

УДК 57.083.132

© Т. С. Тихомирова, Ю. А. Лепехин, М. Р. Тараскевич, 2024

**УНИВЕРСАЛЬНАЯ БИОРЕАКТОРНАЯ СИСТЕМА  
МАЛОГО ОБЪЕМА С ПЕРКОЛЯЦИОННЫМ ПЕРЕМЕШИВАНИЕМ  
ЛБ-1 ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ,  
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К МЕХАНИЧЕСКОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ**

Лабораторные биореакторы малого объема (до 5 л) являются удобным и эффективным инструментом для проведения биотехнологических процессов, тематика которых весьма разнообразна. Главной целью их использования являются углубленное изучение особенностей процессов, проводимых в контролируемых условиях, а также их дальнейшая оптимизация и масштабирование. В данной работе предложен лабораторный биореактор малого объема ЛБ-1 (1.5 л), перемешивание в котором осуществляется за счет возвратного тока жидкой фазы между двумя цилиндрическими емкостями под действием сжатого воздуха (перколяция). При этом насыщение питательной среды газами происходит в пленке жидкости на поверхности емкостей и твердотельных носителей. Массообменные характеристики позволяют классифицировать ЛБ-1 как пленочный биореактор колонного типа, который может быть использован для культивирования микроорганизмов, чувствительных к механическому воздействию, а также для иммобилизованных оmyваемых культур. Кроме того, был разработан погружной теплообменник, особенности работы которого выявлены с помощью численного моделирования процесса термостатирования. На основе результатов гидродинамического моделирования был разработан паростерилизуемый крестообразный разъем с перегородкой для асептического отбора проб.

*Кл. сл.:* лабораторный биореактор малого объема, колонный биореактор, биопленки, масштабирование, биотехнологический процесс, перколяционное перемешивание

**ВВЕДЕНИЕ**

Биореакторы малого объема являются лабораторным оборудованием, которое используют для проведения различных биотехнологических процессов. При этом тематика данных исследований довольно разнообразна. Помимо одностадийного культивирования продуцентов, лабораторные биореакторы могут быть использованы для отработки процессов очистки сточных вод [1, 2], биокаталитической трансформации субстратов [3, 4], получения вакцин [5, 6], вирусной трансформации клеток [7] и т.д. Целью их использования являются исследование особенностей процессов, проводимых в контролируемых условиях [8, 9], дальнейшая их оптимизация [10, 11] и масштабирование [12, 13].

Существует несколько подходов к классификации биореакторов, основанных на их конструкции, режимах работы, способах подвода энергии, а также типах осуществляемых процессов [14–17]. Поэтому при постановке биотехнологического эксперимента следует учитывать множество параметров для выбора адекватной модели биореакторной системы. Реакторы колонного типа и реак-

торы с мешалкой являются наиболее популярными конструкциями, обеспечивающими необходимый минимум биотехнологического процесса. Колонные биореакторы обеспечивают мягкое перемешивание за счет барботажа. При этом не возникает напряжений сдвига, которые могут негативно влиять на рост и развитие культуры [18, 19]. Недостатком данной конструкции является низкое значение коэффициента массопереноса  $k_{La}$  до  $320 \text{ ч}^{-1}$  [20, 21]. Данный показатель можно повысить путем увеличения объемного расхода перемешиваемого газа [20] или за счет изменения линейных размеров колонны [22]. В свою очередь, биореактор с мешалкой характеризуется более высокими показателями массопереноса ( $50\text{--}550 \text{ ч}^{-1}$  [23–25]), что повышает его спрос на рынке.

Вышеперечисленные типы биореакторов активно используются в процедурах как прямого, так и обратного масштабирования. Прямое масштабирование процессов культивирования или биокатализа является важным этапом биотехнологических исследований. Оно включает в себя перенос лабораторного эксперимента в контролируемые условия биореактора с последующим поэтапным увеличением объемов. Результаты пря-

мого масштабирования позволяют судить о рентабельности исследуемого процесса [11, 26–28]. Тем не менее увеличение объемов также повышает риск возникновения градиента скорости и концентрации в реакционной зоне, что ведет к снижению эффективности процесса. В таких случаях целесообразно проводить обратное масштабирование. Суть данного метода состоит в симуляции процессов, происходящих в определенных зонах промышленных биореакторов (пристеночных, центральных, придонных и т.д.) [8, 29, 30].

Как видно, прямое и обратное масштабирование осуществляются с помощью лабораторных биореакторов малого объема (0.1–5 л), которые позволяют оптимизировать условия проведения микробиологических и ферментационных процессов и произвести сбор данных о влиянии различных факторов (способ перемешивания, увеличение реакционного объема, температурный и кислородный режимы и т.д.) на конечный результат. В на-

стоящий момент конструкция коммерческих лабораторных биореакторов представлена в виде реактора с лопастной мешалкой (турбина Раштона) с различным числом лопастей (табл. 1).

Данный тип мешалок обеспечивает в основном радиальное (от центра к стенке) течение жидкости. Мешалки с наклонным расположением лопастей создают также и слабые осевые (вдоль вала) токи. При этом при перемешивании возникает напряжение сдвига, что может повлиять на рост и развитие чувствительных к механическому повреждению микроорганизмов [31–34]. Эффективность данной конструкции также может быть снижена, поскольку перемешивание жидкости происходит только в области, прилегающей непосредственно к лопастям. Поэтому при перемешивании лопастными мешалками в высоком слое жидкости их выполняют многоярусными, что создает еще больше сдвиговых напряжений.

**Табл. 1.** Коммерческие лабораторные биореакторы малого объема с мешалкой

Название	Производитель	Объем, л	Тип перемешивания	Ссылка
BIOSTAT® Cplus	Sartorius staedium biotech	5, 10, 15, 20, 30	Мешалка (турбина Раштона, 6 лопастей)	[35]
BIOSTAT® B	Sartorius staedium biotech	1, 2, 5, 10	Мешалка (турбина Раштона, 3 лопасти)	[36, 37]
BIOSTAT® Bplus	Sartorius staedium biotech	1, 2, 5, 10	Мешалка (турбина Раштона, 2 лопасти)	[5, 6, 38, 39]
Braun airlift fermentor (BIOSTAT® B-DCU II)	Sartorius staedium biotech	2, 5	Мешалка (турбина Раштона), эрлифтный	[37, 40]
Ambr®250	Sartorius staedium biotech	0.25	Мешалка (турбина Раштона, 2 лопасти)	[41]
New Brunswick FS300, baffled fermenter®	New Brunswick Scientific	3.5, 5, 7.5, 14, 20	Мешалка (турбина Раштона, 6 лопастей)	[11]
BioFlo 3000	New Brunswick Scientific	1.6, 3.3, 6.6	Мешалка (турбина Раштона, 6 лопастей)	[42]
New Brunswick BioFlo 110 Fermentor	New Brunswick Scientific	1.3, 3, 7.5, 14	Мешалка (турбина Раштона, 2 лопасти)	[27]
Multifors	INFORS AG	0.25, 0.5, 0.75, 1	Мешалка (турбина Раштона, 2 лопасти)	[43]
Ralf Plus-System	Bioengineering inc.	2, 3.7, 5, 6.7	Мешалка (турбина Раштона, 6 лопастей)	[44]
BIOTECH-3BG	Shanghai BaoXing Bio-Engineering Equipment Co., Ltd	3, 5, 7	Мешалка (турбина Раштона, 6 лопастей)	[45]
Continuous stirred tank reactors (CSTR)	Nano-Mag Technologies Pvt. Ltd	1, 2, 5, 10, 20, 25	Мешалка (турбина Раштона, 6 лопастей)	[46]

Подобная стандартная конструкция лабораторного биореактора ограничивает использование твердых субстратов, агрессивных или взрывоопасных сред, что сокращает область их применения. Поэтому целью данной работы являлась разработка альтернативных конструкций лабораторных биореакторов, основанных на пневматическом перемешивании, что является перспективным направлением инженерных исследований.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Численное моделирование процесса термостатирования

Моделирование теплопередачи в процессе термостатирования жидкости в реакционной емкости ЛБ-1 в покое и при перемешивании необходимо для понимания особенностей работы разработанного погружного теплообменника. В неподвижном слое жидкости перенос тепла в реакционной емкости ЛБ-1 реализуется посредством свободной конвекции и теплопроводности. Теплопередача здесь рассчитывается по следующему уравнению сохранения энергии (1):

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p \mathbf{u} \nabla T + \nabla \mathbf{q} = \mathcal{Q} + \mathcal{Q}_p + \mathcal{Q}_{vd}, \quad (1)$$

где  $\rho$  — плотность среды, кг/м<sup>3</sup>;  $C_p$  — удельная теплоемкость при постоянном давлении, Дж/(кг·К);  $T$  — абсолютная температура, К;  $\mathbf{u}$  — вектор скорости, м/с;  $\mathbf{q}$  — тепловой поток посредством теплопроводности, Вт/м<sup>2</sup>;  $\mathcal{Q}$  — источники тепла, отличные от вязкого рассеяния, Вт/м<sup>3</sup>;  $\mathcal{Q}_p$  — работа, совершаемая за счет изменения давления, Вт/м<sup>3</sup>;  $\mathcal{Q}_{vd}$  — вязкое рассеяние, Вт/м<sup>3</sup>.

Параметры  $\mathcal{Q}_p$  и  $\mathcal{Q}_{vd}$  определяются по следующим уравнениям (2, 3):

$$\mathcal{Q}_p = \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \nabla p \right), \quad (2)$$

$$\mathcal{Q}_{vd} = \tau : \nabla \mathbf{u}, \quad (3)$$

где  $\alpha_p$  — коэффициент термического расширения, К<sup>-1</sup>;  $\tau$  — тензор вязких напряжений, Па.

Для стационарной задачи теплопроводности (когда система находится в равновесии) уравнение скорости известно как закон Фурье и описывается как уравнение (4):

$$\mathbf{q} = -k \nabla T, \quad (4)$$

где  $k$  — коэффициент теплопроводности материала, Вт/(м·К). Уравнение (4) широко используется для квазиравновесных процессов, где важно распределение температуры в системе. Поэтому оно

применимо для процесса термостатирования в реакционной емкости в режиме покоя.

В процессе моделирования термостатирования на верхней и внешней поверхностях использовалось граничное условие конвективного теплового потока, основанное на разнице температур между рабочей поверхностью (стеклянной стенкой царги и стальным основанием емкости) и окружающей атмосферой.

### Модель Кейса – Кроуфорда

Для теоретических предсказаний турбулентного теплообмена в пограничных слоях и потоках в каналах знание турбулентного числа Прандтля  $Pr_T$  имеет решающее значение. Для расчета данного критерия использовалась модель Кейса – Кроуфорда (5) [47]:

$$Pr_T = \left[ \frac{1}{2 Pr_{T\infty}} + \frac{0.3 C_p \mu_T}{\lambda \sqrt{Pr_{T\infty}}} - \left( \frac{0.3 C_p \mu_T}{\lambda} \right)^2 \times \left( 1 - \exp \left( - \frac{\lambda}{0.3 C_p \mu_T \sqrt{Pr_{T\infty}}} \right) \right) \right]^{-1}, \quad (5)$$

где число Прандтля в бесконечности  $Pr_{T\infty} = 0.85$ ;  $\lambda$  — проводимость.

Модель Кейса – Кроуфорда является относительно точной моделью для расчета  $Pr_T$  с достаточной аппроксимацией для большинства видов турбулентных течений, ограниченных стенками, за исключением турбулентного течения жидких металлов [48].

### Гидродинамическое моделирование течения жидкости и уравнения Навье – Стокса

Движение вязких жидких веществ можно описать некоторыми дифференциальными уравнениями в частных производных, называемыми уравнениями Навье – Стокса. Для движения несжимаемой вязкой жидкости с постоянной плотностью уравнение Навье – Стокса и совместное с ним уравнение непрерывности имеют вид (6):

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \left[ -p \mathbf{I} + \mu (\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T) \right] + \mathbf{F}, \quad (6)$$

$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0,$$

где  $\mathbf{u}$  — вектор скорости жидкой фазы, м/с;  $p \mathbf{I}$  — объемное напряжение;  $\mu$  — динамическая вязкость жидкости, Па·с;  $\mathbf{F}$  — совокупность внешних сил, приложенных к жидкости.

Уравнения Навье – Стокса используются для описания физики многих явлений. Они широко применяются для решения инженерных задач, таких как течение воды в трубах и теплообменниках, обтекание тел различной геометрии, а также для научно-исследовательских целей (океанские течения, моделирование погоды, движение воздушных масс, движение жидкостей в биореакторах).

Для численного моделирования турбулентных течений использовались модель турбулентности  $k$ - $\epsilon$  и уравнения RANS (Reynolds-Averaged Navier–Stokes), в основу которых положены уравнения Навье – Стокса, осредненные по Рейнольдсу. При этом масштаб пульсаций вычислялся как  $0.038 \cdot d_z$ , где  $d_z$  — гидравлический диаметр, мм.

### Объемный коэффициент массопередачи $k_{La}$

Объемный коэффициент массопередачи  $k_{La}$  [ $\text{ч}^{-1}$ ] является основной массообменной характеристикой биореакторов, отображающей скорость переноса кислорода через границу раздела фаз. Для определения  $k_{La}$  широко применяется метод вытеснения с последующей газацией ("gassing out") [49]. Данный метод предполагает удаление растворенного кислорода из жидкой фазы путем барботирования азотом до тех пор, пока концентрация кислорода в жидкой фазе не достигнет нуля. Затем снова вводится воздух или кислород и измеряется изменение концентрации кислорода в жидкости с помощью полярографических или оптических электродов. Изменение концентрации кислорода в жидкости происходит до достижения равновесной концентрации согласно уравнению (7):

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C), \quad (7)$$

где  $k_L$  — коэффициент массопередачи, отображающий скорость диффузии вещества на границе раздела фаз, м/с;  $a$  — удельная площадь раздела фаз,  $\text{м}^2/\text{м}^3$ ;  $C^*$  и  $C$  — равновесная и текущая концентрации растворенного кислорода, мг/л. Интегрирование уравнения (7) позволяет описать связь между концентрацией кислорода и временем, предполагая, что  $k_L \cdot a$  остается постоянным (8):

$$\ln(C^* - C) = -k_L a t. \quad (8)$$

Таким образом, график зависимости  $\ln(C^* - C)$  от времени дает прямую линию, тангенс угла наклона которой равен  $(-k_L \cdot a)$ . Этот метод имеет преимущество перед химическим методом сульфитного окисления, т.к. может быть использован для ферментационной среды, в которой могут присутствовать мертвые клетки или мицелий в концентрации, равной той, которая образуется во время ферментации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

