CK.0000069655

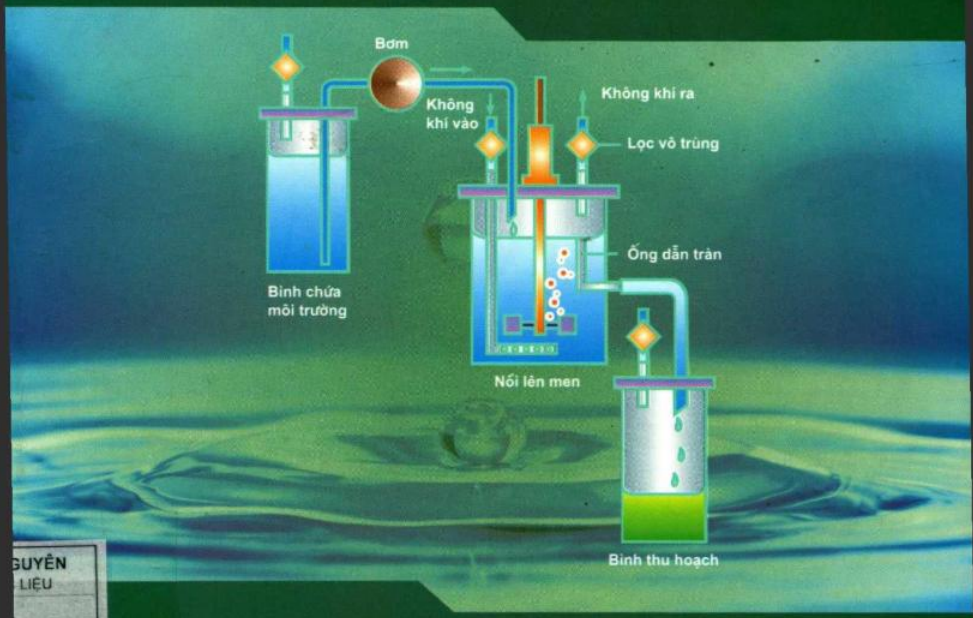
https://nhathuocngocanh.com/

BỘ Y TẾ

Công nghệ
SINH HỌC DƯỢC

(DÙNG CHO ĐÀO TẠO DƯỢC SĨ ĐẠI HỌC)

Chủ biên: GS. TS. NGUYỄN VĂN THANH



GUYỄN
LIỆU

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

https://nhathuocngocanh.com/

https://nhathuocngocanh.com/

BỘ Y TẾ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC DƯỢC

(DÙNG CHO ĐÀO TẠO DƯỢC SĨ ĐẠI HỌC)

MÃ SỐ: Đ.20.Z.09

(Tái bản lần thứ nhất)

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC VIỆT NAM

https://nhathuocngocanh.com/

Chỉ đạo biên soạn

VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO – BỘ Y TẾ

Chủ biên

GS.TS. NGUYỄN VĂN THANH

Những người biên soạn

GS.TS. NGUYỄN VĂN THANH
TS. TRẦN CÁT ĐÔNG
PGS.TS. TRẦN THU HOA
PGS.TS. BÙI TÙNG HIỆP
TS. NGUYỄN TRỌNG HIỆP
ThS. HUỲNH THỊ NGỌC LAN

Tham gia tổ chức bản thảo

ThS. PHÍ VĂN THÂM
TS. NGUYỄN MẠNH PHA

https://nhathuocngocanh.com/

LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện một số điều của Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục & Đào tạo và Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo Dược sĩ đại học. Bộ Y tế tổ chức biên soạn tài liệu dạy – học các môn cơ sở và chuyên môn theo chương trình trên nhằm từng bước xây dựng bộ sách đạt chuẩn chuyên môn trong công tác đào tạo nhân lực y tế.

Cuốn **Công nghệ sinh học Dược** được biên soạn dựa vào chương trình giáo dục của khoa Dược Đại học Y–Dược Tp. Hồ Chí Minh trên cơ sở chương trình khung đã được phê duyệt. Sách được các giáo sư, tiến sĩ, các nhà giáo có kinh nghiệm của Bộ môn Vi sinh – ký sinh biên soạn theo phương châm: kiến thức cơ bản, hệ thống; nội dung chính xác, khoa học; cập nhật các tiến bộ khoa học, kỹ thuật hiện đại và thực tiễn Việt Nam.

Cuốn **Công nghệ sinh học Dược** đã được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách và tài liệu dạy – học chuyên ngành Dược sĩ đại học của Bộ Y tế thẩm định năm 2009. Bộ Y tế quyết định ban hành là tài liệu dạy – học đạt chuẩn chuyên môn của Ngành trong giai đoạn hiện nay. Trong thời gian từ 3 đến 5 năm, sách phải được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật.

Bộ Y tế chân thành cảm ơn các tác giả và Hội đồng chuyên môn thẩm định đã giúp hoàn thành cuốn sách; cảm ơn GS.TSKH. Nguyễn Văn Dịp và PGS.TS. Cao Văn Thu đã đọc và phản biện để cuốn sách sớm hoàn thành, kịp thời phục vụ cho công tác đào tạo nhân lực y tế.

Lần đầu xuất bản, chúng tôi mong nhận được ý kiến đóng góp của đồng nghiệp, các bạn sinh viên và các độc giả để lần xuất bản sau sách được hoàn thiện hơn.

VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO – BỘ Y TẾ

https://nhathuocngocanh.com/

https://nhathuocngocanh.com/

LỜI NÓI ĐẦU

Công nghệ sinh học đã xuất hiện từ khi loài người còn chưa có hiểu biết đầy đủ về các hệ thống sống. Các công nghệ sơ khai này được hình thành nhờ kinh nghiệm và chủ yếu liên quan đến việc chế biến thực phẩm và đồ uống lên men. Đến thế kỷ XIX, khi Louis Pasteur đặt nền móng cho vi sinh học thực nghiệm, công nghệ sinh học bước vào thời kỳ mới dựa trên khoa học sinh học. Từ lúc đó, công nghệ lên men hiện đại đã được phát triển để sản xuất các chất chuyển hóa từ vi sinh vật nhằm phục vụ đời sống và các ngành công nghiệp khác. Cũng trong thời kỳ này, vaccin đã được phát minh và đây có thể coi là sản phẩm công nghệ sinh học dược đầu tiên, nhưng một ngành công nghiệp sinh học dược thực sự chưa được hình thành.

Sự ra đời của công nghiệp sinh học dược thực sự được đánh dấu bằng việc sản xuất penicillin và streptomycin nhờ công nghệ lên men vào những năm 1940. Đến cuối những năm 1970, công nghệ sinh học dược đã bước vào một giai đoạn mới với việc sản xuất insulin người bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Chính việc áp dụng mạnh mẽ công nghệ gen trong sản xuất các protein trị liệu đã làm cho công nghệ sinh học dược trở thành động lực chính để đưa công nghệ này vào giai đoạn hiện đại với sự hội tụ của công nghệ gen và công nghệ lên men. Ngày nay, công nghệ sinh học dược vẫn dựa trên nền tảng công nghệ lên men để sản xuất ra sản phẩm, nhưng việc phát triển các sản phẩm mới chủ yếu dựa vào công nghệ gen, enzym và tế bào. Mặt khác, các hệ thống sản xuất không còn là tế bào vi sinh vật nữa mà có thể là tế bào động vật, thực vật, sinh vật chuyển gen và thậm chí các hệ thống phi sinh vật.

Công nghệ sinh học dược ngày nay đóng vai trò quan trọng đối với ngành Dược. Trong các năm gần đây, thuốc công nghệ sinh học chiếm đa số các thuốc mới được phát triển và cấp phép. Các hãng dược phẩm lớn trên thế giới đều có bộ phận công nghệ sinh học rất mạnh hoặc sáp nhập với các hãng công nghệ sinh học. Công nghệ sinh học trong ngành Y–Dược chiếm đến 80–90% tổng doanh thu của công nghệ sinh học nói chung. Dược phẩm công nghệ sinh học hiện nay không còn là các sản phẩm chuyển hóa vi sinh vật mà chủ yếu là các protein tái tổ hợp, acid nucleic và tế bào.

Trong sách này, chúng tôi cố gắng khái quát các công nghệ nền tảng của công nghệ sinh học dược và cung cấp các thí dụ về công nghệ sản xuất của một số dược phẩm cụ thể. Sách được chia làm năm chương tương ứng với các công nghệ nền đó là: công nghệ lên men, công nghệ enzym, công nghệ tế bào, công nghệ gen và công nghệ miễn dịch, trong mỗi chương đều có khái quát các vấn đề chung của công nghệ và ứng dụng sản xuất một số sản phẩm cụ thể.

Sách được xuất bản lần đầu do đó không tránh khỏi thiết sót, rất mong nhận được sự đóng góp ý kiến của bạn đọc.

CÁC TÁC GIẢ

https://nhathuocngocanh.com/

https://nhathuocngocanh.com/

MỤC LỤC

Lời giới thiệu 3
Lời nói đầu 5
***Bài 1.* Mở đầu** 9
1. Khái niệm 9
2. Sự phát triển của Công nghệ sinh học thế giới 13
3. Sự phát triển của Công nghệ sinh học Việt Nam 14
4. Phát triển Công nghệ sinh học Việt Nam đến năm 2020 16

Chương 1. CÔNG NGHỆ LÊN MEN 20
***Bài 2.* Khái niệm và phương pháp lên men công nghiệp** 20
1. Đại cương 20
2. Chủng vi sinh vật 21
3. Môi trường lên men 36
4. Hệ thống lên men 46
5. Giám sát quá trình lên men 58
***Bài 3.* Sản xuất kháng sinh** 61
1. Mở đầu 61
2. Sản xuất benzylpenicillin 62
3. Sản xuất penicillin V 68
4. Sản xuất cephalosporin C 68
5. Sản xuất erythromycin 72
***Bài 4.* Thực phẩm chức năng** 81
1. Khái niệm 81
2. Prebiotic 83
3. Probiotic 85
4. Những khuynh hướng trong tương lai 100
***Bài 5.* Sản xuất một số sản phẩm lên men khác** 103
1. Sản xuất acid hữu cơ 103
2. Sản xuất acid amin bằng con đường lên men 118
3. Sản xuất một số vitamin 132

Chương II. CÔNG NGHỆ ENZYM 145
***Bài 6.* Khái quát về công nghệ enzym – protein** 145
1. Khái niệm 145
2. Xúc tác sinh học 146
3. Nguồn cung cấp enzym 149
5. Enzym cố định 158
***Bài 7.* Ứng dụng enzym trong ngành Dược** 170
1. Enzym trị liệu 170
2. Sản xuất thuốc bằng công nghệ enzym 181

https://nhathuocngocanh.com/

Chương III. CÔNG NGHỆ TẾ BÀO 191
***Bài 8.* Công nghệ nuôi cấy tế bào và ứng dụng trong ngành Y–Dược** 191
1. Công nghệ nuôi cấy tế bào 191
2. Ứng dụng công nghệ nuôi cấy tế bào 198
***Bài 9.* Công nghệ tế bào gốc** 201
1. Khái niệm 201
2. Triển vọng và khó khăn trong việc ứng dụng tế bào gốc 207
3. Sản xuất phôi IVF (in vitro fertility) 209

Chương IV. CÔNG NGHỆ GEN 211
***Bài 10.* Công cụ và kỹ thuật cơ bản** 211
1. Lược sử công nghệ gen 211
2. Công cụ cơ bản 212
3. Kỹ thuật thao tác gen 220
4. Tối ưu hóa sự biểu hiện của gen tái tổ hợp 225
***Bài 11.* Ứng dụng công nghệ gen** 230
1. Sản xuất protein tái tổ hợp 230
2. Liệu pháp gen 249
***Bài 12.* Các phương pháp chẩn đoán phân tử** 255
1. Những phương pháp cơ bản trong chẩn đoán phân tử 256
2. Ứng dụng của chẩn đoán phân tử 272

Chương V. CÔNG NGHỆ MIỄN DỊCH 283
***Bài 13.* Sản xuất vaccin** 283
1. Mở đầu 283
2. Phân loại vaccin 284
3. Phương pháp sản xuất vaccin 286
4. Tá chất miễn dịch 293
***Bài 14.* Huyết thanh và kháng thể** 297
1. Lịch sử hình thành 297
2. Các chế phẩm gamma globulin 298
3. Dự phòng bằng globulin huyết thanh miễn dịch 301
4. Dự phòng bằng globulin miễn dịch cao 302
5. Miễn dịch liệu pháp với kháng thể đơn dòng 303
6. Miễn dịch liệu pháp trong điều trị ung thư 303
Đáp án Tự lượng giá 305
Tài liệu tham khảo và đọc thêm 306
Mục lục tra cứu (index) 308

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 1

MỞ ĐẦU

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các khái niệm về công nghệ sinh học và công nghệ sinh học dược.

2. Trình bày được quá trình phát triển của công nghệ sinh học thế giới và Việt Nam.

3. Chỉ ra được các đặc điểm chính của công nghệ sinh học.

1. KHÁI NIỆM

1.1. Định nghĩa

Thuật ngữ "***công nghệ sinh học***" lần đầu tiên được nhắc đến bởi Karl Ereky, một kỹ sư người Hungary vào năm 1919. Lúc bấy giờ, nó nhằm chỉ kiểu sản xuất trong đó sản phẩm được tạo ra từ nguyên liệu đầu với sự trợ giúp của sinh vật sống. Ereky đã hình dung ra một "thời đại hóa sinh" tương tự như "thời đồ đá" và "thời đồ sắt".

Ngày nay, có nhiều định nghĩa về công nghệ sinh học, tuy nhiên định nghĩa ***công nghệ sinh học*** là "bất kỳ công cụ nào được sử dụng để thao tác trên các sinh vật, các hệ thống sinh học hay một phần của nó để tạo ra sản phẩm hay dịch vụ" được công nhận rộng rãi. Từ định nghĩa này ta có thể thấy rằng, ngay cả trước khi loài người hiểu được sinh học là gì họ đã sử dụng Công nghệ sinh học (CNSH) để sản xuất rượu và bánh mì, đã biết biến đổi các đặc tính tự nhiên của sinh vật nhằm thu các sản phẩm có lợi. Với kinh nghiệm và các kiến thức tích lũy được đến nay CNSH đã có tầm ảnh hưởng sâu rộng đến nhiều khía cạnh đời sống con người, mở ra nhiều triển vọng về năng suất nông nghiệp hay điều trị bệnh tật, cải thiện chất lượng cuộc sống.

Với việc tích lũy kiến thức và kinh nghiệm với các kỹ thuật sinh học hiện đại, định nghĩa CNSH được mở rộng bao gồm các ứng dụng của công nghệ tái tổ hợp di truyền, công nghệ nuôi cấy tế bào trong sản xuất và dịch vụ. CNSH hiện đại và cổ điển không khác nhau về nguyên lý nhưng khác nhau về kỹ thuật được sử dụng. Ví dụ, việc cải thiện di truyền cổ điển và các kỹ thuật di truyền phân tử có cùng mục đích nhằm cải thiện sản phẩm để thu được nhiều lợi ích hơn, tuy nhiên, các cải tiến ở mức phân tử cho kết quả chắc chắn hơn. Hầu hết các thuộc tính của sản phẩm sinh học đều được biến đổi theo hướng có lợi bởi nhà sản xuất. Phương pháp

https://nhathuocngocanh.com/

cổ điển để biến đổi một tính trạng nào đó cần nhiều thời gian và quan trọng hơn nó phụ thuộc nhiều vào sự tồn tại của thuộc tính đó trong tự nhiên. Ví dụ, để cải thiện tính đề kháng với sâu bệnh, các nhà khoa học cần tìm ra nguồn cung cấp kiểu gen đề kháng tương thích với loài cần cải tạo mới có thể lai được. Đôi khi điều này gần như không thể được vì tính trạng đó không tồn tại trong kho dự trữ gen của loài hoặc các loài lân cận. Với công nghệ gen, người ta có thể đưa một gen đề kháng như vậy từ một loài không tương thích vào loài cần cải thiện với kết quả tin cậy được mà không cần quan tâm đến sự tương thích về bộ máy sinh sản giữa hai loài. Điều này cho phép mở rộng gần như vô hạn kho dự trữ gen.

Công nghệ sinh học hiện đại được thực hiện ở mức độ phân tử, nghĩa là các giới hạn trước đây có liên quan đến loài đều không còn nữa. Đó là vì tất cả các loài đều chứa ADN, phân tử mang toàn bộ thông tinh di truyền với mã di truyền phổ biến cho tất cả các loài. Các phân tử ADN này có thể được thao tác, xử lý, biến đổi bên trong hay bên ngoài tế bào, có thể di chuyển từ tế bào này sang tế bào khác, vượt qua các biên giới của loài sinh học.

1.2. Phân loại công nghệ sinh học

Theo sự phát triển của kỹ thuật sản xuất, CNSH được được chia làm ba thế hệ:

– ***Thế hệ một:*** sản xuất các sản phẩm thực phẩm và nước uống lên men. Kỹ thuật được sử dụng bao gồm lên men hở với giống tự nhiên và phần lớn là chưa được biết rõ, nuôi trồng và nuôi cấy mô thực vật. Giống sản xuất được cải tiến thông qua chọn lọc tự nhiên hay lai tạo.

– ***Thế hệ hai:*** sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào hay nuôi cấy mô để sản xuất. Sản phẩm của thế hệ này gồm kháng sinh, enzym, vitamin, acid amin, acid hữu cơ, dung môi. Kỹ thuật được sử dụng bao gồm gây đột biến và chọn lọc chủng vi sinh vật và phương pháp lên men kín, thuần chủng, được tối ưu hóa để sinh sản phẩm tối đa.

– ***Thế hệ ba*** chính là ***CNSH hiện đại***. Nó bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp di truyền. Ứng dụng công nghiệp của nó bao gồm dược phẩm, nông nghiệp, hóa chất, y học. Các sản phẩm hiện nay đang là các protein trị liệu, chẩn đoán, vaccin thế hệ hai, ba, cải tạo giống nông nghiệp và xử lý môi trường.

Cần lưu ý rằng ngày nay tất cả các thế hệ CNSH đều sử dụng các kỹ thuật của thế hệ ba, bất kể họ sử dụng công nghệ thế hệ một, hai hay ba để sản xuất. Do đó phát triển CNSH cần đặt trọng tâm phát triển các kỹ thuật thế hệ ba để tạo tiền đề thúc đẩy chung.

Xét về phạm vi ứng dụng CNSH có thể được chia là ba loại:

– Công nghệ sinh học xanh (Green Biotechnology): CNSH áp dụng trong nông nghiệp và xử lý môi trường.

https://nhathuocngocanh.com/

– Công nghệ sinh học trắng (White Biotechnology): sử dụng xúc tác sinh học và công nghệ lên men để tạo ra các sản phẩm công nghiệp như hóa chất hay enzym.

– Công nghệ sinh học đỏ (Red Biotechnology): CNSH ứng dụng trong Y–Dược. Chẩn đoán và điều trị bệnh. Sản xuất dược phẩm.

1.3. Kỷ nguyên công nghệ sinh học hiện đại

Công nghệ sinh học hiện đại với những tiềm năng ứng dụng to lớn đã thu hút sự quan tâm của nhiều người, tuy nhiên nó cũng làm một số người e ngại và thậm chí phản đối. Hai đặc điểm chính của CNSH là nguyên nhân của sự e ngại này là tốc độ áp dụng của nó trong nhiều lĩnh vực kinh tế trong các năm gần đây và cách tiếp cận đột ngột của nó vào thị trường tiêu dùng. Có thể thấy, ví dụ, thời gian từ lúc phát hiện ra công nghệ đến lúc sản phẩm có mặt trên thị trường được rút ngắn rất nhiều so với 50 – 100 năm trước đây. Trước đây, một sáng chế, như máy truyền hình, từ lúc phôi thai phải mất 20 – 30 năm mới phổ biến. Nhưng ngày nay, nhiều sản phẩm CNSH, như thực phẩm biến đổi gen, đã được đưa ra sử dụng trên thị trường ngay cả trước khi mọi người có được nhận thức đầy đủ về nó. Sự thiếu nhận thức của công chúng đã tạo ra tâm lý sợ hãi đối với các sản phẩm của CNSH.

Có thể so sánh với thời điểm mà động cơ hơi nước và các dây chuyền công nghiệp được phát minh. Khi đó người ta sợ hãi trước sự cải thiện năng suất mà các phát minh này đem lại.

Bảng 1.1. So sánh thời gian phát triển và thương mại hóa một số công nghệ

Công nghệ	Phát minh	Bắt đầu sản xuất	Thời gian phát triển
Viết máy	1888	1938	50 năm
Truyền hình	1907	1936	29 năm
Giống cây trồng biến đổi gen	1983	1994	11 năm

1.4. Các đặc điểm của công nghệ sinh học

1. ***Là một kỹ thuật đa năng***. Ứng dụng rộng rãi, và có tính chuyển đổi qua lại giữa các lĩnh vực, ví dụ một kỹ thuật được áp dụng cho y tế cũng có thể được sử dụng cho nông nghiệp.

2. ***Đòi hỏi mức độ nghiên cứu cao***. Tỷ lệ đầu tư cho nghiên cứu để phát triển một sản phẩm mới cao hơn các ngành khác 5 – 10 lần và chiếm đến 40 – 50% lợi tức. Do đó, sự liên hệ giữa các cơ sở hàn lâm với cơ sở ứng dụng sản xuất phải hết sức chặt chẽ.

https://nhathuocngocanh.com/

3. ***Đa lĩnh vực***. Hội tụ của nhiều lĩnh vực khoa học công nghệ khác nhau như di truyền học, hóa sinh, công nghệ thông tin, cơ khí tự động hóa,...

4. ***Có tính hợp tác cao***. Để tạo được ứng dụng công nghiệp, CNSH phải có được sự phối hợp chặt chẽ và đồng bộ giữa năng lực nghiên cứu, cơ khí tự động hóa và sự phát triển của công nghệ sản xuất mới. Cần thiết phải phối hợp các lĩnh vực có liên quan tạo thành một mạng lưới chặt chẽ mới đảm bảo được đầu ra của công nghệ.

1.5. Công nghệ sinh học Y–Dược

Công nghệ sinh học Y–Dược (CNSHYD): được nhắc đến như là CNSH đỏ, là lĩnh vực CNSH tạo ra các sản phẩm phục vụ cho việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe con người. Trên thế giới CNSHYD là một mũi nhọn của CNSH và là lĩnh vực đang được đầu tư nghiên cứu mạnh nhất, tạo ra nhiều lợi nhuận nhất.

Các đặc điểm của CNSHYD

1. ***Đòi hỏi mức độ đầu tư cho nghiên cứu cao***: nhu cầu về chăm sóc và bảo vệ sức khỏe là các nhu cầu hết sức cấp bách trong khi quá trình phát triển sản phẩm lại phức tạp do đặt nặng các vấn đề về an toàn, độ chính xác, độ tin cậy. Do đó, để có được sản phẩm cần phải đầu tư lớn về tài chính và nhân lực cho nghiên cứu, mới có thể rút ngắn thời gian phát triển và tạo ưu thế cạnh tranh.

2. ***Quy mô vừa và nhỏ***. Do khối lượng thành phẩm cần có để đáp ứng nhu cầu không lớn như các lĩnh vực khác như nông nghiệp hay hóa chất nên quy mô sản xuất của các quá trình CNSHYD thường từ nhỏ đến trung bình.

3. ***Tỷ lệ đầu tư nghiên cứu cao hơn sản xuất***: do quy mô sản xuất nhỏ nên đầu tư cho thiết bị sản xuất thường thấp; đầu tư chủ yếu tập trung cho nghiên cứu.

4. ***Có tính phối hợp cao***: để có được ứng dụng, CNSHYD đòi hỏi sự hợp tác chặt chẽ giữa các ngành sinh học, hóa học, dược lý học, dược động học, bào chế. Quá trình phát triển một sản phẩm CNSHYD cần sự phối hợp giữa cơ sở nghiên cứu với cơ sở Y–Dược mới có thể triển khai các thử nghiệm lâm sàng và đảm bảo các vấn đề về an toàn và y đức.

Sản phẩm của CNSHYD

– ***Chẩn đoán y học***: các công cụ chẩn đoán dựa trên ADN, enzym, miễn dịch học.

– ***Dự phòng bệnh***: vaccin, đặc biệt là vaccin thế hệ hai (subunit vaccin) và thế hệ ba (ADN vaccin).

– ***Điều trị bệnh***: các công cụ và nền tảng cần cho

+ Liệu pháp gen

+ Liệu pháp miễn dịch

+ Liệu pháp tế bào gốc

https://nhathuocngocanh.com/

– *Dược phẩm*:

+ Dược phẩm tái tổ hợp: hormon, enzym tái tổ hợp, protein trị liệu.

+ Thuốc có nguồn gốc từ sinh vật như kháng sinh, enzym, coenzym, vitamin, probiotic, prebiotic, steroid, các chất có hoạt tính sinh học như taxol,...

+ Hệ thống chuyển giao thuốc: thuốc được bao trong các màng sinh học có gắn các phân tử định hướng đến nơi cần điều trị nhờ hệ thống thụ thể, do đó làm tăng hiệu quả sử dụng, giảm liều lượng và độc tính của thuốc.

+ Thuốc và nguyên liệu thuốc tổng hợp bằng con đường xúc tác sinh học: thay thế xúc tác hóa học bằng xúc tác sinh học để đơn giản hóa quá trình tổng hợp nguyên liệu thuốc, do đó giảm giá thành, tăng khả năng cạnh tranh. Đặc biệt gần đây các dược phẩm tinh khiết quang học có tính đặc hiệu và hiệu quả cao hơn trong khi độc tính và độ an toàn cao hơn so với dạng hỗn hợp tiêu triền là một lĩnh vực mới trong tổng hợp nguyên liệu thuốc mà xúc tác sinh học là lựa chọn bắt buộc.

+ Các dược liệu quý bằng con đường nuôi cấy mô, nuôi cấy tế bào.

2. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC THẾ GIỚI

Từ bình minh của nhân loại, người ta đã sử dụng các hệ thống sống để tạo ra sản phẩm, chủ yếu là lương thực, thực phẩm. Cây trồng, vật nuôi đã được lai tạo, vi sinh vật đã được sử dụng để sản xuất thực phẩm như rượu, bia, phô–mát và bánh mì, mặc dù bản chất và cơ chế của quá trình hoàn toàn không được hiểu rõ.

Từ thế kỷ XIX, cùng với sự phát hiện ra vi sinh vật, các khám phá của Mendel đã đặt nền móng cho các quá trình lên men thuần chủng, khái niệm lên men vô trùng qua các công trình của Koch, Pasteur, và Lister.

Trong Thế chiến I, CNSH đã được sử dụng để sản xuất aceton từ tinh bột dùng cho công nghiệp sơn, phục vụ cho kỹ nghệ xe hơi. Các nghiên cứu trong những năm 1930 nhắm đến việc gia tăng năng suất sản phẩm nông nghiệp để cung cấp cho công nghiệp thay vì nhập khẩu. Thế chiến II đã thúc đẩy quá trình sản xuất penicillin để phục vụ quân đội. Và từ đó CNSH hướng đến việc sản xuất dược phẩm và các hóa chất công nghiệp. Khái niệm vũ khí sinh học và chiến tranh sinh học cũng ra đời trong thời kỳ này. Bên cạnh đó CNSH trong nông nghiệp, thuốc trừ sâu sinh học, chế biến thực phẩm, sản xuất năng lượng cũng phát triển vượt bậc.

Nửa sau của thế kỷ XX, cùng với sự phát hiện cấu trúc ADN và sự phát triển của ngành Sinh học phân tử, các công cụ thao tác gen dần dần được phát hiện và lần đầu tiên vào năm 1973 Stanley Cohen đã thành công trong việc tạo ra phân tử di truyền mới hoạt động được *in vitro* bằng việc sử dụng enzym giới hạn và

https://nhathuocngocanh.com/

ligase, mở ra kỷ nguyên CNSH hiện đại. Năm 1976, trên cơ sở thành tựu của Stanley Cohen, công ty Genetech (California, Mỹ) được thành lập và đến năm 1978 đã tạo dòng thành công insulin người vào vi khuẩn *E. coli*. Năm 1982, insulin người tái tổ hợp trong *E. coli* được cấp phép lưu hành bởi FDA, mở đầu cho hàng loạt dược phẩm tái tổ hợp ra đời.

Năm 1997, I. Wilmut công bố việc nhân bản vô tính động vật và tạo cừu Doly, mở ra triển vọng nhân bản nhiều loại động vật từ tế bào soma. Thomson và cộng sự (1998) đã công bố việc phân lập được các dòng tế bào gốc phôi (embryonic stem cell) từ phôi nang (blastocyst) người. Sau 4,5 tháng các tế bào này vẫn giữ nguyên khả năng phát triển thành các tế bào biểu mô, sụn, xương, cơ trơn, thần kinh, da. Đó là những cơ sở đầu tiên của công nghệ tế bào gốc.

Ngày 26/6/2000, lần đầu tiên công bố kết quả giải trình tự bộ gen người (Human Genome Project– HGP). Tháng 2–2001, công bố tiếp những kết quả phân tích chi tiết hơn và tháng 4/2003 "Giải mã bộ gen người" đã ở dạng hoàn chỉnh. Thành tựu to lớn này mở ra những triển vọng to lớn cho sinh học phân tử, di truyền học, hóa sinh học, và công nghệ sinh học.

Năm 2000, mức tiêu thụ sản phẩm CNSH hiện đại trên 50 tỷ USD và dự kiến sẽ tăng nhanh trong những năm sắp đến.

Khác với CNSH truyền thống, CNSH hiện đại sử dụng các tác nhân sinh học đã được cải thiện bằng kỹ thuật gen để chuyển hóa nguyên liệu thành sản phẩm với mục tiêu là năng suất chất lượng và thích ứng rộng đối với các điều kiện ngoại cảnh thay đổi. Sản phẩm cụ thể của CNSH hiện đại là các protein tái tổ hợp, các sản phẩm chuyển hóa được tách chiết, tinh chế để sử dụng trong y tế để bảo vệ sức khỏe con người và các ngành khác.

Các công nghệ nền của CNSH hiện đại là công nghệ gen, công nghệ tế bào (vi sinh vật, động vật, thực vật), công nghệ lên men (fermentation technology) và công nghệ enzym (enzym technology) trong đó công nghệ gen là cốt lõi.

3. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VIỆT NAM

3.1. Những tiền đề quan trọng

Ngày 1–1–1889, Viện Pasteur Paris được thành lập. Tại đây những học trò của Pasteur như Calmette và Guierin đã làm ra vaccin chống lao (BCG), Emile Roux phát minh việc trị liệu bằng huyết thanh và tìm ra thuốc trị bệnh bạch hầu.

Năm 1891, Viện Pasteur Sài Gòn, chi nhánh đầu tiên của Viện Pasteur ở nước ngoài đã được thành lập và Albert Calmette là giám đốc đầu tiên. Năm ấy Calmette mới 27 tuổi, ông tiếp nhận một phòng thí nghiệm đơn sơ tại Viện quân y Grall (Bệnh viện nhi đồng II Tp HCM ngày nay). Trong vòng không đầy 3 năm

https://nhathuocngocanh.com/

Calmette đã sản xuất được vaccin đậu mùa, vaccin chống dại, men làm nếp rượu và bước đầu triển khai công trình làm huyết thanh chống nọc rắn hổ mang.

Năm 1893, Alexandre Yersin nối nghiệp Calmette. Vào những năm 1895–1896, Yersin bắt đầu xây dựng Viện Pasteur Nha Trang và trại chăn nuôi ngựa Suối Dầu để chế huyết thanh. Ông cũng di thực cây Canhkina làm thuốc chống sốt rét và cây cao su góp phần phát triển kinh tế. Yersin là người phát hiện ra vi khuẩn dịch hạch và năm 1895 cùng với E. Roux đã nghiên cứu thành công cách chế huyết thanh miễn dịch điều trị người bị bệnh dịch hạch.

Năm 1925, Viện Pasteur Hà Nội được thành lập. Năm 1936, Viện Đà Lạt và các Viện Pasteur Đông Dương khác được đặt dưới sự chỉ đạo của Paris.

3.2. Giai đoạn từ 1945 đến nay

Năm 1949, BS. Nguyễn Văn Hưởng ở vùng kháng chiến đã sản xuất được vaccin phòng đậu mùa, tả, thương hàn.

Năm 1950, BS. Phạm Ngọc Thạch và BS. Đặng Văn Ngữ đã nuôi cấy nấm Penicillium lấy dịch nuôi cấy để rửa vết thương cho thương binh. BS. Đặng Văn Ngữ trực tiếp sản xuất dịch thô penicillin ở chiến khu Việt Bắc.

Công nghiệp vaccin: công ty vaccin và chế phẩm sinh học I Hà Nội và Viện Vaccin và chế phẩm sinh học Nha Trang đã sản xuất đủ lượng vaccin phòng bệnh hàng năm ở nước ta: vaccin viêm gan B (trên 4 triệu liều), vaccin viêm não Nhật Bản (trên 3 triệu liều), vaccin tả uống (trên 400 ngàn liều), vaccin dại (150 ngàn liều), và các loại vaccin khác như BCG (Viện Pasteur Tp HCM), vaccin thương hàn, ho gà và uốn ván.

Công nghiệp acid amin và lên men: công nghiệp rượu bia tiếp tục phát triển kể từ khi nhà máy rượu Sài Gòn ra đời và năm 1887.

Trong những năm của thập niên 1960: nhập nhà máy sản xuất bột ngọt (mì chính) và phát triển mạnh ở các tỉnh phía Nam.

Từ 1996, nhiều công ty liên doanh như Ajino–moto, Vedan... đã xây dựng nhà máy bột ngọt liên doanh.

Từ năm 1995 đến nay: các ứng dụng của CNSH hiện đại như chẩn đoán phân tử, chuyển gen động vật và thực vật, vi sinh vật tái tổ hợp, vaccin tái tổ hợp bắt đầu nghiên cứu tại các viện, trường trong nước. Gần đây nhất là các dự án sản xuất vaccin bằng virus trên tế bào thận khỉ tiên phát của Công ty vaccin và sinh phẩm I Hà Nội. Viện công nghệ sinh học đang phối hợp với viện vaccin Nha Trang nghiên cứu sản xuất vaccin H5N1 cho người bằng phương pháp nuôi cấy chủng NIBRG–14 giảm độc lực trên phôi gà. Gần đây Viện Pasteur TP. HCM đang dự định triển khai dự án nghiên cứu quy trình sản xuất vaccin cúm H5N1 dùng cho người bằng phương pháp nuôi cấy virus bất hoạt trên phôi gà và tế bào Vero.

https://nhathuocngocanh.com/

3.3. Thành tựu 30 năm phát triển công nghệ sinh học ở TP. Hồ Chí Minh

Một số kết quả điển hình trong việc ứng dụng và phát triển CNSH tại TP. HCM trước khi có Nghị quyết 18/CP có thể được tóm tắt như sau:

Trong sản xuất nông nghiệp, chú trọng các đề tài phục vụ sự phát triển của nông nghiệp ngoại thành để thỏa mãn nhu cầu thực phẩm và một phần lương thực cho nhân dân thành phố trên cơ sở thâm canh tăng năng suất và chất lượng sản phẩm. Đề tài sản xuất các chất kích thích sinh trưởng thực vật bằng vi sinh vật đã thành công trong việc sản xuất gibberellin ở quy mô phòng thí nghiệm và pilot. Đề tài nhân giống các cây trồng nông nghiệp bằng nuôi cấy mô đã thành công trong việc nhân giống nhiều cây trồng có giá trị như khoai tây, cà phê, chuối, mía, cam, quýt, đu đủ, phong lan, địa lan..., góp phần đưa TP. HCM trở thành một trung tâm mạnh của cả nước về công nghệ nuôi cấy mô thực vật, có khả năng chuyển giao công nghệ cho các địa phương khác. Đề tài sản xuất rau sạch bước đầu ứng dụng bẫy pheromon, thuốc trừ sâu vi sinh, thuốc thảo mộc... để hạn chế dư lượng thuốc trừ sâu trong rau, tạo cơ sở cho sự phát triển của sản xuất rau sạch phục vụ nhu cầu nhân dân thành phố.

Một số đề tài đã ứng dụng thành công vi sinh vật và enzym phục vụ lĩnh vực chế biến lương thực, thực phẩm: lên men bề mặt mật rỉ đường bằng nấm mốc để tạo acid citric ở quy mô pilot, lên men nước dừa bằng vi khuẩn để tạo thành dừa ở quy mô thương phẩm, sản xuất glucose và fructose bằng công nghệ enzym ở quy mô pilot, cải tiến chất lượng về mùi và màu củ nước mắm xuất khẩu...

Trong lĩnh vực bảo vệ môi trường, một số đề tài đã ứng dụng thành công vi sinh vật trong xử lý rác thành phân bón hữu cơ; phân lập và ứng dụng vi sinh vật trong tạo bùn hoạt tính để xử lý nước thải công nghiệp...

Cùng với hoạt động nghiên cứu và phát triển CNSH ở các viện, trường đại học, Chương trình CNSH TP.HCM đã tạo cơ sở khá vững chắc cho việc thực hiện Nghị quyết 18/CP của Chính phủ về phát triển CNSH.

4. PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VIỆT NAM ĐẾN NĂM 2020

Để đẩy mạnh việc nghiên cứu, phát triển và ứng dụng CNSH đến năm 2020, Đảng đã chỉ ra phương châm, mục tiêu, nhiệm vụ và giải pháp phát triển CNSH trong thời gian tới như sau:

Phương châm

1. Trên cơ sở tiếp nhận chuyển giao công nghệ, đẩy mạnh phát triển công nghệ nội sinh, đi thẳng vào công nghệ cao trong lĩnh vực CNSH nhằm vừa khai thác tối ưu, vừa bảo vệ và phát triển nguồn tài nguyên sinh vật của đất nước;

2. Không ngừng nâng cao tính cạnh tranh của các sản phẩm sinh học đồng thời đảm bảo sự phát triển bền vững;

https://nhathuocngocanh.com/

3. Huy động các nguồn lực của xã hội, các thành phần kinh tế tham gia phát triển CNSH.

Mục tiêu

1. Góp phần đẩy mạnh, nâng cao chất lượng sản phẩm, sức cạnh tranh của nông sản hàng hóa, tăng nhanh tỷ lệ nông sản chế biến xuất khẩu; giảm nhập khẩu, tiến tới cung cấp một phần nguyên liệu làm thuốc chữa bệnh thiết yếu cho nhân dân;

2. Xây dựng nền công nghiệp sinh học thành một ngành kinh tế – kỹ thuật công nghệ cao, sản xuất được một số sản phẩm chủ lực và có đóng góp xứng đáng cho GDP;

3. Phát triển CNSH đạt trình độ công nghệ tiên tiến trong khu vực;

4. Tạo ra phong trào ứng dụng CNSH rộng khắp trong quần chúng.

Nhiệm vụ

1. Ứng dụng rộng rải CNSH vào sản xuất và đời sống. Trong lĩnh vực nông lâm ngư nghiệp, CNSH phải góp phần quan trọng trong việc tạo ra các giống cây trồng, vật nuôi mới có năng suất, chất lượng và hiệu quả kinh tế cao, đóng góp thiết thực vào chuyển đổi cơ cấu kinh tế; tạo ra công nghệ chế biến nông sản nhằm đa dạng hóa và nâng cao chất lượng sản phẩm xuất khẩu. Trong lĩnh vực Y–Dược, CNSH có nhiệm vụ góp phần giảm nhập khẩu, từng bước tự túc các nguyên liệu làm thuốc; nhanh chóng áp dụng CNSH hiện đại vào khám chữa bệnh; tập trung nghiên cứu ứng dụng các công nghệ mũi nhọn để sản xuất vaccin thế hệ mới, các loại thuốc điều trị là protein tái tổ hợp, đưa các liệu pháp công nghệ gen, công nghệ tế bào vào điều trị các bệnh hiểm nghèo, các vi sinh vật tái tổ hợp để sản xuất kháng sinh, vitamin và acid amin. CNSH môi trường tập trung nghiên cứu, phát triển và ứng dụng rộng rải các công nghệ xử lý các chất thải rắn, lỏng, và ô nhiễm do sự cố tràn dầu.

2. Xây dựng và phát triển công nghiệp sinh học: tiến hành quy hoạch và đầu tư phát triển nền công nghiệp sinh học trong tất cả các lĩnh vực Nông nghiệp, Thủy sản, Y–Dược; trong đó đặc biệt chú trọng phát triển công nghiệp chế biến, công nghiệp nguyên liệu làm thuốc, vaccin thế hệ mới và các ngành công nghiệp phụ trợ.

3. Phát triển tiềm lực khoa học và công nghệ của CNSH. Mở rộng quy mô và nâng cao chất lượng đào tạo nguồn nhân lực, đảm bảo sau 2010 cung cấp đầy đủ cán bộ cho các nhu cầu nghiên cứu phát triển công nghệ, giảng dạy, quản lý và sản xuất kinh doanh. Tăng cường đầu tư và hoàn thiện mạng lưới các phòng thí nghiệm CNSH, tập trung đầu tư dứt điểm và đưa vào sử dụng các phòng thí nghiệm trọng điểm; xây dựng ở ba miền Bắc, Trung, Nam các trung tâm mạnh về CNSH làm hạt nhân cho việc nghiên cứu và ứng dụng CNSH trong cả nước,

https://nhathuocngocanh.com/

nhanh chóng làm chủ các công nghệ nền trong lĩnh vực CNSH. Phấn đấu đến năm 2020 đạt trình độ tiên tiến trong khu vực đối với một số lĩnh vực công nghệ quan trọng của CNSH. Tập trung nghiên cứu và ứng dụng công nghệ gen tạo ra các biến đổi bộ gen thực vật, động vật theo hướng có lợi; chữa các bệnh di truyền; chú trọng nghiên cứu các đặc điểm và các thay đổi bộ gen của người và vi sinh vật do tác động của ô nhiễm môi trường và chất độc hóa học. Tập trung nghiên cứu và ứng dụng công nghệ tế bào động và thực vật trong tạo và nhân nhanh giống cây trồng và vật nuôi có ưu thế về sản xuất, chất lượng; phát triển và ứng dụng công nghệ tế bào gốc trong trị liệu. Tập trung nghiên cứu và ứng dụng công nghệ enzym và protein trong công nghiệp chế biến và đặc biệt trong lĩnh vực miễn dịch học phân tử phục vụ sản xuất vaccin thế hệ mới và chế phẩm chẩn đoán bệnh. Công nghệ vi sinh tập trung nghiên cứu, đánh giá và ứng dụng tài nguyên vi sinh vật; tạo chủng giống cao sản bằng công nghệ cao; nghiên cứu hoàn thiện, phát triển và ứng dụng các kỹ thuật lên men vi sinh vật trong sản xuất phục vụ phát triển công nghiệp sinh học.

Giải pháp

Tạo sự chuyển biến mạnh mẽ trong nhận thức của các cấp ủy Đảng, các ngành, các cấp và toàn xã hội về vai trò, vị trí và tầm quan trọng của CNSH trong sự nghiệp công nghiệp hóa và hiện đại hóa;

Tạo hành lang pháp lý để phát triển CNSH và tăng cường công tác quản lý Nhà nước trong lĩnh vực CNSH;

Xây dựng và tổ chức thực hiện có hiệu quả Kế hoạch tổng thể phát triển CNSH, Chiến lược đào tạo nguồn nhân lực, Quy hoạch phát triển công nghiệp sinh học;

Đa dạng hóa các nguồn lực và tập trung đầu tư để nghiên cứu, sản xuất các sản phẩm CNSH cơ bản và thiết yếu phục vụ phát triển kinh tế – xã hội; hình thành và áp dụng những chính sách ưu đãi cao nhất cho phát triển nhanh các doanh nghiệp CNSH vừa và nhỏ;

Tạo lập thị trường công nghệ cho CNSH, trong đó phải gắn kết chặt chẽ hoạt động khoa học và công nghệ với hoạt động sản xuất và kinh doanh của doanh nghiệp; khuyến khích và hỗ trợ cho các hoạt động chuyển giao và ứng dụng CNSH vào sản xuất và đời sống;

Mở rộng quan hệ hợp tác quốc tế, tranh thủ mọi quan hệ quốc tế để đào tạo đội ngũ cán bộ đầu đàn, chuyên gia giỏi và nâng cao trình độ nghiên cứu, phát triển công nghệ trong lĩnh vực CNSH;

Đẩy mạnh thông tin, tuyên truyền để đưa các tiến bộ công nghệ trong lĩnh vực CNSH đến người sử dụng.

https://nhathuocngocanh.com/

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Ý nghĩa của công nghệ gen đối với sự phát triển của CNSH.
2. CNSH thế hệ 3 có đặc điểm gì và ảnh hưởng của nó đối với sự phát triển của CNSH nói chung.
3. Giải thích đặc điểm quy mô vừa và nhỏ của CNSHYD và ý nghĩa của nó đối với việc phát triển CNSH ở nước ta.
4. Sự kiện nào được xem là khởi đầu cho dược phẩm tái tổ hợp
   A. Phát hiện cấu trúc xoắn kép của ADN
   B. Phát hiện penicillin
   C. Insulin người tái tổ hợp trong *E. coli* được FDA cấp phép
   D. Công bố kết quả Dự án Bộ gen Người
5. Công nghệ sinh học xanh là công nghệ
   A. Sản xuất nhiên liệu sinh học
   B. Sử dụng enzym trong sản xuất thuốc
   C. Ứng dụng trong nông nghiệp và môi trường
   D. Lai tạo giống cây trồng

https://nhathuocngocanh.com/

CHƯƠNG 1

CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Bài 2

KHÁI NIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP LÊN MEN CÔNG NGHIỆP

MỤC TIÊU

1. *Trình bày được mục đích và sản phẩm của lên men công nghiệp.*
2. *Biết được cách chọn lọc và cải tạo chủng lên men.*
3. *Trình bày được cơ sở hình thành công thức và các thành phần của môi trường lên men.*
4. *Nêu được đặc điểm, kiểu thiết bị sử dụng, ưu nhược điểm của các kỹ thuật lên men.*
5. *Nêu được các yếu tố ảnh hưởng và các yếu tố cần kiểm soát trong quá trình lên men.*

1. ĐẠI CƯƠNG

Thuật ngữ lên men (fermentation) từ tiếng La Tinh "fervere" có nghĩa là làm chín, dùng để diễn tả hoạt động của nấm men trong dịch chiết trái cây hay dịch đường hóa ngũ cốc.

Ngày nay, người ta hiểu lên men là tất cả các quá trình biến đổi do vi sinh vật thực hiện trong điều kiện yếm khí hay hiếu khí. Hay nói một cách khác lên men là sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất hữu ích cho con người trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

Lên men công nghiệp được hình thành từ cuối thế kỷ XIX và phát triển mạnh từ nửa cuối thế kỷ XX. Hầu hết các quy trình sản xuất của công nghệ sinh học, kể cả CNSH hiện đại dựa trên công nghệ gen, đều dựa vào kỹ thuật lên men để tạo ra sản phẩm.

1.1. Mục đích

Phân lập, tuyển chọn và cải tạo giống vi sinh vật từ các nguồn gen tự nhiên, chế phẩm nhập nội và lên men truyền thống bằng con đường lai tạo, gây đột

https://nhathuocngocanh.com/

biến và tái tổ hợp nhằm tạo ra giống có hoạt tính và khả năng cạnh tranh cao để ứng dụng trong công nghiệp, nông nghiệp, y tế và bảo vệ môi trường, phát triển các sản phẩm phân bón vi sinh, vi sinh vật trợ sinh (probiotic), thuốc bảo vệ thực vật, động vật, các chế phẩm vi sinh dùng để xử lý nước, làm sạch môi trường, các protein–enzym và các sản phẩm chuyển hóa của vi sinh vật.

1.2. Sản phẩm của công nghệ lên men

1. Sinh khối vi sinh vật: giống, men bánh mì, vaccin, protein đơn bào, phân vi sinh, chế phẩm diệt côn trùng, probiotic.

2. Enzym vi sinh vật: α–amylase, β–glucanase, amyloglucosidase, glucose isomerase, glucose oxidase, cellulase, hemicellulase, pectinase, invertase, protease, lactase, lipase, streptokinase...

3. Sản phẩm trao đổi chất

a. Sơ cấp: rượu, bia, acid amin, acid hữu cơ, nucleotid, một số vitamin....

b. Thứ cấp: kháng sinh, lipid vi sinh vật, chất mang, các chất tăng trưởng, các chất có hoạt tính sinh học.

4. Sản phẩm tái tổ hợp gen: các protein tái tổ hợp và các sản phẩm khác được tạo ra nhờ các tế bào vi sinh vật chuyển gen

5. Các biopolymer và biosurfactant: các polysaccharid ngoại bào như xanthan, gellan, alginat vi sinh, cellulose vi khuẩn... và các chất hoạt động bề mặt (biosurfactant) được sản xuất bằng công nghệ lên men.

2. CHỦNG VI SINH VẬT

2.1. Khái quát

Vi sinh vật được sử dụng rộng rãi trong các quá trình công nghệ để tạo ra các sản phẩm hoặc cung cấp các chất trung gian để tạo ra sản phẩm. Vi sinh vật được sử dụng nhiều do các ưu thế như dễ nuôi cấy ở quy mô lớn, tăng trưởng nhanh, sử dụng được các cơ chất rẻ tiền (trong nhiều trường hợp là các chất phế thải từ các công nghiệp khác) và khả năng cho nhiều sản phẩm đa dạng. Bên cạnh đó chúng dễ dàng được biến đổi di truyền làm cho khả năng cải thiện thuộc tính để sản xuất ra sản phẩm mới là vô tận.

Trong các quy trình cổ xưa, sự lên men được thực hiện bởi một hỗn hợp các vi sinh vật (một số vẫn còn được tiếp tục đến ngày nay). Tuy nhiên, gần đây các nỗ lực để phân lập và cải tạo chủng diễn ra gần 120 năm trước đã dẫn đến khái niệm lên men thuần chủng, và đến nay đó là xu thế chung. Các chủng lên men thường được phân lập từ môi trường tự nhiên bằng cách sàng lọc ngẫu nhiên, tuy nhiên, chủng cũng có thể có được từ các ngân hàng chủng. Hầu hết các vi sinh vật này, bất kể nguồn gốc, đều trải qua quá trình biến đổi để cải tạo chủng

https://nhathuocngocanh.com/

bằng đột biến hay lai tạo nhằm tăng cường các đặc tính cần thiết cho công nghệ. Ngày nay, kỹ thuật di truyền đã được sử dụng nhiều trong việc cải tạo chủng, tạo ra tiềm năng to lớn trong việc sử dụng vi sinh vật biến đổi di truyền để tạo ra các sản phẩm hoàn toàn mới mà không thể thực hiện được với các vi sinh vật ban đầu.

Trong đa số trường hợp, các quy định về an toàn ảnh hưởng nhiều đến việc chọn lựa chủng trong công nghiệp. Về mặt an toàn, vi sinh vật được chia làm bốn loại:

1. Không gây bệnh cho người, động vật và môi trường (GRAS – Generally Recognized As Safe).

2. Có thể gây khó chịu cho người, động vật và môi trường.

3. Gây bệnh, truyền bệnh nhưng có cách chữa trị.

4. Gây bệnh, truyền bệnh rất nhanh nhưng chưa có cách chữa trị.

Nói chung công nghiệp lên men thường ưu tiên sử dụng các chủng GRAS (generally recognized as safe – được coi là an toàn), đặc biệt đối với các quá trình sản xuất có liên quan đến thực phẩm. Nguyên nhân là do tiến trình xin cấp phép sử dụng một vi sinh vật mới trong công nghệ hết sức khó khăn và tốn kém. Nếu một vi sinh vật gây bệnh hay vi sinh vật biến đổi di truyền được sử dụng trong sản xuất, các biện pháp an toàn bổ sung phải được áp dụng. Các phương tiện tồn trữ đặc biệt được áp dụng để đảm bảo là các vi sinh vật này không thoát ra khỏi nồi lên men.

Bảng 2.1. Một số ví dụ vi sinh vật GRAS

Vi khuẩn	**Nấm sợi**
Bacillus subtilis	*Aspergillus niger*
Lactobacillus bulgaricus	*Aspergillus oryzae*
Lactococcus lactis	*Mucor javanicus*
Leuconostoc oenos	*Penicillium roquefortii*
Nấm men	
Candida utilis	*Kluyveromyces lactis*
Kluyveromyces marxianus	*Saccharomyces cerevisiae*

2.2. Phân lập các chủng thích hợp từ môi trường

Vi sinh vật sản xuất có thể được mua từ các ngân hàng chủng, tuy nhiên, các chủng này tồn tại khắp nơi trong tự nhiên, do đó có thể phân lập chúng từ nơi sinh cư tự nhiên để giảm phụ thuộc vào các ngân hàng chủng và tạo ưu thế độc quyền về chủng sản xuất. Các chiến lược được áp dụng để phân lập chủng vi

https://nhathuocngocanh.com/

sinh vật công nghiệp thích hợp từ môi trường có thể được chia làm hai kiểu, "săn lùng" (shotgun) và có định hướng (objective). Trong kiểu "săn lùng", mẫu có chứa vi sinh vật sống tự do, biofilm (màng sinh học), và các kiểu sinh thái của vi sinh vật khác được thu nhận từ thú, thực vật, đất, chất thải, nước thải, và đặc biệt tại các nơi có điều kiện bất thường. Các mẫu phân lập được sau đó được sàng lọc theo các đặc tính mong muốn. Kiểu có định hướng thì việc lấy mẫu có chủ đích hơn, thường là nơi sinh cư tự nhiên của vi sinh vật muốn phân lập. Ví dụ vi khuẩn sinh methan sẽ hiện diện trong lớp bùn trầm tích thiếu oxy dưới các ao, hồ, vi khuẩn phân hủy hemoglobin có nhiều ở các lò mổ, và vi khuẩn oxy hóa hydrocarbon dễ tìm thấy tại các giếng dầu hay gara sửa xe hoặc khi cần tìm vi sinh vật khả năng phân hủy một chất độc nào đó, người ta sẽ lưu tâm đến các vị trí có nhiều chất độc tương ứng.

Sau khi lấy mẫu, một vấn đề quan trọng là phải quyết định sử dụng môi trường nào để phân lập và nuôi cấy chúng. Thông thường bước đầu tiên người ta sẽ kìm hãm hoặc giết các vi sinh vật phổ biến trong mẫu và kích thích sự tăng trưởng của các vi sinh vật hiếm gặp. Sau đó vi sinh vật cần phân lập sẽ "được làm giàu" bằng kỹ thuật nuôi cấy tăng sinh để các vi sinh vật mong muốn biểu hiện các tính trạng và tăng số lượng trước khi phân lập và sàng lọc. Kỹ thuật này khá đơn giản: người ta thiết lập các điều kiện môi trường về nguồn năng lượng, carbon, và nitơ; chất nhận hydro; khí trường; nhiệt độ; pH; ánh sáng; v.v..., thì đó hỗn hợp vi sinh vật được cấy vào và những vi sinh vật nào có khả năng thích nghi cao nhất sẽ chiếm ưu thế và "được làm giàu" so với các sinh vật khác. Tuy nhiên, cách này chỉ áp dụng được cho các vi sinh vật có đặc tính mong muốn à ưu thế sinh học của chúng.

Môi trường tăng sinh lỏng nên được sử dụng nếu chủng mong muốn là chủng có tốc lộ phát triển nhanh nhất. Trong trường hợp này, mẫu vi sinh vật sẽ được cấy chuyển lặp lại nhiều lần để thu được vi sinh vật mong muốn trong mẫu cấy cuối cùng. Tuy nhiên, nếu các chủng không có sự khác biệt đáng kể về thuộc tính tăng trưởng, phương pháp phân lập trên môi trường rắn nên được sử dụng: mẫu vi sinh vật được pha loãng và trải trên các môi trường tăng sinh rắn. Vi sinh vật sẽ tăng trưởng thành khóm riêng biệt và được sàng lọc.

Khi có được mẫu vi sinh vật thuần khiết trên môi trường rắn, các biện pháp sàng lọc sẽ được áp dụng trên các mẫu phân lập được. Ở thời điểm này, mức độ hoạt tính mong muốn không nhất thiết phải cao vì sau đó chủng sẽ được cải tiến và chọn lọc tiếp để làm mạnh các đặc điểm mong muốn và loại bỏ các tính trạng gây khó khăn cho công nghệ. Ngoài ra, các đặc điểm như tính ổn định, độc tính cũng là một yếu tố tham gia chọn lọc.

Việc phân lập chủng lên men thuần khiết từ các mẫu lên men vi sinh vật hỗn hợp trong các quy trình lên men cổ xưa cũng được tiến hành theo cách tương tự.

https://nhathuocngocanh.com/

Việc phân lập và chọn lọc một vi sinh vật tương đối dễ dàng, tuy nhiên nếu thuộc tính mong muốn thuộc về một nhóm vi sinh vật hoạt động phối hợp với nhau, ví dụ các vi sinh vật để phân hủy một phức hợp đa thành phần, thì vấn đề sẽ trở nên phức tạp hơn nhiều. Nhưng về nguyên tắc, người ta sẽ chia quá trình phức thành một loạt các quá trình con trong đó chỉ liên quan đến một vi sinh vật hay một enzym.

2.3. Các ngân hàng chủng

Các ngân hàng này sưu tập và lưu giữ các chủng vi sinh vật đã được phân lập và xác định một số tính chất sơ bộ, là một nguồn cung cấp chủng rất mạnh. Trên thế giới có khoảng 500 ngân hàng khác nhau, hầu hết là nhỏ và cục bộ, hoặc được chuyên biệt về một nhóm vi sinh vật nào đó. Một số ngân hàng chủng chủ yếu được liệt kê trong Bảng 2.2. Cần lưu ý khi sử dụng chủng từ nguồn này là tuy tiết kiệm rất nhiều chi phí để phân lập và sàng lọc sơ bộ từ môi trường tự nhiên, nhưng các đối thủ công nghệ cũng biết và có thể sử dụng các chủng như vậy do đó ưu thế cạnh tranh sẽ không còn.

Bảng 2.2. Một số ngân hàng chủng quan trọng đối với công nghệ

Ngân hàng	Loại chủng được giữ
American Type Culture Collection (ATCC), USA	Tất cả
Centraalbureau voor Schimmelculture (CBS), Hà Lan	Nấm men và nấm sợi
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Pháp	Tất cả
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulture (DSMZ), Đức	Tất cả
Các ngân hàng chủng của Vương Quốc Anh	
Culture Collection of Algae & Protozoa (CCAP)	Tảo và bào tử trùng
European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)	Tế bào động vật
CABI	Nấm sợi
National Collection of Food Bacteria (NCFB)	Vi khuẩn thực phẩm
National Collection of Industrial & Marine Bacteria (NCIMB)	Vi khuẩn (chung, công nghiệp, nước mặn)
National Collection of Pathogenic Fungi (NCPF)	Nấm gây bệnh
National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB)	Vi khuẩn gây bệnh thực vật
National Collection of Type Cultures (NCTC)	Vi khuẩn trong y học
National Collection of Wood Rotting Fungi (NCWRF)	Nấm phân hủy gỗ
National Collection of Yeast Cultures (NCYC)	Nấm men (không gây bệnh)

https://nhathuocngocanh.com/

2.4. Các chủng công nghiệp và biện pháp cải tạo

Bất kể nguồn gốc, chủng được sử dụng trong công nghệ cần thỏa mãn một số yêu cầu:

1. Ổn định di truyền.

2. Sản xuất hiệu quả sản phẩm mong muốn, con đường sinh tổng hợp sản phẩm đã được khảo sát kỹ.

3. Không cần hay ít cần bổ sung vitamin và yếu tố tăng trưởng.

4. Sử dụng được các cơ chất phổ biến và rẻ tiền.

5. Có thể biến đổi di truyền được.

6. An toàn, không gây bệnh, và không sản xuất chất độc, trừ khi đó chính là sản phẩm.

7. Dễ dàng thu hoạch từ quá trình lên men.

8. Dễ dàng phá vỡ tế bào nếu sản phẩm là nội bào.

9. Ít tạo ra sản phẩm phụ để thuận tiện cho việc tinh chế sản phẩm.

Các đặc tính khác như tính ưa nhiệt, ưa muối cũng được quan tâm trong lên men. Ngoài ra, đặc biệt đối với tế bào phát triển trong môi trường lỏng, chúng cần có khả năng tăng trưởng được trong các nồi lên men hiện có, tránh phát sinh chi phí chế tạo nồi mới, đồng thời có khả năng chịu khuấy, không sinh quá nhiều bọt và không có xu hướng bám vào các bề mặt.

Cải tạo chủng

Vi sinh vật hiếm khi được sử dụng trong công nghệ dưới dạng hoang dại. Trong hầu hết trường hợp, các chủng đột biến được tạo ra và chọn lọc để phù hợp với yêu cầu của công nghệ sản xuất. Cải tạo chủng là một phần quan trọng sống còn của tiến trình triển khai trong hầu hết công nghệ lên men. Nó giúp giảm giá thành thông qua tăng năng suất hoặc giảm chi phí sản xuất. Nhiều phương pháp biến đổi di truyền đã được sử dụng để thay đổi đặc điểm di truyền của chủng. Chiến lược nhằm thu được chủng có các đột biến mong muốn đòi hỏi kiến thức sâu về chuyển hóa và di truyền của chủng ban đầu.

Trong nhiều trường hợp việc cải tiến được tiến hành thông qua các phương pháp tái tổ hợp di truyền tự nhiên, trong đó kết hợp các yếu tố di truyền từ các bộ gen khác nhau để tạo thành một kiểu gen mới. Một cách khác là thông qua đột biến. Các chủng tái tổ hợp và đột biến được chọn lọc theo các đặc tính thích hợp cho lên men công nghiệp. Ngoài ra, gần đây người ta còn dựa vào kỹ thuật thao tác gen hay công nghệ gen. Công nghệ gen về lý thuyết có thể đưa một tính trạng mới, thông qua gen – ADN, vào tế bào, vượt qua các rào cản sinh học về loài và nguồn gen, do đó khả năng cải tạo chủng của nó là vô tận.

Các chủng sau khi cải tạo thường không sống được trong môi trường tự

https://nhathuocngocanh.com/

nhiên, do chúng bị thay đổi cơ cấu điều hòa để tạo ra các chuyển hóa mất cân bằng. Ngoài ra chúng cũng cần được duy trì trên các môi trường chuyên biệt để chọn lọc và duy trì các thuộc tính được chọn lọc.

Tái tổ hợp tự nhiên

ADN vi khuẩn thường ở dạng một nhiễm sắc thể đơn và các plasmid. Mỗi plasmid có thể mang hàng trăm gen bổ sung và chúng có thể có hàng nghìn bản sao trong mỗi tế bào. Các plasmid bổ sung các thông tin di truyền cho các tính trạng không có trong nhiễm sắc thể. Không như các tế bào nhân thật, vi khuẩn không sinh sản hữu tính, tuy nhiên chúng có thể trao đổi một số thông tin di truyền với nhau thông qua tiếp hợp, tải nạp và biến nạp, nhờ đó người ta có thể chủ động đưa thêm các tính trạng mới vào tế bào vi khuẩn.

Ở các tế bào nhân thật, sự tái tổ hợp di truyền xảy ra trong quá trình sinh sản hữu tính. Kiểu gen mới được tạo ra do sự trao đổi chéo giữa các nhiễm sắc thể bố mẹ trong quá trình giảm phân. Một số loài nấm quan trọng trong công nghệ, bao gồm *Penicillium* và *Aspergillus*, không có sinh sản hữu tính đúng nghĩa, tuy nhiên, chu kỳ cận hữu tính cung cấp một phương thức để tạo ra chủng mới. Điều này xảy ra khi hai thể đơn bội di truyền khác nhau được nuôi chung và để sợi nấm hòa nhập với nhau tạo ra một chủng dị nhân cấu tạo bởi hệ sợi chứa các nhân có nguồn gốc từ mỗi chủng ban đầu. Việc tạo thể dị nhân ngày nay có thể thực hiện *in vitro* bằng cách hợp nhất thể nguyên sinh (protoplast). Ngoài ra, một số tế bào nhân thật, bao gồm một số nấm men, nấm sợi, cũng có plasmid nên cũng có thể dùng làm công cụ thao tác di truyền.

Gây đột biến

Gây đột biến liên tiếp xen kẽ với chọn lọc có định hướng và sàng lọc các chủng sống sót là một công cụ cải tạo chủng hiệu quả. Các đột biến có thể tự nhiên hay cảm ứng, nhưng chúng đều có thể xem là hậu quả của các quá trình tự nhiên nên thường ít gặp vấn đề với các quy định cấp phép hơn các chủng được tái tổ hợp bằng kỹ thuật thao tác gen.

Các phương pháp gây đột biến nói chung có ứng dụng giới hạn vì chúng chủ yếu đạt được kết quả do làm rối loạn cơ chế kiểm soát. Các phương pháp truyền thống này đã được áp dụng thành công để loại màu vàng của penicillin (chrysogenin), một sắc tố vàng sản sinh bởi chủng *Penicillium chrysogenum*. Việc gây đột biến này cũng đã làm tăng hiệu suất penicillin. Các ví dụ khác về đột biến làm yếu quá trình kiểm soát để tạo chủng năng suất cao hơn được thấy ở một số vi sinh vật dùng để sản xuất acid amin.

Gần đây, các phương pháp mới được phát triển làm tăng khả năng đột biến chung và tăng tần suất đột biến của một gen cụ thể nhằm thu được kiểu đột biến mong muốn với tần suất cao nhất. Kỹ thuật gây đột biến định hướng này đòi hỏi các kiến thức nhất định về các gen điều khiển của gen đích và bản đồ gen của vi

https://nhathuocngocanh.com/

sinh vật. Hơn nữa, gây đột biến *in vitro* hiện nay được sử dụng phối hợp với thao tác di truyền để làm biến đổi các gen hay một phần của gen đã được tạo dòng.

Đột biến ngẫu nhiên

Trong một quần thể vi sinh vật các đột biến diễn ra một cách tự nhiên không cần có sự can thiệp do các sai sót trong quá trình sao chép vật liệu di truyền. Đột biến tự nhiên xảy ra với tần suất rất thấp, ví dụ ở hầu hết vi khuẩn tần suất này xấp xỉ 10^{-10} cho một gen qua mỗi thế hệ. Xác suất xảy ra một đột biến trên một gen (thay đổi một nucleotid) vào khoảng 10^{-5}, và cho một cặp nucleotid là 10^{-8}. Tần suất của các đột biến ngược (đột biến về dạng hoang dại) cũng tương tự, do đó nếu không có áp lực chọn lọc thì sự thay đổi kiểu gen và kiểu hình do đột biến ngẫu nhiên trong tự nhiên rất thấp. Ngay cả khi có áp lực chọn lọc để giữ lại các kiểu hình có ưu thế thì đột biến ngẫu nhiên cũng khó có ứng dụng trong việc cải tạo chủng vì tần suất đầu vào quá thấp.

Đột biến nhân tạo – cảm ứng

Tần suất đột biến có thể được tăng lên đáng kể nếu xử lý tế bào với các tác nhân gây đột biến hóa học, vật lý hay sinh học. Có thể chia đột biến làm ba loại: (1) thay thế cặp base ví dụ AT bằng GC; (2) chèn hoặc mất cặp base; (3) chèn hoặc mất hoặc thay đổi vị trí của một đoạn ADN trong nhiễm sắc thể. Các đột biến loại 1, còn gọi là đột biến điểm, rất dễ nghịch đảo về dạng ban đầu.

Nhiều phương pháp được sử dụng để cảm ứng đột biến:

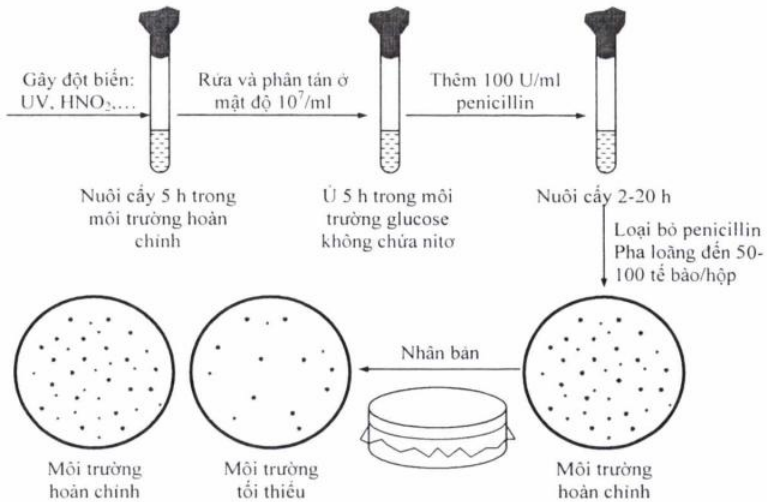
1. Sử dụng base tương đồng. Các base này đủ giống với các base tự nhiên, do đó bị đưa vào trình tự ADN trong quá trình sao chép. Chúng vẫn có chức năng bình thường, tuy nhiên có xu hướng bắt cặp nhầm khi sao chép lần hai và do đó gây ra các đột biến điểm.

2. Thay đổi về hóa học của các base. Một số tác nhân gây đột biến ảnh hưởng đến cấu trúc hóa học của base và do đó gây sai sót khi sao chép. Ví dụ, xử lý tế bào với nitrit (HNO_2) gây khử amin của adenin, guanin, cytosin và gây bắt cặp sai. Các tác nhân alkyl hóa như ethyl hay methyl methanesulfonat, ethyleneimin, nitrogen mustard, và N–methyl–N–nitro–N'–nitrosoguanidin (MNG), là các chất gây đột biến mạnh nhất. Thuốc nhuộm Acridine (proflavin) hoạt động bằng cách chèn vào giữa các sợi ADN và gây chèn hay mất một cặp base.

3. Chiếu xạ. Chiếu xạ UV ảnh hưởng đến các base pyrimidin và gây sai sót trong sao chép.

4. Gây đột biến bằng transposon. Thông qua tiếp hợp, các plasmid mang transposon (yếu tố Tn) có thể được đưa vào tế bào cần gây đột biến. Transposon có thể chuyển vị đến các vị trí khác trên nhiễm sắc thể hay plasmid và làm gián đoạn các gen tại đó dẫn đến đột biến.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 2.1. Phương pháp làm giàu thể khuyết dưỡng bằng penicillin

Các loại thể đột biến và nguyên tắc chọn lọc

Đột biến ngẫu nhiên hay cảm ứng nói chung đều là các sự kiện hiếm xảy ra đối với tế bào và số thể đột biến thu được từ một quần thể thường nhỏ. Thông thường người ta phải khảo sát hàng nghìn đĩa thạch với hàng triệu khóm (dòng tế bào) để tìm ra một thể đột biến mong muốn nếu không có biện pháp chọn lọc thích hợp để làm tăng số lượng của thể đột biến mong muốn trong dân số. Do đó việc sàng lọc thể đột biến đóng vai trò quan trọng trong việc thu được thuộc tính mong muốn. Việc tăng sinh thể đột biến có thể đạt được bằng cách tiêu diệt các tế bào ban đầu hay nuôi cấy trong các điều kiện mà thể đột biến có ưu thế tăng trưởng. Có nhiều phương pháp để tăng sinh thể đột biến. Trên thực tế việc thiết kế chiến lược sàng lọc thể đột biến là một trong những nghệ thuật phức tạp và đòi hỏi cao nhất đối với các nhà vi sinh vật học, mỗi loại thể đột biến cần một biện pháp đột biến riêng.

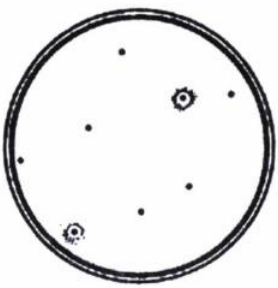
Việc nhận diện thể đột biến là một vấn đề khác. Nếu thể đột biến có kiểu hình rõ ràng, ví dụ có màu hay kháng lại một chất ức chế nào đó thì vấn đề rất đơn giản, chúng có thể dễ dàng nhận diện giữa các khóm vi khuẩn nguyên thủy. Một số thể đột biến có thể được phát hiện sau khi thêm các thuốc thử, ví dụ thêm dung dịch Lugol để phát hiện các thể đột biến thủy phân tinh bột đã được cấy trên thạch tinh bột. Việc phát hiện các thể đột biến khuyết dưỡng bằng cách so sánh sự tăng trưởng của cùng dân số trên hai môi trường khác nhau. Tuy nhiên, việc phát hiện nhiều thể đột biến cần một chiến lược tốt và nhiều công sức.

https://nhathuocngocanh.com/

Các thể khuyết dưỡng. Nếu thể đột biến mất khả năng tổng hợp một chất nào đó thì nó chỉ phát triển trên môi trường có sẵn chất đó. Ví dụ thể khuyết dưỡng đối với leucin (leu–) có thể được nhận ra bằng cách so sánh hai môi trường, một chứa và một không chứa leucin. Khi đó các tế bào nguyên dưỡng mẹ (leu+) sẽ mọc trên cả hai, trong khi thể khuyết dưỡng chỉ mọc trên môi trường chứa leucin.

Việc tăng sinh thể khuyết dưỡng có thể thực hiện bằng cách sử dụng các tác nhân tiêu diệt các tế bào đang tăng trưởng, ví dụ penicillin, khi đó các tế bào nguyên thủy đang tăng trưởng mạnh sẽ bị chết và các tế bào đột biến sẽ không bị ảnh hưởng vì nó không tăng trưởng được trên môi trường tối thiểu. Hậu quả là khi loại bỏ yếu tố chọn lọc, penicillin, thì tỷ lệ thể đột biến và thể nguyên dưỡng sẽ tăng lên 10^4 đến 10^6 lần (hình 2.1). Một phương pháp khác sử dụng nguyên tắc "tổng hợp gây chết": tế bào nguyên dưỡng tăng trưởng được sẽ tổng hợp các chất chuyển hóa độc đối với nó ví dụ phosphat có phóng xạ hay các chất kháng chuyển hóa và sẽ bị chết, trong khi thể khuyết dưỡng không tăng trưởng được sẽ sống sót.

Đột biến điều hòa. Vài thể đột biến có khả năng tạo enzym sinh tổng hợp hằng định, trong khi ở tế bào nguyên thủy sự tạo enzym này phụ thuộc các điều kiện chuyển hóa. Các tế bào này có thể được phát hiện trực tiếp từ môi trường thạch. Ví dụ, nếu một chất kháng chuyển hóa được thêm vào môi trường thạch, các tế bào nguyên thủy sẽ tích hợp chúng vào chuỗi peptid và do đó ngừng tăng trưởng. Tuy nhiên, thể đột biến do enzym hoạt động liên tục nên có sự sản xuất vượt mức chất chuyển hóa bình thường nên không sử dụng chất kháng chuyển hóa trong chuỗi peptid và do đó vẫn tăng trưởng được. Đôi khi cơ chế điều hòa của thể đột biến bị tổn thương dẫn đến sự tiết chất chuyển hóa vào môi trường và kích thích sự tăng trưởng thứ cấp của tế bào nguyên thủy, điều này có thể quan sát được trên thạch do sự hiện diện của các khóm vệ tinh bao quanh khóm đột biến.

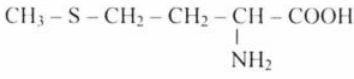


Hình 2.2. Sự phát triển khóm vệ tinh: thể đột biến kháng với chất kháng chuyển hóa

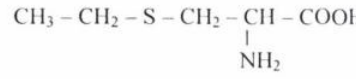
https://nhathuocngocanh.com/

10^9 tế bào được trải trên hộp thạch chứa chất kháng chuyển hóa, sau khi ủ có 8 khóm mọc lên là các khóm của thể đột biến. Hai khóm có sự phát triển kiểu vệ tinh chứng tỏ sự đề kháng của khóm đột biến ở trung tâm là do sự sản xuất quá mức và bài xuất của chất chuyển hóa bình thường.

Hoạt động của chất kháng chuyển hóa. Chất chuyển hóa và kháng chuyển hóa có cấu trúc tương tự nhau, nhưng chất kháng chuyển hóa không có chức năng sinh học, thí dụ methionin và ethionin chỉ khác nhau vị trí của S trong cấu trúc phân tử:



Methionin



Ethionin

Do giống nhau, các chất kháng chuyển hóa được tham gia quá trình trao đổi chất, nhưng không làm được đầy đủ chức năng của chất trao đổi thực, nên chất giả này thường gây tác dụng ức chế và làm chết tế bào.

Có nhiều nguyên nhân gây ra ức chế :

– Một chất tương đồng với acid amin được tham gia vào cấu trúc một protein enzym làm cho enzym bất hoạt.

– Chất tương đồng cạnh tranh với chất trao đổi về trung tâm hoạt động của enzym và do vậy ngăn cản sự chuyển hóa của chất trao đổi.

– Các chất tương đồng xuất hiện ở sản phẩm cuối cùng của một chuỗi tổng hợp, do kết hợp với enzym dị lập thể và làm giảm hoạt tính của nó hay do phản ứng với các chất ức chế mà làm giảm sự tổng hợp của các enzym. Do vậy, sự tổng hợp chất trao đổi thật bị ngăn cản và sinh sản của tế bào bị ức chế.

Bảng 2.3. Quy trình chọn lọc và nhận biết một số thể đột biến

Loại thể đột biến	Quy trình chọn lọc hoặc tăng sinh	Nhận biết thể đột biến
Kháng chất ức chế, kháng sinh, chất độc hay thực khuẩn	Trải khoảng 10^8 tế bào trên thạch dinh dưỡng chứa chất ức chế	Chỉ các thể đột biến kháng chất ức chế mới mọc được
Khuyết dưỡng cần chất tăng trưởng (vitamin, acid amin, hay các chất chuyển hóa kháng)	Kỹ thuật sử dụng penicillin hay chất tương đồng (kháng chuyển hóa): nuôi cấy tế bào trên môi trường thiếu chất tăng trưởng nhưng chứa penicillin hay các chất khác chỉ tiêu diệt tế bào đang tăng trưởng, thể khuyết dưỡng không mọc trên môi trường tối thiểu nên sống sót	Kỹ thuật cấy nhân bản trên hai môi trường hoàn chỉnh và tối thiểu, thể đột biến chỉ mọc trên môi trường hoàn chỉnh

https://nhathuocngocanh.com/

Loại thể đột biến	Quy trình chọn lọc hoặc tăng sinh	Nhận biết thể đột biến
Mất khả năng sử dụng cơ chất đặc thù	Kỹ thuật sử dụng penicillin và/hay ly trích các khóm được định vị: huyền dịch tế bào được trải trên thạch dinh dưỡng chứa cơ chất sử dụng được bởi dạng hoang dại ở nồng độ bình thường (0,5 vol%), và cơ chất sử dụng bởi thể đột biến ở nồng độ rất thấp (0,005 vol%). Các khóm được định vị và chuyển qua hộp mới.	So sánh khóm trên các hộp thạch chứa cơ chất khác nhau; thể đột biến không thể phát triển trên cơ chất bình thường, sẽ cần cơ chất đột biến do đó sẽ bị nhận diện. Thể đột biến có tiết có thể được nhận diện bằng cách nhuộm hay dùng chỉ thị.
Nhạy nhiệt	Kỹ thuật sử dụng penicillin để diệt tế bào hoang dại tăng trưởng ở nhiệt độ cao.	So sánh khóm trên hộp thạch ủ ở các nhiệt độ khác nhau. Chỉ thu nhận các khóm mọc ở 25°C nhưng không mọc ở 37°C.
Mất ức chế hoặc sản xuất liên tục enzym dị hóa	1) nuôi cấy liên tục với cơ chất là yếu tố giới hạn tăng trưởng; 2) cho tăng trưởng luân phiên trên hai cơ chất khác nhau; 3) tăng trưởng khi có sự hiện diện của chất ức chế cảm ứng (kháng cảm ứng).	Nếu huyền dịch tế bào được trải trên thạch dinh dưỡng chứa cơ chất không cảm ứng và sau thời gian ủ phun dung dịch chứa cơ chất sử dụng được + chỉ thị + chất ức chế tổng hợp protein enzym, chỉ có thể đột biến sản xuất liên tục mới có thể phân hủy cơ chất ngay lập tức và biến đổi chỉ thị.
Mất ức chế hoặc sản xuất liên tục enzym đồng hóa	Tăng trưởng với sự hiện diện của chất kháng chuyển hóa ức chế sự tăng trưởng của tế bào hoang dại. Trong số các tế bào kháng lại được có các thể đột biến không bị ức chế đối với sản phẩm cuối.	Chỉ có các thể đột biến tăng trưởng được, và có thể được bao quanh bởi các khóm vệ tinh của dạng hoang dại.

Các phương pháp chọn lọc khác. Nhiều phương pháp khác có thể được dùng để tách tế bào đột biến ra khỏi tế bào nhân nguyên thủy. Do một số tế bào đột biến tổng hợp liên tục sẽ có tỷ trọng khác với tế bào nhân nguyên thủy (do khác nhau về hàm lượng sản phẩm) nên có thể ủ tế bào trong điều kiện chỉ kích thích sự tổng hợp ở một trong hai loại tế bào và sau đó ly tâm trong thang nồng độ đường saccharose. Một số phương pháp dựa vào đáp ứng khác nhau của tế bào đối với các kích thích ngoại cảnh ví dụ sự di chuyển theo ánh sáng (quang ứng động), theo nồng độ chất dinh dưỡng (hóa ứng động), hay nồng độ oxy (khí ứng động), có thể được sử dụng để chọn lọc các thể đột biến có liên quan. Sự hấp

https://nhathuocngocanh.com/

phụ lên bề mặt các hạt (glycogen hay tinh bột, giọt dầu hay hạt lignocellulose) và sau đó tách ra bằng ly tâm phân đoạn có thể được áp dụng đối với các đột biến làm thay đổi cấu trúc bề mặt tế bào. Hoặc một kỹ thuật gọi là "tự sát", trong đó sử dụng một chất được chuyển hóa bởi dạng hoang dại thành chất độc và do đó giết chết chúng. Ví dụ như các chất monofluoroacetat, bromopyruvat, hay chlorat, được chuyển thành fluorocitrat, bromolactat, hay chlorin có độc tính. Thể đột biến bị mất khả năng này nên sống sót. Phương pháp này được áp dụng để chọn lọc các đột biến mất nitrate reductase (chlorat, perchlorat), hay các thể đột biến lên men không sinh acid (bromide, bromate).

Nhờ các phương pháp chọn lọc định hướng các thể đột biến ngày càng được cải tiến và thích hợp, người ta đã chọn ra nhiều chủng có năng suất lên men cao dùng trong sản xuất enzym, acid amin, vitamin, các chất kháng sinh... Một huyền dịch tế bào chứa 10 – 15 g/l chất khô cần khoảng 200 – 300 mg một acid amin nhất định để tổng hợp protein. Trong thực tế ngày nay người ta đã tạo ra các chủng siêu tổng hợp tới 80 g/l acid glutamic và 60 g/l lysin hoặc cao hơn. Như vậy, các chủng này đã sản xuất thừa ra so với yêu cầu bản thân 200 – 300 lần. Đối với riboflavin nhu cầu là 0,5 mg (20 – 50 ìg/g chất khô) mà năng suất lên men đạt 5 g/l tức là tăng 10.000 lần.

Lai ghép tế bào trần và biến nạp gen

Trong các năm gần đây nhiều công trình tạo giống vi sinh vật công nghiệp bằng đột biến từ tế bào trần đã cho kết quả khả quan. Các phương pháp lai ghép tế bào trần và biến nạp gen (tái tổ hợp ADN) ở các tế bào vi sinh vật đã giúp cho việc tạo giống vi sinh vật công nghiệp. Nhiều chủng mới có hoạt tính cao, có khả năng sinh tổng hợp các chất liệu quý mà trước đây chỉ có thể sinh ra ở cơ thể động vật hoặc thực vật thì nay các gen điều khiển tổng hợp chất đó đã được ghép vào tế bào vi khuẩn. Công việc sau đó là tổ chức một quá trình lên men và đưa vào sản xuất công nghiệp như các sản phẩm truyền thống khác. Như vậy, công nghệ gen cho phép bỏ qua việc cải tạo chủng nguyên thủy để phù hợp với công nghệ lên men, vì chủng ban đầu chỉ là nguồn cung cấp gen trong khi chủng sản xuất (nhận gen) là một chủng đã được tối ưu hóa về mặt kỹ thuật lên men.

Thao tác di truyền trên vi sinh vật

Trong hơn 20 năm qua sự phát triển của kỹ thuật tái tổ hợp ADN và các phương pháp dung hợp tế bào, như tạo thể lai để sản xuất kháng thể đơn dòng, đã ảnh hưởng mạnh đến công nghệ sinh học. Khác với tái tổ hợp tự nhiên, kỹ thuật tái tổ hợp ADN mở ra khả năng vô tận để tạo ra gen mới. Các phương pháp này cũng có tính chuyên biệt cao và được kiểm soát tốt. Kỹ thuật này cho phép một trình tự ADN nào đó được chuyển từ sinh vật này sang sinh vật khác và cho phép thao tác trên nó để cải tiến, ví dụ như làm tăng hiệu suất sản phẩm bằng cách loại bỏ các điểm thắt cổ chai trong con đường chuyển hóa hay khuếch

https://nhathuocngocanh.com/

đại hay biến đổi các bước nào đó trong quá trình chuyển hóa hoặc thay đổi codon mã hóa của chuỗi peptid.

Nhìn chung, kỹ thuật thao tác di truyền cho phép đưa một đặc tính hoàn toàn mới vào vi sinh vật. Vi sinh vật thường được biến đổi để tăng tổng hợp hay tiết ra một số enzym có thể dẫn đến việc sản sinh một chất mới hay cho phép sử dụng các cơ chất rẻ tiền hơn. Vì không có giới hạn về nguồn gốc của gen mà vi sinh vật biểu hiện, nên có thể biểu hiện gen của thực vật hay động vật trong vi sinh vật. Các sản phẩm thực sự đã được sản xuất thành công như hormon tăng trưởng người, insulin, các interferon. Tuy nhiên, các phương pháp này không hoàn toàn thay thế các phương pháp gây đột biến truyền thống mà chúng bổ sung cho nhau trong chiến lược cải tạo chủng công nghệ.

Các sản phẩm như interferon, insulin, các kháng thể đơn dòng v.v... đã được sản xuất theo công nghệ lên men. Cũng cần lưu ý rằng việc dùng các chủng vi sinh vật đã được biến đổi di truyền phải hết sức thận trọng, vì nếu để chúng thoát ra ngoài thì việc kiểm soát chúng rất khó khăn và hậu quả khó lường trước được. Vì vậy, ở các nước phát triển có các quy định ngặt nghèo với việc cấp phép sử dụng các chủng tái tổ hợp dùng cho công nghiệp.

Chiến lược thao tác di truyền trên vi khuẩn

Kỹ thuật di truyền liên quan đến việc thao tác trên ADN bên ngoài tế bào, do vậy cần thiết phải tách và tinh chế gen đích từ bộ gen tế bào cho. Trình tự ADN phân lập được có thể bị biến đổi và cơ chế điều khiển sự biểu hiện của nó có thể bị thay đổi trước khi được đưa vào tế bào chủ mới nhờ các vector.

Ngày nay với kỹ thuật PCR người ta có thể khuếch đại trực tiếp gen đích (đã biết trước trình tự hoặc ít nhất là trình tự ở hai đầu để thiết kế đoạn mồi) từ bộ gen tế bào cho rồi tạo dòng vào tế bào nhận mới. Bên cạnh đó, ngày càng có nhiều sinh vật được giải trình tự bộ gen và công bố trong các ngân hàng gen, nên việc tìm trình tự của gen đích để tiến hành các thao tác di truyền càng trở nên dễ dàng hơn bao giờ hết.

Khi đã tìm được gen đích và trình tự của nó, các biến đổi di truyền cần thiết sẽ được thực hiện, như đột biến, thay đổi cách điều hòa, ... và gen bị biến đổi sẽ được đưa trở lại tế bào ban đầu hay tế bào mới để sử dụng đặc điểm mới của gen này.

Các giới hạn của tế bào chủ nhân nguyên thủy

Kỹ thuật thao tác di truyền về lý thuyết như trình bày ở trên tương đối đơn giản, tuy nhiên, trên thực tế vấn đề phức tạp hơn nhiều. Nếu *E. coli* được sử dụng làm tế bào chủ để biểu hiện gen không phải của nó, gen có thể không biểu hiện được. Vấn đề được khắc phục bằng cách tạo dòng gen đích kèm theo hệ thống điều khiển mà tế bào đích có thể nhận diện được. Hơn nữa để thu được

https://nhathuocngocanh.com/

nhiều sản phẩm, vector phải có nhiều bản sao và ổn định trong tế bào đích. Ngoài ra, gen đích cần được đặt dưới sự điều khiển của một promoter mạnh. Khi tế bào đích biểu hiện một số gen lạ hoặc gen của chính nó nhưng với mức độ cao, protein thu được có thể gây độc cho tế bào đích làm nó bị chết trong quá trình biểu hiện. Để khắc phục, một cơ chế kiểm soát sự biểu hiện có thể tắt mở, bằng chất cảm ứng chẳng hạn, để tế bào chỉ biểu hiện gen đích khi các đạt được điều kiện nuôi cấy nhất định.

Nói chung, các vi khuẩn Gram âm có thể biểu hiện các gen từ vi khuẩn Gram dương, tuy nhiên, ngược lại thì không phải lúc nào cũng thành công. Vấn đề đặc biệt khó khăn khi biểu hiện một gen của tế bào nhân thật ở vi khuẩn do sự khác nhau về bộ máy và cách thức phiên mã cũng như dịch mã. Ví dụ gen của tế bào nhân thật chứa các vùng không mã hóa, intron, được loại bỏ trong quá trình trưởng thành của mRNA. Vấn đề này có thể giải quyết bằng cách dùng enzym sao chép ngược (reverse transcriptase) để tổng hợp ADN từ mRNA. Một vấn đề nữa là một số protein của tế bào nhân thật cần được biến đổi sau dịch mã để có hoạt tính, mà bộ máy này không hiện diện ở tế bào nhân nguyên thủy, vấn đề này chỉ có thể giải quyết bằng cách dùng tế bào đích nhân thật để biểu hiện.

Protein tiết là dạng có nhiều thuận lợi đối với sản xuất vì nó làm giảm các chi phí để thu tách sản phẩm. Tuy nhiên, ở vi khuẩn Gram âm các protein này thường không tiết thẳng vào môi trường mà nằm lại trong màng ngoài, do vậy nếu muốn protein được tiết vào môi trường cần phải biểu hiện ở dạng tế bào không có thành tế bào, L–form.

Ngoài ra còn có các vấn đề khác như sản phẩm gen không ổn định dẫn đến bị phân hủy bởi protease, protein không gập đúng nên không có hoạt tính.

Tế bào chủ nhân thật

Các tế bào chủ này có ưu thế là chúng có cơ chế biến đổi sau dịch mã để làm cho sản phẩm gen có được hoạt tính cần thiết. *Saccharomyces cerevisiae* là tế bào chủ hay dùng, vì nó có bộ máy di truyền được biết rõ, không gây hại và người ta có kinh nghiệm sử dụng nó trong công nghiệp lên men hàng trăm năm nay. Tuy nhiên, năng suất sản phẩm tương đối thấp, 1–5% tổng protein và một số protein bị giữ lại trong khoảng chu chất (periplasm). Các tế bào nhân thật khác có thể tốt hơn, đặc biệt là các methylotroph, *Pichia angusta* và *Pichia pastoris*. Các tế bào chủ này có promoter cảm ứng mạnh hơn và có khả năng biến đổi sau phiên mã khá giống tế bào người.

Tính ổn định của chủng

Một yếu tố quan trọng trong cải tạo chủng là tính ổn định của nó. Nghĩa là các chủng ổn định để có thể nuôi cấy, bảo quản, lưu, và không bị mất các đặc điểm đã được chọn lọc. Các chủng có mang plasmid cần được giữ với kháng sinh

https://nhathuocngocanh.com/

thích hợp để đảm bảo sự ổn định của plasmid. Sự không ổn định của plasmid có thể do sự tái sắp xếp của plasmid, bất ổn định cấu trúc, hay bị mất plasmid, tính ổn định phân ly. Các vấn đề này có thể giải quyết bằng cách thiết kế các plasmid có chứa các gen cần thiết để ổn định plasmid nói chung và ổn định plasmid đã nhận gen ngoại lai, plasmid tái tổ hợp. Vấn đề ổn định phân ly có thể giải quyết bằng cách đưa thêm các yếu tố thiết yếu cho sự sống sót của chủng vào plasmid, khi đó tế bào sẽ chết nếu bị mất plasmid. Ví dụ chúng chứa các gen gây chết ở nhiễm sắc thể và các gen ức chế ở plasmid, tế bào sẽ biểu hiện gen ức chế để ngăn sự biểu hiện gen gây chết nếu chúng còn mang plasmid. Tuy nhiên, để đảm bảo sự ổn định tốt nhất vẫn là đưa gen đích tích hợp vào nhiễm sắc thể.

2.5. Bảo quản giống vi sinh vật

Việc cải tạo thành công chủng mới sẽ không có ý nghĩa nếu chủng không được bảo quản để có thể sống sót và ổn định các tính trạng thu được. Do đó việc bảo quản chủng là một việc có ý nghĩa quan trọng trong vi sinh nói chung và vi sinh công nghệ nói riêng. Không có phương pháp hoàn hảo và phổ quát nào để bảo quản tất cả các loại vi sinh vật, ngay cả các chủng của cùng một loài cũng có thể đáp ứng khác nhau đối với một phương pháp bảo quản nào đó. Thông thường các phương pháp sau đây được sử dụng trong việc bảo quản các chủng vi sinh vật:

Cấy chuyền. Bảo quản các lọ hay ống môi trường đã được cấy chủng và định kỳ cấy chuyền sang môi trường mới. Cách này tuy đơn giản nhưng mất nhiều công lao động khi phải bảo quản một số lượng chủng lớn, đồng thời do quá trình trao đổi chất vẫn tiếp diễn, chủng có nguy cơ thay đổi các thuộc tính di truyền. Ống môi trường giữ chủng có thể được phủ dầu khoáng để tránh bay hơi nước và ngăn cản oxy.

Làm khô. Nấm men, các nấm khác, và một số vi khuẩn có thể được bảo quản bằng cách trộn tế bào với các giá mang (đất, cát, kieselguhr, đĩa giấy, đĩa gelatin) và làm khô ở nhiệt độ phòng.

Đông khô. Tế bào được phân tán trong môi trường chứa chất bảo quản đông lạnh như sữa gầy, đường,... rồi đông lạnh, mẫu đông lạnh được cho thăng hoa hơi nước dưới chân không cao đến khô. Toàn bộ quá trình diễn ra ở nhiệt độ rất thấp, do đó có thể bảo quản được tế bào một cách toàn vẹn về tính chất. Mẫu sau khi đông khô có thể bảo quản chống ẩm trong điều kiện mát hay ở nhiệt độ phòng, trong khí trơ. Do không có nước nên sự chuyển hóa không diễn ra được, tế bào ở trạng thái ngủ và do đó các thuộc tính di truyền được bảo toàn.

Đông lạnh. Huyền dịch tế bào trong chất bảo quản chống đông lạnh (cryoprotectant) như glycerol, glutamate, saccharose,... được đông lạnh nhanh và bảo quản ở nhiệt độ thấp –70°C, –140°C, hay –196°C. Nhiệt độ thấp ức chế

https://nhathuocngocanh.com/

quá trình chuyển hóa vào do đó đặt tế bào vào trạng thái ngủ. Cách làm này đơn giản và hiệu quả nhưng cần phải có phương tiện để duy trì nhiệt độ thấp liên tục trong nhiều năm.

Nói chung sau thời gian bảo quản chủng sẽ ít nhiều mất khả năng sống lại và có thể thay đổi tính chất ở nhiều mức độ, do đó cần tìm phương pháp tối ưu nhất cho từng chủng. Sau thời gian bảo quản, trước khi đưa vào sử dụng cần kiểm tra lại tính chất của chủng.

3. MÔI TRƯỜNG LÊN MEN

3.1. Cơ sở hình thành công thức môi trường

Môi trường lên men phải thỏa mãn tất cả các yêu cầu về dinh dưỡng của vi sinh vật và đáp ứng các yêu cầu kỹ thuật của công nghệ. Chất dinh dưỡng phải được tính toán để hỗ trợ sự sinh tổng hợp sản phẩm mong muốn. Hầu hết các quy trình lên men công nghiệp đều trải qua nhiều giai đoạn, như cấy hoạt hóa, nuôi quy mô nhỏ rồi mới đến quy mô sản xuất. Mỗi giai đoạn có các yêu cầu kỹ thuật khác nhau, do đó đòi hỏi thành phần môi trường cũng khác nhau. Tính chất sản phẩm cũng quyết định, ví dụ nếu sản phẩm chính là sinh khối hay chất chuyển hóa sơ cấp thì môi trường được thiết kế để làm cho vi sinh vật tăng trưởng tối ưu. Trong khi nếu sản phẩm là chất chuyển hóa thứ cấp thì việc sinh tổng hợp sản phẩm lại không có liên quan đến sự tăng trưởng, khi đó môi trường được tính toán nhằm cung cấp cho vi sinh vật sự tăng trưởng khởi đầu nào đó và theo sau là điều kiện tối ưu cho sự sinh tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp mong muốn, một số nguồn dinh dưỡng sẽ bị giới hạn và sự tăng trưởng có thể ngừng.

Bước đầu tiên trong việc hình thành công thức môi trường là khảo sát tổng quát quy trình dựa vào sự tăng trưởng và hình thành sản phẩm theo các liều lượng khác nhau của mỗi thành phần. Bước này chủ yếu là xem xét nguồn carbon, nitơ, khoáng chất, oxy đầu vào ảnh hưởng như thế nào đến sinh khối và lượng sản phẩm. Các thông tin này cho phép tính toán lượng tối thiểu của mỗi thành phần để thu được lượng sinh khối hay sản phẩm nhất định. Công thức hóa học tổng quát của tế bào vi sinh vật là $C_4H_7O_2N$, hay tính theo khối lượng khô thì tế bào vi sinh vật chứa 48% carbon, 7% hydro, 32% oxy và 14% nitơ, tỷ lệ này thay đổi đôi chút ở mỗi vi sinh vật. Trong đó, nguyên tố carbon là thành phần của các hợp chất hữu cơ của tế bào, cho và nhận electron. Nguyên tố oxy nhận electron, là thành phần của nước. Nguyên tố hydro là thành phần của nước, cho electron. Nguyên tố nitơ cho và nhận electron là thành phần của các acid nucleic và protein. Ngoài ra, các nguyên tố khác như phospho, lưu huỳnh ... là thành phần của các coenzym A. Do đó việc xác định thành phần nguyên tố cụ

https://nhathuocngocanh.com/
thể của tế bào vi sinh vật đang nghiên cứu cũng góp phần vào việc hình thành công thức môi trường, vì nó đảm bảo khi vi sinh vật tăng trưởng không có thành phần nào bị thiếu hụt, trừ khi có chủ định.

Từ những nguyên tố trên, thành phần hóa học của các vi sinh vật rất khác nhau (*Bảng 2.4*). Các điều kiện sống của vi sinh vật cũng rất khác nhau *(Bảng 2.5)*.

Bảng 2.4. Thành phần hóa học của các nhóm vi sinh vật

	Vi khuẩn	Nấm men	Nấm
Protein	55–60%	40–50%	30–35%
Lipid	7%	8%	8%
Đường	9%	48%	49%
A. nucleic	23%	8%	5%

Bảng 2.5. Điều kiện sống của một số loại vi sinh vật

Nhiệt độ	pH	Nồng độ muối
– Mesophile: 20–50°C	– Vi khuẩn : 7–7,5	– Không ưa mặn: < 2% NaCl
– Thermophile: > 45°C	– Nấm men: 3–6	– Ưa mặn: 2–30% NaCl
– Psychophile: < 20°C	– Nấm: 3–6	
	Thiobacillus thiooxydans pH=0	
	$S + O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$	
	Bacillus pasteurii pH > 8	
	Urê → amoniac	

Có ba dạng môi trường:

– Môi trường tổng hợp: đó là môi trường có thành phần hóa học chính xác về mặt định tính và định lượng.

– Môi trường phức hoặc bán tổng hợp: người ta chỉ biết thành phần chính xác của một vài hợp chất (về mặt định lượng đối với các chất cần quan tâm như yếu tố tăng trưởng, các thành phần khác dựa theo kinh nghiệm).

– Môi trường công nghiệp: nguyên liệu phức ban đầu chủ yếu bắt nguồn từ các sản phẩm nông nghiệp hoặc từ sữa vì chúng rẻ và tương đối dồi dào. Nhưng chúng phải thỏa mãn các tiêu chuẩn nhất định về chất lượng (độ bền và cấu tạo...). Trong số các nguyên liệu công nghiệp ban đầu, các nguồn carbon có thể là tinh bột, nước mật, dầu, nước sữa và tập hợp các sản phẩm phụ của chúng.

Các yếu tố chính ảnh hưởng đến việc chọn các cơ chất cụ thể trong công thức môi trường như sau:

https://nhathuocngocanh.com/

1. Giá thành và khả năng cung cấp; lý tưởng nhất là cơ chất rẻ, có thành phần chất lượng ổn định và sẵn có quanh năm.

2. Dễ xử lý, vận chuyển và bảo quản với chi phí thấp.

3. Không gây khó khăn cho quá trình tiệt trùng và không bị biến chất.

4. Có các thuộc tính vật lý như độ nhớt, khả năng trộn lẫn, ... không ảnh hưởng đến công thức chung, việc vận hành nồi cũng như xử lý sau lên men.

5. Giúp đạt được nồng độ sản phẩm đích với tốc độ hình thành và năng suất sản phẩm trên gam cơ chất cao.

6. Nồng độ và loại tạp chất cũng như khả năng tạo sản phẩm phụ thấp không làm ảnh hưởng đến quá trình tách sản phẩm chính sau đó.

7. Có tính an toàn tốt.

Thành phần cuối cùng của môi trường lên men không chỉ liên quan đến bản thân quá trình lên men mà liên quan đến chi phí tách loại tế bào ra khỏi môi trường và tinh chế sản phẩm sau lên men và chi phí xử lý chất thải của quy trình.

3.2. Các thành phần chính của môi trường

Nguồn carbon

Nguồn carbon cần thiết có thể được xác định bằng hệ số hiệu suất sinh khối (Y), là chỉ số thể hiện hiệu suất chuyển hóa cơ chất thành sinh khối.

$$Y_{carbon}\ (g/g) = \text{Sinh khối tạo ra (g)} / \text{Nguồn carbon sử dụng (g)}$$

Đối với một quy trình công nghệ việc xác định hệ số hiệu suất của tất cả các chất dinh dưỡng là cần thiết. Mỗi hệ số được xác định bằng một loạt các lô lên men trong đó cơ chất cần xác định là chất dinh dưỡng hữu hạn duy nhất, trong khi các chất khác được cung cấp thừa. Bằng cách thay đổi nồng độ ban đầu của chất dinh dưỡng hữu hạn rồi so sánh với lượng sinh khối thu được ta có thể tính ra hiệu suất. Tuy nhiên, hệ số này gắn liền với điều kiện lên men do đó nếu thay đổi pH, nhiệt độ, ... thì hệ số cũng thay đổi theo. Các vi sinh vật khác nhau có hệ số khác nhau đối với cùng một cơ chất (xem bảng) do có cách chuyển hóa cơ chất khác nhau. Ví dụ *Saccharomyces cerevisiae* nuôi bằng glucose có hệ số hiệu suất sinh khối là 0,56 và 0,12 g/g trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí tương ứng.

Bảng 2.6. Hiệu suất sinh khối của môi trường tối thiểu với nguồn carbon khác nhau

	$Y_{glucose}$	Y_{etanol}	$Y_{metanol}$	Y_{octane}
Phát triển hiếu khí				
Aspergillus nidulans	0,61			
Candida utilis	0,51	0,68		
E. coli	0,52			

https://nhathuocngocanh.com/

	$Y_{glucose}$	Y_{etanol}	$Y_{metanol}$	Y_{octane}
Pichia angusta			0,36	
Penicillium chrysogenum	0,43			
Pseudomonas aeruginosa	0,43			
Các Pseudomonas			0,54	1,07
Saccharomyces cerevisiae	0,56	0,63		
Phát triển kỵ khí				
Moorella thermatica	0,11			
E. coli	0,13			
Klebsiella pneuminiae	0,12			
Saccharomyces cerevisiae	0,12			

Vì nguồn carbon cũng đồng thời là nguồn năng lượng nên hiệu suất tạo ATP và sự sử dụng ATP của vi sinh vật cũng là một yếu tố quan trọng. Thường việc ước lượng cần bao nhiêu ATP để tăng trưởng là rất cần thiết mặc dù khá khó khăn.

Carbohydrate là nguồn carbon và năng lượng hay được sử dụng nhất trong lên men vi sinh vật. Tuy nhiên, rượu, alkan và acid hữu cơ cũng đôi khi được sử dụng. Chất béo động vật và dầu thực vật có thể sử dụng trong một số môi trường bên cạnh nguồn carbon chính.

Mật mía

Glucose và saccharose tinh khiết hiếm khi được sử dụng trong lên men công nghiệp do giá thành cao. Mật mía là nguồn saccharose rẻ tiền hơn nhiều. Nó chứa khoảng 50–60% carbohydrate, chủ yếu là saccharose, ngoài ra còn chứa 2% chất có nitơ, một số vitamin và khoáng chất. Thành phần chính xác thay đổi tùy theo nguồn mía, nơi thu hoạch, điều kiện trồng và công nghệ làm đường được sử dụng. Nồng độ carbohydrate có thể giảm trong quá trình bảo quản do nhiễm vi sinh vật. Một cơ chất tương tự là sản phẩm phụ của công nghệ làm siro ngô, chứa chủ yếu là glucose.

Cao chiết mạch nha

Thành phần chứa khoảng 90% carbohydrate, trong đó có khoảng 20% đường 6 carbon (chủ yếu là glucose), 55% đường đôi (chủ yếu là maltose và một ít saccharose) và 10% maltotriose. Ngoài ra còn chứa 15–20% dextrin có nhánh và thẳng. Nó cũng chứa một ít vitamin và khoảng 5% hợp chất có nitơ. Đây là nguồn carbon thích hợp cho lên men nấm sợi, nấm men và actinomyces. Thành phần cũng thay đổi tùy theo quy trình sản xuất mạch nha.

https://nhathuocngocanh.com/

Việc tiệt trùng các môi trường chứa cao chiết mạch nha cần kiểm soát tốt để tránh quá nhiệt. Các đường khử và acid amin có xu hướng tạo phản ứng Maillard khi bị đun nóng ở pH thấp. Phản ứng này tạo ra các sản phẩm ngưng tụ màu nâu, làm giảm khả năng lên men của vật liệu đồng thời một số sản phẩm có thể ức chế sự tăng trưởng của vi sinh vật.

Tinh bột và dextrin

Các polysaccharid này không dễ sử dụng như các đường đơn hay đôi nhưng chúng có thể được chuyển hóa trực tiếp bởi vi sinh vật sinh amylase, nhất là các nấm sợi. Các enzym ngoại bào này sẽ thủy phân cơ chất thành hỗn hợp glucose, maltose hay maltotriose tương đối giống thành phần của dịch chiết mạch nha.

Tinh bột bắp được sử dụng phổ biến nhất. Để dễ được sử dụng hơn trong các quy trình lên men khác nhau, tinh bột thường được chuyển hóa thành dạng siro, chủ yếu chứa glucose. Đầu tiên tinh bột được gel hóa rồi thủy phân bằng acid loãng hay enzym thủy phân tinh bột, thường là glucoamylase của vi khuẩn.

Nước thải sulfit

Đường trong nước thải của công nghiệp giấy này có thể dùng để lên men nấm men. Nước thải từ việc xử lý cây họ thông có chứa 2–3% (kl/tt) đường, gồm 80% đường 6 carbon và 20% đường 5 carbon. Đường 6 carbon gồm glucose, mannose và galactose, trong khi đường 5 carbon chủ yếu là xylose và arabinose. Nước thải từ các cây rụng lá theo mùa chứa chủ yếu đường 5 carbon. Thông thường nước thải này cần được xử lý trước khi sử dụng vì nó chứa sulphur dioxid. pH thấp được trung hòa bằng calci hydroxid hay calci carbonat và phải bổ sung thêm nguồn nitơ và phospho.

Cellulose

Cellulose được tìm thấy chủ yếu ở dạng lignocellulose, hợp thành từ cellulose, hemicellulose và lignin, trong thành tế bào thực vật. Lignocellulose có thể thu được từ chất thải nông nghiệp, lâm nghiệp và công nghiệp. Rất ít vi sinh vật sử dụng được cơ chất này và nó cũng khó bị thủy phân. Thường nó được sử dụng để lên men rắn như nuôi một số loài nấm. Tuy nhiên, nó cũng có tiềm năng lớn vì khả năng chuyển hóa thành đường hay ethanol.

Bã sữa chua (whey)

Whey là một sản phẩm phụ của công nghiệp sữa. Hàng năm có 80 triệu tấn, chứa khoảng 1 triệu tấn lactose và 0,2 triệu tấn protein sữa. Chi phí vận chuyển và bảo quản tốn kém, do đó, người ta thường làm bay hơi nước để cô đặc lactose dùng để lên men, sau đó tách loại protein sữa để sử dụng làm thức ăn gia súc. Nói chung lactose không phải là một đường lên men tốt như saccharose vì nó ít được chuyển hóa bởi vi sinh vật, ví dụ *Saccharomyces cerevisiae* không lên men lactose. Nó chủ yếu được sử dụng để lên men penicillin và hiện nay vẫn dùng

https://nhathuocngocanh.com/

trong lên men rượu, acid lactic, xanthan gum, protein đơn bào, vitamin B_{12} và acid gibberellic.

Alkan và alcol

n–alkan có chuỗi carbon 10 – 20 có thể được chuyển hóa bởi một số vi sinh vật. Thường thích hợp hơn khi sử dụng dạng hỗn hợp. Tuy nhiên, việc sử dụng chúng trong công nghiệp hay phụ thuộc vào giá dầu. Methan cũng được sử dụng làm nguồn carbon bởi một số ít vi sinh vật, nhưng một sản phẩm của nó là methanol thì được ưa chuộng trong công nghiệp. Methanol tinh dễ tìm và rẻ; nó có thể trộn lẫn được với nước, có tỷ lệ carbon cao, mặc dù cũng rất ít vi sinh vật có thể sử dụng nó. Mặt khác, không như các cơ chất khác, methanol độc đối với vi sinh vật nên chỉ có thể sử dụng ở nồng độ rất thấp 0,1–1% (tt/tt). Khi lên men với methanol, nhu cầu về oxy và nhiệt cao hơn bình thường và các alkan cũng vậy, thậm chí còn hơn. Các cơ chất này được ưa chuộng trong thập niên 70 – 80 nhưng ngày nay được coi là không kinh tế.

Ethanol ít độc hơn và được sử dụng như là cơ chất duy nhất hay đồng cơ chất bởi nhiều vi sinh vật, nhưng nó khá đắt. Tuy nhiên, các công nghiệp chuyển hóa nó thành acid acetic vẫn còn rất phổ biến.

Chất béo và dầu

Các chất béo rắn của động vật chủ yếu chứa glycerid của acid palmitic, stearic hiếm khi được sử dụng trong lên men. Tuy nhiên, dầu thực vật (chủ yếu là dầu hạt bông vải, hạt lanh, ngô, olive, cọ, hạt nho và đậu nành) và đôi khi dầu cá có thể được sử dụng làm nguồn carbon chính hay bổ sung đặc biệt trong lên men kháng sinh. Dầu thực vật chủ yếu chứa acid oleic và linoleic, nhưng dầu hạt lanh và đậu nành có khá nhiều acid linoleic. Dầu chứa nhiều năng lượng hơn carbohydrate có cùng khối lượng. Ngoài ra carbohydrate thường chiếm thể tích lớn hơn, trong khi dầu có thể đặc biệt hữu dụng trong lên men mẻ bổ sung dinh dưỡng gián đoạn do chiếm thể tích nhỏ nên có chỗ để bổ sung các thành phần khác.

