

3. STERILEZÉS

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

Fogalmak:

Sterilizálás: adott rendszerben lévő összes mikroba elpusztítása
Aszeptikusitás: 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 besu-
gárzás (UV, γ). 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



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:

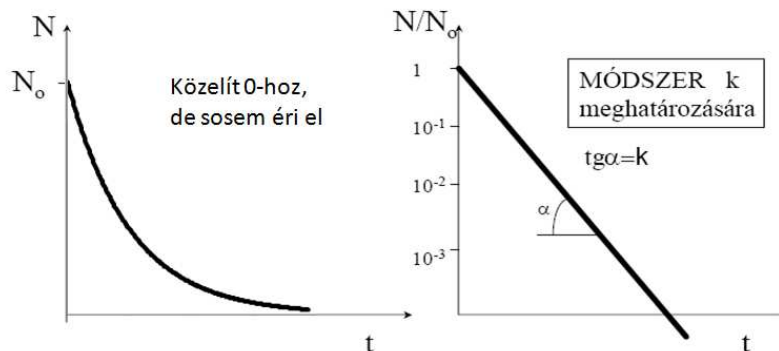
- a hőmérséklettől
- a mikroba fajtájától
- a vegetatív sejtek érzékenyebbek, mint a baktériumspórák
- a közegtől



A hőpusztulási sebesség

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

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

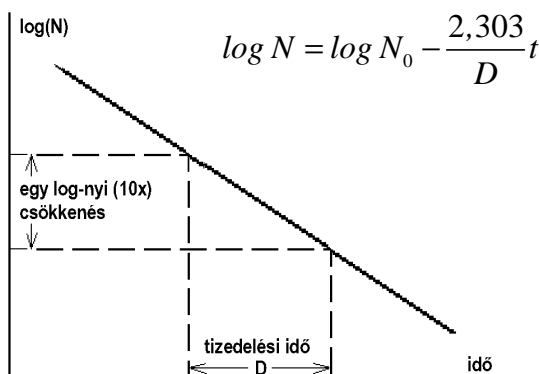


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

5

A hőpusztulási sebesség

Másik megközelítés: a tizedelési idő. Tíz-es alapú logaritmus skálán ábrázolva a pusztulást értelmezhető a 90%-os csíraszámcsökkenéshez 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:

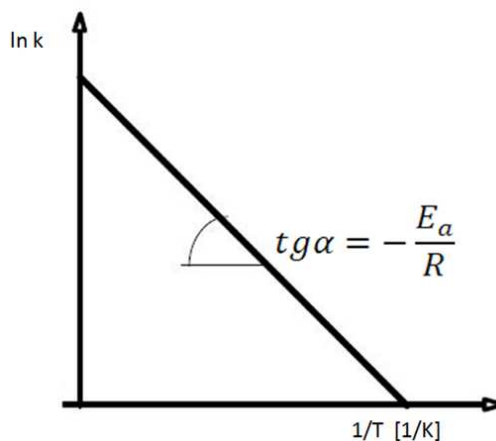
$$k = A \cdot e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad \ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \cdot \frac{1}{T}$$

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



A hőpusztulási sebesség

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



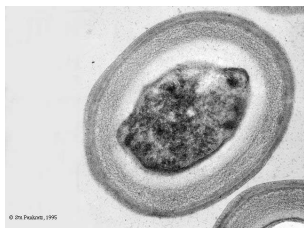
A hőpusztulási sebesség

A k értéke függ a mikroba fajtájától és állapotától is.

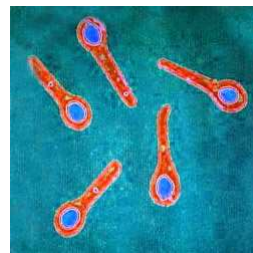
A legellenállóbbak a baktériumspórák.

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

Bacillus stearothermophilus



Clostridium botulinum



a k és D értékek ezekre ismertek



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

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.

Sterilizáció 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 sterilizációból egy nem sikerül, azaz marad túlélő sejt a rendszerben.

A sterilizáció 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.