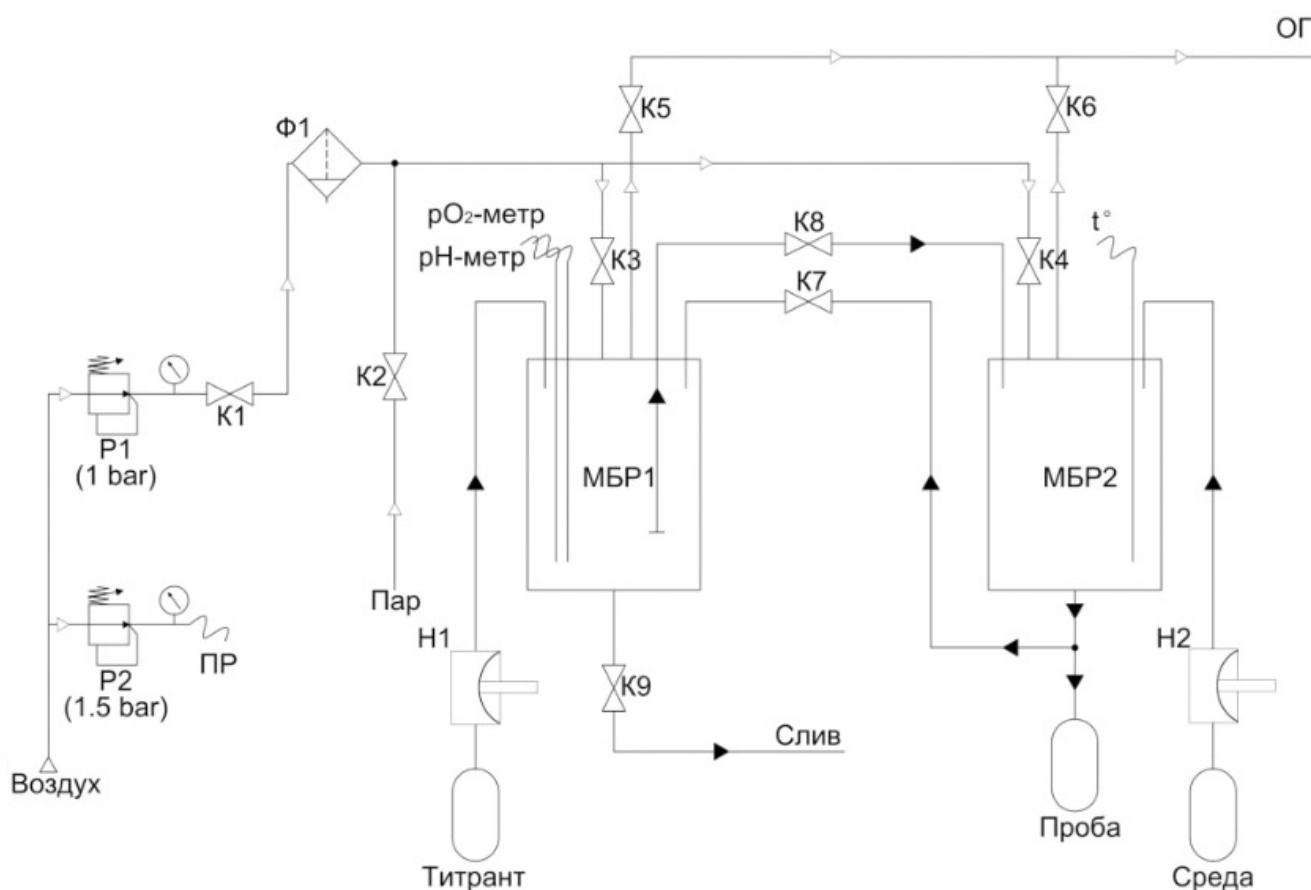
### Конструкция биореактора с перколяционным перемешиванием

Одним из критериев выбора биореакторного оборудования для масштабирования процессов культивирования микроорганизмов, чувствительных к механическому повреждению, является отсутствие напряжений сдвига при перемешивании [43, 50]. На базе опытного производства Института биологического приборостроения РАН (ИБП РАН) был разработан способ реализации подобных процессов, а также макет лабораторного биореактора для их реализации [51–54]. Перемешивание здесь осуществляется за счет возвратного тока жидкой фазы между двумя вертикально закрепленными цилиндрическими емкостями под действием сжатого газа (воздуха). При этом насыщение питательной среды газами происходит в пленке жидкости на внутренней стенке емкостей и на поверхности твердотельных носителей, а также частично за счет барботажа. Данный способ перемешивания получил название перколяционного, поскольку в емкости может быть загружен твердый субстрат.

Таким образом, согласно классификации биореакторов по типу конструкции, лабораторный биореактор (1.5 л) с перколяционным перемешиванием является биореактором колонного типа, предназначенного для погруженного и твердофазного культивирования. Упрощенная схема биореактора с перколяционным перемешиванием представлена на рис. 1.

Биореактор ЛБ-1 состоит из реакционного блока, клапанного блока и станции управления. Детали и узлы реакционных емкостей были изготовлены из нержавеющей стали методами механической обработки. Сборка компонентов биореактора осуществлялась с помощью резьбового соединения с использованием уплотнительных колец. Данный тип соединения являлся предпочтительным, т.к. сварное соединение может проявлять повышенную склонность к образованию очагов коррозии в агрессивных условиях биотехнологического процесса [55, 56]. Уплотнительные кольца также использовались между стеклянной царгой и крышками емкостей для обеспечения герметичности реакционной зоны биореактора. Все материалы являются термически стабильными, что позволяет стерилизовать собранную биореакторную систему острым паром.

При разработке биореактора применялся принцип взаимозаменяемости, при котором элементы конструкции, изготовленные с определенной точностью геометрических параметров, способны выполнять заданные функции вне зависимости от времени и места их изготовления.



**Рис. 1.** Упрощенная схема лабораторного биореактора (1.5 л) с перколяционным перемешиванием.

Ф<sub>1</sub> — фильтр-осушитель; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> — регулятор давления с манометром; МБР1, МБР2 — реакционная емкость; Н1, Н2 — насос мембранный; ПР — блок пневмораспределителей; ОГ — отходящие газы; К1, ..., К9 — клапаны пережимные нормально закрытые

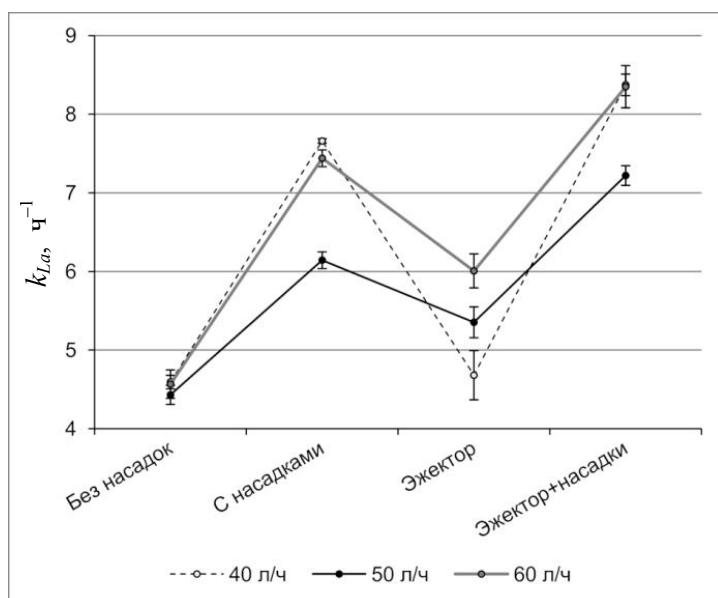
Движение жидкой и газовой фаз регулируется клапанами пережимными нормально закрытыми К1–К9; направление потоков жидкости и газов указано черными и белыми треугольниками соответственно. Реакционные емкости МБР оснащены датчиками рН, рО<sub>2</sub> и температуры; добавление титрантов или питательной среды в реакционную зону осуществляется за счет мембранных насосов-дозаторов с регулируемым объемом мембраны; работа клапанов регулируется 3-линейными 2-позиционными пневмораспределителями нормально закрытыми

### Определение объемного коэффициента массопередачи $k_{La}$ для ЛБ-1

Объемный коэффициент массопередачи  $k_{La}$  для лабораторного биореактора ЛБ-1 зависит от скорости перетока жидкой фазы между реакционными емкостями, регулируемой объемом расходом перемешивающего воздуха. Повысить данный показатель можно за счет добавления в систему принудительной аэрации жидкой фазы в протоке и использования твердотельных насадок (рис. 2).

Без использования дополнительных инструментов для увеличения массопереноса коэффициент  $k_{La}$  для ЛБ-1 составил  $4.5 \pm 0.1 \text{ ч}^{-1}$ , что соответствует показателям для барботажной колонны с низким объемным расходом аэрирующего воз-

духа [57–59]. Добавление твердотельных насадок седловидной формы общей площадью  $0.037 \text{ м}^2$  в реакционную емкость способствовало повышению коэффициента массопередачи до  $7.1 \pm 0.7 \text{ ч}^{-1}$  (рис. 2). В свою очередь, принудительная аэрация жидкой фазы в протоке с помощью эжекторного разьема значительно меньше влияет на  $k_{La}$  по сравнению с насадками и достигает  $6.0 \pm 0.1 \text{ ч}^{-1}$ . Следует также отметить, что в данном режиме работы наблюдается прямая зависимость коэффициента массопередачи от объемного расхода перемешивающего воздуха. Наибольшее значение  $k_{La}$ , которое составило  $8.4 \pm 0.3 \text{ ч}^{-1}$ , было достигнуто при одновременном использовании твердотельных насадок и принудительной аэрации в режиме интенсивного перемешивания.



**Рис. 2.** Зависимость объемного коэффициента массопередачи  $k_{La}$  от условий перемешивания в лабораторном биореакторе ЛБ-1

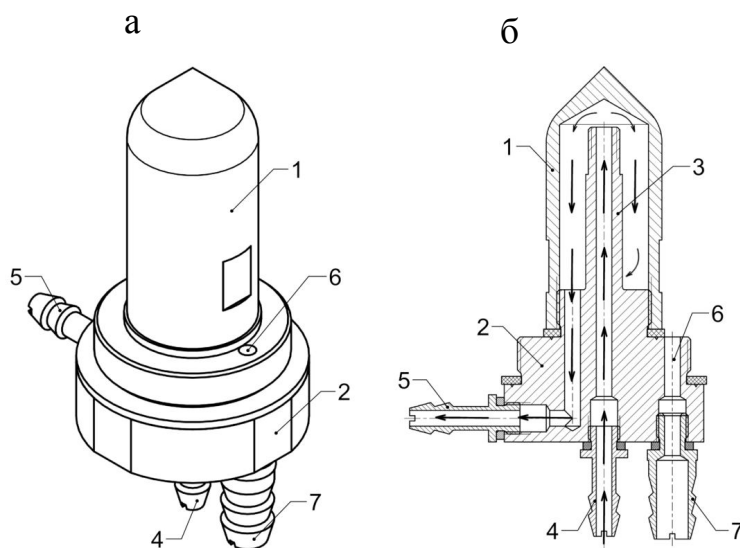
Таким образом, лабораторный биореактор ЛБ-1 в своей базовой комплектации, являясь биореактором колонного типа, обеспечивает довольно низкий коэффициент массопередачи. Однако добавление в конструкцию дополнительных поверхностей или мембранных элементов, а также повышение скорости перемешивания и принудительная аэрация способствуют увеличению значений  $k_{La}$ . Следует отметить, что использование подвижной жидкой фазы и неподвижных твердотельных носителей характерно для пленочных биореакторов, широко применяемых для культивирования иммобилизованных культур [60–62].

### Погружной теплообменник с жидкостным нагревом

Для обеспечения заданных условий культивирования реакционные емкости лабораторного биореактора ЛБ-1 оснащены теплообменниками погружного типа с жидкостным нагревом (рис. 3).

Как видно из рис. 3, погружной теплообменник представляет собой сборочный узел с разъемным соединением и возможностью промывки деталей отдельно.

Эффективная площадь теплообменной поверхности стакана составляет  $35 \pm 0.5 \text{ см}^2$ , которая



**Рис. 3.** Модель теплообменника погружного типа с жидкостным нагревом.

а — изометрическая проекция модели; б — сечение модели.

1 — стакан, 2 — корпус, 3 — удлинитель потока, 4 — входной штуцер, 5 — выходной штуцер, 6 — сливное отверстие, 7 — сливной штуцер. Стрелками отображено направление потока теплоносителя

может быть расширена до  $63 \pm 0.5 \text{ см}^2$  за счет добавления в конструкцию вставок. Предпочтительным вариантом монтажа погружного теплообменника является резьбовое соединение с основанием биореакторной емкости, что обеспечивает наибольшую площадь контакта теплообменной поверхности и жидкой фазы в реакционной зоне.

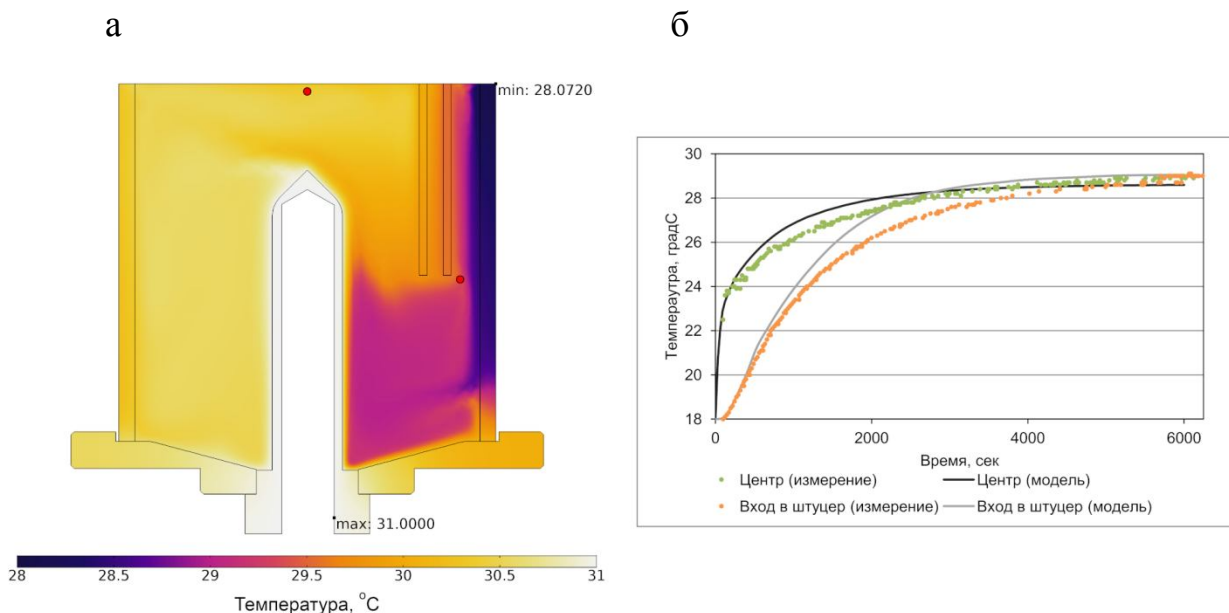
Для изучения поведения системы в процессе термостатирования было проведено численное моделирование теплопередачи в реакционной емкости ЛБ-1 в статическом режиме (рис. 4).

Число Рэлея для слоя воздуха над поверхностью жидкости составило  $4.36 \cdot 10^{-6}$ , что соответствует ламинарному потоку, в котором теплопередача осуществляется за счет теплопроводности, а не конвекции. Поэтому коэффициент теплопередачи  $k$  (4), используемый при моделировании, был принят равным  $2.5 \text{ Вт}/(\text{м}^2 \cdot \text{К})$ , что соответствует тепловому сопротивлению в тонком слое воздуха при температуре  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  [63]. Из-за низких значений коэффициентов теплопередачи воздушной пленки на поверхности жидкой фазы большая часть тепла

поступает через эффективную поверхность погружного теплообменника.

Согласно результатам численного моделирования, в статичном режиме требуемая температура жидкой среды в  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  может быть достигнута в течение часа. Кроме того, следует отметить выраженный тепловой градиент, при котором разница температур в объеме реакционной емкости может достигать  $3 \text{ }^\circ\text{C}$  (рис. 4, а). Данная неоднородность распределения тепла обусловлена наличием удлиненного штуцера, предназначенного для поддержания заданного уровня жидкости в реакционной емкости во время перемешивания (рис. 1, МБР1, магистраль К8).

