

### 3. STERILEZÉS

A mikrobák tenyésztésénél általában arra törekszünk, hogy a berendezésben kizárólag a kiválasztott mikrobafajta szaporodjon. A környezet, azaz a fermentor, a tápoldat, minden anyag viszont sokféle mikrobával szennyezett – ezeket a folyamat megkezdése előtt el kell pusztítani – ez a sterilizálás.

#### Fogalmak:

Sterilizálás: adott rendszerben lévő összes mikroba elpusztítása  
 Aszeptikus: a mikrobák távoltartása a rendszertől (csíramentes állapot fenntartása)  
 → aszeptikus működés = steril működés  
 Elszigetelés/izolálás: a mikrobák távoltartása a környezettől



### A hőpusztulási sebesség

Állandó hőmérsékleten a hőpusztulás kinetikája elsőrendű:

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

N: élő csírszám [db/térfogat]

k: hőpusztulási sebességi állandó [1/min]

k függ:

- a hőmérséklettől
- a mikroba fajtájától
- a vegetatív sejtek érzékenyebbek, mint a baktériumspórák
- a közegtől



### STERILEZÉS

A mikroorganizmusokat többféle módszerrel is elpusztíthatjuk, használhatunk fizikai módszereket, illetve kémiai anyagokat.

Fizikai módszerek a hőkezelés, a szűrés, nagy energiájú besugárzás (UV,  $\gamma$ ). Ipari méretekben a hőkezelés a legkönnyebben kivitelezhető eljárás, ezért az ipari gyakorlatban a sterilizálásra általában gőzfűtést használnak.

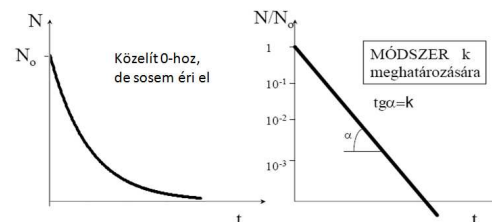
Miért pusztulnak el a mikroorganizmusok magas hőmérsékleten?

- Fehérjéik denaturálódnak
- Membránszerkezeteik megolvadnak, elfolynak, felbomlanak



### A hőpusztulási sebesség

Állandó k esetén (állandó hőmérsékleten) az egyenlet integrálható, melynek megoldása:  $N = N_0 e^{-kt}$   $\ln \frac{N_0}{N} = k \cdot t$



### Sterilizálás hővel:

Száraz hő: a tárgyakat szárazon, levegőben hőkezeljük (150-160 fokon, ~2 órán keresztül)

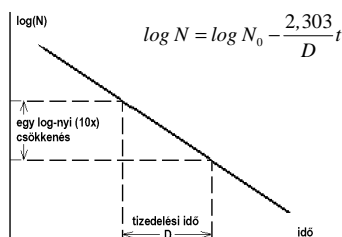
Nedves hő: az anyagokat (víz)gőztérben hőkezeljük (120-122 fokon 20-30 percig). (Táp)oldatokat is lehet, túlnyomás alatt. Ehhez a hőmérséklethez ~1,2 bar túlnyomás tartozik.

Pasztörözés: maximum 100 °C-os hőkezelés, amely csak a mikrobák vegetatív alakjait pusztítja el, a spórákat nem.



### A hőpusztulási sebesség

Másik megközelítés: a tizedelési idő. Tíz alapú logaritmus skálán ábrázolva a pusztulást értelmezhető a 90%-os csírszám-csökkenéshez tartozó idő, avagy tizedelési idő. A kívánt mértékű előlés nagyságrendjével (tíz-hatványával) szorozva kapható meg a szükséges sterilizációs idő.



$$t = \frac{D}{2,303} \cdot \log \frac{N_0}{N}$$



## A hőpusztulási sebesség

A hőpusztulási sebességi állandó függ a hőmérséklettől:  
Arrhénius egyenlet:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

A: empirikus állandó  
 $E_a$ : a hőpusztulás látszólagos aktiválási energiája [KJ/mol]  
 T: abszolút hőmérséklet [K]



## A hőpusztulási sebesség

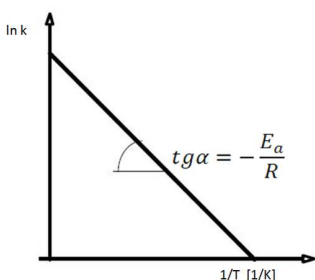
A sejteket körülvevő közeg is befolyásolja a hőpusztulást:

- Már enyhén savas közegben is gyorsabban pusztulnak, mint semleges pH-n.
- Tömény a cukoroldatokban (pl. melasz) lassabban pusztulnak a mikrobák, mint felhígított formában.



