

POLITECHNIKA WARSZAWSKA

Rozprawa doktorska

Dyscyplina naukowa inżynieria chemiczna
Dziedzina nauk inżynieryjno-technicznych

mgr inż.

Mateusz Bartczak

Intensyfikacja wymiany masy w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave*

Promotor

prof. uczelni, dr hab. inż. Maciej Pilarek

Warszawa 2025

*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi,
Profesorowi Maciejowi Pilarkowi,
za wsparcie i przewodnictwo na każdym etapie pracy doktorskiej,
otwartość i gotowość do rozmowy na nawet najtrudniejsze tematy.*

*Dziękuję mojemu koledze i współpracownikowi,
Doktorowi Kamilowi Wierzchowskiemu,
za nieocenioną pomoc w realizacji pracy doktorskiej,
twórcze burze mózgów, głębokie rozmowy, za bycie wzorem pracowitości.*

*Serdecznie dziękuję moim Rodzicom
za nieustające wsparcie przez cały okres studiów i doktoratu.*

*Serdecznie dziękuję mojej żonie Zofii
za cierpliwość, wiarę, otuchę
i wsparcie we wszystkich najtrudniejszych momentach.*

Dziękuję mojej córce Uli – za każdy bezinteresowny uśmiech.

*Dziękuję Znajomym i Współpracownikom
z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej
za wspólne przedsięwzięcia, spędzony razem czas i przyjazną atmosferę.*

*Dziękuję Kadrze i Chórzystom
z Chóru Akademickiego Politechniki Warszawskiej
za każdą próbę, koncert i chwile wzruszeń przy wspólnym muzykowaniu.*

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Intensyfikacja wymiany masy w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave*

Bioreaktory *single-use* z mieszaniem typu *wave* wyróżniają się na tle klasycznych bioreaktorów, jak i innych aparatów typu *single-use*, zastosowanym mechanizmem wzbudzania przepływu fazy ciekłej, który wymuszany jest oscylacyjnymi wychyleniami zużywalnego polimerowego zbiornika mocowanego do dedykowanej platformy. Polimerowe zbiorniki bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* są wykonane ze zgrzewanych płyt folii, a faza ciekła wypełnia je tylko częściowo, tak by zapewnić możliwość stałego lub okresowego przepływu strumienia fazy gazowej nad falującą cieczą. Pomimo stosunkowo krótkiego okresu dostępności na rynku oferowanej komercyjnie aparatury, a co za tym idzie niedługiego czasu rutynowej eksploatacji w przemyśle, bioreaktory z mieszaniem typu *wave* są szeroko wykorzystywane w nowoczesnych obszarach przemysłu biofarmaceutycznego. Okazuje się, że wydajności mieszania oraz wnikania masy charakteryzujące mechanizm wzbudzania przepływu cieczy zastosowany w urządzeniach tego typu są wielokrotnie mniejsze w porównaniu do klasycznych bioreaktorów. Z tego powodu aplikacyjność bioreaktorów z mieszaniem typu *wave* jest obecnie ograniczona do realizacji bioprocessów z wykorzystaniem biomasy charakteryzującej się umiarkowanym tempem proliferacji i umiarkowaną szybkością asymilacji tlenu.

Celem badań było opracowanie prototypu oraz bioprocessowa walidacja modyfikacji intensyfikujących wymianę masy w polimerowych zbiornikach Cellbag™ bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25. Zakres podjętych badań eksperymentalnych dotyczył: opracowania charakterystyki wydajności mieszania w fazie ciekłej poddawanej oscylacyjnym wychyleniom w zależności od parametrów operacyjnych pracy bioreaktora, zbadania wpływu zmian wybranych właściwości fazy ciekłej na wydajność wnikania masy, opracowania autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w układzie i analizy struktury falującej powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, oraz bioprocessowej walidacji prototypowych modyfikacji polimerowych zbiorników podczas serii wglębnych okresowych hodowli komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2.

Zbadano wpływ składu fazy ciekłej i dodatku środka przeciwpiennego oraz lepkości fazy ciekłej na wydajność wnikania masy przez falującą powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz. Wykazano, że wzrost lepkości fazy ciekłej w badanym polimerowym zbiorniku powodował spadek wydajności wnikania masy, określony ilościowo poprzez pomiary współczynnika $k_L a$ przy zastosowaniu metody odgazowywania. Na podstawie wyników eksperymentów wnioskowano, że obecność środka przeciwpiennego i zmiana składu fazy ciekłej łącznie wpłynęły na zmianę stosunku współczynnika wnikania k_L i powierzchni właściwej a , powodując w badanym układzie spadek wydajności wnikania masy.

Wyznaczono wartości czasu mieszania dla pełnego zakresu parametrów operacyjnych bioreaktora z mieszaniem typu *wave*. Przyjmując metodykę planowania eksperymentu DoE, zidentyfikowano istotny statystycznie wpływ amplitudy α i częstotliwości ω wychyleń platformy bioreaktora (najsilniejszy wpływ) oraz stopnia napełnienia zbiornika fl na wartości czasu mieszania, oraz stwierdzono brak istotnego wpływu parametru acc . Zaproponowano równania korelacyjne do szacowania wartości czasu mieszania w zależności od wartości parametrów operacyjnych bioreaktora w zbiornikach Cellbag™ o dwóch różnych objętościach nominalnych oraz umożliwiające szacowanie wartości parametrów operacyjnych, przy których wartości czasu mieszania w porównanych zbiornikach były zbliżone. W celu wydajnego i dokładnego pomiaru czasu mieszania w układzie bioreaktora z mieszaniem typu *wave* opracowano adaptację metody kolorymetrycznej bazującą na zaprojektowanym na potrzeby badań układzie do rejestracji materiału filmowego oraz autorskim algorytmie do przetwarzania i analizy obrazu.

Opracowano prototypy polimerowych zbiorników Cellbag™ zmodyfikowanych strukturalnie w celu zwiększenia wydajności mieszania i wnikania masy poprzez umieszczenie na dolnej powierzchni wewnątrz zbiornika półkulistych wypustek. Dobór geometrii modyfikacji zwerifikowano na podstawie wyników symulacji CFD przepływu cieczy wewnątrz zbiornika dla trzech wariantów modyfikacji. Następnie wybrany wariant scharakteryzowano ilościowo pod kątem wpływu na wartości czasu mieszania i współczynnika $k_L a$, identyfikując istotne statystycznie zmiany wartości parametrów wskazujące na pożądane zwiększenie intensywności mieszania i wnikania masy w zmodyfikowanym polimerowym zbiorniku.

Na końcowym etapie badań doświadczalnych przeprowadzono bioprosesową walidację aplikacyjności wybranego wariantu modyfikacji poprzez porównanie wartości parametrów charakteryzujących przebieg hodowli komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2 przeprowadzonych w niezmodyfikowanych i zmodyfikowanych zbiornikach. W przypadku hodowli w zmodyfikowanych zbiornikach zaobserwowano wymierne zmiany przebiegu hodowli: około jednodniowe korzystne przedłużenie okresu dostępności tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym, przy jednoczesnym spowolnieniu tempa spadku stężenia tlenu w stosunku do hodowli kontrolnej, przesunięcie maksimum aktywności metabolicznej hodowanych komórek o około jeden dzień wcześniej w porównaniu do hodowli kontrolnej, zwiększenie końcowej wydajności hodowli oraz zmiany w rozkładzie stężenia cukrów w medium hodowlanym w trakcie hodowli, wskazujące na zwiększenie szybkości przemian metabolicznych zachodzących w komórkach hodowanych w zbiorniku, w którym burzliwość przepływu była zwiększona dzięki zastosowaniu wypustek.

Słowa kluczowe: bioreaktor z mieszaniem typu *wave*, czas mieszania, współczynnik $k_L a$, metoda kolorymetryczna, komórki *Nicotiana tabacum* BY-2, intensyfikacja wymiany masy, *ReadyToProcess WAVE™ 25*.

Abstract of the dissertation

Intensification of mass transfer in a wave-mixed bioreactor

Single-use bioreactors with wave mixing stand out from classic bioreactors and other single-use devices because of the mechanism used to agitate the liquid phase, which is induced by the oscillatory movements of a disposable polymer bag-like container mounted to a dedicated platform. The polymer containers of wave-mixed single-use bioreactors are made of welded sheets of multi-layer film and are partially filled with the liquid phase to ensure continuous or periodic flow of the gas phase over the flowing liquid. Despite the relatively short period of availability of commercially offered equipment on the market, and thus the short period of routine use, wave-mixed bioreactors are widely used in modern areas of the biopharmaceutical industry. The mixing and mass transfer efficiency which characterise the liquid agitation mechanism used in this type of equipment are many times lower than in classic bioreactors. For this reason, the applicability of wave-mixed bioreactors is currently limited to bioprocesses using biomass with moderate proliferation rates and moderate oxygen assimilation rates.

The aim of the research was the development of a prototype and bioprocess validation of modifications for intensification of mass transfer in polymer Cellbag™ containers of the *Ready-ToProcess* WAVE™ 25 bioreactor. The scope of the research included: characterisation of mixing efficiency in the liquid phase subjected to oscillations as a function of the operating parameters of the bioreactor, investigating the impact of changes of selected properties of the liquid phase on mass transfer efficiency, the development of an original adaptation of the colorimetric method for measuring mixing time in the system and analysing the structure of the oscillating gas-liquid interface, and the bioprocess validation of prototype modifications to polymer tanks during a series of batch cultures of *Nicotiana tabacum* BY-2 cells.

The influence of the liquid phase composition and the addition of an anti-foaming agent, as well as the viscosity of the liquid phase, on the mass transfer efficiency through the waving gas-liquid interface was investigated. It was demonstrated that an increase in the viscosity of the liquid phase in the tested bag-like container caused a decrease in mass transfer efficiency, quantified by measurements of the $k_L a$ coefficient with an adaptation of the gassing-out method. Based on the results of the experiments, it was concluded that the presence of an anti-foaming agent and the change in the composition of the liquid phase together affected the change in the ratio of the k_L coefficient and the specific surface area a , causing a decrease in mass transfer efficiency in the tested system.

Mixing times were determined for the full range of operating parameters of the wave-type mixing bioreactor. Using the DoE experimental design methodology, a statistically significant influence of the amplitude α and frequency ω of the bioreactor platform deflections (the strongest influence) and the tank filling level fl on the mixing time was identified, and no significant

influence of the *acc* parameter was found. Correlation equations were proposed to estimate the mixing time depending on the values of the bioreactor operating parameters in Cellbag™ containers with two different nominal volumes, enabling the estimation of the operating parameters at which the mixing times in the compared tanks were similar. To efficiently and accurately measure the mixing time in a wave-type mixing bioreactor system, an adaptation of the colorimetric method was developed based on a system designed for the purposes of the study to record the video material and an original algorithm for image processing and analysis.

Prototypes of Cellbag™ polymer tanks were developed, with structural modifications to increase mixing efficiency and mass transfer through placement of hemispherical protrusions on the bottom surface inside the tank. The selection of the modification geometry was verified based on the results of CFD simulations of liquid flow inside the tank for three modification variants. The selected variant was then quantitatively characterised in terms of its impact on mixing time and $k_L a$ coefficient values, identifying statistically significant changes in parameter values indicating the desired increase in mixing intensity and mass penetration in the modified polymer tank.

At the final stage of experimental research, bioprocess validation of the applicability of the selected modification variant was carried out by comparing the values of parameters characterising the performance of *Nicotiana tabacum* BY-2 cell cultures carried out in unmodified and modified tanks. In the case of cultures in modified tanks, measurable changes in the culture performance were observed: an approximately one-day beneficial extension of the period of dissolved oxygen availability in the culture medium, with a simultaneous slowdown in the rate of oxygen concentration decline compared to the control culture, a shift in the maximum metabolic activity of the cultured cells by about one day earlier compared to the control culture, an increase in the final yield of the culture, and changes in the distribution of sugar concentration in the culture medium during cultivation, indicating an increase in the rate of metabolic changes occurring in cells cultivated in a tank where flow turbulence was increased through the use of protrusions.

Keywords: wave-mixed bioreactor, mixing time, volumetric mass transfer coefficient, colorimetric method, *Nicotiana tabacum* BY-2 cells, mass transfer intensification, ReadyToProcess WAVE™ 25.

Dorobek naukowy

Przedstawione poniżej oznaczenia publikacji identyfikują je w dalszych częściach rozprawy doktorskiej. W nawiasach, o ile dotyczy, zamieszczono wartości bibliometryczne współczynnika wpływu IF z roku opublikowania danej publikacji oraz wartości punktowe determinowane listą Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (zgodnie z datą opublikowania danej publikacji).

I. Zestaw monotematycznych publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

A. Publikacje w czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports (JCR)*

[A1] **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Pilarek M. (2022) *Mixing performance in a litre-scale rocking disposable bioreactor: DoE-based investigation of mixing time dependence on operational parameters*. Chemical Engineering Journal 431: artykuł nr 133288. DOI: 10.1016/j.cej.2021.133288 (IF₂₀₂₂ 13,273, 200 pkt.)

[A2] **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Pilarek M. (2023) *Mass transfer in a liter-scale wave mixed single-use bioreactor: Influence of viscosity and antifoaming agent*. Industrial and Engineering Chemistry Research 62: 10893–10902. DOI: 10.1021/acs.iecr.3c00736 (IF₂₀₂₃ 3,764, 140 pkt.)

[A3] **Bartczak M.**, Pilarek M. (2024) *The colourimetric method for mixing time measurement in single-use and multi-use bioreactors – methodology overview and practical recommendations*. Energies 17: 1–20. DOI: 10.3390/en17010221 (IF₂₀₂₄ 3,0, 140 pkt.)

[A4] **Bartczak M.**, Yilmaz T., Sączek M., Anderson A., Wierzchowski K., Pilarek M. (2025) *Characterisation of small-scale wave-mixed bioreactors using colourimetric method adaptation: mixing performance, flow regime and scale-change study*. Chemical Engineering Journal 509: artykuł nr 161295. DOI: 10.1016/j.cej.2025.161295 (IF 13,4, 200 pkt.)

Wkład autorski w powyższe publikacje:

[A1] Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu planu eksperymentów i metodyki pomiarów czasu mieszania przy zastosowaniu metody pH, przeprowadzenie pomiarów czasu mieszania, obróbka otrzymanych wyników, udział w opracowaniu korelacji wiążącej wartości parametrów operacyjnych bioreaktora z wartościami czasu mieszania, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.

[A2] Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu planu eksperymentów i metodyki pomiarów współczynnika $k_L a$, przeprowadzenie pomiarów współczynnika $k_L a$, obróbka

otrzymanych wyników, udział w opracowaniu korelacji wiążącej liczby kryterialne z wartościami współczynnika $k_L a$, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.

[A3] Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu konspektu artykułu przeglądowego, zebranie zasobu literatury naukowej dotyczącej zastosowań metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.

[A4] Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu planu eksperymentów i metodyki pomiarów czasu mieszania przy zastosowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej oraz analizy struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, przeprowadzenie pomiarów czasu mieszania, obróbka otrzymanych wyników, udział w opracowaniu korelacji wiążących parametry operacyjne bioreaktora z wartościami czasu mieszania w polimerowych zbiornikach o dwóch objętościach nominalnych, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.

II. Spis pozostałych publikacji powstałych podczas dotychczasowej działalności naukowej

M. Publikacje w monografiach konferencyjnych

[M1] **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Pilarek M. (2021) *Adaptation of the sensor method for the determination of mixing time in a rocking single-use bioreactor*. 3rd International Scientific Conference “Chemical Technology and Engineering” Proceedings (str. 166–168), Lviv Polytechnic National University, Lwów, 21–24 czerwca 2021 r., DOI: 10.23939/cte2021.01.166 (IF brak, 0 pkt.)

[M2] **Bartczak M.**, Szczytkowska D., Wierzchowski K., Pilarek M. (2022) *Badania wpływu lepkości fazy ciekłej oraz dodatku środka przeciwpianego na szybkość absorpcji tlenu w bioreaktorze z mieszaniem typu wave*. Bożenna Kawalec-Pietrenko (red.) *Przepływy wielofazowe i operacje mechaniczne inżynierii procesowej* (str. 15–21), Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 22–24 listopada 2022 r. ISBN 978-83-7348-878-6 (IF brak, 20 pkt.)

[M3] **Bartczak M.**, Pilarek M. (2023) *Study on the applicability and precision of a new adaptation of optical mixing time measurement method in a ReadyToProcess WAVE 25 bioreactor*. 4th International Scientific Conference “Chemical Technology and Engineering” Proceedings (str. 167–172), Lviv Polytechnic National University, Lwów, 26–29 czerwca 2023 r., DOI: 10.23939/cte2023.167 (IF brak, 0 pkt.)

[M4] **Bartczak M.**, Pilarek M., (2023) *Charakterystyka czasu mieszania w bioreaktorze ReadyToProcess WAVE 25: aplikacyjność metody optycznej z cyfrową analizą obrazu*. XIV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej (str. 15–20), Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Konopnica, 25–27 września 2023 r. ISBN 978-83-66741-57-7. DOI: 10.34658/9788366741577 (IF brak, 0 pkt.)

[M5] **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Karpiński G., Kawka M., Pawlukiewicz S., Sykłowska-Baranek K., Makowski Ł., Pilarek M. (2024) *Intensification of dispersed plant cells proliferation in a structurally modified single-use container of a wave-mixed bioreactor*. Tomasz R. Sosnowski, Maciej Szwaab (red.) *Chemical and Process Engineering for Environment and Health. Current status in 2024* (str. 128–135), Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Technologii Eksploatacji, Sarbinowo, 11–14 września 2024 r., ISBN 978-83-7789-746-1 (IF brak, 20 pkt.)

P. Zgłoszenia patentowe

[P1] Pilarek M., **Bartczak M.**, *Urządzenie do automatycznego precyzyjnego powtarzalnego dozowania odczynników*. Zgłoszenie nr P.443555 (wniosek o udzielenie patentu z dnia 23 stycznia 2023 r.)

[P2] Makowski Ł., Pilarek M., Pawlukiewicz S, **Bartczak M.**, Wierzchowski K., *Zbiornik hodowlany z wypustką podłużną i zastosowanie tego zbiornika do hodowli komórek biomasy w warunkach in vitro*. Zgłoszenie nr P.448095 (wniosek o udzielenie patentu z dnia 25 marca 2024 r.)

[P3] Makowski Ł., Pilarek M., Pawlukiewicz S, **Bartczak M.**, Wierzchowski K., *Zbiornik hodowlany z wypustkami punktowymi i zastosowanie tego zbiornika do hodowli komórek biomasy w warunkach in vitro*. Zgłoszenie nr P.448096 (wniosek o udzielenie patentu z dnia 25 marca 2024 r.)

[P4] Makowski Ł., Pilarek M., Pawlukiewicz S, **Bartczak M.**, Wierzchowski K., *Zbiornik hodowlany z wypustką podłużną skośną i zastosowanie tego zbiornika do hodowli komórek biomasy w warunkach in vitro*. Zgłoszenie nr P.448097 (wniosek o udzielenie patentu z dnia 25 marca 2024 r.)

Udziały w konferencjach (podkreślono nazwisko współautora prezentującego)

RM. Referaty na konferencjach międzynarodowych

[RM1] **Bartczak M.**, Raczkowska A., Wierzchowski K., Pilarek M., *Determination of mixing time in a disposable bioreactor supported with wave-induced agitation*. 9th European Young Engineers Conference, Warszawa, 19–21 kwietnia 2021 r. (online).

[RM2] **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Pilarek M., *Adaptation of the sensor method for the determination of mixing time in a rocking single-use bioreactor*. 3rd International Scientific Conference “Chemical Technology and Engineering”, Lwów, 21–24 czerwca 2021 r. (online).

[RM3] Anderson A., **Bartczak M.**, Pilarek M., *Investigation of the influence of liquid phase viscosity on the mixing time in a rocking single-use bioreactor*. 10th European Young Engineers Conference, Warszawa, 4–6 kwietnia 2022 r. (online).

[RM4] **Bartczak M.**, Pilarek M., *Study on the applicability and precision of a new adaptation of optical mixing time measurement method in a ReadyToProcess WAVE 25 bioreactor*. 4th International Scientific Conference “Chemical Technology and Engineering”, Lwów, 26–29 czerwca 2023 r. (online).

[RM5] Yilmaz T., **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Pilarek M., *Optimisation of the measurement procedure for the colourimetric method adaptation in wave-mixed single-use bioreactors*. 12th European Young Engineers Conference, Warszawa, 15–17 kwietnia 2024 r.

PM. Postery na konferencjach międzynarodowych

[PM1] **Bartczak M.**, Pilarek M., *Progress in characterisation of liquid flow in oscillatory rocked disposable bioreactors: experimental procedures and empirical models for mixing time evaluation*. 7th BioProScale Symposium “Scaling Up and Down Bioprocesses: Technological Innovation and Cell Physiology Insights”, Berlin, 28–31 marca 2022 r.

[PM2] Kłósiewicz B., **Bartczak M.**, Pilarek M., *Design and prototype of an automatic reagent dosing device for use in a wave-mixed single-use bioreactor system*. 11th European Young Engineers Conference, Warszawa, 17–19 kwietnia 2023 r.

[PM3] **Bartczak M.**, Pilarek M., *A novel optical method based on computer image analysis for mixing time measurement in a wave mixed disposable bioreactor*. 8th European Process Intensification Conference, Warszawa, 31 maja – 2 czerwca 2023 r.

[PM4] **Bartczak M.**, Wierzchowski K., Karpiński G., Kawka M., Pawlukiewicz S., Sykłowska-Baranek K., Makowski Ł., Pilarek M., *Intensified proliferation of BY-2 plant cells in structurally modified culture bags for wave-mixed single-use bioreactor*. 8th BioProScale

Symposium “Scaling Up and Down Bioprocesses: Strategies, Tools and Process Performance”, Berlin, 9–11 kwietnia 2024 r.

[PM5] Karpiński G., Wierzchowski K., **Bartczak M.**, Kawka M., Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., *Cultivation of transfected Nicotiana tabacum BY-2 cells in a rocking disposable bioreactor*. 12th European Young Engineers Conference, Warszawa, 15–17 kwietnia 2024 r.

[PM6] Czajka R., Wierzchowski K., **Bartczak M.**, Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., *Novel 3D printed culture flasks for transgenic root culture under wave-type agitation conditions*. 12th European Young Engineers Conference, Warszawa, 15–17 kwietnia 2024 r.

[PM7] Bobrova M., Wierzchowski K., **Bartczak M.**, Sykłowska-Baranek K., Pilarek M., *Methods for assessing the metabolic activity of plant cells*. 12th European Young Engineers Conference, Warszawa, 15–17 kwietnia 2024 r.

RK. Referaty na konferencjach krajowych

[RK1] Bartczak M., Pilarek M., *Charakterystyka czasu mieszania w bioreaktorze ReadyTo-Process WAVE 25: aplikacyjność metody optycznej z cyfrową analizą obrazu*. XIV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa „Postępy Inżynierii Bioreaktorowej”, Konopnica, 25–27 września 2023 r.

[RK2] Bartczak M., Wierzchowski K., Karpiński G., Kawka M., Pawlukiewicz S., Sykłowska-Baranek K., Makowski Ł., Pilarek M., *Intensification of dispersed plant cells proliferation in a structurally modified single-use container of a wave-mixed bioreactor*. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Inżynieria Chemiczna i Procesowa dla Środowiska i Medycyny”, Sarbinowo, 11–14 września 2024 r.

PK. Postery na konferencjach krajowych

[PK1] Bartczak M., Szczytkowska D., Wierzchowski K., Pilarek M., *Badania wpływu lepkości fazy ciekłej oraz dodatku środka przeciwpianowego na szybkość absorpcji tlenu w bioreaktorze z mieszaniem typu wave*. XIII Ogólnopolska Konferencja Przepływów Wielofazowych oraz VIII Ogólnopolska Konferencja Operacji Mechanicznych Inżynierii Procesowej, Gdańsk, 22–24 listopada 2022 r.

Dane bibliometryczne podsumowujące dorobek naukowy (wg stanu na dzień 30.11.2025):

- Mateusz Bartczak – numer ORCID: 0000-0002-2233-551X, Scopus ID: 57194618314,
- sumaryczna wartość współczynnika wpływu IF (wg Bazy Wiedzy Politechniki Warszawskiej, <https://repo.pw.edu.pl>): 35,3
- sumaryczna punktacja MNiSW (wg Bazy Wiedzy Politechniki Warszawskiej, <https://repo.pw.edu.pl>): 720
- wartość indeksu Hirscha (wg bazy Scopus, www.scopus.com): 3
- sumaryczna liczba cytowań, w tym bez autocytowań (wg bazy Scopus, www.scopus.com): 29, bez autocytowań: 23.

Wyniki otrzymane w trakcie realizacji pracy doktorskiej i wykorzystane podczas opracowania niniejszej rozprawy doktorskiej uzyskano w toku realizacji projektów:

„Biodegradowalna polimerowa platforma do hodowli korzeni transgeniczných w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave*”

Rada Naukowa Dyscypliny Inżynieria Chemiczna, Politechnika Warszawska,
konkurs: I.Chem-1

Kierownik: dr hab. inż. Maciej Pilarek, prof. uczelni

Termin realizacji projektu: sierpień 2020 – listopad 2021

„Opracowanie metody optycznej do wyznaczania czasu mieszania w bioreaktorze *single-use* z wykorzystaniem technik komputerowej analizy obrazu”

Grant Dziekana Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska,
edycja 2022

Kierownik: mgr inż. Mateusz Bartczak

Termin realizacji projektu: marzec – grudzień 2022

„Modyfikacja bioreaktora *single-use* intensyfikująca hodowlę biomasy: projekt, opracowanie i bioprosowa walidacja jednorazowych zbiorników do hodowli transfekowanych komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2”

Inicjatywa Doskonałości: Uczelnia Badawcza, Politechnika Warszawska,
konkurs: YOUNG PW

Kierownik: mgr inż. Mateusz Bartczak

Termin realizacji projektu: kwiecień 2023 – marzec 2025



Spis treści

Streszczenie rozprawy doktorskiej.....	5
Abstract of the dissertation.....	7
Dorobek naukowy	9
Spis treści	16
Spis symboli i skrótów	18
1. Wstęp.....	21
2. Cel i zakres rozprawy doktorskiej. Tezy naukowe.....	23
3. Wprowadzenie.....	27
3.1. Bioreaktory <i>single-use</i> : geneza, systematyka, aplikacyjność.....	27
3.2. Parametry charakteryzujące wymianę masy w bioreaktorach <i>single-use</i> z mieszaniem typu <i>wave</i>	42
3.3. Krytyczne porównanie aplikacyjności metod pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach	48
3.4. Podsumowanie aktualnego stanu wiedzy	56
4. Materiały i metody	58
4.1. Bioreaktor <i>single-use</i> z mieszaniem typu <i>wave</i>	58
4.2. Metodyka określania charakterystyki czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L przy zastosowaniu metody pH.....	60
4.3. Metodyka określenia wpływu wybranych właściwości fazy ciekłej na wartości współczynnika $k_L a$	64
4.4. Metodyka określania charakterystyki czasu mieszania w zbiornikach Cellbag™ 2 L i Cellbag™ 10 L przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z komputerową analizą obrazu.....	68
4.5. Metodyka analizy struktury falującej powierzchni międzyfazowej.....	79
4.6. Metodyka symulacji przepływu w zbiorniku bioreaktora z mieszaniem typu <i>wave</i> przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów	81
4.7. Metodyka modyfikacji polimerowych zbiorników bioreaktora z mieszaniem typu <i>wave</i> intensyfikującej wymianę masy	85
4.8. Metodyka hodowli zawiesiny komórek <i>Nicotiana tabacum</i> linii BY-2 w zbiornikach Cellbag™.....	88
4.9. Metody statystyczne	95

5.	Wyniki i dyskusja.....	96
5.1.	Wpływ wybranych właściwości fazy ciekłej na wartości współczynnika k_{La}	96
5.2.	Wpływ parametrów operacyjnych na wartości czasu mieszania	102
5.3.	Analiza wydajności adaptacji metody kolorymetrycznej do ilościowego pomiaru czasu mieszania typu <i>wave</i> w polimerowych naczyniach hodowlanych	108
5.4.	Analiza kształtu falującej powierzchni międzyfazowej	113
5.5.	Przewidywanie wydajności mieszania fazy ciekłej w polimerowych zbiornikach Cellbag™ o objętościach 2 L i 10 L.....	121
5.6.	Strukturalna modyfikacja naczyń hodowlanych Cellbag™	127
6.	Podsumowanie i wnioski końcowe	149
7.	Bibliografia	154
8.	Spis rysunków	169
9.	Spis tabel	176
10.	Pełne teksty monotematycznych publikacji	178
10.1.	Publikacja [A1].....	178
10.2.	Publikacja [A2].....	189
10.3.	Publikacja [A3].....	200
10.4.	Publikacja [A4].....	221

Spis symboli i skrótów

a	właściwa powierzchnia międzyfazowa (m^{-1})
A	absorbancja (–)
acc	stopień wygładzenia trójkątnej funkcji oscylacji platformy funkcją cosinus (–)
B	współczynnik kształtu kropli wiszącej (–)
BBD	plan Boxa-Behnkena (ang. <i>Box-Behnken design</i>)
BY-2	Bright Yellow no. 2
CFD	obliczeniowa mechanika płynów (ang. <i>computational fluid dynamics</i>)
CIP	cleaning-in-place
C_{O_2}	stężenie tlenu rozpuszczonego w cieczy (g m^{-3})
C_{Ts}	stężenie znacznika T wewnątrz obszaru obserwacji s (mol m^{-3})
$C_{T\infty}$	stężenie asymptotyczne znacznika T (mol m^{-3})
C_X	stężenie biomasy (g m^{-3})
C^*	stężenie równowagowe tlenu (g m^{-3})
d	średnica zbiornika bioreaktora z mieszaniem orbitalnym (m)
d_s	niehomogeniczność mieszaniny (–)
DMEM	pożywka hodowlana Dulbecco's modified Eagle medium
DO	stężenie tlenu rozpuszczonego (–)
DO^*	stężenie równowagowe tlenu rozpuszczonego (–)
D_{O_2}	współczynnik dyfuzji tlenu ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
d_0	średnica ruchu orbitalnego (m)
EVA	poli(etylen-octan) winylu
EVOH	alkohol etylowinyłowy
\vec{f}	człon źródłowy pędu
FB	stężenie biomasy (g m^{-3})
FBS	plodowa surowica cielęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
fl	stopień napełnienia (–)
F-68	surfaktant Pluronic® F-68
g	przyspieszenie ziemskie (m s^{-2})
GFP	białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescence protein</i>)
GMP	dobra praktyka wytwarzania (ang. <i>good manufacturing practice</i>)
HDPE	polietylen wysokiej gęstości

Ho	homogeniczność (-)
k_L	współczynnik wnikania masy po stronie fazy ciekłej ($m\ s^{-1}$)
K_L	współczynnik przenikania masy po stronie fazy ciekłej ($m\ s^{-1}$)
$k_L a$	objętościowy współczynnik wnikania masy (s^{-1})
L	wymiar charakterystyczny (m)
LDPE	polietylen niskiej gęstości
LLDPE	liniowy polietylen niskiej gęstości
LS	pożywka hodowlana Linsmeiera i Skooga
m	masa (kg)
m_{Avg}	średnia ruchoma liczby pikseli należących do obszaru o danej barwie (-)
n	częstotliwość oscylacji platformy bioreaktora z mieszaniem orbitalnym (s^{-1})
OTR	szybkość wnikania tlenu z gazu do cieczy ($g\ m^{-3}\ s^{-1}$)
OUR	szybkość asymilacji tlenu przez biomasę ($g\ m^{-3}\ s^{-1}$)
PA	poliamid
PET	poli(tereftalan etylenu)
pLIF	planarna laserowo indukowana fluorescencja
P	ciśnienie (Pa)
PP	polipropylen
PVDC	poli(chlorek winylidenu)
R	współczynnik kształtu kropli wiszącej (m)
Re_L	zmodyfikowana liczba Reynoldsa (-)
RO	woda poddana procesowi odwróconej osmozy (ang. <i>reverse osmosis</i>)
\mathfrak{R}_s	obszar obserwacji
S	stężenie substratu ($mol\ m^{-3}$)
SR	promień kuli (m)
t	czas (s)
t_m	czas mieszania (s)
$t_{\delta s}$	czas mieszania (przy progu δ odchylenia stężenia składnika s od homogeniczności) (s)
$t_{95\%}$	czas mieszania (przy progu 95% homogeniczności) (s)
T	temperatura ($^{\circ}C$)
q_{O_2}	właściwa szybkość asymilacji tlenu (s^{-1})
q_s	właściwa szybkość asymilacji ($mol\ g^{-1}\ s^{-1}$)

Q_G	natężenie przepływu fazy gazowej ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
\vec{u}	wektor prędkości
V	objętość robocza (m^3)
V_L	objętość fazy ciekłej w zbiorniku (m^3)
V_{nom}	objętość nominalna (m^3)
VOF	volume of fluid
X	stężenie biomasy (g m^{-3})
Y	wartość właściwości cieczy mierzona na potrzeby wyznaczenia wartości homogeniczności Ho (–)
α	amplituda oscylacji platformy bioreaktora ($^\circ$)
γ	napięcie powierzchniowe (N m^{-1})
δ	próg odchylenia od homogeniczności (–)
λ	długość fali (nm)
μ	lepkość dynamiczna (Pa s)
ν	lepkość kinematyczna ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
ρ	gęstość (kg m^{-3})
σ	odchylenie standardowe (s)
τ	stała czasowa procesu transportu wybranego substratu w bioreaktorze (s)
τ_c	stała czasowa asymilacji wybranego substratu przez biomasę (s)
ϕ	wielkość porów membrany filtrującej (μm)
ω	częstotliwość oscylacji platformy bioreaktora (s^{-1})

1. Wstęp

Bioreaktory *single-use* z mieszaniem typu *wave* stanowią jeden z typów urządzeń należących do szerokiej kategorii nowoczesnej aparatury bioprosesowej charakteryzującej się wykorzystaniem zużywalnych zbiorników wykonanych z tworzywa sztucznego, które są przeznaczone do hodowli biomasy [1]. Cechą wyróżniającą tę grupę urządzeń na tle innych rozwiązań *single-use*, jak i na tle klasycznych bioreaktorów, wyposażonych w zbiorniki wielorazowego użytku, jest zastosowany mechanizm wzbudzania przepływu fazy ciekłej w polimerowym zbiorniku oparty o oscylacyjne wychylenia platformy, do której mocuje się polimerowy zużywalny zbiornik [2].

W typowym scenariuszu zastosowania bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, zbiornikowi wykonanemu ze zgrzewanych płatów elastycznej folii polimerowej nadaje się odpowiedni kształt poprzez utrzymywanie w jego wnętrzu niewielkiego nadciśnienia gazu przetwarzanego przez objętość zbiornika [3]. Należy pamiętać, że objętość robocza polimerowego zbiornika jest jedynie częściowo wypełniona fazą ciekłą (pozostałą objętość roboczą wypełnia przepływająca faza gazowa) [4], wskutek czego podczas oscylacyjnych wychyleń platformy bioreaktora kształt powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz zmienia się dynamicznie, formując quasistacjonarne struktury ruchu falowego, których charakter zależy m.in. od wartości amplitudy i częstotliwości oscylacyjnych wychyleń zbiornika, stopnia napełnienia zbiornika fazą ciekłą oraz właściwości fizykochemicznych ciekłego medium hodowlanego [5].

Mechanizm wzbudzania przepływu fazy ciekłej wykorzystywany w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* charakteryzuje się zapewnianiem w polimerowym naczyniu warunków sprzyjających prowadzeniu hodowli *in vitro* biomasy komórek wrażliwych na zjawiska wynikające z hydrodynamicznego stresu komórkowego [6], [7]. W ograniczaniu tego typu negatywnych zjawisk wydatnie pomaga napowietrzanie medium hodowlanego przez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz bez użycia dodatkowych urządzeń rozpraszających gaz do postaci pęcherzyków, jak i brak ruchomych elementów mieszających umieszczonych wewnątrz polimerowego zbiornika w trakcie prowadzenia bioprosesu z wrażliwymi mechanicznie komórkami [8].

Zastosowanie zużywalnych, presterylizowanych polimerowych zbiorników w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* przekłada się na wymierne korzyści istotne z punktu widzenia prowadzenia działalności w sektorach przemysłu biofarmaceutycznego i bioinżynierskiego, takie jak łatwiejsze zachowanie krytycznie wymaganej jałowości prowadzonych bioprosesów i zmniejszenie ryzyka wystąpienia zakażeń, ograniczenie zużycia mediów oraz czynników chemicznych do czyszczenia i sterylizacji aparatury, czy możliwość znacznego skrócenia czasu potrzebnego na przesterowanie instalacji produkcyjnej pod kątem wytwarzania

nowego bioproduktu [9], [10]. Argumenty te niezaprzeczalnie wpłynęły na znaczne rozszerzenie aplikacyjności instalacji bioreaktorowych opartych o technologię *single-use*, wykorzystywanych aktualnie jako podstawowe urządzenia w nowoczesnych obszarach przemysłu biofarmaceutycznego, takich jak przykładowo:

- hodowle ludzkich komórek macierzystych [11],
- hodowle ludzkich limfocytów T do terapii przeciwnowotworowych [12],
- produkcja ludzkich lub humanizowanych przeciwciał monoklonalnych do zastosowań terapeutycznych i diagnostycznych [13],
- otrzymywanie biologicznie czynnych roślinnych metabolitów wtórnych otrzymywanych w hodowlach biomasy roślinnej w formie niezróżnicowanych komórek tkanki kalusowej lub zróżnicowanych w organy korzeni transformowanych [14], [15], [16],
- hodowle komórek mikroorganizmów, głównie bakterii, w celu uzyskiwania rekombinowanych bioproduktów białkowych [17], [18], [19].

Pomimo udokumentowanej użyteczności w realizacji bioprocessów, bioreaktory *single-use* z mieszaniem typu *wave* cechuje ograniczona szybkość wnikania masy w porównaniu do klasycznych bioreaktorów wyposażonych w dysze lub belkotki rozpraszające gaz dostarczany w głąb fazy ciekłej do postaci drobnych pęcherzyków a, w efekcie, wielokrotnego zwiększenia powierzchni wnikania masy. Z tego względu, bioreaktory *single-use* z mieszaniem typu *wave* znalazły zastosowanie przy realizacji bioprocessów z wykorzystaniem typów biomasy o umiarkowanym, w odniesieniu do mikroorganizmów, tempie proliferacji i szybkości asymilacji tlenu [20], [21].

Przedstawione powyżej ograniczenie stało się podstawową motywacją do podjęcia studiów nad intensyfikacją procesu wnikania masy oraz zwiększeniem wydajności mieszania w polimerowych zbiornikach wykorzystywanych do prowadzenia procesów w skali laboratoryjnej poprzez modyfikacje zbiornika ukierunkowane na poprawę warunków *in vitro* proliferacji hodowanej biomasy, z zachowaniem korzyści wynikających z charakterystyki mieszania typu *wave*. Istotną częścią badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej było opracowanie nowych i udoskonalonych adaptacji procedur umożliwiających ilościowy opis wydajności mieszania w polimerowych zbiornikach poddawanych oscylacyjnym wychyleniom, w celu wyznaczenia funkcyjnych powiązań między zmiennymi opisującymi pracę danego bioreaktora a wartościami parametrów operacyjnych charakteryzującymi realizowany proces. Wyzwanie to podjęto ze względu na potencjał do rozszerzenia zasobu dostępnych procedur pomiaru kluczowych parametrów procesowych w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* o adaptacje wykorzystujące nowoczesne techniki cyfrowego rejestrowania, przetwarzania oraz analizy obrazu.

2. Cel i zakres rozprawy doktorskiej. Tezy naukowe.

Celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była intensyfikacja wymiany masy w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave* poprzez strukturalne modyfikacje geometrii polimerowych zbiorników do hodowli biomasy.

Zakres badań podjętych w studiach prowadzących do niniejszej rozprawy doktorskiej obejmował: (i) określenie wpływu parametrów procesowych bioreaktora z mieszaniem typu *wave* na wydajność mieszania fazy ciekłej oraz wpływu wybranych właściwości fazy ciekłej na wydajność wnikania masy w oscylacyjnie wychylanych polimerowych zbiornikach, wraz z proponowaniem równań korelacyjnych wiążących wyznaczane wielkości z wartościami parametrów charakteryzujących pracę bioreaktora, (ii) opracowanie autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w układzie i analizy struktury falującej powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz z komputerową analizą obrazu oraz (iii) zaprojektowanie, opracowanie prototypu, wstępną selekcję i weryfikację wpływu strukturalnych modyfikacji polimerowego zbiornika na wydajność mieszania i transportu masy w układzie bioreaktora z mieszaniem typu *wave*, a także bioprocusową walidację zaproponowanych rozwiązań.

W ramach realizacji postawionych zadań badawczych, na wstępnym etapie badań wyznaczono wartości czasu mieszania w polimerowym zbiorniku o objętości nominalnej 2 L przy zastosowaniu metody pomiaru odczynu pH oraz wyznaczono wartości objętościowego współczynnika wnikania masy ($k_L a$) w zależności od lepkości i składu fazy ciekłej poddawanej oscylacyjnym wychyleniom. Stwierdzone podczas prac laboratoryjnych i następnie przeprowadzonej analizy wyników wady ograniczające aplikacyjność metody pomiaru odczynu pH do ilościowej charakteryzacji badanego typu bioreaktora stały się przyczynkiem do opracowania w kolejnym etapie prac autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej z komputerową analizą obrazu, przy użyciu której wyznaczono wartości czasu mieszania ($t_{95\%}$) w polimerowych zbiornikach o objętościach nominalnych 2 L i 10 L. Na podstawie zebranych wyników, przy użyciu narzędzi statystycznych wyznaczono współczynniki równań korelacyjnych do przewidywania wartości czasu mieszania w polimerowych zbiornikach.

W dalszej części badań, przy użyciu metod i narzędzi komputerowej mechaniki płynów przeprowadzono obliczenia symulacyjne przepływu wewnątrz polimerowego zbiornika o trzech wariantach zmodyfikowanej geometrii. Wyniki symulacji użyto jako podstawę wyboru jednego wariantu strukturalnej modyfikacji przeznaczonego do dalszych etapów badań obejmujących: ocenę wpływu zmiany geometrii polimerowego zbiornika na wydajność mieszania i wnikania masy w badanym układzie oraz bioprocusową walidację modyfikacji poprzez

przeprowadzenie szeregu hodowli *in vitro* zawiesiny niezróżnicowanych komórek tkanki kalusowej *Nicotiana tabacum* linii *Bright Yellow no. 2*.

Postawiono następujące tezy naukowe:

- Możliwe jest zastosowanie metody kolorymetrycznej do efektywnego wyznaczania ilościowej charakterystyki czasu mieszania w zależności od wartości parametrów operacyjnych bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*.
- Zastosowanie równań korelacyjnych ze współczynnikami, których wartości wyznaczono na podstawie danych eksperymentalnych, pozwala na przewidywanie wartości czasu mieszania w polimerowych zbiornikach w pełnym dostępnym zakresie parametrów operacyjnych bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* i porównywanie przewidywanej wydajności mieszania między polimerowymi zbiornikami o różnych objętościach nominalnych.
- Strukturalne modyfikacje zbiorników do hodowli komórek w układzie bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* mogą wpływać na skrócenie czasu mieszania fazy ciekłej oraz zwiększenie intensywności transportu masy przez powierzchnię międzyfazową bez eskalacji zjawisk negatywnie oddziałujących na hodowaną *in vitro* biomasę, a przez to pozwalają intensyfikować hodowle biomasy w tego typu urządzeniach.

Merytoryczne uzasadnienie i szeroką dyskusję postawionych tez przedstawiono w artykułach naukowych zaliczonych do monotematycznego zestawu publikacji, który stanowi integralną część niniejszej rozprawy doktorskiej. W celu usystematyzowania materiału naukowego zaprezentowanego w artykułach tworzących monotematyczny zestaw publikacji, przedstawiono autoreferat pełniący funkcję przewodnika po opublikowanych materiałach, który podzielono na trzy zasadnicze części:

- Część pierwsza, obejmująca Rozdział 3 pt. „Wprowadzenie”, w której przedstawiono:
 - przegląd literaturowy dotyczący omówienia genezy bioreaktorów *single-use* oraz podziału tej grupy urządzeń na najintensywniej rozwijane typy z uwzględnieniem inżynierskiej charakterystyki poszczególnych typów, wraz ze wskazaniem aktualnych praktycznych zastosowań w celach badawczych oraz w przemyśle,
 - przegląd literatury dotyczący parametrów charakteryzujących wymianę masy w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* obejmujący przedstawienie definicji omawianych parametrów, udokumentowane w literaturze zakresy wartości

eksperymentalnych oraz przykłady równań korelacyjnych do przewidywania wartości tych parametrów w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*,

- przegląd literatury dotyczący omówienia oraz krytycznego porównania metod pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach pod względem wybranych cech wpływających na ich aplikacyjność do określania charakterystyki wydajności mieszania w bioreaktorach *single-use* wyposażonych w polimerowe zbiorniki [A3].
- Część druga, obejmująca Rozdział 4 pt. „Materiały i metody”, w której przedstawiono:
 - opis przyjętej metodyki do ilościowej identyfikacji charakterystyki wydajności mieszania w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave* przy zastosowaniu metody odczynu pH, w tym wyznaczania wartości czasu mieszania i planowania eksperymentu [A1],
 - opis przyjętej metodyki do ilościowej identyfikacji charakterystyki wnikania masy w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave* w zależności od wybranych właściwości fazy ciekłej, w tym wyznaczania wartości współczynnika $k_L a$ [A2],
 - opis przyjętej metodyki do ilościowej identyfikacji charakterystyki wydajności mieszania w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave* przy zastosowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej, z uwzględnieniem opisu układu do rejestracji materiału filmowego, opracowania procedury laboratoryjnej, metodyki przetwarzania i analizy obrazu, sposobu wyznaczania wartości czasu mieszania oraz planowania eksperymentu [A3], [A4].
 - opis przyjętej metodyki analizy struktury falującej powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, z uwzględnieniem sposobu przetwarzania i analizy materiału filmowego [A4],
 - opis przyjętej metodyki symulacji przepływu w zbiorniku bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów dla niezmodyfikowanej oraz wybranych wariantów zmodyfikowanej geometrii zbiornika,
 - opis przyjętej metodyki modyfikacji polimerowego zbiornika bioreaktora z mieszaniem typu *wave* poprzez umieszczenie wypustek w celu intensyfikacji wymiany masy w polimerowym zbiorniku,
 - opis przyjętej metodyki hodowli zawiesiny komórek *N. tabacum* linii BY-2 w niezmodyfikowanych oraz zmodyfikowanych polimerowych zbiornikach bioreaktora z mieszaniem typu *wave*.

- Część trzecia, obejmująca Rozdział 5 pt. „Wyniki i dyskusja”, w której przedstawiono:
 - najważniejsze wyniki prezentujące wpływ wybranych właściwości fazy ciekłej na wymianę masy w polimerowym zbiorniku bioreaktora z mieszaniem typu *wave*, które zostały opublikowane w artykule [A2],
 - najważniejsze wyniki otrzymane przy zastosowaniu metody pH, prezentujące wpływ parametrów pracy bioreaktora z mieszaniem typu *wave* na wydajność mieszania w polimerowym zbiorniku, opublikowane w artykule [A1], wraz z krytyczną oceną aplikacyjności metody pH do określania charakterystyki bioreaktora z mieszaniem typu *wave*,
 - najważniejsze wyniki otrzymane przy zastosowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej, prezentujące wpływ parametrów pracy bioreaktora z mieszaniem typu *wave* na wydajność mieszania w polimerowych zbiornikach o dwóch objętościach nominalnych oraz powiązanie tych wyników z przeprowadzoną klasyfikacją struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, opublikowane w artykule [A4],
 - wyniki otrzymane w ramach części badań poświęconej bioprocessowej weryfikacji polimerowych zbiorników bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* poprzez hodowle komórek *N. tabacum* linii BY-2, poprzedzone analizą wpływu modyfikacji na wydajność mieszania oraz wydajność wnikania masy przeprowadzoną na podstawie wyników symulacji przepływu oraz pomiarów czasu mieszania i współczynnika $k_L a$.

3. Wprowadzenie

3.1. Bioreaktory *single-use*: geneza, systematyka, aplikacyjność

Geneza

Bioreaktory *single-use* to grupa urządzeń charakteryzująca się zastosowaniem zbiorników wykonanych z tworzywa sztucznego, przeznaczonych do hodowli biomasy komórek o podwyższonej wrażliwości na niszczące efekty hydrodynamicznego stresu komórkowego oraz do realizacji bioprocessów angażujących taką biomasę. Pierwsze doniesienie w literaturze naukowej dotyczące bioprocessowego wykorzystania zużywalnych zbiorników wykonanych z polimerowej folii pochodzi z pierwszej połowy lat 60. XX wieku [22]. Zbiorniki w kształcie czworoscianu o objętości roboczej 50 mL wykonano ręcznie ze zgrzewanych płatów folii polipropylenowej lub teflonowej, a następnie wykorzystano do hodowli wglębnej komórek bakterii *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* oraz *Serratia marcescens*. Główną motywacją autorów tych pionierskich badań było opracowanie w pełni funkcjonalnego zamiennika dla kolb Erlenmayera, który pozwoliłby na obniżenie ryzyka zakażeń związanego z kłopotliwym procesem mycia szkła laboratoryjnego po zakończonym bioprocessie, jak i pomysł na wydajniejsze wykorzystanie powierzchni tacy wstrząsarki laboratoryjnej.

Kolejnym przykładem wczesnych zastosowań technologii *single-use* jest praca z lat 90. XX wieku, w której bioreaktor o średnicy 6 cm wykonano z przeźiernej folii na wzór szklanego bioreaktora typu *airlift*, a następnie wykorzystano do hodowli *in vitro* biomasy roślinnej proliferującej w formie zróżnicowanych pędów górnych kilku gatunków roślin użytkowych [23]. Autorzy cytowanej pracy zwrócili uwagę na ekonomiczne ograniczenia w zastosowaniu szklanych bioreaktorów do hodowli zróżnicowanej biomasy roślinnej, wynikające przede wszystkim z wysokiego kosztu zakupu aparatury i wysokich kosztów operacyjnych.

Jeden z etapów rozwoju reaktorów *single-use* obejmował wykorzystanie bioreaktorów membranowych typu *hollow fiber* oraz systemów statycznych. W badaniach tych, zbiorniki o objętości roboczej 25 mL wykonane z gazoprzepuszczalnego fluoropolimeru wykorzystano do statycznej (tj. niemieszanej) hodowli biomasy komórek roślinnych dwóch gatunków: *Nicotiana tabacum* linii *Bright Yellow* no. 2 [24] oraz *Lithospermum erythrorhizon* [25]. Celami obu przytaczanych bioprocessów było otrzymywanie naftochinonów biosyntetyzowanych przez biomasę hodowaną w warunkach *in vitro*.

Już od pierwszych udokumentowanych w literaturze naukowej i wskazanych powyżej prób opracowania zbiorników wykonanych z polimerowych folii i ich zastosowania do hodowli

wgłębnych biomasy mikroorganizmów czy też komórek roślinnych, wyłaniały się argumenty uzasadniające potencjał wynikający z wprowadzenia bioreaktorów *single-use* do szerokiego zastosowania: (i) zwiększenie wydajności bioprocessu poprzez zniwelowanie prawdopodobieństwa utraty hodowli w wyniku zakażenia spowodowanego użyciem niesterylnego klasycznego naczynia hodowlanego wykonanego ze szkła lub stali kwasoodpornej niewłaściwie poddanego procedurze jałowania, (ii) zmniejszenie kosztów inwestycyjnych wynikających z rozbudowy infrastruktury aparaturowej oraz (iii) zmniejszenie jednostkowych kosztów operacyjnych bioprocessu poprzez wyeliminowanie długotrwałych i kosztochłonnych procedur czyszczenia aparatury CIP (ang. *cleaning-in-place*).

W ciągu pierwszych dwóch dekad XXI wieku nastąpiło znaczne upowszechnienie bioreaktorów *single-use* w branży biotechnologicznej i farmaceutycznej, dodatkowo przyspieszone wzrostem zapotrzebowania na wartościowe farmaceutycznie specyficzne produkty pochodzenia biologicznego, będące metabolitami pozyskiwanymi m.in. z izolowanych komórek zwierzęcych czy też roślinnych. Nie bez znaczenia był także postęp dokonany w udoskonalaniu technologii wytwarzania biozgodnych tworzyw sztucznych i biomateriałów o odpowiednich właściwościach mechanicznych. Zakres stosowalności polimerowych zbiorników do hodowli biomasy i realizacji bioprocessów poszerzył się o możliwość przeprowadzania procesów także z wykorzystaniem komórek owadzych, ssaczy, a wreszcie i ludzkich. Współcześnie, komercyjnie dostępne są urządzenia o objętościach roboczych rzędu od kilkudziesięciu mililitrów do kilku metrów sześciennych, zintegrowane z komputerowymi systemami sterowania i różniące się, między innymi, stopniem oprzyrządowania oraz mechanizmem mieszania, możliwymi do dobrania w zależności od wymagań określonych podatnością komórek hodowanej biomasy na niszczenie w mieszanych układach hodowlanych oraz od skali realizacji bioprocessu planowanego do zastosowania w zakładzie produkcyjnym. Systemy bioreaktorów *single-use* są zwykle modularne, umożliwiające dobór dodatkowej aparatury, takiej jak pompy lub kontrolery czujników, jak i rozszerzającej funkcjonalności wykorzystanego układu aparaturowego w miarę zwiększania skali realizowanego bioprocessu. Zalety układów hodowlanych wykorzystujących polimerowe zbiorniki hodowlane jednorazowego użytku, upowszechniona dostępność tego typu systemów oferowanych przez zarówno uznane koncerny czy nowopowstające firmy, które w portfolio swoich produktów posiadają rozwiązania profilowane pod bioprocessowe wymagania użytkowników, jak i obniżający się koszt jednostkowy użycia naczyń i zbiorników jednorazowego zastosowania, w synergiczny sposób przełożyły się na powstanie nowego sektora aparaturowego i aplikacyjnego w przemyśle biofarmaceutycznym i bioinżynierskim, który od pierwszej dekady XXI wieku został określony mianem technologii *single-use* [26].

Obecnie stosowane polimerowe zbiorniki bioreaktorów *single-use* przyjmują formę wolnostojących konstrukcji zgrzewanych bądź odlewanych ze sztywnego tworzywa, lub toreb wykonanych ze zgrzewanych płatów jedno-, kilku- bądź wielowarstwowych folii o różnej elastyczności. Zbiorniki te mocowane są do powierzchni wychyłanych orbitalnie platform lub umieszczane wewnątrz obudowy o wymiarach dostosowanych do zbiorników o danej objętości. Zastosowanie platformy lub obudowy pozwala na łatwe uzupełnienie tak specyficznego układu aparaturowego o dodatkowe komponenty, takie jak elementy układu regulacji temperatury zawartości zbiornika, porty przyłączeniowe przewodów do transportu gazów i cieczy lub złącza odchodzące od czujników wbudowanych w ścianę polimerowego zbiornika bądź sensorów wtopionych bezpośrednio w ścianę zbiornika, czy też umieszczonych wewnątrz jego objętości roboczej. Docelowy kształt oraz odpowiednią sztywność zbiorników wykonanych z elastycznej folii uzyskuje się poprzez utrzymywanie w ich wnętrzu niewielkiego nadciśnienia (zwykle poniżej 0,1 bar [27]) dzięki użyciu zaworu zwrotnego na wylocie przetłaczanego przez zbiornik gazu (najczęściej wyjałowionego powietrza atmosferycznego).

Wolnostojące zbiorniki bioreaktorów *single-use* są zwykle wytłaczane w formie pojedynczej warstwy tworzywa sztucznego pełniącego rolę warstwy kontaktowej, najczęściej wykonanej z jednej z odmian polietylenu, takiej jak polietylen niskiej (LDPE) lub wysokiej (HDPE) gęstości czy też ich mieszanek, polipropylenu (PP) lub poli(etylenu-octanu) winylu (EVA) [28].

Skład poszczególnych warstw folii, z których produkowane są polimerowe zbiorniki o kształcie worków czy też toreb dobierany jest w odniesieniu do specyficznych wymagań biomasy hodowanej w tego typu nietypowych układach aparaturowych [28], [29]. Warstwa kontaktowa, przeznaczona do bezpośredniego kontaktu z medium hodowlanym zawierającym komórki danego typu biomasy, musi cechować się odpornością chemiczną i inertnością biochemiczną, elastycznością, dobrą zgrzewalnością oraz niską podatnością na wymywanie związków chemicznych pozostałych po procesie wytwarzania zapobiegającą ekstrakcji składników folii do mieszanej w zbiorniku fazy ciekłej. Podobnie jak w przypadku tworzyw jedno-warstwowych, warstwa barierowa w wielowarstwowych foliach może być wykonana z LDPE, HDPE, LLDPE, PP lub EVA. Natomiast zadaniem warstwy zewnętrznej, wykonanej najczęściej z poliamidu (PA) lub poli(tereftalanu etylenu) (PET), jest zapewnienie odpowiednich właściwości mechanicznych wielowarstwowego materiału poprzez wysoką odporność na przebicie oraz wytrzymałość na rozciąganie i deformacje kształtu zbiornika [29]. Warstwa barierowa, której zadaniem jest zapobieganie przenikaniu gazów i innych lotnych substancji do otoczenia bioreaktora, może być również wykonana z alkoholu etylowinyloвого (EVOH) lub poli(chlorku winylidenu) (PVDC). Oba wymienione polimery cechują się niską

przepuszczalnością dla gazów i pary wodnej, jednak, ze względu na wrażliwość na wilgoć lub słabą zgrzewalność, warstwy wykonane z tych tworzyw umieszcza się jedynie w foliach wielowarstwowych, pomiędzy warstwą kontaktową a warstwą zewnętrzną [30].

Systematyka

Spośród wielu wariantów bioreaktorów *single-use*, które jako prototypy były opracowywane i badane na wstępnych etapach ekspansji technologii *single-use* w zastosowaniach bioprosesowych, wyłoniły się trzy najobszerniej i najintensywniej rozwijane typy aparatów [1], [9], [31]:

- bioreaktory *single-use* z mieszadłem mechanicznym,
- bioreaktory *single-use* z mieszaniem orbitalnym,
- bioreaktory *single-use* z (oscylacyjnym) mieszaniem typu *wave*.

Bioreaktory *single-use* z mieszadłem mechanicznym pod względem zastosowanego mechanizmu mieszania są podobne do szeroko stosowanych klasycznych reaktorów/bioreaktorów zbiornikowych wyposażonych w zbiorniki wykonane ze szkła lub stali nierdzewnej. Oczywiście analogie w budowie tych dwóch grup aparatów, tj. urządzeń wyposażonych w klasyczne szklane lub stalowe zbiorniki wielokrotnego użytku oraz zużywalne zbiorniki polimerowe sprawiają, że dotychczas opublikowane modele i korelacje matematyczne, opracowane w celu przewidywania wartości parametrów pracy oraz przebiegu procesów realizowanych w bioreaktorach wielokrotnego użytku, mogą być stosowane także do ich zużywalnych odpowiedników aparaturowych [32].

Natlenianie płynu hodowlanego w systemach *single-use* z mieszadłem odbywa się najczęściej barbotażowo, z wykorzystaniem dysz rozpraszających dostarczającą fazę gazową do postaci drobnych pęcherzyków. Zwykle dysze są zintegrowane z jednorazowym zbiornikiem i wraz z nim dostarczane, a ich wyloty są niekiedy strukturalnie zintegrowane z dnem lub dolną częścią ściany bocznej polimerowego zbiornika [33].

Połączenie silnika z wałem mieszadła w polimerowych zbiornikach stosowanych w bioreaktorach *single-use* musi być realizowane bez ryzyka utraty szczelności zbiornika, które prawie zawsze odpowiada za rozjałowienie układu hodowlanego i jego zakażenie mikrobiologiczne. W przypadku zbiorników wykonanych z elastycznych tworzyw polimerowych często wykorzystywane w tym celu są sprzęgła magnetyczne [5], natomiast w przypadku wolnostojących zbiorników wykonanych z twardych polimerów używa się, odpowiednio, uszczelnionych złączy, czyli rozwiązań analogicznych do stosowanych w urządzeniach wyposażonych w szklane lub stalowe zbiorniki [34], [35]. Typ mieszadła wbudowanego w strukturę jednorazowego

zbiornika powinien być dostosowywany do właściwości hodowanej w nim biomasy, w szczególności do wytrzymałości komórek na hydrodynamiczny stres komórkowy wywołany przebywaniem komórek w cyrkulującej lub przepływającej przez naczynie fazy ciekłej medium hodowlanego, który to przepływ charakteryzowany jest zwykle wysokimi wartościami naprężeń ścinających. Z danych katalogowych udostępnianych przez producentów bioreaktorów *single-use* wynika, że jako mieszadła mechaniczne zintegrowane z polimerowymi zbiornikami najczęściej wykorzystywane są turbiny Rushtona lub mieszadła śmigłowe, ale niektórzy z dostawców konfigurują zbiorniki polimerowe również z innymi typami mieszadeł o ograniczonym wpływie na hodowane wglębnie komórki [36].

Spośród wszystkich typów bioreaktorów *single-use*, to właśnie polimerowe zbiorniki jednorazowego użytku wyposażone w mieszadło mechaniczne są dostępne w najszerszym zakresie objętości roboczych. Z jednej strony, zautomatyzowane systemy hodowlane o wysokiej przepustowości (ang. *high-throughput*) umożliwiające prowadzenie niezależnych bioprocusów równolegle w nawet kilkudziesięciu miniaturowych zbiornikach wykorzystują polimerowe zbiorniki o pojemnościach od kilkunastu do kilkuset mililitrów [35], [37], [38]. Natomiast na drugim biegunie rozpiętości dostępnych objętości, największe dostępne obecnie zużywalne zbiorniki wykonane z polimerowego tworzywa mogą pomieścić od kilkuset litrów do nawet kilku metrów sześciennych ciekłego medium hodowlanego [39].

Poniżej przedstawiono wybrane modele bioreaktorów *single-use* z mieszadłem dostępne aktualnie na rynku, wraz z zakresami dostępnych objętości roboczych charakteryzujących modele polimerowych zużywalnych naczyń hodowlanych wykorzystywane w danych aparatach:

- **ABEC CSR[®]**, 50–6000 L
- **Applikon AppliFlex[™] ST**, 0,5–3 L
- **Cytiva Xcellerex[™] XDR**, 10–2000 L
- **Eppendorf BioBLU[®] c**, 0,1–40 L
- **Eppendorf BioBLU[®] f**, 0,0065–3,75 L
- **Merck Mobius[®] 3L**, 3L
- **Sartorius Univessel[®] SU**, 2 L
- **Sartorius Ambr[®]**, 0,001–0,25 L
- **Sartorius Biostat[®] STR**, 50–2000 L
- **Thermo Scientific DynaDrive[™]**, 5–5000 L
- **Thermo Scientific HyPerforma[™]**, 50–2000 L

Powyższe dane zostały zgromadzone na podstawie ofert handlowych dostępnych na stronach internetowych producentów wymienionych bioreaktorów *single-use*, które analizowano podczas przygotowywania niniejszej rozprawy (tj. w okresie lipiec–wrzesień 2025 r.).

Idea opracowania bioreaktorów *single-use* z mieszaniem orbitalnym wywodzi się bezpośrednio z potrzeby powiększania skali układów hodowlanych powszechnie realizowanych laboratoryjnie w biotechnologii i naukach przyrodniczych, czyli okresowych hodowli wglębnych biomasy prowadzonych w kolbach Erlenmayera umieszczanych na tacy wstrząsarki laboratoryjnej wprowadzanej w ciągły orbitalny ruch [40]. Energia mieszania w bioreaktorach z mieszaniem orbitalnym jest wprowadzana do cieczy bez zastosowania mieszadła mechanicznego, zaś wnikanie tlenu do cieczy hodowlanej odbywa się poprzez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz [41].

Zbiorniki do hodowli w systemach bioreaktorów z mieszaniem orbitalnym mają zwykle cylindryczny (lub zbliżony do cylindrycznego) kształt i są produkowane prawie wyłącznie z elastycznych tworzyw. Obudowa, wewnątrz której umieszcza się zbiornik jednorazowego użytku, znajduje się na ruchomej platformie o regulowanej częstotliwości orbitalnych oscylacji. Modele bioreaktorów *single-use* z mieszaniem orbitalnym są przystosowane do hodowli w skali pilotażowej prowadzonych w zbiornikach polimerowych o objętości roboczej od kilku do kilkudziesięciu litrów, ale również i do produkcji przemysłowej w urządzeniach przystosowanych do przeprowadzania szarży hodowlanej o objętości metrów sześciennych [42].

Regularność struktury przepływu cieczy uzyskiwana w polimerowych zbiornikach bioreaktorów *single-use* z mieszaniem orbitalnym oraz podobieństwo mechanizmu mieszania do tego wykorzystywanego w kolbach Erlenmayera wpłynęły na opracowanie charakterystyki tej grupy urządzeń opartej o liczby kryterialne oraz opracowanie równania korelacyjnego do szacowania wartości objętościowego współczynnika wnikania masy po stronie fazy ciekłej $k_L a$ [43]:

$$k_L a \cdot \left(\frac{\nu}{g^2}\right)^{\frac{1}{3}} = 1,06 \cdot 10^{-3} \cdot \left(\frac{n^2 d_0}{g}\right)^{1,06} \left(\frac{V_L}{d^3}\right)^{-1,2} \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-1,06} \left(\frac{d^3 g}{\nu^2}\right)^{-0,12} \left(\frac{\nu}{D_{O_2}}\right)^{-0,12} \quad (1)$$

Zmiennymi w powyższym równaniu korelacyjnym, którego zakres stosowalności obejmuje zbiorniki o objętości od 20 do 200 litrów, są: średnica bioreaktora d , częstotliwość oscylacji n , średnica ruchu orbitalnego d_0 , objętość V_L i lepkość kinematyczna ν cieczy w zbiorniku oraz współczynnik dyfuzji tlenu D_{O_2} .

W dostępnej literaturze naukowej dotrzeć można do doniesień o próbach zmodyfikowania geometrii jednorazowych zbiorników bioreaktorów *single-use* z mieszaniem orbitalnym w celu

zwiększenia efektywności mieszania i intensyfikacji transportu masy. Jedną z modyfikacji polegała na wprowadzeniu do wnętrza bioreaktora elementu w kształcie helisy pozostającego w kontakcie z cylindryczną ścianą zbiornika w celu zwiększenia wartości współczynnika $k_L a$ poprzez rozwinięcie powierzchni wnikania masy [44]. Autorzy wskazują, że poprzez zaproponowaną modyfikację konstrukcji polimerowego zbiornika udało się zwiększyć wydajność wnikania masy przez powierzchnię międzyfazową około 5-krotnie w przypadku zbiornika o objętości nominalnej 30 litrów oraz około 10-krotnie w przypadku zbiornika o objętości nominalnej 1,5 m³.

Inna grupa badawcza zaproponowała wykorzystanie mieszanego orbitalnie zbiornika w kształcie pierścienia z wbudowanymi w jego ściany przegrodami. Pomimo osiągnięcia wysokich wartości współczynnika $k_L a$ oraz porównywalnych parametrów wzrostu biomasy komórek zwierzęcych w porównaniu do hodowli przeprowadzonej w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave*, istotnym mankamentem rozwiązania było znaczne zwiększenie wartości naprężeń ścinających w cieczy oraz trudności w wytwarzaniu przegród z tworzyw wykorzystywanych do produkcji zbiorników *single-use* [45], [46].

Kolejnym testowanym rozwiązaniem prototypowym był polimerowy zbiornik w kształcie prostopadłościanu z łukowato zaokrąglonymi rogami. Zmiana geometrii poskutkowała zwiększeniem wartości mocy właściwej mieszania, ponad dwukrotnym zwiększeniem wartości współczynnika $k_L a$ oraz ponad dwukrotnym zmniejszeniem wartości czasu mieszania w porównaniu do wartości analogicznych parametrów uzyskanych w przypadku zastosowania mieszanego orbitalnie zbiornika o przekroju kołowym. Pomimo obiecujących wyników, autorzy tego rozwiązania nie przeprowadzili weryfikacji bioprosesowej zbiornika o zmodyfikowanej geometrii, która powinna zostać przedstawiona w celu pełnej oceny przebiegu hodowli i zachowania się biomasy przy zmienionych warunkach hydrodynamicznych [47].

Aktualnie dostępne na rynku modele bioreaktorów *single-use* z mieszaniem orbitalnym oferowane są wyłącznie przez dwóch producentów, którzy do swoich aparatów oferują następujące zakresy objętości roboczych naczyń hodowlanych:

- **Kühner OrbShake™**, 1,5–2500 L
- **TPP TubeSpin® Bioreactor**, 0,001–0,4 L

Bioreaktory *single-use* z (oscylacyjnym) mieszaniem typu *wave* stanowią trzecią grupę bioreaktorów wyposażanych w zbiorniki jednorazowego użytku. Mechanizm mieszania zastosowany w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave* opiera się na wzbudzeniu falowego ruchu cieczy wskutek oscylacyjnego ruchu platformy, na której umieszcza się zbiornik, w którym

realizuje się dany bioprocess. W większości dostępnych komercyjnie modeli bioreaktorów z mieszaniem typu *wave*, ruch platformy odbywa się wokół jednej poziomej osi. Jednakże dostępne są również rozwiązania, w których, w celu zwiększenia wydajności mieszania, oscylacyjne wychylenia są sprzężone z ruchem posuwisto-zwrotnym wykonywanym przez polimerowy zbiornik wzdłuż liniowych szyn [6]. Kąt i częstotliwość oscylacyjnych wychyleń platformy jest najczęściej regulowana przy użyciu komputera wyposażonego w dedykowane oprogramowanie. W aparatach zaliczanych do tej grupy bioreaktorów *single-use* uzyskiwane jest mieszanie bez wykorzystania mieszadła mechanicznego oraz natlenianie cieczy hodowlanej przez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową, a połączenie tych efektów procesowych skutkuje potencjałem ograniczenia wartości maksymalnych naprężeń ścinających i sprawia, że ten typ bioreaktorów *single-use* jest szczególnie często wykorzystywany do hodowli komórek wrażliwych na hydrodynamiczny stres komórkowy, czyli na przykład komórek zwierzęcych (owadźcych, ssaczy i ludzkich) pozbawionych ściany komórkowej, a chronionych jedynie przez niewytrzymałą mechanicznie błonę komórkową, czy też komórek roślinnych otoczonych umiarkowanie wytrzymałą mechanicznie ścianą komórkową, której struktura oparta jest na mikrofibrach celulozowych, lub protoplastów komórek roślinnych sztucznie pozbawianych ścian komórkowych [7], [48], [49].

Polimerowe zbiorniki do realizacji hodowli w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* są najczęściej wytwarzane z dwóch prostokątnych płatów folii z polimerowego tworzywa sztucznego, zgrzewanych wzdłuż ich krawędzi. Utworzona w ten sposób górna powierzchnia zbiornika jest doposażana według indywidualnego zamówienia w króćce przewodów do transportu cieczy i gazów oraz inne przyłącza, takie jak, przykładowo, porty do pobierania próbek. Zbiorniki te mogą być również wyposażone we wbudowane w powierzchnię dolnej ściany jednorazowe optyczne miniaturowe czujniki (sensory) stężenia tlenu rozpuszczonego w fazie wodnej lub odczynu pH medium hodowlanego, lub zaawansowane impedancyjne czujniki stężenia żywych komórek w pożywce. Jednorazowe czujniki, poza chemicznymi elementami czułymi na zmianę wybranych właściwości mieszaniny hodowlanej, zawierają złącza do przewodów światłowodowych lub elektrycznych transmitujących sygnały do przetwornika w celu automatycznie przeprowadzanej analizy zmian parametrów układu.

Przepływ cieczy w bioreaktorach *single-use* typu *wave* wywoływany oscylacyjnym ruchem platformy, na której umieszczony jest polimerowy zbiornik, charakteryzuje się dużą definiowaną zmiennością w zależności od wielu czynników, takich jak amplituda i częstotliwość oscylacji, stopień napełnienia zbiornika czy właściwości reologiczne mieszanej cieczy. Rozwinięcie powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz w trakcie każdego cyklu oscylacji oraz

intensywność załamywania powstających fal mają istotny związek z szybkością wnikania masy oraz wydajnością mieszania realizowanego w polimerowych zbiornikach tego typu. Szczegółowy opis parametrów charakteryzujących wymianę masy w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* zamieszczono w Rozdziale 3.2 niniejszej rozprawy.

Objętości nominalne polimerowych zbiorników oferowanych przez producentów bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* mieszczą się w zakresie od 1 do 200 litrów, co przekłada się na zakres maksymalnej objętości roboczej od około 0,5 do około 100 litrów. Urządzenia tego typu są często wykorzystywane do bioprocessów realizowanych w skali ćwierć- lub półtechnicznej, czyli na etapie między skalą laboratoryjną realizowaną na płytkach wielodłukowych lub w kolbach Erlenmayera a skalą produkcyjną [6].

Przykłady aktualnie oferowanych modeli bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave*, wraz z dostępnym zakresem objętości roboczych polimerowych zbiorników oferowanych dla każdego z systemów, przedstawiono poniżej (w nawiasach podano sposób realizacji oscylacyjnych wychyleń zbiorników):

- **Sartorius** Biostat® RM, 1–100 L (oscylacyjne wychylenia 1D)
- **Cytiva** *ReadyToProcess* WAVE™ 25, 1–100 L (oscylacyjne wychylenia 1D)
- **Cell-tainer**™, 0,15–200 L (oscylacyjne wychylenia 2D).

Aplikacyjność

Wszystkie typy bioreaktorów *single-use* oferują szereg zalet wynikających z zastosowania polimerowych zbiorników jednorazowego użytku przeznaczonych do hodowli biomasy lub realizacji innych bioprocessów. Współcześnie dostępne w komercyjnej ofercie polimerowe zbiorniki są fabrycznie presterylizowane przez ich producenta, co przekłada się na znaczne zredukowanie, a nawet wyeliminowanie kosztów operacyjnych i zużycia mediów związanych z czyszczeniem aparatury po każdej szarży danego bioprocessu oraz na skrócenie przestojów układu bioreaktora *single-use*. Zminimalizowane ryzyko zakażenia układu hodowlanego sprawia, że bioreaktory *single-use* są wykorzystywane w procesach, w których priorytetowe jest zachowanie jak najwyższej czystości produktu, realizowanych w zakładach zachowujących zgodność z normami dobrej praktyki wytwarzania (ang. *Good Manufacturing Practice*, GMP), które m.in. obejmują producentów biofarmaceutyków [50].

Zastosowanie bioreaktorów *single-use*, w porównaniu do procesów realizowanych w zbiornikach wielokrotnego użytku, tj. szklanych lub stalowych, stwarza możliwości zachowania konfigurowalności organizacji realizacji procesu produkcji oraz znacznie ułatwia przestrajanie układu i wprowadzanie modyfikacji w instalacji wykorzystywanej do prowadzenia

bioproduktu. Zastosowanie bioreaktorów *single-use* umożliwia producentom z sektora biofarmaceutycznego wdrażanie instalacji o łącznych pojemnościach sięgających dziesiątek metrów sześciennych, w których czas potrzebny na dostosowanie ciągu produkcyjnego do wytwarzania dowolnego nowego bioproduktu, w zależności od aktualnego zapotrzebowania, może być nie dłuższy niż cztery tygodnie [50], [51]. Przegląd zastosowań bioreaktorów *single-use* pogrupowanych według typu zastosowanego układu bioreaktorowego, z wyszczególnieniem objętości roboczej V oraz objętości nominalnej V_{nom} polimerowego zbiornika, przedstawiono w Tabeli 1.

Bioreaktory *single-use* i wykorzystywane w nich zużywalne polimerowe zbiorniki znalazły zastosowanie w szczególności w nowoczesnych obszarach przemysłu biofarmaceutycznego, między innymi na etapie analiz przesiewowych w trakcie realizacji badań klinicznych [32], opracowywaniu szczepionek nowej generacji, czy też w postępie, który w ostatnim dwudziestolecu dokonał się w medycynie spersonalizowanej [52] oraz terapiach komórkowych [53]. W tego typu aplikacjach skala produkcji jest niewielka, a przez to mogłaby okazać się nierentowną przy zastosowaniu klasycznych bioreaktorów wyposażonych w szklane czy stalowe zbiorniki wielokrotnego użytku wymagające sterylizacji, a przez to również i przestojów instalacji pomiędzy kolejno realizowanymi szarżami danego bioproduktu. Udokumentowane w doniesieniach literaturowych zastosowania bioreaktorów *single-use* z mieszadłem obejmują między innymi produkcję przeciwciał poli- i monoklonalnych [54] wykorzystywanych w immunoterapii, diagnostyce medycznej, ale również i w wysoko selektywnych metodach analitycznych, a także wytwarzanie inhibitorów proteaz [55] zapobiegających rozwojowi chorób pasożytniczych przenoszonych przez owady, na które jak dotąd brakuje skutecznych leków. Kolejną z biofarmaceutycznych aplikacji bioreaktorów *single-use* zaopatrzonych w zużywalne zbiorniki z mieszadłem do realizacji bioproduktów w małej objętości było wykorzystanie do równoległego prowadzenia różnych wariantów tego samego bioproduktu na etapie optymalizacji składu pożywki przeznaczonej do hodowli bakterii z rodzaju *Neisseriaceae* [56]. W hodowlach tych uzyskiwano wydzielane zewnątrzkomórkowo pęcherzyki błony komórkowej o potencjalnym zastosowaniu jako biotyczne adiuwanty w preparatach szczepionkowych, wzmacniające immunogenność podstawowego czynnika biotycznego.

Od samego początku rozwoju i dalszej ewolucji konstrukcyjnej bioreaktorów *single-use* obszar zastosowań urządzeń wykorzystujących zalety mieszania orbitalnego, jak i mieszania typu *wave* wywołwanego oscylacyjnymi wychyleniami całego zbiornika, obejmuje głównie bioproduktów realizowane z zastosowaniem biomasy komórek zwierzęcych i ludzkich oraz biomasy komórek i organów roślinnych. Wyróżniane w doniesieniach literaturowych jest wykorzystanie bioreaktorów *single-use* tej grupy do otrzymywania cząstek wirusów namnażanych

bezpośrednio w komórkach danego gatunku ssaka, które to bioprodukty wirusowe, po procesie atenuacji, stanowią czynnik biotyczny w atenuowanych wariantach wektorowych szczepionek przeciwwirusowych [57], a w przypadku zachowania wirulencji namnożonych wirusów wykorzystywane są jako wirusowe wektory w testowanych terapiach genowych [58]. Bioreaktory *single-use* z mieszaniem orbitalnym oraz aparaty z mieszaniem typu *wave* odegrały kluczową rolę w trakcie jakże doskonale pamiętanej pandemii COVID-19. Urządzenia tego typu były wykorzystywane do przeprowadzanej w warunkach *in vitro* transkrypcji specyficznych matryc mRNA [59], które to makrocząsteczki stanowiły czynnik biotyczny nowych generacji szczepionek, takich jak Comirnaty™ (nazwa kodowa: BNT162b2) czy Spikevax (nazwa kodowa: mRNA-1273), produkowanych, odpowiednio, przez przedsiębiorstwa Pfizer-BioNTech oraz Moderna Inc. Wspomniane preparaty szczepionkowe w znacznym stopniu odpowiadały za upowszechnienie w populacji ludzkiej odporności na infekcje wywoływane kolejnymi wariantami wirusa SARS-CoV-2. Innym zastosowaniem omawianej grupy bioreaktorów *single-use* w trakcie pandemii COVID-19 było wytwarzanie białka *spike* koronawirusa SARS-CoV-2 na potrzeby badań serologicznych [60].

Istotną współczesną gałąź zastosowania bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* stanowi otrzymywanie cennych farmaceutycznie metabolitów wtórnych biosyntetyzowanych przez hodowaną w warunkach *in vitro* biomasę roślinną. W doniesieniach literaturowych odnotowano wykorzystanie bioreaktorów z mieszaniem typu *wave* przy produkcji enzymu α -galaktozydazy A stosowanego w leczeniu choroby metabolicznej Fabry'ego ze splątków (protonema) mchu z rodzaju *Physcomitrella*, czy związków z grupy triterpenoidów ekstrahowanych z hodowanych włącznie zawiesin komórek tkanki kalusowej *Ocimum basilicum*, charakteryzujących się właściwościami przeciwzapalnymi [61] i przeciwutleniającymi [62], a także wykorzystywanych między innymi do zapobiegania uszkodzeniom wątroby wywołanym działaniem leków stosowanych w chemioterapii [63]. Bioreaktory *single-use*, w których ruch cieczy jest wzbudzany oscylacyjnymi wychyleniami polimerowego zbiornika, były jak dotąd wykorzystywane również do powiększania skali produkcji biomasy ludzkich limfocytów CAR-T, hodowanych na potrzeby terapii komórkowych [12], czy też innych specyficznych biofarmaceutyków zyskujących na aplikacyjności, takich jak przeciwciała monoklonalne [64].

Tabela 1. Przegląd praktycznych zastosowań różnych typów bioreaktorów *single-use*.

Biomasa	Bioprodukt	V (L)	V_{nom} (L)	Źródło
Bioreaktory <i>single-use</i> z mieszadłem				
komórki jajnika chomika chińskiego (CHO)	przeciwciała monoklonalne	640–1000	1000	[65]
ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (hMSC)	biomasa	1,0–2,4	3,0	[66]
ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste (hMSC)	biomasa	0,015	0,015	[67]
ludzkie indukowane pluri-potencjalne komórki macierzyste (hiPSC)	biomasa	0,20	0,25	[68]
komórki jajnika chomika chińskiego (CHO)	immunoglobulina G (IgG)	$24 \times 0,18$	$24 \times 0,25$	[69]
komórki jajnika chomika chińskiego (CHO)	immunoglobulina G (IgG)	200	200	[70]
grzyby strzępkowe <i>Penicillum</i> sp.	inhibitor proteaz	2,0	2,0	[71]
bakterie <i>Escherichia coli</i> K12	inhibitor proteaz	50	50	[72]
bakterie Gram-ujemne <i>Neisseriaceae</i> sp.	pęcherzyki błony komórkowej (OMVs)	$24 \times 0,008$	$24 \times 0,015$	[35]
Bioreaktory <i>single-use</i> z mieszaniem orbitalnym				
ludzkie limfoblasty (MEG-01)	biomasa	1,0	1,0	[73]
komórki siatkówki kaczkowej (AGE1.CR.pIX)	cząstki wirusa grypy typu A	5,0–10,0	10	[74], [75]
komórki jajnika chomika chińskiego (CHO)	przeciwciała monoklonalne	8,0	10	[74]

komórki siatkówki kaczkowej (AGE1.CR.pIX)	cząstki wirusa Ankara (MVA-CR19)	5,0	10	[76]
<hr/> Bioreaktory <i>single-use</i> z mieszaniem typu <i>wave</i> <hr/>				
mikroalgi <i>Cryptocodinium cohnii</i>	kwasy dokosaheksaenowy (ω -3 nienasycony)	1	15*	[16]
ludzkie embrionalne komórki macierzyste (hESC)	biomasa	0,40	1	[11]
splątki mchu <i>Physcomitrella patens</i>	α -galaktozydaza	100	200	[14]
Gram-dodatnie bakterie <i>Streptomyces clavuligerus</i>	kwasy klawulanowy	5,0	10,0*	[18]
owadzie komórki <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf9)	owadzie białko rekombinowane	1,0	2,0	[19]
ludzkie limfocyty CAR-T	biomasa	1,0	2,0	[12]
komórki miazgi (CMCs) bazylii pospolitej	triterpenoidy	1,0	2,0	[15]
zarodki somatyczne jodły kaukaskiej	dojrzałe zarodki somatyczne do syntetycznych nasion	4,0	10	[77]
ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK-293)	przeciwciała poliklonalne	15–20	50	[13]
ludzkie embrionalne komórki nerki (HEK-293)	białko <i>spike</i> wirusa SARS-CoV-2	30	50	[60]
polimeraza RNA z bakteriofagu T7	mRNA do szczepionki przeciw SARS-CoV-2	100	200	[59]
chondrocyty bydła domowego (CP5)	biomasa	0,30	2,0	[8]

lizat komórek tytoniu szlachetnego (BY-2)	białko syntezowane pozakomórkowo (CFP)	1,0	2,0*	[17]
transfekowane owadzie komórki <i>Spodoptera frugiperda</i> (Sf21)	białka rekombinowane	20	10	[78]

* – bioreaktor z dwuwymiarowym ruchem platformy

Wśród szeregu niezaprzeczalnych zalet wynikających z użytkowania polimerowych zbiorników, zastosowanie bioreaktorów *single-use* w produkcji przemysłowej jest jednak poważnym źródłem powstawania znacznej ilości i masy odpadów w formie zużytych tworzyw sztucznych, których zagospodarowanie i przetwarzanie wymaga często dekontaminacji materiału biologicznego potencjalnie powodującego skażenia. Innym problemem, dostrzegalnym przez pryzmat skomplikowanej struktury wielowarstwowych folii wykorzystywanych do wytworzenia zbiorników, są wieloetapowe strategie recyklingu tego typu odpadów przeznaczonych do ponownego użytku. Upowszechnianie się systemów bioreaktorów *single-use* w przemyśle farmaceutycznym, jak i w sektorze badań i rozwoju, wraz z coraz bardziej zaostrzonymi wymaganiami środowiskowymi nakładanymi przez organy regulacyjne na przemysł farmaceutyczny, w tym branżę *life-science*, synergicznie sprawiają, że producenci bioreaktorów *single-use* zaczęli w ostatnich latach dostrzegać konieczność wdrażania strategii ponownego wykorzystania odpadów z tworzyw sztucznych użytych do wytworzenia polimerowych zbiorników i obecnie kierują się w stronę bardziej zrównoważonych rozwiązań [79], [80]. Pomimo tego, głównie z uwagi na restrykcyjną konieczność stosowania certyfikowanych i standaryzowanych materiałów zużywalnych dopuszczonych do kontaktu z materiałem biologicznym, obecnie polimerowe zbiorniki bioreaktorów *single-use* są wciąż produkowane z surowców pierwotnych, zaś powstające odpady po chemicznej dekontaminacji i stabilizacji biologicznej są zwykle kierowane do spalarni wpływając na emisję dużej ilości gazów cieplarnianych [81], [82].

Innym mankamentem polimerowych zbiorników, w które wyposażane są bioreaktory *single-use*, jest uzależnienie od dostaw jednorazowych zbiorników wytwarzanych najczęściej przez wyłącznie jednego producenta, będącego jednocześnie dystrybutorem danego systemu bioreaktora *single-use*. Zależność ta może być problematyczna w przypadku zaburzenia łańcucha dostaw lub w okresach podwyższonego zapotrzebowania na materiały zużywalne, w tym też zbiorniki, skutkując znacznymi opóźnieniami w dostawach do ośrodków badawczych lub limitując zdolności produkcyjne zakładów [83], [84]. Tego rodzaju znaczne (nawet ponad

roczne!) opóźnienia w dostawach polimerowych zbiorników do różnego typu bioreaktorów *single-use* były obserwowane na przykład w szczytowej fazie pandemii COVID-19, z uwagi na drastyczny wzrost zapotrzebowania na tego typu aparaturę w przemyśle biofarmaceutycznym, w szczególności wśród producentów preparatów szczepionkowych.

Próbując jak najbardziej kompleksowo scharakteryzować aplikacyjność bioreaktorów *single-use* wyposażonych w polimerowe zbiorniki do hodowli, warto również wspomnieć o możliwym niekontrolowanym wpływie na hodowaną w tych zbiornikach biomasę wywieranym przez potencjalnie łągowane lub wymywane związki chemiczne pochodzące z tworzyw sztucznych strukturalnie tworzących polimerowy zbiornik, takich jak pozostałości katalizatorów, surfaktantów, rozpuszczalników, stabilizatorów i innych dodatków funkcjonalnych domieszkowanych do żywicy używanej w procesie produkcyjnym lub produkty rozkładu tych komponentów zachodzącego pod wpływem promieniowania gamma w trakcie presterylizacji polimerowych zbiorników przed dostarczeniem ich do odbiorcy końcowego [85], [86]. Oczywiście przed tego typu negatywnym wpływem na hodowaną biomasę zabezpieczyć można się korzystając z certyfikowanych zbiorników oferowanych przez uznanych dostawców. Ocena biozgodności danego materiału pod względem obecności niepożądanych związków wymywanych polega na wykrywaniu nawet śladowych stężeń tego typu związków chemicznych w fazie ciekłej pozostającej w przedłużonym kontakcie ze zbiornikiem w warunkach prowadzenia danego bioprocessu, jak i na badaniu parametrów hodowli pod kątem zaburzeń proliferacji biomasy hodowanej w testowanych zbiornikach [87], [88]. Badania pod kątem podatności na migrację związków łągowanych polegają na określaniu stężenia niepożądanych substancji obecnych w rozpuszczalniku (np. roztworach etanolu, surfaktantów, roztworów o różnym stężeniu soli, kwasów lub zasad) poddanemu przedłużonemu kontaktowi z badanym tworzywem w podwyższonej temperaturze [89]. W przypadku korzystania z oferty uznanych dostawców oferujących certyfikowane polimerowe zbiorniki, dane takie powinny być dostępne dla użytkownika końcowego danego typu polimerowego zbiornika już na etapie wyboru konkretnego rozwiązania aparaturowego poprzedzającego jego finalne zamówienie.

3.2. Parametry charakteryzujące wymianę masy w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*

Czas mieszania

Czas mieszania to parametr definiowany jako okres potrzebny do osiągnięcia pewnego założonego stopnia homogeniczności mieszaniny składającej się początkowo z przynajmniej dwóch składników różniących się pod względem przynajmniej jednej właściwości. Parametr ten jest ilościowym wskaźnikiem wydajności mieszania w bioreaktorze, związanej bezpośrednio z szybkością osiągania jednorodności cieczy hodowlanej, kluczowej dla poprawnego przebiegu hodowli [90]. Wydajne mieszanie przyspiesza transport masy w układzie, a z drugiej strony transport masy może być ograniczany przez efektywność mieszania. W przypadku bioreaktorów, wartość czasu mieszania zależy od geometrii zbiornika, w którym realizowany jest dany bioprocess, zastosowanego mechanizmu mieszania, energii mieszania oraz właściwości mieszanej fazy ciekłej, a w przypadku układów hodowlanych – właściwości zawiesiny komórek w wodnym roztworze pożywki [5]. Fluktuacje parametrów mieszaniny (tj. pożywki hodowlanej) wywołane obecnością gradientów stężenia tlenu, substratów, czy też metabolitów, mogą mieć istotny wpływ na wydajność hodowli oraz zmianę przebiegu natywnych szlaków metabolicznych odpowiadających za biosyntezę wybranych bioproduktów w komórkach hodowanej biomasy. Negatywny efekt może mieć przebywanie biomasy zarówno w obszarach o zbyt niskim, jak i zbyt wysokim stężeniu wybranego substratu w porównaniu do średniego stężenia tego związku chemicznego w zbiorniku bioreaktora [91].

Przyczyną powstawania gradientów stężenia w trakcie realizacji bioprocessu, skutkujących wyczerpaniem lub nadmiarem istotnego składnika mieszaniny hodowlanej, jest niedostateczna szybkość przenoszenia wybranego składnika mieszaniny w stosunku do szybkości jego asymilacji lub zewnątrzkomórkowej sekrecji przez elementy biomasy (tj. komórki, agregaty komórek, organy). Ryzyko wystąpienia tego zjawiska można ocenić poprzez porównanie wartości stałej czasowej asymilacji wybranego substratu przez biomasę τ_c , z wartością stałej czasowej τ odnoszącej się do procesu transportu tego składnika w bioreaktorze w warunkach prowadzenia bioprocessu [92]. Wartość τ_c można określić na podstawie ilorazu stężenia substratu S oraz szybkości asymilacji, będącej iloczynem właściwej szybkości asymilacji q_S oraz stężenia biomasy X [93]:

$$\tau_c = \frac{S}{q_S X} \quad (2)$$

Z kolei przykładowym sposobem doświadczalnego wyznaczenia stałej czasowej τ , odnoszącej się do transportu składnika mieszaniny, jest wyznaczenie wartości czasu mieszania w bioreaktorze. Zbliżone wartości stałych czasowych τ_c odnoszących się do asymilacji przez komórkę wybranych substratów lub tlenu, jak i czasu mieszania w bioreaktorze, mogą sygnalizować zwiększone ryzyko wystąpienia limitowania wzrostu biomasy wywołanego niejednorodnością środowiska hodowli [92], [94].

Przegląd wartości czasu mieszania charakteryzujących bioreaktory *single-use* z mieszaniem typu *wave* przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Przegląd udokumentowanych w literaturze wartości czasu mieszania charakteryzujących bioreaktory *single-use* z mieszaniem typu *wave* z jednowymiarowymi lub dwuwymiarowymi wychyleniami platformy (zgodnie z publikacją [A1]).

Typ	Nazwa handlowa	Objętość nominalna (L)	Objętość cieczy (L)	Parametry mieszania	Czas mieszania (s)	Źródło
Wychylenia 1D	BioWave™	2	0,8–1,0	α : 5–10°	264–9	[95]
		20	8–10	ω : 6–24 min ⁻¹	1402–40	
		100	40–50		837–22	
		200	100–200	α : 4–12° ω : 5–25 min ⁻¹	874–65	
	Wave Bioreactor	20	10	ω : 5–40 min ⁻¹	10–5	[2]
		200	100	α : 5–10°	60–5	
	ReadyToProcess	2	0,2	ω : 2–40 min ⁻¹	367–4	[A1]
	WAVE™ 25		0,6	α : 2–12°	861–4	
			1,0		893–4	
	ReadyToProcess	10	3	ω : 10–40 min ⁻¹	42–13	[48]
WAVE™ 25		5	α : 8–12°	195–15		
	20	6		156–37		
		8		377–38		
		10		343–34		
Wychylenia 2D	Cell-tainer™	20	5	ω : 15–35 min ⁻¹	15–9	[96]
			10		16–12	
			15		20–13	
		200	75	ω : 7–30 min ⁻¹	135–108	
			115		140–65	
		150		115–80		

Na podstawie analizy danych zebranych w Tabeli 2 można stwierdzić, że wartości czasu mieszania w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave* silnie zależą od częstotliwości oraz amplitudy ruchu oscylacyjnego platformy oraz od stopnia napełnienia zbiornika. Duża rozbieżność między wartościami czasu mieszania zmierzonymi przy najmniejszych oraz największych wartościach parametrów mieszania typu *wave*, wynosząca nawet dwa rzędy wielkości, świadczy o istotności doboru odpowiedniej amplitudy i częstotliwości oscylacyjnych wychyleń zbiornika dla poprawnego przebiegu realizowanego w takim układzie bioprocessu. Znajomość charakterystyki czasu mieszania danego urządzenia, ustalonej przy użyciu odpowiednio dobranej metody pomiaru, oraz opracowanie na podstawie danych doświadczalnych modeli matematycznych do przewidywania intensywności mieszania może wydatnie zmniejszyć koszty prac badawczo-rozwojowych mających na celu między innymi optymalizację warunków hodowli danego typu biomasy. Charakterystykę metodyki pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach *single-use* przedstawiono w Rozdziale 3.3 niniejszej rozprawy.

Dotychczas opublikowane doniesienia literaturowe zawierają pojedynczy przykład równania korelacyjnego do przewidywania wartości czasu mieszania w bioreaktorze Cell-tainer™ z dwuwymiarowym ruchem platformy, na której umieszczony jest polimerowy zbiornik [73]:

$$t_m = 10^{-0.0203\omega - 0.0176\alpha + 0.0217V_L + 1.8025} - 1 \quad (3)$$

Współczynniki Równania 3 obliczono na podstawie danych dotyczących czasu mieszania uzyskanych przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów [97]. Zakres stosowności Równania 3 obejmuje wartości amplitudy oscylacji α od 5 do 16°, częstotliwości oscylacji ω od 5 do 25 min⁻¹ oraz objętości roboczej V_L od 3 do 20 L cieczy w polimerowym zbiorniku o objętości nominalnej 20 L. Autorzy przytaczanych badań zaznaczają jednak, że zgodność wartości czasu mieszania uzyskanych przy zastosowaniu komputerowych symulacji z danymi doświadczalnymi istotnie spadała wraz ze zmniejszającą się intensywnością mieszania. Według Autorów cytowanej publikacji [97], błąd związany z niedoszacowaniem wartości czasu mieszania w badanym układzie przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów wynosił więcej niż 50% w porównaniu z danymi eksperymentalnymi uzyskanymi przy częstotliwości $\omega = 5$ min⁻¹, amplitudzie $\alpha = 8^\circ$ oraz objętości roboczej $V_L = 5$ L [97]. Należy mieć na uwadze, że dane otrzymywane przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów, w szczególności opisujące skomplikowaną i obciążoną stochastyczną zmiennością strukturę przepływu w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*, mogą być uznane za miarodajne wyłącznie pod warunkiem starannej walidacji obliczeń poprzedzonej precyzyjnym odwzorowaniem rzeczywistej geometrii polimerowego zbiornika wypełnionego fazą ciekłą oraz gazową, wyznaczeniem

siatki obliczeniowej o wysokiej jakości oraz doбором parametrów algorytmu obliczeniowego z uwzględnieniem jego charakterystyki oraz ograniczeń.

