

На правах рукописи

Сафаров Руслан Рафиг оглы

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ГИДРОДИНАМИКИ И МАССООБМЕНА В
ПОЛОВОЛОКОННОМ МЕМБРАННОМ БИОРЕАКТОРЕ (НА ПРИМЕРЕ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ)**

05.17.08 - Процессы и аппараты химических технологий

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре кибернетики химико-технологических процессов ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Меньшутина Наталья Васильевна, профессор кафедры кибернетики химико-технологических процессов ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева»

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Липин Александр Геннадьевич, заведующий кафедрой процессов и аппаратов химической технологии ФГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет»

кандидат технических наук, доцент
Ключников Андрей Иванович, доцент кафедры машин и аппаратов пищевых производств ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Ведущая организация: **ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет»**

Защита состоится «29» декабря 2016 года в 11.00 на заседании диссертационного совета Д 212.204.03 при РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047, г. Москва, Миусская пл., 9) в конференц-зале университета (ауд. 443)

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева и на сайте <http://diss.muctr.ru>

Автореферат диссертации разослан «__» ноября 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 212.204.03

Женса А.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы: В настоящее время вопросам совершенствованию аппаратного оформления химико-технологических и биотехнологических процессов придается большое значение. Большое внимание уделяется созданию эффективных технологических схем и производств на основе использования новых современных машин и аппаратов. Одним из таких современных аппаратов является мембранный биореактор, использование которого позволяет проводить химические, фармацевтические и биологические продукты, поэтому актуальным является исследование гидродинамики, тепло- и массообменных процессов, протекающих в нем. Применение половолоконного мембранного биореактора позволяет достичь высокой плотности клеток и высокой объемной производительности при отсутствии сильного гидродинамического воздействия на клетки.

Использование математического моделирования для исследований биотехнологических микрообъектов позволяет анализировать и прогнозировать характеристики химико-биологических систем для получения представления о процессах и явлениях, происходящих внутри аппарата. Кроме того, актуальной задачей является построение электронной модели, которую легко модернизировать под задачи масштабирования реактора и под разные типы клеток млекопитающих, а также минимизировать затраты на использование питательной среды и энергосбережение.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках базовой части государственного задания.

Целью диссертационной работы является математическое моделирование половолоконного мембранного биореактора для культивирования клеток млекопитающих.

Для достижения заданной цели поставлены следующие научно-технические задачи:

1. Проведение экспериментальных исследований культивирования клеток млекопитающих на примере культуры клеток Chinese Hamster Ovary (CHO) в половолоконном биореакторе и моделирование кинетических зависимостей.
2. Анализ возможности использования вычислительной гидродинамики (CFD) для расчета гидродинамики потоков в мембранных биореакторах. Выбор геометрии сетки для оптимизации времени расчетов и точности решения.
3. Математическое моделирование гидродинамики потоков в половолоконном мембранном биореакторе при помощи CFD (20 волокон).
4. Проведение вычислительного эксперимента по модели с целью определения оптимального способа подачи питательной среды во внутриволоконное пространство (ВП) и его выбор на основе оценки энергоэффективности процесса.
5. Анализ возможности противоточного и прямоточного режимов подачи питательной среды в межволоконное пространство (МП).
6. Создание технологической схемы процесса культивирования клеток в мембранном биореакторе.

7. Проведение масштабирования процесса в большем по размеру полволоконном биореакторе (60 волокон).

Научная новизна:

Разработана математическая модель полволоконного мембранного биореактора, позволяющая исследовать гидродинамику движения жидкости во внутриволоконном и межволоконном пространствах, процесс микрофильтрации через мембрану с учетом увеличения числа клеток на ее поверхности. Получены эпюры распределения скоростей и давления в каждой точке аппарата. Доказана применимость модели Ферхюльста для расчета кинетики роста клеток СНО, которая была использована для описания процессов массопереноса в биореакторе.

Исследованы разные способы подачи питательной среды во внутриволоконное и межволоконное пространства биореактора. Предложены прямоточный способ подачи питательной среды в межволоконное пространство и экспоненциальная зависимость подачи питательной среды во внутриволоконное пространство.

Проведен выбор геометрии сетки для оптимизации времени расчетов. Доказана применимость и масштабируемость модели полволоконных мембранных биореакторов с различным количеством волокон.

Создана электронная модель, в которой возможна визуализация процессов гидродинамики, массопереноса и кинетики роста клеток на мембране в реакторе.

Практическая значимость:

Разработана программа расчета полволоконного мембранного биореактора для культивирования клеток млекопитающих, позволяющая исследовать режимы работы, выбрать наиболее оптимальный с учетом энергозатрат. Разработанная программа может быть использована как в проектных и научных организациях, так и в университетах для обучения магистров.

Для культуры клеток СНО подобран оптимальный режим работы биореакторов полволоконного типа различного масштаба с использованием расчётов по математической модели. Оценена энергоэффективность при различных способах подачи питательной среды во ВП. Проведен анализ способа подачи питательной среды в МП полволоконного биореактора.

Создана технологическая схема процесса культивирования клеток млекопитающих в полволоконном мембранном биореакторе и собрана лабораторная установка, позволяющая соблюдать требуемые условия культивирования, с учетом экономии питательной среды.

Методология и методы исследования:

Для достижения целей диссертационной работы были использованы: методики по измерению кинетики роста клеток СНО, определению концентрации основных компонентов культуральной жидкости; метод сканирующей электронной микроскопии для определения пористости полволоконных мембран; метод математического моделирования с использованием механики сплошных сред; метод конечных объемов; методы и инструменты графического и численного анализа полученных результатов, включающие графическое представление полей

векторов и построение профилей различных характеристик потока на произвольных поверхностях.

На защиту выносятся:

- Экспериментальные исследования кинетики роста клеток СНО и математическое описание кинетики с использованием модели Ферхюльста.
- Математические модели гидродинамики потоков питательной среды в половолоконном мембранном биореакторе, являющиеся основой моделирования движения жидкости во внутриволоконном и межволоконном пространствах биореактора.
- Вычислительный эксперимент и результаты математического моделирования для биореактора с 20-ю половолоконными мембранами: визуализация гидродинамической обстановки в половолоконном биореакторе на разных этапах культивирования; анализ способов подачи питательной среды во ВП и сравнение их энергоэффективности; рекомендации по способу подачи потока питательной среды в МП относительно потока во ВП; зависимости изменения расхода питательной среды в половолоконном биореакторе и численные рекомендации по объемным расходам для биореакторов различного масштаба.
- Масштабирование процесса культивирования клеток млекопитающих.
- Технологическая схема и экспериментальная лабораторная установка для культивирования клеток млекопитающих в половолоконном биореакторе.