## A hőpusztulási sebesség

Az egyenlet félogaritmusos ábrázolásban egyenest ad. Néhány pont meghatározásával az egyenes felvehető, és ennek alapján bármely hőmérsékletre kiszámítható a k értéke.



## A hőpusztulás valószínűségi értelmezése

Az exponenciális kifejezésből kitűnik, hogy a végső csíraszám sohasem éri el a nullát. Teljes sterilításhoz végtelen hőkezelési idő kellene. Ezért egy végesen kicsi értéket választanak célértéknek.

Sterilizés kritériuma a biotechnológiai iparban:

$$1 - P_0(t) = 10^{-2} \cdot 10^{-4}$$

Pl.:  $1 - P_0(t) = 10^{-3}$  akkor  $1 - 10^{-3} = 0,999 \rightarrow$  ezer sterilizésből egy nem sikerül, azaz marad túlélő sejt a rendszerben.

A sterilizés kritériuma egyszersmind a végső csíraszámot adja meg, mértékegysége: túlélő csíra/zárt egység. (Mindegy, hogy mekkora: ampulla ↔ konzerv ↔ fermentor)



## A hőpusztulási sebesség

A k értéke függ a mikroba fajtájától és állapotától is.

A legellenállóbbak a baktériumspórák.

Az  $N_0$  megállapításánál a jelen lévő sokféle mikroba sejtjeit számolják meg együttesen (összcsíraszám). A méretezésnél nem veszik figyelembe az eltérő hőtűrést, hanem mindegyiket nagyon ellenálló spóráknak tekintik, mint pl.:

*Bacillus stearothermophilus*

*Clostridium botulinum*



a k és D értékek ezekre ismertek



## A hőkezelési idő: $t = \frac{1}{k} \ln \frac{N_0}{N}$

A hőkezelés idejét célszerű minél rövidebbre választani:

- a kezelt rendszerben lévő biológiailag értékes anyagok kevésbé bomlanak el,
- energetikailag is kedvezőbb.

Az összefüggésből látható, hogy a hőkezelési idő nem csak a k értékétől függ, hanem az  $N_0$  értékével is befolyásolható. Az anyagok mikrobiológiai szennyezettsége csökkenthető az általános higiénia javításával, illetve hűtéssel.



### A hőpusztulási sebesség

A mikrotípus és a kiindulási csíraszám hatása:

Azonos fertőzöttség mellett a spórák elpusztításához hosszabb idejű hőkezelés szükséges.

Kisebb csíraszám lerövidíti a sterilizációs időt.

The graph plots  $\log(N)$  on the y-axis (from  $10^4$  to  $10^8$ ) against heat treatment time on the x-axis. Three lines represent different microorganisms: a red line for 'kisebb indulási csíraszám' (smaller initial inoculum), a green line for 'vegetatív sejtek' (vegetative cells), and a blue line for 'spórák' (spores). The red line has the steepest negative slope, followed by the green line, and the blue line has the shallowest slope.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 13

### Konzervkészítmények sterilizálása

Az élelmiszerek, konzervek hőkezeléses tartósításának alapvető technológiai művelete abban áll, hogy a tartósítani kívánt élelmiszert légmentesen fémdobozba, vagy üvegbe zárva, olyan hőmérsékleten és annyi ideig hőkezeljük, amíg az élelmiszerben levő mikroorganizmusok el nem pusztulnak. A túlzott hőhatás az élelmiszer eredeti sajátosságait (állomány, élvezeti érték, íz, stb.) is megváltoztatja, ezért a hőkezelési időt a biztonságos minimumra kell csökkenteni.

A hőközlés során a konzerveket kívülről valamilyen hőtároló közeggel melegítjük. A felfűtés sohasem pillanatszerű, hanem a hőtárolás mechanizmusától függő késéssel megy végbe. A melegítés sebessége függ a töltet halmazállapotától, hővezetőképességétől, valamint a termék alakjától és méretétől.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 16

### Hagyományos laboratóriumi autokláv

The schematic diagram shows a vertical cylindrical autoclave with a lid. It features an 'Hátszakasz' (back chamber) containing 'Víz' (water) and an 'Elektromos fűtés' (electric heating) element. A 'gőz' (steam) outlet is shown at the top. A photograph shows the physical autoclave in a laboratory setting.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 14

