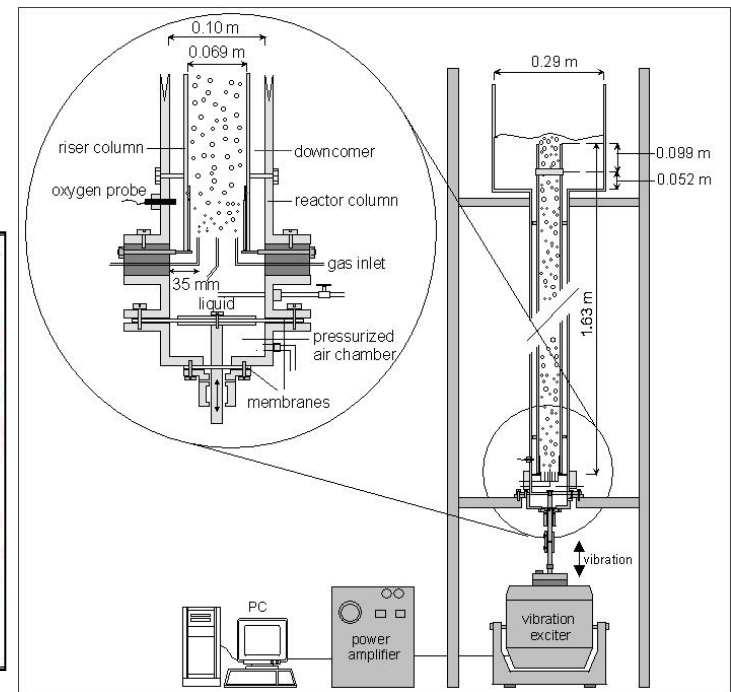
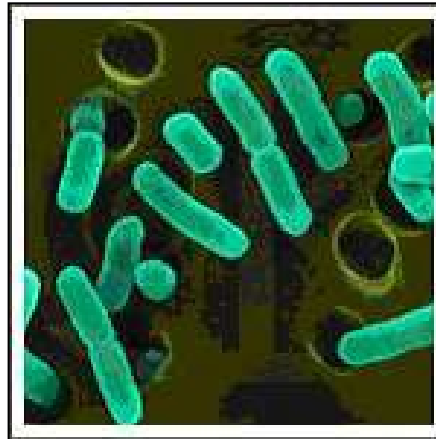


Einführung in die Bioverfahrenstechnik 1

Grundlagen der Bioverfahrenstechnik



20. und 27.11. 2024

Prof. Dr. Axel Blokesch - erreichbar: blokesch@fb2.fra-uas.de

Büro: Gebäude 8, Raum 212 a Tel. z.Z. nicht angeschlossen.

Als Prüfungsausschussvorsitzender auch Ansprechpartner für die Anerkennung von Leistungen aus einem vorhergehenden Studium und Planung eines Auslandsaufenthaltes

Vorlesungen: Donnerstag, den 20.11. und 27.11.2024
von 10:00 bis 11:30 in HC 113 (Hungener Str.)

Exkursion: Montag, den 16.12.2024

Treffpunkt Tor Ost des Industrieparks Höchst um 11:15

Besuch der Lantus-Produktionsanlage (Langzeit-Insulinanalogon)
um 12:30

20. und 27.11. 2024

Desinfection and Sterilization

ISO EN DIN 15883 is valid for cleaning and disinfection devices requiring a reduction of surviving microorganisms by a factor of at least 10^{-5} .

ISO EN DIN 556 defines a Sterility Assurance Level (SAL) of 10^{-6} , that is the probability of the presence a surviving microorganism being at least one to one million.

Test systems and methods to determine the reduction of surviving microorganisms are regulated in both norms.

20. und 27.11. 2024

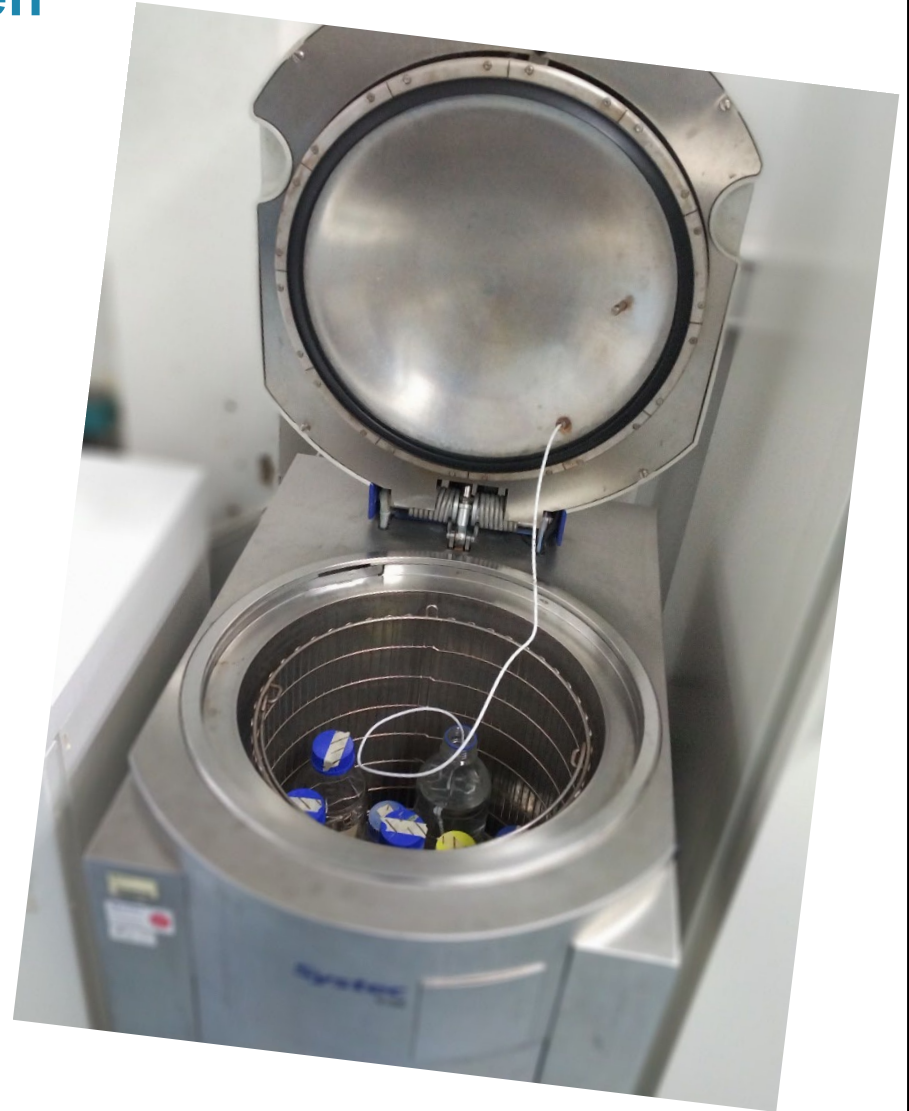
Sterilisation in einem Autoklaven

- Abgeschlossener beheizbarer Behälter (*griech.: auto* – selbst, *lat.: clavis* – Schlüssel, von *claudere* – schließen)
- Programme für trockene Sterilisation und Sterilisation mit Wasserdampf (Standardprogramm: 30 min bei 121 °C)
- Überprüfung mit Testkeimen wie *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 und *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953)
- Sterilisiert werden Medien, Geräte, Abfälle – natürlich separat
- Glucosehaltige Medien karamellisieren dabei partiell (Braunfärbung)

Will man das vermeiden, bietet sich alternativ eine Sterilfiltration an.