Nguồn nitơ

Hầu hết các vi sinh vật công nghiệp đều có thể sử dụng nguồn nitơ hữu cơ hay vô cơ. Nitơ vô cơ thường là muối amoni như sulfat, hydrophosphat hay amoniac. Amoniac có thể sử dụng làm chất điều chỉnh pH trong quá trình lên men. Nguồn nitơ hữu cơ bao gồm acid amin, protein và urea. Nó thường được sử dụng ở dạng phụ phẩm thô của các công nghiệp khác. Acid amin tinh khiết hiếm khi được sử dụng. thường là trong trường hợp nó là tiền chất của sản phẩm.

Nước thải ngâm bắp

Chất thải này thu được như là sản phẩm phụ của quá trình chiết tinh bột từ bắp và được sử dụng lần đầu tiên trong lên men penicillin từ những năm 40.

https://nhathuocngocanh.com/

Thành phần của nó thay đổi tùy theo chất lượng bắp và quy trình chế biến. Dịch chiết cô đặc chứa khoảng 4% (kl/tt) nitơ, bao gồm nhiều acid amin, vitamin và khoáng chất. Các cặn đường thường được chuyển thành acid lactic (9–20% (kl/tt)) nhờ các vi khuẩn nhiễm. Nước thải bắp đôi khi được thay thế bằng một thứ tương tự từ công nghệ chế biến tinh bột khoai tây.

Cao nấm men

Cao nấm men được sản xuất từ chất thải của lò bánh mì và bia rượu chủ yếu chứa *Saccharomyces cerevisiae*. Một nguồn khác là *Kluyveromyces maxianus* mọc trên whey (nước thải sữa chua) và *Candida utilis* nuôi bằng cồn hay phế thải của công nghiệp giấy. Các cao chiết này sử dụng trong môi trường lên men là dạng cô đặc đã loại muối, chúng chứa các thành phần tan được của dịch thủy phân tế bào nấm men. Cao nấm men chứa quá 0,05% natri clorid không dùng được vì sẽ gây ăn mòn thiết bị.

Sự thủy phân nấm men thường là tự hủy do các enzym nội sinh của nấm. Quá trình tự hủy khởi đầu bằng shock nhiệt hay thẩm thấu làm cho tế bào chết mà không hư hại enzym. Nhiệt độ và pH được kiểm soát trong suốt quá trình để đảm bảo sự tự hủy được tối ưu và ổn định. Kiểm soát nhiệt đặc biệt quan trọng vì phải ngăn được sự phân hủy của các vitamin. Quá trình tự hủy diễn ra ở 50–55°C trong nhiều giờ trước khi nâng nhiệt độ lên 75°C để bất hoạt enzym. Cuối cùng tế bào được phá vỡ bằng enzym phá hủy màng sinh chất hay bằng tác nhân cơ học. Thành tế bào và các cặn khác được loại bỏ bằng ly tâm hay lọc và dịch tan thu được sẽ được cô đặc nhanh. Cao chiết thường được cung cấp dưới dạng lỏng chứa 50–65% chất rắn, dạng hồ nhão hay bột khô. Chúng chứa acid amin, peptide, vitamin tan trong nước và một ít glucose.

Pepton

Pepton thường là quá đắt để sử dụng trong công nghiệp lên men. Chúng được sản xuất bằng cách thủy phân acid hay enzym các nguyên liệu chứa nhiều protein như thịt, casein, gelatin, keratin, đậu phộng, đậu nành, hạt bông, ... Thành phần acid amin của nó thay đổi theo nguồn nguyên liệu ban đầu. Ví dụ pepton từ gelatin thì nhiều prolin nhưng lại hiếm các acid amin có lưu huỳnh; trong khi pepton từ keratin thì giàu cả prolin lẫn cystein nhưng lại không có lysin. Pepton từ thực vật thường chứa một lượng tương đối lớn carbohydrate.

Bã đậu nành

Phần cặn còn lại sau khi ép dầu chứa khoảng 50% protein, 8% nitơ không phải protein, 30% carbohydrate và 1% dầu. Bã này thường được dùng trong lên men kháng sinh vì nó được chuyển hóa chậm nên giảm khả năng ức chế sự hình thành sản phẩm.

Nước

Tất cả các quá trình lên men, trừ lên men cơ chất rắn, đều cần một lượng lớn

https://nhathuocngocanh.com/

nước. Trong nhiều trường hợp, nước cũng cung cấp các yếu tố vết khoáng chất. Do đó cần nguồn cung cấp nước sạch, ổn định chất lượng thành phần. Trước khi sử dụng cần loại các tạp rắn. Nếu nguồn nước bị "cứng", cần được xử lý để loại muối như calci carbonat, các ion sắt và cloride cũng cần loại bỏ. Một số quy trình lên men cần nước có độ tinh khiết cao như nuôi cấy tế bào động vật, thực vật.

Việc cung cấp nước sạch ngày càng trở nên khó khăn do đó trong quy trình cần có các khâu để tái sử dụng nguồn nước khi có thể.

Khoáng chất

Thông thường nước cung cấp có chứa lượng cobalt, đồng, sắt, magiê, molybden, kẽm đủ cho sự tăng trưởng. Ngoài ra các thành phần khác cũng chứa tạp của các khoáng chất này. Tuy nhiên, nếu hàm lượng của một số ion như calci, magiê, phospho, kali, lưu huỳnh và cloride quá thấp so với yêu cầu thì cần có các biện pháp bổ sung.

Vitamin và các yếu tố tăng trưởng

Nhiều vi sinh vật có thể tổng hợp tất cả các vitamin từ các thành phần cơ bản của môi trường. Đối với một số vi khuẩn, nấm sợi và nấm men khác các thành phần này cần được bổ sung vào môi trường lên men. Hầu hết các nguồn carbon và nitơ đều chứa một số vitamin ở dạng tạp. Các yếu tố tăng trưởng khác, acid amin, nucleotide, acid béo, sterol được thêm vào dưới dạng tinh khiết hoặc để tiết kiệm chi phí có thể sử dụng dạng chiết xuất từ động vật hay thực vật.

Các tiền chất

Một số quy trình lên men cần được bổ sung các tiền chất nhất định, nhất là các quy trình sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp. Khi đó chúng được thêm vào với liều lượng được kiểm soát chặt chẽ và thường ở dạng khá tinh khiết. Ví dụ acid phenylacetic hay phenylcetamid được thêm vào như là tiền chất của sợi nhánh của penicillin. D–threonin là tiền chất của L–isoleucin sản xuất bởi *Serratia marsescens* và acid anthranillic được thêm vào khi sản xuất L–tryptophan bằng *Hansenula anomala*.

Các chất cảm ứng và kích thích

Nếu sự tạo thành sản phẩm phụ thuộc vào một chất cảm ứng đặc thù hay một chất có cấu trúc tương tự, nó phải có mặt trong môi trường hoặc được thêm vào tại những thời điểm xác định trong quá trình lên men. Trong nuôi cấy tế bào thực vật sự sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp như flavonoid, terpenoid có thể được khởi động bằng cách thêm các chất kích thích. Các chất này có thể được phân lập từ các vi sinh vật, nhất là các vi sinh vật gây bệnh thực vật.

Các chất cảm ứng thường cần cho quá trình lên men vi sinh vật biến đổi gen (GMM – Genetic Modified Microorganism). Bởi vì sự tăng trưởng của các vi sinh

https://nhathuocngocanh.com/

vật này có thể bị rối loạn nếu gen đích được hoạt hóa, thường do mức độ phiên mã và dịch mã quá cao. Do đó, một hệ thống cảm ứng thường được thiết kế để tế bào tăng trưởng bình thường mà không có sự hoạt hóa của gen đích, khi sự tăng trưởng đạt mức tối ưu nào đó, sự hoạt hóa gen đích sẽ xảy ra khi thêm chất cảm ứng, khi đó quá trình sản xuất sản phẩm đích mới bắt đầu và tế bào cũng bắt đầu chết.

Các chất ức chế

Các chất ức chế được dùng để thay đổi hướng chuyển hóa của vi sinh vật nhằm tạo ra sản phẩm và giảm các sản phẩm phụ hoặc làm ngưng quá trình chuyển hóa ở một giai đoạn nhất định nhằm tránh sản phẩm đích bị chuyển hóa xa hơn. Một thí dụ điển hình là lên men sulfit trong đó natri bisulfit được dùng để chuyển hướng lên men rượu của *S. cerevisiae* thành sản xuất glycerol.

Một số GMM có mang plasmid chứa gen kháng kháng sinh, môi trường nuôi cấy chứa kháng sinh sẽ giúp loại bỏ những tế bào không mang plasmid.

Chất thay đổi tính thấm tế bào

Các chất này làm tăng tính thấm của tế bào bằng cách thay đổi cấu trúc thành hay màng tế bào để làm tăng sự phóng thích các sản phẩm nội bào vào môi trường lên men. Thường sử dụng penicillin hay các chất hoạt động bề mặt. Chúng thường được thêm vào trong quá trình lên men acid amin như acid glutamic bởi vi khuẩn *Corynerbacterium* và *Brevibacterium*.

Oxy

Tùy thuộc vào nhu cầu oxy của chủng vi sinh vật, oxy có thể được đưa vào dưới dạng không khí chứa 21% oxy hay dạng tinh khiết. Nhu cầu oxy của vi sinh vật thay đổi tùy theo nguồn carbon sử dụng. Trong hầu hết các quy trình lên men không khí hay oxy cung cấp được lọc vô trùng trước khi được bơm vào nồi.

Chất chống bọt

Bọt được tạo ra trong quá trình lên men do protein trong môi trường và khí sục vào. Nếu không kiểm soát được bọt, nó có thể làm tắc hệ thống dẫn khí, tràn nồi, gây nhiễm hay phóng thích vi sinh vật ra môi trường.

Có ba hướng tiếp cận để kiểm soát bọt trong lên men: thay đổi công thức môi trường, dùng các biện pháp cơ học hay hóa học để phá bọt. Các chất phá bọt thường là các chất hoạt động bề mặt, chúng cần có các đặc tính sau:

1. Nhanh chóng phân tán và tác động nhanh.
2. Tác động mạnh với liều thấp.
3. Có tác động kéo dài.
4. Không độc đối với vi sinh vật lên men, người hay thú.
5. Giá rẻ.

https://nhathuocngocanh.com/

6. Bền nhiệt.

7. Tương thích với các thành phần môi trường và quy trình.

Các chất phá bọt tự nhiên như dầu thực vật (đậu nành, hướng dương, cải dầu), dầu cá đã khử mùi, dầu khoáng, và mỡ động vật. Các chất phá bọt tổng hợp hầu hết là dầu silicon, poly alcol, glycol alkyl hóa. Một số chất có thể gây ảnh hưởng đến quá trình xử lý sau lên men nhất là công đoạn lọc.

3.3. Môi trường nuôi cấy tế bào động vật

Các môi trường này thường dựa vào một môi trường nền phức hợp, như Eagle, có chứa glucose, khoáng, vitamin và acid amin. Đối với tế bào động vật có vú, người ta thường thêm huyết thanh như huyết thanh bê, ngựa, ... Huyết thanh cung cấp các yếu tố tăng trưởng bao gồm các yếu tố khởi đầu và gắn kết, các protein liên kết. Chúng cũng cung cấp hormon, yếu tố vết và các chất ức chế protease.

Do sự phức tạp trong thành phần của huyết thanh nên việc tìm kiếm các công thức rẻ tiền để thay thế rất khó khăn. Vấn đề tiệt trùng cũng có nhiều khó khăn do các yếu tố trong huyết thanh kém chịu nhiệt. Thông thường môi trường chứa 5–10% huyết thanh, gần đây người ta cố gắng tạo ra các chủng cần ít thậm chí không cần huyết thanh để tăng trưởng nhờ đó giảm giá thành nuôi cấy.

3.4. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật

Ngược với môi trường nuôi cấy tế bào động vật, tế bào thực vật mọc trên các môi trường tổng hợp. Chúng thường chứa một nguồn carbon hữu cơ (hầu hết các tế bào thực vật phát triển dị dưỡng), một nguồn nitơ, khoáng, và các hormon tăng trưởng. Saccharose thường được dùng làm nguồn carbon, đặc biệt đối với việc sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp, nhưng glucose, fructose, maltose và đôi khi lactose cũng đã được sử dụng. Nitrate thường đóng vai trò nguồn nitơ, được cung cấp ở dạng muối amoni. Tuy nhiên, một số loài cần cung cấp nitơ hữu cơ dưới dạng acid amin. Thành phần và nồng độ các hormon thực vật thay đổi tùy theo loài và theo loại lên men, thường sử dụng auxin cùng với cytokinin để thúc đẩy sự phân bào. Môi trường lên men hai pha hay được sử dụng trong đó pha đầu được cho tăng trưởng tối ưu và pha hai được tối ưu để sản xuất sản phẩm.

3.5. Môi trường giữ giống

Môi trường này được thiết kế để vi sinh vật có sức sống cao và giảm thiểu các biến động về di truyền. Đặc biệt chúng phải giảm lượng các chất chuyển hóa độc. Nếu chủng có đặc điểm không ổn định thì phải được giữ trên các môi trường có tính chọn lọc cho các tính trạng cần giữ (tham khảo công thức môi trường của các cơ quan lưu giữ chủng như ATCC, NCTC, ...).

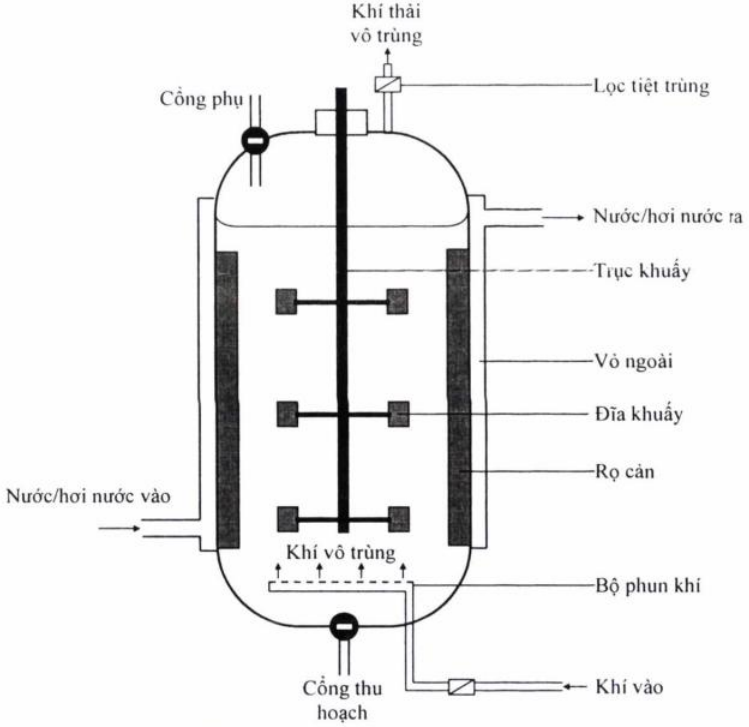
https://nhathuocngocanh.com/

4. HỆ THỐNG LÊN MEN

4.1. Nồi lên men

Nồi lên men hay bình phản ứng sinh học (fermenter/bioreactor) là thùng chứa tế bào, chiết xuất tế bào hay enzym thực hiện phản ứng sinh học.

Nồi lên men có dung tích từ một vài lít đến hàng trăm nghìn lít, được làm bằng thủy tinh hay thép không rỉ, có hệ thống cảm biến đo và điều chỉnh nhiệt độ, pH và oxy hòa tan. Nồi lên men thường có hình trụ với hệ thống cánh quạt như chân vịt tàu thủy nhằm trộn đều và cung cấp oxy. Oxy tan trong nước rất hạn chế (8,4 mg/l ở 25°C) nên cần được cung cấp liên tục (không khí được sục vào và khuấy đều trong nồi lên men). Cần phải có thiết bị theo dõi lượng oxy hòa tan trong môi trường.



Hình 2.3. Nồi lên men kiểu thùng khuấy (stirred tank)

Trong quá trình nuôi cấy hiếu khí, phải cung cấp oxy cho vi sinh vật hô hấp và phát triển sinh khối, đồng thời tạo điều kiện cho hệ enzym trong tế bào hoạt

https://nhathuocngocanh.com/

động và cho hiệu suất sinh tổng hợp cao. Song nếu độ thông khí quá mức thì hiệu quả lên men sẽ giảm, VD lên men vitamin B_{12} đạt hiệu suất tối đa ở độ thông khí 2,7g O_2 /ml/giờ, nếu nâng cao hơn nữa sẽ làm giảm lượng vitamin.

Ngoài việc đảm bảo cho luồng khí vào và khuấy, nồi lên men còn phải gắn thêm các bộ phận cản trên thành để làm tăng hiệu quả vận chuyển oxy và các cửa phụ để bổ sung tế bào nuôi và các chất thiết yếu vào môi trường.

4.2. Sự tăng trưởng của tế bào trong nồi lên men

Tỷ lượng (stoichiometry) của tế bào

70% khối lượng của tế bào là nước. Còn một nửa khối lượng khô của tế bào là carbon và các nguyên tố C, O, N và chiếm khoảng 92% tổng số. Thí dụ, thành phần nguyên tố của *E. coli*. (Bảng 2.7)

Bảng 2.7. Thành phần nguyên tố của tế bào *E. coli*

Nguyên tố	Tỷ lệ (% khô)
C	50
O	20
N	14
H	8
P	3
S	1
K	1
Na	1
Ca	0,5
Mg	0,5
Cl	0,5
Fe	0,2
Các nguyên tố khác	0,3

Công thức hóa học tổng quát của tế bào vi sinh vật là $C_4H_7O_2N$.

Các yếu tố ảnh hưởng đến tăng trưởng tế bào

Sự tỏa nhiệt do tăng trưởng: một phần năng lượng trao đổi chất của tế bào thoát ra ở dạng nhiệt. Do đó cần có thiết bị điều nhiệt để nhiệt độ môi trường lên men dao động trong khoảng +/– 0,5 °C, nhằm duy trì các điều kiện sinh lý tối ưu cho tăng trưởng.

Giới hạn cơ chất: tốc độ tăng trưởng tối đa giảm 50% ở nồng độ 10^{-5} mol đối

https://nhathuocngocanh.com/

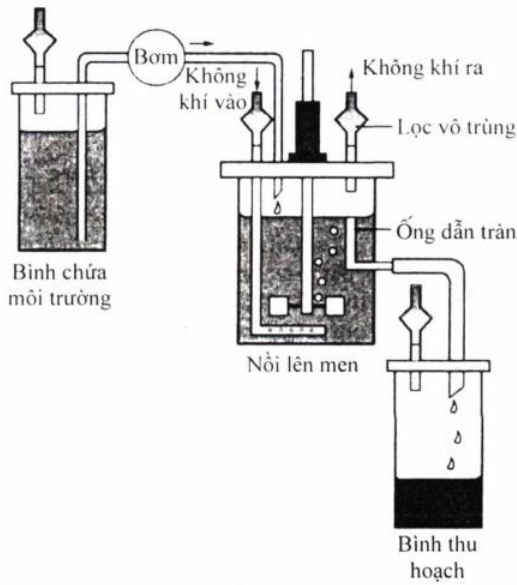
với glucose và các hợp chất N, 10^{-6} mol đối với vitamin và các nhân tố tăng trưởng.

Ức chế cơ chất: nồng độ cơ chất cao làm tốc độ tăng trưởng tối đa giảm 50% ở nồng độ 1–2 mol với glucose và 0,1 – 0,2 mol với nguồn N.

Ức chế sản phẩm: nồng độ sản phẩm cao làm tốc độ tăng trưởng tối đa giảm 50%. Loại ức chế thường gặp ở ethanol, acid hữu cơ, acid amin, kháng sinh... ethanol với nồng độ 1 mol sẽ ức chế nấm men, vi khuẩn.

4.3. Các phương thức lên men

Có nhiều phương thức lên men khác nhau được phân loại theo các thuộc tính cơ bản như sau. Trên thực tế một quy trình lên men là sự kết hợp của nhiều phương thức lên men.



Hình 2.4. Thiết bị lên men liên tục

Kiểu vận hành

Lên men gián đoạn hay lên men từng mẻ (batch fermentation) đây là dạng lên men cổ điển nhất. Môi trường dinh dưỡng được cho một lần vào nồi lên men và thực hiện lên men đến khi thu sản phẩm. Tuần tự theo các giai đoạn: nhân giống, sục khí, phản ứng, thu sản phẩm. Xong một mẻ, lại tiến hành mẻ mới.

Lên men bổ sung dinh dưỡng gián đoạn (fed–batch) trong đó mẫu lên

https://nhathuocngocanh.com/

men được tiến hành theo kiểu gián đoạn nhưng cơ chất không được cho hết một lần mà vào các thời điểm xác định một lượng nhỏ cơ chất được cho vào nồi lên men. Điều đó cho phép kiểm soát chính xác sự sinh trưởng của vi sinh vật và kéo dài thời gian pha lũy thừa hoặc hạn chế các sản phẩm phụ. Cách lên men này cho phép đạt năng suất sinh khối cao hơn. Ví dụ đối với *E. coli* lên men fed–batch cho năng suất sinh khối vào khoảng 70 g /lít môi trường, nhưng chỉ đạt 20 g/lít nếu lên men trong điều kiện thông thường.

Lên men liên tục (continuous fermentation): trong quá trình lên men, nguồn dinh dưỡng được bổ sung liên tục và dịch lên men được lấy bớt ra liên tục và tạo ra sự cân bằng hợp lý (Hình 2.4). Phương thức cung cấp dinh dưỡng này làm cho các điều kiện trong nồi lên men luôn luôn ở trạng thái ổn định, do đó sản phẩm tạo ra tốt hơn. Ưu thế của phương thức lên men này là không phải nhân giống theo từng mẻ, mà có thể lắng đọng môi trường đầu ra để thu tế bào. Do vậy, thời gian lên men có thể được kéo dài hơn. Thí dụ, lên men rượu gián đoạn diễn ra trong 5–7 ngày, còn lên men liên tục có thể cả tháng, thậm chí cả năm.

Độ kín của hệ thống

Lên men hở. Các sản phẩm có khối lượng lớn nhưng giá thành thấp như các sản phẩm lên men truyền thống (rượu, bia, giấm, sữa chua,...) thường được lên men trong các nồi lên men đơn giản và vận hành trong hệ thống hở, không kiểm soát chặt chẽ mức độ ngoại nhiễm. Các quy trình này thường vận hành ở pH hay nhiệt độ mà phần lớn các vi sinh vật ngoại nhiễm khó phát triển, hoặc sử dụng các cơ chất đặc thù cho một số ít vi sinh vật nhất định, do đó nói chung mặc dù hệ thống không kín nhưng mức độ ngoại nhiễm vẫn được kiểm soát trong giới hạn nhất định.

Lên men vô trùng. Các sản phẩm có giá trị cao hoặc có tiêu chuẩn an toàn cao (ví dụ dược phẩm) đòi hỏi hệ thống lên men phức tạp hơn. Hệ thống phải sử dụng môi trường và vật liệu đã tiệt trùng hoặc cho phép tiệt trùng ngay trong hệ thống (CIP – cleaning–in–place) và toàn bộ hệ thống phải được kiểm soát chặt về mức độ nhiễm trong suốt quá trình lên men. Các quy trình này thường sử dụng chủng vi sinh vật thuần.

Sự thông khí

Lên men hiếu khí. Sự tăng trưởng sinh khối hoặc tạo sản phẩm cần có sự hiện diện của oxy, do đó hệ thống lên men phải có cơ chế cung cấp và kiểm soát nồng độ oxy thông qua việc sục khí và khuấy trộn.

Lên men kỵ khí. Ngược lại một số quy trình lên men cần được thực hiện ở điều kiện kỵ khí (lên men rượu), khi đó việc thông khí không còn cần thiết hoặc được thay thế bằng các khí không hô hấp được.

https://nhathuocngocanh.com/

Kiểu thiết bị sử dụng

Lên men nổi

Lên men bề mặt: môi trường lỏng chứa trong khay không quá 5 cm và tế bào mọc lớp trên bề mặt tiếp xúc trực tiếp với không khí. Kiểu lên men này được gọi là lên men tĩnh.

Nuôi cấy lắc: dùng máy lắc để cung cấp oxy do môi trường được bị khuấy trộn nhờ máy lắc. Nếu môi trường tăng trưởng chỉ chiếm 10–20% thể tích bình erlenmeyer, có thể đạt mật độ tế bào 1–2 g khô/lít môi trường.

Lên men bán rắn: cơ chất ẩm để lớp mỏng trên khay.

Lên men chìm

Lên men chìm (submerged fermentation) là kiểu lên men chủ yếu trong công nghiệp. Khi lên men với quy mô lớn hay mật độ tế bào cao, người ta dùng bơm khí (compressor) để thông khí. Thiết bị chủ yếu là nồi lên men (fermentor hay bioreactor)

4.4. Kỹ thuật lên men

Lên men bề mặt

Môi trường

Môi trường rắn thường là cám, bột, ngô, tấm, gạo... Độ ẩm khoảng 60%. Môi trường lỏng thường dùng là nước đường hóa, nước bã rượu, rỉ đường.

Vi sinh vật phát triển hấp thu những chất dinh dưỡng của môi trường (phải tiết ra enzym) và sử dụng oxy phân tử, oxy không khí để hô hấp. Chính vì vậy nuôi cấy bề mặt cần phải có bề mặt thoáng rộng, lớp môi trường không quá sâu (2 – 5 cm).

Thí dụ: nuôi cấy bề mặt môi trường rắn thường dùng cho nấm mốc *Aspergillus* để lấy enzym, hay nuôi cấy xạ khuẩn trên gạo ngô để lấy kháng sinh.

Nuôi cấy *Aspergillus niger* trên bề mặt môi trường lỏng để lấy acid citric. *Saccharomyces cerevisiae* thường được dùng lên men nổi trong công nghiệp cồn.

Nhân giống

Việc nhân giống trong nuôi cấy bề mặt thường bằng hệ sợi hoặc bào tử của nấm mốc hoặc xạ khuẩn.

Nuôi cấy nhân giống có thể để lâu cho nấm mốc và xạ khuẩn mọc già và sinh bào tử. Thu bào tử bằng cách dùng máy hút hoặc dùng chổi lông mềm đã tiệt trùng quét lên mặt môi trường rắn. Bào tử khô đựng trong các bình kín gắn parafin bảo quản ở những nơi mát và bảo quản được hàng năm.

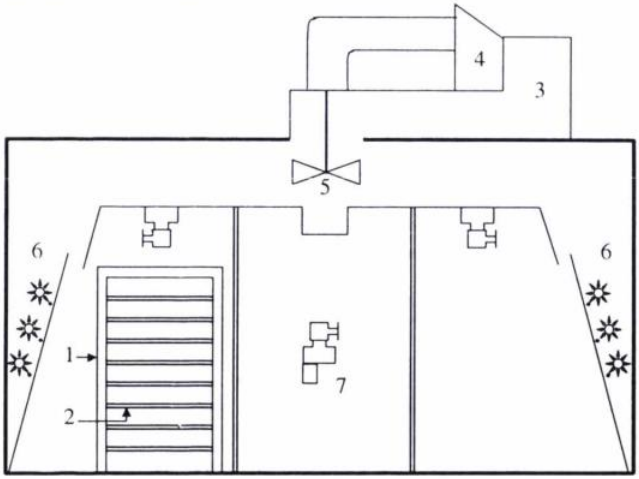
Tiến triển

Cấy giống từ môi trường đã nhân giống. Các bào tử hoặc các mẫu hệ sợi trong

https://nhathuocngocanh.com/

môi trường lên men sau thời gian tiềm phát sẽ phát triển mạnh. Quá trình phát triển của vi sinh vật cần oxy phân tử của không khí để hô hấp. Sản phẩm của sự hô hấp là khí CO_2, và nhiệt lượng tỏa xung quanh. Kết quả là nhiệt độ môi trường tăng lên, nồng độ CO_2 cao lên và môi trường có thể bị khô dần hoặc ướt thêm. Độ ẩm của phòng nuôi cấy vào khoảng 95 – 100%.

Hoạt lực sinh tổng hợp vi sinh vật cao trong thời kỳ các tế bào còn trẻ và giảm dần khi bắt đầu sinh bào tử.



Hình 2.5. Buồng lên men bề mặt sử dụng khay

1. Giá đựng khay; 2. Khay; 3. Cửa cho không khí sạch vào buồng; 4. Cửa cho không khí ra; 5. Quạt; 6. Chỗ phun nước; 7. Bộ phận xả hơi nóng để điều chỉnh nhiệt độ của buồng

Phương tiện

Khi nuôi cấy bề mặt người ta thường rãi môi trường trên các khay, mành, nong, nia. Đây là phương pháp cổ điển, nhưng ngày nay vẫn được phổ biến rộng rãi ở hầu hết các nước trên thế giới. Phương pháp này chiếm tỷ lệ cao trong sản xuất các chế phẩm enzym và chiếm ưu thế cao trong công nghiệp sản xuất acid citric.

Người ta có thể sử dụng buồng lên men bề mặt có các khay đựng mốc trường và có những bộ phận thoáng khí, phun nước thành bên và điều chỉnh nhiệt bằng hơi nóng *(hình 2.5)*.

Lên men chìm

Nhân giống

Nuôi cấy chìm được tiến hành trong các thùng lên men chứa môi trường dinh dưỡng có cánh khuấy và sục khí để cung cấp oxy cho vi sinh vật phát triển.

https://nhathuocngocanh.com/

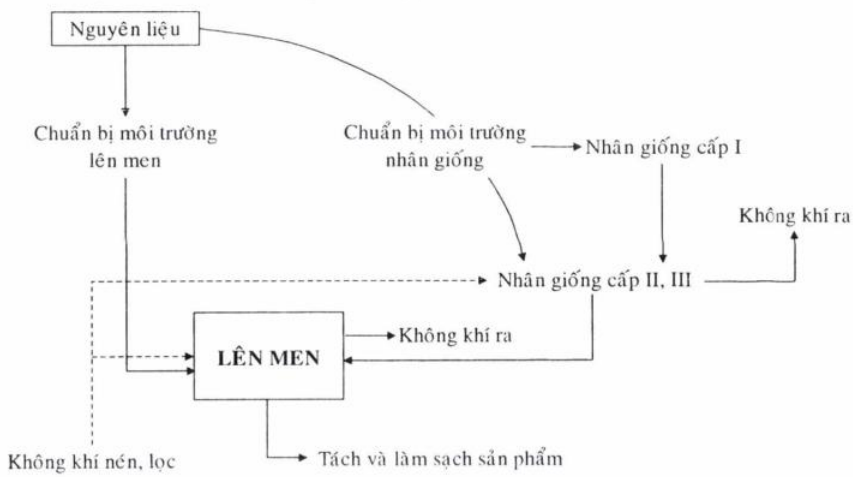
Trong quá trình lên men giống được tiến hành nhân giống qua các cấp : cấp 1 trong bình đặt trên máy lắc, cấp 2 trong bình nhân giống 50 lít có cánh khuấy và sục khí, cấp 3 nếu các thùng lên men chính khoảng vài chục mét khối. Tỷ lệ nhân giống khoảng 1 đến 10%.

Tiến triển

Giống sau khi được tiếp vào thùng lên men qua một vài giờ ở giai đoạn tiềm ẩn, bắt đầu phát triển theo chỉ số logarit. Ở giai đoạn này, các thành phần dinh dưỡng giảm nhanh, nhu cầu oxy tăng nhiều, nhiệt lượng tỏa ra cao, trên bề mặt môi trường nổi bọt, khối bọt tăng dần, gây nhiễm trùng làm hỏng nồi men. Vì vậy khi thấy xuất hiện bọt phải cho dầu thực vật hay mỡ cá voi, hoặc chất phá bọt tổng hợp.

Trong quá trình phát triển, vi khuẩn thường sinh ra các acid hữu cơ (acid lactic, acid acetic, acid propionic...) cùng với các gốc acid còn sót lại như SO_4^{-2}, Cl^{-1}, NO_3^{-1} của các muối amoni làm cho môi trường chuyển về acid. Do vậy người ta thường thêm khoảng 2 – 3% $CaCO_3$ để làm chất ổn định pH hoặc thêm urê hay NH_4OH để điều chỉnh pH.

Thời gian lên men khoảng 30 – 70 giờ, có khi dài hơn.



Hình 2.6. Sơ đồ lên men chìm

Đặc điểm lên men chìm

Dùng môi trường dinh dưỡng có thể hầu như hoàn toàn đáp ứng về nhu cầu sinh lý của từng giống vi sinh vật.

Với một đơn vị thể tích dịch nuôi cấy cho được số lượng chất sinh tổng hợp

https://nhathuocngocanh.com/

cao và hiệu suất lên men nói chung cao hơn nhiều so với phương pháp lên men bề mặt.

Các thiết bị lên men dễ cơ khí hóa, tốn ít nhân công và diện tích mặt bằng nhỏ.

Tuy vậy, phương pháp này cũng có nhược điểm là đòi hỏi trang bị kỹ thuật cao, dễ bị nhiễm trùng toàn bộ. Trong lên men chìm cần khuấy và sục khí liên tục vì vi sinh vật chỉ sử dụng được oxy hòa tan trong môi trường. Khí được nén qua một hệ thống lọc sạch tạp trùng. Hệ thống này tương đối phức tạp và dễ gây nhiễm cho môi trường nuôi cấy *(hình 2.6)*.

4.5. Các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất lên men

Ảnh hưởng của pH môi trường

Trong các dung dịch thường xuyên có ion H^+ tự do. Nồng độ các ion H^+ trong môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng lớn đến sự trao đổi chất và phát triển của vi sinh vật.

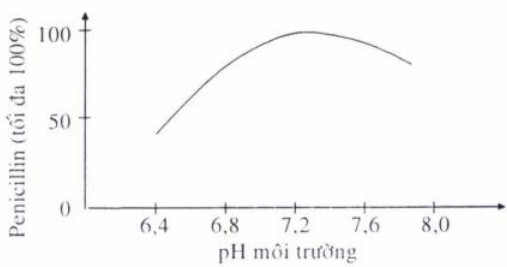
Nồng độ ion H^+ được thể hiện bằng số gam ion H^+ trong 1 lít môi trường. Nếu trong 1 lít dung dịch có 0,001 g ion H^+ thì nồng độ của nó là KH = 0,001g/1 hay HK = $1/10^3$ g/1 = 10^{-3} g/1 và môi trường có pH 3.

pH môi trường ảnh hưởng lớn đến sự phát triển, khả năng sinh tổng hợp của vi sinh vật:

– Tác dụng trực tiếp của ion H^+ hay ion OH^- đến tính chất keo của tế bào, đến hoạt lực của enzym

– Tác dụng gián tiếp pH đến tế bào

pH môi trường ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp của vi sinh vật không giống nhau. Có những pH, ở đó vi sinh vật vẫn phát triển bình thường, nhưng tạo ít hoặc không tạo sản phẩm. Thí dụ: trong sinh tổng hợp penicillin, người ta nhận thấy khi pH của môi trường dưới 6,0 thì vi sinh vật phát triển bình thường, nhưng không tạo được penicillin – pha II hoàn toàn không có *(hình 2.7)*.



Hình 2.7. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sự tạo penicillin

https://nhathuocngocanh.com/

Đối với mỗi một sản phẩm đều có vùng pH tối thích xác định.

Thí dụ : việc tạo thành tetracyclin là tối đa ở vùng pH 6,8 – 8,0, đối với streptomycin là 7,0 – 8,5; đối với penicillin 6,8 – 7,5 ; đối với acid glutamic 6,8 – 7,5; đối với lysin 6,8 – 7,2.

Nồng độ glucose cao trong môi trường thường làm pH chuyển dần về phía acid, vì trong quá trình trao đổi chất vi sinh vật tạo ra nhiều acid hữu cơ.

Trị số pH đầu tiên của môi trường có ảnh hưởng không nhỏ tới sinh trưởng và sinh tổng hợp của vi sinh vật. pH đầu tiên tạo điều kiện thích hợp cho những giai đoạn đầu của quá trình đồng hóa, tích tụ những "bán thành phẩm" để tổng hợp những phân tử các hợp chất cần thiết. Thí dụ : pH đầu thích hợp cho xạ khuẩn *Act. aureofaciens* trong quá trình tổng hợp biomycin là khoảng 6,6 – 6,8.

Có trường hợp, phải thay đổi pH tối thích theo pha sinh trưởng và pha tích tụ sản phẩm. Thí dụ : trong lên men penicillin cần tạo ra ở pha sinh trưởng pH gần 6,8 và ở pha tạo thành penicillin pH khoảng 7,3 *(hình 2.7)*.

Nhu cầu oxy và ảnh hưởng của oxy đến quá trình sinh tổng hợp

Nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí cần phải có sự tiếp xúc giữa chúng với không khí. Trong nuôi cấy bề mặt thì các lớp môi trường phải mỏng để tạo ra mặt thoáng rộng và trong nuôi cấy chìm phải tạo được những điều kiện không khí hòa tan nhiều vào môi trường lỏng.

Độ hòa tan oxy

Vi sinh vật chỉ sử dụng oxy hòa tan trong môi trường lỏng. Tính chất này liên quan tới sự phân bố hệ enzym hô hấp tế bào chất (nước trong tế bào chất chiếm 80%). Lượng oxy hòa tan trong nước rất ít. Tế bào sử dụng oxy để hô hấp và làm giảm lượng oxy trong môi trường.

Thiếu oxy nhất thời sẽ phá vỡ sự trao đổi chất trong tế bào. Vì thế phải cung cấp oxy sao cho tốc độ hòa tan oxy bằng tốc độ sử dụng oxy của vi sinh vật.

Tốc độ hòa tan của oxy trong môi trường lỏng được tính theo công thức :

$$R = \frac{dc}{dt} = K_{La}(C - C_1)$$

Trong đó : R : tốc độ hòa tan của oxy

C : nồng độ oxy bão hòa ở áp suất riêng

C_1 : nồng độ oxy hòa tan ở thời điểm lựa chọn

KLa : hằng số tỷ lệ

t : thời gian

Môi trường lỏng được khuấy đều sẽ làm tăng tốc độ hòa tan của oxy. Song

https://nhathuocngocanh.com/

khuấy quá mạnh sẽ dẫn đến việc làm hỏng cơ học các tế bào và dẫn đến hiện tượng tự phân.

Tăng áp suất riêng của phần (C) sẽ làm tăng độ hòa tan của oxy. Điều này có thể thực hiện bằng cách nén khí qua các máy nén (compressor).

Khi nuôi cấy vi sinh vật hiếu khí trong các bình nhỏ trên máy lắc, tốc độ hòa tan của oxy phụ thuộc vào tốc độ của máy lắc (số vòng hoặc số lần lắc) và kiểu lắc (lắc tròn hay lắc ngang), cũng như tỷ số thể tích môi trường với thể tích chung của bình.

Độ hòa tan của oxy còn phụ thuộc vào nhiệt độ khi nuôi cấy, vào nồng độ các chất hợp phần và độ nhớt của môi trường. Khi nhiệt độ tăng thì độ hòa tan giảm. Nồng độ oxy hòa tan trong các môi trường giảm hai lần khi nhiệt độ tăng từ 30 đến 37°C.

Nồng độ oxy cũng giảm khi sử dụng các chất hoạt động bề mặt, các chất phá bọt và hàm lượng tăng của sinh khối vi sinh.

Có nhiều phương pháp xác định oxy hòa tan : hóa học, cực phổ, đo điện thế oxy hóa – khử, đo trên máy Vacbua.

Phương pháp hóa học được dùng nhiều nhất là phương pháp sulfit. Phương pháp này dựa trên cơ sở oxy hóa sulfit thành sulfat trong sự có mặt của ion đồng hoặc cobalt. Nhược điểm: không chính xác trong dịch nuôi cấy.

Nồng độ oxy hòa tan được biểu thị bằng :

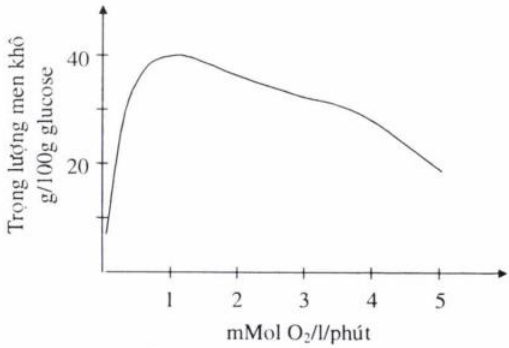
- Phần trăm so với bão hòa.
- Áp suất riêng.
- Milimol hoặc miligam O_2 (gam O_2), lít trên giờ hay lít trên phút.

Ảnh hưởng của sự thông khí lên sự sinh trưởng của vi sinh vật

Đối với nhiều vi sinh vật, sự thông khí sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng, rút ngắn pha tiềm phát, nâng cao sinh khối. Khi tăng tốc độ hòa tan oxy từ 0 đến 5 mmol O_2/lít/phút lượng sinh khối cuối cùng của *Serratia marsescens* sẽ tăng một cách đáng kể và sinh khối đạt cực đại ở 5 mmol O_2/lít/phút. Nhưng nếu tiếp tục tăng thông khí nữa thì lượng sinh khối cuối cùng sẽ giảm. Tốc độ sinh trưởng của *Azotobacter vinelandii* tăng nhiều khi tăng độ thông khí từ 0,21 đến 0,6 g/lít/giờ. Nhưng nếu quá 0,6 g/lít/giờ thì sinh khối sẽ giảm, hình 2.8 biểu diễn mối tương quan giữa độ thông khí và hiệu suất sinh khối của nấm men *Sac. cerevisiae*.

Nhu cầu oxy của vi sinh vật trong các giai đoạn sinh trưởng không giống nhau: trong thời kỳ đầu do sinh khối còn ít, tốc độ hòa tan oxy lớn nên thông khí mạnh là tốt.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 2.8. Ảnh hưởng của mức độ thông khí đến hiệu suất sinh khối của *Saccharomyces cerevisiae*

Độ hòa tan của oxy phụ thuộc vào nhiệt độ. Ở nhiệt độ 5 – 30°C, độ hòa tan của oxy có thể được tính theo công thức :

$$C = \frac{475}{33T}$$

Trong đó : C biểu thị bằng ppm

T : độ bách phân

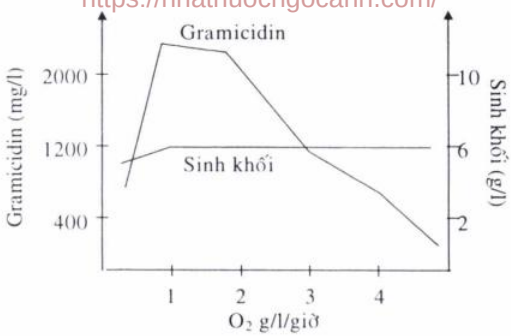
Mức độ thông khí tăng dần theo sinh khối. Thường nhu cầu oxy cực đại khi mức độ sinh trưởng còn chưa dừng lại, khi tốc độ sinh trưởng giảm dần thì oxy hòa tan trong dịch nuôi cấy cũng giảm dần tới số không.

Ảnh hưởng của sự thông khí đến quá trình trao đổi chất và tích lũy sản phẩm sinh tổng hợp

Khi nuôi cấy *Propionibacterium jenseni* trong điều kiện hiếu khí thì nó có thể đồng hóa được glycerin, nhưng khi nuôi cấy trong điều kiện yếm khí thì không đồng hóa được. Khi nuôi cấy nấm men trong điều kiện yếm khí sẽ xảy ra quá trình lên men rượu, khi cung cấp oxy thì nấm men sẽ phát triển sinh khối. Thay đổi cường độ hiếu khí sẽ thay đổi tỷ số giữa các sản phẩm oxy hóa và khử ở các vi sinh vật hiếu khí không bắt buộc như vi khuẩn lactic, vi khuẩn propionic.

Nâng cao cường độ thông khí sẽ làm tăng tốc độ sinh trưởng và số lượng sinh khối vi sinh vật, đồng thời liên quan đến sự tạo thành sản phẩm trao đổi chất (kháng sinh, acid hữu cơ, acid amin, vitamin, enzym, ...). Mức thông khí tăng từ 1 đến 3 g O_2/l/giờ làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp streptomycin một cách đáng kể. Hình 2.9 cho ta thấy sự thông khí ảnh hưởng rõ tới quá trình sinh tổng hợp Gramicidin S ở *Bacillus brevis* và ít có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn này.

https://nhathuocngocanh.com/



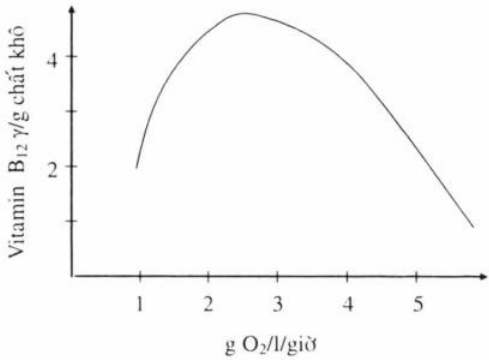
Hình 2.9. Sự tạo thành Gramicidin S trên môi trường tổng hợp phụ thuộc vào mức độ thông khí ở *Bacillus brevis*

Trong quá trình oxy hóa trực tiếp glucose thành acid gluconic hoặc rượu thành acid acetic thì tốc độ sử dụng oxy đều cực đại. Trong lên men citric của *Aspergillus niger* thì hiệu suất cực đại trùng với hoạt lực hô hấp tối đa của mốc này. Nuôi cấy *Brevibacterium flavum* nếu thông khí tốt sẽ tạo ra chủ yếu là acid glutamic và acid cetoglutaric, nếu thông khí không đủ sẽ tạo ra acid succinic và acid lactic và khi không thông khí thì sản phẩm sẽ là acid lactic. Kết quả tương tự đối với *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*) trong quá trình lên men glutamic. Nếu thông khí không đầy đủ, các enzym lactatdehydrogenase và alanindehydrogenase sẽ hoạt động và tạo acid lactic, alanin từ acid pyruvic. Thông khí tốt tạo điều kiện cho hệ enzym glutamatdehydrogenase xúc tác phản ứng tạo acid glutamic từ acid α–cetoglutaric.

Trong quá trình nuôi cấy hiếu khí, phải cung cấp oxy cho vi sinh vật hô hấp và phát triển tăng sinh khối, đồng thời tạo điều kiện để hệ enzym trong tế bào hoạt động và cho hiệu suất sinh tổng hợp cao. Song không phải mọi trường hợp đều theo tỷ lệ thuận: nếu độ thông khí quá mức thích hợp thì hiệu suất sẽ giảm. Lên men vitamin B_{12} đạt hiệu suất tối đa ở độ thông khí 2,7 g O_2/l/giờ, nếu nâng cao nữa sẽ làm giảm lượng vitamin *(hình 2.10)*.

Đối với mỗi quá trình lên men cần phải nghiên cứu ảnh hưởng của cường độ thông khí đối với hiệu suất tạo thành sản phẩm. Trong công nghiệp vi sinh, không khí được nén qua máy nén, qua hệ thống làm nguội, tách dầu nước, qua lọc rồi thổi vào nồi lên men. Trong các thùng lên men và các thùng nuôi cấy nhân giống đều có hệ thống khuấy để trộn môi trường và phân tán không khí. Cường độ sục khí và khuấy tùy thuộc vào yêu cầu của từng loại vi sinh vật, vào từng điều kiện nuôi cấy nhằm thu được hiệu suất sản phẩm tối đa.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 2.10. Sự phụ thuộc vào tốc độ thông khí của quá trình lên men vitamin B_{12}

5. GIÁM SÁT QUÁ TRÌNH LÊN MEN

Các nồi lên men hiện đại được trang bị nhiều loại cảm biến tại chỗ (*in situ*) và được vận hành thông qua giao diện điều khiển kỹ thuật số (direct digital control – DDC). Điều này cho phép kiểm soát một cách chính xác nhiều thông số vận hành cùng lúc như nhiệt độ, pH, tốc độ cấp dinh dưỡng, nồng độ oxy hòa tan, ... *(Bảng 2.8)*. Các thông số này đảm bảo các điều kiện cần thiết để vi sinh vật phát triển tối ưu, do đó được gọi là các thông số nuôi cấy. Ngoài các thông số nuôi cấy, một số nồi lên men hiện đại còn được trang bị các cảm biến *in situ* và các bộ phân tích trực tuyến (on–line) như lấy mẫu, phân tích khí thải, ... cho phép theo dõi thường xuyên các thông số nuôi cấy. Các thông số này có thể được theo dõi với tần suất rất cao (30 – 1.000 lần/giờ). Với các tiến bộ về máy tính, việc kiểm soát các thông số nuôi cấy có thể được thực hiện một cách chính xác với độ lặp lại cao.

Bảng 2.8. Một số cảm biến *in situ* để đo thông số nuôi cấy

Thông số	Cảm biến	Khoảng hoạt động	Độ chính xác
Nhiệt độ	Pt–100	0 – 150 °C	0,1 °C
Áp suất	Piezoresistor	0 – 2 bar	20 mbar
Lưu tốc khí	Đồng hồ nhiệt lượng	0 – 20 L min^{-1}	20 mL min^{-1}
pH	Điện cực pH	2 – 12	0,02
pO_2	Điện cực Polarografic Clark	0 – 400 mbar	2 mbar
pCO_2	Điện cực pH có màng	0 – 100 mbar	2 mbar

Các cảm biến *in situ*. Các cảm biến này được đặt ngay bên trong nồi và có thể được tiệt trùng cùng với nồi mà không phải tháo ra *(Bảng 2.8)*. Chúng được

https://nhathuocngocanh.com/
thiết kế dựa trên các nguyên lý khác nhau nhưng nói chung hầu hết các cảm biến này rất đáng tin cậy và được sử dụng thường quy trong các quy trình ở phòng thí nghiệm hay ở quy mô công nghiệp.

Bảng 2.9. Ưu và nhược điểm của các nguyên lý cảm biến *in situ* khác nhau

Nguyên lý	Ưu điểm	Nhược điểm
Mật độ quang	Khoảng tuyến tính rộng	Có nhiễu tín hiệu
Huỳnh quang	Độ nhạy cao	Nhiều nhiễu
	Đo được hoạt động tế bào	Khó diễn giải tín hiệu
Độ dẫn	Dải đo được rộng	Bị nhiễu bởi sự thông khí và khuấy
	Đo được hoạt động tế bào	Khó diễn giải tín hiệu
Siêu âm	Khoảng tuyến tính rộng	Bị nhiễu bởi sự thông khí và khuấy
	Không cần vệ sinh	Nhạy cảm với nhiệt

Các bộ phân tích trực tuyến. Một số thông số quan trọng không thể đo được bằng các cảm biến *in situ* như glucose và các thành phần môi trường, khi đó người ta dùng các phương pháp phân tích trực tuyến. Trong phương pháp này, mẫu được lấy và phân tích một cách tự động. Kiểu FIA (flow injection analysis) hay được dùng vì tốc độ, độ chính xác, độ tin cậy cao. Tuy nhiên, nhược điểm của FIA là chỉ phân tích được một tham số. Thế hệ tiên tiến hơn sử dụng các kỹ thuật SIA (sequential injection analysis) cho phép đo nhiều tham số trong cùng một thiết bị. Các hệ thống phân tích khác như khối phổ (mass spectrometry – MS), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), và sắc ký khí (GC) đôi khi cũng được dùng. Mặc dù các hệ thống phân tích này có thể phân tích nhiều tham số trong một lần chạy, nhưng chúng không thể sánh được với FIA về độ tin cậy cũng như tốc độ (tần suất đo cao).

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày các chiến lược phân lập chủng thích hợp để sản xuất.
2. Giải thích các tiêu chí của chủng lên men công nghiệp.
3. So sánh các kỹ thuật đột biến để cải tạo chủng.
4. Công thức hóa học của tế bào và cơ sở hình thành môi trường lên men.
5. So sánh kỹ thuật lên men bề mặt và lên men chìm.
6. Các thông số cần kiểm soát trong quá trình lên men và loại cảm biến tương ứng.
7. Sản phẩm nào sau đây ***không*** phải của lên men công nghiệp:

   A. Sinh khối B. Streptokinase

   C. Insulin tái tổ hợp D. Kháng sinh quynolon
8. Yêu cầu nào ***không*** đúng đối với chủng lên men công nghiệp

https://nhathuocngocanh.com/

A. Ít cần yếu tố tăng trưởng

B. An toàn, không gây bệnh

C. Tiết được sản phẩm ra môi trường

D. Dễ thu hoạch

9. Yếu tố nào ***không*** ảnh hưởng đến việc lựa chọn thành phần môi trường lên men

A. Tính sẵn có

B. Hiệu suất sử dụng và tạo sản phẩm

C. Ít tạo sản phẩm phụ

D. Tan được trong nước

10. Cặp thông số – cảm biến nào sau đây ***không*** phù hợp

A. Nhiệt độ – Pt–100

B. PO_2 – Piezoresistor

C. PCO_2 – Điện cực pH có màng

D. Lưu tốc khí – Đồng hồ nhiệt lượng

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 3

SẢN XUẤT KHÁNG SINH

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các bước chính trong lên men Penicillium chrysogenum sản xuất benzylpenicillin: thành phần môi trường, cách nuôi dưỡng, chủng.

2. Trình bày được tóm tắt quy trình lên men S. erythraea sản xuất erythromycin.

3. Nêu được nguyên tắc tách benzylpenicillin.

1. MỞ ĐẦU

Đa số kháng sinh được sản xuất ở quy mô công nghiệp bằng cách lên men. Thực tế khoa học lên men kháng sinh phát triển chậm mặc dù có sự gia tăng không ngừng việc sử dụng các thiết bị phức tạp, áp dụng các kỹ thuật kiểm soát và sử dụng máy tính. Khó tối ưu hóa quy trình lên men vì không thể có hai mẻ giống nhau hoàn toàn, hiệu suất lên men kháng sinh liên quan với dân số tế bào sống luôn thay đổi cả về số lượng và chất lượng suốt chu kỳ sản xuất.

Sản xuất benzylpenicillin (penicillin G, nguyên thủy chỉ là penicillin) được chọn là mô hình cho quá trình sản xuất kháng sinh. Đây là kháng sinh quan trọng nhất cả về lịch sử và giá trị y học. Penicilin là kháng sinh được sản xuất đầu tiên ở quy mô lớn. Hiện nay, penicillin vẫn được kê toa trên toàn cầu và còn là nguyên liệu đầu cho các kháng sinh bán tổng hợp. Ngoài ra trong bài này quy trình sản xuất kháng sinh macrolid erythromycin bằng xạ khuẩn *Saccharopolyspora erythraea* cũng được mô tả để minh họa vì xạ khuẩn là nguồn sinh kháng sinh tự nhiên phong phú nhất.

Năm 1928, Fleming tình cờ phát hiện ra các hộp petri nuôi tụ cầu bị nhiễm mốc có tạo vòng ức chế. Ông tách mốc xanh này ra nghiên cứu và định danh là *Penicillium notatum*, tuy nhiên, ông chưa tách được chất có tác dụng cũng như nghiên cứu cấu trúc. Năm 1941, công nghệ sản xuất penicilin đã được hình thành. Các chủng đầu tiên chỉ đạt 10–15 IU/ml dịch men. Giai đoạn này người ta nuôi bằng phương pháp bề mặt, dùng nước lọc ra để rửa vết thương. Quá trình đột biến để cải tạo giống đồng thời đưa kỹ thuật lên men chìm vào sản xuất nâng hiệu suất tăng dần lên. Hiện nay hiệu suất tăng gấp 85.000 lần so với lúc ban đầu.

Ở Việt Nam, người nghiên cứu penicilin đầu tiên là cố giáo sư Đặng Văn

https://nhathuocngocanh.com/

Ngữ. Năm 1947, giáo sư đã mang chủng *Penicillium chrysogenum* từ Nhật về và trong chiến khu Việt Bắc giáo sư đã sản xuất ra dịch men penicillin để chữa cho các thương binh.

2. SẢN XUẤT BENZYLPENICILLIN

2.1. Giống

Giống để sản xuất penicillin là *Penicillium notatum*, được phân lập bởi Fleming vào năm 1928 từ sự nhiễm tình cờ. Vào năm 1940, Florey và Chain đã sản xuất được penicillin tinh khiết và tiềm năng chữa bệnh to lớn của nó trở thành hiện thực. Tuy nhiên, kỹ thuật nuôi cấy bề mặt môi trường lỏng để nuôi cấy thể hiếu khí bắt buộc này kéo dài, cần nhiều thao tác và dễ bị nhiễm. Việc phân lập được chủng *Penicillium chrysogenum* cho hiệu suất cao (gấp 100 lần chủng của Fleming) từ quả dưa đỏ bị nhiễm ở chợ Peoria, thuộc bang Illinois – Mỹ đã cho một bước tiến quan trọng. Chủng *P. chrysogenum* có thể nuôi lên men chìm trong bình kín thể tích 250 m^3 có khuấy và thông khí. Từ một nấm gốc này, mỗi nhà sản xuất penicillin có chủng đặc biệt bằng cách xử lý với các tác nhân gây đột biến như tia Rơnghen, tia tử ngoại và các chất ankyl hóa và chọn lọc để thu các biến đổi cải tiến. Các thể biến đổi chọn lọc này có khả năng sản xuất lượng penicillin lớn hơn nhiều so với chủng hoang dại, đặc biệt là khi lên men trong các điều kiện môi trường có kiểm soát. Các kết quả gây đột biến và lai tạo chủng có thể tóm tắt như sau:

– Tốc độ tạo sản phẩm và hiệu suất cao.

– Có khả năng tạo thành sản phẩm trong điều kiện nuôi cấy chìm (các chủng đầu tiên chỉ sinh ra sản phẩm trong điều kiện nuôi cấy bề mặt).

– Sử dụng được cơ chất phức tạp và tiêu thụ tốt phenylacetat.

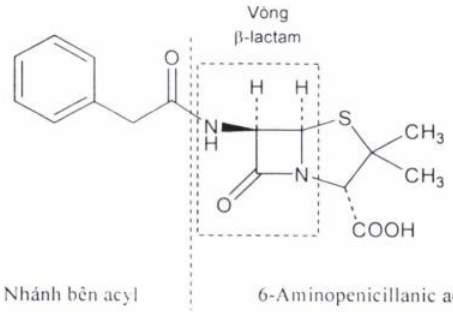
– Không tạo sắc tố gây khó khăn cho việc tinh chế.

– Có hệ sợi sinh trưởng rắn chắc nên dễ tách sợi nấm khỏi môi trường.

Khó khăn là việc chọn lọc được các chủng dị hợp tử bền vững.

Các quy trình chọn lọc chủng này trở thành đặc trưng cơ bản công nghệ sinh học công nghiệp. Các chủng sản xuất được bảo quản ở dạng ngủ bằng bất cứ kỹ thuật bảo quản nuôi cấy chuẩn nào. Huyền phù bào tử có thể được trộn với giá thể trơ như đất, cát hay trong kê vô trùng, chia ra và sấy hoặc được trộn trong môi trường thích hợp và đông khô hoặc bảo quản trong bình nuôi cấy lỏng. Tất cả các hoạt động phòng thí nghiệm được tiến hành trong buồng thổi khí vô trùng đặt trong phòng có duy trì khí lọc áp suất hơi dương so với môi trường bên ngoài. Người thực hiện mặc áo choàng và làm việc vô trùng. Lên men kháng sinh là quá trình nuôi cấy vô trùng bắt buộc, không được để nhiễm sinh vật lạ.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 3.1. Cấu trúc của penicillin G – penicillin tự nhiên

2.2. Nhân giống

Mục đích của nhân giống nhằm thu lượng giống tinh khiết cần thiết ở pha tăng trưởng lũy thừa (logarit) cho giai đoạn lên men. Hình 3.2 là minh họa điển hình cho nhân giống. Thời gian cho mỗi giai đoạn nhân giống được tính bằng ngày. Giống cấy cho giai đoạn sản xuất thường là 1 – 10% tổng thể tích lên men. Nếu lên men được cấy giống không đủ, có thể sẽ kéo dài thời gian tiềm ẩn trước khi bắt đầu tăng trưởng và như vậy sẽ làm kéo dài giai đoạn lên men. Điều này vừa không kinh tế vừa có thể làm tăng trưởng thoái hóa ảnh hưởng hiệu suất, chất lượng và do đó cũng tăng giá.

Môi trường nhân giống được thiết kế để cung cấp cho vi sinh vật tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết. Cung cấp oxy thích hợp ở dạng khí vô trùng và kiểm soát nhiệt độ ở mức mong muốn. Tiêu chuẩn chính để chuyển qua giai đoạn kế tiếp trong tiến trình là giống không nhiễm và tăng trưởng đến mật độ tế bào đã xác định trước. Thường thì sợi nấm mọc phân nhánh và theo thời gian dịch nuôi cấy sánh giống như xúp.

Hình 3.2. Các giai đoạn chuẩn bị giống cho lên men benzylpenicillin

2.3. Lên men

Thiết bị lên men thường làm bằng thép không gỉ, hình trụ, đứng, kín, có dung tích 25–250 m^3. Chiều cao của nó thường gấp ba lần đường kính.

https://nhathuocngocanh.com/

Cung cấp oxy

Lên men penicillin cần oxy được cung cấp dạng không khí lọc vô trùng từ máy nén khí, tốc độ 0,5 – 1,2 (thể tích/phút). Hệ thống cánh khuấy và các gờ cản trong nồi lên men sẽ thúc đẩy sự thông khí.

Kiểm soát nhiệt độ

Quá trình sản xuất benzylpenicillin rất nhạy cảm với nhiệt độ. Nhiệt do chuyển hóa được sinh ra nhiều trong quá trình lên men nên nhiệt độ phải được giảm duy trì ở 26±1°C bằng hệ thống làm lạnh. Nhiệt này được chuyển bằng nước lạnh lưu thông qua các dãy ống trong nồi hoặc qua các ống xoắn quanh bên ngoài ở vỏ nồi. Hệ thống nước lạnh này cũng được dùng để làm nguội môi trường tiệt trùng trong nồi trước khi cấy giống vào.

Thiết bị và tác nhân khử bọt

Nuôi cấy vi sinh vật có thể tạo bọt khi chúng được khuấy và thông khí mạnh. Nếu không kiểm soát bọt tạo ra này, dịch nuôi cấy có thể bị mất qua đường khí thải. Vì vậy nồi lên men thường có hệ thống tự động để phát hiện bọt ngay khi chúng mới chớm, cung cấp áp suất ngược tạm thời để môi trường trong nồi không bị trào và thêm tác nhân khử bọt vô trùng.

Các cảm biến cũng được lắp vào hệ thống lên men để hiện liên tục các biến số quan trọng như nhiệt độ và pH, công suất dùng của motor điện, dòng khí, oxy hòa tan và khí thải.

Bổ sung môi trường

Không phải tất cả các chất dinh dưỡng cần trong quá trình lên men được cho vào ngay từ môi trường nuôi cấy ban đầu. Một số thứ được tiệt trùng riêng và bổ sung vào trong khi lên men, thường là qua hệ thống tự động có chương trình liên tục điều chỉnh trước hoặc bổ sung vô trùng riêng rẽ.

Hệ thống chuyển và lấy mẫu

Có các hệ thống vô trùng để chuyển giống vào nồi, để lấy mẫu thường quy trong quá trình lên men, để thu hoạch sớm, v.v... Sự vô trùng được đảm bảo bằng thiết kế kỹ thuật và bằng dùng hơi nước đến tất cả các phần của nồi và hệ thống ống liên quan. Việc lấy mẫu rất cần thiết để theo dõi số lượng tăng trưởng, động học các chất dinh dưỡng chính và nồng độ penicillin. Ngoài ra, kiểm tra nuôi cấy có bị nhiễm vi sinh vật không mong muốn hay không cũng rất quan trọng.

2.4. Kiểm soát lên men

Sinh tổng hợp benzylpenicillin bị giảm nhiều nếu lượng oxy sẵn có thấp hơn ngưỡng mặc dù vi khuẩn vẫn tiếp tục tăng trưởng. Vì thế, nếu tốc độ tăng trưởng

https://nhathuocngocanh.com/

trong quá trình lên men được giữ như ở giai đoạn nhân giống, dịch nuôi cấy sẽ trở nên rất đậm đặc và sự thông khí sẽ không đủ để duy trì sản xuất penicillin nữa. Như vậy, các điều kiện điều chỉnh cho sự tăng trưởng nhanh chỉ đến khi dân số tế bào đạt được mật độ tối đa mà nồi lên men có thể cung ứng.

Môi trường lên men

Môi trường ban đầu cho vào nồi lên men là phức hợp thiết kế chỉ để cung cấp số lượng mong muốn cho tăng trưởng lúc đầu. Nguồn nitơ chủ yếu là cao ngô (corn steep liquor, CSL) là sản phẩm phụ của công nghệ tinh bột ngô. Nguyên liệu này không chỉ đặc biệt quan trọng cho lên men penicillin mà còn có giá trị trong nhiều môi trường nuôi nấm sản xuất kháng sinh. Cao ngô cũng chứa nhiều hợp chất carbon, như các acid và đường, các ion vô cơ và các yếu tố tăng trưởng. Tuy nhiên, giống như một số chất dinh dưỡng khác, cao ngô là phức hợp dinh dưỡng, không được định rõ về mặt hóa học, có nguồn gốc từ các sản phẩm tự nhiên và biến đổi nhiều giữa các lô mẻ sản xuất. Đây là một trong những lý do làm cho các mẻ lên men không bao giờ hoàn toàn giống hệt nhau.

Môi trường chứa các nguồn nitơ phụ trợ và các chất dinh dưỡng thiết yếu như calci (bổ sung ở dạng calci carbonat trung hòa tính acid tự nhiên của cao ngô), magiê, sulphat, phosphat, kali và kim loại vi lượng. Môi trường được tiệt trùng bằng hơi nước ở 120°C trong nồi lên men hoặc nồi riêng.

Chất dinh dưỡng

Môi trường tiệt trùng được khuấy, thông khí, chỉnh pH và nhiệt độ đúng giá trị trên màn hình kiểm soát quá trình. Sau đó cấy giống và bắt đầu pha tăng trưởng. Nguồn carbon ban đầu được cung cấp đủ lượng để duy trì sự tăng trưởng trong giai đoạn đầu nhưng không đủ để cung cấp năng lượng cho sự sản xuất penicillin và duy trì sinh khối cần thiết trong các giai đoạn còn lại của lên men. Nguồn carbon cho các giai đoạn sau này được cung cấp liên tục sao cho mức tăng trưởng nằm trong giới hạn cho phép. Nguồn carbon có thể là saccharose hoặc glucose, và để giảm chi phí có thể dùng loại không tinh khiết như mật đường hoặc dịch thủy phân tinh bột. Vì nồng độ đường còn dư trong môi trường quá thấp không thể đo được, nên tốc độ cung cấp được xác định dựa theo kinh nghiệm và điều chỉnh lại theo các thông số hệ thống. Một cách khác để có được giới hạn carbon nhưng tránh được các phiền phức do phải theo dõi chặt chẽ tốc độ cung cấp carbon là cung cấp tất cả carbohydrat ngay từ đầu dưới dạng lactose. Sự thủy phân lactose thành hexose có tốc độ hạn chế sẽ đảm bảo sự cung cấp lượng carbohydrate có thể đồng hóa một cách từ từ và ổn định.

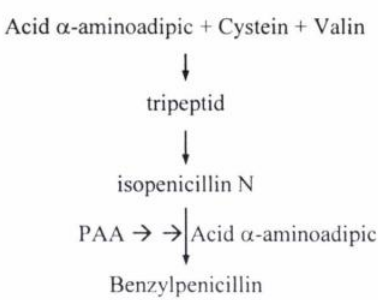
Calci, magiê, phosphat, và các kim loại vi lượng được bổ sung lúc đầu thường đủ cho suốt quá trình lên men, nhưng vi sinh vật cần cung cấp thêm nitơ và lưu

https://nhathuocngocanh.com/

huỳnh để cân bằng dinh dưỡng carbon. Nitơ thường được bổ sung ở dạng khí amoniac. Việc cung cấp carbon và nitơ không chỉ đáp ứng cho nhu cầu của vi sinh vật về các nguyên tố này đúng theo tỷ lệ phân tử gam, mà chúng còn nhằm duy trì dự trữ ion amoni thích hợp và góp phần kiểm soát pH, sự chuyển hóa carbon làm acid hóa và được cân bằng bởi tính kiềm của amoniac. Sulphate thường được cung cấp cùng với đường. Tất cả các dinh dưỡng được tiệt trùng trước khi đong vào nồi lên men. Sự nhiễm các vi khuẩn đề kháng với kháng sinh vào nồi lên men hiếm khi xảy ra, nhưng thiệt hại do sự nhiễm này rất nghiêm trọng nên việc ngăn chặn hết sức cần thiết. Vi khuẩn nhiễm tăng trưởng nhanh, sản xuất β–lactamase, tiêu thụ dinh dưỡng, làm mất kiểm soát pH và ảnh hưởng quá trình chiết xuất sau đó. Pha tăng trưởng nhanh chóng chuyển sang pha sản xuất kháng sinh. pH và nhiệt độ tối ưu cho sự tăng trưởng không phải là tối ưu cho sự sản xuất kháng sinh và có thể có các thay đổi trong kiểm soát các thông số này. Khi bắt đầu pha sản xuất kháng sinh, acid phenylacetic (PAA) được bổ sung liên tục.

Kích thích bằng PAA

PAA cung cấp nhánh bên cho benzylpenicillin; không có PAA, các vi sinh vật tổng hợp chỉ một lượng nhỏ penicillin này. Trong cao ngô có các hợp chất phenylacetyl (có từ phenylalanine trong hạt được biến đổi bởi hệ vi sinh vật trong tự nhiên), nên cao ngô là nguồn phức hợp nitơ rẻ và tốt nhất được dùng trong những thí nghiệm ban đầu và dẫn đến sử dụng PAA. PAA không chỉ kích thích sinh tổng hợp benzylpenicillin mà nó còn ức chế sự tạo thành các penicillin không mong muốn khác. Tuy nhiên, nồng độ cao PAA sẽ độc với nấm và vì thế không thể thêm nó một cách bừa bãi, mặt khác PAA đắt tiền. Việc cung cấp PAA được kiểm soát sao cho luôn duy trì được lượng PAA thích hợp mà không tới giới hạn độc. Giảm lượng PAA cho vào ngay trước khi kết thúc lên men để lượng tiền chất chưa sử dụng trong dịch nuôi cấy cuối không quá thừa.



https://nhathuocngocanh.com/

Sinh tổng hợp benzylpenicillin đi từ ba acid amin: acid α–aminoadipic, cystein và valin, và PAA. Các acid amin tụ lại thành tripeptid, đóng vòng tạo cấu trúc vòng của penicillin với nhánh bên α–aminoadipyl, isopenicillin N. Sau đó thêm nhánh bên nhóm phenylacetyl từ PAA cho ra benzylpenicillin.

Gần đây lý thuyết và công nghệ di truyền đã phát triển để có được chủng hoạt tính cao. Trong những năm 1980 đã có tiến bộ vượt bực về phân lập và thao tác các gen sinh tổng hợp theo con đường này và các con đường liên quan thành các cephalosporin (qua nấm mốc sản xuất cephalosporin C là *Acremonium chrysogenum*) và các cephamycin (qua xạ khuẩn sản xuất cephamycin C là *Streptomyces clavuligerus*). Ngày nay các nhà sản xuất kháng sinh có thể áp dụng kỹ thuật tái tổ hợp ADN cho các chủng nấm mốc công nghiệp để sản xuất β–lactam và có những triển vọng thú vị về việc tạo các thay đổi di truyền làm tăng đáng kể sản phẩm. Còn cần cải tiến nhiều khía cạnh vì các chủng công nghiệp hiện hành và quá trình lên men chỉ mới chuyển < 10% tổng carbon thành penicillin.

Kết thúc

Quyết định ngưng lên men rất phức tạp và phải căn cứ vào một số yếu tố. Thường thì nhà sản xuất sẽ thu hoạch ngay sau khi có dấu hiệu đầu tiên của sự giảm hiệu quả chuyển đổi nguyên liệu thô đắt tiền nhất (nguồn carbon, tức là glucose) thành penicillin.

2.5. Chiết xuất

Thu tế bào

Khi thu hoạch, benzylpenicillin hòa tan ngoại bào, cùng với nhiều chuyển hóa khác và các thành phần của môi trường. Bước đầu tiên của quá trình sau lên men là loại bỏ tế bào bằng cách lọc hoặc ly tâm. Giai đoạn này được tiến hành sao cho tránh nhiễm các vi sinh vật đề kháng sinh bằng cách tiết β–lactamase vì có thể làm mất nhiều hoặc mất toàn bộ sản phẩm.

Tách benzylpenicillin

Giai đoạn tiếp theo là tách benzylpenicillin. Quá trình này thường dùng dung môi mặc dù cũng có các phương pháp khác như sắc ký trao đổi ion và kết tủa. Ở pH 2–2,5 của dung dịch nước, penicillin có hệ số tách cao trong các dung môi hữu cơ như amyl acetate, butyl acetate và methyl isobutyl ketone. Việc chiết phải được tiến hành nhanh vì benzylpenicillin rất không ổn định ở các giá trị pH thấp này. Sau đó penicillin được chiết lại vào dung dịch đệm ở pH 7,5, lúc này penicillin có hệ số tách mạnh trong pha nước. Thu hồi dung môi bằng chưng cất để tái sử dụng.

Xử lý chất chiết thô

Benzylpenicillin được sản xuất dưới các dạng muối khác nhau tùy theo dự

https://nhathuocngocanh.com/

định sử dụng là làm nguyên liệu đầu vào cho các nhà sản xuất bán tổng hợp các kháng sinh β–lactam hoặc cho sử dụng lâm sàng.

Việc xử lý chất chiết penicillin thô thay đổi theo mục tiêu nhưng gồm có việc tạo muối thích hợp, sau đó xử lý loại bỏ các chí nhiệt tố (pyrogen) và tiệt trùng. Để tiệt trùng thường dùng cách lọc nhưng muối kim loại tinh khiết của penicillin có thể tiệt trùng bằng nhiệt khô.

Để dùng đường tiêm, kháng sinh được đóng gói trong lọ vô trùng ở dạng bột hoặc huyền dịch. Để dùng đường uống, có thể bào chế dạng viên bao phim hay bất cứ dạng chuẩn nào khác. Lấy mẫu ngẫu nhiên với số lượng thích hợp thành phẩm để đảm bảo kiểm tra chất lượng chặt chẽ đảm bảo đạt các yêu cầu về hoạt lực, tinh khiết, không có chí nhiệt tố và vô trùng.

Tất cả các giai đoạn sản xuất kháng sinh từ lên men đến thành phẩm được tuân theo thực hành sản xuất thuốc tốt (GMP) trong đó có cả kiểm soát chất lượng. GMP đòi hỏi "một hệ thống toàn diện từ khâu thiết kế, lập hồ sơ, thực thi và kiểm tra đến nhà xưởng, nhân sự, thiết bị và các tài nguyên khác nhằm đảm bảo sản phẩm sẽ đạt chất lượng đúng với dự định dùng".

3. SẢN XUẤT PENICILLIN V

Các penicillin khác nhau được sinh tổng hợp bằng cách bổ sung các chất cho acyl khác nhau. Ví dụ cho tiền chất acid phenoxyacetic thay vì PAA, penicillin V được sản xuất bởi quy trình tương tự như benzylpenicillin. Trong con đường sinh tổng hợp, nhánh bên α–aminoadipyl của isopenicillin N được thay bởi nhóm phenoxyacetyl *(Bảng 3.1)*.

Vi sinh vật dùng cũng là *P. chrysogenum*. Nhà sản xuất có thể dùng cùng một chủng đột biến để sản xuất cả hai sản phẩm hoặc có thể dùng các thể đột biến khác nhau cho hai loại penicillin. Tình huống này tương tự với các chủng *Streptomyces aureofaciens* dùng lên men sản xuất cả chlortetracyclin và demethylchlortetracyclin.

Giống như benzylpenicillin, penicillin V vẫn được dùng rộng rãi và cũng có thể dùng làm nguyên liệu đầu để bán tổng hợp các penicillin không thể sản xuất trực tiếp bằng con đường lên men.

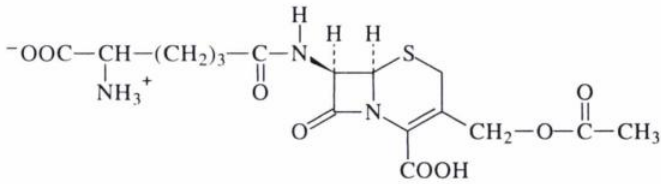
4. SẢN XUẤT CEPHALOSPORIN C

Penicillin V hoặc benzylpenicillin có thể được chuyển thành cephalosporin bằng cách mở rộng vòng hóa học. Ví dụ có thể sản xuất cephalosporin thế hệ một như cephalexin theo cách này. Tuy nhiên, hầu hết các cephalosporin được dùng trong lâm sàng là sản phẩm bán tổng hợp từ sản phẩm lên men cephalosporin C.

https://nhathuocngocanh.com/

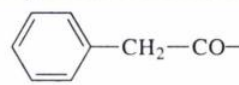
Chủng gốc (thời đó được gọi là *Cephalosporium acremonium*) được phân lập tại bờ biển Sardinian vào năm 1945 khi quan sát thấy là nước cống địa phương ra biển khá sạch. Vì hoạt tính liên quan đến nhiều hợp chất khác nhau nên nghiên cứu tiến triển chậm. Cephalosporin C được tách đầu tiên vào năm 1952 nhưng phải mất một thập kỷ các cephalosporin bán tổng hợp mới được dùng trong lâm sàng.

Con đường sinh tổng hợp cephalosporin C giống với các penicillin cũng như isopenicillin N. Giống với nhiều lên men kháng sinh khác, không cần dinh dưỡng tiền chất cho cephalosporin C. Trong các chất chuyển hóa của vi sinh vật có đủ cơ chất nhóm acetyl cho phản ứng acetyltransferase cuối. Chiết sản phẩm khỏi dịch nuôi cấy bằng cách hấp phụ vào carbon hoặc resin, ít dùng dung môi. Điều này minh họa một điểm chung quan trọng là các quá trình sản xuất kháng sinh khác nhau nhiều ở giai đoạn hồi phục sản phẩm chứ không phải giai đoạn lên men. Hình 3.4 minh họa lộ trình sản xuất điển hình từ nhân giống đến ra thành phẩm kháng sinh.



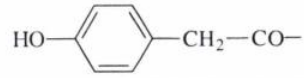
Hình 3.3. Cấu trúc cephalosporin C

Bảng 3.1. Cấu trúc của một số penicillin tự nhiên, các penicillin sinh tổng hợp quan trọng nhất và penicillin bán tổng hợp

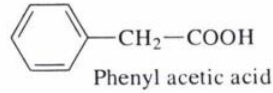
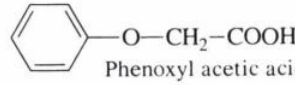
Penicillin thiên nhiên	
Sản phẩm	*Mạch nhánh N–Acyl*
Benzylpenicillin (Penicillin G)	
2–pentenylpenicillin (Penicillin F)	$CH_3—CH_2—CH=CH—CH_2—CO—$
n–Amylpenicillin (Penicillin – Dihydro F)	$CH_3—(CH_2)_4—CO—$
n–Heptylpenicillin (penicillin K)	$CH_3—(CH_2)_6—CO—$

https://nhathuocngocanh.com/

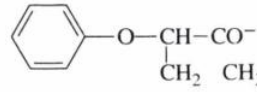
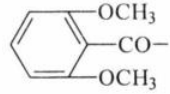
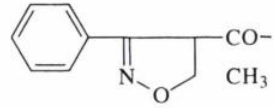
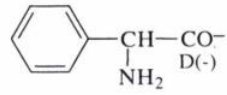
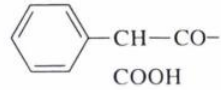
p–Hydroxybenzylpenicillin (penicillin X)



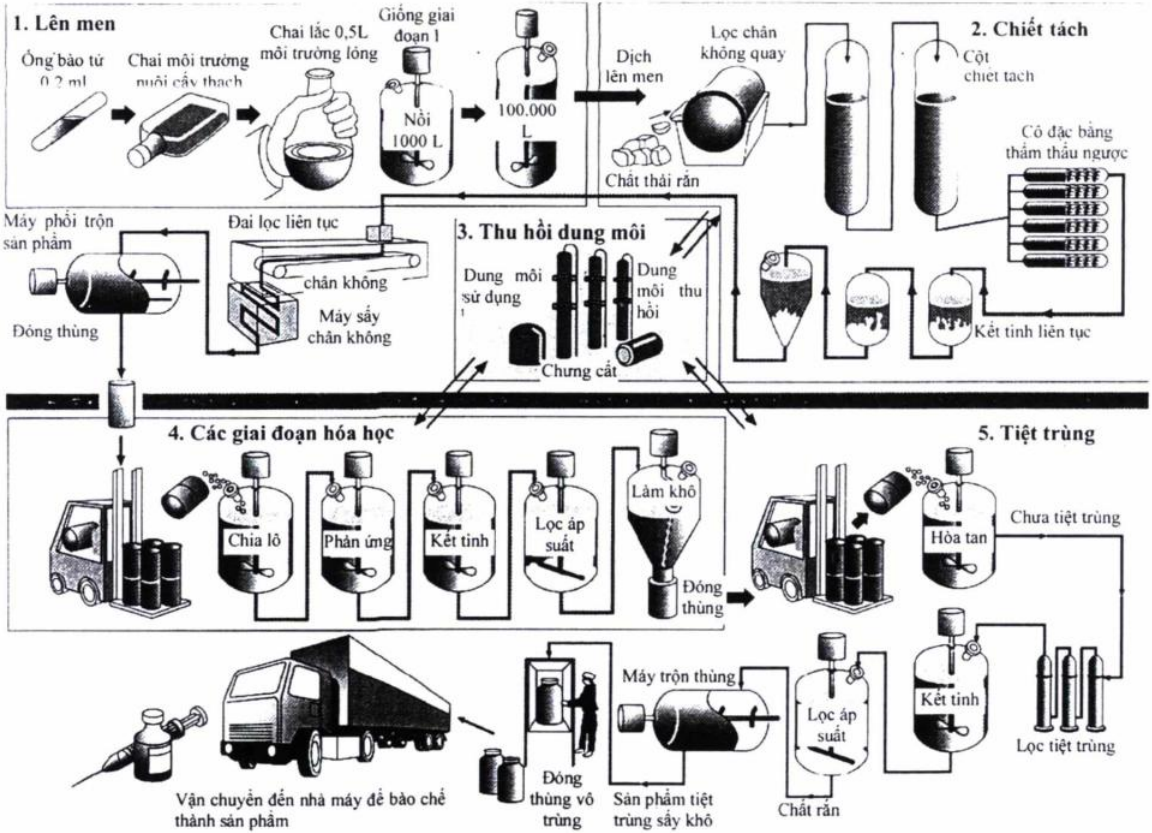
Penicillin sinh tổng hợp

Sản phẩm mong muốn	*Tiền chất*
Benzylpenicillin: không bền với acid, nhạy với β–lactamase, hoạt tính thấp trên VK Gram (–)	 Phenyl acetic acid
Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V): ổn định với acid, các đặc tính khác giống penicillin	 Phenoxyl acetic acid
Allylmercaptomethylpenicillin (Penicillin O): giảm các đặc tính gây dị ứng	$H_2C{=}CH{-}CH_2{-}S{-}CH_2{-}COOH$ Allyl mercapto acetic acid

Penicillin bán tổng hợp

Sản phẩm mong muốn	*Mạch nhánh N–Acyl*
Propicillin: ổn định với acid, nhạy với β–lactamase	
Methicillin: ổn định với acid, kháng β–lactamase	
Oxacillin: ổn định với acid, kháng β–lactamase	
Ampicillin: phổ kháng khuẩn rộng (đặc biệt kháng VK Gram (–), ổn định với acid, nhạy với β–lactamase	
Carbenicillin: phổ kháng khuẩn rộng (đặc biệt kháng *pseudomonas aeruginosa*, ổn định với acid nhưng uống không công hiệu, nhạy với β–lactamase	

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 3.4. Quá trình sản xuất cephalosporin điển hình

https://nhathuocngocanh.com/

5. SẢN XUẤT ERYTHROMYCIN

Một ví dụ điển hình khác minh họa sản xuất kháng sinh bằng lên men vi sinh vật là quy trình sản xuất kháng sinh macrolid erythromycin bằng xạ khuẩn *Saccharopolyspora erythraea* (tên trước đây là *Streptomyces erythreus*).

Xạ khuẩn (Actinomycetes) và đặc biệt là các thành viên của chi *Streptomyces* có ở khắp nơi trong tự nhiên và là nguồn phong phú cho các chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học. Bảng 3.2 liệt kê 62 chất chuyển hóa thứ cấp hữu dụng của hơn 9.000 phân tử có hoạt tính sinh học phân lập từ xạ khuẩn cho đến nay (2004), chiếm hai phần ba các kháng sinh đã biết làm từ vi sinh vật và khoảng 60% các chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học ngoài kháng sinh. Gần 80% các phân tử này được làm từ *Streptomyces*.

S. erythraea được mô tả lần đầu vào năm 1919 bởi Waksman. Năm 1952, hoạt tính kháng sinh của chủng *S. erythraea* NRRL2338 có nguồn gốc từ chủng phân lập đầu tiên được công bố. Chủng NRRL 2338 sản xuất khoảng 0,25–1 g erythromycin trong 1 lít tùy điều kiện nuôi cấy. 50 năm sau, hiệu suất này tăng lên hơn gấp 10 lần, khoảng 10–13 g/L canh nuôi. Sự sinh tổng hợp erythromycin được mã hóa bởi các gen *ery* nằm trên đoạn ADN dài khoảng 60 kb, tóm tắt trong hình 3.4. Sự lên men sản xuất hỗn hợp erythromycin A, B, C, và D, trong đó chỉ có erythromycin A là chất được mong muốn (hình 3.5). Các hợp chất kia là sản phẩm hydroxyl hóa một phần hoặc các chất methyl hóa trung gian. Một chủng sản xuất tốt phải cho ra lượng erythromycin A cao, ít nhất là 8–10 g/L, chứa trên 90% hàm lượng là erythromycin A. Một số hãng sản xuất lớn là Lilly (1952), Abbott (những năm 1970). Sản lượng erythromycin hàng năm là 4.000 tấn. Mặc dù một ít erythromycin vẫn được dùng (1.000 tấn), phần lớn nó được chuyển đổi hóa học thành azithromycin (1.500 tấn), clarithromycin (1.500 tấn), và roxithromycin (400 tấn).

Bảng 3.2. Danh sách các kháng sinh từ xạ khuẩn có ích

Kháng sinh	Xạ khuẩn	Phân loại hóa học	Đích	Ứng dụng
Actinomycin D	*Streptomyces* spp.	Peptid	Phiên mã	Kháng ung thư
Antimycin A	*Streptomyces* spp.	Macrolid	Hệ thống cytochrom	Telocidal
Avermectin	*S. avermitilis*	Macrolid (PK)	Các kênh ion chlorid	Kháng ký sinh trùng
Bambermycin	*S. bambergiensis*	Các amino–glycosid thay thế (phức hợp của hơn bốn moenomycin)	Peptidoglycan	Thúc đẩy tăng trưởng
Bialaphos	*S. hygroscopicus*	Peptid	Glutamin synthetase	Diệt cỏ

https://nhathuocngocanh.com/

Kháng sinh	Xạ khuẩn	Phân loại hóa học	Đích	Ứng dụng
Bleomycin	*S. verticillus*	Glycopeptid	Đứt sợi ADN	Kháng ung thư
Candicidin	*S. griseus*	Polyen macrolid (PK)	Màng (thể tạo pore)	Kháng nấm
Cephamycin C	*Nocardia lactamdurans* (và các chủng khác)	β–Lactam	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Chloramphenicol	*S. venezuelae*	*N*–Dichloracyl phenylpropanoid	R	Kháng khuẩn
Chlorotetracyline	*S. aureofaciens*	Tetracyclin (PK)	R	Kháng khuẩn
Acid Clavulanic	*S. clavuligerus*	β–lactam	Ức chế β–Lactamase	Phối hợp với β–lactam kháng khuẩn
Cycloserin	*S. orchidaceus*	Cyclic peptid thay thế	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Daptomycin	*S roseosporus*	Lipopeptid	Acid Lipoteichoic?	Kháng khuẩn
Daunorubicin (daunomycin)	*S. peucetius*	Anthracyclin (PK)	Xen vào ADN	Kháng ung thư
Desferrioxamin	*S. pilosus*	Peptid	Sắt chelat	Tẩy sắt khi dư thừa sắt
Doxorubicin (adiamycin)	*S. peucetius* var. *caesius*	Anthracyclin (PK)	Xen vào ADN	Kháng ung thư
Erythromycin	*S. erythraea*	Macrolid (PK)	R	Kháng khuẩn
FK506 (tacrolimus)	*S. hygroscopicus*	Macrolid (PK)	Gắn vào FK protein	Ức chế miễn dịch
Fortimicin	*Micromonospora olivoasterospora*	Aminoglycosid	R	Kháng khuẩn
Fosfomycin	*Steptomyces* spp.	Acid Phosphoric	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Gentamycin	*Micromonospora* spp.	Aminoglycosid	R	Kháng khuẩn
Hygromycin B	*S. hygroscopicus*	Aminoglycosid thay thế	R	Kháng giun sán
Kanamycin	*S. kanamyceticus*	Aminoglycosid	R	Kháng khuẩn
Lasalocid	*S. lasaliensis*	Polyether (PK)	Màng (thể mang ion)	Kháng cầu trùng; thúc đẩy tăng trưởng
Lincomycin	*S. lincolnensis*	Đường amide	R	Kháng khuẩn
Milbemycin	*S. hygroscopicus*	Macrolide (PK)	Các kênh ion chloride	Kháng ký sinh trùng
Mithramycin	*S. argillaceus*	Acid Aureolic	Alkyl hóa ADN	Kháng ung thư
Mitomycin C	*S. caespitosus*, *S. verticillatus*	Benzoquinone	Liên kết chéo ADN	Kháng ung thư
Monensin	*S. cinnamonensis*	Polyether (PK)	Màng (thể mang ion)	Kháng cầu trùng; thúc đẩy tăng trưởng

https://nhathuocngocanh.com/

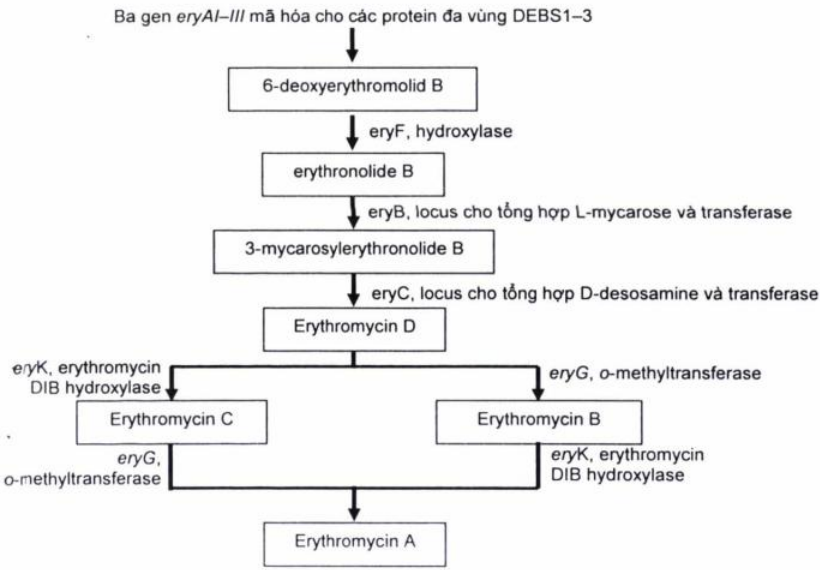
Kháng sinh	Xạ khuẩn	Phân loại hóa học	Đích	Ứng dụng
Natamycin	*S. nataensis*	Tetraen polyen (PK)	Màng (thể tạo pore)	Kháng nấm
Neomycin	*S. fradiae*	Aminoglycosid	R	Kháng khuẩn
Nikkomycin	*S. tendae*	Nucleosid	Sinh tổng hợp chitin	Kháng nấm; insecticidal
Nocardicin	*Nocardia uniformis*	β–Lactam	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Nosiheptide	*S. actuosus*	Thiopeptid	R	Thúc đẩy tăng trưởng
Novobiocin	*S. niveus*	Coumerin glycosid	ADN gyrase (GyrB–subunit)	Kháng khuẩn
Nystatin	*S. noursei*	Polyen macrolid (PK)	Màng (thể tạo pore)	Kháng nấm
Oleandromycin	*S. antibioticus*	Macrolid (PK)	R	Kháng khuẩn
Oxytetracycline	*S. rimosus*	Tetracyclin (PK)	R	Kháng khuẩn
Paromomycin	*S. rimosus forma paromomycinus*	Aminoglycosid	R	Kháng amib
Phleomycin	*S. verticillus*	Glycopeptid	Gãy sợi ADN	Kháng ung thư
Polyoxins	*S. cacaoi* var. *asoensis*	Nucleosid–peptid	Sinh tổng hợp chitin	Kháng nấm (bảo vệ thực vật)
Pristinamycin	*S. pristinaespiralis*	Peptidic macrolacton + polyunsatturated macrolactone (PK)	R	Kháng khuẩn
Puromycin	*S. alboniger*	Purin nucleosid	R	Nghiên cứu
Rapamycin	*S. hygroscopicus*	Macrolid (PK)	Gắn FK protein	ức chế miễn dịch
Rifamycin	*Amycolatopsis mediterranei*	Ansamycin (PK)	ARN polymerase	Kháng khuẩn
Ristocetin	*Nocardia lruida*	Glycopeptid	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Salinomycin	*S. albus*	Polyether (PK)	Màng (thể mang ion)	Kháng cầu trùng; thúc đẩy tăng trưởng
Spectinomycin	*S. spectabilis*	Aminocyclitol	R	Kháng khuẩn
Spinosyns	*S. spinosa*	Tetracyclic mocrolid (PK)	Chưa rõ	Diệt côn trùng
Spiramycin	*S. ambofaciens*	Macrolid (PK)	R	Kháng khuẩn
Streptogramins	*S. graminofaciens*	Macrocyclic lacton	R	Kháng khuẩn
Streptomycin	*S. griseus*	Aminoglycosid	R	Kháng khuẩn
Streptothricin	*S. lavendulae*	*N*–Glycosid	R	Thúc đẩy tăng trưởng; bảo vệ thực vật

https://nhathuocngocanh.com/

Kháng sinh	Xạ khuẩn	Phân loại hóa học	Đích	Ứng dụng
Teichoplanin	*Actinoplanes teichomyceticus*	Glycoprotein	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Tetracycline	*S. aureofaciens*	Tetracyclin (PK)	R	Kháng khuẩn
Thienamycin	*S. cattleya*	β–Lactam	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Thiostrepton	*S. azureus*	Thiopeptid	R	Thúc đẩy tăng trưởng
Tobramycin	*S. tenebrarius*	Aminoglycoside	R	Kháng khuẩn
Tylosin	*S. fradiae*	Macrolide (PK)	R	Thúc đẩy tăng trưởng
Validamycin	*S. hygroscopicus*	Aminoglycosid	R	Bảo vệ thực vật
Vancomycin	*Amycolatopsis orientalis*	Glycopeptid	Peptidoglycan	Kháng khuẩn
Virginamycin	*S. virginiae*	Macrocyclic lacton (PK) +	R	Thúc đẩy tăng trưởng macrocyclic peptidolacton

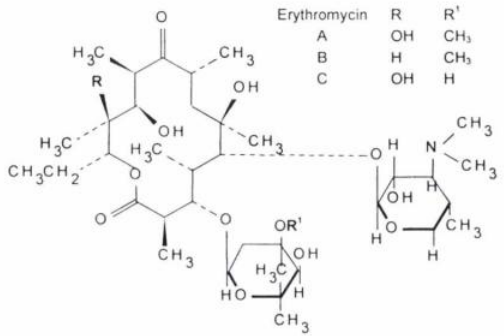
a PK = polyketid.

b R = gắn vào ribosom nên ức chế tổng hợp protein.



Hình 3.5. Sự sinh tổng hợp erythromycin

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 3.6. Các erythromycin

Erythromycin là hỗn hợp các kháng sinh macrolid chứa phần lớn là erythromycin A

5.1. Chọn giống, giữ giống và lên men

Do các chủng năng suất cao dễ bị biến đổi di truyền nên cần thiết phải liên tục phân lập lại các chủng năng suất cao có ít sản phẩm phụ erythromycin B và C.

Chọn chủng *S. erythraea* năng suất cao

Chủng thường ở ống thạch nghiêng, đông khô hoặc huyền phù bào tử được chuyển vào môi trường lỏng (V1), nuôi 48 giờ rồi pha loãng và trải trên hộp chứa môi trường thạch tạo bào tử (M1 hoặc CMAE–1). Ủ 10–14 ngày ở 34°C và độ ẩm khoảng 60%, khuẩn lạc mọc giống sao, đường kính 3 mm, màu xám hồng và sắc tố bào tử màu nâu nhạt (hình 3.7), mặt dưới khuẩn lạc có màu nâu đậm. Chọn các khuẩn lạc có hình thái khác nhau và cấy lên thạch nghiêng.

Hình 3.7. Hình thái khuẩn lạc *S. erythraea*. A– từ mặt đáy, B– từ mặt trên

Giữ giống *S. erythraea*

Mỗi khuẩn lạc riêng rẽ được cấy vào hai đến ba ống thạch nghiêng môi trường M1. Ủ 10–14 ngày ở 34°C đến khi tạo bào tử. Các ống giống này có thể giữ ở 4°C một tháng.

Tạo huyền phù bào tử bằng cách thêm 5 ml nước vô trùng vào ống thạch nghiêng và cào nhẹ bề mặt bằng pipet vô trùng. Thêm 20% glycerol vào và phân

https://nhathuocngocanh.com/
nhỏ 1,5 mL, bảo quản ở –80°C. Chủng trong glycerol có thể dùng trong một năm không bị biến đổi di truyền hoặc sản xuất erythromycin.

Kiểm tra khả năng sản xuất erythromycin của giống bằng cách nuôi 1 mL huyền phù bào tử mới pha hoặc 1,5 mL huyền phù bào tử đông lạnh trong 30 mL môi trường V1. Ủ 40 giờ ở 34°C trên máy lắc, lấy 3 ml cấy vào 27 mL môi trường F1, rồi nuôi trong 9 ngày, mỗi ngày bổ sung dầu đậu nành (0,2 mL, ngày 0–6) và *n*–propanol (0,1 mL, ngày 0–5; 0,15 mL, ngày 6–9). Cân bình hàng ngày và thêm nước vô trùng để bù lượng bốc hơi. Lấy mẫu, lọc và định lượng erythromycin. Chọn các chủng tốt nhất để đông khô.

Lên men *S. erythraea*

Nuôi cấy thực hiện qua ba giai đoạn.

1. Giai đoạn 1 nuôi giống trong 35 mL môi trường V1.

2. Sau 48 giờ, cấy giống này vào 3,5 L môi trường V2. Tốc độ khuấy 800 vòng/phút, tốc độ thông khí 0,6 thể tích/ thể tích/phút, nhiệt độ 34°C. Theo dõi mật độ oxy hòa tan, pH, quá trình oxy hóa khử, nồng độ khí CO_2 thải ra. Sự tăng trưởng được theo dõi bằng ly tâm đo thể tích hệ sợi hoặc cân sinh khối khô.

3. Sau khoảng 40 giờ, chuyển 1,5 L canh lỏng vào bình lên men 20 L chứa 10 L môi trường F1. Điều kiện nuôi cấy giai đoạn này: 34°C, pH không quá 7,2 bằng H_2SO_4, tốc độ khuấy 700 vòng/phút, tốc độ thông khí 0,37 thể tích/ thể tích/phút trong 12 giờ đầu sau đó tăng lên 0,83 thể tích/ thể tích/phút. Duy trì dinh dưỡng *n*–propanol, dầu đậu nành, dextrin. Theo dõi trực tuyến quá trình oxy hóa khử, nồng độ khí CO_2 thải ra, glucose tự do, sinh hóa. Hàng ngày lấy 50 hoặc 100 ml để định lượng erythromycin, PMV, hoặc trọng lượng tế bào khô và soi kính hiển vi kiểm tra nhiễm cũng như hình thái sợi nấm.

5.2. Tách erythromycin

Tách erythromycin gồm các bước: (1) Tách erythromycin–isothiocyanat, (2) Tạo erythromycin base và (3) Thử độ tinh khiết và hoạt tính của erythromycin.

Tách erythromycin–isothiocyanat

Chỉnh pH 8,5 với NaOH 20%, loại bỏ sinh khối bằng ly tâm 3000*g* trong 30 phút ở 4°C. Dịch nổi được lọc trong bằng lọc thủy tinh, chỉnh pH 9,5 ± 0.1. Thêm 1.5% methylisobutylketone và khuấy hỗn hợp trong 10 phút ở 4°C. Ly tâm (2000*g* trong 5 phút) thu pha hữu cơ và định lượng erythromycin bằng HPLC. Đun pha hữu cơ đến 30°C, thêm 0.63 L dung dịch Na isothiocyanat 33% cho mỗi gam erythromycin. Chỉnh pH 5,8 với acetic acid 10%, làm nguội hỗn hợp đến 10°C và ủ 3 giờ có khuấy nhẹ để kết tinh erythromycin–isothiocyanat. Duy trì pH 5,8 Lọc và rửa tủa, sấy chân không ở 50°C. Hiệu suất theo trọng lượng của quy trình này là khoảng 83%.

https://nhathuocngocanh.com/

Tạo erythromycin base

Erythromycin–isothiocyanat ướt sau khi lọc được chuyển thành erythromycin base thô bằng cách hòa trong dichloromethan, khuấy nhẹ ở 33°C, thêm dung dịch NaOH 15% đến pH 9,5 – 10,0. Thêm chất trợ lọc (Perlite) và than hoạt và lọc. Rửa bằng lượng nhỏ dichloromethan. Chiết pha hữu cơ (dịch lọc) với nước khử ion ở 33°C và khuấy nhẹ. Sau đó kết tinh erythromycin ở nhiệt độ thấp (5°C). Ly tâm hoặc lọc, rửa erythromycin kết tủa với dichloromethan, và sau đó sấy khô ở 50°C. Hòa erythromycin base thô trong nước khử ion và đun đến 50–60°C. Thêm lauryl sulfat, ly tâm hoặc lọc, và rửa với nước khử ion (60°C) để thu erythromycin base tinh khiết.

5.3. Thử độ tinh khiết và hoạt tính của erythromycin

Thử hoạt tính của erythromycin bằng phương pháp sinh học và thực hiện song song với erythromycin chuẩn, gồm các bước như sau:

1. Rót 35 mL môi trường TSB vào đĩa Petri (12 × 12 cm).

2. Đợi môi trường đông, thêm lớp thứ hai gồm 35 mL môi trường TSB chứa 35 µL dịch nuôi cấy qua đêm của *Micrococcus luteus* (nuôi 18 giờ ở 30°C trong LB).

3. Định lượng erythromycin bằng nhỏ 10 µL phần nổi dịch nuôi cấy (hoặc lượng thích hợp hòa tan trong methanol) lên đĩa thử kháng sinh đặt trên đĩa thạch. Sau khi ủ ở 30°C trong 48 giờ, đo vùng ức chế *M. luteus* và tính lượng erythromycin (g/L) bằng đường cong chuẩn.

Thử độ tinh khiết của erythromycin bằng HPLC, xác định các erythromycin A, B, và C trong canh cấy.

Công thức môi trường

1. Môi trường thạch M1: 5 g/L glucose khan, 5 g/L trypton, 0,5 g/L betaine–HCl, 5 g/L tinh bột ngô, 1 g/L cao ngô, 200 mg/µL $MgSO_4.7H_2O$, 2 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$, 0.8 mg/L $CuSO_4.5H_2O$, 0,2 mg/L $CoCl_2.6H_2O$, 4 mg/L $FeSO_4.7H_2O$, 80 mg/L $CaCl_2.6H_2O$, 10 g/L NaCl, 150 mg/L KH_2PO_4, và 20 g/L agar.

2. Môi trường V1: 16 g/L tinh bột ngô, 10 g/L dextrin, 15 g/L bột đậu nành, 2,5 g/L NaCl, 5 mL/L cao ngô, 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 6 mL/L dầu đậu nành tinh khiết, và 4 g/L $CaCO_3$. Chỉnh pH trước hấp tiệt trùng đến 6,5.

3. Môi trường V2: 18 g/L tinh bột ngô, 12 g/L dextrin, 15 g/L bột đậu nành, 3 g/L NaCl, 6 mL/L cao ngô, 1,2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 6 mL/L dầu đậu nành tinh khiết, và 5 g/L $CaCO_3$. Chỉnh pH sau hấp tiệt trùng về 6,8.

4. Môi trường TSB (Tryptic soy broth).

https://nhathuocngocanh.com/

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Penicillin

A. Được tìm ra bởi Flemming năm 1928.

B. Từ mốc xanh *P. notatum*.

C. Từ nấm mốc *P. chrysogenum*.

D. Là kháng sinh được tìm ra đầu tiên.

E. A, C và D.

2. Chủng sản xuất penicillin hiện nay ***không*** có các đặc tính

A. Không sinh sắc tố

B. Sợi chắc, dễ lọc tách,

C. Sử dụng được cơ chất phức tạp

D. Nuôi cấy chìm được

E. Hiệu suất khoảng 60 mg/ml

3. Phần có thể thay đổi trong cấu trúc của penicillin G để cho các dẫn xuất là

A. Vòng β–lactam

B. 6–amino penicillanic acid

C. Mạch nhánh acyl

D. Vòng thiazolidine

E. Pentenylpenicillin

4. Công nghệ sản xuất penicillin dùng phương pháp

A. Nuôi cấy bề mặt

B. Nuôi cấy chìm

C. Nuôi cấy hiếu khí

D. Nuôi cấy yếm khí

E. A, B, C

5. Nguồn carbon thường dùng trong lên men sản xuất penicillin là

A. Glucose

B. Lactose

C. Saccharose

D. Fructose

E. Tinh bột

6. Cao ngô được thêm vào môi trường lên men sản xuất penicillin vì nó chứa

A. β–phenyletylamin

B. Natrithiosulfat

https://nhathuocngocanh.com/

C. Ba acid amin mồi

D. Allyl mercapto acetic acid

E. Nhiều nguyên tố vi lượng

7. Chiết xuất penicillin bằng

A. Cột trao đổi ion

B. Hấp phụ vào carbon hoặc resin

C. Nước ở pH 2–2.5

D. Dung môi hữu cơ

E. Tất cả đều đúng

8. Tối ưu hóa lên men kháng sinh

A. Bằng sử dụng các thiết bị phức tạp

B. Khó vì không thể có hai mẻ giống nhau một cách hoàn toàn

C. Áp dụng các kỹ thuật kiểm soát phản hồi và dùng máy tính

D. Mục tiêu là dân số số lượng và chất lượng tế bào sống

E. B và D

9. Các nhà sản xuất penicillin xử lý để có chủng sản xuất đặc biệt

A. Tia Rơnghen

B. Tia tử ngoại

C. Các chất ankyl hóa

D. Áp dụng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

E. Tất cả

10. Không đúng trong lên men sinh tổng hợp penicillin

A. Cần cho cao ngô vào môi trường nuôi cấy

B. Môi trường được tiệt trùng bằng hơi nước ở 120°C

C. Duy trì tốc độ thông khí

D. Khi bắt đầu pha sản xuất kháng sinh, phenylacetic acid được bổ sung liên tục

E. Nhiễm vi khuẩn lạ có thể làm pha tăng trưởng nhanh chóng chuyển sang pha sản xuất kháng sinh.

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 4

THỰC PHẨM CHỨC NĂNG

MỤC TIÊU

1. *Phân biệt được các loại thực phẩm chức năng.*
2. *Nêu được các yêu cầu và một số ví dụ về prebiotic.*
3. *Nêu và giải thích được các yêu cầu của probiotic.*
4. *Nêu được các chức năng chính của probiotic và phương pháp chứng minh.*

1. KHÁI NIỆM

1.1. Khoa học dinh dưỡng

Mặc dù con người đã nói đến "thực phẩm" (food) và "chế độ ăn" (diet) từ xa xưa nhưng khái niệm "dinh dưỡng" và khoa học dinh dưỡng (nutrition) chỉ mới được biết đến từ thế kỷ XIX và phát triển mạnh trong thế kỷ XX. Trước đây, khoa học dinh dưỡng hầu như chỉ quan tâm đến thành phần tổng quát của thực phẩm và đưa ra các hướng dẫn chế độ ăn đủ chất, ví dụ chất đạm, chất bột, chất béo,... để đảm bảo cơ thể phát triển bình thường, không bị suy dinh dưỡng. Đến cuối thế kỷ XX và đầu thế kỷ XXI, người ta bắt đầu liên hệ giữa thành phần hóa học của thức ăn hoặc một loại thức ăn nào đó với sức khỏe hay tuổi thọ và nhận thấy chúng có quan hệ với nhau, ví dụ việc tiêu thụ sữa chua và tuổi thọ của một nhóm người ở Bungary. Từ đó có sự thay đổi mạnh mẽ về quan niệm dinh dưỡng và sức khỏe.

Quan điểm về sự liên quan giữa sức khỏe và dinh dưỡng đã được nhắc đến nhiều trong thời gian gần đây và có ảnh hưởng sâu sắc đến việc sử dụng thực phẩm cũng như công nghiệp thực phẩm. Một số nguyên nhân có thể kể như sau:

- Những nhận thức mới về sự liên quan giữa dinh dưỡng và sức khỏe.
- Tăng tần suất các bệnh liên quan đến dinh dưỡng, chủ yếu do tăng tuổi thọ.
- Các tiến bộ khoa học về dinh dưỡng, sinh học, và miễn dịch học.
- Sự gia tăng chi phí chăm sóc y tế.
- Sự phát triển của công nghệ thực phẩm.

1.2. Một số định nghĩa

Cùng với sự phát triển của khoa học dinh dưỡng các khái niệm như "thực phẩm

https://nhathuocngocanh.com/

chức năng" (functional food) (TPCN), thực phẩm tăng cường (fortified food), dược thực phẩm (nutraceutical), tinh chất thực vật (phytochemical), dược mỹ phẩm (cosmeceutical), chất trợ sinh (probiotic), chất tiền sinh (prebiotic),... đã ra đời. Tuy nhiên, việc phân biệt các khái niệm này còn rất mơ hồ và được sử dụng khá tùy tiện. Một cách tổng quát, TPCN được xem như các thực phẩm có thể có khả năng tạo ra các lợi ích về sinh lý học hay sức khỏe, ngoài các lợi ích về mặt dinh dưỡng thông thường và quan trọng hơn nó có thể giúp dự phòng các bệnh mạn tính có liên quan đến chế độ dinh dưỡng. Nó chuyển trọng tâm từ các chế độ dinh dưỡng tổng quát đến các thành phần dinh dưỡng hay một chất cụ thể. Các thành phần dinh dưỡng mới với lợi ích về sức khỏe bao gồm chất xơ, oligosaccharide (prebiotic); acid béo không no, chất chống oxy hóa, vitamin, khoáng chất, các chất chiết từ thực vật, và một số vi sinh vật đặc biệt (probiotic).

Tinh chất thực vật (phytochemical) chỉ các chất hóa học tồn tại tự nhiên trong thực vật được chiết xuất thành dạng tinh khiết có tác dụng tốt với sức khỏe. Tinh chất thực vật có thể ngăn ngừa hay làm chậm các bệnh thoái hóa mạn tính và tăng cường sức khỏe. Một nhóm chất được biết đến nhiều trong khái niệm này là các "phytoestrogen", chúng có thể có tác động như hormon estrogen của người. Các chất thường gặp khác có thể kể: genistein, các carotenoid, catechin...

Dược thực phẩm (nutraceutical) chỉ các chất có thể được xem là thực phẩm hay một phần của thực phẩm và có thể cung cấp các lợi ích về sức khỏe hay y học, bao gồm việc ngăn ngừa hay điều trị bệnh. Do đó dược thực phẩm có thể là một dưỡng chất được phân lập tinh khiết như vitamin E; chất bổ sung trong chế độ ăn kiêng; sản phẩm từ cây thuốc; hay thực phẩm biến đổi gen. Chúng có thể được sử dụng dưới hình thức tương tự thuốc, ví dụ viên nén, viên nang, bột và có liều lượng được chỉ định.

