PHẠM THÀNH HỔ

NHẬP MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

PHẠM THÀNH HỔ

NHẬP MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

LỜI NÓI ĐẦU

Loài người đang sống ở giữa thập niên đầu tiên của thế kỉ XXI, *thế kỉ Công nghệ sinh học*. Tuy con người đã biết sử dụng các thực phẩm lên men cổ truyền từ 10000 năm trước đây và *Công nghệ lên men* đã khởi động từ đầu thế kỉ XX, nhưng *Cách mạng công nghệ sinh học* thật sự ra đời vào đầu thập niên 1970. Trong gần 35 năm qua, *Công nghệ sinh học* (CNSH) phát triển mạnh với nhiều thành tựu rực rỡ và rất xứng đáng được mang danh của thế kỉ mới.

Công nghệ sinh học đã phát triển như vũ bão với đỉnh cao là sự kiện hoàn tất giải kí tự chuỗi *Bộ gen người* vào năm 2003, nhân kỉ niệm 50 năm phát minh chuỗi xoắn kép DNA. Ngoài ra, hàng loạt các công nghệ mới ra đời như *genomics, proteomics, công nghệ RNA, microarray,...* và được ứng dụng vào các lĩnh vực khác nhau. Công nghệ sinh học vi sinh vật, thực vật và động vật đã đạt nhiều thành tựu to lớn, góp phần cải thiện đáng kể cuộc sống con người. Nhiều ứng dụng to lớn hơn còn đang ở phía trước.

Ở các nước, có nhiều sách, và cả những bộ sách nhiều tập về CNSH đã được xuất bản. Cuốn sách này được biên soạn nhằm phác hoạ những nét căn bản và khái quát về *Công nghệ sinh học* nên mang tên "Nhập môn".

Sách được biên soạn làm giáo trình cho sinh viên khoa công nghệ sinh học của các trường đại học. Sách còn có thể làm tài liệu tham khảo cho sinh viên khoa sinh học của các trường đại học và cao đẳng, cho các giáo viên sinh học. Các kiến thức trong sách được cập nhật hoá và trình bày có hệ thống, giúp người đọc có định hướng tốt cho hoạt động học tập, giảng dạy và nghiên cứu.

Sách được xuất bản lần đầu chắc không tránh khỏi thiếu sót. Tác giả xin chân thành cám ơn và rất mong nhận được những góp ý của các đồng nghiệp và bạn đọc, để lần xuất bản sau sách sẽ được hoàn chỉnh hơn.

Trong quá trình chuẩn bị sách, chúng tôi nhận được sự giúp đỡ và động viên của người thân và các cộng sự. Chúng tôi xin chân thành cám ơn người bạn đời – giảng viên trường Đại học Bách khoa TP. Hồ Chí Minh – Lê Xuân Mai ; các cộng sự : *ThS.* Lương Thị Mỹ Ngân, *ThS.* Nguyễn Thị Mỹ Lan, *ThS.* Lê Thị Thanh Loan và CN. Trần Vân Khánh. Chúng tôi cũng xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ tích cực của Ban Giám đốc, Biên tập viên và các cán bộ chuyên môn khác của Nhà Xuất bản Giáo dục tại TP. Hồ Chí Minh.

***PGS.TS.* PHẠM THÀNH HỔ**

Khoa Sinh học – Đại học Khoa học tự nhiên

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HỒ CHÍ MINH

Phần I
KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CHƯƠNG 1
THẾ KỈ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Nhân loại đang sống ở thiên niên kỉ mới thứ ba, thế kỉ XXI, ***thế kỉ công nghệ sinh học***, cụm từ không còn chỉ về tương lai như cách nay nhiều thập niên mà đang khẳng định một hiện thực. Đặc biệt, *năm 2003 có* ý nghĩa lịch sử với 2 sự kiện : kỉ niệm *50 năm* phát minh *chuỗi xoắn kép DNA* và *bộ gen người* được hoàn tất với độ chính xác cao, mở ra nhiều triển vọng vô cùng to lớn cho các ứng dụng trong tương lai.

I. NGÀNH KHOA HỌC CÔNG NGHỆ MŨI NHỌN CỦA THẾ KỈ

1. Những bước tiến vượt bậc của Sinh học thế kỉ XX

Loài người tích luỹ những kiến thức về thế giới sinh vật sớm nhất so với các ngành khoa học khác, vì các sinh vật rất *gần gũi và liên quan mật thiết với đời sống* con người. Tuy nhiên, sự sống đầy bí ẩn, nhất là các *cơ chế vi mô*, nên trong một thời gian dài sinh học ở dạng *mô tả* ; chỉ tới cuối thế kỉ XX *Sinh học thực nghiệm* mới có sự phát triển vượt bậc và khẳng định vị trí quan trọng của nó.

a) Các phát minh chủ yếu của thế kỉ XIX

Sinh học thế kỉ XIX đã tạo những tiền đề căn bản cho sinh học thực nghiệm thế kỉ XX nhờ các phát minh chủ yếu sau :

– Năm 1655, *tế bào* được phát hiện nhờ *kính hiển vi*, và năm 1837 – 1838, Schleiden và Schwann nêu ra *Học thuyết tế bào*.

– Năm 1859, C. Darwin nêu ra *Học thuyết tiến hoá* làm thay đổi tư duy nhân loại : Con người không phải là trung tâm vũ trụ mà cũng chỉ là sản phẩm của sự tiến hoá.

– Năm 1865, Mendel chứng minh sự tồn tại của các *nhân tố di truyền* (*gen*) và mở đầu cho các nghiên cứu đi sâu vào thế giới *vi mô* của sự sống. Năm 1868, F. Miescher tìm ra *DNA*.

– Những năm 1860, các nghiên cứu của L.Pasteur đã mở đường cho sự phát triển của *Vi sinh vật học* và *CNSH vi sinh vật*.

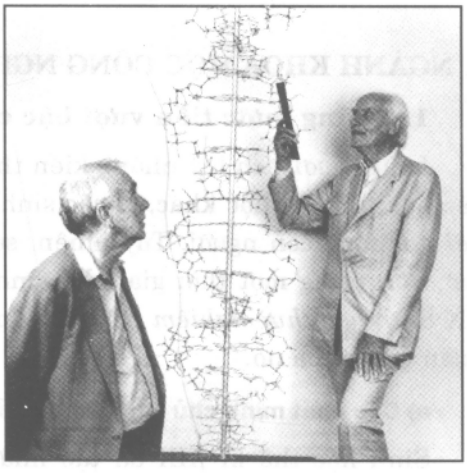
b) Những phát minh nền tảng của thế kỉ XX

– Đầu thế kỉ XX, khái niệm *gen* được xác lập ; và năm 1910 – 1920, T.H. Morgan nêu ra *Thuyết di truyền nhiễm sắc thể*.

– Giữa thế kỉ XX (năm 1953), *mô hình cấu trúc phân tử DNA của Watson-Crick* ra đời, đặt nền móng cho sự phát triển của Sinh học phân tử. Phát minh khoa học này được đánh giá là lớn nhất trong thế kỉ XX, nó ra đời sau bom nguyên tử (1945) và trước khi phóng vệ tinh nhân tạo đầu tiên (1957). Năm 1962, *Watson, Crick* và *Wilkins* đã được nhận giải Nobel ; tiếp đó, đến năm 2002 có 40 giải Nobel thì 2/3 số giải này liên quan đến DNA.

Sau phát minh Watson-Crick, giới khoa học đã tiên đoán ***thế kỉ XXI là thế kỉ sinh học*** và sự phát triển vượt bậc của sinh học ở nửa cuối thế kỉ XX đã biến dự báo thành hiện thực.

Hình 1.1. J. Watson (trái) và F. Crick (phải) năm 1953



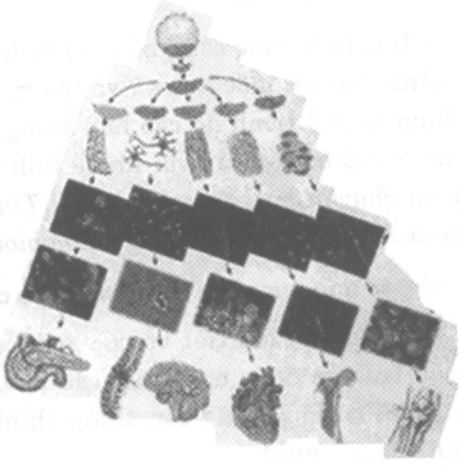
Hình 1.2. J. Watson (trái) và F. Crick (phải) năm 2003

– *Sinh học phân tử* hình thành và phát triển với *Học thuyết trung tâm : DNA → mRNA → Protein.* Vào thập niên 1960, các phát minh quan trọng liên tiếp ra đời : 64 codon mã di truyền (1966), điều hoà biểu hiện gen (1962),...

– Năm 1972 – 1973, *kĩ thuật di truyền* ra đời làm bùng nổ *cách mạng CNSH*, làm cho con người có khả năng *vượt giới hạn tiến hoá* và *thay quyền "Tạo hoá"* cải biến các sinh vật, kể cả con người.

– Tháng 2/1997, Wilmut công bố *Nhân bản vô tính động vật (Animal cloning) và tạo cừu Dolly*, mở ra triển vọng to lớn trong nhân giống nhiều loài động vật từ *tế bào soma* (tế bào sinh dưỡng), kể cả nhân bản người.

Hình 1.3. Cừu Dolly



Hình 1.4. Tế bào gốc (Stem cell) từ phôi và sự biệt hoá thành các mô, cơ quan khác nhau

– Thành tựu mới nổi bật trong năm 1999 là phát hiện về *Tế bào gốc soma (Somatic stem cell),* các tế bào vẫn giữ nguyên tính chất như tế bào phôi, tức khả năng có thể phát triển thành nhiều loại tế bào chuyên biệt khác nhau như tế bào tim, thần kinh,... Sự kết hợp với những công nghệ nền tảng khác cho phép phát triển các liệu pháp để trị các bệnh mãn tính, sử dụng tế bào để hồi phục chức năng cơ quan bị thương tổn do bệnh kinh niên. Đặc biệt, *nhân bản vô tính động vật* bằng *nhân của tế bào gốc sẽ dễ thực hiện hơn rất nhiều.* Khả năng *nhân bản con người* đã thành hiện thực.

– Ngày 26/6/2000, lần đầu tiên công bố kết quả *giải kí tự chuỗi (Sequencing) của bộ gen người* (Human Genome Project – HGP). *Dự án* này khởi sự từ năm 1990 với kinh phí 3 tỉ đô la Mĩ (USD) trong 15 năm. Tháng 2/2001, công bố tiếp những kết quả phân tích chi tiết hơn và tháng 4/2003 *Giải kí tự chuỗi bộ gen người* đã ở dạng hoàn chỉnh với độ chính xác cao. Thành tựu này là một *kì công vĩ đại* của loài người. Nó mở ra những triển vọng to lớn chưa lường hết được.

– Sinh học hiện đại phát triển trên tất cả các lĩnh vực với tốc độ chưa từng thấy như trong Sinh học phân tử, Di truyền học, Vi sinh vật học, Hoá sinh học, Sinh học phân tử của tế bào và Sinh học phát triển. Ranh giới giữa các bộ môn đã mờ nhạt dần trong những thập niên cuối thế kỉ XX và nghiên cứu sự sống với lối *tiếp cận đa ngành* được cảm nhận ở nhiều phòng thí nghiệm. Sự phát triển vượt bậc đó thể hiện ở mọi mặt như *phát triển lực*

lượng, chiều rộng, chiều sâu, tốc độ và *tầm ảnh hưởng*. Ví dụ về tốc độ : thời gian cần để giải kí tự chuỗi nucleotide của bộ gen người tiến triển như sau : vào năm 1980, phải cần *1000 năm* ; vào năm 1990 chỉ cần *100 năm* ; năm 2000 chỉ trong *1 năm*.

– Đặc biệt, việc công bố *Giải kí tự bộ gen người* sớm hơn dự kiến 3 năm đã đánh dấu cột mốc lịch sử và mở ra một chân trời rộng lớn cho nghiên cứu và khai thác ở trình độ cao hơn trong thế kỉ XXI. *Thời đại sau bộ gen (Post-Genomics Era)* bắt đầu với nhiều lĩnh vực khoa học công nghệ mới do sự tích hợp và chuyên hoá khoa học như : *Tin-Sinh học (Bioinformatics), Biochip và microarrays, CNSH siêu nhỏ (Nanobiotechnology),...*

c) Các ứng dụng tạo ra những cuộc cách mạng mới

Sự hiểu biết chi tiết về các gen, cơ chế phân tử của sự sống, đặc biệt là về cấu trúc và chức năng của các phân tử DNA, RNA và protein, cho phép con người có khả năng can thiệp chính xác vào các quá trình sống để phục vụ lợi ích của mình.

Hình 1.5. Hình tượng hoá cuộc cách mạng di truyền (Science 9/2000)

Dòng chữ to bên dưới có nghĩa : 39 hoạ sĩ phiêu lưu mô tả về nghiên cứu di truyền học thay đổi cuộc sống chúng ta như thế nào ?

Một số thành tựu chủ yếu :

– Các vi sinh vật (góc trái trên cùng) mang gen người sản xuất các protein trị liệu.

– Các thực vật được chuyển gen có độ đồng đều cao.

– Sự phát triển của chọn giống động vật như bò, heo, gà từ động vật rừng (phía trái) đến các giống tốt hiện tại (ở giữa) và cuối cùng là giống của tương lai (bò là một khối thịt vuông vắn chứa đầy sữa với cái đầu rất bé ; gà 6 cánh ; heo căng tròn có thận, phổi và tim có thể dùng thay thế cơ quan con người.

– Vào thập niên 1960, *Cách mạng xanh* đã làm tăng vọt sản lượng lúa mì, lúa nước nhờ các giống đột biến thân lùn. Hiện nay có các giống lúa Thần nông đang trồng phổ biến ở nước ta.

– Vào thập niên 1970, *Cách mạng công nghệ sinh* học bùng nổ sau phát minh *Kĩ thuật di truyền, làm cho* con người có thể *thay quyền tạo hoá* cải biến các sinh vật và các cụm từ *Cách mạng di truyền, Thời đại gen* đã trở nên phổ biến (hình 1.5), mà đến nay chưa thấy giới hạn ngoại trừ *đạo lí sinh học* (Bioethics).

Một đặc điểm của CNSH là sự gắn chặt giữa nghiên cứu cơ bản và ứng dụng. Sự giải kí tự chuỗi thành công ở bộ gen người và hàng trăm các sinh vật khác đã tạo ra ngành khoa học nghiên cứu về bộ gen - *Genomics* (*genome* : bộ gen) và nghiên cứu về protein là *Proteomics*. Kèm theo đó là những cuộc cách mạng trong từng ngành và hình thành *Y dược học bộ gen (Medico-pharmaceutical genomics), Nông nghiệp dựa vào bộ gen (Agricultural genomics), Sinh môi dựa vào bộ gen (Environmental genomics).*

Tuy nhiên, bên cạnh mặt tích cực vẫn có nhiều vấn đề gây lo lắng và thậm chí sợ hãi cho nhiều người như các *sinh vật biến đổi gen* (Genetically Modified Organism-GMO) hay *nhân bản vô tính người*,... Do đó, vấn đề *đạo lí sinh học* (bioethics) và *an toàn sinh học* (biosafety) được đặt ra và đã có nhiều luật cấm các thí nghiệm phi đạo lí như *nhân bản người*.

2. Cải thiện toàn diện chất lượng cuộc sống con người

Một đặc điểm nổi bật và là khác biệt lớn nhất của CNSH so với các ngành khoa học kĩ thuật mũi nhọn khác là ảnh hưởng trực tiếp và gián tiếp đến con người. Mọi thành tựu khoa học suy đến cùng đều phải phục vụ cho con người. Cải thiện toàn diện chất lượng cuộc sống con người là nhu cầu cấp thiết của nhân loại trong thế kỉ mới này, khi mà đời sống vật chất không ngừng được nâng cao và khoa học công nghệ ở tầm cao mới. CNSH phải ở vị trí hàng đầu trong thoả mãn khát vọng đó. Nó tác động tích cực đến mọi mặt đời sống con người, bao gồm *duy trì mạng sống, nuôi sống, cung cấp phương tiện sống và tạo môi trường sống*. Hiện nay, với khả năng đến mức có thể cải biến con người *thay quyền tạo hoá*, CNSH có nhiều phương tiện kĩ thuật cao để thoả mãn ước vọng của loài người. Ví dụ qua sự phát triển của y học :

– Trước 1970 : *Y học lâm sàng*, chủ yếu hoá sinh và thuốc phân tử nhỏ.

– 1975 – 1995 : *Y sinh học phân tử* có khả năng tạo dòng gen (Gene cloning), xác định các gen bệnh, tạo protein tái tổ hợp trị liệu (insulin, iterferon,...) và phát hiện cơ chế bệnh như tế bào chết theo chương trình (apoptosis).

– 1995 : *Y học bộ gen* (Genomic medecine) có thể chẩn đoán sự khác nhau trên từng nucleotide giữa các cá thể người, dẫn đến *Y học cá thể hoá* (Individualized medecine), *Bộ gen dược học* (Pharmacogenomics), Proteomics, Bioinformatics,...

Hiện nay, có nhiều khả năng kéo dài cuộc sống con người và vấn đề bất tử không còn là viễn tưởng.

3. CNSH với những ngành KHCN hàng đầu trong tương lai

a) Sự hấp dẫn đối với các nhà tin học

Vào những thập niên cuối thế kỉ XX và đầu thế kỉ XXI, khoa học công nghệ (KHCN) trên thế giới phát triển nhanh với tốc độ chưa từng thấy, trong đó đứng đầu là Công nghệ thông tin và kế sau là CNSH.

Bill Gates, người đầu tiên của nhân loại có tài sản vượt 100 tỉ USD và hiện là người giàu nhất thế giới, Chủ tịch Tập đoàn Công nghệ tin học số một thế giới ***Microsoft*** đã nghe các bài giảng và tài trợ để thành lập bộ môn mới là *Công nghệ Sinh học Phân tử* (năm 1991). Vào thời đó, đây là bộ môn đầu tiên có sự kết hợp giữa sinh học phân tử và điện toán.

Ngày 16/6/1996, Bill Gates đã phát biểu trên một trang Web : *"Giống như phần mềm, CNSH sẽ thay đổi thế giới"*. Đôi khi có người hỏi tôi : *"Ông sẽ chọn lĩnh vực nào nếu không là các máy điện toán ?"*. *"Tôi nghĩ sẽ hoạt động trong Công nghệ Sinh học. Tôi trông đợi những tiến bộ vượt bậc của Y học trong 2 thập niên tới và các nhà CNSH sẽ ở trung tâm của sự tiến bộ đó"*.

Các triệu phú và tỉ phú của Tập đoàn Micrsoft cũng đã đầu tư cho CNSH để tìm *cách săn sóc sức khỏe kiểu mới*. Ngoài ra, những viên chức của Microsft hiểu được *sự đan chéo giữa các máy điện toán với CNSH*. Nguồn tiền từ Microsoft đã biến *Seattle thành một trung tâm CNSH với hơn 40 công ti*. Gates và các nhà tin học cho rằng : *"CNSH ngày nay như Công nghệ phần mềm trước đây 20 năm (1980)"* và *"chưa có một công nghệ nào có khả năng cải thiện chất lượng cuộc sống con người bằng CNSH"*.

b) Sự gắn bó của CNSH với tin học

Tin học đã trực tiếp góp phần không thể thiếu vào thành công của *Bộ gen người*. Bộ gen người được cắt thành hàng trăm triệu đoạn ngắn để giải kí tự chuỗi và các kết quả rời rạc của từng đoạn được *ráp nối trở lại thành mạch dài liên tục* thì do máy điện toán thực hiện ở giai đoạn cuối với *300 máy* (giá 300 000 USD/máy) *được nối thành mạng. Tổng chi phí cho Tin học* trong dự án Bộ gen người là *130 triệu USD*.

