

Μάθημα Βιοχημικές Διεργασίες (ENE.2070)

Αποστείρωση & Ανάδευση

Δρ. ΑΝΕΣΤΗΣ ΒΛΥΣΙΔΗΣ

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Πατρών

Τι μάθαμε στην προηγούμενη διάλεξη (Διάλεξη 6)

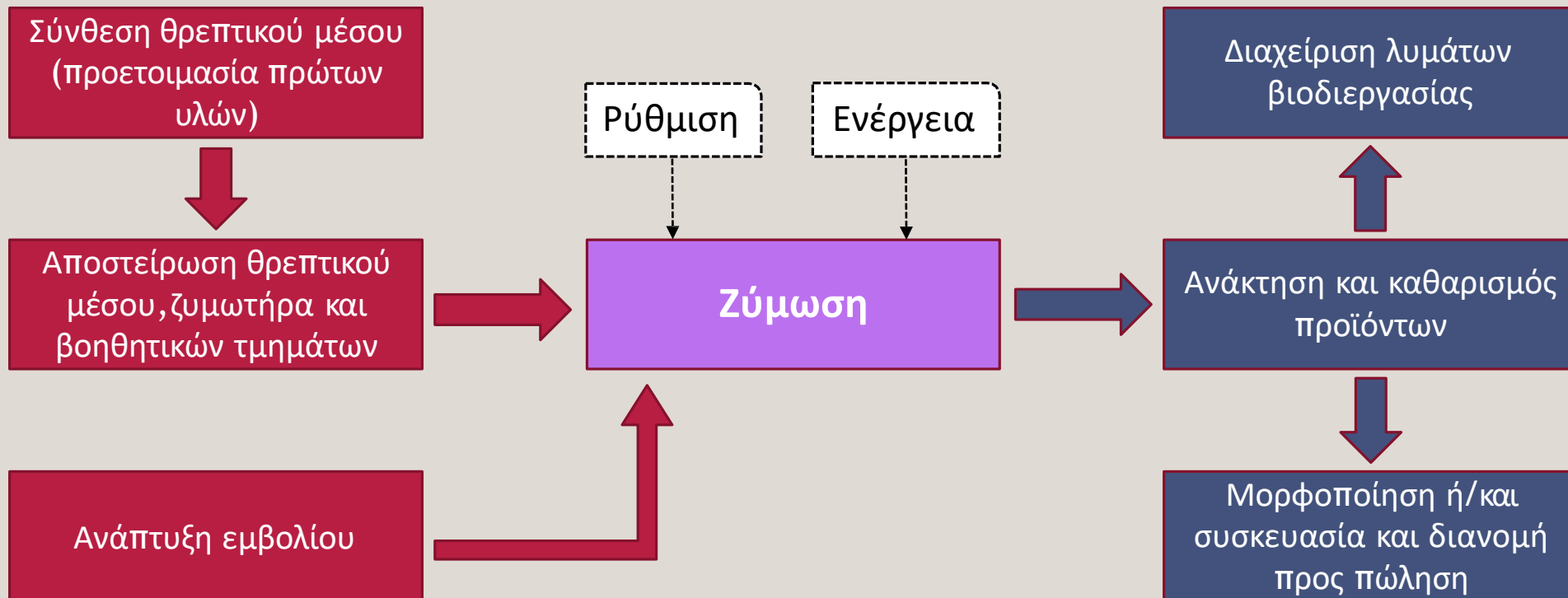
- Βήματα μιας Διεργασίας Ζύμωσης
- Διαδικασία και ερωτήματα σχεδιασμού μίας ζύμωσης
- Τύποι βιοαντιδραστήρων και τρόποι λειτουργίας τους
- Ισοζύγια Μάζας για Ιδανικούς Βιοαντιδραστήρες
 - Διαλείποντος έργου
 - Ημι-διαλείποντος έργου
 - Συνεχούς λειτουργίας

Περιγραφή Σημερινής Διάλεξης (Διάλεξη 7)

- Αποστείρωση του Θρεπτικού Μέσου
 - Γιατί χρειάζεται
 - Τα στάδια
 - Κινητικές μίας αποστείρωσης
 - Υπολογισμό του χρόνου μίας αποστείρωσης
- Κατανάλωση ισχύς σε διεργασίες ζύμωσης
- Σχηματισμοί Βιοαντιδραστήρων

Αποστείρωση του Θρεπτικού Μέσου

Απαραίτητα Βήματα Εφαρμογής μιας Διεργασίας Ζύμωσης



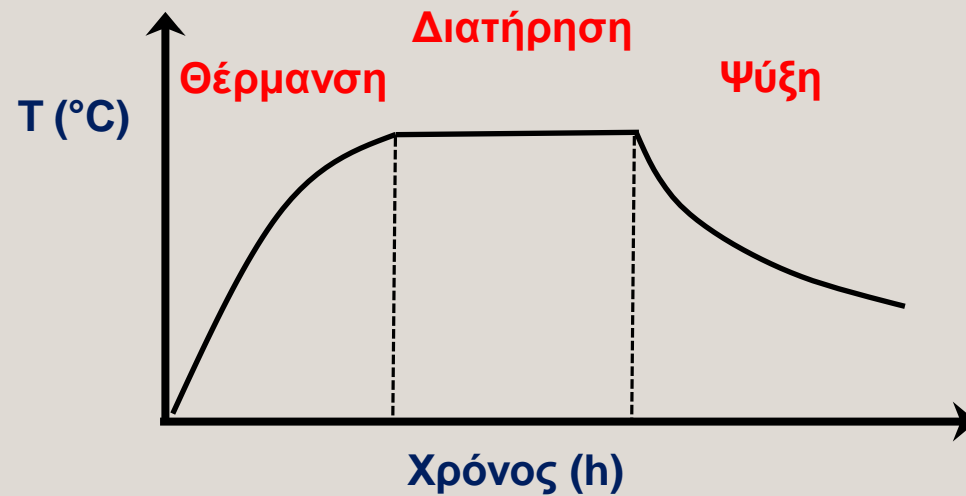
Αποστείρωση ή Παστερίωση του θρεπτικού μέσου ζύμωσης

- Η αποστείρωση είναι η εξάλειψη (απενεργοποίηση, καταστροφή ή αποκλεισμός) **όλων** των μικροοργανισμών από το θρεπτικό μέσο.
- Η παστερίωση δεν είναι μέθοδος αποστείρωσης. Εδώ η θέρμανση εφαρμόζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες για τη **μείωση** του μικροβιακού πληθυσμού.
- Η αποστείρωση με φίλτρο εφαρμόζεται για τον αποκλεισμό μικροοργανισμών (π.χ. χρήση κλίνης ινών, όπως υαλοβάμβακας)
- Η **θερμική αποστείρωση** χρησιμοποιεί κορεσμένο ατμό υπό πίεση και επιτρέπει την εφαρμογή υψηλότερων θερμοκρασιών (π.χ. πίεση 15 psi παρέχει ατμό στους 121 °C).
- Αυτή είναι η **κύρια** διαδικασία που χρησιμοποιείται για την αποστείρωση του εξοπλισμού και των θρεπτικών μέσων σε διαδικασίες ζύμωσης.

Αποφυγή Μόλυνσης

1. Αποτελεσματικός σχεδιασμός και κατασκευή της μονάδας ζύμωσης.
2. Χρησιμοποιώντας ένα καθαρό εμβόλιο για την έναρξη της ζύμωσης.
3. Αποστείρωση του θρεπτικού μέσου.
4. Αποστείρωση του δοχείου ζύμωσης (αντιδραστήρα).
5. Αποστείρωση όλων των υλικών που θα προστεθούν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (π.χ. θρεπτικές ουσίες, και τα ρυθμιστικά διαλύματα για σταθερό pH κλπ.).
6. Διατήρηση ασηπτικών συνθηκών κατά τη ζύμωση.
7. Θέσπιση λεπτομερών λειτουργικών διαδικασιών αποστείρωσης, ασηπτικών μέτρων διατήρησης και εκπαίδευσης προσωπικού.

