

# Biotechnológia félüzemi léptékben

## Fekete Erzsébet

Készült: Debreceni Egyetem  
Biomérnöki Tanszék  
Debrecen  
2015

Terjedelem: 111 oldal

Kézirat lezárva: 2015.10.29.

*A tananyag elkészítését a Munkaerő-piaci igényeknek megfelelő, gyakorlatorientált képzések, szolgáltatások a Debreceni Egyetemen Élelmiszeripar, Gépészet, Informatika, Turisztika és Vendéglátás területen (Munkaalapú tudás a Debreceni Egyetem oktatásában) **TÁMOP-4.1.1.F-13/1-2013-0004** számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.*

**SZÉCHENYI** 



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

Európai Unió  
Európai Szociális  
Alap



**BEFEKTETÉS A JÖVŐBE**

**Szeretnénk megköszönni Rác Viktóriának (kutató-fejlesztő, TEVA Gyógyszergyár Zrt.) a jegyzet lektorálását.**

# Tartalomjegyzék

<b>1. BEVEZETÉS.....</b>	<b>5</b>
<b>2. FÉLÜZEMI FERMENTOR.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. FERMENTORRAL SZEMBEN TÁMASZTOTT KÖVETELMÉNYEK.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2. FÉLÜZEMI (150L-ES) FERMENTOR FELÉPÍTÉSE .....</b>	<b>8</b>
2.2.1. <i>Fermentortest anyaga, részei .....</i>	<i>8</i>
2.2.2. <i>Tömszelence .....</i>	<i>9</i>
2.2.3. <i>Hajtás .....</i>	<i>10</i>
2.2.4. <i>Keverő.....</i>	<i>11</i>
2.2.5. <i>Duplikátor .....</i>	<i>12</i>
2.2.6. <i>Szűrőtorony .....</i>	<i>13</i>
2.2.7. <i>Hasadótárca.....</i>	<i>13</i>
2.2.8. <i>Csövek.....</i>	<i>14</i>
2.2.9. <i>Mérő berendezések .....</i>	<i>14</i>
2.2.10. <i>Beavatkozók.....</i>	<i>21</i>
<b>2.3. FERMENTOR MŰKÖDÉSÉHEZ SZÜKSÉGES SEGÉDÁRAMOK.....</b>	<b>24</b>
<b>3. A FOLYAMATIRÁNYÍTÓ RENDSZER MŰKÖDÉSE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.1. YOKOGAWA CENTUM CS300 FELHASZNÁLÓI SZINTŰ KEZELÉSE.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2. MŰVELETEK A FOLYAMATIRÁNYÍTÓ RENDSZEREN .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. <i>Alapműveletek .....</i>	<i>33</i>
3.2.2. <i>Részműveletek .....</i>	<i>34</i>
3.2.3. <i>Előkamra műveletek .....</i>	<i>34</i>
<b>3.3. FERMENTÁCIÓS PARAMÉTEREK SZABÁLYOZÁSA .....</b>	<b>37</b>
3.3.1. <i>A keverő fordulatszámának szabályozása .....</i>	<i>37</i>
3.3.2. <i>Hőmérséklet mérése és szabályozás .....</i>	<i>38</i>
3.3.3. <i>pH mérése és szabályozása .....</i>	<i>39</i>
3.3.4. <i>Oldott oxigén mérése és szabályozása .....</i>	<i>40</i>
3.3.5. <i>Bemenő levegő mérése és szabályozása.....</i>	<i>41</i>
3.3.6. <i>A nyomás szabályozása .....</i>	<i>41</i>
<b>4. AUTOMATA ÉS MANUÁLIS MŰVELETEK .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1. STERILEZÉSI MŰVELETEK FÉLÜZEMI LÉPTÉKBEN .....</b>	<b>43</b>
4.1.1. <i>Levegőszűrő sterilizáció .....</i>	<i>43</i>
4.1.2. <i>A fermentor üres sterilizáció gőzzel.....</i>	<i>44</i>
4.1.3. <i>Tömszelence sterilizáció .....</i>	<i>44</i>

4.1.4.	<i>Fermentor feltöltése táptalajjal.....</i>	45
4.1.5.	<i>A táptalaj in situ sterilizációja.....</i>	45
4.2.	<b>FELSŐLEVEGŐ MŰVELETE.....</b>	51
4.3.	<b>AZ OLTÁS MŰVELETE .....</b>	51
4.4.	<b>FERMENTÁLÁS MŰVELETE .....</b>	53
4.5.	<b>FERMENTÁCIÓ BEFEJEZÉSÉVEL KAPCSOLATOS MŰVELETEK.....</b>	54
4.5.1.	<i>Részleengedés/Leengedés.....</i>	54
4.5.2.	<i>Inaktiválás .....</i>	55
4.5.3.	<i>Kiürítés .....</i>	55
4.5.4.	<i>Készülék mosása.....</i>	56
5.	<b>FÉLÜZEMI FERMENTÁCIÓS GYAKORLATOK.....</b>	57
5.1.	<b>FÉLÜZEMI FERMENTOR STERILIZÁCIÓJA .....</b>	57
5.2.	<b>BATCH FERMENTÁCIÓS GYAKORLAT .....</b>	64
5.3.	<b>FED-BATCH TENYÉSZTÉSI GYAKORLAT .....</b>	72
6.	<b>A LÉPTÉKNÖVELÉS (SCALE-UP) KRITIKUS PARAMÉTEREI.....</b>	79
6.1.	<b>INOKULÁSI JELENTŐSÉGE A LÉPTÉKNÖVELÉS SORÁN .....</b>	80
6.2.	<b>KEVERTETÉSSEL KAPCSOLATOS LÉPTÉKNÖVELÉSI TÉNYEZŐK .....</b>	83
6.2.1.	<i>Keverő kerületi sebessége.....</i>	83
6.2.2.	<i>Keverési idő.....</i>	84
6.2.3.	<i>Egységnyi térfogatba bevitt energia.....</i>	86
6.3.	<b>HŰTÉSI IGÉNY A LÉPTÉKNÖVELÉSSEL .....</b>	90
6.3.1.	<i>Mikrobák metabolikus hőtermelése.....</i>	91
6.3.2.	<i>A keverő által leadott hőmennyiség .....</i>	91
6.4.	<b>LEVEGŐZTETÉSSEL KAPCSOLATOS LÉPTÉKNÖVELÉSI PARAMÉTEREK.....</b>	94
6.4.1.	<i>Oxigén oldhatósága folyadékban .....</i>	94
6.4.2.	<i><math>K_L a</math>, mint léptéknövelési paraméter .....</i>	95
6.5.	<b>A RÁADAGOLÁS LÉPTÉKNÖVELÉSE.....</b>	104
7.	<b>FELHASZNÁLT ÉS AJÁNLOTT IRODALOM .....</b>	111

## 1. Bevezetés

A biotechnológia a biokémiának, a mikrobiológiának és a műszaki tudományoknak az integrált felhasználása annak érdekében, hogy az élőlényeknek (jellemzően mikroorganizmusoknak), valamely képességét ipari termelési célokra alkalmazzuk. A biotechnológia egy interdiszciplináris alkalmazott tudomány, ahol a biomérnök feladata, hogy a biotechnológiai eljárásokat a valóságban, termelő ipari léptékben működtetni tudja. Ez azt jelenti, hogy a laboratóriumi folyamatok léptéknövelését meg kell oldani, az ipari termelő technológiákat meg kell tervezni és meg kell valósítani, és a már működő technológiákat optimális szinten üzemeltetni kell. A fermentor egy olyan speciálisan kialakított reaktor, amelyben élő anyagok (baktériumok, sugárgombák, penészgombák, esetleg növényi vagy állati, emberi sejtek) alkalmazásával történő folyamatokat végzünk, tanulmányozunk bennük. A fermentációs technika ebben az előállítási folyamatban nagyon fontos helyet foglal el, mert a hasznos munkára fogott sejteket, sejtalkotókat, enzimeket előállítja és segítségével véghezviszi a termék előállítását.

Egy piacképes termék előállítását a biotechnológiában hosszú laboratóriumi kísérletek előzik meg, mely során az alkalmazott mikroorganizmus törzsfejlesztésen esik át az adott termék túltermeltetésének érdekében. A kitűzött cél megvalósításához az alkalmazott mikrobára, annak kiválasztott anyagcsere útvonalára optimalizált környezet létrehozása ugyanilyen fontos része a megvalósításnak. Csak akkor gazdaságos a termék előállítása, ha ez nagy volumenben úgynevezett ipari léptékben is megvalósítható. Az esetek többségében termelői léptékben nem lehet biztosítani a laboratóriumi kísérletek során optimalizált paramétereket. Így szükséges egy köztes optimalizálási lépés, mely során a kísérleti eredményeket viszonylag kis költséggel, de már a termelői körülményekhez hasonló módon megvalósítható. Ezt nevezik a biotechnológiában félüzemi léptéknek. Ez a lépték az 50-től 1000 literes térfogatú bioreaktorok alkalmazását jelenti.

E jegyzet a biomérnök hallgatók számára készült, melynek segítségével betekintést nyerhetnek a félüzemi léptékben alkalmazott fermentorok jellemző tulajdonságaiba, felépítésébe és használatába. A szak elvégzéséhez szükséges félüzemi gyakorlat teljesítése során a hallgatók szembesülnek a feladatok elvégzéséhez kapcsolódó problémákkal, melyeket a jegyzet mind elméleti, mind gyakorlati oldalról megközelít és magyaráz. A fermentor működtetéséhez elengedhetetlen folyamatirányító rendszer felhasználói szintű használatához és a fermentációs folyamatok kiértékeléséhez is segítséget nyújt. Továbbá a hallgatók megismerkedhetnek a léptéknövelés legfontosabb kritikus paraméterével, melyeknek a félüzemi léptékben történő optimalizálása elengedhetetlen a tényleges termelési gyakorlatban.

Számolási feladatok levezetésével szemlélteti egy-egy jellemző tulajdonság változását a léptéknövelés során. A példákban vett számolások nagy része nem a gyakorlatból vett adatokat használja fel, hanem a probléma megértéséhez nyújtanak kiindulási adatokat.

## **2. Félüzemi fermentor**

Egy félüzemi fermentor létesítésének célja, hogy a fermentációs technológiák alkalmazásával hatóanyagokat, fermentlevet és ezzel együtt biomasszát állítson elő, melynek során a technológia optimalizálása, fejlesztése történik és további kísérletekhez kiindulási anyagot biztosítson. Ebben a léptékben az optimalizáció idejét le lehet rövidíteni, így olcsón és hatékonyan vizsgálható a technológia hatásfoka. A meglévő technológiák és termékek esetén azok olcsóbban vizsgálhatók léptékcsökkentéssel (scale-down). Továbbá alkalmas fermentlé biztosítására a következő technológiai lépések fejlesztéséhez, kis mennyiségű termék előállítására. A fermentlé hatékonyabb feldolgozásának fejlesztéséhez szolgáltathat megfelelő mennyiségű alapanyagot. Alkalmas a vegyipari, biotechnológiai folyamatok, eszközök irányítástechnikai rendszerek magas szintű bemutatására, oktatására. Szükség esetén adagoló tartályokként is funkcionálhatnak.

### **2.1.Fermentorral szemben támasztott követelmények**

Annak érdekében, hogy egy fermentor megfelelő körülményeket biztosítson a folyamatok és az adott termék képződésének legmagasabb kihozatalához, számos általános kritériumnak meg kell felelnie. Az alkalmazott mikroorganizmus monokultúrában kell jelen lennie a tenyészközegben, tehát a táptalajnak és a mikrobával érintkező közegeknek sterilnek, illetve sterilen tarthatónak kell lennie. E két kritériumból következik, hogy a fermentornak nyomásálló edénynek kell lenni, hiszen a sterilizálás hőfoka 121 °C, amihez 1,1 bar túlnyomást kell biztosítani. A túlnyomás biztosítása a készülékben a sterilen tarthatóságnak is az egyik velejárója. A hasznos mikroba bejuttatásának feltételét steril körülmények között az alapvető kritériumok közé soroljuk. Ha süllyesztett, folyékony fermentációt hajtunk végre a folyadéknek homogénnek kell lennie, ami azt jelenti, hogy minden időpillanatban biztosítva legyenek az azonos körülmények a folyadék minden egyes pontján. Ennek a kritériumnak a megvalósításához szükséges a tökéletes kevertetés. A mikroorganizmus számára a növekedést és termelést elősegítő paraméterek szabályozhatósága alapvető feltétel. Ezek a paraméterek a következők:

- (1) Hőmérséklet mérése és szabályozása. A szabályozása történhet belső hőcserélőn keresztül és/vagy külső hőcserélővel (duplikált falú fermentorok).
- (2) Aerob fermentációk során steril levegő bejuttatásának mérése és szabályozása.
- (3) A belső nyomás szabályozhatósága.
- (4) Kevertetés szabályozása
- (5) A fermentor töltöttségének detektálása.

(6) A pH mérése és szabályozása

(7) Megfelelő oldott oxigén szint biztosítása aerob fermentációk esetén.

Ezeket túl tudunk oldatokat (szénforrás, nitrogénforrás, habzástóló, sav- és lúgoldatok) közvetlenül vagy perisztaltikus pumpával bejuttatni a belső térbe.

## **2.2.Félüzemi (150L-es) fermentor felépítése**

### **2.2.1. Fermentortest anyaga, részei**

A fermentor laboratóriumi léptékben általában üvegből készül, melynek legfőbb előnye a tisztíthatóság és a könnyen kezelhetőség. Az üveg egy meglehetősen inert anyag, az ebből való szennyeződések kioldódása, korrózió nem jellemző, és a fonalas gombákra jellemző kitapadás is elkerülhető alkalmazásukkor. Viszont nagyobb léptékben (20 L felett) már nem találkozunk üvegfalú fermentorokkal. Ennek oka az alacsony nyomás ellenállóság és a törékenysége, így e volumen felett minden esetben fémből készült fermentorokkal kell dolgoznunk.

A fémfermentorok anyaga rozsdamentes acél, mely 12,5%-ban tartalmaz krómot a korrózió ellen. Kristályszerkezete ausztenites acél, melyben a stabilizátorok a mangán, nikkel és szén. Számos előnnyel bír a biotechnológiai folyamatok során az acél ilyen jellegű kiképezése: hő- és korrózióálló, könnyen megmunkálható, nem mágnesezhető és tartós.

A biotechnológiában kiemelt fontosságú a fermentor belső felületének felületkezelése. A mikroorganizmusok a növekedésük során megtapadhatnak az érdes acélfelületen és az anyagátadási tényezők (hőátadás, oxigén abszorpció, tápanyag, pH) romlásával kerülnek hátrányos helyzetbe, továbbá a bioreaktorok tisztíthatóságát is nehezítik. Egy felület érdességét Ra és RMS értékekkel jellemzik, mely a bioreaktorok esetében 0,6 µm-t kell elérni. Ez általában mechanikai felületkezeléssel vagy elektropolírozással oldható meg.

A fermentorok nem hermetikusan zárt berendezések. Az illesztések (fedél, bemenetek, szondák, forgó elemek) tökéletes zárásához hozzátartoznak a tömítések, mely az abszolút sterilitás és a környezet védelme érdekében elengedhetetlenek. A tömítések ellenőrzését nyomástartással lehet megvizsgálni, melyet túlnyomás mellett a berendezések eresztését figyeljük. Tömítés teszt során a reaktort vízzel töltjük fel és nyomás hatására vizsgáljuk a szivárgást. A tömítéseket szivárgási fokkal jellemezhetjük és a 0,05 g/h/m alatti érték tekinthető jó tömítésnek. A forgó részek tömítését – a fermentorok esetén a keverőtengely tömítését- a tömszelence látja el. Az álló részek tömítésére lapos tömítés (ablak) vagy O gyűrűs tömítést (szondák) alkalmaznak.

A Debreceni Egyetem kísérleti üzemének fermentációs laboratóriumában egy 150 liter teljes/100 liter hasznos térfogatú fermentor található, mely aerob fermentációk végrehajtására alkalmas (1. kép). A fermentortest nyomás- és saválló acélból készült és kettős fal (un. duplikátor) veszi körül. A keverő megfelelő, steril csatlakozását egy duplacsúszógyűrűs tömszelence (Double Mechanical Seal, DMS) biztosítja. A fermentoron kialakított sterilizálható csővezeték szakaszokon lehet anyagokat ki- és bejuttatni. Batch (szakaszos) és fed-batch (rátáplálásos) fermentációs technológiát tudunk alkalmazni a készülékkel.



**1. kép** Debreceni Egyetem Kísérleti üzemének 150 literes fermentora

### **2.2.2. Tömszelence**

A keverőtengely steril csatlakozását a fermentorhoz a tömszelence segítségével oldják meg. Kiemelt fontosságú a sterilitás szempontjából, mert nem egy statikus elemről, hanem egy mozgó alkatrész, a keverőtengely tömítését oldja meg. Több típusú tömszelencét használnak a fermentációs iparban. Van nyomás és hőálló szimeringekkel tömítő, dupla csúszógyűrűs tömszelence léghűtéses zárófolyadék tartállyal, illetve vízhűtéses zárófolyadék tartállyal. A Debreceni Egyetem kísérleti üzemében dupla csúszógyűrűs tömszelence van vízhűtéses zárófolyadék tartállyal (2. kép). A zárófolyadékot a technológiai gőzből bekondenzált víz, nyomását a technológiai gőzből származó nyomás adja. A kondenzvíz a tömszelence csúszógyűrűinek kenését is biztosítja. Működés közben állandó nyomás alatt kell lennie a

sterilitás érdekében, továbbá az élettartamát is csökkenti az esetleges nyomásesés. Nem minden esetben kell végrehajtani a tömszelence sterilizését, csak nagy leállások (nyári, téli), fertőzött fermentáció, illetve a tömszelencét is érintő karbantartás után. Ha különösen nagy terhelés éri a fermentáció közben a tömszelencét, javasolt újraszterilizálni. A túl gyakori sterilizés viszont csökkenti a tömszelence élettartamát.



**2. kép** Tömszelence a zárófolyadék tartállyal és a motor

### 2.2.3. Hajtás

A fermentációs ipar a keverő meghajtásához aszinkron elektromos motorokat alkalmaz, melyre váltakozó frekvenciájú elektromos áramot kapcsolnak. Az aszinkron motorokra rákapcsolt hálózati feszültség a motor állórészén egy szinkron fordulatszámmal forgó mágneses mezőt alakít ki. A mező percenkénti fordulatszáma:

$$N = \frac{60 * f_1}{p}$$

összefüggéssel számítható ki, ahol az  $f_1$  a hálózati frekvencia, a  $p$  pedig a póluspárok száma. Ez utóbbi a motor alkotórészének illetve a tekercselésének a kialakításától függ, leggyakrabban 1,2,3,4 póluspárú motorokkal találkozhatunk. A nagyobb póluspárszám viszonylag ritka. Tehát az aszinkron motorok fordulatszámát alapvetően két tényező határozza meg, az egyik a hálózati váltakozó áram frekvenciája, a másik pedig a motor póluspárjainak

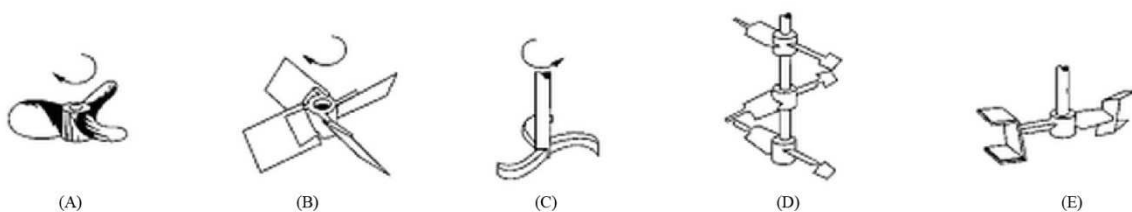
száma. A hálózati frekvencia 50 Hz, a póluspárszám pedig a motor tekercselésétől függ, így adott motornál az is fix. Az aszinkron motorok fordulatszámának fokozatmentes változtatása csak a frekvencia változtatásával lehetséges. A frekvenciaváltó egy olyan készülék, amibe bevezetjük a hálózati áramot és a kimenetére aszinkron motort kapcsolunk. A hálózati frekvencia változtatás előnye, hogy a frekvencia tág határok között változtatható. Ma már olyan mikroprocesszor által vezérelt frekvencia-átalakítóberendezések vannak, amelyek a frekvencia változtatásán kívül számos hajtástechnikai jellemzőt is befolyásolnak.

A motorok teljesítmény felvételét mérni lehet és az így kapott információkból következtetni tudunk a fermentálé reológiai tulajdonságaira és annak változásáról a fermentáció során.

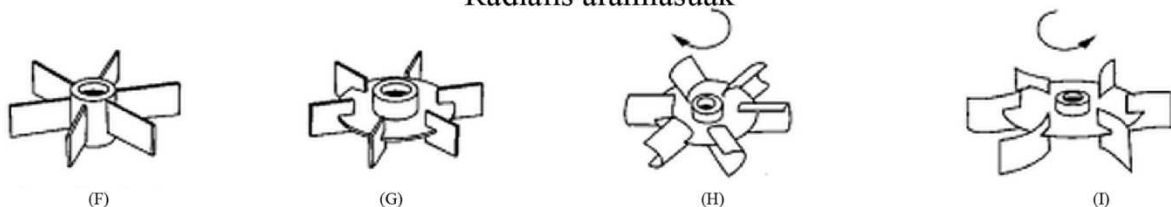
#### 2.2.4. Keverő

A keverőnek a legfontosabb feladatai a homogenizálás és az anyagtranszport fenntartása, azaz a beáramló levegő, a tápoldatban oldott vagy nem oldott tápanyagok, és a keletkezett termékek egyenletes eloszlása. Egy bioreaktor tervezésekor a keverőelemek típusa, elhelyezkedése, geometriája kiemelkedő fontossággal bír. A keverőelemek jellemző tulajdonsága az általa kifejtett nyírőerő, ami a fermentorban növekedő mikroorganizmusokra adott esetben negatív hatással is lehet. A fermentációs iparban leggyakrabban használt keverő típusokat a 3. kép mutatja be. Az axiális keverőelemek a folyadékot tengelyirányú áramlásra, míg a radiális keverőelemek a tengelyre merőleges folyadékáramlást hoznak létre.

#### Axiális áramlásúak

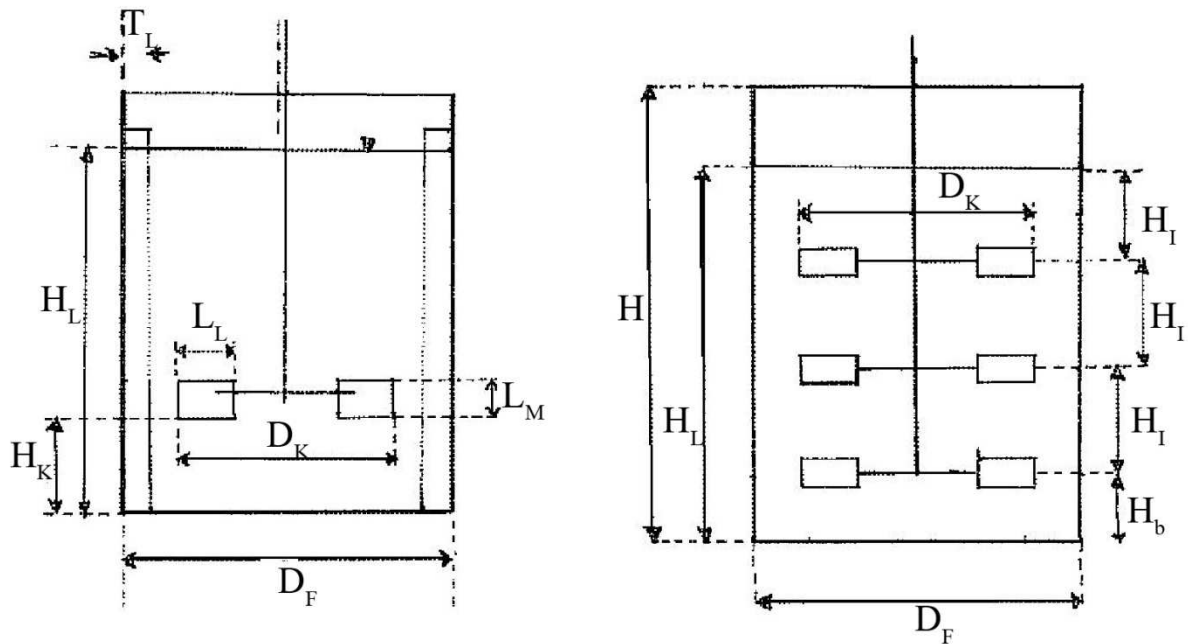


#### Radiális áramlásúak



**3. kép** (A) propeller; (B) ferde lapú turbina keverő; (C) Pfaudler hátrahajlított; (D) Ekato MIG; (E) Ekato INTERMIG; (F) Nyitott lapos keverő; (G) Rushton turbina; (H) Scaba SRGT; (I) Hátrasöprő lemezes

Laboratóriumi és félüzemi léptékben leggyakrabban használt keverőelem típus a Rushton turbina. A keverőelemek elhelyezését a fermentorban a mérnökök tapasztalatai alapján a 1. ábra mutatja be. A térfogat növekedésével a gyakorlatban magasabb, karcsú fermentorokat célszerű tervezni, ami maga után vonja, hogy több keverőelem beépítése szükséges. Ezek elhelyezkedését a fermentorban a 1. ábrán látható általános összefüggés szerint alkalmazzák.



**1. ábra** A keverőelemek méretaránya a fermentor méreteihez viszonyítva. A keverőelemek elhelyezkedése.

- Keverőelem átmérője:  $D_K = 0,3-0,4D_F$
- Torlólemezek szélessége:  $T_L = 0,1D_F$
- Alsó keverő távolsága az fermentor aljától:  $H_K = \max 0,3D_F$
- Keverőelemek egymástól való távolsága:  $2D_K > H_I > D_K$
- Keverőelemek száma (n):  $H_L/D_K - 1 > n > H_L/D_K - 2$

A gyakorlatban az alsó keverőelem általában nagyobb átmérőjű, mert ennek a feladata a levegőbuborékok diszpergálása, a további keverőelemek leginkább a homogenizálásért felelősek.

### 2.2.5. Duplikátor

A duplikátor szintén egy nyomásálló edény, mely körülöleli a fermentortestet. Ezen keresztül tudjuk fűteni és hűteni a fermentlevet. A hőmérsékletszabályozás során a hűtést hálózati vízzel oldjuk meg, mely a duplikátor alján kerül be a rendszerbe, míg a fűtés gőzzel történik és a duplikátor felső részén kerül bevezetésre. Négy szerelvény tartozik a duplikátorhoz és egy keringető szivattyú. A négy szerelvény a következő: duplikátor gőz bemenő, hűtővíz bemenő, hűtővíz elmenő és duplikátor leürítő szelep.

#### **2.2.6. Szűrőtorony**

A fermentor levegőztetéséhez elengedhetetlen a sterilre szűrt levegő, ezt a feladatot látja el a szűrőtorony (4. kép). Ez egy eldobható egység, mely átlátszó polikarbonátból készült, így észrevehetőek a szennyeződések vagy a mechanikai sérülések. A belül található szűrőbetét 0,2 µm átmérőjű pórusokat tartalmaz. Ezek képesek kiszűrni a levegőben található baktériumokat, spórákat, porszemeket. A szűrőtoronyt minden fermentáció előtt sterilizálni kell, mely során legalább 20 percig gőzt áramoltatunk a szűrőn, majd a kiszáritást követően az átáramló levegő már sterilnek tekinthető.



**4. kép Szűrőtorony**

#### **2.2.7. Hasadótárcsa**

Egy biztonsági berendezés, amely a fermentorból kilépő levegő csővezetékére van illesztve. Megvédi a fermentort a túl magas nyomástól azzal, hogy a benne lévő membrán egy bizonyos túlnyomás felett elszakad.

### **2.2.8. Csövek**

A fermentor irányába érkező illetve a kilépő anyagáramok csővezetékeivel szemben támasztott főbb követelményei a tisztíthatóság és a sterilitás. Megengedhetetlen, hogy előforduljon tisztíthatatlan helyek. Általában ilyen kritikus pontok a csatlakozásoknál, a szelepeknél és a mérőműszereknél vannak. A csövek anyagának kiválasztásakor az adott vezeték funkcióját veszik figyelembe (sav vezeték, mintavevő, termék elvezetésére szolgál, tartályokat összekötő).

### **2.2.9. Mérő berendezések**

#### Rotaméter

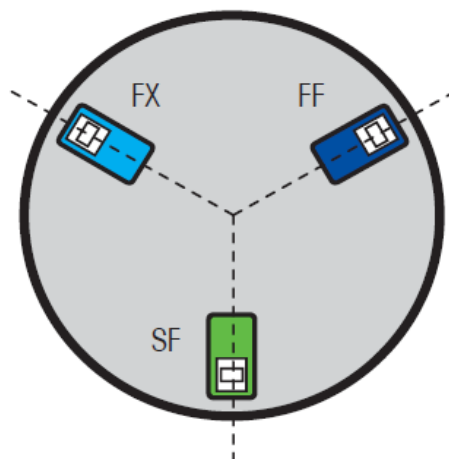
A fermentációs ipar számos, a gyakorlatban jól alkalmazható áramlásmérők közül választhat, melyekkel az átáramló közeg (folyékony vagy gáz) mennyiségét lehet mérni. A teljesség igénye nélkül ezek típusai a következők: turbinás-, szárnykerekű-, örvénylevél-, elektromágneses-, ultrahangos-, forgódugattyús-, termometriás-, coriolis-elvű-, torlósöves áramlásmérők. A fermentációs ipar a bemenő levegő mennyiségének mérésére általában rotamétert alkalmaz. Egy belül kúpos csőbe helyeznek egy testet (nevezzük úszónak). Alulról a kisebb átmérőjű rész felől áramlik a mérendő közeg. Az áramlás hatására az úszó megemelkedik a csőben. A megemelkedés mértéke arányos a térfogatárammal. Az automatikus szabályozási igényeknek megfelelően már lehet kapni olyan rotamétert, mely ezekbe a folyamatirányító rendszerekbe analóg kimenetein jól beépíthetőek (5. kép). A rotaméter normálliter/perc (NL/min) mértékegységben méri az átáramló levegő mennyiségét. A normálliter azt jelenti, hogy a ténylegesen átáramló mennyiséget légköri nyomású és hőmérsékletű állapotra vetíti vissza.



**5. kép** Rotaméter

### Tömegmérő bélyegek

A tartályokban tárolt anyagmennyiséget szint- vagy tömegméréssel lehet meghatározni. A szintmérés egyszerűbb és olcsóbb megoldás, azonban számos esetben nem alkalmazható. A fermentor tömegét és a benne lévő folyadék sűrűségét ismerve könnyen kiszámítható a folyadék térfogata. A tartálmérlegeknél a mérlegcella (7. kép) a tartályon kívül helyezkedik el. A mérlegek kialakításának egyik fontos szempontja, a mérendő tartály szimmetriája. Teljesen szimmetrikus folyadéktartályok esetén a tartálynak csak egy részét kell mérlegcellára helyezni (6. kép). A tartálmérleg felépítésének egy másik lényeges szempontja, hogy a mérlegcellákat egy síkban kell rögzíteni. A mérőcella analóg áramkimenetén a tömeggel arányos 4-20mA-t vagy 0-20 mA-t állít elő.



**6. kép** Mérőcellák elhelyezése szimmetrikus tartály esetén: FF: fix pont, SF: fél úszó, FX: úszó



**7. kép** Mérőcella

### pH elektróda

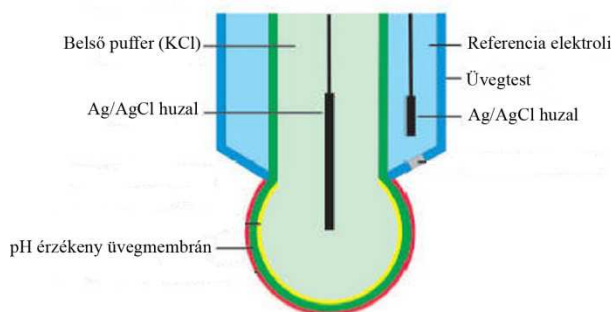
A kémhatás mérésének kivételesen pontos módszere a potenciometriás elektrokémiai mérismód, amelyhez két elektróda szükséges. Mivel egy elektród potenciálját mindig csak egy másik elektródhoz viszonyítva lehet meghatározni, a közöttük kialakuló feszültségkülönbség mérésével, ezért a mérőelektródot egy referenciaelektróddal galvánelemmé kapcsolják össze. A galvánelem elektromotoros erejéből a pH kiszámítható, illetve a pH mérésre szolgáló készülékek azonnal pH egységekben jelzik a mérési eredményt. Ennek érzékenysége elérheti 0,001 pH-egységet. Az egyik elektróda érzékeny a kémhatásra, a másik, a kontroll vagy referencia elektróda pedig nem. A referencia elektróda belsejében ezüst/ezüst klorid található, amely stabil pH értéket és változatlan potenciált mutat. Az elektróda külsején só-híd biztosítja az ezüst oldat kapcsolatát a vizsgálandó mintával, amely igen érzékeny terület. A pH érzékeny elektródat üvegmembrán borítja (kb. 100 mikron vastagságú).

A gyakorlatban ma már szinte kizárólag kombinált elektródás pH mérőműszereket alkalmazunk. Ezek legfontosabb jellemzője, hogy a mérő elektróda és a referencia elektróda egy elektródatestbe van beépítve. A mérés eredményének megbízhatóságát javítja és pontosságát növeli a két elektróda egymáshoz való közelsége, illetve a só-híd és a pH érzékelő közötti lecsökkent távolság. A kombinált elektróda általában hőmérséklet érzékelőt is tartalmaz, amely lehetővé teszi a műszer számára a mérés során a hőmérsékleti hatások kompenzációját.

A pH-érzékeny üvegelektrod különleges összetételű, nagy elektromos vezetőképességű és kis olvadáspontú üvegből készített membrán. Az üvegmembrán erősebb falú üvegcsőre van forrasztva. Az üvegelektrod lényegében egy vékony falú üveggömb (membrán), amely az

oldat  $H^+$  ionjaival ioncsere egyensúlyt alakít ki. A membránon kialakuló potenciált a két oldalán levő  $H^+$  ionkoncentrációk aránya határozza meg. Ha az üveggömb belsejében állandó  $H^+$  ionkoncentrációt biztosítunk (pl. megfelelő pufferoldattal való feltöltés révén), az elektródpotenciál változása egyedül a külső  $H^+$  ionkoncentrációtól, azaz az oldat pH-jától fog függeni. Savas oldatok esetén a pozitív töltésű szabad hidrogén ionok ( $H^+$ ) a belső pufferhez képest pozitív mV potenciált hoznak létre, míg lúgos oldatoknál a belső pufferhez képest kisebb koncentrációjú hidrogén ionok negatív mV potenciált hoz létre.

Az elektródának ki kell bírnia a sterilizálás során a magas 120-130 °C-ot és az ezzel járó 1,1-1,3 bar nyomást, ezért a kombinált elektródák külső borítása általában erős falú üvegcsőből készülnek.