Năm 2000, báo cáo của các Tập đoàn khoa học máy điện toán (Computer Sciences Corp. (CSC)) bàn tới sự đóng góp của *6 bước đột phá kĩ thuật số thế hệ tiếp theo* như là các công nghệ mang lại ưu việt tuyệt đối cho các ngành công nghiệp *trong tương lai*. Ngoài việc được xếp vị trí thứ ba, CNSH còn quan hệ với các bước khác như :

– *Công nghệ siêu nhỏ* hay *Công nghệ nano* (Nanotechnology), mà sự ra đời của *Công nghệ sinh học nano* (Nanobiotechnology) là một ví dụ.

– *Các hệ thống thông minh và người máy* (Intelligent systems and robotics) với sự góp phần của *Người máy sinh học* (Biorobot).

– *Con người trực diện với máy điện toán* (Human/computer interfaces) nhằm *kết nối máy điện toán với bộ não người*, mà dự kiến sẽ có kết quả vào những năm 2050 – 2060. CNSH sẽ góp phần *chế tạo vật liệu kết nối* tốt và an toàn.

Lĩnh vực *Genomics và Proteomics* có thể sử dụng tất cả các công nghệ tiên tiến trên để tạo sản phẩm mới dựa vào CNSH. Ngoài ra, protein *Bacteriorhodopsin* đang được nghiên cứu dùng làm bộ nhớ cho *máy điện toán* (Protein-based computer hay Biocomputer).

c) Những ý tưởng sáng tạo từ phía sinh học

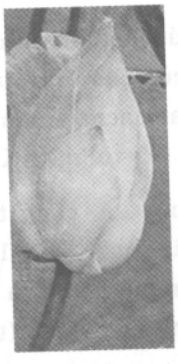
Trên đây là quan điểm của các nhà tin học. Ngược lại, về phía sinh học thì nhiều cơ chế và quá trình có thể góp phần đáng kể bằng những ý tưởng cho sự sáng tạo của các ngành khoa học mũi nhọn trong tương lai.

– Xét về *Công nghệ nano* thì tế bào là một hệ thống chứa nhiều công cụ nano. Mỗi protein và mỗi enzyme có thể là một công cụ nano.

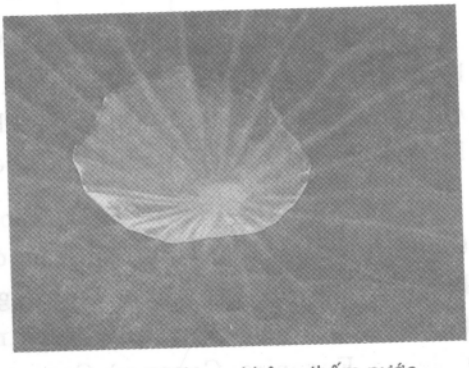
– Xét về *Công nghệ tự động hoá* thì tế bào là một bộ máy tự động hoá siêu hạng. Ví dụ, tế bào trứng người được thụ tinh thành hợp tử, mà sự phát triển tự động của nó sẽ tạo nên một cá thể hoàn chỉnh.

– Xét từ góc độ *Công nghệ vật liệu mới* thì nhiều loại vật liệu của tế bào có những tính chất ưu việt mà con người mơ ước tạo ra.

"Hiệu quả sen" (Lotus effect) : lá và cánh hoa sen có đặc điểm không để bụi bám. Tính ưu việt này được công nghệ nano nhại lại để chế kính không dính bụi.



Hình 1.6. Hoa sen



Hình 1.7. Lá sen không thấm nước và không dính bụi.

Chế tạo vật liệu kết dính mô phỏng theo cấu tạo của chân thằn lằn, có tính gắn chặt vào chỗ bám giúp nó trèo trên tường và dán mình lên trần nhà, đó là mong muốn của các kĩ sư vật liệu.

Cần nhấn mạnh rằng những cấu trúc sinh học ưu việt như trên đã có từ nhiều tỉ hoặc hàng trăm triệu năm trước đây. CNSH tận dụng ngay những cấu trúc này để sản xuất và thử nghiệm, đồng thời sự hiểu biết về các cơ chế tinh vi của tế bào sẽ cung cấp nhiều ý tưởng cho sự sáng tạo của các nhà khoa học công nghệ để tìm ra các kĩ thuật mới.

CNSH hiện đại đang bước vào *giai đoạn sau bộ gen người* với tốc độ phát triển nhanh chưa từng thấy. Cùng với các ngành mũi nhọn như công nghệ thông tin, tự động hoá, công nghệ nano, vật liệu mới, CNSH góp phần tích cực vào diện mạo khoa học công nghệ của thế kỉ mới.

4. Một bộ phận của nền kinh tế tri thức

Nền kinh tế tri thức đòi hỏi *công nghệ cao* và *sự sáng tạo lớn*. Trước hết phải nói đến kĩ thuật mấu chốt quyết định sự ra đời của CNSH hiện đại, đó là *kĩ thuật tái tổ hợp DNA* (DNA recombinant Technology), gọi đơn giản là *công nghệ gen* (CN gen). Ngoài ra, CNSH liên quan chặt chẽ với những ngành KHCN hàng đầu của thế kỉ và đòi hỏi nhiều sáng tạo. Chính những sáng tạo mới sẽ đẩy nhanh tốc độ phát triển của CNSH.

Mục đích cuối cùng của đa phần các nghiên cứu CNSH là tạo ra *thương phẩm* và do vậy nó cũng chịu sự chi phối đáng kể về *hiệu quả kinh tế*. Sự phát triển nhảy vọt trong kinh doanh của CNSH đã thể hiện ngay từ 15 tháng 10 năm 1980, trong vòng 20 phút, giá cổ phiếu ở thị trường chứng khoán New York của Công ti CNSH *Genentech* tăng từ 35 USD lên 89 USD và cuối ngày ở mức 71,25 USD với 528 000 cổ phiếu. Lần đầu tiên trong lịch sử thị trường chứng khoán có sự tăng vọt như vậy.

Những động lực kinh tế đã thu hút nguồn vốn đầu tư lớn từ nhiều nguồn khác nhau, đặc biệt có sự tham gia của các *tập đoàn đa quốc gia hoá dược khổng lồ* như Monsanto, Du Pont, Pharmacia, American Cyanamid, Eli Lilly, Merck, Novartis, Hoffmann-La Roche, GlaxoSmithKline, ...

Ngay từ năm 1983 – 1985, khoảng 200 công ti nhỏ về CNSH đã được thành lập ở Mĩ nhờ chính sách ưu đãi thuế. Đến 1985, số công ti tăng đến hơn 400, mà chủ yếu nhằm vào công nghệ gen ; và thuật ngữ "gen" có trong tên gọi của nhiều công ti nổi tiếng như Genetech (từ 1980), Biogen, Amgen, Calgene, Engenics, Genex và Cangene.

Tính đến 2002, ở Mĩ có hơn 1300 và trên toàn thế giới có hơn 3000 công ti CNSH. Một số công ti đã bị bán lại cho các tập đoàn hoá dược khổng lồ như vào năm 1991, 60% của Genentech đã bị bán cho Hoffmann-La Roche với giá 2,1 tỉ USD. Không ít công ti bị phá sản. Sự biến động đó là đặc điểm của thị trường CNSH. Năm 2000, tiền đầu tư đạt 33 tỉ USD.

Đến năm 2000, hàng tá thuốc, sản phẩm của CN gen, đã được cấp giấy chứng nhận ; hơn 200 loại đang thử ở người và hơn 750 loại đang trong quá trình thực hiện. Ngay từ năm 1996, lần đầu tiên doanh số bán protein tái tổ hợp *erythropoetin* (chất kích thích tạo máu) vượt 1 tỉ USD/năm. Năm 2000, tiền bán các *kháng thể đơn dòng* vượt 2 tỉ USD/năm. Doanh thu của CN gen tăng vọt từ 6 tỉ USD năm 1986 đến 25 tỉ USD năm 2000.

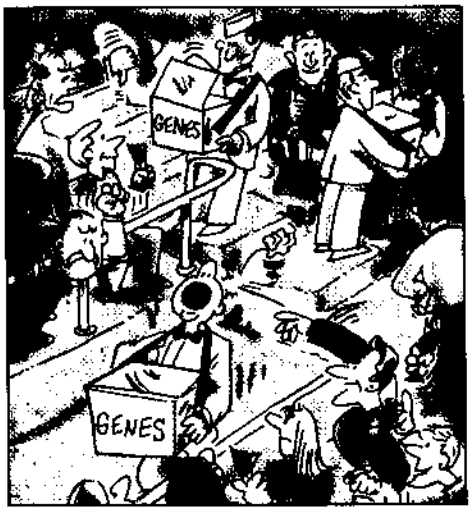
Hơn thế nữa, một xu hướng phát triển chung của nền kinh tế tri thức là sự tham gia trực tiếp của các nhà khoa học vào các công ti. Hebert Boyer, một tác giả phát minh ra kĩ thuật di truyền, là phó chủ tịch công ti công nghệ gen đầu tiên *Genentech*. Theo gương ông có nhiều giáo sư, nhà khoa học đã trực tiếp tham gia vào các công ti CNSH nhỏ.

Tạp chí bán nguyệt san Genetic Engineering News mỗi năm có nêu danh sách 100 triệu phú USD trong lĩnh vực CN gen (hình 1.8) và thống kê số triệu phú có trình độ sau đại học trong đó ít nhất là 96/100.

Hình 1.8. Khai thác bộ gen đem lại nhiều lợi nhuận.

Nhận xét chung nhất có tính quy luật trong phát triển CNSH là *thời gian cần thiết để chuyển đổi từ phát minh khoa học thành công nghệ sản xuất ngày càng ngắn dần*, tới mức không cần có sự phân chia giai đoạn và đòi hỏi các cơ sở nghiên cứu cần được đầu tư triển khai và ngược lại các cơ sở sản xuất cũng phải có chương trình nghiên cứu và phát triển R&D (Research & Development) cho mình.

Ví dụ, *Insulin* tái tổ hợp bắt đầu thử nghiệm từ 1975, đến 1982 được phép sử dụng (7 năm) ; sản xuất chip chẩn đoán từ 1999 đến 2001 (3 năm). Ngay sau khi bộ gen người công bố thì vấn đề thương mại hoá bộ gen đã được đặt ra (hình 1.9).



Hình 1.9. Thương mại hoá bộ gen thành hiện thực

Tóm lại, sự phát triển của CNSH diễn ra với tốc độ nhanh, gắn với nhiều ngành KHCN tiên tiến nhất tạo nên một số lĩnh vực mới, góp phần tích cực trong cải thiện toàn diện chất lượng sống của con người và là một bộ phận của nền kinh tế tri thức. Thế kỉ XXI là thế kỉ của CNSH. Đó là một tất yếu lịch sử. Ngay từ năm 1987, Cơ quan đánh giá công nghệ của Mĩ (US Office of Technology Assesment) cho rằng : "*Cuộc cách mạng khoa học mới chứng tỏ rằng* ***CNSH phân tử*** *(Molecular Biotechnology) có thể thay đổi cuộc sống và tương lai của các công dân một cách mạnh mẽ như* ***Cuộc cách mạng công nghiệp*** *đã làm cách nay 2 thế kỉ và* ***Cách mạng của máy điện toán*** *hiện nay*".

Một điều hết sức quan trọng là trong tương lai không xa, những thành quả của CNSH sẽ có *tác động trực tiếp đến từng người* như khi chẩn đoán bộ gen người được thực hiện với giá rẻ. Mọi người không những chứng kiến nhiều chuyện thần kì được thông báo hằng ngày trên các phương tiện truyền thông đại chúng, mà còn có thể được thụ hưởng trực tiếp nhiều sản phẩm của CNSH. Do vậy, sự hiểu biết về CNSH không phải chỉ cần cho giới khoa học có chuyên môn liên quan, mà cho từng người để có thể hành xử hợp lí theo đà phát triển nhanh của khoa học và dự tính cần làm gì cho thế hệ con cháu trong tương lai.

II. CÔNG NGHỆ SINH HỌC LÀ GÌ ?

1. Khái niệm

Giống như nhiều ngành khoa học công nghệ khác, thuật ngữ *Công nghệ sinh học (Biotechnology)* có nhiều định nghĩa khác nhau và hiểu nó cũng không thống nhất.

Công nghệ sinh học có thể hiểu theo 2 nghĩa *rộng* và *hẹp* :

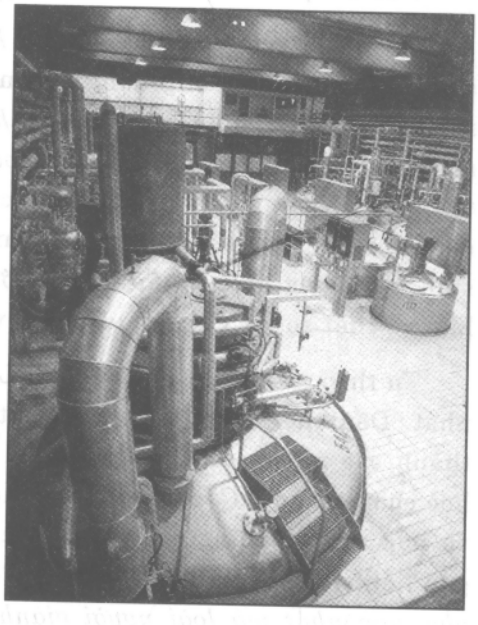
– Theo *nghĩa rộng* bao gồm cả các ứng dụng lâu đời như lên men rượu, bia, phomat,...và cả các kĩ thuật cao cấp ngày nay. Theo nghĩa này, CNSH xuất hiện cách đây hơn 100 thế kỉ (10000 năm).

– Theo *nghĩa hẹp* : CNSH liên quan đến kĩ thuật hiện đại nhất như công nghệ di truyền và các kĩ thuật cao cấp khác như *cố định enzyme, tạo dòng vi khuẩn tổng hợp protein người, tạo các kháng thể đơn dòng* ... Theo nghĩa này CNSH được tính từ 1970.

Công nghệ sinh học (Biotechnology) là một thuật ngữ khoa học do kĩ sư người Hungary là Karl Ereky nêu ra vào năm 1917 để chỉ quá trình nuôi heo (lợn) với quy mô lớn bằng thức ăn là củ cải đường lên men. Tuy nhiên, thuật ngữ này ít được nhắc đến trong hơn 50 năm và chỉ được sử dụng rộng rãi sau phát minh ra kĩ thuật di truyền (KTDT) vào đầu thập niên 1970, nên có lúc được coi là sự *bùng nổ* CNSH.

Trước 1970, CNSH được hiểu là *Công nghiệp lên men* (Industrial fermentation) vi sinh vật để tạo thương phẩm. Trong các thập niên 1960 và 1970, *công nghệ lên men* đã phát triển thành một *ngành công nghiệp lớn* trên thế giới với doanh số gần trăm tỉ USD/năm.

Đầu những năm 1970, CNSH đã chuyển sang một giai đoạn mới cao hơn hẳn về chất nhờ KTDT. Các kĩ thuật mới cho phép tạo giống trực tiếp nhanh hơn, tận dụng nguồn gen từ nhiều sinh vật khác nhau để tạo các chủng sản lượng cao mà ít tốn công sức để phân lập và gây đột biến như trước đây. Nhờ đó, các vi sinh vật, các tế bào động vật và thực vật có thể được sử dụng như các "*nhà máy sinh học*" để sản xuất hàng loạt các protein người như insulin, interferon,... Các động vật và thực vật có thể trở thành *bioreactor tự nhiên* tạo các sản phẩm từ gen lạ đưa vào, không cần lai tạo và chọn lọc các biến dị bằng lai trong loài như trước đây.



Hình 1.10. Một góc nhà máy sản xuất kháng sinh bằng công nghệ lên men

Thuật ngữ CNSH gồm 2 vế ***công nghệ*** (technology) và ***sinh học*** (bio) :

– *Công nghệ* được hiểu theo ba khía cạnh. Thứ nhất, lúc ban đầu chủ yếu là *công nghệ lên men* (hình 1.10). Thứ hai, KTDT hay *công nghệ gen*. Thứ ba, CNSH là một *phạm trù sản xuất* có sự gắn kết chặt chẽ từ *nghiên cứu cơ bản* đến *tạo ra thương phẩm*.

– *Sinh học* gồm hai khía cạnh chủ yếu. Thứ nhất, là *các quá trình sinh* học. Thứ hai, là giới hạn *ở mức nhóm tế bào, tế bào* và *dưới tế bào*. Ví dụ, kĩ thuật *in vitro* (trong ống nghiệm) nuôi mô tế bào cây lúa hay nuôi hạt phấn lúa để chọn giống. Đa phần các quy trình sản xuất dùng vi sinh vật được kể là CNSH vì thực hiện ở mức tế bào.

Công nghệ sinh học *có thể hiểu đơn giản là công nghệ sử dụng các* ***quá trình sinh học*** *của* ***các tế bào*** *vi sinh vật, động vật và thực vật tạo ra* ***thương phẩm*** *phục vụ lợi ích con người.*

Đến nay, có thể phân biệt 3 loại :

– *CNSH truyền thống* (Traditional biotechnology).

– *CNSH hiện đại* (Modern biotechnology).

– *CNSH phân tử* (Molecular biotechnology) : CN gen và ứng dụng.

Sự ra đời của *Cách mạng sinh học mới* làm cho thuật ngữ *Công nghệ sinh học* trở nên thông dụng vào nửa sau của thập niên 70. Trước 1973, người ta thường dùng các từ *Vi sinh công nghiệp*, *Công nghệ lên men*, *Kĩ thuật sinh hoá*,... *Công nghệ sinh học* là một thuật ngữ *rất đạt*, đã bao hàm trong nó tất cả những tên đã gọi các lĩnh vực ứng dụng trước đây và với nội dung mới. Nó phản ánh những thành tựu hết sức to lớn của sự phát triển sinh học trong nhiều thập niên trước đó. *Cách mạng sinh học mới* cao hơn hẳn về chất so với *Cách mạng xanh* vào những năm của thập niên 1960.

Từ thuở sơ khai tới thời cổ đại La Mã Hi Lạp, khoa học là một hệ thống nhất. Đến thời Phục hưng, sự phát triển khoa học dẫn đến tách biệt nó thành các ngành và chuyên ngành. Điều này cũng thể hiện rõ trong sinh học cho đến nay. *Cách mạng sinh học mới* đã tạo ra các lĩnh vực đa ngành và hợp nhất các ứng dụng sinh học ở cấp độ tế bào và phân tử, đồng thời gắn liền với công nghệ, dưới tên gọi chung là CNSH và được coi là *quyền lực ghê gớm nhất mà loài người giành được kế từ sau thành tựu phân hạch nguyên tử*, hay được coi là *Bà hoàng của thế kỉ XXI*.

2. Các lĩnh vực của CNSH

Từ những năm 1970 đến nay, CNSH được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau và được phân loại theo các đối tượng hoặc ngành ứng dụng.

a) CNSH phân loại theo các đối tượng

– *Công nghệ sinh học phân tử* (Molecular biotechnology) gồm công nghệ gen và các ứng dụng kĩ thuật di truyền.