Обоснованность и достоверность полученных результатов:

Применена процедура итеративной адаптации расчетной сетки, позволяющая добиться независимости решения системы уравнений математической модели численными методами от топологии и структуры расчетной сетки. Проведена проверка адекватности разработанной математической модели с использованием лабораторных исследований, включающих в себя современные средства аналитического измерения параметров экспериментальных исследований (ВЭЖХ, автоматический счетчик плотности клеточной культуры, сканирующая электронная микроскопия), высокоточные датчики регистрации основных показателей процесса культивирования (концентрации растворенного кислорода, CO_2 , температуры, pH).

Апробация:

Результаты исследований представлены на различных Международных и Всероссийских научных конференциях, среди которых: Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014г.), Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии» (Москва, 2016г.), 10, 11 Международные конгрессы молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, 2014 г., 2015г.), 21 Международный конгресс химико-технологических процессов CHISA (Прага, Чехия, 2014), 10 Европейский конгресс по химической технологии и прикладной биотехнологии (Ницца, Франция, 2015г.).

Личный вклад автора:

Автор принимал непосредственное участие в сборке лабораторной установки, проведении

и планировании экспериментальных исследований, аналитическом анализе полученных результатов исследования, составлении математической модели для описания кинетики роста клеток и движения потоков внутри биореактора, компьютерных вычислениях и масштабировании полуволоконного мембранного биореактора.

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 работы в ведущих рецензируемых журналах, определенных Высшей аттестационной комиссией.

Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка условных обозначений, списка литературы из 131 наименований. Общий объем составляет 182 страницы печатного текста, включая 24 таблицы, 84 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении отражена и обоснована актуальность исследований, приведены цели и задачи, научная новизна, практическая значимость работы, ее апробация, используемые методология и методы исследований, сформулированы положения, выносимые на защиту.

В первой главе проведен анализ научно-технической литературы. Рассмотрены основные типы биореакторов для культивирования клеток млекопитающих (суспензионных и адгезивных), в том числе мембранные биореактора промышленного и лабораторного масштабов. Отдельно рассмотрены аспекты математического моделирования процесса культивирования клеток в биореакторах, кинетические модели роста клеток, особенности моделирования роста клеток на подложках, а также некоторые методы составления моделей биореакторов в целом.

По результатам анализа литературы были поставлены цель и задачи, определена стратегия исследований, отраженная на рисунке 1, и создана база данных по биореакторам.



Рисунок 1 – Стратегия исследования и моделирования полуволоконного мембранного биореактора

Во второй главе в качестве объекта исследования использовали клетки постоянной линии, полученной на материале клеток СНО, как одной из наиболее распространенных в исследовательских работах.

Представлена собранная лабораторная установка для культивирования клеток, основными элементами которой являются полволоконный биореактор, автоклавируемый сосуд с питательной средой, рабочая камера, термостатируемый шкаф, блок управления, блок перистальтических насосов. Полволоконный биореактор состоит из цилиндрического корпуса, в котором расположены полые мембранные волокна. Пространство внутри реактора разделяют на две части: межволоконное пространство (МП) и внутриволоконное пространство (ВП) (рисунок 2).

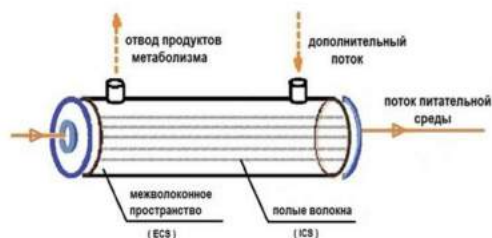


Рисунок 2 – Схематичное изображение полволоконного мембранного биореактора

При культивировании клеток млекопитающих используют следующий принцип действия (рисунок 2): верхние патрубки в корпусе биореактора используют для размещения клеток в МП, для отвода метаболитов и, при необходимости, для подачи дополнительного потока среды; во фронтальные патрубки биореактора во ВП поступает основной поток питательной среды, часть которого проходит сквозь поры в волокнах (пермеат) для обеспечения питания клеток (рисунок 3), оставшаяся часть среды выходит из биореактора и после дополнительной обработки возвращается обратно в биореактор. Исследуемый полволоконный биореактор является лабораторным и используется чаще всего в научно-исследовательских центрах для изучения процессов роста и размножения клеток адгезивного типа.

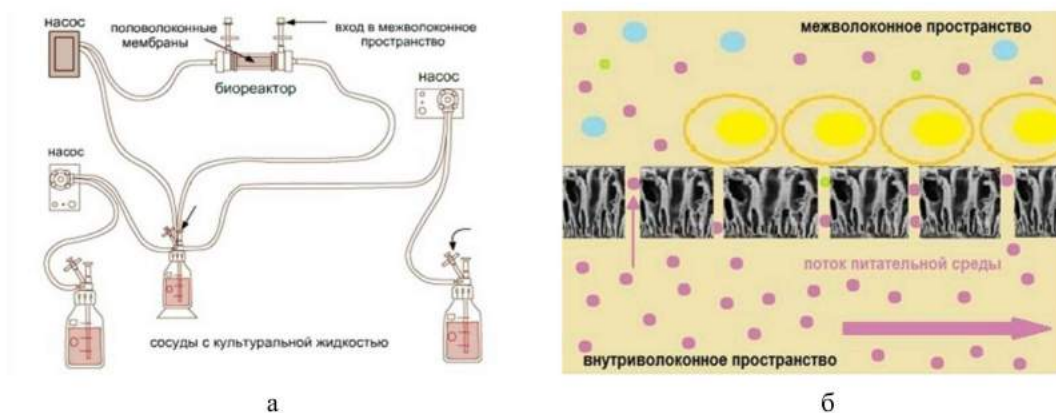


Рисунок 3 – Схема подключения полволоконного биореактора (а) и принцип разделения компонентов культуральной жидкости относительно мембраны полволоконного биореактора(б)

Параметры исследуемого биореактора, указанные производителем в паспорте аппарата, сведены в таблицу 1.