**8. kép** Kombinált pH elektróda felépítése



**9. kép** Kombinált pH elektróda

### Hőmérséklet mérő

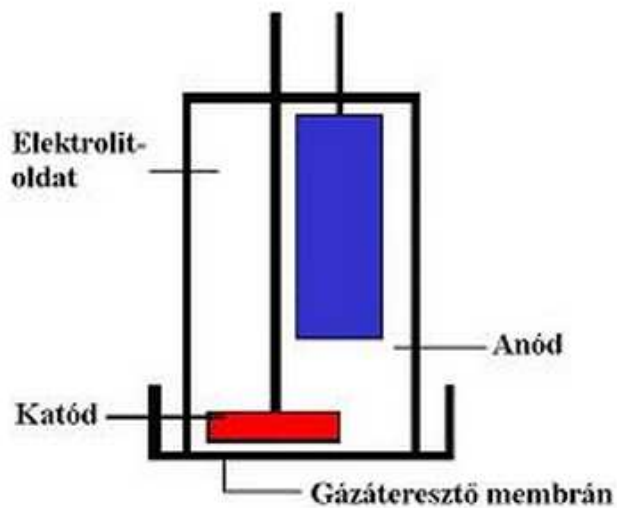
A fermentáció hőmérsékletének pontos mérése elengedhetetlen, hiszen minden mikroorganizmusnak van egy hőmérséklet optimuma, amelyen a növekedés a legintenzívebb, vagy bizonyos esetekben a hőmérséklet a termékképződést befolyásolhatja. Hőmérőeszközök lehetnek folyadéktöltésű-, elektromos ellenállás hőmérők, termoelemek és sugárzásmérők. A sugárzásmérők kivételével a hőmérők a saját hőmérsékletüket jelzik. A fermentációs iparban a folyékony közeg hőmérsékletének mérésére ellenállás hőmérőket alkalmaznak. Működésük alapja, hogy a fémek elektromos ellenállása a hőmérséklettel változik. A fémek vezetése jó közelítéssel lineárisan nő a hőmérséklet csökkenésével. Ha a huzal ellenállását mérni tudjuk,

meghatározhatjuk a huzal hőmérsékletét. Olyan anyagból készült huzalokat alkalmaznak, amelyek a hőmérséklet hatására jelentősen változtatják az ellenállásukat. Folyékony közegek hőmérsékletét általában Pt 100-as szenzorral mérik, melynek elnevezése abból adódik, hogy a szenzor ellenállása  $100 \Omega$   $0^\circ\text{C}$ -on. Ezeknek az eszközöknek az előnye mellett, hogy nagy pontossággal mérnek, analóg kimenetein könnyen beépíthetők a folyamatszabályozásba. A szabályozás általában PID kontrollert segítségével történik.

### Oldott oxigén szenzor

A folyadékban oldott oxigén mennyiségi meghatározása a széles körben elterjedt Clark-féle elektródával történik, mely működését tekintve egy elektrokémiai módszeren alapuló mérés. Ez az oxigén érzékelő a legegyszerűbb esetben egy munkaelektrodát és egy ellenelektrodát tartalmaz. Mindkét elektróda elektrolízis-rendszerben helyezkedik el, amelyet gázáteresztő membrán választ el a mintától, amely csak az oxigén számára átjárható. A munkaelektroda az oxigén-molekulákat hidroxid-ionokká redukálja. Ennél az elektrokémiai reakciónál áram folyik az érzékelőben az ellenelektrodától a munkaelektrodához. Az áramintenzitás és az oxigénkoncentráció között jól definiált függvénykapcsolat áll fenn. Minél több oxigén van a mintában, annál nagyobb az áramjel. Az oxigénmérő műszer oldhatósági függvény figyelembevételével számítja ki ebből a jelből az oldat oxigén-koncentrációját.

<b>Cella</b>	<b>Reakció</b>
Anód	$2\text{Ag} + 2\text{Cl}^- \rightarrow 2\text{AgCl} + 2\text{e}^-$
Katód	$2\text{e}^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{OH}^-$
Teljes reakció	$2\text{e}^- + \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{Ag} + 2\text{Cl}^- \rightarrow 2 \text{OH}^- + 2\text{AgCl} + 2\text{e}^-$



**10. kép** Oldott oxigén szenzor felépítése



**11. kép** Oldott oxigén szenzor

Az elmúlt években kezdtek elterjedni az optikai elven működő oldott oxigén szondák. Az optikai eljárások előnye a gyorsaság, a multifunkcionalitás, a kis üzemeltetési költség, de emellett még számos probléma megoldás vár a szenzor tényleges elterjedéséhez.

### Nyomásmérő

A fermentor belső nyomásának méréséhez olyan érzékelőket kell alkalmazni, mely gyors, megbízható, pontos és a folyamatszabályozásba beépíthető. Ezen kritériumoknak leginkább a

villamos elvű és piezoelektromos nyomásmérők felelnek meg. A „piezo” szó görög eredetű, nyomást jelent. A piezoelektromos anyagok felületén mechanikai igénybevételekor elektromos töltés kialakulása figyelhető meg. A keletkezett elektromos töltés és az alkalmazott húzó-, ill. nyomóerő között lineáris összefüggés figyelhető meg.

A belső nyomás pontos detektálása és szabályozása a fermentációt megelőző sterilizációs műveleteknél és maga a fermentáció folyamata alatt is kitüntetett szereppel bír. A belső nyomás meghatározza, hogy az oxigén, a szén-dioxid mennyire oldódik a fermentálékban. Ha nagyon habzik a tenyészet, a dómtéri nyomás növelésével vissza lehet szorítani a habzást, viszont a magas CO<sub>2</sub> koncentráció a tenyészet növekedésére és produktivására is negatív hatással lehet.

#### További mérő berendezések:

Elmenő levegő összetételének elemzése:

Az elmenő levegő elemzése is hasznos információkkal szolgál a fermentorban zajló folyamatokról. Az egyes gázokat jellegzetes tulajdonságaik alapján ismerik fel és mérik meg a mennyiségüket. Az oxigént a paramágneses sajátsága alapján, a szén-dioxidot jellegzetes infravörös elnyelése segítségével. Gázelemzőként elterjedten alkalmaznak tömegspektrométert, amivel minden illó komponens felismerhető és a koncentrációja meghatározható.

Ha az elmenő gázban metanolt vagy etanolt detektálunk, akkor arra következtethetünk, hogy anaerob folyamatok mennek végbe, ami a nem megfelelő oxigén szintről árulkodik. Az egyik legfontosabb paraméter az elmenő gázok összetételét illetően a CO<sub>2</sub> szintje. A respirációs hányados, amely a termelt CO<sub>2</sub> (CTR) és a felvett oxigén hányadosa (OUR), információt ad a növekedés intenzitásáról illetve a hasznosuló szénforrás milyenségéről. Ha a respirációs hányados egy körüli érték, akkor az egyszerű cukrok fogyasztását feltételezhetjük a fermentorban. Ha ez az érték egy alatti, akkor valamilyen nehezebben hasznosuló szénforrás metabolizmusa történik. Ez abban az esetben lehet érdekes számunkra, ha cukrok mellett valamilyen növényi olajt kevertünk a táptalajba a habzás megfékezésére. Ebben az esetben a respirációs hányados csökkenése a cukor kimerüléséről ad információt.

Oldott szén-dioxid mérése:

Az oldott oxigén mérésével ellentétben az oldott szén-dioxid nem csak fizikai, hanem kémiai folyamat is, így a Henry törvénnyel nem írható le a folyamat. A mérés elve a pH mérésre vezethető vissza. Egy membránnal elválasztott térben nátrium-bikarbonát puffer van, melybe

a szén-dioxid átdiffundál és megváltoztatja a puffer kémhatását. A pH változás méréséből visszaszámolható a fermentleiben jelen levő szén-dioxid szintje.

A motor teljesítményfelvételének mérése:

A bekevert teljesítmény mérése fontos információkkal szolgáltat a fermentáció során általában változó fermentlé viszkozitásáról és sűrűségéről, aminek következtében adott fordulatszám mellett kisebb vagy nagyobb energiával lehet a keverőt forgatni. A keverőmotorra szerelt teljesítménymérő valamelyest információt ad a fermentorban, a folyamat során beállt aktuális viszkozitásról. Emellett scale-up paraméter is. Lényeges eltérés van a levegőztetett és nem levegőztetett fermentor átkeveréséhez szükséges teljesítményfelvétel között, ez a kísérletek alapján számítható is.

NIR szonda:

A NIR (near infrared) spektroszkópia a mérésekhez az elektromágneses sugárzás közeli, infravörös tartományát használja fel. A NIR-t már elterjedten alkalmazzák mezőgazdasági-, élelmiszer-, gyógyszer-, olajipari termékek vizsgálatára, valamint az orvosi diagnosztikában, ám csak az utóbbi időben kezdett elterjedni a fermentációs eljárásoknál. Legfőbb előnyei az on-line üzemmódba használható a NIR technikának a gyors és folyamatos információnyerés, melynek pontossága megközelítheti a kromatográfias módszereket. Hagyományosan a fermentorból mintát vettek, a minta megfelelő előkészítése után valamilyen kromatográfias módszerrel mutatták ki az egyes komponensek koncentrációt. Ezzel a technikával mintavétel nélkül, folyamatosan kaphatják az információt a fermentorban történtekről. A vizsgálati módszer azon alapul, hogy összehasonlítják egy korábban felvett anyag spektrumát a mintáéval. A mintára jutó monokromatikus sugárzás hullámhosszát változtathatják, és azt vizsgálják, hogy mely hullámhosszaknál milyen intenzitású a fényelnyelés mértéke.

### **2.2.10. Beavatkozók**

#### Szelepek, csapok

A csapok belső szerkezete mindössze egy lyukas golyóból áll, melyet 90°-al elforgatva lehet nyitni/zárni. A csap előnye általában az alacsonyabb alaki ellenállás, olcsóbb ár, egyszerűbb kezelés. Lehetnek kézzel (gőz bemenő főcsap, hűtővíz főcsap), vagy automatikusan működtethetőek (duplikátor hűtővíz be/ki, gőz be csapok). A félüzemben a fermentor belső nyomását szabályozó szerkezet is egy gömbcsap, a golyó elfordulásának mértékét és így a gáz áramlását is fokozatosan be lehet állítani.

A szelepek zárását és nyitását a szelepszár végén, a szeleptányér végzi el, amely merőlegesen a szeleplülésre mozgatható fel és le. Zárt állapotban a szeleptányér az ülésre szorul, míg onnan távolodva egyre kevésbé akadályozza az áramlást. Az automatizált rendszerekben jellemzően a membránszelepek terjedtek el, amelyeket a különféle közegek nyitására és zárására lehet alkalmazni. A pneumatikus membránszelepek működtetéséhez sűrített levegőt használnak, melynek legfőbb előnye az elektromos vezérlésű szelepekkel szemben, hogy nem fordulhat elő elektromos zárlat. Ezek a szelepek kétállásúak és megfelelnek az aszeptikus, steril és ultra tiszta alkalmazásoknak (12-13. kép). A kézi membránszelepek ezzel szemben fokozatos átáramlást biztosítanak, melyeket az adagoló csonkokon találhatunk (14. kép).

A gőzvezetékek végein kondenzvíz leválasztó szelepeket célszerű alkalmazni (17. kép). Minden ilyen szeleptípus automatikusan vezeti el a gőzből keletkezett kondenzátumot, de a gőzt nem engedi át. Az úszógolyós kivitelű szelepek működése függetlenül a hőfoktól vagy a nyomástól a folyadékszint alapján működik.

A fermentorba bejutó levegő mennyiségét a rotaméterrel tudjuk meghatározni, az átáramló levegő szabályozásához pedig olyan precíz, pontos és gyorsan reagáló szelepet kell alkalmazni, mely rövid időn belül képes a folyamatirányító rendszeren megadott értéket beállítani (15-16. kép).



**12. kép** Pneumatikus membránszelepek



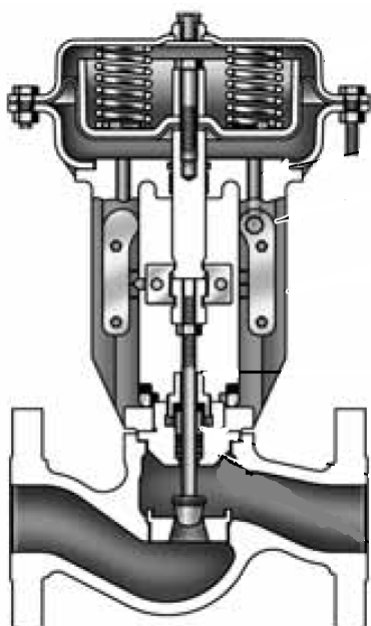
**13. kép** Pneumatikus membránszelep



**14. kép** Kézi membránszelep



**17. kép** Kondenzvíz leválasztó szelep



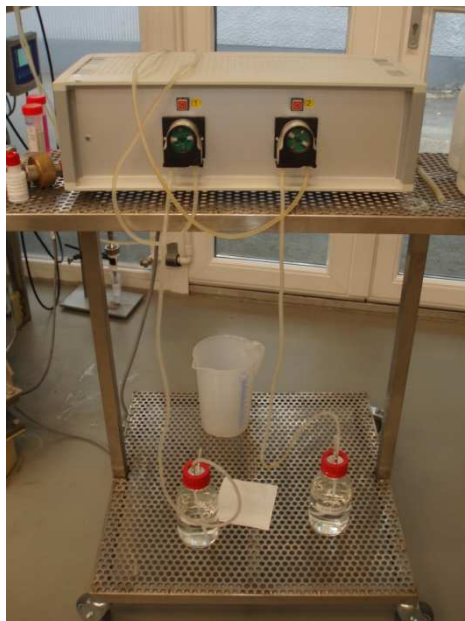
**15. kép** Levegő áramlásának szabályozószelepe



**16. kép** Szabályozószelep

### Perisztaltikus pumpa

A perisztaltikus pumpák alacsony viszkozitású folyadékok továbbítását végzik. A pumpa görgői előre haladva maguk előtt összenyomják a tömlőt, így kényszerítve a tömlőben levő folyadékot az előre haladásra (18. kép). A táptalaj adagolása így sterilen továbbítható a fermentorba. Gátat szab a működésének a fermentor belső terében uralkodó nyomás nagysága. Általában maximum 0,7 bar túlnyomás ellenében alkalmazhatóak ezek a pumpák. Táptalajon kívül a pH szabályozáshoz használt sav- és lúgadagolást, illetve a habzás gátlásához szükséges anyagok bejuttatását is ezzel az eszközzel lehet végrehajtani. (18. kép)



**18. kép** Perisztaltikus pumpa

### **2.3.Fermentor működéséhez szükséges segédáramok**

#### Ioncserélt víz

Az ioncserélő berendezés elsődleges feladata a hálózati víz keménységéért felelős magnézium és kalcium ionok eltávolítása, mely a berendezések vízkövesedését, rosszabb esetben dugulását idézné elő. A víztisztító berendezés első lépcsőjeként egy kationcserélő oszlopon halad át a hálózati víz, majd az előlagyított víz egy 5 és 3  $\mu\text{m}$ -es aktívszenes finomszűrőn érkezik a reverz ozmózis berendezésre. Ipari léptékben a fermentációhoz hálózati vizet használnak a táptalaj oldószereként, de a félüzemi léptékben még előnyösebb lagyított vizet alkalmazni. A vízlagyító feladata a lagyított víz előállítását gőzgenerátorhoz és az RO –hoz. RO készülék feladata a nagy tisztaságú víz előállítását.

### Hálózati víz

Hálózati víz lehet a táptalaj oldószere, de a fermentor hűtésére és a tömszelence zárófolyadék tartályának hűtésére is használható.

### Gőz

A gőzgenerátor állítja elő a gőzt ioncserélt vízből, mellyel a fermentor fűtését lehet megoldani. Elengedhetetlen a fermentor sterilizálásához, illetve az egyes szakaszok sterilen tartásához. Általában 3-4 baros gőzt alkalmazunk, melynek hőmérséklete 130-145 °C körül van.

### Technológiai- és műszerlevegő

A 2 baros technológiai levegőt és a 6 baros műszerlevegőt olajmentes kompresszor állítja elő. A vezetékbe jutó sűrített levegő teljesen por és vízmentes. A technológiai levegő elsősorban a fermentor bemenő levegőjét szolgálja és így a belső nyomás emelkedését is ezen segédáram segítségével érhetjük el. A műszerlevegő a PLC működtetésű pneumatikus membránszelepek nyitását zárását biztosítja.

### **3. A folyamatirányító rendszer működése**

#### **3.1. Yokogawa Centum CS300 felhasználói szintű kezelése**

A kísérleti Üzemben a vezérlő állomáson működő PC képernyőin keresztül indíthatjuk el az egyes számítógépes műveleteket, valamint azok működéséhez szükséges paramétereket ezeken keresztül tudjuk módosítani. A folyamatirányító rendszer a Yokogawa Centum CS300, melyen a szabályozás és a vezérlés több szinten valósul meg.

0. szint: mérő és beavatkozó egységek (műszerek, szelep- és szabályozó vezérlések), analóg kapcsolat a PLC-k felé. Például: pH-mérő, rotaméter, (néhány műszer önmagában is képes szabályozásra)

1. szint: PLC, (Programable Logic Controller) (a programok futnak rajta), Ethernet kommunikációval, Yokogawa Centrum CS3000

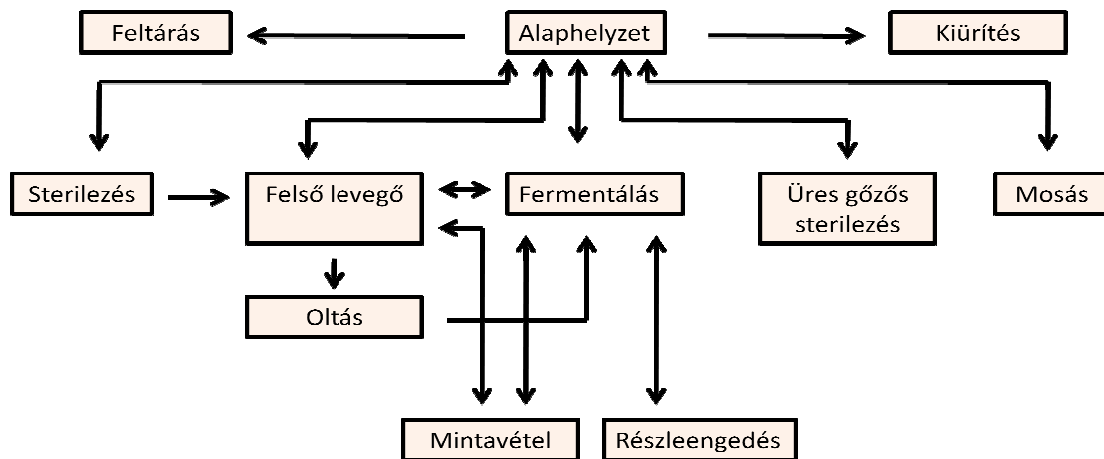
2. szint: SCADA vagy DCS (Distributed Control System), flexibilis, redundáns, és tápegységekkel üzemel, mikrosekundumos reakcióidővel rendelkezik.

3. szint: Operátori állomás: A terepen elhelyezett számítógép, monitorral, billentyűzettel és egérrel.

A Yokogawa cég egy nemzetközileg is elismert ipari mérés- és irányítástechnikai, illetve laboratóriumi mérés-technikai eszközöket, valamint ezekhez kapcsolódóan átfogó megoldásokat és szolgáltatásokat kínáló vállalat. A Yokogawa rendszer egy grafikus folyamatirányítási szoftver, amely lehetővé teszi az automatikus nyit-zár szelepek pneumatikus irányítását PLC vezérelten, az egyes segédáramok ki-és bekapcsolását, számos művelet automatikus lefutását (sterilizálás, fermentáció, kiürítés, mosás), fontosabb paraméterek ellenőrzését és szabályozását. A szoftver számos funkcióval rendelkezik: az egyes készülékeket grafikusan be lehet hívni, trendvonalak segítségével követhetők az egyes mérőműszereken mért paraméterek változásai. Az internetes kapcsolatnak köszönhetően a reakciók felügyelete az épület más részeiből, vagy akár otthonról is könnyen elvégezhető.

#### **Műveleti ábra**

A műveleti ábrán láthatóak az alap- és részműveletek egymásra épülése. Alaphelyzetből minden alpművelet indítható. A sterilizálás művelet végeztével a felsőlevegő műveletbe kerül a rendszer, ahonnan az oltás indítható. Az oltást követően a készülék a fermentálás műveletébe automatikusan áll át. Mintavétel csak a felsőlevegő és a fermentálás műveletből indítható, míg a részleengedés csak fermentálásból.

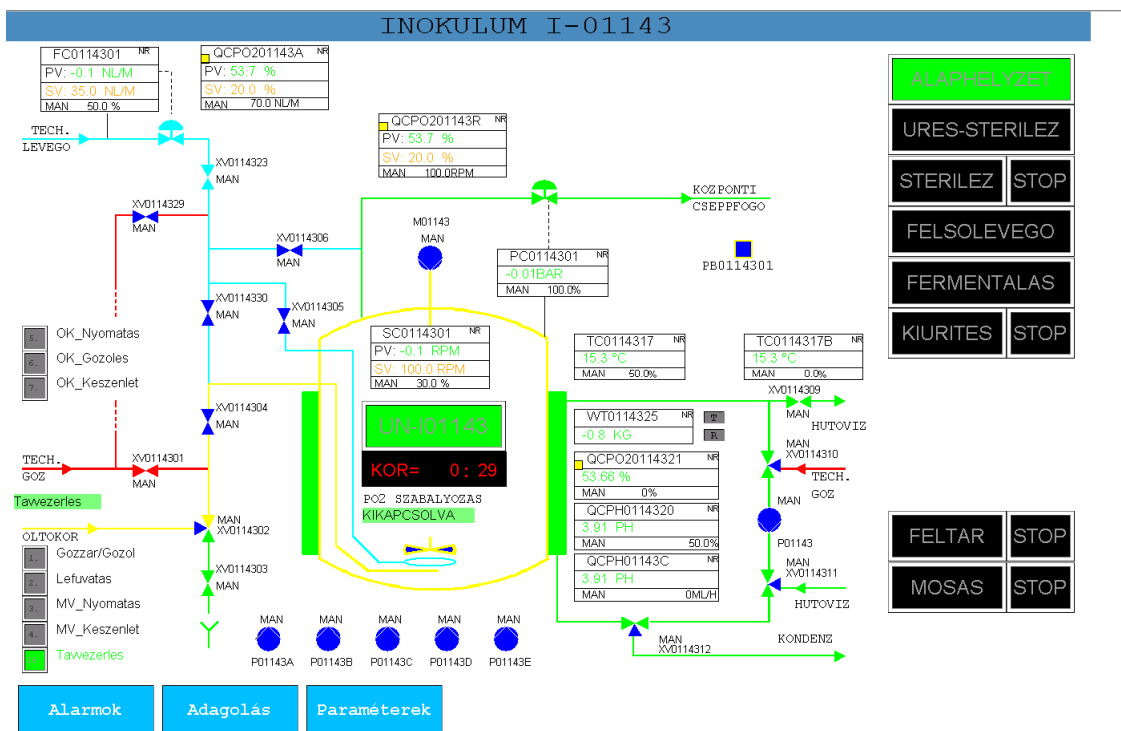


2. ábra Műveleti ábra

### Készülék ábra

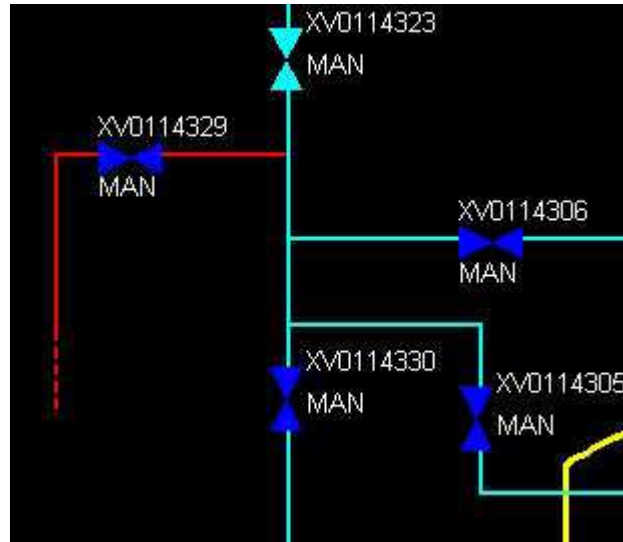
A grafikus felületen a reaktor egyszerűsített folyamatábráján könnyen áttekinthető módon egyszerre kapunk információt a reaktor állapotjellemzőiről és a szelepek állásáról.

Az ábráról a készülékhez tartozó mérőkörök és beavatkozók állapotát, az alapparamétereket tudjuk leolvasni. Az egyes műveleteket innen indíthatjuk. Csak az indítható műveletek nyomógombjai látszanak. Innen érhetjük el a paramétertáblát, az adagolási paramétereket és az alarm ábrát. A távvezérlésű szelepek és a szabályozó panelek állapotát ezen ábrán állíthatjuk.



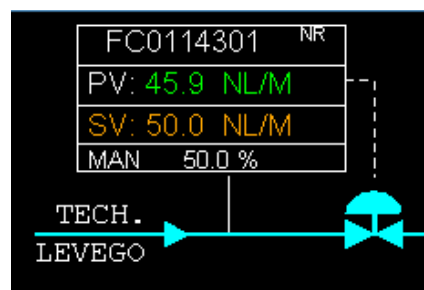
3. ábra Készülék ábra

A szoftvert sokan kedvelik egyszerű áttekinthetősége miatt. Ha a felületre tekintünk, azonnal látszik, mely eszközök/szelepek működnek és melyek vannak zárt állásban. Egy szelep akkor van nyitva, ha a színe megegyezik a belépő és kilépő csővezeték színével, az eltérő szín zárt állást jelez.



**4. ábra** Részlet a készülékábráról (XV0114323 szelep nyitott, a többi zárt állapotban van)

Minden szabályozott paraméterhez tartozik egy szabályozó panel. Két értéket olvashatunk le erről a panelről, a PV érték az adott pillanatban mért érték, az SV (set value) a megadott értéket jelzi.



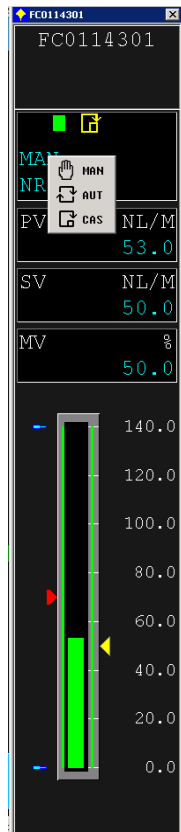
**5. ábra** A bemenő levegő szabályozó panelje

Minden egyes a szabályozásban szereplő szerelvénynek, motornak, távadónak és szabályozónak egyedi jelölése van melyek a következők:

<i>A távadó kódja</i>	<i>Magyar elnevezése</i>
XV0114301...30	automata nyit-zár szelepek
FC0114301	Bemenő levegő áramlásszabályozója
PC0114301	Nyomásszabályozó

TC0114317 TC0114317/B	Hőmérséklet szabályozó
SC0114301	Keverő fordulatszám szabályozó
WT0114325	Tömegmérő távadója
QCPH0114320 QCPH01143C	pH szabályozó
QCPO20114321	oldott oxigén mérő
QCPO201143R	oldott oxigén szabályozó keverő fordulatszámával
QCPO201143A	oldott oxigén szabályozó levegő mennyiségével

A szabályozó panelre kattintva a dialógusablakot nyithatjuk meg, ahol megváltoztathatjuk manuális módban az SV értékét és a szabályozott folyamat határértékeit. Az éppen folyamatban lévő művelettől függően változtathatjuk meg, hogy az adott szabályozás automata (AUT), cascad (CAS) vagy manuálisan (MAN) szabályozott legyen. Kézi vezérléshez mindig ki kell választani a manuális üzemmódot.



**6. ábra** Dialógusablak

### Paraméter ábra

Az ábráról a készülék paramétereit tudjuk leolvasni, az alapjeleket, alapparamétereket megváltoztatni. A fermentáció, a feltárás és a sterilizés alapparamétereit tudjuk változtatni. Az egyes műveletek megkezdése előtt kell beállítani.

PARAMÉTEREK I-01143				
		I-01143		
		SV / PV		
HŐM (FERMENTÁLÁS)	[°C]	22.0	/ 22.0	MAN
LEVEGŐ	[NL/M]	50.0	/ -0.1	MAN
NYOMÁS	[BAR]	0.40	/ -0.01	MAN
FORDULATSZÁM	[RPM]	150.0	/ -0.1	MAN
TÖMEG	[KG]		2.2	
pH (SAV-LUG)	[pH]	6.80	/ 4.86	MAN
pH (C-FORRÁS)	[pH]	0.00	/ 4.86	MAN
ÖLDÖTT OXIGÉN	[%]	50.00	/ 12.97	MAN
LEVEGŐ SZELEP	[%]	100.0		
VÉGSELEP	[%]	27.0		
<b>FELTÁRÁS</b>				
HÖMÉRSÉKLET	[°C]	80.0		
IDŐ	[sec]	800		
VISSZHÜTÉSI HŐM.	[°C]	40.0		
<b>STERILIZÉSI</b>				
HÖMÉRSÉKLET	[°C]	121.0		
IDŐ	[sec]	1200		
VÉGSELEPZÁRÁS	[°C]	85.0		
MINTAVÉTEL: TÖMEG	[KG]			
RÉSZLEENG.: TÖMEG	[KG]			
KÉSZÜLEKMOSÁS: HŐM.	[°C]	95.0		

Alarmok
Adagolás

7. ábra Paraméter ábra

### Alarm ábra

Az ábráról a legfontosabb alarm paramétereket és a hozzájuk tartozó jelenlegi mért értéket tudjuk leolvasni, az általunk leggyakrabban használt alarmfajták paramétereit megváltoztatni. A PV az aktuális értéket, a HH a nagyon magas, a PH illetve PL a folyamatban még megfelelő, de magas illetve alacsony, az LL a nagyon alacsony, a DL pedig a  $\pm$  eltérés alarm értékeit adja meg.

ALARM BEÁLLÍTÁSOK I-01143							
		I-01143					
		HH	PH	PV	PL	LL	DL
HŐMÉRSÉKLET	[°C]	150.0	150.0	22.0	-30.0	0.0	150.0
LEVEGŐ	[NL/M]	170.0	140.0	-0.1	0.0	0.0	140.0
NYOMÁS	[BAR]	2.5	4.0	-0.01	0.0	0.0	4.0
FORDULATSZÁM	[RPM]	1000.0	500.0	-0.1	0.0	0.0	800.0
TÖMEG	[KG]	200.0	200.0	2.2	0.0	0.0	
pH	[pH]	14.00	8.00	4.86	4.00	0.00	7.00
OLDOTT OXIGÉN	[%]	500.00	500.00	12.97	0.00	0.00	500.00

Paraméterek      Adagolás

8. ábra Alarm ábra

Trendvonalak megjelenítése:

Az állapotjellemzőket a szoftver folyamatosan rögzíti, lehetőséget teremtve az egyes műveletek során fellépő hibák azonosítására és kijavítására. A következő paramétereket egy perces gyakorisággal rögzíti és jeleníti meg: hőmérséklet (°C), bemenő levegőmennyiség (NL/min), belső nyomás (bar), fordulatszám (rpm), tömeg (kg), pH (0-14), dO<sub>2</sub> (%). Ezen az alapparamétereken kívül további érzékelők alkalmazásával tisztább képet kaphatunk a lejátszódó folyamatokról. Ilyen érzékelők az elmenő levegő gázelemzése, a fermentlé viszkozitásának mérése, NIR alkalmazása, vagy a motor teljesítményfelvételének detektálása. A rögzített paramétereket diagramon jeleníti meg a szoftver, melyből fontos információkra tudunk következtetni a fermentorban zajló folyamatokról.

Néhány fontosabb felhasználói szintű kezeléshez elengedhetetlen nyomógomb jelölések:



Felhasználó váltás/bejelentkezéshez



Ezzel tudjuk megjeleníteni a toolbox menüsört, mely szükséges a fermentor irányításához.



A folyamatirányító rendszer által vezérelt készülékek között tudunk váltani.



A műveletek naplózásának megjelenítése



A mért adatok diagramon való megjelenítése



Készülékábrába megjelenítése



A folyamatirányító rendszer által vezérelt készülékek között tudunk váltani.

## 3.2.Műveletek a folyamatirányító rendszeren

### 3.2.1.Alapműveletek

A folyamatirányító rendszeren az alábbi alapműveleteket tudjuk indítani a fermentoron:

**Alaphelyzet:** Minden beavatkozó eszköz kézzel vezérelhető. Alaphelyzetben hajthatjuk végre a tömszelence sterilizését, a szenzorok behelyezését, a duplikátor feltöltését, a táptalaj elkészítését és összekeverését.

**Üres gőzös sterilizálás:** A levegőszűrő sterilizálásával párhuzamosan a készülék üres állapotában történő sterilizációs művelet, mely a készülék teljes sterilitásához elengedhetetlen.

**Sterilizálás:** A készülék sterilizálása a táptalajjal együtt. Ezen művelet során a táptalaj hőmérsékletének 121 °C-ot, 1,1 bar nyomást el kell érnie és ezt az állapotot legalább 20 percig tartania kell.

**Felsőlevegő:** A sterilizált táptalaj védelme a leoltás megkezdéséig. A fermentációs paraméterek beállításának lehetősége.

**Fermentálás:** A fermentáció folyamata a megadott paraméterek mellett. Az oltás pillanatától kezdődik és a kezelő személyzet állíthatja le a leengedéssel majd alaphelyzetbe való átállással.

**Feltárás:** A maradék fermentlé inaktiválása kb 80 °C-on tetszőleges ideig.

Mosás: A fermentor tisztítási művelete a fermentációt követően.

Kiürítés: A fermentor tartalmának teljes leengedése

### 3.2.2. Részműveletek

Mintavétel: Mintavevő csonkon történő kisebb mennyiségű fermentlé vétele a készülékből. Maximálisan a készülék ábrán megadott tömegű minta vehető.

Részleengedés: Megadott tömegű fermentlé leengedése a mintavevő csonkon keresztül.

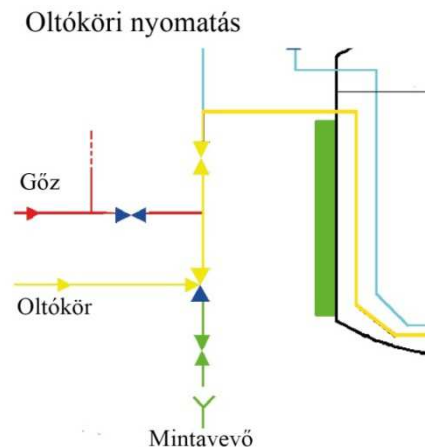
Oltás: Az inokuláláshoz szükséges nyomásesést biztosítja.

### 3.2.3. Előkamra műveletek

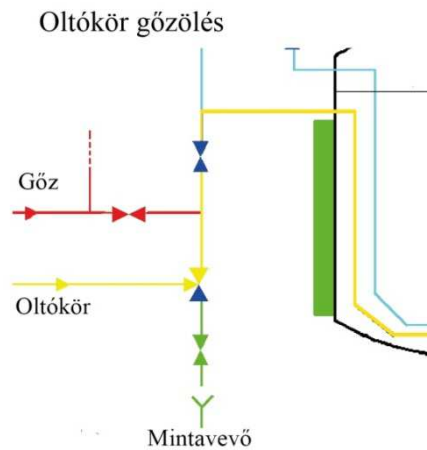
Az előkamra a fermentorba beáramló és kilépő anyagok műveleteire alkalmas, 3-4 szeleppel határolt sterilizálható tér.