Для проверки полученной модели были проведены лабораторные испытания, в ходе которых было определено изменение температуры в центре верхнего слоя модельной жидкости и в наименее нагретой области на входе в удлиненный штуцер (рис. 4, б). Полученные данные согласуются с результатами численного моделирования.



**Рис. 4.** Модель процесса термостатирования с использованием погружного теплообменника в реакционной емкости лабораторного биореактора ЛБ-1 в статическом режиме.

а — профиль градиента температуры; б — изменение температуры модельной жидкости в центральной точке поверхностного слоя жидкости и на входе в удлиненный штуцер уровня.

Объем реакционной емкости 1.42 л; коэффициент заполнения 75%; в качестве модельной нагреваемой жидкости — вода ( $18 \text{ }^\circ\text{C}$ ); области измерения температуры указаны метками; температура окружающей среды  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; температура теплоносителя  $31 \text{ }^\circ\text{C}$ ; требуемая температура нагрева  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ; эффективная площадь поверхности теплообменника  $62.3 \text{ см}^2$ ; время нагрева 6000 с.

Измерение проводилось с помощью термометра сопротивления ДТС 214-Pt100.A3.40/1 (ОВЕН®)

Время установления требуемой температуры нагреваемой жидкости в 28 °С для модели и лабораторного эксперимента в центральной точке поверхностного слоя составило  $2380 \pm 354$  с. Однако следует отметить, что для области на входе в штуцер уровня по достижении температуры 24 °С в условиях лабораторного эксперимента наблюдается замедление процесса нагревания, что может быть обусловлено влиянием окружающей среды. На внешней стороне стенок реакционной емкости образуется пленка конденсата из-за разности температур окружающего воздуха и нагреваемой жидкости, что не было учтено в модели. Время достижения требуемой температуры в данной области в условиях лабораторного эксперимента составило 3655 с против 2550 с для модели.

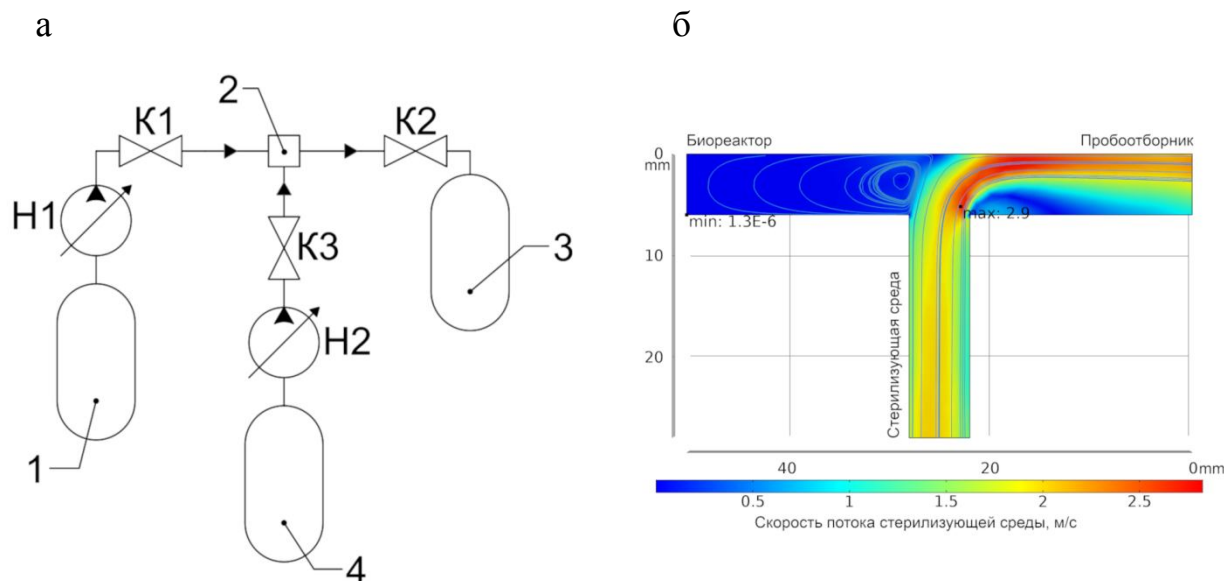
Таким образом, полученные данные свидетельствуют о достаточной эффективности разработанного погружного теплообменника. Данный рабочий узел может быть использован в составе ла-

бораторного биореактора ЛБ-1 при проведении биотехнологических процессов.

### Паростерилизуемый разъем для асептического отбора проб

В биотехнологическом процессе с использованием биореакторов различного объема асептический отбор проб является залогом успеха проводимого эксперимента. Внесение посторонней микрофлоры в биореактор может привести не только к получению некорректных результатов, но и к контаминации рабочих поверхностей.

В лабораторных биореакторах объемом от 3 до 10 л асептический отбор проб осуществляется с помощью специальных портов, расположенных на стенке реакционной емкости [64]. К таким портам могут быть присоединены несколько пробоотборников, стерилизация которых проходит совместно со стерилизацией всей биореакторной установки [65].



**Рис. 5.** Стерилизуемый Т-образный разъем для асептического отбора пробы.

а — принципиальная схема узла асептического отбора пробы; б — модель потока стерилизующей среды через Т-образный разъем.

1 — биореакторная емкость; 2 — стерилизуемый Т-образный разъем для асептического отбора пробы; 3 — пробоотборник; 4 — источник стерилизующей среды; в качестве модельной стерилизующей среды принят пар (120 °С), объемный расход 60 л/ч; диаметр проходного сечения Т-образного стерилизуемого разъема  $\varnothing$  6 мм.

Поток стерилизующей среды (жидкость или пар) и жидкого образца регулируется клапанами К1–К3. Направление потоков жидкости/пара указано черными треугольниками; движение жидкой фазы осуществляется с помощью перистальтических насосов Н1 и Н2; в случае стерилизации острым паром насос Н2 не используется; гидродинамическое моделирование соответствует режиму стерилизации (клапан К1 закрыт)



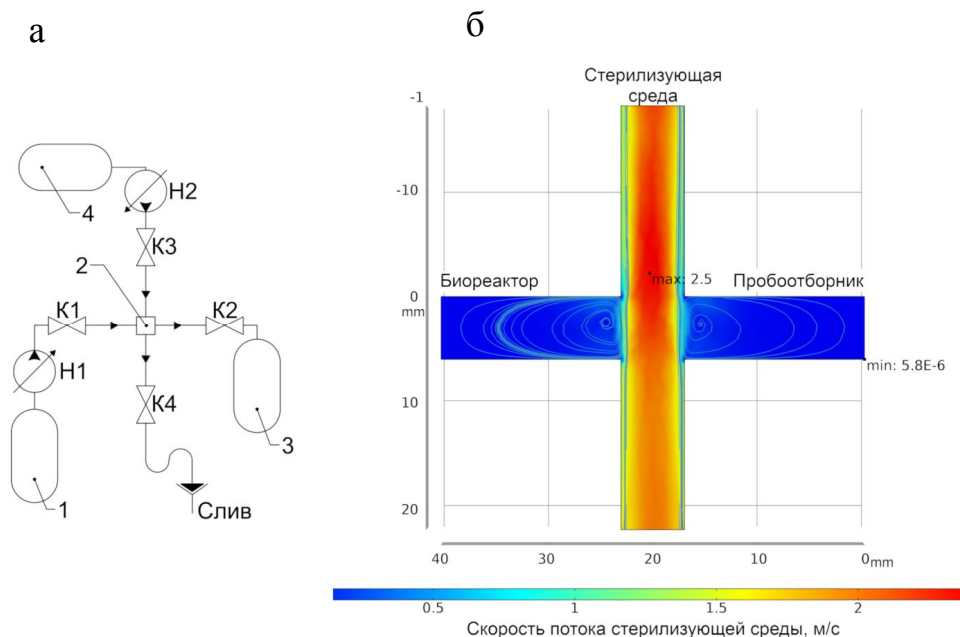
Для лабораторных биореакторов малого объема (до 3 л) применяются выносные вакуумные пробоотборники [66] или линии герметичных емкостей [67]. Главным недостатком всех перечисленных выше способов отбора проб является невозможность повторной процедуры стерилизации.

В работе [68] данную проблему предлагается решить за счет использования стерилизуемого Т-образного разъема для подключения пробоотборника к биореакторной системе (рис. 5). Согласно предлагаемой схеме (рис. 5, а), к биореакторной емкости 1, через Т-образный разъем 2, подключается пробоотборник 3 и источник стерилизующей среды 4.

В режиме штатной работы биореактора все магистрали системы пробоотборника перекрыты клапанами К1–К3. Отбор пробы осуществляется в два этапа, на первом из которых производится предварительная стерилизация узла при открытых клапанах К2 и К3 с помощью насоса Н2. После этого клапаны К2 и К3 закрываются, в то время как клапан К1 открывается для отбора образца с помощью насоса Н1. Преимуществом данной системы является возможность не только отбирать

пробы, но и осуществлять подпитку субстратом. Из недостатков следует отметить низкую эффективность стерилизации рабочих поверхностей из-за особенностей потока стерилизующей среды в канале Т-образного разъема (рис. 5, б). В соответствии с результатами гидродинамического моделирования несовершенство конструкции Т-образного разъема характеризуется снижением способности стерилизующей среды проникать в ответвления, расположенные под углом к проточной магистрали стерилизации, что провоцирует образование мертвых зон. При объемном расходе острого пара (120 °С) 60 л/ч минимальная скорость потока  $1.3 \cdot 10^{-6}$  м/с наблюдается в месте соединения Т-образного разъема и биореакторной емкости. Кроме того, в ответвлении пробоотборника наблюдается зона пониженной скорости, что может отразиться на эффективности стерилизации.

Использование крестообразного фитинга для подключения проточной вспомогательной магистрали, по которой подается стерилизующая среда, может значительно снизить риск контаминации реакционной среды (рис. 6, а).



**Рис. 6.** Стерилизуемый крестообразный разъем для асептического отбора образцов.

а — принципиальная схема узла асептического отбора проб с использованием паростерилизуемого крестообразного разъема; б — модель потока стерилизующей среды через крестообразный разъем.

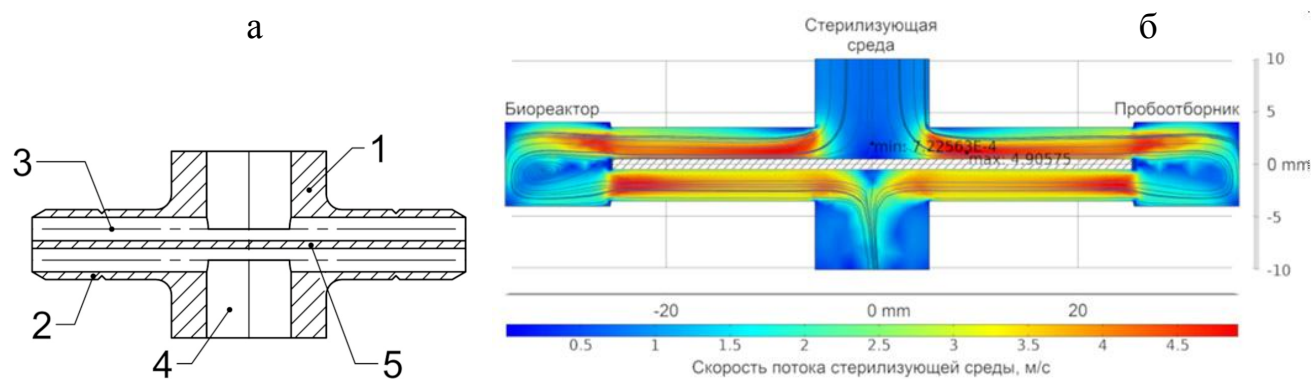
1 — биореакторная емкость; 2 — стерилизуемый крестообразный разъем для асептического отбора проб; 3 — пробоотборник; 4 — источник стерилизующей среды; в качестве модельной стерилизующей среды принят пар (120 °С), объемный расход 60 л/ч; диаметр проходного сечения крестообразного разъема  $\varnothing$  6 мм.

Поток стерилизующей среды (жидкость или пар) и жидкого образца регулируется клапанами К1–К4. Направление потоков жидкости/пара указано черными треугольниками. Движение жидкой фазы осуществляется с помощью перистальтических насосов Н1 и Н2. В случае стерилизации острым паром Н2 не используется; гидродинамическое моделирование соответствует режиму стерилизации (клапаны К1 и К2 закрыты)

Согласно предлагаемой схеме (рис. 6, а), к биореакторной емкости 1, через крестообразный разъем 2, подключается пробоотборник 3 и источник стерилизующей среды 4. В режиме штатной работы биореактора все магистрали системы пробоотборника перекрыты клапанами К1–К4. Отбор пробы осуществляется в два этапа, на первом из которых производится предварительная стерилизация узла при открытых клапанах К3 и К4 с помощью насоса Н2. После этого клапаны К3 и К4 закрываются, в то время как клапаны К1 и К2 открываются для отбора образца с помощью насоса Н1. Следует отметить, что, в отличие от системы с Т-образным разъемом (рис. 5, а), в данной системе емкость для отбора проб присоединяется до начала процедуры стерилизации, что значительно снижает риск контаминации. Тем не менее, как и в случае с Т-образным разъемом (рис. 5, б), крестообразный разъем является неэффективным, т.к. присутствуют зоны нулевой скорости жидкой фазы ( $5.8 \cdot 10^{-6}$  м/с).

Для решения данной проблемы был разработан стерилизуемый крестообразный разъем особого сечения, который обеспечивает увеличение проникающей способности стерилизующей среды (рис. 7) [69].

Данный подход подразумевает наличие перегородки внутри крестовины, которая перенаправляет поток в сторону вспомогательной стерилизующей магистрали (рис. 7, а). Согласно результатам гидродинамического моделирования, максимальная скорость стерилизующей среды наблюдается в области поворота потока в каналы основной магистрали и составляет 4.9 м/с, что в два раза больше, чем для Т-образного и крестообразного разьема (рис. 5, б, и 6, б). Данная особенность объясняется двукратным уменьшением диаметра проходного сечения с 6 мм до 3.2 мм. Следует отметить, что область минимальной скорости ( $7.2 \cdot 10^{-4}$  м/с) расположена в середине перегородки на оси входного потока. Аналогичная конусообразная область наблюдается на противоположной стороне перегородки. Поскольку движение стерилизующей среды в них снижено, данные области составляют "паразитный" объем. За счет того, что крестообразный разъем с перегородкой изготавливается из прокатной нержавеющей стали круглого сечения методами механической обработки, данный объем был замещен конструктивным элементом (рис. 8).



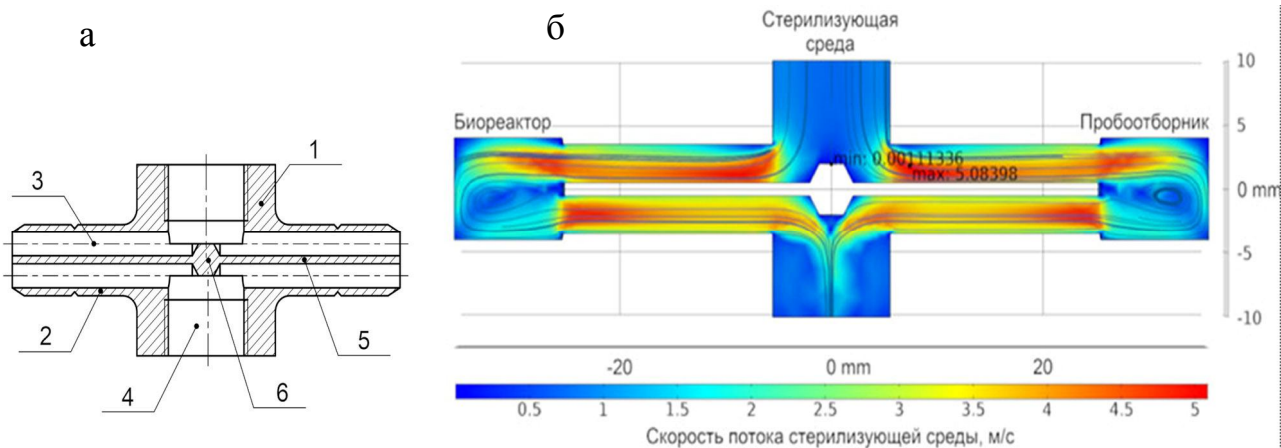
**Рис. 7.** Крестообразный разъем с перегородкой для асептического отбора образцов.