Для изучения кинетики роста клеток был проведен эксперимент по культивированию клеток СНО в чашках Петри в ФГБУН Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Длительность эксперимента составляла 6 суток. Клетки культуры СНО помещали в 6 чашек с 7 мл ростовой питательной среды DMEM/F-12 каждая. Исходное количество клеток в каждой чашке — $2 \cdot 10^5$. Каждые сутки из одной из культуральных чашек проводили отбор проб для исследования количества клеток и концентрации глюкозы в питательной среде. В таблице 2 сведены данные, полученные из эксперимента.

Для исследования пористости полволоконной мембраны использовался метод сканирующий электронной микроскопии в Центре коллективного пользования (РХТУ им. Д.И. Менделеева). Были получены увеличенные изображения пористой структуры волокна

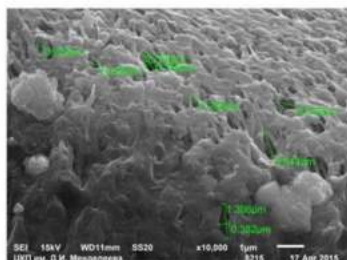


Рисунок 4 – СЭМ: поверхность полволоконной мембраны

В результате сделан вывод о наличии пор, средний размер которых составляет 0,7 мкм, и определено количество пор на единицу поверхности мембраны.

В третьей главе разработана модель полволоконного мембранного биореактора с использованием вычислительной гидродинамики. Решение поставленной задачи с помощью современных программных пакетов, реализующих методы и принципы вычислительной гидродинамики, было разделено на несколько этапов. Каждый из этапов в той или иной мере оказывает влияние на точность и достоверность получаемых результатов. В ходе выполнения указанных этапов была сформирована система уравнений, описывающих процессы, протекающие в полволоконном мембранном биореакторе, созданы электронные геометрические модели исследуемой системы, сгенерирована расчётная сетка, необходимая для численного решения системы уравнения с использованием метода конечных объёмов, разработана стратегия численного решения и мониторинга процесса решения, проведена конфигурация расчётного модуля, проведены визуализация и анализ полученных результатов расчёта.

Таблица 1 – Параметры исследуемого полволоконного мембранного биореактора

Количество волокон, шт	20
Диаметр ВП, мкм	700
Диаметр МП, мкм	1300
Толщина стенки, мкм	300
Длина мембранного волокна, см	11
Диаметр корпуса, мм	13
Длина корпуса, см	13

Таблица 2 – Зависимость концентрации глюкозы в питательной среде от количества клеток

Время, сутки	Концентрация глюкозы, ммоль/л	Количество клеток, шт
0	29,70	$2,00 \cdot 10^5$
1	29,00	$2,73 \cdot 10^5$
2	28,20	$6,75 \cdot 10^5$
3	26,20	$1,50 \cdot 10^6$
4	25,40	$2,91 \cdot 10^6$
5	21,16	$5,33 \cdot 10^6$
6	14,13	$6,50 \cdot 10^6$

При разработке модели были приняты следующие допущения:

- 1) жидкость вязкая и несжимаемая; 2) вязкость жидкости постоянна; 3) поры мембраны расположены перпендикулярно поверхности волокна, имеют цилиндрическую форму, размеры пор одинаковы; 4) поры распределены равномерно по поверхности волокна; 5) проницаемость мембраны зависит только от количества пор, свободных от клеток; 6) клетки заполняют поверхность мембраны равномерно; 7) поток питательной среды обеспечивает клетки питательными веществами с избытком; отсутствует концентрационная поляризация; 8) волокна параллельны друг другу; 9) клетки, прикрепленные к поверхности, имеют форму полусферы; 10) линейные размеры всех клеток одинаковы.

Математическая модель – это система дифференциальных уравнений, включающих уравнения материального баланса и уравнения движения, записанные для двух зон: внутриволоконной и межволоконной; и дополненные начальными, граничными условиями и дополнительными соотношениями, которые учитывают переток питательной среды через мембрану, и жизнедеятельность клеток (таблица 3).

Таблица 3 – Уравнения математической модели мембранного биореактора

Внутриволоконное пространство	
Уравнения модели	Начальные и граничные условия
$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \rho}{\partial t} + \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = -J \\ \frac{\partial \rho v_x}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_x}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_x}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial x} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) + \rho g \\ \frac{\partial \rho v_y}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_y}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial z^2} \right) \\ \frac{\partial \rho v_z}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_z}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_z}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial z} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) \end{array} \right.$	$\begin{array}{l} \vec{v}(t=0) = \vec{v}_{01} \\ \rho(t=0) = \rho_{01} \\ \vec{v}(x_{ст}, y_{ст}, z_{ст}) = 0 \\ \vec{v}(x_{вх}, y_{вх}, z_{вх}) = \vec{v}_{вх} \\ P(x_{вых}, y_{вых}, z_{вых}) = \\ = P_{вых} \end{array}$
Межволоконное пространство	
Уравнения модели	Начальные и граничные условия
$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial \rho}{\partial t} + \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = I + J \\ \frac{\partial \rho v_x}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_x}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_x}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_x}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial x} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_x}{\partial z^2} \right) + \rho g \\ \frac{\partial \rho v_y}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_y}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_y}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_y}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_y}{\partial z^2} \right) \\ \frac{\partial \rho v_z}{\partial t} + v_x \rho \frac{\partial v_z}{\partial x} + v_y \rho \frac{\partial v_z}{\partial y} + v_z \rho \frac{\partial v_z}{\partial z} = -\frac{\partial P}{\partial z} + \mu \left(\frac{\partial^2 v_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v_z}{\partial z^2} \right) \end{array} \right.$	$\begin{array}{l} \vec{v}(t=0) = \vec{v}_{02} \\ \rho(t=0) = \rho_{02} \\ \vec{v}(x_{ст}, y_{ст}, z_{ст}) = 0 \\ \vec{v}(x_{вх2}, y_{вх2}, z_{вх2}) = \\ = \vec{v}_{вх} \\ P(x_{вых}, y_{вых}, z_{вых}) = \\ = P_a \end{array}$

