

Tổng quan.

Phương pháp hiện đại phân tích các quá trình công nghệ hóa học và sinh học dựa trên phương pháp phản xạ tia Laser

• Lê Minh Tâm

• Friedel H. Schwartz

Sequip S&E GmbH, Düsseldorf, Đức

(Bài nhận ngày 23 tháng 09 năm 2015, nhận đăng ngày 02 tháng 12 năm 2016)

TÓM TẮT

Xác định phân bố cỡ hạt (PSD – Particle Size Distribution) là một trong những nhiệm vụ quan trọng nhất để quan sát và điều khiển các quá trình công nghệ hóa học và sinh học. Trong điều kiện các hạt liên tục chuyển động dưới tác dụng của lưu chất, việc xác định này là một thách thức về mặt kỹ thuật. Bài báo này tổng hợp một

Từ khóa: xác định phân bố cỡ hạt, phản xạ Laser, quan sát trực tuyến quá trình sinh học và hóa học

MỞ ĐẦU

Mật độ hạt và phân bố cỡ hạt là hai đặc tính quan trọng nhất đối với hầu hết các quá trình công nghệ liên quan đến hệ dị thể [1]. Biến đổi mật độ hạt theo thời gian, hay nói cách khác là nồng độ, cho biết mức độ chuyển hóa của quá trình. Trong khi đó, phân bố cỡ hạt quyết định hàng loạt tính chất quan trọng của sản phẩm cuối như tốc độ hòa tan của các thành phần được phẩm, tính chất hóa lý của hạt rắn (hoạt tính hóa học, khả năng lưu động, vón cục, v.v), khả năng xúc tác (phụ thuộc vào bề mặt riêng của hạt xúc tác), hay sự bền vững của hệ nhũ tương được sử dụng rộng rãi trong mỹ phẩm và các sản phẩm chăm sóc cá nhân, v.v. Hiện nay, việc phát triển các công nghệ mới nhằm phân tích phân bố cỡ hạt với độ chính xác cao và giảm thiểu tác động đối với hệ hạt gốc (hạn chế lấy mẫu) đang là nhu cầu cấp thiết đối với nhiều ngành công nghiệp. Vì thế, năm 2004, tổ chức FDA (Food and Drug Administration, USA) đã hệ thống hóa và đưa ra các tiêu chuẩn đo lường nhằm nâng cao khả năng

số kết quả nghiên cứu về việc sử dụng phương pháp phản xạ Laser trong việc xác định phân tích cấp hạt trong thời gian thực (in-situ and real time conditions). Hai quá trình được chọn lọc để giới thiệu bao gồm: kết tinh amino acid L-arginine và quá trình sinh học.

tối ưu hóa các quá trình công nghệ, từ đó hình thành nên khái niệm kỹ thuật phân tích quá trình (Process Analytical Technology, PAT) [2]. PAT đầu tiên được áp dụng cho các quá trình sản xuất dược phẩm nhưng sau đó đã nhanh chóng được áp dụng rộng rãi trong các lĩnh vực khác như thực phẩm, sinh học, v.v.

Hiệu năng của phương pháp phân tích được đánh giá dựa trên khả năng theo dõi liên tục từ đầu đến cuối các quá trình công nghệ. Một số yêu cầu quan trọng của các phương pháp phân tích hiện đại có thể kể đến bao gồm:

Khả năng đo đạc trực tuyến (in/on-line) trong qui trình công nghệ, không lấy mẫu và không pha loãng (in-situ conditions): Hạn chế lấy mẫu để đo đạc là yêu cầu hàng đầu đối với các phương pháp nghiên cứu hiện đại. Việc tránh lấy mẫu theo thời gian sẽ giải quyết nhiều vấn đề như giảm thiểu lượng mất sản phẩm (đặc biệt đối với qui mô nhỏ trong phòng thí nghiệm), hạn chế khả năng nhiễm tạp chất xâm nhập do lấy mẫu (đặc biệt đối với

các quá trình sinh học, nhiễm khuẩn có thể thay đổi toàn bộ quá trình công nghệ, tạo ra sản phẩm không mong muốn hay độc tố).

Thích hợp phân tích cho dải nồng độ rộng: Nồng độ của các quá trình kết tinh thông thường có thể biến đổi trong khoảng khá rộng thí dụ từ 1–40 % từ lúc sinh mầm cho đến phát triển tinh thể và sau đó hệ đạt cân bằng. Hoặc đối với quá trình lên men, OD (optical density) có thể đạt đến 50–100 OD hay thậm chí rất cao ở cuối quá trình. Vậy nên kỹ thuật đo phải đủ khả năng phân giải trong khoảng biến đổi nồng độ rộng.

Phép đo trong thời gian thực (real time analysis): Thông thường các phương pháp truyền thống như phương pháp lắng hay rây có thể kéo dài hàng giờ (thậm chí đơn vị tính có thể là ngày) cho mỗi phép đo đơn lẻ. Nhược điểm này khiến chúng không đủ hiệu quả để theo dõi các quá trình động và diễn ra trong thời gian ngắn. Nhằm nâng cao khả năng tự động hóa và điều khiển, các phép đo đòi hỏi phải có độ hồi tiếp nhanh, xuất kết quả trong thời gian thực. Thí dụ, để quan sát quá trình sinh mầm trong kỹ thuật kết tinh, thời gian đo yêu cầu xuất kết quả sau mỗi giây, tuy nhiên đối với các quá trình sinh học, thời gian đo có thể kéo dài do động học của quá trình diễn ra chậm hơn.

Phép đo phải mang tính xử lý thống kê: Mặc dù phương pháp phân tích ảnh kính hiển vi vẫn đang là phương pháp phổ biến hiện nay, nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là tính hạn chế với mẫu có nồng độ cao, thường không quá 5–10 %. Vì thế số lượng hạt được phân tích trên mỗi ảnh thường chỉ vài trăm, kết quả không mang tính đại diện cho toàn hệ.

