

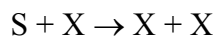
Hình 4.2. Sơ đồ (a) hệ lên men thùng khuấy mẻ và (b) hệ lên men dòng nút.

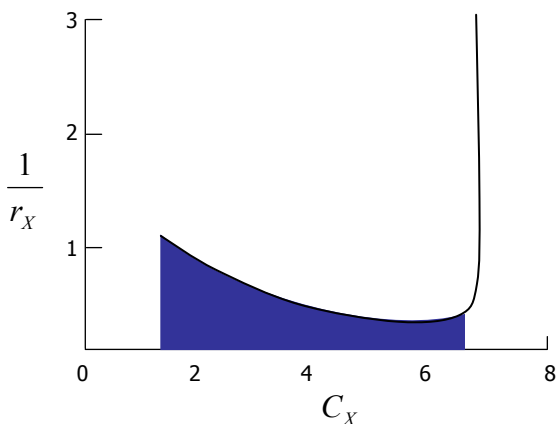
Để thu được phương trình hiệu suất của lên men mẻ, chúng ta cần lấy tích phân phương trình (4.1) sẽ được:

$$\int_{C_{X_0}}^{C_X} \frac{dC_X}{r_X} = \int_{C_{X_0}}^{C_X} \frac{dC_X}{\mu C_X} = \int_{t_0}^t dt = t - t_0 \quad (4.2)$$

Cần lưu ý rằng, phương trình (4.2) chỉ được ứng dụng khi $r_X > 0$. Vì thế, t_0 (trong phương trình 4.2) không phải là thời gian của nuôi cấy ban đầu sau khi tiếp mẫu, mà là thời gian tế bào khởi động sinh trưởng, là giai đoạn pha sinh trưởng bắt đầu tăng nhanh.

Theo phương trình (4.2), thời gian sinh trưởng từng mẻ $t - t_0$ chính là diện tích phía dưới đường cong $1/r_X$ theo C_X giữa C_{X_0} và C_X (Hình 4.3). Đường cong liên tục ở hình 4.3 được tính toán bằng phương trình Monod và vùng có màu tối bằng $t - t_0$. Thời gian sinh trưởng từng mẻ ít khi được ước lượng bằng đồ thị này vì để xác định nó thì dựa vào đường cong t theo C_X là đơn giản hơn. Tuy nhiên, biểu diễn bằng đồ thị sẽ thuận tiện trong việc so sánh tiềm năng của các cấu hình hệ lên men khác nhau (sẽ được thảo luận sau). Lúc này chỉ lưu ý rằng, đường cong có màu tối dạng chữ U là đặc trưng của các **phản ứng xúc tác tự động**:





Hình 4.3. Đồ thị của thời gian sinh trưởng từng mẻ $t - t_0$ (vùng tối). Đường cong liên tục biểu diễn mô hình Monod với $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,71 \text{ g/L}$; $Y_{X/S} = 0,6$; $C_{X_0} = 1,6 \text{ g/L}$; và $C_{S_0} = 10 \text{ g/L}$.

Tốc độ khởi đầu của **phản ứng xúc tác tự động** chậm do nồng độ của X thấp. Tốc độ phản ứng tăng lên khi các tế bào sinh sản và sau đó sẽ đạt đến tốc độ tối đa. Khi lượng cơ chất giảm và các sản phẩm độc được tích lũy, thì tốc độ phản ứng giảm xuống ở giá trị thấp hơn.

Nếu động học Monod (Monod kinetics) biểu diễn thích hợp tốc độ sinh trưởng trong suốt pha hàm mũ, thì chúng ta có thể thay thế phương trình (3.11) ở chương 3 vào phương trình (4.2) để có được:

$$\int_{C_{X_0}}^{C_X} \frac{(K_S + C_S)dC_X}{\mu_{\max} C_S C_X} = \int_{t_0}^t dt \quad (4.3)$$

Phương trình (4.3) có thể tính được tích phân nếu chúng ta biết mối quan hệ giữa C_S và C_X . Người ta đã quan sát thấy rằng số lượng sinh khối tế bào được sản xuất tỷ lệ với lượng cơ chất giới hạn được tiêu thụ. Hiệu suất sinh trưởng ($Y_{X/S}$) đã được định nghĩa như sau:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta C_X}{-\Delta C_S} = \frac{C_X - C_{X_0}}{-(C_S - C_{S_0})} \quad (4.4)$$