Дополнительные соотношения	
$J = \begin{cases} \frac{\varepsilon r_n^2 S \rho \Delta P}{8 \mu \delta \Delta L} \\ 0, \text{ при } x \neq x_{m1}, y \neq y_{m1}, z \neq z_{m1} \end{cases}$	$; I = \int_1^N (q^c(t) - q^m(t)) dt;$

где ρ – плотность среды, кг/м³; v_x, v_y, v_z – скорости среды вдоль осей, м/с; g – ускорение свободного падения м/с²; J – поток массы, переходящий из внутриволоконного пространства в межволоконное через мембрану, кг/м²·с; P – давление, Па; μ – динамическая вязкость, Па·с; t – время, с; x, y, z – координаты, м; ε – количество пор на единицу поверхности мембраны, 1/м²; r_n – средний радиус пор, м; S – площадь поверхности мембраны, м²; δ – показатель кривизны пор; L – толщина мембраны, м; N – число клеток; q^c – расход питательной среды, потребляемый одной клеткой, м³/с; q^m – расход метаболитов, выделяемых одной клеткой, м³/с.

Давление среды на выходе из межволоконного пространства биореактора для исследуемой системы составляет 101325 Па.

Для решения системы уравнений модели в работе был применён метод конечных объёмов, реализованный в программном пакете ANSYS Fluent. Для использования этого метода была построена трёхмерная расчётная сетка, состоящая из тетраэдрических элементов. Процесс построения расчётной сетки состоял из двух этапов: этап создания первичной расчётной сетки (выполнялся однократно) и этап адаптации расчётной сетки (выполнялся в несколько итераций). На рисунках 5 (а и б) показаны первичные расчётные сетки для отдельно взятой половолоконной мембраны и для всего биореактора соответственно. Первичная расчётная сетка биореактора имеет более высокую плотность возле половолоконных мембранных элементов, так как именно эта область представляет наибольший интерес.

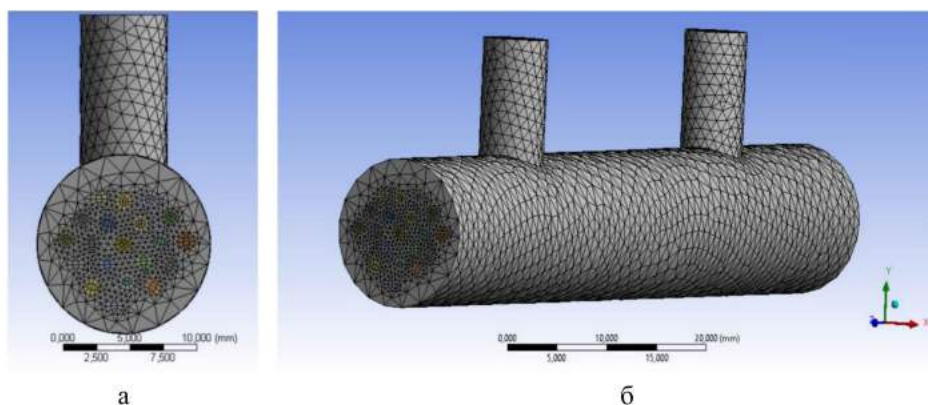


Рисунок 5 – Расчётная сетка биореактора: а – вид сбоку; б – под углом 45°

Поверхности, прилегающие к зонам с повышенной плотностью сетки, разбивались на треугольные элементы с шагом 0,4 мм. Поверхности, прилегающие к зонам с пониженной

плотностью, разбивались также на треугольные элементы с шагом 0,8 мм. Общее количество полученных тетраэдрических элементов первичной сетки биореактора составило 837422.

Далее проводилась адаптация расчётной сетки с целью получения максимально возможной точности решения для разработанной математической модели и выбранных численных методов, а также для обеспечения независимости результатов решения от топологии расчётной сетки. В результате адаптации расчётной сетки было получено решение с максимально возможной точностью, независящей от топологии сетки, и при этом уменьшено время, затраченное на проведение расчёта. Решение уравнений модели осуществлялось с использованием метода конечных объёмов путем пространственной дискретизации уравнений.

В четвертой главе для определения необходимых объемных расходов питательной среды, подаваемых внутрь биореактора, была разработана схема расчета, включающая расчет гидродинамики внутри одного волокна и в биореакторе в целом, представленная на рисунке 1. На основании экспериментальных данных кинетика роста клеток была описана при помощи дифференциального уравнения Ферхюльста:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{K}\right), \quad (1)$$

где N - количество клеток в момент времени t , штуки; t - время культивирования, сутки; μ - удельная скорость роста клеток, сутки⁻¹, K – емкость популяции (параметр, характеризующий предельную численность популяции). $\mu = 0,89$ сутки⁻¹ и $K = 1,80 \cdot 10^7$.

С использованием начальной концентрации глюкозы (как основного компонента питательной среды), данных по изменению ее концентрации во времени в процессе роста клеток и исходного количества среды в чашке Петри было получено значение расхода питательной среды, требуемое для одной клетки. С учетом площади поверхности всех мембранных волокон, заполняемых клетками, для биореактора с 20-ю волокнами было определено время его полного заполнения клетками (8 суток). На основании вышеизложенного были получены значения необходимого объемного расхода пермеата для каждых суток, достаточного для обеспечения всех процессов жизнедеятельности клеток (таблица 4).

Расчет потока сквозь мембрану (потока пермеата) был проведен на основе уравнений Хагена-Пуазейля и Дарси. Коэффициент проницаемости мембраны был рассчитан на основе выражения:

$$\alpha = \frac{n\pi r_n^4}{S_{\text{вол}} 8\varphi}, \quad (2)$$

где α – коэффициент проницаемости мембраны, м²; r_n - радиус поры, м; ρ – плотность жидкости, кг/м³; φ - извилистость пор, n - количество пор.

