątek stanowią prace Zhanga i wsp. (37,38) opublikowane w dwóch ostatnich latach i poświęcone właściwościom mechanicznym komórek *hybrydoma* mysich TB/C3. Do pomiaru sił rozrywających stosowany był specjalny mikro-manipulator. Stwierdzono, że siły rozrywające rosną liniowo wraz z rozmiarami komórek, podczas gdy napięcie rozrywające membran plazmatycznych

¹ Instytut Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego, Akademia Rolnicza, Poznań.

² Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Poznań.

oraz moduł ściśliwości są niezależne od wielkości komórki. Według definicji autorów napięcie membranowe może być opisane następującym wyrażeniem:

$$T = K \frac{A - A_0}{A_0},$$

gdzie T — napięcie membranowe, K — moduł ściśliwości, A — powierzchnia komórki podczas ściskania, A_0 — naturalna powierzchnia komórki. W momencie rozrywania komórki

$$T_b = K \frac{A_b - A_0}{A_0},$$

gdzie T_b oznacza napięcie rozrywające membrany, a A_b powierzchnię w momencie rozrywania.

Dla badanych komórek *hybrydoma* napięcie ścinające zostało określone jako ok. $1,8 \times 10^{-3} \text{Nm}^{-1}$. Parametr ten został uznany za podstawowy dla charakterystyki właściwości mechanicznych komórek zwierzęcych. Stwierdzono, że napięcie rozrywające membrany oraz moduł ściśliwości znacznie zwiększają się w fazie szybkiego wzrostu komórek, po czym wyraźnie maleją w fazie ich obumierania.

Do hodowli komórek zwierzęcych wykorzystywane są głównie reaktory z mieszaniem pneumatycznym typu *air-lift*, reaktory z mieszaniem mechanicznym oraz reaktory membranowe. Bioreaktory specjalnie budowane do hodowli komórkowych różnią się od klasycznych bioreaktorów mikrobiologicznych mniejszym stosunkiem wysokości do średnicy oraz zaokrąglonym dnem. W przypadku reaktorów z mieszaniem mechanicznym stosowane są głównie mieszadła typu śruby okrętowej. Wieloletnie doświadczenia wykazały, że jest to mieszadło generujące najmniejsze siły ścinające, a zatem wywołujące najmniejsze uszkodzenia mechaniczne komórek. W porównaniu z hodowlami mikroorganizmów w hodowlach komórkowych ssaków stosowane są znacznie mniejsze objętości naczyni. Bioreaktor o objętości kilku tysięcy litrów jest reaktorem produkcyjnym, podczas gdy w procesach mikrobiologicznych objętość taka stosowana jest zaledwie na poziomie kultury inokulacyjnej.

Wśród głównych czynników fizycznych występujących w bioreaktorze, które wpływają niszcząco na komórkę, wymienić należy siły:

- 1) ścinające związane z mieszaniem pożywki,
- 2) występujące przy wzajemnym zderzaniu się komórek oraz
- 3) występujące na płaszczyźnie wymiany międzyfazowej gaz/ciecz/ciało stałe (powietrze/pożywka/komórka) (31).

2. Źródła sił ścinających

Uszkodzenia jakim ulegają komórki ssaków w aparaturze biotechnologicznej są w dużej mierze wywołane oddziaływaniami mechanicznymi, określanymi jako siły ścinające. Oddziaływania te występują w większości procesów

jednostkowych, powszechnie stosowanych w biotechnologii, a szczególnie tam, gdzie stosuje się intensywne mieszanie lub przetłaczanie cieczy pompami. Do hodowli komórek zwierzęcych najczęściej stosowane są bądź samodzielne bioreaktory, bądź reaktory połączone z jednostką separującą komórki. Stąd też potencjalnie największe zagrożenie mechanicznego uszkodzenia komórek pojawia się w bioreaktorach i mikro- lub ultrafiltrach. Warunki hydrodynamiczne występujące w tych urządzeniach zależą od ich konstrukcji, sposobu wywoływania ruchu pożywki i jej napowietrzania. Wielkość, częstość i rodzaj mechanicznych oddziaływań w bioreaktorach będzie także uwarunkowana tym, czy proces jest prowadzony z udziałem nieosłoniętych, swobodnie rozproszonych komórek, czy też komórek unieruchomionych na lub w nośnikach o różnych właściwościach, wymiarach i kształcie.

Do najważniejszych czynników mechanicznych występujących w bioreaktorach należą: dynamiczne oddziaływanie cieczy na nośniki komórek i zderzenia nośników pomiędzy sobą, związane z burzliwością cieczy. Tego rodzaju oddziaływania zagrażają przede wszystkim kulturom unieruchomionym na nośnikach i w mniejszym stopniu komórkom rozproszonym swobodnie.

Innym ważnym czynnikiem są oddziaływania na granicy kontaktu fazy ciekłej i gazowej, np. na powierzchni swobodnej cieczy lub w pobliżu ruchomego pęcherzyka gazu w reaktorach bełkotkowych oraz w zbiornikach z mieszadłami, blisko tworzącego się leja, w wyniku samonapowietrzania się medium i zjawisk związanych z pękaniem pęcherzyków powietrza. Tego rodzaju oddziaływania najbardziej zagrażają komórkom swobodnie rozproszonym.

Wiele uszkodzeń mechanicznych komórek wywołuje przepływy cieczy w pobliżu powierzchni stałych, np. w warstwie przyściennej wokół ruchomych i nieruchomych części fermentora lub w czasie przepływu w rurach, pompach i ultrafiltrach.

Dużym niebezpieczeństwem dla kultur komórkowych są także zderzenia swobodnych komórek lub ich nośników z elementami konstrukcji bioreaktora (mieszadło, ścianki i czujniki), wywołane ruchem cieczy.

W wielu pracach omawiających uszkodzenia komórek w aparaturze biotechnologicznej, autorzy zwykle ograniczali się do przedstawienia skutków tych uszkodzeń, takich jak np. spadek wydajności produktów, obniżenie aktywności enzymatycznej, itp., jako efekt jednego, rzadziej kilku prostych parametrów procesu (np. częstości obrotów mieszadła, strumienia objętości gazu, itp.). W ostatnich latach, do opisu zjawisk wywołujących uszkodzenia mikroorganizmów w bioreaktorach, coraz częściej stosuje się teorie i prawa inżynierii procesowej, omawiające problemy dynamiki płynów. Takie ujęcie zagadnienia umożliwi lepsze zrozumienie roli hydrodynamicznych oddziaływań w bioreaktorach i przeciwdziałanie im, a jednocześnie odpowiedź na takie pytania (1) jakiego rodzaju siły i w jaki sposób oddziałują na komórki w bioreaktorze, (2) czy skutki działania sił ścinających zależą od ich wielkości, czy też od ich częstości występowania, (3) jakiego rodzaju siły występują w poszczególnych typach aparatów oraz (4) jaki jest wpływ oddziaływań mechanicznych na wzrost komórek i ich metabolizm?

