

Nguyễn Hoàng Lộc

Giáo trình
CÔNG NGHỆ TẾ BÀO



**Nhà xuất bản Đại học Huế
Năm 2006**

<https://nhathuocngocanh.com/>

PGS. TS. Nguyễn Hoàng Lộc

Giáo trình
CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

**Nhà xuất bản Đại học Huế
Năm 2006**

Mục lục

	Trang
Lời nói đầu	1
Chương 1. Mở đầu	2
I. Công nghệ sinh học	2
1. Công nghệ DNA tái tổ hợp	2
2. Dung hợp tế bào	3
3. Ứng dụng của công nghệ sinh học hiện đại	3
II. Công nghệ tế bào	5
1. Chúng ta mong đợi thay đổi cái gì	6
2. Quá trình sinh học xảy ra với một tốc độ như thế nào	7
3. Hệ thống được hoạt động và điều chỉnh như thế nào để đạt được hiệu suất tối đa	7
4. Các sản phẩm được phân tách như thế nào để có được sự tinh sạch cực đại và giá thành tối thiểu	7
III. Quá trình sinh học	8
1. Các ưu điểm	8
2. Các nhược điểm	8
IV. Định nghĩa sự lên men	9
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	10
Chương 2. Sinh trưởng và bất động của tế bào	11
I. Xác định sinh trưởng của tế bào	11
1. Xác định số lượng tế bào	11
2. Xác định sinh khối tế bào	13
3. Các phương pháp gián tiếp	14
II. Bất động tế bào	16
1. Gắn lên bề mặt	16
2. Tạo thể xộp	16
3. Sử dụng bao vi thể	18
4. Tự kết khối	18
III. Một số thí nghiệm điển hình	18
1. Đường cong sinh trưởng của nấm men	18
2. Đường cong sinh trưởng của thực vật	20
3. Bất động tế bào thực vật	21
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	22

Chương 3. Động học sinh trưởng của tế bào	23
I. Mở đầu	23
II. Định nghĩa	24
III. Chu kỳ sinh trưởng của nuôi cấy mẻ	26
1. Pha lag	26
2. Pha sinh trưởng theo hàm mũ	28
3. Các nhân tố ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng đặc trưng	29
4. Pha tĩnh và pha chết	31
IV. Các ký hiệu	31
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	32
Chương 4. Thiết kế hệ lên men	33
I. Hệ lên men thùng khuấy	33
1. Hệ lên men dòng nút (PFF) hoặc mẻ (batch)	35
2. Hệ lên men thùng khuấy liên tục (CSTF) lý tưởng	38
3. Ước lượng các thông số động học Monod	41
4. Hiệu suất của CSTF	43
5. So sánh nuôi cấy của hệ lên men mẻ và hệ lên men thùng khuấy liên tục	45
II. Thu hồi tế bào	46
1. Thu hồi tế bào ở PFF	46
2. Thu hồi tế bào ở CSTF	49
III. Các hệ lên men khác	51
1. Hệ lên men cột	52
2. Hệ lên men vòng	54
IV. Các ký hiệu	55
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	57
Chương 5. Nuôi cấy tế bào vi sinh vật	58
I. Tế bào vi sinh vật	58
II. Vi khuẩn	61
1. Hình dạng	61
2. Kiểu sinh trưởng	61
3. Các điều kiện vật lý ảnh hưởng đến sinh trưởng	61
III. Vi nấm	62
1. Nấm men	63
2. Nấm mốc	63
IV. Môi trường nuôi cấy	64
1. Môi trường tự nhiên	65

2. Môi trường tổng hợp	65
3. Khử trùng	65
4. Nuôi cấy	66
V. Sản xuất kháng sinh	66
1. Sản xuất penicillin	66
2. Sản xuất streptomycin	68
VI. Sản xuất thuốc bằng công nghệ DNA tái tổ hợp	69
1. Insulin	69
2. Interferon	70
3. Hormone	70
4. Vaccine	71
5. Một số loại thuốc khác	72
VII. Sản xuất enzyme	74
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	76
Chương 6. Nuôi cấy tế bào động vật	77
I. Mở đầu	77
1. Các ưu điểm của nuôi cấy tế bào động vật	78
2. Một số hạn chế của nuôi cấy tế bào động vật	78
II. Tế bào động vật	80
1. Các tế bào dịch huyền phù	80
2. Các tế bào dính bám	80
III. Môi trường nuôi cấy	81
IV. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật	83
1. Hệ thống sản xuất	84
2. Tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng và tế bào vật chủ	86
V. Các kháng thể đơn dòng	87
1. Dung hợp tế bào	88
2. Thử nghiệm kháng thể	90
IV. Sản xuất thuốc và DNA vaccine	91
1. Interferon	91
2. Hoạt tố plasminogen mô	92
3. DNA vaccine	92
VII. Tế bào động vật sử dụng trong cấy ghép	94
VIII. Tạo cơ quan từ tế bào động vật nuôi cấy	97
IX. Mô hình thực nghiệm	98
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	99

Chương 7. Nuôi cấy tế bào thực vật	100
I. Mở đầu	100
II. Tế bào thực vật	102
III. Các loại nuôi cấy tế bào và mô thực vật	104
1. Sinh trưởng không phân hóa	104
2. Sinh trưởng có phân hóa	105
IV. Môi trường nuôi cấy	107
V. Sản xuất các chất thứ cấp	108
1. Các chất thứ cấp dùng trong thực phẩm	111
2. Các chất thứ cấp dùng trong dược phẩm	114
VI. Sản xuất các protein tái tổ hợp	116
1. GM-CSF người	117
2. Kháng thể IgG1 của chuột	119
3. Interleukin	119
VII. Chọn dòng tế bào biến dị soma	120
VIII. Dung hợp protoplast hay lai vô tính tế bào thực vật	120
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	122
Chương 8. Công nghệ DNA tái tổ hợp	123
I. DNA và RNA	123
II. Tạo dòng gen	127
1. Các trình tự DNA	127
2. Sự kết hợp của các phân tử DNA	129
III. Khả năng ổn định của các vi sinh vật tái tổ hợp	131
1. Động học lên men của các nuôi cấy tái tổ hợp	133
2. Nuôi cấy trong hệ thống lên men thùng khuấy liên tục	136
3. Các phương pháp ổn định	138
IV. Biến đổi di truyền ở tế bào thực vật	139
1. Kỹ thuật gen	140
2. Biến nạp gen	143
V. Biến đổi di truyền ở tế bào động vật	144
1. Kỹ thuật gen	144
2. Biến nạp gen	145
VI. Các ký hiệu	149
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	150
Chương 9. Tiệt trùng	151
I. Các phương pháp tiệt trùng	151
1. Nhiệt	151

2. Hóa chất	152
3. Tia cực tím	152
4. Sóng siêu âm	152
5. Lọc	152
II. Động học của hiện tượng chết do nhiệt	153
III. Tiêu chuẩn thiết kế	154
IV. Tiệt trùng từng mẻ	154
V. Tiệt trùng liên tục	156
1. Bộ phận đun nóng	157
2. Bộ phận giữ nóng	157
3. Bộ phận làm lạnh	161
4. Tiệt trùng không khí	161
VI. Các ký hiệu	166
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	168
Chương 10. Khuấy trộn và thông khí	169
I. Mở đầu	169
1. Con đường chuyển khối	171
II. Các khái niệm cơ bản về chuyển khối	171
1. Sự khuếch tán phân tử trong chất lỏng	171
2. Hệ số chuyển khối	173
3. Cơ chế của chuyển khối	175
III. Xác định vùng phân giới	176
IV. Tắc nghẽn khí	177
1. Phun khí bằng khuấy trộn không cơ học	178
2. Phun khí bằng khuấy trộn cơ học	178
V. Xác định tốc độ hấp thụ oxygen	179
1. Phương pháp oxy hóa sodium sulfite	181
2. Kỹ thuật tách không khí	182
3. Xác định trực tiếp	183
4. Kỹ thuật động lực học	183
VI. Các ký hiệu	184
Tài liệu tham khảo/đọc thêm	186
Phụ lục. Một số thuật ngữ cơ bản	187
Mục lục	201

Lời nói đầu

Công nghệ tế bào là một bộ phận quan trọng của công nghệ sinh học, chủ yếu nghiên cứu các quá trình nuôi cấy tế bào động-thực vật và vi sinh vật để sản xuất sinh khối, sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học (enzyme, vaccine, các chất thứ cấp...), để làm mô hình thực nghiệm khảo sát các tác động của hoá chất, làm nguyên liệu ghép tế bào và cơ quan...

Mặc dù, các kỹ thuật nuôi cấy tế bào chỉ được phát triển vào nửa đầu thế kỷ 20, nhưng đến nay các ứng dụng của chúng đã có những bước tiến vượt bậc nhờ sự đóng góp của công nghệ DNA tái tổ hợp.

Bên cạnh các giáo trình như: sinh học phân tử, nhập môn công nghệ sinh học, công nghệ DNA tái tổ hợp, công nghệ chuyển gen... giáo trình công nghệ tế bào sẽ giúp sinh viên tiếp cận thêm một lĩnh vực khác của công nghệ sinh học thông qua việc cung cấp những kiến thức cơ bản về các vấn đề sau:

- Sinh trưởng và động học sinh trưởng của tế bào.
- Thiết kế các hệ lên men.
- Nuôi cấy tế bào và các ứng dụng của chúng.

Giáo trình công nghệ tế bào được biên soạn theo hướng khảo sát một quá trình sinh học mang tính công nghệ nhiều hơn cả đó là quá trình lên men ứng dụng cho cả tế bào vi sinh vật, lẫn tế bào động-thực vật trong các thiết bị nuôi cấy (bioreactor/fermenter). Do đó, một số ứng dụng khác của các kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào nói chung chúng tôi không đưa vào giáo trình này.

Lĩnh vực công nghệ tế bào rất rộng và đa dạng, hơn nữa giáo trình này mới được xuất bản lần đầu tiên nên khó tránh khỏi thiếu sót hoặc chưa đáp ứng được yêu cầu bạn đọc. Vì thế, chúng tôi rất mong nhận được nhiều ý kiến đóng góp để lần xuất bản sau được hoàn thiện hơn.

Tác giả

Chương 1

Mở đầu

I. Công nghệ sinh học

Đến nay có rất nhiều định nghĩa và cách diễn đạt khác nhau về công nghệ sinh học tùy theo từng tác giả và tổ chức. Tuy nhiên, công nghệ sinh học (biotechnology) có thể được định nghĩa một cách tổng quát như sau:

“Công nghệ sinh học là các quá trình sản xuất ở quy mô công nghiệp mà nhân tố tham gia trực tiếp và quyết định là các tế bào sống (vi sinh vật, thực vật và động vật). Mỗi tế bào sống của cơ thể sinh vật hoạt động trong lĩnh vực sản xuất này được xem như một lò phản ứng nhỏ”.

Nếu công nghệ sinh học được định nghĩa theo hướng trên thì nó không thể được thừa nhận là một lĩnh vực khoa học mới. Bởi vì, từ xa xưa loài người đã biết sử dụng các vi sinh vật để lên men bánh mì và thực phẩm, cho dù họ không biết cơ chế của những biến đổi sinh học này là như thế nào. Loài người cũng đã biết từ rất lâu việc lai tạo động vật và thực vật để cải thiện năng suất vật nuôi và cây trồng được tốt hơn. Vì thế, công nghệ sinh học được định nghĩa như trên được xem như công nghệ sinh học truyền thống.

Tuy nhiên, trong những năm gần đây thuật ngữ công nghệ sinh học thường được sử dụng nhằm đề cập đến những kỹ thuật mới như DNA tái tổ hợp và dung hợp tế bào, và được xem là lĩnh vực công nghệ sinh học hiện đại.

1. Công nghệ DNA tái tổ hợp (*DNA recombinant technology*)

Là những kỹ thuật cho phép thao tác trực tiếp nguyên liệu di truyền của các tế bào riêng biệt, có thể được sử dụng để phát triển các vi sinh vật sản xuất các sản phẩm mới cũng như các cơ thể hữu ích khác. Những kỹ thuật này còn được gọi là kỹ thuật di truyền (genetic engineering), công nghệ di truyền (genetic technology), thao tác gen (gene manipulation), kỹ thuật gen (gene engineering) hay công nghệ gen (gene

technology)... Mục tiêu chính của công nghệ DNA tái tổ hợp là gắn một gen ngoại lai (foreign gene) mã hóa cho một sản phẩm mong muốn vào trong các dạng DNA mạch vòng (plasmid vector) và sau đó đưa chúng vào trong một cơ thể vật chủ, sao cho gen ngoại lai có thể biểu hiện để sản xuất sản phẩm của nó từ cơ thể này.

2. Dung hợp tế bào (cell fusion)

Là quá trình hình thành một tế bào lai đơn (single hybrid cell) với nhân và tế bào chất từ hai loại tế bào riêng biệt để tổ hợp các đặc điểm mong muốn của cả hai loại tế bào này. Chẳng hạn, các tế bào đặc biệt của hệ thống miễn dịch có thể sản xuất ra các kháng thể hữu ích. Tuy nhiên, các tế bào này thường khó nuôi cấy vì tốc độ sinh trưởng của chúng rất chậm. Mặt khác, các tế bào khối u nhất định nào đó có các đặc điểm bất tử và phân chia nhanh. Bằng cách dung hợp hai tế bào này, một tế bào lai hybridoma có thể được tạo ra mang cả hai tính trạng trên. Các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies-Mabs) được sản xuất từ các tế bào lai, được dùng để chẩn đoán, điều trị bệnh và tinh sạch protein.

3. Ứng dụng của công nghệ sinh học hiện đại

Các ứng dụng của công nghệ sinh học hiện đại là rất nhiều (Bảng 1.1). Các dược phẩm hiếm và đắt tiền trước đây như insulin để chữa bệnh đái tháo đường, hormone sinh trưởng người để điều trị bệnh còi của trẻ em, interferon để chống viêm nhiễm, vaccine phòng bệnh và các kháng thể đơn dòng dùng để chẩn đoán... có thể được sản xuất bằng các tế bào được biến đổi di truyền hoặc các tế bào lai rẽ tiền với số lượng lớn. Các con giống sạch bệnh hoặc khỏe mạnh hơn, các vật nuôi dùng làm thực phẩm có sản lượng cao có thể được phát triển, các loài cây trồng quan trọng có thể được biến đổi di truyền để có các tính trạng chống chịu stress, chống chịu chất diệt cỏ và kháng côn trùng. Hơn nữa, công nghệ DNA tái tổ hợp có thể được ứng dụng để phát triển các vi sinh vật được biến đổi di truyền (genetically modification) sao cho chúng có thể sản xuất các hợp chất hóa học khác nhau với sản lượng cao hơn các vi sinh vật bình thường.

Bảng 1.1. Các ứng dụng của công nghệ sinh học hiện đại.

Lĩnh vực	Các sản phẩm hoặc các ứng dụng
Dược phẩm	Kháng sinh, kháng nguyên (kích thích các đáp ứng kháng thể), endorphin (chất dẫn truyền thần kinh), γ -globulin (ngăn cản sự viêm nhiễm), hormone sinh trưởng người (điều trị trẻ em bị bệnh còi), albumin huyết thanh người (điều trị chấn thương cơ thể), các nhân tố điều hòa miễn dịch, insulin, interferon (điều trị bệnh viêm nhiễm), interleukin (điều trị các bệnh nhiễm trùng và ung thư), lymphokine (phản ứng miễn dịch điều chỉnh), kháng thể đơn dòng (chẩn đoán hoặc phân phối thuốc), peptide hoạt hóa thần kinh (bắt chước các peptide điều khiển sự đau của cơ thể), các nhân tố hoạt hóa plasminogen của mô (hòa tan các cục máu đông), vaccine.
Chăn nuôi-Thú y	Phát triển các con giống sạch bệnh và mạnh khỏe hơn, các gia súc cho thịt có sản lượng cao hơn.
Trồng trọt	Chuyển các tính trạng chống chịu stress, kháng côn trùng và chất diệt cỏ vào các loài cây trồng, phát triển các giống cây trồng có khả năng tăng quá trình quang hợp và cố định đạm, phát triển các thuốc trừ sâu sinh học và các vi khuẩn nhân không đóng băng (non-ice nucleating).
Các hóa chất đặc biệt	Các amino acid, enzyme, vitamin, lipid, các chất thơm được hydroxyl hóa, các polymer sinh học.
Các ứng dụng môi trường	Ngâm chiết khoáng, cô đặc kim loại, kiểm soát sự ô nhiễm, phân hủy chất thải độc và thu hồi dầu loang.
Các hóa chất thương mại	Acetic acid, acetone, butanol, ethanol, nhiều sản phẩm khác từ các quá trình biến đổi sinh khối.
Điện tử sinh học	Biosensor, biochip.

II. Công nghệ tế bào

Các công nghệ DNA tái tổ hợp hoặc dung hợp tế bào được khởi đầu bởi những nghiên cứu thuần túy và các kết quả cuối cùng có thể phát triển thành một loại tế bào mới có thể sản xuất sản phẩm với số lượng ít ỏi ở qui mô phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, các kết quả nói trên lại rất có ý nghĩa thương mại và vì thế nó đòi hỏi phải phát triển thành quy trình công nghiệp với một công nghệ khả thi và có hiệu quả kinh tế. Để phát triển một quá trình sản xuất ở quy mô phòng thí nghiệm thành một quy trình công nghiệp lớn, chúng ta không thể chỉ đơn thuần tăng kích thước của bình nuôi cấy (vessel) lên.

Ví dụ: Ở quy mô phòng thí nghiệm là 100 mL, một bình tam giác nhỏ nuôi trên một máy lắc là phương thức lý tưởng để nuôi cấy tế bào. Nhưng đối với hoạt động ở quy mô lớn 2.000 L, chúng ta không thể sử dụng một bình nuôi khác có thể tích lớn hơn và lắc nó, mà cần phải thiết kế một hệ lên men (fermenter) hay còn gọi là nồi phản ứng sinh học (bioreactor) hiệu quả để nuôi cấy tế bào trong những điều kiện tối ưu nhất. Vì thế, công nghệ tế bào (một trong những lĩnh vực chính của công nghệ sinh học) có vai trò rất quan trọng trong thương mại hóa các sản phẩm của nó.

Để minh họa vai trò của công nghệ tế bào, có thể xem một quá trình sinh học đặc trưng bao gồm các tế bào vi khuẩn như trình bày ở hình 1.1. Các nguyên liệu thô (thường là sinh khối) được xử lý và trộn với các thành phần cần thiết khác để tế bào có thể sinh trưởng tốt trong một hỗn hợp dịch lỏng, môi trường nuôi cấy được khử trùng để loại bỏ tất cả các cơ thể sống và đưa vào bình nuôi cấy hình trụ lớn, thiết bị đặc trưng với cánh khuấy, vách ngăn, hệ thống thông khí và các bộ phận cảm biến để điều chỉnh các điều kiện lên men. Một chủng vi sinh vật thuần khiết được đưa vào trong một bình nuôi cấy. Các tế bào khởi đầu sinh sản theo hàm mũ sau một thời gian nhất định của pha lag và đạt tới nồng độ tế bào cực đại khi môi trường đã bị sử dụng hết. Sự lên men sẽ dừng lại và các thành phần sẽ được hút ra để thu hồi sản phẩm và tinh sạch chúng. Quá trình này được hoạt động theo kiểu lên men mẻ (batch culture) hoặc liên tục (continuous culture).

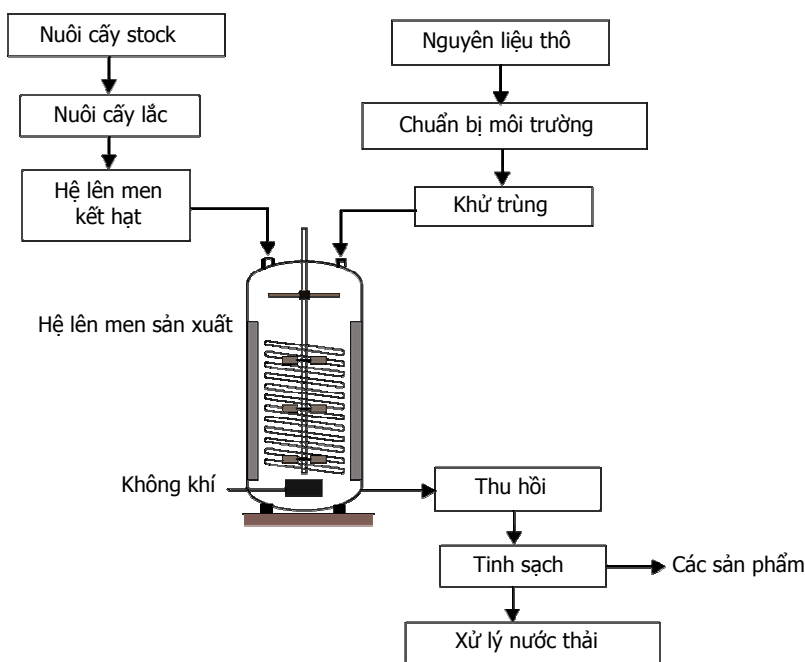
Khi tiến hành một quá trình sinh học (bioprocessing) trên quy mô lớn cần lưu ý:

- Phải thu được các chất xúc tác sinh học tốt nhất (vi sinh vật, tế bào động vật, tế bào thực vật, hoặc enzyme) cho một quá trình mong muốn.

- Tạo ra môi trường tốt nhất có thể cho sự xúc tác bằng cách thiết kế các bioreactor/fermenter thích hợp và cho nó hoạt động trong một phương thức tối ưu.

- Phân tách các sản phẩm mong muốn từ hỗn hợp phản ứng trong một phương thức kinh tế nhất.

Các nhiệm vụ đặt ra bao gồm thiết kế và phát triển một quá trình sinh học. Các vấn đề cơ bản được đòi hỏi cho công việc này như sau:



Hình 1.1. Một quá trình sinh học đặc trưng.

1. Chúng ta mong đợi thay đổi cái gì

Để trả lời câu hỏi này, cần phải có những hiểu biết về các khoa học cơ bản của quá trình công nghệ. Đó là vi sinh vật học, hóa sinh học, di truyền học, sinh học phân tử... Chúng ta cần phải tìm hiểu các vấn đề này trong một phạm vi nhất định. Điều quan trọng ở đây là các chất xúc tác sinh học được chọn lọc hoặc sửa đổi di truyền phải thích hợp cho các hoạt động sản xuất ở quy mô lớn.

2. Quá trình sinh học xảy ra với một tốc độ như thế nào

Nếu một quá trình nhất định có thể sản xuất một sản phẩm, thì điều quan trọng cần biết là quá trình đó sẽ xảy ra với tốc độ như thế nào. Động học của quá trình sẽ chi phối các tốc độ phản ứng dưới ảnh hưởng của các điều kiện vật lý và hóa học nhất định. Chúng ta cần nắm vững hóa động học (chemical kinetics) để thiết kế nồi phản ứng (reactor) thích hợp. Các kỹ thuật tương tự được ứng dụng để giải quyết động học enzyme (enzyme kinetics) hoặc động học tế bào (cell kinetics). Để thiết kế một hệ lên men hiệu quả cho các chất xúc tác sinh học hoạt động, điều quan trọng cần biết là tốc độ phản ứng bị ảnh hưởng như thế nào bởi các điều kiện hoạt động không giống nhau. Điều này bao gồm cả nghiên cứu về nhiệt động học (thermodynamics), các hiện tượng vận chuyển, các tương tác sinh học, khả năng ổn định của các dòng tế bào vi sinh vật (hoặc tế bào động vật và thực vật) dùng làm nguyên liệu sản xuất...

3. Hệ thống được hoạt động và điều chỉnh như thế nào để đạt được hiệu suất tối đa

Để sự hoạt động và điều chỉnh hệ thống được tối ưu, chúng ta cần phải phát triển các bộ cảm biến trực tuyến (on-line sensor) chính xác. Thuật toán tối ưu trực tuyến cần được xây dựng và tối ưu hóa để tăng cường khả năng hoạt động của các quá trình sinh học và đảm bảo rằng những quá trình này được hoạt động một cách kinh tế nhất.

4. Các sản phẩm được phân tách như thế nào để có được sự tinh sạch cực đại và giá thành tối thiểu

Đối với bước này, quá trình bio-downstream (phân tách sinh học), chúng ta có thể sử dụng các kỹ thuật phân tách khác nhau được phát triển trong các quá trình hóa học như chưng cất, hấp thụ, tách chiết, hấp phụ, sấy khô, lọc, kết tủa và ngâm chiết. Hơn nữa, song song với các kỹ thuật phân tách tiêu chuẩn này, chúng ta cần thiết phát triển các kỹ thuật mới thích hợp để phân tách các nguyên liệu sinh học. Nhiều kỹ thuật đã được phát triển để phân tách hoặc phân tích các nguyên liệu sinh học ở quy mô phòng thí nghiệm, như là sắc ký (chromatography), điện di (electrophoresis) và thẩm tách (dialysis). Các kỹ thuật này cần được nghiên cứu thêm sao cho chúng có thể hoạt động hiệu quả trên quy mô công nghiệp.

III. Quá trình sinh học

Các ứng dụng công nghiệp của các quá trình sinh học là sử dụng các tế bào sống hoặc thành phần của chúng để thực hiện những thay đổi vật lý và hóa học. So với các quá trình hóa học truyền thống, các quá trình sinh học có những ưu điểm và nhược điểm như sau:

1. Các ưu điểm

- **Điều kiện phản ứng nhẹ nhàng.** Điều kiện phản ứng cho các quá trình sinh học là nhẹ nhàng-ôn hòa. Đặc trưng là nhiệt độ phòng, áp suất khí quyển và pH môi trường khá trung tính. Kết quả, sự hoạt động ít nguy hiểm và điều kiện sản xuất ít phức tạp hơn so với các quá trình hóa học đặc biệt.

- **Tính đặc hiệu.** Một chất xúc tác enzyme có tính đặc hiệu cao và xúc tác chỉ một hoặc một số ít các phản ứng hóa học. Sự đa dạng của các enzyme hiện có có thể xúc tác cho một phạm vi rất rộng các phản ứng khác nhau.

- **Tính hiệu lực.** Tốc độ của một phản ứng được xúc tác bằng enzyme thường nhanh hơn nhiều so với khi phản ứng này thực hiện nhờ các chất xúc tác không phải sinh học. Chỉ một lượng nhỏ enzyme được yêu cầu cũng đủ để sản xuất một hiệu quả mong muốn.

- **Các tài nguyên có thể đổi mới.** Nguyên liệu thô chủ yếu của các quá trình sinh học là sinh khối (biomass) cung cấp cả bộ khung carbon lẫn năng lượng cần cho sự tổng hợp các hóa chất hữu cơ.

- **Công nghệ DNA tái tổ hợp.** Là những kỹ thuật sửa đổi hệ thống di truyền nhằm nâng cao năng suất sinh học. Sự phát triển của những kỹ thuật này hứa hẹn các khả năng khổng lồ để cải thiện các quá trình sinh học.

2. Các nhược điểm

- **Các hỗn hợp sản phẩm phức tạp.** Trong các trường hợp nuôi cấy tế bào (vi sinh vật, thực vật hoặc động vật). Các phản ứng đa enzyme xảy ra trong một chuỗi tuần tự hoặc song song, hỗn hợp sản phẩm cuối cùng chứa khối lượng tế bào, nhiều sản phẩm trao đổi chất phụ, và một phần còn lại của các chất dinh dưỡng ban đầu. Khối lượng tế bào cũng chứa các thành phần khác nhau của tế bào.

- **Các môi trường nước loãng.** Các thành phần có giá trị thương mại chỉ được sản xuất với một lượng nhỏ trong môi trường nước nên sự phân

tách chúng là rất đắt tiền. Bởi vì các sản phẩm của các quá trình sinh học thường mẫn cảm với nhiệt, do đó các kỹ thuật phân tách truyền thống không thể sử dụng mà phải phát triển các kỹ thuật phân tách mới cho các mục đích sản xuất trên quy mô lớn.

- **Sự nhiễm bẩn.** Hệ thống lên men có thể dễ dàng bị nhiễm bẩn, do nhiều vi khuẩn và nấm mốc có thể sinh trưởng rất mạnh trong hầu hết các môi trường nuôi cấy. Vấn đề trở nên khó khăn hơn khi nuôi cấy tế bào động vật và thực vật bởi vì chúng cần một thời gian sinh trưởng dài ngày và tốc độ sinh trưởng của chúng chậm hơn rất nhiều so với tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn và nấm mốc trong môi trường nhiễm bẩn.

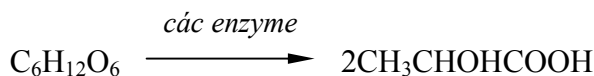
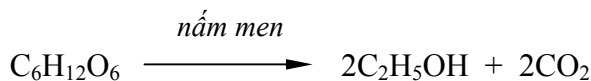
- **Khuynh hướng hay biến đổi.** Các tế bào có khuynh hướng đột biến do sự thay đổi môi trường và có thể mất đi một vài đặc điểm gây thiệt hại cho sự thành công của quá trình sản xuất. Các enzyme tương đối mẫn cảm hoặc là các phân tử không ổn định và đòi hỏi sự cẩn thận trong khi sử dụng chúng.

IV. Định nghĩa sự lên men

Thông thường, sự lên men (fermentation) được định nghĩa là quá trình sản xuất ethanol hoặc lactic acid từ glucose ($C_6H_{12}O_6$).

- **Quá trình sản xuất ethanol.** Là quá trình mà một số nấm men phân giải các loại đường trong môi trường yếm khí để sản xuất rượu ethanol.

- **Quá trình sản xuất lactic acid.** Là quá trình mà một số enzyme như lactodehydrogenase phân giải các chất trung gian như NADH (trong đường phân yếm khí) thành lactic acid chứ không thành ethanol. Lên men lactic được dùng trong công nghệ chế biến sữa để làm phomat và sữa chua.



Tuy nhiên, ngày nay người ta đã mở rộng định nghĩa cho khái niệm này như sau: “Lên men là quá trình sử dụng các enzyme biến đổi những hợp chất hữu cơ” theo *Webster’s New College Dictionary* (A Merriam-Webster

1977) và đây là định nghĩa mà chúng tôi sử dụng trong giáo trình này dùng để mô tả các quá trình nuôi cấy các tế bào vi sinh vật, động vật và thực vật trong các hệ lên men hay các nôi phản ứng sinh học.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

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

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

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

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

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

Chương 2

Sinh trưởng và bất động của tế bào

I. Xác định sinh trưởng của tế bào

Trong các hệ thống sinh học, mọi sự sinh trưởng đều có thể được định nghĩa là sự tăng tuân tự của các thành phần hóa học. Tăng đơn thuần khối lượng không thể phản ánh đầy đủ sự sinh trưởng, do tế bào có thể chỉ tăng hàm lượng các sản phẩm dự trữ của chúng như là glycogen, poly- β -hydroxybutyrate. Sự sinh trưởng cân bằng (balanced growth) được định nghĩa là sự sinh trưởng mà trong suốt quá trình đó sự nhân đôi sinh khối xảy ra cùng với sự nhân đôi của tất cả các đặc tính xác định khác của quần thể như là protein, DNA, RNA và nước nội bào. Mặt khác, quá trình nuôi cấy trải qua sự sinh trưởng cân bằng duy trì một thành phần hóa học không đổi. Trong một môi trường dinh dưỡng thích hợp mà sau đó tế bào sẽ trở nên thích nghi thì nó sẽ ở trong trạng thái sinh trưởng cân bằng.

Tiếp theo quá trình sinh trưởng, cần phải xác định số lượng tế bào. Sự sinh trưởng của tế bào có thể được xác định bằng số lượng tế bào, sinh khối tế bào hoặc hoạt tính tế bào.

1. Xác định số lượng tế bào

1.1. Đếm bằng kính hiển vi

Số lượng tế bào trong quần lạc có thể được đếm dưới kính hiển vi bằng cách đếm các tế bào được đưa vào trong một buồng đếm đặc biệt. Có hai loại buồng đếm được dùng để đếm số lượng tế bào trong một mẫu dịch lỏng:

- *Haemocytomete*. Buồng đếm tế bào máu dùng cho những tế bào có đường kính $\geq 3 \mu\text{m}$ (Hình 2.1).

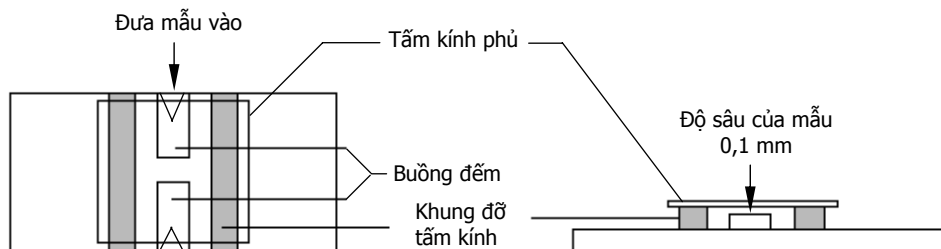
- *Petroff-Hausser counting chamber*. Buồng đếm Petroff-Hausser được dùng chủ yếu cho vi khuẩn.

Cả hai loại buồng đếm có các đường kẻ ô vuông đặc trưng trên bề mặt của tấm kính (lam kính). Khung đỡ trên mỗi mặt của tấm đếm (grid) giữ một tấm kính phủ (cover glass) cách tấm đếm một khoảng cách đã biết (ví dụ: 0,1 mm) sao cho thể tích của ô vuông được biết chính xác. Một mẫu dịch huyền phù tế bào cần đếm được cho chảy qua dưới tấm phủ và làm

đầy buồng đếm. Sau đó, đếm số lượng tế bào trên một đơn vị diện tích của đường kẻ dưới kính hiển vi. Các dịch huyền phù đậm đặc cũng có thể đếm được nếu chúng được pha loãng thích hợp.

Một số ưu điểm của phương pháp đếm trực tiếp:

- Chỉ cần các thiết bị tối thiểu.
- Các kết quả thu được nhanh.
- Có thể quan sát các đặc điểm hình thái của cơ thể.



Hình 2.1. Buồng đếm haemocytometer.

Một số nhược điểm của phương pháp đếm trực tiếp:

- Thường rất khó phân biệt các tế bào chết và tế bào sống.
- Không thích hợp cho các dịch huyền phù có mật độ thấp.
- Các tế bào có kích thước nhỏ thường khó quan sát dưới kính hiển vi và có thể không thấy khi đếm.
- Phương pháp đếm thực tế gây mỏi mệt và nhầm lẫn trong quá trình đếm.
- Không thích hợp đối với các tế bào xếp thành cụm như là mycelium (thể sợi nấm).

1.2. Đếm các tế bào phát triển trên đĩa nuôi cấy (petri dish)

Các tế bào phát triển được định nghĩa là tế bào có thể phân chia và tạo ra khuẩn lạc. Có hai cách để thực hiện phương pháp đếm trên đĩa petri: phương pháp đĩa trải (spread plate) và phương pháp đĩa rót (pour plate).

Với phương pháp đĩa trải, một thể tích nhỏ hơn 100 μL được trải khắp bề mặt agar. Với phương pháp đĩa rót, mẫu vật được trộn với agar nóng

chảy (đã để nguội đến khoảng 60°C) và được rót trên đĩa vô trùng. Các đĩa sau đó được nuôi cho đến khi xuất hiện khuẩn lạc, và số lượng khuẩn lạc được đếm trực tiếp. Điều quan trọng là số lượng các khuẩn lạc phát triển trên đĩa phải không quá lớn hoặc không quá nhỏ. Để thu được một số lượng tế bào thích hợp trên một đơn vị diện tích thì mẫu vật phải được pha loãng. Trường hợp cần pha loãng nhiều, người ta thường sử dụng kỹ thuật pha loãng tuần tự (serial dilution). Ví dụ: để thực hiện pha loãng $1/10^6$, thì có thể thực hiện ba lần pha loãng liên tiếp $1/100$ hoặc sáu lần pha loãng liên tiếp $1/10$.

1.3. Đếm bằng máy đếm

Để tránh sự đơn điệu khi đếm trực tiếp bằng kính hiển vi, có thể sử dụng phương pháp đếm bằng máy đếm. Kỹ thuật này cho phép không chỉ đếm được số lượng tế bào, mà còn đo cả kích thước tế bào. Nhược điểm của phương pháp này là nó không thể phân biệt giữa tế bào và các phần tử bản khác. Kỹ thuật này cũng khó sử dụng với các cơ thể dạng chuỗi và không đem lại kết quả tốt với các cơ thể dạng hệ sợi (ví dụ như nấm).

2. Xác định sinh khối tế bào

2.1. Trọng lượng khô của tế bào

Trọng lượng khô tế bào có thể được xác định trực tiếp bằng cách lấy một lượng tối thiểu của dịch huyền phù tế bào để ly tâm. Sau khi đổ thể nổi, tế bào được rửa bằng nước cất để loại bỏ tất cả các chất hòa tan. Dịch huyền phù được ly tâm một lần nữa và các tế bào sau khi kết đặc lại được sấy khô trong tủ sấy và cân để xác định trọng lượng. Đây là phương thức trực tiếp nhất để xác định số lượng sinh khối tế bào. Tuy nhiên, cách xác định như thế tốn nhiều thời gian và dễ bỏ qua những thay đổi nhỏ của sinh khối tế bào. Kỹ thuật này chỉ có thể sử dụng đối với những dịch huyền phù dày đặc và tế bào phải được rửa sạch hoàn toàn khỏi những chất ngoại sinh bám vào.

2.2. Độ đục của dịch huyền phù tế bào

Sinh khối tế bào cũng có thể được xác định bằng phương pháp quang học thông qua xác định lượng ánh sáng bị tán xạ bởi dịch huyền phù tế bào. Kỹ thuật này dựa trên cơ sở lập luận rằng các phần tử nhỏ tán xạ ánh sáng một cách tương xứng, trong các giới hạn nhất định, tới nồng độ của chúng. Khi tia sáng xuyên qua dịch huyền phù của tế bào, thì lượng ánh sáng truyền

qua bị giảm đi do kết quả của sự tán xạ, như vậy đó chính là phương pháp xác định mật độ tế bào.

Việc đo độ đục của dịch huyền phù tế bào thường được thực hiện trên máy quang phổ để đọc các đơn vị hấp thụ (A). Khả năng hấp thụ (absorbency) được định nghĩa là số logarithm của tỷ lệ giữa cường độ ánh sáng va chạm vào dịch huyền phù tế bào (I_0) và cường độ ánh sáng được truyền qua bởi dịch huyền phù (I):

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Đường cong chuẩn (standard curve) có thể thu được bằng cách đo độ hấp thụ (A) của mẫu với nồng độ tế bào đã biết trước. Việc đo thường được thực hiện ở bước sóng từ 600-700 nm.

3. Các phương pháp gián tiếp

Phương pháp gián tiếp để xác định sinh khối tế bào dựa trên phép tính hệ số tỷ lượng toàn phần (overall stoichiometry) cho sự sinh trưởng và tạo thành sản phẩm, có thể được trình bày trong một dạng chung như sau:

nguồn carbon + nguồn nitrogen + phosphate + $O_2 \rightarrow$

sinh khối tế bào + CO_2 + H_2O + sản phẩm + nhiệt

Sự thay đổi sinh khối tế bào có thể được kiểm soát gián tiếp bằng cách xác định sự tiêu thụ chất dinh dưỡng, tạo thành sản phẩm, các thành phần tế bào, giải phóng nhiệt hoặc các tính chất vật lý khác của dịch nuôi cấy tế bào.

3.1. Sự tiêu thụ chất dinh dưỡng

Cần chọn một chất dinh dưỡng mà chất này không bao giờ được sử dụng để tổng hợp sản phẩm trao đổi chất. Phosphate, sulfate hoặc magnesium có thể là những chọn lựa tốt. Khi sinh khối tế bào là sản phẩm chính, thì nồng độ của nguồn carbon còn lại trong môi trường có thể được đo để đánh giá sinh khối tế bào.

3.2. Tạo thành các sản phẩm

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

3.3. Các thành phần tế bào

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

3.4. Giải phóng nhiệt

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

3.5. Độ nhớt

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

II. Bất động tế bào

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

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

1. Gắn lên bề mặt

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

2. Tạo thể xốp

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

Bảng 2.1. Các phương pháp bất động tế bào.

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

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

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

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

¹ Collagen: chất tạo keo.

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

³ Emulsion: dạng nhũ tương.

⁴ Polyelectrolytes: các chất đa điện phân.

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

3. Sử dụng bao vi thể

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

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

4. Tự kết khối

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

III. Một số thí nghiệm điển hình

1. Đường cong sinh trưởng của nấm men

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

1.1. Nguyên liệu

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

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

- Hai bình tam giác 125 mL

- Pipette vô trùng

- Đèn Bunsen

- Nồi khử trùng

- Tủ ấm

- Hemocytometer

- Ly tâm

- Cân hóa chất

- Máy quang phổ

1.2. Phương thức tiến hành

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

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

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

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

2. Đường cong sinh trưởng của thực vật

2.1. Nguyên liệu

- Một dòng tế bào dịch huyền phù của thực vật sinh trưởng tốt. Phương thức sau đây dựa trên cơ sở nuôi cấy tế bào thuốc lá. Nếu chọn dòng tế bào khác thì cần thay đổi môi trường.

- Hỗn hợp muối khoáng của Murashige-Skoog (1962) (Bảng 7.2), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), KH_2PO_4 , inositol, thiamine.HCl, và sucrose để pha chế môi trường.

- Hai bình tam giác 125 mL
- Pipette loại miệng rộng vô trùng (10 mL)
- Tủ nuôi tế bào thực vật kèm máy lắc
- Cân hóa chất
- Ly tâm
- Eppendorf tube

2.2. Phương thức tiến hành

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

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

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

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

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

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

3. Bất động tế bào thực vật

3.1. Nguyên liệu

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

- Alginate

- CaCl₂

- Bơm nhu động

- Nồi áp suất

- Cân hóa chất

3.2. Phương thức tiến hành

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

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

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

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

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

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

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

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

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

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

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

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

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

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

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

Chương 3

Động học sinh trưởng của tế bào

I. Mở đầu

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

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

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

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

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

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

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

II. Định nghĩa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dường như dC_X/dt và r_X luôn luôn giống nhau, nhưng thực ra không phải như vậy. Giá trị dC_X/dt là sự thay đổi nồng độ tế bào trong hệ lên men, là yếu tố có thể bao gồm hiệu quả của tốc độ dòng chảy đi vào và đi ra, sự tái sinh tế bào, và các điều kiện hoạt động khác của hệ lên men. Trong khi đó r_X là tốc độ sinh trưởng thực tế của tế bào. Hai giá trị này chỉ giống nhau trong trường hợp hoạt động lên men mẻ.

Tốc độ sinh trưởng dựa trên số lượng tế bào và tốc độ sinh trưởng dựa trên trọng lượng tế bào không nhất thiết phải giống nhau, bởi vì kích thước trung bình của các tế bào có thể rất khác nhau khi chuyển từ pha sinh trưởng này đến pha sinh trưởng khác. Khi sinh khối của một tế bào riêng biệt tăng lên mà không có sự phân chia, thì tốc độ sinh trưởng dựa trên trọng lượng tế bào cũng tăng lên, trong khi tốc độ sinh trưởng dựa trên số lượng tế bào lại giữ nguyên. Tuy nhiên, trong suốt thời gian sinh trưởng theo hàm mũ, pha sinh trưởng mà chúng ta quan tâm nhất dưới quan điểm của công nghệ, thì tốc độ sinh trưởng dựa trên số lượng tế bào và tốc độ sinh trưởng dựa trên trọng lượng tế bào có thể được giả định là tương đương nhau.

Trong một số trường hợp tốc độ sinh trưởng bị nhầm lẫn với tốc độ phân chia, là khái niệm được định nghĩa như là tốc độ phân chia tế bào trên một đơn vị thời gian. Nếu tất cả tế bào trong bình nuôi cấy ở thời điểm $t = 0$ ($C_N = C_{N_0}$) phân chia chỉ sau một thời gian nhất định, thì quần thể tế bào sẽ tăng lên $C_{N_0} \times 2$ lần. Nếu các tế bào được phân chia n lần sau thời gian t , thì số lượng tổng số của tế bào sẽ là:

$$C_N = C_{N_0} \times 2^n \quad (3.1)$$

Và tốc độ phân chia trung bình là:

$$\bar{\delta} = \frac{n}{t} \quad (3.2)$$

Vì $n = \log_2 C_N - \log_2 C_{N_0}$ theo phương trình 3.1, nên tốc độ phân chia trung bình sẽ là:

$$\bar{\delta} = \frac{1}{t} (\log_2 C_N - \log_2 C_{N_0}) \quad (3.3)$$

Và tốc độ phân chia ở thời gian t là:

$$\delta = \frac{d \log_2 C_N}{dt} \quad (3.4)$$

Vì thế, tốc độ sinh trưởng (được định nghĩa là sự thay đổi số lượng tế bào theo thời gian) chính là độ dốc của đường cong C_N theo t . Trong khi đó, tốc độ phân chia là độ dốc của đường cong $\log_2 C_N$ theo t . Như đã giải thích, tốc độ phân chia là hằng số trong suốt thời gian sinh trưởng theo hàm mũ, trong khi đó tốc độ sinh trưởng lại không như vậy. Vì thế, hai khái niệm này không được nhầm lẫn với nhau.

III. Chu kỳ sinh trưởng của nuôi cấy mẻ

Nếu nuôi cấy các vi sinh vật đơn bào trong môi trường vô trùng sạch và đo mật độ số lượng tế bào theo thời gian thì trên đồ thị của nó ta có thể thấy có sáu pha sinh trưởng và chết của tế bào (Hình 3.1), đó là:

- **Pha lag.** Là thời gian khi sự thay đổi số lượng tế bào bằng không.

- **Pha sinh trưởng nhanh.** Số lượng tế bào bắt đầu tăng và tốc độ phân chia đạt đến cực đại.

- **Pha sinh trưởng theo hàm mũ.** Số lượng tế bào tăng theo hàm mũ khi tế bào bắt đầu phân chia, tốc độ sinh trưởng tăng lên trong suốt pha này, nhưng tốc độ phân chia tỷ lệ với $d \ln C_N / dt$, là hằng số ở giá trị cực đại của nó, như được minh họa ở hình 3.1.

- **Pha sinh trưởng chậm.** Khi tốc độ sinh trưởng đạt đến cực đại, thì giai đoạn tiếp theo là pha sinh trưởng chậm trong đó cả hai tốc độ sinh trưởng và tốc độ phân chia đều giảm.

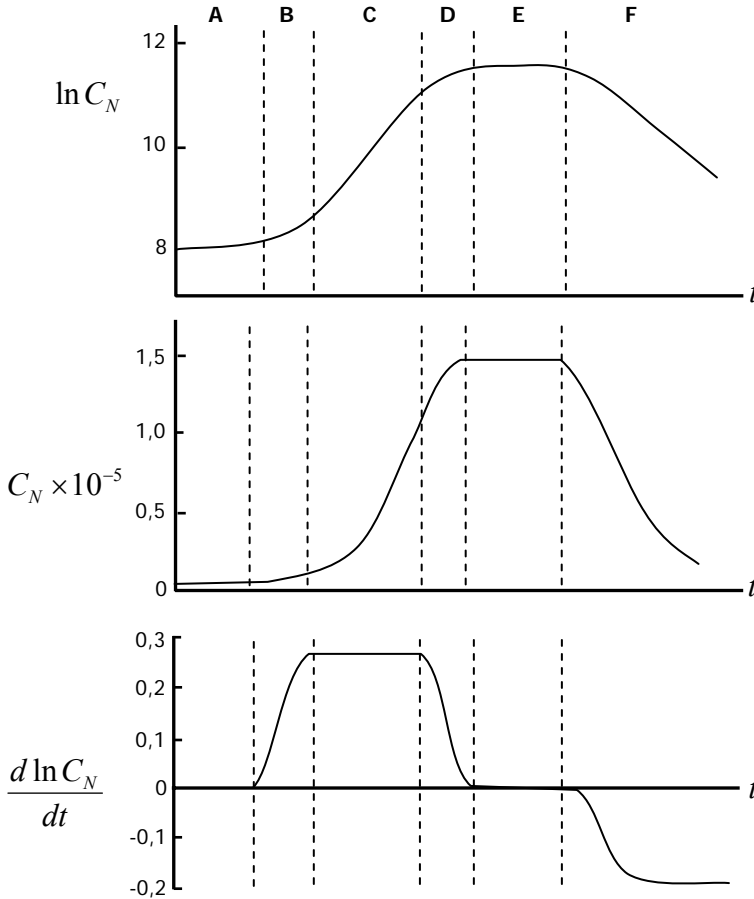
- **Pha tĩnh.** Quần thể tế bào đạt đến giá trị cực đại và sẽ không tăng thêm nữa.

- **Pha chết.** Sau khi các chất dinh dưỡng của tế bào cạn kiệt, tế bào sẽ bắt đầu chết và số lượng tế bào sống sót sẽ giảm.

1. Pha lag

Pha lag (hoặc pha tĩnh khởi đầu hoặc tiềm tàng) là thời kỳ khởi đầu của quá trình nuôi cấy, trong suốt thời kỳ này sự thay đổi số lượng tế bào là bằng không hoặc không đáng kể. Mặc dù số lượng tế bào không tăng lên,

nhưng tế bào có thể sinh trưởng bằng cách tăng kích thước trong suốt thời kỳ này.



Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng đặc trưng của các cơ thể đơn bào. (A) pha lag, (B) pha sinh trưởng nhanh, (C) pha sinh trưởng theo hàm mũ, (D) pha sinh trưởng chậm, (E) pha tĩnh, (F) pha chết.

Độ dài của pha lag tùy thuộc vào nhiều nhân tố, chẳng hạn như loại và tuổi của cơ thể vi sinh vật (hoặc tế bào động-thực vật), và các điều kiện nuôi cấy. Pha lag thường xuất hiện do tế bào phải điều chỉnh với môi trường mới trước khi sự sinh trưởng có thể bắt đầu. Nếu vi sinh vật được cấy từ môi trường có nồng độ chất dinh dưỡng thấp vào môi trường có nồng độ chất

dinh dưỡng cao, thì pha lag thường kéo dài. Nếu nó được chuyển từ nơi có nồng độ cao đến nơi có nồng độ thấp thì thường không xuất hiện pha lag.

Một nhân tố quan trọng khác ảnh hưởng đến độ dài của pha lag là lượng mẫu được đưa vào nuôi cấy (inoculum size). Nếu một lượng nhỏ tế bào được đưa vào một thể tích lớn thì chúng sẽ có một pha lag dài. Ở trường hợp nuôi cấy tế bào trên quy mô lớn, thì thời gian của pha lag càng ngắn càng tốt. Vì thế, để đưa mẫu vào (còn gọi là tiếp mẫu) quy trình lên men công nghiệp, chúng ta cần phải có một dãy các nồi lên men có lượng mẫu lớn dần để giảm thiểu ảnh hưởng của pha lag.

Vào giai đoạn kết thúc pha lag, khi sự sinh trưởng của tế bào bắt đầu, thì tốc độ phân chia tế bào tăng lên từ từ và đạt đến giá trị cực đại ở thời kỳ sinh trưởng theo hàm mũ, như trình bày bằng sự tăng lên ở góc uốn cong B trong hình 3.1. Thời kỳ chuyển tiếp này được gọi chung là pha sinh trưởng nhanh và thường được xem như là một phần của pha lag.

2. Pha sinh trưởng theo hàm mũ (pha logarithm)

Ở các cơ thể đơn bào, sự nhân đôi tăng dần của số lượng tế bào cho kết quả tốc độ sinh trưởng tăng lên liên tục trong quần thể. Nuôi cấy vi khuẩn trải qua sự sinh trưởng cân bằng kiểu như phản ứng hóa học bậc một tự xúc tác. Vì thế, tốc độ tăng trưởng của quần thể tế bào ở mọi thời điểm tỷ lệ với mật độ số lượng (C_N) của tế bào hiện diện tại thời điểm đó.

$$r_N = \frac{dC_N}{dt} = \mu C_N \quad (3.5)$$

Trong đó: hằng số μ được biết như là tốc độ sinh trưởng đặc trưng (giờ^{-1}). Không nên nhầm lẫn tốc độ sinh trưởng đặc trưng với tốc độ sinh trưởng (có các đơn vị và ý nghĩa khác hẳn). Tốc độ sinh trưởng là sự thay đổi của mật độ số lượng tế bào theo thời gian, trong khi đó tốc độ sinh trưởng đặc trưng là:

$$\mu = \frac{1}{C_N} \times \frac{dC_N}{dt} = \frac{d \ln C_N}{dt} \quad (3.6)$$

Đó là sự thay đổi theo logarithm tự nhiên của mật độ số lượng tế bào theo thời gian. So sánh phương trình (3.4) và (3.6) cho thấy:

$$\mu = \frac{d \ln C_N}{dt} = \ln 2 \left(\frac{d \log_2 C_N}{dt} \right) = \delta \ln 2 \quad (3.7)$$

Vì vậy, tốc độ sinh trưởng đặc trưng μ bằng $\ln 2$ lần tốc độ phân chia δ .

Nếu μ là hằng số theo thời gian trong suốt thời kỳ sinh trưởng theo pha hàm mũ, thì phương trình (3.5) có thể được lấy tích phân từ t_0 tới t khi đó:

$$\int_{C_{N_0}}^{C_N} \frac{dC_N}{C_N} = \int_{t_0}^t \mu dt \quad (3.8)$$

Hay:

$$C_N = C_{N_0} \exp[\mu(t - t_0)] \quad (3.9)$$

Trong đó: C_{N_0} là mật độ số lượng tế bào ở t_0 khi sự sinh trưởng hàm mũ bắt đầu. Phương trình (3.9) cho thấy sự tăng lên của số lượng tế bào theo hàm mũ đối với thời gian.

Thời gian cần thiết để gấp đôi quần thể, được gọi là thời gian nhân đôi (t_d), có thể ước lượng từ phương trình (3.9), bằng cách đặt $C_N = 2C_{N_0}$ và $t_0 = 0$, giải theo t ta có:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{1}{\delta} \quad (3.10)$$

Thời gian nhân đôi tỷ lệ nghịch với tốc độ sinh trưởng đặc trưng và bằng số nghịch đảo của tốc độ phân chia.

3. Các nhân tố ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng đặc trưng

3.1. Nồng độ cơ chất

Một trong những phương trình được sử dụng rộng rãi nhất thể hiện ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (chất dinh dưỡng) lên μ là phương trình Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S} \quad (3.11)$$

Trong đó: C_S là nồng độ của cơ chất giới hạn (limiting substrate) trong môi trường và K_S là hệ số hệ thống. Mỗi quan hệ này được trình bày bằng đồ thị trong hình 3.2. Giá trị của K_S tương đương với nồng độ của chất dinh dưỡng khi tốc độ sinh trưởng đặc trưng bằng một nửa giá trị cực đại của nó (μ_{\max}).

Theo phương trình Monod, sự tăng lên về sau của nồng độ chất dinh dưỡng khi μ đạt đến μ_{\max} đã không ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng đặc trưng, như đã trình bày ở hình 3.2. Tuy nhiên, tốc độ sinh trưởng đặc trưng sẽ giảm xuống khi nồng độ chất dinh dưỡng tăng lên vượt quá một mức độ nhất định.

3.2. Nồng độ sản phẩm

Khi các tế bào sinh trưởng, chúng sẽ sản xuất ra các sản phẩm trao đổi chất và có thể tích lũy trong môi trường. Sinh trưởng của các vi sinh vật thường bị ức chế bởi các sản phẩm này, ảnh hưởng của các sản phẩm này có thể được bổ sung vào phương trình Monod như sau:

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \times \left(\frac{K_P}{K_P + C_P} \right) \quad (3.12)$$

hoặc:

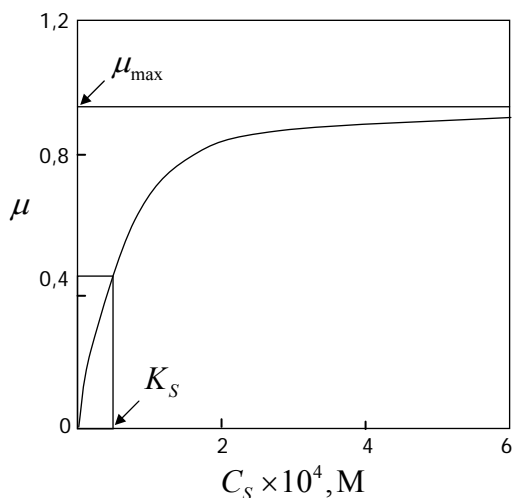
$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \times \left(1 - \frac{C_P}{C_{Pm}} \right)^n \quad (3.13)$$

Trong đó: K_P là hệ số nồng độ sản phẩm và C_P là nồng độ sản phẩm.

Cả hai phương trình trên đã mô tả sự ức chế sản phẩm khá tốt. C_{Pm} được ký hiệu là nồng độ cực đại của sản phẩm, là yếu tố làm cho các tế bào không thể sinh trưởng do sự ức chế sản phẩm.

3.3. Các điều kiện khác

Tốc độ sinh trưởng đặc trưng của các tế bào cũng bị ảnh hưởng bởi pH môi trường, nhiệt độ và sự cung cấp oxygen. Nhiệt độ và pH tối ưu của các loại tế bào khác nhau (động-thực vật và vi sinh vật) là cũng khác nhau.



Hình 3.2. Sự phụ thuộc của tốc độ sinh trưởng đặc trưng vào nồng độ của chất dinh dưỡng giới hạn sinh trưởng. $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,22 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

4. Pha tĩnh và pha chết

Sinh trưởng của quần thể tế bào thường bị hạn chế hoặc do sử dụng hết toàn bộ các chất dinh dưỡng có sẵn hoặc do sự tích lũy các sản phẩm độc của sự trao đổi chất. Kết quả là tốc độ sinh trưởng giảm và sự sinh trưởng cuối cùng đã dừng lại. Ở thời điểm này nuôi cấy được gọi là pha tĩnh. Giai đoạn chuyển tiếp giữa pha hàm mũ và pha tĩnh bao gồm một thời kỳ sinh trưởng không cân bằng và trong suốt thời kỳ này các thành phần khác nhau của tế bào được tổng hợp ở các tốc độ không bằng nhau. Kết quả là các tế bào trong pha tĩnh có một thành phần hóa học khác với các tế bào trong pha hàm mũ.