Таблица 4 – Результат расчета необходимого объемного потока пермеата

Время, сутки	Количество клеток, штук	Необходимый объемный поток пермеата, л/ч
0	450000	0,013
1	1021165	0,029
2	2307265	0,066
3	5136867	0,148
4	11072204	0,313
5	22303858	0,634
6	39595843	1,127
7	58345336	1,656
8	72070260	2,048

На основании условия постепенного заполнения поверхности мембраны клетками и, соответственно, забивки пор были рассчитаны предельные значения проницаемости для случаев минимального количества клеток на мембране (или клетки отсутствуют) (коэффициент проницаемости максимален) и максимального количества клеток на мембране (коэффициент проницаемости минимален):

$$\alpha_{max} = 4,8 \cdot 10^{-15} \text{ м}^2; \alpha_{min} = 8,3 \cdot 10^{-17} \text{ м}^2.$$

На рисунке 6 представлена модель геометрии одной мембраны и 20-ти мембран в биореакторе.

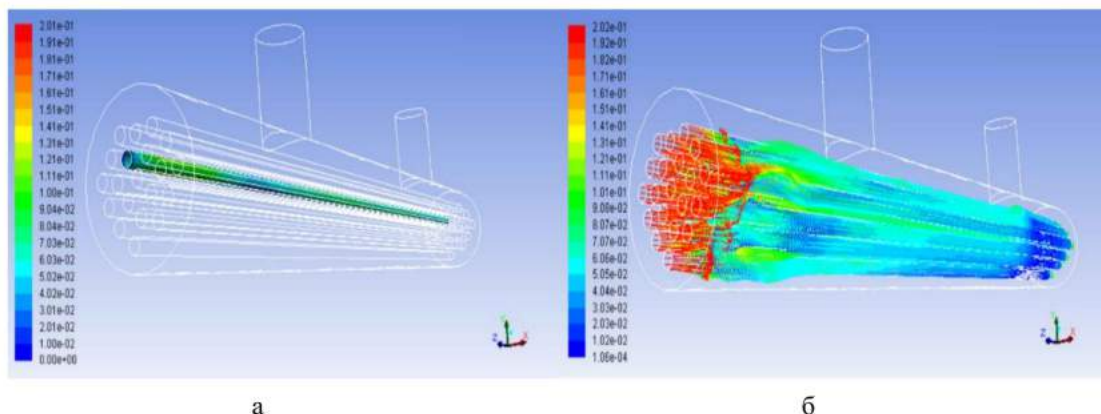


Рисунок 6 – Моделирование гидродинамики в полволоконной мембране, распределение скоростей: а – контурное (выделена одна мембрана); б – векторное (отражено 20 мембран)

Выбор режима подачи питательной среды во внутриволоконное пространство

Для определения наиболее оптимального режима подачи питательных веществ на вход во внутриволоконное пространство биореактора были проанализированы три режима подачи питательной среды:

- 1) максимально возможный расход на протяжении всего времени культивирования;
- 2) ступенчатая система подачи потока через определенные промежутки времени (3 значения) в течение культивирования;
- 3) плавное посуточное увеличение значения потока питательной среды.

Режим 1. На основании рекомендации производителя максимальный расход питательной среды на вход в ВП составил 12 л/ч (рисунок 7 а), полученные значения объемного расхода пермеата приведены на рисунке 7 б.

При сравнении зависимости объемного расхода пермеата от времени (рисунок 7 б) и требуемых рассчитанных расходов (таблица 4) видно, что на протяжении всего времени культивирования клеткам хватает с избытком питательной среды. Таким образом, питательной среды расходуется больше, чем необходимо.

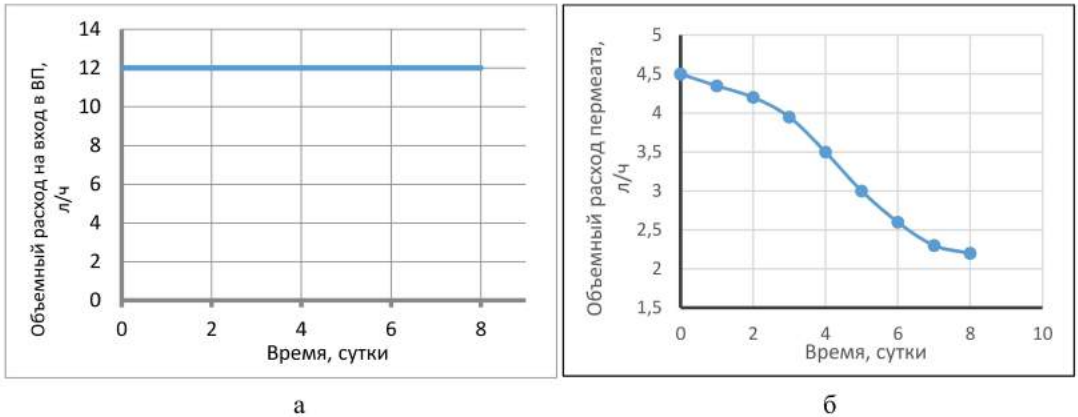


Рисунок 7 – Режим 1: а – изменение объемного расхода на входе в ВП биореактора от времени; б – изменение объемного расхода пермеата с течением времени

Режим 2. Во втором режиме питательная среда подавалась на вход во ВП при трех разных расходах, находящихся в пределах, указанных производителем биореактора в спецификации – 4 л/ч, 8 л/ч, 12 л/ч. По результатам расчетов было необходимо получить зависимость объемного расхода пермеата от коэффициента проницаемости мембраны при каждом из трех расходов среды на вход во ВП, по которой в дальнейшем был рассчитан удельный объемный поток питательной среды клеткам в различные моменты времени процесса.

С использованием минимального расхода пермеата для одной половолоконной мембраны (таблица 3) было рассчитано время, за которое поток пермеата достигнет требуемого значения для каждого из трех расходов (рисунок 8 а и б). Зависимость объемного расхода на входе во внутриволоконное пространство в данном случае имеет ступенчатый вид (рисунок 8 а).