W niniejszym opracowaniu zostały omówione podstawowe teorie dotyczące ruchu cieczy w aparaturze biotechnologicznej i jej oddziaływanie na komórki zwierzęce. W dalszej części przedstawiono odniesienie tych teorii do najczęściej stosowanych typów aparatów i zachodzących w nich zjawisk hydrodynamicznych.

3. Elementy dynamiki cieczy

Zagadnienia dynamiki cieczy omawia się oddzielnie dla uwarstwionego (laminarnego) i burzliwego (turbulentnego) ruchu cieczy. O charakterze ruchu decyduje bezwymiarowa liczba Reynoldsa (tab. 1), oznaczona symbolem Re , wyrażająca stosunek sił bezwładności cieczy, wywołujących zmiany prędkości, do sił lepkości przeciwstawiających się tym zmianom. Gdy stosunek ten jest mały, siły lepkości przeważają i ruch jest uwarstwiony, natomiast gdy przekroczy on pewną wielkość krytyczną, o stanie układu zaczynają decydować siły bezwładności.

3.1. Uwarstwiony ruch cieczy

W ruchu uwarstwowionym tory poszczególnych cząstek i poruszającej się cieczy są proste, równoległe względem siebie i równoległe do osi rury czy płaszczyzny omywanej przez ciecz. Naprężenia ścinające są wywołane poprzecznym gradientem prędkości, dw/dy . Prędkość ścinania (prędkość zmian odkształcenia) jest równa gradientowi prędkości, a naprężenie ścinające τ jest funkcją gradientu prędkości:

$$\tau = \mu \frac{dw}{dy},$$

gdzie μ — lepkość dynamiczna cieczy.

W cieczach newtonowskich lepkość dynamiczna jest stała. W cieczach nienewtonowskich współczynnik lepkości dynamicznej zastępują charakterystyczne współczynniki, odpowiednie dla określonego modelu cieczy. Lepkość pozorna cieczy nienewtonowskich jest funkcją prędkości ścinania.

Proste, równoległe ścinanie powoduje odkształcenie fragmentów cieczy wywołane działaniem sił ściskających (prostopadłych) i ścinających (stycznych), oraz dodatkowo ich rotację. W cieczach nienewtonowskich, będących zawiesinami rozproszonych cząstek stałych, w tym przypadku komórek zwierzęcych, siły ścinające powodują odkształcenia (wydłużenia) tych cząstek i często całkowite zniszczenie komórek.

TABELA 1
LICZBA REYNOLDSA I JEJ WIELKOŚCI KRYTYCZNE

Przepływ w rurach, szczelinach i wzdłuż powierzchni	Ruch cieczy w mieszalniku
$Re = \frac{\bar{w} d_z \rho}{\mu}$ $Re_{kr} = 2100$ <p>pełny ruch burzliwy, gdy $Re > 10\ 000$</p>	$Re = \frac{n d_m^2 \rho}{\mu}$ $Re_{kr} \approx 10$ <p>i zależy dodatkowo od konstrukcji mieszalnika</p> <p>pełny ruch burzliwy, gdy $Re > 1000$</p>
<p>\bar{w} — średnia prędkość cieczy d — charakterystyczny wymiar przepływu d_z — gęstość cieczy μ — lepkość dynamiczna cieczy</p>	<p>n — częstość obrotów mieszadła d_m — średnica mieszadła</p>

3.2. Burzliwy ruch cieczy

W burzliwym ruchu cieczy, prędkość w określonym punkcie oscyluje bezładnie w czasie i przestrzeni wokół pewnej wartości średniej, wyznaczającej przepływ główny cieczy. Energia kinetyczna jest przekazywana pomiędzy fragmentami cieczy głównie poprzez ruch wirów. Chwilowe składowe prędkości w ruchu burzliwym przedstawia się zwykle wyrażeniami (35):

$$w_x = \bar{w}_x + w'_x, \quad w_y = \bar{w}_y + w'_y, \quad w_z = \bar{w}_z + w'_z$$

gdzie \bar{w}_x , \bar{w}_y , \bar{w}_z są średnimi prędkościami lokalnymi, zaś w'_x , w'_y i w'_z wyrażają chwilowe pulsacje prędkości, przy czym te ostatnie nieregularnie oscylują wokół regularnej prędkości przepływu głównego. Obecność pulsacyjnych składowych prędkości powoduje występowanie w przepływie dodatkowych naprężeń stycznych, do naprężeń wywołanych siłami lepkości, nazywanych w literaturze „naprężeniami pozornymi” lub „naprężeniami Reynoldsa” (35). Ich chwilowa wielkość może być wielokrotnie większa od naprężeń pochodzących od sił lepkości.

W literaturze omawiającej mechanikę płynów spotyka się także pojęcie *lepkość burzliwa* lub *lepkość wirowa*. Całkowite naprężenia styczne w przepływie burzliwym można wyrazić wtedy funkcją sumy lepkości burzliwej i lepkości dynamicznej (molekularnej) oraz gradientu prędkości (3).

Omawiając oddziaływania powodowane siłami ścinającymi w ruchu burzliwym, należy wspomnieć o teorii izotropowej burzliwości Kołmogorowa (15, 20), wykorzystywanej w pracach badawczych dotyczących skutków hydrodynamicznych oddziaływań na hodowle komórek. „Izotropowa” oznacza, że uśrednione w czasie kwadraty pulsacji prędkości, w trzech prostopadłych

kierunkach są jednakowe, tj. $\overline{w_x^2} = \overline{w_y^2} = \overline{w_z^2}$, a zatem wymiana energii kinetycznej jest jednakowa we wszystkich kierunkach.

W czasie burzliwego ruchu cieczy, np. w bioreaktorze z mieszadłem, największe pierwotne wiry o wymiarach porównywalnych z szerokością łopatki mieszadła, zależą od charakterystyki głównego strumienia i są zasadniczo anizotropowe. Jednakże pierwotne wiry są nietrwałe i zanikają, przekazując energię łańcuchowo do wirów o coraz mniejszych wymiarach, gdzie w końcu następuje rozproszenie (dysypacja) ich energii i zamiana jej na ciepło. Teoria Kołmogorowa zakłada, że dla dużych liczb Reynoldsa, opisujących przepływ główny cieczy, wiry o niewielkich rozmiarach są izotropowe, a zatem w ruchu cieczy będzie przeważać miejscowa burzliwość izotropowa. Właściwości izotropowych wirów o niewielkich rozmiarach określa parametr ε , przedstawiający lokalną prędkość rozpraszania energii (P) na jednostkę masy fazy ciągłej (ρV)

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho V} .$$

Praca Cuttera (12) dowodzi, że największa prędkość rozpraszania energii występuje w pobliżu mieszadła.

