

Bioreaktory

Sterylizacja
Pomiary
Regulacja i sterowanie

M. Kamiński

Gdańsk 2016

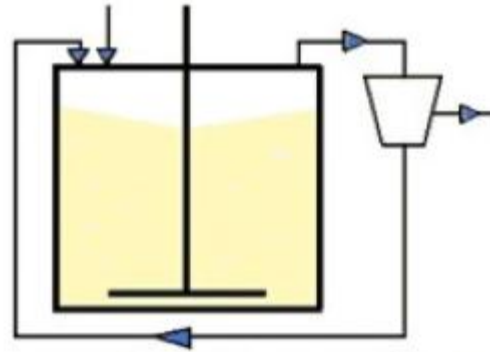
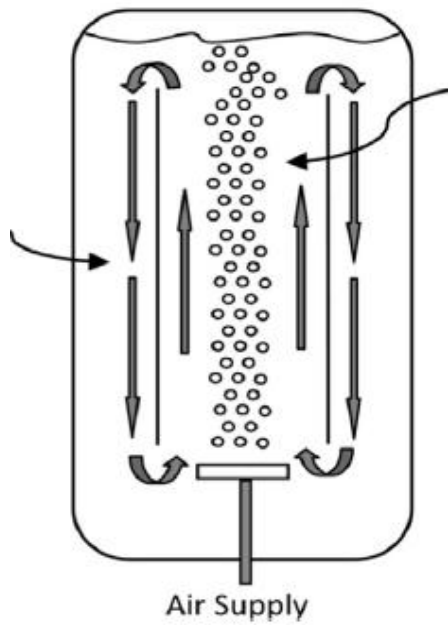
Sterylność

WARUNKI ASEPTYCZNE

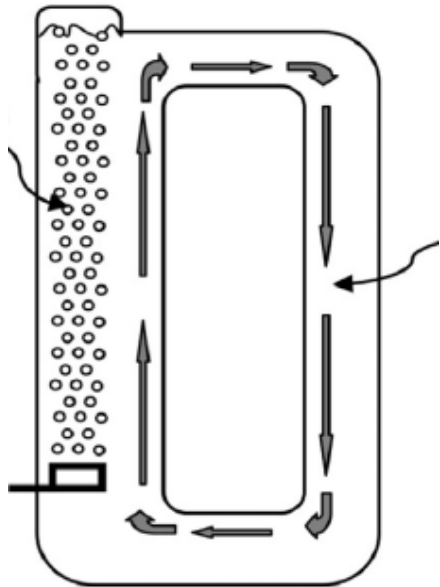
WYBÓR METODY STERYLIZACJI

METODY I MECHANIZMY STERYLIZACJI

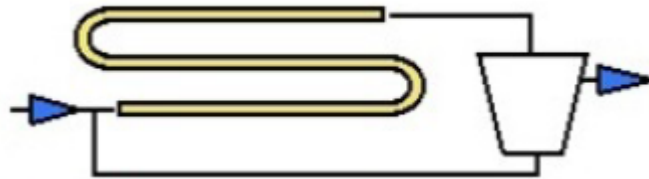
Główne rodzaje bioreaktorów



Reaktor zbiornikowy



Reaktory „air-lift”

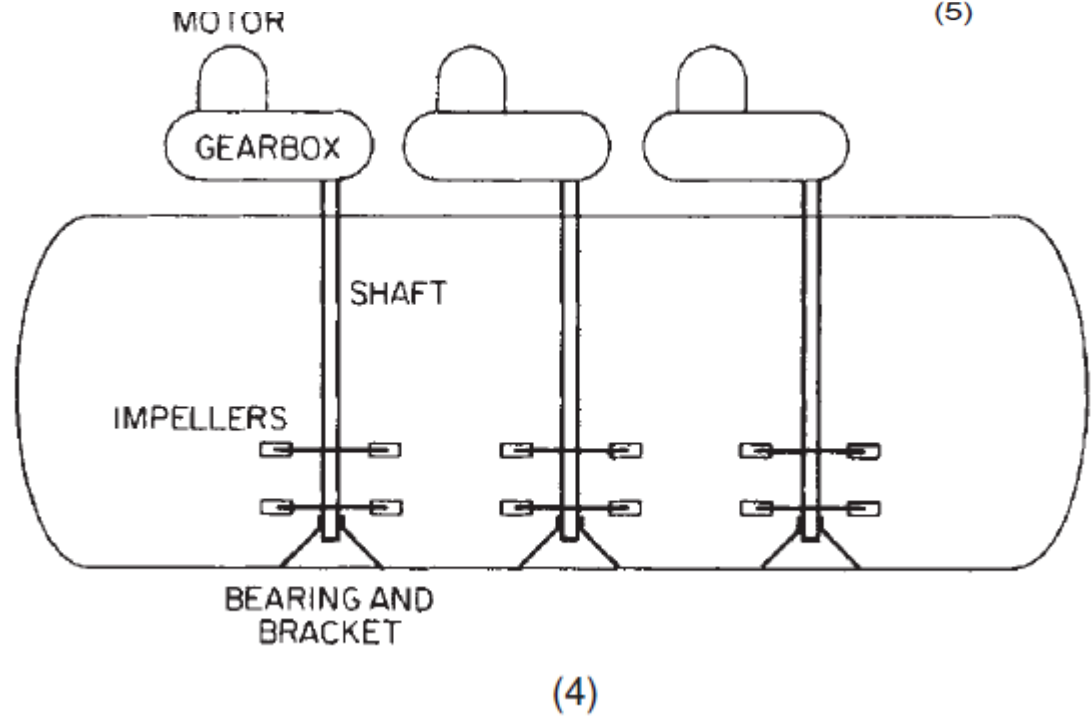
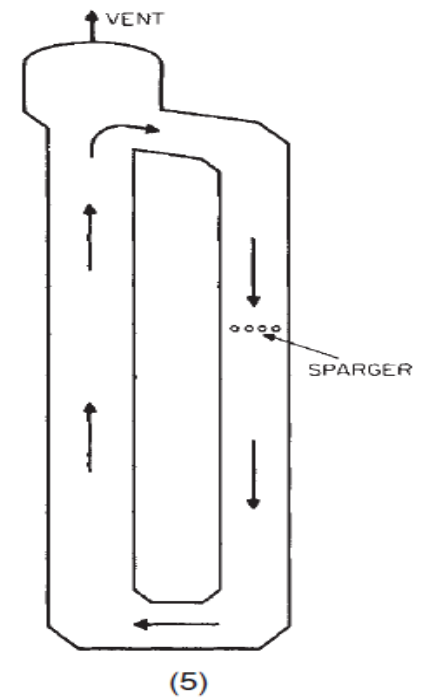
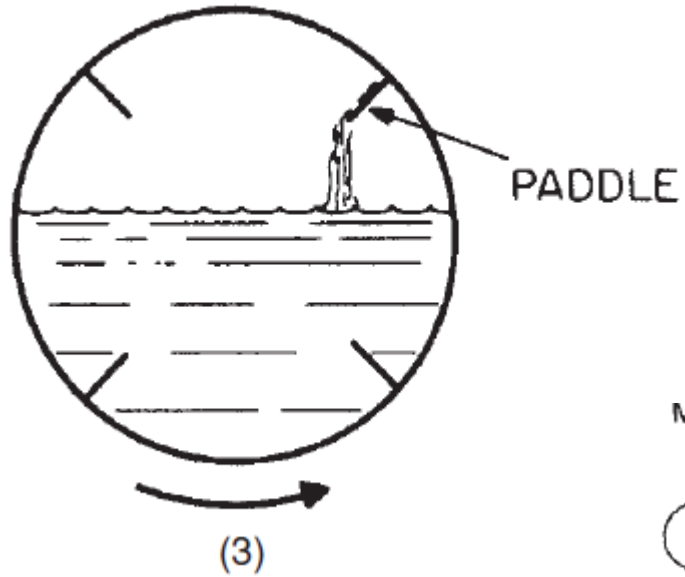