Objętościowy współczynnik wnikania masy po stronie fazy ciekłej $k_L a$

Zastosowania bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* obejmują bioproceny realizowane w warunkach tlenowych, w których kluczową i nadrzędną kwestią jest zapewnienie wydajnego transportu tlenu, dostarczanego w procesie wnikania przez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz z gazu wypełniającego objętość polimerowego zbiornika nad falującą fazą ciekłą do cieczy zawierającej biomasę. Niska rozpuszczalność tlenu w wodzie, stanowiącej podstawowy (i jedyny) rozpuszczalnik składników pożywek hodowlanych, wpływa na ograniczoną możliwość akumulacji tego gazu rozpuszczonego w medium hodowlanym. Właściwość ta sprawia, że konieczne jest stałe dostarczanie tlenu w trakcie bioproceny z szybkością nie mniejszą niż szybkość jego asymilacji przez biomasę [98]. Bilans masowy tlenu rozpuszczonego w fazie ciekłej w bioreaktorze można opisać następującym równaniem:

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR = K_L a (C^* - C_{O_2}) - q_{O_2} \cdot C_X \quad (4)$$

Człon akumulacyjny dC_{O_2}/dt w Równaniu 4, odpowiadający szybkości zmiany w czasie wartości stężenia tlenu rozpuszczonego w cieczy, równa się różnicy między szybkością wnikania tlenu z gazu do cieczy *OTR* (ang. *oxygen transfer rate*) a szybkością asymilacji tlenu przez biomasę *OUR* (ang. *oxygen uptake rate*). Szybkość asymilacji tlenu równa jest iloczynowi właściwej szybkości asymilacji tlenu q_{O_2} , specyficznej dla danego typu biomasy, oraz stężenia biomasy C_X . Szybkość wnikania tlenu w Równaniu 4 jest wyrażona jako iloczyn współczynnika przenikania po stronie cieczy K_L , właściwej powierzchni międzyfazowej a oraz potencjału przenikania tlenu, wyrażonego jako różnica równowagowego stężenia tlenu C^* i stężenia tlenu rozpuszczonego w cieczy C_{O_2} . Odwrotność współczynnika przenikania K_L równa się sumie oporów wnikania tlenu przez fazę gazową oraz ciekłą. Biorąc pod uwagę niską rozpuszczalność tlenu w wodzie, trafnie zakłada się, że główny opór przenoszenia tlenu przez powierzchnię międzyfazową występuje po stronie fazy ciekłej, wobec czego wartość współczynnika przenikania K_L jest w przybliżeniu równa wartości współczynnika wnikania po stronie cieczy k_L [99].

Doświadczalnie, wartości współczynnika k_L oraz powierzchni właściwej a zwykle wyznacza się wspólnie, w formie iloczynu $k_L \cdot a$, zwanego objętościowym współczynnikiem wnikania masy po stronie cieczy. Współczynnik $k_L a$ jest jednym z podstawowych wskaźników wykorzystywanych do charakteryzacji bioreaktorów. Najczęściej wykorzystywaną metodą

wykorzystywaną do eksperymentalnego określenia wartości $k_L a$ jest metoda odgazowywania (ang. *gassing-out method*), polegająca na monitorowaniu zmian wartości stężenia tlenu w trakcie napowietrzania cieczy wysyczonej uprzednio gazem obojętnym, najczęściej azotem lub hellem [100]. Dane literaturowe dotyczące wartości współczynnika $k_L a$ charakteryzujące bioreaktory z mieszaniem typu *wave* z jednowymiarowym ruchem platformy, które uzyskano przy zastosowaniu metody odgazowywania przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Przegląd danych literaturowych dotyczących eksperymentalnie uzyskanych wartości współczynnika $k_L a$ w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave* z jednowymiarowym ruchem platformy.

Parametry ruchu oscylacyjnego	Stopień napełnienia fl , objętość nominalna V_{nom}	$k_L a$ (h^{-1})	Źródło
$\alpha: 2 - 12^\circ, \omega: 2 - 40 \text{ min}^{-1}$	$fl = 5 - 50\%, V_{nom} = 2 L$	1,1–19	[3]
$\alpha: 5 - 10^\circ, \omega: 10 - 30 \text{ min}^{-1}$	$fl = 50\%, V_{nom}: 2 L$	2–19	[19]
$\alpha: 2 - 10^\circ, \omega: 10 - 40 \text{ min}^{-1}$	$fl = 20\%, V_{nom} = 10 L$	10–71	[101]
$\alpha: 8 - 12^\circ, \omega: 10 - 40 \text{ min}^{-1}$	$fl: 30 - 50\%, V_{nom} = 10 L$	1,6–110	[48]
$\alpha: 5 - 10^\circ, \omega: 10 - 30 \text{ min}^{-1}$	$fl = 50\%, V_{nom} = 10 L$	2–22	[19]
$\alpha: 8 - 12^\circ, \omega: 10 - 40 \text{ min}^{-1}$	$fl: 30 - 50\%, V_{nom} = 20 L$	1,6–140	[48]
$\alpha: 5 - 9^\circ, \omega: 15 - 30 \text{ min}^{-1}$	$fl = 50\%, V_{nom} = 50 L$	2–20	[19]

Na podstawie danych przedstawionych w Tabeli 3 można wywnioskować ogólne zależności, że wartość współczynnika $k_L a$ w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave* zwiększa się wraz ze zwiększaniem wartości amplitudy i częstotliwości ruchu oscylacyjnego platformy, na której umieszczony jest polimerowy zbiornik poddawany oscylacyjnym wychyleniom, oraz wraz ze zwiększaniem stopnia napełnienia cieczą zbiornika. Wartości współczynnika $k_L a$ w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave* są porównywalne z wartościami obserwowanymi w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem orbitalnym: w przypadku zbiorników o objętości nominalnej 50 litrów przy stopniu napełnienia $fl = 50\%$, w zbiorniku mieszanym orbitalnie otrzymano $k_L a$ na poziomie 5–16 h^{-1} [43], zaś w zbiorniku bioreaktora z mieszaniem typu *wave* uzyskano wartości w przedziale 2–20 h^{-1} [19]. W przypadku zbiornika mieszanego orbitalnie o objętości nominalnej 10 litrów przy stopniu napełnienia $fl = 50\%$ zaobserwowano wartości $k_L a$ w przedziale 5–38 h^{-1} [43], w porównaniu do wartości w przedziale 1,6–31 h^{-1} [48] zmierzonymi w układzie bioreaktora z mieszaniem typu *wave* przy tej samej objętości roboczej.

Wartości $k_L a$ charakteryzujące polimerowe zbiorniki bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* są nieco niższe w porównaniu do wartości osiąganych w bioreaktorach *single-use* z mieszadłem o podobnych objętościach nominalnych. W jednym z badań, w polimerowym

zbiorniku z mieszadłem mechanicznym o objętości nominalnej 3 litrów uzyskano wartości $k_L a$ w przedziale 7–38 h⁻¹ [34], w porównaniu do wartości $k_L a$ w przedziale 1,1–19 h⁻¹ zmierzonych w polimerowym zbiorniku bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* o pojemności 2 litrów [3], [19]. Znacznie wyższe wartości współczynnika $k_L a$, rzędu 10²–10³ h⁻¹ zaobserwowano w badaniach z wykorzystaniem klasycznych bioreaktorów zbiornikowych z mieszadłem o pojemnościach 7,5, 25 oraz 75 litrów, wykorzystywanych do bioprocessów z udziałem mikroorganizmów cechujących się bardzo dużym zapotrzebowaniem na tlen [102], [103].

Wartość $k_L a$, charakteryzującą dany układ bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, można szacować przy użyciu równań korelacyjnych, w których zmiennymi niezależnymi mogą być parametry charakteryzujące pracę i właściwości danego reaktora lub liczby kryterialne. W dotychczas opublikowanych doniesieniach literaturowych opisano kilka propozycji równań korelacyjnych do przewidywania wartości współczynnika $k_L a$ w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave* zdefiniowanych na podstawie danych doświadczalnych, które zebrano w Tabeli 4.

Tabela 4. Przykłady opublikowanych równań korelacyjnych do przewidywania wartości współczynnika $k_L a$ w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*.

Równanie korelacyjne	Zakres stosowalności	Źródło
$k_L a = 10,379 \omega^{0,594} (\sin \alpha)^{0,443} Q_G^{0,592}$	(5) $\alpha: 2 - 12^\circ,$	[3]
$Sh a L = 13,423 Re_L^{0,522} Re_G^{0,664} Sc^{0,527}$	(6) $\omega: 2 - 40 \text{ min}^{-1},$ $fl: 5 - 50\%,$ $Q_G: 0.1 - 1 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ dla $V_{nom} = 2 L$	
$Sh = \frac{k_L \cdot L}{D_L}, Re_L = \frac{\omega L^2}{\nu_L} \sin \alpha, Re_G = \frac{u_G \cdot L}{\nu_G}, Sc = \frac{\nu_L}{D_L}$		
$k_L a = Sc^{-0,5} \cdot \left(\frac{\varepsilon}{\nu}\right)^{0,25} \cdot \left(\frac{A}{V_L}\right) + \left(\frac{12}{\pi^{0,5}}\right) \cdot \frac{D_L^{0,5} B(0,4(S - 0.08)^{2,5} c^5 L_c)^{1,25} \rho_{wave}^{0,25}}{\nu^{0,25} m_{wave}^{0,25} V_L \bar{d}_b W g^{2,25}}$	(7) $fl: 30 - 50\%, \alpha = 8^\circ,$ $\omega: 10 - 40 \text{ min}^{-1}$ dla $V_{nom} = 10 L$ $fl: 30 - 50\%,$ $\alpha = 12^\circ,$ $\omega: 10 - 40 \text{ min}^{-1}$ dla $V_{nom} = 20 L$	[104]

Zakres stosowalności równań 1 i 2 przedstawionych w Tabeli 4 w pełni pokrywa się z dostępnym zakresem regulacji amplitudy i częstotliwości ruchu oscylacyjnego systemu bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25* wykorzystywanego w trakcie badań oraz z zakresem stopnia napełnienia wykorzystywanego w części doświadczalnej niniejszej rozprawy doktorskiej polimerowego zbiornika *Cellbag™* o objętości nominalnej 2 L [3]. Zmienne oraz poszczególne człony równania 7 przedstawionego w Tabeli 4 zostały dobrane w oparciu o mechanistyczny model, w którym powiązано wpływ odnawiania powierzchni międzyfazowej w reżimie burzliwym oraz procesu załamywania fali i porywania pęcherzy gazu pod powierzchnią cieczy na

intensywność wnikania masy przez powierzchnię międzyfazową w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave* wyposażonym w zbiorniki do hodowli o objętościach nominalnych 10 L i 20 L [104].

3.3. Krytyczne porównanie aplikacyjności metod pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach

Pomiar wartości czasu mieszania zarówno w reaktorach chemicznych, bioreaktorach, jak i innych urządzeniach wyposażonych w mieszalniki wypełnione cieczą, polega na obserwacji procesu mieszania, trwającego od momentu dodania znacznika wywołującego zmianę wybranej właściwości cieczy do momentu osiągnięcia zadanego stopnia homogeniczności mieszaniny. W przypadku mieszania znacznika T w pewnym obszarze obserwacji wewnątrz cieczy \mathfrak{R}_s (ang. *region of scrutiny*) bez zachodzącej reakcji chemicznej, niehomogeniczność mieszaniny d_s można zdefiniować jako maksymalny ułamek między wartością bezwzględnej różnicy średniego stężenia znacznika wewnątrz obszaru obserwacji C_{Ts} i stężenia asymptotycznego znacznika $C_{T\infty}$ a stężeniem asymptotycznym $C_{T\infty}$ [105]:

$$d_s(\mathfrak{R}_s; t) \equiv \max \left(\frac{|C_{Ts}(\mathfrak{R}_s; t) - C_{T\infty}|}{C_{T\infty}} \right) \quad (8)$$

Przyjmując pewien próg odchylenia od homogeniczności δ , czas mieszania $t_{\delta s}$ wewnątrz obszaru obserwacji można zdefiniować jako najdłuższy czas od momentu dodania znacznika do osiągnięcia wartości $d_s(\mathfrak{R}_s; t)$ równej δ . Wobec powyższej definicji, określenie wartości czasu mieszania następuje z pominięciem wszelkich niejednorodności wewnątrz obszaru obserwacji \mathfrak{R}_s . Wynika z tego, że zwiększenie objętości obszaru obserwacji \mathfrak{R}_s skutkuje pominięciem niejednorodności w większej objętości cieczy i, tym samym, zmniejszeniem uzyskanej wartości czasu mieszania [106].

Eksperymentalne metody określania wartości czasu mieszania w bioreaktorach można podzielić ze względu na sposób pozyskiwania danych o aktualnym rozkładzie stężenia znacznika w cieczy na następujące ogólne kategorie [5]:

- metoda sensorowa,
- metoda kolorymetryczna,
- planarna laserowo indukowana fluorescencja.

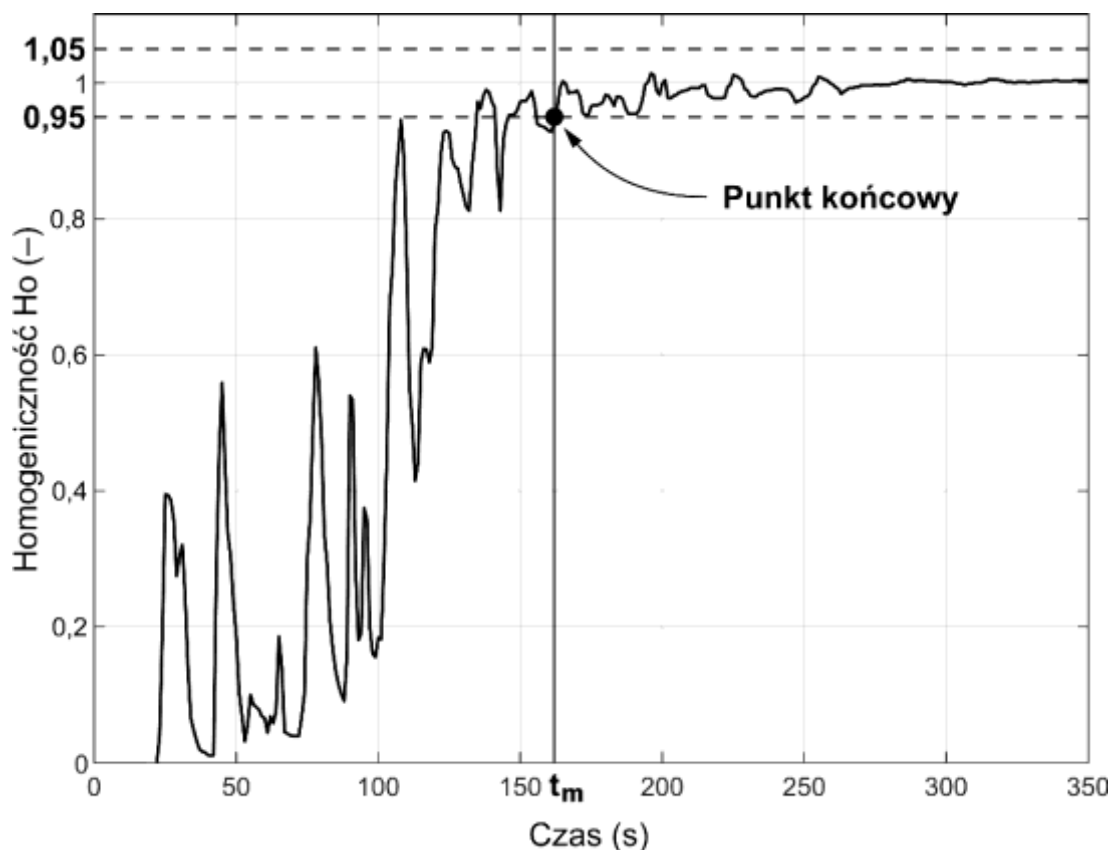
Metoda sensorowa

Metoda sensorowa pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach opiera się na śledzeniu zmian w czasie odczytów układu pomiarowego wyposażonego w przynajmniej jeden czujnik

rejestrujący *on-line* zmiany wybranej właściwości mieszanej cieczy, a która to zmiana jest wywoływana dodaniem znacznika do układu. Istotnymi czynnikami wpływającymi na jakość pomiaru oraz otrzymywane wartości czasu mieszania w metodzie sensorowej jest umiejscowienie i liczba czujników oraz ich czas reakcji, wpływający na maksymalną rozdzielczość pomiaru. Przyjmuje się, że w celu zapewnienia jak największej dokładności pomiaru, czas reakcji czujnika powinien być przynajmniej pięciokrotnie krótszy od mierzonej wartości czasu mieszania [100]. Wyróżnia się odmiany metody sensorowej na podstawie mierzonej właściwości mieszanej cieczy oraz typu zastosowanego czujnika. Czas mieszania w poszczególnych odmianach metody sensorowej definiuje się jako okres od momentu dodania znacznika do trwałego osiągnięcia pewnego progu homogeniczności, którego wartość najczęściej przyjmuje się jako równą 95%. Wartość homogeniczności Ho można wyznaczyć stosując poniższy wzór:

$$Ho(t) = \frac{Y(t) - Y_0}{Y_\infty - Y_0} \quad (9)$$

W równaniu 9 symbol Y oznacza wartość mierzonej właściwości cieczy w wybranym wariantcie metody w czasie t , w momencie tuż przed dodaniem znacznika lub końcową (asymptotyczną) wartość mierzonej właściwości, przy oznaczeniu symbolu Y odpowiednio indeksami dolnymi 0 lub ∞ . Przebieg zmian wartości homogeniczności Ho oraz sposób wyznaczania wartości czasu mieszania przedstawiono ilustracyjnie na Rysunku 1. W przypadku bioreaktorów *single-use*, najprostszym sposobem implementacji metody sensorowej do pomiaru czasu mieszania jest zastosowanie czujnika wbudowanego w ścianę polimerowego zbiornika wybranego układu bioreaktora *single-use*. W przypadku, gdy zbyt wąski zakres pomiarowy, zbyt długi czas reakcji lub zbyt mała maksymalna częstotliwość odczytów wartości mierzonego parametru przez wbudowany czujnik uniemożliwiają jego zastosowanie, alternatywnym podejściem może być montaż w polimerowym zbiorniku bioreaktora *single-use* dodatkowego czujnika zespolonego z zewnętrznym układem pomiarowym. Należy jednak mieć na uwadze, że umieszczenie dodatkowych elementów wewnątrz zbiornika może wpłynąć na obciążenie otrzymanych danych eksperymentalnych trudnym do ilościowego ujęcia błędem wynikającym z inwazyjności metody pomiaru i obecności dodatkowego stałego elementu w przestrzeni wewnętrznej zbiornika, który zaburza strukturę przepływu fazy ciekłej.



Rysunek 1. Graficzne przedstawienie sposobu wyznaczania wartości czasu mieszania przy zastosowaniu metody sensorowej (na podstawie [A1]). Na wykresie widoczne są skokowe zmiany wartości homogeniczności w początkowej fazie pomiaru oraz stopniowe ustalanie się mierzonej wartości w miarę postępu procesu mieszania. Poziome kreskowane linie oznaczają założony dopuszczalny próg odchylenia od homogeniczności, np. wynoszący $\pm 0,05$. Czas mieszania t_m to okres, który upłynął od momentu dodania znacznika ($t = 0$ s) do momentu trwałego osiągnięcia wartości homogeniczności w zadanym przedziale, oznaczonego jako punkt końcowy pomiaru.

Jednym z wariantów metody sensorowej jest metoda temperaturowa pomiaru czasu mieszania, polegająca na śledzeniu zmian wartości temperatury mieszanej cieczy po dodaniu znacznika o temperaturze innej niż panująca wewnątrz zbiornika lub po rozpoczęciu mieszania wewnątrz zbiornika napelnionego dwoma objętościami cieczy różniącymi się temperaturą [107]. Ze względu na duży wpływ temperatury na lepkość cieczy, zastosowanie tego wariantu metody sensorowej jest niezalecane w przypadku pomiaru czasu mieszania w cieczach o wysokiej lepkości [5]. Najprostszym sposobem implementacji metody temperaturowej jest wykorzystanie czujnika temperatury wbudowanego w ścianę polimerowego zbiornika lub w podstawę, na której umieszcza się zbiornik w układzie badanego bioreaktora *single-use*, pod

warunkiem odpowiednio krótkiego czasu reakcji czujnika w stosunku do oczekiwanych wartości czasu mieszania. Wadą metody temperaturowej jest podatność otrzymywanych odczytów pomiaru temperatury na zakłócenia związane z transportem ciepła między zbiornikiem a jego otoczeniem w trakcie pomiaru, którego strumień zależy od temperatury cieczy w zbiorniku w danym momencie pomiaru oraz stopnia odizolowania zbiornika od otoczenia.

Innym wariantem metody sensorowej jest metoda pomiaru przewodnictwa polegająca na pomiarze zmian wartości przewodnictwa (konduktancji) mieszanej cieczy po dodaniu roztworu elektrolitu, najczęściej w formie stężonego roztworu soli [108], [109]. Kolejny wariant, metoda pomiaru odczynu pH, opiera się z kolei na obserwowaniu zmian wskazań miernika odczynu pH po dodaniu do mieszanej fazy ciekłej znacznika wywołującego zajście natychmiastowej reakcji zobojętniania między kwasem i zasadą obecnymi w znaczniku oraz w cieczy wewnątrz zbiornika [110]. Do zastosowania metody przewodnictwa lub metody pH w wybranym układzie bioreaktora *single-use* konieczne jest zwykle zamontowanie dodatkowych czujników (selektywnych elektrod), których obecność może zakłócać przepływ wewnątrz polimerowego zbiornika, co ma szczególne znaczenie w przypadku badania układów o małej objętości roboczej. Zakres stosowalności dedykowanych sensorów odczynu pH bazujących na zmiennej fluorescencji organicznego barwnika, które często stanowią fabryczne wyposażenie polimerowych zbiorników wykorzystywanych w bioreaktorach *single-use*, jest zwykle zbyt wąski i niewystarczający, by możliwe było ich zastosowanie do pomiarów czasu mieszania, podczas których obserwowane wartości pH wykraczają poza zakres typowy dla procesów biotechnologicznych. Jedną z implementacji metody sensorowej zakładała użycie dwóch elektrod pH umieszczonych w pobliżu miejsca dozowania znacznika oraz w maksymalnej odległości od tego obszaru. Sygnałem, na podstawie którego wyznaczano moment osiągnięcia pożądanej jednorodności mieszaniny, była w tym przypadku różnica wartości odczynu pH uzyskanych przy użyciu obu elektrod [111].

Metoda kolorymetryczna

Pomiar czasu mieszania przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej polega na obserwacji stopniowej zmiany zabarwienia cieczy wewnątrz reaktora wywołanej dodaniem znacznika. Warunkiem koniecznym do zastosowania metody kolorymetrycznej jest przynajmniej częściowa przezierność materiału, z którego jest wykonany polimerowy zbiornik w badanym układzie bioreaktora *single-use*. Zmiana barwy mieszanej fazy ciekłej może zachodzić bez udziału lub z udziałem reakcji chemicznej. W pierwszym przypadku rolę znacznika może pełnić roztwór inertnego barwnika wprowadzanego do niezabarwionej cieczy. W drugim przypadku

o wymieszaniu cieczy świadczy nie tylko fizyczna obecność znacznika w danym obszarze, lecz również kontakt reagentów na poziomie molekularnym. Reakcją chemiczną w przypadku metody kolorymetrycznej może być reakcja zobojętniania w obecności zmieniającego barwę jednego lub więcej wskaźnika odczynu pH lub reakcja utleniania jodu cząsteczkowego I_2 w obecności skrobi, po dodaniu roztworu jonów tiosiarczanowych $S_2O_3^{2-}$, skutkująca odbarwieniem brunatno zabarwionej mieszaniny [112]. W przypadku pomiaru czasu mieszania w zbiornikach wykonanych z materiałów polimerowych, należy uwzględnić potencjalne ryzyko trwałego barwienia materiału zbiornika przez reagenty lub wskaźniki. Spis udokumentowanych w literaturze zastosowań metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach różnych typów bioreaktorów *single-use* przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Spis zastosowań metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach różnych typów bioreaktorów *single-use* (zgodnie z [A3]).

Objętość robocza	Nazwa handlowa (jeżeli dostępna)	Wskaźnik	Analiza obrazu		Źródło
			Oprogramowanie	Przestrzeń barw (jeżeli dotyczy)	
Bioreaktory <i>single-use</i> z mieszadłem					
3 L	Mobius CellReady™	jod i skrobia	nie podano	nie podano	[34]
15 mL	Ambr™	jod i skrobia	nie dotyczy (obserwacja)	nie dotyczy	[113]
1 L	Allegro™ STR 50	czerwień metylowa i błękit tymolowy	MATLAB	RGB (kanał G)	[114]
Bioreaktory <i>single-use</i> z mieszaniem orbitalnym					
2 L, 3 L, 30 L, 1500 L	Kühner™ ES-W shaker	czerwień metylowa i błękit tymolowy	nie podano (autorskie)	RGB (kanał G)	[42]
600 mL	TubeSpin® 600	czerwień metylowa i błękit tymolowy	nie podano	RGB (kanał G)	[115]
2 L		czerwień metylowa i błękit tymolowy	MATLAB	RGB (kanał G)	[116], [117]
Bioreaktory <i>single-use</i> z mieszaniem typu <i>wave</i>					
2 L, 20 L	BIOSTAT® CultiBag™ RM	jod i skrobia	nie dotyczy (obserwacja)	nie dotyczy	[118]
10 L		fenoloftaleina	nie dotyczy (obserwacja)	nie dotyczy	[101]

Znaczącą zaletą metody kolorymetrycznej jest możliwość rejestracji przebiegu procesu mieszania cieczy przy zastosowaniu kamer i późniejszej obróbki nagrań przy użyciu komputerowych algorytmów przetwarzania i analizy obrazu. Takie podejście eliminuje zakłócenia związane z subiektywną oceną aktualnej barwy mieszanej cieczy przez obserwatora oraz umożliwia pozyskanie dodatkowych informacji na temat struktury przepływu w badanym układzie [112]. Wymienione zalety metody kolorymetrycznej można jednoznacznie zinterpretować jako pożądane cechy zwiększające aplikacyjność metodyki i precyzję uzyskiwanych dzięki niej wyników.

Ważnym aspektem wpływającym na jakość danych otrzymywanych przy użyciu metody kolorymetrycznej jest sposób pozyskiwania obrazu przedstawiającego proces mieszania [119]. Techniczne aspekty związane z projektowaniem procedury laboratoryjnej, dotyczące m.in. doboru kamery, jej umiejscowienia, doboru parametrów nagrywania oraz zagadnienia związane z komputerową analizą obrazu, omówiono szczegółowo i obszernie w formie praktycznego poradnika w Rozdziałach 3, 4 i 5 artykułu [A3] będącego częścią zestawu monotematycznych publikacji naukowych wchodzących w skład niniejszej rozprawy.

Planarna laserowo indukowana fluorescencja

Kolejną metodą, która może być wykorzystywana do uzyskiwania ilościowych danych opisujących proces mieszania w bioreaktorach *single-use*, jest planarna laserowo indukowana fluorescencja (ang. *planar laser-induced fluorescence*, pLIF). Metoda pLIF polega na obserwowaniu przestrzennego i czasowego rozkładu intensywności fluorescencji barwnika na płaszczyźnie oświetlanej laserem o odpowiedniej długości fali. Obserwacja procesu mieszania odbywa się za pośrednictwem kamery o wysokiej częstotliwości odczytu, której płaszczyzna ekspozycji jest równoległa do płaszczyzny emitowanego światła laserowego, zaś elementy optyczne są wyposażone w filtr wyodrębniający z obrazu światło o długości fali charakterystycznej dla widma emisji wybranego barwnika. Często stosowanymi barwnikami w metodzie pLIF są organiczne substancje takie jak rodamina B [120], [121] lub fluoresceina [110], [122]. Zastosowanie laserowo indukowanej fluorescencji umożliwia bardzo dokładny pomiar czasu mieszania w oparciu o rozkład stężenia barwnika w oświetlanej płaszczyźnie z wysoką rozdzielczością przestrzenną i czasową. Ponadto możliwa jest szczegółowa analiza struktury przepływu w badanym układzie na podstawie obserwowanego kształtu obszarów różniących się stężeniem barwnika. Wzbudzenie fluorescencji barwnika w wąskiej płaszczyźnie światła laserowego sprawia, że w przeciwieństwie do metody kolorymetrycznej, nie występuje ryzyko wzajemnego przesłaniania obszarów cieczy o różnej barwie. Zastosowanie metody pLIF wiąże się z koniecznością kalibracji układu pomiarowego w celu powiązania intensywności obserwowanego zabarwienia ze stężeniem barwnika w mieszaninie. Ograniczenia w implementacji wzbudzonej laserowo fluorescencji wynikają z konieczności stosowania specjalistycznego sprzętu, takiego jak kamera o dużej szybkości i źródło emitujące płaszczyznę światła laserowego, oraz zapewnienia odpowiednich właściwości optycznych polimerowego materiału bioreaktora w celu zapobiegnięcia rozpraszania światła wzbudzającego fluorescencję, obserwowanego na przykład podczas skraplania się parującej cieczy w trakcie realizacji pomiaru.

Krytyczne porównanie metod pomiaru czasu mieszania

Przedstawione powyżej eksperymentalne metody pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach porównano pod kątem kilku właściwości wpływających na ich aplikacyjność: rozdzielczości przestrzennej i czasowej pomiaru, inwazyjności metody względem struktury polimerowego zbiornika, kosztów inwestycyjnych związanych z pozyskaniem sprzętu, wymagań aparaturowych, dostępnych metod pozyskiwania i analizy danych eksperymentalnych oraz możliwości pozyskania dodatkowych informacji na temat struktury przepływu. Porównanie przedstawiono w poniższej Tabeli 6.

Tabela 6. Krytyczne porównanie eksperymentalnych metod pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach *single-use* wyposażonych w polimerowe zbiorniki.

↓ Kryterium Metoda →	sensorowa	kolorymetryczna	pLIF
Rozdzielczość przestrzenna	⊖ Bardzo niska Śledzenie przebiegu mieszania odbywa się wyłącznie w miejscu montażu czujnika.	⊕ Wysoka Powiązana z rozdzielczością kamery cyfrowej. Możliwe wzajemne przesłanianie obszarów cieczy o różnej barwie.	⊕ Bardzo wysoka Powiązana z rozdzielczością kamery cyfrowej. Obserwacja fluorescencji w wąskiej oświetlanej płaszczyźnie eliminuje ryzyko przesłaniania elementów cieczy.
Rozdzielczość czasowa	⊖ Niska Ograniczona czasem inercji zastosowanej elektrody, czyli szybkością reakcji na zmianę parametru.	⊕ Wysoka Powiązana z częstotliwością odczytu kamery cyfrowej. Zwykle wynosi nie mniej niż 25 odczytów na sekundę.	⊕ Bardzo wysoka Powiązana z częstotliwością odczytu kamery dużej szybkości. Możliwe do uzyskania kilkaset odczytów na sekundę.
Inwazyjność	⊖ Tak Inwazyjność metody zależy od konieczności montażu dodatkowych czujników wewnątrz polimerowego zbiornika, co wiąże się z ingerencją w jego strukturę.	⊕ Nie Pomiar odbywa się poprzez obserwację zbiornika bez konieczności wprowadzania dodatkowych elementów do jego wnętrza.	⊕ Nie Pomiar odbywa się poprzez obserwację zbiornika bez konieczności wprowadzania dodatkowych elementów do jego wnętrza.
Koszty inwestycyjne	⊕ Bardzo niskie Możliwe zastosowanie czujników fabrycznie wbudowanych w zbiornik lub łatwo dostępnych elektrod pH lub konduktometrycznych.	⓪ Umiarkowane Konieczny zakup kamery cyfrowej oraz montaż ogólnego oświetlenia pola widzenia kamery.	⊖ Bardzo wysokie Konieczny zakup specjalistycznego oświetlenia laserowego i kamery o dużej częstotliwości odczytu z filtrami optycznymi.
Wymagania aparaturowe	⊕ Niskie Konieczny montaż dodatkowego lub wykorzystanie fabrycznie dostępnego czujnika.	⓪ Umiarkowane Wymagana przynajmniej częściowa przezierność polimerowego zbiornika.	⊖ Wysokie Wymagane dobre właściwości optyczne materiału, z którego wykonano zbiornik.
Przystępność metod przetwarzania i analizy danych	⊕ Duża Przetwarzanie sygnałów z czujników możliwe przy zastosowaniu szeroko dostępnych narzędzi statystycznych.	⓪ Umiarkowana Możliwe manualne (obserwacje) lub wspomagane komputerowo (algorytmy przetwarzania obrazu) określenie wartości czasu mieszania.	⊖ Ograniczona Określenie wartości czasu mieszania możliwy wyłącznie przy użyciu komputerowych algorytmów przetwarzania obrazu.
Możliwość pozyskania dodatkowych danych o strukturze przepływu	⊖ Nie Nie ma możliwości obserwacji struktury przepływu cieczy.	⊕ Tak Możliwe pozyskanie danych o strukturze przepływu.	⊕ Tak Możliwe pozyskanie bardzo dokładnych danych o strukturze przepływu.

3.4. Podsumowanie aktualnego stanu wiedzy

Upowszechnienie bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* na rynku dostępnej komercyjnie aparatury wywarło istotny wpływ na rozwój przemysłu biofarmaceutycznego w ciągu ostatnich dwóch dekad. Wynikające z zastosowania tego typu nietypowych układów aparaturowych zmniejszone ryzyko zakażeń oraz skrócenie przestojów instalacji produkcyjnej, związane z zastosowaniem polimerowych zużywalnych zbiorników z przeznaczeniem do hodowli głównie materiału biologicznego wrażliwego na warunki zbyt intensywnego mieszania układu hodowlanego z uwagi na delikatną i niewytrzymałą mechanicznie strukturę ściany komórkowej (np. komórki roślinne, mikroalgi) lub jej brak (np. komórki zwierzęce, protoplasty komórek roślinnych), sprawiło, że opłacalne stało się produkowanie innowacyjnych bioproduktów wytwarzanych na niewielką skalę. Z drugiej strony, zastosowanie technologii *single-use* pozwala na skrócenie etapu rozwoju i szybkie powiększanie wydajności produkcji nowych produktów biofarmaceutycznych, czego szczególnym przykładem jest wprowadzenie w ciągu kilkunastu miesięcy do masowego obrotu preparatów szczepionkowych skierowanych przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, w których czynnik biotyczny stanowiły makrocząsteczki mRNA. Pomimo stale zwiększającej się popularności, względnie krótki okres komercyjnej dostępności bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave*, w porównaniu do ugruntowanego i tradycyjnego użycia bioreaktorów zbiornikowych z mieszadłem, wpływa na wciąż ograniczony zasób modeli matematycznych i równań korelacyjnych umożliwiających szacowanie wartości parametrów procesowych istotnych z punktu widzenia przebiegu bioprocessu, takich jak czas mieszania czy objętościowy współczynnik wnikania masy $k_L a$. Z tego względu, istotnym badawczo i praktycznie oraz ekonomicznie umotywowanym jest opracowanie nowych metod pomiaru tych parametrów w celu powiązania funkcyjnymi zależnościami ich wartości z wielkościami charakteryzującymi pracę danego bioreaktora *single-use* oraz zachodzącymi w polimerowych zbiornikach procesami.

W trakcie bioprocessów realizowanych z wykorzystaniem włącznie hodowanych komórek, bardzo często obserwowanym zjawiskiem jest stopniowa zmiana właściwości ciekłego medium hodowlanego, w którym zawieszono są komórki, w szczególności właściwości reologicznych pożywki, wraz z postępującym zwiększaniem się stężenia biomasy oraz z intensywną zewnątrzkomórkową sekrecją metabolitów pierwotnych i wtórnych biosyntetyzowanych w wyniku przemiany materii definiowanej specyficznością szlaków metabolicznych. Wynikające z tego zwiększenie lepkości cieczy mieszanej w danym układzie może ograniczać generowanie i propagację charakterystycznych fal na powierzchni cieczy w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave*,

co w powiązaniu z rosnącym wraz z czasem trwania hodowli zapotrzebowaniem biomasy na tlen może skutkować niedostatecznie szybkim wnikaniem, a w ostateczności wyczerpaniem tlenu zakumulowanego w cieczy hodowlanej, skutkującym szybkim zamieraniem cennego materiału biologicznego utrzymywanego w nienatycznych warunkach *in vitro*. Rozwiązaniem, którego opracowanie i wdrożenie mogłoby ograniczyć negatywne skutki wystąpienia powyższych zjawisk limitujących wydajność bioprocessów, a przynajmniej częściowo wyeliminować te zjawiska, mogłoby być wprowadzenie modyfikacji polimerowego zbiornika bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, ukierunkowanych na intensyfikację transportu masy przez powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz oraz zwiększających wydajność mieszania zachodzącego wewnątrz fazy ciekłej. Istotnym wymaganiem, które powinny spełniać proponowane modyfikacje zbiorników, jest zachowanie podstawowych zalet układów z mieszaniem typu *wave* wyposażonych w polimerowe zbiorniki, w szczególności niskich wartości naprężeń ścinających w fazie ciekłej utrzymywanych dzięki bezpęcherzykowemu napowietrzaniu poprzez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową oraz mieszania cieczy bez zastosowania mieszadła mechanicznego realizowanego w wyniku oscylacyjnych wychyleń całego polimerowego zbiornika generujących fale przepływające wewnątrz jego objętości.

Zaproponowanie modyfikacji zwiększających wydajność mieszania typu *wave* oraz intensyfikujących transport masy przez powierzchnię międzyfazową, określenie wpływu proponowanych modyfikacji na proliferację biomasy oraz potencjalna komercjalizacja nowych rozwiązań mogłaby znacząco wpłynąć na poszerzenie możliwości zastosowania oraz zwiększenie wydajności układów bioreaktorowych wykorzystujących polimerowe zużywalne zbiorniki do hodowli *in vitro* izolowanych komórek prowadzonych w warunkach mieszania typu *wave*.

4. Materiały i metody

4.1. Bioreaktor *single-use* z mieszaniem typu *wave*

W części doświadczalnej pracy doktorskiej zastosowano bioreaktor *ReadyToProcess* WAVE™ 25 (Rysunek 2) wyprodukowany przez firmę GE Healthcare, obecnie wspierany serwisowo i osprzętowo przez firmę Cytiva. Centralnym elementem modularnego systemu bioreaktora była jednostka *ReadyToProcess* WAVE™ 25 Rocker, wyposażona w napęd wprawianej w oscylacyjne wychylenia platformy Tray 10, na której umieszczano polimerowe zbiorniki do hodowli Cellbag™ o dwóch różnych objętościach nominalnych: 2 L i 10 L. Platforma Tray 10 była wyposażona we wbudowany czujnik temperatury oraz wbudowane elementy grzewcze (ogniwa Peltiera) umożliwiające regulację temperatury zawartości zbiornika. Termostatowanie układu wspomagane było uchylną pokrywą odizolowującą polimerowy zbiornik od środowiska zewnętrznego, w tym również od wpływu światła.



Rysunek 2. Bioreaktor *ReadyToProcess* WAVE™ 25 [27].

Jednostka centralna systemu wykorzystywanego w badaniach bioreaktora *single-use* była połączona z jednostką kontrolno-pomiarową *ReadyToProcess*™ CBCU, odpowiedzialną za dostarczanie do polimerowego zbiornika mieszanki gazowej o zadanym składzie i natężeniu objętościowym oraz za odbieranie i przetwarzanie sygnałów z fabrycznie wbudowanych w zbiorniki Cellbag™ miniaturowych optycznych sensorów: odczynu pH i stężenia tlenu rozpuszczonego w fazie wodnej (ang. *dissolved oxygen*, DO). Jednostka CBCU umożliwia dozowanie do układu mieszanki azotu, tlenu oraz dwutlenku węgla, skomponowanej z gazów o wysokiej czystości podawanych z niezależnych butli ciśnieniowych (N₂, O₂, CO₂) lub

powietrza atmosferycznego za pośrednictwem zewnętrznej sprężarki, przez okresowo zmieniane filtry ($\phi = 0,25 \mu\text{m}$) zapewniające jałowość dostarczanych gazów.

Polimerowe, zużywalne zbiorniki do hodowli Cellbag™ były wykonane z dwóch płatów wielowarstwowej folii polimerowej o handlowej nazwie Bioclear™ 11 [123], zgrzanych wzdłuż ich obwodu. W toku prac eksperymentalnych wykorzystywano zbiorniki Cellbag™ o objętościach nominalnych 2 L i 10 L. Zgodnie z katalogowymi danymi producenta, potwierdzonymi korespondencją e-mailową z jego krajowym przedstawicielem, dopuszczalny zakres stopnia napełnienia cieczą zbiornika Cellbag™ 2 L wynosił od 10% do 50%, a w przypadku zbiornika Cellbag™ 10 L od 5% do 50%.

Niezależnie od wariantu objętościowego, dolna płaszczyzna polimerowych zbiorników wyposażona była w adaptery optycznych miniaturowych sensorów odczynu pH i DO, w których centralnej części znajdowały się usztywnione polimerowe łatki z fluorescencyjnymi barwnikami czuły na zmianę stężenia wykrywanego składnika cieczy, tj. kationów wodorowych w przypadku sensora odczynu pH oraz cząsteczek tlenu w przypadku sensora DO. Wzbudzenie emisji barwnika oraz odbiór sygnału zwrotnego z miniaturowych sensorów pH i DO odbywał się poprzez włókna światłowodowe podłączone do jednostki CBCU. Zakres pomiarowy czujnika odczynu pH wbudowanego w jednorazowy zbiornik wynosił od 4,5 do 8,5 z dokładnością $\pm 0,1$, natomiast zakres weryfikowalnej pracy sensora DO wynosił od 0% do 250% stężenia nasycenia powietrzem z dokładnością $\pm 5\%$. Górna płaszczyzna zbiorników Cellbag™ zawierała: (i) wlot i (ii) wylot gazu, oba zabezpieczone filtrami ($\phi = 0,25 \mu\text{m}$) zapewniającymi jałową pracę zbiornika oraz jednocześnie przeciwdziałającymi emisji materiału biologicznego na zewnątrz zbiornika, (iii) port z nakrętką wykorzystywany do szybkiego opróżniania lub napełniania zbiornika dużą ilością cieczy, (iv) port strzykawkowy z końcówką typu Luer do bezigłowego pobierania próbek lub dozowania małych objętości cieczy do wnętrza zbiornika, oraz (v) dodatkowe opcjonalne przyłącza przewodów do transportu cieczy (niewykorzystywane w trakcie prowadzonych prac badawczych). Mocowanie zbiorników Cellbag™ do platformy Tray 10 odbywało się przy użyciu plastikowych prętów wmontowanych na końcach krótszych krawędzi, które umieszczano wewnątrz ręcznie zamykanych sprężynowych zatrzasków. W trakcie pracy bioreaktora istniała możliwość umieszczenia zamykanej pokrywy nad kołysaną platformą, która usprawniała pracę układu regulacji temperatury poprzez minimalizowanie strat ciepła do otoczenia oraz odcinała dostęp światła do wnętrza polimerowego zbiornika.

Dodatkowym komponentem systemu bioreaktora *single-use*, niewykorzystywanym w trakcie prac zrealizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej, był zestaw dwóch

niezależnych pomp perystaltycznych wchodzących w skład jednostki *ReadyToProcess* WAVE™ Pump 25.

Sterowanie pracą oraz monitorowanie wartości parametrów operacyjnych bioreaktora odbywało się przy pomocy dedykowanego oprogramowania UNICORN™ zainstalowanego na komputerze klasy PC połączonym z centralną jednostką *ReadyToProcess* WAVE™ Rocker. Oprogramowanie UNICORN™ umożliwia zadawanie wartości parametrów pracy systemu bioreaktora *single-use* na żądanie operatora lub automatycznie (zgodnie z ustalonym harmonogramem). Dopuszczalne zakresy wartości parametrów pracy jednostki centralnej Rocker oraz jednostki kontrolno-pomiarowej CBCU przedstawiono poniżej w oparciu o specyfikację udostępnioną przez producenta systemu bioreaktora *single-use* [27]:

- amplituda ruchu oscylacyjnego platformy α : 2–12°,
- częstotliwość ruchu oscylacyjnego platformy ω : 2–40 min⁻¹,
- profil przyspieszenia w trakcie ruchu oscylacyjnego acc : 15–100%,
- temperatura zawartości zbiornika T : (temperatura otoczenia + 5°C) – 40°C,
- natężenie objętościowe gazu Q_G : 0,050–1,0 L · min⁻¹,
- stężenie objętościowe tlenu w mieszance gazowej: 0–50% przy zasilaniu czystym azotem i tlenem, 21–50% przy zasilaniu czystym tlenem i sprężonym powietrzem.

4.2. Metodyka określania charakterystyki czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L przy zastosowaniu metody pH

Wyznaczanie wartości czasu mieszania przy zastosowaniu metody pH

Na początkowym etapie badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, pomiary wartości czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L wykonywano przy zastosowaniu metody pH. Pomiar wartości odczynu pH odbywał się przy zastosowaniu zewnętrznego układu pomiarowego składającego się z uniwersalnego miernika CX-401 (Elmetron, Polska) i elektrody pH EPP-1 (Elmetron, Polska).

Rejestracja wskazań miernika do formatu pliku tekstowego w celu późniejszej analizy zgromadzonych danych odbywała się przy zastosowaniu złącza szeregowego w standardzie RS-232C. Odczyt wartości odczynu pH odbywał się z częstotliwością 1 s⁻¹, maksymalną dostępną za pośrednictwem miernika CX-401. Każdorazowo przed rozpoczęciem pomiarów przeprowadzono kalibrację elektrody pH przy użyciu roztworów wzorcowych oraz wprowadzono do pamięci miernika wartość temperatury 37 °C w celu kompensacji wpływu różnicy temperatury kalibracji i temperatury cieczy w zbiorniku *single-use* na wyniki pomiarów.

Polimerowe zbiorniki do hodowli serii Cellbag™, w tym wykorzystywany w badaniach zbiornik Cellbag™ 2 L, nie są fabrycznie przystosowane do montażu zewnętrznych elektrod pomiarowych. Z tego powodu, na potrzeby badań, w centralnej części górnej płaszczyzny zbiornika Cellbag™ 2 L wykonano otwór na dławnicę kablową, której domyślnym przeznaczeniem jest zapewnianie szczelności obudów instalacji elektrycznych w miejscach wyprowadzeń przewodów. Końcówka elektrody pH wprowadzonej pionowo przez otwór dławnicy pozostawała w kontakcie z cieczą przy zachowaniu wymaganej szczelności całego układu, krytycznie potrzebnej do utrzymania odpowiedniego funkcjonalnego roboczego kształtu polimerowego zbiornika (Rysunek 3).



Rysunek 3. Sposób mocowania elektrody pH do polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L przy zastosowaniu dławnicy kablowej (na podstawie: materiały uzupełniające do artykułu [A1]).

Pomiar czasu mieszania przy zastosowaniu metody pH polegał na rejestracji wartości odczynu pH fazy ciekłej mieszanej w polimerowym zbiorniku od momentu ręcznego wstrzyknięcia przez port strzykawkowy porcji znacznika, którym był wodny roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu $0,5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, w celu wywołania zmiany odczynu pH w znajdującym się w polimerowym zbiorniku wodnym roztworze kwasu solnego o stężeniu $0,001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 3$). Roztwór znacznika dodawano w ilości 2,5 mL na 1 L roztworu wewnątrz polimerowego zbiornika, co oznaczało w przeliczeniu 1,25-krotny nadmiar liczby moli zasady w stosunku do liczby moli kwasu. Temperatura cieczy w zbiorniku w trakcie pomiarów wynosiła $37 \text{ }^\circ\text{C}$, zaś natężenie objętościowe gazu dostarczanego do zbiornika wynosiło $0,55 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Rejestracja wskazań miernika trwała do momentu osiągnięcia stałej wartości odczynu pH przez co najmniej 10 kolejnych odczytów. Biorąc pod uwagę stechiometryczne ilości zastosowanych reagentów, końcowa wartość odczynu pH wynosiła 10,4. Na podstawie surowych

danych zarchiwizowanych przez miernik wyznaczano wartość homogeniczności przy użyciu wzoru zgodnego z definicją przedstawioną w Rozdziale 3.3 (Równanie 10) niniejszej rozprawy, które przyjęło postać:

$$Ho(t) = \frac{pH(t) - pH_0}{pH_\infty - pH_0} \quad (10)$$

Czas mieszania t_m w zastosowanej implementacji metody pH był zdefiniowany jako moment trwałego osiągnięcia wartości homogeniczności w zakresie $1,00 \pm 0,05$. Wartość czasu mieszania wyznaczano przy użyciu oprogramowania MATLAB (MathWorks, Inc., USA) według sposobu opisanego w Rozdziale 3.3 niniejszej rozprawy i przedstawionego graficznie na Rysunku 1.

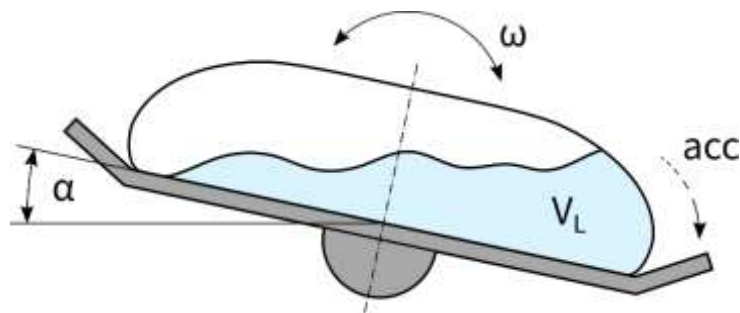
Projektowanie eksperymentu (DoE)

Eksperymenty, których celem było określenie charakterystyki czasu mieszania realizowanego w zbiorniku Cellbag™ 2 L z zastosowaniem metody pH, zostały zaplanowane przy użyciu metod projektowania eksperymentu (ang. *design of experiment*, DoE). Implementacja metod DoE wymaga wyodrębnienia zestawu niezależnych zmiennych (inaczej: parametrów lub czynników, ang. *factors*), do których przydziela się co najmniej dwie wartości, zwane poziomami, uwzględniane w siatce wariantów eksperymentalnych stanowiącej podstawę planu eksperymentu. Zastosowanie takiego podejścia umożliwia, między innymi, określenie istotności wpływu każdego z niezależnych czynników na wartości mierzonych zmiennych wyjściowych, wykrycie ewentualnych krzyżowych oddziaływań czynników na zmienne wyjściowe, a w efekcie końcowym na ograniczenie kosztów prowadzenia prac doświadczalnych poprzez zmniejszenie liczby koniecznych do wykonania eksperymentów [124].

Na potrzeby określenia charakterystyki czasu mieszania realizowanego w zbiorniku Cellbag™ 2 L z zastosowaniem metody pH wybrano pełny trójwartościowy czteroczynnikowy plan eksperymentów, oznaczany zgodnie z nomenklaturą metodyki DoE symbolem 3^4 . Wyodrębniono cztery niezależne parametry charakteryzujące pracę badanego systemu bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, przedstawione graficznie na Rysunku 4, tj.:

- amplitudę ruchu oscylacyjnego α ,
- częstotliwość ruchu oscylacyjnego ω ,
- parametr opisujący profil przyspieszenia w trakcie ruchu oscylacyjnego acc ,
- objętość cieczy w zbiorniku do hodowli V_L .

Parametr acc , opisywany w dokumentacji producenta badanego bioreaktora *single-use* terminem *rocking motion*, był zdefiniowany jako stopień wygładzenia trójkątnej funkcji oscylacji platformy funkcją cosinus [125]. Innymi słowy, wybranie niskiej wartości parametru acc skutkowało w przybliżeniu liniowym profilem przyspieszenia w trakcie całego cyklu oscylacji. Wybranie wysokiej wartości parametru acc przekładało się na bardziej płynny ruch platformy, co było w szczególności widoczne w momentach osiągnięcia maksymalnego kąta wychylenia w trakcie każdego cyklu oscylacji.



Rysunek 4. Parametry operacyjne badanego systemu bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* uwzględnione w planowaniu eksperymentu zgodnie z założeniami metodyki DoE (na podstawie [A1]).

W Tabeli 7 przedstawione zostały wartości eksperymentalne dobrane dla czterech zmiennych niezależnych odpowiadające trzem poziomom czynników w planie eksperymentów. Plan eksperymentu składał się z 81 kombinacji wartości eksperymentalnych czterech parametrów. Pomiar czasu mieszania dla każdej kombinacji został przeprowadzony trzykrotnie, wobec czego razem wykonano 243 eksperymenty. Analiza otrzymanych danych doświadczalnych została przeprowadzona przy użyciu oprogramowania MATLAB (MathWorks, Inc., USA) oraz programu Statistica (TIBCO Software, Inc., USA).

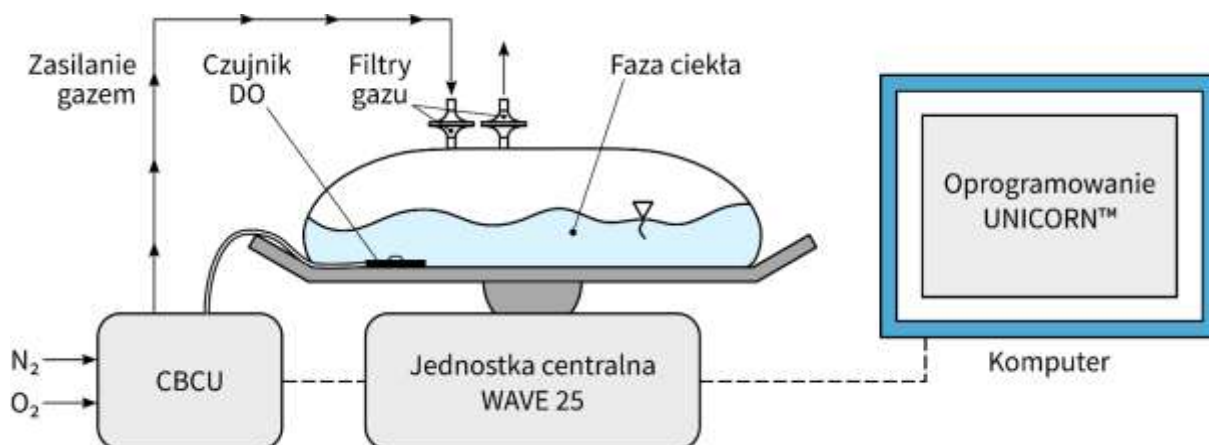
Tabela 7. Wartości eksperymentalne zmiennych niezależnych uwzględnionych w planie eksperymentów ustalonym zgodnie z założeniami metodyki DoE.

Zmienna	Dostępny zakres regulacji	Poziom, wartość eksperymentalna		
		-1 (minimalny)	0 (centralny)	+1 (maksymalny)
α (°)	2–12	2	7	12
ω (min ⁻¹)	2–40	2	21	40
acc (%)	15–100	30	60	90
V_L (L)	0,2–1	0,2	0,6	1,0

4.3. Metodyka określenia wpływu wybranych właściwości fazy ciekłej na wartości współczynnika $k_L a$

Metodyka wyznaczania wartości współczynnika $k_L a$

Pomiar wartości objętościowego współczynnika wnikania masy po stronie fazy ciekłej $k_L a$ realizowano na podstawie procedury opartej o metodę odgazowywania. W trakcie wykonywania pomiarów wykorzystywano optyczny czujnik DO fabrycznie wbudowany w dolną powierzchnię polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L, którego wskazania rejestrowano przy użyciu dedykowanego oprogramowania UNICORN™. Mieszanki gazów dostarczane w trakcie eksperymentów składały się z gazów wysokiej czystości: azotu i tlenu, dostarczanych do zbiornika z butli ciśnieniowych za pośrednictwem jednostki CBCU. Niezależnie od składu ilościowego używanej fazy gazowej, natężenie objętościowe mieszanki gazowej wynosiło $0,55 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, zaś temperatura cieczy w zbiorniku wynosiła $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Pomiar wartości współczynnika $k_L a$ odbywał się przy parametrach ruchu oscylacyjnego $\alpha = 7^\circ$ i $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$. Schemat układu do pomiaru wartości współczynnika $k_L a$ przedstawiono na Rysunku 5.



Rysunek 5. Schemat układu doświadczenia do pomiaru wartości współczynnika $k_L a$ podczas oscylacyjnego mieszania typu *wave* fazy ciekłej w jednorazowym zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A2]).

Procedura pomiaru szybkości absorpcji tlenu w fazie ciekłej rozpoczynała się od umieszczenia w polimerowym zbiorniku cieczy o zadanym składzie i wysycenia jej czystym azotem ($100\%_{\text{ov/v}} \text{ N}_2$) aż do osiągnięcia wartości stężenia tlenu rozpuszczonego poniżej 5% przez przynajmniej 5 minut. Pomiar szybkości absorpcji tlenu w cieczy wewnątrz polimerowego zbiornika rozpoczynał się w momencie zmiany stężenia objętościowego tlenu w mieszance gazowej

(21%_{v/v} O₂, 79%_{v/v} N₂). Wskazania czujnika rejestrowano do momentu osiągnięcia wartości DO powyżej 95% przez przynajmniej 5 minut.

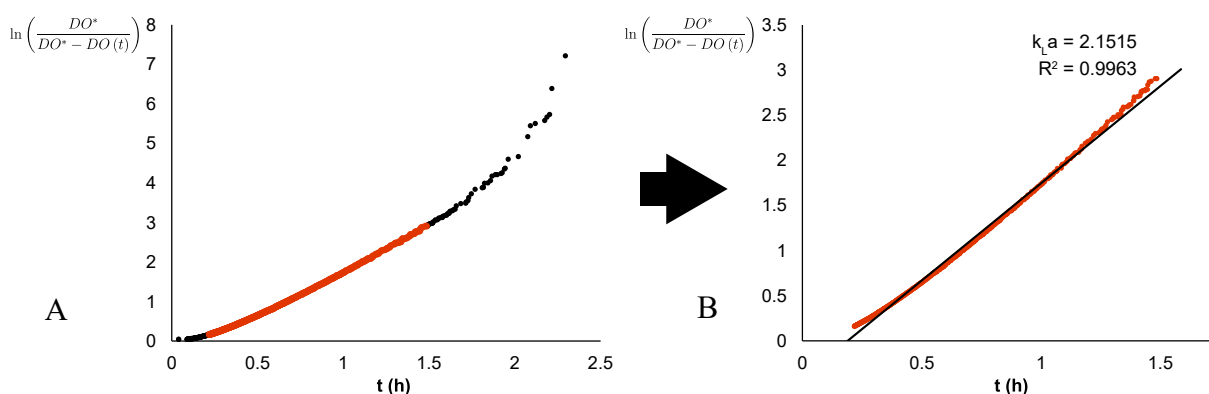
Zbiory surowych danych zarejestrowanych przez czujnik DO i zarchiwizowanych w oprogramowaniu UNICORN™ posłużyły do wyznaczenia wartości współczynnika $k_L a$ na podstawie bilansu masowego tlenu w fazie ciekłej:

$$\frac{dDO(t)}{dt} = k_L a (DO^* - DO(t)) \quad (11)$$

Równanie 11 obowiązuje przy założeniu, że ciśnienie cząstkowe tlenu w fazie gazowej obecnej w zbiorniku jest stałe i równe ciśnieniu cząstkowemu tlenu w mieszance dostarczanej do układu, co ma związek z niską rozpuszczalnością tego gazu w fazie ciekłej, której głównym składnikiem była woda. Scałkowanie Równania 11 daje następujące wyrażenie:

$$\ln\left(\frac{DO^*}{DO^* - DO(t)}\right) = k_L a \cdot t \quad (12)$$

Równanie 12 można zinterpretować jako równanie liniowe, którego współczynnik kierunkowy jest równy wartości współczynnika $k_L a$. Wartość DO^* zdefiniowano jako najwyższą wartość DO dla danego pomiaru. Sposób wyznaczania wartości współczynnika $k_L a$ na podstawie danych pochodzących z pomiaru szybkości absorpcji przedstawiono graficznie na Rysunku 6.



Rysunek 6. Sposób wyznaczania wartości współczynnika $k_L a$ na podstawie zmiany wartości stężenia DO w trakcie pomiaru. **A:** Wykres wartości wyrażenia z lewej strony Równania 12 w funkcji czasu. **B:** W przybliżeniu liniowy wycinek wykresu, do którego dopasowano funkcję liniową o współczynniku kierunkowym równym wartości współczynnika $k_L a$ (zgodnie z [A2]).

Badanie wpływu składu fazy ciekłej na osiągnięte wartości współczynnika $k_L a$

Przeprowadzono serię pomiarów, których celem było określenie wpływu wybranych właściwości fazy ciekłej na wydajność wnikania masy w układzie badanego bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*. W zależności od eksperymentu, głównym składnikiem fazy ciekłej była woda poddana procesowi odwróconej osmozy (ang. *reverse osmosis*, RO) lub pożywka hodowlana DMEM (ang. *Dulbecco's modified Eagle medium*, Thermo Fisher Scientific Inc., USA; nr kat. 21885025). Pożywka DMEM jest szeroko wykorzystywana w hodowlach *in vitro* izolowanej biomasy komórek zwierzęcych i ludzkich, a w jej skład wchodzi między innymi aminokwasy, witaminy, sole nieorganiczne i węglowodany [126], [127], które wspólnie stanowią funkcjonalną mieszaninę mikro- i makroelementów metabolicznie istotnych dla hodowanych komórek. Woda RO oraz pożywka DMEM były niezależnie suplementowane 10%_{v/v} dodatkiem płodowej surowicy cielęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS, Thermo Fisher Scientific Inc., USA; nr kat. A5256701), która jest podstawowym i najczęściej niezbędnym, naturalnym dodatkiem do pożywek hodowlanych wykorzystywanych w hodowlach komórek ssaczych prowadzonych w warunkach *in vitro*.

W celu odzwierciedlenia obecności w badanych fazach ciekłych biomasy komórek i odwzorowania jej wpływu na właściwości reologiczne cieczy poddawanej mieszaniu w polimerowym zbiorniku, lepkość uzyskanych mieszanin modyfikowano dodatkiem gliceryny w stężeniu 0–50%_{v/v} w interwałach co 10%_{v/v}. Mieszaniny DMEM i gliceryny dodatkowo niezależnie zmodyfikowano dodatkiem 5 cm³ niejonowego surfaktantu Pluronic® F-68, szeroko wykorzystywanego jako biozgodny środek przeciwpienny. Całkowita objętość mieszanin w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L, bez uwzględnienia pomijalnie objętościowo niewielkiego dodatku środka przeciwpiennego, wynosiła 0,3 L. Szczegółowy skład mieszanin wraz z oznaczeniami stosowanymi podczas analizy wyników przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Składy mieszanin wykorzystywanych podczas badania wpływu wybranych właściwości cieczy na wartości współczynnika $k_L a$ osiągnane w warunkach mieszania typu *wave* (zgodnie z materiałami uzupełniającymi do artykułu [A2]).

Oznaczenie	Główny składnik	Objętość (cm ³)			
		Główny składnik	FBS	Gliceryna	Pluronic® F-68
A0	RO	270	30	0	–
A1		243	27	30	–
A2		216	24	60	–
A3		189	21	90	–
A4		162	18	120	–
A5		135	15	150	–
B0	DMEM	270	30	0	–
B1		243	27	30	–
B2		216	24	60	–
B3		189	21	90	–
B4		162	18	120	–
B5		135	15	150	–
C0	DMEM	270	30	0	5
C1		243	27	30	5
C2		216	24	60	5
C3		189	21	90	5
C4		162	18	120	5
C5		135	15	150	5

Metodyka wyznaczania wartości napięcia powierzchniowego, gęstości oraz lepkości dynamicznej fazy ciekłej

Pomiary wartości napięcia powierzchniowego dla wybranych mieszanin wykonano metodą kropli wiszącej przy zastosowaniu systemu do analizy kształtu kropli DSA100 (Krüss, Niemcy). System DSA100 nie umożliwiał regulacji temperatury analizowanej cieczy, z tego względu pomiary napięcia powierzchniowego odbywały się w temperaturze otoczenia, w chwili wykonywania analiz równej 21,5 °C. Wartość napięcia powierzchniowego γ wyznaczano na podstawie poniższego wzoru [128]:

$$\gamma = -\frac{R^2 g \Delta \rho}{B} \quad (13)$$

Wartości parametrów R i B opisujących kształt wiszącej kropli były wyznaczone automatycznie przy zastosowaniu funkcji wbudowanych w program ADVANCE dedykowany do obsługi systemu DSA100.

Analizę gęstości fazy ciekłej wykonywano przy użyciu miernika gęstości DA-650 (KEM, Japonia). Pomiar wartości gęstości, które były wykorzystane do obliczenia wartości napięcia powierzchniowego, przeprowadzono w temperaturze 21,5 °C, zaś pomiary wartości gęstości, które były wykorzystane do wyznaczenia wartości liczby Reynoldsa przeprowadzono w temperaturze 37 °C, równej temperaturze fazy ciekłej termostatowanej w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L.

Wartości lepkości dynamicznej przygotowanych mieszanin zmierzono przy zastosowaniu reometru LVDV-III (Brookfield, USA) w układzie stożek-płytki (stożek typu CP40). Pomiar wartości lepkości dla każdej badanej mieszaniny przeprowadzono trzykrotnie, przyjmując następujące parametry pomiaru: temperatura 37 °C, prędkość obrotowa stożka 50 min⁻¹, objętość próbki 0,5 cm³, czas pomiaru 1 minuta. Biorąc pod uwagę liniowy charakter krzywych płynięcia, przyjęto, że wszystkie zastosowane mieszaniny mają właściwości reologiczne płynów newtonowskich (potwierdzone niezależnie przez Poona [129]).

4.4. Metodyka określania charakterystyki czasu mieszania w zbiornikach Cellbag™ 2 L i Cellbag™ 10 L przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z komputerową analizą obrazu

Główną motywacją do opracowania autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, było potencjalne zwiększenie dokładności i powtarzalności pomiarów, w porównaniu z wykorzystywaną początkowo metodą pH, oraz wyeliminowanie zakłóceń związanych z inwazyjnością pomiarów oraz ręcznym dozowaniem roztworu znacznika przez osobę wykonującą pomiar. Adaptacja metody kolorymetrycznej do wymagań badanego układu, z oczywistym uwzględnieniem ograniczeń tego układu, wymagała rozwiązania kilku praktycznych problemów związanych z pozyskiwaniem i analizą materiału filmowego, które opisano w poniższym podrozdziale.

Układ do rejestracji materiału filmowego

Materiał filmowy dotyczący wszystkich przeprowadzonych eksperymentów rejestrowano w sposób cyfrowy z wykorzystaniem kompaktowej wodoodpornej kamery cyfrowej GoPro Hero™ 10 (GoPro Inc., USA), umieszczonej nieruchomo dokładnie nad środkiem polimerowego naczynia Cellbag™ zamocowanego do platformy bioreaktora wykonującej oscylacyjne wychylenia. Do montażu kamery wykorzystano autorsko zaprojektowany na potrzeby badań statyw zbudowany z części wydrukowanych w 3D na drukarce Prusa i3 MK3S+ (Prusa Research a.s., Czechy). Statyw zaopatrzony był w oświetlenie naświetlaczami LED emitującymi białe światło o temperaturze barwowej 4000 K znad każdego boku oscylacyjnie wychylanej platformy. Statyw wraz z oświetleniem połączono trwale z platformą bioreaktora, co umożliwiło pozyskiwanie obrazu nieruchomego względem kołysanego zbiornika Cellbag™ oraz równomiernie oświetlać obserwowany obszar, przy jednoczesnej eliminacji zakłóceń wywołanych działaniem zewnętrznych źródeł światła. Rozdzielczość nagrywanego materiału wideo wynosiła nie mniej niż 1920 na 1080 pikseli, co przekładało się na rozdzielczość przestrzenną wynoszącą 0,13 milimetra na piksel. Rozdzielczość czasowa nagrywania, stanowiąca odwrotność liczby klatek na sekundę materiału filmowego, była dostosowywana w zakresie 0,01–0,04 s w zależności od intensywności mieszania i związanej z nią oczekiwanej wartości czasu mieszania. Parametry nagrywania, takie jak szybkość migawki, czułość ISO oraz balans bieli, ustawiono manualnie, jako stałe dla wszystkich wykonywanych pomiarów, w celu przeciwdziałania wykonywanej przez kamerę GoPro automatycznej kompensacji zmian jasności i zabarwienia zawartości polimerowego zbiornika w trakcie mieszania. Zewnętrzne krawędzie zbiorników Cellbag™ oraz nieprzezroczyste króćce i przewody polimerowych zbiorników wykorzystywanych w pomiarach przesłonięto taśmą maskującą w charakterystycznym kolorze, wyznaczając obszary przeznaczone do wykluczenia na etapie maskowania wstępnego w trakcie przetwarzania materiału filmowego.

Opracowanie procedury laboratoryjnej

Barwnym wskaźnikiem wykorzystywanym w trakcie pomiarów z zastosowaniem metody kolorymetrycznej był błękit bromotymolowy (nr CAS 76-61-9). Błękit bromotymolowy przyjmuje w roztworze o odczynie pH mniejszym niż 6,0 barwę żółtą, zaś w roztworze o odczynie pH większym niż 7,6 barwę niebieską. W zakresie odczynów $\text{pH} > 6,0$ i $\text{pH} < 7,6$ wodne roztwory błękitu bromotymolowego przyjmują zielone zabarwienie, co jest związane obecnością w równowadze formy kwasowej i zasadowej cząsteczek wskaźnika [130]. Zmiana barwy wskaźnika w zastosowanej procedurze laboratoryjnej była wywoływana zmianą odczynu pH

roztworu wskutek zachodzącej reakcji zobojętniania z udziałem jonów wodorowych i hydroksylowych obecnych w roztworach po dysocjacji cząsteczek kwasu chlorowodorowego i wodorotlenku sodu.

Polimerowy zbiornik Cellbag™ napełniano wybraną objętością roztworu HCl lub NaOH, w zależności od wybranego wariantu, a następnie uzupełniano dodatkiem roztworu błękitu bromotymolowego. Następnie uruchamiano oscylacyjny ruch platformy bioreaktora o wartościach α i ω zadanych w systemie UNICORN™, zgodnie z danym wariantem eksperymentu. Temperaturę fazy ciekłej w zbiorniku utrzymywano na poziomie 37 °C przy użyciu automatycznego układu regulacji temperatury wbudowanego w badany bioreaktor *single-use*. Po osiągnięciu zadanej wartości temperatury rozpoczynano rejestrację obrazu oscylacyjnie wychylanego zbiornika, a następnie dodawano do wnętrza zbiornika przez wbudowany port strzykawkowy porcję roztworu znacznika, co wywoływało stopniową, postępującą zmianę zabarwienia fazy ciekłej. Koniec pomiaru następował, gdy stwierdzano zakończenie zmian barwy oraz zanik jakichkolwiek niewymieszanych obszarów cieczy. Szczegółowy opis procedury laboratoryjnej pomiaru czasu mieszania przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej przedstawiono w części A materiałów uzupełniających do artykułu [A4].

Skład roztworu znacznika oraz fazy ciekłej wewnątrz zbiornika dobrano w oparciu o badanie, w którym oceniono wpływ wybranych parametrów na otrzymywane wartości czasu mieszania oraz dokładność wyników. W eksperymentach wykorzystano zbiornik do hodowli Cellbag™ 10 L. Objętość fazy ciekłej w zbiorniku wynosiła 2,75 L, zaś wartość temperatury utrzymywano na poziomie 37 °C.

Przeprowadzono eksperymenty podzielone na dwa bloki:

- Blok 1: znacznik – roztwór NaOH, początkowy skład cieczy w zbiorniku: 0,001 M HCl
- Blok 2: znacznik – roztwór HCl, początkowy skład cieczy w zbiorniku: 0,001 M NaOH

Wartości eksperymentalne zmiennych niezależnych dobrane przy użyciu metodyki DoE (tj. dwuczynnikowy plan trójwartościowy, 3²) oraz wartości stężenia i objętości roztworu znacznika dozowanego do wnętrza polimerowego zbiornika wynikające z wartości zmiennych niezależnych przedstawiono w Tabeli 9.

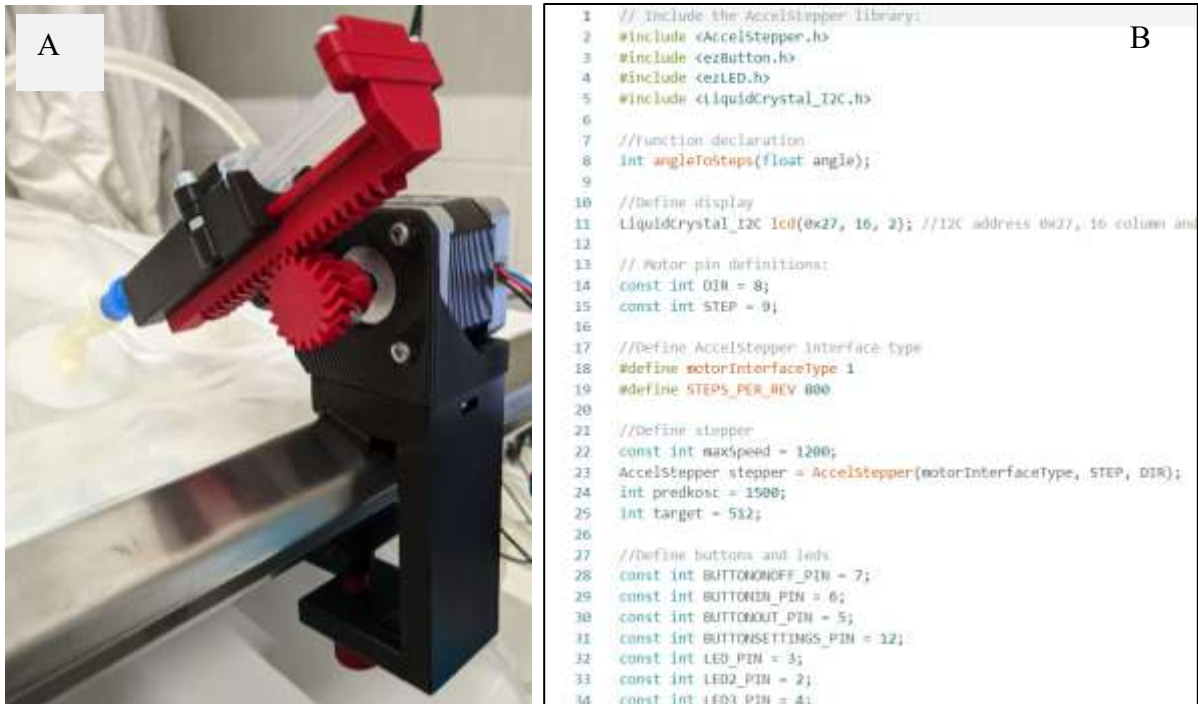
Tabela 9. Wartości stężenia i objętości roztworu znacznika wstrzykiwanego do polimerowego zbiornika wyznaczone na podstawie wartości zmiennych niezależnych: stosunku molowego reagentów oraz stosunku objętości znacznika i roztworu wewnątrz zbiornika (na podstawie [A4]).

Nr wariantu	Zmienne niezależne		Stężenie znacznika (mol/L)	Objętość znacznika (mL)
	Stosunek molowy reagentów (mol _{znacznik} /mol _{roztwór})	Stosunek objętości (mL _{znacznik} /L _{roztwór})		
1	1,5	0,5	3	1,375
2	2	0,5	4	1,375
3	4	0,5	8	1,375
4	1,5	1	1,5	2,75
5	2	1	2	2,75
6	4	1	4	2,75
7	1,5	2	0,75	5,5
8	2	2	1	5,5
9	4	2	2	5,5

Układ do zautomatyzowanego dozowania znacznika

Roztwór znacznika dozowano przy zastosowaniu autorsko opracowanego na potrzeby badań systemu do zautomatyzowanego dozowania, składającego się z wytworzonego przy zastosowaniu druku 3D uchwytu na strzykawkę mocowanego do krawędzi oscylacyjnie wychylanej platformy bioreaktora oraz przekładni zębatej napędzanej przy użyciu silnika krokowego NEMA 17 (Rysunek 7A). Silnik krokowy był obsługiwany przy pomocy sterownika typu A4988 połączonego z mikrokontrolerem ATmega 328P na płycie Arduino UNO R3 wykonującym zadania opisane w kodzie programu opracowanym na potrzeby badań (Rysunek 7B). Układ do zautomatyzowanego dozowania był wyposażony w interfejs użytkownika umożliwiający wsuwanie i wysuwanie tłoka strzykawki oraz wybór objętości dozowania. Wsuniecie tłoka strzykawki i związane z tym wstrzyknięcie roztworu do wnętrza zbiornika Cellbag™ miało miejsce w momencie maksymalnego wychylenia platformy, wykrywanym mechanicznie przy użyciu wyłącznika krańcowego.

Szczegółowy opis zasady działania układu do zautomatyzowanego dozowania znacznika oraz jego poszczególnych części przedstawiono w opisie dołączonym do wniosku o udzielenie patentu [P1].



Rysunek 7. System do zautomatyzowanego dozowania znacznika. **A:** Uchwyt na strzykawkę wraz z silnikiem napędzającym przekładnię zębatą. **B:** Fragment kodu odpowiadającego za sterowanie pracą silnika krokowego oraz regulację parametrów wstrzykiwania.

Przetwarzanie i analiza obrazu

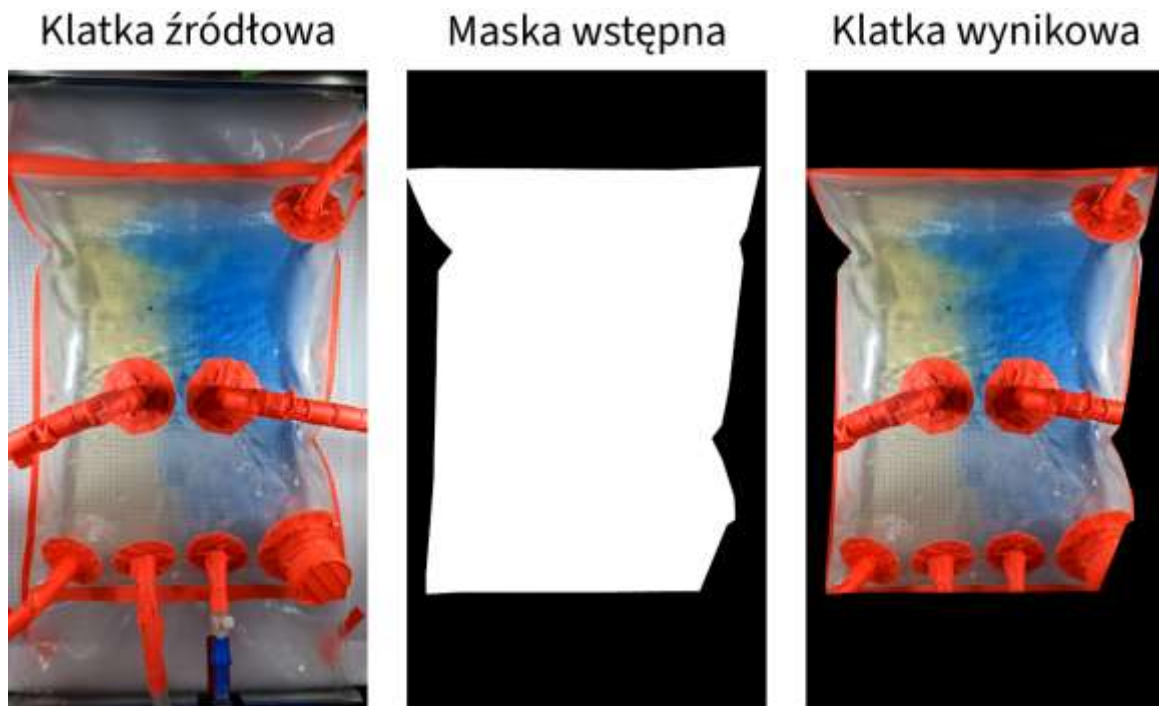
Uzyskany materiał filmowy przetwarzano przy użyciu opracowanego na potrzeby badań algorytmu w języku Python (wersja 3.11), którego funkcjonalność rozszerzono przy zastosowaniu biblioteki OpenCV (wersja 4.9.0). OpenCV to biblioteka programistyczna o otwartym kodzie źródłowym, zawierająca funkcje do przetwarzania i analizy obrazu oraz do zastosowań w obszarze komputerowego rozpoznawania obrazów [131]. Algorytm do przetwarzania i analizy obrazu wykonywał szereg czynności, które podsumowano na schemacie blokowym przedstawionym na Rysunku 8.



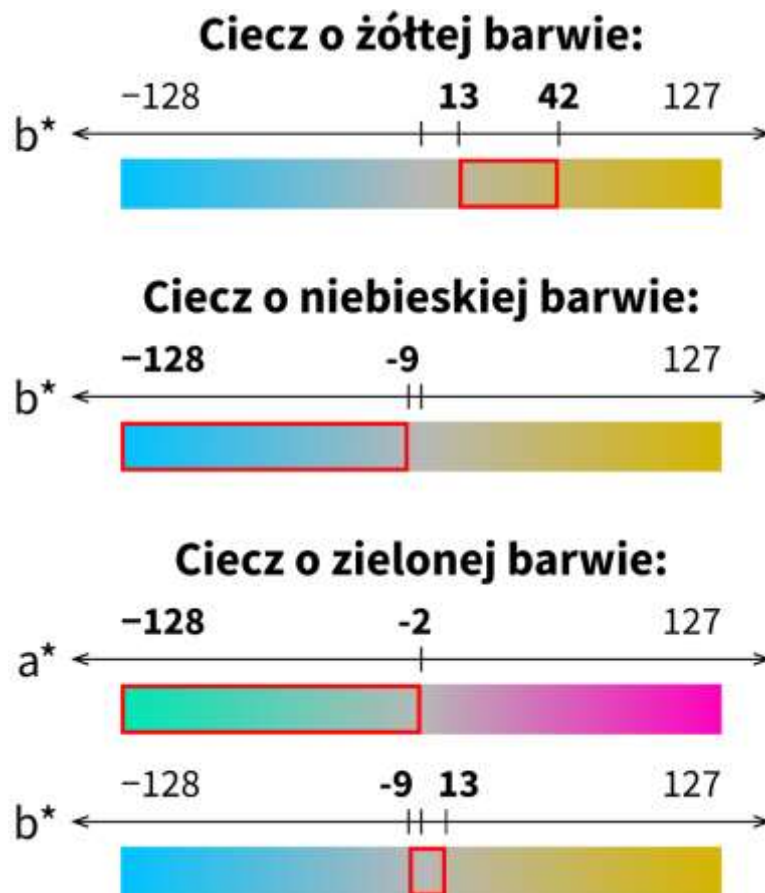
Rysunek 8. Schemat blokowy algorytmu do przetwarzania obrazu zastosowanego w autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania. Blok otoczony przerywaną linią zawiera czynności, które wykonywano w pętli na każdej kolejnej klatce materiału filmowego.

Pierwszym krokiem przetwarzania obrazu po inicjalizacji oraz odczycie danej klatki z pliku filmowego było maskowanie wstępne, w którym z surowego obrazu wykluczano zgrubnie wyznaczony obszar obejmujący otoczenie polimerowego zbiornika, niezawierający informacji na temat procesu mieszania w badanym układzie (Rysunek 9). Następnie, obszary obejmujące fragmenty zbiornika przesłonięte taśmą maskującą oraz mieszaną fazę ciekłą o wybranej barwie wykrywano poprzez progowanie w oparciu o dobrane empirycznie wartości graniczne zakresów barw w przestrzeni $L^*a^*b^*$ (Rysunek 10). Opis danego elementu obrazu w przestrzeni kolorów $L^*a^*b^*$ odbywał się poprzez przypisanie wartości do trzech kanałów:

- L^* – wartość odpowiadająca odbieranej jasności danego elementu obrazu,
- a^* – zabarwienie na osi przeciwstawnych barw zielony–czerwony,
- b^* – zabarwienie na osi przeciwstawnych barw żółty–niebieski.



Rysunek 9. Proces maskowania wstępnego na przykładzie polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).



Rysunek 10. Dobrane empirycznie wartości graniczne zakresów barw w przestrzeni $L^*a^*b^*$ (zgodnie z [A4]).

Maski otrzymane w wyniku powyższego progowania filtrowano przy pomocy operacji zamknięcia, po czym sumowano liczbę pikseli zajmowanych przez obszary cieczy o żółtej, zielonej lub niebieskiej barwie, odpowiadającej zabarwieniu wskaźnika w środowisku kwasowym, obojętnym lub zasadowym. Zestaw trzech wartości sumy liczby pikseli, interpretowanych jako pole powierzchni obszarów w trzech wykrywanych kolorach, wraz z przyporządkowanym im numerem porządkowym klatki wideo były zapisywane do zbiorczego pliku tekstowego przeznaczonego do dalszej analizy.

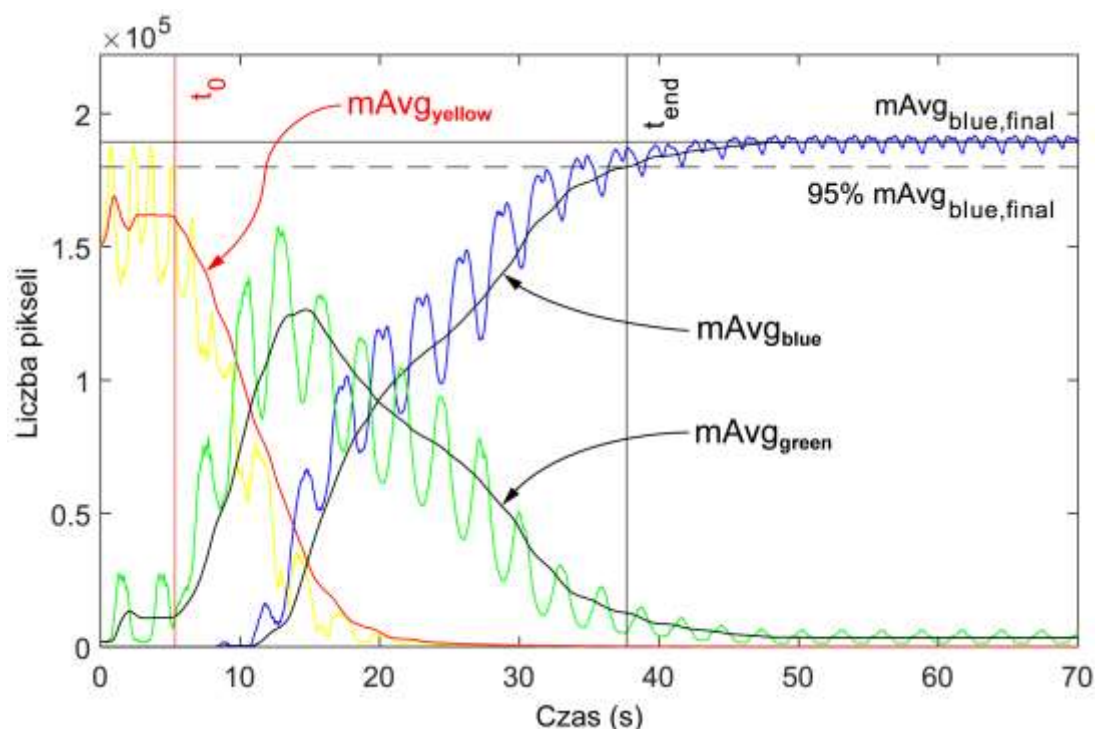
Szczegółowy opis zasady działania algorytmu do przetwarzania obrazu w ramach opracowanej autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej zamieszczono w części B materiałów uzupełniających do artykułu [A4].

Wyznaczanie wartości czasu mieszania

Po ukończeniu przetwarzania i analizy materiału filmowego przedstawiającego proces mieszania przebiegający w badanym polimerowym zbiorniku, zbiorczy plik tekstowy zawierający wartości pola powierzchni obszarów o danej barwie importowano do środowiska MATLAB R2023b w celu wyznaczenia wartości czasu mieszania przy użyciu skryptu opracowanego na potrzeby niniejszej pracy. Przykładowy wykres surowych danych będących wynikiem działania algorytmu przetwarzania obrazu oraz graficzne przedstawienie sposobu obliczania wartości czasu mieszania w metodzie kolorymetrycznej przedstawiono na Rysunku 11.

Wykresy na Rysunku 11 oznaczone żółtą, zieloną oraz niebieską linią przedstawiają wartości sumarycznych liczb pikseli przyporządkowane obszarom w każdej z trzech wykrywanych barw. Wyraźnie widoczny jest stopniowy spadek liczby pikseli odpowiadających obszarom fazy ciekłej o początkowej żółtej barwie, zastępowanych przez obszary o przejściowej zielonej barwie, a następnie o barwie niebieskiej. Oscylacje widoczne na wykresach były wywołane zmianą powierzchni zajmowanej przez fazę ciekłą w zbiorniku w trakcie oscylacji platformy bioreaktora widocznej z punktu widzenia kamery. W celu zniwelowania oscylacji wyznaczano wartości średniej ruchomej o okresie uśredniania równym długości okresu oscylacji platformy, których wykresy oznaczono symbolami $mAvg_{yellow}$, $mAvg_{green}$ oraz $mAvg_{blue}$. Moment dodania roztworu znacznika, oznaczony na Rysunku 11 symbolem t_0 , wykrywano na podstawie nagłego spadku wartości różniczki liczby pikseli odpowiadających fazie ciekłej o początkowej barwie. Czas mieszania t_m w opracowanej adaptacji metody kolorymetrycznej zdefiniowano jako moment trwałego osiągnięcia 95% zmiany wartości średniej ruchomej liczby pikseli zajmowanych przez obszar w końcowym kolorze wskaźnika, oznaczonej na Rysunku 11 symbolem $mAvg_{blue,final}$.

Szczegółowy opis zadań wykonywanych przez skrypt do wyznaczenia wartości czasu mieszania przedstawiono w części C materiałów uzupełniających do artykułu [A4].



Rysunek 11. Przykładowy wykres danych wyjściowych z algorytmu do przetwarzania obrazu w funkcji czasu oraz sposób wyznaczania wartości czasu mieszania. Wartość czasu mieszania w podanym przykładzie wynosiła 37,5 sekundy (Cellbag™ 10 L, $\alpha = 2^\circ$, $\omega = 21 \text{ min}^{-1}$, $fl = 0,275$) (zgodnie z artykułem [A4]).

Projektowanie eksperymentu (DoE)

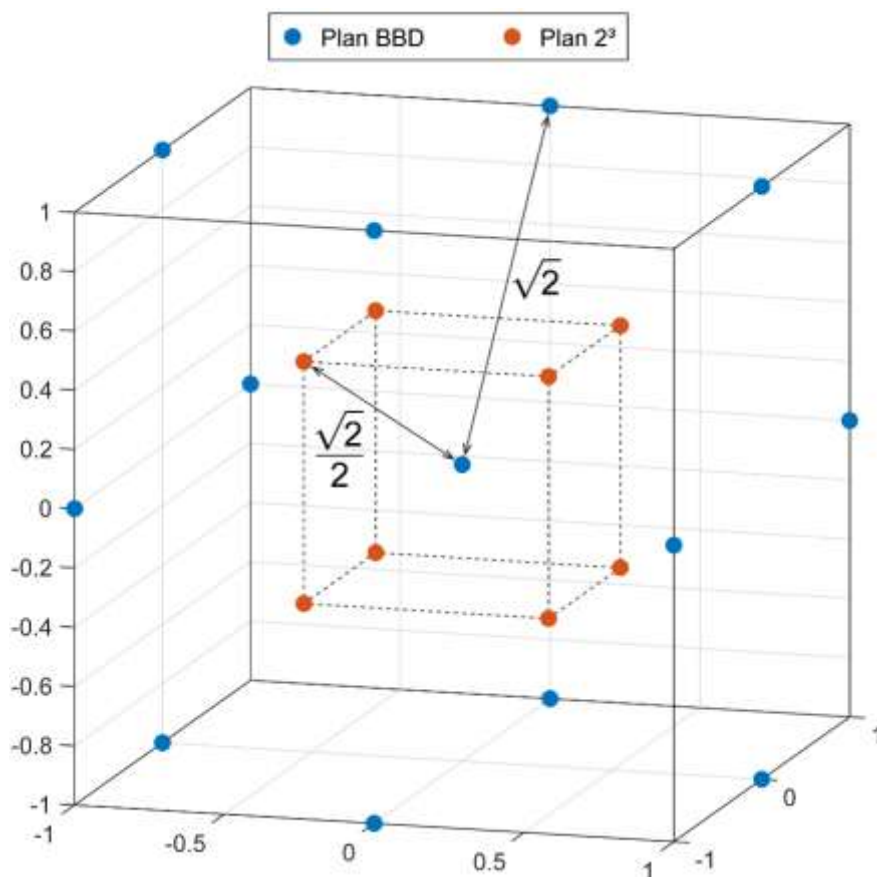
Opracowaną adaptację metody kolorymetrycznej wykorzystano w celu określenia i powiązania charakterystyk czasu mieszania w zbiornikach Cellbag™ 2 L i Cellbag™ 10 L. Plan eksperymentów z wykorzystaniem polimerowych zbiorników w obu rozmiarach opracowano przy użyciu metodologii DoE. W oparciu o wyniki uzyskane we wcześniejszej części badań przy zastosowaniu metody pH, w planowaniu uwzględniono trzy niezależne parametry pracy bioreaktora z pominięciem parametru *acc*: amplitudę ruchu oscylacyjnego α , częstotliwość ruchu oscylacyjnego ω oraz stopień napełnienia zbiornika *fl*. Parametr *fl* był zdefiniowany jako opisany poniższym wyrażeniem iloraz wartości objętości cieczy w polimerowym zbiorniku V_L oraz objętości nominalnej tego zbiornika V_{nom} :

$$fl = \frac{V_L}{V_{nom}} \quad (14)$$

Zastosowanie stopnia napełnienia fl zamiast objętości cieczy w zbiorniku umożliwiło bezpośrednie powiązanie uzyskanych charakterystyk czasu mieszania w zbiornikach Cellbag™ o różnych objętościach nominalnych.

Przestrzeń eksperymentalną zaprojektowano z wykorzystaniem planu Boxa-Behnkena (ang. *Box-Behnken design*, BBD) rozszerzonego o pełny dwuwartościowy plan dla trzech czynników (2^3). Powiązanie planów miało na celu zwiększenie pokrycia przestrzeni eksperymentalnej dla pośrednich wartości analizowanych parametrów operacyjnych. Na Rysunku 12 przedstawiono schemat przestrzeni eksperymentalnej otrzymanej w wyniku powiązania planów eksperymentalnych. Wartości eksperymentalne w planie Boxa-Behnkena dobrano, by obejmowały cały dostępny zakres określony specyfikacją techniczną bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™*. Współrzędne punktów należących do planu 2^3 w przestrzeni eksperymentalnej wyznaczono tak, aby ich odległość od punktu centralnego o współrzędnych (0; 0; 0) była równa połowie odległości między punktem centralnym a pozostałymi punktami planu BBD w przestrzeni eksperymentalnej. Biorąc pod uwagę, że odległość punktów w planie BBD od punktu centralnego była równa $\sqrt{2}$, wartości współrzędnych punktów planu 2^3 wynosiły $(\pm 1/\sqrt{6}; \pm 1/\sqrt{6}; \pm 1/\sqrt{6}) \approx (\pm 0,41; \pm 0,41; \pm 0,41)$ we wszystkich ośmiu kombinacjach. Wartości eksperymentalne rozpatrywanych parametrów operacyjnych, odpowiadające poszczególnym poziomom w przestrzeni eksperymentalnej, przedstawiono w Tabeli 10.

Łącznie przeprowadzono 47 pomiarów czasu mieszania w obu badanych odmianach zbiorników Cellbag™. Pomiarów przeprowadzono trzykrotnie dla każdego z 13 wariantów eksperymentalnych w planie BBD oraz dwukrotnie dla każdego z 8 wariantów w planie 2^3 .



Rysunek 12. Schemat przestrzeni eksperymentalnej. Odległość między punktem centralnym a pozostałymi punktami w planie BBD była równa $\sqrt{2}$. Odległość między punktem centralnym a punktami planu 2^3 wynosiła połowę tej wartości (na podstawie [A4]).

Tabela 10. Wartości parametrów operacyjnych uwzględnione w przyjętym planie eksperymentów.