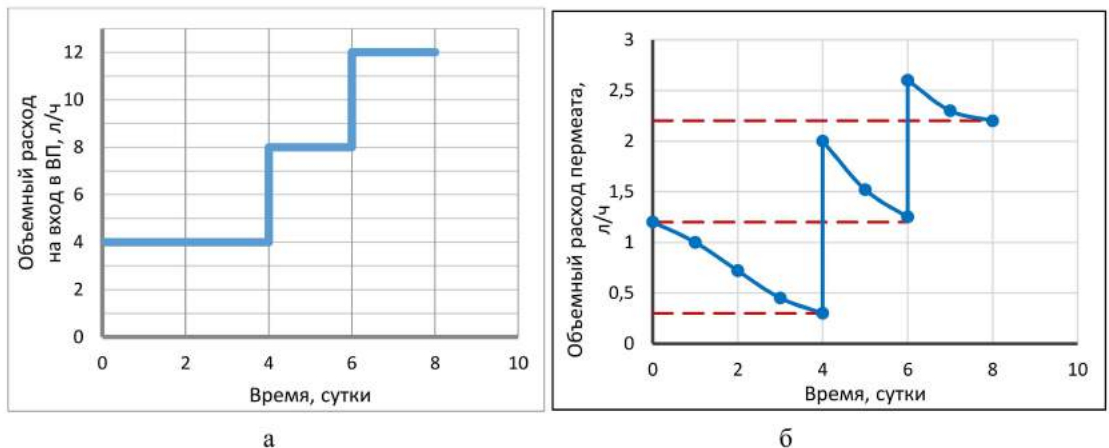


Рисунок 8 – Режим 2: а – изменение объемного расхода потока на входе в ВП от времени; б – изменение объемного расхода пермеата (оранжевым цветом указаны минимально допустимые значения расхода)

Режим 3. Значение объемного расхода, который требуется подать на вход во ВП биореактора для обеспечения рассчитанного значения расхода пермеата, было определено с

помощью программного комплекса ANSYS Fluent. Распределение векторов скоростей вдоль полволоконной мембраны показано на рисунке 9.

Анализируя скоростное распределение потока, необходимо отметить значительное уменьшение скорости потока во ВП по длине волокна. Это объясняется достаточно свободным прохождением питательной среды сквозь мембрану в начальный момент времени, и, соответственно, высокой проницаемостью волокна в связи с минимальным количеством клеток на его поверхности. В связи с этим, значительное количество потока питательной среды проникает сквозь поры, не достигая середины длины волокна.

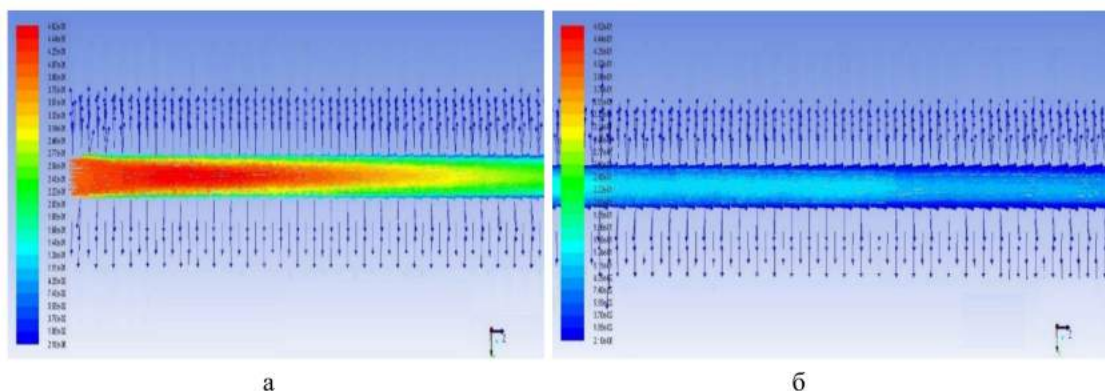


Рисунок 9 – Режим 3: векторное распределение скоростей потока вдоль полволоконной мембраны в начальный момент времени: а – на входе потока во ВП; б – на выходе из ВП

С учетом количества клеток, выросших по истечении каждых суток, были получены значения объемного расхода на входе в ВП биореактора. Таким образом, была получена эмпирическая зависимость, по которой можно определить расход питательной среды на вход в биореактор (в л/ч): $Q_1 = 1,12 \cdot e^{0,012t}$ л/ч (рисунок 10).

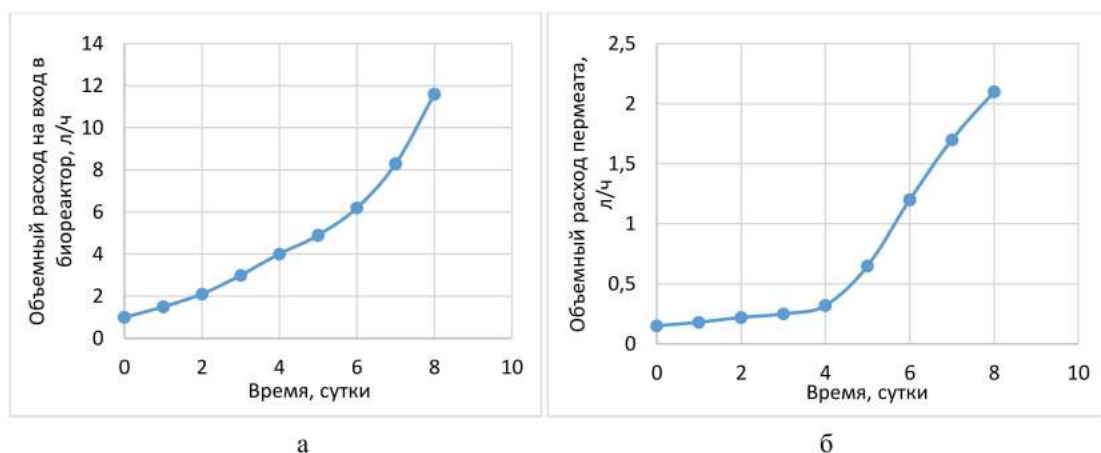


Рисунок 10 – Режим 3: а- зависимость изменения объемного расхода потока на вход в ВП; б – изменение объёмного расхода пермеата

Расчет энергоэффективности

Оценка наиболее оптимального режима подачи питательной среды во внутриволоконное пространство была проведена на основе расчета энергоэффективности экспериментальной установки, основными элементами, потребляющими электроэнергию, которой являются: рабочая камера, автоклавируемый сосуд, перистальтические насосы и воздушный компрессор. Стоимость процесса D , затраченная на работу установки, рассчитывается по формуле: $D = C \cdot P_{\text{общ}} \cdot \tau_i$, где C - стоимость одного кВт·ч, руб; $P_{\text{общ}}$ - затрачиваемая мощность элементов установки, кВт; τ_i - время работы установки, ч. $P_{\text{общ}} = P_{\text{меш}} + P_{\text{комп}} + P_{\text{нагр}} + P_{\text{нас}}$; $P_{\text{меш}}, P_{\text{комп}}, P_{\text{нас}} = f(Q_1)$; $P_{\text{нагр}} = \text{const}$.