Kołmogorow (20) zdefiniował także „mikroskalę burzliwości”, zaliczając do niej wiry o umownej liczbie Reynoldsa równej jedności. W wirach o wielkości mniejszej od mikroskali Kołmogorowa, rozproszenie energii następuje przy przewadze sił lepkości, zaś powyżej dominują siły bezwładności. W mikroskali Kołmogorowa wiry są opisywane za pomocą wymiaru η i prędkości v_e :

$$\eta = \left(\nu^3 / \varepsilon \right)^{1/4} \quad \text{i} \quad v_e = (\nu \varepsilon)^{1/4} = \frac{\nu}{\eta} .$$

gdzie: ν oznacza kinematyczną lepkość cieczy.

4. Oddziaływania ciecz – cząstka i cząstka – cząstka

4.1. Ruch uwarstwiony

Swobodne komórki zwierzęce rozproszone w cieczach hodowlanych, na skutek oddziaływań elektrostatycznych, wywołanych ładunkami na ich powierzchni, oraz sił van der Waalsa, mają skłonność do flokulacji, tj. tworzenia wielokomórkowych agregatów. Ilościowy opis oddziaływań hydrodynamicznych na sflokulowane komórki jest niezmiernie złożony i musi brać pod uwagę strukturę i oddziaływania pomiędzy agregatami.

Obserwacje ustalonego przepływu zawiesin zawierających agregaty wskazują, że już przy niewielkich prędkościach ścinania sieć utworzona przez sflokulowane komórki rozrywa się na mniejsze fragmenty, oddziałujące na siebie w czasie ruchu. Zwiększenie prędkości ścinania zmniejsza coraz bardziej wymiary agregatów aż do całkowitego rozerwania ich na pojedyncze komórki,

które z kolei zderzając się ze sobą mogą tworzyć kolejne agregaty. Oddziaływania hydrodynamiczne w przepływie zawiesin komórek są zatem funkcją ciągle zachodzącego procesu flokulacji i deflokulacji.

Przedstawione zjawiska w uproszczeniu wyjaśniają nienewtonowskie właściwości zawiesin mikroorganizmów. Zawiesina zawierająca sflokulowane komórki wykazuje większą lepkość, niż gdy komórki nie są połączone. Wynika to z unieruchomienia części cieczy pomiędzy komórkami w strukturze agregatu. W miarę zmniejszania się wymiarów agregatów pod wpływem sił ścinających, lepkość zawiesiny maleje. Jeżeli zjawisko to występuje przy stałej prędkości ścinania, zawiesina ma cechy cieczy tiksotropowej. Jeżeli natomiast lepkość zawiesiny przy danej prędkości ścinania nie zmienia się, najczęściej spełnia ona równanie cieczy pseudoplastycznej:

$$\tau = k \left(\frac{dw}{dy} \right)^n,$$

gdzie n — wskaźnik płynięcia i k — współczynnik konsystencji, są właściwościami reologicznymi zawiesiny.

W badaniach oddziaływań hydrodynamicznych ciecz – cząstka i cząstka – cząstka w zawiesinie rozproszonych komórek zwierzęcych w przepływach uwarstwionych pomocne są różne typy reometrów o dobrze zdefiniowanym przepływie, np. cylindryczne kapilary, reometry rotacyjne z współosiowymi cylindrami, reometry typu stożek-płytką itp. W każdym z tych przyrządów możliwe jest wyłączone zdefiniowanie i pomiar naprężeń ścinających w całej objętości cieczy, a nie działających na pojedynczą komórkę.

4.2. Ruch burzliwy

Oddziaływania ciecz – cząstka w ruchu burzliwym zależą od stosunku wielkości wirów do wielkości cząstki. Gdy średnica cząstek rozproszonych w cieczy jest mniejsza od średnicy wirów, a gęstość cząstek porównywalna z gęstością cieczy, ich prędkość względem cieczy jest niewielka i są one unoszone przez ciecz. Z drugiej strony, wiry o niewielkich rozmiarach nie są zdolne do unoszenia cząstki i przemieszczają się po jej powierzchni. Przy zderzeniu się wiru z większą od niego cząstką, może nastąpić dysypacja energii kinetycznej wiru na powierzchni cząstki i jego zanik. Złożoność zjawisk hydrodynamicznych w pobliżu cząstki w ruchu burzliwym nie pozwala określić wielkości naprężeń stycznych działających na powierzchnię cząstki. Wyniki badań mechanicznych uszkodzeń komórek zwierzęcych w bioreaktorach z przepływem burzliwym analizuje się zwykle porównując wymiary komórek lub ich nośników z charakterystycznym wymiarem wiru (η) w mikroskali Kolmogorowa lub prędkością rozpraszania energii (ϵ).

W bioreaktorach z intensywnie mieszaną cieczą obok wirów występują silne oddziaływania cząstka – cząstka. Teoretyczny opis tych oddziaływań jest bardzo trudny. Na uszkodzenia komórek mają wpływ zarówno częstość jak

i energia oddziaływań i nie wiadomo, który z tych czynników dominuje w warunkach zróżnicowanego mieszania i różnego stężenia komórek. W kulturach o dużej gęstości wymagana prędkość mieszania, a co się z tym wiąże wielkość oddziaływań mechanicznych, przekracza zwykle wartości uznane za bezpieczne dla komórek ssaków. Należy przy tym odnotować, że częstość i energia oddziaływań są trudne do opisanego przy użyciu praw mechaniki cieczy.

Cherry i Papoutsakis (7) zaproponowali do opisu częstości zderzeń pomiędzy kulistymi nośnikami komórek w bioreaktorach z mieszałkami współczynnik N_c , przy założeniu, że najmniejszy charakterystyczny wymiar wirów jest porównywalny ze średnicą kulistego nośnika (d):

$$N_c \equiv \left(v\phi^{7/3}/d^{8/3} \right),$$

gdzie: ϕ wyraża stosunek powierzchni kulek nośnika do objętości komórek.

