

## 3. STERILEZÉS

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

### Fogalmak:

Sterilizáció: adott rendszerben lévő összes mikroba elpusztítása  
Aszeptikus állapot: a mikrobák távoltartása a rendszertől (csíramen-tes állapot fenntartása)

→ aszeptikus működés = steril működés

Elszigetelés/izolálás: a mikrobák távol tartása a környezettől



## 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 sterilizációra általában gőzfűtést használnak.

Miért pusztulnak el a mikroorganizmusok magas hőmérsékleten?

- Fehérjéik denaturálódnak
- Membránszerkezeteik megolvadnak, elfolynak, felbomlanak



## Sterilizáció 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.

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



## A hőpusztulási sebesség

Állandó hőmérsékleten a hőpusztulás kinetikája elsőrendű:

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

N: élő csíraszám [db/térfogat]

k: hőpusztulási sebességi állandó [1/min]

k függ:

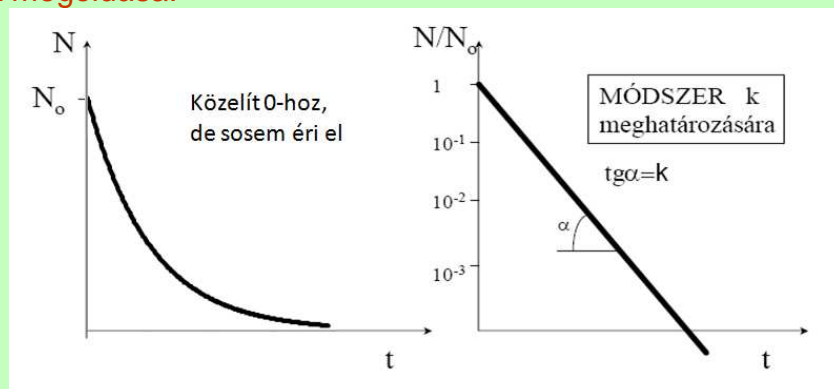
- a hőmérséklettől
- a mikroba fajtájától
- a vegetatív sejtek érzékenyebbek, mint a baktériumspórák
- a közegtől



## A hőpusztulási sebesség

Állandó  $k$  esetén (állandó hőmérsékleten) az egyenlet integrálható, melynek megoldása:

$$N = N_0 e^{-kt} \quad \ln \frac{N_0}{N} = k \cdot t$$

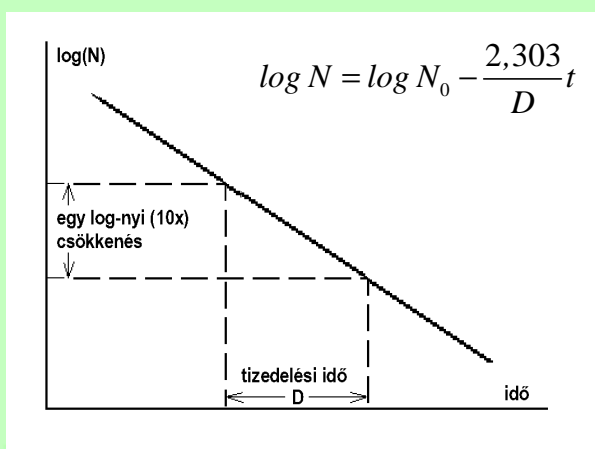


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

## A hőpusztulási sebesség

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



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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

6

## A hőpusztulási sebesség

A hőpusztulási sebességi állandó függ a hőmérséklettől:  
Arrhénius egyenlet:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