20. und 27.11. 2024

Sterilisation in einem Autoklaven



Modell von SysTec im Bio-Labor, bis März 2024 in Gebäude 7, 2. OG

20. und 27.11. 2024

For devices like bioreactors, tubings, separators, filter cartridges:

Sterilisation in Place (SIP) followed by Cleaning in Place (CIP)

- **Devices for sterilisation and cleaning processes installed along with the production process**
- **multiple use: heat transfer jacket for moderate cooling/warming during production is used for heat sterilization with hot steam**

Alternative: More and more used are single use devices which are discarded after use.

20. und 27.11. 2024

Choice of Cleaning Reagents

- **salpetric acid (HNO_3): best for removing mineral sediments**
- **phosphoric acid (H_3PO_4): best for removing proteins**
- **sulfuric acid (H_2SO_4): best for oxidizing organic compounds**
- **Why not hydrochloric acid (HCl): It is corroding, oxidizing iron turning it to rust (over long time even stainless steel), but I used it e.g. for rinsing filter modules (outer case and tubings polypropylene, filter e.g. PVDF, not metal parts in contact with medium)**
- **Lye, e.g. NaOH solution, removes proteins without corroding steels (but corrodes glasses, aluminium)**

20. und 27.11. 2024

Sterilization

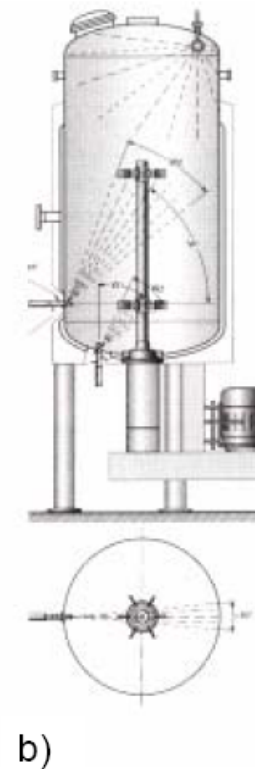
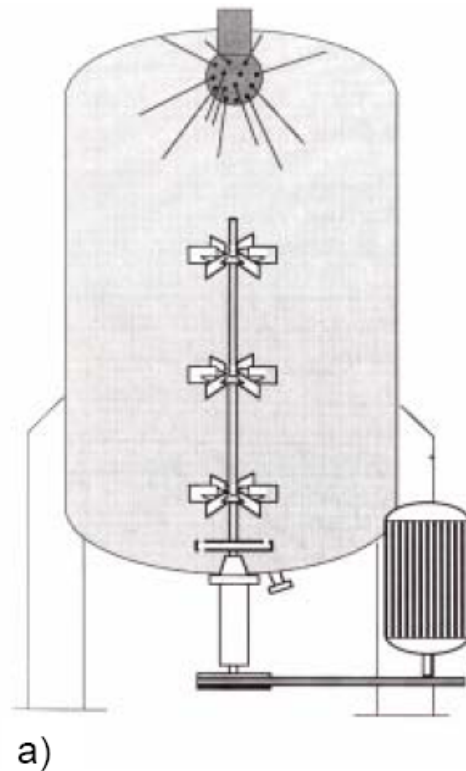
- chemical treatment
 - enzyme treatment
 - ionising irradiation
 - heating
- possible damage to proteins
→ best for waste treatment, preventing
GMOs to be released
- most frequently used method

Remind: 121°C is no natural constant
but an empirical finding
120°C + 1°C tolerance

20. und 27.11. 2024

Spray Head for Cleaning in a Stirred Reactor

- a) Einbaubeispiel eines Sprühkopfes in einem Rührbehälter
- b) Sprühkopfausstattung eines Rührbehälters



Quelle: W. Storhas, Bioverfahrensentwicklung, Wiley-VCH (2003)

20. und 27.11. 2024

Sterilization – Outline of a CIP Process

	phase	water type, concentration	temperature	time
1	pre-rinsing	stock water	20 °C	5 min
2	alkaline solution	0.5 – 1.5 %	80 °C	20 - 30 min
3	intermediate rinsing	fresh water	15 °C	5 min
4	acid	0.5 – 1.0 %	70 °C	20 - 30 min
5	final rinsing	fresh water	15 °C	5 min

Source: Storhas, W.: Bioverfahrensentwicklung, Wiley-VCH, Weinheim 2003,
translated: A.Blokesch

20. und 27.11. 2024

Sterilization – Germ Load (CFU) of Media Components

Colony Forming Units or Total Viable Count

CFU or TVC

unstable

resistant

Medium	Gesamtkeimzahl [Keime / ml]	Labile Keime [Keime / ml]	Resistente Keime [Keime / ml]
Hefeextrakt	10^5 - 10^9	10^4 - 10^9	10^0 - 10^1
Sojamehl	10^4 - 10^9	10^3 - 10^7	10^1 - 10^7
MQW	10^2 - 10^6	10^2 - 10^5	10^1 - 10^4
Melasse	10^5 - 10^7	10^2 - 10^5	10^2 - 10^5

yeast extract
soy meal
corn soak water
molasse

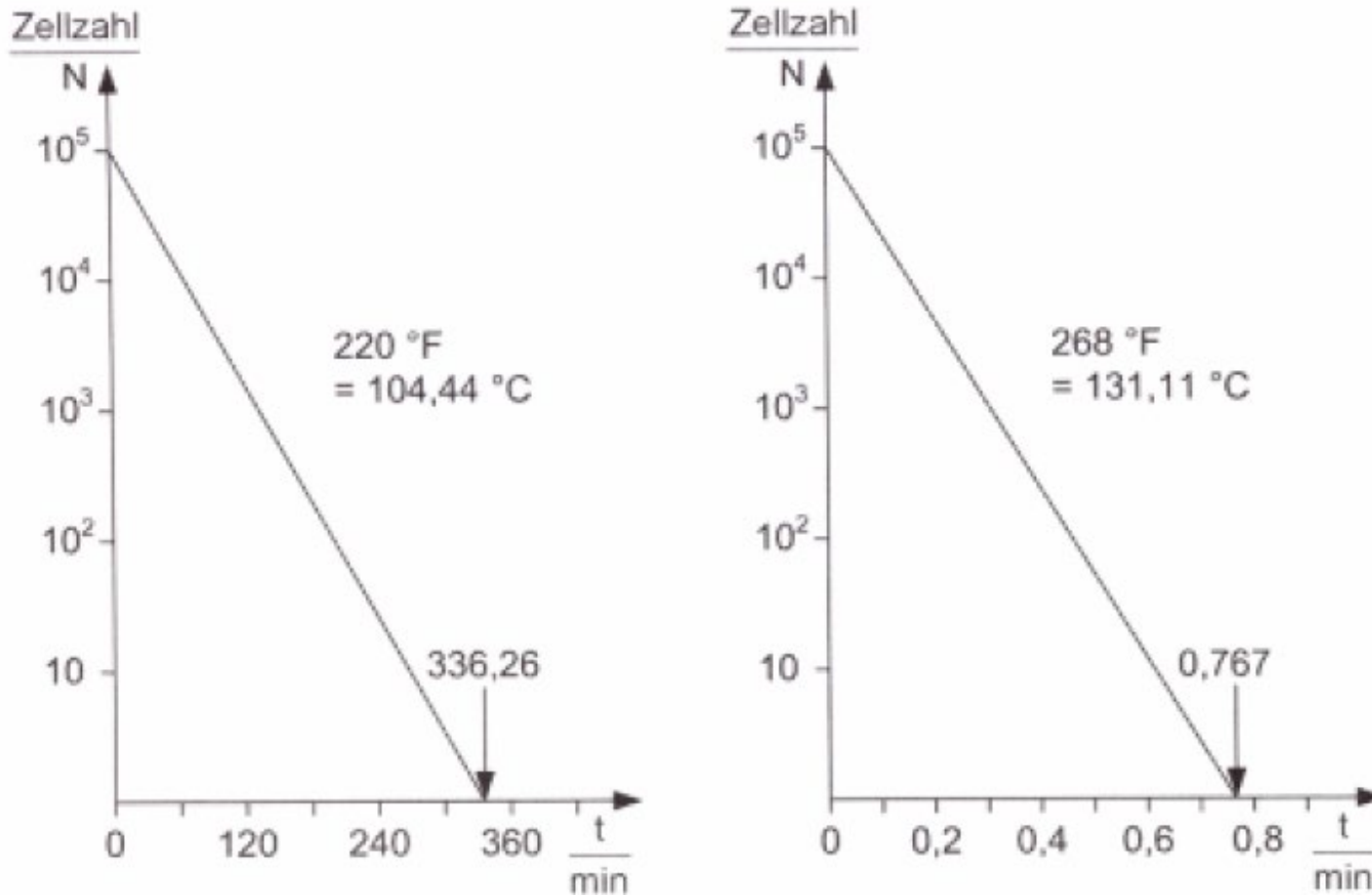
Keimbelastung verschiedener Medienbestandteil in industriellen Bioprozessen