Az ábrákon feltüntetett szelepek színe és a vezeték színe különböző, akkor az adott szelep zárt állásban van. Ellenkező esetben nyitott állásban vannak a szelepek.

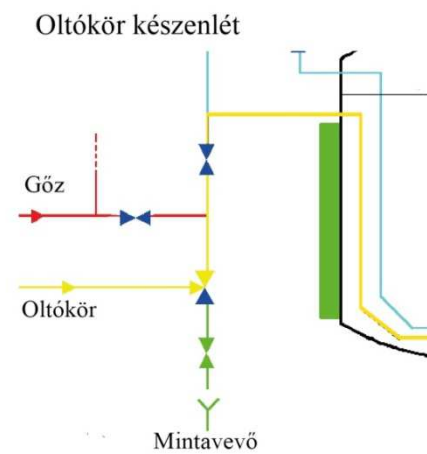
Oltóköri nyomatás: az oltókörön keresztül történő be-, illetve kinyomatás a nyomásviszonyoknak megfelelően



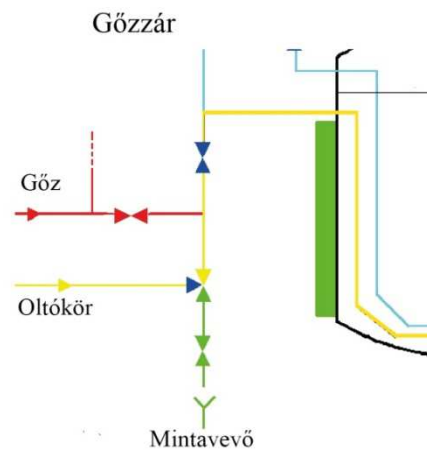
Oltóköri gőzölés: Az oltókörhöz tartozó szerelvények sterilizését teszi lehetővé.



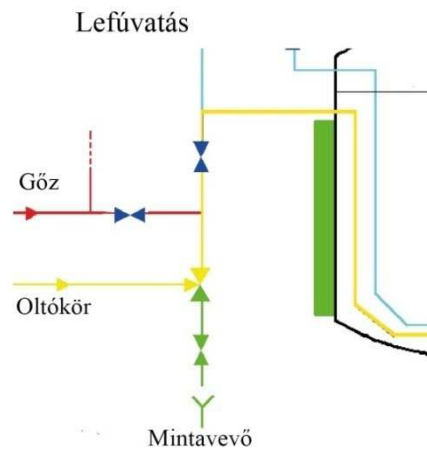
Oltóköri készenlét: Az oltást megelőző készenlégi művelet



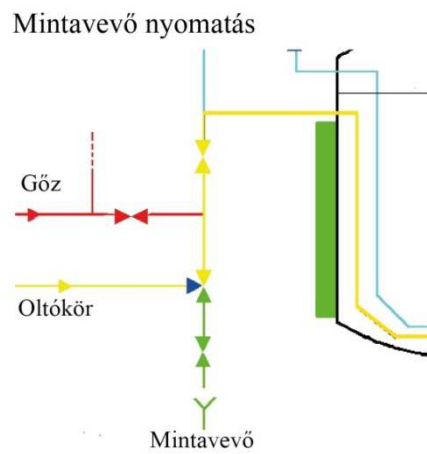
Gőzzár: A mintavevő szerelvényeit gőzzel telíti, a mintavevő kézi szelep nyitásával a gőzáramlás manuálisan szabályozható.



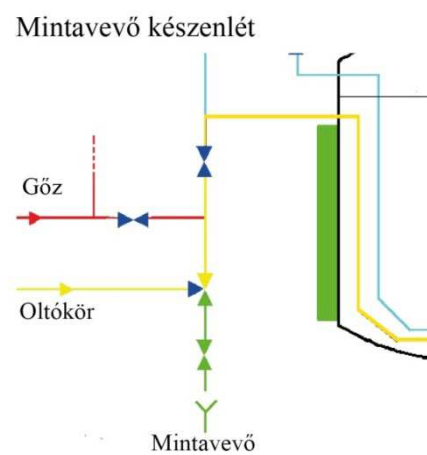
Lefúvatás: Az oltókör és a mintavevő szelepei nyitva.



Mintavevő nyomatás: A mintavevő csakon keresztül történhet ezen művelet során a be-, illetve kiáramlás a fermentorból/ből.



Mintavevő készenlét: A mintavevő szerelvényei nincsenek gőzzár alatt.



### **3.3.Fermentációs paraméterek szabályozása**

A fermentoron a folyamatirányító rendszerrel az alábbi paramétereket mérjük, és az adatokat rögzítjük egy perces gyakorisággal:

Hőmérséklet

Levegőmennyiség

Belső nyomás

Fordulatszám

Tömeg

pH

dO<sub>2</sub>

Az előbbi paraméterek közül a következőket tudjuk szabályozni:

Hőmérséklet

Levegőmennyiség

Belső nyomás

Fordulatszám

pH

dO<sub>2</sub>

#### **3.3.1. A keverő fordulatszámának szabályozása**

A keverőt meghajtó motor fordulatszámát a frekvenciaváltó segítségével szabályozhatjuk. Egy aszinkronmotor fordulatszáma a rákapcsolt hálózati áram frekvenciájától függ, ennek változtatásával érhetjük el a fokozatmentes fordulatszám szabályozást. Célszerű meghatározni egy minimális fordulatszámot, mely a maximális fordulatszámnak a 10%. A megfelelő fordulatszám kiválasztása számos tényezőtől függ.

- (1) Homogenizálás: a fermentlé oldott és nem oldott komponenseinek jó elkeveredéséhez, a koncentrációk egyenletes eloszlásához szükséges keveredési idő meghatározásával számolhatjuk ki az ehhez megfelelő minimális fordulatszámot. Erre azért van feltétlenül szükség, hogy a különböző anyagátadási folyamatok mindenütt egyforma sebességgel folyjanak, és a biológiai történések sebességeit a lehető legkisebb mértékben korlátozzák.
- (2) Levegő diszpergálása a folyadékban két folyamatot jelent: nagy buborékok diszpergálása, mellyel a buborékok oxigénátadási felületét, a fajlagos felületét növelhetjük. Továbbá a buborékokat egyenletesen el kell oszlatni a rendszerben.

- (3) Gáz- és folyadékfázis elválasztása: a képződött anyagcseretermékeket ( $\text{CO}_2$ ) tartalmazó buborékok eltávolítása, mely az oxigénabszorpcióhoz teljesen hasonló összefüggésekkel leírható anyagátadási folyamat. A léptéknövelés során a folyadékoszlop magasságával együtt nő a hidrosztatikai nyomás is, mellyel nő a  $\text{CO}_2$  oldódása. Csak a kevertetés növelésével tudjuk hatékonyabban eltávolítani a  $\text{CO}_2$ -t.
- (4) Energiabevitel a folyadékba: a folyadékot állandó mozgásban kell tartani az első három pontban felsorolt tényezők végrehajtása érdekében. A bevitt mechanikai energia hővé alakul, ezért állandóan pótolni kell. Az egységnyi fermentlé térfogatba bevitt energia határozza meg elsődlegesen az oxigénabszorpciós viszonyokat, így a léptéknövelés során az egyik kritikus paraméter.
- (5) A keverő által kifejtett nyíróerő: A fordulatszám növekedésével nő a nyíróerő nagysága, mely a sejtek fizikai károsodását eredményezheti. Az egysejtes fermentációk (baktérium, élesztő) kevésbé érzékenyek a nyíróerőre, míg a fonalas gombák magas nyírás hatására pelletes morfológiát vesznek fel. Túl magas nyírásnál pedig a fonalak feltöredeznek, mely létulajdonság és termékképződés romlásához vezethet.
- (6) Gazdasági tényező: A motor által felvett teljesítmény biztosításának költsége számottevő lehet a termelés teljes költségében.

A kísérleti üzemben lehetőségünk van a fordulatszám automatikus változtatására az oldott oxigén függvényében. A keverő fordulatszámát addig tartja a megadott értéken, amíg az oldott oxigén szintje a tartani kívánt szint alá esik. Ha elérte ezt a minimális oldott oxigén szintet, növelni kezdi a fordulatszámot, melynek hatására a több oxigén tud beoldódni. Ezt egy bizonyos szintig lehet csak alkalmazni, mely után szükséges a levegő mennyiségének a növelése is. Az ilyen jellegű szabályozást csak abban az esetben alkalmazzuk, amikor az oldott oxigén szintjének kitüntetett szerepe van a termékképződés folyamatába.

### **3.3.2. Hőmérséklet mérése és szabályozás**

A fermentációs iparban a hőmérséklet mérésére leggyakrabban ellenállás hőmérőket alkalmaznak. Ezek legfőbb előnyei, hogy gyors válaszidejűek és jól integrálhatóak a folyamatirányításba. A fermentáció ideje alatt a hőmérsékletnek egy adott értéken tartása a cél. A mikrobák hőtermelése és a keverő által bevitt energia hővé alakulása következtében a közeg hőmérséklete általában folyamatosan növekszik. Ennek kompenzálására hűtővizet engedünk a duplikátorba. Az automata hőmérsékletszabályozók általában PID szabályozást hajtanak végre. Ennek lényege, hogy a beavatkozást követően a mérendő érték változásának

az időbeni alakulásával is kalkulál. Ennek függvényében a következő beavatkozás idejét és mértékét is figyelembe veszi. A hőmérséklet szabályozás a fermentáció ideje alatt értéktartó szabályozás, míg a sterilizálás ideje alatt programszerű szabályozást követ.

### **3.3.3. pH mérése és szabályozása**

Minden mikrobának van egy pH optimuma, ahol a növekedése a leggyorsabb. Ha a tenyészet gyors növekedése a cél, akkor a kémhatást ezen a pH-n célszerű tartani. Gyakori eset az, amikor a termékképződés pH optimuma a mikroba pH optimumával nem esik egybe. A kémhatás detektálása és szabályozása a fermentációk során döntő többségben elengedhetetlen. Szigorúan véve a pH szabályozott fermentációk már nem sorolhatóak a batch módszerek közé, hiszen a különböző sav/lúg oldatok adagolása történik.

#### pH elektróda kalibrálása:

A pH elektródákat használatuk előtt (még sterilizálás előtt) minden esetben kalibrálni kell. A kalibrálás általában két pontban történik, jól definiált, stabil pH-jú oldatokkal. A következőben a Debreceni Egyetem Kísérleti üzemében alkalmazott Mettler Toledo M400-as transzmitterhez tartozó kombinált elektróda kalibrálását mutatjuk be:

- A transzmitteren nyomjuk meg a CAL gombot, majd válasszuk a 2 pontos kalibrációt.
- Helyezzük a pH 7-es puffer oldatba az elektródát és nyomjuk meg az ENTER-t.
- Miután a készülék a pH 7-hez tartozó mV értéket rögzítette, helyezzük az elektródát a második pufferbe (pH 4), majd nyomjunk ENTER-t.
- A sikeres kalibrációt követően megjelenik a kijelzőn az S faktor (slope calibration) és a Z faktor (offset calibration). Az előbbi a kalibrációs egyenes meredekségét, az utóbbi az egyenes eltérést mutatja a 0,0 ponttól.
- Az ADJUST gombbal menthetjük a mért értékeket.

#### pH szabályozása:

A pH szabályozása történhet sav- illetve lúg oldatokkal és egyes esetekben cukor oldattal. Az oldatok adagolása félüzemi léptékben még történhet perisztaltikus pumpákkal. A sav és lúg oldatok töménységét és minőségét célszerű úgy kiválasztani, hogy az adott mikrobának és a táptalajnak is megfeleljen. Ha NaOH-t és HCl-t használunk lúgnak illetve savnak, akkor ezeket a mikroba tápanyagként nem tudja hasznosítani, ám ha ammónium-hidroxid illetve foszforsavat adagolunk pH szabályozás során számolhatunk azzal, hogy a tápanyagként

hasznosítható adagolást végzünk. Egy másik módja a pH szabályozásnak, amikor valamilyen egyszerű cukrot tartalmazó oldatot alkalmazunk. A sejtek a cukrok metabolizmusa során cukor savakat képeznek, melynek következtében a közeg kémhatása csökken. A cukor kimerülésével egyidőben a kémhatás hirtelen növekedni kezd. Ha ebben a pillanatban újabb egyszerű cukrok ráadagolása történik, a pH növekedése leáll, és újra fokozatosan csökkenni kezd. Ezzel a módszerrel adott esetben a szénforrás ráadagolást és a pH szabályozást is egy lépésben oldjuk meg. Nem utolsó sorban ezzel az egyszerű cukrok által kiváltott karbon katabolit repressziót is derepresszálhatjuk.

#### **3.3.4. Oldott oxigén mérése és szabályozása**

Oldott oxigén mérésére a 2.2.9. fejezetben bemutatott elektródát használjuk. A maximálisan oldható oxigén szintje folyadékokban számos paramétertől függ: a folyadék hőmérsékletétől, a folyadékban jelen levő oldott anyagoktól és a folyadékra ható nyomástól. Így az elektródát minden egyes fermentáció előtt az adott hőmérsékleten, az alkalmazandó nyomáson és az adott táptalajra kalibrálni kell.

A kísérleti üzemben alkalmazott Mettler Toledo M400-as transzmitter és az ehhez kapcsolódó elektróda kalibrációjának menete:

- A kalibrációt a táptalaj sterilizése után a felsőlevegő műveletében hajtjuk végre. Sterilizés során megváltozhat a táptalaj oxigén abszorpciós képessége, így célszerű ezt követően kalibrálni az elektródát.
- Felsőlevegő műveletében beállítjuk a belső nyomást, amit a fermentáció ideje alatt szeretnénk tartani. Ebben a műveletben a hőmérsékletet és a bemenő levegő értékét is változtathatjuk. 10-15 perc elteltével a táptalaj telítődik oxigénnel.
- A kalibrálás előtt a transzmitteren beállítjuk, hogy a mérés milyen nyomáson történik. Ezt az M400-as transzmitter esetén higanymilliméterben kell megadni.
- A kalibrálás ebben az esetben csak egy pontban történik, amely során beállíthatjuk az adott körülmények között a 100%-os telítettséget. A 0%-ot akkor mér a rendszer, ha egyáltalán nem folyik áram az elektródán.
- Megnyomjuk a CAL billentyűt a transzmitteren és kiválasztjuk a „slope calibration” lehetőséget. A kalibrációs során mért mA jelhez tartozó érték lesz a 100%.
- A sikeres kalibráció után megadja a kalibrációs egyenes meredekségét.

### Oldott oxigén szabályozása:

Az oldott oxigén mennyiségét a gyakorlatban háromféleképpen tudjuk befolyásolni. A keverő fordulatszámának növelésével a befúvatott levegőbuborékok méretét tudjuk csökkenteni. A levegő diszpergálásval csökkentjük méretét és ezzel növeljük a fajlagos felületét. Az oxigén abszorpció hatékonysága növelhető a felület növelésével. Gátat szab a fordulatszám emelésének a keverő által kifejtett nyíróerő és a motor által felvett teljesítmény nagysága. Növelni lehet az oldott oxigén mennyiségét a befúvatott levegő mennyiségének növelésével. Egy adott mennyiségű befúvatott levegő felett már nem képes a keverő többet diszpergálni, így a keverőn átfúj a levegő. Ezt a jelenséget hívjuk elárasztásnak, mely során a keverő tengelye mentén felvándorol a levegő. Minden keverőtípusnál meg kell határozni azt, hogy mennyi az a levegőmennyiség, amit az adott keverő rendszer még be tud diszpergálni.

Az oldott oxigén szintet növelni lehet a folyadékra ható nyomás növelésével. Viszont túl magas nyomás károsíthatja a mikroba növekedését és a ráadagolási nehézségeket is maga után vonhat.

Az oldott oxigén szintet automata szabályozással vagy manuálisan is végre lehet hajtani a fordulatszám és a levegő mennyiség változtatásával. Továbbá a folyamatirányító rendszeren a kettő kombinálásával is megoldható a szabályozás.

### **3.3.5. Bemenő levegő mérése és szabályozása**

A megfelelő mennyiségű bemenő levegő beállítása elengedhetetlen ahhoz, hogy a sejtek megfelelő oldott oxigén szint mellett tudjanak növekedni. A mérése rotaméterrel történik, szabályozására egy megfelelően kiképzett szabályozó szelep szükséges. A levegőt L/min mértékegységben mérjük, de a léptéknöveléshez használt érték az egységnyi térfogatba bevitt levegő mennyisége, melyet VVM-ben adunk meg. A bemenő levegő mennyiségét a fermentáció alatt általában állandó értéken tartjuk. Ettől eltérő eset az, amikor az oldott oxigén szintjét a levegő mennyiségével szeretnénk növelni, mely a beáramló levegő mennyiségének növelését igényli. Az oldott oxigénnek ezen módon történő szabályozásának hátránya, hogy a hirtelen megnövekedett levegő mennyiségére nem tud azonnal válaszolni a nyomásszabályozó és átmenetileg megnő a belső tér nyomása, mely hatással lehet az esetleges ráadagolás mértékére és a sejtek fiziológiájára.

### **3.3.6. A nyomás szabályozása**

A belső tér nyomását az elmenő levegő csővezetékére szerelt szelep állásával tudjuk szabályozni. Az általunk megadott nyomás értéket úgy tudja beállítani a folyamatirányító

rendszer, hogy a kimenő levegő áramlását megfelelő mértékben gátolja. 0%-os állásnál a szelep zárva van, és nem engedi kiáramolni a levegőt, 100%-os állásnál pedig a kiáramlás útjában nincs akadály. A nyomásszabályozó szelep megfelelő működésének kiemelt jelentősége van a következő műveletek során: sterilizálás, felsőlevegő, oltás, fermentálás és kiürítés. A nyomásszabályozót a folyamatirányító rendszer automata műveleteiben a kezelőnek nem áll módjában beavatkozni, csak a paramétertáblán beállított nyomásértéket lehet beállítani.

## **4. Automata és manuális műveletek**

### **4.1. Sterilizációs műveletek félüzemi léptékben**

A sterilizációs eljárások kiemelt fontosságúak a biotechnológiában. Minden tenyésztési módszernél függetlenül a léptéktől alapvető kritérium a monokultúras tenyésztés. A sterilizációs módját alapvetően az határozza meg, hogy milyen közeget, eszközt szeretnénk csíra-mentesíteni, így beszélhetünk fizikai (hővel, nedves hővel, UV-val), illetve kémiai (formalin, alkohol, hypo) sterilizációs módokról. A fermentációs technológiában a sterilizációs folyamata és lépései a félüzemi és a termelői léptékben nagyrészt megegyeznek. Ebben a fejezetben ezeket lépéseket fogjuk tanulmányozni és magyarázni.

#### **4.1.1. Levegőszűrő sterilizációja**

Aerob fermentációk során nagy mennyiségű levegőt juttatunk be a fermentorba a mikroorganizmusok oxigén igényének kielégítésére. A levegőben mindig jelen vannak spórák illetve a porszemcsék felületén különböző mikroorganizmusok. Így mielőtt bejut a fermentorba eltérő pórusú szűrőkön áramoltatjuk át a szennyezők leválasztása érdekében. Az utolsó szűrőnek, melynek a pórusátmérője  $0,2\ \mu\text{m}$  a mikroorganizmusok és spórák kiszűrése a feladata. Ennek érdekében ezt minden fermentáció indítása előtt sterilizálni kell. A szűrőbetét egy- vagy kétrétegű teflon, amely polikarbonát szűrőházzal van egybeépítve, ez lehetővé teszi, hogy szemrevételezéssel megállapítsuk a szűrőnek az elhasználtság fokát. Amennyiben sérülést, anyagmaradványt vagy túlzott elszíneződést tapasztalunk a szűrőt cserélni kell.

A szűrőtorny sterilizálásának menete:

- A szűrőtornyban lévő kifúvató szelepeket kézzel beállítjuk úgy, hogy a levegő kiáramlása ne legyen túl erős.
- A szűrőtorny felett található kézi membránszerelvényekkel levegőről átállunk gőzre.
- A kifúvató szelepeken a gőzáramlást pipára állítjuk.
- Ennek a gőzáramlásnak minimum 20 percig kell tartania.
- 20 perc elteltével van lehetőségünk átállni szárításba. Kézi membránszerelvényekkel átállunk gőzről levegőre.
- Ha a szűrőtornyban már nem látunk nedvességet, elzárhatjuk a kifúvató szelepeket

#### **4.1.2. A fermentor üres sterilizése gőzzel**

A fermentor feltöltés előtti, üres állapotában végezzük el, amely során a fermentorhoz tartozó csőszakaszokat is csíramentesítjük. Annak érdekében tesszük ezt, hogy a csövekben és a fermentorban a nehezen elérhető holtterek is gőzzel átjártak legyenek, melyek a táptalajjal történő sterilizálás során nem biztos, hogy megoldottak lennének. Ezt a műveletet a szűrőtorony sterilizálása mellett is végrehajthatjuk.

Üres gőzös sterilizálás menete:

- A folyamatirányító rendszeren elindítjuk az „üres-sterilizálás” műveletet.
- A műveletet szintén minimum 20 percig végezzük. Ez alatt a mintavevő kézi membrán szelepeinek nyitásával a csővezetékekben felgyülemelő kondenzvizet időközönként leeresztjük. Fokozott figyelmet igényel az oltócső szabad végén időközönként kiáramló gőz. A folyamatirányító rendszeren manuálisan tudjuk állítani a nyomásszabályozó szelep állását, így tudjuk befolyásolni a készülék belső nyomását és ezzel együtt a hőmérsékletét is.
- A folyamatirányító rendszer 20 perc elteltével figyelmeztet, hogy átállhatunk szárítás műveletébe, melyet a „kontroll” gomb megnyomásával érhetünk el.
- 80 °C-ig a rendszer steril levegő befúvatásával hűl, majd ezt követően a duplikátorba beáramló hűtővíz is segíti a lehűlést.
- 40 °C-ot elérve a rendszer átáll alaphelyzetbe.

#### **4.1.3. Tömszelence sterilizálása**

A dupla csúszógyűrűs tömszelence zárófolyadékát a technológiai gőzből bekondenzált víz, nyomását a technológiai gőzrendszer nyomása biztosítja. A zárófolyadék egyben a tömszelence kenését is biztosítja. Ha működés közben leesik a nyomás vagy elfogy a folyadékfázis, a tömszelence sterilizálása megszűnik, rosszabb esetben tönkre is mehet. Kötelező sterilizálni a tömszelencét a nyári illetve a téli leállítás, fertőzött fermentáció, energiaszünet, a tömszelencét is érintő javítás után. Javasolt sterilizálni a tömszelencét 3-4 ciklusonként, illetve különösen nagy terhelés és fordulatszámmal futtatott ciklus után.

Tömszelence sterilizálásának menete:

- A készülék alaphelyzetben van.
- A zárófolyadék tartály hűtővíz bemenő szelepét elzárjuk

- Megnyitjuk a zárófolyadék tartály alján lévő gömbcsapot, melyből kis mennyiségű kondenzvíz folyik ki.
- A tömszelence legmélyebb pontján lévő gömbcsapot óvatosan nyitjuk. Ezzel megkezdjük a tömszelence ürítését. Törekedjünk arra, hogy kis elvétellel ürüljön a zárófolyadék tartály, hogy megvédjük a tömszelencét a hirtelen felmelegedéstől.
- A zárófolyadék tartályban a hőmérséklet eléri a 150 °C-ot, jelezve azt, hogy a tartályból a kondenzvíz kiürült.
- Amikor a gőz megjelenik a tömszelence legalsó pontján, a szelepen a gőzkiáramlást állítsuk pipára.
- Minimum 20 percen át sterilizzuk a tömszelencét, de lehet több is.
- 20 perc után zárjuk el a gőzkiáramlást. A zárófolyadék tartály alsó leeresztő gömbcsapját zárjuk el. A hűtővíz bemenő szelepet kb. 50%-ra nyissuk meg.
- Ahhoz, hogy a tömszelence csúszógyűrűi közötti a folyadékfilm kialakuljon, legalább 1 órát várnunk kell. Ez alatt az idő alatt a keverőt tilos elindítani.

#### **4.1.4. Fermentor feltöltése táptalajjal**

Egy fermentor teljes térfogatának általában csak a 70-80 %-ig töltjük fel. Ennek több oka is van:

- levegőztetés során megnöveljük a térfogatot
- valamennyi habtér mindig szükséges a folyadékszint felett
- tömszelence megóvása a szennyezőktől

A táptalajkomponenseket por alakban, vagy feloldást követően a fermentor felső, nyitható munkanyílásán keresztül juttathatjuk be. A megadott térfogat eléréséhez további ioncserélt- vagy hálózati vizet az oltóköron keresztül adagoljuk. A táptalajnak a tömegét tudjuk leolvasni a folyamatirányító rendszeren, de ha ismerjük a sűrűségét, könnyen kiszámolhatjuk a pontos térfogatát is.

#### **4.1.5. A táptalaj *in situ* sterilizációja gőzzel**

A táptalaj sterilizációja egy kötelező feladat, ha monokultúrás tenyészetet szeretnénk létrehozni. Azon ritka kivételektől eltekintve, amikor rendelkezésre áll egy folyamatos sterilizáló vagy egy külön erre a célra kiképzett táptalaj sterilizáló üst, a táptalajt mindig a fermentorban, a fermentorral együtt sterilizzuk. Laboratóriumi lépték (üvegfermentorok) esetén a táptalajt a

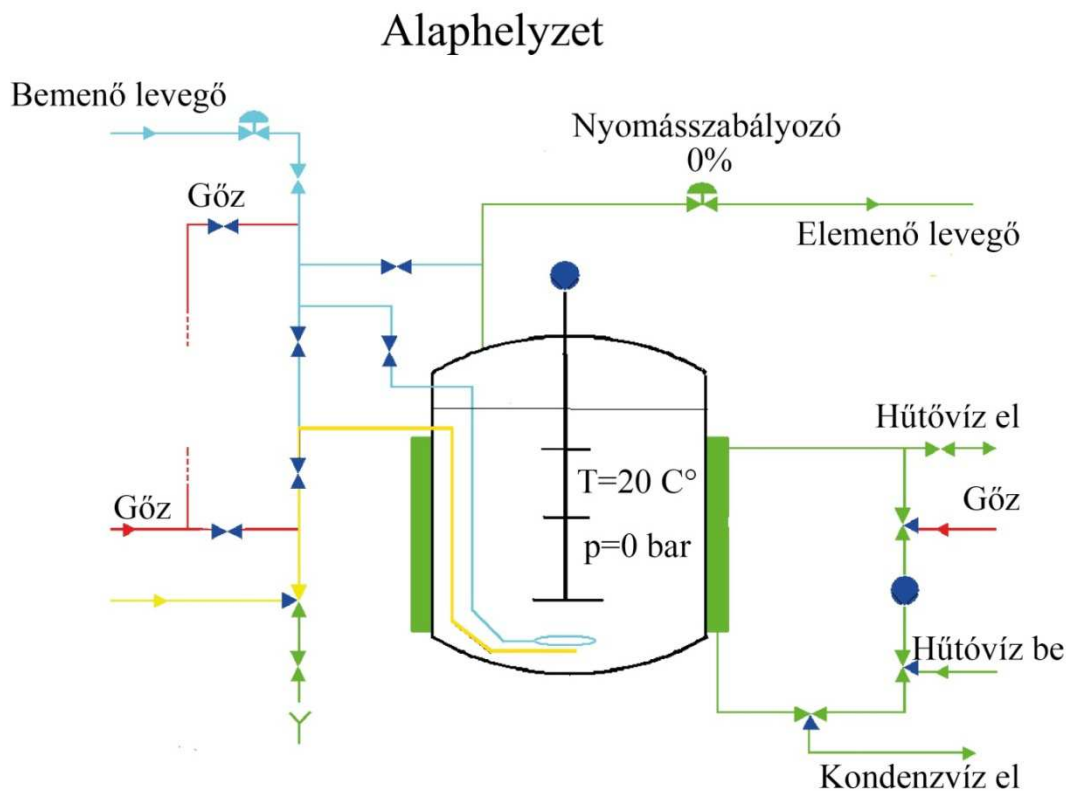
fermentorral együtt nedves gőzzel autoklávban sterilizzük, mely során a hőtartási időt a térfogattal arányosan növelni kell. *In situ* sterilizációról akkor beszélünk, amikor a bioreaktort az adott helyén, onnan nem elmozdítva csíramentesítjük. Ennek egyik változata, amely ugyancsak laboratóriumi léptékben használatos, amikor belső, elektromos fűtőszálakat alkalmazva érjük el a sterilizációs hőmérsékletet. Nagyobb térfogatú fermentorok duplikált falúak, amelybe a gőzt bevezetve érhetünk el magasabb hőmérsékletet. Ezeknek a sterilizációja során direkt gőzbevezetéssel is gyorsíthatjuk a sterilizációs hőmérséklet és a megfelelő nyomás elérését. Az eddig említett sterilizációs módok a nedves gőzzel való sterilizációhoz sorolhatók, melyek során a táptalaj hőmérsékletének legalább 121 °C-ot kell elérnie és ezen a hőmérsékleten legalább 20 percet kell eltöltenie.

150 L-es félüzemi fermentor sterilizálásának menete:

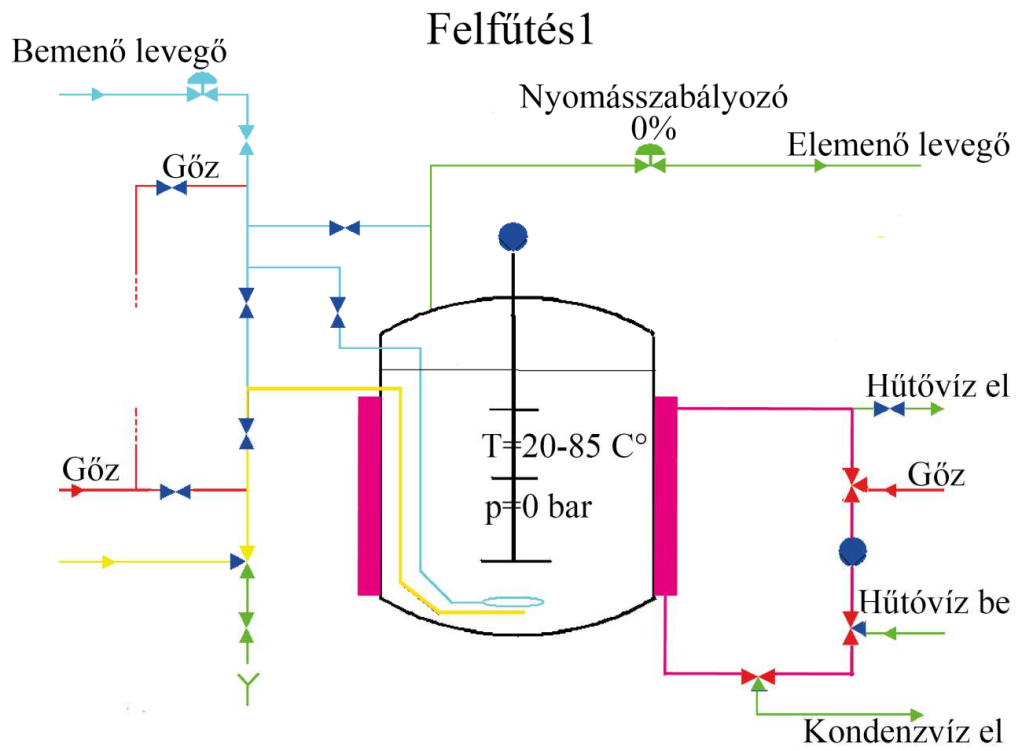
Egy megfelelő folyamatirányító rendszer segítségével ez a művelet teljesen automatikussá tehető, de a készüléken be kell állítanunk néhány kézi szerelvényt a nagyobb biztonságú sterilizáció és a helyes működés érdekében.

- Ellenőrizzük a sterilizáció indítása előtt a készülék lezártságát.
- Nyissuk pipára a mintavevő kézi membránszelepet és az adagoló csomagon lévő szerelvényeket.
- Állítsuk be a készülékábrán a fermentáció induló paramétereit, a paramétertáblán pedig sterilizációs hőfokát, idejét és a végszelep záráshoz tartozó hőmérsékletet (80-95 °C).
- Indítsuk el a sterilizációs műveletét a folyamatirányító rendszeren.
- Felfűtés1: A duplikátoron keresztül gőzbevezetéssel fűti a fermentort. A duplikátor hűtővíz be és ki szelepei zárva, csak a duplikátor kondenzvíz elmenő szelepe van nyitva. A végszelepszárás hőfok eléréseig a készülékben nincs túlnyomás. A pipára állított membránszerelvényeket ellenőrizzük. (9. ábra)
- Felfűtés2: A végszelepszabályozó a program algoritmus szerint felváltva nyitja illetve zárja a szelepet a megfelelő nyomás elérése érdekében. Duplikátoron továbbra is állandó a gőzbevezetés. Szintén egy megadott algoritmus szerint direkt gőzbevezetés történik a felsőlevegő-, az alsólevegő illetve a mintavevő szerelvényein keresztül. 100 °C felett állítsuk az adagoló csomagok kézi membránszelepeivel a gőzt pipára. Formalinos vattával és alufóliával tekerjük körbe. (10. ábra)

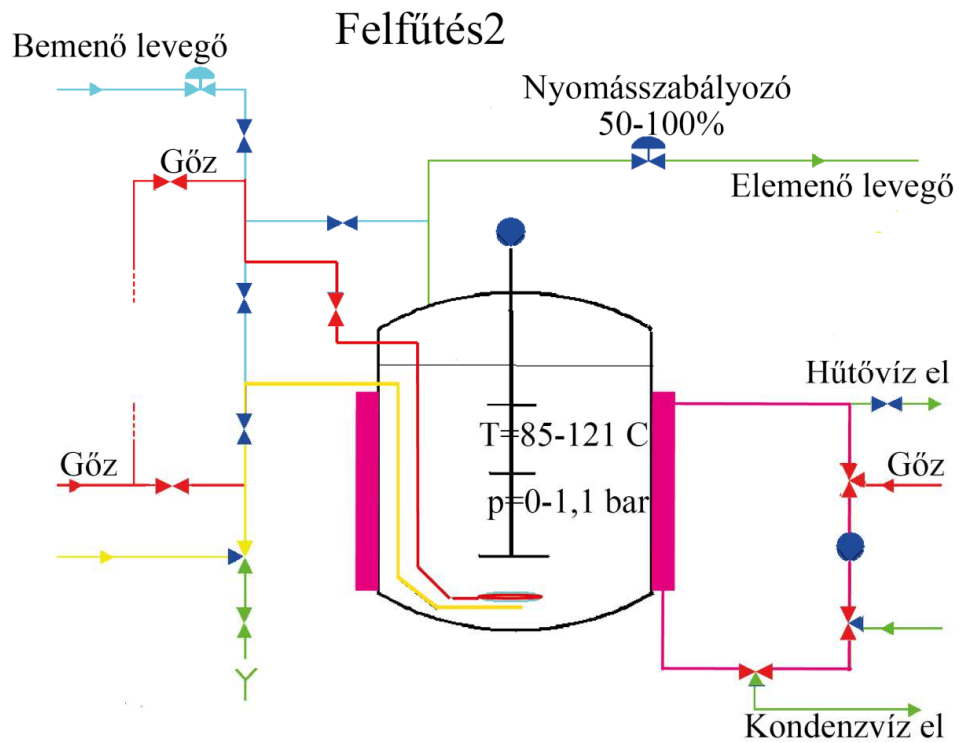
- Hőntartás: ha a rendszer elérte a 121 °C-ot átáll hőntartás műveletébe. A végszelepszabályzó nyitással, zárással automatikusan állítja a belső tér nyomását, mely 1-1,2 bar túlnyomás között ingadozik. A hőntartás a paramétertáblán megadott ideig tart. (11. ábra)
- Hűtés: A gőzbeáramlás minden szerelvényen megszűnik, helyette steril levegőt fúvat a felsőlevegő szerelvényén. Duplikátorba hűtővíz kerül. A visszahűtés megkezdésekor lezárjuk az adagoló csonkok kézi membránszelepit, de a csonkok végein a formalinos vattát és alufóliát a bekötésig rajta hagyjuk. (12. ábra)
- A sterilizálás ideje alatt ellenőrizzük a készüléket, bármilyen rendellenesség esetén sterilizálást állítsuk le.
- Ha a hőmérséklet elérte a megadott értéket a program azonnal átáll a felsőlevegő műveletébe.