Dược mỹ phẩm (cosmeceutical) là các mỹ phẩm có các lợi ích giống như thuốc, ví dụ kem chống lão hóa, chống khô da,... Dược mỹ phẩm có thể chứa hoạt chất như vitamin, tinh chất thực vật, enzym, chất chống oxy hóa hay tinh dầu. Tuy nhiên, các hoạt chất này không nhất thiết phải có tác dụng và ngay cả khi chúng có tác dụng thì không nhất thiết phải đủ liều lượng hay được phối chế thích hợp vì bản chất của sản phẩm là mỹ phẩm chứ không phải dược phẩm. Bên cạnh đó, cách sử dụng của chúng thường là tại chỗ dưới dạng kem, thuốc xức hay thuốc mỡ, không như dược phẩm có thể dùng trong.

Vitafood được định nghĩa là "thực phẩm hay đồ uống có thể làm tăng chất lượng sống về thể chất hay tinh thần, tăng khả năng chịu đựng hay hồi phục trong trường hợp vận động quá mức hay bệnh tật, ví dụ nước tăng lực". Chúng cũng có thể tăng cường trạng thái sức khỏe của người dùng hay có tiềm năng ngăn chặn các nguy cơ về sức khỏe.

https://nhathuocngocanh.com/

Prebiotic là các thành phần thức ăn không chứa mầm sống, lên men được (ví dụ chất xơ) được chứng minh là có ảnh hưởng tích cực đến hệ vi sinh vật đường ruột của người dùng. Ảnh hưởng này có thể thông qua sự kích thích có chọn lọc sự tăng trưởng và/ hay hoạt động của một hay một số giới hạn vi sinh vật trong ruột. Một số chất được xác định là prebiotic như chất xơ, lactulose, fructo– và galacto–oligosaccharide (FOS và GOS), và inulin (chiết xuất rau diếp). Chúng phải không được thủy phân hay hấp thu ở đoạn đầu của đường tiêu hóa. Nói chung các chất này làm thay đổi hệ vi sinh vật ở ruột già về mặt thành phần theo hướng có lợi cho sức khỏe và gây ra hiệu ứng có lợi tại chỗ hay toàn thân, trong đó bifidobacteria và/ hay *Lactobacillus* là các vi khuẩn được nhắm đến.

Probiotic là các vi sinh vật sống khi được đưa vào cơ thể (ví dụ với thức ăn) với số lượng đủ sẽ tạo ảnh hưởng có lợi đến cân bằng hệ vi sinh vật đường tiêu hóa và do đó có ảnh hưởng tích cực đến sức khỏe. Các vi sinh vật được sử dụng phổ biến nhất là các vi khuẩn lactic, như *Lactobacillus* hay bifidobacteria, chúng có thể được thêm vào sản phẩm lên men sữa, và cũng góp một phần trong việc hình thành sản phẩm lên men, hoặc được bổ sung dưới dạng bột đông khô.

Synbiotic là sự phối hợp probiotic và prebiotic. Hỗn hợp này sẽ có lợi do vừa cung cấp vi sinh vật có lợi, vừa tạo điều kiện để các vi sinh vật này duy trì và phát triển.

Thực phẩm chức năng là thực phẩm được chứng minh là có ảnh hưởng tích cực đến một hay nhiều chức năng của cơ thể người dùng, ngoài giá trị dinh dưỡng, để cải thiện tình trạng sức khỏe hay làm giảm nguy cơ mắc một bệnh nào đó. Cần phân biệt thực phẩm chức năng với các thực phẩm được làm giàu hay bổ sung một thành phần nào đó (fortified food – thực phẩm tăng cường) (ví dụ vitamin, khoáng chất). Do vậy, thực phẩm chứa probiotic (ví dụ chứa vi sinh vật sống) được coi là thực phẩm chức năng. Hơn nữa, thực phẩm chức năng phải có thể được sử dụng với số lượng như là thực phẩm thông thường, có xét đến vấn đề cân bằng các thành phần trong chế độ dinh dưỡng. Có thể nói TPCN bao hàm tất cả các dạng nói trên, nhưng tùy theo ngữ cảnh cụ thể các khái niệm khác được sử dụng nhằm cụ thể hóa hoặc khu trú về mặt bản chất hay ứng dụng.

2. PREBIOTIC

Quan điểm cho rằng các carbohydrate chỉ đơn thuần cung cấp năng lượng đã lạc hậu. Do tính đa dạng về hóa học và vật lý nên tốc độ và mức độ tiêu hóa, hấp thu của chúng cũng khác nhau. Các carbohydrate không bị tiêu hóa ở phần trên của ống tiêu hóa tạo thành các cơ chất chính cho sự tăng trưởng của vi khuẩn ở ruột già. Do vậy, cung cấp các chất này, prebiotic, sẽ hỗ trợ các probiotic khó định cư hay tăng trưởng yếu. Trong số các chất có tiềm năng prebiotic như peptide, protein, và một số lipid thì các carbohydrate không tiêu hóa được, bao gồm các

https://nhathuocngocanh.com/

carbohydrate chứa fructose, glucose, xylose và galactose, được chú ý nhiều nhất. Các chất được coi là prebiotic phải thỏa các điều kiện:

1. Không được thủy phân hay hấp thu ở đoạn trên của ống tiêu hóa.

2. Là cơ chất chọn lọc của một hay một số giới hạn vi khuẩn có lợi sống hội sinh trong ruột già, do đó các vi khuẩn này sẽ được kích thích tăng trưởng hay chuyển hóa.

3. Có khả năng thay đổi thành phần hệ vi khuẩn ruột già theo hướng có lợi.

4. Tạo ra các hiệu ứng có lợi tại chỗ hay toàn thân đối với người sử dụng.

Một vài carbohydrate không tiêu hóa được có hiệu ứng chức năng trên đường tiêu hóa có thể xem như có lợi cho sức khỏe, ví dụ kiểm soát thời gian lưu chuyển thức ăn qua ruột cải thiện hấp thu glucose, giảm hấp thu chất béo và cholesterol, tăng thể tích và khả năng giữ nước của thức ăn trong ruột non, điều hòa sự lên men vi sinh vật để làm tăng sản xuất các acid béo chuỗi ngắn, giảm pH và amoniac. Sự phối hợp các hiệu ứng này có thể cải thiện sức khỏe của người dùng do giảm các rối loạn đường ruột (táo bón và tiêu chảy), bệnh tim mạch, và ung thư ruột.

Các carbohydrate được quan tâm nhiều nhất là các oligosaccharide, trong đó fructooligosaccharide (FOS) được nghiên cứu nhiều nhất. Một số thực phẩm chứa nhiều FOS như rau diếp xoăn, tỏi, hành, ac-ti-sô, và măng tây. FOS và các oligosaccharide cũng có thể được tạo ra nhờ enzym, điều này có ý nghĩa trong sản xuất công nghiệp. Năm 1995, 12 oligosaccharide thực phẩm đã được sản xuất thương mại gồm: lactulose, galactooligosaccharide, fructo–OS (OS = oligosaccharide), isomalto–OS, malto–OS, palatinose–OS, glucosyl sucrose, cyclodextrin, soybean–OS, lactosucrose, gentio–OS, và xylo–OS. Đa số các chất này có tác động kích thích sự tăng trưởng của bifidobacteria, chỉ có glycosyl–sucrose, malto–OS, và cyclodextrin là không. Các bifidobacteria có thể có những hiệu ứng có lợi như cải thiện môi trường ruột, ức chế vi khuẩn gây bệnh, điều hòa miễn dịch, tổng hợp vitamin B, cải thiện hấp thu calci, hạ amoniac và cholesterol máu, giảm hình thành khối u.

Nhiều nghiên cứu cho thấy sau khi sử dụng FOS có sự gia tăng bifidobacteria và *Lactobacillus*, tăng acid béo chuỗi ngắn (SCFA) và giảm clostridia, fusobacteria, bacteroides và pH. Sự lên men FOS chọn lọc bởi bifidobacteria cũng đã được xác nhận *in vivo* trên người tình nguyện khỏe mạnh. Hơn nữa, khi bifidobacteria tăng trưởng trên cơ chất này, các vi khuẩn như bacteroides, clostridia hay coliform có mức tăng trưởng thấp hay thậm chí giảm số lượng. Liều lượng FOS có hiệu quả ở người là 4 đến 15 g mỗi ngày. Một số prebiotic, như inulin và oligofructose đã được ghi nhận làm tăng tính sinh khả dụng của một số khoáng chất cần thiết như calci. Khi ăn inulin, sự hấp thu calci tăng có ý nghĩa nhưng không ảnh hưởng đến sự hấp thu các khoáng chất khác như magiê, sắt hay kẽm.

https://nhathuocngocanh.com/

3. PROBIOTIC

Thuật ngữ probiotic vốn có nhiều định nghĩa khác nhau, nó được sử dụng lần đầu tiên năm 1965 để mô tả một chất được tạo ra bởi một protozoon để kích thích sự tăng trưởng của một con khác. Đến những năm 70 nó mô tả chất chiết từ mô có tác dụng tăng sinh mô. Năm 1974, Parker đã sử dụng để chỉ các chất bổ sung thức ăn động vật: là các sinh vật và chất các tác động tích cực lên động vật bằng cách cân bằng vi sinh vật ruột. Fuller (1989) đã đưa ra định nghĩa rất gần với hiện nay là "một bổ sung vi sinh vật sống qua thức ăn có tác động tích cực lên ký chủ bằng cách cải thiện cân bằng vi sinh vật đường ruột". Định nghĩa này được mở rộng để bao hàm cả các vi khuẩn sống không dùng đường uống và không tác động qua hệ vi sinh vật đường ruột: "một vi sinh vật hay hỗn hợp vi sinh vật sống, được dùng cho người hay động vật dưới dạng sản phẩm lên men hay tế bào khô có ảnh hưởng tích cực đến người dùng bằng cách cải thiện tính chất hệ vi sinh vật nội tại". Định nghĩa này bao gồm cả các probiotic dùng qua đường uống, đường hô hấp trên (dạng aerosol), hay niệu sinh dục (dùng tại chỗ).

Probiotic theo định nghĩa là những chế phẩm bổ sung có chứa vi sinh vật sống nhằm tăng cường sức khỏe cho người sử dụng bằng cách duy trì và cải thiện cân bằng hệ vi khuẩn nội tại. Do có những tác động có lợi đối với sức khỏe của con người nên trong hai thập niên qua đã có rất nhiều sản phẩm sữa chua và sữa lên men được bổ sung probiotic. Nhìn chung các sản phẩm này thường chứa các chủng vi khuẩn sinh lactic như *Lactobacillus acidophilus* và Bifidobacteria mà thường được biết đến như là "bifidus". Đã có những bước phát triển rất mạnh mẽ trong lĩnh vực thực phẩm chức năng, đặc biệt là các thực phẩm có chứa probiotic và preliotic tăng cường sức khỏe thông qua việc cải thiện hệ vi khuẩn có ích tại ruột. Đã có những bằng chứng khoa học chứng minh rằng việc duy trì một hệ vi khuẩn khỏe mạnh tại ruột sẽ góp phần chống lại các rối loạn đường tiêu hóa như: nhiễm trùng tiêu hóa, các bệnh viêm đường ruột, và kể cả ung thư... Việc sử dụng các sản phẩm có chứa probiotic sẽ làm tăng lượng vi khuẩn có ích tại ruột, đồng thời làm giảm các vi khuẩn có khả năng gây hại, tăng cường khả năng phòng vệ tự nhiên của cơ thể. Ngày nay, đã có rất nhiều các bằng chứng về những tác động có lợi của probiotic trên sức khỏe của con người. Tuy nhiên, những nghiên cứu này chỉ tập trung trên các đối tượng đã mang bệnh. Do đó một yêu cầu cấp thiết được đặt ra là phải có những nghiên cứu rộng hơn trên một dân số lớn hơn để chứng minh tác dụng hữu ích của probiotic đối với những có sức khỏe bình thường.

Trước đây, các probiotic thường được nhắc đến dưới các dạng sử dụng qua đường tiêu hóa, nhưng gần đây đã có nhiều chế phẩm chứa probiotic có tác động bên ngoài đường tiêu hóa như âm đạo hoặc đường hô hấp.

https://nhathuocngocanh.com/

3.1. Tiêu chí chọn lọc chủng probiotic

Nói chung các vi sinh vật được lựa chọn làm probiotic phải đáp ứng được các tiêu chuẩn về an toàn, chức năng và tính kỹ thuật.

Trước khi một probiotic có thể mang lại những lợi ích trên sức khỏe con người chúng phải đáp ứng được các chỉ tiêu sau :

1. Chủng vi sinh vật phải có những đặc điểm phù hợp với công nghệ để có thể đưa vào sản xuất.

2. Có khả năng sống và không bị biến đổi chức năng khi đưa vào sản phẩm.

3. Không gây các mùi vị khó chịu cho sản phẩm.

4. Có khả năng sống sót khi đi qua đường tiêu hóa (dạ dày–ruột non) nếu được sử dung qua đường này.

5. Các vi khuẩn sống phải đi đến được nơi tác động của chúng.

6. Có khả năng thực hiện chức năng trong môi trường nơi chúng được định hướng.

Để nghiên cứu tác động của probiotic trên đường tiêu hóa, người ta sử dụng các kỹ thuật phân tử để giúp phân biệt vi sinh vật được đưa vào cơ thể với hàng ngàn chủng vi sinh vật khác tạo nên hệ sinh thái vi sinh vật đang hiện diện tại đường tiêu hóa. Ngoài ra, các kỹ thuật này cần phải có khả năng đánh giá được tác động của probiotic sử dụng đối với thành phần hệ vi khuẩn tại ruột, cũng như những tác động quan trọng trên ký chủ. Chúng không chỉ chứng minh cho những tác động có lợi của probiotic mà còn phải chứng minh là không có tác động có hại nào đối với sức khỏe con người. Khi đã đạt qua được các tiêu chí trên thì probiotic có thể được đưa vào sản xuất ở quy mô pilot để tìm hiểu những tác động có lợi trên sức khỏe của người tiêu dùng.

An toàn

Những tiêu chuẩn an toàn về probiotic gần đây được đề cập rất nhiều. Một vấn đề gây tranh cãi là có nhất thiết các probiotic phải bắt buộc có nguồn gốc từ người hay không, tuy nhiên hầu hết các chủng probiotic được sử dụng thành công hiện nay đều có nguồn gốc từ người. Ngoài ra, cũng có những tranh luận khác cho rằng chức năng hoạt động của probiotic sẽ tốt hơn trong một môi trường mà có những tính chất giống với môi trường ban đầu mà chúng được phân lập (chẳng hạn như đường ruột của người). Khía cạnh an toàn của probiotic bao gồm những điểm cụ thể sau :

1. Có định danh chính xác

2. Những chủng sử dụng cho người tốt nhất là có nguồn gốc từ người.

3. Được phân lập từ đường tiêu hóa của người khỏe mạnh.

4. Được chứng minh là không có khả năng gây bệnh.

https://nhathuocngocanh.com/

5. Không liên quan tới bệnh tật, ví dụ như nhiễm trùng nội mạc cơ tim, hay gây rối loạn tiêu hóa.

6. Không gây khử liên hợp muối mật.

7. Đặc điểm di truyền ổn định.

8. Không mang các gen đề kháng kháng sinh có thể truyền được.

Nghiên cứu về an toàn của các probiotic

Tính an toàn của các chủng probiotic là điều được quan tâm hàng đầu, những hướng dẫn đánh giá tính an toàn của probiotic có thể tìm thấy trong nhiều tạp chí khác nhau. Có một số phương thức giúp tiến hành đánh giá tính an toàn của probiotic: nghiên cứu trên các đặc tính nội tại của chủng probiotic; nghiên cứu về dược động học của chủng probiotic, nghiên cứu các mối tác động qua lại giữa probiotic và ký chủ. Nhưng nói chung các probiotic thường thuộc nhóm vi sinh vật GRAS.

Bảng 4.1. Một số vi khuẩn làm probiotic và khả năng gây nhiễm

Lactobacillus	không gây bệnh, đôi khi gây nhiễm trùng cơ hội ở các bệnh nhân suy giảm miễn dịch
Streptococcus	streptococci dùng uống phần lớn không gây bệnh (bao gồm Str. thermophilus); một số có thể gây nhiễm trùng cơ hội
Enterococcus	một vài chủng là tác nhân gây bệnh cơ hội với hoạt tính huyết giải và khả năng truyền để kháng kháng sinh (VD vancomycin)
Bifidobacterium	phần lớn không gây bệnh, một số trường hợp gây nhiễm trùng ở người
Saccharomyces	phần lớn không gây bệnh, một số trường hợp gây nhiễm trùng ở người

Những kiến thức mà chúng ta có được về khả năng sống của các probiotic trong đường tiêu hóa, sự chuyển vị, các đặc tính về sự cư ngụ, và hàm lượng các thành phần hoạt tính có nguồn gốc từ probiotic sẽ góp phần quan trọng trong việc đánh giá những tác động có lợi và những tác động có hại của probiotic trên đối tượng sử dụng. Có sự khác biệt về khả năng sống của các chủng probiotic khác nhau trên những vùng khác nhau của hệ tiêu hóa. Một số chủng bị chết phần lớn sau khi đi qua dạ dày, trong khi một số chủng vẫn sống sót với số lượng lớn sau khi đi qua ruột. Dược động học của các probiotic được nghiên cứu trên *in vivo* nhờ các kỹ thuật đặt ống thông, sinh thiết hay thẩm phân. Một số tính chất về enzym như giải liên hợp quá mức muối mật, phá hủy lớp niêm mạc được cho là có nguy cơ gây các tác động bất lợi cho ký chủ. Những đặc tính như vậy có thể tiến hành nghiên cứu trên *in vitro*. Các enzym có hoạt tính gây kết tập tiểu cầu

https://nhathuocngocanh.com/

dường như chúng có ái lực trên van tim, và hình thành nên các sản phẩm chuyển hóa không mong muốn, quá trình này cũng có thể nghiên cứu trên *in vitro*.

Việc tiến hành nghiên cứu các nguy cơ của việc sử dụng probiotic tốn nhiều thời gian và tiền bạc. Các probiotic có yếu tố nguy cơ thấp có thể phải được khuyến cáo sử dụng cho những bệnh nhân có tổn thương miễn dịch, nhưng trong những trường hợp này phải cân nhắc yếu tố nguy cơ và lợi ích. Điều này đòi hỏi phải có những thông tin có liên quan đến tính an toàn và hiệu quả của sản phẩm. Hiện tại, đã sẵn có những thông tin về tính an toàn của các vi khuẩn lactic. Cho đến hiện nay, có hai báo cáo về tình trạng nhiễm trùng gây nên bởi probiotic. Một chủng *L. rhamnosus* không phân biệt được với chủng *L. rhamnosus* GG đã được phân lập từ vùng ápxe tại gan của một người phụ nữ lớn tuổi với tiền sử bị cao huyết áp và tiểu đường. Trường hợp thứ hai là một chủng *L. rhamnosus* được cho là gây viêm nội mạc cơ tim ở một bệnh nhân nam lớn tuổi. Tuy nhiên, không như trong trường hợp ápxe gan, khi mà chủng vi khuẩn đã được xác định rõ ràng thông qua việc phân tích toàn bộ gen bằng kỹ thuật dấu ấn di truyền, chủng gây viêm nội mạc cơ tim chỉ được xác định bằng các phương pháp phân loại chủng thông thường, và dùng kỹ thuật khối phổ để định danh. Khả năng phân biệt của các phương pháp định danh chủng thông thường là thấp, và chưa có một dữ liệu nào chứng minh khả năng phân biệt được các chủng *Lactobacillus* bằng phương pháp khối phổ. Vì vậy, không thể kết luận rằng trong trường hợp viêm nội mạc cơ tim ở trên là do sử dụng *L. rhamnosus*.

Hai phát hiện này (một đã được chứng minh và một chưa có đầy đủ chứng cứ) cho thấy rằng mặc dù những sản phẩm probiotic được cho là an toàn khi đã được sử dụng đại trà trong nhiều năm ở châu Âu và Nhật Bản, vẫn có thể gây ra những trường hợp nhiễm trùng nghiêm trọng, đặc biệt là trên những bệnh nhân mà hệ miễn dịch đã suy giảm.

Vấn đề an toàn của vi khuẩn đề kháng kháng sinh

Việc sử dụng kháng sinh một cách bừa bãi ở người, thú y và ở động vật đã góp phần thúc đẩy sự gia tăng tình trạng đề kháng kháng sinh ở các vi sinh vật, điều này đã dẫn đến nhiều vấn đề nghiêm trọng trong việc điều trị nhiễm trùng. Sự đề kháng kháng sinh ở vi khuẩn có thể là do tự nhiên hoặc mắc phải. Đề kháng tự nhiên được xem như là một đặc điểm tự nhiên của loài, trong khi đó đề kháng mắc phải là do những đột biến về di truyền hay thu được từ gen của những vi khuẩn đề kháng kháng sinh khác.

Vi khuẩn *Lactobacillus* có khả năng đề kháng tự nhiên với nhiều loại kháng sinh, nhưng trong hầu hết các trường hợp thì các chủng này không có khả năng truyền gen đề kháng kháng sinh. Các chủng *Lactobacillus* có gen đề kháng

https://nhathuocngocanh.com/
kháng sinh không truyền được chưa hẳn được xem là an toàn khi sử dụng. Một vài chủng *Lactobacillus* như *L. rhamnosus*, *L. casei* có tính đề kháng tự nhiên đối với vancomycin. Các loài này có tiền chất peptidoglycan tận cùng bằng D–lactate, trong khi những chủng nhạy với vancomycin thì tận cùng chứa D–alanine. Nhiều chủng *Lactobacillus* đề kháng tự nhiên với vancomycin đã có một lịch sử được sử dụng lâu dài một cách an toàn như là probiotic, và không có biểu hiện nào cho thấy chúng truyền gen đề kháng này cho những vi khuẩn khác. Một số công trình đã chứng minh rằng yếu tố đề kháng kháng sinh của chủng *L. rhamnosus* GG không hoàn toàn giống với các vi khuẩn enterococci, và không thấy có sự truyền gen đề kháng kháng sinh nào giữa *L. rhamnosus* GG và enterococci.

Mặc dù cơ chế đề kháng kháng sinh bằng plasmid của *Lactobacillus* thường không phổ biến, nhưng trong một vài loài thì vẫn có cơ chế đề kháng này, việc sử dụng những chủng này làm probiotic cần phải xem xét lại về mặt an toàn. Bởi vì trong những trường hợp như vậy thì có thể diễn ra sự trao đổi gen giữa những loài khác xa về mặt di truyền, những chủng có yếu tố di động mang gen đề kháng như vậy không nên sử dụng ở người và thú vật. Việc kiểm tra khả năng của một chủng probiotic dự kiến như là một vi khuẩn cho trong tiếp hợp các gen đề kháng cần được thực hiện hết sức thận trọng, nhất là khi sử dụng probiotic trong quá trình điều trị với kháng sinh, và thậm chí dùng probiotic để nuôi gia súc, bởi việc sử dụng kháng sinh thường xuyên như là một yếu tố tăng trọng có thể góp phần chọn lọc các chủng đề kháng kháng sinh. Khả năng nhạy cảm kháng sinh của các lactobicilli là rất khác nhau, một vài chủng đề kháng không điển hình với một số kháng sinh thường sử dụng trên lâm sàng đã tìm thấy ở các loài *Lactobacillus*. Điều đó cho thấy cần phải kiểm tra tính nhạy cảm kháng của mỗi chủng probiotic.

Hầu hết bifidobacteria đều đề kháng tự nhiên với acid nalidixic, neomycin, polymyxin B, kanamycin, gentamycin, streptomycin và metronidazol. Những nghiên cứu ban đầu cho thấy vancomycin có khả năng ức chế mạnh các bifidobacteria, trong khi theo những nghiên cứu gần đây thì đề kháng vancomycin là một đặc điểm thường thấy ở các bifidobacteria. Tuy nhiên kỹ thuật thực hiện để thử tính nhạy cảm kháng sinh của hai nghiên cứu này là khác nhau do đó khó có thể so sánh về các dữ liệu này. Sự tụt giảm lượng bifidobacteria trong phân khi sử dụng vancomycin điều đó gợi ý rằng bifidobacteria nhạy cảm với tác nhân này. Những nghiên cứu về di truyền của đặc tính đề kháng kháng sinh của bifidobacteria sẽ giúp chúng ta hiểu rõ hơn về cơ chế đề kháng của chi này.

3.2. Chức năng

Những yêu cầu về chức năng của probiotic cần được chứng minh bằng các phương pháp thử nghiệm trên *in vitro*, và kết quả của những nghiên cứu này

https://nhathuocngocanh.com/

phải thể hiện trong những nghiên cứu có kiểm soát trên người. Khi lựa chọn một chủng probiotic thì các yếu tố chức năng cần được quan tâm là:

1. Có khả năng dung nạp với acid và dịch vị của người.
2. Có khả năng dung nạp với muối mật (là đặc tính rất quan trọng để probiotic có thể sống sót được khi đi qua ruột non).
3. Có khả năng bám dính vào bề mặt niêm mạc ruột và tồn tại lâu dài trong đường tiêu hóa.
4. Có khả năng kích thích miễn dịch nhưng không có tác động gây viêm.
5. Có khả năng cạnh tranh với hệ vi sinh vật tự nhiên.
6. Sản xuất các chất kháng sinh vi sinh vật (ví dụ bacteriocin, hydrogen peroxide, acid hữu cơ)
7. Có hoạt tính đối kháng với tác nhân gây bệnh như *Helicobacter pylori*, *Samonella sp.*, *Listeria monocytogenes* và *Clostridium difficile*.
8. Có khả năng chống đột biến và các yếu tố gây ung thư.
9. Các lợi ích khác được chứng minh trên lâm sàng.

Thử nghiệm về việc sử dụng với những chủng probiotic khác nhau cho thấy rằng: chủng probiotic được sử dụng sẽ biến mất khỏi đường tiêu hóa sau một vài tuần ngừng dùng. Điều này đặt ra một câu hỏi là tiêu chí probiotic phải tồn tại lâu dài trong đường tiêu hóa có thực sự cần thiết hay không. Tuy nhiên, những chủng probiotic dù chỉ có khả năng tồn tại tạm thời trong đường tiêu hóa cũng sẽ gia tăng cơ hội mang lại những ích lợi cho ký chủ, do vậy tiêu chí cũng cần phải được quan tâm.

Hiệu quả lâm sàng của một vài chủng probiotic được trình bày trong Bảng 4.2 dưới đây. Những hiệu quả bao gồm: điều hòa miễn dịch, điều hòa hệ sinh thái vi khuẩn đường ruột, chống tiêu chảy, giảm tính hoạt động của các enzym trong phân.

Bảng 4.2. Tác dụng lâm sàng của một số chủng probiotic

Chủng	Tác dụng lâm sàng trên người
Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103)	Giảm hoạt tính enzym phân, giảm tiêu chảy do kháng sinh ở trẻ em, điều trị và dự phòng rotavirus và tiêu chảy cấp ở trẻ em, điều trị tiêu chảy tái phát do *Clostridium difficile*, kích thích miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng viêm da không điển hình ở trẻ em.
Lactobacillus johnsonii (acidophilus) LJ–1 (La1)	Cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng cường miễn dịch, hỗ trợ điều trị *Helicobacter pylori*.
Bifidobacterium lactis Bb–12	Dự phòng tiêu chảy du lịch, điều trị tiêu chảy do virus, kể cả rotavirus, cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, cải thiện tình trạng táo bón, kích thích miễn dịch, giảm nhẹ triệu chứng viêm da không điển hình ở trẻ em.

https://nhathuocngocanh.com/

Lactobacillus reuteri (BioGaia Biologics)	Rút ngắn thời gian bị tiêu chảy do rotavirus ở trẻ em, điều trị tiêu chảy cấp ở trẻ em, an toàn và dung nạp tốt ở bệnh nhân trưởng thành HIV dương tính.
Lactobacillus casei Shirota	Cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, giảm hoạt tính enzym phân, có tác động tích cực đối với ung thư mặt bàng quang và ung thư cổ tử cung, không ảnh hưởng đến hệ miễn dịch của người khỏe mạnh.
Lactobacillus plantarum DSM9843 (299v)	Cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, tăng hàm lượng acid béo mạch ngắn trong phân.
Saccharomyces boulardii	Dự phòng tiêu chảy do kháng sinh, điều trị viêm ruột kết do *Clostridium difficile*, dự phòng tiêu chảy ở bệnh nhân sử dụng dinh dưỡng qua ống.
Chủng trong sữa chua (*Streptococcus thermophilus* và / hay L. *delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	Không có tác dụng trên tiêu chảy do rotavirus, không có hiệu ứng tăng cường miễn dịch khi bị tiêu chảy do rotavirus, không có tác dụng lên hoạt tính enzym phân, tác động yếu trên bạch bào nhưng không ảnh hưởng đến hoạt tính thực bào chung ở người khỏe mạnh.

Khả năng bám dính

Khả năng bám vào bề mặt và sau đó là phát triển trong đường tiêu hóa người được xem là điều kiện tiên quyết quyết định chức năng của probiotic. Những vi khuẩn có khả năng bám dính vào bề mặt ruột sẽ có thể tồn tại trong ruột lâu hơn và do đó có điều kiện để biểu hiện những tác động điều hòa miễn dịch và trên chuyển hóa hơn là những chủng probiotic không có khả năng bám dính. Khả năng bám dính sẽ tạo nên một mối tương tác giữa probiotic và bề mặt niêm mạc ruột là nơi có chứa nhiều tế bào lympho, điều này sẽ kích thích tính miễn dịch tại chỗ và toàn bộ cơ thể. Do đó, người ta cho rằng chỉ có những chủng probiotic có khả năng bám dính mới tạo được hiệu quả cảm ứng miễn dịch và làm ổn định hàng rào bảo vệ niêm mạc ruột. Sự bám dính của probiotic cũng tạo nên khả năng cạnh tranh gắn vào biểu mô ruột giữa những vi khuẩn gây bệnh và probiotic. Trên *in vitro* người ta thấy rằng cả hai dạng vi khuẩn *L. acidophilus* còn sống hoặc đã bị chết do nhiệt đều có khả năng ức chế sự bám dính của các vi khuẩn gây bệnh.

Những nghiên cứu so sánh có kiểm soát ở những hệ thống mô hình trên *in vitro*, chẳng hạn những dòng tế bào ung thư trực tràng như HT–29 và Caco–2 rất quan trọng trong thử nghiệm về tính bám dính của probiotic. Hai dòng tế bào HT–29 và Caco–2 biệt hóa thành tế bào ruột vì vậy có thể sử dụng như là một mô hình cho biểu mô ruột non. Một loại niêm dịch (chất bao phủ bề mặt niêm mạc ruột) được tiết bởi những dòng biến thể của tế bào HT–29, HT–29–MTX cũng được sử dụng trong những nghiên cứu về khả năng bám dính. Những thử nghiệm về khả năng bám dính trên *in vitro* cho ta biết được sự khác biệt về

https://nhathuocngocanh.com/

khả năng bám dính của những chủng probiotic khác nhau. Gần đây người ta sử dụng một glycoprotein có được từ thủ thuật mở thông nhánh hồi tràng của ruột hay từ các nguyên liệu của phân được sử dụng như là một mô hình thử nghiệm tính bám dính của probiotic trên niêm dịch ruột non. Niêm dịch là hàng rào tiếp xúc đầu tiên giữa vi khuẩn được sử dụng và niêm mạc ruột non. Do đó, trong việc nghiên cứu về khả năng bám dính của probiotic ngoài việc sử dụng những dòng tế bào không có khả năng tiết niêm dịch như Caco–2 và HT–29, cần phải sử dụng thêm những dữ liệu có được từ thử nghiệm khả năng bám dính với niêm dịch. Qua nghiên cứu người ta thấy rằng khả năng bám dính của các probiotic là khác nhau, và có những trường hợp probiotic có khả năng gắn kết được với tế bào Caco–2 và HT–29 nhưng không có khả năng gắn kết hiệu quả với niêm dịch. Ngoài ra, người ta còn phát hiện rằng khả năng bám dính của các vi khuẩn bifidobacteria trên niêm dịch của những đối tượng ở những nhóm tuổi khác nhau là có sự khác biệt (gắn kém hơn trên niêm dịch của người lớn tuổi).

Nghiên cứu về khả năng bám dính cũng có thể thực hiện bằng kỹ thuật sinh thiết, bằng cách sinh thiết một mẫu mô sau một thời gian sử dụng probiotic. Tuy nhiên việc lấy mẫu sinh thiết mô gây nên một trở ngại về đạo đức do đó người ta chỉ thực hiện lấy mẫu mô trong những trường hợp nội soi trực tràng thường quy. Mẫu sinh thiết mô trong những trường hợp này không chỉ giới hạn ở vùng trực tràng sigma, mà còn có được những mẫu mô ở vùng ruột già (đại tràng lên, trực tràng xuống và trực tràng ngang). Nhờ kỹ thuật sinh thiết mà người ta phát hiện rằng các chủng probiotic thương mại (*L. rhamnosus* GG) có khả năng gắn kết vào vùng đại tràng xuống nhiều hơn các vùng khác. Nghiên cứu cũng đã chứng minh được khả năng bám dính của các chủng *Lactobacillus* đối với những mẫu sinh thiết mô trực tràng trên những đối tượng thử nghiệm tình nguyện đã sử dụng súp bột yến mạch. Kỹ thuật sinh thiết được xem như là một phương tiện chính xác nhất để đánh giá khả năng bám dính của các probiotic. Tuy nhiên, kỹ thuật này cũng còn có nhiều hạn chế: trước hết là vấn đề đạo đức của việc lấy mẫu mô, thứ hai là kỹ thuật này đòi hỏi phải có người có chuyên môn cao thực hiện, thứ ba là khi thiết bị nội soi di chuyển trong ruột sẽ làm mất lượng lớn vi khuẩn bám dính trên bề mặt mẫu sinh thiết và chỉ để lại những vi khuẩn có khả năng bám mạnh nhất vào mẫu sinh thiết do đó cũng có thể mắc sai số.

Mặc dầu đã có nhiều nỗ lực nghiên cứu về khả năng bám dính của probiotic, tuy nhiên mối liên hệ về khả năng bám dính của probiotic và chức năng của chúng cũng vẫn chỉ là sự suy đoán.

Khả năng điều hòa miễn dịch

Sự bám dính của probiotic và những sản phẩm của chúng trên các mô lympho tại ruột sẽ kích hoạt tác động bảo vệ của hệ miễn dịch. Những nghiên cứu được tiến hành trên người cho thấy rằng các vi khuẩn probiotic đã có những

https://nhathuocngocanh.com/

tác động có lợi trên ký chủ. Tuy nhiên, người ta cũng quan sát thấy khả năng đáp ứng khác nhau khi sử dụng những chủng probiotic khác nhau. Trong hai thử nghiệm độc lập đối với *L. johnsonii* LJ–1 và *L. salivarius* UCC 118 người ta thấy có sự cảm ứng đối với đáp ứng của kháng thể IgA trên niêm mạc và sự gia tăng hoạt động của những tế bào thực bào. Các tác động điều hòa miễn dịch của những chủng này không liên quan tới đáp ứng viêm và nhìn chung không gây ra thay đổi đáp ứng miễn dịch có hại. Thử nghiệm trên *in vitro* cho thấy rằng dịch chiết từ tế bào *L. rhamnosus* GG và *Bifidobacterium lactis* Bb–12 có khả năng ức chế sự tăng sinh của các tế bào lympho. Những bằng chứng về tác động điều hòa miễn dịch của hai chủng này còn được chứng minh ở những trẻ em bị eczema do dị ứng với thực phẩm. Những đứa trẻ được sử dụng *L. rhamnosus* GG và *Bifidobacterium lactis* Bb–12 cho thấy có sự cải thiện rõ rệt về các triệu chứng lâm sàng so với nhóm trẻ chỉ dùng giả dược. *L. rhamnosus* GG còn cho thấy khả năng làm giảm phản ứng miễn dịch gây viêm ở những đối tượng mẫn cảm với sữa, trong khi ở những đối tượng bình thường nó gia tăng đáp ứng miễn dịch. Hơn thế nữa, *L. rhamnosus* GG còn cho thấy thúc đẩy đáp ứng miễn dịch của kháng thể IgA ở những bệnh nhân bị bệnh Crohn và tăng cường tuần hoàn cho những tế bào bài tiết kháng thể ở những trẻ bị tiêu chảy do rotavirus. Một số nghiên cứu trên chuột cho thấy một vi khuẩn không thường trú trong đường ruột như Bacillus cũng có khả năng cảm ứng tăng IgA trên niêm mạc ruột và do đó gia tăng khả năng phòng vệ của niêm mạc.

Khả năng chống lại các yếu tố gây bệnh

Để có thể tác động trên hệ sinh thái vi khuẩn đường ruột, một điều quan trọng là các probiotic phải có khả chống lại các vi khuẩn gây bệnh bằng cách tiết ra các kháng sinh hay là những chất cạnh tranh. Đã có nhiều nghiên cứu về bacteriocin, một kháng sinh do vi khuẩn lactic tiết ra. Mặc dù, nhiều chủng probiotic có thể sản xuất bacteriocin, nhưng vai trò ức chế các tác nhân gây bệnh của chúng trên *in vitro* là rất giới hạn, chúng chỉ có tác động trên những loài có quan hệ gần khác như *Lactobacillus* hay những chủng sinh bào tử như *Bacillus* hay *Clostridium*. Tuy nhiên, những chất chuyển hóa có trọng lượng phân tử thấp như H_2O_2, acid lactic, acid acetic và những hợp chất thơm khác; và những chất chuyển hóa bậc hai khác có vai trò quan trọng hơn trong việc chống lại các vi khuẩn gây bệnh khác như *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium*, *Helicobacter*. Thử nghiệm *in vitro* với *L. rhamnosus* GG cho thấy chúng tạo ra những chất kháng khuẩn có trọng lượng phân tử nhỏ, có thể là những chuỗi acid béo mạch ngắn, nhưng khác với acid acetic và lactic là chúng có khả năng ức chế các vi khuẩn kỵ khí như: *Clostridium, Bacteroides, Bifidobacterium,* chống lại *Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococus* nhưng không chống lại các *Lactobacillus* khác. Khả năng chống lại vi khuẩn gây bệnh đường ruột của *L. rhamnosus* GG đã tiến hành trên *in vivo* với chuột được gây nhiễm

https://nhathuocngocanh.com/

S. typhimurium. Thử nghiệm trên *in vitro* cho thấy dịch môi trường nuôi cấy của chủng *L. acidophilus* có thể làm giảm khả năng sống của *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* và các *Enterobacter sp.* khác. Những chất kháng khuẩn trọng lượng phân tử thấp không xác định được nhưng chúng được sản xuất độc lập với các acid lactic và chúng cũng không có tác động đối với các chủng *Lactobacillus* hay *Bifidobacterium* được thử nghiệm. Khả năng kháng khuẩn của *L. acidophilus* LB SCS đối với *S. typhimurium* cũng được thể hiện trong mô hình gây nhiễm ở chuột trên *in vivo*. *L. acidophilus (johnsonii)* LA1 (LJ–1) sản xuất các chất kháng khuẩn không thuộc nhóm bacteriocin (chưa được xác định nhưng khác với acid lactic) có khả năng chống lại nhiều loại vi khuẩn Gram âm và Gram dương trên *in vitro* như *S. aureus, S. flexneri, K. pneumoniae, P. aeruginosa* và *Enterobacter cloacae*. Tuy nhiên, sự ức chế trên *Lactobacillus* và bifidobacteria không được phát hiện. Hoạt tính ức chế của chủng LA1 đối với *S. typhimurium* cũng phát hiện thấy trên mô hình *in vivo* ở chuột. Ngoài ra, người ta còn thấy *L. acidophilus* chống lại vi khuẩn *H. pylori* trong những thử nghiệm trên *in vitro* và cả những thử nghiệm trên người.

Khả năng chống đột biến và các yếu tố gây ung thư

Khả năng chống đột biến và ung thư của những vi khuẩn sử dụng cùng thực phẩm hay của hệ vi khuẩn hiện diện trong hệ sinh thái ruột đã được nghiên cứu trong nhiều năm qua. Khả năng chống ung thư của probiotic được cho là do một trong những cơ chế sau: sự gắn kết và phân hủy các chất gây ung thư, sản xuất ra những hợp chất kháng ung thư, điều hòa những enzym tiền chất gây ung thư tại ruột, ức chế khối u bằng một cơ chế đáp ứng miễn dịch. Người ta nhấn mạnh khả năng chống tạo đột biến và các chất gây ung thư trên *in vitro* của những chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ những sản phẩm lên men hay các sản phẩm được làm từ sữa (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, và *Pediococcus*). Tuy nhiên, theo các tiêu chuẩn gần đây thì một ít chủng trong nhóm này được xem như probiotic. Thêm vào đó đặc tính chống đột biến không phải là đặc thù của riêng các vi khuẩn sinh lactic, đặc tính này dường như cũng gặp trong một số chủng vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Có nhiều loại vi khuẩn và cả tế bào nấm có khả năng liên kết với các tác nhân gây đột biến trên *in vitro*. Hơn thế nữa các tế bào vi khuẩn không sống cũng có khả năng liên kết với các yếu tố gây đột biến hay ung thư. Ngoài các nghiên cứu kháng đột biến và ung thư *in vitro*, một số chủng *Lactobacillus* và *Bifidobacterium* cũng đã được nghiên cứu trên mô hình *in vivo* trên chuột.

Trong các thử nghiệm trên người, các chủng probiotic có liên quan đến sự giảm tính gây đột biến của phân hay hoạt tính các enzym trong phân có liên quan đến việc hoạt hóa các chất gây đột biến hay ung thư. Các enzym phân như

https://nhathuocngocanh.com/
nitroreductase và β–glucuronidase có khả năng chuyển các chất tiền sinh ung thư thành chất gây ung thư trong trực tràng. Trong các nghiên cứu trên người, việc sử dụng chủng *L. acidophilus* NCFB 1748 được chứng minh là làm giảm tính gây đột biến của phân và nước tiểu. Sự ức chế tính gây đột biến của nước tiểu cũng đã được chứng minh với chủng *L. casei* Shirota. Bổ sung chủng *L. rhamnosus* GG làm giảm hoạt tính phân của β–glucuronidase, nitroreductase và glycocholic acid hydrolase ở phụ nữ khỏe mạnh. Khi dùng ở người, các chủng *L. gasseri* ADH và *L. casei* Shirota cũng làm giảm hoạt tính enzym phân. Việc sử dụng chủng *L. casei* Shirota ở một số bệnh nhân ung thư cho thấy có các hiệu ứng có lợi như làm giảm tái phát ung thư bàng quang và kéo dài thời gian sống và khoảng cách tái phát của ung thư cổ tử cung. Tuy nhiên, vấn đề hoạt tính chống ung thư hay đột biến của probiotic vẫn giới hạn trên các mô hình *in vitro* hay *in vivo*, việc mở rộng ra trên người để dự phòng ung thư vẫn còn nhiều bất đồng.

3.3. Các vấn đề về công nghệ

Thực phẩm chức năng chứa probiotic ngày nay đã trở nên phổ biến ở thị trường. Ra đời cách đây khoảng 20 năm các sản phẩm này đã có sự tăng trưởng liên tục và ngày nay được hầu hết người tiêu dùng biết đến. Để thành công trong việc thúc đẩy khả năng tiêu dùng các sản phẩm probiotic và thực phẩm chức năng ngành công nghiệp thực phẩm phải đáp ứng những đòi hỏi về tính an toàn của sản phẩm đối với người tiêu dùng. Tất cả các sản phẩm probiotic phải an toàn và những đặc tính tốt về cảm quan. Chúng phải chứa những chủng vi sinh vật xác định ở một liều lượng xác định trong suốt quá trình bảo quản. Kiểm tra các sản phẩm hiện hành trên thị trường người ta thấy rằng điều này không phải lúc nào cũng đạt được.

Thậm chí một chủng probiotic đã thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu về tính an toàn cũng như chức năng thì tiêu chí công nghệ vẫn là một yếu tố cực kỳ quan trọng. Các yếu tố công nghệ cần phải xem xét khi lựa chọn một probiotic bao gồm :

1. Có những đặc tính tốt về cảm quan.
2. Đề kháng với thực khuẩn thể.
3. Dễ sản xuất: tăng trưởng đủ mạnh, dễ thu hoạch.
4. Có khả năng sống sót trong quá trình sản xuất.
5. Ổn định trong quá trình sản xuất và bảo quản.
6. Có thể đánh giá chất lượng khi được trộn vào sản phẩm cuối cùng.

Khả năng sống và hoạt tính của probiotic là những yếu tố quyết định chức năng của chúng. Tuy nhiên, một vài nghiên cứu cho thấy rằng các probiotic ở dạng không sống vẫn mang lại những tác động có lợi như điều hòa miễn dịch và trung hòa các yếu tố gây ung thư trên ký chủ. Do đó, đối với một số chủng

https://nhathuocngocanh.com/

probiotic chỉ cần thỏa mãn điều kiện là chúng phát triển tốt trong giai đoạn đầu của quá trình sản xuất là đủ, mà không nhất thiết phải duy trì khả năng sống trong quá trình bảo quản.

Trước khi một sản phẩm probiotic có thể đến tay người tiêu dùng, trước hết chúng phải có khả năng sản xuất được ở những điều kiện công nghiệp, vẫn đảm bảo khả năng sống và còn hoạt tính sau quá bảo quản lạnh hay ở trạng thái đông khô và cả trong những sản phẩm thực mà cuối cùng chúng sẽ được đưa vào. Ngoài ra, khi đưa vào thực thực phẩm chúng không được phép tạo ra các mùi vị khó chịu. Vật liệu để đóng gói và điều kiện bảo quản cũng ảnh hưởng không nhỏ đến chất lượng của sản phẩm.

Các thực phẩm chứa probiotic thường là những thực phẩm lên men, hoặc ở dạng thực phẩm công thức cho trẻ, nước uống trái cây, thức uống từ nước sữa và sữa có đường. Sữa lên men và pho mát là những sản phẩm thường thấy có chứa probiotic. Những thực phẩm lên men là những sản phẩm được sản xuất bởi quá trình lên men của vi sinh vật. Trong quá trình này đường sẽ được biến đổi thành ethanol và/hay các acid hữu cơ mà chủ yếu là acid acetic, lactic và acid propionic. Nấm men và vi khuẩn sinh lactic là những chủng vi sinh vật thường được sử dụng trong lên men thực phẩm. Trong lên men các sản phẩm từ sữa người ta thường sử dụng *Lactobacillus* và *Lactococcus*, nhưng nấm men và vi khuẩn sinh propionic cũng được sử dụng.

Sản xuất các sản phẩm lên men chứa probiotic

Hầu hết các nhà sản xuất mẫu cấy khởi đầu lớn hiện nay đều sản xuất các chủng vi khuẩn lactic và bifidobacteria đường ruột thường gặp. Các mẫu cấy probiotic thương mại bán sẵn thường chứa một hoặc hỗn hợp nhiều chủng vi khuẩn. Trong hầu hết các trường hợp những đặc tính của probiotic sẽ bị ảnh hưởng bởi chủng ban đầu hay môi trường đã sản xuất ra chúng. Vì vậy, những thông tin cụ thể về đặc tính của một chủng xác định là hết sức quan trọng trong việc tối ưu hóa quy trình sản xuất. Các mẫu nuôi cấy probiotic có thể được sử dụng ở những dạng đặc biệt như viên nén và viên nang, hoặc chúng có thể dùng để sản xuất nhiều loại sản phẩm thực phẩm lên men khác nhau. Trong một vài trường hợp, mẫu nuôi cấy được đưa vào thực phẩm để tạo ra một probiotic nhất định hay để tạo những đặc tính chức năng cho sản phẩm.

Hầu hết các mẫu cấy probiotic thương mại làm sẵn thường được cung cấp dưới dạng có hàm lượng cao, và hầu hết chúng được thiết kế để sử dụng cho DVS (direct vat set – cho thẳng vào sản phẩm). Người ta thường sử dụng các mẫu cấy DVS có hàm lượng cao vi khuẩn vì việc nhân giống các vi sinh vật probiotic tại nơi sản xuất thường gặp khó khăn. Các sản phẩm DVS có thể được cung cấp dưới dạng các môi trường đông lạnh có hàm lượng cao hay là dạng môi trường

https://nhathuocngocanh.com/
đông khô. Các môi trường nền được đóng gói trong các bao bì có khả năng chống lại ánh sáng và độ ẩm. Hầu hết chúng được đựng trong các thùng carton hay túi nhỏ bên ngoài được bao phủ bởi một lớp bao kim loại tráng nhôm. Bởi vì các sản phẩm này rất nhạy cảm với các yếu tố bên ngoài, nên cần tuân theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất trong quá trình thao tác và bảo quản chúng. Thông thường các mẫu cấy đông lạnh sâu chứa hơn 10^{10} cfu g^{-1}, trong khi các môi trường đông khô thường chứa hơn 10^{11} cfu g^{-1}. Hàm lượng tế bào trên mỗi gam sản phẩm thay đổi tùy theo mô trường và chủng sinh vật được sử dụng.

Trong việc sản xuất các thực phẩm lên men, điều quan trọng là các mẫu nuôi cấy probiotic được sử dụng góp phần làm cho sản phẩm có những đặc tính tốt về cảm quan. Vì vậy, người ta thường phối hợp các vi khuẩn probiotic với những chủng vi khuẩn khác thích hợp cho quá trình lên men của một sản phẩm nhất định. Trong sản xuất những sản phẩm lên men có nguồn gốc từ sữa người ta thường phối hợp chủng probiotic với *S. thermophilus* và *L. delbrueckii* để tạo được hương vị và cảm giác mong muốn. Những thành phần chính tạo hương vị của các loài được sử dụng cùng với probiotic được trình bày trong bảng dưới đây.

Bảng 4.3. Một số vi khuẩn dùng để điều chỉnh hương vị

Chủng sinh vật	Thành phần chính tạo hương vị
Lactobacillus acidophilus	Lactate (DL)
Bifidobacterium spp.	Lactate (L+), acetate
Streptococcus thermophilus	Lactate (L+), acetaldehyde, diacetyl.
Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus	Lactate (L+), acetaldehyde, diacetyl.

Trong nhiều trường hợp người tiêu dùng cảm thấy các sản phẩm lên men có chứa *L. delbrueckii* thường quá acid và có mùi của acetaldehyde rất nặng (hương vị sữa chua). Vì vậy, các môi trường probiotic đã được phát triển nhằm mang đến những hương vị thích hợp với từng sản phẩm mà chúng được sử dụng. Một ví dụ về về môi trường như vậy là môi trường ABT (có chứa *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* và *S. thermophilus*).

Lựa chọn các vi sinh vật đầu vào có khả năng tạo acid ổn định là một việc hết sức quan trọng. Tuy nhiên, khi lựa chọn cần phải xem xét đến tác động của chúng trên sức khỏe con người. Bởi vì môi trường bên trong đường tiêu hóa và môi trường bên trong sản phẩm là khác nhau, do đó các probiotic thường không thích hợp để làm một vi sinh vật khởi đầu của quá trình lên men. Vì trong môi

https://nhathuocngocanh.com/

trường như vậy chúng sẽ phát triển chậm và tạo ra những hương vị không thích hợp cho sản phẩm. Có thể vượt qua trở ngại này bằng cách dùng một quy trình sản xuất vô khuẩn như được dùng để sản xuất các sản phẩm sữa với acidophilus và sử dụng probiotic có hàm lượng cao khoảng 10^9 cfu g^{-1}. Ngoài ra cũng có thể đưa thêm vào môi trường các cơ chất tạo năng lượng cho probiotic như glucose và các yếu tố tăng trưởng như dịch chiết cao nấm men và protein thủy phân hay các chất chống oxy hóa, khoáng chất và vitamin. Tuy nhiên, đôi khi việc áp dụng các biện pháp trên có thể cải thiện việc dùng probiotic như là vi sinh vật khởi đầu, nhưng vẫn chưa đủ để có thể sản xuất sản phẩm lên men. Vấn đề này có thể được giải quyết bằng cách thêm vào trong quá trình chuẩn bị probiotic một mẫu cấy khởi đầu trợ giúp.

Khi sản xuất các sản phẩm lên men có chứa probiotic, nhiệt độ lên men thường được duy trì ở 37–40°C bởi vì nhiệt độ này thích hợp cho sự phân chia của nhiều chủng probiotic. Các probiotic có thể được trộn với các chủng khởi đầu và phát triển cộng sinh cùng với các vi khuẩn khác trong quá trình lên men. Cũng có trường hợp người ta đưa probiotic vào sản phẩm sau quá trình lên men (ví dụ sản phẩm "Cultura" của Đan Mạch). Trong những sản phẩm sữa probiotic đặc biệt (các sản phẩm có đường), probiotic được đưa vào sản phẩm theo một cách thức đặc biệt sao cho chúng vẫn có sống nhưng không phân chia bằng cách giữ lạnh sản phẩm.

Tương tác giữa probiotic và vi khuẩn khởi đầu lên men

Mối tương tác giữa probiotic và vi khuẩn khởi đầu sẽ ảnh hưởng đến chất lượng của sản phẩm. Có những bằng chứng cho thấy rằng có thể tạo ra những sản phẩm có hương vị tốt mà vẫn giữ được khả năng sống cao của vi khuẩn bằng cách sử dụng phối hợp probiotic và các vi khuẩn khởi đầu. Thông thường cần lựa chọn một vi khuẩn khởi đầu thích hợp bằng cách thử nghiệm với các mẫu hiện có. Các vi khuẩn khởi đầu có thể dùng như *S. thermophilus*, môi trường sữa chua và các vi khuẩn ưa nhiệt trung bình với sự kết hợp của nhiều chủng *Lactococcus* khác nhau. Một phối hợp tối ưu giữa probiotic và vi khuẩn khởi đầu cần phải tiến hành trên thực nghiệm để biết được phối hợp nào tạo được cảm giác tốt nhất cho sản phẩm và khả năng sống cao nhất của probiotic.

Trong quá trình thực nghiệm này có một số nguyên tắc cần phải tuân thủ. Nếu có thể thì probiotic phải có thể phát triển trong suốt quá trình lên men. Điều này sẽ làm gia tăng lượng probiotic trong sản phẩm do đó làm giảm giá thành sản xuất, và tăng khả năng thích nghi của probiotic trong môi trường của sản phẩm. Vi khuẩn khởi đầu chỉ nên có tốc độ phát triển vừa phải để các probiotic có thể phát triển. Một điều quan trọng khác là probiotic phải được thêm vào trước hay

https://nhathuocngocanh.com/
cùng thời điểm với vi khuẩn khởi đầu. Đưa probiotic vào sau quá trình lên men không những không làm tăng lượng vi khuẩn mà còn làm giảm khả năng sống của probiotic, điều này đã quan sát thấy đối với *L. acidophilus* được trộn với sữa chua. Các vi khuẩn khởi đầu có thể cải thiện sự tăng trưởng của probiotic bằng cách sản xuất ra những chất thích hợp với sự tăng trưởng của probiotic hoặc làm giảm áp lực oxy trong môi trường lên men. Bifidobacteria khá nhạy cảm với oxy nhưng bằng cách lựa chọn một chủng *S. thermophilus* thích hợp sẽ có thể làm tăng khả năng sống của *B.longum*. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cũng có khả năng làm tăng sự phát triển của *Bifidobacterium* nhờ khả năng thủy phân protein làm tăng hàm lượng các acid amin như valine, glycine, và histidine trong môi trường.

Trong quá trình chọn lựa một vi khuẩn khởi đầu cho quá trình lên men cần phải lưu ý đến các tác động bất lợi của nó đối với khả năng năng sống của probiotic. Khả năng sống của probiotic có thể bị ảnh hưởng bởi những chất chuyển hóa sinh ra trong quá trình phát triển của vi khuẩn khởi đầu như acid lactic, H_2O_2 và các bacteriocin. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* một chủng thường gặp trong môi trường sữa chua, tạo ra một lượng lớn acid D–lactic khi sản phẩm được bảo quản sau quá trình lên men ở nhiệt độ thấp. Tác động của D–lactate trên các probiotic là khác nhau tùy thuộc vào chủng. Người ta đã chứng minh rằng một số chủng bifidobacteria không thể phát triển trong môi trường sữa chua, nhưng khi phối trộn thích hợp giữa probiotic và vi khuẩn khởi đầu th. có thể ngăn chặn hiện tượng làm giảm số lượng vi khuẩn. Những vi khuẩn khởi đầu chỉ gồm *S. thermophilus* có thể hoạt động tốt hơn cùng với probiotic nhạy cảm với acid và pH thấp. Chúng sẽ tạo một môi trường ít acid hơn trong quá trình lên men và bảo quản.

Tác động của các chất chuyển hóa sinh ra bởi vi khuẩn khởi đầu đối với khả năng sống của probiotic có thể tăng lên trên *in vivo*. Khi mà các thực phẩm chức năng đến dạ dày–nơi có môi trường pH thấp thì số lượng các phân tử acid lactic không hòa tan sẽ tăng lên. Vì khả năng sống của probiotic chịu ảnh hưởng mạnh nhất bởi các acid không ion hóa, do đó khả năng sống của vi khuẩn sẽ bị giảm bởi acid chlohydric từ dịch vị và lượng acid lactic từ sản phẩm. So sánh tác động của acid trên khả năng sống của *L. acidophilus* NCFB 1748 với một sản phẩm sữa có đường thấy rằng tỷ lệ probiotic sống của sản phẩm sữa có đường sau khi đi qua đường tiêu hóa cao hơn gấp 10 lần.

Tương tác giữa probiotic và prebiotic

Thực phẩm chức năng có chứa cả probiotic và prebiotic được gọi là synbiotic. Hầu hết các prebiotic biết được cho đến ngày nay là những carbohydrate không bị hấp thu bởi ruột, với số lượng các đường đơn trong phân tử là từ hai đến vài

https://nhathuocngocanh.com/

trăm. Một số prebiotic điển hình là lactulose, galacto– và fructooligosacharid và dextrin giới hạn. Bởi vì khái niệm synbiotic khá mới mẻ nên chưa có nhiều nghiên cứu về tác động qua lại giữa probiotic và prebiotic. Một đặc tính chung của prebiotic là chúng có thể ảnh hưởng trên sự phát triển và khả năng sống của probiotic bằng cách tác động trên sự phát triển và chuyển hóa của cả probiotic và vi khuẩn khởi đầu.

Sản xuất các thực phẩm không có nguồn gốc từ sữa chứa probiotic

Còn nhiều thử thách cần phải vượt qua để áp dụng các mẫu nuôi cấy probiotic cho các sản phẩm không có nguồn gốc từ sữa. Khả năng sống của probiotic trong thực phẩm phụ thuộc vào nhiều yếu tố như pH, nhiệt độ bảo quản, sự hiện diện của các sinh vật cạnh tranh, các chất ức chế (như NaCl). Trong những sản phẩm thức ăn dành cho trẻ hay bánh kẹo (chocolate) có chứa probiotic thì một điều quan trọng là cần phải duy trì được khả năng sống và hoạt tính của probiotic trong một thời gian dài. Bởi vì các probiotic được đưa vào các sản phẩm như là một thành phần bổ trợ nên trong điều kiện như vậy probiotic thường không có khả năng nhân lên, và không thể đảm bảo được các yêu cầu cần thiết cho sự ổn định của probiotic. Các yếu tố như nước, hàm lượng oxy cao và nhiệt độ là một bài toán khó giải quyết trong việc đưa probiotic vào sử dụng trong những sản phẩm này. Việc bảo quản ở nhiệt độ thường của các sản phẩm không làm từ sữa như các sản phẩm ngũ cốc, các loại nước uống, chocolate thực sự là một vấn đề thách thức đối với sự ổn định của probiotic. Những vấn đề này trong một vài trường hợp có thể giải quyết bằng kỹ thuật bao gói để đảm bảo tính ổn định và khả năng sống của probiotic. Một số sản phẩm thực phẩm cho trẻ và bánh kẹo có chứa probiotic gần đây đã được phát triển và đã được đưa ra thị trường.

4. NHỮNG KHUYNH HƯỚNG TRONG TƯƠNG LAI

Chế độ ăn uống là hướng tập trung chủ yếu để duy tình trạng sức khỏe tốt nhất trong cả cuộc đời, nó sẽ góp phần ngăn chặn sớm các bệnh mạn tính như rối loạn dạ dày–ruột, các bệnh tim mạch, ung thư, bệnh loãng xương, cũng như ngăn chặn quá trình lão hóa. Mặc dù mối liên hệ phức tạp giữa thực phẩm sử dụng và sức khỏe vẫn còn chưa được hiểu biết cặn kẽ, nhưng những nghiên cứu gần đây trong nhiều lĩnh vực khác nhau đã cho chúng ta hiểu sâu hơn về sự liên hệ này. Nhu cầu đòi hỏi phát triển những sản phẩm dinh dưỡng đã thúc đẩy ngành công nghiệp thực phẩm đưa ra nhiều sản phẩm mới.

Ý thức và chi phí mà người tiêu dùng dành cho những sản phẩm có lợi đối với sức khỏe ngày càng gia tăng, các nhân tố kinh tế xã hội ảnh hưởng rất lớn

https://nhathuocngocanh.com/
đến điều này và điều đó giải thích tại sao các sản phẩm probiotic được sử dụng rộng rãi ở châu Âu và ngày càng phổ biến trên thế giới. Tuy nhiên, vẫn tồn tại sự hoài nghi về hiệu quả của probiotic ở người tiêu dùng, các tổ chức tiêu dùng, và cộng đồng khoa học. Một dự án gần đây của cộng đồng châu Âu với nỗ lực hợp tác về sự trao đổi thông tin và một phương thức khoa học để lựa chọn và sử dụng các probiotic, những sản phẩm thực phẩm chức năng có thể phát triển và đem lại những lợi ích có thể thấy được đối với sức khỏe cho người tiêu dùng. Các chủng probiotic có thể sản xuất thành công và đưa vào các sản phẩm thực phẩm được người tiêu dùng chấp nhận, trong khi vẫn giữ được khả năng sống và chức năng. Có sự khác biệt rất lớn giữa các chủng không chỉ về khía cạch kỹ thuật mà cả về khả năng tác động đối với sức khỏe của con người.

Khái niệm probiotic ngày nay đã phổ biến trong giới khoa học và trong lĩnh vực công nghiệp. Tuy nhiên, cũng cần phải có những nghiên cứu khoa học sâu về lĩnh vực này. Những lĩnh vực cần tập trung nghiên cứu bao gồm: chẩn đoán bệnh đường tiêu hóa, miễn dịch học, những chất đánh dấu sinh học (biomarker) và chức năng. Những nghiên cứu trên nhóm người có kiểm soát là điều đặc biệt quan trọng cho sự thành công về mặt kinh tế và xã hội cho những thực phẩm chức năng probiotic, những sản phẩm này cần phải có những điều chỉnh thích hợp cho các đối tượng đặc biệt như người già và trẻ em. Những nghiên cứu trong tương lai về vấn đề vi khuẩn probiotic sẽ tập trung vào việc tìm ra những chủng mới và đặc hiệu hơn trên từng nhóm đối tượng sử dụng (như nhóm tuổi, tình trạng sức khỏe, tình trạng bệnh tật).

Những hướng nghiên cứu tiếp tục trong tương lai của khoa học và công nghệ trong lĩnh vực thực phẩm chức năng sẽ là :

- Thiết lập các liên kết giữa tri thức và kỹ năng về thực phẩm, chức năng của hệ tiêu hóa và sức khỏe của con người.

- Nghiên cứu cơ chế tác động của probiotic trên đường tiêu hóa, phát triển các phương tiện chẩn đoán và các chất đánh dấu sinh học để đánh giá chúng.

- Đánh giá vai trò của probiotic đối với sức khỏe của các nhóm người sử dụng.

- Thử nghiệm tính hiệu quả của probiotic trong các bệnh đường tiêu hóa, nhiễm trùng đường ruột và dị ứng.

- Đánh giá nhu cầu của người sử dụng.

- Phát triển các kỹ thuật để tăng cường tính ổn định và khả năng sống của probiotic.

- Phát triển kỹ thuật cho những sản phẩm probiotic không gắn với các sản phẩm có liên quan sữa (chẳng hạn như ngũ cốc).

https://nhathuocngocanh.com/

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên một số sản phẩm thực phẩm chức năng hiện đang lưu hành.
2. Trình bày cơ chế tác dụng của prebiotic.
3. Nêu một số thí nghiệm chứng minh chức năng chống đột biến và yếu tố gây ung thư của probiotic.
4. Sản phẩm nào dưới đây được xem là probiotic
   A. Sữa bổ sung DHA.
   B. Dầu cá giàu omega–3.
   C. Chiết xuất tảo Spirulina.
   D. Bột đông khô của *S. cerevisiae* sống.
5. Chất nào sau đây ***không*** được xem là prebiotic
   A. Acid béo chuỗi ngắn (SCFA)
   B. Fructooligosaccharid
   C. Inulin
   D. Glucosyl sucrose

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 5

SẢN XUẤT MỘT SỐ SẢN PHẨM LÊN MEN KHÁC

MỤC TIÊU

1. *Liệt kê được các cơ chế và vi sinh vật quan trọng sử dụng trong quá trình lên men.*
2. *Trình bày được các quy trình lên men, tinh chế sản phẩm và các yếu tố ảnh hưởng trong công nghệ sản xuất.*
3. *Vận dụng được các yếu tố ảnh hưởng, kỹ thuật công nghệ gen để tối ưu hóa năng suất.*

1. SẢN XUẤT ACID HỮU CƠ

1.1. Acid lactic

Acid lactic được phát hiện bởi nhà hóa học Thụy Điển Scheele năm 1780 từ sữa và sử dụng bởi Charles E. Avery tại Mỹ năm 1880 với hai đồng phân là L(+) và D(–) *(hình 5.1)*. Hiện nay acid lactic được sử dụng trong nhiều lĩnh vực công nghệ khác nhau theo những tiêu chuẩn về chất lượng khác nhau, cao nhất là theo tiêu chuẩn Dược điển. Trong công nghệ thực phẩm, nước giải khát, acid lactic được sử dụng như chất chỉnh pH, bảo quản và tăng cường hương vị. Trong dược phẩm và mỹ phẩm, acid lactic sử dụng để làm một số kem trị mụn, chất làm ẩm... với dạng L(+) acid lactic.

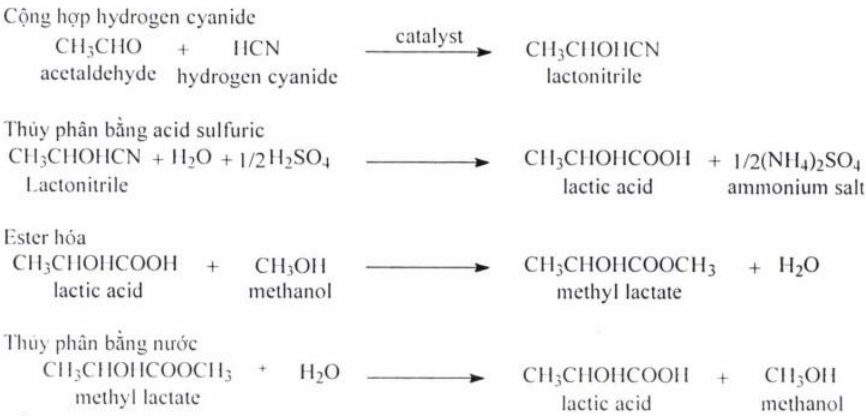
D-lactic acid L- lactic acid

Hình 5.1. Công thức lactic acid

Phương pháp hóa học cho hỗn hợp racemic (từ acetaldehyde, chuyển thành dạng methyl actate để loại tạp rồi cho trở lại acid lactic) (hình 5.2), chủ yếu sử dụng trong công nghệ thực phẩm. Tại Mỹ vào năm 1989 đã tiêu thụ 33 triệu lb với 16,8 triệulb làm chất nhũ hóa sữa, 9,8 triệu lb làm phụ gia nước giải khát và 3,7 triệu lb dùng trong dược phẩm và mỹ phẩm.

https://nhathuocngocanh.com/

Phương pháp lên men vi sinh vật có thể cho luôn L(+) acid lactic hay D(–) acid lactic tùy theo chủng sử dụng.



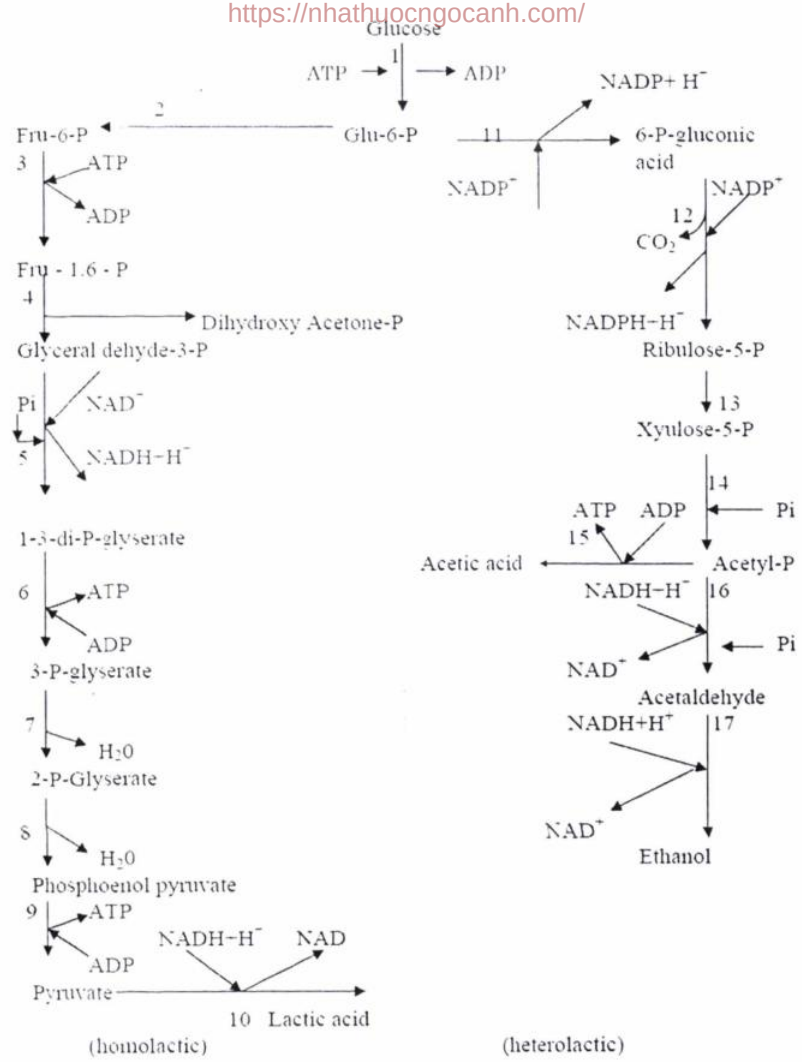
Hình 5.2. Sơ đồ quá trình sản xuất acid lactic bằng phương pháp hóa học

Cơ chế

Acid lactic được tạo thành từ sự chuyển hóa mono hoặc disaccharide bước đầu đi theo con đường Embden–Mayerhoff. Sau đó dưới điều kiện kỵ khí, acid pyruvic sinh ra sẽ được khử hóa thành acid lactic dưới tác dụng enzym lactate dehydrogenase. Lactacte dehydrogenase (LDH) của các vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong việc tạo thành L(+) hay D(–) acid lactic do khả năng lập thể hóa sản phẩm (do gen *ldh*D hay *ldh*L quy định), tùy theo chủng vi khuẩn lactic có loại gen nào thì sẽ cho các sản phẩm tương ứng. Gen mã hóa enzym L(+) lactate dehydrogenase được nghiên cứu trên *Lactobacillus plantarum*. Gen mã hóa enzym D(–) lactate dehydrogenase được nghiên cứu trên *L. johnsonii*.

Có hai dạng lên men tạo acid lactic từ hydratcarbon là đồng hình (homolactic) hay dị hình (heterolactic). Lên men lactic đồng hình khi lượng acid lactic chiếm đại đa số do vi khuẩn lactic loại này có enzym aldolase nhưng không có enzym phosphoketolase. Lên men dị hình khi lượng acid lactic chiếm tỷ lệ thấp, đi kèm với hỗn hợp chất khác như acid acetic, acid formic hoặc CO_2, do vi khuẩn lactic không có enzym aldolase nhưng có enzym phosphoketolase *(hình 5.3)*.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 5.3. Quá trình lên men lactic đồng hình hay dị hình

Các enzym ký hiệu như sau: 1. Hexokinase, 2. Phosphoglucoisomerase, 3. Phosphofructokinase, 4. Aldolase, 5. Triose phosphate isomerase, 6. Phosphoglycerokinase, 7. Phosphoglyseromutase, 8. Enolase, 9. Pyruvat kinase, 10. Lactic dehydrogenase, 11. Glucose–6– phosphate dehydrogenase, 12. 6–phosphogluconate dehydrogenase, 13. Ribolosephosphate–3–epimerase, 14. Phosphoketolase, 15. Acetokinase, 16.Aldehyde dehydrogenase và 17. Alcohol dehydrogenase.

https://nhathuocngocanh.com/

Tác nhân

Hiện nay các chủng vi khuẩn lactic (LAB: lactic acid bacteria) đang được sử dụng nhiều trong công nghệ vi sinh để sản xuất acid lactic, nhất là *Lactobacillus delbrueckii*. Ngoài ra *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, các giống Bacillus (*B. coagulans*), Rhizopus (*R. oryzae*) và Streptococcus cũng được sử dụng, có thể phối hợp các vi khuẩn lactic hoặc phối hợp với vi khuẩn khác như *Streptococcus thermophilus* trong quá trình lên men. Việc lựa chọn loài vi khuẩn lactic tùy theo khả năng sử dụng hydratcarbon của chúng. *L. delbrueckii* có thể lên men cho acid lactic từ saccharose, *L. bulgaricus* có thể lên men cho acid lactic từ lactose. *L. helveticus*, *L. amylophylus* thì có thể sử dụng cả hai, *R. oryzae* có thể sử dụng trực tiếp tinh bột. Hiện nay trong công nghiệp đều là những chủng đột biến theo hướng sản xuất mạnh acid lactic nhưng không bị ức chế bởi nồng độ cao chất này trong môi trường nuôi cấy so với các chủng hoang dại.

Lên men

Theo Luedeking và Piret (1959), việc tạo thành acid lactic tỷ lệ với việc phát triển và mật độ tế bào vi khuẩn, điều này thì ảnh hưởng nhiều bởi nhiệt độ môi trường, pH và nguồn dinh dưỡng. Nguồn hydratcarbon quan trọng với vi khuẩn lactic gồm có glucose, fructose và lactose. Theo nhiều tác giả, trong lên men công nghiệp, lượng hydratcarbon thường từ 5–20% nhưng thông thường trong khoảng 12%. Đối với glucose, lượng cho vào quá trình lên men liên tục để đạt việc sản xuất tối đa acid lactic là 60 g/l, với saccharose là 78,2 g/l. Việc sử dụng tinh bột giúp giảm giá thành nhưng cần xử lý trước với enzym để biến đổi đến maltose và glucose.

Nguồn nitơ bổ sung thường sử dụng nhất cho việc lên men ở vi khuẩn lactic là dịch chiết men, sau đó là dịch thủy phân protein từ những nguồn khác nhau như casein, đậu nành... Các nguồn nitơ giúp vi khuẩn lactic tăng trưởng tốt đáng kể do vậy lượng acid lactic sinh ra cũng tăng theo. Dịch chiết men giúp cho lên men acid lactic tốt nhất vào khoảng 5–15g/l, có thể kết hợp với việc bổ sung $(NH4)_2SO4$ theo tỷ lệ 1:3.

Các nguyên tố vi lượng khác như phospho, kali, magiê và lưu huỳnh ảnh hưởng không rõ rệt đến việc tăng trưởng của vi khuẩn lactic *(Bảng 5.1)*. Ngược lại vitamin B_6 rất quan trọng đến việc sinh tổng hợp acid amin của vi khuẩn lactic do vậy cũng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và tạo thành acid lactic.

Việc khuấy trộn tốc độ chậm khoảng 50 rpm/phút trong lúc lên men đóng vai trò quan trọng để trộn đều môi trường nuôi dưỡng, nhiệt độ, thông khí, thoát hơi tạo ra trong quá trình lên men và như vậy đảm bảo vi sinh vật trao đổi chất tốt hơn. Vi khuẩn lactic có loại ưa nhiệt (nhiệt độ phát triển tối thích từ 45–62°C)

https://nhathuocngocanh.com/

hoặc không (nhiệt độ phát triển tối thích từ 25–45°C). Với *L. delbrueckii* cần nhiệt độ đảm bảo từ 37–45°C: ở 45°C lượng acid lactic tạo ra khoảng 4,9%, ở 40°C lượng acid lactic tạo ra khoảng 4,2%, khi nhiệt độ tăng đến 50°C lượng acid lactic sản xuất ra chỉ còn 2,1%.

pH trong quá trình lên men tạo acid lactic phải giữ từ 4,5 trở lên, tốt nhất là từ 5,5–6,5. Với *L. delbrueckii* nếu pH đảm bảo bằng 6 sẽ phát triển 94,7%, pH 6,5 sẽ giảm còn 67,1%, ở pH 5,5 chỉ còn 67,1% và lượng acid lactic cũng giảm đi tương ứng. Các chất điều chỉnh pH là các muối $NaHCO_3$, Na_2CO_3, các chất kiềm NaOH, NH_4OH. Lượng acid lactic thô có thể đạt được từ 71g/l, nếu dùng *R. oryzae*, lượng acid lactic có thể đạt ~80g/l. Hiện nay acid lactic chủ yếu sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy bán chìm trên môi trường lỏng (submerged culture).

Quy trình công nghệ

Sau đây giới thiệu một quy trình lên men acid lactic trong nồi lên men liên tục:

Với 90 lít môi trường nuôi dưỡng, trong đó gồm (tất cả theo trọng lượng): 9,5% protein; lactose 4%; dịch chiết men 1,5%; K_2HPO_4 0,3%; $MgSO_4 7H_2O$ 0,04%; $MnSO_4 4H_2O$ 0,015%; Tween RTM80 0,1%; cystein hydrochlorid 0,006%.

Môi trường được tiệt trùng và giữ ở 45°C, cấy vào 18g đông khô *L. helveticus* +53 g Flavourzyme (một exo–peptidase của hãng NOVO, Copenhagen, Denmark), ủ trong điều kiện yếm khí trong 9 giờ. Quá trình lên men liên tục kéo dài 34 ngày được giữ các thông số sau (tính theo trọng lượng): protein 0,35%; Flavourzyme 0,01 %; lactose 4%. pH môi trường được giữ ở 5,75 bằng khí amoniac (tốt hơn so với dùng NaOH vì đây cũng là nguồn nitơ). Sản phẩm được lấy ra theo vận tốc 1 lít/phút, lượng acid lactic trong đó có thể đạt trên 4%.

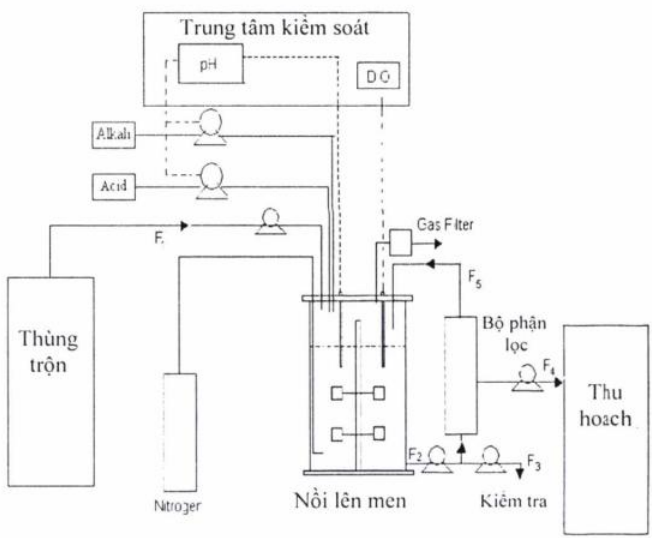
Việc tách acid lactic trước hết bằng siêu lọc để loại các vi khuẩn lactic còn sót trong dung dịch sau đó chỉnh về pH 5,8 với NaOH hay $Ca(OH)_2$ để chuyển sang dạng sodium hay calcium lactate. Sau đó pH được chỉnh về 1,6 với H_2SO_4 và hỗn hợp được chạy qua cột sắc ký với nhựa trao đổi cation trước đó được cân bằng ở pH 3,09 bằng rửa cột với H_2SO_4 loãng. Rửa giải acid lactic ra khỏi cột với H_2SO_4, giữ pH cột thấp hơn hay tối đa ở 3,87, lúc này acid lactic có thể đạt trên 25%.

Việc tinh sạch có thể kết hợp nhựa trao đổi ion với hai lần thẩm tích ion (electrodialysis) và cuối cùng với cột trao đổi cation hay anion nếu cần thiết. Acid lactic thu được có thể đạt tới 80 – 90% lượng đường sử dụng ban đầu khi lên men.

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 5.1. Một số môi trường tiêu biểu để nuôi, giữ gốc vi khuẩn lactic

Thành phần (g/L)	Môi trường RMS	Môi trường LC	Môi trường SY
Pepton	10,00	–	–
Trypticase		10,00	
Cao thịt	10,00		
Cao nấm men	5,00	10,00	20,00
KH_2PO_4	2,00	–	–
K_2HPO_4		6,00	2,50
Diammodium citrat	2,00	2,00	–
Glucose	20,00	20,00	–
Saccharose	–	–	100,00
Tween 80	1	1	–
Sodium acetate	5,00	25,00	–
$MgSO_4.7H_2O$	0,58	0,58	–
$MnSO_4.4H_2O$	0,25	0,15	–
$FeSO_4.7H_2O$	–	0,3	–
Agar	15	15	15



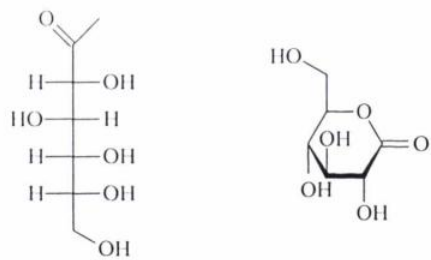
Hình 5.4. Sơ đồ sản xuất acid lactic bằng phương pháp lên men liên tục

F_2: Loại cặn. F_3: Kiểm soát nồng độ sản phẩm. F_4: Bộ phận lọc kết hợp nhựa trao đổi ion. F_5: Môi trường sau khi loại tạp được tái sử dụng

https://nhathuocngocanh.com/

1.2. Acid gluconic

Acid gluconic được phát hiện năm 1870 bởi Hlasiwetz và Habermann. Năm 1880, Boutroux tìm thấy các vi khuẩn sinh acid acetic có thể sinh ra acid gluconic. Năm 1922, Molliard tìm thấy acid gluconic từ *Sterigmatocystis nigra* (nay là *Aspergillus niger)*. Nhu cầu hiện nay trên thế giới có thể đến 60.000 tấn hàng năm. Trong tự nhiên, acid gluconic có nhiều trong các sản phẩm từ sữa, rượu vang (tới 0,25%) và dấm (tới 2%), do vậy hiện nay acid gluconic được sử dụng nhiều trong công nghệ thực phẩm như chất điều chỉnh hương vị (E 574), chất bảo quản bản chất tự nhiên hoặc chỉnh pH trong rượu vang, nước ép trái cây... Trong dược phẩm chủ yếu là sử dụng các dạng muối sắt (trị thiếu máu), muối kẽm, muối calcium (trị thiếu kẽm, calci) của acid này. Muối sodium gluconate được sử dụng như chelat của các ion kim loại hóa trị 2 hoặc 3.



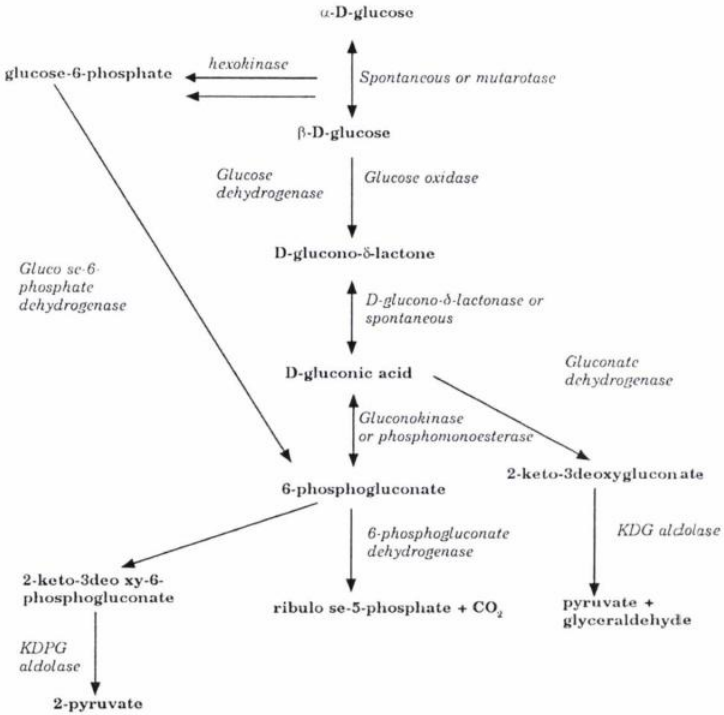
Hình 5.5. Công thức của acid gluconic (A) và glucono–δ–lactone (B)

Acic gluconic có thể sản xuất bằng phương pháp hóa học bởi sự oxy hóa bằng điện cực nhóm aldehyd tại C1 của beta–D–glucose sẽ cho ra glucono–δ–lactone ($C_6H_{10}O_6$) và H_2O_2 sau đó glucono–δ–lactone sẽ được thủy phân cho ra acid gluconic *(hình 5.6)* nhưng gần đây phương pháp lên men vi sinh vật chiếm vai trò chủ đạo vì những ưu điểm mạnh mẽ với gần 100% glucose sẽ chuyển thành acid gluconic và không cần nhiều bước tinh khiết hóa.

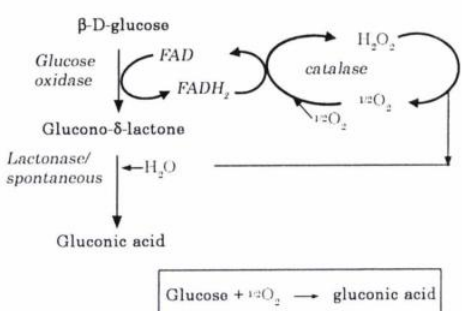
Cơ chế

Sự chuyển hóa thành acid gluconic từ glucose theo quá trình trong hình 5.6.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 5.6. Quá trình chuyển hóa tạo acid gluconic



Hình 5.7. Sơ đồ oxy hóa glucose bởi *A. niger*

https://nhathuocngocanh.com/

Tác nhân

Ban đầu *Penicillinum* species (*P. glaucum*) được sử dụng nhưng hiện nay *Aspergillus* đã chiếm ưu thế *(hình 5.7)*. Việc sử dụng quá trình lên men nhiều giai đoạn, bán chìm với *Acinetobacter suboxydans, A. methanolicus* cũng đang được áp dụng. Ngoài ra nấm men như *Aureobasidium pullulans* cũng được một số tác giả sử dụng. Vi khuẩn như *Pseudomonas savastanoi* cũng có thể tạo acid gluconic nhưng có nhiều sản phẩm phụ như 2–ketogluconat (do enzym gluconic acid dehydrogenase tác động trên acid gluconic) hoặc 2,5–diketogluconic acid (enzym 2–ketogluconic acid dehydrogenase tác động trên 2–ketogluconat).

Enzym glucose oxydase (β–D–glucose: oxygen 1–oxidoreductase) từ vi sinh vật sẽ oxy hóa glucose cho ra acid gluconic. Enzym này được cảm ứng bởi nồng độ cao của glucose, pH khoảng 5,5 và mức độ bão hòa oxy trong môi trường nuôi dưỡng nhưng không bền khi nhiệt độ trên 50°C. Tác động của enzym chỉ đạt 5% ở pH = 2, 35% ở pH = 3 và đạt tối đa 100% ở pH = 5,6. Một số tác giả cho rằng enzym này là ngoại bào nhưng một số khác thì cho rằng đây là enzym nội bào hay từ peroxisome. Gen glucose oxydase từ *A. niger* có thể được chuyển vào *Saccharomyces cerevisiae* đã làm cho enzym này có thể ngoại bào, tiết ra môi trường tới 75–400 μg/ml.

Lên men

Nguồn hydratcarbon quan trọng nhất là glucose nhưng để giảm giá thành có thể sử dụng dịch thủy phân tinh bột, dịch ép mía, rỉ đường... Cũng cần xử lý sắt nếu hàm lượng cao bởi kali ferrocyanid $K_4[Fe(CN)_6]$. Việc tạo acid gluconic cũng bị ảnh hưởng bởi ion kẽm, magiê, calci, sắt... Các điều kiện chung để tối ưu hóa việc sản xuất acid gluconic: nồng độ glucose phải từ 110–250g/L, nitơ và phosphat phải ở nồng độ thấp (20 mM), pH từ 4,5–6,5, cường độ thông khí cao với áp suất 4 bar.

Ở nấm men *Aureobasidium pullulans*, nhiều phương pháp lên men liên tục hay không liên tục được áp dụng, các yếu tố pH, oxy, nhiệt độ quá trình lên men, thông khí hay thành phần môi trường nuôi dưỡng được nghiên cứu. Trong đó nếu pH = 6,5 cho hiệu suất chuyển đổi tới 94% và giảm chỉ còn 67,8% tại pH = 4,5. Nhiệt độ 29–31°C là thích hợp nhất.

Lưu ý rằng trong chuyển hóa glucose thành acid gluconic, việc bất động nấm sợi như *A. niger* đóng vai trò quan trọng bằng cách sử dụng nồi lên men không cánh khuấy hoặc giá mang bằng cellulose. Chủng *A. pullulans* DSM 7085 sử dụng giá mang là đá thủy tinh xốp đã sản xuất 375g/L acid gluconic trong 22 giờ bằng phương pháp lên men liên tục.

Quy trình công nghệ

Hỗn dịch bào tử của *A. niger* được chuẩn bị từ nuôi cấy bề mặt trên môi

https://nhathuocngocanh.com/

trường rắn sau đó sẽ cho vào nồi lên men ở pH 6,5 và nhiệt độ 30–33°C, tỷ lệ 1:10. Quá trình lên men đi kèm với sự thông khí rất mạnh (áp suất tới 4 bar) kéo dài 60–70 giờ, có thể kết hợp với tốc độ quay 420 vòng/phút, pH trong quá trình giữ từ 4,5–7.

Môi trường nuôi cần có glucose 100–250g/lít, hàm lượng thấp phosphate cũng như nguồn nitơ (chỉ khoảng 20mmol/lít), sự tăng trưởng như vậy của *A. niger* sẽ dẫn đến việc oxy hóa glucose. pH là một yếu tố quan trọng, cần giữ từ 4,5–7 trong đó pH ở 5,5 là thích hợp nhất.

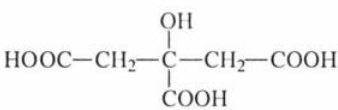
Bất động nấm sợi *A. niger* bằng việc sử dụng nồi lên men không có cánh khuấy, kết hợp calcium alginate, calcium alginate agar sẽ giúp đạt năng suất 5g/l*giờ trên 100g/l glucose ban đầu và nồng độ acid gluconic đạt được là 80g/l. Với giá mang bằng cellulose có những lỗ nhỏ để bất động *A. niger* khi lên men năng suất được cải thiện đáng kể: sau quá trình lên men liên tục kéo dài 61 ngày, nồng độ acid gluconic có thể đạt đến 120–140g/L.

Việc tách acid gluconic sẽ trước hết lọc loại bỏ vi sinh vật. Sau đó trung hòa với chất kiềm như $Ca(OH)_2$ để có calcium gluconate. Tủa chất này bằng cách thêm NaCl và nhiệt độ lạnh. Thêm vào H_2SO_4 sẽ tạo tủa $CaSO_4$. Dịch còn lại cho chạy qua cột trao đổi cation để hấp phụ số ion Ca^{++} còn sót lại. Dịch thoát ra sẽ được kết tinh acid gluconic ở –10°C, có thể kết hợp với dung môi cồn.

1.3. Acid citric

Acid citric có nhiều trong công nghiệp thực phẩm, công nghiệp hóa học và công nghiệp dược phẩm.

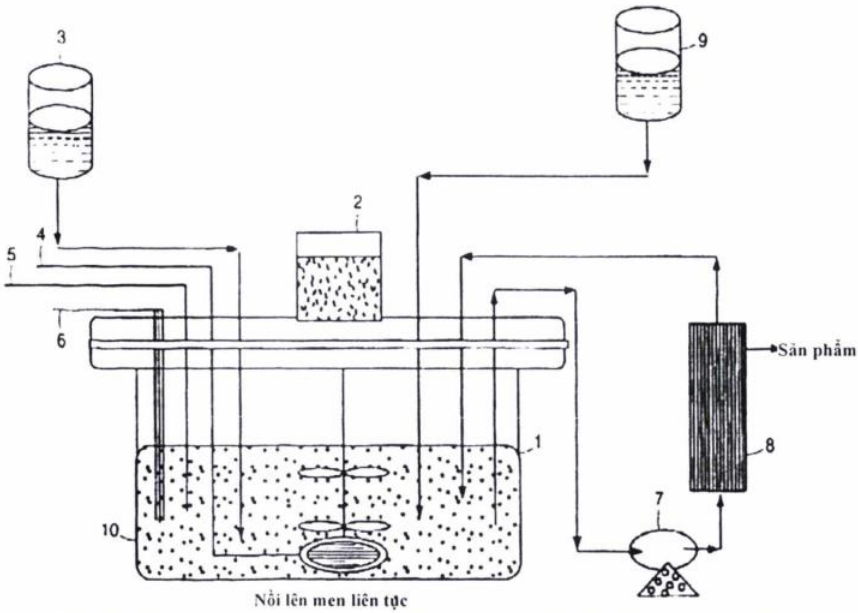
Acid citric có công thức:



Acid citric được Scheele cô lập từ năm 1784 từ dịch quả chanh và đến năm 1945 dịch quả dứa là nguồn nguyên liệu duy nhất trong kỹ nghệ.

Từ năm 1893, nhà thực vật học người Đức là C. Wehmer đã phát hiện mốc *Aspergillus niger* trên môi trường chứa đường và có mặt $CaCO_3$ sẽ tích lũy acid citric. Năm 1916 Curric công bố kết quả của những công trình nghiên cứu sản xuất acid citric bằng *A. niger*. Năm 1926, người ta đã nghĩ ra phương pháp sử dụng môi trường acid để huấn luyện mốc *A. niger* và chọn được nhiều chủng có thể chuyển hóa được đến 65% đường thành acid citric. Từ những năm này acid citric đã được sản xuất từ vi sinh vật theo phương pháp bề mặt. Thực chất đây là sự lên men oxy hóa hay là oxy hóa không hoàn toàn. Vi sinh vật hô hấp hiếu khí, nhưng sản phẩm lại là những hợp chất hữu cơ được oxy hóa một phần.

https://nhathuocngocanh.com/

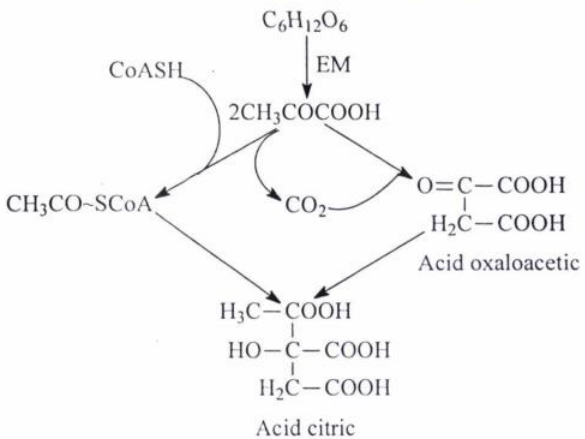


Hình 5.8. Sản xuất acid gluconic/ muối tương ứng bằng phương pháp lên men liên tục

1. Nối với máy vi tính điều khiển; 2. Cánh khuấy; 3. Bộ phận chứa Kiềm tương ứng; 4. Bộ phận thổi khí; 5. Cảm ứng nhiệt độ; 6. Cảm ứng pH; 7. Bơm luân chuyển môi trường; 8. Bộ phận siêu lọc; 9. Bộ phận chứa glucose/môi trường nuôi dưỡng; 10. Nối lên men liên tục

Cơ chế

Sự chuyển hóa thành acid citric có thể được biểu diễn như sau:



Hình 5.9. Con đường chuyển hóa thành acid citric

https://nhathuocngocanh.com/

Tác nhân

Nhiều vi sinh vật như *Aspergillus niger*, *A. clavatus*, *A. wentii*, *Penicillium luteum*, *Mucor periformis*, *A. fumaricus*, *A. japonicus*, *Botrytis cinerea* đã được sử dụng để chế tạo acid citric, nhưng chỉ có một vài chủng *Aspergillus niger* được dùng trong kỹ nghệ vì dễ nuôi cấy, bền vững về mặt di truyền, cho hiệu suất cao và không tạo những tạp chất không muốn có.

Lên men

Hiện nay người ta thường nuôi mốc *A. niger* trên môi trường rắn hoặc môi trường lỏng. Ở môi trường lỏng, lớp dịch thường có chiều dày khoảng 6 – 8 cm. Các sợi nấm phát triển trên bề mặt và chuyển hóa đường thành acid citric. Nồng độ đường ban đầu thường cho vào khoảng 15 – 20%. Thời gian nuôi cấy kéo dài 10 ngày. Nhiệt độ dùng từ 28 – 30°C, lượng đường được chuyển hóa thành acid citric đến 80%, pH môi trường lúc đầu 6,8 – 7,0 sau đó hạ xuống 4,5 đến 3,0.

Acid citric được tạo thành qua các phản ứng của chu trình Krebs. Để tạo được acid này cần phải ức chế những phản ứng tiếp theo. Thiếu sắt là nguyên nhân cơ bản gây ra sự sản xuất thừa acid citric. Trong các nguyên liệu dùng để sản xuất acid citric như rỉ đường, người ta phải loại sắt bằng cách kết tủa chúng bằng ferocyanid kali $K_4[Fe_2(CN)_6]$. Chất này đồng thời cũng ức chế enzym isocitrat dehydrogenase. Kim loại nặng thường kìm hãm vi sinh vật lên men. Bằng cách bổ sung các ion đồng (150 mg/l) có thể sản xuất thừa acid citric mà không cần loại sắt. Bổ sung kẽm (0,5 mg/l) hay mangan (3 mg/l) cũng được.

Năm 1930 phương pháp lên men chìm được áp dụng để sản xuất acid citric nhưng phải giải quyết tốt nhiều thông số ảnh hưởng đến sản xuất như :

1. Chọn lọc chủng vi sinh vật (ở Nga thường dùng *A. niger* 288/9).

2. Thành phần của môi trường và chọn cơ chất : nồng độ đường phải xấp xỉ 15% và nồng độ các chất đạm khá nhỏ để tránh sự tạo thành oxalat, pH phải thấp và được khống chế bằng cách cho thêm calci carbonat.

3. Hàm lượng phosphat dưới 0,01%.

4. Bắt buộc phải xử lý sơ bộ các đường để giới hạn chặt chẽ hàm lượng của một số nguyên tố kim loại như sắt, mangan, kẽm và đồng.

5. Kiểm soát nhiệt độ từ 35 – 40°C tùy theo chủng.

6. Tầm quan trọng của môi trường ủ về chất lượng và số lượng.

7. Thông khí phải hết sức mãnh liệt và việc sử dụng oxy nguyên chất hay hỗn hợp với nitơ là cần thiết với một vài chủng, nhờ thế mới đảm bảo được hiệu suất biến đổi đến 100% trong 6 – 9 ngày. Kiểm soát hệ tạo bọt.

Hiệu suất % acid citric được sản xuất phụ thuộc vào nguồn carbon được giới thiệu theo bảng sau đây:

https://nhathuocngocanh.com/

Nguồn carbon	Hiệu suất %
Tinh bột	71,5
Glucose	72
Rỉ củ cải đường	64 – 72
Rỉ đường mía	63 – 61,9
Saccarose	72
Đường ngô	79,7

Lên men citric theo hai phương pháp: lên men bề mặt và lên men chìm. Phương pháp lên men bề mặt trên môi trường lỏng được dùng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất acid citric.

Lên men bề mặt trên môi trường lỏng

Dụng cụ lên men là khay nhôm hoặc thép không gỉ có kích thước khác nhau tùy thuộc vào các giá đựng buồng lên men. Có thể dùng sắt hay gỗ làm khay, nhưng bên ngoài cần sơn những lớp sơn chịu acid.

Sau đây giới thiệu một số môi trường lên men:

1. Môi trường dinh dưỡng đối với chủng *Asp. niger* 82 chứa 150 g đường saccharose; 0,25 g $MgSO_4.7H_2O$; 0,5 g NH_4NO_3; 0,16 g KH_2PO_4; nước vừa đủ một lít.

2. Môi trường Currie (%): đường 12 – 15 g; $MgSO_4$ 0,25 g; NH_4NO_3 0,2 g; KH_2PO_4 0,1 g; pH = 3 – 3,6

3. Môi trường Deolger (%): đường 14 g; $MgSO_4$ 0,023; NH_4NO_3 0,223; KH_2PO_4 0,1; pH = 1,6 – 2,2

4. Đường 10%; NH_4NO_3 0,25%; KH_2PO_4 0,01%; $MgSO_4.7H_2O$ 0,03%; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,0008%; pH = 5,5 – 6

Có thể dùng rỉ đường thay đường, nhưng cần phải xử lý trước khi pha môi trường: trộn rỉ đường với nước (một phần rỉ đường, hai phần nước) thêm 0,9% tanin (so với rỉ lường). Tanin trước khi dùng được hòa tan vào nước nóng rồi mới đổ vào rỉ đường. Đun nóng dịch đường tới 80 – 90°C trong 30 phút, để lắng. Lấy phần dịch trong và pha môi trường, tính toán sao cho để có nồng độ đường cần thiết. Trường hợp rỉ đường nhiều sắt sẽ thêm $K_4[Fe(CN)_6]$ để loại sắt :

$$4Fe^{3+} + 3[Fe(CN)_6]^{4-} \rightarrow Fe_4[Fe(CN)_6]_3$$

Môi trường pha xong cần phải lọc và thanh trùng, rồi cấy giống bào tử, cho lên men trên các khay có lớp môi trường dày khoảng 2 – 8 cm và có thổi khí đã lọc trên bề mặt khay, nhiệt độ buồng lên men giữ ở 28 – 32°C.

https://nhathuocngocanh.com/

Lên men bề mặt có thể thực hiện qua hai bước có bổ sung đường: nuôi mốc khoảng 48 – 60 giờ trên lớp môi trường 2 – 3 cm tạo thành màng mốc, ta bổ sung vào phía dưới dịch đường 12 – 13% (không có muối khoáng) nâng lớp môi trường dày tới 8 cm. Tiếp tục lên men 8 ngày.

Lên men trên môi trường rắn

Môi trường rắn được chuẩn bị từ cám và nước (tỷ lệ 1:1), hấp 1 giờ, tãi ra khay thành lớp mỏng có chiều dày 2 –3 cm. Cấy bào tử *Asp. batatae* (tỷ lệ bào tử là 0,3%), nuôi 4 – 5 ngày. Có thể thay cám bằng khoai lang khô hoặc bột sắn trộn trấu. Phương pháp đó sẽ thích hợp với điều kiện nước ta hiện nay : hiệu quả kinh tế cao. Một vài báo cáo gần đây cho thấy có cơ sở nghiên cứu cấy mốc trên bột sắn thu được acid citric với hiệu suất 3 – 4 kg bột sắn cho 1 kg acid.

Lên men chìm

Quá trình lên men nhân giống như trong sản xuất kháng sinh hoặc các acid amin. Cho môi trường vào các thùng lên men, thanh trùng ở 110 – 120°C, làm nguội tới 32 – 34°C, tiếp giống bào tử hoặc dịch nhân giống. Nuôi ở 32°C, khuấy và thổi khí liên tục. Thời gian lên men 6 – 7 ngày.

Vì sự tích tụ acid citric pH môi trường giảm pH xuống 1 – 1,5 nên cần cho thêm $CaCO_3$ vào môi trường để giảm độ acid (chú ý : cần phải giữ cho môi trường luôn luôn có phản ứng acid). Sau khi kết thúc lên men, dùng H_2SO_4 để chuyển calci citrat thành acid citric.

Quy trình công nghệ

– Lên men chìm được ứng dụng chậm hơn, tuy nhiên hiện nay là chủ yếu.

– Tách tế bào được thực hiện qua hệ thống lọc trống quay (trống có màng lọc bao gồm ngoài ngâm một phần vào dịch lên men, trong hút chân không làm nước bị hút vào trong và sợi nấm bị giữ lại trên màng).

– Tủa acid citric: dịch sau lọc chứa citric acid hòa tan được tủa dưới dạng citrate calcium do phản ứng với đá vôi bột mịn (lime) trong thiết bị tủa. Citrate calcium được thu hồi khỏi dịch lỏng.

– Chuyển citrate calcium trở lại thành citric acid do phản ứng với acid sulfuric.

– Tinh sạch citric acid qua các cột tẩy màu (decolorizing), trao đổi cation, trao đổi anion và tẩy màu lần cuối.

– Kết tinh: dịch tinh sạch được đưa vào thiết bị cho bốc hơi và kết tinh.

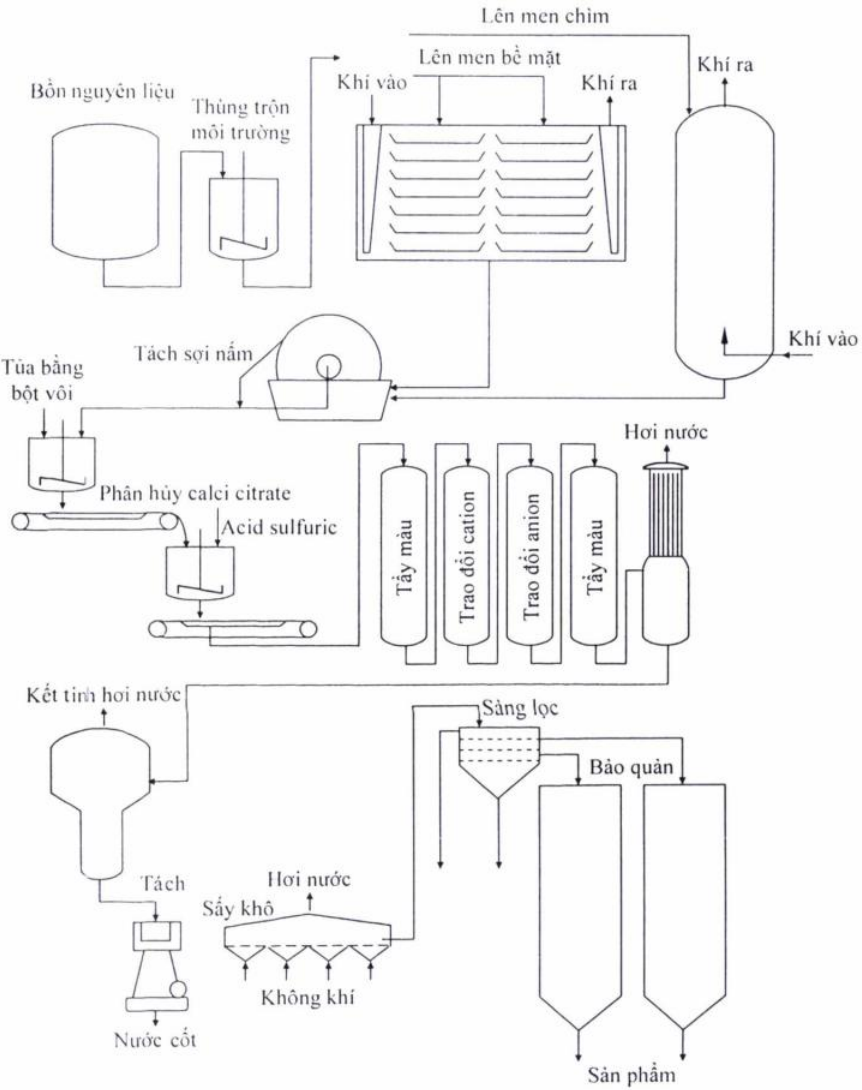
– Ly tâm tách nước cốt để thu tinh thể.

– Sấy các tinh thể citric acid và sàng lọc tinh thể to và nhỏ.

– Bảo quản thương phẩm.

https://nhathuocngocanh.com/

Các quy trình chỉ khác nhau ở bước đầu (phụ thuộc vào kiểu lên men), các bước về sau từ tách tế bào, thu sản phẩm và chế biến như nhau *(hình 5.10)*.



Hình 5.10. Sơ đồ quy trình sản xuất acid citric bằng con đường lên men

https://nhathuocngocanh.com/

2. SẢN XUẤT ACID AMIN BẰNG CON ĐƯỜNG LÊN MEN

2.1. Khái quát

Lịch sử

Ở Nhật Bản, một loài tảo biển – tảo bẹ – từ lâu đã được sử dụng làm nguồn cung cấp hương vị. Người ta chiết từ lá tảo với nước sôi và dùng dịch chiết như một loại súp để nêm nếm thức ăn. Hợp chất tạo ra vị có trong tảo biển đã được GS. Kikunae Ikeda xác định là glutamat natri vào năm 1908. Sau đó, hợp chất này đã được sản xuất trên quy mô công nghiệp từ lúa mì, đậu nành và các loại cây giàu protein khác bằng cách thủy phân bằng dung dịch acid chlohydric đậm đặc, nhưng hiệu quả kinh tế của phương pháp này không cao.

Vào năm 1957, Kinoshita và cộng sự đã phân lập và xác định một vi khuẩn là *Micrococcus glutamicus* (sau đó đã được xác định lại là *Corynebacterium glutamicum*). Vi khuẩn này sản xuất một lượng đáng kể L–glutamic acid trong môi trường nuôi cấy và công nghệ vi sinh sản xuất natri glutamate bắt đầu từ đó. Từ đó, rất nhiều vi khuẩn đã được xác định là sản xuất tốt acid glutamic và được dùng cho công nghiệp sản xuất acid glutamic ở Nhật Bản. Sau thành công này, rất nhiều phương pháp vi sinh đã được nghiên cứu và phát triển để sản xuất các acid amin khác. Ngày nay, một loạt các acid amin được sản xuất bằng phương pháp vi sinh và được dùng trong các lĩnh vực như dược phẩm, thực phẩm, và trong công nghiệp hóa học.

Bảng 5.2. Sản xuất acid amin ở Nhật Bản và trên thế giới năm 1996

Acid amin	Khối lượng (tấn/năm)		Phương pháp			
	Nhật	Thế giới	Sinh tổng hợp	Enzym	Hóa học	Chiết xuất
Glycin	14.000	22.000			x	
L–Alanin	250	500		x	x	
DL–Alanin	1500	1500			x	
L–Aspartat	3000	7000		x		
L–Asparagin	60	60		x		x
L–Arginin và các chất tương tự	1000	1200	x			
L–Cystein và các chất tương tự	900	1500		x		x
L–Glutamat	85.000	1.000.000	x			
L–Glutamin	1200	1300	x			

https://nhathuocngocanh.com/

Acid amin	Khối lượng (tấn/năm)		Phương pháp			
	Nhật	Thế giới	Sinh tổng hợp	Enzym	Hóa học	Chiết xuất
L–Histidin	400	400	x			
L–Isoleucin	350	400	x			
L–Leucin	350	500				x
L–Lysin	500	250.000	x			
L–Methionin	200	300			x	
DL–Methionin	35000	350.000			x	
L–Phenylalanin	2500	8000			x	
L–Prolin	250	350	x			x
L–Serin	100	200	x	x		
L–Threonin	350	4000	x			
L–Tryptophan	400	500	x	x		
L–Tyrosin	70	120				x
L–Valin	400	500	x		x	
L–Dihydroxy						
L–phenylalanin	150	250		x		
D–Phenylglycin và các chất tương tự	3000	5000		x	x	

Các phương pháp sản xuất công nghiệp

Hiện nay có ba phương pháp sản xuất acid amin:

1. Phương pháp trích ly các acid amin từ dịch thủy phân protein. Phương pháp này dùng để thu nhận L–cystein, L–cystin, L–leucin, L–asparagin, L–tyrosin

2. Phương pháp tổng hợp hóa học. Phương pháp này dùng để sản xuất glycin, alanin, methionin, tryptophan

3. Phương pháp lên men vi sinh vật

Trong các phương pháp trên, phương pháp hóa học thường cho 1 hỗn hợp các dạng đồng phân L và D–acid amin. Do đó việc tách dạng L (dạng thích hợp cho dinh dưỡng) hết sức tốn kém.

