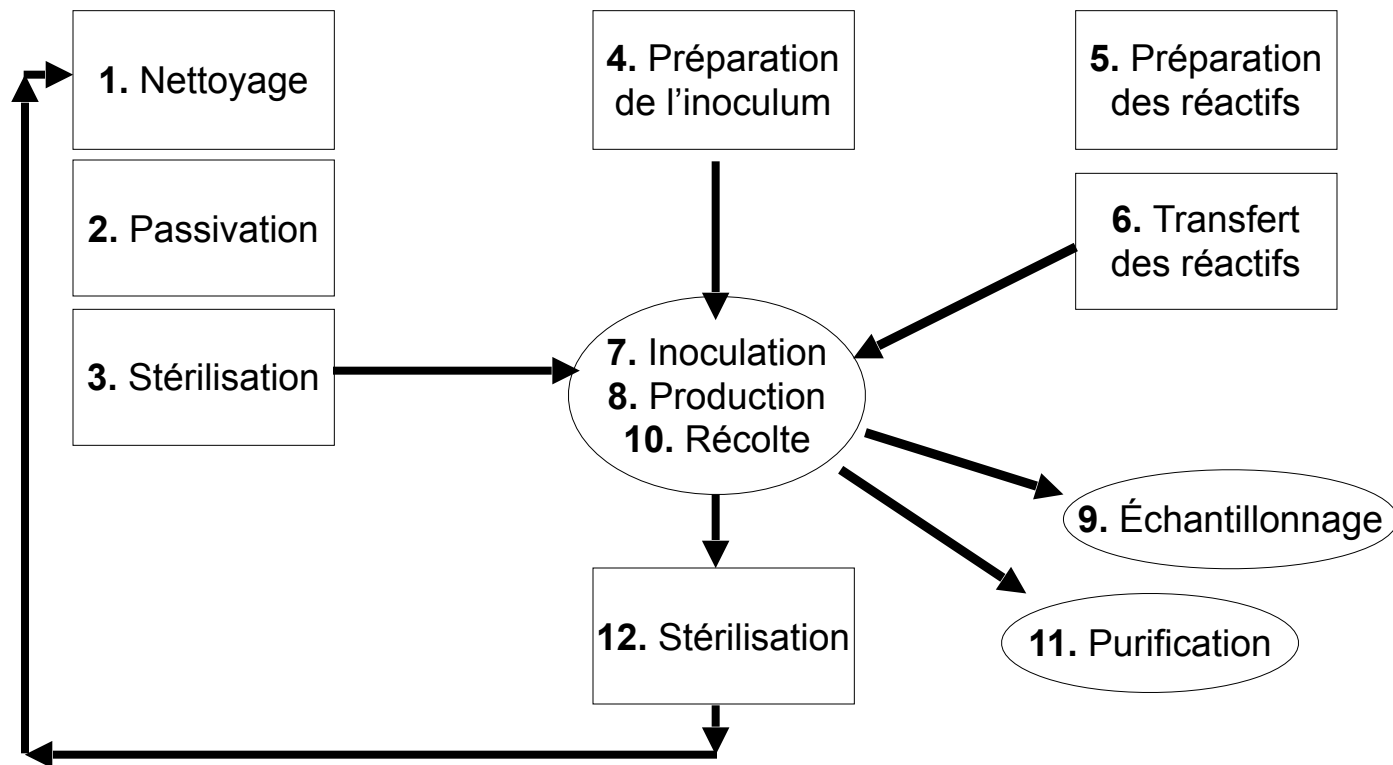


# Un cycle de production

## Préparation d'un cycle de production



# Plan de cours

## **Stérilisation & cycle de production**

- Notions de stérilisation et d'asepsie
- Stérilisation des gaz
- Stérilisation des équipements
- Calcul du temps de stérilisation
- Cycle de production
  - Nettoyage
  - Passivation
  - Test de pression et de stérilité

# Plan de présentation

Un très bref historique

Aseptiser ou stériliser ?

Pourquoi ?

- Question de rendement ou de réglementation ?

Que doit-on stériliser?

Comment?

- Principes d'opération
- Calculs



Un vecteur majeur de transfert de chaleur : l'eau



# Très bref historique : stérilisation

Les premières observations de stérilisation remontent à la nuit des temps!

**Le vin:** jus de raisin « stabilisé »

**Le yaourt et le fromage:** lait « stabilisé »

**Leeuwenhoek (1632-1723)** observe l'effet létal du café chaud sur la microflore du tartre de ses dents

**Spallanzani (1729-1799)** comprend qu'il y a stérilisation par la chaleur en faisant bouillir des flacons contenant du milieu de culture

**Pasteur (1822-1895)** développera la « pasteurisation »

- Décontamination à température modérée (60-90°C) permettant de diminuer le nombre de microorganismes tout en minimisant la dégradation des éléments nutritifs

# Stérilisation vs Désinfection

## Comparaison d'agents stérilisants

Agent	<i>E. coli</i>
<b>Bactéricide</b>	Un agent qui détruit les formes végétatives des bactéries. Les fongicides, virucides et sporicides sont des agents qui détruisent respectivement les mycètes, les virus et les spores.
<b>Bactériostatique</b>	Un agent qui inhibe la croissance (division) des bactéries. Un agent fongistatique inhibe la croissance des mycètes, et les microbiostatiques inhibent la croissance des microorganismes en général.
<b>Pasteurisation</b>	Destruction des microorganismes viables en utilisant de faibles températures (i.e. 70°C pendant 30 min). Les spores microbiennes ne sont toutefois pas tuées par cette méthode.
<b>Tyndallisation</b>	Cette méthode est principalement une pasteurisation multiple. Pendant la première pasteurisation, les microorganismes viables sont tués. En même temps, les spores sont activées vers la germination et se transforment en cellules viables pendant un temps de refroidissement (i.e. <12 h) des média jusqu'à approximativement 20 °C. Après, ces organismes sont détruits par une deuxième pasteurisation, etc. Cette approche est particulièrement intéressante pour du matériel sensible à la °T.

# Stérilisation vs Désinfection

## Comparaison de germicides

Produits	Concentration	Activité
Oxyde d'éthylène (gaz: 55-60 °C)	400-800 mg/L	Élevée
Glutaraldéhyde aqueux	2 %	Élevée
Formaldéhyde + alcool	8 % + 60-70 %	Élevée
Formaldéhyde aqueux	3-8 %	Élevée à moyenne
Iode + alcool	0,5 % + 70 %	Moyenne
Alcools	70-95 %	Moyenne
Composés chlorés	4-5 %	Moyenne
Composés phénoliques	0,5-3 %	Moyenne à faible
Iodophorés	75-150 ppm	Moyenne à faible
Composés d'ammonium quaternaire	1 : 750	Faible
Composé de mercure	1 : 500-1000	Faible

## Interprétation

### Cible de contaminant biologique

Bactéries			Mycètes (spores)	Virus	Prions
A	B	Spores			
+	+	+	+	+	+
+	+	-	+	+	+
+	-	-	+	+	-

A : Forme habituelle, e.g. *Staphylococcus*  
 B : *Bacillus anthracis*  
 Spores : bactériennes

# Stérilisation vs Désinfection

## Comparaison d'agents stérilisants

Agent	<i>E. coli</i>	<i>Spores bactériennes</i>	<i>Spores de moisissures</i>	<i>Virus et bactériophages</i>
Phénol	1	10 <sup>8</sup>	1-2	30
Formaldéhyde	1	250	N/A	2
Chaleur sèche	1	1000	2-10	1
Chaleur humide	1	3x10 <sup>8</sup>	2-10	1-5
Radiations U.V.	1	2-5	5-100	5-10

# Stérilisation vs Aseptie

- La stérilité est un concept absolu:
  - Un bioréacteur est parfaitement stérilisé ou il ne l'est pas
  - État qui s'applique à une surface, un gaz, un liquide, un volume
- L'aseptie concerne plus le maintien de conditions pour lesquelles on a absence de contaminants:
  - Se nettoyer les mains avec un antiseptique
  - Manipuler de façon aseptique
- Donc, on stérilise un bioréacteur ainsi que l'ensemble de ses intrants et extrants et on le manipule aseptiquement par la suite

# Que doit-on stériliser?

- Tout ce avec quoi le produit entrera en contact doit être stérilisé:
- avant les opérations: protection de la production
- et après: protection des employés
  - Surfaces
  - Gaz alimentés
  - Liquides alimentés
  - Etc.

# Objectifs de la stérilisation

- Retirer tout contaminant: vivant ou non?
- Retirer complètement les cellules et empêcher leur présence?
- Éliminer la capacité qu'ont les microorganismes de se diviser?
- Détruire les cellules présentes (attaquer les parois cellulaires)
- Dénaturer le matériel génétique

# Stérilisation d'un fluide ou d'un équipement de bioprocédé

## Plusieurs méthodes:

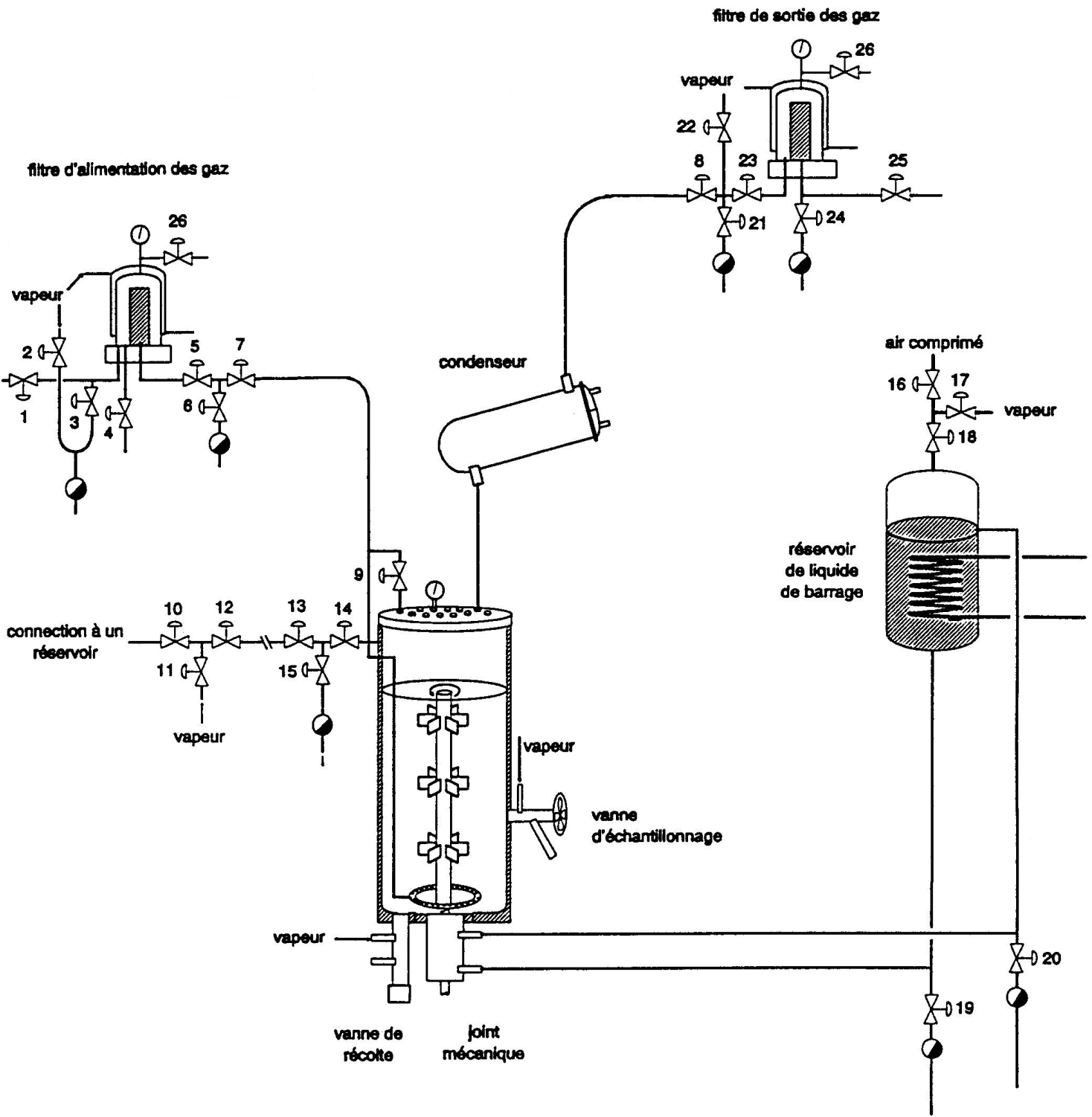
- Thermique (la plus courante)
- Chimique (acide, base ou agent létal)
- Physique (filtration)
- Photonique (UV, rayons gamma)

La méthode dépend des conditions opératoires, des équipements, etc.