### Hidegpont

A termék kívülről befelé fokozatosan melegszik át, a közepén található a **hidegpont**, ahol a legalacsonyabb a hőmérséklet. Itt a legnagyobb a hőfokkésés, felmelegítésnél ezt melegszik fel utoljára, lehűtésnél viszont ez hűl le legvégül. A sterilizációt úgy kell méretezni, hogy a hidegpontban is megfelelő legyen a hőkezelés, ott is elpusztuljanak a mikroorganizmusok. A hidegpont helye a hőtranszporttól függ. A hő behatolása (= hőpenetráció) kétféle módon történhet: szilárd vagy pépes készítményeknél túlnyomórészt hővezetéssel, míg a folyadékokban a konvekciós (áramlós) hőtranszport jellemző.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 17

### Ipari fermentor steril zárású szerelvényei

The diagram shows a complex industrial fermenter with various ports and components. A legend lists the parts:

- 1 - levegő sterilizátor
- 2 - ingatlások
- 3 - elszívó levegő szűrés
- 4 - pH-sz, tapoldatcsatlakozás
- 5 - miniatűr
- 6 - steril tengelytömítés
- 7 - leeresztő csatlakozás
- 8 - szűrőszelvény

Other labels include 'Sterilitás határa', 'Tengelyhez steril víz', and 'hőcserélő'.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 15

### Hidegpont

a. Hővezetésnél minden irányból egyformán terjed a hő, így utoljára a geometriai középpont melegszik fel.

b. Konvekciójánál a függőleges falak mentén felmenő áramlások alakulnak ki, ezek a tengelyben lefelé irányuló áramlást okoznak, ami a hidegpontot lefelé tolja.

Diagram (a) shows heat transfer by conduction, with arrows pointing inward from all sides towards a central red star representing the 'hidegpont' (cold spot). Diagram (b) shows heat transfer by convection, with arrows indicating upward flow along the walls and downward flow in the center, also pointing to the 'hidegpont'.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 18

### A termék alakjának hatása

A hőpenetráció szempontjából a termék legkisebb mérete, „vékonysága” számít, ez határozza meg a hőterjedés úthosszát.

a<sub>2</sub>      b<sub>2</sub>      c<sub>2</sub>

19

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Nyomásviszonyok, hatónyomás

A hatónyomás csökkenthető, ha:

- a konzerveket forrón, vagy vákuumban zárják le
- a hűtési szakaszban sűrített levegővel pótolják a külső gőznyomást.

20

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### A termék méretének hatása

A hőkezelési görbéken is jól látható, hogy minél nagyobb méretű a termék, annál tovább tart a hő behatolása a hidegpontig.

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Táptalaj sterilizálása

Ebben az esetben nem kis egységeket, hanem nagy mennyiségű (1 – 100 m<sup>3</sup>) homogén folyadékot kell sterilizálni. A hőkezelés menete hasonló, szakaszai a: - felfűtés, - hőtartás, - lehűtés.

Ezek megvalósítása kétféleképpen történhet:

- szakaszos sterilizációval: a táptalajt a fermentorba töltik, és a fermentor belső terét, a szerelvényeit és a táptalajt egyszerre sterilizálják.
- folytonos sterilizáló berendezésben: a táptalajt külön sterilizáló rendszerben, nagy hőmérsékleten, rövid ideig hőkezelik, és a gőzzel előzetesen üresen sterilizált fermentorba vezetik.

23

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Nyomásviszonyok, hatónyomás

A zárt csomagolású termékben belül és kívül kialakuló hőmérsékletkülönbség miatt nyomáskülönbség is létrejön. Ez a hatónyomás. A belső nyomás mindig nagyobb, mint a külső, mert a dobozban maradt bezárt levegő nyomása hozzáadódik a belső gőznyomáshoz. Ez feszíti a csomagolást, néha a doboz, vagy üveg szétrobbanását, deformálódását (bombásodás) esetleg zárszfélzakadást eredményezhet.

A maximális értékét a lehűtési szakaszban éri el, amikor a külső nyomás már nulla, a belső forró anyag gőznyomása viszont még nagy.