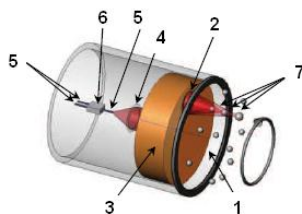
Hiện nay có một số phương pháp được sử dụng phổ biến nhằm xác định phân bố cỡ hạt, có thể chia các phương pháp này thành hai nhóm. Nhóm thứ nhất bao gồm các phương pháp đo trực tiếp (in/on-line) ngay trong qui trình công nghệ như việc sử dụng sóng siêu âm, phản xạ tia Laser, v.v. Nhóm thứ hai bao gồm các phương pháp đo

không trực tiếp (off-line) như phương pháp rây, lắng, kính hiển vi điện tử, tán xạ ánh sáng, v.v. Nhược điểm lớn nhất của các phương pháp phân tích không trực tiếp là phải tiến hành lấy mẫu và chuẩn bị mẫu cho mỗi phép đo riêng lẻ. Một số hạn chế tiêu biểu của các phép đo không trực tiếp đơn cử có thể kể đến: Phương pháp rây phải sử dụng lượng mẫu tương đối lớn, thời gian phân tích dài, khó phân giải cấp hạt mịn dưới vài μm . Phương pháp lắng cần thời gian phân tích dài, thường kéo dài vài ngày [3]. Phương pháp kính hiển vi điện tử gặp nhiều khó khăn đối với mẫu có nồng độ cao do vấn đề phân mảnh giữa hạt và nền (background) trong các thuật toán xử lý hình ảnh, thường phân tích với số lượng hạt tối đa vài trăm hạt trên một khung hình [4]. Phương pháp tán xạ ánh sáng có ưu điểm là có thể phân tích hạt tới kích thước nano nhưng nhược điểm là đo không trực tiếp và kết quả được xử lý bằng các thuật toán trong đó có sử dụng một số giả định (hai phương pháp thường được sử dụng là Mie và Fraunhofer) [5]. Những phương pháp trên không hiệu quả để phân tích các quá trình trong thời gian thực. Vượt qua những hạn chế trên, phương pháp được đánh giá có đủ khả năng phân tích quá trình trong thời gian thực hiện nay phải kể đến là phương pháp phản xạ tia Laser. Phương pháp phản xạ tia Laser là phương pháp trực tiếp đo tia phản xạ từ bề mặt hạt, từ đó đưa ra kết quả phân tích về mật độ hạt, phân bố cỡ hạt và thông tin liên quan đến trạng thái bề mặt hạt. Bài báo này tập trung bàn luận phương pháp xác định phân bố cỡ hạt hiệu năng cao dựa trên phương pháp phản xạ tia Laser của công ty Sequip Particle Technology (Sequip S&E GmbH).

PHƯƠNG PHÁP PHẢN XẠ TIA LASER ỨNG DỤNG TRONG XÁC ĐỊNH PHÂN BỐ CỖ HẠT

Hệ thống sử dụng một nguồn Laser với năng lượng hiệu chỉnh được trong phạm vi từ 1–20 mW. Chùm tia Laser đơn sắc (bước sóng 782 nm) từ nguồn được dẫn đến hệ thấu kính (3) bằng

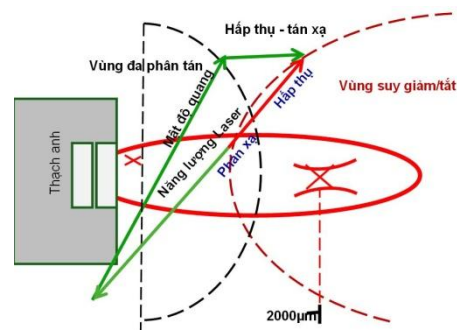
sợi quang học đơn (single-fiber) với tiết diện 4 μm (5) và bộ chia quang (6) đến bộ định hướng (4). Sau khi đi vào hệ thấu kính động (tốc độ góc 2 m/s), chùm hội tụ (2) tạo ra điểm hội tụ tại vị trí (7) trước cửa sổ thạch anh (1). Khi điểm hội tụ chuyển động tịnh tiến theo chiều dọc trục, thì thiết bị hoạt động theo nguyên lý 1-D. Tương tự, nếu điểm hội tụ chuyển động tròn trong mặt phẳng song song với cửa sổ thạch anh, thiết bị 2-D. Kết hợp hai kiểu chuyển động trên, quỹ đạo xoắn ốc sẽ được tạo ra từ các chuyển động nhanh của điểm hội tụ theo phương thức 3-D. Do đó có thể phát hiện tất cả các hạt trong một thể tích ba chiều liên tục. Kỹ thuật này có thể phát hiện diện tích bề mặt hạt hay thể tích hạt thay vì chỉ có chiều dài dây cung (chord length) của các hạt. Tính năng này là một bước tiến đáng kể so với phương pháp thông thường, đặc biệt trong các trường hợp hạt có hình dạng phức tạp như các tinh thể hình kim và các hạt có kích thước lớn. Ngoài ra, việc sử dụng sợi quang học đơn (single-fiber) cho phép phát hiện chính xác chỉ có các hạt tại điểm hội tụ, các hạt ngoài điểm hội tụ hoặc một phần thuộc vào điểm hội tụ (out of focus) sẽ được lọc bỏ. Bên cạnh đó, ưu điểm của kỹ thuật phân tích này là độ chính xác cao và độ lặp lại tốt các dữ liệu thực nghiệm (phân tích hàng nghìn hạt trong mỗi giây) [6].