- On filtre un débit gazeux (empêcher la présence de contaminants)
- On stérilise un fluide par filtration ou par la chaleur
- On stérilise un équipement de bioréacteur par la chaleur
- Dans le domaine alimentaire : rayonnement UV pour stériliser des surfaces

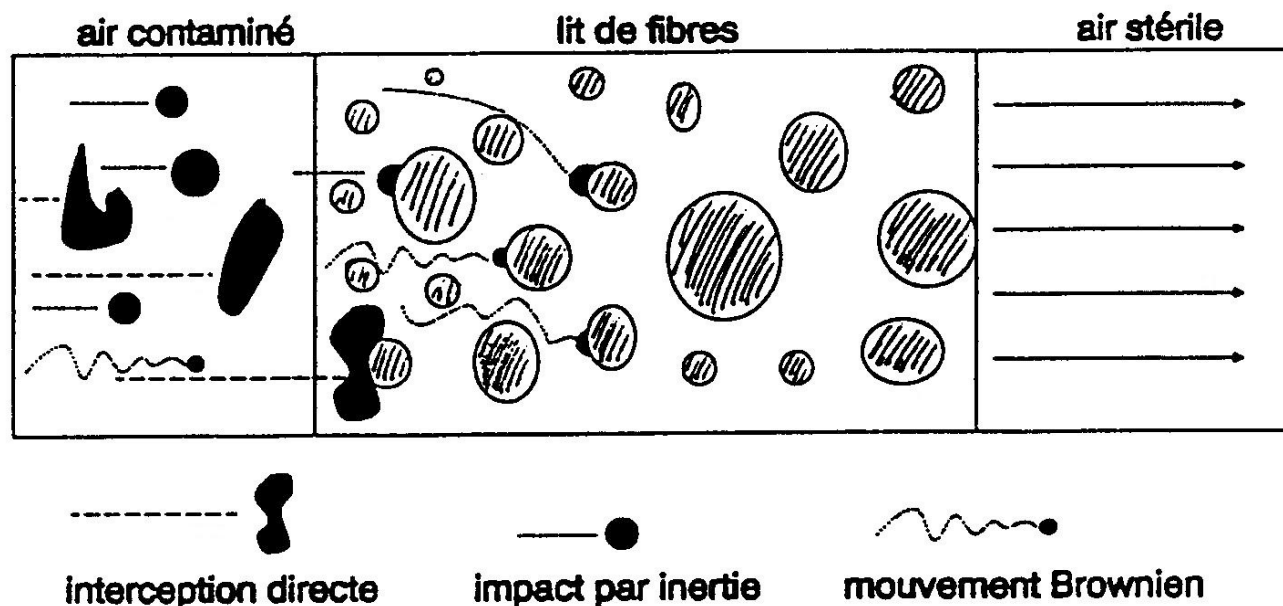


# Montage idéal : pharma



# Stérilisation des gaz par filtration

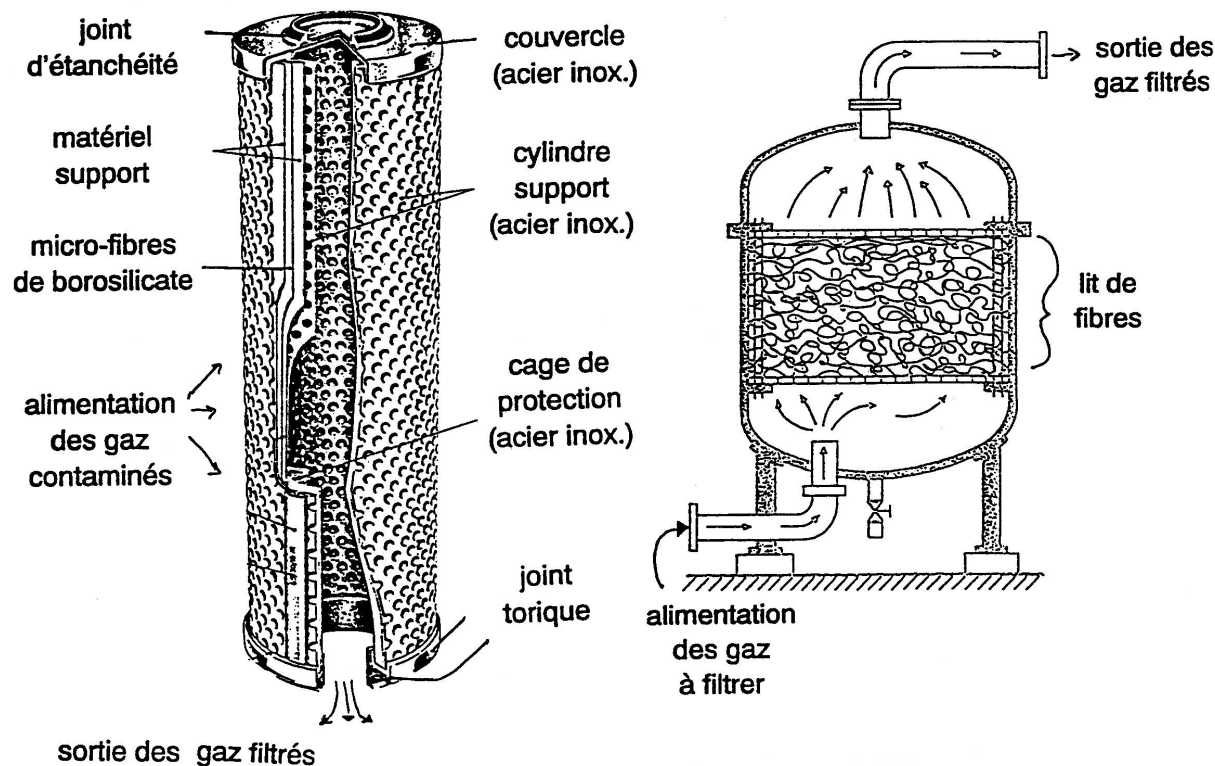
## Filtration par pénétration: lit de fibres



- ◆ Puisque le réacteur peut voir passer des volumes très élevés ( $\text{m}^3/\text{min}$  x plusieurs jours), la filtration doit être efficace