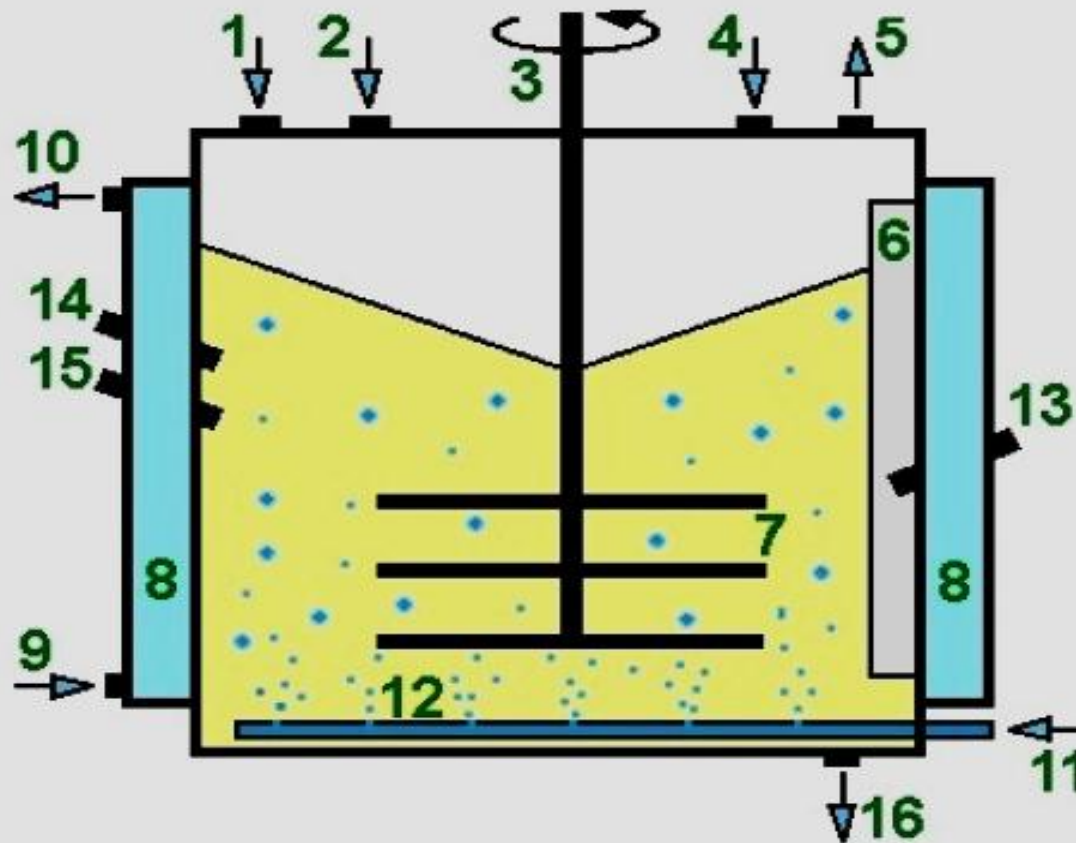
Reaktor rurowy



Reaktor wielodziałowy

BIOREAKTORY





**Bioreaktor
(fermentor) o
działaniu
okresowym,
możliwy do
przekształcenia w
ciągły**

*(taka „geometria”
posiada podstawowe
wady - jakie (!?))*

1- regulacja pH (dopływ kwasu lub ługu do regulacji pH),

2- dopływ pożywki,

3- wał z napędem,

4- dopływ środka odpeniającego,

5- odpowietrzanie,

6- odbojnik,

7- mieszadło trójtarczowe,

8- płaszcz chłodzący,

9- dopływ wody chłodzącej,

10- odpływ wody chłodzącej,

11- sprężone powietrze lub gaz,

