

3.2. Tạo thành các sản phẩm

Điều quan trọng là cần kiểm tra sản phẩm tạo thành có được kết hợp với sự sinh trưởng hay không. Một số sản phẩm được tạo thành sau khi sinh khối tế bào đạt tới pha tĩnh (stationary phase) của chu kỳ sinh trưởng và vì thế, không được kết hợp với sự sinh trưởng. Sự giải phóng CO_2 có thể được xác định và nó có quan hệ tỷ lệ đối với sự sinh trưởng của tế bào. Một sản phẩm hoàn toàn chung cho mọi phản ứng lên men là ion H^+ . Lượng kiềm bổ sung vào dịch lên men sẽ duy trì độ pH thích hợp cho sinh trưởng.

3.3. Các thành phần tế bào

Đối với các nuôi cấy trải qua sự sinh trưởng cân bằng, thì các thành phần tế bào thuộc nhóm đại phân tử như là protein, RNA và DNA có thể được xác định thay cho sinh khối tế bào. Tuy nhiên, cần phải thận trọng do tỷ lệ của những nguyên liệu này trong tế bào có thể thay đổi theo thời gian nếu nuôi cấy không trải qua sự sinh trưởng cân bằng.

3.4. Giải phóng nhiệt

Sự sinh trưởng của tế bào phát ra nhiệt. Lượng nhiệt phát ra tùy thuộc vào hiệu suất sử dụng năng lượng carbon. Vì thế, việc xác định nhiệt độ của hệ lên men có thể kết hợp gián tiếp với sự sinh trưởng của tế bào. Tuy nhiên, lượng nhiệt toàn phần tích lũy trong hệ lên men phụ thuộc vào hiệu quả phối hợp của các nguồn sinh nhiệt và mất nhiệt khác nhau như: nhiệt từ quá trình khuấy và bay hơi, nhiệt tiêu hao xung quanh thành của hệ lên men và nhiệt nhạy (sensible heat) trong luồng không khí. Vì thế, để xác định sinh trưởng bằng sự giải phóng nhiệt, cần phải thiết lập cân bằng năng lượng của hệ lên men mặc dù đây một công việc không dễ dàng.

3.5. Độ nhớt

Sinh trưởng của cơ thể hệ sợi (nấm) hoặc sự tạo thành polysaccharide đã làm tăng độ nhớt của dịch lên men (fermentation broth). Vì thế, việc xác định độ nhớt của dịch lên men rất hữu ích trong các quá trình lên men ở quy mô công nghiệp. Độ nhớt biểu kiến đo được ở tốc độ dịch chuyển cố định có thể được dùng để đánh giá nồng độ tế bào hoặc nồng độ sản phẩm.

II. Bất động tế bào

Phương pháp bất động (immobilization) các tế bào hoàn chỉnh có nhiều ưu điểm hơn các kỹ thuật nuôi cấy truyền thống. Bằng cách bất động tế bào, việc thiết kế quy trình đơn giản hơn khi các tế bào được gắn với các phần tử lớn hoặc trên các bề mặt được phân tách dễ dàng khỏi dòng sản phẩm. Điều này đảm bảo hoạt động liên tục của hệ lên men không bị nguy cơ rửa trôi tế bào. Sự bất động cũng có thể cung cấp các điều kiện có lợi cho sự phân hóa tế bào và sự truyền đạt thông tin giữa các tế bào, bằng cách ấy đã thúc đẩy sản phẩm có sản lượng các chất trao đổi thứ cấp cao. Sự bất động có thể bảo vệ tế bào bằng cách làm giảm các sự cố liên quan tới lực trượt (shear forces) gây tổn thương tế bào.

Các phương pháp bất động tế bào có thể được phân chia thành bốn nhóm chính được tóm tắt ở bảng 2.1.

1. Gắn lên bề mặt

Các tế bào có thể gắn lên bề mặt của mảnh gỗ nhỏ, collagen, microcarrier, hoặc các nhựa tổng hợp trao đổi ion (resin). Một ví dụ của kiểu bất động này là sử dụng các microcarrier cho các tế bào động vật. Ưu điểm chính của microcarrier là nó cung cấp một diện tích bề mặt lớn để gắn tế bào. Vật liệu cho microcarrier bao gồm các nhựa tổng hợp trao đổi ion, các hạt nhỏ dựa trên cơ sở dextran được bọc bằng gelatin, các hạt polyacrylamide, các hạt polystyrene, các hạt thủy tinh rỗng, các hạt cellulose hình trụ, và các giọt florua carbon nhỏ được ổn định bằng polylysine. Hiện nay, các microcarrier dựa trên dextran được sử dụng rộng rãi nhất để bất động tế bào động vật.