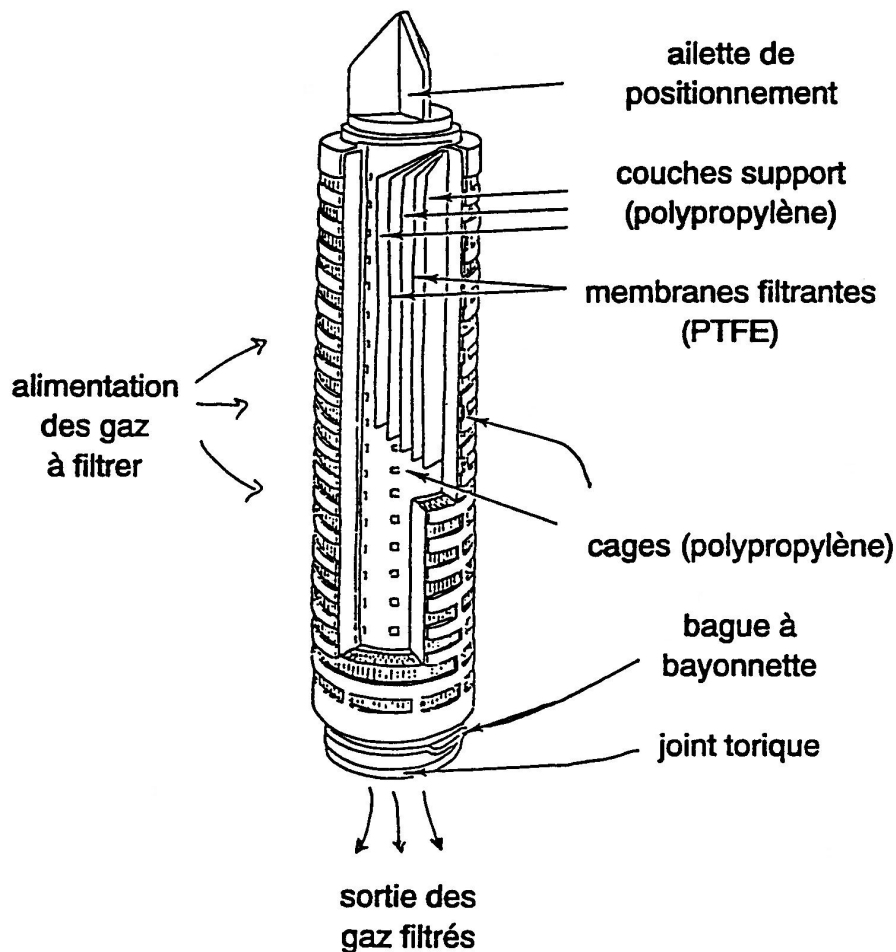
# Stérilisation des gaz par filtration

## Filtration par pénétration: lit de fibres

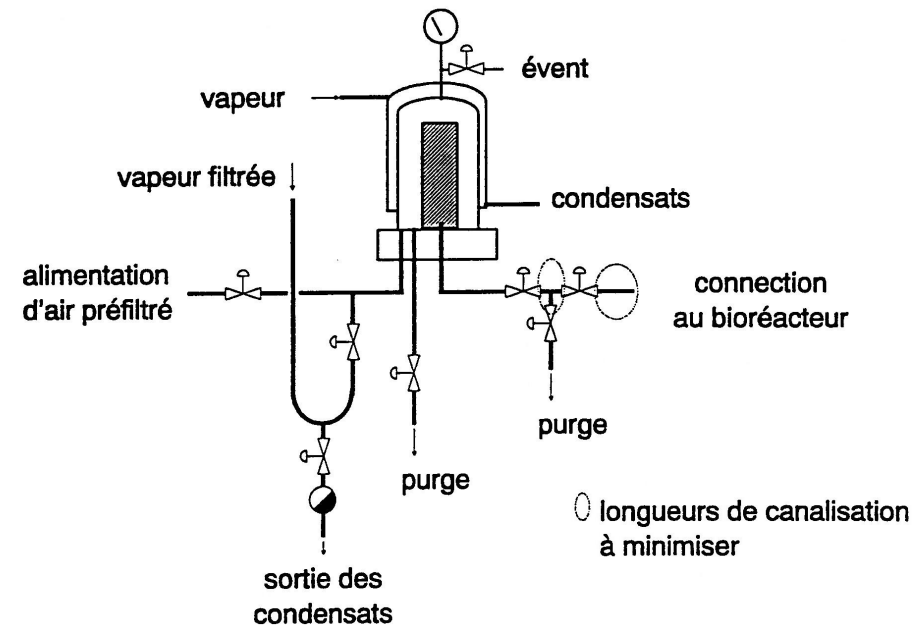


# Stérilisation des gaz par filtration

## Filtration absolue: membrane

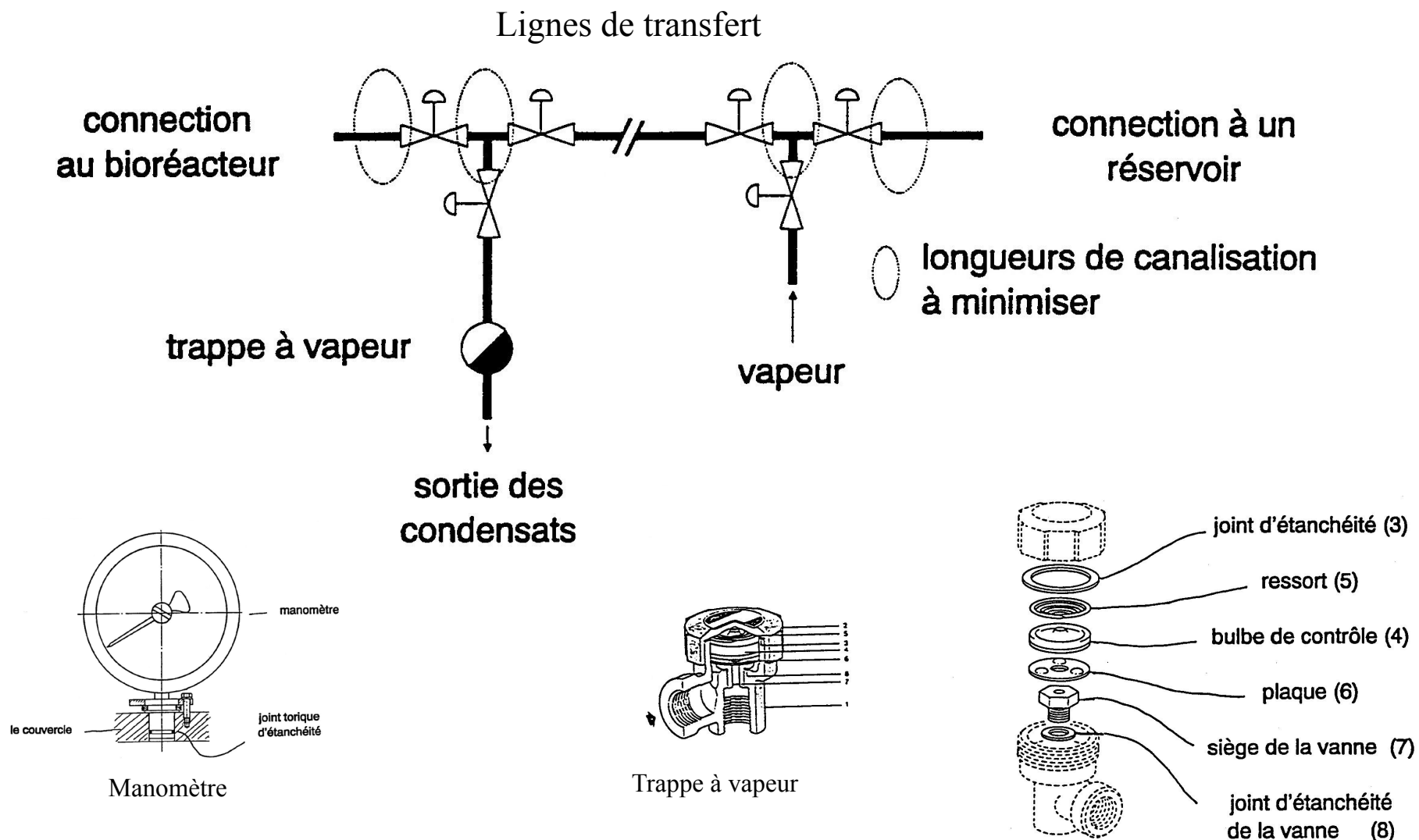


Cartouche d'un filtre absolu



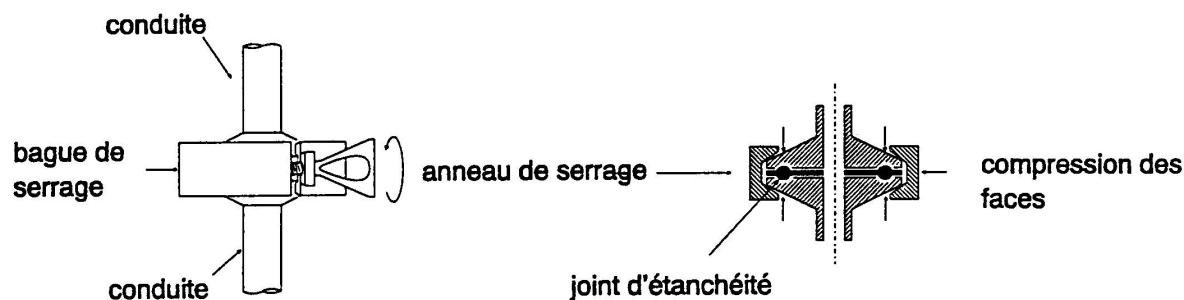
Installation d'un filtre absolu

# Nettoyage d'une canalisation



# Nettoyage d'une canalisation

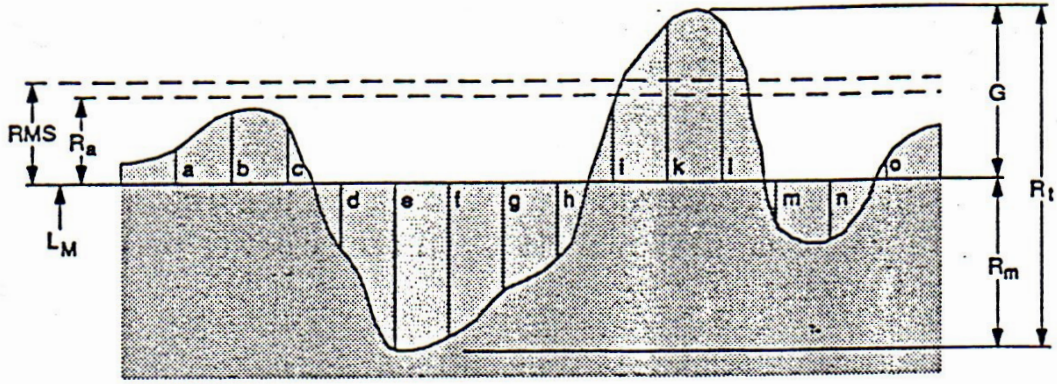
Lignes soudées	Lignes avec raccords sanitaires
<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Opérations de stérilisation et d'utilisation facilité</li> <li>• Les joints soudés offrent une étanchéité excellente</li> <li>• Requièrent peu d'entretien</li> </ul>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nettoyage et stérilisation faciles</li> <li>• Flexibilité de modifications</li> <li>• Faciles d'entretien</li> </ul>
<p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les soudures ne peuvent être polies qu'à l'extérieur : cordons difficiles à nettoyer et stériliser</li> <li>• La configuration ne peut être modifiée facilement</li> <li>• Difficile d'entretien lors du bris d'une soudure</li> </ul>	<p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Entretien fréquent</li> </ul>



Connexion Tri-Clamp<sup>MC</sup>



# Nettoyage de canalisations ou de cuves



$$R_a = \frac{a+b+c+\dots+o}{z}$$

$$RMS = \frac{a^2+b^2+c^2+\dots+o^2}{z} \approx 1.1 R_a$$

- R<sub>t</sub> Roughness (Germany)
- R<sub>m</sub> Mean roughness
- R<sub>a</sub> Arithmetic mean roughness (UK)
- RMS Geometric mean roughness (USA)
- G Smoothing depth
- a,b,c,.. Distance from profile to medium line L<sub>M</sub>
- L<sub>M</sub> Medium line
- z Number of distances

Finissions la plus lisse possible!

Variation of surface qualities based on different measuring methods

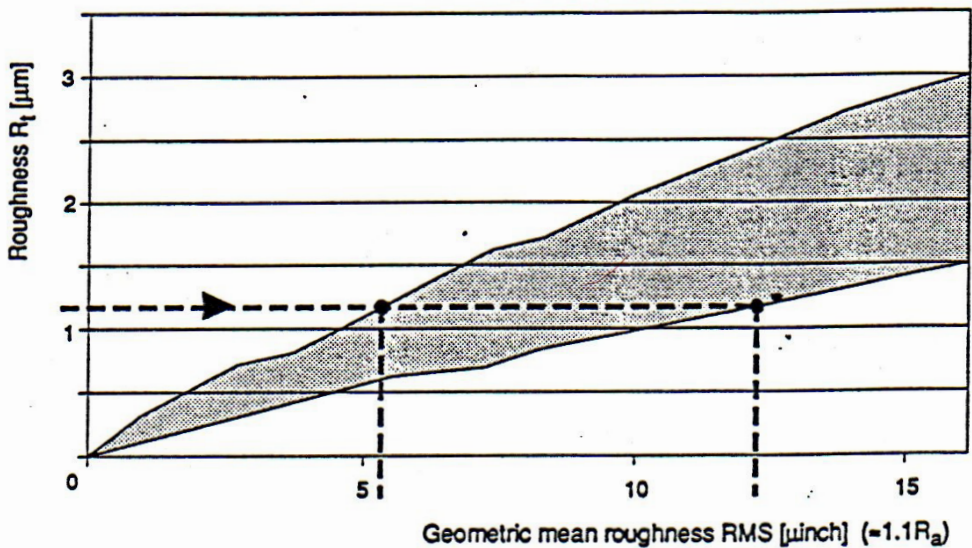
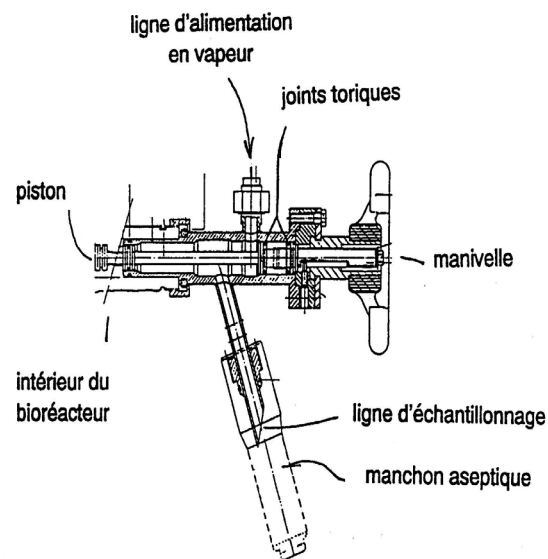


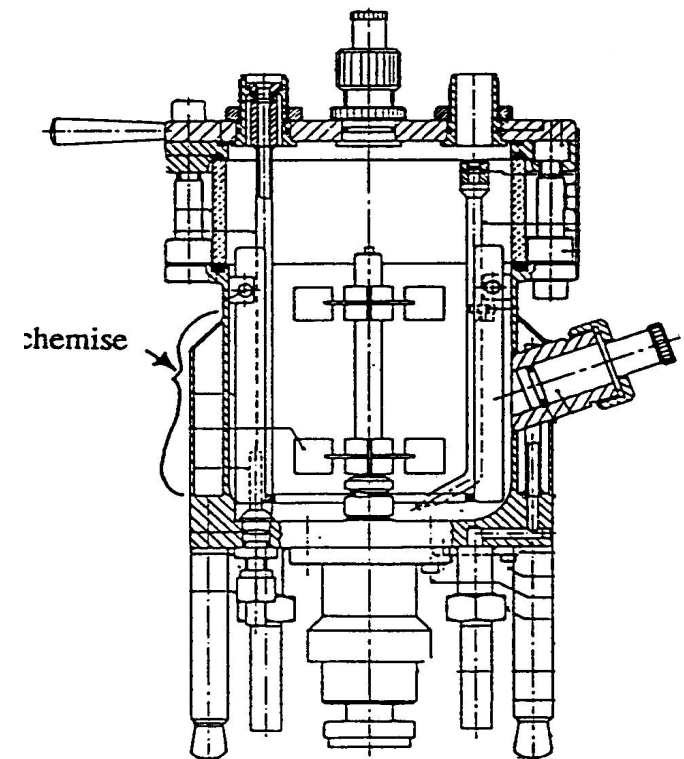
Figure 6.7 Definition and Illustration of Roughness Values.

# Une chemise

- Ok pour les petits volumes
- Facile à nettoyer
- Pas de zones mortes
- Faible surface d'échange



vanne piston pour grands volumes

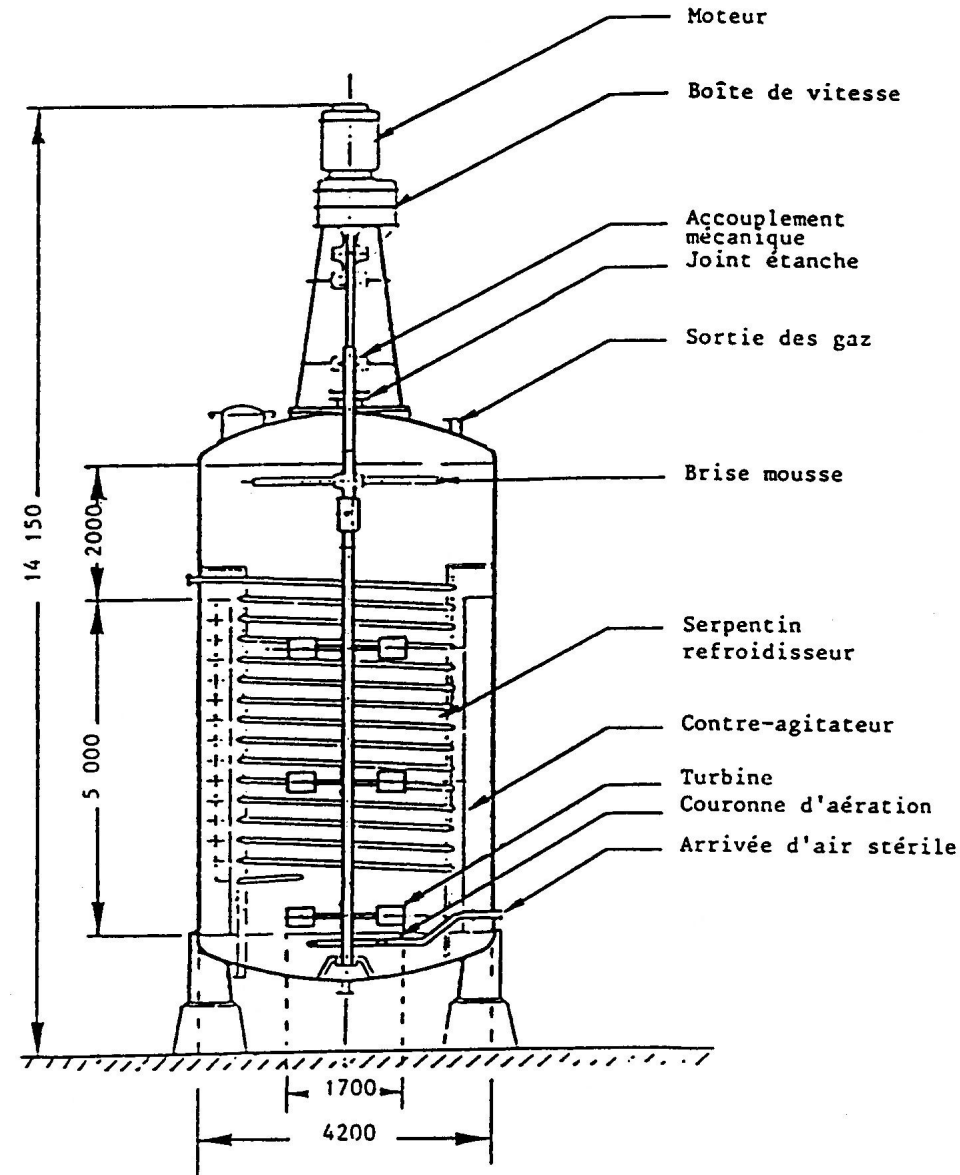


Bioréacteur



# Un serpentin

- Ok pour les grands volumes
- Difficile à nettoyer
- Risque de zones mortes
- Grande surface d'échange



Bioréacteur muni de surfaces d'échange thermique internes

# Transfert de chaleur

## Cinétiques thermiques

MODE DE CHAUFFAGE	PROFIL T-vs-t	PARAMÈTRES
INJECTION	$(T - T_o) = \alpha \left( \frac{\beta t}{1 + \beta t} \right)$ <i>profil hyperbolique</i>	$\alpha = \frac{\Delta \hat{H}_{vap}}{C_p}$ $\beta = s/M_o$
CHAUFFAGE ÉLECTRIQUE	$(T - T_o) = \alpha t$ <i>profil linéaire</i>	$\alpha = \frac{S}{M_{tot} C_p}$
CHEMISE OU SERPENTIN (VAPEUR)	$\left( \frac{T - T_s}{T_o - T_s} \right) = e^{-\alpha t}$ <i>profil exponentiel</i>	$\alpha = \frac{UA}{M_{tot} C_p}$
CHEMISE OU SERPENTIN (REFROIDISSEMENT)	$\left( \frac{T - T_{oo}}{T_o - T_{oo}} \right) = e^{-\alpha t}$ <i>profil exponentiel</i>	$\alpha = \frac{w C_p}{M_{tot} C_p} \left[ 1 - e^{-\frac{UA}{w C_p}} \right]$
T =	température du milieu	To = température initiale du milieu
T <sub>s</sub> =	température de la vapeur	T <sub>oo</sub> = température d'entrée de l'eau
ΔĤ <sub>vap</sub> =	enthalpie nette de la vapeur [kJ/h]	s = débit de vapeur [kg/h]
U =	coefficient global de transfert [W.m <sup>2</sup> .K <sup>-1</sup> ]	S = puissance de l'élément chauffant [W]
C <sub>p</sub> =	chaleur spécifique de l'eau de refroidissement	A = surface d'échange
M <sub>tot</sub> =	masse total du milieu	M <sub>o</sub> = masse initiale du milieu
C <sub>p</sub> =	chaleur spécifique du milieu	