Κινητικές Αποστείρωσης



Ο κυτταρικός θάνατος προκαλείται λόγω θερμικής μετουσίωσης των ενζύμων

Κινητικές Αποστείρωσης

Η εξίσωση του ρυθμού θανάτου είναι:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \Rightarrow \ln \frac{N}{N_0} = -kt \Rightarrow \boxed{\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt}}$$

N : ο αριθμός των ζωντανών μικροοργανισμών

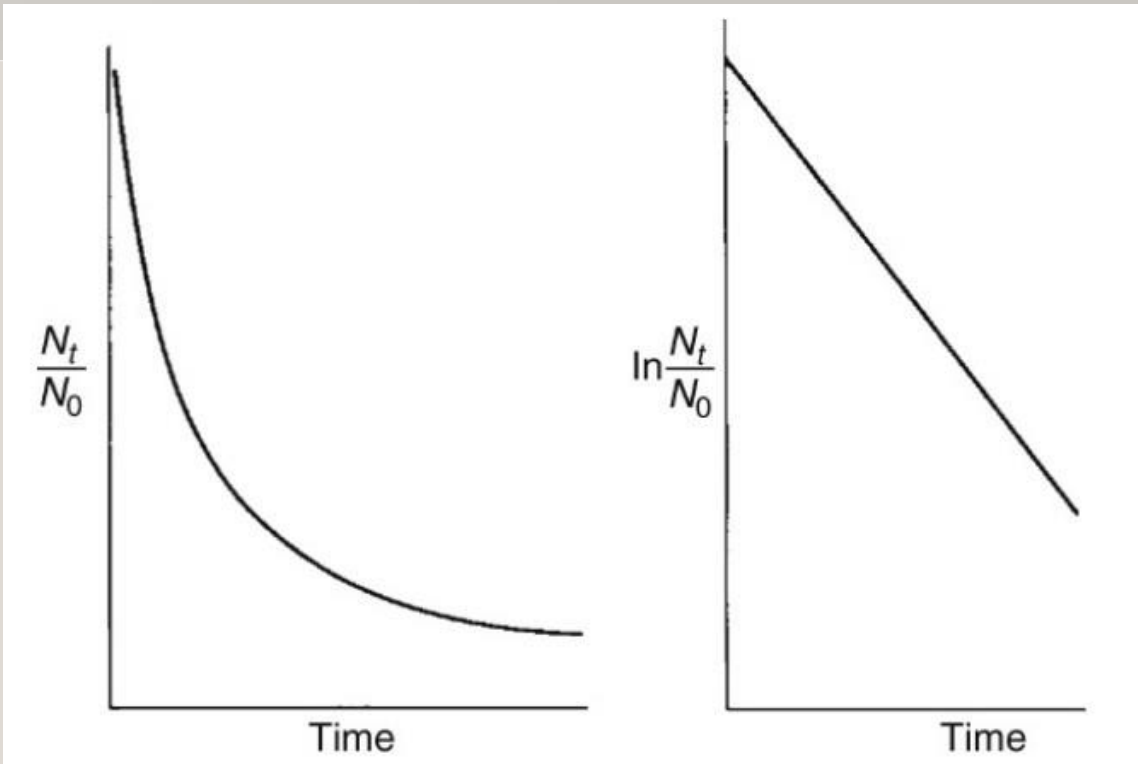
t : ο χρόνος αποστείρωσης

k (ή k_d): είναι η σταθερά του ειδικού ρυθμού θανάτου (min^{-1} ή h^{-1} ή s^{-1}) (ή η σταθερά ρυθμού της αντίδρασης)

Εδώ μας ενδιαφέρει να εξετάσουμε τον συνολικό αριθμό των μικροοργανισμών και όχι την συγκέντρωσή τους. Καθώς ο ελάχιστος αριθμός των μικροοργανισμών που μπορεί να προκαλέσει μόλυνση είναι η μονάδα! Ανεξαρτήτως του όγκου του αντιδραστήρα.

Ιδανικές και μη ιδανικές καμπύλες θανάτου

Ιδανικές



$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt}$$

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kt$$

Γραφικές παραστάσεις που δείχνουν την αναλογία επιζώντων κυττάρων με τα αρχικά που υπόκεινται σε θερμοκρασία αποστείρωσης πάνω από ένα χρονικό διάστημα.

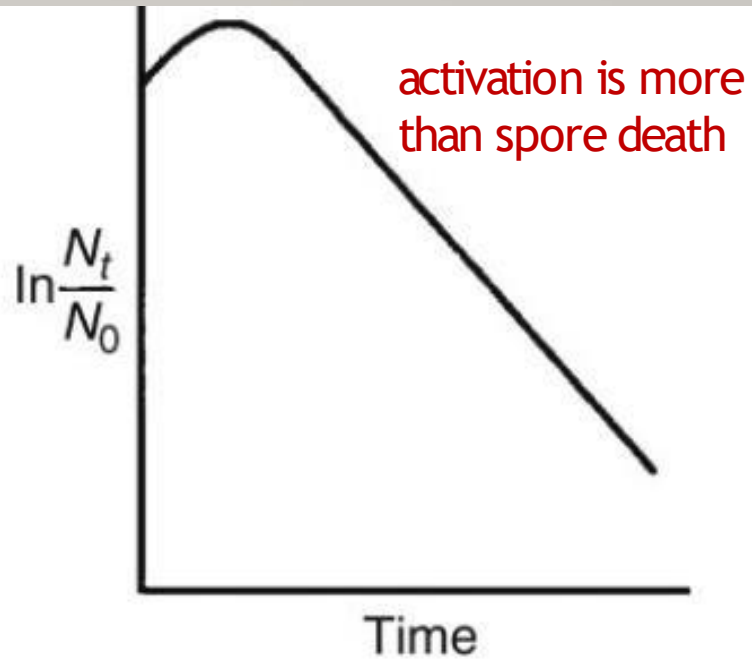
Ιδανικές και μη ιδανικές καμπύλες θανάτου

Μη - ιδανικές

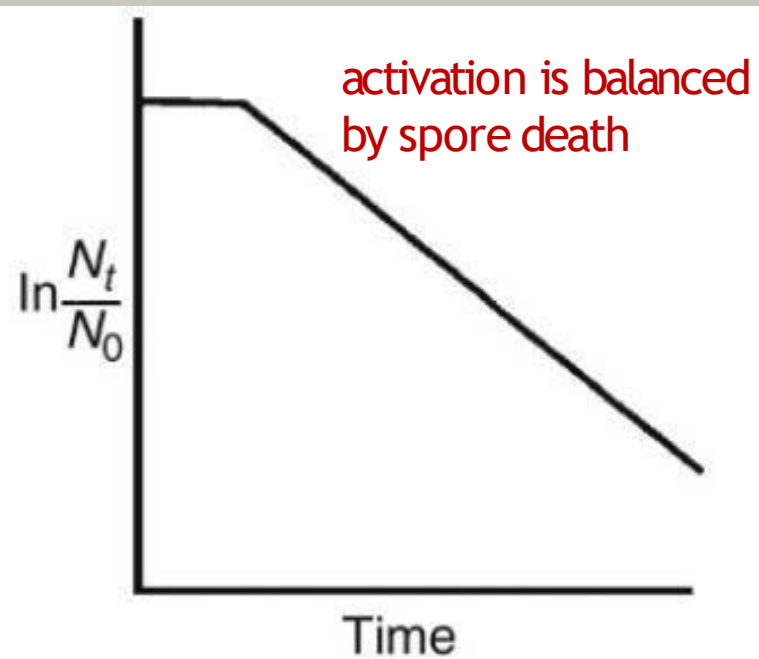
- Η σχέση που είδαμε στο προηγούμενο σχήμα παρατηρείται μόνο με την αποστείρωση μιας καθαρής καλλιέργειας σε μία φυσιολογική μορφή, υπό ιδανικές συνθήκες αποστείρωσης.
- Η τιμή του k δεν εξαρτάται μόνο από τα είδη μικροοργανισμών, αλλά εξαρτάται και από τη φυσιολογική μορφή του κυττάρου.
- Πολλοί οργανισμοί δεν εξουδετερώνονται άμεσα, αλλά μετατρέπονται πρώτα σε σπόρια, τα οποία εξουδετερώνονται στη συνέχεια με άλλη κινητική.
- Για παράδειγμα, τα ενδοσπόρια του γένους *Bacillus* είναι πολύ πιο ανθεκτικά στη θερμότητα από τα φυτικά κύτταρα.
- Η απόκλιση από μια άμεση εκθετική μείωση του βιώσιμου αριθμού σπορίων οφείλεται στη θερμική ενεργοποίηση των σπορίων, δηλαδή στην επαγωγή της βλάστησης των σπορίων από τη θερμότητα και την υγρασία της αρχικής περιόδου της διαδικασίας αποστείρωσης.