Pha tĩnh thường được tiếp theo bởi pha chết mà trong đó các cơ thể trong quần thể bị chết. Sự chết xuất hiện hoặc do sự suy yếu của việc bảo quản năng lượng của tế bào, hoặc do sự tích lũy các sản phẩm độc tố. Giống như sự sinh trưởng, sự chết là một hàm mũ. Trong một số trường hợp, cơ thể không chỉ chết mà còn phân hủy, một quá trình còn được gọi là sự phân giải.

IV. Các ký hiệu

C nồng độ, khối lượng trên một đơn vị thể tích nuôi cấy, kg/m^3

C_N mật độ số lượng tế bào, số lượng tế bào/ m^3

C_{N_0} mật độ số lượng tế bào tại thời điểm t_0 , số lượng tế bào/ m^3

C_P nồng độ sản phẩm

C_{Pm} nồng độ cực đại của sản phẩm

C_S	nồng độ cơ chất
C_X	nồng độ tế bào, trọng lượng khô tế bào trên thể tích kg/m^3
dC_X/dt	sự thay đổi nồng độ khô của tế bào theo thời gian
dC_N/dt	sự thay đổi mật độ số lượng tế bào theo thời gian
K_P	hệ số nồng độ sản phẩm
K_S	hệ số hệ thống cho động học Monod, kg/m^3
n	số lượng tế bào
r	tốc độ
r_X	tốc độ sinh trưởng của tế bào trên cơ sở trọng lượng khô
r_N	tốc độ sinh trưởng của tế bào trên cơ sở số lượng
t	thời gian, s
t_d	thời gian nhân đôi, s
δ	tốc độ phân chia của tế bào, s^{-1}
$\bar{\delta}$	tốc độ phân chia tế bào trung bình, s^{-1}
μ	tốc độ sinh trưởng đặc trưng, s^{-1} hoặc $\text{kg/m}^3/\text{s}$
μ_{\max}	tốc độ sinh trưởng cực đại, s^{-1} hoặc $\text{kg/m}^3/\text{s}$
ρ	mật độ tế bào, kg/m^3

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

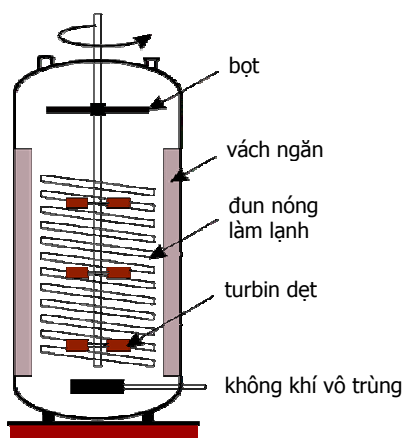
1. **Asenjo JA and Merchuk JC.** 1995. Bioreactor System Design. *Marcel Dekker, Inc.* New York, USA.
2. **Atkinson B and Mavituna F.** 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd ed. *Stockton Press*, New York, USA.
3. **Chia TF.** 2003. Engineering Applications in Biology. Updated 1st ed. *McGraw-Hill Education*, Singapore.
4. **Flickinger MC and Drew SW.** 1999. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. *John Wiley & Sons*, New York, USA.
5. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.
6. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.
7. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* New Jersey, USA.
8. **Vogel HC and Todaro CL.** 1997. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Principles, Process Design, and Equipment). 2nd ed. *Noyes Publications*. New Jersey, USA.

Chương 4

Thiết kế hệ lên men

I. Hệ lên men thùng khuấy

Nồi phản ứng sinh học (bioreactor) hay còn gọi là hệ lên men (fermenter) là loại thiết bị mà trong nó sự biến đổi hóa sinh được tiến hành bởi các tế bào sống hoặc các thành phần tế bào *in vivo* (enzyme). Trong chương này, nồi phản ứng sinh học để nuôi cấy các tế bào sống được gọi là hệ lên men để phân biệt các nồi phản ứng sinh học dùng cho các enzyme. Trong phòng thí nghiệm, các tế bào thường được nuôi cấy trong các bình tam giác trên máy lắc. Lắc nhẹ bình tam giác rất hiệu quả để tạo ra dịch huyền phù tế bào, tăng cường sự oxy hóa thông qua bề mặt chất lỏng và trợ giúp sự chuyển khối (mass transfer) của các chất dinh dưỡng mà không gây nguy hiểm cho cấu trúc tế bào.



Hình 4. 1. Sơ đồ hệ lên men dùng cho sản xuất penicillin.

Đối với hoạt động sản xuất ở quy mô lớn, thì hệ thống lên men thùng khuấy (stirred-tank fermenter, STF) được sử dụng rộng rãi nhất để thiết kế cho quá trình lên men công nghiệp. Nó có thể được dùng cho cả hai trường hợp lên men hiếu khí (aerobic) và yếm khí (anaerobic) trong một phạm vi rộng các loại tế bào khác nhau bao gồm vi sinh vật, động vật và thực vật.

Hình 4.1 giới thiệu sơ đồ hệ lên men dùng trong sản xuất penicillin. Cường độ pha trộn (mixing intensity) có thể rất khác nhau bằng cách chọn loại cánh khuấy (impeller) thích hợp và các tốc độ khuấy khác nhau. Việc sục khí và khuấy cơ học trong hệ lên men rất tốt cho nuôi cấy dịch huyền phù tế bào, sự oxy hóa, sự pha trộn môi trường và truyền nhiệt. STF cũng có thể được dùng cho các môi trường có độ nhớt cao. Nó là một trong những hệ lên men quy mô lớn đầu tiên được phát triển trong công nghiệp dược. Đặc điểm và tiềm năng của STF được nghiên cứu rộng rãi. Do hệ lên men thùng khuấy thường được làm bằng thép không rỉ và hoạt động trong điều kiện ôn hòa nên tuổi thọ của thiết bị rất lâu.

Nhược điểm của hệ lên men thùng khuấy bắt nguồn từ ưu điểm của nó. Bộ phận (cánh) khuấy rất hiệu quả trong việc pha trộn các thành phần của hệ lên men, nhưng lại tiêu thụ một lượng lớn công suất và có thể gây nguy hiểm cho những hệ thống tế bào nuôi cấy miễn cảm với lực trượt (shear force) như tế bào động vật có vú hoặc tế bào thực vật. Lực trượt của chất lỏng trong hỗn hợp được tạo ra bởi gradient tốc độ của các thành phần tốc độ (hướng tâm và tiếp tuyến) của chất lỏng khi rời khỏi vùng cánh khuấy. Khi chất lỏng rời khỏi vùng trung tâm, thì tốc độ của nó ở vị trí trên và dưới cánh khuấy (có khoảng cách bằng chiều rộng cánh khuấy) sẽ giảm khoảng 85% và tạo ra một vùng trượt cao. Khi tỷ lệ chiều rộng cánh khuấy trên đường kính của nó tăng thì profile tốc độ ít có dạng đặc trưng của parabol mà trở nên tù hơn và nó tạo ra lực trượt ít hơn do gradient tốc độ lớn dần lên. Vì thế, bằng cách tăng chiều rộng cánh khuấy, có thể ứng dụng thành công STF trong nuôi cấy tế bào động vật hoặc tế bào thực vật.

Nhiều hệ lên men quy mô phòng thí nghiệm được làm bằng thủy tinh có nắp bằng thép không rỉ. Các thùng lên men lớn hơn được làm bằng thép không rỉ. Tỷ lệ chiều cao trên đường kính của thùng lên men (vessel) hoặc là 2/1 hoặc là 3/1 và thường được khuấy bằng hai hoặc ba turbine khuấy (cánh khuấy). Trục cánh khuấy được gắn trên nắp hoặc từ đáy của thùng bằng giá đỡ. Tỷ lệ đường kính cánh khuấy (D_I) trên đường kính của thùng (D_T) thường là từ 0,3-0,4. Trong trường hợp hệ lên men có hai cánh khuấy, thì khoảng cách giữa cánh khuấy thứ nhất với đáy của vessel và khoảng cách giữa hai cánh khuấy bằng 1,5 đường kính cánh khuấy. Khoảng cách này giảm xuống còn 1,0 so với đường kính cánh khuấy trong trường hợp hệ lên men có ba cánh khuấy. Bốn vách ngăn (baffles) cách đều nhau thường

được thiết kế để ngăn cản sự hình thành dòng xoáy làm giảm hiệu suất pha trộn. Chiều rộng của vách ngăn thường bằng 1/10 đường kính của thùng (tank). Ở trường hợp hệ lên men hiếu khí (aerobic fermenter), thì một bộ phun lỗ đơn (single orifice sparger) hoặc một bộ phun vòng được sử dụng để sục khí cho hệ lên men. Bộ phận phun được đặt ở vị trí giữa cánh khuấy cuối cùng và đáy của vessel. Độ pH trong hệ lên men có thể được duy trì bằng cách dùng dung dịch đệm hoặc bộ điều chỉnh pH (pH controller). Nhiệt độ được điều chỉnh bằng hệ thống gia nhiệt và làm lạnh tự động.

1. Hệ lên men dòng nút (plug-flow fermenter, PFF) hoặc mẻ (batch fermenter)

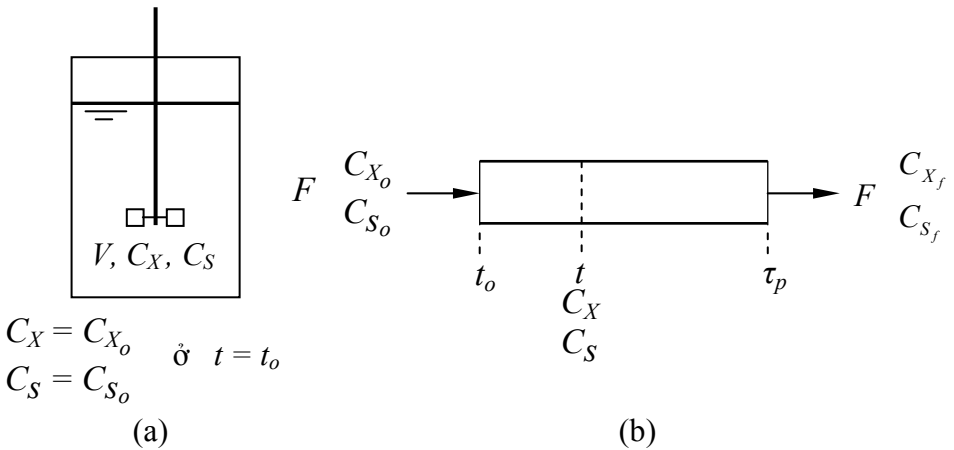
Một hệ lên men khuấy lý tưởng phải có khả năng pha trộn tốt sao cho các thành phần đồng nhất trong một kết cấu ở mọi thời điểm. Một hệ lên men lý tưởng khác là hệ lên men dòng nút, một dạng tương đồng của hệ lên men mẻ.

Trong hệ lên men dòng ống (tubular-flow fermenter), chất dinh dưỡng (cơ chất) và tế bào đi vào một đầu của ống hình trụ và tế bào sẽ sinh trưởng trong khi chúng đi qua ống này. Do ống dài và thiếu bộ phận khuấy nên đã ngăn cản sự pha trộn hoàn toàn của chất lỏng, vì thế tính chất của dòng chảy thay đổi trong hai chiều tiếp tuyến và hướng tâm. Tuy nhiên, sự biến thiên trong chiều hướng tâm nhỏ hơn chiều tiếp tuyến. Một hệ lên men dòng ống mà không có những biến thiên hướng tâm thì được gọi là hệ lên men dòng nút (PFF).

Thực tế, hệ lên men PFF rất khó xây dựng. Cho dù hệ lên men PFF trạng thái ổn định (steady state) được hoạt động trong một kiểu liên tục, thì nồng độ tế bào của hệ lên men mẻ lý tưởng sau thời gian t sẽ giống như nồng độ tế bào của hệ lên men PFF trạng thái ổn định ở vị trí chiều dọc nơi mà thời gian lưu (residence time) τ bằng t (Hình 4.2). Vì thế, sự phân tích sau đây ứng dụng cho cả hai, hệ lên men mẻ lý tưởng và PFF trạng thái ổn định.

Nếu môi trường lỏng được tiếp mẫu bằng nuôi cấy kết hạt (seed culture), thì tế bào sẽ bắt đầu sinh trưởng theo hàm mũ sau pha lag. Trong hệ lên men mẻ, sự thay đổi nồng độ tế bào bằng tốc độ sinh trưởng tế bào:

$$\frac{dC_X}{dt} = r_X = \mu C_X \quad (4.1)$$



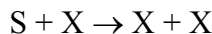
Hình 4.2. Sơ đồ (a) hệ lên men thùng khuấy mẻ và (b) hệ lên men dòng nút.

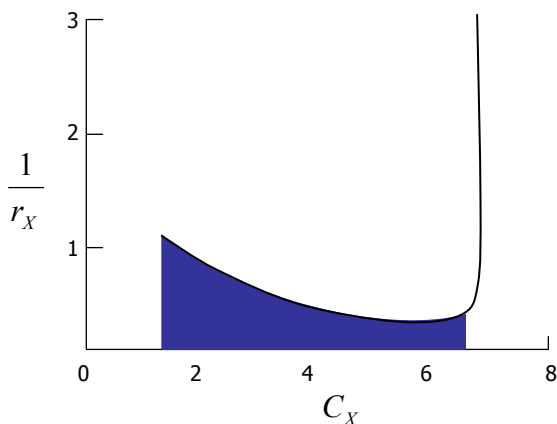
Để thu được phương trình hiệu suất của lên men mẻ, chúng ta cần lấy tích phân phương trình (4.1) sẽ được:

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

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

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





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

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

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

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

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

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

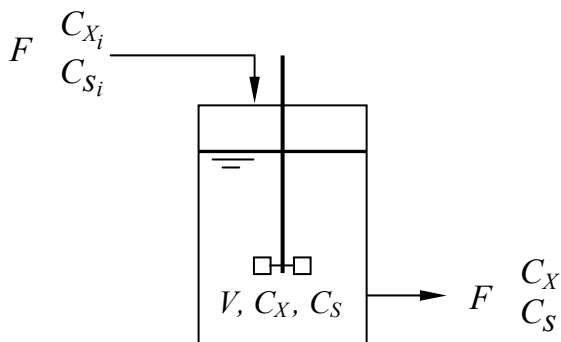
Thay phương trình (4.4) vào phương trình (4.3), tích phân của phương trình tổng hợp này sẽ đưa ra mối quan hệ giữa nồng độ tế bào và thời gian:

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

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

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

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



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

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

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

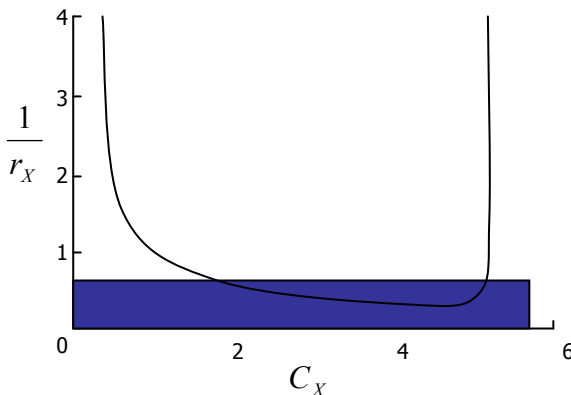
Trong đó: r_X là tốc độ sinh trưởng tế bào trong hệ lên men và dC_X/dt biểu diễn sự thay đổi nồng độ tế bào trong hệ lên men theo thời gian.

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tương tự:

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

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

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

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

3. Ước lượng các thông số động học Monod

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

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

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

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

$$\frac{C_S}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} + \frac{C_S}{\mu_{\max}} \quad (4.15)$$

$$\mu = \mu_{\max} - K_S \frac{\mu}{C_S} \quad (4.16)$$

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

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

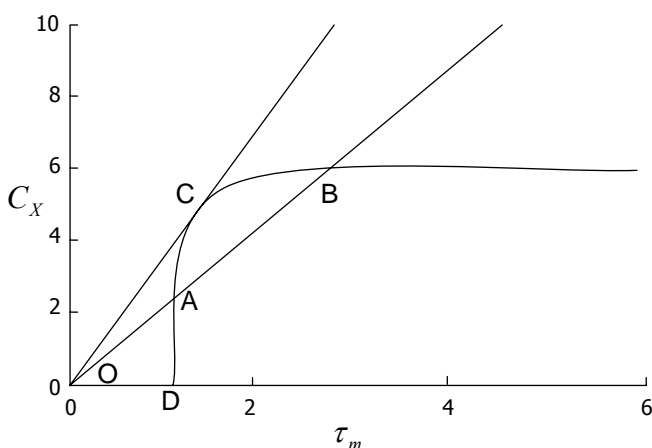
Hơn nữa, do hầu hết các hệ lên men quy mô lớn được tiến hành trong kiểu từng mẻ, cho nên các thông số động học được xác định bởi nghiên cứu chemostat phải dự báo được sự sinh trưởng trong kiểu lên men này. Tuy nhiên, bằng chứng (kiểm tra và xác minh) mô hình động học và ước lượng các thông số động học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

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

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

4. Hiệu suất của CSTF

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

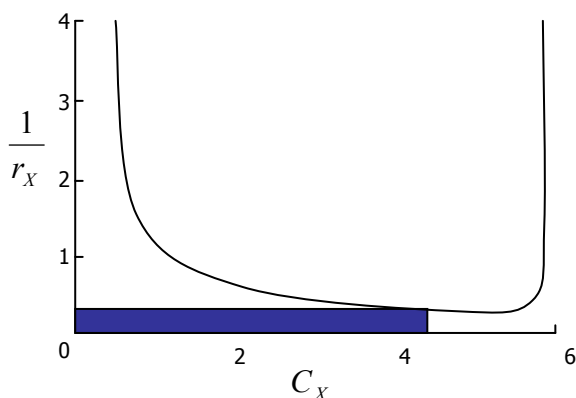


Hình 4.6. Sự thay đổi nồng độ tế bào và cơ chất như là một hàm của thời gian lưu. Hiệu suất bằng độ dốc của đường thẳng \overline{OAB} . Đường cong được vẽ bằng mô hình Monod với $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,71 \text{ g/L}$; $Y_{X/S} = 0,6$; và $C_{S_i} = 10 \text{ g/L}$.

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

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

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



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

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

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

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

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

Trong đó:

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

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

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

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

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

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

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

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

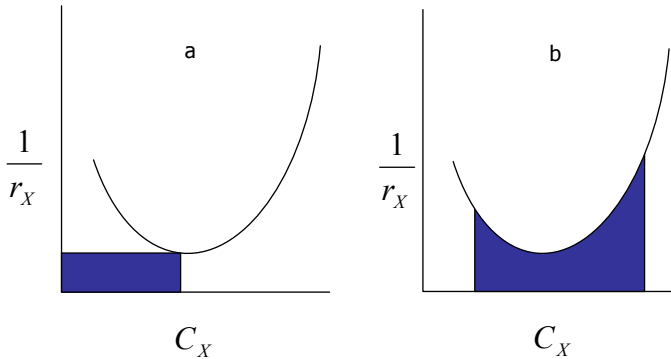
Trong đó: t_0 là thời gian cần thiết để đạt tới pha sinh trưởng theo hàm mũ. Diện tích bên dưới của đường cong $1/r_X$ theo C_X , giữa C_{X_i} và C_X là bằng $\tau_b - t_1$ như đã được trình bày ở hình 4.3.

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

Vì đường cong $1/r_X$ theo C_X có dạng hình chữ U nên chúng ta có thể có một vài nhận xét cho hệ lên men đơn như sau:

- Hầu hết các hệ lên men sản xuất là một CSTF hoạt động với nồng độ tế bào mà ở đó giá trị của $1/r_X$ là tối thiểu (Hình 4.8 a) do nó đòi hỏi thời gian lưu ngắn nhất.

- Nếu nồng độ cuối cùng của tế bào được hướng tới ở trong pha tĩnh, thì hệ lên men mẻ là chọn lựa tốt hơn CSTF, vì thời gian lưu cần thiết cho nuôi cấy mẻ (Hình 4.8 b) là ngắn hơn của CSTF.



Hình 4.8. Minh họa bằng đồ thị thời gian lưu được yêu cầu (vùng tối) cho: (a) CSTF và (b) hệ lên men mẻ.

II. Thu hồi tế bào

Đối với hoạt động liên tục của PFF và CSTF, các tế bào thất thoát cùng với dòng chảy ra (outlet) đã hạn chế hiệu suất của hệ lên men. Vì thế, hiệu suất có thể được cải thiện bằng cách thu hồi (recycling) tế bào từ dòng chảy ra để đưa trở lại hệ lên men.

1. Thu hồi tế bào ở PFF

PFF đòi hỏi sự hiện diện ban đầu của tế bào trong dòng chảy vào (inlet) như là một hệ lên men mẻ đòi hỏi đưa mẫu vào ban đầu. Phương thức kinh tế nhất để cung cấp tế bào trong dòng chảy vào là thu hồi một phần của

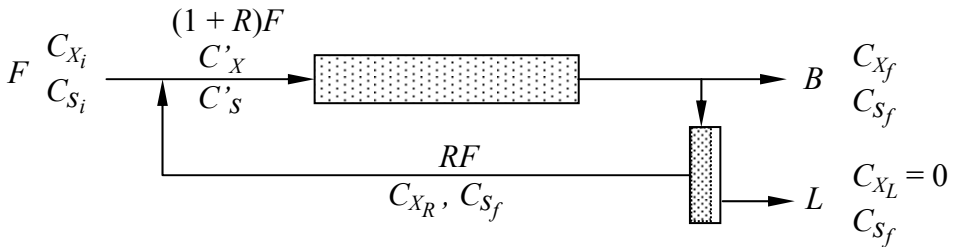
dòng chảy ra đưa trở lại dòng chảy vào với (hoặc không có) thiết bị tách rời tế bào.

Hình 4.9 mô tả sơ đồ thu hồi tế bào ở PFF. Không giống như CSTF, PFF không đòi hỏi thiết bị tách rời tế bào để thu hồi, vì sự hiện diện của nó không làm tăng đáng kể hiệu suất của hệ lên men.

Phương trình hiệu suất của PFF với động học Monod có thể được viết như sau:

$$\frac{V}{(1+R)F} = \frac{\tau_p}{1+R} = \int_{C'_X}^{C_{Xf}} \frac{dC_X}{r_X} = \int_{C'_X}^{C_{Xf}} \frac{(K_S + C_S)dC_X}{\mu_{\max} C_S C_X} \quad (4.23)$$

Trong đó: τ_p là thời gian lưu dựa trên tốc độ dòng chảy của toàn bộ hệ thống. Thời gian lưu thực tế trong hệ lên men lớn hơn τ_p do tốc độ dòng chảy tăng lên nhờ thu hồi tế bào.



Hình 4.9. Sơ đồ thu hồi tế bào ở PFF.

Nếu hiệu suất sinh trưởng là không đổi thì:

$$C_S = C'_S - \frac{1}{Y_{XS}}(C_X - C'_X) \quad (4.24)$$

Thay phương trình (4.24) vào trong phương trình (4.23) cho C_S và lấy tích phân ta sẽ có kết quả sau:

$$\frac{\tau_p \mu_{\max}}{1+R} = \left(\frac{K_S Y_{XS}}{C'_X + C'_S Y_{XS}} + 1 \right) \ln \frac{C_{Xf}}{C'_X} + \frac{K_S Y_{X/S}}{C'_X + C'_S Y_{X/S}} \ln \frac{C'_S}{C_{Sf}} \quad (4.25)$$

Trong đó: C'_X và C'_S có thể được ước lượng từ sự cân bằng tế bào và cơ chất ở điểm phối trộn của dòng chảy vào và dòng chảy thu hồi như sau:

$$C'_X = \frac{C_{X_i} + RC_{X_R}}{1 + R} \quad (4.26)$$

$$C'_S = \frac{C_{S_i} + RC_{S_R}}{1 + R} \quad (4.27)$$

Nồng độ tế bào của dòng chảy ra, có thể được ước lượng từ toàn bộ sự cân bằng tế bào như sau:

$$C_{X_f} = \frac{1}{\beta} [C_{X_i} + Y_{X/S} (C_{S_i} - C_{S_f})] \quad (4.28)$$

Nồng độ tế bào của dòng chảy thu hồi có thể được ước lượng từ sự cân bằng tế bào trên bộ lọc như sau:

$$C_{X_R} = \frac{1 + R - \beta}{R} C_{X_f} \quad (4.29)$$

Trong đó: β là tỷ lệ xả (bleeding) được định nghĩa như sau:

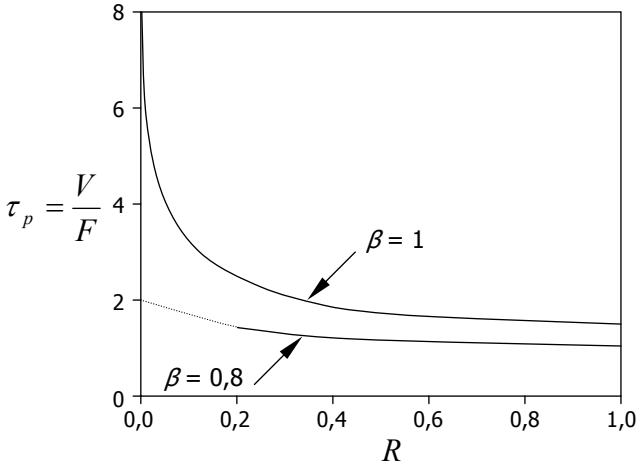
$$\beta = \frac{B}{F} \quad (4.30)$$

Hình 4.10 trình bày hiệu quả của tốc độ thu hồi (R) trên thời gian lưu của hệ thống PFF có thu hồi. Lưu ý rằng thời gian lưu được tính toán dựa trên tốc độ dòng chảy vào, đó là thời gian lưu thực sự của hệ lên men. Thời gian lưu thực tế trên hệ thống PFF là không quan trọng bởi vì nó sẽ giảm xuống khi tăng tốc độ thu hồi.

Khi $\beta = 1$, tốc độ xả sẽ bằng tốc độ dòng chảy, và tốc độ dòng chảy của phần được lọc L là bằng 0, vì thế dòng chảy thu hồi không được lọc. Thời gian lưu sẽ là vô hạn nếu R bằng 0 và giảm rõ rệt khi R tăng lên. Trong trường hợp này tỷ lệ thu hồi tối ưu có thể ở trong khoảng 0,2.

Một đường cong khác trong hình 4.10 là cho $\beta = B/F = 1,8$. Thời gian lưu cần thiết có thể giảm bằng cách tập trung dòng chảy thu hồi từ 25-40% khi R ở trong khoảng 0,2-1,0. Khi $R \leq 1,2$, thì một đoạn của đường

cong được biểu diễn bằng dấu chấm, bởi vì khó có thể giảm tỷ lệ thu hồi xuống dưới 0,2 khi $\beta = 0,8$.



Hình 4.10. Ảnh hưởng của tốc độ thu hồi (R) và tỷ lệ xả ($\beta = B/F$) lên thời gian lưu ($\tau_p = V/F$ giờ) của hệ thống PFF có thu hồi. Đường cong được vẽ bằng mô hình Monod với $\mu_{\max} = 0,935/\text{giờ}$; $K_S = 0,71 \text{ g/L}$; $Y_{X/S} = 0,6$; $C_{S_i} = 10 \text{ g/L}$; $C_{S_f} = 1,3 \text{ g/L}$; và $C_{X_i} = 0$.

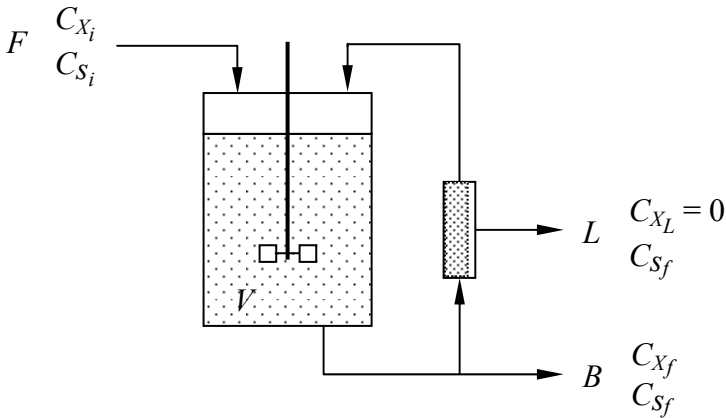
Việc phân tích trong phần này và các phần sau cũng có thể được ứng dụng trong các bể lắng tế bào như là một bộ phận phân tách tế bào. Dòng chảy ra của bể lắng tế bào sẽ bằng $F = B+L$ và nồng độ của nó sẽ là $(B/F) \times C_{X_f} = \beta C_{X_f}$.

2. Thu hồi tế bào ở CSTF

Hiệu suất tế bào trong CSTF tăng lên cùng với việc tăng tốc độ pha loãng và đạt đến giá trị cực đại. Nếu tốc độ pha loãng tăng lên quá điểm cực đại, thì hiệu suất của hệ lên men sẽ giảm đột ngột và tế bào sẽ bắt đầu bị pha loãng do tốc độ sinh sản tế bào kém hơn sự hao hụt tế bào ở dòng chảy ra. Một phương thức cải thiện hiệu suất hệ lên men là thu hồi tế bào bằng cách tách rời tế bào khỏi dòng chảy sản phẩm bằng hệ lọc dòng chảy ngang (cross-flow filter unit) (Hình 4.11).

Nồng độ cao của tế bào (được duy trì bằng cách thu hồi tế bào) sẽ làm tăng hiệu suất tế bào khi tốc độ sinh trưởng tỷ lệ tương ứng với nồng độ tế

bào. Tuy nhiên, phải có giới hạn trong việc tăng hiệu suất tế bào với việc tăng nồng độ tế bào bởi vì trong môi trường có nồng độ tế bào cao, thì tốc độ chuyển khối chất dinh dưỡng sẽ bị giảm do việc dồn vào một nơi quá đông và gây kết khối của tế bào. Việc duy trì nồng độ quá cao của tế bào cũng không có lợi bởi vì bộ phận lọc sẽ thường xuyên bị hỏng hơn ở trường hợp nồng độ tế bào cao.



Hình 4.11. Sơ đồ thu hồi tế bào ở CSTF.

Nếu tất cả tế bào được thu hồi trở lại trong hệ lên men, thì nồng độ tế bào sẽ tăng liên tục theo thời gian và trạng thái ổn định sẽ không bao giờ đạt được. Vì thế, để hoạt động của CSTF có sự thu hồi ở trạng thái ổn định, chúng ta cần có một dòng xả (Hình 4.11). Phương trình cân bằng nguyên liệu cho tế bào trong hệ lên men có bộ phận thu hồi tế bào có dạng như sau:

$$FC_{X_i} - BC_{X_f} + V\mu C_X = V \frac{dC_X}{dt} \quad (4.31)$$

Cần lưu ý rằng, tốc độ dòng chảy thực tế đi vào và đi ra khỏi bộ phận lọc không quyết định hoàn toàn đến sự cân bằng tất cả nguyên liệu. Đối với CSTF trạng thái ổn định có sự thu hồi tế bào và chất dinh dưỡng vô trùng, thì:

$$\beta D = \frac{\beta}{\tau_m} = \mu \quad (4.32)$$

Lúc này βD thay cho D và bằng tốc độ sinh trưởng đặc trưng. Khi $D = 1$ tế bào không được thu hồi, vì thế $\beta = \mu$.

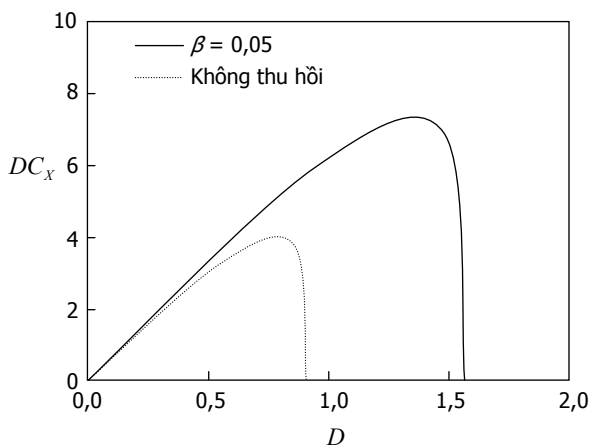
Nếu tốc độ sinh trưởng có thể biểu diễn bằng động học Monod, thì thay thế phương trình (3.11) ở chương 3 vào phương trình (4.32) ta có:

$$C_S = \frac{\beta K_S}{\tau_m \mu_{\max} - \beta} \quad (4.33)$$

C_S chỉ có nghĩa khi $\tau_m \mu_{\max} > \beta$. Nồng độ tế bào trong hệ lên men có thể được tính toán từ giá trị của C_S như sau:

$$C_X = \frac{Y_{X/S}}{\beta} (C_{S_i} - C_S) \quad (4.34)$$

Hình 4.12 cho thấy ảnh hưởng của tỷ lệ xả lên hiệu suất tế bào đối với mô hình Monod. Khi β bị giảm xuống từ 1 (không thu hồi) tới 0,5 thì hiệu suất tế bào được tăng lên gấp đôi.



Hình 4.12. Ảnh hưởng của tỷ lệ xả lên hiệu suất tế bào (βDC_X).

III. Các hệ lên men khác

Nhiều hệ lên men khác đã được đề xuất và thử nghiệm. Các hệ lên men này được thiết kế để cải thiện hoặc nhược điểm của hệ lên men thùng khuấy (tiêu thụ công suất lớn) hoặc các yêu cầu đặc biệt của một quá trình lên men nhất định như: sự khí tốt hơn, chuyển nhiệt hiệu quả, tách hoặc giữ lại tế bào, bất động tế bào, giảm bớt thiết bị và giá thành của sản phẩm, và thường không được thiết kế cho quy mô lớn.

Các hệ lên men thường được phân loại dựa trên cơ sở các kiểu bình nuôi của chúng như là thùng, cột, hoặc các hệ lên men vòng (loop). Cả hai hệ lên men thùng và cột được xây dựng trên cơ sở bình nuôi hình trụ. Có thể phân loại dựa theo tỷ lệ chiều cao (H) trên đường kính (D) như sau:

$H/D < 3$ cho hệ lên men thùng.

$H/D > 3$ cho hệ lên men cột.

Hệ lên men vòng là hệ lên men thùng hoặc cột có vòng lưu thông chất lỏng, (có thể là ống thông gió (draft) ở giữa hoặc là một cái vòng gắn ở bên ngoài hệ lên men).

Có thể phân loại các hệ lên men theo một cách khác dựa trên cơ sở các thành phần của hệ lên men được phối hợp như thế nào: bởi khí nén, bởi bộ phận chuyển động cơ học bên trong, hoặc bởi bơm chất lỏng bên ngoài. Các hệ lên men tiêu biểu trong mỗi loại được trình bày ở bảng 4.1, và các ưu điểm và nhược điểm của ba loại hệ lên men cơ bản được trình bày ở bảng 4.2.

Bảng 4.1. Phân loại các hệ lên men.

Loại bình nuôi	Nguồn trộn sơ cấp		
	Khí nén	Các bộ phận chuyển động bên trong	Bơm ở bên ngoài
Thùng	-	Thùng khuấy	-
Cột	Cột bong bóng Cột hình nón	Nhiều giai đoạn (hoặc đợt)	Khay sàng (rây) Đệm nhồi
Vòng	Áp lực không khí đẩy lên theo chu kỳ	Vòng chân vịt	Vòng tia

1. Hệ lên men cột (*column fermenter*)

Hệ lên men đơn giản nhất là hệ lên men cột bong bóng (còn gọi là hệ lên men tháp-tower fermenter), thường bao gồm một bình trụ dài, có bộ phận phun khí ở dưới đáy (Hình 4.13 a-c). Các thành phần của hệ lên men được trộn bằng cách tăng số lượng bong bóng lên, cũng là yếu tố có thể cung cấp oxygen cần thiết cho tế bào. Khi các tế bào lắng xuống, nồng độ

cao của tế bào có thể được duy trì ở phần thấp hơn của cột mà không có bất kỳ một thiết bị nào để tách rời chúng.

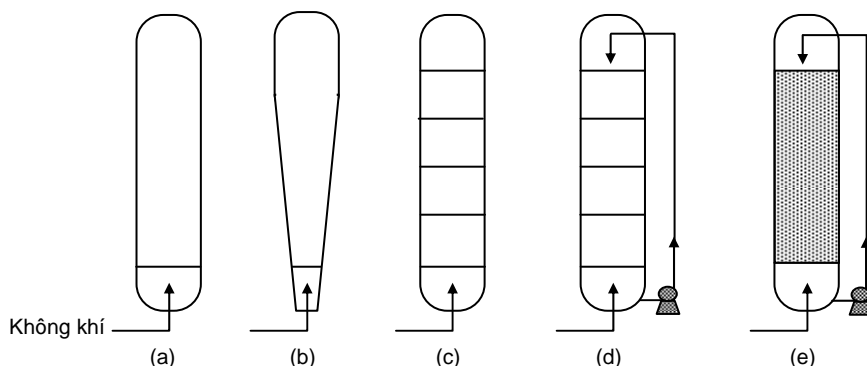
Tuy nhiên, hệ lên men cột bong bóng thường bị hạn chế ở trường hợp lên men hiếu khí và việc tăng các bong bóng không thể cung cấp một sự pha trộn đầy đủ cho sự sinh trưởng tối ưu. Chỉ có phần thấp hơn của cột có thể duy trì nồng độ tế bào cao dẫn đến sự lên men ban đầu nhanh được tiếp theo bởi sự lên men chậm hơn do các cơ chất mong muốn bị giảm đi. Khi nồng độ tế bào tăng lên trong hệ lên men, cần có lưu tốc không khí cao để duy trì dịch huyền phù tế bào và sự pha trộn. Tuy nhiên, lưu tốc không khí tăng lên có thể gây ra sự tạo bọt nhiều và việc duy trì các bong bóng khí trong cột dẫn đến làm giảm hiệu suất của hệ lên men. Khi bong bóng tăng lên nhiều trong cột chúng có thể kết thành một khối nhanh chóng làm giảm tốc độ chuyển oxygen. Vì thế, các hệ lên men cột có thể không thay đổi được và hạn chế một phạm vi khá hẹp các điều kiện hoạt động.

Bảng 4.2. Ưu điểm và nhược điểm của cấu hình ba hệ lên men cơ bản.

Loại	Ưu điểm	Nhược điểm
Thùng khuấy	<ol style="list-style-type: none">1. Linh hoạt và dễ thích ứng2. Phạm vi mật độ pha trộn rộng3. Có thể sử dụng môi trường có độ nhớt cao	<ol style="list-style-type: none">1. Tiêu thụ công suất lớn2. Gây tổn hại cho các tế bào mẫn cảm với lực trượt3. Giá thành thiết bị cao
Cột bong bóng	<ol style="list-style-type: none">1. Không có các bộ phận chuyển động2. Đơn giản3. Giá thành thiết bị thấp4. Nồng độ tế bào cao	<ol style="list-style-type: none">1. Pha trộn kém2. Tạo bọt dư thừa3. Giới hạn đối với hệ thống có độ nhớt thấp
Lực đẩy không khí	<ol style="list-style-type: none">1. Không có các bộ phận chuyển động2. Đơn giản3. Hiệu suất hút khí cao4. Chuyển nhiệt tốt	<ol style="list-style-type: none">1. Pha trộn kém2. Tạo bọt dư thừa3. Giới hạn đối với hệ thống có độ nhớt thấp

Để khắc phục nhược điểm của hệ lên men cột, một vài kiểu thiết kế khác đã được đề xuất. Hệ lên men cột hình chóp ngược (Hình 4.13 b) có thể

duy trì lưu tốc không khí cao trên một đơn vị diện tích ở phần thấp hơn của hệ lên men mà ở đó có nồng độ tế bào cao. Một vài khay sàng lọc có thể được cài đặt trong cột (Hình 4.13 c) để tăng hiệu quả tiếp xúc khí-chất lỏng và phá vỡ sự kết khối của bong bóng khí. Để tăng cường sự pha trộn mà không có các phần chuyển động bên trong, dịch lên men (môi trường) có thể được bơm ra ngoài và quay vòng (tuần hoàn) bằng cách dùng một bơm chất lỏng ở bên ngoài (Hình 4.13 d và e).



Hình 4.13. Các hệ lên men cột: (a) cột bong bóng (bubble column), (b) cột hình nón (tapered column), (c) cột bong bóng có khay sàng lọc (sieve-tray bubble column), (d) cột bong bóng có khay sàng lọc với bơm ở bên ngoài, (e) cột nhồi (packed-bed) với bơm ở bên ngoài.

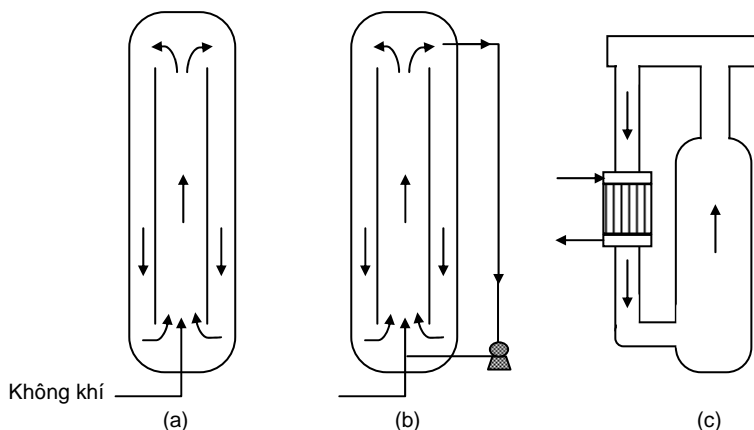
2. Hệ lên men vòng (loop fermenter)

Hệ lên men vòng là hệ lên men thùng (tank fermenter) hoặc cột (column fermenter) có vòng lưu thông chất lỏng, nó có thể là một ống thông gió ở giữa hoặc là một cái vòng ở bên ngoài. Tùy thuộc vào sự lưu thông chất lỏng được tạo ra như thế nào, mà hệ lên men được phân loại thành ba kiểu: lực đẩy không khí (air-lift), vòng khuấy (stirred loop) và vòi phun (jet loop) (Hình 4.14).

Sự lưu thông chất lỏng của hệ lên men dùng lực đẩy nhờ vào việc phun không khí để tạo ra sự khác nhau về mật độ giữa phần giàu bong bóng của chất lỏng trong tấm đứng (riser) và phần được rút hết bong bóng nặng hơn của chất lỏng trong đáy thùng (downcomer) (Hình 4.14 a). Sự pha trộn và lưu thông chất lỏng trong thùng lên men có thể được tăng cường bằng cách gắn thêm một bộ phận bơm ở bên ngoài (Hình 4.14 b). Tuy nhiên, việc bổ sung

bơm đã làm giảm ưu điểm của hệ lên men nhờ lực đẩy không khí là hiệu suất năng lượng thấp và đơn giản.

Hệ lên men áp lực chu kỳ ICI (Imperial Chemical Industries Ltd., England) là một hệ lên men dùng lực đẩy không khí với một vòng bên ngoài (outer loop) được phát triển cho lên men hiếu khí đòi hỏi có sự chuyển nhiệt. Môi trường và không khí được đưa vào trong các phần cao hơn và thấp hơn (Hình 4.14 c). Không khí phục vụ cho hai mục đích: cung cấp oxygen cần thiết cho sự sinh trưởng của tế bào và tạo ra sự lưu thông tự nhiên của chất lỏng trong hệ lên men thông qua một cái vòng. Bộ phận trao đổi nhiệt để làm lạnh môi trường lỏng được cài đặt vào trong cái vòng đó. Hệ lên men này đã được chứng minh là tạo ra một tốc độ hấp thụ oxygen cao trên một đơn vị thể tích.



Hình 4.14. Các hệ lên men vòng: (a) lực đẩy không khí, (b) lực đẩy không khí có bơm bên ngoài, (c) áp lực chu kỳ ICI.

IV. Các ký hiệu

- B tốc độ chảy của dòng xả, m^3/s
- β tỷ lệ xả, được định nghĩa như B/F
- C_p nồng độ sản phẩm
- C_{P_i} nồng độ sản phẩm đưa vào
- C_S nồng độ cơ chất
- C'_S nồng độ cơ chất ở điểm phối trộn của dòng chảy vào và dòng chảy thu hồi

C_{S_0}	nồng độ cơ chất tại thời điểm t_0
C_{S_f}	nồng độ cơ chất sau khi ra khỏi hệ lên men
C_{S_i}	nồng độ cơ chất đưa vào
$C_{S,opt}$	nồng độ cơ chất tối ưu
C_X	nồng độ tế bào
C'_X	nồng độ tế bào ở điểm phối trộn của dòng chảy vào và dòng chảy thu hồi
C_{X_0}	nồng độ tế bào tại thời điểm t_0
C_{X_f}	nồng độ tế bào sau khi ra khỏi hệ lên men
C_{X_i}	nồng độ tế bào đưa vào
C_{X_L}	nồng độ tế bào thu hồi qua lọc
C_{X_R}	nồng độ tế bào của dòng chảy thu hồi
$C_{X,opt}$	nồng độ tế bào tối ưu
D	tốc độ pha loãng, s^{-1}
F	tốc độ dòng chảy, m^3/s
τ_m	thời gian lưu, s
$\tau_{m,opt}$	thời gian lưu tối ưu, s
τ_p	thời gian lưu dựa trên tốc độ dòng chảy của toàn bộ hệ thống
τ_b	thời gian lưu cần thiết để nuôi cấy mẻ hoặc PFF trạng thái ổn định đạt tới một nồng độ tế bào nhất định
K_S	hệ số hệ thống
L	tốc độ dòng chảy qua lọc, m^3/s
μ	tốc độ sinh trưởng đặc trưng, s^{-1} hoặc $kg/m^3/s$
μ_{max}	tốc độ sinh trưởng cực đại
R	tốc độ thu hồi
r_X	tốc độ sinh trưởng tế bào
V	thể tích làm việc của hệ lên men, m^3
$Y_{P/S}$	hiệu suất sản phẩm/cơ chất

$Y_{X/S}$ hiệu suất sinh trưởng/cơ chất
 X tế bào trên cơ sở trọng lượng khô

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Asenjo JA and Merchuk JC.** 1995. Bioreactor System Design. *Marcel Dekker, Inc.* New York, USA.
2. **Atkinson B and Mavituna F.** 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd ed. *Stockton Press*, New York, USA.
3. **Flickinger MC and Drew SW.** 1999. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. *John Wiley & Sons*, New York, USA.
4. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.
5. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* NJ, USA.
6. **Vogel HC and Todaro CL.** 1997. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Principles, Process Design, and Equipment). 2nd ed. *Noyes Publications*. New Jersey, USA.

Chương 5

Nuôi cấy tế bào vi sinh vật

Mặc dù cho đến thế kỷ 19 vai trò của vi sinh vật trong những biến đổi sinh học vẫn không được thừa nhận, nhưng con người đã sử dụng vi sinh vật từ rất lâu trong việc chế biến thực phẩm, thức uống có cồn, sản xuất sữa, dệt vải... Ngày nay, việc sử dụng vi sinh vật rộng rãi hơn trước đây rất nhiều. Chúng không chỉ được dùng trong các quá trình vi sinh vật truyền thống mà còn cho các quá trình mới như sản xuất dược phẩm, hóa chất công nghiệp, enzyme, hóa chất nông nghiệp, xử lý nước thải, lọc khoáng và các công nghệ DNA tái tổ hợp. Chương này chỉ tập trung giới thiệu các ứng dụng của nuôi cấy tế bào vi sinh vật trong sản xuất dược phẩm (đặc biệt là dược phẩm DNA tái tổ hợp) và sản xuất enzyme.

I. Tế bào vi sinh vật

Tất cả các cơ thể sống được Haeckel (1866) phân loại thành giới động vật (animal kingdom), giới thực vật (plant kingdom) và sinh vật đơn bào (protist) như trình bày trong bảng 5.1.

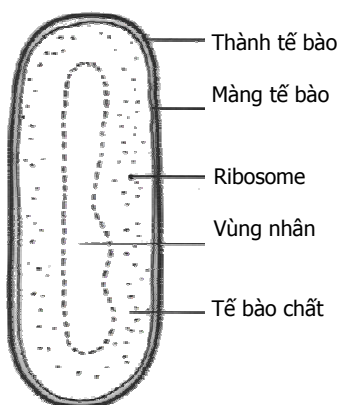
Các protist được xem là các cơ thể sống tương đối đơn giản so với thực vật và động vật. Chúng bao gồm tảo, động vật nguyên sinh, nấm và vi khuẩn. Sự phát triển của kính hiển vi điện tử đã cho phép các nhà khoa học thừa nhận rằng cấu trúc đơn vị của tất cả các cơ thể sống được phân chia trong hai loại: sinh vật tiền nhân (prokaryotes) và sinh vật nhân thật (eukaryotes).

Các tế bào tiền nhân là đơn vị cấu trúc trong hai nhóm vi sinh vật: vi khuẩn và tảo lam (còn gọi là vi khuẩn lam-cyanobacteria). Các tế bào tiền nhân có kích thước nhỏ và đơn giản như trình bày ở hình 5.1, nó không được chia thành ngăn bởi các hệ thống màng đơn vị (unit membrane systems). Các tế bào chỉ có hai vùng bên trong được phân biệt cấu trúc là: tế bào chất và vùng nhân (hoặc dịch nhân). Tế bào chất có các chấm dạng hạt màu tối chính là thành phần ribosome, bao gồm protein và ribonucleic acid (RNA). Ribosome là nơi xảy ra các phản ứng hóa sinh quan trọng cho sự tổng hợp protein. Vùng nhân có dạng không đều, rất biệt lập mặc dù nó không được giới hạn bởi màng. Vùng nhân chứa deoxyribonucleic acid

(DNA) mang thông tin di truyền xác định sự sản xuất protein và các chất khác của tế bào cũng như xác định các cấu trúc của nó.

Bảng 5.1. Phân loại các cơ thể sống.

Đa bào	Động vật		Nhân thật ¹
	Thực vật		
Đơn bào	Sinh vật đơn bào ²	Tảo (Algae) Động vật nguyên sinh (Protozoa) Nấm (Fungi) Nấm mốc (Molds) Nấm men (Yeasts)	Nhân thật
		Vi khuẩn (Bacteria)	



Hình 5.1. Minh họa một tế bào đặc trưng của sinh vật tiền nhân.

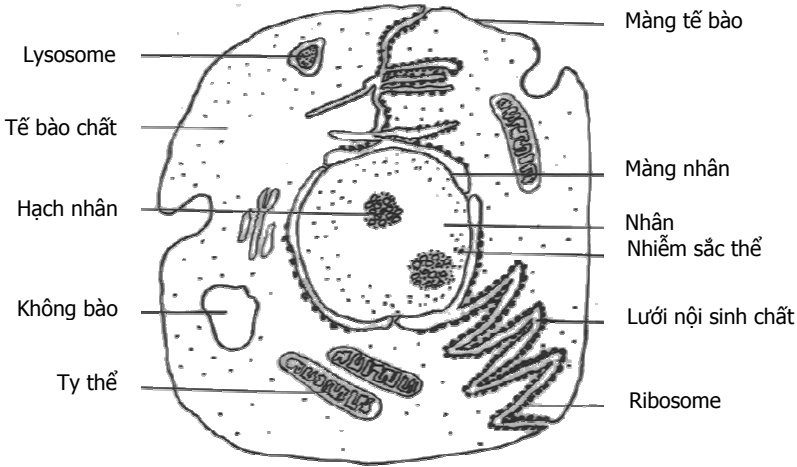
Các tế bào prokaryote được bao quanh bởi thành tế bào (cell wall) và màng tế bào (cell membrane), thành tế bào thường dày hơn màng tế bào, bảo vệ tế bào khỏi các ảnh hưởng từ bên ngoài. Màng tế bào (hoặc màng tế bào chất) là một hàng rào chọn lọc giữa phần bên trong tế bào và môi

¹ Nhân thật: còn gọi là nhân chuẩn.

² Sinh vật đơn bào: còn gọi là sinh vật nguyên sinh.

³ Tiền nhân: còn gọi là nhân sơ.

trường bên ngoài. Các phân tử lớn nhất được biết đã đi qua màng này là các đoạn DNA và các protein có trọng lượng phân tử thấp. Màng tế bào có thể được gấp lại và mở rộng trong tế bào chất. Màng tế bào như là bề mặt mà trên đó các chất khác của tế bào được gắn vào và giữ nhiều chức năng quan trọng của tế bào.



Hình 5.2. Minh họa một tế bào đặc trưng của sinh vật nhân thật.

Các tế bào eukaryote phức tạp hơn, chúng là cấu trúc đơn vị ở động vật, thực vật, protozoa, nấm và tảo. Tế bào eukaryote có các hệ thống màng đơn vị bên trong để tách biệt nhiều thành phần chức năng của tế bào như trình bày ở hình 5.2. Các tế bào eukaryote lớn hơn và phức tạp hơn các tế bào prokaryote từ 1.000-10.000 lần. Nhân được bao bọc chung quanh bởi một màng đôi có các lỗ nhỏ rộng từ 40-70 μm , bên trong nhân chứa các nhiễm sắc thể. Nhân điều hòa các tính chất di truyền và tất cả các hoạt động sống của tế bào. Nhiễm sắc thể dài và là các thể sợi mảnh, chứa các gen sắp xếp trên một chuỗi mạch thẳng trong các nucleoprotein (protein cộng nucleic acid). Tế bào chất chứa một số lớn các hạt gọi là ribosome cần thiết trong các phản ứng liên tục để tổng hợp các nguyên liệu tế bào. Ribosome được tập trung một cách đặc biệt dọc theo bề mặt xù xì của lưới nội sinh chất, một mạng lưới không đều của các kênh nối liền nhau được phân định với màng. Ty thể chứa các enzyme vận chuyển điện tử sử dụng oxygen trong quá trình sản sinh ra năng lượng. Không bào và lysosome là các cơ quan tử giúp cách ly các phản ứng hóa học khác nhau trong tế bào.

II. Vi khuẩn

1. Hình dạng

Vi khuẩn là những cơ thể sống đơn bào có kích thước hiển vi. Hiện nay, người ta đã biết được khoảng 1.500 loài trong tất cả môi trường tự nhiên. Đường kính đặc trưng của tế bào vi khuẩn trong khoảng 0,5-1 μm . Chiều dài của vi khuẩn rất khác nhau. Vi khuẩn xuất hiện trong các dạng như sau: cocci (có dạng hình cầu hoặc hình trứng), bacilli (có dạng hình trụ hoặc hình que), spirilla (có dạng cuộn xoắn ốc).

2. Kiểu sinh trưởng

Vi khuẩn sinh sản chủ yếu theo phương thức phân đôi (binary fission) như được minh họa trong hình 5.3. Quá trình này bao gồm một số bước sau: kéo dài tế bào, lõm vào của thành tế bào, phân phối nguyên liệu của nhân, bắt đầu hình thành một vách ngăn ngang, phân phối nguyên liệu tế bào vào trong hai tế bào, và phân chia thành hai tế bào mới. Đây là quá trình sinh sản vô tính.

3. Các điều kiện vật lý ảnh hưởng đến sinh trưởng

Ba nhân tố vật lý chủ yếu ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn là nhiệt độ, oxygen và độ pH.

Do sự sinh trưởng và hoạt tính của vi khuẩn biểu thị sự hoạt động của enzyme, và do tốc độ của các phản ứng enzyme tăng lên cùng với việc tăng nhiệt độ, cho nên tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn sẽ phụ thuộc vào nhiệt độ. Tùy thuộc vào phạm vi nhiệt độ mà chúng sinh trưởng, vi khuẩn sẽ được gọi là psychrophiles⁴, mesophiles⁵ hoặc thermophiles⁶. Phạm vi nhiệt độ mà mỗi nhóm có khả năng sinh trưởng và nhiệt độ tối ưu được trình bày trong bảng 5.2.

Các khí quan trọng chủ yếu trong nuôi cấy vi khuẩn là oxygen và CO₂. Có thể chia ra bốn loại vi khuẩn tùy theo sự phản ứng của chúng đối với oxygen như sau:

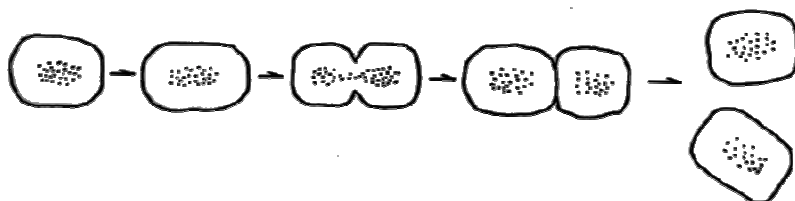
- Vi khuẩn hiếu khí sinh trưởng trong sự có mặt của oxygen tự do.
- Vi khuẩn kỵ khí sinh trưởng trong điều kiện không có oxygen tự do.

⁴ Psychrophiles: vi khuẩn ưa lạnh (dưới -20°C).

⁵ Mesophiles: vi khuẩn ưa nhiệt trung bình.

⁶ Thermophiles: vi khuẩn ưa nhiệt độ cao.

- Vi khuẩn kỵ khí tùy ý sinh trưởng trong điều kiện có oxygen tự do hoặc không.
- Vi khuẩn ưa ít oxygen sinh trưởng trong sự có mặt một lượng rất ít oxy tự do.



Hình 5.3. Vi khuẩn sinh sản bằng cách phân đôi.

Bảng 5.2. Phạm vi nhiệt độ thích hợp cho sinh trưởng của các loại vi khuẩn khác nhau.