# Transfert de chaleur

## VALEUR TYPIQUES DE U

Source: Chemical Engineers' Handbook, Perry et Chilton Ed. McGraw-Hill, New York, 5e édition, Chapitre 10 (1973)

Cinétiques  
thermiques  
(paramètres)

TABLE 10-14 Jacketed Vessels: Overall Coefficients

Jacket fluid	Fluid in vessel	Wall material	Overall U*	
			Btu/(h·ft <sup>2</sup> ·°F)	J/(m <sup>2</sup> ·s·K)
Steam	Water	Stainless steel	150-300	850-1700
Steam	Aqueous solution	Stainless steel	80-200	450-1140
Steam	Organics	Stainless steel	50-150	285- 850
Steam	Light oil	Stainless steel	60-160	340- 910
Steam	Heavy oil	Stainless steel	10- 50	57- 285
Brine	Water	Stainless steel	40-180	230-1625
Brine	Aqueous solution	Stainless steel	35-150	200- 850
Brine	Organics	Stainless steel	30-120	170- 680
Brine	Light oil	Stainless steel	35-130	200- 740
Brine	Heavy oil	Stainless steel	10- 30	57- 170
Heat-transfer oil	Water	Stainless steel	50-200	285-1140
Heat-transfer oil	Aqueous solution	Stainless steel	40-170	230- 965
Heat-transfer oil	Organics	Stainless steel	30-120	170- 680
Heat-transfer oil	Light oil	Stainless steel	35-130	200- 740
Heat-transfer oil	Heavy oil	Stainless steel	10- 40	57- 230
Steam	Water	Class-lined CS	70-100	400- 570
Steam	Aqueous solution	Class-lined CS	50- 85	285- 480
Steam	Organics	Class-lined CS	30- 70	170- 400
Steam	Light oil	Class-lined CS	40- 75	230- 425
Steam	Heavy oil	Class-lined CS	10- 40	57- 230
Brine	Water	Class-lined CS	30- 80	170- 450
Brine	Aqueous solution	Class-lined CS	25- 70	140- 400
Brine	Organics	Class-lined CS	20- 60	115- 340
Brine	Light oil	Class-lined CS	25- 65	140- 370
Brine	Heavy oil	Class-lined CS	10- 30	57- 170
Heat-transfer oil	Water	Class-lined CS	30- 80	170- 450
Heat-transfer oil	Aqueous solution	Class-lined CS	25- 70	140- 400
Heat-transfer oil	Organics	Class-lined CS	25- 65	140- 370
Heat-transfer oil	Light oil	Class-lined CS	20- 70	115- 400
Heat-transfer oil	Heavy oil	Class-lined CS	10- 35	57- 200

\*Values listed are for moderate nonproximity agitation. CS = carbon steel.

# Transfert de chaleur

Cinétiques  
thermiques  
(paramètres)

TABLE 10 Overall Heat-Transfer Coefficients for Coils Immersed in Liquids  
*U* Expressed as  $Btu/ft^2 \cdot h \cdot ^\circ F$

Substance inside coil	Substance outside coil	Coil material	Agitation	<i>U</i>
Steam	Water	Lead	Agitated	70
Steam	Sugar and molasses solutions	Copper	None	50-240
Steam	Boiling aqueous solution	.....	.....	600
Cold water	Dilute organic dye intermediate	Lead	Turboagitator at 95 r.p.m.	300
Cold water	Warm water	Wrought iron	Air bubbled into water surrounding coil	150-300
Cold water	Hot water	Lead	0.40 r.p.m. paddle stirrer	90-360
Brine	A. 10% acids	.....	30 r.p.m.	100
Cold water	25% sodium at 60°C.	Wrought iron	Agitated	50
Water	Aqueous solution	Lead	500 r.p.m. sleeve propeller	250
Water	8% NaOH	.....	22 r.p.m.	155
Steam	Fatty acid	Copper (pancake)	None	96-100
Milk	Water	.....	Agitation	300
Cold water	Hot water	Copper	None	105-180
60°F. water	10% aqueous sugar solution	Lead	Mild	50-60
Steam and hydrogen at 1500 lb./sq. in.	60°F. water	Steel	.....	100-165
Steam 110-146 lb./sq. in. gage	Vegetable oil	Steel	None	23-29
Steam	Vegetable oil	Steel	Various	39-72
Cold water	Vegetable oil	Steel	Various	29-72



# Le nettoyage en-place (CIP)

- Faciliter le nettoyage
- Réduire le démontage des équipements

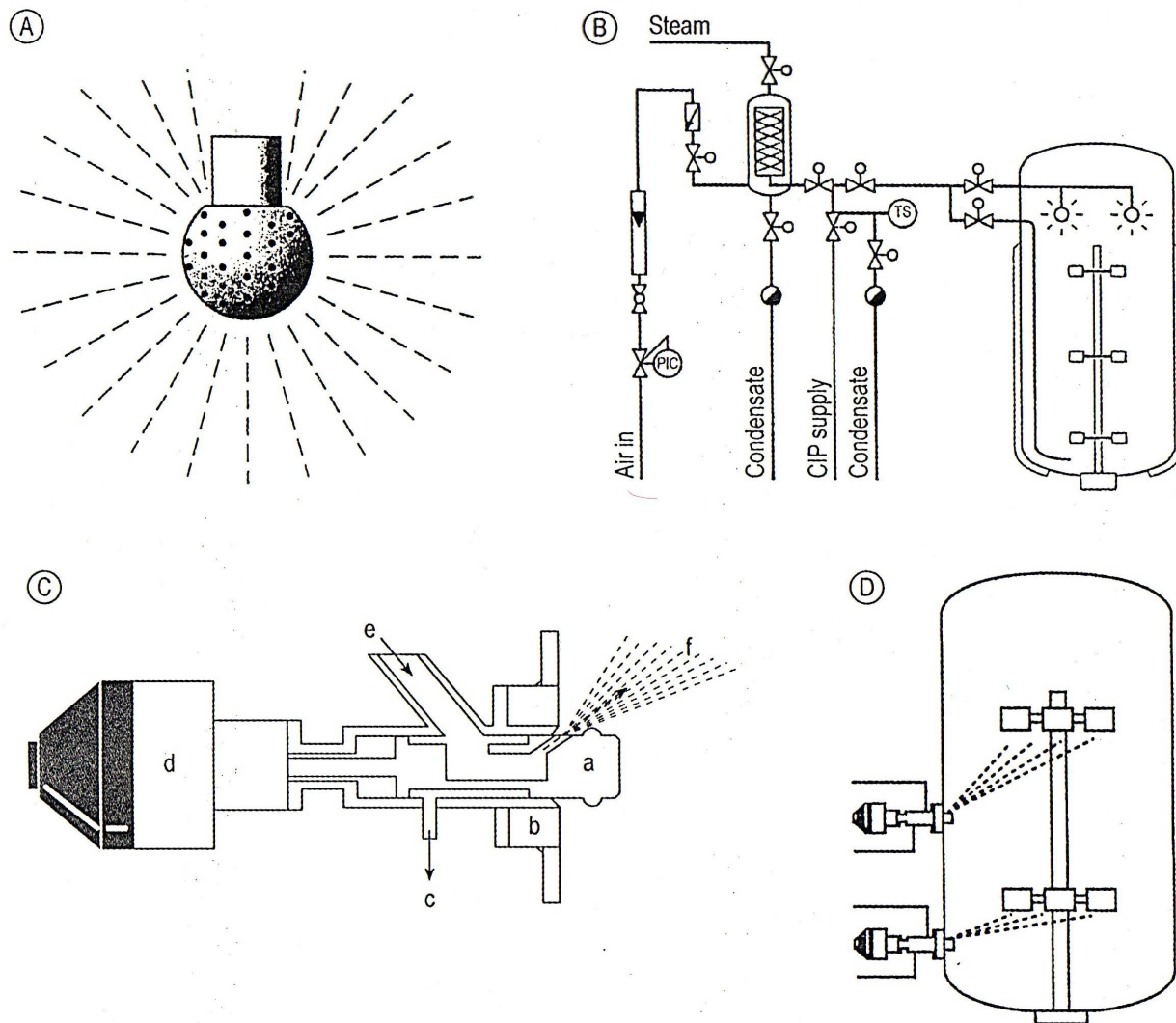


Figure 3. Spray nozzles and application examples to clean a stirred tank [25]

A) spray ball with action radius of 360° and flow rates from 1 to 15 m<sup>3</sup>/h; B) Stirred vessel requiring a minimum of two spray balls; C) Spray valve; D) Application to sparge directly on critical parts

# Nettoyage +

Grosses besognes

## DÉSINFECTION

- stérilisation à la vapeur
- agents antibactériens:
  - savons nécessitent de nombreux rinçages
  - solution d'hypochlorite de sodium: < 150 ppm, 20 min @ 25°C pour de l'acier de grade 316.

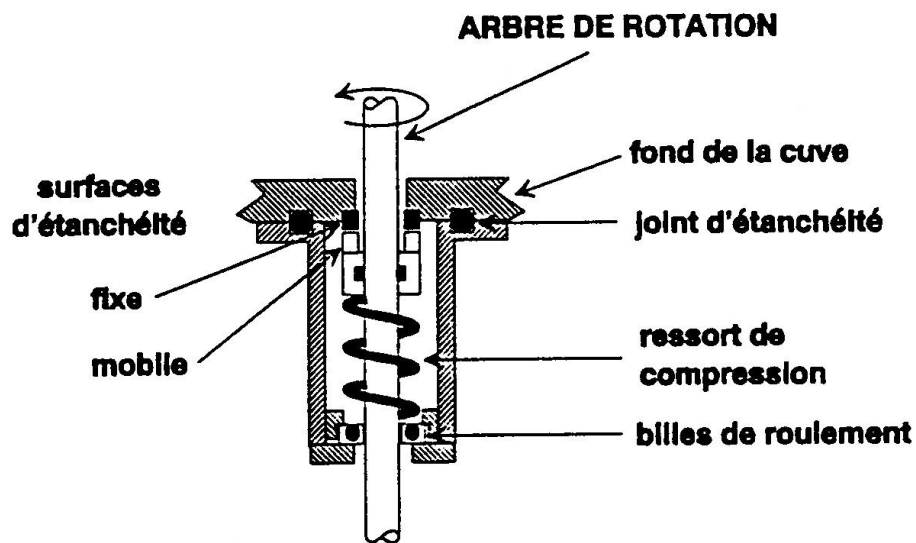
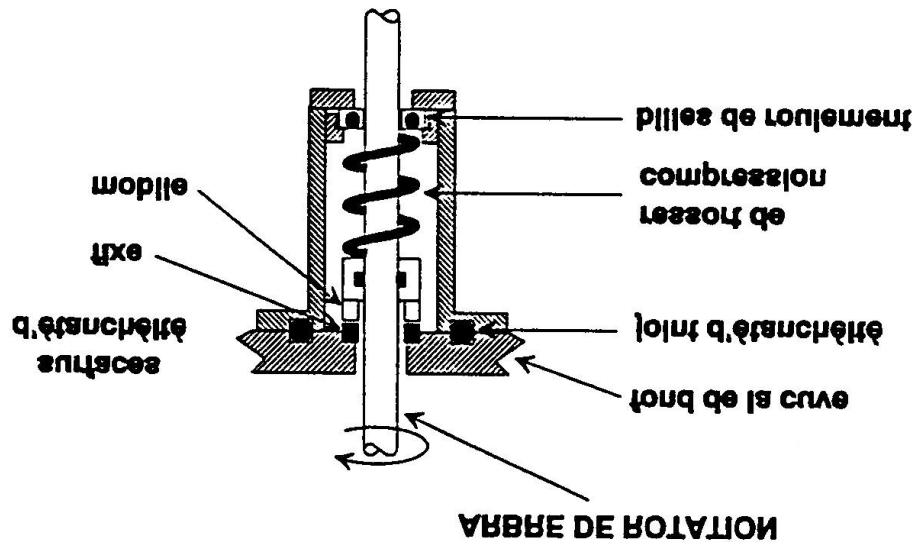
Taches de rouilles