Các phương pháp vi sinh để sản xuất acid amin được phân loại như sau:

1. Phương pháp sử dụng các chủng vi khuẩn hoang dại (L–glutamic acid, L–alanine, L–valine)

https://nhathuocngocanh.com/

2. Phương pháp sử dụng vi khuẩn đột biến (L–lysin, L–threonin, L–arginin, L–citrullin, L–ornithin, L–homoserin, L–tryptophan, L–phenylalanin, L–tyrosin, L–histidin, ...)

3. Phương pháp thêm các tiền chất (L–throenin, L–isoleucin, L–tryptophan...)

4. Phương pháp enzym (acid L–aspartic, L–alanin, L–cytein, L–dihydroxy–phenylalanin, D–p–hydroxyphenyl–glycin...)

5. Phương pháp sử dụng các dòng vi khuẩn được tạo ra bằng các kỹ thuật biến đổi gen, protein và chất chuyển hóa hoặc sự kết hợp của các kỹ thuật trên (hydroxy–L–prolin)

Thông tin về việc sản xuất được tóm tắt ở Bảng 5.3.

Vi sinh vật sản xuất

Hiện nay các chủng sử dụng trong công nghiệp đều là những dạng đột biến, được tạo ra bằng cách xử lý các tác nhân đột biến, sau đó tiến hành chọn lọc công phu nhằm thu được các chủng không chịu sự chi phối của các quy luật kiểm soát trao đổi chất như ức chế ngược (feedback inhibition) và ức chế (repression) sinh tổng hợp các enzym tham gia vào quá trình sinh tổng hợp acid amin, hoặc là các đột biến kháng được các đồng đẳng của các acid amin.

Bảng 5.3. Chủng vi sinh vật sản xuất acid amin bằng con đường lên men

Loại acid amin	Chủng sử dụng	Năng suất (g/l)	Nguồn carbon
Dl–alanin	*Microbacterium ammoniphilum*	60	Glucose
L–alanin	*Streptomyces coelicolor* 3 – 19	9	Glucose
L–arginin	*Brevibacterium flavum*	35	Glucose
L–phenylalanin	*Corynebacterium glutamicum*	9	Glucose
	Corynebacterium glutamicum	>100	Glucose
L–glutamic acid	*Brevibacterium flavum*	98	Acetat
	Arthrobacter paraffineus	82	n–alkans
L–histidin	*Brevibacterium flavum*	10	Glucose
L–leucin	*Brevibacterium lactofermentum*	28	Glucose
	Corynebacterium glutamicum	39	Glucose
L–lysin	*Brevibacterium flavum* FA 1 – 30	57	Glucose
	Brevibacterium flavum	75	Acetat
L–methionin	*Corynebacterium glutamicum*	2	Glucose
L–ornithin	*Corynebacterium glutamicum*	26	Glucose

https://nhathuocngocanh.com/

Loại acid amin	Chủng sử dụng	Năng suất (g/l)	Nguồn carbon
L–prolin	*Brevibacterium flavum*	29	Glucose
	Brevibacterium flavum	18	Glucose
L–threonin	*E. coli* K12	27	Acetat
	E. coli K12	55	Đường ăn
L–tryptophan	*Corynebacterium glutamicum* Px 115–97	12	Glucose
L–tyrozin	*Corynebacterium glutamicum* Ps 20	18	Glucose
L–valin	*Brevibacterium lactofermentum* No 487	31	Glucose

2.2. L–Glutamic acid

Glutamic acid được sản xuất bởi vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* trong môi trường có nồng độ đường và các ion aminonium cao, nồng độ khoáng chất thích hợp và nồng độ biotin giới hạn, điều kiện hiếu khí. Lượng L–glutamate tạo ra trong môi trường này khoảng 100 g/l trong 2–3 ngày.

Nhiều vi khuẩn khác cũng tạo ra nhiều glutamic acid như *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium thiogenitalis*, và *Microbacterium amoniacphilum*. Đặc điểm chung của các chủng này là: Gram dương, không hình thành bào tử, không chuyển động, cầu khuẩn, hoặc trực khuẩn; tất cả đều cần có biotin để phát triển. Ngày nay, người ta cho là các vi khuẩn này đều thuộc giống *Corynebacterium*.

Nguồn carbon thường được dùng nhất là glucose, thu được bằng cách dùng enzym thủy phân tinh bột bắp, khoai tây, và sắn. Rỉ đường phế thải cũng được sử dụng vì rẻ tiền nhưng nó lại chứa một lượng lớn biotin làm ngăn cản sự tổng hợp glutamate. Vì thế cần phải thêm vào môi trường các chất hoạt tính khác để sự tích tụ glutamate được dễ dàng hơn.

Acid acetic và ethanol cũng là những nguồn cung cấp carbon tốt cho sự sản xuất glutamate. Ethanol được sử dụng sau khi chuyển thành acid acetic trong tế bào vi khuẩn. Vài hyrocarbon như n–parafin cũng được xem như là nguồn carbon. Tuy nhiên, ngày nay các nguồn carbon "không đường", như acid acetic, ethanol, không còn được sử dụng vì những lý do kinh tế.

Nồng độ nitơ cao cần thiết cho sự sản xuất glutamate, và thực tế trong sản xuất đã dùng khí hay dung dịch amoniac, muối amoni vô cơ thích hợp hoặc urê. Các muối vô cơ như kali phosphate, muối sắt, mangan cũng quan trọng. pH của môi trường được khống chế từ 7–8 bằng cách thêm khí hay dung dịch amoniac và các ion amonium được thêm vào như nguồn cung cấp nitơ.

https://nhathuocngocanh.com/

Các vi khuẩn Coryneform thường có khả năng đồng hóa đường mạnh và glutamase dehydrogenase là enzym chịu trách nhiệm cho việc tổng hợp glutamate. Glucose trong tế bào vi khuẩn được phân hủy bằng con đường EMP và một phần của chu trình TCA, 2–oxo–glutarat được hình thành trong chu kỳ sẽ được amin hóa do tác động của enzym glutamate dehydrogenase.

Biotin đóng vai trò quan trọng trong điều hòa sự phát triển của vi khuẩn và sự sản xuất glutamate. Việc thêm biotin vào dưới nồng độ tối ưu là điều kiện cơ bản để sản xuất tốt acid glutamic trong môi trường. Khi sử dụng nguồn nguyên liệu dầu như rỉ đường có chứa nhiều biotin, việc thêm penicillin vào môi trường nhận thấy cho hiệu quả tốt. Vài acid béo bão hòa hoặc ester của chúng có tác dụng tương tự penicillin trong sản xuất glutamate. Chủng đột biến *Corynebacterium alkanolyticum* cần glycerol được cảm ứng, sự sản xuất glutamic không cần thêm vào penicillin và không ảnh hưởng bởi nồng độ biotin.

Các xử lý như giới hạn nồng độ biotin, thêm penicillin hay chất tẩy hoặc cảm ứng chủng đột biến cần glycerol cho thấy dưới các điều kiện này bề mặt tế bào vi khuẩn bị tổn thương, dẫn đến sự rò rỉ glutamate. Lý thuyết rò rỉ đã được chấp nhận trong một thời gian dài nhưng gần đây có một lý thuyết khác về sự bài tiết glutamate: có sự hiện diện protein vận chuyển glutamate trên bề mặt tế bào.

Phức hợp 2–oxoglutarate dehydrogenase (ODHC), có vai trò xúc tác cho sự biến đổi 2–oxo–glutarat thành succinyl–CoA, bước đầu tiên của sự tổng hợp succinate trong chu trình TCA, được nhận thấy giảm trong tế bào vi khuẩn dưới điều kiện sản xuất glutamate. Hoạt động của enzym này trở nên rất thấp với sự hiện diện của xà phòng hoặc penicillin (để hạn chế lượng biotin). Các kết quả này cho thấy một trong những nguyên nhân chính để gia tăng sản xuất glutamate là giảm hoạt tính 2–oxoglutamat dehydrogenase, các giống vi khuẩn phá hủy các gen tạo ra enzym này cũng sản xuất glutamate nhiều như các vi khuẩn hoang dại ở các điều kiện tăng sản xuất glutamate.

Ngoài ra, một gen mới phát hiện và tạo dòng là *dtsR* có thể phục hồi sự nhạy cảm với xà phòng của các đột biến từ vi khuẩn sản xuất glutamate *Corynebacterium glutamicum*. Các tác giả cho rằng gen *dtsR* này mã hóa cho một thành phần của phức hợp enzym chứa biotin và có vai trò trong chuyển hóa acid béo. Họ đã ghi nhận rằng sự phá hủy gen này dẫn đến sự sản xuất glutamate liên tục ngay cả trong điều kiện môi trường có chứa nhiều biotin và cho rằng sự tăng sản xuất glutamate là do sự mất cân bằng trong quá trình hiệp đồng giữa tổng hợp acid béo và tổng hợp glutamate. Các tác giả cũng chứng minh thành công: các tác nhân cảm ứng gia tăng sản xuất glutamate như Tween 40 và việc hạn chế lượng biotin làm giảm nồng độ protein DtsR, mà sự giảm này sau đó gây ra sự tăng sản xuất bằng

https://nhathuocngocanh.com/
cách giảm hoạt tính của ODHC. *Corynebacterium glutamicum* hiện nay đã được giải mã di truyền.

Monosodium L–glutamate được sản xuất rộng rãi trên thế giới khoảng một triệu tấn một năm bằng phương pháp vi sinh. Hai công ty của Nhật là Ajinomoto và Kyowa Hakko Kogyo, đã xây dựng nhiều nhà máy và sản xuất glutamate ở nhiều nước khác, chủ yếu là ở Đông Nam Á, Hàn Quốc, và ngày nay Đài Loan cũng sản xuất một lượng lớn monosodium glutamate. Monosodium glutamate được dùng trong công nghệ thực phẩm, ester của nó được dùng làm xà phòng, và polyme được dùng làm da nhân tạo.

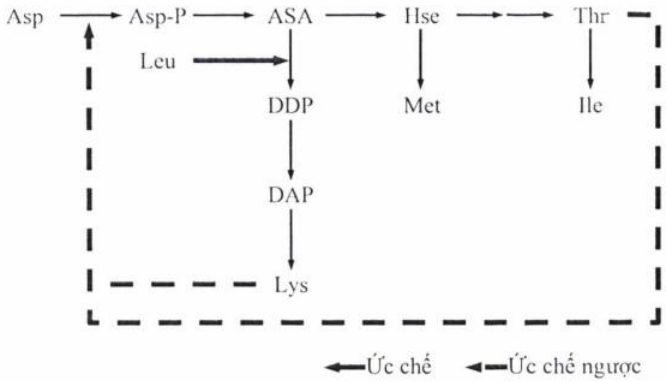
2.3. L–Lysine

L–Lysine được sản xuất bởi các vi khuẩn đột biến từ các chủng vi khuẩn sản xuất glutamate hoang dại bao gồm *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* trong môi trường có nồng độ đường, ion ammonium cao, pH trung tính và điều kiện hiếu khí.

Quá trình sinh tổng hợp L–lysine và L–threonine ở vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum* được trình bày ở hình 5.11. Ở bước đầu tiên, hình thành phosphoaspartat từ aspartate, quá trình này được xúc tác bởi aspartokinase, enzym này rất nhạy cảm với sự ức chế ngược bởi L–lysine và L–threonine. Các chủng vi khuẩn đột biến tự dưỡng homoserine (hoặc threonine cộng với methionine), thiếu enzym homoserine dehydrogenase, có thể sản xuất L–lysine trong môi trường. Thứ hai, các chủng vi khuẩn đột biến có kiểu hình nhạy cảm với threonin hay methionin gây ra do đột biến trên homoserine dehydrogenase (hoạt tính thấp) cũng tạo ra một lượng đáng kể L–lysine trong môi trường. Ngoài ra, chủng vi khuẩn đột biến đề kháng chất tương tự lysine cũng được dùng để sản xuất L–lysine và aspartokinase ở các chủng này không nhạy cảm với quá trình ức chế ngược.

Đặc điểm của các vi khuẩn sản xuất lysine này được kết hợp với nhau để tạo ra một chủng có khả năng sản xuất lysine mạnh hơn. Ngoài các đặc tính cơ bản trên, sự đột biến cần leucine cũng có hiệu quả làm tăng lượng lysine bởi vì dihydrodipycolinate synthase trong vi khuẩn đột biến được giải phóng khỏi tình trạng ức chế bởi leucine. Các tiền chất cho sự tổng hợp lysine bao gồm phosphoenol pyruvate, pyruvate và acetylCoA. Hơn nữa, nhiều đột biến được cảm ứng trong các vi khuẩn sản xuất lysine nhằm cung cấp đủ và cân bằng các tiền chất; như đột biến mất pyruvate kinase và giảm hoạt tính pyruvate dehydrogenase, v.v... Ngoài ra, đột biến cần alanine cũng được ghi nhận là có hiệu quả trong gia tăng lượng lysine.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 5.11. Điều hòa sinh tổng hợp lysin

ASA: aspartate–β–semialdehyd; DDP: dihydro–dipicolinate; DAP: α, ε–diaminopimelat

Ngày nay, gen của các enzym chịu trách nhiệm cho sự sinh tổng hợp lysine ở *Corynebacterium* đã được tạo dòng và xác định trình tự nucleotide. Đó là các gen của aspartokinase, aspartate semialdehyde dehydrogenase, dihydrodipycolynat synthase, dihydrodipycolynat reductase, tetrahydrodipicolinate succinylase, succinyl diaminopimelat decarboxylase. Hệ thống tạo dòng–biểu hiện của *Corynebacterium* đã được thiết lập và sử dụng để đưa các gen mã hóa các enzym chịu trách nhiệm cho sinh tổng hợp lysine, cho thấy chúng có hiệu quả trong việc gia tăng lượng lysine tạo ra. Đó là các gen của aspartokinase, dihydrodipycolynat synthase.

Một gen mới, *ldc*, mã hóa cho lysine decarboxylase được tìm thấy bên cạnh gen *cadA* ở *Escherichia coli* đã được biết trước đó và enzym được tinh chế từ chủng siêu biểu hiện. Lysin decarboxylase, được mã hóa bởi *ldc*, được sản xuất liên tục bởi *E. coli*, trong khi gen *cadA* mã hóa cho enzym cảm ứng. Sự tồn tại một lysine decarboxylase mới ở *Corynebacterium* sản xuất lysine và nghiên cứu hiệu quả của việc loại bỏ gen đối với việc sản xuất lysine đang rất được quan tâm.

Người ta đã tạo dòng một gen mới phát hiện là *lysE* từ *Corynebacterium glutamicum* và nhận thấy chúng mã hóa cho chất vận chuyển đặc hiệu lysine ra khỏi tế bào. Gần đây các nhà khoa học đã phân tích cấu hình không gian trong màng đối với sản phẩm của gen này và nhận thấy nó thuộc vào một họ các protein có ở một số vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, và *Helicobacter pylori*. Người ta cho rằng các protein trong họ LtsE xúc tác cho sự vận chuyển các chất tan sinh học quan trọng bao gồm các acid amin ra khỏi tế bào.

https://nhathuocngocanh.com/

Lysine được dùng làm chất bổ sung cho thức ăn gia cầm, lợn vì các thức ăn thường dùng như ngũ cốc, đậu nành không béo chứa ít lysine, là một acid amin thiết yếu cho vật nuôi. Lượng L–lysine được sản xuất trên thế giới hàng năm khoảng 400.000 tấn, được cung cấp chủ yếu bởi các công ty Ajinomoto, Kyowa Kogyou, ADM và BASF.

2.4. L–Threonine

L–Threonine được sản xuất bởi các chủng vi khuẩn đột biến dị dưỡng và/hay các chủng vi khuẩn đột biến để kháng chất tương tự threonin và các chủng được tạo ra bằng công nghệ gen. Đó là các vi khuẩn *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *B. flavum*, *Serratia marcescens*, và *Proteus regrettii*.

Các vi khuẩn đột biến dị dưỡng L–lysin, diaminopimelat, hay L–methionin có thể sản xuất L–threonin trong môi trường nhưng không đạt năng suất đủ để áp dụng sản xuất. Một chủng vi khuẩn đột biến đề kháng chất tương tự L–threonin (acid α–amino–β–hydroxyvaleic (AHV)) có thể sản xuất L–threonin và enzym homoserin dehydrogenase của chủng này không nhạy cảm với quá trình ức chế ngược của L–threonin *(hình 5.11)*. Các chủng vi khuẩn sản xuất nhiều L–threonin hơn được tạo ra bằng cách kết hợp các đột biến dị dưỡng và đột biến đề kháng AHV. Các chủng *S. marcescen* đột biến sản xuất L–threonin được tạo ra bằng kỹ thuật giới nạp với phage. Chủng này có các đặc điểm như sau: khiếm khuyết enzym thoái hóa L–threonin, đột biến trên aspartokinase và homoserine dehydrogenase làm mất nhạy cảm với quá trình ức chế ngược của L–threonin, đột biến ở các enzym sinh tổng hợp L–threonin làm cho chúng không bị ức chế bởi L–threonin, đột biến trên aspartokinase làm mất nhạy cảm với sự ức chế ngược bởi L–lysin và đột biến ở aspartokinase và homoserine dehydrogenase làm cho chúng không bị ức chế bởi L–methionine.

Các kỹ thuật tái tổ hợp ADN đã được dùng để cải tiến các chủng sản xuất L–threonin. Một chủng đột biến cần threonin của *E. coli* được chuyển thể bởi các gen của threonin operon thu được từ các vi khuẩn đề kháng AHV và không nhạy cảm với quá trình ức chế ngược nhằm tăng sự biểu hiện các enzym và tăng lượng L–threonin. Chủng *E. coli* đột biến trong ADN nhiễm sắc thể cũng được tạo mang các gen biểu hiện mạnh của threonin operon lấy từ các vi khuẩn đề kháng AHV và không nhạy cảm với quá trình ức chế ngược với kỹ thuật đột biến sử dụng phage Mu. Chủng này được dùng trong sản xuất L–threonin ở Pháp. Sản lượng L–threonin của các chủng vi khuẩn này được tóm tắt ở Bảng 5.4. *E. coli* đột biến tăng sản xuất threonin có thể tạo ra 100g/l L–threonin trong 77 giờ, do Okamoto và các cộng sự tạo ra và cho rằng giống vi khuẩn này có một số khiếm khuyết về chức năng hấp thu threonin.

Sản xuất L–threonin từ vi khuẩn đã được bắt đầu từ những năm 1970, các

https://nhathuocngocanh.com/

chủng vi khuẩn đột biến dị dưỡng và đề kháng các chất tương tự được nuôi cấy trong điều kiện có sự hiện diện các acid amin mà các vi khuẩn đột biến cần.

L–Threonin là một acid amin thiết yếu cho con người và vật nuôi như lợn, gia cầm. Nó được dùng làm chất bổ sung cho thức ăn động vật, dược phẩm, thức ăn, mỹ phẩm. Trên thế giới, mỗi năm sản xuất khoảng 13.000–14.000 tấn.

Bảng 5.4. Sản lượng L–threonin của các chủng vi khuẩn đột biến

Giống	Thời gian (h)	Lượng (g/l)	Tốc độ (g/l/h)	Tác giả
C. glutamicum	90	52	0,58	Katsumata
B. lactofermentum	100	58	0,58	Ishida
S. marcescen	96	100	1,04	Masuda
E. coli	72	65	0,90	Shimizu
E. coli	77	100	1,30	Okamoto

2.5. L–Aspartic acid

L–aspartate được tạo ra bằng phương pháp dùng enzym một giai đoạn từ fumarate và amonia; phương pháp hai giai đoạn từ maleate qua trung gian fumarate. Sự chuyển đổi từ fumarate sang L–aspartate được xúc tác bởi aspartase và từ maleate sang fumarate bằng maleate isomerase.

$$\text{Maleate} \xrightarrow{\text{Maleate isomerase}} \text{Fumarate} \xrightarrow{\text{Aspartase}} \text{L-aspartate}$$

Sản xuất L–aspartate công nghiệp bằng enzym được bắt đầu từ năm 1960 với hệ thống sản xuất theo lô dùng *E. coli* có aspartase hoạt tính cao. Từ năm 1973, aspartase chiết xuất từ *E. coli* được cố định trên nhựa trao đổi ion và L–aspartate được sản xuất trong một hệ thống phản ứng liên tục sử dụng cột enzym cố định do Chibata và cộng sự tiến hành ở công ty Tanabe Seiyaku. Một hệ thống khác trong đó tế bào vi khuẩn *E. coli* được cố định trên gel acrylamid cũng được bắt đầu dùng vào năm 1973 và sản xuất công nghiệp bởi công ty Tanabe Seiyaku. Vào năm 1978, tác nhân cố định được đổi thành K–carageenan, một loại polysaccharide thu được từ tảo biển. Sự thay đổi này cải thiện đáng kể sản lượng aspartate thu được và đạt 100 tấn/tháng với nồi phản ứng 1 m^3. Tại Mỹ, việc cố định tế bào vi khuẩn *E. coli* với aspartase hoạt tính cao dùng polyurethane và polyazetidin, trong đó polyazetidin cho hoạt tính aspartase cao 55,9 mol/h/kg tế bào ướt.

Trong những năm 1990, một hệ thống sản xuất L–aspartate mới đã được đề xuất. Trong hệ thống này, các tế bào của vi khuẩn coryneform nguyên vẹn ở trạng thái nghỉ được sử dụng không cố định mà sử dụng màng siêu lọc. Chủng vi khuẩn này có hoạt tính maleate isomerase và aspartase cao nhờ kỹ thuật biến

https://nhathuocngocanh.com/
đổi gen. Các plasmid được đưa vào tế bào và giữ ổn định; tế bào được sử dụng lại nhiều lần mà không bị mất hoạt tính và ly giải.

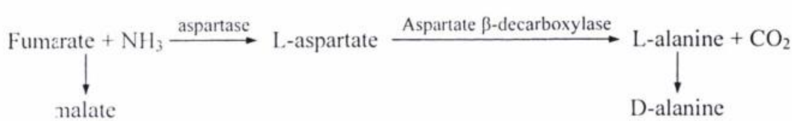
L–Aspartate được dùng trong dịch truyền dinh dưỡng, phụ gia thực phẩm, nguyên liệu đầu tổng hợp chất làm ngọt nghèo năng lượng aspartame, aspartyl–phenylalanine methyl ester. Gần đây, nghiên cứu sử dụng L–aspartate làm nguyên liệu đầu để sản xuất polyme được nghiên cứu nhiều do trong phân tử có ba gốc phản ứng và các polyme tạo thành có thể phân hủy sinh học. Nó được dùng như xà phòng, tác nhân chelat hóa hay xử lý nước.

2.6. L–Alanine

L–alanine được tạo ra từ L–aspartate bằng phương pháp một giai đoạn sử dụng aspartate β–decarboxylase.

$$\text{L-aspartate} \xrightarrow{\text{Aspartate } \beta\text{-decarboxylase}} \text{L-alanine} + CO_2$$

Vi khuẩn *Pseudomonas dacunhae* được phân lập, định danh, và được chọn là chủng vi khuẩn được sử dụng trong sản xuất L–alanine vì chủng cho hoạt tính aspartate β–decarboxylase cao nhất. Ban đầu, L–alanine được sản xuất bằng cách cố định *P. dacunhae* trên polyacrilamide tại công ty Tanabe Seiyaku. Các tế bào vi khuẩn được cố định trên ê–carageenan, một polysaccharide thu được từ rong biển. Các vi khuẩn cố định được nhồi vào cột và cột được dùng cho việc sản xuất liên tục L–alanine. Hệ thống phản ứng cột kín được thiết kế và dùng trong sản xuất L–alanine. Quá trình được tiến hành ở áp suất cao, ngăn ngừa khí carbonic thoát ra. Cột này được nối tiếp với hệ thống sản xuất L–aspartate để có thể sản xuất L–alanine trực tiếp từ fumarate. Tuy nhiên trong hệ thống này, phản ứng phụ gây ra bởi fumarase và alanine racemase ở cả hai vi khuẩn *E. coli* và *P. dacunhae* làm giảm hiệu suất đáng kể. Các enzym này bị bất hoạt bằng cách xử lý riêng tế bào hai vi khuẩn này ở nhiệt độ cao và pH thấp. Sau đó, việc cố định chúng trên K–carageenan cho phép sản xuất L–alanine trong một bình phản ứng mà không tạo ra các sản phẩm phụ như malate và D–alanine:



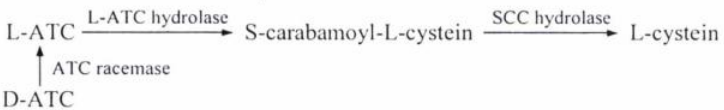
L–alanine được sản xuất 10 tấn/tháng với hệ thống cột áp suất cao. L–alanine được dùng trong dịch truyền dinh dưỡng, là một chất phụ gia tốt do có vị ngọt và tác dụng kiềm khuẩn.

2.7. L–Cyteine

L–Cysteine đã được sản xuất bằng cách chiết xuất từ lông tóc sau khi được thủy phân bằng acid mạnh. Tuy nhiên, quy trình này có nhiều vấn đề như đòi

https://nhathuocngocanh.com/

hỏi nhiều năng lượng, nặng mùi, tạo nhiều chất thải acid, nguồn lông tóc không chắc chắn. Vào những năm 1970, phương pháp sản xuất L–cysteine bằng enzym qua ba giai đoạn đã được công ty Ajinomoto thiết lập và sản xuất L–cysteine từ DL–2–amino–Δ^2–thiazoline–4–carboxylate (DL–ATC). Các enzym xúc tác gồm có DL–ATC racemase, L–ATC hydrolase, S–carabamoyl–L–cysteine (SCC) hydrolase:



Một chủng vi khuẩn được phân lập từ đất và định danh là *Pseudomonas thiazolinophilum* có hoạt tính sản xuất L–cysteine từ DL–ATC cao nhất. Các enzym chịu trách nhiệm cho sự chuyển đổi có thể cảm ứng và việc thêm DL–ATC vào môi trường cần thiết để có hoạt tính enzym cao. Thêm Fe^{2+} và Mn^{2+} vào môi trường cũng góp phần cho việc tăng cường hoạt tính enzym. Phản ứng được diễn ra bằng cách cho các tế bào có hoạt tính cao với enzym vào hỗn hợp phản ứng có chứa DL–ATC. Thêm hydroxylamine, một chất ức chế các enzym phụ thuộc vitamin B6, vào phản ứng có tác dụng ngăn cản sự thoái hóa L–cysteine tạo thành do ức chế cysteine desulfhydrase. Vi khuẩn đột biến thiếu enzym này cũng được dùng trong công nghiệp sản xuất L–cyteine. L–cysteine tạo ra trong hỗn hợp phản ứng bị oxy hóa thành L–cystine do sự thông khí trong quá trình phản ứng và kết tủa ở dạng tinh thể. Lượng L–cyteine thu được từ 40 g/l DL–ATC khoảng 31,4 g/l, hiệu suất 95% về số mol. Công ty Ajinomoto bắt đầu sản xuất L–cyteine bằng phương pháp enzym từ năm 1982.

S–Carboxymethyl–L–cysteine cũng được sản xuất bằng phương pháp tương tự với nguyên liệu ban đầu thích hợp.

L–Cysteine được dùng làm hóa chất, dưỡng tóc, chất phụ gia thực phẩm.

2.8. L–DOPA (L–3,4–dihydroxyphenylalanine)

L–DOPA (L–3,4–dihydroxyphenylalanine) được sản xuất từ pyrocathechol, pyruvate và amoniac bằng phản ứng enzym một giai đoạn sử dụng tyrosine phenol–lyase:

$$\text{Pyrocatechol} + \text{pyruvate} + NH_3 \xrightarrow{\text{Tyrosine phenol-lyase}} \text{L-DOPA}$$

Tyrosine phenol–lyase (TPL) là enzym đa chức năng phụ thuộc pyridoxal 5'–phosphate và xúc tác cho sự thoái hóa tyrosine thành phenol, pyruvate và amonia. Đây là phản ứng thuận nghịch, và khi thay pyrocatechol cho phenol trong phản ứng nghịch sẽ tạo ra L–DOPA.

Erwinia herbicola được chọn để sản xuất L–DOPA từ 1041 chủng vi khuẩn

https://nhathuocngocanh.com/

được khảo sát. Điều kiện nuôi cấy để thu các tế bào có hoạt tính cao TPL và điều kiện phản ứng tổng hợp L–DOPA đã được tối ưu cho vi khuẩn này. Các tế bào được nuôi cấy ở 28°C, 28h trong môi trường nền chứa 0,2% L–tyrosine, 0,2% K_2HPO_4 và 0,1% $MgSO_4.7H_2O$ (pH 7,5). Các chất dinh dưỡng khác nhau được thêm vào môi trường với những lượng khác nhau. Việc thêm cao nấm men, cao thịt, polypepton, và dịch thủy phân protein đậu nành vào môi trường nền làm gia tăng sự phát triển tế bào cũng như sự hình thành TPL. Sự ức chế dị dưỡng sinh tổng hợp TPL xảy ra khi thêm glucose, pyruvat, và α–ketoglutarat vào môi trường với nồng độ cao. Nguồn carbon thích hợp cho sự phát triển của tế bào cũng như sự tích tụ enzym là glycerol. Sự tạo enzym gia tăng đáng kể khi glycerol được cho vào môi trường cùng với succinate, fumarate hoặc maleate. TPL là một enzym cảm ứng do đó việc thêm vào môi trường L–tyrosine là cần thiết cho sự hình thành của enzym. L–Phenyl–alanine không phải là chất cảm ứng cho sinh tổng hợp TPL nhưng nó hoạt động như tác nhân hiệp lực với sự cảm ứng bởi L–tyrosine. Hoạt tính TPL tăng lên năm lần khi thêm L–phenylalanine đồng thời với L–tyrosine vào môi trường. Tế bào vi khuẩn *E. herbicola* có hoạt tính TPL cao được chuẩn bị bằng cách nuôi cấy ở 28°C trong 28 giờ trong môi trường chứa 0,2% KH_2PO_4, 0,1% $MgSO_4.7H_2O$, 2 ppm Fe^{2+} ($MgSO_4.7H_2O$), 0,01% pyridoxine.HCl, 0,6% glycerol, 0,5% succinic acid, 0,1% DL–methionine, 0,2% DL–alanine, 0,05% glycine, 0,1% L–phenylalanine và 12 ml dung dịch thủy phân protein đậu nành trong 100 ml nước, pH được giữ ở 7,5 trong suốt quá trình nuôi cấy. Ở điều kiện này, TPL tích lũy trong tế bào vi khuẩn *E. herbicola* chiếm khoảng 10% tổng lượng protein hòa tan trong tế bào.

Phản ứng tổng hợp L–DOPA bằng enzym được tiến hành trong hệ thống sản xuất theo lô với các vi khuẩn *E. herbicola* có hoạt tính TPL cao. Do pyruvate không bền trong hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ cao vì thế tổng hợp L–DOPA thích hợp ở nhiệt độ thấp. Phản ứng được tiến hành ở 16°C, 48 giờ trong hỗn hợp có chứa những lượng sodium pyruvate khác nhau, 5 g ammonium acetate, 0,6 g pyrocatechol, 0,2 g sodium sulfite, 0,1 g EDTA và tế bào vi khuẩn được thu từ 100 ml môi trường, trong tổng thể tích phản ứng 100 ml. pH được điều chỉnh ở 8,0 bằng amoniac. Cứ 2 giờ, sodium pyruvate và pyrocatechol được thêm vào môi trường để duy trì nồng độ ban đầu. L–DOPA thu được tối đa khi nồng độ sodium pyruvate được giữ ở 0,5%. Pyrocatechol và pyruvate được thêm vào gián đoạn nhằm tránh TPL biến tính và tránh sự tạo thành các sản phẩm phụ. Sodium sulfite được thêm vào để giữ cho phản ứng ở trạng thái khử, tránh oxy hóa L–DOPA tạo ra. L–DOPA không tan trong môi trường phản ứng và xuất hiện ở dạng tinh thể, tổng lượng thu được khoảng 110 g/l.

Cơ chế cảm ứng và ức chế của TPL ở *E. herbicola* đã được nghiên cứu cho thấy sinh tổng hợp TPL được điều hòa ở mức độ phiên mã. mARN của TPL tăng lên khi thêm tyrosine và giảm khi thêm glucose vào môi trường. TyrR box, một

https://nhathuocngocanh.com/

vùng giống operator được tìm thấy ở phần 5' của gen tpl, gen mã hóa cho TPL. TyrR box là vị trí gắn điển hình trên ADN nơi protein điều hòa TyrR gắn vào và điều hòa sự phiên mã của regulon gồm các enzym hay yếu tố vận chuyển chịu trách nhiệm trong sinh tổng hợp các acid amin thơm hay vận chuyển chúng qua màng tế bào.

L–DOPA là tiền chất của chất trung gian dẫn truyền thần kinh dopamin và được dùng trong điều trị bệnh Parkinson, bệnh do sự thiếu hụt dopamin trong não. Trên thế giới, L–DOPA được sản xuất khoảng 250 tấn/năm. Nó được sản xuất chủ yếu bằng phương pháp hóa học trong một quy trình gồm 8 giai đoạn phản ứng gồm cả giai đoạn xử lý đồng phân quang học (Bảng 5.5). Phương pháp sản xuất L–DOPA bằng enzym là phương pháp một giai đoạn đơn giản và hiện nay là một trong những quy trình kinh tế nhất. Quy trình này lần đầu tiên được áp dụng tại công ty Ajinomoto vào năm 1993.

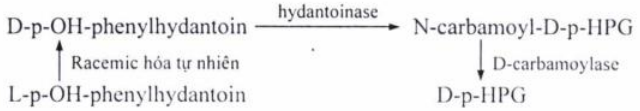
Bảng 5.5. So sánh phương pháp sản xuất L–DOPA hóa học và enzym

	Phương pháp enzym	Phương pháp hóa học
Nguyên liệu ban đầu	Pyrocatechol, pyruvate, amoniac	Vanillin, hydantoin, acetic anhydric, hydrogen
Số lượng các phản ứng	1	8
Phân giải quang học	Không	Cần
Trang thiết bị	Thiết bị lên men bình thường	Thiết bị chuyên dụng
Thời gian (ngày)	3	15
Sản phẩm phụ	H_2O	NH_3, CO_2, acetate

2.9. D–p–Hydroxyphenylglycine

D–p–Hydroxyphenylglycine (D–HPG) là nguyên liệu đầu trong bán tổng hợp các penicillin và cephalosporine, như amoxcillin, cephadoxel. D–HPG được sản xuất từ DL–p–hydroxyphenylhydantoin (DL–HPH) bằng phương pháp enzym hai giai đoạn.

DL–HPH được tổng hợp từ sự amidoalkyl hóa phenol. DL–HPH được thủy phân hoàn toàn thành N–carbamcyl–D–p–HPG bằng hydantoinase của vi khuẩn. N–carbamoyl–D–p–HPG sau đó được thủy phân tạo D–HPG bằng N–carbamoyl–D–p–HPG hydrolase của vi khuẩn :



https://nhathuocngocanh.com/

DL–HPH dễ bị đồng phân hóa tự nhiên trong môi trường có pH hơi kiềm nhưng không phải với N–carbamoyl–D–p–HPG. Sau đó trong suốt phản ứng, chỉ D–HPH bị hydantoinase thủy phân tạo D–HPG thông qua N–carbamoyl–D–p–HPG. L–HPH bị đồng phân hóa và thủy phân bởi hydantoinase để tạo D–HPG. Cuối cùng DL–HPH trong hỗn hợp phản ứng được thủy phân hoàn toàn để tạo D–HPG.

D–hydantoin hydrolase hoạt tính cao được tìm thấy ở các vi khuẩn thuộc họ *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Corynebacterium* và các xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces*, *Actinoplanes*. D–carbamylase hoạt tính cao được tìm thấy ở nhiều vi khuẩn khác nhau thuộc chi Agrobacterium, Pseudomonas, Comamonas, và Blastobacter. Gen của hai enzym này được tạo dòng và chuyển vào *E. coli* dùng làm nguồn cung cấp enzym. Để giữ D–carbamoylase bền khi tái sử dụng, kỹ thuật đột biến ngẫu nhiên được áp dụng trên D–carbamoylase của *Agrobacterium*. Ba enzym đột biến bền với nhiệt được tạo ra, các đột biến này xảy ra trên các acid amin His57, Pro203 và Val236. Các đột biến được phối hợp lại trong một phân tử và enzym đột biến, chứa bộ ba đột biến His57Tyr, Pro203Glu và Val236Ala bền ở nhiệt độ cao hơn 19°C so với enzym hoang dại. Tế bào vi khuẩn *E. coli* đột biến này được cố định và được sử dụng trong công nghiệp để sản xuất D–HPG cùng với D–hydantoinase được cố định. Nối phản ứng dùng D–carbamoylase cố định có thể sử dụng trong một năm mà không cần bổ sung enzym mới.

Phương pháp dùng enzym sản xuất D–HPG được bắt đầu từ 1980 tại Singapore và nối phản ứng dùng D–carbamoylase cố định được áp dụng vào năm 1995. Hàng năm trên thế giới sản xuất khoảng 2000 tấn.

2.10. Hydroxy–L–Proline

Trans–4–hydroxy–L–proline hay cis–3–hydroxy–L–Proline được sản xuất từ L–proline bằng tác động tương ứng của L–proline 4–hydrolase hay 3–hyrolase. Một cơ chất khác là 2–Oxoglutarate được cung cấp khi thêm glucose vào hỗn hợp phản ứng:

$$\text{L-Pro} + \text{2-oxo-glutarate} + O_2 \xrightarrow{\text{4-hydroxylase}} \text{4-OH-Pro} + \text{succinate} + CO_2$$

$$\text{L-Pro} + \text{2-oxo-glutarate} + O_2 \xrightarrow{\text{3-hydroxylase}} \text{3-OH-Pro} + \text{succinate} + CO_2$$

Trans–4–hydroxy–L–proline là thành phần của protein trong mô động vật như collagen và được chiết từ collagen sau khi thủy phân với acid mạnh. Việc tìm thấy L–proline hydroxylase mở ra triển vọng sản xuất L–proline bằng enzym v. sinh vật.

L–Proline 4–hydroxylase được tìm thấy ở các xạ khuẩn tạo etamycin thuộc chi *Streptomyces*, *Dactylosporangium*, *Amycolatopsis*. L–Proline–3–hydrolase

https://nhathuocngocanh.com/

được tìm thấy ở các xạ khuẩn tạo telomycin thuộc họ *Streptomyces*, và vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*.

Các gen của các proline hydrolase đã được tạo dòng trên *E. coli* và các tế bào siêu biểu hiện các enzym này được dùng để cung cấp proline hydrolase cho công nghiệp sản xuất L–hydroproline. Các gen của xạ khuẩn khó biểu hiện ở mức cao trong tế bào vi khuẩn *E. coli* và phần gen mã hóa cho đầu N tận của enzym được biến đổi để phù hợp với mã di truyền của *E. coli*. Ngoài ra, promoter của *trp* operon cũng được đưa vào thành hai bản ở vị trí promoter của gen trong plasmid để đạt được mức siêu biểu hiện. Những biến đổi này làm tăng biểu hiện của 4–hydrolase lên 1400 lần và của 3–hydrolase 1000 lần so với chủng ban đầu.

2–Oxoglutarate, một trong những cơ chất của quá trình hydroxyl hóa, được cung cấp từ glucose trong môi trường phản ứng thông qua con đường chuyển hóa EMP và chu trình TCA trong *E. coli* và sản phẩm succinate được tuần hoàn. Người ta tạo ra *E. coli* đột biến khiếm khuyết enzym thoái hóa L–proline và dùng nó làm tế bào chủ cho sản xuất L–hydroxyprolin.

Sử dụng *E. coli* làm tế bào chủ trong sản xuất proline cho phép sản xuất trực tiếp L–hydroproline từ glucose. Trong trường hợp này, các gen sinh tổng hợp L–proline đã được đột biến kháng ức chế được đưa vào *E. coli* cùng với gen của L–proline hydrogenase.

Công nghiệp sản xuất trans–4–hydroxy–L–proline đã được bắt đầu vào năm 1997. 4–Hydroxy–L–proline được dùng làm nguyên liệu đầu trong tổng hợp hóa học bất đối, nguyên liệu sản xuất thuốc, mỹ phẩm và phụ gia thực phẩm.

3. SẢN XUẤT VITAMIN

Vitamin giữ vai trò quan trọng trong các quá trình trao đổi chất của cơ thể sống và là chất chuyển hóa sơ cấp (primary metabolite). Chúng tham gia vào các quá trình trao đổi chất dưới dạng các coenzym. Các vitamin được sản xuất bằng các phương pháp:

- Chiết xuất từ động vật, thực vật
- Tổng hợp hoặc bán tổng hợp hóa học
- Tổng hợp bằng vi sinh vật hoặc có kết hợp phương pháp hóa học

Phần lớn các vitamin được tổng hợp hoặc bán tổng hợp bằng phương pháp hóa học. Các vitamin tổng hợp bằng phương pháp vi sinh có thể kể đến: vitamin B_{12}, vitamin B_2 (riboflavin).

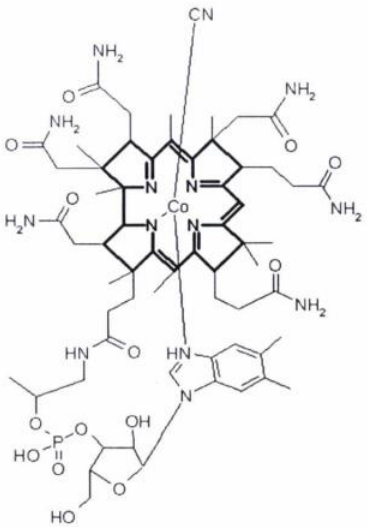
3.1. Vitamin B_{12}

Vitamin B_{12} có tên 5,6–dimethylbenzilmidazol cobamid cyanid hoặc 5,6–dimethylbenzimidazol cyanocobamid hoặc cobalamin, cobamid, được Rickes và

https://nhathuocngocanh.com/

cộng sự phân lập đầu tiên từ gan động vật năm 1948 và được sử dụng điều trị bệnh thiếu máu.

Phân tử gồm hai phần: phần mang màu cấu trúc giống porphyrin, có chứa nguyên tố cobalt và một ribonucleotid với gốc base nhân purine là 5,6–dimethylbenzimidazol *(hình 5.12)*. Nếu thay phần base này bằng các base khác sẽ được các dẫn chất gần với vitamin B_{12} nhưng không có tác dụng sinh học (pseudovitamin). Vitamin B_{12} kết tinh màu đỏ sẫm, không mùi vị. Đây là vitamin tan trong nước, trong các dung dịch trung tính, trong cồn, không tan trong các dung dịch ether, benzen... Bền trong môi trường acid, chịu được tác động ánh sáng trong môi trường kiềm, trong môi trường có kim loại nặng thì bị phân hủy nhanh chóng.



Hình 5.12. Công thức vitamin B_{12}

Trước đây vitamin B_{12} được chiết từ gan động vật (khoảng 10 mg/1 tấn gan). Hiện nay việc sản xuất B_{12} chủ yếu bằng con đường lên men vi sinh vật từ các chủng: *Propionibacterium shermanii* ATCC 13673 hoặc *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207 hay *Pseudomonas denitrificans*. Tế bào của các vi khuẩn này chứa một lượng đáng kể vitamin B_{12}. Ngoài ra trong quá trình lên men streptomycin nhờ xạ khuẩn *Streptomyces griseus* và lên men chlorotetracyclin nhờ *S. aureofaciens* cũng cho sản phẩm phụ là vitamin B_{12} vào khoảng 2 mg/l. Ngoài ra còn có một số vi sinh vật khác sử dụng để sản xuất vitamin B_{12} trong công

https://nhathuocngocanh.com/

nghiệp. Bên cạnh đó, quá trình lên men dạng metan trên bã rượu cũng thu được sản phẩm giàu vitamin B_{12} dùng cho mục đích chăn nuôi.

Quá trình lên men vitamin B_{12} bằng vi khuẩn *Propionibacterium shermanii*

• **Giống vi khuẩn *Propionibacterium shermanii:*** trực khuẩn nhỏ, xếp thành đôi hoặc chuỗi, kỵ khí hoặc hiếu khí không bắt buộc, Gram dương, có khả năng lên men acid lactic, glycerin, glucose, fructose, lactose nhanh chóng tạo acid propionic, acetic, CO_2 ... Vi khuẩn tăng trưởng mạnh ở pH 4,5 – 7,5 nhưng tạo vitamin B_{12} nhiều nhất ở 5,8 – 7,5. Nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng và sinh tổng hợp vitamin là 28 – 30° C.

• **Các bước chủ yếu trong quá trình tạo vitamin B_{12}**: trước tiên là quá trình tạo porphyrin, sau đó gắn phần ribonucleotid vào. Sự tổng hợp porphyrin liên quan chặt chẽ với các sản phẩm của chu trình Krebs.

• **Lên men**: giống được nhân lên cấp 1 rồi cấp 2 để cung cấp đủ sinh khối cho quá trình lên men. Vitamin B_{12} giữ chức năng nhất định trong trao đổi chất của vi khuẩn. Đây là coenzym của nhiều enzym trong quá trình sinh tổng hợp nucleotid và tham gia vào những quá trình xảy ra trong giai đoạn sinh trưởng mạnh của tế bào vì vậy vitamin B_{12} được tạo thành song song với sự gia tăng sinh khối của vi khuẩn trong những ngày đầu. Với *P. shermanii* thì giai đoạn đầu nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí (khoảng 3 ngày) có bổ sung tiền chất 5,6–dimethybenzimidazol để ngăn cản việc tổng hợp vitamin B_{12}, cho phép tích tụ các chất trung gian (gọi chung là cobinamid). Sau đó là giai đoạn nuôi cấy hiếu khí và thêm dimethybenzimidazol vào để biến đổi thành vitamin.

– ***Môi trường:***

+ Nguồn carbon: glucose, cao ngô. Trong thời gian lên men nếu bổ sung glucose liên tục sinh khối sẽ tiếp tục gia tăng trong cả quá trình

+ Nguồn nitơ: amoni sulphat

+ Các chất khác: các muối kim loại ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh tổng hợp. Thêm vào môi trường muối cobalt thì hiệu xuất tăng đáng kể vì vậy cần bổ sung vào môi trường với nồng độ 3–5μg /l. Nếu trong môi trường có chứa sắt, kẽm, sulphat mangan sẽ ức chế quá trình sinh tổng hợp vitamin B_{12}. Các vitamin khác có tác dụng kích thích tăng trưởng và tăng hiệu suất sinh tổng hợp gồm: thiamin, biotin, acid nicotinic, acid folic... với liều lượng thích hợp làm hiệu suất tăng gấp 5–6 lần. Việc bổ sung 5,6–dimethylbenzimidazole sẽ làm tăng sự tạo vitamin B_{12}, được dùng làm tiền chất bổ sung vào môi trường với nồng độ 1–10mg/l.

– ***Điều kiện lý hóa:***

+ pH: pH đầu của môi trường nhân giống và lên men khoảng 6,8–7. Trong quá trình lên men phải điều chỉnh pH do tạo ra acid propionic, có thể dùng

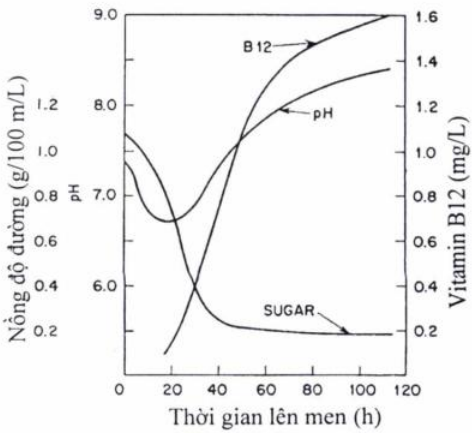
https://nhathuocngocanh.com/
$CaCO_3$, NH_4OH để điều chỉnh pH. pH tối ưu cho tăng trưởng và tạo vitamin là 6,3–7,5.

+ Oxy: thời gian 3 ngày đầu phải tạo môi trường kỵ khí, mặc dù vi khuẩn hiếu khí tùy ý nhưng nếu 50 giờ đầu hiếu khí sẽ làm giảm sinh khối và hiệu suất tổng hợp, 3–4 ngày sau thổi khí nhẹ.

+ Nhiệt độ: nhiệt độ tối ưu cho sự lên men là 28–30°C, giới hạn tối đa cho sự sinh tổng hợp là 32°C

– ***Thiết bị nuôi cấy:*** phải là loại không gỉ, chính vì vậy công nghệ sản xuất B_{12} với *Propionibacterium shermanii* phức tạp so với các phương pháp khác nhưng cho hiệu suất lên men và hàm lượng vitamin cao.

– ***Tách sản phẩm:*** tách sinh khối bằng máy ly tâm 10.000 vòng/phút. Sinh khối thu được sấy khô 80–120°C từ 10–30 phút ở pH 6,5–8,5, tán nhỏ được dạng chế phẩm thô giàu vitamin (trên 1000μg/g) dùng cho chăn nuôi hoặc hòa tan, với sự hiện diện của KCN và sodium nitrite, cobalamine thu được ban đầu sẽ chuyển thành cyanocobalamine (vitamin B_{12}) tinh khiết cao.

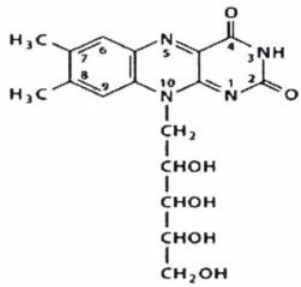


Hình 5.13. Biến đổi động học trong quá trình lên men từng mẻ vitamin B_{12}

3.2. Sinh tổng hợp riboflavin

Riboflavin (vitamin B_2) được Kulm chiết ra từ trứng vào năm 1933, có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi hydrat carbon, lipid và protein. Đây là thành phần của flavinase, một enzym có trong tất cả các tế bào, tham gia vào quá trình dinh dưỡng và hô hấp của sinh vật. Phân tử riboflavin cấu tạo từ ba nhân isoaloxazin và một phân tử đường ribose *(hình 5.14)*.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 5.14. Công thức vitamin B_2

Riboflavin sản phẩm thương mại hiện nay được tổng hợp bằng phương pháp lên men và hóa học. Với phương pháp lên men thì sinh tổng hợp từ các chủng nấm *Eremothecium ashbyii* và *Ashbyi gossypii*, có thể tới hơn 20g/L. Riboflavin được tạo thành được tiết ra ngoài hoặc sau quá trình tự phân.

- **Vi sinh vật:** giống nấm *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii (Eremothecium gossypii)*: có khả năng sinh tổng hợp riboflavin cao, được dùng chủ yếu trong công nghiệp.

Eremothecium ashbyii: ký sinh trên thực vật, có thể sinh sản vô tính bằng bào tử. Trên môi trường thạch cho những khuẩn lạc trắng lúc còn non, khi già khuẩn ty có thể bị phân hủy, màu vàng, quá trình giữ giống cần phải cấy chuyển định kỳ sau 5–10 ngày.

Ashbyi gossypii: ký sinh ở nụ bông, café và một số cây khác như chanh, cà chua. Nấm có cấu tạo khuẩn ty phân nhánh và bào tử nang. Các chủng nấm được giữ trên môi trường thạch, tránh ánh sáng mặt trời, nhiệt độ phát triển tốt là 28°C.

- **Nhu cầu dinh dưỡng :**

– Nguồn carbon: glucose, saccarose, levulose, mannose, ngoài ra có thể dùng maltose, glycerin..., trên môi trường tinh bột lượng vitamin sinh ra ít. Việc sử dụng phối hợp với maltose cho hiệu suất sinh tổng hợp cao nhất, vi sinh vật chậm già hơn sử dụng một đường glucose *(Bảng 5.6)*.

– Nguồn nitơ: có thể là các hợp chất vô cơ hoặc hữu cơ. Tốt nhất là các protein động vật giàu chất keo, casein, globulin. Glycin là acid amin làm nâng cao hiệu suất cho sự sinh tổng hợp vitamin này, nếu thêm vào môi trường 0,1% glycin sẽ tăng hiệu suất lên 33%. Ngoài ra dịch tự phân nấm men, nước chiết đậu, lòng trắng trứng, cao thịt,... đều cho kết quả tốt. Các nguồn nitơ vô cơ thì cho sinh khối phát triển tốt nhưng hiệu suất sinh tổng hợp vitamin thấp.

– Các chất tăng trưởng: thiamin, biotin có ảnh hưởng rõ tới sự sinh tổng hợp

https://nhathuocngocanh.com/
vitamin. Dịch thủy phân men, nước chiết mầm lúa cũng có tác dụng kích thích tăng trưởng. Pyrimidin và purin có trong môi trường có tác dụng như tiền chất của riboflavin. Các chất như xanthin, guanin, adenin, acid uric hypoxanthin có tác dụng nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp. Ngược lại uraxin có tác dụng kìm hãm sự sinh tổng hợp.

– Lipid đóng vai trò quan trọng trong sự sinh tổng hợp vitamin, thay thế một phần nguồn carbon. Khi bổ sung chất béo với lượng 0,6–1,2% vào môi trường có thể nâng hiệu suất gấp đôi.

Bảng 5.6. Ảnh hưởng nguồn carbon tới sự phát triển, sinh tổng hợp riboflavin

Hydratcarbon	Sinh khối (mg%)	Riboflavin (mg%)	Riboflavin (% sinh khối)
Arabinose	15	0,7	4,7
Xylose	30	0,51	1,7
Rhamnose	21	0,79	3,8
Glucose	175	7,7	4,4
Fructose	142	6,5	4,6
Manit	187	5,84	3,1
Galactose	16	1,06	6,6
Maltose	120	5,82	4,8
Saccharose	145	7,95	5,5
Tinh bột	20	0,36	1,1
Inulin	41	0,44	1,1

Nguồn carbon tương đối thích hợp đối với *A. gossypii* là glucose, saccharose và maltose. Rỉ đường mía và củ cải dùng để nuôi sẽ cho hiệu suất tổng hợp riboflavin thấp mặc dù hệ sợi phát triển tốt. Tương tự, chúng mọc rất mạnh trên môi trường chứa asparagin, biotin, thiamin, inozit và một số muối khác nhưng riboflavin được tạo thành ít. Lipid có giá trị lớn trong việc nâng cao hiệu suất tổng hợp riboflavin. Glycin bổ sung từ 1–3 g/L như là tiền chất để tạo base nitơ guanine.

Quá trình lên men vitamin B_2 bằng nấm *Eremothecium ashbyii*

- Lên men

Nuôi cấy *Eremothecium ashbyii* để sản xuất riboflavin có thể thực hiện theo phương pháp bề mặt và phương pháp chìm. Tuy nhiên trong công nghiệp thường dùng phương pháp lên men chìm để sản xuất vitamin này vì thu được hiệu suất

https://nhathuocngocanh.com/

cao. Trong phương pháp lên men chìm, nấm được nuôi trong môi trường lỏng có sục khí.

Môi trường nuôi cấy có 5% đường saccharose, 3% dịch thủy phân protein, 0,3% cao thịt, 1% mầm lúa mì, 0,35 KH_2PO_4, 0,25% NaCl. pH ban đầu là 6, nhiệt độ duy trì ở 28°C – 30°C, tỷ lệ giống cấy vào là 10%, thời gian lên men là 7 ngày có thể cho hiệu suất 1800mcg/l. Trong trường hợp bổ sung chất béo vào môi trường có protein hiệu suất có thể tăng 100%.

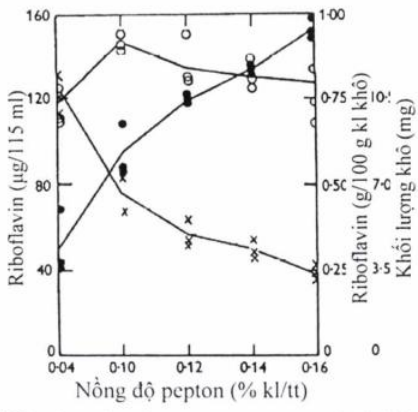
Tỷ lệ giữa lượng riboflavin nội bào và ngoại bào của *E. ashbyii* phụ thuộc vào mức sinh trưởng. Để cho sự tạo thành riboflavin bình thường cần phải sục khí mạnh. Ion sắt có thể kìm hãm sự sinh tổng hợp riboflavin.

Dịch lên men được cô đặc, chỉnh pH 4,5 và sấy khô sau đó kết tinh thu sản phẩm.

Đối với *A. gossypii*, nhiệt độ thích hợp để tạo thành riboflavin là 26 – 28°C. Hiệu suất sinh tổng hợp ở nhiệt độ cao bị giảm, nhiệt độ thấp phải kéo dài thời gian lên men. pH lên men ban đầu trong khoảng 6 – 7, nếu pH đầu là 4,5 – 5,5 thì nấm phát triển tốt nhưng không thuận lợi cho sinh tổng hợp riboflavin.

Môi trường lên men chứa 2% glucose, 2% cao ngô, được bổ sung thêm ion Fe từ máu động vật (1%). Tỷ lệ giống cấy vào là 1% thể tích môi trường. Quá trình lên men trong khoảng 4 – 5 ngày và được sục khí, hiệu suất thu được từ 500 – 600µg /ml *(hình 5.16)*.

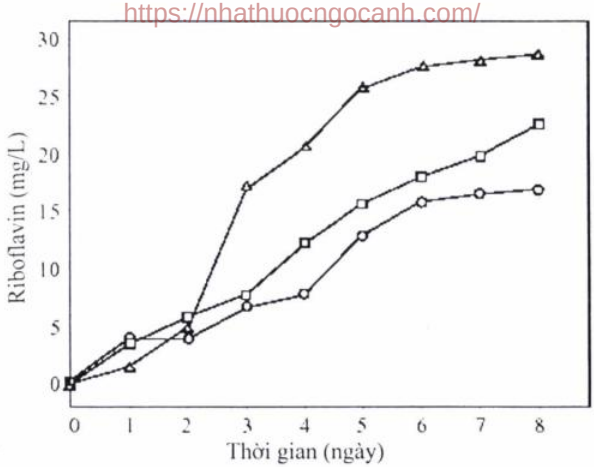
Sản phẩm riboflavin thu được bằng cách chỉnh pH về 4,5, đun môi trường nuôi cấy sau khi kết thúc ở 60°C trong 3 giờ với bacterial alkaline protease. Giảm nhiệt độ về 25°C và pH 7, ly tâm thu sản phẩm thô.



Hình 5.15. Biến đổi động học theo lượng pepton trong quá trình lên men riboflavin bằng *E. ashbyii* trong 5 ngày ở 28°C.

(●: Riboflavin khô. ○: Riboflavin mcg/15ml.
X: Riboflavin tính theo g/100g trọng lượng khô của sợi nấm)

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 5.16. Biến đổi động học trong quá trình lên men riboflavin bằng *A. gossypii* nuôi cấy lắc

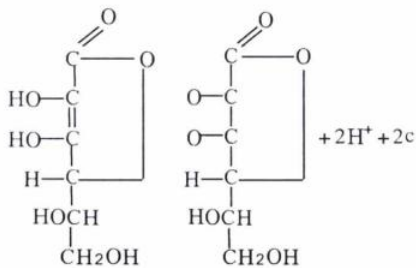
(O: bã sữa + dầu đậu nành; □: bã sữa + pepton; △: bã sữa. Dầu đậu nành, pepton cho vào là 10g/L).

3.3. Vitamin C

Đây là một vitamin có vai trò quan trọng với sức khỏe con người nhưng chỉ được phân lập được từ năm 1928 bởi nhà sinh hóa người Hungari A. Szent–Gryorgyi. Kể từ thế kỷ 15 và 16, các nhà khoa học đã thấy nhiều trường hợp thủy thủ tử vong trong những chuyến hải trình dài ngày do thiếu thức ăn tươi. Sau đó nước ép chanh đã được sử dụng để phòng ngừa từ thế kỷ 16. Từ năm 1996 tới 1984 có tới hơn 22.000 bài báo khoa học nói về vai trò của chất này với sức khỏe con người. Hiện nay vitamin C giữ vai trò là sản phẩm sử dụng nhiều nhất trong ngành dược, hóa học hay công nghệ thực phẩm. Việc thiếu vitamin C ảnh hưởng đến nhiều quá trình chuyển hóa trong cơ thể, đặc biệt ở tế bào gan như là tổng hợp collagen, acid amin, đáp ứng miễn dịch và một số quá trình còn chưa được biết rõ. Có thể nói vitamin này giữ chức năng khử như là chất mang điện tử do vậy giữ vai trò hết sức quan trọng trong phản ứng oxy hóa–khử của tế bào người cũng như động vật, chỉ có dạng L (+) mới có hoạt tính sinh học. Vitamin C hiện diện nhiều trong nước ép chanh, cà chua... Trước đó vitamin này có những tên khác như: cevitamic acid, hexuronic acid, scorbutamin. Từ năm 1965 theo IUPAC–IUB (hội đồng danh pháp quốc tế hợp chất hóa sinh), tên gọi vitamin C hay ascorbic acid (L–ascorbic acid) được thống nhất sử dụng.

https://nhathuocngocanh.com/

L–ascorbic acid là tinh thể trắng, tan chảy ở 192°C. Trong tự nhiên, vitamin C có hai dạng: dạng khử (ascorbic acid) hay dạng oxy hóa (dehydro ascorbic acid) (hình 5.17). Ascorbic acid dạng khử hay oxy hóa có thể chuyển đổi qua lại dưới tác dụng chất oxy hóa–khử nhưng khi có sự hiện diện chất kiềm thì cho ra 2,5–diketogluconic acid (2,5–DKG) không có hoạt tính điều trị bệnh do thiếu vitamin C (antiscorbutic activity). Trên người và động vật có vú, thực vật, vi khuẩn thì vitamin C được sinh tổng hợp theo nhiều con đường khác nhau (hình 5.18). Từ thực vật L–ascorbic acid có thể sinh tổng hợp từ D–glucose thông qua L–sorbonose hoặc qua L–galactose và L–galactono–1,4–lactone để cho ra L–ascorbic acid dưới tác dụng enzym L–galactose dehydrogenase và L–galactono–1,4–lactone dehydrogenase.

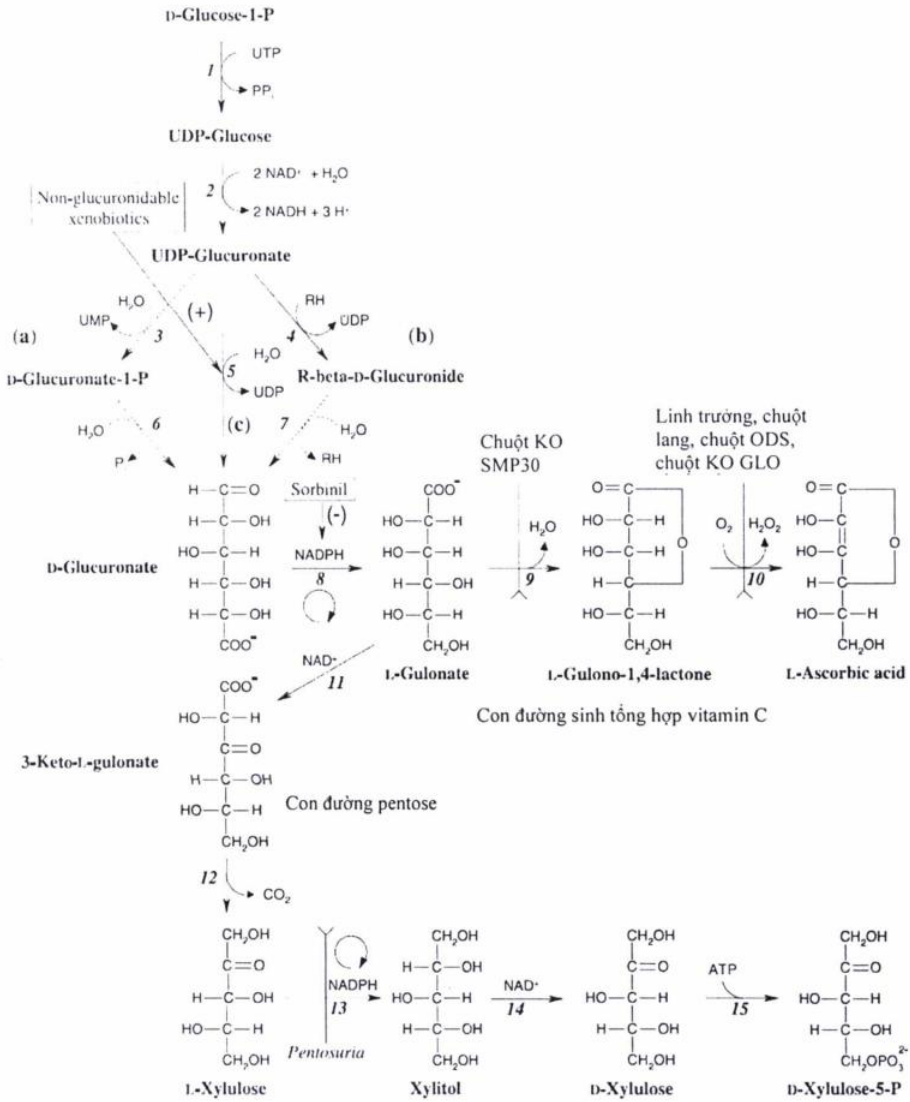


Hình 5.17. Dạng khử và oxy hóa của ascorbic acid

Việc sản xuất vitamin C trước kia phải qua nhiều giai đoạn với nhiều vi sinh vật khác nhau hoặc bán tổng hợp trong đó một số là phản ứng hóa học, đa số đều nhắm vào việc biến đổi 2–keto–L–gluconic acid cho ra ascorbic acid. Trước hết từ D–glucose sẽ cho ra L–sorbose, giai đoạn này nhiều giống vi sinh vật có thể thực hiện được, có thể kể đến *Acetobacter, Alcaligenes, Aerobacter, Azotobacter, Pseudomonas, Serratia* và *Xanthomonas*.

Ngoài ra có thể khử hóa D–glucose cho ra D–sorbitol bằng phản ứng khử hóa học nhưng có ít vi sinh vật có khả năng oxy hóa sorbitol cho ra 2–KLG. Sau những năm 1970, các nhà nghiên cứu đã tìm ra nhiều vi sinh vật có thể oxy hóa sinh học chuyển L–sorbose thành 2–KLG như *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293 hoặc *Pseudomonas aeroginosa* IFO 3839. Ngoài ra vi sinh vật này (tên cũ là *Gluconobacter oxydans* DSM4025 (FERM BP–3812)) có thể sản xuất vitamin C từ D–sorbitol, L–sorbonose và L–gulose *(Bảng 5.7)*, sản phẩm tiết ra trong môi trường nuôi cấy hoặc trong tế bào vi sinh vật.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 5.18. Sinh tổng hợp vitamin C trên động vật có vú

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 5.7. Năng suất tạo vitamin C từ những tiền chất khác nhau của *Gluconobacter oxydans* DSM4025 (FERM BP–3812)

Cơ chất	Lượng Vitamin C tạo được (mg/L)		
	4h	20h	24h
0,8% D–Sorbitol	0	62,3	90,3
0,8% L–Sorbose	636,1	908	874,3
0,5% L–Sorbose	1365	1117	1044
1% L–Glucose	488,8	1355	1673

Một phương pháp khác là biến nạp gen cần thiết: *Erwinia herbicola* ATCC 31626 có thể chuyển hóa D–glucose thành 2,5–diketo–D–gluconic acid (2,5–DKG) bao gồm nhiều bước với nhiều enzym, trong khi đó sự chuyển đổi 2,5–DKG thành 2–keto–L–gulonic acid (2–KLG) do *Corynebacterium sp.* (ATCC 31090) chỉ sau một bước. Chiến lược tốt nhất là thiết kế một vi sinh vật có khả năng chuyển D–glucose thành 2–KLG là tách gen 2,5–DKG reductase từ *Corynebacterium sp.* và cho biểu hiện trong *Erwinia herbicola*. Các tế bào *Erwinia herbicola* được biến nạp gen 2,5–DKG reductase có khả năng chuyển hóa trực tiếp D–glucose thành 2–KLG vì các enzym nội bào nằm ở màng trong của vi khuẩn sẽ chuyển D–glucose thành 2,5–DKG và 2,5–DKG reductase có trong bào tương (được biến nạp từ *Corynebacterium sp.*) sẽ chuyển thành 2–KLG. Chất này có thể chuyển dễ dàng thành L–ascorbic acid bằng acid. Thêm vào đó, bằng phương pháp đột biến điểm định hướng sẽ thu được đột biến gen 2,5–DKG reductase có hoạt tính cao hơn khoảng 2 lần và bền với nhiệt hơn dạng enzym tự nhiên. Sau đó 2–KLG có thể chuyển đổi hóa học thủy phân để dễ dàng cho ra vitamin C.

Môi trường nhân giống *G. oxydans melanogenus* IFO 3293 gồm 5% D–mannitol; 0,25% $MgSO_4.7H_2O$; 1,75% nước ngâm bắp; 5% dịch chiết men; 0,5% urê; 0,5% $CaCO_3$; 2% agar, nuôi cấy ở 27°C trong 4 ngày. Môi trường nhân giống cấp 2 gồm 8% L–sorbose; 5% dịch chiết men; 0,05% glycerol; 0,25% $MgSO_4.7H_2O$; 1,75% nước ngâm bắp; 0,5% urê; 1,5% $CaCO_3$, nuôi cấy ở 30°C, 240 rpm trong 20h. Chuyển qua tỷ lệ 6% môi trường lên men cùng thành phần nhưng lượng nước ngâm bắp là 3% và chất chống tạo bọt 0,15%, nhiệt độ 30°C, 180 rpm sau 20 giờ đã có thể cho 407,1 mg/L vitamin C.

Nếu nuôi cấy theo mẻ (fed–batch) từ *G. oxydans* DSM 17078, môi trường gồm 100 g/L D–sorbitol; 0,5 g/L glycerol; 15 g/L dịch chiết men; 2,5 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 15 g/L $CaCO_3$ nhiệt độ 30°C, 180 rpm. Sau 48 giờ, 150 ml dịch nuôi cấy cho vào nồi lên men 10 lít (bioreactor) với 5, 3 lít gồm thành phần là 20 g/L D–sorbitol; 0,5 g/lglycerol; 15 g/L dịch chiết men và 2,5 g/L $MgSO_4.7H_2O$, nhiệt độ 30°C, pH kiểm sóat ở 6 bằng cách thêm 28% dung dịch amoniac, thông khí 4,5 l/phút và

https://nhathuocngocanh.com/

khuấy trộn 300 rpm. Sau 96 giờ, lượng vitamin C thu được có thể đạt 950 mg/L, một số tác giả cho thấy nếu thu hoạch tế bào vi sinh vật thì trong đó cũng chứa vitamin C.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Ưu điểm của sản xuất các acid amin, acid hữu cơ từ vi sinh vật:
   A. Tốc độ sinh trưởng cao như động vật
   B. Hàm lượng protein cao nhất
   C. Tạo L-Acid amin
   D. Cả A và B
   E. Cả A, B, C
2. Trong phương pháp lên men vi sinh vật tạo acid amin, acid hữu cơ, vitamin có thể dùng
   A. Chỉ một vi sinh vật
   B. Ba giai đoạn với 2 vi sinh vật
   C. Hai giai đoạn với 2 vi sinh vật
   D. Cả A và C
   E. Nhiều giai đoạn kết hợp
3. Chủng vi sinh vật dùng sản xuất a.amin, acid hữu cơ, vitamin thường là chủng đột biến có tính chất:
   A. Không chịu tác động ức chế ngược
   B. Sẽ bị thoái hoá mất năng suất sau vài năm
   C. Không chịu tác động chất ức chế sinh tổng hợp là các enzym tham gia
   D. Không có enzym thoái hóa sản phẩm
   E. Cả A C, D
4. Các chủng sử dụng sản xuất L-glutamic có các yếu tố:
   A. Không có alpha-ketoglutarate dehydrogenase, giảm tính thấm của màng tế bào
   B. Nhiều enzym L-glutamat dehydrogenase
   C. Nhiều alpha-ketoglutarate dehydrogenase và ít ezym L-glutamat dehydrogenase
   D. Cả A và B
   E. Cả A B, C
5. Trong sản xuất L-lysin, acid diaminopimelic được sử dụng:
   A. Như là chất ức chế ngược khi chủng đã thoái hoá
   B. Trong phương pháp hai giai đoạn, như là tiền chất của lysin

https://nhathuocngocanh.com/

C. Trong tổng hợp chất trao đổi bậc 2

D. Như là chất ức chế tổng hợp các enzym cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp

E. Như là chất kích thích tổng hợp các enzym cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp

6. Các nguyên tố vi lượng Fe, Mg, Mn ảnh hưởng giảm năng suất của việc sinh tổng hợp:

A. Acid gluconic

B. Acid lactic

C. Acid citric

D. Vitamin B_{12}

E. Cả A, C, D

7. Nguồn nitơ sử dụng trong sản xuất vitamin B_2 và B_{12} phải sử dụng:

A. Protein động vật

B. $(NH_4)_2SO_4$

C. Cao chiết men

D. Máu động vật

E. Cả A, C, D

8. Kỹ thuật công nghệ gen tạo được chủng sản xuất vitamin C năng suất cao kết hợp các enzym:

A. 2,5–diketo–D–gluconic acid

B. 2–keto–L–gulonic acid

C. L–galactose dehydrogenase

D. Cả A và B

E. Cả A và C

9. Chủng vi khuẩn được sử dụng trong sinh tổng hợp vitamin B_{12}

A. *Propionibacterium shermani*

B. *Propionibacterium freudenreichii*

C. *Eremothericum ashbyi*

D. *Ashbyi gossypii*

E. Cả A và B

10. Phần cấu trúc có tác dụng sinh học của vitamin B_{12}

A.Ribonucleotid gốc base là 5,6–dimetylbenzylmidazole

B.Porphyrin

C. Porphyrin kết hợp cobalt

D. Cả B và C

E. Tất cả

https://nhathuocngocanh.com/

CHƯƠNG II

CÔNG NGHỆ ENZYM

Bài 6

KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ ENZYM – PROTEIN

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các ưu điểm của xúc tác sinh học.

2. Trình bày được các kỹ thuật áp dụng trong sản xuất protein – enzym.

3. Trình bày được các yêu cầu và kỹ thuật cố định enzym.

1. KHÁI NIỆM

Enzym là chất xúc tác sinh học, đa số enzym có bản chất là protein, một số ít enzym (các ribozym) có bản chất là ARN. Tuy nhiên, ngày nay việc ứng dụng xúc tác enzym đã vượt ra ngoài phạm vi của các quá trình sinh học. Như các chất xúc tác khác, enzym giúp cho phản ứng đạt được điểm cân bằng nhanh hơn. Enzym không thể xúc tác phản ứng có sự thay đổi năng lượng tự do không thuận lợi trừ khi phản ứng đó có thể song hành với một phản ứng khác có sự thay đổi năng lượng tự do thuận lợi hơn. Điều này cũng thường gặp trong các hệ thống sinh học, do vậy không nên hiểu sai khả năng của enzym là có thể xúc tác các phản ứng ngược với các quy luật chung của hóa học. Điểm khác biệt lớn của enzym so với các xúc tác hóa học là nó giúp phản ứng xảy ra nhanh hơn trong điều kiện bình thường về áp suất, nhiệt độ, pH.

Hoạt động của enzym đã được biết từ hàng nghìn năm trước, sự lên men của đường thành rượu bởi nấm men là một thí dụ cổ xưa nhất của một quá trình công nghệ sinh học. Tuy nhiên, chỉ đến gần đây, các đặc tính của enzym mới được hiểu rõ. Ngày nay, các nghiên cứu về enzym đã bước vào một giai đoạn mới với sự hội tụ kiến thức từ hóa học protein, lý sinh phân tử và sinh học phân tử. Nhờ đó người ta hiểu sâu hơn cấu trúc, hoạt động của protein–enzym và trong nhiều trường hợp người ta có thể can thiệp để thay đổi phân tử protein–enzym nhằm cải thiện hoạt tính hay tính chất của nó. Đó chính là ***công nghệ protein*** (proteinengineering) – một thành phần quan trọng của công nghệ sinh học.

https://nhathuocngocanh.com/

Enzym được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau như công nghiệp, nông nghiệp, phân tích và dược phẩm. Mức độ yêu cầu về số lượng và chất lượng của enzym trong các lĩnh vực này rất khác nhau *(Bảng 6.1)*.

Bảng 6.1. Nhu cầu sử dụng khác nhau của các enzym

Chỉ tiêu	Enzym công nghiệp	Enzym phân tích	Enzym dược phẩm
Lượng sử dụng	Tấn	Milligam → gam	Milligam → gam
Độ tinh khiết	Không tinh khiết	Tinh thể tinh khiết	Tinh thể tinh khiết
Nguồn gốc	Vi sinh vật, thường ngoại bào	Vi sinh vật, động vật, thực vật, thường nội bào	Vi sinh vật, động vật, thực vật, thường nội bào
Giá sản xuất	Thấp	Trung bình	Cao

Đến nay, người ta đã biết được hơn 2000 loại enzym, nhưng chỉ khoảng vài trăm enzym là có thể thương mại hóa được.

2. XÚC TÁC SINH HỌC

Trong công nghiệp enzym đã được ứng dụng làm chất xúc tác trong nhiều quy trình sản xuất hóa chất và dược phẩm. Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy enzym có nhiều đặc điểm xúc tác ưu việt giúp nó có ưu thế và ứng dụng đa dạng.

2.1. Tính chọn lọc cao

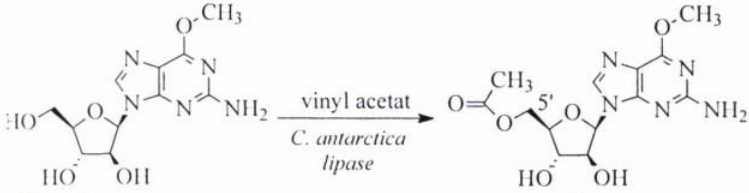
Tính chọn lọc là một yêu cầu cần thiết trong tổng hợp các chất hữu cơ. Enzym có tính chọn lọc cao nên chúng đã góp phần giải quyết nhiều vấn đề nan giải trong tổng hợp hóa học. Tính chọn lọc theo nhóm của enzym trên cả các phân tử phức tạp mà không cần nhóm bảo vệ là ưu thế cơ bản của xúc tác sinh học. Điều này giúp giảm bớt nhiều bước tổng hợp và do đó rút ngắn thời gian chiếm dụng nồi phản ứng, đây là một yếu tố quan trọng của tính kinh tế trong sản xuất hóa chất và dược phẩm. Tính chọn lọc cao, vốn là đặc tính độc quyền của xúc tác sinh học, hiện nay cũng có thể đạt được bằng xúc tác kim loại chuyển tiếp, chủ yếu dùng trong chọn lọc đồng phân hydrogen hóa.

Chọn lọc theo vị trí nhóm hóa học

Enzym có tính chọn lọc cao về mặt vị trí nhóm thế (regioselective) nhờ đó tránh được việc phải che chắn các nhóm thế trong tổng hợp hóa học thông thường. Một ví dụ về tính chọn lọc theo vị trí là phản ứng tổng hợp dẫn chất acyl hóa của một dẫn xuất purine (Nelarabine, được Glaxo Welcome phát triển để làm tác nhân kháng bệnh bạch cầu). Phản ứng này được xúc tác bằng lipase cố định của *Candida antartica* typ B với chất cho acyl vinyl acetat, đã đạt được hiệu suất chuyển hóa 99% thành 5'–monoacetat, chất này dễ tan hơn và do đó

https://nhathuocngocanh.com/

làm tăng sinh khả dụng. Điều đó này hầu như không đạt được bằng phản ứng acyl hóa thông thường vì nó ưu tiên cho N–acyl hóa. Tính chọn lọc theo vị trí trong quy trình này đặc biệt cao, có ít hơn 0,1% 3'–monoacetat và dưới 0,3% 3',5'–diacetat được hình thành.



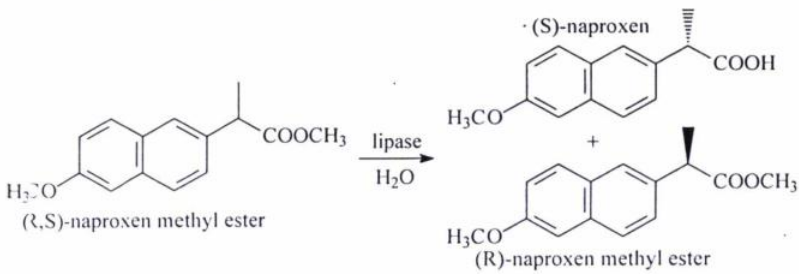
Dẫn xuất Purine (Nelarabine) Sản phẩm acyl hóa

Hình 6.1. Tính chọn lọc vị trí phản ứng của xúc tác sinh học

Chọn lọc không gian

Phản ứng do enzym xúc tác có tính chọn lọc cao về mặt quang học (enantioselective). Điều này quan trọng đối với việc tổng hợp thuốc, vì đối với nhiều phân tử thuốc chỉ một trong hai đồng phân đối quang là có hoạt tính, do đó thuốc tinh khiết quang học có hoạt tính cao và ít tác dụng phụ hơn thuốc dạng hỗn hợp racemic. Ví dụ các thuốc kháng viêm không steroid (NSAID) thuộc nhóm 2–aryl propionic acid, điển hình là naproxen, trong nhóm này đồng phân (S) có hoạt tính mạnh hơn đồng phân (R) (28 lần đối với naproxen), do đó nếu thuốc này được cung cấp ở dạng tinh khiết quang học (S)–naproxen sẽ có liều dùng và độc tính thấp hơn dạng racemic. Các thuốc chẹn bêta như propanolol và đồng vận beta như salbutamol cũng có đặc điểm này và hiện nay đều có thể tổng hợp dưới dạng tinh khiết quang học nhờ xúc tác enzym.

Xúc tác enzym là cách tiếp cận ngày càng được ưa chuộng để giải quyết vấn đề đồng phân quang học trong tổng hợp hóa dược, vì tính đơn giản và hiệu quả. Lipase và esterase có tính chọn lọc đồng phân quang học với các cơ chất đa dạng như ester, acol, ester carboxylic và thậm chí cả amin.



(R,S)-naproxen methyl ester (R)-naproxen methyl ester

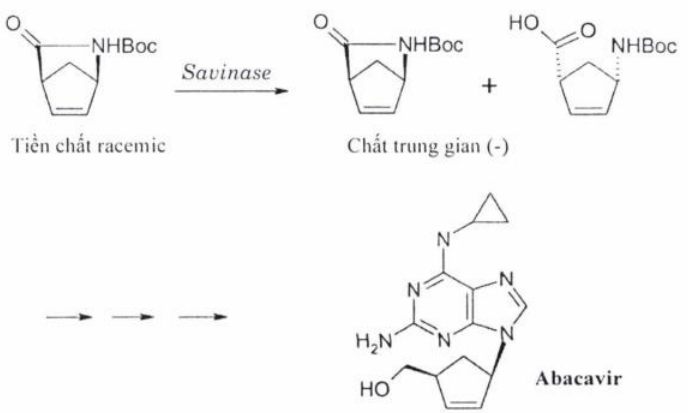
Hình 6.2. Phân giải đồng phân quang học bằng xúc tác sinh học

https://nhathuocngocanh.com/

2.2. Hoạt động trên cơ chất đa dạng

Trước đây, đã có quan niệm sai lạc về xúc tác sinh học, cho rằng chúng chỉ hoạt động trên các cơ chất có trong hệ thống sinh học, do đó ứng dụng của chúng bị giới hạn. Tuy nhiên, gần đây, người ta đã chứng minh các enzym có thể tác động trên các cơ chất đa dạng hơn nhiều. Với một số loại enzym, đặc biệt hydrolase (esterase, lipase, protease,...), đôi khi tác động trên các cơ chất khác xa cơ chất tự nhiên của chúng. Ví dụ như lipase thủy phân triglycerid trong thiên nhiên nhưng chúng cũng xúc tác các phản ứng khác như tạo ester từ ceten và acol, hoặc amid từ ester và amoniac. Hay lipase được sử dụng để thủy phân ester của naproxen trong hình 6.2 ở trên.

Ngược lại, tính chuyên biệt của cơ chất có thể bị giới hạn đối với những enzym tự nhiên chuyển hóa các phân tử nhỏ, như là catalase hoặc aspartase. Và điều này cũng xảy ra với một số enzym của các sinh vật bậc cao, nhưng hầu hết các enzym từ vi sinh vật có khuynh hướng chấp nhận cơ chất đa dạng.



Hình 6.3. Sản xuất abacavir bằng xúc tác sinh học

2.3. Hoạt động được trong môi trường không phải là nước

Đa số enzym chỉ hoạt động được trong môi trường nước. Tuy nhiên, một số enzym, đặc biệt là các lipase, có thể hoạt động trong môi trường hoàn toàn khan nước. Trong tự nhiên lipase hoạt động ở pha trung gian nước–dầu, nhưng người ta đã chứng minh lipase cũng hoạt động tốt trong các dung môi như toluen, ether và hydrocarbon no.

2.4. Khả năng đảm nhận lượng cơ chất cao

Mặc dù nồng độ cơ chất là vấn đề chính trong các quy trình xúc tác sinh học

https://nhathuocngocanh.com/
nhưng vẫn có rất nhiều trường hợp trong đó nồng độ cơ chất cao có thể đạt được, ví dụ trong tổng hợp Abacavir, chế phẩm trung gian quan trọng của chất ức chế enzym phiên mã ngược của hãng Glaxo Wellcome (Ziagen). Bước quyết định trong quy trình sản xuất tác nhân kháng HIV này là phải phân giải trong giai đoạn đầu tiền chất Lactame ở dạng racemic bằng một protesase kiềm (Savinase) để thu được chất trung gian tổng hợp dạng (–). Enzym này sử dụng nồng độ cơ chất lên tới 100 g/l trong hỗn hợp tetrahydrofuran và nước. Lượng dư chất đối quang (–), cũng là tiền chất của Carbovir, đạt trên 99% với hiệu suất hóa học là 84% khi có 50% chuyển hóa.

2.5. Có độ bền đủ cao

Thông thường, các enzym có tính ổn định thấp, nhạy cảm với các tác nhân thường gặp trong các quy trình tổng hợp, nên nhanh chóng mất hoạt tính. Điều này cũng có nghĩa là chi phí chất xúc tác trong quy trình sẽ cao và hạn chế khả năng ứng dụng của enzym trong tổng hợp hóa học. Nhưng gần đây người ta đã có nhiều tiến bộ trong cải thiện độ bền của enzym thông qua việc cố định chúng lên các giá mang rắn. Enzym cố định có độ bền cao hơn hẳn so với enzym tự do. Mặt khác, khi được cố định trên giá mang rắn người ta có thể dễ dàng thu hồi enzym từ hỗn hợp phản ứng để sử dụng trong chu kỳ xúc tác tiếp theo hoặc thiết kế phản ứng vận hành theo kiểu liên tục, trong đó cơ chất được bơm liên tục qua lưới chất xúc tác là enzym cố định. Tính hữu hiệu của biện pháp này đã được chứng minh với penicillin G amidase (PGA). Khi được gắn đồng hóa trị vào chất mang, PGA có thể sử dụng làm chất xúc tác cho khoảng 1000 mẻ trong phản ứng chuyển penicillin G thành 6–aminopenicillanic acid (6–APA) trước khi phải thay bằng enzym mới.

2.6. Tính kinh tế

Enzym có giá thành cao, nhưng nếu xét về hiệu suất và tổng giá thành của một quy trình sản xuất với xúc tác enzym thì giá thành trong nhiều trường hợp rẻ hơn so với xúc tác hóa học, nhất là các xúc tác kim loại chuyển tiếp.

Các ví dụ về việc áp dụng xúc tác sinh học trong sản xuất hóa chất và dược phẩm ở quy mô công nghiệp như acrylic acid, 6–APA và D–p–hydroxyphenylglycine đã chứng minh rõ ràng về hiệu quả kinh tế cao vượt trội của xúc tác enzym.

3. NGUỒN CUNG CẤP ENZYM

Enzym có thể được sản xuất từ nhiều nguồn khác nhau như động vật (như pepsin trypsin từ phụ phẩm của lò mổ), thực vật (như papain, bromelin), nhưng nguồn enzym quan trọng nhất là vi sinh vật. Gần đây vi sinh vật còn được sử dụng như là tế bào chủ để sản xuất các enzym tái tổ hợp từ các nguồn

https://nhathuocngocanh.com/

khác do tính kinh tế của việc nuôi cấy vi sinh vật so với việc chiết tách từ mô hay nuôi cấy tế bào bậc cao. Rất nhiều vi sinh vật khác nhau được sử dụng để sản xuất enzym trong công nghiệp. Chúng có thể là các hệ thống sản xuất nhân thật như nấm men hay mốc hoặc nhân nguyên thủy như các vi khuẩn Gram dương hay Gram âm. Các enzym sử dụng làm dược phẩm đôi khi được sản xuất bằng hệ thống tế bào động vật hay côn trùng do khả năng biến đổi hậu dịch mã tốt hơn vi sinh vật (*xem thêm bài Công nghệ gen*). Trong lịch sử sản xuất enzym, các vi sinh vật được sử dụng là các vi sinh vật sản xuất enzym tương ứng tự nhiên.

Cơ chế tổng hợp enzym chung của các sinh vật bao gồm phiên mã, dịch mã và xử lý hậu dịch mã, nói chung khá ổn định. Tuy nhiên, có sự khác biệt giữa các sinh vật khác nhau, đặc biệt giữa nhân thật và nhân nguyên thủy. Bản thân các enzym cùng loại cũng khác nhau về phân tử lượng, số mạch peptid, điểm đẳng điện, và mức độ glycosyl hóa.

Các sinh vật khác nhau cũng khác nhau về tính thích hợp với quá trình lên men như độ nhớt hay khả năng thu hồi, độ an toàn, do đó cần phải xét đến đặc điểm này khi lựa chọn chủng sản xuất.

4. CẢI THIỆN CHỦNG VI SINH VẬT SẢN XUẤT VÀ TÍNH CHẤT ENZYM

Phương pháp kinh điển

Hầu hết các chủng sản xuất đều được cải tiến thông qua quá trình chọn lọc kinh điển. Quá trình bao gồm việc gây đột biến bằng hóa chất hay UV. Đôi khi cũng dùng đột biến hay tái tổ hợp để có được đặc tính mong muốn. Sau khi đột biến, chủng sẽ được sàng lọc lại theo tính chất mong muốn. Phương pháp sàng lọc phải đủ nhạy để phát hiện chủng đột biến trong dân số $10^4 - 10^5$ tế bào.

Kỹ thuật di truyền

Hiện nay việc cải thiện chủng được thực hiện thông qua kỹ thuật di truyền. Chủng được cải thiện bằng cách biến đổi bộ gen của nó hay đưa vào các yếu tố di truyền ngoại lai nhờ đó tăng tốc độ cải thiện lên rất nhiều (*xem thêm Chương Công nghệ gen*).

Kỹ thuật di truyền cho phép gia tăng mức độ phiên mã bằng cách tạo các plasmid mang gen đích đặt dưới sự kiểm soát của một promoter mạnh, đồng thời bản thân plasmid có nhiều bản sao trong tế bào nên cũng làm tăng số lượng mã được phiên. Kỹ thuật tương tự cũng được dùng để thêm vào gen đích các đặc tính mong muốn ví dụ như thêm đoạn gen mã hóa cho việc xuất protein ra môi trường ngoại bào.

Kỹ thuật di truyền cũng giúp sản xuất các protein của động vật bậc cao, vốn

https://nhathuocngocanh.com/
rất khó lên men ở quy mô lớn, trong các tế bào vi sinh vật. Ví dụ, chymosin (E.C. 3.4.23.4), là một renin từ bê, đã được tạo dòng để sản xuất công nghiệp ở vi khuẩn.

Thiết kế hợp lý và tiến hóa định hướng

Kỹ thuật di truyền hiện đại cho phép biến đổi phân tử theo ý muốn dẫn đến việc thiết kế phân tử protein nói chung hay enzym nói riêng để thu được phân tử có các đặc điểm mong muốn còn gọi là ***thiết kế hợp lý*** (rationale design). Trong cách tiếp cận này, quá trình thiết kế trên máy tính và gây đột biến định hướng điểm được lặp lại nhiều lần. Tuy nhiên, cách này thường cho ra các phân tử không có được tính chất mong muốn vì thiếu các thông tin chi tiết về cấu trúc và quan hệ cấu trúc với tính chất sinh học.

Gần đây, người ta bắt đầu áp dụng cách tiếp cận với công cụ ***tiến hóa định hướng*** (directed evolution), trong đó enzym được cải thiện bằng cách định hướng sự tiến hóa của nó trong phòng thí nghiệm thông qua việc gây đột biến ngẫu nhiên hoặc tái tổ hợp lặp lại nhiều lần kết hợp sàng lọc và chọn lọc. Tiến hóa định hướng hiện nay là một công cụ đầy hứa hẹn trong việc phát triển các enzym dược phẩm và gần đây đã thu được nhiều thành công đáng kể. Tiến hóa định hướng được áp dụng để cải thiện không chỉ tính chất của protein mà còn có thể cải thiện cả khả năng siêu sản xuất của chủng. Ví dụ, bằng cách đột biến theo kiểu tiến hóa định hướng plasmid mang gen subtilisin, khả năng sản xuất enzym này đã tăng lên năm lần, nhờ vào việc cải thiện số bản sao của plasmid và khả năng của promoter trong khi không làm thay đổi cấu trúc của sản phẩm.

Bảng 6.2. So sánh chọn lọc tự nhiên và định hướng

	Tiến hóa tự nhiên	Tiến hóa định hướng
Đột biến điểm	Ít	Nhiều
Đột biến mất	Nhiều	Hiếm
Đột biến chèn	Nhiều	Hiếm
Nghịch đảo	Nhiều	Hiếm
Lặp	Nhiều	Hiếm
Dung hợp	Nhiều	Hiếm
Tái tổ hợp	Giao tử và sinh dưỡng	PCR
Chọn lọc	Chọn lọc tự nhiên (ưu thế)	Chọn lọc / sàng lọc hiệu năng cao

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 6.3. So sánh thiết kế hợp lý với tiến hóa định hướng

	Thiết kế hợp lý	Tiến hóa định hướng
Kiến thức về cấu trúc protein	Cần	Không cần
Kiến thức về cơ chế	Cần	Không cần
Nhiễu đột biến điểm	Không	Chủ yếu chuyển vị
Thay đổi cấu trúc bậc hai	Khả thi	Không khả thi
Thay đổi nhóm chức năng	Khả thi	Không khả thi
Phép kiểm enzym nhạy	Cần	Không cần
Phương án chọn lọc	Không cần	Cần

5. SẢN XUẤT ENZYM

Quá trình sản xuất enzym–protein có thể được chia thành các giai đoạn chính sau:

- Chuẩn bị nguyên liệu sinh học
- Chiết tách enzym ra khỏi mô hay tế bào
- Cô đặc dịch enzym thô
- Tinh chế đạt độ tinh khiết mong muốn

5.1. Chuẩn bị nguyên liệu sinh học

Cơ quan động vật. Khi sản xuất enzym bằng cách chiết tách từ mô động vật, các cơ quan động vật phải được vận chuyển và bảo quản lạnh để giữ hoạt tính enzym. Mô cũng phải được loại chất béo và mô liên kết trước khi đông lạnh. Mô đông lạnh sau đó được nghiền trên máy nghiền thịt và enzym được chiết với dung dịch đệm. Bên cạnh việc nghiền cơ học, các phương pháp sử dụng enzym để phá vỡ tế bào cũng được sử dụng. Chất béo làm cản trở các bước tinh chế sau đó có thể được loại bằng cách chiết với dung môi hữu cơ. Tuy nhiên, hoạt tính enzym có thể bị ảnh hưởng bởi quá trình này.

Nguyên liệu thực vật. Thực vật có thể được nghiền và chiết với dung dịch đệm. Tế bào cũng có thể được phá vỡ bằng cách xử lý với enzym.

Vi sinh vật là nguồn gốc cung cấp enzym quan trọng nhất. Enzym của vi sinh vật đa phần là enzym ngoại bào hoặc được biến đổi di truyền để xuất ra ngoài tế bào. Mặt khác, việc biến đổi di truyền cũng có thể được dùng để thay đổi tính chất protein giúp việc tinh chế dễ dàng hơn, như gắn thêm nhóm ái lực.

Đối với enzym ngoại bào bước đầu tiên để tinh chế là tách tế bào ra khỏi dung dịch lên men. Đối với enzym nội bào, bước đầu tiên là phá vỡ tế bào. Có

https://nhathuocngocanh.com/
nhiều phương pháp để phá tế bào, tuy nhiên số phương pháp có thể áp dụng ở quy mô công nghiệp rất giới hạn.

Bảng 6.4. Các phương pháp phá vỡ tế bào

Phương pháp cơ học	Phương pháp khác
Áp suất cao (Manton – Gaulin, French–press)	Làm khô (đông khô, dung môi hữu cơ)
Nghiền (máy nghiền bi)	Ly giải:
Siêu âm	Vật lý: đông lạnh, sốc thẩm thấu
	Hóa học: chất tẩy, kháng sinh
	Enzym: lysozym, kháng sinh

5.2. Chiết tách

Sau khi làm vỡ tế bào, việc tiếp theo là tách dịch enzym ra khỏi các phần khác. Điều này đôi khi khá khó khăn do kích thước nhỏ của tế bào vi khuẩn và chênh lệch ít giữa tỷ trọng tế bào và môi trường lên men. Trong công nghiệp người ta có thể dùng kỹ thuật lọc liên tục. Các tế bào lớn như nấm men có thể loại ra bằng cách lắng. Ngày nay, các hệ thống ly tâm liên tục được phát triển hiệu quả để tách tế bào và mảnh tế bào một cách liên tục. Các mảnh vỡ thực vật và mô được tách bằng ly tâm thông thường hay lọc.

Các phương pháp lọc truyền thống như lọc áp suất, lọc chân không bị hạn chế bởi sự tích tụ của các phần tử trên bề mặt lọc dẫn đến giảm lưu lượng và tắc lọc. Do đó, quá trình lọc đôi khi bị gián đoạn để lấy phần chất rắn tích tụ ra.

Một phương pháp lọc cải tiến là ***lọc chảy qua*** (cross–flow filtration). Trong kỹ thuật này chất cần lọc chảy qua hệ thống theo hướng song song với bề mặt lọc do đó tránh được sự tích tụ chất rắn trên bề mặt làm tắc lọc. Để duy trì tốc độ lọc cao kỹ thuật này sử dụng diện tích lọc rất lớn và tiêu tốn nhiều năng lượng để lưu thông dịch lọc.

Phương pháp ***kết bông*** (flocculation) là quá trình làm cho các tiểu phần rắn kết tụ với nhau thành dạng lớn hơn, kết tập xuống và dễ dàng loại ra bằng các phương pháp lọc đơn giản. Các tác nhân kết bông được dùng để làm tăng khả năng kết tụ của hỗn dịch. Chúng có thể là các chất tan trong nước và dạng polyme đa điện tích có phân tử lượng 10^3 đến trên 5×10^6. Kỹ thuật kết bông với các chất đa điện tích gồm hai bước. Bước đầu tiên là trung hòa điện tích bề mặt của tế bào hay mảnh tế bào. Bước hai bao gồm việc liên kết các mảnh này để chúng kết tập xuống.

5.3. Cô đặc

Thông thường nồng độ enzym trong vật liệu đầu rất thấp. Do đó, để đạt được

https://nhathuocngocanh.com/

hiệu quả tinh chế một cách kinh tế cần cô đặc nguyên liệu ban đầu để giảm thể tích xử lý. Các phương pháp sử dụng phải không ảnh hưởng đến hoạt tính enzym. Có nhiều phương pháp có thể áp dụng.

Có thể sử dụng nhiệt nhẹ nhàng để làm bay hơi chất lỏng. Thông thường người ta làm bay hơi trên hệ thống được thiết kế với bề mặt bay hơi rất lớn và có sự khuấy trộn để tăng tốc quá trình.

Kết tủa là một phương pháp đơn giản để cô đặc enzym. Kỹ thuật này dựa vào bản chất phức tạp của phân tử protein với điện tích và các nhóm kỵ nước nên có thể làm cho kết tụ lại bằng cách thay đổi môi trường quanh chúng.

- **Kết tủa enzym với muối**, do ở nồng độ cao muối tác động lên các phân tử nước bao quanh protein và thay đổi lực tĩnh điện dẫn đến sự kết tủa. Ammonium sulfat là muối thường được dùng nhất. Enzym cũng có thể được phân đoạn một cách hạn chế bằng cách tủa với nồng độ muối khác nhau. Nồng độ muối sử dụng thường trong khoảng 20 – 80% độ bão hòa. Tuy nhiên, sự ăn mòn vật liệu và sự hiện diện của muối trong enzym thu được và vấn đề xử lý chất thải chứa muối là các hạn chế của kỹ thuật này.

- **Kết tủa với dung môi hữu cơ**. Dung môi làm thay đổi độ tan của enzym do làm giảm hằng số lưỡng cực của môi trường nước. Dung môi thường dùng là ethanol và aceton. Tuy nhiên, việc tiến hành phải thận trọng vì enzym dễ dàng bị biến tính khi có mặt dung môi hữu cơ.

- **Tủa bằng các polyme** như polyethylenimin và polyethylen glycol. Cơ chế hoạt động cũng tương tự như dung môi hữu cơ. Hầu hết enzym sẽ tủa ở nồng độ polyme khoảng 15 đến 20 %.

- **Tủa tại điểm đẳng điện.** Protein là các phân tử lưỡng cực mang cả nhóm acid lẫn base, và tính tan của nó phụ thuộc nhiều vào cân bằng điện tích của các nhóm này. Tại điểm đẳng điện thì độ tan của protein là thấp nhất và khi đó nó dễ dàng bị tủa ra khỏi dung dịch.

- **Siêu lọc** có nguyên lý tương tự kỹ thuật lọc, nhưng dùng màng bán thấm để lọc, do vậy tùy theo kích thước của lỗ lọc có thể cho phép giữ protein hoặc thậm chí cả các chất tan khác lại trên lọc. Siêu lọc có thể vận hành theo thang chênh lệch áp suất thẩm thấu hay áp suất cơ học và trong trường hợp sau người ta áp dụng kiểu lọc chảy qua để tránh tắc lọc.

5.4. Tinh chế

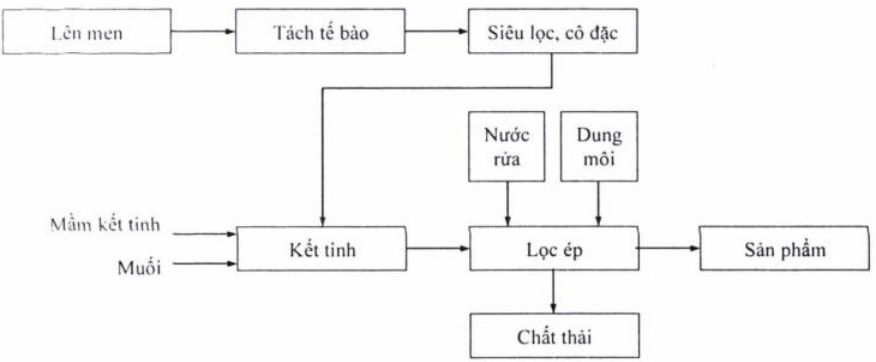
Đối với nhiều ứng dụng công nghiệp, enzym chỉ cần được tinh chế một phần. Tuy nhiên, enzym dùng trong phân tích hay y tế đòi hỏi độ tinh khiết cao. Nhiều phương pháp được sử dụng để tinh chế enzym như kết tinh, điện di, và sắc ký.

https://nhathuocngocanh.com/

Kết tinh

Đây là phương pháp lâu đời nhất để tinh chế enzym. Enzym có thể được kết tinh bằng cách gây cảm ứng hay thành lập các tương tác protein–protein với các điều kiện dung môi để làm cho enzym bị quá bão hòa. Nhiều enzym được tinh chế bằng cách này từ dịch lên men như cellulase, glucose isomerase, subtilisin, và alcohol oxidase.

Nhiều yếu tố như loại muối, nồng độ, pH, nhiệt độ, sự hiện diện của các lượng và loại tạp khác nhau, sự khuấy trộn, mầm kết tinh có thể ảnh hưởng đến sự kết tinh enzym. Việc kiểm soát mức độ quá bão hòa trong suốt quá trình kết tinh là yếu tố chính để tối ưu hóa kích thước tinh thể. Điều này có thể đạt được bằng cách dùng các chất kết tủa như muối, pH, và nhiệt độ. Nhiệt độ đóng vai trò quan trọng đối với tốc độ kết tinh. Cellulase và subtilisin được kết tinh ở tốc độ cao hơn khi nhiệt độ tăng lên. Dạng tinh thể cũng bị ảnh hưởng bởi điều kiện kết tinh. Ví dụ, subtilisin có tinh thể dạng phiến chữ nhật nếu nhân kết tinh được hình thành ở nhiệt độ thấp và sau đó tăng nhiệt độ khi tinh thể lớn dần.



Hình 6.4. Quy trình kết tinh công nghiệp của subtilisin dưới dạng muối halogen

Điện di

Điện di có thể dùng để phân lập các enzym hay protein tinh khiết ở quy mô phòng thí nghiệm. Tùy thuộc vào điều kiện, các kỹ thuật điện di khác nhau có thể áp dụng: điện di vùng (zone electrophoresis), điện di đẳng tốc (isotachophoresis) hay khuếch tán lỗ (porosity gradient). Nhiệt sinh ra trong quá trình điện di và nhiễu do sự đối lưu là các vấn đề khi phát triển quy mô lớn của phương pháp này.

https://nhathuocngocanh.com/

Sắc ký

Sắc ký là phương pháp tinh chế enzym quan trọng nhất *(Bảng 6.5)*. Các phân tử được tách ra theo đặc tính vật lý của chúng (kích thước, hình dạng, điện tích, tương tác kỵ nước), hay đặc tính hóa học (gắn đồng hóa trị), hay sinh học (ái lực đặc hiệu).

Tùy theo mức độ tinh khiết yêu cầu của sản phẩm, quá trình tinh chế có thể phải qua nhiều bước với các kỹ thuật sắc ký khác nhau. Thông thường sẽ gồm các bước tách thô nhằm thu đa số enzym cần quan tâm với lượng tạp nhất định, theo sau là bước "đánh bóng" (polishing) để thu enzym tinh khiết. Ví dụ sắc ký ái lực hay trao đổi ion trong bước 1 và sắc ký lọc gel hay tương tác kỵ nước thường được dùng trong bước đánh bóng. Số bước càng nhiều thì độ tinh khiết càng cao, tuy nhiên hiệu suất toàn phần sẽ càng thấp. Kinh nghiệm cho thấy một quá trình tinh chế hiệu quả không gồm quá ba bước.

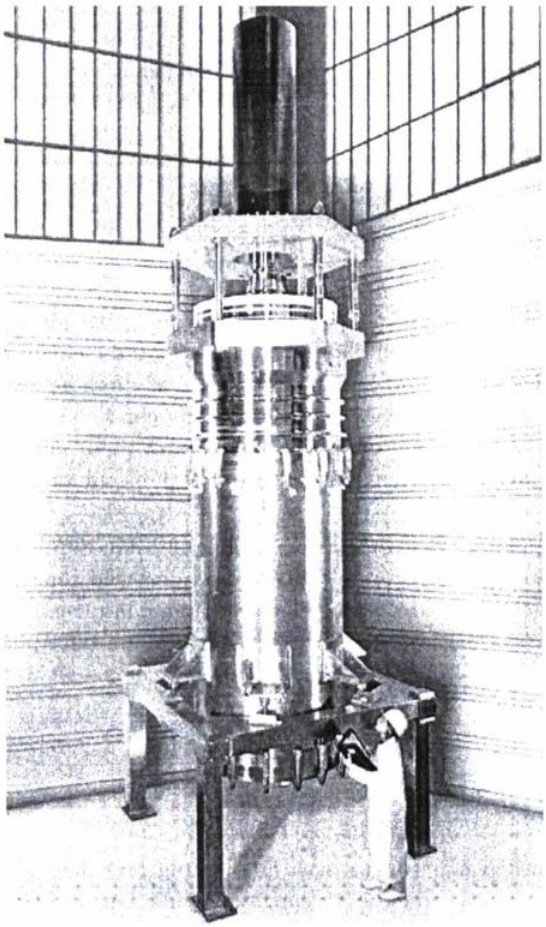
Bảng 6.5. Các phương pháp sắc ký

Loại sắc ký	Nguyên lý	Tách theo
Hấp phụ	Liên kết bề mặt	Ái lực bề mặt
Phân bố	Cân bằng phân bố	Tính phân cực
Trao đổi ion	Liên kết ion	Điện tích
Lọc gel	Khuếch tán lỗ	Kích thước và hình dạng phân tử
Ái lực	Hấp phụ đặc hiệu	Cấu trúc phân tử
Kỵ nước	Tương tác kỵ nước	Cấu trúc phân tử
Đồng hóa trị	Liên kết đồng hóa trị	Tính phân cực
Đánh bắt ion kim loại	Sự thành lập phức	Cấu trúc phân tử

* ***Trong sắc ký lọc gel***, gel thân nước với các lỗ có kích thước xác định được dùng dưới dạng cột để tách các phân tử sinh học. Dung dịch mẫu cần được cô đặc vì lượng mẫu có thể tách được bị giới hạn trong khoảng 10% thể tích cột. Các phân tử được tách theo kích thước và hình dạng, trong đó phân tử càng cồng kềnh thì sẽ chạy ra khỏi cột trước và ngược lại. Các loại gel với mức độ liên kết chéo khác nhau tạo ra các lỗ trong gel có kích thước khác nhau và do đó có khả năng phân tách các phân tử có kích thước khác nhau.

* ***Sắc ký trao đổi ion*** là một kỹ thuật tách dựa trên điện tích của phân tử protein. Các phân tử protein nói chung có thể tích dương hay âm và tổng điện tích của nó phụ thuộc pH và có thể được phân tách tương ứng với nhựa trao đổi cation hay anion sao cho protein quan tâm được giữ lại trong cột sau bước đầu tiên. Mẫu cần được chuẩn bị trong môi trường có lực ion thấp và việc giải hấp

https://nhathuocngocanh.com/
phụ được thực hiện bằng các dung dịch có nồng độ muối tăng dần. Do protein quan tâm được giữ lại trong cột nên chúng có xu hướng được cô đặc lại và do đó mẫu ban đầu có thể loãng. Khả năng tiếp nhận lượng mẫu lớn và loãng làm cho sắc ký trao đổi ion rất phổ biến trong tinh chế protein.



Hình 6.5. Hệ thống sắc ký tinh chế protein tái tổ hợp ở quy mô công nghiệp

* ***Trong sắc ký tương tác kỵ nước***, nhựa sắc ký là dẫn xuất của Sepharose được hoạt hóa với CNBr có phần aminoalkan với chiều dài thay đổi. Phương pháp này dựa trên sự tương tác của các vùng kỵ nước trong phân tử protein với các nhóm kỵ nước trên nhựa. Sự hấp phụ xảy ra ở nồng độ muối cao, và các phân

https://nhathuocngocanh.com/

đoạn chất đã gắn được giải hấp phụ với các dung dịch muối có nồng độ giảm dần. Chính vì vậy, phương pháp này được xem là lý tưởng để tinh chế các enzym sau khi được cô đặc bằng cách tủa với muối.