Hình 1. Sơ đồ nguyên lý đầu dò phản xạ Laser

1. Cửa sổ thạch anh
2. Chùm tia Laser hội tụ
3. Hệ thống thấu kính quang học động
4. Bộ phận định hướng chùm tia tới và chùm tia phản xạ
5. Sợi quang học đơn (single-fiber)
6. Bộ chia quang
7. Điểm hội tụ chuyển động (dynamic focus)

Có hai vùng vật lý quan trọng được mô tả như Hình 2 bao gồm vùng gây nên hiệu ứng đa phân tán (multi scatter effect) và vùng gây nên hiệu ứng tắt (damping effect). Hiệu ứng đa phân tán hình thành do sự phản xạ của các hạt thứ cấp tạo nên tín hiệu nhiễu. Trong khi đó, hiệu ứng tắt làm mất hoặc tiêu hao tín hiệu dẫn đến tín hiệu quá yếu để có thể phân tích được. Vùng đa phân tán, trực tiếp ở phía trước của cửa sổ cảm biến, chịu ảnh hưởng của tính chất quang học (optical property) của hệ dị thể. Mức độ phản xạ Laser trong vùng chịu tác động của hiệu ứng tắt phụ thuộc vào tính chất quang học của hạt và của hệ phân tán (thí dụ như chỉ số khúc xạ, trạng thái bề mặt hạt, khả năng hấp thụ và phản xạ ánh sáng).



Hình 2. Nguyên lý phương pháp phản xạ Laser

Khoảng cách từ cửa sổ thạch anh đến điểm hội tụ gọi là khoảng di chuyển TD (travel distance). TD đóng vai trò quan trọng trong việc xác định kích thước hạt. TD nhỏ cho phép phát hiện các hạt mịn. Ngược lại, khi điểm hội tụ chuyển động sâu vào trong môi trường, trọng tâm quang học mở rộng và vì thế có thể phát hiện các hạt với kích thước lên đến 2000 μm (trong trường hợp đặc biệt có thể đến 4000 μm). Vị trí của điểm hội tụ, do đó, ảnh hưởng rất lớn đến việc xác định kích thước hạt và biến đổi kích thước hạt trong suốt quá trình. Nếu giả định hạt có dạng hình cầu, khoảng TD tối ưu là $\frac{1}{2}$ kích thước của các hạt cần nghiên cứu. Vị trí tối ưu của TD ở giữa hai vùng gây nên hiệu ứng đa phân tán và hiệu ứng tắt.

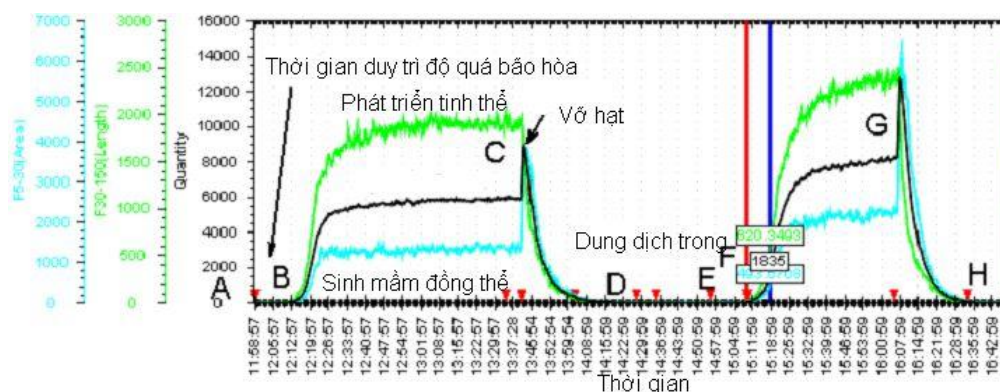
Bên cạnh giá trị TD, năng lượng Laser được sử dụng cũng là yếu tố quan trọng quyết định kết quả đo. Tương quan giữa mật độ quang học và sự hấp thụ quang học của hệ dị thể dẫn đến cần phải xác định năng lượng Laser tối ưu cho mỗi loại vật liệu khác nhau. Thí dụ Laser 10 – 20 mW được khuyến cáo cho những vật liệu có độ hấp thụ quang học mạnh như carbon, nhưng đối với các vật liệu có độ phản xạ mạnh như TiO_2 thì nguồn Laser không nên vượt quá 2 mW vì nó sẽ dẫn đến quá tải cho bộ thu tín hiệu phản xạ. Như vậy, bên cạnh TD, nguồn năng lượng Laser cũng là yếu tố cần phải tối ưu hóa cho các loại vật liệu khác nhau.

Hiện nay phương pháp phản xạ Laser đã được áp dụng thành công đối với nhiều lĩnh vực công nghệ, đơn cử như: Việc theo dõi trực tuyến phân bố cỡ hạt ở trạng thái động của các giọt/bọt trong hệ phản ứng dị thể 3 pha (khí)-(nước)-(inonic lỏng) được công bố bởi Torres-Martínez và Melgarejo-Torres [7, 8]. Christian Hahn đã áp dụng thành công kỹ thuật này để theo dõi quá trình lên men sữa [9]. Việc nghiên cứu các quá trình sinh trưởng và phát triển của *E. coli* cũng đã được công bố [10], v.v. Trong bài báo này, phương pháp phản xạ tia Laser được sử dụng để theo dõi trực tuyến các quá trình sẽ được giới thiệu qua hai thí dụ: kết tinh amino acid và công nghệ sinh học.