Sản phẩm : các protein, vaccine tái tổ hợp ; các chế phẩm dùng chẩn đoán và trị liệu ; các vi sinh vật, động thực vật chuyển gen ; ...

– *Công nghệ sinh học protein và enzyme* (Biotechnology of proteins and enzymes).

Sản phẩm :

+ Các protein của máu ; vaccine và kháng thể ; hormone và nhân tố tăng trưởng ; interferon, interleukin ; protein dùng cho phân tích ; protein không xúc tác ;...

+ Các enzyme công nghiệp (industrial enzymes) như protease, amylase, pectinase;... ; các enzyme cố định (immobilized enzymes) ; các enzyme từ vi sinh vật cực đoan (extremophiles) ; ...

+ *Cảm biến sinh học* (biosensor).

– *Công nghệ sinh học vi sinh vật* (Microbial biotechnology).

Sản phẩm : các loại thực phẩm lên men cổ truyền (rượu, bia, fromage, tương, chao ...), các enzyme, các acid hữu cơ, các amino acid, các thuốc kháng sinh, các biopolymer,...hay sinh khối tế bào vi sinh làm nguồn protein, kể cả nấm trồng....

– *Công nghệ sinh học thực vật* (Plant biotechnology).

Sản phẩm : Các cây vi nhân giống trong ống nghiệm (*in vitro*), các dòng tế bào từ nuôi hạt phấn, các dòng tế bào thực vật được nuôi *in vitro* ứng dụng trong nhân và chọn giống,...

– *Công nghệ sinh học động vật* (Animal biotechnology).

Sản phẩm : Các interferon, hormone chiết tách từ nuôi tế bào động vật, vaccine virus, các kháng thể đơn dòng, các tế bào gốc (stem cell) được nuôi tạo dòng (cloning) động vật, kĩ thuật mô tế bào, chẩn đoán nhanh đực cái, chuyển phôi ghép phôi,...

b) CNSH gọi theo các lĩnh vực kinh tế xã hội

Căn cứ các lĩnh vực kinh tế xã hội, CNSH gồm chủ yếu :

– *Công nghệ sinh học y học* (Medical biotechnology).

– *Công nghệ sinh học thực phẩm* (Food biotechnology).

– *Công nghệ sinh học năng lượng* (Energetic biotechnology).

– *Công nghệ sinh học trong hoá học và vật liệu* (Biotechnology in chemistry and materials).

– *Công nghệ sinh học nông nghiệp* (Agricultural biotechnology).

– *Công nghệ sinh học môi trường* (Environmental biotechnology).

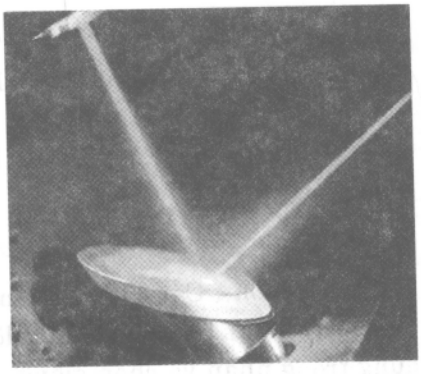
Ngoài những lĩnh vực này, nhiều hướng nghiên cứu chuyên sâu về nhiều vấn đề đã hình thành như CNSH hương liệu (Aroma biotechnology), CNSH khoáng chất (Mineral biotechnology),...

3. Bản chất đa ngành của công nghệ sinh học

Thường mỗi ngành KHCN có mối liên hệ với một số ngành khác. Tuy nhiên, mối quan hệ này của CNSH rất rộng và là một đặc điểm mà ngay trên biểu tượng về bộ gen người có nêu các ngành có liên quan như : *Sinh học, Vật lí học, Hoá học, Đạo đức học* (Ethics), *Kĩ thuật chế tạo* (Engineering) *và Tin học*. Mối liên hệ này còn thể hiện ngay giữa các chuyên ngành sinh học.

a) Sự hỗ trợ của khoa học và kĩ thuật

Những thành tựu rực rỡ của sinh học không thể tách rời *các tiến bộ kĩ thuật do vật lí và hoá học, tin học* đem lại. Đó là *kính hiển vi điện tử, máy siêu li tâm, kĩ thuật đánh dấu đồng vị phóng xạ* các phân tử, *điện di (electrophoresis), sắc kí ái lực (affinity chromatography)* có thể tách những phân tử phức tạp như các kháng thể đơn dòng, *điện định vị hai chiều (bidimensionel electrofocalisation)* cho phép phân tích cùng lúc đến 50000 loại protein của tế bào, *vi phân tích (micro-analysis)* giúp xác định cấu trúc bậc một của protein chỉ với vài nanogram chất hay phân tích các polysaccharide gắn với protein trong các glucoprotein.



Hình 1.11. Dùng tia laser đọc kết quả phân tích

Nhiều phương pháp vật lí, hoá học hiện đại như sử dụng tia laser (hình 1.11), *cộng hưởng từ hạt nhân* (NMR: Nuclear magnetic resonance), *khối phổ*

(Mass spectroscopy), phân tích tinh thể protein và cấu trúc bộ gen bằng tia X (X-ray cristallography) đã được sử dụng phổ biến.

Các máy tự động ra đời rút ngắn đáng kể thời gian nghiên cứu.

b) Sự gắn kết các môn sinh học cơ bản

Càng đi sâu vào các cơ chế phân tử, sự sống càng có nhiều biểu hiện giống nhau, dẫn đến *sự thống nhất các lĩnh vực khác nhau của sinh học*. Những thành tựu của Sinh học phân tử, Di truyền học, Hoá sinh học, Vi sinh vật học, Sinh học tế bào,... đã dẫn đến sự ra đời của CNSH. Đồng thời, sự phát triển của CNSH đã làm giàu thêm kiến thức trong các bộ môn này và mở rộng ứng dụng cả về chiều rộng lẫn chiều sâu.

Thêm vào đó, sự phát triển của nhiều kĩ thuật chuyên ngành mới đã góp phần tích cực tạo nên diện mạo đa dạng của CNSH như *kĩ thuật tái tổ hợp DNA, xúc tác sinh học* (biocatalysis), *nuôi cấy mô tế bào động vật và người, kĩ thuật* tạo *kháng thể đơn dòng* (hybridomas), *nuôi cấy mô và tế bào thực vật, kĩ thuật lên men quy mô lớn, chuyển hoá sinh học* (biotransformation), *chế biến* và *xử lí các chất phế thải, kĩ thuật hoá điện sinh học* (Bioelectrochemistry).

Một định nghĩa cho thấy rõ mối liên hệ đa ngành : *CNSH là một tập hợp các ngành khoa học và công nghệ (Sinh học phân tử, Di truyền học, Vi sinh vật học, Sinh hoá học và Công nghệ học) nhằm tạo ra các quy trình công nghệ khai thác ở quy mô công nghiệp các hoạt động sống của vi sinh vật, tế bào thực vật và động vật để sản xuất ra các sản phẩm có giá trị phục vụ đời sống, phát triển kinh tế xã hội và bảo vệ môi trường.*

4. Sự thống nhất giữa nghiên cứu cơ bản và ứng dụng

L. Pasteur (1871) đã nói : *"Không và nghìn lần không, tôi chưa biết một khoa học nào mà có thể gọi nó là ứng dụng. Có khoa học và có các lĩnh vực ứng dụng của nó và chúng liên quan với nhau như các quả gắn với cây mọc lên tạo ra nó"*. Nghĩa là bất kì một ngành khoa học nào cũng phải có nghiên cứu cơ bản để dẫn đến ứng dụng. Bản thân sự phát triển CNSH thể hiện rất rõ mối liên hệ hữu cơ này.

Ví dụ : Kĩ thuật di truyền ra đời nhờ các nghiên cứu cơ bản giúp hiểu rõ cắt, nối và tổng hợp DNA như thế nào, các plasmide tồn tại và sinh sản độc lập nhờ cơ chế gì, ... và nhiều kiến thức khác nữa.

Hơn thế nữa, các nghiên cứu phải gắn liền với *công nghệ* và cuối cùng là *thương phẩm*.

III. CÔNG NGHỆ SINH HỌC RA ĐỜI LÀ MỘT TẤT YẾU LỊCH SỬ

Ngay từ thập niên 70, cuộc *cách mạng công nghiệp lần II* đã bộc lộ rõ nhiều nhược điểm và nhân loại đứng trước những thách thức to lớn : các khủng hoảng tăng dân số, môi sinh, năng lượng. *Cách mạng sinh học mới* có nhiều ưu thế, đem đến nhiều niềm hi vọng mới, hứa hẹn giải toả nhiều tai hoạ cho nhân loại.

1. CNSH ra đời phù hợp quy luật tự nhiên

Cho đến nay, con người liên tục khai thác thiên nhiên nhưng chưa lường được các hậu quả và sự khủng hoảng toàn cầu. Các cuộc khủng hoảng toàn cầu đó làm cho con người có ý thức hơn bao giờ hết về *bảo tồn thiên nhiên và sinh quyển*. Các biện pháp sản xuất bằng CNSH có nhiều ưu điểm như : *tiêu tốn ít năng lượng, ít gây ô nhiễm, tận dụng sự phân huỷ sinh học* và mang lại *nhiều lợi ích cùng lúc*.

CNSH thực sự là cơ sở cho sự phát triển nông nghiệp bền vững vì nó phù hợp với quy luật tự nhiên, không gây mất cân bằng sinh thái.

2. CNSH khai thác và tận dụng khả năng của tế bào

Tế bào là đơn vị cơ sở của sự sống, có cấu tạo vật chất hết sức phức tạp tinh vi, có các biểu hiện nhanh nhạy chính xác để đáp lại những thay đổi của môi trường. *Nhiều cấu trúc, phản ứng, cơ chế của hoạt động sống tinh vi, chính xác và hoàn thiện hơn rất nhiều so với các quy trình công nghiệp* mà loài người đang sản xuất.

Xu hướng mới nhất hiện nay trong chữa trị bệnh là dùng *tế bào gốc* thay thế tế bào bệnh và như vậy khỏi dùng một loại thuốc nào đó cả đời.

Các tiến bộ sinh học cho phép *sử dụng một cách chủ động* và *có điều khiển* các quá trình sinh học. Việc sử dụng trực tiếp các hệ thống sinh học vào những quy trình sản xuất là *phương thức tối ưu*.

3. Các công nghệ khác so với công nghệ sinh học

a) Tổng hợp hoá học so với sinh tổng hợp

	Tổng hợp hoá học	*Sinh tổng hợp*
1	Tổng hợp và tinh sạch qua nhiều bước.	Phản ứng nối tiếp không cần tinh sạch qua từng công đoạn.
2	Cơ chất thường dùng từ nguyên liệu cổ sinh.	Đường đơn.

3	Triền quang hoá (Racemization)* thường phải có để tạo isomer.	Các stereoisomer có hoạt tính quang học đúng nhu cầu cơ thể.
4	Nhiều sản phẩm phụ có thể được tạo ra.	Hoạt tính xúc tác của enzyme có tính đặc hiệu cao.
5	Không xem là sản phẩm tự nhiên.	Sản phẩm tự nhiên.

Triền quang hoá (Racemization)* có nghĩa làm phân tử quay phải hoặc trái.

b) Chất chiết xuất từ thực vật so với tổng hợp do vi sinh vật

	Nguồn thực vật	*Tổng hợp do vi sinh vật*
1	Nồng độ thấp.	Nồng độ do chọn giống*.
2	Chiết xuất đắt giá.	Cải tiến thu hồi chiết xuất hiệu quả và sản lượng cao.
3	Thay đổi theo mùa.	Không phụ thuộc mùa.
4	Sản phẩm đặc hiệu đối với một số kiểu mô tế bào. Ví dụ : sắc tố của quả.	Sản phẩm không đặc hiệu đối với một số mô tế bào.
5	Phải có chính sách cung cấp nguyên liệu ổn định như quy hoạch vùng.	Nguồn nguyên liệu rẻ tiền, thường là phụ phế liệu.

*. Ví dụ, trước đây sản xuất *citric acid* từ nước ép trái chanh, để có 1 tấn cần 30 – 40 tấn chanh quả trồng trên 2,7ha. Sản xuất bằng lên men do *Aspergillus niger* (năng suất >90%) thì cần 3 tấn rỉ đường (40% chất khô) có thể thu được 1 tấn citric acid.

4. Các sản phẩm đặc hiệu của công nghệ lên men

Trên thực tế, nhiều chế phẩm CNSH được sản xuất với số lượng lớn :

– Antibiotics : penicillin, tetracycline,...

– Amino acid : MSG, lysine ...

– Steroids : 11 α-hydroxylation của steroid, Vitamin C,..

– Pesticides.: Bào tử của BT (*Bacillus thuringiensis*).

– Hoá chất số lượng lớn : ethanol nhiên liệu, citric acid, ...

– Các enzyme : protease, glucose isomerase, amylase,...

– Các vitamin : riboflavin (B_2), vitamin B_{12},...

– Các nucleotide : 5'IMP, 5'GMP,...

– Polysaccharides : xanthan, cellulose vi khuẩn,...

– Vaccine các loại.

Trong xu hướng phát triển *Hoá học xanh* (Green chemistry) thì nhiều quy trình công nghệ hoá học sẽ được thay thế bằng CNSH.

IV. SƠ LƯỢC LỊCH SỬ PHÁT TRIỂN CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CNSH có lịch sử hình thành từ lâu. Từ thuở xa xưa, tuy chưa biết về các vi sinh vật, nhưng loài người đã biết sử dụng chúng trong các thực phẩm lên men cổ truyền.

Các loại rượu, bia, giấm,...là những thực phẩm được sử sách ghi nhận từ nhiều nghìn năm trước đây và có nhắc đến trong kinh thánh. Ở Trung Đông, Ai Cập có di tích ghi nhận con người đã biết làm bia từ cách nay hơn 6000 năm. Nhiều thế kỉ trước Công nguyên, ở Trung Quốc, Hi lạp, La Mã, rượu đã phổ biến trong các bữa tiệc, thậm chí đã suy tôn *Thần rượu vang Dyonisos* (hình 1.12).

Hình 1.12. Thần rượu vang *Dyonisos*

1. Những giai đoạn phát triển của CNSH trên thế giới

Mãi đến cuối thế kỉ XIX, những *cơ sở khoa học đầu tiên của sự lên men* mới được nêu ra. Ngày nay, có nhiều người coi nhà di truyền học *G. Mendel* và nhà vi sinh học *L. Pasteur* là những người đặt nền móng đầu tiên cho CNSH. Sự phát triển của CNSH có thể được chia ra *5 giai đoạn* :

– *Giai đoạn trước Pasteur (đến 1865).*

– *Giai đoạn phát triển công nghiệp lên men (Industrial fermentation) (1866 – 1940).*

– *Giai đoạn công nghiệp kháng sinh và hoá chất (1941 – 1960).*

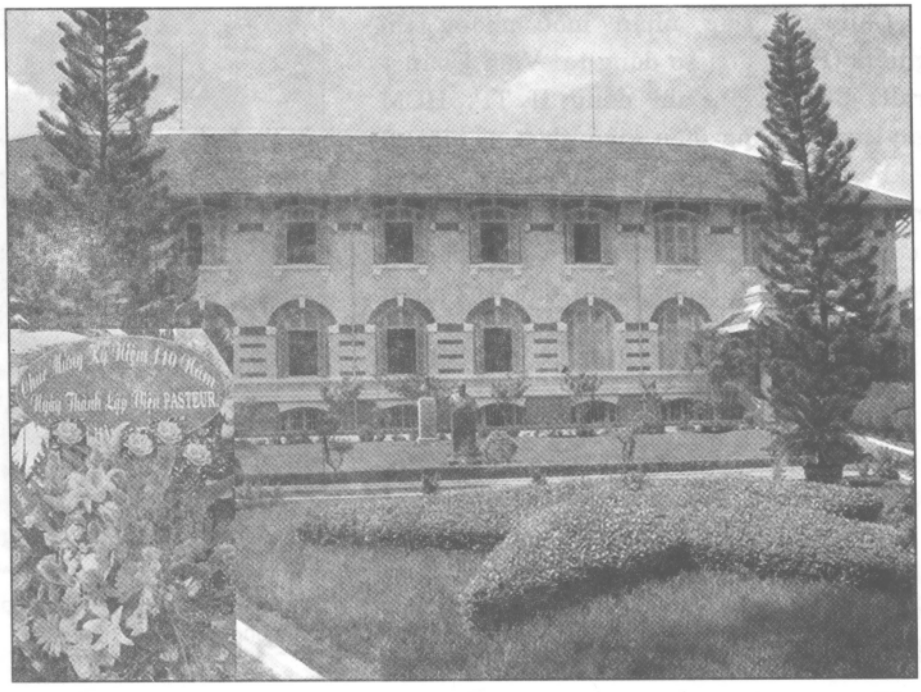
– *Giai đoạn sinh tổng hợp điều khiển (1961 – 1975).*

– *Giai đoạn công nghệ sinh học phân tử (1976 – đến nay).*

2. Những mốc phát triển của CNSH ở nước ta

a) Những khai phá đầu tiên đáng tự hào

Viện Pasteur Sài Gòn là cái nôi của CNSH Việt Nam, là Viện thứ hai trên thế giới sau Viện ở Paris, được thành lập năm 1891, và năm 2001 vừa qua đã kỉ niệm 110 năm ngày ra đời (hình 1.13).



Hình 1.13. Viện Pasteur Tp HCM ngày nay
Phía xa là tượng Louis Pasteur và A. Calmette.
Ảnh nhỏ góc trái là vòng hoa mừng 110 năm Viện Pasteur Sài Gòn

Louis Pasteur (hình 1.14) đã quyết định thành lập chi nhánh đầu tiên ngoài nước Pháp của Viện gốc Paris, đã giao trách nhiệm ấy cho một trong những đồ đệ đầu tiên của ông là bác sĩ ***Albert Calmette*** (hình 1.15) làm giám đốc đầu tiên của Viện Pasteur Sài Gòn, và sau này bác sĩ ***Alexandre Yersin*** là giám đốc thứ hai (hình 1.16). A. Calmette nhận ngay nhiệm vụ, tháng 2/1891 đáp bến Sài Gòn, lúc ấy mới 27 tuổi.

Hình 1.14. Tượng L. Pasteur ở Viện Sài Gòn

Hình 1.15. Tượng A. Calmette

Hình 1.16. A. Yersin

Calmette tiếp nhận một phòng thí nghiệm (PTN) đơn sơ đóng tại Viện Quân y Grall (Bệnh viện nhi đồng II TP. HCM ngày nay). Trong điều kiện chưa ai biết gì về khoa học vi trùng, A. Calmette phải vật lộn với bao nhiêu khó khăn vật chất như chưa có điện, khí cụ, hoá chất và tất cả đều phải gửi từ Pháp sang, phải đào tạo nhân viên kĩ thuật đáp ứng những yêu cầu nghiêm ngặt của vi trùng học.

Hình 1.17. Bác sĩ Calmette (bên phải) đang cho rắn hổ mang ăn

Calmette ở lại Sài Gòn không đầy 3 năm và ông đã thực hiện một khối lượng lớn công việc từ sản xuất *vaccine đậu mùa* và *chống dại* trong điều kiện tại chỗ, đến nghiên cứu về bệnh lí nhiệt đới, về *men làm rượu* nếp, về tẩy sạch nước uống cho thành phố.

Và bước đầu triển khai công trình làm *huyết thanh chống nọc rắn hổ mang*, một công trình được cả thế giới hoan nghênh (hình 1.17). Nếu mọi người biết Calmette là *người đã sáng tạo ra BCG,* cũng đừng quên ông là *người đã sáng lập ra* ***Viện Pateur*** Sài Gòn.