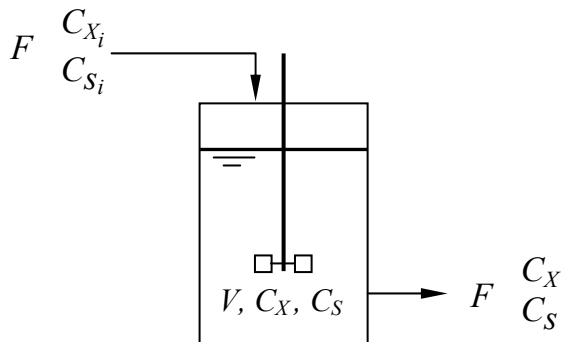
Thay phương trình (4.4) vào phương trình (4.3), tích phân của phương trình tổng hợp này sẽ đưa ra mối quan hệ giữa nồng độ tế bào và thời gian:

$$(t - t_0)\mu_{\max} = \left(\frac{K_S Y_{X/S}}{C_{X_0} + C_{S_0} Y_{X/S}} + 1 \right) \ln \frac{C_X}{C_{X_0}} + \frac{K_S Y_{X/S}}{C_{X_0} + C_{S_0} Y_{X/S}} \ln \frac{C_{S_0}}{C_S} \quad (4.5)$$

2. Hệ lên men thùng khuấy liên tục (continuous stirred-tank fermenter-CSTF) lý tưởng

Quần thể tế bào có thể tiếp tục ở giai đoạn sinh trưởng hàm mũ trong một thời gian dài bằng cách duy trì hệ thống nuôi cấy liên tục. Hình 4.4 trình bày sơ đồ hệ lên men thùng khuấy liên tục (CSTF). Buồng sinh trưởng (thùng lên men hay bình nuôi) được kết nối với bình chứa môi trường vô trùng. Khi quá trình sinh trưởng bắt đầu thì môi trường sạch được cung cấp liên tục từ bình chứa môi trường.

Hệ thống nuôi cấy liên tục có thể hoạt động như là một chemostat (thể ổn định hóa tính) hoặc turbidostat (thể ổn định độ đục). Trong chemostat tốc độ dòng chảy được cài đặt ở một giá trị đặc biệt và tốc độ sinh trưởng của nuôi cấy sẽ điều chỉnh tốc độ dòng chảy này. Nói chung, hoạt động chemostat dễ dàng hơn turbidostat, do nó có thể được thực hiện bằng cách đặt máy bơm ở một tốc độ dòng chảy không đổi, trong khi turbidostat đòi hỏi một thiết bị cảm quang (optical sensing device) và một bộ điều chỉnh (controller). Tuy nhiên, turbidostat được giới thiệu khi hệ lên men liên tục cần được tiến hành ở các tốc độ pha loãng cao gần với điểm rửa trôi (washout point), khi ta có thể ngăn cản sự rửa trôi bằng cách điều hòa tốc độ dòng chảy trong trường hợp thất thoát tế bào thông qua dòng chảy ra ngoài vượt quá sự sinh trưởng tế bào trong hệ lên men.



Hình 4.4. Sơ đồ hệ lên men thùng khuấy liên tục (CSTF).

Cân bằng nguyên liệu cho tế bào trong CSTF (Hình 4.4) có thể được viết như sau:

$$FC_{X_i} - FC_X + Vr_X = V \frac{dC_X}{dt} \quad (4.6)$$

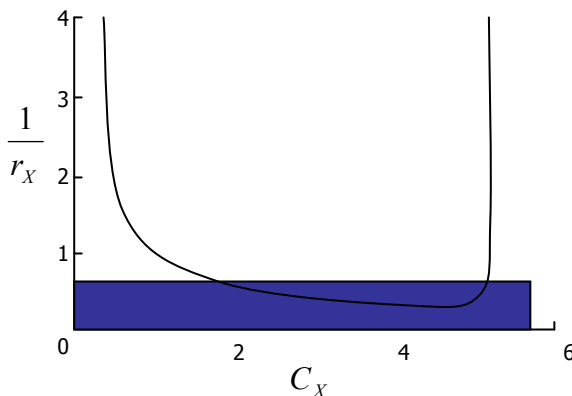
Trong đó: r_X là tốc độ sinh trưởng tế bào trong hệ lên men và dC_X/dt biểu diễn sự thay đổi nồng độ tế bào trong hệ lên men theo thời gian.