MQW: Maisquellwasser

Source: Storhas, W.: Bioverfahrensentwicklung, Wiley-VCH, Weinheim 2003,
translated: A.Blokesch

20. und 27.11. 2024

Inactivation of *B. stearothermophilus* at 104°C and 131°C



Chmiel, H., ed.: Bioprozesstechnik, 2nd edit., Elsevier, 2005.

20. und 27.11. 2024

UNIVERSITY
OF APPLIED SCIENCES

Sterilization

General law of exponential extinction:

$$N = N_0 e^{-k t}$$

k : rate of (cells) dying

t : time of sterilization

The decimal time of reduction - D - is the time in which the number of microorganisms – N - has decreased to the 10th part of the original number N_0 .

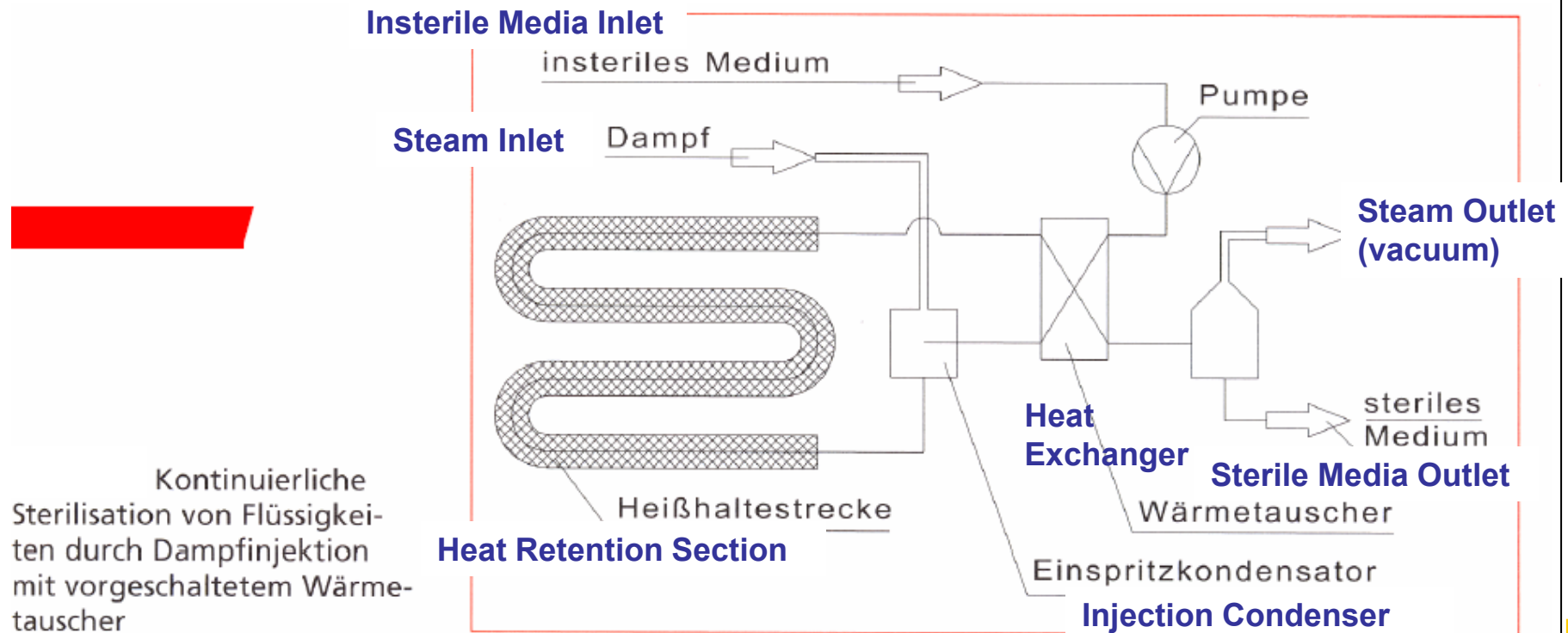
$$\begin{aligned} \frac{1}{10} N_0 &= N_0 e^{-k D} \\ \Leftrightarrow \frac{1}{10} &= e^{-k D} \end{aligned}$$

Logarithmic form:

$$\begin{aligned} \Leftrightarrow \ln \frac{1}{10} &= -k D \Leftrightarrow \ln 10 = 2.3026 = k D \\ \Leftrightarrow D &= 2.3026 / k \end{aligned}$$