Vào giữa năm 1893, Calmette bị kiết lị nặng phải rời bỏ Sài Gòn và tiếp nối ông là A. Yersin, vừa là bác học vừa là một nhà thám hiểm đã phát hiện ra Cao nguyên Lâm Đồng và vi khuẩn Dịch hạch (1894), ông cũng là *người sáng lập Viện Pasteur Nha Trang* chuyên về Thú y.

Năm 1925, Viện Pasteur Hà Nội được thành lập ; 1936, Viện Đà Lạt và toàn bộ các Viện Pasteur Đông Dương được đặt dưới sự chỉ đạo của Paris để bảo đảm cho chất lượng và uy tín của các công trình khoa học.

CNSH Việt Nam có *may mắn lớn* là được đặt nền móng bởi những nhà khoa học nổi tiếng thế giới, về nhân cách thì mọi người phải cúi đầu bái phục và về hiệu quả công việc thì thật tuyệt vời. Không phải ngẫu nhiên mà tên *đường Pasteur, Calmette, Yersin* lại quen thuộc với người dân Hà Nội, TP. HCM, Nha Trang, Đà Lạt,..., trong khi số đường phố ở Việt Nam mang tên người nước ngoài chỉ trên dưới con số 5. Thật vinh dự biết bao cho CNSH Việt Nam ! Mong rằng hào quang sáng chói của những bậc khai phá luôn là bạn đồng hành của các nhà CNSH Việt Nam hôm nay và mai sau.

Nhà máy rượu Sài Gòn ra đời năm 1887, mở đầu cho *Công nghiệp Sinh học ở Việt Nam.*

b) Những thành tựu trong giai đoạn 1945 – 1954

Trong những năm 1945 – 1954, ở vùng kháng chiến, các nhà khoa học đối đầu với bom đạn, với những trận càn quét nhưng vẫn vượt muôn ngàn khó khăn để sản xuất hàng triệu liều vaccine, huyết thanh và bảo vệ được sức khoẻ của nhân dân. Năm 1949, BS Nguyễn Văn Hưởng (hình 1.18) ở vùng kháng chiến đã sản xuất vaccine chống đậu mùa, tả, thương hàn ; làm các loại xét nghiệm. Tất cả đều làm dưới những mái nhà tranh mà hễ báo động lại phải dời chỗ. Thật là kì diệu, phải bao nhiêu công sức, sáng kiến mới sản xuất quy mô lớn trong *hoàn cảnh bưng biền* mà vẫn tôn trọng những yêu sách nghiêm ngặt về vi trùng học. Bác sĩ Hưởng đã đào tạo nhiều kĩ thuật viên, lập ra nhiều đội vệ sinh đi các vùng tiêm chủng, hướng dẫn vệ sinh, gây ra một phong trào lớn rộng.

Hình 1.18. BS. Nguyễn Văn Hưởng (1906-1998)

Hình 1.19. GS. BS. Đặng Văn Ngữ

Sự kiện thứ hai đáng ghi vào lịch sử CNSH VN là vào năm 1950 đã thử nghiệm nuôi cấy nấm *Penicillium* để làm thuốc rửa vết thương trong kháng chiến của GS. BS. Phạm Ngọc Thạch và GS. BS. Đặng Văn Ngữ (hình 1.19). BS. Đặng Văn Ngữ trực tiếp sản xuất dịch thô penicillin ở chiến khu Việt Bắc mà hình ảnh được ghi lại bởi những đoạn phim quý giá của đạo diễn Liên Xô R. Carmen trong *phim "Việt Nam".*

Sự nghiệp khoa học của ông thật phong phú và toàn diện, bao gồm nhiều lĩnh vực : đào tạo cán bộ y tế các cấp, nghiên cứu khoa học, xây dựng bộ môn Sinh vật học và Kí sinh trùng của Trường đại học Y Hà Nội, xây dựng Viện sốt rét-kí sinh trùng và côn trùng, tổ chức chỉ đạo công tác tiêu

diệt bệnh sốt rét trên toàn miền Bắc. Ông không sợ chiến tranh ác liệt và đã trực tiếp đi vào chiến trường miền Nam để nghiên cứu kí sinh trùng sốt rét và đã hi sinh trên đường làm nhiệm vụ vào năm 1967.

BS. Hưởng và BS. Ngữ là những người VN nêu tấm gương sáng về tài năng và tinh thần hiến dâng cho sự nghiệp khoa học. Ngày nay, ở TP.HCM và một số tỉnh thành khác có những con đường mang tên hai ông. Đó cũng là một vinh dự cho CNSH Việt Nam.

c) Giai đoạn 1955 đến nay

Kể từ ngày miền Bắc giải phóng là 50 năm và từ ngày thống nhất đất nước là 30 năm đã trôi qua, CNSH VN đã phát triển rất mạnh về lực lượng với sự đa dạng các lĩnh vực nghiên cứu và đào tạo. Không ít cán bộ được đào tạo ở nước ngoài. Tuy nhiên, những thành tựu thể hiện qua các ứng dụng cụ thể thì quá khiêm nhường, phần lớn lặp lại những công việc của nước ngoài đã làm. Có thể ghi nhận một số sự kiện như sau :

– *Công nghiệp vaccine* là lĩnh vực đạt hiệu quả cao nhất. Công ti vaccine và chế phẩm sinh học I Hà Nội và Viện vaccine và chế phẩm sinh học Nha Trang đã sản xuất đủ lượng để đáp ứng nhu cầu về vaccine phòng bệnh hằng năm ở nước ta : vaccine viêm gan B (trên 4000000 liều), vaccine viêm não Nhật Bản (trên 3000000 liều), vaccine tả uống (1400000 liều), vaccine dại (150000 liều) và các loại khác như BCG (Viện Pasteur TP.HCM), DPT (thương hàn, ho gà, uốn ván),...

– *Công nghiệp rượu bia* tiếp tục phát triển từ thời Pháp.

– Trong những năm của thập niên 1960 : nhập nhà máy sản xuất bột ngọt (mì chính) và phát triển mạnh ở các tỉnh phía Nam. Thời mở cửa từ 1996, nhiều công ti liên doanh như Ajino-moto, Vedan,... đã xây dựng các nhà máy bột ngọt, nhiều nhà máy bia liên doanh.

– Từ năm 1995, các kĩ thuật của CNSH hiện đại như lập bản đồ gen, chẩn đoán phân tử, chuyển gen động và thực vật, vi sinh vật tái tổ hợp, vaccine tái tổ hợp được bắt đầu nghiên cứu tại các Viện và nhiều Trường đại học.

CNSH là lĩnh vực công nghệ cao được nhà nước ta ưu tiên phát triển. Nghị quyết 18/CP của Thủ tướng chính phủ khẳng định : *Cùng các ngành công nghệ mũi nhọn khác (công nghệ thông tin, công nghệ tự động hoá và công nghệ vật liệu mới), công nghệ sinh học sẽ góp phần khai thác tối ưu các nguồn lực của đất nước phục vụ phát triển sản xuất, nâng cao chất lượng cuộc sống của nhân dân và chuẩn bị những tiền đề cần thiết về mặt công nghệ cho đất nước tiến vào thế kỉ XXI.*

3. Thế kỉ CNSH là một tất yếu lịch sử

Năm 1989, ông Covalchenko – Viện sĩ Viện hàn lâm khoa học Liên Xô chuyên về *tư liệu lịch sử* có nhận xét về xu hướng phát triển khoa học như sau : *"Thế kỉ XX là thế kỉ của vật chất vô sinh, thế kỉ XXI là thế kỉ hữu sinh (sinh vật), thế kỉ XXII là thế kỉ con người, thế kỉ XXIII là thế kỉ hoạt động cá thể của con người,..."*.

Quả đất của chúng ta được hình thành từ những đám bụi vũ trụ cách nay 4,6 tỉ năm và đã diễn ra 3 quá trình tiến hoá :

– *Tiến hoá nguyên tử* hay vật lí kéo dài 1 tỉ năm đầu.

– *Tiến hoá hoá học* khởi sự từ 0,5 tỉ năm đầu, kéo dài 1,5 tỉ năm.

– *Tiến hoá sinh học* bắt đầu từ 3,5 tỉ năm trước, kéo dài cho đến nay và với sự xuất hiện loài người đã chuyển sang *tiến hoá xã hội*. Sự sống là bước phát triển cao hơn của tiến hoá và phức tạp hơn rất nhiều so với các quá trình vật lí và hoá học.

Thế kỉ XX được coi là *Thế kỉ vật lí học* mà đỉnh cao ứng dụng là chế tạo thành công bom nguyên tử, chinh phục không gian vũ trụ, công nghệ thông tin, tự động hoá, vật liệu mới, công nghệ nano,... Cùng với đà phát triển như vũ bão của các KHCN đó, *Sinh học* đã thu được những thành tựu sáng chói để vững bước tiến vào *Thế kỉ công nghệ sinh học*.

Mặc dù chúng ta đang sống trong một *kỉ nguyên thịnh vượng* và *công nghệ phát triển vượt bậc chưa từng thấy trong lịch sử*, nhưng nhiều thách thức gay gắt đang đặt ra cho loài người.

– *Duy trì mạng sống con người :* Nhiệm vụ hàng đầu của CNSH là giải quyết vấn đề mạng sống mà mỗi con người đều phải trải qua là *sinh, lão, bệnh, tử*. CNSH đang tập trung nỗ lực tìm các loại thuốc hiệu nghiệm chữa khỏi các bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS,.... Thuốc cho mọi người sống mạnh khoẻ hơn : cho người trung niên, người già. *Y học cá thể hoá* sẽ phát triển mạnh và biện pháp *dự phòng* cho mỗi người kháng được bệnh sẽ là xu hướng chủ yếu của Y học thế kỉ XXI.

– *Đói và no quá mức :* Hiện vẫn còn có 800 – 850 triệu người bị suy dinh dưỡng, trong đó có hơn 200 triệu trẻ em, và rất nhiều trẻ trong số này sẽ không bao giờ phát triển đầy đủ những năng lực trí tuệ và thể chất của mình. Ngoài ra, 1 đến 1,5 tỉ người thường không có được những bữa ăn cân đối với lượng chất dinh dưỡng theo yêu cầu.

Một mặt CNSH phải giải quyết nạn đói, mặt khác làm giảm số người béo phì đang gia tăng trên thế giới (khoảng 300 triệu năm 1995), đến mức ở

Mĩ mới đây đã chính thức coi là một bệnh. CNSH phải đối đầu với hai thái cực : gia tăng lương thực thực phẩm để khắc phục nạn đói ; đồng thời tạo các chế phẩm mới thay thế thức ăn truyền thống như các chất ngọt thay đường để ăn không tích mỡ, lipid ăn không làm béo,...

Ngoài ra, CNSH phải thoả mãn yêu cầu ngày càng cao hơn đối với thực phẩm : không những an toàn cho người tiêu dùng hiện nay, mà cho cả thế hệ con cháu mai sau.

– *Nhu cầu năng lượng* hiện nay rất cấp thiết và ngày càng gay gắt hơn khi dự báo nguồn năng lượng tái sinh sẽ cạn kiệt vào những năm 2050 – 2060. CNSH đang tập trung nỗ lực để biến nguồn sinh khối thực vật (như gỗ rừng, phụ phế liệu nông nghiệp,...) khổng lồ trên Trái đất thành nhiên liệu tiện dụng như cồn ethanol thay xăng dầu. Ngoài ra, hydrogen là nguồn năng lượng lí tưởng, mà sản xuất hydrogen sinh học hứa hẹn là nguồn năng lượng rẻ tiền, an toàn và không gây ô nhiễm.

– *Cải thiện môi trường sống :* Sự phát triển công nghiệp và khai thác tài nguyên quá độ đã gây những hiểm hoạ môi trường như vấn đề khí thải làm khí quyển nóng lên. CNSH phải gia tăng các quy trình công nghệ ít gây ô nhiễm hoặc thay thế quy trình có hại như sản xuất *hoá chất xanh* (green chemicals) hay các *vật liệu chịu phân huỷ sinh học*. Đồng thời tìm các biện pháp khắc phục ô nhiễm và *bồi hoàn sinh học* (bioremedation) như xử lí nước thải, phân huỷ các *chất dị sinh* (xenobiotic).

Sinh học thế kỉ XX đã đặt bệ phóng vững chắc và nâng lên tầm cao mới cho sự phát triển *Sinh học* và *Công nghệ Sinh học* trong thế kỉ XXI. Kể từ thuở hoang sơ, khi con người còn thu nhặt hái lượm, chưa bao giờ con người hiểu biết về cơ thể mình sâu sắc như hiện nay, chưa bao giờ con người có quyền lực ghê gớm như hiện nay trong cải biến thiên nhiên phục vụ cho mình. *Công nghệ Sinh học* trong thế kỉ XXI sẽ *góp phần tích cực khắc phục những thách thức* nêu trên và đó cũng là một *tất yếu lịch sử* của sự phát triển KHCN của nhân loại.

Do vậy, tất cả các quốc gia đều hi vọng tìm thấy cơ hội mới để vươn lên trong CNSH và đều có Chiến lược quốc gia phát triển CNSH.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Loài người đang sống trong thế kỉ CNSH. Sinh học thế kỉ XX đã phát triển một cách vượt bậc trên tất cả các lĩnh vực và đạt được những thành tựu có tính cách mạng như *phát minh mô hình chuỗi xoắn kép DNA, kĩ thuật di truyền,...* làm bùng nổ *cuộc cách mạng mới* thống nhất các ứng dụng ở cấp độ tế bào và phân tử với tên gọi chung là *Công nghệ sinh học*. Nó khẳng định vai trò hàng đầu trong cải thiện chất lượng cuộc sống con người bằng kĩ thuật cao. Đồng thời, nó có mối liên quan tương hỗ, chặt chẽ với các ngành khoa học mũi nhọn khác như tin học, công nghệ nano, vật liệu mới,... và là một bộ phận của nền kinh tế tri thức.

Có nhiều lĩnh vực CNSH khác nhau theo đối tượng như CNSH phân tử, CNSH protein và enzyme, CNSH vi sinh, CNSH thực vật và CNSH động vật.. CNSH có ứng dụng rộng rãi trong y dược, lương thực thực phẩm, năng lượng, hoá chất, vật liệu mới, nông lâm ngư nghiệp và bảo vệ môi sinh.

Ứng dụng CNSH có nhiều lợi thế : phù hợp quy luật tự nhiên, tận dụng khả năng tế bào và nhiều sản phẩm đặc hiệu phổ biến rộng trên thị trường.

CNSH VN ra đời vào thập niên cuối thế kỉ XIX với Viện Pasteur Sàigòn và những tên tuổi sáng chói như L.Pasteur, A. Calmette và A. Yersin. Thời kháng chiến 1945 – 1954, các vaccine và dịch thô penicillin là những sản phẩm huyền thoại góp phần vào thắng lợi chung, tên tuổi của các anh hùng BS. Nguyễn Văn Hưởng và GS. BS. Đặng Văn Ngữ cũng đi vào lịch sử.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao nói thế kỉ CNSH là một tất yếu lịch sử ?

2. Kĩ thuật di truyền có vai trò cách mạng hoá như thế nào ?.

3. Phát minh nào làm cho nhân bản người có thể thành hiện thực ?

4. Vì sao nói việc công bố *Bộ gen người* là một cột mốc lịch sử ?

5. CNSH có vai trò gì trong cải thiện chất lượng cuộc sống con người ?

6. CNSH có mối quan hệ như thế nào với các ngành KHCN mũi nhọn khác ?

7. Vì sao nói CNSH là một bộ phận của nền kinh tế tri thức ?

8. Thuật ngữ CNSH được hiểu như thế nào ?

9. Xét theo đối tượng ứng dụng, có những loại CNSH nào ?

10. Xét theo các lĩnh vực kinh tế xã hội, có những loại CNSH nào ?

11. Hãy phân tích cho thấy ứng dụng CNSH phù hợp với quy luật tự nhiên ?

12. Sinh tổng hợp của CNSH có những lợi điểm gì so với tổng hợp hoá học ?

13. Công lao của Calmette và Yersin như thế nào ?

14. Trong kháng chiến 1945 – 1954, công trình CNSH nào sáng giá nhất ?

15. Bạn rút ra được bài học gì từ sự phát triển của CNSH Việt Nam ?

CHƯƠNG II

TẾ BÀO LÀ CÔNG CỤ SẢN XUẤT VÀ THỬ NGHIỆM CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hầu hết các cơ thể sinh vật, kể cả con người đều có *cấu tạo tế bào*. Ngày càng sáng tỏ rằng tế bào thực sự là một *nhà máy tí hon*, trong các cấu trúc tinh vi của nó diễn ra vô số phản ứng enzyme dưới sự kiểm soát chính xác về không gian và thời gian, có sự điều hoà hợp lí và hài hoà. Tế bào thực hiện các công việc mà những *kĩ sư tài giỏi nhất vẫn chưa bắt chước được*.

Tế bào là đối tượng trung tâm của CNSH. Chúng là *công cụ sản xuất căn bản* để tạo ra hàng loạt sản phẩm như ethanol, amino acid, các enzyme, plastic phân hủy sinh học, vaccin,... ; chúng còn được *nuôi để trị bệnh* hay sản sinh ra *cơ quan thay thế* cho cơ thể người ; chúng còn là *"phòng thí nghiệm" sống* để thử nghiệm thuốc hoặc nghiên cứu sự tương tác giữa các protein. Trong tương lai không xa, các tín hiệu từ tế bào thần kinh có thể được khai thác để vận hành các máy điện toán hay những hệ thống khác.

I. CÁC PHÂN TỬ

1. Các nguyên tố trong cơ thể sống

Sự hoàn hảo về mặt hoá học trong tế bào sống thể hiện ngay trong thành phần cấu tạo từ các nguyên tố vốn có trong thiên nhiên. Trong *92* nguyên tố của thiên nhiên *chỉ 25 nguyên* tố có trong các cơ thể sinh vật.

Sự khác nhau của các cơ thể sống với vật thể vô sinh thể hiện ở *tỉ lệ các nguyên tố* tham gia cấu tạo nên chúng. *H, O, C và N* chiếm hơn *96%* thành phần tế bào. Trong bảng tuần hoàn các nguyên tố, chúng là những nguyên tố *nhẹ nhất, bé nhất* của mỗi nhóm (*H đầu nhóm I, C đầu nhóm IV, N đầu nhóm V* và *O đầu nhóm VI*). Đáng chú ý là lớp điện tử của chúng như sau : H_1, O_{2+6}, N_{2+5} *và* C_{2+4}, nên tương ứng chúng có các *liên kết hoá trị (H = 1, O = 2, N = 3 và C = 4)* và có khả năng tạo *liên kết đơn* hoặc *đôi*. Riêng C có thể tạo thành *liên kết ba* với N (– C ≡ N) hoặc giữa C với nhau. Đặc biệt quan trọng là nguyên tố C có khả năng tác dụng với nhau tạo liên kết cộng hoá trị bền vững (– C – C –).

Các nguyên tố có rất ít (< 0,01%) như I, Co,... là *vi lượng* hay *vi tố*.