а — продольное сечение; б — модель потока стерилизующей среды.

1 — корпус; 2 — штуцер основной магистрали (от биореактора к пробоотборнику); 3 — каналы основной магистрали; 4 — каналы вспомогательной стерилизующей магистрали; 5 — направляющая перегородка.

Модельная стерилизующая среда — пар (120 °С), объемный расход 60 л/ч.

Диаметры: проходного сечения стерилизующей магистрали  $\varnothing$  6 мм, рабочей магистрали  $\varnothing$  6 мм, направляющих магистралей, разделенных перегородкой,  $\varnothing$  3.2 мм. Гидродинамическое моделирование соответствует режиму стерилизации (рис. 6, а, клапаны К1 и К2 закрыты)



**Рис. 8.** Модифицированный крестообразный разъем с перегородкой для асептического отбора образцов.

а — продольное сечение; б — модель потока стерилизующей среды.

1 — корпус; 2 — штуцер основной магистрали (от биореактора к пробоотборнику); 3 — каналы основной магистрали; 4 — каналы вспомогательной стерилизующей магистрали; 5 — направляющая перегородка; 6 — трапециевидный делитель потока.

Модельная стерилизующая среда — пар (120 °С), объемный расход 60 л/ч.

Диаметры: проходного сечения стерилизующей магистрали  $\varnothing$  6 мм, рабочей магистрали  $\varnothing$  6 мм, направляющих магистралей, разделенных перегородкой,  $\varnothing$  3.2 мм. Гидродинамическое моделирование соответствует режиму стерилизации (рис. 6, а, клапаны К1 и К2 закрыты)

Трапециевидный элемент расположен в середине направляющей перегородки и выполняет функцию делителя входного потока стерилизующей среды и его равномерное распределение в каналы основной магистрали. При этом минимальная скорость потока составляет 0.001 м/с и наблюдается на площадке делителя (рис. 8, б). Следует также отметить, что добавление данного конструктивного элемента в просвет каналов основной магистрали не влияет на профиль скоростей потока стерилизующей среды.

Как упоминалось выше, данный разъем может быть использован не только для отбора проб, но и для добавления питательных сред и титрантов в реакционную емкость биореактора. Для определения влияния трапециевидного делителя на профиль скоростей потока жидкой фазы в режиме подпитки субстратом было проведено гидродинамическое моделирование (Приложение, рис. П).

Согласно результатам гидродинамического моделирования, глубина проникновения жидкой фазы в ответвление вспомогательной стерилизующей магистрали для разъема с трапециевидным делителем больше, чем для разъема с гладкой перегородкой (Приложение, рис. П). Максимальная скорость потока жидкой фазы при прохождении данного конструктивного элемента составляет  $1.37 \cdot 10^{-5}$  м/с, что в 1.4 раза больше, чем для гладкого канала ( $9.18 \cdot 10^{-6}$  м/с). Можно сделать вывод, что использование крестообразного разъема с трапециевидным делителем при работе основной ма-

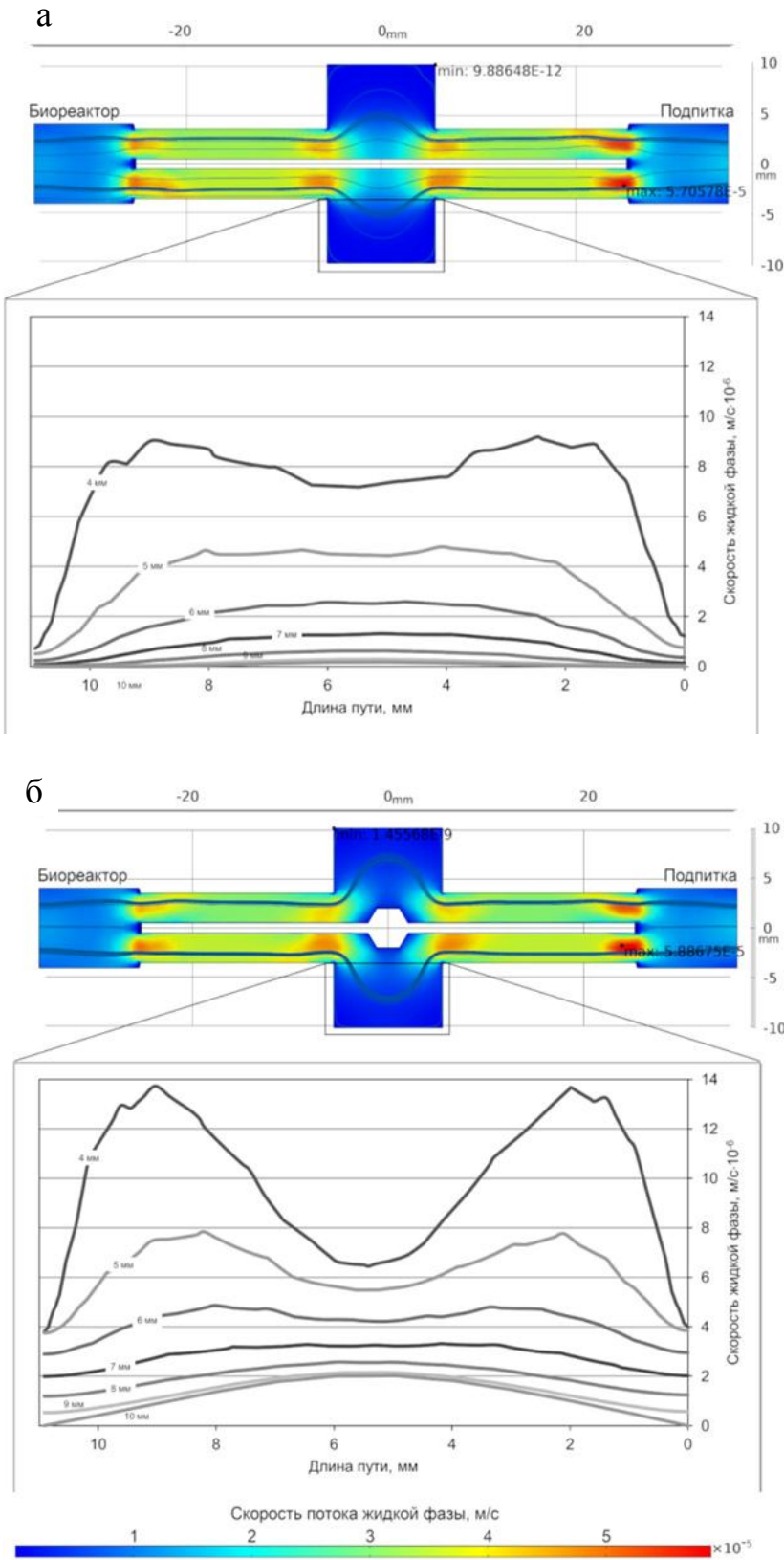
гистрала способствует уменьшению объема застойной зоны, образующейся во вспомогательной стерилизующей магистрали.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был разработан лабораторный биореактор малого объема ЛБ-1 (1.5 л) с перколяционным перемешиванием. Такой тип перемешивания обеспечивает насыщение питательной среды газами, главным образом в пленке жидкости на внутренней поверхности емкостей, а также частично за счет барботажа. Каждый единичный объем перемешиваемой жидкости проходит критические точки турбулентности в соединительной магистрали, что обеспечивает высокую степень гомогенности среды без образования срезающих напряжений, характерных для турбинных и лопаточных мешалок. Поэтому данный подход применим при культивировании микроорганизмов, чувствительных к механическому воздействию, а также для иммобилизованных омываемых культур.

Сборка представленного биореактора осуществляется с помощью разъемного резьбового соединения, что позволяет использовать набор необходимых деталей и узлов для выполнения конкретной биотехнологической задачи в научно-практических и образовательных целях, а также дает возможность мобильной замены или добавления элементов конструкции при сохранении текущего функционального уровня.

ПРИЛОЖЕНИЕ



**Рис. П.** Гидродинамическое моделирование течения жидкой фазы через крестообразный стерилизуемый разъем с перегородкой в режиме подпитки субстратом.

а — разъем с гладкой перегородкой; б — разъем с перегородкой и трапециевидным делителем потока.

Профили скоростей жидкой фазы соответствуют сечениям входного потока основной магистрали до плоскости входного отверстия вспомогательной стерилизующей магистрали с шагом в 1 мм. Модельная жидкая фаза — вода (20 °С), объемный расход 10 мл/мин. Гидродинамическое моделирование соответствует режиму отбора проб/подпитки субстратом (рис. 6, а, клапаны К3 и К4 закрыты)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alvarado-Gutiérrez M.L., Ruiz-Ordaz N., Galíndez-Mayer J., Santoyo-Tepole F., Curiel-Quesada E., García-Mena J., Ahuatzí-Chacón D.* Kinetics of carbendazim degradation in a horizontal tubular biofilm reactor // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2017. Vol. 40, no. 4. P. 519–528. DOI: 10.1007/s00449-016-1717-3
2. *Yang Y., Zhang L., Cheng J., Zhang S., Li B., Peng Y.* Achieve efficient nitrogen removal from real sewage in a plug-flow integrated fixed-film activated sludge (IFAS) reactor via partial nitrification/anammox pathway // *Bioreour. Technol.* 2017. Vol. 239. P. 294–301. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.041
3. *Guilherme E.C.X., de Oliveira J.C., de Carvalho L.M., Brandi I.V., Santos S.H.S., de Carvalho G.G.C., Cota J., Mara Aparecida de Carvalho B.* Synthesis of supermacroporous cryogel for bioreactors continuous starch hydrolysis // *Electrophoresis.* 2017. Vol. 38, no. 22–23. P. 2940–2946. DOI: 10.1002/elps.201700208
4. *Zhang C., Li J., Wang J., Song X., Zhang J., Wu S., Hu C., Gong Z., Jia L.* Antihyperlipidaemic and hepatoprotective activities of acidic and enzymatic hydrolysis exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04: 1 // *BMC Complement. Altern. Med.* 2017. Vol. 17, no. 1. Id. 403. DOI: 10.1186/s12906-017-1892-z
5. *Frensing T., Heldt F.S., Pflugmacher A., Behrendt I., Jordan I., Flockerzi D., Genzel Y., Reichl U.* Continuous influenza virus production in cell culture shows a periodic accumulation of defective interfering particles // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8, no. 9. Id. e72288. DOI: 10.1371/journal.pone.0072288
6. *Tapia F., Jordan I., Genzel Y., Reichl U.* Efficient and stable production of Modified Vaccinia Ankara virus in two-stage semi-continuous and in continuous stirred tank cultivation systems // *PLoS ONE.* 2017. Vol. 12, no. 8. Id. e0182553. DOI: 10.1371/journal.pone.0182553
7. *Wu H.-C., Hu Y.-C., Bentley W.E.* Tubular bioreactor for probing baculovirus infection and protein production // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. 2016. Vol. 1350. P. 461–467. DOI: 10.1007/978-1-4939-3043-2\_23
8. *Xu C., Clark C., Ryder T., Sparks C., Zhou J., Wang M., Russell R., Scott C.* Characterization of TAP Ambr 250 disposable bioreactors, as a reliable scale-down model for biologics process development // *Biotechnol. Prog.* 2017. Vol. 33, no 2. P. 478–489. DOI: 10.1002/btpr.2417
9. *Oncel S., Kose A.* Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity // *Bioreour. Technol.* 2014. Vol. 151. P. 265–270. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.076
10. *Cantera S., Muñoz R., Lebrero R., López J.C., Rodríguez Y., García-Encina C.A.* Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. Vol. 50. P. 128–135. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.12.021
11. *Galvagno M.A., Iannone L.J., Bianchi J., Kronberg F., Rost E., Carstens M.R., Cerrutti C.* Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol // *Rev. Argent. Microbiol.* 2011. Vol. 43, no. 3. P. 218–225. DOI: 10.1590/S0325-75412011000300010
12. *Raza Z.A., Tariq M.R., Majeed M.I., Banat I.M.* Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2019. Vol. 42, no. 6. P. 901–919. DOI: 10.1007/s00449-019-02093-x
13. *Asih D.R., Alam M.Z., Alam Z., Salleh M.N., Salleh N., Salihu A.* Pilot-scale production of lipase using palm oil mill effluent as a basal medium and its immobilization by selected materials // *J. Oleo Sci.* 2014. Vol. 63, no. 8. P. 779–785. DOI: 10.5650/jos.ess13187
14. *Zhong J.-J.* Bioreactor Engineering // *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* / ed. M. Moo-Young. Oxford: Pergamon, 2019. P. 257–269. DOI: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00077-X
15. *Shanmugam M.K., Mandari V., Devarai S.K., Gummadi S.N.* Types of bioreactors and important design considerations // *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* / ed. R. Sirohi et al. Elsevier, 2022. P. 3–30. DOI: 10.1016/B978-0-323-91167-2.00008-3
16. *De la Fuente Salcido N.M., Andrade A.M.A.* Challenges of fermentation engineering // *Advances in food bioproducts and bioprocessing technologies.* CRC Press, 2019. Ch. 11. P. 233–264. DOI: 10.1201/9780429331817-11
17. *Tikhomirova T.S., Taraskevich M.S., Ponomarenko O.V.* The role of laboratory-scale bioreactors at the semi-continuous and continuous microbiological and biotechnological processes // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. Vol. 102, no. 17. P. 7293–7308. DOI: 10.1007/s00253-018-9194-z
18. *Arrojo B., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Méndez R.* Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR) // *J. Biotechnol.* 2006. Vol. 123, no. 4. P. 453–463. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.023
19. *Cantera S., Sánchez-Andrea I., Lebrero R., García-Encina P.A., Stams A.J.M., Muñoz R.* Multi-production of high added market value metabolites from diluted methane emissions via methanotrophic extremophiles // *Bioreour. Technol.* 2018. Vol. 267. P. 401–407. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.07.057
20. *Kumar R.N., Vinod A.V.* Oxygen mass transfer in bubble column bioreactor // *Period. Polytech. Chem. Eng.* 2014. Vol. 58, no. 1. P. 21–30. DOI: 10.3311/PPch.7122
21. *Doig S.D., Ortiz-Ochoa K., Ward J.M., Baganz F.* Characterization of oxygen transfer in miniature and lab-scale bubble column bioreactors and comparison of microbial growth performance based on constant k(L)a // *Biotechnol. Prog.* 2005. Vol. 21, no. 4. P. 1175–1182. DOI: 10.1021/bp050064j
22. *Chaumat H., Billet-Duquenne A.M., Augier F., Mathieu C., Delmas H.* Mass transfer in bubble column for industrial conditions - effects of organic medium, gas and liquid flow rates and column design // *Chem. Eng. Sci.* 2005. Vol. 60, no. 22. P. 5930–5936. DOI: 10.1016/j.ces.2005.04.026

