

# Filtrace vzduchu pro fermentační procesy

628.83  
663.1:66.067.1

Ing. PETR ETTLER, CSc. — Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy  
Ing. ZDENĚK RYCHLÍK, CSc., Ing. JAN LANGER — Výzkumný ústav vřduchotechniky, Praha

## 1. Úvod

Připrava sterilního vzduchu pro biosyntetické výrobky patří mezi důležité úkoly pro úspěšné vyřešení řady biotechnologických postupů. Připrava sterilního vzduchu se podílí 40 % na rozpisu celkových nákladů těchto výrob [1]. Velikost aerace dosahuje u některých procesů až litr objemu na objem vsádky za minutu. Výpadek v přívodu sterilního vzduchu představuje velké ekonomické ztráty, nejen z důvodů potenciálního vniknutí kontaminanta do kultivačního média, ale též proto, že aerační plyn plní ještě další funkce. Mezi nejdůležitější patří dodržení trvalé dodávky kyslíku k rostoucím buňkám produkčního mikroorganismu, ventilace uvolněného  $\text{CO}_2$  a zajištění homogenity vsádky zvláště u fermentorů s nižším instalovaným jednotkovým příkonem. Změny tlaku vřáněného aeračního plynu mají též negativní dopad na redistribuci materiálů filtrů, vyústují ve vytvoření průchodů a kanálů ve filtrech. Z uvedených důvodů je patrné, že je velmi důležitá správná volba filtračního zařízení. Ve spolupráci VÚAB Roztoky a VÚV Praha byly provedeny zkoušky, jejichž cílem bylo v návaznosti na testování kvality filtračních materiálů různé provenience navrhnout vhodný systém filtrace vzduchu pro dodržení sterility provozovaných biosyntetických výrob.

## 2. Materiály a metody

Pro navržení optimálního systému filtrace byly testovány filtrační materiály na těchto vzorcích:

- a) na membráně ze svíčky Aerotube CEF 03015 firmy Millipore-USA,
- b) na papíru FV vyrobeném ze skleněných mikrovřáken (výrobce nř. podnik Irapa, Štětí),
- c) na vlákněném materiálu PC-S (nesprávně nazývaném Petrianova tkanina), výrobce národní podnik SLZ Hněšťa.

Vzorky filtračních materiálů byly zkoušeny metodou olejové mlhy na koeficient průniku [2]. Podstatou této metody je nefelometrické zjišťování koncentrace přibližně monodispersního kapalného aerosolu olejové mlhy před a za zkoušeným vzorkem filtračního materiálu. Byl použit nefelometr FEN 90 dovezený prostřednictvím Mašpřiborintorgu (SSSR). Koeficient průniku  $K_p$  je procentní poměr hmotnostní koncentrace aerosolu za vzorkem filtračního materiálu a před ním. Dále byl zjišťován scintilačním počítačem částic Sartorius (NSR) průnik polydispersního aerosolu krystalů NaCl. Porovnává se početní koncentrace částic NaCl před vzorkem a za vzorkem. Poslední testovací metodou bylo hodnocení materiálu fotoelektrickým počítačem částic AZ-4, dodavatel Mašpř-



Tab. 1. Stanovení koeficientu průniku olejové mlhy

Vzorek	Koeficient průniku $K_p$ [%]
Aerotube	0,000 001
FV	1 vrstva 0,000 025
	2 vrstvy 0 nelze již vyhodnotit, je mimo rozsah měřících přístrojů
	3 vrstvy 0
PC - S	1 vrstva 0,083 000
	2 vrstvy 0,000 025
	3 vrstvy 0

vstupní koncentrace 2 500 mg . m<sup>-3</sup>  
 střední velikost částic 0,3 μm  
 čelní rychlost 1,67 cm . s<sup>-1</sup>

Tab. 2. Měření početní koncentrace částic aerosolu NaCl před a za vzorkem v 1 litru vzduchu