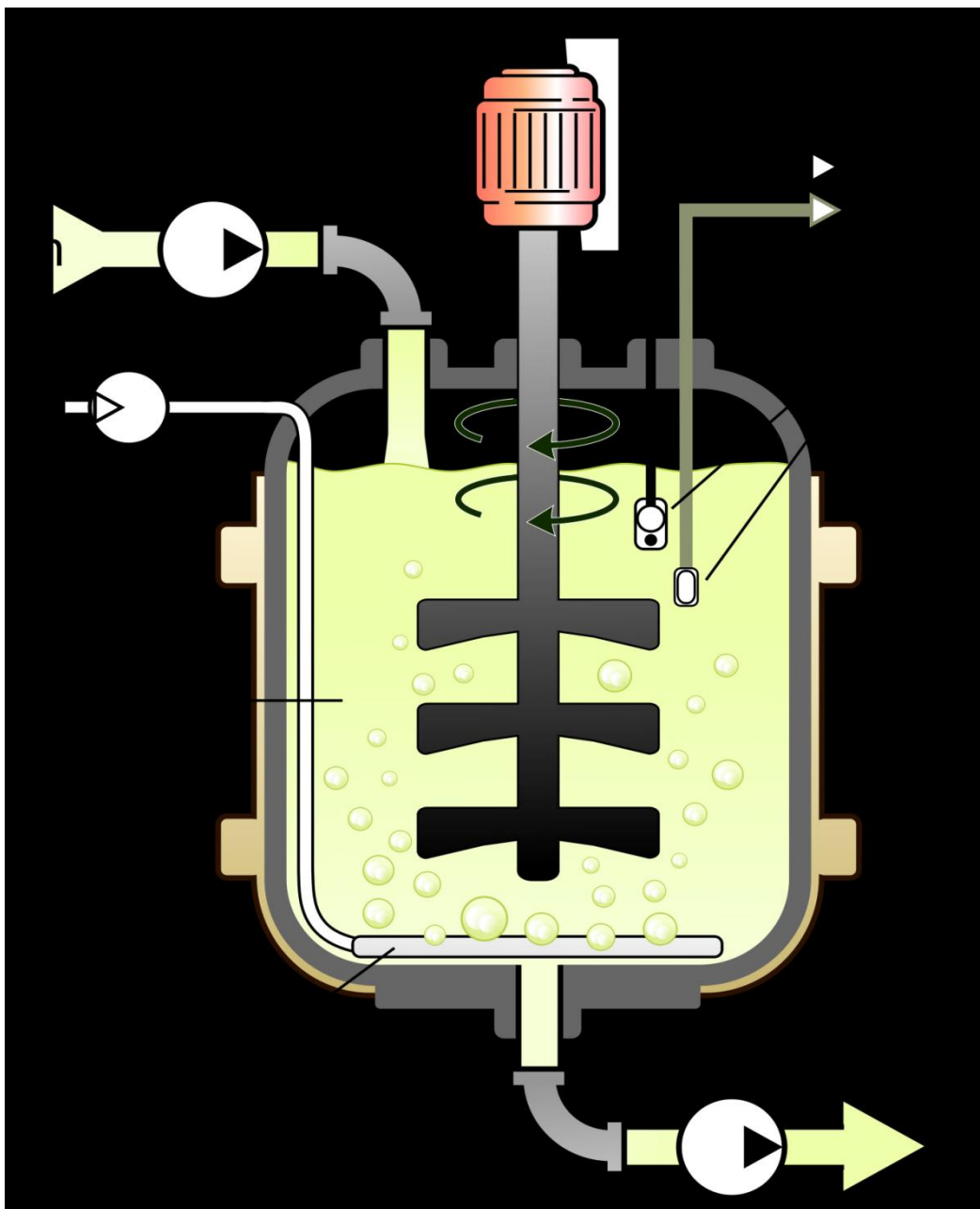
12- dyspergator powietrza,

13- kurek probierczy do autoanalizatora,

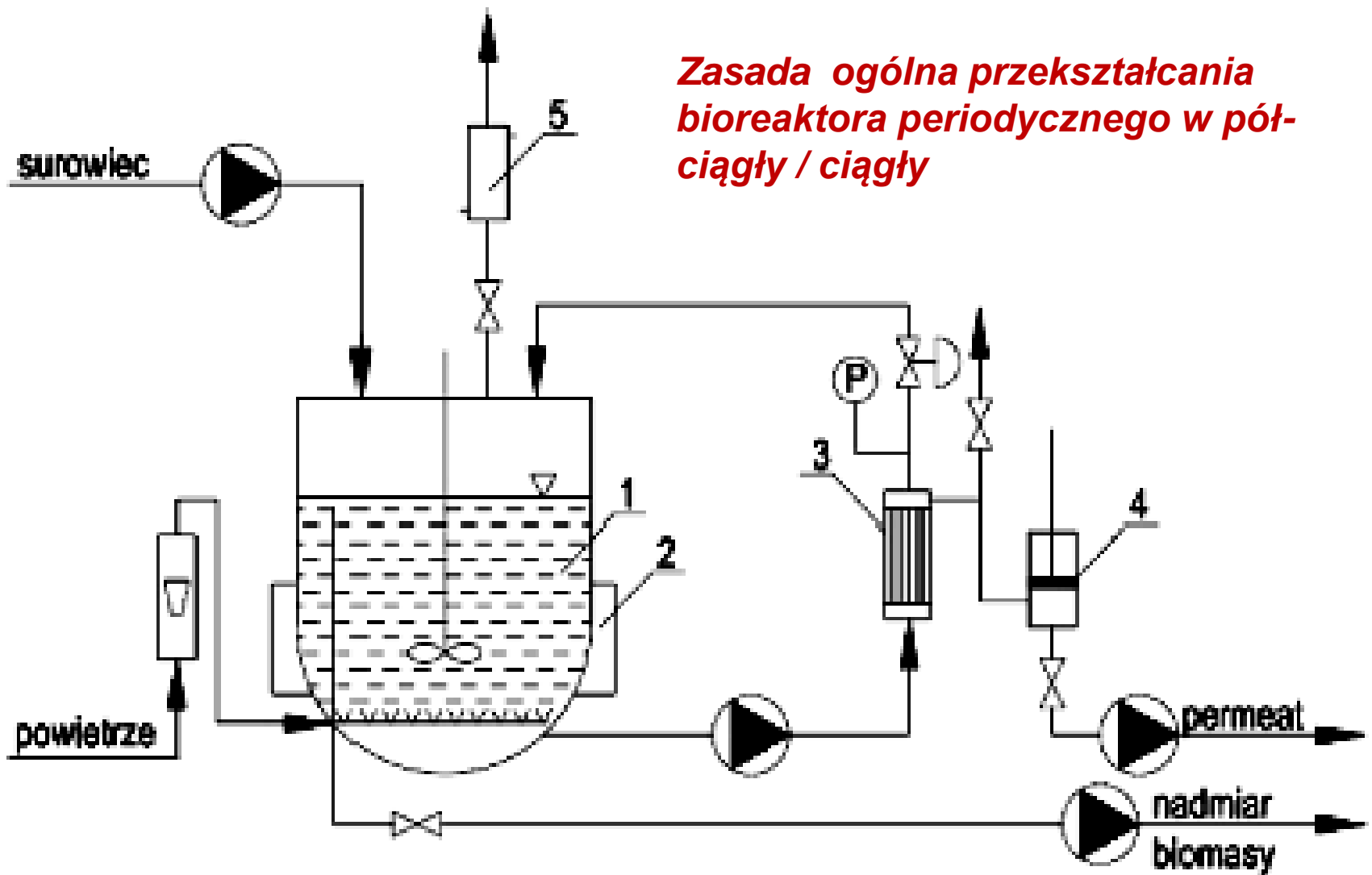
14- analizator stężenia CO₂,

15- analizator zawartości rozpuszczonego tlenu,

16- zawór do opróżniania fermentora



*Taka geometria jest
zdecydowanie
bardziej właściwa –
dlaczego (!)*

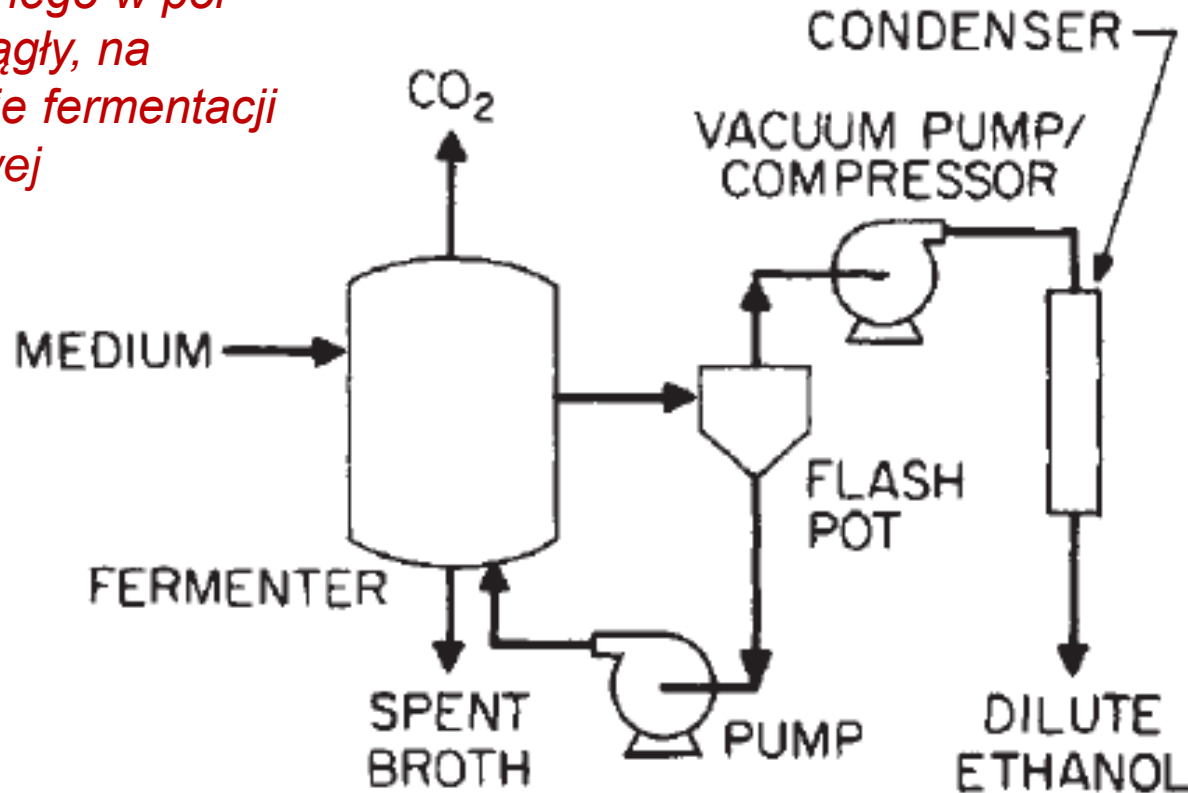


Rys. 1. Schemat bioreaktora membranowego; 1- zbiornik reaktora, 2 - płaszcz grzewczy, 3 - moduł membranowy, 4 - system płukania zwrotnego, 5 - chłodnica zwrotna

BIOREAKTORY