Đối với CSTF hoạt động trạng thái ổn định, thì sự thay đổi nồng độ tế bào theo thời gian là bằng không ($dC_X/dt = 0$) do các tế bào trong bình nuôi chỉ sinh trưởng đủ nhanh để thay thế những tế bào bị hao hụt theo dòng chảy ra ngoài, và phương trình (4.6) trở thành:

$$\tau_m = \frac{V}{F} = \frac{C_X - C_{X_i}}{r_X} \quad (4.7)$$

Phương trình (4.7) cho thấy thời gian lưu cần thiết (τ_m) bằng diện tích hình chữ nhật có chiều rộng $C_X - C_{X_i}$ và chiều cao $1/r_X$ trên đường cong $1/r_X$ theo C_X .

Hình 4.5 biểu diễn đường cong $1/r_X$ theo C_X . Diện tích hình chữ nhật được tô đậm ở trong hình bằng thời gian lưu trong CSTF khi dòng chảy vào là vô trùng. Minh họa thời gian lưu bằng đồ thị có thể giúp chúng ta so sánh hiệu quả của các hệ lên men. Hệ lên men có thời gian lưu ngắn hơn (để đạt tới một nồng độ tế bào nhất định) là hiệu quả hơn. Hoạt động tối ưu của hệ lên men dựa trên sự minh họa đồ thị này sẽ được thảo luận trong phần tiếp theo.



Hình 4.5. Minh họa bằng đồ thị ước lượng thời gian lưu cho CSTF. Đường biểu diễn mô hình Monod với $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,71 \text{ g/L}$; $Y_{X/S} = 0,6$; $C_{S_i} = 10 \text{ g/L}$; và $C_{X_i} = 0$.

Nếu dòng chảy vào là vô trùng ($C_{X_i} = 0$), và tế bào trong CSTF đang sinh trưởng theo hàm mũ ($r_X = \mu C_X$) thì phương trình (4.7) sẽ trở thành:

$$\tau_m = \frac{1}{\mu} = \frac{1}{D} \quad (4.8)$$

Trong đó: D được biết như là tốc độ pha loãng và có giá trị bằng nghịch đảo của thời gian lưu (τ_m). Vì thế, đối với CSTF trạng thái ổn định có chất dinh dưỡng vô trùng, thì tốc độ sinh trưởng đặc trưng bằng tốc độ pha loãng. Mặt khác, tốc độ sinh trưởng đặc trưng của tế bào có thể được điều chỉnh bằng cách thay đổi tốc độ dòng chảy môi trường. Nếu tốc độ sinh trưởng có thể được biểu diễn bằng phương trình Monod, thì sau đó:

$$D = \mu = \frac{1}{\tau_m} = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S} \quad (4.9)$$

Từ phương trình (4.9), C_S có thể được tính toán bằng thời gian lưu đã biết và các thông số động học Monod như sau:

$$C_S = \frac{K_S}{\tau_m \mu_{\max} - 1} \quad (4.10)$$

Tuy nhiên, cần chú ý rằng phương trình (4.10) chỉ có giá trị khi $\tau_m \mu_{\max} > 1$. Nếu $\tau_m \mu_{\max} < 1$, tốc độ sinh trưởng của tế bào sẽ thấp hơn tốc độ tế bào thất thoát theo dòng chảy ra ngoài. Do đó, tất cả tế bào trong hệ lên men sẽ bị rửa trôi, và phương trình (4.10) sẽ không có giá trị.

Nếu hiệu suất sinh trưởng ($Y_{X/S}$) là hằng số, thì sau đó:

$$C_X = Y_{X/S} (C_{S_i} - C_S) \quad (4.11)$$

Thay phương trình (4.10) vào phương trình (4.11) sẽ cho hiệu suất tương quan đối với C_X như sau:

$$C_X = Y_{X/S} \left(C_{S_i} - \frac{K_S}{\tau_m \mu_{\max} - 1} \right) \quad (4.12)$$

Tương tự:

$$C_P = C_{P_i} + Y_{P/S} \left(C_{S_i} - \frac{K_S}{\tau_m \mu_{\max}} - 1 \right) \quad (4.13)$$

Trong đó: C_P là nồng độ sản phẩm, C_{P_i} là nồng độ sản phẩm đưa vào.