2. Tạo thể xốp

Phương pháp này cho phép các tế bào khuếch tán trong các thể xốp đã có sẵn như cordierite và pore glass (hạt thủy tinh có nhiều lỗ rỗng nhỏ), ở trong đó chúng sẽ sinh trưởng và được giữ lại. Ưu điểm chính của phương pháp này là các vật liệu tạo thể xốp đã có sẵn chống chịu được sự phân hủy trong các bình nuôi có khuấy từ hơn các loại vật liệu tạo thể xốp khác (alginate, acrylamide...), và thể xốp thường không có hại đối với tế bào. Tuy nhiên, phương pháp này gặp khó khăn trong việc hướng tới nồng độ cao của tế bào do thể tích lỗ thủy tinh (pore) bị giới hạn bởi chúng được làm sẵn bằng các loại vật liệu tạo thể xốp đặc trưng.

Bảng 2.1. Các phương pháp bất động tế bào.

Phương pháp	Vật liệu
Gắn lên bề mặt	Mảnh gỗ mỏng, collagen ¹ , microcarrier ² , các nhựa trao đổi ion, các oxide kim loại
Tạo thể xốp	Cordierite, pore glass, acrylamide, alginate, collagen, κ -carrageenan
Bao vi thể	Polylysine, ethylcellulose, emulsion ³ , màng tổng hợp
Tự kết khối	Các tiểu thể hệ sợi, polyelectrolytes ⁴ , nhân tổ liên kết ngang

Một phương thức khác là bọc các tế bào bằng thể xốp được tạo thành trong điều kiện *in situ*. Các vật liệu thuộc gelatin khác nhau như acrylamide, alginate, collagen, và κ -carrageenan, có thể được trộn với dịch huyền phù tế bào và tạo gel trong các dạng và kích thước khác nhau.

Một phương thức đơn giản khác là tạo các hạt hình cầu dạng gel alginate-calcium là như sau: Các tế bào dịch huyền phù sau khi cô lại sẽ được trộn với alginate để tạo ra một nồng độ alginate cuối cùng từ 1-3% (w/v) và hỗn hợp alginate-tế bào được bơm bằng kim tiêm thuốc vào dung dịch calcium chloride. Các hạt được tạo thành ngay tức thời có đường kính từ 1-5 mm tùy thuộc vào nồng độ tế bào và alginate của dung dịch và kích thước của mũi kim tiêm. Cần lưu ý thêm là phải duy trì sự vô trùng trong suốt quá trình bất động tế bào.

Nhược điểm chính của việc sử dụng alginate để bất động tế bào là để lọt các tế bào từ sự phân chia tế bào xuất hiện bên trong các hạt riêng rẽ. Việc lọt tế bào có thể được giảm thiểu hoặc bằng cách tăng nồng độ của alginate hoặc calcium chlorite trong các hạt hoặc bằng cách tạo ra các hạt

¹ Collagen: chất tạo keo.

² Microcarrier: một tiểu thể có kích thước hiển vi (thường là một hạt polymer đường kính khoảng 200 μm) để các tế bào trong nuôi cấy dịch huyền phù gắn vào và sinh trưởng.

³ Emulsion: dạng nhũ tương.

⁴ Polyelectrolytes: các chất đa điện phân.

nhỏ. Tuy nhiên, việc tăng nồng độ của alginate hoặc calcium chloride trong hạt có thể làm giảm tốc độ khuếch tán cơ chất thông qua gel và có thể ảnh hưởng đến khả năng sống sót của các tế bào được bao bọc.

3. Sử dụng bao vi thể

Các tế bào có thể được bất động bằng các bao vi thể (microcapsule) có màng hoặc màng bán thấm không cố định hoặc cố định. Ưu điểm của kỹ thuật đóng vỏ bao là tạo một diện tích bề mặt lớn cho sự tiếp xúc của cơ chất và tế bào. Màng bán thấm chỉ cho đi qua một cách chọn lọc những thành phần có trọng lượng phân tử thấp.