prof. M. Kamiński

*Zasada przekształcania
bioreaktora
periodycznego w pół-
ciągły / ciągły, na
przykładzie fermentacji
alkoholowej*



FLASH POT AT LOW PRESSURE

(6)

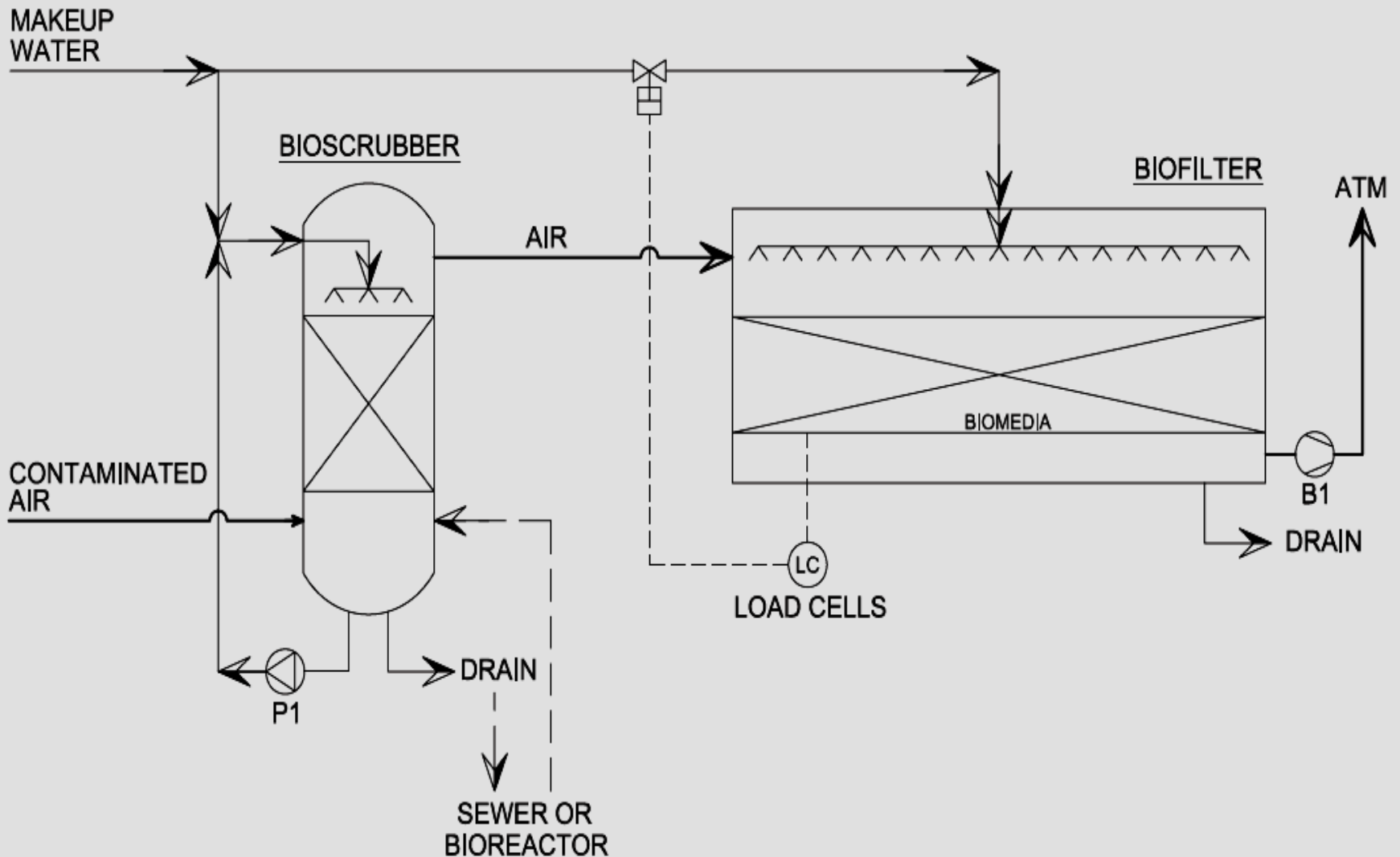


FIG. 22-18 Contaminated air is pretreated (shown: a countercurrent bioscrubber), before passing into the biofilter. Air is biofiltered, flowing downward through the media. Biomedia moisture content is accurately controlled via load-cell control of water sprays on media surface. (Courtesy of Waterleau Biofilter-Bioton, Bel-Air, www.waterleau.com.)