Một lần nữa, phương trình (4.12) và (4.13) chỉ có giá trị khi $\tau_m \mu_{\max} > 1$.

Trong phần này, chúng ta đặt cân bằng nguyên liệu cho nồng độ tế bào và thu được các phương trình khác nhau cho CSTF. Các phương trình tương tự cũng có thể thu được bằng cách đặt các cân bằng nguyên liệu cho nồng độ cơ chất và nồng độ sản phẩm.

3. Ước lượng các thông số động học Monod

Đăng thức tốc độ sinh trưởng đặc trưng và tốc độ pha loãng của CSTF ở trạng thái ổn định (phương trình 4.9) tiện lợi trong nghiên cứu ảnh hưởng của các thành phần khác nhau của môi trường lên tốc độ sinh trưởng đặc trưng. Bằng cách đo nồng độ cơ chất ở trạng thái ổn định với các tốc độ dòng chảy khác nhau, các mô hình động học khác nhau có thể được thử nghiệm và giá trị của các thông số động học có thể được ước lượng. Sắp xếp lại phương trình (4.9) có thể thu được mối quan hệ tuyến tính như sau:

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \times \frac{1}{C_S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad (4.14)$$

Trong đó: μ bằng tốc độ pha loãng (D) cho chemostat. Nếu một tế bào nhất định tuân theo động học Monod, thì đồ thị $1/\mu$ theo $1/C_S$ sẽ đem lại giá trị μ_{\max} và K_S (bằng cách đọc phần bị chặn và độ dốc của đường thẳng). Đồ thị này có ưu điểm cho thấy mối quan hệ giữa biến độc lập (C_S) và biến phụ thuộc μ . Tuy nhiên, $1/\mu$ sẽ tiến tới ∞ nếu nồng độ cơ chất giảm dần đến trọng lượng vượt quá mức để đo khi nồng độ cơ chất thấp và trọng lượng không đủ để đo khi các nồng độ cơ chất cao.

Phương trình (4.9) có thể sắp xếp lại để đưa ra các mối quan hệ tuyến tính ứng dụng thay cho phương trình (4.14) nhằm ước lượng tốt hơn các thông số trong những trường hợp nhất định:

$$\frac{C_s}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} + \frac{C_s}{\mu_{\max}} \quad (4.15)$$

$$\mu = \mu_{\max} - K_s \frac{\mu}{C_s} \quad (4.16)$$

Tuy nhiên, giới hạn của phép tính gần đúng này (để xác định các thông số động học) gặp khó khăn khi sử dụng CSTF. Đối với trường hợp vận hành theo từng mẻ, chúng ta thậm chí có thể dùng bình tam giác lắc trên máy lắc để vận hành nhiều mẻ với các điều kiện khác nhau trong cùng một thời gian. Vận hành theo từng mẻ trong nồi lên men có khuấy cũng không khó khăn lắm, do không có các kết nối đi vào và đi ra (ngoại trừ bộ phận cung cấp không khí) và thời gian vận hành ngắn, ít có nguy cơ của sự nhiễm bẩn hệ lên men.

Để vận hành CSTF, chúng ta cần có các nguồn cung cấp dinh dưỡng và tích trữ sản phẩm được kết nối vô trùng với hệ lên men. Tốc độ của các dòng chảy vào và ra khỏi hệ lên men cần được kiểm soát một cách chính xác. Thỉnh thoảng, việc kiểm soát tốc độ dòng chảy ra có thể gặp khó khăn do sự tạo bọt và kết khối của các tế bào. Do thời gian vận hành ít nhất một vài ngày hoặc thậm chí cả tuần để đạt tới trạng thái ổn định (cũng gây ra sự biến đổi tốc độ pha loãng), cho nên luôn có rủi ro cao đối với hệ lên men do bị nhiễm bẩn. Thường xuyên gặp khó khăn trong việc đạt tới trạng thái ổn định bởi đột biến của tế bào và khả năng thích nghi với môi trường mới của chúng.