23. Liu B., Zheng Y., Cheng R., Xu Z., Wang M., Jin Z. Experimental study on gas–liquid dispersion and mass transfer in shear-thinning system with coaxial mixer // *Chin. J. Chem. Eng.* 2018. Vol. 26, no. 9. P. 1785–1791. DOI: 10.1016/j.cjche.2018.02.009
24. Aroniada M., Maina S., Koutinas A., Kookos I.K. Estimation of volumetric mass transfer coefficient (kLa) - Review of classical approaches and contribution of a novel methodology // *Biochem. Eng. J.* 2020. Vol. 155. Id. 107458. DOI: 10.1016/j.bej.2019.107458
25. Yawalkar A.A., Heesink A.B.M., Versteeg G.F., Pangarkar V.G. Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tank reactors // *Can. J. Chem. Eng.* 2002. Vol. 80, no. 5. P. 840–848. DOI: 10.1002/cjce.5450800507
26. Xu S., Gavin J., Jiang R., Chen H. Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes // *Biotechnol. Prog.* 2017. Vol. 33, no. 4. P. 867–878. DOI: 10.1002/btpr.2415
27. Rioseras B., López-García M.T., Yagüe C., Sánchez J., Manteca A. Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production // *Bioresour. Technol.* 2014. Vol. 151. P. 191–198. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.068
28. Steger F., Rachbauer L., Windhagauer M., Montgomery L.F.R., Bochmann G. Optimisation of continuous gas fermentation by immobilisation of acetate-producing *Acetobacterium woodii* // *Anaerobe.* 2017. Vol. 46. P. 96–103. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.010
29. Brand E., Junne S., Anane E., Cruz-Bournazou M.N., Neubauer C. Importance of the cultivation history for the response of *Escherichia coli* to oscillations in scale-down experiments // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2018. Vol. 41, no. 9. P. 1305–1313. DOI: 10.1007/s00449-018-1958-4
30. Sandner V., Pybus L.C., McCreath G., Glassey J. Scale-down model development in ambr™ systems: An industrial perspective // *Biotechnol. J.* 2018. Vol. 14, no. 4. DOI: 10.1002/biot.201700766
31. Jonczyk C., Takenberg M., Hartwig S., Beutel S., Berger R.G., Scheper T. Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems // *J. Biotechnol.* 2013. Vol. 167, no. 4. P. 370–376. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.018
32. Michels M.H.A., van der Goot A.J., Vermuë M.H., Wijffels R.H. Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump // *J. Appl. Phycol.* 2016. Vol. 28, no. 1. P. 53–62. DOI: 10.1007/s10811-015-0559-8
33. Verkholaz Y., Lavrov C., Guseva E., Menshutina N., Boudrant J. Simulations of hydrodynamic stress in stirred-tank bioreactors using CFD technology // *Computer Aided Chemical Engineering* / eds. E.N. Pistikopoulos, M.C. Georgiadis, A.C. Kokossis. Elsevier, 2011. Vol. 29. P. 1451–1454. DOI: 10.1016/B978-0-444-54298-4.50069-6
34. Merchuk J.C. Shear effects on suspended cells // *Bioreactor Systems and Effects.* Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 1991. Vol. 44. P. 65–95. DOI: 10.1007/BFb0000748
35. Fazenda M.L., Harvey L.M., McNeil B. Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum* // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2010. Vol. 20, no 4. P. 844–851. DOI: 10.4014/jmb.0911.11020
36. Zheng Y.-X., Wang Y.-L., Pan J., Zhang J.-R., Dai Y., Chen K.-Y. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content // *Bioresour. Technol.* 2017. Vol. 241. P. 1138–1144. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.066
37. Orr D., Zheng W., Campbell B.S., McDougall B.M., Seviour R.J. Culture conditions affect the chemical composition of the exopolysaccharide synthesized by the fungus *Aureobasidium pullulans* // *J. Appl. Microbiol.* 2009. Vol. 107, no. 2. P. 691–698. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04247.x
38. Timoumi A., Bideaux C., Guillouet S.E., Allouche Y., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N. Influence of oxygen availability on the metabolism and morphology of *Yarrowia lipolytica*: insights into the impact of glucose levels on dimorphism // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 101, no. 19. P. 7317–7333. DOI: 10.1007/s00253-017-8446-7
39. Timoumi A., Cléret M., Bideaux C., Guillouet S.E., Allouche Y., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N. Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017. Vol. 101, no. 1. P. 351–366. DOI: 10.1007/s00253-016-7856-2
40. Cobas M., Danko A.S., Pazos M., Sanromán M.A. Removal of metal and organic pollutants from wastewater by a sequential selective technique // *Bioresour. Technol.* 2016. Vol. 213. P. 2–10. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.036
41. Moore R.L.L., Worrallo M.J., Mitchell C.D., Harriman J., Glen K.E., Thomas R.J. Immobilisation of Delta-like 1 ligand for the scalable and controlled manufacture of hematopoietic progenitor cells in a stirred bioreactor // *BMC Biotechnol.* 2017. Vol. 17, iss. 1. Art. 65. DOI: 10.1186/s12896-017-0383-0
42. Nitsche B.M., Jørgensen T.R., Akeroyd M., Meyer V., Ram A.F. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome // *BMC Genomics.* 2012. Vol. 13. Art. 380. DOI: 10.1186/1471-2164-13-380
43. Jost B., Holz M., Aurich A., Barth G., Bley T., Müller R.A. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. Vol. 99, no. 4. P. 1675–1686. DOI: 10.1007/s00253-014-6252-z
44. Bellou S., Makri A., Triantaphyllidou I.-E., Papanikolaou S., Aggelis G. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment // *Microbiol. Read. Engl.* 2014. Vol. 160, no. 4. P. 807–817. DOI: 10.1099/mic.0.074302-0
45. Chen C.-C., Zha X.-H., Zheng C. Construction of fibrous bed bioreactor for enhanced succinic acid production using wastewater of dextran fermentation // *Bioprocess*

- Biosyst. Eng. 2017. Vol. 40, no. 12. P. 1859–1866. DOI: 10.1007/s00449-017-1839-2
46. Zhao L., Cao G.-L., Sheng T., Ren H.-Y., Wang A.-J., Zhang J., Zhong Y.-J., Ren N.-Q. Bio-immobilization of dark fermentative bacteria for enhancing continuous hydrogen production from cornstalk hydrolysate // *Biore-sour. Technol.* 2017. Vol. 243. P. 548–555. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.161
  47. Kays W.M., Crawford M.E. Convective heat and mass transfer. 3rd ed. NY, USA, McGraw-Hill Science, 1993. 480 p.
  48. Kays W.M. Turbulent Prandtl number. Where are we? // *ASME J. Heat Transf.* 1994. Vol. 116, iss. 2. P. 284–295. DOI: 10.1115/1.2911398
  49. Cerri M.O., Esperança M.N., Badino A.C., de Arruda Ribeiro M.P. A new approach for kLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2016. Vol. 91, no. 12. P. 3061–3069. DOI: 10.1002/jctb.4937
  50. Dos Santos M.C., Cerri M.O., Bicas J.L. Relation of shear stress and kLa on bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in a bioreactor // *Bioprocess Bio-syst. Eng.* 2022. Vol. 45, no. 4. P. 733–740. DOI: 10.1007/s00449-022-02693-0
  51. Редикутьцев Ю.В., Зиновьев М.А., Кудряшов В.К., Мальшиев Р.М., Наумов В.Н., Угратицкий А.А. Аппарат для культивирования клеток и микроорганизмов. Патент RU106899U1. 07.27.2011. URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU106899U1\\_20110727](https://yandex.ru/patents/doc/RU106899U1_20110727)
  52. Редикутьцев Ю.В., Кудряшов В.К., Зиновьев М.А., Угратицкий А.А., Голиченков В.С., Безручко В.В., Сизов А.Н., Шевелев Д.А., Семенович Е.А., Тараскевич М.Р. Аппарат для совмещенного культивирования микроорганизмов. Патент RU93394U1. 04.27.2010. URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU93394U1\\_20100427](https://yandex.ru/patents/doc/RU93394U1_20100427)
  53. Редикутьцев Ю.В., Ширишков Н.В., Гаврилов А.Б., Ходаков Е.В. Способ реализации ферментационных процессов и аппарат для его осуществления. Патент RU2596924C1. 09.10.2016. URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2596924C1\\_20160910](https://yandex.ru/patents/doc/RU2596924C1_20160910)
  54. Редикутьцев Ю.В., Зиновьев М.А., Коньков М.А., Кудряшов В.К., Мальшиев Р.М., Наумов В.Н., Тараскевич М.Р., Угратицкий А.А. Установка для совмещенного культивирования микроорганизмов. Патент RU102618U1. 03.10.2011. URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU102618U1\\_20110310](https://yandex.ru/patents/doc/RU102618U1_20110310)
  55. Borba A.P., de Souza J., Haupt W., de Oliveira de Souza F.R., Sporket F., Rossini E.G., Reis B.P. Microstructural analysis of corrosion of welded joints in stainless steel used in manufacture of bioreactors // *IJRES.* 2016. Vol. 4, iss. 12. P. 37–48. DOI: 10.6084/m9.figshare.12317492
  56. Yan M., Wei B., Xu J., Li Y., Hu Y., Cai Z., Sun C. Insight into sulfate-reducing bacteria corrosion behavior of X80 pipeline steel welded joint in a soil solution // *J. Mater. Res. Technol.* 2023. Vol. 24. P. 5839–5863. DOI: 10.1016/j.jmrt.2023.04.163
  57. Kadic E., Heindel T.J. Bubble Column Bioreactors // An introduction to bioreactor hydrodynamics and gas-liquid mass transfer. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. P. 124–167. DOI: 10.1002/9781118869703
  58. Lübbert A. Bubble Column Bioreactors // *Bioreaction engineering: modeling and control* / ed. K. Schügerl, K.-H. Bellgardt. Berlin, Heidelberg: Springer, 2000. P. 247–273. DOI: 10.1007/978-3-642-59735-0\_9
  59. Khalil A., Rosso D., DeGroot C.T. Effects of flow velocity and bubble size distribution on oxygen mass transfer in bubble column reactors – A critical evaluation of the computational fluid dynamics-population balance model // *Water Environ. Res.* 2021. Vol. 93, no. 10. P. 2274–2297. DOI: 10.1002/wer.1604
  60. Mahdinia E., Demirci A., Berenjian A. Biofilm reactors as a promising method for vitamin K (menaquinone-7) production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. Vol. 103, no. 14. P. 5583–5592. DOI: 10.1007/s00253-019-09913-w
  61. Hu G., Zhai M., Niu R., Xu X., Liu Q., Jia J. Optimization of culture condition for ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* liquid static culture and design of a suitable bioreactor // *Molecules.* 2018. Vol. 23, no. 10. Id. 2563. DOI: 10.3390/molecules23102563
  62. Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher C., Maddox I.S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates // *Microb. Cell Factories.* 2005. Vol. 4, no. 1. Id. 24. DOI: 10.1186/1475-2859-4-24
  63. Kosky C., Balmer R., Keat W., Wise G. Mechanical Engineering // *Exploring Engineering (Third Edition)* / ed. C. Kosky et al. Boston, Academic Press, 2013. Ch. 12. P. 259–281. DOI: 10.1016/B978-0-12-415891-7.00012-1
  64. Goodwin M.E. Sampling ports and related container systems. Патент EP1837640B1. 07.01.2020. URL: <https://patents.google.com/patent/EP1837640B1/en>
  65. Goodwin M.E., Larsen J.K. Tube port and associated container system. Патент JP5265345B2. 08.14.2013.
  66. Wang Y., Qin W., Liang Y., Chen Y., Jiang Y. Sampling device of fermentation tank. Патент CN211713089U. 10.20.2020.
  67. Lee C.B., Giroux D. Automatable aseptic sample withdrawal system. Патент US8281672B2. 10.09.2012. URL: <https://patents.google.com/patent/US8281672B2/en>
  68. Qian J., Huang G., Wan Z., Gao Y., Xia, Yang S., Wang C., Zhao Y. Sampling port and harvesting port connector for bioreactor. Патент CN203200260U. 09.18.2013.

69. Пономаренко О.В., Лепехин Ю.А., Тихомирова Т.С.  
Фитинг стерилизуемый для гибких трубок. Патент  
RU2788265C1. 01.17.2023. URL:  
[https://yandex.ru/patents/doc/RU2788265C1\\_20230117](https://yandex.ru/patents/doc/RU2788265C1_20230117)

**Федеральный исследовательский центр "Пушкинский  
научный центр биологических исследований Российской  
академии наук", Институт биологического  
приборостроения с опытным производством РАН,  
г. Пушкино**

Контакты: Тихомирова Татьяна Сергеевна,  
tts05@mail.ru

Материал поступил в редакцию 08.09.2023

## A PERCOLATION LAB-SCALE BIOREACTOR SYSTEM LB-1 FOR CULTIVATION OF MICROORGANISMS SENSITIVE TO MECHANICAL DAMAGES

**T. S. Tikhomirova, Y. A. Lepekhin, M. S. Taraskevich**

*Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences,  
Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the RAS",  
Pushchino, Moscow Region, Russia*

Lab-scale bioreactors are convenient and efficient equipment for various biotechnological processes. The main purpose of their application is an in-depth study of the properties of processes occurring under controlled conditions, as well as their further optimization and scaling. In this paper, we propose the lab-scale bioreactor (1.5 L), in which mixing is carried out due to a bidirectional flow of liquid between two cylindrical vessels due to compressed gases (percolation). Saturation of liquid media here is performed both in a thin layer of liquid on the surface of vessels and solid carriers. The mass transfer characteristics made it possible to qualify LB-1 as a column film bioreactor, which can be used for cultivating both microorganisms sensitive to mechanical damage and immobilized washed cultures (biofilms). In addition, an immersion heat exchanger and a steam sterilizable X-shaped connector were developed, the features of which were revealed using numerical simulation of the temperature control process and computational fluid dynamics.