Các màng dạng sợi rỗng tạo thành một cấu trúc hình ống thường được sắp hàng như là các bó sợi song song bên trong một buồng hình trụ. Các tế bào được giữ lại trên thành của các sợi rỗng trong khi môi trường dinh dưỡng được thông khí luân chuyển quanh các sợi. Loại màng này có thể cung cấp thêm sự bảo vệ chống nhiễm bẩn môi trường. Tuy nhiên, nhược điểm chính của hệ thống màng này là giá thành cao, sự tắc nghẽn của màng đã làm trở ngại cho việc chuyển khối và gây khó khăn trong việc thông khí.

4. Tự kết khối

Các tế bào tự kết khối hoặc kết thành cụm như len cũng có thể được xem như là các tế bào được bất động do kích thước lớn của chúng có ưu điểm tương tự như sự bất động bằng các phương pháp khác. Trong khi nấm mốc sẽ tạo ra các tiểu thể tự nhiên, thì các tế bào vi khuẩn hoặc nấm men lại cần đến sự kết cụm. Các nhân tố kết thành cụm nhân tạo hoặc các nhân tố liên kết ngang (cross-linkers) có thể được bổ sung để tăng cường quá trình.

III. Một số thí nghiệm điển hình

1. Đường cong sinh trưởng của nấm men

Trong thí nghiệm này, chủng nấm men sẽ được nuôi cấy trong bình tam giác thủy tinh, và sự thay đổi nồng độ tế bào sẽ được kiểm soát bằng cách dùng ba kỹ thuật khác nhau: đếm dưới kính hiển vi, xác định khối lượng khô, độ đục của dịch huyền phù tế bào.

1.1. Nguyên liệu

- Một chủng nấm men bất kỳ sinh trưởng trong nuôi cấy dịch huyền phù. Chúng ta có thể thu chủng nấm men từ một phòng thí nghiệm vi sinh vật hoặc mua một chủng đặc biệt từ công ty.

- Glucose, dịch chiết nấm men, NH_4Cl , MgSO_4 , CaCl_2 và chất chống tạo bọt để pha môi trường.

- Hai bình tam giác 125 mL

- Pipette vô trùng

- Đèn Bunsen

- Nồi khử trùng

- Tủ ẩm

- Hemocytometer

- Ly tâm

- Cân hóa chất

- Máy quang phổ

1.2. Phương thức tiến hành

- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy theo bảng 2.2. Rót 50 mL/bình vào 2 bình tam giác loại 125 mL.

Bảng 2.2. Môi trường sinh trưởng đặc trưng của nấm men.

Glucose	100 g
Dịch chiết nấm men	8,5 g
NH_4Cl	1,32 g
MgSO_4	0,11 g
CaCl_2	0,06 g
Chất chống tạo bọt	0,2 mL
Nước	bổ sung vừa đủ 1 L

- Nút bình tam giác bằng một trong số vật liệu sau: giấy nhôm, nút plastic chịu nhiệt, nắp inox, hoặc bông không thấm nước.
- Khử trùng bình tam giác đựng môi trường ở 121°C trong 20 phút.
- Tiếp mẫu (inoculate) 1 mL dịch nuôi cấy nấm men trước đó vào bình tam giác chứa môi trường vô trùng. Tiến hành cẩn thận để khỏi bị nhiễm bẩn pipette, nắp đậy và bình tam giác trong suốt quá trình tiếp mẫu. Để giảm thiểu cơ hội nhiễm bẩn, nên đốt nắp đậy và cổ của bình tam giác sau khi lấy nắp ra để cấy nấm men vào.
- Đặt bình tam giác vào trong tủ ấm ở 37°C.
- Lấy 2 mL mẫu ở các khoảng thời gian khác nhau trong quá trình nuôi cấy để xác định nồng độ tế bào bằng cách đếm trên kính hiển vi, xác định trọng lượng khô và đo độ đục (mật độ quang) bằng máy quang phổ. Thời gian lấy mẫu phải được sắp xếp sao có thể thu được cho đường cong sinh trưởng tốt thể hiện cả ba phase sinh trưởng (xem chương 3). Trước khi lấy mẫu phải trộn tất cả các thành phần trong bình tam giác bằng cách lắc.