21

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Szakaszos sterilizálás

A szakaszos sterilizálás méretezésénél külön kell választani a három szakaszt. Az egy szakaszok végpontjához rendeljük hozzá a maradék csíraszámokat (N<sub>0</sub>, N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>végző</sub>).

$$\ln \frac{N_0}{N_v} = \ln \frac{N_0}{N_1} + \ln \frac{N_1}{N_2} + \ln \frac{N_2}{N_v}$$

A három szakaszban együttesen kell eljutni a mért kiindulási csíraszámától a tervezett végső csíraszámig (általában 10<sup>-3</sup> élő csíra/fermentor)

24

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

### Szakaszos sterilizálás

A levezetett összefüggés szerint a k.t szorzatok összege adja az eredő pusztulást.

$$\ln \frac{N_0}{N_v} = k_f \cdot t_f + k_h \cdot t_h + k_l \cdot t_l$$

Az állandó hőmérsékletű hőtartási szakaszban a k értéke állandó, így egyszerűen a szorzattal számolhatunk.

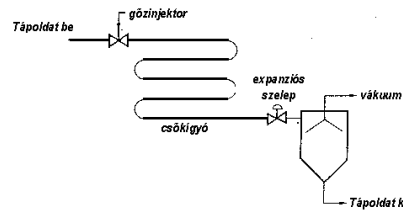
A felfűtési és lehűtési szakaszban viszont a hőmérséklet változik, és vele együtt a k értékek is. Itt a szorzat helyett a k-t függvény integráljával kell számolni.

$$k \cdot t = \int k(T) dt$$



### Gőzinjektoros megoldás

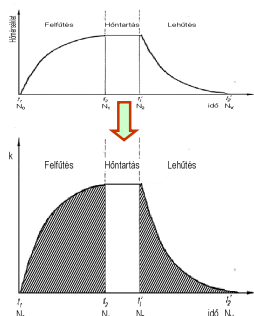
A csővezetékben áramló folyadék felmelegítését direkt gőz bevezetésével oldják meg. A lekondenzáló gőz pillanatszerűen felviszi a hőmérsékletet 130-140 fokra, a nyomás ~4 barra emelkedik. A hőtartást a hőszigetelt csőkiágóban eltöltött 1-2 perces idő jelenti. A lehűtés expanziós szelepen való átlépéssel jön létre: a nyomás alól a folyadék vákuumterembe lép át, felforr, és egy része elpárolog. Az elvont párolgáshó leviszi a hőfokot ~80 fokra.



### Szakaszos sterilizálás

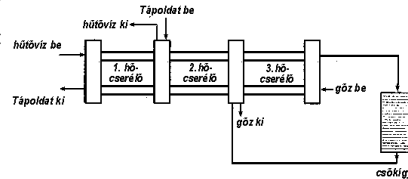
Ehhez ismerni kellene a k – t függvényt. Ezt létrehozhatjuk a megmért T – t függvény átszerkesztésével. Minden hőmérséklethez ismerjük a standard spórás mikroorganizmusok k értékeit, így kiszámíthatjuk a k – t függvény pontjait. Az integrálok értékei numerikusan kiszámíthatók.

A gyakorlatban a felfűtési és lehűtési szakaszok adottak (az adott berendezés jellemzői), így a méretezés csak a hőtartási szakasz idejének meghatározására irányul.



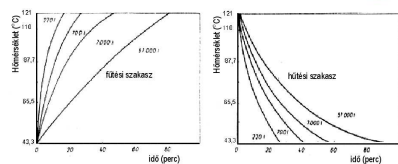
### Hőcserélős megoldás

A hőcsere az igen jó hőátadású lemezes hőcserélőkben történik. A hideg oldatot a 2. hőcserélőben előmelegíti a kilépő forró steril tápoldat. A 3. egységben gőzfűtéssel másodpercek alatt eléri a 140-145 fokot, ezt a hőfokot a csőkiágóban áthaladva ~2 percig tartja, majd két lépésben lehűl. Előbb a 2. egységben adja át hőjének egy részét, majd az 1.-ben hűtővízzel hűtik le a kívánt hőfokra.



### Folytonos sterilizálás

Nagy méretű fermentoroknál, ahol nagy tömegű tápoldatot kell sterilizálni, nagyon megnő a felfűtés, és különösen a lehűtés időtartama. Az értékes üzemórák megtakarítása érdekében ezeknél külön sterilizálják az üres készüléket és tápoldatot. A folyadék sterilizálása átfolyó rendszerben, folyamatosan történik. A folyamat három szakasza nem időben, hanem térben követi egymást.



### A folytonos sterilizálás méretezése

A felfűtési és lehűtési szakasz sejtpusztító hatása a rövid idő miatt elhanyagolható, így állandó hőfokú sterilizációval számolhatunk. A magas hőmérséklet miatt igen rövid hőtartási idő elegendő.