## LA PASSIVATION (trois étapes)

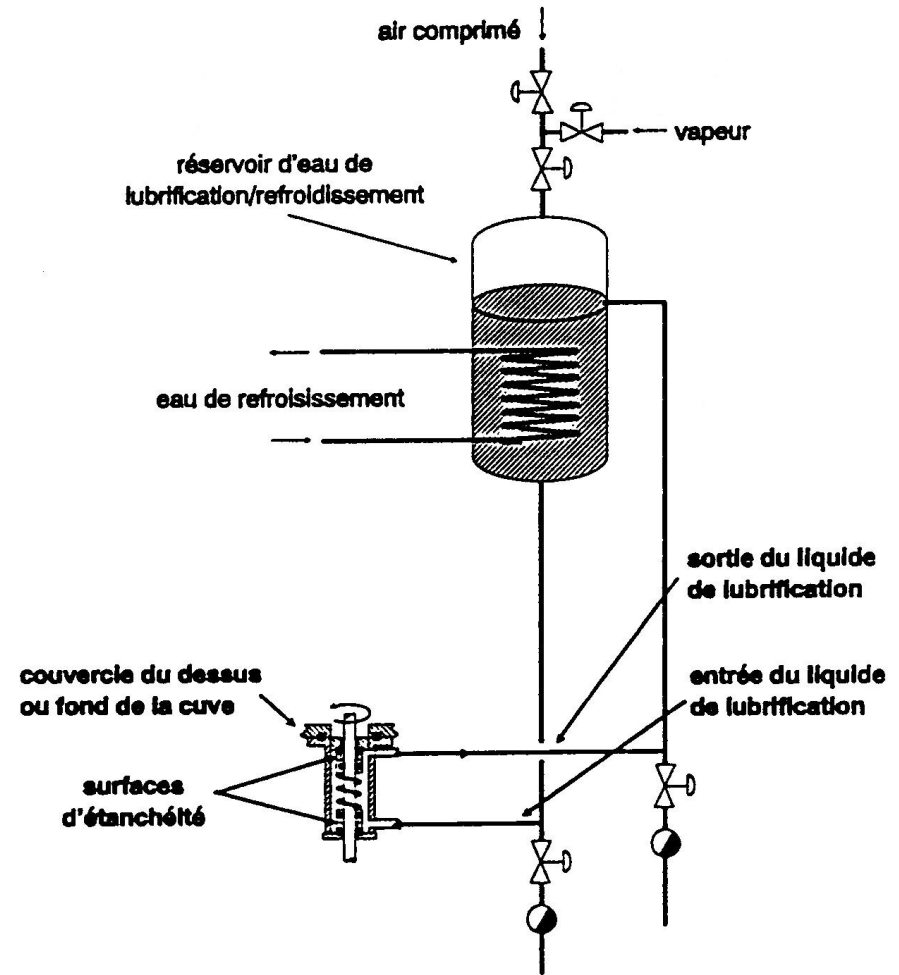
Cette procédure ne doit cependant être effectuée que pour répondre à des problèmes précis:

- pièces fraîchement machinées
- pièces avec des signes apparents d'oxydation en surface
- acide faible (citrique 1% massique) à 60 degrés C durant 1 heure;
- base forte (soude caustique 1% massique) à 60 degrés C durant 1 heure;
- rincer jusqu'à ce que le pH redevienne neutre.

# Joint mécanique d'agitation



Assemblage d'un joint mécanique d'étanchéité



Joint mécanique en tandem

# Prévoir la stérilisation des équipements

Il y a plusieurs «méthodes» ou modèles prédictifs :

- **Réduction décimale:** temps pour réduire d'un log la concentration en contaminant microbien
- **Calcul probabiliste:** probabilité d'une spore vivante
- **Calcul simplifié des 3 étapes:**
  - chauffe-retenue-refroidissement
- Dans les trois cas, on cherche le temps de stérilisation selon une température de stérilisation



# Prévoir la stérilisation des équipements

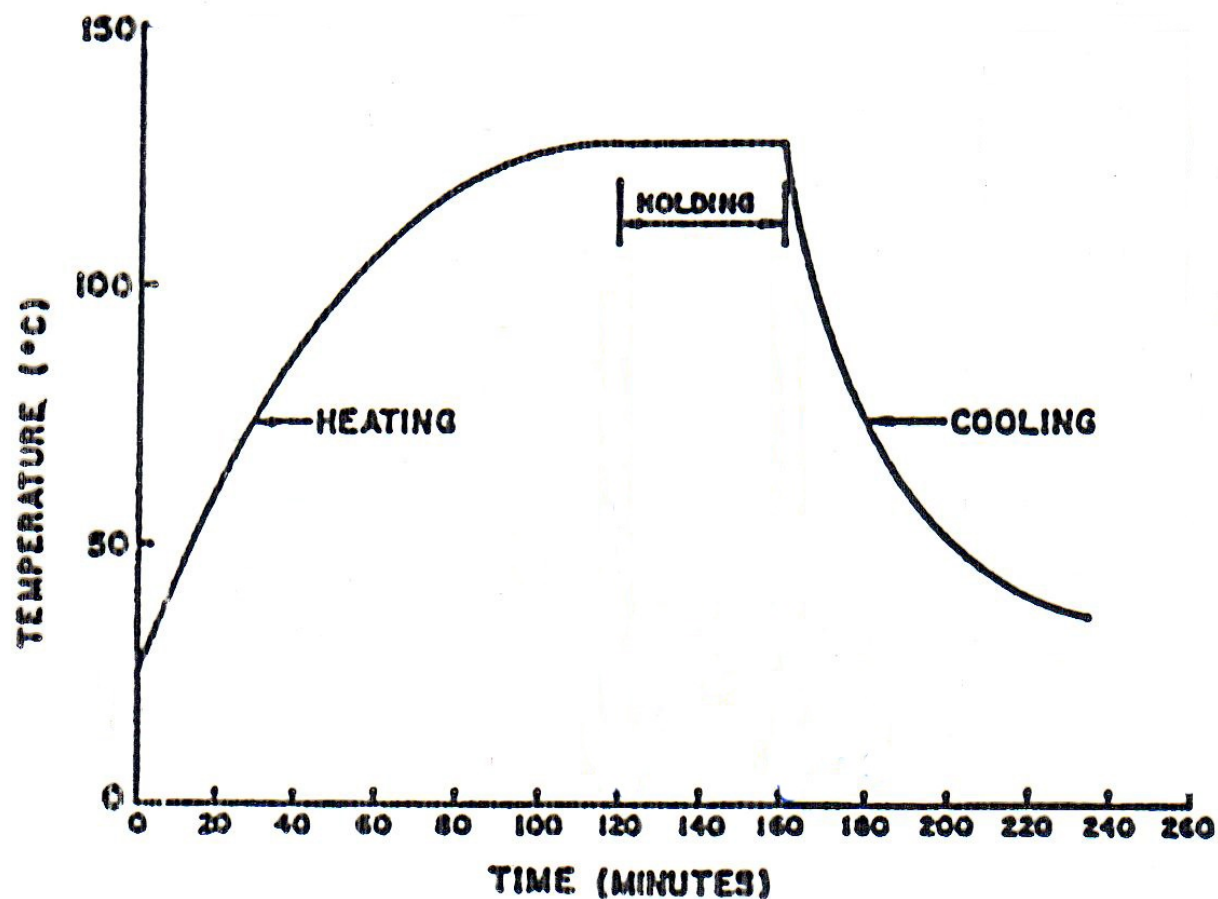
- On se concentrera sur la stérilisation par la chaleur, mais les principes peuvent s'appliquer aux autres méthodes
- On parle de nombre de microorganismes, puisque 1 seul peut faire rater la stérilisation:
- On cherche à estimer le temps requis pour stériliser, ou réduire la charge en contaminants microbiens

$$N_o = n_o * V \quad \text{avec } V : \text{ le volume de liquide à décontaminer}$$

$n_o$  : concentration en contaminant viable [nb.L<sup>-1</sup>]  
 $N_o$  : quantité totale en contaminant viable [nb.]

# Profil de température : cycle de stérilisation

Courbe typique de la température lors de procédés de stérilisation en mode cuvée



Typical heating, holding, and cooling temperature-time profile for batch sterilization cycle.

# Prévoir la stérilisation des équipements

Bilans ...

$$\frac{dn}{dt} = -k_d \cdot n \quad k_d = k_{d,o} \cdot e^{\frac{-Ea}{R \cdot T}}$$

# Prévoir la stérilisation des équipements

Bilans ...

$$\frac{dn}{dt} = -k_d \cdot n \quad k_d = k_{d,o} \cdot e^{\frac{-Ea}{R \cdot T}}$$

$$\int_{n_o}^n \frac{dn}{n} = \int_{t=0}^t -k_d \cdot dt$$

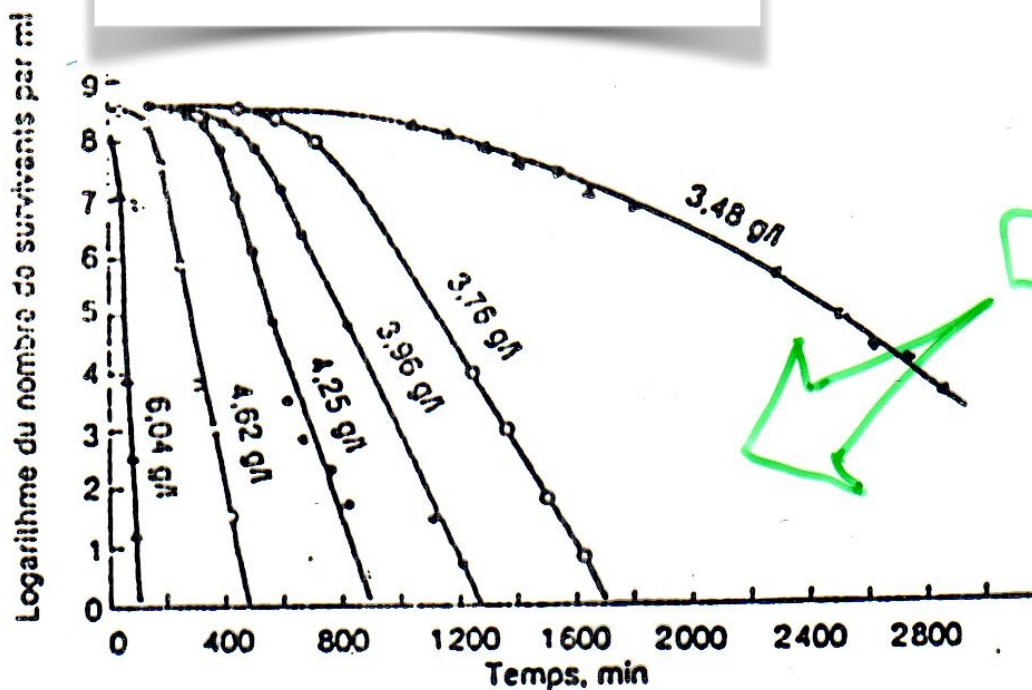
$$\ln\left(\frac{n}{n_o}\right) = -k_d \cdot t$$

$$\frac{n}{n_o} = e^{-k_d \cdot t}$$

# Agent bactéricides : viabilité dans le temps

$$\ln\left(\frac{n}{n_0}\right) = -k_d \cdot t$$

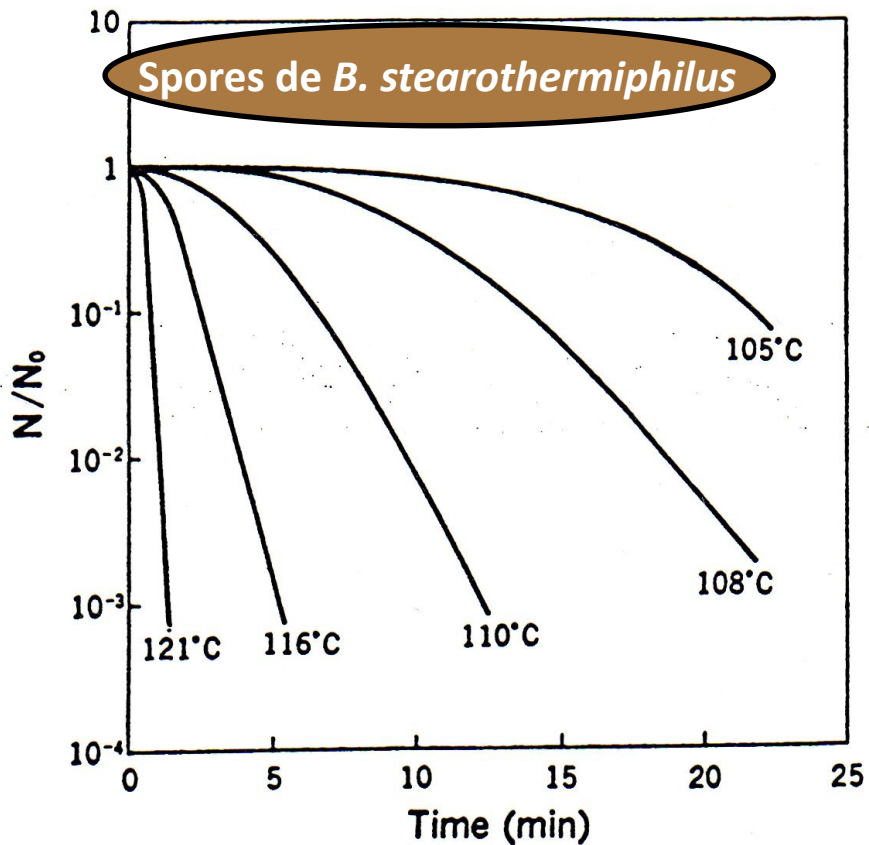
Les agents bactéricides auront un effet qui sera fonction de leur concentration