Velikost částic [μm] ≥	Vzorek Aerotube	
	před	za
0,03	38 729 915	1 541
0,06	33 047 766	1 239
0,12	21 443 207	724
0,21	7 087 671	195
0,40	498 540	3
0,52	126 137	0
0,70	6 007	0
FV 1 vrstva		
0,03	27 117 329	1 017
0,06	23 115 037	823
0,12	14 343 515	421
0,21	4 271 908	74
0,40	347 504	1
0,52	65 906	0
0,70	0	0
FV 2 vrstvy		
0,03	30 465 650	1 083
0,06	25 557 663	837
0,12	15 223 792	401
0,21	4 281 691	73
0,40	264 971	1
0,52	72 265	0
0,70	0	0
FV 3 vrstvy		
0,03	39 196 290	1 481
0,06	33 548 444	1 188
0,12	21 660 153	690
0,21	7 431 694	122
0,40	562 366	2
0,52	157 221	0
0,70	6 047	0

čelní rychlost 4,57 cm . s<sup>-1</sup>

borintorg (SSSR). Při této metodě se zjišťuje početní koncentrace částic o velikosti ≥ 0,5 μm za vzorkem při běžné vstupní koncentraci atmosférického aerosolu. Dále bylo provedeno měření tlakové ztráty filtrační svíčky Aerotube CEF 03105 a svíčky vyrobené ve VÚAB z materiálu FV. Tento materiál byl v trojnásobné vrstvě navinut na nosnou konstrukci z nerezavějící oceli.

### 3. Výsledky a diskuse

Pro sterilní filtraci vzduchu jsou používány dva základ-

Tab. 3. Měření počítacem částic. Vstupní početní koncentrace aerosolových částic tlakového vzduchu

Velikost částic [μm]	Počet částic v 1 litru vzduchu
≥ 0,3	220 000
0,4	125 000
0,5	75 000
0,6	19 000
0,7	12 000
0,8	6 000
0,9	3 300
1	1 400
2	500
5	22
10	1

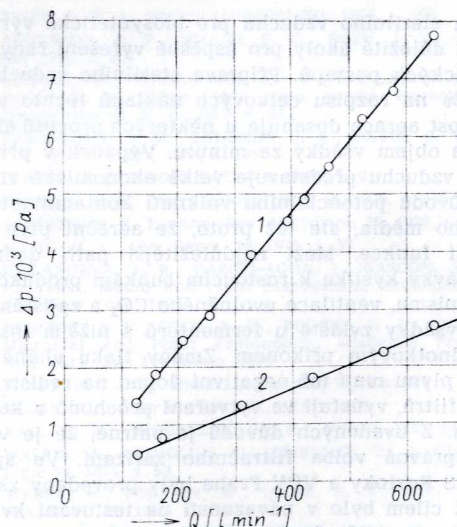
čelní rychlost 7,56 cm . s<sup>-1</sup>

Poznámka: Vstupní koncentrace byla shodná pro všechny vzorky

Tab. 4. Měření počítacem částic. Výstupní početní koncentrace aerosolových částic tlakového vzduchu za jednotlivými vzorky

Vzorek	Počet částic velikosti $\geq 0,5 \mu\text{m}$ za vzorkem v 1 litru vzduchu		Doba ustálení konečné hodnoty [min]	
	Hodnota			
	počáteční	konečná		
Aerotube	30	0	10	
FV	1 vrstva	36	0	15
	2 vrstvy	26	0	15
	3 vrstvy	11	0	20
PC-S	1 vrstva	122	152	trvalý stav
	2 vrstvy	1	0	5
	3 vrstvy	1	0	5