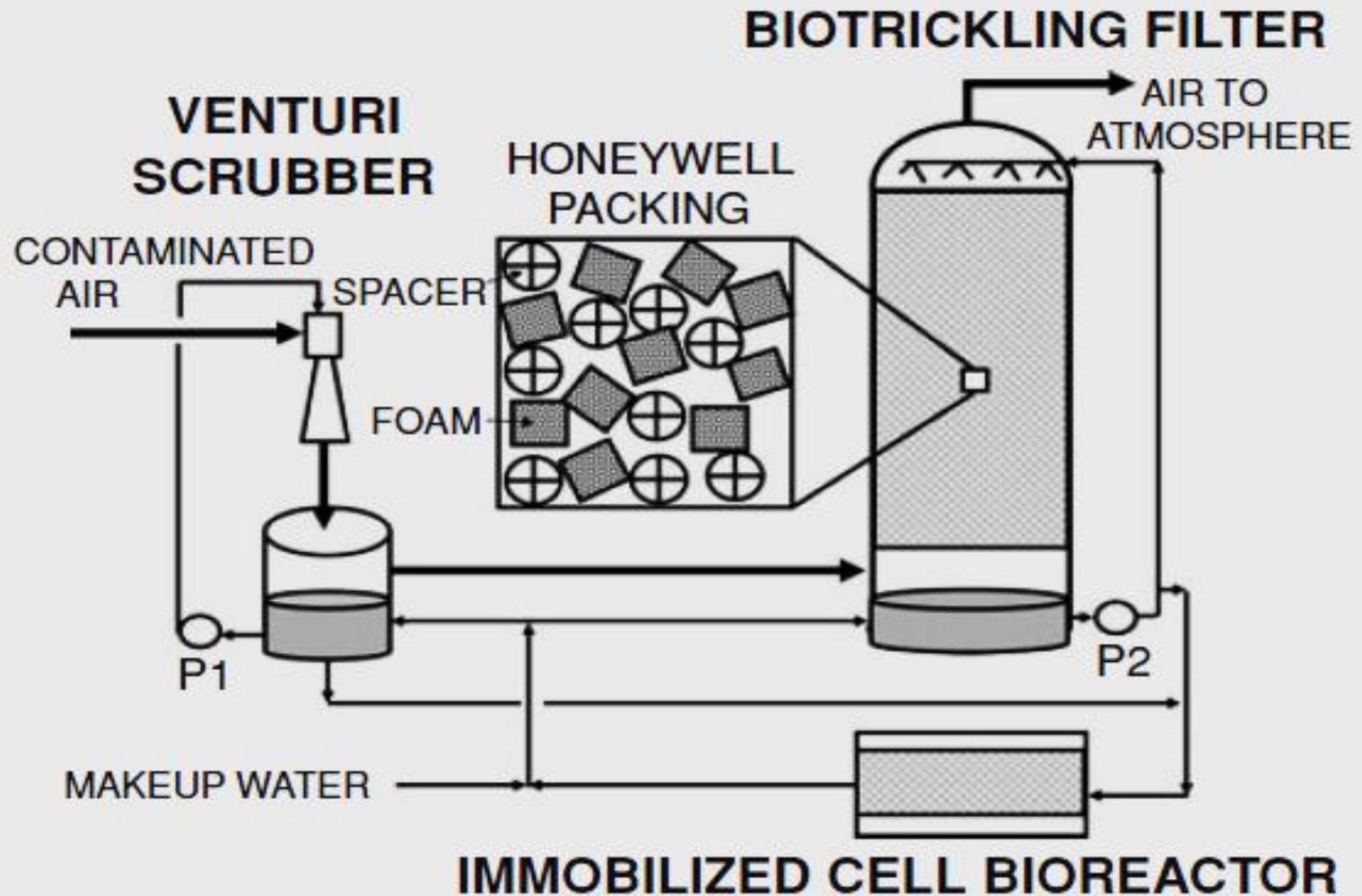


FIG. 22-19 Contaminated air is pretreated (shown: a Venturi scrubber), before passing into the biotrickling filter. Air is biofiltered, flowing downward through the media. (Courtesy of Honeywell PAI—Biological Air Treatment System, www.honeywellpai.com.)

STERYLNOŚĆ

Sterylność definiuje się jako stan wolny od mikroorganizmów, które mogą ulegać samoistnej reprodukcji tj. nie ma mikroorganizmów które są zdolne do wzrostu w danych specyficznych warunkach procesowych.

Inaktywacja żywych mikroorganizmów wskutek procedury sterylizacyjnej jest opisana funkcją eksponentylną. Oznacza to, że nigdy stężenie mikroorganizmów nie osiąga wartości 0.

Stan jałowy: prawdopodobieństwo wystąpienia drobnoustroju wynosi 10^{-6} oznacza, że jedna próbka na milion może być skażona.

WARUNKI ASEPTYCZNE

Wymogi stawiane produkcji sterylnej są integralną częścią wymogów, prawidłowej praktyki wytwarzania tj. Good Manufacturing Practice →GMP.

Nie każdy bio-proces wymaga sterylności np. w przemyśle mleczarskim wystarcza pasteryzacja, która zabija formy wegetatywne bakterii a pozostawia przetrwalnikowe.

Bio-procesy do których używane są czyste kultury mikroorganizmów muszą być realizowane w warunkach sterylnych.

Działanie w kierunku uniknięcia infekcji:

Sterylizacja bioreaktora

Stosowanie czystych kultur bakterii do zaszczepienia

Sterylizacja pożywek oraz składników doprowadzanych do reaktora

Zachowanie warunków aseptycznych podczas hodowli

Techniki sterylizacji:

Sterylizacja w wyniku oddzielenia (usunięcia) żywych mikroorganizmów

Sterylizacja w wyniku zabicia żywych mikroorganizmów

WYBÓR METODY STERYLIZACJI

zależy od:

Odporności mikroorganizmów i ich formy

Materiału reaktora

Parametrów prowadzenia procesu

Formy spoczynkowe tj. przetrwalniki, zarodniki są bardziej odporne na sterylizację termiczną niż formy wegetatywne. Zniszczenie form przetrwalnikowych wymaga $t \geq 120^{\circ}\text{C}$ i czasu sterylizacji 15÷30 min.

Komórki wegetatywne drobnoustrojów w roztworach wodnych w temp. $t \pm 70-80^{\circ}\text{C}$ giną zwykle po kilku minutach.

METODY I MECHANIZMY STERYLIZACJI

Sterylizacja termiczna polega na nieodwracalnej termicznej dezaktywacji białek kluczowych dla życia mikroorganizmów.