ỨNG DỤNG TRONG QUAN SÁT TRỰC TUYẾN QUÁ TRÌNH KẾT TINH AMINO ACID L-ARGININE

Arginine là một amino acid quan trọng cho sự tăng trưởng của động vật. Các dẫn xuất của nó với các acid hữu cơ và vô cơ được sự chú ý trong lĩnh vực vật liệu quang học [11]. Tuy nhiên, việc thiết kế quá trình kết tinh đối với amino acid này hiện nay còn gặp nhiều khó khăn do chưa có đầy đủ các dữ liệu cần thiết như độ tan (cân bằng rắn-lỏng) và khả năng duy trì trạng thái giả bền trước khi sinh mầm đồng thể (induction period).

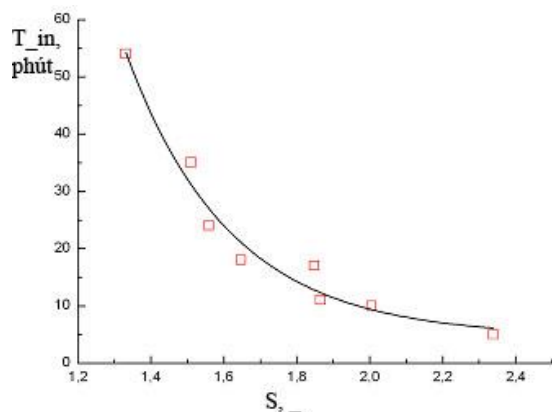
Trong phần này, kỹ thuật phản xạ tia Laser của công ty Sequip S&E GmbH được sử dụng để theo dõi trực tuyến quá trình kết tinh. Thí dụ quá trình kết tinh dung dịch L-arginine được thực hiện 2 chu kỳ như biểu diễn trên Hình 3 [12]. Ở chu kỳ thứ nhất, dung dịch L-arginine bão hòa ở 35 °C được làm lạnh đến 10 °C và quá trình kết tinh được quan sát như đoạn $A \rightarrow B \rightarrow C$. Sau đó, các tinh thể được hòa tan hoàn toàn bằng cách nâng nhiệt độ hệ lên 40 °C như biểu diễn trên đoạn $C \rightarrow D$. Từ dung dịch trong suốt đó, nhiệt độ của hệ được giảm đến 5 °C để kết tinh chu kỳ thứ hai ($E \rightarrow F \rightarrow G \rightarrow H$). Từ kết quả thu được của hai chu kỳ, dễ dàng nhận thấy sự lặp lại khá tốt của kỹ thuật đo do sự đồng dạng của hai chu kỳ. Riêng chu kỳ hai do độ quá bão hòa cao hơn nên quá trình kết tinh diễn ra sâu hơn so với chu kỳ thứ nhất. Phân tích chi tiết chu kỳ thứ nhất có thể nhận thấy: Tại thời điểm ban đầu của quá trình, trong dung dịch quá bão hòa ở 10 °C, số lượng tín hiệu phản xạ (Quantity) được ghi nhận là gần bằng 0 do dung dịch trong suốt (từ $A \rightarrow B$, xem Hình 3). Sau đó, quá trình sinh mầm đồng thể xảy ra ở một thời điểm nhất định dưới độ quá bão hòa như trên. Sự sinh mầm làm số lượng hạt tăng đột biến như sự kiện được quan sát tại thời điểm B (Hình 3). Quá trình phát triển tinh thể tiếp diễn dẫn đến biến đổi liên tục tập hợp hạt như những sự kiện được ghi nhận trong khoảng $B \rightarrow C$. Do quá trình sinh mầm và phát triển tinh thể diễn ra liên tục, các tinh thể được phát triển từ các mầm tinh thể nhỏ và đồng thời quá trình sinh mầm thứ cấp cũng diễn ra bù đắp lại lượng mầm tiêu hao trước đó. Do vậy, phân đoạn hạt mịn 5–30 μm hầu như không thay đổi nhưng số lượng hạt trong phân đoạn 30–150 μm thì tăng lên không ngừng và sau đó đạt đến cân bằng. Các sự kiện tương tự được quan sát đối với chu kỳ thứ hai. Như vậy, với việc thiết lập các thông số đo phù hợp, quá trình kết tinh có thể được dễ dàng theo dõi trực tuyến từ lúc sinh mầm, phát triển tinh thể, cho đến hệ đạt cân bằng với kỹ thuật phản xạ Laser.



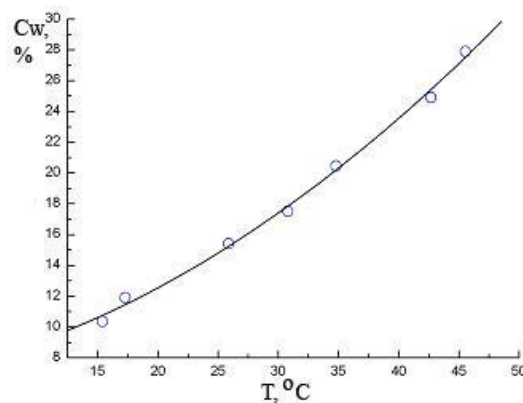
Hình 3. Quá trình kết tinh và hòa tan L-arginine được theo dõi trong thời gian thực

Từ Hình 3, một thông số quan trọng của quá trình kết tinh có thể được rút ra như thời gian duy trì trạng thái giả bền (induction period) của L-arginine trong dung dịch nước với các độ quá bão hòa khác nhau. Kết quả này được biểu diễn trên Hình 4. Đây là các dữ liệu rất quan trọng trong việc tối ưu hóa động học các quá trình kết tinh. Hiện nay, một phương pháp đang được phát triển mạnh mẽ nhằm tinh chế các đồng phân quang học (enantiomer) trong dược phẩm được biết đến với tên gọi “kết tinh chọn lọc” (preferential crystallization) [13, 14]. Trong phương pháp này,

dung dịch chứa đồng thời cả 2 đồng phân quang học được đưa vào vùng giả bền. Sau đó mầm đồng thể của một trong hai đồng phân được đưa vào để kết tinh đồng phân mục tiêu trong khi đồng phân còn lại vẫn còn ở trong dung dịch trong một khoảng thời gian nhất định. Toàn bộ quá trình này phụ thuộc vào độ rộng vùng giả bền và thời gian duy trì vùng giả bền. Do vậy, dữ liệu thời gian duy trì vùng giả bền thu được từ phép đo này là rất cần thiết cho việc thiết kế và tối ưu các quá trình kết tinh của L-arginine.