čelní rychlost 7,56 cm . s<sup>-1</sup>

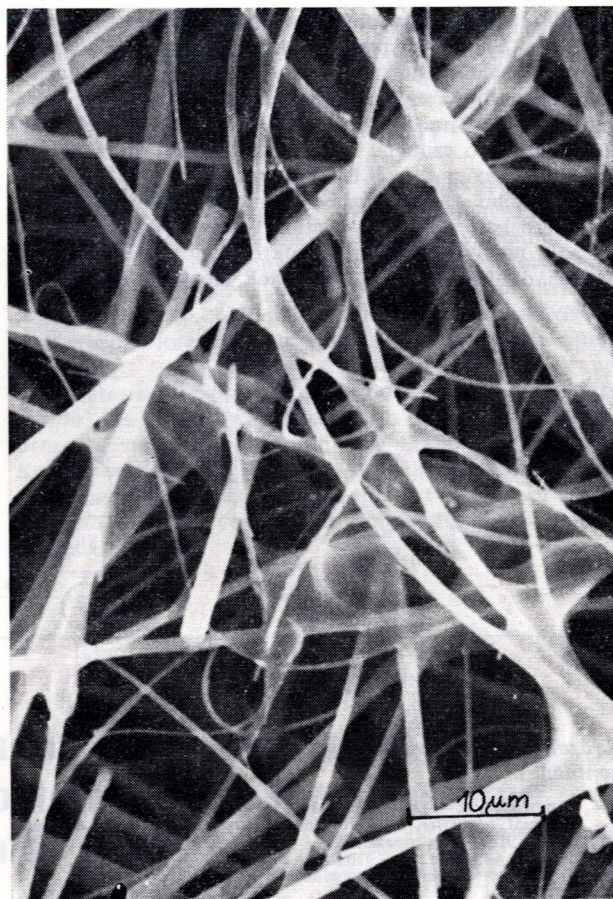


Obrázek 1. Tlakové charakteristiky filtračních svíček

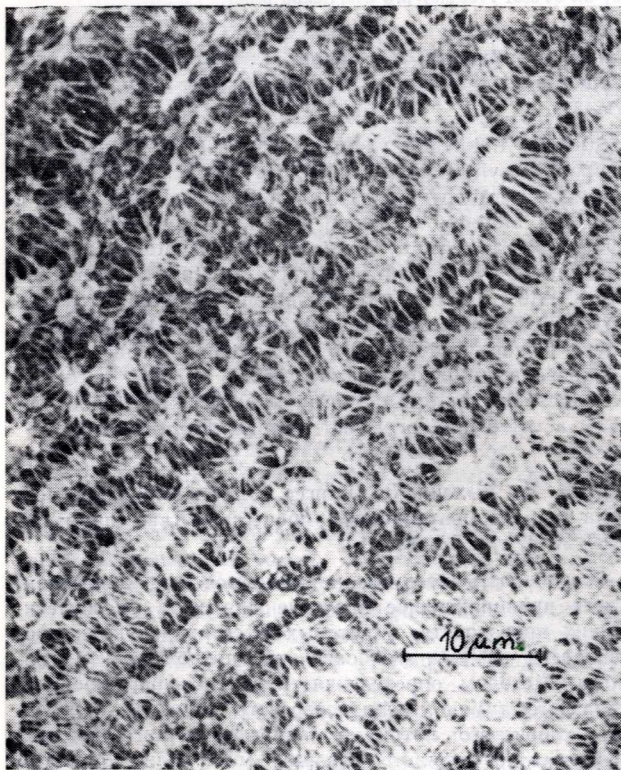




Obrázek 2. Membrána Millipore



Obrázek 4. Materiál PC-S (výrobce SLZ Hnúšťa)