Mỗi nguyên tố, thậm chí là *dấu vết*, đều có vai trò thiết yếu cho sự sống tế bào. Điều đáng kinh ngạc là tế bào *hấp thu* và *sử dụng* các nguyên tố một cách *tinh vi* và *chính xác*. Ví dụ, Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) ghi nhận sự thiếu sắt (Fe) của cơ thể biểu hiện ở 30% dân số toàn cầu (chủ yếu ăn gạo) gây bệnh thiếu máu. Vấn đề là ở chỗ : tế bào có cơ chế *hấp thu sắt*, đồng thời cũng có biện pháp *chống dư thừa sắt*. Trong gạo không thiếu sắt, nhưng khi nấu chín *enzyme phytase* của lúa bị hỏng nên không phá huỷ *phytic acid* là chất ngăn cản hấp thu sắt của cơ thể. CNSH phải dùng các biện pháp đặc biệt để khắc phục khiếm khuyết này của gạo bằng cách chuyển 3 gen (có gen tạo phytase chịu nhiệt) để tạo được giống lúa mà ăn gạo của nó không bị thiếu sắt.

2. Các chất vô cơ

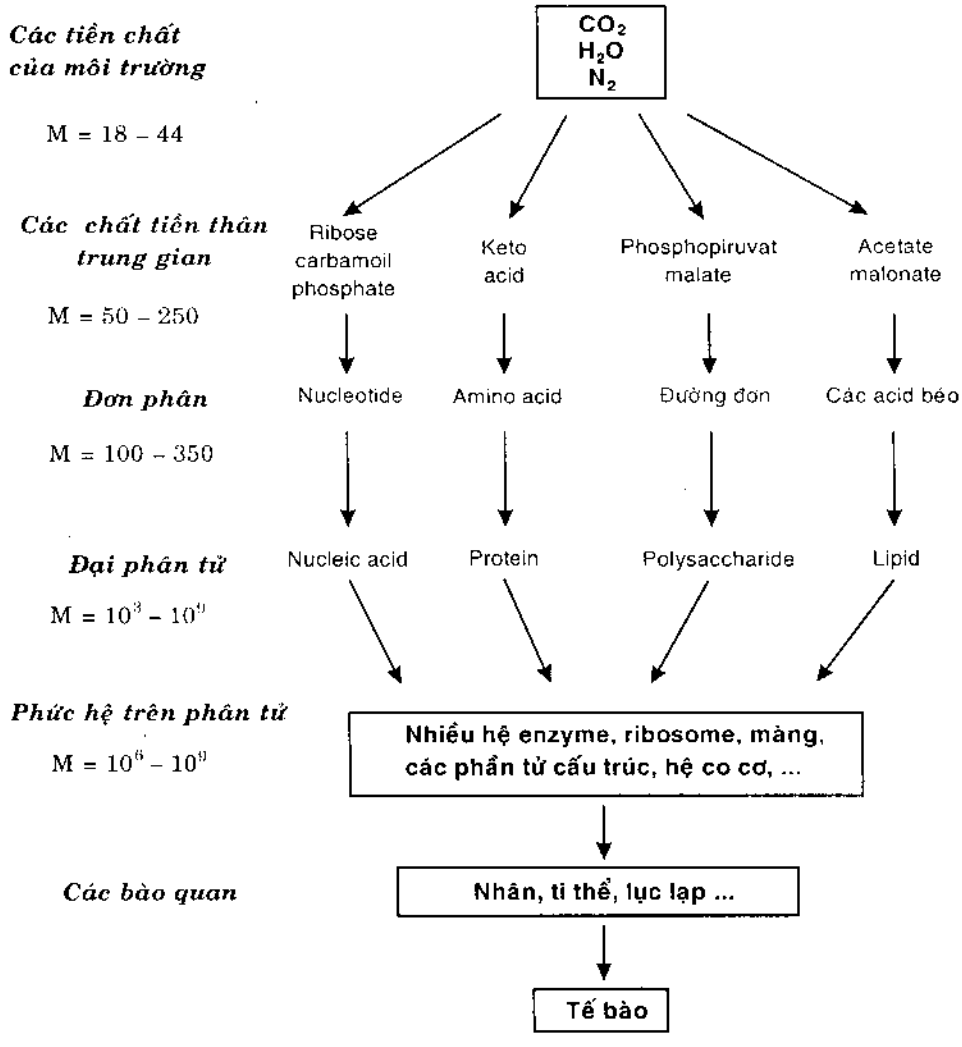
Trong bất kì cơ thể sống nào *nước cũng chiếm phần lớn (70 – 80%)*, cá biệt như con sứa tỉ lệ nước có thể đến 98%. Về mặt hoá học, *nước là dung môi* để các chất hoà tan dễ dàng *thực hiện phản ứng* và *ổn định cấu trúc tế bào*. Ngoài ra, nước còn giữ vai trò quan trọng trong *điều hoà nhiệt độ cơ thể* và *môi trường*. Nó là một *nhân tố giới hạn trong sinh môi*.

Ngoài nước, tế bào còn có các chất vô cơ khác như *acid, base, muối vô cơ* và *các nguyên tố kim loại*. Ở động vật có xương, *bộ xương* chứa nhiều chất vô cơ nhất (khoảng 1/10 khối lượng cơ thể, chủ yếu là Ca).

3. Khái quát về các chất hữu cơ được tổng hợp trong tế bào

Tế bào thực vật đã sử dụng *năng lượng mặt trời* khử CO_2 để tạo nên carbohydrate (glucose) giàu năng lượng. Chúng là các *sinh vật tự dưỡng* (autotroph). Động vật, và nhiều vi sinh vật phải sử dụng các hợp chất hữu cơ có sẵn gọi là *sinh vật dị dưỡng* (heterotroph). Dòng năng lượng ở dạng hợp chất hoá học bắt đầu từ thực vật được chuyển sang nhiều sinh vật kế tiếp tạo nên dây chuyền năng lượng. Suy cho cùng, *năng lượng mặt trời* là nguồn năng lượng cho sự sống hiện tại trên hành tinh .

Các chất hữu cơ trong cơ thể sinh vật rất nhiều và đa dạng. Tuy nhiên, chúng đều được cấu tạo theo nguyên tắc chung đơn giản là từ các *tiền chất* của môi trường như CO_2, H_2O, N_2 tạo nên *các chất tiền thân trung gian*, tiếp theo thành các *đơn vị cấu trúc* (các *đơn phân* – monomer) để tạo ra bốn loại polymer là các đại phân tử sinh học cấu tạo nên tế bào. Sơ đồ ở hình 2.1 mô tả khái quát về các chất hữu cơ trong tế bào.



Hình 2.1. Sơ đồ tiến trình tổng hợp các chất hữu cơ trong tế bào

4. Các chất hữu cơ phân tử nhỏ

Các chất hữu cơ phân tử nhỏ gồm các chất như hydrocarbon, carbohydrate, lipid, các amino acid và các nucleotide cùng các dẫn xuất. Chúng được tổng hợp theo nguyên tắc từng phản ứng đơn giản do các *enzyme xúc tác,* mà việc tổng hợp các enzyme và protein do các gen chi phối.

Các chất *đồng phân (isomers)* có cùng công thức phân tử, nhưng cấu hình không gian khác nhau như glucose, lactose và fructose là 3 đồng phân có cùng công thức $C_6H_{12}O_6$.

a) Carbohydrate thường gặp gồm : các *đường đơn* (monosaccharide) như glucose, fructose, *đường đôi* (disaccharide) như saccharose, maltose, lactose và *đường đa* (polysaccharide) như tinh bột, cellulose, chitin. Chúng là *nguồn cung cấp năng lượng* và *nguyên liệu tổng hợp* chủ yếu cho tế bào.

b) Lipid gồm những chất như dầu, mỡ có tính nhờn, *không tan trong nước, tan trong các dung môi hữu cơ* như ether, chlorophorm,... Các lipid thường gặp là acid béo, glycerid hay mỡ trung tính và phospholipid.

Các phospholipid và glycolipid tham gia cấu tạo các *màng tế bào*. Các glycerid là nguồn *dự trữ năng lượng* và có vai trò *cách nhiệt*. Lipid còn là thành phần của *một số vitamin như vitamin D* và là dung môi của nhiều vitamin (A, D, E, K).

c) Các amino acid là những chất hữu cơ đồng thời có mang 2 nhóm chức : nhóm *amin ($-NH_2$) mang tính kiềm và carboxyl ($-COOH$)* có *tính acid* gắn với 1 C gọi là *Cα*.

20 loại amino acid khác nhau ở *gốc bên (lateral) R*. Sự không đối xứng của Cα tạo ra 2 đồng phân không gian (stereoisomer) là dạng *D* và *L*. Các protein trong cơ thể sinh vật chỉ gồm các *L - amino acid*. Chúng nối nhau bằng *liên kết peptid* để tạo mạch polypeptide.

d) Các nucleotide là những đơn vị cấu trúc của DNA và RNA mà thành phần gồm các base nitric mạch vòng là *adenine (A), guanine (G), cytosine (C), thymine (T) và uracil (U)* ; gốc phosphate có thể có 1P, 2P, 3P và đường pentose (*ribose và deoxyribose*).

Các nucleotide còn giữ những chức năng quan trọng khác trong tế bào như ATP vận chuyển năng lượng, tham gia vào coenzyme A, hay AMP vòng.

2 nhóm sản phẩm các chất hữu cơ phân tử nhỏ của CNSH là :

– *Các chất trao đổi sơ cấp* và *sản phẩm cuối* (Primary metabolites and end products) là các chất đáp ứng cho nhu cầu thiết yếu của tế bào và một số chất khác được tạo ra do lên men như ethanol.

– *Các chất trao đổi thứ cấp* (Secondary metabolites) là các chất giúp cho sự thích nghi tốt hơn như các chất kháng sinh, alkaloid, sắc tố,...

Nhiều chất hoá học phức tạp dùng trong y dược như nhân sâm, shikonin... khó tổng hợp nhân tạo, trước đây phải lấy từ thực vật, động vật ; ngày nay CNSH thu các chất đó từ tế bào được nuôi cấy.

Các chất trong thế giới thực vật rất đa dạng. Ước tính có *hơn 50000* loại chất khác nhau ở thực vật và mỗi năm phát hiện thêm khoảng 1500 chất mới.

5. Nucleic acid

Các đại phân tử sinh học có cấu trúc và hình dạng đặc trưng để thực hiện những *chức năng chuyên biệt* quan trọng nhất của sự sống như acid nucleic chứa thông tin di truyền, còn protein là những công cụ phân tử thực hiện mọi hoạt động sống. Nucleic acid gồm 2 loại : *ribonucleic acid (RNA)* và *deoxyribonucleic acid (DNA).*

a) Deoxyribonucleic acid (DNA)

DNA là một polynucleotide, là vật chất di truyền có trong tất cả các loại tế bào. DNA gồm có gốc *acid phosphoric, đường 5-deoxyribose và các base nitric* là adenine (A), guanine (G), cytosine (C) và thymine (T).

Tất cả các sinh vật đều có chung một cấu trúc DNA. Tính đặc trưng DNA của một loài biểu hiện ở *trình tự sắp xếp các nucleotide dọc theo chiều dài* phân tử *và số lượng* của chúng.

Vào năm 1953, J. Watson và F. Crick đã tổng hợp các số liệu phân tích hoá học và tán xạ tia X đối với DNA của Rosaline Franklin và Maurice Wilkins để xây dựng mô hình *chuỗi xoắn kép DNA* (hình 2.2) với những đặc điểm sau :

– Mạch polynucleotide có *khung đường – phosphate* nhờ liên kết phosphodiester giữa phosphoric acid với đường deoxyribose. Mạch có một đầu 5'P và đầu kia 3'OH.

– 2 mạch polynucleotide gắn nhau nhờ bắt cặp base nitric đứng đối diện giữa 2 mạch bằng các liên kết hydro theo *nguyên tắc bổ sung* ***A*** với ***T*** và ngược lại (2 liên kết hydro), ***G*** với ***C*** và ngược lại (3 liên kết hydro).

– 2 mạch polynucleotide xếp *ngược chiều* nhau hay *đối song song.*

– Đường kính chuỗi xoắn là 20 ; mỗi chu kì xoắn gồm 10 cặp N, dài 34Å hay 3,4nm ; 2 mạch polynucleotide *xoắn* đều từ trái sang phải ; các base có mặt phẳng vuông góc với trục dài và cách trên dưới 3,4Å.

Nguyên tắc bắt cặp bổ sung đã dẫn đến nhiều hệ quả cực kì quan trọng cho sự phát triển vượt bậc của Sinh học và CNSH là :

– Cơ sở cho sự truyền đạt thông tin từ DNA đến RNA và protein.

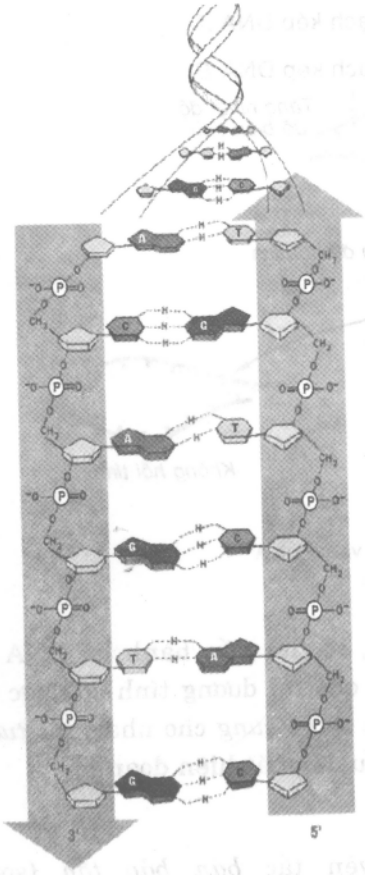
– Cơ sở cho sự sao chép chính xác của vật chất di truyền.

– Cơ chế phân tử của đột biến.

– Biết trình tự nucleotide mạch1, suy ra trình tự tương ứng mạch 2. Đây là cơ sở để tổng hợp mẫu dò (probe) DNA.

– Biến tính (denaturation) và hồi tính (renaturation) DNA dẫn đến lai nucleic acid và lai phân tử, làm cơ sở cho các chẩn đoán mới.

– Tiềm năng cho sửa sai, khi sai ở mạch 1 dựa vào mạch 2 để sửa.



Hình 2.2. Mô hình chuỗi xoắn kép DNA của Watson – Crick

– Phía trên cùng mô tả vòng xoắn của phân tử.

– Nguyên tắc bắt cặp bổ sung : *A* với *T*, *G* với *C*.

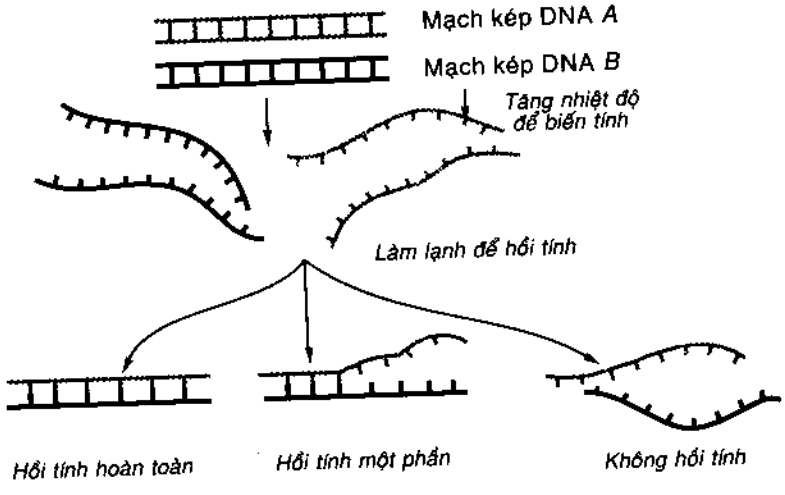
– Hai mũi tên ngược chiều thể hiện tính đối song song.

• Biến tính DNA và lai nucleic acid

Một tính chất quan trọng của DNA là khả năng *biến tính* và *hồi tính*.

2 mạch DNA gắn với nhau nhờ các liên kết hydro, nếu các liên kết này bị đứt 2 mạch sẽ tách rời nhau như khi đun nóng phân tử DNA vượt quá nhiệt độ sinh lí (thường ở khoảng 80 – 95°C). Đó là hiện tượng *biến tính* (denaturation) của DNA. Nhiệt độ làm tách 2 mạch DNA là *điểm chảy* (melting point), nó đặc trưng cho mỗi loại DNA, phụ thuộc số lượng liên kết hydro. Chất *formamide* làm hạ thấp điểm chảy, dùng để giảm nhiệt độ lai.

Sự biến tính là thuận nghịch. Nếu DNA đã biến tính được hạ nhiệt độ từ từ trở lại bình thường thì chúng có thể gắn lại với nhau thành mạch kép, gọi là *hồi tính* (renaturation) (hình 2.3).



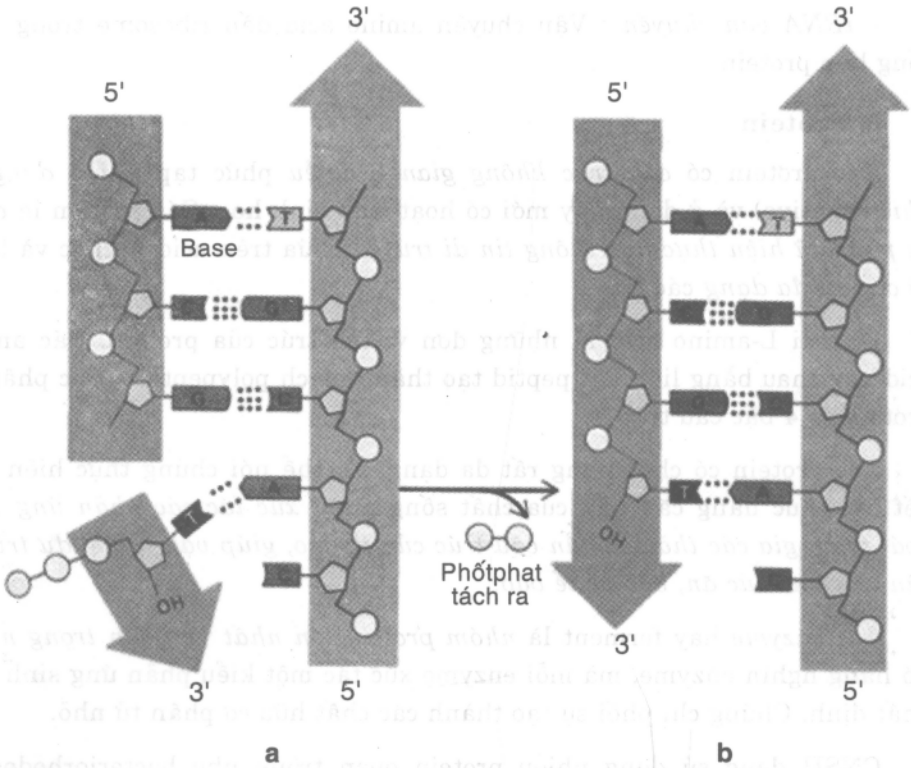
Hình 2.3. Biến tính, hồi tính và lai DNA

Sử dụng đặc tính biến tính và hồi tính, có thể tiến hành lai DNA với DNA, DNA với RNA và RNA với RNA. Kết quả lai dương tính có được khi giữa 2 loại DNA phải có những *đoạn có trình tự bổ sung* cho nhau, tức *tương đồng*. Có thể dùng đồng vị phóng xạ đánh dấu để phát hiện đoạn lai.