Wrażliwość termiczna rośnie ze wzrostem zawartości wody.

Dlatego też sterylizacja parą wodną przebiega szybciej niż sterylizacja suchym powietrzem, podczas której szybkość nagrzewania materiału jest niższa i następuje wysychanie materiału.

Promieniowanie elektromagnetyczne - może powodować uszkodzenie DNA.

- **Promieniowanie nadfioletowe** działa wyłącznie na warstwę powierzchniową substancji sterylizowanej.
- **Promieniowanie X lub γ** penetruje w głąb materiału

Czynniki chemiczne mogą oddziaływać destrukcyjnie w stosunku do materiału biologicznego, niszczyć błony komórkowe, denaturować enzymy.

Metody fizyczne

Metody termiczne

(nasycona para wodna lub wrząca woda pod podwyższonym ciśnieniem temp. 115÷140 °C, gorące suche powietrze o temp. 160÷200°C).

Filtracja wyjąłwiająca

(filtracja wgłębna na filtrach włóknikowych o przeciętnej średnicy 0,2μm; materiały filtracyjne muszą być sterylizowane przed zastosowaniem do wyjąłławiania).

Metody radiacyjne

(nadfiolet, promieniowanie γ , promieniowanie X, strumień elektronów z akceleratora, wykorzystuje się radioizotopy kobaltu-60, cezu-137).

Metody chemiczne

Roztwory chemicznych środków wyjąławiających działające powierzchniowo (*sterylizacja pomieszczeń i sprzętu*)

Formalina 10%,

Aldehyd glutarowy 2%

Fenol 1%

Pochloryn sodu

Etanol 70%

Izopropanol

Związki jodu i chloru

Czwartorzędowe zasady amoniowe

Tlenek etylenu

Wybór metody sterylizacji

Wybór metody sterylizacji zależy od:
Odporności mikroorganizmów i ich formy
Materiału reaktora
Parametrów prowadzenia procesu

Formy spoczynkowe tj. przetrwalniki, zarodniki są bardziej odporne na sterylizację termiczną niż formy wegetatywne. Zniszczenie form przetrwalnikowych wymaga $t \pm 120^{\circ}\text{C}$ i czasu sterylizacji 15÷30 min.

Komórki wegetatywne drobnoustrojów w roztworach wodnych w temp. $t \pm 70-80^{\circ}\text{C}$ giną zwykle po kilku minutach.

Efektywność sterylizacji

zależy od (*stosownie do rodzaju zastosowanej techniki*):

Temperatury

Natężenia strumienia energii promieniowania

Stężenia substancji chemicznej

Czasu działania

Wilgotności

Obecności tlenu

Odporności poszczególnych drobnoustrojów

Szybkość termicznego obumierania mikroorganizmów podczas sterylizacji wysoką temperaturą (suche ciepło) lub nasyconą parą wodną

$$-\frac{dN(t)}{dt} = kN(t) \qquad - \int_{N_0}^N \frac{dN(t)}{N(t)} = -k \int_0^t dt$$

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -k \cdot t$$

k- stała kinetyczna śmierci cieplnej
k = f (t, rodzaj mikroorganizmów)

$$\ln\left(\frac{1}{10}\right) = k \cdot D_{temp}$$

$$D_{temp} = \frac{2,303}{k}$$

T [°C]	D [min]
100	4743
105	696
110	102
120	2,3
130	0,047
140	0,001

Czas dziesięciokrotnej redukcji zależy od rodzaju mikroorganizmów i sposobu sterylizacji:

Suche ciepło *Bacillus subtilis* 30 min (sterylizacja mniej efektywna niż parą wodną).

Nasyconą parą wodną *Bacillus stearothermophilis* 1,5 min.

Czas śmierci termicznej – minimalny okres czasu niezbędny dla zniszczenia organizmu w danej temperaturze

Temperatura śmierci termicznej – najniższa temperatura niezbędna dla zabicia drobnoustroju w czasie 10 min

Energia aktywacji śmierci termicznej- drobnoustrojów jest znacznie wyższa od energii aktywacji rozkładu termicznego wielu związków organicznych i wynosi 200-400 kJ/mol.

Minimalny czas sterylizacji. Jeżeli przyjmie się że prawdopodobieństwo powodzenia sterylizacji wynosi P , a początkowe zanieczyszczenie mikrobiologiczne wynosi N_0 komórek, na rozważaną ilość materiału V to min. czas sterylizacji wynosi:

$$t = D_{\text{temp}} * \log\left(\frac{N_0 * V}{P}\right)$$

REALIZACJA STERYLIZACJI:

Sterylizacja termiczna może być prowadzona w wyniku bezpośredniego podawania pary do aparatu sterylizowanego.

Autoklawy: do sterylizacji pożywek i bioreaktorów laboratoryjnych.
Temperatura i ciśnienie pary nasyconej podawanej do autoklawu wynosi:
W warunkach laboratoryjnych $t=115\div 121^{\circ}\text{C}$ $\tau=15\div 30$ min
W warunkach przemysłowych temp. i czas τ sterylizacji są różne

Suszarki – do sterylizacji szkła laboratoryjnego sterylizacja suchym powietrzem $t=150\div 180^{\circ}\text{C}$

Sterylizacja „żywą parą” – do bioreaktorów przemysłowych oraz rurociągów i przewodów. Fermentory sterylizuje się zarówno puste jak i napełnione pożywką. Media hodowlane o dużej lepkości i wykazujące tendencję do rozkładu pod wpływem podwyższonej temperatury winny być sterylizowane.

Niepożądane skutki sterylizacji termicznej pożywek:

Karmelizacja roztworów sacharydów

Hydrolyza związków

Dezaktywacja witamin

Polimeryzacja

Denaturacja białek

STERYLIZACJA CIĄGŁA:

Prowadzona w przepływie ciągłym w wymiennikach ciepła.

Ogrzewanie:

Przeponowe – ogrzewanie do $t=140^{\circ}\text{C}$, czas trwania-kilka minut,

Bezprzeponowe – para wodna bezpośrednio do sterylizowanego płynu

Energia aktywacji:

Energia aktywacji śmierci termicznej drobnoustrojów: 200÷400 kJ/mol

Energia aktywacji niekorzystnych reakcji zachodzących między składnikami pożywki-ok. 3 razy niższa:

$80 < E \text{ (kJ/mol)} < 130 \text{ kJ/mol}$

Zalety sterylizacji ciągłej SC

Istotne skrócenie czasu trwania SC w stosunku do sterylizacji periodycznej

Krótki czas trwania SC-nie dochodzi znaczącej degradacji pożywki tj. skład pożywki pozostaje praktycznie niezmienny