20. und 27.11. 2024

Sterilization by Steam Injection with Upstream Heat Exchanger

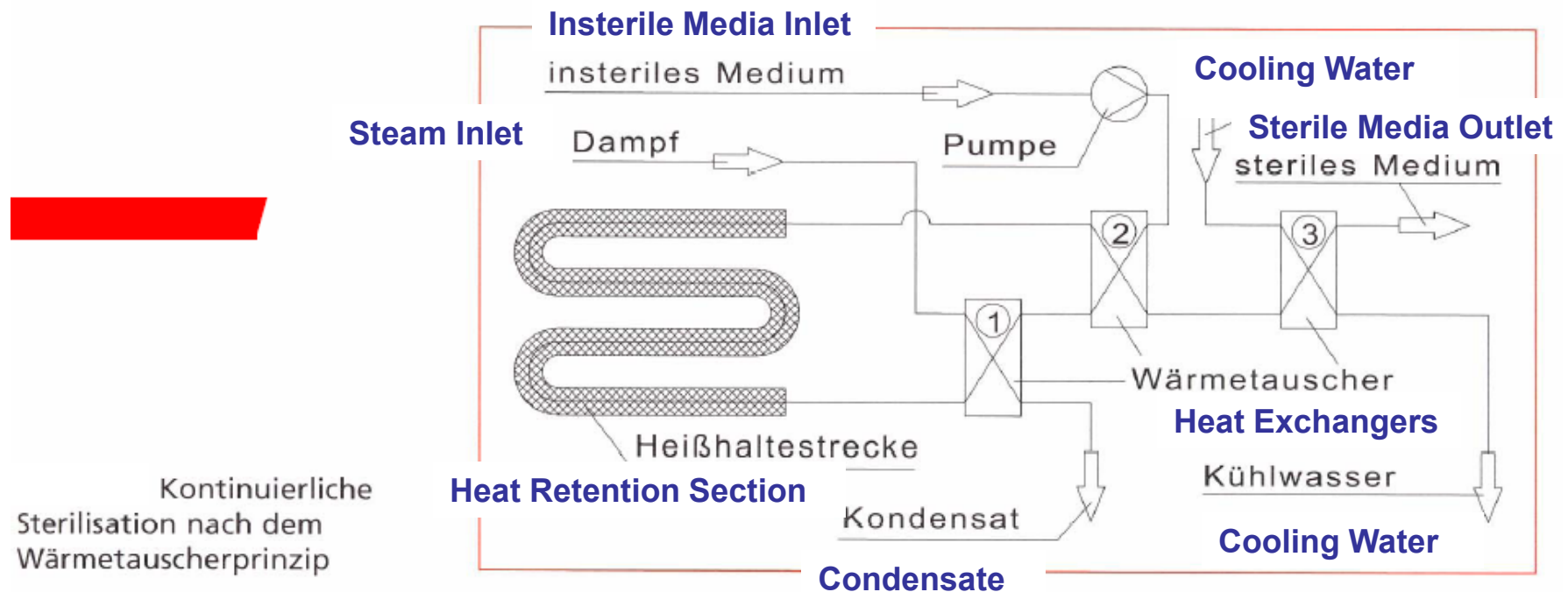


Source:

Chmiel, H., ed.: Bioprozesstechnik, 2nd edit., Elsevier, 2005.

20. und 27.11. 2024

Continuous Sterilization via Heat Exchanger (1,2 & 3)



Source:

Chmiel, H., ed.: Bioprozesstechnik, 2nd edit., Elsevier, 2005.

20. und 27.11. 2024

Maintaining Sterility

Exhaust Gas Filter

Supply Air Filter

Flux Pipe

**Stirred Bioreactor with
Reagent Tank e.g. for pH
Adjustment**

Gerührter Bioreaktor mit
Korrekturmittelvorlage

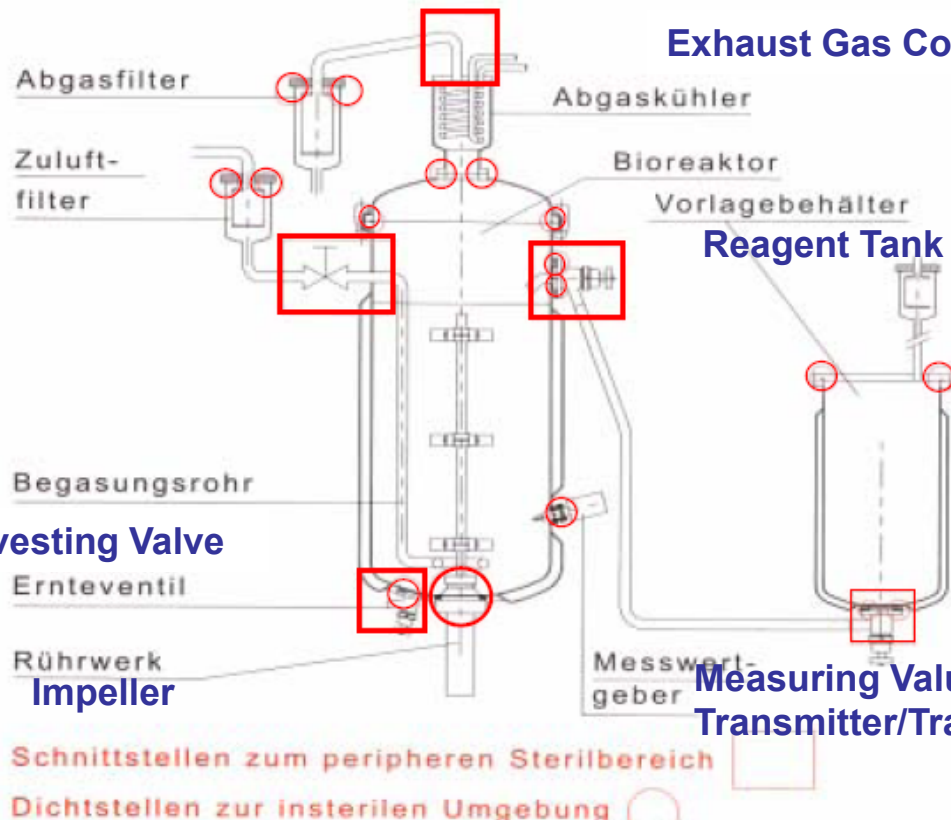
Harvesting Valve

Impeller

Exhaust Gas Cooler

Reagent Tank

Measuring Value
Transmitter/Transducer



 Interface to Peripheral Sterile Field Sealing Point to Non-Sterile Environment

Source: : H. Chmiel (Hrsg.), Bioprozesstechnik 2. Auflage, Elsevier (2005)

20. und 27.11. 2024

Sterilization by Filtration

retaining bacteria, fungi with a 0.2 μm pore size filter (for clear buffer solutions)
In case of fermentation supernatants or tissue extracts centrifugation,
prefiltration with pore size 0.5 μm followed by 0.2 μm

**Special case: removal of virus
with pore sizes $\ll 0.1 \mu\text{m}$**

Virusinaktivierung durch Filtration

- Ultipor® VF Grade DV50 Virus Removal Filter Cartridges (Pall)
- Viresolve Standard Modules (Millipore)