*Keywords:* lab-scale bioreactor, column bioreactor, scaling, biotechnological process, percolation

### REFERENCES

1. Alvarado-Gutiérrez M.L., Ruiz-Ordaz N., Galíndez-Mayer J., Santoyo-Tepole F., Curiel-Quesada E., García-Mena J., Ahuatzí-Chacón D. Kinetics of carbendazim degradation in a horizontal tubular biofilm reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2017, vol. 40, no. 4, pp. 519–528. DOI: 10.1007/s00449-016-1717-3
2. Yang Y., Zhang L., Cheng J., Zhang S., Li B., Peng Y. Achieve efficient nitrogen removal from real sewage in a plug-flow integrated fixed-film activated sludge (IFAS) reactor via partial nitrification/anammox pathway. *Biore-sour. Technol.*, 2017, vol. 239, pp. 294–301. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.041
3. Guilherme E.C.X., de Oliveira J.C., de Carvalho L.M., Brandi I.V., Santos S.H.S., de Carvalho G.G.C., Cota J., Mara Aparecida de Carvalho B. Synthesis of supermacro-porous cryogel for bioreactors continuous starch hydrolysis. *Electrophoresis*, 2017, vol. 38, no. 22-23, pp. 2940–2946. DOI: 10.1002/elps.201700208
4. Zhang C., Li J., Wang J., Song X., Zhang J., Wu S., Hu C., Gong Z., Jia L. Antihyperlipidaemic and hepato-



- protective activities of acidic and enzymatic hydrolysis exopolysaccharides from *Pleurotus eryngii* SI-04: 1. *BMC Complement. Altern. Med.*, 2017, vol. 17, no. 1, id. 403. DOI: 10.1186/s12906-017-1892-z
5. Frensing T., Heldt F.S., Pflugmacher A., Behrendt I., Jordan I., Flockerzi D., Genzel Y., Reichl U. Continuous influenza virus production in cell culture shows a periodic accumulation of defective interfering particles. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 9, id. e72288. DOI: 10.1371/journal.pone.0072288
  6. Tapia F., Jordan I., Genzel Y., Reichl U. Efficient and stable production of Modified Vaccinia Ankara virus in two-stage semi-continuous and in continuous stirred tank cultivation systems. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 8, id. e0182553. DOI: 10.1371/journal.pone.0182553
  7. Wu H.C., Hu Y.C., Bentley W.E. Tubular bioreactor for probing baculovirus infection and protein production. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ, 2016, vol. 1350, pp. 461–467. DOI: 10.1007/978-1-4939-3043-2\_23
  8. Xu C., Clark C., Ryder T., Sparks C., Zhou J., Wang M., Russell R., Scott C. Characterization of TAP Ambr 250 disposable bioreactors, as a reliable scale-down model for biologics process development. *Biotechnol. Prog.*, 2017, vol. 33, no. 2, pp. 478–489. DOI: 10.1002/btpr.2417
  9. Oncel S., Kose A. Comparison of tubular and panel type photobioreactors for biohydrogen production utilizing *Chlamydomonas reinhardtii* considering mixing time and light intensity. *Bioresour. Technol.*, 2014, vol. 151, pp. 265–270. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.076
  10. Cantera S., Muñoz R., Lebrero R., López J.C., Rodríguez Y., García-Encina C.A. Technologies for the bioconversion of methane into more valuable products. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, vol. 50, pp. 128–135. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.12.021
  11. Galvagno M.A., Iannone L.J., Bianchi J., Kronberg F., Rost E., Carstens M.R., Cerrutti C. Optimization of biomass production of a mutant of *Yarrowia lipolytica* with an increased lipase activity using raw glycerol. *Rev. Argent. Microbiol.*, 2011, vol. 43, no. 3, pp. 218–225. DOI: 10.1590/S0325-75412011000300010
  12. Raza Z.A., Tariq M.R., Majeed M.I., Banat I.M. Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2019, vol. 42, no. 6, pp. 901–919. DOI: 10.1007/s00449-019-02093-x
  13. Asih D.R., Alam M.Z., Alam Z., Salleh M.N., Salleh N., Salihi A. Pilot-scale production of lipase using palm oil mill effluent as a basal medium and its immobilization by selected materials. *J. Oleo Sci.*, 2014, vol. 63, no. 8, pp. 779–785. DOI: 10.5650/jos.ess13187
  14. Zhong J.-J. *Bioreactor Engineering. Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, ed. M. Moo-Young, Oxford, Pergamon, 2019, pp. 257–269. DOI: 10.1016/B978-0-444-64046-8.00077-X
  15. Shanmugam M.K., Mandari V., Devarai S.K., Gumma S.N. Types of bioreactors and important design considerations. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, ed. R. Sirohi et al., Elsevier, 2022, pp. 3–30. DOI: 10.1016/B978-0-323-91167-2.00008-3
  16. De la Fuente Salcido N.M., Andrade A.M.A. Challenges of fermentation engineering. *Advances in food bioproducts and bioprocessing technologies*, CRC Press, 2019, Ch. 11, pp. 233–264. DOI: 10.1201/9780429331817-11
  17. Tikhomirova T.S., Taraskevich M.S., Ponomarenko O.V. The role of laboratory-scale bioreactors at the semi-continuous and continuous microbiological and biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, vol. 102, no. 17, pp. 7293–7308. DOI: 10.1007/s00253-018-9194-z
  18. Arrojo B., Mosquera-Corral A., Campos J.L., Méndez R. Effects of mechanical stress on Anammox granules in a sequencing batch reactor (SBR). *J. Biotechnol.*, 2006, vol. 123, no. 4, pp. 453–463. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.12.023
  19. Cantera S., Sánchez-Andrea I., Lebrero R., García-Encina P.A., Stams A.J.M., Muñoz R. Multi-production of high added market value metabolites from diluted methane emissions via methanotrophic extremophiles. *Bioresour. Technol.*, 2018, vol. 267, pp. 401–407. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.07.057
  20. Kumar R.N., Vinod A.V. Oxygen mass transfer in bubble column bioreactor. *Period. Polytech. Chem. Eng.*, 2014, vol. 58, no. 1, pp. 21–30. DOI: 10.3311/PPch.7122
  21. Doig S.D., Ortiz-Ochoa K., Ward J.M., Baganz F. Characterization of oxygen transfer in miniature and lab-scale bubble column bioreactors and comparison of microbial growth performance based on constant  $k(L)a$ . *Biotechnol. Prog.*, 2005, vol. 21, no. 4, pp. 1175–1182. DOI: 10.1021/bp050064j
  22. Chaumat H., Billet-Duquenne A.M., Augier F., Mathieu C., Delmas H. Mass transfer in bubble column for industrial conditions - effects of organic medium, gas and liquid flow rates and column design. *Chem. Eng. Sci.*, 2005, vol. 60, no. 22, pp. 5930–5936. DOI: 10.1016/j.ces.2005.04.026
  23. Liu B., Zheng Y., Cheng R., Xu Z., Wang M., Jin Z. Experimental study on gas–liquid dispersion and mass transfer in shear-thinning system with coaxial mixer. *Chin. J. Chem. Eng.*, 2018, vol. 26, no. 9, pp. 1785–1791. DOI: 10.1016/j.cjche.2018.02.009
  24. Aroniada M., Maina S., Koutinas A., Kookos I.K. Estimation of volumetric mass transfer coefficient ( $kLa$ ) - Review of classical approaches and contribution of a novel methodology. *Biochem. Eng. J.*, 2020, vol. 155, id. 107458. DOI: 10.1016/j.bej.2019.107458
  25. Yawalkar A.A., Heesink A.B.M., Versteeg G.F., Pangarkar V.G. Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tank reactors. *Can. J. Chem. Eng.*, 2002, vol. 80, no. 5, pp. 840–848. DOI: 10.1002/cjce.5450800507
  26. Xu S., Gavin J., Jiang R., Chen H. Bioreactor productivity and media cost comparison for different intensified cell culture processes. *Biotechnol. Prog.*, 2017, vol. 33, no. 4, pp. 867–878. DOI: 10.1002/btpr.2415
  27. Rioseras B., López-García M.T., Yagüe C., Sánchez J., Manteca A. Mycelium differentiation and development of *Streptomyces coelicolor* in lab-scale bioreactors: programmed cell death, differentiation, and lysis are closely linked to undecylprodigiosin and actinorhodin production. *Bioresour. Technol.*, 2014, vol. 151, pp. 191–198. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.068

28. Steger F., Rachbauer L., Windhagauer M., Montgomery L.F.R., Bochmann G. Optimisation of continuous gas fermentation by immobilisation of acetate-producing *Acetobacterium woodii*. *Anaerobe*, 2017, vol. 46, pp. 96–103. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.010
29. Brand E., Junne S., Anane E., Cruz-Bournazou M.N., Neubauer C. Importance of the cultivation history for the response of *Escherichia coli* to oscillations in scale-down experiments. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2018, vol. 41, no. 9, pp. 1305–1313. DOI: 10.1007/s00449-018-1958-4
30. Sandner V., Pybus L.C., McCreath G., Glassey J. Scale-down model development in ambr™ systems: An industrial perspective. *Biotechnol. J.*, 2018, vol. 14, no. 4, id. 1700766. DOI: 10.1002/biot.201700766
31. Jonczyk C., Takenberg M., Hartwig S., Beutel S., Berger R.G., Scheper T. Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems. *J. Biotechnol.*, 2013, vol. 167, no. 4, pp. 370–376. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2013.07.018
32. Michels M.H.A., van der Goot A.J., Vermuë M.H., Wijffels R.H. Cultivation of shear stress sensitive and tolerant microalgal species in a tubular photobioreactor equipped with a centrifugal pump. *J. Appl. Phycol.*, 2016, vol. 28, no. 1, pp. 53–62. DOI: 10.1007/s10811-015-0559-8
33. Verkholaz Y., Lavrov C., Guseva E., Menshutina N., Boudrant J. Simulations of hydrodynamic stress in stirred-tank bioreactors using CFD technology. *Computer Aided Chemical Engineering*, eds. E.N. Pistikopoulos, M.C. Georgiadis, A.C. Kokossis, Elsevier, 2011, vol. 29, pp. 1451–1454. DOI: 10.1016/B978-0-444-54298-4.50069-6
34. Merchuk J.C. Shear effects on suspended cells. *Bioreactor Systems and Effects. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 1991, vol. 44, pp. 65–95. DOI: 10.1007/BFb0000748
35. Fazenda M.L., Harvey L.M., McNeil B. Effects of dissolved oxygen on fungal morphology and process rheology during fed-batch processing of *Ganoderma lucidum*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, vol. 20, no. 4, pp. 844–851. DOI: 10.4014/jmb.0911.11020
36. Zheng Y.-X., Wang Y.-L., Pan J., Zhang J.-R., Dai Y., Chen K.-Y. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. *Bioresour. Technol.*, 2017, vol. 241, pp. 1138–1144. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.066
37. Orr D., Zheng W., Campbell B.S., McDougall B.M., Seviour R.J. Culture conditions affect the chemical composition of the exopolysaccharide synthesized by the fungus *Aureobasidium pullulans*. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 107, no. 2, pp. 691–698. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04247.x
38. Timoumi A., Bideaux C., Guillouet S.E., Allouche Y., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N. Influence of oxygen availability on the metabolism and morphology of *Yarrowia lipolytica*: insights into the impact of glucose levels on dimorphism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 101, no. 19, pp. 7317–7333. DOI: 10.1007/s00253-017-8446-7
39. Timoumi A., Cléret M., Bideaux C., Guillouet S.E., Allouche Y., Molina-Jouve C., Fillaudeau L., Gorret N. Dynamic behavior of *Yarrowia lipolytica* in response to pH perturbations: dependence of the stress response on the culture mode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2017, vol. 101, no. 1, pp. 351–366. DOI: 10.1007/s00253-016-7856-2
40. Cobas M., Danko A.S., Pazos M., Sanromán M.A. Removal of metal and organic pollutants from wastewater by a sequential selective technique. *Bioresour. Technol.*, 2016, vol. 213, pp. 2–10. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.02.036
41. Moore R.L.L., Worrallo M.J., Mitchell C.D., Harriman J., Glen K.E., Thomas R.J. Immobilisation of Delta-like 1 ligand for the scalable and controlled manufacture of hematopoietic progenitor cells in a stirred bioreactor. *BMC Biotechnol.*, 2017, vol. 17, no. 1, id. 65. DOI: 10.1186/s12896-017-0383-0
42. Nitsche B.M., Jørgensen T.R., Akeroyd M., Meyer V., Ram A.F. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics*, 2012, vol. 13, id. 380. DOI: 10.1186/1471-2164-13-380
43. Jost B., Holz M., Aurich A., Barth G., Bley T., Müller R.A. The influence of oxygen limitation for the production of succinic acid with recombinant strains of *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, vol. 99, no. 4, pp. 1675–1686. DOI: 10.1007/s00253-014-6252-z
44. Bellou S., Makri A., Triantaphyllidou I.-E., Papanikolaou S., Aggelis G. Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiol. Read. Engl.*, 2014, vol. 160, no. 4, pp. 807–817. DOI: 10.1099/mic.0.074302-0
45. Chen C.-C., Zha X.-H., Zheng C. Construction of fibrous bed bioreactor for enhanced succinic acid production using wastewater of dextran fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2017, vol. 40, no. 12, pp. 1859–1866. DOI: 10.1007/s00449-017-1839-2
46. Zhao L., Cao G.-L., Sheng T., Ren H.-Y., Wang A.-J., Zhang J., Zhong Y.-J., Ren N.-Q. Bio-immobilization of dark fermentative bacteria for enhancing continuous hydrogen production from cornstarch hydrolysate. *Bioresour. Technol.*, 2017, vol. 243, pp. 548–555. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.161
47. Kays W.M., Crawford M.E. *Convective heat and mass transfer*. 3rd ed. NY, USA, McGraw-Hill Science, 1993. 480 p.
48. Kays W.M. Turbulent Prandtl number. Where are we? *ASME J. Heat Transf.*, 1994, vol. 116, no. 2, pp. 284–295. DOI: 10.1115/1.2911398
49. Cerri M.O., Esperança M.N., Badino A.C., de Arruda Ribeiro M.P. A new approach for kLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2016, vol. 91, no. 12, pp. 3061–3069. DOI: 10.1002/jctb.4937
50. Dos Santos M.C., Cerri M.O., Bicas J.L. Relation of shear stress and kLa on bikaverin production by *Fusarium oxysporum* CCT7620 in a bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2022, vol. 45, no. 4, pp. 733–740. DOI: 10.1007/s00449-022-02693-0