Loại vi khuẩn	Phạm vi nhiệt độ cho sinh trưởng	Nhiệt độ tối ưu
Psychrophiles	-7 ~ 35°C	20 ~ 30°C
Mesophiles	7 ~ 45°C	30 ~ 40°C
Thermophiles	40 ~ 75°C	45 ~ 60°C

Đối với hầu hết vi khuẩn, độ pH tối ưu cho sinh trưởng nằm trong khoảng 6,5-7,5. Mặc dù, một vài vi khuẩn có thể sinh trưởng ở phạm vi pH cực đoan, nhưng ở hầu hết các loài giới hạn cực đại và cực tiểu nằm trong khoảng giữa pH 4 và pH 9.

III. Vi nấm

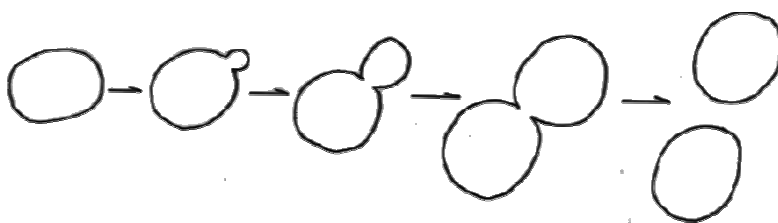
Nấm nói chung là các thực vật không có chlorophyll và vì thế không thể tự tổng hợp các chất dinh dưỡng cho chúng. Chúng rất khác nhau về kích thước và hình dạng, từ nấm men đơn bào (single-cell yeast) đến nấm ăn đa bào (multicellular mushroom). Trong số chúng, nấm men và nấm mốc là những loại nấm công nghiệp quan trọng.

1. Nấm men

Nấm men được phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Chúng được tìm thấy trong trong quả, hạt và các loại thực phẩm có chứa đường khác. Chúng cũng có ở trong đất, trong không khí, trên da và trong ruột động vật. Do nấm men không có chlorophyll (diệp lục tố), cho nên chúng phụ thuộc vào thực vật bậc cao và động vật để có được năng lượng cho các hoạt động sống. Nấm men nói chung là các cơ thể đơn bào, có hình dạng từ hình cầu đến hình trứng. Kích thước của chúng rộng từ 1-5 μm và dài từ 5-30 μm . Thành tế bào ở tế bào non thường mỏng và trở nên dày ở tế bào già.

Kiểu sinh trưởng phổ biến nhất ở nấm men là nảy chồi (budding), đây là một quá trình sinh sản vô tính như minh họa ở hình 5.4. Một chồi nhỏ (hoặc tế bào con-daughter cell) được tạo thành trên bề mặt của tế bào trưởng thành. Chồi sinh trưởng và được làm đầy các nguyên liệu nhân và tế bào chất từ tế bào bố mẹ. Khi chồi lớn bằng bố mẹ, thì bộ máy nhân ở cả hai tế bào được thay đổi và tế bào được phân cắt. Tế bào con có thể bám vào tế bào bố mẹ, thường là ngay sau khi tế bào phân chia.

Nấm men quan trọng nhất là các chủng của *Saccharomyces cerevisiae* được dùng trong sản xuất rượu vang, bia và bột nở bánh mì.

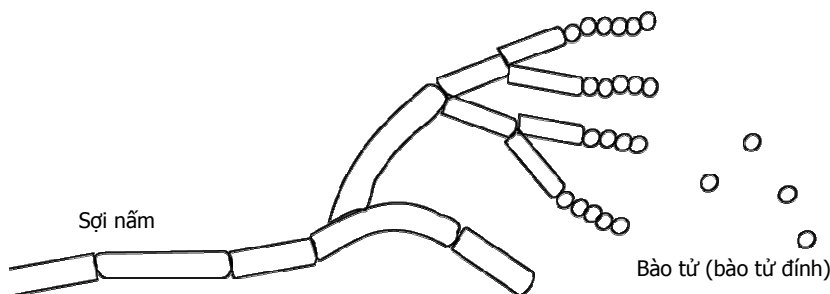


Hình 5.4. Kiểu sinh trưởng đặc trưng của nấm men bằng cách nảy chồi.

2. Nấm mốc

Nấm mốc là loại nấm dạng sợi (Hình 5.5). Một tế bào sinh sản đơn hoặc bào tử (bào tử hạt đính-conidia) được nảy mầm để tạo thành một sợi dài gọi là sợi nấm (hyphae) phân cành lặp lại khi nó kéo dài một cấu trúc sinh dưỡng gọi là hệ sợi nấm (mycelium). Hệ này bao gồm một khối tế bào chất đa nhân ở trong một hệ thống các ống phân cành nhiều và cứng. Do hệ

sợi nấm có khả năng sinh trưởng vô hạn, cho nên nó có thể đạt tới các kích thước vĩ mô.



Hình 5.5. Kiểu sinh trưởng của nấm sợi bằng cách phân cành.

Các loại nấm mốc quan trọng nhất trong công nghiệp là *Aspergillus* và *Penicillium*. Mốc được sử dụng trong sản xuất kháng sinh, hóa chất công nghiệp, enzyme, và các thực phẩm bổ sung.

IV. Môi trường nuôi cấy

Sự sinh trưởng của quần thể vi khuẩn trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo được gọi là nuôi cấy (cultivation). Một kiểu nuôi cấy chỉ chứa một loại vi sinh vật được gọi là nuôi cấy thuần khiết (pure culture). Nuôi cấy hỗn hợp (mixed culture) là một loại nuôi cấy chứa nhiều hơn một loại vi sinh vật.

Các bước cần thiết cho nuôi cấy vi sinh vật là như sau:

- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy cho phép vi sinh vật có thể sinh trưởng tốt nhất.
- Khử trùng môi trường để loại bỏ tất cả các cơ thể sống có trong bình nuôi cấy.
- Cấy vi sinh vật vào trong môi trường đã chuẩn bị.

Để nuôi cấy vi sinh vật, môi trường nuôi cấy phải được chuẩn bị trong những loại bình nuôi được sử dụng phổ biến nhất, chẳng hạn ống nghiệm, bình tam giác, đĩa petri hoặc nồi lên men. Có hai loại môi trường nuôi cấy chính: môi trường tự nhiên (dựa trên kinh nghiệm) và môi trường tổng hợp (thành phần hóa học xác định). Nói chung, các môi trường dinh dưỡng rất

khác nhau về hình thái (dạng rắn hoặc lỏng) và thành phần, tùy thuộc vào loại vi sinh vật được nuôi cấy và mục đích nuôi cấy.

1. Môi trường tự nhiên

Là những loại môi trường dựa trên cơ sở của kinh nghiệm, mà không dựa trên sự hiểu biết chính xác về thành phần các chất dinh dưỡng và tác động của chúng. Môi trường tự nhiên thường chứa peptone, dịch chiết thịt bò, hoặc dịch chiết nấm men. Khi sử dụng môi trường rắn, có thể bổ sung các tác nhân làm rắn vào môi trường như gelatin hoặc agar. Ví dụ về môi trường rắn và môi trường lỏng dùng cho sinh trưởng của nhiều loại vi sinh vật dị dưỡng là tương đối đơn giản, phổ biến là canh dinh dưỡng (nutrient broth) và agar dinh dưỡng (nutrient agar). Thành phần của chúng như sau:

- Canh dinh dưỡng: 3 g nước chiết thịt bò, 5 g peptone, 5 g dịch chiết nấm men và nước bổ sung tới 1 L.

- Agar dinh dưỡng: cùng thành phần như canh dinh dưỡng nhưng có thêm 15 g agar và nước bổ sung tới 1 L.

2. Môi trường tổng hợp

Môi trường chứa các dung dịch pha loãng của hóa chất tinh khiết, được biết là các hợp chất hữu cơ và/hoặc vô cơ. Chúng thường được sử dụng cho các mục đích nghiên cứu hơn là để sản xuất. Môi trường có thể đơn giản như là muối ammonium vô cơ cộng với các muối khoáng và đường, hoặc phức tạp như là casein tinh sạch được bổ sung thêm các vitamin, muối khoáng và đường.

3. Khử trùng

Môi trường dinh dưỡng thích hợp được chọn để nuôi cấy một loại vi sinh vật đặc biệt sẽ được rót vào các bình nuôi cấy. Nếu sử dụng các ống nghiệm hoặc bình tam giác, thì chúng phải được úp bằng một nắp đậy thích hợp cho phép có sự trao đổi khí với khí quyển nhưng vẫn ngăn cản các cơ thể ngoại lai rơi vào môi trường. Các loại nắp khác nhau được dùng trong phòng thí nghiệm bao gồm: nút bông, bọ plastic, nắp vụn, nắp kim loại và giấy nhôm.

Môi trường sau đó phải được khử trùng để loại bỏ tất cả các cơ thể sống trong bình chứa môi trường. Phương pháp khử trùng phổ biến nhất là

khử trùng bằng hơi nước dưới áp suất cao trong nồi khử trùng (autoclave). Nói chung, autoclave hoạt động ở áp suất 15 psi ở 121°C. Thời gian khử trùng tùy thuộc vào bản chất của nguyên liệu, loại bình chứa và thể tích của môi trường. Ví dụ, đối với ống nghiệm chứa môi trường lỏng có thể khử trùng từ 15-20 phút ở 121°C.

4. Nuôi cấy

Nuôi cấy là sự tiếp mẫu (vi sinh vật) vào bình chứa môi trường dinh dưỡng vô trùng. Sự tiếp mẫu khi nuôi cấy trên môi trường rắn có agar được thực hiện bằng que cấy có vòng kim loại ở đầu (metal wire hoặc loop) được khử trùng nhanh trước khi sử dụng bằng cách đốt nóng trên đèn cồn.

Cấy chuyển trong nuôi cấy lỏng thường được thực hiện bằng Pasteur pipette. Sự tiếp mẫu thường được tiến hành trong tủ cấy vô trùng (laminar flow cabinet) để giảm thiểu nguy cơ nhiễm bẩn. Điều quan trọng là phải nắm vững các kỹ thuật hút pipette thích hợp cho việc tiếp mẫu và lấy mẫu trong quá trình nuôi cấy.

V. Sản xuất kháng sinh

1. Sản xuất penicillin

Sản xuất penicillin là một trong những ứng dụng thương mại quan trọng đã thành công trong việc phát triển các quá trình nuôi cấy vi sinh vật ở quy mô phòng thí nghiệm thành quy mô sản xuất công nghiệp.

Giữa năm 1941 và 1945, sản xuất penicillin của Mỹ tăng từ chỗ hầu như không có gì đến 650 tỷ đơn vị⁷ trên một tháng, trong khi đó giá của nó giảm từ 20 USD trên 100.000 đơn vị xuống còn 60 cent. Hiệu suất của penicillin cũng đã được tăng lên hàng ngàn lần nhờ vào những yếu tố sau:

- Cải thiện thành phần môi trường-nước chiết ngâm ngô được dùng làm chất khởi động sinh trưởng, dùng lactose thay cho glucose, và bổ sung phenylacetic acid.

- Phát triển các kỹ thuật nuôi cấy chìm.

- Tạo ra các chủng đột biến của *Penicillium chrysognum* bằng phương pháp chiếu xạ tia cực tím và tia X.

⁷ Một đơn vị (unit) tương đương 0,6 µg của chuẩn quốc tế cho hoạt tính penicillin.

- Các phương pháp hiện đại của các kỹ thuật phân tách và tinh sạch đầu ra (downstream processing)⁸.

Ngày nay, hiệu suất của penicillin thậm chí còn cao hơn nữa bởi kỹ thuật chọn lọc các thể đột biến tốt hơn, cũng như cải thiện môi trường và các kỹ thuật lên men hợp lý hơn.

1.1. Các bước chính của kỹ thuật sản xuất penicillin

- **Chuẩn bị và khử trùng môi trường.** Môi trường đặc trưng chứa nước chiết ngâm ngô (4-5% trọng lượng khô), bổ sung nguồn nitrogen như là bột đậu nành, dịch chiết nấm men, chất lỏng giống nước sau khi sữa chua đông lại; nguồn carbon là lactose, và một số loại đệm khác.

- **Tiếp mẫu (cấy gậy).** Các bào tử đã đông khô sinh trưởng trên môi trường thạch nghiêng được cấy gậy vào môi trường lỏng trong bình tam giác để nuôi cấy lác, tiếp theo là nuôi cấy kết hạt thứ cấp và sơ cấp, và nuôi cấy trong hệ lên men quy mô lớn có thể tích tăng lên nhiều lần. Việc tăng dần thể tích của nuôi cấy kết hạt được thực hiện để tạo ra một lượng mẫu đủ lớn đưa vào nuôi cấy sao cho mỗi bước được rút ngắn hợp lý và thiết bị quy mô lớn được sử dụng hiệu quả.

- **Nuôi cấy.** Hệ lên men có cánh khuấy được sử dụng trong kiểu lên men mẻ có cung cấp dinh dưỡng (fed-batch culture) là glucose và nitrogen trong suốt quá trình nuôi cấy. Kích thước đặc trưng của bình nuôi khoảng từ 40.000-200.000 L. Oxygen được cung cấp bằng phương pháp phun không khí ở tốc độ 0,5-1,0 thể tích không khí/thể tích chất lỏng/phút. Công suất đưa vào để quay turbine và phun khí là khoảng 1-4 W/L. Độ pH được duy trì ở 6,5. Trong lên men penicillin đặc trưng hầu hết sinh khối tế bào cần thiết được thu trong suốt 40 giờ đầu tiên. Penicillin bắt đầu được sản xuất ở pha sinh trưởng hàm mũ và tiếp tục được sản xuất cho tới khi nó đạt tới pha tĩnh. Sự sinh trưởng phải được tiếp tục ở một tốc độ tối thiểu nhất định để duy trì sản lượng penicillin cao. Đây là lý do tại sao glucose và nitrogen được cung cấp liên tục trong suốt quá trình lên men mặc dù chúng đã được bổ sung vào môi trường ngay từ đầu. Penicillin sau khi được tế bào sản xuất đã tiết vào môi trường nuôi cấy.

⁸ Downstream processing: là các bước của quá trình sinh học tiếp theo sau sự lên men và/hoặc nuôi cấy tế bào, một chuỗi các hoạt động phân tách và tinh sạch cần thiết để thu được sản phẩm thuốc theo yêu cầu ở mức độ tinh sạch cần thiết.

- **Quá trình downstream.** Sau khi loại bỏ hệ sợi nấm mốc, penicillin được phân tách từ canh trường (môi trường nuôi cấy) bằng phương thức chiết dòng nước ngược hai giai đoạn liên tục với amylose hoặc butyl acetate.

2. Sản xuất streptomycin

Streptomycin là một kháng sinh dùng phổ biến trong y học, thú y và bảo vệ thực vật. Streptomycin được phát hiện vào năm 1944 từ dịch nuôi cấy một chủng xạ khuẩn *Streptomyces griseus* (còn gọi là *Actinomyces streptomycin*). Giống xạ khuẩn sinh streptomycin khi nuôi cấy chìm phát triển thành hai pha:

- Pha thứ nhất (pha sinh trưởng mạnh). Các bào tử nảy chồi và mọc thành sợi sau 6-8 giờ, mỗi bào tử mọc một chồi, khuẩn ty thường thẳng và phân nhánh rất yếu, tế bào chất ưa kiềm.

- Pha thứ hai (khuẩn ty không phát triển). Cuối ngày thứ ba sợi xạ khuẩn bị chia nhỏ và bắt đầu tự phân.

Những giống sinh streptomycin thường không ổn định. Do đó, trong tương lai cần có sự can thiệp của công nghệ DNA tái tổ hợp (xem chương 8) nhằm tạo ra những giống có hoạt lực cao và ổn định để đưa vào sản xuất. Giữ bào tử ở dạng đông khô trong khoảng năm năm có thể còn 96-99% hoạt lực, trong cát thạch anh tới ba năm, trên môi trường thạch nước đậu ở 5°C tới một năm. Các nguồn carbon mà giống *Streptomyces* có thể đồng hóa được và sinh kháng sinh là glucose, tinh bột, dextrin, maltose, fructose, galactose, manose. Trong thực tế, glucose và tinh bột được dùng làm nguồn nguyên liệu trong sản xuất streptomycin.

2.1. Các phương pháp sản xuất streptomycin

Lên men streptomycin được thực hiện theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình lên men này cũng giống như lên men các loại kháng sinh khác, bao gồm các giai đoạn: nhân giống và lên men chính.

- **Nhân giống.** Giống xạ khuẩn được bảo quản ở dạng bào tử. Cấy bào tử vào môi trường nhân giống trong bình tam giác, lắc 180-220 vòng/phút ở 26-28°C/30-70 giờ, sau đó cho tiếp vào các nồi nhân giống (có sục khí và khuấy), nuôi tiếp cho phát triển sinh khối 20-40 giờ. Nhiệm vụ chính trong giai đoạn nhân giống là tạo ra một khối lượng lớn khuẩn ty xạ khuẩn ưa kiềm có khả năng phát triển mạnh trong giai đoạn lên men chính và tạo thành một lượng lớn kháng sinh.

- **Lên men.** Lên men streptomycin là quá trình lên men hai pha điển hình. Nhiệt độ lên men khoảng 26-28°C, thời gian lên men 96 giờ. Trong thời gian lên men cần phải thông khí và khuấy trộn môi trường. Lượng không khí thổi qua môi trường trung bình là 1 thể tích/1 thể tích môi trường. Khuấy môi trường liên tục trong suốt cả quá trình lên men (kể cả khi nhân giống) nếu ngừng khuấy chỉ trong một thời gian ngắn sẽ làm giảm hiệu suất streptomycin. Độ pH trong những giờ đầu có giảm chút ít sau đó tăng dần.

VI. Sản xuất thuốc bằng công nghệ DNA tái tổ hợp

1. Insulin

Ngày nay, việc sản xuất insulin ở quy mô công nghiệp có lẽ là một trong những thành công nổi bật nhất, sớm nhất của công nghệ sinh học hiện đại.

Insulin là một protein được tuyến tụy tiết ra nhằm điều hòa lượng đường trong máu. Cơ thể thiếu hụt insulin trong máu sẽ làm rối loạn hầu hết các quá trình trao đổi chất ở cơ thể, dẫn đến tích tụ nhiều đường trong nước tiểu. Trong cơ thể, insulin được tổng hợp dưới dạng proinsulin gồm ba chuỗi polypeptide: A, B và C. Khi proinsulin chuyển thành insulin, chuỗi C được loại bỏ, hai chuỗi A và B nối với nhau bởi hai cầu disulfide (-S-S-). Để điều trị bệnh này người ta thường tiêm insulin cho người bệnh. Chế phẩm insulin này được tách chiết từ tuyến tụy của gia súc. Tuy nhiên, để có được 100 gram insulin người ta phải sử dụng tụy của 4.000-5.000 con bò. Vì vậy, giá thành của insulin trước đây là rất cao. Mặt khác, vì cấu tạo của insulin bò hơi khác với insulin người nên trong máu của bệnh nhân được điều trị bằng insulin bò bao giờ cũng xuất hiện kháng thể đối với insulin bò. Điều này gây ra một số hậu quả không mong muốn làm giảm một phần hoạt tính của insulin cũng như giảm thời gian tác động của thuốc.

Boger (1978) lần đầu tiên sử dụng công nghệ DNA tái tổ hợp thông qua vi khuẩn *E. coli* đã thu nhận được một lượng lớn insulin. Cụ thể, người ta đã chuyển gen mã hóa tính trạng sản xuất insulin của người sang cho *E. coli*. Vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp gen được nuôi cấy trong nồi lên men có dung tích 1.000 L, sau một thời gian ngắn có thể thu được 200 g insulin, tương đương với lượng insulin chiết rút từ 8.000-10.000 con bò. Thành công này đã cho thấy gen của người có thể làm việc một cách hiệu quả trong genome của vi sinh vật.

Hai sản phẩm thương mại của insulin (được sản xuất từ nấm men *S. cerevisiae* tái tổ hợp) hiện đang được sử dụng là: Actrapid và Novolog (NovoNordisk).

2. Interferon

Interferon có bản chất protein, là yếu tố miễn dịch không đặc hiệu, giúp cơ thể chống lại nhiều loại bệnh do interferon có phổ tác dụng kháng virus rộng.

Thông thường để thu nhận interferon, người ta phải tách chiết chúng từ huyết thanh của máu nên rất tốn kém.

Bằng phương pháp công nghệ DNA tái tổ hợp tương tự như insulin, hiện nay người ta có thể thu nhận một lượng lớn interferon thông qua các cơ thể vi sinh vật đã được tái tổ hợp gen để phục vụ cho việc điều trị các bệnh nhiễm trùng như viêm gan B, viêm gan C, một số bệnh ung thư do virus...

Gilbert (1980) đã đoạt giải thưởng Nobel nhờ thành công trong việc thu nhận interferon từ *E. coli* đã được tái tổ hợp gen mã hóa interferon. Đến năm 1981, Đại học Washington (Mỹ) đã thành công trong việc thu nhận interferon từ nấm men *S. cerevisiae* có hiệu suất cao gấp 10.000 lần so với tế bào *E. coli* tái tổ hợp.

3. Hormone

3.1. Hormone sinh trưởng người (human growth hormone-HGH)

Thông thường, HGH của động vật có vú được sản xuất từ tuyến yên của các động vật non và trong suốt thời gian trước khi chúng trưởng thành. HGH có tác dụng tăng tốc độ sinh trưởng và kích thích cơ thể tăng khối lượng cơ. Ở người sau 30 tuổi, sản xuất hormone sinh trưởng sẽ dừng lại, nếu tiêm HGH sau độ tuổi này sẽ gây ra sự phát triển cơ bắp và lượng mỡ giảm xuống.

Hormone sinh trưởng người là protein chứa khoảng 191 amino acid, thiếu nó cơ thể người sẽ bị lùn. Trước đây hormone phát triển được tách từ tuyến yên của người chết. Mỗi tử thi cho khoảng 4-6 mg HGH và muốn chữa khỏi cho một người lùn phải cần lượng HGH thu được từ 100-150 tử thi. Điều này cho thấy một trở ngại rất lớn khi chữa trị chứng lùn cho trẻ em. Hiện nay, HGH đã được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp thông qua *E. coli* với một hiệu suất rất lớn (1 L dịch lên men của *E. coli* thu được HGH tương đương với lượng chất này thu được từ 60 tử thi). Đây là một trong những protein được sản xuất bằng công nghệ sinh học hiện đại sớm nhất. HGH tái tổ hợp khác với HGH bình thường bởi một amino acid, do *E. coli* không có khả năng loại bỏ gốc methionine khởi đầu mà nó thường bị loại sau khi dịch mã trong tế bào người.

Insulin và hormone sinh trưởng người là các protein tương đối đơn giản vì không bị glycosyl hóa và biến đổi nhiều ở hậu dịch mã, nên có thể dùng *E. coli* (prokaryote) làm tế bào vật chủ để sản xuất chúng. Đối với những protein đòi hỏi quá trình glycosyl và biến đổi hậu dịch mã thì không thể sử dụng tế bào prokaryote làm tế bào vật chủ trong công nghệ DNA tái tổ hợp mà phải sử dụng các tế bào eukaryote như: nấm men, nấm mốc, thực vật hoặc động vật.

3.2. Somatostatin

Đây là loại hormone đặc biệt, thường được tổng hợp trong não động vật và người với một hàm lượng vô cùng thấp. Somatostatin có vai trò điều hòa hormone sinh trưởng và insulin đi vào máu, kiểm tra sự tổng hợp hai loại hormone này. Quy trình sản xuất loại sản phẩm sinh học đặc biệt quý này cũng bao gồm các bước chủ yếu sau đây:

- + Phân lập gen mã hóa somatostatin hoặc tổng hợp trong ống nghiệm.

- + Tạo dòng gen somatostatin bằng cách gắn gen này vào vector plasmid để chuyển gen vào *E. coli*. Mỗi mẻ nuôi cấy 7,5 L vi khuẩn *E. coli* này sẽ cho ra 5 mg somatostatin nguyên chất. Trước đây, muốn có khối lượng hormone này phải tiến hành cả năm trên nguyên liệu lấy từ nửa triệu não cừu.

4. Vaccine

Trong sản xuất vaccine, cho đến thời gian gần đây, người ta vẫn sử dụng vaccine bất hoạt hoặc vaccine sống nhược độc làm kháng nguyên kích thích tạo kháng thể cần thiết trong cơ thể người và vật nuôi. Những vaccine được sản xuất theo cách này có một vài hạn chế, chẳng hạn vaccine sống nhược độc có khả năng quay trở lại dạng độc hoặc hoạt lực của nó giảm khá nhanh trong cơ thể người và vật nuôi.

Đến nay, nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta đã sản xuất được protein vỏ của một số loại virus như virus bệnh dại và viêm gan B. Sản xuất vaccine kỹ thuật gen là một lĩnh vực phát triển mạnh hiện nay của công nghệ DNA tái tổ hợp. Đây là loại vaccine được bào chế từ vi khuẩn đã được chuyển gen mã hóa tổng hợp một protein kháng nguyên của một loại virus hay một loại vi khuẩn gây bệnh nào đó. Hiện nay, các loại vaccine kỹ thuật gen được sử dụng cho người bao gồm vaccine viêm gan B, vaccine dại kiểu mới, vaccine tả kiểu mới, vaccine sốt rét và vaccine bệnh phong.

Virus viêm gan B có vỏ ngoài lypoprotein. Kháng nguyên bề mặt là protein chủ yếu của vỏ ngoài, được phát hiện trong máu người bị nhiễm. Người ta biến nạp gen tổng hợp kháng nguyên của virus viêm gan B vào vi khuẩn *E. coli* sau đó sản xuất sinh khối ở quy mô lớn các vi khuẩn *E. coli* mang gen tái tổ hợp này, biến *E. coli* thành nhà máy sản xuất kháng nguyên để làm vaccine.

Một số sản phẩm thương mại của kháng nguyên bề mặt viêm gan B (được sản xuất từ nấm men *S. cerevisiae* tái tổ hợp) hiện đang được sử dụng là: Ambirix (GlaxoSmithKline), Comvax (Merck), HBVAXPRO (Aventis Pharma), Hexavac (Aventis Pasteur), Infanrix-Penta (GlaxoSmithKline), Pediarix (GlaxoSmithKline), Procomvax (Aventis Pasteur), Twinrix (GlaxoSmithKline).

5. Một số loại thuốc khác

Hiện nay có gần 140 loại protein trị liệu đã được cho phép sử dụng ở Mỹ và châu Âu. Các protein trị liệu có thể được chia làm hai loại: 1) các protein không bị biến đổi hậu dịch mã, và 2) các protein cần quá trình hậu dịch mã (hầu hết là kiểu *N*-glycosylation⁹) để có chức năng sinh học đầy đủ.

Các protein không có quá trình glycosyl hóa (glycosylation)¹⁰, ở hậu dịch mã, biểu hiện đặc hiệu hoặc trong vi khuẩn *E. coli* hoặc trong nấm men và hiện nay chúng chiếm khoảng 40% thị trường protein trị liệu. Tuy nhiên, một số trong chúng đã biểu hiện ở cả hai hệ thống, chẳng hạn như insulin tái tổ hợp được sản xuất cả trong *E. coli* (Humulin, Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA) lẫn trong nấm men (Novolog, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Đan Mạch).

Sản xuất các protein tái tổ hợp thường đòi hỏi quá trình *N*-glycosylation ở trạng thái tự nhiên của chúng, trong hầu hết trường hợp chúng cần các vật chủ biểu hiện là động vật có vú (hệ thống có khả năng bắt chước glycosylation của người). Các vật chủ prokaryote như *E. coli* không glycosyl hóa protein được, và các hệ thống biểu hiện thuộc eukaryote bậc thấp như nấm men hoặc các tế bào côn trùng thường ít ổn định để thực hiện

⁹ *N*-glycosylation: các oligosaccharide liên kết cộng hóa trị với protein ở nguyên tử nitrogen.

¹⁰ Glycosyl hóa: là quá trình bổ sung một hoặc nhiều phân tử carbohydrate (gốc đường) vào một phân tử protein (glycoprotein) sau khi nó được tổng hợp nhờ ribosome.

glycosylation của động vật có vú. Tuy nhiên, việc nuôi cấy các tế bào động vật có vú gặp nhiều khó khăn như: môi trường dinh dưỡng đắt tiền, thời gian nuôi cấy dài ngày, tế bào rất mẫn cảm với các lực trượt của hệ lên men... (xem chương 6). Do đó, các yêu cầu sinh trưởng cho vật chủ biểu hiện các chế phẩm sinh-dược không được cải thiện đã buộc các công ty phải quay lại với các hệ thống biểu hiện của nấm men và nấm sợi (eukaryote) do chúng có khả năng cung cấp hiệu suất protein cao ($> 1 \text{ g/L}$) trong các quá trình lên men ngắn ngày, để có thể tăng quy mô sản xuất (lên tới 100 m^3).

Tất cả các protein trị liệu dựa trên cơ sở nấm men hiện nay được sản xuất trong loài nấm men *S. cerevisiae* (Bảng 5.3), nhưng các loài nấm men khác cũng đã được phát triển để sản xuất protein trị liệu. Nấm men *Pichia pastoris* trước đây được công ty Philips Petroleum (Bartlesville, OK, USA) sử dụng như là một hệ thống sản xuất protein đơn bào, nhưng sau đó đã được biến đổi di truyền để biểu hiện các protein ngoại lai. Hơn 120 protein tái tổ hợp đã được biểu hiện trong loại vật chủ này, khá nhiều trong số đó có nguồn gốc từ người và động vật có vú. Gần đây hơn, nấm men *P. pastoris* cũng được dùng để biểu hiện các protein trị liệu (đang được thử nghiệm lâm sàng) (Bảng 5.3).

Công ty Genencor (Palo Alto, CA USA) trước đây đã sử dụng các nấm sợi *Aspergillus niger* và *Trichoderma reesei* cho sản xuất quy mô lớn các enzyme công nghiệp tái tổ hợp. Nhưng gần đây họ cũng đã cố gắng biểu hiện các protein trị liệu (ví dụ: các IgG hoàn chỉnh) ở *A. niger*. Kháng thể này được sản xuất với hàm lượng $< 1 \text{ g/L}$, được lắp ráp chính xác và liên kết với kháng nguyên. Thành công tương tự với biểu hiện kháng thể nguyên vẹn cũng đã thu được ở *P. pastoris*, tuy nhiên hàm lượng khá thấp $< 40 \text{ mg/L}$. Người ta cũng đã chứng minh kháng thể được sản xuất trong *A. niger* có tập tính dược động học (pharmacokinetic behavior) và hoạt tính ADCC¹¹ tương tự với các kháng thể có nguồn gốc từ các tế bào động vật có vú.

Công ty Berna Biotechnology (Bern, Switzerland) cũng đã phát triển phương pháp biểu hiện protein thích hợp dựa trên cơ sở nấm men methylotrophic *Hansenula polymorpha*, đây là loài đang được nghiên cứu để sản xuất các vaccine tái tổ hợp.

¹¹ ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity): Khả năng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể.

Bảng 5.3. Một số protein trị liệu khác được sản xuất bằng công nghệ DNA tái tổ hợp

A. Các sản phẩm thương mại			
Tên thương mại	Protein tái tổ hợp	Công ty	Hệ thống biểu hiện
Elitex	Urate oxidase	Sanofi-Synthelabo	<i>S. cerevisiae</i>
Glucagen	Glucagon	Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Leukine	GM-CSF ¹²	Berlex	<i>S. cerevisiae</i>
Refuldan	Hirudin/lepirudin ¹³	Hoechst	<i>S. cerevisiae</i>
Regranex rh	Yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc tiểu huyết cầu	Ortho-McNeil Phama (US), Janssen-Cilag(EU)	<i>S. cerevisiae</i>
Revasc	Hirudin/desirudin ¹⁴	Aventis	<i>S. cerevisiae</i>
B. Các sản phẩm chưa hoàn chỉnh			
Protein	Chỉ định	Công ty	Hệ thống biểu hiện
Angiostatin	Yếu tố chống hình thành u mạch	EntreMed	<i>P. pastoris</i>
Elastase inhibitor	Bệnh xơ nang	Dyax	<i>P. pastoris</i>
Endostatin	Yếu tố chống hình thành u mạch	EntreMed	<i>P. pastoris</i>
Epidermal growth factor analog	Bệnh tiểu đường	Transition Therapeutics	<i>P. pastoris</i>
Insulin-like growth factor-1	Thiếu hụt yếu tố 1 sinh trưởng giống insulin	Cephalon	<i>P. pastoris</i>
Human serum albumin	Ổn định thể tích máu trong các vết bỏng/sốc	Mitsubishi Pharma (formely Welfide)	<i>P. pastoris</i>
Kallikrein inhibitor	U mạch di truyền	Dyax	<i>P. pastoris</i>

VII. Sản xuất enzyme

Ứng dụng thương mại chính của các enzyme vi sinh vật là trong công nghiệp thực phẩm và sản xuất bia mặc dù enzyme đã được thừa nhận trong

¹² GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor): yếu tố kích thích quần lạc đại thực bào của tế bào bạch cầu hạt.

¹³ Chất chống đông máu.

¹⁴ Chất chống đông máu.

các ứng dụng chẩn đoán và điều trị bệnh. Hầu hết các loại enzyme được tổng hợp trong pha log của nuôi cấy mẹ và được xem như các chất trao đổi sơ cấp. Tuy nhiên, trong một số trường hợp amylase (*Bacillus stearothermophilus*) được sản xuất bởi nuôi cấy idiophase vì thế có thể xem là tương đương với các chất trao đổi thứ cấp. Các enzyme có thể được sản xuất từ động-thực vật cũng như các nguồn vi sinh vật, nhưng sản xuất bằng lên men vi sinh vật là phương pháp kinh tế và thích hợp nhất. Hơn nữa, hiện nay nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp người ta có thể chuyển gen vào các tế bào vi sinh vật để sản xuất các enzyme của động-thực vật. Các tiến bộ của công nghệ DNA tái tổ hợp đã mở rộng phạm vi các sản phẩm lên men tiềm tàng của vi sinh vật. Có khả năng đưa các gen từ các cơ thể bậc cao vào các tế bào vi sinh vật như là các tế bào nhận để tổng hợp các protein (bao gồm enzyme) ngoại lai. Các tế bào vật chủ dùng trong những trường hợp này là *E. coli*, *S. cerevisiae* và một số loại nấm men khác.

Trong quá trình sinh trưởng của vi sinh vật, enzyme được hình thành trong tế bào và một số được tiết ra môi trường xung quanh. Trong sản xuất chủ yếu là sản phẩm của enzyme ngoại bào, còn nếu muốn tách enzyme nội bào thì phải phá vỡ tế bào. Các vi sinh vật được dùng trong sản xuất enzyme gồm có vi khuẩn, nấm mốc, nấm men và xạ khuẩn. Các chế phẩm enzyme được sản xuất từ vi sinh vật đã được ứng dụng trong nhiều ngành công nghiệp khác nhau, chủ yếu là các enzyme thủy phân dùng trong công nghiệp thực phẩm như:

- Amylase dùng trong sản xuất đường mật ngô và chocolate, trong sản xuất bia, chế biến dextrin với dịch đường để sản xuất thức ăn cho người già và trẻ em, trong sản xuất nước quả và trong y học.

- Protease thủy phân protein của sữa để chế biến những món ăn kiêng đặc biệt, được dùng trong thuộc da, sản xuất bột giặt, phim ảnh, tơ sợi, len dạ và trong y học. Protease vi sinh vật có thể sử dụng cùng với amylase trong chế biến thức ăn gia súc.

- Pectinase là nhóm enzyme thủy phân pectin tạo thành galacturonic acid, glucose, galactose, arabinose, methanol...

- Cytolase là hệ enzyme có hoạt tính cao có thể phân hủy hemicellulose, pentozan, lignin... Các enzyme này được gọi chung là cytolase (bao gồm cellulase, hemicellulase, pentosinase).

- Invertase là enzyme nội bào được dùng rộng rãi trong sản xuất bánh kẹo, rượu mùi, kem, mật ong nhân tạo. Nó làm tăng vị ngọt khi thủy phân

đường saccharose thành fructose và glucose, làm tăng độ hòa tan của saccharose trong sản phẩm.

Trong một tương lai gần, enzyme sẽ được sử dụng rộng rãi trong y học để làm đầu dò (probe) cho các thiết bị phân tích y khoa và để chữa bệnh. Hiện nay, một số enzyme như: glucooxydase, hexokinase, esterase, urease, cholesteroloxydase, alcoholdehydrogenase... đã được sử dụng khá phổ biến trong y học. Điển hình nhất là sử dụng glucooxydase cố định trên bề mặt điện cực platinum trong thiết bị phân tích hàm lượng glucose máu. Trong y học, enzyme còn được sử dụng để chữa trị một số bệnh liên quan đến sự thiếu hụt của một số enzyme trong cơ thể người, hoặc dùng enzyme để loại bỏ những cục thịt, mỡ dư thừa gây nguy hiểm cho một số bộ phận của cơ thể người. Chẳng hạn: dùng enzyme streptokinase và urokinase để làm tan máu đông làm tắc nghẽn mạch máu.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Trần Thị Thanh.** 2003. Công nghệ vi sinh. *NXB Giáo dục*, Hà Nội.
2. **Nguyễn Văn Uyển và Nguyễn Tiến Thắng.** 1999. Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học. *NXB Giáo dục*, TP Hồ Chí Minh.
3. **Babey F and Mujacic.** 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotech.* 22: 1399-1408.
4. **Cutler SJ and Cutler HG.** 2000. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. *CRC Press LLC*, USA.
5. **Gerngross TU.** 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotech.* 22: 1409-1414.
6. **Klevenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
7. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.
8. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* NJ, USA.

Chương 6

Nuôi cấy tế bào động vật

I. Mở đầu

Tế bào động vật tách từ mô có thể được nuôi cấy trên các loại môi trường dinh dưỡng tổng hợp bên ngoài cơ thể, chúng sinh trưởng bằng cách tăng số lượng và kích thước tế bào. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật đã tạo cơ hội để nghiên cứu các tế bào ung thư, phân loại các khối u ác tính, mô hình thực nghiệm để khảo sát tác động của hóa chất, xác định sự tương hợp của mô trong cấy ghép và nghiên cứu các tế bào đặc biệt cùng sự tương tác của chúng.

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật có vú có thể được ứng dụng để sản xuất các hợp chất hóa sinh quan trọng dùng trong chẩn đoán như các hormone sinh trưởng của người, interferon, hoạt tố plasminogen mô, các viral vaccine và các kháng thể đơn dòng. Theo phương pháp truyền thống các hợp chất hóa sinh này được sản xuất bằng cách sử dụng các động vật sống hoặc được tách chiết từ xác người chết. Chẳng hạn, các kháng thể đơn dòng có thể được sản xuất bằng cách nuôi cấy các tế bào hybridoma trong các khoang màng bụng (peritoneal cavity) của chuột, hoặc hormone sinh trưởng dùng để chữa bệnh còi (*dwarfism*) có thể được tách chiết từ xác người chết. Tuy nhiên, số lượng thu được từ các phương pháp này rất hạn chế vì thế việc ứng dụng rộng rãi chúng trong điều trị còn gặp nhiều khó khăn.

Một vài sản phẩm gen của động vật có vú cũng có thể được sản xuất bởi hệ thống vi khuẩn bằng cách dùng công nghệ DNA tái tổ hợp. Tốc độ sinh trưởng nhanh, thành phần môi trường đơn giản và rẻ tiền của nuôi cấy tế bào vi khuẩn khiến chúng có nhiều ưu điểm hơn so với nuôi cấy tế bào động vật có vú. Tuy nhiên, vi khuẩn lại thiếu khả năng sửa đổi hậu dịch mã (*post-translational modifications*) bao gồm việc phân giải protein, liên kết các tiểu đơn vị (subunit), hoặc nhiều phản ứng kết hợp khác nhau như glycosylation, methylation, carboxylation, amidation, hình thành các cầu nối disulfide hoặc phosphoryl hóa (phosphorylation) các gốc amino acid. Những

sửa đổi này rất quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của sản phẩm. Ví dụ, quá trình glycosyl hóa (glycosylation) có thể giúp bảo vệ protein chống lại sự phân giải chúng, duy trì khả năng ổn định cấu trúc và biến đổi kháng nguyên. Vì thế, nhiều công ty đã phải quay lại với hệ thống vật chủ biểu hiện các protein ngoại lai là các tế bào động vật có vú. Hiện nay, khoảng 60% protein tái tổ hợp dùng làm dược phẩm được sản xuất từ các hệ thống tế bào vật chủ này.

1. Các ưu điểm của nuôi cấy tế bào động vật

- Hệ thống tế bào động vật là các “nhà máy tế bào” thích hợp cho việc sản xuất các phân tử phức tạp và các kháng thể dùng làm thuốc phòng bệnh, điều trị hoặc chẩn đoán (Bảng 6.1).

- Các tế bào động vật đáp ứng được quá trình hậu dịch mã chính xác đối với các sản phẩm protein sinh-dược (biopharmaceutical).

- Sản xuất các viral vector dùng trong liệu pháp gen (biến nạp một gen bình thường vào trong tế bào soma mang gen tương ứng bị khiếm khuyết để chữa bệnh do sự khiếm khuyết đó gây ra). Các mục đích chính của liệu pháp này là các bệnh ung thư, hội chứng suy giảm miễn dịch (HIV), chứng viêm khớp, các bệnh tim mạch và xơ hóa u nang.

- Sản xuất các tế bào động vật để dùng làm cơ chất *in vitro* trong nghiên cứu độc chất học và dược học.

- Phát triển công nghệ mô hoặc phát sinh cơ quan để sản xuất các cơ quan thay thế nhân tạo-sinh học/các dụng cụ trợ giúp, chẳng hạn:

 - + Da nhân tạo để chữa bỏng.

 - + Mô gan để chữa bệnh viêm gan.

 - + Đảo Langerhans để chữa bệnh tiểu đường.

2. Một số hạn chế của nuôi cấy tế bào động vật

Mặc dù tiềm năng ứng dụng của nuôi cấy tế bào động vật là rất lớn, nhưng việc nuôi cấy một số lượng lớn tế bào động vật thường gặp các khó khăn sau:

- Các tế bào động vật có kích thước lớn hơn và cấu trúc phức tạp hơn các tế bào vi sinh vật.

Bảng 6.1. Các sản phẩm của nuôi cấy tế bào động vật.

Nhóm I	Enzyme	Urokinase, hoạt tố plasminogen mô (t-PA) ¹ T
	Hormone	Hormone sinh trưởng (GH) ²
	Các nhân tố sinh trưởng	Các cytokine khác
Nhóm II	Vaccine ³	Bệnh dại, bệnh quai bị, bệnh sởi ở người... Veterinary-FMD vaccine, New Cattle's Disease ...
Nhóm III	Kháng thể đơn dòng	Các công cụ chẩn đoán
Nhóm IV	Virus côn trùng	Thuốc trừ sâu sinh học cho Baculovirus
Nhóm V	Các chất điều hòa miễn dịch	Interferon và interleukin
Nhóm VI	Các tế bào nguyên vẹn	Thử nghiệm độc chất học

- Tốc độ sinh trưởng của tế bào động vật rất chậm so với tế bào vi sinh vật. Vì thế, sản lượng của chúng khá thấp và việc duy trì điều kiện nuôi cấy vô trùng trong một thời gian dài thường gặp nhiều khó khăn hơn.

- Các tế bào động vật được bao bọc bởi màng huyết tương, mỏng hơn nhiều so với thành tế bào dày chắc thường thấy ở vi sinh vật hoặc tế bào thực vật, và kết quả là chúng rất dễ bị biến dạng và vỡ.

¹ Tissue plasminogen activator (tPA): một protein chuyên hóa trong tế bào của động vật có vú có tính năng kích thích plasminogen là tiền chất của mô dạng không hoạt động chuyển sang trạng thái hoạt động dùng để điều trị các cơn đau tim.

² Growth hormone (GH): (a) chuỗi polypeptide hormone do miên trước của tuyến yên tiết ra điều chỉnh tăng kích thước cơ thể. (b) bất kỳ chất nội tiết nào tham gia điều chỉnh sinh trưởng trong các cơ thể động vật hay thực vật.

³ Vaccine: kháng nguyên đã làm mất khả năng gây bệnh nhưng còn giữ khả năng sinh kháng thể để tiêm chủng gây miễn dịch phòng bệnh. Vaccine có thể gồm một độc tố không hoạt động hoặc một chất không độc bằng cách sử dụng các vi khuẩn hoặc virus đã chết hoặc giảm độc. Có nhiều cách tiêm chủng: dưới da, xuyên da, tiêm bắp, gây sẹo hoặc uống qua đường miệng.

- Nhu cầu dinh dưỡng của tế bào động vật chưa được xác định một cách đầy đủ, và môi trường nuôi cấy thường đòi hỏi bổ sung huyết thanh máu rất đắt tiền.

- Tế bào động vật là một phần của mô đã được tổ chức (phân hóa) hơn là một cơ thể đơn bào riêng biệt như vi sinh vật.

- Hầu hết các tế bào động vật chỉ sinh trưởng khi được gắn trên một bề mặt.

II. Tế bào động vật

Các tế bào động vật là tế bào eukaryote, chúng được liên kết với nhau bởi các nguyên liệu gian bào để tạo thành mô. Mô động vật thường được phân chia theo bốn nhóm: biểu mô (epithelium), mô liên kết (connective tissue), mô cơ (muscle) và mô thần kinh (nerve). Biểu mô tạo thành lớp phủ và lớp lót trên các bề mặt tự do của cơ thể, cả bên trong và bên ngoài. Ở mô liên kết, các tế bào thường được bao bọc trong thể gian bào rộng (kéo dài), đó có thể là chất lỏng, hơi rắn hoặc rắn. Các tế bào mô cơ thường thon dài và được gắn với nhau thành một phiến hoặc một bó bởi mô liên kết. Mô cơ chịu trách nhiệm cho hầu hết chuyển động ở động vật bậc cao. Các tế bào mô thần kinh gồm có thân bào chứa nhân và một hoặc nhiều phần mở rộng dài và mảnh được gọi là sợi. Các tế bào thần kinh được kích thích dễ dàng và truyền xung động rất nhanh.

1. Các tế bào dịch huyền phù

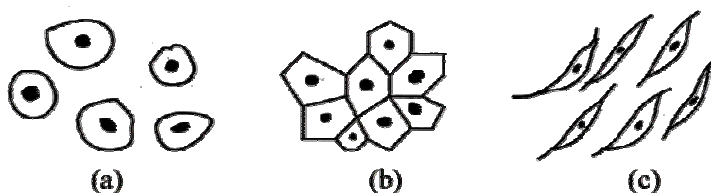
Tế bào hồng cầu và bạch huyết là các mô liên kết không điển hình dạng thể lỏng. Các tế bào máu hoặc dịch bạch huyết là các tế bào dịch huyền phù (suspension cells), hoặc không dính bám khi chúng sinh trưởng trong nuôi cấy *in vitro*. Các tế bào không dính bám không đòi hỏi bề mặt để sinh trưởng.

Chẳng hạn, các tế bào bạch huyết (lymphocytes) (Hình 6.1a) bắt nguồn từ mô bạch huyết là các tế bào không dính bám và có hình cầu đường kính từ 10-20 μm . Chúng có thể được nuôi cấy trong môi trường dịch lỏng theo phương thức tương tự vi khuẩn.

2. Các tế bào dính bám

Hầu hết các tế bào động vật bình thường là các tế bào dính bám, vì thế chúng cần có bề mặt để gắn vào và sinh trưởng. Trong các ứng dụng, người

ta sử dụng rộng rãi các loại tế bào dính bám là tế bào biểu mô và nguyên bào sợi (fibroblast) (Hình 6.1b và c). Các tế bào dính bám cần có một bề mặt ẩm để sinh trưởng như là thủy tinh hoặc plastic. Đĩa petri hoặc các chai trực lẫn là các loại được sử dụng rộng rãi nhất. Các chai được đặt nằm trên một trục lẫn quay tròn chậm trong tủ ẩm. Chai có dung tích 1 L chứa khoảng 100 mL môi trường là thích hợp cho các tế bào vừa sinh trưởng trên thành chai vừa tiếp xúc với môi trường và không khí. Tuy nhiên, chai trực lẫn chỉ dùng cho quy mô phòng thí nghiệm vì diện tích bề mặt trên một đơn vị thể tích của chai nuôi cấy khá nhỏ ($500 \text{ cm}^2/\text{L}$).



Hình 6.1. Các tế bào động vật thường được sử dụng trong nuôi cấy.

(a) tế bào bạch huyết, (b) tế bào biểu mô, (c) nguyên bào sợi

Tỷ lệ diện tích/thể tích có thể được tăng lên khi các tế bào sinh trưởng trên các giá thể là polymer bọt biển (spongy), thể gốm (ceramic), các sợi rỗng, bao vi thể (microcapsule), hoặc trên các hạt nhỏ có kích thước hiển vi gọi là microcarrier.

III. Môi trường nuôi cấy

Nhu cầu dinh dưỡng của các tế bào động vật có vú lớn hơn vì sinh vật do, không giống các vi sinh vật, động vật không trao đổi chất nitrogen vô cơ. Vì thế, nhiều amino acid và vitamin cần phải được bổ sung vào môi trường. Môi trường đặc trưng dùng trong nuôi cấy tế bào động vật bao gồm các amino acid, các vitamin, các hormone, các nhân tố sinh trưởng, muối khoáng và glucose. Ngoài ra, môi trường cần được cung cấp từ 2-20% (theo thể tích) huyết tương của động vật có vú. Mặc dù huyết thanh có thành phần chưa được xác định đầy đủ, nhưng nhiều nghiên cứu đã cho thấy nó rất cần thiết cho sự phát triển và tồn tại của tế bào trong nuôi cấy. Bảng 6.2 trình

bày thành phần và hàm lượng của các chất trong môi trường Eagle (Eagle 1959), đây là một trong những môi trường được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy tế bào động vật.

Bảng 6.2. Thành phần môi trường Eagle (1959).

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>1. L-Amino acid</i>		<i>3. Vitamin</i>	
Arginine	105	Choline	1
Cystine	24	Folic acid	1
Glutamine	292	Inositol	2
Histidine	31	Nicotinamide	1
Isoleucine	52	Pantothenate	1
Leucine	52	Pyridoxal	1
Lysine	58	Riboflavin	0,1
Methionine	15	Thiamine	1
Phenylalanine	32		
Threonine	48	<i>4. Muối</i>	
Tryptophan	10	NaCl	6800
Tyrosine	36	KCl	400
Valine	46	CaCl ₂	200
		MgCl ₂ .6H ₂ O	200
<i>2. Carbohydrate</i>		NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O	150
Glucose	1000	NaHCO ₃	2000
Serum	5-10%		

Huyết thanh dùng trong môi trường nuôi cấy không chỉ đắt tiền mà còn là nguồn nhiễm bẩn virus và mycoplasma. Do bản chất hóa học của huyết thanh chưa được xác định đầy đủ nên trong một số trường hợp có thể ảnh hưởng xấu đến kết quả nuôi cấy. Sự hiện diện của nhiều protein khác nhau trong huyết thanh cũng có thể làm phức tạp các quá trình phân tách và

ting sạch đầu ra. Vì lý do đó, nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để xây dựng công thức môi trường không có huyết thanh. Những công thức này chứa các hormone và các nhân tố sinh trưởng được tinh sạch để thay thế cho huyết thanh.

Trước đây, huyết thanh của thai bò (fetal bovine serum-FBS), được bổ sung ở nồng độ 1-20%, là rất cần thiết cho sự sinh sản của các tế bào động vật có vú. Nhưng ngày nay, nhiều quá trình nuôi cấy tế bào ở quy mô lớn đã bắt đầu thực hiện trong môi trường không có huyết thanh.

IV. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật

Phương pháp chính trong nuôi cấy tế bào động vật có vú để sản xuất các sản phẩm sinh-dược là dựa trên cơ sở nuôi cấy dịch huyền phù trong hệ lên men. Từ lâu, hệ lên men đã được sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn và nấm men. Đầu tiên, sự lên men là thuật ngữ dùng cho sản xuất cồn. Sau đó, các nhà vi sinh vật học ứng dụng các nguyên tắc trên để tách chiết các vitamin, các acid hữu cơ và các kháng sinh... Kết quả dẫn đến sự phát triển nhanh chóng các phương pháp và các hệ thống lên men khác nhau.

Các nguyên lý tương tự sau đó được ứng dụng cho nuôi cấy sinh khối tế bào động vật và thực vật. Tuy nhiên, nuôi cấy các tế bào động vật và thực vật khó khăn hơn nhiều so với vi sinh vật, cái chính là do quá trình trao đổi chất trong các loại tế bào này diễn ra chậm, điều này cũng phản ánh tốc độ sinh trưởng chậm của tế bào. Các tế bào động vật có nhu cầu dinh dưỡng phức tạp hơn so với vi khuẩn và nấm men, chúng không có thành tế bào như vi khuẩn vì thế rất dễ biến dạng và vỡ. Do đó, các hệ thống khuấy và sục khí được thiết kế khác với nuôi cấy vi khuẩn. Mặc dù có một số điểm không thuận lợi, nhưng hệ thống lên men đã được sử dụng để nuôi cấy tế bào động vật ít nhất cũng vài chục năm trước đây. Các dòng tế bào khác nhau như BHK-21, LS, các tế bào Namalwa... đã được sinh trưởng trong hệ lên men theo phương thức nuôi cấy chìm ngập trong môi trường để sản xuất các viral vaccine và các sản phẩm khác.

Đặc điểm dễ biến dạng và dễ vỡ của tế bào động vật đã được khắc phục bằng cách đưa vào các cánh khuấy có dạng hình mái chèo. Việc cung cấp khí trực tiếp có thể tạo ra bọt khí dễ làm vỡ tế bào, vì thế cần cung cấp khí bằng cách khuếch tán thông qua ống silicone. Môi trường chứa nhiều protein huyết thanh có khả năng gây ra hiện tượng tạo bọt nên cần khuấy chậm và nhẹ. Đối với nuôi cấy mật độ cao, cần cung cấp thêm oxygen.

Phương pháp dùng ống silicone để sục khí có nhiều ưu điểm do không tạo ra bọt khí và tốc độ truyền oxygen là thỏa đáng.

Như vậy, các hệ lên men vi sinh vật được cải tiến thích hợp có thể dùng để nuôi cấy sinh khối các tế bào động vật sinh trưởng trong dịch huyền phù. Nếu muốn nuôi cấy một dòng tế bào dính bám thì nên dùng một hệ thống chất mang như là microcarrier.

Các dòng tế bào động vật có vú thường được sử dụng trong nuôi cấy là CHO⁴, NSO⁵, BHK⁶, HEK-293⁷ và tế bào võng mạc của người.

1. Hệ thống sản xuất

Phát triển một quá trình sản xuất công nghiệp cho protein tái tổ hợp của tế bào động vật có vú thường dựa theo hệ thống được trình bày ở hình 6.2. Đầu tiên, gen quan tâm được tái tổ hợp với các nhân tố điều hòa phiên mã (promoter) cần thiết trong plasmid vector để chuyển vào tế bào. Đồng thời, gen thứ hai (gen chọn lọc-selector, hay còn gọi là gen chỉ thị chọn lọc-selectable marker) cũng được chuyển cho tế bào nhận để phân biệt tế bào được biến nạp và không biến nạp. Sự hiện diện của tác nhân chọn lọc trên môi trường nuôi cấy sau khi chuyển gen một vài ngày đã cho phép phân lập các tế bào tái tổ hợp sống sót. Các gen chỉ thị chọn lọc được dùng phổ biến nhất là dihydrofolate reductase (DHFR), một enzyme tham gia trong quá trình chuyển hóa nucleotide, và glutamine synthetase (GS). Trong cả hai trường hợp, sự chọn lọc xảy ra khi thiếu chất chuyển hóa thích hợp trong môi trường (hypoxantine và thymidine, trong trường hợp của DHFR hoặc glutamine trong trường hợp GS), do đó đã ngăn cản sự sinh trưởng của các tế bào không biến nạp.

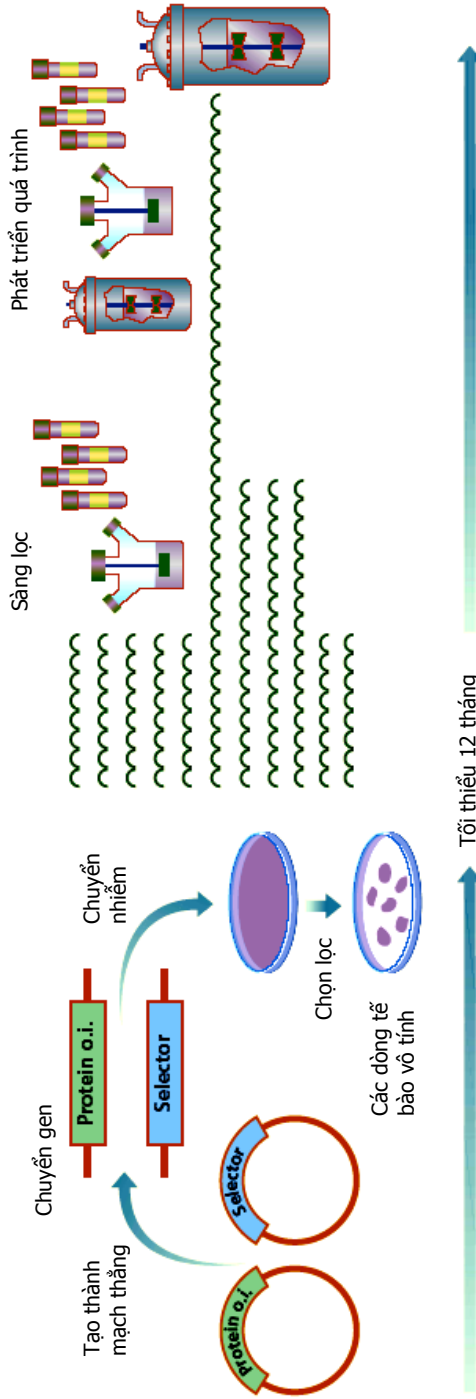
Sau khi chọn lọc, các tế bào sống sót (xem như là các tế bào đơn) được chuyển vào bình nuôi cấy thứ hai, và quá trình nuôi cấy được phát triển để sản xuất các quần thể vô tính (clonal populations). Cuối cùng, các dòng riêng biệt được đánh giá khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp để chọn ra dòng có khả năng sản xuất cao nhất. Từ những dòng này, một dòng tế bào có tốc độ sinh trưởng thích hợp và các sản lượng cao được sử dụng để sản xuất protein tái tổ hợp. Quá trình nuôi cấy sau đó sẽ được thiết lập và tối ưu hóa cho sản xuất.