• Cơ chế tự nhân đôi hay sao chép của DNA

DNA sao chép theo khuôn với nguyên tắc *bán bảo tồn* (semi-conservative) : 2 mạch cũ của DNA ban đầu tách ra, mỗi cái làm *khuôn tổng hợp mạch mới*. Kết quả 1 phân tử DNA ban đầu tạo ra 2 phân tử con giống hệt nhau. *Mỗi phân tử con đều mang một mạch cũ* và *một mạch mới* (hình 2.4). Quá trình diễn biến phức tạp nhưng có các cơ chế chung. Đặc biệt mạch mới luôn tổng hợp theo *hướng* $5'P \rightarrow 3'OH$ giúp sửa sai tốt.

Mỗi bước đều có *enzyme đặc hiệu* tác động như DNA-polymerase III tổng hợp mạch mới bổ sung, DNA-polymerase I và ligase nối các đoạn rời.



Hình 2.4. Sơ đồ tổng hợp mạch DNA con mới bổ sung với mạch đơn DNA mẹ

a) (T) gắn vào đầu 3' DNA mới khi bắt cặp với (A) trên mạch đơn DNA mẹ.

b) (T) đã gắn xong, nhìn rõ 1 mạch đơn DNA mới và 1 mạch đơn DNA cũ .

Tóm lại, DNA *thỏa mãn đầy đủ các yêu cầu đối với chất di truyền* : chứa và truyền đạt thông tin, tự sao chép, có khả năng biến dị di truyền và tiềm năng cho tự sửa sai.

b) Ribonucleic acid (RNA)

RNA đóng vai trò trung gian trong tổng hợp protein, gần đây phát hiện một số RNA có khả năng xúc tác.

• Cấu trúc và chức năng của RNA

RNA có các đặc điểm chung : cấu trúc *một mạch polyribonucleotide, uracil* (U) thay cho *thymine* (T) trong thành phần *nucleotide*, gồm 3 loại chủ yếu :

– *mRNA* : Nhận và truyền đạt thông tin từ DNA.

– *rRNA* : Thành phần *cấu trúc* của ribosome.

– *tRNA vận chuyển* : Vận chuyển amino acid đến ribosome trong sinh tổng hợp protein.

6. Protein

Các protein có *cấu trúc không gian 3 chiều* phức tạp khi ở *dạng tự nhiên* (native) và ở dạng này mới có hoạt tính sinh học. Các protein là *công cụ phân tử hiện thực hoá thông tin di truyền* chứa trên acid nucleic và là *cơ sở của sự đa dạng* các loài.

20 loại L-amino acid là những đơn vị cấu trúc của protein. Các amino acid nối nhau bằng liên kết peptid tạo thành mạch polypeptide. Các phân tử protein có 4 bậc cấu trúc.

Các protein có chức năng rất đa dạng. Có thể nói chúng thực hiện hầu hết các chức năng căn bản của chất sống như : *xúc tác các phản ứng sinh hoá, tham gia các thành phần cấu trúc của tế bào, giúp vận động, dự trữ và vận chuyển thức ăn, bảo vệ tế bào.*

Các enzyme hay ferment là *nhóm protein lớn nhất* và *quan trọng nhất.* Có hàng nghìn enzyme, mà mỗi enzyme xúc tác một kiểu phản ứng sinh hoá nhất định. Chúng chi phối sự tạo thành các chất hữu cơ phân tử nhỏ.

CNSH đang sử dụng nhiều protein quan trọng như bacteriorhodopsin dùng làm bộ nhớ máy điện toán, protein tơ nhện làm áo giáp chống đạn,...

II. CÁC GEN

Năm 1865, Gr. Mendel đã chứng minh sự di truyền do các nhân tố di truyền (sau đó gọi là ***gen***) và nêu ra các quy luật di truyền mang tên ông. Khái niệm gen thực sự đã làm nền tảng cho những phát minh lớn của Sinh học thế kỉ XX, nên Mendel được coi như Newton của Sinh học.

1. Gen và tính trạng

Trước tiên, cần biết rõ các quy luật di truyền Mendel và một số thuật ngữ căn bản để hiểu chi tiết hơn về những thành tựu của *thời đại gen* và các triển vọng trong tương lai.

– Các kết quả thí nghiệm của Mendel được phát biểu thành 2 quy luật :

+ *Quy luật Mendel I* gọi là quy luật phân li hay giao tử thuần khiết.

+ *Quy luật Mendel II* gọi là quy luật phân li độc lập và tổ hợp tự do.

Ngày nay, ngay trên vườn Mendel đã trồng hoa trang trí màu đỏ và trắng thành các hàng biểu hiện quy luật Mendel I (hình 2.5).

– Một số khái niệm và thuật ngữ :

+ Thế hệ cha mẹ được kí hiệu bằng chữ *P* (*parenta*), con lai thế hệ thứ nhất kí hiệu F_1 (tiếng La tinh *Filii*-con), con lai thế hệ thứ hai kí hiệu F_2. Kí hiệu *x* chỉ sự lai. Mendel giả định trong mỗi cá thể có 2 nhân tố di truyền là AA, Aa hoặc aa. Ở thế hệ F_1 tất cả con lai (Aa) đều hoa đỏ. Ở thế hệ F_2 có sự phân li tỉ lệ 3 hoa đỏ (1AA + 2Aa) : 1 hoa trắng (aa). Gen quy định tính trạng hoa đỏ biểu hiện ở F_1 là *trội* (dominant) và kí hiệu bằng chữ hoa *A*, còn gen quy định tính trạng hoa trắng là *lặn* (recessive) kí hiệu *a*.

+ *Gen* : Nhân tố di truyền xác định các tính trạng của sinh vật, như hình dạng hạt, màu sắc, trái và hoa,...

+ *Allele* : Các trạng thái khác nhau của một gen, như gen màu hoa có 2 *allele* là A và a.

+ *Đồng hợp tử* (Homozygote) : Cá thể có 2 allele giống nhau như AA hoặc aa.

+ *Dị hợp tử* (Heterozygote) : Cá thể có 2 allele khác nhau như Aa.

+ *Kiểu gen* (Genotype) : Tập hợp các gen quy định tính trạng.

+ *Kiểu hình* (Phenotype) : Biểu hiện của tính trạng ; nó là kết quả sự tương tác giữa kiểu gen với môi trường.

Hình 2.5. Khu vườn thí nghiệm Mendel thời nay ở Tu viện Bruno (Cộng hoà Séc)

Giải thích *quy luật Mendel I* theo các hàng hoa chiều ngang kể từ hàng xa nhất với các chữ viết trên các cụm hoa :

– Hàng xa nhất : P thuần chủng : Đỏ (AA) x Trắng (aa).

– Hàng kế tiếp 1 : F_1 đồng tính đỏ (Aa).

– Hàng kế tiếp 2 : F_2 phân li tỉ lệ kiểu hình (3 đỏ : 1 trắng), tỉ lệ kiểu gen (1 AA : 2 Aa : 1 aa).

– Bốn hàng dưới cùng là hậu thế của F_2 tính theo chiều dọc, gồm:

+ 1 đỏ thuần F_2 (AA) cho ra 4 cụm hoa đỏ (AA).

+ 2 đỏ lai F_2 (Aa) cho ra 3 cụm hoa đỏ (1AA và 2Aa) và 1 cụm hoa trắng (aa).

+ 1 trắng thuần F_2 (aa) cho ra 4 cụm hoa trắng (aa).

Hình 2.6 . Một số tính trạng Mendel ở người

Đến nay, di truyền học khẳng định mọi *tính trạng* của sinh vật đều chịu sự chi phối của các *gen tương ứng*. Các tính trạng của người cũng tuân theo các quy luật Mendel. Hình 2.6 chỉ nêu một số tính trạng hình thái như tóc mọc thành đỉnh nhọn ở trán, nhiều tàn nhang, lúm đồng tiền trên gò má, cằm thẳng hoặc chẻ, có lông trên ngực hoặc cánh tay,...

Một hệ quả rất quan trọng từ sự hiểu biết về gen là *sự tương đồng* của các gen ở những loài sinh vật có quan hệ phát sinh trong tiến hoá. Phát hiện một gen ở loài vật này có thể tìm gen tương ứng ở loài khác. Ví dụ, nhờ phát hiện đột biến chuột béo phì (hình 2.7) do sai hỏng protein lectin mà tìm ra gen tương ứng ở người để nghiên cứu trị bệnh béo phì.

Giải thích *quy luật Mendel I* theo các hàng hoa chiều ngang kể từ hàng xa nhất với các chữ viết trên các cụm hoa :

– Hàng xa nhất : P thuần chủng : Đỏ (AA) x Trắng (aa).

– Hàng kế tiếp 1 : F_1 đồng tính đỏ (Aa).

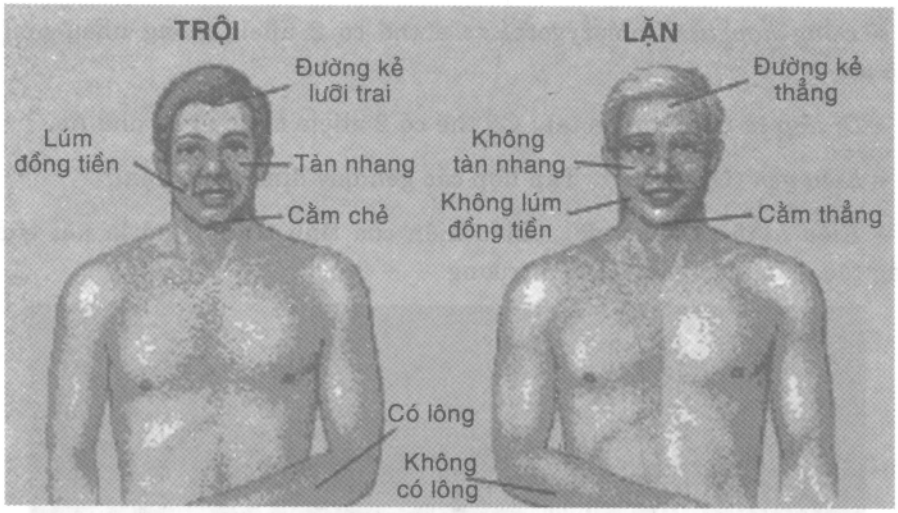
– Hàng kế tiếp 2 : F_2 phân li tỉ lệ kiểu hình (3 đỏ : 1 trắng), tỉ lệ kiểu gen (1 AA : 2 Aa : 1 aa).

– Bốn hàng dưới cùng là hậu thế của F_2 tính theo chiều dọc, gồm:

+ 1 đỏ thuần F_2 (AA) cho ra 4 cụm hoa đỏ (AA).

+ 2 đỏ lai F_2 (Aa) cho ra 3 cụm hoa đỏ (1AA và 2Aa) và 1 cụm hoa trắng (aa).

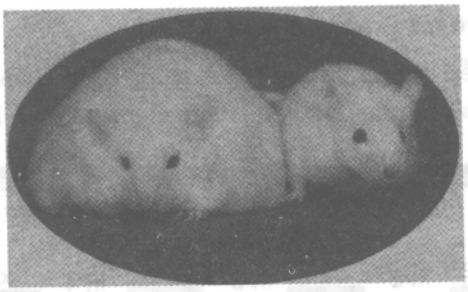
+ 1 trắng thuần F_2 (aa) cho ra 4 cụm hoa trắng (aa).



Hình 2.6 . Một số tính trạng Mendel ở người

Đến nay, di truyền học khẳng định mọi *tính trạng* của sinh vật đều chịu sự chi phối của các *gen tương ứng*. Các tính trạng của người cũng tuân theo các quy luật Mendel. Hình 2.6 chỉ nêu một số tính trạng hình thái như tóc mọc thành đỉnh nhọn ở trán, nhiều tàn nhang, lúm đồng tiền trên gò má, cằm thẳng hoặc chẻ, có lông trên ngực hoặc cánh tay,...

Một hệ quả rất quan trọng từ sự hiểu biết về gen là *sự tương đồng* của các gen ở những loài sinh vật có quan hệ phát sinh trong tiến hoá. Phát hiện một gen ở loài vật này có thể tìm gen tương ứng ở loài khác. Ví dụ, nhờ phát hiện đột biến chuột béo phì (hình 2.7) do sai hỏng protein lectin mà tìm ra gen tương ứng ở người để nghiên cứu trị bệnh béo phì.



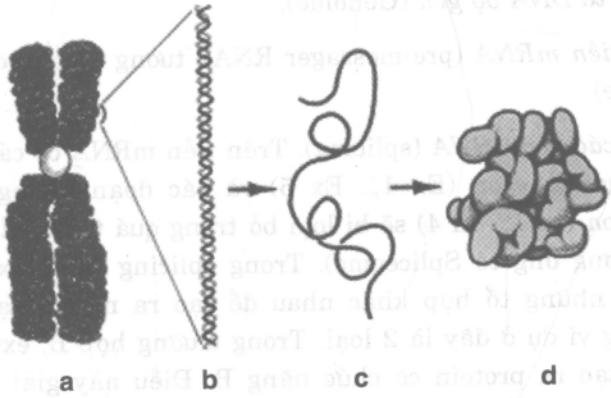
Hình. 2.7. Đột biến chuột béo phì do sai hỏng protein lectin

2. Sinh tổng hợp protein

Ở cấp độ tế bào, công trình của T.H. Morgan đã chứng minh gen nằm trên *nhiễm sắc thể* trong *nhân tế bào*. Ở cấp độ phân tử, thông tin di truyền được mã hoá ở dạng trình tự thẳng của 4 loại nucleotid trên DNA và RNA. Đơn vị của thông tin di truyền là các *gen*. Sự biểu hiện của gen ra tính trạng thông qua tổng hợp protein theo sơ đồ hình 2.8.

a) Mã di truyền

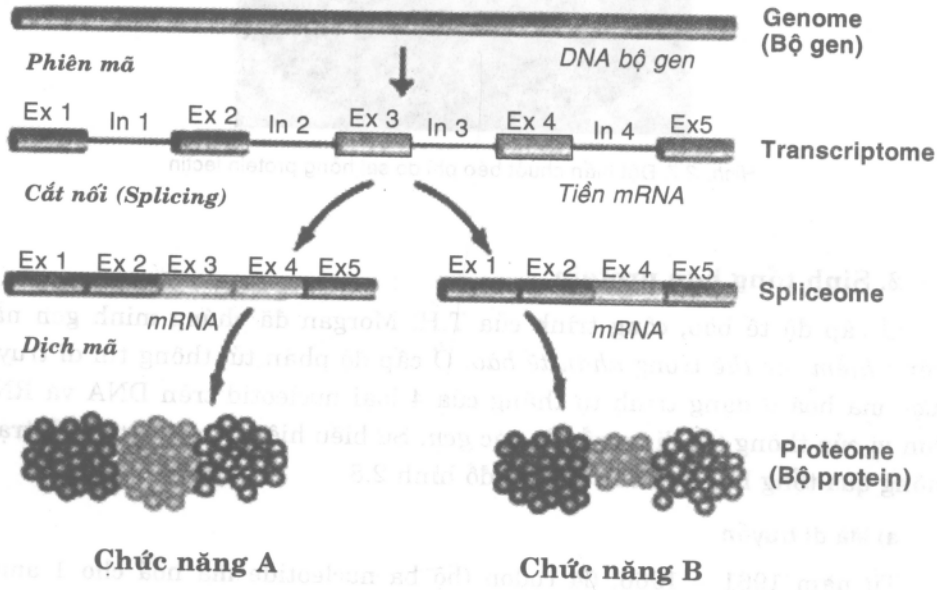
Từ năm 1961 – 1966, 64 codon (bộ ba nucleotide mã hoá cho 1 amino acid) đã được xác định. Mã có tính ***"suy thoái"*** (degeneration) tức một amino acid có thể có nhiều codon mã hoá, chỉ trừ methionin và tryptophan chỉ có 1 codon. Có 1 codon khởi sự là AUG tương ứng với methionin và 3 codon kết thúc UAA, UAG và UGA. Trừ một số ngoại lệ nhỏ, mã di truyền có *tính vạn năng* (universel) tức toàn bộ thế giới sinh vật có chung bộ mã di truyền.



Hình 2.8. Dòng thông tin di truyền từ gen trên nhiễm sắc thể đến protein.
a) NST chứa các gen ; b) Gen là 1 đoạn DNA ; c) mRNA thông tin ; d) Protein.

b) Quá trình phiên mã (transcription)

Quá trình chuyển thông tin từ DNA sang RNA được gọi là *sự phiên mã* nhờ enzyme RNA polymerase và các ribonucleotide, đặc biệt là uracil.



Hình 2.9. Quá trình sinh tổng hợp protein của gen gián đoạn ở *Eukaryotae*

Sự phiên mã ở Sinh vật nhân sơ *Prokaryotae* đơn giản hơn so với ở Sinh vật nhân chuẩn *Eukaryotae*. Hình 2.9 mô tả quá trình từ phiên mã đến protein của gen gián đoạn ở *Eukaryotae*. Đây là quá trình phức tạp qua các giai đoạn :

– Bắt đầu từ *DNA bộ gen* (Genome).

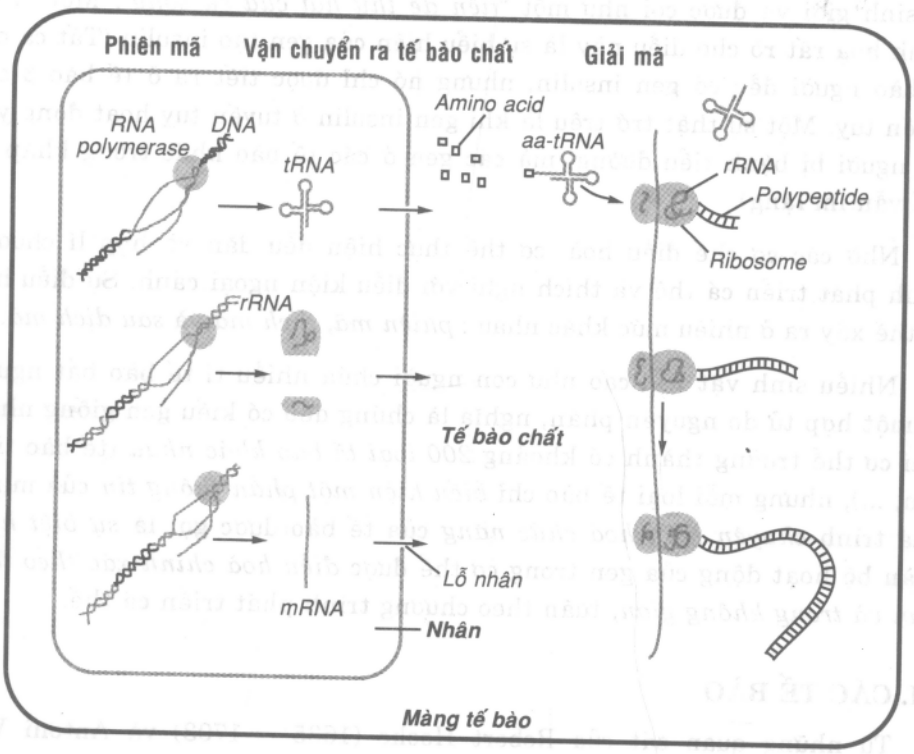
– Tạo ra *tiền mRNA* (pre-messager RNA), tương ứng sẽ có *bộ phiên mã* (Transcriptome).

– *Cắt nối các đoạn RNA* (splicing). Trên tiền mRNA có các đoạn mã hoá trên protein gọi là *exon* (Ex 1,... Ex 5) và các đoạn không mã hoá trên protein là *intron* (In 1,... In 4) sẽ bị loại bỏ trong quá trình *cắt ra nối lại* gọi là *splicing* (tương ứng có Spliceome). Trong splicing có thể xảy ra việc nối các exon theo những tổ hợp khác nhau để tạo ra nhiều loại mRNA khác nhau, mà trong ví dụ ở đây là 2 loại. Trong trường hợp B, exon 3 bị loại bỏ và mRNA sẽ tạo ra protein có chức năng B. Điều này giải thích vì sao ở người số loại protein nhiều hơn so với số gen của bộ gen.