51. Redikul'tsev Yu.V., Zinov'ev M.A., Kudryashov V.K., Malyshev R.M., Naumov V.N., Ugraitskii A.A. Apparát dlya kul'tivirovaniya kletok i mikroorganizmov [Cell and microorganism culture apparatus]. Patent RF no. RU106899U1. Prioritet 07.27.2011. (In Russ.). URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU106899U1\\_20110727](https://yandex.ru/patents/doc/RU106899U1_20110727)
52. Redikul'tsev Yu.V., Kudryashov V.K., Zinov'ev M.A., Ugraitskii A.A., Golichenkov V.S., Bezruchko V.V., Sizov A.N., Shevelev D.A., Semenovich E.A., Taraskevich M.R. Apparát dlya sovmeshchennogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov [Apparatus for combined cultivation of microorganisms]. Patent RF no. RU93394U1. Prioritet 04.27.2010. (In Russ.). URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU93394U1\\_20100427](https://yandex.ru/patents/doc/RU93394U1_20100427)
53. Redikul'tsev Yu.V., Shirshikov N.V., Gavrilov A.B., Khodakov E.V. Sposob realizatsii fermentatsionnykh protsessov i apparát dlya ego osushchestvleniya [Method for implementation of fermentation processes and apparatus for its implementation]. Patent RF no. RU2596924C1. Prioritet 09.10.2016. (In Russ.). URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2596924C1\\_20160910](https://yandex.ru/patents/doc/RU2596924C1_20160910)
54. Redikul'tsev Yu.V., Zinov'ev M.A., Kon'kov M.A., Kudryashov V.K., Malyshev R.M., Naumov V.N., Taraskevich M.R., Ugraitskii A.A. Ustanovka dlya sovmeshchennogo kul'tivirovaniya mikroorganizmov [Combined microbial culture plant]. Patent RF no. RU102618U1. Prioritet 03.10.2011. (In Russ.). URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU102618U1\\_20110310](https://yandex.ru/patents/doc/RU102618U1_20110310)
55. Borba A.P., de Souza J., Haupt W., de Oliveira de Souza F.R., Sporket F., Rossini E.G., Reis B.P. Microstructural analysis of corrosion of welded joints in stainless steel used in manufacture of bioreactors. *IJRES*, 2016, vol. 4, no. 12, pp. 37–48. DOI: 10.6084/m9.figshare.12317492
56. Yan M., Wei B., Xu J., Li Y., Hu Y., Cai Z., Sun C. Insight into sulfate-reducing bacteria corrosion behavior of X80 pipeline steel welded joint in a soil solution. *J. Mater. Res. Technol.*, 2023, vol. 24, pp. 5839–5863. DOI: 10.1016/j.jmrt.2023.04.163
57. Kadic E., Heindel T.J. Bubble Column Bioreactors. *An introduction to bioreactor hydrodynamics and gas-liquid mass transfer*, John Wiley & Sons, Ltd, 2014, pp. 124–167. DOI: 10.1002/9781118869703
58. Lübbert A. Bubble Column Bioreactors. *Bioreaction engineering: modeling and control*, eds. K. Schügerl, K.-H. Bellgardt, Berlin, Heidelberg, Springer, 2000, pp. 247–273. DOI: 10.1007/978-3-642-59735-0\_9
59. Khalil A., Rosso D., DeGroot C.T. Effects of flow velocity and bubble size distribution on oxygen mass transfer in bubble column reactors – A critical evaluation of the computational fluid dynamics-population balance model. *Water Environ. Res.*, 2021, vol. 93, no. 10, pp. 2274–2297. DOI: 10.1002/wer.1604
60. Mahdinia E., Demirci A., Berenjian A. Biofilm reactors as a promising method for vitamin K (menaquinone-7) production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, vol. 103, no. 14, pp. 5583–5592. DOI: 10.1007/s00253-019-09913-w
61. Hu G., Zhai M., Niu R., Xu X., Liu Q., Jia J. Optimization of culture condition for ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* liquid static culture and design of a suitable bioreactor. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 10, id. 2563. DOI: 10.3390/molecules23102563
62. Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher C., Maddox I.S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microb. Cell Factories*, 2005, vol. 4, no. 1, id. 24. DOI: 10.1186/1475-2859-4-24
63. Kosky C., Balmer R., Keat W., Wise G. Mechanical Engineering. *Exploring Engineering* (Third Edition), eds. C. Kosky et al., Boston, Academic Press, 2013, Ch. 12, pp. 259–281. DOI: 10.1016/B978-0-12-415891-7.00012-1
64. Goodwin M.E. Sampling ports and related container systems. Patent EP1837640B1. 07.01.2020. URL: <https://patents.google.com/patent/EP1837640B1/en>
65. Goodwin M.E., Larsen J.K. Tube port and associated container system. Patent JP5265345B2. 08.14.2013.
66. Wang Y., Qin W., Liang Y., Chen Y., Jiang Y. Sampling device of fermentation tank. Patent CN211713089U. 10.20.2020.
67. Lee C.B., Giroux D. Automatable aseptic sample withdrawal system. Patent US8281672B2. 10.09.2012. URL: <https://patents.google.com/patent/US8281672B2/en>
68. Qian J., Huang G., Wan Z., Gao Y., Xia, Yang S., Wang C., Zhao Y. Sampling port and harvesting port connector for bioreactor. Patent CN203200260U. 09.18.2013.
69. Ponomarenko O.V., Lepekhin Yu.A., Tikhomirova T.S. Fiting sterilizuemyi dlya gibkikh trubok [Sterilizable fitting for flexible tubes]. Patent RF no. RU2788265C1. Prioritet 01.17.2023. (In Russ.). URL: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2788265C1\\_20230117](https://yandex.ru/patents/doc/RU2788265C1_20230117)

Contacts: *Tikhomirova Tatyana Sergeevna*,  
tts05@mail.ru

Article received by the editorial office on 08.09.2023

## INTRODUCTION

Small-volume bioreactors are laboratory equipment that is used to carry out various biotechnological processes. At the same time, the topics of these studies are quite diverse. In addition to one-stage cultivation of autotrophs. Laboratory bioreactors can be used to develop wastewater treatment [1, 2], biocatalytic transformation of substrates [3, 4], production of vaccines [5, 6], viral transformation of cells [7] etc. The purpose of their use is to study the features of processes carried out under controlled conditions [8, 9], their further optimization [10, 11] and scaling [12, 13].

There are several approaches to the classification of bioreactors based on their design, operating modes, methods of energy supply, and the types of processes carried out [14–17]. Therefore, when setting up a biotechnological experiment, many parameters should be taken into account to select an adequate model of a bioreactor system. Column-type reactors and stirred tank reactors are the most popular designs, providing the necessary minimum for the biotechnological process. Column bioreactors provide gentle mixing due to sparging. In this case, shear stresses, which can negatively affect the growth and development of the culture, do not arise [18, 19]. The disadvantage of this design is the low value of the mass transfer coefficient  $k_{La}$  up to  $320 \text{ h}^{-1}$  [20, 21]. This indicator can be enlarged by increasing the volumetric flow rate of the mixing gas [20] or by changing the linear dimensions of the column [22]. In turn, a bioreactor with a stirrer is characterized by higher mass transfer rates ( $50\text{--}550 \text{ h}^{-1}$  [23–25]), which increases its demand on the market.

The above types of bioreactors are actively used in both forward and reverse scaling procedures. Direct scaling up of cultivation or biocatalysis processes is an important step in bio-technological research. It involves transferring a laboratory experiment to the controlled conditions of a bioreactor with a subsequent gradual increase in volumes. The results of direct scaling allow us to judge the profitability of the process under study [11, 26–28]. However, increasing volumes also increases the risk of rate and concentration gradients in the reaction zone, which leads to a decrease in process efficiency. In such cases, it is advisable to carry out reverse scaling. The essence of this method is to simulate the processes occurring in certain zones of industrial bioreactors (near-wall, central, bottom, etc.) [8, 29, 30].

As you can see, direct and reverse scaling is carried out using small-volume laboratory bioreactors (0.1–5 L), which allow optimizing the conditions for microbiological and fermentation processes and collecting data on the influence of various factors (method stirring, increasing the reaction volume, tempera-

ture and oxygen conditions, etc.) on the final result. Currently, the design of commercial laboratory bioreactors is presented in the form of a reactor with a paddle stirrer (Rushton turbine) and different numbers of blades (Tab. 1).

**Tab. 1.** Commercial laboratory small volume bioreactors with stirrer

This type of mixer provides a mainly radial (from the center to the wall) flow of liquid. Mixers with inclined blades also create weak axial (along the shaft) currents. In this case, during mixing, shear stress arises, which can affect the growth and development of microorganisms sensitive to mechanical damage [31–34]. The efficiency of this design may also be reduced since the liquid is only mixed in the area adjacent directly to the blades. Therefore, paddle mixers are multi-tiered for mixing in a high layer of liquid, which creates even more shear stresses.

Such a standard design of a laboratory bioreactor limits the use of solid substrates, aggressive or explosive environments, and reduces the scope of their application. Therefore, the goal of this work was to develop alternative designs of laboratory bioreactors based on pneumatic mixing, which is a promising area of engineering research.

## MATERIALS AND METHODS

### Numerical thermostating modeling

Heat transfer modeling during temperature control of liquid in the reaction vessel LB-1 at rest and with stirring is necessary to understand the operating features of the developed submersible heat exchanger. In a stationary layer of liquid, heat transfer in the reaction vessel LB-1 is realized through free convection and thermal conductivity. Heat transfer here is calculated using the following energy conservation equation (1):

$$\rho C_p \frac{\partial T}{\partial t} + \rho C_p \mathbf{u} \nabla T + \nabla \mathbf{q} = Q + Q_p + Q_{vd}, \quad (1)$$

where  $\rho$  is the density of the medium,  $\text{kg/m}^3$ ;  $C_p$  is specific heat capacity at constant pressure,  $\text{J}/(\text{kg K})$ ;  $T$  is absolute temperature,  $\text{K}$ ;  $\mathbf{u}$  is velocity vector,  $\text{m/s}$ ;  $\mathbf{q}$  is heat flow by means of thermal conductivity,  $\text{W/m}^2$ ;  $Q$  is heat sources other than viscous dissipation,  $\text{W/m}^3$ ;  $Q_p$  is the work done due to pressure changes,  $\text{W/m}^3$ ;  $Q_{vd}$  is viscous dissipation,  $\text{W/m}^3$ .

Parameters  $Q_p$  and  $Q_{vd}$  are determined by the following equations (2, 3):

$$Q_p = \alpha_p T \left( \frac{\partial p}{\partial t} + \mathbf{u} \nabla p \right), \quad (2)$$

$$Q_{vd} = \tau : \nabla \mathbf{u}, \quad (3)$$

where  $\alpha_p$  is the coefficient of thermal expansion,  $K^{-1}$ ;  $\tau$  is viscous stress tensor, Pa.

For a stationary heat conduction problem (when the system is in equilibrium), the rate equation is known as Fourier's law and is described as equation (4):

$$q = -k \nabla T, \quad (4)$$

where  $k$  is the thermal conductivity coefficient of the material,  $W/(m \text{ K})$ . Equation (4) is widely used for quasi-equilibrium processes, where the temperature distribution in the system is important. Therefore, it is applicable for the process of thermostating in a reaction vessel in rest mode.

In the process of thermostating modeling on the upper and outer surfaces, the boundary condition of convective heat flow was used, based on the temperature difference between the working surface (the glass wall of the shell and the steel base of the container) and the surrounding atmosphere.

### The Kays – Crawford model

For theoretical predictions of turbulent heat transfer in boundary layers and flows in canals, knowledge of the turbulent Prandtl number  $Pr_T$  is critical. To calculate this criterion, the Kays – Crawford model [5] [47] was used:

$$Pr_T = \left( \frac{1}{2Pr_{T\infty}} + \frac{0.3C_p\mu_T}{\lambda\sqrt{Pr_{T\infty}}} - \left( \frac{0.3C_p\mu_T}{\lambda} \right)^2 \right) \times \left( 1 - \exp \left( - \frac{\lambda}{0.3C_p\mu_T\sqrt{Pr_{T\infty}}} \right) \right)^{-1}, \quad (5)$$

where the Prandtl number at infinity is  $Pr_{T\infty} = 0.85$ ;  $\lambda$  is conductivity.

The Kays – Crawford model is a relatively accurate model for calculating  $Pr_T$  with sufficient approximation for most types of turbulent flows limited by walls, with the exception of turbulent flow of liquid metals [48].

### Hydrodynamic modeling of fluid flow and the Navier – Stokes equation

The movement of viscous liquid substances can be described by certain partial differential equations, called the Navier – Stokes equations. For the movement of an incompressible viscous fluid with constant

density, the Navier–Stokes equation and the joint continuity equation have the form (6):

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} + \rho(\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} = \nabla \left[ -p\mathbf{I} + \mu \left( \nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T \right) \right] + \mathbf{F}, \quad (6)$$

$$\rho \nabla \cdot (\mathbf{u}) = 0,$$

where  $\mathbf{u}$  is the velocity vector of the liquid phase,  $m/s$ ;  $p\mathbf{I}$  is volume stress;  $\mu$  dynamic viscosity of the liquid,  $Pa \cdot s$ ;  $\mathbf{F}$  is the set of external forces applied to the fluid.

The Navier – Stokes equations are used to describe the physics of many phenomena. They are widely used to solve engineering problems, such as water flow in pipes and heat exchangers, flow around bodies of various geometries, as well as for scientific research purposes (ocean currents, weather modeling, movement of air masses, movement of liquids in bioreactors).

For numerical simulation of turbulent flows, a  $k$ - $\epsilon$  turbulence model and the RANS (Reynolds-Averaged Navier – Stokes) equations were used. The pulsation scale was calculated as  $0.038 \cdot d_e$ , where  $d_e$  was the hydraulic diameter,  $mm$ .

### Volumetric mass transfer coefficient $k_{La}$

The volumetric mass transfer coefficient  $k_{La}$  [ $h^{-1}$ ] is the main mass transfer characteristic of bioreactors, reflecting the rate of oxygen transfer across the phase boundary. The method of displacement followed by gassing out is widely used to determine  $k_{La}$ , [49]. This method involves removing dissolved oxygen from the liquid phase by nitrogen bubbling until the oxygen concentration in the liquid phase reaches zero. Then air or oxygen is reintroduced, and the change in oxygen concentration in the liquid is measured using polarographic or optical electrodes. The change in oxygen concentration in the liquid changes until the equilibrium concentration is reached, according to equation (7):

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C), \quad (7)$$

where  $k_L$  is the mass transfer coefficient, reflecting the diffusion rate of the substance at the phase boundary,  $m/s$ ;  $a$  is specific phase interface area,  $m^2/m^3$ ;  $C^*$  and  $C$  are equilibrium and current concentrations of dissolved oxygen,  $mg/L$ . Integrating equation (7) allows us to describe the relationship between oxygen concentration and time, assuming that  $k_L \cdot a$  remains constant (8):

$$\ln(C^* - C) = -k_L a t. \quad (8)$$

Thus, the graph of  $\ln(C^* - C)$  versus time gives a straight line, the tangent of the angle of which is equal to  $(-k_L \cdot a)$ . This method has an advantage over

the chemical method of sulfite oxidation because it can be used for fermentation media where dead cells or mycelium may be present in a concentration equal to that formed during fermentation.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Design of a bioreactor with percolation mixing

One of the criteria for choosing bioreactor equipment for scaling cultivation of microorganisms sensitive to mechanical damage is the absence of shear stresses during mixing [43, 50]. The Institute of Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences (IBP RAS) and its pilot plant developed a method for implementing such processes as well as a model of a laboratory bioreactor for their implementation [51–54]. Mixing here is carried out due to the return current of the liquid phase between two vertically fixed cylindrical containers under the action of compressed gas (air). In this case, the gas saturation of the nutrient medium occurs in the liquid film on the inner wall of the containers and on the surface of solid carriers, partially due to sparging. This mixing method is called percolation, since a solid substrate can be loaded into the container.

Thus, according to the classification of bioreactors by type of construction, a laboratory bioreactor (1.5 l) with percolation mixing is a column-type bioreactor intended for submerged and solid-phase cultivation. A simplified diagram of a bioreactor with percolation mixing is shown in Fig. 1.

**Fig. 1.** Simplified diagram of a laboratory bioreactor (1.5 l) with percolation mixing.

Φ1 — filter drier; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> — pressure regulator with pressure gauge; МБР1, МБР2 — reaction vessel; H1, H2 — diaphragm pump; ПП — pneumatic distributor block; ОГ — exhaust gases; K1, ..., K9 — normally closed pinch valves.

The movement of the liquid and gas phases is regulated by normally closed pinch valves K1–K9; The direction of liquid and gas flows is indicated by black and white triangles, respectively. МБР reaction vessels are equipped with pH, pO<sub>2</sub> and temperature sensors; the addition of titrants or nutrient medium to the reaction zone is carried out using membrane dosing pumps with an adjustable membrane volume; valve operation is regulated by 3-line 2-position normally closed pneumatic valves

The LB-1 bioreactor consists of a reaction block, a valve block, and a control station. Parts and components of the reaction vessels were made of stainless steel using mechanical processing methods. The assembly of the bioreactor components was carried out

using a threaded connection using O-rings. This type of connection was preferred because a welded joint may exhibit an increased tendency to form corrosion spots under the aggressive conditions of a biotechnological process [55, 56]. O-rings were also used between the glass shell and container lids to ensure the tightness of the reaction zone of the bioreactor. All materials are thermally stable enough to sterilize the assembled bioreactor system with live steam.

When developing the bioreactor, the principle of interchangeability was used, in which structural elements manufactured with a certain accuracy of geometric parameters are capable of performing specified functions regardless of the time and place of their manufacture.

### Determination of volume factor of mass transfer $k_{La}$ for LB-1

The volumetric mass transfer coefficient  $k_{La}$  for the laboratory bioreactor LB-1 depends on the flow rate of the liquid phase between the reaction vessels, which in turn depends on the volumetric flow rate of mixing air. This indicator can be increased by supplying a system with a liquid phase forced aeration in the flow and solid-state nozzles (Fig. 2).