Ιδανικές και μη ιδανικές καμπύλες θανάτου

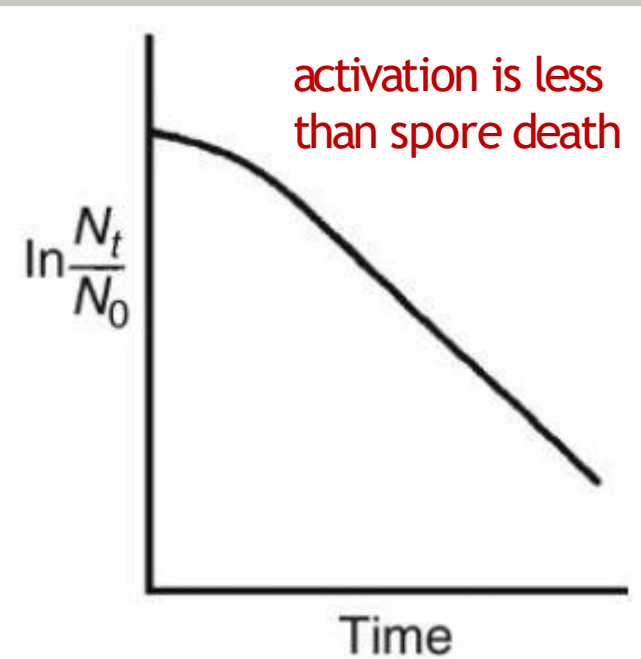
Μη-ιδανικές



Η αρχική αύξηση του πληθυσμού προκύπτει από τη θερμική ενεργοποίηση των σπορίων στα αρχικά στάδια μιας διαδικασίας αποστείρωσης.



Στην αρχή της διαδικασίας ο θάνατος των σπορίων αντισταθμίζεται από την ενεργοποίηση των σπορίων λόγω της θερμότητας και υγρασίας.

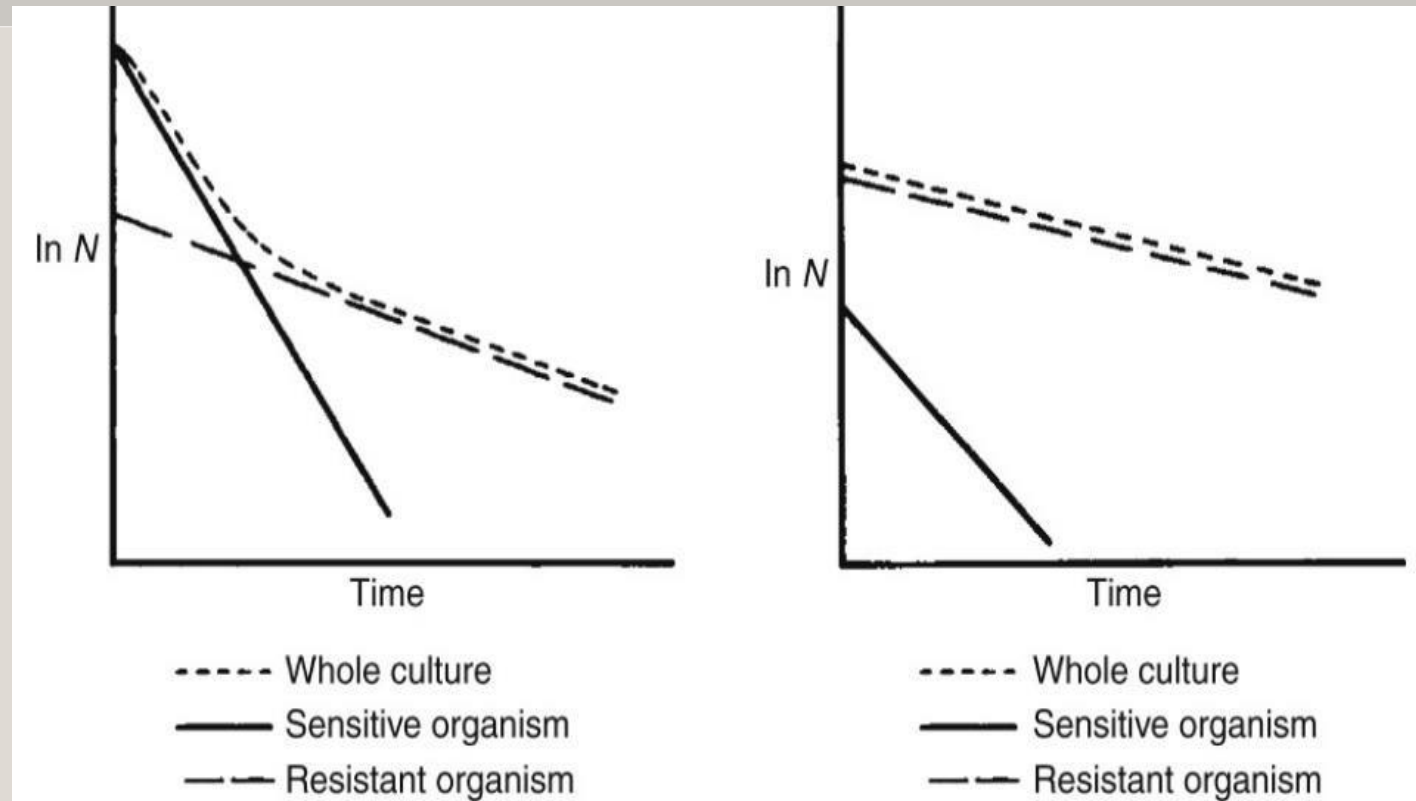


Μικρότερο ρυθμό θανάτου από το μέγιστο στην αρχή της διαδικασίας λόγω της αντιστάθμισης του θανάτου των σπορίων από την ενεργοποίηση θερμότητας των σπορίων.

Ιδανικές και μη ιδανικές καμπύλες θανάτου

Αποστείρωση Μικτών Καλλιεργείων

- Τυπικά αποτελέσματα της αποστείρωσης μικτών καλλιεργείων που περιέχουν δύο είδη με διαφορετικές ευαισθησίες στη θερμότητα.
- Σχήμα 1: ο πληθυσμός αποτελείται κυρίως από τον λιγότερο ανθεκτικό τύπο όπου η αρχική μείωση οφείλεται κυρίως στο θάνατο του λιγότερο ανθεκτικού κυτταρικού πληθυσμού και η μεταγενέστερη, λιγότερο γρήγορη μείωση, οφείλεται κυρίως στο θάνατο του πιο ανθεκτικού κυτταρικού πληθυσμού.
- Σχήμα 2: αντιπροσωπεύει την αντίστροφη κατάσταση όπου κυριαρχεί ο πιο ανθεκτικός τύπος και η παρουσία του συγκαλύπτει τη μείωση του αριθμού του λιγότερο ανθεκτικού τύπου.



Επίδραση της Θερμοκρασίας στην σταθερά του ειδικού ρυθμού θανάτου

- Το k είναι σταθερά μόνο υπό σταθερές θερμοκρασίες.
- Σε υψηλότερες T , ο μικροβιακός πληθυσμός μειώνεται ταχύτερα. Έτσι, το διάγραμμα του N/N_0 δίνει πιο απότομες κλίσεις αφού το k είναι μεγαλύτερο.
- Η σχέση μεταξύ θερμοκρασίας και k ακολουθεί την εξίσωση Arrhenius:

$$k = A_r e^{-\frac{\Delta E}{RT}}$$

A_r είναι μία εμπειρική σταθερά που περιγράφεται από το μέγεθος του k (min^{-1}),

ΔE είναι η ενέργεια ενεργοποίησης θερμικής καταστροφής (cal mol^{-1}),

R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($1.98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

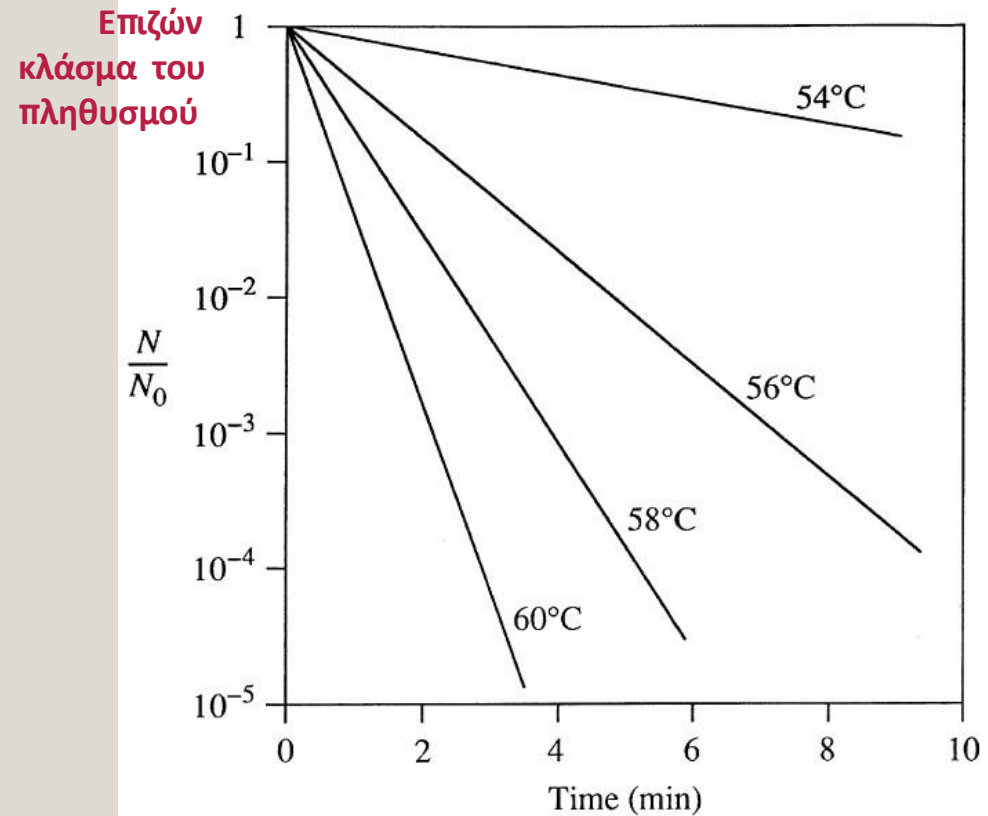
T είναι η θερμοκρασία (K)