На основании расчетов было показано, что среди предложенных способов наиболее энергоэффективным является режим 3, при котором общая стоимость процесса по сравнению с двумя другими режимами была снижена на 30%.

Моделирование гидродинамики в межволоконном пространстве (МП) биореактора

Моделирование гидродинамики в МП биореактора велось с учетом поглощения клетками питательной среды и отводом продуктов метаболизма.

В зависимости от количества клеток, выросших к текущему моменту времени, путем учета процента заполнения клетками волокон была получена зависимость для определения необходимого расхода среды в МП биореактора с течением времени. Расчет гидравлических потерь давления в МП с учетом особенностей процесса был проведен аналогично варианту для потока, который обтекает параллельный пучок труб. Рассчитаны смоченный периметр, расстояние между волокнами, критерий Рейнольдса.

На основе конструктивных особенностей проектируемого половолоконного биореактора возможны два способа подачи питательной среды в межволоконное пространство относительно основного потока внутри волокон: прямоточный и противоточный. Расчет скоростного распределения питательной среды был произведен для обоих способов организации процесса (рисунок 11).

На основании расчетов, был выбран прямоточный режим как наиболее рациональный с точки зрения распределения потоков питательной среды. Кроме того, была оценена адекватность модели мембранного биореактора, относительная ошибка составила 10,5%. Таким образом, используемая модель достаточно точно описывает гидродинамическую обстановку и кинетику роста клеток в биореакторе.

В пятой главе проведен расчет для реактора большего объема с 60-ю половолоконными мембранами. Технические характеристики биореактора указаны в таблице 5, модель геометрии представлена на рисунке 12. Расчетная сетка биореактора с 60-ю волокнами содержит 12 млн. ячеек с минимальным размером ячейки в зоне повышенной плотности сетки, равным 0,1 мм.

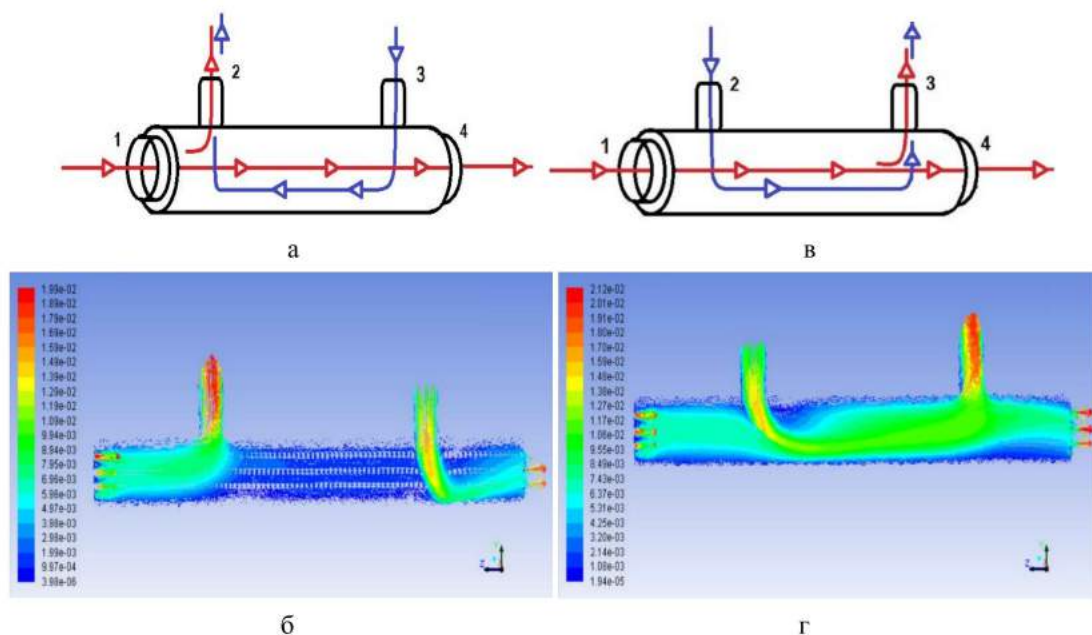


Рисунок 11 – Способы подачи питательной среды (схема движения потоков - а, в; результаты расчета – б, г): а, б – противоточное движение; в, г- прямоточное движение

Таблица 5 – Параметры исследуемого
половолоконного мембранного
биореактора

Геометрический параметр	Размер
Количество волокон, шт	60
Диаметр внутриволоконного Пространства мембраны, мкм	700
Диаметр мембраны внешний, мкм	1300
Толщина стенки, мкм	300
Длина мембранного волокна, см	11
Диаметр корпуса, мм	22
Длина корпуса, см	13

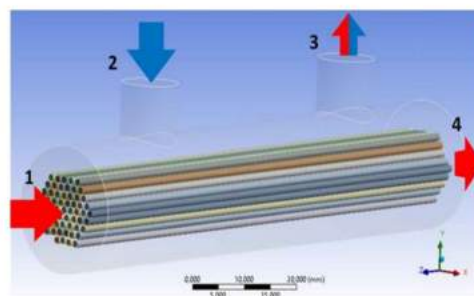


Рисунок 12 – Модель исследуемого биореактора: 1,2 – входные патрубки; 3,4 – выходные патрубки; красный цвет – среда, поступающая во ВП; синий цвет – среда, поступающая в МП биореактора

Результаты расчетов скоростей в ВП и МП показали (рисунок 13) достаточное равномерное распределение потоков по длине биореактора и отсутствие застойных зон.

На рисунке 13 видны области, в которых скорость имеет максимальное значение (выделены красным цветом). Данные области относятся к зоне входа питательной среды во ВП и к зоне выхода питательной среды из МВ. Однако данные зоны не содержат поверхностей с прикрепленными клетками, поэтому рассматриваемые скоростные пики не окажут стрессового влияния на клетки.