A: empirikus állandó

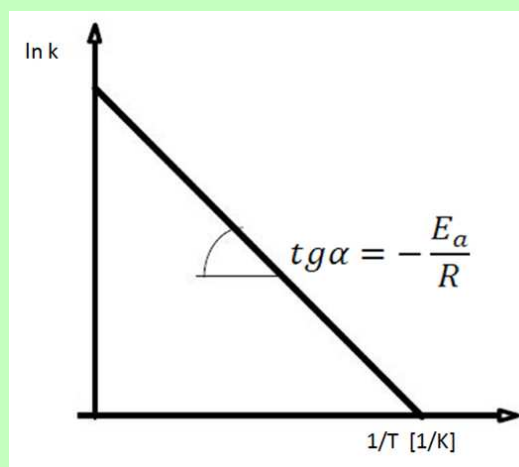
$E_a$ : a hőpusztulás látszólagos aktiválási energiája [KJ/mol]

T: abszolút hőmérséklet [K]



## A hőpusztulási sebesség

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



## A hőpusztulási sebesség

A  $k$  értéke függ a mikroba fajtájától és állapotától is.

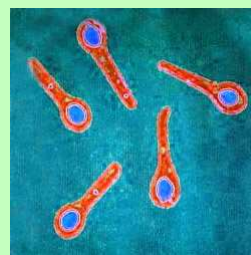
A legellenállóbbak a baktériumspórák.

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

*Bacillus stearothermophilus*



*Clostridium botulinum*



a  $k$  és  $D$  értékek ezekre ismertek



## 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 hőpusztulás valószínűségi értelmezése

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

Sterilizálás kritériuma a biotechnológiai iparban:

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

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

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



## 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.

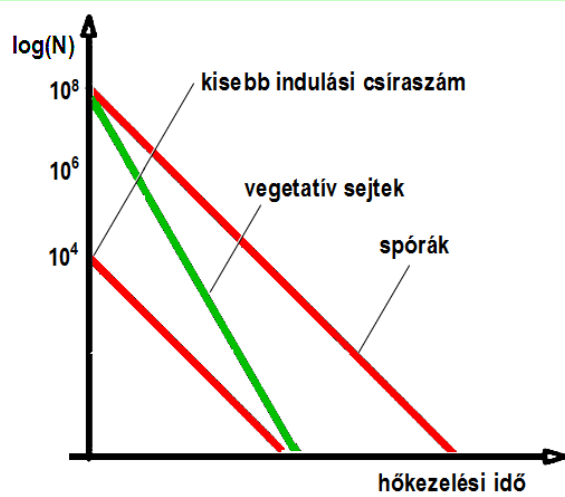


## A hőpusztulási sebesség

A mikrobatípus és a kiindulási csíraszám hatása:

Azonos fertőzöttség mellett a spórák elpusztításához hosszabb idejű hőkezelés szükséges.

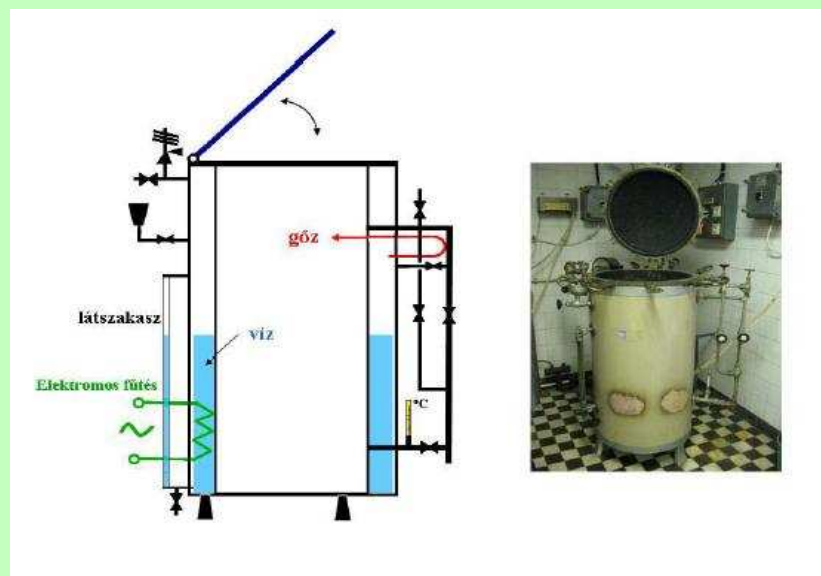
Kisebb csíraszám lerövidíti a sterilizációs időt.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