Parametr	Dostępny zakres	BBD			2^3	
		-1 (min.)	0 (centr.)	+1 (maks.)	-0,41 (min.)	+0,41 (maks.)
Cellbag™ 2 L						
α (°)	2–12	2	7	12	5	9
ω (min ⁻¹)	2–40	2	21	40	13	29
fl (-)	0,1–0,5	0,10	0,30	0,50	0,22	0,38
Cellbag™ 10 L						
α (°)	2–12	2	7	12	5	9
ω (min ⁻¹)	2–40	2	21	40	13	29
fl (-)	0,05–0,5	0,05	0,275	0,5	0,185	0,365

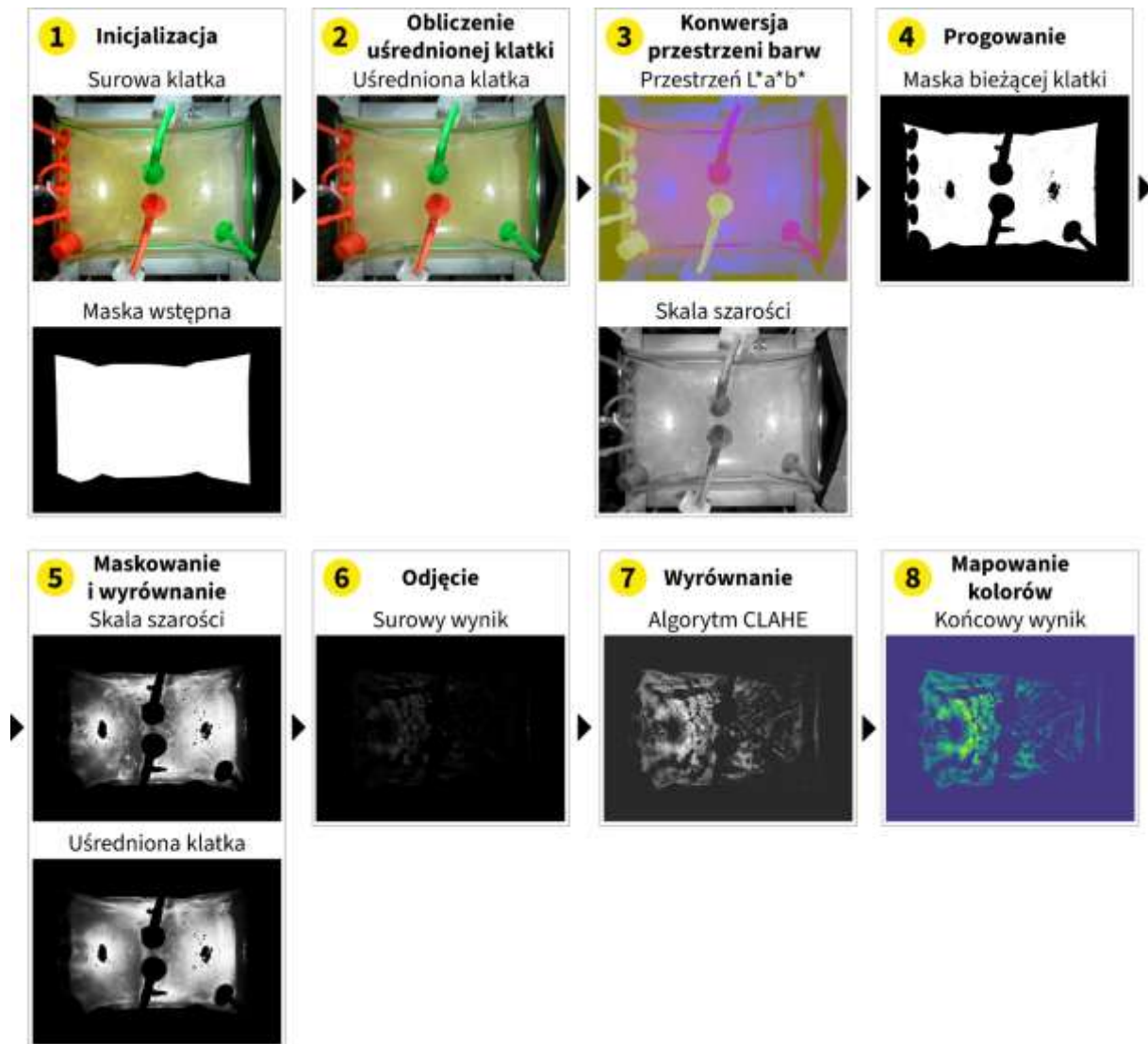
4.5. Metodyka analizy struktury falującej powierzchni międzyfazowej

Materiał filmowy zebrany na potrzeby wyznaczenia wartości czasu mieszania przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej poddano dodatkowej procedurze przetwarzania w celu pozyskania informacji na temat zmian struktury falującej powierzchni międzyfazowej w zależności od parametrów ruchu oscylacyjnego platformy bioreaktora. Przetwarzanie materiału filmowego odbywało się przy zastosowaniu opracowanego na potrzeby badań algorytmu w języku Python w wersji 3.11, którego funkcjonalność rozszerzono biblioteką OpenCV w wersji 4.9.0 oraz biblioteką NumPy w wersji 1.24.3. Przetwarzaniu poddano fragmenty nagrań przedstawiające mieszaną w polimerowych zbiornikach Cellbag™ 2 L i Cellbag™ 10 L fazę ciekłą o barwie żółtej, odpowiadającej zabarwieniu błękitu bromotymolowego w środowisku kwaśnym.

Algorytm wykonywał szereg działań, których efektem było wzmocnienie widocznych na obrazie struktur powierzchni międzyfazowej cieczy. Kluczowym etapem pracy algorytmu było obliczenie „uśrednionej klatki” (ang. *median frame*) przedstawiającej obraz kołysanego zbiornika z pominięciem dynamicznych zmian kształtu obserwowanej fazy ciekłej, wyznaczonej na podstawie losowo wybranego zestawu 50 klatek ze źródłowego materiału filmowego. Uśredniona klatka pełniła funkcję tła odejmowanego od bieżących klatek obrazu wideo w celu wyodrębnienia lokalnych zmian w obrazie mieszanej cieczy.

Kolejne etapy pracy algorytmu uwzględniały konwersję przestrzeni barw uśrednionej klatki oraz bieżących klatek wideo do skali szarości, wyrównanie histogramów (ang. *histogram equalization*) uśrednionej klatki oraz bieżących klatek w celu poprawy kontrastu, odjęcie uśrednionej klatki od bieżącej klatki wideo, wyrównanie histogramu obrazu wynikowego przy zastosowaniu algorytmu adaptacyjnej korekcji histogramu z ograniczeniem kontrastu (ang. *contrast-limited adaptive histogram equalization, CLAHE*) oraz zastosowanie mapy kolorów dla obrazu wynikowego w celu zwiększenia czytelności wzmacnianych obszarów. Zastosowanie procedury umożliwiło wyodrębnienie obrazu powierzchni międzyfazowej z pominięciem zakłóceń, wynikających z drobnych wibracji kamery oraz osadzania się kondensującej pary wodnej na górnej płaszczyźnie polimerowego zbiornika. Graficzne podsumowanie etapów algorytmu do wzmacniania obrazu struktury powierzchni międzyfazowej przedstawiono na Rysunku 13.

Szczegółowy opis procedury działania algorytmu przedstawiono w części D materiałów uzupełniających do artykułu [A4].



Rysunek 13. Graficzne podsumowanie kolejnych etapów cyfrowego przetwarzania obrazu wykonywanego w ramach algorytmu przetwarzania obrazu do wzmocnienia struktury powierzchni międzyfazowej (na podstawie [A4]).

4.6. Metodyka symulacji przepływu w zbiorniku bioreaktora z mieszaniem typu *wave* przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów

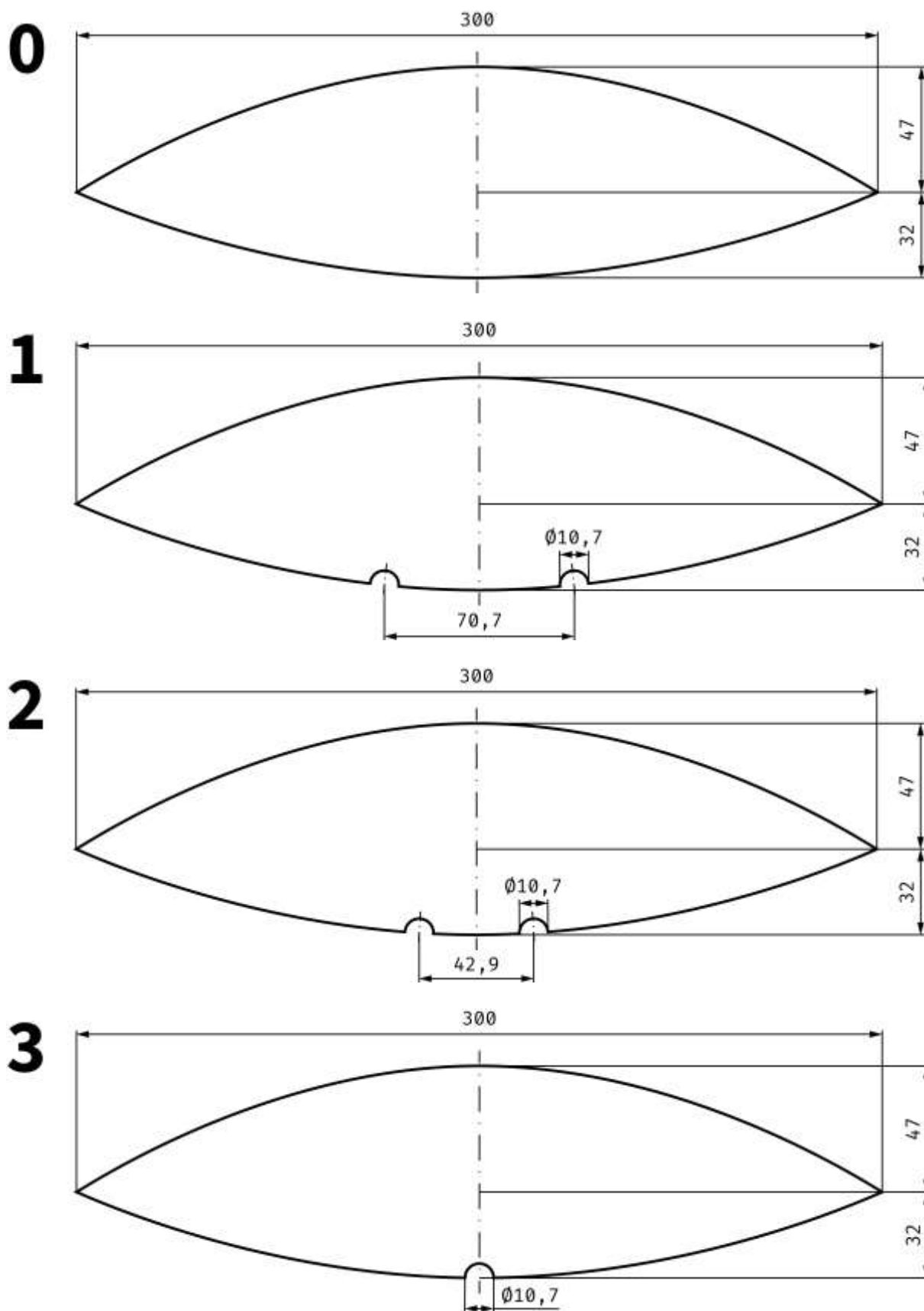
W celu oszacowania wpływu wybranych modyfikacji geometrii polimerowych zbiorników bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* na parametry istotne z punktu widzenia bioprocusów z wykorzystaniem biomasy izolowanych komórek, przeprowadzono szereg symulacji przepływu fazy ciekłej przy zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów (ang. *computational fluid dynamics*, CFD). Symulacje wykonano przy użyciu pakietu oprogramowania ANSYS w wersji 2022 R2. Badania opisane w niniejszym rozdziale wykonano we współpracy z zespołem badawczym pod kierownictwem Profesora Łukasza Makowskiego z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej.

Odzworowanie geometrii jednorazowego zbiornika do hodowli

Symulacje przepływu przeprowadzono przy zastosowaniu dwuwymiarowego (2D) odzworowania geometrii zbiornika Cellbag™ 2 L opracowanego przy użyciu programu *DesignModeler* wchodzącego w skład pakietu ANSYS. Na podstawie wykonanej wstępnej analizy dostępnych wariantów wykazano, że zastosowanie uproszczonej, dwuwymiarowej geometrii do symulacji przepływu cieczy w bioreaktorze z mieszaniem typu *wave* pozwala na uzyskanie porównywalnych wyników przy znacznym ograniczeniu kosztów obliczeń. Oszacowano, że rozbieżności między wynikami otrzymanymi w symulacjach z zastosowaniem trójwymiarowej geometrii oraz uproszczonej geometrii 2D wynoszą średnio około 20% [132].

Na potrzeby przeprowadzonych symulacji założono, że napełniony cieczą oraz utrzymywany w docelowym kształcie poprzez nadciśnienie przetłaczanego gazu polimerowy zbiornik jest sztywny. Na Rysunku 14 przedstawiono schematycznie zastosowaną geometrię zbiornika Cellbag™ w kilku wariantach, zdefiniowanych według poniższych reguł:

- Wariant 0: podstawowa geometria w formie przekroju zbiornika pionową płaszczyzną prostopadłą do osi oscylacji platformy bez modyfikacji (układ referencyjny).
- Wariant 1: geometria zmodyfikowana dwoma półkulistymi wypustkami o średnicy 10,7 mm umieszczonymi na dnie zbiornika w odległości 70,7 mm (około $\frac{1}{5}$ całkowitej długości zbiornika) symetrycznie względem osi symetrii przekroju.
- Wariant 2: geometria zmodyfikowana dwoma półkulistymi wypustkami o średnicy 10,7 mm umieszczonymi na dnie zbiornika w odległości 42,9 mm (około $\frac{1}{7}$ całkowitej długości zbiornika) symetrycznie względem osi symetrii przekroju.
- Wariant 3: geometria zmodyfikowana pojedynczą wypustką o średnicy 10,7 mm umieszczoną na środku dna zbiornika.



Rysunek 14. Schematy zwymiarowanych wariantów odwzorowania geometrii zbiornika Cellbag™ 2 L zastosowanych na potrzeby symulacji CFD.

Siatka numeryczna

Ustawienia siatek numerycznych, wygenerowanych przy zastosowaniu programu *Meshing* wchodzącego w skład pakietu ANSYS, dobrano z uwzględnieniem ogólnej charakterystyki przepływu w badanym układzie. Zastosowane geometrie podzielono na dwie części, tworząc obszary, w których w zależności od wariantu zastosowano różne wartości rozmiaru komórek oraz parametrów warstwy przyściennej. Komórki w dolnej części zbiornika, w której spodziewano się, że miały zachodzić zjawiska związane z przepływem fazy ciekłej, zagęszczono względem komórek w górnej części tego samego zbiornika.

Ustawienia obliczeń

Obliczenia prowadzono w programie *Fluent* wchodzącym w skład pakietu ANSYS w trybie podwójnej precyzji, w stanie nieustalonym, z automatycznym doбором kroku czasowego. Zdefiniowano warunek brzegowy braku poślizgu cieczy na ściankach polimerowego zbiornika. Przyjęto, że właściwości fazy ciekłej są takie same jak wody o temperaturze 37 °C, zaś właściwości fazy gazowej takie, jak właściwości powietrza. Ze względu na skomplikowaną strukturę powierzchni międzyfazowej w zbiorniku poddawanych oscylacyjnym wychyleniom, do opisu układu wielofazowego wybrano metodę *volume of fluid* (VOF), w którym każda z faz jest traktowana jako ciągły obszar, zgodnie z podejściem Euler-Euler. W metodzie VOF wykorzystuje się koncepcję udziału fazowego, zgodnie z którą każdej komórce obliczeniowej przypisuje się wartość ciągłej w czasie i przestrzeni funkcji opisującej ułamek objętości zajmowanej przez każdą z faz [133]. Zastosowanie modelu VOF pozwoliło na modelowanie kształtu powierzchni swobodnej, identyfikowanej poprzez lokalną wartość ułamka objętościowego fazy ciekłej.

Obliczenia symulacyjne prowadzono przy założeniu przepływu laminarnego, w przypadku którego stosuje się równanie bilansu pędu oraz równanie ciągłości w następujących postaciach:

$$\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + \vec{u}\nabla\vec{u} = -\frac{\nabla P}{\rho} + \nu\nabla^2\vec{u} + \vec{f} \quad (15)$$

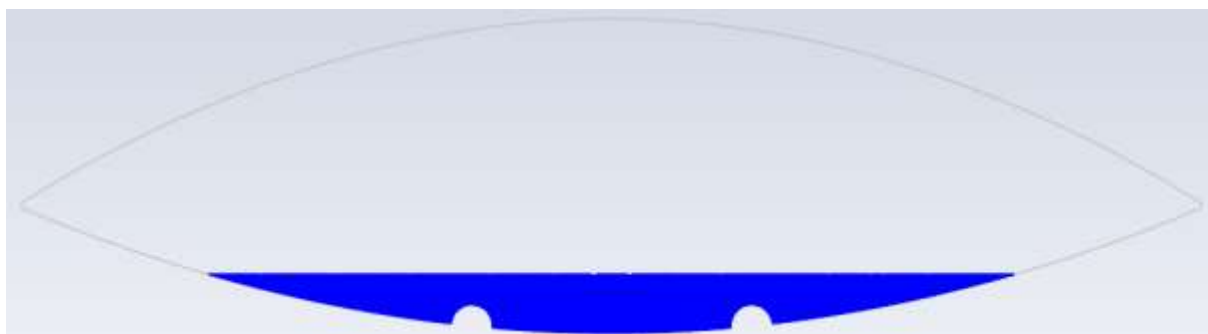
$$\nabla\vec{u} = 0 \quad (16)$$

Symbol \vec{f} w Równaniu 15 oznacza człon źródłowy pędu reprezentujący wpływ grawitacji na oscylacyjnie wychylany polimerowy zbiornik bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*. Przyjęto, że siatka numeryczna nie zmienia swojego położenia względem przyjętego układu współrzędnych, natomiast wraz ze zmianą kąta odchylenia od poziomu $\alpha(t)$ w trakcie cyklu

oscylacji zmieniają się wartości wektorów siły grawitacji działających w kierunkach x i y , opisane odpowiednio członami $g \cdot \sin(\alpha(t))$ oraz $g \cdot \cos(\alpha(t))$.

W celu wyznaczenia wartości czasu mieszania w układzie zdefiniowano skalar reprezentujący traser dodawany do fazy ciekłej falującej w polimerowym zbiorniku w trakcie pomiarów czasu mieszania w rzeczywistym układzie. Równania transportu masy dla zdefiniowanego skalaru były rozwiązywane wspólnie z bilansami płynu. Przyjęto, że wartość współczynnika dyfuzji skalaru w cieczy jest stała i wynosi $10^{-6} \text{ kg} \cdot (\text{m} \cdot \text{s})^{-1}$. Równania modelowe rozwiązywano w sprzężeniu przy zastosowaniu metody SIMPLE, natomiast interpolacja ciśnienia odbywała się przy zastosowaniu schematu PRESTO!.

Wnętrze symulowanego polimerowego zbiornika wypełniano fazą ciekłą oraz znacznikiem poprzez zdefiniowanie dwóch regionów. Wysokość regionu odpowiadającego fazie ciekłej w najgłębszym miejscu w symulowanym zbiorniku była równoważna 0,3 L cieczy znajdującej się wewnątrz zbiornika Cellbag™ 2 L (Rysunek 15). Region odpowiadający porcji znacznika dodanej do wnętrza zbiornika miał kształt półkola o średnicy 5 mm (Rysunek 16), natomiast wartość początkowa bezwymiarowego stężenia zdefiniowanego skalaru wewnątrz regionu wynosiła 2 700.



Rysunek 15. Sposób wypełnienia geometrii zbiornika cieczą na przykładzie Wariantu 1.



Rysunek 16. Sposób dodania znacznika do fazy ciekłej w zbiorniku na przykładzie Wariantu 1.

Wielkość kroku czasowego w trakcie obliczeń była dostosowywana na podstawie wartości globalnej liczby Couranta według metody *Multiphase Specific*. Wartość globalnej liczby Couranta ustalono jako równą 2, maksymalna liczba iteracji na krok czasowy wynosiła 100, natomiast minimalna i maksymalna długość kroku czasowego wynosiły odpowiednio 10^{-6} s i 10^{-5} s. Minimalna i maksymalna wartość współczynnika zmiany kroku czasowego wynosiły odpowiednio 0,8 oraz 1,2. Obliczenia prowadzono do momentu, w którym maksymalne bezwymiarowe stężenie skalara spadło do wartości równej 100, co oznaczało, że było 100 razy większe od średniej wartości bezwymiarowego stężenia.

W celu osiągnięcia poprawnego rozkładu prędkości pozbawionego wpływu rozruchu płynu, przed wprowadzeniem bezwymiarowego stężenia traseru prowadzono symulacje przepływu przez dwa pełne cykle oscylacji, będące punktem początkowym obliczeń w obecności traseru.

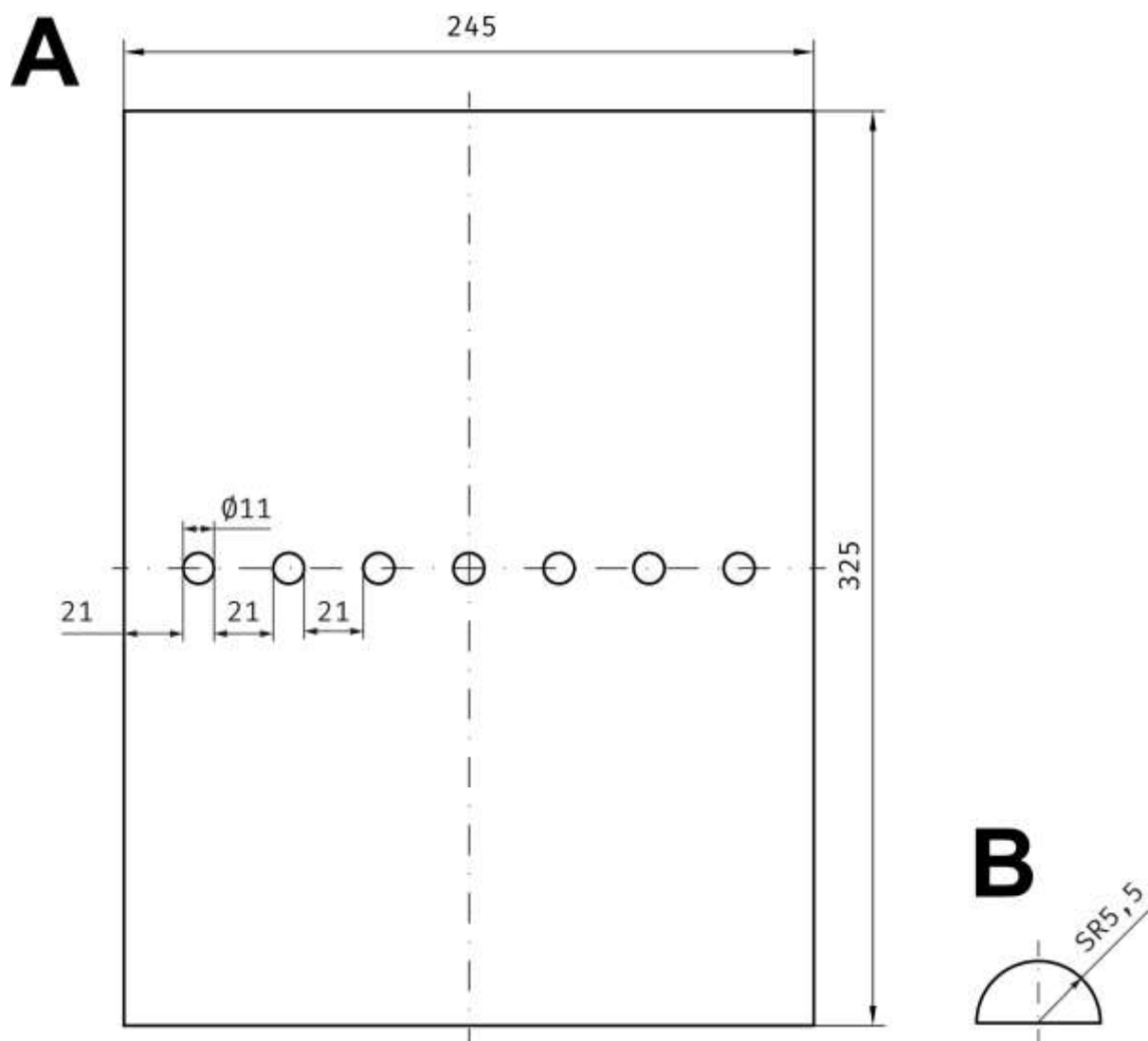
4.7. Metodyka modyfikacji polimerowych zbiorników bioreaktora z mieszaniem typu *wave* intensyfikującej wymianę masy

Jednym z celów badawczych pracy doktorskiej było opracowanie prototypów modyfikacji zużywalnych polimerowych zbiorników, które zapewniałyby intensyfikację wymiany masy i które mogłyby zostać wykorzystane praktycznie do hodowli biomasy prowadzonej w warunkach *in vitro* w układzie bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25*. Podjęcie tego wyzwania było umotywowane potencjalnym zwiększeniem wydajności procesów realizowanych w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* lub rozszerzeniem obszaru zastosowań tego typu urządzeń w odniesieniu do form biomasy, które do tej pory nie były hodowane w tego typu urządzeniach. W trakcie prac nad modyfikacją polimerowych zbiorników przyjęto założenie, zgodnie z którym intensyfikacja wymiany masy w badanym układzie powinna zająć bez znacznego zwiększenia naprężeń ścinających generowanych wskutek ruchu fazy ciekłej, a kształt wprowadzanych elementów nie powinien wpływać na powstawanie stref martwych, w których mogłaby gromadzić się hodowana biomasa. Dodatkowymi aspektami branymi pod uwagę ze względu na potencjał komercjalizacji prototypowych modyfikacji polimerowych zbiorników było zachowanie ogólnej prostoty proponowanych rozwiązań i możliwość ich łatwego uwzględnienia w przemysłowym procesie wytwarzania pre-sterylizowanych zużywalnych polimerowych zbiorników do hodowli.

Strukturalne modyfikacje polimerowych zbiorników *Cellbag™ 2 L* polegały na przymocowaniu do dolnej powierzchni, po wewnętrznej stronie (tzn. wewnątrz) zbiornika, wypustek

zwiększających burzliwość przepływu fazy ciekłej. Zaproponowana modyfikacja składała się z 7 wypustek w jednym rzędzie umieszczonym prostopadle do dłuższej krawędzi zbiornika i w równej odległości od obu krótszych krawędzi zbiornika (Rysunek 17A). Wypustki miały kształt półkul o średnicy 11 mm (Rysunek 17B). Geometria modyfikacji została opracowana w oparciu o Wariant 3 geometrii bioreaktora wykorzystywanej podczas obliczeń symulacyjnych CFD, których wyniki przedstawiono w Rozdziale 5.6 niniejszej rozprawy.

Wypustki wykonano z przezroczystego polilaktydu uformowanego przy zastosowaniu druku 3D. Wypustki były mocowane do wewnętrznej strony dna polimerowego zbiornika Cellbag™ klejem cyjanoakrylowym poprzez nacięcie wykonane w dolnej powierzchni zbiornika, które w celu zachowania szczelności układu zaklejono po montażu wypustek przezroczystą taśmą polietylenową o wysokiej przyczepności. Przed etapem bioprocusowej walidacji, zmodyfikowane zbiorniki wysterylizowano przez naświetlenie dawką promieniowania β o wielkości 15,0 kGy przy użyciu akceleratora do sterylizacji radiacyjnej ELEKTRONIKA 10/10 emitującego strumień elektronów o energii 9,1 MeV.



Rysunek 17. Schemat rozmieszczenia wypustek w zaproponowanej prototypowej modyfikacji zbiornika Cellbag™ 2 L. **A:** Rozmieszczenie wypustek na dolnej ścianie wewnątrz polimerowego zbiornika. **B:** Wymiary wypustek wykorzystanych w modyfikacji.

4.8. Metodyka hodowli zawiesiny komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2 w zbiornikach Cellbag™

W celu bioprosesowej weryfikacji wpływu prototypowych modyfikacji polimerowego zbiornika Cellbag™ na proliferację biomasy przeprowadzono szereg wglębnych hodowli zawiesiny komórek tkanki kalusowej *Nicotiana tabacum* linii *Bright Yellow no. 2* (BY-2). W przedstawianych badaniach wykorzystano komórki roślinne linii transformowanej genem białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*, GFP), która na potrzeby badań udostępniona została przez Zakład Biologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w ramach współpracy badawczej.

Komórki *N. tabacum* linii BY-2 są często wykorzystywanym materiałem biologicznym w badaniach o różnorodnej tematyce, między innymi ze względu na zdolność do intensywnej proliferacji biomasy, możliwość łatwego powiększania skali hodowli do dużych objętości, wysoki stopień jednorodności populacji komórek w trakcie hodowli oraz podatność biomasy na ukierunkowane transformacje genetyczne [134], [135]. Zmodyfikowane genetycznie komórki *N. tabacum* linii BY-2 są wykorzystywane jako system ekspresji białek ssaczych prostszy w hodowli niż komórki zwierzęce, a nawet bezpieczniejszy w porównaniu z systemami ekspresji opartymi o komórki prokariotyczne, w których białkowy bioprodukt może być zanieczyszczony trudnymi do oddzielenia endotoksynami bakteryjnymi [136]. Wzrost stężenia biomasy w trakcie hodowli komórek *N. tabacum* BY-2 wiąże się ze znaczącą zmianą właściwości hydrodynamicznych medium hodowlanego wpływającą na ograniczenie propagacji fal na powierzchni swobodnej i zmniejszenie wydajności wnikania masy. Wystąpienie tych zjawisk sprawia, że rosnące zapotrzebowanie hodowanej biomasy komórek *N. tabacum* na tlen nie może zostać zaspokojone w trakcie hodowli prowadzonych w warunkach *in vitro*.

W trakcie badań wykonano łącznie cztery wglębne hodowle okresowe biomasy komórek *N. tabacum* linii BY-2, po dwie hodowle okresowe w niezmodyfikowanym zbiorniku (układ referencyjny) oraz w zbiornikach zmodyfikowanych zgodnie z założeniami modyfikacji opracowanej w oparciu o Wariant 3 geometrii bioreaktora wykorzystywanej podczas obliczeń symulacyjnych CFD.

Medium hodowlane

W badaniach wykorzystano zalecaną do prowadzenia hodowli wglębnych komórek BY-2 zmodyfikowaną pożywkę hodowlaną Linsmeiera i Skooga (LS) [134], [137] o następującym składzie:

- naważka komercyjnie dostępnego podłoża hodowlanego LS (Duchefa Biochemie, NL) w stężeniu 4,4 g/L, w którego skład wchodzi:
 - sześciowodny chlorek kobaltu (II) $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/L,
 - pięciowodny siarczan miedzi (II) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,025 mg/L,
 - wersenian żelazowo-sodowy FeNaEDTA 36,70 mg/L,
 - kwas borowy H_3BO_3 6,20 mg/L,
 - jodek potasu KI 0,83 mg/L,
 - jednowodny siarczan manganu (II) $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16,90 mg/L,
 - dwuwodny molibdenian sodu $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,25 mg/L,
 - siedmiowodny siarczan cynku $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 6,60 mg/L,
 - chlorek wapnia CaCl_2 332,02 mg/L,
 - diwodorofosforan potasu KH_2PO_4 170,00 mg/L,
 - azotan potasu KNO_3 1900,00 mg/L,
 - siarczan magnezu MgSO_4 180,54 mg/L,
 - azotan amonu NH_4NO_3 1650,00 mg/L,
 - mioinozytol 100,00 mg/L,
 - chlorowodorek tiaminy 0,40 mg/L,
- roztwór diwodorofosforanu potasu KH_2PO_4 o stężeniu 100 mg/mL dodany w objętości 2 mL na 1 L medium hodowlanego,
- roztwór kwasu 2,4-dichlorofenylooctowego o stężeniu 1 mg/mL dodany w objętości 200 μL na 1 L medium hodowlanego,
- sacharoza w stężeniu 30 g/L,
- woda destylowana jako rozpuszczalnik naważek składników wyżej wymienionego medium hodowlanego.

Odczynniki do analiz

W trakcie przeprowadzania analiz biomasy i pochodzących z niej próbek biologicznych, a także w trakcie przygotowywania prób poddawanych następnie analizie jakościowej i/lub ilościowej, wykorzystano następujące odczynniki lub zestawy odczynników:

- 0,1M roztwór wodny HCl,
- 0,1M roztwór wodny KOH,
- 70% wodny roztwór etanolu do chemicznej dezynfekcji powierzchni, drobnego sprzętu laboratoryjnego oraz dłoni,

- odczynnik PrestoBlue do oznaczania aktywności metabolicznej komórek (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific),
- czysty chemicznie tlen (AirProducts),
- woda destylowana jałowa (woda destylowana sterylizowana w autoklawie i przechowywana w szczelnie zamkniętych szklanych butelkach typu Schott).

Biomasa i inokulum do hodowli

W badaniach wykorzystano proliferujące w zawieszynie komórki *Nicotiana tabacum Bright Yellow No. 2* (BY-2) linii G1M, czyli komórki roślinne transformowane genem biosyntezy białka zielonej fluorescencji GFP otrzymane w Zakładzie Biologii Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Inokulum, czyli startową porcję biomasy do inokulacji polimerowego zbiornika zapoczątkowującej hodowlę prowadzoną w tym zbiorniku, każdorazowo otrzymywano w wyniku propagacji komórek hodowanych w małej skali. W celu przygotowania porcji zawiesiny komórek wymaganej do zainicjowania hodowli w polimerowym zbiorniku Cellbag™, w warunkach sterylnych (w komorze laminarnej), używając pipetora automatycznego zaopatrzonego w jałową pipetę serologiczną jednorazowego użytku, przenoszono 5 mL startowej zawiesiny biomasy do kolby Erlenmayera o pojemności 250 mL zawierającej 95 mL jałowego medium hodowlanego LS. Tak przygotowaną zawiesinę komórek pozostawiano w termostatowanym (24 °C) inkubatorze z wstrząsaniem o częstotliwości 105 min⁻¹, w ciemności, na okres 7 dni. Po upływie założonego 7-dniowego czasu inkubacji przenoszono uzyskane w ten sposób inokulum do polimerowego zbiornika Cellbag™, inicjując w ten sposób hodowlę *in vitro* prowadzoną w warunkach mieszania typu *wave*.

Po zakończeniu 7-dniowej hodowli, próbkę (10 cm³) uzyskanej zawiesiny komórek *N. tabacum* BY-2 jałowo filtrowano pod zmniejszonym ciśnieniem na jałowej bibule laboratoryjnej, a następnie wydzieloną w ten sposób biomasę ważono z zachowaniem kryteriów jałowości. Na podstawie pomiaru masy mokrej biomasy obliczano wymaganą objętość inokulum potrzebną do uzyskania odpowiedniego stężenia biomasy w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L. Dla wszystkich hodowli wgłębnych przeprowadzonych w polimerowych zbiornikach oscylacyjnie wychylanych w bioreaktorze *ReadyToProcess™* WAVE 25, początkowa gęstość komórek *N. tabacum* BY-2 w momencie rozpoczynania hodowli wynosiła 12,5 g/L. Wartość początkowej gęstości biomasy oraz procedura przygotowywania inokulum komórek *N. tabacum* BY-2 były zgodne z wytycznymi zawartymi w referencyjnej publikacji [138].

Zbiorniki Cellbag™ do hodowli biomasy

W przeprowadzonych hodowlach, których celem była bioprosesowa weryfikacja aplikacyjności zaproponowanych modyfikacji zbiorników Cellbag™, wykorzystano dwa rodzaje polimerowych zbiorników Cellbag™ (Cytiva):

- niezmodyfikowane, fabrycznie presterylizowane polimerowe zbiorniki Cellbag™ 2 L o pojemności roboczej do 1 L oraz pojemności nominalnej 2 L,
- zmodyfikowane i następnie wysterylizowane promieniowaniem β polimerowe zbiorniki Cellbag™ 2 L poddane autorskiej modyfikacji dolnej wewnętrznej powierzchni zbiornika zgodnie z opisem przedstawionym w Rozdziale 4.7.

Aparatura i urządzenia laboratoryjne

W trakcie realizacji badań wykorzystano następujące aparaty i urządzenia laboratoryjne:

- bioreaktor *ReadyToProcess* WAVE™ 25 (Cytiva) zapewniający mieszanie typu *wave*,
- polimerowe zbiorniki Cellbag™ 2 L (Cytiva), w tym: zbiorniki niezmodyfikowane oraz zbiorniki po autorskiej modyfikacji dolnej powierzchni wewnętrznej (zgodnie z Rozdziałem 4.7),
- waga laboratoryjna o dokładności 0,01 g (Radwag WPS 2100/C/2),
- waga analityczna o dokładności 0,0001 g (Radwag AS 160/C/2),
- komora laminarna o pionowym przepływie jałowego powietrza (Herasafe™ KS 12, Thermo Fisher Scientific),
- sterylizator parowy (SMS ELMi ESS-207),
- inkubator z wstrząsaniem (JeioTech ISS-7200),
- mikroskop odwróconego pola (Nikon Eclipse TS100),
- mieszadło typu wortex (Biologix),
- wirówka laboratoryjna (MPW 260RH),
- pompa próżniowa (Gast Manufacturing Inc., 0523-101Q-G588DX),
- pH-metr (Mettler Toledo FiveEasy Plus),
- spektrofotometr UV-Vis (UV-5100 Metash Instruments Co., Ltd)
- suszarka laboratoryjna (MPM),
- chromatograf ciekłowy HPLC (Varian 635 CL System) wyposażony w detektor RI Smartline 2300 (Varian) oraz kolumnę RSO-Oligosaccharide Ag⁺ 4% (Rezex),
- kołyska laboratoryjna (MR12 Biosan).

Drobne wyposażenie laboratoryjne

W trakcie realizacji badań wykorzystano następujący drobny sprzęt laboratoryjny jedno- i wielokrotnego użytku:

- pipety automatyczne (HTL Discovery Pro),
- pipetor automatyczny (HTL Swiftpet Pro),
- sterylne końcówki do pipet automatycznych 10 μ L, 200 μ L i 1000 μ L (NEST Biotechnology Co.),
- sterylne pipety serologiczne 10mL i 25mL (Biologix),
- sterylne probówki wirownicze typu Falcon 15 i 50 mL (Biologix),
- sterylne probówki wirownicze typu Eppendorf 1,5 mL i 2 mL (Googlab Scientific),
- cylindry miarowe szklane 100 mL, 250 mL i 1000 mL,
- kolby Erlenmayera szklane 250 mL,
- butelki szklane 500 mL i 1000 mL odporne na autoklawowanie,
- laboratoryjny palnik gazowy na mieszanekę propanu i butanu,
- sterylne strzykawki z gwintowanymi końcówkami typu Luer 5 mL i 15 mL (Biologix),
- sterylne filtry strzykawkowe 0,2 μ m (Bionovo),
- fiołki szklane na próby do analizy HPLC,
- bibuła filtracyjna laboratoryjna.

Hodowla komórek *N. tabacum* BY-2 w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave*

Sterylny polimerowy zbiornik hodowlany (zbiornik niezmodyfikowany był presterylizowany przez dostawcę, zbiornik modyfikowany był sterylizowany promieniowaniem β bezpośrednio po modyfikacji) umieszczano w komorze laminarnej o pionowym przepływie jałowego powietrza w celu przetłoczenia do zbiornika przez dedykowany port Luer założonej objętości medium hodowlanego, a następnie inokulum zawiesiny komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2. Medium hodowlane i inokulum łączono w takich proporcjach, by w momencie inokulacji zbiornika stężenie świeżej biomasy komórek *N. tabacum* BY-2 wyniosło 12,5 g/L, a objętość całkowita zawiesiny komórek w zbiorniku wyniosła 1 L (czyli 50% nominalnej objętości używanego zbiornika Cellbag™ 2 L). Przygotowany w powyższy sposób zbiornik zawierający zawiesinę komórek o gęstości początkowej mocowano uchwytami na platformie bioreaktora *ReadyTo-Process* WAVE™ 25. Hodowlę prowadzono w ciemności przez 10 dni, utrzymując temperaturę układu hodowlanego na poziomie 26 °C oraz doprowadzając do zbiornika powietrze zawierające 21% tlenu, ze stałym natężeniem przepływu fazy gazowej przez objętość fazy gazowej

ponad cieżką falującą w zbiorniku ustalonym na poziomie 0,5 L/min. W trakcie wszystkich przeprowadzonych hodowli wartości parametrów operacyjnych bioreaktora definiujące ruch oscylacyjny polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L zmieniano według harmonogramu przedstawionego w Tabeli 11, zgodnie z referencyjną procedurą hodowli wgłębnej zawiesiny komórek *N. tabacum* zalecaną przez producenta bioreaktora [139].

Tabela 11. Harmonogram zmian wartości parametrów operacyjnych bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25* definiujących oscylacyjne wychylenia zbiornika Cellbag™ 2 L podczas hodowli biomasy *N. tabacum* zalecane przez producenta bioreaktora (według [139]).

Czas hodowli (h)	Amplituda α (°)	Częstotliwość ω (min ⁻¹)
0–48	6	20
48–120	8	26
120–168	12	30

Przez cały czas trwania prowadzonych hodowli, przy użyciu oprogramowania UNICORN™ automatycznie rejestrowano i archiwizowano wartości odczynu pH, stężenia tlenu rozpuszczonego DO oraz temperatury medium hodowlanego. Przy użyciu dedykowanego portu Luer pobierano ze zbiornika próbki medium hodowlanego o objętości 15 mL w dniach 0 (tj. po 2 godzinach od rozpoczęcia hodowli), 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 i 10 danej hodowli. Po zakończeniu każdej z hodowli, całą uzyskaną biomasę odfiltrowywano pod zmniejszonym ciśnieniem z zachowaniem kryteriów jałowości, a następnie wciąż wilgotną ważono w celu ilościowego porównania wydajności hodowli w ostatnim dniu procesu.

Wyznaczenie aktywności metabolicznej komórek

Objętość 1 mL zawiesiny komórek pobranej z każdej z 15-mililitrowych serii próbek pochodzących z danej hodowli, przenoszono jałowo (w komorze laminarnej) do sterylnej probówki typu Falcon o objętości 15 mL, a następnie pięciokrotnie rozcieńczano czystym (pozbawionym komórek) sterylnym roztworem pożywki LS. Po dokładnym wymieszaniu rozcieńczonej zawiesiny komórek na mieszadle typu wortex, do trzech sterylnych probówek typu Eppendorf przenoszono po 1350 μ L rozcieńczonej zawiesiny komórek, a następnie uzupełniano 150 μ L odczynnika PrestoBlue do uzyskania sumarycznej objętości 1,5 mL. Następnie, przygotowane w ten sposób próbki ponownie dokładnie mieszano na mieszadle typu wortex, po czym przygotowane w ten sposób mieszaniny w probówkach przenoszono na trzydzieści minut do inkubatora z wstrząsaniem, gdzie utrzymywana była temperatura 37 °C. Po założonym czasie inkubacji, probówki przenoszono do wirówki laboratoryjnej schłodzonej do temperatury 10 °C,

w której wirowano je przez dziesięć minut przy częstotliwości 5000 min^{-1} . Po odwirowaniu osadu komórek, uzyskany supernatant przenoszono do kuwet pomiarowych o pojemności 1 mL i z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis odczytywano absorbancję A próbki przy dwóch długościach fali: $\lambda_1 = 570 \text{ nm}$ oraz $\lambda_2 = 600 \text{ nm}$. Wartość stopnia redukcji odczynnika PrestoBlue wyznaczano przy zastosowaniu Równania 17, zgodnie z równaniem podanym w procedurze oznaczenia przez producenta wykorzystywanego odczynnika PrestoBlue [140]:

$$\%_{\text{redukcji}} = \frac{(117216 \cdot A_{\lambda_1}) - (80586 \cdot A_{\lambda_2})}{(155677 \cdot A_{\text{medium}_{600\text{nm}}}) - (14652 \cdot A_{\text{medium}_{570\text{nm}}})} \cdot 100\% \quad (17)$$

Wyznaczenie stężenia biomasy

Objętość 10 mL zawiesiny komórek pobranej z każdej z 15-mililitrowych próbek pobieranych z danej hodowli przenoszono jałowo (w komorze laminarnej) do sterylnej probówki typu Falcon, aby wykonać oznaczenie stężenia biomasy w medium hodowlanym. Każdorazowo oznaczenie wykonywano w trzech powtórzeniach. Następnie próbki poddawano w warunkach jałowych filtracji pod zmniejszonym ciśnieniem, pozwalającej osadzić biomasę na jałowym sączku o znanej masie. Sączki o znanej masie z mokrą biomasą umieszczano na suchych i jałowych szklanych szalkach Petriego o znanej masie i ważono na wadze analitycznej. Pozwalało to na określenie masy mokrej biomasy i wyznaczenie stężenia biomasy FB komórek w przeliczeniu na jednostkową objętość medium hodowlanego (Równanie 18):

$$FB = \frac{m_{\text{szalki+biomasa}} - m_{\text{szalki}}}{10 \text{ mL}} \cdot 1000 \frac{\text{mL}}{\text{L}} \quad (18)$$

Wyznaczenie stężenia cukrów w medium hodowlanym

Filtrat uzyskany z każdej próbki wykorzystanej do wyznaczenia stężenia biomasy zbierano do osobnych jałowych probówek typu Eppendorff. Następnie, przy użyciu sterylnych strzykawek, ciecz przetłaczano przez filtry strzykawkowe do czystych fiolek szklanych umieszczanych w module automatycznego pobierania próbek w chromatografii HPLC firmy Varian, wyposażony w detektor RI Smartline 2300 (Varian) i kolumnę RSO-Oligosaccharide Ag^+ 4% (Rezex) przeznaczoną do chromatograficznego rozdzielania cukrów. Przygotowane fioleki umieszczano w autosamplerze chromatografu i przeprowadzano ilościową analizę stężeń sacharozy, glukozy oraz fruktozy w badanych próbkach medium hodowlanego, w oparciu o krzywą wzorcową przygotowaną uprzednio na podstawie analizy próbek roztworów wzorcowych sacharozy, fruktozy i glukozy o znanych stężeniach w zakresie od 0 do $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ w interwałach co $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, zgodnie z procedurą opisaną w referencyjnym artykule [141].

4.9. Metody statystyczne

Planowanie eksperymentów zrealizowanych w ramach przeprowadzonych badań oraz statystycznie prawidłową analizę uzyskanych danych eksperymentalnych przeprowadzono przy zastosowaniu następujących pakietów oprogramowania:

- Oprogramowanie Statistica (TIBCO Software Inc.):
 - planowanie eksperymentów i dobór wartości eksperymentalnych parametrów procesowych przy użyciu funkcji *DoE*,
 - określanie wartości efektów standaryzowanych i istotności statystycznej wpływu poszczególnych parametrów na wartości czasu mieszania oraz objętościowego współczynnika wnikania masy $k_L a$.
- Oprogramowanie MATLAB (MathWorks Inc.):
 - automatyzacja przetwarzania danych uzyskanych w pomiarach czasu mieszania przy zastosowaniu metody pH,
 - automatyzacja przetwarzania danych z pomiarów czasu mieszania przy zastosowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej,
 - wyznaczanie współczynników równań korelacyjnych na podstawie danych eksperymentalnych,
 - ocena dopasowania do uzyskanego modelu matematycznego przy zastosowaniu funkcji regresji nieliniowej *fitnlm* z pakietu *Statistics and Machine Learning Toolbox*,
 - analiza wariancji przy zastosowaniu funkcji *anova* z pakietu *Statistics and Machine Learning Toolbox*.
- Program do obsługi arkuszy kalkulacyjnych Excel (Microsoft Corp.):
 - wyznaczanie wartości współczynnika $k_L a$ na podstawie odczytów czujnika tlenu rozpuszczonego DO,
 - zastosowanie formuł regresji liniowej,
 - zarządzanie zbiorami danych eksperymentalnych.

5. Wyniki i dyskusja

5.1. Wpływ wybranych właściwości fazy ciekłej na wartości współczynnika k_{La}

Cel i merytoryczne uzasadnienie badań

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu lepkości oraz dodatku środka przeciwpiennego na wydajność wnikania masy osiąganą w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L podczas oscylacyjnych wychyleń warunkujących mieszanie typu *wave* fazy ciekłej znajdującej się w zbiorniku. Podczas hodowli biomasy różnego typu komórek, które są realizowane w warunkach *in vitro*, w tym w bioreaktorach, aktywność metaboliczna biomasy skutkuje zewnątrzkomórkową sekrecją szeregu biochemicznych produktów metabolizmu komórek. Wydzielanie na zewnątrz komórek powstających w nich metabolitów (tj. cukrowców, peptydów i białek, całego szeregu metabolitów wtórnych) wpływa istotnie na lepkość medium hodowlanego, w którym inkubowana jest biomasa. Zmiany lepkości medium hodowlanego w trakcie hodowli biomasy to zatem zjawisko typowe, które jest jednym z kryteriów rozróżniających procesy chemiczne i biochemiczne realizowane w aparatach zbiornikowych. Niektóre z wydzielanych zewnątrzkomórkowo metabolitów, na przykład białka (w tym enzymy) i peptydy o różnej długości łańcucha aminokwasowego, poza zmianą lepkości pożywki mogą również intensyfikować jej pienienie. W przypadku hodowli *in vitro* biomasy komórek zwierzęcych i ludzkich do pożywki dodaje się znaczne objętości surowicy (zwykle surowica stanowi do 10% objętości końcowej medium hodowlanego), czyli ciekłą frakcję krwi, niezawierającą wprawdzie krwinek i fibrynogenu, ale zawierającą liczne białka (w tym makrocząsteczki albumin i globulin) i sole mineralne. Składniki surowicy również intensyfikują pienienie pożywek. Powstająca w trakcie hodowli biomasy piana stanowi poważne ograniczenie limitujące wydajność hodowli, jak i utrudnia separację bioproduktów z układu hodowlanego. Jednym ze sposobów przeciwdziałania pienieniu pożywek jest suplementacja składu mediów hodowlanych biozgodnym chemicznym środkiem przeciwpiennym. Preparaty tego typu to związki powierzchniowo czynne, powodujące obniżenie napięcia powierzchniowego pęcherzyków fazy gazowej tworzących pianę, a w efekcie końcowym ich pęknięcie. Dodatek środka przeciwpiennego zarówno redukuje pienienie medium hodowlanego, ale również ogranicza tendencję do tworzenia się nowej piany w układzie hodowlanym. Rozpoznanie ilościowych efektów wywoływanych zmianą lepkości fazy wodnej oraz dodatkiem środka przeciwpiennego do fazy wodnej mieszanej w oscylacyjnie

wychylanym polimerowym zbiorniku bioreaktora *single-use* są zatem w pełni uzasadnionym działaniem badawczym. Niniejszą część pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o metodykę przedstawioną w rozdziale 4.3. Szczegółową prezentację i dyskusję wszystkich wyników dotyczących tej części badań doświadczalnych przedstawiono w publikacji [A2]. Natomiast poniżej zaprezentowano i przedyskutowano wątki badawcze najważniejsze z punktu widzenia tematyki rozprawy doktorskiej.

Na potrzeby merytorycznie uzasadnionego omówienia uzyskanych wyników, pogrupowano je w ramach trzech serii eksperymentów, zdefiniowanych na podstawie składu badanej fazy ciekłej poddawanej mieszaniu typu *wave* w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L:

- **Seria A:** mieszanina wody po odwróconej osmozie (woda RO), płodowej surowicy bydłowej (FBS) oraz gliceryny (jako składnika zwiększającego lepkość mieszaniny) w różnych proporcjach.
- **Seria B:** mieszanina pożywki DMEM, FBS oraz gliceryny w różnych proporcjach.
- **Seria C:** mieszanina pożywki DMEM, FBS oraz gliceryny w różnych proporcjach, z dodatkiem środka przeciwpiennego Pluronic® F-68 (F-68).

W celu ujednoczenia i uproszczenia prezentacji wyników, dodatkową wartością wykorzystaną do dyskusji uzyskanych wyników była wartość zmodyfikowanej liczby Reynoldsa Re_L , którą wyznaczano na podstawie wzoru zdefiniowanego we wcześniejszych pracach dotyczących tematyki bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave* [3], zrealizowanych na Wydziale Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej:

$$Re_L = \frac{\omega L^2 \rho}{\mu} \cdot \sin \alpha \quad (19)$$

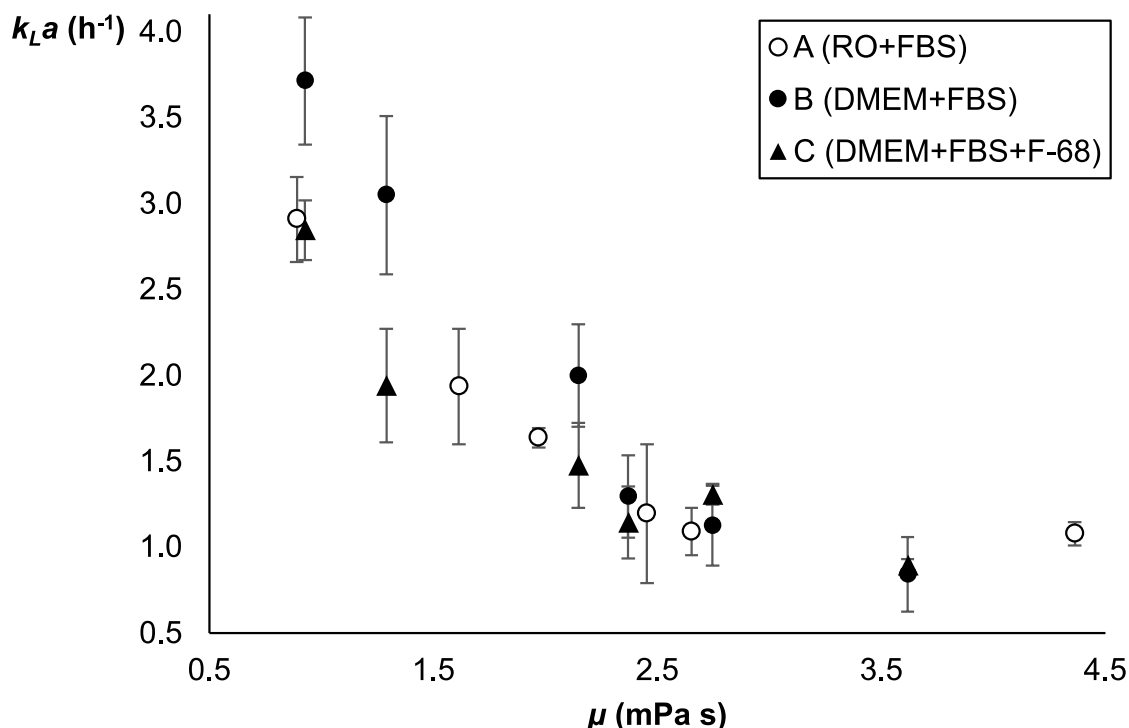
W Równaniu 19 symbolami α i ω oznaczono, odpowiednio, amplitudę oraz częstotliwość oscylacyjnych wychyleń platformy bioreaktora *ReadyToProcess™ WAVE 25*, symbolami ρ i μ oznaczono, odpowiednio, wartości gęstości oraz lepkości dynamicznej fazy ciekłej, a symbolem L oznaczono wymiar charakterystyczny, zdefiniowany jako długość dłuższej krawędzi zbiornika Cellbag™ 2 L, równą 0,33 m.

Wartości liczbowe zmodyfikowanej liczby Reynoldsa Re_L powiązano z wartościami $k_L a$ w celu zdefiniowania równania korelacyjnego do przewidywania wartości współczynnika $k_L a$ osiąganych w badanym układzie w zależności od zadanych wartości parametrów operacyjnych mieszania typu *wave* (tj. falowania cieczy w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L) oraz parametrów fizykochemicznych fazy ciekłej. Podczas pomiarów gęstości fazy ciekłej, ze względu

na ryzyko uszkodzenia aparatury pomiarowej (lepkościomierza) przez białka zawarte w FBS, w zbadanych mieszaninach pominięto dodatek surowicy.

Wpływ lepkości

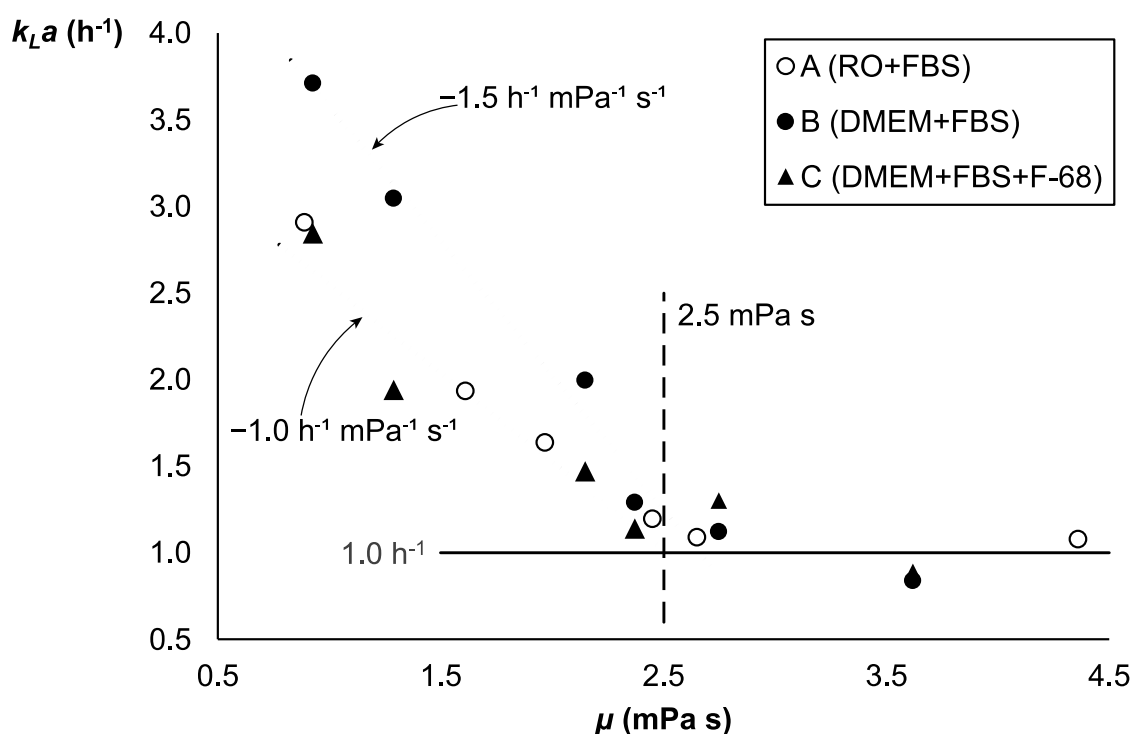
Uzyskane wartości współczynnika $k_L a$ w funkcji lepkości dynamicznej μ dla wszystkich badanych serii doświadczalnych różniących się składem mieszanej fazy ciekłej, przedstawiono na Rysunku 18.



Rysunek 18. Wykres zależności współczynnika $k_L a$ od lepkości dynamicznej fazy ciekłej (zgodnie z [A2]).

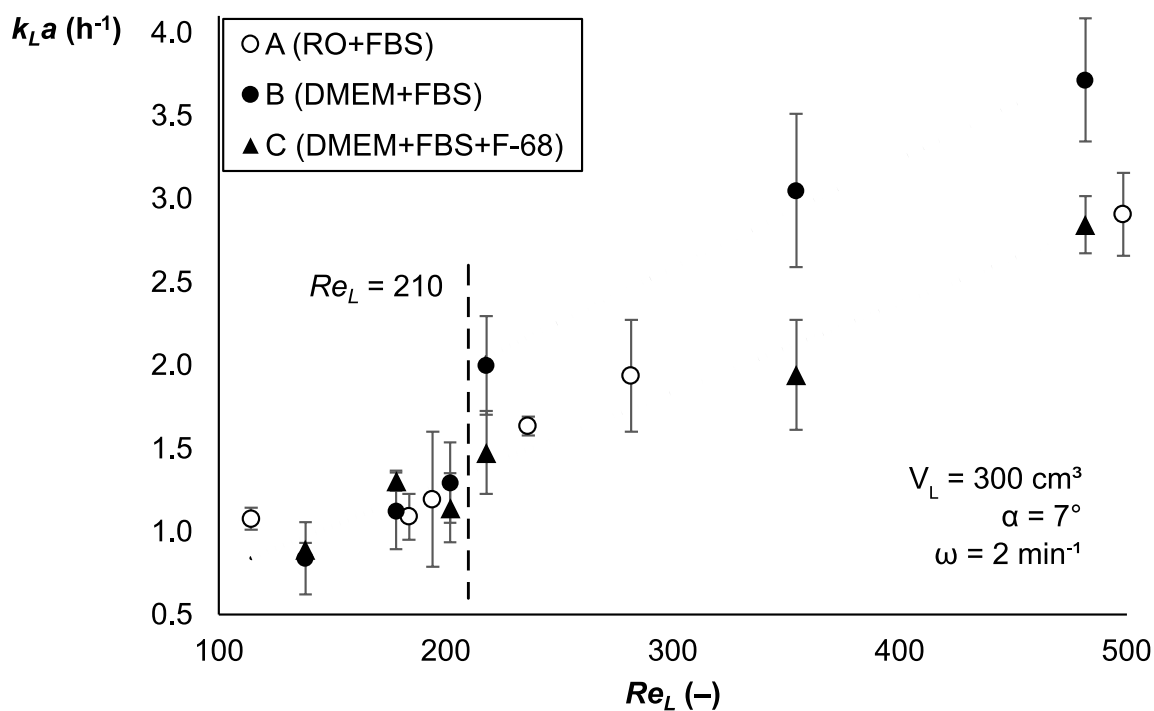
Na podstawie ogólnego przebiegu zależności przedstawionych na Rysunku 18 można stwierdzić, że wzrost lepkości fazy ciekłej wpływał na zmniejszenie intensywności wnikania masy, w szczególności w zakresie fazy ciekłej charakteryzowanej wartościami lepkości poniżej 2,5 mPa · s, którą to wartość uznano za graniczną. Powyżej wartości granicznej 2,5 mPa · s, spadek wartości $k_L a$ był wyraźnie wolniejszy, a osiągnięte wartości współczynnika $k_L a$ wyniosły około 1,0 h^{-1} . Istotność statystyczną wpływu lepkości na wartości $k_L a$ zweryfikowano wynikami testu statystycznego Shapiro-Wilka. Wartości prawdopodobieństwa p potwierdzenia hipotezy zerowej o pochodzeniu zestawów wartości eksperymentalnych z rozkładu normalnego dla kolejnych serii doświadczeń wyniosły: dla serii A 0,021, dla serii B 0,053, a w przypadku serii C 0,005.

By ułatwić dyskusję uzyskanych wyników, na Rysunku 19 przedstawiono wykres wartości współczynnika $k_L a$ w funkcji lepkości dynamicznej cieczy μ z naniesionymi liniami trendu i charakterystycznymi wartościami. Wartości $k_L a$ w zakresie lepkości poniżej granicznej wartości $2,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ były w przypadku mieszanin stanowiących mieszaninę DMEM i FBS (seria B) o około 40–50% wyższe w porównaniu do mieszanin RO i FBS (seria A) oraz mieszanin DMEM i FBS z dodatkiem F-68 (seria C). Przebieg zależności wartości $k_L a$ od lepkości dynamicznej μ w przypadku mieszanin RO i FBS (seria A) oraz DMEM i FBS z dodatkiem F-68 (seria C) był zbliżony. Nachylenie linii trendu w przypadku serii A i serii C w zakresie wartości μ poniżej $2,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ wyniosło około $-1,0 \text{ h}^{-1} \text{ mPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a w przypadku serii B wyniosło około $-1,5 \text{ h}^{-1} \text{ mPa}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



Rysunek 19. Wykres danych eksperymentalnych prezentujący wyznaczone wartości współczynnika $k_L a$ od lepkości dynamicznej μ fazy ciekłej, wraz z oznaczonymi liniami trendu oraz charakterystycznymi wartościami (zgodnie z [A2]).

Wykres wartości współczynnika $k_L a$ w funkcji zmodyfikowanej liczby Reynoldsa Re_L wraz z oznaczonymi liniami trendu i charakterystycznymi wartościami przedstawiono na Rysunku 20. W ogólności, wzrost wartości Re_L był związany ze wzrostem wartości współczynnika $k_L a$. Zależność wartości $k_L a$ uzyskanych w seriach A i C od wartości Re_L była w przybliżeniu liniowa. W przypadku serii B, w zakresie wartości Re_L wyższych od granicznej wartości 210, wyznaczone w układzie wartości $k_L a$ odbiegały od ogólnego liniowego trendu.



Rysunek 20. Wykres wartości współczynnika $k_L a$ w funkcji wartości zmodyfikowanej liczby Reynoldsa Re_L , wraz z oznaczonymi liniami trendu oraz charakterystycznymi wartościami (zgodnie z [A2]).

Jednoznacznie negatywny wpływ wzrostu lepkości dynamicznej μ na wydajność wnikania masy do fazy ciekłej, charakteryzowanej wartościami współczynnika $k_L a$, poddawanej falowaniu w polimerowym zbiorniku wskutek oscylacyjnych wychyleń definiujących mieszanie typu *wave*, był prawdopodobnie związany z mniejszą prędkością przepływu cieczy o wyższej lepkości, co z kolei wpływało na mniejszą szybkość odnawiania powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz w układzie badanego bioreaktora *single-use*. Wraz ze wzrostem lepkości cieczy, wpływ konwekcji wymuszonej na wnikanie masy stawał się coraz mniejszy w stosunku do wpływu powolnych procesów dyfuzji i konwekcji swobodnej. Wartość $Re_L = 210$, powiązana z wartością lepkości μ równą około $2,5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$, zinterpretowano jako wartość graniczną, powyżej której rozpoczyna się proces formowania charakterystycznych fal na powierzchni cieczy poddawanej mieszaniu typu *wave* w polimerowym zbiorniku oscylacyjnie wychylanym w układzie badanego bioreaktora *single-use*. Powstawanie fal i związane z tym rozwinięcie powierzchni międzyfazowej oraz wzbudzenie cyrkulacji w głębi fazy ciekłej mają istotny wpływ na wymianę masy w bioreaktorach z mieszaniem typu *wave*. W jednej z prac autorstwa Eibl i in. [21], znaczny wzrost lepkości medium hodowlanego obserwowany w trakcie bioprocusu realizowanego z udziałem transformowanych genetycznie komórek *N. tabacum* linii BY-2 wydzielających białkowe cząsteczki immunoglobulin (przeciwciał) spowodował zatrzymanie falowania

na powierzchni cieczy i drastyczny spadek wydajności przenoszenia tlenu z fazy gazowej w głąb fazy ciekłej medium hodowlanego.

Zależność między wartościami $k_L a$ a wartościami Re_L przybliżono przy pomocy równania funkcji liniowej, którego współczynniki wyznaczono na podstawie danych eksperymentalnych pochodzących z serii A i C oraz części serii B:

$$k_L a = 5,355 \cdot 10^{-3} Re_L + 0,2281 \quad (20)$$

Zakres stosowalności Równania 20 obejmuje zakres wartości zmodyfikowanej liczby Reynoldsa Re_L od 110 do 500, w tym w mieszaninach z dodatkiem surowicy FBS oraz środka przeciwpiennego Pluronic® F-68.

Wpływ dodatku środka przeciwpiennego

Zaprezentowane na Rysunku 19 i Rysunku 20 otrzymane eksperymentalnie wartości współczynnika $k_L a$ w przypadku mieszanin z serii B, składających się z DMEM i FBS, były, w zakresie lepkości 0,9–2,5 mPa · s, o około 40–50% wyższe od wartości współczynnika $k_L a$ uzyskanych dla mieszanin z serii C, zawierających poza DMEM i FBS również dodatek niejonowego surfaktantu Pluronic™ F-68. Zaobserwowane zjawisko było prawdopodobnie spowodowane łącznym wpływem głównych składników mieszanin (czyli wody RO lub DMEM) oraz środka przeciwpiennego, niezależnie na wartości współczynnika wnikania masy po stronie fazy ciekłej k_L oraz powierzchni właściwej a .

W przypadku udokumentowanych w literaturze naukowej doniesień dotyczących użycia klasycznych systemów bioreaktorowych, takich jak kolumny barbotażowe [142], [143], bioreaktory z przepływem Taylora-Couette'a [144], czy klasyczne bioreaktory z mieszadłem [145], dodatek przeciwpiennego surfaktantu skutkowało zwiększeniem wartości powierzchni właściwej a przy jednoczesnym obniżeniu wartości k_L . Wzrost wartości powierzchni właściwej a w mieszaninach z dodatkiem surfaktantów pełniących funkcję środka przeciwpiennego jest związany ze zmniejszeniem średniego rozmiaru pęcherzyków gazu zatrzymywanych w cieczy oraz zwiększeniem stopnia zatrzymania gazu w fazie ciekłej mieszanej w danym zbiorniku. Spadek wartości współczynnika k_L można z kolei wiązać z jednoczesnym spadkiem dyfuzyjności gazu w fazie ciekłej oraz ograniczeniem burzliwości przepływu w pobliżu powierzchni międzyfazowej wywołanym wyższym stężeniem surfaktantu w tych obszarach cieczy [146].

Przykładowo, w jednym z badań zrealizowanych z wykorzystaniem klasycznego szklanego zbiornika o pojemności 300 L wyposażonym w mieszadło i dodatkowo w różne typy urządzeń napowietrzających, dodatek środka przeciwpiennego F-68 w stężeniu poniżej 0,5 g L⁻¹

skutkowało obniżeniem wartości $k_L a$ z 22 h^{-1} do 10 h^{-1} , a 2,5-krotny spadek wartości k_L przeważał nad 1,1-krotnym wzrostem wartości a [145].

W badanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L umieszczonym w bioreaktorze *Ready-ToProcess*™ WAVE 25, podczas oscylacyjnych wychyleń generujących przepływ w układzie, wnikanie tlenu odbywało się poprzez stale odnawianą przepływającymi falami powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz, bez wykorzystania barbotażu jako procesu zwiększającego powierzchnię transportu gazu do fazy ciekłej. W trakcie badania szybkości absorpcji tlenu do fazy ciekłej, powierzchnia właściwa a była w przybliżeniu stała, niezależnie od składu fazy ciekłej znajdującej się w zbiorniku podczas pomiaru, wobec czego różnice w wartościach $k_L a$ prawdopodobnie mogły wynikać z obniżenia wartości k_L wywołanego dodatkiem surfaktantu F-68.

5.2. Wpływ parametrów operacyjnych na wartości czasu mieszania

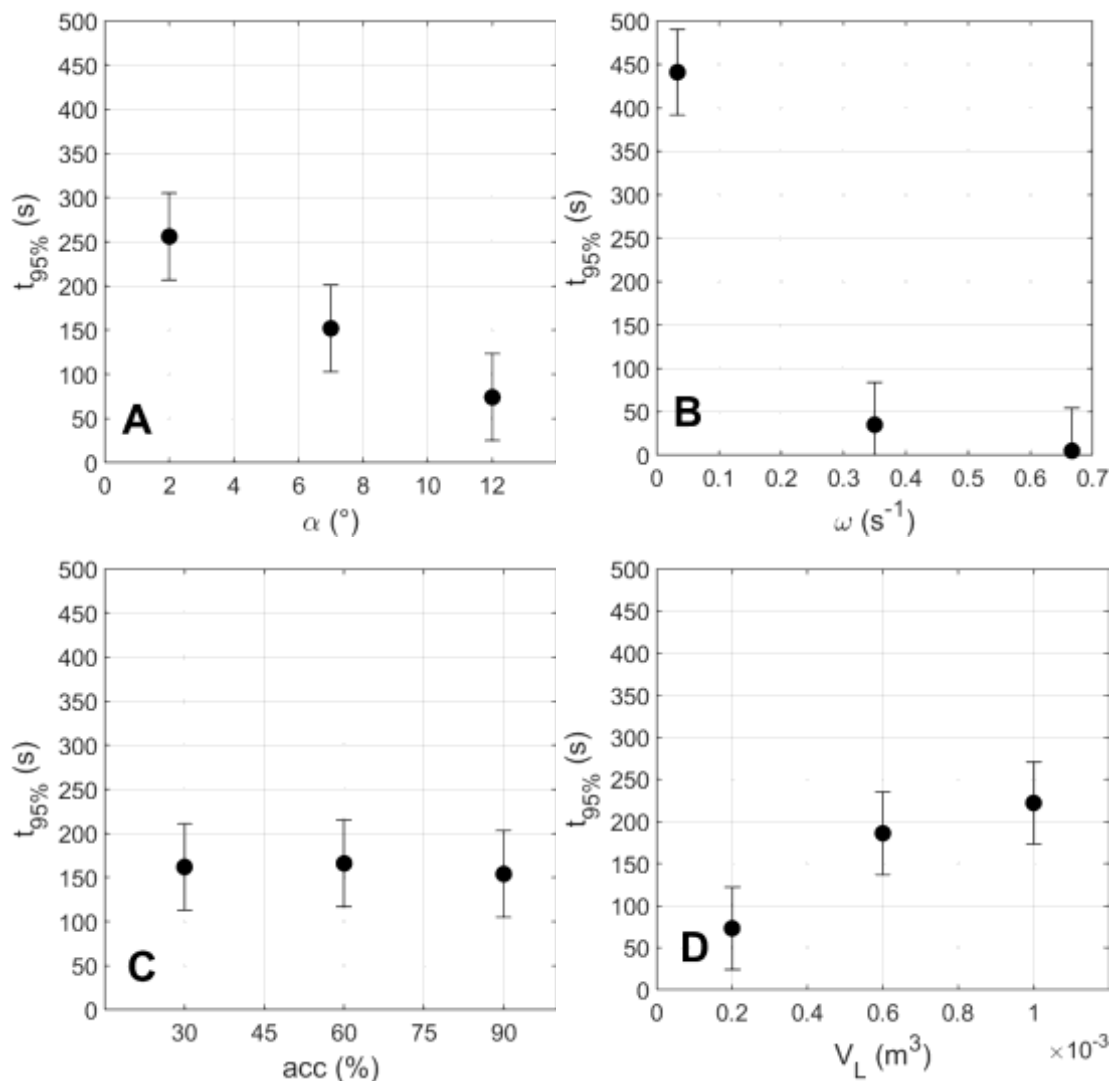
Cel i merytoryczne uzasadnienie badań

Zagadnieniem istotnym z punktu widzenia efektywnego planowania bioprocessów przeprowadzanych w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave* jest możliwość przewidywania wpływu parametrów pracy układu na wydajność mieszania zachodzącego w polimerowym zbiorniku. Powyższe merytoryczne uzasadnienie badań zdeterminowało cel kolejnej części badań, w których podjęto się próby ilościowej identyfikacji wpływu parametrów operacyjnych bioreaktora *ReadyToProcess*™ WAVE 25 determinujących oscylacyjne wychylenia polimerowego zbiornika Cellbag™ na wydajność mieszania typu *wave* fazy ciekłej znajdującej się wewnątrz tego zbiornika identyfikowaną jako czas mieszania $t_{95\%}$. Niniejszą część pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o metodykę przedstawioną w rozdziale 4.2. Szczegółową prezentację i dyskusję wszystkich wyników dotyczących tej części badań doświadczalnych przedstawiono w publikacji [A1]. Natomiast poniżej zaprezentowano i przedyskutowano wątki badawcze najważniejsze z punktu widzenia integracji tematyki rozprawy doktorskiej.

Ogółem, wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ osiągnęte w zbiorniku Cellbag™ 2 L, a zmierzone przy zastosowaniu metody pH, w całym branym pod uwagę zakresie parametrów procesowych wyniosły od 3 do 1350 sekund. Odnotowanie tak zróżnicowanych wartości czasu mieszania, od rzędu kilku sekund do rzędu kilkudziesięciu minut, oznacza, że w pewnych warunkach definiowanych pewnym zakresem parametrów operacyjnych badanego bioreaktora *single-use*, intensywność mieszania typu *wave* w polimerowym zbiorniku i związana z nią wydajność wnikania masy przez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową jest bardzo niska.

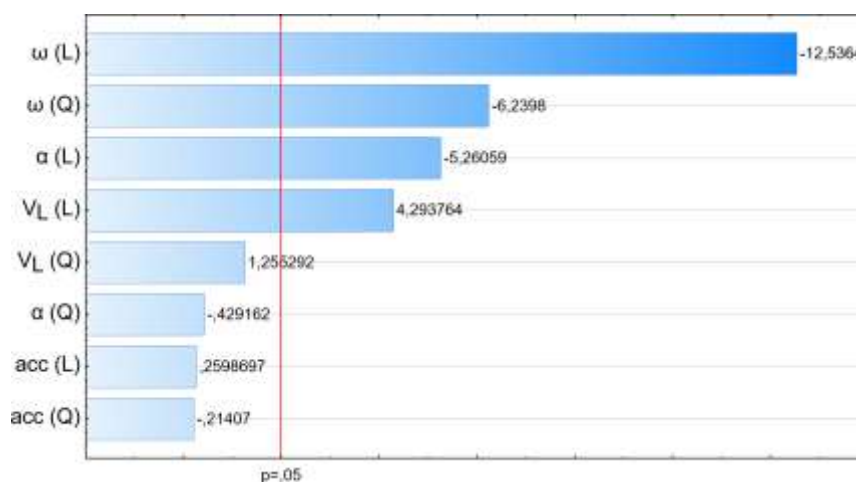
Identyfikacja wpływu parametrów operacyjnych na wydajność mieszania

Wpływ poszczególnych parametrów operacyjnych pracy bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25 na wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ osiągnane w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L określono poprzez wyznaczenie średnich wartości $t_{95\%}$ dla wszystkich poziomów niezależnych parametrów uwzględnionych w planowaniu eksperymentów: amplitudy oscylacyjnych wychyleń α , częstotliwości oscylacyjnych wychyleń ω , parametru opisującego profil przyspieszenia w trakcie cyklu oscylacji acc oraz objętości fazy ciekłej w zbiorniku V_L . Wykresy średnich wartości czasu mieszania dla czterech niezależnych czynników przedstawiono na Rysunku 21. Natomiast wartości bezwzględne standaryzowanej oceny efektu poszczególnych parametrów zebrano na wykresie Pareto przedstawionym na Rysunku 22.



Rysunek 21. Wykresy zależności między średnimi wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$ a brany pod uwagę poziomami niezależnych parametrów procesowych: amplitudy oscylacji α (A), częstotliwości oscylacji ω (B), parametru acc (C) oraz objętości cieczy w zbiorniku V_L (D) (zgodnie z [A1]).

Na podstawie danych przedstawionych na Rysunku 21 można stwierdzić, że wpływ badanych parametrów procesowych na wydajność mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L jest niejednorodny. Największe różnice między średnimi wartościami $t_{95\%}$ zaobserwowano w przypadku parametru ω . Stosunek średnich wartości $t_{95\%}$ między sąsiednimi poziomami parametru ω był równy 12,6 (ω równe 2 min^{-1} i 21 min^{-1}) oraz 7,0 (ω równe 21 min^{-1} i 40 min^{-1}). Wartości bezwzględne standaryzowanej oceny efektu parametru ω przedstawione na Rysunku 22 przekroczyły granicę przedziału ufności $p = 0,05$ zarówno w przypadku efektu liniowego (L), jak i kwadratowego (Q). Ponadto, wartości oceny efektu w przypadku parametru ω były najwyższe spośród odnotowanych dla wszystkich czynników branych pod uwagę.



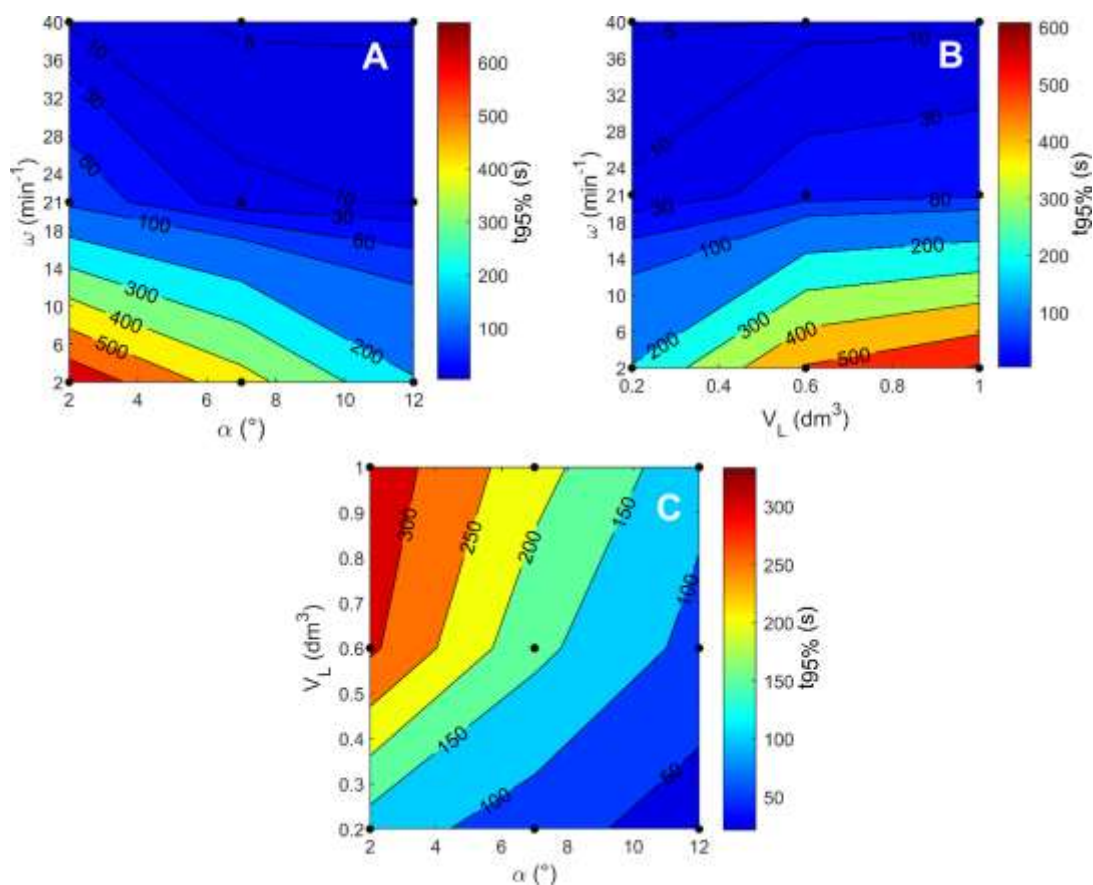
Rysunek 22. Wykres Pareto wartości bezwzględnych standaryzowanej oceny efektu ustalonych na podstawie uzyskanych eksperymentalnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A1]).

W przypadku parametrów α i V_L , różnice między średnimi wartościami $t_{95\%}$ dla sąsiednich poziomów były wyraźnie mniejsze niż w przypadku parametru ω , jednak wciąż wskazywały na występowanie istotnego wpływu na wydajność mieszania w badanym układzie (Rysunek 21). Na podstawie analizy wartości oceny efektu zebranych na wykresie Pareto przedstawionym na Rysunku 22 stwierdzono, że wyłącznie efekty liniowe parametrów α i V_L miały istotny statystycznie wpływ na wartości czasu mieszania osiągnięte w badanym układzie.

Średnie wartości $t_{95\%}$ dla poszczególnych poziomów parametru acc były podobne, zaś wartości oceny efektu liniowego oraz kwadratowego przedstawione na Rysunku 21C nie przekroczyły progu istotności statystycznej. Na tej podstawie stwierdzono, że parametr acc nie ma istotnego wpływu na wydajność mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L i z tego uzasadnionego merytorycznie powodu, w dalszej dyskusji wyników brano pod uwagę wyłącznie parametry α , ω oraz V_L .

Średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ dla wybranych par parametrów procesowych przedstawiono w formie wykresów konturowych na Rysunku 23. Zależności między parametrami procesowymi a wartościami $t_{95\%}$ były monotoniczne: wzrost wartości α lub ω , lub spadek wartości V_L był związany ze zmniejszeniem wartości czasu mieszania $t_{95\%}$. Średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w badanym układzie przy maksymalnej wartości częstotliwości oscylacji $\omega = 40 \text{ min}^{-1}$ wynosiły mniej niż 10 sekund niezależnie od wartości parametrów α i V_L (przedstawionych, odpowiednio, na Rysunku 23A i Rysunku 23B). Średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ poniżej 30 sekund osiągnięto przy wartościach parametrów $\alpha \geq 7^\circ$ oraz $\omega \geq 21 \text{ min}^{-1}$.

Kąt nachylenia izolinii na Rysunku 23C był bliższy 45° w porównaniu do kąta nachylenia izolinii na Rysunku 23A i Rysunku 23B. Zgodnie z tym, wpływ parametrów α i V_L na wartości $t_{95\%}$ osiągame w zbiorniku Cellbag™ 2 L był zbliżony. Ponadto, przebieg oraz kąt nachylenia izolinii na Rysunku 23B i Rysunku 23C pozwalał wnioskować, że wpływ objętości fazy ciekłej V_L na wydajność mieszania osiąganą w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L był największy w zakresie $V_L < 0,6 \text{ dm}^3$.



Rysunek 23. Wykresy konturowe średnich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w zależności od wartości wybranych par parametrów, tj. α i ω (A), ω i V_L (B) oraz α i V_L (C), wpływających istotnie na wydajność mieszania w układzie (zgodnie z [A1]).

Propozycje równań korelacyjnych

Na podstawie uzyskanych danych doświadczalnych zaproponowano szereg równań korelacyjnych do przewidywania wartości czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L. Współczynniki Równania 21 wyznaczono przy zastosowaniu funkcji regresji nieliniowej w środowisku MATLAB, w oparciu o pełny zbiór wartości eksperymentalnych:

$$t_{95\%} = 389,41 \cdot \omega^{-1,068} \cdot (\sin \alpha)^{-0,4886} \cdot V_L^{0,5736} \quad (21)$$

Wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ przewidywane przy zastosowaniu Równania 21 mieściły się w zakresie $\pm 30\%$ wartości otrzymanych eksperymentalnie i wynoszących więcej niż 200 sekund. W zakresie czasu mieszania $t_{95\%}$ poniżej 30 sekund, przewidywania uzyskane przy zastosowaniu Równania 21 silnie przekraczały wartości uzyskane w trakcie badań, osiągając wartości błędu powyżej $+300\%$. W celu zwiększenia dokładności przewidywań w zakresie niskich wartości czasu mieszania, zaproponowano kolejne równanie korelacyjne, którego współczynniki wyznaczono w oparciu o wartości doświadczalne dla parametrów $\alpha \geq 7^\circ$ oraz $\omega \geq 21 \text{ min}^{-1}$:

$$t_{95\%} = 704,16 \cdot \omega^{-1,566} \cdot (\sin \alpha)^{-0,4594} \cdot V_L^{0,4560} \quad (22)$$

Zmienna α w Równaniach 21 i 22 została wyrażona w stopniach, zmienna ω w min^{-1} , natomiast zmienna V_L w dm^3 . Dokładność przewidywań uzyskanych przy zastosowaniu Równania 22 w obszarze niskich wartości czasu mieszania jest znacznie lepsza w porównaniu z Równaniem 21. Większość przewidywanych wartości mieściła się w zakresie błędu $\pm 30\%$ od wartości doświadczalnych, zaś najwyższe wartości błędu przewidywań wynosiły $\pm 50\%$.

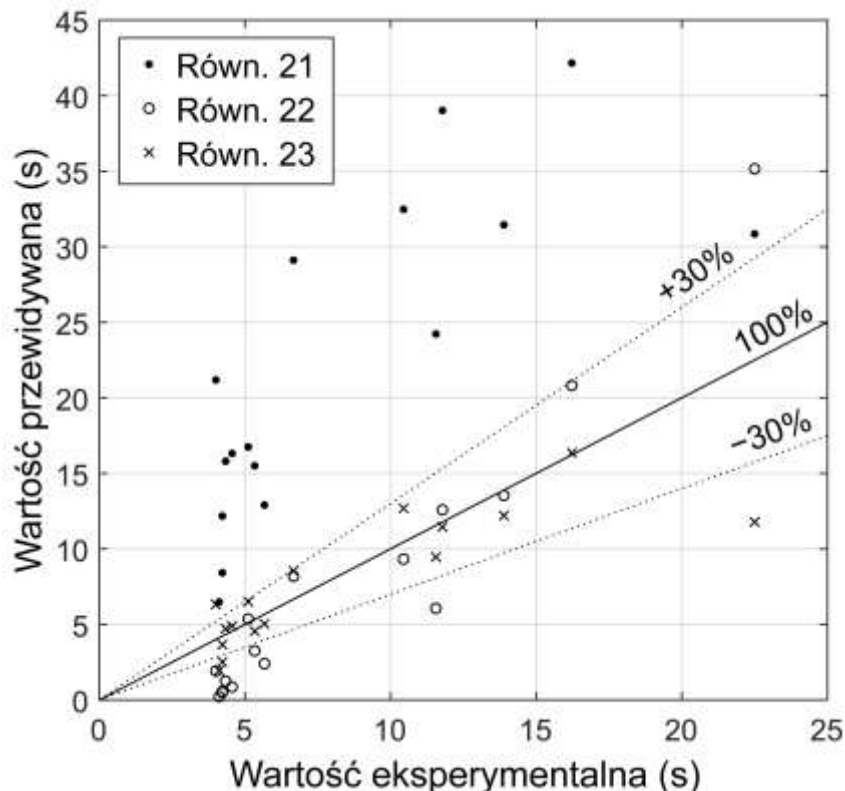
Wartościowym uzupełnieniem zestawu opracowanych równań modelowych (tj. Równań 21 i 22) była zaproponowana korelacja zawierająca człony bezwymiarowe: zmodyfikowaną liczbę Reynoldsa Re_L zdefiniowaną zgodnie z Równaniem 19 oraz stopień napełnienia zbiornika (V/V_L) równy ilorazowi objętości cieczy w zbiorniku oraz objętości nominalnej zbiornika Cellbag™ 2 L:

$$t_{95\%} = 2,2962 \cdot 10^5 \cdot \frac{1}{\omega} \cdot \left(\frac{V}{V_L}\right)^{0,5735} \cdot Re_L^{-0,4757} \quad (23)$$

W Równaniu 23 czas mieszania $t_{95\%}$ jest wyrażony w sekundach, parametr ω w jednostce min^{-1} , zaś V oraz V_L w dm^3 .

Porównanie dokładności przewidywań wydajności mieszania w zakresie niskich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono na Rysunku 24. Przewidywane wartości czasu mieszania $t_{95\%}$

z zakresu poniżej 25 sekund, wyznaczone przy zastosowaniu Równania 23, cechowały się zadowalającą dokładnością, porównywalną z osiąganą w przypadku Równania 22. Wartość bezwzględna średniego błędu przewidywań otrzymanych przy zastosowaniu Równania 23 wynosiła 31%.



Rysunek 24. Wykres dopasowania wartości czasu mieszania przewidywanych na podstawie korelacyjnych równań 21–23 odniesionych do wartości eksperymentalnych mniejszych niż 25 sekund (zgodnie z [A1]).

Kluczowym rezultatem badań omówionych w niniejszym rozdziale rozprawy doktorskiej było poznanie charakterystyki czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L w pełnym dostępnym zakresie czterech parametrów operacyjnych pracy bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25. Określono wpływ poszczególnych parametrów na wydajność mieszania w badanym układzie bioreaktora *single-use*. Na podstawie danych doświadczalnych zaproponowano zestaw równań korelacyjnych do przewidywania wartości czasu mieszania w całym zakresie parametrów procesowych (tj. Równania 21 i 22), w tym równanie modelowe wykorzystujące człony bezwymiarowe (tj. Równanie 23). Według dostępnej wiedzy, publikacja [A1] stanowi pierwszy dostępny w literaturze przykład tak kompleksowego opracowania charakterystyki czasu mieszania w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave* do zastosowań w skali laboratoryjnej, w pełnym dostępnym zakresie parametrów procesowych determinujących ruch oscylacyjny, jak i stopnia napełnienia zużywalnego polimerowego zbiornika.

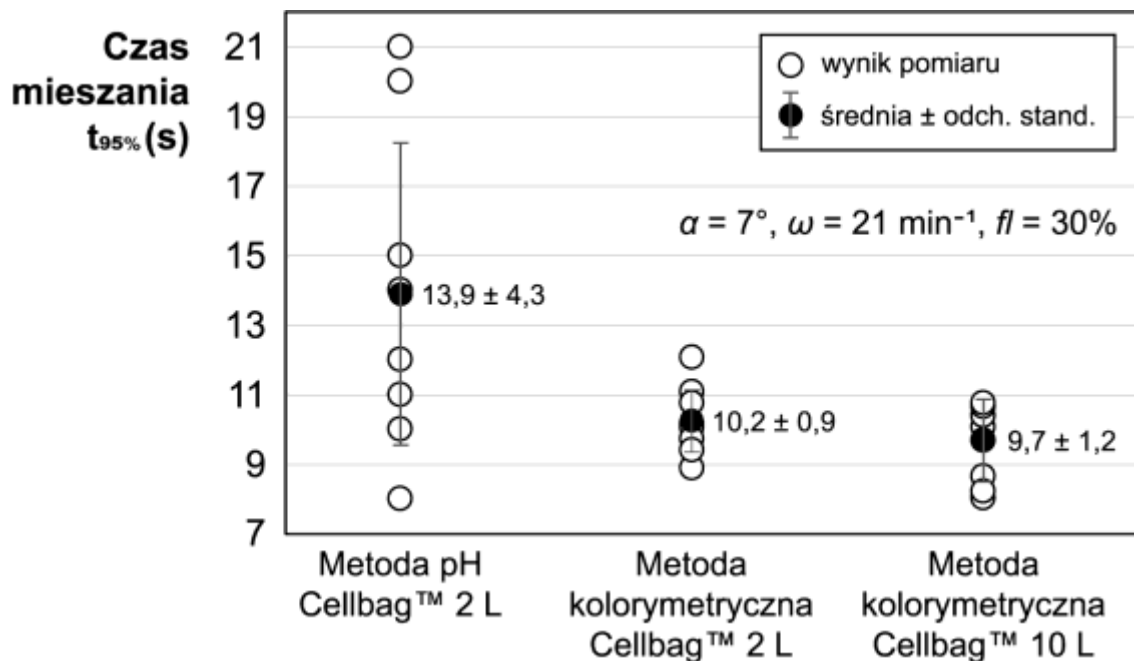
5.3. Analiza wydajności adaptacji metody kolorymetrycznej do ilościowego pomiaru czasu mieszania typu *wave* w polimerowych naczyniach hodowlanych

Cel i merytoryczne uzasadnienie badań

Metoda pH, będąca jedną z odmian metody sensorowej pomiaru czasu mieszania, okazała się cechować pewnymi ograniczeniami, jak na przykład ograniczoną rozdzielczością pomiaru związaną z czasem reakcji zespolonej elektrody pH, brakiem możliwości obserwacji postępu procesu mieszania w całej objętości cieczy związaną z lokalnością metod sensorowych, czy też ograniczoną powtarzalnością pomiarów przeprowadzanych przy tych samych wartościach parametrów procesowych. Powyższe ograniczenia, w połączeniu z koniecznością udoskonalania i rozszerzania metodyki pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach do bioreaktorów *single-use* z mieszaniem typu *wave*, stały się motywacją do podjęcia dalszych badań skupionych na opracowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej. Istotnym elementem w trakcie opracowania procedury laboratoryjnej, która miała być wykorzystywana przy pomiarach wartości czasu mieszania przy użyciu metody kolorymetrycznej, był dobór wartości istotnych zmiennych, takich jak skład oraz stosunek molowy reagentów w roztworze znacznika oraz w roztworze znajdującym się w polimerowym zbiorniku, czy stosunek objętości obu roztworów. Dodatkowo porównano wydajność opracowanej adaptacji metody kolorymetrycznej z wydajnością metody pH poprzez analizę wyników serii eksperymentów przeprowadzonych w takich samych warunkach mieszania typu *wave*. Szczegółową prezentację i dyskusję wszystkich wyników dotyczących tej części badań doświadczalnych przedstawiono w publikacji [A4]. Natomiast poniżej zaprezentowano i przedyskutowano wątki badawcze najważniejsze z punktu widzenia integracji tematyki rozprawy doktorskiej.

Analiza wydajności metody kolorymetrycznej

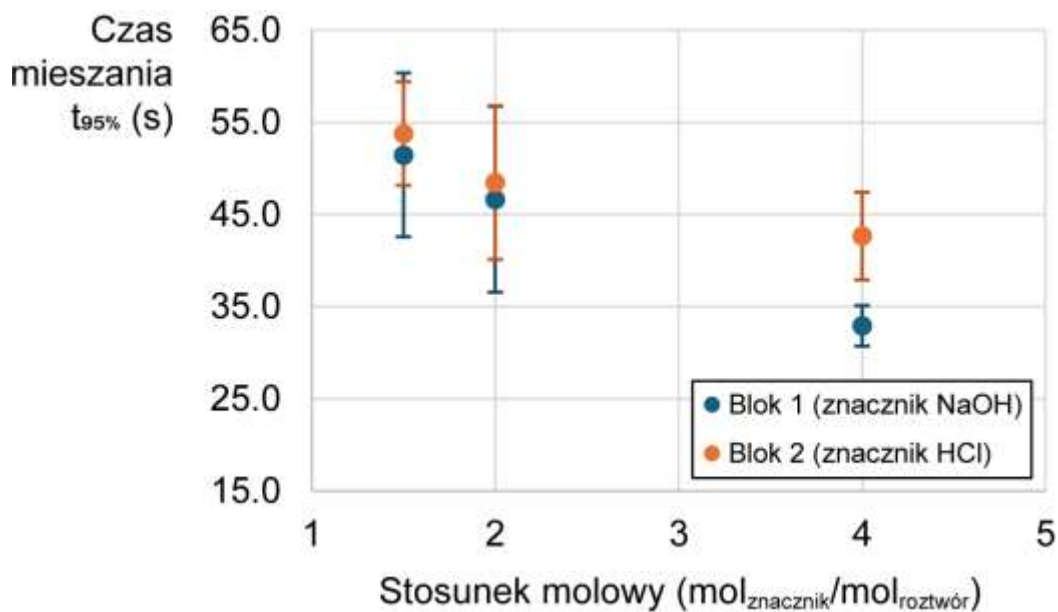
Pierwszym krokiem w analizie aplikacyjności opracowanej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25*, było porównanie powtarzalności wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ uzyskanych dla tych samych parametrów operacyjnych pracy badanego bioreaktora *single-use* w przypadku zastosowania metody pH oraz metody kolorymetrycznej. Wynik ilościowego porównania przedstawiono graficznie na Rysunku 25.