* ***Trong sắc ký ái lực*** enzym cần tinh chế được hấp phụ một cách đặc hiệu và thuận nghịch trên một nhựa sắc ký không tan. Các tương tác đặc hiệu có thể là với chất tương tự cơ chất, chất ức chế enzym, thuốc nhuộm, phức kim loại, hay kháng thể. Việc giải hấp phụ được thực hiện bằng chất cạnh tranh hay tác nhân làm yếu hay cắt đứt liên kết giữa protein và nhựa sắc ký. Nói chung sắc ký ái lực là phương pháp tách đơn giản và hiệu quả nhất, nhưng không phải protein nào cần tinh chế cũng có dạng tương tác đặc hiệu với nó.

6. ENZYM CỐ ĐỊNH

6.1. Khái niệm

Enzym cố định (immobilized enzyme) là enzym bị bắt giữ hay định vị trong một vùng không gian xác định nào đó nhưng vẫn giữ được hoạt tính xúc tác của nó nên có thể dễ dàng tách ra khỏi phản ứng, tái sử dụng hoặc sử dụng liên tục. Nói cách khác, enzym cố định là enzym được làm cho không tan bằng cách gắn nó vào pha rắn để việc tách enzym ra khỏi thành phần phản ứng trở nên dễ dàng. Pha rắn này phải không tan trong môi trường phản ứng, nhưng có thể thân nước hoặc kỵ nước.

Enzym cố định được ứng dụng trong công nghiệp đầu tiên bởi Chibata và cộng sự để chuyển hóa hỗn hợp racemic của D,L–amino acid tổng hợp hóa học nhờ aminoacylase của *Aspergillus oryzae*. Các ứng dụng quan trọng trong công nghiệp của enzym cố định bao gồm: sản xuất đường, acid amin, dược phẩm và nhờ có nó mà nhiều quy trình sản xuất được cải thiện rõ rệt về hiệu suất và tính kinh tế.

6.2. Đặc điểm của enzym cố định

* ***Ưu điểm***

– Enzym có thể được sử dụng lặp lại nhiều lần với cùng một kiểu phản ứng xúc tác nên giảm được chi phí trong quá trình sản xuất.

– Chế phẩm bền hơn enzym tự do nhờ chúng được bảo vệ bởi chất mang. Trong các điều kiện pH, nhiệt độ, áp suất thẩm thấu bất thường enzym vẫn hoạt động được.

– Enzym cố định có tốc độ phản ứng lớn, dễ tổ chức sản xuất ở mức độ tự động hóa cao.

– Nhờ sự cố định mà enzym không lẫn vào sản phẩm cuối, tiết kiệm được thời gian và chi phí cho việc tinh chế sản phẩm.

– Enzym cố định bảo quản tốt hơn enzym tự do cùng loại.

https://nhathuocngocanh.com/

* Nhược điểm

– Sự gắn của enzym vào chất mang có thể dẫn đến sự thay đổi một phần nào cấu trúc của enzym, từ đó có thể làm giảm hoạt tính của enzym so với ban đầu.

– Mặt khác, sự cản trở về không gian do liên kết với chất mang làm hạn chế sự tiếp xúc giữa enzym và cơ chất.

Bảng 6.6. Đặc điểm kỹ thuật của các hệ thống enzym cố định

Thuận lợi	Bất lợi
Tái sử dụng chất xúc tác	Mất hay giảm hoạt tính
Dễ vận hành thùng phản ứng	Khả năng khuếch tán giới hạn
Dễ tách sản phẩm hơn	Tăng chi phí xúc tác
Dễ lựa chọn nồi phản ứng	

Từ đó chúng ta có thể thấy rằng việc sử dụng enzym cố định mang lại lợi ích kinh tế cao hơn so với việc sử dụng enzym tự do.

6.3. Ứng dụng của enzym cố định

Hiện nay trên thế giới có rất nhiều loại enzym được điều chế dạng cố định, các chế phẩm enzym cố định đã được ứng dụng rất hiệu quả trong thực tế.

Bảng 6.7. Một số sản phẩm chủ yếu được sản xuất bằng enzym cố định

Enzym	Sản phẩm
Glucose isomerase	Siro bắp có hàm lượng fructose cao
Amino acid acylase	Sản xuất acid amin
Penicillin acylase	Bán tổng hợp các penicillin
Nitrile hydratase	Acrylamide
β–Galactosidase	Lactose thủy phân (bã sữa chua)

Trong y học

Sử dụng enzym dưới dạng microcapsule để đưa enzym vào chữa bệnh thiếu enzym hoặc bệnh suy giảm hoạt tính enzym. Năm 1954, Chang đã tạo ra vi tiểu cầu bán thấm có gắn enzym, nhờ đó enzym có thể tồn tại lâu trong cơ thể và tạo được nồng độ có hiệu quả mà không gây ra phản ứng phụ.

Urease gắn trong vi tiểu cầu sử dụng loại urê máu trong chạy thận nhân tạo. Vi tiểu cầu chứa catalase thay thế hiệu quả các catalase thiếu trong cơ.

Enzym cố định được ứng dụng trong chẩn đoán bệnh như kỹ thuật ELISA. Ngoài ra, enzym cố định còn có triển vọng trong chữa ung thư bằng cách đưa vi

https://nhathuocngocanh.com/

tiểu cầu có gắn enzym L–asparaginase vào cơ thể. Chúng sẽ ức chế sự phát triển của một số khối u ác tính bởi sự phát triển của các khối u này phụ thuộc vào sự có mặt của L–asparagin.

Một số ứng dụng khác của enzym cố định là nghiên cứu cấu trúc enzym, cấu tạo màng tế bào, mô hình hóa hệ thống enzym trong tế bào.

Trong công nghiệp

Ứng dụng của enzym cố định trong công nghiệp khá đa dạng và mang lại hiệu quả kinh tế cao.

– Các chế phẩm enzym không tan trong công nghệ thực phẩm: catalase để khử trùng sữa, glucoisomerase để đồng phân hóa sản xuất fructose, glucooxydase để sản xuất acid glutamic,...

– Sử dụng aminoacylase cố định để sản xuất acid amin, sản xuất L–acid aspartic bằng aspartase cố định, sản xuất nhóm penicillin acid 6–amino penicillinic (6–APA) bằng enzym cố định penicillinamidase,...

Trong kỹ thuật sinh hóa

Ngày nay người ta sử dụng phương pháp phân tích bằng enzym dựa trên điện cực tiếp xúc với dung dịch nghiên cứu có chứa cơ chất của enzym, trong lớp điện cực sẽ xảy ra phản ứng enzym. Bằng cách này, người ta đã xác định liên tục nồng độ glucose nhờ glucooxidase không tan. Clark cũng dựa vào nguyên tắc này để ra phương pháp xác định methanol, ethanol trong nước và hơi nước nhờ điện cực alcoloxydoreductase cố định.

Trong bảo vệ môi trường

Chất thải của các nhà máy chế biến thực phẩm, rượu, bia,... là nguồn ô nhiễm nặng cho môi trường do giàu hữu cơ. Việc sử dụng enzym cố định để xử lý những chất thải đó làm giảm thiểu hàm lượng hữu cơ trước khi thải ra môi trường bên ngoài.

6.4. Vật liệu cố định

Vật liệu cố định (hay chất mang) và phương pháp cố định là hai yếu tố quyết định hiệu quả của quá trình cố định. Đặc điểm và tính chất của chất mang là cơ sở để lựa chọn phương pháp cố định enzym. Không có chất mang nào thích hợp cho tất cả các loại enzym và cũng không có enzym nào thích hợp với tất cả các loại vật liệu cố định.

Yêu cầu đối với chất mang

Chất mang được sử dụng trong kỹ thuật cố định enzym cần đáp ứng một số yêu cầu sau:

– Chất mang phải rẻ tiền, dễ tìm hoặc dễ tổng hợp.

https://nhathuocngocanh.com/

– Chất mang phải có tính cơ lý ổn định, bền vững để chịu được các tác động trong quá trình cố định enzym như khuấy trộn, lọc, rửa với các loại dung môi...

– Chất mang phải bền vững về mặt hóa học, không hòa tan trong môi trường phản ứng.

– Chất mang phải có diện tích bề mặt lớn, có khả năng trương nở trong môi trường nhằm vừa làm tăng tỷ lệ cố định của enzym lên chất mang vừa làm tăng khả năng tiếp xúc của cơ chất với enzym cố định.

Không có một chất mang lý tưởng đáp ứng tất cả các yêu cầu trên, tùy vào enzym và yêu cầu xúc tác để thử nghiệm thăm dò và lựa chọn chất mang phù hợp.

Phân loại chất mang

Chất mang hữu cơ

Loại chất mang này được chia làm hai nhóm gồm polyme tự nhiên và polyme tổng hợp. Chúng thường có các nhóm hoạt động hóa học như $-NH_2$, –COOH, –OH, –SH,... nên khả năng gắn kết với enzym tương đối tốt.

Chất mang là polyme tự nhiên:

Chất mang loại này có tính tương thích sinh học cao với enzym nhưng kém bền vững với các tác nhân môi trường, dễ bị vi sinh vật phân hủy.

Các polysacchride như cellulose, agarose, dextran, sephadex, gelatin, collagen,... và các dẫn xuất của chúng là nhóm chất mang đang được sử dụng khá rộng rãi.

Các protein như gelatin, keratin, albumin cũng thường được sử dụng. Nhóm này dễ tạo màng, tạo hạt và có nhóm chức năng là $-NH_2$. Vì vậy chúng thường được dùng bắt giữ enzym với tác nhân nối là glutaraldehyd. Nhược điểm của nhóm này là kém bền, dễ nhiễm khuẩn.

Chất mang là polyme tổng hợp:

Các polyme này ổn định và bền vững về tính chất cơ lý, độ trương nở tốt, có thể điều chỉnh được kích thước lỗ. Chúng không bị phân hủy bởi vi sinh vật và các tác nhân môi trường. Nhược điểm là giá thành cao, khả năng tương thích sinh học kém, không phân hủy trong tự nhiên.

Hiện nay có rất nhiều polyme và dẫn xuất polyme tổng hợp được sử dụng để cố định enzym như polyacrylamid, polyvinylacetat, polystyren, polypropylen, polyethylen,...

Chất mang vô cơ

Các chất mang thuộc loại này bền với tác động bên ngoài, không bị phân hủy bởi vi sinh vật, có cấu tạo xốp, phân tử nhỏ, mịn nên dễ hấp phụ enzym. Tuy

https://nhathuocngocanh.com/

nhiên, chúng gắn kết với enzym yếu, chỉ phù hợp với các phương pháp cố định vật lý. Chất mang loại này tương đối rẻ tiền và dễ tìm.

Các chất mang vô cơ thường được sử dụng: các oxid kim loại (silic oxid, nhôm oxid, magiê oxid,...), một số muối ($CaCO_3$, $CaSO_4.H_2O$, $K_2C_2O_4$, Na_2SO_4, KNO_3, NaCl, EDTA–Na_2,...), thủy tinh xốp, zeolit, kaolin, bentonite,...

Bảng 6.8. So sánh một số phương pháp cố định

Đặc tính	Phương pháp liên kết với chất mang			Phương pháp khác	
	Hấp phụ vật lý	Liên kết ion	Liên kết đồng hóa trị	Liên kết chéo	Bắt giữ
Kỹ thuật	Dễ	Dễ	Khó	Khó	Khó
Hoạt tính enzym	Thấp	Cao	Cao	Trung bình	Cao
Tính đặc hiệu cơ chất	Không đổi	Không đổi	Thay đổi	Thay đổi	Không đổi
Lực liên kết	Yếu	Trung bình	Mạnh	Mạnh	Mạnh
Khả năng tái cố định	Có thể	Có thể	Không	Không	Không
Khả năng ứng dụng	Thấp	Trung bình	Trung bình	Thấp	Cao
Chi phí cố định	Thấp	Thấp	Cao	Trung bình	Thấp

6.5. Các phương pháp cố định enzym

Tiêu chí của việc cố định là sao cho chất xúc tác đã cố định vào chất mang thì không thể tách ra mà không có sự phá hủy hoạt tính enzym hay chất mang. Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp người ta vẫn áp dụng các phương pháp có tính thuận nghịch. Để cố định một enzym bất kỳ cần phải thực hiện tuần tự các bước sau đây:

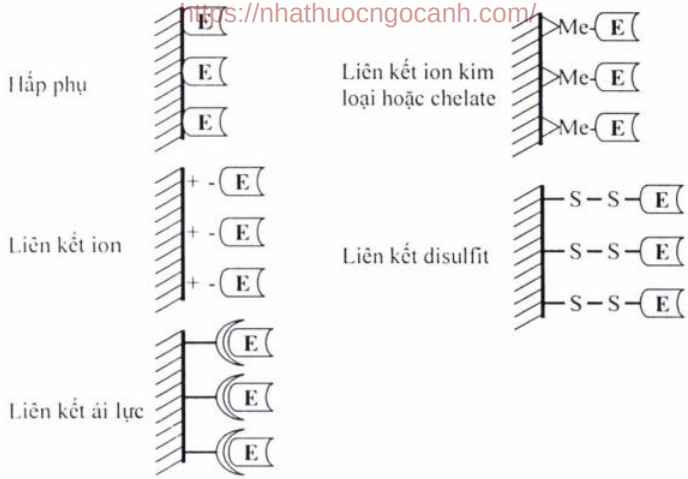
- Chọn chất mang phù hợp với enzym cần gắn kết với nó
- Hoạt hóa chất mang cho khả năng gắn tốt hơn
- Áp dụng kỹ thuật cố định phù hợp với enzym và chất mang đã chọn

Dựa vào bản chất các liên kết giữa chất mang và enzym, người ta phân loại các phương pháp cố định như sau:

6.5.1. Các phương pháp cố định enzym thuận nghịch

Enzym cố định bằng phương pháp này có thể tách ra khỏi chất mang ngay ở điều kiện bình thường. Phương pháp này được sử dụng với những lý do kinh tế, vì khi hoạt tính của enzym cố định suy giảm thì chất mang có thể được tái sử dụng để nạp lại enzym mới. Giá thành của chất mang thường là yếu tố chủ yếu quyết định giá thành của enzym cố định. Sự cố định enzym thuận nghịch đặc biệt quan trọng đối với việc cố định các enzym không ổn định và việc ứng dụng trong các hệ thống phân tích sinh học.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 6.6. Các kiểu cố định thuận nghịch chính

Đặc điểm của enzym cố định theo các phương pháp này:

- Các bước thực hiện dễ dàng, điều kiện nhẹ nhàng.

- Phương pháp này ít gây ảnh hưởng đến enzym so với các phương pháp cố định khác vì việc gắn kết chủ yếu dựa vào liên kết hydro và lực van der Waals.

- Hoạt tính enzym cố định thường cao.

- Độ liên kết giữa enzym và chất mang trong phương pháp này lỏng lẻo nên enzym dễ hòa tan trở lại, liên kết dễ bị cắt đứt khi có các tác động cơ học hoặc tác động của môi trường.

- Hiệu suất cố định enzym lên chất mang không cao.

Một số phương pháp cố định enzym không thuận nghịch:

Hấp phụ

Đây là phương pháp cố định đơn giản nhất, dựa trên sự hấp phụ vật lý hoặc liên kết ion. Chất hấp phụ và enzym được trộn lẫn với nhau trong một khoảng thời gian nhất định để sự hấp phụ xảy ra nhờ tương tác bề mặt như liên kết hydro, lực van der Waals, cầu nối ion, tương tác kỵ nước.

Liên kết ion

Sự cố định này dựa vào nguyên lý tương tác protein–ligand được sử dụng trong sắc ký. Chẳng hạn, một trong những ứng dụng của nguyên lý sắc ký trên enzym cố định thuận nghịch là sự trao đổi ion. Mặc dù phương pháp này đơn giản và thuận nghịch nhưng khó tìm được các điều kiện để enzym vẫn bền vững và hoạt tính hoàn toàn.

https://nhathuocngocanh.com/

Liên kết ái lực

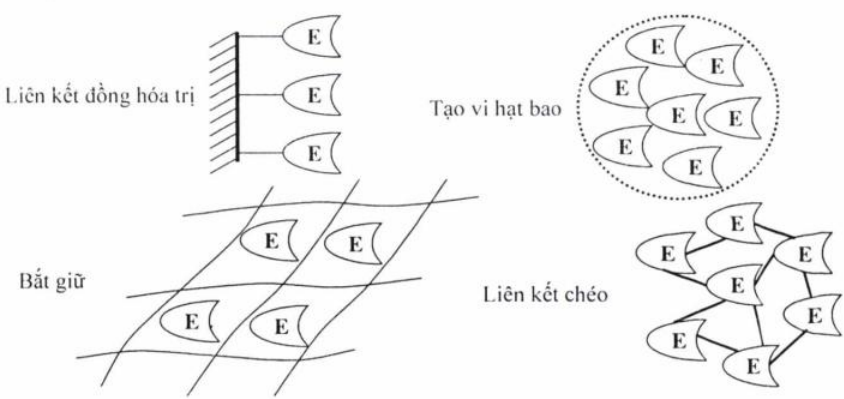
Nguyên lý ái lực giữa các phân tử sinh học được ứng dụng vào việc cố định enzym. Tính chọn lọc đặc biệt của tương tác này chính là lợi điểm của phương pháp. Tuy nhiên, quy trình này thường sử dụng các ligand có ái lực (kháng thể, lectin) có giá thành cao.

Liên kết disulfide

Phương pháp này đặc biệt vì mặc dù là một liên kết đồng hóa trị bền vững hình thành giữa chất mang và enzym, nhưng nó có thể bị phá vỡ bằng phản ứng với một tác nhân phù hợp như dithiothreitol dưới những điều kiện nhẹ nhàng. Thêm vào đó, khả năng phản ứng của các nhóm thiol có thể điều chỉnh theo sự thay đổi pH.

6.5.2. Các phương pháp cố định enzym không thuận nghịch

Cố định không thuận nghịch nghĩa là các chất xúc tác sinh học đã gắn kết với chất mang không thể tách ra khỏi nhau, sự tách ra sẽ phá hủy hoạt tính sinh học của enzym hoặc chất mang. Quá trình cố định enzym không thuận nghịch thường được tiến hành bằng các cách như liên kết đồng hóa trị, bắt giữ, tạo vi nang bao, liên kết chéo.



Hình 6.7. Các kiểu cố định không thuận nghịch chính

Phương pháp gắn enzym bằng liên kết đồng hóa trị với chất mang

Phương pháp này dựa vào ái lực giữa enzym và chất mang để tạo phức giữa enzym – chất mang bằng liên kết cộng hóa trị. Cầu nối này có kích thước vừa phải, một đầu gắn với chất mang polyme, đầu kia gắn với enzym. Điều cơ bản để gắn enzym và chất mang là bằng cách nào để các nhóm thể hiện hoạt tính của enzym không bị tham gia vào phản ứng gắn kết. Một ưu điểm của phương pháp

https://nhathuocngocanh.com/
này là liên kết tự nhiên được hình thành giữa enzym và chất mang bền vững nên enzym không thể tách ra và đi vào dung dịch trong lúc sử dụng.

Phản ứng được tiến hành trong điều kiện nhẹ nhàng để không làm biến tính enzym. Quá trình gắn kết giữa enzym và chất mang có thể tiến hành theo hai cách sau:

– Liên kết trực tiếp: nếu chất mang có chứa các nhóm có khả năng gắn trực tiếp với nhóm amin của protein trong enzym thì các phân tử enzym sẽ gắn vào chất mang bằng liên kết đồng hóa trị tạo thành một cao phân tử không hòa tan.

– Liên kết gián tiếp: chất mang liên kết với enzym thông qua chất trung gian (chất hoạt hóa). Kiểu này được sử dụng khá phổ biến, quá trình này xảy ra theo hai giai đoạn:

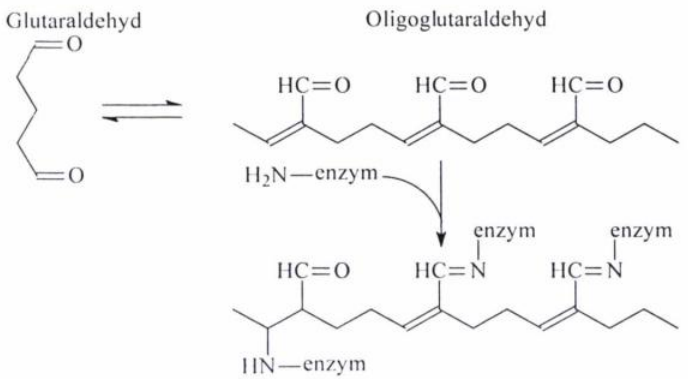
+ Giai đoạn 1: hoạt hóa chất mang bằng cách gắn chúng lên những nhóm chức có khả năng phản ứng tốt hơn.

+ Giai đoạn 2: tạo liên kết giữa các nhóm chức gắn lên chất mang với enzym.

Thông thường, các chất hoạt hóa gồm hai nhóm chức ở hai đầu phân tử tương tự nhau, khi phản ứng thì một nhóm tác dụng với enzym còn một nhóm tác dụng với chất mang. Chẳng hạn như glutaraldehyd cũng hay được sử dụng làm cầu nối để gắn enzym vì nó chứa hai nhóm –CHO ở hai đầu, ở pH trung tính sẽ liên kết được với các nhóm amin $-NH_2$ tự do.

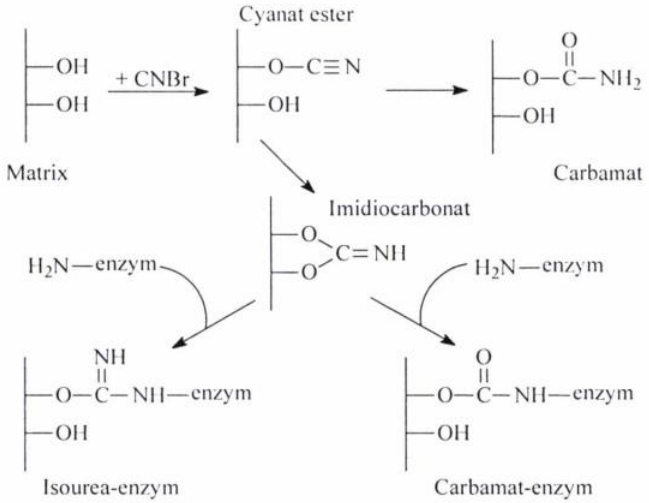
Người ta thường dùng các phương pháp sau để hoạt hóa chất mang:

– Hoạt hóa chất mang bằng glutaraldehyd: dùng để hoạt hóa chất mang có chứa nhóm amin như polyacrylamid, amino ethyl cellulose, chitin, chitosan,...



– Hoạt hóa chất mang bằng cyanogenhalogenide: chất hoạt hóa này thường dùng cho các chất mang có chứa nhóm –OH như các polysaccharide (cellulose, dextran, agarose,...).

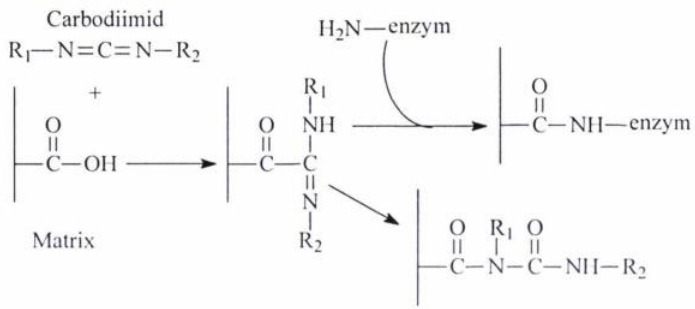
https://nhathuocngocanh.com/



– Hoạt hóa chất mang bằng phản ứng diazo: hoạt hóa các chất mang có chứa nhóm amin vòng như polyaminostyrene, aminobenzen cellullose...

– Hoạt hóa chất mang bằng phương pháp azid: dùng hoạt hóa các chất mang có chứa nhóm –COOH như carboxymethylcellulose. Giá thể được chuyển hóa thành dẫn xuất methylester, sau đó chuyển hóa thành hydrazit khi phản ứng với hydrazin và cuối cùng là azid. Azid phản ứng với enzym ở điều kiện nhiệt độ thấp 0°C – 5°C, pH 7–8.

– Hoạt hóa chất mang bằng carbodiimide: dùng hoạt hóa chất mang có chứa nhóm –COOH. Khi có mặt N,N–dicyclohexilcarbodiimid, enzym dễ dàng liên kết cộng hóa trị với chất mang. Phản ứng xảy ra ở môi trường acid yếu (pH 5). Đây là phương pháp cố định những enzym phản ứng trong môi trường acid như amylase, pepsin, cellulase.



https://nhathuocngocanh.com/

– Hoạt hóa chất mang bằng phương pháp alkyl hóa: nhóm halogen trên vật liệu cố định dễ dàng phản ứng với nhóm amino, nhóm sulfihydryl của enzym. Những chất mang halogen acetyl cellulose có thể hoạt hóa theo phương pháp này.

Chất mang sử dụng trong phương pháp này là polyme hữu cơ, cellulose và các dẫn chất cellulose (CMC, DEAE), agarose ở những dạng cải biến khác nhau, polyme tổng hợp (polyacrylamid, polyurethan), chất vô cơ (silicagel, $Al(OH)_3$),...

Phương pháp bắt giữ enzym vào khuôn gel

Phương pháp này dựa trên nguyên tắc sự hút giữ của enzym vào một mạng lưới mà cơ chất và sản phẩm đi qua được nhưng không cho enzym khuếch tán vào môi trường. Kích thước lỗ trên mạng lưới được kiểm soát sao cho đủ nhỏ để enzym không thoát ra được, mạng lưới chất trùng hợp càng nhỏ enzym sẽ được giữ chặt hơn.

Một số phương pháp bắt giữ enzym:

– Tạo gel nhờ liên kết ion giữa những phân tử có khối lượng phân tử lớn với ion đa hóa trị. Ví dụ: alginate, CMC, alginate và CMC...

– Tạo gel nhờ thay đổi nhiệt độ. Ví dụ: agarose, gelatin...

– Tạo mạng lưới của các polyme nhân tạo dưới tác động của hóa chất, hoặc các tác nhân quang hóa. Ví dụ: polyacrylamid...

– Tạo ra chất mang nhờ sự kết dính của các chất không tan trong dung môi.

Phương pháp này có thể tiến hành bằng cách trộn lẫn enzym với polyme sau đó tạo liên kết giữa polyme và các ion đa hóa trị để tạo thành cấu trúc mạng lưới giữ enzym. Bên cạnh đó có thể cố định bằng cách trộn enzym với monomer và các chất khâu mạch, các monomer sẽ liên kết với nhau tạo thành polyme và nhốt enzym vào các khe hở của mạng lưới. Phương pháp này được sử dụng rất phổ biến. Enzym thường được nhốt trong gel polyacrylamid, polyhydroxymethacrylat, polyvinylpyrolidone.

Với phương pháp này, enzym ít bị biến đổi trong quá trình cố định. Hiệu quả của việc nhốt enzym và hoạt tính của enzym cố định phụ thuộc vào thành phần và tính chất của gel. Nhược điểm của phương pháp là khả năng tiếp xúc với cơ chất của enzym kém, chỉ những enzym ở bề mặt gel tiếp xúc được với cơ chất nên hoạt tính enzym sau cố định thường thấp.

Phương pháp tạo vi nang bao (microencapsulation)

Enzym được giữ trong các bao vi thể có màng bán thấm dày 200 Å (cellulose, polysaccharid). Lớp màng này cho phép cơ chất và sản phẩm phản ứng enzym được qua lại tự do nhưng các phần tử enzym không thể qua lại được vì kích thước phân tử quá lớn.

https://nhathuocngocanh.com/

Như vậy, nếu cơ chất có phân tử lượng quá lớn cũng không thể qua lại màng được nên không thể thực hiện phản ứng với enzym được. Ta cũng có thể tạo vi nang bằng màng thể lỏng. Màng thể lỏng có một pha không tan trong nước cấu tạo từ các chất diện hoạt, dung môi hữu cơ và các chất ổn định.

Quá trình cố định enzym diễn ra liên tục, các vi nang được tạo thành có diện tích bề mặt lớn nên khả năng tiếp xúc của enzym với chúng cao. Phương pháp này cho phép giữ enzym trong dung dịch gần giống với enzym tự do. Phương pháp tạo vi nang dùng để cố định hệ đa enzym rất tiện lợi.

Giữ enzym bằng màng siêu lọc

Enzym được hòa tan tự do trong dung dịch và tiến hành phản ứng enzym ngay trong dung dịch này. Sản phẩm phản ứng được tách ra nhờ màng siêu lọc chọn lọc, còn cơ chất và enzym được giữ lại ở phía bên kia của màng. Các màng siêu lọc này được tạo từ polyme tự nhiên hoặc tổng hợp.

Ảnh hưởng của sự cố định đến hoạt tính của enzym

Khi gắn vào chất mang, enzym sẽ bị giới hạn hoạt động trong phạm vi môi trường xác định, lúc đó cấu trúc không gian của phân tử enzym có thể bị thay đổi nên có thể làm biến đổi một số tính chất của enzym ban đầu. Ví dụ có thể thay đổi khoảng pH hoạt động, nhiệt độ hoạt động, tính đặc hiệu của enzym cũng như hằng số Michoelis. Tất nhiên những thay đổi này phụ thuộc nhiều vào bản chất của chất mang. Nói chung, enzym cố định thường trở nên bền hơn với các yếu tố gây biến tính nhưng độ hoạt động riêng thường thấp hơn enzym ban đầu.

Hoạt tính enzym cố định phụ thuộc vào bản chất của chất mang

Khi enzym được giới hạn trong phạm vi môi trường chất mang xác định sẽ xảy ra một số kiểu tương tác khác nhau của chất mang lên môi trường hoạt động vi mô bao quanh phân tử enzym cố định.

– Kiểu thứ nhất gọi là "hiệu ứng phân phối": chất mang polyme nhờ những tính chất đặc trưng sẽ lôi kéo tới bề mặt của nó hoặc đẩy khỏi cơ chất các sản phẩm phản ứng và các chất khác làm tăng hay giảm tương đối nồng độ của chúng trong phạm vi môi trường vi mô nằm sát cạnh enzym.

– Kiểu thứ hai gọi là "hiệu ứng ngăn chặn": bản thân chất mang polyme ngăn cản sự khuếch tán tự do của các phân tử hướng tới enzym (trong đó có cơ chất) cũng như đi khỏi enzym (trong đó có sản phẩm phản ứng). Từ đó ảnh hưởng trực tiếp hay gián tiếp đến hiệu quả xúc tác của enzym.

Chất mang phân tử lượng càng lớn thì càng làm giảm đáng kể hoạt tính enzym gắn vào đó so với chất mang có phân tử lượng càng nhỏ. Điều này được giải thích bởi sự cản trở không gian của phân tử chất mang đối với phân tử cơ chất trong vùng trung tâm hoạt động của enzym.

https://nhathuocngocanh.com/

Hoạt tính enzym cố định phụ thuộc vào sự khuếch tán của cơ chất, sản phẩm và các phân tử khác

Tốc độ khuếch tán của cơ chất, sản phẩm và các chất khác phụ thuộc vào các yếu tố: kích thước lỗ gel của chất mang polyme, trọng lượng phân tử của cơ chất, sự sai khác do "hiệu ứng phân phối" (sai khác về nồng độ, pH, nhiệt độ hoạt động...), trong đó hai yếu tố đầu đóng vai trò quan trọng nhất.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Thế nào là tính chọn lọc không gian của chất xúc tác, ứng dụng của nó.
2. Ưu nhược điểm của các kỹ thuật lọc trong chiết tách và cô đặc protein.
3. So sánh các phương pháp cố định enzym.
4. Loại sắc ký – nguyên lý tách nào sau đây ***không*** đúng?

   A. Trao đổi ion – điện tích

   B. Ái lực – hấp phụ

   C. Phân bố – tính phân cực

   D. Lọc gel – kích thước phân tử
5. Phương pháp cố định nào có tính thuận nghịch?

   A. Bắt giữ

   B. Tạo vi hạt bao

   C. Liên kết chéo

   D. Liên kết ion

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 7

ỨNG DỤNG ENZYM TRONG NGÀNH DƯỢC

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các yêu cầu và vấn đề cần giải quyết đối với enzym dùng trong trị liệu.

2. Nêu và cho được các ví dụ các kiểu liệu pháp enzym.

3. Trình bày được một số quy trình sản xuất thuốc sử dụng xúc tác enzym.

1. ENZYM TRỊ LIỆU

1.1. Yêu cầu đối với enzym dùng trong trị liệu

Có ba lĩnh vực sử dụng enzym trong điều trị: (1) thay thế các enzym bị mất hay kém chức năng do bệnh di truyền; (2) thay thế enzym bị mất hay kém chức năng do một bệnh mắc phải ở các cơ quan chịu trách nhiệm tổng hợp chúng; và (3) cung cấp một tác dụng sinh học đặc hiệu do đặc tính xúc tác của enzym. Ngoài ra, một số enzym được dùng trong điều trị hỗ trợ khi phối hợp với các liệu pháp khác, hay để giải độc máu hoặc mô.

Để có hiệu quả điều trị enzym cần thỏa các yêu cầu:

– Phải đến được vị trí tác động của chúng trong cơ thể hay mô.

– Phải có hoạt tính trong các điều kiện môi trường tại nơi tác động. Điều này bao gồm sự có mặt của cơ chất hay đồng cơ chất, thế oxy hóa khử, pH, sự hiện diện (hay bão hòa) của chất ức chế.

– Chúng phải đủ bền để có được các thông số dược động học cần thiết, ví dụ nồng độ /mức hoạt tính trong khoảng thời gian thích hợp.

– Độ tan thỏa mãn yêu cầu nếu được dùng theo đường tiêm bắp hay dưới da.

– Độ tinh khiết đủ cao để không có các tác dụng phụ không mong muốn do tạp chất, ví dụ nội độc tố vi khuẩn, chí nhiệt tố.

– Có hiệu quả điều trị dựa trên hoạt tính đặc hiệu của enzym được dùng.

Dĩ nhiên, vì được dùng làm thuốc nên enzym còn phải đáp ứng nhiều yêu cầu khác như các thuốc thông thường:

– An toàn đối với bệnh và chỉ định điều trị. Điều này có nghĩa là hiệu quả của liệu pháp phải cao hơn bất kỳ phản ứng phụ nào, đặc biệt đối với các biến chứng về miễn dịch học.

https://nhathuocngocanh.com/

– Hiệu quả của liệu pháp phải được chứng minh bằng các thử nghiệm lâm sàng có kiểm soát bởi cơ quan có thẩm quyền theo các quy định hiện hành.

– Dạng sử dụng thuận tiện. Điều này tùy thuộc loại bệnh được điều trị. Ví dụ, để điều trị các bệnh nguy hiểm tính mạng thì tính tiện dụng không quan trọng như khi dùng điều trị rối loạn tiêu hóa.

1.2. Giải quyết các vấn đề đặc thù của thuốc protein

Do bản chất là protein nên enzym không được xem như một thuốc lý tưởng vì:

– Không ổn định: enzym là peptid nên hiển nhiên không bền với nhiệt, pH cực đoan, chất gây biến tính, và dễ bị phân hủy sinh học. Điều này dẫn đến thời gian lưu thông ngắn và thời gian bán hủy trong cơ thể cũng ngắn, ví dụ bị thủy phân ở dạ dày do dịch vị hay ở ruột hay gan.

– Các chất ức chế nội sinh có thể hiện diện trong cơ thể, đặc biệt là trong máu, có thể dẫn đến sự ức chế hoạt tính của enzym.

– Sinh khả dụng: do bề mặt phân tử của enzym tan có tính thân nước, nên nói chung nó không thể đi qua màng tế bào (kỵ nước). Đa số thuốc enzym không có sinh khả dụng đường uống, trừ khi enzym được dùng cho các điều trị tại chỗ. Do đó, phải đưa thuốc vào qua các đường tĩnh mạch, tiêm bắp hay dưới da. Trong một số trường hợp có thể dùng đường hít để điều trị các bệnh trên đường hô hấp.

– Tính thấm tế bào: bởi vì enzym không đi vào mô thông qua thành ruột hay vào tế bào người từ máu, các thuốc protein không thích hợp cho các điểm tác động nội bào. Do vậy, hiện nay các liệu pháp enzym thành công chỉ giới hạn trong các bệnh ngoại bào như dùng tại chỗ, giải độc, và các bệnh hiếm nghèo trong phạm vi hệ tuần hoàn. Hầu hết enzym hiện dùng trong các liệu pháp thuộc họ hydrolase.

– Tính chất gây miễn dịch: các protein không phải của người là chất lạ đối với cơ thể nên có thể gây đáp ứng miễn dịch. Khi được tiêm vào máu, chúng có thể kích thích thành lập kháng thể và các đáp ứng miễn dịch tế bào. Điều này có thể ngăn cản việc dùng lặp lại của thuốc (trong khi đối với vaccin thì tính gây miễn dịch là một yếu tố cần thiết để protein dùng làm vaccin có hiệu quả). Trong một số trường hợp, các enzym không phải của người được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền sẽ ít gây miễn dịch hơn các enzym tự nhiên, có lẽ do độ tinh khiết cao hơn và quá trình tinh chế ít gây biến tính protein hơn. Tuy nhiên, ngay cả với các protein tái tổ hợp của người, tính gây miễn dịch vẫn có thể là một vấn đề nếu protein đột biến (mutein) được sử dụng, hoặc nếu quá trình sản xuất không đảm bảo loại bỏ được các protein gập không đúng.

– Phản ứng dị ứng có thể xảy ra khi hít phải bột enzym, đặc biệt là các protease.

https://nhathuocngocanh.com/

– Sản xuất và kiểm định: enzym là các phân tử phức tạp đòi hỏi các quy trình sản xuất rắc rối, dẫn đến giá thành sản xuất cao. Hơn nữa, số phương pháp kiểm định enzym hay protein cũng giới hạn, ngay cả với các phương tiện kỹ thuật tân tiến hiện nay. Điều này làm cho việc kiểm nghiệm sản phẩm trở nên khó khăn.

Mặt khác, có một số điểm thuận lợi trong việc dùng enzym để điều trị:

– Ít tác dụng phụ hơn (bao gồm tác động gây quái thai) so với thuốc thông thường.

– Thời gian phát triển ngắn: với các tiến bộ về thuốc protein tái tổ hợp trong những năm 1980, thời gian để nghiên cứu và phát triển của một thuốc enzym mới ngắn hơn đáng kể và tỷ lệ thất bại trong quá trình thử nghiệm lâm sàng hay tiền lâm sàng thấp hơn so với các thuốc thông thường.

Do đó, nhiều thử thách đang đặt ra đối với nỗ lực phát triển các enzym thành liệu pháp điều trị:

– Cải thiện tính ổn định: nhiều cách tiếp cận để kéo dài tuổi thọ thuốc như liên hợp với polyethylen glycol (PEGylat hóa); liên kết chéo hóa học; phát triển của hệ thống phóng thích có kiểm soát hay trữ thuốc. Ví dụ, tạo vi nang enzym trong các polyme như đồng polyme poly (lactid) – poly (glycolid), hay bao enzym trong các liposom nhân tạo hay xác tế bào máu; hoặc các vị trí nhận thụ thể bằng cách thiết kế các enzym đột biến.

– Giảm tính gây miễn dịch. Ví dụ, bằng cách biến đổi hóa học (PEGylat hóa) hay di truyền để che hay loại bỏ các epitop trên bề mặt protein có thể bị nhận diện bởi hệ thống miễn dịch.

– Hướng đến mô hay tế bào một cách đặc hiệu. Điều này có thể được thực hiện bằng cách biến đổi với các nhóm đường có thể được nhận diện tới các thụ thể tế bào gan, hay tạo dung hợp di truyền với "chất định hướng đích" như các peptid nhận diện hay các phần của kháng thể. Mặt khác, có thể gắn kháng thể vào enzym đặc hiệu với đích tác động.

– Cải thiện khả năng xâm nhập mô bằng cách giảm kích thước phân tử (các thể đột biến) hay dung hợp với các trình tự làm trung gian xuyên màng.

1.3. Nguồn enzym và các hệ thống sản xuất

Enzym từ các nguồn không phải của người như vi khuẩn, nấm, động vật và nọc rắn đã được dùng cho mục đích trị liệu từ rất lâu. Do tính gây miễn dịch, các enzym này chỉ được dùng cho các vị trí bên ngoài như tiêu hóa hay dùng ngoài da. Trong các trường hợp này, độ tinh khiết, nguồn gốc, và liều dùng của các chế phẩm enzym không quá khắt khe.

Việc tinh chế enzym từ người với lượng đủ để sử dụng điều trị hay thậm chí

https://nhathuocngocanh.com/
chỉ đủ để thử nghiệm lâm sàng là một thử thách lớn về mặt công nghệ. Mặc dù vậy, một số enzym người lấy từ máu, nước tiểu, nhau thai hay nuôi cấy tế bào đã được áp dụng trong lâm sàng, như các phân đoạn máu, các yếu tố đông máu, urokinase, imiglucerase, và các enzym khác. Bên cạnh nguồn cung cấp hạn chế của nguyên liệu, một vấn đề lớn của việc lấy enzym từ người là nguy cơ nhiễm virus. Do đó, từ những năm 1980, các enzym của người có nguồn gốc tái tổ hợp được ưa chuộng hơn.

Với các sản phẩm protein dùng để điều trị thay thế thì các protein tái tổ hợp giống hệt protein của người được sử dụng là chủ yếu, nhưng hiện nay xu hướng chiếm ưu thế là phát triển các protein "thế hệ hai" trong đó trình tự acid amin được thay đổi có chủ định nhằm cải thiện hiệu quả và tính an toàn trong điều trị, hay để cải thiện năng suất sản xuất.

Một khía cạnh quan trọng của việc sản xuất các enzym tái tổ hợp dùng trong điều trị là lựa chọn hệ thống biểu hiện. Hầu hết các enzym của người ở dạng tự nhiên đều trải qua quá trình biến đổi hậu dịch mã như glycosy hóa, phosphory hóa, acetylat hóa, myristoy hóa, hay xử lý cắt bằng protease. Nếu tế bào chủ dùng để sản xuất sản phẩm tái tổ hợp không phải là tế bào nguyên thủy sản xuất ra enzym tương ứng thì quá trình biến đổi hậu dịch mã có thể khác đi. Điều này có thể ảnh hưởng đến đặc tính dược động học, dược lực học và tính chất gây miễn dịch của enzym. Và các thay đổi này cần được nghiên cứu bằng thực nghiệm đối với từng trường hợp.

Hiện nay có nhiều hệ thống biểu hiện được dùng để sản xuất các protein trị liệu:

– Sản xuất từ các dòng tế bào người hiển nhiên là tốt nhất về phương diện biến đổi hậu dịch mã nhưng có thể gặp các vấn đề về nhiễm virus.

– Sản xuất từ các tế bào động vật có vú (chủ yếu là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO) và tế bào thận chuột đồng non (BHK)) cũng thường được dùng, đặc biệt đối với các protein cần được glycosy hóa mới có hiệu quả điều trị. Sự glycosy hóa ở tế bào động vật có vú không giống tế bào người về chi tiết nhưng nói chung cũng tương tự.

– Sản xuất từ nấm men (*S. cerevisiae*) có kiểu biến đổi hậu dịch mã khác nhiều so với tế bào người; do đó, đến nay nó chủ yếu được dùng để sản xuất các protein từ nấm.

– *E. coli* không thể glycosy hóa sản phẩm. Về nguyên tắc, các hệ thống sản xuất với vi khuẩn có thuận lợi lớn vì chi phí thấp, hiệu quả kinh tế cao và không bị nguy cơ nhiễm virus. Tuy nhiên, vì các protein của sinh vật nhân thật thường không được gập đúng cách ở tế bào vi khuẩn, việc gập lại protein chính xác sau đó là cần thiết để thu enzym có hoạt tính.

https://nhathuocngocanh.com/

– Sản xuất nhờ thực vật chuyển gen hay từ sữa của các động vật chuyển gen đang được nghiên cứu và cho thấy nhiều triển vọng đặc biệt về năng suất hay các protein phức tạp như yếu tố đông máu VIII.

Hiện nay người ta cũng đang nghiên cứu một thế hệ protein trị liệu thứ ba, một kiểu liệu pháp gen, trong đó protein trị liệu không còn được sản xuất bằng con đường lên men nữa mà bởi chính bệnh nhân, vì gen mã hóa cho protein đó được đưa vào và biểu hiện ngay trong cơ thể bệnh nhân.

1.4. Một số ví dụ liệu pháp enzym

Liệu pháp enzym thay thế

Adagen (Adenosine Deaminase, ADA của bò) được sử dụng để điều trị SCID (Severe Congenital ImmunoDeficiency), enzym cắt bỏ adenosine dư thừa hiện diện trong máu của các bệnh nhân mắc bệnh di truyền thiếu hụt enzym này, nên làm giảm độc tính của chất này đối với hệ miễn dịch. Thành công của phép điều trị nhờ vào việc xử lý enzym với PEG, chất này kéo dài thời gian tác động của enzym (enzym nguyên thủy có thời gian bán hủy chỉ 30 phút), đồng thời làm giảm phản ứng miễn dịch của cơ thể đối với enzym.

Ceredase (chế phẩm tiêm alglucerase) để điều trị bệnh Gaucher, một bệnh về tồn trữ thể ly giải (Lysosomal Storage Diseases – LSD), là liệu pháp enzym thay thế đầu tiên trong đó một enzym ngoại sinh được định hướng chính xác đến nơi tác động của nó trong cơ thể. Brady và cộng sự đã cố tìm cách thay thế enzym glucocerebrosidase bị thiếu hụt ở bệnh nhân mắc bệnh Gaucher bằng enzym tương tự từ nhau thai. Sau đó công nghệ tái tổ hợp protein được áp dụng để sản xuất enzym này một cách hiệu quả hơn và enzym tái tổ hợp đã được chuẩn y để sử dụng vào năm 1994. Sự thành công về mặt thương mại của enzym này đã mở đường cho các liệu pháp enzym khác, đặc biệt là đối với các bệnh LSD khác. Ví dụ, bệnh Fabry là bệnh rối loạn tích lũy glycolipid do thiếu enzym α–galactosidase. Bệnh này ảnh hưởng chủ yếu đến hệ thống mạch máu và có thể gây suy thận, đau và đục giác mạc. Một liệu pháp sử dụng α–galactosidase tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa và một thuốc khác với enzym tương tự được biểu hiện trong tế bào người. Một sản phẩm thứ ba cũng đang được phát triển bằng cách biểu hiện trong tế bào thực vật.

Các liệu pháp enzym thay thế cho các bệnh rối loạn tích lũy polysaccharid niêm mạc (muco–polysaccharide – MPS), một dạng bệnh trong nhóm LSD, cũng đang được triển khai. Laronidase dùng để điều trị thay thế trong MPS I, do thiếu α–L–iduronidase, đã xong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn III. Enzym N–acetylgalactosamine–4–sulfatase để điều trị thay thế trong hội chứng Maroteux–Lamy (MPS VI) cũng đã hoàn thành thử nghiệm độ an toàn và hiệu

https://nhathuocngocanh.com/
quả. Bệnh Hunter (MPS II) do thiếu enzym iduronate 2–sulfatase cũng đã được thử nghiệm.

Bệnh Pompe, do rối loạn tích lũy glycogen loại II (GSDII), gây ra do thiếu α–glucosidase cũng đang được thử nghiệm với liệu pháp enzym. Bệnh chủ yếu gây ảnh hưởng đến hệ cơ. Enzym tái tổ hợp được sử dụng để thử nghiệm.

Ngoài các enzym tiêu hóa được sử dụng đường uống từ rất lâu, ngày nay nhiều bệnh enzym có thể được điều trị bằng enzym đường uống. Ví dụ, bệnh thiếu sucrase–isomaltase (Congenital Sucrase–Isomaltase Deficiency – CSID) có thể được điều trị với sacrosidase, là một β–fructofuranoside fructohydrolase của *Saccharomyces cerevisiae*. Các bệnh nhân bị CSID không thể dùng đường mía thông thường, trong khi đó thuốc cung cấp enzym để thủy phân đường giúp bệnh nhân có thể sử dụng các thực phẩm bình thường. Một bệnh khác là phenylketon niệu (Phenylketonuria – PKU) cũng đòi hỏi chế độ ăn đặc biệt. PKU do thiếu hoặc mất enzym phenylalanin hydroxylase, cần thiết để chuyển phenylalanin thành tyrosin. Thuốc điều trị PKU có thể dùng đường uống chứa enzym phenylalanin amoniac lyase (PAL) tái tổ hợp từ nấm men.

Hỗn hợp các enzym tụy gồm các lipase, protease và amylase được sử dụng trong điều trị bệnh rối loạn hấp thu ở bệnh nhân mắc hội chứng suy giảm miễn dịch (AIDS). Các enzym này cũng được dùng để điều trị chứng thiểu năng tụy, một tình trạng bệnh ảnh hưởng nhiều đến các bệnh nhân bị xơ nang (Cystic Fibrosis – CF). Lipase dùng trong hỗn hợp này có nguồn gốc từ bắp chuyển gen.

Một peptidase được dùng để điều trị bệnh Celiac, rối loạn ruột non do bị phản ứng miễn dịch với protein gliadin có trong các sản phẩm lúa mì.

Ngoài ra, enzym còn có thể dùng qua đường hô hấp. Ví dụ như Pulmozyme (Dornase á) chứa một DNase được dùng để trị xơ nang (CF). Dornase α làm loãng chất nhầy tích lũy trong phổi của bệnh nhân xơ nang.

Liệu pháp enzym dựa vào đặc tính xúc tác

Điều trị mô bị tổn thương

Trước đây nhiều enzym thủy phân protein có nguồn gốc từ thực vật hay vi khuẩn đã được nghiên cứu để thay thế việc chùi rửa vết bỏng, nhưng do chất lượng enzym chưa cao nên kết quả không khả quan.

Nhờ các công nghệ chiết tách và tinh chế mới các enzym gần đây có chất lượng và độ tinh khiết đủ cao để có ứng dụng trong lĩnh vực này. Một chế phẩm gel bôi chứa hỗn hợp các enzym chiết xuất từ dứa đang được thử nghiệm lâm sàng để điều trị bỏng nặng và vừa. Vibrolysin tái tổ hợp, một enzym thủy phân protein có nguồn gốc từ một vi khuẩn biển *Vibrio proteolyticus* được dùng để loại bỏ các protein bị biến tính của da bị bỏng cũng đang được thử nghiệm.

https://nhathuocngocanh.com/

Hoặc một enzym khác là collagenase clostridiopeptidase từ *Clostridium* cũng có triển vọng.

Chondroitinase và hyaluronidase hứa hẹn có ứng dụng trong điều trị các tổn thương cột sống vì nó có thể giúp phục hồi tủy sống bị tổn thương bằng cách loại bỏ chondroitin sulfat, vì chất này ức chế sự phát triển của sợi trục và tích tụ trong tế bào thần kinh đệm.

Điều trị bệnh nhiễm

Lysozym từ lâu được dùng như một chất kháng khuẩn tự nhiên trong nhiều thực phẩm và sản phẩm tiêu dùng. Enzym này thủy phân mạch carbohydrate trong thành tế bào vi khuẩn. Lysozym và một số enzym khác như RNase A và RNase U cũng được chứng minh có hoạt tính chống HIV, hai enzym sau tác động bằng cách phân hủy chọn lọc ARN của virus. Điều này mở ra nhiều triển vọng mới trong điều trị virus thế kỷ.

Một enzym kháng khuẩn tự nhiên khác là chitinase, thủy phân chitin. Nhiều vi sinh vật bao gồm cả vi nấm, bào tử trùng và giun sán có chứa chitin, do đó có thể sử dụng chitinase để diệt chúng. Nhiều vi khuẩn như *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* và *Clostridium perfringens* bị thủy phân bởi các enzym có nguồn gốc thực khuẩn. Bản thân thực khuẩn cũng có tiềm năng sử dụng như kháng sinh, nhất là trong tình hình vi khuẩn đề kháng với kháng sinh ngày càng nghiêm trọng.

Điều trị ung thư

Các nghiên cứu gần dây cho thấy arginin deaminase PEGylate hóa, enzym phân hủy arginin, có thể ức chế u hắc tố ở người và u tế bào gan. Cơ chế tác động dựa vào sự thiếu enzym arginosuccinate synthetase, enzym tổng hợp arginin, ở các tế bào ung thư. Do đó khi arginin bị phân hủy thì các tế bào ung thư sẽ chết do thiếu arginin; trong khi tế bào thường ít bị ảnh hưởng do tự tổng hợp được.

Một enzym được PEGylate hóa khác là asparginase cũng đã được dùng trong lâm sàng cho kết quả tốt hơn trên trẻ em bị ung thư nguyên bào lympho cấp so với enzym nguyên thủy từ vi khuẩn. Tế bào thường có thể tổng hợp asparagin, trong khi tế bào ung thư không thể tổng hợp được nên bị chết khi có mặt enzym phân hủy asparagin như asparginase. Cả enzym nguyên thủy lẫn asparginase PEGylate hóa được sử dụng hiệu quả trong điều trị hỗ trợ liệu pháp hóa trị liệu chuẩn.

Một đặc điểm của quá trình sinh ung thư là tế bào ung thư cần được nhân lên. Người ta đã chứng minh việc loại bỏ chondroitin sulfat proteoglycan bởi chondroitinase AC, hoặc kém hiệu quả hơn bởi chondroitinase B, có thể ức chế sự phát triển của khối u, sự di trú trong mạch máu và sự di căn ung thư.

https://nhathuocngocanh.com/

Liệu pháp thuốc tiền chất enzym được định hướng bằng kháng thể (antibody–directed enzym prodrug therapy – ADEPT) là một ví dụ sử dụng enzym trong liệu pháp điều trị ung thư. Kháng thể đơn dòng mang enzym đến tế bào ung thư một cách đặc hiệu, tại đó enzym sẽ hoạt hóa một thuốc tiền chất thành dạng có hoạt tính và phá hủy tế bào ung thư mà không ảnh hưởng đến tế bào thường.

Một tác dụng phụ của hóa liệu pháp trị ung thư là chứng cao acid uric máu, có thể dẫn đến viêm khớp dạng gout và các bệnh thận mạn tính. Enzym urate oxidase có thể phân hủy dạng acid uric kém tan. Một điều lý thú là gen mã hóa cho enzym này có ở người nhưng không hoạt động do có một codon vô nghĩa. Trong các năm gần đây, người ta đã cấp phép cho ít nhất năm thuốc sử dụng enzym này.

Bảng 7.1. Một số enzym được dùng trong điều trị

Số E.C.	Enzym	Nguồn	Điều trị
1.7.3.3	Urate oxidase tái tổ hợp	*Saccharomyces cerevisiae* tái tổ hợp	Cao acid uric máu ở bệnh nhân TLS
1.7.3.3	Urate oxidase	*Aspergillus flavus*	Gout; Cao acid uric máu ở bệnh nhân TLS
1.15.1.1	Superoxide dismutase	Gan bò hay tế bào hồng cầu	Viêm khớp, viêm đa khớp, hen, ngộ độc oxy ở trẻ sinh non
1.15.1.1	Superoxide dismutase tái tổ hợp	*E. coli* tái tổ hợp hay nấm men	Dự phòng loạn sản phổi – phế quản
1.15.1.1	PEG–superoxide dismutase	Gan bò	Chấn thương đầu kín
2.3.2.13	Yếu tố đông máu XIII	Huyết tương người	Chảy máu, thiếu yếu tố XIII; bệnh fibrin
3.1.1.3	Lipase	*Rhizopus arrhizus*	Trợ tiêu hóa
3.1.1.47	Yếu tố hoạt hóa tiểu cầu acetylhydrolase tái tổ hợp	*E. coli* tái tổ hợp	Nhiễm trùng máu nặng, ARDS, viêm tụy
3.1.4.12	Sphingomyelin phosphodiesterase 1 (acid sphingomyelinase) tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh Niemann – Pick typ B
3.1.6.12	*N*–acetylgalactosamine–4–sulfatase (arylsulfatase B) tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Hội chứng Maroteaux – Lang syndrome (bệnh mucopolysaccharid typ VI)
3.1.6.13	Iduronate–2–sulfatase tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Hội chứng Hunter (bệnh mucopolysaccharid typ II)

https://nhathuocngocanh.com/

Số E.C.	Enzym	Nguồn	Điều trị
3.1.21.1	Desoxyribonuclease tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh phổi tắc nghiẽn mạn tính
3.1.21.1	Desoxyribonuclease (streptodornase)	*Streptococcus haemolyticus*	Loét dạ dày (cùng với streptokinase)
3.1.21.–	T4 endonuclease V	*E. coli* nhiễm thực khuẩn T4	*Xeroderma pigmentosum*
3.1.26.4	Ribonuclease	*Rana pipiens*	U trung biểu mô ác tính, ung thư vú khó chữa, ung thư tế bào thận, kháng virus
3.2.1.1	α–amylase	Tụy lợn	Trợ tiêu hóa
3.2.1.2	β–amylase	*Aspergillus oryzae*	Trợ tiêu hóa
3.2.1.3	acid α–1,4–glucosidase tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh Pompe
3.2.1.4	Cellulase	*Trichoderma viride*	Trợ tiêu hóa
3.2.1.17	Lysozym	Lòng trắng trứng	Bệnh nhiễm (kháng sinh)
3.2.1.22	α–galactosidase tái tổ hợp	Tế bào người tái tổ hợp hay tế bào CHO	Bệnh Fabry
3.2.1.23	β–galactosidase (Lactase)	*Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus oryzae*, hay *Aspergillus niger*	Không dung nạp lactose
3.2.1.35	Hyaluronidase	Tinh hoàn bò	Trợ hấp thu; đau tim
3.2.1.45	Glucosylceramidase (β–glucocerebrosidase)	Nhau thai người	Bệnh Gaucher
3.2.1.45	Glucosylceramidase (β–glucocerebrosidase) tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh Gaucher
3.2.1.45	PEG–β–glucocerebrosidase	Nhau thai người	Bệnh Gaucher
3.2.1.76	α–l–iduronidase tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh mucopolysaccharid
–	Pancreatin (mixture of pancreatic enzymes, e.g. trypsin, chymotrypsin, lipase, α–Amylase)	Tụy lợn	Trợ tiêu hóa
3.4.21.1	Chymotrypsin	Tụy bò	Lành vết thương, trợ tiêu hóa
3.4.21.4	Trypsin	Tụy bò	Làm sạch vết thương, Trợ tiêu hóa

https://nhathuocngocanh.com/

Số E.C.	Enzym	Nguồn	Điều trị
3.4.21.5	Thrombin	Huyết tương người	Chảy máu ngoại biên; bệnh fibrin
3.4.21.7	Plasmin	Huyết tương người hay bò	Làm sạch vết thương
3.4.21.21	Yếu tố đông máu VII	Huyết tương người	Chảy máu, thiếu yếu tố VII
3.4.21.21	Yếu tố đông máu VIIa tái tổ hợp	Tế bào BHK tái tổ hợp	Bệnh ưa chảy máu A và B
–	Yếu tố đông máu VIII	Huyết tương lợn	Bệnh ưa chảy máu A
–	Yếu tố đông máu VIII	Huyết tương người	Bệnh ưa chảy máu A
–	Yếu tố đông máu VIII (chứa yếu tố von Willebrand)	Huyết tương người	Bệnh von Willebrand
–	Yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh ưa chảy máu A
–	Yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp	Tế bào BHK tái tổ hợp	Bệnh ưa chảy máu A
–	Yếu tố đông máu VIII tái tổ hợp (mất đoạn chức năng B)	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh ưa chảy máu A
3.4.21.22	Yếu tố đông máu IX	Huyết tương người	Bệnh ưa chảy máu B
3.4.21.22*	Yếu tố đông máu IX tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Bệnh ưa chảy máu B
3.4.21.34	Kallikrein	Tụy lợn	Bệnh mạch vành và mạch ngoại biên, rối loạn thụ thai
3.4.21.63	Oryzin (protease kiềm của *Aspergillus*)	*Aspergillus sp.*	Viêm
3.4.21.68	Yếu tố hoạt hóa plasminogen mô tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Nhồi máu cơ tim cấp; tắc mạch phổi cấp; sốc nhồi máu
3.4.21.68	Yếu tố mutein hoạt hóa plasminogen mô tái tổ hợp	*E. coli* tái tổ hợp	Nhồi máu cơ tim cấp
3.4.21.68	Yếu tố mutein hoạt hóa plasminogen mô tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Nhồi máu cơ tim cấp
3.4.21.69	Protein C hoạt hóa tái tổ hợp	Tế bào CHO tái tổ hợp	Nhiễm trùng máu nặng
3.4.21.73	Urokinase	Nước tiểu người hay tế bào thận người	Nhồi máu cơ tim cấp
3.4.21.73	Urokinase tái tổ hợp	*E. coli* tái tổ hợp	Nhồi máu cơ tim cấp
–	Streptokinase	*Streptococci* huyết giải β	Nhồi máu cơ tim cấp; loét dạ dày (cùng với ribonuclease)

https://nhathuocngocanh.com/

Số E.C.	Enzym	Nguồn	Điều trị
–	APSAC (phức của dẫn chất *p*–anisoylate hóa của plasminogen–streptokinase)	Huyết tương người (plasminogen)/ *streptococci* huyết giải β (streptokinase)	Nhồi máu cơ tim cấp
3.4.21.74	Ancrod	Nọc *Agkistrodon rhodostoma*	Cải thiện tưới máu; ung thư lympho, u lympho
3.4.21.74	Batroxobin	Nọc *Bothrops atrox*	Cải thiện tưới máu
3.4.21.	Sfericase	*Bacillus sphaericus*	Viêm phế quản mạn tính, viêm phổi, viêm xoang cấp
3.4.22.2	Papain	*Carica papaya*	Trợ tiêu hóa, làm sạch vết thương
3.4.22.6	Chymopapain	Nhựa đu đủ	Làm sạch nucleotid của đĩa đệm cột sống bị lệch
3.4.22.32	Bromelain	*Ananas comosus* var.	Trợ tiêu hóa; viêm
3.4.23.1	Pepsin	Dạ dày lợn	Hỗ trợ chức năng dạ dày; loét dạ dày
3.4.24.3	Collagenase	*Clostridium histolyticum*	Làm sạch vết thương; loét da
3.4.24.28	Protease	*Bacillus subtilis*	Làm sạch vết thương
	Chiết xuất chứa protease, cellulase, RNase, α– và β–amylase	*Aspergillus oryzae*	Trợ tiêu hóa
3.4.24.40	Serrapeptase (serralysin)	*Serratia* E15	Viêm
3.5.1.1	Asparaginase	*E. coli* hay *Erwinia carotovora*	Ung thư tế bào lymph cấp
3.5.1.1	PEG–asparaginase	*E. coli*	Ung thư tế bào lymph cấp
3.5.4.4	PEG–adenosine deaminase	Ruột bò	SCID
4.3.1.8	Uroporphyrinogen–1–synthase (porphobilinogen deaminase) tái tổ hợp	*E. coli* tái tổ hợp	Porphyria gián đoạn cấp

TLS: tumor lysis syndrome (hội chứng ly giải khối u)
SCID: Severe combined immunodeficiency (thiểu năng miễn dịch kết hợp nặng)
CHO: chinese hamster ovary (buồng trứng chuột đồng Trung Hoa)
BHK: baby hamster kidney (thận chuột đồng non)

https://nhathuocngocanh.com/

2. SẢN XUẤT THUỐC BẰNG CÔNG NGHỆ ENZYM

2.1. Thuốc đối quang (chiral drug)

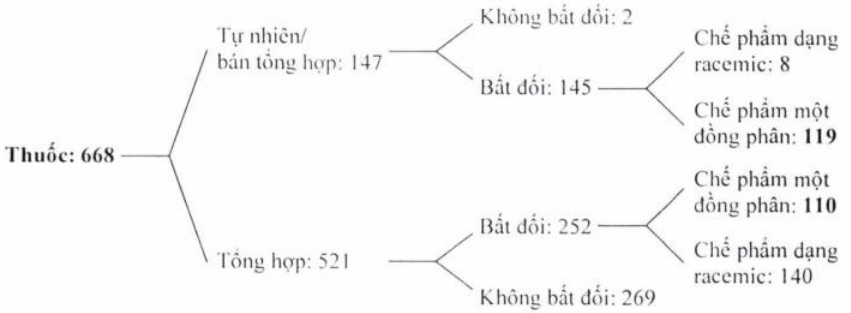
Do cấu trúc không gian của các phân tử sinh học và thụ thể ở sinh vật nên với phần lớn các phân tử có hoạt tính sinh học có đồng phần quang học thì chỉ một trong hai đồng phân có hoạt tính, hoặc các đồng phân có hoạt tính khác nhau. Bên cạnh đó, sự khác biệt giữa các đồng phân còn thể hiện ở các đặc điểm dược động học và chuyển hóa. Điều đó có nghĩa là đồng phân kia không mang lại tác dụng điều trị nhưng có thể gây ra các tác dụng phụ hoặc độc tính. Do đó về lý thuyết thuốc tinh khiết quang học (enantiopure), chỉ chứa một đồng phân, sẽ có tác dụng tốt hơn với ít độc tính và tác dụng phụ so với thuốc racemic. Gần đây công nghiệp sản xuất thuốc đã bắt đầu quan tâm nhiều đến tính chất này và đã có nhiều thuốc trước đây được đăng ký ở dạng không chỉ rõ sự khác biệt về hoạt tính của các đối quang nay được đăng ký lại bản quyền mới với chỉ một trong các đồng phân được sử dụng. Các thuốc này được sản xuất và ứng dụng trong điều trị dựa trên hoạt tính riêng của một đồng phân.

Bảng 7.2. Sự khác biệt về hoạt tính giữa các đồng phân quang học

Tác dụng dược lý chính	Khác biệt giữa các đồng phân
Thuốc chẹn β: propranolol, acebutolol, atenolol, alprenolol, betaxolol, carvedilol, metoprolol, labetalol, pindolol, sotalol, ...	l > d (d = không có hoạt tính) Ví dụ: S(–)–propranolol > R(+)–propranolol
Thuốc chẹn kênh calci: verapamil, nicardipine, nimodipine, nisoldipine, felodipine, mandipine ...	l > d Ví dụ: S(–)–verapamil > R(+)–verapamil
Thuốc giãn phế quản: albuterol (salbutamol), salmeterol và terbutaline	l > d (d = không có hoạt tính) Ví dụ: R(–)–albuterol > S(+)– albuterol
An thần: hexobarbital, secobarbital, mephobarbital, pentobarbital, thiopental, thiohexital	l > d Ví dụ: S(–)–secobarbital > R–(+)secobarbital
Thuốc gây mê: ketamine, isoflurane	d > l (l = không có hoạt tính) Ví dụ: S(+)–ketamine > R(–)–ketamine S(+)–isoflurane > R(–)–isoflurane
Giảm đau tác động trung ương: methadone	Ví dụ: R(–)–methadone > S(+)–methadone
Kháng viêm không steroid: ibuprofen, ketoprofen, benoxaprophen, fenprofen	d > l Ví dụ: S(+)–ibuprofen > R(–)–ibuprofen
An thần: nhóm 3–hydroxy–benzodiazepines: oxazepam, lorazepam, temazepam	d > l (l = không có hoạt tính) Ví dụ: S(+)–oxazepam > R(–)– oxazepam

d, (+): đồng phân quay phải; l, (–): đồng phân quay trái; S, R: cấu hình tuyệt đối

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 7.1. Thuốc đối quang và racemic

2.2. Xúc tác enzym trong công nghệ sản xuất hóa chất và thuốc

Do tính đặc hiệu cao về nhóm hóa học và đặc biệt là tính đặc hiệu về không gian, enzym được ứng dụng ngày càng nhiều trong việc tổng hợp hóa chất và thuốc, nhất là các thuốc đối quang.

Bảng 7.3. Các loại phản ứng được xúc tác bởi enzym

Lớp enzym theo IUBMB	Phản ứng xúc tác
EC 1 Oxidoreductase *Không đòi hỏi đồng cơ chất*	Oxi hóa/khử đối với –CH–OH, –C=O, –C=C, ...
EC 2 Transferase *Không đòi hỏi đồng yếu tố*	Chuyển các nhóm chức như halogen, aldehyd, keto, acyl, glycosyl, ...
EC 3 Hydrolase *Không đòi hỏi đồng yếu tố*	Thủy phân/ngưng tụ các ester, glycosid, nitril, amid, halogen, ...
EC 4 Lyase *Không đòi hỏi đồng yếu tố*	Thêm/loại bỏ; cắt các liên kết C–C, C–O, C–N
EC 5 Isomerase *Không đòi hỏi đồng yếu tố*	Đồng phân hóa, chuyển dạng cis–trans, epime hóa
EC 6 Ligase *Cần đồng cơ chất ATP*	Tạo các liên kết C–O, C–S, C–N, C–C

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 7.4. Một số ứng dụng công nghiệp của enzym cố định

Enzym	Cơ chất	Sản phẩm	Quy mô (tấn)
Penicillin amidase	Penicillin G	Acid 6–Amino penicillanic	6.000
Cephalosporin amidase	Acid Glutaryl–7–Amino cephalosporanic	Acid 7– Amino cephalosporanic	–
Amino acylase	Acid Acyl–D–L–amino	Acid L–amino	300
Aspartase	Acid Fumaric	Acid L–aspartic	1.200
Fumarase	Acid Fumaric	Acid L–malic	360
Lactase (galactosidase)	Lactose / GalGlc	Sữa nghèo lactose / Gal + Glc	–
Aspartase β–decarboxylase	Acid Aspartic	L–alanin	120
Nitrile hydratase	Acrylonitril	Acrylamid	30.000
Glucose isomerase	Glucose (sirô bắp)	Sirô giàu fructose	8.000.000
Lipase	Rac–1–phenylethyl–amin	(S)–1–phenylethyl–amin	200

2.3. Khái quát về công nghệ

Các quy trình sản xuất có thể được vận hành theo lô hoặc liên tục trong nồi phản ứng. Enzym sử dụng trong các quy trình này có thể ở dạng tự do hoặc được cố định lên vật liệu thích hợp để có thể tái sử dụng và dễ dàng tách ra khỏi hỗn hợp sản phẩm. Môi trường phản ứng có thể là nước hoặc dung môi hữu cơ tùy theo tính tan của các chất phản ứng và động học cân bằng của phản ứng. Trong nhiều trường hợp, người ta có thể sử dụng hệ môi trường hai pha gồm nước và một dung môi không trộn lẫn với nước, tuy nhiên việc kiểm soát phản ứng kiểu này rất phức tạp. Khi phản ứng thực hiện trong môi trường dung môi hữu cơ, khan nước hoặc gần như khan, chất xúc tác sử dụng thường phải được cố định để tăng độ bền, ngoài ra, trong môi trường này pH của phản ứng rất khó kiểm soát. Một số vấn đề chung cần được xem xét bất kể kiểu chất xúc tác sử dụng bao gồm:

1. Chi phí cố định phải bù đắp được bởi sự gia tăng tính ổn định hoặc hoạt tính.

2. Giảm thiểu sự mất hoạt tính trong quá trình cố định.

3. Khi enzym được cố định bằng phương pháp có tính thuận nghịch, sự rò rỉ enzym phải được nghiên cứu và có biện pháp thích hợp.

4. Sự giới hạn về luân chuyển vật chất trong chất mang cần được tính toán khi điều chỉnh pH hay nhiệt độ trong quá trình phản ứng.

https://nhathuocngocanh.com/

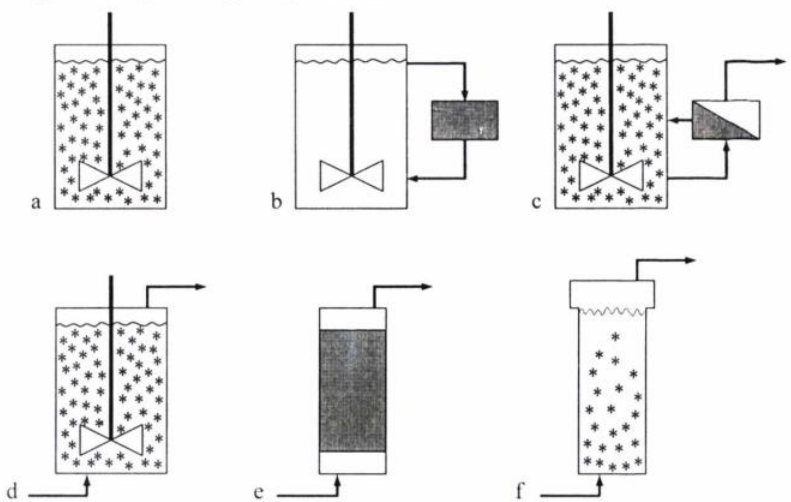
5. Với enzym tự do, hoạt tính chuyển hóa có thể đạt được cao hơn ở nồng độ enzym cao, do đó việc chuyển hóa các cơ chất khó có thể thực hiện được.

6. Tính vô trùng của phản ứng cần được quan tâm.

7. Sự tương thích của dung môi với chất mang và ảnh hưởng của dung môi đến hoạt tính cần được xem xét.

2.4. Lựa chọn nồi phản ứng

Việc lựa chọn thiết kế nồi phản ứng được dựa trên việc phân tích đặc điểm động học của phản ứng. Ví dụ, nếu enzym có đặc điểm bị ức chế bởi lượng dư cơ chất, kiểu nồi vận hành liên tục sẽ có ưu thế. Phản ứng trong đó sản phẩm có tính ức chế mạnh có thể sử dụng nồi lên men gián đoạn hoặc nồi cột nhồi (plug flow) để đạt được hiệu suất cao hơn. Kiểu nồi chiết tách (extractive bioreactor) có thể được dùng nếu cơ chất và sản phẩm có sự khác biệt về độ tan. Với kiểu nồi này có thể tránh được hiệu ứng trên hoạt tính do dung môi hữu cơ, vì enzym được tách rời với pha hữu cơ được dùng để chiết tách sản phẩm không tan. Pha nước chứa enzym sẽ được bão hòa đến khi cơ chất đạt được độ tan cao nhất. Các enzym cố định bằng cách đánh bắt trong các hạt mềm như alginat sẽ không thích hợp với nồi phản ứng có áp suất cao.

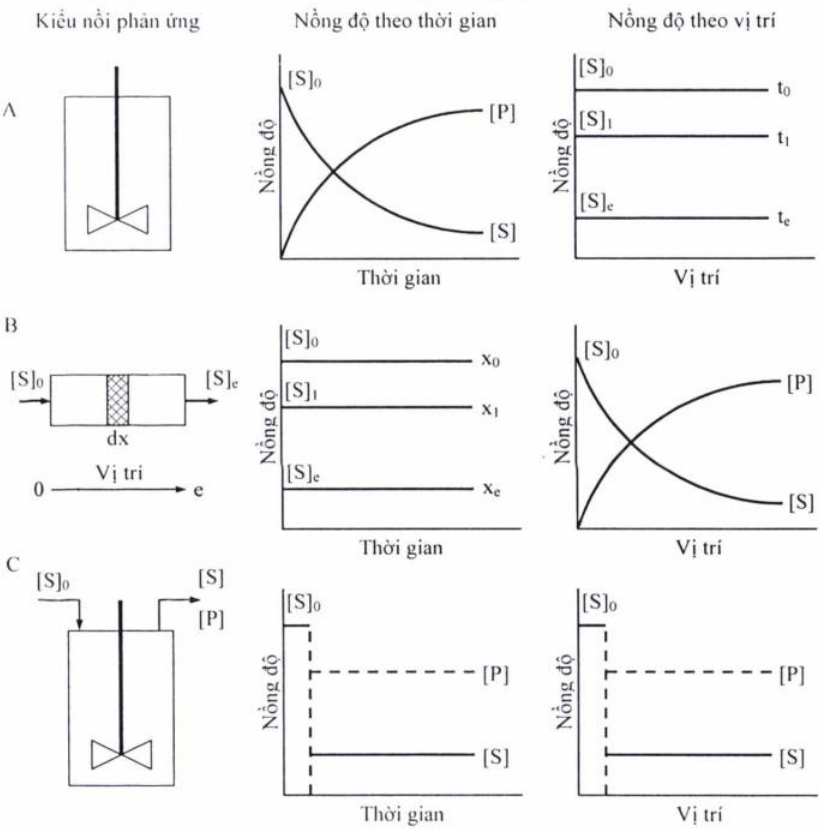


Hình 7.2. Các thiết kế chính của nồi phản ứng enzym

a) vận hành theo lô; b) vận hành theo lô có tuần hoàn; c) thùng khuấy có siêu lọc; d) thùng khuấy vận hành liên tục; e) thùng nhồi liên tục; f) tầng sôi liên tục

Phản ứng trong dung dịch nước thường được thực hiện ở nhiệt độ từ 10–80°C và ở áp suất khí quyển. Do sự ức chế của kim loại nặng đối với enzym, vật liệu

https://nhathuocngocanh.com/
chế tạo nồi phải đảm bảo không để rò rỉ các nguyên tố này. Nồi được vận hành trong các điều kiện nhằm tránh nhiễm khuẩn. Nồi và cơ chất có thể được tiệt trùng trước bằng hóa chất (ethanol, formaldehyd, ethylenoxid, Velcorin) hay hơi nước. Tia cực tím hay gamma có thể được dùng để tiệt trùng enzym đã cố định ngay trên giá mang. Việc cố định được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Các kháng sinh có thể được thêm vào hỗn hợp phản ứng để ngăn vi sinh vật phát triển trong suốt quá trình vận hành. Trong nhiều trường hợp, bản thân các chất phản ứng cũng đóng vai trò chất diệt khuẩn hay ức chế tăng trưởng như các keton hay rượu. Ở nồng độ cao (trên 500 mmol/L), dung dịch có thể trở nên vô trùng do áp suất thẩm thấu quá cao. Các quy trình công nghiệp thường được vận hành ở nhiệt độ cao (trên 55°C) do đó làm giảm nguy cơ nhiễm.



Hình 7.3. Động học của cơ chất và sản phẩm trong các kiểu nồi khác nhau

A: thùng khuấy vận hành theo lô; B: thùng nhồi vận hành liên tục; C: thùng khuấy vận hành liên tục

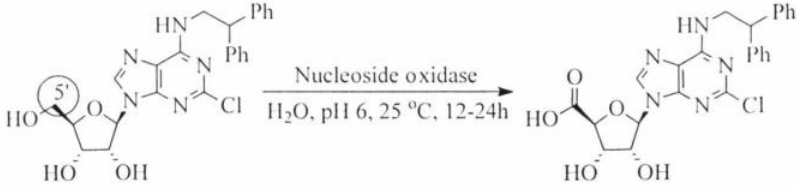
https://nhathuocngocanh.com/

Để đảm bảo chất lượng sản phẩm và hiệu suất của quá trình xử lý sau phản ứng các nồi cần được vận hành sao cho tốc độ chuyển hóa là hằng định. Để tránh ảnh hưởng do tổn thất hoạt tính enzym, thời gian thu hoạch cần được tăng dần hoặc bổ sung enzym mới.

2.5. Một số quy trình sản xuất thuốc nhờ xúc tác enzym

Oxidoreductase

Glaxo Wellcome đã phát triển một quy trình sử dụng nucleoside oxidase lấy từ *Stenotrophomonas maltophilia* (FERM BP–2252) để sản xuất các dẫn xuất 5'–carboxylic acid của các nucleoside đồng đẳng. Việc tổng hợp hóa học gặp khó khăn do tính chất không đồng nhất của hệ phản ứng và đòi hỏi phải bảo vệ các nhóm hydroxyl 2' và 3'. Phản ứng xúc tác với nucleoside oxidase có thể được thực hiện với enzym thô từ dịch chiết tế bào hoặc enzym cố định trên Eupergit–C.



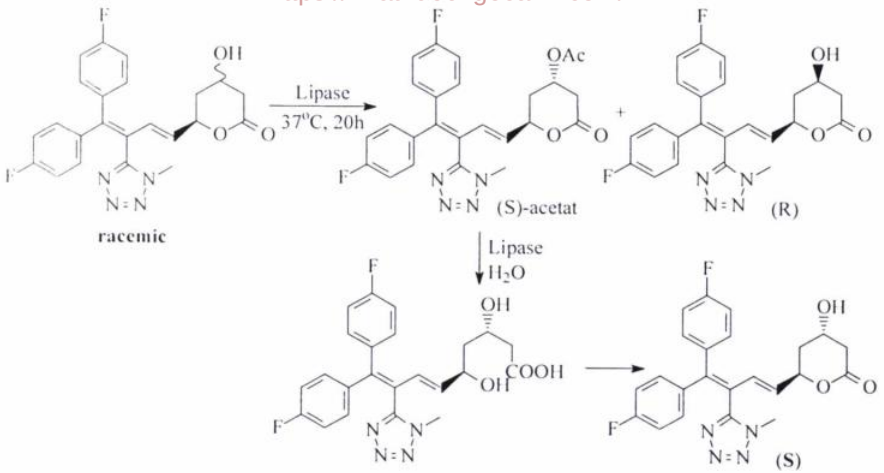
Hình 7.4. Oxy hóa nhóm CHOH thành COOH

Lipase

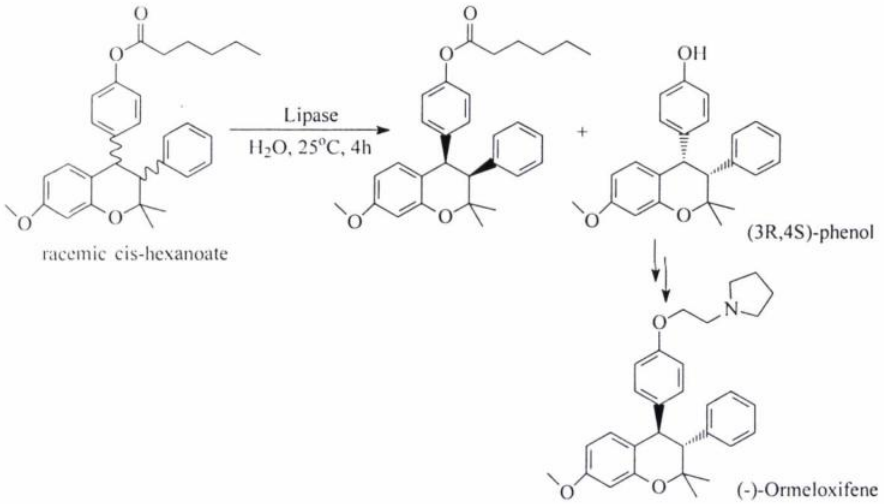
Lipase từ *Pseudomonas cepacia* (Amano PS–30) được cố định trên hạt polypropylen được sử dụng bởi Bristol–Meyers Squybb để sản xuất chất ức chế HMG–CoA reductase. Nguyên liệu lactone dạng racemic được acetyl hóa bằng enzym với dung dịch isopropenyl acetat 9 mM trong toluene để thu được dẫn xuất acetat có cấu hình (S) với hiệu suất 48%. Dẫn xuất acetat sau đó được thủy phân bởi chính enzym trên trong hệ hai pha nước/hữu cơ thành dạng hydroxy acid, và cuối cùng trả lại hoạt chất lactone với cấu hình (S) mong muốn. Quy trình được thực hiện trong nồi phản ứng lô 640 L, và thu được 2,5 kg sản phẩm mỗi ngày, lipase cố định có thể tái sử dụng được 5 lần.

Lipase từ *Candida rugosa* được sử dụng để tổng hợp (–)–Ormeloxifene, thuốc đang thử nghiệm trị loãng xương của hãng Novo Nordisk. Enzym được cố định trên Accurel cho phép tái sử dụng nhiều lần mà không bị mất hoạt tính đáng kể. Hỗn hợp racemic của cis–hexanoat được thủy phân trong môi trường nước acetonitril và thu được dạng phenol cis–(3R,4S) với độ tinh khiết quang 95% và hiệu suất chuyển đổi 50%. Chất này sau đó được gắn thêm mạch nhánh bằng tổng hợp hóa học để thu được (–)–ormeloxifene.

https://nhathuocngocanh.com/



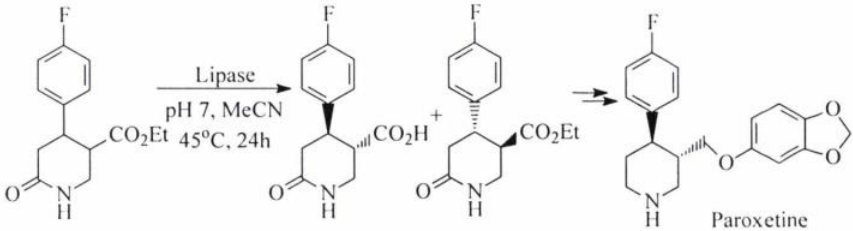
Hình 7.5. Sản xuất chất ức chế HMG–CoA reductase



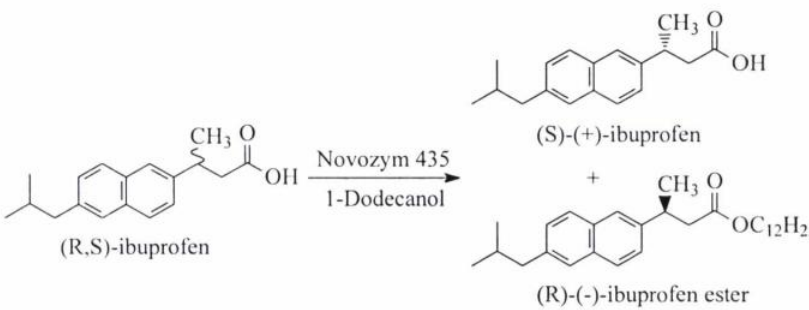
Hình 7.6. Tổng hợp (–)–Ormeloxifene

Paroxetine là thuốc chống trầm cảm, được sản xuất từ chất trung gian 4–(4–fluorophenyl)–6–oxopiperidin–3–carboxylic acid với xúc tác của lipase từ *Candida antarctica* A. Chất trung gian tinh khiết quang học sau đó được biến đổi tiếp bằng con đường hóa học thành paroxetine.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 7.7. Tổng hợp Paroxetine



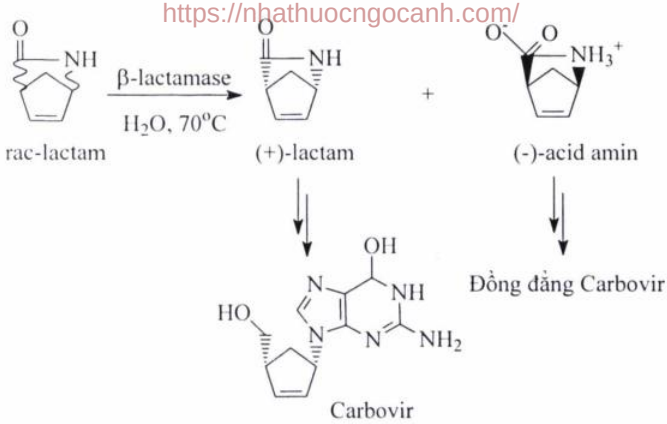
Hình 7.8. Phân giải ibuprofen racemic thành (S)–(+)–ibuprofen

Phản ứng chuyển dạng (*R,S*)–ibuprofen thành (*S*)–ibuprofen được thực hiện qua hai giai đoạn có chọn lọc quang học (enantioselective), cả hai bước đều được xúc tác bởi Novozym 435 (lipase có nguồn gốc từ *Candida antarctica*).

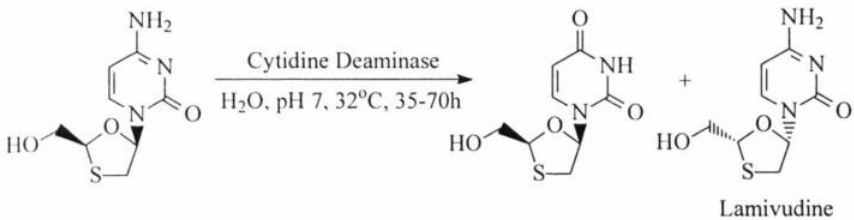
Amidase

Chiroscience đã sử dụng β–lactamhydrolase (β–lactamase) từ *Aureobacterium sp.* được cố định để phân giải lactam dạng racemic thành các dạng (+) và (–) trong quy trình sản xuất các tiền chất của nucleosid carboxylate, một chất trong quá trình sản xuất các thuốc kháng HIV–1 như carbovir và đồng đẳng. Quá trình chuyển hóa được thực hiện theo từng lô trong dung dịch nước trong đó nguyên liệu lactam racemic được luân hồi vào bình phản ứng chứa chất xúc tác được cố định. Enzym trong quy trình này có thể hoạt động liên tục hơn 6 tháng mà không bị mất hoạt tính. Phản ứng ngừng khi dạng (–)–lactam bị thủy phân hoàn toàn thành dạng acid amin, chất này sẽ kết tinh khi thêm aceton. Dạng acid amin có thể dùng để tổng hợp các đồng đẳng của carbovir, trong khi dạng (+)–lactam được biến đổi tiếp bằng hóa học để thu được carbovir trong vài bước tiếp theo.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 7.9. Phân giải lactam racemic bằng β–lactamase



Hình 7.10. Sản xuất Lamivudine tinh khiết quang học

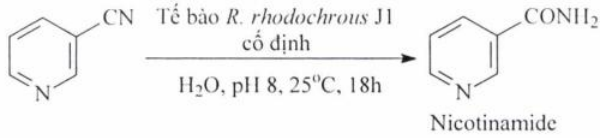
Deaminase

Sản xuất Lamivudine tinh khiết quang học (3TC, (2'*R*–*cis*)–2'–deoxy–3'–thiacytidine), một thuốc kháng HIV và HBV quan trọng, bằng con đường phân giải với enzym được phát triển bởi Glaxo Group Research Ltd. Dạng *rac*–3TC được phân giải nhờ cytidine deaminase từ *Escherichia coli*. Enzym này xúc tác phản ứng khử amin có tính chọn lọc không gian đối với (+)–3TC, tạo thành dạng keto và (–)–3TC mong muốn. Enzym được cố định trên Eupergit C, có thể tái sử dụng ít nhất 15 lần và không bị ức chế bởi nồng độ cơ chất lên đến 30 g/l. Hiệu suất của quy trình khoảng 75% với độ tinh khiết quang của 3TC đạt được là trên 99,5%.

Lyase

Lonza đã xây dựng một nhà máy tại Trung Quốc để sản xuất nicotinamide (vitamin B3) với công suất 3000 tấn bằng xúc tác sinh học từ nguyên liệu đầu là 3–cyanopyridine. Xúc tác được dùng là tế bào *Rhodococcus rhodochrous* J1 được cố định. Quy trình xúc tác sinh học này có hiệu quả vượt trội so với quy trình hóa học sử dụng phản ứng thủy phân kiềm về mặt tính chọn lọc cũng như hiệu suất (xấp xỉ 100%).

https://nhathuocngocanh.com/



Nicotinamide

Hình 7.11. Sản xuất vitamin B_3

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phân tích các thuận lợi trong việc phát triển thuốc enzym–protein.
2. Nêu một số ví dụ liệu pháp enzym.
3. Phân tích ưu điểm và cho ví dụ một số thuốc tinh khiết quang học.
4. Enzym nào sau đây được sử dụng để điều trị ung thư
   A. Asparaginase
   B. Streptokinase
   C. Uricase
   D. Pulmozyme
5. Tổng hợp paroxetin được xúc tác bằng enzym nào
   A. Lipase của *P. cepacia*
   B. Lipase của *C. antarctica*
   C. Lipase của *C. rugosa*
   D. Lipase của *C. albicans*

https://nhathuocngocanh.com/

CHƯƠNG III

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

Bài 8

CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY TẾ BÀO VÀ ỨNG DỤNG TRONG NGÀNH Y TẾ

MỤC TIÊU

1. Trình bày được các mục tiêu của việc nuôi cấy tế bào.

2. Nêu được các yếu tố kỹ thuật chính của công nghệ nuôi cấy tế bào.

3. Trình bày được các ứng dụng của công nghệ nuôi cấy tế bào trong ngành Y–Dược.

1. CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY TẾ BÀO

1.1. Khái quát

Từ cuối thế kỷ XX, công nghệ nuôi cấy tế bào đã phát triển mạnh mẽ và trở thành một bộ phận quan trọng của công nghệ sinh học. Ngày nay nó được ứng dụng nhiều trong việc sản xuất các protein quan trọng trong điều trị, đặc biệt là các protein lớn, phức tạp và cần glycosyl hóa. Các sản phẩm này được dùng để điều trị các bệnh như ung thư, nhiễm virus, các bệnh thiểu năng di truyền, dùng làm vaccin và trị nhiều bệnh mạn tính khác. Chúng đã được chứng minh là an toàn, hiệu quả và kinh tế. Giá trị kinh tế của các sản phẩm từ công nghệ nuôi cấy tế bào hiện đã vượt trên hàng tỷ USD mỗi năm.

Kỹ thuật tái tổ hợp di truyền cũng đã được phát triển và ứng dụng đối với các tế bào động vật, mở ra triển vọng cho việc sản xuất nhiều sản phẩm mới mà trước đây không khả thi, đồng thời các tế bào biến đổi di truyền này có thể được sử dụng thông qua các liệu pháp tế bào hay liệu pháp gen.

1.2. Mục tiêu nuôi cấy tế bào

Tế bào được nuôi cấy nhằm các mục tiêu chính sau:

– Sử dụng tế bào để sản xuất các protein ứng dụng trong trị liệu, làm vaccin

https://nhathuocngocanh.com/

tiểu đơn vị và chẩn đoán. Các dòng tế bào phổ biến được nuôi cấy cho mục đích này có thể kể CHO, BHK, HEK–293, WI–38, MRC–5, SP2/0, NS0 và tế bào côn trùng.

– Dùng tế bào là vật chủ để nhân bản virus dùng cho liệu pháp gen và vaccin virus. Các dòng tế bào thường dùng như Vero, HEK–293 và PER.C6.

– Các tế bào bình thường, tế bào ung thư hay tế bào gốc được nuôi cấy cho mục đích nghiên cứu khoa học hay phát triển sản phẩm. Đặc biệt tế bào được sử dụng trong việc sàng lọc hoạt tính sinh học, phát minh thuốc mới và thử nghiệm độc tính thuốc, tiến tới các mô hình phát triển và thử nghiệm thuốc không sử dụng động vật. Các tế bào thường được nuôi cấy cho mục đích này có thể là tế bào thần kinh, nguyên bào sợi, Caco–2, MRC–5 và tế bào biểu bì.

– Nuôi cấy thu hoạch tế bào để sử dụng trong liệu pháp tế bào hay y học tái tạo, ví dụ tế bào phôi và tế bào gốc.

1.3. Các dòng tế bào

Tế bào sơ cấp (primary cell) được phân lập trực tiếp từ cơ quan hay mô. Chúng thường không đồng nhất và có tính đại diện cho mô gốc. Tế bào sơ cấp có khả năng phát triển giới hạn và chỉ có thể được cấy chuyển một số lần nhất định. Các tế bào thu được từ việc cấy chuyển chọn lọc một tế bào từ dân số tạo thành dòng tế bào của loại tế bào được chọn.

Các mô bình thường chỉ cung cấp các tế bào phát triển giới hạn, trong khi tế bào thu được từ khối u có thể phát triển mãi mãi, dòng tế bào liên tục (bất tử – immortal). Tuy nhiên, cũng có nhiều dòng tế bào liên tục không có nguồn gốc từ mô ung thư như BHK 21 (baby hamster kidney fibroblast – nguyên bào sợi thận chuột đồng non), MDCK (Madin–Darby Canine Kidney epithelial cell – tế bào biểu mô thận chó Madin–Darby), và 3T3 (nguyên bào sợi).

Các dòng tế bào bất tử có thể có được một cách ngẫu nhiên, nhưng hiếm, hoặc sau quá trình chuyển dạng nhờ các chất gây ung thư, nhiễm virus hay nhờ việc đưa vào bộ gen tế bào một gen của virus hay một gen ung thư có khả năng chống lại sự lão hóa tế bào. Quá trình chuyển dạng này gọi là bất tử hóa.

Các ưu thế của dòng tế bào liên tục là: (i) phát triển nhanh hơn, đạt được mật độ tế bào cao hơn; (ii) có thể sử dụng các môi trường nhân tạo không chứa huyết thanh hay protein; và (iii) có tiềm năng nuôi cấy ở dạng huyền dịch, trong nồi lên men quy mô lớn. Nhược điểm của chúng là có nhiễm sắc thể không ổn định, có nhiều biến dị kiểu hình so với tế bào ban đầu và có sự biến mất của nhiều dấu hiệu đặc trưng.

Có nhiều phương pháp để bất tử hóa tế bào nhằm thu dòng tế bào liên tục như chuyển nhiễm hay nhiễm các gen virus (ví dụ các gen E6 và E7 human papilloma virus (HPV), gen kháng nguyên T của virus SV40T từ khỉ) hoặc gây

https://nhathuocngocanh.com/
nhiễm virus (như Epstein – Barr virus và các retrovirus). Một cách khác là tạo tế bào lai bằng cách dung hợp tế bào giới hạn với tế bào liên tục. Các dòng sau này thường áp dụng trong sản xuất kháng thể đơn dòng.

1.4. Môi trường nuôi cấy tế bào

Khái quát

Môi trường nuôi cấy tế bào tốt cần đảm bảo các điều kiện giống như trong cơ thể về mặt nhiệt độ, nồng độ oxy và dioxid carbon, pH, áp suất thẩm thấu và chất dinh dưỡng để tế bào duy trì và phát triển. Trong mô bình thường, tế bào nhận chất dinh dưỡng từ máu, do đó các môi trường nuôi cấy tế bào ban đầu được dựa vào các dịch sinh học như huyết tương, bạch huyết và huyết thanh hoặc các chất chiết từ phôi. Tuy nhiên, các môi trường loại này thường có thành phần không xác định và rất khó đảm bảo sự đồng nhất giữa các lô, do đó người ta đã cố gắng phát triển các môi trường nhân tạo có công thức xác định, môi trường không huyết thanh, nhất là trong các ứng dụng sản xuất, vì việc kiểm soát chất lượng môi trường và sản phẩm sẽ dễ dàng hơn.

Theo mục đích nuôi cấy, môi trường được chia làm 2 loại: duy trì và phát triển. Môi trường phát triển chứa các yếu tố cần thiết để tế bào phân chia và gia tăng số lượng, trong khi đó môi trường duy trì chỉ nhằm đảm bảo tế bào còn nguyên vẹn về cấu trúc và chuyển hóa, nhưng không kích thích tế bào phân chia.

Người ta thường sản xuất môi trường gồm hai thành phần: phần cơ bản, chứa các chất dinh dưỡng, muối, đệm và chỉ thị pH; và phần bổ sung chứa các yếu tố khác cần cho sự tăng trưởng của tế bào. Như vậy tùy theo yêu cầu nuôi cấy mà sử dụng các phần bổ sung khác nhau. Ngoài ra, các môi trường thường chứa kháng sinh và kháng nấm để ngăn ngoại nhiễm.

Các môi trường cơ bản phổ biến để nuôi cấy tế bào động vật có vú gồm: Eagle's medium, MEM; Eagle's medium modified by Dulbecco, DMEM; RPMI 1640; CMRLTM 1066; và Ham's F12. Các môi trường thích hợp để nuôi cấy các dòng tế bào liên tục gồm: CMRLTM 1066, MCDB 411, DMEM. F12, MCDB 301, và IMDM. Đối với các tế bào chưa chuyển dạng có thể sử dụng các môi trường như DMEM, IMDM, MCDB 104, 105, 202, 401, và 501.

Các môi trường cơ bản phổ biến để nuôi cấy tế bào côn trùng gồm: Grace's, TC 100, TNM–FH, D22, Schneider, và M3. Các môi trường này cần được bổ sung huyết thanh bê. Các môi trường không chứa huyết thanh dùng cho côn trùng như Sf900II, Ex–Cell 400, 405, và 420, Express Five1 SFM, Insect–XPRESSTM, HyQ SFX–InsectTM, và IPL 41, các môi trường này rẻ hơn và có tính đồng nhất cao so với các môi trường chứa huyết thanh.

https://nhathuocngocanh.com/

Các thành phần chính của môi trường

Nước

Nước dùng để nuôi cấy tế bào cần có chất lượng cao, không chứa các yếu tố có thể ức chế sự phát triển của tế bào như các kim loại nặng, calci, clo, sắt, nội độc tố, chất gây sốt, các phần tử rắn không tan. Thông thường nước được sử dụng cần đạt tiêu chuẩn nước pha tiêm.

Glucose

Glucose là nguồn carbon và năng lượng, thường cần từ 5 – 25 mM. Glucose nếu bị chuyển hóa không hoàn toàn sẽ sinh ra lactate, làm ức chế sự tăng trưởng. Nhiều loại tế bào cần glutamine như nguồn carbon. Glucose có thể được thay bằng mannose, fructose, galactose, hay maltose để giảm lượng lactate sinh ra, tuy nhiên, nếu sản phẩm protein cần thu phải được glycosyl hóa thì không nên thay thế hoàn toàn.

Amino acid

Các acid amin thiết yếu phải được cung cấp đầy đủ. Nguồn acid amin có thể là hỗn hợp của dạng tinh khiết hay dịch thủy phân protein, hoặc cao chiết nấm men. Lượng cần thường là 0,1 – 1 mM cho mỗi loại. Các acid amin quan trọng nhất là glutamine, methionine, và serine. Glutamine thường được cho vào ở nồng độ cao 1 – 5 mM.

Vitamin

Nhiều tế bào cần bổ sung các vitamin B, biotin, folic acid, niacin, panthotenic acid, thiamin, và ascorbic acid, vitamin A, D, E, và K. Nguồn cung cấp thường dùng là huyết thanh, cao nấm men.

Các ion

Các ion đóng vai trò tạo áp suất thẩm thấu, cân bằng ion và đồng yếu tố của enzym, thường dùng như Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}, và HCO_3^-. Đối với kiểu nuôi cấy dịch treo, nồng độ calci và magiê cần giữ ở mức thấp để ngăn tế bào kết tập hay dính lại.

Huyết thanh

Thường lấy từ bê hay phôi bò, chúng chứa acid amin, yếu tố tăng trưởng, vitamin, protein, homon, chất béo, chất khoáng và nhiều thành phần quan trọng khác. Nồng độ huyết thanh thường dùng là 2 – 20%.

Các thành phần quan trọng khác

Tế bào cần nhiều yếu tố tăng trưởng như FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), NGF (nerve growth factor), TGF (transforming growth factor), PDGF (platelet–derived growth factor), các đồng đẳng của insulin IGF–1 và IGF–2, và các interleukin hay các yếu tố kích thích sự dính vào bề mặt như fibronectin, laminin.

https://nhathuocngocanh.com/

Kháng sinh

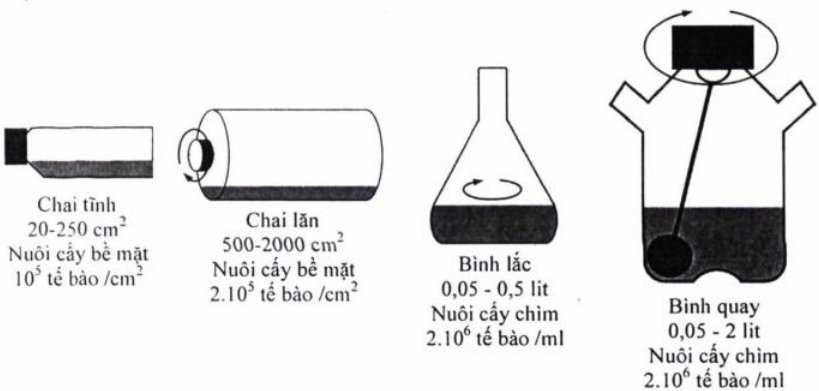
Các kháng sinh như penicillin, streptomycin, và amphotericin B có thể được thêm vào để ngăn sự nhiễm vi sinh vật, tuy nhiên cần có nồng độ giới hạn vì chúng có độc tính tế bào.

1.5. Thiết bị nuôi cấy tế bào

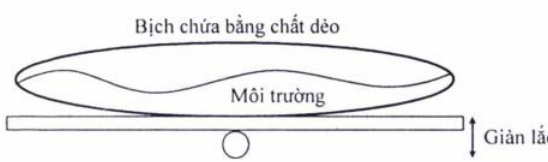
Yêu cầu chung

Nổi lên men tế bào cần đáp ứng các yêu cầu sau để đảm bảo sự phát triển đầy đủ của tế bào và năng suất tạo sản phẩm cao:

- Kiểm soát được pH của môi trường nuôi cấy
- Kiểm soát được nhiệt độ
- Có cơ chế trao đổi khí để đảm bảo cung cấp oxy và loại bỏ carbon dioxid thừa
- Cho phép cung cấp chất dinh dưỡng trong quá trình nuôi cấy
- Cung cấp đủ bề mặt cần thiết để tế bào bám trong trường hợp nuôi cấy các dòng tế bào phụ thuộc bề mặt
- Duy trì trạng thái vô trùng và tránh tạp nhiễm vi sinh vật, virus và các loại tế bào khác.

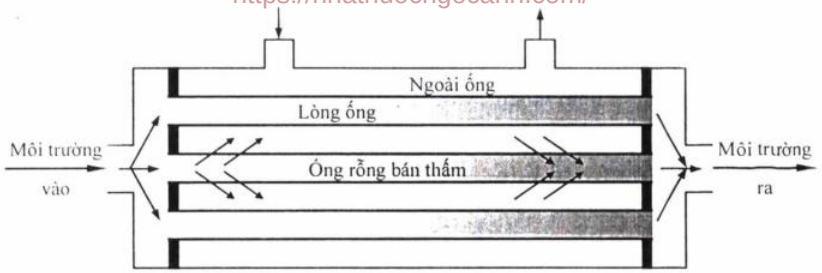


Hình 8.1. Một số kiểu bình nuôi cấy quy mô nhỏ

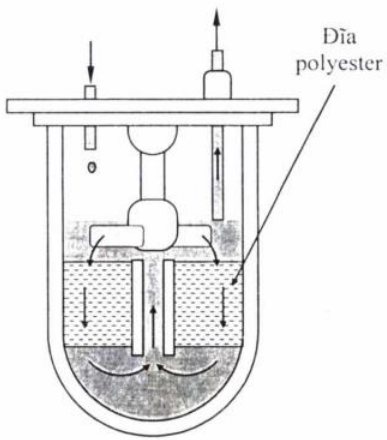


Hình 8.2. Bình nuôi cấy kiểu sóng

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 8.3. Kiểu nối sợi rỗng (hollow fiber)



Hình 8.4. Nối lên men tế bào sử dụng đĩa polyester làm giá mang

Các kiểu bình và nồi nuôi cấy tế bào chính

Các bình nuôi cấy tế bào có thể được chia theo quy mô nuôi cấy, kiểu khuấy trộn và kiểu nuôi cấy:

* *Quy mô:*

– Nhỏ: bình nuôi cấy có thể tích dưới 20 L, thường được sử dụng để nhân giống cho bình lớn hơn. Chúng có thể là chai nuôi cấy tĩnh bằng nhựa dùng một lần, chai lăn, bình quay hoặc chai lắc. Các bình này thường không được trang bị các đầu dò, thiết bị thông khí và chỉ có thể nuôi cấy gián đoạn theo từng lô.

– Lớn: dùng để sản xuất lượng lớn tế bào hoặc sản phẩm từ tế bào. Chúng thường được trang bị các thiết bị để kiểm soát thông khí, pH, nhiệt độ và có thể

https://nhathuocngocanh.com/

vận hành gián đoạn hoặc liên tục. Cấu tạo có thể bằng thủy tinh, nhựa hoặc thép không gỉ dược dụng (AISI 316L) tùy theo quy mô.

** Kiểu khuấy trộn:*

– Nuôi cấy tĩnh: không có khuấy trộn, việc thông khí đạt được nhờ sự khuếch tán oxy qua mặt thoáng, kiểu này thường bị giới hạn về quy mô.

– Kiểu thùng khuấy: khuấy nhờ chân vịt hoặc cánh khuấy, thông khí nhờ đầu phun khí đặt ở đáy nồi. Quy mô có thể lên đến 20.000 lít.

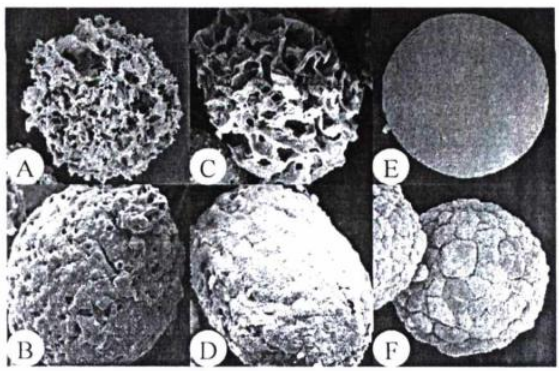
– Kiểu trộn bằng dòng khí (air–lift): nồi được thiết kế thành hai vùng, khí được phun từ dưới lên ở vùng giữa sẽ đóng vai trò khuấy trộn môi trường giữa hai vùng. Kiểu này quy mô có thể lên đến 5000 lít.

– Kiểu sóng (wave): bình nuôi cấy là một bịch bằng chất dẻo mềm được đặt trên một giá có thể lắc để trộn môi trường trong bịch. Bịch thường chỉ dùng một lần và quy mô có thể đạt đến 500 lít môi trường.

** Kiểu nuôi cấy:*

– Đồng nhất: tế bào tự do trong môi trường, do đó các điều kiện lý hóa có thể được kiểm soát dễ dàng và nhất quán tại các vị trí khác nhau trong nồi. Kiểu này chỉ áp dụng cho các loại tế bào không phụ thuộc bề mặt.

– Không đồng nhất: dùng cho các tế bào phụ thuộc bề mặt, các tế bào sẽ phát triển trên đáy bình, trên các giá mang nhúng trong môi trường hoặc trên các giá mang vi thể lơ lửng.



Hình 8.5. Ảnh chụp hiển vi của một số chất mang vi thể dùng trong nuôi cấy tế bào

(A), (C), (E): các chất mang Cytopore™, CultiSpher® G, Cytodex™ I;
(B), (D), (F) chất mang tương ứng đã có tế bào phát triển trên bề mặt sau 6 ngày

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 8.1. Một số chất mang vi thể dùng trong nuôi cấy tế bào

Sản phẩm	Chất liệu	Nhà sản xuất
Chất mang vi thể lỗ nhỏ		
Biosilon®	Polystyren có bề mặt tích điện âm	Nunclon
Cytodex™	Dextran liên kết chéo có các nhóm DEAE	GE Healthcare
Cytodex™	Dextran liên kết chéo được phủ collagen biến tính	GE Healthcare
HyQ® Sphere™	Polystyren có điện tích và lớp phủ tùy chọn	Hyclone/ SoloHill
Chất mang vi thể lỗ lớn		
Cultispher®	Gelatin lợn được liên kết chéo	Percell Biolytica
Cytoline™	Polyethylene/silica	GE Healthcare
Cytopore™	Cellulose liên kết chéo có các nhóm DEAE	GE Healthcare

2. ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ NUÔI CẤY TẾ BÀO

Các sản phẩm và ứng dụng của công nghệ nuôi cấy tế bào gồm.

2.1. Sản xuất protein

Tế bào động vật được nuôi cấy để sản xuất các protein phức tạp mà các hệ thống biểu hiện khác không thực hiện được. Các protein này có thể là tự nhiên hoặc tái tổ hợp.

– Vaccin virus: đa số virus chỉ nhân bản trong tế bào động vật, do đó trước đây để có sinh khối virus làm vaccin, người ta phải lấy từ máu hoặc mô của động vật bị nhiễm, cách làm này không hiệu quả về kinh tế và sản phẩm kém an toàn do nguy cơ tạp nhiễm cao. Công nghệ sản xuất vaccin từ nuôi cấy tế bào ra đời từ những năm 1960 đã khắc phục được các nhược điểm này. Các vaccin như viêm gan B, sởi, quai bị, rubella, dại, lở mồm long móng (Foot and Mouth Disease – FMD) đã được sản xuất hiệu quả bằng công nghệ này. Các quy trình mới đang được phát triển cho các vaccin virus như: HIV, herpes simplex, RSV (respiratory syncytial virus), CMV (cytomegalo virus), cúm,...

– Các cytokine (interferon và interleukin): mặc dù hiện nay đã có nhiều quy trình sử dụng các tế bào đơn giản hơn như nấm men để sản xuất, công nghệ tế bào vẫn đóng vai trò quan trọng trong việc sản xuất một số cytokine.

– Các yếu tố tạo máu: như erythropoietin (EPO) không thể sản xuất bằng công nghệ khác.