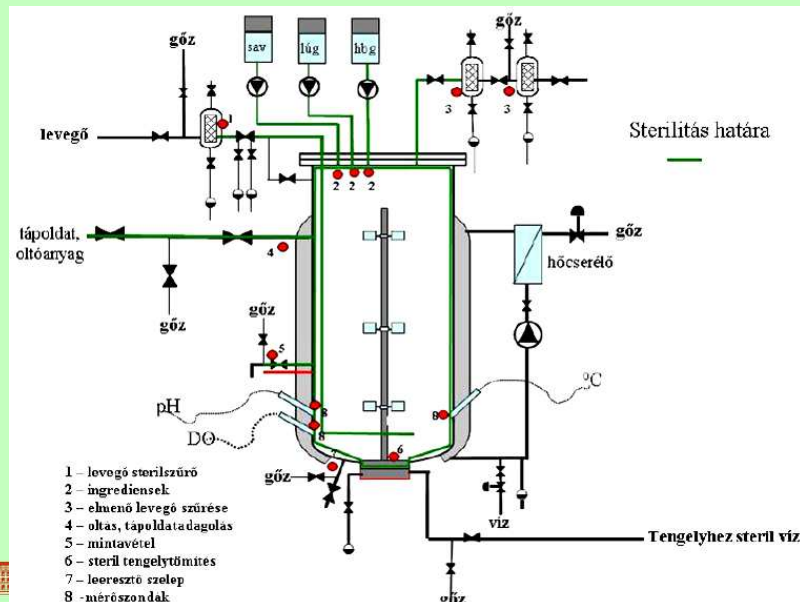
## Hagyományos laboratóriumi autokláv



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

## Ipari fermentor steril zárású szerelvényei



15

## 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 sajátságait (állomány, élvezeti érték, íz, stb.) is megváltoztatja, ezért a hőkezelési időt a biztonságos minimumra kell csökkenteni.

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



16



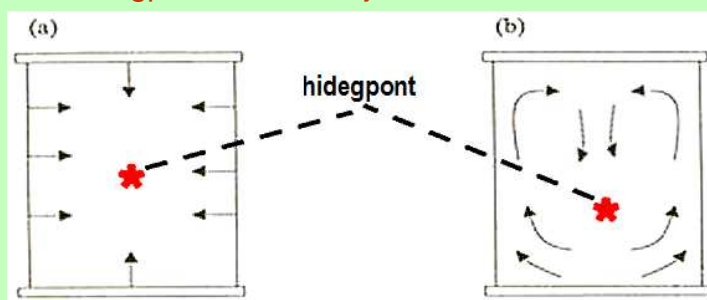
## Hidegpont

A termék kívülről befelé fokozatosan melegszik át, a közepén található a hidegpont, ahol a legalacsonyabb a hőmérséklet. Itt a legnagyobb a hőfokcsésés, felmelegítésnél ezt melegszik fel utoljára, lehűtésnél viszont ez hűl le legvégül. A sterilizálást 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 (áramlásos) hőtranszport a jellemző.



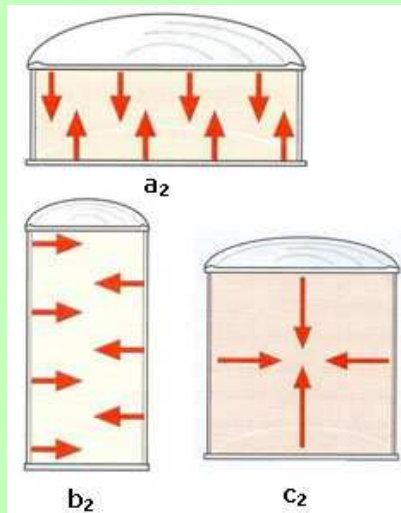
## Hidegpont

- Hővezetésnél minden irányból egyformán terjed a hő, így utoljára a geometriai középpont melegszik fel.
- Konvekciójánál a függőleges falak mentén felmenő áramlások alakulnak ki, ezek a tengelyben lefelé irányuló áramlást okoznak, ami a hidegpontot lefelé tolja.