- Η εξίσωση ρυθμού θανάτου γίνεται:

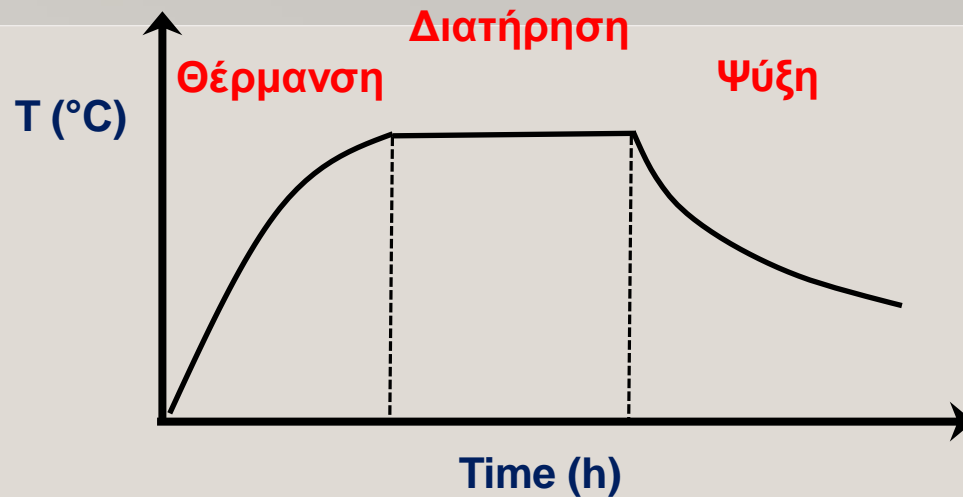
$$\ln \frac{N}{N_0} = -A_r e^{-\frac{\Delta E}{RT}} t$$

Κινητικές Θανάτου σε σχέση με τη Θερμοκρασία

- Αποτελέσματα για το θερμικό θάνατο του *Escherichia coli* σε διάφορες θερμοκρασίες.
- Μικρές αυξήσεις της θερμοκρασίας επηρεάζουν σημαντικά το k και το ρυθμό κυτταρικού θανάτου.



Σχεδιασμός Αποστείρωσης Διαλείποντος έργου



Ο συνολικός αριθμός κυττάρων που καταστράφηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της «φουρνιάς» είναι αθροιστικός κατά τη διάρκεια των σταδίων θέρμανσης, διατήρησης και ψύξης.

Ο συνολικός βαθμός αποστείρωσης δίνεται από:

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{overall} = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{heating} + \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{holding} + \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{cooling}$$

Παράδειγμα

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{overall} = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{heating} + \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{holding} + \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{cooling}$$

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{overall} = 32.2 \quad \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{heating} = 9.8 \quad \ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{cooling} = 10.1$$

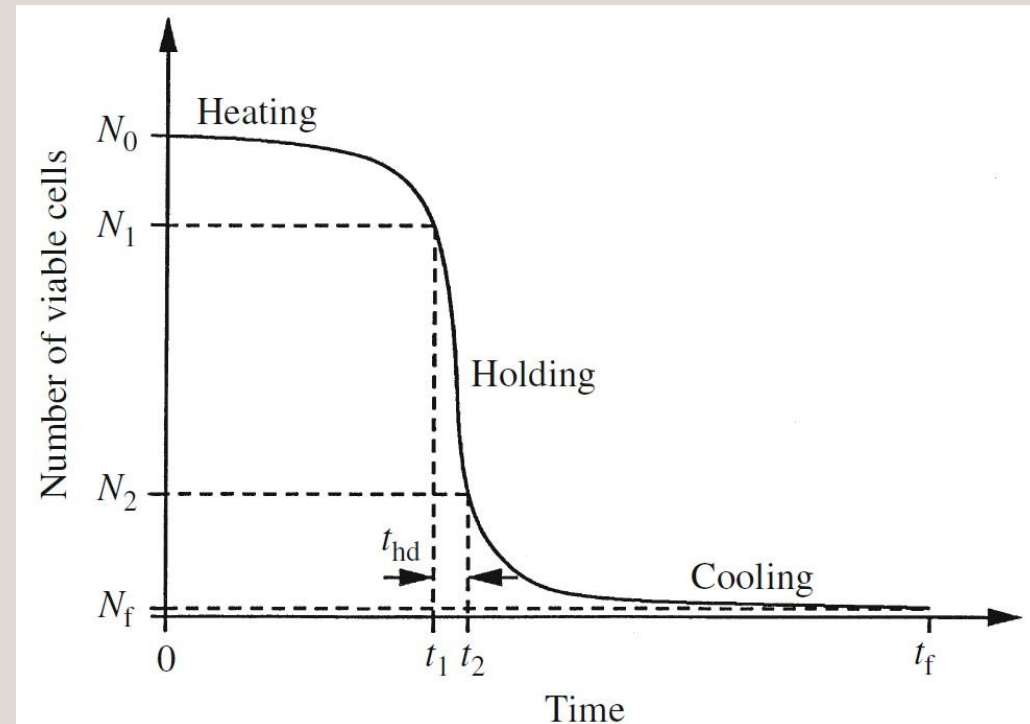
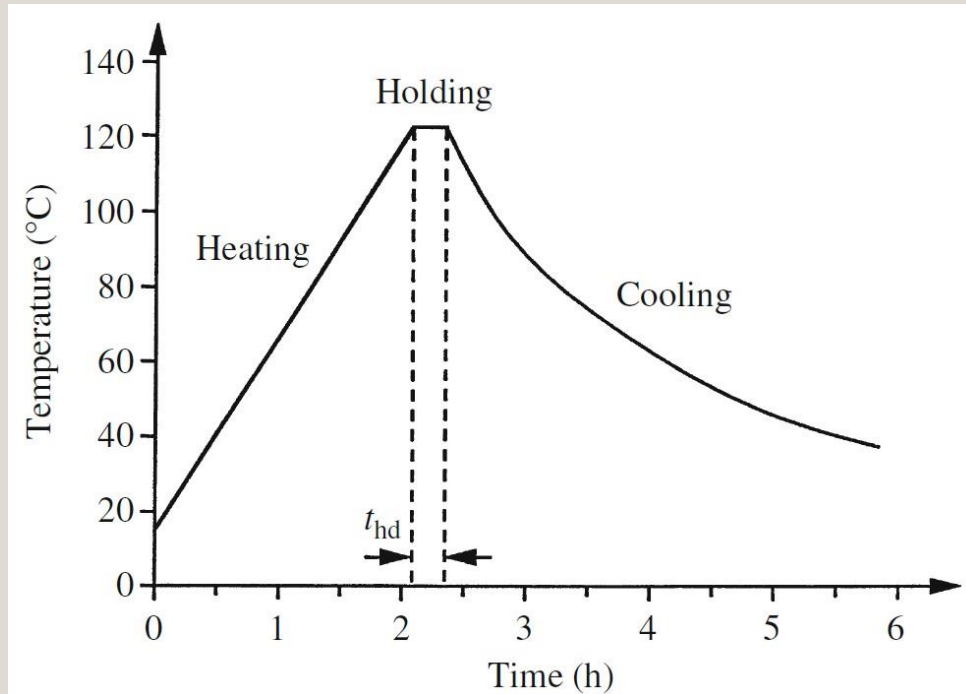
$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right)_{holding} = 32.2 - 9.8 - 10.1 = 12.3$$

Θερμοκρασία Vs k

- Τιμές $\ln(N/N_0)$ των σπορίων του *B. stearothermophilus* κατά την διαδικασία της θέρμανσης για $T = 100 - 130^\circ\text{C}$
- Υποθέτοντας ένα ρυθμό αλλαγής της θερμοκρασίας ίσο με 1°C min^{-1} και
- Αμελητέα καταστροφή σπορίων σε θερμοκρασίες κάτω των 100°C