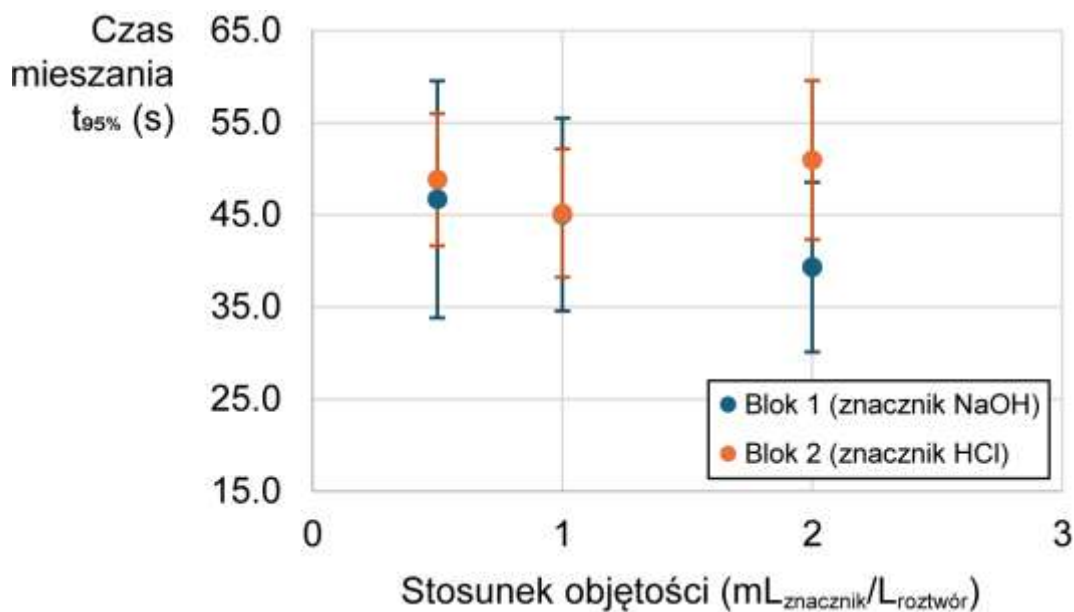
Rysunek 25. Porównanie wartości odchylenia standardowego i rozrzutu wyników pomiarów czasu mieszania $t_{95\%}$ przeprowadzonych przy zastosowaniu metody pH i metody kolorymetrycznej, uzyskanych dla tych samych wartości parametrów operacyjnych bioreaktora (zgodnie z [A4]).

Wartość odchylenia standardowego w przypadku serii dziewięciu pomiarów ($\alpha = 7^\circ$, $\omega = 21 \text{ min}^{-1}$, $fl = 30\%$) w przypadku metody kolorymetrycznej stanowiła 9% (zbiornik Cellbag™ 2 L) oraz 12% (zbiornik Cellbag™ 10 L) średniej wartości czasu mieszania $t_{95\%}$, czyli istotnie mniej w porównaniu do wartości 31% uzyskanej przy zastosowaniu metody pH zastosowanej w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L. Rozrzut wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w przypadku metody kolorymetrycznej również był mniejszy w porównaniu do metody pH. Różnica między największą a najmniejszą uzyskaną wartością $t_{95\%}$ w przypadku adaptacji metody kolorymetrycznej wynosiła 3,2 s oraz 2,7 dla polimerowych zbiorników o pojemności, odpowiednio, 2 L i 10 L, w porównaniu do wartości 13 s uzyskanej przy zastosowaniu metody pH podczas badania efektów mieszania typu *wave* w polimerowym zbiorniku o pojemności 2 L.

Wyniki pomiarów przeprowadzonych w ramach analizy wpływu stosunku molowego reagentów, stosunku objętości znacznika do objętości cieczy w polimerowym zbiorniku oraz składu roztworu znacznika i fazy ciekłej na wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono na Rysunku 26 oraz Rysunku 27. Istotność statystyczną wpływu obu badanych parametrów oceniono na podstawie wartości bezwzględnych efektów standaryzowanych przedstawionych na wykresie na Rysunku 28.



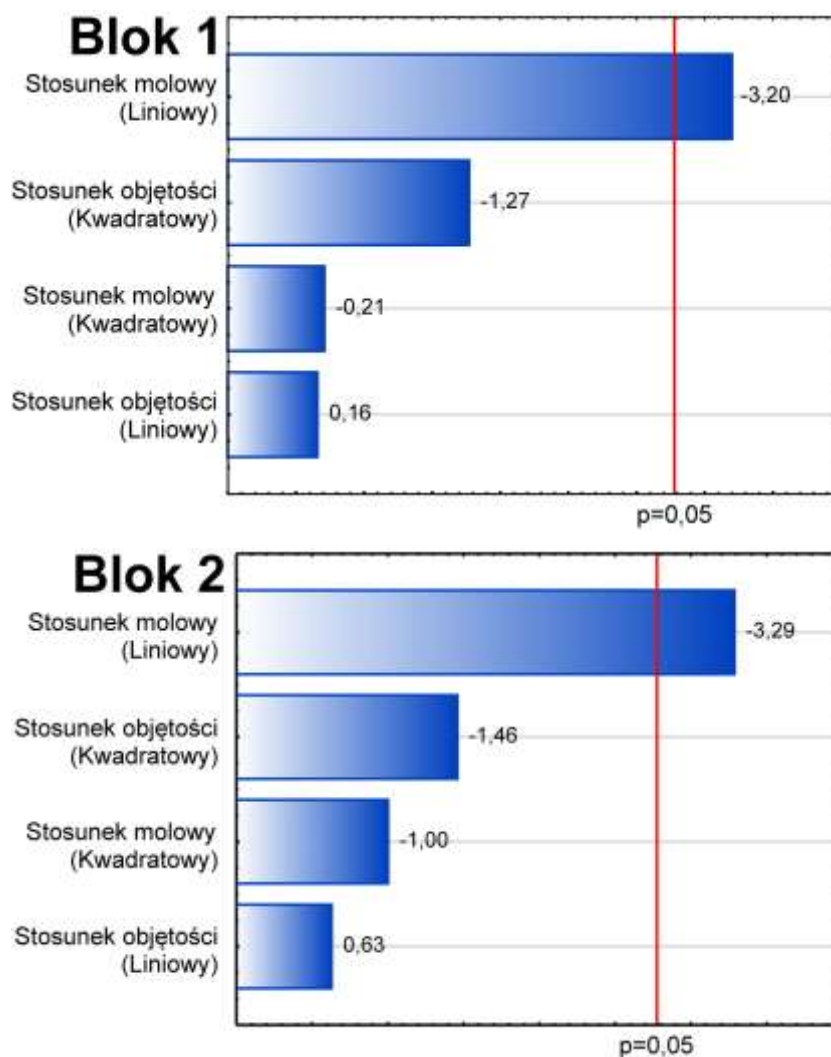
Rysunek 26. Wykres zależności średnich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ od stosunku molowego reagentów w roztworze znacznika oraz roztworze wewnątrz polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).



Rysunek 27. Wykres zależności średnich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ od stosunku objętości roztworu znacznika do objętości roztworu wewnątrz polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).

Na podstawie danych przedstawionych na Rysunku 26 można stwierdzić, że wzrost stosunku molowego reagentów w roztworze znacznika i roztworze znajdującym się w polimerowym zbiorniku bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, to jest zwiększenie stechiometrycznego nadmiaru odczynnika dozowanego do układu, spowodował spadek mierzonej

wartości czasu mieszania $t_{95\%}$. Zależność czasu mieszania $t_{95\%}$ od stosunku molowego reagentów była w przybliżeniu liniowa, zaś istotność statystyczną liniowego efektu tego parametru potwierdzono na podstawie wykresów Pareto (Rysunek 28), na których wartość bezwzględna standaryzowanej oceny efektu przekroczyła granicę przedziału ufności w przypadku obu bloków eksperymentalnych. Obserwacje te były spójne z wnioskami z badań uprzednio opublikowanych przez inne grupy badawcze, w których zwiększenie nadmiaru dozowanego odczynnika wywołało zmniejszenie mierzonych wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ [147], [148].



Rysunek 28. Wykresy Pareto wartości bezwzględnych standaryzowanej oceny efektu parametrów zbadanych w ramach analizy wydajności metody kolorymetrycznej. Blok 1: znacznik – roztwór NaOH, ciecz w zbiorniku: roztwór HCl. Blok 2: znacznik – roztwór HCl, ciecz w zbiorniku: roztwór NaOH (zgodnie z [A4]).

Zastosowanie wysokiej wartości stosunku molowego reagentów profiluje zaprojektowaną w ten sposób procedurę pomiaru w kierunku określania wartości czasu makromieszania oraz wpływa na zwiększenie powtarzalności wyników pomiarów [148]. Biorąc pod uwagę, że obszar zastosowań badanego systemu bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25 obejmuje

głównie procesy z wykorzystaniem biomasy komórek zwierzęcych i ludzkich, lub biomasy komórek i organów roślinnych, czyli form biomasy *Eukaryota* o umiarkowanym (w odniesieniu do mikroorganizmów) tempie proliferacji, ukierunkowanie opracowanej procedury pomiaru do określania czasu makromieszania uznano za wystarczające, pomimo tego, że w tym przypadku osiągnięcie wystarczającej jednorodności stwierdza się w momencie, gdy pewne obszary cieczy mogły nie być wymieszane na poziomie molekularnym [147].

Zmiana stosunku objętości dozowanego roztworu znacznika oraz objętości roztworu wewnątrz zbiornika okazały się nie mieć istotnego statystycznie wpływu na otrzymywane wartości czasu mieszania. Średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawione na Rysunku 27 były zbliżone w przypadku obu bloków eksperymentalnych, a wartości bezwzględne standaryzowanej oceny efektu w przypadku tego parametru nie przekroczyły granicy przedziału ufności.

Istotną statystycznie różnicę między średnimi wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$, zaobserwowaną między blokami eksperymentalnymi wydzielonymi na podstawie składu roztworu znacznika oraz roztworu wewnątrz polimerowego zbiornika, uzyskano wyłącznie w przypadku wartości stosunku molowego reagentów równej 4. Średnia wartość czasu mieszania $t_{95\%}$ oraz odchylenia standardowego dla tej wartości stosunku molowego była najmniejsza w przypadku Bloku 1, w którym jako znacznik wykorzystywano roztwór NaOH i wynosiła $32,9 \pm 2,2$ s, w porównaniu do wartości $42,7 \pm 4,8$ s w analogicznym przypadku przypisanym do Bloku 2.

Osiągnięcie niższych wartości średniego czasu mieszania $t_{95\%}$ oraz mniejszej wartości odchylenia standardowego w przypadku pomiarów przypisanych do Bloku 1, w których barwa roztworu w polimerowym zbiorniku zmieniała się z żółtej na niebieską po dodaniu znacznika o odczynie zasadowym, było w pewnym stopniu sprzeczne z dostępnymi w literaturze zaleceniami dotyczącymi projektowania procedur analitycznych opartych o metodę kolorymetryczną. Według tych literaturowych zaleceń, pomiar bazujący na obserwacji procesu odbarwiania fazy ciekłej powinien dawać dokładniejsze rezultaty, ponieważ wykrywanie ostatnich pozostałych obszarów o ciemnej barwie na tle jasnej cieczy jest zwykle łatwiejsze, a przy tym niweluje ryzyko przesłaniania jasnych obszarów cieczy przez obszary ciemno zabarwione [149]. Wystąpienie odwrotnej zależności w omawianych danych mogło być związane z mniejszą czułością wykrywania przez algorytm przetwarzania obrazu barwy żółtej, słabiej kontrastującej z jasnoszarą barwą platformy bioreaktora, co z kolei opóźniło zakończenie pomiaru, zdefiniowane jako moment osiągnięcia 95% końcowej liczby pikseli o wynikowej barwie roztworu.

Podsumowując, na podstawie analizy wyników przedstawionych w niniejszym rozdziale dobrano następujące optymalne wartości parametrów do wykorzystania we wszystkich

kolejnych pomiarach czasu mieszania $t_{95\%}$ z zastosowaniem opracowanej adaptacji metody kolorymetrycznej:

- stosunek molowy reagentów: $4 \text{ mol}_{\text{znacznik}}/\text{mol}_{\text{roztwór}}$,
- stosunek objętości reagentów: $1 \text{ mL}_{\text{znacznik}}/\text{L}_{\text{roztwór}}$,
- reagent w roztworze znacznika: NaOH,
- reagent w roztworze wewnątrz zbiornika: HCl.

Opracowana adaptacja metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25* cechowała się lepszą powtarzalnością wyników w porównaniu do metody pH wykorzystywanej podczas realizacji początkowych etapów części doświadczalnej pracy doktorskiej. Dodatkowym atutem wynikającym z obserwacji procesu mieszania przy użyciu kamery cyfrowej była możliwość pozyskania dodatkowych informacji na temat przepływu cieczy w zbiornikach *Cellbag™*, które to rezultaty opisano w Rozdziale 5.4 niniejszej rozprawy.

5.4. Analiza kształtu falującej powierzchni międzyfazowej

Cel i merytoryczne uzasadnienie badań

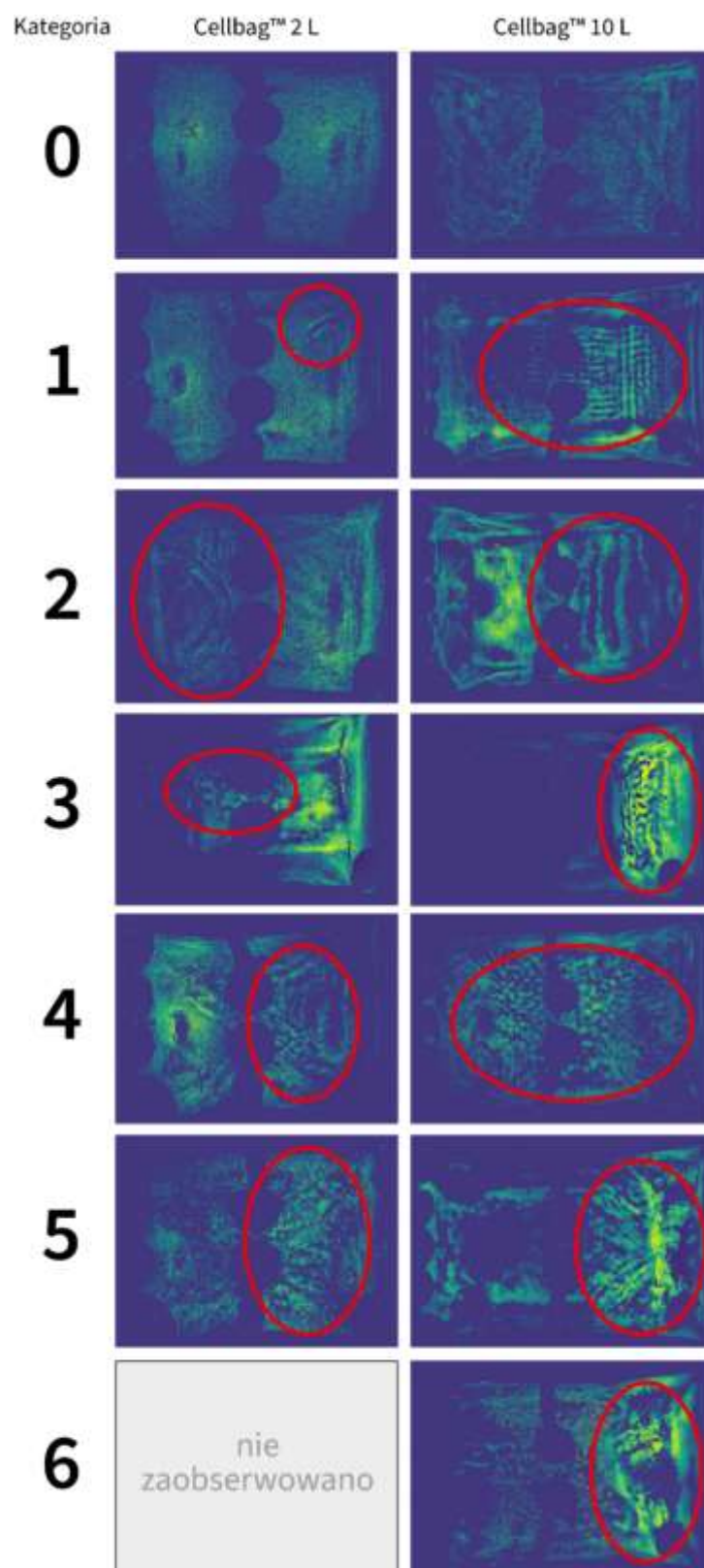
Wykorzystana w przeprowadzonych badaniach adaptacja metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania $t_{95\%}$ stworzyła możliwość archiwizacji w cyfrowej formie pozyskanego materiału filmowego dokumentującego poszczególne eksperymenty. Cyfrowa postać zgromadzonego materiału filmowego pozwalała natomiast na komputerowo wspomaganą cyfrową obróbkę zdigitalizowanego zapisu przebiegu eksperymentów, która w efekcie mogła dostarczyć ciekawych danych charakteryzujących przepływ cieczy w trakcie mieszania typu *wave* zachodzącego w polimerowych zbiornikach *Cellbag™* poddawanych oscylacyjnym wychyleniom. Celem przeprowadzonej pogłębionej analizy cyfrowego materiału filmowego było wyekstrahowanie dodatkowych danych jakościowo i ilościowo charakteryzujących i kwantyfikujących przepływ cieczy falującej w polimerowym zbiorniku poruszonym zgodnie z przyjętymi wartościami parametrów operacyjnych bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25*. Niniejszą część pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o metodykę przedstawioną w Rozdziale 4.5. Szczegółową prezentację i dyskusję wszystkich wyników dotyczących tej części badań doświadczalnych przedstawiono w publikacji [A4]. Natomiast poniżej zaprezentowano i przedyskutowano wątki badawcze najważniejsze z punktu widzenia integracji tematyki rozprawy doktorskiej.

Klasyfikacja przepływu falującej cieczy poddawanej mieszaniu typu *wave*

Materiał filmowy, obszernie zgromadzony w trakcie pomiarów czasu mieszania $t_{95\%}$ w zbiornikach Cellbag™ o pojemności 2 L oraz 10 L z użyciem metody kolorymetrycznej, wykorzystano w celu analizy jakościowej struktur powstających na powierzchni międzyfazowej w warunkach mieszania typu *wave* różniących się intensywnością przepływu fazy ciekłej wywoływanego w oscylacyjnie wychylnym polimerowym zbiorniku. Struktury sklasyfikowano w oparciu o dostępne w literaturze wyniki badań dotyczących kształtu powierzchni swobodnej cieczy w przepływach zaobserwowanych w otwartych kanałach [150] oraz naturalnych akwenach, takich jak rzeki i morza [151], [152]. Kategorie 0–6 wyodrębniono na podstawie następujących kryteriów, a w opisie charakteryzującym Kategorie 3–6 zachowano w nawiasach angielską terminologię przyjętą w publikacji [A4]:

- **Kategoria 0:** płaska powierzchnia cieczy bez widocznych deformacji.
- **Kategoria 1:** drobne fale kapilarne (fale napięcia powierzchniowego) na powierzchni cieczy powstające wskutek wibracji wynikających z pracy napędu oscylacyjnie wychylanej platformy bioreaktora.
- **Kategoria 2:** widoczne fale kapilarne na powierzchni cieczy oraz interakcje między falami kapilarnymi powstającymi w wyniku odbić cieczy od ścian polimerowego zbiornika.
- **Kategoria 3:** widoczne interakcje między falami na powierzchni cieczy odbijającymi się od ścian zbiornika oraz zaokrąglone zaburzenia na powierzchni cieczy w postaci tzw. „guzków” (ang. *knobs*).
- **Kategoria 4:** widoczne zaokrąglone zaburzenia na powierzchni cieczy w postaci „guzków” (ang. *knobs*), wywoływanych zderzaniem się falującej cieczy z krańcami zbiornika i przełamania fali powstającej w wyniku zgromadzenia cieczy przy jednym krańcu zbiornika.
- **Kategoria 5:** Struktura powierzchni międzyfazowej podobna jak w przypadku Kategorii 4, przy czym w momencie załamania fali wyraźnie słyszalny odgłos rozchlapywania/rozbryzgiwania (ang. *splashing*) cieczy.
- **Kategoria 6:** Struktura powierzchni międzyfazowej podobna jak w przypadku Kategorii 5, przy czym w momencie załamania fali słyszalny jest zarówno odgłos rozchlapywania/rozbryzgiwania cieczy (ang. *splashing*), jak i dochodzi do uwięzienia pęcherzy powietrza pod spienioną powierzchnią cieczy (ang. *surf*).

Przykłady obrazowania fal sklasyfikowanych poszczególnymi Kategoriami 0–6, przedstawione zostały na Rysunku 29.



Rysunek 29. Przykłady klatek z cyfrowych nagrań wideo procesu mieszania typu *wave* zaobserwowane podczas przepływu cieczy w badanych zbiornikach Cellbag™ i przyporządkowane do Kategorii 0–6 na podstawie analizy struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz oraz zaobserwowanych cech charakterystycznych zaznaczonych czerwoną linią (zgodnie z [A4]).

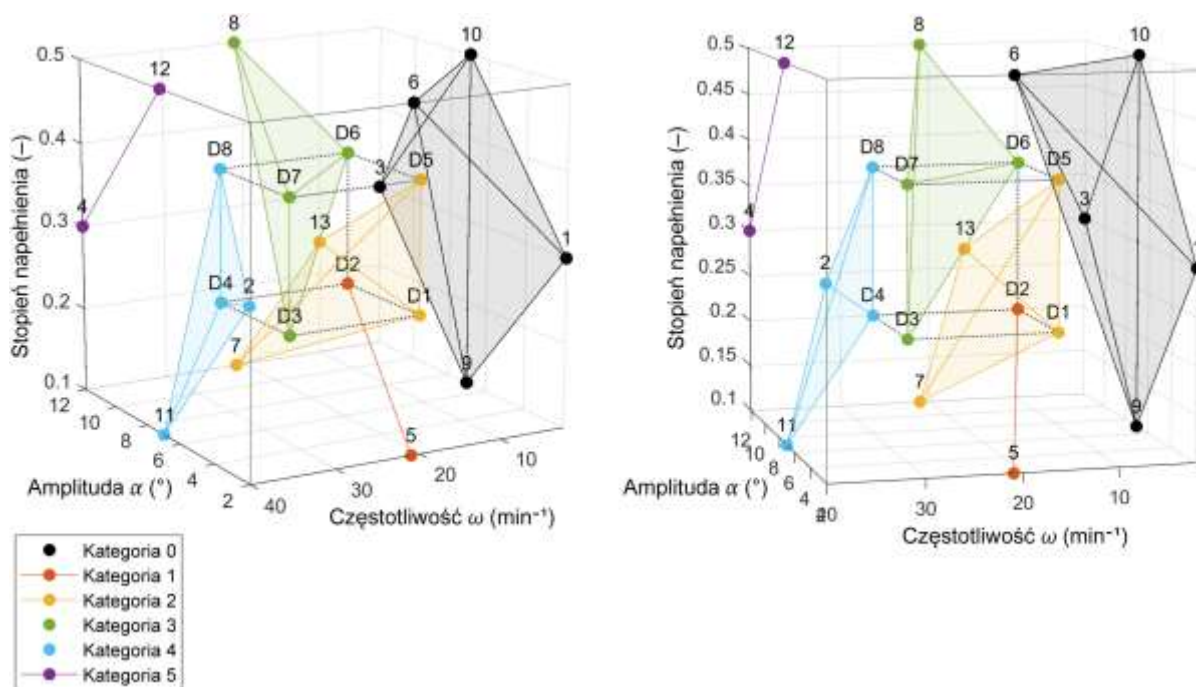
Wynik przyporządkowania do zaproponowanych Kategorii 0–6 nagrań przedstawiających charakterystyczne momenty zaobserwowane w trakcie przepływu cieczy w polimerowych zbiornikach Cellbag™ 2 L i Cellbag™ 10 L wymuszane procesem mieszania typu *wave* uwarunkowanego wartościami parametrów procesowych bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25 przedstawiono, odpowiednio, w Tabeli 12 i Tabeli 13 oraz na Rysunku 30 i Rysunku 31. Kwantyfikacja poszczególnych wariantów eksperymentalnych odpowiadających kombinacjom parametrów procesowych badanego bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* stworzyła możliwość jakościowego powiązania zjawisk zaobserwowanych na falującej powierzchni cieczy z reżimem przepływu cieczy wewnątrz polimerowych zbiorników. Wynik kategoryzacji przedyskutowano z uwzględnieniem wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ uzyskanych przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej i wyznaczonych dla obu rozpatrywanych polimerowych zbiorników Cellbag™, czyli z wynikami omówionymi szczegółowo w Rozdziale 5.5 niniejszej rozprawy.

Tabela 12. Kwantyfikacja kategoryzacji struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz oraz średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wraz z odchyleniami standardowymi, odnotowane w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).

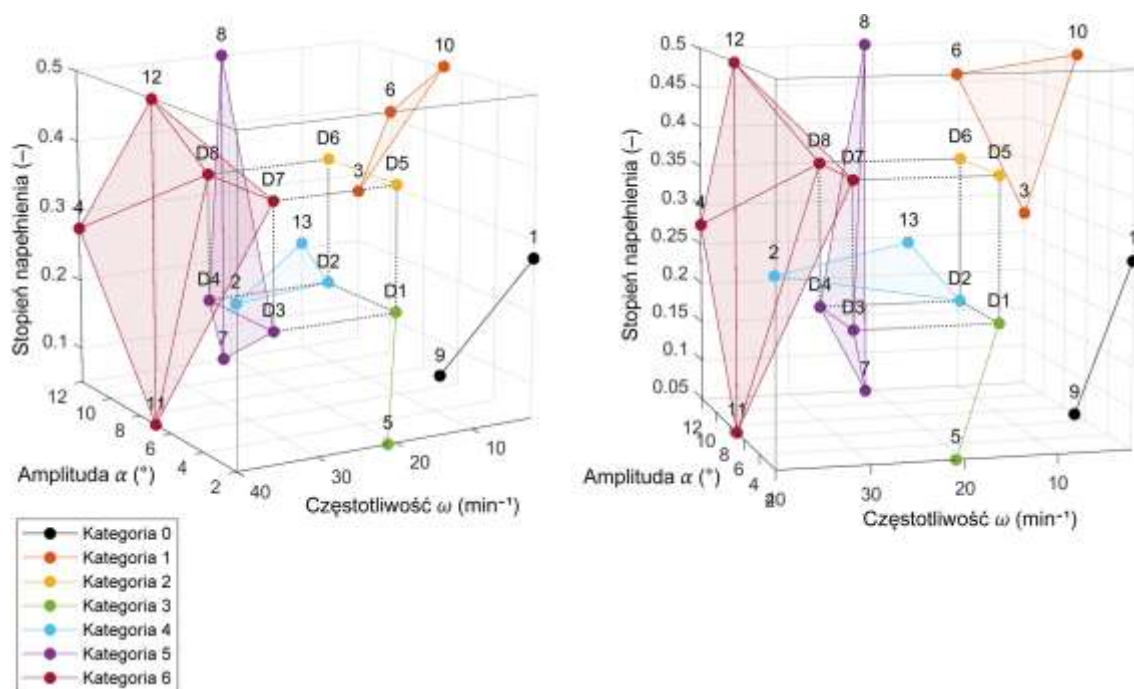
Plan DoE	Nr wariantu	α (°)	ω (min ⁻¹)	fl (-)	$\overline{t_{95\%}}$ (s)	σ (s)	Kategoria
BBD	1	2	2	0,3	1446	108	0
	2	2	40	0,3	7,1	1,5	4
	3	12	2	0,3	254	57	0
	4	12	40	0,3	3,7	1,4	5
	5	2	21	0,1	12,2	6,1	1
	6	2	21	0,5	262	18,5	0
	7	12	21	0,1	9,3	1,6	2
	8	12	21	0,5	15,2	4,8	3
	9	7	2	0,1	188	24,1	0
	10	7	2	0,5	449	21,2	0
	11	7	40	0,1	4,2	0,7	4
	12	7	40	0,5	4,3	0,2	5
	13	7	21	0,3	10,2	0,9	2
2 ³	D1	5	13	0,22	26,9	1,9	2
	D2	9	13	0,22	17,4	1,6	1
	D3	5	29	0,22	7,4	1,9	3
	D4	9	29	0,22	5,6	0,6	4
	D5	5	13	0,38	74,9	29,6	2
	D6	9	13	0,38	23,5	18,0	3
	D7	5	29	0,38	17,8	2,2	3
	D8	9	29	0,38	7,8	0,1	4

Tabela 13. Kwantyfikacja kategoryzacji struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz oraz średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wraz z odchyleniami standardowymi, odnotowane w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).

Plan DoE	Nr wariantu	α (°)	ω (min ⁻¹)	fl (-)	$\overline{t_{95\%}}$ (s)	σ (s)	Kategoria
BBD	1	2	2	0,275	2223	372	0
	2	2	40	0,275	17,1	0,2	4
	3	12	2	0,275	228	18	1
	4	12	40	0,275	2,2	0,2	6
	5	2	21	0,05	13,9	1,2	3
	6	2	21	0,5	413	87	1
	7	12	21	0,05	7,8	0,8	5
	8	12	21	0,5	11,5	1,3	5
	9	7	2	0,05	61,9	4,9	0
	10	7	2	0,5	2150	391	1
	11	7	40	0,05	4,5	0,3	6
	12	7	40	0,5	5,3	1,2	6
	13	7	21	0,275	9,7	1,2	4
2 ³	D1	5	13	0,185	34,2	4,1	3
	D2	9	13	0,185	11,7	1,9	4
	D3	5	29	0,185	6,4	0,6	5
	D4	9	29	0,185	5,7	1,2	5
	D5	5	13	0,365	49,4	11,5	2
	D6	9	13	0,365	46,0	14,9	2
	D7	5	29	0,365	7,9	1,5	6
	D8	9	29	0,365	5,6	0,7	6



Rysunek 30. Przestrzeń eksperymentalna z oznaczonym przydziałem poszczególnych wariantów eksperymentalnych do Kategorii 0–5 kształtu powierzchni międzyfazowej gazu-ciecz zaobserwowanych w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).



Rysunek 31. Przestrzeń eksperymentalna z oznaczonym przydziałem poszczególnych wariantów eksperymentalnych do Kategorii 0–6 kształtu powierzchni międzyfazowej gazu-ciecz zaobserwowanych w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).

W przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L, warianty eksperymentalne nr 1, 3, 6, 9 i 10, dla których wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ były najwyższe (tj. od 188 do 1 450 sekund) przypisano do Kategorii 0. Ten sam zestaw wariantów eksperymentalnych w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (czyli dla wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ od 61,9 do 2 220 sekund) przyporządkowano do Kategorii 0 lub 1. Częstotliwość ruchu oscylacyjnego ustawiona w przypadku wariantów nr 1, 3, 9 i 10 była najniższą dopuszczalną w systemie *ReadyToProcess* WAVE™ 25 i wynosiła 2 min^{-1} , zaś w przypadku wariantu nr 6 częstotliwość 21 min^{-1} była sprzężona z najniższą dopuszczalną amplitudą oscylacji równą 2° oraz najwyższym dopuszczalnym stopniem napełnienia polimerowego zbiornika równym 50%. Biorąc pod uwagę niską intensywność wzbudzania ruchu falowego cieczy oraz jedynie nieznaczne zaburzenia lub nawet brak widocznych zaburzeń powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, wymienione powyżej warianty można przyporządkować do reżimu przepływu laminarnego lub bardzo wczesnej fazy reżimu przejściowego. Wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w przypadku pozostałych wariantów eksperymentalnych wynosiły mniej niż 60 sekund w obu badanych polimerowych zbiornikach.

Wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ osiągnięte w eksperymentach przyporządkowanych do Kategorii 1, w przypadku polimerowego zbiornika o pojemności 2 L wynosiły około 15 sekund i były to wartości znacznie niższe w porównaniu do eksperymentów przeprowadzonych przy zastosowaniu polimerowego zbiornika o pojemności 10 L (powyżej 220 sekund). Istotna różnica między wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$ w eksperymentach przyporządkowanych do tej samej Kategorii 1 jest prawdopodobnie związana z tym, że w przypadku zbiornika Cellbag™ 2 L stopień napełnienia dla tych wariantów był niższy i wynosił poniżej 22%, zaś w przypadku zbiornika Cellbag™ 10 L do Kategorii 1 przyporządkowano warianty, w których stopień napełnienia wynosił 28% lub 50%.

Kategoria 2 zawierała warianty eksperymentalne, dla których zaobserwowano na powierzchni cieczy fale kapilarne, co może świadczyć o przeważającym wpływie lepkości przy formowaniu powierzchni swobodnej cieczy. Począwszy od Kategorii 3, na powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz występowały zaburzenia w kształcie „guzków” (ang. *knobs*), co zinterpretowano jako pierwszy objaw burzliwości przepływu uzyskanego wewnątrz polimerowych zbiorników. Warianty eksperymentalne przyporządkowane do Kategorii 4 oraz Kategorii 5 cechowały się wzrastającą intensywnością mieszania typu *wave* oraz stopniowym zwiększaniem burzliwości, powiązanymi ze zderzeniami dużych mas cieczy z powierzchniami jednorazowych zbiorników do hodowli oraz z odnotowanymi odgłosami rozchlapywania/rozbryzgiwania (ang. *splashing*). Intensywne rozchlapywanie powstających fal oraz zatrzymywanie pęcherzy powietrza pod powierzchnią spienionej cieczy (ang. *surf*), umożliwiające przyporządkowanie

do Kategorii 6, stwierdzono wyłącznie w przypadku wybranych wariantów eksperymentalnych dla zbiornika Cellbag™ 10 L.

Zgodnie z przeprowadzoną klasyfikacją, przypisywany Kategorii 0 oraz Kategorii 1 laminarny reżim przepływu fazy ciekłej w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L zaobserwowano dla szerszego zakresu parametrów procesowych w porównaniu do polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L. W przypadku polimerowego zbiornika o pojemności 2 L, maksymalna częstotliwość oscylacji, przy której stwierdzono występowanie przepływu laminarnego, wynosiła 21 min^{-1} przy stopniu napełnienia równym 0,1 (wariant nr 5). W przypadku polimerowego zbiornika o pojemności 10 L, częstotliwość oscylacji w wariantach przyporządkowanych do kategorii utożsamianych z przepływem laminarnym wynosiła 2 min^{-1} (warianty nr 1, 3, 9, 10) lub 21 min^{-1} przy maksymalnym stopniu napełnienia równym 0,5 (wariant nr 6).

Obecność cech świadczących o burzliwości przepływu fazy ciekłej w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L zaobserwowano przy znacznie mniejszych wartościach parametrów procesowych w porównaniu do polimerowego zbiornika o pojemności 2 L. Do Kategorii 4–6 przyporządkowano warianty eksperymentalne, dla których częstotliwość oscylacji była nie mniejsza niż 29 min^{-1} , wybrane warianty o częstotliwości kołysania równej 21 min^{-1} (warianty nr 8, 13) oraz jeden z wariantów o częstotliwości równej 13 min^{-1} (wariant nr D2). W przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L, reżim burzliwy dominował w przypadku wariantów o częstotliwości kołysania równej 40 min^{-1} oraz wybranych wariantów o częstotliwości 29 min^{-1} (warianty nr D4, D8).

Podsumowując, rozwinięcie przepływu w polimerowym zbiorniku Cellbag™ o pojemności 10 L następowało przy niższych wartościach częstotliwości kołysania niż w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L. Przyczyną obserwowania zjawisk świadczących o większej intensywności przepływu burzliwego w polimerowym zbiorniku o większej objętości nominalnej mogły być większe wymiary polimerowego zbiornika oraz większą objętością fazy ciekłej w 10-litrowym zbiorniku, co wpływało na większą ilość energii oraz pędu przejmowanych przez rozkołysaną i falującą ciecz, a rozpraszanych w każdym cyklu oscylacji platformy bioreaktora.

5.5. Przewidywanie wydajności mieszania fazy ciekłej w polimerowych zbiornikach Cellbag™ o objętościach 2 L i 10 L

Cel i merytoryczne uzasadnienie badań

Celem kolejnej części badań doświadczalnych przeprowadzonych na potrzeby realizacji następnego etapu pracy doktorskiej było opracowanie propozycji równania korelacyjnego zmiany skali do zastosowania w układzie bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*. Z uwagi na pewne ograniczenia stosowalności metody pH (systemowo wynikające z metodyki tej uznanej metody badawczej), podjęto wyzwanie polegające na opracowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania $t_{95\%}$ w polimerowych zbiornikach poddawanych oscylacyjnym wychyleniom. Niniejszą część pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o metodykę przedstawioną w rozdziale 4.4. Szczegółową prezentację i dyskusję wszystkich wyników dotyczących tej części badań doświadczalnych przedstawiono w publikacji [A4]. Natomiast poniżej zaprezentowano i przedyskutowano wątki badawcze najważniejsze z punktu widzenia integracji tematyki rozprawy doktorskiej.

Porównanie wydajności mieszania typu *wave* w polimerowych zbiornikach Cellbag™ 2 L i 10 L

Zoptymalizowaną procedurę eksperymentalną bazującą na opracowanej adaptacji metody kolorymetrycznej wykorzystano do wyznaczenia charakterystyki czasu mieszania $t_{95\%}$ w polimerowych zbiornikach do hodowli Cellbag™ o objętościach nominalnych 2 litrów i 10 litrów. Pełny zbiór danych eksperymentalnych został opublikowany w materiałach uzupełniających do artykułu [A4]. Wyznaczone w pomiarach wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L mieściły się w zakresie od 2,7 do 1 570 sekund, zaś w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 10 L w zakresie od 2,1 do 2 650 sekund. Średnie wartości czasu mieszania wraz z wartościami odchylenia standardowego dla poszczególnych wariantów eksperymentalnych przedstawiono w Tabeli 12 (zbiornik Cellbag™ 2 L) oraz w Tabeli 13 (zbiornik Cellbag™ 10 L).

Średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$, uzyskane dla obu badanych polimerowych zbiorników, wykorzystano w celu wyznaczenia współczynników równań korelacyjnych do przewidywania wartości czasu mieszania w całym badanym zakresie parametrów procesowych. Zapropozowane równania składały się z członów potęgowych, w których zmiennymi niezależnymi są parametry procesowe α , ω i fl . Bezpośrednie wykorzystanie wartości

parametrów operacyjnych pracy bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25 w równaniach korelacyjnych, bez konieczności wyznaczania dodatkowych parametrów będących funkcją, na przykład, wartości związanych z geometrią polimerowego zbiornika lub właściwościami wykorzystywanej cieczy, miało na celu ułatwienie wykorzystania opracowanych równań korelacyjnych do planowania bioprocessów w badanym bioreaktorze *single-use*. Niewykorzystanie członów bezwymiarowych w równaniach korelacyjnych wiązało się również z tym, że udokumentowane w literaturze definicje liczb kryterialnych uwzględniają najczęściej zmienne będące funkcją czasu, a których wartość można wyznaczyć wyłącznie na podstawie komputerowych symulacji przepływu [132], [153]. Inne z dostępnych definicji liczb kryterialnych, określone z myślą o wyznaczaniu na podstawie wartości parametrów pracy lub właściwości danego typu bioreaktora, nie są jednoznaczne – oznacza to, że tę samą wartość liczby kryterialnej można uzyskać przy użyciu różnych zestawów parametrów operacyjnych pracy bioreaktora, przy których charakterystyka przepływu cieczy w bioreaktorze znacznie się różni [3], [49].

W pierwszej kolejności wyznaczono współczynniki równań korelacyjnych w oparciu o średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ uzyskane dla wszystkich wariantów eksperymentalnych w obu polimerowych zbiornikach:

$$t_{95\%,2L} = 2,0287 \cdot (\sin \alpha)^{-1,1482} \cdot \omega^{-1,0288} \cdot fl^{0,6494} \quad (24)$$

$$t_{95\%,10L} = 6,5678 \cdot (\sin \alpha)^{-1,3410} \cdot \omega^{-1,4328} \cdot fl^{2,7480} \quad (25)$$

Pomimo wysokich wartości współczynników korelacji dla Równań 24 i 25, wynoszących odpowiednio 0,9873 i 0,9987, ich skuteczność w przewidywaniu wartości czasu mieszania w pełnym zakresie parametrów oceniono jako niezadowalającą, w szczególności w przypadku zakresu czasu mieszania $t_{95\%}$ o wartościach poniżej 100 sekund. Najlepsze dopasowanie przewidywań wartości czasu mieszania do wartości uzyskanych w eksperymentach osiągnięto w przypadku bardzo wysokich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$, uzyskanych w wariantach eksperymentalnych przypisanych do Kategorii 0 w przypadku zbiornika o pojemności 2 L oraz Kategorii 0 i 1 w przypadku zbiornika o pojemności 10 L (warianty nr 1, 3, 6, 9 i 10). Wartości odległości Cooka (ang. *Cook's distance*) oraz wskaźnika lewarowania (ang. *leverage*) wyznaczone dla wyżej wymienionych wariantów były istotnie wyższe w porównaniu z wartościami wyznaczonymi dla pozostałych punktów z przestrzeni eksperymentalnej (zgodnie z Tabelą 9 w artykule [A4]). Na tej podstawie stwierdzono, że wartości czasu mieszania uzyskane w przypadku wariantów nr 1, 3, 6, 9 i 10 są obserwacjami odstającymi, wpływającymi znacznie na jakość przewidywań uzyskiwanych przy zastosowaniu Równania 24 i Równania 25 w przypadku pozostałych wariantów eksperymentalnych.

W celu zwiększenia jakości przewidywań wartości uzyskiwanych przy użyciu równań modelowych, opracowano dodatkowo dwie korelacje, których współczynniki wyznaczono w oparciu o wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ uzyskane dla wariantów eksperymentalnych przyporządkowanych zgodnie z Tabelą 12 i Tabelą 13 do wszystkich kategorii, z wyjątkiem wariantów nr 1, 3, 6, 9 i 10. Tym samym, przy wyznaczaniu współczynników uwzględniono warianty, dla których średnia wartość czasu mieszania $t_{95\%}$ była mniejsza niż 100 sekund, a zatem mieściła się w przedziale najbardziej użytecznym z punktu widzenia prowadzenia tlenowych bioprocusów w warunkach wydajnego mieszania. Równania korelacyjne 26 i 27, przedstawione poniżej, zawierają w indeksie dolnym dopisek „*fast*”, odnoszący się do zakresu stosowalności obejmującego wartości częstotliwości $\omega \geq 7,5 \text{ min}^{-1}$, z wyłączeniem obszaru o wartościach parametrów operacyjnych pracy bioreaktora należących łącznie do następujących przedziałów: $\{\alpha \in \langle 2^\circ; 3,5^\circ \rangle, \omega \in \langle 2 \text{ min}^{-1}; 25 \text{ min}^{-1} \rangle, fl \in (0,25; 0,5)\}$.

$$t_{95\%,2L,fast} = 0,3850 \cdot (\sin \alpha)^{-1,3790} \cdot \omega^{-2,2320} \cdot fl^{1,6048} \quad (26)$$

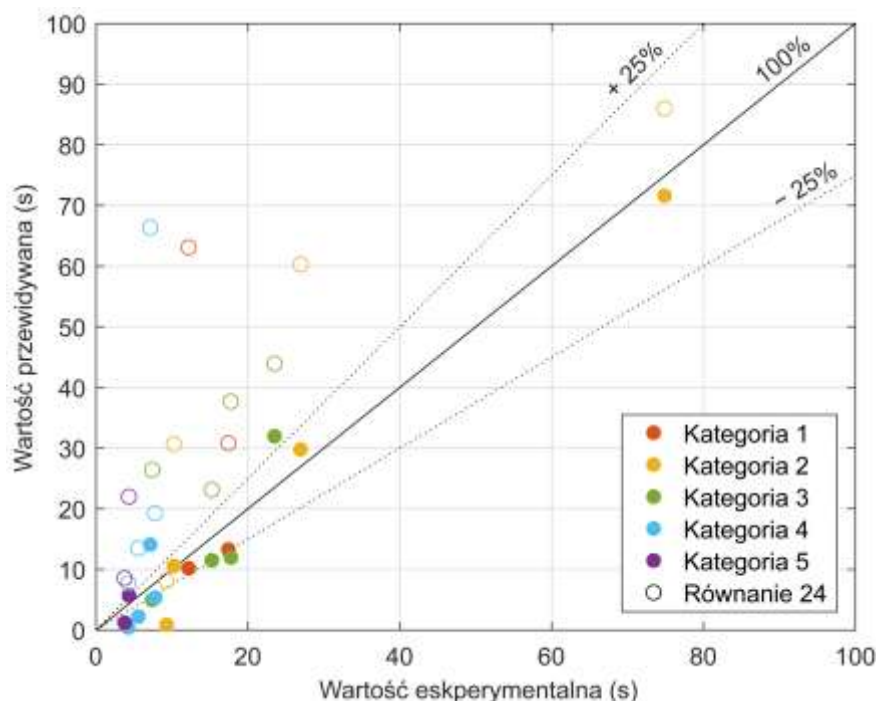
$$t_{95\%,10L,fast} = 0,8937 \cdot (\sin \alpha)^{-0,7857} \cdot \omega^{-1,8784} \cdot fl^{0,6949} \quad (27)$$

Parametry w Równaniach 26 i 27 zostały wyrażone w następujących jednostkach: $[\alpha] = ^\circ$, $[\omega] = s^{-1}$, $[fl] = 1$, $[t_{95\%}] = s$. Zakres stosowalności Równań 26 i 27 obejmuje część przestrzeni eksperymentalnej, w której występowały warianty eksperymentalne przypisane po klasyfikacji kształtu powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz do Kategorii 1–5 w przypadku zbiornika Cellbag™ 2 L oraz Kategorii 2–6 w przypadku zbiornika Cellbag™ 10 L, a zatem te warianty, w których przepływ cieczy w polimerowym zbiorniku zakwalifikowano do reżimu przejściowego lub burzliwego.

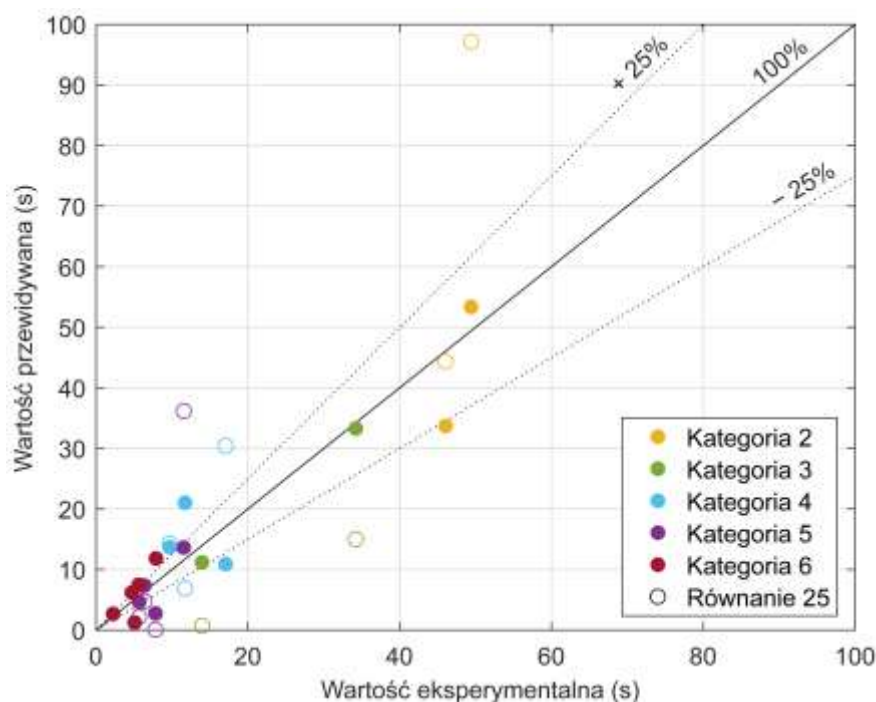
Na podstawie wartości współczynników potęgowych w Równaniach 24 i 25 można wnioskować, że wpływ częstotliwości oscylacyjnych wychyleń polimerowego zbiornika na wydajność mieszania w całej badanej przestrzeni eksperymentalnej był największy spośród badanych parametrów w obu zbadanych polimerowych zbiornikach. Wykluczenie wybranych wariantów ze zbioru danych wykorzystanych do obliczenia wartości współczynników w Równaniach 26 i 27 istotnie zmieniło rozkład wpływu wartości poszczególnych parametrów na przewidywane wartości czasu mieszania. W przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L, wpływ częstotliwości oscylacyjnych wychyleń ω oraz stopnia napełnienia zbiornika fl na przewidywane wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w Równaniu 26 wzrósł w porównaniu do wpływu tych parametrów w Równaniu 24, przy zachowaniu wpływu amplitudy oscylacyjnych wychyleń α na podobnym poziomie. Z kolei w przypadku polimerowego zbiornika

Cellbag™ 10 L zanotowano wzrost wpływu częstotliwości oscylacyjnych wychyleń ω przy jednoczesnym istotnym spadku wartości współczynników przypisanych do amplitudy wychyleń α oraz stopnia napełnienia zbiornika fl . Największą różnicę między wpływem tego samego parametru na wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ przewidywane przy zastosowaniu Równań 26 i 27 zanotowano w przypadku stopnia napełnienia polimerowego zbiornika fl : współczynnik członu potęgowego parametru fl w przypadku korelacji powiązanej z danymi uzyskanymi przy użyciu zbiornika Cellbag™ 2 L był większy o 0,91 od współczynnika analogicznego członu w korelacji powiązanej z wynikami eksperymentów z zastosowaniem zbiornika Cellbag™ 10 L.

Dokładność przewidywań wartości czasu mieszania uzyskanych przy zastosowaniu Równań 24–27 porównano na wykresach dopasowania przedstawionych, odpowiednio, na Rysunku 32 i Rysunku 33. Jakość dopasowania wartości przewidywanych do wartości eksperymentalnych czasu mieszania $t_{95\%}$ uległa poprawie w szczególności pomiędzy Równaniami 26 i 24, odnoszącymi się do danych uzyskanych z wykorzystaniem polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L. W przypadku Równania 27, którego współczynniki wyznaczono na podstawie danych uzyskanych w układzie z polimerowym zbiornikiem Cellbag™ 10 L, również osiągnięto poprawę dopasowania do eksperymentalnych wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w porównaniu do Równania 25.



Rysunek 32. Wykres dopasowania wartości przewidywanych przy zastosowaniu Równania 26 (wypełnione punkty) oraz Równania 24 (określi) do wartości eksperymentalnych czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).

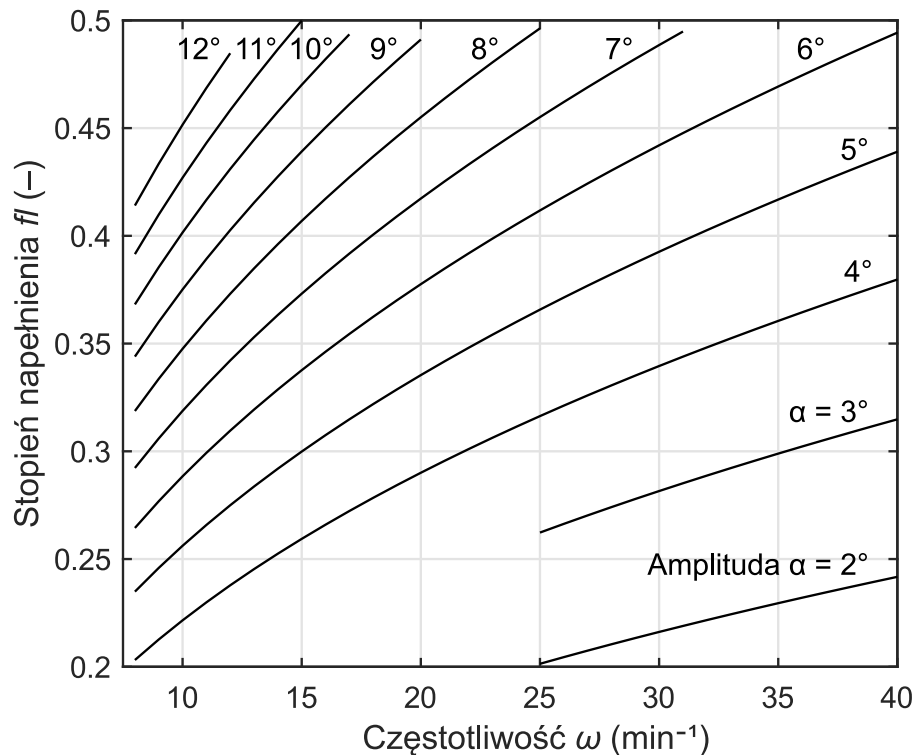


Rysunek 33. Wykres dopasowania wartości przewidywanych przy zastosowaniu Równania 27 (wypełnione punkty) oraz Równania 25 (okręgi) do wartości eksperymentalnych czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).

Równania 26 i 27, których współczynniki wyznaczono w oparciu o wartości doświadczalne czasu mieszania $t_{95\%}$ z zakresu poniżej 100 sekund, wykorzystano w celu zaproponowania Równania 28 umożliwiającego oszacowanie ilorazu wartości czasu mieszania w zbiornikach o pojemności 10 L i 2 L przy wybranych wartościach parametrów procesowych α , ω i fl , potencjalnie użytecznego jako jedno z kryteriów powiększania skali bioprocessów prowadzonych w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*:

$$\frac{t_{95\%,10L,fast}}{t_{95\%,2L,fast}} = 2,3213 \cdot (\sin \alpha)^{0,5933} \cdot \omega^{0,3537} \cdot fl^{-0,9098} \quad (28)$$

Analiza wartości współczynników w Równaniu 28 pozwala stwierdzić, że stosunek przewidywanych wartości czasu mieszania między zbiornikiem Cellbag™ 10 L a zbiornikiem Cellbag™ 2 L jest w przybliżeniu odwrotnie proporcjonalny do wartości stopnia napełnienia porównywanych polimerowych zbiorników. Krzywe na Rysunku 34 odpowiadają kombinacjom parametrów pracy bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, dla których szacowana wartość ilorazu $t_{95\%,10L,fast}/t_{95\%,2L,fast}$ równa się jedności, to jest przewidywane wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w obu badanych zbiornikach są równe.



Rysunek 34. Wykres opracowany w oparciu o Równanie 28. Krzywe na wykresie odpowiadają kombinacjom parametrów operacyjnych pracy bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25, przy których iloraz przewidywanych wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w polimerowych zbiornikach Cellbag™ 10 L oraz 2 L jest równy 1 (zgodnie z [A4]).

Analiza wyników badań eksperymentalnych przeprowadzonych w tej części pracy doktorskiej doprowadziła do opracowania Równania 28, które, według najlepszej wiedzy, w chwili opublikowania artykułu [A4] stanowiło pierwszą udokumentowaną w literaturze propozycję równania korelacyjnego zmiany skali do zastosowania w układzie bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*. Pomimo tego, że do efektywnej zmiany skali wymagane jest podejście kompleksowe, polegające na rozpatrywaniu zmian wartości szeregu parametrów charakteryzujących dany proces, proponowane modelowe Równanie 28 stanowi potencjalny punkt wyjścia do dalszych prac obejmujących poszerzenie zasobu danych doświadczalnych i proponowania na ich podstawie kolejnych równań modelowych.

5.6. Strukturalna modyfikacja naczyń hodowlanych Cellbag™

Cel i merytoryczne uzasadnienie badań

Opracowanie strukturalnej modyfikacji polimerowych zbiorników Cellbag™ 2 L intensyfikującej hodowle biomasy zrealizowano w trzech zasadniczych etapach badań:

- Pierwszy etap objął wykonane metodą CFD symulacje przepływu cieczy w polimerowym zbiorniku w wariacie bez modyfikacji (Wariant 0), jak i po wprowadzeniu modyfikacji zaproponowanych według trzech wariantów (Warianty: 1, 2 i 3), zdefiniowanych według reguł opisanych w Rozdziale 4.6 niniejszej rozprawy. Celem prac przeprowadzonych w ramach pierwszego etapu było oszacowanie wpływu zaproponowanych modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L na warunki mieszania fazy ciekłej poddawanej ciągłemu oscylacyjnemu mieszaniu typu *wave*. Na podstawie analizy wyników badań zrealizowanych w pierwszym etapie dokonano selekcji najbardziej obiecującego wariantu modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika do dalszych badań eksperymentalnych.
- Celem prac zrealizowanych w drugim etapie opracowania użytecznej modyfikacji polimerowego zbiornika do hodowli było eksperymentalne zbadanie wpływu wariantu modyfikacji zbiornika Cellbag™ 2 L (o geometrii wyselekcjonowanej w etapie pierwszym) na wydajności mieszania oraz wnikania masy, dla różnych wariantów mieszania typu *wave*, bez obecności biomasy w fazie ciekłej poddawanej oscylacyjnym wychyleniom. Dla wybranego w pierwszym etapie badań wariantu modyfikacji polimerowego zbiornika, eksperymentalnie wyznaczone zostały wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ i współczynnika $k_L a$. W tym etapie badania zrealizowano zgodnie z metodyką opisaną w Rozdziałach 4.7 (w zakresie praktycznego wykonania polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii) oraz 4.3 i 4.4 (w zakresie ilościowego wyznaczenia wartości parametrów, odpowiednio, $k_L a$ i $t_{95\%}$) niniejszej rozprawy.
- Celem badań eksperymentalnych wykonanych w trzecim etapie była bioprosowa weryfikacja wpływu zaproponowanej modyfikacji polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (wariant geometrii wyselekcjonowany w etapie pierwszym) na proliferację biomasy komórek tkanki kalusowej *N. tabacum* linii BY-2 hodowanej włąbnie w formie zawiesiny komórek i poddawanej ciągłym oscylacyjnym wychyleniom determinującym warunki mieszania typu *wave*. Przeanalizowano przebieg zmian stężenia tlenu rozpuszczonego DO w trakcie całego bioprosu, przyrost biomasy w kolejnych dniach, wartości końcowej wydajności biomasy, a także, dodatkowo, stężenia cukrów w medium hodowlanym oraz aktywności metabolicznej hodowanych komórek roślinnych. W tym etapie badania zrealizowano zgodnie z metodyką opisaną w Rozdziale 4.8 niniejszej rozprawy.

Przyjęta trzyetapowa metodyka postępowania pozwoliła na opracowanie w pełni funkcjonalnego prototypu innowacyjnego polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii. Kompleksowa eksperymentalna analiza wpływu modyfikacji geometrii powierzchni polimerowego zbiornika, zaproponowanych na podstawie wyników modelowania CFD, na kluczowe wartości charakteryzujące procesy mieszania oraz wymiany masy w opracowanym prototypowym rozwiązaniu, potwierdziła korzystny wpływ modyfikacji zbiornika za wydajność mieszania skutkującą intensyfikacją wydajności wymiany masy. Po poddaniu bioprocessowej weryfikacji polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii i po dokonanej analizie wyników ilościowo charakteryzujących proces realizacji w nim hodowli biomasy o szczególnej wrażliwości na warunki mieszania, opracowane rozwiązanie aparaturowe stanowiło podstawę do zgłoszeń ochrony patentowej wynalazków w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej pod numerem P.448096 wraz z towarzyszącymi zgłoszeniami o numerach P.448095 i P.448097. Natomiast poniżej zaprezentowano i przedyskutowano wątki badawcze najważniejsze z punktu widzenia integracji tematyki rozprawy doktorskiej.

Symulacje CFD wpływu proponowanych modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika na strukturę przepływu fazy ciekłej

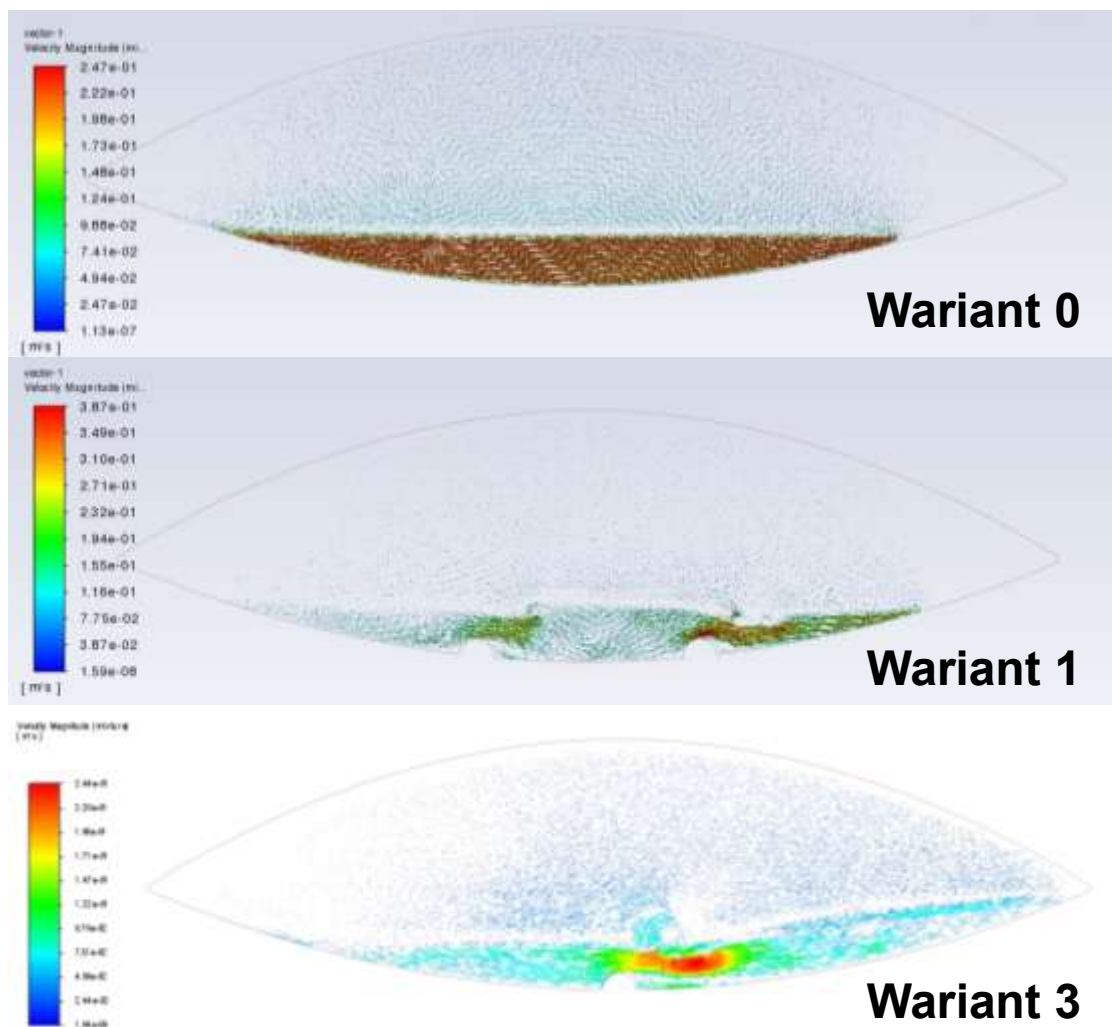
Wyniki opisane w niniejszym podrozdziale uzyskano we współpracy z zespołem badawczym kierowanym przez Pana Profesora Łukasza Makowskiego z Wydziału Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej.

Walidację zaproponowanego modelu referencyjnego niezmodyfikowanego polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (Wariant 0) do obliczeń CFD, przeprowadzono na podstawie porównania wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ uzyskanych na podstawie symulacji oraz trzykrotnie powtórzonych eksperymentów przeprowadzonych z zastosowaniem adaptacji metody kolorymetrycznej według metodyki opisanej w Rozdziale 4.4 rozprawy. Zarówno wszystkie symulacje, jak i wszystkie eksperymenty, przeprowadzono przy tych samych wartościach par parametrów operacyjnych amplitudy α i częstotliwości ω oscylacyjnych wychyleń polimerowego zbiornika, przy stopniu napełnienia zbiornika $fl = 0,15$ (odpowiadającemu objętości fazy ciekłej $V_L = 0,3 \text{ dm}^3$ mieszanej w zbiorniku).

Wpływ rozmieszczenia półkulistych wypustek na przepływ cieczy w zbiorniku Cellbag™ 2 L oceniono na podstawie porównania wykresów pola wektorowego prędkości między referencyjnym zbiornikiem o niezmodyfikowanej geometrii (Wariant 0) a trzema zbiornikami o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3). Wybrane wykresy pola wektorowego prędkości dla dwóch przypadków: referencyjnego zbiornika niezmodyfikowanego (Wariant 0)

oraz trzech zbiorników o zmodyfikowanej geometrii dla kombinacji parametrów mieszania typu *wave* definiowanych przez $\alpha = 6^\circ$ oraz $\omega = 20 \text{ min}^{-1}$, odnotowanych w różnych momentach cyklu oscylacyjnych wychyleń platformy bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25* przedstawiono na Rysunkach 35, 36, 37 i 38.

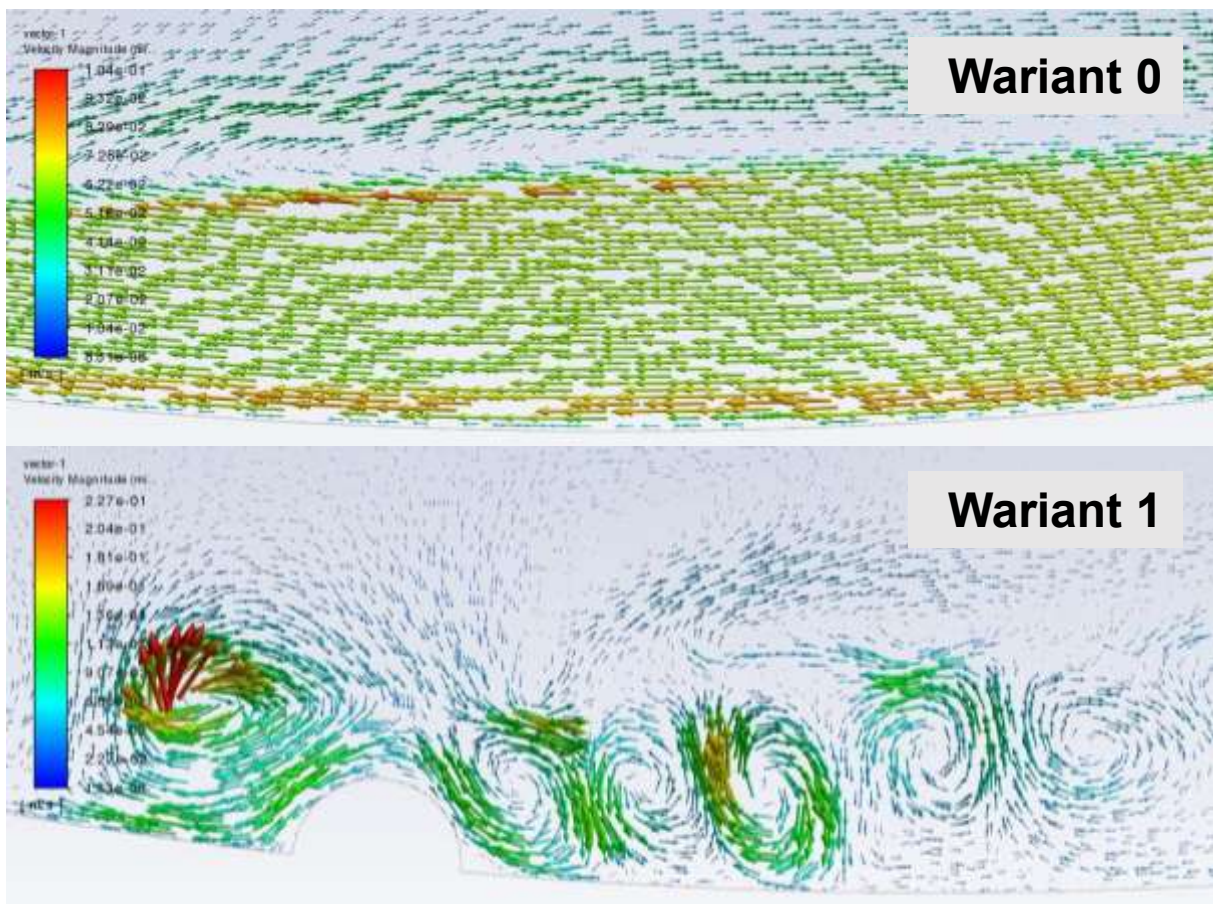
Rozkład prędkości przepływu cieczy w referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L (Wariant 0) był zdecydowanie bardziej jednorodny niż rozkład prędkości przepływu cieczy zaobserwowany w wariantach polimerowego zbiornika ze zmodyfikowaną geometrią. W przypadku referencyjnego Wariantu 0, w czasie 3 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji (Rysunek 35), średnia prędkość przepływu wynosiła około $0,20 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ w większości objętości fazy ciekłej, zaś w przypadku Wariantu 1 oraz Wariantu 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika prędkość przepływu różniła się znacznie między sąsiednimi obszarami fazy ciekłej, osiągając w pobliżu jednej z wypustek maksymalne wartości równe, odpowiednio, około $0,38 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ oraz $0,24 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.



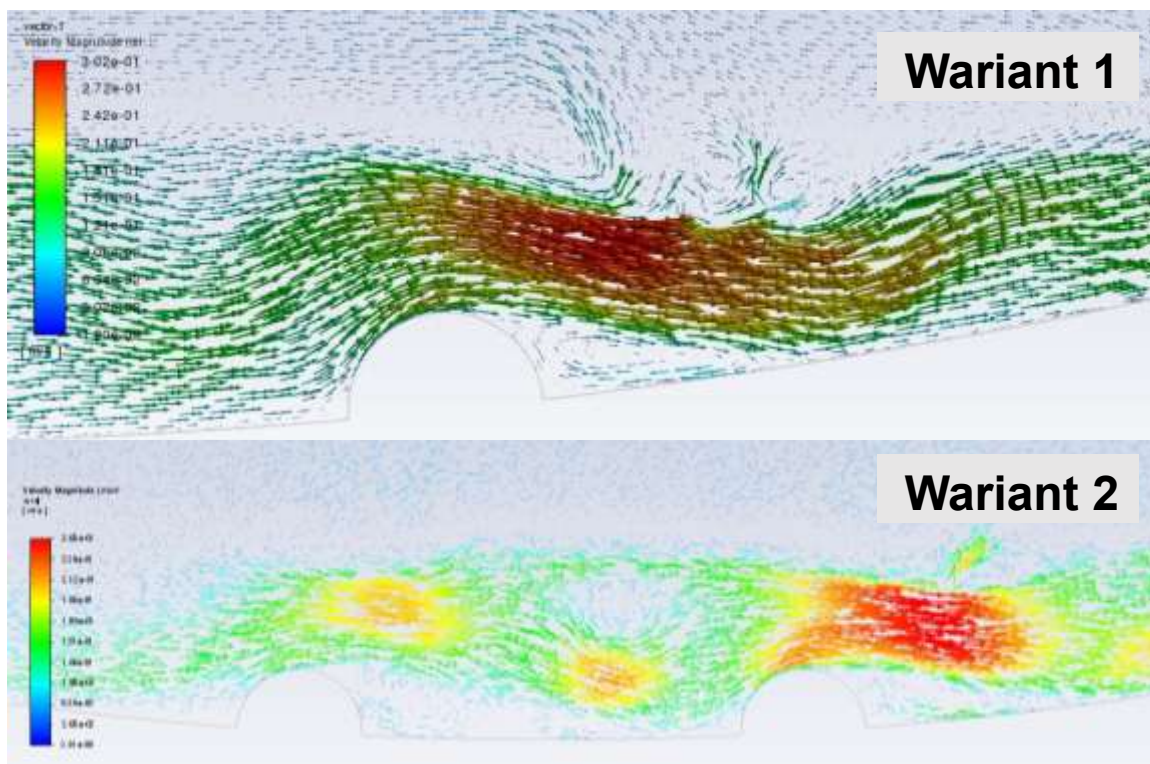
Rysunek 35. Porównanie pól wektorowych prędkości fazy ciekłej wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L niezmodyfikowany (Wariant 0) oraz wybrane dwa warianty polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 1 oraz Wariant 3) w czasie 3 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji.

Zmodyfikowanie geometrii wewnętrznej powierzchni dolnej ściany polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L wpłynęło na zwiększenie burzliwości przepływu, o czym świadczą zaobserwowane w okolicy półkulistych wypustek wiry wsteczne wzmagające cyrkulację wewnątrz fazy ciekłej (Rysunek 36). Kształt wypustek rozmieszczonych na dolnej wewnętrznej ścianie polimerowego zbiornika zgodnie z zaproponowanymi modyfikacjami minimalizował ryzyko powstawania stref martwych przepływu, które mogłyby wystąpić w przypadku zastosowania przegród zawierających wklęsłości lub nisze. W przypadku charakteryzowanych wariantów modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika, zmiana kierunku przepływu cieczy wynikająca z cyklicznych oscylacyjnych wychyleń platformy bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu

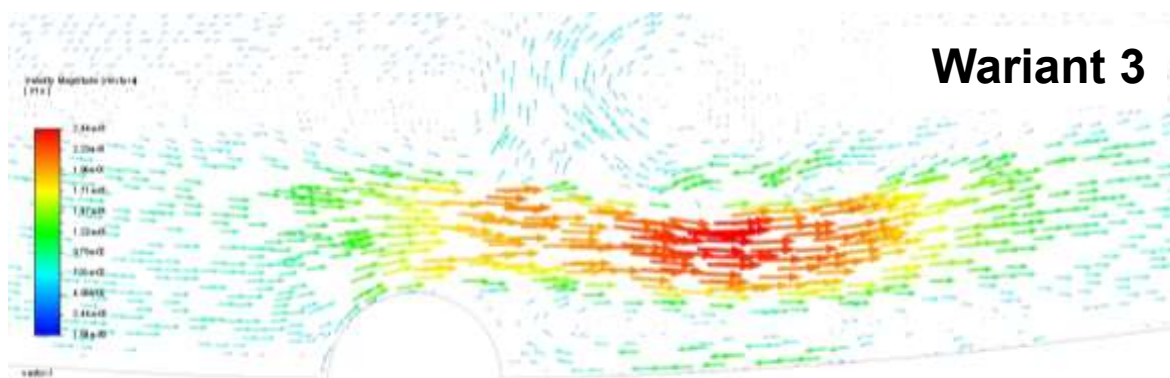
wave, na której umieszcza się polimerowy zbiornik, skutkowało wyniesieniem objętości cieczy znajdującej się w pobliżu wypustki z dala od ściany zbiornika (Rysunek 37, Rysunek 38). Wyraźnie widać, że po wprowadzeniu modyfikacji następuje wymieszanie poprzeczne pomiędzy warstwami płynu, co umożliwia i intensyfikuje transport masy od dołu zbiornika w górę i odwrotnie. Należy zauważyć, że proces ten występuje bez globalnej zmiany charakteru przepływu.



Rysunek 36. Pola wektorowe prędkości fazy ciekłej wyznaczone na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz jeden z wariantów polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 1) w czasie 3,75 sekundy od momentu rozpoczęcia symulacji.

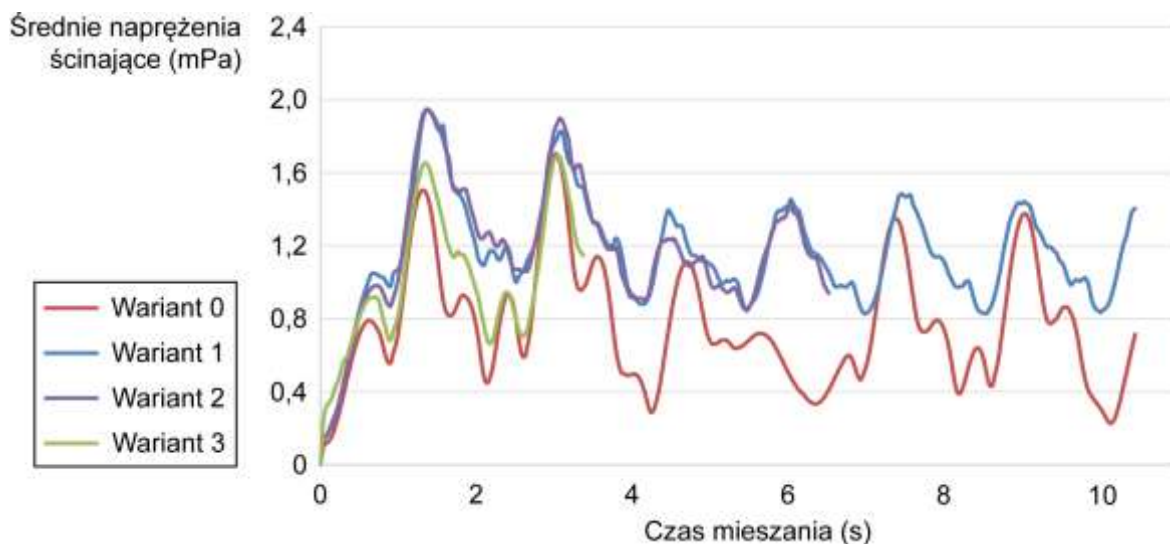


Rysunek 37. Pole wektorowe prędkości fazy ciekłej wyznaczone na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących dwa z wariantów polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 1 oraz Wariant 2) w czasie 6 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji.

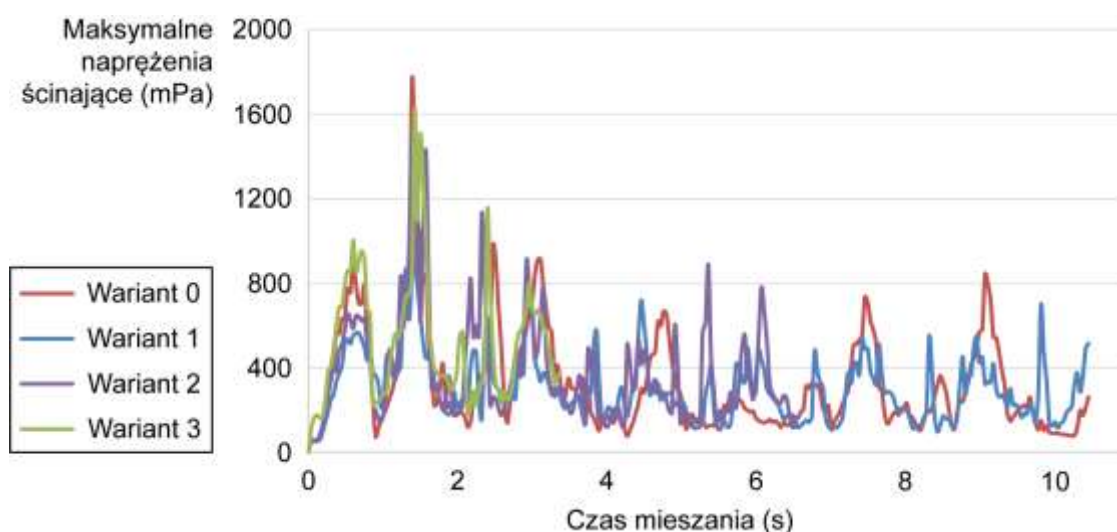


Rysunek 38. Pole wektorowe prędkości fazy ciekłej wyznaczone na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących jeden wariantów polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) w czasie 3 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji.

Zestawione wartości średnich oraz maksymalnych naprężeń ścinających wyznaczone na podstawie symulacji CFD procesu mieszania typu *wave*, obejmujące referencyjny niezmodyfikowany zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3) zaprezentowano, odpowiednio, na Rysunku 39 oraz na Rysunku 40.



Rysunek 39. Porównanie średnich wartości naprężeń ścinających w fazie ciekłej wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3).

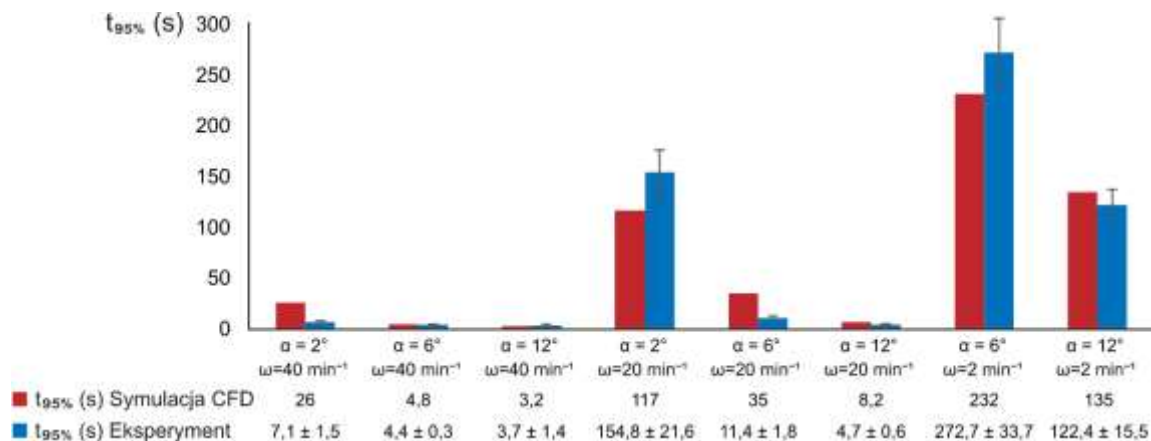


Rysunek 40. Porównanie maksymalnych wartości naprężeń ścinających w fazie ciekłej wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3).

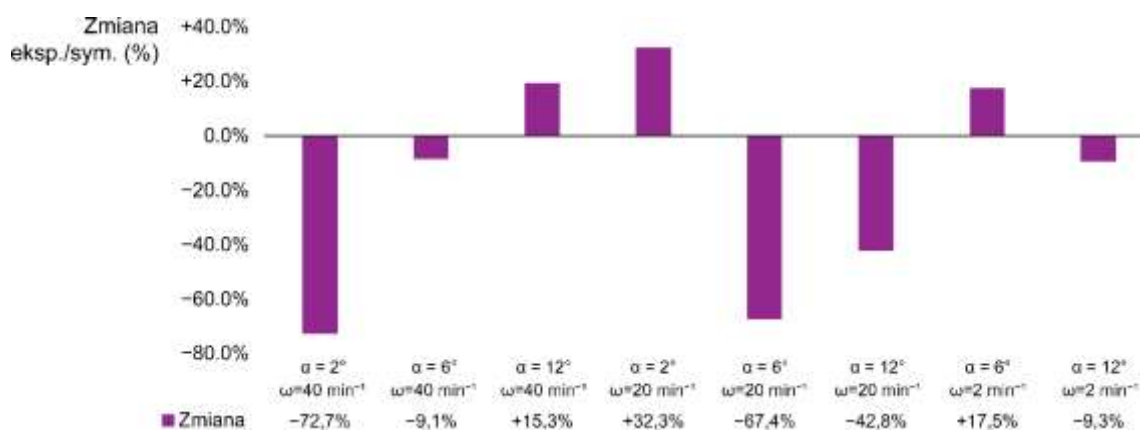
Na podstawie danych przedstawionych na Rysunku 39 oraz Rysunku 40 można stwierdzić, że maksymalne wartości naprężeń ścinających zaobserwowane w symulowanych geometriach zbiornika Cellbag™ 2 L (Rysunek 40) były około 3 rzędy wielkości wyższe w porównaniu do wyznaczonych symulacjami średnich wartości naprężeń (Rysunek 39). Pomimo tego, że symulowany przy użyciu CFD proces mieszania typu *wave* w badanym systemie bioreaktora *single-use* charakteryzował się niskimi średnimi wartościami naprężeń ścinających w fazie ciekłej, wynoszącymi około 1 mPa, to z punktu widzenia bioprocessów istotniejsze jest zapobieganie wzrostowi maksymalnych wartości naprężeń ścinających, które mogą być wielokrotnie wyższe w porównaniu do średnich wartości naprężeń ścinających. Nawet krótki okres przebywania komórek lub drobnych elementów zintegrowanej biomasy (np. agregatów komórek lub sferoidów) w obszarach fazy ciekłej, w których wartości naprężeń ścinających są bliskie maksymalnym obserwowanym w danym układzie, może znacznie zwiększać ryzyko wystąpienia negatywnych efektów hydrodynamicznego stresu komórkowego, w odniesieniu zarówno do stanu fizjologicznego komórek, jak i przebiegu czy wydajności realizowanego w takim układzie bioprocessu. W przypadku zbadanych wariantów modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (Warianty 1–3) nie zaobserwowano zwiększenia maksymalnych wartości naprężeń ścinających (Rysunek 40), pomimo zwiększenia wartości średnich naprężeń ścinających w falującej fazie ciekłej (Rysunek 39). Wynik ten pozwala stwierdzić, że zaproponowane zmiany geometrii powierzchni wewnętrznej dolnej ściany polimerowego zbiornika prawdopodobnie nie powinny zwiększyć ryzyka wystąpienia w komórkach nasilonych negatywnych zjawisk fizjologicznych określanych mianem hydrodynamicznego stresu komórkowego, przy jednoczesnym zwiększeniu wymiany masy w układzie.

Wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wyznaczone na podstawie symulacji CFD oraz wartości $t_{95\%}$ wyznaczone eksperymentalnie zestawiono na Rysunku 41. Natomiast na Rysunku 42 przedstawiono wartości procentowej różnicy między wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$ otrzymanymi w eksperymentach oraz w symulacjach. Średnia bezwzględna wartość różnicy między wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$ otrzymanymi w eksperymentach oraz w symulacjach wyniosła 33,2%. Z wyjątkiem dwóch wariantów, w których wartość eksperymentalna czasu mieszania $t_{95\%}$ była o około 70% niższa niż wartość $t_{95\%}$ uzyskana w symulacjach, różnica między porównywanymi wielkościami była nie większa niż około 30%. Biorąc pod uwagę stopień uproszczenia geometrii polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L na potrzeby zrealizowanych symulacji CFD, uznano, że uzyskane odchylenie od wartości uzyskanych w eksperymentach jest akceptowalne. Jedną z możliwych przyczyn rozbieżności porównywanych par wyników może być różnica w sposobie pozyskiwania informacji o stężeniu lub obecności znacznika

w danym obszarze fazy ciekłej, istniejąca między symulacjami CFD a adaptacją metody kolorymetrycznej. W przypadku symulacji CFD obserwowano rozkład stężenia w głębi przekroju przez objętość fazy ciekłej, zaś w przypadku metody kolorymetrycznej obserwowano zmianę zabarwienia cieczy z góry, co zwiększało szansę przesłaniania pewnych obszarów położonych niżej przez ciecz znajdującą się powyżej.

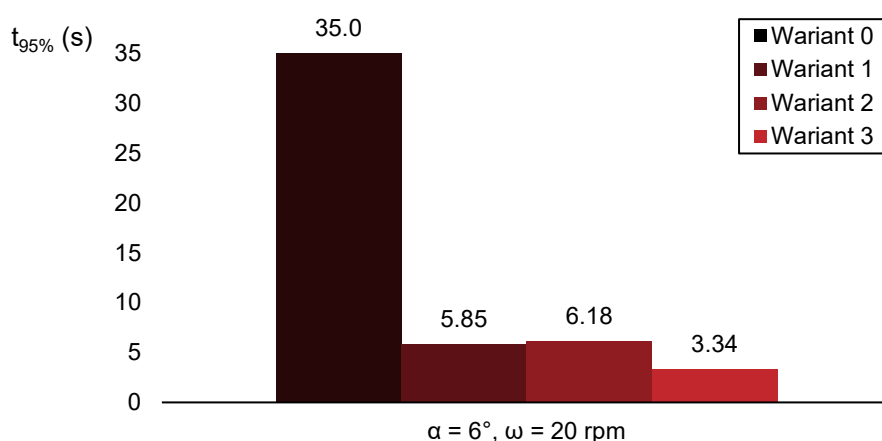


Rysunek 41. Porównanie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ charakteryzujące wydajność mieszaia typu *wave* w referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L (Wariant 0), wyznaczone przy pomocy symulacji CFD oraz w eksperymentalnych pomiarach przy zastosowaniu adaptacji metody kolorymetrycznej. Wartości liczbowe czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu.



Rysunek 42. Względna zmiana wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ pomiędzy wartościami uzyskanymi w eksperymentach a wartościami wyznaczonymi na podstawie wyników symulacji CFD. Wartości liczbowe zmiany czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu.

Na podstawie porównania wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ otrzymanych w symulacjach z wykorzystaniem referencyjnego niezmodyfikowanego zbiornika Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzech wariantów polimerowego zbiornika z wypustkami wprowadzonymi na jego dolnej powierzchni wewnętrznej (Warianty 1, 2 oraz 3) modyfikującymi geometrię powierzchni oryginalnego (tzn. referencyjnego) zbiornika Cellbag™ 2 L, stwierdzono, że umieszczenie na dolnej wewnętrznej powierzchni polimerowego zbiornika jednego rzędu półkulistych wypustek (Wariant 3) najsilniej wpłynęło na zwiększenie wydajności mieszania w badanym układzie bio-reaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* (Rysunek 43). Na tej podstawie wyselekcjonowano Wariant 3 polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii do kolejnych etapów badań weryfikujących aplikacyjność tego prototypu oraz jego bioprosesową użyteczność.



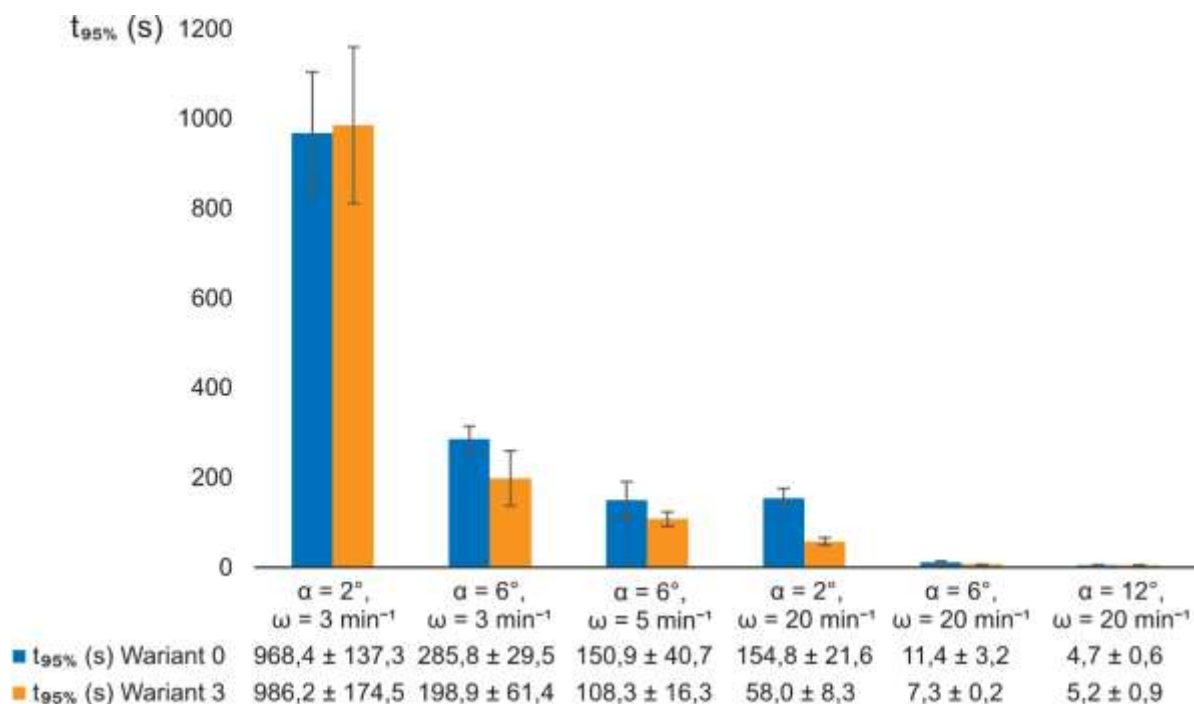
Rysunek 43. Porównanie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3).

Eksperymentalna charakterystyka prototypu polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3 modyfikacji zbiornika Cellbag™ 2 L)

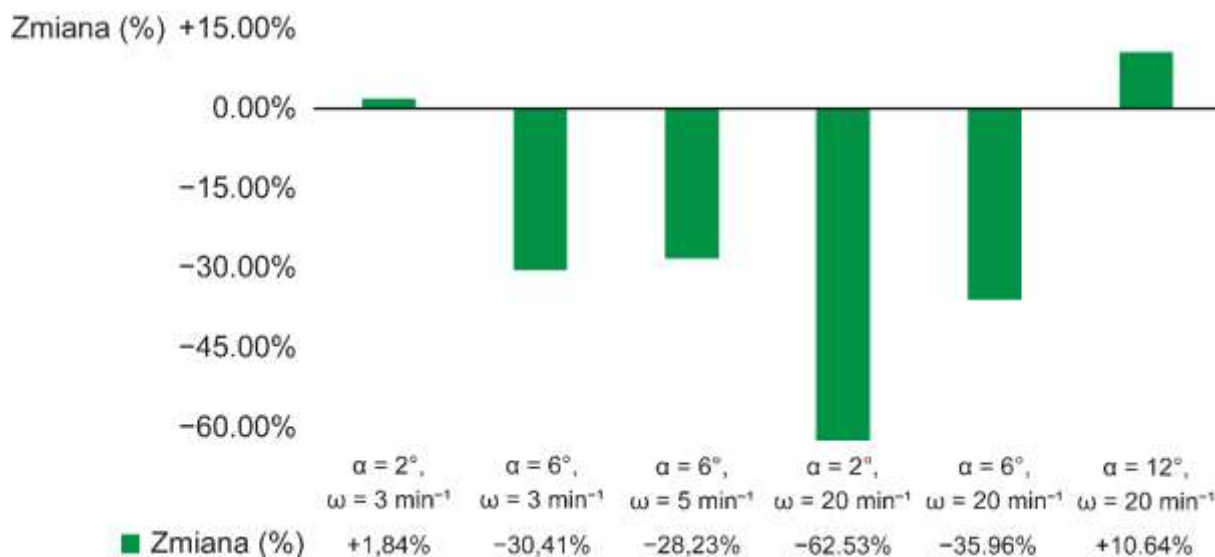
W celu doświadczalnego potwierdzenia korzystnego wpływu na wydajność mieszania typu *wave* realizowanego w zaproponowanej w Wariacie 3 modyfikacji polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L, przeprowadzono serie pomiarów wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ oraz współczynnika $k_L a$ przy stopniu napełnienia Wariantu 3 zbiornika $fl = 0,15$. Wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ uzyskane w niezmodyfikowanym układzie referencyjnym oraz w Wariacie 3 polimerowego zbiornika zestawiono porównawczo na Rysunku 44. Pomimo tego, że w ogólnym ujęciu różnice między wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$ wyznaczonymi doświadczalnie przy

tych samych wartościach parametrów operacyjnych α i ω były mniej wydajne, niż w przypadku wartości $t_{95\%}$ uzyskanych dzięki symulacjom CFD, dla zdecydowanej większości rozpatrywanych par parametrów operacyjnych α i ω zaobserwowano obniżenie okresu koniecznego na osiągnięcie założonego stopnia homogeniczności fazy ciekłej przepływającej w Wariancie 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika.

Największą odnotowaną względną zmianę czasu mieszania $t_{95\%}$, wynoszącą około -60% względem referencyjnego niezmodyfikowanego zbiornika Cellbag™ 2 L, osiągnięto w przypadku kombinacji parametrów operacyjnych bioreaktora $\alpha = 2^\circ$ i $\omega = 20 \text{ min}^{-1}$ (Rysunek 45). Zmniejszenie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ o około 30% osiągnięto także w przypadku trzech innych zbadanych par parametrów operacyjnych α i ω . Zestawy parametrów operacyjnych, przy których czas mieszania $t_{95\%}$ w Wariancie 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika był krótszy, zgodnie z klasyfikacją przedstawioną w Rozdziale 5.4 można przypisać do Kategorii 1 ($\alpha = 6^\circ$ i $\omega = 5 \text{ min}^{-1}$ oraz $\alpha = 2^\circ$ i $\omega = 20 \text{ min}^{-1}$), Kategorii 2 ($\alpha = 6^\circ$ i $\omega = 20 \text{ min}^{-1}$) oraz Kategorii 0 ($\alpha = 6^\circ$ i $\omega = 3 \text{ min}^{-1}$). Pozostałe dwie pary parametrów operacyjnych α i ω , przy których nie zaobserwowano pozytywnego wpływu wprowadzenia modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika w Wariancie 3, można przypisać do Kategorii 0 ($\alpha = 2^\circ$ i $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$) oraz Kategorii 3 ($\alpha = 12^\circ$ i $\omega = 20 \text{ min}^{-1}$). Na tej podstawie stwierdzono, że proponowana modyfikacja geometrii polimerowego zbiornika, czyli Wariant 3, cechuje się największym intensyfikującym wpływem na zwiększenie wydajności mieszania w reżimie przejściowym przepływu cieczy uzyskiwanego w oscylacyjnie wychylanym polimerowym zbiorniku.

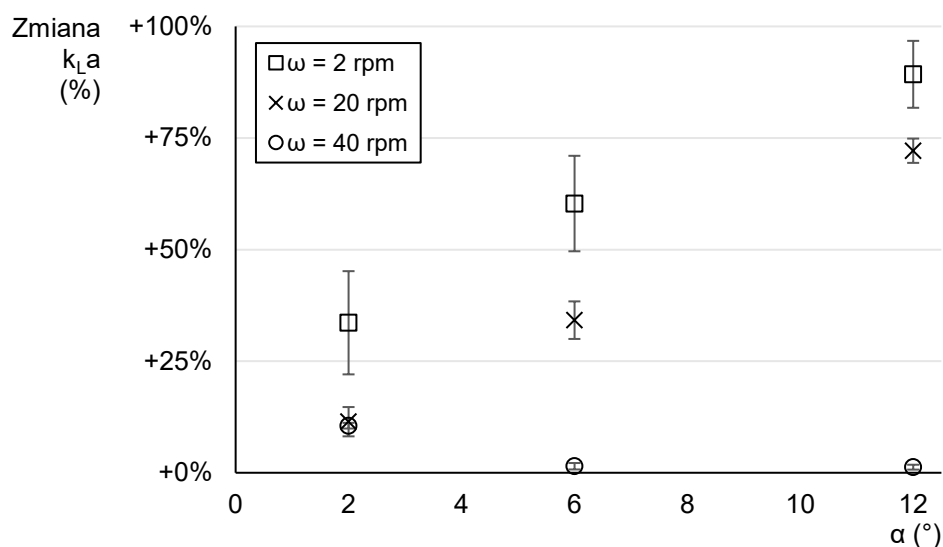


Rysunek 44. Porównanie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w referencyjnym niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz w zmodyfikowanym Wariancie 3 zbiornika. Wartości liczbowe czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu.