Typical Membrane Viral Retention (in Buffer)*

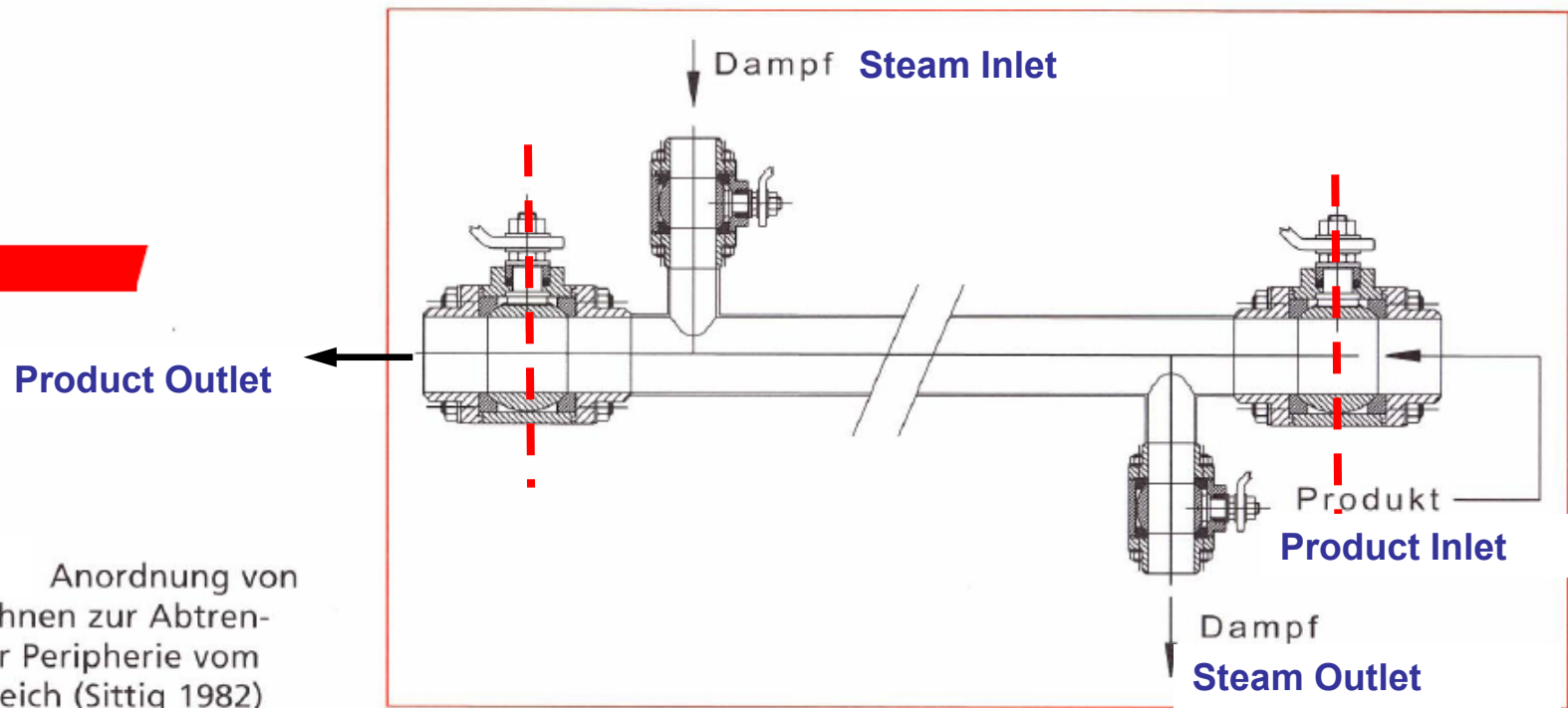
	Viresolve 70	Viresolve 180
Polio Virus	3.5 logs	2 logs
Hepatitis A	**	4 logs
Simian Virus (SV-40)	5.8 logs	**
Sindbis (sin)	7.4 logs	4.5 logs
Reovirus 3 (Reo)	7.2 logs	5.5 logs
Murine Leukemia Virus (MuLV)	6.6 logs	6.0 logs
Human Immunodeficiency Virus (HIV)	8.5 logs	**

*Retention in protein is higher

**Testing not done

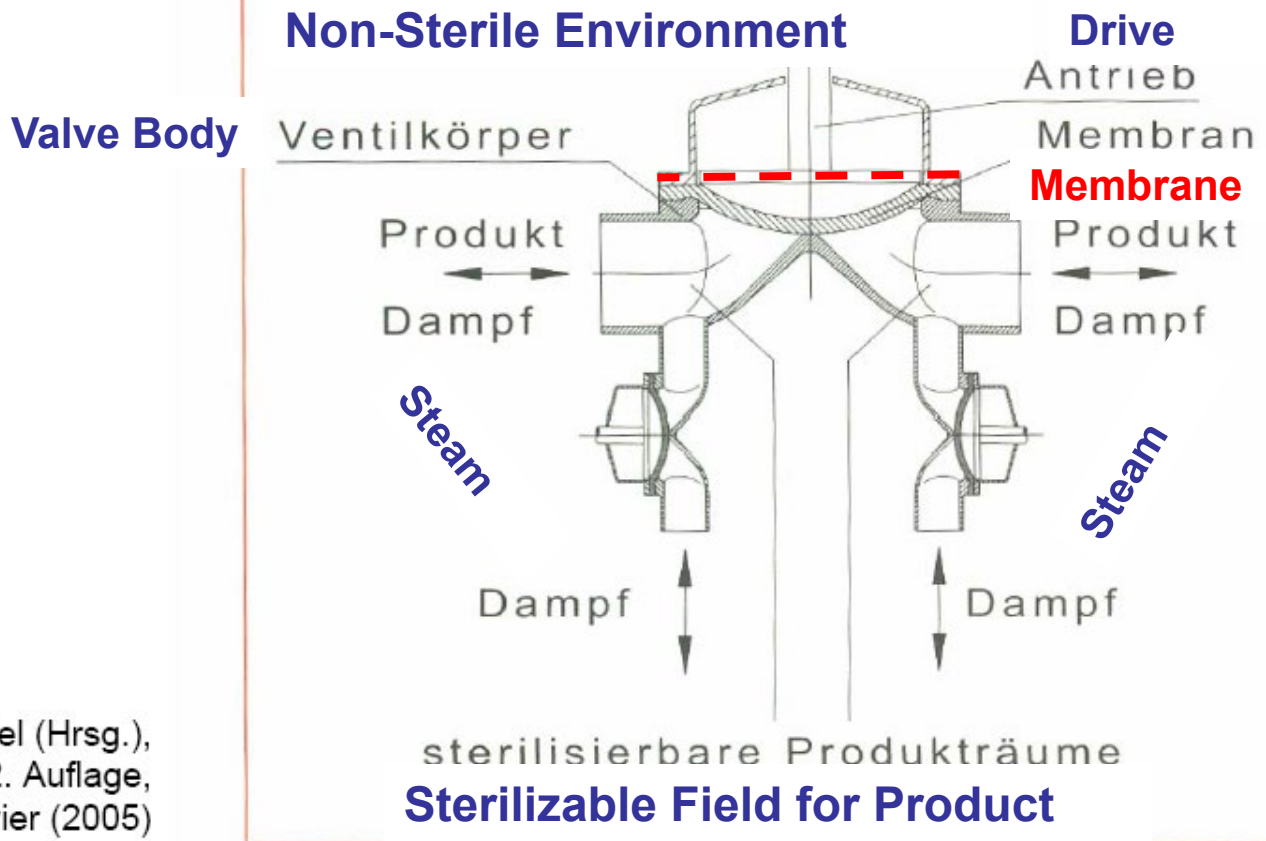
20. und 27.11. 2024

The Way to Adjust Ball Valves ----- to Separate the Sterile Compartment from the not sterile Periphery



20. und 27.11. 2024

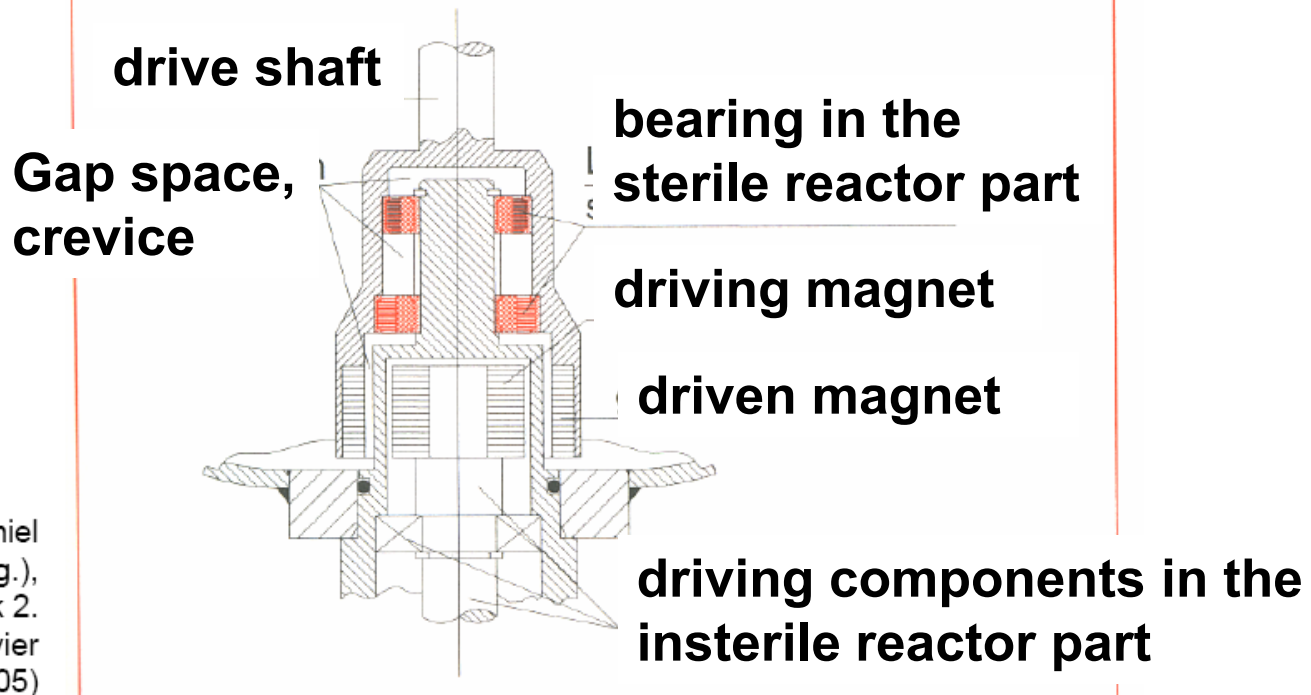
Drive Shaft Sealing as a Sensitive Item for Sterility