⁴ Chinese hamster ovary: tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc.

⁵ Mouse myeloma: tế bào u tủy của chuột.

⁶ Baby hamster kidney: tế bào thận của chuột đồng sơ sinh.

⁷ Human embryo kidney: tế bào thận của phôi người.



Hình 6.2. Sinh sản và phát triển dòng tế bào cho các quá trình nuôi cấy để sản xuất protein tái tổ hợp mong muốn (protein o.i.). Các đường gọn sóng chỉ ra số lần cấy chuyển của các dòng tế bào riêng biệt để sàng lọc tế bào đưa vào sản xuất. Các lọ nhỏ là ngân hàng tế bào được đông lạnh trong nitrogen lỏng. Các bình nuôi xoay (spinner flask) mô tả các hệ thống nuôi cấy quy mô nhỏ để tối ưu hóa quy trình, và các hệ lên men mô tả các quá trình sản xuất ở quy mô lớn.

2. Tối ưu hóa môi trường dinh dưỡng và tế bào vật chủ

Hiện nay, môi trường thương mại dùng cho nuôi cấy tế bào có chất lượng cao đã được một số nhà cung cấp hàng đầu sản xuất. Tuy nhiên, việc sản xuất protein tái tổ hợp cũng cần phải được tối ưu hóa bằng cách khảo sát trên nhiều công thức môi trường dinh dưỡng. Thông thường, một quá trình sản xuất riêng biệt đòi hỏi một vài công thức môi trường khác nhau, trong đó mỗi công thức được thiết kế cho một phase đặc trưng của sự sinh trưởng.

Các môi trường cho tốc độ sinh trưởng nhanh đòi hỏi cấy chuyển 3-5 ngày/lần. Quá trình sản xuất mẻ (6-8 ngày) hoặc mẻ mở rộng (10-21 ngày) dài hơn nhiều so với thời gian cấy chuyển đặc trưng. Phát triển môi trường thích hợp là vô cùng quan trọng và phải được thiết kế trên một cơ sở riêng biệt, đối với mỗi quá trình và mỗi dòng tế bào.

Tương tự môi trường, các tế bào vật chủ cũng phải được cải thiện để chống lại các ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy làm giảm khả năng sống sót và/hoặc tiến hành các bước chuyển gen để kích thích sinh trưởng. Kết quả nghiên cứu của nhiều phòng thí nghiệm cho thấy, các tế bào vật chủ có thể được cải thiện sinh trưởng, khả năng sống sót và sản lượng nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp. Các proto-oncogene⁸, các gen điều chỉnh chu kỳ tế bào (cyclins), các gen yếu tố sinh trưởng (ví dụ yếu tố sinh trưởng giống insulin) và các gen antiapoptosis đã được đưa vào trong tế bào để tạo ra các vật chủ siêu sản xuất (superior production hosts).

Cải thiện sự biến đổi và sản xuất protein hậu dịch mã là một phát triển đầy hứa hẹn khác. Chẳng hạn, người ta thấy hiệu lực của các kháng thể có thể được cải thiện bằng cách tăng cường hiệu lực của cơ quan phản ứng miễn dịch tự nhiên của chúng. Sự biểu hiện dư thừa (over expression) được ổn định của *N*-acetylglucosaminyl-transferase-III, một enzyme không được biểu hiện tự nhiên trong các tế bào CHO và NS0, trong các tế bào sản xuất kháng thể tái tổ hợp đã kích thích tạo các IgG ở nồng độ cao và các oligosaccharide không fucosyl hóa (fucosylation) trong vùng Fc. Những biến đổi của dạng glyco (glycoform) đã làm tăng từ 5-10 lần các độc tố tế bào phụ thuộc kháng thể.

⁸ Proto-oncogene: gen tiền ung thư.

V. Các kháng thể đơn dòng

Các tế bào bạch huyết (lymphocytes) là các tế bào máu trắng cần cho các phản ứng miễn dịch. Các B-lymphocyte, loại sản xuất kháng thể, hiện diện trong lá lách, các u bạch huyết (lympho nodes) và máu. Khi một chất ngoại lai đi vào trong cơ thể của động vật có xương sống, thì các tuyến B-lymphocyte sản xuất nhanh và tiết ra các phân tử protein gọi là immunoglobulin hay còn gọi là kháng thể (antibody). Các kháng thể có các vị trí kết hợp có thể nhận ra hình dạng của yếu tố quyết định đặc hiệu trên bề mặt của chất ngoại lai, còn gọi là kháng nguyên (antigen). Kết quả là các kháng thể có thể liên kết với kháng nguyên đặc hiệu, trung hòa và đào thải các chất ngoại lai. Do tính đặc hiệu của chúng trong việc nhận dạng các tế bào hoặc phân tử đặc biệt nên kháng thể đã là những công cụ rất quan trọng để các nghiên cứu viên và thầy thuốc lâm sàng phát hiện sự hiện diện và nồng độ của thuốc, các sản phẩm của virus và vi khuẩn, hormone và các kháng thể khác trong máu.

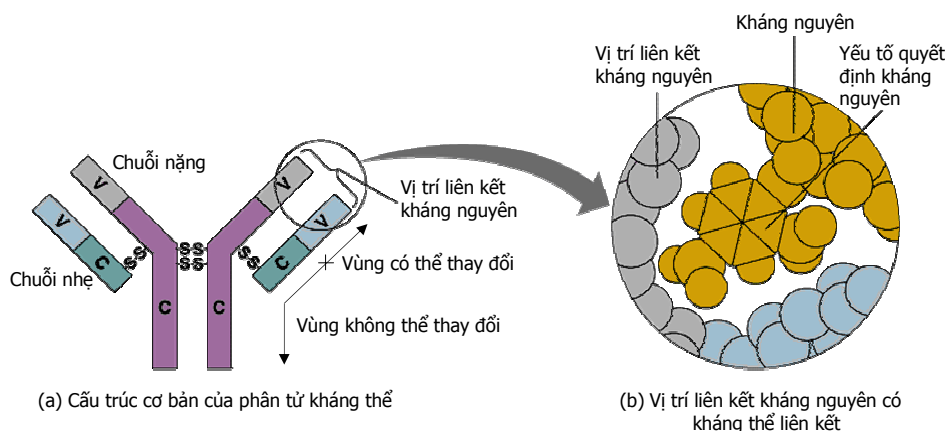
Có 5 loại kháng thể là immunoglobulin G, A, M, D và E. Hình 6.3. minh họa cấu trúc của một loại kháng thể immunoglobulin G (IgG), có cấu trúc protein dạng hình chữ Y bao gồm một cặp chuỗi nặng (heavy chain)⁹ và một cặp chuỗi nhẹ (light chain)¹⁰ được liên kết bởi các cầu nối disulfide. Mỗi chuỗi có 2 vùng: (1) vùng có thể thay đổi được, vùng này khác nhau tùy thuộc vào mỗi loại kháng thể và chúng chứa các vị trí liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên khác nhau, (2) vùng không thể thay đổi được, đặc trưng cho các kháng thể của một phân lớp nhất định. Bản chất của liên kết kháng thể-kháng nguyên tương tự với bản chất của phức hợp cơ chất-enzyme.

Có nhiều dòng khác nhau của B-lymphocyte và mỗi dòng sản xuất ra các kháng thể khác nhau nhận ra các yếu tố quyết định kháng nguyên đặc hiệu. Vì thế, khi một động vật được tiêm một tác nhân miễn dịch, thì nó phản ứng bằng cách sản xuất ra một hỗn hợp kháng thể đa dạng hầu như không thể phân chia được. Để sản xuất một lượng lớn kháng thể đồng nhất (kháng thể đơn dòng) chỉ nhận ra một cấu trúc hóa học, chúng ta phải cho sinh trưởng được một dòng tế bào đặc biệt của B-lymphocyte. Tuy nhiên,

⁹ Heavy chain: mạch polypeptide có trọng lượng phân tử khoảng 55 kDa.

¹⁰ Light chain: mạch polypeptide có trọng lượng phân tử khoảng 23 kDa.

người ta nhận thấy là các tế bào tiết (tạo) ra kháng thể không thể duy trì được trên môi trường nuôi cấy.



Hình 6.3. Cấu trúc kháng thể immunoglobulin G (IgG).

1. Dung hợp tế bào

Không giống như các tế bào tiết ra kháng thể, các tế bào myeloma (u tủy) là loại tế bào khối u ác tính của hệ thống miễn dịch, có thể được nuôi cấy liên tục. Köhler và Milstein (1975) đã phát triển một phương pháp dung hợp các tế bào B-lymphocyte của lá lách với tế bào myeloma của chuột để lai hai loại tế bào này với nhau, tế bào lai myeloma (hay hybridoma), có thể có đặc điểm của cả hai dòng tế bào: đó là sản xuất các kháng thể đặc hiệu và bất tử. Vì hybridoma được bắt nguồn từ một tế bào B-lymphocyte đơn, nên nó chỉ sản xuất một loại kháng thể gọi là kháng thể đơn dòng.

Phương thức đặc trưng để dung hợp tế bào như sau (Hình 6.4):

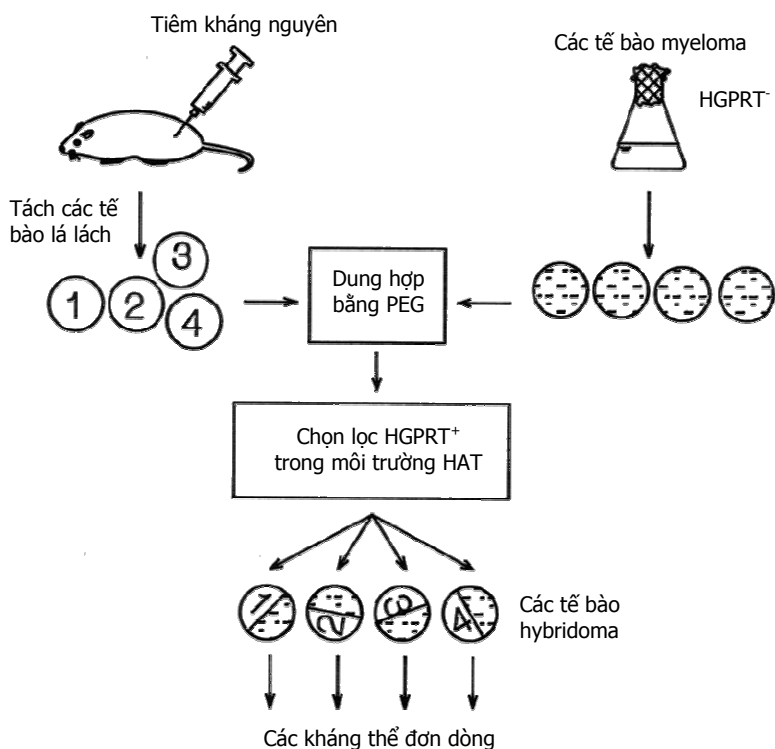
- Tiêm kháng nguyên được chọn vào trong chuột. Hệ thống miễn dịch trong chuột đáp ứng bằng cách sản xuất các tế bào B-lymphocyte để tiết ra kháng thể.

- Lấy lá lách của chuột và tách các tế bào B-lymphocyte.

- Nuôi các tế bào myeloma thích hợp thiếu HPGRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase), đột biến HPGRT⁻, một marker di truyền để chọn các tế bào lai sau khi dung hợp.

- Dung hợp các tế bào B-lymphocyte với các tế bào myeloma bằng cách trộn chúng trong môi trường chứa 40-50% polyethylene glycol (PEG). Môi trường sẽ chứa các hỗn hợp của B-lymphocyte, myeloma, và các tế bào hybrid-myeloma. Các B-lymphocyte chứa HPGRT, như vậy các hybridoma cũng chứa HPGRT. Vì thế, các tế bào myeloma được coi như là HPGRT⁻, trong khi các tế bào B-lymphocyte và hybridoma là HPGRT⁺.

- Chọn lọc các tế bào HPGRT⁺ bằng cách nuôi cấy hỗn hợp trên môi trường chứa HAT (hypoxanthine, aminopterin và thymidine) là chất ức chế sinh trưởng các tế bào HPGRT⁻. Do đó, các tế bào myeloma sẽ chết trên môi trường này, trong khi các tế bào hybridoma sẽ phân chia. Các B-lymphocyte không dung hợp sẽ chết do khoảng thời gian sống bị hạn chế của chúng.



Hình 6.4. Phương thức dung hợp các tế bào B-lymphocyte.

2. Thử nghiệm kháng thể

Các kháng thể đơn dòng có thể được phân tích bằng kỹ thuật thử nghiệm pha rắn như các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme (enzyme linked immunosorbent assays-ELISA) hoặc các thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmuno assays-RIA). Các phương thức thử nghiệm đặc trưng như sau (Hình 6.5):

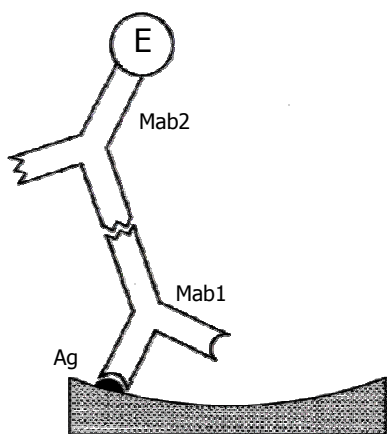
- Đưa dung dịch kháng nguyên đặc hiệu (Ag) vào các giếng của đĩa microtitre có khả năng hút bám kháng nguyên bằng sự tương tác kỵ nước không đặc hiệu. Bổ sung một loại protein không gây cản trở liên kết kháng nguyên-kháng thể sau này, như là bovine serum albumin (BSA) để chiếm các vị trí gắn còn lại trên giếng.

- Bổ sung dung dịch kháng thể đơn dòng thứ nhất (Mab1) là kháng thể đặc hiệu vào giếng. Kháng thể sẽ liên kết với kháng nguyên trên bề mặt rắn.

- Bổ sung kháng thể đơn dòng thứ hai (Mab2) là kháng thể có đặc tính tương phản với immunoglobulin của loại mà từ đó tế bào hybridoma bắt nguồn. Một enzyme (E) cho phương pháp ELISA hoặc đánh dấu đồng vị phóng xạ cho phương pháp RIA được gắn đồng hóa trị với kháng thể thứ hai.

- RIA: đo hoạt tính phóng xạ bằng phương pháp phóng xạ tự ghi (autoradiography) hoặc bằng phương pháp đếm nhấp nháy của hệ thống nâng đỡ rắn (solid scintillation counter).

- ELISA: Bổ sung cơ chất thích hợp và đo mật độ quang (OD) sản phẩm của nó trên máy quang phổ ở bước sóng thích hợp.



Hình 6.5. Sơ đồ thử nghiệm kháng thể ELISA. Enzyme sẽ được thay thế bằng đánh dấu hoạt tính phóng xạ trong trường hợp thử nghiệm RIA.

VI. Sản xuất thuốc và DNA vaccine

1. Interferon

Interferon là một loại cytokine (protein) do tế bào động vật sinh ra mỗi khi chúng bị virus xâm nhập, interferon không đặc hiệu và có tác dụng ức chế sinh sản của virus, ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển (sự phân hóa) của các tế bào khối u và tế bào bình thường nhất định nào đó. Interferon có thể được coi như một loại thuốc hữu hiệu chống các bệnh nhiễm virus và kể cả một vài dạng ung thư.

Cơ thể động vật sản xuất hai loại interferon là interferon I và interferon II. Interferon I có hoạt tính kháng virus bao gồm interferon- α (IFN- α , khối lượng phân tử khoảng từ 17-26 kDa, được bạch cầu sản xuất) và interferon- β (IFN- β , khối lượng phân tử khoảng 21 kDa, được nguyên bào sợi sản xuất). Cả hai loại IFN- α và IFN- β có tác dụng chống lại sự sinh sản của tế bào, đặc biệt là IFN- α , kích thích hoạt động các tế bào giết tự nhiên (NK) làm tăng biểu hiện các phân tử HLA¹¹ lớp I. IFN- α được ứng dụng để điều trị ung thư có hiệu quả (đặc biệt là ung thư máu ác tính, ung thư biểu mô tế bào thận), điều trị bệnh nhiễm virus viêm gan B và C mạn tính (có thể chữa khỏi từ 40-50% số bệnh nhân). Interferon- γ (IFN- γ , có khối lượng phân tử khoảng 25 kDa, được sản xuất từ các lympho T CD4+¹² (h1), T CD8+ và các tế bào NK) hoạt hóa cho sự biểu hiện của các phân tử HLA lớp II, làm thúc đẩy sự biệt hóa các tế bào mono thành các đại thực bào.

Các interferon riêng biệt có các phạm vi hoạt động khác nhau trong các loài khác nhau. α -interferon đã chứng tỏ hiệu quả chống lại bệnh hairy-cell leukemia và viêm gan C. Ngoài ra, nó còn có hoạt tính chống viêm gan B mạn tính, cũng như điều trị bướu sinh dục và một vài bệnh ung thư như ung thư máu và tủy xương. Thuốc xịt mũi chứa α -interferon cung cấp một số chất bảo vệ chống bệnh cảm lạnh do các rhinovirus gây ra.

Trong một thời gian dài, việc cung cấp interferon người cho nghiên cứu bị hạn chế do kỹ thuật tách chiết rất tốn kém. Đến năm 1979, Klein và

¹¹ HLA (Human Leucocyte Antigen): kháng nguyên tế bào bạch cầu người, còn có nghĩa là MHC (phức hệ tương hợp mô chủ yếu-Major Histocompatibility Complex) của người.

¹² CD (Clusters of Differentiation): cụm biệt hóa kháng nguyên. Là những phân tử bộc lộ trên bề mặt tế bào, được nhận biết bởi những kháng thể đơn dòng đặc hiệu với chúng. Số lượng CD hiện nay của các tế bào hệ miễn dịch đã được tìm ra lên đến hàng trăm loại (CD1÷CD247).

cộng sự đã xây dựng hệ thống sản xuất ổn định cho interferon của lymphoid người bằng kỹ thuật nuôi cấy dịch huyền phù của African Burkitt's lymphoma có nguồn gốc từ dòng tế bào Namalva với sự cảm ứng bằng virus gây bệnh New Castle. Nuôi cấy tế bào đã được sinh trưởng trong hệ lên men 50 L trên môi trường không có huyết thanh và được cung cấp oxygen hòa tan ở nồng độ cao để tối ưu sự sinh trưởng của tế bào. Trung bình 3,35 units interferon/mL đã được thu hồi trong sản phẩm cuối cùng chưa tinh sạch.

Tuy nhiên, ngày nay việc tách chiết một lượng lớn interferon đã trở nên thuận lợi hơn nhiều nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp. Gen mã hóa interferon được biến nạp vào tế bào nấm men *S. cerevisiae* (eukaryote) có khả năng sản xuất interferon với sản lượng rất cao. Thành công này đã làm giảm đáng kể giá thành của interferon, mở ra cơ hội sử dụng loại thuốc này trong điều trị các bệnh viêm nhiễm virus và một vài dạng ung thư.

2. Hoạt tố plasminogen mô

Hoạt tố plasminogen mô (t-PA) là một ví dụ về protein trị liệu được tổng hợp trong nuôi cấy các tế bào động vật có vú chuyển gen. t-PA là một protease có tác dụng phân hủy các sợi tơ huyết fibrin (dạng hoạt hóa của protein gây đông máu fibrinogen¹³, protein không tan đã đông kết thành các sợi để hình thành một cục máu đông) được sử dụng để chữa bệnh nghẽn mạch máu. Bệnh nhân bị những cơn đau tim thường được uống t-PA vì nó phá tan những cục máu nhỏ có khả năng làm tắc mạch.

Các nghiên cứu gần đây cho thấy có thể sử dụng các tuyến sữa của động vật chuyển gen để sản xuất các protein hiếm của người. Chẳng hạn, gen t-PA được đưa vào phôi chuột bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, sau đó phôi chuột được cấy vào chuột cái tạo thành chuột chuyển gen có khả năng tiết t-PA người qua sữa.

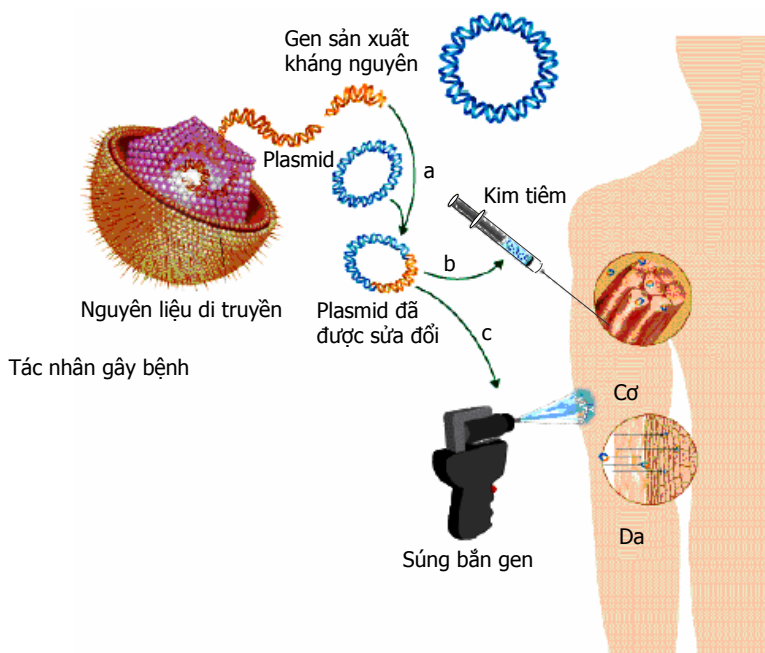
3. DNA vaccine

Còn gọi là vaccine DNA tái tổ hợp, đây là loại nucleic acid vaccine, dựa trên nguyên lý một gen mã hóa cho protein kháng nguyên đặc hiệu được tiêm vào vật chủ (tế bào động vật hoặc vi sinh vật) để sản xuất các kháng nguyên này và khởi động một phản ứng miễn dịch. Nhiều vaccine

¹³ Fibrinogen: protein huyết tương do các tế bào nhu mô gan tổng hợp, tiền chất của fibrin, hoạt hóa để hình thành một cục máu đông khi mạch máu bị chấn thương.

phòng virus hiện nay (sởi, tê liệt, dại...) đều được sản xuất từ nuôi cấy tế bào động vật mà không phải là tế bào vi sinh vật.

Hình 6.6 minh họa mô hình sản xuất và điều trị bằng liệu pháp vaccine DNA tái tổ hợp: Phân lập một hoặc nhiều gen từ tác nhân gây bệnh (pathogen), đưa các gen này vào trong vòng DNA của plasmid và đóng lại (a). Các vòng DNA sau đó được đưa vào trong các nhóm tế bào nhỏ, thường bằng cách tiêm vào tế bào cơ (b) hoặc đẩy vào da nhờ súng bắn gen (c). Các gen được chọn lựa mã hóa cho các kháng nguyên, các chất có thể gây ra một đáp ứng miễn dịch, thường được sản xuất bởi tác nhân gây bệnh.



Hình 6.6. Mô hình sản xuất và điều trị bằng liệu pháp DNA vaccine.

3.1. Phương thức hoạt động của các DNA vaccine

Các DNA vaccine kích thích phản ứng miễn dịch bảo vệ để chống lại tác nhân ngoại nhiễm hoặc tác nhân gây bệnh, chủ yếu bằng hai cách của hệ thống miễn dịch: nhánh thể dịch (yếu tố tấn công các tác nhân gây bệnh bên ngoài tế bào), và nhánh tế bào (yếu tố đào thải các tế bào bị xâm nhiễm bởi tác nhân gây bệnh). Khả năng miễn dịch sẽ được duy trì khi hoạt động này

tạo ra các tế bào ghi nhớ (memory cells) lâu dài để sẵn sàng ngăn chặn tác nhân gây bệnh.

Các vaccine cảm ứng miễn dịch theo phương thức DNA vaccine đi vào tế bào đích (ví dụ: mô cơ) và sau đó hoạt động sản xuất kháng nguyên của tế bào thường được tìm thấy trên tác nhân gây bệnh.

- Trong phản ứng thể dịch, các tế bào máu trắng được gọi là tế bào B liên kết để giải phóng các bản sao của các protein kháng nguyên và sau đó tăng lên nhiều lần. Nhiều thế hệ sau của tế bào đã tiết ra các phân tử kháng thể (trong suốt quá trình xâm nhiễm) và chúng sẽ kết thành cụm trên tác nhân gây bệnh để đánh dấu nó và sau đó là phá hủy.

- Sự biểu hiện các đoạn protein kháng nguyên (hoặc peptide) trên các tế bào bị xâm nhiễm có thể khởi động một đáp ứng tế bào. Sự liên kết các phức hợp kháng nguyên sẽ cảm ứng các tế bào máu trắng (cytotoxic T cells¹⁴) sinh sôi nảy nở để giết chết các tế bào được liên kết hoặc những yếu tố khác biểu hiện các chuỗi peptide tương tự. Các tế bào được hoạt hóa cũng sẽ trở thành các tế bào ghi nhớ, sẵn sàng đào thải các tế bào bị xâm nhiễm bởi tác nhân gây bệnh trong tương lai.

3.2. Thử nghiệm các DNA vaccine trên người

Bảng 6.3 liệt kê một số DNA vaccine được thử nghiệm trên người. Tất cả các vaccine ứng viên trong các thử nghiệm giai đoạn đầu để kiểm tra độ an toàn và đáp ứng miễn dịch đã được sử dụng để điều trị tốt. Không có thử nghiệm nào không có kết quả trong việc ngăn ngừa bệnh. Hầu hết các nghiên cứu này vẫn đang tiếp tục.

VII. Tế bào động vật sử dụng trong cấy ghép

Đây là lĩnh vực ứng dụng mới của nuôi cấy tế bào động vật có vú. Trước đây, để khắc phục các sai hỏng của cơ thể, người ta sử dụng các tác nhân như thuốc, mô hay cơ quan ghép, bộ phận giả. Ngày nay, cùng với sự

¹⁴ Cytotoxic T cells: các tế bào T gây độc, là những tế bào tiêu diệt các tế bào khác. Tất cả các tế bào T gây độc đều là các T-CD8 chỉ nhận biết MHC-lớp I, nhưng tế bào T-CD4 cũng có thể diệt các tế bào khác ở một số trường hợp. Các tế bào T gây độc có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ vật chủ chống lại các tác nhân gây độc nội bào.

phát triển của kỹ thuật nuôi cấy tế bào, xu hướng cấy ghép tế bào đã trở nên ngày càng phổ biến hơn. Chẳng hạn, việc ghép các tế bào tụy sản xuất insulin của lợn vào người mắc bệnh tiểu đường đã được thực hiện vào những năm 1990, tuy nhiên kết quả vẫn chưa rõ ràng. Nghiên cứu này nếu thành công sẽ giúp bệnh nhân không còn phụ thuộc vào việc tiêm thường xuyên insulin, đồng thời loại bỏ tối đa các hậu quả của bệnh. Nguyên tắc tương tự cũng được áp dụng cho trường hợp các tổn thương thần kinh. Một công trình gần đây cho thấy việc ghép các tế bào thần kinh lấy từ thể vân của thai cho phép phục hồi các chức năng của não cũng như chức năng vận động ở khỉ Macaque trước đó có mang các biểu hiện giống chứng bệnh múa giật Huntington của người.

Bên cạnh đó, kỹ thuật ghép tế bào tự thân cũng rất được quan tâm. Người ta hy vọng bằng cách ghép cho bệnh nhân các tế bào nguồn tạo máu sẽ khắc phục được tình trạng không hoạt động của tủy xương (chẳng hạn trường hợp bị chiếu xạ liều cao do tai nạn). Các tế bào này trước đó được thu nhận từ chính người bệnh, cho sinh sản và biệt hóa trong môi trường nhân tạo có chứa các nhân tố sinh trưởng và sau đó được tiêm trở lại cho người bệnh với số lượng lớn. Một nghiên cứu gần đây đã thành công trong việc ghép tự thân tế bào sụn. Trước đây, để chữa các bệnh thương tổn đầu gối, người ta buộc phải sử dụng các bộ phận giả. Tuy nhiên, giải pháp này tỏ ra không hiệu quả lắm: các vật liệu sinh học dùng để chế tạo bộ phận giả (thường là polyethylene) rất kém bền so với đòi hỏi vận động nhiều của khớp gối nên cứ sau 15 năm lại phải thay. Mặt khác, do tế bào sụn không có khả năng sinh sản để bù đắp thương tổn nên không thể dựa vào sự tái sinh tự nhiên. Nhóm nghiên cứu trên đã thu nhận sinh thiết từ một phần sụn lành của người bệnh, tách rời từng tế bào nhờ enzyme thủy phân. Các tế bào này được nuôi cấy và tiêm trở lại vào nơi bị tổn thương. Ở đó, chúng sản sinh và tái tạo một lớp sụn lành thay cho phần hư hỏng. Kỹ thuật này được áp dụng thành công trên vài trăm người bệnh và đã được thương mại hóa rộng rãi. Theo một số tác giả thì tủy xương có thể tiết vào trong máu các tế bào có khả năng biệt hóa thành sụn cơ. Trên cơ sở này, họ đã ghép tế bào tủy xương lấy từ chuột chuyển gen lên chuột bình thường bị tổn thương cơ. Sau vài tuần, các chuột sau chạy nhanh như thỏ, với các tế bào cơ chứa nhân màu xanh.

Bảng 6.3. Một số DNA vaccine được thử nghiệm trên người.

stt	Vaccine	Protein được mã hóa bởi các gen vaccine	Kết quả miễn dịch
1	Ngăn chặn viêm gan B	Kháng nguyên bề mặt viêm gan B	Các đáp ứng tế bào và thể dịch
2	Ngăn chặn các Herpes đơn	Herpes glycoprotein	Các phân tích miễn dịch đang tiến hành
3	Ngăn chặn HIV	Các protein vỏ và điều hòa, hoặc các protein lõi và các enzyme cần thiết trong sao chép HIV	Các đáp ứng tế bào (một cách cơ bản, tất cả các gen chắc chắn sẽ được thử nghiệm trong một vaccine)
4	Ngăn chặn bệnh cúm	Hemagglutinin (ngưng kết tổ hồng cầu)	Các phân tích miễn dịch đang tiến hành (thử nghiệm đã kết thúc)
5	Ngăn chặn bệnh sốt rét	Circumsporozoite protein (protein hạt bào tử vòng)	Các đáp ứng tế bào
6	Liệu pháp HIV	Các protein vỏ và điều hòa; hoặc các protein TAT, NEF và điều hòa	Các đáp ứng thể dịch trong thử nghiệm đầu tiên (đã được kết thúc), các đáp ứng tế bào trong một thử nghiệm khác
7	Các liệu pháp cho ung thư biểu mô do adenovirus ở vú và ruột kết	Carcinoembryonic antigen (CEA)	Các đáp ứng tế bào
8	Các liệu pháp cho B cell lymphoma	Immunoglobulin	Các đáp ứng thể dịch
9	Liệu pháp cho cutaneous T cell lymphoma (CTCL)	T cell receptor	Các phân tích miễn dịch đang tiến hành (thử nghiệm đã kết thúc)
10	Liệu pháp cho ung thư tuyến tiền liệt	Kháng nguyên màng đặc hiệu của tuyến tiền liệt	Các phân tích miễn dịch đang tiến hành

VIII. Tạo cơ quan từ tế bào động vật nuôi cấy

Trong y học, để điều trị chứng xơ vữa động mạch, người ta cần thay thế các mạch máu bị hỏng. Các mạch máu nhân tạo kém bền trong khi khâu nối và rất dễ bị tắc nghẽn. Gần đây, một nhóm nghiên cứu đã sản xuất thành công mạch máu tự nhiên bằng cách nuôi cấy tế bào động mạch chủ của bò, gồm tế bào cơ và tế bào nội mô, trên một giá thể polymer tự tiêu. Các nhà nghiên cứu đã sử dụng một thiết bị hoạt động như quả tim thật và tác động lên các mạch đang hình thành giống hệt như trong điều kiện tự nhiên. Thí nghiệm tương tự với các tế bào có nguồn gốc từ lợn đã cho phép sản xuất mạch máu mà khi đem ghép trở lại trên lợn cho những kết quả rất khả quan.

Tuy nhiên, loại tế bào đang có triển vọng nhất trong lĩnh vực này là tế bào mầm phôi. Tế bào mầm phôi chuột đã được sử dụng từ lâu, nhưng phải đến cuối thế kỷ 20 người ta mới thu nhận được tế bào mầm phôi người bằng hai cách khác nhau: từ tế bào phôi nang và từ tế bào mầm nguyên thủy. Các nhà khoa học cho rằng các tế bào vốn có tính toàn thể này (totipotency) có khả năng tái tạo mô và cơ quan mới, thậm chí có thể chặn đứng cả quá trình lão hóa nếu cơ thể được cung cấp chúng thường xuyên. Một ứng dụng thực tế hơn là việc điều trị cho những cặp vô sinh không có khả năng sản sinh tế bào sinh dục.

Để sử dụng tế bào mầm phôi vào mục đích điều trị cần phải thu nhận được những dòng tế bào có mang bộ gen của người bệnh. Hiện nay, có ba cách tiếp cận chính:

- Tạo dòng trị liệu: thay thế vật liệu di truyền của noãn người bằng nhân của một tế bào trưởng thành. Biện pháp này, về nguyên tắc tương tự như kỹ thuật tạo dòng cừu Dolly. Khác biệt duy nhất ở chỗ thay vì sau đó cấy phôi trở lại tử cung mẹ, người ta sẽ nuôi nó trong điều kiện *in vitro* đến giai đoạn phôi nang. Các tế bào phôi thai được thu nhận từ đó và đem nuôi cấy.

- Cấy nhân tế bào người vào noãn của một động vật có vú bất kỳ đã loại nhân.

- Lập chương trình mới cho nhân của tế bào trưởng thành bằng cách kết hợp tế bào mầm phôi với nhân của một tế bào sinh dưỡng.

Bên cạnh những triển vọng rất lớn, việc sử dụng mầm phôi người cũng gọi ra nhiều vấn đề kỹ thuật, chủ yếu là: (1) phương pháp cho phép các tế bào mầm phôi người biệt hóa theo hướng mong muốn, và (2) các nhân tố chỉ thị và phương pháp chọn lọc tế bào đích (target cells).

Những hiểu biết mới về cơ chế quá trình phát sinh cá thể cộng với việc phát hiện những protein cảm ứng của quá trình này có thể sẽ giải quyết được các vấn đề nêu trên. Gần đây, người ta đã phân lập được một protein (đặt tên là Cerberus), protein này là tín hiệu đầu tiên trong chuỗi hiện tượng hình thành đầu ở phôi cóc (*Xenopus laevis*). Chính nó đã cảm ứng sự biệt hóa các tế bào lân cận ngoại bì thành não và mắt, các tế bào trung bì thành tim và tế bào nội bì thành gan. Phát hiện này góp phần mở ra một triển vọng mới: sản xuất hàng loạt các cơ quan thay thế bằng cách nuôi cấy các tế bào mầm phôi với sự hiện diện của một protein cảm ứng đặc hiệu để hướng sự biệt hóa của chúng thành loại mô mong muốn.

IX. Mô hình thực nghiệm

Như chúng ta đã biết, một loại thuốc muốn dùng để điều trị bệnh trước khi được phép lưu hành phải trải qua nhiều thử nghiệm để đảm bảo hiệu quả tác dụng cũng như mức độ an toàn của nó, trong đó giai đoạn thử nghiệm bước đầu trên các động vật mô hình (model animal) có một ý nghĩa rất quan trọng. Thông thường, những thử nghiệm này đòi hỏi một thời gian dài và tốn kém, đồng thời không phải lúc nào cũng áp dụng được cho người... Vì vậy, hiện nay xu hướng sử dụng tế bào nuôi cấy *in vitro* làm mô hình thử nghiệm ngày càng phát triển, nhất là khi người ta có khả năng nuôi cấy hầu như mọi loại tế bào nhờ vào các kỹ thuật hiện đại.

Mô hình thử nghiệm trên tế bào đã được sử dụng trong các khảo sát về sự chuyển hóa các chất có nguồn gốc ngoại lai nhờ hệ enzyme nội bào. Loại tế bào được sử dụng thông dụng nhất là tế bào gan, do nó có một số ưu thế sau: (1) gan đóng vai trò chủ yếu trong chuyển hóa các hợp chất hóa học, đặc biệt là chất độc, (2) tế bào gan nuôi cấy vẫn giữ nguyên (trong vài giờ đến vài ngày) các chức năng đặc trưng bao gồm cả enzyme chuyển hóa hiện diện với hàm lượng lớn. Việc nuôi cấy chung tế bào gan với tế bào biểu mô cho phép duy trì chúng sống trong nhiều tuần lễ. Đặc biệt, các tế bào gan đã được biến đổi di truyền để có thể sinh tổng hợp các cytochrome P450, đây là các enzyme then chốt trong chuyển hóa các chất ngoại lai, rất có ích để xác định loại cytochrome chịu trách nhiệm biến đổi một loại thuốc nhất định.

Một ứng dụng khác của nuôi cấy tế bào động vật là khảo sát các độc tính đối với vật chất di truyền do các chất chuyển hóa trong tế bào gắn lên DNA. Người ta có thể tạo ra các hư hỏng đặc trưng trên tế bào bằng các chất độc, từ đó phát hiện bào quan bị ảnh hưởng và xác định các cơ chế hóa sinh và phân tử của quá trình chuyển hóa chất độc. Loại tế bào thông dụng nhất

được sử dụng trong trường hợp này cũng là tế bào gan, nhưng hiện nay người ta đã bắt đầu sử dụng tế bào thận và phối để mở rộng nghiên cứu.

Nhìn chung, triển vọng của các mô hình tế bào động vật nuôi cấy rất lớn, đặc biệt là với sự phát triển của nhiều kỹ thuật hiện đại cho phép đảm bảo khả năng sống và chức năng ổn định cho tất cả các loại tế bào nuôi cấy, khả năng phục hồi và sửa chữa các hư hỏng của tế bào cũng như tự động hóa các thao tác.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. Phạm Kim Ngọc và Hồ Huỳnh Thùy Dương. 2001. Sinh học của sự sinh sản. *NXB Giáo dục*, TP Hồ Chí Minh.

2. Bronzino JD. 1995. The Biomedical Engineering Handbook. *CRC Press and IEEF Press*, USA.

3. Fox SR, Patel UA, Yap MG and Wang DI. 2004. Maximizing interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells through temperature shift optimization: experimental and modeling. *Biotechnol Bioeng.* 85(2):177-84.

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

5. Lindner-Olsson E, Chatzissavidou N and Lüllau E. 2001. Animal Cell Technology: From Target to Market. *Proceedings of the 17th ESACT Meeting, Sweden. Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherland.

6. Pollard JW and Walker JM. 1997. Basic Cell Culture Protocols. *Humana Press Inc.* Totowa, New Jersey, USA.

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

8. Wurm FM. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotech.* 22: 1393-1398.

Chương 7

Nuôi cấy tế bào thực vật

I. Mở đầu

Thực vật là nguồn cung cấp các hợp chất hóa học khác nhau rất có giá trị, chẳng hạn các chất dùng làm dược liệu, các chất tạo mùi, các chất dùng làm gia vị, các sắc tố và các hóa chất dùng trong nông nghiệp (Bảng 7.1). Những sản phẩm này, được biết như là các chất trao đổi thứ cấp (secondary metabolites), thường được sản xuất với một lượng rất nhỏ (dạng vết) trong thực vật và không có chức năng trao đổi chất rõ ràng¹. Chúng dường như là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với môi trường chung quanh, là sự thích nghi với stress của môi trường hoặc là sự bảo vệ hóa học chống lại vi sinh vật và động vật.

Mặc dù, hóa học tổng hợp hữu cơ đạt nhiều thành tựu quan trọng nhưng nhiều hợp chất trao đổi thứ cấp (thường gọi là các chất thứ cấp) vẫn còn khó tổng hợp hoặc có thể tổng hợp được nhưng chi phí rất đắt. Chẳng hạn, một số hỗn hợp phức tạp như tinh dầu hoa hồng là không thể tổng hợp hóa học được. Để sản xuất các sản phẩm thứ cấp từ thực vật, các mô thực vật ngoại sinh (chẳng hạn từ cây hoàn chỉnh) có thể được sử dụng để nuôi cấy tế bào dịch huyền phù (cell suspension culture) trong điều kiện vô trùng. Cơ sở khoa học của kỹ thuật này là dựa trên tính toàn thể hóa sinh (biochemical totipotency) duy nhất của tế bào thực vật.

Nuôi cấy tế bào thực vật trong điều kiện *in vitro* để sản xuất các chất thứ cấp có một số ưu điểm sau:

- Các tế bào thực vật có thể được nuôi cấy trong các điều kiện nhân tạo mà không phụ thuộc vào thời tiết và địa lý. Không cần thiết để vận chuyển và bảo quản một số lượng lớn các nguyên liệu thô.

¹ Các chất sơ cấp được sản xuất với số lượng lớn hơn các chất thứ cấp và có các chức năng trao đổi đặc biệt. Các chất sơ cấp thu được từ thực vật bậc cao được sử dụng như là thực phẩm, các phụ gia thực phẩm, và các nguyên liệu thô trong công nghiệp như là các carbohydrate, dầu thực vật, protein và các acid béo.

Bảng 7.1. Các sản phẩm tiềm năng của thực vật đang được quan tâm.

Thực phẩm	Chất màu	Anthocyanin, betacyanin, saffron
	Chất mùi	Chuối, mơ, táo, đào, nho, lê, dứa, quả mâm xôi, nho, măng tây, capsicum, cà chua, cần tây, vanilla, cocoa.
	Chất ngọt	Miraculin, monellin, stevioside, thaumatin
	Gia vị	Bạch đậu khấu, long não, cây hương thảo, nghệ, ngải đắng
	Tinh dầu	Tỏi, hoa nhài, chanh, hành tây, bạc hà, hoắc hương, hoa hồng, vetiver
Dược liệu	Các alkaloid	Ajmalacine, atropine, berberine, codein, hyoscyamine, morphine, scopolamine, vinblastine, vincristine, camptothecin, quinine, serpentine
	Các steroid	Digitoxin, digoxin, diosgenin
	Các chất khác	Ginsengoside, shikonin, ubiquinone-10, rosmarinic acid, diosgenin, L-Dopa, saponin
	Các protein tái tổ hợp	Kháng thể đơn dòng, các interleukin, GM-CSF, các enzyme khác
Nông nghiệp	Hóa chất	Pyrethrin, rotenone, neriifolin, salannin, azadirachtin, các hóa chất alleopathic

- Có thể kiểm soát chất lượng và hiệu suất của sản phẩm bằng cách loại bỏ các trở ngại trong quá trình sản xuất thực vật, như là chất lượng của nguyên liệu thô, sự đồng nhất giữa các lô sản xuất và sự hư hỏng trong quá trình vận chuyển và bảo quản.

- Một số sản phẩm trao đổi chất được sản xuất từ nuôi cấy dịch huyền phù có chất lượng cao hơn trong cây hoàn chỉnh.

Thách thức lớn nhất đối với công nghệ tế bào thực vật là sự ổn định cho phép nuôi cấy tế bào thực vật trên quy mô lớn và đạt hiệu suất tối đa

cho sự tích lũy và sản xuất các chất thứ cấp. Điều này có thể thực hiện bằng cách chọn lọc các kiểu gen thích hợp và các dòng tế bào có sản lượng cao, xây dựng các công thức môi trường dinh dưỡng hợp lý để nuôi cấy tế bào, thiết kế và vận hành các hệ thống nuôi cấy tế bào (bioreactor) hiệu quả. Chúng ta cũng có thể sử dụng kinh nghiệm và kiến thức có được từ nuôi cấy vi sinh vật để áp dụng cho nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, tế bào thực vật và vi sinh vật có một số đặc điểm khác nhau, vì thế cần phải cải tiến và điều chỉnh các điều kiện nuôi cấy cũng như cấu hình của nồi phản ứng (reactor) để tìm được các yêu cầu đặc thù của nuôi cấy tế bào thực vật.

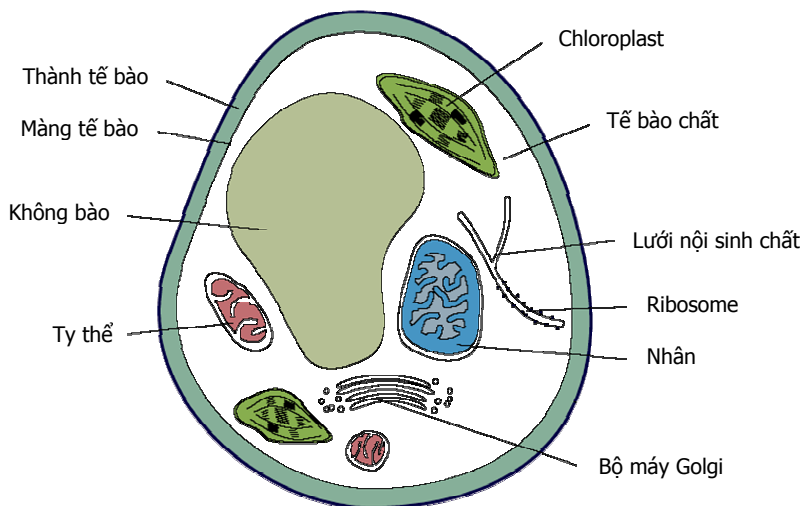
Một số đặc điểm chính khác nhau giữa tế bào thực vật và vi sinh vật:

- Tế bào thực vật lớn hơn tế bào vi khuẩn hoặc vi nấm từ 10-100 lần.
- Sự trao đổi chất của tế bào thực vật chậm hơn vì thế đòi hỏi phải duy trì một điều kiện vô trùng trong thời gian lâu hơn.
- Tế bào thực vật có khuynh hướng kết thành một khối gây ra sự lắng đọng, có khả năng hòa trộn kém.
- Các tế bào thực vật mẫn cảm dễ biến dạng hơn tế bào vi sinh vật.
- Quá trình sản xuất các chất thứ cấp ở tế bào thực vật phụ thuộc các cơ chế điều hòa phức tạp hơn so với các tế bào vi sinh vật.
- Các tế bào thực vật có độ ổn định di truyền thấp hơn tế bào vi sinh vật.

II. Tế bào thực vật

Hình ảnh tế bào thực vật được minh họa ở hình 7.1. Một tế bào đơn thực vật thường có đường kính khoảng từ 20-40 μm và dài 100-200 μm . Cấu trúc chính của tế bào thực vật tương tự các tế bào đặc trưng của eukaryote. Tuy nhiên, tế bào thực vật có một số đặc điểm riêng biệt như thành tế bào dày, không bào lớn và có lục lạp.

Tế bào thực vật được bọc chung quanh bởi thành tế bào. Lớp ngoài của thành tế bào chứa pectin để giúp nó liên kết với các tế bào bên cạnh. Lớp trong của thành tế bào là màng tế bào. Màng tế bào hoàn toàn khác với thành tế bào về hình dạng, thành phần và chức năng. Trong khi thành tế bào cứng rắn, có cấu trúc tương đối dày thì màng tế bào chất lại mỏng (khoảng 75 Å) và mềm dẻo. Màng tế bào bao gồm protein và lipid trong khi thành tế bào là carbohydrate tự nhiên. Thành tế bào có chức năng nâng đỡ cho cây trong khi màng tế bào điều hòa sự vận chuyển các chất đi vào và ra khỏi tế bào.



Hình 7.1. Minh họa một tế bào thực vật.

Không bào (vacuole) có vai trò tiếp nhận các chất thải của sự trao đổi chất hoặc các chất thứ cấp của thực vật. Ở các tế bào non không bào thường nhỏ và nhiều. Khi tế bào lớn dần và già hơn thì không bào cũng mở rộng lên và kết thành một khối. Ở các tế bào thực vật trưởng thành, không bào có thể chiếm tới 90% thể tích tế bào. Không bào được bọc chung quanh bởi màng huyết tương (plasma). Thành phần chính của các không bào lớn là nước chứa các chất hòa tan như các ion vô cơ, các amino acid, các acid hữu cơ, các sắc tố hòa tan trong nước (anthocyanin) và các chất không hòa tan ở dạng tinh thể và hình kim. Ngoài ra, không bào cũng chứa các protein như các hydrolyse, catalase và photphatase. Phân bào tan muốn đề cập đến lipid ở chung quanh tất cả các cấu trúc nổi giữa nhân và màng tế bào.

Lục lạp (chloroplast) là vị trí của quang hợp trong tế bào thực vật, nó chứa chlorophyll là sắc tố lục phản ứng với ánh sáng để sản xuất các carbohydrate. Nhân (nuclear) là trung tâm điều khiển của tế bào chứa DNA để phiên mã và dịch mã thành protein. Các protein tổng hợp được sắp xếp và đóng gói trong các túi của bộ máy Golgi. Nội sinh chất (endoplasmic reticulum) là mạng lưới của các ống nhỏ nối liền các phần khác nhau của tế bào. Ribosome được tập trung trên bề mặt của mạng lưới nội sinh chất và

tham gia vào hoạt động sinh tổng hợp protein. Ty thể (mitochondrion) chứa vật liệu di truyền và nhiều enzyme quan trọng trong sự trao đổi chất của tế bào.

III. Các loại nuôi cấy tế bào và mô thực vật

Khái niệm nuôi cấy tế bào và mô thực vật thường được dùng như là một thuật ngữ chung để mô tả tất cả các loại nuôi cấy thực vật ở điều kiện *in vitro*. Trong các quá trình nuôi cấy này thường xuất hiện hai kiểu sinh trưởng sau:

1. Sinh trưởng không phân hóa (*undifferentiated growth*)

Sinh trưởng không phân hóa xuất hiện thường xuyên khi một mẫu mô của cây hoàn chỉnh được nuôi cấy *in vitro*. Mẫu mô sau đó đã làm biến mất mọi cấu trúc có thể nhận biết được của cây nguyên vẹn ban đầu.

1.1. Nuôi cấy callus

Nuôi cấy callus cho phép các khối tế bào không có hình dạng nhất định tăng lên từ sinh trưởng không phân hóa của mẫu vật trên môi trường dinh dưỡng rắn vô trùng (Hình 7.2). Mẫu vật thường là các cơ quan tử nhỏ hoặc các mẫu mô. Các khối tế bào này không tương ứng với mọi cấu trúc mô đặc trưng của cây hoàn chỉnh. Thuật ngữ nuôi cấy callus được sử dụng do sự phân chia vô tổ chức của tế bào mà lúc đầu được nghĩ là nó cảm ứng với sự tổn thương thực thể của thực vật trong quá trình tách ra khỏi cây hoàn chỉnh. Tuy nhiên, sau đó người ta nhận thấy nó được cảm ứng bởi các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (plant growth regulators) trong môi trường dinh dưỡng rắn.



Hình 7.2. Nuôi cấy callus.

1.2. Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào

Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào chứa các tế bào và các khối tế bào, sinh trưởng phân tán trong môi trường lỏng (Hình 7.3 và 7.4). Thường được khởi đầu bằng cách đặt các khối mô callus dễ vỡ vụn trong môi trường lỏng chuyển động (lắc hoặc khuấy). Nuôi cấy dịch huyền phù vì thế là sự tiến triển từ thực vật đến mẫu vật, tới callus, và cuối cùng tới dịch huyền phù. Nuôi cấy dịch huyền phù thích hợp hơn cho việc sản xuất sinh khối của tế bào thực vật so với nuôi cấy callus, do nuôi cấy dịch huyền phù có thể duy trì và được thao tác tương tự với các hệ thống lên men vi sinh vật được ngập chìm trong môi trường lỏng.

1.3. Nuôi cấy tế bào trần

Nuôi cấy tế bào trần (protoplast) đòi hỏi sự sinh trưởng của protoplast trên môi trường đặc hoặc lỏng. Protoplast có thể được chuẩn bị bằng phương pháp cơ học hoặc enzyme để loại bỏ thành tế bào. Các protoplast được phân lập có thể được sử dụng để: (1) biến đổi thông tin di truyền của tế bào thực vật, (2) tạo ra cây lai vô tính thông qua dung hợp protoplast (protoplast fusion), (3) nghiên cứu sự xâm nhiễm của virus ở thực vật và những vấn đề khác. Một ứng dụng đầy triển vọng khác của nuôi cấy protoplast là vi nhân giống thực vật. Sau khi phân chia protoplast, thành tế bào được tái sinh để tăng sự phát triển callus và tiếp theo là cây hoàn chỉnh nhờ đó thực vật có thể được nhân lên nhiều lần.

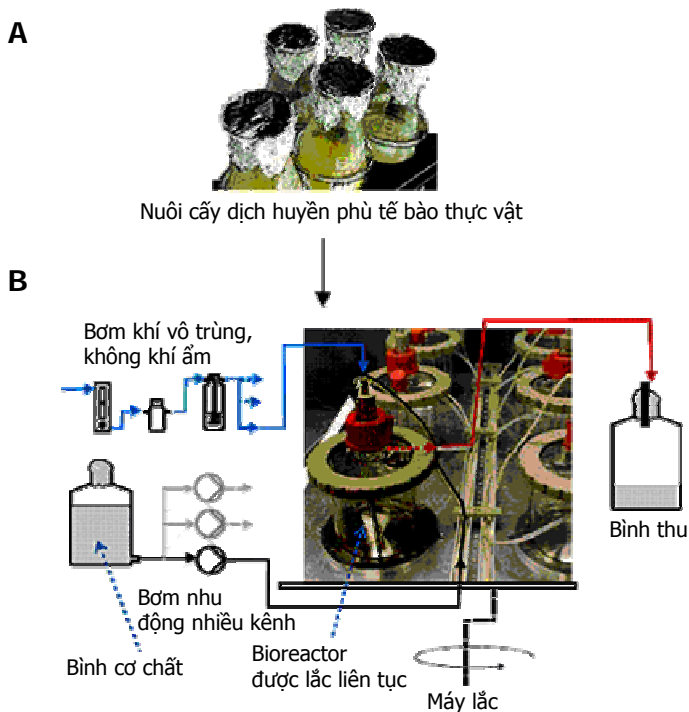
2. Sinh trưởng có phân hóa (*differentiated growth*)

Sinh trưởng có phân hóa xuất hiện khi các bộ phận của thực vật được chuyển lên môi trường nuôi cấy là nơi chúng có thể tiếp tục sinh trưởng với cấu trúc đã được duy trì từ trước. Các cơ quan thực vật được phân hóa có thể sinh trưởng trong quá trình nuôi cấy mà không bị mất sự toàn vẹn của mình còn gọi là nuôi cấy cơ quan (*organ culture*).

2.1. Nuôi cấy rễ tơ

Nuôi cấy rễ tơ có thể được thiết lập từ đầu rễ tách ra ở nhiều loài thực vật khác nhau. Các nuôi cấy rễ sinh trưởng nhanh có thể thu được từ các loài cây hai lá mầm bằng cách gây nhiễm chúng với vi khuẩn đất *Agrobacterium*

rhizogenes. Các dòng rễ tơ (hairy root) được hình thành có thể dùng trong nuôi cấy để sản xuất các chất thứ cấp (Hình 7.5).



Hình 7.3. Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào thực vật trên máy lắc. A: Nuôi trong bình tam giác có lắc để chuẩn bị tế bào. B: Nuôi trong hệ lên men lắc để sản xuất sinh khối.



Hình 7.4. Hệ lên men có cánh khuấy (bình nuôi 5 L) dùng để nuôi cấy dịch huyền phù tế bào thực vật ở quy mô phòng thí nghiệm.



Hình 7.5. Nuôi cấy rễ tơ.

2.2. Nuôi cấy phôi

Nuôi cấy phôi (embryo) có thể được thiết lập cho các phôi tách ra từ các hạt vô trùng, các noãn hoặc quả. Các phôi được sản xuất từ kỹ thuật nuôi cấy tế bào, được gọi là phôi vô tính (somatic embryo), có thể được phân lập và nảy mầm cung cấp một cây trên một mẫu vật. Nuôi cấy phôi có thể được ứng dụng để sản xuất nhanh cây giống từ các hạt có thời gian ngủ nghỉ dài. Phương pháp này có nhiều ưu điểm hơn các hệ thống nhân giống truyền thống như là quá trình đồng nhất di truyền, sản xuất sinh khối và nhân giống các cây trồng sạch bệnh.

IV. Môi trường nuôi cấy

Mặc dù nhu cầu dinh dưỡng của các loại mô nuôi cấy là rất khác nhau nhưng môi trường nuôi cấy mô thực vật đặc trưng chứa các thành phần sau:

- **Các nguyên tố đa lượng.** Bao gồm các loại muối của nitrogen, potassium, calcium, phosphorus, magnesium và sulfur. Đây là sáu nguyên tố chính cần thiết cho sinh trưởng của thực vật bậc cao.

- **Các nguyên tố vi lượng.** Bao gồm các loại muối của sắt, kẽm, mangan, boron, copper, molybdenum và cobalt ở dạng vết.