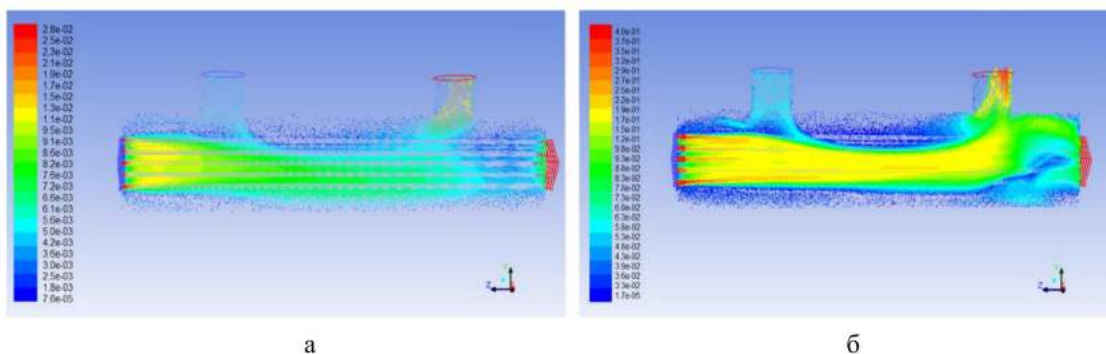


Рисунок 13 – Распределения скоростей потоков в биореакторе: а – на начальном этапе (2 дня), б – конечный этап (8 дней)

Таким образом, по электронной модели рассчитана кинетическая зависимость роста клеток, определены расходы подачи питательной среды во ВП и МП биореактора, проанализирована гидродинамика аппарата с шестьюдесятью полволоконными мембранами.

ВЫВОДЫ

1. Были проведены исследования по культивированию клеток СНО в полволоконном биореакторе и моделирование кинетических зависимостей, на основании которых было рассчитано время проведения процесса культивирования клеток в биореакторе модели C2025 компании FiberCell Systems. Была выбрана модель Ферхюльста для расчета кинетики роста клеток СНО, которая была использована для описания процессов массопереноса в биореакторе.
2. Был проведен анализ возможности использования вычислительной гидродинамики (CFD) для расчета гидродинамики потоков в мембранных биореакторах. В программном пакете ANSYS Fluent была построена электронная геометрическая модель установки. Осуществлен выбор геометрии сетки с различной плотностью для оптимизации времени расчетов и точности решения для конкретного аппарата (общее число ячеек составило 850 тыс.).
3. Разработана математическая модель полволоконного мембранного биореактора, позволяющая исследовать гидродинамику движения жидкости во внутриволоконном и межволоконном пространствах, процесс микрофльтрации через мембрану с учетом увеличения числа клеток на ее поверхности. Получены эпюры распределения скоростей и давления в каждой точке аппарата.
4. Исследованы разные способы подачи питательной среды во внутриволоконное и межволоконное пространства биореактора. Предложены прямоточный способ подачи питательной среды в межволоконное пространство.
5. На основании вычислительного эксперимента по модели и оценки энергоэффективности процесса была выбрана наиболее оптимальная схема посуточного изменения расходов питательной среды в ВП.

6. Создана электронная модель, в которой возможна визуализация процессов гидродинамики, массопереноса и кинетики роста клеток на мембране в реакторе.
7. Проведено масштабирование процесса в большем по размеру полуволоконном биореакторе (60 волокон).
8. Создана технологическая схема процесса культивирования клеток млекопитающих в полуволоконном мембранном биореакторе и собрана лабораторная установка, позволяющая соблюдать требуемые условия культивирования, с учетом экономии питательной среды.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Е.В. Гусева, Р.Р. Сафаров, Н.В. Меньшутина. Подход к моделированию, масштабированию и оптимизации работы биореакторов на основании вычислительной гидродинамики // Программные продукты и системы. 2015. № 4 (112). С. 261-267.
2. Меньшутина Н.В., Сафаров Р.Р., Воробьева Е.С., Гусева Е.В. Моделирование гидродинамики потоков в полуволоконном мембранном биореакторе для культивирования клеток млекопитающих // Вестник ВГУИТ. 2016. № 3. С. 82-87.
3. Воробьева Е.С., Сафаров Р.Р., Иванов С.И., Меньшутина Н.В. База данных по биореакторам // Программные продукты и системы. 2015. № 3. С. 210–213.
4. Р.Р. Сафаров, Н.В. Шорыгин, Е.В. Гусева. Моделирование роста клеток на полуволоконных мембранных элементах // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. 2014. Том XXVIII, № 1 (150). С. 71-74.
5. Сафаров Р.Р., Гусева Е.В., Меньшутина Н.В. Гидродинамическая модель биореактора с полыми волокнами // Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни». Москва, 18-20 марта 2014. С. 306.
6. Е. С. Воробьева, Р. Р. Сафаров, Е. В. Гусева, Н. В. Меньшутина. Моделирование гидродинамики в полуволоконной мембране для культивирования клеток млекопитающих // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. 2015. Т. 29, № 4 (163). С. 72-74.
7. Safarov R., Guseva E., Menshutina N. Application of CFD to model batch and membrane bioreactors // Proceedings of 21st International Congress of Chemical and Process Engineering CHISA 2014 Prague 17th Conference on Process Integration, Modelling and Optimization for Energy Saving and Pollution Reduction. Prague, Czech Republic, 23-27 August 2014.
8. E. Guseva, R. Safarov, N. Menshutina. Modelling of hollow-fiber membrane bioreactor by CFD // Proceedings of 10th European Congress of Chemical Engineering, 3rd European Congress of Applied Biotechnology, 5th European Process Intensification Conference. Nice, 2015. P. 1225.
9. Сафаров Р.Р., Лошманов М.М., Воробьева Е.С., Гусева Е.В., Меньшутина Н.В. Прототип программного комплекса и его применение для прогнозирования процессов культивирования в биореакторе с полыми волокнами // Международная научно-практическая конференция «Биотехнологии в комплексном развитии». Москва, 15-17 марта 2016. С.106.