– Sau cùng là sự dịch mã tạo ra các protein A hoặc B (Proteome).

Một kết quả hết sức bất ngờ là khi giải mã xong bộ gen người thấy *số loại protein lớn hơn số gen gấp nhiều lần* mà nguyên nhân là do splicing theo nhiều kiểu khác nhau và các biến đổi protein sau dịch mã. Chính điều này dẫn đến *khủng hoảng trong định nghĩa về gen* ở thời điểm hiện tại, khi mà quan niệm truyền thống cho đến cuối thế kỉ XX là *một gen – một protein*.

c) Quá trình dịch mã (translation)



Hình 2.10. Sơ đồ dòng thông tin từ DNA đến protein ở sinh vật nhân chuẩn

*DNA trong **nhân tế bào** làm khuôn để tổng hợp cả 3 loại RNA (tRNA, rRNA và mRNA). Cả 3 loại RNA qua **lỗ nhân** ra tế bào chất tham gia tổng hợp mạch polypeptide. Các rRNA góp phần tạo nên ribosome gắn vào mRNA để thực hiện **dịch mã**. tRNA được hoạt hoá, gắn với amino acid đặc hiệu tạo phức hợp aa – tRNA và vào ribosome bắt cặp đặc hiệu **anticodon – codon** trên mRNA.*

Quá trình chuyển từ trình tự các base trên mRNA thành mạch polypeptide được gọi là *dịch mã* (translation). Thông tin được chuyển từ *trình tự ribonucleotide* trên phân tử RNA thành trình tự amino acid trên phân tử protein. Hướng dịch mã trên mRNA là 5' → 3'.

3. Điều hoà sự biểu hiện của gen

Các cơ chế điều hoà giữ nhiều vai trò rất quan trọng cho hoạt động sống như *điều phối các phản ứng* trong tế bào, từng bước thực hiện các giai đoạn của *chương trình phát triển cá thể, thu nhận* và *đáp lại* các biến đổi của môi trường bên ngoài. Như ở trên chúng ta thấy, quá trình sinh tổng hợp protein rất phức tạp, nhưng điều hoà *sự biểu hiện của gen* còn phức tạp hơn rất nhiều. Mỗi sinh vật có một kiểu gen và một kiểu hình. Điều này chung cho cả sinh giới và được coi như một *"tiền đề thứ hai của sự sống"*. Một ví dụ minh hoạ rất rõ cho điều này là sự biểu hiện của gen tạo insulin (Tất cả các tế bào người đều có gen insulin, nhưng nó chỉ được tiết ra ở tế bào β của tuyến tuỵ. Một sự thật trớ trêu là khi gen insulin ở tuyến tuỵ hoạt động yếu thì người bị bệnh tiểu đường, mà các gen ở các tế bào khác trong khắp cơ thể vẫn im lặng).

Nhờ các cơ chế điều hoà, cơ thể thực hiện đều đặn và hợp lí chương trình phát triển cá thể và thích nghi với điều kiện ngoại cảnh. Sự điều hoà có thể xảy ra ở nhiều mức khác nhau : *phiên mã, dịch mã* và *sau dịch mã*.

Nhiều sinh vật bậc cao như con người chứa nhiều tỉ tế bào bắt nguồn từ một hợp tử do nguyên phân, nghĩa là chúng đều có kiểu gen giống nhau. Khi cơ thể trưởng thành có khoảng *200 loại tế bào khác nhau* (tế bào tim, gan, ...), nhưng mỗi loại tế bào chỉ *biểu hiện một phần thông tin* của mình. Quá trình *chuyên môn hoá chức năng* của tế bào được gọi là *sự biệt hoá*. Toàn bộ hoạt động của gen trong cơ thể được *điều hoà chính xác theo thời gian và trong không gian*, tuân theo chương trình phát triển cá thể.

III. CÁC TẾ BÀO

Từ những quan sát của Robert Hooke (1635 – 1703) và Antoni Van Leeuwenhoek (1632 – 1723), được thực hiện nhờ những kính hiển vi quang học đầu tiên, sự hiểu biết về tế bào đã thay đổi rất lớn.

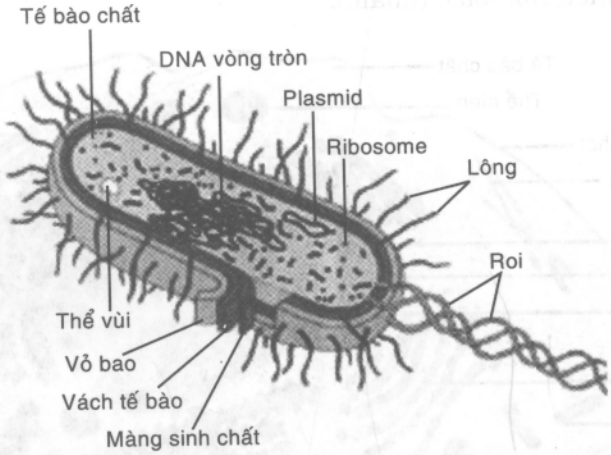
1. Tế bào là đơn vị cơ sở của Sinh giới

Các sinh vật có cấu trúc hoá học rất phức tạp. Tuy nhiên, chỉ các chất hoá học phức tạp chưa đủ để có hoạt động sống. Chúng phải được tổ chức lại trong các *phức hệ phân tử* của *nhiều bào quan* với những *chức năng chuyên biệt* khác nhau, để hình thành tế bào là *đơn vị cơ sở của sự sống*. Các đặc tính của sự sống chỉ biểu hiện *thống nhất, đồng bộ, hài hoà, đầy đủ ở mức tế bào và cao hơn*. Việc hiểu rõ *cấu trúc của tế bào* là cơ sở để nắm vững các *cơ nguyên căn bản của sự sống*.

Ví dụ, di truyền là một đặc tính của tế bào, được quy định bởi các gen và biểu hiện nhờ nguồn *năng lượng* và sự *sinh sản* của tế bào. Các tính trạng của cơ thể *biểu hiện trọn vẹn* chỉ ở mức tế bào. Ngược lại, nhờ có tính di truyền mà hệ thống cấu trúc tinh vi và sự biến đổi năng lượng phức tạp của *tế bào được tái tạo*.

2. Tế bào của sinh vật nhân sơ *Prokaryotae* và sinh vật nhân chuẩn *Eukaryotae*

a) Tế bào của sinh vật nhân sơ (Prokaryotae)



Hình 2.11. Tế bào vi khuẩn Escherichia coli (E. coli)

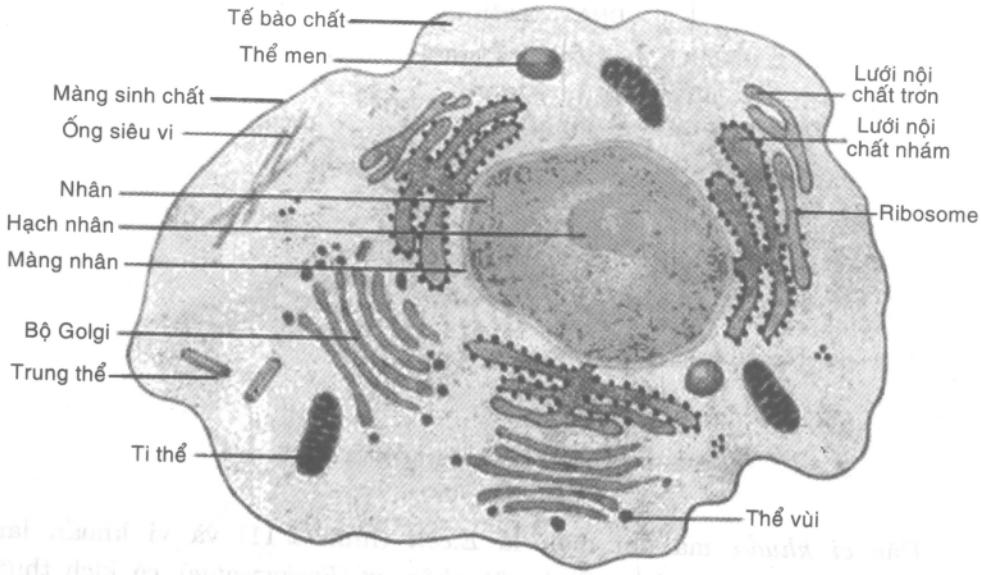
Các *vi khuẩn* mà đại diện là *E.coli* (hình 2.11) và vi khuẩn lam *(Cyanobacteria)* thuộc nhóm Sinh vật nhân sơ (*Prokaryotae*), có kích thước nhỏ bé, khoảng 1 – 10 micromet. Các tế bào này không có phần lớn các bào quan như trong các tế bào của Sinh vật nhân chuẩn. Tuy có ngoại lệ, nhưng quy luật chung là các tế bào *Prokaryotae* không có cấu trúc màng nhân bên trong, có vùng tương tự nhân gọi là nucleoid. Các ribosome 70S nằm rải rác trong tế bào chất. Bộ gen chứa một phân tử DNA lớn, vòng tròn, trần (tức không có gắn thêm các protein). Plasmid là cấu trúc DNA mạch vòng có ở tế bào chất, được dùng mang gen trong KTDT.

b) Tế bào của sinh vật nhân chuẩn (Eukaryotae)

Điểm nổi bật để phân biệt tế bào *Eukaryotae* điển hình là có màng nhân bao quanh. Tiếp theo, tế bào *Eukaryotae* có hệ thống màng phức tạp bên trong tế bào, có các bào quan như lưới nội chất, bộ Golgi, lysosome, ti thể, lục lạp (hình 2.12).

Màng sinh chất (plasma membrane) bao quanh tất cả các tế bào, giới hạn độ lớn và duy trì những sự khác nhau cần thiết giữa các chất, giữa cấu trúc bên trong nó với môi trường bên ngoài. Nó là một bộ lọc có tính chọn lựa cao và thuận tiện cho sự vận chuyển tích cực các chất ; nó kiểm tra sự đi vào của các chất dinh dưỡng và sự thải ra các chất bã, tạo nên sự khác nhau về nồng độ ion giữa trong và ngoài tế bào. Màng sinh chất còn là nơi thu nhận các tín hiệu bên ngoài, cho phép tế bào biến đổi để đáp lại tương ứng với môi trường xung quanh.

Lưới nội chất đóng vai trò trung tâm trong sinh tổng hợp của tế bào nên nó có mang nhiều ribosome (nhám).



Hình 2.12. Tế bào động vật điển hình

Bộ Golgi làm nhiệm vụ biến đổi, chọn lọc và gói các đại phân tử sinh học mà sau đó được tiết ra ngoài hay được vận chuyển đến các bào quan khác như lysosome...

Lysosome không những phân huỷ các chất để "nuôi" tế bào, mà còn "dọn sạch" những bào quan khác khi đã trở nên vô dụng thành các tiền chất đơn giản ban đầu để tế bào tái sử dụng.

Ti thể có trong tất cả các tế bào nhân chuẩn và các lục lạp (chỉ có ở thực vật), có chức năng biến đổi năng lượng thành dạng hữu ích cho hoạt động tế bào. Cả 2 loại bào quan này có hình thái đặc biệt là đều chứa bên trong một số lớn cấu trúc màng.

Nhân là bào quan lớn nhất có chức năng nổi bật là chứa thông tin di truyền. Sự phân chia đều của bộ nhiễm sắc thể về các tế bào con đảm bảo cho tính di truyền.

Qua sơ đồ trên, rõ ràng tế bào là cấu trúc gồm nhiều hệ thống phức tạp được điều hoà nhịp nhàng.

3. Phân bào và sự chết theo chương trình (apoptosis) của tế bào

Nguyên phân và apoptosis điều hoà số lượng tế bào trong quá trình *phát triển, tăng trưởng và làm lành vết thương.*

Nguyên phân (mitosis) là quá trình phân bào ở sinh vật *Eukaryotae* : từ một tế bào mẹ ban đầu tạo ra hai tế bào con có bộ gen như nhau. *Chu trình tế bào* (cell cycle) gồm *nguyên phân và gian kì*, mà trong kì này diễn ra *tổng hợp DNA* trước khi bước vào nguyên phân. *Nguyên phân* là cơ sở của sự *tăng trưởng* ở các sinh vật đa bào và *sinh sản vô tính.*

Sự tăng số lượng tế bào của sinh vật đa bào nhờ nguyên phân. Ở người, hợp tử sau nhiều lần chia nguyên nhiễm hình thành nên cơ thể gồm nhiều tỉ tế bào. Nhờ đó, trừ tế bào sinh dục, các tế bào của cơ thể có bộ nhiễm sắc thể như nhau, tương ứng có lượng thông tin di truyền giống nhau.

Sự kiểm soát chu trình tế bào : Một nhóm các protein tương tác lẫn nhau được gọi là *các chốt kiểm soát* (checkpoints). Chúng đảm bảo cho sự sao chép nhiễm sắc thể (NST) và phân đều về các tế bào con. Ví dụ, chốt kiểm soát sự tổn hại DNA có thể làm *dừng chu trình tế bào* ở bất cứ giai đoạn nào, trong khi đó các gen mã hoá cho các protein hồi phục thương tổn được mở. Ở cuối nguyên phân, *checpoint hình thành thoi vô sắc* hoạt động để hình thành thoi cho NST bám vào.

Các tế bào cũng tuân theo "đồng hồ" báo cho biết phải phân chia bao nhiêu lần. ***Telomere*** là cấu trúc ở đầu mút của NST, nó có hàng trăm đến hàng nghìn đoạn (6 nucleoide) đặc hiệu lặp lại. Trong mỗi lần nguyên phân, telomere mất đi từ 50 đến 200 nucleotide và cứ thế NST thể ngắn dần theo số lần nguyên phân. Thường sau khoảng 50 lần phân bào, sự mất nucleotide của telomere đạt điểm chốt và phát tín hiệu dừng nguyên phân. Tế bào có thể sống nhưng không phân chia hoặc chết. Enzyme ***telomerase*** đặc hiệu giúp *duy trì độ dài bình thường của NST*, nó hiện diện trong các tế bào phân chia không giới hạn như các *tế bào sinh dục, ung thư*, và trong vài kiểu tế bào bình thường (như tế bào tuỷ xương) có vai trò cung cấp các tế bào mới.

Các hormone và *nhân tố tăng trưởng* là những *tác nhân ngoại* bào có ảnh hưởng đến sự phân bào. Các protein *cyclin* và *kinase* có tác động bên trong tế bào đến nguyên phân.

Apoptosis được phát hiện vào thập niên 1990 cho thấy có những cơ chế phức tạp kiểm soát *sự chết của tế bào trong chu trình phát triển*. Vai trò tích cực của apoptosis ngày càng sáng tỏ hơn và được ví như công việc gọt xén của người tạc tượng để tạo sản phẩm hoàn chỉnh. Ví dụ, do apoptosis mà nòng nọc đứt đuôi thành con ếch.

Ở các ngành công nghiệp, muốn mở rộng sản xuất, con người phải chế tạo ra nhiều máy; trong CNSH *chỉ cần tạo tế bào giống ban đầu*, sau đó tự nó sinh sản ra với số lượng lớn ở những điều kiện thích hợp. Con người chỉ cần *giữ giống và nhân giống*. Nhờ hiểu rõ cơ chế sinh sản, con người có thể rút ngắn quá trình nhân giống như trường hợp nuôi cấy mô tế bào thực vật.

4. Hoá học của tế bào

Để tồn tại, tế bào phải thu nhận năng lượng và sinh tổng hợp các chất. Công việc đó được thực hiện nhờ hàng nghìn, hàng vạn các phản ứng hoá học diễn ra liên tục theo trình tự nghiêm ngặt, nhanh nhạy và rất chuẩn xác, ví như một nhà máy hoá học. Nhà máy này rất đặc biệt, vì tế bào hoạt động ở điều kiện đẳng nhiệt, đẳng áp, tức các phản ứng hoá học diễn ra trong điều kiện nhiệt độ như nhau, áp suất như nhau. Hao tốn năng lượng của các phản ứng hoá học trong tế bào là tối thiểu. Trong các PTN hoá học thông thường, khó có thể thực hiện các phản ứng với những điều kiện và tiêu tốn năng lượng như vậy.

Hoá học của tế bào có những đặc tính ưu việt như trên là nhờ :

– Các chất xúc tác là những enzyme có tính đặc hiệu cao.

– Hệ thống cấu trúc và sự phân bố không gian hợp lí trên màng.

– Sự điều hoà hợp lí của các gen.

– Hệ thống tín hiệu chính xác của các tế bào.

Số loại phản ứng hoá học được thực hiện trong tế bào rất lớn. Đến nay con người ghi nhận hàng nghìn loại phản ứng hoá học khác nhau trong thế giới sinh vật. Hầu như tất cả các loại phản ứng hoá học diễn ra trong cơ thể sống như oxy hoá khử, methyl hoá, amin hoá..., và cả những phản ứng có tính đặc hiệu cao như chuyển hoá sinh học (biotransformation).

Ngoài ra, thiên nhiên vốn hài hoà, các phản hoá học của tế bào ít gây ô nhiễm, lại làm sạch môi trường nên các quy trình CNSH không những có giá trị kinh tế, mà còn góp phần đáng kể bảo vệ môi sinh.

5. Tín hiệu tế bào (Cell signalling)

Những thành tựu của Sinh học phân tử tế bào và các bộ gen soi sáng nhiều chi tiết phức tạp về hoạt động sống của tế bào, mà tín hiệu tế bào là một ví dụ. Có những tín hiệu cho sự vận chuyển nội bào (intracellular traffic) và các tín hiệu liên hệ giữa các tế bào (intercellular signals).

Sơ đồ trên hình 2.13 cho thấy các protein sau khi hình thành đã tự động di chuyển đến đúng nơi cần đến nhờ các tín hiệu có ngay trên mỗi phân tử. Ngoài ra, ở các sinh vật đa bào còn có mối liên hệ giữa các tế bào.

Các phân tử thông tin ngoại bào (extracellular informative molecules), thực hiện mối quan hệ giữa các tế bào, là những chất trung gian gồm 3 loại phụ thuộc vào khoảng cách tác động.