- **Các phụ gia hữu cơ.** Một lượng nhỏ các loại vitamin (myo-inositol, thiamine, nicotinic acid, pyridoxine, riboflavin...), các amino acid (thường cho phép bỏ qua nhưng trong một số trường hợp đặc biệt thì có thể dùng), và các phụ gia hữu cơ không xác định khác (malt, dịch chiết nấm men, dịch thủy phân casein, nước dừa...).

- **Các chất kích thích sinh trưởng thực vật.** Thành phần phụ gia quan trọng nhất quyết định kết quả nuôi cấy là các chất điều hòa sinh

trưởng. Các auxin (IAA² và các dạng tương tự được tổng hợp nhân tạo như 2,4-D³, NAA⁴, IBA⁵, NOA⁶...), và các cytokinin (zeatin, 2i-P⁷ và các dạng tương tự được tổng hợp nhân tạo như kinetin, BA⁸...) là những nhóm chất kích thích sinh trưởng và phát sinh hình thái chủ yếu trong nuôi cấy mô và cơ quan của thực vật.

- **Nguồn carbon.** Thường sử dụng sucrose làm nguồn carbon thay cho nguồn carbon được thực vật cố định từ khí quyển bằng quang hợp. Trong đa số các thí nghiệm nuôi cấy, tế bào thực vật đã mất khả năng quang hợp. Glucose cũng thường được đưa vào môi trường và cho hiệu quả tương đương sucrose, trong khi fructose cho hiệu quả kém hơn.

- **Các tác nhân làm rắn (tạo gel) môi trường.** Thường sử dụng là agar, một loại polysaccharide thu được từ một số loài tảo thuộc ngành tảo đỏ (Rhodophyta). Một số hợp chất khác cũng được thử nghiệm thành công như alginate, phytigel, methacel và gel-rite.

Murasghige và Skoog (1962) đã xây dựng môi trường dinh dưỡng cơ bản (gọi là môi trường MS) thích hợp cho hầu hết các thí nghiệm nuôi cấy tế bào thực vật. Thành phần môi trường nuôi cấy được trình bày ở bảng 7.2.

V. Sản xuất các chất thứ cấp

Các chất trao đổi thứ cấp hay còn gọi là các chất thứ cấp có thể xếp trong ba nhóm chính: alkaloid, tinh dầu và glycoside.

Các alkaloid có dạng tinh thể là các hợp chất chứa nitrogen, có thể được tách chiết bằng cách dùng dung dịch acid⁹. Alkaloid có hoạt tính sinh lý trên tất cả động vật và được sử dụng trong công nghiệp dược. Họ alkaloid bao gồm: codein, nicotine, caffeine và morphine. Các tinh dầu chứa hỗn hợp terpenoid và được sử dụng như là chất mùi, chất thơm và dung môi. Glycoside bao gồm các phenolic, tanin và flavonoid, saponin và các

² IAA: indoleacetic acid

³ 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

⁴ NAA: α -naphthaleneacetic acid

⁵ IBA: indole-3-butyric acid

⁶ NOA: 2-naphthoxyacetic acid

⁷ 2-iP: 6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine

⁸ BA: N⁶-benzyladenine hay 6-benzylaminopurine (BAP)

⁹ Tên alkaloid có nghĩa là giống như kiềm (alkali)

cyanogenic glycoside, một số trong chúng được sử dụng làm chất nhuộm, các chất mùi thực phẩm và dược phẩm.

Bảng 7.2. Thành phần môi trường Murashige và Skoog (1962).

Thành phần	Nồng độ (mg/L)	Thành phần	Nồng độ (mg/L)
<i>1. Các nguyên tố đa lượng</i>		FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
KH ₂ PO ₄	170	<i>3. Nguồn carbon</i>	
KNO ₃	1900	Sucrose	30000
NH ₄ NO ₃	1650		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440		
<i>2. Các nguyên tố vi lượng</i>		<i>4. Các phụ gia hữu cơ</i>	
H ₃ BO ₃	6,2	- Các vitamin	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	Thiamine.HCl	0,5
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	Pyridoxine.HCl	0,5
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	Nicotinic acid	0,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	myo-inositol	100
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	- Các chất khác	
KI	0,83	Glycine	2

Một trong những nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến việc sản xuất các chất thứ cấp từ tế bào thực vật là sự phân hóa hình thái. Nhiều chất thứ cấp được sản xuất trong suốt quá trình phân hóa tế bào. Vì thế, chúng thường được tìm thấy trong các mô có tính đặc trưng cao như là rễ, lá và hoa. Do sự phân hóa hình thái và sự trưởng thành không xuất hiện trong nuôi cấy tế bào, nên các chất thứ cấp có khuynh hướng ngưng tạo thành trong nuôi cấy tế bào thực vật. Chỉ một số giới hạn hệ thống nuôi cấy tế bào thực vật là có thể sản xuất một lượng vừa phải các chất thứ cấp, cho dù thực vật tự nhiên mà từ đó các tế bào được thu thập, là có thể sản xuất chúng.

Tuy nhiên, các tế bào không phân hóa trong nuôi cấy dịch huyền phù thường tạo thành một khối khoảng vài trăm tế bào do tính chất dính nhót của bề mặt tế bào, từ sự tiết ra của các polysaccharide cũng như mật độ cao của tế bào (Hình 7.6). Do gradient nồng độ và sự tương tác tế bào, các tế bào ở giữa khối sẽ được tiếp xúc với môi trường, điều đó khác với các tế bào ở bên ngoài. Do đó, sự phân hóa sẽ xuất hiện tới một mức độ nào đó trong khối để cho phép tạo thành các chất thứ cấp.



Hình 7.6. Sự kết khối trong nuôi cấy tế bào thực vật.

Một số kết quả nghiên cứu cho rằng một số nuôi cấy dịch huyền phù có khả năng tổng hợp các sản phẩm đặc biệt có nồng độ cao hơn so với cây mà từ đó chúng bắt nguồn. Chẳng hạn: Schulte và cs (1987) đã thông báo sự tạo thành các anthraquinone trong các nuôi cấy tế bào (được tối ưu các điều kiện) đã vượt trội các cây sinh trưởng trong điều kiện tự nhiên (17/19 loài khác nhau) thuộc các chi *Asperula*, *Galium*, *Rubia* và *Sherardia*. Hiệu suất anthraquinone cao nhất là trường hợp của loài *Galium verum* (1,7 g/L) và nồng độ cao nhất là ở loài *Rubia fruticosa* (20% trọng lượng khô).

Đã có những bằng chứng rõ ràng cho thấy có mối quan hệ ngược (feedback) giữa tốc độ sinh trưởng và khả năng sản xuất các chất thứ cấp. Khi tốc độ sinh trưởng cao, các quá trình sơ cấp của tế bào là phân chia tế bào và sản xuất sinh khối tế bào đã diễn ra mạnh mẽ. Ngược lại, trong pha tĩnh khi sự sinh trưởng giảm đến mức tối thiểu, thì lúc này hoạt động sản xuất và tích lũy các chất thứ cấp đã tăng lên.

Thành phần môi trường cũng có ảnh hưởng một cách ý nghĩa đến số lượng các chất thứ cấp được sản xuất. Yêu cầu cơ bản khi thiết kế các công thức môi trường dinh dưỡng là đảm bảo hoàn thành sự sinh trưởng của tế bào. Sau khi tế bào đạt đến một quần lạc nhất định, sự thay đổi thành phần môi trường cũng có thể ảnh hưởng đến sự tích lũy sản phẩm. Chẳng hạn, người ta đã cải thiện sản lượng của shikonin có nguồn gốc từ nuôi cấy dịch huyền phù tế bào của cây *Lithospermum erythrorhizon* bằng cách dùng môi trường sản xuất để thay cho môi trường sinh trưởng. Môi trường sản xuất

thường chứa nhiều sucrose hơn nhưng ít các thành phần vô cơ và vitamin hơn so với môi trường sinh trưởng.

Tích lũy sản phẩm bằng nuôi cấy tế bào thực vật có thể được kích thích bởi các elicitor sống hoặc không sống. Các elicitor sống là các hợp chất hoặc các chất có nguồn gốc từ vi sinh vật và các elicitor không sống là các tác nhân gây stress như chiếu xạ UV, sốc thẩm thấu, hoặc các ion kim loại nặng. Các elicitor sống (biotic) thường được sản xuất bằng cách nghiền đồng thể hệ sợi nấm và vô trùng dịch thu được. Ảnh hưởng của các biotic elicitor lên sự tích lũy của các chất thứ cấp tùy thuộc vào đặc trưng và nồng độ của elicitor, thời gian tiếp xúc elicitor, và giai đoạn sinh trưởng của tế bào thực vật.

1. Các chất thứ cấp dùng trong thực phẩm

1.1. Các chất màu

- Anthocyanin

Các anthocyanin là các sắc tố tiêu biểu có trong các loài thực vật hạt kín (angiosperms) và các loài thực vật có hoa (flowering plants) của các họ Poaceae, Fabaceae, Rosaceae, Cruciferae, Vitaceae và Solanaceae tập trung ở các bộ phận khác nhau như: rễ, lá, hoa và quả. Anthocyanin tách chiết từ nho là nguồn tiềm tàng nhất trên thế giới. Hiện nay, người ta cũng đã tiến hành nuôi cấy tế bào của các loài *Vitis vinifera*, *Daucus carota* và *Euphorbia millii* để sản xuất anthocyanin. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào là phương tiện lý tưởng để sản xuất anthocyanin với sản lượng cao từ 10-20% trọng lượng khô. Sản xuất anthocyanin nói chung đạt cực đại trong suốt pha tĩnh. Stress thẩm thấu được tạo ra do sucrose và các tác nhân khác cho thấy có thể điều hòa quá trình sản xuất anthocyanin trong nuôi cấy tế bào *V. vinifera*.

- Betalaine

Các betalaine là các sắc tố tiêu biểu có trong các loài thực vật hạt kín và các loài thực vật có hoa thuộc các họ Chenopodiaceae, Amaranthaceae và Phytolacaceae. Một số loài nấm ăn thuộc bộ Agaricinales cũng sản xuất betalaine. Nuôi cấy tế bào thực vật đã chứng minh được khả năng sản xuất betalaine. Giống như nhiều chất thứ cấp khác, betalaine trong nuôi cấy tế bào thực vật đạt nồng độ cực đại trong pha tĩnh của sinh trưởng tế bào. Tuy nhiên, nuôi cấy tế bào dịch huyền phù của *Phytolacca americana* lại cho

thấy betalaine đạt nồng độ cao nhất ở pha sinh trưởng hàm mũ (pha log). Tế bào cây *Chenopodium rubrum* nuôi cấy 15 ngày tuổi có thể sản xuất được 35-45 mg betalaine/L môi trường. Nuôi cấy tế bào và nuôi cấy rễ tơ của cây *Beta vulgaris* cũng được tiến hành để sản xuất betalaine.

- Crocin và crocetin

Crocus sativus (cây nghệ tây) là nguồn cung cấp crocin chủ yếu, một loại sắc tố màu đỏ tươi được tìm thấy trong đầu nhụy của nó. Đầu nhụy cây nghệ tây (saffron) cũng sản xuất các crocetin. Crocin là một digentiobiocide ester của crocetin. Đây là loại nguyên liệu có giá trị cao, do thực tế cây nghệ tây chỉ có thể sinh trưởng ở những vùng địa lý đặc biệt trên thế giới và đòi hỏi nhiều nhân công khi thu hoạch. Muốn thu hoạch 1 kg đầu nhụy nghệ tây (một loại gia vị có giá trị) cần phải có khoảng 150.000 hoa. Hiện nay, người ta đã phát triển các phương pháp nuôi cấy tế bào của đầu nhụy cây nghệ tây trong điều kiện *in vitro* để sản xuất các gốc cơ bản của saffron. Mô nuôi cấy trong trường hợp này được cảm ứng để sản xuất các callus có màu chứa crocin và các crocetin và cũng là safrana (gốc cơ bản của chất màu) của saffron.

- Capsaicin và các capsaicinoid

Capsaicin là gốc cay chủ yếu của ớt, các capsaicinoid chịu trách nhiệm cho vị cay là dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin và homodihydrocapsaicin. Capsaicinoid được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm như một phụ gia. Ngoài ra, người ta còn sử dụng capsaicin tinh khiết để bào chế được phẩm điều trị chứng viêm khớp và làm thuốc giảm đau. Capsaicin có thể được sản xuất bằng nuôi cấy bất động tế bào của *Capsicum frutescens*. Các tế bào *Capsicum* bất động sẽ sản xuất capsaicin cao gấp vài lần so với tế bào dịch huyền phù tự do. Mô giá noãn (placenta) của *Capsicum* được bất động sẽ sản xuất lượng capsaicin cao hơn các tế bào bất động.

1.2. Các chất mùi

- Vanilla

Đây là nguyên liệu tạo mùi phổ biến và được sử dụng rộng rãi nhất. Vanilla tự nhiên là thị trường rất hứa hẹn cho sản xuất chất mùi bằng phương pháp công nghệ sinh học. Nó là hỗn hợp phức tạp của các thành

phần chất mùi chiết ra từ hạt của *Vanilla planifolia*. Đây là hóa chất mùi phổ biến và được sử dụng rộng rãi cho nhiều loại thực phẩm. Khoảng 12.000 tấn vanilla được tiêu thụ hằng năm, nhưng trong đó chỉ khoảng 20 tấn được tách chiết từ hạt, phần còn lại được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học, thường là từ các sản phẩm hóa dầu như guaiacol và một đôi khi từ lignin, một sản phẩm của bột giấy. Sản xuất các hợp chất mùi vanilla bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *V. planifolia* đã được chứng minh thành công. Nuôi cấy tế bào cây *V. planifolia* được khởi đầu bằng nuôi cấy các cơ quan khác nhau của cây như lá hoặc đoạn thân bằng cách dùng các tổ hợp chất kích thích sinh trưởng khác nhau. Thông thường, kinetin được dùng để khởi động sự tổng hợp vanillic acid trong nuôi cấy dịch huyền phù của *V. planifolia*. Sản xuất vanilla được cải thiện bằng cách bổ sung thêm than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy. Sản lượng vanilla trong nuôi cấy tế bào thường là 2,2%. Một số cải tiến điều kiện nuôi cấy đã làm giảm thời gian nuôi cấy tế bào từ 160 giờ còn 50 giờ và sản lượng vanilla tăng từ 100 mg/L lên đến hơn 1.000 mg/L, tương đương 8% hàm lượng vanilla trên trọng lượng khô.

- Garlic và onion

Các chất mùi garlic và onion cũng được sản xuất trong nuôi cấy tế bào. Các chất mùi này phát triển từ các tiền chất (precursor) ngoại sinh trong quá trình xử lý sau thu hoạch. Nuôi cấy tế bào cây tỏi (*Allium sativum*) không phân hóa (hoặc các callus phân hóa có màu xanh lục) đã thu được một số loại tiền chất amino acid (methyl, propyl, allyl và cysteine sulphoxides) và hai loại hợp chất ninhydrin-positive không xác định. Chất mùi tổng số thu được trong callus hình cầu màu trắng (globular white callus) và callus màu xanh lục phân hóa chậm (semidifferentiated green callus) tương ứng là 4% và 13% so với cây trồng trong tự nhiên. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật của cây hành (*Allium cepa*) để sản xuất các chất mùi onion cũng đã được phát triển. Prince (1991) đã chứng minh sự tăng lên của các hợp chất mùi onion trong nuôi cấy rễ. Thông qua việc bổ sung các amino acid như cysteine, methionine và glutathione, nồng độ cuối cùng của sản phẩm có thể tăng lên rất lớn.

1.3. Các chất ngọt

- Stevioside

Stevioside tự nhiên ngọt hơn sucrose khoảng 300 lần. Dịch chiết từ cây hoàn chỉnh chứa khoảng 41% stevioside. Các kiểm nghiệm về độc chất

học cho thấy rằng stevioside hoàn toàn an toàn cho người dùng. Hơn nữa, các nghiên cứu nha khoa gợi ý rằng các sản phẩm này có thể ức chế thực sự sinh trưởng của các vi sinh vật vùng miệng. Sản xuất stevioside trong nuôi cấy callus của *Stevia rebaudiana* đã được nghiên cứu chi tiết. Những nuôi cấy chồi tạo rễ đã cho vị ngọt, chứng minh rằng cả hai: rễ và lá cần thiết cho sự tổng hợp stevioside.

2. Các chất thứ cấp dùng trong dược phẩm

2.1. Các alkaloid

Người ta có thể thu được các chất như caffein từ nuôi cấy tế bào cây *Coffea arabica*, betalain trong callus củ cải đường, berberin từ tế bào cây *Coptis japonica* (loài cây này phải trồng từ 4-6 năm mới thu được hàm lượng đáng kể berberin trong rễ, trong khi hàm lượng này có thể thu được sau 4 tuần bằng phương pháp nuôi cấy tế bào)... Những chất này được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp hương liệu và trong y học.

Chất reserpine có tác dụng chữa bệnh cao huyết áp và các bệnh rối loạn tuần hoàn cũng được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy tế bào cây *Rauwolfia serpentina*. Nuôi cấy tế bào của cây này trong 30 ngày trong hệ lên men quy mô lớn có thể sản xuất được 3.500 kg reserpine, tương đương với lượng hàng năm của cả thế giới thu được từ rễ cây đó.

Các nhà nghiên cứu thuộc tổ hợp dược phẩm Gibageigy (Based, Thụy Sĩ) đã sản xuất được loại alkaloid là scopolamine từ tế bào cây *Hyoscyanus aegypticus* nuôi cấy trong hệ lên men không có cánh khuấy. Bằng cách chọn lọc các dòng tế bào cao sản nhờ kỹ thuật đột biến tế bào trần, biến dị đơn dòng (monoclonal variation) và kỹ thuật gen, người ta đã tăng được sản lượng scopolamine lên gấp hàng ngàn lần.

Nhiều nghiên cứu cho thấy nuôi cấy callus và tế bào của cây *Catharanthus roseus* có hàm lượng serpentin ngang với cây dược liệu bình thường. Một số nghiên cứu đã phân lập được các dòng tế bào *Cantharanthus* sản xuất serpentin và ajmalacine từ nuôi cấy *in vitro*. Bằng loại môi trường sản xuất đặc biệt người ta đã đưa được sản lượng alkaloid của hai dòng tế bào tốt nhất lên một mức cao hơn nữa, trong đó một dòng tạo được 162 mg/L serpentin, còn dòng kia tạo được 72 mg/L serpentin cùng với 264 mg/L ajmalacine. Mới đây, người ta đã hoàn thiện được công nghệ nuôi cấy tế bào của cây *C. roseus* để sản xuất viblastine và vincristine

là hai chất chống ung thư rất mạnh, hiện đang có nhu cầu rất cao vì chúng được sử dụng để chữa ung thư máu.

Sikuli và cộng sự (1997) sau khi gây nhiễm cây *Datura stramonium* với *Agrobacterium rhizogenes* đã nhận thấy hàm lượng hyoscyamine ở rễ đạt cực đại sau 6 tuần nuôi cấy < 100 mg/L.

2.2. Các steroid

Trong lĩnh vực steroid và chuyển hóa steroid, các dòng tế bào có năng suất cao đã được Kaul và cs đề cập đến từ năm 1969. Họ đã nuôi cấy thành công tế bào của cây *Dioscorea deltoidea* để sản xuất diosgenin, là nguyên liệu thô chủ yếu để sản xuất các steroid chống thụ thai và các hormone tuyến thượng thận.

Quá trình chuyển hóa các hợp chất glycoside tim (cardiac) bằng nuôi cấy tế bào của cây *Digitalis lanata* cũng đã được nghiên cứu. Người ta nhận thấy, mặc dù các tế bào *Digitalis* ngừng sản xuất glycoside tim nhưng chúng vẫn có khả năng hydroxyd hóa digitoxin ở nguyên tử C₁₂ để tạo ra digoxin. Digoxin là một hợp chất có ý nghĩa y học lớn hơn digitoxin. Quá trình hydroxyd hóa xảy ra trong nuôi cấy tế bào rất nhanh và rất hiệu quả khi đưa vào môi trường nuôi cấy chất β -methyl-digitoxin. Sau 12 ngày, người ta đã thu được 4 g β -methyl-digitoxin trong một bình nuôi dung tích 20 L.

2.3. Một số chất khác

Thí dụ điển hình nhất là công nghệ sản xuất shikonin, một loại sắc tố đỏ có khả năng diệt khuẩn, có trong rễ của cây *Lithospermum erythrorhizon*. Bình thường shikonin tích lũy không nhiều trong rễ. Tuy nhiên, các nhà khoa học Nhật đã tạo được dòng tế bào rễ cây *Lithospermum* có khả năng tích lũy đến 15% shikonin và đã hoàn chỉnh công nghệ nuôi cấy tế bào sản xuất shikonin. Công nghệ này cho phép trong một chu kỳ nuôi cấy thu hoạch tới 5 kg hoạt chất và giúp giảm rất nhiều giá thành của shikonin.

Hàm lượng tương đối cao của ubiquinone-10 được tìm thấy trong tế bào thuốc lá nuôi cấy *in vitro* và của L-dopa trong môi trường nuôi cấy tế bào *Mucuna pruriens*. Nuôi cấy tế bào của cây *Panax pseudoginseng* đã cho hàm lượng saponin khá cao. Nuôi cấy tế bào của cây *Glycyrrhiza glabra* đã thu được hàm lượng glycyrrhizin từ 3-4% trọng lượng khô.

Hàm lượng chất thứ cấp cao nhất được tìm thấy trong nuôi cấy tế bào của cây *Coleus blumei* đó là chất rosmarinic acid chiếm 13-15% trọng lượng khô trong chu kỳ nuôi 13 ngày, lớn gấp 5 lần so với hàm lượng trong cây trồng ở điều kiện tự nhiên. Trong những năm 1980, người ta cũng đã sản xuất rất có hiệu quả ginsenoside là hoạt chất chủ yếu của nhân sâm *Panax ginseng*. Các anthraquinone là một nhóm các sản phẩm tự nhiên quan trọng có ở vi khuẩn, nấm, địa y và thực vật bậc cao có các hoạt tính sinh học như: kháng khuẩn, kháng nấm, giảm huyết áp, giảm đau, chống sốt rét, chống oxy hóa, kháng bệnh bạch cầu và các chức năng đột biến. Ở thực vật bậc cao, chúng đã được tìm thấy ở rất nhiều họ thực vật khác nhau, chẳng hạn Rubiaceae, Rhamnaceae, Polygonaceae, Leguminosae... Nuôi cấy tế bào các loài của họ Rubiaceae đã cho phép thu được một lượng lớn anthraquinone thậm chí trong một số trường hợp đã vượt quá hàm lượng anthraquinone ở cây bố mẹ.

Công ty Escagenetics (California, Mỹ) đã thành công trong sản xuất taxol bằng nuôi cấy rễ tơ (hairy-root). Taxol là chất tách chiết từ vỏ và lá kim của cây thủy tùng (*Taxus brerifolia*) đang được sử dụng hiệu quả trong điều trị nhiều loại ung thư. Việc cung cấp taxol gặp khó khăn vì bản thân cây thủy tùng khan hiếm và hàm lượng taxol trong chúng rất thấp. Escagenetics đã có thể sản xuất taxol với nồng độ cao hơn nồng độ tự nhiên thấy trong vỏ và lá cây thủy tùng.

VI. Sản xuất các protein tái tổ hợp

Nuôi cấy tế bào thực vật đã được sử dụng để sản xuất các sản phẩm tự nhiên cách đây hơn 20 năm và gần đây hơn chúng được dùng để sản xuất các protein tái tổ hợp. Protein tái tổ hợp (protein ngoại lai) là protein tự nhiên được sửa đổi bằng công nghệ gen nhằm nâng cao hoặc thay đổi hoạt tính của chúng. Tương tự như các tế bào vi sinh vật, các tế bào thực vật rất thích hợp cho các nguyên liệu tái tổ hợp do chúng có thể sinh trưởng trên môi trường tương đối đơn giản không cần bổ sung protein, nhưng do chúng là các sinh vật eukaryote bậc cao nên có thể tiến hành các biến đổi hậu dịch mã như trong tế bào của người. Nếu protein ngoại lai được sản xuất trong nuôi cấy tế bào và được tiết ra trong môi trường, nhiều hơn phần được tích lũy trong tế bào, thì việc thu hồi và tinh sạch sản phẩm có thể được tiến hành mà không có nhiều protein nhiễm bản. Các

protein có nguồn gốc thực vật an toàn cho người hơn các protein có nguồn gốc từ tế bào động vật bởi vì các chất nhiễm bẩn và virus thực vật không phải là tác nhân gây bệnh ở người. Ngoài ra, nuôi cấy tế bào thực vật cũng là một công cụ thực nghiệm thuận lợi cho việc khảo sát sự sản xuất protein ngoại lai trong cây hoàn chỉnh (whole plants) (Bảng 7.3).

Thực vật chuyển gen hiện nay được xem là hệ thống sản xuất rất kinh tế cho việc sản xuất các protein ngoại lai như kháng thể, enzyme và hormone. Sản xuất thương mại một số protein của vi khuẩn và động vật đã được tiến hành bằng thực vật. Yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của sản xuất protein dựa trên cơ sở thực vật là hiệu suất của protein ngoại lai hoặc nồng độ của sản phẩm được tích lũy trong sinh khối. Theo đó, người ta đã chú ý cải thiện sự biểu hiện gen ngoại lai trong cây chuyển gen thông qua việc phát triển các promoter tốt hơn, chọn lọc các dòng chuyển gen ổn định, và ức chế gen im lặng (silence gene). Tuy nhiên, một yếu tố quan trọng là sự đứt gãy protein ngoại lai đã làm giảm nồng độ của sản phẩm chức năng trong mô thực vật sau khi các phân tử được tổng hợp và lắp ráp. Sự đứt gãy protein ngoại lai đã làm bản sản phẩm với các đoạn protein mất hoạt tính, và người ta cũng gặp khó khăn khi loại bỏ các protein đứt gãy này trong các hoạt động thu hồi protein chức năng ở sản xuất quy mô lớn. Tìm hiểu chi tiết về vị trí và cơ chế của sự đứt gãy ở nội và ngoại bào là rất cần thiết để có thể phát triển phương pháp sao cho giảm thiểu được sự tổn thất protein ở hậu sau dịch mã.

1. GM-CSF người

GM-CSF người (human granulocyte macrophage-colony stimulate factor), là một trong bốn glycoprotein đặc biệt kích thích quần lạc đại thực bào của tế bào bạch cầu hạt tổ tiên sản sinh ra các bạch cầu hạt, đại thực bào và hai loại tế bào máu trắng quan trọng. GM-CSF người được ứng dụng lâm sàng trong điều trị bệnh giảm bạch cầu trung tính (neutropenia) và bệnh thiếu máu không tái tạo (aplastic anemia). Sử dụng GM-CSF người trong cấy ghép tủy xương đã giảm thiểu đáng kể nguy cơ nhiễm trùng do chúng kích thích tăng tổng số bạch cầu trung tính. GM-CSF người đã được biểu hiện trong nhiều cơ thể vật chủ khác nhau như: *E. coli*,

nấm men, *A. niger*, tế bào động vật có vú và tế bào thực vật, và hiện nay được sản xuất để dùng trong lâm sàng.

Bảng 7.3. Một số protein tái tổ hợp được sản xuất bằng nuôi cấy tế bào thực vật.

Protein được biểu hiện	Loài thực vật
Nhân tố sinh trưởng biểu mô người	<i>Nicotiana tabacum</i>
Hormone sinh trưởng ở người	<i>N. tabacum</i>
Albumin huyết thanh người	<i>N. tabacum, Solanum tuberosum</i>
Nhân tố sinh trưởng ở cá hồi	<i>N. tabacum</i>
α -interferon người	<i>Oryza sativa</i>
Hirudin (chống đông máu)	<i>N. tabacum</i>
Erythropoietin người	<i>N. tabacum</i>
α and β haemoglobin người	<i>N. tabacum</i>
Human muscarinic cholinergic receptors	<i>N. tabacum</i>
GM-CSF chuột	<i>N. tabacum</i>
Interleukin-2 và Interleukin-4 người	<i>N. tabacum</i>
Alkaline phosphatase nhau thai người	<i>N. tabacum</i>
α 1-antitrypsin người	<i>O. sativa</i>
HBsAg	<i>N. tabacum, Glycine max</i>
GM-CSF người	<i>N. tabacum, O. sativa, Lycopersicum esculentum</i>
Kháng thể đơn dòng (Mab) chống HBsAg	<i>N. tabacum</i>
Lysozyme người	<i>O. sativa</i>
Mab chuỗi nặng	<i>N. tabacum</i>
IgG _{2b/k} chuột	<i>N. tabacum</i>
Đoạn kháng thể scFv	<i>N. tabacum, O. sativa</i>
Đoạn kháng thể bisFcFv	<i>N. tabacum</i>
IgG _{2b/k} kích thích hoàn chỉnh	<i>N. tabacum</i>
Chuỗi nặng γ đơn dòng của chuột	<i>N. tabacum</i>
Bryodin 1	<i>N. tabacum</i>

2. Kháng thể IgG1 của chuột

Đã được sản xuất bằng cách nuôi cấy rễ tơ và tế bào dịch huyền phù của cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) chuyển gen. Để thực hiện lắp ráp kháng thể hoàn chỉnh, từ 2 đến 4 đoạn kháng thể nhỏ đã được tích lũy trong sinh khối tế bào. Các nhân tố ức chế protease, các tác nhân ổn định protein, các nhân tố ức chế *N*-glycosylation và sự tiết protein, các tác nhân tái hoạt động glycan (polysaccharide) và các mẫu dò ái lực đã được sử dụng để nghiên cứu đặc điểm của các đoạn này, khảo sát các vị trí của chúng và cơ chế hình thành. Tất cả các phân tử kháng thể đã được tiết ra trong môi trường nuôi cấy.

3. Interleukin

Là thuật ngữ chung cho các cytokine được bạch cầu sản xuất (lymphokine), trong đó interleukin-2 là một cytokine quan trọng nhất đối với sự phát triển và đáp ứng miễn dịch thích ứng, được sử dụng để điều trị một số bệnh viêm nhiễm virus và bệnh ung thư.

Interleukin-2 (IL-2) và interleukin-4 (IL-4) của người được sản xuất và tiết ra môi trường nuôi cấy dịch huyền phù tế bào cây *N. tabacum* đã biến đổi di truyền. Sự tiết qua màng huyết tương và thành tế bào vào môi trường được thuận lợi nhờ trình tự leader tự nhiên của của động vật có vú. Nồng độ của IL-2 và IL-4 trong môi trường nuôi cấy tương ứng là 0,10 và 0,18 μ g/mL, mặc dù nồng độ của chúng ở bên trong các lymphokine là cao hơn (IL-2 khoảng 0,8 μ g/mL và IL-4 khoảng 0,28 μ g/mL).

Phân tích Western blot¹⁰ cho thấy IL-4 được tiết ra môi trường nuôi cấy tế bào thực vật là hai chuỗi polypeptide nhỏ với trọng lượng phân tử khoảng 18-20 kDa. Hoạt tính sinh học của IL-2 được xác định bởi sự sinh sản tế bào của dòng tế bào CTLL-2 của chuột phụ thuộc IL-2 [CT.h4S]

¹⁰ Western blot: kỹ thuật phân tích protein dựa trên nguyên lý liên kết kháng nguyên-kháng thể để phát hiện protein đặc hiệu có bản chất kháng nguyên (thường được thấm tích lên màng nitrocellulose sau khi chạy điện di SDS-PAGE, và cố định ở đó). Sau khi protein trên màng lai gắn với kháng thể thứ nhất đặc hiệu và tiếp đến là kháng thể thứ hai có đánh dấu enzyme (alkaline phosphatase hoặc horse-radish peroxidase...) thì phức hợp này sẽ được liên kết với cơ chất để tạo màu. Sự hiện diện của protein ngoại lai (sản phẩm dịch mã của gen ngoại lai được chuyển vào tế bào vật chủ) sẽ được phát hiện nhờ sự xuất hiện màu của phản ứng lai.

được chuyển nhiễm ổn định bằng receptor IL-4 của người. Những khám phá này cho thấy rằng nuôi cấy dịch huyền phù tế bào thực vật có thể được sử dụng để sản xuất và tiết ra môi trường đủ loại các protein động vật có vú có hoạt tính sinh học dùng trong chẩn đoán và điều trị.

VII. Chọn dòng tế bào biến dị soma

Người ta có thể tiến hành xử lý và chọn lọc tế bào thực vật ở ba mức độ cấu trúc chính: callus, tế bào đơn (single cell) và tế bào trần.

Trong phạm vi công nghệ (nuôi cấy) tế bào thực vật, người ta thường tập trung các nghiên cứu cho mục đích chọn dòng tế bào sản xuất dư thừa (over production) các loại sản phẩm chủ yếu là các amino acid và các hợp chất tự nhiên¹¹.

Nhìn chung, hiện tượng biến dị di truyền xuất hiện ở các tế bào không phân hóa (undifferentiation), các protoplast phân lập, các callus và các mô nuôi cấy *in vitro*. Nuôi cấy tế bào thực vật có khả năng tạo biến dị di truyền tương đối nhanh và không cần phải ứng dụng các kỹ thuật phức tạp khác.

Các biến dị chọn lọc được trong nuôi cấy *in vitro* có nhiều cách gọi khác nhau như: dòng callus (calliclones-từ nuôi cấy callus) hoặc dòng protoplast (protoclones-từ nuôi cấy protoplast)... Tuy nhiên, thuật ngữ biến dị dòng soma (somaclonal variation) được sử dụng phổ biến nhất, hoặc biến dị dòng giao tử (gametoclonal variation) để chỉ các dòng bị biến đổi di truyền phát triển từ các tế bào giao tử hoặc thể giao tử. Sự đa dạng của biến dị ở các dòng soma làm nổi bật một thực tế rằng biến dị dòng soma là một công cụ rất hữu hiệu cho việc cải thiện các đặc điểm di truyền của tế bào.

VIII. Dung hợp protoplast hay lai vô tính tế bào thực vật

Đặc trưng của tế bào thực vật là có thành cellulose bao quanh, sau đó đến màng nguyên sinh. Thành cellulose giữ cho tế bào thực vật có hình

¹¹ Trong công tác giống cây trồng, chọn dòng tế bào biến dị soma có thể khái quát ở một số ứng dụng sau:

- Chọn dòng tế bào chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, ví dụ: chống chịu nóng, lạnh, phèn, mặn, khô-hạn...
- Chọn dòng tế bào kháng các độc tố: độc tố do nấm bệnh tiết ra, các loại kháng sinh...

Các dòng tế bào mang các đặc tính mong muốn sau khi chọn lọc được sẽ được tái sinh thành cơ thể thực vật hoàn chỉnh để phát triển nguồn cây giống mới, thích hợp cho các điều kiện sản xuất nông nghiệp cụ thể.

dáng nhất định, còn các hợp chất pectin nằm trong thành có nhiệm vụ liên kết gắn các tế bào với nhau thành mô. Màng nguyên sinh cho phép protoplast (tế bào đã được phá bỏ thành cellulose và chỉ còn lại màng sinh chất) có thể hấp thu vào tế bào các đại phân tử (nucleic acid, protein) thậm chí cả các cơ quan tử như lục lạp, ty thể, nhân bào theo cơ chế của amip. Nếu để các protoplast cạnh nhau, chúng có thể dễ hòa làm một, đó là hiện tượng dung hợp (protoplast fusion) hay còn gọi là lai vô tính tế bào (cell somatic hybridization). Kỹ thuật dung hợp protoplast cho phép mở rộng nguồn gen của các loài thực vật, tạo ra các dòng tế bào sản xuất mới¹² mang các đặc tính di truyền ưu việt của cả bố và mẹ.

Một số kỹ thuật dung hợp protoplast như:

- Dung hợp bằng hóa chất. Phương pháp này dùng NaNO_3 hoặc polyethylene glycol (PEG) để kích thích dung hợp của hai protoplast.

- Dung hợp bằng điện (electrofusion). Phương pháp này đơn giản hơn, nhanh hơn và hiệu quả hơn dung hợp bằng hóa chất. Điều quan trọng hơn cả là dung hợp bằng điện không gây độc cho tế bào như thường thấy ở các protoplast hoặc các thể dị nhân được xử lý bằng PEG. Cũng theo hướng này và gần đây đã được chứng minh, người ta đã dùng các xung điện (electric pulses) để đưa trực tiếp DNA ngoại lai vào trong tế bào thực vật. Trong dung hợp bằng điện, đầu tiên các protoplast được đưa vào trong ngăn dung hợp nhỏ có hai dây kim loại song song với nhau đóng vai trò là các điện cực. Tiếp đó, sử dụng điện áp (voltage) thấp và trường AC dao động nhanh (rapidly oscillating AC field) để kích thích các protoplast sắp thành từng chuỗi tế bào (chuỗi ngọc trai-pearl chains) giữa các điện cực. Phương thức này cho phép các tế bào tiếp xúc hoàn toàn với nhau trong một vài phút. Sau khi các tế bào xếp hàng hoàn chỉnh, quá trình dung hợp được thực hiện theo từng đợt ngắn của xung DC điện áp cao (high-voltage DC pulses). Xung DC điện áp cao tạo ra sự phá vỡ thuận nghịch của màng nguyên sinh chất (plasma membrane) ở vị trí tiếp xúc của các tế bào, tạo ra sự dung hợp và tái tổ chức lại màng một cách hợp lý. Một quá trình hoàn chỉnh bắt đầu từ lúc đưa các protoplast vào bên trong ngăn và chuyển chúng lên môi trường nuôi cấy, có thể được thực hiện trong năm phút hoặc ít hơn.

¹² Hoặc các giống cây trồng mới cho sản xuất nông nghiệp.

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Atkinson B and Mavituna F.** 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd ed. *Stockton Press*, New York, USA.
2. **Chia TF.** 2003. Engineering Applications in Biology. Updated 1st ed. *McGraw-Hill Education*, Singapore.
3. **Cutler SJ and Cutler HG.** 2000. Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals. *CRC Press LLC*, USA.
4. **Fischer R, Emans N, Schuster F, Hellwig S and Drossard J.** 1999. Towards molecular farming in the future: using plant-cell-suspension cultures as bioreactors. *Biotech Appl Biochem.* 30: 109-112.
5. **Hellwig S, Drossard J, Twyman RM and Fischer R.** 2004. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotech.* 22: 1415-1422.
6. **Kieran PM, MacLoughlin PF and Malone DM.** 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J Biotech.* 59: 39-52.
7. **Klevenz H.** 2002. Industrial Pharmaceutical Biotechnology. *Wiley-VCH Verlag GmbH*, Weinheim, Germany.
8. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.
9. **Ramawat KG and Merillon JM.** 1999. Biotechnology: Secondary Metabolites. *Science Publishers Inc.* USA.
10. **Roberts MF and Wink M.** 1998. Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Plenum Press*, New York, USA.
11. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* NJ, USA.

Chương 8

Công nghệ DNA tái tổ hợp

Công cụ chính trong công nghệ sinh học hiện đại là công nghệ DNA tái tổ hợp¹ hay còn gọi là kỹ thuật di truyền. Công nghệ này cho phép thao tác trực tiếp trên các nguyên liệu di truyền của các tế bào riêng biệt. Bằng cách đưa các thông tin di truyền ngoại lai vào trong các cơ thể vi sinh vật, các tế bào động vật và thực vật sinh trưởng nhanh, chúng ta có thể sản xuất ra các sản phẩm của gen ngoại lai (các protein) với các tốc độ và hiệu suất cao hơn mà thường không thể thực hiện ở các hệ thống tế bào khác.

Chương này trình bày những nét chính của các nguyên lý cơ bản trong kỹ thuật di truyền và các vấn đề liên quan đến nuôi cấy tế bào đã được chuyển gen ngoại lai.

I. DNA và RNA

Deoxyribonucleotide acid (DNA) là phân tử quan trọng nhất trong các tế bào sống và chứa tất cả thông tin đặc trưng của tế bào. DNA và ribonucleotide acid (RNA) là các đại phân tử² polymer mạch thẳng được xây dựng trên các tiểu đơn vị riêng rẽ là các nucleotides. Một đơn vị monomer (nucleotide) có ba thành phần sau (Hình 8.1):

- Đường năm carbon mạch vòng (pentose): deoxyribose cho DNA và ribose cho RNA.

- Một nitrogen base của dẫn xuất hoặc purine hoặc pyrimidine liên kết đồng hóa trị với nguyên tử carbon thứ nhất của đường bằng liên kết kết N-glycoside (Hình 8.1).

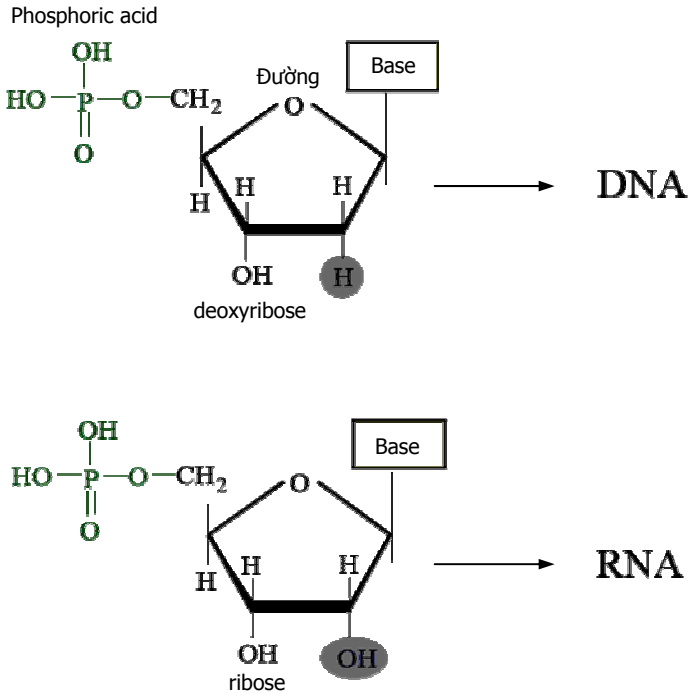
 - + Purine: adenine (A), guanine (G).

 - + Pyrimidine: cytosine (C), thymine (T) cho DNA và uracil (U) chỉ cho RNA.

- Một gốc phosphate gắn vào carbon vị trí thứ 5 của đường bằng liên kết phosphoester.

¹ Xem chương 1 giới thiệu chung về công nghệ sinh học.

² Đại phân tử (macromolecular): là một polymer được tạo thành từ hơn 100 monomers.



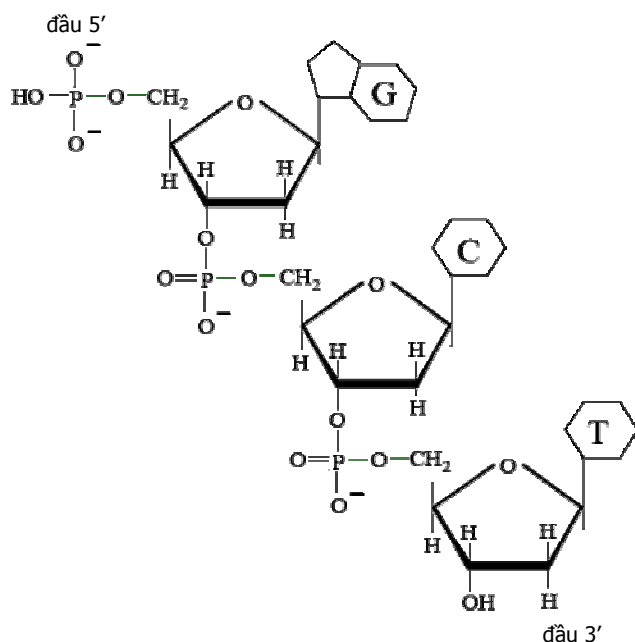
Hình 8.1. Cấu trúc của nucleotide.

Các nucleotide của DNA được gọi là deoxyribonucleotide, vì chúng chứa đường deoxyribose, trong khi đó nucleotide của RNA được gọi là ribonucleotide vì chúng chứa đường ribose. Mỗi nucleotide chứa một vùng đặc trưng và một vùng không đặc trưng. Các nhóm đường và phosphate là phần không đặc trưng của nucleotide, trong khi các base purine và pyrimidine tạo nên phần đặc trưng của nucleotide.

Một nucleotide này sẽ được kết hợp với các nucleotide khác bằng một liên kết hóa học giữa các nguyên tử trong các vùng không đặc trưng tạo ra các polynucleotide (Hình 8.2). Sự liên kết (được gọi là các liên kết phosphodiester) xảy ra giữa một nhóm phosphate và một nhóm OH trên thành phần đường.

Điểm đặc trưng nhất của DNA là nó thường bao gồm hai sợi bổ sung xoắn gần như song song xung quanh một trục chung tạo thành một xoắn kép (double helix) tương tự như một cầu thang xoắn ốc (Hình 8.3). Mỗi sợi là một polynucleotide. Đường kính của xoắn (chiều ngang bậc thang) khoảng

20 Å, Chiều cao của mỗi vòng xoắn là 34 Å, gồm 10 bậc thang nghĩa là mỗi vòng xoắn có 10 nucleotide trên mỗi sợi.



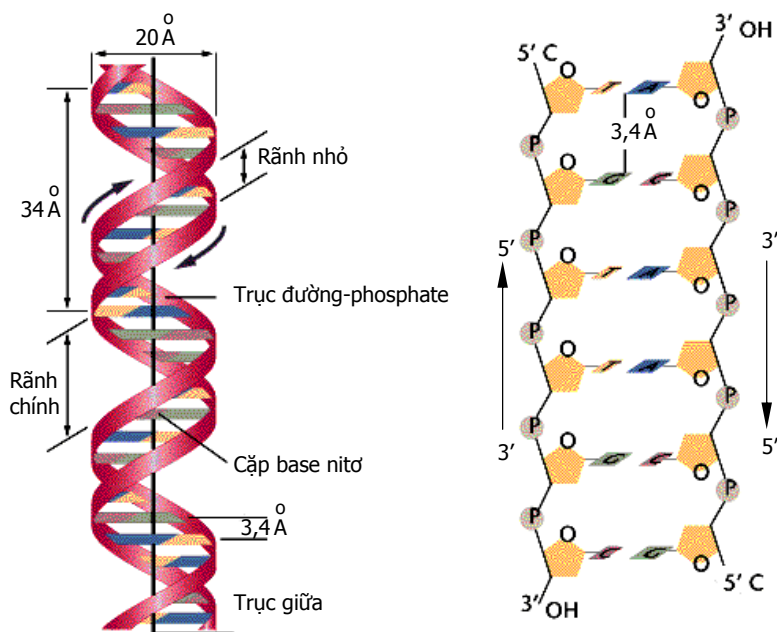
Hình 8.2. Một phần của DNA.

Hai sợi được kết hợp bằng liên kết hydrogen giữa các cặp base purine với pyrimidine³. Adenine (purine) luôn luôn bắt cặp với thymine (pyrimidine), và guanine (purine) với cytosine (pyrimidine). Kết quả phân tích hóa học về nồng độ phân tử của các base trong DNA đã cho thấy rằng lượng adenine luôn bằng thymine và lượng guanine luôn bằng cytosine. Sự bắt cặp base này đặc trưng đến nỗi adenine chỉ liên kết với thymine và guanine chỉ liên kết với cytosine, nhờ đó đã tạo ra một khả năng ổn định cao bởi liên kết hydrogen giữa các base bổ sung.

Hơn nữa, đặc trưng của sự bắt cặp base này cho phép truyền thông tin di truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác. Khi sự nhân đôi tế bào xuất hiện, xoắn kép của DNA tháo ra, và hai sợi DNA mới được tạo thành bổ sung cho

³ Một liên kết hydrogen giữa hai sợi là một lực hút yếu giữa một nguyên tử hydrogen được liên kết đồng hóa trị (H-N) và một nguyên tử ketonic oxygen điện tích âm (C=O).

hai sợi gốc. Như vậy, mỗi tế bào mới chứa một sợi DNA gốc và một sợi DNA mới được tổng hợp trong xoắn kép của nó.



Hình 8.3. Mô hình xoắn kép của phân tử DNA.

Trình tự của các base (A, G, T và C) trong một sợi DNA đặc trưng cho một trình tự của các amino acid sẽ được lắp ráp để tạo thành một phân tử protein. Mã di truyền là tập hợp các trình tự base tương ứng cho mỗi amino acid (codon). Vì chỉ có 4 base trong DNA và 20 amino acid trong protein, cho nên mỗi codon phải chứa ít nhất 3 base⁴. Hai base không thể làm thành một codon bởi vì chỉ có 4^2 cặp hợp lý của 4 base. Nhưng 3 base thì có thể bởi vì sẽ có $4^3 = 64$ bộ ba hợp lý. Vì số lượng bộ ba hợp lý lớn hơn 20, cho nên một vài codon chỉ định cùng một amino acid. Trong một nghĩa khác, mã di truyền là rất phức tạp, ví dụ: UCU, UCC, UCA, UCG, AGU và AGC đều cùng mã hóa cho serine (Bảng 8.1).

⁴ Hai mươi amino acid được tìm thấy trong các phân tử protein là: Alanine (Ala), Arginine (Arg), Asparagine (Asn), Aspartic acid (Asp), Cysteine (Cys), Glutamic acid (Glu), Glutamine (Gln), Glycine (Gly), Histidine (His), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Lysine (Lys), Methionine (Met), Phenylalanine (Phe), Proline (Pro), Serine (Ser), Threonine (Thr), Tryptophan (Trp), Tyrosine (Tyr) và Valine (Val).

Bảng 8.1. Mã di truyền chung.

Vị trí thứ nhất	Vị trí thứ hai				Vị trí thứ ba
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
U	Leu	Ser	STOP	STOP	A
U	Leu	Ser	STOP	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
C	Leu	Pro	His	Arg	C
C	Leu	Pro	Gln	Arg	A
C	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
A	Ile	Thr	Asn	Ser	C
A	Ile	Thr	Lys	Arg	A
A	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
G	Val	Ala	Asp	Gly	C
G	Val	Ala	Glu	Gly	A
G	Val	Ala	Glu	Gly	G

II. Tạo dòng gen

Tạo dòng một gen là công việc trung tâm của công nghệ DNA tái tổ hợp. Gen là đơn vị cơ sở của thông tin di truyền nằm trên nhiễm sắc thể của tế bào. Các nhiễm sắc thể là các cấu trúc sợi dài và mảnh nằm ở trong nhân, bao gồm chủ yếu là DNA. Thông tin di truyền được bảo quản trong một chuỗi trình tự của các base nucleotide, gồm có một đoạn DNA. Mỗi gen ghi rõ cấu trúc của một sản phẩm gen đặc biệt, thường là một protein.

1. Các trình tự DNA

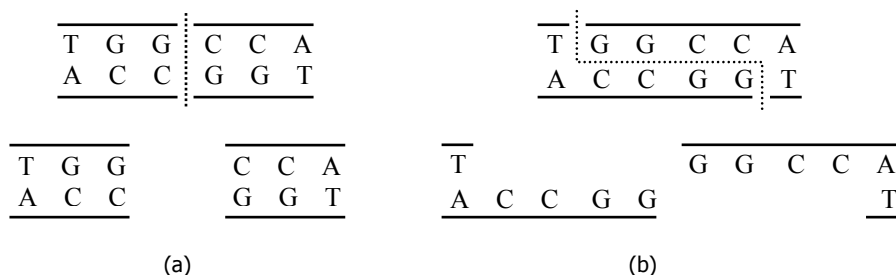
Để thao tác gen, cần phải biết về tất cả các tổ chức của các trình tự DNA và các đơn vị chức năng của DNA tương tác với các đơn vị khác trong tất cả các đơn vị di truyền của cơ thể (genome) là như thế nào. Việc

phát hiện ra các enzyme hạn chế (restriction endonucleases, RE) của vi khuẩn cắt DNA ở những trình tự đặc trưng, đã giúp cho việc thao tác dễ dàng hơn, vì nó có thể giảm chiều dài của các phân tử DNA thành một tập hợp bao gồm các đoạn ngắn hơn.

Các enzyme hạn chế hiện diện trong hầu hết các tế bào vi khuẩn để ngăn cản DNA ngoại lai tiếp quản bộ máy tổng hợp protein của tế bào. DNA của chính chúng sẽ được bảo vệ khỏi tác dụng của enzyme hạn chế, nhờ sự có mặt của các enzyme nội bào có thể methyl hóa (methylation) các nucleotide đặc biệt, vì thế các nucleotide này không thể bị nhận biết bởi các enzyme hạn chế.

Mỗi enzyme hạn chế nhận biết và cắt một trình tự DNA đặc biệt thường chứa bốn hoặc sáu cặp nucleotide. Ví dụ enzyme *EcoRI* chiết từ *E. coli* cắt trình tự GAATTC, enzyme *BalI* của *Brevibacterium albidum* cắt trình tự TGGCCA (Hình 8.4). Có hơn 500 enzyme hạn chế khác nhau được tinh sạch từ khoảng 250 vi sinh vật khác nhau. Các enzyme hạn chế cắt gãy các phân tử DNA sợi đôi theo hai cách khác nhau như trình bày ở hình 8.4:

- Cắt trên một đường thẳng đối xứng để tạo ra các phân tử đầu bằng.
- Cắt trên những vị trí nằm đối xứng quanh một đường thẳng đối xứng để tạo ra những phân tử đầu so le (đầu kết dính).



Hình 8.4. Hai kiểu cắt của enzyme hạn chế.

(a) tạo ra đầu bằng, và (b) tạo ra đầu so le

Vì một enzyme hạn chế nhận biết một trình tự duy nhất, cho nên số vị trí cắt trên một phân tử DNA đặc biệt thường là nhỏ. Các đoạn DNA được cắt bởi enzyme hạn chế có thể được phân tách theo kích thước bằng điện di agarose gel để nghiên cứu. Do sự tương tự của tổ chức phân tử trong tất cả

các cơ thể, cho nên DNA vi khuẩn, DNA thực vật và DNA động vật có vú tương hợp nhau về cấu trúc. Vì thế, một đoạn DNA từ một dạng sống này có thể dễ dàng được pha trộn với DNA của một dạng sống khác. Sự tương tự này cũng phù hợp đối với plasmid, nhân tố di truyền ngoài nhân được tìm thấy trong nhiều loài vi khuẩn khác nhau. Chúng là những phân tử DNA mạch vòng đóng sợi đôi được dùng làm vector mang các đoạn DNA ngoại lai dùng trong công nghệ DNA tái tổ hợp.

2. Sự kết hợp của các phân tử DNA

Các phương thức cơ bản của công nghệ DNA tái tổ hợp là: (1) Kết hợp một đoạn DNA vào một phân tử DNA (như là vector⁵) có thể tái bản, và (2) Cung cấp một môi trường cho phép sao chép phân tử DNA đã được kết hợp.

Có ba loại vector phổ biến được dùng để tạo dòng các đoạn DNA ngoại lai và tái bản (sao chép) trong *E. coli*. Đó là plasmid, bacteriophage λ và cosmid. Tất cả những vector này phải có một số tính chất cần thiết sau:

- Có khả năng tự tái bản trong *E. coli*.
- Chứa các gen chỉ thị chọn lọc để dễ dàng phân biệt và tinh sạch vector của thể tái tổ hợp với các dạng khác.
- Có các vùng DNA không cần thiết cho sự sinh sản trong vi khuẩn, vì thế DNA ngoại lai có thể được đưa vào trong các vùng này.
- Có thể biến nạp vào tế bào vật chủ một cách dễ dàng.

DNA plasmid có thể được phân lập từ nuôi cấy vi khuẩn chứa plasmid bằng cách bổ sung chất tẩy (như là sodium dodecyl sulfate⁶) và bằng cách ly tâm sự sinh tan (lysate). Phức hợp nhiễm sắc thể vi khuẩn, lớn hơn plasmid nhiều, sẽ lắng xuống đáy của tube ly tâm, plasmid siêu xoắn và các đoạn nhiễm sắc thể mạch thẳng giữ lại trong thể nổi. Plasmid siêu xoắn một lần nữa được phân tách bằng ly tâm sau khi xử lý với CsCl và EtBr.

⁵ Vector là phân tử DNA được sử dụng để đưa DNA ngoại lai vào trong tế bào vật chủ.

⁶ Chất tẩy làm biến đổi bề mặt tế bào để giải phóng các thành phần tế bào ra môi trường bên ngoài.

Plasmid chứa các gen mã hóa cho các enzyme thường có lợi cho vi khuẩn vật chủ. Các plasmid mang các kiểu hình khác nhau như: kháng kháng sinh, sản xuất kháng sinh, phân hủy các hợp chất hữu cơ phức tạp, sản xuất các enzyme hạn chế và enzyme biến đổi (modification enzymes).

Các plasmid có thể được chuyển vào trong vi khuẩn sau khi vi khuẩn được xử lý sao cho tế bào có thể thấm qua nhất thời các phân tử DNA nhỏ. Quá trình này được biết như là sự biến nạp (transformation). Vi khuẩn được biến nạp thành công có thể được chọn lọc dựa trên kiểu hình mới mà chúng nhận được từ plasmid, chẳng hạn khả năng kháng các kháng sinh.

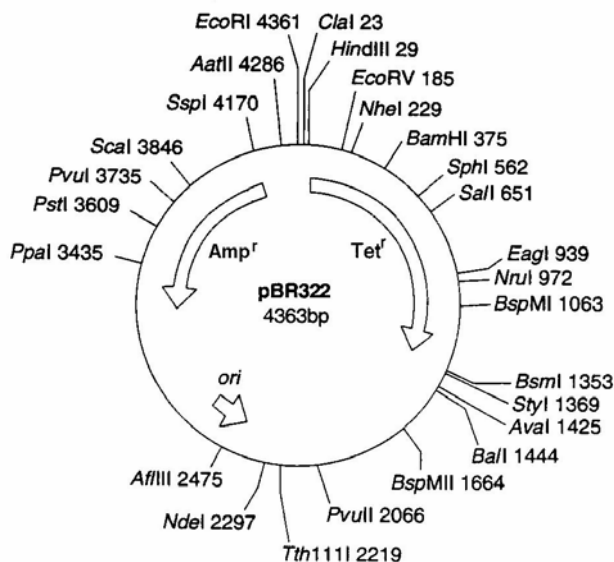
Một số plasmid hiện diện trong tế bào có số bản sao thấp (một hoặc một vài bản sao trên tế bào) do DNA plasmid chỉ sao chép một hoặc hai lần trước khi tế bào phân chia. Tuy nhiên, các plasmid khác tồn tại một số bản sao lớn hơn (10 tới 100 bản sao trên một tế bào) do DNA tái bản lặp lại cho đến khi đạt được số bản sao thích hợp. Các plasmid có số bản sao lớn được gọi là plasmid tái bản dạng lỏng lẻo (relaxed plasmid), và đây là một trong những tính chất hữu ích của vector tạo dòng.