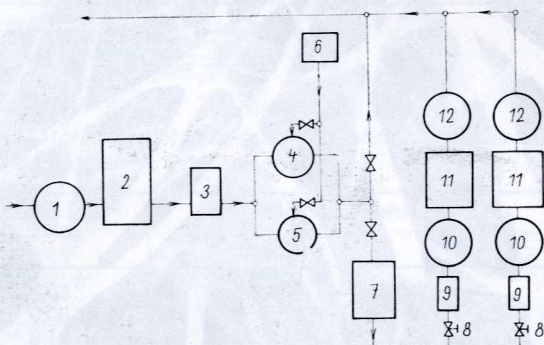


Obrázek 3. Filtrační papír FV (výrobce Irapa Štětí)

ní typy filtrů: vysokoúčinné vláknenné filtry a membránové filtry. Vláknenné filtry jsou vyráběny ze skleněných vláken, celulózových materiálů stlačených nebo jiným způsobem stmelěných do hmoty. Další možností je použití bavlněných a vlněných vláken, azbestových vláken stmelěných tlakem nebo pryskyřicemi. Odlučovací schopnost těchto filtračních materiálů je dána především průměrem filtračních vláken, který se pohybuje v rozmezí 0,2 až 15  $\mu\text{m}$  a dále zaplněností filtrační vrstvy. Při průchodu se mikroorganismy mechanicky zachycují ve struktuře filtru, popřípadě se zachycují působením elektrostatického náboje. Účinnost této skupiny hloubkových filtrů závisí dále na rychlosti proudění a velikosti zachycovaných částic. Tato účinnost může být negativně ovlivněna, jak již bylo uvedeno, kolísáním tlaku, vlhkostí vzduchu a „prorůstáním“ mikrobiální kontaminace. Membránové filtry patří k druhému typu filtrů. Jsou často označovány jako absolutní, i když takové označení není přesné. Tyto materiály vynikají identitou velikosti pórů a pracují na principu převážně mechanického odloučení na povrchu síta. Nevýhodou bývají větší tlakové ztráty, zvláště při větším mechanickém znečištění vzduchu. Složení membránových filtrů různých firem je většinou patentově chráněno; jedná se o látky na bázi nitrocelulózy, acetátu celulózy, esterů celulózy apod. Byla vypracována řada metodik hodnocení filtračních materiálů pro sterilizační filtraci vzduchu. Například probublávací test (bubble-point test) [3] nebo zjišťování schopnosti odstranit mikroorganismus *Pseudomonas diminuta* ATCC 19146 z filtrovaného média [4]. Jako nejvýhodnější se jeví testování před a po filtraci, aniž by se poškodily filtry [3].



Pro naše pokusy byly použity metody stanovení průniku olejové mlhy, polydisperzního aerosolu krystalů NaCl a atmosférického vzduchu. Filtry používané pro sterilní biosyntetické výroby nesmějí překročit hodnotu koeficientu průniku na olejovou mlhu 0,03 % a při průchodu atmosférického vzduchu mohou být v prostoru za filtrem obsaženy maximálně 4 částice velikosti  $= 0,5 \mu\text{m}$  v 1 litru vzduchu [5]. Metoda s atmosférickým vzduchem však nerozliší, zda jde o částice tuhého nebo kapalného aerosolu nebo kontaminující mikroorganismy schopné života za daných vnějších podmínek biosyntetického procesu.



Obrázek 5. Schéma přípravy sterilního vzduchu pro fermentační výroby

1 — kompresor, 2 — vzdušník, 3 — hrubý filtr, 4 — předfiltr, 5 — rezervní předfiltr, 6 — formaldehydový kotlík, 7 — zařízení pro snížení vlhkosti vzduchu, 8 — regulátor průtoku, 9 — měřič průtoku množství, 10 — filtrační svíčka, 11 — fermentor, 12 — zařízení na úpravu výstupního vzduchu