– Hormon tăng trưởng: mặc dù đã được sản xuất bằng *E. coli* tái tổ hợp, công nghệ tế bào vẫn tỏ ra hiệu quả trong việc sản xuất homon tăng trưởng người, công ty Serono hiện vẫn sản xuất dưới tên gọi Serostim và Saizen.

https://nhathuocngocanh.com/

– Kháng thể đơn dòng chỉ có thể sản xuất được bằng công nghệ nuôi cấy tế bào.

– Các yếu tố đông máu và phân hủy cục đông máu: yếu tố VII, VIII, IX, tPA,...

– Các sản phẩm khác như protein C hoạt hóa (APC), FSH (Follicle Stimulating Hormone), thụ thể TNF tan (Embrel), ...

Bảng 8.2. Một số protein đã cấp phép sử dụng được sản xuất bằng công nghệ tế bào

Sản phẩm	Protein	Ứng dụng	Tế bào sản xuất	Năm
Avonex	b–Interferon	Đa xơ cứng	CHO	1996
BeneFix	Yếu tố IX	Bệnh ưa chảy máu B	CHO	1997
Epogen	Erythropoietin	Thiếu máu	CHO	1989
Gonal–f	Hormon kích thích hoàng thể (FSH)	Vô sinh nữ	CHO	1995
Herceptin / trastuzumab	mAb	Ung thư vú	CHO	1998
Kogenate	Yếu tố VIII	Bệnh ưa chảy máu A	BHK	1993
Simulec/ basiliximab	mAb	Thải ghép thận cấp	Tế bào u tủy chuột	1998
Campath / alemtuzumab	mAb lai người	Bệnh bạch cầu	CHO	2001
Xolair / omalizumab	mAb lai người	Hen suyễn	CHO	2003
Avastin / bevacizumab	mAb lai người	Ung thư ruột kết hay trực tràng	CHO	2004

2.2. Liệu pháp tế bào (cell therapy)

Tế bào hoặc mô nuôi cấy được dùng để thay thế hoặc sửa chữa mô hư hỏng. Tế bào gốc được quan tâm nhiều trong những năm gần đây do khả năng biệt hóa đặc biệt của chúng thành các loại tế bào khác trong cơ thể. Các tế bào này có thể được nuôi cấy và cho biệt hóa tế bào thành tế bào đích và dùng để cấy ghép hoặc thay thế mà không bị thải loại.

Bảng 8.3. Một số ứng dụng của tế bào gốc

Nguồn tế bào	Loại tế bào	Ứng dụng
Tủy xương	Tạo máu	Ung thư, suy giảm miễn dịch, bệnh chuyển hóa, bệnh hemoglobin, nhồi máu cơ tim
Mô phôi thần kinh	Nơron	Bệnh Parkinson
Da	Biểu bì	Bỏng, loét, bệnh da di truyền
Tụy	Tụy	Đái tháo đường

https://nhathuocngocanh.com/

2.3. Công nghệ mô

Công nghệ này có quan hệ rất gần với liệu pháp tế bào nhưng nó bao gồm kiến thức của sinh học phân tử, sinh học tế bào, công nghệ vật liệu sinh học (biomaterial), công nghệ lên men, cơ sinh học, ... nhằm tạo ra mô mới. Những sản phẩm thương mại hiện nay còn rất giới hạn như keratinocyte, Apligraf (Novartis), được nuôi cấy *in vitro* để ghép cho người bị bỏng hay tổn thương da không tự lành và Carticel (Genzyme) gồm các tế bào sụn (chondrocyte) để chữa các tổn thương sụn.

Bảng 8.4. Một số sản phẩm công nghệ mô

Sản phẩm	Công ty	Chỉ định	Năm
Dermagraft–TC	Advanced Tissue Sciences	Thay thế da cho bệnh nhân bỏng	1997
Carticel®	Genzym Tissue Repair	Hư hỏng sụn	1997
Apligraf®	Novartis	Loét do viêm tĩnh mạch	1998
DACS® SC	Denderon	Hóa liệu pháp	1999

* Liệu pháp gen và ADN vaccin. Liệu pháp gen hoặc vaccin ADN đều nhằm đưa gen vào tế bào soma và cho biểu hiện trong cơ thể. Công nghệ nuôi cấy tế bào được ứng dụng theo hai cách: dùng làm tế bào chủ để sản xuất vector và nuôi cấy tế bào đã được chuyển gen để đưa vào cơ thể.

* Công cụ sàng lọc và phát triển sản phẩm mới. Tế bào được nuôi cấy để dùng cho các thử nghiệm sàng lọc, đánh giá độc tính *in vitro*, hướng đến mục tiêu thử nghiệm thuốc không dùng súc vật.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. So sánh tế bào sơ cấp và thứ cấp.

2. Các thành phần chính của môi trường nuôi cấy tế bào.

3. So sánh các chất mang vi thể.

4. Vì sao môi trường nuôi cấy tế bào thường chứa các dịch sinh học từ máu

A. Máu giàu chất dinh dưỡng

B. Nguồn cung cấp máu đa dạng

C. Các dịch này có thành phần giống môi trường tự nhiên trong cơ thể

D. Cho hiệu suất nuôi cấy cao.

5. Các sản phẩm nào ***không*** được sản xuất bằng công nghệ nuôi cấy tế bào

A. Insulin B. Erythropoietin

C. Kháng thể đơn dòng D. Yếu tố đông máu VIII.

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 9

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO GỐC

MỤC TIÊU

1. Nêu được các loại tế bào gốc, nguồn gốc xuất xứ và tiềm năng của từng loại.

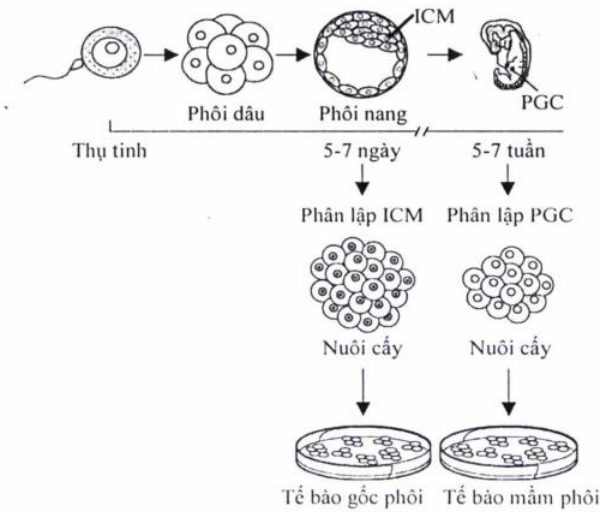
2. Trình bày các ứng dụng của tế bào gốc trong Y học.

1. KHÁI NIỆM

Tế bào gốc (stem cell) là những tế bào có khả năng tự tái sinh lâu dài và có thể tạo ra ít nhất một kiểu tế bào được biệt hóa ở mức độ cao *(hình 9.5)*.

Ở động vật có xương sống, các tế bào gốc tồn tại dưới hai dạng: tế bào gốc phôi (embryonic stem cell) và tế bào gốc trưởng thành (adult stem cell), thí dụ tế bào tủy sống, tế bào máu cuống rốn...

Bên cạnh các tế bào gốc phôi, được phân lập từ ICM (Inner Cell Mass) của phôi nang còn có các tế bào mầm phôi (embryonic germ cell) được phân lập từ nhóm tế bào mầm nguyên thủy (primordial germ cell – PGC) của các phôi 5 – 7 tuần tuổi. Đây là nhóm tế bào phát triển thành tế bào sinh dục *(hình 9.1)*.



Hình 9.1. Tế bào gốc phôi và tế bào mầm phôi

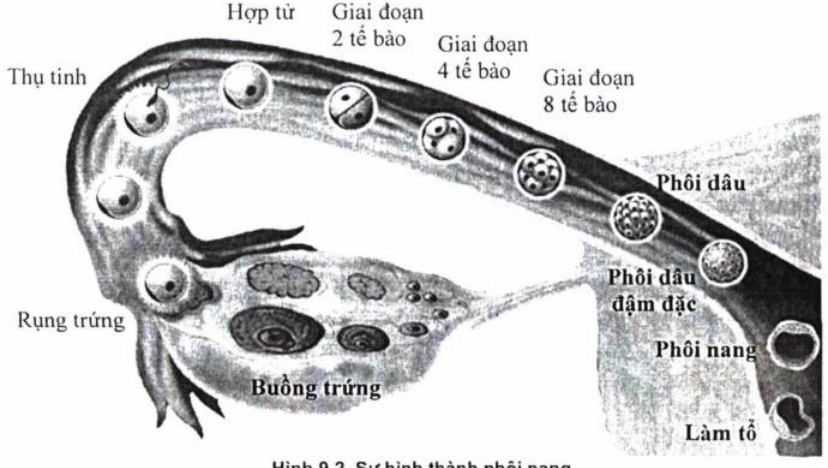
https://nhathuocngocanh.com/

1.1. Sự hình thành phôi nang

Ở người, tế bào trứng sau khi được thụ tinh tạo nên hợp tử toàn phần (zygote) *(hình 9.2)*. Đây là tế bào lưỡng bội (deploid cell 2n) đã có đầy đủ thông tin di truyền để kiểm soát và phát triển hợp tử thành một cơ thể hoàn chỉnh. Từ sự nhân đôi tế bào hình thành nên phôi dâu (morula). Các tế bào của phôi được gọi là các tế bào toàn năng (totipotent), nghĩa là các tế bào này có toàn bộ năng lực phát triển độc lập từ mỗi tế bào thành một cơ thể hoàn chỉnh. Phôi dâu phát triển thành khối tế bào hình cầu rỗng, giống quả bóng, được gọi là phôi nang (blastocyst). Sau khi thụ tinh từ 3 đến 5 ngày, khối tế bào này đã di chuyển từ vòi trứng và đến tử cung. Lúc bấy giờ, phôi nang đã tạo ra các lớp có chức năng khác nhau:

– Các lớp vỏ phôi nang là các nguyên bào (trophoblast) cấu tạo nên lá nuôi phôi sau này hình thành nên rau thai nuôi dưỡng thai nhi.

– Khối tế bào bên trong (inner cell mass – ICM) tập trung một phía ở mặt trong của phôi nang, sẽ hình thành nên cơ thể thai nhi.



Hình 9.2. Sự hình thành phôi nang

1.2. Tăng sinh và biệt hóa

Tăng sinh và biệt hóa là hai hiện tượng thường xuyên diễn ra trong suốt quá trình hình thành và phát triển của phôi, thai và cơ thể dẫn đến sự tăng lên về số lượng và chủng loại tế bào, điều này được thực hiện bởi hai quá trình tương ứng là tăng sinh và biệt hóa.

– Tăng sinh (proliferation) là hiện tượng tế bào phân chia theo cơ chế nhân đôi làm tăng số lượng. Tăng sinh thường xảy ra từ lúc sinh ra, lớn lên, già và chết. Ước tính một người trưởng thành có khoảng 10.000 tỷ tế bào (10^{13}).

– Biệt hóa (differentiation) là hiện tượng các tế bào sinh ra có cấu trúc và /

https://nhathuocngocanh.com/
hoặc chức năng không giống tế bào sinh ra nó, làm xuất hiện loại tế bào mới. Quá trình biệt hóa biến các tế bào thành các tế bào chuyên biệt (specialized cell) có các chức năng chuyên biệt trong cấu tạo và chức năng của mô, cơ quan và cơ thể.

Hầu hết tế bào trong cơ thể đều mang bộ gen (genome) giống như ở hợp tử để điều khiển việc xây dựng và vận hành cơ thể, tuy nhiên khi tế bào đã biệt hóa và trở nên chuyên biệt thì các gen không cần thiết cho hoạt động của tế bào sẽ bị "tắt" (turn off). Ví dụ tế bào phôi không cần gen điều khiển các phản ứng khử độc như tế bào gan; tế bào xương không cần các sợi cơ co bóp như tế bào cơ... tế bào càng biệt hóa càng có nhiều gen bị tắt đi và càng có ít khả năng chuyển đổi thành loại tế bào khác. Con đường biệt hóa là con đường một chiều, không thuận nghịch.

1.3. Tế bào gốc (stem cell)

Tế bào gốc là tế bào chưa có chức năng chuyên biệt (unspaecialized cell) có tiềm năng phát triển thành nhiều loại tế bào khác nhau và có khả năng tự thay mới mình (self–renewal). Tế bào gốc chưa có cấu trúc tế bào đặc trưng cho việc cấu tạo cũng như vận hành của một loại mô hay cơ quan cụ thể. Đây là loại tế bào còn chưa hoặc rất ít biệt hóa nên có thể biệt hóa theo nhiều hướng tạo ra nhiều loại tế bào chuyên biệt. Tự thay mới là khả năng sinh ra các tế bào giống hệt nhau để thay thế chúng. Thông thường các tế bào phân chia theo phương thức nhân đôi kiểu đối xứng (symetric) tạo ra hai tế bào giống nhau. Tế bào gốc có thể phân chia theo kiểu không đối xứng (asymetric) thành hai tế bào khác nhau trong đó có một tế bào không thay đổi ở mức độ biệt hóa và một tế bào đã biệt hóa hơn. Tế bào này tiếp tục phân chia và biệt hóa hơn để tạo các tế bào tiền thân (progenitor hay precursor cell) và sau đó sẽ biệt hóa tiếp thành các tế bào chuyên biệt tham gia cấu tạo và vận hành chức năng của mô cơ quan.

Trong cơ thể, các tế bào gốc được lưu trữ tại các ổ tế bào gốc (stem cell niche), nằm rải rác ở khắp các mô và cơ quan của cơ thể. Nhờ tăng sinh và biệt hóa mà các tế bào gốc cung cấp nguồn tế bào mới để tái tạo mô và giữ cho cơ thể luôn ở trạng thái cân bằng. Ổ (niche) được cấu tạo từ những tế bào và phân tử có nhiệm vụ tạo ra một vi môi trường thích hợp cùng các tín hiệu cần thiết vừa bảo vệ tế bào gốc trước các tín hiệu gây chết tế bào theo chương trình (apotosis) từ bên ngoài lọt vào, vừa điều phối hoạt động đều đặn hay tăng tốc khi cần đồng thời kiểm soát không cho phát triển thái quá dẫn đến ung thư.

Tế bào gốc phôi (embryonic stem cell).

Tế bào gốc phôi chỉ gồm một loại tế bào lấy từ các tế bào của ICM ở phôi (có thể là phôi phát triển từ trứng được thụ tinh hoặc trứng được chuyển nhân).

Tế bào gốc trưởng thành (adult stem cell).

Tế bào gốc trưởng thành là các tế bào gốc phân lập từ phôi sau khi đã làm tổ vào tử cung cho đến khi còn trong bụng mẹ hoặc trẻ em từ ngay sau khi sinh ra cho đến người trưởng thành. Người ta còn gọi tế bào gốc trưởng thành là các tế

https://nhathuocngocanh.com/

bào gốc đặc hiệu cơ quan (organ–specific stem cell) hay tế bào gốc đặc hiệu mô (tissue–specific stem cell). Nói một cách khác, tất cả tế bào gốc lấy từ các mô khác nhau của phôi sau khi làm tổ của thai, của trẻ mới sinh cho đến người già hay tế bào gốc lấy từ cuống rốn (cả trong máu và trong nhu mô) đều được gọi là tế bào gốc trưởng thành. Chữ trưởng thành được hiểu theo góc độ trưởng thành không còn non nớt và thuần nhất từ ICM của phôi nang, mà đã có đặc điểm định hình mô, định hình cơ quan khác nhau (chứ không phải lấy từ người trưởng thành).

Sự khác biệt giữa tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành

Điểm khác nhau mấu chốt giữa tế bào gốc phôi và tế bào gốc trưởng thành là:

– Tế bào gốc phôi có khả năng phân chia và phát triển vô hạn định (indifinite) và có tiềm năng biệt hóa thành tất cả các loại tế bào.

– Tế bào gốc trưởng thành chỉ có khả năng phân chia giới hạn cùng tiềm năng tạo ra một số giới hạn loại tế bào.

– Tế bào gốc trưởng thành được phân lập từ các mô nên biệt hóa hơn tế bào gốc phôi.

– Một số gen ở tế bào gốc trưởng thành đã bị "tắt" nên tế bào gốc trưởng thành không còn khả năng tạo ra tất cả các loại tế bào.

– Lộ trình biệt hóa tế bào gốc trưởng thành thành các tế bào dùng cho điều trị ngắn và đơn giản hơn tế bào gốc phôi.

– Nhược điểm và cũng là khó khăn lớn nhất cho phép ứng dụng rộng rãi tế bào gốc trưởng thành trong điều trị là số lượng tế bào hạn chế không đủ cho nhu cầu điều trị và số loại tế bào này sau một số lần phân chia nhất định sẽ bị biệt hóa.

Tiềm năng phát triển của tế bào gốc

Số lượng và loại tế bào mới được tạo ra từ tế bào gốc là không giống nhau. Có loại tế bào gốc có tiềm năng sinh ra được nhiều, có loại sinh ra được ít.

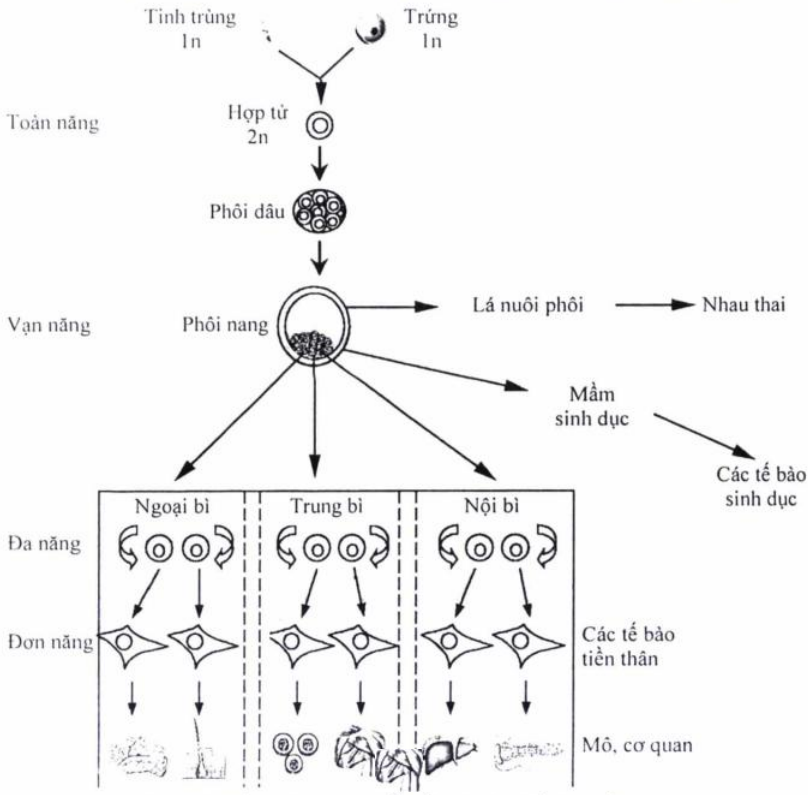
Các tế bào của giai đoạn phôi dâu là tế bào toàn năng (totipotent) vì mỗi tế bào này có thể phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh. Sang đến giai đoạn phôi nang bắt đầu có sự phân chia chức năng: chức năng nuôi dưỡng do các tế bào lá nuôi đảm nhiệm (sau này thành rau thai); chức năng tạo nên cơ thể thai nhi do các tế bào của ICM đảm nhiệm. Như vậy, các tế bào ICM là các tế bào vạn năng (pluripotent) do chỉ thiếu khả năng tạo các tế bào lá nuôi mà thôi. Cũng có lẽ vì thế, mà người ta thường gọi các tế bào ICM là tế bào gốc phôi vạn năng (pluripotent embryonic stem cell) *(xem hình 9.3)*.

Phôi nang nguyên vẹn sau khi làm tổ ở tử cung sẽ phát triển thành bào thai, trong đó các tế bào lá phôi gồm nội bì (endoderm), trung bì (mesoderm) và các tế bào mầm nguyên thủy (primordial germ cell – PGC). Chức năng đã được phân chia: các tế bào của nội bì sẽ tạo nên gan và tụy, trung bì hình thành các cơ, xương, sụn, máu và mô liên kết; ngoại bì tạo hệ thống thần kinh và da. Các tế bào

https://nhathuocngocanh.com/

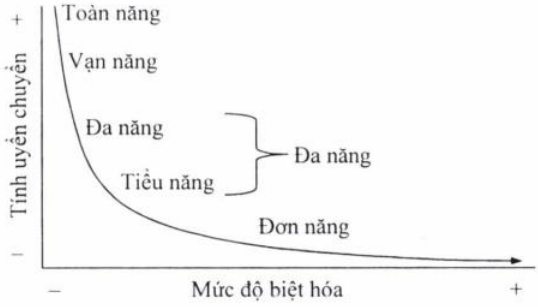
mầm sinh dục sau này sẽ sinh ra các giao tử (trứng hoặc tinh trùng). Tiềm năng tạo ra số loại tế bào và mô của các lá phôi đã bị hạn chế hơn so với các tế bào vạn năng ICM. Tuy vậy, các tế bào gốc phân lập ở mỗi lá phôi vẫn có thể tạo ra được nhiều loại tế bào và mô theo định hướng của mỗi loại lá phôi. Chính vì vậy mà chúng được gọi là tế bào gốc đa năng (multipotent). Tùy giai đoạn và vị trí lấy tế bào gốc mà các tế bào này có khả năng chỉ tạo ra được vài loại tế bào và chính vì vậy chúng được gọi là tế bào gốc ít tiềm năng (oligopotent). Có tác giả gộp hai loại đa năng và ít tiềm năng thành tế bào đa năng. Các tế bào đa năng tiếp tục phát triển tạo thành các tế bào tiền thân (progenitor/ precusor cell) là tế bào chỉ còn tiềm năng phát triển thành một loại tế bào duy nhất để tạo nên một loại tế bào duy nhất tạo nên mô và cơ quan của cơ thể. Vì thế, các tế bào tiền thân được gọi là tế bào đơn năng (unipotent) *(hình 9.3)*.

Như vậy, tế bào càng biệt hóa thì tiềm năng sinh ra số loại tế bào mới càng giảm đi. Quan hệ giữa biệt hóa và khả năng sinh ra được biểu diễn trong hình 9.4.

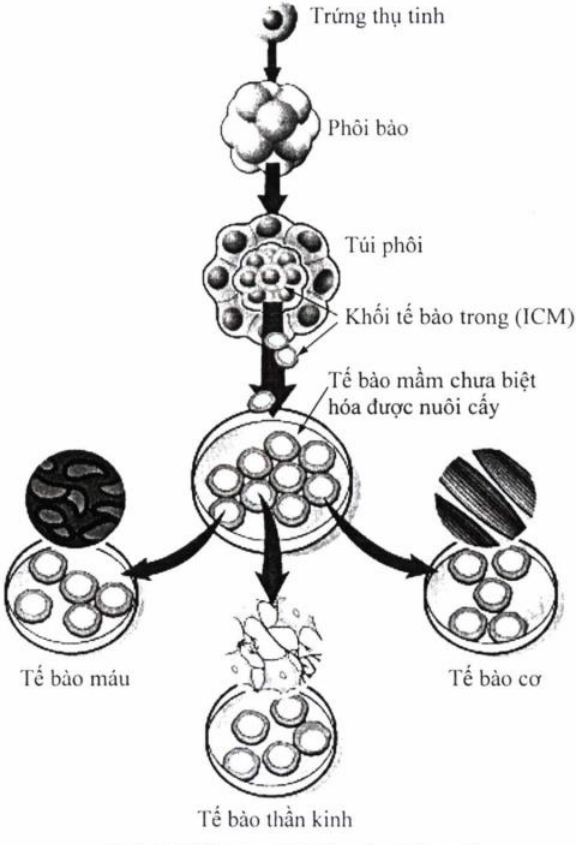


Hình 9.3. Tiềm năng phát triển của các loại tế bào gốc

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 9.4. Tương quan giữa tiềm năng với mức độ uyển chuyển và biệt hóa tế bào gốc

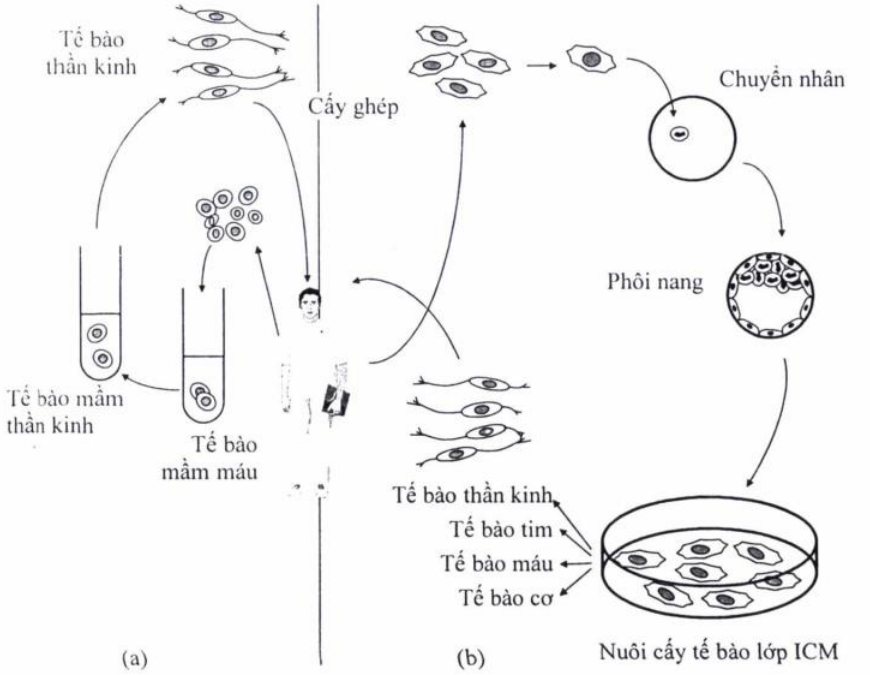


Hình 9.5. Khả năng biệt hóa của tế bào gốc

https://nhathuocngocanh.com/

2. TRIỂN VỌNG VÀ KHÓ KHĂN TRONG VIỆC ỨNG DỤNG TẾ BÀO GỐC

Một trong những hướng phát triển của y học tái tạo (regenerative medicine) là thay thế tế bào gốc vào chỗ tế bào bệnh để phục hồi chức năng trở lại bình thường mà không phải sử dụng thuốc suốt đời *(xem hình 9.6)*.



Hình 9.6. Chiến lược trong liệu pháp tế bào gốc để điều trị các bệnh hiểm nghèo ở người

(a) Sử dụng tế bào gốc trưởng thành;
(b) Sử dụng tế bào sinh dưỡng trưởng thành để sản xuất tế bào gốc phôi.

Từ năm 1954, người ta đã tiến hành nghiên cứu tế bào gốc phôi và vào những năm 1970, những nghiên cứu ghép tế bào gốc tủy sống trong việc chữa bệnh khiếm khuyết miễn dịch và leukemia đã được tiến hành. Nhưng những nghiên cứu thật sự về các tế bào gốc phôi chỉ mới bắt đầu vào năm 1988, khi Jame Thomson thu nhận được những tế bào gốc phôi từ khối bên trong (Inter Cell Mass – ICM) của phôi nang (blastocyte). Các dòng tế bào này không hề biệt hóa sau nuôi cấy 4 – 5 tháng và vẫn giữa nguyên tiềm năng phát triển thành các loại tế bào của ba lá phôi để phát triển thành các tế bào biểu mô, sụn, xương, cơ trơn, biểu mô thần kinh, tế bào da,... Mở ra triển vọng ứng dụng to lớn trong

https://nhathuocngocanh.com/
việc tìm hiểu quá trình phát triển phôi thai người trong y học tái tạo cơ quan và nghiên cứu phát triển thuốc. Ngày nay, người ta có thể phân lập được các tế bào gốc từ các mô khác nhau của phôi, thai, các phần phụ của thai như màng trong dây rốn, nhau thai và nhiều mô khác từ tế bào trưởng thành. Hy vọng sử dụng tế bào gốc trong y học tái tạo (regenerative medicine) và trị liệu tế bào (germ theraphy) trong chữa trị nhiều bệnh tổn thương hoặc mất chức năng tế bào, chức năng cơ quan như đái tháo đường, Alzheimer, liệt, teo tủy sống,...

Tế bào gốc được ứng dụng theo bốn hướng:

- Thay thế mô/cơ quan
- Sửa chữa những tế bào bị hỏng
- Vector cho liệu pháp di truyền.
- Vector cho các tác nhân hóa liệu pháp.

Ngày nay, công nghệ tế bào gốc đã thành công trong những lĩnh vực sau đây:

- Những tế bào gốc trong mô đã biểu hiện gen trong xương, sụn, mô mỡ, cơ, nội bì và tế bào thần kinh.

- Những tế bào gốc đa năng (multipotent stem cell) có thể biệt hóa thành những tế bào có hình dạng và chức năng giống như tế bào gan.

- Những tế bào gốc thần kinh có thể đi vào não sau khi tiêm vào cơ thể.

- Những nghiên cứu gần đây còn cho thấy: các tế bào gốc có thể biệt hoá thành tế bào cơ tim, thần kinh, cơ khi nước trong môi trường dinh dưỡng thấp.

- Tái tạo da sau bỏng.
- Tạo mô cơ xương trong chấn thương chỉnh hình.
- Liệu pháp tế bào gốc làm giảm tổn thương nhồi máu cơn tim.
- Ghép tủy xương.
- Điều trị ung thư máu bằng tế bào gốc tạo máu.
- Phục hồi chức năng cơ tim bằng tế bào gốc hay tế bào tiền thân.
- Biệt hóa tế bào thành tế bào tiết insulin.
- Chèn thêm gen mã hóa thụ thể có vai trò điều hòa sự ức chế tiết insulin theo nồng độ đường máu.
- Tạo dòng liệu pháp trong điều trị (therapeutic cloning).

Những câu hỏi đặt ra cho công nghệ tế bào gốc:

- Những tế bào gốc phôi nuôi cấy *in vitro* có thể cho ra tất cả các loại tế bào của một cơ thể trưởng thành không?

- Những tế bào gốc phôi khi nuôi cấy *in vitro* có chức năng giống như khi phát triển trong phôi bình thường không?

- Tế bào gốc *in vitro* có bị đột biến không?

https://nhathuocngocanh.com/

Trở ngại lớn nhất trong các chương trình khai thác tế bào gốc phôi là đạo lý và pháp luật.

Ngày 25/8/2000, Tổng thống Mỹ B. Clinton cho phép cấp kinh phí cho những nghiên cứu trên dòng tế bào thai người (human fetal cell lines) nhưng không dùng tế bào phôi. Ngày 9/3/2009, Tổng thống Obama đã công bố một chính sách cho phép mở rộng nghiên cứu tế bào gốc phôi người. Hiện nay, Mỹ đã nghiêm cấm khai thác tế bào gốc phôi người. Hàn Quốc và một số phòng thí nghiệm ở Nhật được phép nghiên tế bào gốc phôi người. Sau khi nghiên cứu của giáo sư Hwang Woo Suk bị kết luận là giả mạo, các nhà bác học người Anh ở Newcastle đã nhân bản thành công phôi người. Việc này giúp đem lại hy vọng trích tế bào gốc riêng lẻ tương thích với các bệnh nhân *(xem hình 9.6)*.

Trong những năm gần đây, các nhà khoa học Việt Nam cũng đạt được những thành tựu nhất định trong nuôi cấy tế bào gốc. Ngày 08/02/2002 bé Nguyễn Thị Kim Ngân, 4 tuổi, được ghép máu cuống rốn người để chữa bệnh ung thư bạch cầu dòng lympho tại bệnh viện Truyền máu và Huyết học Tp. HCM. Trước đó, tại đây cũng đã thành công trong việc ghép tế bào gốc tự thân bằng cách huy động máu ngoại vi. Đến nay (2001) Bệnh viện Truyền máu và Huyết học Tp.HCM đã thực hiện thành công (81%) liệu pháp ghép tủy bằng máu cuống rốn cũng như ghép tế bào gốc tự thân. Kỹ thuật này đang được tiến hành ở một số bệnh viện khác nhau như Bệnh viện Bạch Mai, Huế...

Những tế bào gốc được gọi là myES (my stem cell) sẽ không bị đào thải được thực hiện theo các bước: 1) Nhận bất kỳ tế bào của bất kỳ mô nào trên cơ thể bệnh nhân. 2) Tạo phôi từ nhân tế bào này và trứng đã được loại nhân. 3) Thu nhận tế bào ICM. 4) Cấy hay biệt hoá những tế bào gốc này thành cơ quan mong muốn cho cấy ghép.

3. SẢN XUẤT PHÔI IVF (IN VITRO FERTILITY)

Thụ tinh trong ống nghiệm trên người tuy đã manh nha từ năm 1961, nhưng mãi đến năm 1978 mới có em bé đầu tiên ra đời nhờ công nghệ này (Louise Brown). Tính đến 1990, trên thế giới đã có gần 100.000 bé ra đời bằng thụ tinh trong ống nghiệm.

Ở khu vực Đông Nam Á, một số nước như Thái Lan, Singapore, Malaysia, Philipine, Indonesia, Việt Nam cũng đã thành công trong kỹ thuật IVF.

Bệnh viện Từ Dũ đã thành công đầu tiên trong lĩnh vực hỗ trợ sinh sản IVF trên người vào năm 1998. Đến nay, số trẻ chào đời từ công nghệ này đã lên tới hàng ngàn.

https://nhathuocngocanh.com/

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Khái niệm tiềm năng của tế bào gốc là gì? Cho ví dụ minh họa.
2. Phân biệt quá trình tăng sinh và biệt hóa.
3. Trình bày các khó khăn trong ứng dụng tế bào gốc.
4. Phôi nang là
   A. Khối tế bào phát triển từ phôi dâu trước khi làm tổ trong tử cung.
   B. Tế bào trứng đã thụ tinh trong tử cung
   C. Các tế bào gốc toàn năng.
   D. Phôi ở giai đoạn 16 tế bào.
5. Ứng dụng tế bào gốc gặp khó khăn vì
   A. Vấn đề đạo đức và pháp luật
   B. Nguồn cung cấp phôi giới hạn
   C. Thông tin khoa học chưa đầy đủ
   D. Tất cả

https://nhathuocngocanh.com/

CHƯƠNG IV

CÔNG NGHỆ GEN

Bài 10

CÔNG CỤ VÀ KỸ THUẬT CƠ BẢN

MỤC TIÊU

1. Nêu được yêu cầu, đặc điểm và ứng dụng của các công cụ cơ bản của công nghệ gen

2. Trình bày được các bước và kỹ thuật chính trong tạo dòng gen.

1. LƯỢC SỬ CÔNG NGHỆ GEN

Công nghệ di truyền còn được gọi là công nghệ gen hay kỹ thuật tái tổ hợp ADN đã trở thành một thuật ngữ rất phổ biến. Những khái niệm về biến đổi di truyền của các sinh vật sống cũng không mới, nó đã được áp dụng trong nông nghiệp và di truyền học vi sinh vật để cải tạo giống từ rất lâu mà không cần có những kiến thức về di truyền phân tử như ngày nay.

Định nghĩa tổng quát là các thao tác di truyền được dùng để tạo ra các cá thể có sự tổ hợp mới về đặc điểm di truyền. Các thao tác này được chia làm hai loại :

– Các thao tác tế bào, liên quan đến việc tạo tế bào lai.

– Các thao tác phân tử, liên quan đến việc tạo ra phân tử ADN tái tổ hợp nhân tạo, đưa chúng vào vector và chuyển nó vào tế bào chủ. Đây chính là công nghệ gen mà người ta thường nhắc đến.

Acid deoxyribonucleic, chất quyết định sự di truyền, được chiết tách lần đầu vào năm 1869, bởi Miescher, một nhà khoa học người Đức. Tuy nhiên, khi thấy rằng ADN chỉ chứa bốn thành phần cơ bản (A, T, G và C) người ta cho rằng nó không thể đóng vai trò vật liệu di truyền, sự tập trung chú ý được hướng vào các protein. Bảy mươi năm sau, Avery đã thực hiện một thí nghiệm lịch sử với phế cầu khuẩn (pneumococcus) và chỉ ra rằng ADN chứ không phải protein mới là vật liệu di truyền. Sinh học phân tử hiện đại ra đời năm 1953 khi Watson và Crick công bố cấu trúc xoắn kép của ADN. Sau đó ARN thông tin, ARN vận chuyển, ribosom được phát hiện và nghiên cứu chức năng. Các vấn đề sao chép

https://nhathuocngocanh.com/

và tổng hợp ADN cũng được khám phá. Các hiểu biết về điều kiện và quy luật lai ADN, enzym cắt giới hạn, enzym nối (ligase) đã thúc đẩy mạnh sự phát triển của kỹ thuật thao tác gen. Năm 1972, phương pháp tạo dòng ADN lần đầu tiên được thực hiện bởi Boyer, Cohen, và Berg. Năm 1977, sản phẩm đầu tiên của công nghệ gen, somatostatin tái tổ hợp ra đời. Năm 1983, PCR được phát minh bởi K.B. Mullis đã tạo ra một cuộc cách mạng trong thao tác gen.

2. CÔNG CỤ CƠ BẢN

2.1. Chủng vi sinh vật

Các thao tác gen thường được tiến hành trên *E. coli* vì nó có bộ máy di truyền đã được nghiên cứu khá đầy đủ và có tốc độ tăng trưởng nhanh trong khi khả năng gây bệnh lại thấp.

Bên cạnh việc phân loại theo nguồn gốc ví dụ như nấm men, nấm sợi, vi khuẩn, tế bào động vật, ... các chủng vi sinh vật dùng trong công nghệ gen thường được chia làm hai nhóm lớn:

– **Chủng để tạo dòng**: là chủng mang các đặc tính và đột biến cho phép thu nhận ADN ngoại lai và duy trì chúng ổn định với số bản sao cao, cho phép chiết tách trở lại thu được lượng lớn ADN đích cho các nghiên cứu tiếp sau. Ngoài ra các chủng này cũng mang một số đột biến cho phép dễ dàng phát hiện dòng mang ADN đích, ví dụ kỹ thuật bổ sung alpha.

– **Chủng biểu hiện**: mang các yếu tố cần thiết để biểu hiện gen đích và để ổn định sản phẩm biểu hiện. Các chủng này cho phép biểu hiện gen đích với mức độ cao nhằm thu được nhiều sản phẩm biểu hiện gen–protein.

Dưới đây là một số chủng vi khuẩn xuất phát từ chủng *E. coli* K12 thường sử dụng :

* *Chủng tạo dòng thông thường:*

– *JM103* : dùng để nhân bản các vector của phage M13, cũng có thể dùng với plasmid pUC, là các plasmid sử dụng kỹ thuật bổ sung alpha để chọn lọc dòng tái tổ hợp. Chủng này bị mất gen β–galactosidase trên nhiễm sắc thể, nhưng có mang gen cho đoạn omega của β–galactosidase trên plasmid F, cho phép nó bị nhiễm bởi các phage dạng sợi như M13. Nếu mất plasmid F sẽ làm mất khả năng này, do đó phải duy trì chủng này trên môi trường tối thiểu.

– *JM109* : tương tự JM103, ngoại trừ có đột biến trên gen *recA*, làm cho nó mất khả năng tái tổ hợp tương đồng. Chủng này được dùng nhiều hơn JM103 vì ít làm biến đổi đoạn gen ngoại lai. Tuy nhiên, hiệu suất thu ADN của M13 của nó thấp hơn JM103.

– *DH5–α* : chủng này cũng có đặc tính bổ sung alpha như JM103 hay JM109.

https://nhathuocngocanh.com/
Chủng này mang gen *recA*1 đột biến. Ngoài ra, nó còn mang đột biến *deoR* làm dễ dàng cho việc thu nhận các mảnh ADN lớn.

* *Chủng biểu hiện*

– BL21(DE3): biểu hiện mạnh các gen đích được điều khiển bởi promoter T7. Bị đột biến mất các gen protease lon và ompT.

– BL21*trxB*: giống như BL21 nhưng có đột biến *trxB* để giúp hình thành cầu disulfit trong tế bào chất giúp một số protein gập lại đúng.

2.2. Vector tạo dòng

Có bốn loại vector cơ bản dùng trong tạo dòng là plasmid, các vector thực khuẩn tiêu giải có nguồn gốc từ phage lambda, các cosmid và vector từ các phage dạng sợi như M13.

Plasmid

Plasmid là một phân tử ADN sợi kép, vòng kín, nhỏ có thể nhân bản độc lập trong tế bào. Tất cả các plasmid được dùng trong nghiên cứu sinh học phân tử phải thỏa mãn ba yêu cầu :

– Có yếu tố đánh dấu để chọn lọc dòng tái tổ hợp, thường là một gen kháng kháng sinh hoặc dùng kỹ thuật bổ sung alpha.

– Có điểm khởi đầu sao chép (Ori) cho phép nhân bản plasmid trong tế bào chất không phụ thuộc nhiễm sắc thể. Các plasmid được sử dụng hiện nay thường có điểm Ori có thể kiểm soát được, ví dụ cho phép khuếch đại plasmid khi có mặt chất ức chế tổng hợp protein (như chloramphenicol). Điều này giúp tăng số bản sao của plasmid trong tế bào chủ và cho hiệu suất cao khi chiết tách plasmid với độ tinh khiết khá tốt.

– Có vùng tạo dòng (Multiple Cloning Site – MCS) : có chứa nhiều trình tự nhận diện duy nhất của nhiều RE khác nhau nằm liên tiếp nhau (polylinker), cho phép cắt để duỗi plasmid và chèn đoạn gen mong muốn vào.

Plasmid lý tưởng cần có kích thước nhỏ (2–10 kb), không tiếp hợp được, nên không di chuyển được, và có kiểu hình biểu hiện được trên tế bào chủ. Ngoài ra nó cũng cần có nhiều trình tự nhận diện duy nhất của enzym cắt giới hạn và có số bản sao lớn (>10). Các plasmid sau khi tái tổ hợp sẽ được đưa vào tế bào chủ bằng cách biến nạp hay thẩm điện (electroporation).

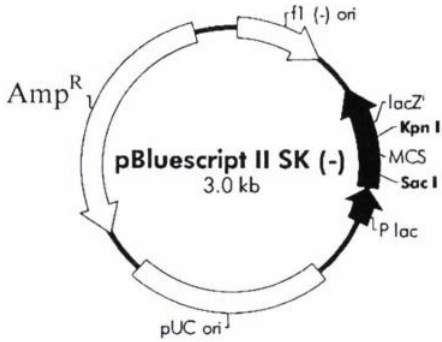
* *pUC*

Là một họ các plasmid có mang một số đặc tính của vector M13 và pBR, làm thuận lợi hơn cho thao tác. Kích thước nhỏ (2,7 kb), có gen kháng ampicillin, điểm Ori của pBR322 và một phần gen lacZ của *E. coli*. Vùng tạo dòng (tương tự M13) nằm trong đoạn lacZ nên cũng dùng kỹ thuật bổ sung alpha. Cho số bản sao cao, và có thể được khuếch đại bằng chloramphenicol.

https://nhathuocngocanh.com/

** pGEM và pBluescript II*

Mang nhiều yếu tố thuận tiện cho thao tác. Kích thước khá nhỏ (2,9 kb), cho số bản sao cao trong tế bào *E. coli* thích hợp. Vùng tạo dòng nằm giữa hai promoter cho phép phiên mã từ trình tự được chèn vào.



Hình 10.1. Sơ đồ một plasmid điển hình

Gồm gen đánh dấu chèn *lacZ'*; vùng tạo dòng, MCS, nằm trong *lacZ'*; điểm gốc sao chép, ori; gen đánh dấu để kháng kháng sinh, Amp^R.

** pET và pGEX*

Là các họ vector plasmid để tạo dòng và biểu hiện gen, tinh chế protein. Có vùng tạo dòng, vị trí gắn ribosom, promoter được tối ưu hóa để biểu hiện gen đích. Ngoài ra còn được tích hợp nhiều trình tự mã hóa cho đoạn chức năng giúp tinh chế hay nhận diện protein biểu hiện như polyhistidine tag, S–tag, GST–tag ...

Các vector từ phage lambda

Đây là một phage tiêu giải, nghĩa là sau khi xâm nhập tế bào chủ, phage sẽ nhân bản ADN của mình và tạo các virion, ly giải tế bào chủ rồi phóng thích phage.

Khi được dùng làm vector, người ta cắt bỏ một phần bộ gen của phage không liên quan đến quá trình tiêu giải và thay thế bằng đoạn ADN cần tạo dòng. Do đặc tính của phage, nên sau tái tổ hợp kích thước vector phải lớn hơn 73% (38 kb) và nhỏ hơn 102% (51 kb) so với dạng hoang dại (50 kb) thì mới đóng gói dễ dàng thành phage được. Vì vậy, khi sử dụng làm vector tái tổ hợp phải chú ý đến kích thước đoạn gen muốn chèn.

Có hai điểm thuận lợi khi dùng loại vector này để xây dựng các thư viện tái tổ hợp. Thứ nhất, bộ gen của phage sau khi tái tổ hợp có thể được đóng gói bằng cách trộn với các protein vỏ (đã được thương mại hóa) (đóng gói *in vitro*. Điều này rất có ý nghĩa vì khi đó chỉ cần một lượng ít vector và ADN cần chèn. Đóng

https://nhathuocngocanh.com/

gói *in vitro* là cách đơn giản nhất để đưa ADN tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* chủ. Thứ hai, các thư viện phage có thể dễ dàng phát hiện với mẫu dò, khuếch đại và bảo quản trong một thời gian dài.

Vector cosmid

Cosmid là một dạng lai giữa phage và plasmid và có được các ưu thế của cả hai dạng vector. Nó có thể dùng để tạo dòng các đoạn gen có kích thước lớn đến 50 kb. Cosmid vector mang yếu tố chọn lọc, điểm Ori của plasmid, vị trí tạo dòng và các trình tự của phage lambda mã hóa cho vị trí *cos*. Để tái tổ hợp, người ta cắt vector bằng RE tại vị trí tạo dòng và trộn với đoạn gen muốn chèn (có chiều dài từ 35–45 kb), vector và đoạn chèn sẽ được nối lại bằng ligase, tạo thành một sợi ADN thẳng với đoạn chèn bị kẹp giữa hai vector. Sợi ADN này khi ủ với các protein vỏ sẽ tạo thành phage và được gây nhiễm vào *E. coli*. Sau khi vào tế bào chủ, ADN tái tổ hợp sẽ tạo thành vòng và hoạt động như một plasmid.

Bảng 10.1. Một số RE thường dùng

Tên RE	Vị trí nhận diện / cắt[2]	Dung dịch đệm[3]	Vi khuẩn
AatII	GACGT*C	K	*Acetobacter aceti*
AluI	AG*CT	L	*Athrobacter luteus*
BalI (*MscI*)[1]	TGG*CCA	O (L)	*Brevibacterium albidum*
BamHI	G*GATCC	M	*Bacillus amyloliquefaciens*
BglII	A*GATCT	M	*Bacillus globigii*
BclI	T*GATCA	L	*Bacillus caldolyticus*
*Bsp*106I (*ClaI*)[1]	AT*CGAT	M (O)	*Bacillus sphaericus* / *Caryophanon latum*
EcoRI	G*AATTC	M	*E. coli*
EcoRII (*BstNI*)[1]	*CC(A/T)GG	M (L)	*E. coli* / *Bacillus stearothermophilus*
HaeIII	GG*CC	L	*Haemophilus aegyptius*
HincII	GTY*RAC	L (M)	*Haemophilus influenzae* Rc
HindIII	A*AGCTT	L	*Haemophilus influenzae* Rd
HinfI	G*ANTC	L	*Haemophilus influenzae* Rf
HpaI	GTT*AAC	L	*Haemophilus parainfluenzae*
KpnI	GGTAC*C	O	*Klebsiella pneumoniae*
MboII	GAAGANNNNNNNN* CTTCTNNNNNNN*	O	*Moxarella bovis*

https://nhathuocngocanh.com/

Tên RE	Vị trí nhận diện / cắt[2]	Dung dịch đệm[3]	Vi khuẩn
MboI (*Sau*3A)[1]	•GATC	L (L)	*Moxarella bovis* / *Staphylococcus aureus* 3A
MspI (*HpaII*)[1]	C•CGG	O (O)	*Moxarella species*
NotI	GC•GGCCGC	M	*Nocardia otitidis–caviarum*
PstI	CTGCA•C	L	*Providencia stuartii*
PvuI	CGAT•CG	M	*Proteus vulgaris*
PvuII	CAG•CTG	M	*Proteus vulgaris*
SacI (*SstI*)[1]	GAGCT•C	O (L)	*Streptomyces achromogenes*
SacII (*SstII*)[1]	CCGC•GG	O (L)	*Streptomyces achromogenes*
SalI	G•TCGAC	H	*Streptomyces albus*
SmaI	CCC•GGG	K	*Serratia marcescens*
SphI	GCATG•C	M	
StuI	AGG•CCT	L	*Streptomyces tubercidicus*
TaqI	T•CGA	L	*Thermus aquaticus*
XbaI	T•CTAGA	L	*Xanthomonas campestris* pv. *badrii*
XhoI	C•TCGAG	L	*Xanthomonas holcicola*
XmaI	C•CCGGG	O	*Xanthomonas malvacearum*

[1] có cùng vị trí nhận diện nhưng khác nguồn gốc.

[2] trình tự nhận diện theo chiều 5'–3', • là vị trí cắt. A : adenin, C : cytosin, G : guanin, N : bất kỳ base nitơ nào, R : purin, T : thymin, Y : pyrimidin

[3] K : 10 mM Tris–Cl pH 8 + 10 mM $MgCl_2$ + 20 mM KCl ; L : 50 mM NaCl + 10 mM Tris–Cl pH 7,4 + 10 mM $MgCl_2$ + 1 mM DTT ; M : 100 mM NaCl + 10 mM Tris–Cl pH 7,4 + 10 mM $MgCl_2$ + 1 mM DTT ; H : 150 mM NaCl + 10 mM Tris–Cl pH 7,4 + 10 mM $MgCl_2$ + 1 mM DTT ; O : 10 mM Tris–Cl pH 7,4 + 10 mM $MgCl_2$ + 1 mM DTT

2.3. Các enzym làm biến đổi acid nucleic

Enzym cắt giới hạn / methylase

** Chức năng*

Enzym cắt giới hạn (restriction enzyme–RE) là các endonuclease có khả năng cắt ADN tại hay gần một trình tự nhận diện đặc hiệu. Song song với chúng tế bào có các enzym methylase xúc tác việc metyl hóa các trình tự nhận diện đặc hiệu và ngăn cản tác động của enzym cắt giới hạn. Các loài khác nhau có cặp

https://nhathuocngocanh.com/
RE/metylase khác nhau. Hậu quả là nếu các ADN ngoại lai (ví dụ ADN phage) chưa bị metyl hóa sẽ bị cắt và thoái hóa, trong khi ADN của tế bào chủ được bảo vệ. Điều này giúp cho bộ gen của vi khuẩn được ổn định.

** Phân loại RE*

Có ba loại RE : I, II và III. Loại I và III mang một phức hệ gồm cả hai hoạt tính cắt giới hạn và metyl hóa, loại này cần ATP để có năng lượng và nó cắt ADN tại vị trí khá xa điểm nhận diện. Hai loại này ít được dùng trong các thực hành sinh học phân tử. Loại II chỉ có hoạt tính endonuclease, không cần ATP để hoạt động và cắt ADN tại hoặc rất gần vị trí nhận diện. Loại II được sử dụng nhiều trong thực tiễn sinh học phân tử và hiện người ta đã biết khoảng 1000 RE loại này và có vài trăm loại đã được thương mại hóa.

Để gọi tên RE người ta dùng ba ký tự Latinh (in nghiêng) trên cơ sở tên chi và loài (đôi khi sử dụng thêm ký tự thứ tư để chỉ chủng (strain) hoặc plasmid) và một số La mã để chỉ thứ tự phát hiện ra enzym. Ví dụ : *SmaI* : là RE của *Serratia marcescens* được phát hiện trước tiên.

** Vị trí nhận diện / cắt*

Vị trí nhận diện của đa số RE loại II thường chứa 4 – 6 nucleotide và thường có sự đối xứng cặp (trình tự palindrome). Có bốn kiểu sắp xếp của trình tự nhận diện: palindrome (ví dụ *BamHI*, *EcoRI*) ; palindrome bị ngắt (*HinfI*, *XmnI*); trình tự bị thoái biến, thường có phần còn lại của sự đối xứng cặp (*EcoRII*, *HincII*); không phải palindrome (*MboII*).

RE chỉ cắt ADN sợi đôi và tạo ra hai đầu tận 5' phosphate và 3' hydroxyl. Đầu cắt có thể tà hoặc so le. Nếu trình tự nhận diện có phần nào tính đối xứng thì điểm cắt thường nằm giữa nó và ở vị trí giống nhau cho mỗi dây. Ngược lại thì vị trí cắt cách khoảng so với nó. Bảng tóm tắt đặc điểm một số RE thường dùng.

Polymerase

Polymerase là các enzym chịu trách nhiệm tổng hợp acid nucleic từ các đơn vị nucleotide.

** ADN polymerase phụ thuộc ADN*

– *E. coli* ADN polymerase I

Được phân lập từ *E. coli*, nhưng ngày nay đã được sản xuất từ chủng vi khuẩn có khả năng siêu tổng hợp enzym này.

Mục đích sử dụng :

+ Đánh dấu ADN

+ Tổng hợp sợi thứ hai của ADNbs

Đặc tính :

+ Hoạt tính tổng hợp 5'– 3': dùng đoạn mồi ADN hay ARN. Hoạt động tốt trên khuôn mẫu ADN. Khả năng xử lý thấp và cần tối thiểu một mM dNTP.

https://nhathuocngocanh.com/

+ Exonuclease 3'– 5' : yếu hơn polymerase của T_4 và T_7.

+ Exonuclease 5'– 3'

– Đoạn Klenow (đoạn lớn của polymerase I của *E. coli*)

Thu được nhờ tác động của enzym thủy phân protein trên polymerase I của *E. coli* hoặc nhờ siêu tổng hợp ở dòng tái tổ hợp gen quy định polymerase đã được biến đổi. Đoạn Klenow không có hoạt tính exonuclease 5'– 3'. Gần đây với công nghệ di truyền đã tạo được dòng sản xuất đoạn Klenow không có hoạt tính exonuclease (exo^- Klenow enzym; Stratagene).

Sử dụng :

+ Làm tà đầu 3'bị hụt (đầu dính)

+ Loại bỏ đầu 3' nhô ra.

+ Đánh dấu đầu 3' của ADN sợi đôi, đặc biệt đối với đầu 3' bị hụt.

+ Tổng hợp sợi thứ hai của ADNbs, có ưu điểm hơn polymerase I vì không có hoạt tính exonuclease 5'– 3'.

+ Đánh dấu bằng kỹ thuật mồi ngẫu nhiên.

+ Định trình tự ADN bằng phương pháp dideoxy.

+ Tổng hợp ADN từ ADN sợi đơn với mồi đặc hiệu.

– ADN polymerase T4

Được ly trích từ *E. coli* bị nhiễm phage T_4. Có đặc tính gần như đoạn Klenow nhưng có hoạt tính exonuclease 3'– 5' mạnh hơn, không làm dịch chuyển sợi và không tác động trên ADN bị cắt khía.

Sử dụng :

+ Làm tà đầu 3' bị hụt.

+ Loại bỏ đầu 3' nhô ra.

+ Đánh dấu đầu 3' của ADN sợi đôi.

+ Tổng hợp ADN từ ADN sợi đơn với mồi đặc hiệu.

– ADN polymerase T7

Gồm hai tiểu đơn vị : lớn : có hoạt tính enzym do phage T_7 mã hóa ; nhỏ : là một thioredoxin protein do tế bào chủ *E. coli* mã hóa. Khả năng xử lý thấp, nhưng nếu kết hợp với thioredoxin thì tăng lên rất nhiều. Khi thay đổi phần thioredoxin thì hoạt tính exonuclease 3' – 5' bị mất.

Sử dụng :

+ Định trình tự ADN bằng phương pháp dideoxy.

+ Tổng hợp các ADN cực dài.

+ Làm tà đầu 3' bị hụt.

https://nhathuocngocanh.com/

+ Loại bỏ đầu 3' nhô ra và đánh dấu đầu 3' của ADN.

+ Tổng hợp sợi thứ hai của ADN_{bs}, có ưu điểm hơn polymerase I vì không có hoạt tính exonuclease 5'– 3'.

+ Đánh dấu bằng kỹ thuật mồi ngẫu nhiên.

– Taq ADN polymerase

Ly trích từ *Thermus aquaticus*, hiện nay đã có dạng tái tổ hợp. Hoạt động tối ưu ở 75 – 80°C, hoạt tính giảm 10 lần ở 37°C. Hoạt tính enzym vẫn còn hơn 50% sau 2 giờ ở 95°C.

Sử dụng :

– Khuếch đại ADN bằng phản ứng chuỗi polymerase.

– Định trình tự ADN bằng phương pháp dideoxy. Có khả năng thực hiện ở nhiệt độ cao nên tránh được các cấu trúc thứ cấp của khuôn mẫu và có thể tiến hành với lượng mẫu rất nhỏ.

– Polymerase phụ thuộc ARN (hoặc ADN)

Còn gọi là enzym sao chép ngược (reverse transcriptase). Có hai loại : AMV (từ avian myeloblastosis retrovirus) và MMLV (từ mouse Moloney retrovirus)

Sử dụng :

+ Tổng hợp sợi thứ nhất của ADN_{bs}.

+ Định trình tự ADN bằng phương pháp dideoxy. Trong vài trường hợp nó tốt hơn các polymerase khác.

– ADN Polymerase không phụ thuộc khuôn mẫu

Còn gọi là terminal (deoxynucleotidyl) transferase. Ly trích từ thymus của bê. Có khả năng thêm nucleotide vào nhóm 3'hydroxyl của mỗi ADN mà không cần khuôn mẫu.

– ARN polymerase phụ thuộc ADN

Là các ARN polymerase của phage SP6, T_3, T_7. Có khả năng phiên mã ARN từ khuôn mẫu ADN. Ưu điểm của nó là: chỉ phiên mã từ vị trí khởi động (promoter) đặc hiệu của phage; tổng hợp nhanh các phân tử ARN dài hàng nghìn nucleotide ; có thể cho ra 5 – 30 bản ARN từ một khuôn mẫu ADN.

Ligase

Là enzym xúc tác sự tổng hợp liên kết cộng hóa trị phosphodiester giữa đầu 3'–hydroxyl và 5'–phosphate của ADN, cho phép nối hai phân tử ADN hoặc đóng vòng ADN. ADN ligase của T_4 và *E. coli* cần ADN sợi đôi, trong khi ARN ligase của T_1 có thể dùng ARN hoặc ADN sợi đơn.

ADN ligase của *E. coli* cần NAD để có năng lượng và có thể dùng sửa chữa chỗ bị cắt khía hay nối các đầu dính. ADN ligase của T_4 cần ATP để hoạt động

https://nhathuocngocanh.com/

và có thể dùng để sửa chỗ cắt khía, nối đầu dính và cả đầu tù, do đó nó được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay.

3. KỸ THUẬT THAO TÁC GEN

3.1. Tạo đoạn ADN cần tạo dòng

Đoạn ADN đích cần tạo dòng có thể được tạo ra bằng cách cắt ADN nhiễm sắc thể bằng một hay nhiều RE thành nhiều đoạn nhỏ, các đoạn này sau đó được tạo dòng riêng biệt và sàng lọc để thu được dòng chứa đoạn ADN mong muốn. Nếu một phần ở hai đầu đoạn ADN đích đã biết trước trình tự, có thể thiết kế đoạn mồi và khuếch đại nó với PCR. Trong thiết kế của đoạn mồi có thể đưa vào trình tự nhận diện của RE và sau đó có thể cắt sản phẩm PCR để có được các đầu mong muốn thích hợp cho việc tạo dòng.

- **Tổng hợp và tạo dòng ADN_{bs} (cDNA)**

Ở tế bào nhân thật, sự tổ chức của vật liệu di truyền không có tính liên tục do đó ADN nhiễm sắc thể không thể dùng để tạo dòng gen, mà thay vào đó các mARN, mang thông tin di truyền liên quan trực tiếp đến việc mã hóa cho protein, được sử dụng để làm nguồn gen đích. Tuy nhiên, mARN không thể được sử dụng trực tiếp để tạo dòng, do vậy để có thể sử dụng thông tin di truyền của mARN người ta phải chuyển nó thành ADN, gọi là ADN_{bs}.

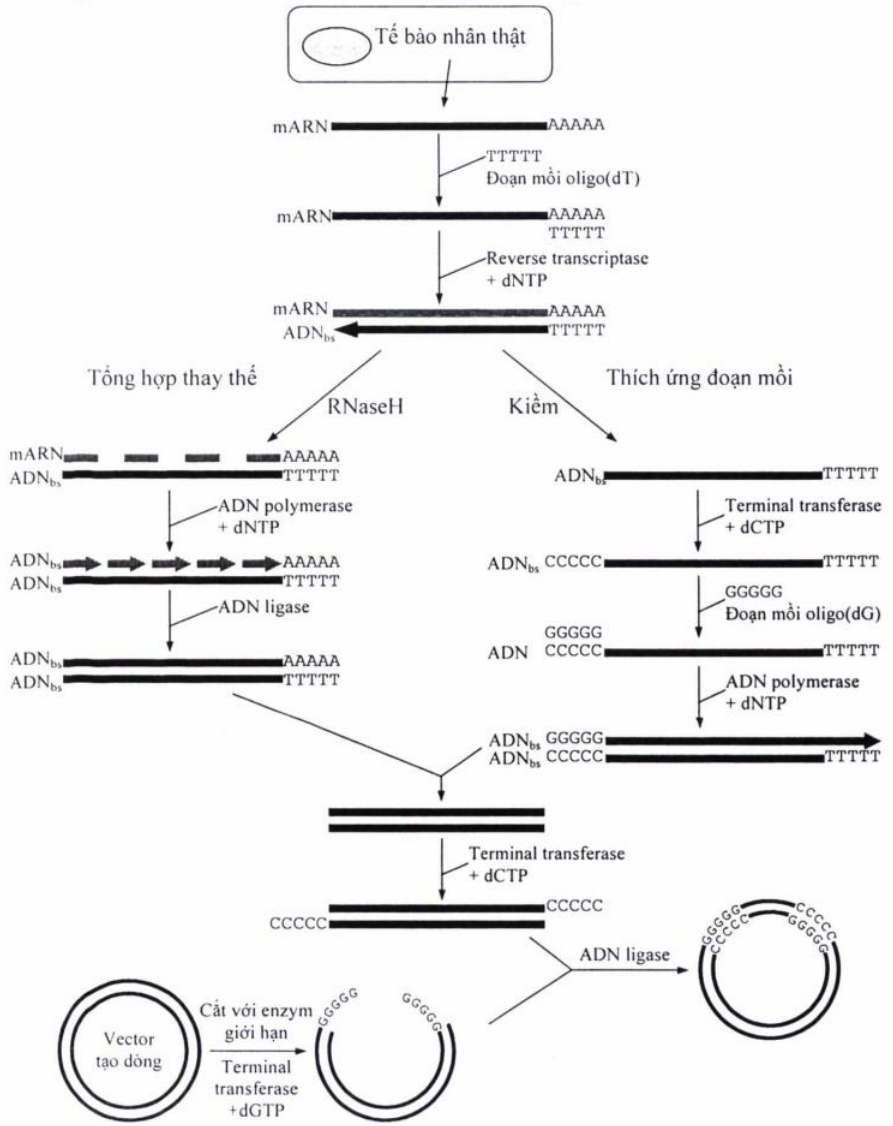
Có hai phương pháp được dùng để tổng hợp ADN_{bs} từ mARN gọi là tổng hợp thay thế và tổng hợp thích ứng đoạn mồi. Đối với cả hai phương pháp, sợi đầu tiên của ADN_{bs} sẽ được tổng hợp bằng đoạn mồi bổ sung với mARN có polythymin nhờ enzym sao chép ngược. Kết quả thu được một sợi đôi lai mARN /ADN_{bs}. Giai đoạn hai khác nhau đối với mỗi phương pháp.

Phương pháp hay dùng nhất là tổng hợp thay thế, dựa vào việc sử dụng enzym ribonuclease H (RNaseH), enzym này cắt phần ARN của phân tử lai $mARNADN_{bs}$ và có hoạt tính 5' → 3' và 3' → 5' exonuclease. Kết quả là ARN bị phân hủy một phần ở cả hai đầu. Các mảnh ARN thu được có thể dùng làm mồi để tổng hợp ADN nhờ ADN polymerase I. Enzym này có hoạt tính 5'→3' exonuclease và polymerase sẽ lấp đầy các khe (nick) và loại bỏ mồi ARN một cách hữu hiệu. Các mảnh ADN_{bs} tạo ra sẽ được nối lại bằng ADN ligase. Phương pháp này có thể chừa lại vùng 5'ARN cap.

Phương pháp tổng hợp thích ứng đoạn mồi, dựa vào sự loại bỏ sợi ARN, từ phân tử lai mARN/ADN_{bs}, bằng cách xử lý với kiềm. Sau đó thêm polyC vào đầu 3' của ADN nhờ enzym terminal transferase. Lúc này có thể dùng đoạn mồi có polyG để tổng hợp sợi thứ hai của ADN_{bs} bằng ADN polymerase *(xem hình 10.2)*. Phương pháp này, khác với tổng hợp thay thế, tạo ra phân tử ADN_{bs} với vùng 5'ADN cap nguyên vẹn. Tuy nhiên, nó có nhiều bước hơn và bước terminal transferase khó kiểm soát.

https://nhathuocngocanh.com/

Cuối cùng, việc tạo dòng ADN_{bs} được hỗ trợ bởi việc thêm polyC ở đầu 3' bằng của ADN_{bs} bằng terminal transferase và nối chúng với vector đã duỗi thẳng và xử lý với terminal transferase để có polyG bổ sung.



Hình 10.2. Tổng hợp và tạo dòng ADN_{bs}

https://nhathuocngocanh.com/

3.2. Cắt và nối ADN tạo phân tử tái tổ hợp

Vector tạo dòng và đoạn ADN đích được xử lý với RE tạo ra các đầu cắt tương thích nhau để sau đó có thể nối ADN đích vào vector. Hai đầu cắt được coi là tương thích nếu chúng có thể nối lại được bằng ligase. Cần lưu ý tính tương thích khi cắt–nối ADN. Các đầu tù luôn tương thích với nhau. Các đầu dính được cắt bởi cùng RE sẽ tương thích với nhau. Các đầu dính tạo ra do các RE khác nhau thường không tương thích trong đa số trường hợp *(xem Bảng 10.2)*.

Bảng 10.2. Enzym cắt giới hạn và tính tương thích của đầu cắt

RE	Điểm nhận diện	Đầu cắt	Tính tương thích	Sản phẩm
		Dính		
*Sau*3A	–**GATC**–	–**GATC** –		–**GATCC**–
	–**CTAG**–	– **CTAG**–		–CTAGG–
		Dính	Tương thích	
*Bam*HI	–GGATCC–	–GGATC C–		–GGATC–
	–CCTAGG–	–C CTAGG–		–**CCTAG**–
		Dính	Không tương thích	
*Eco*RI	–**GAATTC**–	–**G AATTC**–		–GAATTC–
	–**CTTAAG**–	–**CTTAA G**–		–**CTTAA**G–
		Dính	Tương thích	
*Eco*RI	–GAATTC–	–G AATTC–		–**GAATTC**–
	–CTTAAG–	–CTTAA G–		–CTTAA**G**–
		Tù	Không tương thích	
*Dra*I	–**TTTAAA**–	–**TTT** **AAA**–		–**TTT**ATC–
	–**AAATTT**–	–**AAA** **TTT**–		–**AAA**TAG–
		Tù	Tương thích	
*Eco*RV	–GATATC–	–GAT ATC–		–GAT**AAA**–
	–CTATAG–	–CTA TAG–		–CTA**TTT**–

3.3. Đưa vector vào tế bào chủ

Để duy trì và biểu hiện gen tái tổ hợp cần đưa vector tái tổ hợp vào tế bào chủ thích hợp. Có bốn phương pháp chính là biến nạp, thẩm điện, tiếp hợp và tải nạp.

Trong sự biến nạp các vi khuẩn như *E. coli* có thể nhận plasmid tái tổ hợp khi bị xử lý với $CaCl_2$ lạnh để thành dạng khả nạp (competent). Các tế bào khả nạp này được trộn với ADN và cho shock nhiệt ở 42°C trong thời gian ngắn, khi đó nó sẽ thu nhận plasmid vào trong tế bào.

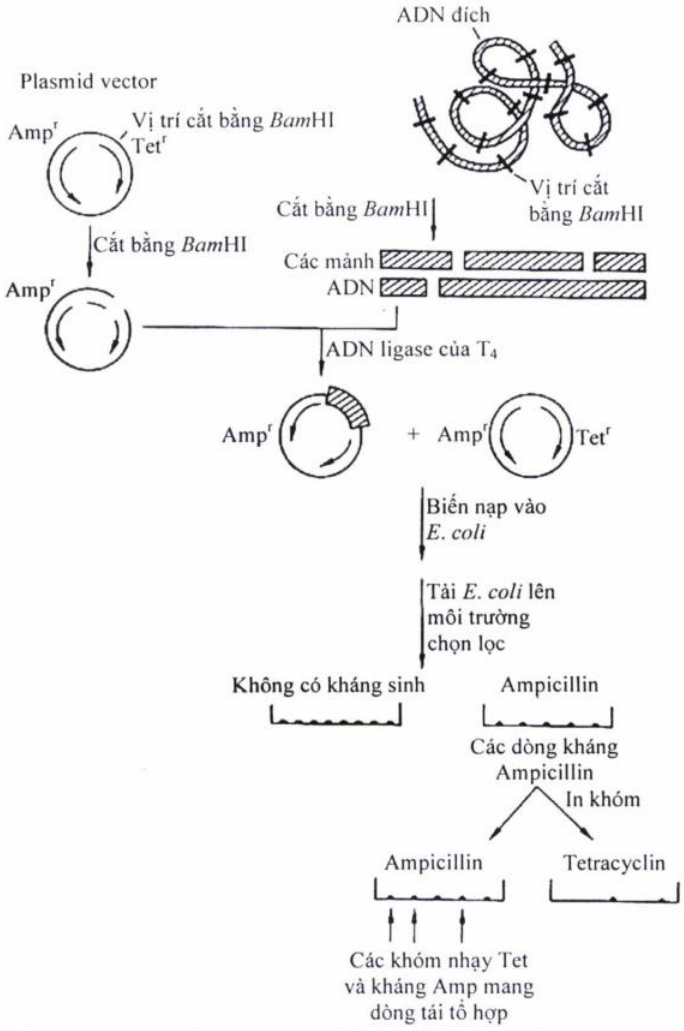
Thẩm điện là phương pháp thường gặp để đưa ADN vào tế bào vi khuẩn cũng như tế bào nhân chuẩn. Kỹ thuật này dựa vào việc đưa ADN vào tế bào khi

https://nhathuocngocanh.com/

cho tế bào tiếp xúc với điện trường cao thế. Thẩm điện cho phép đưa ADN với hầu như mọi kích thước vào tế bào.

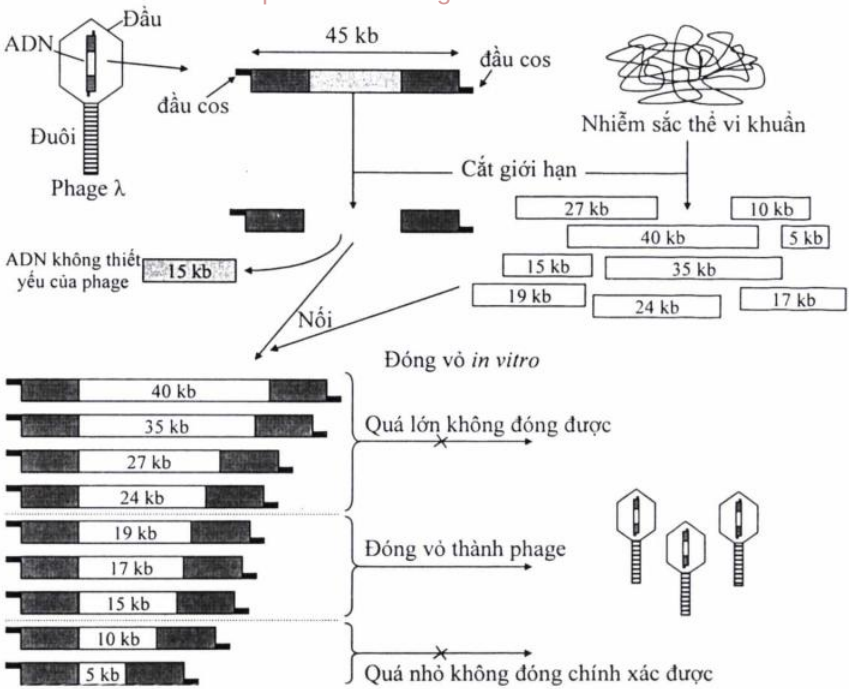
Thỉnh thoảng sự tiếp hợp cũng được sử dụng, tuy nhiên, chỉ những plasmid có mang yếu tố tiếp hợp mới chuyển được.

Tải nạp là cách chuyển ADN vào tế bào bằng virus. Phương pháp này được sử dụng để đưa phage hay cosmid tái tổ hợp vào *E. coli*.



Hình 10.3. Kỹ thuật tạo dòng và xây dựng thư viện gen bằng vector plasmid

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 10.4. Kỹ thuật tạo dòng và xây dựng thư viện gen bằng phage λ

Các mảnh ADN sau khi nối với ADN phage sẽ được trộn với vỏ của phage và cho đóng vỏ *in vitro*. Do phage λ chỉ nhận và đóng vỏ chính xác những mảnh ADN nằm giữa hai đầu cos có kích thước 35 – 45 kb nên những mảnh tái tổ hợp nào có kích thước lớn hơn hoặc nhỏ hơn giới hạn này sẽ không được đóng vỏ thành phage.

3.4. Chọn lọc thư viện gen

Với thư viện gen thu được cần phải sàng lọc hàng nghìn dòng khác nhau để tìm ra gen mong muốn, do đó việc chon lựa phương pháp sàng lọc sẽ phụ thuộc nhiều vào các hóa chất và thông tin đang có về gen đích.

Sàng lọc bằng phương pháp lai

Kỹ thuật này được dùng khi đã biết một phần trình tự của gen cần tìm hay hiện đang có một mảnh của gen này. Cách khác, một mảnh ADN của gen khác có liên quan gần đến gen cần tìm được dùng làm đoạn dò. Trong kỹ thuật lai,

https://nhathuocngocanh.com/

người ta cấy các dòng khác nhau trong thư viện lên hộp thạch rồi tạo ra một bản sao trên màng nitrocellulose hay màng nylon của các khóm hay plaque. Màng sau đó được đem lai với đoạn dò có đánh dấu phóng xạ chứa một phần trình tự đặc hiệu của gen đích. Như vậy đoạn dò chỉ bám vào chỗ có khóm hay plaque của dòng mang gen đích, sau khi xạ ký ta thu được tín hiệu trên phim và đối chiếu phim với hộp thạch ban đầu ta biết được dòng nào mang đoạn chèn có gen đích.

Sàng lọc bằng miễn dịch

Kỹ thuật này được dùng để tìm một gen mã hóa cho protein mà ta đang có kháng thể đặc hiệu. Sự thành công của phương pháp này phụ thuộc vào việc gen đích có biểu hiện được hay không. Các bước tiến hành cũng tương tự phương pháp lai, khóm hay plaque sau khi chuyển qua màng được ủ với kháng thể đặc hiệu của protein đích, kháng thể này sẽ bám vào chỗ có protein đích. Sau đó một kháng thể thứ hai có đánh dấu được thêm vào để nhận diện kháng thể trước, nhờ đó phát hiện được vị trí của kháng thể đầu tiên cũng là vị trí của protein đích.

Sàng lọc theo hoạt tính protein

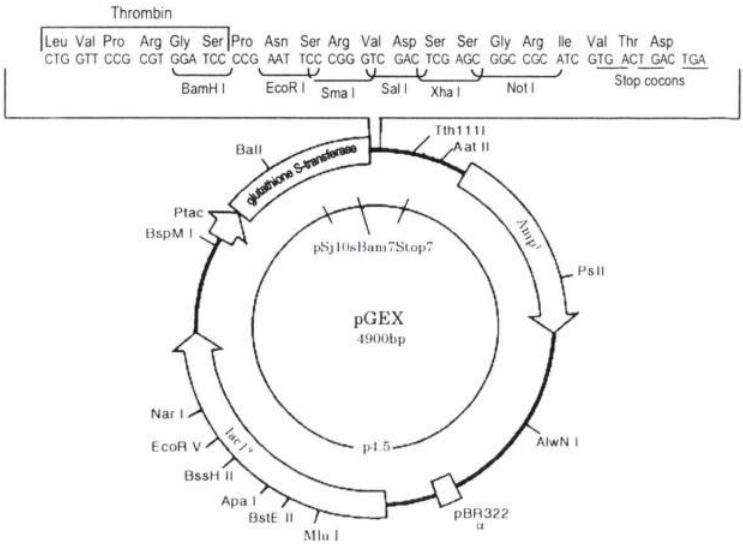
Cách này giới hạn vào các protein đích có hoạt tính đặc hiệu có thể dễ dàng xác định trong một dân số rất lớn các dòng tái tổ hợp. Và hiển nhiên gen đích phải biểu hiện được protein trong các dòng tế bào.

4. TỐI ƯU HÓA SỰ BIỂU HIỆN CỦA GEN TÁI TỔ HỢP

Một trong các mục tiêu của các công ty Dược phẩm sản xuất các thuốc tái tổ hợp mới là biểu hiện ở mức tối đa gen tái tổ hợp để thu được nhiều thuốc. Tuy nhiên, việc tạo dòng gen vào vector không đảm bảo là gen se biểu hiện mạnh. Do đó để cải thiện sự biểu hiện gen chúng ta cần tối ưu hóa các giai đoạn khác nhau của quá trình tổng hợp protein. Điều này có thể đạt được bằng cách sử dụng các vector đặc biệt gọi là vector biểu hiện *(xem hình 10.5)*.

Vector gồm có một promoter mạnh–Ptac, bị ức chế bằng $lacI^q$ do đó chỉ hoạt động khi được cảm ứng bằng lactose hay IPTG; theo sau bởi một đoạn gen mã hóa cho Glutathion–S–transferase (GST), protein này giúp cho protein đích khi nối vào có được độ tan và tính ổn định cao hơn, nhất là các protein nhỏ, ngoài ra còn giúp cho việc tinh chế protein đích bằng sắc ký ái lực với cột GST, giữa trình tự của GST và vùng tạo dòng (MCS) có vị trí cắt của thrombin, do đó ta có thể dùng thrombin để cắt loại GST ra khỏi protein đích sau khi tinh chế. Ngoài ra các yếu tố như RBS, terminator cũng được thêm vào và tối ưu hóa

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 10.5. Sơ đồ một vector biểu hiện điển hình

4.1. Tối ưu hóa phiên mã

Quá trình phiên mã phụ thuộc vào hoạt động của promoter, do đó để gen đích biểu hiện tốt, cần đặt gen dưới sự điều khiển của một promoter thích hợp và đủ mạnh *(xem hình 10.5)*. Có hai loại promoter là nội tại, điều khiển sự biểu hiện liên tục của gen, và cảm ứng, hoạt động phụ thuộc vào sự có mặt của chất cảm ứng, do đó có thể bật tắt được. Promoter cảm ứng được dùng để biểu hiện các gen mà protein của nó độc đối với tế bào, khi đó tế bào tăng trưởng đến thời điểm thích hợp thì chất cảm ứng được thêm vào và sự sản xuất protein đích mới bắt đầu.

Ngoài ra, để đảm bảo sự phiên mã ngừng lại ở đầu 3' của gen, người ta thêm vào cuối gen một trình tự gọi là terminator.

4.2. Tối ưu hóa dịch mã

Yếu tố quyết định hiệu suất dịch mã là một trình tự nucleotid ngắn nằm trước gen cần thiết cho sự gắn của ribosom (vị trí gắn ribosom–RBS) để bắt đầu sự dịch mã. Trình tự này cần lựa chọn sao cho có ái lực cao đối với ribosom của tế bào chủ, đồng thời khoảng cách của trình tự này đến codon khởi đầu cũng cần được tối ưu hóa để đảm bảo hiệu suất dịch mã cao.

Ngày nay, nhiều hệ thống biểu hiện gen đã được thương mại hóa, các hệ thống này có promoter và RBS đã được tối ưu hóa, chúng ta chỉ cần tạo dòng gen đích vào đúng vị trí trên vector là có thể tận dụng được các ưu điểm này của vector.

https://nhathuocngocanh.com/

Các protein nhỏ có thể bị phân hủy bởi các protease nội bào khi được biểu hiện trong tế bào chủ không phải là tế bào nguyên thủy của nó. Để tránh hiện tượng này, người ta thường nối nó với một protein lớn hơn và quá trình dịch mã sẽ tạo ra một protein lai (fusion protein). Phần protein ngoại lai được nối vào còn có thể giúp cho việc tinh chế và xử lý protein đích và có thể được loại bỏ khi hoàn thành nhiệm vụ *(xem hình 10.5)*.

Vấn đề protein đích bị phân hủy sau khi dịch mã còn có thể khắc phục bằng cách sử dụng các tế bào chủ bị đột biến không có protease.

4.3. Biến đổi hậu dịch mã

Protein đích sau khi dịch mã có thể cần phải trải qua nhiều khâu xử lý để có hoạt tính sinh học cần thiết. Các biến đổi hậu dịch mã này có thể là tạo cầu disulfit hay cắt bỏ tiền chất, glycosyl hóa, ... Tuy nhiên, *E. coli* là tế bào hay được sử dụng nhất lại không thực hiện được nhiều trong số các biến đổi này nên việc lựa chọn tế bào chủ thích hợp có khả năng thực hiện các biến đổi hậu dịch mã là hết sức quan trọng.

Bảng 10.3. So sánh các tế bào chủ trong biểu hiện gen tái tổ hợp

Tế bào chủ	Ưu điểm	Nhược điểm
E. coli	Dễ nuôi cấy ở quy mô lớn Các kiểm soát phiên mã và dịch mã được biết rõ Đã được sử dụng thành công để sản xuất insulin, interferon, somatotropin	Khó làm cho một số protein bài xuất vào môi trường Phân hủy protein nhỏ bởi protease Không thể thực hiện hầu hết các biến đổi hậu dịch mã Nhiều protein nằm trong tế bào chất dưới dạng không tan
Bacillus subtilis	Nhiều protein có thể xuất vào môi trường nuôi cấy Dễ nuôi cấy ở quy mô lớn	Điều hòa biểu hiện gen chưa được hiểu rõ hết Ít vector có mức biểu hiện cao Không thể thực hiện hầu hết các biến đổi hậu dịch mã
Saccharomyces cerevisiae	Dễ nuôi cấy ở quy mô lớn Glycosyl hóa được tốt Xuất protein vào môi trường tốt Có nhiều hệ thống biểu hiện ở mức cao Protein tái tổ hợp không tạo thể không tan trong tế bào chất	Điều hòa biểu hiện gen chưa được hiểu rõ hết Đôi khi không thực hiện được biến đổi hậu dịch mã một cách chính xác
Nấm men khác	Dễ nuôi cấy ở quy mô lớn Có thể glycosyl hóa, một số được tối ưu hóa như: *Pichia pastoris* và *Hansenula polymorpha* Dễ xuất protein vào môi trường	Biểu hiện gen khó kiểm soát Đôi khi biến đổi hậu dịch mã không chính xác

https://nhathuocngocanh.com/

Tế bào chủ	Ưu điểm	Nhược điểm
Tế bào côn trùng	Mức biểu hiện cao	Khó lên quy mô lớn
	Không có nguy cơ virus hay prion	Các chuỗi mannose có thể gây ung thư
	Glycosyl hóa chính xác	
Tế bào động vật có vú	Biến đổi hậu dịch mã chính xác đối với protein người	Điều hòa biểu hiện gen chưa được hiểu rõ hết
	Các nhiều hệ thống biểu hiện tốt	Tỷ lệ xuất protein ra ngoài thấp
	Protein tái tổ hợp ổn định cao	Có nguy cơ nhiễm virus
		Khó lên quy mô lớn
Động vật chuyển gen	Biến đổi hậu dịch mã chính xác	Nguy cơ nhiễm cao
	Dễ dàng thu được lượng lớn protein tái tổ hợp, ví dụ một con dê có thể cho 1 kg protein tái tổ hợp trong sữa mỗi năm	Sản phẩm đôi khi không ổn định
	Tương đối rẻ	

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phân biệt chủng để tạo dòng và chủng để biểu hiện gen
2. Trình bày các ưu điểm của vector plasmid
3. Trình bày các ưu điểm của vector từ phage
4. So sánh các tế bào chủ để biểu hiện gen
5. Công nghệ di truyền là quá trình
   A. Biến đổi phân tử ADN bên ngoài VSV
   B. Làm cho phân tử ADN thu được có thể biểu hiện chức năng trong tế bào
   C. Đưa phân tử ADN đã biến đổi vào tế bào
   D. Cắt nối phân tử ADN
   E. Tất cả
6. Kỹ thuật bổ sung alpha để đánh dấu chèn
   A. Vector mang đoạn chèn có cấu trúc alpha
   B. Vector mang đoạn chèn mất yếu tố alpha
   C. Vector mang đoạn chèn nhận được yếu tố alpha
   D. Đoạn chèn cung cấp yếu tố alpha
   E. Yếu tố alpha giúp việc nối đoạn chèn vào vector dễ dàng hơn

https://nhathuocngocanh.com/

Khoanh tròn ý trả lời đúng trong các câu

7. Cho biết:

Enzym	Đầu cắt	
*Sau*3A	– GATC	–
	–	CTAG–
BamHI	– GGATC	C–
	– C	CTAGG–

A. Hai enzym trên có đầu cắt tương thích

B. Hai enzym trên có đầu cắt không tương thích

C. Đầu cắt của *Sau*3A không nối lại được

D. Đầu cắt của *Bam*HI không nối lại được

E. Đầu cắt của *Sau*3A là đầu tù

8. Khi tạo dòng, vector được cắt tại

A. Vị trí đánh dấu chèn

B. Gen đề kháng kháng sinh

C. Vùng promoter

D. Vùng Ori

E. Vùng tạo dòng

9. Muốn biểu hiện được sau khi tạo dòng, cần đặt đoạn chèn ở

A. Trước promoter

B. Trước RBS

C. Trước promoter và RBS

D. Sau promoter và RBS

E. Sau promoter và trước RBS

10. Nhược điểm của tế bào động vật có vú khi dùng để biểu hiện gen tái tổ hợp

A. Điều hòa chưa được biết rõ

B. Tỷ lệ xuất protein ra ngoài thấp

C. Có nguy cơ nhiễm virus

D. Khó lên quy mô lớn

E. Tất cả

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 11

ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ GEN

MỤC TIÊU

1. Nêu được các vấn đề của công nghệ sản xuất protein truyền thống.

2. Trình bày được chiến lược tạo dòng gen để sản xuất một số dược phẩm tái tổ hợp.

3. Trình bày được các hệ thống vector được sử dụng trong liệu pháp gen.

4. Biết được nguyên lý và ứng dụng của liệu pháp gen.

1. SẢN XUẤT PROTEIN TÁI TỔ HỢP

1.1. Các vấn đề của công nghệ sản xuất protein truyền thống

Trước đây, hormon và protein trị liệu được sản xuất bằng con đường chiết tách từ mô, dịch nội tạng động vật hay người. Phương pháp này có nhiều khó khăn do hàm lượng các protein này trong cơ thể rất thấp nên số lượng sản xuất không đủ cung cấp. Quy trình sản xuất lại rất khó khăn và tốn kém làm cho giá thành sản xuất rất cao. Bên cạnh đó, nếu nguồn gốc protein từ động vật lại không hoàn toàn giống ở người nên có nhiều phản ứng phụ hay phản ứng dị ứng. Nhiều trường hợp nguyên liệu hay sản phẩm chứa các mầm virus hay prion nguy hiểm đối với người sản xuất cũng như người dùng.

Ngày nay với sự ra đời của công nghệ gen, các hormon protein và protein trị liệu đều được sản xuất bằng con đường tái tổ hợp di truyền. Gen quy định các protein này của người được tạo dòng và dùng để sản xuất protein nhờ vi sinh vật tái tổ hợp. Sản phẩm thu được hoàn toàn có nguồn gốc từ người (gen của người) nên các vấn đề về dị ứng và tác dụng phụ được giải quyết triệt để. Các nồi lên men sản xuất protein trị liệu ở quy mô công nghiệp cỡ 2000 – 5000 lít.

1.2. Erythropoietin

Hóa sinh và sinh lý học của EPO

Trước đây hơn 100 năm, chứng thiếu oxy được cho là nguyên nhân kích thích sự tạo hồng cầu. Vào năm 1977, erythropoietin (EPO) người đã được tinh chế từ những bệnh nhân thiếu máu vô hình. Gen người mã hóa cho EPO được tạo dòng năm 1985, và hiện nay đã có EPO tái tổ hợp (rEPO). Một đơn vị hoạt tính (U) EPO được định nghĩa như là hoạt tính kích thích sự tạo hồng cầu bởi 5 µmol

https://nhathuocngocanh.com/

$CoCl_2$ được tiêm vào một con chuột đực Sprague Dawler đói. Ion Cobalt thúc đẩy sự tạo hồng cầu thông qua việc kích thích sản xuất EPO, bởi vì ion này giả lập tình trạng thiếu oxy máu. rEPO của người chuẩn gần đây nhất chứa 130.000 U/mg protein khi nó được glycosyl hóa đầy đủ. Nồng độ trong máu ở người trưởng thành khỏe mạnh trong khoảng từ 10 đến 30 mU/mL. Năm 1989, thụ thể EPO đã được tạo dòng từ dòng tế bào ung máu và con đường truyền tín hiệu của EPO đã được nghiên cứu trong những thập niên gần đây.

EPO kích thích quá trình sản xuất hồng cầu bằng cách thúc đẩy quá trình phát triển của những tiền tế bào erythroid muộn và sự trưởng thành của chúng thành những tiền nguyên hồng cầu, tại đó quá trình tổng hợp globin bắt đầu. EPO được chấp nhận rộng rãi như là chất điều hòa sinh lý chính trong quá trình biệt hóa erythroid và kiểm soát việc duy trì mức độ sinh lý của lượng hồng cầu lưu thông. EPO là một protein glycosyl hóa nhiều và được sản xuất chủ yếu ở thận của người trưởng thành. Bệnh thiếu máu kết hợp với thiểu năng thận thường do bởi sự suy giảm EPO, và việc sử dụng EPO có thể cải thiện rõ rệt tình trạng các bệnh nhân này với ít phản ứng phụ. Carbohydrat gắn với EPO giữ vai trò quan trọng trong việc thể hiện hoạt tính *in vivo*.

Hóa học

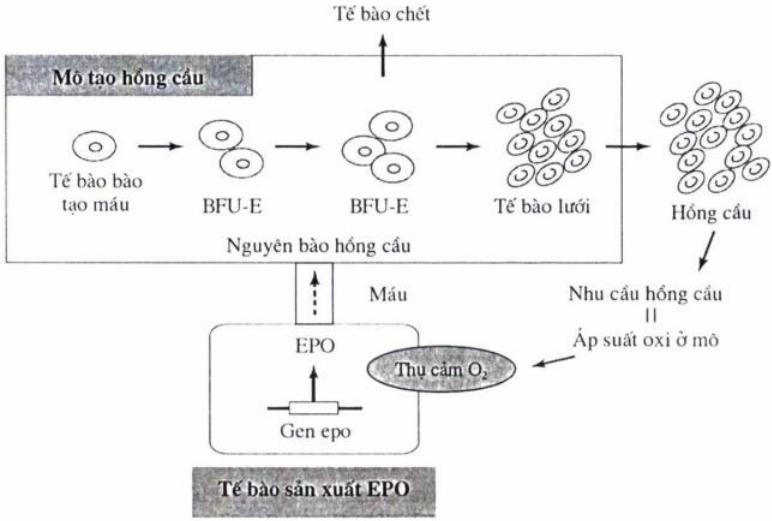
Gen EPO người được nằm trên nhiễm sắc thể 7p11–q11. Gen EPO chuột được khoanh vùng trên nhiễm sắc thể số 5. Gen chỉ có một bản sao với chiều dài 4 kb với một vùng promoter nhỏ, 5 exon, 4 intron, và trình tự tăng cường được cảm ứng bởi sự giảm oxy máu. Promoter, nằm trong intron đầu tiên, và trình tự tăng cường được cảm ứng bởi sự thiếu oxy máu có độ tương đồng cao giữa EPO người và chuột. ADNbs ở EPO người mã hóa cho 193 acid amin. EPO dạng hoạt động được phân lập từ nước tiểu người gồm có 165 acid amin và được tạo thành do cắt bỏ đoạn peptid tín hiệu gồm 27 acid amin N–tận và Arg C–tận trong quá trình xử lý hậu dịch mã. Hai cầu disulfid nối vị trí 7 và 161; 29 và 33. Cầu disulfid giữa 7 và 161 cần thiết cho hoạt tính sinh học EPO. Protein EPO người và chuột có tỷ lệ tương đồng khoảng 80%, nên EPO người có thể gắn chéo với thụ thể EPO chuột và ngược lại. Protein EPO có mức tương đồng đáng kể với thrombopoietin trưởng thành, tác nhân điều hòa chủ yếu của megakaryopoiesis.

Sinh tổng hợp EPO

Khi mà các tế bào thận chịu trách nhiệm cho quá trình sản xuất EPO vẫn bình thường, mối quan hệ giữa nồng độ của EPO và hemoglobin trong máu thông thường là nghịch đảo. Sự suy giảm lượng hemoglobin, do mất máu chẳng hạn, được phát hiện bởi những tế bào sản xuất EPO trong thận thông qua sự giảm cung cấp oxygen *(xem hình 11.1)*. Nồng độ thấp của oxygen kích thích sự phiên mã của gen EPO, và kết quả là EPO tăng lên trong máu và thúc đẩy sự tăng sinh và biệt hóa của những tiền tế bào hồng cầu ở giai đoạn sau (CFU–E),

https://nhathuocngocanh.com/

tiền tế bào hồng cầu bị tác động bởi EPO, thành tế bào hồng cầu trưởng thành. Việc khôi phục lại lượng hồng cầu với hệ quả cung cấp đủ oxygen sẽ ức chế quá trình sản xuất EPO.



Hình 11.1. Điều hòa quá trình tạo hồng cầu bởi EPO

Hoạt động của EPO

Sự tạo hồng cầu bị ảnh hưởng bởi vài yếu tố tăng trưởng tế bào máu. EPO là một glycoprotein giữ vai trò thiết yếu trong việc điều hòa sự tạo hồng cầu bằng cách kích thích quá trình tăng sinh và biệt hóa của những tiền tế bào erythroid. Tất cả những tế bào máu biệt hóa ở giai đoạn cuối bắt nguồn từ những tế bào gốc đa năng có khả năng sinh sản. Quá trình tạo hồng cầu tập trung ở xương tủy, và lách cũng là một vị trí tạo máu hoạt động ở chuột. Những tế bào gốc cấp hai được biệt hóa thành những tế bào gốc đa năng với khả năng biệt hóa thành vài dòng nguyên bào đặc thù nhưng mất khả năng sinh sản. Mỗi dòng nguyên bào đặc thù biệt hóa thành các tế bào máu trưởng thành như là hồng cầu, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu hạt, tế bào nhân khổng lồ. Những nguyên bào đặc thù cho hồng cầu sơ khai nhất có nguồn gốc từ những tế bào gốc đa năng là những tiền tế bào hồng cầu ở giai đoạn sớm nhất (BFU–E). Mặc dù BFU–E biểu hiện thụ thể của EPO, sự đáp ứng của chúng với EPO thấp, và chúng cần các bổ sung cytokine như là interleukin 3 hay yếu tố kích thích khóm đại thực bào–bạch cầu hạt để tăng sinh và biệt hóa thành CFU–E, dạng nhạy cảm cao nhất đối với EPO. Chuột đồng hợp tử mang đột biến mất chức năng trong gen thụ thể EPO chết trong phôi thai ở ngày thứ 13, bởi vì không tạo được hồng cầu trưởng thành, mặc

https://nhathuocngocanh.com/
dù có mặt rất nhiều CFU–E. Do đó, EPO cần thiết cho sự biệt hóa và tăng sinh của CFU–E. Gần đây, một chức năng mới của EPO trong CNS đã được đưa ra. Những dòng tế bào thần kinh như là PC12 và SN6 biểu hiện thụ thể EPO, và sự gắn của EPO trên các tế bào PC12 làm tăng nồng độ nội bào của những monoamine. EPO bảo vệ các nơron vỏ não và dưới đồi được nuôi cấy đối với độc tính của glutamate qua trung gian thụ thể NMDA, độc tính này được cho là nguyên nhân chính gây ra sự chết nơron do thiếu máu cục bộ. Những nghiên cứu này cho thấy EPO giữ vai trò bảo vệ thần kinh khi não bị thiếu oxy huyết hay thiếu máu cục bộ.

Chức năng của carbohydrate được gắn vào EPO trong việc tạo máu

Phần carbohydrate gắn vào các protein hoạt động trong hệ nội tiết, ví dụ EPO, có nhiều chức năng sinh học khác nhau. Đầu tiên, carbohydrat của glycoprotein cần cho sự sinh tổng hợp và bài tiết của nó, bao gồm sự gấp của protein trong quá trình dịch mã và bảo vệ protein khỏi bị thoái hóa nội bào. Thứ hai, carbohydrat giúp protein bền vững để protein không bị loại trừ khỏi hệ tuần hoàn trong quá trình di chuyển của nó từ nơi sản xuất đến tế bào đích. Những tế bào động vật có vú, đặc biệt là tế bào gan, biểu hiện những protein (lectin) liên kết với carbohydrat trong glycoprotein. Do đó sự glycosyl hóa của protein có thể là tín hiệu xác định thời gian sống của chúng trong hệ tuần hoàn. Thứ ba, carbohydrat liên quan đến sự thể hiện hoạt tính sinh học, bao gồm các bước gắn của protein vào tế bào đích và sự truyền tín hiệu nội bào.

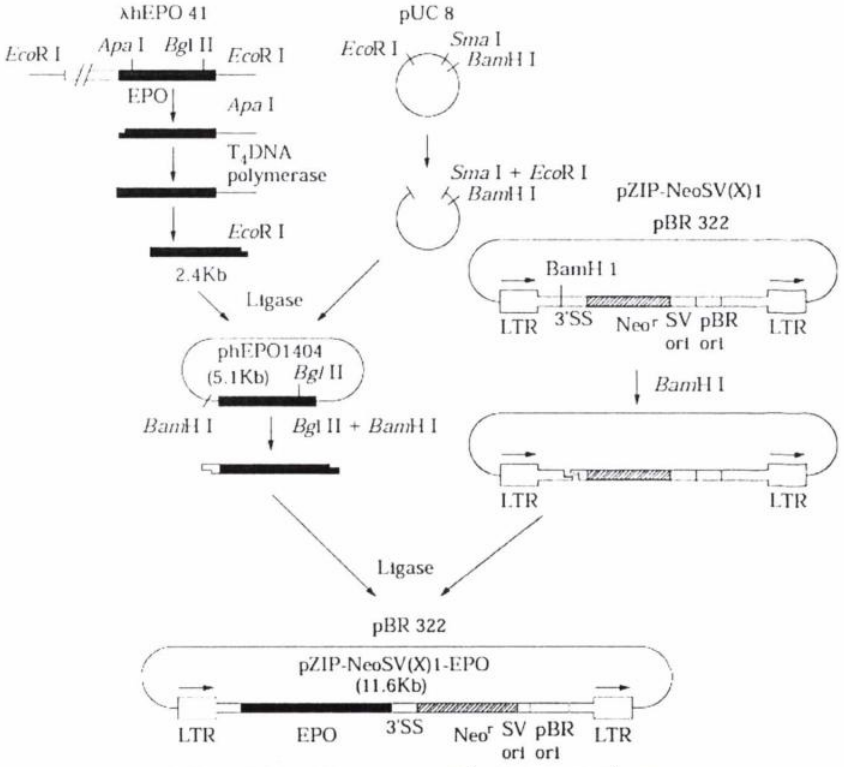
Việc loại bỏ phần carbohydrat ở EPO không ảnh hưởng đến hoạt tính *in vitro* nhưng làm giảm mạnh sự sinh tổng hợp EPO và hoạt tính *in vivo* của nó.

Sản xuất và tinh chế EPO tái tổ hợp

Trong vài trường hợp, các carbohydrate gắn trên protein giữ vai trò chính trong việc biểu hiện hoạt tính sinh học của chúng. Những carbohydrate có thể cần cho hoạt tính *in vitro* cũng như *in vivo*. Thậm chí khi những carbohydrate không cần cho hoạt tính *in vitro*, nó lại rất quan trọng trong *in vivo*; carbohydrate bảo vệ glycoprotein khỏi sự bất hoạt do nhiệt và sự phân hủy protein, kết quả là kéo dài thời gian hoạt động trong hệ tuần hoàn máu. Tế bào nhân thật được dùng để sản xuất các glycoprotein tái tổ hợp. Để ứng dụng trong lâm sàng không chỉ cần glycosyl hóa mà còn cần cấu trúc chính xác của những carbohydrate được gắn; một glycoprotein mà phần carbohydrate tận cùng được nhận diện bởi thụ thể gan sẽ bị loại nhanh chóng ra khỏi tuần hoàn. Kiểu cấu trúc carbohydrate cũng có thể ảnh hưởng đến tính kháng nguyên của sản phẩm tái tổ hợp. Khi những glycoprotein tái tổ hợp được sản xuất trong các tế bào động vật khác loài, chuỗi acid amin của nó sẽ quy định những vị trí mà chuỗi carbohydrate sẽ gắn vào protein, nhưng sự hoàn thành của chuỗi có thể phụ thuộc hoàn toàn vào tế bào chủ. Do đó, điều quan trọng là phải so sánh đặc tính

https://nhathuocngocanh.com/

của những glycoprotein tái tổ hợp sản xuất từ những dòng tế bào khác nhau với những glycoprotein tự nhiên. Glycoprotein cũng có thể phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy.



Hình 11.2. Quy trình tạo vector biểu hiện EPO tái tổ hợp

Phân lập và biểu hiện của gen EPO

Peptid lấy từ EPO niệu (u–EPO) được định trình tự để chuẩn bị đoạn dò ADN tổng hợp nhằm sàng lọc thư viện gen của gan bào thai người tìm gen EPO. Phân tích bằng enzym cắt giới hạn và Southern blot cho thấy những đoạn gen trong ba dòng thể thực khuẩn đều giống nhau. Một dòng, λEPO41, được sử dụng định trình tự. Toàn bộ chuỗi acid amin của EPO đã được xác định. Dòng λEPO41 chứa toàn bộ vùng mã hóa EPO, mặc dù thiếu một nửa vùng 3' không dịch mã. Vector biểu hiện EPO trong tế bào động vật được tạo ra theo quy trình trong hình 11.2. Vector biểu hiện EPO, pZIP–NeoVS(X) 1–EPO, chứa gen EPO nằm

https://nhathuocngocanh.com/

ngay sau một trình tự lặp đầu tận dài (LTR) đóng vai trò promoter phiên mã và được theo sau bằng trình tự ADN lấy từ transposon Tn5 (đoạn Neo trong hình 11.2) chứa gen đề kháng G418 trên tế bào động vật có vú. Vector biểu hiện được đưa vào hai dòng tế bào động vật có vú, tế bào BHK có nguồn gốc từ thận chuột đồng non, và tế bào ψ2 có nguồn gốc từ NIH/3T3. Cả hai loại tế bào này được chuyển nhiễm bằng phương pháp calcium phosphate. Những tế bào sản xuất EPO được phân lập nhờ chọn lọc trong môi trường G418 và qua lần pha loãng giới hạn. Mức EPO trong dịch nuôi cấy của những tế bào sản xuất EPO được định lượng bằng phương pháp định lượng miễn dịch phóng xạ (RIA) là 150 U/mL đối với tế bào BHK và 300 U/mL đối với tế bào ψ2.

Nuôi cấy tế bào và sản xuất EPO

Những tế bào BHK được nuôi cấy trong môi trường cơ bản Eagle bổ sung thêm 10% huyết thanh bê và 10% canh thang bacto tryptose phosphate. Tế bào ψ2 được nuôi trong môi trường Eagle được cải tiến theo Dulbecco bổ sung thêm 10% huyết thanh bê. Mẫu cấy tế bào để sản xuất EPO được bắt đầu với mật độ là 2×10^5 tế bào/mL trong khay nhựa (Nhà Máy Tế Bào của NUNC, 6000m^2) chứa 2 lít môi trường. Sau 4 ngày nuôi cấy, tế bào đã phát triển gần chồng lên nhau. Môi trường nuôi cấy được thay thế bằng môi trường chứa lượng huyết thanh thấp (1,5% huyết thanh bê) và dịch nổi của môi trường nuôi cấy được thu hoạch sau mỗi 3 ngày.

Tinh chế rEPO người

Kháng thể đơn dòng (MAb) từ u–EPO được dùng để tinh chế EPO từ niệu người và dịch nuôi cấy của tế bào BHK sản xuất rEPO, nhưng cần xử lý EPO với SDS trước để EPO gắn với MAb. Để tinh chế nhanh hơn, người ta sử dụng một MAb mới, R2.

Dịch nuôi cấy (100 L) được lọc hút và cô thành 2 L với siêu lọc trên thiết bị sợi rỗng (hollow fiber) (Amicon DC–10, Anvers, Mass) với ngưỡng phân tử lượng 10.000. Dịch cô đặc được cho vào cột hấp phụ miễn dịch (4,4 × 6,6 cm) chứa MAb của EPO R2 gắn trên Affi–gel 10 đã cân bằng với đệm phosphate sinh lý (PBS). Cột được rửa nhiều lần với PBS, 10 mM NaPi pH 7,4, chứa 0,5 M và 0,15 M NaCl theo thứ tự. EPO được giải hấp phụ bằng 0,2 M acetate pH 2,5, chứa 0,15 M NaCl. Sau khi trung hòa dịch giải hấp phụ, protein được cô đặc bằng siêu lọc với thiết bị sợi rỗng (Mini–Module NM–3, Asahikasei, Tokyo) và được kết tủa với cồn 90%. Tủa được hòa tan với một lượng nhỏ PBS và cho vào cột Saphadex G–100 (2,2×94 cm) đã cân bằng với PBS. EPO trong phần này được cô và kết tủa với cồn 90%. Tủa được hòa tan trong 10 mM natri phosphat (NaPi) pH 6,8, chứa 10 μM $CaCl_2$ và được cho vào cột hydroxyapatit (100×7,8 mm: Bio–gel HPHT, Bio–rad) được cân bằng với cùng dung dịch đệm. EPO hấp phụ được giải hấp phụ bằng cách tăng nồng độ NaPi. rEPO–B xuất hiện trong dịch chảy ra của cột

https://nhathuocngocanh.com/

được cân bằng với 10 mM NaPi, trong khi rEPO–ψ được tách ra ở 50 mM NaPi. Hiệu suất tổng quát đối với tế bào BHK khoảng 52% so với tổng hoạt tính ban đầu. Sản phẩm tinh chế chứa 137.000 U/A_{280nm} *(xem Bảng 11.1)*. Cột MAb R2 có thể được dùng lại 30 lần mà không giảm hiệu suất.

Hiện nay, Chế phẩm Tham chiếu Quốc tế phiên bản 2 của EPO người lấy từ Phòng thí nghiệm Quốc tế về Tiêu chuẩn Sinh học của WHO, tại Viện Nghiên cứu Y học Quốc gia, London.

Bảng 11.1. Tinh chế EPO tái tổ hợp từ tế bào BHK

Quy trình	Protein (A_{280nm})	Hoạt tính ($U \times 10^4$)	Hoạt tính chuyên biệt (U/A_{280nm})	Hiệu suất (%)	Mức tinh chế (lần)
Dịch nuôi cấy cô đặc	473.000	1.990	42	100	1
Cột hấp phụ miễn dịch	141	1.680	119.000	84	2830
Sephadex G–100	97	1.310	135.000	66	3210
Hydroxyapatit	75	1.030	137.000	52	3260

Người ta ghi nhận rằng kháng thể đơn dòng kháng EPO (MAb) gắn với kháng nguyên sau khi được xử lý với SDS. Điều này chỉ ra rằng kháng thể gắn với epitope được để lộ ra do sự thay đổi cấu trúc của EPO bởi SDS. Kháng thể này hoạt động hiệu quả trong việc tinh chế EPO từ phần dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào và từ EPO nước tiểu người, tuy nhiên việc xử lý chế phẩm chứa EPO với SDS mất khá nhiều thời gian. Người ta đã tạo được những MAb có khả năng gắn với EPO tự nhiên và và nhờ đó có thể : (1) xây dựng một quy trình tinh chế EPO nhanh hơn bằng MAb cố định, (2) phát triển phản ứng ELISA kiểu kẹp chả dễ dàng thực hiện, nhanh và nhạy hơn phương pháp định lượng phóng xạ miễn dịch (RIA), bằng cách sử dụng MAb gắn với EPO ở những hapten khác nhau.

1.3. Interferon

Giới thiệu

Vào năm 1957, A. Isaacs và J. Lindenmann đã ghi nhận khi các tế bào động vật có vú được ủ với virus cúm bị bất hoạt bởi nhiệt đã sản xuất ra một chất làm cho các tế bào mới trở nên kháng với sự nhiễm virus sống. Chất này được gọi là ***interferon***, là một hệ protein riêng biệt, nhiều chất trong số chúng có quan hệ cấu trúc, và là sản phẩm của một họ đa gen hoặc các gen riêng lẽ. Các interferon (IFN) là các chất kháng virus đặc biệt vì chúng tác động trực tiếp trên tế bào

https://nhathuocngocanh.com/
đích để làm cho tế bào trở nên kháng với sự nhiễm virus tại một hay nhiều giai đoạn phát triển của virus, nhưng không có độc tính trực tiếp đối với virus. Tác động sinh học của IFN không chỉ giới hạn trên virus mà còn có thể chống tăng sinh và điều hòa miễn dịch trên các mô hình *in vitro* và thú. Nhiều loại tế bào động vật có thể sản xuất IFN để đáp ứng với các cảm ứng bên ngoài khác nhau như kháng nguyên, một số ARN sợi đôi và các chất kích thích nguyên phân.

Việc tinh chế IFN từ nguồn tự nhiên để xác định cấu trúc và tính chất sinh học rất khó khăn vì chúng mặc dù có hoạt tính sinh học rất cao nhưng hoạt động với nồng độ cực thấp. Weissmann và cộng sự đã tạo dòng thành công vào *Escherichia coli* một loại IFN, IFN–2, từ lympho bào người, cho phép sản xuất đến hàng gam IFN để nghiên cứu.

IFN–2 b (Intron A) được biến đổi di truyền đã được chấp nhận để sử dụng thương mại ở hơn 30 quốc gia để điều trị các ung thư, virus như bệnh bạch cầu tế bào lông, ung thư mô liên kết Kaposi liên quan đến hội chứng suy giảm miễn dịch (AIDS), ung thư tế bào biểu mô thận, u hắc tố ác tính, u đa tủy, u nhú thanh quản, và mụn cóc sinh dục.

Phân loại và nguồn gốc

Hệ thống phân loại các IFN đầu tiên dựa trên hiện tượng bất hoạt đối với hoạt tính kháng virus của một số IFN ở pH 2. Các IFN ổn định ở pH 2 được gán vào loại I, trong khi các IFN bị hư hỏng được xếp vào loại II. Do đó, hệ thống này có sự dị biệt về nguồn gốc các IFN. IFN loại I được sản xuất bởi lympho bào và nguyên bào sợi khác nhau về tính kháng nguyên và đặc tính hóa học. Do đó người ta đặt lại tên theo nguồn gốc, ví dụ IFN của lympho bào và IFN của nguyên bào sợi. Cách phân loại này cũng chưa đủ để phân biệt vì IFN của nguyên bào sợi được xác định bằng kháng thể đặc hiệu cũng tìm thấy từ lympho bào; và ngược lại. Do đó, cộng đồng nghiên cứu quốc tế đã đi đến thỏa thuận phân loại IFN theo *alpha* và *beta*, tùy theo đặc tính kháng nguyên của chúng. Một loại IFN thứ ba được phân biệt theo kháng nguyên, được gọi là là IFN *gamma* (hay *miễn dịch*); loại IFN này được sản xuất chủ yếu bởi lympho bào T khi bị kích thích bởi kháng nguyên đặc hiệu hay các chất kích thích nguyên phân và cũng được xếp vào loại II (vì không bền với acid).