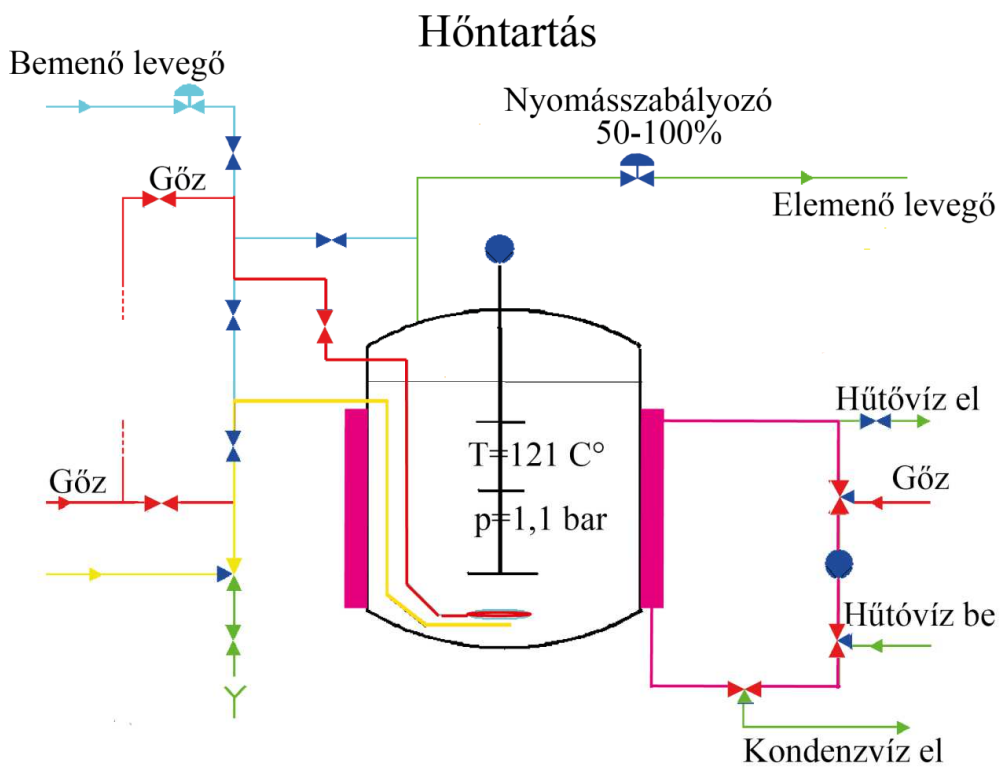
**9. ábra** Alaphelyzet. A bemenő áramok (hűtővíz, gőz, levegő) szelepei zárva vannak. A szelep színe és a vezeték színe különböző, akkor az adott szelep zárt állásban van. Ellenkező esetben nyitott állásban vannak a szelepek.



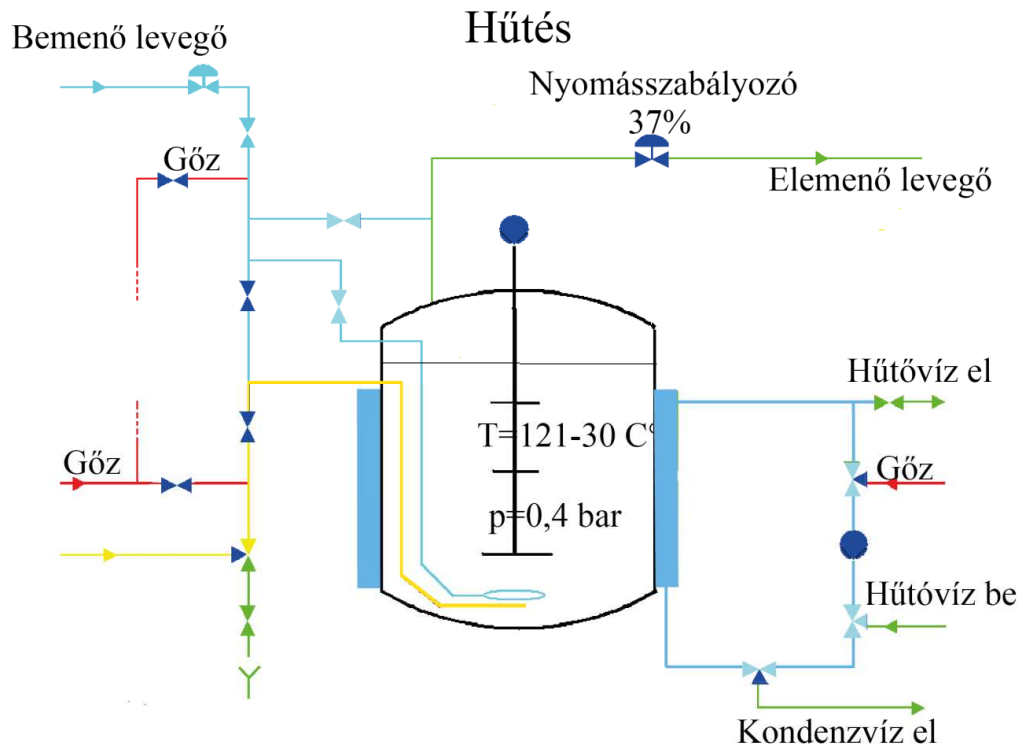
**10. ábra** Felfűtés 1. Gőz áramlik a duplikátorba. A végszelep zárásának hőfokáig ( $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) tart.



**11. ábra** Felfűtés 2. Gőz áramlik a fermentorba a levegő bemenőn. A megadott hőmérséklet (121 °C) eléréséig tart.



**12. ábra** Hőntartás. 121 °C-ot és 1,1 bar nyomást a megadott ideig tartja.



**13. ábra** Hűtés. A hőntartást követően a duplikátorba hűtővíz, a fermentorba steril levegő áramlása segíti a lehűlést a megadott hőmérsékletig. A beáramló levegő állandó nyomás alatt tartja a készüléket.

#### **4.2.Felsőlevegő művelete**

A sterilizációs műveletek elvégzésével a készülék készen áll a tenyésztéssel való leoltásra, az inokulálásra. A táptalaj sterilizációját követően a folyamatirányító rendszer felsőlevegő műveletébe kerül, mely alatt a rendszert steril állapotban tartja a leoltás megkezdéséig. Emellett számos paramétert be tudunk állítani igény szerint, melyek a következők:

- Nyomásszabályozó az általunk megadott értéken tartja a belső tér nyomását.
- A steril táptalajból mintát tudunk venni, a mintavevő csőn keresztül.
- A felsőlevegő művelete során steril levegőt fúvat a rendszerbe megadott algoritmus szerint az alsólevegő és felsőlevegő szerelvényein keresztül. Így a táptalaj rövid időn belül telítődik oxigénnel és az oldott oxigén elektródánkat a felsőlevegő művelete során kalibrálhatjuk 100%-ra.
- A motor fordulatszámát, a táptalaj hőmérsékletét és kémhatását igény szerint állíthatjuk.
- Oltást csak felsőlevegő műveletben indíthatunk.

#### **4.3.Az oltás művelete**

Laboratóriumi léptékben az inokulum mennyisége pár decilitertől 1-2 literig terjed, melyet egy arra kiképzett lombik segítségével juttatunk be a fermentorba. Általában az oltóanyag a gravitáció segítségével egyszerűen belefolyik a fermentorba, hiszen a fermentor belsejében nincs vagy minimális a túlnyomás. Ipari léptékben a termelő fermentorok oltása mindig egy másik kisebb fermentorról történik az oltókörön keresztül, melynek a sterilitásáról előzőleg gondoskodni kell. Félüzemi léptékben lehetőségünk van a két módszer közül választani. Ha az inokulum mennyisége 1-2%, tehát egy 100 literes végtérfogat esetén csak 1-2 liter, akkor a lombikról történő oltást válasszuk, ettől nagyobb mennyiség esetén a fermentorról fermentorra történő inokulálást respektáljuk oltókörön keresztül.

##### Kis mennyiségű (1-2 liter) oltóanyag inokulálásának menete:

- Félautomata művelet, mely során a folyamatirányító rendszeren az oltás parancs megadását követően a rendszer fokozatosan csökkenti a belső tér nyomását.
- Az oltáshoz két személy jelenléte szükséges. Ha a túlnyomás lecsökkent 0,1 bar alá, az egyik személy az oltócsőn mentes sapkáját megoldja és láng mellett csavarja le. A másik személy gázláng mellett tölti be az inokulumot az oltócsőn keresztül.

- A csomak lezárását követően nyomjuk meg a kontroll gombot, amely az előre megadott paraméterekkel indítja a fermentáció műveletét. A kontroll gomb megnyomása a fermentáció 0-dik időpontja.

#### Oltás oltóköron keresztül:

Ha az inokulum mennyiségéből adódóan nem tudunk oltócsomakon leoltani vagy az inokulum tenyésztése egy kisebb fermentorral történik, akkor az oltóköron keresztül kell végeznünk az inokulálást. Ezen művelet elvégzésére egy megfelelően kiképzett nyomástartó edényre van szükségünk, ami adott esetben lehet maga az inokuláló fermentor is.

Az oltóköron keresztül történő oltás során egy flexibilis szilikon cső teremti meg a kapcsolatot az inokuláló és a leoltandó fermentor között. Így a flexibilis csövet az oltókör részének kell tekinteni és biztosítani kell a sterilitását.

- A flexibilis cső egyik végét a gőzcsapra, másik végét az oltókörré kapcsoljuk. A gőzcsap megnyitása után a folyamatirányító rendszeren a Lefúvatás parancsot válasszuk. Az oltókör és a mintavevő közötti szelepek nyitott állása biztosítja, hogy a gőz a mintavevőn áramoljon ki. Ez a folyamat körülbelül 20 percig tartson.
- Az oltókört mindkét irányból gőzöltetni kell, így a 20 perc elteltével a flexibilis cső végét a gőzcsapról a csatornára helyezzük és az oltóköri gőzölés parancsot adunk. Ebben az esetben a gőz az oltókör felől a csatorna irányába áramlik. Minimum 20 percig gőzöltetjük.
- Az inokuláló fermentorra bekötjük a technikai levegőt, mely egy 0,2 µm-es szűrőn halad át az átoltás során. A bekötésen egy kézi szabályozó szelep van, mellyel a levegő áramlását tudjuk finoman szabályozni.
- A folyamatirányító rendszeren állítsuk be az oltóköri készenlét műveletét.
- Indítsuk el az oltás műveletét, mely során a fermentor belső nyomása fokozatosan csökken.
- Ha a nyomás 0,1 bar alá esett, álljunk át oltóköri készenlétből oltóköri nyomásra, és ezzel egyidőben indítsuk meg a levegő beáramlását az inokuláló fermentorba. A megnövekedett nyomás hatására a flexibilis csövön keresztül beáramlik a fermentorba az inokulum.
- Amint az inokulum kiürült a fermentorból a kontroll gomb megnyomásával áll át a rendszer a fermentáció műveletébe.

- Állítsuk a mintavevőt gőzzár alá.



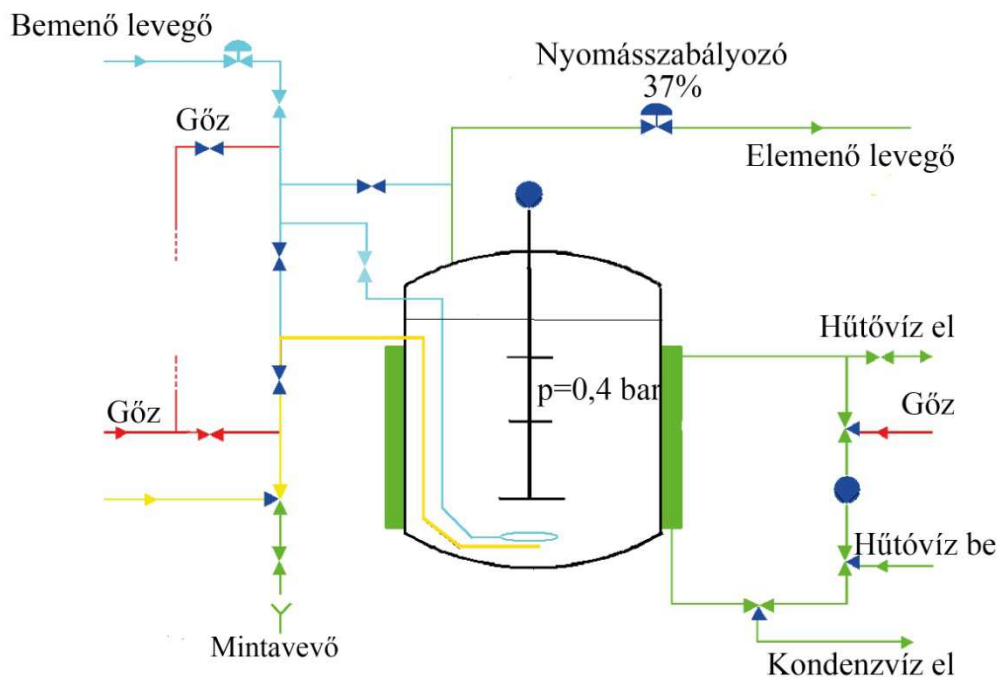
**19. kép** Oltás fermentorról fermentorra oltóköron keresztül

#### **4.4.Fermentálás művelete**

Az oltás befejezésével (a kontroll megnyomásával) a folyamatirányító rendszer átáll fermentálás műveletébe. A paramétertáblán megadott paraméterek szerint állítja be a kevertetést, bemenő levegő mennyiségét, a belső tér nyomását, kémhatását és hőmérsékletét. Ezen paraméterek módosítására lehetőségünk van a fermentáció alatt, ha a paramétertáblán vagy szabályozó panelen megváltoztatjuk az SV (set value) értékét. A diagramablak megnyitásával nyomon tudjuk követni a mért értékek időbeni változását. Fermentálás művelete alatt az előkamra gőzzár alatt van, ezzel biztosítja a steril mintavétel és részleengedés lehetőségét. A mintavételt elindíthatjuk a készülék mellett található kontroll gomb megnyomásával vagy a folyamatirányító rendszeren is. Ekkor megadott mennyiségű mintát vehetünk, de a mintavevőn elhelyezett kézi szeleppel, manuálisan is szabályozhatjuk a levenni kívánt minta mennyiségét. Befejezése a kontroll gomb megnyomásával történik, mely után újra gőzzár alá kerül a mintavevő csonk. A mintavétel ideje alatt a kevertetés minimális fordulatszámon, a levegő a felső levegő szerelvényén áramlik be.

A következő ábrán látható a fermentálás művelete alatt álló készülék szelepeinek állása.

## Fermentálás művelete



14. ábra Fermentálás művelete

### 4.5.Fermentáció befejezésével kapcsolatos műveletek

Akkor tekintünk egy fermentációt befejezettnek, amikor a termék képződéséhez szükséges feltételek már nem adottak. Egy szakaszos- batch fermentáció esetén ez a feltétel jellemzően a tápanyaghiány, melyre számos paraméter változásából következtethetünk. Folyamatos mintavételezéssel detektálhatjuk a tápanyagok koncentrációját és a biomassza tömeg növekedését, majd csökkenését. Az oldott oxigén növekedése, a szén-dioxid szint csökkenése valamint az egyszerű cukrok alkalmazása esetén a pH növekedés adhat információt arról, hogy a tenyészet hanyatló fázisba lépett. Fed-batch fermentáció során folyamatos tápanyag ráadagolás történik, általában a tenyészet növekedésének stacioner fázisától kezdődően. A fermentáció végét a megnövekedett folyadékszint indokolja. Folytonos fermentációk kevésbé jelentősek az iparban, melynek befejezését a karbantartási munkálatok indokolják.

#### 4.5.1. Részleengedés/Leengedés

Részleengedés műveletét hajtjuk végre, ha egy ráadagolásos fermentáció során a folyadékszinten szeretnénk csökkenteni vagy a leengedett tenyészetet egy másik fermentáció inokulumaként szeretnénk hasznosítani. Ha a fermentálnék csak egy bizonyos mennyiségét szeretnénk feldolgozni, akkor is ezt a műveletet választjuk. A folyamatirányító rendszer

paramétertáblájában megadott mennyiséget (kg) a részleengedés művelet indításával az oltóköron keresztül nyomatással hajthatjuk végre.

A leengedés abban különbözik a részleengedéstől, hogy ezen művelet során nem egy megadott mennyiséget, hanem a teljes fermentlé kinyomtatása történik az oltóköron keresztül.

#### **4.5.2. Inaktiválás**

Leengedés vagy részleengedés után a fermentorban mindig marad élő mikroorganizmus, melyet kezelés nélkül nem engedhetünk a csatornára. Kémiai anyagokkal és hőkezeléssel ezt a maradék fermentlevet inaktiválni kell.

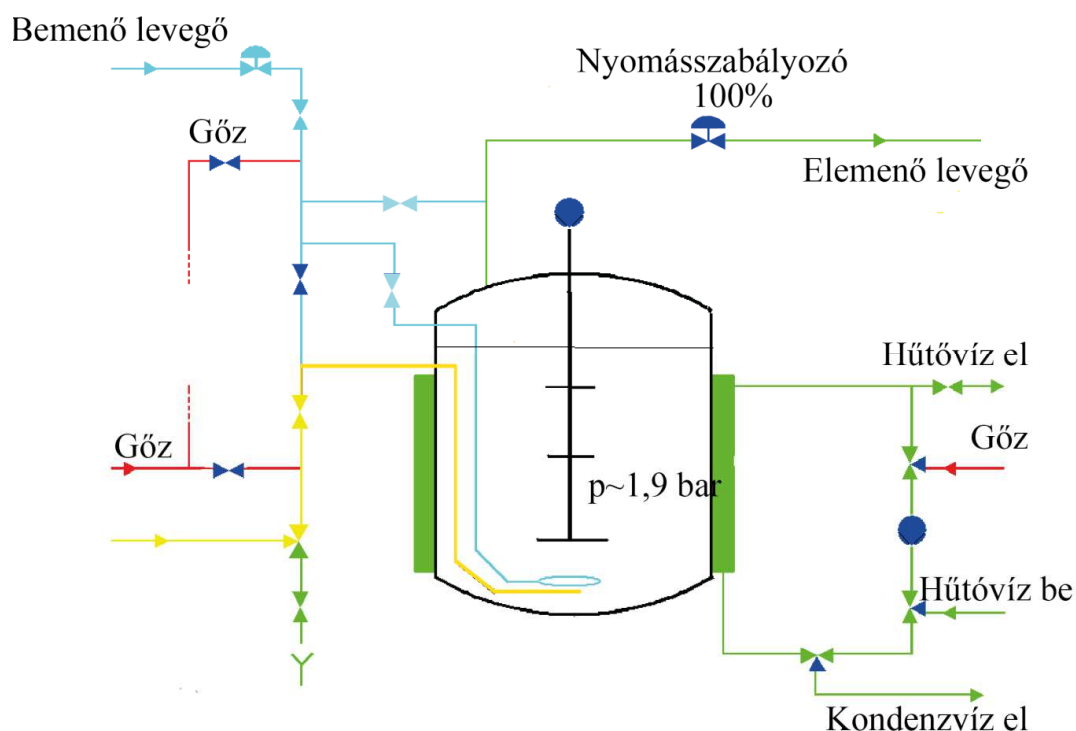
- Az inaktiválás művelet indítása előtt a fermentor alaphelyzetben van
- Felbontott munkanyíláson keresztül a keverőtengelyt és a fermentor falait lemossuk erős vízszugárral.
- Ha szükséges 1-2 deciliter nátrium-hipoklorit/50kg fermentlé hozzáadásával fokozzuk a mikroorganizmusok inaktiválását.
- A munkanyílást visszazárjuk
- A folyamatirányító rendszeren indítjuk az inaktiválás műveletét, mely megadott hőmérsékletre (általában 85 °C) és időtartamig végzi a feltárást.
- A művelet végeztével a fermentor automatikusan alaphelyzetbe áll át.

#### **4.5.3. Kiürítés**

A kiürítés művelet az oltóköron keresztül nyomat a csatornára.

- Ellenőrizzük, hogy a tömlő egyik vége az oltócsonkra, másik vége a csatornához van rögzítve.
- A folyamatirányító rendszeren indítjuk a kiürítés programot.
- A nyomásszabályozó állása a művelet alatt teljesen zárt állapotban van, míg a bemenő levegő mennyisége 100-150 NL/min. A megnövekedett belső nyomás (2 bar) hatására fermentor tartalma az oltóköron keresztül a csatornára távozik. (14. ábra)
- Kiürítés után a készülék automatikusan alaphelyzetbe kerül.
- Kivesszük az elektródákat, megtisztítjuk és a helyükre vakdugót helyezünk.
- A munkanyíláson keresztül mossuk újra a készülék dómterét, a keverőtengelyt és a fermentor falait erős vízszugárral.
- Majd visszazárva a készüléket indítsuk el újra a kiürítés műveletet.

## Kiürítés



15. ábra Kiürítés

### 4.5.4. Készülék mosása

- A készülék dómterét, a keverőtengelyt és a falait alaposan mossuk le erős vízszugárral. Ha szükséges tegyük bele nátrium-hipokloritot vagy nátrium-hidroxidot, majd töltsük fel a készüléket vízzel amennyire csak lehet a munkanyílás tetejéig.
- Bizonyosodjunk meg a készülék zárt állapotáról, majd indítsuk el a mosás műveletét a folyamatirányító rendszeren
- A mosás 2x1 órás szakaszból áll, melynek első részében a paramétertáblán megadott hőfokon áztat (95 °C), majd a keverő fordulatszámát változtatva, gőzt és levegőt fúvat a fermentorba. Ebben a szakaszban a hőmérséklet 110-120 °C-ot is elérheti. Ezzel a hőmérséklet okozta hőtágulással átmosatjuk a levegő elmenőt és leveretjük a dómteret.
- A mosás program során 40 °C-ra visszahűti a rendszert, majd átáll alaphelyzetbe.
- Ürítjük ki a készüléket a kiürítés művelettel.
- Ha szükséges végezzük el a mosás műveletét még egyszer.

## 5. Félüzemi fermentációs gyakorlatok

Az előző fejezetekben bemutatott 150 literes félüzemi fermentor manuális és automata műveleteinek tanulmányozását követően a hallgatók a gyakorlatban is végrehajtandó feladatok részletes leírásával ismerkedhetnek meg ebben a fejezetben. A sterilizációs műveletek szakszerű tervezésének kritériumaival és annak megvalósításával. A gyakorlatokon végrehajtandó batch illetve fed-batch fermentációs technikák tanulmányozásával és azok kiértékelésével.

### 5.1. Félüzemi fermentor sterilizációja

#### Sterilizáció alapjai

A sterilizáció csíramentést jelent, ami alatt azt értjük, hogy az adott közeg vagy eszköz mentes mindenféle fertőző mikroorganizmustól. A sterilizáció az egyik legfontosabb előkészítő művelet a fermentációs iparban, hiszen kevés kivételtől eltekintve monokultúrás tenyésztés szükséges, melynek feltétele, hogy számunkra csak a hasznos mikroba legyen jelen a közegben. Egy rosszul sterilizált tápoldat nagy veszteségeket (idővesztés, anyagvesztés, gazdasági kár) okoz. Kisüzemi léptékben alkalmazott csíramentesítési eljárások közül a hővel történő élő sejt elpusztítás és a mechanikai szűrés a leggyakoribb. Mechanikai szűréssel történik a bemenő levegőnek a csíramentesítése, míg nedves hővel a folyékony közegek, csövek és az eszközök sterilizációja.

A cél tehát olyan életteret létrehozni hőkezeléssel a tenyésztési kívánt mikroba számára, melyben nincs jelen más mikroorganizmus. Egy bizonyos hőmérséklet felett minden mikroorganizmus, még a termotoleráns mikrobák is mérhető módon pusztulnak. A pusztulásnak a kinetikája függ az adott mikroorganizmus fajtájától, annak vegetatív formájától, illetve a hőkezelés fajtájától. Nedves hővel szemben az ellenálló spórák érzékenyebbek, mint száraz hővel szemben. A sejtek pusztulásának időbeli lefolyása exponenciális jellegű, elsőrendű kinetikát követ:

$$\frac{dN}{dt} = -k * N$$

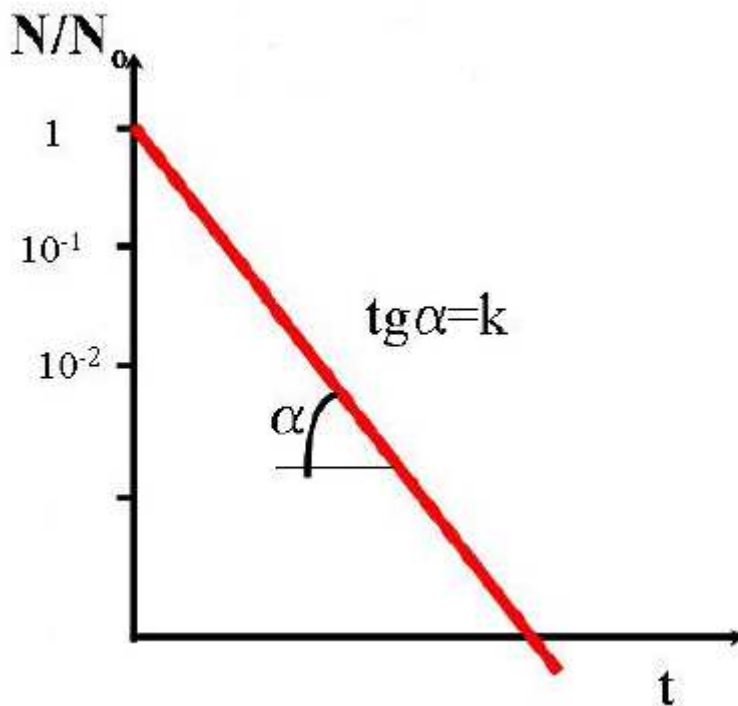
ahol, az  $N$ : az élő csíraszám ( $\text{db}/\text{cm}^3$ ),  $k$ : hőpusztulási sebességi állandó ( $\text{min}^{-1}$ ),  $t$ : idő (min).

Az egyenletet integrálva kapjuk:

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

ahol az  $N_0$  a kezdeti sejtszám, az  $N$ :  $t$  idő elteltével kapott sejtszám.

A  $k$  értéke minden esetben a mikroorganizmusra jellemző érték, mely a hőmérséklet változásával más-más értékeket vesz fel. Ha állandó hőmérsékleten vizsgáljuk a kezdeti sejtszámot és ismert idő elteltével meghatározzuk az életben maradt sejtek számát könnyen kiszámítható a  $k$  értéke az adott mikroorganizmusra. Ehhez grafikusán ábrázolni kell az idő függvényében az  $N/N_0$  értékeket, ahol az  $N_0$  a kezdeti sejtszámot az  $N$  pedig  $t$  időben mért sejtszámot jelenti.



**16. ábra** Forrás:Sevella Béla: Biomérnöki műveletek és folyamatok (2012)

Néhány mikroba hőpusztulásának sebességi állandója:

Mikroba	T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetatív)	110	27
<i>Bacillus subtilis</i> (spórák)	121,1	3
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (spórák)	104	0,051
	125	6,06
	130	17,52
<i>Clostridium botulinum</i> (spórák)	104	0,42

Forrás: Sevella Béla: Biomérnöki műveletek és folyamatok

Mivel a gyakorlatban időigényes feladat lenne meghatározni az adott fertőző mikroorganizmus hőpusztulásának sebességi állandóját, ezért a sterilizációs eljárás validálására a *Bacillus stearothermophilus* termofil baktérium spóráit alkalmazzák, melynek  $k$  állandói

ismertek. Ha egy ismeretlen fertőzés esetén szeretnénk meghatározni a sterilizálás hőfokát és időtartamát, célszerű ennek a hőtűrő baktériumnak a hőpusztulási adatait használni, hiszen jó eséllyel sikeres sterilizálási paramétereket kalkulálhatunk a fertőzésünkkel szemben.

T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )
100	0,019	111	0,267	121	2,538
101	0,025	112	0,336	122	3,16
102	0,032	113	0,423	123	3,929
104	0,051	114	0,531	124	4,881
105	0,065	115	0,666	125	6,056
106	0,083	117	1,045	127	9,293
107	0,105	118	1,307	128	11,494
108	0,133	119	1,633	129	14,2
110	0,212	120	2,037	130	17,524

Forrás: Sevela Béla: Biomérnöki műveletek példatár (2001)

A sterilizálási időnek megfelelően hosszú időtartamot választva elérhetjük azt a pontot, melynél kijelenthetjük, hogy annak a valószínűsége, hogy élő mikroorganizmus van a rendszerben minimális. Ám soha nem éri el ennek a valószínűsége a 0 értéket. A biotechnológiai iparban az általános elfogadható valószínűség, hogy nincs élő mikroorganizmus a rendszerben 99,99%, tehát a sterilizálási kritériumként az  $1 - P_0(t) = 10^{-2} - 10^{-4}$  fogadható el, ahol a  $P_0(t)$  annak a valószínűsége, hogy a  $t$  időben egy csíra még túlélő. Más szóval, csak minden ezer sterilizációból egy nem sikerül, azaz túlélő marad a rendszerben. A fermentációs tápoldatok sterilizálása *in situ*, a fermentorban történik. A tápoldat sterilizálási hőmérsékletre való felmelegítésének ideje és onnan történő lehűlésének időtartama is hozzájárul a hőpusztulás sikerességéhez, melyet minden esetben figyelembe kell venni a biztonságos, de minimális hőntartási idő meghatározásához. A hőpusztulás jelzőszáma ( $\nabla$ ) a kezdeti és végső csíraszám hányadosának a logaritmus. A teljes sterilizálásnak a hőpusztulási jelzőszámát megkaphatjuk, ha az egyes szakaszokban (felfűtés, hőntartás, lehűlés) mért pusztulási jelzőszámokat összeadjuk.

$$\nabla_{\text{összes}} = \nabla_{\text{felfűtés}} + \nabla_{\text{hőntartás}} + \nabla_{\text{hűtés}}$$

$$\nabla_{\text{összes}} = \ln \frac{N_{\text{kezdeti}}}{N_{\text{végső}}} = \ln \frac{N_{\text{kezdeti}}}{N_{\text{felfűtés}}} + \ln \frac{N_{\text{felfűtés}}}{N_{\text{hőntartás}}} + \ln \frac{N_{\text{hőntartás}}}{N_{\text{végső}}}$$

Szakaszos sterilizálásnál a felfűtési, hőntartási és hűtési szakaszok hozzájárulása a sterilizáláshoz jellemzően a következők:

$$\frac{\nabla_{\text{felfűtés}}}{\nabla_{\text{összes}}} = 0,2 ; \frac{\nabla_{\text{hőntartás}}}{\nabla_{\text{összes}}} = 0,75 ; \frac{\nabla_{\text{hűtés}}}{\nabla_{\text{összes}}} = 0,05$$

A táptalajok szakaszos, *in situ* sterilizációkor általánosan elfogadott paraméterek:

hőmérséklet: 121 °C

alkalmazott túlnyomás a készüléken: 1,1 -1,2 bar

hőntartási idő: 20-60 perc

A fermentációs térfogat növekedésével a hőntartási időt növelnünk kell, hiszen a nagyobb készülékeknek nagyobb a hőkapacitása és a hőnek minden pontba ugyanannyinak kell lennie.

### 1.Példafeladat

100 liter táptalaj elkészítését követően megvizsgáltuk a táptalaj fertőzöttségi szintjét, mely  $10^7$  db spóra/ml volt. A spórának a hőpusztulási sebességi állandója 121 °C-on  $3,2 \text{ min}^{-1}$ . Mennyi legyen a minimális hőntartási idő, ha 99,99% sterilítási kritériumnak szeretnénk megfelelni? (Tekintsünk el a felfűtés és lehűtés alatti hőpusztulástól.)

Megoldás:

$$P_0(t)=0,9999 \rightarrow 1-P_0(t)=10^{-4} = N$$

$$k_{121}=3,2 \text{ min}^{-1}$$

$$N_0=10^7 * 10^3 * 10^2 = 10^{12} \text{ db spóra}$$

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

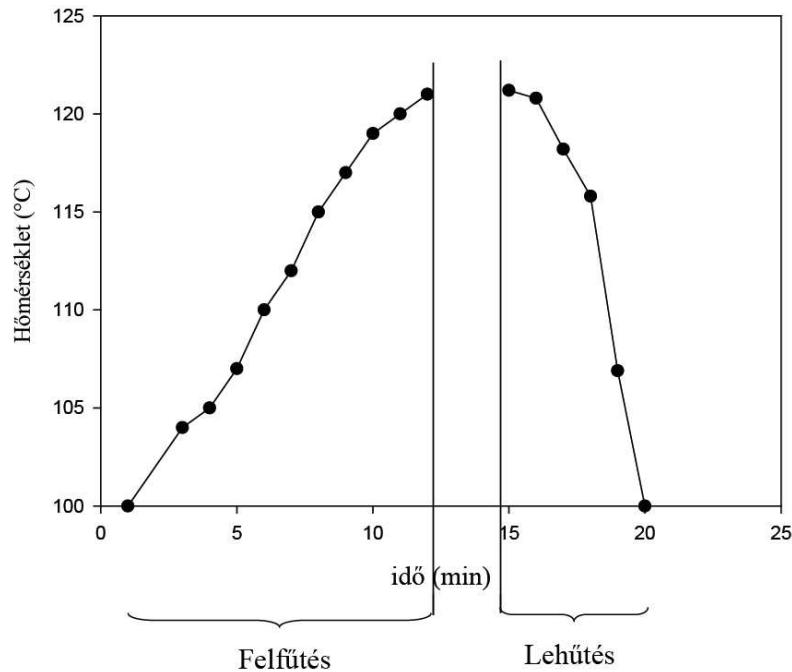
$$\ln(10^{12}/10^{-4})=-3,2t$$

$$t=11,51 \text{ min}$$

### 2.Példafeladat

100 liter táptalaj ismeretlen eredetű spórákkal fertőzött, melynek milliliterenkénti száma  $10^8$  db. Ismerjük a fermentorunk fűtési-hűtési hőbehatolási görbáját, melyeket az alábbi diagramon láthatunk. Mennyi legyen a hőntartási idő, ha 99,99% sterilítási kritériumnak szeretnénk megfelelni?