Quelle: H. Chmiel (Hrsg.),
Bioprozesstechnik 2. Auflage,
Elsevier (2005)

20. und 27.11. 2024

Magnetic Coupled Drive – A Solution to Ensure Sterility

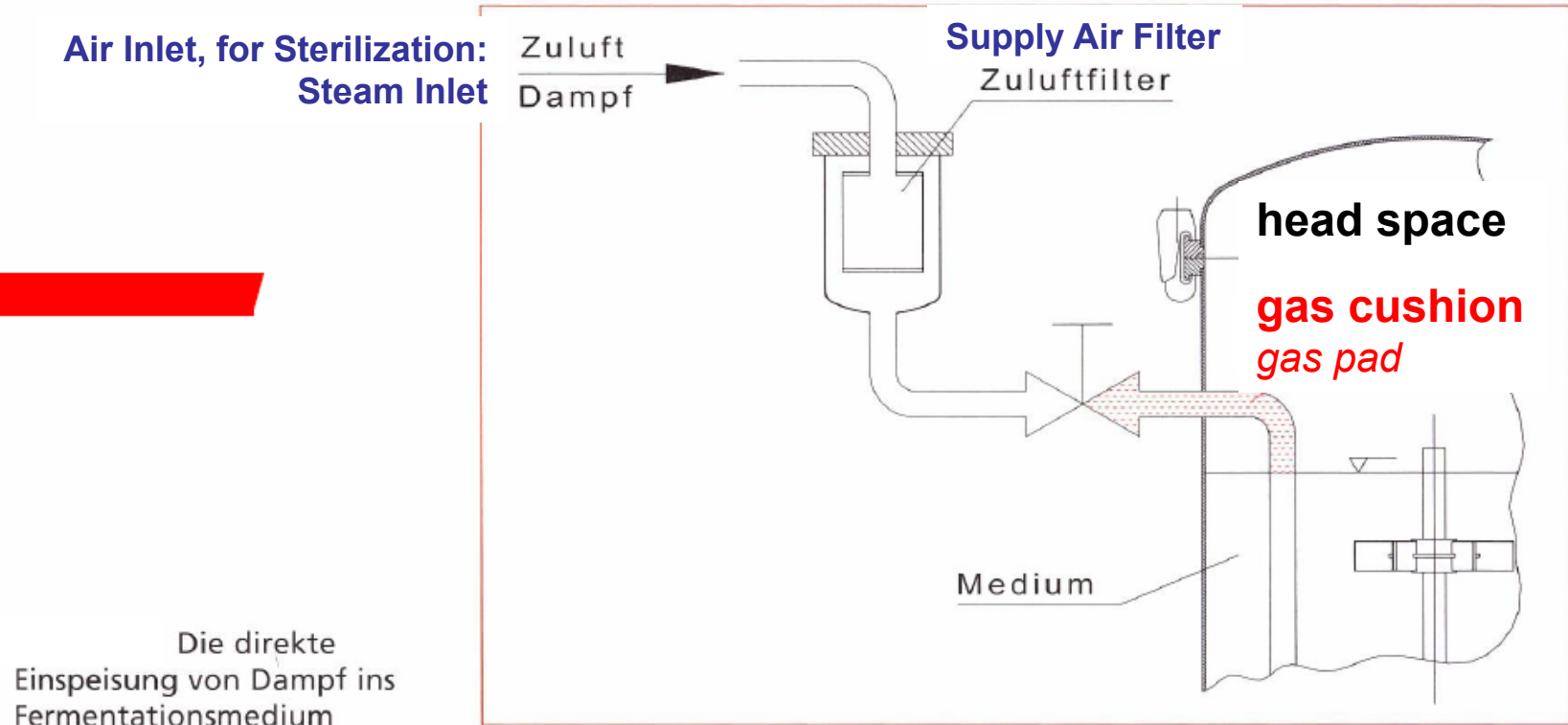


Quelle: H. Chmiel
(Hrsg.),
Bioprozesstechnik 2.
Auflage, Elsevier
(2005)

Impeller driven via magnetic clutch – frequently used for fermenters with volumes up to 1000 l, possible up to 45,000 l

20. und 27.11. 2024

Sterilization by Direct Vaporization



Quelle: H. Chmiel (Hrsg.). Bioprozesstechnik 2. Auflage. Elsevier (2005)

20. und 27.11. 2024

Sterilization by Countercurrent Vaporization

Air Inlet

Luft

Steam Inlet

Dampf

head space

gas cushion
gas pad

Supply Air Filter

Zuluftfilter

Medium

Kopfraum
Gaspolster

Kondensat

Condensate

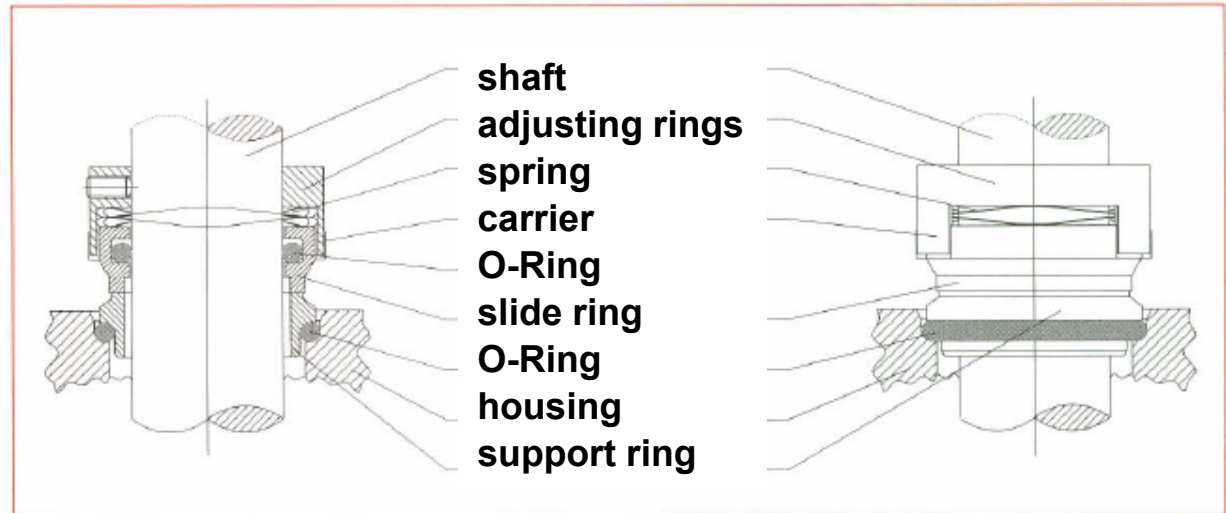
Quelle: H. Chmiel (Hrsg.),
Bioprozesstechnik 2. Auflage, Elsevier
(2005)