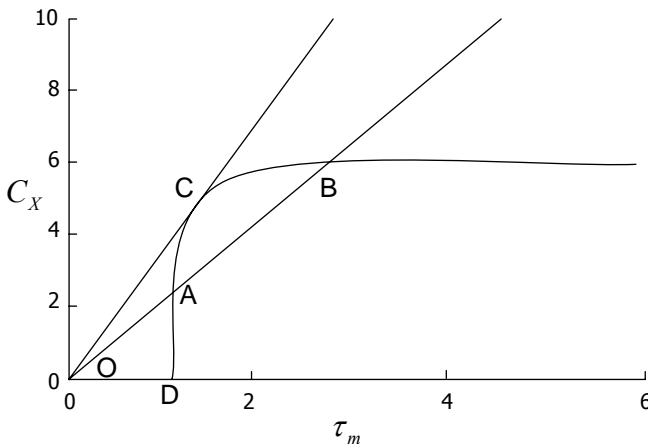
Hơn nữa, do hầu hết các hệ lên men quy mô lớn được tiến hành trong kiểu từng mẻ, cho nên các thông số động học được xác định bởi nghiên cứu chemostat phải dự báo được sự sinh trưởng trong kiểu lên men này. Tuy nhiên, bằng chứng (kiểm tra và xác minh) mô hình động học và ước lượng các thông số động học bằng cách vận hành chemostat là phương pháp đáng tin cậy nhất do điều kiện môi trường không thay đổi của nó.

Các số liệu của vận hành theo từng mẻ có thể được dùng để xác định các thông số động học, cho dù nó không phải là phương thức được giới thiệu cao. Tốc độ sinh trưởng đặc trưng trong suốt quá trình vận hành theo từng mẻ có thể được ước lượng bằng cách đo độ dốc của đường cong nồng độ tế bào theo thời gian ở các điểm khác nhau. Nồng độ cơ chất cần thiết được đo ở cùng các điểm nơi mà độ dốc được đọc. Sau đó các đồ thị theo các phương trình (4.14), (4.15) và (4.16) có thể được xây dựng để xác định

các thông số động học. Tuy nhiên, giá trị của các thông số thu được trong phương pháp này cần thiết được khảo sát cẩn thận xem chúng có ở trong phạm vi hợp lý cho các tế bào được kiểm tra hay không.

4. Hiệu suất của CSTF

Thông thường, hiệu suất của hệ lên men được hiểu như là số lượng sản phẩm được sản xuất trên một đơn vị thời gian và thể tích. Nếu dòng chảy vào là vô trùng ($C_{X_i} = 0$) thì hiệu suất sinh khối tế bào bằng C_X / τ_m , chính là độ dốc của đường thẳng \overline{OAB} của đường cong C_X theo τ_m (Hình 4.6).

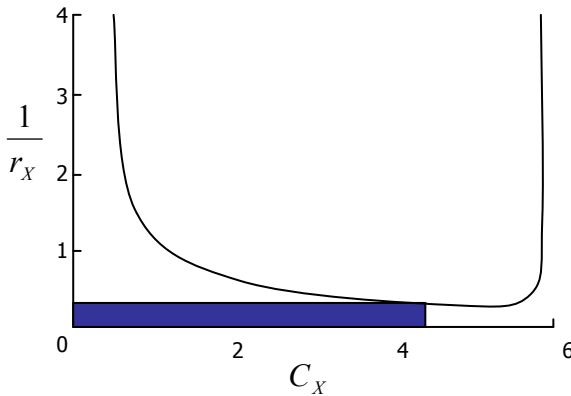


Hình 4.6. Sự thay đổi nồng độ tế bào và cơ chất như là một hàm của thời gian lưu. Hiệu suất bằng độ dốc của đường thẳng \overline{OAB} . Đường cong được vẽ bằng mô hình Monod với $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,71 \text{ g/L}$; $Y_{X/S} = 0,6$; và $C_{S_i} = 10 \text{ g/L}$.