## Hőmérséklet változása a felfűtési és lehűtési szakaszokban



Megoldás:

- A sterilitási kritériumból számoljuk ki mennyi az  $N_{végső}$ .

$$P_0(t)=0,9999 \rightarrow 1-P_0(t)=10^{-4} = N$$

$$N_0=10^8 \cdot 10^3 \cdot 10^2 = 10^{15} \text{ db spóra}$$

- Számoljuk ki a hőpusztulás jelzőszámát:

$$V_{összes} = \ln \frac{N_{kezdeti}}{N_{végső}}$$

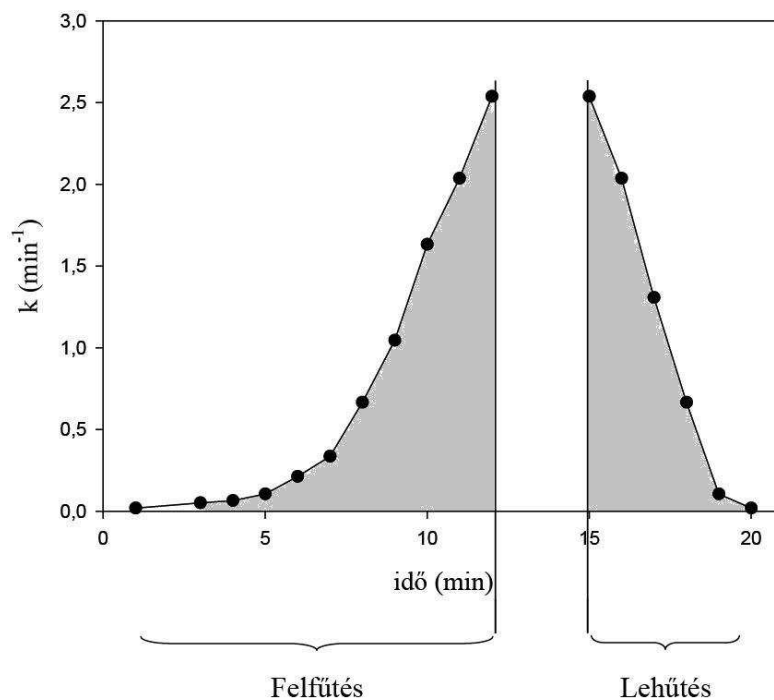
$$V_{összes} = \ln(10^{15}/10^{-4}) = 43,74$$

- Meg kell határozni a felfűtési és lehűtési szakaszokban a hőpusztulási jelzőszámot. A 12. táblázatban szereplő *Bacillus sterotherophilus* termofil baktériumfaj spóráinak hőpusztulási sebességi állandóit alkalmazva megszerkeszthető a k-idő görbe. A görbe grafikus integrálásával megkapható a felfűtési és hűtési hőpusztulási jelzőszám.

Felfűtés			Hűtés		
t (min)	T (°C)	k (min <sup>-1</sup> )	t (min)	T (°C)	k (min)
1	100	0,019	15	121,2	2,538
3	104	0,051	16	120,8	2,037
4	105	0,065	17	118,2	1,307
5	107	0,105	18	115,8	0,666
6	110	0,212	19	106,9	0,105

7	112	0,336	20	97,7	0,019
8	115	0,666			
9	117	1,045			
10	119	1,633			
11	120	2,037			
12	121	2,538			

k - idő diagram



- A görbe alatti terület kiszámításával kapható a  $\nabla_{\text{felfűtési}}$  és  $\nabla_{\text{hűtési}}$  jelzőszám.

$$\nabla_{\text{felfűtési}}: 7,46$$

$$\nabla_{\text{hűtési}}: 5,39$$

$$\nabla_{\text{hőntartás}} = \nabla_{\text{összes}} - (\nabla_{\text{felfűtési}} + \nabla_{\text{hűtési}}) = 30,89$$

$$k_{121} = 2,538$$

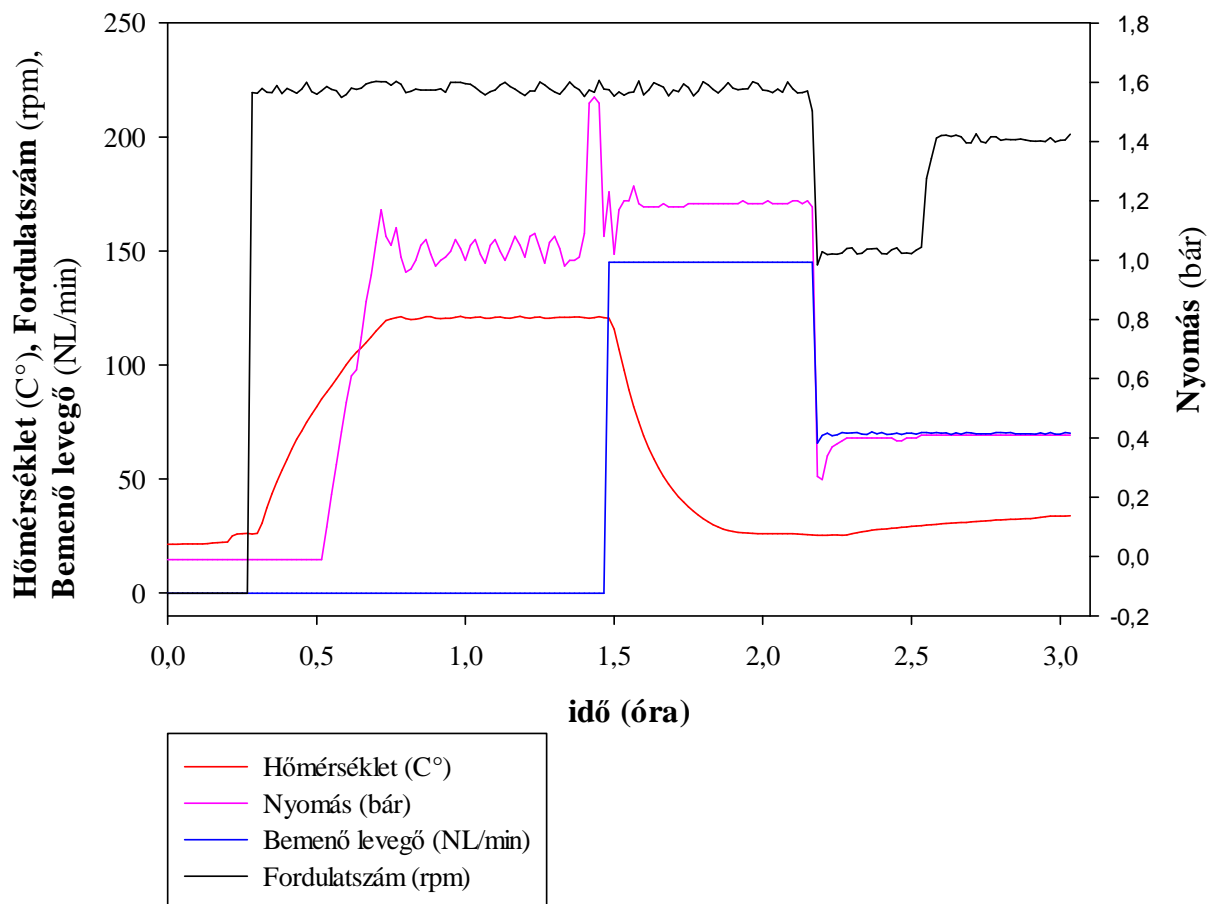
$$\nabla_{\text{hőntartás}} = k_{121} * t \rightarrow t = 12,17 \text{ min}$$

### Sterilizációs gyakorlat

A gyakorlat során a hallgatók elsajátítják egy félüzemi fermentor sterilizációs lépéseit, mely alapvető feltétele a monokultúrák fermentációk kivitelezésének. A gyakorlat magába foglalja a bemenő levegő szűrésére alkalmazott szűrőtorony sterilizációját, a fermentor üres állapotában

végrehajtandó üres-gőzös sterilizációt és a táptalaj sterilizációját. A sterilizáció egyes lépéseinél tapasztaltakat jegyzőkönyvbe felveszik és a gyakorlat végén megállapítják a sterilizáció sikerességét. A gyakorlat során a változó paramétereket feljegyzik, és megszerkesztik a sterilizáció időprofilját, melyhez segítséget nyújt az alábbi ábra.

### A táptalaj sterilizációjának időprofilja



A diagram egy ideális lefutású táptalaj sterilizációjának képét láthatjuk. A hőmérséklet emelkedésének ideje fontos paraméter a hőpusztulás és a rendszer gőzigényének szempontjából. A hőtartás ideje az előre megadott ideig tart, melyhez legalább 1 bar túlnyomás tartozik. A hőtartást követően a hűtés során a rendszer a duplikátorba engedett hűtővíz mellett a bemenő levegő áramlását is megkezdi, ezzel biztosítva a nyomást a készülékben. A diagramon 2,2 óránál látszik, hogy a sterilizáció műveletéből a felsőlevegő műveletébe áll át a folyamatirányító rendszer és a paramétertáblán megadott nyomás, levegőztetés és fordulatszám mellett tartja sterilen a táptalajt.

Gyakorlat menete:

1. lépés: Szűrőtorony sterilizációja a 4.1.1. fejezetben leírtak szerint.

2. lépés: Üres gőzös sterilizálás a 4.1.2. fejezetben leírtak szerint.
3. lépés: Tömszelence sterilizálása a 4.1.3. fejezetben leírtak szerint.
4. lépés: A gyakorlatvezető által kiadott táptalajkomponensek kimérése és a fermentorba való beadagolása. Feloldást követően mintát kell venni és meghatározni a spórák, illetve az élő sejtek számát.
5. lépés: A táptalaj sterilizálása a 4.1.5. fejezetben leírtak szerint történjen. Számolja ki a fertőzöttségi szint alapján a minimális hőntartási időt, és állítsa be a paramétertáblán a sterilizálás hőfokát, a végszelep zárásának hőmérsékletét és a hőntartás idejének hosszát.
6. lépés: A sterilizációs program befejezésével hagyjuk a folyamatszabályozó rendszert a felsőlevegő műveletébe, 18-24 óra múlva vegyünk mintát és ellenőrizzük a sterilizálás sikerességét.

Feladatok:

- Ábrázolja grafikusán a sterilizálás hőmérséklet- nyomás- és bemenő levegő időprofilját.
- Határozza meg a felfűtési szakasz és hűtési szakasz idejét. Értelmezze a nyomás és a bemenő levegő változását a sterilizálás ideje alatt.
- Készítsen mikroszkópi képet az esetleges fertőzésről.

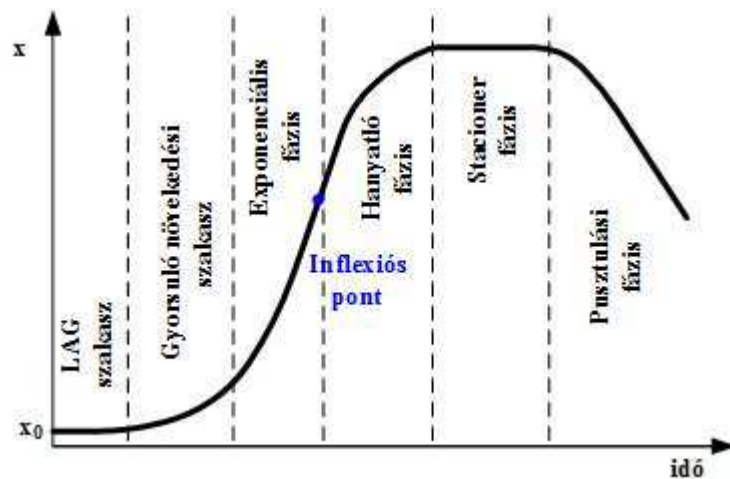
## **5.2.Batch fermentációs gyakorlat**

Batch, más néven szakaszos tenyésztésről akkor beszélünk, ha az inokulálást követően a tenyésztés növekedése további, hozzáadott szubsztrát nélkül történik. A tenyésztés során a szubsztrát metabolizálódik, biomassza és termékek keletkeznek. Szakaszos tenyésztésnek tekintjük azt is, ha a tenyésztés aerob módon illetve pH szabályozottan történik annak ellenére, hogy szubsztrátot adagolunk a folyamat során. Hiszen a folyamatos levegőztetéssel oxigént juttatunk be a közegbe, ami a légzés szubsztrátja. A pH szabályozás során pedig sav és lúg oldatokat adagolunk, mely adott esetben hasznosítható komponenseket tartalmaz a mikroba számára.

Szakaszos fermentációk kivitelezésekor egyik leginkább meghatározó a táptalaj összetételének helyes megválasztása. A táptalajban jelen levő komponensek fogják jellemzően meghatározni, hogy a fermentáció alatt mekkora sejttömeget, produktivitást érhetünk el. A fermentációs ipar döntő többségben kemoorganotróf heterotróf mikroorganizmusokat alkalmaz, melyekre jellemző, hogy az elektron- és hidrogén donor

szerves anyag. A szerves anyagból fogják a növekedéshez, termékek előállításához szükséges energiát megtermelni, így ezek mennyisége és minőségének kiválasztása a legfontosabb szempont a táptalaj összeállításának tervezésekor. Alapvetően kétféle táptalajt különböztetünk meg, a kémiaailag definiált és kémiaailag nem definiált (komplex) táptalajt. Kémiaailag definiált táptalaj esetén a tenyésztési kívánt mikroorganizmus elemi összetételének közelítése a vezérlő elv, a táptalajba mérendő biogén-, mikro- és nyomelemek arányát ez alapján állítják össze. A gyakorlatban általában a szén- és nitrogénforrások kitüntetett szereppel bírnak, jellemzően ezek a komponensek, melyek elsőként limitálni fogják a növekedést, míg más elemek főlegesen vannak jelen a táptalajban. Komplex táptalajok használata jellemző az ipari fermentációk esetén az olcsóság és a magasabb hozamok miatt. Ám ezek összetétele nem definiált, a változatlan hozamok érdekében a komponensek előzetes analízise szükséges. A táptalajtervezés első lépése a fermentációs folyamat sztöchiometriai egyenlet felírásán alapul, melynek bal oldalán a táptalaj komponenseinek mennyiségét, míg a jobb oldalán a keletkezett új sejttömeget és a termékeket tüntetjük fel. A sztöchiometriai egyenlet pontos felírásához ismernünk kell az adott mikroorganizmus elemösszetételét. A mikrobák elemösszetétele faji és tenyésztési körülmények függvénye, ám kisebb-nagyobb eltérésekkel a szárazanyagra vonatkoztatott átlagos elemi összetétel a következő: szén: 40-60%; hidrogén: 7-8%; nitrogén: 7-15%; foszfor: 2-4%; kén: 0,1-1%; oxigén: 0-38%. Az elemösszetétel összege mindig kevesebb, mint 100%, mert a sejtek egyéb elemeket is tartalmaznak, melyek az elégetéses módszerrel történő meghatározás során a hamuban maradnak vissza. A sztöchiometriai egyenletben a mikrobaképletet úgynevezett molnyi mikrobatömeeggel adják meg, melyet úgy kapnak, hogy az elemi összetételt az egyes elemek atomtömegével osztják (pl.:  $C_{3,75}H_{6,45}O_{2,06}N_{0,63} \dots + \text{hamu}$ ). A leírás megkönnyítésére bevezették az úgynevezett C-mol képletet, melyben a C együtthatója mindig 1, azaz a képletet a C-tartalomra vonatkoztatjuk (pl.:  $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2} \dots + \text{hamu}$ ). Ha a szubsztrátok és a termékek is jól definiált összetételű vegyületek, fel tudjuk írni a fermentációt jellemző sztöchiometriai egyenletet.

Egy megfelelően kivitelezett batch fermentáció során a mikroba növekedésének különböző szakaszai jól elkülöníthetőek. A növekedés addig tart, míg valamilyen, a növekedéshez szükséges komponens limitáló tényezővé válik. A növekedés szakaszai e tenyésztési módszert alkalmazása során: a lag-, gyorsuló, exponenciális, hanyatló, stacioner, és pusztuló szakaszokra oszthatjuk.



Az exponenciális szakaszban mért sejttömeg növekedés információt ad az adott táptalajon és tenyésztési körülmények mellett maximális növekedési ráta értékéről. Ha a sejttömeg természetes alapú logaritmusát ábrázoljuk az idő függvényében, az exponenciális szakasz egyenesként jelenik. Az egyenes iránytangense fogja megadni a növekedési ráta értékét.

A mikrobák növekedésével összefüggő kifejezés az eredő hozam, ami az egységnyi elfogyasztott szubsztrátra jutó sejttömeg növekedés. Jelölése  $Y_{x/S_i}$ , ahol az  $S_i$  az  $i$ -edik szubsztrátra vonatkozó eredő hozam.

$$Y_{x/S_i} = \frac{dx}{dS_i}$$

A  $dx$  a sejttömeg változás, a  $dS_i$  a szubsztrát fogyás egy meghatározott idő alatt. A hozamok kiszámolásával a táptalaj komponenseinek hasznosulását adhatjuk meg. A kemoorganotróf heterotróf mikrobák tenyésztésekor számunkra legérdekesebb szubsztrát a szén. A szénforrásnak egy része beépül az újonnan keletkezett sejttömegbe ( $\Delta S_C$ ), egy másik része energianyerésre fordítódik ( $\Delta S_E$ ).

$$\Delta S = \Delta S_C + \Delta S_E$$

A  $\Delta S_C$  kiszámolható, ha ismerjük a szénforrás C-tartalmát ( $\alpha_2$ ), a sejttömeg C-tartalmát ( $\alpha_1$ ) és a keletkezett új sejttömeg mennyiségét ( $\Delta x$ ) az alábbi egyenlet szerint:

$$\alpha_2 \Delta x = \alpha_1 \Delta S_C$$

Fermentációk kinetikai jellemzésére használt fogalom a produktivitás, mellyel jellemezhetjük a termékképződés sebességét. Önkényesen eldönthetjük, hogy a fermentációs produktumok közül melyiket tekintjük terméknek. Ez lehet valamilyen primer vagy szekunder metabolit, extracelluláris enzim vagy akár maga a sejttömeg is.

$$J = \frac{dP \left(\frac{g}{L}\right)}{dt \left(h\right)}$$

A  $P$  az általunk kiválasztott termék változása egységnyi idő alatt.

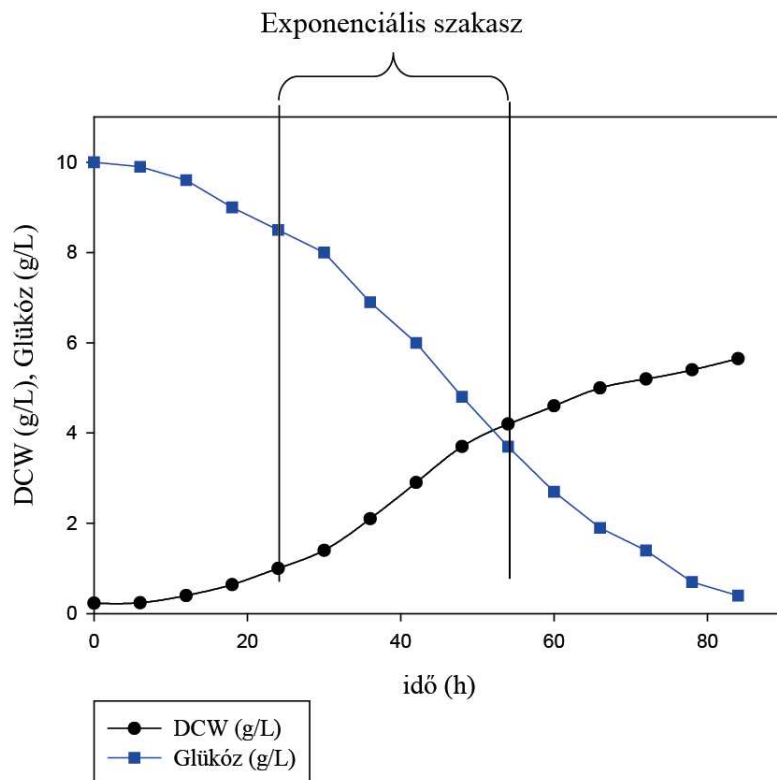
A szubsztrát felvételi ráta a szubsztrát sejtbe jutásának sebessége, melyet felírhatunk az egységnyi idő alatti szubsztrát mennyiségének csökkenéssel (volumetrikus ráta) vagy vonatkoztathatunk biomasszára is (specifikus ráta).

### 3.Példafeladat:

Szakaszos módon tenyésztünk *Aspergillus niger* fonalas gombát, definiált folyékony táptalajon. Egyedüli szénforrásként 10 g/L koncentrációjú glükózt használunk, nitrogénforrásként pedig ammóniumnitrátot. A fermentáció ideje alatt mérjük a glükóz fogyást és a biomassza képződést. A biomassza elemösszetétele a következő volt: C: 45%, O: 33%, H: 6,45%, N: 8,92%.

- Az alábbi táblázat alapján ábrázoljuk az idő függvényében a glükóz fogyást illetve a biomassza keletkezését. Határozzuk meg a növekedési görbén az exponenciális szakaszt.

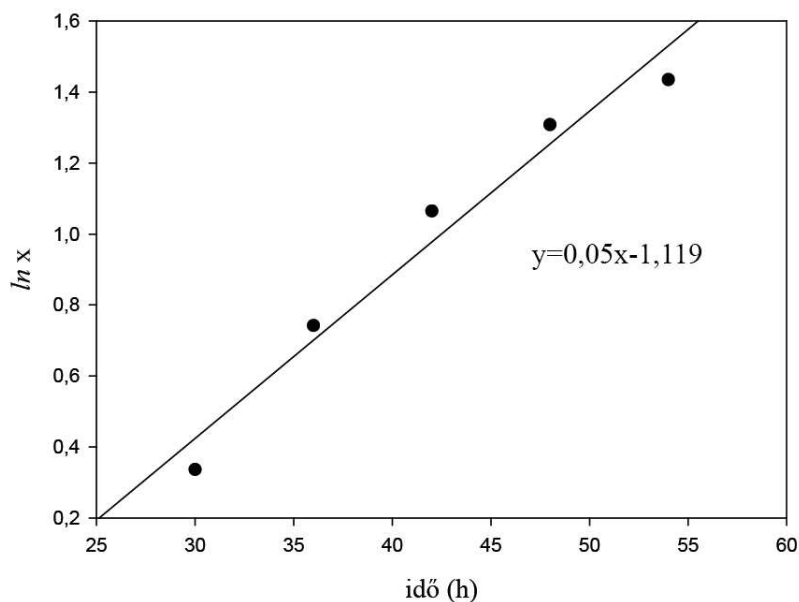
idő (h)	DCW (g/L)	Glükóz (g/L)
0	0,23	10
6	0,24	9,9
12	0,4	9,6
18	0,64	9
24	1	8,5
30	1,4	8
36	2,1	6,9
42	2,9	6
48	3,7	4,8
54	4,2	3,7
60	4,6	2,7
66	5	1,9
72	5,2	1,4
78	5,4	0,7
84	5,65	0,4



- Határozzuk meg mennyi az exponenciális szakaszban a specifikus növekedési ráta:

Ehhez grafikusán ábrázoljuk az exponenciális szakasz adatait felhasználva az idő függvényében az  $\ln x$  értékeket. Az egyenes iránytangense fogja megadni az exponenciális szakaszban a specifikus növekedési rátát.

idő (h)	DCW (g/L)	$\ln x$
30	1,4	0,336
36	2,1	0,741
42	2,9	1,064
48	3,7	1,308
54	4,2	1,435



Az egyenes meredeksége megegyezik a specifikus növekedési rátával, mely az esetünkben **0,05 h<sup>-1</sup>**.

- Számoljuk ki az eredő hozamot:

$Y = \text{keletkezett száraz sejttömeg (g/L)} / \text{szénforrás (g/L)}$

$$Y = (5,65 - 0,23) \text{ (g/L)} / 10 \text{ (g/L)} = \mathbf{0,542}$$

- Számoljuk ki, hogy a 10 g/L szénforrásból hány g/L szén épült be a biomasszába:

Biomassza C tartalma:  $\alpha_2 = 0,45$

Szénforrás C tartalma:  $\alpha_1 = 72/180 = 0,4$

$$\alpha_2 * \Delta x = \alpha_1 * \Delta S_c \rightarrow \Delta S_c = 0,45 * 5,42 / 0,4 = 6,09 \text{ g/L}$$

A szénnek a **60,9 %**-a épült be a biomasszába, **39 %**-a CO<sub>2</sub>-ként távozott.

- Írjuk fel a biomassza elemösszetételét:

$$\text{C: } 45/12 = 3,75$$

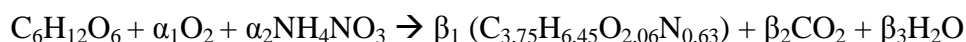
$$\text{H: } 6,45/1 = 6,45$$

$$\text{O: } 33/16 = 2,06$$

$$\text{N: } 8,92/14 = 0,63$$

A biomassza elemösszetétele: **C<sub>3,75</sub>H<sub>6,45</sub>O<sub>2,06</sub>N<sub>0,63</sub>**

- Határozzuk meg a fermentáció sztöchiometriáját:



$$\beta_1: 0,609 * 6 = 3,75 * \beta_1 \rightarrow \beta_1 = 0,974$$

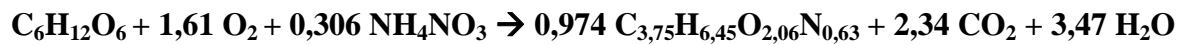
$$\beta_2: 0,39 * 6 = 1 * \beta_2 \rightarrow \beta_2 = 2,34$$

$$\alpha_2: 2 * \alpha_2 = \beta_1 * 0,63 \rightarrow \alpha_2 = 0,306$$

$$\beta_3: 12 + \alpha_2 * 4 = \beta_1 * 6,45 + 2 * \beta_3 \rightarrow \beta_3 = 3,47$$

$$\alpha_1: 6 + \alpha_1 * 2 + \alpha_2 * 3 = \beta_1 * 2,06 + \beta_2 * 2 + \beta_3 \rightarrow \alpha_1 = 1,61$$

Ismerve a sztöchiometriai együtthatókat már felírható az egyenlet:



- Számoljuk ki a szubsztrát hozamot, azaz az 1 g glükózból keletkezett száraz sejtömeget:

$$Y_{x/S_c} = (0,974 * (3,75 * 12 + 6,45 + 2,06 * 16 + 0,63 * 14)) / 180 = \mathbf{0,504} \text{ (g sejt/g glükóz)}$$

- Számoljuk ki az oxigén hozamot, azaz az 1 g oxigénből keletkezett száraz sejtömeget:

$$Y_{x/O} = (0,974 * (3,75 * 12 + 6,45 + 2,06 * 16 + 0,63 * 14)) / (1,61 * 2 * 16) = \mathbf{1,76} \text{ (g sejt/g oxigén)}$$

- Számoljuk ki a fermentáció produktivitását, azaz az esetünkben az egységnyi idő alatt keletkezett biomasszát (g/h):

$$J = 5,42 / 84 = \mathbf{0,064} \text{ g biomassza/h}$$

- Számoljuk ki a szubsztrát fogyási rátát, azaz az egységnyi idő alatt fogyott glükóz mennyiséget (g glükóz/h):

$$dS/dt = 10 / 84 = \mathbf{0,119} \text{ g glükóz/h}$$

## Gyakorlat menete:

### 1. nap

#### Inokulum készítése:

- Készítsünk 5 liter táptalajt az alábbi összetevőkből:

Összetevő	mennyiség
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/L
nyomelemoldat	20 ml/L
glükóz	10 g/L

A táptalaj pH-ját állítsuk 6,5-re 3 M NaOH-val.

Osszuk szét a táptalajt 200 ml-ként lombikokba, majd sterilezzük le autoklávban.

- A glükózt külön sterilezzük autoklávban és a táptalajhoz adagoljuk leoltás előtt.
- Szilárd táptalajon fenntartott *Aspergillus nidulans* vad típusú törzs spóráit spóramosó oldattal mossuk és adagoljuk a lombikokhoz úgy, hogy a lombikban a spórák száma 10<sup>6</sup> db/ml legyen.
- Az inokulum növesztése 24 óráig tartson 200 rpm rázatással 37 °C-on.

## 2. nap

### Sterilizációs lépések

- Végezzük el a szűrőtorony sterilizálását (4.1.1. fejezet) az üres gőzös sterilizálást (4.1.2. fejezet) és ha szükséges a tömszelence sterilizálását (4.1.3. fejezet).
- Kalibráljuk be a pH elektródát két pontban a 3.3.3. fejezetben leírtak szerint.
- Helyezzük be az oldott oxigén- és a pH elektródát a szenzor portokba.
- Az inokulum- és a fermentáció táptalaj megegyezik. Mérjük össze a komponenseket 100 literre vonatkoztatva és töltsük fel a fermentort 90 kg-ig.
- Végezzük el a táptalaj sterilizálását a 4.1.5 fejezetben leírtak szerint.

Sterilizációs paraméterei:

Hőmérséklet: 121 °C

Hőntartás ideje: 1200 sec

Végzselép zárás hőfoka: 85 °C

- Felsőlevegő műveletben kalibráljuk az oldott oxigén szenzort a 3.3.4. fejezet szerint.

Paramétertáblán állítsuk be a fermentáció alatt tartandó értékeket:

Hőmérséklet: 37 °C

Levegő: 50 NL/min

Nyomás: 0,4 bar

Fordulatszám: 200 rpm

A fermentáció alatt nem szabályozzuk az oldott oxigén és kémhatást, csak mérjük.

### Inokulálás:

- A glükóz sterilizálása külön történik a táptalaj többi komponenseitől. Mérjük ki annyi glükózt, hogy a fermentáció kezdetekor 15 g/L legyen a koncentrációja. Oldjuk fel a kimért glükózt 3 liter ioncserélt vízben és autoklávban sterilizáljuk 20 percig. A lehűlést követően adagoljuk a fermentorba a lombikról való oltásnak megfelelő módon. (4.3 fejezet)
- Ha az inokulum tenyészet kora kb 24 órás, végzük el az oltást lombikról a 4.3. fejezetben leírtak szerint. Ha az oltást követően a folyamatirányító rendszer átállt fermentáció műveletbe, vegyük le az első, 0 órás mintát a 4.4. fejezetben részletezett módon.

### **3-4. nap**

#### **Mintavételek:**

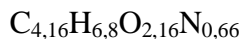
A fermentáció ideje alatt 6-8 óránként vegyünk mintát. 30 ml mintát szűrjünk le szűrőpapíron, majd a szárítsuk a szűrőpapírt és a biomasszát szárítószekrényben súlyállandóságig. 1 ml mintát centrifugáljunk le és a felülúszóból mérjük meg a glükóz tartalmat HPLC-vel. A glükóz koncentrációjának HPLC-s mérése a gyakorlatvezető útmutatásai szerint történjen.

### **5. nap**

- Ha hasznosult a glükóz állítsuk át a készüléket alaphelyzetbe.
- Hajtsuk végre az inaktiválást 85 °C-on 1200 másodperces hőntartással. (4.5.2. fejezet)
- Feltárás műveletét követően leengedhetjük a fermentlevet csatornára a kiürítés program indításával. (4.5.3. fejezet)
- Mossuk ki a fermentort a 4.5.4. fejezetben leírtak szerint.

### **Feladatok**

1. A jegyzőkönyv tartalmazza a gyakorlat során végrehajtott műveleteket.
2. Készítsen diagramot, melyben az idő függvényében ábrázolja a fermentációs paramétereket, a glükóz koncentrációját és a biomassza változását.
3. Határozza meg az exponenciális szakaszban a specifikus növekedési rátát.
4. Számolja ki az eredő-, a szubsztrát-, és az oxigén hozamokat.
5. Számolja ki a produktivitást és a szubsztrát fogyasztási rátát.
6. Határozza meg a fermentáció sztöchiometriáját, ha a biomassza elemösszetétele:



### **5.3.Fed-batch tenyésztési gyakorlat**

A szakaszos fermentáció hanyatló fázisának oka legtöbbször a szén-/energiaforrás vagy a nitrogénforrás elfogyása. A hanyatló fázis meghosszabbításaként értelmezhetjük a fed batch technikát, mely során állandó, változó vagy periodikus módon friss tápanyagokat adagolunk a rendszerbe, de fermentlé elvétel nem történik a fermentorból. Jellemzően a ráadagolás a növekedésnek a hanyatló szakaszában indul meg és működtetés idejét a fermentor térfogata határozza meg. A fermentáció szakaszos módon kezdődik, ekkor a fermentort a teljes térfogatának 50-60%-áig töltik fel és a rátáplálás a 70-85%-os töltöttségig tart. A kezdeti térfogat megválasztásának mértékadója a szenzorok elhelyezkedése a reaktorban, a

hőmérséklet szabályozás megfelelő működésének feltétele és a legalsó keverőlapát szintje. Egy másik lehetséges korlátja lehet a fed-batch technikának az esetleges inhibáló termékek akkumulálódása a közegben.