Do oceny energetycznych skutków zderzeń kulistych cząstek nośnika, zaproponowano „współczynnik intensywności zderzeń burzliwych” w postaci:

$$TCS = \frac{\text{(energia kinetyczna oddziaływań)}(\text{częstość oddziaływań/objętość})}{\text{stężenie cząstek}}$$

wyrażający energię oddziaływań na pojedynczy nośnik na jednostkę czasu (8). Autorzy wyróżnili także intensywność zderzeń wywołaną wirami, opisaną współczynnikiem TCS_w :

$$TCS_w (\varepsilon v)^{3/4} \left(\frac{\Pi^2 \rho_n d^2 \alpha}{72} \right)$$

i intensywność zderzeń wywołaną siłami ścinającymi TCS_σ :

$$TCS_s \left(\frac{\varepsilon}{v} \right)^{3/2} \left(\frac{\Pi^2 \rho_n d^5 \alpha}{72} \right)$$

gdzie: d i ρ_n oznaczają średnicę i gęstość nośnika, zaś α ułamek objętości reaktora zajmowanej przez nośnik.

Korelacja przedstawionych współczynników z wynikami obserwacji hodowli komórkowych, umożliwiła wnioskowanie o wpływie podstawowych parametrów procesu na uszkodzenia komórek w wyniku zderzeń.

5. Siły ścinające w aparaturze biotechnologicznej

5.1. Bioreaktory z mieszadłami

Celem mieszania jest uzyskanie jednorodnej zawiesiny w zbiorniku, zwiększenie prędkości wymiany ciepła i masy oraz rozpraszanie cząstek w cieczy. W każdym z tych działań, duża intensywność mieszania wpływa korzystnie na przebieg procesu. Jednakże intensywne mieszanie zwiększa także wielkość mechanicznych oddziaływań na układ znajdujący się w zbiorniku i może uszkodzić hodowane komórki.

Jeżeli lepkość cieczy w bioreaktorze nie jest zbyt duża, mieszanie cieczy w większości procesów biotechnologicznych zachodzi w obszarze intensywnej burzliwości dla $Re \geq 100\,000$. Zapewnia to bardzo dobre natlenianie hodowli oraz intensywną wymianę masy. W cieczach newtonowskich prędkość rozpraszania energii jest różna w różnych miejscach mieszalnika. Dla celów praktycznych korzystne jest podzielenie mieszalnika na „strefę mieszadła”, gdzie prędkość rozpraszania energii jest największa i „strefę cyrkulacji”, obejmującą pozostałą objętość zbiornika.

Dla mieszadła o średnicy d_m prędkość rozpraszania energii zużywanej do mieszania cieczy określa wyrażenie (34):

$$\varepsilon = \frac{L_m n^3 d_m^5}{V} ,$$

gdzie: L_m oznacza liczbę mocy mieszania, n — częstość obrotów mieszadła, d_m — średnicę mieszadła, zaś V — objętość cieczy w mieszalniku.

Liczba mocy L_m jest funkcją liczby Re i określa się ją z wykresu dla danego typu mieszadła.

Największa burzliwość, a jednocześnie najmniejsze wiry w mikroskali Kołmogorowa występują w strefie mieszadła. Cherry i Papoutsakis (8) ustalili, że dla tej strefy można określić lokalną prędkość rozpraszania energii, przyjmując V równe d_m^3 , a zatem:

$$\varepsilon = L_m n^3 d_m^3 .$$

Dla 6-łopatkowego turbinowego mieszadła tarczowego Rushtona i standardowego stosunku średnicy mieszadła do średnicy zbiornika (0,33) ustalono, że wartość $\varepsilon_m \cong 15\varepsilon$, natomiast w obszarze cyrkulacji $\varepsilon_c \cong 0,28\varepsilon$ (2).

Powyższe zależności mogą być pomocne przy oszacowaniu wymiaru η , najmniejszych wirów w mikroskali Kołmogorowa lub alternatywnie parametru η/d , gdzie d jest średnicą kulistego nośnika komórek, przy ustalaniu parametrów pracy bioreaktora. Wykazano bowiem, że wydajność hodowli w wyniku uszkodzenia komórek zwierzęcych unieruchomionych na kulistych nośnikach gwałtownie spada, gdy $\eta/d < 1$, tzn. gdy wymiar η jest porównywalny

lub mniejszy od średnicy nośnika (9, 10). Wyniki doświadczeń potwierdzają także wpływ podwyższonej lepkości cieczy w fermentorze na zmniejszenie stopnia uszkodzenia komórek (9, 11). Zjawisko to może częściowo wyjaśnić wzrost wymiaru najmniejszych wirów η oraz spadek intensywności zderzeń TCS_s, wywołanych siłami ścinającymi.

Najmniejsze wiry występujące w przepływie turbulentnym mają wymiar $(\nu^3/\varepsilon)^{1/4}$. Ponieważ największą siłę niszczącą mają wiry o wymiarach mniejszych lub równych wielkości kulek nośnika (ok. 150 – 200 μm), stąd korzystne jest tworzenie warunków hydrodynamicznych, pozwalających na zwiększenie rozmiarów wirów. Można to osiągnąć przez zmniejszenie prędkości dysypacji energii (ε) poprzez wyeliminowanie z bioreaktora przegród, zastąpienie mieszadła turbinowego mieszadłem typu śruba okrętowa lub mieszadłem łopatkowym, zmniejszenie prędkości mieszania oraz stosując reaktory o wyokrąglonych dnach i okrągłych elementach konstrukcyjnych. Należy także zalecać stosowanie pożywek o większej lepkości kinematycznej. Skala turbulencji zależy od takiego wyrażenia jak $\nu^{3/4}$, podczas gdy od prędkości dysypacji energii tylko od $\varepsilon^{1/4}$. Efekt zmiany lepkości kinematycznej jest zatem znacznie większy. Można to osiągnąć poprzez dodanie substancji wysokocząsteczkowych. Wielu autorów potwierdza ochronne działanie dodatku surowicy, białek, glikolu polietylenowego, alkoholu poliwinylowego, preparatu Pluronic F86, dekstranów oraz pochodnych celulozy i skrobi, przy czym efekt ten jest używany tylko przy długim kontakcie komórek z tymi substancjami. Z tego względu substancje te wprowadza się do pożywki na początku hodowli. Mechanizm ochronny tych dodatków polega na modyfikacji właściwości hydromechanicznych płynów oraz na działaniu biologicznym na komórki (28, 31, 36).