$T(^{\circ}\text{C})$	$k (\text{min}^{-1})$	$\ln(N/N_0)$
100	0.019	-
101	0.025	0.044
102	0.032	0.076
103	0.040	0.116
104	0.051	0.168
105	0.065	0.233
106	0.083	0.316
107	0.105	0.420
108	0.133	0.553
109	0.168	0.720
110	0.212	0.932
111	0.267	1.199
112	0.336	1.535
113	0.423	1.957
114	0.531	2.488
115	0.666	3.154
116	0.835	3.989
117	1.045	5.034
118	1.307	6.341
119	1.633	7.973
120	2.037	10.010
121	2.538	12.549
122	3.160	15.708
123	3.929	19.638
124	4.881	24.518
125	6.056	30.574
126	7.506	38.080
127	9.293	47.373
128	11.494	58.867
129	14.200	73.067
130	17.524	90.591

Ζωντανά κύτταρα και θερμοκρασία σε σχέση με το χρόνο



Καταστροφή θρεπτικών ουσιών κατά την αποστείρωση με θερμότητα

- Η θερμική αποστείρωση μπορεί επίσης να καταστρέψει θρεπτικά συστατικά, εκτός από τη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού.
- Η καταστροφή των θρεπτικών ουσιών εκφράζεται επίσης μέσω της εξίσωσης Arrhenius, αλλά η ενέργεια ενεργοποίησης είναι χαμηλότερη από αυτήν των μικροβιακών σπορίων.

Πλεονεκτήματα της συνεχούς αποστείρωσης έναντι της αποστείρωσης κατά Παρτίδες:

1. Καλύτερη διατήρηση του θρεπτικού ζύμωσης.
2. Ικανότητα να αποστειρώνονται ξεχωριστά τα συστατικά του θρεπτικού μέσου.
3. Ανώτερη ενεργειακή απόδοση, καταναλώνοντας 60-80% λιγότερο ατμό και νερό ψύξης.
4. Ευκολία κλιμάκωσης
5. Ευκολότερη αυτοματοποίηση
6. Μείωση του χρόνου κύκλου αποστείρωσης και συνεπώς μείωση του συνολικού χρόνου μίας φουρνιάς, αυξάνοντας έτσι την Παραγωγικότητα.
7. Υπό ορισμένες συνθήκες, μείωση της διάβρωσης του ζυμωτήρα.

Πλεονεκτήματα της αποστείρωσης κατά παρτίδες έναντι της συνεχούς αποστείρωσης

1. Χαμηλότερο κόστος εξοπλισμού κεφαλαίου.
2. Χαμηλότερος κίνδυνος μόλυνσης - οι συνεχείς διεργασίες απαιτούν την ασηπτική μεταφορά του αποστειρωμένου υγρού στο αποστειρωμένο δοχείο.
3. Ευκολότερος χειροκίνητος έλεγχος.
4. Ευκολότερο στη χρήση όταν έχουμε θρεπτικά μέσα που περιέχουν υψηλή αναλογία στερεάς ύλης

ΠΡΟΒΛΗΜΑ 1

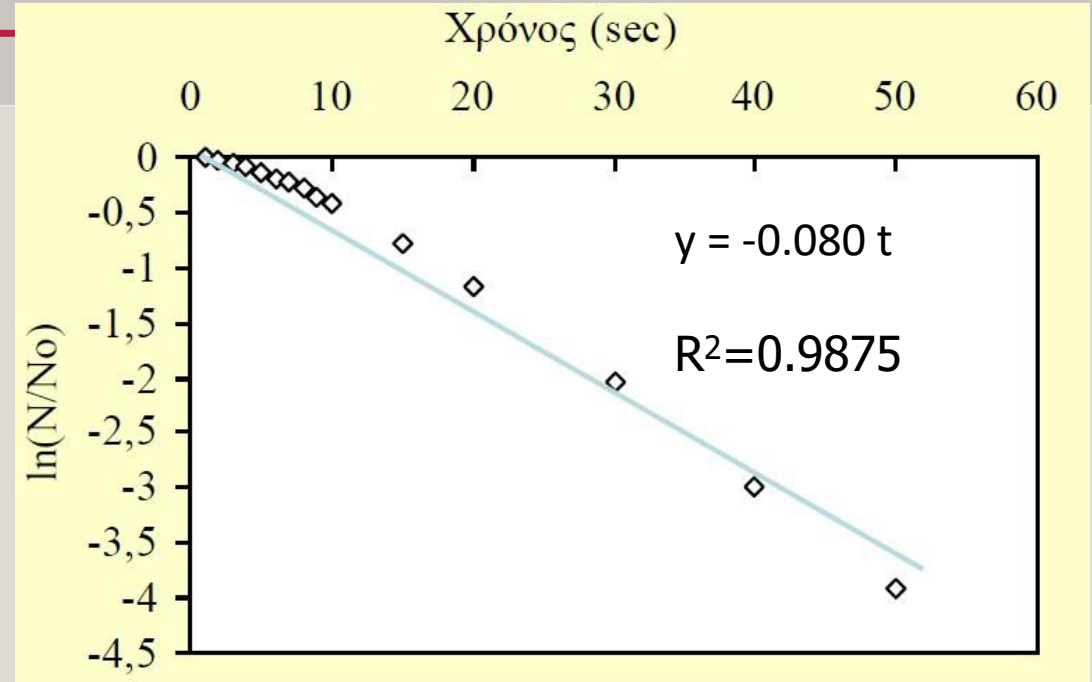
- Κατά τη θερμική απενεργοποίηση σπορίων βακτηρίου στους 121°C προέκυψαν τα δεδομένα του Πίνακα που παρατίθεται.
- Υπολογίστε τη σταθερά του ειδικού ρυθμού θανάτου/ ειδικός ρυθμός θερμικής καταστροφής

Χρόνος (sec)	Αριθμός ζωντανών σπορίων (N)
0	100
1	99
2	98
3	95
4	91
5	88
6	83
7	79

Χρόνος (sec)	Αριθμός ζωντανών σπορίων (N)
8	75
9	70
10	66
15	46
20	31
30	13
40	5
50	2

Λύση προβλήματος 1

Χρόνος (sec)	N/No	ln(N/No)
0	1,000	0,000
1	0,990	-0,010
2	0,980	-0,020
3	0,950	-0,051
4	0,910	-0,094
5	0,880	-0,128
6	0,830	-0,186
7	0,790	-0,236
8	0,750	-0,288
9	0,700	-0,357
10	0,660	-0,416
15	0,460	-0,777
20	0,310	-1,171
30	0,130	-2,040
40	0,050	-2,996
50	0,020	-3,912



- Η προσαρμογή ευθείας στα σημεία του γραφήματος δίνει συντελεστή συσχέτισης $R^2 = 0.9875$
- Ενώ από την κλίση της ευθείας υπολογίζεται ο ειδικός ρυθμός θερμικής καταστροφής $k = 0.080 \text{ sec}^{-1}$.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ 2

Δίνεται ένα ημι-λογαριθμικό διάγραμμα του k_d με το αντίστροφο της θερμοκρασίας

(θερμικό θάνατο των σπορίων *B. Subtilis*) το οποίο περιγράφεται από την εξίσωση $k_d = 2.47 \times 10^{-1} \times e^{-27.030/T}$

(α) Ποια είναι η ειδική σταθερά θανάτου στους 100°C ;

(β) Υπολογίστε το χρόνο που απαιτείται για να σκοτώσετε το 99% των σπόρων σε ένα δείγμα στους 100°C .