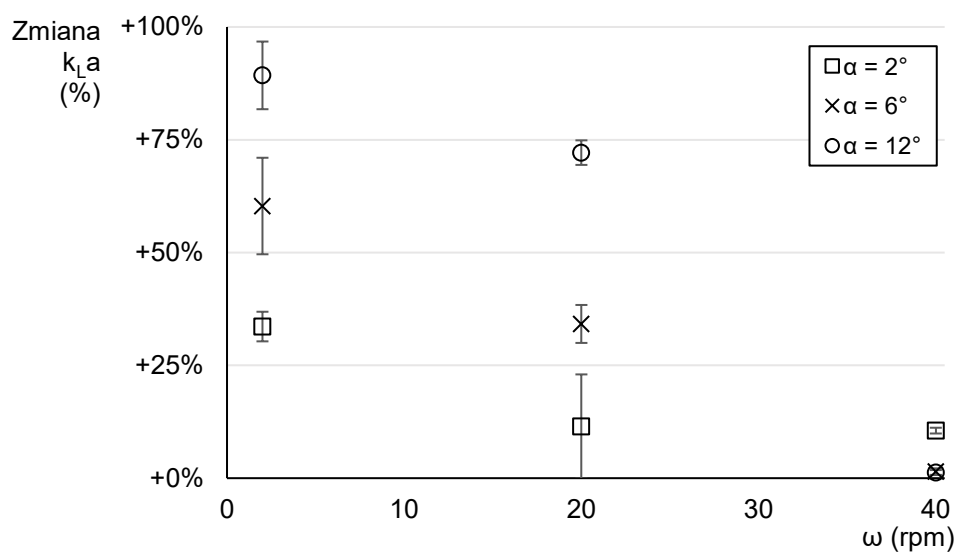


Rysunek 45. Względna zmiana wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ odnotowana między pomiarami wykonanymi przy użyciu referencyjnego niezmodyfikowanego polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L oraz zmodyfikowanego Wariantu 3 zbiornika. Wartości liczbowe zmiany czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu.

Wartości względnej zmiany współczynnika $k_L a$, odnotowane między wartościami uzyskanymi w Wariancie 3 polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii dolnej wewnętrznej powierzchni a referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L, zestawiono porównawczo na Rysunku 46 i Rysunku 47.



Rysunek 46. Wartości względnej zmiany współczynnika $k_L a$ odnotowane między Wariantem 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika a referencyjnym niezmodyfikowanym zbiornikiem Cellbag™ 2 L, w funkcji amplitudy oscylacji α .



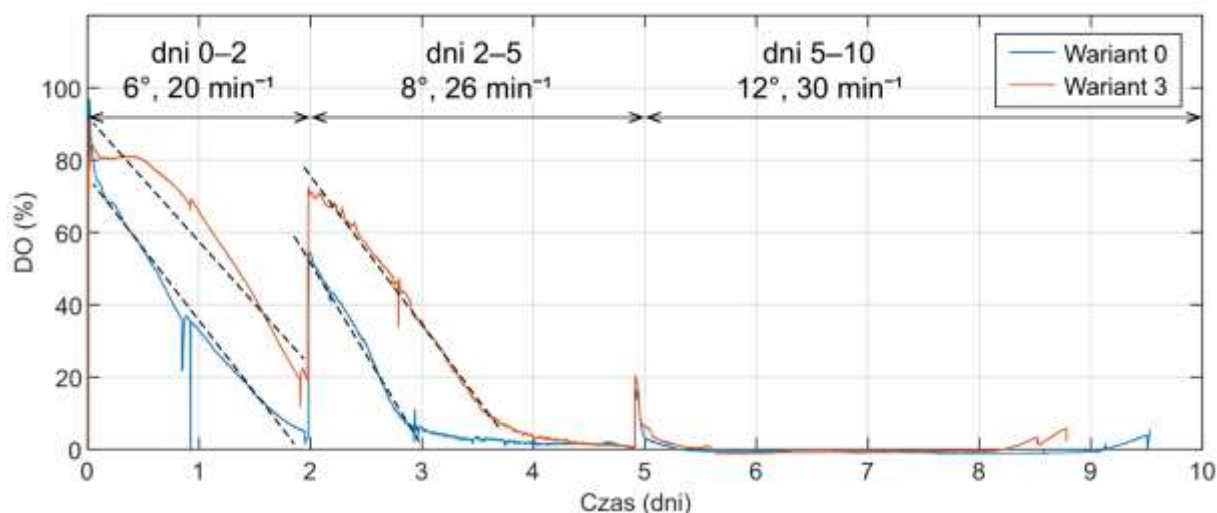
Rysunek 47. Wartości względnej zmiany współczynnika $k_L a$ odnotowane między Wariantem 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika a referencyjnym niezmodyfikowanym zbiornikiem Cellbag™ 2 L, w funkcji częstotliwości oscylacji ω .

Analizując dane ilościowe porównane na Rysunku 46 i Rysunku 47, zaobserwowano w przybliżeniu proporcjonalną zależność między zmianą wartości $k_L a$ a amplitudą oscylacji α , w przypadku małej lub umiarkowanej intensywności wzbudzenia ruchu fazy ciekłej, w szczególności przy dwóch zbadanych częstotliwościach oscylacyjnych wychyleń polimerowego zbiornika: $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$ oraz $\omega = 20 \text{ min}^{-1}$. Największy przyrost wartości $k_L a$ przy tych wartościach częstotliwości ω oscylacyjnych wychyleń zbiornika, wynoszący około 70%, zanotowano przy kombinacji $\alpha = 12^\circ$ oraz $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$. W ogólnym ujęciu, zaproponowany Wariant 3 modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika okazał się najbardziej skuteczny przy małej lub umiarkowanej intensywności oscylacyjnych wychyleń platformy bioreaktora z mieszaniem typu *wave*. Brak istotnej poprawy warunków wnikania masy, tj. brak istotnego wpływu na wyznaczone w porównywanych polimerowych zbiornikach różniących się geometrią wartości współczynnika $k_L a$, stwierdzono w przypadku pomiarów przeprowadzonych przy najwyższej dostępnej częstotliwości oscylacyjnych wychyleń polimerowego zbiornika $\omega = 40 \text{ min}^{-1}$, a zatem w warunkach przepływu burzliwego. Prawdopodobnie wpływ obecności pojedynczego rzędu wypustek na dnie prototypu Wariantu 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika jest pomijalny w porównaniu do burzliwości przepływu wywołanej wysoką częstotliwością ω ruchu oscylacyjnego platformy.

Bioprocusowa walidacja aplikacyjności Wariantu 3 prototypu zmodyfikowanego zbiornika Cellbag™ 2 L

Bioprocusowa walidacja aplikacyjności prototypu Wariantu 3 modyfikacji geometrii polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L objęła swoim zakresem porównanie wyników serii hodowli wgłębnych zawiesiny komórek *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonych w bioreaktorze *ReadyTo-Process* WAVE™ 25 niezależnie wyposażonym w dwa porównywane zbiorniki, w których hodowano zawiesinę biomasy: (i) referencyjny, niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L oraz (ii) prototyp polimerowego zbiornika o geometrii zmodyfikowanej zgodnie z założeniami Wariantu 3. Do porównawczej analizy wpływu użytych zbiorników na proliferującą biomasę wykorzystano: (a) profile stężenia tlenu rozpuszczonego DO w medium hodowlanym, (b) wartości stężenia biomasy w medium hodowlanym, (c) wartości aktywności metabolicznej hodowanych komórek określone referencyjnym testem PrestoBlue, (d) profile stężeń cukrowców w medium hodowlanym. Porównanie wszystkich powyższych parametrów, tj. (a)–(d), monitorowanych w trakcie całych 10-dniowych hodowli zrealizowanych w dwóch porównywanych zbiornikach, tj. (i) i (ii), spełniało kryteria analizy ilościowej. Wykorzystano w tym celu próby zawiesiny komórek w medium hodowlanym, które, okresowo i z zachowaniem kryteriów jałowości, pobierano z układów hodowlanych inkubowanych w obu porównywanych zbiornikach, w tych samych momentach czasowych hodowli.

Pierwszym z kryteriów oceny wpływu Wariantu 3 modyfikacji geometrii zbiornika na hodowle komórek *N. tabacum* BY-2 było porównanie profili stężenia tlenu rozpuszczonego DO w medium hodowlanym w trakcie hodowli. Podczas hodowli przeprowadzonych w obu porównywanych zbiornikach, wartości parametrów operacyjnych bioreaktora α i ω , które definiowały warunki mieszania typu *wave* wywoływanego ruchem oscylacyjnym polimerowych zbiorników, zmieniano według harmonogramu opisanego w referencyjnej procedurze hodowli wgłębnej zawiesiny komórek *N. tabacum* zalecanej przez producenta bioreaktora [110]. Szczegółowa metodyka, według której zrealizowano porównywane hodowle, została przedstawiona w rozdziale 4.8 rozprawy. Wyniki porównania profili DO uzyskanych w hodowlach, które przeprowadzono w dwóch porównywanych zbiornikach, przedstawiono na Rysunku 48.

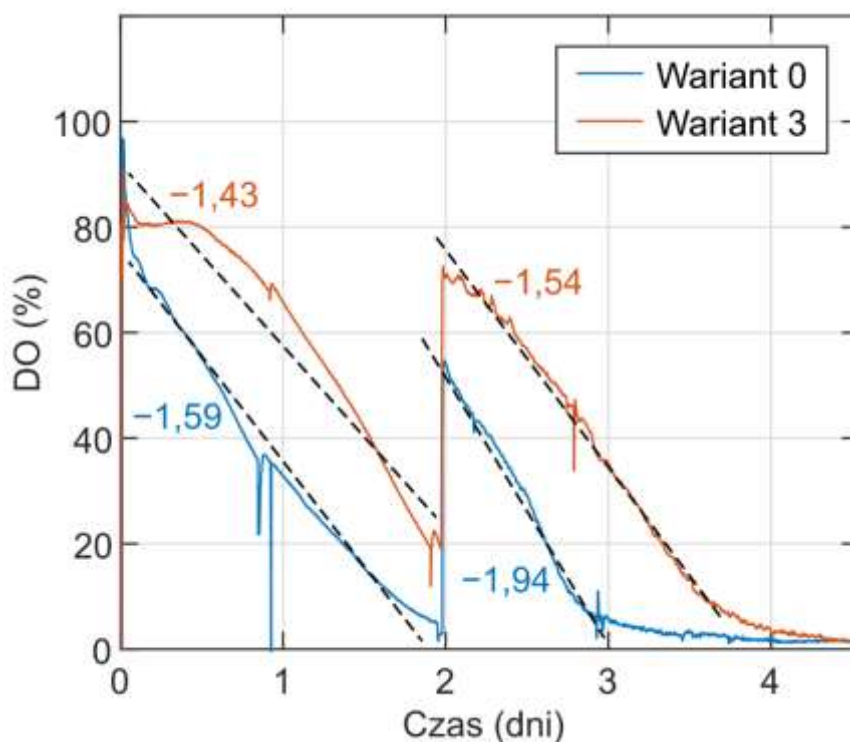


Rysunek 48. Profile stężenia tlenu rozpuszczonego DO w medium hodowlanym odnotowane w trakcie hodowli wglębnych zawiesiny komórek *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonych w referencyjnym niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz w zbiorniku o geometrii zmodyfikowanej zgodnie z założeniami Wariantu 3.

W przypadku obu porównywanych hodowli, wraz z czasem ich trwania stopniowo postępował wzrost biomasy komórek *N. tabacum* BY-2. Proliferacja biomasy, czyli wzrost stężenia komórek prowadzących przemiany biochemiczne szlaków metabolizmu tlenowego, przekładał się bezpośrednio na asymilację tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym przez komórki. Na Rysunku 48 uwidoczniło się to jako stopniowe obniżanie wartości stężenia tlenu rozpuszczonego DO w cieczy, aż do całkowitego wyczerpania tlenu w pożywce, które zostało zaobserwowane około 3. dnia hodowli prowadzonej w referencyjnym, niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku, oraz 4. dnia w przypadku hodowli prowadzonej w prototypie Wariantu 3 zbiornika o zmodyfikowanej geometrii, a zatem o około 24 godziny później. Widoczne na Rysunku 48 skokowe zmiany wartości DO po 2 i 5 dobie hodowli są związane ze zwiększeniem intensywności oscylacyjnych wychyleń platformy bioreaktora, które zrealizowano zgodnie z harmonogramem zalecanym przez producenta bioreaktora (tj. zgodnie z [139]). W przypadku hodowli przeprowadzonej w prototypie polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3), stężenie DO przez pierwsze 12 godzin hodowli utrzymywało się na w przybliżeniu stałym poziomie około 80% maksymalnego nasycenia tlenem i malało wolniej niż w przypadku hodowli przeprowadzonej w referencyjnym, niezmodyfikowanym zbiorniku, podczas której silny spadek wartości DO rozpoczął się praktycznie natychmiast po rozpoczęciu bioprosesu.

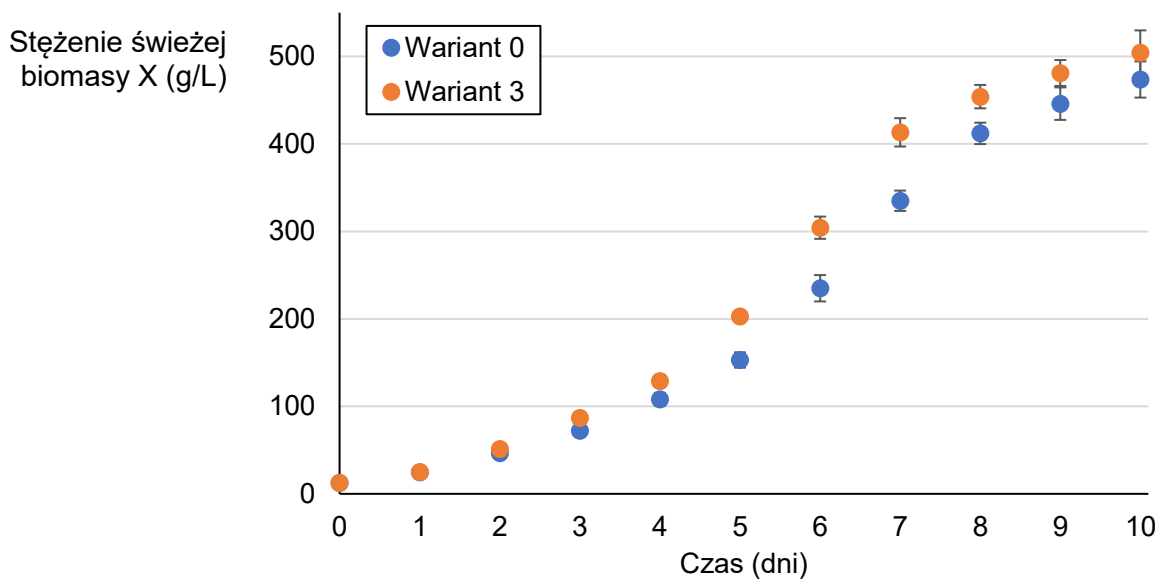
Istotną poprawą warunków prowadzenia procesu hodowli biomasy, wynikającą z wprowadzenia w Wariancie 3 wypustek modyfikujących geometrię polimerowego zbiornika, było spowolnienie tempa postępującego spadku stężenia DO, które oszacowano poprzez porównanie

wartości współczynników kierunkowych prostych wyznaczonych na podstawie linearyzacji wybranych odcinków wykresów, oznaczonych jako linie przerywane na Rysunku 48. W przypadku pierwszych 48 godzin hodowli, tempo spadku DO było około 10% niższe w prototypie polimerowego zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (tj. w Wariancie 3 modyfikacji), natomiast w okresie między 48 a 120 godziną hodowli w prototypie zmodyfikowanego zbiornika było około 20% niższe w porównaniu do hodowli przeprowadzonej w zbiorniku referencyjnym niezmodyfikowanym (Rysunek 49).



Rysunek 49. Powiększenie profili stężenia tlenu rozpuszczonego DO z pierwszych 4,5 dni hodowli przeprowadzonych w obu porównywanych polimerowych zbiornikach. Oznaczono wartości współczynników kierunkowych zlinearyzowanych fragmentów profili stężenia DO.

Kolejnym kryterium bioprocusowej walidacji aplikacyjności opracowanego prototypu polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) było porównanie stężenia biomasy w medium hodowlanym jako parametru ilościowo charakteryzującego proliferację komórek *N. tabacum* BY-2 podczas hodowli wglębnych przeprowadzonych w obu porównywanych polimerowych zbiornikach różniących się geometrią. Porównanie wartości stężenia komórek *N. tabacum* BY-2 w próbkach medium hodowlanego pobranych w tych samych momentach hodowli przeprowadzonych w polimerowym zbiorniku referencyjnym, czyli niezmodyfikowanym Cellbag™ 2 L oraz w prototypie polimerowego zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (tj. w Wariancie 3 modyfikacji), przedstawione zostało na Rysunku 50.



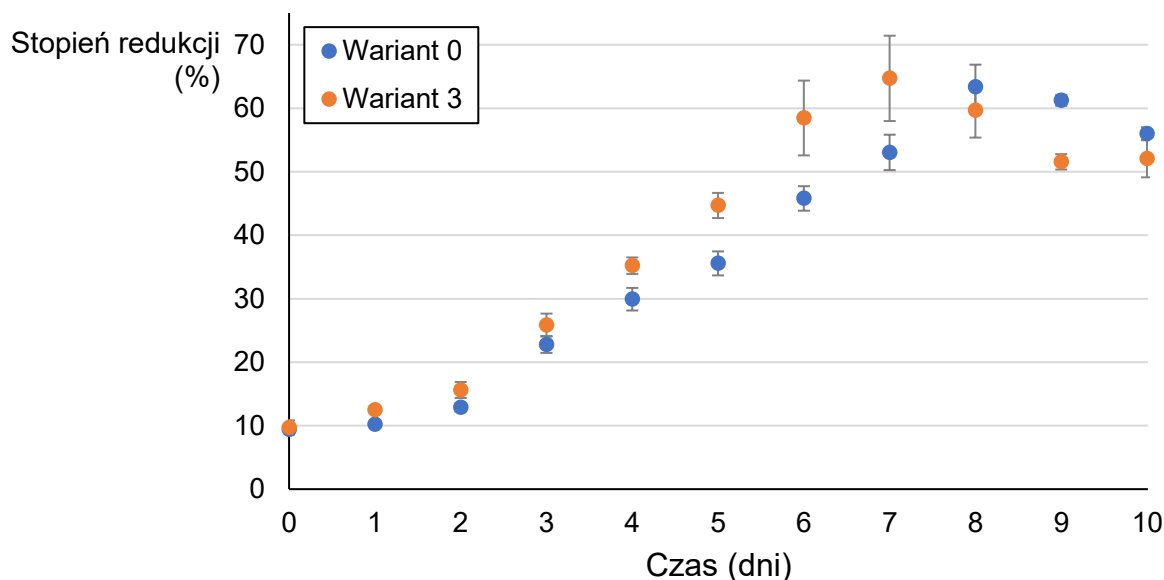
Rysunek 50. Wartości stężeń świeżej (mokrej) biomasy komórek *N. tabacum* BY-2 w kolejnych dniach hodowli wglębnych prowadzonych w porównywanych polimerowych zbiornikach: referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz prototypie zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (Wariant 3 modyfikacji)

Analizując przedstawione na Rysunku 50 profile stężenia biomasy proliferującej w porównywanych polimerowych zbiornikach różniących się geometrią, okazało się, że różnice w wartościach stężenia komórek w próbkach pobranych z hodowli zaczynają być zauważalne od trzeciej doby porównywanych hodowli. Po 72 godzinach hodowli zaobserwowano, że w prototypie zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) stężenie mokrej biomasy było wyraźnie wyższe niż w referencyjnym zbiorniku niepoddanym modyfikacji. W piątej, szóstej i siódmej dobie, wartości stężenia biomasy oznaczone w dwóch porównywanych układach hodowlanych różniły się w największym stopniu, to znaczy wartość stężenia komórek *N. tabacum* BY-2 w hodowli prowadzonej w prototypowym polimerowym naczyniu o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) była w tych dniach o około 28% wyższa w porównaniu do analogicznej wartości charakteryzującej proliferację biomasy w niezmodyfikowanym zbiorniku referencyjnym Cellbag™ 2 L. Najwyższe stężenia biomasy w przypadku obu porównywanych układów hodowlanych zaobserwowano w ostatnim, czyli 10. dniu hodowli, ale wartości odnoszące się do porównywanych zbiorników były wyraźnie różne. Wydajność końcowa biomasy (FW) uzyskana w trakcie hodowli przeprowadzonej w referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L wynosiła $473,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $504,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (FW) dla hodowli przeprowadzonej w prototypowym zbiorniku zmodyfikowanym Wariantem 3 geometrii, a zatem w polimerowym zbiorniku zmodyfikowanym wypustkami uległa zwiększeniu o około 6,5%.

Zauważone różnice w stężeniach biomasy wynikały prawdopodobnie z większej dostępności tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym osiągniętej dzięki zastosowaniu wypustek

modyfikujących geometrię Wariantu 3 prototypowego zmodyfikowanego polimerowego zbiornika. Możliwość zwiększenia stężenia tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym w trakcie bioprodukcji, bez zwiększania wartości parametrów operacyjnych determinujących intensywność mieszania typu *wave*, należy jednoznacznie uznać za zaletę istotną pod względem możliwości zapobiegania wystąpienia w fazie ciekłej nadmiernych naprężeń ścinających, zwiększających ryzyko zakłócenia lub zatrzymania prawidłowego wzrostu biomasy, a nawet lizy komórek. W trakcie przeprowadzonych badań, zwiększenie wartości parametrów operacyjnych mieszania typu *wave* na początku procesu ponad te określone harmonogramem zalecanym przez producenta bioreaktora *ReadyToProcess* WAVE™ 25 i określone w raporcie [139], skutkowało zmianą barwy medium hodowlanego, wynikającą z uszkodzenia znacznego odsetka komórek hodowanych włącznie w formie zawiesiny, i przekładało się na mniejszą końcową wydajność hodowli, pomimo zwiększenia spodziewanej wartości współczynnika $k_L a$.

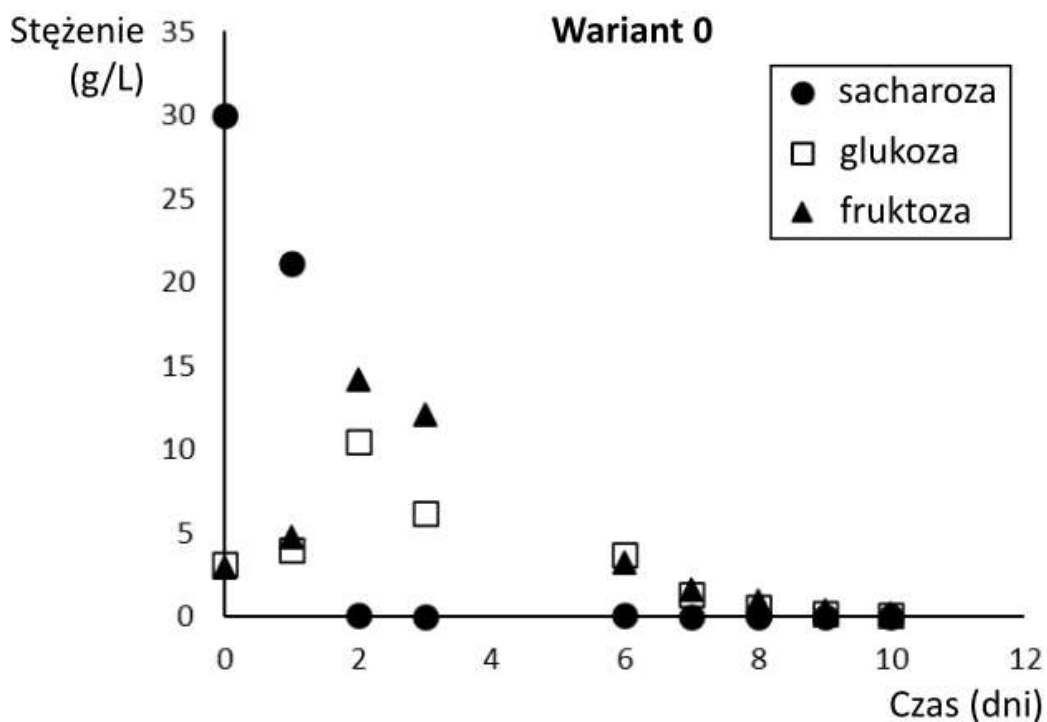
Kolejnym z kryteriów bioprodukcji walidacji opracowanego prototypu polimerowego zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (Wariant 3) było porównanie profili aktywności metabolicznej komórek niezależnie hodowanych w obu porównywanych polimerowych zbiornikach. Aktywność metaboliczna komórek została wyrażona ilościowo w stopniach redukcji odczynnika PrestoBlue, wyznaczonych zgodnie z metodyką przyjętą w Rozdziale 4.4 niniejszej rozprawy, a wyniki tych oznaczeń przedstawiono na Rysunku 51.



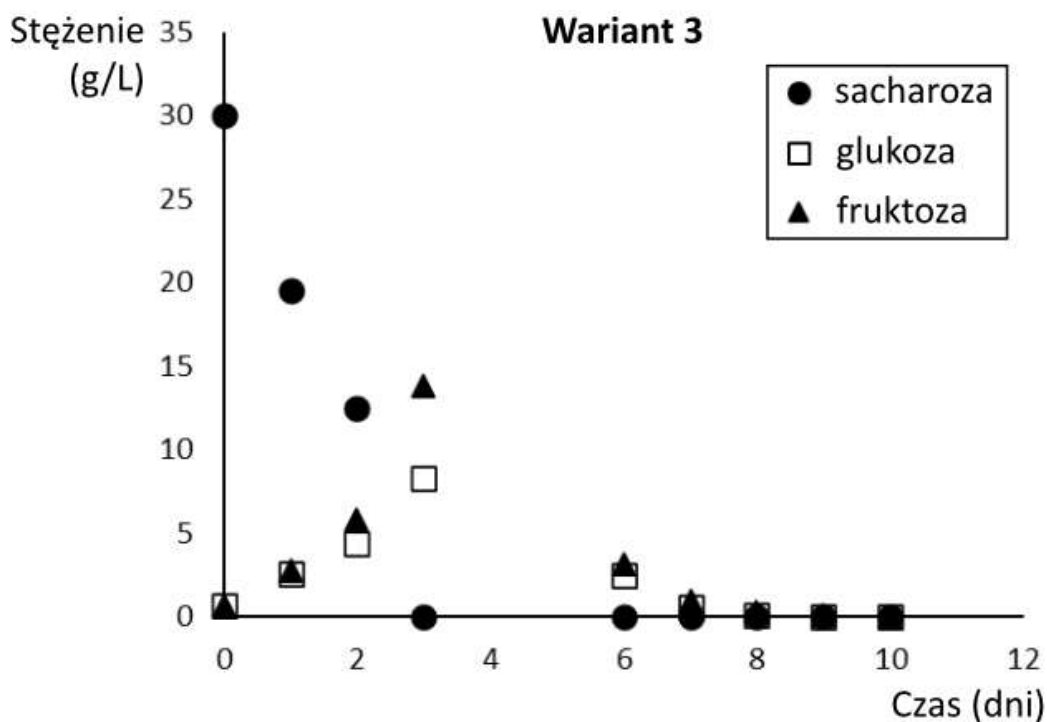
Rysunek 51. Wartości stopnia redukcji odczynnika PrestoBlue oznaczone w próbach zawiesin komórek *N. tabacum* BY-2 pobranych w kolejnych dniach hodowli włącznie przeprowadzonych w porównywanych polimerowych zbiornikach: referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz prototypie zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (Wariant 3).

Analizując przedstawione na Rysunku 51 profile stopni redukcji odczynnika PrestoBlue, ilościowo identyfikujące aktywność metaboliczną biomasy proliferującej w porównywanych polimerowych zbiornikach różniących się geometrią, okazało się, że najwyższy stopień redukcji odczynnika PrestoBlue (64,7%) zaobserwowano w siódmej dobie hodowli prowadzonej w prototypowym zbiorniku zmodyfikowanym wypustkami (Wariant 3). W przypadku hodowli prowadzonej w referencyjnym niezmodyfikowanym naczyniu Cellbag™ 2 L, najwyższa wartość stopienia redukcji odczynnika PrestoBlue była na zbliżonym poziomie (63,4%), ale wartość ta odnotowana została dla próby zawiesiny komórek pobranej w ósmej dobie tej hodowli. Okazało się również, że już po 24 godzinach hodowli stopień redukcji odczynnika PrestoBlue charakteryzujący biomasę inkubowaną w prototypowym zbiorniku o zmodyfikowanej geometrii osiągał wyższe wartości, niż analogiczne wartości charakteryzujące biomasę proliferującą w niezmodyfikowanym zbiorniku referencyjnym. Jednakże po 192 godzinach hodowli tendencja ta się odwróciła i wyższe wartości stopnia redukcji odczynnika PrestoBlue charakteryzowały biomasę w zbiorniku niezmodyfikowanym. Prawdopodobnie mogło to wynikać z tego, że komórki hodowlane z prototypowym zbiorniku o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) przez większość czasu hodowli wykazywały wyższą aktywność metaboliczną zapewnianą przez większą dostępność tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym, ale w końcowej fazie obu porównywanych hodowli, kiedy to stężenia biomasy komórek *N. tabacum* BY-2 osiągały najwyższe wartości, a stężenia tlenu rozpuszczonego DO w medium hodowlanym były bliskie wartości 0, to brak dostępności tlenu odpowiadał za szybsze obniżenie aktywności metabolicznej biomasy komórek roślinnych hodowanych w prototypowym zbiorniku o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3).

Ostatnim elementem dopełniającym kompleksowość poczynionej bioprocessowej walidacji aplikacyjności opracowanego prototypu polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) była ilościowa analiza stężenia cukrów w próbkach pobranych w kolejnych dniach hodowli prowadzonych w porównywanych polimerowych zbiornikach. Analiza dotyczyła ilościowego oznaczenia stężeń: sacharozy (disacharydu stanowiącego dla komórek *N. tabacum* BY-2 jedyne organiczne źródło węgla w zastosowanym medium hodowlanym w chwili inokulacji obu porównywanych układów hodowlanych) oraz monosacharydowych produktów jej hydrolizy, czyli glukozy i fruktozy, które nie były obecne w pożywce w momencie inokulacji porównywanych układów hodowlanych. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń cukrowców rozpuszczonych w medium hodowlanym w kolejnych dniach porównywanych hodowli zaprezentowane zostały na Rysunku 52 i Rysunku 53.



Rysunek 52. Profile stężeń cukrów, tj. sacharozy, glukozy i fruktozy, w medium hodowlanym w funkcji czasu hodowli *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonej w referencyjnym, niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L.



Rysunek 53. Profile stężeń cukrów, tj. sacharozy, glukozy i fruktozy, w medium hodowlanym w funkcji czasu hodowli *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonej w prototypowym polimerowym zbiorniku zmodyfikowanym wypustkami zmieniającymi jego geometrię (Wariant 3 modyfikacji).

Dane przedstawione na Rysunku 52 i Rysunku 53 pozwoliły porównać zmiany w profilach stężeń cukrowców w mediach hodowlanych, których próbki pobrano z porównywanych polimerowych zbiorników różniących się geometrią, w których niezależnie prowadzono hodowle. Zmiany stężeń sacharydowych składników medium hodowlanego mogą być interpretowane jako trendy wynikające z metabolizmu komórek *N. tabacum* BY-2.

Stężenie sacharozy, czyli jedyne cukru obecnego w medium hodowlanym w chwili inokulacji układów biomasą rozproszonych komórek roślinnych, spadało w wyniku stopniowej hydrolizy, przy jednoczesnym wzroście stężenia glukozy i fruktozy. W przypadku prowadzenia bioprocessu w referencyjnym, niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L, stężenie oznaczonego disacharydu spadało poniżej progu detekcji już w drugiej dobie hodowli, a w przypadku analogicznej hodowli prowadzonej w prototypowym polimerowym zbiorniku o zmodyfikowanej geometrii, cząsteczki sacharozy były dostępne dla komórek o około dobę dłużej. Wzrost stężenia glukozy i fruktozy w przypadku hodowli przeprowadzonej w zbiorniku referencyjnym miał miejsce do drugiego dnia hodowli, natomiast w przypadku hodowli przeprowadzonej w prototypowym zmodyfikowanym zbiorniku, stężenia oznaczanych monosacharydów przyrastały do trzeciego dnia hodowli. Analizując wartości stężeń monosacharydów rozpuszczonych w medium hodowlanym, zaobserwowano, że niezależnie od zbiornika, w którym hodowano komórki, maksymalne stężenie glukozy było wyraźnie niższe niż maksymalne stężenie fruktozy, co było prawdopodobnie związane z wystąpieniem preferencji substratowej – zjawiska udokumentowanego w przypadku hodowli *in vitro* biomasy roślinnej [141]. Okazało się, że w przypadku obu porównywanych hodowli, całkowita asymilacja cukrów przez proliferującą biomasę komórek *N. tabacum* BY-2, skutkująca wyczerpaniem się cząsteczek cukrowców w medium hodowlanym, następowała około ósmego dnia trwania procesu.

Maksymalne stężenie glukozy w próbkach pobranych z hodowli prowadzonej w prototypowym zmodyfikowanym zbiorniku osiągnęło wartość $8,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, a tym samym nie przekroczyło wartości $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ odnotowanej w przypadku hodowli w referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L. Obserwacja ta może wskazywać na wystąpienie zmian w szlakach metabolicznych komórek *N. tabacum* BY-2, których to szlaki tlenowego metabolizmu są uzależnione od dostępności tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym. Prawdopodobnym jest, że większa dostępność tlenu zapewniana w trakcie bioprocessu realizowanego w prototypowym polimerowym zbiorniku o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (Wariant 3) wpłynęła korzystnie na zwiększenie szybkości przemian metabolicznych zachodzących w komórkach prowadzących tlenowe przemiany biochemiczne, co świadczy o krytycznej roli odpowiedniego napowietrzania fazy ciekłej układu hodowlanego w przypadku prowadzenia hodowli wgłębnej zawiesiny komórek roślinnych [154].

6. Podsumowanie i wnioski końcowe

W rozprawie doktorskiej, której naukową podstawę stanowi merytorycznie i tematycznie spójny zestaw publikacji, przedstawiono wyniki badań dotyczących charakterystyki czasu mieszania bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, opracowania adaptacji metody kolorymetrycznej pomiaru czasu mieszania z komputerowym przetwarzaniem i analizą obrazu oraz opracowania i weryfikacji bioprocessowej aplikacyjności strukturalnych modyfikacji polimerowych zbiorników intensyfikujących wymianę masy i wydajność mieszania. Wyniki zrealizowanego zakresu badań, jak i sformułowane na ich podstawie wnioski, pozwoliły dowieść słuszności wszystkich postawionych w rozprawie tez, których uzasadnienie zostaje przedstawione poniżej.

Teza nr 1: „Możliwe jest zastosowanie metody kolorymetrycznej do efektywnego wyznaczenia ilościowej charakterystyki czasu mieszania w zależności od wartości parametrów operacyjnych bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*”.

W celu potwierdzenia słuszności tezy nr 1 opracowano szczegółową charakterystykę wydajności mieszania wewnątrz fazy wodnej poddawanej mieszaniu typu *wave* dla pełnego zakresu parametrów operacyjnych bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25* wyposażonego w polimerowe zbiorniki *Cellbag™* o pojemnościach nominalnych 2 L i 10 L. Charakterystykę opracowano przy zastosowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania z wykorzystaniem metod cyfrowego przetwarzania i analizy materiału filmowego. Materiał filmowy zgromadzono przy użyciu zaprojektowanego na potrzeby badań i wytworzonego przy zastosowaniu druku 3D statywu do montażu kamery cyfrowej nieruchomo względem oscylującej platformy bioreaktora, umożliwiając pozyskiwanie wysokiej jakości obrazu bez zakłóceń. Przetwarzanie i analiza obrazu odbywała się przy zastosowaniu autorskich algorytmów opracowanych w języku Python rozszerzonym o funkcjonalność biblioteki *OpenCV* oraz w języku środowiska *MATLAB*. Opracowaną adaptację metody kolorymetrycznej scharakteryzowano i zweryfikowano pod kątem powtarzalności pomiarów w porównaniu ze stosowaną na początkowym etapie badań metodą *pH*, uzyskując znacznie mniejsze wartości odchylenia standardowego oraz rozrzutu wyników serii pomiarów przeprowadzonych dla tych samych wartości parametrów operacyjnych bioreaktora. Procedurę pomiaru czasu mieszania dopracowano w oparciu o analizę wpływu stosunku molowego wykorzystywanych reagentów, stosunku objętości znacznika do objętości cieczy w zbiorniku oraz składu roztworu znacznika i fazy ciekłej w zbiorniku na wartości czasu mieszania i dokładność pomiarów. Rezultatem

przeprowadzonych badań było rozszerzenie zbioru dostępnych procedur laboratoryjnych do ilościowego określania wydajności mieszania w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*. Zastosowanie metody kolorymetrycznej pozwoliło na ograniczenie liczby eksperymentów koniecznych do przeprowadzenia w kolejnych etapach badań. Materiał filmowy zgromadzony na potrzeby wyznaczenia wartości czasu mieszania dodatkowo wykorzystano w celu pozyskania danych o kształcie falującej powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, a następnie klasyfikacji i jakościowego powiązania zaobserwowanych struktur z reżimem przepływu fazy ciekłej wewnątrz polimerowych zbiorników Cellbag™ 2 L i 10 L.

Teza nr 2: „Zastosowanie równań korelacyjnych ze współczynnikami, których wartości wyznaczono na podstawie danych eksperymentalnych, pozwala na przewidywanie wartości czasu mieszania w polimerowych zbiornikach w pełnym dostępnym zakresie parametrów operacyjnych bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* i porównywanie przewidywanej wydajności mieszania między polimerowymi zbiornikami o różnych objętościach nominalnych”.

W celu potwierdzenia słuszności tezy nr 2, na podstawie charakterystyk czasu mieszania w zbiornikach Cellbag™ 2 L i 10 L opracowanych z wykorzystaniem zebranych danych eksperymentalnych wyznaczono współczynniki równań korelacyjnych wiążących wartość czasu mieszania z wartościami trzech parametrów charakteryzujących pracę układu i posiadających istotny statystycznie wpływ na określaną ilościowo wydajność mieszania: amplitudą α i częstotliwością ω oscylacji platformy bioreaktora oraz stopniem napełnienia zbiornika fl . Równania korelacyjne, których zakres danych wejściowych obejmował pełen zbiór danych eksperymentalnych, umożliwiały szacowanie wartości czasu mieszania w pełnym dostępnym zakresie parametrów operacyjnych bioreaktora z mieszaniem typu *wave*, jednak pomimo wysokich wartości współczynników korelacji cechowały się niezadowalającą skutecznością, w szczególności w przypadku zakresu czasu mieszania o wartościach poniżej 100 sekund, najbardziej istotnego z punktu widzenia efektywnego prowadzenia hodowli biomasy. Obserwacje, które zinterpretowano jako odstające i wpływające negatywnie na jakość przewidywań, zgodnie z przeprowadzoną klasyfikacją przepływu falującej cieczy poddawanej mieszanemu typu *wave* przypisano do kategorii odpowiadających reżimowi laminarnemu. W celu zwiększenia jakości przewidywań we wspomnianym powyżej zakresie wartości czasu mieszania poniżej 100 sekund zaproponowano równania korelacyjne, w przypadku których zakres danych wejściowych nie obejmował obserwacji odstających. Osiągnięto znaczną poprawę dopasowania wartości przewidywanych do wartości eksperymentalnych, z błędem przewidywań zbliżonym do $\pm 25\%$. Równania korelacyjne, których współczynniki wyznaczono z wykorzystaniem

danych eksperymentalnych obejmujących wartości czasu mieszania poniżej 100 sekund, wykorzystano w celu wyznaczenia równania umożliwiającego szacowanie kombinacji wartości parametrów pracy bioreaktora, przy których stosunek szacowanych wartości czasu mieszania uzyskanych w zbiorniku o objętości 10 L i objętości 2 L przyjmuje wybraną dowolnie wartość. Przedstawiono wykres, którego krzywe odpowiadają kombinacjom parametrów operacyjnych pracy bioreaktora *ReadyToProcess WAVE™ 25*, dla których stosunek ten równy jest jedności, to znaczy wydajność mieszania w obu zbiornikach jest zbliżona. Zaproponowane równanie stanowi potencjalny punkt wyjścia do dalszych prac obejmujących poszerzenie zasobu danych doświadczalnych i proponowania kolejnych równań modelowych umożliwiających efektywną zmianę skali bioprocessów prowadzonych w bioreaktorach *single-use* z mieszaniem typu *wave*.

Teza nr 3: „Strukturalne modyfikacje zbiorników do hodowli komórek w układzie bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* mogą wpływać na skrócenie czasu mieszania fazy ciekłej oraz zwiększenie intensywności transportu masy przez powierzchnię międzyfazową bez eskalacji zjawisk negatywnie oddziałujących na hodowaną *in vitro* biomasę, a przez to intensyfikować hodowlę biomasy w tego typu urządzeniach”.

W celu potwierdzenia słuszności tezy nr 3 zrealizowano badania podzielone na trzy zasadnicze etapy. W pierwszym etapie przeprowadzono symulacje CFD przepływu wewnątrz fazy ciekłej poddawanej oscylacyjnym wychyleniom w polimerowym zbiorniku w referencyjnym wariantcie geometrii bez modyfikacji oraz w trzech wariantach geometrii zmodyfikowanymi względem wariantu referencyjnego poprzez umieszczenie wewnątrz zbiornika na dolnej powierzchni półkulistych wypustek w różnych konfiguracjach. Na podstawie wyników symulacji stwierdzono, że obecność wypustek wpływa na zmianę struktury przepływu fazy ciekłej w polimerowym zbiorniku poprzez zwiększenie burzliwości przepływu, zwiększenie maksymalnej prędkości przepływu fazy ciekłej oraz lokalną zmianę kierunku przepływu w okolicy wypustek. Dodatkowo, na podstawie analizy danych pozyskanych w obliczeniach stwierdzono, że wprowadzenie modyfikacji nie wiąże się z podwyższeniem maksymalnych wartości naprężeń ścinających w fazie ciekłej, co jest kluczowe z punktu widzenia zapobiegania niepożądanym efektom hydrodynamicznego stresu komórkowego. Spośród zaproponowanych trzech wariantów modyfikacji geometrii bioreaktora, do dalszych etapów badań wyselekcjonowano jeden wariant geometrii – Wariant 3 – w przypadku którego wartość czasu mieszania była najniższa, a tym samym, który to wariant najsilniej wpływał na zwiększenie wydajności mieszania w zbiorniku względem wariantu referencyjnego.

W drugim etapie badań zweryfikowano wpływ wybranego Wariantu 3 zmodyfikowanej geometrii poprzez pomiary czasu mieszania oraz współczynnika $k_L a$ w polimerowych zbiornikach o niezmodyfikowanej (referencyjnej) geometrii oraz prototypach zmodyfikowanych zbiorników wykonanych na potrzeby badań. Stwierdzono, że proponowana modyfikacja geometrii polimerowego zbiornika, czyli Wariant 3, cechuje się największym intensyfikującym wpływem na zwiększenie wydajności mieszania, powodując zmniejszenie wartości czasu mieszania w układzie średnio o około -30% . Wpływ wypustek umieszczonych zgodnie z geometrią Wariantu 3 na wartości współczynnika $k_L a$, a zatem na wydajność wnikania masy przez stale odnawianą powierzchnię międzyfazową gaz-ciecz, był największy w przypadku wariantów eksperymentalnych o częstotliwości oscylacji ω równej 2 min^{-1} oraz 20 min^{-1} , przy największym przyroście wartości $k_L a$, równym około 70% , odnotowanym przy kombinacji parametrów mieszania $\alpha = 12^\circ$ oraz $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$. Wnioskowano, że skuteczność intensyfikacji wydajności mieszania odnotowano w warunkach mieszania typu *wave* odpowiadającym zgodnie z przeprowadzoną klasyfikacją struktur powierzchni międzyfazowej do przejściowego reżimu przepływu fazy ciekłej.

Trzeci etap weryfikacji skuteczności wprowadzonej modyfikacji w intensyfikacji mieszania i wnikania masy w polimerowych zbiornikach CellbagTM polegał na bioprosesowej walidacji obejmującej zakresem porównanie wyników serii hodowli wgłębnych zawiesiny komórek *Nicotiana tabacum* linii BY-2. Na podstawie analizy przebiegu hodowli w zbiorniku referencyjnym (niezmodyfikowanym) oraz w prototypie polimerowego zbiornika o geometrii zmodyfikowanej zgodnie z założeniami Wariantu 3 stwierdzono, że zastosowanie półkulistych wypustek wpłynęło na przesunięcie maksimum aktywności metabolicznej o jeden dzień wcześniej, tj. z 8. na 7. dzień hodowli względem hodowli referencyjnej. Wydajność końcowa biomasy (FW) uzyskana w zbiorniku zmodyfikowanym Wariantem 3 geometrii uległa zwiększeniu o około $6,5\%$ względem hodowli referencyjnej. Zaobserwowano także spowolnienie tempa spadku stężenia tlenu rozpuszczonego w medium hodowlanym w początkowych 4 dniach hodowli i przedłużenie dostępności tlenu rozpuszczonego o około jeden dzień, tj. z 3 dni w przypadku hodowli referencyjnej do 4 dni w przypadku hodowli w zmodyfikowanym zbiorniku. Stwierdzono zmiany w rozkładzie stężenia cukrowców w medium hodowlanym w kolejnych dniach hodowli, które przejawiały się m.in. zaobserwowaniem preferencji substratowej wobec glukozy względem sacharozy w hodowli zrealizowanej w zmodyfikowanym polimerowym zbiorniku, co mogło świadczyć o wystąpieniu zmian w szlakach metabolicznych komórek *N. tabacum* BY-2 wywołanych prawdopodobnie większą dostępnością tlenu zapewnianą w trakcie hodowli. Opisane wyżej obserwacje świadczą o pozytywnym wpływie wprowadzonej

modyfikacji na przebieg hodowli oraz proliferację biomasy w medium hodowlanym poddawany oscylacyjnym wychyleniom w prototypowym zbiorniku zmodyfikowanym poprzez umieszczenie wypustek.

Podsumowując całość rozprawy doktorskiej, za najważniejsze osiągnięcia naukowe przedstawione w monotematycznym zestawie publikacji, stanowiącym jej integralną część, należy uznać:

- zidentyfikowanie wpływu parametrów operacyjnych bioreaktora WAVE™ 25 na wartości czasu mieszania i określenie ich istotności statystycznej zgodnie z metodyką DoE,
- opracowanie szeregu korelacji umożliwiających szacowanie wartości czasu mieszania w funkcji parametrów operacyjnych bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* w pełnym dostępnym zakresie tych parametrów,
- zaproponowanie równania umożliwiającego szacowanie kombinacji wartości parametrów operacyjnych bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*, przy których wartość czasu mieszania w polimerowych zbiornikach o pojemnościach 2 L i 10 L jest zbliżona,
- określenie wpływu wybranych właściwości fazy ciekłej, w tym obecności środka przeciwpiennego oraz lepkości, na wartości współczynnika $k_L a$ osiągnane w polimerowym zbiorniku bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave*,
- opracowanie autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej z komputerowym przetwarzaniem i analizą obrazu do pomiaru czasu mieszania w bioreaktorze *single-use* z mieszaniem typu *wave*,
- jakościowe powiązanie kształtu falującej powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz z reżimem przepływu w fazie ciekłej poddawanej mieszaniu typu *wave*,
- opracowanie prototypu polimerowych zbiorników *single-use* poddanych strukturalnej modyfikacji intensyfikującej mieszanie typu *wave* oraz wnikanie masy w układzie, oraz przeprowadzenie bioprosesowej weryfikacji wpływu modyfikacji polimerowego zbiornika na przebieg hodowli wgłębnej biomasy zawiesiny komórek roślinnych *N. tabacum* linii BY-2.

7. Bibliografia

- [1] V. Jossen, R. Eibl, i D. Eibl, „Single-Use Bioreactors – An Overview”, w *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 2. wyd., R. Eibl i D. Eibl, Red., John Wiley & Sons, Ltd, 2019, s. 37–52. doi: 10.1002/9781119477891.ch4.
- [2] V. Singh, „Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation”, *Cytotechnology*, t. 30, nr 1/3, s. 149–158, 1999, doi: 10.1023/A:1008025016272.
- [3] M. Pilarek, P. Sobieszuk, K. Wierzchowski, i K. Dąbkowska, „Impact of operating parameters on values of a volumetric mass transfer coefficient in a single-use bioreactor with wave-induced agitation”, *Chemical Engineering Research and Design*, t. 136, s. 1–10, sie. 2018, doi: 10.1016/j.cherd.2018.04.012.
- [4] S. Werner *i in.*, „Innovative, Non-stirred Bioreactors in Scales from Milliliters up to 1000 Liters for Suspension Cultures of Cells using Disposable Bags and Containers – A Swiss Contribution”, *CHIMIA*, t. 64, nr 11, Art. nr 11, lis. 2010, doi: 10.2533/chimia.2010.819.
- [5] C. Löffelholz *i in.*, „Bioengineering Parameters for Single-Use Bioreactors: Overview and Evaluation of Suitable Methods”, *Chemie Ingenieur Technik*, t. 85, nr 1–2, s. 40–56, luty 2013, doi: 10.1002/cite.201200125.
- [6] K. Wierzchowski i M. Pilarek, „Disposable rocking bioreactors: recent applications and progressive perspectives”, *Trends in Biotechnology*, t. 42, nr 3, s. 261–264, mar. 2024, doi: 10.1016/j.tibtech.2023.09.003.
- [7] T. Kheirkhah, P. Neubauer, i S. Junne, „Controlling *Aspergillus niger* morphology in a low shear-force environment in a rocking-motion bioreactor”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 195, s. 108905, cze. 2023, doi: 10.1016/j.bej.2023.108905.
- [8] K. Wierzchowski, A. Kuźmińska, i M. Pilarek, „Intensification of chondrocytes proliferation by microcarriers and wave-induced mixing: Reynolds number influence on CP5 cells growth”, *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, t. 166, s. 108472, wrz. 2021, doi: 10.1016/j.cep.2021.108472.
- [9] S. Junne i P. Neubauer, „How scalable and suitable are single-use bioreactors?”, *Current Opinion in Biotechnology*, t. 53, s. 240–247, paź. 2018, doi: 10.1016/j.cop-bio.2018.04.003.
- [10] C. A. Challener, „Single-use Bioreactors Have Reached the Big Time”, *BioPharm International*, t. 30, nr 3, Art. nr 3, 2017.

- [11] B. M. Davis, E. R. Loghin, K. R. Conway, i X. Zhang, „Automated Closed-System Expansion of Pluripotent Stem Cell Aggregates in a Rocking-Motion Bioreactor”, *SLAS Technology*, t. 23, nr 4, s. 364–373, sie. 2018, doi: 10.1177/2472630318760745.
- [12] T. A. Smith, „CAR-T Cell Expansion in a Xuri Cell Expansion System W25”, w *Chimeric Antigen Receptor T Cells*, t. 2086, K. Swiech, K. C. R. Malmegrim, i V. Picanço-Castro, Red., w *Methods in Molecular Biology*, vol. 2086. , New York, NY: Springer US, 2020, s. 151–163. doi: 10.1007/978-1-0716-0146-4_11.
- [13] A. Napoleone *i in.*, „Fed-batch production assessment of a tetravalent bispecific antibody: A case study on piggyBac stably transfected HEK293 cells”, *New Biotechnology*, t. 65, s. 9–19, lis. 2021, doi: 10.1016/j.nbt.2021.07.002.
- [14] H. Niederkrüger, A. Busch, P. Dabrowska-Schlepp, N. Krieghoff, A. Schaaf, i T. Frischmuth, „Single-Use Processing as a Safe and Convenient Way to Develop and Manufacture Moss-Derived Biopharmaceuticals”, w *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1. wyd., R. Eibl i D. Eibl, Red., Wiley, 2019, s. 311–318. doi: 10.1002/9781119477891.ch28.
- [15] A. Mehring, J. Haffelder, J. Chodorski, J. Stiefelmaier, D. Strieth, i R. Ulber, „Establishment and triterpenoid production of *Ocimum basilicum* cambial meristematic cells”, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, t. 143, nr 3, s. 573–581, grudz. 2020, doi: 10.1007/s11240-020-01942-y.
- [16] F. Hillig, N. Porscha, S. Junne, i P. Neubauer, „Growth and docosahexaenoic acid production performance of the heterotrophic marine microalgae *Cryptocodinium cohnii* in the wave-mixed single-use reactor CELL -tainer”, *Engineering in Life Sciences*, t. 14, nr 3, s. 254–263, maj 2014, doi: 10.1002/elsc.201400010.
- [17] M. D. Gupta *i in.*, „Scaling eukaryotic cell-free protein synthesis achieved with the versatile and high-yielding tobacco BY-2 cell lysate”, *Biotech & Bioengineering*, t. 120, nr 10, s. 2890–2906, paź. 2023, doi: 10.1002/bit.28461.
- [18] D. Gómez-Ríos, S. Junne, P. Neubauer, S. Ochoa, R. Ríos-Esteba, i H. Ramírez-Malule, „Characterization of the Metabolic Response of *Streptomyces clavuligerus* to Shear Stress in Stirred Tanks and Single-Use 2D Rocking Motion Bioreactors for Clavulanic Acid Production”, *Antibiotics*, t. 8, nr 4, s. 168, wrz. 2019, doi: 10.3390/antibiotics8040168.
- [19] A. Ghasemi, A. Bozorg, F. Rahmati, R. Mirhassani, i S. Hosseininasab, „Comprehensive study on Wave bioreactor system to scale up the cultivation of and recombinant protein

- expression in baculovirus-infected insect cells”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 143, s. 121–130, mar. 2019, doi: 10.1016/j.bej.2018.12.011.
- [20] R. Eibl, S. Werner, i D. Eibl, „Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications”, w *Disposable Bioreactors*, t. 115, R. Eibl i D. Eibl, Red., w *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol. 115. , Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 55–87. doi: 10.1007/10_2008_15.
- [21] R. Eibl, S. Werner, i D. Eibl, „Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale”, *Eng. Life Sci.*, t. 9, nr 3, s. 156–164, cze. 2009, doi: 10.1002/elsc.200800102.
- [22] E. A. Falch i C. -G. Hedén, „Disposable shaker flasks”, *Biotech & Bioengineering*, t. 5, nr 3, s. 211–220, wrz. 1963, doi: 10.1002/bit.260050306.
- [23] M. Ziv, G. Ronen, i M. Raviv, „Proliferation of meristematic clusters in disposable pre-sterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants”, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, t. 34, nr 2, s. 152–158, kwi. 1998, doi: 10.1007/BF02822781.
- [24] H. Fukui i M. Tanaka, „An envelope-shaped film culture vessel for plant cell suspension cultures and metabolite production without agitation”, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, t. 41, nr 1, s. 17–21, kwi. 1995, doi: 10.1007/BF00124082.
- [25] M. Tanaka, „Disposable Film Culture Vessels”, w *High-Tech and Micropropagation I*, t. 17, Y. P. S. Bajaj, Red., w *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 17. , Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1991, s. 212–228. doi: 10.1007/978-3-642-76415-8_13.
- [26] R. Eibl i D. Eibl, Red., *Disposable Bioreactors*. w *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. doi: 10.1007/978-3-642-01872-5.
- [27] Cytiva, „Disposable Cellbag™ bioreactors for WAVE Bioreactor™ systems data file”. 2021.
- [28] S. Vanhamel i C. Masy, „Production of Disposable Bags: A Manufacturer’s Report”, w *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, R. Eibl i D. Eibl, Red., Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011, s. 113–134. doi: 10.1002/9780470909997.ch10.
- [29] M. Barbaroux i A. Sette, „Properties of Materials Used in Single-Use Flexible Containers: Requirements and Analysis”, *BioPharm International*, t. 19, nr 6, 2006.
- [30] T. K. Goswami i S. Mangaraj, „Advances in polymeric materials for modified atmosphere packaging (MAP)”, w *Multifunctional and Nanoreinforced Polymers for Food Packaging*, Elsevier, 2011, s. 163–242. doi: 10.1533/9780857092786.1.163.

- [31] S. C. Kaiser, C. Löffelholz, S. Werner, i D. Eibl, „CFD for Characterizing Standard and Single-use Stirred Cell Culture Bioreactors”, w *Computational Fluid Dynamics Technologies and Applications*, O. Minin, Red., InTech, 2011. doi: 10.5772/23496.
- [32] P. Xu *i in.*, „Characterization of TAP Ambr 250 disposable bioreactors, as a reliable scale-down model for biologics process development”, *Biotechnology Progress*, t. 33, nr 2, s. 478–489, mar. 2017, doi: 10.1002/btpr.2417.
- [33] S. Werner, M. Kraume, i D. Eibl, „Mixing Systems for Single-Use”, w *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1. wyd., R. Eibl i D. Eibl, Red., Wiley, 2019, s. 25–35. doi: 10.1002/9781119477891.ch3.
- [34] S. C. Kaiser, R. Eibl, i D. Eibl, „Engineering characteristics of a single-use stirred bioreactor at bench-scale: The Mobius CellReady 3L bioreactor as a case study”, *Eng. Life Sci.*, t. 11, nr 4, Art. nr 4, sie. 2011, doi: 10.1002/elsc.201000171.
- [35] A. Baccante *i in.*, „Optimization of a Bacterial Cultivation Medium via a Design-of-Experiment Approach in a Sartorius Ambr® 15 Fermentation Microbioreactor System”, *Fermentation*, t. 9, nr 12, s. 1002, lis. 2023, doi: 10.3390/fermentation9121002.
- [36] V. Jossen, R. Eibl, G. Broccard, i D. Eibl, „Single-Use Systems in Biopharmaceutical Manufacture: State of the Art and Recent Trends”, w *Biopharmaceutical Manufacturing*, t. 11, R. Pörtner, Red., w Cell Engineering, vol. 11. , Cham: Springer International Publishing, 2023, s. 3–38. doi: 10.1007/978-3-031-45669-5_1.
- [37] L. Fernandez-Cerezo, M. K. Wismer, I. Han, i J. M. Pollard, „High throughput screening of ultrafiltration and diafiltration processing of monoclonal antibodies via the ambr® crossflow system”, *Biotechnology Progress*, t. 36, nr 2, s. e2929, mar. 2020, doi: 10.1002/btpr.2929.
- [38] N. Sutherland, L. Chan, K. Kral, i F. Bollmann, „Evaluation of a microbioreactor system as a screening tool for optimizing lentiviral vector process development in suspension culture”, *Cell Gene Therapy Insights*, t. 7, nr 9, s. 1037–1046, wrz. 2021, doi: 10.18609/cgti.2021.136.
- [39] M. T. Smith, L. M. Larsen, K. M. Mullen, i J. Johnson, „Updating the Economics of Biologics Manufacturing with 5,000-L Single-Use Bioreactors”, *BioProcess International*, t. 18, nr 10, 2020.
- [40] M. Reclari, „Hydrodynamics of orbital shaken bioreactors”, Rozprawa doktorska, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2013.
- [41] A. Ducci i W. H. Weheliye, „Orbitally shaken bioreactors-viscosity effects on flow characteristics”, *AIChE J.*, t. 60, nr 11, s. 3951–3968, lis. 2014, doi: 10.1002/aic.14608.

- [42] S. Tissot *i in.*, „Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 52, nr 2–3, Art. nr 2–3, lis. 2010, doi: 10.1016/j.bej.2010.08.005.
- [43] W. Klöckner *i in.*, „Correlation between mass transfer coefficient $k_L a$ and relevant operating parameters in cylindrical disposable shaken bioreactors on a bench-to-pilot scale”, *J Biol Eng*, t. 7, nr 1, Art. nr 1, 2013, doi: 10.1186/1754-1611-7-28.
- [44] X. Zhang *i in.*, „Shaken helical track bioreactors: Providing oxygen to high-density cultures of mammalian cells at volumes up to 1000 L by surface aeration with air”, *New Biotechnology*, t. 25, nr 1, s. 68–75, cze. 2008, doi: 10.1016/j.nbt.2008.03.001.
- [45] S. C. Kaiser, M. Kraume, i D. Eibl, „Development of the Travelling Wave Bioreactor. Part I: Design Studies Based on Numerical Models”, *Chemie Ingenieur Technik*, t. 88, nr 1–2, s. 77–85, luty 2016, doi: 10.1002/cite.201500092.
- [46] S. C. Kaiser, N. Perepelitsa, M. Kraume, i D. Eibl, „Development of the Travelling Wave Bioreactor. Part II: Engineering Characteristics and Cultivation Results”, *Chemie Ingenieur Technik*, t. 88, nr 1–2, s. 86–92, luty 2016, doi: 10.1002/cite.201500091.
- [47] M. Su, Y. Ou, J. Fu, K. Huang, J. Lei, i L. Zhu, „Developing an orbitally shaken bioreactor featuring a square vessel wall with a large circular chamfer”, *Journal of Biotechnology*, t. 392, s. 69–77, wrz. 2024, doi: 10.1016/j.jbiotec.2024.06.014.
- [48] Y. Bai, M. Moo-Young, i W. A. Anderson, „Characterization of power input and its impact on mass transfer in a rocking disposable bioreactor”, *Chemical Engineering Science*, t. 209, s. 115183, grudz. 2019, doi: 10.1016/j.ces.2019.115183.
- [49] D. T. J. Marsh, G. J. Lye, M. Micheletti, A. O. O. Odeleye, A. Ducci, i M. D. Osborne, „Fluid dynamic characterization of a laboratory scale rocked bag bioreactor”, *AIChE J.*, t. 63, nr 9, s. 4177–4187, wrz. 2017, doi: 10.1002/aic.15734.
- [50] J. J. Samaras, M. Micheletti, i W. Ding, „Transformation of Biopharmaceutical Manufacturing Through Single-Use Technologies: Current State, Remaining Challenges, and Future Development”, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, t. 13, nr 1, s. 73–97, cze. 2022, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-092220-030223.
- [51] WuXi Biologics, „The World’s Largest 36,000L Biomanufacturing Line Using Single-use Bioreactors Launches GMP Operation at WuXi Biologics”. Dostęp: 5 grudzień 2024. [Online]. Dostępne na: <https://www.wuxibiologics.com/the-worlds-largest-36000l-biomanufacturing-line-using-single-use-bioreactors-launches-gmp-operation-at-wuxi-biologics/>

- [52] G. T. Frank, „Transformation of biomanufacturing by single-use systems and technology”, *Current Opinion in Chemical Engineering*, t. 22, s. 62–70, grudz. 2018, doi: 10.1016/j.coche.2018.09.006.
- [53] M. S. Croughan, D. Giroux, D. Fang, i B. Lee, „Novel Single-Use Bioreactors for Scale-Up of Anchorage-Dependent Cell Manufacturing for Cell Therapies”, w *Stem Cell Manufacturing*, Elsevier, 2016, s. 105–139. doi: 10.1016/B978-0-444-63265-4.00005-4.
- [54] D. Karussis, „Multiple Sclerosis”, w *International Encyclopedia of Public Health*, Elsevier, 2017, s. 145–179. doi: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00295-2.
- [55] R. Ettari, „Cysteine Proteases as Validated Targets for the Treatment of Neglected and Poverty-Related Parasitic Diseases”, *IJMS*, t. 24, nr 12, s. 10097, cze. 2023, doi: 10.3390/ijms241210097.
- [56] D. Kashyap *i in.*, „Outer Membrane Vesicles: An Emerging Vaccine Platform”, *Vaccines*, t. 10, nr 10, s. 1578, wrz. 2022, doi: 10.3390/vaccines10101578.
- [57] T. Koch *i in.*, „Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial”, *The Lancet Infectious Diseases*, t. 20, nr 7, s. 827–838, lip. 2020, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30248-6.
- [58] W. Walther i U. Stein, „Viral Vectors for Gene Transfer: A Review of Their Use in the Treatment of Human Diseases”, *Drugs*, t. 60, nr 2, s. 249–271, sie. 2000, doi: 10.2165/00003495-200060020-00002.
- [59] I. Labarta, S. Hoffman, i A. Simpkins, „Manufacturing Strategy for the Production of 200 Million Sterile Doses of an mRNA Vaccine for COVID-19”, University of Pennsylvania, Philadelphia, United States, kwi. 2021.
- [60] R. Castro *i in.*, „Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: Impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance”, *Biotech & Bioengineering*, t. 118, nr 6, s. 2202–2219, cze. 2021, doi: 10.1002/bit.27725.
- [61] D. Kashyap, A. Sharma, H. S. Tuli, S. Punia, i A. K. Sharma, „Ursolic Acid and Oleanolic Acid: Pentacyclic Terpenoids with Promising Anti-Inflammatory Activities”, *IAD*, t. 10, nr 1, s. 21–33, wrz. 2016, doi: 10.2174/1872213X10666160711143904.
- [62] Q. Guo, J. He, H. Zhang, L. Yao, i H. Li, „Oleanolic acid alleviates oxidative stress in Alzheimer’s disease by regulating stanniocalcin-1 and uncoupling protein-2 signalling”, *Clin Exp Pharma Physio*, t. 47, nr 7, s. 1263–1271, lip. 2020, doi: 10.1111/1440-1681.13292.

- [63] G. A. Gutiérrez-Rebolledo, A. G. Siordia-Reyes, M. Meckes-Fischer, i A. Jiménez-Arellanes, „Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage”, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, t. 9, nr 7, s. 644–651, lip. 2016, doi: 10.1016/j.apjtm.2016.05.015.
- [64] R.-M. Lu *i in.*, „Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases”, *J Biomed Sci*, t. 27, nr 1, s. 1, grudz. 2020, doi: 10.1186/s12929-019-0592-z.
- [65] B. Minow *i in.*, „Biological performance of two different 1000 L single-use bioreactors applying a simple transfer approach”, *Eng. Life Sci.*, t. 14, nr 3, s. 283–291, maj 2014, doi: 10.1002/elsc.201300147.
- [66] T. A. Grein *i in.*, „Multiphase mixing characteristics in a microcarrier-based stirred tank bioreactor suitable for human mesenchymal stem cell expansion”, *Process Biochemistry*, t. 51, nr 9, s. 1109–1119, wrz. 2016, doi: 10.1016/j.procbio.2016.05.010.
- [67] A. W. Nienow *i in.*, „Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 108, s. 24–29, kwi. 2016, doi: 10.1016/j.bej.2015.08.003.
- [68] B. Abecasis *i in.*, „Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: Bioprocess intensification and scaling-up approaches”, *Journal of Biotechnology*, t. 246, s. 81–93, mar. 2017, doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.004.
- [69] M. Manahan, M. Nelson, J. J. Cacciatore, J. Weng, S. Xu, i J. Pollard, „Scale-down model qualification of ambr® 250 high-throughput mini-bioreactor system for two commercial-scale mAb processes”, *Biotechnology Progress*, t. 35, nr 6, s. e2870, lis. 2019, doi: 10.1002/btpr.2870.
- [70] C. Schirmer, J. Müller, N. Steffen, S. Werner, R. Eibl, i D. Eibl, „How to Produce mAbs in a Cube-Shaped Stirred Single-Use Bioreactor at 200 L Scale”, w *Animal Cell Biotechnology*, t. 2095, R. Pörtner, Red., w *Methods in Molecular Biology*, vol. 2095., New York, NY: Springer US, 2020, s. 169–186. doi: 10.1007/978-1-0716-0191-4_10.
- [71] W. Soerjawanata *i in.*, „Applicability of a single-use bioreactor compared to a glass bioreactor for the fermentation of filamentous fungi and evaluation of the reproducibility of growth in pellet form”, *Engineering in Life Sciences*, t. 21, nr 5, s. 324–339, maj 2021, doi: 10.1002/elsc.202000069.
- [72] A. Thompson i S. Rutter, „Study of a Single-Use Stirred Tank Bioreactor for Manufacturing a Therapeutic Protein in a High Cell Density Microbial Fermentation”, *BPJ*, t. 20, 2021, doi: 10.12665/J200A.Thompson.

- [73] R. W. Nurhayati, Y. Ojima, T. Dohda, i M. Kino-Oka, „Large-scale culture of a megakaryocytic progenitor cell line with a single-use bioreactor system”, *Biotechnology Progress*, t. 34, nr 2, s. 362–369, mar. 2018, doi: 10.1002/btpr.2595.
- [74] T. Bürgin *i in.*, „Orbitally Shaken Single-Use Bioreactor for Animal Cell Cultivation: Fed-Batch and Perfusion Mode”, w *Animal Cell Biotechnology*, t. 2095, R. Pörtner, Red., w *Methods in Molecular Biology*, vol. 2095. , New York, NY: Springer US, 2020, s. 105–123. doi: 10.1007/978-1-0716-0191-4_7.
- [75] J. Coronel *i in.*, „Influenza A virus production in a single-use orbital shaken bioreactor with ATF or TFF perfusion systems”, *Vaccine*, t. 37, nr 47, s. 7011–7018, lis. 2019, doi: 10.1016/j.vaccine.2019.06.005.
- [76] G. Gränicher, F. Tapia, I. Behrendt, I. Jordan, Y. Genzel, i U. Reichl, „Production of Modified Vaccinia Ankara Virus by Intensified Cell Cultures: A Comparison of Platform Technologies for Viral Vector Production”, *Biotechnology Journal*, t. 16, nr 1, s. 2000024, sty. 2021, doi: 10.1002/biot.202000024.
- [77] A. Valdiani, O. K. Hansen, V. K. Johannsen, i U. B. Nielsen, „An efficient bioreactor platform for scaling up the proliferation of Nordmann fir’s (*Abies nordmanniana*) somatic embryos”, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, t. 17, nr 3, s. 1425–1438, mar. 2020, doi: 10.1007/s13762-019-02556-4.
- [78] J.-M. Schlaeppi *i in.*, „A semi-automated large-scale process for the production of recombinant tagged proteins in the Baculovirus expression system”, *Protein Expression and Purification*, t. 50, nr 2, s. 185–195, grudz. 2006, doi: 10.1016/j.pep.2006.06.021.
- [79] M. Ottinger, I. Wenk, J. Carvalho Pereira, G. John, i S. Junne, „Single-Use Technology in the Biopharmaceutical Industry and Sustainability: A Contradiction?”, *Chemie Ingenieur Technik*, t. 94, nr 12, s. 1883–1891, grudz. 2022, doi: 10.1002/cite.202200105.
- [80] W. G. Whitford, M. A. Petrich, i W. P. Flanagan, „Environmental Impacts of Single-Use Systems”, w *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1. wyd., R. Eibl i D. Eibl, Red., Wiley, 2019, s. 169–179. doi: 10.1002/9781119477891.ch13.
- [81] M. Barbaroux, A. Rosskamp, J. Dippel, A. Rees-Manley, B. Garska, i R. Tosato, „Concept for recycling a small-scale plastic-based bioreactor in a close-loop – Technical approach”, *Journal of Cleaner Production*, t. 471, s. 143436, wrz. 2024, doi: 10.1016/j.jclepro.2024.143436.
- [82] H. Pora i B. Rawlings, „Managing solid waste from single-use systems in biopharmaceutical manufacturing”, *BioProcess Int*, t. 01, 2009.

- [83] R. A. Rader i E. S. Langer, „Single-Use Technologies in Biopharmaceutical Manufacturing: A 10-Year Review of Trends and the Future”, w *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1. wyd., R. Eibl i D. Eibl, Red., Wiley, 2019, s. 193–200. doi: 10.1002/9781119477891.ch15.
- [84] D. R. Schmidhalter, A. C. Schmidt, S. Beck, i S. A. Morgenstern-Egli, „A Strategic Approach to the Management of Single-Use Technology”, *Chemie Ingenieur Technik*, t. 94, nr 12, s. 1902–1913, grudz. 2022, doi: 10.1002/cite.202200146.
- [85] Z. El Makhzoumi, „Effect of irradiation of polymeric packaging material on the formation of volatile compounds”, w *Food Packaging and Preservation*, M. Mathlouthi, Red., Boston, MA: Springer US, 1994, s. 88–99. doi: 10.1007/978-1-4615-2173-0_5.
- [86] M. Hammond *i in.*, „A cytotoxic leachable compound from single-use bioprocess equipment that causes poor cell growth performance”, *Biotechnology Progress*, t. 30, nr 2, s. 332–337, mar. 2014, doi: 10.1002/btpr.1869.
- [87] D. Budde *i in.*, „Identification and evaluation of cell- growth-inhibiting bDtBPP-analogue degradation products from phosphite antioxidants used in polyolefin bioprocessing materials”, *Anal Bioanal Chem*, t. 412, nr 19, s. 4505–4518, lip. 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02736-z.
- [88] E. Jurkiewicz, U. Husemann, G. Greller, M. Barbaroux, i C. Fenge, „Verification of a new biocompatible single-use film formulation with optimized additive content for multiple bioprocess applications”, *Biotechnology Progress*, t. 30, nr 5, s. 1171–1176, wrz. 2014, doi: 10.1002/btpr.1934.
- [89] W. Ding, G. Madsen, E. Mahajan, S. O’Connor, i K. Wong, „Standardized Extractables Testing Protocol for Single-Use Systems in Biomanufacturing”, *Pharmaceutical Engineering*, t. 34, nr 6, s. 74–84, 2014.
- [90] P. M. Doran, „Fluid Flow and Mixing”, w *Bioprocess Engineering Principles*, Elsevier, 1995, s. 129–163. doi: 10.1016/B978-012220855-3/50007-9.
- [91] S.-O. Enfors *i in.*, „Physiological responses to mixing in large scale bioreactors”, *Journal of Biotechnology*, t. 85, nr 2, s. 175–185, luty 2001, doi: 10.1016/S0168-1656(00)00365-5.
- [92] A. P. J. Sweere, K. Ch. A. M. Luyben, i N. W. F. Kossen, „Regime analysis and scale-down: Tools to investigate the performance of bioreactors”, *Enzyme and Microbial Technology*, t. 9, nr 7, s. 386–398, lip. 1987, doi: 10.1016/0141-0229(87)90133-5.

- [93] G. Nadal-Rey, D. D. McClure, J. M. Kavanagh, S. Cornelissen, D. F. Fletcher, i K. V. Gernaey, „Understanding gradients in industrial bioreactors”, *Biotechnology Advances*, t. 46, s. 107660, sty. 2021, doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107660.
- [94] N. M. G. Oosterhuis, „Scale-up of bioreactors. A scale-down approach”, Rozprawa doktorska, Delft University of Technology, Delft, 1984. Dostęp: 19 grudzień 2024. [Online]. Dostępne na: <https://resolver.tudelft.nl/uuid:03a887b7-8c20-4052-8d6b-7fe76918d7ec>
- [95] R. Eibl i D. Eibl, „Design And Use Of The Wave Bioreactor For Plant Cell Culture”, w *Plan Tissue Culture Engineering*, t. 6, S. D. Gupta i Y. Ibaraki, Red., w Focus on Biotechnology, vol. 6. , Dordrecht: Springer Netherlands, 2006, s. 203–227. doi: 10.1007/978-1-4020-3694-1_12.
- [96] S. Junne, T. Solymosi, N. Oosterhuis, i P. Neubauer, „Cultivation of Cells and Microorganisms in Wave-Mixed Disposable Bag Bioreactors at Different Scales”, *Chemie Ingenieur Technik*, t. 85, nr 1–2, s. 57–66, luty 2013, doi: 10.1002/cite.201200149.
- [97] S. Seidel, R. W. Maschke, M. Kraume, R. Eibl, i D. Eibl, „CFD modelling of a wave-mixed bioreactor with complex geometry and two degrees of freedom motion”, *Front. Chem. Eng.*, t. 4, s. 1021416, paź. 2022, doi: 10.3389/fceng.2022.1021416.
- [98] F. Garcia-Ochoa i E. Gomez, „Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview”, *Biotechnology Advances*, t. 27, nr 2, s. 153–176, mar. 2009, doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- [99] J. Ciborowski, *Podstawy inżynierii chemicznej*, 1. wyd. Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 1965.
- [100] I. Bauer i in., Recommendations for process engineering characterisation of single-use bioreactors and mixing systems by using experimental methods (2nd Edition). Frankfurt am Main: Dechema Biotechnologie, 2020. [Online]. Dostępne na: https://dechema.de/en/Single_Use_PE_Characterization-path-123211,124930.html
- [101] S. M. J. Jones, T. M. Louw, i S. T. L. Harrison, „Energy consumption due to mixing and mass transfer in a wave photobioreactor”, *Algal Research*, t. 24, s. 317–324, cze. 2017, doi: 10.1016/j.algal.2017.03.001.
- [102] S. Schaepe, A. Kuprijanov, C. Sieblist, M. Jenzsch, R. Simutis, i A. Lübbert, „kLa of stirred tank bioreactors revisited”, *Journal of Biotechnology*, t. 168, nr 4, s. 576–583, grudz. 2013, doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.08.032.
- [103] R. S. Islam, D. Tisi, M. S. Levy, i G. J. Lye, „Scale-up of *Escherichia coli* growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale

- based on matched $k_L a$ ", *Biotech & Bioengineering*, t. 99, nr 5, s. 1128–1139, kwi. 2008, doi: 10.1002/bit.21697.
- [104] Y. Bai, „Characterization and Improvement of Oxygen Mass Transfer in a Rocking Disposable Bioreactor”, PhD thesis, University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada, 2020.
- [105] L. Manna, „Comparison between physical and chemical methods for the measurement of mixing times”, *Chemical Engineering Journal*, t. 67, nr 3, s. 167–173, cze. 1997, doi: 10.1016/S1385-8947(97)00059-4.
- [106] J. Thýn, V. Novák, i P. Pock, „Effect of the measured volume size on the homogenization time”, *The Chemical Engineering Journal*, t. 12, nr 3, s. 211–217, sty. 1976, doi: 10.1016/0300-9467(76)87014-1.
- [107] J. Y. Oldshue, H. E. Hirschland, i A. T. Gretton, „Blending of low-viscosity liquids with side-entering mixers”, *Chemical Engineering Progress*, t. 52, nr 11, s. 481–484, 1956.
- [108] Q. Zhang, Y. Yong, Z.-S. Mao, C. Yang, i C. Zhao, „Experimental determination and numerical simulation of mixing time in a gas–liquid stirred tank”, *Chemical Engineering Science*, t. 64, nr 12, s. 2926–2933, cze. 2009, doi: 10.1016/j.ces.2009.03.030.
- [109] H. Kramers, G. M. Baars, i W. H. Knoll, „A comparative study on the rate of mixing in stirred tanks”, *Chemical Engineering Science*, t. 2, nr 1, s. 35–42, luty 1953, doi: 10.1016/0009-2509(53)80006-0.
- [110] G. Ascanio, „Mixing time in stirred vessels: A review of experimental techniques”, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, t. 23, nr 7, s. 1065–1076, lip. 2015, doi: 10.1016/j.cjche.2014.10.022.
- [111] B. R. Poulsen i J. J. L. Iversen, „Mixing determinations in reactor vessels using linear buffers”, *Chemical Engineering Science*, t. 52, nr 6, s. 979–984, mar. 1997, doi: 10.1016/S0009-2509(96)00466-6.
- [112] M. Kraume, Red., *Mischen und Rühren: Grundlagen und moderne Verfahren*, 1. wyd. Wiley, 2002. doi: 10.1002/3527603360.
- [113] A. W. Nienow *i in.*, „The physical characterisation of a microscale parallel bioreactor platform with an industrial CHO cell line expressing an IgG4”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 76, s. 25–36, lip. 2013, doi: 10.1016/j.bej.2013.04.011.
- [114] J. N. Delbridge, T. A. Barrett, A. Ducci, i M. Micheletti, „Power, mixing and flow dynamics of the novel Allegro™ stirred tank reactor”, *Chemical Engineering Science*, t. 271, s. 118545, maj 2023, doi: 10.1016/j.ces.2023.118545.

- [115] D. T. Monteil *i in.*, „Disposable 600-mL orbitally shaken bioreactor for mammalian cell cultivation in suspension”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 76, s. 6–12, lip. 2013, doi: 10.1016/j.bej.2013.04.008.
- [116] G. Rodriguez, T. Anderlei, M. Micheletti, M. Yianneskis, i A. Ducci, „On the measurement and scaling of mixing time in orbitally shaken bioreactors”, *Biochemical Engineering Journal*, t. 82, s. 10–21, sty. 2014, doi: 10.1016/j.bej.2013.10.021.
- [117] G. Rodriguez, M. Micheletti, i A. Ducci, „Macro- and micro-scale mixing in a shaken bioreactor for fluids of high viscosity”, *Chemical Engineering Research and Design*, t. 132, s. 890–901, kwi. 2018, doi: 10.1016/j.cherd.2018.01.018.
- [118] S. Werner, J. Greulich, K. Geipel, J. Steingroewer, T. Bley, i D. Eibl, „Mass propagation of *Helianthus annuus* suspension cells in orbitally shaken bioreactors: Improved growth rate in single-use bag bioreactors”, *Eng. Life Sci.*, t. 14, nr 6, s. 676–684, lis. 2014, doi: 10.1002/elsc.201400024.
- [119] F. Cabaret, S. Bonnot, L. Fradette, i P. A. Tanguy, „Mixing Time Analysis Using Colorimetric Methods and Image Processing”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, t. 46, nr 14, s. 5032–5042, lip. 2007, doi: 10.1021/ie0613265.
- [120] P. E. Arratia i F. J. Muzzio, „Planar Laser-Induced Fluorescence Method for Analysis of Mixing in Laminar Flows”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, t. 43, nr 20, s. 6557–6568, wrz. 2004, doi: 10.1021/ie049838b.
- [121] Y. Hu, W. Wang, T. Shao, J. Yang, i Y. Cheng, „Visualization of reactive and non-reactive mixing processes in a stirred tank using planar laser induced fluorescence (PLIF) technique”, *Chemical Engineering Research and Design*, t. 90, nr 4, s. 524–533, kwi. 2012, doi: 10.1016/j.cherd.2011.08.021.
- [122] M. M. Alvarez, P. E. Arratia, i F. J. Muzzio, „Laminar Mixing in Eccentric Stirred Tank Systems”, *Can J Chem Eng*, t. 80, nr 4, s. 546–557, sie. 2002, doi: 10.1002/cjce.5450800418.
- [123] Cytiva, „Bioclear™ 10 and 11 films are comparable”. Dostęp: 16 styczeń 2025. [Online]. Dostępne na: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/bioprocessing/knowledge-center/bioclear-10-and-11-films-are-comparable>
- [124] L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, C. Wikström, i S. Wold, *Design of experiments: principles and applications*, 3., rev.enl. Ed. Umeå: Umetrics Academy, 2008.
- [125] Cytiva, „Engineering characterization of ReadyToProcess WAVE™ 25 bioreactor system with 20 L Cellbag™ culture chamber”. sierpień 2016.

- [126] R. Dulbecco i G. Freeman, „Plaque production by the polyoma virus”, *Virology*, t. 8, nr 3, s. 396–397, lip. 1959, doi: 10.1016/0042-6822(59)90043-1.
- [127] H. Eagle, „Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures”, *Science*, t. 130, nr 3373, s. 432–437, sie. 1959, doi: 10.1126/science.130.3373.432.
- [128] A. Morita, D. Carastan, i N. Demarquette, „Influence of drop volume on surface tension evaluated using the pendant drop method”, *Colloid & Polymer Science*, t. 280, nr 9, s. 857–864, wrz. 2002, doi: 10.1007/s00396-002-0694-z.
- [129] C. Poon, „Measuring the density and viscosity of culture media for optimized computational fluid dynamics analysis of in vitro devices”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, t. 126, s. 105024, luty 2022, doi: 10.1016/j.jmbbm.2021.105024.
- [130] I. M. El Nahhal, S. M. Zourab, F. S. Kodeh, i A. I. Qudaih, „Thin film optical BTB pH sensors using sol–gel method in presence of surfactants”, *Int Nano Lett*, t. 2, nr 1, s. 16, grudz. 2012, doi: 10.1186/2228-5326-2-16.
- [131] OpenCV team, „About OpenCV”. Dostęp: 14 marzec 2025. [Online]. Dostępne na: <https://opencv.org/about/>
- [132] C. Zhan, E. Hagrot, L. Brandt, i V. Chotteau, „Study of hydrodynamics in wave bioreactors by computational fluid dynamics reveals a resonance phenomenon”, *Chemical Engineering Science*, t. 193, s. 53–65, sty. 2019, doi: 10.1016/j.ces.2018.08.017.
- [133] C. W. Hirt i B. D. Nichols, „Volume of fluid (VOF) method for the dynamics of free boundaries”, *Journal of Computational Physics*, t. 39, nr 1, s. 201–225, sty. 1981, doi: 10.1016/0021-9991(81)90145-5.
- [134] T. Nagata, Y. Nemoto, i S. Hasezawa, „Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants”, w *International Review of Cytology*, t. 132, Elsevier, 1992, s. 1–30. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62452-3.
- [135] T. Nagata, K. Sakamoto, i T. Shimizu, „Tobacco by-2 cells: The present and beyond”, *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*, t. 40, nr 2, s. 163–166, mar. 2004, doi: 10.1079/IVP2003526.
- [136] D. Tusé, „Safety of plant-made pharmaceuticals: Product development and regulatory considerations based on case studies of two autologous human cancer vaccines”, *Human Vaccines*, t. 7, nr 3, s. 322–330, mar. 2011, doi: 10.4161/hv.7.3.14213.
- [137] E. M. Linsmaier i F. Skoog, „Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures”, *Physiologia Plantarum*, t. 18, nr 1, s. 100–127, sty. 1965, doi: 10.1111/j.1399-3054.1965.tb06874.x.

- [138] N. Perepelitsa, S. C. Kaiser, D. Eibl, i N. Imseng, „Mass Propagation Of *Nicotiana Tabacum* Cv. BY-2 Suspension Cells In The Hyperforma Rocker Bioreactor”, Thermo Fisher Scientific, Bioprocess Online, application note, 2020.
- [139] Cytiva, „Cultivation of antibody producing fast-growing suspension tobacco plant cells in ReadyToProcess WAVE 25 bioreactor system”, Cytiva, application note 29203199 AA, lip. 2016.
- [140] Thermo Fisher Scientific, „Processing Absorbance Data Obtained Using PrestoBlue™ Viability Reagen”, *molecular probes*, 2011.
- [141] K. Wierzchowski *i in.*, „Selective Impact of MTMS-Based Xerogel Morphology on Boosted Proliferation and Enhanced Naphthoquinone Production in Cultures of *Rindera graeca* Transgenic Roots”, *IJMS*, t. 23, nr 22, s. 13669, lis. 2022, doi: 10.3390/ijms232213669.
- [142] J. J. Jeng, J. R. Maa, i Y. M. Yang, „Surface effects and mass transfer in bubble column”, *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, t. 25, nr 4, s. 974–978, paź. 1986, doi: 10.1021/i200035a023.
- [143] D. D. McClure, A. C. Lee, J. M. Kavanagh, D. F. Fletcher, i G. W. Barton, „Impact of Surfactant Addition on Oxygen Mass Transfer in a Bubble Column”, *Chem. Eng. Technol.*, t. 38, nr 1, s. 44–52, sty. 2015, doi: 10.1002/ceat.201400403.
- [144] M. Ramezani, M. J. Legg, A. Haghghat, Z. Li, R. D. Vigil, i M. G. Olsen, „Experimental investigation of the effect of ethyl alcohol surfactant on oxygen mass transfer and bubble size distribution in an air-water multiphase Taylor-Couette vortex bioreactor”, *Chemical Engineering Journal*, t. 319, s. 288–296, lip. 2017, doi: 10.1016/j.cej.2017.03.005.
- [145] C. Sieblist, M. Jenzsch, i M. Pohlscheidt, „Influence of Pluronic F68 on oxygen mass transfer”, *Biotechnol Progress*, t. 29, nr 5, s. 1278–1288, wrz. 2013, doi: 10.1002/btpr.1770.
- [146] I. Belo, A. García-Abuín, D. Gómez-Díaz, J. M. Navaza, i I. Vidal-Tato, „Effect of Tween 80 on Bubble Size and Mass Transfer in a Bubble Contactor”, *Chem. Eng. Technol.*, t. 34, nr 11, s. 1790–1796, lis. 2011, doi: 10.1002/ceat.201100140.
- [147] J. Fitschen *i in.*, „Novel evaluation method to determine the local mixing time distribution in stirred tank reactors”, *Chemical Engineering Science: X*, t. 10, s. 100098, maj 2021, doi: 10.1016/j.cesx.2021.100098.
- [148] E. S. Godleski i J. C. Smith, „Power requirements and blend times in the agitation of pseudoplastic fluids”, *AIChE J.*, t. 8, nr 5, s. 617–620, lis. 1962, doi: 10.1002/aic.690080511.

- [149] D. A. R. Brown, P. N. Jones, J. C. Middleton, G. Papadopoulos, i E. B. Arik, „Experimental Methods”, w *Handbook of Industrial Mixing*, E. L. Paul, V. A. Atiemo-Obeng, i S. M. Kresta, Red., Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2003, s. 145–256. doi: 10.1002/0471451452.ch4.
- [150] S. Smolentsev i R. Miraghaie, „Study of a free surface in open-channel water flows in the regime from “weak” to “strong” turbulence”, *International Journal of Multiphase Flow*, t. 31, nr 8, s. 921–939, sie. 2005, doi: 10.1016/j.ijmultiphaseflow.2005.05.008.
- [151] M. Brocchini i D. H. Peregrine, „The dynamics of strong turbulence at free surfaces. Part 1. Description”, *J. Fluid Mech.*, t. 449, s. 225–254, grudz. 2001, doi: 10.1017/S0022112001006012.
- [152] M. Brocchini i D. H. Peregrine, „The dynamics of strong turbulence at free surfaces. Part 2. Free-surface boundary conditions”, *J. Fluid Mech.*, t. 449, s. 255–290, grudz. 2001, doi: 10.1017/S0022112001006024.
- [153] A. A. Öncül, A. Kalmbach, Y. Genzel, U. Reichl, i D. Thévenin, „Characterization of flow conditions in 2 L and 20 L wave bioreactors® using computational fluid dynamics”, *Biotechnology Progress*, t. 26, nr 1, s. 101–110, sty. 2010, doi: 10.1002/btpr.312.
- [154] S. Chattopadhyay, S. Farkya, A. K. Srivastava, i V. S. Bisaria, „Bioprocess considerations for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures”, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, t. 7, nr 3, s. 138–149, cze. 2002, doi: 10.1007/bf02932911.