Ngoài virus, một số tác nhân tự nhiên và tổng hợp khác cũng cảm ứng được sự sản xuất IFN ở nhiều tế bào khác nhau. Bảng tóm tắt các loại tế bào sản xuất IFN và tác nhân cảm ứng tương ứng. Các tác nhân cảm ứng interferon bao gồm vi khuẩn, protozoa, mycoplasma, rickettsia, và các sản phẩm của vi khuẩn (như chiết xuất thành tế bào, lipopolysaccharid, và nội độc tố). Tác động của các acid nucleic và các đa ion tự nhiên hay tổng hợp như ARN sợi đôi, polynucleotid tổng hợp, và polycarboxylate tổng hợp trên sự sản xuất IFN cũng được nghiên cứu rất nhiều. Các hợp chất phân tử lượng thấp như anthraquinone, propanediamine,

https://nhathuocngocanh.com/

acridine, pyrimidine và fluorenone cũng có thể cảm ứng IFN trong huyết thanh một số thú. Các yêu cầu đặc thù về cấu trúc của các hợp chất phân tử lượng thấp để gây cảm ứng được IFN chưa được xác định. Các chất ức chế chuyển hóa (ví dụ actinomycin D), chất kích thích nguyên phân, kháng nguyên, và tế bào khối u cũng được xác định là tác nhân cảm ứng IFN.

Bảng 11.2. Các IFN theo loại, nguồn gốc và tác nhân cảm ứng

Loại	Nguồn gốc	Tác nhân cảm ứng
Alpha (lympho bào, loại 1)	Đại thực bào	Virus
	Tế bào B	Các tế bào ngoại lai và sản phẩm của chúng
	lympho bào không B, không T	Tác nhân cảm ứng phân tử lượng thấp (ví dụ tilorone)
Beta (nguyên bào sợi loại I)	Tế bào biểu mô	Virus
	Nguyên bào sợi	Polynucleotid
	Lympho bào không B, không T	Các tế bào ngoại lai và sản phẩm của chúng
	Nguyên bào lympho	Các chất ức chế chuyển hóa, chất kích thích nguyên phân tế bào B
Gamma (miễn dịch, loại II)	Tế bào T	chất kích thích nguyên phân tế bào T
	Lympho bào không B, không T	Kháng nguyên ngoại lai và các chất ức chế chuyển hóa

Hoạt tính sinh học

IFN được phát hiện đầu tiên bởi hoạt tính kháng virus, giúp bảo vệ tế bào chống lại sự nhiễm virus. Tuy nhiên, các IFN tự nhiên và tái tổ hợp còn có nhiều tác dụng sinh học khác, như tác dụng ức chế tăng trưởng tế bào, điều hòa miễn dịch nhờ làm tăng hoạt động của các tế bào miễn dịch (ví dụ tế bào NK – natural killer). Một đặc điểm quan trọng của IFN là tính đặc hiệu loài; tất cả các loại IFN của người hoạt động hiệu quả trên tế bào người nhưng rất kém trên tế bào thú. Gần đây các hoạt tính sinh học của IFN được xác định chủ yếu dựa vào các IFN tái tổ hợp tinh khiết. Các hoạt tính này được chia là ba loại như sau:

Hoạt tính kháng virus

Nhiều virus chứa ARN hoặc ADN bị ức chế bởi IFN. Ví dụ virus ADN như herpes virus loại 1 và 2, cytomegalovirus. Ví dụ virus ARN như rhinovirus và virus hợp bào phổi. Ngoài ra, IFN có tác động hiệp lực với nhiều tác nhân kháng virus. Tuy nhiên, mức độ kháng virus không chỉ phụ thuộc vào loại virus mà còn vào đặc tính của tế bào đích, loại IFN, và tỷ lệ virus nhiễm với số tế bào.

https://nhathuocngocanh.com/

Interferon giúp tế bào đề kháng với sự nhiễm virus bằng cách tác động đến các giai đoạn khác nhau trong chu kỳ nhân bản của virus. Nó có thể ức chế các giai đoạn sớm (ví dụ gắn, nhập bào qua trung gian thụ thể, mất bao, và phiên mã), sự dịch mã các ARN thông tin, và sự trưởng thành của virus, bao gồm cả việc đâm chồi của virion trên màng tế bào. Các bằng chứng khác cho thấy IFN làm giảm khả năng nhiễm của các virion thế hệ sau.

Hoạt tính kháng tế bào

Interferon có thể ức chế sự tăng trưởng của nhiều loại tế bào bình thường và tế bào ung thư *in vitro*. Tác dụng kháng tăng trưởng của IFN chủ yếu có tính kìm hãm (ví dụ ngăn cản sự phân bào) hơn là tiêu diệt (ví dụ trực tiếp giết chết tế bào). Tính nhạy cảm với tác dụng ức chế của IFN thay đổi, ngay cả đối với các tế bào có cùng kiểu mô học; điều này có thể do sự khác nhau về số thụ thể IFN hay ái lực của IFN trên thụ thể.

Sự phối hợp các IFN và tác nhân hóa trị liệu có tính hiệp lực hay cộng lực trong việc kháng khối u. Sự hiệp lực là kết quả của một chuỗi các yếu tố tương tác phức tạp, bao gồm bản chất ung thư, cơ chế tác động của tác nhân diệt tế bào, và chế độ liều dùng IFN và tác nhân hóa trị liệu. Tác động hiệp lực phụ thuộc nhiều vào chế độ sử dụng, ví dụ dùng IFN trước hoặc sau tác nhân hóa trị liệu, hoặc dùng đồng thời. Nhiều tác nhân hóa trị liệu không có tác động hiệp lực với IFN.

Một khía cạnh quan trọng trong tác động kháng tế bào của IFN là nó có khả năng điều hòa trạng thái biệt hóa của tế bào, có thể là ức chế hay kích thích. Interferon cũng tương tác hiệp lực với các tác nhân ức chế biệt hóa khác. Sự cảm ứng biệt hóa tế bào ung thư có vai trò nhất định trong tác động kháng ung thư của IFN vì mức độ biệt hóa tế bào tỷ lệ nghịch với tốc độ phân bào.

Tác động điều hòa miễn dịch

Nhiều chức năng miễn dịch có thể bị ảnh hưởng bởi IFN. Các đáp ứng miễn dịch có thể qua trung gian tế bào hay kháng thể. Interferon có thể hoạt hóa hay ức chế cả chức năng miễn dịch tế bào và dịch thể: thường nồng độ cao thì ức chế và thấp thì hoạt hóa. Hoạt tính các tế bào NK cũng như hoạt tính diệt và ức chế khối u của đại thực bào có thể được tăng lên đáng kể bởi cả IFN–α và IFN–γ. Các tế bào miễn dịch khác được hoạt hóa bởi IFN bao gồm lympho bào T, tế bào có hoạt tính tiêu diệt phụ thuộc kháng thể, và tế bào mast. Các interferon của cả ba loại cảm ứng, sự biểu hiện của kháng nguyên loại I của phức hợp hòa hợp mô chính (MHC), và IFN–γ cảm ứng sự biểu hiện của kháng nguyên MHC loại II. Đặc tính này quan trọng vì kháng nguyên MHC loại I đóng vai trò trong sự ly giải của các tế bào bị nhiễm virus và tế bào ung thư bởi lympho bào T. Kháng nguyên MHC loại II cần thiết cho đại thực bào hoạt động như tế bào trình diện kháng nguyên. Tuy nhiên, cả hai nhóm kháng nguyên MHC đều quan trọng để

https://nhathuocngocanh.com/

đạt được đáp ứng tối đa. Tất cả các loại IFN dường như có tác động ức chế sản xuất kháng thể, mặc dù trong một số điều kiện nhất định về liều và thời gian có sự gia tăng sản xuất kháng thể.

Tinh chế

IFN của lympho bào tự nhiên

Nguyên liệu ban đầu để tinh chế IFN người bao gồm lympho bào lấy từ máu, nguyên bào sợi mới sinh, và nguyên bào lympho và các dòng bạch cầu khác nhau. Trước khi công nghệ gen được áp dụng để sản xuất, nguồn cung cấp chính IFN là các tế bào người được nuôi cấy với chất cảm ứng thích hợp (ví dụ virus hay polynucleotid sợi đôi). Vấn đề của việc tinh chế IFN từ nguồn này là mức độ biểu hiện thấp do hoạt tính sinh học cao ở nồng độ thấp của các IFN. Thể tích ban đầu lớn và việc tinh chế qua nhiều giai đoạn nhưng chỉ thu được rất ít sản phẩm. Ví dụ, năm 1978, người ta đã tinh chế được 1,3 g of IFN–α với độ tinh khiết dưới 1 % từ 90 000 bịch máu (tương đương 45 000 lít máu).

Phương pháp đầu tiên tinh chế một phần IFN từ lympho bào người được phát triển bởi Cantell năm 1973 chỉ đủ tạo ra lượng IFN dùng cho thử nghiệm lâm sàng. Theo quy trình này, máu tươi được ly tâm, và phân đoạn lympho bào được lấy ra. Các lympho bào được dồn lại và xử lý với ammonium chloride 0,83 % để ly giải các vết hồng cầu còn sót lại, rồi được phân tán vào môi trường nuôi cấy (ví dụ môi trường nền tối thiểu Eagle), và được mồi với IFN thô. Sự sản xuất các interferon (chủ yếu bởi các bạch cầu đơn nhân) được cảm ứng bằng cách thêm virus Sendai. Sau khi ủ qua đêm, tế bào và cặn được loại bằng ly tâm; dịch nổi chứa IFN thô được dùng làm nguyên liệu tinh chế.

IFN thô đầu tiên được tủa với potassium thiocyanate ở pH 3,4 và được chiết với ethanol 96%. Việc chiết tách với cồn acid bất hoạt virus Sendai và giúp tinh chế một phần IFN vì không phải tất cả protein bị tủa đều tan trở lại được. pH sau đó được chỉnh dần lên để kết tủa các protein tạp, rồi được loại bỏ bằng ly tâm. IFN được tủa ở pH 8, được cô đặc, và thẩm phân trong đệm phosphate sinh lý.

Hoạt tính kháng virus đặc hiệu của sản phẩm IFN khoảng 10^6 IU/mg protein, tương đương với độ tinh khiết 1%. Hiệu suất tổng tính theo một đơn vị máu (0,5 lít) khoảng 5 – 7×10^6 đơn vị hoạt tính kháng virus. Sản phẩm cuối cùng chứa nhiều loại IFN–α khác nhau, bao gồm α–1, α–2, và α–4. Các lymphokine khác (ví dụ các hormon phóng thích bởi lympho bào như interleukin–1 và 2) cũng hiện diện trong chế phẩm.

Chế phẩm IFN được tinh chế một phần như trên có thể tinh chế hơn nữa để đạt được hoạt tính đặc hiệu 10^8 IU/mg protein bằng sắc ký trên cột kháng thể đơn dòng cố định. IFN được giải hấp phụ khỏi cột bằng đệm pH thấp. Tuy nhiên, thành phần tương đối của các loại phụ của IFN–α trong chế phẩm sẽ khác với IFN thô trước khi sắc ký vì ái lực của cột sắc ký với các IFN khác nhau.

https://nhathuocngocanh.com/

IFN–α tái tổ hợp

Việc tinh chế IFN từ vi sinh vật được biến đổi di truyền có những vấn đề đặc thù khác với khi tinh chế từ nguồn tự nhiên. Quy trình tinh chế phải thỏa mãn các yêu cầu sau:

1. Quy trình phải chiết được IFN từ tế bào một cách hiệu quả mà không làm biến tính protein. Không sử dụng các chất biến tính để phá vỡ tế bào với nồng độ cao như urea hay guanidine vì chúng cũng biến tính protein và việc hồi tính nó rất khó khăn, thậm chí không thể được. Điều này đặc biệt đúng với các IFN–α của người vì nó có hai cầu disulfide để giữ cấu trúc tự nhiên. Hơn nữa, ngay cả khi sản phẩm cuối cùng có hoạt tính sinh học và có vẻ đúng cấu trúc thì vẫn có một lượng nhỏ protein gập không đúng và chúng có thể có tính kháng nguyên rất cao mà không thể phát hiện được bằng các phương pháp phân tích thông thường.

2. Quy trình tách và tinh chế phải không cho phép sản phẩm bị lẫn với các chí nhiệt tố của vi khuẩn (các lipopolysaccharid của vi khuẩn Gram âm). Việc loại chí nhiệt tố khỏi IFN đã tinh chế không đơn giản vì phương pháp loại bỏ nó một cách hiệu quả (ví dụ hấp phụ trên than hoạt hay phá hủy bằng bức xạ ion hóa) thì làm ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học hay cấu trúc của IFN.

3. IFN tinh khiết phải không lẫn acidnucleic và protein của vi sinh vật chủ nếu muốn được sử dụng trong lâm sàng.

4. Sản phẩm phải chứa IFN đồng nhất và không chứa các mảnh kết tập hay phân hủy bởi protease. Các thành phần có liên quan đến IFN này có thể gây rất các phản ứng miễn dịch khi được tiêm vào cơ thể.

5. Dĩ nhiên để có thể thương mại hóa quy trình phải có hiệu suất cao (ví dụ 20 %) về hoạt tính sinh học (ví dụ số đơn vị kháng virus).

Quá trình tinh chế IFN–α tái tổ hợp từ *E. coli*, gồm các phân tử lai IFN–δ–4, α–2/α–1 được biến đổi di truyền chứa trình tự amino acid 4 – 62 của IFN–α–2 và 54 – 166 của IFN–α–1 được tóm tắt trong Bảng 11.3. Vector được sử dụng để biến đổi di truyền có nguồn gốc từ vector PBR–322 và được đặt dưới sự kiểm soát của *lac* promoter. Quá trình tinh chế IFN được theo dõi bằng các thay đổi về hoạt tính kháng virus (IU) trên mỗi milligram protein.

Dịch chiết được thu bằng cách acid hóa *E. coli* về pH 2, rồi điều chỉnh về pH trung tính để phóng thích IFN. Cách làm này tận dụng tính bền acid của IFN loại I (α và β) và tránh các tác nhân biến tính nồng độ cao. Bước tinh chế đầu tiên loại acid nucleic và các protein tạp của *E. coli* bằng cách acid hóa về pH 4,5, sau đó ly tâm và thu được dung dịch IFN có hoạt tính cao hơn 20 lần. Tính ổn định của IFN–α ở pH thấp và trong dung môi hữu cơ cho phép kết tủa

https://nhathuocngocanh.com/

tiếp với trichloroacetic acid và chiết với ethanol. Bước này cô đặc IFN mà gần như không bị mất hoạt tính. Hiệu suất 118 % cho thấy sự thu hồi hoàn toàn về hoạt tính kháng virus. Bước tiếp theo sử dụng sắc ký ái lực trên Matrex Gel Blue A Sepharose. Nhựa này được dùng vì cả IFN của người và chuột đều gắn trên blue dextran. IFN được giải hấp phụ bằng dung dịch sodium chloride (2 M). Bước cuối cùng có thể thực hiện theo hai cách: (1) lặp lại quá trình tủa chọn lọc bằng cách thẩm phân trong môi trường lực ion thấp và hòa tan lại trong sodium chloride 2 M hoặc (2) tủa chọn lọc và tiếp sau bởi sắc ký trao đổi ion trên diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose. Hoạt tính đặc hiệu của sản phẩm cuối cùng đạt 7×10^7 IU/mg, tức tinh chế gấp 140 lần tính theo hoạt tính kháng virus.

Bảng 11.3. Quá trình tinh chế IFN–δ–4 α–2/α–1 người tái tổ hợp

Bước tinh chế	Thể tích (lít)	Hoạt tính kháng virus			Tỷ lệ tinh chế (lần)
		10^7 IU/mg	Tổng, 10^9 IU	Hiệu suất, %	
Dịch chiết từ *E. coli*	765,0	0,05	629	100	(1,0)
Acid hóa (pH 4,5)	765,0	1,12	466	67	2,4
Chiết bằng trichloroacetic acid–ethanol	21,0	2,1	740	118	42
Matrex Gel Blue A Sepharose	15,3	7,7	177	28	154
Cô đặc bằng siêu lọc và theo sau bởi	1,0	8,2	192	31	164
Tủa chọn lọc	0,069	7,0	30	5	140
Sắc ký trên DEAE Sepharose	0,031	7,0	18	3	140

Một cách khác để tinh chế IFN–α sử dụng sắc ký hấp phụ miễn dịch với kháng thể đơn dòng cố định. Quá trình tinh chế IFN–α–5 bằng kỹ thuật này được tóm tắt trong Bảng 11.4. IFN–α–5 được chiết từ *E. coli* bằng cách acid hóa và trung hòa về pH trung tính. IFN trong dịch chiết được hấp phụ trên silica gel và giải ra bằng cách hạ pH xuống 2,0, bước này làm tăng hoạt tính đặc hiệu lên 10 lần. Sắc ký silica gel cũng loại bỏ phần lớn acid nucleic trong phân đoạn không gắn. Sắc ký Matrex Gel Blue A tinh chế thêm 3,3 lần. Tiếp theo, IFN được hấp phụ trên nhựa trao đổi anion (ví dụ DEAE Sepharose) và giải ra với thang pH từ 8,0 đến 6,0, làm tăng hoạt tính đặc hiệu lên 10 lần nữa. Dịch giải hấp phụ DEAE Sepharose được tinh chế thêm trên cột kháng thể đơn dòng cố định, YOK Sepharose. Việc giải hấp phụ được tiến hành với sodium citrate 0,1 M, pH 2,0. Hoạt tính đặc hiệu cuối cùng đạt được $1,9\times10^8$ IU/mg.

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 11.4. Quá trình tinh chế IFN–α–5 người tái tổ hợp

Bước tinh chế	Thể tích (lít)	Hoạt tính kháng virus			Tỷ lệ tinh chế (lần)
		10^7 IU/mg	Tổng, 10^9 IU	Hiệu suất, %	
Dịch chiết từ *E. coli*	200,0	0,019	42	(100)	(1,0)
Silica (Si 200)	1,8	0,18	32	76	9,5
Matrex Gel Blue A	0,8	0,6	25	60	31,6
DEAE Sepharose CL–6 B	0,2	5,8	10	24	305
YOK Sepharose	0,04	19,0	8	19	1000

Loại chí nhiệt tố

Chế phẩm IFN cần có lượng chí nhiệt tố thấp để sử dụng được trong lâm sàng. Mặc dù quy trình tinh chế IFN tự nhiên hay tái tổ hợp mô tả ở trên nói chung cho ra sản phẩm có hàm lượng chí nhiệt tố rất thấp (5 – 10 ng nội độc tố trên mỗi milligram protein), vẫn có một số trường hợp sản phẩm thu được có lượng chí nhiệt tố cao. Có thể làm giảm lượng nội độc tố trong các chế phẩm này bằng cách điện di đẳng điện tuần hoàn (recycling isolelectric focusing – RIEF). Điện di đẳng điện dựa trên nguyên lý các chất có điện tích di chuyển trong điện trường và thang pH tính sẽ ngừng lại tại điểm có pH bằng pH đẳng điện của nó (tại đó tổng điện tích của phân tử bằng không). Trong kỹ thuật RIEF, dung dịch protein được tuần hoàn liên tục giữa bể trao đổi nhiệt với bể điện di. Khi áp dụng kỹ thuật RIEF trên dung dịch IFN–α–2 có hàm lượng chí nhiệt tố cao, đa số nội độc tố và IFN–α–2 di chuyển đến các vị trí pH khác nhau, pH 5,07 đối với nội độc tố, và pH 6,4 đối với IFN.

Trong khi tiến hành RIEF để loại chí nhiệt tố, IFN–α–2 cũng được tinh chế thêm 40 lần, kết quả là hàm lượng chí nhiệt tố giảm xuống còn 12,5 ng/mg protein, so với 500 ng/mg trước khi xử lý. Hoạt tính kháng virus đặc hiệu không bị mất trong quá trình này và lượng IFN thu hồi được đạt >90 %. Các chất điện giải sử dụng trong quá trình điện di được loại ra bằng cách kết tinh protein, sắc ký lọc gel, hay tủa với ammonium sulfate.

1.4. Insulin tái tổ hợp

Giới thiệu

Insulin là một hormon protein có kích thước 5,8 kDa, được tiết bởi đảo Langerhans của tụy. Nó có vai trò quan trọng trong việc điều hòa mức glucose trong máu. Về mặt cấu trúc nó là một protein phức với hai chuỗi polypeptid,

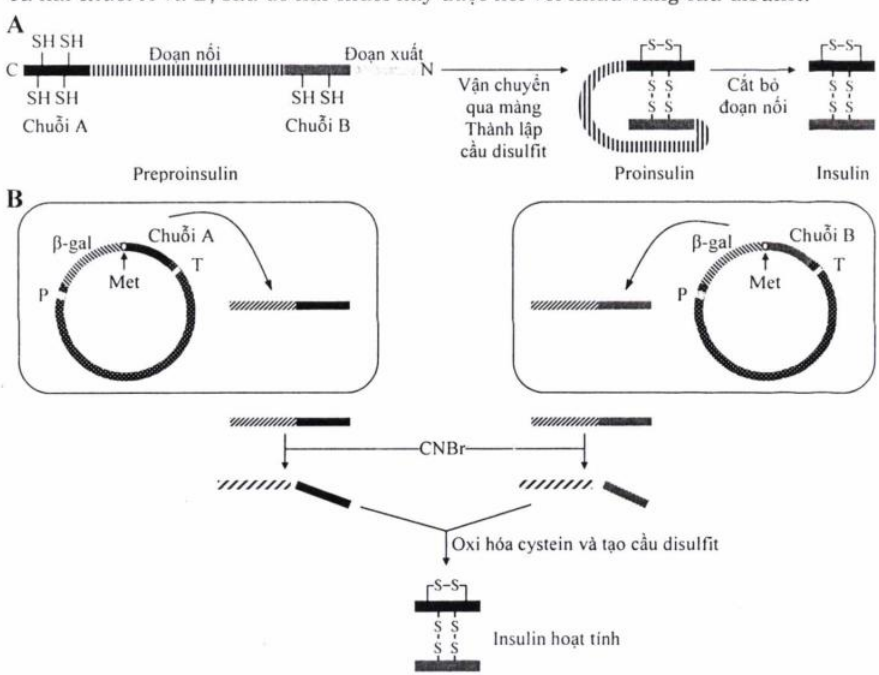
https://nhathuocngocanh.com/

chuỗi A gồm 21 acid amin và chuỗi B gồm 30 acid amin, nối với nhau bằng hai cầu disulfit. Hàng năm nhu cầu insulin lên đến 5 tấn.

Trước kia insulin được sản xuất bằng cách chiết xuất từ tụy tạng của lợn hay bò, sau đó được tinh sạch qua nhiều bước sắc ký. Tuy nhiên, chúng không phải là insulin người do đó có thể gây ra các phản ứng miễn dịch làm bất hoạt insulin. Ngoài ra, công suất sản xuất giới hạn làm cho giá thành tăng và việc kiểm soát bệnh tiểu đường gặp nhiều khó khăn do không đủ thuốc.

Insulin người tái tổ hợp lần đầu tiên được sản xuất năm 1982. Việc sản xuất bằng con đường tái tổ hợp tránh được các vấn đề gặp phải với insulin chiết xuất. Ngoài ra insulin người tái tổ hợp còn tránh được vấn đề nhiễm bẩn do lẫn các hormon khác hay nhiễm virus từ động vật.

Insulin được sinh tổng hợp dưới dạng tiền chất là một polypeptid gọi là preproinsulin *(xem hình 11.3A)*, trong quá trình bài xuất nó được xử lý thành proinsulin và cuối cùng là insulin. Quá trình này bao gồm việc cắt bỏ đoạn nối tạo ra hai chuỗi A và B, sau đó hai chuỗi này được nối với nhau bằng cầu disulfit.



Hình 11.3. Sản xuất insulin tái tổ hợp

A. Cấu trúc và quá trình trưởng thành của insulin trong tế bào người.

B. Một trong các phương án để tổng hợp insulin tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* và biến đổi nó để có insulin hoạt tính. P = Promoter; T = Terminator; Met = methionin; CNBr = cyanogen bromid

https://nhathuocngocanh.com/

Hiện nay có nhiều hướng tiếp cận khác nhau để sản xuất insulin người tái tổ hợp, một trong những cách đó như sau. Đầu tiên hai mảnh ADN mã hóa cho chuỗi A và B được tạo dòng sao cho mảnh ADN này được nối vào đuôi của gen β–galactosidase *(xem hình 11.3.B)*. Khi biểu hiện các dòng *E. coli* này sẽ sản xuất ra hai protein tái tổ hợp có phần đầu là β–galactosidase và đuôi sẽ là chuỗi A hoặc B của insulin. Các protein này được tinh chế và xử lý với cyanogen bromid để phóng thích các chuỗi của insulin. Do lúc nối gen β–galactosidase với các ADN của insulin người ta đã chèn một codon methionin vào giữa hai gen nên protein tái tổ hợp thu được có chứa một methionin nằm ở vị trí nối của β–galactosidase và chuỗi insulin, đây cũng là methionin duy nhất trong toàn chuỗi protein lai, do đó khi xử lý với cyanogen bromid, chất này sẽ tấn công vào acid amin này và cắt chuỗi peptid tại đó. Các chuỗi A và B được phóng thích ra sẽ được tinh chế và trộn với nhau rồi xử lý để tạo cầu disulfit thành insulin hoạt tính (insulin người crb). Ngoài ra cũng có các phương pháp khác trong đó hai chuỗi insulin được nối vào hai đầu của β–galactosidase để tạo một protein lai duy nhất, nhờ đó đơn giản hóa quá trình sản xuất.

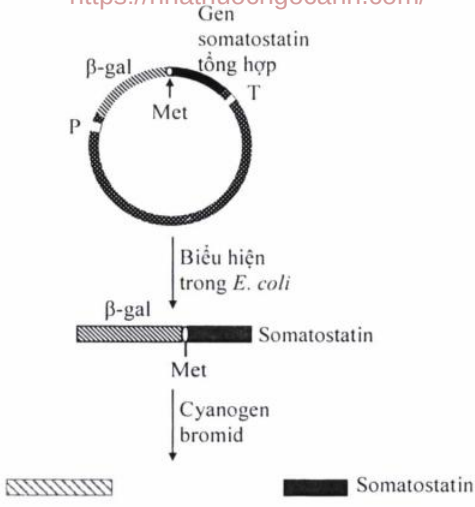
Một cách sản xuất khác được phát triển bởi Eli Lilly, trong đó chủng *E. coli* được tái tổ hợp với đoạn gen mã hóa cho proinsulin. Sản phẩm thu được khi lên men là proinsulin sẽ được tinh chế và cắt bỏ đoạn C *in vitro* để thu được insulin hoạt tính (insulin người prb). Cách làm này tiết kiệm được một bước lên men, giảm nhẹ chi phí lên men và xử lý hậu lên men, do đó chiếm ưu thế trong sản xuất.

Quá trình tinh chế insulin hoạt tính sau đó bao gồm nhiều bước sắc ký như trao đổi ion, lọc gel, tương tác kỵ nước và cuối cùng "đánh bóng" bằng sắc ký lỏng cao áp pha đảo (RP–HPLC). Công đoạn cuối này sử dụng cột RP–HPLC C8 hay C18 ở quy mô trên 80 lít, với công suất lên đến 1200 g insulin mỗi mẻ. Bước "đánh bóng" không chỉ tăng độ tinh khiết của sản phẩm, loại các tạp có nguồn gốc *E. coli* mà còn tách được các phân tử insulin bị biến tính ra khỏi insulin tự nhiên.

1.5. Somatostatin tái tổ hợp

Somatostatin còn gọi là "hormon chống tăng trưởng", nó điều hòa hoạt động của hormon tăng trưởng và được sử dụng để điều trị bệnh to cực (phát triển xương không kiểm soát được). Đây là một protein rất nhỏ, đoạn gen mã hóa nó được tổng hợp hóa học một cách dễ dàng và tạo dòng vào vector thích hợp trong *E. coli*. Tuy nhiên, *E. coli* khi biểu hiện gen này sẽ có xu hướng phân hủy nó nên người ta tránh bằng cách nối nó với β–galactosidase. Và cũng như insulin người ta cũng chèn một methionin giữa hai peptid để sau đó có thể xử lý để cắt bỏ β–galactosidase (xem hình 11.4).

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 11.4. Sản xuất somatostatin tái tổ hợp
P: promoter ; T: Terminator; β–gal: β–galactosidase

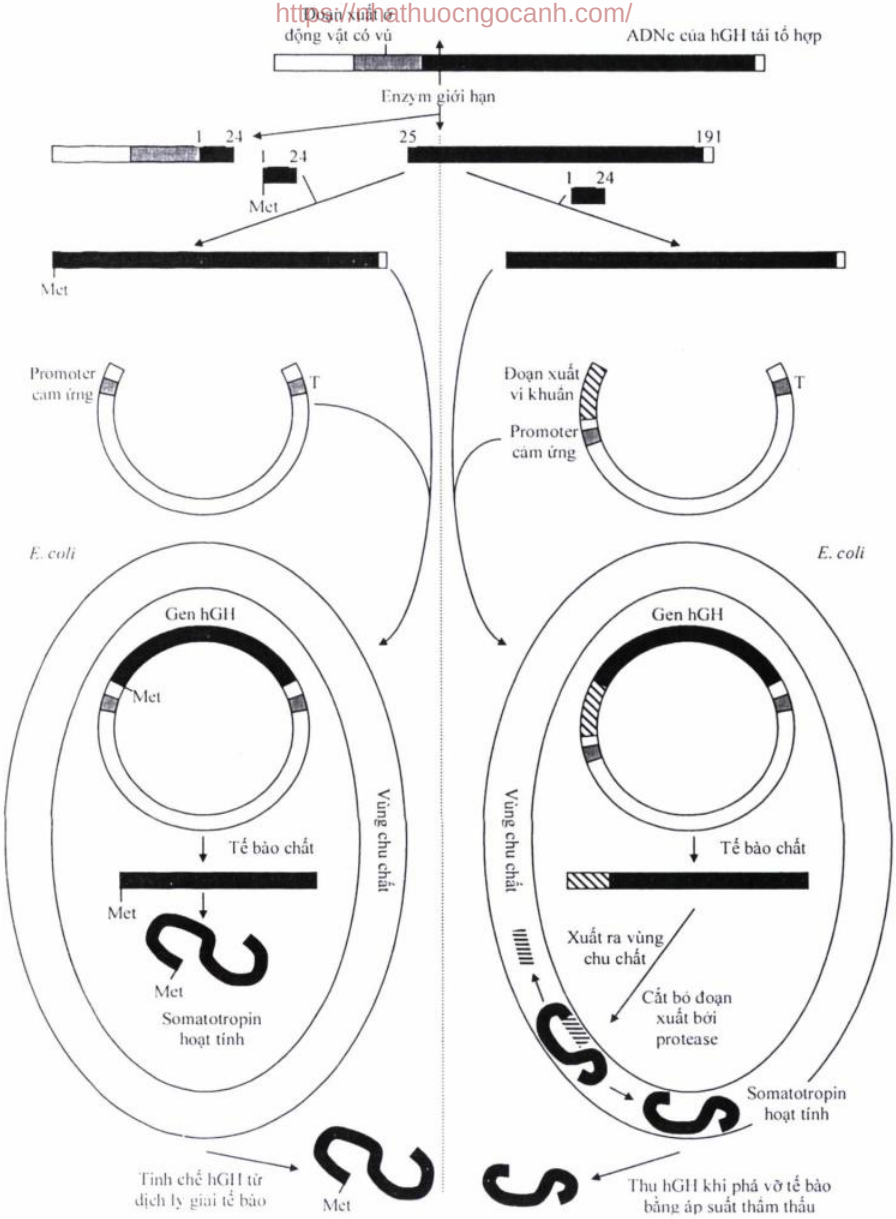
Somatotropin tái tổ hợp

Somatotropin, còn gọi là "hormon tăng trưởng người" (hGH), gồm 191 acid amin, hGH được sinh tổng hợp trong tuyến yên và có chức năng điều hòa sự tăng trưởng. Việc tiêm đều đặn hormon này cho các trẻ em bị bệnh còi do thiếu nó có thể khôi phục sự tăng trưởng của các em gần như mức bình thường. Trong trường hợp này hormon chiết từ động vật không có tác động do đó nguồn duy nhất hiệu quả là từ người. Do tuyến yên từ người chết rất khan hiếm nên việc sử dụng hGH tái tổ hợp là một yêu cầu bức thiết. Hơn nữa nguy cơ nhiễm virus từ tử thi ở các trẻ em dùng hGH từ nguồn này cũng góp phần làm việc sử dụng chúng trở nên khó khăn.

Vì gen mã hóa cho somatotropin khá dài nên không thể tổng hợp hóa học được, người ta phải sinh tổng hợp ADN_{bs} từ bộ gen người và tạo dòng nó vào vi khuẩn để sinh tổng hợp hormon. Có hai cách tiếp cận được trình bày trong hình 11.5.

Cách thứ nhất, đoạn ADN mã hóa cho trình tự bài xuất của hormon được cắt bỏ bằng enzym cắt giới hạn cùng với 24 codon đầu tiên của protein trưởng thành. Một đoạn ADN tổng hợp gồm methionin và 24 codon đầu tiên được nối với phần ADN còn lại để sau đó được tạo dòng và biểu hiện trong *E. coli (xem hình 11.5)*. Khi biểu hiện hGH tái tổ hợp sẽ tích tụ trong tế bào chất và được chiết tách sau khi phá vỡ tế bào. hGH này khác với protein bình thường do có mang một methionin ở đầu N.

https://nhathuocngocanh.com/

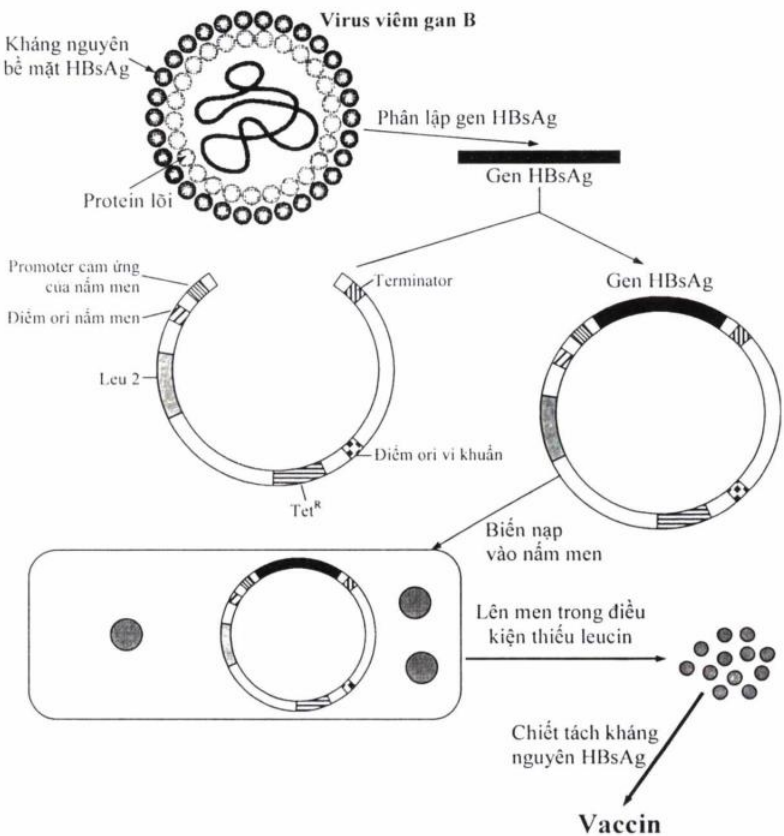


Hình 11.5. Hai phương án sản xuất hGH tái tổ hợp

https://nhathuocngocanh.com/

Một cách tiếp cận khác là thay thế đoạn peptid để bài xuất của tế bào động vật có vú bằng đoạn tương tự của vi khuẩn, do đó protein tái tổ hợp sẽ được xuất ra vùng chu chất của tế bào chủ và việc tinh chế dễ dàng hơn so với cách tiếp cận ở trên. Tại vùng chu chất của tế bào, protein tái tổ hợp sẽ bị xử lý bởi các protease ở đây và loại bỏ đoạn peptid bài xuất và phóng thích hGH trưởng thành không có chứa methionin ở đầu N. hGH được sản xuất với các tế bào chủ là *E. coli*, *Bacillus subtilis* hay *P. aeruginosa*.

1.7. Vaccin viêm gan B tái tổ hợp



Hình 11.6. Sản xuất vaccin viêm gan B tái tổ hợp

Trước dây người ta sản xuất vaccin bằng hai con đường. Một là sản xuất vaccin bất hoạt từ tác nhân gây bệnh bị chết do hóa chất. Hai là vaccin giảm độc, trong đó tác nhân gây bệnh còn sống nhưng không còn khả năng nhân lên trong

https://nhathuocngocanh.com/
người được chủng ngừa. Tuy nhiên, các cách tiếp cận này không tạo được vaccin an toàn tuyệt đối do có nhiều nguy cơ về dị ứng, mẫn cảm hay bị nhiễm bệnh do tác nhân dùng làm vaccin hoạt động trở lại. Để tránh vấn đề này người ta dùng công nghệ di truyền để làm ra vaccin tái tổ hợp hay vaccin subunit, chỉ chứa phần có chức năng tạo đáp ứng miễn dịch nhưng không có nguy cơ gây nhiễm.

Vaccin chống virus viêm gan B là vaccin subunit đầu tiên được sử dụng. Virus này có kháng nguyên bề mặt là HBsAg đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch và bảo vệ của nó có thể chống lại virus. Gen mã hóa cho kháng nguyên này được phân lập và tạo dòng trong nấm men để sản xuất ra kháng nguyên *(xem hình 11.6)*.

Gen mã hóa cho kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (HBsAg) được phân lập và tạo dòng trong một vector con thoi có khả năng biểu hiện trong tế bào nấm men. Sự hiện diện của gen Leu2 trong plasmid cho phép nuôi cấy chọn lọc nấm men mang plasmid tái tổ hợp trong môi trường không chứa leucin.

2. LIỆU PHÁP GEN

2.1. Giới thiệu

Liệu pháp gen bao hàm việc đưa gen vào tế bào để hiệu chỉnh sai sót về gen. Điều này có thể làm chậm tiến triển của bệnh và nhờ đó cải thiện chất lượng sống của người bệnh. Việc giải mã thành công bộ gen người đã ảnh hưởng mạnh mẽ đến tiềm năng phát triển của liệu pháp gen.

Cùng với sự tiến bộ về sinh học tế bào và phân tử, nhiều bệnh đã tìm được nguyên nhân là do sự thay đổi trong gen. Khi có sự thay đổi trong gen, protein do nó mã hóa có thể bị thay đổi theo và có thể dẫn đến trường hợp protein không thực hiện được chức năng bình thường, hay nói cách khác là một tình trạng bệnh. Liệu pháp gen nhằm mục đích hiệu chỉnh lại sự khiếm khuyết về di truyền đã gây ra tình trạng bệnh. Liệu pháp gen bao gồm việc khóa các gen đã được hoạt hóa không đúng hay sửa chữa hoặc thay thế gen hư hỏng bằng gen bình thường. Các bệnh mà liệu pháp gen nhắm đến thường chỉ liên quan đến một gen. Một khía cạnh khác của liệu pháp gen là phòng bệnh thông qua việc đưa các gen cần thiết cho cơ chế phòng vệ vào cơ thể, ví dụ vaccin ADN.

Bước đầu tiên trong liệu pháp là xác định gen gây bệnh. Sau đó các vật liệu di truyền thích hợp sẽ được thiết kế và đưa vào tế bào đích để hiệu chỉnh sai sót do gen. Có hai chiến lược chính được dùng: (i) liệu pháp *in vivo*, trong đó vật liệu di truyền được đưa thẳng vào cơ thể; (ii) liệu pháp *ex vivo*, trong đó tế bào đích sẽ được phân lập và nuôi cấy, vật liệu di truyền sẽ được đưa vào tế bào này và sau đó tế bào được đưa vào cơ thể.

https://nhathuocngocanh.com/

2.2. Vector dùng trong liệu pháp gen

Các vector có thể được chia làm hai loại: tổng hợp và virus. Vector tổng hợp đưa gen trực tiếp vào tế bào đích, chúng gồm ADN plasmid, ADN trần và ADN được kết hợp với cơ chế phóng thích. Vector virus sử dụng khả năng nhiễm của virus để đưa gen vào tế bào đích và hiện đang được dùng rộng rãi trong các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng vì có tính ổn định cao.

Vector virus

Vector virus rất thuận lợi cho việc đưa gen vào tế bào, tuy nhiên, nhiều quản ngại về các hiệu ứng phụ do sự nhiễm của virus có thể dẫn đến sự tổn thương tế bào hoặc ung thư. Ngoài ra, chúng cũng bị giới hạn bởi kích thước gen ngoại lai mà chúng có mang, khó khăn trong nuôi cấy và chuẩn hóa việc nuôi cấy để thu virus và giá thành cao hơn so với vector plasmid.

Về cơ bản người ta loại bỏ các gen của virus có liên quan đến việc gây bệnh và giữ lại các yếu tố cần thiết cho việc nhân bản và gây nhiễm. Để dùng làm vector các virus cần được:

- Xác định trình tự cần cho việc nhân bản virus
- Cấu trúc hạt virus
- Cách thức đóng gói bộ gen virus
- Sự phóng thích của gen ngoại lai vào tế bào chủ.

Bảng 11.5. Một số vector virus phổ biến

Vector	Ưu điểm	Nhược điểm
Adenovirus	Nhiễm các tế bào không phân chia	Gây miễn dịch mạnh
	Có năng suất nuôi cấy cao	Sự biểu hiện ngắn
AVV	Nhiễm các tế bào không phân chia	Khả năng tích hợp hạn chế
	Nhiễm được nhiều loại tế bào	Sự biểu hiện ngắn
HSV	Nhiễm được nhiều loại tế bào	Năng suất nuôi cấy thấp
		Độc tế bào
		Sự biểu hiện ngắn
Lentivirus	Có năng suất nuôi cấy cao	Có thể gây hiệu ứng không mong muốn
	Nhiễm vĩnh viễn các tế bào không phân chia	
Retrovirus	Tích hợp ADN virus vào nhiễm sắc thể ký chủ	Chỉ nhiễm được tế bào đang phân chia

AVV, adeno-associated virus; HSV, herpes simplex virus

https://nhathuocngocanh.com/

Adenovirus rất phổ biến trong tự nhiên, chúng nhiễm được chuột và các động vật có vú, kể cả người. Về sinh học chúng là các virus không có bao với bộ gen là ADN thẳng sợi đôi. Khi nhiễm bộ gen không tích hợp với nhiễm sắc thể ký chủ mà tồn tại dưới dạng episom. Bộ gen dài 35 kb, trong đó 30 kb có thể được thay thế bằng gen đích.

Adeno–associated virus (AVV) là các virus thuộc nhóm parvo không gây bệnh của người. Chúng thường được sử dụng với virus hỗ trợ, thường là adenovirus. AVV có thể nhiễm tế bào đang phân chia hoặc không, khi không có mặt virus hỗ trợ chúng có thể tích hợp vào vai trò đặc hiệu trên bộ gen ký chủ. Bộ gen AVV là một phân tử ADN sợi đơn, chỉ mang được không quá 4,7 kb gen ngoại lai.

Virus Herpes simplex type 1 (HSV–1) là một virus hướng nơron của người, chúng được dùng để chuyển gen vào hệ thần kinh. Bộ gen của HSV là ADN sợi đôi dạng thẳng dài 152 kb, trong đó 40 – 50 kb có thể được thay bằng gen đích.

Retrovirus có bộ gen là ARN, sau khi nhiễm, được chuyển thành ADN sợi đôi và tích hợp với bộ gen tế bào chủ. Retrovirus được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay do tạo ra thể chuyển nhiễm bền. Nhược điểm của nó là sự tích hợp xảy ra ngẫu nhiên và có thể dẫn đến sự thay đổi có hại trên bộ gen tế bào chủ và chỉ nhiễm được tế bào đang phân chia.

Lentivirus là một lớp phụ của retrovirus có khả năng nhân lên trong tế bào không phân chia, do đó tạo thành thể chuyển nhiễm vĩnh viễn.

Các vector tổng hợp: plasmid ADN

Ưu điểm của plasmid là mang được đoạn gen đích lớn, không có nguy cơ gây đột biến tế bào chủ và dễ dàng sản xuất với số lượng lớn từ vi khuẩn. Các plasmid dùng trong liệu pháp gen ngoài các yêu cầu chung đối với plasmid, nó cần mang trình tự của promoter, thường là của virus, để có thể phiên mã gen đích trong tế bào chủ eukaryot.

Vector plasmid thường được biến nạp vào vi khuẩn để lưu giữ và thao tác rồi mới đưa vào tế bào.

Các hệ thống chuyển gen

Các vector không phải virus không tự nhiễm được mà cần có sự trợ giúp của cơ chế chuyển gen độc lập. Các cơ chế này có thể kể như tiêm bắp, uống, xịt mũi hay xuyên da. Các cơ chế này thường có hiệu suất chuyển gen và biểu hiện thấp, do đó cần một lượng lớn ADN mới cho hiệu quả mong muốn. Các cơ chế hiệu quả hơn bao gồm dạn đặc hiệu, liposom, lipoplex và polyplex.

Đạn sinh học

Hay "súng bắn gen" để chuyển gen vào từng tế bào đơn lẻ bằng cách sử dụng ADN được hấp phụ trên hạt vàng (đường kính 0,6 – 2 μm). Để chuyển nhiễm

https://nhathuocngocanh.com/
các hạt này được đặt trong một dụng cụ gọi là súng bắn gen và được phóng ra nhờ helium áp suaas cao xuyên qua da vào tế bào. Hiệu suất chuyển cao hơn hàng trăm lần so với tiêm bắp vì gen được chuyển thẳng vào tế bào nên không bị phân hủy.

Liposom

Liposom cấu tạo là một màng kép phospholipid bao quanh một hạt nước, nó có thể chứa nhiều loại chất, kể cả ADN plasmid. Liposom cũng có thể được gắn kháng thể, protein hoặc đường lên bề mặt và nhờ đó định hướng đến vai trò đặc hiệu. Khi tiếp xúc với tế bào các màng phospholipid sẽ dung hợp và phóng thích nội dung của liposom vào tế bào.

Lipoplex và polyplex

Là các phức hợp ADN với một phân tử lipid hay polyme tích điện dương. Sau khi kết hợp ADN, các hạt này tích điện dương và được thực bào. Lợi thế của hệ thống này là:

- Bảo vệ plasmid, giảm lượng ADN cần;
- Khi tương tác với tế bào bằng cơ chế thực bào, các hạt này có thể kích thích đáp ứng miễn dịch tốt hơn và do đó thích hợp cho ADN vaccin
- Có thể sử dụng qua nhiều đường như miệng, mũi và phổi
- Để dùng
- Ổn định khi bảo quản dưới dạng đông khô.

2.3. Các nguyên lý của liệu pháp gen

Liệu pháp gen dựa trên ba nguyên lý cơ bản:

- Thay thế hoặc hiệu chỉnh một gen nhằm tạo ra sản phẩm cần thiết cho tế bào hoặc cơ quan hoạt động.
- Đưa một gen lạ vào tế bào đích để sản xuất một chất không có tự nhiên.
- Bất hoặc một gen chịu trách nhiệm cho các rối loạn của tế bào.

Thay thế hoặc hiệu chỉnh gen đột biến

Đây là kiểu liệu pháp gen được sử dụng rộng rãi nhất và có thể áp dụng cho nhiều loại bệnh. Thông thường, vector virus hay được dùng nhất do sự biểu hiện lâu dài của gen chuyển.

Đưa gen lạ vào

Kỹ thuật này thường dùng trong ADN vaccin hay liệu pháp chống bệnh nhiễm. Gen mã hóa cho protein kháng nguyên của tác nhân gây bệnh được xác định và tạo dòng vào vector biểu hiện rồi chuyển nhiễm vào tế bào. Trong trường hợp này, các vector plasmid thường được sử dụng nhất do an toàn.

https://nhathuocngocanh.com/

Bất hoạt gen

Sự biểu hiện bất thường của một gen có thể làm tế bào bị mất cân bằng. Khi đó nếu gen có biểu hiện bất thường không quan trọng đối với sự sống và chức năng của tế bào, nó có thể được bất hoạt để đưa tế bào về trạng thái lành mạnh. Sự bất hoạt có thể được thực hiện ở mức độ ADN, mARN hay protein. Ví dụ việc đưa vào các ARN sợi đôi để kích hoạt quá trình can thiệp ARN (RNA interference – RNAi), dẫn đến sự thoái hóa của mARN. Tuy nhiên, ở hầu hết tế bào động vật có vú, điều này có thể gây đáp ứng độc tính tế bào cao, do đó cần thiết kế các ARN can thiệp (interference RNA – iRNA) nhân tạo có tính đặc hiệu cao đối với gen đích. Mặc dù rất hiệu quả, việc làm tắt biểu hiện gen bằng iRNA nhân tạo chỉ tạm thời, do đó giới hạn khả năng ứng dụng của nó. Để khắc phục, người ta tạo ra các vector plasmid hay virus để sản xuất iRNA ngay trong tế bào.

2.4. Các nghiên cứu lâm sàng

Từ năm 1989 đến 2006, hơn 500 nghiên cứu lâm sàng về liệu pháp gen đã được thực hiện. Trong đó 70% là để chữa ung thư và hầu hết (97%) được thực hiện ở Pha I và II trên bệnh nhân. Khoảng 3% được thực hiện ở cả ba pha. Đến nay, chỉ mới có một sản phẩm được cấp phép thương mại hóa là Gendicine vào năm 2003 và đang được đánh giá ở Pha IV.

Trong các nghiên cứu lâm sàng, vector được sử dụng chủ yếu là virus (68%), trong đó retrovirus và adenovirus được dùng nhiều nhất. Vector tổng hợp được sử dụng trong 25% số nghiên cứu, và 16% dùng ADN trần.

Thất bại trong các nghiên cứu lâm sàng liệu pháp gen gồm: hiệu quả trị liệu ngắn; gây đáp ứng miễn dịch chống lại vector; gây đột biến dẫn đến ung thư, rối loạn đa gen như tim mạch, Alzheimer, viêm khớp và đái tháo đường.

Gendicine

Gendicine là sản phẩm liệu pháp gen đầu tiên được cấp phép do một công ty Trung Quốc, Shenzhen Sibiono GeneTech, sản xuất dựa trên vector adenovirus. Gendicine dùng để điều trị carcinom đầu và cổ. Sản phẩm là một adenovirus tái tổ hợp, chứa gen ức chế ung thư p53. Gen này bị đột biến ở 50 – 70% khối u của người, dẫn đến phát sinh ung thư, ngoài ra, các protein có nguồn gốc từ gen đột biến cũng liên quan đến sự điều hòa quá mức của một gen đa kháng thuốc, do đó không đáp ứng với hóa trị. Việc đưa gen p53 chưa đột biến vào và sau đó được biểu hiện thành protein p53 đã kiểm soát và loại bỏ được khối u. Tác dụng hiệp đồng có thể đạt được khi dùng kết hợp liệu pháp gen với xạ trị và hóa trị.

Gendicine được sản xuất nhờ tế bào SBN, một dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào thận phôi người, dòng 239 (HEK–293). Do đây là tế bào phụ thuộc bề mặt nên hệ thống CellCube, nổi nuôi cấy sử dụng các đĩa, đã được dùng để sản xuất. Tuy nhiên, hiệu suất tế bào cũng chỉ đạt $4,9 \times 10^9$ hạt virus/cm^2. Sau đó, quá

https://nhathuocngocanh.com/

trình phát triển đã sử dụng hệ thống nuôi cấy kiểu cột nhồi với các đĩa Fibra–Cel™ cho năng suất cao hơn 15 lần. Bên cạnh đó kỹ thuật nuôi cấy chìm theo lô với môi trường không chứa huyết thanh cũng được phát triển. Sau khi nuôi cấy, virus được tinh chế trên hệ thống tự động với hiệu suất thu hồi hạt virus khoảng 65%. Sản phẩm đã phối chế được phân phối vào lọ thủy tinh và bảo quản đông lạnh cho đến khi dùng.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phân loại và nguồn gốc của các interferon.
2. Trình bày phương pháp loại chí nhiệt tố trong sản xuất interferon.
3. So sánh các phương án tạo dòng sản xuất insulin người tái tổ hợp.
4. Vai trò của codon methionin trong tạo dòng sản xuất insulin tái tổ hợp
   A. Làm tăng hoạt tính insulin
   B. Làm cho insulin tái tổ hợp giống insulin người
   C. Làm cầu nối hai chuỗi A và B
   D. Giúp phản ứng oxy hóa tạo cầu disulfit
   E. Giúp cắt loại β–galactosidase
5. Khi tạo dòng để sản xuất somatotropin tái tổ hợp người ta
   A. Tổng hợp hóa học 24 codon đầu tiên của somatotropin hoạt tính
   B. Cắt bỏ đoạn xuất trên gen nguyên thủy
   C. Gắn thêm đoạn xuất vi khuẩn
   D. Sử dụng *E. coli* làm tế bào chủ
   E. Tất cả

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 12

CÁC PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ

MỤC TIÊU

1. Nêu được các kỹ thuật cơ bản trong chẩn đoán phân tử.

2. So sánh được thuận lợi và giới hạn của các phương pháp dựa trên ADN.

3. Kể được các ứng dụng của chẩn đoán phân tử trong những ngành khoa học khác nhau.

Vào những năm 70 của thế kỷ XX, đã có sự nở rộ của nhiều kỹ thuật mới trong chẩn đoán bệnh nhiễm. Trước đó việc phát hiện, chẩn đoán các bệnh nhiễm chủ yếu dựa vào các phương pháp cổ điển đã có trên 100 năm. Trải qua một thời gian ngắn, kể từ những thực nghiệm đầu tiên khoảng vào năm 1972 của Berg P. (Nobel về Hóa học năm 1980), các ứng dụng của chẩn đoán phân tử (molecular diagnosis) có những tiến bộ to lớn, trở nên phong phú và đầy hứa hẹn. Các kỹ thuật hiện đại cũng được phát triển đa dạng, hoặc để áp dụng trong một phòng thí nghiệm nghiên cứu về cấu trúc và các biểu hiện của gen (hay là từ gen), hoặc áp dụng trong công nghiệp để sản xuất từ tế bào (chẳng hạn từ *E. coli*) các protein có ích, cần thiết cho con người hoặc là thí nghiệm sinh học lâm sàng để thực hiện việc chẩn đoán bệnh.

Nhìn chung các phương pháp phát hiện hiệu quả phải đặc hiệu, nhạy và đơn giản. Tính đặc hiệu nghĩa là thử nghiệm chỉ dương tính khi có sinh vật hoặc phân tử đích. Độ nhạy nghĩa là xét nghiệm phải phát hiện được lượng rất nhỏ phân tử hay sinh vật đích thậm chí cả khi có những sinh vật hay chất gây nhiễu khác. Tính đơn giản đòi hỏi xét nghiệm được tiến hành hiệu quả, năng suất, không đắt và trên nguyên lý đơn giản.

Ước tính doanh thu của các chẩn đoán phân tử trên toàn thế giới vào khoảng 7,7 tỷ USD trong năm 1999, và dự kiến sẽ tăng 5–10% trong 5–10 năm tiếp theo. Thị trường của các chẩn đoán dựa trên ADN vào khoảng 500 triệu USD trong năm 1999 và sẽ tăng khoảng 30%/năm và tới năm 2004 là xấp xỉ hai tỷ USD.

https://nhathuocngocanh.com/

1. NHỮNG PHƯƠNG PHÁP CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ CƠ BẢN

1.1. Phương pháp miễn dịch

Trong quá khứ, việc tìm kiếm các tác nhân bệnh nhiễm dựa trên nuôi cấy, phản ứng huyết thanh học và tính chất sinh–hóa. Phản ứng huyết thanh học thông dụng là cố định bổ thể, ngưng tập, nhưng các phản ứng trên có nhược điểm là không nhạy và không chuyên biệt. Phản ứng miễn dịch bù đắp được các nhược điểm trên, phát triển chủ yếu là kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescence assay–IFA) và miễn dịch phóng xạ (radioactive immunoassay–RIA), tiếp đến là sự phát triển kỹ thuật miễn dịch men (enzym immunoassay–EIA). Kỹ thuật miễn dịch phóng xạ có độ nhạy và chuyên biệt cao nhưng đắt tiền và do sử dụng những đồng vị phóng xạ nên phải có những trang thiết bị sử dụng và bảo vệ chuyên biệt. Hiện nay kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang còn được sử dụng rộng rãi trong nhiều lãnh vực, nhưng kỹ thuật miễn dịch men đã thay thế mạnh mẽ kỹ thuật miễn dịch phóng xạ. Phản ứng miễn dịch để chẩn đoán tác nhân bệnh nhiễm hiện nay phát triển dựa trên kháng nguyên chuyên biệt hoặc kháng thể chuyên biệt.

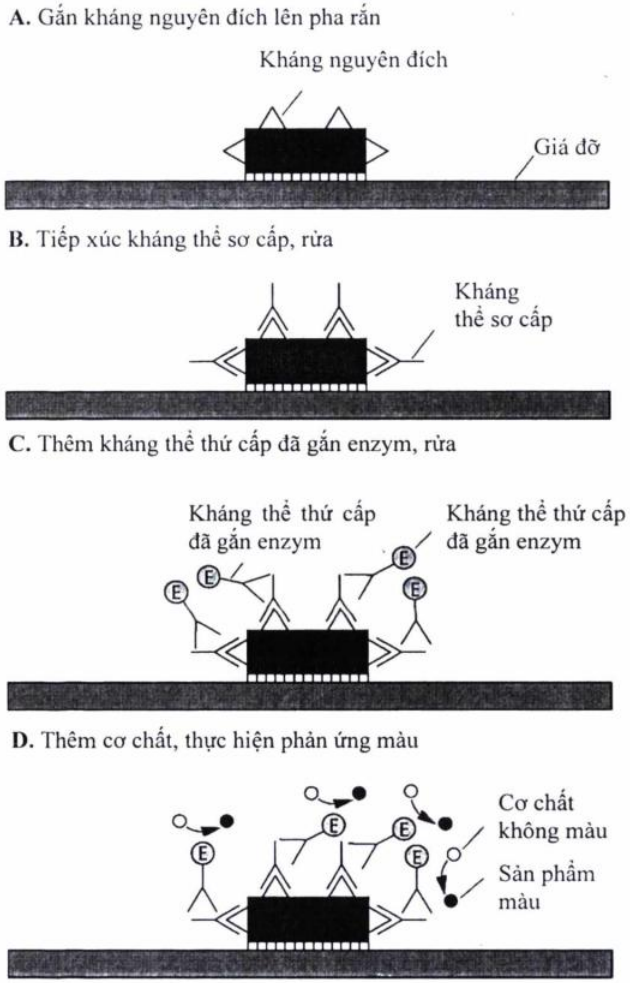
Thử nghiệm **trực tiếp** dựa trên kháng nguyên (hoặc kháng thể) thiết kế để phát hiện trực tiếp sự hiện diện kháng thể (hoặc kháng nguyên) chuyên biệt tương ứng trong bệnh phẩm lâm sàng. Kháng nguyên được gắn trên pha rắn phản ứng trực tiếp với kháng huyết thanh liên hợp với enzym. Nhược điểm là kháng thể có thể gắn không đặc hiệu với các tạp chất có trong mẫu làm cho tín hiệu nền cao hoặc dương tính giả. Thử nghiệm **gián tiếp** thường thiết kế thêm một kháng thể thứ cấp (secondary antibody) đã gắn chất đánh dấu sẽ gắn được với phức hợp kháng nguyên–kháng thể ban đầu (hiện nay gọi là kháng thể sơ cấp để phân biệt) kết hợp với các bước rửa để loại các liên kết không đặc hiệu gây nhiễu.

Thử nghiệm dựa trên kháng nguyên thiết kế để phát hiện sự hiện diện kháng thể chịu trách nhiệm tương ứng nhóm immunoglobulin, thường là nhắm đến các immunoglobulin G (IgG) hoặc M (IgM). Thông thường khi bị bệnh nhiễm, kháng thể IgM xuất hiện sớm hơn kháng thể IgG, đạt tối đa trong vòng 7–10 ngày nhưng chỉ tồn tại ít tuần sau đó, trong khi IgG xuất hiện trễ hơn, thông thường đạt tối đa sau 4 – 6 tuần sau khi nhiễm bệnh nhưng tồn tại lâu dài hơn nhiều trong cơ thể.

Kỹ thuật miễn dịch men và phóng xạ: các kỹ thuật này rất giống nhau về nguyên tắc. Với kỹ thuật miễn dịch men và phóng xạ: kháng thể hay kháng nguyên trước đó được gắn chất đánh dấu là enzym hay chất phóng xạ, sau đó được hấp phụ cố định bởi những liên kết đồng hóa trị trên bề mặt pha rắn là những vi giếng hay bi nhựa polystyren, màng nitrocelluose (solid–phase EIA hay solid–phase RIA). Khi cho tiếp xúc với huyết thanh bệnh nhân sẽ có sự kết

https://nhathuocngocanh.com/

hợp kháng nguyên–kháng thể tương ứng. Trong kỹ thuật miễn dịch men thường sử dụng chất đánh dấu là 2,2'–azino–bis(3–ethylbenzthiazoline–6–sulphonic acid) (ABTS) hay 3,3',5,5'–Tetramethylbenzidine (TMB). Khi bị tác dụng của enzym peoxydae (thường dùng horseradish peroxidase) sẽ cho phản ứng màu (xanh lá cây với ABTS, xanh da trời với TMB). Kỹ thuật miễn dịch phóng xạ thường sử dụng chất đánh dấu đồng vị phóng xạ là ^{125}Iode hay ^{131}Iode.



Hình 12.1. Quy trình phản ứng ELISA gián tiếp

https://nhathuocngocanh.com/

Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang: cũng có thể sử dụng thử nghiệm trực tiếp hay gián tiếp. Kháng nguyên thường được sử dụng để phát hiện kháng thể trong thử nghiệm trực tiếp. Các chất phát huỳnh quang thường sử dụng là isothiocyanat. Phức hợp kháng nguyên–kháng thể sẽ được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Kỹ thuật hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (Enzym–Linked Immunosorbent Assay –ELISA) thực chất là kỹ thuật miễn dịch men pha rắn (solid–phase EIA). Quy trình ELISA gián tiếp chẩn đoán gồm các bước sau:

1. Gắn kháng nguyên đích biết trước đang cần xét nghiệm sự có mặt của phân tử hay sinh vật đặc hiệu vào pha rắn như đĩa vi chuẩn độ bằng nhựa gồm 96 vi giếng.

2. Cho tiếp xúc với huyết thanh bệnh nhân. Nếu có kháng thể đặc hiệu sẽ có gắn kết kháng thể (còn gọi là kháng thể sơ cấp) trực tiếp vào kháng nguyên đích trên vi giếng. Rửa phiến để loại bỏ kháng thể sơ cấp không được gắn.

3. Bổ sung kháng thể thứ cấp (hay còn gọi kháng kháng thể) liên kết đặc hiệu với kháng thể sơ cấp chứ không phải phân tử đích. Kháng thể thứ cấp đã được gắn một enzym như phosphatase kiềm, peroxidase hay urease để xúc tác phản ứng chuyển cơ chất không màu thành sản phẩm có màu. Rửa hỗn hợp để loại bỏ các liên kết không đặc hiệu.

4. Cho cơ chất không màu. Thực hiện phản ứng tạo sản phẩm màu trong điều kiện thích hợp

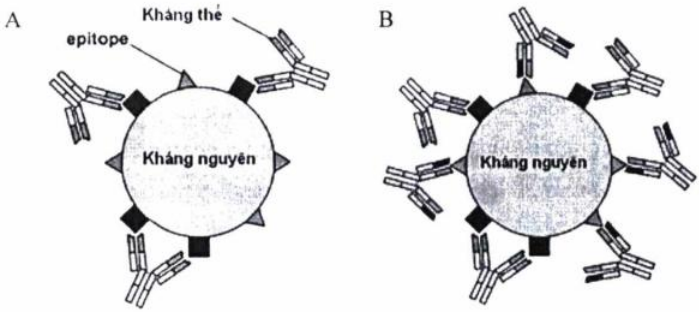
5. Quan sát hoặc đo mật độ quang của sản phẩm màu.

Kỹ thuật miễn dịch với kháng thể đơn dòng: động vật có vú có một hệ tế bào phức tạp liên quan đến bảo vệ cơ thể khỏi độc chất và sự xâm nhập của các tác nhân lây nhiễm. Là một phần của đáp ứng bảo vệ, tế bào lympho có thể được cảm ứng để sinh protein đặc hiệu (kháng thể) liên kết với các chất lạ (kháng nguyên) và với sự trợ giúp của các protein hệ miễn dịch khác bao gồm hệ thống bổ thể – trung hoà các tác động sinh học. Vì mỗi kháng nguyên thường có vài epitop khác nhau nên trong đáp ứng miễn dịch sẽ có vài loại tế bào trong hệ miễn dịch mà mỗi loại sinh ra một kháng thể khác nhau chống lại một hay nhiều epitop kháng nguyên. Tập hợp các kháng thể như vậy mà tất cả đều phản ứng với cùng một kháng nguyên, cấu thành một kháng thể đa dòng. Đối với các xét nghiệm chẩn đoán cụ thể, việc dùng kháng thể đa dòng có hai hạn chế: (1) số lượng kháng thể khác nhau trong chế phẩm đa dòng có thể khác nhau giữa các lô sản xuất và (2) kháng thể đa dòng không thể dùng để phân biệt hai đích tương tự nhau, tức là khi kháng nguyên của vi sinh vật gây bệnh và không gây bệnh có một số epitope giống nhau. Tuy nhiên, vấn đề này có thể khắc phục được vì hiện nay đã có kháng thể đơn dòng cho từng quyết định kháng nguyên.

Các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody–MoAb hay MAb) chỉ nhận biết

https://nhathuocngocanh.com/

một epitope trên một kháng nguyên tương ứng. Vấn đề là phải tìm ra cách để tạo một dòng tế bào có thể nuôi cấy được và sinh được kháng thể đơn dòng có ái lực cao với kháng nguyên đích đặc hiệu. Dòng tế bào như vậy là nguồn cung cấp ổn định, liên tục các phân tử kháng thể giống hệt nhau. Thật không may, tế bào lympho B tạo các kháng thể có đời sống ngắn ngủi, không thể tái sinh trong khi nuôi cấy. Người ta biết rằng tế bào lympho bình thường đôi khi trở thành tế bào ung thư (ví dụ u tủy xương) có khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy mà vẫn có nhiều thuộc tính của tế bào B. Do vậy, tế bào u tủy xương, đặc biệt là những tế bào không sinh kháng thể, trở thành ứng viên để dung hợp với tế bào B sinh kháng thể. Năm 1970, Cesar Milstein và Georges Kuhler với kỹ thuật hybridoma (tế bào lai giữa một lympho B có khả năng sản xuất kháng thể với một tế bào ung thư có đời sống khá dài). Dạng lai này sẽ có thành phần di truyền của tế bào B để sinh kháng thể và chức năng phân chia tế bào của dạng tế bào ung thư để có thể phát triển trong môi trường nuôi cấy. Nhược điểm là tốn nhiều công sức, tốn kém để tạo được một kháng thể đơn dòng đặc hiệu. Kháng thể đơn dòng được sử dụng rộng rãi trong sinh học và y học, chúng vừa là phương tiện chẩn đoán khi được gắn với những chất đánh dấu thích hợp vừa là công cụ điều trị ung thư ở người nhưng phải sử dụng ADN tái tổ hợp với vật liệu di truyền người.



Hình 12.2. Kháng thể đa dòng và đơn dòng

A. Kháng thể đơn dòng chỉ liên kết với một epitope đặc hiệu.
B. Các kháng thể đa dòng, mỗi kháng thể liên kết với một epitope khác nhau

1.2. Phương pháp dựa trên ADN

Kỹ thuật lai phân tử

Đây là kỹ thuật không khuếch đại acid nucleic với kỹ thuật dùng các đoạn dò (probe) thường là ADN đặc hiệu dưới dạng sợi đơn (ssDNA) đã được đánh dấu (enzym hay đồng vị phóng xạ), sau đó cho lai phân tử đặc hiệu để phát hiện các đoạn ADN đặc hiệu của vi khuẩn có trong bệnh phẩm, rồi chuyển sản phẩm lên màng cellulose (kỹ thuật Southern–blot). Để có hiệu quả, đoạn dò phải có tính

https://nhathuocngocanh.com/

đặc hiệu cao, nói cách khác, đoạn dò ADN chỉ lai chọn lọc với trình tự acid nucleic đích. Dương tính giả (tức có đáp ứng khi không có chuỗi đích) và âm tính giả làm giảm nghiêm trọng khả năng sử dụng của quy trình chẩn đoán. Đoạn dò có thể đặc hiệu ở các mức phân loại khác nhau của sinh vật, chúng có thể phân biệt giữa hai hay nhiều loài, xác định các chủng cụ thể giữa cùng một loài hoặc nhận ra sự khác nhau giữa các gen. Tùy vào yêu cầu của các quy trình xét nghiệm, mẫu dò có thể là ADN hay ARN (sẽ phát hiện ARN đặc hiệu của vi khuẩn, gọi là kỹ thuật Northern–blot); độ dài có thể lớn (>100 nucleotid hay ngắn (<50 nucleotid); được tổng hợp hoá học toàn bộ một gen nhân dòng hoặc các vùng tách riêng của một gen. Độ nhạy của phương pháp này tùy thuộc vào sự có mặt nhiều hay ít của ADN đích trong bệnh phẩm, nếu ADN đích quá ít, ADN đoạn dò không thể phát hiện được.

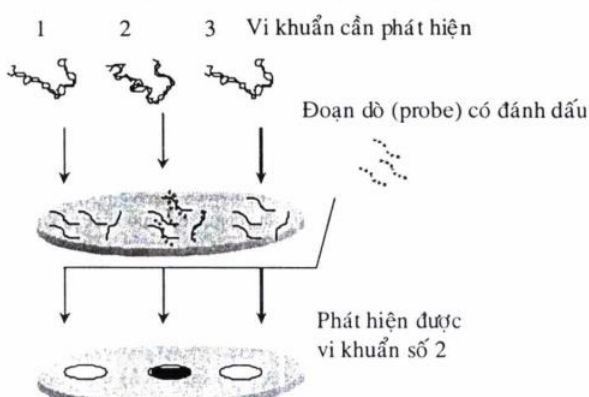
Thử nghiệm chẩn đoán lai phân tử acid nucleic có ba yếu tố chính: ADN đoạn dò, ADN đích và phản ứng phát hiện sản phẩm. Cơ sở vật lý của hệ thống này là sự cặp đôi nghiêm ngặt của các bazơ nitơ, là liên kết hydro giữa chuỗi nucleotid đoạn dò và chuỗi nucleotid đích theo nguyên tắc bổ sung. Nguyên tắc của phương pháp thể hiện trong hình 12.3, sơ đồ tổng quát quá trình lai phân tử acid nucleic ở các phòng thí nghiệm như sau:

1. Gắn ADN sợi đơn (đích) lên màng đỡ.

2. Thêm ADN sợi đơn, đã đánh dấu (đoạn dò) dưới các điều kiện thích hợp về nhiệt độ, lực ion để thúc đẩy sự cặp đôi của các bazơ giữa đoạn dò và ADN đích.

3. Rửa giá đỡ để loại bỏ ADN đoạn dò thừa không gắn.

4. Xác định sản phẩm lai phân tử tạo thành giữa đoạn dò và ADN đích.



Hình 12.3. Nguyên tắc phát hiện vi khuẩn gây bệnh bằng phương pháp lai phân tử dùng đoạn dò

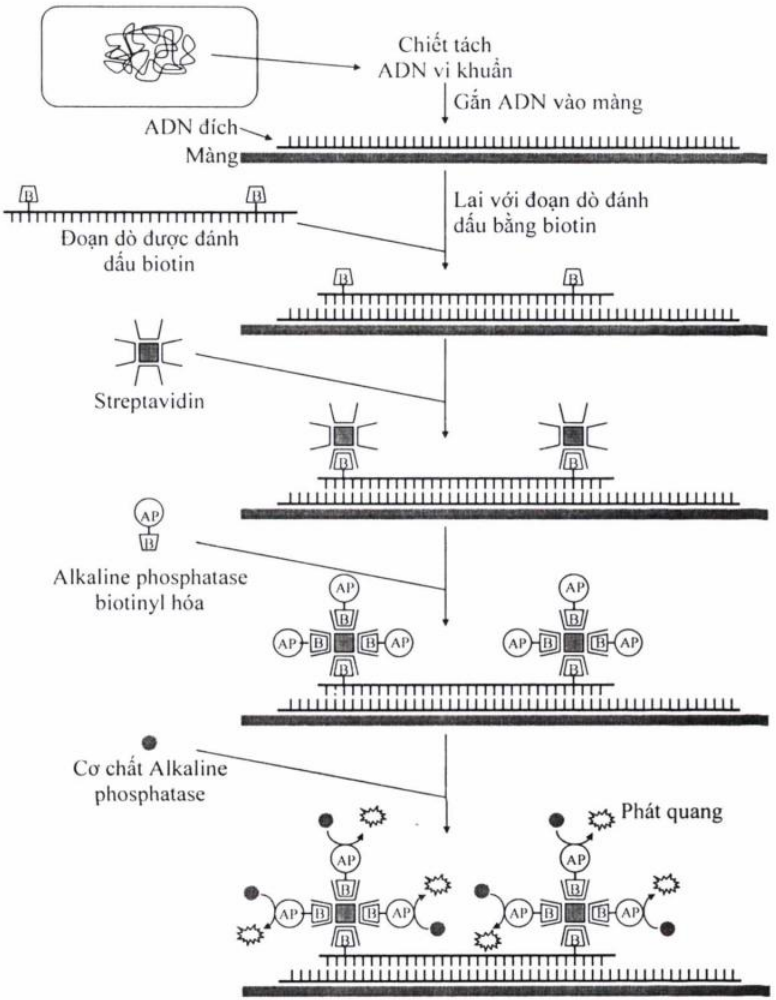
https://nhathuocngocanh.com/

Các đoạn đích ARN cũng được sử dụng vì có nhiều bản sao ARN hơn ADN trong một tế bào, giúp tăng độ nhạy phương pháp dò tìm. Mặc dù mARN có thể được sử dụng như nguồn cung cấp đoạn đích, hiếm khi nó được dùng một mình do số lượng trong tế bào thường biến động nhanh. Tuy nhiên, khuyết điểm này của các mARN có thể là một ưu điểm khi phân biệt các tế bào không hoạt động và đang hoạt động. ARN ribosom (rARN) thường là đích tốt nhất cho đoạn dò trong thử nghiệm tầm soát. Các gen 16S rRNA tiểu đơn vị nhỏ của ribosom (small sub–unit ribosomal ADN: ssu–rDNA) và 23S rRNA của tiểu đơn vị lớn ribosom (large sub–unit: lsu–rDNA) rất hữu ích trong việc phát hiện các nhóm phân loại vì tính chất bảo tồn cao. rARN có tính bảo tồn cao hơn mARN, và có nhiều bản sao hơn ADN trong mỗi tế bào. Thí dụ, *E. coli* có khoảng 10,000 ribosom trong một tế bào so với một hoặc bốn bản sao ADN trong khi tăng trưởng, do đó dò tìm rARN nhạy hơn ADN 1,000 lần hoặc hơn. ADN plasmid cũng là một đích hiệu quả trong vài vi sinh vật. Tuy nhiên, hạn chế của ADN plasmid là chúng có thể chuyển nhiễm giữa các sinh vật vì thế có thể hiện diện trong các chủng không quan tâm hoặc bị mất. Đích tốt nhất, ARN hoặc ADN, là chuỗi nucleotid (ví dụ: các yếu tố virus, các gen độc) đặc hiệu và không hiện diện trong tế bào các chủng không quan tâm.

Như trong kỹ thuật miễn dịch, hầu hết các đoạn dò được đánh dấu để có thể được phát hiện sau khi lai hóa. Phần đánh dấu có thể được gắn hoặc tích hợp trong phân tử dò. Các đồng vị phóng xạ như ^{32}P, ^{35}S, và ^{125}I thường được tích hợp trong cấu trúc phân tử. Các enzym như phosphatase kiềm hoặc horseradish peroxidase thường được liên kết đồng hóa trị với đoạn dò. Sự liên kết đồng hóa trị của phần đánh dấu bao gồm một chất trung gian (phần đệm) làm cho enzym cách xa đoạn dò. Điều này cho phép phản ứng lai hóa diễn ra mà không bị cản trở không gian và đảm bảo chức năng nguyên vẹn của enzym gắn kết. Một biến thể trong đánh dấu acid nucleic là gắn biotin vào đoạn dò và sau đó phát hiện biotin bằng enzym được gắn kết với avidin. Biotin có thể được đưa vào acid nucleic thông qua một nucleotide bị biotinyl hóa hoặc qua một hợp chất quang hoạt được gọi là photobiotin *(hình 12.4)*.

Đầu tiên các nghiên cứu sử dụng sự lai hóa acid nucleic đã dùng đồng vị phóng xạ để đánh dấu các đoạn dò acid nucleic. Chu kỳ bán rã ngắn của hầu hết các đồng vị phóng xạ (14 ngày đối với ^{32}P; 60 ngày đối với ^{125}I) và quy trình thao tác và tiêu hủy đặc biệt làm chúng không phù hợp với hầu hết phòng thí nghiệm lâm sàng và các nhà sản xuất kit thương mại. Đoạn dò phóng xạ nhạy hơn đoạn dò không phóng xạ nhưng có nhiều phản ứng dương tính giả hơn. Do tính dễ sử dụng, chi phí, và không cần trang thiết bị sử dụng, bảo vệ đặc biệt, hiện nay đoạn dò đánh dấu không phóng xạ được sử dụng rộng rãi hơn.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 12.4. Kỹ thuật lai phân tử ADN với chất đánh dấu biotin

Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic

Các kỹ thuật trước không khuếch đại được số lượng acid nucleic đích. Như vậy phải nuôi cấy được vi sinh vật để gia tăng lượng acid nucleic đích mà đôi khi là không thể vì một số tác nhân gây nhiễm không thể nuôi cấy được, và một số

https://nhathuocngocanh.com/

khác thường đòi hỏi thời gian nuôi cấy dài hoặc quá trình nuôi cấy hết sức phức tạp và tốn kém. Để giải quyết vấn đề, có hai hướng tiếp cận:

1. Khuếch đại số lượng đoạn acid nucleic đích trong mẫu bằng các kỹ thuật khuếch đại gen trước khi tiến hành kỹ thuật lai hóa phát hiện.

2. Tiến hành phát hiện với kỹ thuật khuếch đại tín hiệu, làm cho tín hiệu mạnh lên vượt ngưỡng phát hiện, mặc dù số lượng ADN đích thấp hơn ngưỡng phát hiện của kỹ thuật lai hóa thông thường.

Các thử nghiệm có thể được tiến hành bằng cách kết hợp cả hai cách tiếp cận. Trình tự acid nucleic đích có thể được khuếch đại, do đó làm tăng lượng acid nucleic đích sẵn có cho việc phát hiện và đoạn dò có thể được thiết kế với một hệ thống khuếch đại tín hiệu cho phép phát hiện số cặp lai hóa rất thấp.

Các kỹ thuật này có chung nguyên tắc: sử dụng một hoặc nhiều enzym để tổng hợp (khuếch đại) cho ra nhiều bản sao của acid nucleic đích nhờ các cặp mồi (primers) acid nucleic đã bắt cặp theo nguyên tắc bổ sung với acid nucleic đích ở những vị trí chuyên biệt. Bằng kỹ thuật này, hàng triệu tới hàng tỷ bản sao chính xác của trình tự acid nucleic đích được tạo ra sau vài giờ thao tác, do vậy độ nhạy của kỹ thuật hơn hẳn so với các kỹ thuật không khuếch đại. Lưu ý, kỹ thuật khuếch đại gen chỉ giúp làm tăng số bản sao của acid nucleic đích vượt lên trên ngưỡng phát hiện chứ không trực tiếp làm nhiệm vụ phát hiện đối tượng. Sản phẩm khuếch đại gen sau đó cần được lấy ra để tiến hành thử nghiệm phát hiện ví dụ chạy điện di và nhuộm sản phẩm, hoặc thực hiện lai hóa với đoạn dò, hoặc kỹ thuật ELISA.

Thử nghiệm PCR

Bằng các khuếch đại đoạn nucleotide đặc trưng của vi sinh vật gây bệnh trong mẫu bệnh phẩm, thử nghiệm PCR có thể phát hiện vi sinh vật với độ nhạy cực cao hơn hẳn các thử nghiệm trước đây (về mặt lý thuyết chỉ cần có một vi sinh vật là có hiện diện acid nucleic đích và được PCR khuếch đại).

Với thử nghiệm PCR định danh, vấn đề là tìm cho được đoạn mồi (primer đặc hiệu). Hiện nay có nhiều phần mềm giúp tối ưu hoá cho đoạn mồi, điều này thì tương đối đơn giản so với tìm ra kháng nguyên, kháng thể đặc hiệu trong các phản ứng huyết thanh nhưng mặt khác cần biết rõ về trình tự đoạn ADN của vi sinh vật sẽ khuếch đại. Tiếp theo cần thử nghiệm xem các đoạn mồi được chọn có nhạy cảm và đặc hiệu hay không, nếu chưa được phải tiếp tục với cặp mồi khác, đây cũng chính là nhược điểm của PCR.

Do thử nghiệm PCR quá nhạy nên khi áp dụng trong chẩn đoán, một vấn đề quan trọng cần lưu tâm, đó là hiện tượng dương tính giả, chủ yếu bị nhiễm bởi

https://nhathuocngocanh.com/

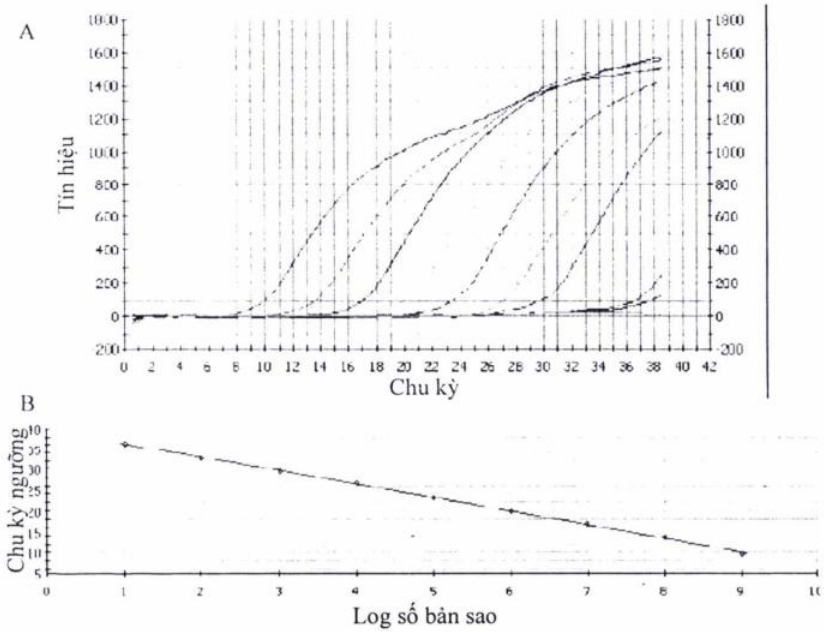
các lần thử nghiệm trước đó. Vì thế cần phải tổ chức thí nghiệm thật chặt chẽ, các giai đoạn thí nghiệm phải được thực hiện tại những khu vực riêng biệt với đồ dùng thí nghiệm riêng (micropipete riêng...), nếu được thì dùng các vật liệu chỉ dùng một lần (đầu típ, ống nhựa cho phản ứng, ống chứa bệnh phẩm....). Việc kiểm soát chất lượng phản ứng (Quality Control) phải đặt lên hàng đầu. Luôn luôn phải sử dụng chứng (+) (Positive control) và chứng (–) (Negative control) trong mỗi phản ứng. Chứng (+) chỉ chứa lượng rất thấp ADN hay ARN đích nhưng hoàn hảo (10–50 copies) để chỉ ra tất cả thành phần phản ứng hoạt động tốt, không có chất ức chế phản ứng, ngoài ra còn nhằm cho biết mức nhạy cảm của phản ứng. Chứng (–) chỉ chứa các thành phần thuốc thử của phản ứng PCR, một khi chứng (–) trở nên (+), phản ứng trở nên không giá trị và cần kiểm tra tất cả thuốc thử, vật dụng thí nghiệm...

Multiplex PCR: sử dụng từ hai cặp mồi trở lên để khuếch đại nhiều trình tự acid nucleic đích chọn lọc cùng lúc chỉ trong một type phản ứng. Cần thiết kế những cặp mồi kỹ càng với một số yêu cầu: chúng phải có cùng nhiệt độ lai, không tạo sản phẩm bắt cặp chéo, các sản phẩm tạo ra nên có kích thước khác biệt có thể tách rời dễ dàng trong quá trình điện di phát hiện. Ưu điểm của multiplex–PCR là ta có thể giảm nhiều chi phí hóa chất thử nghiệm cũng như thời gian thao tác, với nhiều trình tự đích được phát hiện cùng lúc sẽ phục vụ cho nhiều ý định nghiên cứu.

Real–time PCR: PCR thời gian thật, là kỹ thuật PCR với mồi được gắn phân tử phát huỳnh quang và phân tử dập tắt huỳnh quang sao cho khi mồi được kéo dài thành sản phẩm thì tín hiệu huỳnh quang được giải phóng hoặc phản ứng được thực hiện với mồi bình thường nhưng sau đó sản phẩm khuếch đại được nhuộm huỳnh quang bằng thuốc nhuộm xen giữa ADN sợi đôi, phản ứng được tiến hành trong một máy luân nhiệt đặc biệt có trang bị đầu dò huỳnh quang, sau mỗi chu kỳ khuếch đại, đầu dò sẽ đọc để phát hiện cường độ huỳnh quang, cường độ này tỷ lệ thuận với số sản phẩm khuếch đại (hình 12.5). Vì sau mỗi chu kỳ khuếch đại, số sản phẩm sẽ tăng gấp đôi, nên với số chu kỳ biết trước, căn cứ vào đường cong tương quan chuẩn giữa cường độ huỳnh quang và số phân tử phát người ta có thể tính ra số bản sao của khuôn mẫu khuếch đại ban đầu có trong phản ứng, và từ đó tính ra số vi sinh vật có trong mẫu dựa trên kiến thức về số bản sao của khuôn mẫu trong một tế bào.

Real–time PCR được ứng dụng nhiều trong chẩn đoán và xét nghiệm do nó cho phép phát hiện sản phẩm khuếch đại mà không cần mở ống phản ứng, mặt khác nếu kết hợp với mẫu chuẩn đã biết trước số bản sao được tạo ra, người ta có thể định lượng được số bản khuôn mẫu ban đầu của mẫu thử. Kết hợp với ưu thế về độ nhạy của kỹ thuật PCR, realtime PCR rất thích hợp để phát hiện và định lượng nhanh các vi sinh vật.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 12.5. Real–time PCR trong chẩn đoán viêm gan virus C

A. Đường cong tương quan chuẩn cường độ huỳnh quang.
B. Đường cong chuẩn cho phép xác định số lượng trình tự đích ban đầu.

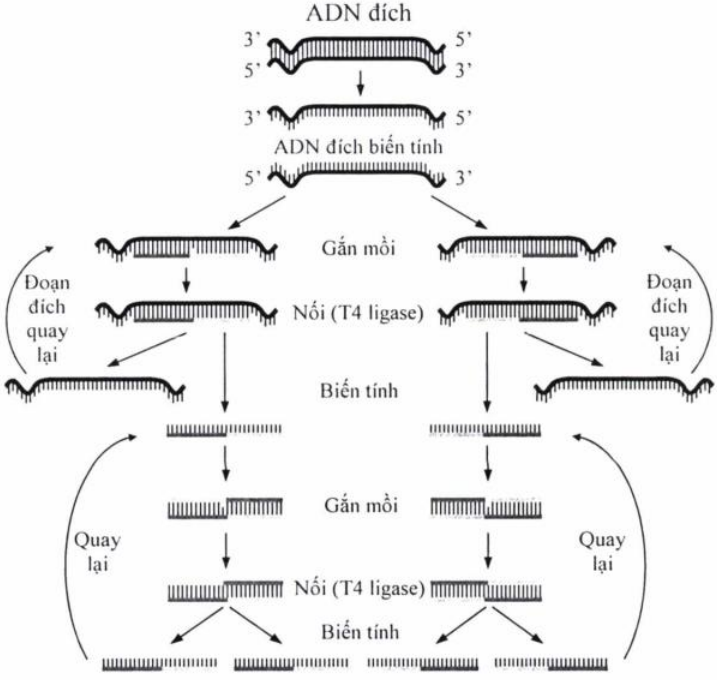
Phản ứng khuếch đại bằng ligase

Phản ứng khuếch đại bằng ligase, còn gọi là phản ứng chuỗi ligase (LCR là tên thương mại) hoặc thử nghiệm nối oligonucleotid, là một kỹ thuật khác để khuếch đại và phát hiện trình tự đích. Không giống như PCR (tạo phân tử ADN mới từ các nucleotid riêng lẻ), phản ứng dùng ligase sử dụng một enzym bền với nhiệt để nối hai chuỗi nucleotid nằm gần kề nhau. Giống với PCR, LCR cũng có tính chu kỳ và gồm các chu kỳ cơ bản như biến tính, ủ, nối. Cũng như trong PCR, các cặp oligonucleotid được nối lại, cùng với chuỗi gốc trở thành khuôn mẫu cho chu kỳ tiếp theo *(xem hình 12.6)*. Phản ứng này có từ 20 đến 30 chu kỳ tạo ra 10^6 lần tăng so với chuỗi đích. Hiện thời phương pháp có giới hạn phát hiện đến 10 đoạn đích acid nucleoic.

Trong phản ứng dùng ligase, toàn bộ trình tự đích phải được biết, vì một bp không khớp tại điểm gắn kết có thể cản trở sự kết hợp các oligonucleotid. Mặc dù điều này không tốt trong nhiều trường hợp, nhưng rất hữu ích trong việc xác định điểm đột biến trong trình tự đích. Barany đã sử dụng kỹ thuật này để phân

https://nhathuocngocanh.com/

biệt β–globulin bình thường và β–globulin hình lưỡi liềm trong mẫu máu của bệnh nhân với bệnh thiếu máu tế bào hình lưỡi liềm. Cũng giống như PCR, ligase bền với nhiệt cần để quay vòng phản ứng khuếch đại. Tuy nhiên, phản ứng dùng ligase thích hợp hơn PCR trong công việc chẩn đoán. Trong khi PCR tạo ra các phân tử ADN hoặc ARN mới, trong nhiều trường hợp các phân tử mới tạo ra vẫn đòi hỏi vài dạng kiểm tra hoặc định tính để xác định độ đặc hiệu chính xác của ADN. Phản ứng dùng ligase sử dụng các trình tự đã biết cho mục đích phát hiện duy nhất; các đoạn dò phải lai hóa ở các vị trí gần kề để được nối lại với nhau và được phát hiện.



Hình 12.6. Nguyên lý phản ứng chuỗi ligase

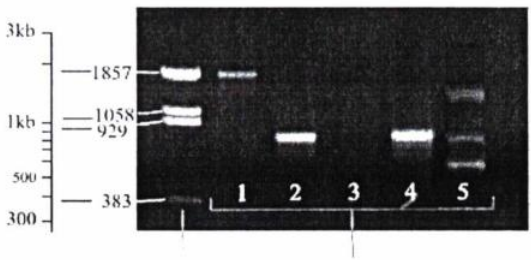
Một biến thể của phản ứng dùng ligase là việc sử dụng cả polymerase và ligase. Hai đoạn mồi oligonucleotid được gắn với chuỗi đích nhưng có khoảng trống giữa chúng để polymerase lấp đầy; sau đó ligase mới nối khoảng trống được lấp đầy với đoạn mồi thứ 2. Sự biến đổi này, gọi là gap–LCR (G–LCR là tên

https://nhathuocngocanh.com/

thương mại). Phản ứng khuếch đại dùng ligase cũng được dùng để xác định đột biến liên quan đến bệnh xơ hóa nang, trong việc phát hiện các đoạn gen của chuỗi β trong thụ thể tế bào T ở người, và xác định một số tác nhân lây nhiễm qua đường sinh dục như *Chlamydia trachomatis*, virus gây bệnh u nhú ở người (Human papilloma virus).

Kỹ thuật phát hiện sản phẩm khuếch đại gen

Sản phẩm khuếch đại gen có thể được phát hiện một cách đơn giản là chạy điện di trên gel để tách nó ra khỏi phản ứng và sau đó nhuộm gel để phát hiện vạch acid nucleic sản phẩm. Thông thường người ta cần chạy điện di song song với thang ADN chuẩn để xác định kích thước sản phẩm có đúng với thiết kế của phương pháp hay không *(xem hình 12.7)*. Nhìn chung cách phát hiện này đơn giản, giá thành thấp, nhưng nó đòi hỏi nhiều thao tác thủ công, do đó năng suất phân tích thấp, chưa kể đến tính đặc hiệu vì chỉ đơn thuần dựa trên việc nhuộm sản phẩm mà không có sự xác nhận hiện diện của trình tự đích thông qua lai hóa. Một nhược điểm lớn nữa là hóa chất nhuộm acid nucleic (như Ethidium Bromide) thường gây ung thư do đó nguy hiểm cho người thực hiện.

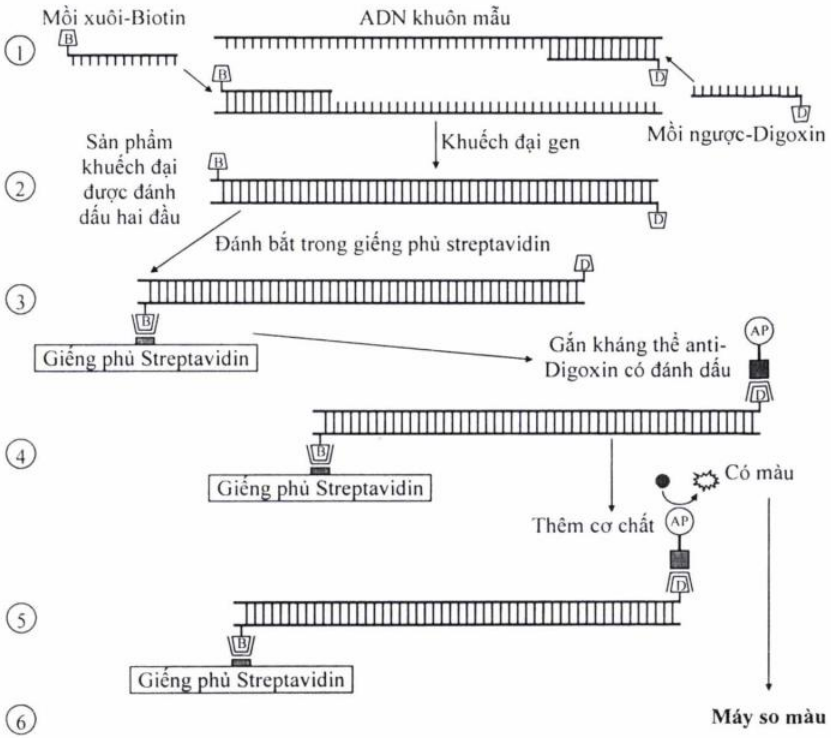


Hình 12.7. Đọc kết quả bằng điện di và nhuộm sản phẩm với ethidium bromid

Lần đầu tiên là thang ADN chuẩn biết trước kích thước các băng; giếng 1, 5 là các sản phẩm PCR không đúng kích thước; giếng hai là chứng (+), kích thước sản phẩm là 800 bp; giếng ba là chứng (–); giếng bốn là sản phẩm PCR trên mẫu thử, kích thước 800 bp

Để giảm các nhược điểm của kỹ thuật trên ngày nay trong chẩn đoán phân tử hiện đại người ta thường phối hợp nhiều kỹ thuật nhu PCR–ELISA hoặc lai hóa để phát hiện sản phẩm. Tuy có thể tốn kém nhiều hóa chất, thêm nhiều bước trung gian và có giá thành cao, nhưng chúng có thể được thực hiện hàng loạt, một cách tự động, độ chính xác, độ nhạy cao hơn và nhất là an toàn hơn *(xem hình 12.8)*.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 12.8. Sơ đồ kỹ thuật PCR–ELISA để phát hiện sản phẩm khuếch đại

Một số kỹ thuật xác định các dấu ấn di truyền

Dấu ấn di truyền ở đây là những dấu ấn giúp phân biệt các cá thể trong cùng loài, xem có liên hệ với nhau không. Các dấu ấn này không có ý nghĩa gì trong việc biểu hiện kiểu hình thông qua tổng hợp protein. Trước đây, để phát hiện các dấu ấn di truyền, nhà nghiên cứu phải ly trích được bộ gen từ một khối lượng khá nhiều tế bào của các thể cần khảo sát (mô, máu...), sau đó cắt đoạn bộ gen này bằng các enzym cắt giới hạn, điện di trên thạch, làm Southern blot, rồi dùng các đoạn dò đặc hiệu được đánh dấu để phát hiện. Kết quả là mỗi cá thể sẽ có một hình ảnh đặc trưng bằng các vạch được đánh dấu bằng các đoạn dò khi lai ghép trên Southern blot (đối với ADN, còn với ARN được gọi là Northern blot). Người ta gọi kỹ thuật này là kỹ thuật phân tích sự đa hình về chiều dài của các mảnh ADN bị cắt đoạn (Restriction Fragment Lengh Polymorphism–RFLP). Plasmid cũng đã được dùng để phân tích vì có chứa nhiều thông tin di

https://nhathuocngocanh.com/
truyền như để kháng kháng sinh, độc lực, độc tố... năng lực để phân tích dấu ấn di truyền kém hơn nhiễm sắc thể, tuy nhiên vẫn được áp dụng trong khảo sát dịch tễ học bệnh nhiễm vi khuẩn vì đơn giản, dễ thực hiện.

Hiện nay, các phương pháp định dấu ấn di truyền mức độ phân tử có thể được chia làm ba nhóm:

a) Phân tích dấu ấn nhiễm sắc thể sử dụng kỹ thuật khuếch đại gen.

b) Cắt giới hạn nhiễm sắc thể vi khuẩn.

c) Khuếch đại một gen và phân tích trình tự.

Trong thực tế, có nhiều cải tiến hay biến thể của các chiến lược cơ bản trên. Để tăng độ nhạy, có thể phối hợp với phản ứng PCR, ta có thể dùng các đoạn mồi nằm trước và sau các microsatellite, là các cấu trúc CACACA lặp đi lặp lại có rải rác khoảng 100.000 lần trong bộ gen của động vật có vú. Các cá thể khác nhau có sự khác nhau về số lượng các cấu trúc CA tạo thành các microsatellite mà phản ứng PCR sẽ khuếch đại. Các phương pháp dấu ấn dựa trên PCR có thể khai thác nhiều nhóm mồi lặp khác nhau như REP, các trình tự xen giữa rARN, các trình tự ADN đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (Random Amplification of Polymorphic ADN–RAPD). Chiến lược kết hợp dựa vào sự đa hình độ dài các đoạn cắt giới hạn sau khuếch đại bằng PCR có thể được phân tích giản đơn với gel agarose nhuộm ethidium bromid hay có thể được chuyển lên màng và lai với các đoạn dò đánh dấu, phân tích số lượng các vạch trên gel, sẽ thấy các các vạch khác nhau tùy theo từng cá thể phân tích (PCR–RFLP).

Các kỹ thuật dấu ấn di truyền dựa trên PCR hiện đang sử dụng có thể kể đến PCR với mồi lặp (Repetitive Extragenic Palindromic) – rep–PCR), PCR đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (Random Amplification of Polymorphic DNA – RAPD), PCR của vùng xen giữa 16S và 23S rDNA ('ribotyping'), PCR đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD–PCR) và xác định trình tự acid nucleic. Có nhiều vấn đề cần xem xét trước khi áp dụng định trình tự acid nucleic trong việc định type. Đầu tiên, việc định trình tự ADN thường chỉ được thực hiện trên một đoạn ADN ngắn, việc định trình tự của nhiều gen hay một vùng lớn của nhiễm sắc thể là không thực tiễn. Ngược lại với các kỹ thuật như PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis – Điện di trường xung), Rep–PCR, hay RAPD, trong đó toàn bộ nhiễm sắc thể được sử dụng để phân tích, định trình tự ADN chỉ khảo sát một phần rất nhỏ các vị trí có tiềm năng khác biệt giữa các chủng nên khả năng có sự đa hình để phân biệt thấp hơn. Ngược lại, việc định trình tự ADN lại được coi là "tiêu chuẩn vàng" trong việc định type virus như trên virus viêm gan virus C (HCV) và là phương pháp phân tử duy nhất để xác định chính xác các đột biến liên quan đến kháng thuốc ở HIV.

https://nhathuocngocanh.com/

Việc khuếch đại một gen và phân tích trình tự có thể khác nhau do gen được chọn khác nhau, hay do việc sử dụng thông tin trình tự thu được trực tiếp hay gián tiếp thông qua việc dịch thành protein.

Rep–PCR là phương pháp dấu ấn di truyền vi khuẩn được thực hiện bằng cách khuếch đại ADN nhiễm sắc thể với các mồi bắt cặp với các trình tự lặp trong bộ gen vi khuẩn. Do sự phân bố của các trình tự này trong bộ gen khác nhau giữa các chủng khác nhau nên sản phẩm khuếch đại có sự đa hình về kích thước. Hai yếu tố lặp được sử dụng trong Rep–PCR. 1) Các yếu tố đối xứng ngoài gen lặp (Repetitive Extragenic Palindromic – REP), là các trình tự dài khoảng 38 bp bao gồm sáu vị trí thoái hóa và nút thắt 5 bp thay đổi ở giữa mỗi phía của một nhánh đối xứng được bảo tồn. Các trình tự REP được thấy ở nhiều vi khuẩn đường ruột và được cho là có vai trò điều hòa trong các vùng không dịch mã của operon vi khuẩn. 2) Các trình tự chung lặp lại giữa các gen của vi khuẩn đường ruột (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – ERIC) là loại yếu tố lặp thứ hai. Các trình tự ERIC gồm các yếu tố dài 126 bp chứa một đoạn lặp nghịch đảo ở tâm bảo tồn cao và cũng hiện diện trong các vùng không dịch mã của nhiễm sắc thể. Các trình tự ERIC không có sự tương đồng nào với REP. Chúng được mô tả dựa trên các trình tự thu được từ *E. coli* và *Salmonella typhimunium*.

Ngoài các trình tự REP và ERIC được sử dụng nhiều nhất, trình tự BOX, cũng được dùng để phân biệt các *Streptococcus pneumoniae*. Yếu tố BOX nằm trong các vùng xen giữa các gen và cũng có thể tạo cấu trúc nút thắt do tính chất đối xứng cặp. Chúng là các yếu tố lặp khảm cấu tạo gồm các phối hợp khác nhau của ba đơn vị trình tự boxA, boxB, và boxC. Ba đơn vị này có chiều dài tương ứng là 59, 45, và 50 nucleotid. Yếu tố BOX không có quan hệ trình tự với cả REP lẫn ERIC. Yếu tố BOX được tìm thấy ở nhiều vi khuẩn.

Các mồi REP ban đầu được thiết kế từ nhánh bên phải và trái của trình tự đối xứng bảo tồn và hướng nghịch nhau để khuếch đại hướng ra theo chiều 3' tính từ tâm của vùng đối xứng. Theo cách này, các sản phẩm khuếch đại là trình tự nằm giữa các vùng đối xứng (kích thước 200 bp đến 4 kb). Trong nhiều trường hợp của mồi lặp, người ta dùng insosine để làm tăng tính thoái biến của mồi và độ nhạy của phản ứng. Điều này dẫn đến số băng tạo ra lớn hơn và do đó tăng khả năng phân biệt chính xác. Rep–PCR có thể được thực hiện với ADN được chiết từ khuẩn lạc hay chiết thô từ tế bào. Phản ứng khuếch đại REP hay ERIC có thể được thực hiện với mồi đơn, hay một bộ các mồi đơn, hay hay nhiều bộ mồi đơn. Thông thường kết quả khuếch đại với mồi ERIC ít phức tạp hơn so với mồi REP, nhưng cả hai đều có khả năng phân biệt tốt đến mức chủng. Việc áp dụng cả hai mồi cho cùng một mẫu làm tăng khả năng phân biệt cao hơn các phương pháp khác sử dụng độc lập.

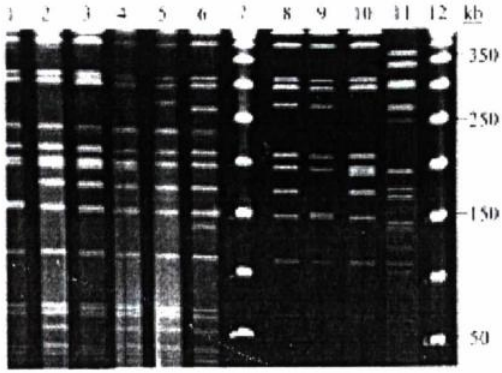
https://nhathuocngocanh.com/

Rep–PCR được xem có năng lực phân biệt cao hơn kỹ thuật phân tích gen 16S rRNA hay vùng xen giữa 16S và 23S. Hơn nữa, các nghiên cứu so sánh Rep–PCR với các phương pháp khác như điện di enzym đa locus, sinh hóa, hay định type ribosom đều cho thấy Rep–PCR ưu việt hơn, tương quan tốt với kết quả PFGE nhưng nói chung có năng lực phân biệt hơi thấp hơn.

Với phương pháp đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (RAPD), một mồi oligonucleotid tuỳ ý, thường dài 9 – 10 bp, không chứa bất kỳ trình tự đối xứng nào và có thành phần G+C khoảng 50 – 80%, cho bắt cặp với acid nucleic đích trong điều kiện bắt cặp không chặt chẽ như nhiệt độ thấp 30 – 40°C. Sản phẩm PCR lúc bây giờ là những đoạn ADN dài ngắn khác nhau do bắt cặp ngẫu nhiên trên ADN đích (nhưng sẽ với chuỗi đích nào tương đối bổ sung nhất với nó), số lượng, kích thước các đoạn này sẽ được phát hiện sau khi điện di trên bản gel. Sự giống và khác nhau hình ảnh trên bản gel cho biết các cá thể phân tích có giống hay khác nhau. So sánh với những phương pháp khác để xác định tính dấu ấn di truyền, RAPD có một số ưu điểm: (1) Một bộ mồi oligonucleotid như nhau (chung) có thể dùng cho mọi loài thực vật. (2) Không cần dữ liệu ngân hàng bộ gen, phóng xạ, Southern blot hay lai ADN, nên có thể dễ dàng và nhanh chóng. (3) Quy trình có thể được thực hiện tự động. Hơn nữa, với các phân tích PCR truyền thống cần phải biết trình tự của gen hoặc đoạn gen đặc hiệu là đích để khuếch đại. Nói cách khác, sự nhân bội đa hình ngẫu nhiên trong phân tích RAPD có thể diễn ra mọi nơi trong bộ gen có hai đoạn trình tự bổ sung với mồi trong giới hạn chiều dài cho phép của PCR.

Điện di trường xung (Pulsed–field gel electrophhayesis – PFGE) thường được coi là "tiêu chuẩn vàng" của các phương pháp định type phân tử. Để thực hiện PFGE, toàn bộ ADN nhiễm sắc thể được ly trích và được kết hợp với agarose đã đun chảy rồi đổ vào các khuôn nhỏ cho đông lại. Khi agarose đông lại thu được nút thạch chứa vi khuẩn. Vi khuẩn này sẽ được ly giải *in situ* bằng enzym–xà phòng, và sau đó ADN phóng thích ra được cắt với các enzym cắt giới hạn "hiếm", chỉ cắt nhiễm sắc thể tại vài điểm. Đặc điểm hiếm này phụ thuộc vào độ dài của trình tự nhận diện, nói chung trình tự này càng dài thì xác suất xuất hiện càng thấp. Nút thạch sau khi xử lý được nhồi vào bản thạch agarose vào dược điện di trong thiết bị điện di trường xung. Trường xung cho phép tách các mảnh ADN có kích thước rất lớn trong khoảng 10 đến 800 kb. Kết quả điện di được phát hiện bằng cách nhuộm gel với một thuốc nhuộm huỳnh quang như ethidium bromide và chụp hình *(xem hình 12.9)*. Dữ liệu được lưu trữ và phân tích bằng một trong các phần mềm của Applied Math, Bio–Rad... Với sự hỗ trợ của các phần mềm quét gel, người ta có thể xây dựng ngân hàng mẫu PFGE cho tất cả các loài vi sinh vật, và dùng làm dữ liệu tham chiếu cho các chủng mới. Hạn chế của PFGE là thời gian phân tích quá dài, mất đến 2 – 3 ngày, do đó khó phân tích một số lượng mẫu lớn.

https://nhathuocngocanh.com/



Hình 12.9. PFGE phân tích trên các chủng *Shigella flexneri*

Làn 7 và 12 là thang ADN chuẩn biết trước kích thước các băng

Bảng 12.1. Tóm tắt đặc điểm các kỹ thuật xác định dấu ấn di truyền

Phương pháp	Sử dụng	Phân tích kết quả	Khả năng phân biệt	Thời gian thu kết quả (ngày)	Độ lặp lại trong 1 PTN	Độ lặp lại giữa các PTN	Chi phí đầu tư ban đầu	Chi phí cho một lần thử
PFGE	Bình thường	Dễ	Cao	3	Tốt	Tốt	Vừa phải	Vừa phải
PCR–RFLP	Dễ	Dễ	Trung bình	1	Tốt	Tốt	Vừa phải	Thấp
Rep–PCR	Dễ	Dễ	Cao	1	Tốt	Trung bình	Vừa phải	Thấp
RAPD	Dễ	Dễ	Cao	1	Trung bình	Yếu	Vừa phải	Thấp
CFLP	Bình thường	Bình thường	Trung bình	2	Tốt	Yếu	Vừa phải	Cao
AFLP	Bình thường	Dễ	Cao	2	Tốt	Tốt	Cao	Vừa phải
Xác định trình tự	Khó	Bình thường	Cao	2	Tốt	Tốt	Cao	Cao

2. ỨNG DỤNG CỦA CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ

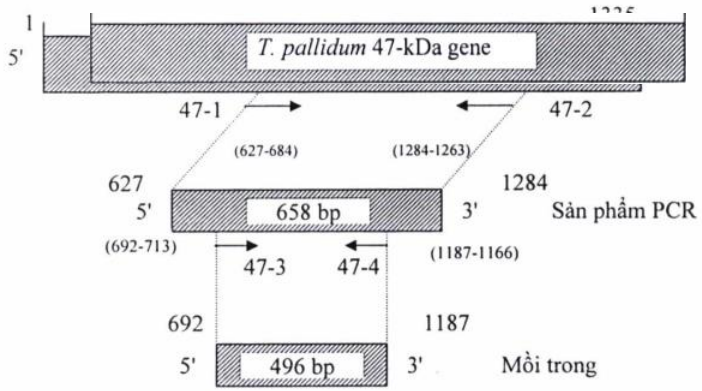
2.1. Phát hiện, định danh vi sinh vật gây bệnh

Hiện nay, chẩn đoán phân tử ngày càng đóng vai trò quan trọng để phát hiện, định danh vi sinh vật gây bệnh với nhiều ưu điểm: nhanh, chỉ trong vòng

https://nhathuocngocanh.com/

vài giờ, đặc biệt nhanh nếu so với một số vi khuẩn phát triển chậm như *M. tuberculosis*. Áp dụng được cho các vi sinh vật không hay khó nuôi cấy như các sinh vật gây bệnh qua đường sinh dục (kể cả HIV), các Rickettsia... Phổ áp dụng rất rộng (vi khuẩn, virus, nấm...). Độ nhạy rất cao (với kỹ thuật PCR, về nguyên tắc chỉ cần có một vi sinh vật để ly trích được ADN). Các phương pháp dựa trên ADN thường sử dụng là phương pháp đoạn dò (đoạn dò ADN) và PCR. Tuy nhiên cần nhớ hai phương pháp này ngoài ra còn có thể áp dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau (xác định trình tự chuỗi của đoạn ADN, hình sự, dấu ấn di truyền, khảo cổ học, tiến hoá...)