- Η εξίσωση της γραμμής του σχήματος είναι:

$$k_d = 2.47 \times 10^{-1} \times e^{-27.030/T}$$

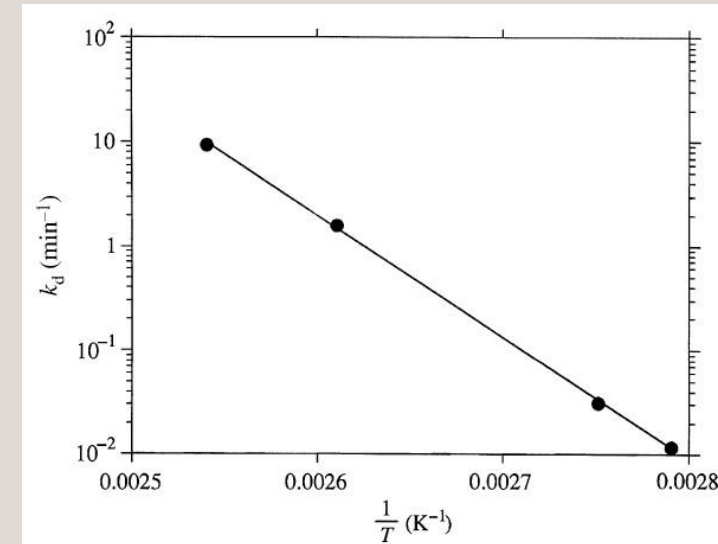
- Όπου το k έχει μονάδες min^{-1} και το T έχει μονάδες K .
Οπότε, για $T = 100^\circ\text{C} = 373.15 \text{ K}$,

- $k = 0.23 \text{ min}^{-1}$

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt}$$

- Για N ίσο με 1% of N_0 , $N/N_0 = 0.01$. Στους 100°C , $k = 0.23 \text{ min}^{-1}$:

$$t = \frac{-\ln(0.01)}{0.23 \text{ min}^{-1}} = 20 \text{ min}$$



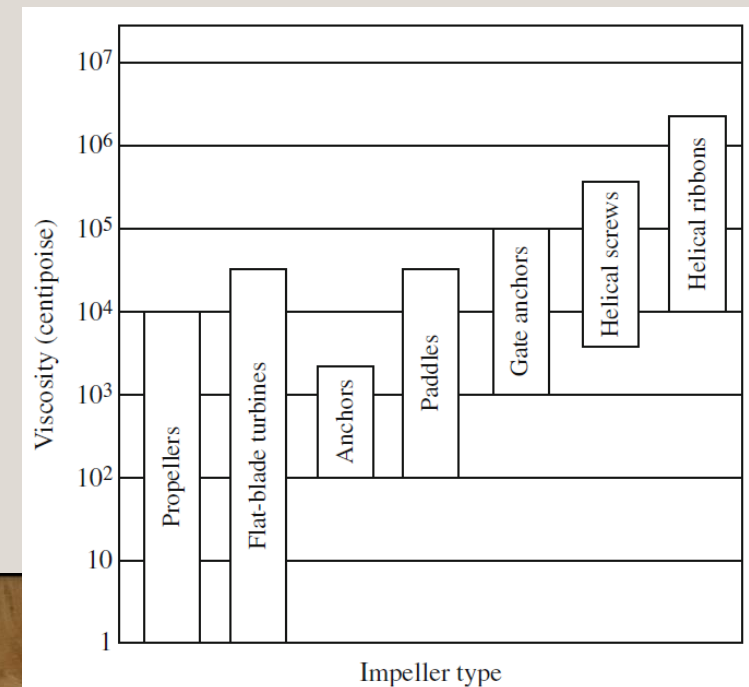
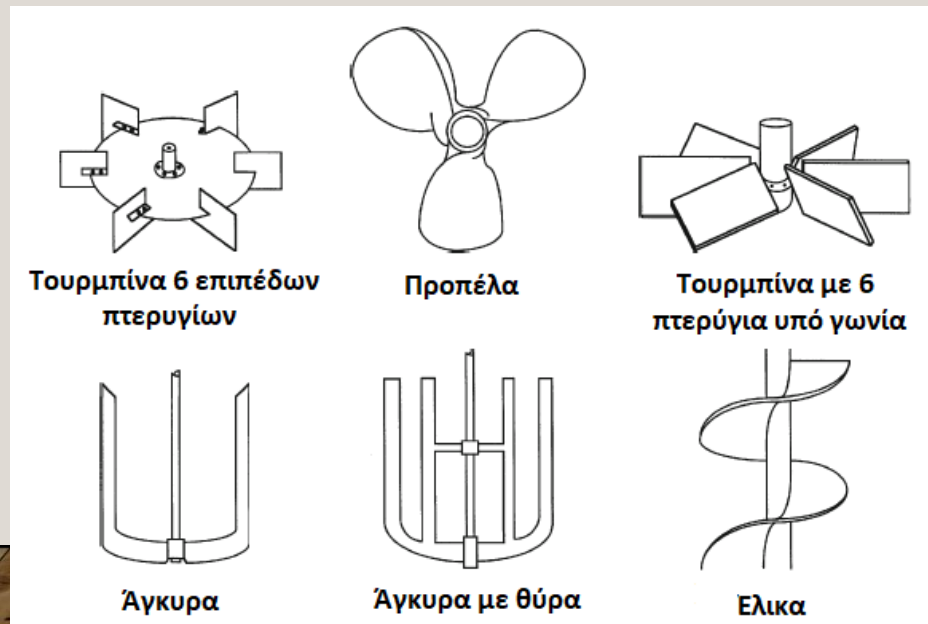
$$k_d = 2.47 \times 10^{-1} \times e^{-27.030/T}$$

Σκοπός της Ανάδευσης

- Ανακάτεμα διαλυτών συστατικών του θρεπτικού μέσου
- Διασπορά αερίων (π.χ. αέρας) μέσα σε υγρό με τη μορφή μικρών φυσαλίδων
- Διατήρηση στερεών σωματιδίων (π.χ. κυττάρων) σε αιώρηση
- Διασπορά μη αναμείξιμων υγρών με σχηματισμό γαλακτώματος ή αιωρήματος σταγονιδίων
- Ενίσχυση της μεταφοράς θερμότητας από και προς το υγρό μέσο

Ανάδευση - Σχεδιασμός Ταράκτρου

- Η επιλογή του ταράκτρου εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το ιξώδες του υγρού προς ανάμιξη και η ευαισθησία του συστήματος σε μηχανική διάτμηση
- Για υγρά χαμηλού έως μέσου ιξώδους, συνιστώνται προπέλες και τουρμπίνες επίπεδης λεπίδας



Rushton turbine

- Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη πτερωτή στη βιομηχανία ζύμωσης είναι η τουρμπίνα 6 πτερυγίων σε δίσκο (Rushton turbine).
- Πολύ αποτελεσματική για τη διασπορά αερίων.