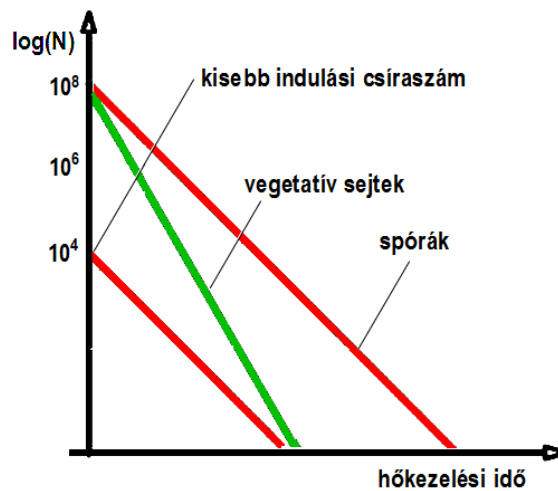


A hőpusztulási sebesség

A mikrobatípus és a kiindulási csíraszám hatása:

Azonos fertőzöttség mellett a spórák elpusztításához hosszabb idejű hőkezelés szükséges.

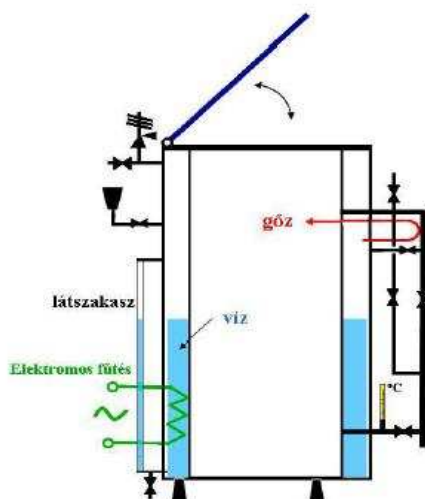
Kiseb csíraszám lerövidíti a sterilizációs időt.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

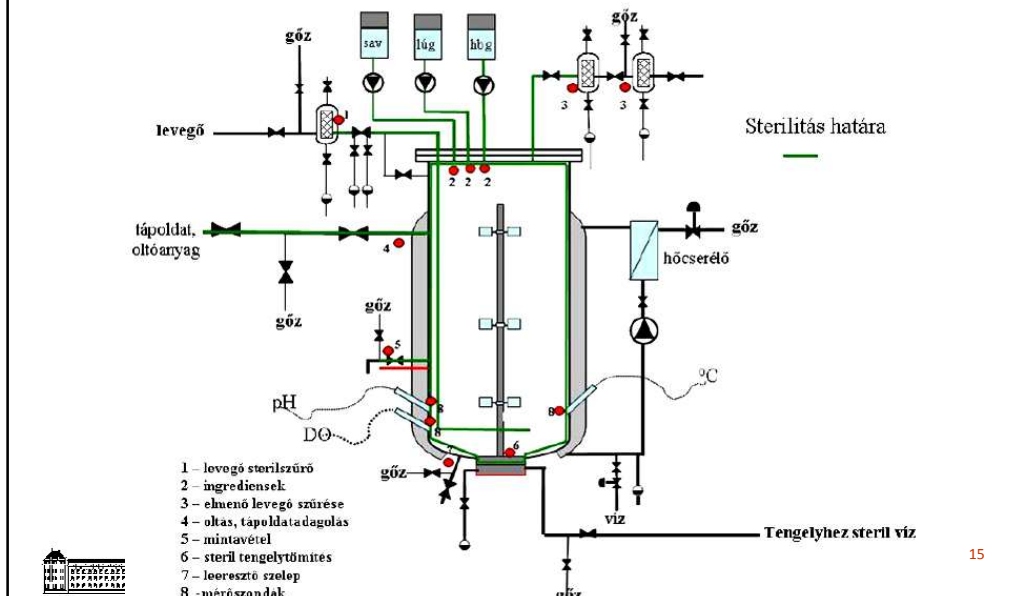
Hagyományos laboratóriumi autokláv



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Ipari fermentor steril zárású szerelvényei



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 hőátadó közeggel melegítjük. A felfűtés sohasem pillanatszerű, hanem a hőátadás mechanizmusától függő késéssel megy végbe. A melegítés sebessége függ a töltet halmazállapotától, hővezetőképességétől, valamint a termék alakjától és méretétől.