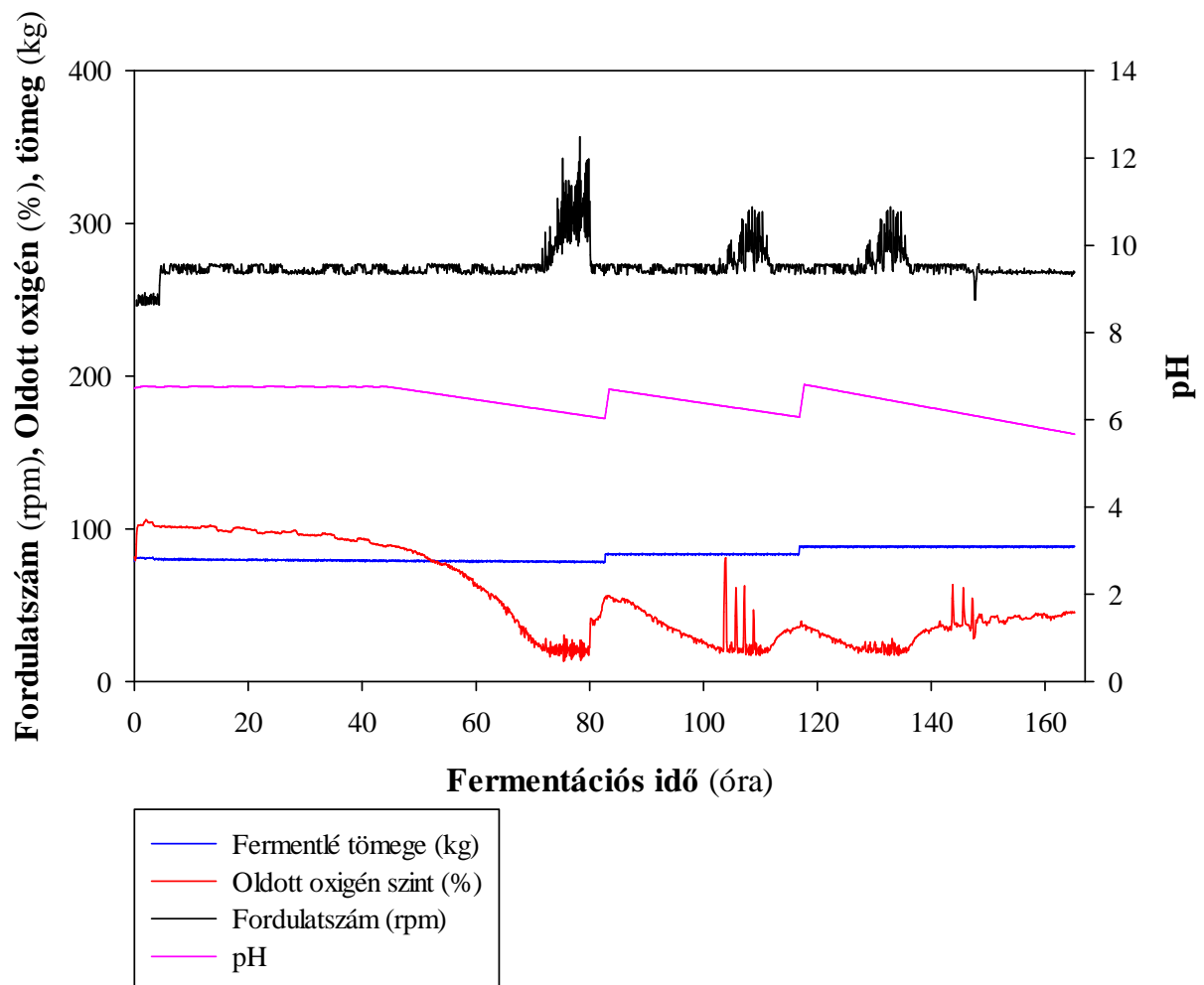
A ráadagolást célja szerint megkülönböztethetjük a következőket:

- 1) Konstans növekedési sebesség fenntartása. Akkor választjuk ezt a ráadagolási módot, ha a tenyészet egy bizonyos növekedési ráta mellett ér el magas produktivitást. A folyamatos ráadagolás sebességét és a beadagolt szubsztrátok koncentrációját kísérletes úton kell előre meghatározni, vagy folyamatos mintavétellel ellenőrizni a sejttömeg gyarapodást.
- 2) Konstans szubsztrát koncentráció fenntartása. Ennek kivitelezésekor a szubsztrát koncentrációját folyamatosan mérni kell vagy becsülni. A szubsztrát adagolás sebességét manuálisan vagy automatikusan kell állítani a mért szubsztrát koncentráció függvényében.
- 3) Limitáló szubsztrát koncentráció fenntartása. A termékképződés alacsony szubsztrát szintet igényel. A szubsztrát limitáció ellenőrzése érdekében időnként meg kell állítani a beadagolást és az oldott oxigén szint másodperceken belüli emelkedése jelzi azt, hogy az adott szubsztrát limitáló. A glükóz nagy koncentrációban nagyon sok antibiotikum bioszintézisét katabolit represszióval akadályozza. A glükóz szintet ezért megfelelően alacsony értéken szükséges tartani a tenyésztés során, különösen a fermentáció azon szakaszában, ahol az antibiotikum-szintézis történik.
- 4) Oldott oxigén változásának szabályozása rátáplálással. A növekedés hanyatló fázisában az oldott oxigén szint növekedni kezd. Ha ekkor a hanyatlást kiváltó limitáló szubsztrát adagolását megkezdjük, az oldott oxigén szint újra csökkenni kezd és mindaddig alacsony szinten marad, míg újra szubsztrát limitáció lép fel. Az ily módon szabályozott ráadagolásnál figyelniük kell, hogy a folyamat során a  $K_{La}$  értéke állandó legyen a fermentorban.
- 5) Kémhatás változásának szabályozása egyszerű cukrok ráadagolásával. A sejtek a cukrok metabolizmusa során cukor savakat képeznek, melynek következtében a közeg kémhatása csökken. Az egyszerű cukrok kimerülésével egyidőben a kémhatás hirtelen növekedni kezd. Ha ebben a pillanatban újabb egyszerű cukrok ráadagolása történik, a pH növekedése leáll, és újra fokozatosan csökkenni kezd. Ezzel a módszerrel adott esetben a szénforrás ráadagolást és a pH szabályozást is egy lépésben oldjuk meg. Nem utolsó sorban ezzel az egyszerű cukrok által kiváltott karbon katabolit repressziót is derepresszálhatjuk.

### Gyakorlat célja:

A gyakorlat során ráadagolásos fermentáció végrehajtása a cél. A gyakorlat első lépései megegyeznek a szakaszos tenyésztés lépéseivel, ám a hanyatló szakasz kezdetével glükóz ráadagolást kell állítani. A ráadagolás szakaszos módon történjen a pH változásának függvényében. Emellett állítsunk be oldott oxigén szint szabályozást, melynek a kritériuma az, hogy az oldott oxigén minimális értéke 10% lehet. Ezt a keverő fordulatszámának változásával érje el a folyamatirányító rendszer. A fermentációs paraméterek rögzítésével és ábrázolásával az alábbi diagramhoz hasonló fermentációs profil elérése és kiértékelése a cél.

### Ráadagolásos fermentáció időprofilja



- Az oldott oxigén szint csökkenése a tenyészet növekedését jelzi. Az oldott oxigén szint újbóli csökkenése a ráadagolás egyik nyomjelzője.
- A tenyészet oxigén szükségletének kielégítése érdekében az oldott oxigén szintjét 20%-on tartottuk, melyet a fordulatszám változásával értünk el. A megemelkedett fordulatszám kielégítette ezt az igényünket.

- A fermentlé tömegének változása a ráadagolás pillanatában megnövekedett. A ráadagolás szakaszos módon, két esetben történt meg.
- A pH szabályozása nem sav- és lúg oldatok alkalmazásával történt. Egyszerű cukrok alkalmazása esetén a fermentlé kémhatása fokozatosan savasodik, majd a szénforrás kimerülésekor egy hirtelen emelkedést lehet detektálni. Ennek detektálását követően történik általában az új cukrok ráadagolása, melynek következtében az emelkedés leáll, és újra fokozatosan csökkenni kezd a kémhatás.

## Gyakorlat menete:

### 1. nap

#### Inokulum készítése:

- Készítsünk 5 liter táptalajt az alábbi összetevőkből:

Összetevő	mennyiség
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g/L
nyomelemoldat	10 ml/L
pepton	4 g/L
élesztőkivonat	4 g/L
glükóz	10 g/L

A táptalaj pH-ját állítsuk 7-re 3 M NaOH-val.

Osszuk szét a táptalajt 200 ml-ként lombikokba, majd sterilezzük le autoklávban.

- A glükózt külön sterilezzük autoklávban és a táptalajhoz adagoljuk leoltás előtt.
- Szilárd táptalajon fenntartott *Penicillium crysogenum* NRRL-1951 vad típusú törzs spóráit spóramosó oldattal mossuk és adagoljuk a lombikokhoz úgy, hogy a lombikban a spórák száma 10<sup>6</sup> db/ml legyen.
- Az inokulum növesztése 24 óráig tartson 200 rpm rázatással 37 °C-on.

### 2. nap

#### Sterilizációs lépések

- Végezzük el a szűrőtorony sterilizését (4.1.1. fejezet) az üres gőzös sterilizést (4.1.2. fejezet) és ha szükséges a tömszelence sterilizését (4.1.3. fejezet).

- Kalibráljuk be a pH elektródát két pontban a 3.3.3. fejezetben leírtak szerint.
- Helyezzük be az oldott oxigén- és a pH elektródát a szenzor portokba.
- Az inokulum- és a fermentáció táptalaj megegyezik. Mérjük össze a komponenseket 80 literre vonatkoztatva és töltsük fel a fermentort 70 kg-ig.
- Végezzük el a táptalaj sterilizését a 4.1.5 fejezetben leírtak szerint.

Sterilizés paraméterei:

Hőmérséklet: 121 °C

Hőntartás ideje: 1200 sec

Végszelep zárás hőfoka: 85 °C

- Felsőlevegő műveletben kalibráljuk az oldott oxigén szenzort a 3.3.4. fejezet szerint.

Paramétertáblán állítsuk be a fermentáció alatt tartandó értékeket:

Hőmérséklet: 28 °C

Levegő: 40 NL/min

Nyomás: 0,4 bar

Fordulatszám: 150 rpm

#### Inokulálás:

- A glükóz sterilizése külön történik a táptalaj többi komponenseitől. Mérjük ki annyi glükózt, hogy a fermentáció kezdetekor 10 g/L legyen a koncentrációja. Oldjuk fel a kimért glükózt 2 liter ioncserélt vízben és autoklávban sterilizzük 20 percig. A lehűlést követően adagoljuk a fermentorba a lombikról való oltásnak megfelelő módon. (4.3 fejezet)
- Ha az inokulum tenyészet kora kb. 24 órás, végezzük el az oltást lombikról a 4.3. fejezetben leírtak szerint. Ha az oltást követően a folyamatirányító rendszer átállt fermentáció műveletbe, vegyük le az első, 0 órás mintát a 4.4. fejezetben részletezett módon.

#### Oldott oxigén szint szabályozás beállítása:

Több lehetőség van az oldott oxigén szint szabályozására: A levegő mennyiségének növelése, a keverő fordulatszámának emelése vagy a belső nyomás emelése. A gyakorlaton a keverő fordulatszámának automatikus változtatásával szabályozzuk az oldott oxigén szintjét.

- A paramétertáblát megnyitva állítsuk a DO set point-ot 30%-ra.

- Az SC0114301 szabályozó panel tuning ablakában állítsuk be a minimális fordulatszámot 150 rpm-re, a maximális fordulatszámot pedig 300 rpm-re.
- A PO2 SZABÁLYOZÁS-ra kattintva állítsuk be a szabályozást fordulatszámmal.
- Az SC011301 szabályozó panelt állítsuk CAS üzemmódba.
- A QCPO201143R szabályozó panelt állítsuk AUT üzemmódba.

### **3-4. nap**

- Mintavételek:

A fermentáció ideje alatt 6-8 óránként vegyünk mintát. 30 ml mintát szűrjünk le szűrőpapíron, majd a szárítsuk a szűrőpapírt és a biomasszát szárítószekrényben súlyállandóságig. 1 ml mintát centrifugáljunk le és a felülúszóból mérjük meg a glükóz tartalmat HPLC-vel. A glükóz koncentrációjának HPLC-s mérése a gyakorlatvezető útmutatásai szerint történjen.

- A ráadagolást 20 g/L koncentrációjú glükóz oldattal fogjuk végezni. Ehhez autoklávban sterilizzunk le 5 liter glükóz oldatot, olyan üvegedényben, amely a szilikon csővel el van látva. A sterilizést követően a szilikon csövet fűzzük be egy perisztaltikus pumpába, majd a cső szabad végét a fermentor adagoló csonkjába.
- A perisztaltikus pumpát előzőleg kalibráljuk. Állítsuk be úgy a pumpa fordulatszámát, hogy az adagolás sebessége 10 ml/ perc legyen.
- Ha a pH emelkedése elkezdődik, kezdjük el a glükóz adagolását mindaddig, amíg a pH újra csökkenni kezd. Jegyezzük fel az adagolás idejét és számoljuk ki a hozzáadott glükóz mennyiségét.
- Becsüljük meg a glükóz hasznosulásának idejét.
- A következő pH változás alkalmával járjunk el hasonló módon mint a fent említett esetben

### **5. nap**

- Állítsuk le a fermentációt.
- Hajtsuk végre az inaktiválást 85 °C-on 1200 másodperces hőntartással. (4.5.2. fejezet)
- Feltárás műveletét követően leengedhetjük a fermentlevet csatornára a kiürítés program indításával. (4.5.3. fejezet)
- Mossuk ki a fermentort a 4.5.4. fejezetben leírtak szerint.

### **Feladatok**

1. A jegyzőkönyv tartalmazza a gyakorlat során végrehajtott műveleteket.
2. Készítsen diagramot, melyben az idő függvényében ábrázolja a fermentációs paramétereket, a glükóz koncentrációját és a biomassza változását.
3. Magyarázza a pH-oldott oxigén- fordulatszám-glükóz koncentráció görbéinek alakulását.
4. Számolja ki az eredő- és szubsztrát hozamokat, valamint a szubsztrát hasznosulási rátaját.

## 6. A léptéknövelés (scale-up) kritikus paraméterei

Mint minden ipari gyártás, gazdaságilag csak akkor előnyös, ha időegység alatt nagy mennyiségű terméket tud előállítani. Nincs ez másképp a biotechnológiában sem. Ahhoz, hogy az alkalmazott élőlények által termelt piacképes terméket költséghatékonyan lehessen előállítani, nagy volumenben kell az adott gyártást végrehajtani. A gyártásra alkalmazott készülék a biotechnológiában a fermentor, melynek napjainkban, a gyakorlatban is bevált térfogata 300 m<sup>3</sup> körül maximalizálódott. A laboratóriumban kikísérletezett fermentációs paramétereket nem lehet közvetlenül alkalmazni a nagy térfogatú termelő fermentorokban. A technológia optimalizálását több szinten is el kell végezni: rázott lombikban, laborfermentorban, kísérleti üzemi fermentorban, termelő fermentorban. A laboratóriumi folyamatok ipari léptékre való átvitelét léptéknövelési folyamatnak nevezzük. A biotechnológiában félüzemi léptéknek nevezzük azt a köztes optimalizálási lépést, mely során a kísérleti eredményeket viszonylag kis költséggel, de már a termelői körülményekhez hasonló módon megvalósítható. Ez a lépték az 50-től 1000 literes térfogatú bioreaktorok alkalmazását jelenti. Rázott lombikban lehet a genetikai munka eredményét felhasználni, kipróbálni, technológiai igényeket megállapítani. Az optimalizálás ezen szintje csak az alapvető paraméterek megismerésére alkalmas (pl.: hőmérséklet, táptalajkomponensek). Hátránya, hogy a kis térfogat miatt csak korlátozott mintavételezés lehetséges, adagolások optimalizálása nem megoldható, levegőztetési problémákra nem ad választ. Laborfermentorban már optimalizálhatóak a technológiai paraméterek, amelyek továbbvihetőek a félüzemi léptékre. A félüzemi fermentorokkal való optimalizálás során már a méretnövelési problémák megoldásain van a hangsúly. Számos léptéknövelési paramétert figyelembe kell venni a folyamat optimalizálása során, melyek közül a legfontosabbak a következők:

- (1) Az inokulum mennyisége: Batch fermentáció során az inokulum mennyisége döntően meghatározza a fermentáció időbeli lefolyását. A legtöbb esetben a szekunder metabolitok képződése a növekedésnek az idiofázisában történik, így a lag, a gyorsuló és exponenciális szakaszok időbeli elhúzódása gazdaságilag előnytelen. Ezért célszerű azt a megfelelő inokulum mennyiséget és azokat a léptéknövelési térfogatokat alkalmazni, amellyel a leghamarabb jutunk el a mikroorganizmusok termelő szakaszába.
- (2) Hűtési igény növekedése a léptéknöveléssel: A fermentáció során két számottevő hőfejlődési tényezővel kell számolnunk: a mikrobák által termelt hővel és a keverő által leadott hővel. A lépték növelésével a felület négyzetesen, míg a térfogat

köbösen növekedik, így kisebb léptékben még elégséges hűtőfelület nagyobb volumenben már nem kielégítő, ezért belső hőcserélők alkalmazása lehet szükséges.

- (3) Kevertetéssel és levegőztetéssel kapcsolatos optimalizálási tényezők: A lépték növelésével a keverő fordulatszámának és a bemenő levegő mennyiségének megválasztása egymással szorosan összefüggő, az adott tenyésztetre optimalizált paraméterek szerint történnek. A gyakorlatban leggyakrabban alkalmazott léptéknövelési módszerek a levegőztetés és a fordulatszám kiválasztásakor:
- a) Az azonos egységnyi térfogatra vetített teljesítményfelvételen alapuló léptéknövelés.
  - b) Azonos nyíróerőn alapuló, azonos kerületi sebességgel történő kevertetés.
  - c) Azonos átkeveredési időn alapuló.
  - d) Azonos  $K_L a$ -n alapuló léptéknövelés.

### **6.1. Inokulálás jelentősége a léptéknövelés során**

Inokulálásnak nevezzük a biotechnológiában azt a folyamatot, amikor egy exponenciális növekedésben lévő tenyésztetet új, más mikroorganizmust nem tartalmazó táptalajra/tápoldatra átoltjuk. Az inokulálás mennyiségét %-ban adjuk meg, amely kifejezi az inokulum térfogata és a fermentációs végtérfogat közötti arányt. Ha batch fermentációról beszélünk, akkor az inokulum mennyisége döntően meghatározza a fermentáció időbeli lefolyását. A legtöbb esetben a szekunder metabolit képződés a növekedésnek az idiofázisában történik, így a lag és exponenciális szakaszok időbeli elhúzódása gazdaságilag előnytelen. Ezért célszerű azt a megfelelő inokulum mennyiséget és azokat a léptéknövelési térfogatosokat alkalmazni, amellyel a leghamarabb jutunk el a mikroorganizmusok termelő szakaszába. Az alkalmazandó inokulum mennyiség meghatározását a léptéknövelés során alapvetően az adott mikroorganizmus generációs ideje szabja meg. Egy viszonylag gyorsan növekvő (generációs idő:  $0,3-0,7 \text{ h}^{-1}$ ) baktérium tenyésztésekor általában 1-2%-os inokulum mennyiséggel, míg a lassabban növekvő (generációs idő:  $1-3 \text{ h}^{-1}$ ) fonalas gomba esetén 5-10%-os térfogattal számolhatunk. A léptéknövelés egy további sarkalatos pontja, hogy maga az átoltandó tenyésztet az exponenciális növekedési szakaszban legyen az inokulálás időpontjában. Ettől eltérő esetben hosszú adaptálódási idővel is számolnunk kell, mely megnöveli a fermentáció idejét. Egy egyszerű számítás segítségével szemléltetni lehet a léptéknövelés jelentőségét és a fermentáció idejére gyakorolt hatását.

#### 4.Példafeladat:

Az élesztő generációs ideje exponenciális növekedési szakaszban legyen  $0,5 \text{ h}^{-1}$ . Számoljuk ki, mennyi időre van szüksége egy élesztő tenyészetnek a  $10^6$  db/ml sejtszám eléréséhez egy  $10 \text{ m}^3$ -es végtérfogatú fermentáció esetén:

(1) ha  $1 \text{ L } 10^6$  db/ml sejtkoncentrációjú inokulummal oltjuk le a fermentort

(2) ha az  $1 \text{ L } 10^6$  db/ml sejtkoncentrációjú inokulummal először egy  $100 \text{ L}$ -es fermentációt végzünk, majd  $10^6$  db/ml koncentrációt elérve oltjuk át a  $10 \text{ m}^3$ -es fermentorra.

Tegyük fel, hogy az átoltást követően  $4$  óra alatt éri el a tenyészet az exponenciális szakaszt. Tehát számoljunk  $4$  órás lag, illetve gyorsuló növekedési szakasszal.

#### Megoldás:

Exponenciális növekedési szakaszban az alábbi egyenletet használhatjuk:

$$\ln N = \ln N_0 + \frac{\ln 2t}{g}$$

ahol,  $N$ : sejtszám,  $N_0$ : kiindulási sejtszám,  $g$ : generációs idő,  $t$ : idő

(1)

$$V_1 = 1 \text{ L}$$

$$C_1 = 10^6 \text{ db/ml} = 10^9 \text{ db/L}$$

$$N_0 = C_1 \cdot V_1 = 10^9 \text{ db}$$

$$V_2 = 10 \text{ m}^3$$

$$C_2 = 10^6 \text{ db/ml}$$

$$N = C_2 \cdot V_2 = 10^{13} \text{ db}$$

$$\text{Behelyettesítve: } \ln(10^{13}) = \ln(10^9) + \ln 2t / 0,5$$

$$t = 49,7 \text{ h (+4 óra adaptáció)}$$

$$\underline{\underline{t = 53,7 \text{ h}}}$$

(2)

$$V_1 = 1 \text{ L}$$

$$C_1 = 10^6 \text{ db/ml} = 10^9 \text{ db/L}$$

$$N_0 = C_1 \cdot V_1 = 10^9 \text{ db}$$

$$V_2 = 100 \text{ L}$$

$$C_2 = 10^6 \text{ db/ml}$$

$$N = C_2 \cdot V_2 = 10^{11} \text{ db}$$

$$\ln(10^{11}) = \ln(10^9) + \ln 2t / 0,5$$

$$t_1 = 4,98 \text{ h (+4 h adaptáció)}$$

$$t_1 = \mathbf{8,98 \text{ h}}$$

$$V_2 = 100 \text{ L}$$

$$C_2 = 10^6 \text{ db/ml} = 10^9 \text{ db/L}$$

$$N_0 = C_1 * V_1 = 10^{11} \text{ db}$$

$$V_3 = 10 \text{ m}^3$$

$$C_3 = 10^6 \text{ db/ml}$$

$$N = C_3 * V_3 = 10^{13} \text{ db}$$

$$\ln(10^{13}) = \ln(10^{11}) + \ln 2 / 0,5$$

$$t_2 = 4,98 \text{ h (+4 h adaptáció)}$$

$$t_2 = \mathbf{8,98 \text{ h}}$$

Összesen  $8,98\text{h} + 8,98 \text{ h} = \mathbf{17,96 \text{ óra}}$  szükséges

Ezen egyszerű példa alapján látható, hogy körülbelül harmad annyi idő alatt lehet ugyanazt a sejtkoncentrációt elérni egy köztes lépték bevezetésével.

## 5. Példafeladat

Számoljuk ki, mennyi időt lehet nyerni az inokulum mennyiségének helyes megválasztásával, ha a tenyészteti kívánt mikroorganizmus maximális növekedési rátája  $0,8 \text{ h}^{-1}$ . A választható inokulum mennyisége 2% illetve 10%.

### Megoldás:

Az alábbi egyenlettel számolhatjuk ki az időkülönbséget:

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left( \frac{I_h}{I_l} \right)$$

ahol,

$\mu_{max}$ : a maximális növekedési ráta

$I_h$ : magasabb inokulum mennyiség százalékban

$I_l$ : alacsonyabb inokulum mennyiség százalékban

$$t = (1/0,8 \text{ h}^{-1}) \ln(10\%/2\%) = 2,01 \text{ h}$$

A feladat során feltételeztük, hogy a tenyészet végig maximális növekedési ráta mellett szaporodik, így mérettől függetlenül meg tudtuk határozni a megspórolt időt a különböző inokulum mennyiségek alkalmazásával, mely a példafeladatban **2,01 óra**.

## További feladatok

- 1) Az *Escherichia coli*-nak az adott táptalajon exponenciális növekedési szakaszban a generációs ideje  $0,35 \text{ h}^{-1}$ . Ezen a táptalajon kísérletes úton meghatároztuk a lag és gyorsuló növekedési szakasz idejét, amely  $3,5 \text{ h}$  volt. Hány óra alatt érhetjük el egy  $20 \text{ m}^3$ -es fermentorban a  $10^8 \text{ db/ml}$  sejtkoncentrációt, ha rendelkezésünkre áll egy  $5 \text{ literes}$  laboratóriumi, egy  $200 \text{ literes}$  félüzemi és a  $20 \text{ m}^3$ -es termelő fermentor? Az  $5 \text{ literes}$  fermentort  $1\%$ -os inokulum mennyiséggel oltjuk le, melynek sejtkoncentrációja  $10^7 \text{ db/ml}$ .
- 2) Egy fonalas gombának az exponenciális szakaszban a növekedési rátája  $0,462 \text{ h}^{-1}$ . A kísérletes úton meghatározott lag illetve gyorsuló növekedési szakasza  $12,5 \text{ óra}$ . Válasszuk ki a megfelelő inokulum mennyiségeket annak érdekében, hogy a leggyorsabban jusson el a tenyészet egy  $50 \text{ m}^3$ -es fermentorban az idiofázisba, melyhez  $20 \text{ g/L}$  biomassa koncentráció tartozik. A feladat elméleti megoldásához tetszőleges léptékeket választhatunk.

## 6.2. Kevertetéssel kapcsolatos léptéknövelési tényezők

### 6.2.1. Keverő kerületi sebessége

A keverő kerületi sebességével arányosan nő a nyíróerő is, mely adott esetben a léptéknövelés kritikus pontja lehet. A nyíróerő a kerületi sebességtől és a keverőelem típusától függ. A mechanikusan kevert tartályokban kialakuló erős nyíróerők hatására bekövetkezhetnek sejtkárosodások. Az egysejtes fermentációk fermentleve newtoni folyadékként viselkednek, melynek jellemzője, hogy a kevertetés fordulatszáma és a nyírófeszültség között egyenes arányosság van. Ha a keverőelemek geometriája megegyezik a lépték növelésével, akkor azonos nyíróerő megtartásához kisebb fordulatszámot kell választanunk a nagyobb léptékben.

## 6. Példafeladat

Hogyan változik a kerületi sebesség a lépték növelésével, ha azonos fordulatszámot használunk a két lépték között és a keverőelem típusa megegyezik.

$$N_{\text{félüzemi}} = 200 \text{ rpm} = 3,33 \text{ s}^{-1}$$

$$D_i = 0,196 \text{ m}$$

$$v_k = D_i \pi N$$

$$v_k = 0,196 \text{ m} * 3,14 * 3,33 \text{ s}^{-1} = \mathbf{2,04 \text{ m/s}}$$

$$N_{\text{termelői}} = 3,33 \text{ s}^{-1}$$

$$D_i = 1,1 \text{ m}$$

$$v_k = 1,1 * 3,14 * 3,33 = \mathbf{11,5 \text{ m/s}}$$

Mennyi legyen a termelő fermentor fordulatszáma, ha azonos kerületi sebességet szeretnénk alkalmazni?

$$2,04 = 1,1 * 3,14 * N$$

$$N = 2,04 / (1,1 * 3,14) = 0,59 \text{ s}^{-1} = \mathbf{35,4 \text{ rpm}}$$

### 6.2.2. Keveredési idő

A keveredési idő kiszámításával megkapjuk azt az időmennyiséget, ami ahhoz szükséges, hogy a fermentorba beadagolt szubsztrátum azonos koncentrációban legyen jelen a fermentor minden egyes pontjában. Erre azért van szükség, hogy az anyagátadási- és biológiai folyamatok mindenütt egyforma sebességgel folyjanak. A rátáplálásos fermentációk esetén ez az idő nem haladhatja meg a szubsztrátum felvételi sebességét, illetve a pH szabályozott fermentációk során a beadagolt sav és lúg oldatok megfelelően gyorsan legyen eloszlatva a folyadékban. A keveredési időt ( $t_k$ ) a dimenziómentes keverési szám ( $N_k$ ) meghatározásával könnyen kiszámítható, mely a keverőelemek típusa szerint más és más.

$$N_k = t_k * N$$

Egy adott keverőtípus keverési száma pedig a dimenziómentes keverési Reynolds szám ( $Re$ ) értékének függvénye. A Reynolds szám az áramlástan egyik legalapvetőbb dimenziómentes jellemzője, melyet leginkább az áramlás típusának meghatározására szolgál. Lamináris áramlás esetén a  $Re < 10$ , átmeneti tartományban  $10 < Re < 1000$ , turbulens áramláskor a  $Re > 1000$ . Ha adott körülmények között az áramlás a turbulens áramlás tartományába esik, akkor a keverési szám egy állandó értéket vesz fel.

$$Re = \frac{N * D_i^2 * \rho}{\mu}$$

### 7. Példafeladat:

A kisüzemi fermentorban a folyadék térfogata  $0,1 \text{ m}^3$ , viszkozitása  $10^{-2} \text{ Pas}$ , sűrűsége  $1000 \text{ kg/m}^3$ . 3 db Rushton keverő található benne, melynek átmérője  $0,196 \text{ m}$ . Számoljuk ki a keveredési időt, ha a fordulatszám:

- (1) 100 rpm
- (2) 200 rpm
- (3) 300 rpm
- (4) 400 rpm

(1)

Számoljuk ki a keverési Reynolds számot:

$$Re = \frac{N * D_i^2 * \rho}{\mu}$$

Ahol,  $N$ : a fordulatszám [ $s^{-1}$ ]

$D_i$ : a keverőelem átmérője [m]

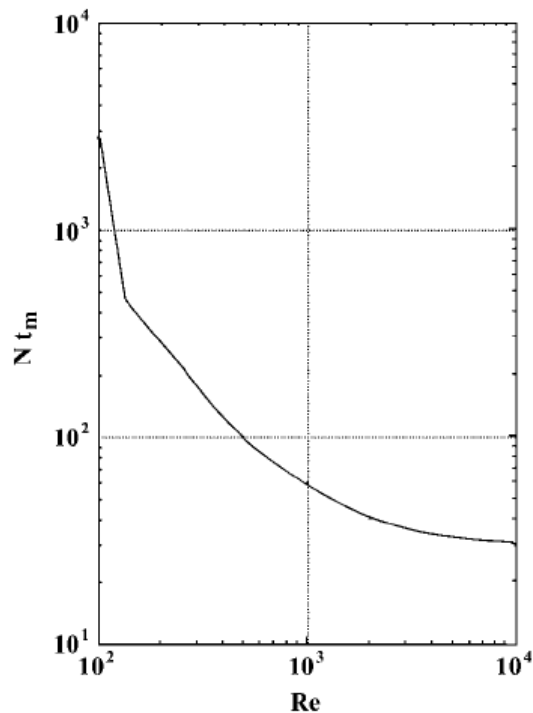
$\rho$ : a folyadék sűrűsége [ $kg/m^3$ ]

$\mu$ : a folyadék viszkozitása [Pas]

$$Re = 1,667 * 0,196^2 * 1000 / 0,01 = \underline{6403,9} \rightarrow \text{Az áramlás turbulens}$$

tartományba esik

Turbulens áramlás esetén a keverési szám egy konstans értéket vesz fel, amit a következő ábráról lehet leolvasni. A diagram a Rushton keverő típusra vonatkozik.



**17. ábra** Keverési szám függése a Re számtól. (Forrás: Shiego Katho, Fumitake Yoshida: Biochemical Engineering)

Turbulens áramlás esetén a dimenziómentes keverési szám értéke: 30

A keveredési szám:  $N_k = t_k * N$

Ahol,  $t_k$ : keverési idő [s]

$N$ : fordulatszám [ $s^{-1}$ ]

$$30 = t_k * 1,667 \rightarrow \underline{t_k = 18 \text{ s}}$$

(2) 200 rpm esetén:  $\underline{t_k = 9 \text{ s}}$

(3) 300 rpm estén:  $t_k = 6 \text{ s}$

(4) 400 rpm esetén:  $t_k = 4,5 \text{ s}$

A keverési szám a léptéknövelés során a következő egyenlet szerint alkalmazható:

$$N_k = \text{konstans} * V/D_i^3$$

### 6.2.3. Egységnyi térfogatba bevitt energia

A keverő elsődleges funkciója az energiabevitel, azaz a folyadékmozgás létrehozása. A folyadékot állandó mozgásban kell tartani a levegő diszpergálása, a gáz és folyadékfázis elválasztása és a fermentlé oldott és nem oldott komponenseinek jó elkeverése érdekében. Az egységnyi fermentlé térfogatba bevitt energia határozza meg elsődlegesen az oxigénabszorpciós viszonyokat, melyből következik, hogy a bevitt energiát növelni kell. Másrészt, mivel ez az energiabevitel a keverő teljesítményfelvételében költségként jelenik meg, egy lehetséges minimumra is törekedni kell.

A keverő által felvett teljesítmény függ a készülék és a keverőelem geometriai viszonyaitól, a kevert folyadék sűrűségétől, viszkozitásától. Egy keverő jellegzetes teljesítményfelvételi tartományát a dimenziómentes teljesítményszámra ( $N_p$ ) adják meg.

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D_i^5}$$

A teljesítményszám a Reynolds szám függvényének diagramján egymástól jól elkülöníthető 3 áramlási tartomány ismerhető fel (18. ábra). Ha az áramlás a turbulens tartományba esik, akkor a Re-szám növelésével már a teljesítményszám nem változik. A teljesítményfelvétel nőni fog, ha a keverőtengelyre több keverőelemet szerelnek és ez a növekedés lineáris a keverőelemek számával.

A keverő teljesítményfelvétele kisebb egy levegőztetett rendszernek, mint a nem levegőztetett rendszernek. A levegőztetés során a folyadék relatív sűrűsége csökkenteni fog. Ha a sűrűsége csökken, akkor a teljesítményfelvétel is csökkeni fog. A levegőztetéssel kiváltott keverő teljesítménycsökkenését a dimenziómentes levegőztetési számmal ( $N_a$ ) írható le.

$$N_a = \frac{\text{lineáris légsebesség}}{\text{keverő kerületi sebessége}} = \frac{U_G}{v_k} = \frac{Q / \frac{D_i^2 \pi}{4}}{\pi N D_i}$$

A levegőztetési szám függvényében a levegőztetés körülményeinek hatása a keverőteljesítmény felvételére jól tanulmányozható. A keverési energia aránya a levegőztetett,

illetve nem levegőztetett esetben a levegőztetési szám függvénye. Ez a függvény különböző keverőtípusok esetén változni fog, bár valamennyi görbe közel azonos határértékhez tart az  $N_a$  növekedése esetén, ez a határérték 0,3–0,4 értéknél van. A lineáris légsebességet nem a teljes fermentor keresztmetszetére, hanem a keverő által súrolt felületre számítjuk. Minden egyes fordulatszámhoz más-más levegőztetési tartomány tartozik, amelyen belül működtethető a reaktor anélkül, hogy elárasztás lépne fel. Az elárasztás olyan, mintha a keverő levegőben forogna, a gáz felaprítás és elkeverés nélkül áramlik át a rendszeren.

### 8.Példafeladat

Mennyi az egységnyi térfogatba bevitt energia:

- (a) csak kevertetéssel
- (b) kevertetés+levegőztetés

Ahol a következő paramétereket ismerjük:

A folyadék térfogata:  $V = 0,1 \text{ m}^3$

Bemenő levegő:  $Q = 90 \text{ L/min}$

A keverő fordulatszám:  $N = 150 \text{ rpm}$

A folyadék sűrűsége:  $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$

A folyadék viszkozitása:  $\mu = 10^{-3} \text{ Pas}$

A fermentor átmérője:  $D_T = 0,49 \text{ m}$

A 6 lapátos Rushton turbina átmérője:  $D_i = 0,196 \text{ m}$

A keverőelemek száma: 3

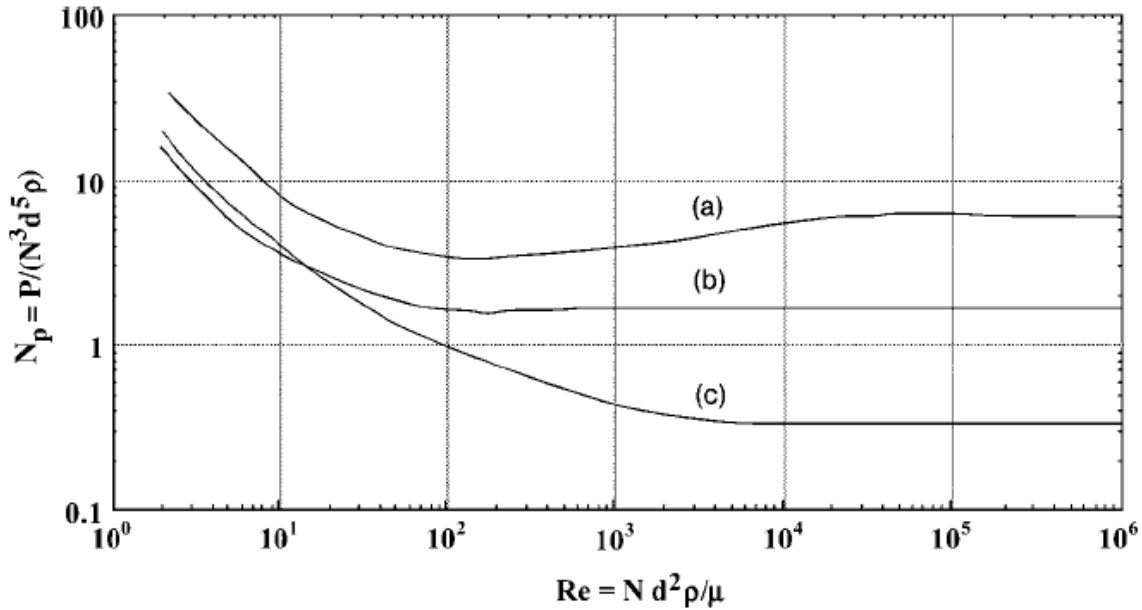
A torlólemezek szélessége:  $w_t = 50 \text{ mm}$

Számoljuk ki a keveredési Reynolds számot:

$$Re = \frac{N * D_i^2 * \rho}{\mu}$$

$Re = 2,5 * 0,196^2 * 1000 / 0,001 = 9,6 * 10^4 \rightarrow$  az áramlás a turbulens tartományba esik.