Mniejsze zużycie energii, w porównaniu ze sterylizacją periodyczną

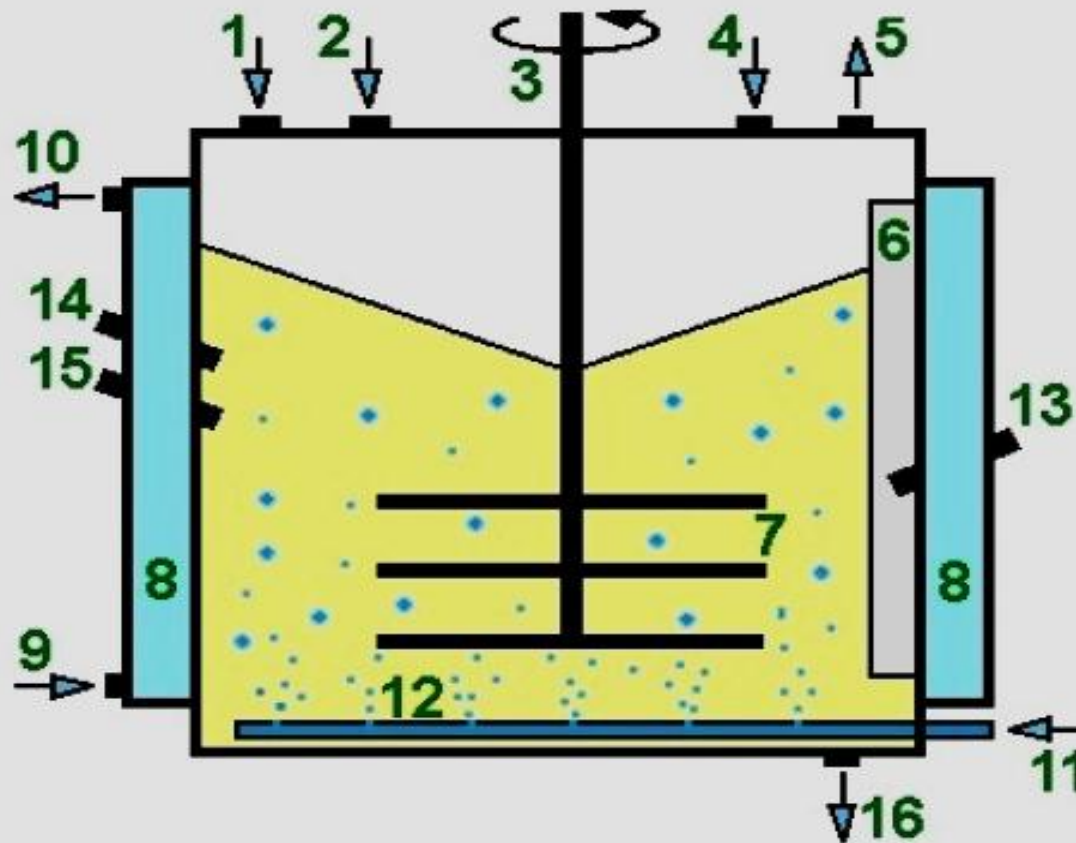
Większa efektywność (skuteczność)

Łatwość kontroli czasu kontaktu i temperatury

Czasami nie da się zastosować sterylizacji ciągłej

Pomiary / regulacja / sterowanie

- *Wielkości, parametry mierzone / sterowane (regulowane)*
- *Stosowane czujniki / metodyki pomiarowe*
- *Stosowane zasady regulacji (sterowania)*
- *Problemy, z którymi należy się liczyć:*
 - *„dynamika”*
 - *„zakłócenia”*



**Bioreaktor
(fermentor) o
działaniu
okresowym,
możliwy do
przekształcenia w
ciągły**

*(taka „geometria”
posiada podstawowe
wady - jakie (!?))*

1- regulacja pH (dopływ kwasu lub ługu do regulacji pH),

2- dopływ pożywki,

3- wał z napędem,

4- dopływ środka odpeniającego,

5- odpowietrzanie,

6- odbojnik,

7- mieszadło trójtarczowe,

8- płaszcz chłodzący,

9- dopływ wody chłodzącej,

10- odpływ wody chłodzącej,

11- sprężone powietrze lub gaz,

12- dyspergator powietrza,

13- kurek probierczy do autoanalizatora,

14- analizator stężenia CO₂,

15- analizator zawartości rozpuszczonego tlenu,

16- zawór do opróżniania fermentora

Komputerowy system sterowania - wykorzystanie sygnałów czujników pomiarowych

Touch Screen Controller



pH, DO, Temp, Pump, ORP, Pressure Compensation



pH, DO, Temp, RPM, Foam, Feed, Pressure, Alarm Setup



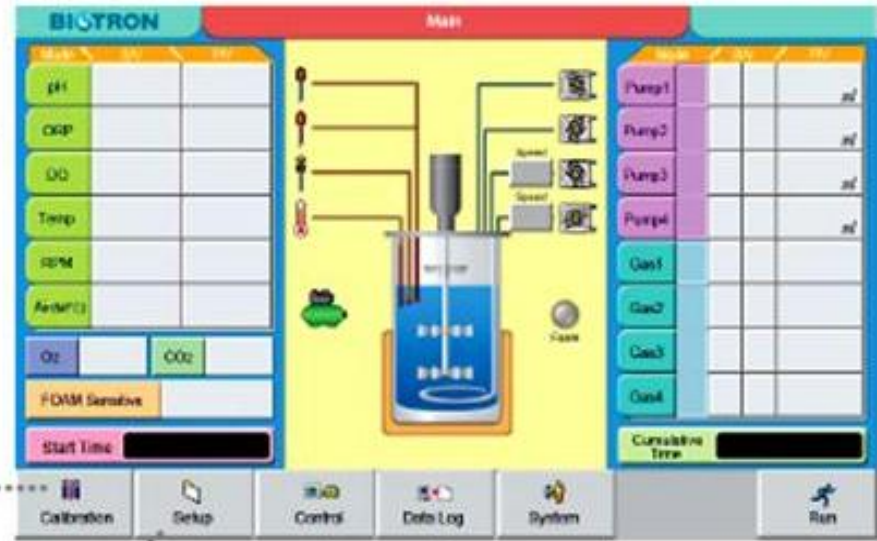
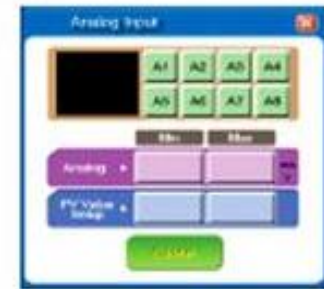
Fed-Batch, pH Control, DO control, Interface Setup



Data Record and Storage



Hardware Setup



Typowe wyposażenie bioreaktora przemysłowego do tlenowej fermentacji węgłębnej prowadzonej w warunkach sterylnych

-- Bioreaktor z doprowadzaniem / odprowadzaniem ciepła --

Układ pomiaru i regulacji temperatury.

Układ pomiaru i regulacji pH.