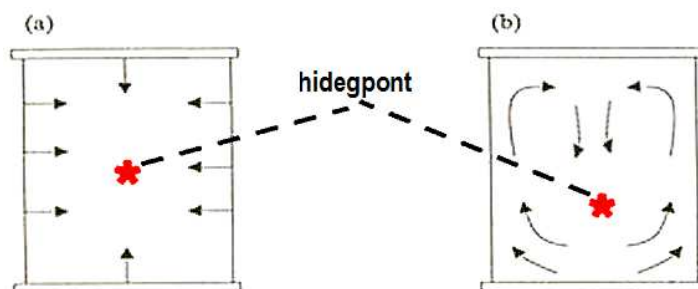
Hidegpont

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 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 konvekció (áramlásos) hőtranszport a jellemző.



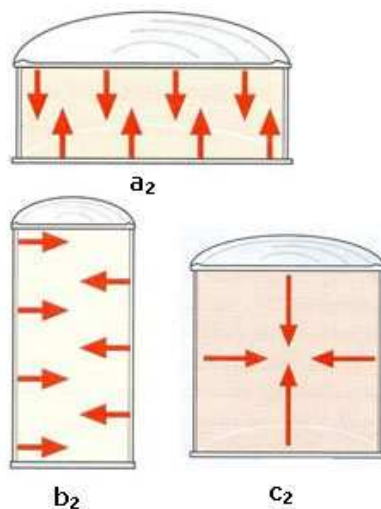
Hidegpont

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

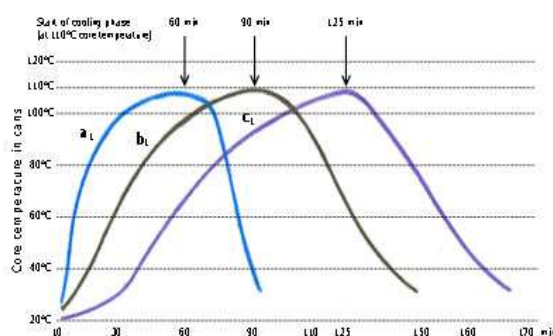


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.

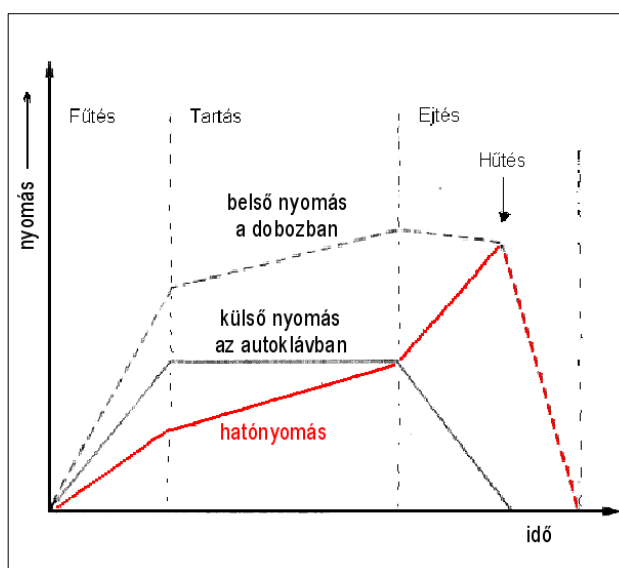
A maximális értékét a lehűtési szakaszban éri el, amikor a külső nyomás már nulla, a belső forró anyag gőznyomása viszont még nagy.



Nyomásviszonyok, hatónyomás

A hatónyomás csökkenthető, ha:

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



Tápanyagok sterilizálása

Ebben az esetben nem kis egységeket, hanem nagy mennyiségű (1 – 100 m³) 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.

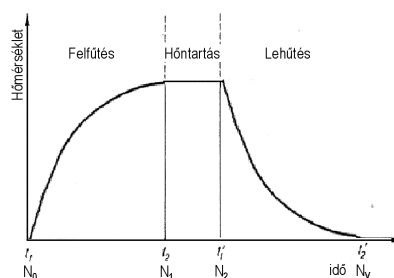


Szakaszos sterilizálás

A szakaszos sterilizálás 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 10⁻³ élő csíra/fermentor)



Szakaszos sterilizálás

A levezetett összefüggés szerint a $k \cdot t$ 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 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 $k \cdot t$ függvény integráljával kell számolni.