Zjištěné výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách 1 až 4. Tlakové charakteristiky svíčky Aerotube CEF 03105 a svíčky s trojnásobnou vrstvou materiálu FV jsou zachyceny na obr. 1. Na obr. 2, 3 a 4 jsou mikrofotografie testovaných filtračních materiálů. Snímky zhotovil na rastrovacím elektronickém mikroskopu Jaromír Blažek (VÚV, Praha). Všechny snímky mají shodné zvětšení a je na nich vidět patrný rozdíl ve struktuře vrstev. Obrázek 2 představuje mikrosnímek části vrstvy materiálu PC-S. Charakteristické je určité zvlnění vláken, která se spojují do skupin a vytvářejí provazce. Proto lze pozorovat určité kolísání i v odlučivosti částic, neboť tam, kde je více provazců, je i snížena filtrační kvalita materiálu. Na obr. 3 je mikrosnímek tzv. vláknenné membrány vy-preparované z filtrační svíčky Aerotube CEF 03105. V jedné poměrně slabé vrstvě má materiál již velmi vysokou odlučivost. Z obrázku je zřejmá velmi jemná vláknenná struktura. Náhradou za tuto vláknennou membránu byl navržen tuzemský materiál FV vyobrazený na snímku 4. Tento materiál má větší poréznost než předchozí, ale i větší tloušťku. Proto i v jedné vrstvě se odlučivost může srovnávat s vláknennou membránou. Má i tu výhodu, že má značně nižší tlakovou ztrátu než membrána. V jednom filtru nahrazujícím dovážené filtry Millipore jsou při vyhovující tlakové ztrátě umístěny 3 vrstvy materiálu FV. Tím se kompenzuje výrazný nedostatek tohoto materiálu, totiž jeho malá mechanická odolnost. Filtrační svíčky Aerotube mají velmi dobře vyřešenou otázku mechanické odolnosti, takže i úmyslné poškození je obtížné. Zvláště to platí o filtrační membráně, která je kryta dvěma dacronovými tkaninami. Svými vlastnostmi se tyto svíčky řadí do klasifikační třídy V [5] a vytvářejí z hlediska počtu částic v ovzduší prostředí prvního stupně čistoty [6]. Filtrační schopnosti tuzemské náhrady za dovážené svíčky jsou přibližně shodné. U těchto

postačuje pro účinnou filtraci jediná vrstva papíru ze skleněných mikrovláken. Další vrstvy účinnosti filtrace nezvyšují, zvyšují však provozní jistotu. Při mechanickém poškození vrchní vrstvy filtračního mikroskleněného papíru zůstává dále svíčka provozuschopnou. Filtrační materiál PC-S může být pro vysokoúčinnou filtraci používán jen do vícevrstevových filtrů, protože v jedné vrstvě nemá dostatečnou kvalitu. Lze ho použít pouze do teploty 60 °C.

Na základě poznatků z těchto měření vlastností filtračních materiálů byl navržen způsob filtrace vzduchu pro biosyntetické procesy. Jeho schéma je uvedeno na obr. 5. Podle tohoto návrhu se atmosférický vzduch stlačený kompresorem 1 vhání do vzdušníku 2, kde nastává vyrovnání tlaku. Vzduch dále prochází hrubým filtrem 3, ve kterém se odlučují olejové kapénky a hrubé nečistoty. Filtr může tvořit např. nádoba naplněná skelnou vatou. Potrubím je dále stlačený vzduch veden k vlastní fermentační lince. Předfiltr 4, resp. rezervní předfiltr 5 odlučují velké částice, které nebyly zachyceny skelnou vatou nebo které se uvolnily z potrubního rozvodu. S výhodou je možno využít vícevrstevového filtru s filtračním materiálem PC-S. Před každou fermentační nádobu 11 je umístěn individuální vysokoúčinný filtr 10. Jako vhodné filtračního materiálu vytvářejícího v ovzduší první stupeň čistoty je možno použít mikroskleněného papíru FV. Vzduch vystupující z fermentační nádoby je podle potřeby vhodně upravován, aby se neuvolňovaly nežádoucí látky do okolního ovzduší.

Tento návrh se nezabývá řešením odloučení vlhkosti ze sterilního vzduchu.