2. Đường cong sinh trưởng của thực vật

2.1. Nguyên liệu

- Một dòng tế bào dịch huyền phù của thực vật sinh trưởng tốt. Phương thức sau đây dựa trên cơ sở nuôi cấy tế bào thuốc lá. Nếu chọn dòng tế bào khác thì cần thay đổi môi trường.
- Hỗn hợp muối khoáng của Murashige-Skoog (1962) (Bảng 7.2), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), KH_2PO_4 , inositol, thiamine.HCl, và sucrose để pha chế môi trường.
- Hai bình tam giác 125 mL
- Pipette loại miệng rộng vô trùng (10 mL)
- Tủ nuôi tế bào thực vật kèm máy lắc
- Cân hóa chất
- Ly tâm
- Eppendorf tube

2.2. Phương thức tiến hành

- Chuẩn bị môi trường muối khoáng của Murashige-Skoog, 0,2 mg/L 2,4-D, 0,18 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L inositol, 1 mg/L thiamine.HCl và 30 g/L

sucrose⁵. Điều chỉnh pH tới 5,8 bằng KOH 1N và phân phối môi trường vào hai bình tam giác loại 125 mL, sao cho mỗi bình tam giác chứa 30 mL.

- Đậy nắp bình tam giác và khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

- Cấy vào bình tam giác chứa 30 mL môi trường với 1,5 mL của dịch huyền phù tế bào 7 ngày tuổi và đặt trong tủ nuôi tế bào thực vật có máy lắc và lắc 150 vòng/phút, nhiệt độ nuôi 27°C, chiếu sáng 8 giờ/ngày ở cường độ 2.000 lux.

- Lấy 1,5 mL dịch nuôi cấy mỗi ngày đã được trộn kỹ và cho vào Eppendorf tube để cân, ly tâm tube ở 9.000 vòng/phút trong 4-5 phút và loại thể nổi. Cân lại tube và tính toán phần trăm trọng lượng tế bào ẩm. Đặt tube trong tủ sấy ở 70°C trong hai ngày và cân lại để tính toán trọng lượng khô.

- Vẽ đồ thị sự thay đổi nồng độ tế bào khô và tươi (ẩm) theo thời gian.

3. Bất động tế bào thực vật

3.1. Nguyên liệu

- 30 mL tế bào dịch huyền phù thuốc lá sinh trưởng bằng phương pháp đã mô tả trong thí nghiệm trước.

- Alginate

- CaCl₂

- Bơm nhu động

- Nồi áp suất

- Cân hóa chất

3.2. Phương thức tiến hành

- Trộn 0,875 g alginate, 5 mL môi trường nuôi cấy thực vật và 25 mL nước và khử trùng.

- Đợi cho 30 mL dịch nuôi cấy huyền phù của tế bào thực vật lắng xuống, loại bỏ thể nổi. Bước này thường mất khoảng 10 phút.

- Bổ sung hỗn hợp alginate và trộn với các tế bào đã được cô lại.

⁵ Môi trường này chỉ có tính chất tham khảo. Thông thường các loài thực vật khác nhau với các mục đích nuôi cấy khác nhau, sẽ có các nhu cầu dinh dưỡng khác nhau. Khi đó, chúng ta phải thiết kế các môi trường nuôi cấy có tính đặc hiệu cao hơn.

- Bơm hỗn hợp alginate-tế bào qua một ống silicon vô trùng (1,6 mm ID) và cung cấp từng giọt vào trong bình tam giác chứa 200 mL dung dịch vô trùng của CaCl_2 0,12 M. Các giọt nhỏ sẽ phản ứng ngay lập tức với CaCl_2 để tạo ra các hạt hình cầu có đường kính khoảng 3,75-4,5 mm.

- Giữ các hạt trong dung dịch CaCl_2 khoảng 1 giờ để đảm bảo phản ứng kết tủa đã xảy ra hoàn toàn.

- Cấy vào bình tam giác chứa 30 mL môi trường thực vật với khoảng 30 hạt tế bào thực vật đã được bất động và đặt nó trong tủ nuôi tế bào thực vật có máy lắc và lắc 150 vòng/phút, nhiệt độ nuôi 27°C , chiếu sáng 8 giờ/ngày ở cường độ 2.000 lux.

- Chúng ta có thể xác định nồng độ tế bào khô và ẩm của các tế bào tự do trong dịch huyền phù và các tế bào được bất động trong suốt quá trình nuôi cấy mẻ. Để xác định nồng độ tế bào của các tế bào được bất động, cần phải hòa tan các hạt trong potassium phosphate 1 M trong 24 giờ.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Atkinson B and Mavituna F.** 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd ed. *Stockton Press*, New York, USA.

2. **Flickinger MC and Drew SW.** 1999. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. *John Wiley & Sons*, New York, USA.

3. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.

4. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.

5. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* New Jersey, USA.

6. **Vogel HC and Todaro CL.** 1997. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Principles, Process Design, and Equipment). 2nd ed. *Noyes Publications*. New Jersey, USA.