8. Spis rysunków

- Rysunek 1 Graficzne przedstawienie sposobu wyznaczania wartości czasu mieszania przy zastosowaniu metody sensorowej (na podstawie [A1]). Na wykresie widoczne są skokowe zmiany wartości homogeniczności w początkowej fazie pomiaru oraz stopniowe ustalanie się mierzonej wartości w miarę postępu procesu mieszania. Poziome kreskowane linie oznaczają założony dopuszczalny próg odchylenia od homogeniczności, np. wynoszący $\pm 0,05$. Czas mieszania t_m to okres, który upłynął od momentu dodania znacznika ($t = 0$ s) do momentu trwałego osiągnięcia wartości homogeniczności w zadanym przedziale, oznaczonego jako punkt końcowy pomiaru. 50
- Rysunek 2 Bioreaktor *ReadyToProcess* WAVE™ 25 [27]. 58
- Rysunek 3 Sposób mocowania elektrody pH do polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L przy zastosowaniu dławnicy kablowej (na podstawie: materiały uzupełniające do artykułu [A1]). 61
- Rysunek 4 Parametry operacyjne badanego systemu bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* uwzględnione w planowaniu eksperymentu zgodnie z założeniami metodyki DoE (na podstawie [A1]). 63
- Rysunek 5 Schemat układu doświadczalnego do pomiaru wartości współczynnika $k_L a$ podczas oscylacyjnego mieszania typu *wave* fazy ciekłej w jednorazowym zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A2]). 64
- Rysunek 6 Sposób wyznaczania wartości współczynnika $k_L a$ na podstawie zmiany wartości stężenia DO w trakcie pomiaru. **A:** Wykres wartości wyrażenia z lewej strony Równania 12 w funkcji czasu. **B:** W przybliżeniu liniowy wycinek wykresu, do którego dopasowano funkcję liniową o współczynniku kierunkowym równym wartości współczynnika $k_L a$ (zgodnie z [A2]). 65
- Rysunek 7 System do zautomatyzowanego dozowania znacznika. **A:** Uchwyt na strzykawkę wraz z silnikiem napędzającym przekładnię zębatą. **B:** Fragment kodu odpowiadającego za sterowanie pracą silnika krokowego oraz regulację parametrów wstrzykiwania. 72
- Rysunek 8 Schemat blokowy algorytmu do przetwarzania obrazu zastosowanego w autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania. 73

	Blok otoczony przerywaną linią zawiera czynności, które wykonywano w pętli na każdej kolejnej klatce materiału filmowego.	
Rysunek 9	Proces maskowania wstępnego na przykładzie polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).	74
Rysunek 10	Dobre empirycznie wartości graniczne zakresów barw w przestrzeni $L^*a^*b^*$ (zgodnie z [A4]).	74
Rysunek 11	Przykładowy wykres danych wyjściowych z algorytmu do przetwarzania obrazu w funkcji czasu oraz sposób wyznaczania wartości czasu mieszania. Wartość czasu mieszania w podanym przykładzie wynosiła 37,5 sekundy (Cellbag™ 10 L, $\alpha = 2^\circ$, $\omega = 21 \text{ min}^{-1}$, $fl = 0,275$) (zgodnie z artykułem [A4]).	76
Rysunek 12	Schemat przestrzeni eksperymentalnej. Odległość między punktem centralnym a pozostałymi punktami w planie BBD była równa $\sqrt{2}$. Odległość między punktem centralnym a punktami planu 2^3 wynosiła połowę tej wartości (na podstawie [A4]).	78
Rysunek 13	Graficzne podsumowanie kolejnych etapów cyfrowego przetwarzania obrazu wykonywanego w ramach algorytmu przetwarzania obrazu do wzmacniania struktury powierzchni międzyfazowej (na podstawie [A4]).	80
Rysunek 14	Schematy zwymiarowanych wariantów odwzorowania geometrii zbiornika Cellbag™ 2 L zastosowanych na potrzeby symulacji CFD.	82
Rysunek 15	Sposób wypełnienia geometrii zbiornika cieczą na przykładzie Wariantu 1.	84
Rysunek 16	Sposób dodania znacznika do fazy ciekłej w zbiorniku na przykładzie Wariantu 1.	84
Rysunek 17	Schemat rozmieszczenia wypustek w zaproponowanej prototypowej modyfikacji zbiornika Cellbag™ 2 L. A: Rozmieszczenie wypustek na dolnej ścianie wewnątrz polimerowego zbiornika. B: Wymiary wypustek wykorzystanych w modyfikacji.	87
Rysunek 18	Wykres zależności współczynnika $k_L a$ od lepkości dynamicznej fazy ciekłej (zgodnie z [A2]).	98
Rysunek 19	Wykres danych eksperymentalnych prezentujący wyznaczone wartości współczynnika $k_L a$ od lepkości dynamicznej μ fazy ciekłej, wraz z oznaczonymi liniami trendu oraz charakterystycznymi wartościami (zgodnie z [A2]).	99

Rysunek 20	Wykres wartości współczynnika $k_L a$ w funkcji wartości zmodyfikowanej liczby Reynoldsa Re_L , wraz z oznaczonymi liniami trendu oraz charakterystycznymi wartościami (zgodnie z [A2]).	100
Rysunek 21	Wykresy zależności między średnimi wartościami czasu mieszania $t_{95\%}$ a branymi pod uwagę poziomami niezależnych parametrów procesowych: amplitudy oscylacji α (A), częstotliwości oscylacji ω (B), parametru acc (C) oraz objętości cieczy w zbiorniku V_L (D) (zgodnie z [A1]).	103
Rysunek 22	Wykres Pareto wartości bezwzględnych standaryzowanej oceny efektu ustalonych na podstawie uzyskanych eksperymentalnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A1]).	104
Rysunek 23	Wykresy konturowe średnich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w zależności od wartości wybranych par parametrów, tj. α i ω (A), ω i V_L (B) oraz α i V_L (C), wpływających istotnie na wydajność mieszania w układzie (zgodnie z [A1]).	105
Rysunek 24	Wykres dopasowania wartości czasu mieszania przewidywanych na podstawie korelacyjnych równań 21–23 odniesionych do wartości eksperymentalnych mniejszych niż 25 sekund (zgodnie z [A1]).	107
Rysunek 25	Porównanie wartości odchylenia standardowego i rozrzutu wyników pomiarów czasu mieszania $t_{95\%}$ przeprowadzonych przy zastosowaniu metody pH i metody kolorymetrycznej, uzyskanych dla tych samych wartości parametrów operacyjnych bioreaktora (zgodnie z [A4]).	109
Rysunek 26	Wykres zależności średnich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ od stosunku molarowego reagentów w roztworze znacznika oraz roztworze wewnątrz polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).	110
Rysunek 27	Wykres zależności średnich wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ od stosunku objętości roztworu znacznika do objętości roztworu wewnątrz polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).	110
Rysunek 28	Wykresy Pareto wartości bezwzględnych standaryzowanej oceny efektu parametrów zbadanych w ramach analizy wydajności metody kolorymetrycznej. Blok 1: znacznik – roztwór NaOH, ciecz w zbiorniku: roztwór HCl. Blok 2: znacznik – roztwór HCl, ciecz w zbiorniku: roztwór NaOH (zgodnie z [A4]).	111

- Rysunek 29 Przykłady klitek z cyfrowych nagrań wideo procesu mieszania typu *wave* 115
zaobserwowane podczas przepływu cieczy w badanych zbiornikach Cellbag™ i przyporządkowanych do Kategorii 0–6 na podstawie analizy struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz oraz zaobserwowanych cech charakterystycznych zaznaczonych czerwoną linią (zgodnie z [A4]).
- Rysunek 30 Przestrzeń eksperymentalna z oznaczonym przydziałem poszczególnych 118
wariantów eksperymentalnych do Kategorii 0–5 kształtu powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz zaobserwowanych w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).
- Rysunek 31 Przestrzeń eksperymentalna z oznaczonym przydziałem poszczególnych 118
wariantów eksperymentalnych do Kategorii 0–6 kształtu powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz zaobserwowanych w przypadku polimerowego zbiornika Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).
- Rysunek 32 Wykres dopasowania wartości przewidywanych przy zastosowaniu Równania 124
26 (wypełnione punkty) oraz Równania 24 (okręgi) do wartości eksperymentalnych czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie z [A4]).
- Rysunek 33 Wykres dopasowania wartości przewidywanych przy zastosowaniu Równania 125
27 (wypełnione punkty) oraz Równania 25 (okręgi) do wartości eksperymentalnych czasu mieszania w zbiorniku Cellbag™ 10 L (zgodnie z [A4]).
- Rysunek 34 Wykres opracowany w oparciu o Równanie 28. Krzywe na wykresie odpowiadają kombinacjom parametrów operacyjnych pracy bioreaktora *Ready-ToProcess WAVE™* 25, przy których iloraz przewidywanych wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w polimerowych zbiornikach Cellbag™ 10 L oraz 2 L jest równy 1 (zgodnie z [A4]). 126
- Rysunek 35 Porównanie pól wektorowych prędkości fazy ciekłej wyznaczonych 130
na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L niezmodyfikowany (Wariant 0) oraz wybrane dwa warianty polimerowego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 1 oraz Wariant 3) w czasie 3 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji.
- Rysunek 36 Pola wektorowe prędkości fazy ciekłej wyznaczone na podstawie wyników 131
symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz jeden z wariantów polimerowego

- zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 1) w czasie 3,75 sekundy od momentu rozpoczęcia symulacji.
- Rysunek 37 Pole wektorowe prędkości fazy ciekłej wyznaczone na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących dwa z wariantów polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 1 oraz Wariant 2) w czasie 6 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji. 132
- Rysunek 38 Pole wektorowe prędkości fazy ciekłej wyznaczone na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących jeden wariantów polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L o zmodyfikowanej geometrii (Wariant 3) w czasie 3 sekund od momentu rozpoczęcia symulacji. 132
- Rysunek 39 Porównanie średnich wartości naprężeń ścinających w fazie ciekłej wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3). 133
- Rysunek 40 Porównanie maksymalnych wartości naprężeń ścinających w fazie ciekłej wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3). 133
- Rysunek 41 Porównanie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ charakteryzujące wydajność miesznania typu *wave* w referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L (Wariant 0), wyznaczone przy pomocy symulacji CFD oraz w eksperymentalnych pomiarach przy zastosowaniu adaptacji metody kolorymetrycznej. Wartości liczbowe czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu. 135
- Rysunek 42 Względna zmiana wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ pomiędzy wartościami uzyskanymi w eksperymentach a wartościami wyznaczonymi na podstawie wyników symulacji CFD. Wartości liczbowe zmiany czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu. 135
- Rysunek 43 Porównanie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wyznaczonych na podstawie wyników symulacji CFD obejmujących referencyjny niezmodyfikowany 136

- polimerowy zbiornik Cellbag™ 2 L (Wariant 0) oraz trzy warianty tego zbiornika o zmodyfikowanej geometrii (Warianty: 1, 2 i 3).
- Rysunek 44 Porównanie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ w referencyjnym niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz w zmodyfikowanym Wariacie 3 zbiornika. Wartości liczbowe czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu. 138
- Rysunek 45 Względna zmiana wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ odnotowana między pomiarami wykonanymi przy użyciu referencyjnego niezmodyfikowanego polimerowego zbiornika Cellbag™ 2 L oraz zmodyfikowanego Wariantu 3 zbiornika. Wartości liczbowe zmiany czasu mieszania $t_{95\%}$ przedstawiono pod odpowiadającymi im słupkami wykresu. 138
- Rysunek 46 Wartości względnej zmiany współczynnika $k_L a$ odnotowane między Wariantem 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika a referencyjnym niezmodyfikowanym zbiornikiem Cellbag™ 2 L, w funkcji amplitudy oscylacji α . 139
- Rysunek 47 Wartości względnej zmiany współczynnika $k_L a$ odnotowane między Wariantem 3 zmodyfikowanego polimerowego zbiornika a referencyjnym niezmodyfikowanym zbiornikiem Cellbag™ 2 L, w funkcji częstotliwości oscylacji ω . 139
- Rysunek 48 Profile stężenia tlenu rozpuszczonego DO w medium hodowlanym odnotowane w trakcie hodowli wgłębnych zawiesiny komórek *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonych w referencyjnym niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz w zbiorniku o geometrii zmodyfikowanej zgodnie z założeniami Wariantu 3. 142
- Rysunek 49 Powiększenie profili stężenia tlenu rozpuszczonego DO z pierwszych 4,5 dni hodowli przeprowadzonych w obu porównywanych polimerowych zbiornikach. Oznaczono wartości współczynników kierunkowych zlinearyzowanych fragmentów profili stężenia DO. 143
- Rysunek 50 Wartości stężeń świeżej (mokrej) biomasy komórek *N. tabacum* BY-2 w kolejnych dniach hodowli wgłębnych prowadzonych w porównywanych polimerowych zbiornikach: referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz prototypie zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (Wariant 3 modyfikacji) 144

- Rysunek 51 Wartości stopnia redukcji odczynnika PrestoBlue oznaczone w próbach zawiesin komórek *N. tabacum* BY-2 pobranych w kolejnych dniach hodowli wglębnych przeprowadzonych w porównywanych polimerowych zbiornikach: referencyjnym niezmodyfikowanym zbiorniku Cellbag™ 2 L oraz prototypie zbiornika o geometrii zmodyfikowanej wypustkami (Wariant 3). 145
- Rysunek 52 Profile stężeń cukrów, tj. sacharozy, glukozy i fruktozy, w medium hodowlanym w funkcji czasu hodowli *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonej w referencyjnym, niezmodyfikowanym polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L. 147
- Rysunek 53 Profile stężeń cukrów, tj. sacharozy, glukozy i fruktozy, w medium hodowlanym w funkcji czasu hodowli *N. tabacum* BY-2 przeprowadzonej w prototypowym polimerowym zbiorniku zmodyfikowanym wypustkami zmieniającymi jego geometrię (Wariant 3 modyfikacji). 147

9. Spis tabel

Tabela 1	Przegląd praktycznych zastosowań różnych typów bioreaktorów <i>single-use</i> .	38
Tabela 2	Przegląd udokumentowanych w literaturze wartości czasu mieszania charakteryzujących bioreaktory <i>single-use</i> z mieszaniem typu <i>wave</i> z jednowymiarowymi lub dwuwymiarowymi wychyleniami platformy (zgodnie z publikacją [A1]).	43
Tabela 3	Przegląd danych literaturowych dotyczących eksperymentalnie uzyskanych wartości współczynnika k_La w bioreaktorach z mieszaniem typu <i>wave</i> z jednowymiarowym ruchem platformy.	46
Tabela 4	Przykłady opublikowanych równań korelacyjnych do przewidywania wartości współczynnika k_La w bioreaktorach <i>single-use</i> z mieszaniem typu <i>wave</i> .	47
Tabela 5	Spis zastosowań metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w polimerowych zbiornikach różnych typów bioreaktorów <i>single-use</i> (zgodnie z [A3]).	52
Tabela 6	Krytyczne porównanie eksperymentalnych metod pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach <i>single-use</i> wyposażonych w polimerowe zbiorniki.	55
Tabela 7	Wartości eksperymentalne zmiennych niezależnych uwzględnionych w planie eksperymentów ustalonym zgodnie z założeniami metodyki DoE.	63
Tabela 8	Składy mieszanin wykorzystywanych podczas badania wpływu wybranych właściwości cieczy na wartości współczynnika k_La osiągnięte w warunkach mieszania typu <i>wave</i> (zgodnie z materiałami uzupełniającymi do artykułu [A2]).	67
Tabela 9	Wartości stężenia i objętości roztworu znacznika wstrzykiwanego do polimerowego zbiornika wyznaczone na podstawie wartości zmiennych niezależnych: stosunku molowego reagentów oraz stosunku objętości znacznika i roztworu wewnątrz zbiornika (na podstawie [A4]).	71
Tabela 10	Wartości parametrów operacyjnych uwzględnione w przyjętym planie eksperymentów.	78
Tabela 11	Harmonogram zmian wartości parametrów operacyjnych bioreaktora <i>ReadyToProcess WAVE™ 25</i> definiujących oscylacyjne wychylenia zbiornika <i>Cellbag™ 2 L</i> podczas hodowli biomasy <i>N. tabacum</i> zalecane przez producenta bioreaktora (według [139]).	93

- Tabela 12 Kwantyfikacja kategoryzacji struktury powierzchni międzyfazowej gaz- 116
ciecz oraz średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wraz z odchyleniami stan-
dardowymi, odnotowane w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 2 L (zgodnie
z [A4]).
- Tabela 13 Kwantyfikacja kategoryzacji struktury powierzchni międzyfazowej gaz- 117
ciecz oraz średnie wartości czasu mieszania $t_{95\%}$ wraz z odchyleniami stan-
dardowymi, odnotowane w polimerowym zbiorniku Cellbag™ 10 L (zgod-
nie z [A4]).

10. Pełne teksty monotematycznych publikacji

10.1. Publikacja [A1]

Bartczak M., Wierzchowski K., Pilarek M. (2022) *Mixing performance in a litre-scale rocking disposable bioreactor: DoE-based investigation of mixing time dependence on operational parameters*. Chemical Engineering Journal 431:133288. DOI:10.1016/j.cej.2021.133288 (IF₂₀₂₂ 13,273, 200 pkt.)

Wkład autorski:

Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu planu eksperymentów i metodyki pomiarów czasu mieszania przy zastosowaniu metody pH, przeprowadzenie pomiarów czasu mieszania, obróbka otrzymanych wyników, udział w opracowaniu korelacji wiążącej wartości parametrów operacyjnych bioreaktora z wartościami czasu mieszania, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.



Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cej

Mixing performance in a litre-scale rocking disposable bioreactor: DoE-based investigation of mixing time dependence on operational parameters

Mateusz Bartzak^{a,b}, Kamil Wierchowski^a, Maciej Pilarek^{a,*}^a Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland^b Doctoral School no. 1, Warsaw University of Technology, Plac Politechniki 1, 00-661 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Single-use (disposable) bioreactor
Wave-induced agitation
Mixing time
Homogeneity
Sensor method
Design of Experiment (DoE)

ABSTRACT

Rocking single-use bioreactors (SUBs) adopt an effective mixing mechanism based on the rocking movement of a platform on which a disposable bag-like container is placed. Non-typical liquid flow patterns make the hydrodynamical properties of rocking SUBs not yet well systematized. The aim of the study was to determine a quantitative characteristic of mixing time in a ReadyToProcess WAVE 25 system equipped with a 2-litre Cellbag disposable container, with the use of a sensor method and the Design of Experiment (DoE) methodology. The DoE-based approach has been used to screen significant operational parameters and evaluate their impact on the values of mixing time reached in the studied rocking SUB system. To quantify relations between operational parameters and important process quantities in rocking disposable bag-like containers of different sizes, a set of original formulas for generalization of experimental data and predicting mixing time values has been proposed. The set includes exponential correlations and a correlation involving a dimensionless filling level term and a modified Reynolds number expression. Comparisons between estimations and experimental data have shown satisfactory levels of accuracy within $\pm 30\%$ of experimental values. The correlation involving dimensionless terms can be applied for disposable bag-like containers offered by different manufacturers and of various sizes.

1. Introduction

Single-use bioreactors (SUBs) are becoming increasingly prevalent among manufacturers from the bioengineering industry for their greater flexibility and tailor-design for end-user, fast turnover times, elimination of sterilization and follow-up validation procedures resulting in shorter downtimes between subsequent uses, as well as the high potential for bioprocess modifications [1,2]. Nominally, the term *single-use bioreactors* is commonly used to describe a group of devices in which the culture vessels are designed to be used only once, typically made from welded together multi-layer plastic films. The vessels are fitted with various disposable components, such as miniaturized sensors, sampling ports and piping sections. Many SUB systems have been developed and made commercially available over the last two decades. As of today, three main types of SUBs have gained the most popularity in the biopharmaceutical and bioprocess industries [3]: (i) stirred tank SUBs, similar in principle to the conventional stirred stainless-steel or glass bioreactors; (ii) orbitally shaken SUBs, in which the mixing energy is

provided by orbital oscillations of the cylindrically-shaped disposable vessel; (iii) rocking SUBs, also referred to as wave-mixed bioreactors, adopting an agitation mechanism resulting from the rocking of a platform with a disposable bag-like container. The characterization of the latter group of SUBs was in the scope of this study.

Agitation in rocking SUBs is done by the continuous oscillatory movement of the disposable and flexible pillow-shaped bag-like container filled with the liquid culture medium (broth) and gas phase, and mounted on the bioreactor platform. The oscillatory movement of the platform may be performed in one, two or three dimensions. The most common are the rocking SUBs in which the agitation results from the oscillatory movement in one direction around a horizontal axis (1D). The specific name of this type of SUBs, i.e. wave-mixed devices, comes from a characteristic wave-like pattern of liquid flow and liquid surface inside the bag-like container induced by the oscillations. Experimental investigations and Computational fluid dynamics (CFD) simulations have shown that shear stress and energy dissipation distribution during wave-type agitation are significantly more homogenous than in classical bioreactors and SUBs equipped with mechanical rotating stirrers [4,5].

* Corresponding author.

E-mail address: maciej.pilarek@pw.edu.pl (M. Pilarek).<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133288>

Received 6 August 2021; Received in revised form 13 October 2021; Accepted 27 October 2021

Available online 3 November 2021

1385-8947/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Nomenclature		ν_L	kinematic viscosity ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
Symbols		σ	standard deviation (s)
acc	degree of smoothing of a triangular oscillatory function with a cosine function (%)	ω	rocking frequency (min^{-1})
d	diameter of a container for orbitally shaken SUB (m)	Abbreviations	
Ho	homogeneity (-)	ID	one-dimensional
L	length of a bag-like container for rocking SUB (m)	2D	two-dimensional
N	orbital motion frequency (min^{-1})	ANOVA	analysis of variance
Re_L	modified Reynolds number (-)	CFD	computational fluid dynamics
t	time (s)	DoE	Design of Experiment
$t_{95\%}$	mixing time (s)	N/S	not specified
t_C	experiment temperature ($^{\circ}\text{C}$)	SUB	single-use bioreactor
u_{tip}	impeller tip speed (m s^{-1})	Indices	
V	total volume of a bag-like container (dm^3)	0	starting value
V_L	volume of liquid inside a bag-like container (dm^3)	∞	end value
α	rocking angle ($^{\circ}$)		

This feature makes rocking SUBs suitable for the bioprocessing of fragile and shear-sensitive animal cells and cell-aggregates, plant cells and their tissues and organs, and hybrid biomass-biomaterial constructs.

Despite the advantages of the agitation mechanism in rocking SUBs, it has to be noted that the mixing and aeration intensity in these devices is lower when compared to, e.g. conventional reusable bioreactors with rotating stirrers. This feature makes rocking SUBs unsuitable for the proliferation of biomass with very high oxygen demand. Another disadvantage worth mentioning is the dependence of rocking SUBs users on proprietary disposable equipment, often supplied by only one manufacturer [1]. Rocking SUBs are relatively new to the bioindustry market, hence the engineering properties of this group of devices have not yet been well systematized. Creating a useful mathematical model to describe the mixing conditions in rocking SUBs is challenging due to the limited number of available appropriate independent parameters caused by the non-typical liquid flow patterns inside rocking SUBs, the irregular shape and the lack of moving parts inside the culture containers. Due to the design philosophy of SUBs, their utilization causes an increase in the amount of plastic waste created by the manufacturers and increases the operational costs related to recycling and waste processing.

Rocking SUBs are utilized in modern areas of the biopharmaceutical and bioprocess industries, e.g. for scaling-up of viral vaccines manufacturing [5,6], chimeric antigen receptor-modified human T cells cultures [7,8] and human mesenchymal stem cells [9,10] for cell therapy, proliferation of adherent cells on microcarriers [11,12], as well as in the production of pharmaceutically valuable secondary metabolites extracellularly secreted by callus cells and plant tissues or organs

[13–15]. Rocking SUBs have found their way in laboratory to medium-scale cultures, with the disposable containers available in sizes ranging from 0.1 L to ca. 0.5 m^3 of working volume [3,16]. Wave-type bioreactors are often applied in the proliferation of inoculum cultures, which are subsequently used to inoculate the production-scale bioreactors [17].

Liquid flow dynamics and mixing performance in rocking bioreactors is influenced by many parameters. This includes ones defining the rocking motion (i.e. angle and rate of the oscillations, acceleration profile of the rocking cycle), those connected with the characteristics of the culture vessel (i.e. fill volume, shape/geometry and size of the bag-like container) and the liquid properties (i.e. its viscosity and density) [3,16]. Mixing time, which describes the time required for reaching a certain level of homogeneity of the mixture, is a valuable parameter that allows for a simple quantitative assessment of the mixing conditions inside the vessel. Homogeneity is essential during all bioprocesses. Any significant gradients in the concentration of oxygen or nutrients appearing inside the culture medium can quickly lead to limited growth or even death of the biomass.

The main aim of this study was to quantitatively determine the mixing characteristics in the ReadyToProcess WAVE™ 25 bioreactor (Cytiva, formerly GE Healthcare Life Sciences, US) equipped with a disposable Cellbag™ 2 L vessel by the measurement of mixing time values using a sensor method according to the Design of Experiment (DoE) methodology. The impact of four independent operating parameters defining the rocking motion in the system on the values of mixing time has been investigated: rocking angle (α), rocking frequency (ω), fill

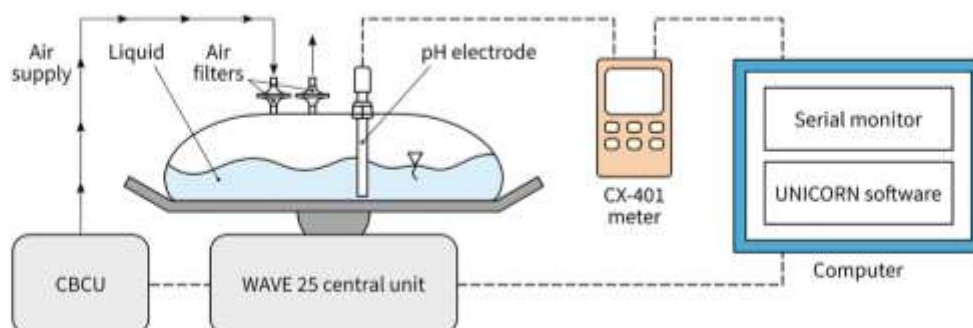


Fig. 1. Scheme of the experimental setup: WAVE 25 central unit equipped with the Cellbag 2 L bag-like container and other accessories. Dashed lines represent electrical and data connections, arrowed lines represent airflow into and out of the container.

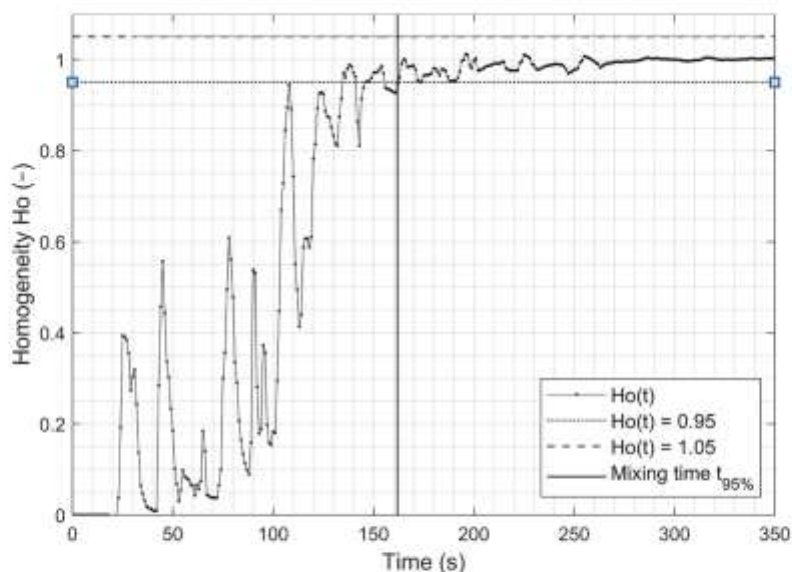


Fig. 2. Example of system response in the applied sensor method ($\alpha = 12^\circ$, $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$, $V_L = 0.6 \text{ dm}^3$, $\text{acc} = 60\%$). The changes in homogeneity values are visible during the mixing process, reaching the 1.00 ± 0.05 range (area between dashed and dotted horizontal lines). Mixing time $t_{95\%} = 162 \text{ s}$ is marked with a solid bold vertical line.

volume (V_L), and the acceleration profile of rocking cycle (acc). Based on DoE methodology, i.e. the Box-Behnken design (BBD), experimental values of the studied operational parameters were chosen to cover the entirety of the available control ranges. Based on the results, two exponential correlations and a correlation involving a dimensionless filling level term and a modified Reynolds number expression have been proposed, together with a detailed comparison between predicted and experimental values. To our knowledge, this work is the first attempt at formulating mathematical expressions which generalize experimental results and allow for predicting mixing time values in a rocking SUB. Proposed correlations cover the entire operational parameters ranges and involve dimensionless terms and numbers – a property necessary for up- or downscaling of bioprocesses. This work is an important step towards the characterization of hydrodynamics inside litre-scale rocking SUBs, which might expand their practicability and applicability in the biopharmaceutical and bioprocess industries and the laboratory-scale experimental procedures.

2. Materials and methods

2.1. Single-use bioreactor setup

The ReadyToProcess WAVE™ 25 (WAVE 25; Cytiva, formerly GE Healthcare Life Sciences, US) system has been used. The central unit was equipped with a Tray 10 platform, on which a Cellbag™ 2 L (Cytiva, US) disposable bag-like container was mounted. The total volume of the container V was 2 dm^3 . The central unit was wire-connected to a CBCU device (Cytiva, US) responsible for maintaining a set gas flow pumped into the container. Atmospheric air was provided to the CBCU through a compressor and then administered into the vessel at a constant flow rate of $0.5 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$. Both the central and the CBCU units were wire-connected to a computer and operated through dedicated UNICORN software (Cytiva, US). The experimental setup, containing airflow, electrical and data connections, is illustrated in Fig. 1.

2.2. Mixing time measurement

The sensor method, which relies on the monitoring of temporal changes of pH values in the liquid phase and finding a moment in which 95% homogeneity is reached, has been applied to quantitatively characterize the values of mixing time.

The pH measurement was done using a pre-calibrated pH glass electrode EPP-1 (Elmetron, Poland) connected to a universal laboratory meter CX-401 (Elmetron, Poland). The pH electrode was mounted on the top surface of the bag-like container via a sealed electrical cable gland (Fig. S1; see Supplementary Material). Such mounting was air- and watertight and provided a stable position for the electrode. The CX-401 m was connected to the WAVE 25 computer through a serial port for easy data acquisition. The pH values were continuously recorded with an interval of 1 s, a minimum available interval for the applied meter. Temperature compensation was set automatically to a value of 37.0°C , the same as the liquid thermostat setting of the WAVE 25 system.

The starting mixture was a 0.001 M solution of hydrochloric acid (pH 3.0). After no less than 10 min of continuous rocking pre-agitation performed for flow development and temperature stabilization, an impulse of chemical tracer was added, and the recording of pH values was initiated. 0.5 M solution of sodium hydroxide was applied as the tracer and was dosed at 2.5 cm^3 per 1 dm^3 of starting mixture. The recording was stopped after a stable (± 0.05) value has been reached for at least 10 consecutive pH readouts. Given the starting mixture and tracer concentrations, the expected end pH value equalled 10.4. After each experiment, the bag was emptied and rinsed 5 times by complete filling with double distilled water.

A detailed step-by-step measurement procedure is listed in the Supplementary Material.

Recorded pH values were converted to homogeneity (H_o), according to Eq. (1):

$$H_o(t) = \frac{\text{pH}(t) - \text{pH}_0}{\text{pH}_\infty - \text{pH}_0} \quad (1)$$

Mixing time ($t_{95\%}$) was specified as the moment in which the homogeneity entered the range of 1.00 ± 0.05 for the last time. An example

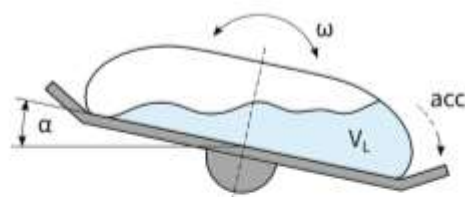


Fig. 3. Graphical description of operating parameters included in the experimental planning.

Table 1

Values of operating parameters included as independent factors in DoE-aided analysis.

parameter/ factor	available control range	experimental values			unit
		-1 (minimum)	0 (centre)	+1 (maximum)	
α	2–12	2	7	12	°
ω	2–40	2	21	40	min ⁻¹
acc	15–100	30	60	90	%
V_L	0.1–1	0.2	0.6	1.0	dm ³

of system response after the tracer addition into the starting mixture has been presented in Fig. 2. Obtained data were analyzed using MATLAB environment (MathWorks Inc.) and the Statistica software (TIBCO Software Inc.).

2.3. Investigated operating parameters

The following four independent operating parameters have been considered for their influence on the values of mixing time observed in the studied WAVE 25 system (Fig. 3):

- α , corresponding to the amplitude of the oscillatory movement,
- ω , corresponding to the frequency of the oscillatory movement,
- acc, describing the smoothing of a triangular oscillatory function with a cosine function [18], i.e. the bigger the value of acc, the smoother was the deceleration of movement near the maximum angle of each rocking half-cycle,
- V_L , representing the volume of liquid inside the vessel.

α , ω and acc are the factors directly associated with the mechanical characteristics of the rocking movement, which generates waves inside the bag-like container. Therefore, these three parameters strictly define the conditions of wave-induced agitation performed in the WAVE 25 system. In addition, V_L can be recognized as a parameter characterizing the liquid phase inside the container during wave-induced mixing [19].

All measurements were performed at the liquid temperature of 37 °C (t_c), corresponding to the recommended in vitro environment temperature for cultures of isolated human and mammalian cells and cell lines.

2.4. Experimental design

The experiments were planned using the Design of Experiment (DoE) methodology. A set of experimental values has been assigned for each independent factor (Table 1). Selected values represent the available control range of each parameter specified by the manufacturer of the WAVE 25 bioreactor. In the study, a full experimental plan consisting of 81 process parameters combinations was used. Measurements were performed in triplicate for each combination.

Table 2

Mean values of mixing time for all selected levels of investigated operating parameters available in the WAVE 25 system. The standard error of the mean for the data in the following table equals 24.54 s.

parameter/factor	experimental value	level	mean $t_{95\%}$ (s)
α (°)	2	-1	256
	7	0	152
	12	+1	74
ω (min ⁻¹)	2	-1	441
	21	0	35
	40	+1	5
acc (%)	30	-1	162
	60	0	166
	90	+1	154
V_L (dm ³)	0.2	-1	73
	0.6	0	186
	1.0	+1	222

3. Results

3.1. Detailed presentation of experimental data

Experiments for each of the 81 sets of operational parameters in the full experimental plan were performed 3 times, which gave 243 individually performed measurements. Based on the raw experimental data, mixing time values in the Cellbag 2 L container ranged from 3 to 1350 s. As a preliminary step for the statistical analysis, the triplicate experimental values of mixing time were averaged for each set of operational parameters. A complete set of experimental data and mean values of the measured mixing time are presented in the Supplementary Material to this article (i.e. Table S1).

3.2. Analysis of the impact of operating parameters on the values of mixing time

According to the DoE-selected independent variable levels, obtained results were averaged to precisely determine the influence of each investigated operating parameter on the values of mixing time measured in the studied WAVE 25 system. Mean values of mixing time reported for all levels of operating parameters have been summarized in Table 2 and graphically presented in Fig. 4.

Based on points plotted in Fig. 4, it is noted that the investigated four operating parameters unevenly impacted the values of mixing time obtainable in the Cellbag 2 L disposable bag-like container rocked by the WAVE 25 system. The most significant differences between the average mixing time values have been reported for the studied levels of ω . Average $t_{95\%}$ at ω equal to 2 min⁻¹ was 12.6 times longer than the average $t_{95\%}$ observed for ω equal to 21 min⁻¹, i.e. levels -1 and 0, respectively. The ratio of average $t_{95\%}$ values between ω of 21 min⁻¹ and 40 min⁻¹, i.e. levels 0 and +1, respectively, was equal to 7. In conjunction with the points plotted in Fig. 4B, these values indicate an exponential relationship between ω and $t_{95\%}$ and a strong effect of ω exhibited on the mixing quality in the Cellbag 2 L container rocked by WAVE 25.

On the contrary, average $t_{95\%}$ values observed for all three considered levels of acc were very similar. The difference between $t_{95\%}$ values for the maximum, i.e. +1, and minimum, i.e. -1, levels of acc equalled only 7 s (Fig. 4C).

Differences between average $t_{95\%}$ values reported for α (Fig. 4A) and V_L (Fig. 4D) were smaller than those observed for ω but significantly higher than the differences of average $t_{95\%}$ noted for acc. The arrangement of data points for α and V_L both indicate more linear relationships than the relationship in the case of ω .

In order to quantify the influence of operating parameters, effect size analysis has been performed as a part of the analysis of variance (ANOVA). Results of ANOVA have been summarised in Table 3. These data have also been graphically presented in Fig. 4E in a Pareto chart of

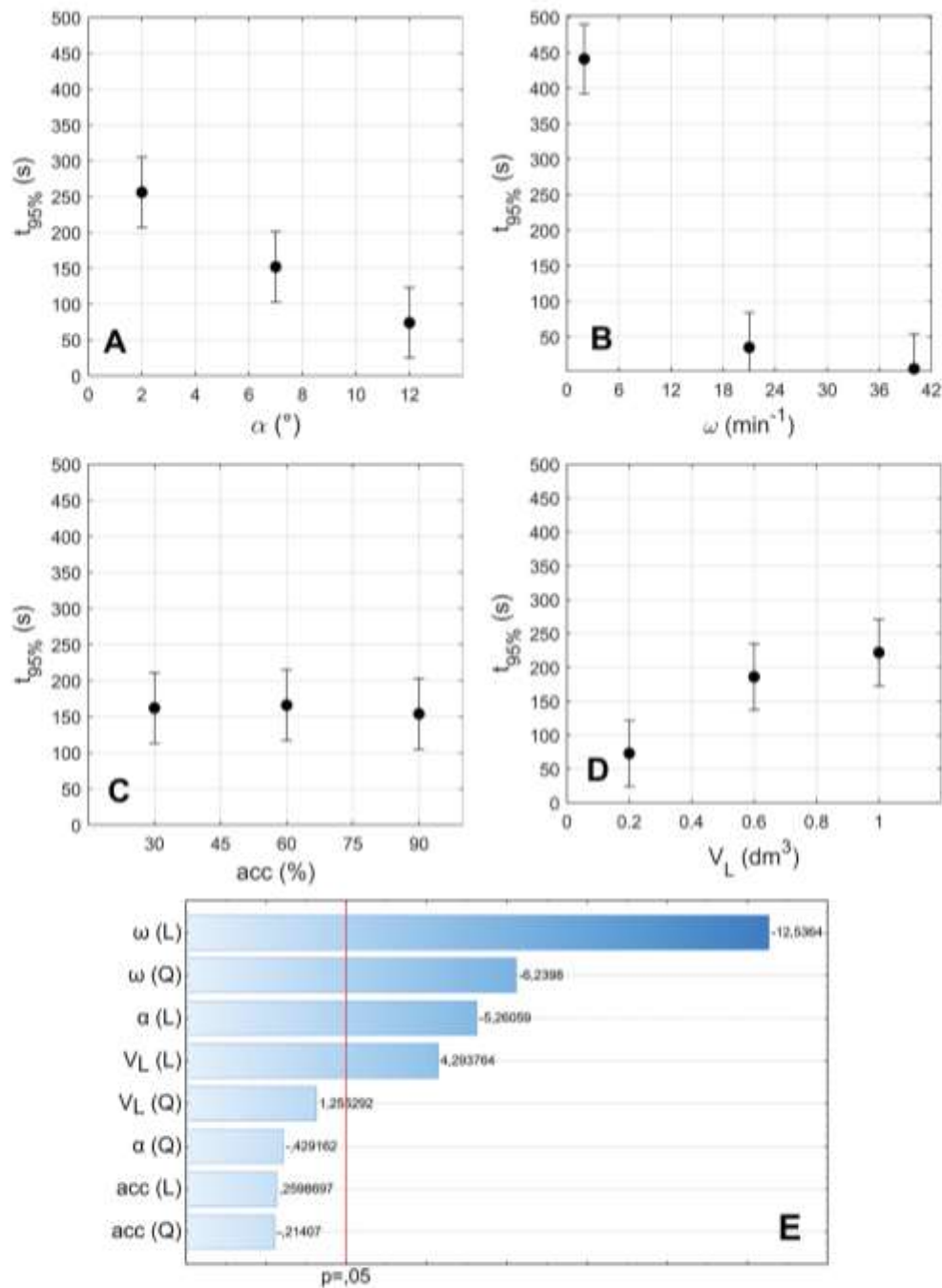


Fig. 4. Relationships between experimentally determined mixing time values and selected values of WAVE 25 operational parameters: a significant linear effect of α (A); a significant effect of ω , strongest of all investigated parameters (B); statistically insignificant effect of acc (C); significant linear effect of V_L (D); Pareto chart of standardized effect absolute values (E).

standardized effect absolute values.

Clearly visible from Fig. 4E, the standardized effects referred to ω were by far the biggest from the effects of other investigated parameters. p -values for the ω (L) and ω (Q) effects were much smaller than the set confidence interval boundary of $p = 5 \times 10^{-2}$.

In the case of α and V_L , the interpretation of data presented in Fig. 4E and Table 3 may suggest that only the linear (L) effects of those parameters lay inside the confidence interval. This further proves that the relationship between $t_{95\%}$ and these two parameters, i.e. α and V_L , was linear.

Table 3
p-values of linear (L) and quadratic (Q) effects for the investigated operating parameters of the WAVE 25 system equipped with a Cellbag 2 L bag-like container, based on the results of ANOVA.

parameter	effect type	p-value
α	L	1.41×10^{-6}
	Q	6.69×10^{-1}
ω	L	8.91×10^{-20}
	Q	2.69×10^{-8}
acc	L	8.31×10^{-1}
	Q	7.96×10^{-1}
V_L	L	5.40×10^{-5}
	Q	2.13×10^{-1}

Last but not least, p-values for (L) and (Q) effects referred to acc were both much bigger than $p = 5 \times 10^{-2}$. In other words, based on data presented in Fig. 4E, the standardized effects referred to acc lay outside the confidence interval. This indicates that the impact of acc on the values of mixing time in the studied system was not statistically significant.

Based on the performed statistical tests, it was shown that only α , ω and V_L significantly influenced the values of mixing time achievable in Cellbag 2 L disposable bag-like container rocked by the WAVE 25 system. On the other hand, the acc parameter was shown to have a negligible effect on the quality of mixing performed in the studied WAVE 25 and Cellbag 2 L system. Therefore, in all further discussions, only the α , ω and V_L parameters will be considered, and the acc parameter will be

omitted.

3.3. Analysis of the mixing performance

Mean values of mixing time for selected pairs of process parameters have been presented as surface response plots in Fig. 5. Relationships between operating parameters and $t_{95\%}$ were monotonic in all cases: increasing the value of α or ω resulted in a decrease of $t_{95\%}$, and, in the opposite, increasing the value of V_L resulted in an increase of $t_{95\%}$.

The average mixing time values for the highest ω equal to 40 min^{-1} were smaller than 10 s regardless of the values of α and V_L , as may be seen in Fig. 5A and 5B, respectively. The mixing time for α higher than 7° and ω higher than 21 min^{-1} was always shorter than 30 s. Mixing times of less than 10 s were achieved for α higher than 7° and ω higher than 27 min^{-1} .

Isolines arrangement in Fig. 5B indicates that the filling volume had the most substantial effect on mixing efficiency in the range below 0.6 dm^3 . For bigger volumes, the effect became less significant.

The slope of isolines in Fig. 5C was closer to 45° when compared to Fig. 5A and Fig. 5B. Therefore, the effects of α and V_L on the values of mixing time obtained in the studied WAVE 25 system equipped with Cellbag 2 L container were similar. Such observation was consistent with the findings based on the statistical analysis performed in Section 3.2 and the standardized effect absolute values graphically presented in Fig. 4E.

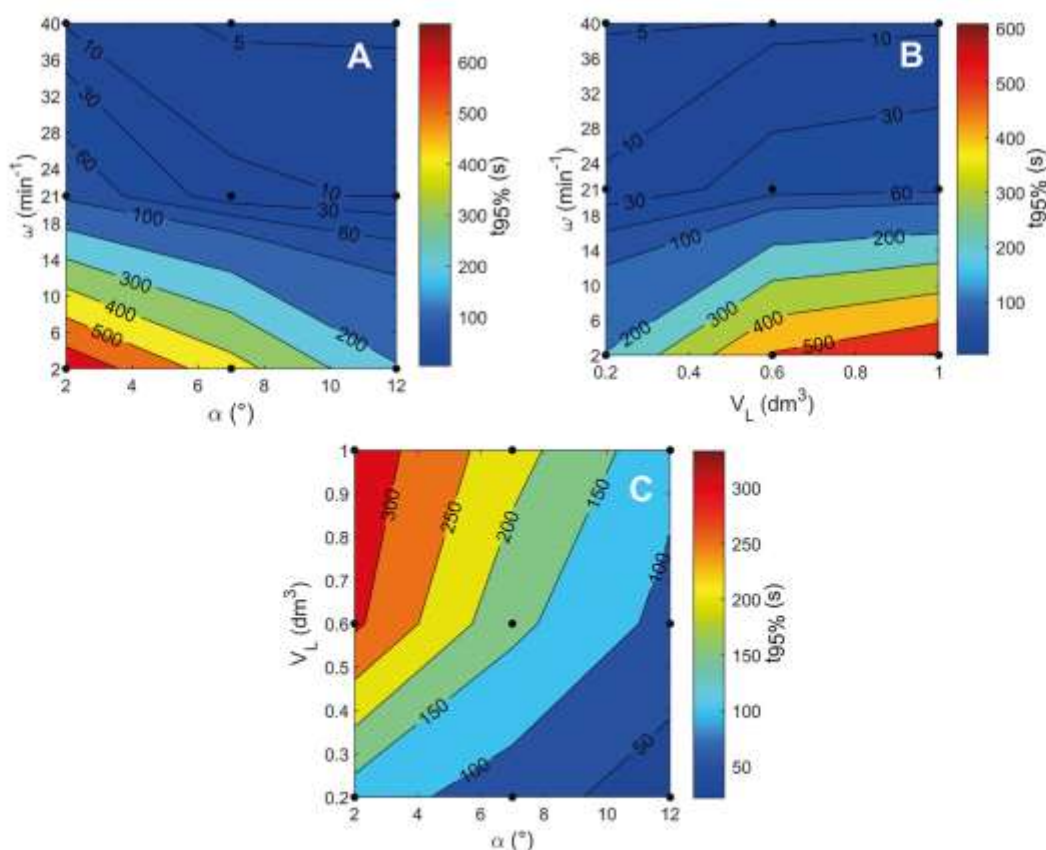


Fig. 5. Surface response plots for pairs of operational parameters which significantly impacted the values of $t_{95\%}$: pair of ω (vertical axis) and α (horizontal axis) (A), pair of ω and V_L (B), pair of V_L and α (C).

Table 4
A comparative summary of data on mixing time values characterizing stirred, rocking and orbitally shaken SUBs, as reported previously in the literature.

Type	model	V (dm ³)	V _L (dm ³)	operating parameters	t _{95%} (s)	reference
stirred	Molius CellReady	3	1.5	u _{tip} 0.4–1.0 m s ⁻¹	14.9–3.4	[20]
			2.0	0.3–1.0 m s ⁻¹	33.4–7.0	
			2.5	0.4–0.8 m s ⁻¹	27.0–13.6	
			N/S	u _{tip} 0.6–1.8 m s ⁻¹	19–8	
					35–11	
1D-rocking	Sartorius CultBag STR	50			35–13	[21]
			200		65–20	
			500		59–20	
			1000		28–7	
			2000		264–9	
	Univessel SU	2	N/S	u _{tip} 0.6–1.8 m s ⁻¹	1402–40	[22]
			0.8–1.0	ac 6–24 min ⁻¹	837–22	
			8–10	ac 5–10°	874–65	
			40–50	ac 5–25 min ⁻¹		
			100–200	ac 4–12°		
	BinWave	2	0.2	ac 5–40 min ⁻¹	10–5	[23]
			0.6	ac 5–10°	60–5	
			1.0	ac 2–40 min ⁻¹	367–4	
			1.0	ac 2–12°	861–4	
			1.0		893–4	
WaveBioreactor	2	3	ac 10–40 min ⁻¹	42–13	[25]	
		5	ac 8–12°	195–15		
		6		156–37		
		8		377–38		
		10		343–34		
ReadyToProcess WAVE 25	10	5	ac 15–35 min ⁻¹	15–9	[26]	
		10		16–12		
		15		20–13		
		75	ac 7–30 min ⁻¹	135–106		
		115		140–65		
2D-rocking	Cell-tainer	20	0.54	N: 110–200 min ⁻¹	109–10	[27]
			0.94	140–200 min ⁻¹	40–20	
			1.5	90–200 min ⁻¹	150–20	
			2.2	100–200 min ⁻¹	240–10	
			4.0	90–200 min ⁻¹	190–10	
			100	N: 50–70 min ⁻¹	70–24	
orbitally shaken	research vessel	N/S, d = 7 cm	0.54	N: 110–200 min ⁻¹	109–10	[27]
			0.94	140–200 min ⁻¹	40–20	
			1.5	90–200 min ⁻¹	150–20	
			2.2	100–200 min ⁻¹	240–10	
			4.0	90–200 min ⁻¹	190–10	
Kuhser SB-200X	200	N/S, d = 13 cm	0.54	N: 110–200 min ⁻¹	109–10	[28]
			0.94	140–200 min ⁻¹	40–20	
			1.5	90–200 min ⁻¹	150–20	
			2.2	100–200 min ⁻¹	240–10	
			4.0	90–200 min ⁻¹	190–10	

4. Discussion

Obtained results have demonstrated a valuable insight into the mixing properties of the WAVE 25 bioreactor equipped with the disposable Cellbag 2 L bag-like container. ω and α have been recognized as the two parameters that provide the biggest freedom in changing the mixing intensity. In general, the most intensive mixing, i.e. the shortest $t_{95\%}$ values, can be achieved for $\alpha = 12^\circ$ and $\omega = 40 \text{ min}^{-1}$. Together with the V_L parameter, these parameters have been identified as the operational parameters that significantly impact $t_{95\%}$ values. It should be kept in mind during the planning and scheduling of cell cultures that the values of $t_{95\%}$ tend to be longer for higher filling volumes. The influence of the acc parameter was negligible.

Experimental values presented in this study have been compared to data reported in previously published papers investigating the mixing time in various types of SUBs with disposable containers varying in operational volume. A comparative summary of the literature data is presented in Table 4.

Based on the comparison drawn in Table 4, mixing time values obtained in this study were consistent with data reported in previously published works. The overall trend of lower ω and lower α resulting in higher $t_{95\%}$ values was apparent in both the literature data and data from the current study.

In the case of the ReadyToProcess WAVE 25 system, the relationship between higher V_L causing lower mixing intensity shown in this study, i.e. in a system equipped with the 2-litre disposable bag-like container, was also present in the values presented by Bai [25] for the system equipped with 10- and 20-litre bag-like containers. An increase in the filling level from 30% to 50% caused an increase in maximum mixing time values from 42 s to 195 s (i.e. + 360%) in a 10-litre Cellbag and from 156 s to 343 s (i.e. + 120%) in a 20-litre Cellbag. A similar, though

less pronounced trend was visible in the present study, i.e. for 2-litre Cellbag, where increasing the filling level from 30% to 50% gave an overall + 20% change in the values of mixing time (see: Table 3).

The highest $t_{95\%}$ values in a rocking SUB, which other researchers have reported in order of hundreds of seconds, were similar to the maximum values measured in this work. The maximum value in a disposable 2-litre bag-like container reported by Eibl & Eibl [23] equalled 264 s, which was shorter than the 367 s value noted in the case of our experimental setup. However, such result was obtained at significantly higher values of operational parameters (i.e. $\omega = 24 \text{ min}^{-1}$ and $\alpha = 5^\circ$) compared to this study (i.e. $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$ and $\alpha = 2^\circ$). The biggest difference was visible when compared to data obtained by Singh [24], where the highest $t_{95\%}$ values were no longer than 60 s. However, according to Thomassen et al. [29], the application of an optical fluorescent dye method done by Singh could have led to underestimating real $t_{95\%}$ values.

Very pronounced in 1D-rocking SUBs were the differences revealed between the highest and lowest $t_{95\%}$ values. Mixing quality at the lowest α and ω applied can be insufficient for obtaining homogenous culture conditions and efficient cell proliferation. Therefore, proper selection of appropriate values of operational parameters defining the rocking motion is essential for the successful application of this type of bioreactors. Worth noting is that in the case of the Cell-tainer, a 2D-rocking SUB, the mixing times in a disposable 200 L bag-like vessel were much shorter at the lowest agitation intensity than the mixing times observed in a 1D-rocked disposable 200 L bag-like container [23,26]. Similarly, mixing times reported for the Cell-tainer equipped with a disposable 20-litre container were much shorter than the values for the 20-litre Cellbag 1D-rocked in the ReadyToProcess WAVE 25 system, according to results reported by Bai [25]. This suggests that the 2D rocking motion applied in rocking SUBs enhanced the homogenization speed and the mass transfer

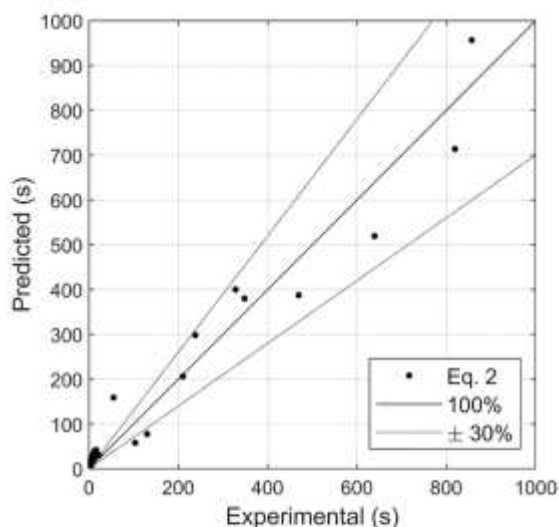


Fig. 6. Parity plots of experimental $t_{95\%}$ and its values predicted based on Eq. (2), all data points.

intensity compared to the 1D-rocking SUBs. Nevertheless, 1D-rocking SUBs seem to be more prevalent in the industry today, with the disposable containers of the highest available volumes are applied more commonly than the laboratory-scale models [3].

$t_{95\%}$ values observed in stirred and orbitally shaken SUBs are significantly smaller than the values obtained in rocking SUB setups. In the case of stirred SUBs, mixing is much more efficient due to the high velocity and turbulence zones caused by the motion of a rotating impeller, which is not present in rocking SUBs. Shorter $t_{95\%}$ inside orbitally shaken bioreactors may result from the much higher platform rotation frequency compared to the oscillatory movement frequency of rocking SUBs.

As commonly known, correlations are recognized as a handy tool that allows for the generalization of measured experimental data, as well as quick and straightforward to implement prediction of important process parameters for a continuous range of input variables. An exponential correlation including all operational parameters, which had a significant effect on the values of $t_{95\%}$, i.e. ω , α and V_L , has been proposed as follows:

$$t_{95\%} = 389.41 \cdot \omega^{-1.089} \cdot (\sin \alpha)^{-0.489} \cdot V_L^{0.5736} \quad (2)$$

Constants and exponentials in Eq. (2) have been numerically found with the nonlinear regression function in the MATLAB environment. $t_{95\%}$ in Eq. (2) has been expressed in seconds, ω in min^{-1} , α in degrees, and V_L in dm^3 . The coefficient of determination R^2 for Eq. (2) equalled 0.958. Comparison between experimental data and values of $t_{95\%}$ predicted based on Eq. (2) has been presented in Fig. 6 in the form of a parity plot.

As shown in Fig. 6, predictions based on Eq. (2) lay within $\pm 30\%$ of experimental values larger than 200 s. Experimental $t_{95\%}$ values below 30 s were heavily over-estimated by Eq. (2), with over +300% errors and no predictions within $\pm 30\%$ of original values. This indicates that Eq. (2) can only be used to estimate $t_{95\%}$ values in low rocking intensity conditions, limiting its practicality.

In an attempt to improve the prediction quality in the range of low $t_{95\%}$ values, another exponential correlation has been proposed, with coefficients fitted to experimental data at $\omega \geq 21 \text{ min}^{-1}$ and $\alpha \geq 7^\circ$, presented below as Eq. (3):

$$t_{95\%} = 704.16 \cdot \omega^{-1.516} \cdot (\sin \alpha)^{-0.4594} \cdot V_L^{0.450} \quad (3)$$

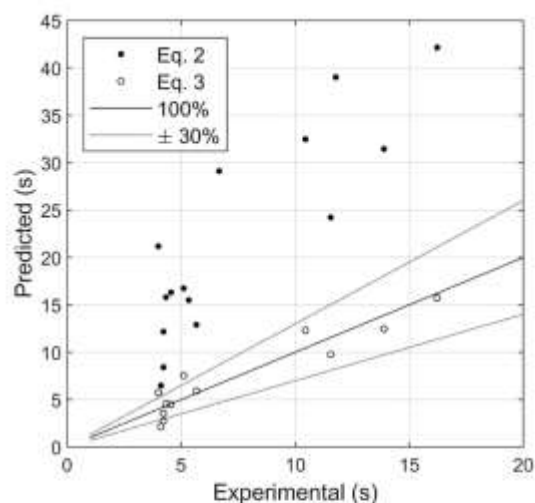


Fig. 7. Parity plot of experimentally measured $t_{95\%}$ and its values predicted based on Eq. (3) (empty markers), compared with predictions from Eq. (2) (black-filled markers).

$t_{95\%}$ in Eq. (3) has been expressed in seconds, ω in s^{-1} , α in degrees, and V_L in m^3 . The coefficient of determination R^2 for Eq. (3) equalled 0.886. Comparison between experimental data and predictions based on both introduced correlations, i.e. Eq. (2) and Eq. (3), has been presented in Fig. 7. Visible is the improved accuracy of predictions in the high mixing intensity regime. The majority of predictions with Eq. (3) lay within $\pm 30\%$ of experimental values, and the highest errors are within $\pm 50\%$.

Lower accuracy of predictions in the range of low $t_{95\%}$ values, i.e. $\omega \geq 21 \text{ min}^{-1}$ and $\alpha \geq 7^\circ$, is probably connected with the limited resolution of the experimental setup: frequency of readouts for the CX-401 meter is capped at a maximum of 1 Hz. Therefore, there were several process parameter combinations for which the mixing time value was very similar, which was especially apparent with mixing times below 10 s. At this magnitude of values, all $\pm 1 \text{ s}$ differences may have had a significant relative effect on final results. This shortcoming could probably be solved using measurement units capable of lower intervals between readouts to provide high-precision data or with the use of computer simulations.

There certainly exists a significant gap in the quantitative characterization of liquid flow patterns in rocking SUBs, caused by the lack of expressions describing relations between operational parameters and significant process quantities in disposable bag-like containers of different sizes. Thus, it is a significant disadvantage of rocking systems compared to other types of SUBs, for which appropriate scale-up correlations have already been proposed, e.g. for orbitally shaken SUBs [30,31], or for which existing mathematical models applied with conventional bioreactors can be used, as in the case of stirred SUBs [3]. A correlation involving dimensionless terms and numbers should be proposed to pave the way for defining scale-change expressions for rocking SUBs.

The following original correlation, which involves a dimensionless term representing the filling level of the disposable bag-like container and a modified Reynolds number expression has been introduced:

$$t_{95\%} = 2.2962 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{\omega} \cdot \left(\frac{V_L}{V} \right)^{0.5735} \cdot Re_{cl}^{-0.4757} \quad (4)$$

$t_{95\%}$ in Eq. (4) has been expressed in seconds, ω in min^{-1} , both V_L and V in dm^3 . Re_{cl} in Eq. (4) was expressed in the form previously proposed by our team [19]:

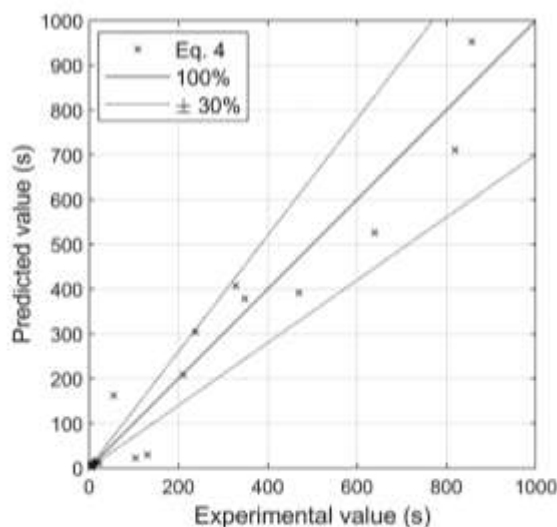


Fig. 8. Parity plot of experimentally measured $t_{0.95\%}$ and its values predicted based on Eq. (4), all data points.

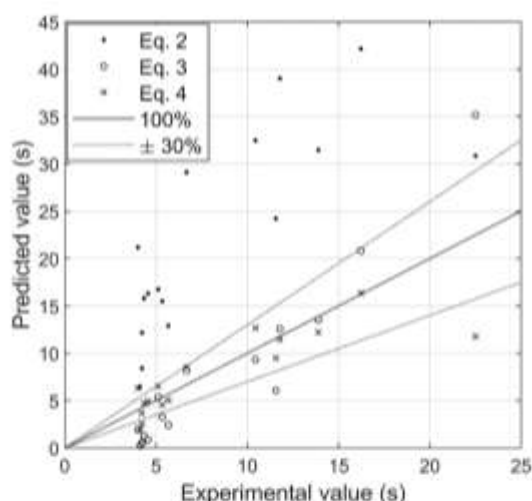


Fig. 9. Parity plot of experimental $t_{0.95\%}$ and its values predicted based on Eq. (4), presented as data points for experimental values below 25 s (data points based on predictions from Eqs. (2) and (3) displayed for comparison).

$$Re_L = \frac{\omega \cdot L^2}{\nu} \sin \alpha \quad (5)$$

Characteristic dimension L in Eq. (5) is the length of the bag-like container – in the case of the studied Cellbag 2 L, L equals 0.32 m. ν in Eq. (5) is the kinematic viscosity of water at 37 °C, equal to $6.962 \times 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. The coefficient of determination R^2 for Eq. (4) equalled 0.953. The quality of $t_{0.95\%}$ predictions based on Eq. (4) has been displayed in Fig. 8.

The estimation quality in the high mixing time range was similar to the one observed in the case of $t_{0.95\%}$ estimated with Eq. (2). However, a deeper consideration should also be given to comparing the experimental and predicted values for high mixing intensity, i.e. for rocking defined by high values of α and ω , as operating parameters of the studied

WAVE 25 system.

To summarise the discussion, $t_{0.95\%}$ values predictions based on all introduced correlations, i.e. on Eq. (4), but also on Eqs. (2) and (3), have been comparatively summarized on a parity plot in Fig. 9.

As shown in Fig. 9, the problems with $t_{0.95\%}$ predictions in the high mixing intensity range observed for Eq. (2) are not present for Eq. (4), and the quality of $t_{0.95\%}$ predictions based on Eq. (4) for this regime was similar to Eq. (3). Apart from few outliers, the vast majority of the points lay within $\pm 30\%$ of experimental values. The absolute average error of predictions from Eq. (4) equalled 30.92%. Presented set of correlations, i.e. Eqs. (2)–(4) can be used for predicting $t_{0.95\%}$ in the ReadyToProcess WAVE 25 SUB system equipped with the disposable Cellbag 2 L container. In the high mixing intensity range, Eq. (2) should be used in conjunction with Eq. (3), which is applicable in the range of $\omega \geq 21 \text{ min}^{-1}$ and $\alpha \geq 7^\circ$. Eq. (4), in turn, can be used in the entire range of operational parameters available in WAVE 25, according to experimental values from Table 1. Additionally, the use of dimensionless terms in Eq. (4) should allow for applying analogous formulas for disposable bag-like containers by different manufacturers and of various sizes. Overall, predictions of $t_{0.95\%}$ values made with Eqs. (2)–(4) were within $\pm 30\%$ of experimental values in most cases, making all of them useful during bioprocesses planning (i.e. cell cultures, biotransformations, etc.) in the studied rocking SUB system.

5. Conclusions

To conclude, in this work, the mixing time characteristic in a litre-scale 1D-rocking disposable bioreactor has been thoroughly analyzed based on the application of a ReadyToProcess WAVE 25 system equipped with a Cellbag 2 L bag-like container. Based on a series of experiments planned with DoE methods and the analysis of their results, three operational parameters have been identified having a significant effect on the mixing quality: α , ω , and V_L , with the effect of ω being the strongest. Obtained experimental data have been compared to results from previously published research regarding mixing time in various types of SUBs: mechanically driven, orbitally shaken, as well as 1D- and 2D-rocking models. A set of correlations has been proposed, which can be used for calculating/predicting mixing time values for arbitrary operational parameter values inside specified ranges, which cover the entire (α and ω) or the majority (V_L) of available settings in the WAVE 25 system. Presented formulas have revealed a satisfactory level of accuracy within $\pm 30\%$ of experimental values. The presented results intend to be a step towards the better systematization of liquid flow inside disposable containers operated in rocking SUB setups. In turn, this will facilitate up- and downscaling operations and enable the broader application of this group of devices in the biopharmaceutical and bioprocess industries.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This research was supported by the Warsaw University of Technology – the Scientific Council of the Discipline Chemical Engineering, grant number I-Chem.1.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133288>.

References

- [1] D. Eibl, R. Eibl, Single-Use Equipment in Biopharmaceutical Manufacture: A Brief Introduction, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Single-Use Technol. Biopharm. Manuf.*, 1st ed., Wiley, 2019, pp. 1–11, <https://doi.org/10.1002/9781119477891.ch1>.
- [2] S. Vanhamel, C. Pitou, Production of Disposable Bags – A Manufacturer's Report, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Single-Use Technol. Biopharm. Manuf.*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2019, pp. 95–116, <https://doi.org/10.1002/9781119477891.ch8>.
- [3] V. Jossen, R. Eibl, D. Eibl, Single-Use Bioreactors – An Overview, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Single-Use Technol. Biopharm. Manuf.*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2019, pp. 37–52, <https://doi.org/10.1002/9781119477891.ch4>.
- [4] A. Mizukami, K. Swiech, Mesenchymal stromal cells: from discovery to manufacturing and commercialization, *Stem Cells Int.* 2018 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1155/2018/4082923>.
- [5] M.C. Decarli, D.P. dos Santos, R.M. Astray, D.C. Venturi-Monteiro, S.A.C. Joerg, D. M. Correia, J. de Sá da Silva, M.P. Roca, H. Lungoni, B.D. Meszcal, C.A. Pereira, C. A.T. Souza, DROSOPHELA S2 cell culture in a WAVE Bioreactor: potential for scaling up the production of the recombinant rabies virus glycoprotein, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (11) (2018) 4773–4783, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8962-0>.
- [6] L.E. Gallo-Ramírez, A. Nikolay, Y. Genzel, U. Reichl, Bioreactor concepts for cell culture-based viral vaccine production, *Expert Rev. Vaccines* 14 (9) (2015) 1181–1195, <https://doi.org/10.1586/14739284.2015.1067144>.
- [7] B.L. Levine, J. Miskin, K. Wonsacott, C. Keir, Global manufacturing of CAR T cell therapy, *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 4 (2017) 92–101, <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2016.12.006>.
- [8] H. Zhang, D.E. Kent, M. Albanna, L. Liu, X.S. Sun, S. Esker, S. Somana, Bioreactor technology for cell therapy manufacturing in regenerative medicine, *Curr. Stem Cell Rep.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s40279-021-00209-x>.
- [9] Y. Zhang, X. Wang, M. Pong, L. Chen, Z. Ye, Application of bioreactor in stem cell culture, *J. Biomed. Sci. Eng.* 10 (11) (2017) 485–499, <https://doi.org/10.4236/jbse.2017.1011037>.
- [10] A.-C. Tsai, Y. Liu, X. Yuan, R. Chella, T. Ma, Aggregation kinetics of human mesenchymal stem cells under wave motion, *Biotechnol. J.* 12 (5) (2017) 1600448, <https://doi.org/10.1002/biot.201600448>.
- [11] K. Wierchowski, A. Kuzmifuska, M. Pilarek, Intensification of chondrocytes proliferation by microcarriers and wave-induced mixing: Reynolds number influence on CP5 cells growth, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 166 (2021) 108472, <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108472>.
- [12] LeTuyen Nguyen, S. Bang, I. Noh, Tissue regeneration of human mesenchymal stem cells on porous gelatin micro-carriers by long-term dynamic in vitro culture, *Tissue Eng Regen. Med.* 16 (1) (2019) 19–28, <https://doi.org/10.1007/s13770-018-00174-8>.
- [13] N. Insaeng, S. Schillberg, C. Schürch, D. Schmid, K. Schütte, G. Gori, D. Eibl, R. Eibl, Suspension Culture of Plant Cells Under Heterotrophic Conditions, in: H.-P. Meyer, D.R. Schmidhalter (Eds.), *Ind. Scale Suspens. Cult. Living Cells*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, Germany, 2014, pp. 224–258, <https://doi.org/10.1002/9783527683321.ch07>.
- [14] C. Srikanth, S. Srivastava, Bioreactor Design and Analysis for Large-Scale Plant Cell and Hairy Root Cultivation, in: V. Srivastava, S. Mehrotra, S. Mishra (Eds.), *Hairy Roots*, Springer Singapore, Singapore, 2018, pp. 147–182, https://doi.org/10.1007/978-981-13-2562-5_7.
- [15] D.J. Craik, M.-H. Lee, F.B.H. Rehm, B. Tombling, B. Doffek, H. Peacock, Ribosomally-synthesised cyclic peptides from plants as drug leads and pharmaceutical scaffolds, *Bioorg. Med. Chem.* 26 (10) (2018) 2727–2737, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.005>.
- [16] K. Sway, C. Urrea, P.A. Shamoun, H.u. Zhang, Computational fluid dynamics analysis of mixing and gas-liquid mass transfer in wave bag bioreactor, *Biotechnol. Prog.* 36 (6) (2020), <https://doi.org/10.1002/btpr.3049>.
- [17] K.P. Clapp, A. Costan, E.K. Lindskog, Upstream processing equipment, in *Biopharm. process.*, Elsevier (2018) 457–476, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00024-4>.
- [18] Cytiva, Engineering characterization of ReadyToProcess WAVE™ 25 bioreactor system with 20 L Cellbag™ culture chamber, (2016).
- [19] M. Pilarek, P. Sobieszuk, K. Wierchowski, K. Dąbkowska, Impact of operating parameters on values of a volumetric mass transfer coefficient in a single-use bioreactor with wave-induced agitation, *Chem. Eng. Res. Des.* 136 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.04.012>.
- [20] S.C. Kaiser, R. Eibl, D. Eibl, Engineering characteristics of a single-use stirred bioreactor at bench-scale: The Möbius Cell Ready 3L bioreactor as a case study, *Eng. Life Sci.* 11 (4) (2011) 359–368, <https://doi.org/10.1002/etlc.v11.410.1002/etlc.201000171>.
- [21] T. Dreher, U. Husemann, S. Ruhl, G. Greller, Design space definition for a stirred single-use bioreactor family from 50 to 2000 L scale, *BMC Proc.* 7 (S6) (2013), <https://doi.org/10.1186/1753-0561-7-56-P55>.
- [22] A. Grebe, C. Feng, J.-P. Chaudard, Efficient tools for process development and characterization in the universal bag bioreactor, *BioProcess Int.* 12 (2014) 7–9.
- [23] R. Eibl, D. Eibl, Design And Use Of The Wave Bioreactor For Plant Cell Culture, in: S.D. Gupta, Y. Ibaraki (Eds.), *Plant Tissue Cult. Eng.*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2006, pp. 203–227, https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_12.
- [24] V. Singh, Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation, *Cytotechnology* 30 (1999) 149–158, <https://doi.org/10.1023/A:1006029016292>.
- [25] Y. Bai, M. Moo-Young, W.A. Anderson, Characterization of power input and its impact on mass transfer in a rocking disposable bioreactor, *Chem. Eng. Sci.* 209 (2019) 115183, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115183>.
- [26] S. Junne, T. Solymsó, N. Oosterhuis, P. Neubauer, Cultivation of cells and microorganisms in wave-mixed disposable bag bioreactors at different scales, *Chem. Ing. Tech.* 85 (2013) 57–66, <https://doi.org/10.1002/cite.201200149>.
- [27] G. Rodríguez, T. Anderlei, M. Michelletti, M. Ylammeski, A. Ducci, On the measurement and scaling of mixing time in orbitally shaken bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 82 (2014) 10–21, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.021>.
- [28] T. Anderlei, C. Cesana, C. Bürki, M. De Jesus, M. Kühner, F. Wurm, R. Löhner, Shaken bioreactors provide culture alternative, *Genet. Eng. Biotechnol. News* 29 (2009) (accessed June 2, 2021), <https://www.genengnews.com/magazine/122/shaken-bioreactors-provide-culture-alternative/>.
- [29] Y.E. Thomassen, J.E. van der Welle, G. van Eilander, L.A. van der Pol, W.A. M. Bakker, Transfer of an adherent Vero cell culture method between two different rocking motion type bioreactors with respect to cell growth and metabolic rates, *Process Biochem.* 47 (2) (2012) 288–296, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.11.006>.
- [30] W. Klöckner, B. Gorem, T. Anderlei, N. Raven, S. Schillberg, C. Lattermann, J. Büchs, Correlation between mass transfer coefficient kLa and relevant operating parameters in cylindrical disposable shaken bioreactors on a bench-to-pilot scale, *J. Biol. Eng.* 7 (2013) 28, <https://doi.org/10.1186/1754-1611-7-28>.
- [31] S. Tissot, M. Farhat, D.L. Hacker, T. Anderlei, M. Kühner, C. Cominelli, F. Wurm, Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors, *Biochem. Eng. J.* 52 (2-3) (2010) 181–186, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.005>.

10.2. Publikacja [A2]

Bartczak M., Wierzchowski K., Pilarek M. (2023) *Mass transfer in a liter-scale wave mixed single-use bioreactor: Influence of viscosity and antifoaming agent*. Industrial and Engineering Chemistry Research 62: 10893–10902. DOI: 10.1021/acs.iecr.3c00736 (IF₂₀₂₃ 3,764, 140 pkt.)

Wkład autorski:

Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu planu eksperymentów i metodyki pomiarów współczynnika $k_L a$, przeprowadzenie pomiarów współczynnika $k_L a$, obróbka otrzymanych wyników, udział w opracowaniu korelacji wiążącej liczby kryterialne z wartościami współczynnika $k_L a$, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.

Mass Transfer in a Liter-Scale Wave Mixed Single-Use Bioreactor: Influence of Viscosity and Antifoaming Agent

Mateusz Bartczak, Kamil Wierzchowski, and Maciej Pilarek[✉]



Cite This: *Ind. Eng. Chem. Res.* 2023, 62, 10893–10902



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

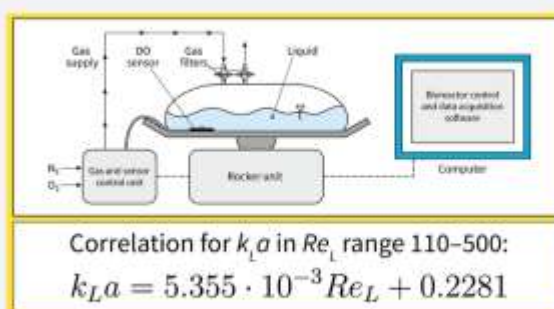


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Wave mixed single-use bioreactors (also called rocking bioreactors) are a group of devices in which mixing is caused by characteristic wave-like movement of liquid inside a pillow-shaped bag mounted on a continuously oscillating platform. This study aimed to investigate the influence of liquid phase viscosity and the presence of an antifoaming agent on the mass transfer in a 2 liter single-use bag used in a ReadyToProcess WAVE 25 bioreactor system. The mass transfer rate was quantified by measuring the volumetric liquid-side mass transfer coefficient $k_L a$ using a gassing-out method. Two liquid phase mixture types were independently composed of Dulbecco's modified Eagle medium or water and supplemented with fetal bovine serum (FBS). The viscosity of the liquid phases was modified with glycerin. The measurements were performed with and without the addition of a Pluronic F-68 antifoaming agent in a viscosity range of 0.9–4.2 mPa·s. It was shown that the viscosity of the liquid phase significantly impacts the values of the $k_L a$ coefficient, ranging from 0.8 to 3.7 h⁻¹ at $\alpha = 7^\circ$ and $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$. The addition of the antifoaming agent caused a decrease in the mass transfer rate. A correlation has been proposed for estimating $k_L a$ values as a function of the modified Reynolds number.



Correlation for $k_L a$ in Re_L range 110–500:

$$k_L a = 5.355 \cdot 10^{-3} Re_L + 0.2281$$

INTRODUCTION

Wave mixed single-use bioreactors (also referred to as rocking disposable bioreactors) are a group of devices widely used for small to medium-scale operations at volumes ranging from 0.1 to 200 dm³ in various bioengineering/bioprocess research and production areas. The recent reports of wave mixed bioreactor use include their application for the production of viral particles for anti-viral vaccines manufacture,² human mesenchymal stem cells,³ modified T cells production,⁴ cultures of HL-60 human hematopoietic cells,⁵ modified *Plasmodium falciparum* blood stage malaria cell banks⁶ or natural killer cells, cytokine-induced killer cells, and dendritic cells for immunotherapy.⁷ Rocking bioreactors are also a field of intensive study for various researchers in regard to the hydrodynamical properties of the liquid flow inside single-use bags.^{8–16}

The practical and research interest in wave mixed bioreactors is due to their specific properties, namely the characteristic mixing mechanism resulting in low levels of shear stress to the cultured biomass¹ and flexibility, allowing for rapid volume changes in the performed bioprocess.¹⁷ These properties add to the benefits of single-use systems, such as shorter downtimes compared to the stainless-steel multi-use bioreactors and easier sterility preservation, thanks to the pre-sterilized single-use culture bags being shipped after gamma radiation treatment.¹⁸

Despite the already substantial amount of experimental data regarding wave mixed single-use bioreactors, given the wide

interest from researchers and broad applicability in modern areas of biopharmacy, bioengineering, and novel medical therapies, characterization of rocking bioreactors is still desired, as it has been discussed in reports about, e.g., stirred single-use and multi-use reactors (10⁻¹ to 10⁰ dm³ volume,^{19–22} 10¹ to 10² dm³ volume,^{23–27} and 10³ dm³ volume^{28–30}). Similar to other bioreactor types, such as orbitally shaken single-use bioreactors^{31–35} and shake flasks^{36–39} or airlift bioreactors,^{40–42} it is valuable and relevant to further supplement the base of experimental data about wave mixed devices, including those regarding the mass transfer. The data will subsequently enable researchers to derive empirical correlations for predicting values of important parameters (e.g., mixing time, volumetric mass transfer coefficient) as a function of process variables, such as those defining the wave mixing (rocking angle α , rocking frequency ω , headspace gas flow rate Q_L) or the properties of the liquid phase (temperature T , viscosity μ , volume of liquid phase V_L).

Received: March 7, 2023

Revised: June 21, 2023

Accepted: June 22, 2023

Published: July 4, 2023



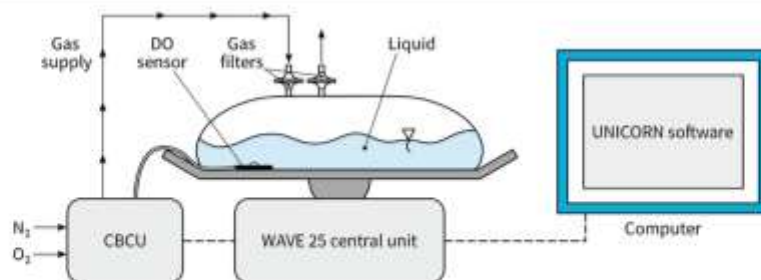


Figure 1. Scheme of the experimental setup: WAVE 25 central unit equipped with the 2 L single-use bag. Dashed lines represent electrical and data connections. Arrowed lines represent gas flow connections. A double line represents an optical fiber connection.

This work aimed to investigate the impact of liquid phase viscosity on the oxygen transfer characteristics in a rocking bioreactor based on the ReadyToProcess WAVE 25 system (WAVE 25, Cytiva, USA) equipped with a 2 dm³ total volume Cellbag bioreactor container (Cytiva, USA). The impact was evaluated by measurements of the volumetric mass transfer coefficient $k_L a$ in mixtures based on reverse osmosis (RO) water or the Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), each supplemented with 10 %_{v/v} addition of fetal bovine serum (FBS). The mixtures were modified with glycerin in a range of concentrations to simulate the presence of suspended cell biomass and its effects on the viscosity of the culture medium. Additionally, we examined the impact of an antifoaming agent, the Pluronic F-68 non-ionic surfactant, on the mass transfer rate in the studied systems. An empirical correlation for estimating values of $k_L a$ coefficient as a function of the modified Reynolds number has been proposed.

MATERIALS AND METHODS

Single-Use Wave Mixed Bioreactor System. A WAVE 25 bioreactor system equipped with a single-use Cellbag 2 L container was used during the experiments. The main mechanical part of the system was the central unit with the 1D-rocking platform. The bottom surface of the disposable bag contained an integrated miniaturized spectrophotometric single-use dissolved oxygen (DO) sensor. The DO sensor was connected via an optical fiber to a peripheral Ready-ToProcess CBCU control and measurement unit. DO measurements were performed automatically every 30 s and recorded with the data acquisition functions built into the dedicated UNICORN software. The CBCU, apart from emitting and collecting light signals to and from the DO sensor, was used to measure and control the volumetric flow rate of gas supplied to the single-use bag. Temperature control in the system was done automatically with the heater and measurement system built into the oscillating platform. All operational parameters, including the temperature values, gas volumetric flow rate, gas composition, DO values, and rocking motion parameters, were controlled by the user and recorded via a PC running UNICORN software. A scheme of the experimental setup is presented in Figure 1.

DO Sensor Response Time Measurement. Response time is an important factor, as it describes the maximum detectable rate of change of the measured quantity and, in this case, limits the maximum measurable $k_L a$ value. For this study, the DO sensor response time was determined through a step response testing according to the following procedure.

1. The measurement involved two beakers filled with RO water. Dissolved oxygen was eliminated from the liquid in the first beaker by sparging with pure N₂. Completion of the elimination of oxygen was determined by placing a DO sensor patch cut out from the single-use bag inside the liquid until the DO concentration reading had fallen to a steady value of approximately 1.0 ± 1.0%. Liquid in the second beaker was saturated with oxygen using a 79 %_{v/v} N₂ + 21 %_{v/v} O₂ mixture. In the second beaker, the saturation with oxygen was complete when the DO readings reached a steady value of 100 ± 1%. The gasses were sparged into the liquid in both beakers for the whole measurement duration to ensure a stable concentration of dissolved gasses. The time between DO readings was set to 5 s, a minimum allowed by the UNICORN software.
2. After the elimination and saturation with oxygen had been completed in both beakers, the step input was done by quickly removing the sensor patch from the beaker filled with nitrogen-saturated liquid and immediately placing it inside the beaker with oxygen-saturated liquid.
3. The DO values were recorded until the readouts reached a steady value of 100 ± 1%.
4. The DO sensor response time was defined as the time value at which 63.2% of the total change in normalized DO value (Figure 2) has been achieved. The response time value was calculated based on the experimental data points approximated with an exponential curve.

The above procedure was conducted three times to obtain three distinct sensor response curves and response time values.

Liquid Phase Compositions. The $k_L a$ measurements were performed on liquid mixtures of varying compositions. The main ingredient of the mixtures was either reverse osmosis water (RO) or Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc, USA; cat. no. 21885025). DMEM is a medium widely used in *in vitro* cultures of isolated animal or human cells. DMEM medium is formulated from various components, such as amino acids, vitamins, inorganic salts, sugars, and pH indicators.^{43,44}

RO and DMEM were independently supplemented with a 10 %_{v/v} addition of fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific Inc, USA; cat. no. A5256701), a common natural supplement needed for the proper growth of mammalian cells in the *in vitro* culture conditions.

The viscosity of acquired RO + FBS and DMEM + FBS mixtures was modified by adding 0–50 %_{v/v} glycerin in 10 %_{v/v} increments. Measurements for each series of mixtures were performed thrice, independently with and without a 5 cm³

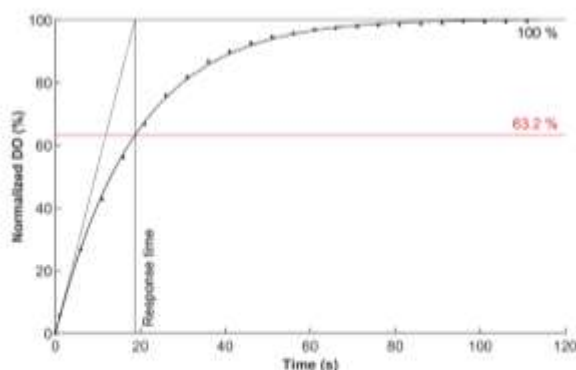


Figure 2. A plot of normalized DO values over time: an example of a DO sensor response curve. Experimental data points are approximated with an exponential function. The argument value, at which 63.2% of the sensor response is achieved, is marked as the response time. The response time can also be defined as the argument value, at which a line tangent to the response curve at the starting point, i.e., at the maximum rate of change of the sensor readings, crosses the 100% value.

addition of a non-ionic surfactant Pluronic F-68 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA; cat. no. 24040032), commonly utilized during cell cultures as an antifoaming agent.

The total volume of liquid used in each independently performed experiment, excluding the antifoaming agent, was 300 cm³. Compositions of the liquid phases used in the experiments are listed in Table S1 in the Supporting Information.

Gas Phase Composition. The gas mixtures used in the experiments consisted of high-purity nitrogen N₂ and oxygen O₂ supplied from pressure tanks, automatically mixed and administered into the single-use bag via the CBCU unit at a volumetric rate $Q_{G_i} = 0.55 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. The volumetric concentration of O₂ was controlled via the UNICORN software, and its value was different depending on the current step of the absorption rate measurement procedure, as specified in the Absorption Rate Measurements section and Table 1. According to the device specifications,⁴⁵ the O₂ concentration control accuracy was equal to $\pm 0.6\%$, and the volumetric rate control accuracy was equal to $\pm 0.01 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Table 1. Operational Parameters Values during the Experiments

operational parameter	deoxygenation	oxygenation	
antifoaming agent	yes	no	yes/no
α (deg)	7	7	7
ω (min ⁻¹)	40	21	2
Q_{G_i} (dm ³ min ⁻¹)	0.55	0.55	0.55
% _{v/v} O ₂	0.0	0.0	21.0
% _{v/v} N ₂	100	100	79
T (°C)	37	37	37

Surface Tension. The surface tension of mixtures was measured with a DSA100 drop shape analysis system (Krüss, Germany) in a pendant drop setup using the ADVANCE software suite. The surface tension was measured at the ambient temperature of 21.5 °C, as temperature control was unavailable in the DSA100 system. The formula for calculating surface tension⁴⁶ is given as follows:

$$\gamma = -\frac{R^2 g \Delta \rho}{B} \quad (1)$$

the liquid drop shape R and B parameters were calculated automatically using the functions built into the ADVANCE software.

Density Measurement. Density measurements were performed with a DA-650 density/specific gravity meter (KEM, Japan). The measurements were performed under a temperature corresponding to the selected part of the analysis. Namely, density measurements of which the results were to be used for the surface tension calculation were performed at 21.5 °C, while the measurements of which the results were used for Reynolds number calculation were performed at 37 °C.

Viscosity Measurement. The dynamic viscosity of mixtures was measured using an LVDV-III rheometer (Brookfield, USA) in a cone-plate system (cone type CP40), suitable for low to very high viscosity measurements and for liquids with varying rheological properties. The viscosity measurements were independently performed three times for each mixture under constant conditions: $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, cone rotational speed 50 min⁻¹, sample volume 0.5 cm³, and measurement time 1 min. Based on the linear shape of the flow curves, all variants of liquid mixtures can be considered Newtonian fluids (also stated by Poon, 2022⁴⁷).

Absorption Rate Measurements. The absorption rate was determined with a procedure based on the gassing-out method. The gassing-out method is recommended for determining aeration intensity in disposable systems.⁴⁸ The absorption rate was measured thrice for each mixture composition according to the following steps.

1. The single-use container was filled with $V_L = 300 \text{ cm}^3$ of a liquid mixture with specified composition and glycerin concentration. For the C mixture series, 5 cm³ of the antifoaming agent was added to the container.
2. Liquid deoxygenation was initiated with the rocking agitation operational parameters setting according to the values in Table 1. The volumetric oxygen concentration in the gas mixture administered to the polymer bag was set to 0.0%. The value of ω during the oxygenation was lower for mixtures without the antifoaming agent addition to prevent excessive foaming. Before the wave mixing initiation, the volume above the liquid phase was filled with the inert N₂ gas. The liquid inside the bag was kept at 37 °C with heaters built into the rocker unit. The deoxygenation was performed until the DO values had fallen below 5% for at least 5 min.
3. After the deoxygenation, the rocking parameters were changed to the values for the oxygenation step, according to Table 1. After the change, the rocking was performed for at least 5 min to stabilize the liquid flow inside the bag.
4. Liquid oxygenation was initiated with the change of gaseous oxygen concentration from 0.0 %_{v/v} to 21 %_{v/v} via the UNICORN software. From this moment, the DO values were recorded using the built-in data acquisition tools.
5. The oxygenation was performed until the DO values reached 95% for at least 5 min. The data describing the temporal changes of DO values were exported for analysis outside the UNICORN software.
6. In case the subsequent measurement was to be performed with a liquid phase of the same composition,

the procedure was repeated from step 2. If the liquid phase composition was to be changed, the single-use bag was emptied and rinsed three times with RO water, and the measurement procedure was repeated from step 1.

REYNOLDS NUMBER

Values of the Reynolds number inside the liquid for the studied system were calculated according to the expression proposed by Pilarek *et al.*¹¹

$$Re_L = \frac{\omega d^2 \rho}{\mu} \sin \alpha \quad (2)$$

In the above equation, d is the characteristic dimension corresponding to the Cellbag 2 L single-use container length, equal to 0.33 m.

Determination of the $k_L a$ Coefficient. The experimental data sets collected from the measurements have been used to calculate the $k_L a$ values. The DO over time plots for each measurement describe the process of liquid phase oxygenation (Figure 3).

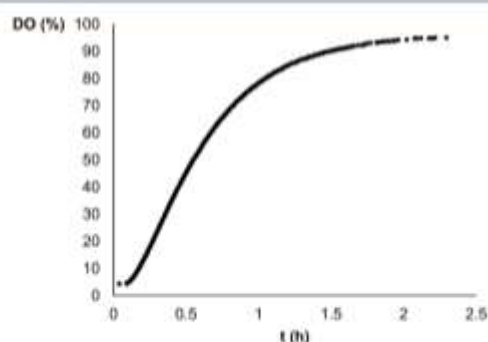


Figure 3. DO over time plot: an example of an oxygenation profile. The plot consists of raw data from one of the measurements for mixture C2. A similar curve shape was obtained for all measurements.

The $k_L a$ values were calculated based on the oxygen mass balance equation in the liquid phase (eq 3)

$$\frac{dDO(t)}{dt} = k_L a \times (DO^* - DO(t)) \quad (3)$$

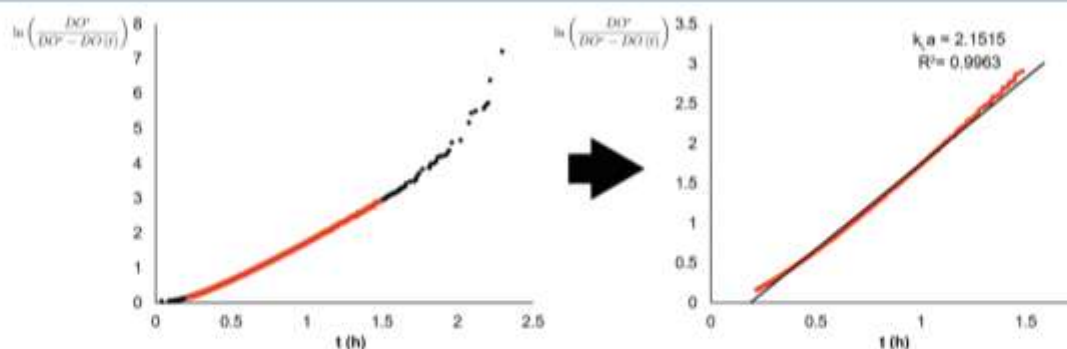


Figure 4. Graphical representation of the $k_L a$ coefficient. Left: Mixture C2 measurement data recalculated into the logarithm expression from eq 4. The linear subpart of the plot is marked in red. Right: Linear subpart of the plot with the linear trend line. In this example, $k_L a = 2.15 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0.9963$).

Equation 3 holds under the assumption that the partial pressure of oxygen in the gas phase is constant and equal to the partial pressure of oxygen in the gas mixture administered to the disposable container, which relates to the very low solubility of oxygen in RO water and DMEM. Integration of eq 3 gives the following expression:

$$\ln\left(\frac{DO^*}{DO^* - DO(t)}\right) = k_L a \times t \quad (4)$$

Equation 4 can be interpreted as a linear equation, the slope of which corresponds to the $k_L a$ value, allowing for a graphical representation of this parameter (Figure 4).

The plot in Figure 3 shows a short period of increasing slope after the beginning of DO readings acquisition. This shape corresponds to the period of gas exchange in the bag's headspace, in which the partial pressure of oxygen is not constant (% v/v O_2 changing from 0.0 to 21.0%; see Table 1). To account for this, data from the first 12 min of data acquisition were omitted in all cases, which corresponds to more than 3 times the time needed to exchange the volume of gas in the headspace (t_{ex}), calculated as follows:

$$t_{ex} = \frac{V_{ha}}{Q_G} = \frac{V_{tot} - V_L}{Q_G} = \frac{2.0 \text{ dm}^3 - 0.3 \text{ dm}^3}{0.55 \frac{\text{dm}^3}{\text{min}}} = 3.1 \text{ min} \quad (5)$$

The DO^* value was selected as the highest DO value obtained from the experimental data for a given measurement, and it was equal to $100 \pm 5\%$ in all measurements. In total, 54 independent measurements, three for each of the 18 liquid mixture variants, have been performed. $k_L a$ values for each of the mixtures have been averaged and taken for further analysis.

RESULTS

DO Sensor Response Time. The DO sensor response time calculated based on the step response curves was $18.0 \pm 0.7 \text{ s}$. Due to the total duration of each $k_L a$ measurement, which in all cases was equal to more than 1 h, the effect of the DO sensor response time was negligible and did not impact the further analysis.

Surface Tension and Density. The surface tension and density measurements were performed on mixtures of RO water with glycerin or DMEM with glycerin. FBS was omitted during surface tension and density measurements due to the

risk of the capillary tube setup in the DA-650 density meter becoming faulty due to the FBS protein contents.

The results of the surface tension and density measurements for selected mixtures are presented in Table 2.

Table 2. Results of the Surface Tension and Density Measurements

main ingredient	glycerin concentration (% _{v/v})	surface tension γ (mN m ⁻¹)	std. deviation (mN m ⁻¹)	density ρ (kg m ⁻³)
RO	0	71.69	0.11	997.89
RO	10	69.70	0.09	1030.6
DMEM	0	72.08	0.22	1006.5
DMEM	10	69.76	0.09	1037.9

As shown in Table 2, the surface tension values between mixtures with the same glycerin concentration are very similar. The surface tension value of pure DMEM is 0.54% larger than the surface tension of pure RO water. The difference in surface tension values between the DMEM + 10 %_{v/v} glycerin mixture and the RO + 10 %_{v/v} glycerin is smaller, equal to less than 0.1%.

Values of density obtained from the measurements performed at 37 °C with pure mixture ingredients are presented in Table 3. Data from Table 3 were subsequently

Table 3. Results of the Density Measurements

mixture ingredient	density ρ (kg m ⁻³)
RO	993.3
DMEM	1000.3
FBS	1090.1
glycerin	1250.2

used to calculate liquid Reynolds number values. Density values of the A and B series mixtures were calculated additively based on the concentrations of each ingredient. Due to the low concentration of the antifoaming agent in the C series mixtures, the density values are taken as the same as for the B series mixtures.

Viscosity. Results of the dynamic viscosity measurements are presented in Figure 5 and Table S2 in the Supporting Information.

As can be seen from the data displayed in Figure 5, the viscosity values between A and B series mixtures, differing in

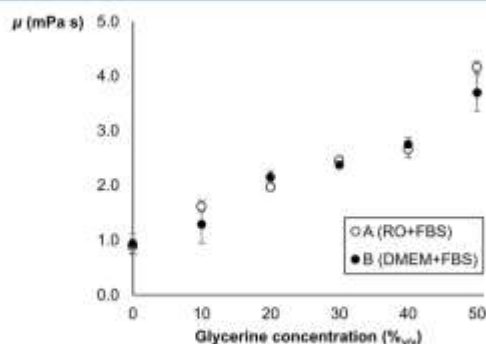


Figure 5. A plot of the dynamic viscosity values for the A and B series mixtures obtained from the measurements.

the main ingredient (RO water or DMEM), are similar in value. Viscosity values of C series mixtures containing the addition of antifoaming surfactant are assumed to be the same as the B series. This assumption is based on the small percentage of the antifoaming agent in the mixtures, equal to 1.6 %_{v/v}.

Reynolds Number. Reynolds number values calculated for each mixture variant are presented in Table 4.

Table 4. Reynolds Number Values Calculated Based on Eq 2

mixture no	Reynolds number Re_L (-)
A0	499
A1	282
A2	236
A3	194
A4	184
A5	114
B0	482
B1	354
B2	218
B3	202
B4	178
B5	138

Reynolds number values for the C series mixtures are taken as the same as for the B series mixtures, based on the previously stated assumption of equal viscosity and density values between the two series.

$k_L a$ Coefficient. The $k_L a$ coefficient values obtained for all mixtures as a function of dynamic viscosity μ are presented in Figure 6 and Table S3 in the Supporting Information.

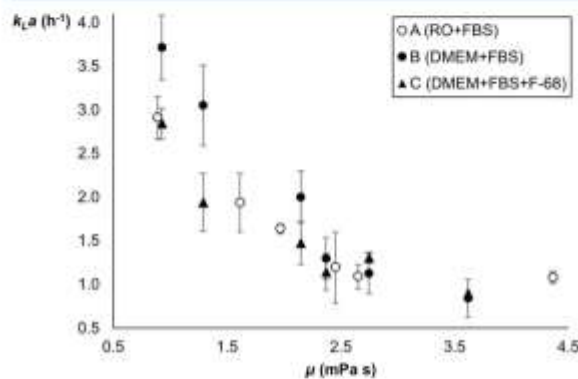


Figure 6. A plot of the $k_L a$ coefficient values obtained from the measurements for all series of mixtures as a function of dynamic viscosity.

As can be seen from the experimental data presented in Figure 6 and Table S3, the general trend is that the $k_L a$ values are decreasing with the increase of the liquid dynamic viscosity. This trend is most pronounced for $k_L a$ values at viscosity values below 2.5 mPa·s. The decrease of $k_L a$ for viscosity values higher than 2.5 mPa·s is less apparent, with the coefficient values converging around the 1.00 h⁻¹ value. The trends and the characteristic values in the data are presented in Figure 7.

The $k_L a$ values are the highest for the B series mixtures (DMEM + FBS). The slope of the change in the volumetric mass transfer coefficient values is also the highest, with the

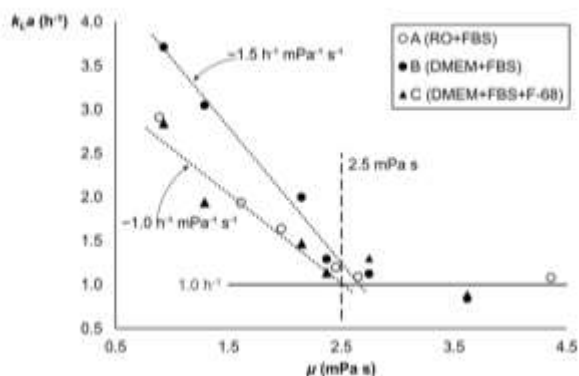


Figure 7. A plot of the experimental data points with marked trends and characteristic values. Two linear trends of $k_{L,a}$ values are marked with dotted lines. Characteristic values of 1.0 h^{-1} and $2.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ are marked with a solid and a dashed line.

values decreasing three times between B0 and B3 mixtures at a slope of around $-1.5 \text{ h}^{-1}\cdot\text{mPa}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. The $k_{L,a}$ values for viscosities below the level of $2.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ are about 40–50% higher for the B series mixtures than for the A and C series mixtures.

For the A and C series mixtures, the character of the $k_{L,a}$ versus viscosity relationship is similar. In each of the two series, the $k_{L,a}$ values for mixtures without glycerine are equal to around 2.6 h^{-1} . For the viscosity values below $2.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, the slope of the decrease in $k_{L,a}$ values is equal to around $-1.0 \text{ h}^{-1}\cdot\text{mPa}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

The statistical significance of the viscosity impact on the $k_{L,a}$ values has been determined using the Shapiro–Wilk test. The p -values calculated for individual data points in each mixture series are equal to: series A—0.021, series B—0.053, series C—0.005. Based on the low p -values for all three experimental series, it is concluded that the effect of viscosity on the $k_{L,a}$ values is statistically significant.

The $k_{L,a}$ coefficient values obtained from all measurements as a function of the liquid Reynolds number values, together with the observed trends, are presented in Figure 8.

As shown in Figure 8, the general trend is that the $k_{L,a}$ values are increasing with the increase of the Re_L values. Data points

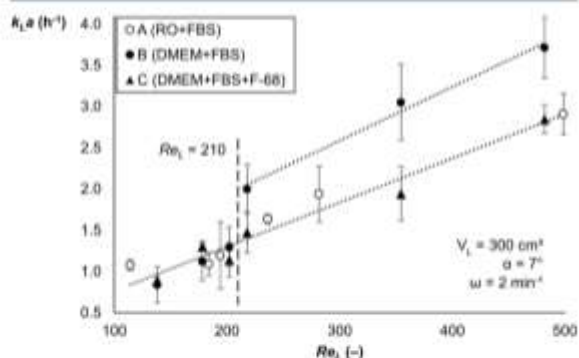


Figure 8. A plot of the $k_{L,a}$ coefficient values obtained from the measurements as a function of liquid Reynolds number at rocking motion parameters $\alpha = 7^\circ$ and $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$. The linear trends, analogous to the trends in Figure 7, are marked with dotted lines. The characteristic value of $Re_L = 210$ is marked with a dashed vertical line.

for the A and C series mixtures and a part of the B series align in an approximately linear trend in relation to the Re_L values. Data points for the B series start to deviate from the linear trend at Re_L values bigger than around 210.

The linear trend shown in Figure 8 of values from the whole A and C series and part of the B series is described with the following expression:

$$k_{L,a} = 5.355 \times 10^{-3} Re_L + 0.2281 \quad (6)$$

statistical parameters for eq 6 with relation to the whole A and C series and part of the B series are: $R^2 = 0.957$, $SSE = 0.247$, and $RMSE = 0.128$. The standard errors for both parameters of eq 6 are, respectively, equal to $0.314 \cdot 10^{-3}$ and 0.0832 .

DISCUSSION

The viscosity value of mixture B1 (DMEM + 10% FBS without glycerin) corresponds well with the results obtained by Poon.⁴⁷ The dynamic viscosity value at the same temperature of 37°C in that study equals $0.930 \pm 0.034 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, within 99% of the value obtained in this study.

The obtained results demonstrate that the viscosity of the liquid phase in the Cellbag 2 L single-use container significantly impacts the mixing performance and mass transfer rate during the rocking motion performed in the WAVE 25 system. Values of the $k_{L,a}$ coefficient have decreased substantially over the whole range of viscosity values, with the most significant change corresponding to the viscosity range of $0.9\text{--}2.5 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ and the Re_L range of $110\text{--}210$. Such an effect could be caused by the lower velocity of liquid flow inside the single-use bag, thus renewing the gas–liquid interface more slowly. With the increasing viscosity, liquid flow inside the container goes into the laminar region, making the forced convection dissolved oxygen transfer mechanism give way to much slower diffusion and natural convection processes. The characteristic value of $Re_L = 210$ could be interpreted as a critical value at which a transition in the flow regime occurs. At very low Re_L values below 210, the characteristic wave movement on the liquid surface cannot properly develop. $Re_L = 210$ value is interpreted as the point at which wave formation initiates.