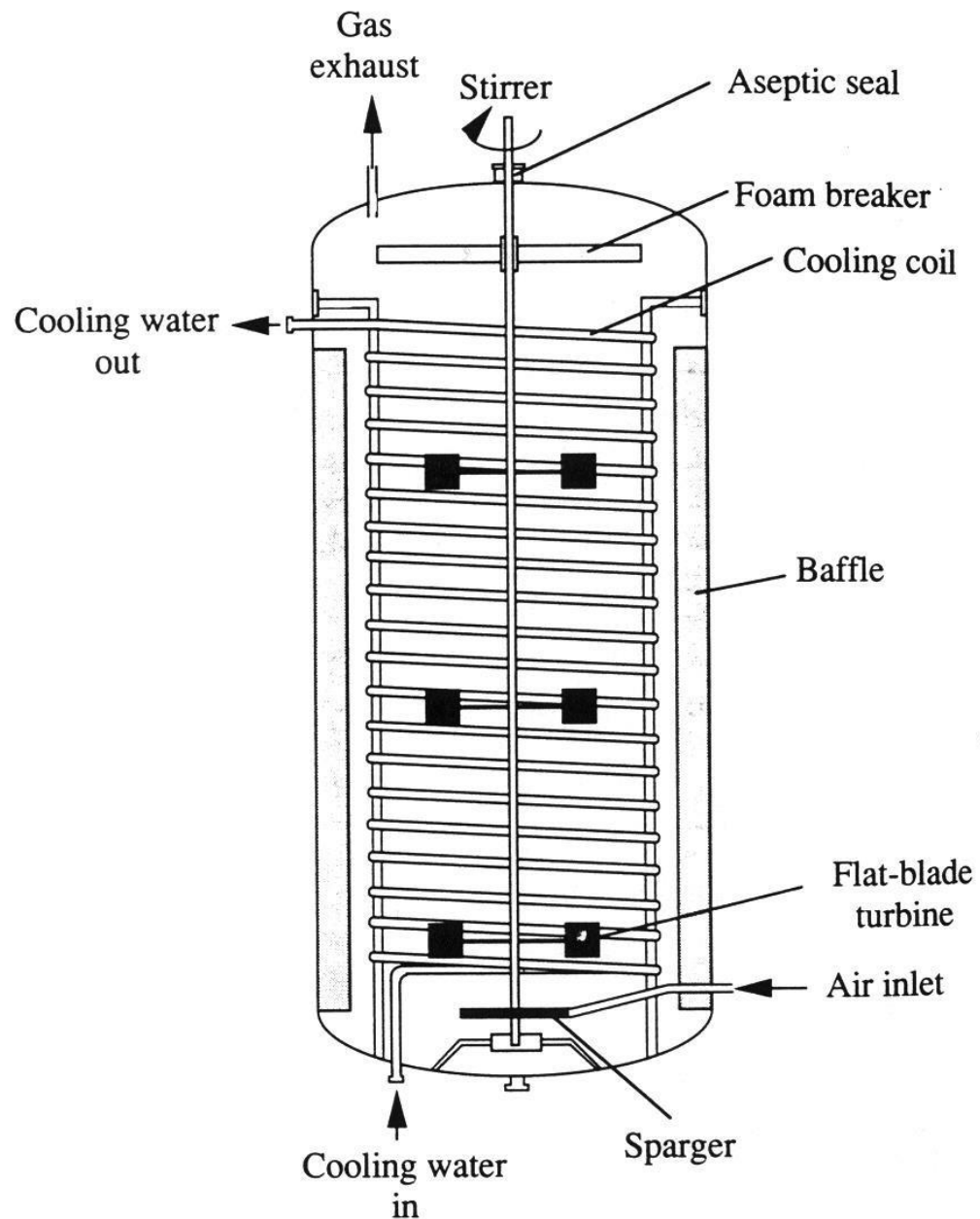


Αποτελεσματικότητα ανάμειξης

- Περιοριστικό βήμα η μακροανάμειξη
- Χρόνος ανάμειξης t_m : ο χρόνος για επίτευξη ομοιογένειας
- Έγχυση μικρής ποσότητας ιχνηθέτη και παρακολούθηση της συγκέντρωσης με το χρόνο σε συγκεκριμένο σημείο δειγματοληψίας
- Χρόνος μέχρι η διακύμανση να είναι κάτω από 10%

- Εξαρτάται από το
 - μέγεθος βιοαντιδραστήρα (D_T)
 - μέγεθος ταράκτρου (D_i)
 - ταχύτητα περιστροφής ταράκτρου (N_i)
 - ιδιότητες υγρού (π.χ ιξώδες)

Σχηματισμοί Βιοαντιδραστήρων



Τυπικός Βιοαντιδραστήρας για αερόβιες ζυμώσεις με ανάδευση

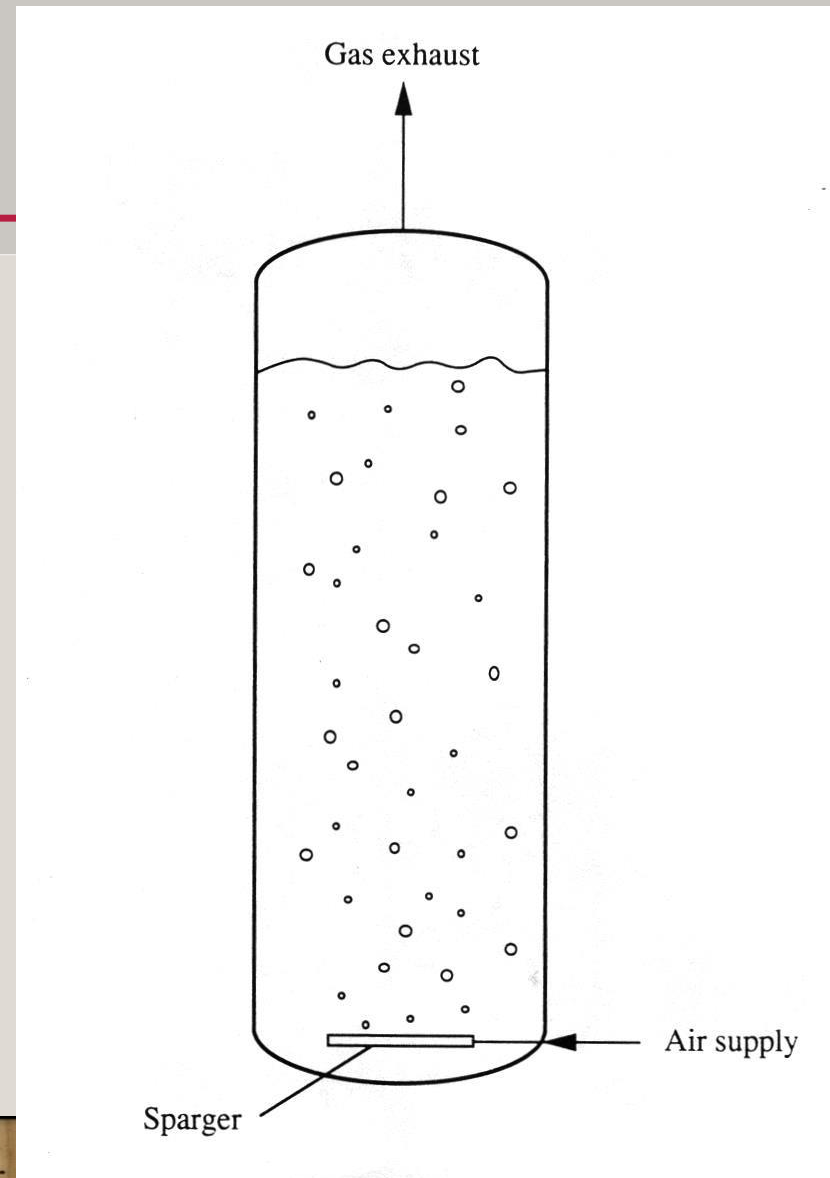
Καλός έλεγχος και ρύθμιση μεταβλητών

Αντιβιοτικά
Βιοχημικά
Ένζυμα

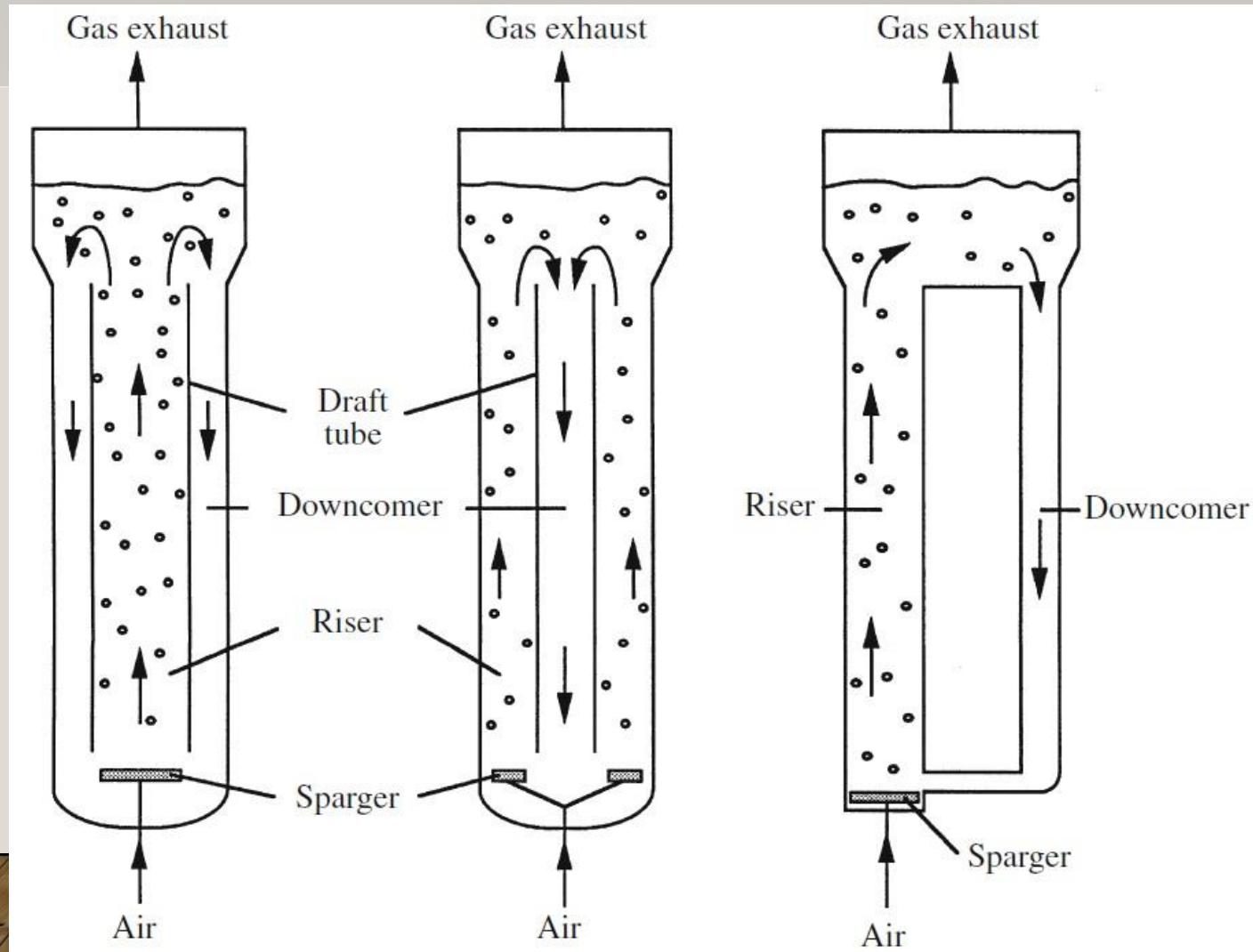
Βιοαντιδραστήρες στήλης φυσαλίδων

Χαμηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας
Ικανοποιητική μεταφορά μάζας & θερμότητας