#### Literatura

- [1] WHITAKER, A.: Proc. Biochem., 8 (6), 1973, s. 23
- [2] ON 12 5014 Metoda zkoušení filtrů zkušebním aerosolem olejové mlhy
- [3] TRASEN, B.: J. of the Parent. Drug Ass. 5 (35), 1979, s. 273
- [4] PALL, D. B.: Proc. Biochem., 1 (11), 1975, s. 9
- [5] ON 12 5005 třídění filtrů atmosférického vzduchu
- [6] ON 84 5651 Předpisy pro aseptickou práci

Ettler, P. - Rychlík, L. - Langer, J.: Filtrace vzduchu pro fermentační procesy. Kvas. prům., 29, 1983, č. 4, s. 83—87.

Sterilita tlakového vzduchu má zásadní význam pro průběh biosyntetických výrob, při kterých jsou v nadprodukci vyráběny enzymy, aminokyseliny, antibiotika a hormony. Metodou stanovení průniku olejové mlhy, polydisperzního aerosolu krystalů NaCl a atmosférického vzduchu byly testovány filtrační materiály Aerotube CEF 03105, papír ze skleněných mikrovláken FV a materiál PC-S. Podle naměřených výsledků byl vypracován návrh filtrace vzduchu pro fermentační výroby a byla odzkoušena náhrada za zahraniční svíčky, vyrobená z tuzemského materiálu FV, odpovídající klasifikační třídě V a vytvářející prostředí prvního stupně čistoty.

Эттер, П., Рычлик, Л., Лангер, Я.: Фильтрация воздуха для ферментационных процессов. Квас. прум. 29, 1983, № 4, стр. 83—87.

Стерильность воздуха, подающегося под давлением, имеет принципиальное значение для хода биосинтетических производств, в которых в сверхпродукции производятся ферменты, аминокислоты, антибиотики и гормоны. Методом определения проникновения масляно-образного тумана, полидисперсного аэрозоля кристаллов хлористого натрия и атмосферического воздуха испытывались фильтровальные материалы Аэротубе CEF 03105, бумага из стеклянных микроволокон FV и материал PC-S. По результатам, полученным при



измерениях, был разработан проект фильтрования воздуха для ферментационных производств и была испытана замена свечных фильтров зарубежного происхождения на те же из отечественного материала FV, соответствующие квалификационному классу 5 и создающие среду первой степени чистоты.

**Ettler, P. - Rychlík, G.: Air Filtration for Fermentation Processes.** Kvas. prům. 29, 1983, No. 4, p. 83—87.

The sterility of compressed air has a principal effect on the course of biosynthetic processes where enzymes, amino acids, antibiotics and hormones are produced. Following filter materials were tested: Aerotube CEFG 03105, a sheet of glass microfibres FV and the material PC-S. The penetration of oil aerosol, polydispersed aerosol of crystalline NaCl and atmospheric air through the mentioned materials was studied. On a base of the results obtained a procedure for the air filtration suitable for fermentation processes was elaborated. When the inland material FV was used the classification of

class V with the first degree of purity was achieved. This procedure replaced the imported filtration candles.

**Ettler, P. - Rychlík, Z. - Langer, J.: Filtration der Luft für Fermentationsprozesse.** Kvas. prům. 29, 1983, Nr. 4, S. 83—87.

Die Sterilität der Druckluft hat eine grundsätzliche Bedeutung für den Verlauf biosynthetischer Technologien, bei denen in Überproduktion Enzyme, Aminosäuren, Antibiotica und Hormone erzeugt werden. Mittels Methode des Durchdringens des Ölnebels, des polydispersen Aerosols der NaCl-Kristalle und der atmosphärischen Luft wurden folgende Filtrationsmaterialie getestet: Aerotube CEFG 03105, Papier aus Mikroglasfasern FV und das Material PC-S. Aufgrund der Versuchsergebnisse wurde das Luftfiltrationsverfahren für Fermentationsprozesse vorgeschlagen und der Ersatz ausländischer Kerzen erprobt der aus dem inländischen Material FV hergestellt wird, der Klassifikationsgruppe V entspricht und ein Medium des ersten Reinheitsgrades gewährleistet.