Hình 4. Thời gian duy trì độ quá bão hòa T_{in} (induction time) của L-arginine [12]



Hình 5. Độ tan L-arginine xác định theo phương pháp đa nhiệt [12]

Bên cạnh đó, sử dụng kỹ thuật đo này còn cho phép quan sát quá trình hòa tan các chất rắn vào trong dung môi nhất định. Sự minh họa đã được biểu diễn trên Hình 3 đối với cả hai chu kỳ. Ở đây, nhiệt độ toàn hệ được nâng lên 40 °C, quá trình vỡ hạt (breakage) nhanh chóng diễn ra làm số hạt tăng đột ngột như sự kiện diễn ra tại C hoặc G. Sau đó các hạt này nhanh chóng tan ra tạo dung dịch trong suốt (clear solution) tại D hoặc H. Như vậy, nếu nâng nhiệt rất chậm (thí dụ tốc độ nâng nhiệt 0,5 K/min, hệ được khuấy trộn) cho một hệ huyền phù có nồng độ xác định thì các hạt sẽ tan ra. Dựa trên nguyên lý xác định độ tan theo phương pháp đa nhiệt, đến khi các hạt tan hòa toàn thì nhiệt độ tại đó sẽ tương ứng với nhiệt độ bão hòa. Bằng cách áp dụng phương pháp này với việc sử dụng thiết bị đo trực tuyến, ta có thể xác định được đường cong độ tan của L-arginine trong dung dịch nước như Hình 5. Áp dụng phương pháp Apenblat cho cân bằng rắn-lỏng, các thông số (nội hàm của chúng bao gồm enthalpy và entropy của quá trình hòa tan) trong mô hình toán được xác định như phương trình sau [12].

$$\ln x = A + B \frac{1}{T} + C \ln T = 9.7925 \cdot 10^3 + 65.8878 \frac{1}{T} - 65.8878 \ln T$$

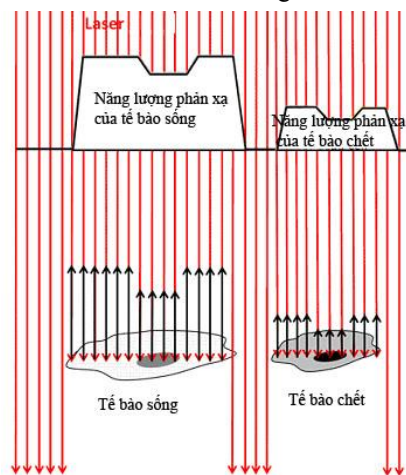
Cùng với dữ liệu miền giả bền, giá trị độ tan là các thông số quyết định đến quá trình kết tinh. Như vậy, việc sử dụng cùng một phương pháp đo cho phép xác định trực tuyến đồng thời độ tan và miền giả bền mà không cần tiến hành lấy mẫu đã được thực hiện trong điều kiện gốc của quá trình động.

ỨNG DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU CÁC QUÁ TRÌNH SINH HỌC

Hiện nay, các quá trình sinh học được đánh giá là công nghệ tiềm năng cho ngành công nghiệp sản xuất các chế phẩm vi sinh chẳng hạn như vitamin, amino acid và các chất thơm v.v. Chúng được sử dụng rộng rãi nhằm cung cấp chất dinh dưỡng cho con người và động vật cũng như để sản xuất hóa chất cơ bản [15]. Hơn nữa, quá trình lên men và nuôi cấy tế bào là cơ sở cần

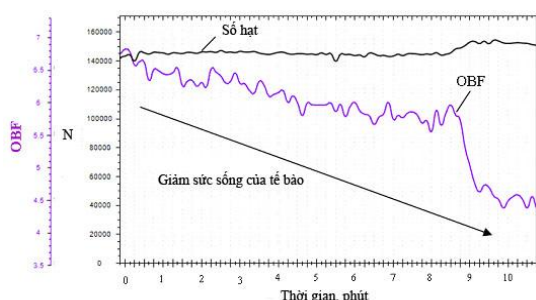
đoán y học hiện đại để đưa ra các phương pháp trị liệu thích hợp. Việc tối ưu hóa các quá trình sinh học trong điều kiện nhiệt độ, pH, độ ẩm hoặc thời gian, v.v đòi hỏi áp dụng công nghệ đo hiệu quả để có thể phân tích các thông số cụ thể về khả năng hoạt động của hệ vi sinh. Kỹ thuật phản xạ Laser với chức năng cung cấp thông tin về số lượng, kích thước và hình dạng của tế bào, do đó có thể được sử dụng để theo dõi các hiện tượng như sự tăng trưởng của tế bào, phân chia thành các tế bào mới hoặc sự chết đi của chúng.

Trạng thái bề mặt các tế bào phản ánh hoạt tính của chúng, vì thế phổ phản xạ của tế bào sống và chết có cường độ và hình dạng khác nhau trên dao động đỏ. Hình 6 minh họa mức độ phản xạ quang học của tế bào sống và chết. Kết quả nghiên cứu các tế bào sống cho thấy tín hiệu phản xạ của chúng có cường độ cao hơn so với các tế bào chết tương ứng [10, 16]. Tỷ lệ sống và chết của các tế bào có thể được đánh giá bằng cách phân tích các giá trị OBF (obscuration factor, hàm tích hợp trong thuật toán Sequip) mà giá trị trung bình phản ánh hành vi phản xạ Laser trên bề mặt của các tế bào. Trên thực tế, OBF liên quan mật thiết đến trạng thái bề mặt của tế bào. Thí dụ sau đây minh họa một ứng dụng trong đó có sử dụng giá trị OBF nhằm quan sát trực tuyến quá trình chết của các tế bào ung thư.