## A termék alakjának hatása

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

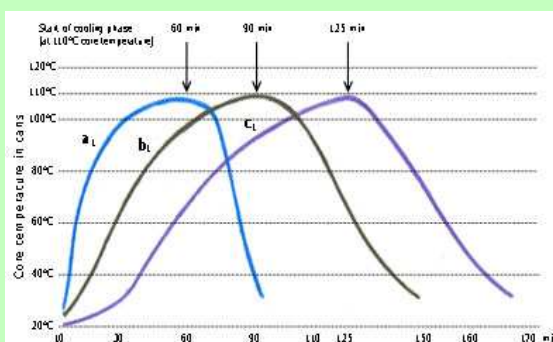


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

## A termék méretének hatása

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



BME Alkalmazott B



## Nyomásviszonyok, hatónyomás

A zárt csomagolású terméken 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 zárásfelfszakadást eredményezhet.

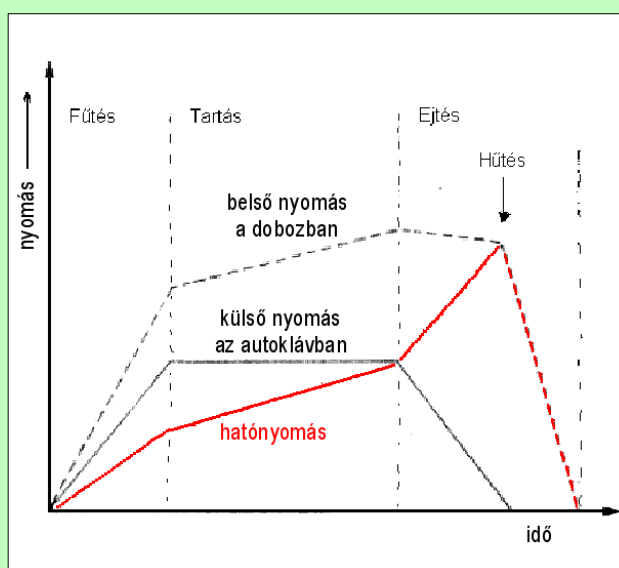
A maximális értékét a lehűtési szakaszban éri el, amikor a külső nyomás már nulla, a belső forró anyag gőznyomása viszont még nagy.



## Nyomásviszonyok, hatónyomás

A hatónyomás csökkenthető, ha:

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



## Tápanyagok sterilizációja

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, - hőntartás, - lehűtés.

Ezek megvalósítása kétféleképpen történhet:

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

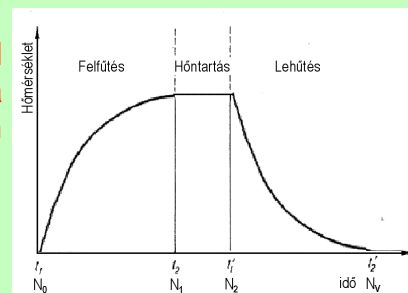


## Szakaszos sterilizáció

A szakaszos sterilizáció méretezésénél külön kell választani a három szakaszt. Az egyes szakaszok végpontjához rendeljük hozzá a maradék csíraszámokat ( $N_0$ ,  $N_1$ ,  $N_2$ ,  $N_{végső}$ ).

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

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



## Szakaszos sterilizálás

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

Az állandó hőmérsékletű hőntartási 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.