Table 5 contains the results of volumetric mass transfer coefficient measurements performed in similar setups, i.e., 1D wave mixed bioreactors. The data are presented next to the experimental conditions. In the listed papers, the $k_{L,a}$ measurements were performed without considering the changes in the liquid viscosity inside the single-use bag, usually with pure water as the liquid phase. Considering this, based on the data in Table 5, $k_{L,a}$ values obtained for the lowest intensity of rocking motion are similar in magnitude to the values obtained in this study. It has to be noted that the rocking motion parameters values and the single-use bags' total volume in the literature data were higher than those in our study, which limits the comparability of data. In one of the previously published studies,¹¹ where the same Re_L definition was used, the value of $k_{L,a}$ obtained at $Re_L = 182$ was equal to 1.1 h^{-1} . This value corresponds well with the results in this study, where the values of $k_{L,a}$ at Re_L values of approximately 180 were equal to 1.09 h^{-1} (mixture A4), 1.12 h^{-1} (mixture B4), and 1.31 h^{-1} (mixture C4). The data¹¹ were obtained at lower rocking parameters ($\alpha = 2^\circ$, $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$) and lower liquid viscosity ($0.69 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) compared to those in our study ($\alpha = 7^\circ$, $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$, $\mu = 2.65\text{--}2.75 \text{ mPa}\cdot\text{s}$).

Table 5. Summary of $k_L a$ Experimental Data in 1D Wave Mixed Bioreactors

model name	method	experimental conditions	$k_L a$ (h^{-1})	source
ReadyToProcess WAVE 25	gassing-out	$\alpha = 7^\circ$, $\omega = 2 \text{ min}^{-1}$, $\beta = 15\%$, $V_{\text{tot}} = 2 \text{ L}$	0.8–3.7	this study
WAVE Bioreactor	gassing-in	$\alpha: 2\text{--}10^\circ$, $\omega: 10\text{--}40 \text{ min}^{-1}$, $\beta = 20\%$, $V_{\text{tot}} = 10 \text{ L}$	10–71	16
ReadyToProcess WAVE 25	gassing-out	$\alpha: 2\text{--}12^\circ$, $\omega: 2\text{--}40 \text{ min}^{-1}$, $\beta: 5\text{--}50\%$, $V_{\text{tot}} = 2 \text{ L}$	1.1–19	11
WAVE Bioreactor	n/s	$\alpha: 4\text{--}7^\circ$, $\omega: 15\text{--}30 \text{ min}^{-1}$, $\beta = 50\%$, $V_{\text{tot}} = 10 \text{ L}$	4.7–6.5	14
WAVE Bioreactor	dynamic gassing-out	$\alpha: 8\text{--}12^\circ$, $\omega: 10\text{--}40 \text{ min}^{-1}$, $V_L: 30\text{--}50\%$, $V_{\text{tot}} = 10\text{--}20 \text{ L}$	1.6–140	8
WAVE Bioreactor	dynamic gassing-out	$\alpha: 5\text{--}10^\circ$, $\omega: 10\text{--}30 \text{ min}^{-1}$, $\beta = 50\%$, $V_{\text{tot}}: 10\text{--}50 \text{ L}$	2–22	49

These results indicate that liquid viscosity can be a limiting factor for efficient mass transfer in wave-mixed bioreactors. This conclusion corresponds well with data obtained from other research. For example, in the work of Eibl *et al.* (2009), the wave formation in the liquid was stopped after the culture medium viscosity increased from 0.001 to 0.41 Pa·s, heavily decreasing the oxygen transfer rate through the interface.⁵⁰ Similar observations of viscosity increase negatively impacting the mass transfer rate in a container/tank were reported in the case of different bioreactor systems, such as stirred bioreactors,^{51,52} orbitally shaken bioreactors,⁵³ and bubble columns.⁵³

The experimental data show an interesting relationship between the mass transfer coefficient values and the liquid phase composition. It was observed that the $k_L a$ values are the highest for the B series mixtures, based on DMEM + FBS without the surfactant addition. In contrast, for the remaining A and C series mixtures, the $k_L a$ values were similar regardless of the mixture composition. Values collected in Table 2 suggest that this observation is not connected with the surface tension of examined liquid mixtures. In the case of B (DMEM + FBS) and A mixtures (RO + FBS) at 0 %_{v/v} glycerin concentration, the $k_{L,A00}/k_{L,A0}$ ratio equals 1.27, while the surface tension values for corresponding mixtures differ by only 0.5%. At a glycerin concentration of 10 %_{v/v}, the $k_{L,A10}/k_{L,A1}$ ratio equals 1.57, but the corresponding surface tension values are practically the same, considering the standard deviation of obtained data.

This observation is presumed to be related to the combined effect of the main mixture ingredient (RO water or DMEM) and the non-ionic antifoaming agent on the distinct values of the liquid-side mass transfer coefficient k_L and the specific surface area a . In a few papers regarding the impact of surfactants and antifoaming agents on the mass transfer in reactors, it is stated that their presence in the liquid phase influences the balance of k_L and a values, affecting $k_L a$ as a product of the two. Results of similar experiments in various systems, such as bubble columns,^{54,55} Taylor-Couette vortex bioreactor,⁵⁶ and stirred bioreactor,⁵⁷ all aerated with the use of dispersed gas bubbles from spargers, have shown that surfactant addition causes an increase of the a value and a decrease of the k_L value. An increase of a value relates to the decrease in average bubble size and increase of gas holdup with the growing surfactant concentration. A decrease in k_L may be caused by the reduction of gas diffusivity in the liquid with the surfactant or the decrease of turbulence near the interface due to the higher surfactant concentration near the liquid–gas surface.⁵⁸ The combined effect on the $k_L a$ may depend on the individual properties of the surfactant, such as molecular mass, molecule size, its ionic character, as well as the size and shape of the bioreactor bag.

Jeng *et al.*⁵⁴ point out that surfactant addition may cause an increase in mass transfer capability, but this effect may only be

apparent at minimal surfactant concentrations. In a study with a bubble column filled with distilled water supplemented with a cationic surfactant SDBS at varying concentrations, an increase of surfactant concentration from 0 to 0.05 mmol L⁻¹ has caused an increase in both k_L and a , resulting in an increase of $k_L a$ from 1.3 to 2.8 h⁻¹. However, a further increase of surfactant concentration from 0.1 to 0.2 mmol L⁻¹ caused a decrease of $k_L a$ from 1.7 to 0.7 h⁻¹ through a 1.2-fold increase of a from 6.5 to 8 m⁻¹ combined with a 3-fold decrease of k_L from 0.33 to 0.11 m h⁻¹.

In the case of the data published by Sieblist *et al.*,⁵⁷ regarding the influence of Pluronic F-68 surfactant in a 300 L stirred bioreactor with sinter, ring, and open tube spargers, the 1.1 times increase of a was outweighed by the 2.5 times decrease of k_L , resulting in a significant reduction of mass transfer rate from 22 to 10 h⁻¹ at F-68 concentrations below 0.5 g L⁻¹. Interestingly, this relationship was observed in three out of four investigated types of spargers, suggesting that the effect depends on the surface characteristics of the sparging equipment. As a different example, in the work of Belo *et al.*, adding a non-ionic surfactant Tween 80, caused a 2.5 times decrease in k_L and a 1.2–1.4 times increase in a .⁵⁸

At the examined Re_L range of 110–500 and in liquid mixtures with the Pluronic F-68 antifoaming agent used, the $k_L a$ value for mixtures with antifoaming agent addition can be estimated with the use of a simple linear empirical correlation (eq 6)

$$k_L a = 5.355 \times 10^{-3} Re_L + 0.2281$$

In the case of the studied WAVE 25 bioreactor, oxygen transfer is performed without the use of any sparging systems supporting the aeration of the waving liquid phase. Hence, the effect of surfactant addition on a is not present. The only bubbles in the system during experiments were observed at the surface of the liquid, covering a small portion of the liquid–gas surface. This relationship can explain the differences in $k_L a$ values between the B and C series mixtures: the antifoaming agent caused a decrease in k_L , therefore decreasing the overall mass transfer rate.

The similarity of $k_L a$ coefficient data for A and C mixtures is assumed to be caused by the k_L values being higher in RO water than in DMEM, therefore cancelling the impact of the antifoaming agent. This correlation may be due to some of the ingredients present in the used DMEM medium, absent in RO water, especially D-glucose (1 g L⁻¹ in the used DMEM formulation), which could as well play a role in decreasing the diffusivity of oxygen in the liquid phase.⁵⁹

CONCLUSIONS

- Mass transfer in a disposable rocking WAVE 25 bioreactor equipped with a Cellbag 2 L bag-like

container is significantly influenced by the liquid phase viscosity.

- $k_L a$ coefficient values had decreased for viscosity values below 2.5 mPa·s at a rate of $-1.5 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mPa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ in the case of DMEM + FBS mixtures without the antifoaming agent and at a rate of $-1.0 \text{ h}^{-1} \cdot \text{mPa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ in case of DMEM + FBS mixtures with the Pluronic F-68 surfactant and RO water + FBS mixtures. For viscosity values above 2.5 mPa·s, the volumetric mass transfer coefficient values equaled about 1 h^{-1} .
- In the case of the DMEM + FBS + Pluronic F-68 mixtures and RO + FBS mixtures, the relationship between $k_L a$ values and the Re_L values is approximately linear.
- Pluronic F-68 addition caused a decrease in mass transfer rate. Based on the experimental data and findings from other research, it is assumed that this influence relates to the decrease of the mass transfer coefficient k_L values.
- The study gives an insight into the liquid flow and mass transfer characteristics in wave mixed bioreactors in changing liquid phase compositions, which is essential for analyzing the WAVE 25 bioreactors system's applicability in cultures with various fermentation broth properties.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.3c00736>.

Liquid phase compositions used in the experiments; results of the dynamic viscosity measurements for the A and B series mixtures; and results of the $k_L a$ coefficient measurements for all series of mixtures (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Maciej Pilarek – Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, 00-645 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-8489-0842; Email: maciej.pilarek@pw.edu.pl

Authors

Mateusz Bartczak – Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, 00-645 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-2233-551X
 Kamil Wierzbowski – Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, 00-645 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-7718-0033

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.iecr.3c00736>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology—Dean Grant 2022.

■ SYMBOLS AND ABBREVIATIONS

Symbols

a	specific surface area (m^{-1})
B	drop shape factor (–)
d	characteristic dimension, length of the single-use bag (m)
DO	dissolved oxygen concentration (%)
DO [*]	saturation dissolved oxygen concentration (%)
fl	filling level (%)
g	gravitational constant (m s^{-2})
k_L	liquid-side mass transfer coefficient (m s^{-1})
$k_{L,a}$	liquid-side volumetric mass transfer coefficient (h^{-1})
R	radius of curvature at the apex of the drop (m)
R^2	determination coefficient (–)
Re_L	Reynolds number for the liquid phase (–)
t_{es}	time necessary to exchange the volume of gas in the headspace (min)
T	temperature ($^{\circ}\text{C}$)
$Q_{G,i}$	gas phase volumetric rate ($\text{dm}^3 \text{ min}^{-1}$)
V_{tot}	total volume of the single-use bag (dm^3)
V_L	volume of liquid inside the single-use bag (cm^3)
α	rocking amplitude angle ($^{\circ}$)
$\Delta\rho$	difference between the densities of the two liquids in contact (liquid/air) (kg m^{-3})
γ	surface tension (N m^{-1})
μ	dynamic viscosity (Pa s)
ρ	density (kg m^{-3})
ω	rocking frequency (min^{-1})

Abbreviations

DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
FBS	fetal bovine serum
n/a	non-applicable
n/s	not specified
RMSE	root-mean-square error
RO	reverse osmosis
SDBS	sodium dodecylbenzenesulfonate
SSE	sum of the squared estimate of errors

Indices

ex	exchange
G	gas phase
hs	headspace
L	liquid phase
tot	total
v/v	volume concentration

■ REFERENCES

- (1) Junne, S.; Neubauer, P. How Scalable and Suitable Are Single-Use Bioreactors? *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *53*, 240–247.
- (2) Demirden, S. F.; Alptekin, K.; Kimiz-Gebologlu, I.; Oncel, S. S. Influenza Vaccine: An Engineering Vision from Virological Importance to Production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2022**, *27*, 740–764.
- (3) Tsai, A.-C.; Liu, Y.; Yuan, X.; Chella, R.; Ma, T. Aggregation Kinetics of Human Mesenchymal Stem Cells under Wave Motion. *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, 1600448.
- (4) Hami, L. S.; Green, C.; Leshinsky, N.; Markham, E.; Miller, K.; Craig, S. GMP Production and Testing of Xcellerated T Cells™ for the Treatment of Patients with CLL. *Cytotherapy* **2004**, *6*, 554–562.
- (5) Wierzbowski, K.; Grabowska, I.; Pilarek, M. Efficient Propagation of Suspended HL-60 Cells in a Disposable Bioreactor Supporting Wave-Induced Agitation at Various Reynolds Number. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2020**, *43*, 1973–1985.

- (6) Pawliw, R.; Farrow, R.; Sekuloski, S.; Jennings, H.; Healer, J.; Phuong, T.; Sathu, P.; Pasay, C.; Evans, K.; Cowman, A. F.; Schofield, L.; Chen, N.; McCarthy, J.; Trenholme, K. A Bioreactor System for the Manufacture of a Genetically Modified Plasmodium Falciparum Blood Stage Malaria Cell Bank for Use in a Clinical Trial. *Malar. J.* **2018**, *17*, 283.
- (7) Meng, Y.; Sun, J.; Hu, T.; Ma, Y.; Du, T.; Kong, C.; Zhang, G.; Yu, T.; Piao, H. Rapid Expansion in the WAVE Bioreactor of Clinical Scale Cells for Tumor Immunotherapy. *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14*, 2516–2526.
- (8) Bai, Y.; Moo-Young, M.; Anderson, W. A. Characterization of Power Input and Its Impact on Mass Transfer in a Rocking Disposable Bioreactor. *Chem. Eng. Sci.* **2019**, *209*, 115183.
- (9) Bartczak, M.; Wierchowski, K.; Pilarek, M. Mixing Performance in a Litre-Scale Rocking Disposable Bioreactor: DoE-Based Investigation of Mixing Time Dependence on Operational Parameters. *Chem. Eng. J.* **2022**, *431*, 133288.
- (10) Marsh, D. T. J.; Lye, G. J.; Micheletti, M.; Odeleye, A. O. O.; Ducci, A.; Osborne, M. D. Fluid Dynamic Characterization of a Laboratory Scale Rocked Bag Bioreactor. *AIChE J.* **2017**, *63*, 4177–4187.
- (11) Pilarek, M.; Sobieszuk, P.; Wierchowski, K.; Dąbkowska, K. Impact of Operating Parameters on Values of a Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Single-Use Bioreactor with Wave-Induced Agitation. *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *136*, 1–10.
- (12) Seidel, S.; Maschke, R.; Kraume, M.; Eibl-Schindler, R.; Eibl, D. CFD Modelling of a Wave-Mixed Bioreactor with Complex Geometry and Two Degrees of Freedom Motion. *Front. Chem. Eng.* **2022**, *4*, 1021416.
- (13) Svay, K.; Urrea, C.; Shamlou, P. A.; Zhang, H. Computational Fluid Dynamics Analysis of Mixing and Gas–Liquid Mass Transfer in Wave Bag Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **2020**, *36*, No. e3049.
- (14) Zhan, C.; Hagrot, E.; Brandt, L.; Chotteau, V. Study of Hydrodynamics in Wave Bioreactors by Computational Fluid Dynamics Reveals a Resonance Phenomenon. *Chem. Eng. Sci.* **2019**, *193*, 53–65.
- (15) Eibl, R.; Werner, S.; Eibl, D. Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications. In *Disposable Bioreactors*; Eibl, R., Eibl, D., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2009; pp 55–87.
- (16) Jones, S. M. J.; Louw, T. M.; Harrison, S. T. L. Energy Consumption Due to Mixing and Mass Transfer in a Wave Photobioreactor. *Algal Res.* **2017**, *24*, 317–324.
- (17) Frank, G. T. Transformation of Biomanufacturing by Single-Use Systems and Technology. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2018**, *22*, 62–70.
- (18) Jossen, V.; Eibl, R.; Eibl, D. Single-Use Bioreactors – An Overview. In *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*; Eibl, R., Eibl, D., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, 2019; pp 37–52.
- (19) Gill, N. K.; Appleton, M.; Baganz, F.; Lye, G. J. Quantification of Power Consumption and Oxygen Transfer Characteristics of a Stirred Miniature Bioreactor for Predictive Fermentation Scale-Up. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 1144–1155.
- (20) Campesi, A.; Cerri, M. O.; Hokka, C. O.; Badino, A. C. Determination of the Average Shear Rate in a Stirred and Aerated Tank Bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2009**, *32*, 241–248.
- (21) Kaiser, S. C.; Eibl, R.; Eibl, D. Engineering Characteristics of a Single-Use Stirred Bioreactor at Bench-Scale: The Mobius CellReady 3L Bioreactor as a Case Study. *Eng. Life Sci.* **2011**, *11*, 359–368.
- (22) Papagianni, M.; Matthey, M.; Kristiansen, B. Citric Acid Production and Morphology of *Aspergillus Niger* as Functions of the Mixing Intensity in a Stirred Tank and a Tubular Loop Bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **1998**, *2*, 197–205.
- (23) Gabelle, J.-C.; Augier, F.; Carvalho, A.; Rousset, R.; Morchain, J. Effect of Tank Size on $k_L a$ and Mixing Time in Aerated Stirred Reactors with Non-newtonian Fluids. *Can. J. Chem. Eng.* **2011**, *89*, 1139–1153.
- (24) Amer, M.; Feng, Y.; Ramsey, J. D. Using CFD Simulations and Statistical Analysis to Correlate Oxygen Mass Transfer Coefficient to Both Geometrical Parameters and Operating Conditions in a Stirred-tank Bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **2019**, *35*, No. e2785.
- (25) Kapic, A.; Heindel, T. J. Correlating Gas-Liquid Mass Transfer in a Stirred-Tank Reactor. *Chem. Eng. Res. Des.* **2006**, *84*, 239–245.
- (26) Linek, V.; Kordač, M.; Pujasová, M.; Moucha, T. Gas–Liquid Mass Transfer Coefficient in Stirred Tanks Interpreted through Models of Idealized Eddy Structure of Turbulence in the Bubble Vicinity. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2004**, *43*, 1511–1517.
- (27) Kazemzadeh, A.; Elias, C.; Tamer, M.; Lohi, A.; Ein-Mozaffari, F. Mass Transfer in a Single-Use Angled-Shaft Aerated Stirred Bioreactor Applicable for Animal Cell Culture. *Chem. Eng. Sci.* **2020**, *219*, 115606.
- (28) Minow, B.; Tschöpe, S.; Regner, A.; Populin, M.; Reiser, S.; Noack, C.; Neubauer, P. Biological Performance of Two Different 1000 L Single-Use Bioreactors Applying a Simple Transfer Approach. *Eng. Life Sci.* **2014**, *14*, 283–291.
- (29) Chandrasekharan, K.; Calderbank, P. H. Further Observations on the Scale-up of Aerated Mixing Vessels. *Chem. Eng. Sci.* **1981**, *36*, 818–823.
- (30) Vrābel, P.; van der Lans, R. G. J. M.; Luyben, K. Ch. A. M.; Boon, L.; Nienow, A. W. Mixing in Large-Scale Vessels Stirred with Multiple Radial or Radial and Axial up-Pumping Impellers: Modelling and Measurements. *Chem. Eng. Sci.* **2000**, *55*, 5881–5896.
- (31) Ducci, A.; Wehlye, W. H. Orbitally Shaken Bioreactors-Viscosity Effects on Flow Characteristics. *AIChE J.* **2014**, *60*, 3951–3968.
- (32) Klöckner, W.; Gacem, R.; Anderlei, T.; Raven, N.; Schillberg, S.; Lattermann, C.; Büchs, J. Correlation between Mass Transfer Coefficient $K_L a$ and Relevant Operating Parameters in Cylindrical Disposable Shaken Bioreactors on a Bench-to-Pilot Scale. *J. Biol. Eng.* **2013**, *7*, 28.
- (33) Lee, H.; Lee, J.-C.; Seo, Y. Mixing Characteristics for Scale-up of an Orbital Shaken Bioreactor. *Chem. Eng. Technol.* **2022**, *45*, 946–952.
- (34) Wiegmann, V.; Gardner, R. A.; Spencer, D. I. R.; Baganz, F. Equal Mixing Time Enables Scale-down and Optimization of a CHO Cell Culture Process Using a Shaken Microbioreactor System. *Biotechnol. J.* **2021**, *16*, 2100360.
- (35) Zhu, L.; Han, W.; Song, B.; Wang, Z. Characterizing the Fluid Dynamics in the Flow Fields of Cylindrical Orbitally Shaken Bioreactors with Different Geometry Sizes. *Eng. Life Sci.* **2018**, *18*, 570–578.
- (36) Peter, C. P.; Suzuki, Y.; Büchs, J. Hydromechanical Stress in Shake Flasks: Correlation for the Maximum Local Energy Dissipation Rate. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 1164–1176.
- (37) Meier, K.; Klöckner, W.; Bonhage, B.; Antonov, E.; Regestein, L.; Büchs, J. Correlation for the Maximum Oxygen Transfer Capacity in Shake Flasks for a Wide Range of Operating Conditions and for Different Culture Media. *Biochem. Eng. J.* **2016**, *109*, 228–235.
- (38) Giese, H.; Klöckner, W.; Peña, C.; Galindo, E.; Lotter, S.; Wetzel, K.; Meissner, L.; Peter, C. P.; Büchs, J. Effective Shear Rates in Shake Flasks. *Chem. Eng. Sci.* **2014**, *118*, 102–113.
- (39) Tan, R.-K.; Eberhard, W.; Büchs, J. Measurement and Characterization of Mixing Time in Shake Flasks. *Chem. Eng. Sci.* **2011**, *66*, 440–447.
- (40) Fraser, R. D.; Hill, G. A. Hydrodynamic Characteristics of a Spinning Sparger, External Loop Airlift Bioreactor. *Can. J. Chem. Eng.* **1993**, *71*, 419–425.
- (41) Merchuk, J. C. Airlift Bioreactors: Review of Recent Advances. *Can. J. Chem. Eng.* **2008**, *81*, 324–337.
- (42) Cerri, M. O.; Badino, A. C. Oxygen Transfer in Three Scales of Concentric Tube Airlift Bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *51*, 40–47.
- (43) Dulbecco, R.; Freeman, G. Plaque Production by the Polyoma Virus. *Virology* **1959**, *8*, 396–397.
- (44) Eagle, H. Amino Acid Metabolism in Mammalian Cell Cultures. *Science* **1959**, *130*, 432–437.
- (45) Cytiva. *ReadyToProcess WAVE 25 User Manual*, 2020.

- (46) Morita, A.; Carastan, D.; Demarquette, N. Influence of Drop Volume on Surface Tension Evaluated Using the Pendant Drop Method. *Colloid Polym. Sci.* **2002**, *280*, 857–864.
- (47) Poon, C. Measuring the Density and Viscosity of Culture Media for Optimized Computational Fluid Dynamics Analysis of in Vitro Devices. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2022**, *126*, 105024.
- (48) Bauer, I.; Dreher, T.; Eibl, D.; Glöckler, R.; Husemann, U.; John, G. T.; Kaiser, S. C.; Kampeis, P.; Kauling, J.; Kleebank, S.; Kraume, M.; Kuhlmann, W.; Löffelholz, C.; Meusel, W.; Möller, J.; Pörtner, R.; Sieblist, C.; Tscheschke, B.; Werner, S. *Recommendations for Process Engineering Characterisation of Single-Use Bioreactors and Mixing Systems by Using Experimental Methods*, 2nd ed.; Dechema Biotechnologie: Frankfurt am Main, 2020.
- (49) Ghasemi, A.; Bozorg, A.; Rahmati, F.; Mirhassani, R.; Hosseinasab, S. Comprehensive Study on Wave Bioreactor System to Scale up the Cultivation of and Recombinant Protein Expression in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Biochem. Eng. J.* **2019**, *143*, 121–130.
- (50) Eibl, R.; Werner, S.; Eibl, D. Disposable Bioreactors for Plant Liquid Cultures at Litre-Scale. *Eng. Life Sci.* **2009**, *9*, 156–164.
- (51) Özbek, B.; Gayik, S. The Studies on the Oxygen Mass Transfer Coefficient in a Bioreactor. *Process Biochem.* **2001**, *36*, 729–741.
- (52) Puthli, M. S.; Rathod, V. K.; Pandit, A. B. Gas–Liquid Mass Transfer Studies with Triple Impeller System on a Laboratory Scale Bioreactor. *Biochem. Eng. J.* **2005**, *23*, 25–30.
- (53) Mendes, C. E.; Badino, A. C. Oxygen Transfer in Different Pneumatic Bioreactors Containing Viscous Newtonian Fluids. *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, *94*, 456–465.
- (54) Jeng, J. J.; Maa, J. R.; Yang, Y. M. Surface Effects and Mass Transfer in Bubble Column. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **1986**, *25*, 974–978.
- (55) McClure, D. D.; Lee, A. C.; Kavanagh, J. M.; Fletcher, D. F.; Barton, G. W. Impact of Surfactant Addition on Oxygen Mass Transfer in a Bubble Column. *Chem. Eng. Technol.* **2015**, *38*, 44–52.
- (56) Ramezani, M.; Legg, M. J.; Haghghat, A.; Li, Z.; Vigil, R. D.; Olsen, M. G. Experimental Investigation of the Effect of Ethyl Alcohol Surfactant on Oxygen Mass Transfer and Bubble Size Distribution in an Air-Water Multiphase Taylor-Couette Vortex Bioreactor. *Chem. Eng. J.* **2017**, *319*, 288–296.
- (57) Sieblist, C.; Jenzsch, M.; Pohlscheidt, M. Influence of Pluronic F68 on Oxygen Mass Transfer. *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 1278–1288.
- (58) Belo, I.; García-Abuín, A.; Gómez-Díaz, D.; Navaza, J. M.; Vidal-Tato, I. Effect of Tween 80 on Bubble Size and Mass Transfer in a Bubble Contactor. *Chem. Eng. Technol.* **2011**, *34*, 1790–1796.
- (59) Jannongwong, M.; Loubiere, K.; Dietrich, N.; Hébrard, G. Experimental Study of Oxygen Diffusion Coefficients in Clean Water Containing Salt, Glucose or Surfactant: Consequences on the Liquid-Side Mass Transfer Coefficients. *Chem. Eng. J.* **2010**, *165*, 758–768.

10.3. Publikacja [A3]

Bartczak M., Pilarek M. (2024) *The colourimetric method for mixing time measurement in single-use and multi-use bioreactors – methodology overview and practical recommendations*. Energies 17: 1–20. DOI: 10.3390/en17010221 (IF₂₀₂₄ 3,0, 140 pkt.)

Wkład autorski:

Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu konspektu artykułu przeglądowego, zebranie zasobu literatury naukowej dotyczącej zastosowań metody kolorymetrycznej do pomiaru czasu mieszania w bioreaktorach, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.

Review

The Colourimetric Method for Mixing Time Measurement in Single-Use and Multi-Use Bioreactors—Methodology Overview and Practical Recommendations

Mateusz Bartczak  and Maciej Pilarek *

Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland; mateusz.bartczak.dokt@pw.edu.pl

* Correspondence: maciej.pilarek@pw.edu.pl

Abstract: Mixing time is an important parameter for quantifying the mixing efficiency of a bioreactor system, essential for successful bioprocess development in various branches of the bioengineering sector (e.g., biopharma, biorefineries, food industry and bioreactor design). The colourimetric method is one of the ways of obtaining valuable quantitative data about the mixing process and the liquid flow inside a vessel. This review consists of a catalogue and a discussion of previously published data in which the colourimetric method has been utilised; a critical comparison between the colourimetric and other mixing time measurement methods; an explanation of practical considerations regarding the bioreactor setup and the choice of reagents; a practical guide for requirements for the acquisition of high-quality images of the mixing process; a thorough discussion of aspects connected to the computer image processing of the video material. This review is intended to thoroughly present the versatility of the colourimetric method for mixing time measurement in miscellaneous bioreactor systems, i.e., in classical tanks and modern single-use (disposable) plastic film-based bag-like containers, and to facilitate the implementation of the colourimetric method in new research setups by providing complete and valuable recommendations about each step of the methodology.

Keywords: bioreactors; colourimetric method; image analysis; image processing; mixing time; single-use bag-like containers



Citation: Bartczak, M.; Pilarek, M. The Colourimetric Method for Mixing Time Measurement in Single-Use and Multi-Use Bioreactors—Methodology Overview and Practical Recommendations. *Energies* **2024**, *17*, 221. <https://doi.org/10.3390/en17010221>

Academic Editor: Dimitrios Sidiras

Received: 18 October 2023

Revised: 21 December 2023

Accepted: 29 December 2023

Published: 31 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Mixing time is defined as the duration needed to achieve a set level of homogeneity in a mixture from the moment of a tracer addition into a system [1]. The mixing time characteristics can be obtained on a local and global level. The global mixing time corresponds to the homogenisation of liquid in the whole vessel, while the local mixing time is obtained when the overall volume is divided into smaller parts. The mixing characteristic is an important factor in bioprocesses, as it is one of the ways of defining the cell growth environment and its ability to sustain the proper growth of the culture [2]. Mixing time optimisation is the key aspect of chemical and biochemical process development in various areas of modern industry, e.g., biopharma, biorefineries, food industry, or bioreactor design. Mixing time can provide quantitative information on the locations of inhomogeneities, where the biomass can experience insufficient access to nutrients, locally elevated concentrations of extracellularly secreted toxic metabolites and gradients of essential process parameters [3].

There are technique methods for mixing time measurement, which in general can be divided into local methods, where the information on the mixing process is gathered at only one point inside the vessel, and global methods, where the obtained mixing characteristic is based on the observation of the entire volume of liquid present in the multi-use tank of a classical reactor or disposable plastic film-based bag-like container of a single-use bioreactor (SUB) [4,5].

Some examples of mixing time measurement methods are [4,6,7] the temperature method, where a liquid of a different temperature is added to the bulk volume; the conductivity method, with a tracer being an electrolyte solution; planar laser-induced fluorescence (PLIF), in which a fluorescent indicator is being excited by a sheet of laser light; the colourimetric method, where a tracer (i.e., an indicator or a dye) is injected into the liquid and the mixing progress is evaluated based on the colour change of the bulk liquid due to a reaction or change in the concentration of the indicator.

Application of the colourimetric method offers the possibility of non-invasive, detailed observation of liquid flow patterns inside a bioreactor vessel with inexpensive tools and accessible non-toxic chemicals [7]. It is, however, limited by the requirement of optical access into the inside of the examined vessel and by the possibility of parts of the liquid obscuring each other due to the 2D projection of the 3D bioreactor volume [8].

This review paper is set up with two primary goals. The first is to summarise studies in which the colourimetric method was utilised during the experiments. The studies have been grouped according to the type of reactor or bioreactor being characterised. The second goal of this review is to present and explain the steps and requirements that ought to be fulfilled for deploying the colourimetric method at any research facility and, possibly, in new experimental setups. These recommendations are based on the practices implemented previously by different research groups. To our knowledge, this review is the first paper in which the colourimetric method has been covered in-depth with regard to various types of reactors and bioreactors, including providing recommendations for an image analysis and processing, including the newest methods and tools.

Previously published works about mixing time measurement in reactors focus on covering and comparing many methods differing in their fundamental principles, such as the specialised methods covered by Ascanio (2015) [4] or more common methods for determining mixing time and other engineering parameters covered by Löffelholz (2013) [9]. The recommendations for single-use bioreactor characterisation by Bauer et al. [10] include the decolourisation method for mixing time measurement with iodometry but suggest only visual observation and mixing time determination. The paper by Cabaret et al. (2007) [10], while thoroughly covering the topic of colour-changing chemicals and introducing the methods for an image analysis based on colour channel values, does not include statements about colourimetric method application devices other than stirred reactors and does not delve into the technical considerations for image acquisition.

This review is divided into sections dedicated to explaining four main topics crucial in the practical challenges of colourimetric method application for mixing time measurement in various types of bioreactors:

- Section 2. Applications of the Colourimetric Method for Reactor and Bioreactor Studies contains a catalogue of existing papers, which contains results based on the application of the colourimetric method, a discussion about the types of devices in which the colourimetric method has been applied, a comparison of mixing time measurement methods based on experimental data and a discussion about the advantages and shortcomings of visual and computerised image processing.
- Section 3. Laboratory Procedure Considerations contains a listing of colour-changing chemicals that can be used with the colourimetric method, recommendations regarding a typical laboratory procedure for mixing time measurement and a summary of liquids of various rheological characteristics previously analysed in colourimetric method setups.
- Section 4. Image Acquisition contains a discussion about the cases where special adaptation of the camera equipment to the reactor was necessary, with a focus on the acquisition of high-quality image data and a set of recommendations for the camera equipment, image parameters that need to be considered during image acquisition and proper lighting of the experimental setup.
- Section 5. Image Processing contains recommendations for the final step of colourimetric method application, i.e., the suggested order and description of operations during

digital image processing, a summary of colour spaces that can be considered in the processing, the definitions of mixing time that have been previously applied in different studies, a discussion about local mixing time and mixing time maps and a summary of software tools that can be used for the application of the colourimetric method.

Information provided in this review paper should facilitate the successful holistic application of the colourimetric method in research facilities, offering an accessible possibility for an in-depth liquid flow analysis in single-use or multi-use bioreactor setups.

2. Applications of the Colourimetric Method for Reactor and Bioreactor Studies

Since the literature mention in the work by Fox and Gex [11], in which mixing time in “cylindrical vessels 1 and 5 ft in diameter” was originally measured through observation of phenolphthalein decolourisation, the colourimetric method has been used extensively during testing and characterisation of vessels and bioreactors of various types and scales. Several variants of the method have been developed, involving different colour-change chemicals, reagents, image processing and analysis techniques and mixing time value definitions. A summary of previously published scientific papers and reports involving the colourimetric method for mixing time measurement, grouped according to the type of system being investigated, is presented in Table 1.

Table 1. A catalogue of scientific papers and reports in which the colourimetric method has been implemented for mixing time measurement during the experiments.

Working Volume	Commercial Name (If Applicable)	Colour-Changing Reagents	Image Analysis		Notes	Reference
			Software (If Applicable, Version No. If Specified by Authors)	Colour Space (If Applicable)		
<i>Stirred tank reactors (multi-use)</i>						
22–280 L		phenolphthalein	n/a (visual)			[11]
25–37 L		methyl red	n/a (visual)			[12]
3 L, 13 L		iodine + starch	n/a (visual)			[13]
140 L		iodine + starch	n/a (visual)			[14]
180 L		iodine + starch	n/a (visual)			[15]
7 L		bromothymol blue	n/a (visual)		no quantitative data	[16]
50 L		iodine + starch	n/a (visual)			[17]
30 L		DISMT *	OPTIMAS 6.5	RGB (G channel)		[18]
750 L		bromocresol purple	n/a (visual)			[19]
46 L		bromocresol purple	n/s	RGB (G channel)		[20]
7.8 L, 14.5 L, 200 L		various (see footer) **	n/s (in-house)	RGB (channel depending on indicator)		[10]
30 L		DISMT *	OPTIMAS 6.5	RGB (G channel)		[21]
35 L, 77 L, 190 L		bromocresol purple	n/s (in-house)	RGB (G channel)		[22]
4 L		bromocresol purple	Image-Pro Plus 4.5.1	n/s		[23]
42 L, 340 L		n/s	n/s (in-house)	grayscale		[24]
200 L, 400 L		iodine + starch	n/s	n/s		[25]
10 mL		methylene blue	ImageJ 1.48b6, MATLAB R2012a	grayscale		[26]
5 L		bromocresol purple	n/s	n/s		[27]
15 m ³		phenolphthalein	ImageJ	grayscale		[3]
2 L		bromocresol purple	MATLAB	HSV		[28]
12 L		phenolphthalein	ImageJ	RGB		[29]
200 mL	DASGIP® Cellferm-pro	DISMT *	MATLAB	RGB (G channel)	with microcarriers	[30]
3 L		bromothymol blue	n/s	grayscale		[31]
10 L		Cochineal Red	MATLAB R2020a	RGB (R channel)		[32]
3.8 L		bromothymol blue	MATLAB	grayscale	single multi-compartment bioreactor	[2]
250 mL		DISMT *	MATLAB	RGB (G channel)		[33]
<i>Stirred tank reactors (SCLBs)</i>						
3 L	Mobius CellReady™	iodine + starch	n/s	n/s		[34]
15 mL	Ambr™	iodine + starch	n/a (visual)			[35]
1 L	Allegro™ STR 50	DISMT *	MATLAB	RGB (G channel)	scale-down prototype of a 50 L bioreactor	[36]

Table 1. Cont.

Working Volume	Commercial Name (If Applicable)	Colour-Changing Reagents	Image Analysis		Notes	Reference
			Software (If Applicable, Version No. If Specified by Authors)	Colour Space (If Applicable)		
<i>Shaken or rocked vessels (shake flasks, orbitally shaken or wave-mixed SJBs)</i>						
2 L, 3 L, 30 L, 1500 L	Kühner™ ES-W shaker	DISMT *	n/s (in-house)	RGB (G channel)	orbitally shaken	[37]
100 mL, 250 mL, 500 mL, 600 mL	TubeSpin® 600	bromothymol blue DISMT *	n/a (visual) n/s	n/a RGB (G channel)	shake flasks orbitally shaken	[6] [38]
2 L, 20 L	BIOSTAT® CultiBag™ RM	iodine + starch	n/a (visual)		shake flasks and rocking bioreactor bags (orbitally shaken or rocked)	[39]
2 L		DISMT *	MATLAB (version n/s)	RGB (G channel)	orbitally shaken	[40,41]
10 L		phenolphthalein	n/a (visual)		rocking (wave-mixed) single-use bioreactor; no quantitative data	[42]
<i>Others</i>						
37 L		Purple Dimarone R 2 RL	n/s (in-house)	grayscale	bubble column	[43]
120 mL		bromophenol blue	n/s	RGB	soft elastic reactor	[44]
10 L		Patent Blue V (E131) dye	VLC 3.0.16, IrfanView 4.58, GIMP 2.10.24	grayscale	plastic bag bubble photobioreactor	[45]

* Double Indicator System for Mixing Time—a methyl red and thymol blue indicator system. ** pH indicators used: bromocresol purple, bromothymol blue, cresol red, methyl red, phenolphthalein, phenol red. n/a—not applicable; n/s—not specified.

2.1. Applications of the Colourimetric Method across Types of Devices

The biggest number of previously published papers, which included the colourimetric method for determination of mixing time, regarded stirred tank reactors and bioreactors, including, in some cases, single-use bioreactors [34–36]. The investigations included baffled and unbaffled classical tanks agitated with various equipment: Rushton turbines [3,10,15–17,19,24,25,27,28,31–33] and their variants (Scaba SRGT [15]), pitched-blade impellers [3,10,17,24,25,33], disk turbines [19], elephant ear [27,36] and marine blade impellers [27,34,35], hydrofoil [14], Maxblend™ [10,22,23], helical ribbon [13,18,29], a trapezoidal paddle [30], axial flow impellers [24] and planetary [18,21] and coaxial mixers [20]. Some papers contained results from experiments involving orbitally shaken devices, i.e., shake flasks [6], orbitally-shaken single-use bioreactors [37,38,40,41] and wave-mixed single-use bioreactors agitated on an orbitally shaken [39] or a rocking platform [39,42]. A few publications contained results and observations of mixing performance inside other devices, such as a bubble column [43], a soft elastic reactor [44] and a plastic bag photobioreactor [45].

Typically, the maximum volume of the vessel analysed using the colourimetric method was no larger than 1000 L. The volume of analysed vessels ranged from the millilitre scale [6,27,30,33,38,44], including vessels from parallel bioreactor systems [35], through bench-scale and laboratory-scale devices [16–18,20–22,24,27–29,31,32,34,36,37], up to pilot-scale systems in the hundred-litre range [14,15,19,22,24,25]. However, one has to note the examples of large-scale reactors, such as the 1500 L orbitally shaken single-use plastic film-based bag-like container analysed by Tissot et al. [37] or the 15 m³ stirred tank investigated by Rosseburg et al. [3].

The colourimetric method, which enables researchers to calculate mixing time quantitatively, allows for observing compartmentalisation and segregated zones inside the liquid during the mixing process. These observations have been performed in stirred tanks, e.g., as a way of comparing different combinations and operation modes of impellers mounted inside a vessel [19,20,22,27,28], gathering information about the performance of an impeller in a particular setup [22,23,26,29] or characterising the progress of the mixing process inside commercially available systems, including single-use bioreactors [35,36]. Similar observations have also been performed in disposable orbitally shaken vessels, for example, in the work of Rodriguez et al. [41], where detailed images captured during the decolourisation of methyl red and thymol blue were used to correlate the size of vortical cells inside the liquid phase with the dimensionless mixing number Nt_m for an in-depth analysis of

the impact of operational parameters on the flow structure of the mixed liquid phase. A phenolphthalein decolourisation-based method was used in work by Jones et al. [42] for qualitative observation of mixing inside a wave-mixed 10 L single-use bag—however, no detailed analysis of the flow induced by the continuous oscillations of the platform has been performed.

The colourimetric method has been extensively used during studies of orbitally shaken disposable cylinders and flasks across different scales. In the work of Tissot et al. [37], the colourimetric method was used as the source of experimental data for the derivation of a scale-up factor in orbitally shaken vessels of four different sizes and as a means of examining and verifying similar mixing regimes between 1500 L and 30 L scales. Tan et al. [6] proposed a correlation between mixing time and the power input in the turbulent flow regime inside shake flasks in the 100–500 mL scale. Rodriguez et al. [40,41] also showed the relationship between Froude number values and the mixing number.

Gaugler et al., in their work [2], used the colourimetric method for characterising a newly developed single multi-compartment bioreactor (SMCB), which allows for the recreation of large-scale mixing behaviour in a small-scale vessel. In the study, special discs with different arrangements of holes were used to divide the tank volume into compartments, allowing for the adjustment of mixing time values to simulate the conditions inside a large-scale tank during scale-down approaches. Data about the mixing process gathered through observations and a further analysis of video material were used to derive empirical correlations for calculating the area of perforations on the discs depending on the desired mixing time value and the power input in the bioreactor.

A notable example of colourimetric method application is presented in the paper of Xiao et al. [44], in which a quantitative comparison of mixing states by calculating spatial and frequency distributions of the mixing level inside a soft-elastic reactor (SER) was presented based on the extensive analysis of images captured during the decolourisation of a bromophenol blue indicator. The recording and subsequent analysis of the video material provided insight into the complicated mixing mechanism of the investigated system.

The above examples show that the colourimetric method is well suited for scale-up, scale-down, performance and characterisation studies of various types of reactor and bioreactor systems, including novel and prototyped devices, the properties of which have not yet been well systematised. The following chapters and subsections of this review contain recommendations structured around different aspects of colourimetric method implementation aimed at shortening and facilitating the steps necessary for successfully applying similar procedures in new experimental setups.

2.2. Comparisons between Mixing Time Measurement Methods

Some papers in the field include comparisons between results obtained using various mixing time measurement methods performed in identical experimental setups. Care should be taken during these comparisons, as the methods inherently differ in the phenomena being observed as indications of the mixing process, the applied definitions of mixing time and the invasiveness and locality of the measurement. The methods most often mentioned next to the colourimetric method are

- the sensor method, based on recording temporal changes in the readings of one or more sensors placed inside the mixed liquid, including
 - the thermal method, in which temperature sensors such as thermocouples monitor the changes in liquid temperature after injection of a small portion of liquid of a different temperature [46];
 - the conductivity and pH methods, which rely on measuring changes in conductivity or pH after introducing a tracer with conductometric or pH electrodes [47].
- planar laser-induced fluorescence (PLIF), in which the mixing is observed through the dispersion of a fluorescent dye excited by a sheet of laser light, resulting in the emission of light at a specific wavelength [48].

Kraume and Zehner [17] applied the iodine–starch decolourisation and conductivity methods to characterise homogenisation efficiency in a baffled tank with a pitched blade or a Rushton turbine. The authors found that the results obtained with both methods were similar, with 10–20% scattering of values across the stirrer speed range. Different accuracies of results are reported depending on the impeller type. In the case of the pitched blade turbine, the scattering was more significant, and the values from the decolourisation method were higher than those from the sensor method.

Trad et al. [27] and Chezeau et al. [28] have directly compared results obtained with colourimetric, conductivity and PLIF methods in small-scale bioreactors agitated with different impellers. The authors of [28] emphasised that for each method, the same volume of tracer was injected in explicitly defined places and that the mixing time was defined as the moment of reaching 95% homogeneity. The authors conclude that the results obtained with the three methods were similar. However, in the case of [28], discrepancies could be observed in the transitional flow regime, where the sensor method values were higher than those obtained with two other methods. Shortcomings of the sensor method are pointed out, namely the dependency on probe placement and the inability to examine flow patterns [27]. The decolourisation and PLIF methods were supplemented with digital image processing, which could improve their accuracy. It is mentioned that the decolourisation method may underestimate mixing time values that are under 10 s and is subject to errors due to the obscuring of the parts of liquid further from the camera by the regions in front of the vessel [28]. However, the authors point out the PLIF's disadvantage of a high cost, focused mainly in the laser and camera hardware [27].

2.3. Visual Observations and Computerised Image Processing

Among the various approaches to processing captured video data, a significant distinction can be made between visual observations and computerised digital image processing. Before the advent of inexpensive and powerful computers, visual observations or a visual analysis of image frames by the observer performing the measurement were prevalent in studies involving the colourimetric method. A visual image analysis has substantial disadvantages, given the inherent subjectivity of colour perception of the observer [10], which limits the repeatability and reproducibility of results; high labour costs; and limited ability to perform measurements in which low mixing time values characterise the mixing process. In the work of Fox and Gex [11], the authors attempted to limit the errors in visual interpretation through independent simultaneous determination of the measurement endpoint by two observers. The authors point out that in most cases, the results agreed within 10%, but deviations as high as 60% also occurred. Despite these shortcomings, Lamberto et al. [16] still point out the advantages of a visual analysis, mainly compared to the sensor methods, which involve introducing probes into the liquid, which disturb flow patterns meant to be measured.

The work of Delaplace et al. [18] is the first example present in the literature of mixing process images being digitally analysed with the aid of computer software. In that study, the temporal changes in RGB values of frames acquired with a digital webcam at a temporal resolution of 1 Hz were processed with a macro written for commercial OPTIMAS software. Nearly all papers published after the work of Delaplace et al. [18] involved a computer image analysis in some form, with differences in the image acquisition hardware, data processing software and definitions of mixing time used for calculating results. A summary of techniques, software and requirements for a digital image analysis is presented in Section 5.

3. Laboratory Procedure Considerations

The literature regarding the colourimetric method gives a few examples of the reagents and colour-changing chemicals that can be used in laboratory procedures. They can be generally arranged into two main categories:

- Physical methods (without a chemical reaction)—observation of the mixing process is based on the temporal changes in concentration of a dye dissolving in the bulk of the liquid. The dye does not change its chemical structure during mixing. Examples of dyes that have been used in studies with the colourimetric method are methylene blue [26], Cochineal Red [32], Purple Drimarene R 2 RL [43] and Patent Blue V E131 [45].
- Chemical methods (with a chemical reaction)—the progress of the mixing process is assumed using the colour change in a chemical, which changes its properties based on an instantaneous chemical reaction [49]. The frequently used chemical reactions are
 - A redox reaction between iodine/triiodide (i.e., I_2/I_3^- ions) and thiosulfate anions, $S_2O_3^{2-}$, in a starch solution [13], usually called the iodometric reaction. During the reaction, the iodine/triiodide is reduced into an iodide, I^- , anion, which makes the dissolved starch change from deep purple to colourless. This reaction was applied during studies of multi-use reactors [13–15,17,25] and single-use bag-like containers [34,35,39]. The disadvantage of the iodometric reaction with applications in SUB setups is the possible interaction between iodine and the polymer film of the single-use bag, which can lead to staining and gradual deterioration of the optical properties of the disposable container.
 - An acid–base neutralisation reaction in the presence of one or more pH indicators. The chemicals used during the experiments were usually strong bases and acids, like sodium hydroxide and hydrochloric acid, at various concentrations depending on the setup and the indicator pH colour change range. One or more indicators in one solution can be added during the experiments. Examples of the pH indicator systems that have been used with the colourimetric method are listed in Table 2. The colour ranges of the indicator are summarized in Figure 1.

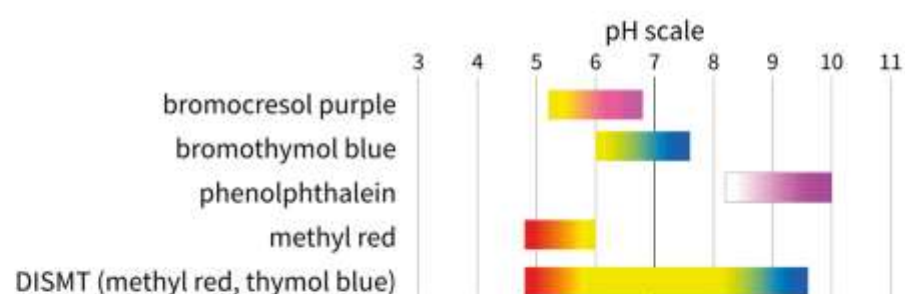


Figure 1. pH colour change ranges of several indicators or systems of indicator used in colourimetric method applications.

Table 2. pH indicators used in colourimetric method studies (based on Cabaret et al. [10]).

Indicator	Colour at Low pH	pH Colour Change Range	Colour at High pH	Reference
<i>Single indicator systems</i>				
bromocresol purple	yellow	5.2–6.8	purple	[19,20,22,23,27,28]
bromothymol blue	yellow	6.0–7.6	blue	[2,6,16,31]
phenolphthalein	colourless	8.2–10.0	pink	[3,11,29,42]
methyl red	red	4.8–6.0	yellow	[12]
<i>Double indicator systems</i>				
DISMT (methyl red, thymol blue)	red	4.8–9.6	blue	[18,21,30,33,36–38,40,41]

With the physical methods, in which no chemical reaction occurs, the mixing progress is only determined based on the dilution of the dye. With this, a given portion of liquid

can appear mixed within the sampling equipment's finite resolution but not molecularly mixed. With chemical-reaction-based diagnostics, the reagent molecules must come into contact to allow colour change [50].

The typical laboratory procedure for mixing time determination using the colourimetric method is summarised in Figure 2. The primary step is filling the vessel with a starting solution consisting of the starting reagent at a given concentration with a small amount of the indicator dissolved. A small volume of the tracer solution is rapidly injected into the liquid after the starting solution is brought to the correct agitation and environment conditions. The concentration of the tracer solution should be significantly higher than the starting solution, which will minimise the total volume of the tracer needed to bring the solution to the final colour.

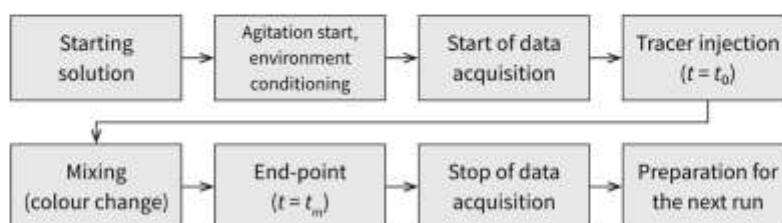


Figure 2. Typical laboratory procedure for mixing time determination using the colourimetric method.

The amount and concentration of the tracer needed for a single injection are related to the molar ratio of the acid and base. The molar ratio can influence the repeatability of measurements and whether micro- or macromixing time is to be measured. At a reagent molar ratio of 1:1, a stoichiometric mixture is obtained. In this case, for the mixing to be complete, every molecule of the tracer has to come into contact with a starting reagent molecule, and the micromixing time can be measured [10,31]. At this ratio, the longest mixing time values, also called "terminal mixing times", will be obtained. However, since obtaining an exact 1:1 ratio of reagents is difficult in laboratory conditions, the micromixing time measurements with the colourimetric method can be unreliable, with significant deviations in values between individual measurements and poor repeatability [1].

Usually, a higher reagent molar ratio should lead to obtaining more reliable results and improve measurement repeatability. In this case, more than one tracer molecule can come into contact with each molecule of the starting reagent, which means that the mixed appearance of the liquid can be achieved without perfect mixing on the molecular level. Some authors recommend a reagent molar ratio not smaller than 2:1. After this threshold, the reliability is greatly improved, and the results represent the macromixing time in the studied systems [1]. In the case of bioreactors, given the living cells' metabolism rate, the macromixing time is sufficient for evaluating whether the conditions inside a vessel are suitable for a given bioprocess [31].

It is recommended that the experiments are performed as partial or complete decolourisation, in which the indicator colour in the starting solution is darker and more saturated than in the final, mixed state. When decolourisation is applied, the remaining unmixed darker areas of liquid are easier to distinguish from the lightly coloured bulk of the liquid in a 2D projection of a 3D vessel volume. In an opposite scenario, the darker mixed regions of liquid can obscure and cover the lighter areas, making them less visible, which can cause the measurement endpoint to be more difficult to detect [7,8] and the resulting mixing time values underestimated [46].

Fitschen et al. [31] point out the advantage of colour-changing chemicals, which do not become colourless at the end of the measurement (e.g., phenolphthalein). Applying an indicator exhibiting two distinct, contrasting colours can allow for investigations of the flow pattern and intermediate zones, enabling the researchers to obtain more information about the temporal progress of the mixing process.

The DISMT system, i.e., the Double Indicator System for Mixing Time, was developed by Melton et al. [50]. The methodology relies on the colour change in two independent pH indicators: methyl red and thymol blue. Liquid during the measurement with the DISMT system is red at a pH smaller than 4.8 and blue at a pH bigger than 9.6. Between those values, i.e., in the pH range 4.8–9.6, both indicators are yellow, indicating that the liquids are “mixed within tolerance”. The system allows for capturing compartments inside the liquid in which there is overconcentration of either the base or the acid, improving the ability to detect intermediate zones. However, applying the DISMT scheme requires pH balancing of the solutions used before measurement to ensure the 1:1 ratio of the acidic and alkaline chemicals.

With the colourimetric method, it is possible to analyse mixing in liquids of different rheological properties: non-Newtonian solutions of sodium carboxymethyl cellulose (CMC) [20,22,24,29,43], polyacrylamide [13], xanthan gum [19,22,24] or Newtonian mixtures of water with glucose syrup [10,18–20,22,23], glycerin [13], polyalkene glycol [28] and polyethylene glycol [43].

4. Image Acquisition

Image acquisition is a crucial step in the application of the colourimetric method. The quality of frames in the video material will directly influence its usability. Properties of the experimental setup in which the colourimetric method will be used, adaptation of the filming equipment to the setup characteristics, use of sufficient quality filming equipment and proper adjustment of image parameters are the factors that need to be considered in the planning and preparations for the deployment.

4.1. Properties of the Device for Characterisation

An essential part of successfully implementing the colourimetric method in a new experimental setup is considering the device’s properties for characterisation, which will influence the placement and mounting of the camera equipment. The first requirement for applying the colourimetric method is an optical window allowing for observing the contents inside the vessel. In general, it is preferred that the vessel be made entirely from transparent material, which is sometimes fulfilled by the design of the device. An example is the case of single-use bioreactors, where the culture bag is made from multi-layer plastic film [51] or, as in small-scale stirred SUBs [34,35], from rigid plastic material. Sources also report the use of vessels made from glass [2,16,21,24,26,28,31,43,48], acrylic/plexiglass [3,13,15,24,25,33,36,52] or polycarbonate [10,19,53].

In cases where the device to be characterised is made from a non-transparent material, it may be necessary to construct a 3D mimic that reflects the geometry of the original equipment. The requirement of optical access to the insides of the vessel is the limiting factor of the applicability of the colourimetric method in industrial-scale systems [3]. Satisfying this requirement is more challenging, given the cost and feasibility of manufacturing large structural parts with good mechanical and optical properties.

The considerations should also focus on the shape of the device’s vessel and internal equipment, whether it is stationary or performs movement, and the characteristics of the liquid agitation mechanism. In most cases, as in the case of stirred bioreactors, the vessel walls are usually stationary, and the only moving parts of the device are the rotating agitator and its shaft. Therefore, the camera can usually be mounted stationarily in front of the tank with a view of a plane parallel to its vertical axis [2,28,29,32] (Figure 3). In their papers regarding the characterisation of small-scale cylindrical vessels, some authors mention placing the device inside a separate rectangular vessel filled with liquid of a similar composition and refractive index to the one inside the tank [10,20,22,29–31,48,53]. This approach is used to minimise the distortions from the curved tank walls.

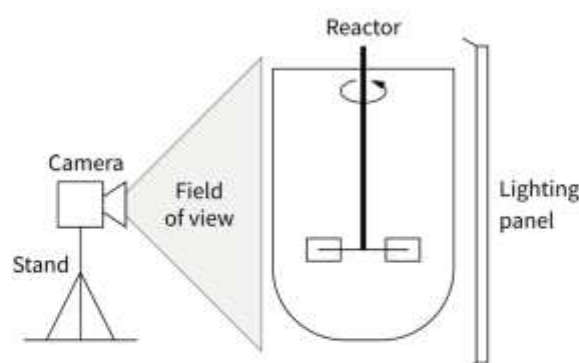


Figure 3. Example of the camera placement in a stirred tank setup with a lighting panel mounted behind the vessel for uniform illumination.

In some cases, rotation of the agitation equipment and changes in its apparent shape during the rotation cycle can introduce noise and partial obstructions of the view of some parts of the liquid inside the vessel. The effects of these disturbances should be considered during the postprocessing of image data. Iranshahi et al. [23] in their work used a Maxblend™ impeller, which has a large surface area and covers the majority of tank volume during the rotation cycle. During the image processing, the authors selected frames in which the agitator is perpendicular to the camera, corresponding to the moments in which the apparent area of the agitator is minimal. Analogously, Xiao et al. [44], during studies with a soft-elastic reactor, only selected the frames in which the beating slider crank is not pressing on the repetitively deformed walls of the vessel. These approaches can limit the temporal resolution of the measurement or be non-feasible depending on the shape of the agitator. An alternative solution could involve averaging the output pixel data, with the duration of the averaging window being at least equal to the duration of one agitator rotation cycle, taking advantage of the oscillatory nature of the image disturbances.

In experimental setups involving other types of reactors, additional steps for adapting the camera equipment to device characteristics may be necessary. Tan et al. [6] used a rotating camera setup adapted from Seletzky et al. [54] to obtain a stable image of the liquid inside a shaken flask. The setup consisted of two tables connected to an electrical motor via a gearbox, which caused the flask and the camera to rotate in opposite directions at the same frequency. As a result, the rotating liquid inside the vessel was not moving relative to the camera. An image from the camera was sent to a computer through a wireless transmitter.

Another type of device for which adaptation of the camera equipment could be performed for recording high-quality video material is disposable wave-mixed bioreactors. The liquid inside bag-like containers is agitated through the oscillating movements of a platform. The oscillations in the most often applied wave-mixed systems occur around one rotational axis (1D) or one rotational and along one linear axis (2D) [55,56]. There, the filming equipment could be mounted to the platform above the single-use bag with a dedicated mount, resulting in an image stationary to the rocking movement. However, no such solutions have been presented in the literature. Jones et al. [42] performed visual observations of the mixing process inside a wave-mixed bioreactor, but the camera was mounted next to the device, independent of the rocking platform.

4.2. Filming Equipment (Camera, Lighting)

Currently, the market offers plenty of options for selecting camera equipment. The choice of filming equipment depends primarily on its availability, cost, the desired size in relation to the experimental setup and existing inventory and expertise inside a research facility. The literature contains reports of the use of industrial solutions [6,30,33,36,40,44] or consumer-grade devices such as digital SLRs [27,28,31,57], mirrorless [45] or compact digital cameras [26,29,32,37,38] or webcams [18]. Other consumer equipment could be

suitable for a colourimetric method setup, including action cameras or widely available smartphone cameras.

Consumer-grade cameras have the advantage of ease of use: the devices usually have a user-friendly interface and record files in well-known formats into built-in storage. Industrial cameras could require additional equipment, such as speciality lenses [30,33,36,40] or connectors [44].

It is recommended for the camera to have a manual mode, enabling the user to adjust and fix the values of image parameters. The parameters which need to be considered are

- Video resolution, being the number of pixels along the width and height of each frame. The resolution impacts the spatial resolution of frames related to the physical dimensions of the vessel being filmed and, generally, the amount of detail that can be captured and further retrieved from the material.
- The frame rate, equal to the number of frames captured during one second, which determines the maximum temporal resolution of the measurement. The frame rate should be a multiple of the alternating current frequency in the electrical grid to eliminate flicker from lighting equipment.
- The bitrate, which is the amount of video data saved in a unit of time, usually given in kilobits per second. In general, the higher the video bitrate, the lower the compression and the more detail can be saved onto each frame. This setting is often controlled by the camera—the bitrate changes in time depending on the complexity of a given video segment.
- The lens focal length influencing the shape and relative size of objects on the focal plane depending on their placement in the frame. A lens or a camera setting that produces a rectilinear image with little barrel distortion should be used to avoid errors related to the parts of the vessel near the frame edge appearing too large relative to the centre of the frame. Understandably, there is a trade-off between the value of focal length, camera field of view and distance between the camera and the observed device.
- White balance, which is an adjustment of the relative intensity of colours and influences their temperature in relation to the light source's colour temperature. It is recommended that the white balance parameter value is set manually to the value corresponding to the colour temperature of lighting used in the setup. If the white balance adjustment were to be left automatic, the average hue in the frame could improperly skew during the mixing process as the indicator colour gradually changes.
- The exposure value, shutter speed, f-number and ISO, i.e., the parameters that influence the exposure of the resulting images. Values of these parameters should be adjusted to obtain frames with good brightness and contrast and will depend on the intensity of light sources illuminating the frame. Values of the parameters should be set as constant during filming to prevent the camera from compensating as the image changes relative to brightness during the colour change.

It is worth remembering the influence of resolution, frame rate and bitrate values on the size of video files. Choosing bigger values of these parameters may result in a more detailed image but will also produce larger amounts of data, increasing the computing power and time demand for image processing.

Sufficient lighting is essential for obtaining high-quality footage. The primary goal is to acquire uniform light coverage across all major parts of the observed scene, which limits the risk that the colour change is not sufficiently pronounced. Additionally, the lighting should be bright enough and uniform to eliminate noise in darker areas, independent of external interference and light sources near the observed device. The literature mentions using white panels behind the vessel to uniformly diffuse [3,22] or reflect [6,10,20,23,32,45] the light emitted from sources placed next to or behind the observed vessel. Different authors also mention using LED lighting panels with a diffuser built into the enclosure [27,28,30,31,36,40,44].

5. Image Processing

5.1. Processing Algorithm

After the video material has been obtained, it has to be processed to extract valuable data about the mixing process. Nowadays, with computers with high processing power, it is appropriate to process the material through an algorithm that performs operations (Figure 4) on every frame of the video material.

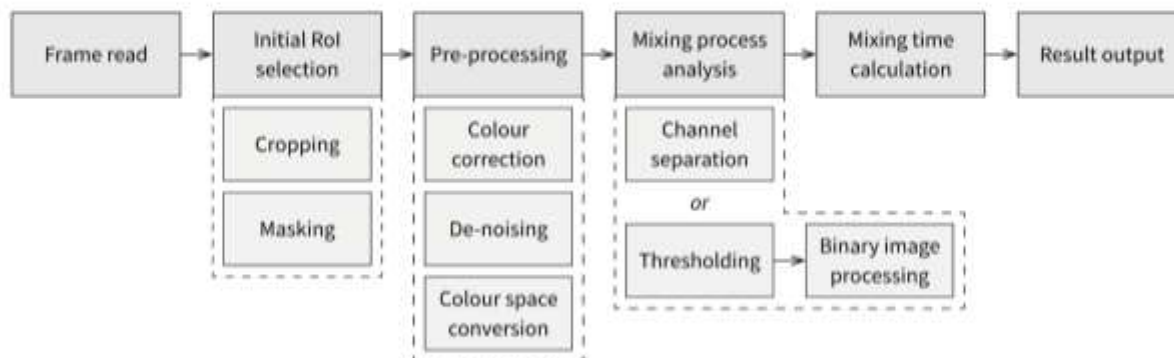


Figure 4. A scheme of suggested operations in an image processing algorithm for mixing time calculation with the colourimetric method. The main steps can be split into sub-operations performed as needed based on the form and quality of the initial video material and the selected definition for mixing time calculation.

Every digital video file consists of digital still images called frames. Each frame has to be read before processing and stored in memory as a table with cells corresponding to each pixel containing the colour information (Figure 5). In some situations where the observed vessel is not stationary related to the camera, which could be the case, for example, with shaken vessels, only some frames could be selected for processing, such as those separated by a time interval corresponding to the shaking motion oscillation period.

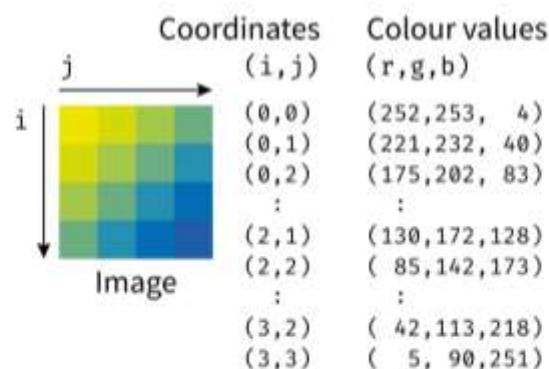


Figure 5. Example of an image being represented as a table of values. Each pixel is assigned a set of coordinates (i, j), to which a triplet of values representing the colour information is attached. In the example, a gradient of yellow to blue across the diagonal of the image, the r and g values, which in combination represent the yellow colour, are getting smaller as the coordinate values increase. On the contrary, the b channel increases across the diagonal in accordance with the intensity of blue colour in the image. More information about the RGB colour space and other colour spaces is provided in Section 5.2.

After reading a frame, an initial region of interest (RoI) selection can be performed. Depending on the experimental setup and how the captured vessel is placed inside the

camera field of view, the image can be cropped or masked so that only the parts representing the observed liquid remain for a further analysis. The masking can be performed manually and only once for a given setup if the apparent shape of the vessel and the agitating equipment is constant for the duration of the video and the camera's position related to the filmed vessel is not changing between measurements (Figure 6). The masking can also be performed through thresholding, with selected parts of the vessel or the surroundings marked, for example, with a specific colour not interfering with the colour of the observed liquid. A combination of the two methods could also be used, for example, when minor movement of the camera occurs during the measurement, as could be with cameras mounted to the rocker in wave-mixed devices or to the oscillating platform in shaken devices.



Figure 6. An example of initial region of interest selection. A binary mask is constructed, which excludes the elements of a frame, which interfere with the observation of vessel contents. The mask is overlaid on top of the original frame to obtain an image for further processing.

With the appropriate region of interest selected, image processing can be performed to improve the quality of the data or make them suitable for further operations. The processing could involve colour corrections, such as contrast expansion, changes in white balance, brightness or gamma correction of the image [58]. Image processing can also involve operations to decrease noise, which can appear due to insufficient lighting in some parts of the image. The de-noising can be performed with filtering algorithms (e.g., Gaussian, median or bilateral) [59]. Image processing should be limited to as few operations as possible, as it will increase the amount of computational power necessary for the whole process. This goal can be achieved by obtaining high-quality video material, as described in Section 4.

Colour space conversion is an operation that can be performed to make the data easier to analyse, for example, by simplifying the selection of colours corresponding to mixed and unmixed regions. Choice of the colour space should be performed based on what colour-changing reagents are used during the experiments. For example, if bromothymol blue, which changes colour from blue to yellow, was to be used, the b^* component of the $L^*a^*b^*$ space could be used for a simple selection of colour ranges corresponding to each state of the indicator. Colour spaces and their characteristics are explained in Section 5.2.

The approach taken during the analysis of the mixing process can be different depending on the characteristics of the observed vessel, what the liquid flow characteristics inside the observed vessel are and what definition of mixing time is intended to be used at the end of the process (see Section 5.3):

1. The first approach to obtaining data about the mixing process is to perform separation of the image's colour channels, select one of the components and directly observe changes in the values of the component, either averaged across the whole domain or divided into subdomains or individual pixels.

- The second approach, which could be used when the apparent shape of the observed liquid changes in time, is to find the areas corresponding to each discernible state of mixedness through thresholding. The thresholding will require the selection of colour ranges corresponding to each state of the applied indicators, which, if the video material is filmed at consistent filming parameters, should be performed once for the whole series of measurements. The binary masks resulting from thresholding can be improved with binary image operations, such as erosion and dilation or opening and closing [59].

5.2. Colour Spaces

A crucial point of an image analysis is determining how the colour information corresponds to the mixedness state of the liquid. The colour information is stored in the image with values organised according to a specified colour space. Multiple colour spaces have been developed, each varying in how they represent colour [60]. The following paragraphs contain brief descriptions of selected colour spaces, which were previously broadly adopted during colourimetric method studies or could be used more often given their utilisation in similar areas.

The grayscale is the simplest way of representing differences between areas of liquid differing in relative brightness, which has been utilised in colourimetric mixing time determination [26,31]. In grayscale, only information on the lightness of a pixel is stored. Usually, the single parameter of grayscale is limited from 0 (black) to 255 (white). Grayscale can be suited for analysing images in which the liquid's initial and final colours differ strongly in brightness. However, since all other colour information is not preserved, it is recommended that other options be examined. The choice of colour space should be based on the available functionality in the software selected for the image processing and the effectiveness of colour separation assessed during the initial tests of the image processing algorithm.

RGB colour space (Figure 7, left) consists of three channels: R for the intensity of red colour in the image, G for green and B for blue. It is used in almost all popular digital output systems for everyday use [61]. Through its abundance, most papers regarding the colourimetric mixing time measurement method use RGB or some part of it to represent colour information. However, RGB has disadvantages, such as high correlation among its components [62] and being susceptible to changes in scene illumination [63].

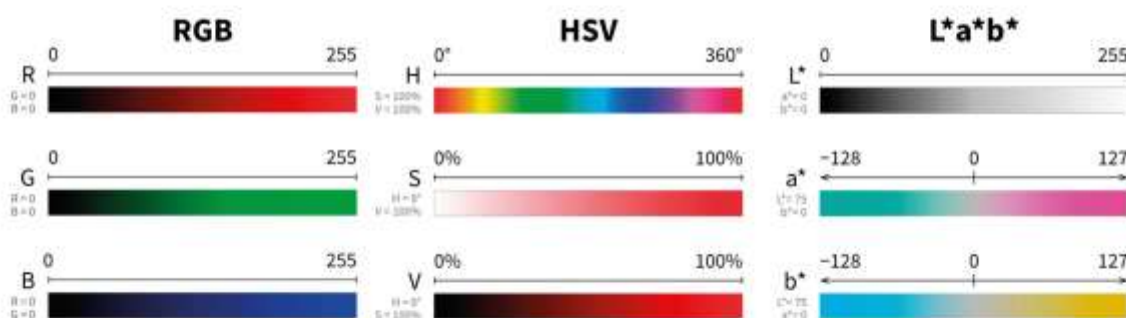


Figure 7. Components of RGB, HSV and $L^*a^*b^*$ colour spaces with their typical ranges. Values of the other two components set for each axis are listed below their symbol. Values of RGB and HSV components are defined with numerical limits. In the case of the $L^*a^*b^*$ colour space, the values of the a^* and b^* components are theoretically unlimited. The limits in the graphic are typical for when 8-bit integer math is used.

HSV colour space (Figure 7, centre) consists of three channels: H for the hue of the colour, S for saturation and V for the value (intensity). The HSV space can be represented as a cylinder, in which the H channel is scaled as an angular component, the S channel

corresponds to the radial dimension and the V channel is scaled in the axial dimension [60]. HSV space differs from RGB as it separates the information on the intensity of colour from the hue [64].

L*a*b* (Figure 7, right) is a colour space defined by the International Commission on Illumination, consisting of three channels: L* corresponds to the lightness of the colour, while a* and b* are chromatic components with negative and positive values for colour opponents. The a* component indicates where the colour falls along the red–green axis, and the b* component represents the position of colour on the blue–yellow axis [65]. L*a*b* colour space was designed to be uniform and is approximately linear, which means that a distance between two colours in L*a*b* space corresponds to a similar perceived difference for the observer [66]. It also provides good separation of the lightness component from the saturation and hue components [61]. L*a*b* is frequently used in food science [67,68], for human face detection applications [69] or in optoelectronics [70]. Trujillo-de Santiago et al. [71] presented results for mixing time measurements in a vessel filled with an opaque non-Newtonian blue maize flour suspension, which is an unusual example, given that the colour change could only be detected on the outer surface of the fluid.

5.3. Mixing Time Value Calculation

5.3.1. Global Mixing Time

Processing the video data should lead to obtaining data describing the mixing process inside the studied vessel. The simplest quantitative result, which can be obtained with the colourimetric method, is the global mixing time value. Different definitions of global mixing time have been used in different studies, the summary of which is presented below.

In the case of works where the liquid was observed visually, the mixing time was usually defined as the moment in which the last element of liquid in the colour representing the unmixed state has been eliminated [11,15]. Usually, indicators used during the experiments with visual observations had a dark and saturated colour in the unmixed state and were colourless or light-coloured in the final state. Therefore, the goal was to catch the point where the last dark-coloured spot in the liquid disappeared [12].

After the advent of a computer-aided image analysis, the global mixing time value definitions rely on specifying a measure of the progress of the observed process. In general, the parameter taken as the measure of mixing progress can be normalised to obtain a homogeneity Ho value with the use of the following equation [72]:

$$Ho(t) = \frac{X_{\infty} - X(t)}{X_{\infty} - X(0)} \quad (1)$$

In Equation (1), X is the parameter taken as the measure of mixing progress, and $X(t)$ is the parameter value at the time t . $X(0)$ is the value of the parameter at the moment of tracer injection. X_{∞} is the value of the parameter at the end of the measurement after a steady state has been reached. Mixing time is then defined as the moment in time when Ho permanently reaches 100% within some specified deviation, for example, 5% or 10%.

Delaplace et al. [18] have defined the mixing time as the time between tracer injection and the moment of achieving less than 10% deviation in the green channel brightness compared to the mean level. The green channel from RGB space has been used, as the increase in its values is related to the change in liquid colour from red to yellow, the latter being a mixture of the red and green components.

Cabaret et al. [10] examined which of the three RGB channels is most suitable for global mixing time determination based on the amplitude of change and the stability of values in the mixed state for the values of each channel. The authors specified which RGB component gives the best colour separation for several pH indicators. In the study of Cabaret et al., the mixing efficiency at a given moment is defined as a ratio between the number of pixels corresponding to the mixed liquid and the total number of pixels in the region of interest [10].

A different approach for global mixing time calculation has been used by Xiao et al. [44] and previously also by Trujillo-de Santiago et al. [71]. In these reports, the three colour values for each picture element are treated as Cartesian coordinates of points in 3D space. At any moment t , a distance between points represents the current colour of a given picture element and the final colour of mixed liquid. The distance, which then is taken as the measure of mixing progress, can be calculated according to the following expression:

$$D_{ij}(t) = \sqrt{(\bar{K}_{\infty} - K_{ij}(t))^2 + (\bar{L}_{\infty} - L_{ij}(t))^2 + (\bar{M}_{\infty} - M_{ij}(t))^2} \quad (2)$$

In Equation (2), i and j are the coordinates of a given pixel in the analysed image, $(K_{ij}(t), L_{ij}(t), M_{ij}(t))$ are the colour values of the pixel in an arbitrary colour space at a given moment t , $(\bar{K}_{\infty}, \bar{L}_{\infty}, \bar{M}_{\infty})$ are the colour values in the final homogenous state averaged across the whole analysed area and $D_{ij}(t)$ is the distance between those values represented by two points in 3D space.

The $D_{ij}(t)$ values for all pixels can be normalised with the use of Equation (1). The global mixing time can be calculated by averaging the homogeneity values across the whole picture domain and taking the time value at which a given deviation from 100% homogeneity is reached, analogously to the previously described method. The averaging of the homogeneity values can be performed by using an equation:

$$\overline{Ho}(t) = \frac{\sum_i^A Ho_{ij}(t)}{A} \quad (3)$$

A in Equation (3) represents the area, i.e., the total number of pixels, assigned to the analysed region of interest. In the simplest case, with a rectangular region of interest, A would be equal to the product of its width and height.

The mixing time value can also be determined through the analysis of the log root-mean-square variance of the normalised homogeneity values, as presented in studies of Gabelle et al. [24] and the report of Plais and Augier [43] based on the work of Brown et al. [8]:

$$\log \sigma_{RMS}^2 = \log \left(\frac{1}{np} \sum_{i=1}^{np} (Ho(t) - 1)^2 \right) \quad (4)$$

In the work of Brown et al. [8], where this definition was intended for use with the sensor method, np in Equation (4) represents the number of probes placed in the liquid. In the works of Gabelle et al. [24] and the study of Plais and Augier [43], np corresponds to the number of subdivisions introduced into the original image. With this approach, mixing time with a 5% deviation from perfect homogeneity is defined as the moment when $\log \sigma_{RMS}^2 = -2.6$.

5.3.2. Local Mixing Time, Mixing Time Maps

Apart from calculating global mixing time values, which can be performed using any mixing time measurement method, the colourimetric method offers the possibility of obtaining local mixing time values in any chosen area of the liquid. The main region of interest can be split into multiple parts, with the smallest possible being the single pixel of the original image. The local mixing time value can be calculated similarly to the global mixing time but without averaging homogeneity values across the entire analysed image.

Local mixing time values can be presented as mixing time maps. Mixing time maps can be prepared by mapping the local mixing time values to a colour scale and plotting them on a 2D surface in spots corresponding to the areas or pixels in the original frame. Mixing time maps can be a tool for easy quantification of compartments and concentration gradients during the mixing process and have been used to present data in studies regarding various types of vessels and colourimetric method variants [30,31,37,38,40,41,44].

5.4. Software Tools

There are several software tools available for the processing of obtained video material. Free and open-source software tools can be used over proprietary programs to improve reproducibility and decrease the cost of research. The selection of software used for image processing should also be based on the programming experience of the personnel and whether it provides all necessary functions.

The software that is frequently used for the image processing based on the data in Table 1 is MATLAB by The MathWorks, Inc. Many authors mention the use of this environment for the processing of image data [28,30,33] and for the further calculations of the mixing time value [26]. In some studies, the Image Processing Toolbox is mentioned [32], a part of the library of extensions to the MATLAB environment containing functions dedicated to image data operations. The popularity of MATLAB among researchers [73] and extensive user documentation may facilitate the implementation of this environment into research based on the colourimetric method.

Another piece of software used during the image analysis by some researchers [3,26,29] is ImageJ—an open-source application for batch processing of images developed at the National Institute of Health in the United States. It is mainly used in medical applications and supports image analysis functions, which can be expanded through plug-ins [74]. ImageJ is operated through a graphical user interface, which can make it more accessible for research teams. Detailed documentation for the program is available on the project's website.

The OpenCV library provides tools for computer-vision-related tasks in many research and commercial applications [75]. It is free, open-source and available for Python and C++. The library has extensive functionality, containing numerous algorithms for accepting video streams, accessing pixel data and performing morphological and filtering operations, among others [76]. Similarly to the MATLAB Image Processing Toolbox, implementation of OpenCV will require moderate programming skills. Documentation, tutorials and other helpful resources are widely available without additional cost, which could enable researchers with some programming experience to use OpenCV in their research for analysing colourimetric method video material.

6. Conclusions

The colourimetric method is a powerful way of examining the mixing performance in tank reactors and various bioreactors. The application of the method has been well documented across systems varying in their working principle and characteristics, including the material of the vessel and the agitation mechanism employed. The colourimetric method allows for detailed observation of liquid flow during the mixing process in the whole body of liquid or with a focus on specifically selected areas inside the reactor, which gives it a substantial advantage over local sensor methods. The method is non-invasive, which enables the examination of liquid flow patterns in setups with various geometries and mixing mechanisms without unwanted disturbances and difficult-to-quantify errors resulting from introducing additional sensors or equipment into the vessel. It is possible to implement the colourimetric method approach with easily accessible chemicals (iodometry redox reaction or neutralisation reaction with pH indicators) and affordable equipment (widely available commercial cameras). The computerised analysis of the video material gathered through the experiments increases the interdisciplinarity of the studies, integrating bioreactor and fluid mechanics research with computer science. The wide availability of image analysis tools and multiple documented definitions for mixing time value calculation give flexibility and room for adjustment of the method for the requirements of a specific experimental setup. Additionally, a thorough analysis of the images can provide valuable information about the liquid flow patterns or zones with insufficient mixing inside the vessel. Broader application of the colourimetric method could accelerate the development of new bioreactor systems and the examination of their characteristics, including prototypical devices with newly developed geometries or agitation mechanisms.

Author Contributions: Conceptualization, M.B. and M.P.; data curation, M.B.; funding acquisition, M.B. and M.P.; investigation, M.B.; project administration, M.P.; supervision, M.P.; visualization, M.B.; writing—original draft, M.B.; writing—review & editing, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Research was funded by the Warsaw University of Technology within the Excellence Initiative: Research University (IDUB) programme (YOUNG PW grant).

Data Availability Statement: No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funder had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Godleski, E.S.; Smith, J.C. Power Requirements and Blend Times in the Agitation of Pseudoplastic Fluids. *AIChE J.* **1962**, *8*, 617–620. [\[CrossRef\]](#)
2. Gaugler, L.; Mast, Y.; Fitschen, J.; Hofmann, S.; Schlüter, M.; Takors, R. Scaling-down Biopharmaceutical Production Processes via a Single Multi-compartment Bioreactor (SMCB). *Eng. Life Sci.* **2023**, *23*, e2100161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Rosseburg, A.; Fitschen, J.; Wutz, J.; Wucherpfennig, T.; Schlüter, M. Hydrodynamic Inhomogeneities in Large Scale Stirred Tanks—Influence on Mixing Time. *Chem. Eng. Sci.* **2018**, *188*, 208–220. [\[CrossRef\]](#)
4. Ascanio, G. Mixing Time in Stirred Vessels: A Review of Experimental Techniques. *Chin. J. Chem. Eng.* **2015**, *23*, 1065–1076. [\[CrossRef\]](#)
5. Hillig, F.; Pilarek, M.; Junne, S.; Neubauer, P. Cultivation of Marine Microorganisms in Single-Use Systems. In *Disposable Bioreactors II*; Eibl, D., Eibl, R., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; Volume 138, pp. 179–206, ISBN 978-3-642-45157-7.
6. Tan, R.-K.; Eberhard, W.; Büchs, J. Measurement and Characterization of Mixing Time in Shake Flasks. *Chem. Eng. Sci.* **2011**, *66*, 440–447. [\[CrossRef\]](#)
7. Li, L.; Wang, K.; Zhao, Q.; Gao, Q.; Zhou, H.; Jiang, J.; Mei, W. A Critical Review of Experimental and CFD Techniques to Characterize the Mixing Performance of Anaerobic Digesters for Biogas Production. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* **2022**, *21*, 665–689. [\[CrossRef\]](#)
8. Brown, D.A.R.; Jones, P.N.; Middleton, J.C.; Papadopoulos, G.; Arik, E.B. Experimental Methods. In *Handbook of Industrial Mixing*; Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A., Kresta, S.M., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2003; pp. 145–256, ISBN 978-0-471-26919-9.
9. Löffelholz, C.; Husemann, U.; Greller, G.; Meusel, W.; Kauling, J.; Ay, P.; Kraume, M.; Eibl, R.; Eibl, D. Bioengineering Parameters for Single-Use Bioreactors: Overview and Evaluation of Suitable Methods. *Chem. Ing. Tech.* **2013**, *85*, 40–56. [\[CrossRef\]](#)
10. Cabaret, F.; Bonnot, S.; Fradette, L.; Tanguy, P.A. Mixing Time Analysis Using Colorimetric Methods and Image Processing. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46*, 5032–5042. [\[CrossRef\]](#)
11. Fox, E.A.; Gex, V.E. Single-Phase Blending of Liquids. *AIChE J.* **1956**, *2*, 539–544. [\[CrossRef\]](#)
12. Norwood, K.W.; Metzner, A.B. Flow Patterns and Mixing Rates in Agitated Vessels. *AIChE J.* **1960**, *6*, 432–437. [\[CrossRef\]](#)
13. Carreau, P.J.; Patterson, I.; Yap, C.Y. Mixing of Viscoelastic Fluids with Helical-Ribbon Agitators. I—Mixing Time and Flow Patterns. *Can. J. Chem. Eng.* **1976**, *54*, 135–142. [\[CrossRef\]](#)
14. Haß, V.C.; Nienow, A.W. Ein Neuer, Axial Fördernder Rührer Zum Dispergieren von Gas in Flüssigkeiten: Ein Neuer, Axial Fördernder Rührer Zum Dispergieren von Gas in Flüssigkeiten. *Chem. Ing. Tech.* **1989**, *61*, 152–154. [\[CrossRef\]](#)
15. Saito, F.; Nienow, A.W.; Chatwin, S.; Moore, I.P.T. Power, Gas Dispersion and Homogenisation Characteristics of Scaba SRGT and Rushton Turbine Impellers. *J. Chem. Eng. Jpn. JCEJ* **1992**, *25*, 281–287. [\[CrossRef\]](#)
16. Lamberto, D.J.; Muzzio, F.J.; Swanson, P.D.; Tonkovich, A.L. Using Time-Dependent RPM to Enhance Mixing in Stirred Vessels. *Chem. Eng. Sci.* **1996**, *51*, 733–741. [\[CrossRef\]](#)
17. Kraume, M.; Zehner, P. Experience with Experimental Standards for Measurements of Various Parameters in Stirred Tanks. *Chem. Eng. Res. Des.* **2001**, *79*, 811–818. [\[CrossRef\]](#)
18. Delaplace, G.; Bouvier, L.; Moreau, A.; Guérin, R.; Leuliet, J.-C. Determination of Mixing Time by Colourimetric Diagnosis—Application to a New Mixing System. *Exp. Fluids* **2004**, *36*, 437–443. [\[CrossRef\]](#)
19. Foucault, S.; Ascanio, G.; Tanguy, P.A. Mixing Times in Coaxial Mixers with Newtonian and Non-Newtonian Fluids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 352–359. [\[CrossRef\]](#)
20. Bonnot, S.; Cabaret, F.; Fradette, L.; Tanguy, P.A. Characterization of Mixing Patterns in a Coaxial Mixer. *Chem. Eng. Res. Des.* **2007**, *85*, 1129–1135. [\[CrossRef\]](#)
21. Delaplace, G.; Thakur, R.K.; Bouvier, L.; André, C.; Torrez, C. Dimensional Analysis for Planetary Mixer: Mixing Time and Reynolds Numbers. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62*, 1442–1447. [\[CrossRef\]](#)

22. Fradette, L.; Thomé, G.; Tanguy, P.A.; Takenaka, K. Power and Mixing Time Study Involving a Maxblend® Impeller with Viscous Newtonian and Non-Newtonian Fluids. *Chem. Eng. Res. Des.* **2007**, *85*, 1514–1523. [\[CrossRef\]](#)
23. Iranshahi, A.; Devals, C.; Heniche, M.; Fradette, L.; Tanguy, P.A.; Takenaka, K. Hydrodynamics Characterization of the Maxblend Impeller. *Chem. Eng. Sci.* **2007**, *62*, 3641–3653. [\[CrossRef\]](#)
24. Gabelle, J.-C.; Augier, F.; Carvalho, A.; Rousset, R.; Morchain, J. Effect of Tank Size on $k_L a$ and Mixing Time in Aerated Stirred Reactors with Non-newtonian Fluids. *Can. J. Chem. Eng.* **2011**, *89*, 1139–1153. [\[CrossRef\]](#)
25. Sieblist, C.; Jenzsch, M.; Pohlscheidt, M.; Lübbert, A. Insights into Large-Scale Cell-Culture Reactors: I. Liquid Mixing and Oxygen Supply. *Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 1532–1546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Allonneau, C.; Olmos, E.; Guyot, S.; Ferret, E.; Gervais, P.; Cachon, R. Hydrodynamic Characterization of a New Small-Scale Reactor Mixed by a Magnetic Bar. *Biochem. Eng. J.* **2015**, *96*, 29–37. [\[CrossRef\]](#)
27. Trad, Z.; Fontaine, J.-P.; Larroche, C.; Vial, C. Experimental and Numerical Investigation of Hydrodynamics and Mixing in a Dual-Impeller Mechanically-Stirred Digester. *Chem. Eng. J.* **2017**, *329*, 142–155. [\[CrossRef\]](#)
28. Chezeau, B.; Fontaine, J.P.; Vial, C. Analysis of Liquid-to-Gas Mass Transfer, Mixing and Hydrogen Production in Dark Fermentation Process. *Chem. Eng. J.* **2019**, *372*, 715–727. [\[CrossRef\]](#)
29. Amirafabi, M.; Khiadani, M.; Mohammed, H.A. Performance of a Dual Helical Ribbon Impeller in a Two-Phase (Gas-Liquid) Stirred Tank Reactor. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **2020**, *148*, 107811. [\[CrossRef\]](#)
30. Samaras, J.J.; Ducci, A.; Micheletti, M. Flow, Suspension and Mixing Dynamics in DASGIP Bioreactors, Part 2. *AIChE J.* **2020**, *66*, e16999. [\[CrossRef\]](#)
31. Fitschen, J.; Hofmann, S.; Wutz, J.; Kameke, A.V.; Hoffmann, M.; Wucherpfennig, T.; Schlüter, M. Novel Evaluation Method to Determine the Local Mixing Time Distribution in Stirred Tank Reactors. *Chem. Eng. Sci. X* **2021**, *10*, 100098. [\[CrossRef\]](#)
32. Vivek, V.; Eka, E.N.; Chew, W. Mixing Studies in an Unbaffled Bioreactor Using a Computational Model Corroborated with In-Situ Raman and Imaging Analyses. *Chem. Eng. J. Adv.* **2022**, *9*, 100232. [\[CrossRef\]](#)
33. Tregidgo, M.; Dorn, M.; Lucas, C.; Micheletti, M. Design and Characterization of a Novel Perfusion Reactor for Biopharmaceuticals Production. *Chem. Eng. Res. Des.* **2023**, *194*, 344–357. [\[CrossRef\]](#)
34. Kaiser, S.C.; Eibl, R.; Eibl, D. Engineering Characteristics of a Single-Use Stirred Bioreactor at Bench-Scale: The Mobius CellReady 3L Bioreactor as a Case Study. *Eng. Life Sci.* **2011**, *11*, 359–368. [\[CrossRef\]](#)
35. Nienow, A.W.; Rielly, C.D.; Brosnan, K.; Bargh, N.; Lee, K.; Coopman, K.; Hewitt, C.J. The Physical Characterisation of a Microscale Parallel Bioreactor Platform with an Industrial CHO Cell Line Expressing an IgG4. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *76*, 25–36. [\[CrossRef\]](#)
36. Delbridge, J.N.; Barrett, T.A.; Ducci, A.; Micheletti, M. Power, Mixing and Flow Dynamics of the Novel Allegro™ Stirred Tank Reactor. *Chem. Eng. Sci.* **2023**, *271*, 118545. [\[CrossRef\]](#)
37. Tissot, S.; Farhat, M.; Hacker, D.L.; Anderlei, T.; Kühner, M.; Comninellis, C.; Wurm, F. Determination of a Scale-up Factor from Mixing Time Studies in Orbitally Shaken Bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **2010**, *52*, 181–186. [\[CrossRef\]](#)
38. Monteil, D.T.; Tontodonati, G.; Ghimire, S.; Baldi, L.; Hacker, D.L.; Bürki, C.A.; Wurm, F.M. Disposable 600-mL Orbitally Shaken Bioreactor for Mammalian Cell Cultivation in Suspension. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *76*, 6–12. [\[CrossRef\]](#)
39. Werner, S.; Greulich, J.; Geipel, K.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Eibl, D. Mass Propagation of *Helianthus annuus* Suspension Cells in Orbitally Shaken Bioreactors: Improved Growth Rate in Single-Use Bag Bioreactors. *Eng. Life Sci.* **2014**, *14*, 676–684. [\[CrossRef\]](#)
40. Rodriguez, G.; Anderlei, T.; Micheletti, M.; Yianneskis, M.; Ducci, A. On the Measurement and Scaling of Mixing Time in Orbitally Shaken Bioreactors. *Biochem. Eng. J.* **2014**, *82*, 10–21. [\[CrossRef\]](#)
41. Rodriguez, G.; Micheletti, M.; Ducci, A. Macro- and Micro-Scale Mixing in a Shaken Bioreactor for Fluids of High Viscosity. *Chem. Eng. Res. Des.* **2018**, *132*, 890–901. [\[CrossRef\]](#)
42. Jones, S.M.J.; Louw, T.M.; Harrison, S.T.L. Energy Consumption Due to Mixing and Mass Transfer in a Wave Photobioreactor. *Algal Res.* **2017**, *24*, 317–324. [\[CrossRef\]](#)
43. Plais, C.; Augier, F. Effect of Liquid Viscosity on Mixing Times in Bubble Columns. *Theor. Found. Chem. Eng.* **2016**, *50*, 969–974. [\[CrossRef\]](#)
44. Xiao, J.; Zou, C.; Liu, M.; Zhang, G.; Delaplace, G.; Jeantet, R.; Chen, X.D. Mixing in a Soft-Elastic Reactor (SER) Characterized Using an RGB Based Image Analysis Method. *Chem. Eng. Sci.* **2018**, *181*, 272–285. [\[CrossRef\]](#)
45. Wurm, H.; Sandmann, M. Establishment of a Simple Method to Evaluate Mixing Times in a Plastic Bag Photobioreactor Using Image Processing Based on Freeware Tools. *BMC Res. Notes* **2021**, *14*, 470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Hoogendoorn, C.J.; Den Hartog, A.P. Model Studies on Mixers in the Viscous Flow Region. *Chem. Eng. Sci.* **1967**, *22*, 1689–1699. [\[CrossRef\]](#)
47. Bartczak, M.; Wierzychowski, K.; Pilarek, M. Mixing Performance in a Litre-Scale Rocking Disposable Bioreactor: DoE-Based Investigation of Mixing Time Dependence on Operational Parameters. *Chem. Eng. J.* **2022**, *431*, 133288. [\[CrossRef\]](#)
48. Guillard, F.; Trägårdh, C.; Fuchs, L. A Study of Turbulent Mixing in a Turbine-Agitated Tank Using a Fluorescence Technique. *Exp. Fluids* **2000**, *28*, 225–235. [\[CrossRef\]](#)
49. Paul, E.L.; Atiemo-Obeng, V.A.; Kresta, S.M. (Eds.) *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*; Wiley-Interscience: Hoboken, NJ, USA, 2004; ISBN 978-0-471-26919-9.
50. Melton, L.A.; Lipp, C.W.; Spradling, R.W.; Paulson, K.A. Dismt—Determination of Mixing Time through Color Changes. *Chem. Eng. Commun.* **2002**, *189*, 322–338. [\[CrossRef\]](#)

51. Vanhamel, S.; Masy, C. Production of Disposable Bags: A Manufacturer's Report. In *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*; Eibl, R., Eibl, D., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp. 113–134, ISBN 978-0-470-90999-7.
52. Álvarez, M.M.; Guzmán, A.; Elías, M. Experimental Visualization of Mixing Pathologies in Laminar Stirred Tank Bioreactors. *Chem. Eng. Sci.* **2005**, *60*, 2449–2457. [[CrossRef](#)]
53. Vega-Alvarado, L.; Taboada, B.; Hidalgo-Millán, A.; Ascanio, G. An Image Analysis Method for the Measurement of Mixing Times in Stirred Vessels. *Chem. Eng. Technol.* **2011**, *34*, 859–866. [[CrossRef](#)]
54. Seletzky, J.; Otten, K.; Lotter, S.; Fricke, J.; Peter, C.; Maier, H.; Büchs, J. A Simple and Inexpensive Method for Investigating Microbiological, Enzymatic, or Inorganic Catalysis Using Standard Histology and Microbiology Laboratory Equipment: Assembly, Mass Transfer Properties, Hydrodynamic Conditions and Evaluation. *Biotech. Histochem.* **2006**, *81*, 133–138. [[CrossRef](#)]
55. Jossen, V.; Eibl, R.; Eibl, D. Single-Use Bioreactors—An Overview. In *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*; Eibl, R., Eibl, D., Eds.; John Wiley & Sons Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 37–52, ISBN 978-1-119-47789-1.
56. Bartczak, M.; Wierzchowski, K.; Pilarek, M. Mass Transfer in a Liter-Scale Wave Mixed Single-Use Bioreactor: Influence of Viscosity and Antifoaming Agent. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2023**, *62*, 10893–10902. [[CrossRef](#)]
57. Sharma, R.; Collair, W.; Williams, A.; Harrison, S.T.L.; Tai, S.L. Design and Engineering Characterization of a Horizontal Tubular Bioreactor with Spiral Impeller for Cell Cultivation. *Biochem. Eng. J.* **2023**, *191*, 108794. [[CrossRef](#)]
58. Burger, W.; Burge, M.J. *Digital Image Processing: An Algorithmic Introduction Using Java*; Texts in Computer Science; Springer: London, UK, 2008; ISBN 978-1-84628-379-6.
59. Russ, J.C. *The Image Processing Handbook*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006; ISBN 978-0-203-88109-5.
60. Tkalcic, M.; Tasic, J.F. Colour Spaces: Perceptual, Historical and Applicational Background. In Proceedings of the The IEEE Region 8 EUROCON 2003. Computer as a Tool, Ljubljana, Slovenia, 22–24 September 2003; IEEE: Ljubljana, Slovenia, 2003; Volume 1, pp. 304–308.
61. Kahu, S.Y.; Raut, R.B.; Bhurchandi, K.M. Review and Evaluation of Color Spaces for Image/Video Compression. *Color Res. Appl.* **2019**, *44*, 8–33. [[CrossRef](#)]
62. Cheng, H.D.; Jiang, X.H.; Sun, Y.; Wang, J. Color Image Segmentation: Advances and Prospects. *Pattern Recognit.* **2001**, *34*, 2259–2281. [[CrossRef](#)]
63. Liu, Y.; Yang, F.; Yang, R.; Jia, K.; Zhang, H. Research on Segmentation of Weed Images Based on Computer Vision. *J. Electron.* **2007**, *24*, 285–288. [[CrossRef](#)]
64. Sural, S.; Qian, G.; Pramanik, S. Segmentation and Histogram Generation Using the HSV Color Space for Image Retrieval. In Proceedings of the International Conference on Image Processing, Rochester, NY, USA, 22–25 September 2002; IEEE: Rochester, NY, USA, 2002; Volume 2, pp. II-589–II-592.
65. Bora, D.J.; Gupta, A.K.; Khan, F.A. Comparing the Performance of L*A*B* and HSV Color Spaces with Respect to Color Image Segmentation. *arXiv* **2015**, arXiv:1506.01472. [[CrossRef](#)]
66. Alata, O.; Quintard, L. Is There a Best Color Space for Color Image Characterization or Representation Based on Multivariate Gaussian Mixture Model? *Comput. Vis. Image Underst.* **2009**, *113*, 867–877. [[CrossRef](#)]
67. Lee, S.-M.; Lee, K.-T.; Lee, S.-H.; Song, J.-K. Origin of Human Colour Preference for Food. *J. Food Eng.* **2013**, *119*, 508–515. [[CrossRef](#)]
68. Afshari-Jouybari, H.; Farahnaky, A. Evaluation of Photoshop Software Potential for Food Colorimetry. *J. Food Eng.* **2011**, *106*, 170–175. [[CrossRef](#)]
69. Cai, J.; Goshtasby, A. Detecting Human Faces in Color Images. *Image Vis. Comput.* **1999**, *18*, 63–75. [[CrossRef](#)]
70. Suzuki, K.; Hirayama, E.; Sugiyama, T.; Yasuda, K.; Okabe, H.; Citterio, D. Ionophore-Based Lithium Ion Film Optode Realizing Multiple Color Variations Utilizing Digital Color Analysis. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5766–5773. [[CrossRef](#)]
71. Trujillo-de Santiago, G.; Rojas-de Gante, C.; García-Lara, S.; Balleca-Estrada, A.; Alvarez, M.M. Studying Mixing in Non-Newtonian Blue Maize Flour Suspensions Using Color Analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112954. [[CrossRef](#)]
72. Bauer, I.; Dreher, T.; Eibl, D.; Glöckler, R.; Husemann, U.; John, G.T.; Kaiser, S.C.; Kampeis, P.; Kauling, J.; Kleebank, S.; et al. *Recommendations for Process Engineering Characterisation of Single-Use Bioreactors and Mixing Systems by Using Experimental Methods*, 2nd ed.; Dechema Biotechnologie: Frankfurt am Main, Germany, 2020; ISBN 978-3-89746-227-4.
73. Kong, J.; Dimitrov, M.; Yang, Y.; Liyanage, J.; Cao, L.; Staples, J.; Mantor, M.; Zhou, H. Accelerating MATLAB Image Processing Toolbox Functions on GPUs. In Proceedings of the 3rd Workshop on General-Purpose Computation on Graphics Processing Units, Pittsburgh, PA, USA, 14 March 2010; ACM: Pittsburgh, PA, USA, 2010; pp. 75–85.
74. Abramoff, M.D.; Magalhães, P.J.; Ram, S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **2004**, *11*, 36–42.
75. Culjak, I.; Abram, D.; Pribanic, T.; Dzap, H.; Cifrek, M. A Brief Introduction to OpenCV. In Proceedings of the 2012 Proceedings of the 35th International Convention MIPRO, Opatija, Croatia, 21–25 May 2012; IEEE: Opatija, Croatia, 2012.
76. Howse, J. *OpenCV Computer Vision with Python*; Packt Publishing: Birmingham, UK, 2013; ISBN 978-1-78216-392-3.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

10.4. Publikacja [A4]

Bartczak M., Yılmaz T., Sączek M., Anderson A., Wierzchowski K., Pilarek M. (2025) *Characterisation of small-scale wave-mixed bioreactors using colourimetric method adaptation: mixing performance, flow regime and scale-change study*. Chemical Engineering Journal 509: artykuł nr 161295. DOI: 10.1016/j.cej.2025.161295 (IF 13,4, 200 pkt.)