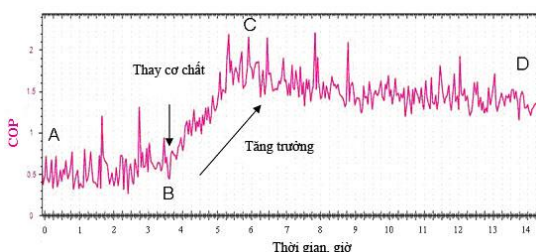
Hình 6. Khả năng phản xạ Laser của tế bào sống và tế bào chết [16]

Hình 7 cho thấy sự biến đổi của các tế bào ung thư đã được điều trị bằng một tác nhân hóa trị liệu. Có thể thấy số lượng tế bào (counts) vẫn không đổi trong suốt thời gian xử lý tế bào ung thư. Tuy nhiên, giá trị OBF giảm dần chứng tỏ khả năng sống của tế bào liên tục giảm trong suốt thời gian hóa trị liệu. Sau khoảng 15 phút tất cả các tế bào ung thư bị chết. Từ kết quả đó kết luận quan trọng về hiệu quả của các tác nhân hóa trị đã được sử dụng để tiêu diệt tế bào ung thư cụ thể có thể được rút ra.



Hình 7. Xử lý tế bào ung thư bằng tác nhân hóa trị liệu [16]

Bên cạnh việc quan sát sự chết đi của các tế bào, một chức năng khác rất quan trọng nhằm theo dõi sự tăng trưởng và phân chia tế bào cũng đã được phát triển bởi Sequip. Một biến mới đã được xác định, gọi là xác suất trùng hợp ngẫu nhiên (COP – coincidence propability). Các giá trị COP chỉ ra khoảng cách tương đối giữa các hạt với nhau, tức là khoảng cách trung bình giữa các hạt (D) liên quan đến số hạt (n) theo phương trình: $COP = D/n$



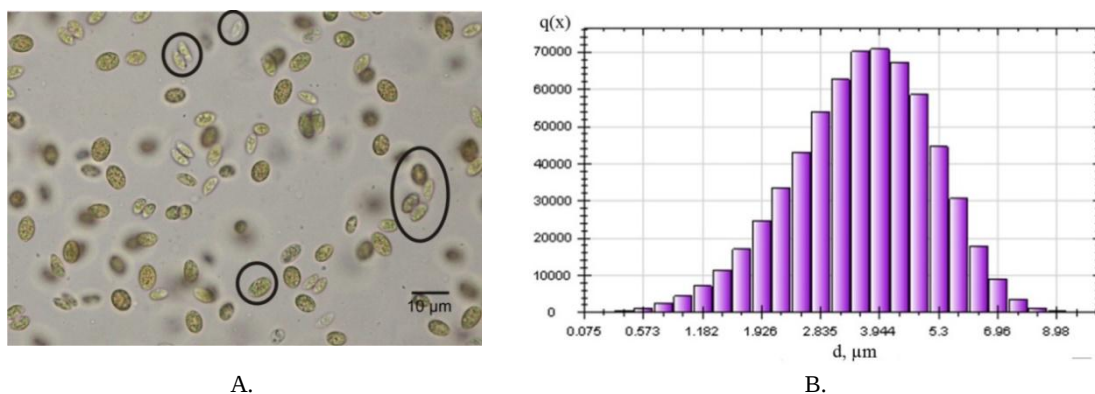
Hình 8. Quá trình tăng trưởng của *E. coli* [16]

Nếu quá trình tăng trưởng tế bào diễn ra, không chỉ số lượng tế bào mà ngay cả COP cũng

sẽ tăng [10, 16]. Để phân biệt hai hạt cạnh nhau, ít nhất thời gian khác nhau 1 ms là điều kiện cần thiết. Các kết quả quan sát của một quá trình lên men sử dụng vi khuẩn *E. coli* được biểu diễn trên Hình 8. Trong khoảng thời gian đầu (A→B), giá trị COP tương đối ổn định chứng tỏ trạng thái của vi khuẩn không thay đổi. Tuy nhiên, sau khi chất dinh dưỡng được bổ sung tại B, vi khuẩn phát triển mạnh từ 4 – 6 giờ, tương ứng đoạn B→C. Sau đó giá trị này duy trì một thời gian và có xu hướng giảm dần (từ C→D) do chất dinh dưỡng cho vi khuẩn đã tiêu hao do sử dụng. Sự gia tăng của COP chỉ ra sự tăng trưởng và phát triển của các tế bào.

Như vậy, hai tính chất vật lý OBF và COP có thể được sử dụng cùng với tổng số hạt đếm được nhằm theo dõi các quá trình sinh học một cách trực tuyến. So với các kỹ thuật khác hiện nay để nghiên cứu hoạt tính tế bào, kỹ thuật Laser cho thấy có nhiều ưu thế vượt trội như phân tích trong thời gian thực, không cần sử dụng các chất nhuộm tế bào (như calcein/propidium iodide, v.v.), không cần lấy mẫu và cũng không cần pha loãng. Đối với các quá trình sinh học, đó là các ưu điểm rất lớn giúp hạn chế khả năng xâm nhập của vi khuẩn lạ hay các vi sinh vật không mong muốn.