**Fig. 2.** Dependence of the volumetric mass transfer coefficient  $k_{La}$  on mixing conditions in the laboratory bioreactor LB-1

Without the use of additional tools to increase mass transfer, the  $k_{La}$  coefficient for LB-1 was  $4.5 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$ , which corresponds to the indicators for a bubble column with a low volumetric flow rate of aerating air [57–59]. Adding  $0.037 \text{ m}^2$  of solid-saddle shaped nozzles into the reaction vessel contributed to an increase in the mass transfer coefficient to  $7.1 \pm 0.7 \text{ h}^{-1}$  (Fig. 2). In turn, forced aeration of the liquid phase in the duct using an ejector connector has a much smaller effect on  $k_{La}$  compared to nozzles and reaches  $6.0 \pm 0.1 \text{ h}^{-1}$ . It should also be noted that in this operating mode, there is a direct dependence of the mass transfer coefficient on the volumetric flow rate of mixing air. The highest  $k_{La}$  value, which amounted to  $8.4 \pm 0.3 \text{ h}^{-1}$ , was achieved with the simultaneous use of solid nozzles and forced aeration in intensive mixing mode.

Thus, the laboratory bioreactor LB-1 in its basic configuration, being a column-type bioreactor, provides a rather low mass transfer coefficient. However, adding additional surfaces or membrane elements to the design, as well as increasing the mixing speed and forced aeration, contribute to an increase in  $k_{La}$  values. It should be noted that the use of a mobile liquid

phase and stationary solid carriers is typical for film bioreactors, which are widely used for the cultivation of immobilized cultures [60–62].

### Immersion heat exchanger with liquid heating

To ensure the specified cultivation conditions, the reaction vessels of the laboratory bioreactor LB-1 are equipped with heat exchangers of submersible type and liquid heating (Fig. 3).

**Fig. 3.** Model of a submersible type heat exchanger with liquid heating.

a — isometric projection of the model; б — cross-section of the model.

1 — glass, 2 — body, 3 — flow extension, 4 — inlet fitting, 5 — outlet fitting, 6 — drain hole, 7 — drain fitting. Arrows indicate the direction of heat carrier flow

As can be seen from Fig. 3, the submersible heat exchanger is an assembly unit with a detachable connection that makes it possible to wash parts separately.

The effective area of the heat exchange surface of the glass is  $35 \pm 0.5 \text{ cm}^2$ , which can be expanded to  $63 \pm 0.5 \text{ cm}^2$  by adding inserts to the design. The preferred option for installing a submersible heat exchanger is a threaded connection to the base of the bioreactor vessel, which provides the largest contact area between the heat exchange surface and the liquid phase in the reaction zone.

To study the behavior of the system during thermostating, a numerical simulation of heat transfer in the LB-1 reaction vessel was carried out in static mode (Fig. 4).

**Fig. 4.** Model of the thermostating process using a submersible heat exchanger in the reaction vessel of the laboratory bioreactor LB -1 in static mode.

a — temperature gradient profile; б — change in the temperature of the model liquid at the central point of the surface layer of the liquid and at the entrance to the extended level fitting.

The volume of the reaction vessel is 1.42 L; fill factor is 75%; water is a model heated liquid (18 °C). Temperature measurement areas are indicated by marks; ambient temperature 20 °C; heat carrier temperature 31 °C; required heating temperature 28 °C; effective surface area of the heat exchanger  $62.3 \text{ cm}^2$ ; heating time 6000 s.

The measurement was carried out using a resistance thermometer ДТС 214-Pt100.A3.40/1 (OBEH®)

The Rayleigh number for the air layer above the liquid surface was  $4.36 \pm 10^{-6}$ , which corresponds to a laminar flow in which heat transfer occurs due to thermal conductivity rather than convection. Therefore, the heat transfer coefficient  $k$  (4), used in the modeling, was taken to be equal to  $2.5 \text{ W}/(\text{m}^2 \text{ K})$ , which corresponds to the thermal resistance in a thin layer of air at a temperature of 20 °C [63]. Due to the low heat transfer coefficients of the air film on the surface of the liquid phase, most of the heat enters through the effective surface of the submersible heat exchanger.

According to the results of numerical modeling, the required temperature of the liquid medium of 28 °C can be achieved in static mode in one hour. In addition, it should be noted that there is a pronounced thermal gradient, at which the temperature difference in the volume of the reaction vessel can reach 3 °C (Fig. 4, a). This non-uniformity of heat distribution is due to the presence of an extended fitting designed to maintain a given level of liquid in the reaction vessel during mixing (Fig. 1, MBP1, line K8).

To verify the resulting model, laboratory tests were carried out, during which the temperature change was determined in the center of the upper layer of the model liquid and in the least heated area at the entrance to the extended fitting (Fig. 4, б). The data obtained are consistent with the results of numerical modeling.

The time to establish the required temperature of the heated liquid at 28 °C for the model and laboratory experiment at the central point of the surface layer was  $2380 \pm 354 \text{ s}$ . However, it should be noted that for the area at the inlet to the level fitting, upon reaching a temperature of 24 °C under the conditions of a laboratory experiment, a slowdown in the heating process is observed, which may be due to the influence of the environment. A film of condensation forms on the outside of the reaction vessel walls due to the temperature difference between the ambient air and the heated liquid, which was not taken into account in the model. The time to reach the required temperature in this area under the conditions of a laboratory experiment was 3655 s versus 2550 s in the model.

Thus, the data obtained indicate sufficient efficiency of the developed submersible heat exchanger. This working unit can be used as part of a laboratory bioreactor LB-1 when carrying out biotechnological processes.

### Steam sterilizable connector for aseptic sampling

Aseptic sampling is the key to the success of the experiment in the biotechnological usage of bioreactors of various volumes. The introduction of outside microflora into the bioreactor can lead not only to in-

correct results, but also to contamination of working surfaces.

In laboratory bioreactors with a volume of 3 up to 10 l, aseptic sampling is carried out using special ports located on the wall of the reaction vessel [64]. Several samplers can be connected to such ports, the sterilization of which takes place together with the sterilization of the entire bioreactor installation [65].

For small-volume laboratory bioreactors (up to 3 L), remote vacuum samplers [66] or lines of sealed containers [67] are used. The main disadvantage of all the above sampling methods is the impossibility of repeating the sterilization procedure.

In [68], it is proposed to solve this problem by using a sterilizable T-shaped connector to connect the sampler to the bioreactor system (Fig. 5). According to the proposed scheme (Fig. 5, a), a sampler 3 and a source of sterilizing medium 4 are connected to the bioreactor vessel 1, through a T-shaped connector 2.

**Fig. 5.** Sterilizable T-connector for aseptic sampling.

a — schematic diagram of the aseptic sampling unit;  $\bar{6}$  — model of the flow of the sterilizing medium through the T-shaped connector.

1 — bioreactor container; 2 — sterilizable T-shaped connector for aseptic sampling; 3 — sampler; 4 — source of sterilizing medium; steam (120 °C) was used as a model sterilizing medium, volumetric flow 60 L/h; bore diameter of the T-shaped sterilizable connector  $\varnothing$  6 mm.

The flow of sterilizing medium (liquid or steam) and liquid sample is controlled by valves K1–K3. The direction of liquid/vapor flows is indicated by black triangles; the movement of the liquid phase is carried out using peristaltic pumps H1 and H2; in case of sterilization with live steam, the H2 pump is not used; hydrodynamic modeling corresponds to the sterilization mode (valve K1 is closed)

During normal operation of the bioreactor, all lines of the sampler system are closed by valves K1–K3. Sampling is carried out in two stages, in the first of which the unit is pre-sterilized with the valves K2 and K3 open using pump H2. After this, valves K2 and K3 are closed, while valve K1 is opened for sampling using pump H1. The advantage of this system is the ability not only to take samples, but also to replenish the substrate. Among the disadvantages, it should be noted the low efficiency of sterilization of working surfaces due to the characteristics of the flow of the sterilizing medium in the channel of the T-shaped connector (Fig. 5,  $\bar{6}$ ). In accordance with the results of hydrodynamic modeling, the imperfection of the T-shaped connector design is characterized by a decrease in the ability of the sterilizing medium to penetrate branches located at an angle to the sterilization flow line, which provokes the formation of dead

zones. At a volumetric flow rate of live steam (120°C) of 60 L/h, the minimum flow velocity of  $1.3 \cdot 10^{-6}$  m/s is observed at the junction of the T-shaped connector and the bioreactor tank. In addition, there is a zone of reduced speed in the sampler branch, which may affect the effectiveness of sterilization.

The use of a cross-shaped fitting to connect the auxiliary flow line through which the sterilizing medium is supplied can significantly reduce the risk of contamination of the reaction medium (Fig. 6, a).

**Fig. 6.** Sterilizable cross connector for aseptic sampling.

a — schematic diagram of an aseptic sampling unit using a steam-sterilizable cross-shaped connector;  $\bar{6}$  — model of the flow of the sterilizing medium through the cross-shaped connector.

1 — bioreactor container; 2 — sterilizable cross-shaped connector for aseptic sampling; 3 — sampler; 4 — source of sterilizing medium; steam is used as a model sterilizing medium (120 °C), volumetric flow 60 L/h; bore diameter of the cross-shaped connector  $\varnothing$  6 mm.

The flow of sterilizing medium (liquid or steam) and liquid sample is controlled by valves K1–K4. The direction of liquid/vapor flows is indicated by black triangles. The movement of the liquid phase is carried out using peristaltic pumps H1 and H2. In case of sterilization with live steam, the H2 pump is not used; hydrodynamic modeling corresponds to the sterilization mode (valves K1 and K2 are closed)

According to the proposed scheme (Fig. 6, a), a sampler 3 and a source of sterilizing medium 4 are connected through a cross-shaped connector 2 to the bioreactor vessel 1. In the normal operation mode of the bioreactor, all lines of the sampler system are blocked by valves K1–K4. Sampling is carried out in two stages, in the first of which preliminary sterilization of the unit is performed with valves K3 and K4 open using pump H2. After this, valves K3 and K4 are closed, while valves K1 and K2 are opened to take the sample using pump H1. It should be noted that, unlike a system with a T-shaped connector (Fig. 5, a), in this system the sampling container is connected before the start of the sterilization procedure, which significantly reduces the risk of contamination. However, as in the case of the T-shaped connector (Fig. 5,  $\bar{6}$ ), the cross-shaped connector is ineffective because there are zones of zero velocity in the liquid phase ( $5.8 \cdot 10^{-6}$  m/s).

To solve this problem, a sterilizable cross-shaped connector with a special cross-section was developed, which ensures an increase in the penetrating ability of the sterilizing medium (Fig. 7) [69].



**Fig. 7.** Cross connector with partition for aseptic sampling.

a — longitudinal section; б — model of the flow of the sterilizing medium.

1 — body; 2 — main line fitting (from the bioreactor to the sampler); 3 — channels of the main line; 4 — channels of the auxiliary sterilizing line; 5 — guide partition.

The model sterilizing medium is steam (120 °C), volumetric flow of 60 L/h.

Diameters: flow section of the sterilizing line  $\varnothing$  6 mm, working line  $\varnothing$  6 mm, guide lines separated by a partition  $\varnothing$  3.2 mm. Hydrodynamic modeling corresponds to the sterilization mode (Fig. 6, a, valves K1 and K2 are closed)

This approach implies the presence of a partition inside the cross, which redirects the flow towards the auxiliary sterilizing line (Fig. 7, a). According to the results of hydrodynamic modeling, the maximum speed of the sterilizing medium is observed in the area where the flow turns into the channels of the main line and is 4.9 m/s, which is two times more than for the T-shaped and cross-shaped connectors (Fig. 5, б, and 6, б). This feature is explained by a twofold decrease in the diameter of the flow section from 6 mm to 3.2 mm. It should be noted that the region of minimum speed ( $7.2 \cdot 10^{-4}$  m/s) is located in the middle of the partition on the axis of the inlet flow. A similar cone-shaped area is observed on the opposite side of the partition. Since the movement of the sterilizing medium in them is reduced, these areas constitute a “parasitic” volume. Due to the fact that the cross-shaped connector with a partition is made of rolled stainless steel of round cross-section using mechanical processing methods, this volume was replaced by a structural element (Fig. 8).

**Fig. 8.** Modified cross connector with partition for aseptic sampling.

a — longitudinal section; б — model of the flow of the sterilizing medium.

1 — body; 2 — main line fitting (from the bioreactor to the sampler); 3 — channels of the main line; 4 — channels of the auxiliary sterilizing line; 5 — guide partition; 6 — trapezoidal flow divider.

The model sterilizing medium is steam (120 °C), volumetric flow of 60 l/h.

Diameters: flow section of the sterilizing line  $\varnothing$  6 mm, working line  $\varnothing$  6 mm, guide lines separated by a partition  $\varnothing$  3.2 mm. Hydrodynamic modeling corresponds to the sterilization mode (Fig. 6, a, valves K1 and K2 are closed)

The trapezoidal element is located in the middle of the guide partition and serves as a divider for the inlet

flow of the sterilizing medium and its uniform distribution into the channels of the main line. The minimum flow velocity is 0.001 m/s and is observed at the divider site (Fig. 8, б). It should also be noted that the addition of this structural element to the lumen of the main line channels does not affect the flow rate profile of the sterilizing medium.

As mentioned above, this connector can be used not only for sampling but also for adding culture media and titrants into the reaction vessel of the bioreactor. To determine the influence of the trapezoidal divider on the profile of the liquid phase flow rates in the substrate feeding mode, hydrodynamic modeling was carried out (Appendix, Fig. II).

According to the results of hydrodynamic modeling, the depth of penetration of the liquid phase into the branch of the auxiliary sterilizing line for a connector with a trapezoidal divider is greater than for a connector with a smooth partition (Appendix, Fig. II). The maximum flow rate of the liquid phase when passing through this structural element is  $1.37 \cdot 10^{-5}$  m/s, which is 1.4 times more than for a smooth channel ( $9.18 \cdot 10^{-6}$  m/s). It can be concluded that the use of a cross-shaped connector with a trapezoidal divider helps to reduce the volume of the stagnant zone formed in the auxiliary sterilizing line when operating the main line.

## CONCLUSION

This work presents a developed small-volume laboratory bioreactor LB-1 (1.5 L) with percolation mixing. This type of mixing ensures the nutrient medium saturation with gases, mainly in the liquid film on the inner surface of containers, and also partly due to bubbling. Each unit volume of mixed liquid passes through critical turbulence points in the connecting line, which ensures a high degree of homogeneity of the medium without the formation of shear stresses characteristic of turbine and blade mixers. Therefore, this approach is applicable for cultivating microorganisms that are sensitive to mechanical stress, as well as for immobilized washed cultures.

The presented bioreactor is assembled using a detachable threaded connection, which allows the use of a set of necessary parts and assemblies to perform a specific biotechnological task for scientific, practical and educational purposes and also makes it possible to mobilely replace or add structural elements while maintaining the current functional level.

## Appendix

**Fig. II.** Hydrodynamic modeling of liquid phase flow through a cross-shaped sterilizable connector with a partition in substratum feeding mode.

a — connector with a smooth partition;

б — connector with a partition and a trapezoidal flow divider.

Velocity profiles of the liquid phase correspond to the cross sections of the inlet flow at a distance of  $\pm 4$  mm from the axis of the main line fitting to the plane of the inlet of the auxiliary sterilizing line in increments of 1 mm.

The model liquid phase is water (20 °C), volume flow 10 mL/min. Hydrodynamic modeling corresponds to the sampling/substrate feeding mode (Fig. 6, a, valves K3 and K4 are closed)