Biorąc pod uwagę fakt, że w bioreaktorach z mieszaniem mechanicznym najsilniej niszczącymi czynnikami są małe wiry o rozmiarach poniżej średnicy kulek mikronośników oraz kolizje z twardymi częściami bioreaktora, należy z dużą rozważą dobierać rozmiary nośników. W bioreaktorach, w których kolizje z mieszadłem stanowią główną przyczynę niszczenia komórek zwierzęcych, korzystne jest stosowanie mniejszych kulek nośnika. Mniejsza jest wówczas częstotliwość i energia kinetyczna kolizji. W systemach, gdzie głównym czynnikiem niszczącym są burzliwe wiry, zmniejszenie rozmiarów kulek nośnika pociąga za sobą zmniejszenie energii kolizji, ale jednocześnie wzrasta częstotliwość kolizji. Za korzystne uznać także należy stosowanie możliwie niewielkich średnic mieszadeł, gdyż zarówno ε jak i T_{cs} są wprost proporcjonalne do średnicy.

W hodowlach komórek swobodnie rozproszonych w cieczy, prowadzonych w bioreaktorach z mieszadłem mechanicznym stwierdzono, że uszkodzenia komórek występują przy częstości obrotów mieszadła większych od 150 – 350 min^{-1} , niezależnie od konstrukcji fermentora (14, 23). W tych warunkach, wymiar najmniejszych wirów w mikroskali Kolmogorowa jest 6 – 10 razy większy od typowych wymiarów komórek zwierzęcych i zjawiska związane z rozpraszaniem energii nie są główną przyczyną ich uszkodzania. Jednakże

przy podanej częstości obrotów mieszadła w zbiorniku bez przegród powstaje głęboki, osiowy wir ze skłonnością do załamywania się w dolnej części. Prowadzi to do napowietrzania cieczy i powstawania stosunkowo dużych (o średnicy 1 – 3 mm), elastycznych i łatwo pękających pęcherzyków. Zjawisko to uważa się za podstawową przyczynę uszkodzenia komórek. Zauważono także, że wyeliminowanie osiowego wiru poprzez większe lub całkowite wypełnienie fermentora cieczą lub zastosowanie bocznych przegród, umożliwiło zwiększenie częstości obrotów mieszadła do 600 – 700 min^{-1} bez groźnych skutków dla rozproszonych komórek (21). Powstające przy tym bardzo ruchliwe pęcherzyki powietrza o niewielkich rozmiarach (50 – 300 μm) są sztywne i nie łączą się w większe, natomiast wymiar najmniejszych wirów jest porównywalny ze średnicą typowych komórek dopiero przy częstości obrotów 800 1/min.

Należy dodać, że optymalna częstość obrotów mieszadła w klasycznych bioreaktorach nie przekracza 50 obr/min i zależy od typu komórek, właściwości reologicznych pożywki oraz objętości i kształtu bioreaktora.

Maksymalna prędkość ścinająca, a zatem i naprężenie ścinające, są proporcjonalne do prędkości obwodowej mieszadła $\pi n D$, a średnia prędkość ścinająca jest proporcjonalna do częstości obrotów mieszadła, n . W typowych bioreaktorach z mieszadłami wartość naprężeń ścinających wynosi ok. 10 – 12 N, natomiast w bioreaktorach wyposażonych w turbinę Rushtona, maksymalne naprężenie ścinające dochodzi do 90 N (30).

Ogólnie uznaje się, że mechanizm uszkodzania swobodnie rozproszonych komórek zwierzęcych w bioreaktorach z mieszadłami mechanicznymi jest dwojaki. W zakresie niskich częstości obrotów mieszadła, przy dostępie powietrza do powierzchni swobodnej cieczy w reaktorze i powstawaniu osiowego wiru, uszkodzenia są wynikiem rozrywania się dużych pęcherzyków powietrza, które tworzą się w cieczy na skutek pochłaniania powietrza w procesie mieszania. Przy bardzo dużej intensywności mieszania, braku osiowego wiru i dostępu powietrza do cieczy, uszkodzenia komórek powodują naprężenia związane z mikroburzliwością cieczy i rozpraszaniem energii kinetycznej wirów.

Dla cieczy nienewtonowskich, poza uogólnieniami do określania charakterystyk mocy mieszania, brak jak dotąd użytecznych teorii pozwalających oszacować siły ścinające w bioreaktorach z mieszadłami. Wynika to z faktu, że lepkość cieczy zależy, między innymi, od jej stanu hydrodynamicznego w mieszalniku, a zatem częstości obrotów mieszadła, typu mieszadła i mieszalnika. Nie wystarczy w tym przypadku znajomość charakterystyki reologicznej danej cieczy nienewtonowskiej, gdyż w dalszym ciągu trudność stwarza określenie aktualnego gradientu prędkości dw/dy dla danych obrotów mieszadła oraz konkretnego mieszalnika. Dla cieczy pseudoplastycznych może np. nastąpić lokalizacja ruchu w obrębie strefy mieszadła, prowadząc do gwałtownego wzrostu miejscowych prędkości ścinania (27).

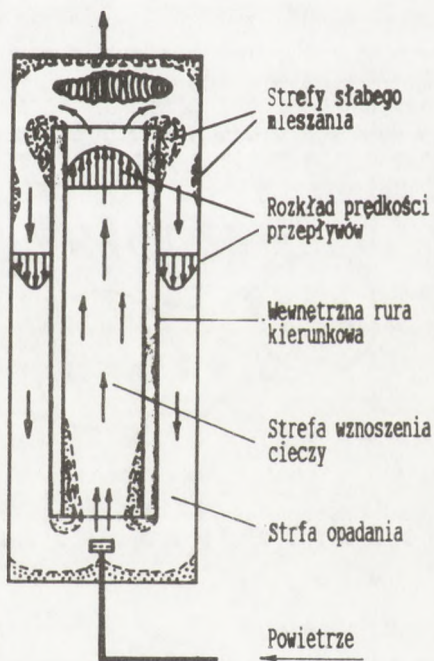
5.2. Bioreaktory bętkotkowe

Dla uniknięcia uszkodzeń mechanicznych komórek korzystne rozwiązanie stanowi hodowla komórek w reaktorze z pneumatycznym przemieszczaniem cieczy (*air-lift*). Zapewnia on znacznie łagodniejsze warunki hodowli dzięki temu, że wyeliminowane jest mieszanie mechaniczne. W literaturze można spotkać liczne opisy hodowli komórkowych w tego typu bioreaktorach (1, 6, 17).

Najbardziej rozpowszechniona konstrukcja bioreaktora typu *air-lift*, składa się z dwóch pionowych, współosiowych rur, przy czym do rury środkowej (zazwyczaj ssącej) od dołu jest włączane powietrze przy użyciu bętkotki, wywołując ruch cieczy w górę. W górnej części reaktora gaz opuszcza ciecz, a ta spływa w dół rurą zewnętrzną (opadową) (rys. 1). W ten sposób, uzyskuje się zarówno mieszanie jak i napowietrzanie.