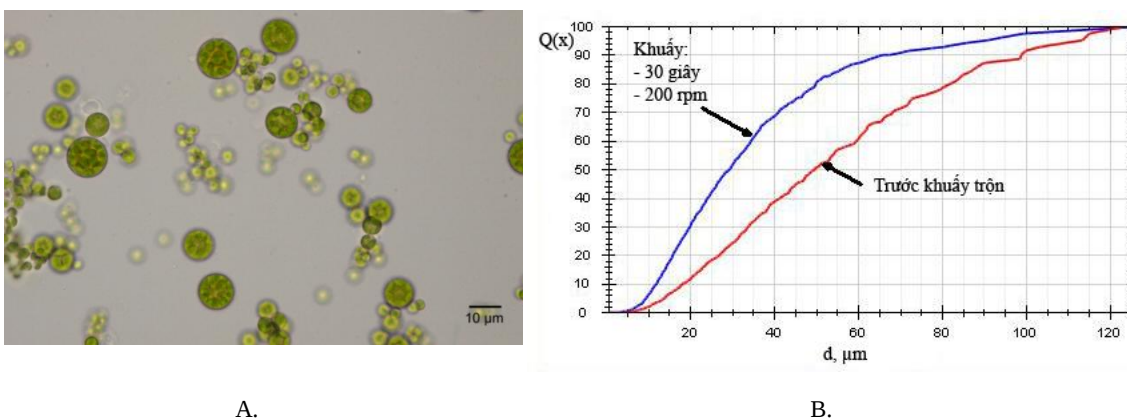
Ngoài ra, một thí nghiệm độc lập trên hệ tảo *Scenedesmus* được tiến hành nhằm so sánh kết quả của phương pháp phản xạ Laser và kính hiển vi điện tử. Kết quả phân tích kính hiển vi điện tử trên Hình 9A cho thấy hạt sơ cấp của tảo *Scenedesmus* có kích thước vào khoảng 4 – 5 μm . Trên thực tế, một số tảo đơn lẻ có thể kết tụ thành các khối lớn hơn hoặc phân chia thành các tế bào con làm thay đổi hoạt tính của tảo. Áp dụng phương pháp phản xạ Laser, hạt sơ cấp và thứ cấp của tảo *Scenedesmus* cho ra một phân bố thống kê với kích thước đặc trưng d5, d50 và d95 lần lượt là 0,8; 4,3 và 8,1 μm (Hình 9B). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với phương pháp kính hiển vi điện tử.



Hình 9. A) Ảnh kính hiển vi điện tử tảo *Scenedesmus*, B) Biểu đồ phân bố histogram kích thước hạt xác định bằng phương pháp phân xạ Laser

Ngoài ra, việc sử dụng phương pháp đo trực tuyến còn cho phép xác định các quá trình phức tạp như kết tụ - giải kết tụ. Việc thay đổi trạng thái tập hợp có thể ảnh hưởng đến tính chất của các đối tượng sinh học [17, 18]. Thí nghiệm sau đây được tiến hành trên tảo *Bracteacoccus*. Tảo *Bracteacoccus* có thể dễ dàng kết tụ thành các khối lớn (Hình 10A), nhưng các khối này kém bền. Dưới tác động cơ học (thí dụ như khuấy trộn), các khối kết tụ này dễ dàng bị phá vỡ thành các cấu trúc nhỏ hơn. Quá trình kết tụ - giải kết tụ của tảo *Bracteacoccus* là một quá trình động, sử

dụng kỹ thuật phân xạ tia Laser có thể xác định ngay trạng thái của hệ trong thời gian thực. Hình 10B mô tả đường cong tích lũy của hệ. Ban đầu hệ tồn tại các khối kết tụ lớn ($d_{50} = 49,5 \mu\text{m}$), nhưng sau 30 giây khuấy trộn, các khối này sẽ bị phân chia thành các tập hợp nhỏ hơn với kích thước trung bình $d_{50} = 29,6 \mu\text{m}$. Tương ứng với quá trình này có thể thấy đường cong tích lũy đã dịch chuyển sang trái vì tập hợp hạt lúc này có kích thước nhỏ hơn so với trước khi tác động cơ học vào hệ.



Hình 10. A) Ảnh kính hiển vi điện tử tảo *Bracteacoccus*, các khối kết tụ được hình thành nhưng kém bền cơ học; B) Biểu đồ đường cong tích lũy kích thước hạt xác định bằng phương pháp phân xạ Laser

KẾT LUẬN

Trong thập niên gần đây, xu hướng ứng dụng PAT vào quan sát và tối ưu các quá trình hóa học và sinh học đã được phát triển nhanh chóng trên thế giới. Các tập đoàn lớn như BASF, Evonik, Bayer, v.v. đã và đang đầu tư mạnh mẽ vào lĩnh vực này nhằm tăng cường khả năng tối ưu hóa, giảm thiểu rủi ro cho quá trình sản xuất. Đối với vấn đề xác định phân bố cỡ hạt trong các hệ dị thể, một phương pháp hiện đại được giới thiệu trong bài báo này với việc sử dụng kỹ thuật phản xạ Laser đã thể hiện nhiều ưu điểm mà các phương pháp truyền thống không đủ hiệu lực. Khả năng nổi bật của phương pháp phản xạ tia Laser có thể kể đến như hồi tiếp nhanh, xuất kết quả trong thời gian thực. Ngoài ra, kết quả đạt được mang tính thống kê cao do đo đạc với số lượng hạt rất lớn (chục-trăm nghìn hạt). Đặc biệt do không cần lấy mẫu, phương pháp này không làm thay đổi trạng thái tập hợp hạt. Điều này cực kỳ quan trọng đối với việc nghiên cứu các hệ