Hình 8.5 trình bày một trong các vector plasmid dạng lỏng lẻo, pBR322 (thể hệ thứ hai), dài 4.363 bp, vector này chứa hai gen kháng kháng sinh là Ampicillin (Amp) và Tetracycline (Tet). Số thứ tự của các nucleotide trên vector được bắt đầu với vị trí *EcoRI* duy nhất: T đầu tiên trong chuỗi GAATTC được quy ước là nucleotide thứ nhất. Các số thứ tự sau đó được tiếp tục quanh phân tử vector theo hướng từ gen kháng Tet tới gen kháng Amp.

Plasmid có thể được cắt ở một số thứ tự nào đó trong các vị trí xác định bằng enzyme hạn chế. Vì thế, các đoạn được tạo ra có thể tạo vòng bằng cách kết hợp các đầu kết dính bổ trợ. Hơn nữa, các đoạn được tạo ra bởi một enzyme đặc biệt hoạt động trên một phân tử DNA sẽ có cùng đầu kết dính với đoạn được tạo ra bởi cùng một enzyme hoạt động trên một phân tử DNA khác. Vì thế, các đoạn từ hai phân tử DNA khác nhau từ hai cơ thể khác nhau có thể kết hợp bằng các liên kết hydrogen thuận nghịch khi các đoạn này được trộn lại.

Nếu sự kết hợp được gắn lại sau khi bắt cặp, thì các đoạn được kết hợp cố định bền vững, sự kết hợp của các đoạn này được thực hiện nhờ enzyme ligase (còn gọi là polynucleotide ligase) liên kết đồng hóa trị các

phân tử tái tổ hợp bằng cách tạo ra liên kết phosphodiester giữa đầu 5'-PO₄ của một polynucleotide với đầu 3'-OH của polynucleotide khác.



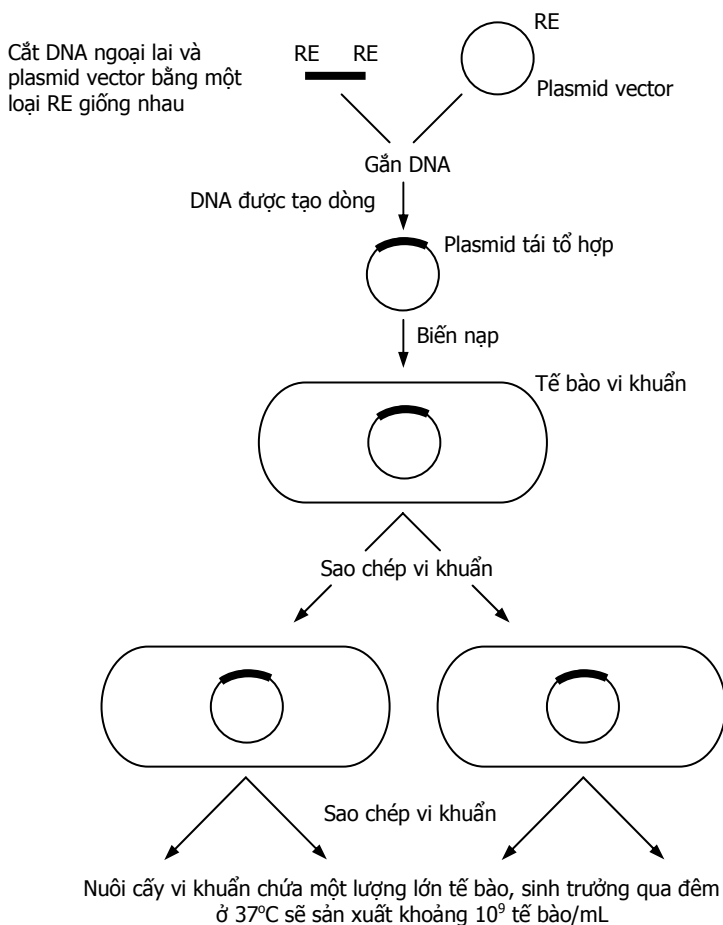
Hình 8.5. Plasmid vector pBR 322. *Amp^r* và *Tet^r*: gen kháng ampicillin và tetracycline, *ori*: trình tự khởi đầu sao chép, và một số vị trí nhận biết cho các RE.

Hình 8.6. trình bày toàn bộ phương thức sản xuất DNA tái tổ hợp (tạo dòng gen). Plasmid được cắt ở các vị trí xác định bằng enzyme hạn chế. DNA của một genome ngoại lai được cắt cùng một loại enzyme, một số đoạn trong đó có thể có gen quan tâm. Plasmid và các đoạn của genome được phối trộn và kết hợp nhờ enzyme ligase. Các plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào vi khuẩn bằng đồng nuôi cấy plasmid và vi khuẩn.

III. Khả năng ổn định của các vi sinh vật tái tổ hợp

Khi các vi sinh vật tái tổ hợp được nuôi cấy để sản xuất protein tái tổ hợp, thì hiệu suất của sản phẩm protein có thể bị giảm do sự tổn thất của plasmid trong cơ thể khi chúng trải qua nhiều lần sinh sản trong quá trình sinh trưởng của vi sinh vật. Khả năng mất ổn định có thể do: (1) Sự phân chia khiếm khuyết của plasmid trong quá trình phân chia của tế bào, hoặc (2) Mất khả năng ổn định cấu trúc tạo ra các đột biến của DNA plasmid.

Để ổn định sự phân chia của plasmid, các tế bào cần được sao chép sao cho số lượng trung bình của các bản sao plasmid trên một tế bào được nhân gấp đôi chỉ trong một thế hệ, và các bản sao plasmid cần được phân phối bằng nhau tới các tế bào con khi phân chia tế bào. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy sự không ổn định của plasmid đã được phát hiện trong các hệ thống cơ thể vật chủ như: *E. coli*, *Bacillus subtilis* cũng như nấm men.



Hình 8.6. Phương thức cơ bản để tạo dòng gen.

Một bộ phận các tế bào mang plasmid trong quần thể tổng số được xem như là một hàm số lượng các thế hệ sinh trưởng. Vì thế, khi thể tích của hệ lên men tăng lên thì số lượng các thế hệ sinh trưởng (generation of

growth) cũng tăng, nhưng một bộ phận các tế bào mang plasmid và hiệu suất sản phẩm lại giảm. Sự không ổn định của plasmid sẽ tiếp tục nếu hệ lên men quy mô lớn được hoạt động liên tục.

1. Động học lên men của các nuôi cấy tái tổ hợp

Nếu gọi xác suất để các tế bào mang plasmid (X^+) sản sinh ra các tế bào không mang plasmid (X^-) sau một lần phân chia là p . Khi ấy với N tế bào mang plasmid, sau một lần phân chia sẽ sản sinh ra $N(1-p)$ tế bào mang plasmid và Np tế bào không mang plasmid.

Tổng số tế bào (X^+) sẽ là $N(2-p)$. Trong suốt thời kỳ sinh trưởng theo hàm mũ, tốc độ sinh trưởng của các tế bào mang plasmid sẽ được biểu diễn như sau:

$$\frac{dC_{X^+}}{dt} = (1-p)\mu^+ C_{X^+} \quad (8.1)$$

Trong đó: μ^+ là tốc độ sinh trưởng đặc trưng của các tế bào mang plasmid, C_{X^+} là số lượng các tế bào mang plasmid trên một đơn vị thể tích. Nếu khối lượng tế bào tương ứng xấp xỉ với số lượng tế bào, thì phương trình tốc độ sinh trưởng đã cho cũng có thể áp dụng được khi C_{X^+} là khối lượng tế bào trên một đơn vị thể tích.

Mặt khác, tốc độ sinh trưởng của các tế bào không mang plasmid sẽ là:

$$\frac{dC_{X^-}}{dt} = p\mu^+ C_{X^+} + \mu^- C_{X^-} \quad (8.2)$$

Trong đó: μ^- là tốc độ sinh trưởng đặc trưng của các tế bào không có plasmid, và C_{X^-} số lượng các tế bào không mang plasmid trên một đơn vị thể tích.

Nếu chúng ta chấp nhận rằng μ^+ và p là hằng số, thì tích phân của phương trình (8.1) sẽ là:

$$C_{X^+} = C_{X_0^+} \exp[(1-p)\mu^+ t] \quad (8.3)$$

Trong đó: $C_{X_0^+}$ là nồng độ ban đầu của các tế bào mang plasmid.

Trong trường hợp các tế bào không mang plasmid, thay thế phương trình (8.3) vào (8.2) ta được:

$$\frac{dC_{X^-}}{dt} = p\mu^+ C_{X_0^+} \exp[(1-p)\mu^+ t] + \mu^- C_{X^-} \quad (8.4)$$

Giải phương trình vi phân tuyến tính bậc một đã cho, ta có:

$$C_{X^-} = \frac{p\mu^+ C_{X_0^+}}{(1-p)\mu^+ - \mu^-} \left\{ \exp[(1-p)\mu^+ t] - \exp(\mu^- t) \right\} + C_{X_0^-} \exp(\mu^- t) \quad (8.5)$$

Vì vậy, các phương trình (8.3) và (8.5) dự báo sự thay đổi theo thời gian của C_{X^+} và C_{X^-} để đưa ra các giá trị của p , μ^+ và μ^- .

Bộ phận các tế bào mang plasmid trong quần thể tổng số (f) có thể được định nghĩa như sau:

$$f = \frac{C_{X^+}}{C_{X^+} + C_{X^-}} \quad (8.6)$$

Thay phương trình (8.3) và (8.5) vào phương trình (8.6) cho kết quả:

$$f = \frac{C_{X_0^+} \exp[(1-p)\mu^+ t]}{C_{X_0^+} \exp[(1-p)\mu^+ t] + \frac{p\mu^+ C_{X_0^+}}{(1-p)\mu^+ - \mu^-} \left\{ \exp[(1-p)\mu^+ t] - \exp(\mu^- t) \right\} + C_{X_0^-} \exp(\mu^- t)} \quad (8.7)$$

Đây là phương trình chỉ ra sự thay đổi của bộ phận các tế bào mang plasmid theo thời gian trong suốt thời kỳ sinh trưởng hàm mũ của quá trình lên men mẻ. Điều này được quan tâm để xem f giảm như thế nào theo số lượng thế hệ.

Trong suốt thời kỳ sinh trưởng theo hàm mũ, số lượng thế hệ (n) của các tế bào mang plasmid có thể được tính toán từ mối quan hệ sau:

$$n = \frac{\mu^+ t}{\ln 2} \quad (8.8)$$

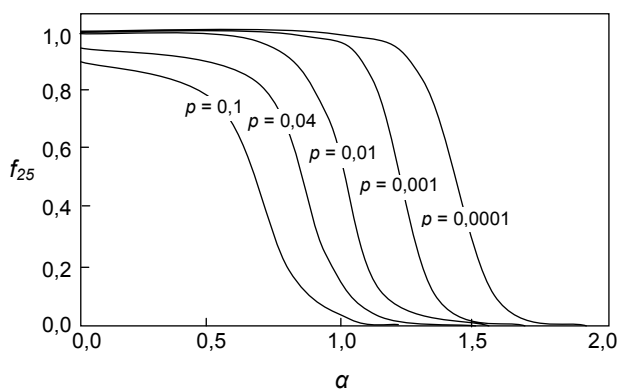
Kết hợp các phương trình (8.7) và (8.8) sẽ có kết quả phương trình của f theo thế hệ thứ n như sau:

$$f = \frac{1 - \alpha - p}{1 - \alpha - p \left[2^{n(\alpha + p - 1)} \right]} \quad (8.9)$$

Trong đó, α là tỷ lệ của các tốc độ sinh trưởng đặc trưng:

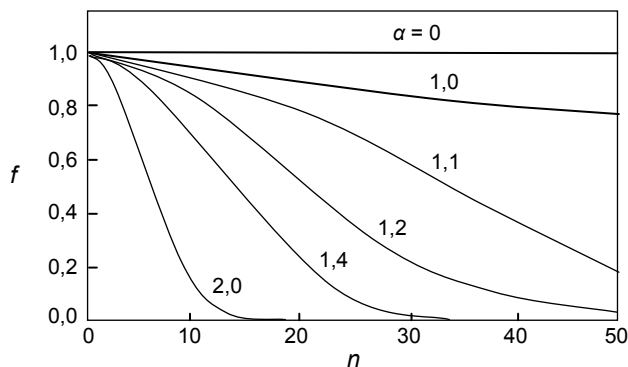
$$\alpha = \frac{\mu^+}{\mu^-} \tag{8.10}$$

Phương trình (8.9) có thể được dùng để dự báo sự thay đổi của f theo số thế hệ cho một loạt quá trình lên men mẻ, nếu chúng ta chấp nhận rằng các tế bào nhân lên theo hàm mũ trong khi nuôi cấy từng mẻ một. Hình 8.7 cho thấy ảnh hưởng của p và α lên f_{25} (f của 25 thế hệ), là thông số bị giảm khi tăng α và p . Khi $p \leq 0,01$ và $\alpha < 1$, thì f_{25} gần bằng 1, khi đó các tế bào mang plasmid rất ổn định. Tuy nhiên, khi α tiến tới 2, f_{25} cũng trở thành 0. Giá trị đặc trưng của α giao động từ 1 đến 2.



Hình 8.7. Bộ phận tế bào mang plasmid sau 25 thế hệ (f_{25}) như là một hàm của α và p .

Hình 8.8 cho thấy sự thay đổi của f như là một hàm của n và α . Giá trị p được đặt không đổi là 0,01. Giá trị của f giảm nhanh khi n và α tăng lên. Khi α bằng 1,4 tất cả tế bào mang plasmid đã mất plasmid của chúng sau khoảng 33 thế hệ.



Hình 8.8. Bộ phận tế bào mang plasmid (f) theo số lượng thế hệ n ($p \leq 0,01$).

2. Nuôi cấy trong hệ thống lên men thùng khuấy liên tục (CSTF)

Nói chung, chúng ta cần phải kiểm tra khả năng ổn định của các tế bào tái tổ hợp trong hệ thống lên men thùng khuấy liên tục. Cân bằng nguyên liệu cho các tế bào mang plasmid chung quanh một CSTF sản xuất như sau:

$$-DC_{X^+} + (1-p)\mu^+C_{X^+} = \frac{dC_{X^+}}{dt} \quad (8.11)$$

Tương tự, cân bằng nguyên liệu cho các tế bào không mang plasmid đã được đưa ra như sau:

$$-DC_{X^-} + p\mu^+C_{X^+} + p\mu^-C_{X^-} = \frac{dC_{X^-}}{dt} \quad (8.12)$$

Cộng hai phương trình (8.11) và (8.12) sẽ được phương trình nồng độ tổng số của tế bào:

$$(\mu^+C_{X^+} + \mu^-C_{X^-}) - D(C_{X^+} + C_{X^-}) = \frac{d(C_{X^+} + C_{X^-})}{dt} \quad (8.13)$$

Nếu CSTF được hoạt động sao cho nồng độ tổng số của tế bào không đổi theo thời gian, thì:

$$\mu^+(C_{X^+} + \alpha C_{X^-}) = D(C_{X^+} + C_{X^-}) \quad (8.14)$$

Nếu $\alpha = 1$, thì phương trình (8.14) được đơn giản hóa thành:

$$\mu^+ = D \quad (8.15)$$

Vì thế, tốc độ sinh trưởng đặc trưng của tế bào trong hệ lên men là không đổi và được xác định bằng tốc độ pha loãng. Thay phương trình (8.15) vào các phương trình (8.11) và (8.12) ta được:

$$C_{X^+} = C_{X_0^+} \exp(-pDt) \quad (8.16)$$

$$C_{X^-} = C_{X_0^-} + C_{X_0^+} [1 - \exp(-pDt)] \quad (8.17)$$

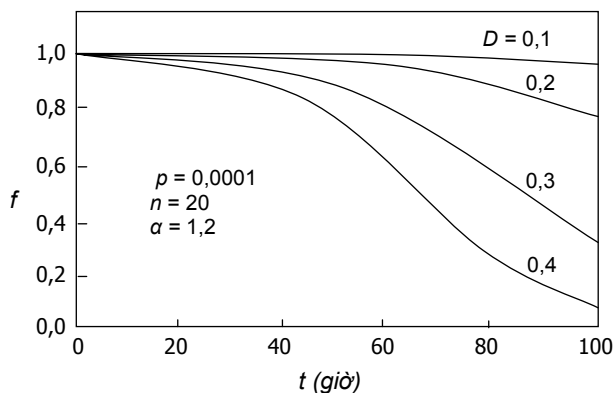
Như vậy, trong suốt quá trình lên men liên tục, nồng độ của các tế bào mang plasmid sẽ bị giảm, trong khi đó nồng độ các tế bào không mang plasmid sẽ tăng lên.

Nếu $\alpha \neq 1$, thì μ^+ không còn là hằng số đối với tốc độ pha loãng không đổi trong suốt sự hoạt động ở trạng thái ổn định của CSTF nữa nhưng vẫn phụ thuộc vào nồng độ tế bào (C_{X^+} và C_{X^-} và α theo phương trình 8.14). Kết quả μ^+ cũng thay đổi theo thời gian. Bằng cách giải đồng thời các phương trình (8.11), (8.12) và (8.14), chúng ta có thể ước lượng C_{X^+} và C_{X^-} sẽ thay đổi theo thời gian như thế nào. Điều này có thể giúp khảo sát xem bộ phận tế bào mang plasmid sẽ giảm như thế nào theo thời gian. Thay phương trình (8.14) vào phương trình (8.11) và chia cho C_{X^+} và C_{X^-} ta có:

$$\frac{df}{dt} = -Df + \frac{(1-p)Df}{\alpha + (1-\alpha)f} \quad (8.18)$$

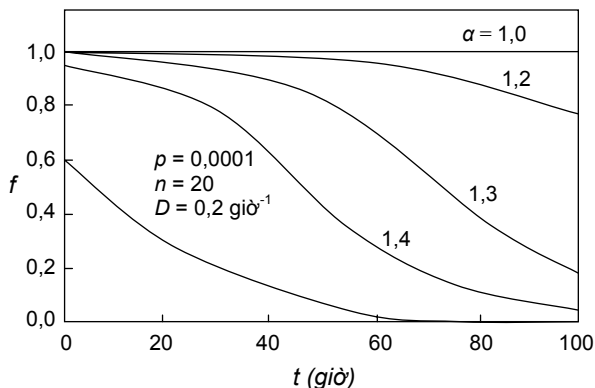
Giải phương trình trên cho thấy giá trị f thay đổi theo thời gian. Giá trị lúc đầu của f dùng để giải phương trình (8.18) có thể thu được từ phương trình (8.9).

Hình 8.9 mô tả sự thay đổi theo thời gian của bộ phận tế bào mang plasmid trong suốt sự hoạt động ở trạng thái ổn định của CSTF. Bộ phận tế bào mang plasmid bị giảm theo thời gian cùng với việc tăng tốc độ pha loãng lên. Khi p và D đủ thấp, và α gần tới 1, thì CSTF có thể hoạt động một cách hiệu quả trong một thời gian dài.



Hình 8.9. Ảnh hưởng của tốc độ pha loãng (D) lên bộ phận tế bào mang plasmid trong sự hoạt động ở trạng thái ổn định của CSTF. Giá trị ban đầu của f được tính toán bằng cách thừa nhận số lần sinh sản cần thiết cho bước tiếp mẫu và nuôi cấy mẻ ban đầu, và sự lên men liên tục ở trạng thái không ổn định là 20.

Tuy nhiên, nếu α tăng lên đến 1,4 thì CSTF sẽ mất hầu như tất cả các tế bào mang plasmid sau 100 giờ hoạt động ở trạng thái ổn định (Hình 8.10).



Hình 8.10. Ảnh hưởng của α lên bộ phận của các tế bào mang plasmid trong sự hoạt động ở trạng thái ổn định của CSTF. Giá trị ban đầu của f được tính toán bằng cách thừa nhận số lần sinh sản cần thiết cho bước tiếp mẫu và nuôi cấy mẻ ban đầu, và sự lên men liên tục ở trạng thái không ổn định là 20.

3. Các phương pháp ổn định

Một số yêu cầu cần được lưu ý để đảm bảo cho sự ổn định của hệ thống tái tổ hợp có khuynh hướng bị mất các plasmid của chúng như sau:

- Xây dựng các công thức môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của các tế bào mang plasmid hơn qua các tế bào không mang plasmid.

- Đặt các áp lực chọn lọc lên các tế bào không mang plasmid bằng cách dùng các đột biến quang tự dưỡng (auxotrophic mutants) hoặc các plasmid kháng kháng sinh.

- Dùng plasmid hoặc chủng đột biến phụ thuộc nhiệt độ.

- Dùng đối chứng biểu hiện gen phụ thuộc nhiệt độ.

- Dùng các plasmid không chứa các nhân tố chuyển vị (transposon). Các nhân tố chuyển vị (còn gọi là gen nhảy) là các đoạn DNA có thể được chèn vào trong một vài vị trí trong bộ gen và có thể gây ra đột biến.

- Dùng chủng tái tổ hợp không hoàn toàn.

IV. Biến đổi di truyền ở tế bào thực vật

Mặc dù lợi ích của nuôi cấy tế bào thực vật quy mô lớn đã được thừa nhận, kỹ thuật này vẫn còn gặp một vài khó khăn khi ứng dụng công nghiệp để sản xuất các sản phẩm thứ cấp và sơ cấp. Việc sử dụng không đúng mức các kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật chủ yếu là do tốc độ sinh trưởng chậm của các tế bào thực vật so với tế bào vi sinh vật và sản lượng cũng thường thấp hơn.

Những phát triển gần đây của công nghệ DNA tái tổ hợp cho thấy một hứa hẹn rất lớn trong việc giải quyết vấn đề này. Các tế bào nuôi cấy sinh trưởng nhanh có thể được chọn lọc và biến đổi di truyền để tạo ra các sản phẩm có giá trị thương mại ở nồng độ cao hơn hiệu suất bình thường của tế bào. Các sản phẩm tiềm năng của công nghệ DNA tái tổ hợp là các protein ngoại lai và các chất trao đổi thứ cấp.

Sản xuất các chất trao đổi thứ cấp từ các tế bào thực vật biến đổi di truyền có thể tăng sản lượng một cách sâu sắc và thương mại hóa nhanh chóng các nuôi cấy thực vật ở quy mô lớn. Tuy nhiên, các gen cần thiết cho sinh tổng hợp các chất trao đổi thứ cấp có giá trị kinh tế quan trọng đến nay vẫn chưa được phân lập. Bởi vì các chất trao đổi thứ cấp thường được sinh tổng hợp thông qua hoạt động kết hợp của nhiều sản phẩm gen, nhiều gen được yêu cầu cho mỗi phương thức sinh tổng hợp để dẫn tới sản xuất các chất trao đổi thứ cấp.

Trong khi đó, các gen mã hóa cho các protein có giá trị kinh tế quan trọng được nhận dạng và biến nạp thành công vào các vi sinh vật bởi vì các protein là các sản phẩm gen trực tiếp. Kỹ thuật biến nạp gen ngoại lai vào trong tế bào thực vật cũng được phát triển cho các ứng dụng nông nghiệp của nuôi cấy tế bào thực vật. Vì thế, sản xuất protein ngoại lai từ các tế bào thuốc lá được biến đổi di truyền có thể đạt được nhiều thành quả.

Dưới đây là các ưu điểm tiềm tàng của việc ứng dụng tế bào thực vật như là các tế bào vật chủ cho các sản phẩm ngoại lai:

- Các sản phẩm protein từ các tế bào thực vật tái tổ hợp có thể là các dược phẩm có hiệu lực và chức năng hơn các sản phẩm có nguồn gốc từ vi sinh vật bởi vì sự biến đổi hậu dịch mã là có thể xảy ra trong các tế bào thực vật.

- Môi trường (chủ yếu là nguồn carbon) nuôi cấy tế bào thực vật được xác định tốt và không đắt tiền, trong khi các tế bào động vật đòi hỏi bổ sung huyết thanh rất đắt tiền trong môi trường dinh dưỡng của chúng.

- Các tế bào dịch huyền phù thực vật có thể đạt đến mật độ tế bào rất cao (60% trọng lượng tươi hoặc 2,4% trọng lượng khô). Kết quả này cao hơn kết quả mà các kiểu nuôi cấy khác có thể đạt được.

- Sự nhiễm bẩn bởi vi khuẩn và nấm dễ dàng được kiểm soát trong nuôi cấy mô thực vật. Hơn nữa các tác nhân nhiễm bẩn này thường không phải là các tác nhân gây bệnh cho người.

Hiatt và cộng sự (1989) đã cho thấy tiềm năng rất lớn trong việc sản xuất các protein ngoại lai từ thực vật bằng cách chứng minh sự sản xuất immunoglobulin và lắp ráp các kháng thể chức năng trong cây thuốc lá được biến đổi di truyền. Họ đã biến nạp vào mảnh lá thuốc lá các DNA bổ sung (cDNA) tổng hợp từ mRNA của hybridoma chuột và đã tái sinh mảnh lá thành cây hoàn chỉnh. Các thực vật biểu hiện các chuỗi immunoglobulin γ hoặc κ riêng rẽ được lai để sản xuất con cháu trong đó cả hai chuỗi được biểu hiện đồng thời. Một kháng thể chức năng tích lũy tới 1,3% protein lá tổng số trong các thực vật biểu hiện các cDNA hoàn chỉnh chứa các chuỗi leader.

1. Kỹ thuật gen

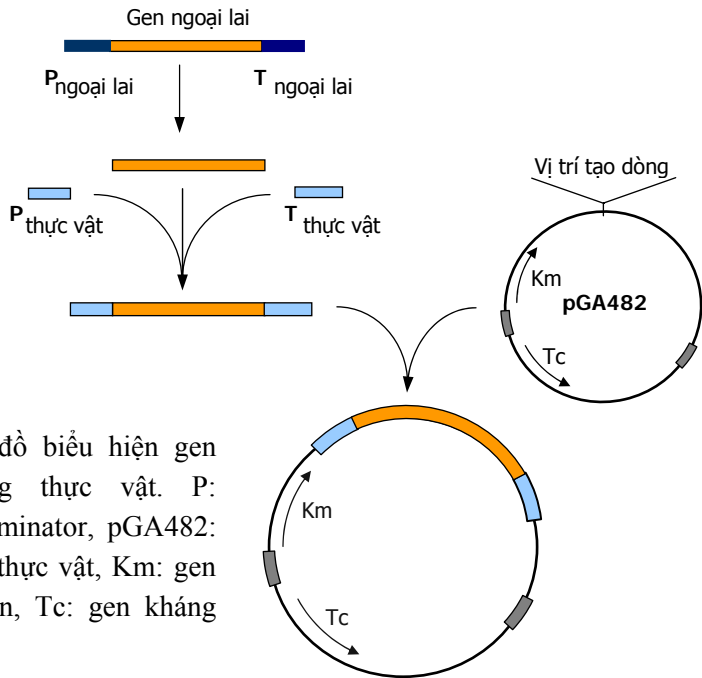
Một gen ngoại lai (của vi khuẩn hoặc động vật) cần phải được sửa đổi để biểu hiện tính chất của chúng trong các tế bào thực vật. Điều này cho thấy rằng thông tin di truyền được yêu cầu cho sự biểu hiện gen, như là sản xuất mRNA từ gen và dịch mã mRNA thành protein, là hoàn toàn khác giữa thực vật và các cơ thể sống khác. Để có kết quả tốt nhất, cả hai vùng ngược hướng (promoter) và cùng hướng (terminator) của gen cấu trúc (gen mã hoá cho sản phẩm protein mong muốn-coding gene) phải được thay thế bằng một chuỗi DNA của thực vật chứa thông tin thích hợp như trình bày ở hình 8.11.

1.1. Promoter

Promoter thực vật có thể phân chia thành hai loại, cấu trúc và cảm ứng. Các promoter cấu trúc có chức năng trong hầu hết tất cả các mô. Các

promoter cảm ứng thường là im lặng cho đến khi chúng được cảm ứng nhờ các nhân tố môi trường hoặc nhân tố phát triển.

Chẳng hạn, các promoter cho quang hợp, các cơ chế bảo vệ và phát triển hoa được cảm ứng chỉ dưới một điều kiện nhất định. Chọn một promoter thực vật tùy thuộc vào bản chất của sản phẩm mong muốn. Đối với hầu hết các trường hợp, một promoter cấu trúc mạnh là nguồn tốt nhất để sản xuất một sản phẩm ngoại lai. Tuy nhiên, nếu sản phẩm ngoại lai là bất lợi đối với sinh trưởng của thực vật, thì cần thiết sử dụng một promoter cảm ứng sao cho sản phẩm sẽ được tổng hợp chỉ dưới các điều kiện mong muốn. Các promoter cho quang hợp được cảm ứng nhanh nhờ ánh sáng trắng và tắt trong suốt thời gian tối. Các gen tiểu đơn vị nhỏ của ribulose-1,5-biphosphate carboxylase và các gen protein light-harvesting được biểu hiện nhiều nhất trong mô xanh. Vì thế, promoter từ các gen này có khả năng là nguồn tốt nhất cho các biểu hiện cảm ứng với ánh sáng. Các promoter cho quang hợp được phân lập từ các nguồn thực vật khác nhau và dùng cho sự biểu hiện của một gen vi khuẩn.



Hình 8.11. Sơ đồ biểu hiện gen ngoại lai trong thực vật. P: promoter, T: terminator, pGA482: vector tạo dòng thực vật, Km: gen kháng kanamycin, Tc: gen kháng tetracycline.

1.2. Terminator

Người ta biết rất ít về terminator của thực vật và chưa chứng minh được là liệu terminator của động vật có chức năng trong thực vật hay không.

Cho tới khi điều này được làm rõ, thì để an toàn hơn nên sử dụng một terminator thực vật để biểu hiện cực đại một gen ngoại lai. Terminator *nos* (nopaline synthase) được dùng thường xuyên nhất mặc dù một số terminator khác của thực vật cũng đã được phân lập.

1.3. Các chuỗi tín hiệu

Không nên có tín hiệu khởi đầu dịch mã (ATG) ở giữa chuỗi promoter và gen cấu trúc vì trình tự ATG này sẽ làm giảm một cách ý nghĩa hiệu suất dịch mã. Khoảng cách giữa các vùng điều hòa (promoter và terminator) và gen cấu trúc phải không được quá dài. Nếu không thì mRNA được sản xuất sẽ kém ổn định.

Một trong những nhân tố quan trọng xét về thực tế thao tác gen là vị trí cuối cùng của protein. Các protein ngoại lai được sản xuất có thể được duy trì trong tế bào chất, được chuyển vào trong một cơ quan tử, hoặc được tiết ra ngoài tế bào. Hầu hết protein thực vật phân bố trong tế bào chất, để nó được chuyển vào trong cơ quan tử của tế bào chất hoặc ra ngoài màng tế bào thì một tín hiệu đặc trưng (polypeptide) phải được gắn vào đầu tận cùng amino của protein mong muốn. Chuỗi peptide tín hiệu này được tách ra trong giai đoạn sớm của sự vận chuyển và chỉ một protein chức năng hoàn chỉnh được giải phóng tới nơi đến cuối cùng. Điều này chưa được hiểu đầy đủ không biết liệu chỉ một mình chuỗi peptide tín hiệu có đủ cho sự vận chuyển đúng cách hay không. Những nghiên cứu gần đây cho thấy rằng sự vận chuyển của protein ngoại lai vào trong chloroplast chỉ yêu cầu một peptide tín hiệu. Tuy nhiên, cơ chế vận chuyển vào trong các cơ quan tử khác hoặc trong môi trường ngoại bào là rất khác nhau. Nếu thông tin bổ sung trong thể protein chủ yếu cũng cần thiết, thì sẽ cực kỳ khó khăn khi thiết kế cho một protein ngoại lai được vận chuyển mà không có sự thay đổi về cấu trúc protein để khỏi làm hỏng chức năng của protein.

Nhiều protein được tổng hợp trong các tế bào được biến đổi di truyền. Ví dụ: carbohydrate thường được gắn với các protein tìm thấy trên màng tế bào. Một số protein được phosphoryl hóa. Những biến đổi như thế hoặc gây hoạt động hoặc làm bất hoạt chức năng của protein. Vì vậy, một gen ngoại lai phải được thao tác thích hợp cho một biến đổi hậu dịch mã chính xác. Ví dụ, nếu muốn gắn carbohydrate vào protein, thì có thể thiết kế một quá trình để tiết protein ra ngoài màng tế bào. Trong phương thức này protein có thể được biến đổi cho phù hợp. Tuy nhiên, các cơ chế biến đổi như thế có thể

khác nhau trong mỗi cơ thể sống. Vì thế, chọn lọc cẩn thận dòng tế bào thích hợp là rất cần thiết.

2. Biến nạp gen

Có nhiều kỹ thuật khác nhau được dùng để biến nạp gen vào tế bào thực vật, chẳng hạn biến nạp gen gián tiếp qua *Agrobacterium tumefaciens*, biến nạp gen trực tiếp bằng vi đạn (microprojectile) nhờ súng bắn gen (gene gun) hoặc hệ thống dội bom (bombardement), xung điện (electroporation), vi tiêm (microinjection), sóng siêu âm (ultrasonic), tinh thể silicon carbide, PEG (polyethylene glycol)...

Tuy nhiên, kỹ thuật được sử dụng rộng rãi nhất để biến nạp một chuỗi DNA mới vào thực vật là dựa trên cơ sở Ti-plasmid của *A. tumefaciens*. Trong thời gian ủ tế bào thực vật với vi khuẩn đất, thì một chuỗi đặc biệt được gọi là DNA vận chuyển (T-DNA) của Ti-plasmid được chuyển từ vi khuẩn vào tế bào thực vật. Nếu gen ngoại lai được xâm nhiễm có trong T-DNA, thì gen có thể được chuyển vào trong nhiễm sắc thể thực vật cùng với T-DNA. T-DNA tự nhiên mang các gen sản xuất phytohormone dẫn đến tạo thành khối u ở các tế bào bị xâm nhiễm. Để tránh hiện tượng tạo khối u và tạo điều kiện cho việc chọn lọc nhanh các thể biến nạp, các marker (gen chỉ thị) kháng của thực vật đã được phát triển bằng cách dung hợp gen kháng kháng sinh của vi khuẩn với các vùng điều hòa của thực vật như đã mô tả ở phần trước. Theo phương thức này các marker kháng kanamycin và marker kháng chloramphenicol đã được xây dựng và sử dụng để thay thế các gen phytohormone trên vùng T-DNA. Do Ti-plasmid tự nhiên khó thao tác trực tiếp *in vitro* bằng các phương pháp DNA tái tổ hợp vì kích thước lớn của chúng (khoảng 200 kb), vì thế người ta đã phát triển các hệ thống đơn giản hơn.

Phương pháp hiệu quả nhất đã được sử dụng đó là hệ thống binary vector. Một trong các binary vector được trình bày ở hình 8.11. Hệ thống này phụ thuộc vào một vector nhỏ mang các yếu tố được yêu cầu tối thiểu trong dạng *cis*. Các chức năng khác cần cho cơ chế chuyển gen được giao cho một helper plasmid riêng biệt, Ti-plasmid. Những phương thức này cho phép đưa vào và duy trì một cách dễ dàng DNA ngoại lai chứa trong một gen đã được thao tác di truyền.

Các tế bào thực vật có thể biến nạp với một gen ngoại lai bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Trong phương pháp này, các vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa binary vector và một helper Ti-plasmid được trộn lại với các tế bào

nuôi cấy có hoạt tính sinh trưởng hoặc mảnh cắt của thực vật (mảnh lá). Sau khi ủ hỗn hợp này khoảng hai ngày. Các tế bào biến nạp được chọn lọc trên môi trường agar có kháng sinh thích hợp. Thể biến nạp có thể được phát hiện bằng mắt thường sau khi đồng nuôi cấy từ 2-3 tuần. Một vài tế bào trong mảnh lá đã được biến nạp sẽ được tái sinh thành cây. Các cây chuyển gen này sau đó sẽ được sử dụng để tạo callus dùng trong nuôi cấy dịch huyền phù tế bào ở các hệ lên men quy mô lớn.

V. Biến đổi di truyền ở tế bào động vật

Biến đổi di truyền các tế bào động vật có thể được ứng dụng để sản xuất một protein đặc trưng hoặc cải thiện đặc điểm của một dòng tế bào sản xuất. Cũng tương tự như ở thực vật, hiện nay có nhiều phương pháp đưa DNA ngoại lai vào tế bào động vật có vú để biến đổi di truyền, ví dụ: chuyển nhiễm (transfection) hay còn gọi là hóa biến nạp, lipofection (DNA được đưa vào thông qua liposome), xung điện, vi tiêm DNA trực tiếp vào tế bào, bắn gen, dung hợp (fusion) tế bào động vật có vú với protoplast của vi khuẩn mang DNA hoặc các hệ thống viral vector (kể cả các tiểu phân phage)... Các dòng tế bào chuyển nhiễm sẽ biểu hiện DNA ngoại lai ổn định chỉ khi nó được hợp nhất trong genome. Ngược với cơ thể vi sinh vật, sự hợp nhất của DNA ngoại lai hầu hết là không tương ứng (non-homologous). Vì thế, gen mã hóa sản phẩm protein có thể được hợp nhất trong các vùng của genome, mà vùng đó không thuận lợi cho việc biểu hiện hiệu quả của gen.

1. Kỹ thuật gen

Một số gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker) cho các tế bào động vật có vú là có sẵn. Các marker trội (có thể được dùng bất chấp dòng tế bào vật chủ) hầu hết liên quan với tính kháng thuốc. Các marker lặn (được sử dụng trong sự kết hợp với đặc điểm di truyền của tế bào vật chủ) có thể bao gồm các enzyme của sự chuyển hóa purine và pyrimidine, tính kháng thuốc hoặc chuyển hóa amino acid. Hai hệ thống thành công nhất là hệ thống glutamine synthetase (GS) và hệ thống dihydrofolate reductase (DHFR).

Enzyme GS (được tổng hợp nhờ gen *gs*) xúc tác cho sự tạo thành glutamine từ glutamate và các ion ammonium. Gen *gs* có thể được dùng như là một marker chọn lọc trong các tế bào hybridoma và myeloma hoặc các tế

bào không có *gs* khác. Các tế bào được chuyển nhiễm ổn định sẽ biểu hiện gen *gs* và sinh trưởng ổn định trên môi trường không có glutamine.

Enzyme DHFR (được tổng hợp nhờ gen *dhfr*) dùng cho dòng tế bào CHO *dhfr*⁻. Dòng tế bào *dhfr*⁻ không ổn định để tổng hợp tetrahydrofolate một cofactor cần thiết trong chuyển hóa một carbon (one-carbon). Các dòng tế bào *dhfr*⁻ chỉ sinh trưởng ổn định trên môi trường chứa thymidine và hypoxanthine và các tiền chất (precursors) cần thiết để vượt qua sự khiếm khuyết này. Các tế bào chuyển nhiễm biểu hiện gen *dhfr* có khả năng sinh trưởng ổn định trên môi trường không bổ sung các chất nói trên.

Biến đổi di truyền của các tế bào động vật có vú để cải thiện dòng tế bào chưa được phát triển rộng rãi nhưng cũng đã tăng lên đáng kể. Các lĩnh vực đang được quan tâm là kéo dài sự sống của các tế bào sản xuất, sinh trưởng trong môi trường không có huyết thanh, giảm sự tạo thành các sản phẩm phụ và các đặc tính glycosylation. Apoptosis, yếu tố xuất hiện trong hầu hết các nuôi cấy tế bào động vật có vú, có thể bị ảnh hưởng nhờ việc đưa vào gen *bcl2*, một gen kháng apoptosis. Phương thức này sẽ kéo dài sự sống của tế bào và liên quan pha sản xuất của quá trình nuôi cấy.

2. Biến nạp gen

Chọn phương pháp biến nạp gen phụ thuộc vào mức độ biểu hiện gen được mong đợi, biểu hiện trong thời gian ngắn hoặc biểu hiện ổn định; loại tế bào đích như tế bào dịch huyền phù hoặc tế bào dính bám, các dòng tế bào thích nghi hoặc phân hóa. Mỗi phương pháp đều đòi hỏi sự tối ưu cao, bao gồm các yếu tố như: số lượng tế bào, nồng độ DNA và vector biểu hiện.

2.1. Phương pháp chuyển nhiễm

Dùng calcium phosphate kết tủa DNA, có phạm vi hiệu quả từ $1-10^4$ khuẩn lạc/ 10^6 tế bào/ μg . Sự hợp nhất DNA ngoại lai trong DNA tế bào mang tính ngẫu nhiên. DNA chuyển nhiễm thường tái tổ hợp trước khi hợp nhất làm cho thể hội nhập mang nhiều bản sao DNA trong tế bào. Hiệu quả chuyển nạp có thể tăng ở một vài dòng tế bào được xử lý dimethyl sulfoxide (DMSO) hoặc glycerol trong một thời gian ngắn (4-6 giờ) sau khi chuyển nhiễm. Xử lý sốc sau chuyển nhiễm bằng chloroquin diphosphate gây độc cao. Mức độ độc thay đổi giữa các dòng tế bào, đặc biệt các tế bào nuôi cấy dịch huyền phù và các tế bào phân hóa ở giai đoạn cuối. Khi thay calcium

phosphate bằng DEAE-dextran thì chuyển nhiễm DNA có thể ít độc hơn với mọi xử lý sốc sau chuyển nhiễm ở tế bào nuôi cấy dịch huyền phù và tế bào phân hóa.

2.2. Phương pháp lipofection

Phương pháp này sử dụng các lipid trung tính hoặc mang cation để tạo thành liposome. Phức lipid hợp nhất với màng huyết tương sẽ phóng thích DNA dính bám vào trong phần bào tan. Phương pháp này cho hiệu suất chuyển nạp cao hơn hóa biến nạp. Tính đồng nhất của thành phần lipid giữa màng tế bào vật chủ và lipofectant làm tăng hiệu quả dung hợp và tăng khả năng xâm nhập của DNA gắn kèm. Các liposome mang cation (lipofectin) thích hợp cho chuyển gen *in vitro* với hiệu suất trên 90% ở một số loại tế bào nuôi cấy. Lipofectin được sử dụng để bọc các virus. Việc tạo ra các liposome chứa protein virus trong lớp lipid đã cải thiện hiệu quả gắn của vector với các tế bào đặc biệt, như là tế bào ung thư gan. Chỉ có một số phương pháp thích hợp để chuyển DNA qua màng huyết tương bằng thực ẩm bào (endocytosis) và đẩy mạnh các quá trình nội thể gây thoái biến và sắp xếp lại DNA. Liposome được dùng để phân phối *in vivo* và *ex vivo* các gen người tới tế bào đích thích hợp.

2.3. Phương pháp chuyển gen bằng xung điện

Phương pháp này yêu cầu nghiêm ngặt các thông số của thiết bị điện xung liên quan đến hiệu suất xâm nhập của DNA. Dòng điện được sử dụng để tạo ra ở các tế bào treo trong dung dịch DNA các lỗ thủng trên màng huyết tương và thông qua đó DNA theo gradient mật độ chui vào trong phần bào tan. Phương pháp này được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy dịch huyền phù lymphocyte (lympho bào). Chuyển nạp gen bằng xung điện có khuynh hướng tạo ra các thể hội nhập mang bản sao DNA đơn và thường được sử dụng để chuyển gen vào các tế bào mầm phôi (embryonic stem-ES). Việc chuyển nạp gen thông qua điện trường ở các tế bào tạo máu (hematopoietic cells) và các thể hệ tổ tiên của chúng là phương thức thích hợp cho các virals vector đòi hỏi hệ thống đóng gói phức tạp. Các tế bào tủy xương tổ tiên (bone marrow progenitor cells) được nuôi trong môi trường có cytokine, interleukin 3, sẽ tăng tần số chuyển nhiễm và biểu hiện gen ở các tế bào tạo bạch cầu hạt (granulopoietic) và thể hồng cầu (erythroid) tổ tiên. Các marker chọn lọc trội như là pSVNeo ghi mã cho một gen của prokaryote, neomycin phosphotransferase (*neo*) mang gen khởi động

(promoter) và gen tăng cường (enhancer) của Simian Virus 40 (SV 40), cho phép phân lập các tế bào kháng neomycin bằng cách dùng một dạng đồng đẳng của neomycin, G418, trong môi trường bổ sung. Chuyển nạp gen pSVNeo bằng xung điện vào trong tế bào mầm tủy xương cho kết quả tốt, và có thể ứng dụng để chuyển nạp cDNA của yếu tố đông máu (factor IX) vào trong tế bào đệm (stromal cells) có nguồn gốc tủy xương.

2.4. Phương pháp vi tiêm

Là phương pháp chuyển DNA trực tiếp nhất và có hiệu quả cao. Tuy nhiên, số lượng tế bào thí nghiệm bị giới hạn chỉ trong vài trăm. Kỹ thuật tinh xảo và thiết bị đắt tiền của vi tiêm đã hạn chế sử dụng rộng rãi phương pháp này. Tiến bộ lớn nhất của phương pháp vi tiêm là khả năng giảm sát biểu hiện của DNA ngoại lai ở các tế bào riêng rẽ. Hơn nữa, trong khi chuyển nhiễm và chuyển gen bằng xung điện có thể vô cùng độc, thì vi tiêm phân phối DNA trực tiếp vào trong nhân tế bào mà không gây nguy hiểm đến sự nguyên vẹn của tế bào. Để giảm độc tính tới mức tối thiểu, thể tích DNA phải được hạn chế nhỏ hơn 10% thể tích nhân. Đặc trưng của vi tiêm là cung cấp phương thức để tạo ra các động vật được chuyển gen, đánh giá biểu hiện gen được tạo dòng trong các tế bào phôi, cung cấp phương pháp trực tiếp để tạo các đột biến chèn đoạn (insertional mutants), xác định các nhân tố điều hòa biểu hiện gen đặc trưng mô và đặc trưng tế bào, và phân lập các dòng provirus nguyên vẹn của các retrovirus để tiến hành phân tích bệnh lý học.

2.5. Phương pháp dùng súng bắn gen

Phương pháp này sử dụng các hạt kim loại như là tungsten hoặc vàng làm vi đạn. Vi đạn được bọc bằng DNA và được bắn đi với một vận tốc thích hợp để xâm nhập vào tế bào đích. Hiệu quả của phương pháp này tương đương với phương pháp chuyển nhiễm. Sự biểu hiện thành công của DNA ngoại lai trong tế bào chuột NIH 3T3, tế bào khỉ COS 7 và một dòng đại thực bào (macrophage) đã được thông báo. Súng bắn gen và phương pháp tiêm trực tiếp DNA trần của plasmid bị hạn chế đối với tim và các tế bào cơ xương của động vật. Chỉ có 1-3% tế bào nhận DNA và sản xuất một lượng nhỏ protein được ghi mã. Các phương tiện hiện hành hầu hết đều thích hợp cho các chiến lược vaccine trong đó với một lượng nhỏ protein là đủ để tạo ra một phản ứng miễn dịch.

2.6. Viral vector

Các viral vector là các cấu trúc tái tổ hợp trong đó một hoặc nhiều gen virus được thay thế bởi DNA tạo dòng. Chuyển nạp gen đặc trưng mô hoặc tế bào được thực hiện bằng cách chọn lọc các điểm thụ cảm của tế bào đặc hiệu virus. Virus mang DNA tái tổ hợp xâm nhiễm vào tế bào đích đặc trưng và phân phối tải trọng di truyền vào trong chúng. Một đặc điểm hấp dẫn của viral vector là điều hòa biểu hiện gen khi có mặt promoter và enhancer của virus. Các viral vector có nguồn gốc từ hầu hết các virus DNA, bao gồm SV 40, các virus tạo u dạng nhú (papilloma virus) ở người và bò, nhóm virus DNA của parvoviridae (adeno-associated virus, AAV), adenoviruses (các virus mang DNA sợi kép), các virus bệnh mụn giộp (herpes) và virus bệnh đậu mùa (vaccinia). Kích thước của các đoạn chèn (insert DNA) thay đổi từ 2-3 kb ở các papovavirus tới > 50 kb ở vaccinia. Các viral vector có thể cho phép biểu hiện trong thời gian ngắn và hầu như 100% ở điều kiện *in vitro*. DNA của provirus được sản xuất nhờ phiên mã ngược RNA của retrovirus (nhóm virus mang RNA sợi đơn) hợp nhất như là một bản sao đơn trong nhiễm sắc thể vật chủ, giảm tới mức tối thiểu sự phiên mã gen. Các viral vector đặc biệt được thiết kế để phân phối DNA ngoại lai vào trong các tế bào phân hóa, các tế bào mầm phôi, và các lymphocyte. Mặc dù các retrovirus đã được sử dụng để chuyển gen, nhưng cũng có một vài khó khăn do provirus của nó thiếu khả năng hợp nhất vào các tế bào thụ động, bởi vì DNA chỉ hợp nhất khi tế bào trải qua thời kỳ phân bào. Điều này dẫn tới thất bại khi biểu hiện ở mức độ cao các gen chuyển nạp. Để có khả năng tái tổ hợp, kích thước tối đa của đoạn chèn DNA khoảng 7 kb.

Tóm lại, chọn lựa một phương pháp chuyển nạp gen thích hợp phụ thuộc vào mục đích thí nghiệm và các tế bào đích (tế bào dính bám hay tế bào dịch huyền phù), chúng là những tế bào sơ cấp hay đã thích nghi, đã phân hóa hay có nhiều tiềm năng. Thử nghiệm biểu hiện của DNA chuyển nhiễm có thể là tạm thời (trong thời gian ngắn) hoặc bền vững (ổn định) với các mức độ biểu hiện cơ bản hoặc có thể suy diễn. Các dòng tế bào dính bám dễ thao tác bằng các phương pháp chuyển gen khác nhau với thử nghiệm thành công biểu hiện gen sau đó. Khi độc tính của phương pháp chuyển nhiễm loại trừ khả năng biểu hiện gen, thì một trong các phương pháp khác có thể cho phép thiết kế thí nghiệm thành công. Khi phương pháp chuyển nhiễm, xung điện, và viral vector thất bại thì phương pháp vi tiêm có thể sẽ thích hợp. Chuyển nạp gen trong các tế bào không dính bám khó thực hiện nhưng sử dụng viral vector và chuyển nhiễm DEAE, cũng như

liposome có thể là giải pháp hợp lý. Có khả năng vi tiêm các tế bào không dính bám nhưng cần sự dính kết hóa học của tế bào với cơ chất.

Nồng độ DNA dùng trong thí nghiệm chuyển gen thay đổi từ 1ng đến 10 μg cho 10^5 - 10^6 tế bào nhận. Trong vi tiêm, một vài trăm tế bào được tiêm trực tiếp DNA nồng độ từ 1 pg đến 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ tương đương với 1 - 10^2 bản sao của cấu trúc tái tổ hợp. Số lượng bản sao đưa vào trong các tế bào nhận vật chủ tỷ lệ với kích thước vector, đoạn chèn (insert DNA) và nồng độ DNA. Các cấu trúc mạch thẳng hợp nhất thông qua tái tổ hợp cao hơn khoảng 10 lần các cấu trúc mạch vòng. Chuyển nhiễm thông qua liposome trở thành một kỹ thuật phổ biến nhờ độc tính thấp hơn và hiệu quả chuyển nạp cao. Trong khi phương pháp xung điện đòi hỏi một số lượng lớn DNA (10-40 μg) và trung bình sẽ giết chết một nửa tế bào nhận.

VI. Các ký hiệu

C	nồng độ, số lượng tế bào/ m^3 hoặc kg/m^3
C_{X^+}	số lượng các tế bào mang plasmid trên một đơn vị thể tích
$C_{X_0^+}$	nồng độ ban đầu của các tế bào mang plasmid
C_{X^-}	số lượng các tế bào không mang plasmid trên một đơn vị thể tích
$C_{X_0^-}$	nồng độ ban đầu của các tế bào không mang plasmid
D	tốc độ pha loãng, s^{-1}
f	số tế bào mang plasmid trong quần lạc tế bào tổng số, thông số không có thứ nguyên
f_n	số tế bào mang plasmid trong quần lạc tế bào tổng số sau n thế hệ, thông số không có thứ nguyên
n	số thế hệ, thông số không có thứ nguyên
p	xác suất xuất hiện số tế bào không có plasmid trong một thế hệ
t	thời gian, s
α	tỷ lệ của các tốc độ sinh trưởng đặc trưng ($\bar{\mu}/\mu^+$), thông số không có thứ nguyên
μ^+	tốc độ sinh trưởng đặc trưng của các tế bào mang plasmid, s^{-1}
$\bar{\mu}$	tốc độ sinh trưởng đặc trưng của các tế bào không có plasmid, s^{-1}
X^+	tế bào mang plasmid
X^-	tế bào không mang plasmid

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Atkinson B and Mavituna F.** 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd ed. *Stockton Press*, New York, USA.
2. **Bains W.** 2003. Biotechnology from A to Z. *Oxford University Press, Inc.* New York, USA.
3. **Chia TF.** 2003. Engineering Applications in Biology. Updated 1st ed. *McGraw-Hill Education*, Singapore.
4. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.
5. **Old RW and Primrose.** 1989. Principles of Gene Manipulation. *Blackwell Scientific Publications*, Osney Mead, Oxford, UK.
6. **Ratledge C and Kristiansen B.** 2002. Basic Biotechnology. *Cambridge University Press*, UK.
7. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* New Jersey, USA.
8. **Singleton P and Sainsbury D.** 2001. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology. 3rd ed. *John Wiley & Sons, Ltd.* UK.
9. **Walker JM and Rapley R.** 2002. Molecular Biology and Biotechnology. 4th ed. *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge, UK.

Chương 9

Tiệt trùng

Hầu hết các quá trình lên men công nghiệp được tiến hành như các nuôi cấy thuần khiết trong đó chỉ có các chủng chọn lọc được phép sinh trưởng. Nếu một cơ thể vi sinh vật ngoại lai hiện diện trong môi trường hoặc trong bất kỳ một bộ phận thiết bị nào đó, thì chúng sẽ làm nhiễm bẩn môi trường, sản xuất ra các sản phẩm có hại có thể hạn chế sinh trưởng của các cơ thể được sản xuất. Vì thế, trước khi bắt đầu quá trình lên men, môi trường và các thiết bị lên men phải được tiệt trùng để loại bỏ tất cả các nguy cơ gây nhiễm và các điều kiện vô trùng này phải được duy trì trong suốt quá trình lên men.

I. Các phương pháp tiệt trùng

Tiệt trùng môi trường lên men hoặc các thiết bị có thể thực hiện bằng cách phá hủy tất cả các cơ thể sống hoặc bằng phương thức nhiệt (ấm hoặc khô), hoặc các tác nhân hóa học, chiếu xạ (tia cực tím hoặc tia X) và bằng các phương pháp cơ học (siêu âm hoặc sóng âm thanh). Một hướng khác là loại các cơ thể sống bằng phương pháp lọc hoặc ly tâm tốc độ cao.

1. Nhiệt

Nhiệt là phương thức được sử dụng rộng rãi nhất để tiệt trùng, có thể sử dụng cho cả hai loại môi trường đặc và lỏng. Nó có thể được ứng dụng dưới dạng nhiệt khô hoặc ẩm (hơi nước). Nhiệt ẩm thường hiệu quả hơn nhiệt khô, do khả năng kháng nhiệt ở bên trong của các tế bào vi khuẩn được tăng lên mạnh trong trạng thái khô hoàn toàn. Kết quả là tỷ lệ chết của tế bào khô thấp hơn nhiều so với tế bào ẩm. Sự dẫn nhiệt trong không khí khô cũng có tốc độ kém hơn trong không khí ẩm. Vì thế, nhiệt khô chỉ được dùng để tiệt trùng dụng cụ thủy tinh hoặc các vật liệu rắn chịu nhiệt. Bằng cách tăng áp suất lên bình nuôi cấy, nhiệt độ hơi nước có thể tăng lên một cách ý nghĩa trên cả điểm sôi của nước. Nồi tiệt trùng áp suất (autoclave) ở phòng thí nghiệm thường được hoạt động ở áp suất hơi nước khoảng 15 psi tương ứng với 121°C, các bào tử vi khuẩn bị giết nhanh ở 121°C.

2. Hóa chất

Các tác nhân hóa học có thể được dùng để giết vi sinh vật bằng khả năng oxy hóa hoặc alkyl hóa. Tuy nhiên, chúng không được dùng để tiệt trùng môi trường bởi vì các hóa chất này có thể ức chế sinh trưởng của các cơ thể lên men. Các tác nhân hóa học được sử dụng thường xuyên cho việc xử lý để loại bỏ hoặc làm giảm mức độ nguy hại của các tác nhân gây bệnh. Một số tác nhân hóa học kháng khuẩn chính là: phenol và các hợp chất phenol (phenol, cresol, orthophenylphenol), alcohol (ethyl, methyl), các halogen (iodine, hypochlorite, chloramine), các chất tẩy, thuốc nhuộm, các hợp chất ammonium bậc bốn, các acid, kiềm và các tác nhân gây vô sinh dạng khí (ethylene oxide, β -propiolactone, formadehyde).