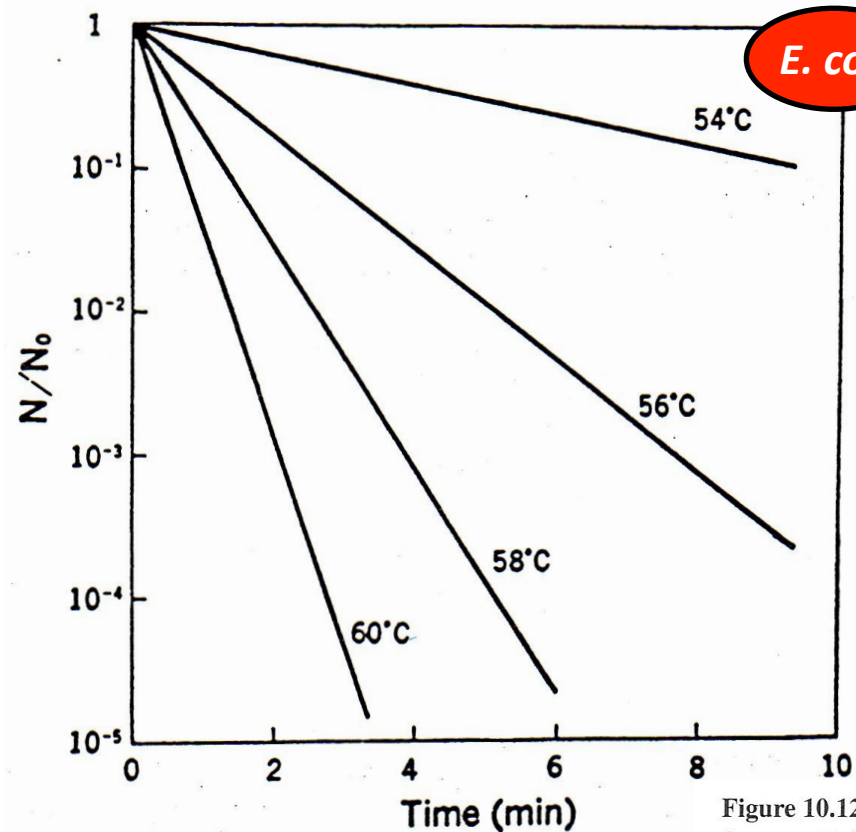
$\log M$

[désinfectant]

# Résistance à la chaleur : une question d'espèce



(a)



(b)

$$\ln\left(\frac{n}{n_0}\right) = -k_d \cdot t$$

Exemple de stérilisation par la chaleur humide  
(mortalité cellulaire)

Figure 10.12. (a) Typical death-rate data for spores of *Bacillus stearothermophilus* Fs 7954 in distilled water, where  $N$  = number of viable spores at any time,  $N_0$  = original number of viable spores. (b) Typical death rate for *E. coli* in buffer, where  $N$  = number of viable cells at any time and  $N_0$  = original number of viable cells. (With permission, from S. Aiba, A. E. Humphrey, and N. F. Millis, *Biochemical Engineering*, 2d ed., University of Tokyo Press, Tokyo, 1973, p. 241.)

# Stérilisation : sensibilité à la chaleur

$$\ln\left(\frac{n}{n_o}\right) = -k_d \cdot t$$

Valeurs typiques de sensibilité à la chaleur pour des spores de *Bacillus stearothermophilus*

Température (°C)	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	
	Humide	Sec
100	0,02	
110	0,21	
120	2,0	0,12
130	17,5	
140	136	
150	956	

# Stérilisation : sensibilité à la chaleur

## Valeurs typiques de sensibilité à la chaleur pour divers composés, microorganismes et réactions

Composé, microorganisme ou réaction		Énergie d'activation : $E_a$ (kJ.g mol <sup>-1</sup> )
spores	<i>B. stearothermophilus</i>	287,2
	<i>B. subtilis</i>	318,0
	<i>Cl. botulinum</i>	343,1
microorganismes	<i>E. coli</i>	530,9
nutriments	vitamine B12	96,6
	thiamine.HCL (B6)	92,0
	riboflavine (B2)	98,7
	acide folique	70,2
	alcool d-pantothenyle	87,8
enzymes	trypsine	170,5
	peroxidase	98,7
	lipase pancréatique	192,3
réaction	Maillard	130,5

$$k_d = k_{d,o} \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}}$$



# Stérilisation : sensibilité à la chaleur

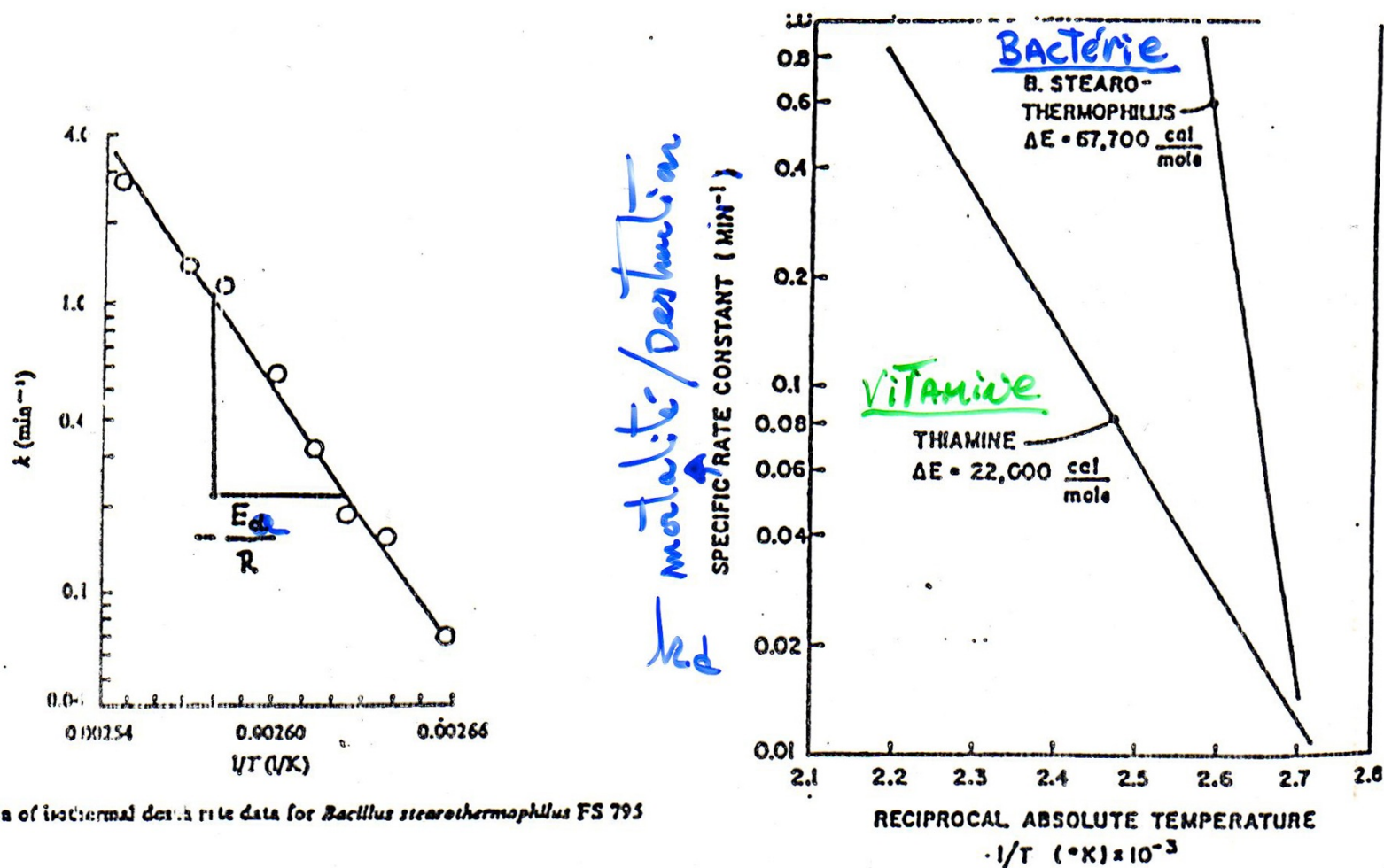


Figure 17. Correlation of isothermal death rate data for *Bacillus stearothermophilus* FS 795 et al. (1965).

# Stérilisation: modèle probabiliste

Par une approche stochastique de la stérilisation, la probabilité qu'au temps « t » il reste « N » microorganismes viables:

$$P_N(t) = \frac{N_o!}{(N_o - N)!N!} (e^{-k_d \cdot t})^N (1 - e^{-k_d \cdot t})^{(N_o - N)}$$

Or, dans le cas de produits injectables, nous cherchons à atteindre  $N=0$ , soit, une probabilité d'extinction totale:

$$P_o(t) = (1 - e^{-k_d \cdot t})^{N_o}$$

et la probabilité d'avoir au moins un microorganisme viable (ou disons, survivant à la stérilisation) ou  $N>0$ :

$$1 - P_o(t) = 1 - (1 - e^{-k_d \cdot t})^{N_o}$$

et pour  $N_o \gg \gg 0$  ...

# Stérilisation: modèle probabiliste

et pour  $N_o \gg \gg 0$ :

$$1 - P_o(t) = 1 - (1 - e^{-k_d \cdot t})(1 - e^{-k_d \cdot t}) \dots N_o \text{ fois}$$

$$1 - P_o(t) = 1 - [1 - 2e^{-k_d \cdot t} + e^{2k_d \cdot t}] \dots$$

$$1 - P_o(t) = 1 - [1 - e^{-k_d \cdot t} - 2e^{-k_d \cdot t} + 2e^{-2k_d \cdot t} + e^{2k_d \cdot t} - e^{k_d \cdot t}] \dots$$

$$1 - P_o(t) = 1 - [1 - 3e^{-k_d \cdot t} + \dots] \dots$$

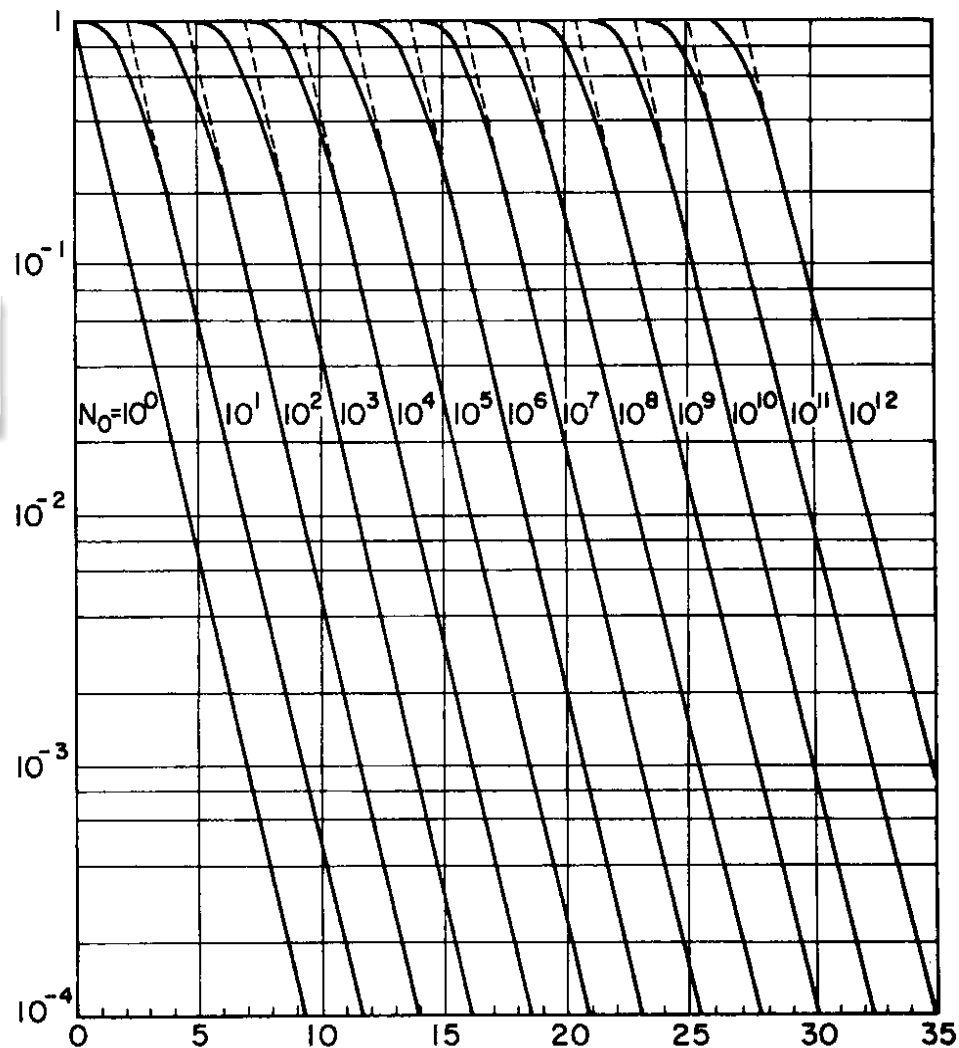
on obtient donc, par approximation:  $1 - P_o(t) \cong N_o e^{-k_d \cdot t}$

ce qui signifie que  $1 - P_o(t) \cong N$       valable si  $(1 - P_o(t)) \leq 0,01$

une valeur qui peut être lue sur le graphique:

# Stérilisation: modèle probabiliste

$$1 - P_o(t) \cong N$$



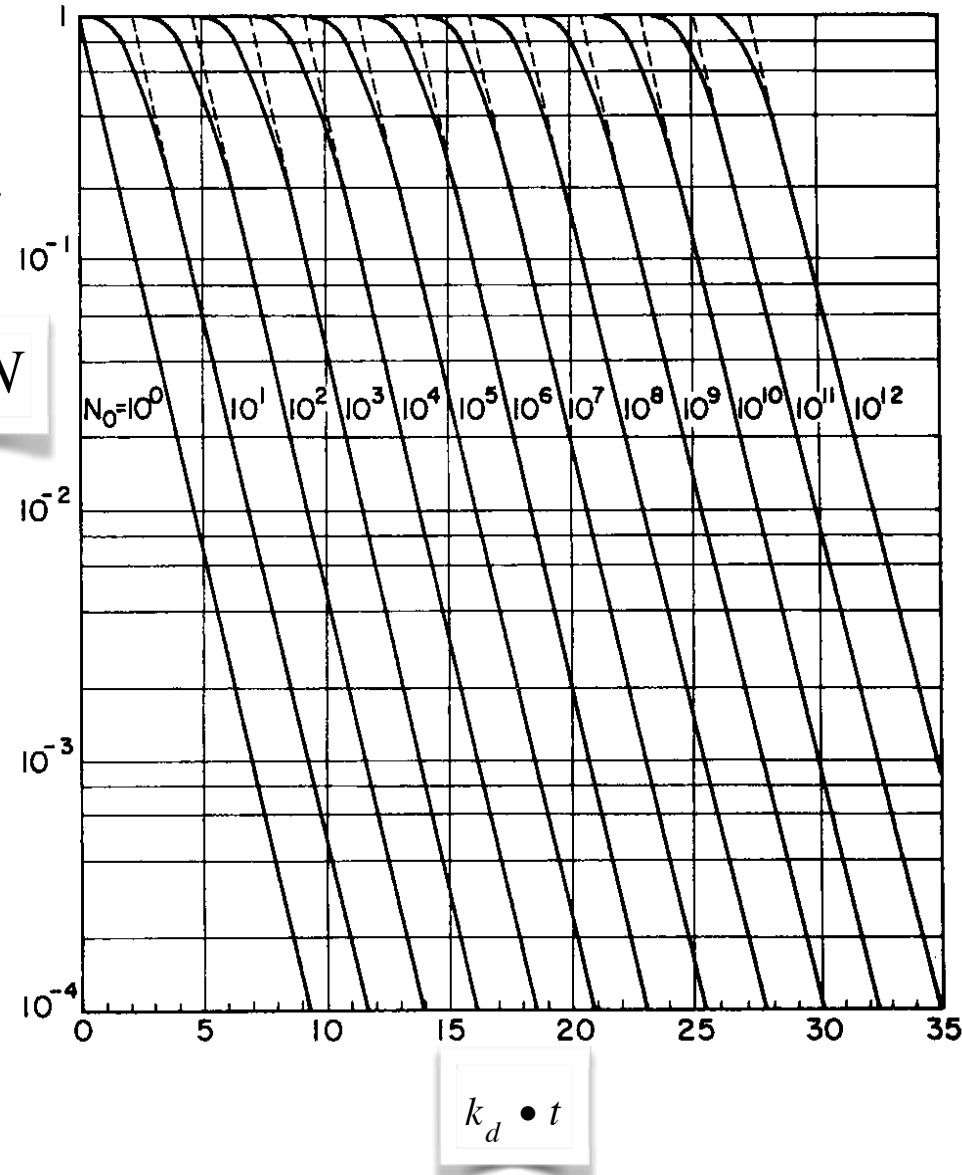
$$k_d \cdot t$$

# Stérilisation: modèle probabiliste

## Utilisation de la charte de stérilisation

1. Spécifier une probabilité de contamination «  $1 - P_0$  » jugée acceptable (e.g.  $10^{-3}$ )
2. Déterminer  $N_0$
3. Lire  $k_d t$  sur la charte
4. Connaissant le  $k_d$  pour l'organisme, en déduire le temps «  $t$  » requis

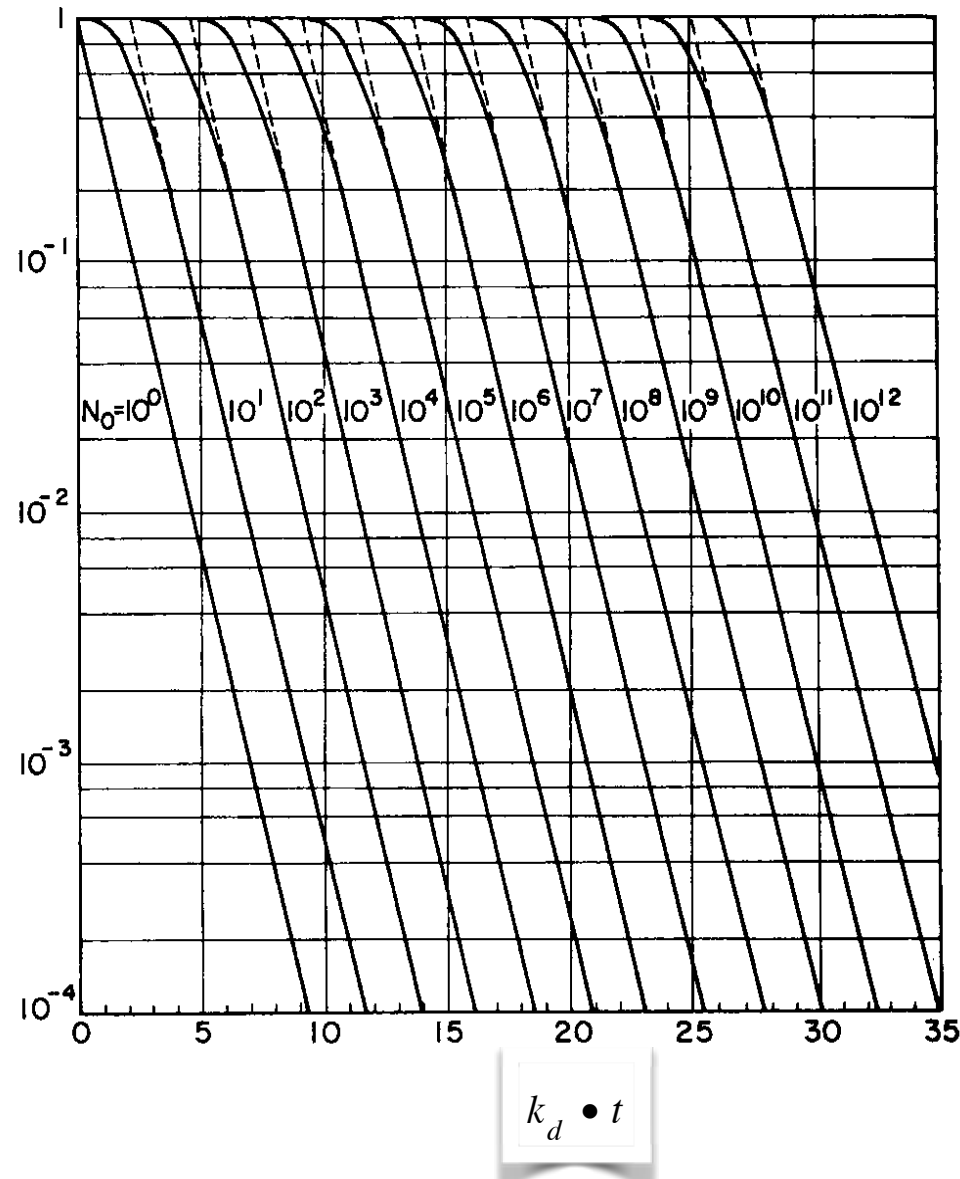
$$1 - P_0(t) \cong N$$



# Stérilisation: modèle probabiliste

Mise à l'échelle des paramètres ?

$$1 - P_o(t) \cong N$$



# Stérilisation: modèle cinétique

Facteur « Nabla » (ou « facteur de stérilisation » ou « facteur Del »)

$$\nabla = \ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = k_d t = k_0 t e^{-E/RT}$$

Utilisé comme critère de design: plus ce facteur est grand, plus le temps de stérilisation requis est long

Pour *Bacillus stearothermophilus* (l'un des micro-organismes les plus résistants à la chaleur):

- Énergie d'activation (Ea)=283 kJ/mol
- Constante d'Arrhénius (k<sub>0</sub>)=1x10<sup>36.2</sup> s<sup>-1</sup>

En considérant un facteur de risque de 1/1000 ⇒ N = 0.001

Pour un nombre initial de 10<sup>11</sup> cellules:  $\nabla = \ln\left(\frac{N_0}{N}\right) = 32.2$

# Stérilisation: modèle cinétique

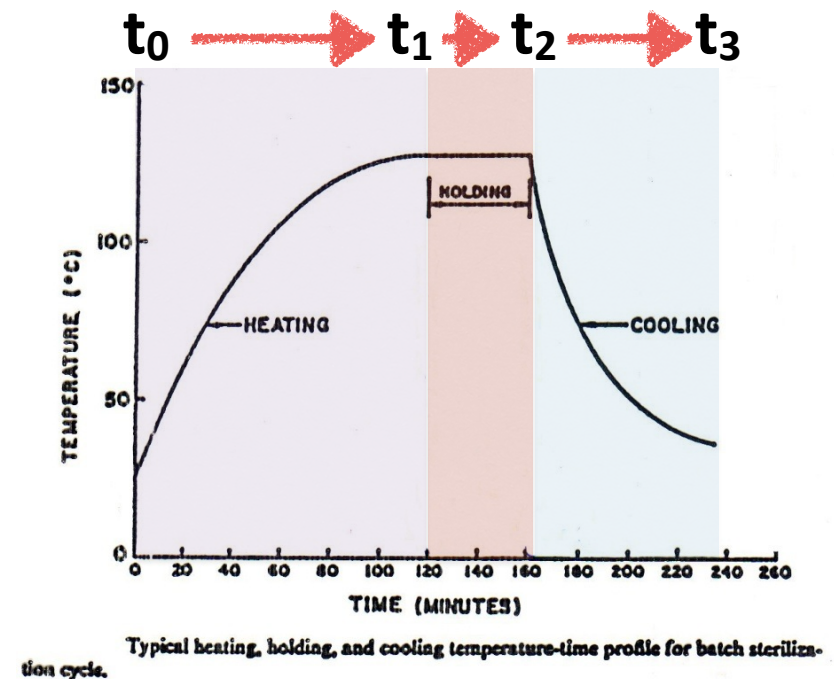
Un certain nombre de cellules sont en fait détruites durant les phases de chauffe et de refroidissement:

$$\nabla_{global} = \nabla_{chauffe} + \nabla_{retenue} + \nabla_{refroidissement}$$

$$\nabla_{chauffe} = \int_0^{t_1} k_d dt \quad (T \neq cste)$$

$$\nabla_{retenue} = \int_{t_1}^{t_2} k_d dt \quad \text{ou : } \nabla_{retenue} = k_d \cdot \text{temps}_{retenue}$$

$$\nabla_{refroidissement} = \int_{t_2}^{t_3} k_d dt \quad (T \neq cste)$$



**Temps de stérilisation:**  $t_{requis} = (t_1 - 0) + (t_2 - t_1) + (t_3 - t_2) = t_3$



# Stérilisation: modèle cinétique

Valeur de  $\nabla$  et de  $k_d$  pour les spores de **B. stearothermophilus** à des températures supérieures à 100°C pour un taux d'évolution de la température de **1°C/min**

$T$ (°C)	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$\nabla$
100	0.015	—
101	0.019	0.033
102	0.024	0.057
103	0.031	0.088
104	0.039	0.126
105	0.049	0.176
106	0.063	0.239
107	0.080	0.318
108	0.100	0.419
109	0.127	0.547
110	0.161	0.708
111	0.203	0.911
112	0.256	1.167
113	0.322	1.491
114	0.405	1.894
115	0.509	2.403
116	0.638	3.042
117	0.800	3.841
118	1.000	4.842
119	1.250	6.093
120	1.562	7.654
121	1.947	9.601
122	2.426	12.027
123	3.019	15.046
124	3.752	18.800
125	4.658	23.456
126	5.777	29.233
127	7.158	36.391
128	8.858	45.249
129	10.951	56.200
130	13.525	69.725

# Stérilisation: modèle cinétique

## Calcul selon une approche simplifiée

En assumant que:

- 1) La destruction des cellules est surtout significative pour  $T > 100^\circ\text{C}$
- 2) Les périodes de chauffe et de refroidissement sont linéaires

A partir de données tabulées de  $\nabla$  et de  $k_d$  correspondant à un taux d'évolution de la température de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , on peut calculer le facteur  $\nabla$  correspondant à tout autre taux de montée (ou descente) de température en assumant que le changement sera proportionnel

Par exemple, si la température grimpe de  $100^\circ\text{C}$  à  $121^\circ\text{C}$  pendant «  $t_1$  » min:

$$\nabla_{chauffe} = 9.601 \times \frac{t_1}{21 \text{ min}}$$

**De façon analogue, si le refroidissement s'effectue en 15 min:**

$$\nabla_{refroidissement} = 9.601 \times \frac{15}{21 \text{ min}} = 6.86$$

# Stérilisation: modèle cinétique

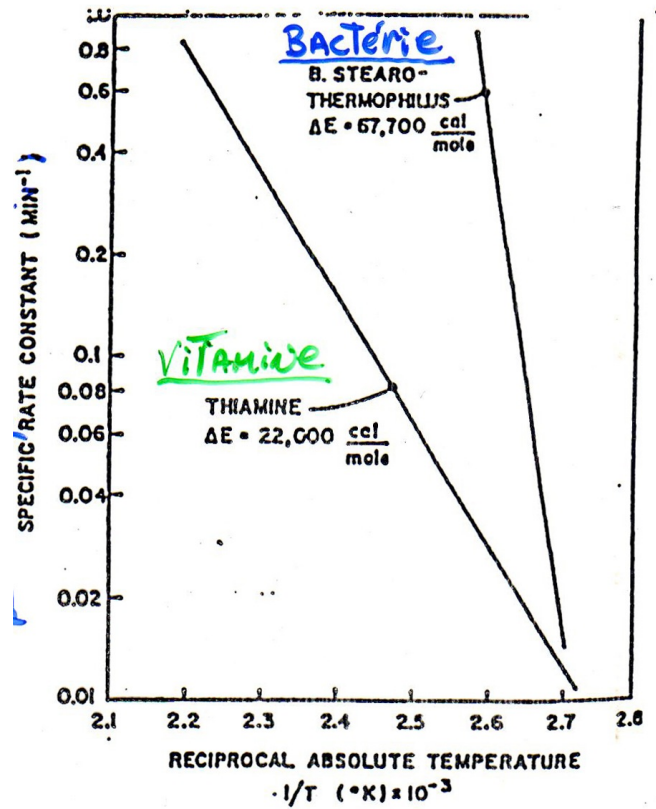
**Calcul selon une approche simplifiée**