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

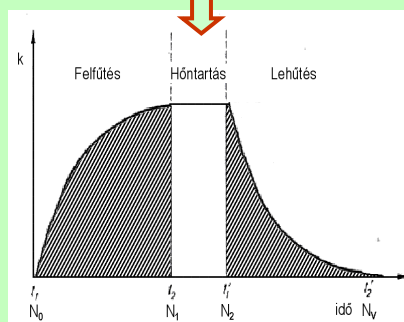
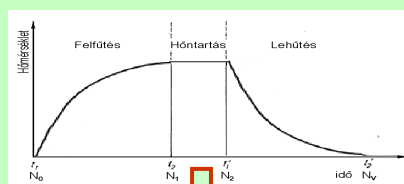
$$k \cdot t = \int k(T) dt$$



## Szakaszos sterilizálás

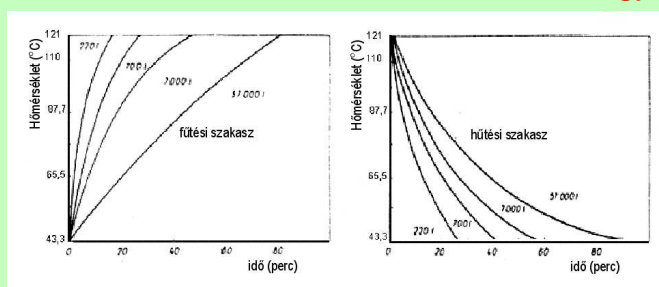
Ehhez ismerni kellene a  $k - t$  függvényt. Ezt létrehozhatjuk a megmért  $T - t$  függvény átszerkesztésével. Minden hőmérsékletre ismerjük a standard spórás mikroorganizmusok  $k$  értékeit, így kiszámíthatjuk a  $k - t$  függvény pontjait. Az integrálok értékei numerikusan kiszámíthatók.

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



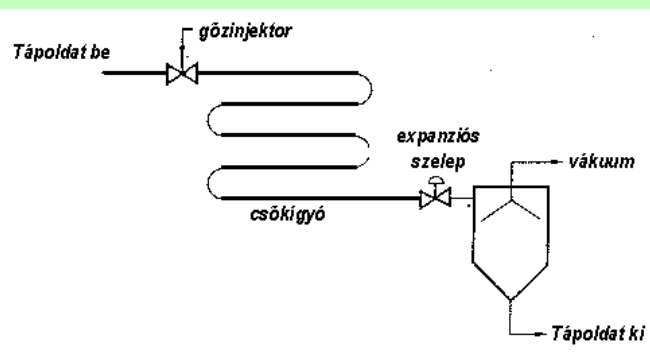
## Folytonos sterilizálás

Nagy méretű fermentoroknál, ahol nagy tömegű tápoldatot kell sterilizálni, nagyon megnő a fűtés, 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.



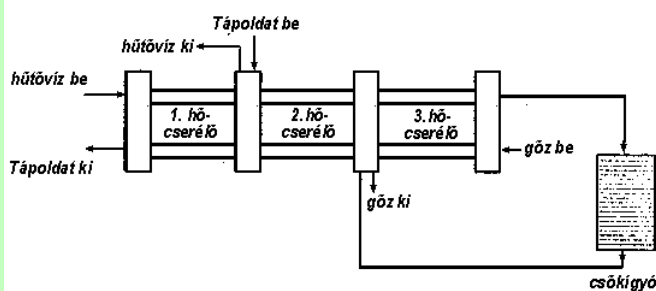
## Gőzinjektoros megoldás

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 csőkigyóban eltöltött 1-2 perces idő jelenti. A lehűtés expanziós szelepen való átlépéssel jön létre: a nyomás alól a folyadék vákuumtérbe lép át, felforr, és egy része elpárolog. Az elvont párologáshő leviszi a hőfokot ~80 fokra.



## 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 csőkiyón 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.



## A folytonos sterilizálás méretezése

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