3. Tia cực tím

Nhiều nguyên liệu tế bào hấp thụ ánh sáng cực tím, dẫn đến gây nguy hiểm cho gen và sau đó giết chết tế bào. Bước sóng khoảng 256 nm có hiệu quả diệt khuẩn cao nhất. Tuy nhiên, tia cực tím có rất ít khả năng xuyên qua vật chất. Vì thế, việc sử dụng chúng bị hạn chế đối với việc làm giảm quần thể vi sinh vật trong phòng nơi mà điều kiện vô trùng cần thiết được duy trì thường xuyên, chẳng hạn như các phòng mổ của bệnh viện hoặc các buồng làm việc sạch trong phòng thí nghiệm.

Tia X gây chết cơ thể vi sinh vật và có khả năng xuyên qua vật chất. Tuy nhiên, chúng không thực tế như các công cụ tiệt trùng khác do chi phí đắt cũng như sự lo lắng về an toàn lao động.

4. Sóng siêu âm

Sóng âm thanh hoặc siêu âm có cường độ đủ mạnh cũng có thể phá vỡ và giết chết tế bào. Kỹ thuật này thường được sử dụng để phá vỡ tế bào nhằm tách chiết các thành phần của nội bào (protein, enzyme...) hơn là để tiệt trùng.

5. Lọc

Là kỹ thuật được sử dụng hiệu quả nhất trong việc loại bỏ các vi sinh vật trong không khí hoặc trong các loại khí khác. Trong trường hợp dung dịch lỏng, nó được dùng cho các sản phẩm hoặc các loại môi trường không bền nhiệt, dễ dàng bị phá hủy như các huyết thanh người và động vật, các loại enzyme.

Trong số các kỹ thuật được giới thiệu ở trên, nhiệt ẩm có hiệu quả và kinh tế nhất cho các yêu cầu tiết trùng nói chung của hệ lên men. Vì thế, các phần sau đây chỉ mô tả động học của hiện tượng chết tế bào và các hoạt động tiết trùng bằng nhiệt ẩm.

II. Động học của hiện tượng chết do nhiệt

Hiện tượng chết do nhiệt của vi sinh vật, ở một nhiệt độ đặc trưng, có thể mô tả bằng phương trình động học bậc một:

$$\frac{dn}{dt} = -k_d n \quad (9.1)$$

Trong đó: k_d là tốc độ chết đặc trưng, giá trị của nó phụ thuộc không chỉ vào loài mà còn vào dạng sinh lý của tế bào. Ví dụ: giá trị k_d của bào tử vi khuẩn ở 121°C là 1 phút⁻¹, trong khi đó giá trị này của các tế bào sinh dưỡng khác nhau từ 10¹ phút⁻¹ đến 10¹⁰ phút⁻¹ tùy thuộc vào từng cơ thể đặc biệt.

Tích phân của phương trình (9.1) cho kết quả:

$$\ln \frac{n}{n_0} = -\int_0^t k_d dt \quad (9.2)$$

hoặc:

$$n = n_0 \exp\left(-\int_0^t k_d dt\right) \quad (9.3)$$

Phương trình (9.3) cho thấy sự suy giảm theo hàm mũ của quần lạc tế bào. Sự phụ thuộc vào nhiệt độ của tốc độ chết đặc trưng k_d có thể được thừa nhận theo phương trình Arrhenius:

$$k_d = k_{d_0} \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right) \quad (9.4)$$

Trong đó: k_{d_0} là hệ số Arrhenius bằng 5,7×10³⁹ giờ⁻¹, R là hằng số khí, T là nhiệt độ tuyệt đối, E_d là năng lượng hoạt động có thể thu được từ độ dốc của đồ thị ln(k_d) theo 1/ T . Ví dụ: năng lượng hoạt động của *E. coli* là 127 kcal/gmol và của *Bacillus stearothermophilus* (chủng Fs 7954) là 68,7 kcal/gmol.

III. Tiêu chuẩn thiết kế

Từ phương trình (9.2) và (9.4) tiêu chuẩn thiết kế cho sự tiết trùng (∇) có thể được định nghĩa như sau (Deindoerfer và Humphrey 1959):

$$\nabla = \ln \frac{n}{n_0} = \int_0^t k_d dt = k_{d_0} \int_0^t \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right) dt \quad (9.5)$$

∇ cũng được xem như là yếu tố Del, là thước đo quy mô của công việc được hoàn thành. Yếu tố Del tăng lên khi số tế bào cuối cùng giảm. Ví dụ: Khi giảm số tế bào trong hệ lên men từ 10^{10} cơ thể có thể sinh trưởng được xuống còn 1 thì yếu tố Del sẽ bằng:

$$\nabla = \ln \frac{10^{10}}{1} = 23 \quad (9.6)$$

Việc giảm số lượng tế bào từ 10^{10} xuống còn 1 dường như rất ấn tượng. Tuy nhiên, thậm chí nếu 1 cơ thể còn sống thì toàn bộ hệ lên men vẫn bị nhiễm. Vì thế, tất cả các vi sinh vật còn sống phải được đào thải. Khi giảm số lượng tế bào tới 0 thì yếu tố Del bằng ∞ , điều đó có nghĩa là về mặt lý thuyết không có khả năng phá vỡ tất cả cấu trúc của các tế bào sống. Vì thế, số lượng tế bào cuối cùng cần thiết được biểu hiện như là phân số của 1, bằng với xác suất của sự nhiễm bẩn. Ví dụ: $n = 0,001$ nghĩa là cơ hội cho một nhân tố gây nhiễm bẩn sống sót khi bị tiết trùng là 1/1000. Nhân tố Del làm giảm số lượng tế bào trong hệ lên men từ 10^{10} cơ thể sống xuống còn 0,001 là:

$$\nabla = \ln \frac{10^{10}}{0,001} = 30 \quad (9.7)$$

Dựa trên cơ sở tiêu chuẩn tiết trùng đã được tính toán, chúng ta có thể thiết kế một thiết bị tiết trùng tối ưu.

IV. Tiết trùng từng mẻ

Tiết trùng môi trường trong hệ lên men có thể tiến hành từng mẻ bằng cách phun hơi nước (steam sparging) trực tiếp, bằng các bộ phận đun nóng bằng điện, hoặc bằng áp lực tuần hoàn không đổi làm ngưng tụ hơi nước thông qua cuộn dây đốt. Các chu kỳ tiết trùng được sắp xếp theo thứ tự đun

nóng, giữ nóng và làm lạnh. Vì thế, yếu tố Del toàn phần (total) sẽ bằng tổng số yếu tố Del đun nóng (heat), giữ nóng (hold) và làm lạnh (cool):

$$\nabla_{\text{total}} = \nabla_{\text{heat}} + \nabla_{\text{hold}} + \nabla_{\text{cool}} \quad (9.8)$$

Giá trị của ∇_{heat} và ∇_{cool} được xác định bằng các phương pháp dùng cho quá trình đun nóng và làm lạnh. Giá trị của ∇_{hold} được xác định bằng chiều dài của thời gian giữ nóng. Phương thức thiết kế để đánh giá thời gian giữ nóng như sau:

- Tính toán tiêu chuẩn tiết trùng toàn phần.

- Xác định profile của nhiệt độ theo thời gian trong suốt các chu kỳ đun nóng, giữ nóng và làm lạnh của quá trình tiết trùng. Nếu các phép đo thực nghiệm không tiến hành được, thì các phương trình lý thuyết cho việc làm nóng và lạnh có thể được sử dụng, đó là những phương trình đường thẳng, hàm mũ hoặc hyperbolic tùy thuộc vào kiểu làm nóng và lạnh. Các phương trình được gợi ý cho các quá trình làm nóng và lạnh khác nhau như sau (Deindoerfer và Humphrey 1959):

+ Đun nóng từng mẻ bằng cách phun hơi nước trực tiếp vào môi trường, phương trình dạng hyperbolic:

$$T = T_0 + \frac{Hm_s t}{c(M + m_s t)} \quad (9.9)$$

Trong đó: T là nhiệt độ tuyệt đối ($^{\circ}\text{K}$), T_0 là nhiệt độ tuyệt đối ban đầu của môi trường ($^{\circ}\text{K}$), H là enthalpy của hơi nước liên quan với nhiệt độ của môi trường chưa nấu chín (J/kg), m_s là tốc độ dòng chảy của khối hơi nước (kg/s), t là thời gian (s), c là nhiệt đặc trưng của môi trường (J/kg $^{\circ}\text{K}$), và M là khối lượng ban đầu của môi trường trong nồi tiết trùng mẻ (kg).

+ Đun nóng từng mẻ bằng tốc độ không đổi của dòng nhiệt, như đun nóng bằng nhiệt, phương trình dạng đường thẳng:

$$T = T_0 + \frac{qTt}{cM} \quad (9.10)$$

Trong đó: q là tốc độ truyền nhiệt (J/s).

+ Đun nóng từng mẻ bằng nguồn đẳng nhiệt, như tuần hoàn hơi nước thông qua cuộn dây đốt, phương trình dạng hàm mũ:

$$T = T_H + (T_0 - T_H) \exp\left(-\frac{UA t}{cM}\right) \quad (9.11)$$

Trong đó: T_H là nhiệt độ tuyệt đối của nguồn nhiệt ($^{\circ}\text{K}$), U là hệ số chuyển nhiệt toàn phần ($\text{J/s m}^2\text{K}$), và A là diện tích mặt cắt của sự chuyển nhiệt xuất hiện trong khi tiết trùng (m^2).

+ Làm lạnh từng mẻ bằng cách dùng bể không đẳng nhiệt liên tục, như cho nước lạnh chảy qua nhờ ống làm lạnh xoắn, phương trình dạng hàm mũ:

$$T = T_{C_0} + (T_0 - T_{C_0}) \exp\left\{-\left[1 - \exp\left(-\frac{UA}{m_c c}\right)\right] \frac{m_c t}{M}\right\} \quad (9.12)$$

Trong đó: T_{C_0} là nhiệt độ tuyệt đối ban đầu của bồn nhiệt ($^{\circ}\text{K}$), m_c là tốc độ dòng chảy của khối chất lỏng làm nguội (kg/s).

- Vẽ giá trị của k_d như là một hàm thời gian.

- Lấy tích phân các diện tích dưới đường cong k_d theo thời gian cho các quá trình làm lạnh và làm nóng để đánh giá tương ứng ∇_{heat} và ∇_{cool} . Nếu sử dụng các phương trình lý thuyết, thì lấy tích phân phương trình (9.5) sau khi thay thế các profile nhiệt độ thích hợp. Sau đó, thời gian giữ nóng có thể được tính toán từ phương trình:

$$t_{\text{hold}} = \frac{\nabla_{\text{total}}}{k_d} = \frac{\nabla_{\text{heat}} + \nabla_{\text{hold}} + \nabla_{\text{cool}}}{k_d} \quad (9.13)$$

V. Tiết trùng liên tục

Tiết trùng được tiến hành trong kiểu liên tục hiệu quả hơn kiểu từng mẻ. Tiết trùng liên tục có một số ưu điểm sau:

- Lập kế hoạch sản xuất đơn giản, cho phép sử dụng tối đa thiết bị và sự giảm thiểu sự chậm trễ.

- Cung cấp các điều kiện tái sản xuất.

- Có thể hoạt động ở nhiệt độ cao (140°C , chẳng hạn 121°C trong tiết trùng từng mẻ), vì thế thời gian tiết trùng có thể rút ngắn (thời gian giữ chỉ từ 1-2 phút).

- Cần ít hơi nước bằng cách thu hồi nhiệt từ môi trường được tiết trùng. Kết quả là nó cũng cần ít nước làm lạnh.

- Dễ dàng hơn trong tự động hóa quá trình, nhờ vậy cường độ lao động ít hơn.

Một thiết bị tiết trùng liên tục bao gồm ba bộ phận chính: đun nóng, giữ và làm lạnh.

1. Bộ phận đun nóng

Phương pháp đun nóng có thể chia làm hai loại: phun hơi nước trực tiếp và làm nóng gián tiếp trong các thiết bị trao đổi nhiệt ống lồng ống (shell-and-tube) hoặc có khung đĩa (plate-and-frame). Làm nóng trực tiếp hiệu quả hơn gián tiếp do không có vật cản (barrier) giữa môi trường và nguồn nhiệt. Dụng cụ phun hơi nước làm nóng nhanh môi trường tới một nhiệt độ tiết trùng tối đa. Vì thế, sự tiết trùng trong suốt thời gian đun nóng là đáng kể.

Đối với làm nóng gián tiếp, bộ phận trao đổi nhiệt có khung đĩa thường hiệu quả hơn loại truyền nhiệt ống lồng ống. Tuy nhiên, bộ phận đầu bị hạn chế đối với các áp lực thấp (thường dưới 20 atm) do cường lực cấu trúc yếu của nó so với bộ phận sau. Loại có khung đĩa cũng thuận lợi cho các hệ thống có độ nhớt cao.

Sự thay đổi nhiệt độ liên quan với thời gian lưu trung bình ($\bar{\tau}_{\text{heat}}$) khi môi trường đi qua nguồn đẳng nhiệt có thể được tính gần đúng như sau (Deindoerfer và Humphrey 1959b):

$$T_{C_2} = T_H - (T_H - T_{C_1}) \exp\left(-\frac{UA\tau_{\text{heat}}}{cW}\right) \quad (9.14)$$

Với W là khối lượng môi trường trong hệ thống tiết trùng.

Trường hợp đun nóng bằng cách dùng nguồn nhiệt dòng nước ngược có tốc độ dòng chảy và công suất nhiệt tương đương, thì ta có phương trình sau:

$$T_{C_2} = T_{C_1} - \frac{\Delta TUA\bar{\tau}_{\text{heat}}}{cW} \quad (9.15)$$

2. Bộ phận giữ nóng

Môi trường được đun nóng đi qua bộ phận giữ nhiệt bao gồm một ống dài. Bộ phận giữ được duy trì trong các điều kiện đoạn nhiệt. Nếu nhiệt mất trong bộ phận này là không đáng kể, thì nhiệt độ có thể được thừa nhận là hằng số. Thời gian lưu trung bình trong bộ phận giữ là:

$$\bar{\tau}_{\text{hold}} = \frac{L}{\bar{u}} \quad (9.16)$$

Trong đó: L là chiều dài bộ phận giữ, \bar{u} là tốc độ trung bình.

Từ đó yếu tố Del được tính như sau:

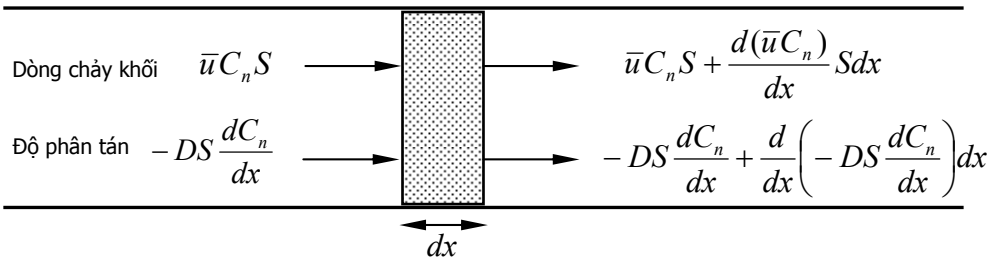
$$\nabla_{\text{hold}} = \ln \frac{n_o}{n} = k_d \bar{\tau}_{\text{hold}} = k_{d_0} \exp\left(-\frac{E_d}{RT}\right) \bar{\tau}_{\text{hold}} \quad (9.17)$$

Với n_0 là số lượng tế bào ở thời điểm bắt đầu của bộ phận giữ.

Nếu môi trường trong bộ phận giữ chạy như một dòng nút lý tưởng (ideal plug flow), thì thời gian lưu của môi trường trong phần này là giống với tất cả các môi trường khác. Vì vậy, mức độ diệt trùng không thay đổi. Tuy nhiên, việc không giữ đúng mục tiêu do bản chất nhớt của chất lỏng, sự ma sát của thành ống, các xoáy nước bất thường của chất lỏng chảy đã gây ra sự phân chia dòng nút lý tưởng. Kết quả là profile tốc độ có giá trị cực đại ở giữa đường ống và giá trị tối thiểu ở vùng lân cận thành ống.

Sự phân chia của dòng nút lý tưởng do sự trộn lẫn quanh trục có thể được mô tả bằng mô hình phân tán (Levenspiel 1972). Hình 9.1 trình bày yếu tố vi sai với độ dày dx trong ống giữ. Sự cân bằng nguyên liệu cơ bản cho các tế bào lơ lửng trong môi trường là:

$$\text{Vào} - \text{Ra} - \text{Giết chết bằng diệt trùng} = \text{Tích lũy} \quad (9.18)$$



Hình 9.1. Các cân bằng nguyên liệu quanh bộ phận sơ cấp trong ống giữ.

Ở trạng thái ổn định, giới hạn tích lũy bằng không. Sự đi vào và đi ra khỏi môi trường của tế bào nhờ một dòng chảy khối và một điều kiện

khuếch tán (độ phân tán) quanh trục. Số lượng tế bào đi vào trừ cho những tế bào rời đi bằng dòng chảy khối là:

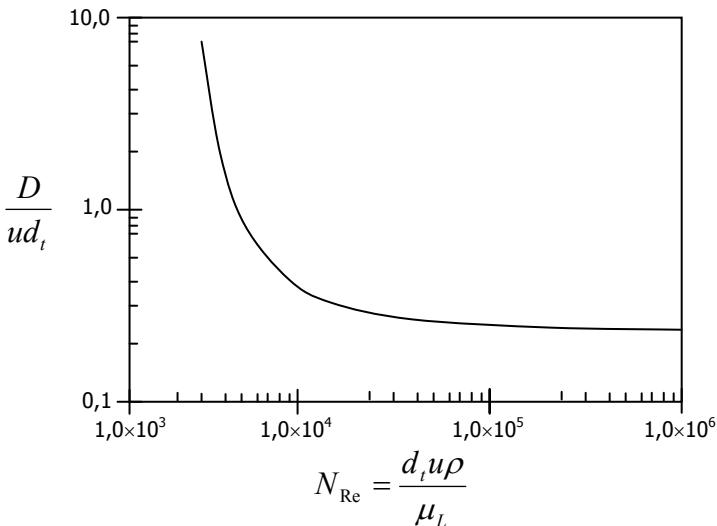
$$\bar{u}C_n S - \left[\bar{u}C_n S + \frac{d(\bar{u}C_n)}{dx} S dx \right] \quad (9.19)$$

Trong đó: C_n là mật độ số lượng tế bào, S diện tích mặt cắt của ống.

Tương tự với sự khuếch tán phân tử, dòng chảy hướng trục x của tế bào lơ lửng trong môi trường do sự phân tán quanh trục có thể được biểu diễn như sau:

$$J_n = -D \frac{dC_n}{dx} \quad (9.20)$$

Trong đó: D là hệ số phân tán quanh trục được mô tả bằng mức độ trộn ngược (backmixing) trong dòng chảy. Nếu D bằng 0, thì sự phân phối tốc độ hướng tới dòng chảy nút lý tưởng. Nếu D bằng ∞ , thì dòng chảy trong ống sẽ phối trộn tốt giống như một cái bình được trộn hoàn toàn. Đối với dòng chảy xáo trộn hỗn loạn, thì hệ số phân tán tương quan như là một hàm của số Reynolds (Hình 9.2).



Hình 9.2. Tương quan cho $\frac{D}{u d_t}$ như là một hàm của số Reynolds.

Số lượng các tế bào đi vào và đi ra nhờ sự phân tán quanh trục là:

$$-DS \frac{dC_n}{dx} - \left[-DS \frac{dC_n}{dx} + \frac{d}{dx} \left(-DS \frac{dC_n}{dx} \right) dx \right] \quad (9.21)$$

Số lượng các tế bào bị giết khi tiệt trùng là $k_d C_n S dx$. Vì thế, bằng cách thay thế phương trình (9.19), (9.21) vào trong phương trình (9.18) và đơn giản hóa, ta được:

$$\frac{d}{dx} \left(D \frac{dC_n}{dx} \right) - \frac{d(\bar{u} C_n)}{dx} - k_d C_n = 0 \quad (9.22)$$

Đối với hằng số D và \bar{u} , phương trình (9.22) có thể được biến đổi trong dạng không có thứ nguyên:

$$\frac{d^2 C_n'}{dx'^2} - N_{Pe} \frac{dC_n'}{dx'} - N_{Pe} \frac{k_d L}{\bar{u}} C_n' = 0 \quad (9.23)$$

Trong đó:

$$C_n' = \frac{C_n}{C_{n_0}} \quad x' = \frac{x}{L} \quad N_{Pe} = \frac{\bar{u} L}{D}$$

N_{Pe} được biết như là số Péclet. Khi $N_{Pe} = \infty$ thì nó là dòng nút lý tưởng. Các điều kiện cho việc giải phương trình (9.23) là:

$$\frac{dC_n'}{dx'} + N_{Pe}(1 - C_n') = 0 \quad \text{ở } x' = 0 \quad (9.24)$$

$$\frac{dC_n'}{dx'} = 0 \quad \text{ở } x' = 1$$

Giải phương trình (9.23) ta được:

$$C_n' \Big|_{x'=1} = \frac{4\varphi \exp\left(\frac{N_{Pe}}{2}\right)}{(1 + \varphi)^2 \exp\left(\frac{\varphi N_{Pe}}{2}\right) - (1 - \varphi)^2 \exp\left(-\frac{\varphi N_{Pe}}{2}\right)} \quad (9.25)$$

Trong đó:

$$\varphi = \sqrt{1 + \frac{4k_d L / \bar{u}}{N_{Pe}}} \quad (9.26)$$

3. Bộ phận làm lạnh

Đối với bộ phận làm lạnh, dùng một buồng làm mát có khả năng loại nhiệt là rất hiệu quả. Một kỹ thuật khác là đưa môi trường nóng qua một van mở rộng vào trong buồng chân không được xem là quá trình làm lạnh nhanh (flash cooling). Cả hai kỹ thuật này ít tốn thời gian, vì thế thời gian làm lạnh trong suốt quá trình tiệt trùng được cho là không đáng kể.

Bộ phận trao đổi nhiệt ống lồng ống và có khung đĩa cũng có thể được dùng để làm lạnh bằng cách dùng bồn đẳng nhiệt là:

$$T_{H_2} = T_C - (T_C - T_{H_1}) \exp\left(\frac{UA\bar{\tau}_{cool}}{cW}\right) \quad (9.27)$$

Trong đó: T_C là nhiệt độ tuyệt đối của bồn nhiệt.

Trường hợp làm lạnh bằng cách dùng bồn nhiệt dòng nước ngược có tốc độ dòng chảy và khả năng nhiệt bằng nhau, thì ta có phương trình sau:

$$T_{H_2} = T_{H_1} - \frac{\Delta TUA\bar{\tau}_{cool}}{cW} \quad (9.28)$$

4. Tiệt trùng không khí

Đối với lên men hiếu khí (aerobic fermentations), thì cần cung cấp không khí liên tục. Tốc độ sục khí đặc trưng cho lên men hiếu khí khoảng 0,5-1,0 vvm (thể tích khí/thể tích chất lỏng/phút). Điều này đòi hỏi một lượng lớn không khí. Vì thế, không chỉ môi trường mà không khí cũng phải vô trùng. Tất cả những kỹ thuật vô trùng dùng cho môi trường cũng có thể áp dụng cho không khí. Tuy nhiên, tiệt trùng theo phương thức nhiệt không thực tế về mặt kinh tế và cũng không hiệu quả do hiệu suất truyền nhiệt thấp của không khí so với chất lỏng. Kỹ thuật tiệt trùng có hiệu quả nhất cho không khí là phương pháp lọc bằng cách dùng bộ lọc màng (membrane filter) hoặc bộ lọc sợi (fibrous filter).

Nút bông, thường được dùng như là nắp đậy cho ống nghiệm hoặc bình tam giác đựng dung dịch vô trùng, là một ví dụ tốt để loại vi sinh vật ra

khởi không khí bằng sợi lọc. Một bộ lọc đơn giản được làm bằng cách nhồi bông trong cột. Tuy nhiên, với các bộ lọc làm bằng bông thì sự giảm áp lớn và sự ẩm ướt có thể là điều kiện thuận lợi cho sự nhiễm bẩn. Vì thế, các sợi thủy tinh thích hợp khi lọc môi trường do chúng tạo ra một sự giảm áp thấp hơn và ít có khả năng ẩm ướt hoặc cháy. Hệ thống lọc hiện đại bằng sợi là các ống hình trụ làm từ các vi sợi borosilicate liên kết, chúng được bao bọc trong mạng lưới đã gia cố polypropylene. Loại thiết kế này có thể phân phối hơn 3 m³/s không khí vô trùng ở sự giảm áp suất 0,1 bar.

Với các bộ lọc sợi, các tiêu thể trên không đã được thu thập bằng các cơ chế đóng chặt (impaction), ngăn chặn (interception) và khuếch tán (diffusion).

4.1. Đóng chặt

Khi dòng khí mang các phần tử chảy quanh ống góp (collector), thì các phần tử này sẽ theo luồng không khí cho tới khi chúng rẽ ra quanh ống góp. Các tiêu thể nhờ khối lượng của chúng sẽ có động lượng (sức đẩy tới) đầy đủ để tiếp tục chuyển động hướng tới ống hình trụ và chọc thủng dòng khí (Hình 9.3). Hiệu suất thu gom bằng cơ chế đóng chặt (η_{imp}) theo quán tính là một hàm của số Stokes và Reynolds như sau:

$$\eta_{imp} = f(N_{St}, N_{Re}) = \left(\frac{C_f \rho_p d_p^2 v_0}{18 \mu D_c}, \frac{D_c v_0 \rho}{\mu} \right) \quad (9.29)$$

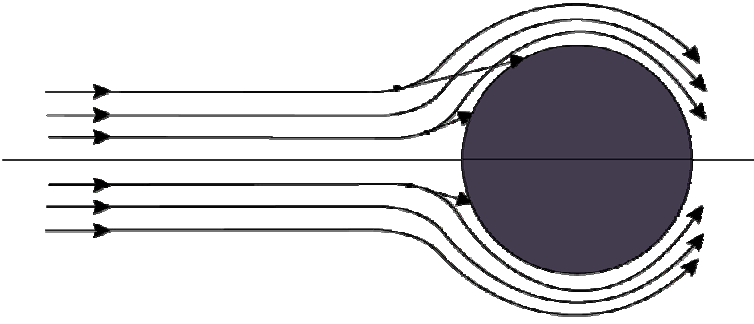
Trong đó: N_{St} là số Stokes, ρ mật độ, ρ_p mật độ các phần tử, d_p đường kính phần tử, D_c đường kính ống góp, v_0 tốc độ chất lỏng ngược hướng không bị xáo trộn, μ độ nhớt lưu chất (nước và khí), C_f là yếu tố hiệu chỉnh Cunningham. Giá trị của C_f có thể được ước lượng từ sự hiệu chỉnh theo kinh nghiệm được phát triển bởi Davis (Strauss 1975):

$$C_f = 1 + \frac{2\lambda}{d_p} \left[1,257 + 0,400 \exp\left(-1,10 \frac{d_p}{2\lambda}\right) \right] \quad (9.30)$$

Trong đó: λ là đường đi tự do trung bình của các phân tử khí dựa trên phương trình Chapman-Enskog:

$$\lambda = \left(\frac{\mu}{0,499 \rho} \right) \sqrt{\frac{\pi M_w}{8RT}} \quad (9.31)$$

Với M_w trọng lượng phân tử của các phân tử khí.



Hình 9.3. Kiểu luồng khí quanh sợi hình ống, cho thấy hướng đi của các phần tử được thu thập bởi sự đóng chặt theo quán tính.

Hiệu suất η_{imp} được định nghĩa là phần tử nhỏ tiếp cận với ống góp đóng chặt.

$$\eta_{\text{imp}} = \frac{N_{\text{St}}^3}{N_{\text{St}}^3 + 0,77N_{\text{St}}^2 + 0,22} \quad \text{cho } N_{\text{Re}_c} = 10 \quad (9.32)$$

Trong đó: N_{Re_c} là số Reynolds của ống góp.

Một tương quan khác được đề xuất bởi Friedlander (1967) là:

$$\eta_{\text{imp}} = 0,075N_{\text{St}}^{1,2} \quad (9.33)$$

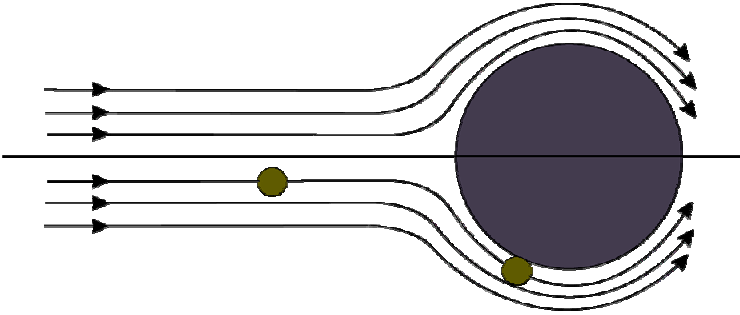
Như vậy, hiệu suất tăng lên với việc tăng đường kính phần tử hoặc tốc độ dòng khí.

4.2. Ngăn chặn

Mô hình đóng chặt theo quán tính thừa nhận các phần tử có khối lượng, và vì thế có quán tính, nhưng không có kích thước. Một cơ chế ngăn chặn được xem như là ở đó các phần tử có kích thước, nhưng không có khối lượng, và vì thế chúng có thể theo dòng khí chuyển động quanh ống góp. Nếu dòng khí đi qua gần đủ bề mặt của sợi, thì các phần tử sẽ tiếp xúc với sợi và bị loại bỏ (Hình 9.4). Hiệu suất ngăn chặn (η_{int}) phụ thuộc vào tỷ lệ của đường kính phần tử với đường kính của ống góp ($\kappa = d_p / D_c$):

$$\eta_{\text{int}} = \frac{1}{2,002 - \ln N_{\text{Re}_c}} \left[(1 + \kappa) \ln(1 + \kappa) - \frac{\kappa(2 + \kappa)}{2(1 + \kappa)} \right] \quad (9.34)$$

η_{int} được phát triển bằng cách dùng phương trình tốc độ dòng chảy của Langmuir (Strauss 1975). Tỷ lệ κ được xem như là thông số ngăn cản. Hiệu suất thu gom bằng ngăn chặn tăng lên cùng với việc tăng kích thước của các phần tử.



Hình 9.4. Kiểu luồng khí quanh sợi hình ống, cho thấy cơ chế thu thập ngăn chặn.

4.3. Khuếch tán

Các phần tử có đường kính nhỏ hơn khoảng 1 micron (μm) biểu lộ một sự chuyển động Brown có cường độ đủ để tạo ra sự khuếch tán. Nếu dòng chảy chứa các phần tử này tới gần ống góp thì các phần tử này sẽ va trúng ống góp và bị loại bỏ. Ngược với hai cơ chế trước, hiệu suất thu gom bằng khuếch tán tăng lên cùng với việc giảm kích thước phần tử hoặc tốc độ không khí. Kích thước đặc trưng của các phần tử được thu gom bằng cơ chế này là nhỏ hơn $0,5 \mu\text{m}$. Hiệu suất thu gom bằng khuếch tán (η_{dif}) có thể ước lượng bằng một phương trình tương tự phương trình Langmuir như sau (Strauss 1975):

$$\eta_{\text{dif}} = \frac{1}{2,002 - \ln N_{\text{Re}_c}} \left[(1 + Z) \ln(1 + Z) - \frac{Z(2 + Z)}{2(1 + Z)} \right] \quad (9.35)$$

Trong đó: Z là thông số khuếch tán, được định nghĩa như sau:

$$Z = \left[2,24(2,002 - \ln N_{\text{Re}_c}) \frac{D_{\text{Br}}}{\nu D_c} \right]^{\frac{1}{3}} \quad (9.36)$$

Với D_{Br} là sự khuếch tán do chuyển động Brown.

Friedlander (1976) đã gợi ý sự tương quan sau:

$$\eta_{dif} = 1,3N_{Pe}^{-2/3} + 0,7\kappa^2 \quad (9.37)$$

Trong đó: N_{Pe} là số Péclet, một thông số không có thứ nguyên quan trọng trong lý thuyết khuếch tán đối lưu. Nó được định nghĩa như sau:

$$N_{Pe} = \frac{v_0 D_c}{D_{Br}} = N_{Re} N_{Sc} \quad (9.38)$$

Với N_{Sc} là số Schmidt, được định nghĩa như sau:

$$N_{Sc} = \frac{\mu}{\rho D_{Br}} \quad (9.39)$$

Sự khuếch tán nhờ chuyển động Brown cho các phần tử có kích thước nhỏ hơn micron (submicron) có thể được ước lượng từ biểu thức:

$$D_{Br} = \frac{C_f kT}{3\pi\mu d_p} \quad (9.40)$$

Trong đó: k là hằng số Boltzmann ($1,38054 \times 10^{-23} \text{ J}^\circ\text{K}$).

4.4. Cơ chế kết hợp

Hiệu suất thu gom tổng số của bộ lọc sợi thu được từ hiệu quả phối hợp của ba cơ chế có trước. Một phương thức đơn giản để phối hợp hiệu suất thu gom của các cơ chế khác nhau là bổ sung chúng cùng với nhau. Nhưng điều này đã gợi ý là các phần tử có thể được thu gom không chỉ một lần. Một hướng tốt hơn là dùng mối tương quan sau:

$$\eta_c = 1 - (1 - \eta_{imp})(1 - \eta_{int})(1 - \eta_{dif}) \quad (9.41)$$

Đây là yếu tố chỉ cho phép các phần tử không được thu gom bằng cơ chế này thì được thu gom bằng cơ chế khác. Thay thế phương trình (9.32), (9.34) và (9.35) vào phương trình (9.41) sẽ cho kết quả trong mối tương quan đối với hiệu suất thu gom bằng các cơ chế kết hợp (combined mechanism, η_c). Pasceri và Friedlander (1960) đã hiệu chỉnh hiệu suất thu gom kết hợp như sau:

$$\eta_c = \frac{6}{N_{Sc}^{2/3} N_{Re_c}^{0,5}} + 3\kappa^2 N_{Re_c}^{0,5} \quad (9.42)$$

Như đã đề cập, với việc tăng tốc độ dòng khí bề mặt thì η_{imp} và η_{int} tăng trong khi η_{dif} giảm. Vì thế, hiệu suất thu gom phối hợp thường giảm tới một điểm tối thiểu và sau đó tăng cùng với việc tăng tốc độ dòng khí bề mặt.

VI. Các ký hiệu

- A* diện tích mặt cắt của sự chuyển nhiệt xuất hiện trong khi tiết trùng, m²
- C_f* yếu tố hiệu chỉnh Cunningham, không có thứ nguyên
- C_n* mật độ số lượng tế bào, số lượng tế bào/m³
- c* nhiệt đặc trưng của môi trường, J/kg^oK
- D* hệ số phân tán quanh trục
- D_{Br}* sự khuếch tán do chuyển động Brown, m²/s
- D_c* đường kính ống góp, m
- d_p* đường kính phân tử, m
- d_t* đường kính ống, m
- E_d* năng lượng hoạt động cho sự tiêu diệt tế bào bằng nhiệt trong phương trình Arrhenius, J/kmol
- H* enthalpy của hơi nước liên quan với nhiệt độ của môi trường chưa nấu chín, J/kg
- J_n* luồng tế bào do sự phân tán quanh trục, m⁻²s⁻¹
- k* hằng số Boltzmann: 1,38054×10⁻²³ J/^oK hoặc 1,38054×10⁻¹⁶ erg/^oK
- k_d* tốc độ chết đặc trưng, s⁻¹ hoặc kg/m³/s
- L* chiều dài của bộ phận giữ, m
- M* khối lượng ban đầu của môi trường trong nồi tiết trùng mẻ, kg
- M_w* trọng lượng phân tử của các phân tử khí, kg/kmol
- m_s* tốc độ dòng chảy của khối hơi nước, kg/s
- m_c* tốc độ dòng chảy của khối chất lỏng làm nguội, kg/s

N_{Pe}	số Péclet ($\bar{u}L/D$ hoặc v_0D_c/D_{Br}), không thứ nguyên
N_{Re}	số Reynolds ($d_p\bar{u}\rho/\mu_L$), không thứ nguyên
N_{Re_c}	số Reynolds của ống góp ($D_c v_0\rho/\mu$), không thứ nguyên
N_{Sc}	số Schmidt ($\mu/\rho D_{Br}$), không thứ nguyên
N_{St}	số Stokes ($C_f\rho d_p^2 v_0/18 \mu D_c$), không thứ nguyên
n	số tế bào trong hệ thống
q	tốc độ truyền nhiệt, J/s
R	hằng số khí: $8,314\times 10^3$ J/kmol $^\circ$ K hoặc $8,314\times 10^7$ erg/mol $^\circ$ K
S	diện tích mặt cắt của ống, m 2
T	nhiệt độ tuyệt đối, $^\circ$ K
T_0	nhiệt độ tuyệt đối ban đầu của môi trường, $^\circ$ K
T_C	nhiệt độ tuyệt đối của bồn nhiệt, $^\circ$ K
T_{Co}	nhiệt độ tuyệt đối ban đầu của bồn nhiệt, $^\circ$ K
T_H	nhiệt độ tuyệt đối của nguồn nhiệt, $^\circ$ K
t	thời gian, s
U	hệ số chuyển nhiệt toàn phần, J/s m 2 $^\circ$ K
u	tốc độ, m/s
\bar{u}	tốc độ trung bình, m/s
v	tốc độ chất lỏng trong phạm vi không gian trống của bộ lọc, m/s
v_0	tốc độ chất lỏng ngược hướng không bị xáo trộn, m/s
W	khối lượng môi trường trong hệ thống tiết trùng, kg
x	khoảng cách định hướng-x, m
Z	thông số khuếch tán được định nghĩa trong phương trình (9.36), không thứ nguyên
η	hiệu suất thu gom, không thứ nguyên
κ	tỷ lệ của phần tử và đường kính ống góp (d_p/D_c), không thứ nguyên
λ	đường đi tự do trung bình của các phân tử khí, m
μ	độ nhớt lưu chất (nước và khí), kg/m s
μ_L	độ nhớt chất lỏng, kg/m s

ρ	mật độ, kg/m ³
ρ_p	mật độ các phần tử, kg/m ³
$\bar{\tau}$	thời gian lưu trung bình, s
∇	tiêu chuẩn thiết kế cho sự tiết trùng, không thứ nguyên

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Asenjo JA and Merchuk JC.** 1995. Bioreactor System Design. *Marcel Dekker, Inc.* New York, USA.
2. **Atkinson B and Mavituna F.** 1991. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook. 2nd ed. *Stockton Press*, New York, USA.
3. **Chia TF.** 2003. Engineering Applications in Biology. Updated 1st ed. *McGraw-Hill Education*, Singapore.
4. **Flickinger MC and Drew SW.** 1999. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation. *John Wiley & Sons*, New York, USA.
5. **Lee JM.** 2001. Biochemical Engineering. *Prentice Hall, Inc.* USA.
6. **Shuler ML and Kargi F.** 2002. Bioprocess Engineering-Basic Concepts. 2nd ed. *Prentice Hall, Inc.* New Jersey, USA.
7. **Vogel HC and Todaro CL.** 1997. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Principles, Process Design, and Equipment). 2nd ed. *Noyes Publications*. New Jersey, USA.

Chương 10

Khuấy trộn và thông khí

I. Mở đầu

Một trong những nhân tố quan trọng cần được lưu ý khi thiết kế hệ lên men đó là khả năng khuấy trộn thích hợp các thành phần của nó. Các vấn đề chính của sự khuấy trộn trong hệ lên men là sự phân tán của các bong bóng khí, tạo huyền phù các cơ thể vi sinh vật (hoặc tế bào thực vật và động vật) và tăng cường sự chuyển nhiệt và chuyển khối trong môi trường.

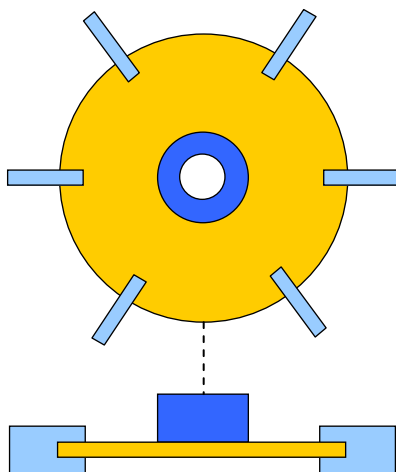
Nói chung, hầu hết các chất dinh dưỡng đều có khả năng hòa tan cao trong nước, do đó trong thời gian lên men nếu chỉ để phân bố đều môi trường khi các tế bào tiêu thụ chất dinh dưỡng thì sự khuấy trộn không thật cần thiết. Tuy nhiên, ở trường hợp oxygen hòa tan thì người ta lại rất mong muốn có một sự khuấy trộn tốt vì khả năng hòa tan của nó trong môi trường lên men là rất kém, trong khi yêu cầu oxygen cho sự sinh trưởng của các vi sinh vật hiếu khí (hoặc tế bào thực vật và động vật) lại rất cao.

Ví dụ: khi oxygen được cung cấp từ không khí, nồng độ cực đại đặc trưng của nó trong dung dịch nước là từ 6-8 mg/L. Nhu cầu oxygen của tế bào, mặc dù có thể phụ thuộc rất lớn vào loại tế bào, thường là khoảng 1 g/L giờ. Ngay cả khi môi trường lên men được bão hòa hoàn toàn với oxygen, thì oxygen hòa tan sẽ được cơ thể tiêu thụ ít hơn một chút nếu như nó không được cung cấp liên tục.

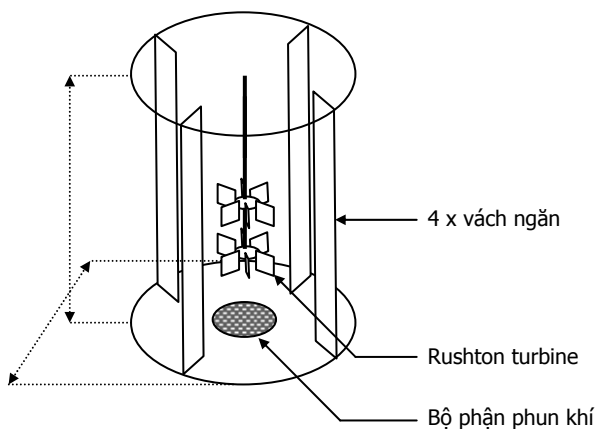
Ở quy mô phòng thí nghiệm, sự khuấy trộn được tạo ra nhờ máy lắc (shaker) là thích hợp để nuôi cấy tế bào trong các bình thủy tinh hoặc ống nghiệm. Các máy lắc vòng hoặc lắc ngang tạo ra một sự phối trộn nhẹ và trao đổi khí bề mặt rất hiệu quả. Trường hợp lên men ở quy mô pilot hoặc quy mô sản xuất, sự khuấy trộn thường được tạo ra bằng cách khuấy cơ học có hoặc không có sục khí. Phổ biến nhất là sử dụng loại cánh khuấy (impeller) tạo ra dòng chảy tỏa tròn với sáu cánh khuấy mỏng được gắn vào trong một đĩa, gọi là turbine đĩa có cánh khuấy mỏng (flat-blade disk turbine) hoặc Rushton turbine (Hình 10.1 và 10.2).

Các cánh khuấy dòng tỏa tròn (các mái chèo và turbine) tạo ra dòng chảy tỏa tròn từ cánh của turbine hướng tới vách ngăn của bình nuôi (vessel), trong đó dòng chảy chia ra theo hai hướng: một hướng đi lên dọc

theo vách, rồi đi trở vào vùng trung tâm theo bề mặt chất lỏng, và đi xuống vùng cánh khuấy dọc theo trục khuấy. Một hướng khác đi xuống dọc theo vách và đáy, sau đó đi vào vùng cánh khuấy.



Hình 10.1. Sơ đồ Rushton turbine.



Hình 10.2. Sơ đồ bình lên men có cánh khuấy.

Mặt khác, các cánh khuấy dòng chảy theo trục (cánh quạt và các mác chèo không bằng phẳng) tạo ra dòng chảy đi xuống đáy bình, sau đó đi lên dọc theo vách và quay xuống vùng trung tâm của cánh khuấy. Vì thế, các turbine đĩa có cánh khuấy mỏng có ưu điểm hạn chế đoạn mạch (short-

circuiting) của khí dọc theo trục truyền động (drive shaft) nhờ sự nén khí, đưa vào từ phía dưới, dọc theo hướng vào trong vòi thoát (discharge jet).

1. Con đường chuyển khối

Con đường của các chất khí từ một bong bóng vào một cơ quan tử trong tế bào có thể được phân chia trong một vài bước như sau:

a. Chuyển từ khí nén (bulk gas) trong một bong bóng tới một lớp khí tương đối nguyên chất (relatively unmixed gas layer).

b. Khuếch tán thông qua lớp khí tương đối nguyên chất.

c. Khuếch tán thông qua lớp chất lỏng tương đối nguyên chất quanh bong bóng.

d. Chuyển từ lớp chất lỏng tương đối nguyên chất tới khối chất lỏng nén (bulk liquid).

e. Chuyển từ khối chất lỏng nén tới một lớp chất lỏng tương đối nguyên chất quanh một tế bào.

f. Khuếch tán thông qua lớp chất lỏng tương đối nguyên chất.

g. Khuếch tán từ bề mặt của một tế bào tới một cơ quan tử mà trong đó oxygen đã bị tiêu hao.

Các bước c và e là chậm nhất. Sự khuấy trộn và thông khí sẽ tăng cường tốc độ chuyển khối trong các bước này và tăng diện tích tương tác giữa khí và chất lỏng.

Chương này trình bày một số mối tương quan khác nhau đối với sự chuyển khối lỏng-khí, diện tích tương tác, kích thước bong bóng, sự tắc nghẽn khí, sự tiêu thụ công suất khuấy và hệ số thể tích chuyển khối, đó là những công cụ quan trọng để thiết kế và hoạt động các hệ lên men. Sự tới hạn đối với việc tăng quy mô sản xuất và sự khuấy trộn nhạy cảm với lực trượt cũng được trình bày. Đầu tiên, chúng ta tìm hiểu các khái niệm cơ bản của sự chuyển khối mà quan trọng là hiểu được sự chuyển khối lỏng-khí trong hệ lên men.

II. Các khái niệm cơ bản về chuyển khối

1. Sự khuếch tán phân tử trong chất lỏng

Khi nồng độ của một thành phần biến thiên từ một điểm này đến một điểm khác, thì thành phần này có xu hướng chảy theo hướng làm giảm những sự khác biệt cục bộ trong nồng độ.

Dòng phân tử của cấu tử A liên quan với vận tốc phân tử trung bình của tất cả cấu tử J_A là tỷ lệ với gradient nồng độ dC_A/dz khi:

$$J_A = -D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \quad (10.1)$$

Phương trình (10.1) là định luật thứ nhất của Fick được viết cho chiều z . Ký hiệu D_{AB} trong phương trình (10.1) biểu diễn khả năng khuếch tán cấu tử A vào B, tức là giá trị đo độ chuyển động khuếch tán của nó.

Dòng phân tử của A liên quan với tọa độ cố định (stationary coordinate) N_A là bằng:

$$N_A = \frac{C_A}{C} (N_A + N_B) - D_{AB} \frac{dC_A}{dz} \quad (10.2)$$

Trong đó: C là nồng độ tổng số của các cấu tử A và B, và N_B là dòng phân tử của B liên quan với tọa độ cố định. Đối với dung dịch loãng của cấu tử A thì:

$$N_A \approx J_A \quad (10.3)$$

1.1. Sự khuếch tán

Lý thuyết động học chất lỏng không có nhiều ưu điểm so với chất khí. Vì thế, mối tương quan cho khả năng khuếch tán trong chất lỏng là không rõ rệt như trong các chất khí. Trong số những mối tương quan đã được đề cập, thì tương quan Wilke-Chang (1955) được sử dụng rộng rãi nhất cho các dung dịch loãng của các chất không điện phân:

$$D_{AB}^o = \frac{1,173 \times 10^{-16} (\xi M_B)^{0,5} T}{\mu V_{bA}^{0,6}} \quad (10.4)$$

Khi các dung môi là nước, Skelland (1974) đã giới thiệu sử dụng mối tương quan được phát triển bởi Othmer và Thakar (1953):

$$D_{AB}^o = \frac{1,112 \times 10^{-13}}{\mu^{1,1} V_{bA}^{0,6}} \quad (10.5)$$

Hai môi tương quan cho trước không phù hợp về thứ nguyên, vì thế các phương trình sử dụng đơn vị SI như sau:

D_{AB}^o khả năng khuếch tán của A trong B, trong một dung dịch rất loãng, m^2/s

M_B khối lượng phân tử của cấu tử B, $kg/kmol$

T nhiệt độ, oK

μ tốc độ hòa tan, $kg/m/s$

V_{bA} thể tích phân tử hòa tan ở điểm sôi bình thường, $m^3/kmol$ ($0,0256 m^3/kmol$ cho oxygen)

ξ yếu tố kết hợp đối với dung môi: 2,26 đối với nước; 1,9 đối với methanol; 1,5 đối với ethanol; 1,0 các dung môi không kết hợp như benzene và ethyl ether.

2. Hệ số chuyển khối

Dòng chảy khối (mass flux), tốc độ chuyển khối q_G trên đơn vị diện tích, tỷ lệ với sự chênh lệch nồng độ. Nếu một chất hòa tan chuyển từ pha khí vào pha lỏng, thì dòng chảy khối của nó từ pha khí tới bề mặt chung N_G là:

$$N_G = \frac{q_G}{A} = k_G(C_G - C_{G_i}) \quad (10.6)$$

Trong đó: C_G và C_{G_i} là nồng độ khí mặt biên (gas-side concentration) tương ứng ở phần chính và vùng phân giới (bề mặt chung) (Hình 10.3). k_G là hệ số chuyển khối riêng rẽ cho pha khí và A là diện tích vùng phân giới.

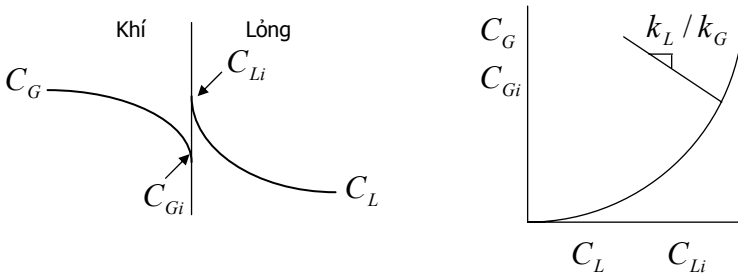
Tương tự, dòng chảy khối của pha lỏng ở mặt biên (liquid-side phase) N_L là:

$$N_L = \frac{q_L}{A} = k_L(C_{L_i} - C_L) \quad (10.7)$$

Trong đó: k_L là hệ số chuyển khối riêng rẽ đối với pha lỏng, q_L là tốc độ hấp thụ khí.

Do lượng chất hòa tan được chuyển từ pha khí tới vùng phân giới phải bằng lượng chất hòa tan từ vùng phân giới tới pha lỏng, nên:

$$N_G = N_L \tag{10.8}$$



Hình 10.3. Profile nồng độ ở gần vùng phân giới khí-lỏng và một đường cong ở trạng thái cân bằng.

Thay phương trình (10.6) và (10.7) vào trong phương trình (10.8) ta được:

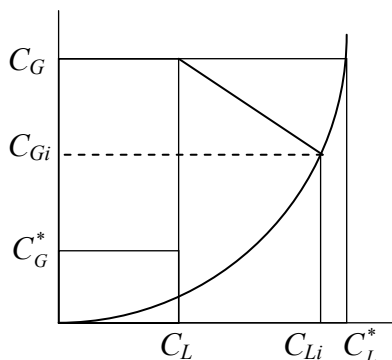
$$\frac{C_G - C_{G_i}}{C_L - C_{L_i}} = -\frac{k_L}{k_G} \tag{10.9}$$

Phương trình (10.9) có độ dốc của đường cong kết nối (C_L, C_G) và (C_{L_i}, C_{G_i}) như trình bày ở hình 10.3.

Sử dụng phương trình (10.6) hoặc (10.7) để xác định hệ số chuyển khối gặp nhiều khó khăn do chúng ta không thể đo nồng độ của vùng phân giới C_{L_i} hoặc C_{G_i} . Vì thế, để thuận lợi cho việc xác định toàn bộ hệ số chuyển khối có thể dùng phương trình sau:

$$N_G = N_L = K_G(C_G - C_G^*) = K_L(C_L^* - C_L) \tag{10.10}$$

Trong đó: C_G^* là nồng độ khí ở mặt biên sẽ cân bằng với nồng độ khí hiện diện trong pha lỏng. Tương tự, C_L^* là nồng độ chất lỏng ở mặt biên sẽ cân bằng với nồng độ chất lỏng hiện diện trong pha khí. Những thông số này dễ dàng đọc từ đường cong ở trạng thái cân bằng trình bày ở hình 10.4. K_G và K_L được định nghĩa lại là các hệ số chuyển khối toàn bộ tương ứng cho các mặt biên của khí và lỏng.



Hình 10.4. Đường cong ở trạng thái cân bằng giải thích ý nghĩa của C_G^* và C_L^* .

3. Cơ chế của chuyển khối

Một vài cơ chế khác nhau đã được đưa ra cung cấp cơ sở cho lý thuyết chuyển khối gian kỳ (interphase). Ba cơ chế tốt nhất được biết là: thuyết hai màng (two-film), thuyết thấm qua (penetration) và thuyết phục hồi bề mặt (surface renewal).

3.1. Thuyết hai màng

Thuyết này giả thiết rằng đặc tính khó di chuyển hoàn toàn được bao gồm trong hai màng giả ở bên này hoặc bên kia vùng phân giới, trong đó sự di chuyển xảy ra nhờ khuếch tán phân tử. Mô hình này dẫn đến kết luận rằng hệ số chuyển khối k_L tỷ lệ với khả năng khuếch tán D_{AB} và tỷ lệ nghịch với độ dày của màng z_f như sau:

$$k_L = \frac{D_{AB}}{z_f} \quad (10.11)$$

3.2. Thuyết thấm qua

Thuyết này thừa nhận rằng xoáy nước hỗn loạn đi từ phần chính của pha tới vùng phân giới, ở đó chúng duy trì một thời gian phơi không đổi t_e . Chất hòa tan được thừa nhận là thấm vào trong xoáy nước có sẵn ở vùng phân giới bởi một quá trình khuếch tán phân tử ở trạng thái không ổn định. Mô hình này dự báo rằng hệ số chuyển khối tỷ lệ trực tiếp với căn bậc hai của khả năng khuếch tán phân tử:

$$k_L = 2 \left(\frac{D_{AB}}{\pi t_e} \right)^{1/2} \quad (10.12)$$

Trong đó: π là áp suất tuyệt đối.

3.3. Thuyết phục hồi bề mặt

Thuyết này đề xuất rằng có một giới hạn thời gian vô tận cho các nhân tố bề mặt và hàm phân bố tuổi bề mặt (surface age). Lý thuyết này dự báo một lần nữa hệ số chuyển khối tỷ lệ với căn bậc hai của khả năng khuếch tán phân tử:

$$k_L = (sD_{AB})^{1/2} \quad (10.13)$$

Trong đó: s là tốc độ phân đoạn của sự phục hồi bề mặt.

Tất cả lý thuyết nói trên đòi hỏi phải biết một số thông số chưa xác định như: độ dày màng có thật z_f , thời gian phơi t_e hoặc tốc độ phân đoạn của sự phục hồi bề mặt s . Nói chung, những tính chất này ít được biết đến, đến mức cả ba lý thuyết là không hoàn chỉnh. Tuy nhiên, những lý thuyết này giúp chúng ta hình dung cơ chế chuyển khối ở vùng phân giới và cũng biết sự phụ thuộc hàm mũ của khả năng khuếch tán phân tử trên hệ số chuyển khối.

III. Xác định vùng phân giới

Để tính toán tốc độ hấp thụ khí q_L của phương trình 10.7, chúng ta cần biết diện tích vùng phân giới khí-lỏng là thông số có thể đo được bằng cách ứng dụng một vài kỹ thuật như là chụp ảnh, truyền sáng và quang phổ laser.

Diện tích vùng phân giới (a) trên một đơn vị thể tích có thể được tính toán từ đường kính trung bình Sauter D_{32} (m) và phân đoạn thể tích của pha khí H , như sau:

$$a = \frac{6H}{D_{32}} \quad (10.14)$$

Đường kính trung bình Sauter, một giá trị trung bình của bề mặt thể tích, có thể được tính toán bằng cách đo các kích thước giọt trực tiếp từ các hình ảnh của độ phân tán theo phương trình sau:

$$D_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i D_i^3}{\sum_{i=1}^n n_i D_i^2} \quad (10.15)$$

Xác định kích thước các giọt bằng hình ảnh là phương pháp dễ làm trong số nhiều kỹ thuật xác định do nó không đòi hỏi sự định cỡ trước (calibration). Tuy nhiên, để chụp một bức ảnh rõ ràng có thể là rất khó khăn và đọc các bức ảnh này là một công việc đơn điệu tẻ nhạt, tốn nhiều thời gian. Các bức ảnh có thể chụp thông qua chân đế hoặc thành bên của bình lên men. Để loại bỏ tình trạng không rõ ràng do bề mặt bị cong của thành bình, bình lên men có thể được cho ngập chìm trong một cái thùng hình chữ nhật hoặc một túi nước được gắn trên thành. Nhược điểm của phương thức này đó là việc đo kích thước giọt bị hạn chế đối với những vùng gần thành bình, là nơi không thể đại diện cho toàn bộ sự phân tán trong hệ lên men.