Wkład autorski:

Pierwszy autor publikacji – udział w opracowaniu planu eksperymentów i metodyki pomiarów czasu mieszania przy zastosowaniu autorskiej adaptacji metody kolorymetrycznej oraz analizy struktury powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz, przeprowadzenie pomiarów czasu mieszania, obróbka otrzymanych wyników, udział w opracowaniu korelacji wiążących parametry operacyjne bioreaktora z wartościami czasu mieszania w polimerowych zbiornikach o dwóch objętościach nominalnych, przygotowanie rysunków, udział merytoryczny w opracowaniu manuskryptu.



Characterisation of litre-scale wave-mixed bioreactors using colourimetric method adaptation: Mixing performance, flow regime and scale change study

Mateusz Bartczak , Tuğba Yılmaz, Mateusz Sączek, Agnieszka Anderson, Kamil Wierzchowski , Maciej Pilarek

Faculty of Chemical and Process Engineering, Warsaw University of Technology, Łaska Waryńskiego 1, 00-645 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Wave-mixed bioreactors
Scale change
Mixing performance
Flow regime
Liquid surface features
Colourimetric method

ABSTRACT

The paper presents a new digitally-enhanced adaptation of the colourimetric method for mixing time measurement in small-scale, 2-litre and 10-litre disposable culture bags of a wave-mixed single-use bioreactor. Wave-mixed single-use bioreactors are a modern, well-established group of devices applied for manufacturing advanced and valuable products, mainly for the biopharmaceutical sector. The innovative original colourimetric method adaptation consisted of a self-designed mounting solution for a digital camera to obtain a high-quality image of the rocking bioreactor platform and an in-house algorithm for image processing and data analysis. Mixing time characteristics and influence of operational parameters in 2-litre and 10-litre vessels are presented. The obtained video footage was additionally processed to retrieve data about the features of the liquid surface during the rocking oscillatory motion, which were used to compare the flow development and regime between both examined culture bags. A valuable result of the work is the developed scale-change correlation equation for predicting process parameter values based on a selected mixing time ratio. The work extends currently available experimental techniques in wave-mixed bioreactors and offers the development potential for expanding the presented model equations to other important process parameters, like the mass transfer coefficient.

1. Introduction

Wave-mixed single-use bioreactors, also called rocking bioreactors, are widely used across the modern bioprocess and biopharmaceutical industry [1]. Their versatility is proven across the field, with documented applications in the laboratory-scale (with biomass of human [2], animal [3,4], plant cells [5], and bacteria [6]) or industrial-scale (with biomass of human [7], animal [8], plant cells [9] and bacteria [10]) production of valuable cell-derived bioproducts. Agitation in rocking bioreactors is performed through repetitive oscillations of a platform, onto which a disposable culture bag made from a multi-layer Bioclear™ 11 LLDPE-EVOH-EVA polymer film [11] is mounted. In most models offered currently on the market, the oscillations happen around one horizontal rotational axis (1D). Devices with simultaneous oscillations around a horizontal axis and a linear rail (2D) or two rotational axes (3D) have also been documented [1].

Single-use technology in wave-mixed bioreactors offers several advantages, like greater flexibility of a production facility based around

single-use technology [12], lower risk of contamination through the elimination of CIP procedures [13], and low shear stress values in the liquid medium during agitation [14]. Simultaneously, single-use bioreactors are hampered by the bags' relatively high cost and the dependency on a limited number of manufacturers, often the only suppliers of disposable bags to a given bioreactor model [1]. Environmental concerns regarding the complicated processing of large amounts of contaminated bio-hazardous plastic waste produced while utilising single-use bioreactors also pose a significant issue [15].

In this study, the ReadyToProcess WAVE™ rocking bioreactor system by Cytiva with Cellbag™ 2 L and 10 L bags was used. A new adaptation of the colourimetric method was developed and utilised to obtain quantitative mixing time data in both disposable containers. The colourimetric method of mixing time measurement relies on observing the colour change after adding an impulse of tracer to the bulk solution. It was previously used in many reactor and bioreactor systems, including single-use solutions [16]. Usually, the observations are done during a colour change caused by a fast chemical reaction in the presence of a pH indicator [17–20] or other chemicals, like starch and iodine [21–23].

* Corresponding author.

E-mail address: maciej.pilarek@pw.edu.pl (M. Pilarek).

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.161295>

Received 17 October 2024; Received in revised form 21 January 2025; Accepted 4 March 2025

Available online 5 March 2025

1385-8947/© 2025 Elsevier B.V. All rights reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Symbols and abbreviations		Indices	
Symbols		<i>blue</i>	blue colour
d_i	discrete derivative of frame no. i	<i>end</i>	end value
f_l	filling level (-)	<i>green</i>	green colour
$mAvg_{\text{colour}}$	moving average of a colour	i	index of a frame, time or other variable
n_i	frame number i	<i>nom</i>	nominal
p	confidence interval boundary	<i>yellow</i>	yellow colour
R^2	correlation coefficient	Abbreviations	
SS	sum of squares of the standard deviations (s^2)	2^3	two-value three-parameter full factorial design
t_0	moment of tracer addition (s)	BBD	Box-Behnken design
t_i	time signature of frame number i	CLAHE	contrast limited adaptive histogram equalisation
t_{end}	end time of mixing time measurement	DoE	design of experiment
t_{95}	mixing time (s)	EtOH	ethanol
V_L	liquid volume (L)	fps	frames per second
V_{nom}	nominal volume of a culture bag (L)	RO	reverse osmosis
<i>window</i>	averaging window	RMSE	root-mean-square error
α	amplitude (angle) of oscillations (°)	rpm	revolutions per minute
σ	standard deviation (s)		
ω	frequency of oscillations (rpm)		

The colourimetric method was chosen for this study for its non-invasiveness and the possibility of observing of mixing progress in the entire vessel, compared to the sensor method based on pH measurement, in which an electrode was introduced into the bag fully or partially through its top wall [24–26].

Previous reports of using an indicator to observe the mixing progress in a wave-mixed bioreactor were made in a 2 L bag in the BIOSTAT® CultuBag RM system with iodine and starch mixture applied as an indicator [23] and in a 10 L Cellbag™ by Cytiva, where phenolphthalein was used as a decolourised dye to visually observe the mixing patterns [27]. The currently presented work improves on the methods previously used with rocking bioreactors by introducing computer image processing techniques to analyse the video footage of the mixing process. A steady image of the culture bag was obtained through a custom-made camera mount, eliminating external disturbances. The video footage was additionally used to classify the flow regime in both bioreactor vessels across the bioreactors' operational range based on the features of the liquid surface during oscillations.

The advantage of the presented adaptation is the use of commercially-available components, such as a consumer-grade digital camera, and the hardware components (such as the camera mount and the dosing system) being manufactured using a well-established FDM 3D printing technique and operated using an open-source Arduino micro-controller platform. The in-house developed image processing code was written using open-source software, such as Python and OpenCV or the MATLAB environment, which is widely utilised in science and engineering. These aspects potentially broaden the areas where image processing techniques could be used, especially in studies of bioreactors with new properties or construction.

The aim of the study was to utilize the mixing time data acquired with the use of an innovative colourimetric method adaptation to obtain model equations for estimating mixing time values in the 2 L and 10 L single-use culture bags and to calculate coefficients for scale change equations, allowing for calculating agitation parameters and the filling level to preserve a specified ratio of mixing time values between both vessels – the first, according to the authors' best knowledge, reported attempt at developing a scale change equation for rocking bioreactors.

This paper consists of three main sections: an extensive description of the *Materials and methods* (i.e., the bioreactor setup, design of the colourimetric method adaptation, DoE-based experimental planning, image processing and data analysis), *Results* presentation (i.e., colourimetric method performance data, mixing time data from both

Cellbags™, categorisation of flow based on liquid surface features) and *Discussion* (i.e., the analysis of the colourimetric method performance, the impact of the operating parameters on the mixing performance in both culture bags and the comparison of the flow conditions in both, and the description of the scale change equation).

The Authors believe that the results presented in this work will significantly expand the available techniques for characterising single-use bioreactors and facilitate the application of this group of devices across different scales. The presented digitally-assisted adaptation of the colourimetric method is a major step in the improvement of disposable bioreactor characterisation, also from the point of view of their practical applications. We hypothesise that the researchers and the laboratories in the field will benefit from the results of the presented methodology.

2. Materials and methods

2.1. The bioreactor

The experimental study was performed using the ReadyToProcess WAVE™ 25 rocking bioreactor system by Cytiva. The system's main components were the rocker unit, the CBCU, and the computer. The rocker unit contained a Tray 10 oscillating platform with built-in temperature regulation elements and mounting brackets for the culture bags. The CBCU was an auxiliary unit responsible for controlling the volumetric gas output rate to the culture bag. The computer contained UNICORN™ software through which the bioreactor's operational parameters could be set and monitored. The two main operational parameters controlled with UNICORN™ were the amplitude (angle) of oscillations α and the frequency of oscillations ω .

The bioreactor was equipped with Cellbag™ 2 L or 10 L polymer single-use culture bag-like containers with, correspondingly, 2 L and 10 L of nominal volume. Dimensions of the 2 L Cellbag™ were 325 × 245 mm (length × width), while the dimensions of the 10 L Cellbag™ were 475 × 315 mm (length × width). The maximum filling level f_l for both bag models was 50 %. Bags could be mounted one at a time to the top of the rocking platform and contained gas inlet and outlet ports with pre-mounted aseptic filters, a screwcap port for transporting large amounts of liquid, and a luer-lock syringe port for sampling or injections.

The culture bags were adapted for the video recordings by covering the edges, tubing, and opaque areas near the ports with orange masking tape. The tape was used at the video processing stage to key out areas

outside the region of interest, i.e., areas that did not contain useful information about the mixing process. The gas filters and tubing connected to the ports protruding from the centre of the bag's top surface were moved further away from the camera lens by connecting them through two 90° elbows.

2.2. Colourimetric method adaptation

Mixing time measurements were performed using an original adaptation of the colourimetric method. The measurement procedure was based on the observation of mixing progress through colour change of a pH indicator during instantaneous neutralization reaction [28] after tracer solution injection and consisted of several steps described in detail in Supplement A of the Supplementary Materials.

The bag-like container was filled with a selected volume of the starting mixture with dissolved HCl or NaOH depending on the experimental variant and an addition of bromothymol blue pH indicator. The wave agitation was started with selected α and ω values. Temperature regulation was turned on and set to 37 °C, the same constant value for all measurements. Video recording of the bag contents was started. The recordings were done using a GoPro Hero™ 10 digital camera placed centrally and stationary over the rocking platform with an in-house designed mount built from 3D-printed components (Fig. 1), with constant image parameters. A portion of the tracer solution with selected concentration and volume was injected into the bulk liquid through the syringe port of the bag, triggering the colour change reaction. The tracer was a solution of NaOH or HCl, with a concentration depending on the experimental variant. The injections were performed with an in-house designed dosing system [29], which comprised a 3D-printed syringe holder (Fig. 2) mounted to the edge of the rocking platform, a rack-and-pinion mechanism for moving the syringe plunger. After no more visible colour changes and no traces of unmixed liquid remained in the bag, the oscillations and the recording were stopped, and the bag was emptied and rinsed before the subsequent measurement.

2.3. Image processing: mixing time value calculation

After the laboratory procedure, the video files containing data about the mixing process were processed using an in-house algorithm. The algorithm was written in Python 3.11 equipped with the OpenCV 4.9.0 image processing library. Before processing, a manual mask had to be created based on one of the video frames. The manual mask contained a rough outline of the bag, excluding all areas outside the bag that were to be omitted during processing (Fig. 3).

Detection of areas of particular colour was done through thresholding based on empirically selected ranges of values for each of the three channels in the L*a*b* colour space, presented in Fig. 4. The key output of the algorithm, which was later used for calculating the mixing

time value, was the number of pixels belonging to areas of a given colour. Detailed description of the tasks performed by the video processing algorithm is presented in Supplement B of the Supplementary Materials to this article.

The processing algorithm contained optional functionality, namely displaying a live visual preview and saving video files of the algorithm output. After video processing, the output text file was imported into MATLAB R2023b, and the value of mixing time was calculated using an in-house script. Mixing time t_{95} was defined as the time between the tracer injection and the moment at which 95 % of the absolute change in the moving average of the mixed-state-coloured liquid number of pixels has been achieved. Detailed description of the tasks performed by the script for calculating the mixing time value is presented in Supplement C of the Supplementary Materials to this article.

An example of the raw output of the video analysis algorithm and a visual representation of the mixing time calculation procedure is presented in Fig. 5. Yellow, green and blue plots shown in Fig. 5 represent the raw number of pixel values for each detected liquid colour. Periodic value changes visible in those plots are caused by the changing apparent area covered by the liquid during bag oscillations, with a period equal to oscillation frequency ω . The $mAvg_{yellow}$, $mAvg_{green}$ and $mAvg_{blue}$ plots represent the moving average values of each detected colour. The $mAvg_{blue,final}$ solid horizontal line represents the final blue colour number of pixels value, with the dashed horizontal line representing the 95 % threshold for determining the t_{95} value marked with a black vertical line. The red vertical t_0 line represents the tracer injection time determined by the sudden change in the discrete derivative value of the yellow colour number of pixels (Fig. 6).

An example of video output using the video processing algorithm is available in the Supplementary Materials.

2.4. Image processing: Liquid surface features amplification

Apart from mixing time calculation, the recorded footage was processed using an in-house algorithm to obtain data about the features of the liquid surface during oscillations of various amplitudes and frequencies. The algorithm was written in Python 3.11 equipped with the OpenCV 4.9.0 image processing library and the NumPy 1.24.3 array processing library. Small video sections with only yellow-coloured liquid visible in the frame were used. The core operation of this processing stage was subtracting video frames from a calculated "median frame", treated as a static background. The liquid surface features amplification was performed by an algorithm, the tasks of which are described in detail in the Supplement D of the Supplementary Materials.

Applying the procedure allowed for analysis of the liquid surface features inside the studied bag-like containers. Despite some imperfections in the raw video, the procedure results are satisfactory, such as condensation on the bags' top surface resulting from heating the liquid

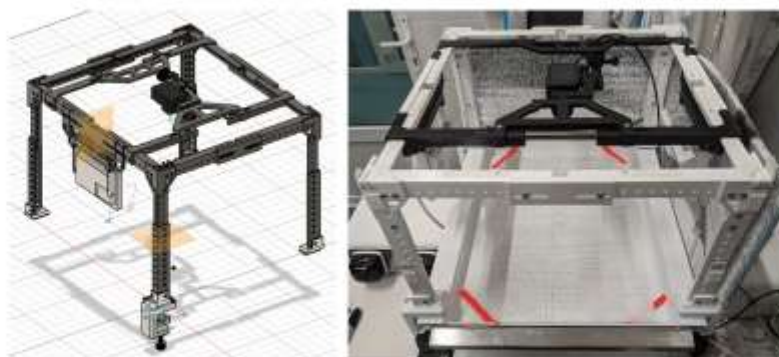


Fig. 1. Mount for the camera and lighting. Left: 3D model designed using Autodesk Fusion software. Right: 3D-printed mount with the camera and reflective panels.

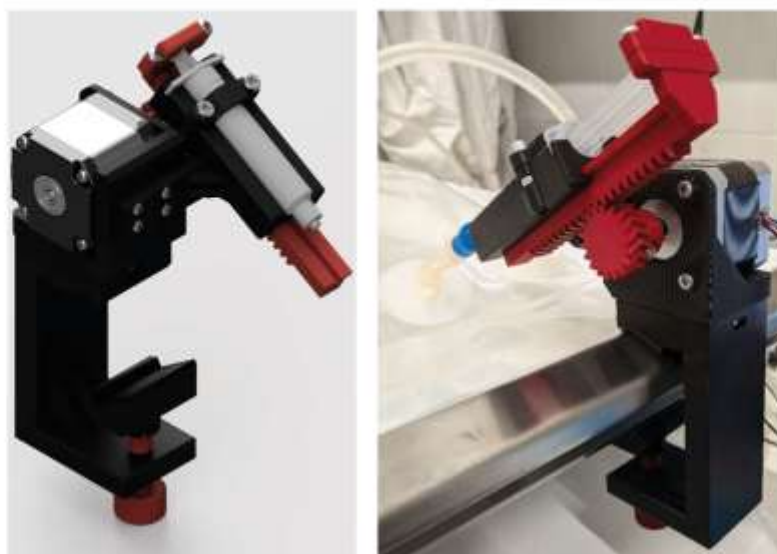


Fig. 2. 3D rendering of the syringe holder equipped with a 2 mL syringe. Left: isometric view of the holder with the visible stepper motor. Right: 3D printed dosing device mounted to the bioreactor rocking tray with the rack-and-pinion mechanism.

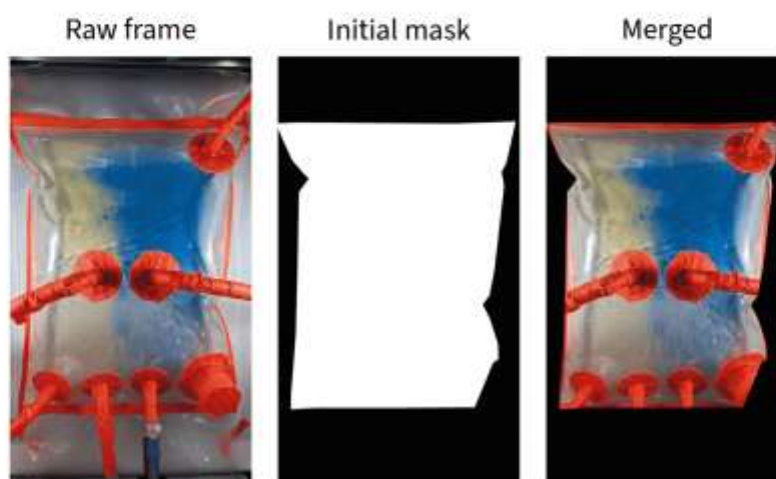


Fig. 3. Merging of the initial mask with a raw video frame.

or minor image vibrations.

The liquid surface amplification procedure is graphically summarised in Fig. 7. An example of video output of the liquid surface amplification algorithm is available in the [Supplementary Materials](#).

2.5. Characterisation of colourimetric method performance

The performance of the colourimetric method adaptation was characterised in two ways:

1. A direct comparison of the deviation between several individual measurements was performed at the same process parameters using the colourimetric method and an adaptation of the sensor method, as covered in previous work [25]. The measurements were performed nine times for both methods at the parameters corresponding to the

centre point in the DoE-experimental plan for the Cellbag™ 2 L vessel: $\alpha = 7^\circ$, $\omega = 21$ rpm, $fl = 0.3$. As an addition, experiments performed at the DoE centre point in the Cellbag™ 10 L were also compared ($\alpha = 7^\circ$, $\omega = 21$ rpm, $fl = 0.275$).

2. DoE-aided study regarding the influence of the composition of tracer and bulk solutions, the molar ratio of reagents in the tracer and bulk solution, and the volume of the tracer in relation to the bulk solution volume.

The DoE design used for the abovementioned study was a 3^2 three-level full factorial design with 1 blocking variable. The blocking variable was the composition of tracer and bulk solutions, i.e., whether a base-containing tracer solution was injected into an acid solution or an acid-containing tracer solution was injected into a base solution (Table 1, tracer solution composition according to Table 3). The other

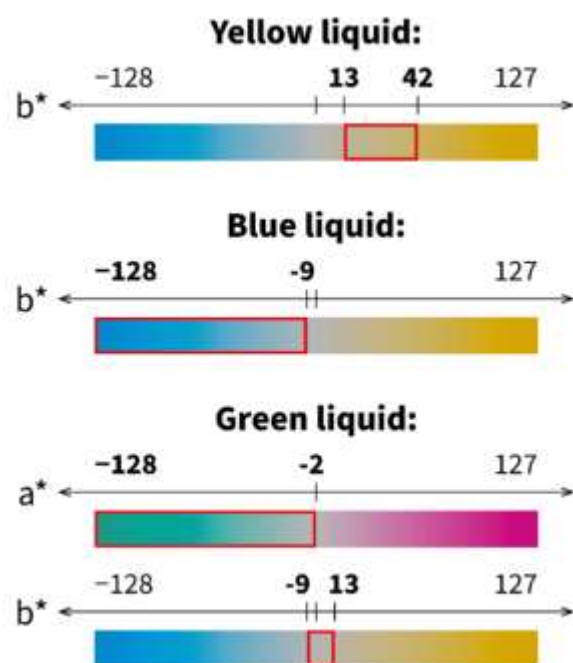


Fig. 4. Colour range limits for thresholding for each of the three detected liquid colours.

two independent variables were the molar ratio of reagents in both solutions and the ratio of the volume of the tracer to the volume of the bulk solution. Experimental parameter values employed in the study are

listed in Table 2.

The measurements were performed in the Cellbag™ 10 L container at the following rocking parameters: $\alpha = 2^\circ$, $\omega = 21$ rpm, $f_l = 0.275$. Results from this characterisation study were later used to select the composition, concentration and amount of tracer solution used in the mixing time characterisation study. In each of the two blocks, there were nine experimental variants. Measurements for each variant were performed three times, which gives 54 individual measurements in total.

2.6. DoE-aided mixing time characterisation

The mixing performance of the Cellbag 2 L and Cellbag 10 L single-use bags was characterised through a series of measurements planned using the DoE methodology. Three independent operational parameters were considered, which were previously proven to have a significant impact on mixing time in a rocking bioreactor [25]: α , ω and f_l (Fig. 8). The α and ω parameter values were controlled directly through the UNICORN™ software. The f_l parameter was defined as the ratio between the volume of liquid inside the bag V_l and the bag's nominal volume V_{nom} (Equation (1)).

$$f_l = \frac{V_l}{V_{nom}} \quad (1)$$

Experimental values of the three parameters were selected to cover the whole of the available operational ranges. The DoE design used was the Box-Behnken design (BBD) combined with a two-level full factorial design (2^3). Combining the two designs was chosen to improve the experimental region coverage in the intermediate range of parameter values. The BBD consisted of 13 experimental variants, with the centre point variant replicated thrice and was chosen to limit the number of experiments in the study. The 2^3 design consisted of 8 experimental variants. Measurements for each variant in the BBD were repeated three times, while in the 2^3 the measurements were repeated twice. In total, for each Cellbag™, 61 individual measurements for each Cellbag were

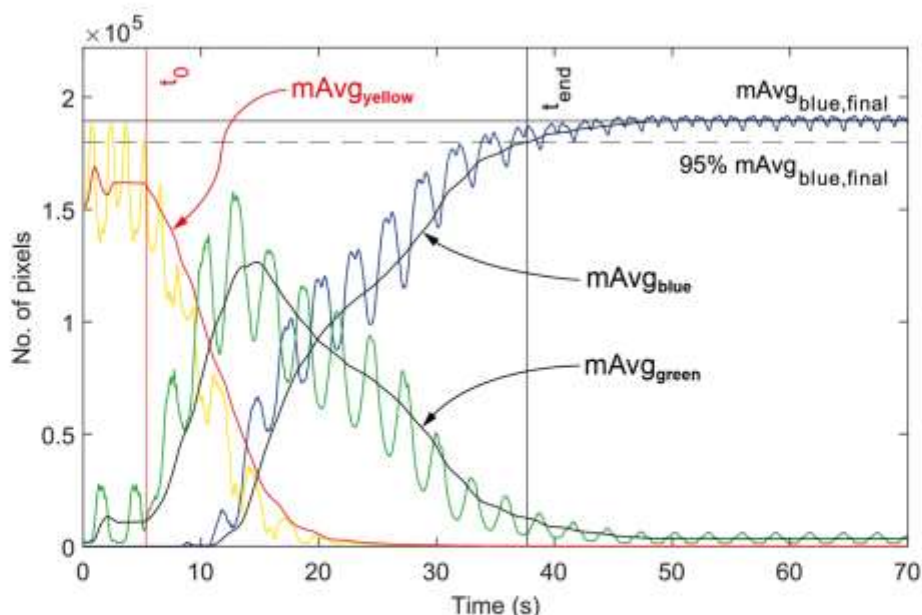


Fig. 5. Example of the output of the video analysis algorithm and visual representation of the mixing time calculation procedure. After tracer injection (t_0 vertical red line), the amount of visible yellow colour gradually decreased, being replaced first by green and then by blue colour. The amount of green colour, which corresponded to the intermediate state of mixing, is seen to have a maximum during the mixing process. The mixing time in the measurement was 32.3 s (10 L bag, $\alpha = 2^\circ$, $\omega = 21$ rpm, $f_l = 0.275$). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

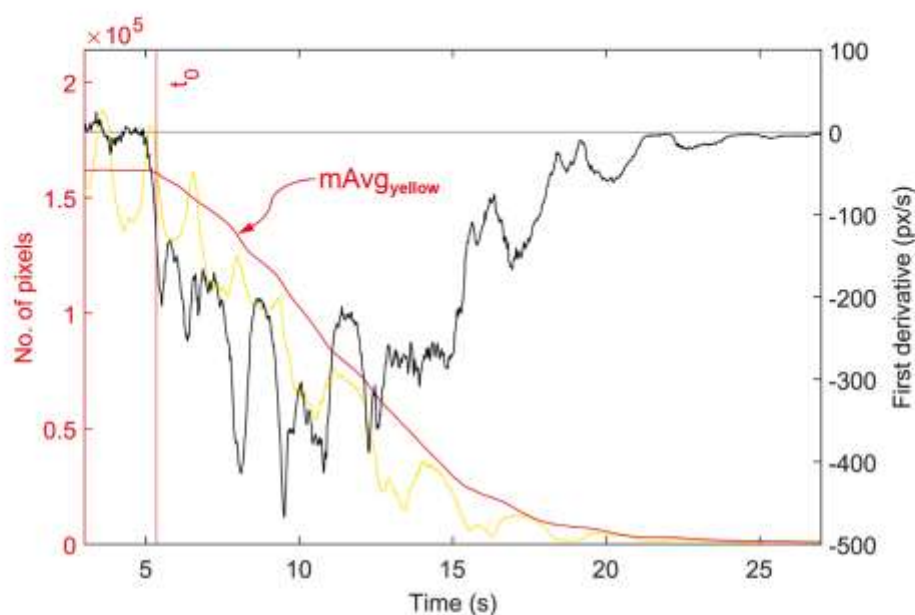


Fig. 6. Determination of the tracer injection moment t_0 based on the discrete derivative of the raw number of pixels data. Left y-axis (red): the raw number of yellow pixels y and its moving average $mAvg_{yellow}$. Right y-axis (black): first derivative of the moving average. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

performed.

High and low levels of the 2^3 design were chosen so that the distance of each factor combination in the 3D experimental region from the centre $(0, 0, 0)$ point was half the distance of the combinations in the BBD design. Given that each point in the BBD design is at a distance $\sqrt{2}$ from the centre point, the coordinates of the 2^3 design levels in the same 3D region should be $(\pm \frac{1}{\sqrt{6}}, \pm \frac{1}{\sqrt{6}}, \pm \frac{1}{\sqrt{6}}) \approx (\pm 0.41, \pm 0.41, \pm 0.41)$ in all eight combinations. In our experiments, due to practical constraints (i. e., α could be adjusted within 0.5° and ω could be adjusted within 1 rpm), the operational parameter values were chosen to be as close as possible to those calculated coordinates.

The 3D experimental region of the combined designs is presented in Fig. 9. Values of the three operational parameters, corresponding to specific design levels, are listed in Table 4.

2.7. Data analysis

Numerical data obtained using the abovementioned procedures was processed using Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc.) and MATLAB R2023b (MathWorks Inc.) software. Statistica 13.3 was used to analyse the impact of independent parameters on the output variable with the *Statistics > DOE* functions. MATLAB R2023b *fitlm* function from the *Statistics and Machine Learning Toolbox* was used to calculate coefficient values in the correlations and estimate mixing time values based on experimental data. The output of the *fitlm* function was a *Non-LinearModel* class variable – properties of this class of variables, such as *Coefficients*, *Diagnostics* (leverage, Cook's distance), *RMSE*, and *Rsq*, were used in the analysis of the performance of acquired correlational equations.

3. Results

3.1. Characterisation of colourimetric method performance

A direct comparison of the deviation between the series of measurements under the same conditions ($\alpha = 7^\circ$, $\omega = 21$ rpm, $f_l = 30\%$) was performed using the adaptation of the colourimetric method and the previously reported sensor method, presented in Fig. 10. The standard deviation in the sensor method data [25] was equal to 31 % of the average mixing time value, a significantly bigger value than the 9 % for the colourimetric method in the 2 L Cellbag™ and 12 % in the 10 L Cellbag™. The difference between the smallest and biggest obtained values was much smaller for the colourimetric method adaptation, equal to 3.2 s or 2.7 s in the 2 L and 10 L Cellbags™, compared to 13 s for the sensor method.

A complete listing of mixing time measurements results from the DoE-based performance study is presented in *Supplementary Materials*. Table 5 and Table 6 contain average values of mixing time \bar{t}_m , the standard deviation σ calculated for every group of 9 measurements, and the sum of squares of the standard deviations $SS = \sum \sigma^2$ values calculated from the 3 runs done at a specific parameter value separately for both blocks of measurements in relation to the examined independent parameters. Data from Table 5 and Table 6 are also presented in Fig. 11 and Fig. 12. Statistical significance of the molar ratio of reagents and the volume ratio between tracer and bulk solutions was determined based on the Pareto plot of standardised effects values, presented in Fig. 13.

Data presented in Table 5 shows that in both measurement blocks, the bigger the molar ratio of reagents, i. e., the excess of tracer reagent compared to the bulk solution, the shorter the average mixing time value. In Fig. 11, this relation is monotonous and approximately linear. Between the minimum and maximum molar ratio values, the mixing time decreased by 36 % for Block 1 and 21 % for Block 2. The difference between both blocks was the biggest at the molar ratio equal to 4, reaching a value of 9.8 s. Additionally, only at this molar ratio was the difference between the two compared blocks statistically significant,

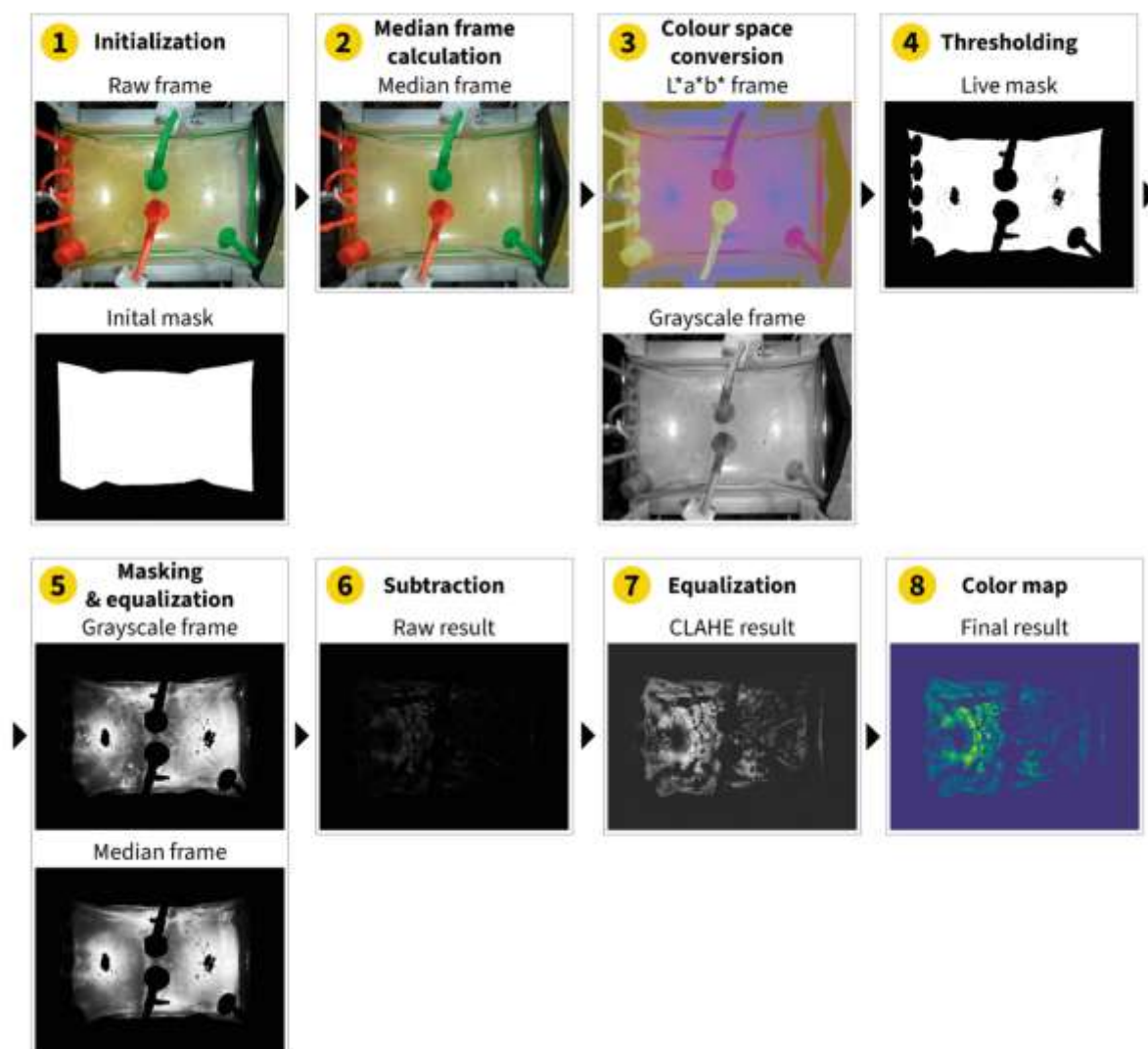


Fig. 7. Step-by-step summarisation of the liquid surface amplification algorithm. The images present the result of each processing step.

Table 1

Compositions of the tracer and bulk solutions in the colourimetric method performance study.

	Tracer	Bulk solution
Block 1	NaOH solution, concentration according to Table 3	0.001 mol/L HCl
Block 2	HCl solution, concentration according to Table 3	0.001 mol/L NaOH

Table 2

Values of parameters selected using the DoE methodology in the colourimetric method performance study.

Parameter	3 ² design levels		
	-1 (min)	0 (centre)	1 (max)
Molar ratio of reagents ($\text{mol}_{\text{tracer}}/\text{mol}_{\text{bulk}}$)	1.5	2	4
Volume ratio ($\text{ml}_{\text{tracer}}/\text{L}_{\text{bulk}}$)	0.5	1	2

Table 3

Compositions and volumes of tracer solution injected into the bulk solution in all variants of the colourimetric method characterisation study calculated from the values of parameters selected using DoE.

Variant no.	Molar ratio of reagents ($\text{mol}_{\text{tracer}}/\text{mol}_{\text{bulk}}$)	Volume ratio ($\text{ml}_{\text{tracer}}/\text{L}_{\text{bulk}}$)	Concentration (mol/L)	Volume (ml)
1	1.5	0.5	3	1.375
2	2	0.5	4	1.375
3	4	0.5	8	1.375
4	1.5	1	1.5	2.75
5	2	1	2	2.75
6	4	1	4	2.75
7	1.5	2	0.75	5.5
8	2	2	1	5.5
9	4	2	2	5.5

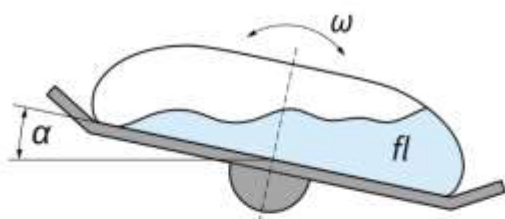


Fig. 8. Side-view illustration of the rocking platform with the culture bag with marked process parameters, which were considered during the DoE-based study.

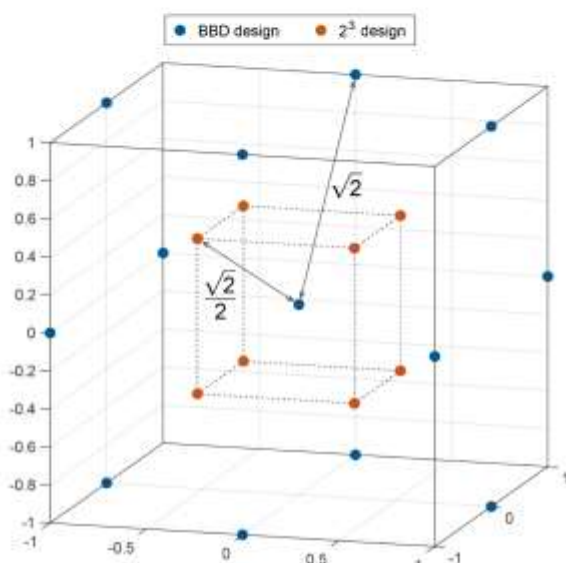


Fig. 9. 3D experimental design. The distance between the centre point and a BBD point is marked with the $\sqrt{2}$ value. In the 2^3 design, the distance between the centre point and its design levels is half of this value.

Table 4

Values of the operational parameters selected using the DoE methodology.

Cellbag™ 2 L						
Parameter	Available range	BBD levels			2^3 design levels	
		-1 (min)	0 (centre)	1 (max)	-0.41 (min)	0.41 (max)
$\alpha(^{\circ})$	2–12	2	7	12	5	9
$\omega(\text{rpm})$	2–40	2	21	40	13	29
$\beta(-)$	0.1–0.5	0.10	0.30	0.50	0.22	0.38
Cellbag™ 10 L						
Parameter	Available range	BBD levels			2^3 design levels	
		-1 (min)	0 (centre)	1 (max)	-0.41 (min)	0.41 (max)
$\alpha(^{\circ})$	2–12	2	7	12	5	9
$\omega(\text{rpm})$	2–40	2	21	40	13	29
$\beta(-)$	0.05–0.5	0.05	0.275	0.5	0.185	0.365

with the error bars not overlapping. The standard deviation and the sum of squares were the smallest for the molar ratio of 4 and Block 1 of measurements.

In the case of the volume ratio between the tracer and bulk solutions,

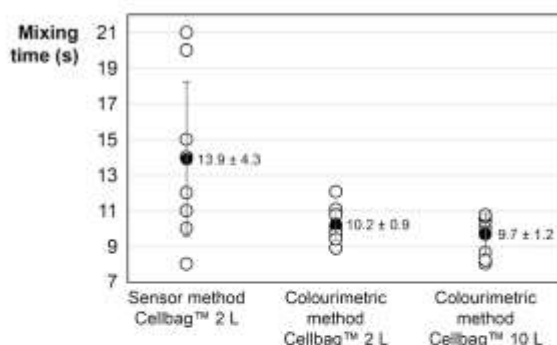


Fig. 10. Comparison of the standard deviation values between mixing time measurement methods ($\alpha = 7^{\circ}$, $\omega = 21$ rpm, $\beta = 30\%$). White points represent the results of individual measurements. Black points with error bars represent the averages with annotated values \pm the standard deviation. Sensor method data from previously published report [25].

Table 5

Average mixing time and standard deviation values in relation to the molar ratio of reagents for both blocks of measurements.

Block	Molar ratio of reagents ($\text{mol}_{\text{tracer}}/\text{mol}_{\text{bulk}}$)	\bar{t}_m (s)	σ (s)	SS (s^2)
Block 1 (NaOH tracer)	1.5	51.5	8.9	196
	2	46.6	10.1	98.3
	4	32.9	2.2	11.0
Block 2 (HCl tracer)	1.5	53.8	5.6	90.4
	2	48.5	8.3	194
	4	42.7	4.8	30.9

Table 6

Mixing time and standard deviation values in relation to the ratio of tracer volume to the bulk liquid volume for both blocks of measurements.

Block	Volume ratio ($\text{mL}_{\text{tracer}}/\text{L}_{\text{bulk}}$)	\bar{t}_m (s)	σ (s)	SS (s^2)
Block 1 (NaOH tracer)	0.5	46.7	12.9	242
	1	45.0	10.5	18.9
	2	39.3	9.2	44.4
Block 2 (HCl tracer)	0.5	48.8	7.2	35.3
	1	45.2	7.0	53.9
	2	50.9	8.6	226

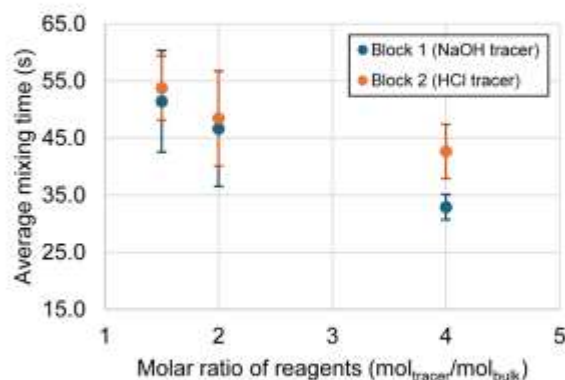


Fig. 11. Average mixing time values as a function of the molar ratio of reagents in the tracer and the bulk solutions. The error bars correspond to the standard deviation values.

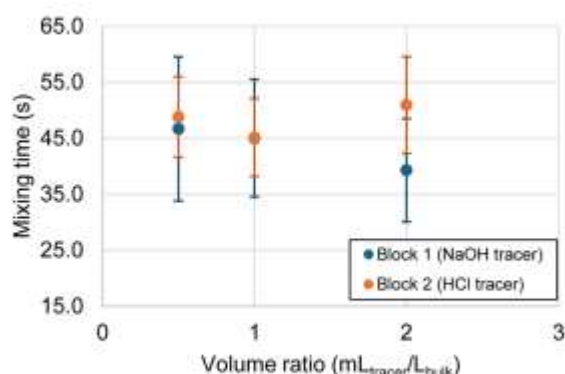


Fig. 12. Average mixing time values as a function of the volume ratio of tracer and bulk solutions. The error bars correspond to the standard deviation values.

the impact of this parameter on the mixing time values is less pronounced. The relation between the average mixing time and the volume ratio is non-monotonous for Block 2 and is approximately inversely proportional for Block 1. Mixing time values for the 0.5 and 1 vol ratios are practically the same, with the biggest difference visible at a volume ratio equal to 2, but still smaller than standard deviation intervals. The smallest standard deviation value was observed at a volume ratio of 1 in Block 2. However, the smallest sum of squares value is noted at the volume ratio of 1 in Block 1.

Pareto plots in Fig. 13 show that only the linear effect of the molar ratio of reagents has exceeded the confidence interval boundary of $p = 0.05$. This suggests that the volume ratio of tracer to bulk solutions did not have a statistically significant effect on the performance of the colourimetric method adaptation.

3.2. Mixing time data

Based on the raw experimental data, mixing time values ranged from 2.7 to 1570 s in the Cellbag™ 2 L vessel and from 2.1 to 2650 s in the Cellbag™ 10 L vessel. The mixing time range for the Cellbag™ 2 L obtained in this study are longer in the low mixing intensity range compared to literature data, where mixing time values for the same operating conditions obtained using the sensor method in the same culture bag model ranged from 3 to 820 s [25]. Mixing time values obtained for the low and intermediate mixing intensity regime are shorter for the sensor method compared to the colourimetric method – this observation may be related to the locality of measurement in the sensor method, in which the areas of liquid with higher local mixing time value may not be reflected by the sensor located in one point inside the bag. In the case of the Cellbag™ 10 L, comparison between experimental data points at similar mixing conditions gives an analogous

result: a literature value of $30,0 \pm 3,5$ s ($\alpha = 12^\circ$, $\omega = 20$ rpm, $fl = 50\%$) [26] compared to $15,2 \pm 4,8$ s obtained in this study ($\alpha = 12^\circ$, $\omega = 21$ rpm, $fl = 50\%$).

The complete set of experimental data and mean values of mixing time calculated for each experimental variant are presented in the *Supplementary Materials* to this article. Table 7 and Table 8 contain average mixing time values obtained in both examined single-use bags with standard deviation values.

Based on the data presented in Table 7 and Table 8, it can be seen that the largest mixing time values were obtained at the smallest agitation parameters, i.e. $\alpha = 2^\circ$ and $\omega = 2$ rpm (i.e., experiment no. 1). In both examined bag-like containers, mixing time values longer than 60 s were noted at the slowest rocking frequency $\omega = 2$ rpm and at the smallest rocking amplitude $\alpha = 2^\circ$ combined with the largest filling level $fl = 0.5$ (experiments no. 1, 3, 6, 9, 10).

The shortest mixing times in the Cellbag™ 2 L, smaller than 10 s, were observed at rocking frequencies $\omega = 40$ rpm regardless of the rocking angle and filling level (experiments no. 2, 4, 11, 12), at $\omega = 29$ rpm at all points (experiments no. D3, D4, D8) except for the smallest amplitude and largest filling level, and at $\omega = 21$ rpm at the largest amplitude $\alpha = 12^\circ$ and the lowest filling level (experiment no. 7).

In the case of the Cellbag™ 10 L, the smallest mixing time values below 20 s were observed for all measurements at frequencies $\omega \geq 29$ rpm (experiments no. 2, 4, 11, 12, D3, D4, D7, D8), at $\omega = 21$ rpm measurements except for the lowest amplitude and largest filling volume (experiments no. 5, 7, 8, 13), and for one measurement at $\omega = 13$ rpm, i.

Table 7

Average values of mixing time and the classification of liquid surface features obtained for the Cellbag™ 2 L vessel.

DoE design	Exp. no.	$\alpha(^{\circ})$	$\omega(\text{rpm})$	$fl(-)$	$\bar{t}_m(\text{s})$	$\sigma(\text{s})$	Category
BBD	1	2	2	0.3	1446	108	0
	2	2	40	0.3	7.1	1.5	4
	3	12	2	0.3	254	57	0
	4	12	40	0.3	3.7	1.4	5
	5	2	21	0.1	12.2	6.1	1
	6	2	21	0.5	262	18.5	0
	7	12	21	0.1	9.3	1.6	2
	8	12	21	0.5	15.2	4.8	3
	9	7	2	0.1	188	24.1	0
	10	7	2	0.5	449	21.2	0
	11	7	40	0.1	4.2	0.7	4
	12	7	40	0.5	4.3	0.2	5
	13	7	21	0.3	10.2	0.9	2
2^3	D1	5	13	0.22	26.9	1.9	2
	D2	9	13	0.22	17.4	1.6	1
	D3	5	29	0.22	7.4	1.9	3
	D4	9	29	0.22	5.6	0.6	4
	D5	5	13	0.38	74.9	29.6	2
	D6	9	13	0.38	23.5	18.0	3
	D7	5	29	0.38	17.8	2.2	3
	D8	9	29	0.38	7.8	0.1	4

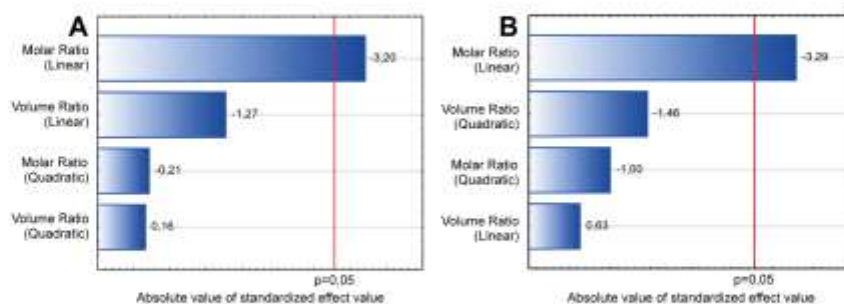


Fig. 13. Pareto plots of standardised effects values in the colourimetric method performance study. A: Block 1 (NaOH tracer), B: Block 2 (HCl tracer).

Table 8
Average values of mixing time and the classification of liquid surface features obtained for the Cellbag™ 10 L vessel.

DoE design	Exp. no.	$\alpha(^{\circ})$	$\omega(\text{rpm})$	$f(\text{-})$	$\bar{t}_m(\text{s})$	$\sigma(\text{s})$	Category
BBD	1	2	2	0.275	2223	372	0
	2	2	40	0.275	17.1	0.2	4
	3	12	2	0.275	228	18	1
	4	12	40	0.275	2.2	0.2	6
	5	2	21	0.05	13.9	1.2	3
	6	2	21	0.5	413	87	1
	7	12	21	0.05	7.8	0.8	5
	8	12	21	0.5	11.5	1.3	5
	9	7	2	0.05	61.9	4.9	0
	10	7	2	0.5	2150	391	1
	11	7	40	0.05	4.5	0.3	6
	12	7	40	0.5	5.3	1.2	6
	13	7	21	0.275	9.7	1.2	4
2^3	D1	5	13	0.185	34.2	4.1	3
	D2	9	13	0.185	11.7	1.9	4
	D3	5	29	0.185	6.4	0.6	5
	D4	9	29	0.185	5.7	1.2	5
	D5	5	13	0.365	49.4	11.5	2
	D6	9	13	0.365	46.0	14.9	2
	D7	5	29	0.365	7.9	1.5	6
	D8	9	29	0.365	5.6	0.7	6

e. at the largest α and smallest f in the 2^3 DoE design (experiment no. D2).

3.3. Liquid surface features analysis

The result of the liquid surface amplification image processing has been used to qualitatively categorise the experimental variants based on the presence or absence of several features. The features, taken by analogy from previous studies regarding free surface features in open channel flows [30] and large natural water bodies as rivers or oceans [31,32], were seen to emerge and be replaced with different ones with the changing rocking motion intensity and filling level. The categorisation which was employed is presented below:

- Category 0: flat liquid surface with no visible deformations.
- Category 1: minor capillary waves (ripples) in the surface from vibrations caused by the non-smooth movement of the rocking platform.
- Category 2: capillary waves (ripples) in the surface and cross-interactions between them, resulting from small wavefronts reflecting from the sides of the bag.
- Category 3: turbulences in the form of knobs are visible on the surface, though the cross-interactions between wavefronts are still discernible.
- Category 4: turbulences in the form of multiple irregular round lumps (described as *knobs* in the literature regarding flow in natural water bodies [31]) are visible on the surface, the liquid collides with the side of the bag, and the wave breaks over.
- Category 5: similar to Category 4; additionally, splashing could be heard when the wave breaks over.
- Category 6: similar to Category 5; apart from audible splashing, air entrapment occurred as the wave broke over after colliding with the end of the bag.

Examples of images qualified for each of the categories are presented in Fig. 14.

Table 7 and Table 8 contain the classification performed for each experimental variant, presented with the rocking parameters, filling level and the average value of mixing time characterising 2 L and 10 L bags, respectively.

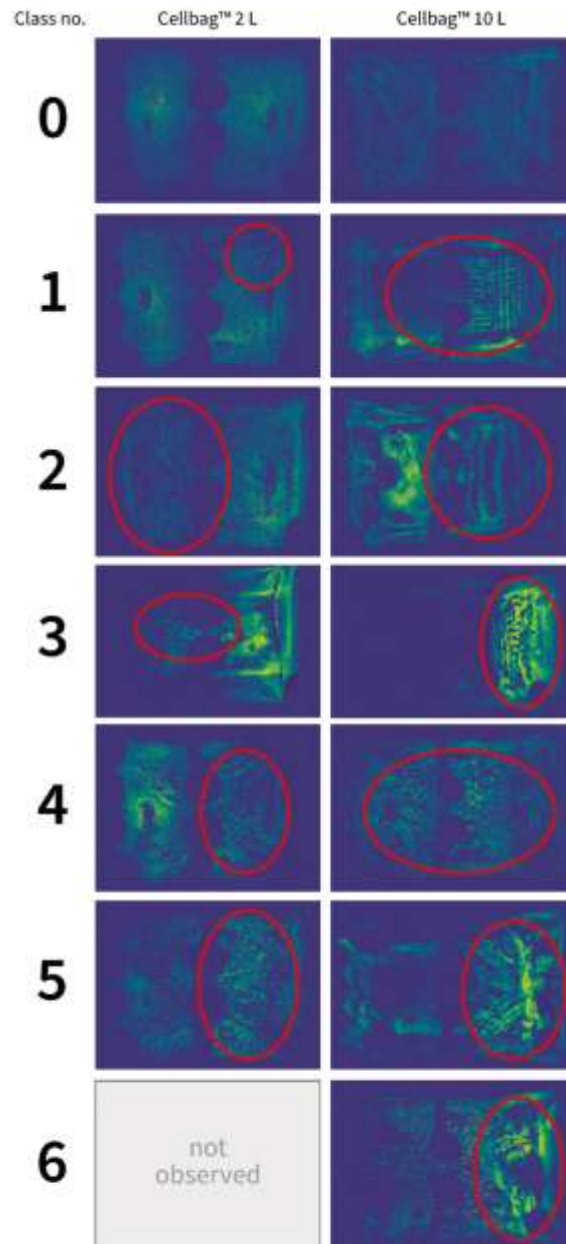


Fig. 14. Examples of output frames images from the liquid surface features amplification algorithm. The videos have been categorised into six classes corresponding to various features observed on the surface, marked in red. Given the dynamic nature of the observed features, the above examples may not fully describe the basis of the classification. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

4.1. Analysis of the colourimetric method performance

Data presented in Table 5 and Fig. 11 indicate that \bar{t}_m and σ values

decrease as the tracer reagent's stoichiometric excess increases. This observation is consistent with findings from previously published studies [18,33], where increasing the ratio of reagents between tracer and bulk solution leads to a decrease in mixing time values, simultaneously allowing for the measurement of macromixing time in a vessel. Godleski and Smith first pointed out that increasing the molar ratio further would lead to diminishing returns, i.e., not causing a significant decrease in the obtained mixing time value.

In the case of the volume ratio of tracer and bulk solutions, despite no statistical significance on the mixing time for this parameter shown based on data in Table 6 and Fig. 12, it should be noted that for Block 1 (NaOH tracer), the largest σ and SS values are observed at the lowest volume ratio values, while for Block 2 (HCl tracer) the opposite is true. This result is somewhat counter-intuitive, given the statements from previously published studies, according to which observation of decolourisation reactions (similar to Block 2 of this study) gives more reliable results due to the remaining dark patches of unmixed liquid being more easily distinguishable from the lightly coloured bulk liquid and easier detection of measurement endpoint [16,34]. Additionally, results in Table 6 show that in Block 2 (blue to yellow liquid), the average mixing time values are slightly bigger than in Block 1 (yellow to blue liquid), which is also contrary to a previous paper, where the colour addition method is reported to lead to underestimated mixing time values [35]. The exact cause of this could be connected to the limited ability to detect lightly coloured liquid on a light background compared to dark-coloured liquid, as was the case in the experimental setup in this study, or to some aspect of the colour recognition and thresholding in the processing algorithm.

Results of the colourimetric method performance investigation point at, based on the smallest standard deviation and standard error values presented in Table 5 and Table 6, the following optimal values of the molar ratio of reagents, the volume ratio of tracer to bulk solutions, and the active ingredient in the tracer solution:

- Molar ratio of reagents: $4 \text{ mol}_{\text{tracer}}/\text{mol}_{\text{bulk}}$.
- Volume ratio: $1 \text{ mL}_{\text{tracer}}/\text{L}_{\text{bulk}}$.
- Active ingredient in the tracer: NaOH.
- Active ingredient in the bulk solution: HCl.

The values listed above were employed in the broader experimental part of the study, as described in the *DoE-aided mixing time characterization* section.

In general, the colourimetric method adaptation has proven to be more robust and give better reproducibility compared to the previously used sensor method, as shown in the comparison in Fig. 10, with the added benefit of possibly retrieving additional data about the liquid flow, as presented in the *Image processing: liquid surface features amplification* section.

4.2. Comparison of mixing performance between single-use bags

Analysis of data presented in Table 7 and Table 8 showed that the hydrodynamic conditions inside both examined bags are heavily influenced by the rocking parameters and the filling level, and the liquid flow structure inside the bags can be dramatically different depending on the mixing energy input. Literature studies suggest that features visible on the liquid surface can imply information about the turbulence intensity in the bulk of the liquid [31]. Simultaneously, it is mentioned that disturbances on the surface, caused by turbulent eddies reaching and dissipating near the surface, greatly impact the mass transfer between the liquid-gas interface [30]. Although the present study treats the influence of operating parameters on mixing time and homogenisation, i.e., the events which happen in the liquid with the omission of the gas phase, the two topics – mixing intensity and mass transfer – are strongly connected. The discussion presented in this section is mainly descriptive. However, quantitative data could be obtained using techniques and

methods not covered in this work or be correlated from previously published results.

In the case of the Cellbag™ 2 L, Category 0, where little to no disturbances were visible on the liquid surface, has been assigned to the experiments with the largest noted mixing time values, between 188 and 1450 s (in five experimental variants). The longest mixing times for the 10-litre bag (i.e., 61.9–2220 s) were assigned to Categories 0 and 1. Given the low agitation intensity (i.e., $\omega = 2 \text{ rpm}$, $\alpha = 2 \text{ rpm}$ and the largest filling level $f_l = 0.5$), these cases could be assigned to the laminar flow regime or the transitional regime with little turbulences. In both vessels, for the experiments apart from those described above, the mixing time was shorter than approximately 60 s.

Mixing time values in experiments assigned to Category 1 in the 2 L bag-like container are much shorter than Category 1 in the 10 L one, equal to only approximately 15 s. These experiments, however, have been performed at the lowest filling level for the Cellbag™ 2 L, which could lower the mixing time despite the low mixing intensity.

Category 2 contains experiments in which capillary waves were observed on the liquid surface in both Cellbags™, suggesting that viscosity effects were still dominating in the formation of the interface and any turbulence in the bulk of the liquid. Also visible, especially in Cellbag™ 10 L footage, were characteristic orthogonal mesh-like features, the emergence of which was connected with the non-smooth movement of the rocker's stepper motor.

Starting with Category 3, areas with turbulent knobs and cell-like structures began to appear on the liquid surface, indicating increasing turbulence. Category 3 is taken as the threshold of the turbulent flow regime. At Category 4, the turbulent structures occupy an increasing fraction of the liquid's apparent surface, heading into a strong turbulence regime. Category 5 marks experiments during which audible splashing occurred, likely caused by high-velocity portions of liquid colliding with other volumes travelling in different directions or with the bags' walls. At Category 5, the bulk of the liquid was observed to accumulate near and collide with the opposite ends of the bag, forming areas of high turbulence.

Category 6, observed only in Cellbag™ 10 L, was classified with similar features to Category 5, but with additional breaking waves combined with air entrapment and liquid volumes travelling some way along the upper bag surface with accumulated momentum. Mixing time values inside the 10 L bag assigned to Category 6 were approximately equal (experiments 11 and 12) or, in some cases, shorter (i.e., experiments no. 4, D7, D8) than the values characterising the 2 L vessel. The homogenisation was faster in the 10 L bag at the highest rocking parameters (i.e., $\alpha = 12^\circ$ and $\omega = 40 \text{ rpm}$) or the second-highest rocking frequency (i.e., $\omega = 29 \text{ rpm}$). This observation indicates that the liquid flow can be more developed in the 10 L bag, likely connected to the bigger mass of liquid moving in every cycle.

Fig. 15 and Fig. 16 contain 3D plots of the experimental regions with points corresponding to each variant. Every point has been coloured according to the category assigned to it according to Table 7 and Table 8. Points assigned to the same category were connected with lines, and, where possible, a 3D hull was drawn to mark the part of the experimental region assigned to each category of liquid surface features and, implicitly, to indicate a flow regime or turbulence intensity.

Analysis of Fig. 15 and Fig. 16 can give several insights into the hydrodynamics in both Cellbags™. Firstly, the laminar regime, prescribed in this study to Categories 0 and 1, was present in the 2 L bag in a broader range of parameters compared to the 10 L bag. In the 2 L container, it could be observed up to $\omega = 21 \text{ rpm}$ at the lowest filling level $f_l = 0.1$ (i.e., experiment no. 5). Meanwhile, in the 10 L bag, the laminar regime prevailed only at $\omega = 2 \text{ rpm}$ and $\omega = 21 \text{ rpm}$ at the maximum filling level $f_l = 0.5$ (i.e., experiment no. 6).

On the contrary, the turbulent regime onset in the 10 L Cellbag™ was observed much earlier compared to the smaller vessel. Categories 4–6, assigned to this regime, were assigned to all points at $\omega \geq 29 \text{ rpm}$, but additionally to some points at $\omega = 21 \text{ rpm}$ (experiments no. 8 and 13) or

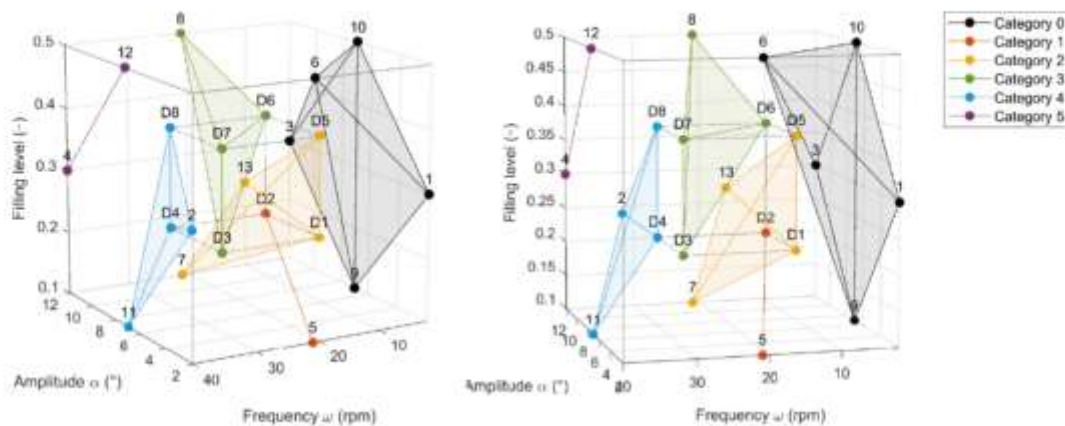


Fig. 15. 3D experimental regions with variants assigned to liquid surface features categories for the Cellbag™ 2 L. Left and right plots show the same data from a different view. Labels above every point indicate the experimental variant in accordance with Table 7.

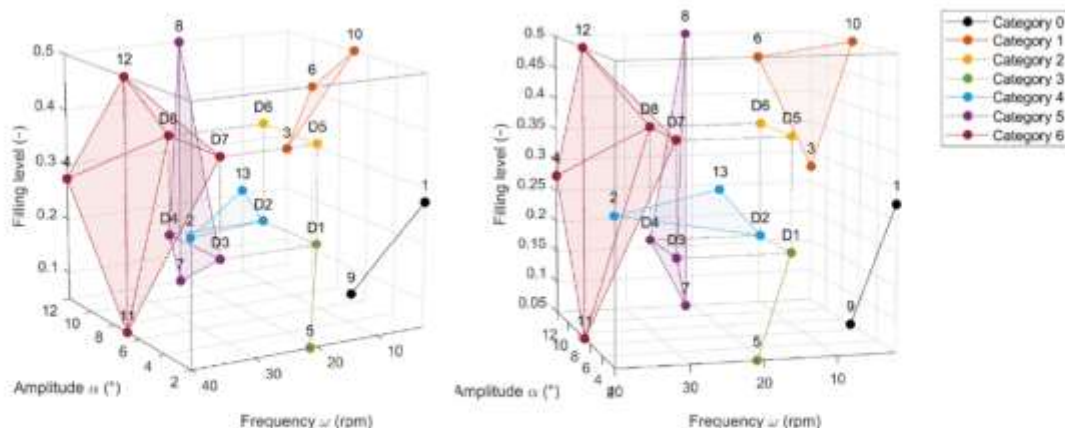


Fig. 16. 3D experimental regions with experimental variants assigned to liquid surface features categories for the Cellbag™ 10 L. Left and right plots show the same data from a different view. Labels above every point indicate the experimental variant in accordance with Table 8.

even at relatively low frequency $\omega = 13$ rpm (experiment no. D2). For the smaller bag, the turbulent regime dominated only at $\omega = 40$ rpm and some points at $\omega = 29$ rpm (experiments no. D4 and D8).

As a product of the above, the transitional regime prescribed to Categories 2 and 3 was apparent in a big part of the experimental region for the 2 L bag (7 points in the ω range of 13–29 rpm), while only observed for few experiments in the 10 L Cellbag™ (experiments no. 5, D1, D5 and D6).

In general, the distribution of the categories in the Cellbag™ 2 L is more structured in relation to the increasing agitation parameters, without many differences across the filling level range. In the 10 L bag, arrangement of the categories seems to be less organised, with Categories 0–2 occupying only the area at $\omega = 2$ rpm and above $fl = 0.35$ at $\omega \leq 21$ rpm and $\alpha < 7^\circ$.

In summary, the increased volume of liquid inside the 10 L Cellbag™ and its increased dimensions lead to stronger turbulence compared to Cellbag™ 2 L, caused by the larger amount of energy and momentum gathered and dissipated in the liquid in every rocking cycle. Stronger turbulence is likely to cause shear stresses of greater amplitude in the 10 L bag while also providing more mass transfer performance – however, this statement would have to be verified using other experimental or simulation techniques and methods. This result should be considered

while changing the scale of cell cultures and other bioprocesses between 2 L and 10 L bags.

4.3. Impact of operating parameters on mixing time in Cellbag™ 2 L and 10 L vessels

Average mixing time data presented in Table 7 and Table 8 were correlated with the three investigated parameters, α , ω and fl , to obtain an exponential correlation equations for estimating the values of mixing time in both examined bag-like containers in the entire available operational range of the bioreactor. The approach in this study was to maximise the usability of the calculated model equations by using the bioreactor operational parameters directly without concealing them in dimensionless quantities. This decision is also dictated by, in the Authors' opinion, the limited versatility of existing dimensionless quantities developed for rocking bioreactors:

- Using those expressions often requires the knowledge of additional coefficients, which are a function of the bag geometry, rocking parameters, filling volume and liquid properties [36].
- The expressions contain time-dependent variables that cannot be easily measured experimentally, thus being correlated, for example,

with a specific implementation of a computational simulation method [37,38].

- Values of the dimensionless quantities may not correspond one-to-one to specific hydrodynamical conditions inside the bag, i.e., the same value of the dimensionless quantity may be calculated from different operational parameters values, for which the flow structures and mixing intensities are vastly different [25,39–41].

Direct use of bioreactor operational parameters makes the model equations more straightforward to analyse and manipulate and easier to use for any potential operator.

All the following correlation equations are calculated for use with parameters in the following units: $[\alpha] = ^\circ$ (degrees), $[\omega] = \frac{\text{rpm}}{60} = \text{s}^{-1}$, $[f] = \frac{t_{\text{burst}}}{t_{\text{tot}}} = 1$, $[t_m] = \text{s}$.

Equation (2) coefficients were calculated based on the entire set of experimental data for the Cellbag™ 2 L, shown in Table 7:

$$t_{m,2L} = 2.0287 \cdot (\sin\alpha)^{-1.1482} \cdot \omega^{-1.0288} \cdot f^{0.6794} \quad (2)$$

Correspondingly, **Equation (3)** was calculated based on experimental data in Table 8 for the Cellbag™ 10 L:

$$t_{m,10L} = 6.5678 \cdot (\sin\alpha)^{-1.3410} \cdot \omega^{-1.4328} \cdot f^{2.7480} \quad (3)$$

The R^2 values for **Equation (2)** and **(3)** equal 0.9873 and 0.9987, respectively. The RMSE values for **Equation (2)** and **(3)** equal 36.34 and 23.29, respectively.

The performance of **Equations (2)** and **(3)** at estimating mixing time values is presented graphically in Fig. 17 and Fig. 18 as parity plots of experimental and predicted values.

Based on the data presented in Fig. 17 and Fig. 18, it is apparent that **Equation (2)** and **Equation (3)** perform well for predicting high values of mixing time above 200 s. Regarding data obtained for the Cellbag™ 2 L, **Equation (6)** heavily overestimates mixing time values below 100 s. In the case of data obtained for the Cellbag™ 10 L, the predictions for values below 100 s are also poor, but the data points are scattered around both sides of the parity line.

A notable observation in Fig. 18 (right) is the data point assigned to Category 0, of which the predicted mixing time is much lower than the experimental value. This point corresponds to experiment no. 9 (set of $\alpha = 7^\circ$, $\omega = 2$ rpm, $f = 0.05$ in the Cellbag™ 10 L), where the mixing time was equal to 61.9 ± 4.9 s. This experimental value may be interpreted as unusually low, given the low rocking frequency, and compared to the result obtained in the Cellbag™ 2 L, where mixing time in experiment no. 9 (set of $\alpha = 7^\circ$, $\omega = 2$ rpm and $f = 0.1$) was equal to 188 ± 24.1 s, i. e., over three times longer than in the 10 L bag. The difference may be down to the differences in geometry of both Cellbags™; the 10 L bag is

longer than the 2 L bag, therefore, the liquid has more distance to travel along the bottom of the bag during the rocking cycle, allowing it to gather more kinetic energy which can be dissipated into mixing energy when the platform decelerates as it approaches the maximum rocking amplitude. Additionally, the filling level in the 10 L bag in experiment no. 9 is two times smaller than in experiment no. 9 in the 2 L bag, which could also shorten the measured mixing time.

In the case of the Cellbag™ 2 L data, the best-fitted data points belong to Category 0 of liquid surface features (i.e., experiments no. 1, 3, 6, 9 and 10). Similarly, in the case of the Cellbag™ 10 L data, the best-fitted data points belong to Categories 0 and 1 (i.e., experiments no. 1, 3, 6, 9 and 10). The Cook's distance and leverage values for these data points are significantly larger than for the remaining part of the data set, as shown in Table 9, which is a basis for interpreting them as outliers. Categories 0 and 1, to which the outliers are assigned, correspond to low agitation parameters and laminar flow regime inside the culture bag, as discussed in the *Comparison of mixing performance between single-use bags* section.

To improve the performance of calculated model equations, new model coefficients have been calculated for the part of the data sets excluding the specified outliers in the laminar flow regime with high mixing time values (**Equation (4)** for the Cellbag™ 2 L and **Equation (5)** for the Cellbag™ 10 L, denoted as "fast").

$$t_{m,2L,fast} = 0.3850 \cdot (\sin\alpha)^{-1.3790} \cdot \omega^{-2.2330} \cdot f^{1.6048} \quad (4)$$

$$t_{m,10L,fast} = 0.8937 \cdot (\sin\alpha)^{-0.7857} \cdot \omega^{-1.8794} \cdot f^{0.6949} \quad (5)$$

The R^2 values for **Equation (4)** and **Equation (5)** are equal to 0.910 and 0.854, respectively. The RMSE values for **Equation (4)** and **Equation (5)** are respectively equal to 5.20 and 5.66.

The applicability range of **Equation (4)** and **Equation (5)** is the combination of two sets of parameters: $\omega \geq 7.5$ rpm and $(\alpha \geq 3.5^\circ, \omega \geq 25$ rpm, $f \leq 0.25)$. The range has been determined based on the parts of the 3D experimental region covered by Categories 0 in the case of the 2 L bag and Categories 0 and 1 in the case of the 10 L bag by taking the average between parameter values taken by points in these categories and the next closest experimental value of the same parameter in the experimental region.

In the transitional and turbulent flow regime, the parameter impact structure is different across the two culture bags and compared to the correlations which include the laminar regime. In the case of the Cellbag™ 2 L, the impact of rocking frequency and filling level has significantly increased (with power coefficients -2.23 and 1.60), with the impact of the amplitude remaining similar. For the bigger, 10 L bag, only the frequency impact had increased (i.e. the coefficient of -1.88), while the rocking amplitude and filling level impacts had dropped below

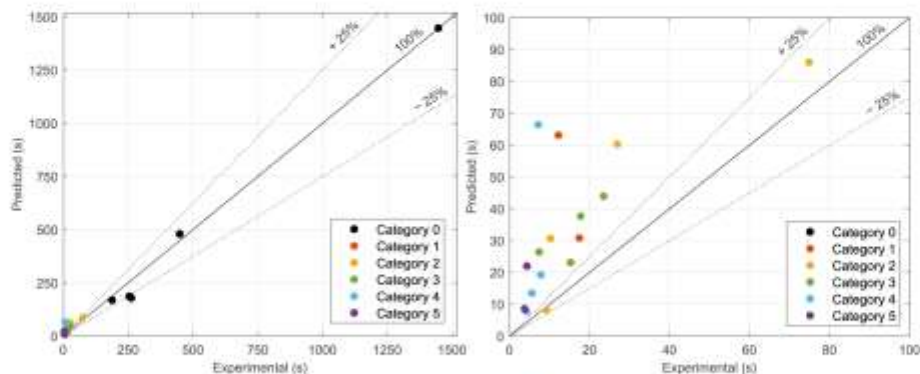


Fig. 17. Parity plots of experimental and predicted mixing time values based on Equation (2) for the Cellbag™ 2 L. Left: entire data set. Right: data points below 100 s.

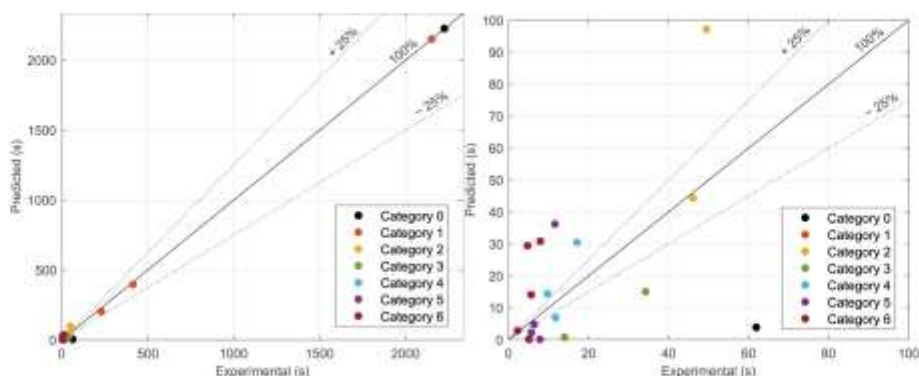


Fig. 18. Parity plots of experimental and predicted mixing time values based on Equation (3) for the Cellbag™ 10 L. Left: entire data set. Right: data points below 100 s.

Table 9

Comparison of Cook's distance and leverage values for the outliers and remaining data points.

	Parameter	Outliers	Remaining points (average)
Cellbag™ 2 L (Equation (2))	Cook's distance	0.41–8.4	0.015
	leverage	0.26–0.99	0.037
Cellbag™ 10 L (Equation (3))	Cook's distance	4.5–2960	0.011
	leverage	0.78–0.99	0.017

proportionality (i.e., coefficients of -0.79 and 0.69).

These observations suggest that the mechanism of flow development and the wave-mixing patterns across the two examined bags are different and not analogous, despite similarities in the agitation mechanism and the same equipment, namely the Tray™ 10 platform and ReadyToProcess™ rocker being used for the agitation.

The performance of Equations (4)–(5) at estimating mixing time values is presented graphically in Fig. 19 and Fig. 20, respectively.

As can be seen in Fig. 19 and Fig. 20, the performance of Equations (4) and (5) at predicting mixing time values in both Cellbags™ is greatly improved compared to Equations (2) and (3). Points in the long and short mixing time value range lay closer to the parity line, especially in the case of Cellbag™ 2 L data (Fig. 19), where the predictions were

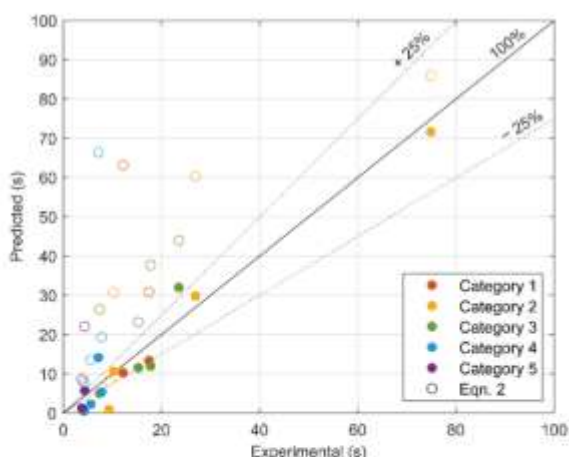


Fig. 19. Parity plots of experimental and predicted mixing time values based on Equation (4) for the Cellbag™ 2 L (filled points), compared with values based on Equation (2) (outlined points) for data points below 100 s.

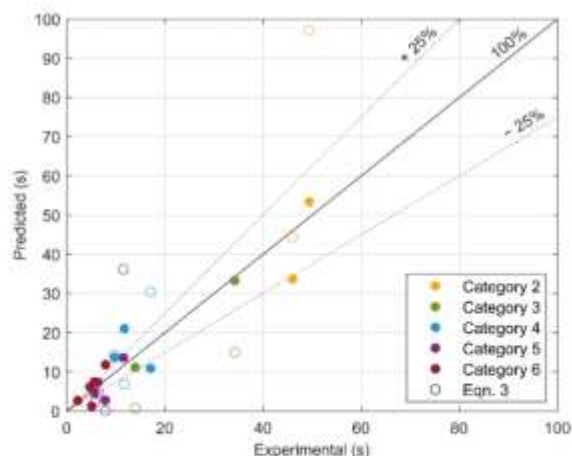


Fig. 20. Parity plots of experimental and predicted mixing time values based on Equation (5) for the Cellbag™ 10 L (filled points), compared with values based on Equation (3) (outlined points) for data points below 100 s.

previously substantially overestimated.

Some predictions may be underestimated, especially in the mixing time range of ≤ 10 s. However, given the high mixing intensity and small absolute errors of the predictions, this shortcoming is likely not hampering the usability of the model equations. Given that rocking bioreactors are used in cultures of fragile forms of biomass, such as animal or plant cells, such low mixing time values would mean a practically instant homogenisation compared to the rate at which cells metabolise and typical mixing time values in various bioreactor types [42].

4.4. Scale change equation

An approach to developing a scale change equation based on the mixing time data has been made by utilising the correlational model equations applicable in the short mixing time range in both examined Cellbags™, Equations (4) and (5). The scale change equation, Equation (6), allows for calculating the rocking parameters and filling level values in one of the culture bags to preserve a specified ratio of mixing time values between both vessels.

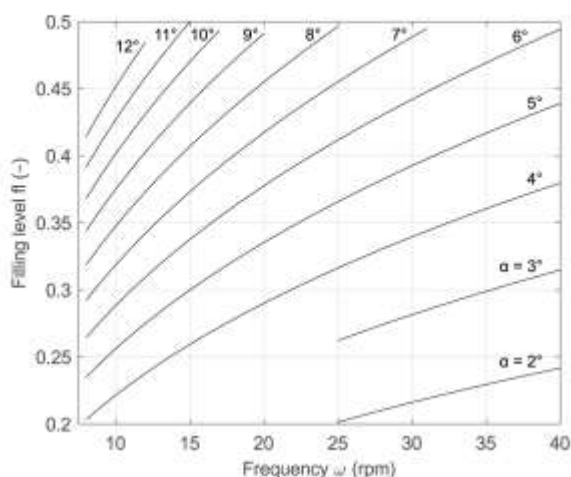


Fig. 21. Scale change plot for the Cellbag™ 2 L and Cellbag™ 10 L vessels. Plot lines indicate parameters where mixing time in both vessels equals the same value.

$$\frac{t_{m,10L, \text{fl}}}{t_{m,2L, \text{fl}}} = 2.3213 \cdot (\sin \alpha)^{0.5933} \cdot \omega^{0.3537} \cdot fl^{-0.9098} \quad (6)$$

Equation (6) has the same applicability range as Equations (4) and (5), being a result of the division between Equation (5) and Equation (4). Given the value of the last coefficient of the equation, the ratio of mixing time in both vessels under the same agitation amplitude and frequency is roughly inversely proportional to the filling level in both vessels, that is, increasing the filling level in both bags would cause the ratio to be approximately two times smaller.

Equation (6) has been used to draw the plot lines in Fig. 21, which could be used as a simple resource in changing the scale of culture between Cellbag™ 2 L and 10 L vessels. Plot lines in Fig. 21 mark the process parameter values at which the mixing time ratio equals 1, i.e., the mixing time value is the same in both vessels. Each plot line is assigned a different value of rocking amplitude α , while the horizontal and vertical axes contain the rocking frequency and filling level values. Fig. 19 could be used in practice to determine the filling level value at which, without changing the value of rocking frequency or amplitude, the mixing time in both Cellbags™ would be similar.

5. Conclusions

The adaptation of the colourimetric method presented in this study was proven to yield more repetitive and accurate results than the previously used sensor method of measuring mixing time in a wave-mixed rocking bioreactor based on the values of standard deviation across the experimental region and the spread between mixing time values obtained for a series of experiments under the same experimental conditions for both methods. The high quality of the obtained video material, mainly its stability during the oscillations, allowed for retrieving valuable additional information about liquid flow inside the culture bags, in this case, the features on the liquid surface, which were used to deduce information about flow regime in the bioreactor.

The method could be further easily adapted to wave-mixed bioreactors of different volumes and models. Certainly, the biggest attention should be given to the experimental procedures for obtaining high-quality video material in a given experimental setup, which could be later easily used by the image processing algorithms. The adaptation presented in this paper was performed using widely available components, and the custom parts were produced using well-established FDM

3D printing equipment. This aspect could considerably improve the availability of colourimetric measurements in single-use bioreactor analysis.

Despite the potential usefulness of the models presented in the current study, the Authors realise that scale change in any reactor, let alone a bioreactor, is a complicated engineering problem, not restricted to only providing the same or similar mixing time value in both compared vessels. Other crucial parameters, such as the volumetric mass transfer coefficient $k_L a$ or power input, would have to be included in switching between wave-mixed polymer-made containers of different sizes. Nonetheless, in the Authors' opinion, the results presented in this study could facilitate and shorten the scaling-up or scaling-down of a bio-process performed in a small culture medium volume.

The procedure explained in the current study could be easily expanded for developing scale change equations in rocking bioreactor bags of different sizes or supplied by different manufacturers, or for predicting the culture conditions based on other crucial bioprocess parameters. Additionally, further research should be given to expanding the models to describe the influence of liquid phase viscosity, which is especially important when analysing the conditions in processes where the culture medium viscosity is high, for example, due to high cell densities.

Overall, in the Authors' opinion, this work expands the range of experimental techniques for characterising single-use wave-mixed bioreactors and extends the range of mathematical tools for the efficient utilisation of such devices for performing, developing, or scaling various bioprocesses involving fragile biomass of cells not resistant to shear-stress generated during intensive mixing.

CRedit authorship contribution statement

Mateusz Bartczak: Writing – original draft, Visualization, Validation, Software, Resources, Project administration, Methodology, Data curation, Conceptualization. **Tugba Yilmaz:** Investigation, Data curation. **Mateusz Sączek:** Investigation, Data curation. **Agnieszka Anderson:** Investigation, Data curation. **Kamil Wierczowski:** Validation, Resources, Methodology, Conceptualization. **Maciej Pilarek:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Resources, Methodology, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

Research was funded by the Warsaw University of Technology, Poland within the Excellence Initiative: Research University (IDUB) programme (YOUNG PW grant).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.161295>.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- [1] K. Wierczowski, M. Pilarek, Disposable rocking bioreactors: recent applications and progressive perspectives, *Trends Biotechnol.* 42 (2024) 261–264, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.09.003>.

- [2] T.A. Smith, CAR-T Cell Expansion in a Xuri Cell Expansion System W25, in: K. Swiech, K.C.R. Malmegrim, V. Picanço-Castro (Eds.), *Chimeric Antigen Receptor T Cells*, Springer US, New York, NY, 2020; pp. 151–163. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0146-4_11.
- [3] A. Ghasemi, A. Bozorg, F. Rahmati, R. Mirhassani, S. Hosseiniinasab, Comprehensive study on Wave bioreactor system to scale up the cultivation of and recombinant protein expression in baculovirus-infected insect cells, *Biochem. Eng. J.* 143 (2019) 121–130, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.011>.
- [4] M.C. Decarli, D.P. dos Santos, R.M. Astray, D.C. Ventini-Monteiro, S.A.C. Jorge, D. M. Correia, J. de Sá, M.P. da Silva, H. Itzcun, B.D. Languni, C.A. Menozzi, C.A.T. S. Pereira, DROSOPHILA S2 cell culture in a WAVE Bioreactor: potential for scaling up the production of the recombinant rabies virus glycoprotein, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102 (2018) 4773–4783, <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8962-0>.
- [5] A. Valdiani, O.K. Hansen, V.K. Johannsen, U.B. Nielsen, An efficient bioreactor platform for scaling up the proliferation of Nordmann fir's (*Abies nordmanniana*) somatic embryos, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 17 (2020) 1425–1438, <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02556-4>.
- [6] D. Gómez-Ríos, S. Junne, P. Neubauer, S. Ochoa, R. Rico-Esteva, H. Ramírez-Malule, Characterization of the metabolic response of *Streptomyces clavuligerus* to shear stress in stirred tanks and single-use 2D rocking motion bioreactors for clavulanic acid production, *Antibiotics* 8 (2019) 168, <https://doi.org/10.3390/antib8040168>.
- [7] R. Castro, L.S. Nobre, R.P. Eleuterio, M. Thomaz, A. Pires, S.M. Monteiro, S. Mendes, R.A. Gomes, J.J. Clemente, M.F.O. Sousa, F. Pinto, A.C. Silva, M. C. Freitas, A.R. Lemos, O. Akpogheneta, L. Kosack, M. Bergman, N. Duarte, P. Matoso, J. Costa, T.M. Bandejas, P. Gomes-Alves, C.P. Gonçalves, J. Demengeot, P.M. Alves, Production of high-quality SARS-CoV-2 antigens: impact of bioprocess and storage on glycosylation, biophysical attributes, and ELISA serologic tests performance, *Biotech & Bioengineering* 118 (2021) 2202–2219, <https://doi.org/10.1002/bit.27725>.
- [8] J.-M. Schlaeppli, M. Henke, M. Mahnke, S. Hartmann, R. Schmitz, Y. Poulquén, B. Kerins, E. Weber, F. Kollinger, H.P. Kocher, A semi-automated large-scale process for the production of recombinant tagged proteins in the Baculovirus expression system, *Protein Expr. Purif.* 50 (2006) 185–195, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.06.021>.
- [9] H. Niederkrüger, A. Busch, P. Dabrowska-Schlepp, N. Kriehoff, A. Schaaf, T. Frischmuth, Single-Use Processing as a Safe and Convenient Way to Develop and Manufacture Moss-Derived Biopharmaceuticals, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1st ed., Wiley, 2019, pp. 311–318, <https://doi.org/10.1002/9781119477891.ch28>.
- [10] J. Labarta, S. Hoffmann, A. Simpkins, *Manufacturing Strategy for the Production of 200 Million Sterile Doses of an mRNA Vaccine for COVID-19*, University of Pennsylvania, Philadelphia, United States, 2021.
- [11] Cytiva, Bioclear™ 10 and 11 films are comparable, (n.d.). <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/solutions/bioprocessing/knowledge-center/bioclear-10-and-11-films-are-comparable> (accessed January 16, 2025).
- [12] G.T. Frank, Transformation of biomanufacturing by single-use systems and technology, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 22 (2018) 62–70, <https://doi.org/10.1016/j.coch.2018.09.006>.
- [13] V. Jossen, R. Eibl, D. Eibl, Single-Use Bioreactors – An Overview, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1st ed., Wiley, 2019, pp. 37–52, <https://doi.org/10.1002/9781119477891.ch4>.
- [14] S. Junne, P. Neubauer, How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Curr. Opin. Biotechnol.* 53 (2018) 240–247, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.04.003>.
- [15] W.G. Whitford, M.A. Petrich, W.P. Flanagan, Environmental Impacts of Single-Use Systems, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture*, 1st ed., Wiley, 2019, pp. 169–179, <https://doi.org/10.1002/9781119477891.ch13>.
- [16] M. Bartzczak, M. Pilarek, The colourimetric method for mixing time measurement in single-use and multi-use bioreactors—methodology overview and practical recommendations, *Energies* 17 (2023) 221, <https://doi.org/10.3390/en17010221>.
- [17] J.N. Dellbridge, T.A. Barrett, A. Ducci, M. Micheletti, Power, mixing and flow dynamics of the novel Allegro™ stirred tank reactor, *Chem. Eng. Sci.* 271 (2023) 118545, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2023.118545>.
- [18] J. Fitschen, S. Hofmann, J. Wutz, A. v. Kameke, M. Hoffmann, T. Wucherpfennig, M. Schlüter, Novel evaluation method to determine the local mixing time distribution in stirred tank reactors, *Chemical Engineering Science: X* 10 (2021) 100098, <https://doi.org/10.1016/j.cesx.2021.100098>.
- [19] L. Gaugler, Y. Mast, J. Fitschen, S. Hofmann, M. Schlüter, R. Takors, Scaling-down biopharmaceutical production processes via a single multi-compartment bioreactor (SMCB), *Eng. Life Sci.* 23 (2023), <https://doi.org/10.1002/elsc.202100161>.
- [20] J.J. Samaras, A. Ducci, M. Micheletti, Flow, suspension and mixing dynamics in DASGIP bioreactors, Part 2, *AIChE J.* 66 (2020), <https://doi.org/10.1002/aic.16999>.
- [21] A.W. Nienow, On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime, *Chem. Eng. Sci.* 52 (1997) 2557–2565, [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(97\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(97)00072-5).
- [22] C. Sieblist, M. Jenzsch, M. Pohlscheidt, A. Lübbert, Insights into large-scale cell-culture reactors: I. Liquid mixing and oxygen supply, *Biotech. J.* 6 (2011) 1532–1546, <https://doi.org/10.1002/biot.201000408>.
- [23] S. Werner, J. Greulich, K. Geipel, J. Steingrover, T. Bley, D. Eibl, Mass propagation of *Helminthus ornatus* suspension cells in orbitally shaken bioreactors: improved growth rate in single-use bag bioreactors, *Eng. Life Sci.* 14 (2014) 676–684, <https://doi.org/10.1002/elsc.201400024>.
- [24] Y. Bai, *Characterization and Improvement of Oxygen Mass Transfer in a Rocking Disposable Bioreactor*, University of Waterloo, 2020, PhD thesis.
- [25] M. Bartzczak, K. Wierchowowski, M. Pilarek, Mixing performance in a litre-scale rocking disposable bioreactor: DoE-based investigation of mixing time dependence on operational parameters, *Chem. Eng. J.* 431 (2022) 133288, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.133288>.
- [26] Y. Bai, M. Moo-Young, W.A. Anderson, Characterization of power input and its impact on mass transfer in a rocking disposable bioreactor, *Chem. Eng. Sci.* 209 (2019) 115183, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115183>.
- [27] S.M.J. Jones, T.M. Louw, S.T.L. Harrison, Energy consumption due to mixing and mass transfer in a wave photobioreactor, *Algal Res.* 24 (2017) 317–324, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.001>.
- [28] G. Ertl, H. Gerischer, Ein Vergleich der Kinetik der Neutralisationsreaktionen des leichten und schweren Wassers, *Zeitschrift Für Elektrochemie, Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie* 66 (1962) 560–563, <https://doi.org/10.1002/bbpc.19620660708>.
- [29] M. Pilarek, M. Bartzczak, Device for automatic, precise and repetitive reagent dosing, Republic of Poland Patent Office. Patent application no. P.443555, 2023.
- [30] S. Smolentsev, R. Miraghalae, Study of a free surface in open-channel water flows in the regime from “weak” to “strong” turbulence, *Int. J. Multiph. Flow* 31 (2005) 921–939, <https://doi.org/10.1016/j.ijm.2005.05.008>.
- [31] M. Brocchini, D.H. Peregrine, The dynamics of strong turbulence at free surfaces. Part 1. Description, *J. Fluid Mech.* 449 (2001) 225–254, <https://doi.org/10.1017/S0022112001006012>.
- [32] M. Brocchini, D.H. Peregrine, The dynamics of strong turbulence at free surfaces. Part 2. Free-surface boundary conditions, *J. Fluid Mech.* 449 (2001) 255–290, <https://doi.org/10.1017/S0022112001006024>.
- [33] E.S. Godleski, J.C. Smith, Power requirements and blend times in the agitation of pseudoplastic fluids, *AIChE J.* 8 (1962) 617–620, <https://doi.org/10.1002/aic.690080511>.
- [34] D.A.R. Brown, P.N. Jones, J.C. Middleton, G. Papadopoulos, E.B. Arık, *Experimental Methods*, in: E.L. Paul, V.A. Atiemo-Obeng, S.M. Kresta (Eds.), *Handbook of Industrial Mixing*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2003; pp. 145–256. <https://doi.org/10.1002/0471451452.ch4>.
- [35] C.J. Hoogendoorn, A.P. Den Hartog, Model studies on mixers in the viscous flow region, *Chem. Eng. Sci.* 22 (1967) 1689–1699, [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(67\)80204-5](https://doi.org/10.1016/0009-2509(67)80204-5).
- [36] R. Eibl, S. Werner, D. Eibl, Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications, in: R. Eibl, D. Eibl (Eds.), *Disposable Bioreactors*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2009; pp. 55–87, <https://doi.org/10.1007/10.2008.15>.
- [37] A.A. Öncül, A. Kalmbach, Y. Genzel, U. Reichl, D. Thövenin, Characterization of flow conditions in 2 L and 20 L wave bioreactors® using computational fluid dynamics, *Biotechnol. Prog.* 26 (2010) 101–110, <https://doi.org/10.1002/btpr.312>.
- [38] C. Zhan, E. Hagrot, L. Brandt, V. Choteau, Study of hydrodynamics in wave bioreactors by computational fluid dynamics reveals a resonance phenomenon, *Chem. Eng. Sci.* 193 (2019) 53–65, <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.08.017>.
- [39] M. Bartzczak, K. Wierchowowski, M. Pilarek, Mass transfer in a liter-scale wave mixed single-use bioreactor: influence of viscosity and antifoaming agent, *Ind. Eng. Chem. Res.* 62 (2023) 10893–10902, <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c00736>.
- [40] D.T.J. Marsh, G.J. Lye, M. Micheletti, A.O.O. Odeleye, A. Ducci, M.D. Osborne, Fluid dynamic characterization of a laboratory scale rocked bag bioreactor, *AIChE J.* 63 (2017) 4177–4187, <https://doi.org/10.1002/aic.15234>.
- [41] M. Pilarek, P. Sobieszuk, K. Wierchowowski, K. Dąbkowska, Impact of operating parameters on values of a volumetric mass transfer coefficient in a single-use bioreactor with wave-induced agitation, *Chem. Eng. Res. Des.* 136 (2018) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.04.012>.
- [42] A.R. Lara, E. Galindo, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, Living with heterogeneities in bioreactors: understanding the effects of environmental gradients on cells, *MB* 34 (2006) 355–382, <https://doi.org/10.1385/MB:34:3:355>.