thống động (dynamic systems) như kết tụ do điện tích bề mặt của protein, vỡ-sinh hạt trong kỹ thuật tạo hạt được phẩm, kích thước bọt khí hay giọt lỏng trong hệ dị thể lỏng-khí hay lỏng-lỏng, v.v. đều là những đại lượng có thể phân tích định lượng nhờ kỹ thuật này. Hai thí dụ được giới thiệu trong bài báo này bao gồm quá trình kết tinh và quá trình sinh học đã minh họa hiệu năng của việc ứng dụng kỹ thuật mới trong việc đo đạc trực tuyến các quá trình động. Ngoài ra còn có nhiều ứng dụng khác đã được công bố trên các tạp chí chuyên ngành như trong thực phẩm, phản ứng dị thể, v.v. Tóm lại, khả năng ứng dụng đa dạng và là công cụ mạnh trong việc đánh giá các quá trình công nghệ khiến cho việc sử dụng kỹ thuật phản xạ Laser trở nên cấp thiết trong nghiên cứu phát triển học thuật cũng như cho các ngành công nghiệp, đặc biệt trong các môi trường khắc nghiệt, dễ cháy nổ, đòi hỏi tự động hóa cao.

Review.

Advanced methods for *in situ* chemical and bio processes analysis based on the Laser back-reflectance measurement technology

- **Le Minh Tam**
- **Friedel H. Schwartz**
Sequip S&E GmbH, Düsseldorf, Germany

ABSTRACT

Determination of the particle size distribution (PSD) is one of the most important tasks to monitor and control for most of chemical and bio-processes. In continuous movement of particles under effects of the carrying fluid, PSD determination is a technically challenging. This

article summarizes some researches in which Laser back reflectance measurement method was used for in-situ and in real time PSD analysis. Two processes are selected to introduce including: crystallization of the amino acid L-arginine and biological processes.

Keywords: *particle size distribution, Laser back reflectance measurement, in-situ chemical and bio-process monitoring*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. F. Schwartz, J. Schwartz, Proceeding of BIWIC 2012, 19th International Workshop on Industrial Crystallization, China (2012).
- [2]. FDA, Pharmaceutical cGMPs for the 21st century – A risk based approach, Final Report, September 2004
- [3]. T. Allen, Powder sampling and particle size determination, Elsevier (2003).
- [4]. D. Sarkar, D.X. Tien, Z. Ying, R. Srinivasan, In situ particle size estimation for crystallization processes by multivariate image analysis, *Chem. Eng. Sci.*, 64, 9–19 (2009).
- [5]. Z. Stojanovic, S. Markovic, Determination of particle size distributions by Laser diffraction, *Technics – New Materials*, 21, 10-22 (2012).
- [6]. <http://www.sequip-particle-technology.de>
- [7]. D. Torres-Martínez, R. Melgarejo-Torres, M. Gutiérrez-Rojas, L. Aguilera-Vázquez, M. Micheletti, G.J. Lye, S. Huerta-Ochoa, Hydrodynamic and oxygen mass transfer studies in a three-phase (air–water–ionic liquid) stirred tank bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, 45, 3, 209–217 (2009).
- [8]. R. Melgarejo-Torres, D. Torres-Martínez, M. Gutiérrez-Rojas, A. Gómez de Jesús, G.J. Lye, S. Huerta-Ochoa, Regime analysis of a Baeyer-Villiger bioconversion in a three phase (air-water-ionic liquid) stirred tank bioreactor, *Biochemical Engineering Journal*, 58, 87–95 (2011).
- [9]. C. Hahn, S. Wille, G. Migliore, L. Mertz, J. Weiss, J. Hinrichs, Inline messung von mikrogelpartikel in frischkäse, *DMW – Die Milchwirtschaft*, 11, 422–425 (2012).
- [10]. A. Brognaux, J. Bugge, F.H. Schwartz, P. Thonart, S. Telek, F. Delvigne, Real-time monitoring of cell viability and cell density on the basis of a three dimensional optical reflectance method (3D-ORM): investigation of the effect of sub-lethal and lethal injuries, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 7, 679–686 (2013).
- [11]. T. Mallik, T. Kar, G. Bocelli, A. Musatti, Structural and thermal characterization of L-arginine dihydrate - a nonlinear optical material, *Crystal Research and Technology*, 41, 3, 280–284 (2006).
- [12]. L.M. Tam, Solubility and Induction Time of the L-enantiomer of amino acid arginine determination with *in situ* 3D-ORM, 20th International Workshop on Industrial Crystallization, Danmark, 373–379 (2013).
- [13]. H. Lorenz, D. Polenske, A.S. Morgenstern, Application of preferential crystallization to resolve racemic compounds in a hybrid process, *Chirality*, 18, 10, 828–840 (2006).
- [14]. Y. Lu, X. Wang, C.B. Ching, Application of preferential crystallization for different types of racemic compounds, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 15, 7266–7275 (2009).
- [15]. G. Festel, J. Knöll, H. Götz, H. Zinke, Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie, *Chemie Ingenieur Technik*, 76, 3, 307–312 (2004).
- [16]. L. Helmdach, F. Schwartz, J. Ulrich, Process control using advanced particle analyzing systems: applications from crystallization to fermentation processes, *Chem. Eng. Technol.*, 37, 2, 213–220 (2014).
- [17]. Y.V. Frenkel, A.D. Clark, K. Das, Y.H. Wang, P.J. Lewi, P.A. Janssen, E. Arnold, Concentration and pH dependent aggregation of hydrophobic drug molecules and relevance for oral bioavailability, *J. Med. Chem.*, 48, 1974–1983 (2005).
- [18]. L. Pohjala, P. Tammela, Aggregating behavior of phenolic compounds - a source of false bioassay results?, *Molecules*, 17, 10774–10790 (2012).