Sự phân bố kích thước giọt có thể được đo gián tiếp bằng cách dùng kỹ thuật truyền sáng. Khi một chùm sáng đi qua một vùng có độ phân tán khí-lỏng, thì ánh sáng được tỏa ra bởi các bong bóng khí. Người ta nhận thấy rằng đồ thị của tỷ lệ dập tắt (hàm thuận nghịch của độ truyền sáng $1/T$) dựa theo diện tích vùng phân giới trên một đơn vị thể tích của độ phân tán a , tạo ra một đường thẳng, như sau:

$$\frac{1}{T} = m_1 + m_2 a \quad (10.16)$$

Về lý thuyết, m_1 là phần tử đơn vị, còn m_2 là một hằng số độc lập của sự phân bố kích thước giọt với điều kiện là tất cả các bong bóng khí gần như hình cầu.

Kỹ thuật truyền sáng được sử dụng thường xuyên nhất cho việc xác định kích thước trung bình của bong bóng khí trong sự phân tán khí-lỏng. Kỹ thuật này có một số ưu điểm như đo nhanh và hoạt động trực tuyến.

IV. Tắc nghẽn khí

Tắc nghẽn khí là một trong những thông số quan trọng nhất mô tả thủy động học của hệ lên men. Tắc nghẽn khí tùy thuộc chủ yếu vào vận tốc bề mặt của khí và sự tiêu thụ công suất, và thường là rất nhạy cảm với các

tính chất vật lý của chất lỏng. Tắc nghẽn khí có thể được xác định dễ dàng bằng cách đo mức độ chất lỏng được thông khí trong suốt thời gian hoạt động (Z_F) và mức độ chất lỏng sạch (Z_L). Như vậy, việc tắc nghẽn khí trung bình tiêu phần H được tính theo công thức sau:

$$H = \frac{Z_F - Z_L}{Z_F} \quad (10.17)$$

1. *Phun khí (sparging) bằng khuấy trộn không cơ học*

Đối với một hệ thống hai pha, trong đó pha liên tục duy trì ở chỗ thích hợp của nó, thì sự tắc nghẽn khí sẽ liên quan với vận tốc khí bề mặt V_s và vận tốc tăng bong bóng khí V_t :

$$H = \frac{V_s}{V_s + V_t} \quad (10.18)$$

Akita và Yoshida (1973) đã đặt mối tương quan tắc nghẽn khí đối với việc hấp thụ oxygen ở các dung dịch nước khác nhau trong cột bong bóng như sau:

$$\frac{H}{(1-H)^4} = 0,20 \left(\frac{gD_c^2 \rho_c}{\sigma} \right)^{1/8} \left(\frac{gD_c^3}{v_c^2} \right)^{1/12} \left(\frac{V_s}{\sqrt{gD_c}} \right) \quad (10.19)$$

Trong đó: g là gia tốc do trọng lực, D_c là đường kính cột bong bóng, và σ là áp lực bề mặt, v_c là thể tích chất lỏng của pha liên tục, và ρ_c là mật độ của pha liên tục.

2. *Phun khí bằng khuấy trộn cơ học*

Calderbank (1958) đã đặt mối tương quan tắc nghẽn khí đối với việc phân tán lỏng-khí được khuấy trộn bằng turbine dạng đĩa có cánh khuấy mỏng như sau:

$$H = \left(\frac{V_s H}{V_t} \right)^{1/2} + (2,16 \times 10^{-4}) \left[\frac{(P_m / v)^{0,4} \rho_c^{0,2}}{\sigma^{0,6}} \right] \left(\frac{V_s}{V_t} \right)^{1/2} \quad (10.20)$$

Trong đó $2,6 \times 10^{-4}$ có đơn vị (m) và $V_t = 0,265$ m/s khi kích thước bong bóng ở trong khoảng 2-5 mm đường kính, P_m là công suất bị tiêu hao

do cánh khuấy trong sự phân tán chất lỏng được thông khí, và v là thể tích chất lỏng.

Trường hợp vận tốc khí bề mặt cao ($V_s > 0,02$ m/s), thay P_m và V_t của phương trình (10.20) bằng cách đưa vào công suất hiệu quả P_e và $V_t + V_s$ tương ứng.

V. Xác định tốc độ hấp thụ oxygen

Để ước lượng các thông số thiết kế đưa oxygen vào hệ lên men, chúng ta có thể sử dụng các mối tương quan được trình bày trong các phần trước đây, ứng dụng cho một phạm vi rộng các hệ thống khí-lỏng bổ sung vào hệ thống nước-không khí. Tuy nhiên, phương thức tính toán này dài dòng và các giá trị dự báo từ những mối tương quan này có thể thay đổi rất nhiều.

Cũng có trường hợp chúng ta cũng không thể tìm thấy các mối tương quan thích hợp để áp dụng cho kiểu và thể tích của hệ lên men muốn sử dụng. Trong những trường hợp như thế, chúng ta có thể tự đo tốc độ chuyển oxygen hoặc dùng các mối tương quan dựa trên những thí nghiệm này.

Tốc độ hấp thụ oxygen trên một đơn vị thể tích q_a/v có thể được ước lượng nhờ phương trình:

$$\frac{q_a}{v} = K_L a(C_L^* - C_L) = k_L a(C_L^* - C_L) \quad (10.21)$$

Do oxygen là loại khí ít hòa tan, nên hệ số chuyển khối toàn bộ K_L bằng hệ số chuyển khối riêng rẽ k_L . Mục tiêu của chúng ta trong thiết kế hệ lên men là cực đại hóa tốc độ chuyển oxygen với sự tiêu thụ công suất tối thiểu cần thiết để khuấy trộn chất lỏng và cũng giảm thiểu lưu tốc khí. Để cực đại hóa tốc độ hấp thụ oxygen, chúng ta phải cực đại hóa k_L , a , $C_L^* - C_L$. Tuy nhiên, sự khác biệt nồng độ được hạn chế hoàn toàn bởi vì giá trị C_L^* được giới hạn bởi khả năng hòa tan cực đại rất thấp của nó. Vì thế, các thông số quan tâm chính trong thiết kế là hệ số chuyển khối và diện tích vùng phân giới.

Bảng 10.1 liệt kê khả năng hòa tan của oxygen ở 1 atm trong nước dưới các nhiệt độ khác nhau. Các giá trị thu được là nồng độ oxygen cực

đại ở trong nước khi nó ở trong sự cân bằng với oxygen tinh khiết. Khả năng hòa tan này giảm khi có bổ sung acid hoặc muối như trình bày ở bảng 10.2.

Bảng 10.1. Khả năng hòa tan oxygen trong nước ở 1 atm.

Nhiệt độ (°C)	Khả năng hòa tan	
	mmol O ₂ /L	mg O ₂ /L
0	2,18	69,8
10	1,70	54,5
15	1,54	49,3
20	1,38	44,2
25	1,26	40,3
30	1,16	37,1
35	1,09	34,9
40	1,03	3,0

Bảng 10.2. Khả năng hòa tan của oxygen trong dung dịch muối hoặc acid ở 25°C.

Nồng độ (mol/L)	Khả năng hòa tan (mmol O ₂ /L)		
	HCl	H ₂ SO ₄	NaCl
0,0	1,26	1,26	1,26
0,5	1,21	1,21	1,07
1,0	1,16	1,12	0,89
2,0	1,12	1,02	0,71

Thông thường, chúng ta sử dụng không khí để cung cấp nhu cầu oxygen cho hệ lên men. Nồng độ cực đại của oxygen trong nước ở trong sự cân bằng với C_L^* không khí ở áp suất khí quyển là khoảng một phần mười của khả năng hòa tan đã được liệt kê, theo định luật Henry:

$$C_L^* = \frac{p_{O_2}}{H_{O_2}(T)} \quad (10.22)$$

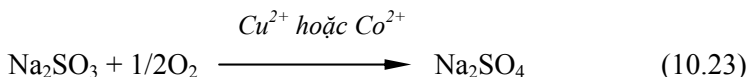
Trong đó: p_{O_2} là áp suất từng phần (partial pressure) của oxygen và $H_{O_2}(T)$ là hằng số oxygen của định luật Henry ở nhiệt độ T. Giá trị của hằng số định luật Henry có thể thu được từ các khả năng hòa tan được liệt kê ở bảng 10.2. Ví dụ: ở 25°C, C_L^* là 1,26 mmol/L và p_{O_2} là 1 atm do nó là oxygen tinh khiết. Bằng cách thay thế các giá trị này vào trong phương trình (10.22), chúng ta thu được $H_{O_2}(T)$ là 0,793 atm L/mmol. Vì thế, nồng độ oxygen cân bằng cho sự tiếp xúc nước-khí ở 25°C sẽ là:

$$C_L^* = \frac{0,209 \text{ atm}}{0,793 \text{ atm L/mmol}} = 0,264 \text{ mmol O}_2/\text{L} = 8,43 \text{ mg/L}$$

Theo điều kiện lý tưởng, tốc độ chuyển oxygen phải được đo trong hệ lên men chứa môi trường dinh dưỡng và tế bào trong suốt quá trình lên men thực tế. Tuy nhiên, điều này khó tiến hành do bản chất phức tạp của môi trường và sự thay đổi lưu biến học (rheology) trong suốt quá trình sinh trưởng của tế bào. Phương thức chung là sử dụng một hệ thống tổng hợp xấp xỉ như các điều kiện của quá trình lên men.

1. Phương pháp oxy hóa sodium sulfite

Phương pháp oxy hóa sodium sulfite dựa trên nguyên tắc oxy hóa sodium sulfite thành sodium sulfate với sự có mặt của chất xúc tác (Cu^{2+} hoặc Co^{2+}) như sau:



Phản ứng này có các đặc điểm sau, đáp ứng đủ cho việc đo tốc độ chuyển oxygen:

- Tốc độ phản ứng độc lập với nồng độ của sodium sulfite trong khoảng 0,04 đến 1 N.

- Tốc độ phản ứng nhanh hơn nhiều so với tốc độ chuyển oxygen. Vì thế tốc độ oxy hóa được điều chỉnh chỉ bởi tốc độ chuyển khối.

Để đo tốc độ chuyển oxygen trong hệ lên men, làm đầy hệ lên men bằng dung dịch sodium sulfite 1 N chứa ít nhất 0,003 M Cu^{2+} . Mở bộ phận sục và bắt đầu bấm giờ khi bong bóng khí đầu tiên xuất hiện trong hệ lên men từ bộ phận sục khí. Cho phép sự oxy hóa tiếp tục từ 4-20 phút, sau đó dùng dòng khí, bộ phận khuấy trộn và timer ở cùng một thời gian, rồi lấy mẫu. Trộn mỗi mẫu với một lượng dư thuốc thử iodine chuẩn bằng pipette sạch. Chuẩn độ bằng dung dịch sodium thiosulfate chuẩn ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) tới điểm cuối của chất chỉ thị tinh bột. Một khi oxygen đưa vào được đo, thì hệ số thể tích chuyển khối $k_L a$ có thể được tính toán bằng cách dùng phương trình (10.21), trong đó C_L là bằng 0 và C_L^* là nồng độ oxygen ở trạng thái cân bằng.

Kỹ thuật oxy hóa sodium sulfite có hạn chế của nó vì trong thực tế dung dịch không thể xấp xỉ với các tính chất vật lý và hóa học của môi trường lên men. Thêm một vấn đề nữa là kỹ thuật này đòi hỏi các nồng độ ion cao (1-2 mol/L), sự có mặt của các ion này có thể ảnh hưởng đến diện tích vùng phân giới và, trong một mức độ thấp hơn, đến hệ số chuyển khối. Tuy nhiên, kỹ thuật này hữu ích khi so sánh với hiệu suất của các hệ lên men và nghiên cứu ảnh hưởng của sự phát triển quy mô sản phẩm và các điều kiện hoạt động.

2. Kỹ thuật tách không khí

Kỹ thuật này giám sát sự thay đổi nồng độ oxygen trong một chất lỏng giàu oxygen được khử oxygen bằng cách cho nitrogen đi qua nó. Điện cực của phép đo cực phổ (polarography) thường được dùng để đo nồng độ. Cân bằng khối trong một bình nuôi cho ra:

$$\frac{dC_L(t)}{dt} = k_L a [C_L^* - C_L(t)] \quad (10.24)$$

Lấy tích phân phương trình đã cho giữa t_1 và t_2 cho kết quả:

$$k_L a = \frac{\ln \left[\frac{C_L^* - C_L(t_1)}{C_L^* - C_L(t_2)} \right]}{t_2 - t_1} \quad (10.25)$$

Từ phương trình trên $k_L a$ có thể được tính toán dựa trên các giá trị đo được $C_L(t_1)$ và $C_L(t_2)$.

3. Xác định trực tiếp

Trong kỹ thuật này, chúng ta đo trực tiếp hàm lượng oxygen của dòng khí đi vào và đi ra khỏi hệ lên men bằng cách sử dụng thiết bị phân tích oxygen không khí. Sự hấp thụ oxygen có thể được tính toán như sau:

$$q_a = Q_{in} C_{O_2, in} - Q_{out} C_{O_2, out} \quad (10.26)$$

Trong đó: Q là tốc độ dòng khí.

Một khi oxygen hấp thụ được đo, thì $k_L a$ có thể được tính toán bằng cách dùng phương trình (10.21), trong đó C_L là nồng độ oxygen của chất lỏng trong hệ lên men và C_L^* là nồng độ của oxygen sẽ ở trạng thái cân bằng với dòng khí. Nồng độ oxygen của chất lỏng trong hệ lên men có thể được đo bằng một bộ cảm biến oxygen trực tuyến (on-line oxygen sensor).

Nếu thể tích của hệ lên men là khá nhỏ (< 50 L), thì sự biến thiên của $(C_L^* - C_L)$ ở trong hệ lên men cũng khá nhỏ. Tuy nhiên, nếu kích thước của hệ lên men là rất lớn, thì sự biến thiên có thể có ý nghĩa. Trong trường hợp này, giá trị trung bình logarithm $(C_L^* - C_L)$ của dòng khí chảy vào và chảy ra có thể được sử dụng, khi đó:

$$(C_L^* - C_L)_{LM} = \frac{(C_L^* - C_L)_{in} - (C_L^* - C_L)_{out}}{\ln \left[\frac{(C_L^* - C_L)_{in}}{(C_L^* - C_L)_{out}} \right]} \quad (10.27)$$

4. Kỹ thuật động lực học

Bằng cách sử dụng kỹ thuật động lực học chúng ta có thể ước lượng giá trị $k_L a$ đối với sự chuyển oxygen trong suốt quá trình lên men thực tế với các tế bào và môi trường nuôi cấy thực sự. Kỹ thuật này dựa trên nguyên tắc của sự cân bằng oxygen của nguyên liệu trong một hệ lên men mẻ hiếu khí trong lúc các tế bào đang hoạt động sinh trưởng khi:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) - r_{O_2} C_X \quad (10.28)$$

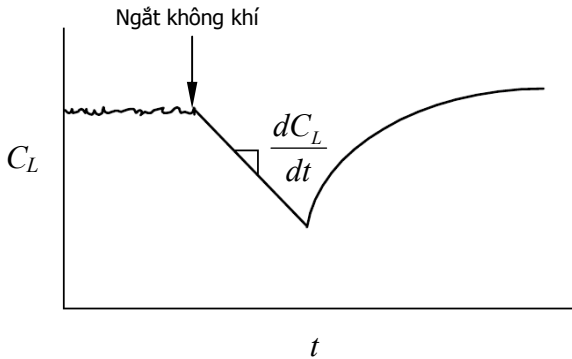
Trong đó: r_{O_2} là tốc độ của hô hấp tế bào (g O₂/g tế bào giờ).

Trong khi nồng độ oxygen hòa tan của hệ lên men là ổn định, nếu đột nhiên chúng ta ngắt sự cung cấp không khí, thì nồng độ của oxygen sẽ bị giảm (Hình 10.5) với tốc độ như sau:

$$\frac{dC_L}{dt} = r_{O_2} C_X \quad (10.29)$$

Vì $k_L a$ trong phương trình (10.28) là bằng 0. Vì thế, bằng cách đo độ dốc của đường cong C_L theo t , chúng ta có thể ước lượng $r_{O_2} C_X$. Nếu chúng ta mở dòng khí thêm một lần nữa, thì nồng độ oxygen hòa tan sẽ được tăng lên theo phương trình (10.28), phương trình này có thể được sắp xếp lại để cho một mối quan hệ tuyến tính như sau:

$$C_L = C_L^* - \frac{1}{k_L a} \left(\frac{dC_L}{dt} + r_{O_2} C_X \right) \quad (10.30)$$



Hình 10.5. Kỹ thuật động học cho việc xác định $k_L a$.

Đồ thị của C_L theo $\frac{dC_L}{dt} + r_{O_2} C_X$ sẽ cho kết quả một đường thẳng có độ dốc $-\frac{1}{k_L a}$ và mặt phẳng y của C_L^* .

VI. Các ký hiệu

A diện tích vùng phân giới, m²

a diện tích vùng phân giới khí-lỏng trên một đơn vị thể tích của sự phân tán cho các số Reynolds của cánh khuấy thấp, m⁻¹

C	nồng độ, kmol/m^3
D_{AB}	khả năng khuếch tán của cấu tử A vào B, tức là giá trị đo của độ chuyển động khuếch tán, m^2/s
D_{AB}^o	khả năng khuếch tán của cấu tử A trong một dung dịch B rất loãng m^2/s
J_A	dòng phân tử của cấu tử A liên quan với vận tốc phân tử trung bình của tất cả cấu tử, $\text{kmol/m}^2\text{s}$
K	hệ số chuyển khối toàn phần, m/s
k	hệ số chuyển khối riêng rẽ, m/s
k_{LA}	hệ số thể tích chuyển khối
g	gia tốc do trọng lực, m/s^2
H	tiểu phân thể tích (phân đoạn) của pha khí trong sự phân tán, không có thứ nguyên
N_A, N_B	dòng khối của A và B liên quan với tọa độ cố định, $\text{kmol/m}^2\text{s}$
N_G, N_L	dòng khối từ pha khí tới pha lỏng và từ pha lỏng đến pha khí, tương ứng, $\text{kmol/m}^2\text{s}$
P	áp suất tổng số, N/m^2
P_e	công suất hiệu quả được đưa vào nhờ phun khí và khuấy cơ học, W
P_m	công suất bị tiêu hao do cánh khuấy trong sự phân tán chất lỏng được thông khí, W
q	tốc độ chuyển khối, kmol/s
Q	tốc độ dòng khí, m^3/s
s	tốc độ phân đoạn của sự phục hồi bề mặt, s^{-1}
t_e	thời gian phơi cho lý thuyết thấm qua, s
V_s	vận tốc khí bề mặt, m/s
V_t	vận tốc tăng bong bóng khí, m/s
v	thể tích chất lỏng, m^3
v_c	thể tích chất lỏng của pha liên tục
Z_F, Z_L	mức độ chất lỏng được sục khí trong suốt thời gian hoạt động, m
z_f	độ dày của màng trong lý thuyết hai màng, m
μ	độ nhớt, kg/m s
π	áp suất tuyệt đối, N/m^2
ρ	mật độ, kg/m^3

ρ_c mật độ của pha liên tục

σ áp lực bề mặt kg/s^2

Tài liệu tham khảo/đọc thêm

1. **Asenjo JA and Merchuk JC.** 1995. Bioreactor System Design. *Marcel Dekker, Inc.* New York, USA.

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

3. **Chia TF.** 2003. Engineering Applications in Biology. Updated 1st ed. *McGraw-Hill Education*, Singapore.

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

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

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

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

Phụ lục

Một số thuật ngữ cơ bản

Agrobacterium tumefaciens. Là loại vi khuẩn đất gây bệnh cho thực vật hai lá mầm được sử dụng như các vector tự nhiên để mang các gen ngoại lai (foreign gene) vào mô và tế bào thực vật. *A. tumefaciens* có chứa một plasmid lớn kích thước khoảng 200 kb gọi là Ti-plasmid (tumor inducing plasmid) chính là tác nhân truyền bệnh cho cây. Khi cây bị nhiễm *A. tumefaciens* qua các vết thương, biểu hiện bệnh rõ nhất là các khối u được hình thành ở ngay chỗ lây nhiễm. Sự hình thành khối u sau đó có thể tiếp tục mà không cần thiết phải có sự hiện diện của vi khuẩn. Khả năng này có được do *A. tumefaciens* đã chuyển một đoạn DNA của Ti-plasmid (T-DNA), có chứa các gen sản xuất ra auxin và cytokinin, xâm nhập vào hệ gen (genome) của cây bị bệnh.

Agrobacterium rhizogenes. Cũng là một loại vi khuẩn đất gây bệnh cho thực vật hai lá mầm. Cơ chế lây nhiễm của *A. rhizogenes* đối với cây cũng tương tự như *A. tumefaciens*, nhưng trong vùng T-DNA của *A. rhizogenes* chỉ có gen sản xuất ra auxin, vì thế sự thay đổi hình thái chính của thực vật là chúng tạo ra rất nhiều rễ tơ (hairy roots) khi bị nhiễm bệnh.

Amino acid. Là một phân tử nhỏ có chứa một nhóm carboxyl (-COOH) và một nhóm amine (-NH₃) cùng nối với một nguyên tử carbon. Amino acid là đơn vị cơ sở của protein.

Apoptosis. Chết theo chương trình là một hình thức chết tự nhiên của tế bào theo một chương trình được kích hoạt nội tại. Đặc điểm của apoptosis là sự phân hủy nhân tế bào và ngưng tụ nhân, trong đó các mảnh nhân được bao bọc bởi các màng chứa cả tế bào chất, sau đó được các đại thực bào tiêu hóa.

Bất động tế bào (cell immobilization). Các kỹ thuật gắn tế bào với các phần tử lớn hoặc trên các bề mặt được phân tách dễ dàng khỏi dòng sản phẩm. Phương pháp này đảm bảo hoạt động liên tục của hệ lên men (fermenter/bioreactor) không bị nguy cơ rửa trôi tế bào. Sự bất động cũng có thể cung cấp các điều kiện có lợi cho sự phân hóa tế bào và sự truyền đạt thông tin giữa các tế bào, bằng cách ấy đã thúc đẩy sản phẩm có sản lượng các chất trao đổi thứ cấp cao. Một số phương pháp bất động tế bào thường

được sử dụng đó là: gắn lên bề mặt, tạo thể xộp, sử dụng bao vi thể và tự kết khối.

Biến dị dòng soma (somaclonal variation). Hiện tượng biến dị di truyền xuất hiện ở các tế bào soma không phân hóa (undifferentiation), các protoplast phân lập, các callus và các mô nuôi cấy *in vitro*. Nguyên nhân của biến dị chủ yếu là do những thay đổi về số lượng và cấu trúc của nhiễm sắc thể.

Biến đổi hậu dịch mã (post-translational modification). Là những biến đổi sau quá trình dịch mã, thay đổi các liên kết hóa trị xảy ra trong chuỗi polypeptide, sau khi chuỗi polypeptide tách khỏi ribosome và trước khi trở thành protein hoạt động thực sự.

Biến nạp (transformation). Quá trình đưa vào và dung nạp một cách chắc chắn DNA ngoại lai trong tế bào thực vật bất luận bằng cách gì để có được một biến đổi di truyền thì đều được coi là biến nạp thành công.

Biến nạp gen gián tiếp qua *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*-mediate transformation). Kỹ thuật này được thiết kế dựa theo phương thức gây bệnh ở cây hai lá mầm của vi khuẩn *A. tumefaciens* để chuyển DNA ngoại lai vào mô thực vật bằng cách đồng nuôi cấy (co-cultivation) vi khuẩn tái tổ hợp với mô nuôi cấy của cây hai lá mầm hoặc cây một lá mầm.

Biến nạp gen bằng vi đạn (microprojectile). Là kỹ thuật chuyển gen nhờ súng bắn gen (gene gun, bombardement). Nguyên tắc của phương pháp này là sử dụng các viên đạn vàng hoặc tungsten có kích thước hiển vi (1-1,5 μm). Vi đạn được trộn với DNA theo một tỷ lệ thích hợp cùng với các chất phụ gia và sau khi kết tủa DNA bao quanh vi đạn, hỗn hợp được làm khô trên một đĩa kim loại mỏng kích thước 0,5-0,8 cm. Đĩa kim loại được gắn vào đầu một viên đạn lớn (macroprojectile) làm bằng nhựa hoặc bông nén hay các vật liệu nhẹ vừa khít với nòng súng. Khi bắn, áp suất hơi đẩy viên đạn lớn đi với tốc độ cao. Ra đến đầu nòng, một lưới thép mịn cản viên đạn lớn lại, nhưng các vi đạn vẫn tiếp tục quỹ đạo với gia tốc lớn đến đích và xuyên vào tế bào. Một tỷ lệ nhất định DNA ngoại lai hợp nhất với DNA tế bào và biểu hiện, thực hiện quá trình biến nạp gen.

Biến nạp gen bằng vi tiêm (microinjection). Là kỹ thuật sử dụng phổ biến trong công nghệ tế bào động vật (animal cell biotechnology). Trên hiển vi trường, DNA plasmid có thể được tiêm vào protoplast và thực hiện biến nạp gen thành công ở khá nhiều đối tượng thực vật. Tuy nhiên, kỹ thuật này hiện nay ít được các phòng thí nghiệm sử dụng, vì thao tác vi tiêm dưới

kính hiển vi đòi hỏi thiết bị vi thao tác (micromanipulator) cực nhạy, thiết bị kéo và mài kim tiêm từ các ống thủy tinh (puller) rất đắt tiền. Ngoài ra, nó còn đòi hỏi kỹ năng thao tác và sự kiên nhẫn cao của kỹ thuật viên.

Biến nạp gen nhờ xung điện (electroporation). Thiết bị điện xung (electroporator) là thiết bị có khả năng tạo ra các xung điện trong thời gian rất ngắn (5-6 phần nghìn giây) và ở điện thế (pulse strenght) chính xác (500 V/cm) với thời gian tắt dần (decay time) 20 ms. Protoplast được đặt giữa hai tấm kim loại cách nhau từ 1-4 mm trong một cuvette bằng nhựa. Ở điện thế cao, xung điện tạo các lỗ tạm thời (cỡ 30 nm) trên màng protoplast và DNA bên ngoài có thể xâm nhập vào chất nguyên sinh.

Biến nạp gen nhờ siêu âm (ultrasonic). Sau khi tách, protoplast được xử lý nhẹ bằng siêu âm có sự hiện diện của DNA ngoại lai. Sóng siêu âm sẽ giúp DNA đi vào tế bào và biểu hiện.

Biến nạp gen nhờ silicon carbide. Tinh thể silicon carbide có độ cứng rất cao, khi lắc với tế bào chúng có tác dụng như các mũi kim nhỏ đâm thủng thành tế bào giúp DNA ngoại lai xâm nhập vào bên trong tế bào.

Biểu hiện gen (gene expression). Quá trình phiên mã và dịch mã để tạo ra sản phẩm protein của gen.

Cảm ứng (induction). Hormone gây tạo một loại cấu trúc, bộ phận hay một quá trình nào đó trong điều kiện *in vitro*.

Cặp base (base pair, bp). Hai nucleotide ở hai chuỗi khác nhau của trên một phân tử DNA mạch kép bổ sung với nhau bởi những liên kết hydrogen: A-T hoặc G-C và là đơn vị đo chiều dài của một phân tử DNA.

Cầu disulfide (disulfide bridge). Một liên kết đồng hóa trị tạo thành giữa hai chuỗi polypeptide qua trung gian của một gốc cystine.

Cấy chuyển (passage hoặc subculture). Chuyển tế bào, mô hay mẫu vật nuôi cấy sang bình nuôi có chứa môi trường mới pha kết hợp với tách nhỏ hoặc làm loãng mật độ để nhân số lượng.

cDNA (complementary DNA). Một phân tử DNA sợi đơn bổ sung cho một phân tử mRNA, được tổng hợp từ khuôn mẫu mRNA này nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase). Sau đó mRNA trong thể lai mRNA-DNA bị phân hủy bằng enzyme RNase H, còn sợi DNA sẽ được dùng làm khuôn mẫu để tổng hợp nên một sợi DNA khác nhờ enzyme DNA polymerase. Hai sợi DNA này sẽ bắt cặp với nhau để trở thành phân tử cDNA sợi đôi.

Chất trao đổi thứ cấp (secondary metabolites). Đường như đây là sản phẩm của các phản ứng hóa học của thực vật với môi trường chung quanh, là sự thích nghi với stress của môi trường hoặc là sự bảo vệ hóa học chống lại vi sinh vật và động vật. Các chất này được sản xuất với một lượng rất nhỏ (dạng vết) trong thực vật và không có chức năng trao đổi chất rõ ràng.

Chủng tế bào (cell strain). Chủng tế bào gồm những tế bào có đặc điểm riêng biệt được chọn từ nuôi cấy khởi sinh hay dòng tế bào có trước. Thường phải nêu rõ nguồn gốc của chủng tế bào trong các công bố khoa học nhất là khi các chủng đó có nguồn gốc từ các phòng thí nghiệm khác.

Chủng phụ (substrain). Được tách và nhân từ một nhóm tế bào của một chủng với những tính trạng mà chủng bố mẹ đó không có.

Cosmid. Là các vector đặc biệt được xây dựng bởi plasmid và đầu *cos* của bacteriophage λ , dùng để tạo dòng các đoạn DNA có kích thước lớn (trên 45 kb) của eukaryote. Các thành phần cơ bản của các vector cosmid bao gồm: một marker kháng kháng sinh và một trình tự khởi đầu sao chép của plasmid (*ori*), đoạn DNA mang đầu kết dính (*cos*) của phage λ .

Công nghệ DNA tái tổ hợp (DNA recombinant technology). Hệ thống các phương pháp phòng thí nghiệm cho phép cắt đoạn DNA từ một sinh vật để ghép nối vào DNA của một sinh vật khác tạo ra phân tử DNA tái tổ hợp. Phân tử này được đưa vào các sinh vật khác nhau để tạo ra những giống chủng vi sinh vật, thực vật và động vật mới, đáp ứng nhu cầu ngày càng cao của sản xuất và đời sống con người. Công nghệ này có ứng dụng rộng rãi trong y học, dược học, nông nghiệp và nhiều ngành công nghiệp.

DNA (deoxyribonucleic acid). Gồm hai chuỗi polynucleotide xoắn lại với nhau tạo nên chuỗi xoắn kép, có một trình tự đặc trưng của các deoxyribonucleic mang thông tin di truyền cho tất cả các tế bào và vi virus chứa DNA.

DNA polymerase. Enzyme xúc tác cho sự tổng hợp sợi DNA mới từ những deoxyribonucleoside 5'-triphosphate trên cơ sở một khuôn mẫu DNA.

DNA replicase. Toàn bộ phức hợp enzyme và protein đặc hiệu cần thiết cho sự tái bản DNA (DNA replication).

DNA siêu xoắn (DNA supercoiling). DNA xoắn lại trên bản thân nó, thường là kết quả của sự gấp khúc, mở xoắn hoặc xoắn lại của chuỗi xoắn kép DNA.

Dịch mã (translation). Quá trình tổng hợp phân tử protein từ khuôn mẫu mRNA.

Đòng (clone). Tập hợp các phân tử, tế bào hoặc cá thể giống hệt nhau cùng bắt nguồn từ một phân tử, tế bào hay cá thể ban đầu.

Đòng giao tử (gametoclone). Những thực vật được tạo ra từ giao tử, bào tử giảm nhiễm hoặc thể giao tử.

Đòng tế bào (cell line). Khái niệm để chỉ sự nuôi cấy của những tế bào có nguồn gốc chung từ lần cấy chuyển đầu tiên.

Dung hợp tế bào (cell fusion). Kỹ thuật làm cho hai hay nhiều tế bào dung hợp với nhau thành một tế bào.

Dung hợp protoplast (protoplast fusion). Kỹ thuật làm cho hai hay nhiều tế bào trần (tế bào thực vật đã phá bỏ thành cellulose) dung hợp với nhau thành một tế bào.

Điện di (electrophoresis). Điện di là kỹ thuật phân chia các phân tử như protein hoặc các đoạn nucleic acid trên cơ sở khối lượng và điện tích thực của chúng bằng sự dịch chuyển khác nhau thông qua giấy, hoặc thông qua gel trong điện trường. Nói cách khác, điện di là sự dịch chuyển trong điện trường của những phân tử tích điện trong dung dịch. Kỹ thuật điện di trên giá rắn (agarose gel và polyacrylamide) được sử dụng rộng rãi cho DNA, RNA và protein.

Độ hấp thụ ánh sáng (absorbency). Hiện tượng một chùm ánh sáng khi đi qua một môi trường có thể bị giảm về cường độ do hấp thụ và do hiệu ứng tán xạ.

Động học enzyme (enzyme kinetics). Là vận tốc phản ứng enzyme được biểu diễn bằng lượng cơ chất bị chuyển hóa (mol) hoặc lượng sản phẩm được tạo thành (mol) trong một đơn vị thời gian (giây).

Động học tế bào (cell kinetics). Là kết quả của hệ thống các phản ứng hóa sinh và các quá trình vận chuyển phức tạp, bao gồm nhiều pha và các hệ thống nhiều thành phần. Trong suốt thời gian sinh trưởng, hỗn hợp không đồng nhất của các tế bào già và non thay đổi liên tục và tự thích nghi với môi trường dinh dưỡng là yếu tố cũng thay đổi liên tục trong các điều kiện vật lý và hóa học.

E. coli (Escherichia coli). Vi khuẩn thường có trong ruột non của động vật có xương sống. *E. coli* được coi như sinh vật mẫu cho việc nghiên cứu hoạt động của tế bào.

Enzyme gắn DNA (DNA ligase). Một enzyme tạo ra một liên kết phosphodiester giữa đầu 3'-OH của một đoạn DNA và đầu 5'-PO₄ của một đoạn DNA khác. Đoạn nối liền được kết hợp bổ sung đôi base với sợi DNA khuôn mẫu.

Enzyme hạn chế (restriction enzyme, RE). Các enzyme hạn chế được phân lập từ prokaryote, chúng có khả năng phân hủy DNA phage, hạn chế khả năng sinh trưởng của phage trong vi khuẩn bằng cách cắt phân tử DNA. Hiện nay, có khoảng 500 loại RE khác nhau. Các enzyme này cắt DNA sợi đôi ở các vị trí nhận biết đặc biệt của chúng gồm từ 4-6 cặp nucleotide có trình tự đối xứng đảo ngược nhau, các đoạn ngắn này gọi là palindrome (đoạn đối xứng: là đoạn DNA có hai sợi hoàn toàn đối xứng giống hệt nhau nếu lật ngược đầu đuôi).

Exon. Các đoạn DNA trong gen có chức năng phiên mã. Exon tồn tại cả ở sinh vật prokaryote lẫn eukaryote. Ở eukaryote, các exon nằm xen kẽ với các đoạn intron chiếm tới 90% tổng số DNA của tế bào và không có chức năng phiên mã.

Gen (gene) hay cistron. Đơn vị cơ bản của di truyền, là một đoạn nhiễm sắc thể mã hóa một chuỗi polypeptide hoặc một phân tử RNA. Gen bao gồm các vùng nằm trước và sau vùng mã hóa và cả những trình tự (intron) nằm giữa các phân tử mã hóa (exon).

Gen kháng apoptosis (antiapoptosis gene). Là gen kháng lại hiện tượng chết tự nhiên đã được chương trình hóa (apoptosis) để tạo ra các vật chủ siêu sản xuất (superior production hosts).

Gen chọn lọc (selector) hay gen chỉ thị chọn lọc (selectable marker). Là các gen chỉ thị được chuyển cho tế bào nhận để phân biệt tế bào được biến nạp và không biến nạp. Sự hiện diện của tác nhân chọn lọc trên môi trường nuôi cấy sau khi chuyển gen một vài ngày đã cho phép phân lập các tế bào tái tổ hợp sống sót.

Gen điều hòa (regulatory gene). Một gen mà sản phẩm của nó tham gia vào sự điều hòa biểu hiện của một gen khác. Ví dụ: gen mã hóa một protein kìm hãm.

Gen khởi động (promoter). Một trình tự trên phân tử DNA mà ở đó RNA polymerase có thể kết hợp được để khởi đầu sự phiên mã.

Gen nhảy hay nhân tố chuyển vị (transposon). Một đoạn DNA nhờ có cấu trúc đặc biệt nên có khả năng di chuyển từ một vị trí này đến một vị trí khác trên phân tử DNA hay từ một nhiễm sắc thể này sang một nhiễm sắc thể khác trong tế bào lưỡng bội. Gen nhảy chỉ chuyển đến những vị trí xác

định trong genome. Trong nhiều trường hợp gen nhảy có thể gây đột biến tại vị trí nó di chuyển đến. Gen nhảy có thể dùng làm phương tiện để gây đột biến định hướng.

Gen tăng cường (enhancer). Một trình tự dạng *cis*, có khả năng đẩy mạnh việc sử dụng một số promoter ở eukaryote, có thể hoạt động theo cả hai hướng ở bất kỳ vị trí nào so với promoter để kích thích sự phiên mã của một gen nhất định.

Gen tiền ung thư (proto-oncogene). Tìm thấy trong genome eukaryote, là thành phần tương ứng của các gen ung thư tìm thấy trong các retrovirus.

Gen ung thư (oncogene). Gen mã hóa cho những sản phẩm có khả năng biến tế bào eukaryote thành tế bào ung thư.

Ghép nối (splicing). Sự loại bỏ các intron và nối liền các exon ở mRNA trong quá trình hoàn thiện sau phiên mã.

Glycosyl hóa (glycosylation). Là quá trình bổ sung một hoặc nhiều phân tử carbohydrate (gốc đường) vào một phân tử protein (glycoprotein) sau khi nó được tổng hợp nhờ ribosome.

Helper plasmid. Plasmid trợ giúp mang vùng *vir* (virulence) và *ori* được sử dụng trong giao phối bộ ba (triparental mating): *Agrobacterium* không có plasmid, *E. coli* có helper plasmid và *E. coli* có binary vector mang gen ngoại lai để tạo thành một *Agrobacterium* tái tổ hợp có binary vector được dùng cho việc biến nạp vào tế bào và mô thực vật.

Hệ gen (genome). Trình tự DNA toàn phần của một sinh vật, chứa toàn bộ thông tin di truyền của cơ thể.

Hệ lên men (fermenter) hay nồi phản ứng sinh học (bioreactor). Là loại thiết bị mà trong nó sự biến đổi hóa sinh được tiến hành bởi các tế bào sống hoặc các thành phần tế bào *in vivo* (enzyme). Ba kỹ thuật lên men cơ bản là: lên men mẻ, lên men mẻ có cung cấp dinh dưỡng và lên men liên tục. Các hệ lên men được thiết kế dựa trên cơ sở của ba kỹ thuật này nhưng được cải tiến cho từng trường hợp cụ thể để tăng hiệu suất nuôi cấy.

Hiệu suất bám (attachment efficiency). Phần trăm số tế bào bám được lên bề mặt môi trường nuôi cấy trong một thời gian nhất định.

Hiệu suất nuôi cấy (plating efficiency). Khái niệm này đồng nghĩa với hiệu suất tạo dòng, nói lên phần trăm số tế bào phát triển thành dòng khi nuôi cấy trên bề mặt môi trường.

Hiệu suất tạo dòng (cloning efficiency). Phần trăm số tế bào đã tạo được dòng khi nuôi cấy trên bề mặt môi trường.

Hybridoma. Dòng tế bào được hình thành từ sự phối hợp một tế bào ung thư và một tế bào bạch cầu lymphocyte B. Hybridoma có khả năng sản sinh các kháng thể (immunoglobulin) một cách vĩnh viễn.

Intron. Là một đoạn DNA được phiên mã nhưng bị loại bỏ trong quá trình hoàn thiện của mRNA, không có mặt ở phân tử mRNA hoàn chỉnh.

In vitro. Dùng để chỉ một quá trình xảy ra trong dịch chiết tế bào không chứa tế bào nguyên vẹn, hay để chỉ các tế bào nuôi cấy trong môi trường nhân tạo.

In vivo. Dùng để chỉ các hiện tượng xảy ra trong tế bào nguyên vẹn hay trong cơ thể.

Kháng nguyên (antigen). Phân tử có khả năng kích thích sản sinh một kháng thể khi xâm nhập vào một cơ thể sống.

Kháng thể (antibody). Một protein (immunoglobulin) do tế bào bạch cầu lymphocyte B sản sinh, có khả năng nhận biết một kháng nguyên lạ đặc trưng và lúc đó sẽ khởi đầu một đáp ứng miễn dịch.

Kháng thể đơn dòng (monoclonal antibody). Được sản sinh từ một dòng hybridoma, vì mỗi dòng hybridoma phát xuất chỉ từ một tế bào bạch cầu lymphocyte B nên toàn bộ các phân tử kháng thể sản sinh ra đều y hệt nhau.

Không bào (vacuole). Có vai trò tiếp nhận các chất thải của sự trao đổi chất hoặc các chất dư thừa của thực vật. Ở các tế bào non không bào thường nhỏ và nhiều, khi tế bào lớn dần và già hơn thì không bào cũng mở rộng lên và kết thành một khối. Ở các tế bào thực vật trưởng thành, không bào có thể chiếm tới 90% thể tích tế bào. Không bào được bọc chung quanh bởi màng huyết tương (plasma). Thành phần chính của các không bào lớn là nước chứa các chất hòa tan như các ion vô cơ, các amino acid, các acid hữu cơ, các sắc tố hòa tan trong nước (anthocyanin) và các chất không hòa tan ở dạng tinh thể và hình kim. Ngoài ra, không bào cũng chứa các protein như các hydrolyse, catalase và photphatase. Phân bào tan muốn đề cập đến lipid ở chung quanh tất cả các cấu trúc nổi giữa nhân và màng tế bào.

Kilobase (Kb). Một nghìn cặp base của một phân tử DNA.

Kỹ thuật vô trùng (aseptic technique). Qui trình ngăn ngừa sự nhiễm nấm, vi khuẩn, siêu vi khuẩn hoặc các loại vi sinh vật khác đối với nuôi cấy mô và tế bào.

Lai tế bào (cell hybridization). Sự dung hợp hai hay nhiều tế bào không giống nhau để tạo một thể tế bào hỗn hợp.

Lần cấy chuyển (passage number). Số lần tế bào, mô hay mẫu vật nuôi cấy được cấy chuyển, qua đó có thể tính tuổi và hệ số đẳng trương của chúng.

Lục lạp (chloroplast). Là vị trí của quang hợp trong tế bào thực vật, nó chứa chlorophyll là sắc tố lục phản ứng với ánh sáng để sản xuất các carbohydrate.

Lưới nội sinh chất (endoplasmic reticulum). Một bào quan có trong tế bào chất của những sinh vật eukaryote, là một phức hợp mạng có hai màng, liên quan đến quá trình tổng hợp và vận chuyển protein.

Màng tế bào (cell membrane). Là lớp trong của thành tế bào. Màng tế bào bao gồm protein và lipid, nó có chức năng điều hòa sự vận chuyển các chất đi vào và ra khỏi tế bào.

Mã di truyền (genetic code). Tất cả những bộ ba nucleotide ở DNA (hoặc mRNA) mã hóa đặc hiệu 20 amino acid khác nhau của protein.

Mã kết thúc (termination codon). UAA, UAG và UGA là những mã kết thúc hoặc còn gọi là mã dừng (stop codon), là những tín hiệu kết thúc tổng hợp protein.

Mật độ quần lạc (population density). Số lượng tế bào trên đơn vị diện tích nuôi cấy hay trên đơn vị thể tích nuôi cấy.

Mẫu vật (explant). Mô được tách từ nguyên liệu ban đầu dùng để duy trì hoặc nuôi cấy.

Methyl hóa (methylation). Mục đích bảo vệ DNA của các đoạn palindrome, nghĩa là gắn gốc methyl (CH_3) ở vị trí cần thiết nên không bị enzyme hạn chế cắt. Khi có sự methyl hóa thì enzyme không nhận biết được vị trí cắt hạn chế và do đó DNA không bị cắt, DNA của phage không có gắn gốc methyl sẽ bị cắt. Trong công nghệ DNA tái tổ hợp, enzyme methyl hóa được gọi là methylase enzyme. Methylase được dùng để bảo vệ đoạn DNA cần gắn vào. Tất cả các chủng *E. coli* đều chứa hai enzyme methyl hóa DNA là: dam-methylase và dcm-methylase.

Môi trường nhân tạo (chemically defined medium). Dung dịch dinh dưỡng dùng để nuôi cấy chỉ chứa những thành phần mà cấu trúc hóa học đã được biết.

Mô sẹo (callus). Khối mô thực vật gồm những tế bào không phân hóa, có khả năng phân chia, được phát sinh từ các tế bào đã phân hóa ít nhiều.

Khi thực vật bị thương tổn thường tạo loại mô này trên vết sẹo, vì thế có tên gọi là mô sẹo.

Nhân (nuclear). Là trung tâm điều khiển của tế bào chứa DNA để phiên mã và dịch mã thành protein. Các protein tổng hợp được sắp xếp và đóng gói trong các túi của bộ máy Golgi.

Nhân dòng (clonal propagation). Nhân giống vô tính những dòng thực vật có nguồn gốc từ một cá thể hay một mảnh cắt duy nhất, đảm bảo hoàn toàn đồng nhất về di truyền.

Nhân giống *in vitro* (*in vitro propagation*). Nhân giống một loài thực vật trong ống nghiệm (bình thủy tinh, bình plastic, hộp plastic...) trên môi trường nhân tạo và trong điều kiện vô trùng. Đồng nghĩa với khái niệm vi nhân giống (micropropagation).

Nucleic acid. Những polynucleotide sinh học tự nhiên trong đó những đơn vị nucleotide được kết hợp với nhau bởi những liên kết phosphodiester thành trình tự riêng biệt: DNA và RNA.

Nuôi cấy dịch huyền phù tế bào (cell suspension culture). Phương thức nuôi tế bào đơn hay cụm nhiều tế bào (cell aggregate) ở trạng thái lơ lửng trong môi trường lỏng trong bình tam giác trên máy lắc (shaker) hoặc trong các hệ lên men chìm (fermenter/bioreactor) để thu sinh khối tế bào (cell biomass) hoặc dịch nuôi cấy (borth), phục vụ cho việc tách chiết các hợp chất có hoạt tính sinh học từ tế bào (đối với các hợp chất nội bào) hoặc tinh sạch chúng từ dịch nuôi cấy (đối với các hợp chất ngoại bào).

Nuôi cấy mô (tissue culture). Duy trì và sinh trưởng các loại mô trong điều kiện *in vitro* nhằm điều khiển phân hóa về hình thái và chức năng của chúng.

Nuôi cấy mô thực vật (plant tissue culture). Duy trì và nuôi dưỡng tế bào, mô, cơ quan hay cây hoàn chỉnh của thực vật trong điều kiện *in vitro*.

Nuôi cấy khởi đầu hay nuôi cấy sơ cấp (primary culture). Nuôi cấy đầu tiên khi tách tế bào, mô hoặc mẫu vật từ cơ thể ban đầu tính đến lần cấy chuyển đầu tiên từ đó sẽ thu được dòng tế bào.

Nuôi cấy phôi (embryo culture). Duy trì và phát triển phôi non hoặc đã trưởng thành được phân lập từ hạt.

Nuôi cấy tế bào (cell culture). Khái niệm chỉ những nuôi cấy trong ống nghiệm (*in vitro*) của những tế bào kể cả tế bào đơn không phân hóa thành mô.

Pha lag (lag phase). Là pha tĩnh khởi đầu hoặc tiềm tàng. Đây là thời kỳ khởi đầu của quá trình nuôi cấy, trong suốt thời kỳ này sự thay đổi số lượng tế bào là bằng không hoặc không đáng kể. Mặc dù số lượng tế bào không tăng lên, nhưng tế bào có thể sinh trưởng bằng cách tăng kích thước trong suốt thời kỳ này.

Pha log (logarithm phase). Là pha sinh trưởng theo hàm mũ. Ở các cơ thể đơn bào (vi sinh vật) hoặc tế bào động-thực vật, sự nhân đôi tăng dần số lượng tế bào cho kết quả tốc độ sinh trưởng tăng lên liên tục trong quần thể ở giai đoạn này.

Pha tĩnh (stationary phase). Là giai đoạn mà sự sinh trưởng của quần thể tế bào thường bị hạn chế hoặc do sử dụng hết toàn bộ các chất dinh dưỡng có sẵn hoặc do sự tích lũy các sản phẩm độc của sự trao đổi chất. Kết quả là tốc độ sinh trưởng giảm và sự sinh trưởng cuối cùng đã dừng lại.

Pha chết (death phase). Là giai đoạn tiếp theo của pha tĩnh mà trong đó các cơ thể trong quần thể bị chết. Sự chết xuất hiện hoặc do sự suy yếu của việc bảo quản năng lượng của tế bào, hoặc do sự tích lũy các sản phẩm độc tố. Giống như sự sinh trưởng, sự chết là một hàm mũ. Trong một số trường hợp, cơ thể không chỉ chết mà còn phân hủy (quá trình phân giải).

Phân hóa hay biệt hóa (differentiation). Một khía cạnh của sự phát triển bao gồm sự hình thành các loại tế bào, các loại mô, các loại cơ quan khác từ một hợp tử ban đầu dưới sự điều khiển đặc biệt của các gen.

Phiên mã (transcription). Sự tổng hợp mRNA từ khuôn mẫu DNA.

Phiên mã ngược (reverse transcription). Sự tổng hợp DNA từ khuôn mẫu mRNA nhờ enzyme phiên mã ngược (reverse transcriptase).

Phóng xạ tự ghi (autoradiography). Kỹ thuật phát hiện các phân tử có đánh dấu phóng xạ thông qua hiệu ứng tạo ảnh của các phân tử này trên phim X-quang.

Phương trình Monod (Monod equation). Là một trong những phương trình được sử dụng rộng rãi nhất thể hiện ảnh hưởng của nồng độ cơ chất (chất dinh dưỡng) lên tốc độ sinh trưởng đặc trưng của tế bào (μ):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S}$$

Trong đó: C_S là nồng độ của cơ chất giới hạn (limiting substrate) trong môi trường và K_S là hệ số hệ thống. Giá trị của K_S tương đương với

nồng độ của chất dinh dưỡng khi tốc độ sinh trưởng đặc trưng bằng một nửa giá trị cực đại của nó (μ_{max}).

Plasmid. Một phân tử DNA mạch vòng ở ngoài nhiễm sắc thể, sao chép độc lập, không phụ thuộc vào DNA của nhiễm sắc thể.

Protein. Một phân tử lớn gồm một hoặc nhiều chuỗi polypeptide, mỗi chuỗi có một trình tự amino acid nhất định, khối lượng phân tử của protein từ vài nghìn đến vài triệu.

Ribosome. Được tập trung trên bề mặt của mạng lưới nội sinh chất và tham gia vào hoạt động sinh tổng hợp protein.

RNA thông tin (messenger RNA, mRNA). Một trong ba loại RNA tham gia vào tổng hợp protein. Loại này có mang thông tin được mã hóa trong trình tự các nucleotide để xác định trình tự amino acid của polypeptide.

RNA vận chuyển (transfer RNA, tRNA). Một trong ba loại phân tử RNA được sinh ra bởi quá trình phiên mã và tham gia vào việc tổng hợp protein: RNA vận chuyển đưa amino acid đến ribosome vào ở đó chúng ghép với thông tin trên mRNA.

Sắc ký (chromatography). Thuật ngữ sắc ký để chỉ các kỹ thuật phân tích và điều chế cho phép tách biệt các hợp phần khác nhau của một hỗn hợp. Phép phân tích sắc ký dựa vào sự di chuyển khác nhau trong một pha động của các chất hòa tan đã được gắn trên một pha tĩnh ở trạng thái rắn. Người ta thường chọn các chất có khả năng kết gắn được với các chất (hòa tan) định phân tách làm pha tĩnh. Tương tác giữa chất hòa tan và pha tĩnh có thể là tương tác hấp phụ, tương tác ion (trao đổi ion), tương tác kỵ nước, tương tác kiểu rây phân tử hoặc tương tác đặc hiệu sinh học.

Sinh khối (biomass). Tổng khối lượng khô của tất cả các chất sống trong một đơn vị diện tích hoặc thể tích.

Sinh trưởng cân bằng (balanced growth). Là sự sinh trưởng mà trong suốt quá trình đó sự nhân đôi sinh khối xảy ra cùng với sự nhân đôi của tất cả các đặc tính xác định khác của quần thể như là protein, DNA, RNA và nước nội bào.

Sự tái bản hay sao chép (replication). Sự tổng hợp một phân tử DNA xoắn kép giống với phân tử DNA mẹ.

Tạo dòng gen (gene cloning). Còn gọi là nhân dòng hay tách dòng gen, là sự sản sinh nhiều bản sao của một phân tử DNA, thường là phân tử DNA tái tổ hợp, bằng cách sao chép phân tử đó trong một vật chủ thích hợp.

Tái tổ hợp (recombination). Quá trình trong đó nhiễm sắc thể hay phân tử DNA đứt ra rồi các phần đứt được nối lại theo một tổ hợp mới. Quá trình này có thể xảy ra trong tế bào sống (qua sự trao đổi chéo trong phân bào giảm nhiễm) hay trong ống nghiệm nhờ các enzyme cắt và nối DNA.

Tầng nuôi dưỡng (feeder layer) hay tế bào nuôi dưỡng (nurse cells). Lớp tế bào có thể đã bị chiếu xạ làm mất khả năng phân bào được trải bên dưới để cung cấp một số chất cần thiết cho lớp tế bào khác nuôi bên trên.

Tế bào lai (hybrid cell). Là tế bào có một nhân được hình thành sau khi dung hợp hai tế bào dẫn đến sự hình thành một nhân hỗn hợp.

Tế bào mầm phôi (embryonic stem cell). Tế bào phôi chưa biệt hóa, có thể được nuôi cấy trong một thời gian dài mà vẫn giữ được tính đa thể (nghĩa là khả năng biệt hóa theo nhiều hướng khác nhau).

Thành tế bào (cell wall). Được cấu tạo bởi các carbohydrate tự nhiên (cellulose và hemicellulose). Lớp ngoài của thành tế bào chứa pectin để giúp nó liên kết với các tế bào bên cạnh. Thành tế bào có chức năng nâng đỡ cho cây.

Thể ổn định hóa tính (chemostat). Trong hệ lên men liên tục tốc độ dòng chảy dinh dưỡng được cài đặt ở một giá trị đặc biệt và tốc độ sinh trưởng của nuôi cấy sẽ điều chỉnh tốc độ dòng chảy này, như vậy sẽ duy trì được nồng độ môi trường dinh dưỡng thích hợp với mật độ tế bào.

Thể ổn định độ đục (turbidostat). Được sử dụng khi hệ lên men liên tục tiến hành ở các tốc độ pha loãng cao gần với điểm rửa trôi (washout point), khi ta có thể ngăn cản sự rửa trôi bằng cách điều hòa tốc độ dòng chảy trong trường hợp thất thoát tế bào thông qua dòng chảy ra ngoài vượt quá sự sinh trưởng tế bào trong hệ lên men.

Thời gian gấp đôi quần thể (population doubling time). Thời gian mà số lượng tế bào của dòng hay chủng nuôi cấy tăng đến gấp đôi kể từ khi bắt đầu nuôi.

Thực khuẩn thể (bacteriophage). Một virus có thể tái bản trong một tế bào vi khuẩn.

Tiếp mẫu (inoculation). Bước đưa mẫu vào trong nuôi cấy khởi đầu (initiation culture).

Tính toàn thể (totipotency). Một đặc tính của tế bào là có khả năng phát triển thành mọi kiểu tế bào có trong cơ thể trưởng thành mà từ đó nó được tách ra, tức là có khả năng tái sinh thành một cơ thể hoàn chỉnh.

Tốc độ phân chia tế bào (cell division rate). Sự phân chia tế bào trên một đơn vị thời gian. Tốc độ phân chia là hằng số trong suốt thời gian sinh trưởng (theo hàm mũ) của tế bào.

Tốc độ sinh trưởng tế bào (cell growth rate). Sự thay đổi số lượng tế bào theo thời gian. Tốc độ sinh trưởng không phải là một hằng số trong suốt thời gian sinh trưởng (theo hàm mũ) của tế bào.

Tốc độ sinh trưởng đặc trưng của tế bào (cell specific growth rate). Sự thay đổi theo logarithm tự nhiên của số lượng tế bào theo thời gian.

Trình tự *cis*. Trình tự trên một phân tử DNA có tác động (điều hòa) đến các trình tự khác trên cùng phân tử DNA đó. Các trình tự *cis* không mã hóa cho protein.

Tuổi thế hệ tế bào (cell generation time). Thời gian giữa hai lần phân chia của tế bào. Khái niệm này không đồng nghĩa với thời gian gấp đôi quần thể.

Ty thể (mitochondrion). Chứa vật liệu di truyền và nhiều enzyme quan trọng trong sự trao đổi chất của tế bào.

Vector. Là các phân tử DNA được sử dụng trong tạo dòng gen và nhân bản chúng trong tế bào vật chủ (*E. coli* hoặc nấm men). Có ba nhóm vector chính gồm: (1) Nhóm plasmid, (2) Nhóm phage/phagemid, và (3) Nhóm nhiễm sắc thể nhân tạo (artificial chromosome: BAC và YAC). Ý tưởng về vector chuyển gen bắt nguồn từ các plasmid của vi khuẩn. Vector chuyển gen là phân tử DNA có khả năng tự tái sinh, tồn tại độc lập trong tế bào và mang được các gen cần chuyển.

Vector hai nguồn (binary vector). Là dạng sử dụng hai hay nhiều loại plasmid và vi khuẩn cùng lúc, ví dụ: vi khuẩn *E. coli* và *Agrobacterium*, các plasmid trong trường hợp này thích ứng với cả *E. coli* và *Agrobacterium*.

Virus. Phân tử có mang nucleic acid (DNA hoặc RNA) nằm trong một vỏ bọc protein, có khả năng sao chép trong tế bào chủ và lan truyền từ tế bào nọ sang tế bào kia.

Xoắn kép (double helix). Cấu trúc ba chiều tự nhiên của hai chuỗi DNA bổ sung, đối song và xoắn với nhau.