# Stérilisation : sensibilité à la chaleur (thermolabilité)

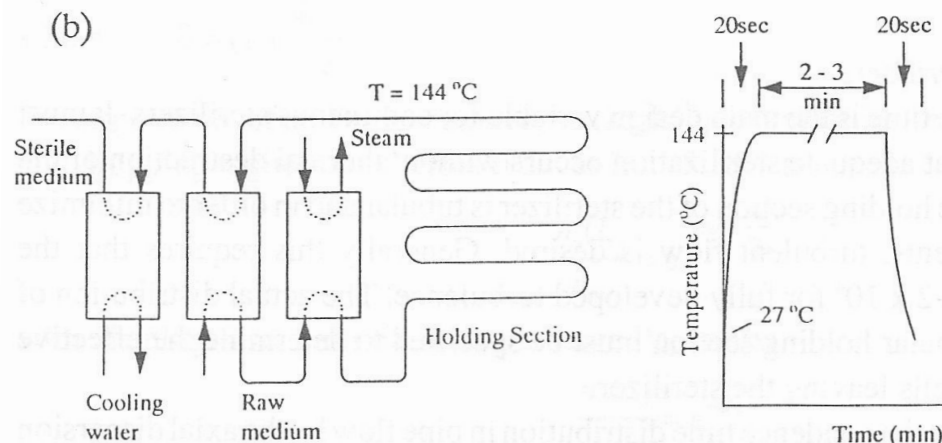
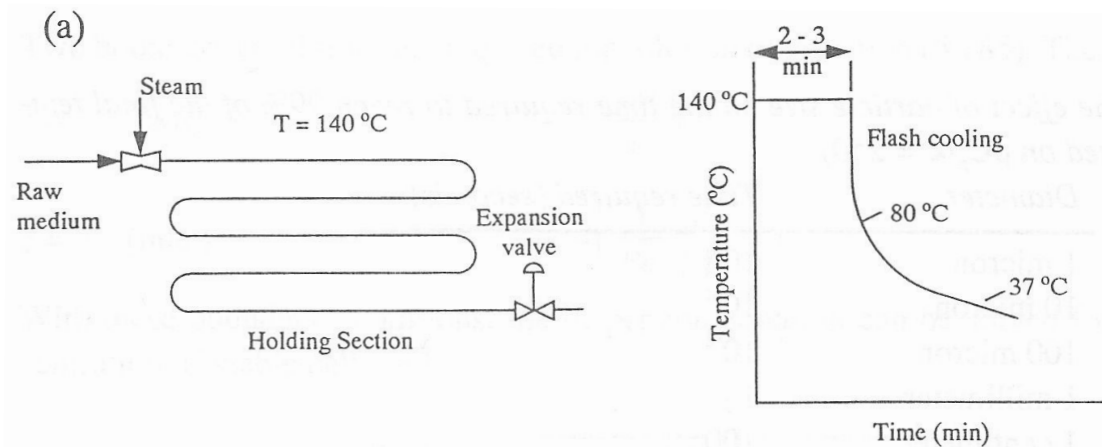
Exemple de l'effet de la température sur la destruction de la thiamine, lors de la stérilisation de spores de *B. stearotherophilus*

Critère de stérilisation  $n/n_0 = 10^{-16}$

Température de stérilisation (°C)	Temps requis de stérilisation (min)	Perte de thiamine (%)
100	843	99.99
110	75	89
120	7.6	27
130	0.851	10
140	0.107	3
150	0.015	1



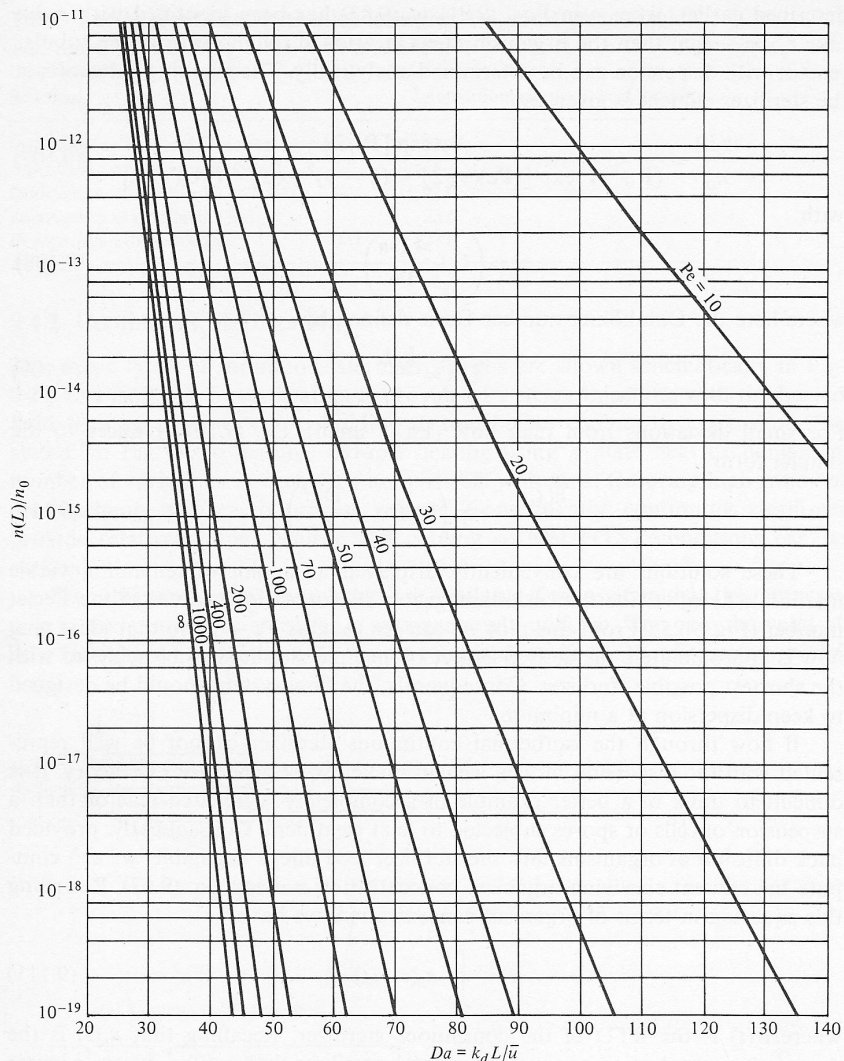
# Stérilisation en continu



Courbe typique de la température lors de procédés de stérilisation en mode continu : **temps court**

*Figure 5.28. Two continuous heat exchanger designs used for medium sterilization (a) the direct-steam-injection exchanger and (b) the plate or spiral heat exchanger. The temperature-time profiles for both are shown.*

# Stérilisation en continu



**Figure 9.25** Effect of axial dispersion on organism destruction in a continuous sterilizer. (Reprinted from S. Aiba, A. E. Humphrey, and N. F. Millis, "Biochemical Engineering, 2d ed., p. 263, University of Tokyo Press, Tokyo, 1973.)

On aura, à faible Pe :

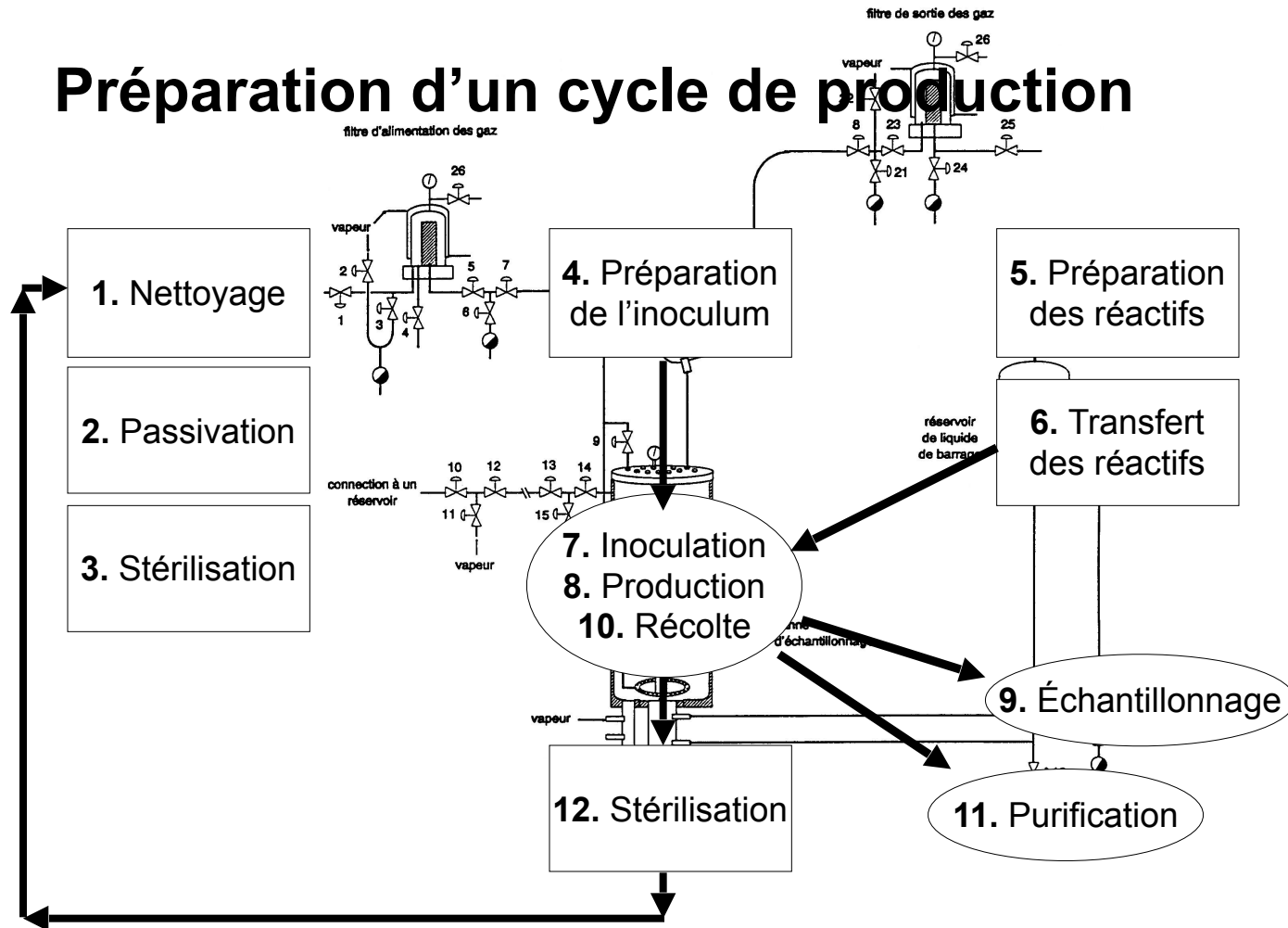
$$\frac{n(L)}{n_0} = \exp\left(-Da + \frac{Da^2}{Pe}\right)$$

où  $Da = \frac{k_d L}{u}$

le nombre de Damköhler

# Un cycle de production

## Préparation d'un cycle de production





# Montage-Passivation-Stérilisation- Test de pression

## Préparation d'un cycle de production

**Requiert une  
série d'étapes  
essentielles  
dont des tests  
d'étanchéité.**

### VALIDATION DES ÉQUIPEMENTS

Cette étape est essentielle et prérequis aux étapes suivantes de stérilisation et de culture.

### TEST DE PRESSION

La procédure consiste à pressuriser (5 psi suffisent) avec de l'air le bioréacteur et à suivre la pression jusqu'au lendemain matin en prenant garde aux variations de température. Lorsqu'une fuite est notée, il est possible de la localiser en repressurant le bioréacteur avec un gaz traceur tel l'hélium. On ballade alors un détecteur à hélium sur les joints ou surfaces suspectes.

### TESTS DE STÉRILITÉ

Requis lorsqu'un bioréacteur sort de l'usine ou qu'une série de contaminations se sont abattues sur des équipements de culture.

Suite au test de pression, le bioréacteur est stérilisé rempli d'un milieu de culture type (riche) ou de celui qui sera utilisé lors de la culture. Les opérations d'aération, d'agitation et de contrôle de la température doivent s'effectuer afin de donner le plus de chances aux contaminants potentiels: i.e. une oxygénation suffisante et une température très favorable à la prolifération des contaminants (autour de 30°C). Durée de 72 heures et +.



# Montage-Passivation-Stérilisation

**Et puis, vous êtes prêts!**

# Références

- Shuler M.J. et Kargi F. Bioprocess Engineering, Basic Concepts. Prentice Hall. 1992. ISBN 0-13-478215-1
- Bailey J.E. et Ollis D.F. Biochemical Engineering Fundamentals. Second Edition. McGraw-Hill. 1986. ISBN 0-07-003212-2