Ha ismerjük a Re szám értékét akkor az alábbi diagramról leolvashatjuk a dimenziómentes teljesítményszámot.



**18. ábra** Korreláció a Reynolds szám és a teljesítményszám között. (a) 6 lapátos Rushton turbina torlólemezekkel, (b) kétlapátos keverő torlólemezekkel, (c) 3 lapátos propeller keverő torlólemezekkel (Forrás: Shiego Katho, Fumitake Yoshida: Biochemical Engineering)

Turbulens áramlás esetén a Rushton turbina teljesítményszáma:  $N_p=6$

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 D_i^5}$$

$$P = N_p N^3 D_i^5 \rho$$

$$P = 6 \cdot 2,5^3 \cdot 0,196^5 \cdot 1000 = 27,11 \text{ W} \rightarrow 1 \text{ keverőre számolva}$$

$$3 \text{ keverőre összesen: } 3 \cdot 27,11 = 81,35 \text{ W}$$

$$\text{Egységnyi térfogatba bevitt energia csak kevertetés esetén: } P/V = \underline{\underline{813,5 \text{ W/m}^3}}$$

(b) Levegőztetéssel:

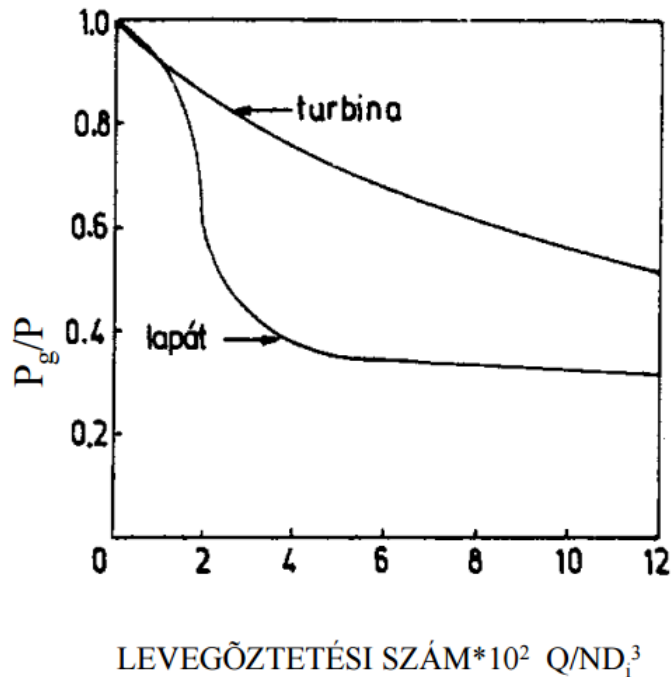
$$Q = 90 \text{ L/min} = 0,09 \text{ m}^3/\text{min} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$$

Levegőztetési dimenziómentes szám meghatározása:

$$N_a = \frac{\text{lineáris légsebesség}}{\text{keverő kerületi sebessége}} = \frac{U_G}{v_k} = \frac{Q / \left( \frac{D_i^2 \pi}{4} \right)}{\pi N D_i}$$

$$N_a = [1,5 \cdot 10^{-3} / (0,196^2 \cdot 3,14 / 4)] / (3,14 \cdot 2,5 \cdot 0,196) = 0,032$$

A levegőztetési szám értékét felhasználva az alábbi diagramról leolvasható a  $P_G/P$  aránya.



19. ábra  $P_G/P$  függése a levegőztetési számtól (Forrás: Sevelle Béla: Biomérnöki műveletek és folyamatok)

$$A \ P_G/P = 0,8 \rightarrow P_G = 0,8 \cdot P = 0,8 \cdot 81,35 = 65,08 \text{ W}$$

$$P_G/V = 650,8 \text{ W/m}^3$$

Ha azonos teljesítmény bevitelén alapuló léptéknövelést szeretnénk alkalmazni, mennyi legyen a fordulatszáma és a beáramló levegő mennyisége, ha fermentor térfogata  $10 \text{ m}^3$  és a keverők átmérője  $1,1 \text{ m}$ .

$$P/V = 813,5 \text{ W/m}^3$$

$$\text{Teljesítményfelvétel levegőztetés nélkül: } P = 10 \cdot 813,5 = 8135 \text{ W}$$

$$P = N_p N^3 D_i^5 \rho$$

$$N^3 = 8135 / (1,1^5 \cdot 6 \cdot 1000) = 0,841$$

$$N = 0,943 \text{ s}^{-1} = 56,63 \text{ rpm}$$

Azonos levegőztetési számot alkalmazva  $Na = 0,032$

$$Q = 0,032 \cdot 56,63 \cdot 1,1 \cdot 3,14 \cdot (1,1^2 \cdot 3,14 / 4) = 0,0989 \text{ m}^3/\text{s} = 5,93 \text{ m}^3/\text{min} = 5934 \text{ L/min}$$

### További feladatok

1. Egy  $10 \text{ m}^3$ -es térfogatú fermentorban az alkalmazható legmagasabb kerületi sebesség  $2,9 \text{ m/s}$ . A keverő átmérője  $1,1 \text{ m}$ , a fermentlé sűrűsége  $1200 \text{ kg/m}^3$  és viszkozitása  $10^{-2} \text{ Pas}$ . Mekkora lehet a maximális fordulatszám, és mennyi a keveredési idő ezen fordulatszámánál?

2. Mekkora az egységnyi térfogatba bevitt energia a következő rendszernek:

A folyadék térfogata:  $V = 20 \text{ m}^3$

Bemenő levegő: 0,4 VVM

A keverő fordulatszám:  $N = 100 \text{ rpm}$

A folyadék sűrűsége:  $\rho = 1100 \text{ kg/m}^3$

A folyadék viszkozitása:  $\mu = 0,02 \text{ Pas}$

A fermentor átmérője:  $D_T = 2 \text{ m}$

A 6 lapátos Rushton turbina átmérője:  $D_i / D_T = 0,3$

A keverőelemek száma: 3

A torlólemezek szélessége:  $w_t = 0,1 \text{ m}$

3. Kisüzemi fermentáció során az egységnyi térfogatba bevitt energia  $1,4 \text{ KW/m}^3$ .  
Mennyi legyen az  $50 \text{ m}^3$ -es fermentáció során a fordulatszám és a beáramló levegő mennyisége, ha a keverő átmérője  $1 \text{ m}$  és a levegőztetési szám  $6$ .

### 6.3. Hűtési igény a léptéknöveléssel

A fermentációk során kevés kivételtől eltekintve a hőmérsékletet egy megadott értéken kell tartani. A fűtéshez gőzt, a hűtéshez hálózati vizet adagolunk a duplikátorba. Döntően két tényező határozza meg, hogy a fermentációnak mekkora a hűtési igénye. A mikroorganizmusok hőtermelése és a keverő által bevitt energia. A mikrobák növekedésük közben hőt adnak le a környezetüknek, ezért a fermentáció ideje alatt a fermentort általában hűteni kell. A keverő által bevitt hőmennyiség függ az alkalmazott keverőelem és a fermentor geometriájától, a fordulatszámtól és a táptalaj reológiai tulajdonságaitól.

A mikrobák hőtermelésének intenzitása a mikroba fajlagos növekedési sebességétől függ. A fajlagos növekedési sebesség pedig korrelál az oxigén felvételi sebességgel (OUR). Hiszen a szerves vegyületek moláris égéshője közel arányos azzal az oxigén- mennyiséggel, amely az adott vegyület elégetéséhez szükséges. Minél nagyobb az adott mikroba oxigén igénye, annál több hőt termel a növekedése közben. A 20. ábrán egy sor fermentáció metabolikus hőtermelése van feltüntetve a légzési sebesség (oxigénfogyasztás) függvényében. A lineáris összefüggés azt jelenti, hogy mintegy  $518 \pm 12 \text{ KJ}$  metabolikus hőtermelés figyelhető meg minden mólnyi oxigén felhasználásakor. Félüzemi léptékben a duplikátorba bevezetett vízzel hatékonyan meg lehet oldani a hűtést, míg nagyobb léptékben már a duplikátoron kívül, belső hőcserélőre is szükség van. Hiszen a lépték növelésével a felület négyzetesen, míg a térfogat

köbösen növekedik. A beépített hőcserélők általában merőlegesek a fermentor falával, így áramlástörőként is funkcionál, mely segíti a folyadék turbulens áramlását.

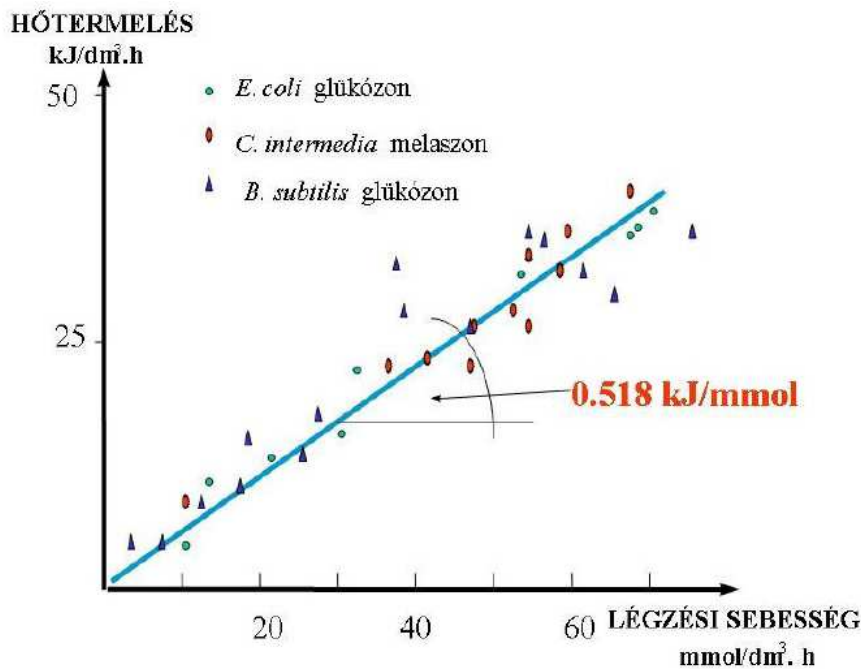
### 6.3.1. Mikroba metabolikus hőtermelése

#### 9. Példafeladat:

(a) *E. coli* fermentáció során a légzés intenzitása 40 mmol/L\*h. A fermentálé térfogata 100 L, hőmérséklete 30 °C és a fermentációt 120 h-ig futtatjuk. A számolás leegyszerűsítése érdekében a tenyésztés egész ideje alatt maximális OUR-el számoljunk.

Mennyi a mikrobák által termelt hőmennyiség?

Metabolikus hőtermelés:  $Q_{met} = V * OUR * t * \alpha$



20. ábra Az oxigénfogyasztás és a metabolikus hőtermelés kapcsolata. (Forrás: Sevela Béla: Biomérnöki műveletek és folyamatok)

$$Q_{met} = 100 \text{ [L]} * 40 \text{ [mmol/L*h]} * 0,518 \text{ [kJ/mmol]} = 2072 \text{ KJ/h}$$

$$120 \text{ h alatt} \rightarrow 248640 \text{ KJ} = \underline{\underline{248,64 \text{ MJ}}}$$

### 6.3.2. A keverő által leadott hőmennyiség

A keverő által bevitt hőmennyiséget legpontosabban kísérletes úton lehet meghatározni. Ezt csak jól szigetelt fermentorok esetén lehet alkalmazni, ahol a hőmérséklet megfelelő érzékenységgel mérhető. A mérés során nem levegőztetjük a folyadékot, a duplikátorból le

kell engedni a hűtővizet és ha lehetséges töltsük fel levegővel, így a folyadék melegedéséből becsülhető a keverő által leadott mechanikus hő. A mechanikus hő becsülhető a keverő által felvett teljesítményből is, de az energiának csak egy része alakul hővé.

### 10. Példafeladat

A fermentort feltöltjük pontosan 100 kg vízzel, majd beállítjuk a hőmérsékletét 25 °C-ra. Ezt követően kiürítjük a duplikátort és elindítjuk a kevertetést 300 rpm-el. Azt figyeltük meg, hogy a víz hőmérséklete 2 óra alatt 5 °C-al emelkedett.

Becsüljük meg a keverő által leadott hőmennyiséget:

$$\Delta t = 2 \text{ h}$$

$$\Delta T = 5 \text{ °C}$$

A víz fajhője: 4,18 KJ/kg\*°C

$$Q_k = C * m * \Delta T / \Delta t$$

$$Q_k = 4,18 \text{ KJ/kg*°C} * 100 \text{ kg} * 2,5 \text{ °C/h} = \mathbf{1045 \text{ KJ/h}}$$

Ha ezt a kevertetést alkalmazzuk egy 120 órás fermentáció alatt, akkor mennyi hő keletkezik?

$$Q_k = 120 \text{ h} * 1045 \text{ KJ/h} = 1,25 * 10^5 \text{ K} = \mathbf{125 \text{ MJ}}$$

Becsüljük meg a keverő által felvett teljesítményt 300 rpm fordulatszám esetén, ha a  $D_i = 0,196 \text{ m}$  és az  $N_p = 6$ .

Nem levegőztetett rendszerre:

$$P = N_p N^3 D_i^5 \rho$$

$$P = 6 * 5^3 * 0,196^5 * 1000 = 216,94 \text{ W}$$

3 keverőre: 650 W

Egységnyi térfogatba bevitt energia: 650 W/0,1 m<sup>3</sup> = 6,5 KW/m<sup>3</sup>

Mennyi hő fejlődne, ha az összes energia hővé alakul?

$$Q_{\text{mech}} = P * V * t$$

$$Q_{\text{mech}} = 6,5 \text{ [KW/m}^3] * 0,1 \text{ [m}^3] * 120 \text{ [h]} = 78 \text{ KWh}$$

1KWh = 3600 KJ

$$78 \text{ KWh} = 2,8 * 10^5 \text{ KJ} = \mathbf{280 \text{ MJ}}$$

Hány százaléka alakul hővé a keverő által bevitt energiának?

$$125 \text{ MJ} / 280 \text{ MJ} = \mathbf{44\%}$$

### 11. Példafeladat:

Számoljuk ki mennyi hűtővíz igénye van a fenti fermentációnak. A hűtővíz hőmérséklete 20 °C. Kössük ki azt a kritériumot, hogy a duplikátorból kilépő víz hőmérséklete minimum 5 °C-al lehet alacsonyabb, mint a fermentáció hőmérséklete. A számolás leegyszerűsítése érdekében tekintsük a hűtővíz és a fermentálé hőkapacitását egyenlőnek.

Az elvonandó hőmennyiség:  $Q_{elv} = Q_{met} + Q_k = 248,6 \text{ MJ} + 125 \text{ MJ} = 373,6 \text{ MJ}$

Számoljuk ki mennyi lesz az átlagos hőmérsékletváltozás a duplikátorban:

$$\Delta T_{\text{átl}} = [(T_{\text{flé}} - T_{\text{be}}) + (T_{\text{flé}} - T_{\text{ki}})] / 2 = [(30 - 20) + (30 - 25)] / 2 = 7,5 \text{ °C}$$

A víz fajhője:  $C = 4,18 \text{ KJ/kg} \cdot \text{°C}$

$$Q_{elv} = C \cdot m \cdot \Delta T$$

$$373600 \text{ [KJ]} = 4,18 \text{ [KJ/°C]} \cdot m \cdot 7,5 \text{ [°C]}$$

$$m = 11917 \text{ Kg} \rightarrow 11,9 \text{ m}^3 \rightarrow \underline{\underline{99,1 \text{ L/h}}}$$

### 12. Példafeladat

Számoljuk ki, hogy mennyi a fermentáció hűtővíz igénye egy 10 m<sup>3</sup>-es fermentációnak, ha a mikroba metabolikus hőtermelése azonos a fenti példával és a keverő egységnyi térfogatba bevitt teljesítmény ugyancsak 6,5 kW/m<sup>3</sup>. A bevitt energiának 44%-a hőenergiává alakul.

$$Q_{met} = V \cdot OUR \cdot t \cdot \alpha$$

$$Q_{met} = 10^4 \cdot 40 \cdot 0,518 = 2 \cdot 10^5 \text{ KJ/h} \rightarrow 120 \text{ h alatt} \rightarrow 2,5 \cdot 10^7 \text{ KJ} = \underline{\underline{2,5 \cdot 10^4 \text{ MJ}}}$$

$$Q_{mech} = P \cdot V \cdot t$$

$$Q_{mech} = 6,5 \text{ [KW/m}^3] \cdot 10 \text{ [m}^3] \cdot 120 \text{ [h]} = 7800 \text{ KWh}$$

$$7800 \text{ KWh} = 2,8 \cdot 10^7 \text{ KJ} = 2,8 \cdot 10^4 \text{ MJ} \rightarrow 44\% \text{-a} \rightarrow \underline{\underline{1,2 \cdot 10^4 \text{ MJ}}}$$

$$m = Q_{elv} / (C \cdot \Delta T)$$

$$m = 3,7 \cdot 10^7 / (4,18 \cdot 7,5) = 1,18 \cdot 10^6 \text{ kg} \rightarrow \underline{\underline{9,8 \cdot 10^3 \text{ kg/h}}}$$

Figyelem! A példák levezetése során nem vettük figyelembe, hogy a levegőztetett rendszerben kisebb a keverő által bevitt teljesítmény és a levegő által elnyelt hőmennyiséggel sem számoltunk.

### További feladatok

1. Egy mikrobának a fermentáció ideje alatt az átlagos légzési intenzitása 20 mmol/L\*h. 50m<sup>3</sup>-es fermentáció során, amely 200 óráig tart, mennyi metabolikus hő keletkezik?

2. Mennyi a keverő által leadott hőmennyiség? Az egységnyi térfogatba beforgatott energia 4 KW/h és 100 óráig tart a fermentáció. A bekevert energia 70%-a hővé alakul.
3. Mennyi a fermentáció hűtővíz igénye a következő adatok ismeretében?  
 A fermentálé térfogata 50 m<sup>3</sup>, sűrűsége 1200 kg/m<sup>3</sup>, viszkozitása 0,02 Pas. A keverő átmérője 1 m és 3 db keverőt tartalmaz. A P<sub>G</sub>/P aránya 0,7. A keverő által bevitt energiának a 80%-a hővé alakul. A fermentációt 150 óráig futtatjuk 37 °C-on és a mikroba átlagos légzési intenzitása 30 mmol/L\*h. Az alkalmazható hűtővíz hőmérséklete 15 °C és a duplikátorból kilépő víz hőmérséklete minimum 5 °C-al lehet alacsonyabb, mint a fermentáció hőmérséklete. A számolás leegyszerűsítése érdekében tekintsük a hűtővíz és a fermentálé hőkapacitását egyenlőnek.

#### **6.4. Levegőztetéssel kapcsolatos léptéknövelési paraméterek**

##### **6.4.1. Oxigén oldhatósága folyadékban**

Aerob mikroorganizmusok tenyésztése kétféle módon történhet: felületi, illetve süllyesztett tenyésztési körülmények között. A süllyesztett vagy más néven szubmerz tenyésztés lehetőségének felfedezése teremtette meg a nagy léptékű fermentációs ipar lehetőségét. Mindkét tenyésztési mód esetén a mikroba csak a tápközegben oldott oxigént veszi fel és hasznosítja. Az oxigén a légzés szubsztrátja, viszont meglehetősen alacsony koncentrációban oldódik vízben, ezért állandóan pótolni, azaz levegőztetni kell a tápközeget.

A vízben oldható oxigén mennyiségét három tényező határozza meg, ezek a víz hőmérséklete, és sótartalma, illetve a nyomás. Az oldható oxigén mennyisége nő a hőmérséklet csökkenésével (a hideg víz több oxigént képes felvenni) és a víz sótartalmának csökkenésével (az édesvíz több oxigént képes feloldani, mint a tengervíz). Az oldható oxigén mennyisége csökken a légköri nyomás csökkenésével (a víz által felvett oxigén mennyisége kisebb nagyobb tengerszint feletti magasságon).

A fermentáció során az alkalmazott táptalaj összetételétől függően az oxigén oldódása változó, a vízhez képest valamennyivel mindig kisebb. A táptalaj maximális oxigén oldhatóságának értékét elsősorban folyadék elektrolitjainak fajtái és mennyisége, valamint a szerves anyagok mennyisége határozza meg.

A vízben oldódó gáz koncentrációját a Henry- törvény segítségével számíthatjuk ki:

oldhatóság [mol/dm<sup>3</sup>] = k<sub>H</sub> [mol/dm<sup>3</sup>\*bar] \* parciális nyomás [bar], ahol k<sub>H</sub> adott hőmérsékleten adott gázra vonatkoztatott Henry-állandó.

### 13. Példafeladat:

Hány g oxigén oldódik 25 °C-os vízben?

- (a) légköri nyomáson
- (b) ha 0,4 bar túlnyomást alkalmazunk?

$$C_{O_2} [\text{mol/dm}^3] = K_H [\text{mol/dm}^3 \cdot \text{bar}] \cdot p_{(O_2)} [\text{bar}]$$

$$K_{H_{O_2}} (25 \text{ °C-on}) = 1,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 \cdot \text{bar}$$

A levegőnek 21%-a oxigén.

- (a) Légköri nyomáson:  $C_{O_2} = 1,3 \cdot 10^{-3} \cdot 0,21 \cdot 1 = 2,73 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \rightarrow \underline{8,7 \text{ mg/dm}^3}$
- (b) 0,4 bar túlnyomáson:  $C_{O_2} = 1,3 \cdot 10^{-3} \cdot 0,21 \cdot 1,4 = 3,8 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \rightarrow \underline{12,2 \text{ mg/dm}^3}$

Léptéknövelés során a vízoszlop hidrosztatikai nyomása is befolyásolja a fermentor alján az oxigén oldódását.

- (c) Mennyi egy 10 m magas fermentor alján az oxigén oldhatósága, ha 0,4 bar túlnyomást alkalmazunk?

$$p_{\text{hidrosztatikus}} = \rho \cdot g \cdot h = 1000 \cdot 9,81 \cdot 10 = 98100 \text{ Pa} = 0,98 \text{ bar}$$

$$C_{O_2} = 1,3 \cdot 10^{-3} \cdot 0,21 \cdot 2,38 = 6,49 \cdot 10^{-4} \text{ mol/dm}^3 \rightarrow \underline{20 \text{ mg/dm}^3}$$

#### 6.4.2. $K_L a$ , mint léptéknövelési paraméter

A Henry törvény alkalmazásával kiszámolható, hogy mennyi a gázok oldódása a folyadékban, azonban semmilyen útmutatást nem ad arra nézve, hogy az egyensúly mennyi idő alatt áll be. Az oxigén abszorpciójának sebességét a következő egyenlet írja le:

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C^* - C)$$

$K_L$  – az eredő folyadékoldali tömegátadási tényező [ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ],

$a$  – térfogategységre jutó anyagátadási felület [ $\text{cm}^{-1}$ ],

$C^*$  – telítési oxigénkoncentráció ( $\text{mg/dm}^3$ ),

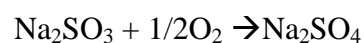
$C$  – az aktuális oldott oxigén koncentráció ( $\text{mg/dm}^3$ ).

A  $K_L$  és az  $a$  értékét külön-külön nehezen lehet megállapítani, mivel ezeket igen sok, a folyadék tulajdonságaitól, a készüléktől és az áramlási viszonyoktól függő paraméter befolyásolja, míg a  $K_L a$  szorzat kísérletesen meghatározható, ezért általában együtt használjuk és eredő folyadékoldali (térfogati) oxigénabszorpció együtthatónak [ $\text{s}^{-1}$ ] hívjuk. Az oxigén abszorpciójának a sebessége a  $K_L a$  szorzattól függ, melynek értékét befolyásolja a határfelület nagysága ( $a$ ) és a határfelület ellenállása ( $K_L$ ).

A  $K_{La}$  értékét nagymértékben befolyásolja a buborékok nagysága, melyet a keverő fordulatszámának növelésével vagy a fúvókák kiképzésével lehet csökkenteni. A fermentlé tulajdonságai, mint a sűrűség, viszkozitás, hőmérséklet, a habzástgátló típusa, az oldott sók és azok ionerőssége is hatással vannak  $K_{La}$  értékére. Egy rendszernek a  $K_{La}$  értéke mindig kisebb lesz, ha táptalajjal mérjük, mintha tiszta vízzel. Ez a különbség akár 50-60% is lehet.

A  $K_{La}$  nagyon jól jellemzi a fermentort és a mérnökök nagyon fontos jellemzőnek tartják. Meghatározása általában kísérletes úton valósítható meg, mely kiszámolható az oxigén telítési sebességéből, a szulfit oxidációjának sebességéből és a dinamikus módszert alkalmazva. Az oxigéntelítési görbe linearizálásával kapott egyenes meredeksége lesz egyenlő a  $K_{La}$  értékével. Ennek a mérésnek a nehézségei az oxigén kihajtása a rendszerből és a pontos oldott oxigén mérés. A dinamikus  $K_{La}$  meghatározása során mikrobát tenyésztünk megfelelő kevertetés és levegőztetés mellett. Egy időre leállítjuk a levegőztetést, majd az oldott oxigén növekedésének görbéjéből számolhatjuk ki a  $K_{La}$  értékét, ha ismerjük a légzés intenzitását. A görbe néhány pontjából a  $dC/dt+xQ$  linearizálást elvégezve, a kapott egyenes reciprok iránytangense megadja a  $K_{La}$  értékét. Ennek megvalósítása a gyakorlatban könnyebb, de a mikroba aktuális növekedési sebessége befolyásolhatja a mérést, ezért nem érdemes az exponenciális növekedési szakaszban alkalmazni. A dinamikus  $K_{La}$  mérés előnye, hogy tenyésztés közben nyújt információt a bioreaktor oxigénátadási viszonyairól. Hátránya viszont, hogy az oldott oxigén mérésére használt elektród általában nem valósidejű jeleket szolgáltat, mindig késésben van a valós oxigén-szint értékétől.

A szulfitmérés során az oxigénabszorpció sebességének mérését egy kémiai reakció sebességének mérésére vezetjük vissza. Az oxigénabszorpció szempontjából vizsgálni kívánt bioreaktort  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -oldattal töltjük meg és levegőztetjük és kevertetjük. A következő reakció játszódik le:



Katalizátorként  $\text{Co}^{2+}$  vagy  $\text{Cu}^{2+}$  ionok jelenléte szükséges. Amíg szulfitionok vannak jelen, addig az oldott oxigén koncentrációja zérus. A szulfát keletkezésének sebességét csak az oxigén abszorpciójának sebessége határozza meg. A szulfit oxidáció sebessége mindig nagyobb oxigénabszorpciót jelez, mint ami vizes oldatban vagy fermentlében lenne, arra viszont kiválóan alkalmas, hogy értékeivel reaktorok oxigénátadási viszonyait, és adott reaktor esetén a különböző technológiai paraméterek mellett történő levegőztetés hatásait

összehasonlíthatjuk. A szulfioxidációs módszert csak tisztavizes modellrendszerben lehet használni, tápoldatban és még inkább lélegző tenyészetben nem!

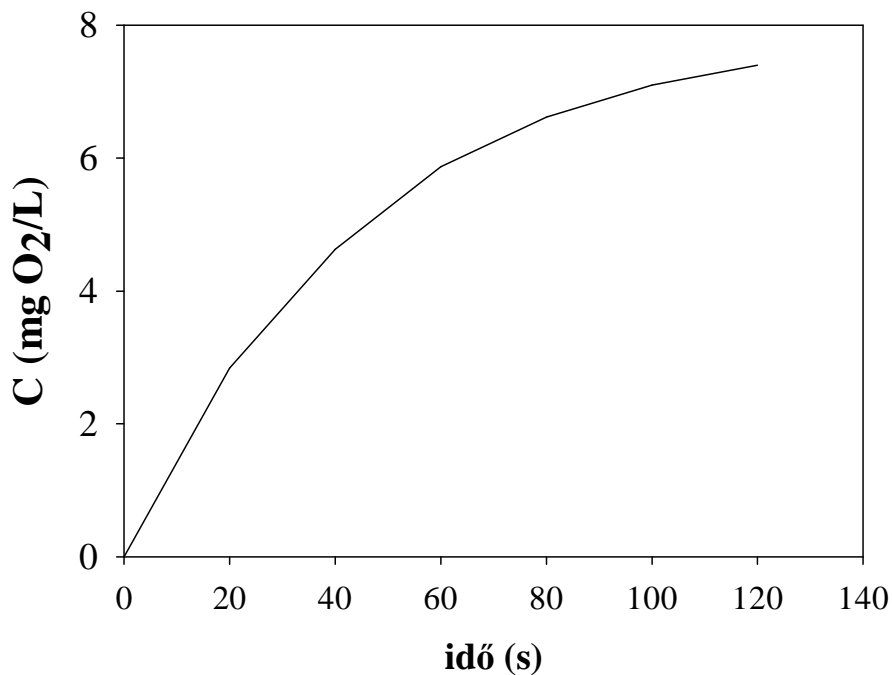
#### 14.Példafeladat

##### (a) $K_L$ a meghatározása oxigéntelítődés sebességéből

A fermentort feltöltjük vízzel vagy táptalajjal és beállítjuk a fermentáció során alkalmazni kívánt kevertetést, levegőztetést és a nyomást. Kalibráljuk be az oldott oxigén szenzort. Ezt követően levegő helyett nitrogéngázt adagoljunk, mellyel kihajtjuk a rendszerből az oxigént. Amikor a DO elektróda 0% (0 mg/L) oldott oxigént jelez, újra indítsuk meg a levegőztetést. Megfelelő időközönként olvassuk le az oldott oxigén szintet, majd ábrázoljuk a telítési görbét, melyből kiszámolható a  $K_L$ a értéke.

A mérés eredménye:

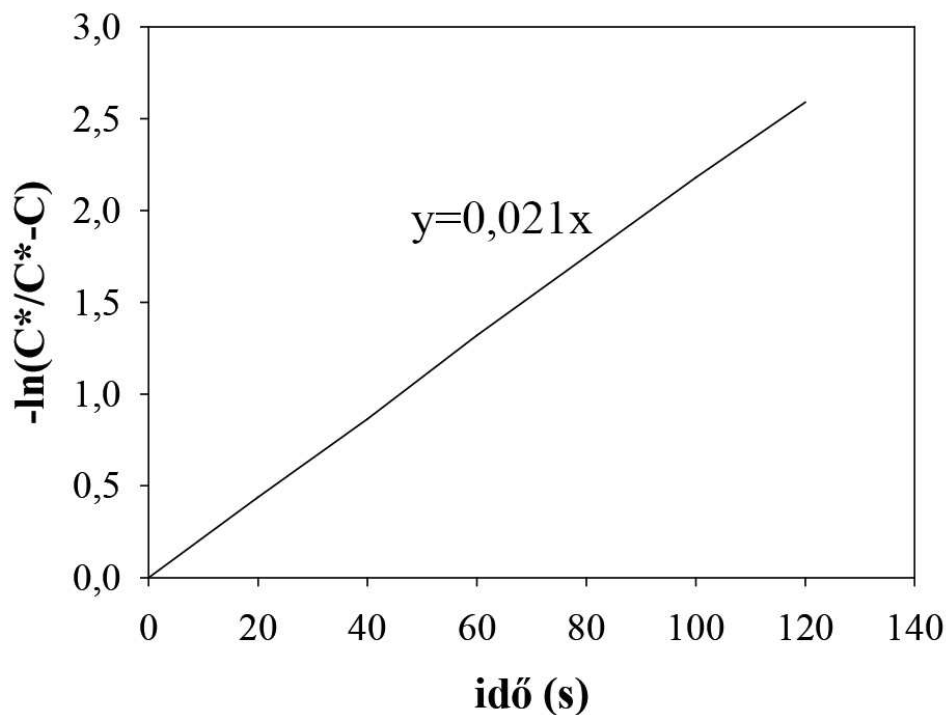
idő (s)	C (mgO <sub>2</sub> /L)
0	0
20	2,84
40	4,63
60	5,87
80	6,62
100	7,1
120	7,4



Az oxigén telítési görbéje

Linearizáljuk a kapott értékeket az alábbi táblázat szerint, majd ábrázoljuk:

idő (s)	$-\ln(C^*/C^*-C)$
0	0
20	0,438
40	0,864
60	1,32
80	1,75
100	2,18
120	2,59



Az egyenes meredeksége egyenlő a  $K_{La}$  értékkel  $s^{-1}$  mértékegységben.

$$\operatorname{tg}\alpha = K_{La} = 0,021 \text{ s}^{-1} = \underline{\underline{75,6 \text{ h}^{-1}}}$$

**(b)  $K_{La}$  meghatározása dinamikus módszerrel:**

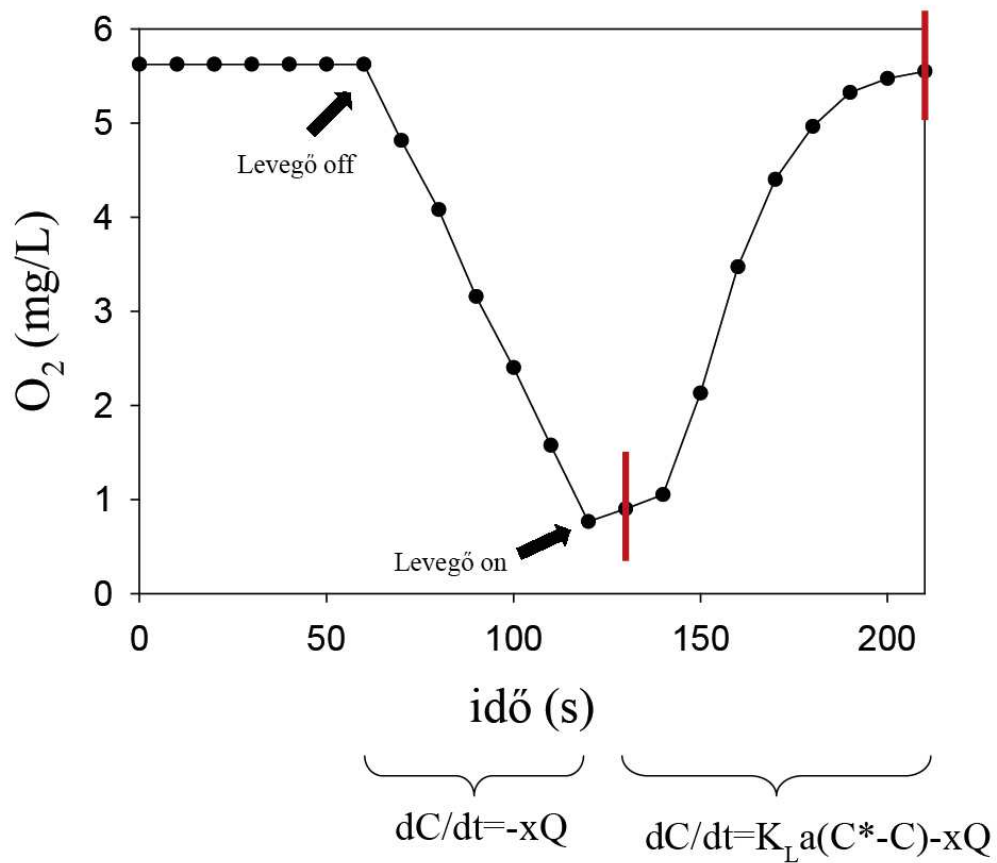
*Pseudomonas putida* tenyésztése folyik a fermentorban. A  $K_{La}$  meghatározása érdekében leállítjuk a levegőztetést, majd egy perc múlva újra levegőztetni kezdjük. A mérés során 10 másodpercenként leolvassuk a DO szenzorról az oldott oxigén mennyiségét.