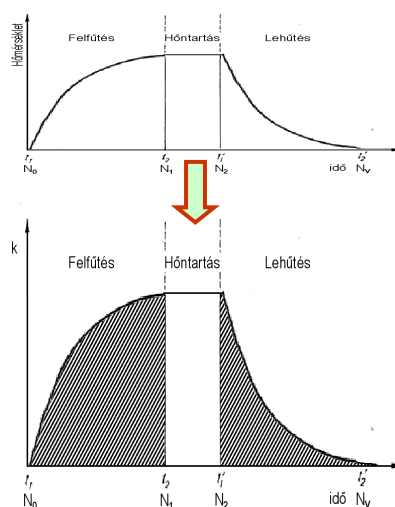
$$k \cdot t = \int k(T) dt$$



Szakaszos sterilizálás

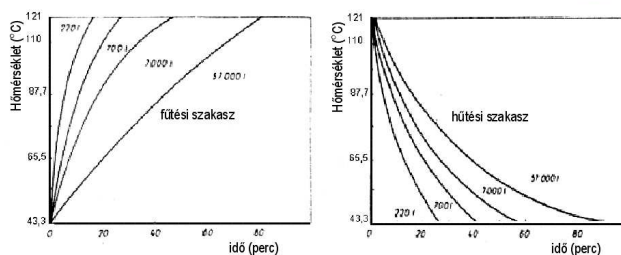
Ehhez ismerni kellene a $k - t$ függvényt. Ezt létrehozhatjuk a megmért $T - t$ függvény átszerkesztésével. Minden hőmérséklethez ismerjük a standard spórás mikroorganizmusok k értékeit, így kiszámíthatjuk a $k - t$ függvény pontjait. Az integrálok értékei numerikusan kiszámíthatók.

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



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.

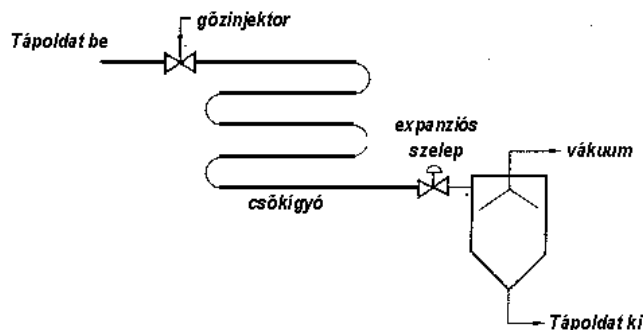


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

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.

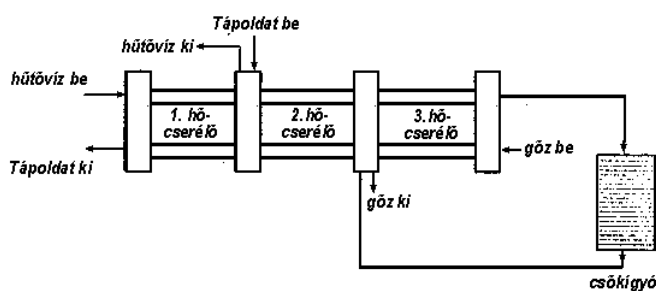


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

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 csőkigyón 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.

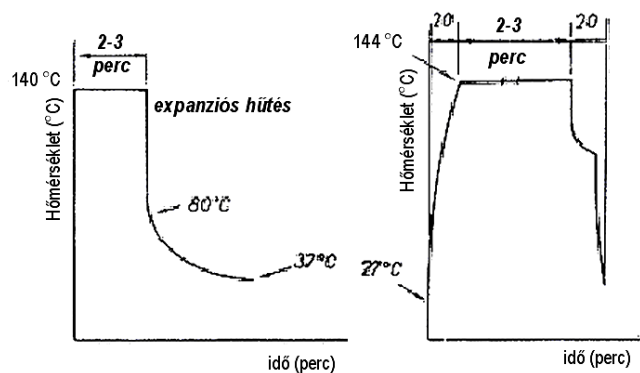


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30