Jedną z podstawowych zalet bioreaktorów bętkotkowych jest uporządkowany przepływ cieczy i niewielkie siły ścinające. Do wad należą niższe wartości współczynników wnikania masy, a zatem mniejsze natlenianie hodowli. Bioreaktory bętkotkowe znajdują zastosowanie głównie do hodowli kultur komórkowych, dla których zapotrzebowanie tlenu jest niskie, zaś komórki są bardzo podatne na uszkodzenia.

Hydrodynamika bioreaktorów bętkotkowych jest bardzo złożona i jeszcze niedostatecznie poznana. Blenke i in. (5) badali ruch cieczy w reaktorze z współosiowymi rurami, obserwując kilka stref powstawania wirów. Dotyczyły to strefy położonej bezpośrednio nad rurą ssącą i dwóch stref wokół jej górnej i dolnej krawędzi (rys. 1). Uważa się jednak, że maksymalne siły ścinające występują w strefie największej burzliwości przy powierzchni cieczy, gdzie następuje gromadzenie się pęcherzyków powietrza, ich koalescencja i uwalnianie z cieczy. Błonka tworząca powierzchnię międzyfazową pęcherzyka powietrza, znajdującego się na powierzchni cieczy, pod wpływem sił ciężkości i sił napięcia powierzchniowego staje się najcieńsza w górnej części pęcherzyka i w tym miejscu przerywa się. Pęcherzyk zapada się, zmniejszając gwałtownie do zera powierzchnię międzyfazową. Jeżeli do powierzchni międzyfazowej przylegają komórki, ulegają one działaniu naprężeń stycznych (rys. 2). Wielkość tych naprężeń zależy od prędkości zapadania się pęche-



Rys.1. Profile przepływu cieczy i strefy powstawania wirów w reaktorze bętkotkowym ze współśrodkową rurą kierunkową.

ryzków, którą oszacować można z zależności (25):

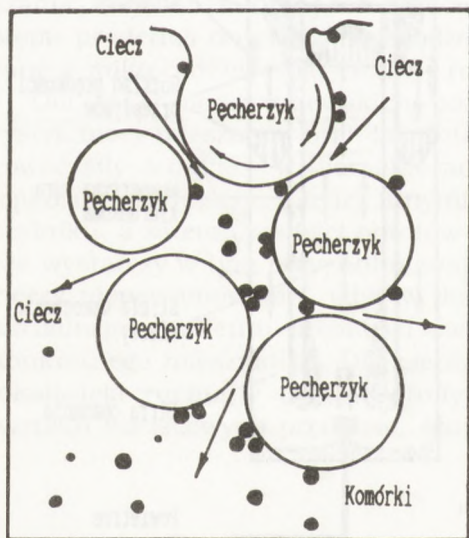
$$w_z \propto \left(\frac{2\sigma}{\rho h} \right)^{0.5},$$

gdzie: σ oznacza napięcie powierzchniowe cieczy, ρ jej gęstość, natomiast h grubość błonki międzyfazowej.

Przy pienieniu się cieczy wewnątrz reaktora, powstała na powierzchni pianę tworzą pęcherzyki powietrza rozdzielone cienkimi warstewkami cieczy. Jeżeli w cieczy uwiecznionej pomiędzy pęcherzykami znajdują się np. komórki, ulegają one naprężeniom stycznym charakterystycznym dla przepływu w szczelinach (rys. 2b). Ponieważ średni wymiar komórek jest zwykle większy od przeciętnej grubości warstwy cieczy pomiędzy pęcherzykami (0,2 – 2,0 μm), uwiecznione komórki będą odkształcać międzyfazową błonkę, zwiększając jeszcze bardziej siły ścinające. Oddziaływania mechaniczne komórek na powierzchnię międzyfazową mogą także ułatwiać pękanie pęcherzyków i w rezultacie wywoływać dodatkowe naprężenia jak na rys. 2a.

Przedstawione mechanizmy oddziaływań na granicy faz pęcherzyk powietrza-ciecz wskazują, że podstawowe znaczenie dla tych oddziaływań mają właściwości pęcherzyków powietrza, a szczególnie właściwości powierzchni międzyfazowej. Do najważniejszych parametrów określających właściwości pęcherzyków powietrza należy jego „sztywność”, decydująca o zdolności do łączenia się z innymi pęcherzykami (koalescencji) i zdolności do pęknięcia. Sztywność pęcherzyka zależy zarówno od jego średnicy (odwrotnie proporcjonalnie) i od właściwości fizycznych powierzchni międzyfazowej (18). Małe pęcherzyki powietrza są zatem bardziej sztywne od dużych, a na ich wielkość wpływa zasadniczo konstrukcja bełkotek, zaś w reaktorach z mieszadłem mechanicznym geometria mieszalnika i parametr ϵ .

Wśród właściwości fizycznych cieczy, decydujących o sztywności pęcherzyków powietrza najważniejsze jest napięcie powierzchniowe medium w reaktorze. Substancje powierzchniowo czynne, obniżające napięcie powierzchniowe cieczy, stwarzają warunki do powstawania niewielkich, trwałych pęcherzyków powietrza o małej zdolności do koalescencji i tworzenia stabilnej piany na swobodnej powierzchni cieczy.



Rys.2. Dwa rodzaje mechanicznych oddziaływań pęcherzyków gazu na rozproszone komórki: (a) pękające i zapadające się pęcherzyki na swobodnej powierzchni cieczy, (b) komórki uwiecznione w cieczy pomiędzy pęcherzykami gazu.

5.3. Ultrafiltry i reaktory membranowe

Mikrofiltracja i ultrafiltracja służy do zagęszczania i odzyskiwania z zawiesin materiału biologicznego. Do separacji komórek zwierzęcych lub metabolitów z ich hodowli (np. przeciwciał) stosuje się na ogół filtrację dynamiczną, najczęściej filtrację styczną (26, 33). Wykorzystuje się do tego celu moduły płaskie lub moduły *hollow-fiber*. Roztwór lub zawiesina przepływa przez porowatą przegrodę, która zatrzymuje niektóre jej składniki. Przegroda filtracyjna, jak i utworzona warstwa osadu, stawia znaczne opory przepływowi cieczy i pokonanie tych oporów wymaga stosowania zwiększonego ciśnienia. W rezultacie materiały poddane zostają działaniu sił ścinających, mogących je uszkodzić, szczególnie wtedy gdy ciecz recyrkuluje kilkakrotnie w module do ultrafiltracji. W modułach ultrafiltracyjnych występują dwa typy przepływów: uwarstwiony i burzliwy. W obu typach przepływu maksymalne naprężenie styczne występuje przy ściankach ultrafiltrów. Naprężenie styczne przy ściance τ_w , jest wprost proporcjonalne do różnicy ciśnień Δp i np. dla kanalików o przekroju kołowym wynosi:

$$\tau_w = \frac{\Delta p D}{4L} ,$$

gdzie D jest średnicą kanalika, a L jego długością.