Động học sinh trưởng của tế bào

I. Mở đầu

Hiểu biết đầy đủ động học sinh trưởng của các tế bào thực vật, động vật và vi sinh vật là rất cần thiết để thiết kế và hoạt động các hệ lên men. Động học tế bào có quan hệ với tốc độ sinh trưởng tế bào và chịu ảnh hưởng của các điều kiện vật lý và hóa học.

Động học tế bào là kết quả của hệ thống các phản ứng hóa sinh và các quá trình vận chuyển phức tạp, bao gồm nhiều pha và các hệ thống nhiều thành phần. Trong suốt thời gian sinh trưởng, hỗn hợp không đồng nhất của các tế bào già và non thay đổi liên tục và tự thích nghi với môi trường dinh dưỡng là yếu tố cũng thay đổi liên tục trong các điều kiện vật lý và hóa học. Nói chung, mô hình toán học chính xác của động học sinh trưởng là không có thể có được. Thậm chí một mô hình thực tế cũng khó tiếp cận bởi vì nó có thể chứa nhiều thông số không thể xác định.

Vì thế, chúng ta cần giả định có thể đạt được những mô hình đơn giản như vậy sẽ hữu ích hơn cho việc thiết kế hệ thống lên men (xem chương 4) và dự báo hiệu suất. Các mô hình khác nhau có thể được phát triển trên cơ sở các giả định về các thành phần và quần thể tế bào như trình bày trong bảng 3.1.

Ngoài các giả định đối với tế bào, môi trường được thiết kế sao cho chỉ một thành phần có thể giới hạn tốc độ phản ứng, còn tất cả các thành phần khác hiện diện ở các nồng độ đủ cao mà những thay đổi nhỏ của chúng không ảnh hưởng rõ rệt đến tốc độ phản ứng. Các hệ thống lên men cũng được kiểm soát sao cho các thông số môi trường như pH, nhiệt độ và nồng độ oxygen hòa tan được duy trì ở một mức độ không đổi.

Trong chương này, các phương trình động học tế bào bắt nguồn từ mô hình được phân phối, không cấu trúc. Các phương trình này được ứng dụng để thiết kế và phân tích các hệ lên men lý tưởng.

Bảng 3.1. Các mô hình khác nhau của động học tế bào.

Quần thể	Các thành phần tế bào	
	Không cấu trúc (unstructured)	Được cấu trúc (structured)
Được phân phối (distributed)	Các tế bào được đại diện bởi một thành phần đơn, phân phối không đồng đều trong quá trình nuôi cấy.	Các tế bào bao gồm nhiều thành phần phức tạp phân phối không đồng đều trong quá trình nuôi cấy.
Bị cô lập (segregated)	Các tế bào được đại diện bởi một thành phần đơn, và tạo thành một hỗn hợp không đồng nhất.	Các tế bào bao gồm nhiều thành phần phức tạp và tạo thành hỗn hợp không đồng nhất.

II. Định nghĩa

Trước tiên, chúng ta hãy định nghĩa một số thuật ngữ dùng cho sinh trưởng của tế bào. Nếu đề cập đến nồng độ tế bào mà không kèm theo bất kỳ một ghi chú đặc điểm nào, thì nó có thể được hiểu theo nhiều nghĩa khác nhau. Đó có thể là số lượng tế bào, trọng lượng tươi tế bào, hoặc trọng lượng khô tế bào trên một đơn vị thể tích. Trong chương này, chúng ta thống nhất các thuật ngữ sau:

C_X : nồng độ tế bào, trọng lượng khô tế bào trên một đơn vị thể tích.

C_N : mật độ số lượng tế bào, số lượng tế bào trên một đơn vị thể tích.

ρ : mật độ tế bào, trọng lượng tươi tế bào trên một đơn vị thể tích của khối lượng tế bào.

Từ đó, có thể định nghĩa tốc độ sinh trưởng của tế bào theo một số cách khác nhau như sau:

dC_X/dt : sự thay đổi nồng độ khô của tế bào theo thời gian.

r_X : tốc độ sinh trưởng của tế bào trên cơ sở trọng lượng khô.

dC_N/dt : sự thay đổi mật độ số lượng tế bào theo thời gian.

r_N : tốc độ sinh trưởng của tế bào trên cơ sở số lượng.

δ : tốc độ phân chia của tế bào trên cơ sở số lượng $d \log_2 C_N / dt$