Ζύμη αρτοποιίας
Κιτρικό οξύ



Βιοαντιδραστήρες ανοδικού ρεύματος αέρα Airlift bioreactors



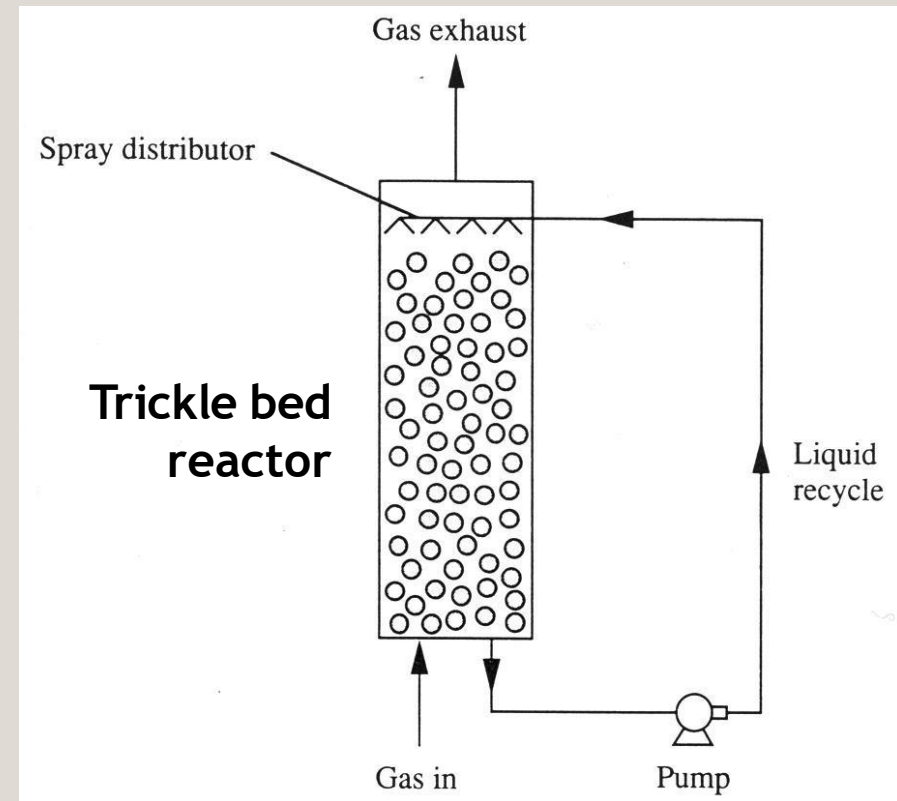
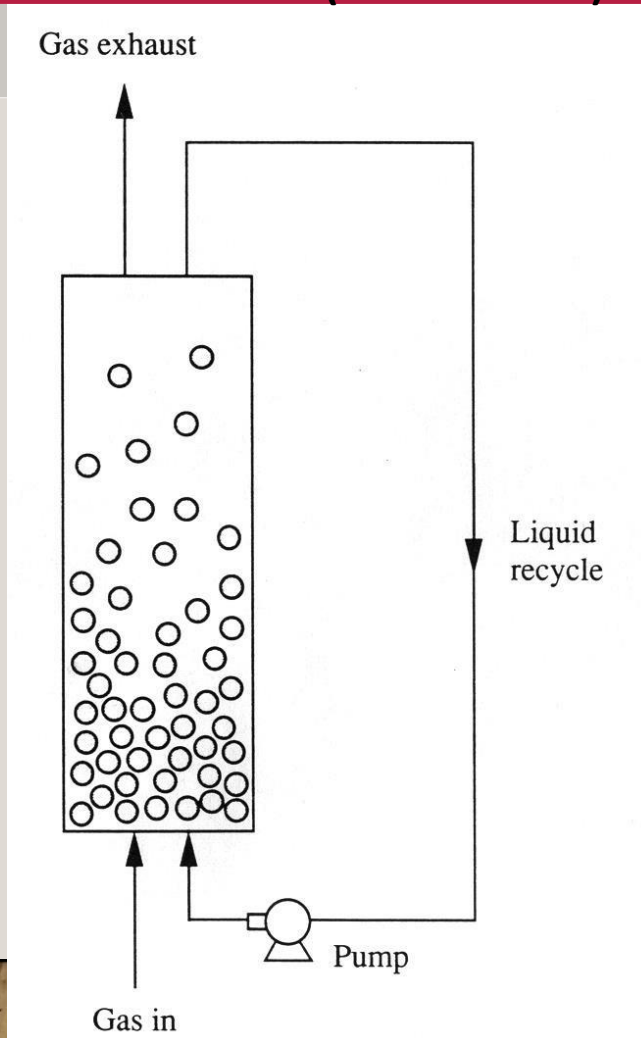
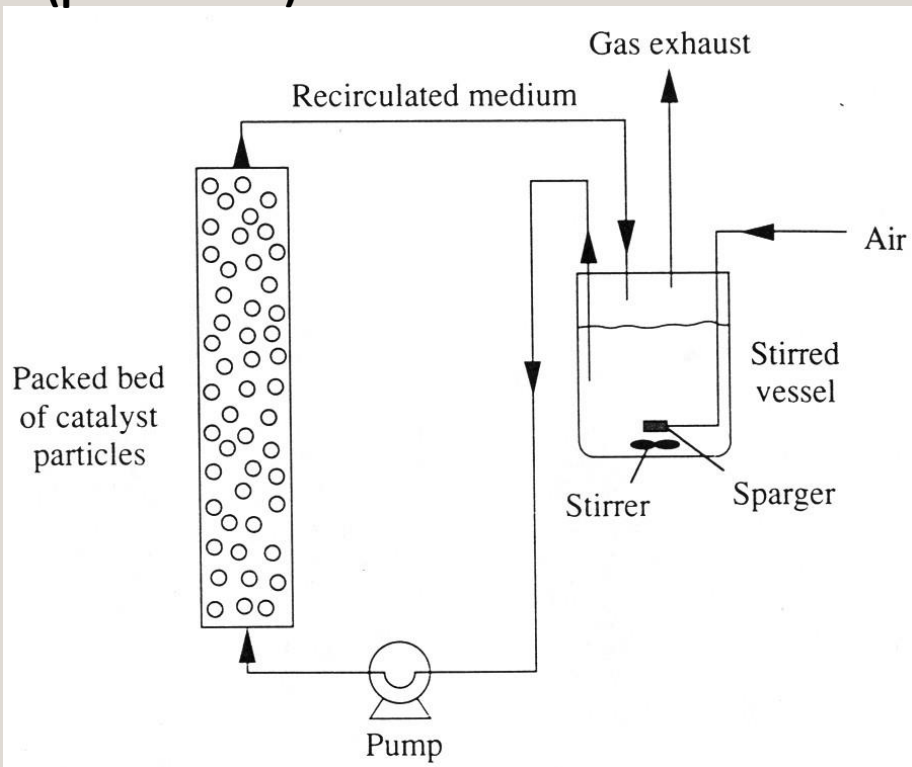
Ικανοποιητική ανάδευση
Καλή μεταφορά μάζας
Προστασία ευαίσθητων κυττάρων

Ζωικά κύτταρα
Επεξεργασία αποβλήτων

Bed bioreactors - Βιοαντιδραστήρες κλίνης

Ρευστοποιημένης κλίνης (fluidized bed)

Σταθερής κλίνης (packed bed)



Δομή Μαθήματος

Ισοζύγια μάζας
& Στοιχειομετρία

Κινητική Ενζυμικών
αντιδράσεων

Κινητική ανάπτυξης
μικροβίων & παραγωγή
Μεταβολικών προϊόντων

Εισαγωγικό
Μάθημα



Σχεδιασμός &
Μηχανική
Βιοαντιδραστήρων

Ανάντι και κατάντι
διεργασίες σε
συστήματα
βιοδιεργασιών

Κλιμάκωση βιοδιεργασιών,
μικτές καλλιέργειες,
αντιδραστήρες ετερογενούς
ανάπτυξης

Φαινόμενα μεταφοράς
μάζας και ενέργειας σε
έναν αντιδραστήρα

Βιβλιογραφία



Michael L. Shuler, Fikret Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ.

Λυμπεράτος Γ., Παύλου Στ., Εισαγωγή στη ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ, Εκδόσεις Τζιόλα, 2011