Układ regulacji prędkości obrotowej mieszadła

Instalacja doprowadzania powietrza poprzez system pomiaru (kontroli) natężenia i odprowadzania gazów pofermentacyjnych (zawsze przez układy filtrujące)

Układy pomiaru i regulacji ciśnienia parcjalnego tlenu, składu powstających gazów (*z reguły czujniki elektrochemiczne*)

Filtr(y) powietrza.

Układ pomiaru i regulacji ciśnienia w reaktorze.

Układ doprowadzania pożywki („podłoża hodowlanego”).

Układ / układy zasilania dodatkowego.

Układ doprowadzania materiału posiewowego.

Układ sterylnego poboru próbek.

Pomiar wysokości piany i instalacja doprowadzania substancji gaszących pianę.

Układ poboru próbek;

Instalacja roztworu myjącego;

Instalacja sterylizacji („sanityzacji”) - „in situ” / „ex-situ”

CHARAKTERYSTYKA PIANY:

Piana nie powstaje gdy występuje jedna, czysta ciecz.

Powstawaniu piany w BR sprzyja mieszanie związków dostarczanych w pożywkach oraz wytwarzanych przez drobnoustroje (glikolipidy, białka).

Piana jest układem dwufazowym:

L-faza ciągła

G-faza zdyspergowana

Pęcherze gazu oddzielone są od siebie lamelami tj. cienkimi błonkami cieczy. Mówi się o dużych grubościach lameli, jeśli $d > 1000 \text{ \AA} = 10^{-7} \text{ m}$.

Piany właściwe – utrwalone warstwą monomolekularną SPC (substancji powierzchniowo czynnej)

Piany zmineralizowane – utrwalone substancją nierozpuszczalną

Piany suche: poliedralne, trwałe

Piany mokre: kuliste, nietrwałe – wysokość warstwy d_{pech} (pęcherza)

Pomiary, w tym – temperatury, pH, P_{O_2} , mętności (najczęściej turbidymetrycznie), prędkości obrotowej mieszadła, poziomu płynu, poziomu piany, natężenia przepływu strumieni ciekłych / gazowych, składu gazów z „biosyntezy”, składu brzezki fermentacyjnej, ...



Features of FUNDALUX® II Systems

- In-line turbidity measurement
- In-situ sterilizable or autoclavable probes
- Integrated in BBI control systems
- For microbial cultures and cell cultures
- Up to 6 AU (absorbance units)
- Seal-less optic design
- LED sapphire optics
- Probes with material certificate

Pomiar składu gazów / wybranych składników brzezki – najczęściej wykonywany w trybie „ex-situ”

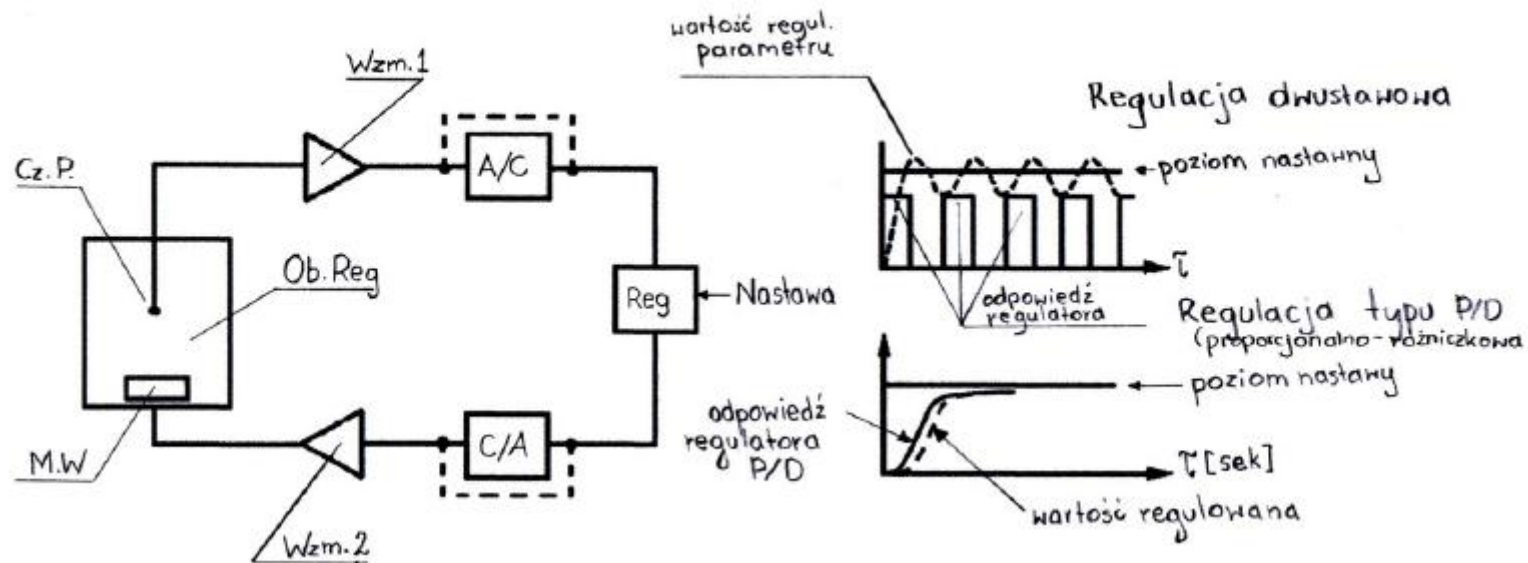
SAMPLING SYSTEM



Sampling system
Designed for contamination free



Układy regulacji wymagają dokonania pomiaru regulowanej wielkości, przetworzenia na „uchyb” po porównaniu z wartością aktualnie wymaganą, a następnie uruchomienia „ustroju wykonawczego”, który ma za zadanie minimalizację „uchybu”



Rys. Zasada regulacji z przetwarzaniem pomiarowego sygnału analogowego na postać cyfrową oraz sygnału cyfrowego na analogową odpowiedź regulatora – odpowiedzi regulatorów na zmianę nastawy

Oznaczenia:

Ob. Reg. – obiekt polegający regulacji,

Cz. P. – czujnik pomiarowy,

Wzm.1 – wzmacniacz sygnału pomiarowego,

A/C – przetwornik analogowo-cyfrowy,

Reg – regulator,

Nastawa – wartość nastawy regulowanego parametru,

C/A – przetwornik cyfrowo-analogowy,

Wzm.2 – wzmacniacz sygnału regulacyjnego,

MW – moduł wykonawczy regulatora

Wielkości regulowane, np.: temperatura, poziom cieczy, prędkość obrotów mieszadła, natężenie przepływu (np. doprowadzanie pożywki), zawartość O_2 w cieczy, pH, itd.

— przebieg sygnałów w przypadku regulacji „cyfrowej”

- - - przebieg sygnałów w przypadku regulacji „analogowej”