Hiệu suất ở điểm A bằng hiệu suất ở điểm B. Ở điểm A nồng độ tế bào của dòng chảy ra thấp nhưng thời gian lưu lại ngắn, vì thế môi trường có thể chảy qua dễ dàng hơn. Ngược lại, ở điểm B nồng độ tế bào của dòng chảy ra cao nhưng thời gian lưu lại dài vì thế chỉ có một lượng nhỏ của môi trường chảy qua. Điểm A là vùng không ổn định vì rất gần với điểm rửa trôi D, và vì chỉ cần một sự dao động nhỏ trong thời gian lưu cũng có thể đem lại một sự thay đổi lớn trong nồng độ tế bào. Khi độ dốc của đường thẳng

tăng lên thì hiệu suất sẽ tăng và độ dài của \overline{AB} giảm. Độ dốc của đường thẳng sẽ đạt giá trị cực đại khi nó là đường tiếp tuyến của đường cong C_X . Vì thế, giá trị hiệu suất cực đại bằng độ dốc của đường \overline{OC} . Hiệu suất cực đại sẽ đạt được ở điểm D.

Điều kiện hoạt động để đạt hiệu suất cực đại ở CSTF có thể ước lượng theo đồ thị bằng cách dùng đường cong $1/r_X$ theo C_X . Hiệu suất cực đại có thể thu được khi thời gian lưu là tối thiểu. Vì thời gian lưu bằng diện tích của hình chữ nhật với chiều rộng C_X và chiều cao $1/r_X$ trên đường cong $1/r_X$ theo C_X , cho nên nó sẽ đạt tối thiểu khi $1/r_X$ là tối thiểu (Hình 4.7).



Hình 4.7. Minh họa bằng đồ thị CSTF với hiệu suất cực đại. Đường liên tục biểu diễn cho mô hình Monod với $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,71 \text{ g/L}$; $Y_{X/S} = 0,6$; $C_{S_i} = 10 \text{ g/L}$; và $C_{X_i} = 0$.

Điều cần lưu ý là điều chỉnh các phương trình cho nồng độ tế bào và thời gian lưu để sao cho hiệu suất tế bào đạt cực đại. Hiệu suất tế bào cho CSTF trạng thái ổn định với chất dinh dưỡng vô trùng là:

$$\frac{C_X}{\tau_m} = r_X = \frac{\mu_{\max} C_S C_X}{K_S + C_S} \quad (4.17)$$

Hiệu suất đạt cực đại khi $dr_X/dC_X = 0$, sau khi thay thế $C_S = C_{S_i} - C_X/Y_{X/S}$ vào phương trình (4.17), lấy tích phân theo C_X và đặt phương trình tổng hợp bằng 0, chúng ta thu được nồng độ tế bào tối ưu ($C_{X,opt}$) cho hiệu suất cực đại như sau:

$$C_{X,opt} = Y_{X/S} C_{S_i} \frac{\alpha}{\alpha + 1} \quad (4.18)$$

Trong đó:

$$\alpha = \sqrt{\frac{K_S + C_{S_i}}{K_S}} \quad (4.19)$$

Vì: $C_S = C_{S_i} - \frac{C_X}{Y_{X/S}}$ nên nồng độ cơ chất tối ưu ($C_{S,opt}$) sẽ là:

$$C_{S,opt} = \frac{C_{S_i}}{\alpha + 1} \quad (4.20)$$

Thay phương trình (4.20) vào phương trình (4.17) để thu được một thời gian lưu tối ưu ($\tau_{m,opt}$) như sau:

$$\tau_{m,opt} = \frac{\alpha}{\mu_{\max}(\alpha - 1)} \quad (4.21)$$

5. So sánh nuôi cấy của hệ lên men mẻ và hệ lên men thùng khuấy liên tục

Như đã đề cập, thời gian lưu cần thiết để nuôi cấy mẻ hoặc PFF trạng thái ổn định đạt tới một nồng độ tế bào nhất định là:

$$\tau_b = t_0 + \int_{C_{X_0}}^{C_X} \frac{dC_X}{r_X} \quad (4.22)$$

Trong đó: t_0 là thời gian cần thiết để đạt tới pha sinh trưởng theo hàm mũ. Diện tích bên dưới của đường cong $1/r_X$ theo C_X , giữa C_{X_i} và C_X là bằng $\tau_b - t_1$ như đã được trình bày ở hình 4.3.

Mặt khác, thời gian lưu ở CSTF được biểu diễn bởi phương trình (4.17) bằng diện tích hình chữ nhật với chiều rộng $C_X - C_{X_i}$, và chiều cao $1/r_X$.