Naprężenie styczne przy ściance wyrazić można także przy użyciu współczynnika oporów tarcia lepkiego λ i wtedy:

$$\tau_w = \lambda (\bar{w})^2 \rho / 8 .$$

W ruchu uwarstwowym cieczy newtonowskiej $\lambda = 64/Re$, a w burzliwym, dla gładkich ścianek kanalików można wykorzystać jedno z proponowanych równań empirycznych, np. zależność Blasiusa (3):

$$\lambda = 0,316 Re^{-1/4} .$$

Dla kanalików o przekroju innym niż kołowy, odpowiednie zależności podają podstawowe opracowania z zakresu mechaniki płynów.

W przepływie uwarstwowym cieczy nienewtonowskiej, np. cieczy pseudoplastycznej, liczbę Re w wyrażeniu $\lambda = 64/Re$ zastępuje się uogólnioną liczbą Reynoldsa w postaci:

$$Re^* = \frac{D^n w^{2-n} \rho}{k 8^{n-1}}$$

Maioresella i in. (26) wskazują, że głównym czynnikiem niszczącym komórki w mikrofiltrach z przepływem stycznym (*cross-flow filtration*) jest ścinanie przy przepływie uwarstwowym, przy czym wartość krytyczna prędkości ścinania wynosi ok. 3000 s^{-1} . Zalecane jest utrzymanie przepływu przy prędkości ścinania poniżej tej wartości w połączeniu z ograniczeniem ciśnienia

transmembranowego. Prowadzenie filtracji przy przepływie burzliwym chroni komórki przed zniszczeniem. Autorzy nie stwierdzili niszczenia komórek przy wartościach liczby Reynoldsa do 71 000 i wymiaru wirów Kołomogorowa powyżej 12 μm .

Wiele kultur komórkowych hodowanych jest z powodzeniem w bioreaktorach kapilarnych lub między warstwami membran płaskich (16, 19). Przepływ cieczy w bioreaktorach membranowych, stosowanych jako reaktory o działaniu ciągłym, jest podobny do przepływu w ultrafiltrach. Produkty reakcji są usuwane na zasadzie ultrafiltracji, zaś komórki pozostają w cyrkulującej cieczy lub zostają unieruchomione pomiędzy membranami. Oddziaływania mechaniczne, wywołane siłami ścinającymi, są podobne do panujących w aparaturze do ultrafiltracji, z wyjątkiem procesów o długim czasie retencji.

6. Efekty biologiczne powodowane przez stres mechaniczny

Wiele doniesień wskazuje, że siły ścinające powodują zmiany we wzroście, budowie i fizjologii komórek zwierzęcych. Wśród zmian obserwowanych w hodowlach komórek rosnących na nośnikach wymienia się spadek prędkości wzrostu, trudności w zasiedlaniu powierzchni nośnika przez komórki, zwiększenie ilości komórek martwych, zmiany morfologiczne komórek oraz utrudnienie w przyczepianiu się komórek do nośnika.

Komórki wystawione na długotrwałe działanie sił ścinających silnie zmieniają swoją morfologię. W pierwszym okresie ulegają znacznemu skróceniu i przybierają kształt wyoblony. Następnie zaokrąglają się, aż w końcowej fazie przyjmują formę kulistą. Powierzchnia kontaktu z nośnikiem zmniejsza się, co prowadzi do odrywania komórek i unoszenia ich przez ciecz. Przy długotrwałej ekspozycji komórek nerek chomika na siły ścinające tworzą się charakterystyczne „zwałowiska” komórek przypominające przegrody (24).

W hodowlach z użyciem mikronośników efektywność przyczepiania się komórek do powierzchni nośnika zależy od częstotliwości kolizji między obu ciałami. W początkowej fazie hodowli komórki wprowadzane są do pożywki w formie zawiesiny. Zawiesina ta jest uzyskiwana z hodowli inoculum w butlach, po odczepieniu komórek z powierzchni szkła metodą tryptynizacji. Po wprowadzeniu komórek do bioreaktora i włączeniu mieszadła dochodzi do kontaktów między komórkami i kulkami nośnika. Im częstsze są kolizje, tym większa jest szansa związania się komórki z mikronośnikiem. Decydującym czynnikiem jest przede wszystkim różnica w prędkości poruszania się obu ciał, gdyż decyduje to o czasie ich wzajemnego kontaktu podczas zetknięcia. Za idealną sytuację należy uznać tę, w której względna różnica prędkości komórek i nośnika jest zbliżona do zera. W tym rozumieniu wszelkie turbulencje w płynie hodowanym w czasie zasiedlania nośnika przez komórki zakłócają ten stan i obniżają efektywność wiązania komórek. Obniżenie wielkości sił ścinających występujących w bioreaktorze może być osiągnięta przez zwiększanie lepkości pożywki, np. przez dodatek niewielkiej ilości agaru. Jed-

nocześnie muszą być zapewnione jednakowe warunki mieszania w całej objętości pożywki (29).

Zmiany wywołane szokiem mechanicznym wśród komórek rosnących w zawieszynie dotyczą wzrostu liczebności komórek martwych, uszkodzeń w błonie cytoplazmatycznej, zmian w syntezie DNA i białek, zmian w metabolizmie RNA i produkcji białek cytoszkieletowych (4, 13, 32).

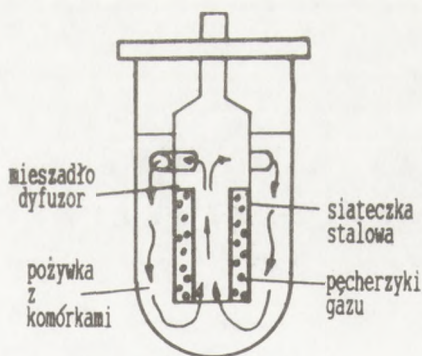
Badania Lakhotia i in. (22) nad wpływem stresu mechanicznego na rosnące w zawieszynie komórki CHO wskazują, że przy zwiększonej częstotliwości mieszania pożywki spada liczebność żywych komórek, lecz jednocześnie obserwowany jest wzrost proliferencji komórek, szczególnie w fazie S. Szybkość syntezy DNA w takich warunkach wzrastała o 50% w stosunku do hodowli kontrolnej prowadzonej przy małych częstotliwościach obrotów mieszadła.