A mért adatokat az alábbi táblázat tartalmazza, mely alapján diagramot készítünk.

idő (s)	$\text{mg O}_2/\text{dm}^3$
0	5,625
10	5,625
20	5,625

30	5,625
40	5,625
50	5,625
60	5,625
70	4,815
80	4,08
90	3,1575
100	2,4
110	1,575
120	0,765
130	0,9
140	1,05
150	2,13
160	3,4725
170	4,4025
180	4,965
190	5,325
200	5,475
210	5,55

### Dinamikus $K_L a$ meghatározása



A légzés intenzitása (OUR) kiszámolható a levegő leállításától a levegő beindítása közötti oxigénfogyásból:

$$dC/dt = -xQ$$

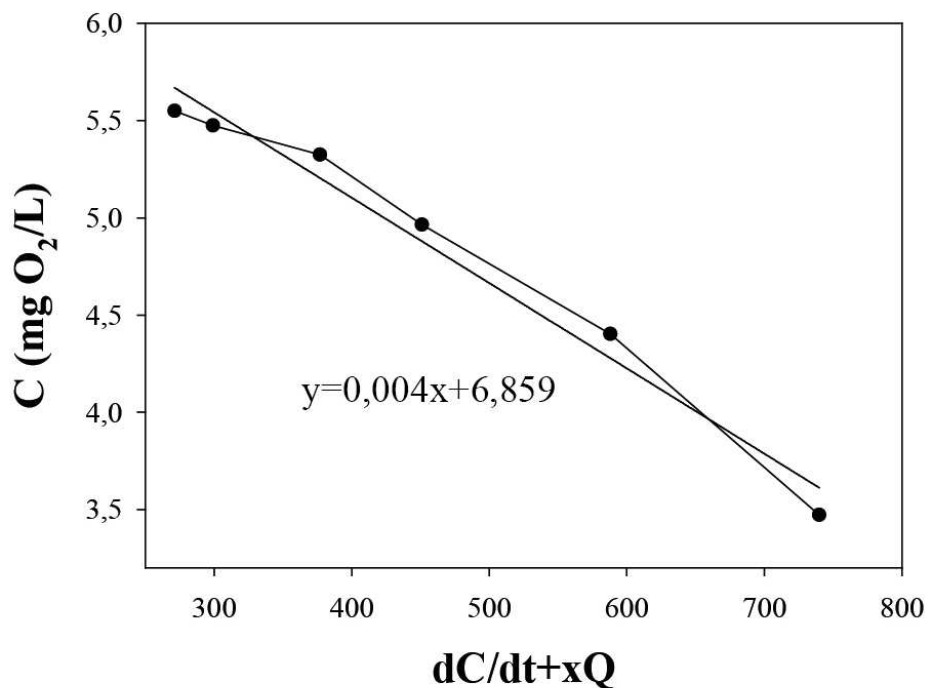
ahol, az  $x$  a tenyészet száraz sejtömege, a  $Q$  pedig az egységnyi biomassza légzésintenzitása.

$$4,725 \text{ [mgO}_2\text{/L]}/0,0194 \text{ [h]} = -xQ$$

$$xQ = 243,5 \text{ mgO}_2\text{/L*h} \rightarrow \mathbf{7,6 \text{ mmol O}_2\text{/L*h}}$$

A  $K_{La}$  kiszámolható a piros vonallal jelzett szakasz linearizálásával, ahol az  $y$  tengely az oldott oxigén koncentrációja, az  $x$  tengelyen pedig a  $dC/dt+xQ$ -t tüntetjük fel. Az egyenes meredeksége a következő összefüggéssel adja meg a  $K_{La}$  értékét:

$$\text{tg}\alpha = -1/K_{La}$$



$$\text{tg}\alpha = -0,004 \rightarrow K_{La} = \mathbf{250 \text{ h}^{-1}}$$

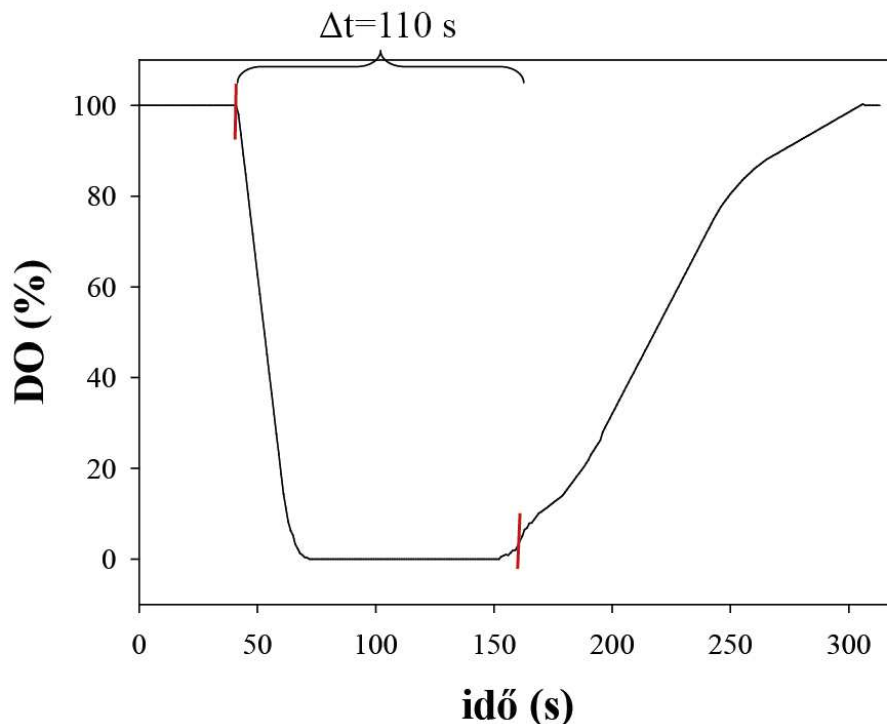
Mennyi az oxigén transzfer ráta (OTR)?

$$\text{OTR} = K_{La}(C^* - C) = 250 * (5,6 - 0,765) = 1208 \text{ mg O}_2\text{/L*h} \rightarrow \mathbf{37,7 \text{ mmol O}_2\text{/L*h}}$$

### (c) $K_{La}$ meghatározása szulfitfogyás módszerrel

Megadott levegőztetés és kevertetés mellett szeretnénk meghatározni a rendszer  $K_{La}$  értékét. A víz térfogata 100 L, hőmérsékletét 25 °C-ra állítjuk és 0,4 bar túlnyomást alkalmazunk a készüléken. Ezen körülmények között az oxigén telítési koncentrációja 12,2 mg/L. 65g

Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-t adagolunk a fermentorba és detektáljuk az oldott oxigén változását.



Az oldott oxigén csökkenésének kezdete és újbóli növekedése között 110 s telt el.

Első lépésben ki kell számolni, hogy hány mól oxigénnel reagált a 65 g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.



$M_{\text{Na}_2\text{SO}_3} = 126 \text{ g/mol}$

$65\text{g}/126\text{g} = 0,515 \text{ mol Na}_2\text{SO}_3 \text{ fogyott} \rightarrow 0,258 \text{ mol O}_2 \text{ fogyott}$

Számoljuk ki mennyi a rendszernek az oxigén transzfer rátája.

$$\text{OTR} = \frac{\text{reagált O}_2 [\text{mmol}]}{V_{\text{víz}} [\text{kg}] \Delta t [\text{h}]}$$

$\text{OTR} = 258 \text{ mmol}/100 \text{ kg} \cdot 0,03 \text{ h} = 86 \text{ mmol}/\text{kg} \cdot \text{h}$

Számoljuk ki mennyi az adott kevertetés és levegőztetés mellett a rendszer  $K_L a C^*$  értéke.

$$\text{OTR} = K_L a C^*$$

$\text{OTR} = 86 \text{ mmol}/\text{kg} \cdot \text{h} = 2752 \text{ mgO}_2/\text{kg} \cdot \text{h}$

$K_L a = \text{OTR}/C^* = 2752 [\text{mgO}_2/\text{kg} \cdot \text{h}]/12,2 [\text{mgO}_2/\text{kg}] = \underline{\underline{225,5 \text{ h}^{-1}}}$

### 15. Példafeladat

Mennyi a levegő hasznosulása, ha 70 mmol/kg·h OTR-t 0,1 m<sup>3</sup>/min levegőztetéssel értük el a következő paraméterek mellett:

A fermentálé térfogata 100 L, hőmérséklete 30 °C.

0,5 bar túlnyomást alkalmaztunk.

A levegő sűrűsége légköri nyomáson:  $1,149 \text{ kg/m}^3$ , melyből kiszámolható, hogy 1,4 bar nyomáson a sűrűsége:  $1,608 \text{ kg/m}^3$

Számoljuk ki a bemenő  $\text{O}_2$  mennyiségét  $0,1 \text{ m}^3/\text{min}$  esetén:

$$1,608 * 0,21 \text{ kg/m}^3 * 0,1 \text{ m}^3/\text{min} = 0,03 \text{ kg/min}$$

Számoljuk ki az  $\text{O}_2$  hasznosulását az OTR érték felhasználásával:

$$\text{OTR} = 70 \text{ mmol/L} * \text{h} = 2,24 * 10^{-3} \text{ kg O}_2/\text{kg} * \text{h}$$

$$100 \text{ L-re számolva} \rightarrow 0,224 \text{ kg O}_2/\text{h} = 3,73 * 10^{-3} \text{ kg/min}$$

$$\text{Levegő hasznosulása: } 3,73 * 10^{-3} / 0,03 = \underline{\underline{12,4 \%}}$$

## 16. Példafeladat

A léptéknövelni kívánt tenyészetünk oxigén felvételi sebessége (OUR)  $40 \text{ mmol/L} * \text{h}$ . Hasonlítsuk össze a szükséges beadagolandó levegő mennyiségeket 5 L-es 100 L-es és  $10 \text{ m}^3$ -es tenyésztés során, ha szeretnénk a kielégíteni a tenyészet oxigén szükségletét? A levegő hasznosulása a rendszernek 15%. Laboratóriumi léptékben (5 L) nem, míg 100 L és  $10 \text{ m}^3$  esetén 0,45 bar túlnyomást alkalmazunk. Mindhárom léptékben a fermentáció hőfoka  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

(a) Mennyi legyen a beáramló levegő mennyisége (L/min) az egyes fermentációk során?

(b) Mennyi az egységnyi térfogatba bevitt levegő mennyisége (VVM) az egyes léptékek esetén?

Számítsuk ki hány kg  $\text{O}_2$ -re van szüksége  $1 \text{ m}^3$  tenyészetnek óránként?

$$\text{OUR} = 40 \text{ mmol/L} * \text{h} = 1,28 \text{ kg/m}^3 * \text{h}$$

5 L-es fermentáció esetén:

A levegő sűrűsége  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -on légköri nyomáson:  $1,149 \text{ kg/m}^3$

$\text{O}_2$  hasznosulása légköri nyomáson:  $1,149 \text{ kg/m}^3 * 0,21 * 0,15 = 0,036 \text{ kg/m}^3$

Szükséges  $\text{O}_2$  mennyisége:  $1,28 \text{ kg/m}^3 * \text{h} * 0,005 \text{ m}^3 = 6,4 * 10^{-3} \text{ kg/h}$

Szükséges levegőmennyiség:  $6,4 * 10^{-3} \text{ kg/h} / 0,036 \text{ kg/m}^3 = 0,178 \text{ m}^3/\text{h} = \underline{\underline{2,96 \text{ L/min}}}$

Egységnyi térfogatba bevitt levegő mennyisége: **0,59 VVM**

100 L-es fermentáció esetén:

Levegő sűrűsége  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 0,45 bar túlnyomáson:  $1,149 \text{ kg/m}^3 * 1,45 \text{ bar} = 1,666 \text{ kg/m}^3$

$\text{O}_2$  hasznosulása 1,45 bar esetén:  $1,666 \text{ kg/m}^3 * 0,21 * 0,15 = 0,052 \text{ kg/m}^3$

Szükséges  $\text{O}_2$  mennyisége:  $1,28 \text{ kg/m}^3 * \text{h} * 0,1 \text{ m}^3 = 0,128 \text{ kg/h}$

Szükséges levegőmennyiség:  $0,128 \text{ kg/h} / 0,052 \text{ kg/m}^3 = 2,46 \text{ m}^3/\text{h} = \underline{\underline{41,02 \text{ L/min}}}$

Egységnyi térfogatba bevitt levegő mennyisége: **0,41 VVM**

10 m<sup>3</sup>-es fermentáció esetén:

Levegő sűrűsége 30 °C-on 0,45 bar túlnyomáson: 1,149 kg/m<sup>3</sup>\*1,45 bar= 1,666 kg/m<sup>3</sup>

O<sub>2</sub> hasznosulása 1,45 bar esetén: 0,052 kg/m<sup>3</sup>

Szükséges O<sub>2</sub> mennyisége: 1,28\*10= 12,8 kg/h

Szükséges levegőmennyiség: 12,8 kg/h/0,052 kg/m<sup>3</sup>= 246 m<sup>3</sup>/h= **4102 L/min**

Egységnyi térfogatba bevitt levegő mennyisége: **0,41 VVM**

### 17.Példafeladat:

Shigeo Katoh és Fumitake Yoshida szerint a K<sub>L</sub>a értéke kiszámítható a fermentor geometriai tényezőiből, levegőztetési és kevertetési viszonyaiból az alábbi egyenlet alapján:

$$K_L a (s^{-1}) = 0,026 \left( \frac{P_G}{V} \right)^{0,4} U_G^{0,5}$$

Az egyenlet 20-40%-os pontossággal használható, ha a P<sub>G</sub>/V 500 és 10000 W/m<sup>3</sup> közötti érték és a víz-levegő rendszer térfogat 2,6 m<sup>3</sup> alatt van. Az U<sub>G</sub> a felületi gázsebesség, a P<sub>G</sub>/V az egységnyi térfogatba bevitt teljesítmény levegőztetett rendszerre.

Számoljuk ki a K<sub>L</sub>a értékét a következő megadott paraméterek szerint: a P<sub>G</sub>/V= 1402,4 W/m<sup>3</sup>, a fermentálé térfogata 0,1 m<sup>3</sup>, a levegőztetés Q= 70 L/min, a keverő átmérője 0,196 m és a reaktor átmérője 0,49 m.

$$Q = 70 \text{ L/min} = 1,1 * 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$$

$$U_G = Q / (D_T^2 \pi / 4) = 1,1 * 10^{-3} / (0,49^2 * 3,14 / 4) = 2 * 10^{-4} \text{ m/s}$$

$$K_L a = 0,026 (1402,4)^{0,4} * (2 * 10^{-4})^{0,5} = 6,77 * 10^{-3} \text{ s}^{-1} = 24 \text{ h}^{-1}$$

$$\mathbf{K_L a = 24 h^{-1} \pm 4,8-9,6}$$

### 18.Példafeladat

Shigeo Katoh és Fumitake Yoshida szerint hasonló geometriájú fermentorok esetén a K<sub>L</sub>a a következő arányosság szerint léptéknövelhető:

$$K_L a = c U_G^m (N^3 D_T^2)^n$$

Az egyenlet lapos turbinakeverőre vonatkozik, ahol az m=n=2/3.

Az alábbi paraméterek mellett számoljuk ki a félüzemi és termelő fermentor levegőztetési és kevertetési értékeit, annak érdekében, hogy a K<sub>L</sub>a értéke a két fermentorban megegyezzen.

Félüzemi paraméterek:

$$D_T = 0,6 \text{ m}$$

$$D_i = 0,24 \text{ m}$$

$$V = 0,17 \text{ m}^3$$

Termelő fermentor paraméterei

$$D_T = 2 \text{ m}$$

$$D_i = 0,8 \text{ m}$$

$$V = 6,28 \text{ m}^3$$

Félüzemi léptékben alkalmazott fordulatszám és levegőztetés:

$$N = 1,5 \text{ s}^{-1}$$

$$Q = 0,5 \text{ m}^3/\text{min} = 8,33 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{s}$$

$$U_{Gf\acute{e}l\acute{u}zemi} = Q / (D_T^2 \cdot \pi / 4) = 8,33 \cdot 10^{-3} / (0,6^2 \cdot 3,14 / 4) = 0,0295 \text{ m/s}$$

$$N^3 D_T^2 = 1,5^3 \cdot 0,6^2 = 1,215$$

Termelői fermentorra számoljuk ki a levegőmennyiséget és a fordulatszámot:

$$0,0295 = Q / (2^2 \cdot 3,14 / 4) \rightarrow Q = 0,0926 \text{ m}^3/\text{s} = \mathbf{5,56 \text{ m}^3/\text{min}}$$

$$1,215 = N^3 \cdot 2^2 \rightarrow N^3 = 0,3 \rightarrow N = \mathbf{0,671 \text{ s}^{-1}}$$

### További feladatok

1. Laboratóriumi fermentornak szeretnénk meghatározni adott kevertetés és levegőztetés mellett a  $K_{La}$  értékét szulfid oxidációs módszerrel. A mérést 10 L vízben hatjuk végre légköri nyomáson. A beadagolt nátrium-szulfid 35 g volt. Az oldott oxigén csökkenése és a növekedése között mért idő 180 másodperc volt.
2. Mennyi a beáramló levegő hasznosulása, ha 60 mmol/kg\*h OTR-t 0,5 VVM levegőztetéssel értük el az 1 m<sup>3</sup>-es fermentorban, mely 70%-ig volt feltöltve. A fermentáció hőmérséklete 30 °C volt és 0,4 bar túlnyomást alkalmaztunk.
3. Egy 50 m<sup>3</sup>-es térfogatú fermentáció során 0,4 VVM levegőztetést és maximálisan 0,5 bar túlnyomást szeretnénk alkalmazni. Kielégíthető-e a mikroba oxigén szükséglete, ha tudjuk, hogy az exponenciális növekedési szakaszban a mikroba légzési sebessége 80 mmol/L\*h és a levegő hasznosulása 18%?
4. Kísérletesen meghatároztuk, hogy a kiválasztott fermentációs paraméterek mellett a  $K_{La}$  értéke 70 h<sup>-1</sup>. A fermentáléban maximálisan oldható oxigén mennyisége 6 mg/L. A fermentálé térfogata 5 m<sup>3</sup> és 1 m<sup>3</sup>/min levegőztetést alkalmazunk 0,4 bar túlnyomáson. Kielégíthető e a mikroba oxigén szükséglete, ha az OUR = 50 mmol/L\*h?

### 6.5.A ráadagolás léptéknövelése

Batch (szakaszos) fermentáció során nem történik a leoltást követően további anyagok ráadagolása. Tenyésztésnek ez a módja ritka az ipari fermentációk esetén. Az ipari termelés

fermentációi leggyakrabban ráadagolásos fed-batch fermentációk, mert ezek produktivitása jóval nagyobb, mint a szakaszos fermentációké.

A ráadagolásnak tekintjük, amikor a termék képződésének szempontjából optimális kémhatáson tartjuk a fermentlé pH-ját, sav illetve lúg oldatok adagolásával. A pH szabályozás során arra törekszünk, hogy minél kevesebb sav illetve lúg oldatok adagolásával érjük el az optimális kémhatást. Ezt két módon tudjuk befolyásolni, ha megfelelően tömény oldatot adagolunk, vagy a fermentlé pufferkapacitását növeljük, úgynevezett pufferrendszert hozunk létre. Pufferoldatnak tekintjük azokat az oldatokat, amelyek nagy mennyiségű savat/bázist képesek befogadni anélkül, hogy a pH értékük nagymértékben megváltozna. Tehát a táptalajnak összetételéből adódóan képesnek kell lennie arra, hogy a mikroorganizmusok növekedésük során képződött savas illetve lúgos jellegű molekulákat közömbösítsen. A pufferoldatok jellemzésére az oldat pH-ját és pufferkapacitását használjuk. A pufferkapacitás megadja, hogy a puffer 1 literének pH-ját hány mol erős sav csökkenti egy egységgel, illetve hány mol erős bázis növeli egy egységgel. A pufferoldat egy gyenge savat és a hozzá konjugált bázist, vagy ennek sóját, vagy egy gyenge bázist, és a hozzá konjugált savat, vagy ennek sóját tartalmazza. Ha ismerjük a pufferoldat összetételét és pH-ját, kiszámolhatjuk a pufferkapacitását. A pufferkapacitás ismeretében megválaszthatjuk a fermentáció során használni kívánt sav és lúg töménységét és mennyiségét.

$$[H^+] = K_S \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Ahol, a  $HA$  a gyenge sav koncentrációja, az  $A^-$  a konjugált bázis koncentrációja, a  $K_S$  a savi disszociációs állandó.

A pH szabályozáson kívül jellemző a ráadagolásos fermentációkra, hogy valamilyen szubsztrát adagolása történik az egész fermentáció alatt, vagy bizonyos paraméterek megváltozásakor. A szubsztrát leggyakrabban szén- illetve nitrogénforrás, biokonverzió során az átalakítandó molekula, de lehetnek prekursorok. A mikrobák növekedésének szempontjából az egyes sók, ásványi anyagok és vitaminok nagy feleslegben vannak jelen a táptalajban, így ezek további adagolása a fermentáció során általában nem szükséges. A növekedést limitáló szubsztrát jellemzően a nitrogén- és a szénforrás. A szekunder metabolitok képződése a növekedés idiofázisában történik, melyet a lassú növekedési sebesség és a limitáló szubsztrát mennyisége jellemez. Ezt a limitált szubsztrát mennyiséget kell állandó értéken tartani a megfelelő produktivitás érdekében. Ehhez szükséges a laboratóriumi vagy félüzemi ráadagolás optimalizálása. Tudnunk kell a tenyésztet szubsztrát felvételi sebességét, a ráadagolt szubsztrát mennyiségét és optimalizálni kell a két folyamatot

az egyensúly érdekében, figyelembe véve a keveredési időt, mely ipari léptékben akár limitáló tényező is lehet.

### 19. Példafeladat:

Mennyi lesz az oldatnak a pufferkapacitása ha a következőket mérem össze 1 literbe: 4,1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  és 2,5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  és az így elkészített oldat pH-ja 7.

Ki kell számolni az oldatokban az anyagmennyiségeket:

$$M_{\text{Na}_2\text{HPO}_4} : 142 \text{ g/mol}$$

$$4,1 \text{ g} = 4,1/142 = 0,0289 \text{ mol}$$

$$M_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} : 120 \text{ g/mol}$$

$$2,5 \text{ g} = 0,0208 \text{ mol}$$

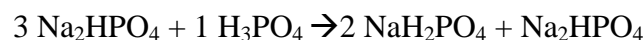
$$\text{pH } 7 \text{ esetén a } [\text{H}^+] = 10^{-7} \text{ mol/dm}^3$$

A savi disszociációs állandó:

$$K_S = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \frac{10^{-7} * 0,0289}{0,0208} = 1,39 * 10^{-7}$$

Savra nézve a pufferkapacitás, ha tiszta foszforsavat használunk:

Írjuk fel a reakcióegyenletet



pH 7-ről pH 6-ra kell változnia a kémhatásnak. A  $[\text{H}^+]$  pH 6 esetén  $10^{-6}$

Mennyire nő meg az  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mennyisége?

Ennek a mennyiségét jelöljük x-el, akkor a  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  mennyisége  $(0,0208 \text{ mol} + 0,0289 \text{ mol} = 0,05 \text{ mol})$   $0,05 - x$  lesz.

$$[\text{H}^+] = K_S \frac{\text{HA}}{\text{A}^-}$$

$$[\text{H}^+] = K_S * (n_{\text{NaH}_2\text{PO}_4} / n_{\text{Na}_2\text{HPO}_4})$$

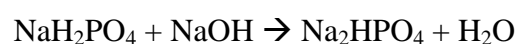
$$10^{-6} = 1,39 * 10^{-7} * (x / 0,05 - x)$$

$x = 0,043 \text{ mol} \rightarrow$  Az  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mennyisége  $0,0289 \text{ mol}$ -ról  $0,043 \text{ mol}$ -ra változott, tehát a reakció során  $0,0141 \text{ mol}$ -t változott az anyagmennyisége.

A reakcióegyenlet szerint  $1 \text{ mol H}_3\text{PO}_4$  reakciójából  $2 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4$  keletkezik, tehát  $0,0141/2 = 0,007 \text{ mol H}_3\text{PO}_4$  szükséges ahhoz, hogy az oldat pH-ja 1-el csökkenjen. **Az oldat pufferkapacitása savra nézve 0,007 mol.**

Lúgra nézve a pufferkapacitás, ha tiszta nátrium-hidroxidot használunk:

Reakcióegyenlet:



pH 7-ről pH 8-ra kell változnia a pH-nak. A  $[H^+]$  pH 8 esetén  $10^{-8}$   
Mennyire nő meg az  $Na_2HPO_4$  mennyisége?  
Ezt a mennyiséget jelöljük x-el, akkor az  $NaH_2PO_4$  mennyisége  $0,05-x$  lesz.

$$[H^+] = K_S \frac{HA}{A^-}$$

$$[H^+] = K_S \cdot (n_{NaH_2PO_4} / n_{Na_2HPO_4})$$

$$10^{-8} = 1,39 \cdot 10^{-7} \cdot (0,05 - x / x)$$

$x = 0,0466 \text{ mol} \rightarrow$  Az  $Na_2HPO_4$  mennyisége  $0,0289 \text{ mol}$ -ról  $0,0466 \text{ mol}$ -ra nőtt, tehát a reakció során  $0,0177 \text{ mol}$ -t változott.

A reakcióegyenlet szerint  $1 \text{ mol NaOH}$  reakciójából  $1 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4$  keletkezik, tehát  $0,0177 \text{ NaOH}$  szükséges ahhoz, hogy az oldat pH-ja 1-el nőjön. **Az oldat pufferkapacitása lúgra nézve  $0,0177 \text{ mol}$ .**

Ezt a pufferolt táptalajt szeretném  $100 \text{ literes}$  fermentáció során alkalmazni. Mennyi és milyen töménységű  $NaOH$ -ra van szükségem, ha laboratóriumi léptékben, egy  $5 \text{ literes}$  batch fermentáció során, pH szabályozás nélkül  $7$ -ről  $5,5$ -re csökken a táptalaj kémhatása?

$5 \text{ liter}$  táptalajban az anyagmennyiségek:

$$M_{Na_2HPO_4}: 142 \text{ g/mol}$$

$$4,1 \text{ g} \cdot 5 = 20,5 \text{ g} \rightarrow 20,5 / 142 = 0,144 \text{ mol}$$

$$M_{NaH_2PO_4}: 120 \text{ g/mol}$$

$$2,5 \text{ g} \cdot 5 = 12,5 \text{ g} \rightarrow 12,5 / 120 = 0,104 \text{ mol}$$

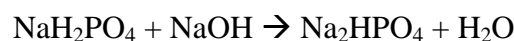
$$\text{pH } 5,5 \rightarrow [H^+] = 10^{-5,5}$$

$$10^{-5,5} = 1,39 \cdot 10^{-7} \cdot (x / 0,248 - x)$$

$$x = 0,237 \text{ mol}$$

Az  $NaH_2PO_4$  mennyisége  $0,144 \text{ mol}$ -ról  $0,237 \text{ mol}$ -ra változott, tehát a fermentáció során  $0,093 \text{ mol}$  változott az  $NaH_2PO_4$  anyagmennyisége, amelyet közömbösíteni kell.

Feltételezzük, hogy  $100 \text{ literben}$  is a pH  $7$ -ről  $5,5$ -re változik, akkor  $0,093 \cdot 20 = 1,86 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4$  kell közömbösíteni.



$1 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4$  közömbösítéséhez  $1 \text{ mol NaOH}$ -ra van szükség, akkor  $1,86 \text{ mol}$  közömbösítéséhez  $1,86 \text{ mol NaOH}$  szükséges.

$1\text{M}$ -os  $NaOH$  oldatot alkalmazva  $1,86 \text{ literre}$  van szükség.

**$2\text{M}$ -os  $NaOH$  oldatot alkalmazva  $0,93 \text{ literre}$  van szükség.**

## 20. Példafeladat

Az alkalmazott táptalaj 1 literjéhez 8 ml 1 M-os NaOH-t adunk, ekkor változik a pH-ja 6,5-ről 7,5-re.

a) Mennyi a táptalaj pufferkapacitása?

1M NaOH= 1 mol/dm<sup>3</sup>

8 ml-ban 0,008 mol NaOH van → pufferkapacitása **0,008 mol**

b) Ezt a táptalajt egy 10 m<sup>3</sup>-es fermentációban alkalmazva mennyi és milyen töménységű NaOH oldatra van szükségünk, ha 50 liternél többet nem szeretnénk adagolni? A tenyésztés exponenciális szakaszában a pH 0,1-et esik óránként és ez a szakasz 15 óráig tart.

1 M-os NaOH-val számolva 1 literhez → óránként → 0,8 ml NaOH szükséges

1 M-os NaOH-val számolva 10 m<sup>3</sup>-hez → óránként → 8 liter NaOH szükséges

1M-os NaOH-val számolva 10 m<sup>3</sup>-hez → 15 óra alatt → 120 liter NaOH szükséges

3M-os NaOH-val számolva 10 m<sup>3</sup>-hez → 15 óra alatt → 40 liter NaOH szükséges

## 21. Példafeladat

Egy 10 m<sup>3</sup>-es fermentorban glükóz ráadagolást kell alkalmaznunk. A tenyészet produktivitása akkor a legnagyobb, ha a glükóz szint nem nagyobb, mint 0,1 %. Mekkora ráadagolási sebességet és milyen töménységű glükóz oldatot alkalmazzunk, hogy ezt a szintet tartani tudjuk, ha a tenyészet szubsztrát felvételi rátája glükózra vonatkoztatva 3 g/L\*h?

Számoljuk ki a glükóz tömegét 0,1 % esetén a fermentorban:

10000 kg \* 0,1/100 = 10 kg → 10 kg glükóznak kell mindig jelen lenni a fermentorban.

Szubsztrát felvételi ráta: 3 g glükóz fogy 1 literben óránként: 10 m<sup>3</sup>-ben → 30 kg/h glükózt kell bejuttatni.

50%-os glükóz oldatot alkalmazva: 30 kg glükóz/60 L víz → a ráadagolás sebessége 60 L/h = 1 L/min

## 22. Példafeladat

Egy 10 m<sup>3</sup>-es fermentorban a keveredési idő 10 s. A ráadagolt szubsztrát egy 50%-os glükóz oldat, melyet 0,5 L/min sebességgel adagolunk. A szubsztrát felvételi ráta 5 g/L\*h. Elégséges e ez a ráadagolás sebessége, hogy minden egyes pontba eljusson a glükóz?

A ráadagolt glükóz mennyisége  $10 \text{ m}^3$ -ben 10 s alatt:  $0,25 \text{ kg} \cdot (10/60) = 0,041 \text{ kg}$

Szubsztrát felvétel 10 s alatt  $10 \text{ m}^3$ -ben:  $10 \cdot 1/3600 \cdot 10 \cdot 5 = 0,013 \text{ kg}$  glükóz fogy a táptalajból 10 s alatt.

Tehát a keveredési idő nem limitálja a szubsztrát felvételt a rendszerben.

### 23. Példafeladat

A glükóz ráadagolás megkezdésekor  $100 \text{ g/L}$  a biomassa koncentrációja  $100$  literes hasznos térfogatú fermentorban.  $0,1 \text{ h}^{-1}$  növekedési sebességet szeretnénk elérni ezzel a tenyésztéssel és tudjuk, hogy a glükózra vonatkoztatott eredő hozam  $0,75$ . Mennyi legyen a ráadagolás sebessége, ha  $50\%$ -os glükóz oldatot alkalmazunk?

$\mu = dx/dt$ , ahol az  $x$  a biomassa tömege.

1 óra alatt a  $\Delta x$ :  $100 \text{ g/l} \cdot 0,1 = 10 \text{ g/l}$

$Y_c = \Delta X / \Delta S_c = 0,75$

$0,75 = 10 / \Delta S_c \rightarrow \Delta S_c = 13,33 \text{ g/L}$

$100$  literes térfogatban  $1333 \text{ g}$  glükóz szükséges a megfelelő növekedéshez 1 óra alatt.

$50\%$ -os oldat esetén  $2666 \text{ ml/h} = 44,4 \text{ ml/min}$  legyen a ráadagolás sebessége.

### További feladatok

- 1) *Trichoderma reesei* tenyésztését MA nevezetű minimál táptalajon végezzük, melynek pufferkapacitását a következő anyagokkal érjük el:  $0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$  és  $4 \text{ g/L KH}_2\text{PO}_4$ . Mennyi a táptalajnak a pufferkapacitása?
- 2) Mennyi annak a komplex táptalajnak a pufferkapacitása, amelynek  $100 \text{ ml}$ -éhez  $4,5 \text{ ml}$   $3 \text{ M}$ -os  $\text{KOH}$ -t adva a pH-ja  $6$ -ról  $7$  re változik. Elegendő e a  $100$  liter  $1 \text{ M}$   $\text{KOH}$  oldatunk egy  $20 \text{ m}^3$ -es fermentáció pH szabályozásához, ha a fermentáció  $0,05 \text{ pH}$ -t csökken óránként az exponenciális szakaszban. Az exponenciális szakasz  $20$  óráig tart.
- 3) Egy fermentáció során a respirációs hányados  $1$  ( $RQ=1$ ). A tenyészet oxigén felvételi rátája  $60 \text{ mmol/L} \cdot \text{h}$ . Egy  $10 \text{ m}^3$ -es fermentóban milyen glükóz ráadagolást végezzünk, hogy a táptalajban  $0,1\%$  legyen a glükóz szint. Tegyük fel, hogy  $1$  mól glükóz molekulából  $4$  mól  $\text{CO}_2$  képződik.
- 4) Egy  $20 \text{ m}^3$ -es fermentorban a keveredési idő  $15 \text{ s}$ . A ráadagolt szubsztrátként  $25\%$ -os glükóz oldat használunk, melyet  $2 \text{ L/min}$  sebességgel adagolunk. A szubsztrát felvételi

ráta  $10 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ . Elégséges e ez a ráadagolási sebesség, hogy minden egyes pontba eljusson a glükóz?

## **7. Felhasznált és ajánlott irodalom**

- Shiego katoh, Fumitake Yoshida, :Biochemical Engineering (2009)
- Nduka Okafor: Modern Industrial Microbiology and Biotechnology (2007)
- Kozma József: Fermentációs technológia
- Sevella Béla: Biomérnöki műveletek és folyamatok (2012), 2. kiadás
- Sevella Béla: Biomérnöki műveletek példatár (2001), Műegyetemi Kiadó
- Fekete Erzsébet, Karaffa Levente, : Ipari biotechnológia (2013)
- Dr. Kutasi József: Fermentációs biotechnológia (2007), Digitális Tankönyvtár