Sterilisation des Zuluftfilters im Gegen-
strom

20. und 27.11. 2024

Sterile Seal with a Slide Ring

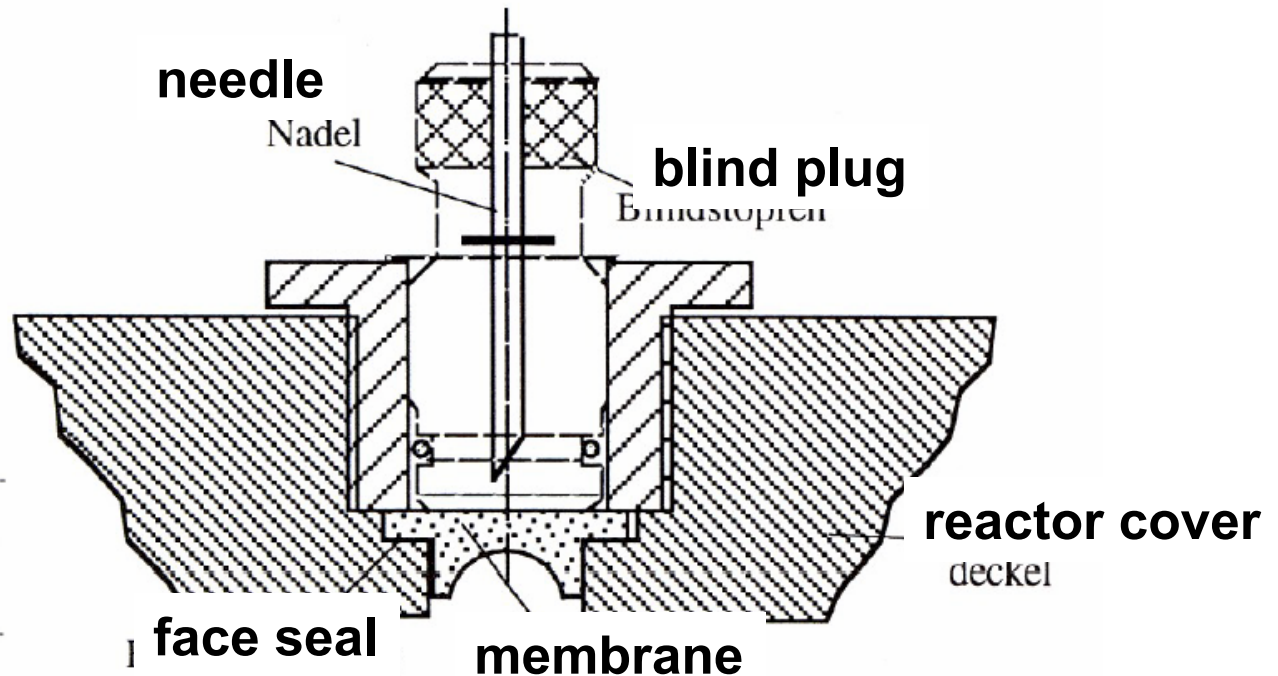
Aufbau einer einfachen drehrichtungsunabhängigen Gleitringdichtung



Quelle: H. Chmiel (Hrsg.), Bioprozesstechnik 2. Auflage, Elsevier (2005)

20. und 27.11. 2024

Tapping Device as a Sterile Inlet – to be removed immediately before injection, pressure in reactor being equal to outside air pressure

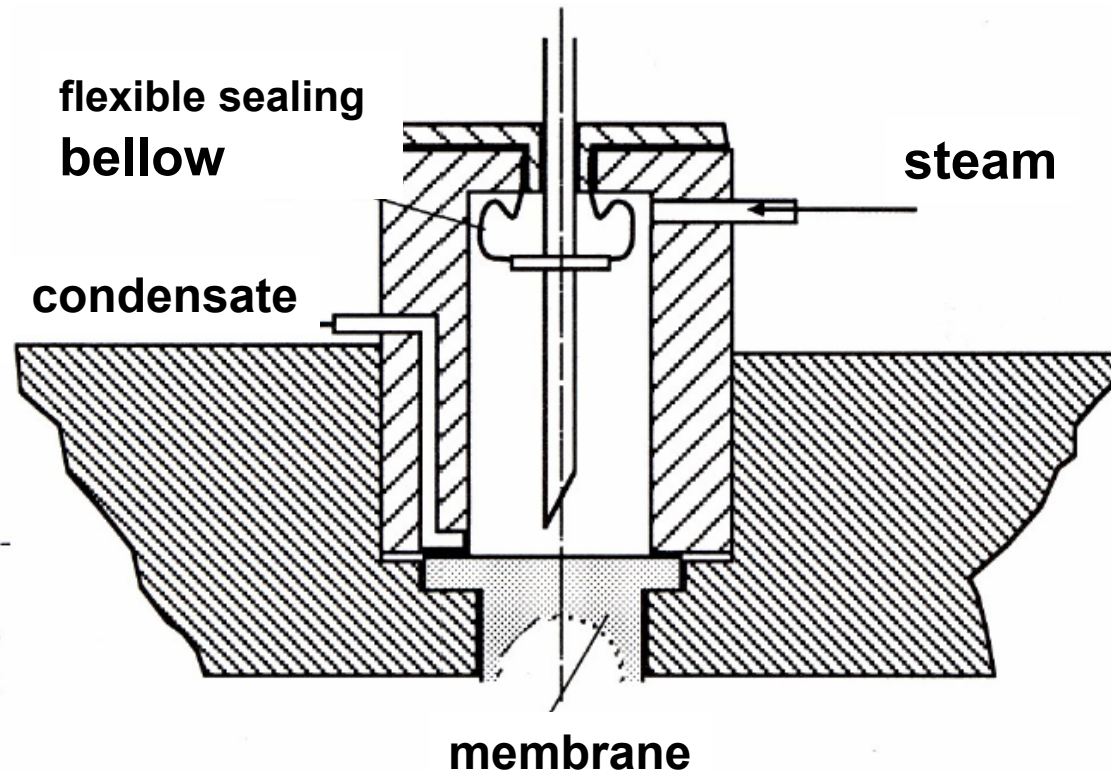


Anstecheinheit zur sterilen Nachgabe von Medien in einen Bioreaktor mittels der Anstechtechnik. Wird die Armatur nicht benutzt, dann sichert ein Blindstopfen die Membran vor dem Herausdrücken. Vor dem Anstechvorgang wird der Blindstopfen entfernt. Während des Anstechvorganges muß der Druck im Bioreaktor etwa Umgebungsdruck sein. Kritisch bei dieser Konstruktion ist die Flächendichtung der Membran

W. Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen; Vieweg Verlag 1994

20. und 27.11. 2024

Vaporizable Tapping Device (prior to injection)



Bedampfbare Anstecheinheit. Vor dem Anstechvorgang kann diese Armatur inklusive der Membranoberfläche ausreichend und kontrollierbar mit Dampf sterilisiert werden. Damit ist ein fehlerhaftes Anstechen ausgeschlossen.

W. Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen; Vieweg Verlag 1994

20. und 27.11. 2024

Sealing



union nut



Dairy coupling

no axial or radial guidance

no prestress → dead room formation during operation

no self-adhesion of the thread → loosened connection during operation

Tri-Clamp Connection

modified flat gasket with all its disadvantages

best fit for lab use, e.g. when frequently to be opened

expensive maintenance if replaceable membranes are used in addition

Sterile Screw

clear axial or radial guidance

defined prestress of the O-ring prevents formation of dead rooms

self-adhesion of the thread
cheap supply material (O-rings)

Storhas, W.: Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Vieweg, Braunschweig 1994. (also: Springer, Heidelberg 2000)

20. und 27.11. 2024

Sealing

Charakteristik von Rohrleitungsverbindungen

Milchrohrverschraubung	Tri-Clamp-Verbindung	Sterilverschraubung
- keine axiale oder radiale Führung - keine definierte Vorspannung des Dichtringes - Bildung eines Totraumes im Betrieb - keine Selbsthaftung des Gewindes, löst sich im Betrieb	- modifizierte Flachdichtung → alle Nachteile der Flachdichtung - Erhöhung der Betriebskosten durch aufwendige Wartung (Membrankosten) - Klammerverschlüsse nur für Labor geeignet - bei größeren Nennweiten → Montageprobleme - geeignet für häufige und schnelle Lösevorgänge	- durch O-Ringvorspannung tottraumfrei - saubere radiale und axiale Führung - definierte O-Ringvorspannung durch metallische Auflage - geeignete Werkstoffpaarung → dadurch selbsthaftendes Gewinde - Verwendung handelsüblicher O-Ringe, dadurch kostengünstig

W. Storhas; Bioreaktoren und periphere Einrichtungen; Vieweg Verlag 1994

20. und 27.11. 2024

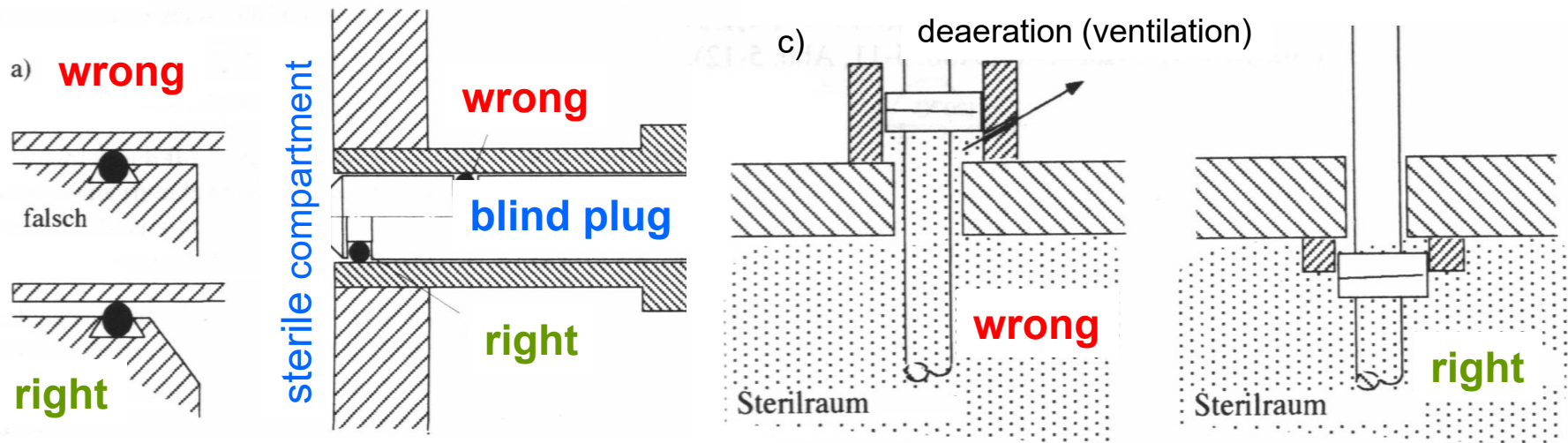
Sterilization

The principle of “maximizing the minimized dead space” illustrated with the examples of

a) Flange seal

b) blind plug sealed by O-ring

c) slide ring seal



Storhas, W.: Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Vieweg, Braunschweig
1994. (also: Springer, Heidelberg 2000)

20. und 27.11. 2024

Sterilisation

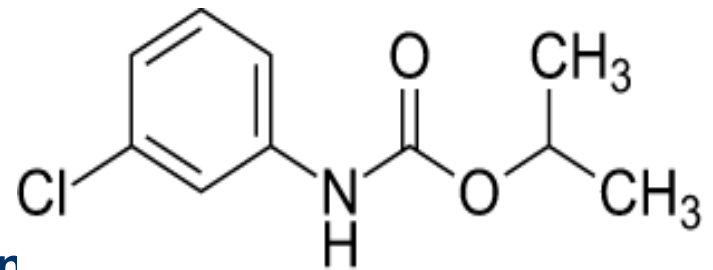
Weitere Möglichkeiten:

- UV-Bestrahlung (Abluft, Abwässer, Kühlflüssigkeiten, im Lebensmittelbereich in Deutschland nur Trinkwasser, Oberflächen von Obst und Gemüse und Hartkäse=
- Energiereiche ionisierende Bestrahlung (Gamma oder Röntgen, beschleunigte Elektronen) – im Lebensmittelbereich in Deutschland nur für
- getrocknete Kräuter und Gewürze zugelassen (1999/2/EG und 199/3/EG)
- Plasmabehandlung
- Ozonbehandlung (eher bei Begasung trockener Flächen)
- Wasserstoffperoxid-Lösungen (30 – 35 %)
- Elektrische Pulse (unmittelbare Wirkung auf Mikroorganismen und lang andauernde Wirkung durch elektrolytisch aus Chloridionen (Cl^-) gebildete Hypochloritionen (ClO^-))

20. und 27.11. 2024

Beispiel aus dem Lebensmittelbereich: Sterilisation von Speisekartoffeln

Damit sie das ganze Jahr über angeboten werden können, dürfen Speisekartoffeln nach der Ernte mit einem Keim- oder Schimmelhemmungsmittel behandelt werden. Am häufigsten wurde das Keimhemmungsmittel Chlorpropham eingesetzt, das aber inzwischen nicht mehr zugelassen ist.



Verbraucherzentrale Nordrhein-Westfalen,
<https://www.verbraucherzentrale.nrw/wissen/lebensmittel/auswaehlen-zubereiten-aufbewahren/bei-kartoffeln-auf-giftstoffe-achten-12213>, 8.2.2022, aufgerufen am 23.11.2022

Zu unterscheiden von der Behandlung mit Saatgut mit Pestiziden, heute vor allem Neonicotinoiden.

20. und 27.11. 2024

Sterilisation

Besondere Anforderungen:

- **Sporenbildner:** Dauerformen überstehen extreme Hitze, deshalb:
Bei moderater Temperatur (30 – 40 °C) ankeimen lassen, dann
Abtöten der Mikroorganismen bei hohen Temperaturen.
- **Legionellen:** Leben als fakultativ intrazelluläre Parasiten in
Amöben (eukaryontische Einzeller). Sind in diesen durch
Einschluss in Cysten besonders widerstandsfähig. Temperaturen <
25 °C oder > 45 °C töten sie nicht ab, verringern aber drastisch ihre
Vermehrung.

20. und 27.11. 2024