7. Wnioski

Komórki zwierzęce wykazują wyjątkowo dużą wrażliwość na zniszczenie przez siły mechaniczne związane z mieszaniem i napowietrzaniem pożywki. Wśród głównych czynników fizycznych, które wpływają niszcząco na komórkę, należy wymienić siły ścinające występujące przy mieszaniu pożywki, szczególnie zaś siły w małych wirach, siły powodujące zderzanie się komórek ze sztywnymi płaszczyznami bioreaktora i kulkami mikronośników oraz siły występujące na płaszczyźnie wymiany międzyfazowej gaz/ciecz/ ciało. Utrzymanie integralności fizycznej komórek zwierzęcych hodowanych w bioreaktorach przy zapewnieniu dobrej wymiany masy między komórką a otoczeniem stanowi główną trudność w hodowlach komórkowych.

Dla ograniczenia zniszczeń mechanicznych komórek zalecane jest zwiększenie lepkości kinematycznej pożywek oraz zmniejszenie prędkości rozpraszania energii. W praktyce można to osiągnąć przez dodatek wysokocząsteczkowych substancji oraz stosowanie specjalnych konstrukcji bioreaktorów. W wielu rozwiązaniach proces napowietrzania pożywki jest przeprowadzany w sposób bezpęcherzykowy poprzez dyfuzję cząsteczkową gazów przez porowate przegrody. W tym celu stosuje się jednostki *hollow-fiber*, węzownice silikonowe i dyfuzory siateczkowe (rys. 3) lub ceramiczne.

Dobra znajomość właściwości mechanicznych poszczególnych rodzajów komórek jest niezbędna przy projektowaniu procesów biotechnicznych, choć jak dotąd, wiedza ta jest bardzo ograniczona.



Rys.3. Bioreaktor z mieszadłem mechanicznym i dyfuzorem siateczkowym.

Literatura

1. Arthoon W. R., Birch R. B., (1986), *Science*, 232, 1390 – 1395.
2. Baldyga J., Bourne J. R., (1988), *Chem. Engn. Res. Design.*, 66, 33.
3. Bennett C. O., Myers J. E., (1982), *Momentum, Heat and Mass Transfer* (3rd ed.), New York, McGraw.
4. Ben-Ze'ev A., Farmer S. R., Penman S., (1980), *Cell*, 21, 365 – 372.
5. Blenke H., Bohner K., Hirner W. W., (1969), *Verfahrenstechnik*, 3, 444.
6. Bugarski B., King G. A., Jovanovic G., Daugulis A. J., Goosen M. F. A., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 264 – 269.
7. Cherry R. S., Papoutsakis E. T., (1986), *Bioproc. Engn.*, 1, 29 – 41.
8. Cherry R. S., Papoutsakis E. T., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 1001 – 1014.
9. Cherry R. S., Papoutsakis E. T., (1989), *Bioproc. Engn.*, 4, 81 – 89.
10. Croughan M. S., Hamel J.-F., Wang D. I. C., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 975 – 982.
11. Croughan M. S., Sayre E. S., Wang D. I. C., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 862 – 872.
12. Cutter L. A., (1966), *AIChE J.*, 12, 35 – 45.
13. Folkman J., Moscona A., (1978), *Nature*, 273, 345 – 349.
14. Gardner A. R., Gainer J. L., Kirwan D. J., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 940 – 947.
15. Hinze I. O., (1959), *Turbulence*, New York, McGraw.
16. Hopkinson J., (1985), *Bio/Technology*, 3, 225 – 230.
17. Hulscher M., Scheibler U., Onken U., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 442 – 446.
18. Joly M., (1972), *Surface and Colloid Science* 5, ed. Matijevic E., 1 – 77, Wiley-Interscience, New York.
19. Knight P., (1989), *Bio/Technology*, 7, 459-461.
20. Kolmogorov D. N., (1941), *Doklady Acad. Sci. USSR N. S.*, 30, 301 – 305.
21. Kunas K. T., Papoutsakis E. T., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 476 – 483.
22. Lakhota S., Bauer K. D., Papoutsakis E. T., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 978 – 990.
23. Lee G. M., Huard T. K., Kaminski M. S., Palsson B. O., (1988), *Biotechnol. Lett.*, 10, 625 – 628.
24. Ludwig A., Kretzmer G., Schugerl K., (1992), *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 209 – 213.
25. MacIntyre F., (1972), *J. Geoph. Res.*, 27, 5211 – 5228.
26. Maiorella B., Dorin G., Carion A., Harano D., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 121 – 126.
27. Metzner A. B., Taylor J. S., (1960), *Am. Inst. Chem. Engrs J.*, 6, 109.
28. Michaels J. D., Petersen J. F., McIntire L. V., Papoutsakis E. T., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 169 – 180.
29. Nielsen V., Johansson A., (1980), *Develop. Biol. Standard*, 46, 131 – 136.
30. Oh S. K. W., Nienow A. W., Al-Rubeai M., Emery A. N., (1989), *J. Biotechnol.*, 12, 45 – 62.
31. Papoutsakis E. T., (1991), *Tibtech*, 9, 316 – 324.
32. Reiter T., Penman S., Capco D. G., (1985), *J. Cell Sci.*, 76, 17 – 33.
33. Shiloach J., Kaufman J. B., Kelly R. M., (1986), *Biotechnol. Progr.*, 2, 230.
34. Stręk F., (1981), *Mieszanie i mieszalniki*, WNT, Warszawa.
35. Thomas C. R., (1990), in: *Chemical Engineering Problems in Biotechnology. Critical Reports on Applied Chemistry*, 29, ed. Winkler M. A., 23 – 93, Elsevier Applied Science, London and New York.
36. Van der Pol L., Bakker W. A. M., Tramper J., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 179 – 182.
37. Zhang Z., Ferenczi M. A., Lush A. C., Thomas C. R., (1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 208 – 210.
38. Zhang Z., Ferenczi M. A., Thomas C. R., (1992), *Chem. Eng. Sci.*, 47, 1347 – 1354.

Mechanical damage of animal cells in bioreactors

Summary

Fluid-mechanical damages of shear sensitive animal cells due to forces generated by media agitation and aeration are reviewed. In anchorage-dependent cultures grown in a stirred bioreactor the cell damage is caused by small turbulent eddies of size of the microcarrier beads and by collision between microcarriers and against the impeller and the stationary parts of bioreactor. In the freely suspended cells grown in stirred or *air-lift* reactors the cell damage is due mainly to air bubble breakup. The mechanical damages can be limited by an increase of kinematic viscosity of fluid and reduction of the local energy dissipation rate. Biological aspects of shear stress are also discussed.

key words:

animal cell, bioreactor, cell damage.

Adres dla korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60 - 623 Poznań.