Xoắn khuẩn giang mai *Treponema pallidum* là một tác nhân gây bệnh qua đường sinh dục quan trọng, không nuôi cấy được trên môi trường nhân tạo nhưng lại có thể cho phản ứng huyết thanh chéo với các *Treponema* không gây bệnh khác. Thực hiện kỹ thuật PCR trên đoạn gen 47–kDa của màng chịu trách nhiệm tạo kháng nguyên (membrane immunogen). Sau đó phát hiện sản phẩm PCR trên gel polyacrylamid kích thước khoảng 658 bp, rồi thực hiện lai Southern blot với mồi trong (internal probe) 47–3 và 47–4 đánh dấu bởi ^{32}P *(xem hình 12.10).*



Hình 12.10. Các đoạn mồi và đoạn dò để phát hiện *T. pallidum* từ gen 47 kDa

Vi sinh vật gây bệnh hiện nay có thể phát hiện bằng kỹ thuật miễn dịch cho bởi Bảng 12.2 và kỹ thuật dựa trên ADN được cho bởi Bảng 12.3. Tuy nhiên, bảng này chỉ cho ý niệm khái quát vì sẽ liên tục được bổ sung bởi các nhà khoa học trên thế giới.

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 12.2. Vi sinh vật gây bệnh được phát hiện bởi kỹ thuật miễn dịch

Tác nhân	Phát hiện bước đầu	Phát hiện chuyên biệt
Virus		
Epstein–Barr	ELISA	IFA
Herpes Simplex Virus	ELISA	IFA
Cytomegalovirus	ELISA	IFA
HIV	ELISA, IFA	WB, IFA
Human T Lymphotropic Virus	ELISA	RIBA
Viêm gan siêu vi (A, B, C, D, E, G)	ELISA tìm kháng nguyên, IgG, IgM	Phản ứng trung hòa, WB3 (VGSV E), RIBA (VGSV C)
Rubella, Sởi	ELISA, HAI, phản ứng ngưng tập, HA	IFA
Varicella–zoster virus	ELISA	IFA
Respiratory syncial virus	ELISA tìm kháng nguyên hoặc kháng thể, HAI	IFA, phản ứng trung hòa
Influenza virus	ELISA, HAI	IFA
Rotavirus	ELISA tìm kháng nguyên hoặc kháng thể, HAI	DFA
Vi khuẩn		
Streptococcus spp.	Phản ứng ngưng tập	ASO, anti–hyaluronidase test
Xoắn khuẩn giang mai	RPR, VDRL	HA, FTA
Borrelia burgdorferi	ELISA	WB, RIBA, IFA
Chlamydia spp.	ELISA tìm kháng nguyên hoặc kháng thể	DFA
Nấm	Ouchterlony, ELISA	IFA
Rickettsiae	Cố định bổ thể, phản ứng ngưng tập	IFA
Ký sinh trùng		
Toxoplasma	HA, ELISA	IFA
Trypanosoma cruzi	ELISA	IFA
Các loại khác	IgE, DFA,	IFA

IFA: Immunofluorescent assay–Miễn dịch huỳnh quang; MB: Westhern–blot–Miễn dịch điện d di protein; RIBA: Recombinant immunoblot assay–Miễn dịch điện di protein tái tổ hợp; HAIAI: Hemaaglutination–Inhibition–phản ứng ức chế ngưng tập hồng cầu; HA: Hemaaglutination–n–Phản ứng ngưng tập hồng cầu; DFA: Direct immunofluorescent–antibody assay–Miễn dịch huỳnh quang trực tiếp tìm kháng thể ; ASO: Anti–streptolysin O assay; FTA: Fluorescenant Treponema Assay

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 12.3. Vi sinh vật gây bệnh có thể chẩn đoán bởi kỹ thuật dựa trên ADN

Tác nhân	Phương pháp/Nhà sản xuất
Chlamydia trachomatis	Lai phân tử/Gen–Probe, Digene; LCR/Abott; PCR/Roche; SDA/Becton Dickinson
Neisseria gonnorrhoeae	Lai phân tử/Gen–Probe, Digene; LCR/Abott; SDA/Becton Dickinson
C. trachomatis và *N. Gonnorrhoeae* multiplex	PCR/Roche ; TMA/Gen–Probe
Kết hợp nuôi cấy để khẳng định *Mycobacterium* spp.	Lai phân tử/Gen–Probe
Kết hợp nuôi cấy để khẳng định nấm và vi khuẩn[a]	Lai phân tử/Gen–Probe
Streptococcus nhóm A	Lai phân tử/Gen–Probe
Viêm gan siêu vi C	Reverse Transcriptase–PCR/Roche
Staphylococcus aureus kháng methicillin	CPT/ID Biomedical Corp.
HIV định lượng	Reverse Transcriptase–PCR/Roche
HIV kháng thuốc	Xác định trình tự gen (CLIP/Visible Genetics)
Human Papilloma virus	Lai phân tử/Digene
Mycobacterium tuberculosis	TMA/Gen–Probe; PCR/Roche
Gardnerella, Trichomonas, Candida	Lai phân tử/Becton Dickinson
Cytomegalovirus	Lai phân tử/Digene ; NASBA/Biomérieux

[a]Nấm gồm: *Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum.* Vi khuẩn gồm: *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* nhóm B, *Haemophilus influenzae, Neisseria gonnorrhoeae, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes*

LCR: Ligase chain reaction; PCR: Polymerase chain reaction; SDA: Stand displacement amplification; TMA: Transcription–mediated amplification; CPT: Cycling probe technology; NASBA: Nucleic acid sequence–based amplification

Nguồn: Cục kiểm tra thực phẩm và dược phẩm Mỹ (US Food and Drug Administration, 2003).

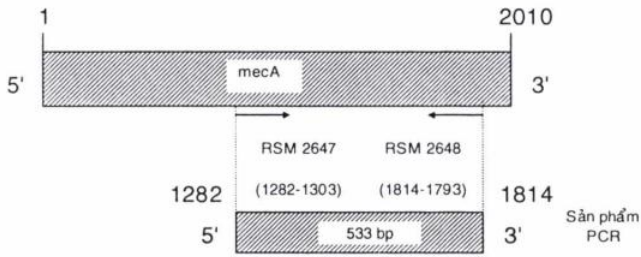
2.2. Phát hiện sự đề kháng kháng sinh

Đây là vai trò rất quan trọng của các phòng thí nghiệm vi sinh nhằm đánh giá, kiểm soát tình hình đề kháng đối với các kháng sinh sau thời gian sử dụng đồng thời góp phần trong việc sử dụng kháng sinh an toàn, hiệu quả. Phải sử dụng nhiều kỹ thuật khác nhau, các phương pháp thông thường gồm có các bước sau: (1) Phân lập tác nhân gây bệnh, (2) Thử nghiệm tính nhạy cảm của tác nhân với các kháng sinh khác nhau. Trong bước này lại có thể sử dụng (i) Dùng đĩa kháng sinh, (ii) Pha loãng trên môi trường lỏng hay rắn, (iii) Thử nghiệm phát hiện các enzym bất hoạt kháng sinh. Tuy nhiên, đây chỉ là phát hiện về kiểu hình của sự đề kháng (phenotypic drug resistance). Các kỹ thuật chẩn đoán

https://nhathuocngocanh.com/

phân tử cho phép ta khảo sát kiểu gen của sự đề kháng kháng sinh (genotypic). Các kháng sinh và gen chịu trách nhiệm gây ra sự đề kháng kháng sinh có thể phát hiện bởi kỹ thuật chẩn đoán phân tử được trình bày trong Bảng 12.4.

Một ví dụ: để phát hiện các *S. aureus* kháng Methicillin (MRSA), nguyên nhân là các chủng này đã sản sinh các Penicillin–binding protein mới được gọi là PBP 2' hay PBP 2a có ái lực thấp đối với các β–Lactams. Để phát hiện gen *mec*A (gen chịu trách nhiệm, không có trên các chủng nhạy cảm với Methicillin), dùng các mồi RSM–2647 và RSM–2648, sản phẩm PCR phát hiện có kích thước 533 bp *(xem hình 12.11)*.



Hình 12.11. Sơ đồ phát hiện gen *mec*A trên *S. Aureus*

Ngoài ra việc phát hiện gen đề kháng trên các vi khuẩn mọc chậm đặc biệt giúp ích cho việc chọn kháng sinh nhạy cảm cho việc trị liệu ngay từ đầu. Chẳng hạn như dùng để phát hiện *M. tuberculosis* (bệnh Lao), hay *M. leprae* (bệnh Phong, Cùi) kháng Rifampicin, một chìa khoá chủ yếu để giúp bác sĩ điều trị có thể sử dụng phác đồ điều trị đúng cho bệnh nhân trong khi đó theo phương pháp cổ điển phải mất 4 – 6 tuần. Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 411 bp (*M. tuberculosis)* với primer **TBrpo 1** và **TBrpo 2** hoặc 710 bp (*M. leprae*) với primer **MLrpo22** và **MLrpo23**.

Trên virus HIV, sau thời gian trị liệu từ 3–12 tháng với AZT người ta đã thấy có sự đề kháng. Hiện nay đã tìm ra bốn đột biến Asp–67 → Asn; Lys–70 → Arg; Thr–215 → Phe/Tyr và Lys–219 → Gln có liên quan. Nếu cả bốn đột biến hiện diện ở chủng virus thì khả năng đề kháng nhanh hơn 100 lần.

Hơn thế nữa phương pháp trên còn có thể dùng phát hiện các gen sinh độc tố như 16S rRNA gen + gen của Toxin B (gây độc tế bào: Cytotoxin) trên *Clostridum difficile,* theo các phương pháp cũ phải mất từ 3 – 5 ngày. Phát hiện các gen sản sinh ra độc tố bền với nhiệt (Heat–stable), không bền với nhiệt (Heat–labile), độc tố tương tự của Shigella (Shiga–Like toxin) nhưng trên *E. coli* để gây ngộ độc thức ăn do vi khuẩn này. Phát hiện các gen sản sinh Enterotoxin, Exfoliative toxin, Toxic Shock syndrome Toxin–1 là các độc tố gây ngộ độc thức ăn, nhọt, hội chứng sốc nhiễm trùng do *S. aureus*...

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 12.4. Các gen đích dùng để phát hiện sự đề kháng kháng sinh

Kháng sinh	Điểm tác động	Vị trí của yếu tố đề kháng	Gen đích đã phát hiện
Aminoglycosides	Quá trình dịch mã	Chromosome, Plasmid, Transposon (Tn)	*ant, aph, aac*
Glycopeptides	Tổng hợp vách tế bào	P	*vanA, vanB, vanC*
Chloramphenicol	Dịch mã (50S ribosome)	P, Tn	*erm, erc, mrs*
Tetracycline	Dịch mã (ngăn aminoacyl–tRNA kết với ribosome	P, C, Tn	*tet*
Macrolides	Dịch mã (50S ribosome)	P, C, Tn	*erm, erc, mrs*
Sulfonamides	Tổng hợp acid folic	P, C	*sul I, mil II*
Trimethoprim	Tổng hợp acid folic	P, C, Tn	*dlfr*
Quynolones	Nhân đôi (ADN gyrase)	C	*gyrA, gyrB*
Rifampicin	Phiên mã (ARN polymerase)	C	*rpoB*
β–Lactam	Tổng hợp vách tế bào và phân chia	P, C, Tn	*mec, tem, các gen β–Lactamase khác*

Ghi chú: viết tắt vị trí tác động C = chromosome, P = plasmid, Tn = Transposon

2.3. Chẩn đoán các rối loạn di truyền

Trước kia, việc chẩn đoán một rối loạn di truyền chỉ dựa vào các chỉ tiêu lâm sàng và các thử nghiệm sinh hóa. Các phương pháp này cho kết quả không chính xác, phải qua nhiều kiểm tra dẫn đến thời gian lâu và đắt tiền. Đặc biệt, các biện pháp này không thể dùng để xác định người lành mang mầm bệnh hay khi cần chẩn đoán trên thai nhi.

Chẩn đoán phân tử rối loạn di truyền về nguyên tắc có thể giải quyết được các vấn đề vừa nêu, với những ưu điểm nổi bật như sau: tính đặc hiệu cao, kết quả chính xác, thời gian rút ngắn rất nhiều so với các phương pháp sinh hóa truyền thống. Hơn nữa không đòi hỏi lượng mẫu nhiều và không cần thủ thuật lấy sinh thiết vì việc phân tích tiến hành trên ADN của đối tượng, được nhận từ một lượng nhỏ của bất kỳ nguồn tế bào nào có nhân như tế bào bạch cầu trong máu ngoại vi hay tế bào biểu mô vòm miệng.

Tuy nhiên có một số hạn chế: do tính đặc hiệu quá cao nên không thể đưa ra một chẩn đoán chung cho mọi đột biến rối loạn di truyền ở một số bệnh. Trên bệnh hồng cầu hình liềm, do sự thay cặp AT ở codon 6 của gen beta–globin dẫn

https://nhathuocngocanh.com/

đến sự thay valin bằng acid glutamic trên protein thì việc áp dụng phương pháp chẩn đoán phân tử là thuận lợi. Nhưng ở một số bệnh khác như bệnh hóa xơ nang (cystic fibrosis), có đến hơn 200 đột biến là nguyên nhân dẫn đến bệnh nên không thể đưa ra một chẩn đoán chung cho mọi đột biến. Thêm vào do tính đa dạng các thể của bộ gen sinh vật, giữa hai cá thể có thể có những sai khác không mang tính bệnh lý, vấn đề là làm sao phát hiện được các đột biến gây bệnh và phân biệt chúng với những đột biến vô hại.

Chẩn đoán các bất thường bẩm sinh trên ADN

Hướng chẩn đoán này nhằm mục đích ngăn ngừa đối với các bệnh di truyền nặng, chưa có biện pháp điều trị và khó hoặc không thể chẩn đoán bằng các phương pháp cổ điển. Một số thành công:

– Phát hiện một đột biến mất đoạn của gen DMD nằm trên nhiễm sắc thể X ở bệnh nhân nam bằng phương pháp Southern blot, kết quả căn cứ vào sự biến mất của một vạch điện di. Gen DMD liên quan đến bệnh thoái hóa cơ Duchenne.

– Phát hiện một mất đoạn dị hợp tử trên gen RB1 nằm trên nhiễm sắc thể 13 (sinh dưỡng) bằng phương pháp Southern blot, kết quả căn cứ vào sự giảm cường độ tín hiệu của một vạch điện di (vì vẫn tồn tại một nhiễm sắc thể lành). Gen RB1 liên quan đến bệnh ung thư nguyên bào võng mạc (retinoblastoma).

– Phát hiện gen của bệnh quánh niêm dịch (Mucoviscidosis) bằng chiến lược di truyền đảo ngược (từ biết trình tự acid amin của protein liên quan đến bệnh tìm ra gen). Bệnh xơ hóa nang là một bệnh di truyền trầm trọng vì các tuyến ngoại tiết đã tiết ra chất dịch quá nhớt. Bệnh này tác động chủ yếu trên tuyến tụy và các tuyến biểu bì phế quản. Mồ hôi của bệnh nhân chứa một lượng rất cao không bình thường các ion Cl^- và Na^+.

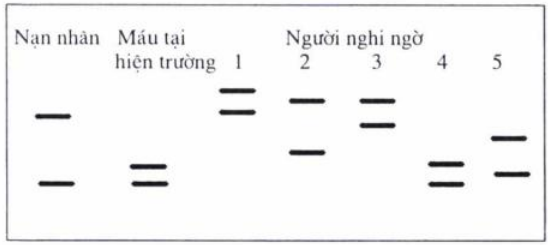
Chẩn đoán các bất thường trên ADN sinh dưỡng

Nguyên tắc chẩn đoán dựa vào sự khác nhau giữa các dòng tế bào. Các tế bào của khối u là các tế bào đơn dòng cùng phát xuất từ một tế bào nguyên thủy tăng sinh vô độ sẽ có chung các đặc tính dòng khác với các tế bào lân cận. Hướng chẩn đoán này đã được ứng dụng ở nhiều dạng ung thư máu: lymphoma Burkitt (Burkitt's lymphoma), lymphoma nang (follicular lymphoma), bệnh bạch cầu v.v...

Xác định các dấu ấn di truyền

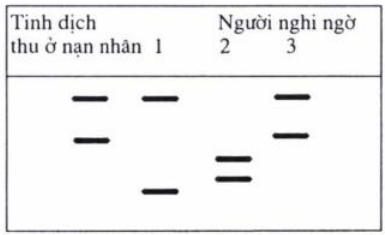
Dấu ấn di truyền có những đóng góp to lớn trong khoa học hình sự. Chỉ cần trên hiện trường còn rất ít mẫu vật: một vài giọt máu khô, vệt tinh dịch, vài sợi lông hay mẫu tóc, hay thậm chí mẫu tàn thuốc có dính vài niêm mạc miệng, là các nhà Chẩn đoán phân tử có thể truy tìm được dấu ấn di truyền và phát hiện tội phạm chính xác từ những người nghi ngờ *(xem hình 12.12 và hình 12.13)*. Một ứng dụng khác nữa về việc xác định dấu ấn di truyền là dùng để xác nhận

https://nhathuocngocanh.com/
quan hệ huyết thống. Hiện nay, ứng dụng để xác định quan hệ cha, con đang có nhu cầu và phát triển mạnh, nguyên tắc được trình bày trong hình 12.14.



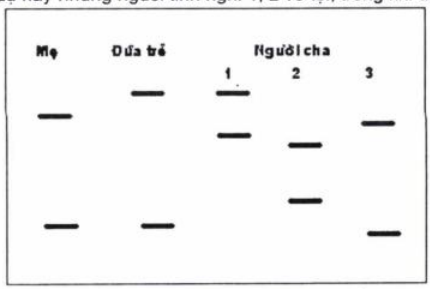
Hình 12.12. Dấu ấn di truyền (RFLP) trong trường hợp nghi ngờ tội phạm

Trong ví dụ này người ta đã thu được tại hiện trường máu không phải của nạn nhân mà của thủ phạm. Những người tình nghi 1, 2, 3, 5 có thể vô tội, trong khi đó số 4 là thủ phạm



Hình 12.13. Dấu ấn di truyền (thực hiện từ máu) trong trường hợp nghi ngờ tội phạm.

Trong ví dụ này những người tình nghi 1, 2 vô tội, trong khi đó số 3 là thủ phạm



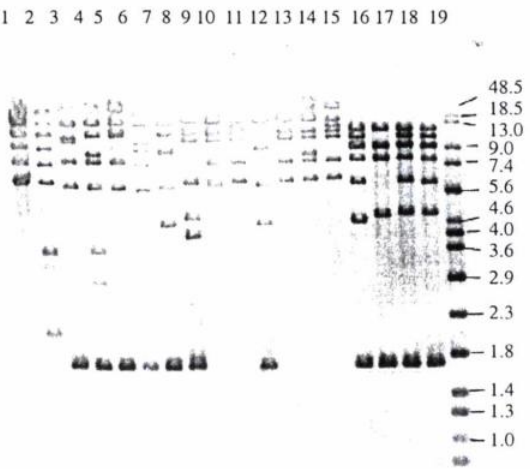
Hình 12.14. Dấu ấn di truyền (RFLP) trong trường hợp cần xác định quan hệ huyết thống

Đứa trẻ trong ví dụ là con của người mẹ và người cha số 1 chứ không phải người số 2 hoặc 3

Chẩn đoán phân tử không những có thể phát hiện được tác nhân vi sinh vật gây bệnh trong bệnh phẩm mà còn có thể phân loại type di truyền và đóng góp to lớn trong nghiên cứu dịch tễ học tìm hiểu mối liên quan của các tác nhân gây bệnh trong cộng đồng. Một thành công nổi tiếng là chứng minh được ba bệnh nhân khám và điều trị răng đã bị nhiễm HIV từ một nguồn gốc là vị nha sĩ chữa răng đã bị nhiễm HIV từ trước ở Florida (Mỹ). Trong môi trường bệnh viện, để phát hiện dịch tễ học của các vi khuẩn gây bệnh nhiễm trùng bệnh viện là rất

https://nhathuocngocanh.com/

quan trọng. Người ta đã áp dụng để tìm dịch tễ học của các vi khuẩn *Serratia marcescens* đề kháng đa kháng sinh cũng như cho nhiều tác nhân gây bệnh khác *(xem hình 12.15)*.



Hình 12.15. Các chủng *Serratia marcescens* kháng Imipenem tìm được trong một bệnh viện được phân tích bằng PCR–RFLP

Làn 19 là thang ADN chuẩn biết trước kích thước các băng

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phương pháp miễn dịch có thể áp dụng để tìm:
   A. Kháng nguyên
   B. Kháng thể
   C. Tác nhân gây bệnh
   D. A và B
   E. B và C
2. Phương pháp miễn dịch phóng xạ so với các phương pháp miễn dịch khác thì có:
   A. Độ nhạy cao nhưng phải có trang thiết bị sử dụng và bảo vệ chuyên biệt
   B. Độ nhạy cao, trang thiết bị sử dụng và bảo vệ đơn giản
   C. Độ chuyên biệt cao, trang thiết bị sử dụng và bảo vệ đơn giản
   D. Độ chuyên biệt cao nhưng phải có trang thiết bị sử dụng và bảo vệ chuyên biệt
   E. Độ nhạy trung bình nhưng trang thiết bị sử dụng và bảo vệ đơn giản

https://nhathuocngocanh.com/

3. Trong phản ứng ELISA gián tiếp gồm các thành phần
   A. Kháng nguyên đích
   B. Kháng thể đặc hiệu sơ cấp
   C. Kháng thể thứ cấp
   D. B và C
   E. A, B, C
4. Kháng thể đơn dòng sản xuất được do sự kết hợp:
   A. Khả năng tạo kháng thể của lympho B và nuôi dễ dàng của tế bào ung thư
   B. Epitop và khả năng nuôi dễ dàng của tế bào ung thư
   C. Epitop và khả năng tạo kháng thể của lympho B
   D. Khả năng tạo kháng thể của lympho B đột biến
   E. Epitope và khả năng tạo kháng thể của lympho B đột biến
5. Tính chất bắt buộc của một đoạn dò trong kỹ thuật lai phân tử:
   A. ADN
   B. ARN
   C. Đặc hiệu trình tự
   D. Được đánh dấu men
   E. Tất cả đúng
6. Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic có thể tăng lượng bản sao trình tự acid nucleic đích lên:
   A. 10 lần
   B. 100 lần
   C. 100.000 lần
   D. Hàng triệu đến hàng tỷ lần
   E. Khoảng 2^n lần, n là số chu kỳ
7. Real–time PCR có ưu điểm:
   A. Ít bị ngoại nhiễm hơn PCR
   B. Rẻ tiền, thao tác đơn giản
   C. Định lượng
   D. A và C
8. Phản ứng gap–LCR có tính chất :
   A. Sử dụng cả enzym polymerase và ligase
   B. Phải biết rõ toàn bộ trình tự đích, quá trình gồm các chu kỳ biến tính, ủ, nối
   C. Xác định được điểm đột biến tại trình tự đích

https://nhathuocngocanh.com/

D. A và C

E. A,B,C

9. Kỹ thuật RAPD xác định các dấu ấn di truyền có thể:

A. Phân biệt các cá thể vi sinh vật cùng loài

B. Dựa trên cấu trúc CACACA lặp đi lặp lại

C. Không cần dữ liệu ngân hàng bộ gen

D. B và C

E. A, B, C

10. Chẩn đoán phân tử có thể ứng dụng trong:

A. Định danh vi sinh vật, đặc điểm type di truyền

B. Xác định quan hệ huyết thống, bệnh di truyền

C. Khoa học hình sự, khảo cổ học

D. A và B

E. A, B, C

https://nhathuocngocanh.com/

CHƯƠNG V

CÔNG NGHỆ MIỄN DỊCH

Bài 13

SẢN XUẤT VACCIN

MỤC TIÊU

1. Phân biệt được các loại vaccin.

2. Nêu được quy trình cơ bản để sản xuất vaccin vi khuẩn.

3. Nêu được quy trình cơ bản để sản xuất vaccin virus.

4. Trình bày được một số tá chất miễn dịch thông dụng.

1. MỞ ĐẦU

Vaccin là chế phẩm kháng nguyên không có đặc tính gây bệnh, được dùng để tạo miễn dịch chủ động đối với tác nhân gây bệnh tương ứng. Tác dụng phòng vệ của vaccin là do chúng kích thích hệ thống miễn dịch của người dùng, tổng hợp các kháng thể đẩy mạnh sự phá hủy vi sinh vật nhiễm hoặc trung hòa độc tố của vi khuẩn. Chế phẩm vaccin chứa vi sinh vật sống suy yếu hoặc đã chết, hoặc protein kháng nguyên. Từ vaccin xuất phát từ chữ đậu bò ("vacca" tiếng Latin nghĩa là bò) mà Edward Jenner dùng cho người để giúp họ chống lại bệnh đậu mùa. Năm 1796, Jenner đã chứng minh nước mủ lấy từ người bị đậu bò (do vắt sữa bò) khi chủng vào da người khác sẽ gây nhiễm trùng tương tự và người bị đậu bò này sau khi hồi phục sẽ không bị bệnh đậu mùa. Tiếp theo phát minh của Jenner, Pasteur phát triển việc chủng ngừa với những tác nhân khác. Tác dụng phòng vệ của vaccin có được chỉ sau hai hoặc ba liều vaccin dùng cách khoảng vài ngày hoặc vài tuần. Khi đã được thiết lập, tính miễn dịch kéo dài vài năm nhưng có thể phải có thêm những liều "nhắc" cách khoảng dài. Vaccin lý tưởng có các đặc tính: sinh miễn dịch, bắt chước nhiễm tự nhiên, cho sự bảo vệ kéo dài, khoảng cách giữa các liều xa, không gây tác dụng phụ nghiêm trọng và ổn định.

Đặc tính chung cho các vaccin là tác dụng chuyên biệt rõ ràng của chúng.

https://nhathuocngocanh.com/

2. PHÂN LOẠI VACCIN

2.1. Phân loại vaccin truyền thống

Vaccin bất hoạt (vaccin chết)

Loại này chứa các vi sinh vật độc đã được làm chết bằng các chất hóa học hoặc nhiệt độ, do đó không còn sinh sôi trong chủ thể được nữa. Các vaccin bất hoạt nói chung an toàn, nhưng không phải là tuyệt đối. Các nội độc tố (endotoxin) bề mặt trên vaccin ho gà bất hoạt đôi khi cảm ứng các đáp ứng DTH (Delayed type hypersensitivity) và virus cúm có gắn với các phản ứng tương tự. Các vaccin bất hoạt không phải luôn cảm ứng miễn dịch phòng vệ. Thường cần tiêm nhắc nhiều lần để tạo phơi nhiễm kháng nguyên liên tục vì vi sinh vật chết tự nó không có khả năng duy trì trong chủ thể và nhanh chóng bị loại sạch bởi hệ miễn dịch. Ngoài ra, các vaccin bất hoạt nói chung chỉ có khả năng cảm ứng miễn dịch thể dịch vì mầm bệnh chết không thể đi vào tế bào chủ. Điều này làm cho vaccin mất tác dụng cơ bản nếu cơ chế nhiễm thông thường là nội bào. Ví dụ như vaccin chống lại cúm, tả, ho gà, dại, dịch hạch, viêm gan A và vaccin bại liệt Salk.

Vaccin sống giảm hoạt lực

Loại này chứa các vi sinh vật sống được nuôi trong những điều kiện làm suy yếu độc lực của chúng (nuôi trong các điều kiện bất thường) hoặc vi sinh vật gần giống nhưng ít nguy hiểm hơn để gây đáp ứng miễn dịch rộng. Vì các vi sinh vật vẫn còn sống, nó cho kích thích kháng nguyên liên tục đủ lâu để sản xuất tế bào nhớ. Trường hợp các virus hoặc vi sinh vật nội bào thường có miễn dịch trung gian tế bào, các mầm bệnh suy yếu có khả năng sinh sôi trong tế bào chủ thể. Tuy nhiên, vì vaccin chứa vi sinh vật sống, các mầm bệnh suy yếu có thể chuyển lại thành dạng gây bệnh, hoặc một số mầm bệnh suy yếu đủ yếu với hệ thống miễn dịch bình thường nhưng vẫn là mầm bệnh với hệ thống miễn dịch suy yếu. Hiện nay các kỹ thuật thao tác di truyền được dùng để loại bỏ các gen gây lực độc, bỏ qua các bất lợi này. Các vaccin này thường tạo đáp ứng miễn dịch bền và được dùng cho người lớn. Ví dụ như vaccin chống lại sốt vàng da, sởi, rubella, quai bị và vaccin bại liệt Sabin. Vaccin lao sống không chứa chủng truyền nhiễm mà là chủng *Mycobacterium bovis* được gọi là "BCG" (Bacille Calmette–Guérin).

Vaccin độc tố

Loại này chứa các chất độc đã bất hoạt không còn gây bệnh. Ví dụ các vaccin độc tố uốn ván và bạch hầu. Không phải tất cả vaccin độc tố đều cho vi sinh vật, ví dụ độc tố *Crotalis atrox* dùng chủng ngừa cho chó chống lại rắn chuông cắn.

Vaccin dưới đơn vị

Loại này chứa một phần nhỏ của tác nhân gây bệnh sản xuất từ vi sinh vật an toàn hoặc tế bào nuôi cấy để gây ra đáp ứng miễn dịch. Bằng cách này, có thể

https://nhathuocngocanh.com/
tránh được các độc tố mạnh, hoặc loại bỏ được các vật liệu mơ hồ hoặc đáp ứng miễn dịch lấn át. Các ví dụ điển hình vaccin dưới đơn vị là vaccin *Haemophilus influenzae* type b, vaccin chống lại HBV chỉ chứa các protein bề mặt của virus (sản xuất từ nấm men), vaccin tiểu phần giống virus (virus–like particle, VLP) chống lại human papillomavirus (HPV) chứa protein capsid chính của virus.

2.2. Một số vaccin mới

Vaccin idiotyp (idiotypic vaccine) – **chứa kháng thể kháng idiotyp**

Cấu trúc liên quan đến vùng biến đổi của kháng nguyên gọi là idiotyp. Idiotyp có phản ứng chéo khi nó có trong cơ thể đã đáp ứng với kháng nguyên đó. Kháng thể gắn kháng nguyên và kháng thể kháng idiotyp thuộc cùng một họ, do đó mỗi phân tử kháng thể đều có thể gắn với epitop trên một phân tử kháng nguyên và trên idiotyp. Như vậy có thể dùng idiotyp làm vaccin cho các bệnh nhiễm.

Vaccin liên hợp (conjugate vaccine)

Một số vi khuẩn có vỏ ngoài polysaccharid có tính miễn dịch yếu. Bằng cách liên kết các vỏ ngoài này với protein (ví dụ các độc tố), polysaccharid sẽ được hệ thống miễn dịch nhận diện như là kháng nguyên protein. Ví dụ vaccin *Haemophilus influenzaee* type B.

Vaccin vector tái tổ hợp (recombinant vector)

Là sự kết hợp sinh lý của một vi sinh vật và ADN của vi sinh vật khác, để chống lại các bệnh có quá trình nhiễm phức tạp. Ví dụ vaccin phòng một số bệnh do virus được làm bằng cách tái tổ hợp biến chủng virus đậu bò (cowpox variant) với các gen vô hại của virus gây bệnh.

Vaccin ADN

Là loại vaccin mới trong những năm gần đây, chứa ADN của các tác nhân gây bệnh. Vaccin hoạt động bằng cách chèn (và biểu hiện, khởi sự cho việc nhận diện của hệ thống miễn dịch) ADN của vi khuẩn hoặc virus vào tế bào. Một số tế bào của hệ thống miễn dịch (các tế bào $CD8^+$ và $CD4^+$) nhận diện các protein biểu hiện sẽ tăng cường tấn công chống lại các protein này và các tế bào biểu hiện chúng. Nếu sau đó chạm trán tác nhân gây bệnh biểu hiện các protein này, hệ thống miễn dịch sẽ tấn công ngay vì các tế bào này sống trong một thời gian rất dài. Một ưu điểm của các vaccin ADN là chúng rất dễ sản xuất và bảo quản. Cho đến năm 2006, vaccin ADN vẫn còn trong giai đoạn thử nghiệm nhưng cho thấy những kết quả đầy hứa hẹn. Ví dụ vaccin ADN phòng cúm H5N1 đang được thử trên người tình nguyện (từ 21/12/2006) chỉ chứa vật liệu di truyền của virus cúm; khi vào trong cơ thể ADN sẽ chỉ dẫn tế bào sản xuất protein hoạt động như vaccin chống lại virus.

https://nhathuocngocanh.com/

Vaccin tổng hợp (synthetic vaccine)

Chứa các peptid, các carbohydrat hoặc các kháng nguyên tổng hợp phần chính hoặc toàn phần. Vaccin peptid tổng hợp có ba tác động nổi bật chính:

– Vaccin peptid tổng hợp của vi khuẩn, được dùng để phòng bệnh do vi khuẩn thông qua việc trung hòa độc tố. Ví dụ các vaccin peptid tổng hợp cho cả hai độc tố bạch hầu và tả.

– Vaccin peptid tổng hợp cho virus chú trọng vào các vùng không biến đổi (trình tự acid amin bảo tồn cao). Các vaccin peptid tổng hợp cho các protein và glycoprotein HIV đang được phát triển.

– Vaccin peptid tổng hợp cho ký sinh trùng đang có nhiều hy vọng với vaccin peptid tổng hợp cho các epitop trùng bào tử của sốt rét.

Các vaccin có thể được bào chế với các tá chất để làm tăng cường hiệu quả. Các tá chất thường dùng là nhũ tương nước trong dầu (làm bằng dầu khoáng hoặc dầu thực vật với chất nhũ hóa), gel hydroxyt nhôm hoặc saponin. Ngoài các tá chất quen thuộc này, các thành phần thêm vào để cảm ứng tác dụng điều biến miễn dịch ở động vật chủ và làm tăng cường hiệu quả của sản phẩm.

Một số tên phân loại vaccin khác

– Vaccin hấp phụ (carrier prophylatic vaccine): vaccin DPT được hấp phụ trên "giá đỡ" gel nhôm hydroxyt.

– Vaccin khác chủng (heterologous vaccine, heterotypic vaccine): vaccin có tác dụng chống lại vi sinh vật khác với loài dùng để chế nó. Ví dụ: vaccin từ đậu bò để phòng đậu người.

– Vaccin đa giá (polyvalent vaccine, multivalent vaccine): vaccin chứa các kháng nguyên bảo vệ của nhiều chủng thuộc về một loài vi khuẩn gây bệnh. Ví dụ: TAB.

– Vaccin hỗn hợp (mixed vaccine): vaccin gồm nhiều kháng nguyên của các loài vi sinh vật khác nhau, để phòng nhiều bệnh nhiễm trùng. Ví dụ: DPT, Priorix.

3. PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VACCIN

Quy trình sản xuất vaccin truyền thống đi từ các tác nhân gây bệnh nguy hiểm, các thành phần hoặc các sản phẩm của chúng, các kháng nguyên không còn đặc tính gây bệnh nhưng còn đặc tính cảm ứng đáp ứng phòng vệ. Các phương pháp dùng sản xuất vaccin phụ thuộc vào giá thành, chuyên chở vaccin và nhất là các đặc tính sinh học của các tác nhân gây bệnh dùng sản xuất.

3.1. Hệ thống giống

Điểm khởi đầu để sản xuất tất cả vaccin vi sinh vật là phân lập vi sinh vật

https://nhathuocngocanh.com/

thích hợp. Thường thì phân lập từ các nhiễm trùng ở người, đôi khi có ngay chủng thích hợp cho sản xuất, đôi khi phải thao tác và chọn lọc trong phòng thí nghiệm thêm.

Khi đã có chủng thích hợp, nhân các vi sinh vật đơn lẻ lên và phân vào nhiều ampoule và bảo quản ở –70°C hoặc đông khô. Đây là lô giống (seed lot). Từ lô này, lấy một hoặc vài ampoul kiểm tra tường tận trong phòng thí nghiệm xem có thỏa đáng không, kiểm tra độ an toàn và hiệu quả thử lâm sàng. Khi các kết quả thử lâm sàng đạt công nhận, lô giống được dùng thường quy cho sản xuất vaccin.

3.2. Sản xuất vi khuẩn và các thành phần vi khuẩn của vaccin vi khuẩn

Sản xuất vi khuẩn và các thành phần vi khuẩn để làm vaccin vi khuẩn được thực hiện trong phòng thí nghiệm bằng những phương pháp lên men đã biết. Thu sản phẩm lên men cuối là quá trình cô đặc và tinh chế các thành phần vaccin để bảo quản được thời gian dài hoặc thương mại.

Lên men

Đầu tiên giống vi khuẩn trong ampoule bảo quản ở –70°C hoặc đông khô được làm tỉnh lại (hoạt hóa). Vi khuẩn hoạt hóa được cấy chuyển một hoặc vài lần vào môi trường nhân giống. Khi vi khuẩn đã được nhân lên đủ, chúng được cấy vào môi trường lên men. Môi trường này thường được chứa trong nồi lên men lớn có khuấy liên tục. Thường pH và thế oxy hóa khử của môi trường được theo dõi và điều chỉnh suốt quá trình nuôi, nhằm thu được hiệu suất vi khuẩn lớn nhất. Trường hợp vi khuẩn mọc nhanh sẽ thu được hiệu suất tối đa sau khoảng một ngày, trường hợp vi khuẩn mọc chậm sẽ thu được hiệu suất tối đa sau hai tuần. Cuối giai đoạn nuôi trong nồi lên men là thu hoạch.

Quá trình thu hoạch vi khuẩn

Hỗn hợp phức tạp gồm tế bào vi khuẩn, các sản phẩm chuyển hóa và môi trường cạn kiệt thu được sau khi lên men. Nếu là vaccin sống giảm hoạt lực, vi khuẩn không độc được tách ra và hòa vào dung môi thích hợp, có thể đông khô. Nếu vaccin làm từ tác nhân gây bệnh, nguy hiểm thì cần theo các quy trình sau.

1. Giết chết. Quá trình này giết chết vi khuẩn và làm cho chúng vô hại. Thường dùng đun nóng và chất tẩy uế. Ví dụ dùng đun nóng và/hoặc formalin để giết các tế bào *Bordetella pertusis* khi làm vaccin ho gà, phenol để giết *Vibrio cholerae* trong vaccin tả và *Salmonella typhi* trong vaccin thương hàn.

2. Tách. Quá trình này tách tế bào vi khuẩn khỏi dịch nuôi cấy. Thường dùng ly tâm. Nếu làm vaccin từ tế bào, dịch lỏng được bỏ đi và tế bào được hòa vào hỗn hợp muối; nếu làm vaccin từ thành phần trong dịch lỏng, tế bào được bỏ đi.

3. Phân đoạn. Quá trình này chiết các thành phần từ tế bào hoặc từ môi

https://nhathuocngocanh.com/

trường nuôi vi khuẩn và thu dạng tinh khiết. Các kháng nguyên polysaccharid của *Neisseria meningitidis* được tách từ tế bào vi khuẩn bằng cách xử lý với hexadecyl–trimethylammonium bromide và của *Streptococcus pneumoniae* xử lý với ethanol. Tinh chế nguyên liệu chiết bằng dung môi thích hợp và kết tủa. Sau khi tinh chế, các thành phần được làm khô thành bột, bảo quản và hợp nhất vào vaccin.

4. Khử độc tố. Quá trình này làm độc tố của vi khuẩn chuyển thành độc tố không hại. Formalin được dùng để khử độc tố của *Corynebacterium diphtheriae* và *Clostridium tetani.* Khử độc tố có thể tiến hành trên dịch nuôi cấy trong nồi lên men hoặc trên độc tố tinh khiết sau khi phân đoạn.

5. Hấp phụ. Các thành phần của vaccin được hấp phụ vào tá chất khoáng. Các tá chất khoáng hoặc chất mang thường được dùng là nhôm hydroxid, nhôm phosphat và calci phosphat làm tăng tính kháng nguyên và giảm độc tính, tại chỗ và hệ thống của vaccin. Vaccin bạch hầu và vaccin bạch hầu/uốn ván/ho gà thường điều chế dạng vaccin hấp phụ.

6. Kết hợp. Liên kết thành phần vaccin cảm ứng đáp ứng miễn dịch yếu với thành phần vaccin cảm ứng đáp ứng miễn dịch tốt. Tính kháng nguyên cho trẻ em của polysaccharide nang của *H. influenzae* Type b được tăng cường mạnh khi liên kết với độc tố bạch hầu và uốn ván, và với protein màng ngoài của *Neisseria meningitidis.*

3.3. Sản xuất virus và các thành phần virus của vaccin virus

Virus chỉ sinh sôi trong tế bào sống nên ban đầu các vaccin virus phải được sản xuất từ động vật: vaccin đậu mùa trong hạ bì của bê và cừu; vaccin dại trong dây cột sống của thỏ và não chuột. Các vaccin đó không còn được dùng để sản xuất vaccin mới nữa và chỉ chủ thể động vật nguyên vẹn được dùng là trứng gà có phôi. Hầu hết các virus cần để sản xuất vaccin virus thu được từ nuôi cấy tế bào nhiễm chủng virus thích hợp.

Nuôi virus

Trứng gà có phôi là chủ thể nuôi virus thuận tiện nhất cho virus cúm và sốt vàng da. Virus cúm tích tụ trong dịch túi niệu của trứng và sốt vàng da tích tụ trong hệ thống thần kinh của phôi.

Quá trình thu virus

Vật liệu chứa virus từ phôi trứng gà nhiễm có một cho đến vài dạng. Trong trường hợp vaccin cúm, dịch túi niệu được ly tâm cho huyền trọc virus tinh khiết một phần và đậm đặc. Dịch đậm đặc này được xử lý với eter hoặc với tác nhân phá vỡ khác để cắt virus thành các thành phần của nó nếu muốn có vaccin virion

https://nhathuocngocanh.com/
hoặc kháng nguyên bề mặt. Phôi gà được dùng sản xuất vaccin sốt vàng da được đồng hóa trong nước thành bột nhuyễn chứa virus. Tiếp theo ly tâm kết tủa hầu hết mảnh vỡ của phôi và virus sốt vàng da trong huyền trọc nước.

Nuôi cấy tế bào cho dịch nhiễm chứa ít mảnh vỡ và thường được làm trong bằng cách lọc. Vì hầu hết vaccin làm từ nuôi cấy tế bào chứa virus sống suy yếu, nên khi sản xuất không có giai đoạn bất hoạt. Tuy nhiên có hai ngoại lệ quan trọng: vaccin virus bại liệt bất hoạt được bất hoạt với formalin loãng hoặc β 3–propiolactone và vaccin dại được bất hoạt với β 3–propiolactone. Điều chế các vaccin bất hoạt cũng có giai đoạn làm đậm đặc bằng cách hấp phụ và rửa virus trong trường hợp vaccin bại liệt và bằng siêu lọc trong trường hợp vaccin dại. Khi hoàn tất, khối nguyên liệu được bảo quản ở nhiệt độ –70°C đến khi trộn thành vaccin cuối.

3.4. Phối trộn

Quá trình này trộn các thành phần khác nhau của vaccin thành khối cuối cùng. Nó được thực hiện trong bình kín, to có khuấy và cổng để thêm các thành phần và rút khối cuối cùng. Khi trộn vaccin vi khuẩn, các thành phần hoạt tính thường cần được pha loãng nhiều và bình được chứa chất pha loãng trước và thường có chất bảo quản như thiomersal. Tiếp theo, đối với khối cuối cùng một thành phần, huyền trọc vi khuẩn, thành phần vi khuẩn hoặc độc tố đậm đặc được thêm vào với số lượng để có nồng độ mong muốn trong sản phẩm cuối cùng. Đối với khối cuối cùng đa thành phần, thêm lần lượt từng thành phần vào. Khi trộn vaccin virus, cần duy trì kháng nguyên đầy đủ và ngăn lây nhiễm. Sau khi trộn đều, khối cuối cùng được phân thành các cỡ thể tích vừa cho đóng gói.

3.5. Đóng ống và làm khô

Vaccin được đóng ống hàn ở dạng lỏng hoặc đông khô trước khi hàn.

Vaccin vi khuẩn một thành phần được liệt kê trong Bảng 13.1, với chú thích về nguyên liệu cơ bản của vaccin, các quá trình nổi bật và kiểm tra hoạt lực và độ an toàn. Vaccin vi khuẩn đa thành phần được làm bằng trộn hai hoặc vài vaccin một thành phần để có hoạt lực và độ an toàn của từng vaccin một thành phần mà nó chứa. Ví dụ điển hình của vaccin vi khuẩn tổ hợp là vaccin hấp phụ bạch hầu, uốn ván và ho gà (DTP) dùng chủng ngừa cho trẻ em.

Vaccin virus một thành phần được liệt kê trong Bảng 13.2, với chú thích tương tự như ở vaccin vi khuẩn. Vaccin virus đa thành phần duy nhất được dùng rộng rãi là vaccin sởi, quai bị và rubella (MMR). Tuy nhiên cả vaccin bại liệt bất hoạt (Salk) và vaccin bại liệt sống (Sabin, uống) đều là hỗn hợp của ba týp huyết thanh. Các vaccin cúm cũng là vaccin tổ hợp chứa nhiều thành phần từ ba chủng virus thường thì là từ hai chủng cúm A và một chủng cúm B.

https://nhathuocngocanh.com/

Bảng 13.1. Các vaccin vi khuẩn dùng để phòng bệnh nhiễm ở người

Vaccin	Nguyên liệu	Quy trình	Thử hoạt lực	Thử an toàn
Anthrax	Môi trường nuôi cấy của *B. anthracis*	1. Tách kháng nguyên phòng vệ khỏi môi trường 2. Hấp phụ	Định lượng 3 + 3 ở chuột lang thử thách với *B. anthracis*	Loại trừ *B. anthracis* sống và độc tố anthrax
BCG	Nuôi cấy của tế bào BCG sống trong môi trường lỏng hoặc trên môi trường rắn	1. Ly tâm vi khuẩn khỏi môi trường 2. Tái hòa trong chất ổn định 3. Đông khô	Đếm sống; cảm ứng mẫn cảm với tuberculin ở chuột lang	Loại trừ mycobacteria độc; không có phản ứng da quá mức
Diphtheria (adsorbed)	Nuôi cấycủa *C. diphtheriae* trong môi trường lỏng	1. Tách và đậm đặc độc tố 2. Chuyển độc tố (toxin) thành giải độc tố (toxoid) 3 Hấp phụ giải độc tố với tá chất	Định lượng 3 + 3 ở chuột lang thử thách tiêm trong da (intradermal challenge)	Tiêm chủng chuột lang loại trừ độc tố còn dư
Haemophilus influenzae type b	Nuôi cấy của *H. influenzae* type b	1. Tách polysaccharide nang 2. Kết hợp với protein	Ước tính hàm lượng polysaccharide nang	
Neisseria meningitidis type A và C	Nuôi cấy của *N.meningitidis* serotyp A và C	1. Kết tủa với hexadecyltrimethyam monium bromide 2. Hòa tan và tinh chế 3. Trộn 4. Đông khô	Ước tính hàm lượng polysaccharide nang	
Pneumococcal polysaccharide	Nuôi cấy 23 serotyp của *Strep. pneumoniae*	1. Kết tủa polysaccharide với ethanol 2. Trộn với vaccin đa giá	Ước tính polysaccharide bằng phương pháp hóa lý	
Tetanus (adsorbed)	Nuôi cấy của *Cl. tetani* trong môi trường lỏng	1. Chuyển độc tố thành giải độc tố 2. Tách và tinh chế giải độc tố 3. Hấp phụ với tá chất	Định lượng 3 + 3 ở chuột nhắt thử thách tiêm dưới da với độc tố uốn ván	Tiêm chủng chuột lang loại trừ độc tố chưa giải độc tố còn dư
Nguyên tế bào thương hàn (Typhoid whole cell)	Nuôi cấy của *Sal. typhi* trong môi trường lỏng	1. Giết bằng nhiệt hoặc phenol 2. Tách và huyền trọc vi khuẩn trong nước muối	Cảm ứng kháng thể ở thỏ	
Kháng nguyên polysaccharide	Nuôi cấy của *Sal. typhi*	Chiết kháng nguyên nang	Ước tính kháng nguyên nang	

https://nhathuocngocanh.com/

Vaccin	Nguyên liệu	Quy trình	Thử hoạt lực	Thử an toàn
nang Vi của thương hàn (Typhoid Vi capsular Polysaccharide antigent)	trong môi trường lỏng			
Vaccin thương hàn sống (Typhoid live vaccine)	Nuôi cấy của chủng *Sal. typhi* Ty21A	Đóng nang	Ước tính hàm lượng vi khuẩn sống	
Nguyên tế bào ho gà (Pertussis)	Nuôi cấy của *B. pertussis* trong môi trường lỏng hoặc trên môi trường rắn	1. Thu hoạch 2. Giết bằng formalin 3. Huyền trọc	Định lượng 3 + 3 ở chuột nhắt thử thách tiêm trong não với *Bord. pertussis* sống	Loại trừ *Sal. typhi* sống Ước tính vi khuẩn tới nồng độ giới hạn 20 x 10^9 cho một liều trên người; Thử tăng trọng ở chuột loại trừ độc tố còn dư
Ho gà (Pertussis) (không có tế bào)	Nuôi cấy của *B. pertussis*	1. Thu hoạch 2. Chiết và trộn các thành phần của tế bào	Như vaccin nguyên tế bào ho gà	Thử tăng trọng ở chuột loại trừ độc tố còn dư

Bảng 13.2. Các vaccin virus dùng để phòng bệnh nhiễm ở người

Vaccin	Nguyên liệu	Quy trình	Thử hoạt lực	Thử an toàn
Viêm gan A	Tế bào lưỡng bội người nhiễm với virus viêm gan A	1. Tách virus khỏi tế bào 2. Bất hoạt với HCHO 3 Hấp phụ vào gel $Al(OH)_3$	Thử nồng độ kháng nguyên bằng ELISA	Tiêm chủng tế bào nuôi cấy loại trừ sự hiện diiện của virus sống
Viêm gan B	Tế bào nấm men biến đổi gen biểu hiện kháng nguyên bề mặt	1. Tách HBsAg khỏi tế bào nấm men 2. Hấp phụ vào gel $Al(OH)_3$	Thử độ kháng nguyên hoặc thử HBsAg bằng ELISA	Kiểm tra sự hiện diện của ADN nấm men
Cúm (virion tách ra)	Dịch túi niệu từ phôi trứng gà nhiễm virus cúm A và B	1. Thu hoạch virus 2. Phá vỡ bằng tác nhân hoạt động bề mặt 3. Trộn các thành phần của các týp huyết thanh khác nhau	Thử nồng độ haemagglutinin bằng khuếch tán miễn dịch (immunodiffusion)	Tiêm chủng phôi trứng gà loại trừ virus sống

https://nhathuocngocanh.com/

Cúm (kháng nguyên bề mặt)	Dịch túi niệu từ phôi trứng gà nhiễm virus cúm A và B	1. Bất hoạt và phá vỡ 2. Tách haemagglutinin và neuraminidase 3. Trộn các haemagglutinin và neuraminidase của các týp huyết thanh khác nhau	Thử nồng độ haemagglutinin bằng khuếch tán miễn dịch	Tiêm chủng phôi trứng gà loại trừ virus sống
Sởi	Tế bào phôi gà nhiễm virus sởi giảm độc lực	1. Lọc 2. Đông khô	Định lượng độ gây nhiễm tế bào nuôi cấy	Kiểm tra loại trừ sự hiện diện của virus thừa
Quai bị	Tế bào phôi gà nuôi cấy nhiễm virus quai bị giảm độc lực	1. Lọc 2. Đông khô	Định lượng độ gây nhiễm tế bào nuôi cấy	Kiểm tra loại trừ sự hiện diện của virus thừa
Bại liệt (bất hoạt) (Salk type)	Tế bào lưỡng bội người nuôi cấy nhiễm với ba týp huyết thanh virus bại liệt	1. Lọc 2. Bất hoạt với formalin 3. Đậm đặc 4. Trộn virus của từng týp huyết thanh	Cảm ứng các kháng thể với virus bại liệt ở gà hoặc chuột lang	Tiêm chủng tế bào nuôi cấy và dây tủy khỉ để loại trừ virus sống
Bại liệt (sống hoặc uống) (Sabin type)	Tế bào nuôi cấy nhiễm với từng loại của ba týp huyết thanh virus bại liệt suy yếu	1. Lọc 2. Trộn virus của ba týp huyết thanh trong môi trường ổn định	Định lượng độ gây nhiễm của từng loại của ba týp huyết thanh virus	Kiểm tra sự suy yếu bằng tiêm chủng dây tủy khỉ và so sánh với tổn thương sinh ra bởi vaccin đối chiếu
Dại	Tế bào lưỡng bội người nuôi cấy nhiễm với virus dại	1. Lọc 2. Bất hoạt với betapropiolactone	Định lượng 3 + 3 ở chuột	Tiêm chủng tế bào nuôi cấy để loại trừ virus sống
Rubella (sởi Đức)	Tế bào lưỡng bội người nuôi cấy nhiễm với virus rubella suy yếu	1. Lọc 2. Trộn với chất ổn định 3. Đông khô	Định lượng độ gây nhiễm tế bào nuôi cấy	Kiểm tra loại trừ sự hiện diện của virus thừa
Varicellat (thủy đậu)	Tế bào lưỡng bội người nhiễm với virus thủy đậu (varicella) suy yếu	1. Lọc 2. Đông khô	Định lượng độ gây nhiễm tế bào nuôi cấy	Kiểm tra loại trừ sự hiện diện của virus thừa
Sốt vàng	Dịch đồng nhất trong nước của phôi gà nhiễm với virus sốt vàng 170 suy yếu	1. Ly tâm loại bỏ mảnh vỡ tế bào 2. Đông khô	Định lượng độ gây nhiễm tế bào nuôi cấy	Kiểm tra loại trừ sự hiện diện của virus thừa

Ghi chú: Các vaccin sởi, quai bị và rubella thường dùng dạng vaccin phối hợp sởi/quai bị/rubella (vaccin MMR– Measles, mumps and rubella vaccines). ELISA, enzyme–linked immunosorbent assay.

https://nhathuocngocanh.com/

3.6. Kiểm soát chất lượng

Kiểm soát chất lượng vaccin nhằm để đảm bảo về hiệu quả và độ an toàn của mỗi lô sản phẩm. Việc kiểm soát được thực hiện theo ba cách: (1) kiểm soát trong quá trình; (2) kiểm soát sản phẩm cuối và (3) yêu cầu phù hợp cho mỗi nguyên liệu sản xuất ban đầu, trung gian, sản phẩm cuối và các phương pháp xử lý. Các kết quả kiểm, tra kiểm soát chất lượng luôn được ghi chi tiết.

Kiểm tra độ an toàn gồm các kiểm tra tổng quát là: (1) Độ vô trùng, (2) Không có độc tố bất thường, (3) Sự hiện diện của nhôm và calci, (4) Formalin tự do và (5) Nồng độ phenol.

4. TÁ CHẤT MIỄN DỊCH

Tá chất (adjuvant) lần đầu tiên được mô tả bởi Ramon như những chất "giúp đỡ" khi thêm vào làm kháng nguyên tạo đáp ứng miễn dịch mạnh hơn so với khi chỉ dùng riêng kháng nguyên. Từ đó nhiều loại chất thiên nhiên và tổng hợp được thử và đã tìm ra một số loại có hoạt tính tá chất. Có thể chia tá chất thành hai loại chính:

- Các hệ thống vận chuyển (delivery system)
- Tá chất kích thích miễn dịch (immunostimulatory adjuvant).

Các hệ thống vận chuyển gồm có các tá chất thường như phèn (alum), các Liposom, các vi tiểu phần (microparticle) và nhũ dịch dầu/nước. Cơ chế hoạt động của các tá chất này chưa được biết rõ, nhưng nhiều loại tạo tích tụ tại chỗ tiêm, làm kháng nguyên phóng thích chậm và kích thích các tế bào của hệ thống miễn dịch thâm nhập. Ngoài ra, đây là các chất thô và không xác định rõ, có khả năng phá hủy mô nghiêm trọng tại chỗ tiêm. Thực tế là hiệu quả của một số tá chất này tùy thuộc vào mức độ phá hủy mô, các chất gây phá hủy mô nghiêm trọng sẽ có hoạt lực tá chất mạnh hơn.

- Các tá chất vô cơ thông thường nhất là hai muối nhôm phosphate và nhôm hydroxide, được dùng trong các vaccin cho người. Việc dùng các muối nhôm làm tá chất không thuận lợi lắm vì tác dụng của chúng là do cảm ứng viêm tại chỗ và do đó có tác dụng phụ.

- Các tá chất hữu cơ như hợp chất hữu cơ Squalene cũng được dùng trong các vaccin cho người. Tuy nhiên, các tá chất hữu cơ thường được dùng trong vaccin động vật.

- Các tá chất là dầu thường được dùng trong vaccin động vật. Tá chất Freund là nhũ dịch kháng nguyên trong dầu khoáng, dùng làm tăng miễn dịch (immunopotentiator). Dạng hoàn chỉnh của tá chất (CFA) này có mycobacteria (thường là *Mycobacterium tuberculosis* – tác nhân gây bệnh lao) bất hoạt và khô.

https://nhathuocngocanh.com/

Dạng không hoàn chỉnh của tá chất (IFA) này không có mycobacteria. Tá chất Freund bị cấm dùng cho người vì độc

– Các virosome chứa hemagglutinin gắn màng (membrane–bound hemagglutinin) và neuraminidase dẫn xuất từ virus cúm và làm khuếch đại hoạt tính kích thích dung hợp và do đó làm dễ dàng hấp thu vào các tế bào trình diện kháng nguyên (antigen presenting cells [APC]) và làm cảm ứng quá trình kháng nguyên tự nhiên. Chuyển tải kháng nguyên bằng các virosome vào hệ thống miễn dịch như thế rất an toàn.

Trong nỗ lực tìm kiếm và phát triển tá chất có hoạt tính phòng vệ miễn dịch mà không gây phá hủy mô nghiêm trọng, các tá chất là các thành phần của vi sinh vật (Bảng 13.3) và có hoạt tính tá chất tùy thuộc vào khả năng kích thích miễn dịch bẩm sinh đã được quan tâm. Thực tế một vài thành phần dẫn xuất từ tác nhân gây bệnh như ngoại độc tố của vi khuẩn (lipopolysaccharide – LPS), thành phần mycobacteria của tá chất Freund hoàn chỉnh, acid ribonucleic sợi đơn (single–stranded ribonucleic acid – ssRNA), và ADN vi khuẩn, gồm có CpG ADN tổng hợp, có thể tạo các tín hiệu "nguy hiểm" nên có hoạt tính tá chất.

Bảng 13.3. Ví dụ các tá chất kích thích miễn dịch bẩm sinh

Tá chất	Bằng chứng hoạt tính tá chất ở:
CpG deoxyribonucleic acid	Gia súc, cừu, lợn, ngựa, khỉ, người, động vật phòng thí nghiệm
Các peptid phòng vệ của chủ thể	Động vật phòng thí nghiệm
Acid ribonucleic sợi đơn và các imidazoquinoline	Khỉ, động vật phòng thí nghiệm
Các polyphosphazene	Động vật phòng thí nghiệm, cừu

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Câu nào ***không*** đúng đối với vaccin dưới đơn vị
   A. Chứa một phần nhỏ của tác nhân gây bệnh
   B. Dùng vi sinh vật an toàn hoặc tế bào nuôi cấy
   C. Sử dụng vector sống suy yếu
   D. Tránh được các độc tố mạnh
   E. Loại bỏ được các thành phần chưa rõ hoặc đáp ứng miễn dịch lấn át
2. Hệ thống giống để sản xuất vaccin
   A. Nguồn gốc phân lập từ các nhiễm trùng ở người và chọn lọc trong phòng thí nghiệm thêm.

https://nhathuocngocanh.com/

B. Bảo quản ở –70°C hoặc đông khô

C. Đã kiểm tra độ an toàn và hiệu quả thử lâm sàng

D. Được chuẩn bị từng lô giống

E. Tất cả

3. Câu nào ***không*** đúng

A. Vaccin "sống" gây kích thích đáp ứng miễn dịch cao.

B. Vaccin "chết" kém an toàn hơn vaccin "sống".

C. Vaccin dưới đơn vị ít gây tác dụng phụ hơn vaccin "sống" và vaccin "chết".

D. Vaccin độc tố chỉ chứa các chất độc đã bất hoạt

E. Vaccin ADN dễ sản xuất, ổn định, vận chuyển, nuôi cấy không nguy hiểm.

4. Tác nhân thường dùng để giết chết vi khuẩn trong làm vaccin "chết" gồm

A. Chiếu UV

B. Đun nóng

C. Chất tẩy uế như formalin, phenol

D. B và C

E. Tất cả

5. Câu nào ***không*** đúng trong làm vaccin thương hàn

A. Từ nuôi cấy *Salmonella typhi*

B. Giết chết vi khuẩn bằng phenol

C. Kháng nguyên là độc tố của vi khuẩn

D. Kháng nguyên là polysaccharide nang Vi

E. Là vaccin "sống" hoặc vaccin "chết"

6. Tính kháng nguyên của polysaccharide nang từ *H. influenzae* type b được tăng cường mạnh khi liên kết với

A. Protein

B. Độc tố bạch hầu

C. Độc tố uốn ván

D. Protein màng ngoài của *N.meningitidis*

E. Tất cả

7. Câu nào ***không*** đúng trong tách kháng nguyên từ nuôi cấy virus để làm vaccin

A. Lọc

B. Ly tâm

C. Thu dịch

D. Thu sinh khối

E. Bất hoạt

https://nhathuocngocanh.com/

8. Chất bảo quản có thể dùng trong vaccin bất hoạt

A. 2–phenoxyethanol

B. Thiomersal

C. Các hợp chất thủy ngân hữu cơ

D. Một số tác nhân kháng vi sinh vật

E. Tất cả

9. Tá chất miễn dịch

A. Làm tăng đáp ứng miễn dịch bởi kháng nguyên

B. Làm tăng độ ổn định của vaccin

C. Làm tăng tính an toàn

D. Kéo dài thời gian tác dụng

E. Tất cả

10. Có thể thử hoạt lực vaccin bằng

A. Dùng thú

B. Đếm sống

C. ELISA

D. Định lượng độ gây nhiễm tế bào nuôi cấy

E. Tất cả

https://nhathuocngocanh.com/

Bài 14

HUYẾT THANH VÀ KHÁNG THỂ

MỤC TIÊU

1. Nêu được các loại globulin miễn dịch

2. Trình bày được các yêu cầu của sản phẩm globulin miễn dịch

3. Kể được các bệnh hiện có thể điều trị hoặc dự phòng bằng globulin miễn dịch.

1. LỊCH SỬ HÌNH THÀNH

Các liệu pháp miễn dịch thụ động đã bắt đầu hình thành từ cuối thế kỷ XIX khi huyết thanh động vật được sử dụng để điều trị một số bệnh nhiễm như viêm phổi, uốn ván, bạch hầu và dại. Huyết thanh người được sử dụng lần đầu tiên năm 1907 bởi Cenci để điều trị sởi, quai bị và ho gà. Các chiết xuất nhau thai đã điều chế bằng cách tủa với ammonium sulfate cũng được sử dụng và được xem như chế phẩm immunoglobulin đầu tiên được sử dụng trong liệu pháp cho người. Đến nay nhau thai vẫn được dùng làm nguồn cung cấp immunoglobulin.

Các phản ứng dị ứng nghiêm trọng gặp phải khi sử dụng huyết thanh động vật và các nguy cơ nhiễm virus viêm gan từ huyết thanh người đã giới hạn liệu pháp huyết thanh trong các bệnh nhiễm nguy cấp đến tính mạng. Đến những năm 1920 người ta đã tách các chất miễn dịch ra từ huyết thanh động vật bằng cách tủa bằng alcohol hay acetone. Một trong những chế phẩm như vậy, dung dịch kháng thể Huntoon, đã được sử dụng đường tiêm trên 400 bệnh nhân mà không gặp phản ứng phản vệ hay bệnh huyết thanh nào; tuy nhiên, sốt, tím tái, và khó thở có xảy ra và dẫn đến tử vong ở 3 bệnh nhân. Sự phát minh ra kháng sinh vào thập niên 1930 đã làm giảm nhu cầu sử dụng liệu pháp huyết thanh. Tuy nhiên, nó vẫn tiếp tục được nghiên cứu, và ngày nay nó đóng vai trò nhất định trong việc điều trị do sự bất lực của nhiều tác nhân hóa liệu pháp và sự đề kháng của kháng sinh.

Hiện nay nhiều sản phẩm sinh học được dùng trong miễn dịch liệu pháp, trong đó quan trọng nhất là các gamma globulin tinh khiết để tiêm bắp (globulin huyết thanh miễn dịch chuẩn – standard immune serum globulin, ISG) và globulin để tiêm tĩnh mạch (immunoglobulin tiêm tĩnh mạch chuẩn – standard intravenous immunoglobulin, IVIG). Các globulin miễn dịch mạnh với hàm lượng

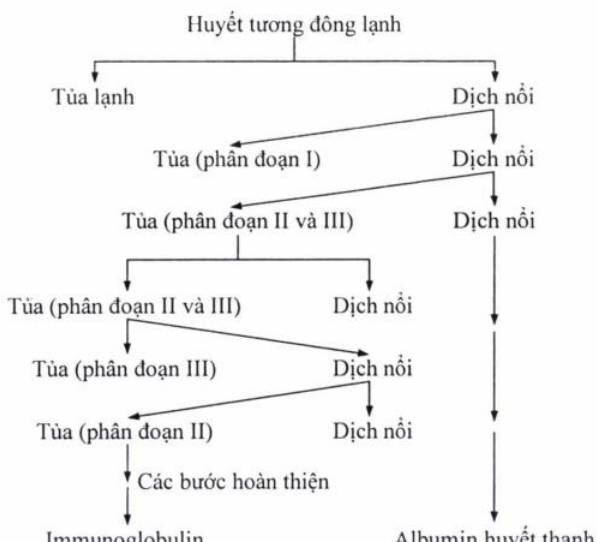
https://nhathuocngocanh.com/

kháng thể cao chống lại một số tác nhân gây bệnh đặc thù cũng được sử dụng. Các chế phẩm khác như kháng độc tố, huyết tương, và các sản phẩm từ máu khác cũng được sử dụng.

2. CÁC CHẾ PHẨM GAMMA GLOBULIN

2.1. Globulin huyết thanh miễn dịch chuẩn

Gamma globulin hay immunoglobulin (viết tắt là Ig) được tách ra lần đầu tiên bằng kỹ thuật điện di năm 1936 và sau đó nhiều nhà nghiên cứu đã nỗ lực trong việc tách các gamma globulin từ huyết thanh với quy mô lớn. Các protein huyết thanh được phân đoạn bằng cách tủa với ethanol dưới các điều kiện pH, nhiệt độ, nồng độ protein, và lực ion được kiểm soát chặt chẽ. Quá trình này làm giàu và ổn định gamma globulin trong huyết tương với hàm lượng kháng thể khá đồng đều trong khi bất hoạt hầu hết virus. Các chế phẩm này được sử dụng để điều trị bệnh nhiễm trong chiến tranh thế giới thứ II. Các chế phẩm immunoglobulin từ huyết thanh người được sử dụng lần đầu tiên vào năm 1952 để điều trị trong bệnh thiếu hụt miễn dịch. Bên cạnh đó, immunoglobulin cũng được chứng minh là chứa lượng kháng thể đủ cao để ngăn chặn hay làm chậm bệnh sởi, viêm do nhiễm, và bại liệt.



Hình 14.1. Điều chế immunoglobulin theo quy trình của Cohn–Oncley

Cohn phân đoạn huyết tương bằng các quy trình làm lạnh – alcohol để thu tủa phân đoạn II. Sau đó áp dụng quy trình của Oncley trên phân đoạn II của Cohn để thu immunoglobulin.

https://nhathuocngocanh.com/

Immunoglobulin tồn tại trong huyết thanh ở nồng độ 600 – 1200 mg/100 ml ở người lớn, chúng chiếm khoảng 11 – 14 % tổng protein huyết thanh và 80 % kháng thể của huyết thanh. Nó được chia làm năm loại chính: A, D, E, G, và M. Immunoglobulin G (IgG) có thời gian bán hủy trong hệ tuần hoàn bình thường khoảng 25 ngày (35 – 40 ngày ở bệnh nhân bị bệnh thiếu gamma globulin máu) và được tổng hợp ở người lớn với tốc độc 35 mg/kg thể trọng. Mức tổng hợp của nó được điều hòa bởi hàm lượng trong huyết thanh. Immunoglobulin M (IgM) và IgA có nồng độ huyết thanh thấp hơn và thời gian bán hủy ngắn hơn IgG. Phân tử lượng của IgG khoảng 145.000 trong đó 2,5% là do các carbohydrate liên kết với dây nặng.

IgG có thể được chia thành bốn loại phụ (Bảng 14.1). Trong đó nhiều nhất là IgG 1 (60 – 70 % tổng IgG) và IgG 2 (20 – 30 % tổng IgG).

Bảng 14.1. Các IgG

Đặc tính	IgG 1	IgG 2	IgG 3	IgG 4
Tỷ lệ trong tổng hợp IgG (người lớn) (%)	60 – 70	20 – 30	5 – 10	<5
Phân tử lượng (dalton)	146.000	146.000	170.000	146.000
Số cầu disulfid	2	4	11	2
Số acid amin trong vùng bản lề	15	12	62	12
Thời gian bán hủy (ngày)	21 – 23	20 – 23	7 – 8	21 – 23
Gắn thụ thể Fc				
Tế bào đơn nhân	++	+	++	·
Bạch cầu trung tính	++	·	++	+

Điều chế globulin huyết thanh miễn dịch

Globulin huyết thanh miễn dịch chuẩn (ISG) được điều chế từ huyết tương được dồn lại từ máu của nhiều người (>1000 người) cho máu. Việc dồn lại nhằm giảm thiểu sự khác biệt về mức kháng thể giữa các cá thể đối với các kháng nguyên đặc hiệu và đảm bảo tính đặc hiệu rộng của kháng thể.

ISG thường được điều chế dưới dạng dung dịch tiêm 16,5 % (165 mg /ml) và tương đương 20 – 25 lần nồng độ IgG huyết tương. Nhờ đó có thể sử dụng một liều tiêm nhỏ để đạt được hiệu quả mong muốn. Do độ nhớt cao của chế phẩm, nó chỉ có thể dùng tiêm bắp hay dưới da, thường với một kim tiêm lớn (16 – 18 ga). Ước tính 1 g của ISG chứa 4×10^{18} phân tử kháng thể với trên 10^7 loại đặc hiệu khác nhau. Sản phẩm, dù tương đối ổn định ở 4°C, có thể vẫn bị phân hủy, có lẽ do nhiễm plasmin. ISG cũng có thể chứa các chất quy định nhóm máu, IgA, và IgG nhị trùng. Sự hiện diện của IgA có thể gây sốc phản vệ ở các bệnh nhân thiếu IgA.

https://nhathuocngocanh.com/

2.2. Immunoglobulin dùng tiêm tĩnh mạch (IVIG)

Ban đầu, các chế phẩm immunoglobulin được sử dụng đường tiêm bắp. Tuy nhiên tiêm tĩnh mạch gamma globulin dễ chịu hơn tiêm bắp hay tiêm dưới da, làm bệnh nhân dễ tuân thủ, và đồng thời cũng cung cấp lượng kháng thể lớn hơn. Điều này đặc biệt quan trọng ở các bệnh nhân có hệ cơ nhỏ (trẻ em) hay hoặc thiếu diện tích da (phỏng), những người có nguy cơ xuất huyết không kiểm soát được (bệnh Wiskott–Aldrich hay các tạng dễ chảy máu khác), hay những người cần sử dụng liều lớn lặp lại nhiều lần (suy giảm miễn dịch) hoặc cần đáp ứng liều nhanh (bệnh nhân ngộ độc). Hơn nữa, việc tiêm tĩnh mạch tránh được sự thoái hóa cục bộ của kháng thể trong ISG tại điểm tiêm. Tuy nhiên, việc tiêm tĩnh mạch có thể gây nhiều phản ứng phòng vệ hay miễn dịch nguy hiểm.

Để tránh các phản ứng có hại, các phương pháp mới được sử dụng để loại bỏ các kết tập của immunoglobulin có phân tử lượng cao. Mặc dù chúng có thể được loại bằng cách ly tâm, nhưng sự kết tập mới có thể xảy ra trong quá trình bảo quản và mặt khác ly tâm không thực hiện được trên quy mô lớn. Các phương pháp mới được phát triển để khắc phục các nhược điểm này như điều chỉnh về pH 4 với sự hiện diện của một ít pepsin, sử dụng poly(ethylene glycol), tủa ethanol, siêu lọc, và sắc ký trao đổi ion. Các chế phẩm IVIG tinh chế từ huyết thanh người dồn lại, được tiệt trùng bằng phương pháp pasteur, chúng có hơn 95% IgG không thay đổi với đoạn Fc còn chức năng nguyên vẹn và chỉ có một lượng nhỏ IgA hoặc IgM.

Các chế phẩm IVIG thường được ổn định bằng các đường đơn hay đôi như maltose hay glucose. Các chất này làm giảm đáng kể tác dụng phụ khi tiêm truyền IVIG, có lẽ do giảm kết tủa hay kết tập. Maltose có thể gây lợi tiểu nhẹ. Các chế phẩm IVIG có chứa 5% – 10% gamma globulin cho thấy có hiệu quả.

2.3. Globulin miễn dịch mạnh và kháng độc tố

Globulin miễn dịch mạnh là các chế phẩm ISG có nồng độ của một kháng thể đặc thù cao. Chúng được điều chế từ huyết tương của bệnh nhân vừa khỏi bệnh hoặc người có đáp ứng cao với việc tiêm chủng hay sự nhiễm tự nhiên. Kháng độc tố được sử dụng trong trường hợp bị ngộ độc với độc tố bạch hầu hoặc botulinus được điều chế từ huyết thanh ngựa hay nọc rắn.

2.4. Các điều kiện sản xuất

WHO đòi hỏi sản phẩm immunoglobulin phải thỏa mãn:

1. Được điều chế từ máu của ít nhất 1000 người cho;
2. Không chứa kinin, plasmin, và hoạt tính prekallikrein;
3. Có hàm lượng IgA thấp;

https://nhathuocngocanh.com/

4. Ít có sự hiện diện của các kết tập immunoglobulin;

5. Chứa ít nhất 90% IgG nguyên vẹn, không bị phân đoạn;

6. Ít bị biến đổi để giữ các hoạt tính như opsonin, bổ túc thể,... ;

7. Chứa tất cả các loại phụ của IgG;

8. Có lượng kháng thể cao đối với ít nhất hai loài vi khuẩn hay độc tố và hai virus (được xác nhận bằng thử nghiệm trung hòa);

9. Chứa ít nhất 0,1 IU kháng thể viêm gan B và có hiệu giá 1:1000 đối với viêm gan A.

Hơn nữa, nhà sản xuất phải chỉ rõ chất pha loãng và bất kỳ các biến đổi hóa học nào được dùng. Sản phẩm được xếp vào loại immunoglobulin miễn dịch cao chỉ khi mức kháng thể cao hơn ít nhất năm lần so với chế phẩm ISG chuẩn.

Các yêu cầu về an toàn gồm thời gian bán hủy của IgG và khả năng truyền virus (đặc biệt HIV, viêm gan B và viêm gan không A, không B).

3. DỰ PHÒNG BẰNG GLOBULIN HUYẾT THANH MIỄN DỊCH

Gây nồng độ thụ động bằng ISG được khuyến cáo để dự phòng ngắn hạn các bệnh không có vaccin hay khi miễn dịch chủ động không thực hiện được trước khi tiếp xúc với bệnh; nó nên được dùng trước khi tiếp xúc hay trong giai đoạn ủ bệnh. Trong các trường hợp này miễn dịch chủ động vẫn nên được áp dụng vì kháng thể được thành lập bởi vaccin sẽ cho sự bảo vệ dài hơn. ISG cũng được sử dụng như liệu pháp thay thế kháng thể ở các bệnh nhân thiếu immunoglobulin huyết thanh (ví dụ bệnh thiếu gamma globulin máu).

Các bệnh được dự phòng ngắn hạn hiệu quả bởi ISG bao gồm:

Viêm gan. ISG có thể ngăn chặn hay làm thay đổi diễn biến viêm gan A. Liều ISG để điều trị viêm gan A là 0,02 mL/kg thể trọng. Cho kháng thể miễn dịch cao cũng có trên thị trường. Trong trường hợp viêm gan B, ISG không được khuyến cáo mà thay vào đó nên dùng globulin miễn dịch cao. Mặc dù ISG có thể làm giảm tần suất viêm gan sau khi truyền máu nhiễm, việc sử dụng để dự phòng viêm gan không A, không B không được chỉ định ưu tiên.

Sởi. Việc sử dụng huyết thanh người mới khỏi bệnh để làm thay đổi diễn biến bệnh sởi đã được ghi nhận từ năm 1907. ISG cũng được chứng minh có thể ngăn chặn hay làm suy yếu bệnh sởi. Tuy nhiên, chương trình tiêm chủng sởi từ năm 1963 đã làm giảm đáng kể khả năng mắc bệnh. Do đó ISG hiện nay chỉ được dùng cho trẻ sơ sinh dưới 1 năm tuổi hay người suy giảm miễn dịch trong vòng 6 tháng tiếp xúc với bệnh sởi đang tiến triển.

Bại liệt. Nếu dùng sớm, ISG có thể làm thay đổi các biến chứng liệt của bệnh bại liệt. Liều dùng ở người chưa tiếp xúc là 0,15 ml/kg thể trọng.

https://nhathuocngocanh.com/

Dự phòng nhiễm trùng ở các bệnh nhân bị giảm gamma globulin máu. ISG tiêm bắp liều 100 mg/kg mỗi 3 – 4 tuần được khuyến cáo. Liều này duy trì mức tuần hoàn của IgG trên 200 mg/ml và và đủ để bảo vệ chống lại nhiều bệnh nhiễm.

Rubella. ISG chuẩn không đáng tin cậy trong việc thay đổi diễn biến bệnh rubella. Kháng thể nồng độ cao nên được sử dụng. Tuy nhiên, ISG được khuyến cáo ở phụ nữ tiếp xúc với bệnh trong giai đoạn đầu mang thai.

4. DỰ PHÒNG BẰNG GLOBULIN MIỄN DỊCH CAO

Một số globulin miễn dịch cao đã có mặt trên thị trường.

Bạch hầu. Kháng độc tố bạch hầu được thu từ máu ngựa được chủng ngừa với độc tố bạch hầu. Cần thử nghiệm tính mẫn cảm với huyết thanh ngựa trước khi sử dụng. Để dự phòng, 1000 – 5000 IU kháng độc tố được tiêm cho người có thử nghiệm Schick (để kiểm tra sự nhạy cảm với bạch hầu) dương tính tiếp xúc với bạch hầu. Liều cao hơn (20 000 – 80 000 IU) được dùng để điều trị.

Viêm gan. Sản phẩm globulin miễn dịch cao cho viêm gan A đã có trên thị trường. Trường hợp viêm gan B, globulin miễn dịch cao được dùng sau khi có tiếp xúc trên niêm mạc hay dưới da (bao gồm cả tiếp xúc sinh dục) ở các cá thể có kháng nguyên dương tính. Điều này cũng được khuyến cáo đối với trẻ sơ sinh của bà mẹ có kháng nguyên dương tính.

Quai bị. ISG không có hiệu quả trong bệnh này nhưng globulin miễn dịch cao có tác dụng.

Ho gà. Globulin miễn dịch cao làm thay đổi bệnh. Ví dụ, tiêm 2,5 ml gamma globulin miễn dịch cao kháng ho gà với liều nhắc lại sau 5 – 7 ngày làm giảm 75 % tình trạng bệnh ở người có tiếp xúc chưa được miễn dịch. Tuy nhiên, kháng sinh có thể được sử dụng tốt hơn trong trường hợp này.

Dại. Globulin miễn dịch cao được khuyến cáo cùng với việc chủng ngừa sau khi tiếp xúc với virus dại, vì cho hiệu quả tốt hơn chỉ dùng chủng ngừa bằng vaccin.

Globulin miễn dịch Rho(D). Được khuyến cáo cho các bà mẹ có rhesus âm tính đang sinh con rhesus dương.

Uốn ván. Mức khuyến cáo hiện nay là 250 IU tiêm bắp đối với người không rõ đã chủng ngừa hay chưa và người có vết thương nặng. Để điều trị tình trạng uốn ván lâm sàng, liều khuyến cáo là 3000 – 6000 đơn vị.

Đậu mùa. Globulin miễn dịch cao được dùng để dự phòng đậu mùa và điều trị các biến chứng da khi chủng ngừa.

Thủy đậu. Chế phẩm miễn dịch cao với thủy đậu được chỉ định cho người tiếp xúc với bệnh cấp và thuộc nhóm nguy cơ cao (sơ sinh hay bệnh nhân suy giảm miễn dịch), và phụ nữ mang thai.

https://nhathuocngocanh.com/

5. MIỄN DỊCH LIỆU PHÁP VỚI KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

Khi tiếp xúc với kháng nguyên, hệ miễn dịch sẽ tạo ra một hỗn hợp kháng thể, kháng thể đa dòng, có thể gắn và trung hòa kháng nguyên đó. Mỗi kháng thể gắn với một epitope khác nhau trên tác nhân gây miễn dịch (kháng nguyên) và được sản xuất bởi một dòng lympho bào B riêng, kháng thể đơn dòng. Dòng tế bào B này không phân chia được nữa. Trong công nghệ người ta tách lấy dòng tế bào sản xuất kháng thể chống lại epitope mong muốn và dung hợp nó với tế bào ung thư bất tử để tạo tế bào lai sản xuất kháng thể đơn dòng tương ứng.

Liệu pháp miễn dịch với huyết thanh như trình bày ở trên tuy có nhiều thành công nhưng do nó là một hỗn hợp của rất nhiều kháng thể nên tính đặc hiệu đối với một bệnh cụ thể kém, trong khi đó khả năng gây tác dụng phụ lại cao. Mặt khác việc sản xuất huyết thanh trị liệu phụ thuộc vào nguồn máu có giới hạn của người cho máu. Việc sử dụng kháng thể đơn dòng để trị liệu có thể khắc phục được các nhược điểm này.

Một số kháng thể đơn dòng của người (human Monoclonal antibody – huMab) đang được phát triển để điều trị các bệnh kháng nguyên như :

1. Kháng nguyên hồng cầu: Rh (chứng tiêu huyết ở trẻ sơ sinh)
2. Kháng nguyên bạch cầu: globulin kháng lympho bào /tế bào tuyến ức
3. Các kháng nguyên virus: viêm gan A và B, dại, CMV, HSV,...
4. Các kháng nguyên vi khuẩn: uốn ván, nội độc tố, phế cầu,...
5. Đào thải thuốc từ máu (quá liều)
6. Kháng nọc rắn
7. Ngừa thai (ví dụ kháng β–human chorionic gonadotropin)

6. MIỄN DỊCH LIỆU PHÁP TRONG ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

Sử dụng miễn dịch liệu pháp trong điều trị ung thư là sử dụng hệ thống miễn dịch để loại bỏ ung thư. Điều chủ yếu đầu tiên là kích thích hệ thống miễn dịch của người bệnh để tấn công tế bào u ác tính. Để có được tác dụng chống ung thư, hoặc là thông qua hệ thống miễn dịch của người bệnh nhìn nhận tế bào u ác tính như đích để phá hủy, hoặc với cách sử dụng kháng thể như một dược phẩm. Trong cả hai trường hợp, hệ thống miễn dịch được hồi phục sẽ phá hủy các tế bào ung thư.

Nhiều loại tế bào ung thư có các antigen không bình thường. Ví dụ GD2 là một antigen có bản chất là glycosphingolipid, thường xuất hiện trên phần lớn các tế bào ung thư trong ung thư phổi, buồng trứng, bướu ở mô mềm ... GD2 trong các trường hợp này sẽ dễ dàng trở thành đích tác động của liệu pháp miễn dịch. Mặt khác, một số tế bào ung thư có các thụ thể ở mặt ngoài mà các tế bào

https://nhathuocngocanh.com/

bình thường không có. Chính các thụ thể này chịu trách nhiệm hoạt hóa con đường truyền tín hiệu dẫn đến sự phân chia tế bào không được kiểm soát. Các tế bào mang thụ thể này cũng sẽ là đích tác động trong việc sử dụng liệu pháp miễn dịch.

Bảng 14.2. Một số chế phẩm sử dụng trong liệu pháp miễn dịch kháng ung thư

Kháng thể	Tên chế phẩm	Năm sử dụng	Đích tác động	Chỉ định điều trị
Alemtuzumab	Campath	2001	CD52	Bệnh bạch cầu cấp tính
Bevacizumab	Avastin	2004	Yếu tố tăng trưởng màng trong của mạch máu	Ung thư tế bào sắc tố
Cetuximab	Erbitux	2004	Thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì	Ung thư tế bào sắc tố
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin	2002	CD20	Bệnh bạch cầu
Panitumumab	Vectibix	2006	Thụ thể của yếu tố tăng trưởng biểu bì	Ung thư tế bào sắc tố
Rituximab	Rituxan, Mabthera	1997	CD20	Bệnh bạch cầu
Trastuzumab	Herceptin	1998	ErB2	Ung thư vú

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phân biệt các sản phẩm globulin miễn dịch.
2. Kể tên các bệnh có thể điều trị bằng kháng thể đơn dòng.
3. Vì sao yêu cầu globulin miễn dịch phải được điều chế từ máu của ít nhất 1000 người?

https://nhathuocngocanh.com/

ĐÁP ÁN TỰ LƯỢNG GIÁ

Bài 1.

4C 5C

Bài 2.

7D 8C 9D 10B

Bài 3.

1E 2E 3C 4B 5B 6A 7D 8E 9E 10C

Bài 4.

4D 5A

Bài 5.

1A 2E 3E 4D 5B 6E 7E 8D 9E 10D

Bài 6.

4B 5D

Bài 7.

4A 5B

Bài 8.

4C 5A

Bài 9.

4A 5D

Bài 10.

5E 6B 7A 8E 9D 10E

Bài 11.

4E 5E

Bài 12.

1D 2A 3D 4A 5C 6E 7D 8E 9E 10E

Bài 13.

1C 2E 3B 4D 5C 6E 7D 8E 9A 10E

https://nhathuocngocanh.com/

TÀI LIỆU THAM KHẢO VÀ ĐỌC THÊM

1. Alan Cross. *Immunotherapy and Vaccines*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 6th ed. 2003. Weinheim: Wiley–VCH.
2. Angus, F.J. và G.R. Gibson, *LFRA ingredients handbook: prebiotics and probiotics*. 2000, Leatherhead: Leatherhead Pub.
3. Barredo, J.L., *Microbial processes and products. Methods in biotechnology Volume* 18. 2005, Totowa: Humana Press.
4. Battler, A. và J. Leor, *Stem cell and gene–based therapy: frontiers in regenerative medicine*. 2006, London: Springer.
5. Castilho, L.D.R., *Animal cell technology: from biopharmaceuticals to gene therapy*. 2008, London: Taylor & Francis.
6. Coolbear, T., *Enzymes and products from bacteria fungi and plant cells*. 1992: Springer–Verlag.
7. El–Mansi, M. và C.F.A. Bryce, *Fermentation microbiology and biotechnology*. 2nd ed. 2007, London: CRC/Taylor & Francis.
8. Fiechter, A., *History of modern biotechnology I*. Advances in biochemical engineering / biotechnology. 2000, London: Springer.
9. Friedrich, W., Vitamins. 1988, New York: W. de Gruyter.
10. Glick, B.R. và J.J. Pasternak, *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 3rd ed. 2003, Washington, D.C.: ASM Press.
11. Groves, M.J., *Pharmaceutical biotechnology*. 2nd ed. 2006, London: Taylor & Francis.
12. Guisan, J.M., *Immobilization of enzymes and cells*. 2nd ed. Methods in biotechnology. 2006, Totowa: Humana.
13. Gutiérrez–López, G.F. và G.V. Barbosa–Cánovas, *Food science and food biotechnology*. Food preservation technology series. 2003, London: CRC Press.
14. Kayser, O., *Pharmaceutical biotechnology: drug discovery and clinical applications*. 2004, Chichester : John Wiley.
15. Kirschning, A., *Immobilized catalysts: solid phases, immobalization and applications*. Topics in current chemistry Vol. 242. 2004, London: Springer.
16. Lee, Y.K., *Handbook of probiotics*. 1999, Chichester: Wiley.
17. McGrath, B.M. và G.D. Walsh, *Directory of therapeutic enzymes*. 2006, London: CRC.

https://nhathuocngocanh.com/

18. Murray, P.R. và E.J. Baron, *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. 2003, Washington, D.C.: ASM Press.

19. Ozturk, S.S. và W.S. Hu, *Cell culture technology for pharmaceutical and cell–based therapies*. Biotechnology and bioprocessing series. 2006, London: Taylor & Francis.

20. Patrinos, G.P. và W. Ansorge, *Molecular diagnostics*. 2005, London: Elsevier Academic Press.

21. Persing, D.H., *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. 1993, Washington, D.C.: ASM Press.

22. Portner, R., *Animal cell biotechnology: methods and protocols*. 2nd ed. Methods in biotechnology. 2007, Totowa: Humana.

23. Primrose, S.B., R.M. Twyman, và R.W. Old, *Principles of gene manipulation*. 6th ed. 2001, Oxford: Blackwell Science.

24. Stephen Denyer, Norman A. Hodges và Sean P. Gorman, *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. 7th ed. 2004, Oxford: Blackwell.

25. Vandamme, E.J., *Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors*. 1989, London: Elsevier Applied Science.

26. Waites, M.J., *Industrial Microbiology*. 2001, Oxford: Blackwell Science.

27. Phạm Thành Hổ. *Nhập môn công nghệ sinh học*. Nhà xuất bản Giáo dục. 2005.

28. Lương Đức Phẩm. *Công nghệ vi sinh vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 1998.

https://nhathuocngocanh.com/

MỤC LỤC TRA CỨU (INDEX)

β

β–galactosidase. *Xem* Lactase
β–lactam 70
β–lactamase 189

A

ABTS 257
Acid amin 118
Acid citric 112
Acid gluconic 109
Acid lactic 103
Acinetobacter suboxydans 111
Acremonium chrysogenum 67
Actinomycetes
  xem Xạ khuẩn 72
Adagen 174
Adeno–associated virus 251
Adenovirus 250
ADEPT 177
ADN ligase 219
ADN polymerase 219, 220
ADN_{bs} 219
Affi–gel 235
Agkistrodon rhodc stoma 180
Alcol 41
Alemtuzumab 304
Alkane 41
Amicon DC–10 235
Amylase 178
Ananas comosus 180
Anthrax 290
Apligraf 200
ARN can thiệp 253
ARN polymerase 219
Arylsulfatase B 177
Ascorbic acid 140
Ashbyi gossypii 136
Asparaginase 180
Asparginase 176
Aspergillus flavus 177
Aspergillus nidulans 38
Aspergillus niger 57, 109, 112, 114, 178
Aspergillus oryzae 178
Aspergillus sp 179
Aureobacterium 188
Aureobasidium pullulans 111
Avastin 199, 304
Avonex 199
AVV. *Xem* Adeno–associated virus

B

Bã đậu nành 42
Bã sữa chua 40
Baby hamster kidney 180
Bacille Calmette–Guérin 284
Bacillus sphaericus 180
Bacillus subtilis 180, 124, 227, 248
Bại liệt 292
Basiliximab 199
Batroxobin 180
BCG 290 *Xem* Bacille Calmette–Guérin
BeneFix 199
Bệnh Fabry 174
Bệnh Hunter 175
Bệnh Pompe 175
Beta–lactam 68
Bevacizumab 304
BHK. *Xem* Baby hamster kidney
Biến nạp 222
Biệt hóa 202
Bifidobacteria 89
Bifidobacterium bifidum 87
Bifidobacterium lactis 90, 93
Bình nuôi cấy kiểu sóng 195
Bio–gel 235
Bioreactor. *Xem* Nồi lên men
Biosilon® 198
Bordetella pertussis 291
Bothrops atrox 180
Botrytis cinerea 114
Brevibacterium flavum 57, 121
Brevibacterium lactofermentum 121
Bromelain 180

C

Cải tạo chủng 25, 34
  biến nạp gen 32
  chọn lọc thể đột biến 28
  di truyền 32, 33
  đột biến 26, 27, 28, 30
  lai ghép 32
  tính ổn định 34

https://nhathuocngocanh.com/

Calmette Albert 14
Cảm biến 58
Campath 199, 304
Can thiệp ARN 253
Candida antarctica 187, 188
Candida rugosa 186
Cao chiết mạch nha 39
Cao nấm men 42
Carica papaya 180
Carrier prophylatic vaccine 286
Carticel 200
Cấy chuyển 35
Cellulase 178
Cellulose 40
Cephalosporin 68, 69
sản xuất 68
Ceredase 174
Cetuximab 304
CF. *Xem* Cystic Fibrosis 255, 256, 272
Chẩn đoán phân tử 272
Chất béo 41
Chất cảm ứng 34, 43, 129, 226, 240
Chất chống bọt 44
Chất kháng chuyển hóa 30, 31
Chất mang vi thể 198
Chất ức chế 44
Chinese hamster ovary 180
CHO. *Xem* Chinese hamster ovary
Chọn lọc thể đột biến 28–31
  chất kháng chuyển hóa 30
  làm giàu với penicillin 31
Chondroitinase 176
Chủng công nghiệp 25
  bảo quản 35
  cải tạo 26–34
  tính ổn định 34
  yêu cầu 25
Chủng vi sinh vật 23–36
  bảo quản 35
  biểu hiện 213
BL21 213
BL21(DE3) 213
BL21*trxB* 213
  cải tạo. *Xem* Cải tạo chủng
  chủng công nghiệp 25
  công nghệ gen 211
DH5-α 212
JM103 212
JM109 212
  ngân hàng chủng 24
  phân lập 24
  tạo dòng 212
Chymopapain 180
Chymotrypsin 178
Clostridium histolyticum 180
Cobalamin 132
Cobamide 132
Cohen Stanley 13
Cohn–Oncley 298
Collagenase 180
Công nghệ enzym 181
  cố định enzym 158
  sản xuất thuốc 181
Công nghệ gen 25, 211, 212
  cải tạo chủng 25, 34
  sản xuất protein 198, 230
  ứng dụng 183–98
Công nghệ lên men 21
  mục đích 20
  sản phẩm 21
Công nghệ mô 200
Công nghệ nuôi cấy tế bào 191
Công nghệ protein 121
Công nghệ sinh học 9
  đặc điểm 11
  đỏ 11
  hiện đại 9, 11, 20
  phân loại 10
  sản phẩm 12
Thế hệ ba 10
Thế hệ hai 10
Thế hệ một 10
  trắng 11
Việt Nam 14
  xanh 10
  Y–Dược 12
Công nghệ tế bào gốc 201
khó khăn 207
Congenital Sucrase–Isomaltase Deficiency 175
Conjugate vaccine 285
Corynebacterium glutamicum 121, 122, 123, ... 124, 125
  cos 224
Cosmeceutical 82
Cosmid 215
Crotalis atrox 284
CSID. *Xem* Congenital Sucrase–Isomaltase Deficiency
Cultispher® 198
Cúm 291
Cystic Fibrosis 175

https://nhathuocngocanh.com/

D

DACS 200
Dại 292
Đạn sinh học 251
Dầu 41
DEAE Sepharose 243
deoR 213
Dermagraft 200
Dextrin 40
DH5–α 212
Dideoxy 218, 219
Điện di trường xung 269
Diphtheria 290
Diphtheria diphtheriae 290
Độ hòa tan oxy 54
Đoạn Klenow 218
Đông khô 35
Đông lạnh 35
Dòng tế bào 192
  bất tử 192
  liên tục 192
  sơ cấp 192
Dornase 175
Đột biến
  cảm ứng 27
Đột biến điều hòa 29
Đột biến ngẫu nhiên 27
Đột biến nhân tạo 27
Dược mỹ phẩm 82
Dược thực phẩm 82

E

EIA. *Xem* Enzym immunoassay
Electroporation. *Xem* Thẩm điện
ELISA. *Xem* Enzym–Linked Immunosorbent Assay
Enzym
  chiết tách 153
  cô đặc 153
  cố định 158
  kết tủa 154
  nguồn cung cấp 149, 152
  sản xuất 152
  sử dụng 146
  tinh chọn lọc 146
Enzym cắt giới hạn 216, 222
  chức năng 216
  phân loại 217
  vị trí nhận diện 217
Enzym cố định 158, 163
  kỹ thuật 162
  sản xuất thuốc 181
  ứng dụng 159, 181
  vật liệu 160
Enzym trị liệu 170, 176, 177
  khó khăn 170
  nguồn enzym 172
  thay thế 174
  thuận lợi 172
  yêu cầu 170
Enzym immunoassay 256
Enzym–Linked Immunosorbent Assay 258
Enzym–Linked Immunosorbent Assay 258
Epogen 199
Erbitux 304
Eremothecium ashbyii 136
ERIC 270
Erwinia carotovora 180
Erwinia herbicola 128, 142
Erythromycin 72, 75
  sản xuất 72
  sinh tổng hợp 75,
Erythropoietin 230
  gen 234
  sản xuất 233
  tinh chế 235
Ethionin 30

F

Fermenter. *Xem* Nồi lên men
Fleming Alexander 61
FMD 198
French–press 153
Fusion protein 227

G

Galactosidase 159
Gamma globulin 298, 299
gap–LCR 266
Gây đột biến 26
Gendicine 253
Globulin miễn dịch 298
Gluconobacter melanogenus 140
Gluconobacter oxydans 140
Glucosylceramidase 178
Glutamatdehydrogenase 57
Gonal–f 199
GRAS 22
GST–tag 214

https://nhathuocngocanh.com/

H

Haemophilus influenzae 215, 285, 290
Hansenula polymorpha 227
Herceptin 199, 304
Herpes Simplex Virus 251
Heterologous vaccine 286
Heterotypic vaccine 286
His–tag 214
HSV. *Xem* Herpes simplex virus
huMab 303
Hyaluronidase 178
Hydroxy–L–Proline 131
Hydroxyphenylglycine 130
HyQ® Sphere™ 198

I

Ibritumomab 304
Ibuprofen 188
ICM 206, 207 *Xem* Inner Cell Mass
Idiotypic vaccine 285
IFA. *Xem* Immunofluorescence assay
IFN. *Xem* Interferon
Immunofluorescence assay 256
Immunoglobulin 297
  điều chế 299
  dự phòng 301, 302
  phân loại 284
  sản xuất 283, 286, 300
  tiêm tĩnh mạch 300
Insulin 243
  insulin người crb 245
  insulin người prb 245
  sản xuất 244
Inter cell mass 207
  interference RNA. *Xem* ARN can thiệp
Interferon 236
  hoạt tính 238
  phân loại 237
  tinh chế 240, 242, 243
  α 237, 238, 241
  γ 237, 238, 239
  δ 237, 238, 241, 242
iRNA. *Xem* ARN can thiệp
ISG 297
IVIG 297, 300

J

JM 212
JM 212

K

Kallikrein 179
Kaposi 237
Kết bông 153
Kháng độc tố 300
Kháng sinh 61–78
Khoáng chất 43
Khối tế bào trong 202
Klebsiella pneuminiae 39
Kluyveromyces fragilis 178
Kluyveromyces maxianus 42
Kogenate 199
Kỹ thuật bổ sung alpha 212
Kỹ thuật hấp phụ miễn dịch liên kết enzym 258
Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic 262
  phát hiện sản phẩm 267
Kỹ thuật miễn dịch 273
Kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang 258
Kỹ thuật miễn dịch men 256
Kỹ thuật miễn dịch phóng xạ 256
Kỹ thuật tạo dòng 220, 223, 224
  biến đổi hậu dịch mã 227, 228
  cắt–nối ADN 222
  chọn lọc thư viện gen 224
  đưa gen vào tế bào 222
  phage 224
  plasmid 223
  tạo đoạn ADN 220
  tế bào chủ 227
  tối ưu hóa 226
  tổng hợp ADN_{bs} 220
Kỹ thuật thao tác gen 220

L

Lactase 178
Lactobacillus delbrueckii 97, 106
Lactobacillus johnsonii 90
Lactobacillus plantarum 91, 104
Lactobacillus reuteri 91
Lactobacillus rhamnosus 88, 90, 92, 93, 95
Lai phân tử 259, 260
đoạn đích 260
đoạn dò ADN 260
L–Alanine 127
Làm khô 35
Lamivudine 189
Laronidase 174
L–Aspartic Acid 126

https://nhathuocngocanh.com/

LCR. *Xem* Ligase chain reaction
L–Cyteine 127
L–DOPA 128
Lên men 21
  bán rắn 50
  bề mặt 50, 115, 116
  chìm 50, 52, 116
  công nghiệp 20
  fed–batch 49
  giám sát 58
  gián đoạn 48
  hiếu khí 49
  hở 10, 49
  kín 49
  kỵ khí 49
  kỹ thuật 50
  liên tục 48
  nổi 50
  phương pháp 48
  vô trùng 49
  yếu tố ảnh hưởng 53
Lentivirus 250, 251
L–Glutamic acid 121
Liệu pháp gen 250
  hệ thống chuyển gen 251
  nguyên lý 252
  vector 249
Liệu pháp tế bào 199
Ligase 219, 221, 265
Lipase 177, 187
Lipoplex 251
Liposom 251
L–Lysine 123
Lọc chảy qua 153
LSD. *Xem* Lysosomal Storage Diseases
L–Threonine 125
Lysosomal Storage Diseases 174
Lysozyme 176, 178

M

MAb. *Xem* Monoclonal antibody
Mabthera 304
Manton – Gaulin 153
Mật mía 39
Matrex Gel Blue A 242, 243
MCS. *Xem* Multiple Cloning Site
Methionin 30
Microbacterium ammoniphilum 120
Micrococcus glutamicus 118
Micrococcus luteus 78
Microencapsulation 167
Miễn dịch liệu pháp 297, 303
  dự phòng 301, 302
  kháng thể đơn dòng 303
  ung thư 303
Môi trường 36–45
Môi trường công nghiệp 37
Môi trường nuôi cấy
  cơ bản 193
  cơ sở 36
  giữ giống 45
  phân loại 284
  tế bào động vật 45, 193
  tế bào thực vật 45
  thành phần 37, 38, 194
Môi trường phức 37
Môi trường tổng hợp 37
Mucor periformis 114
Multiple Cloning Site. *Xem* Vùng tạo dòng
Mycobacterium bovis 284
Mycobacterium tuberculosis 124, 293

N

NAAT. *Xem* Kỹ thuật khuếch đại acid nucleic
Naproxen 147
Neisseria meningitidis 290
Ngân hàng chủng 24
Nguồn carbon 38, 65, 115, 120, 129
Nguồn nitơ 41, 65, 106
Nồi lên men 49, 184
  enzym 184
  nuôi cấy tế bào 196
  thùng khuấy 46
Nổi phản ứng. *Xem* Nổi lên men
Nổi sợi rỗng 196
Nucleoside đồng đẳng 186
Nước thải ngâm bắp 41
Nước thải sulfit 40
Nuôi cấy tế bào
  chất mang vi thể 197
  môi trường 193
  thiết bị 195
  ứng dụng 198
Nutraceutical 82

O

Omalizumab 199
Ormeloxifene 186, 187

https://nhathuocngocanh.com/

Oryzin 179
Oxidoreductase 186

P

Pancreatin 178
Panitumumab 304
Paroxetin 188
  pBluescript II 214
PCR. *Xem* Polymerase chain reaction
PCR-ELISA 268
Penicillin 68
G 63
  sản xuất 62
  sinh tổng hợp 53
  tự nhiên 63
V 68
Penicillium chrysogenum 26, 39, 61
Penicillium luteum 114
Penicillium notatum 61
Pepsin 180
Pepton 42
Pertussis 291
pET 214
PFGE 269, 271
PGC. *Xem* Primordial germ cell
pGEM 214
pGEX 214
Phá tế bào 153
Phage 224
Phage lambda 214
Phagemid. *Xem* Cosmid
Phản ứng miễn dịch 256
Phenylacetic acid 66
Phenylketonuria 175
Phôi nang 201, 202
Phương pháp kết bông 153
Phytochemical 82
Pichia angusta 34, 39
Pichia pastoris 34, 227
PKU. *Xem* Phenylketonuria
Plasmid 213, 214, 223
  pBluescript II 214
  pET 214
  pGEM 214
  pGEX 214
  pUC 213, 214
Plasmin 179
PolyC 220
PolyG 220
Polyhistidine tag 214
Polylinker. *Xem* Vùng tạo dòng
Polymerase 217, 218, 219, 220
Polymerase chain reaction 263
  multiplex 264
  real-time 264
Polyplex 252
Polyvalent vaccine 286
Prebiotic 83, 84
  tiêu chí 86
Preproinsulin 244
Primordial germ cell 204
Probiotic 83, 85
  an toàn 86
  chức năng 89
  công nghệ 95
  tác dụng lâm sàng 90
  tiêu chí 86, 90
Promoter T7 213
Propionibacterium freudenreichii 133
Propionibacterium shermanii 133
Protein lai 227
Protein tái tổ hợp 230
Proteus regrettii 125
Pseudomonas aeruginosa 94
Pseudomonas cepacia 186
Pseudomonas dacunhae 127
Pseudomonas denitrificans 133
Ptac 225
  pUC 213, 214
Pulmozyme 175

Q

Quai bị 292

R

Radioactive immunoassay 256
Rana pipiens 178
RAPD 269
  recA 212
  *recA*1 213
Rep-PCR 269
Retrovirus 250, 251
Reverse transcriptase 34, 219
RFLP 268
Rhizopus arrhizus 177
Rhodococcus rhodochrous 189
RIA. *Xem* Radioactive immunoassay
Riboflavin 135
Ribotyping 269

https://nhathuocngocanh.com/

RIEF 243
Rituxan 304
Rituximab 304
RNA interference. *Xem* Can thiệp ARN
RNAi. *Xem* Can thiệp ARN
RSV 198
Rubella 292

S

Sắc ký 156
  ái lực 158
  lọc gel 156
  trao đổi ion 156
  tương tác kỵ nước 157
Saccharomyces cerevisiae .. 34, 111, 177, 227
Saccharopolyspora erythraea 61, 72
Salmonella typhi 291
Sản xuất enzym 152
  cải thiện chủng 150
  chiết tách 153
  chuẩn bị nguyên liệu 152
  cô đặc 153
  tinh chế 154
Saphadex 235
  SCID. *Xem* Severe combined immunodeficiency
Serrapeptase 180
Serratia 180
Severe combined immunodeficiency 180
Sfericase 180
Simulec 199
Sởi 292
Somatostatin 246
Somatotropin 246
Sốt vàng 292
Sphingomyelin 177
S–tag 214
Stenotrophomonas maltophilia 186
Streptococcus haemolyticus 178
Streptococcus thermophilus 91, 97, 106
Streptodornase 178
Streptokinase 179
Streptomyces aureofaciens 68
Streptomyces clavuligerus 67
Streptomyces coelicolor 120
Streptomyces erythreus 72
Sự thông khí 56
Synbiotic 83

T

Tá chất Freund 294
Tá chất miễn dịch 293, 294
Freund 294
Tải nạp 222
Tái tổ hợp tự nhiên 26
Tăng sinh 202
Taq ADN polymerase 219
Tế bào BHK 179
Tế bào CHO 177, 179
Tế bào chủ 227
  nhân nguyên thủy 33
  nhân thật 34
Tế bào gốc 201, 203
  đa năng 205
  đơn năng 206
  tiềm năng 204
  tiểu năng 206
  trưởng thành 204
  ứng dụng 207
  vạn năng 205
Tế bào gốc phôi 14, 201, 204
Tế bào mầm phôi 201
Tế bào sinh vật
  công thức 36, 47
  thành phần 37, 47
Tế bào sơ cấp 192
Terminal transferase 220
Tetanus 290
Thẩm điện 222
Thể dị nhân 26
Thể khuyết dưỡng 29
Thermus aquaticus 216, 219
Thiết kế hợp lý 151
Thrombin 179
Thử nghiệm miễn dịch
gián tiếp 256
kháng thể thứ cấp 256
  trực tiếp 256
Thực phẩm chức năng 81, 83, 101
  định nghĩa 83
Thuốc đối quang 181
Thủy đậu 292
Tiến chất 43, 123
Tiến hóa định hướng 151
Tiếp hợp 222
Tinh bột 40
Tinh chất thực vật 82
TLS. *Xem* Tumor lysis syndrome
TMB 257

https://nhathuocngocanh.com/

Trastuzumab 199, 304
Trichoderma viride 178
Trypsin 178
Tumor lysis syndrome 180

U

Urate oxidase 177
Urokinase 179

V

Vaccin 283
ADN 285
  chất lượng 293
  conjugate 285
  đa giá 286
  giống 286
  hỗn hợp 286
  idiotype 285
  phân loại 284
  phối trộn 289
  sản xuất 283–62
  synthetic 286
  tá chất miễn dịch 293, 294
  vi khuẩn 287, 289
  virus 198, 288, 291
Vaccin viêm gan B 248
Varicella 292
Vectibix 304
Vector tạo dòng 213
  cosmid 215
  phage lambda 214
  plasmid 184, 213
Vector virus 250
Vi sinh vật
  biến đổi gen 43
  điều kiện sống 37
Vibrio proteolyticus 175
Viêm gan A 291
Viêm gan B 291
Vitafood 82
Vitamin 43
Vitamin B_{12} 57, 133
Vitamin C 139
Vùng tạo dòng 213, 214, 225

W

Whey
xem Bã sữa chua 40

X

Xạ khuẩn 72
Xolair 199
Xúc tác sinh học 146
  động học 185
  quy trình 186

Y

Yersin Alexandre 15
Yếu tố đông máu 177, 179
Yếu tố hoạt hóa tiểu cầu 177

Z

Zevalin 304

https://nhathuocngocanh.com/

Chịu trách nhiệm xuất bản:
Chủ tịch Hội đồng Thành viên kiêm Tổng Giám đốc NGÔ TRẦN ÁI
Tổng biên tập kiêm Phó Tổng Giám đốc NGUYỄN QUÝ THAO

Tổ chức bản thảo và chịu trách nhiệm nội dung:
Phó Tổng biên tập NGUYỄN VĂN TƯ
Giám đốc Công ty CP Sách ĐH–DN NGÔ THỊ THANH BÌNH

Biên tập nội dung và sửa bản in:
BS. VŨ THỊ BÌNH – NGUYỄN DUY MẠNH

Trình bày bìa:
ĐINH XUÂN DŨNG

Thiết kế sách và chế bản:
TRỊNH THỤC KIM DUNG

© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ Khoa học và Đào tạo)

CÔNG NGHỆ SINH HỌC DƯỢC
(DÙNG CHO ĐÀO TẠO DƯỢC SỸ ĐẠI HỌC)

Mã số: 7K829y3-DAI

Số đăng kí KHXB : 54 - 2013/CXB/ 173- 51/GD.

In 500 cuốn (QĐ in số : 39), khổ 19 x 27 cm.

In tại Công ty CP in Phúc Yên.

In xong và nộp lưu chiểu tháng 06 năm 2013.

https://nhathuocngocanh.com/

https://nhathuocngocanh.com/