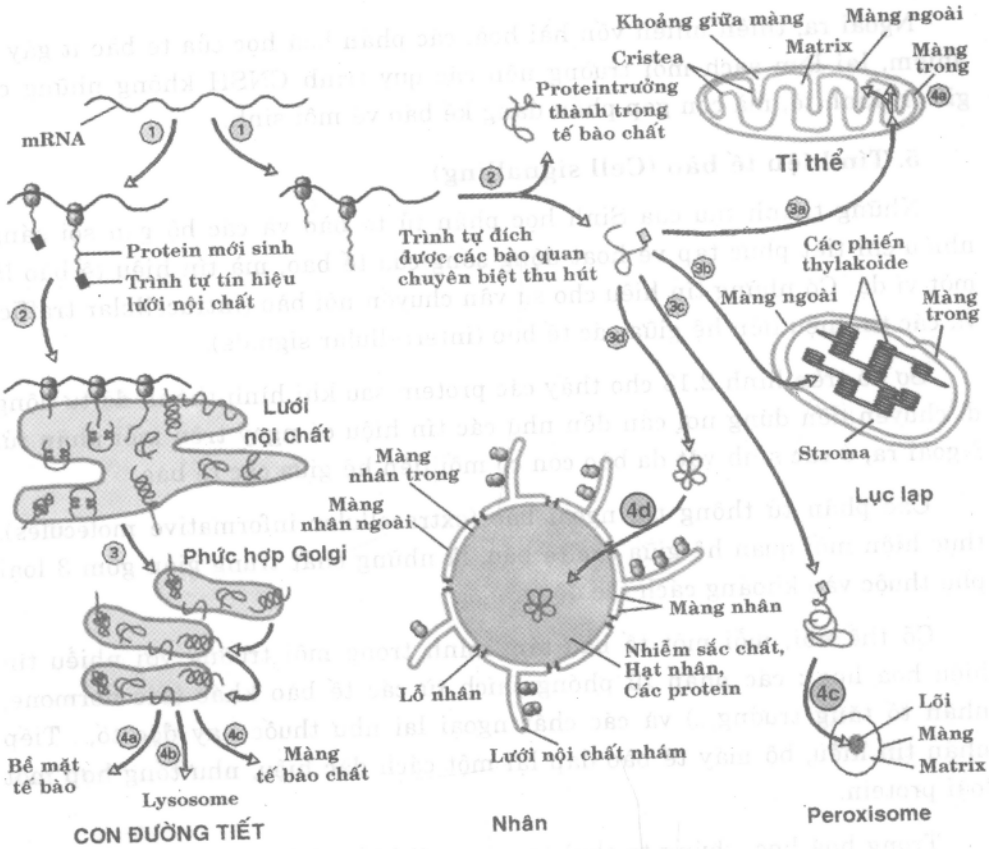
Có thể nói, mỗi một tế bào tắm mình trong môi trường với nhiều tín hiệu hoá học : các phân tử phóng thích từ các tế bào khác (các hormone, nhân tố tăng trưởng,...) và các chất ngoại lai như thuốc hay độc tố,... Tiếp nhận tín hiệu, bộ máy tế bào đáp lại một cách đặc hiệu, như tổng hợp một loại protein.

Trong hoá học, chúng ta thường quen với kiểu phản ứng chất A kết hợp với B thành AB. Tế bào phản ứng phức tạp hơn nhiều : *tín hiệu phát ra* di chuyển rất xa, có *định hướng đúng mục tiêu* để kích thích hoạt động của một phức hợp gồm cả chục protein nhằm đáp lại. Thử hình dung, 1 phân tử protein cầu kích thước 5nm (5 phần triệu milimet) di chuyển đến khoảng cách 300mm (30cm) thì độ dài di chuyển gấp 300 triệu lần. Nếu một người cao 1,5m di chuyển như vậy thì khoảng cách tương ứng là 450 triệu mét = 450000km, hơn gấp rưỡi khoảng cách từ Trái đất đến Mặt trăng. Hoạt động sống của tế bào phức tạp, nhưng chính xác biết bao !

Trên tế bào có các mức tổ chức cao hơn là mô, cơ quan, cơ thể... Tất cả đều có các mối liên hệ bên trong và với môi trường ngoài rất phức tạp thông qua các *tín hiệu tế bào*. Cơ thể được điều hoà bởi 2 cơ chế :

– Các *chất nội tiết* như hormone,.. có tác động chậm.

– Các *xung thần kinh* có tác động nhanh.



Hình 2.13. Sự phân bố tự động các protein về đúng vị trí nhờ các tín hiệu (các hình vuông nhỏ ở đầu phân tử)

6. Khả năng tự sinh sản

Một trong những khả năng kì diệu của thế giới sinh vật là *tự sinh sản* liên quan chặt chẽ với bộ máy di truyền. Việc con người hiểu rõ có khả năng biến đổi định hướng các gen và đưa chúng từ sinh vật này sang biểu hiện ở sinh vật khác đã mở ra nhiều ứng dụng to lớn mà hậu quả khó lường hết được. Ở các ngành công nghiệp, muốn mở rộng sản xuất, con người phải chế tạo ra nhiều máy ; trong công nghệ sinh học *chỉ cần tạo tế bào giống ban đầu,* sau đó tự nó sinh sản ra với số lượng lớn ở những điều kiện thích hợp. Con người chỉ cần *giữ giống và nhân giống*. Nhờ hiểu rõ cơ chế sinh sản, con người có thể rút ngắn quá trình nhân giống như trường hợp nuôi cấy mô tế bào thực vật.

IV. CẢI BIẾN VÀ SỬ DỤNG TẾ BÀO

1. Nuôi tế bào

Ngay từ năm 1840, người nêu ra học thuyết tế bào là Shleiden đã đề cập đến khả năng nuôi tế bào. Đến thập niên 1940, nuôi tế bào thực vật và động vật đã thành công và bắt đầu phát triển.

Nuôi tế bào động vật có nhiều ứng dụng : sản xuất vaccine virus, các protein và hormone ; sản xuất kháng thể đơn dòng,...

Nuôi cấy mô thực vật góp phần cho nhân giống vô tính và chọn giống *in vitro*. Các tế bào thực vật được nuôi rời để sản xuất một số hoá chất. Đặc biệt, có thể sử dụng *tế bào thực vật cố định (immobilized cell)* để thực hiện nhiều lần lặp lại một số phản ứng chuyển hoá hoặc sản xuất các chất. Cố định tế bào giúp sử dụng hoạt tính enzyme mà khỏi mất nhiều công sức cho chiết tách và tinh sạch enzyme rất tốn kém.

2. Sử dụng tế bào gốc (stem cell) để trị bệnh

Việc phát hiện *tế bào gốc soma* có ý nghĩa quan trọng, hứa hẹn nhiều ứng dụng to lớn. Nhiều bệnh do sai hỏng trong hoạt động sống của tế bào mà hiện nay được chữa trị bằng các loại thuốc khác nhau. Một hướng nghiên cứu mới hiện nay là *thay tế bào gốc* vào chỗ tế bào bệnh để hồi phục chức năng trở lại bình thường mà không phải sử dụng thuốc suốt đời. Từ đó mà có lĩnh vực mới đang phát triển là *Y học phục hồi* (Regenerative medecine).

3. Tế bào nhân tạo

Trên cơ sở biết rõ bộ gen các vi sinh vật và các thử nghiệm nhằm loại bỏ từng gen xem vai trò của chúng như thế nào, con người đã biết được 300 gen tối thiểu cần cho hoạt động sống của tế bào. Từ đó, con người đã chế tạo *tế bào nhân tạo với 300 gen tối thiểu* được bọc trong màng phospholipid nhân tạo. *Tế bào nhân tạo* hứa hẹn nhiều ứng dụng ngoạn mục trong tương lai.

4. Dùng tế bào thử nghiệm chế phẩm và hoá chất

Các thử nghiệm về hiệu quả của các tác nhân trị liệu hay độc tố thường tiến hành trên chuột và các động vật. Các thử nghiệm này đắt giá và có quy mô hạn chế. Các mô hình tế bào được sử dụng mở ra khả năng to lớn trong tầm soát (screening) các chất thuốc hay xác định nhanh độc tính của các sản phẩm CNSH.

Tóm lại, cơ sở khoa học của CNSH là sử dụng những tính chất ưu việt của tế bào sống trực tiếp vào những quy trình sản xuất công nghiệp bằng

những kĩ thuật mới tinh vi, chính xác, chủ động và với quy mô rộng lớn hơn. Nhờ đó, CNSH đáp ứng được những yêu cầu cao của cuộc cách mạng sinh học mới *cần những kĩ thuật sản xuất không gây ô nhiễm, tiết kiệm năng lượng* và *có hiệu quả kinh tế cao.*

TÓM TẮT CHƯƠNG

Thực chất của CNSH là ứng dụng các quá trình sống của tế bào vào sản xuất ở quy mô công nghiệp. Sự sống biểu hiện ở 3 cấp độ : phân tử, gen và tế bào.

Ở cấp độ phân tử, từ các nguyên tố chủ yếu là *H, O, C và N* (chiếm hơn 96%) tế bào tạo nên các chất hữu cơ phân tử nhỏ và các loại biopolymer nhờ sự xúc tác của các enzyme có bản chất protein. Protein và nucleic acid là các đại phân tử sinh học thể hiện các tính chất đặc hiệu của sự sống.

Ở cấp độ gen mà bản chất là DNA, các tính trạng được biểu hiện thành từng đơn vị. Thông tin di truyền trên DNA được hiện thực hoá qua quá trình sinh tổng hợp protein : DNA –> RNA –> Protein. Đây là một quá trình phức tạp, chịu sự điều hoà chính xác theo chương trình phát triển cá thể dưới tác động của các nhân tố môi trường trong và ngoài tế bào.

Ở cấp độ tế bào, một cấu trúc gồm nhiều hệ thống phức tạp, sự sống biểu hiện đồng bộ và hài hoà. Nhờ cấu trúc phức tạp và tinh vi, tế bào thực hiện quá trình trao đổi chất như một nhà máy hoá học đặc biệt với nhiều ưu việt.

Do tế bào có nhiều ưu thế, CNSH sử dụng tế bào làm nhà máy sản xuất và công cụ thử nghiệm. Để đạt hiệu quả tốt hơn, CNSH có các biện pháp sử dụng tế bào khác nhau như : cố định, nuôi tế bào gốc trị bệnh, chế tế bào nhân tạo và dùng tế bào làm mô hình thử nghiệm sản phẩm,...

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao 30% dân số thế giới (ăn gạo) bị thiếu sắt ?
2. Các chất carbohydrate nào thường gặp ?
3. Đường đơn nào có số lượng lớn nhất trên Trái đất ?
4. Các chất hữu cơ phân tử nhỏ được tổng hợp theo nguyên tắc nào ?
5. Nguyên tắc bổ sung trong cấu trúc phân tử DNA có những hệ quả quan trọng nào ?
6. Giải thích tại sao tổng hợp hoá học khó thực hiện với phân tử protein ?
7. Gen insulin biểu hiện ở loại tế bào nào ?
8. Sự biệt hoá tế bào là gì ?
9. Các tín hiệu tế bào có vai trò gì ?
10. Tế bào nhân sơ và nhân chuẩn có những đặc điểm gì ?

Phần II
CÔNG NGHỆ SINH HỌC PHÂN TỬ

CHƯƠNG 3
CÁC KĨ THUẬT CỦA CÔNG NGHỆ GEN

Vào năm 1972 – 1973, Berg, Boyer và Cohen ở Mĩ đã tạo nên phân tử *DNA tái tổ hợp in vitro* từ ba nguồn vật liệu di truyền khác nhau. Tiếp theo, 1973 – 1974, nhóm Cohen, Helinski, Boyer đã lần đầu tiên nhận được DNA tái tổ hợp có hoạt tính sinh học. Sự khác nhau căn bản của kĩ thuật mới với phương pháp cũ ở chỗ cho phép *trong điều kiện thí nghiệm in vitro* (trong ống nghiệm) *tạo* thành *(ghép nối)* các tổ hợp *có hoạt tính* khi đưa trở vào tế bào sống từ các đoạn DNA khác nhau có lựa chọn. Có nhiều thuật ngữ đồng nghĩa để chỉ kĩ thuật này :

– *Kĩ thuật tái tổ hợp DNA* (DNA recombinant technology).

– *Kĩ thuật di truyền* (Genetic engeneering).

– *Kĩ thuật gen* (Gene engineering) hay *Công nghệ gen* (Genetic technology hay *gentech*).

– *Thao tác gen* (Gene manipulation).

– *Tạo dòng phân tử* (molecular cloning), vì nhờ nó một đoạn gen hay đoạn nucleic acid được nhân bản thành *dòng* gồm vô số bản sao giống nhau.

Tuy nhiên, khái niệm *kĩ thuật di truyền* có nghĩa rộng hơn, bao trùm hơn, gồm thao tác không chỉ với từng gen mà cả những phần lớn hơn của bộ gen và nhiều phương pháp khác như khuếch đại gen không qua tạo dòng.

I. SƠ ĐỒ KHÁI QUÁT

Kĩ thuật tái tổ hợp DNA được thực hiện qua nhiều công đoạn phức tạp và tinh vi, có thể nói là một *công nghệ* với các bước chủ yếu sau :

– Bước 1 : *Nuôi* tế bào chủ để tạo vector chuyển gen và *nuôi* tế bào cho (như tế bào người) cung cấp DNA.

– Bước 2 : *Tách* DNA plasmid và DNA tế bào cho (người).

– Bước 3 : *Cắt* cả 2 loại DNA bằng cùng một loại enzyme restriction endonuclesae EcoRI tạo các đầu so le cố kết (cohesive ends).

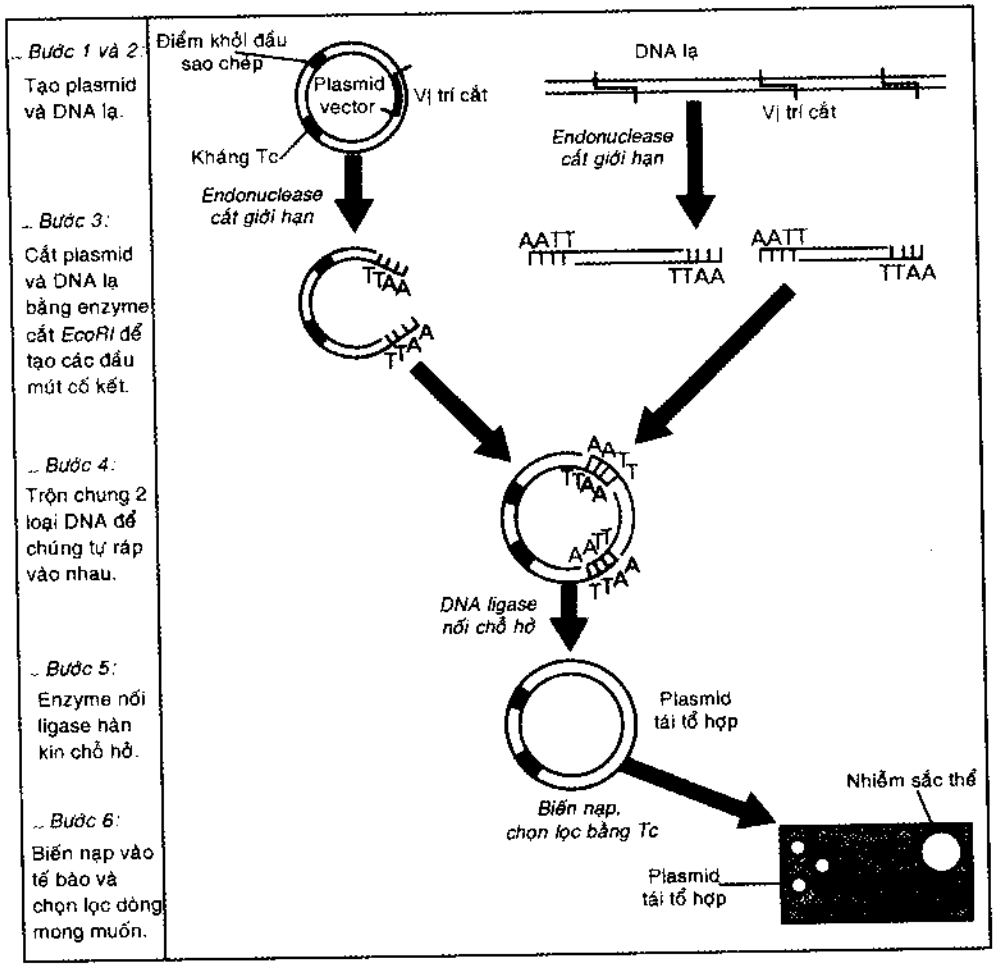
– Bước 4 : *Trộn chung* DNA plasmid đã bị cắt với đoạn DNA tế bào cho (người) để chúng gắn vào nhau bằng bắt cặp bổ sung nhờ các đầu so le cố kết.

– Bước 5 : *Thêm enzyme nối* ligase tạo liên kết hoá trị thành *DNA tái tổ hợp* hoàn chỉnh.

– Bước 6 : *Biến nạp DNA* tái tổ hợp vào tế bào nhận (vi khuẩn *E.coli*).

– Bước 7 : *Chọn lọc* và *tạo dòng* vi khuẩn mang gen lạ (tế bào nhận có plasmid tái tổ hợp mang một đoạn gen hay đoạn nucleic acid được nhân bản thành *dòng* gồm vô số bản sao giống nhau). Sau khi có dòng sẽ tạo điều kiện để gen biểu hiện tạo ra sản phẩm.

Sơ đồ khái quát sau giúp hình dung cụ thể các bước trong quá trình thực hiện (hình 3.1).



Hình 3.1. Sơ đồ khái quát tạo dòng DNA tái tổ hợp

II. CÁC CÔNG CỤ

1. Công cụ enzyme

Sinh học phân tử đã phát hiện và hiểu rõ cơ chế tác động của hàng loạt enzyme. Nhờ đó đã sử dụng chúng thành những công cụ hữu hiệu trong *cắt, nối* và *sao chép gen*.

a) Enzyme cắt hạn chế (Restriction endonuclease)

Năm 1962, V. Arber phát hiện enzyme *"hạn chế"* sinh sản của phage trong tế bào vi khuẩn và gọi là *restriction enzyme* (RE). Năm 1970, H. Smith đã tách được nó đầu tiên từ vi khuẩn *Haemophilus influenzae* được gọi là *HinII*. Các enzyme này cắt phân tử DNA ở giữa một cách đặc hiệu nên được gọi là *enzyme cắt hạn chế*. Do sự kiện này, có người cho rằng CNSH bắt đầu từ 1970. Ngay sau đó không lâu các nhà khoa học đã xác nhận rằng phần lớn các loài vi khuẩn có hệ thống chuyên biệt *hạn chế - biến đổi* (restriction - modification system) để bảo vệ tế bào khỏi sự xâm nhập của DNA lạ.

Các RE nhận biết DNA mạch kép ở những trình tự *điểm nhận biết* và cắt DNA ở ngay điểm này hay điểm kế cận. Các điểm này thường có trình tự 4 – 6 cặp nucleotide đối xứng đảo ngược nhau, gọi là các *palindrom*. Mỗi RE có trình tự nhận biết đặc trưng. Ví dụ :

– Restriction endonuclease Eco RI (từ *E.coli*) có trình tự nhận biết :

↓ *EcoRI* cắt

----G--A--A--T--T--C----- → - -----G A--A--T--T--C -----

- ---C--T--T--A--A--G----- → - -----C--T--T--A--A G-----

↑

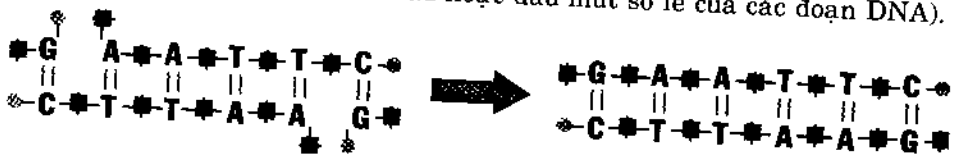
Các enzyme *EcoRI* và *BamHI* khi cắt DNA mạch kép tạo ra các đầu lệch ***cố kết*** hay "***dính***" (cohesive ends) vì các base bổ sung dễ bắt cặp để gắn lại với nhau như lúc chưa bị cắt rời. Nếu có một đoạn DNA lạ khác cùng bị cắt bởi một loại enzyme hạn chế, ví dụ *EcoRI*, thì nhờ các đầu cố kết đoạn DNA lạ có thể xen vào giữa. Tính chất quan trọng này được dùng để cắt và ghép gen (xem phần trên hình 3, phía sau). Tuy nhiên, có một số RE cắt tạo đầu tà như *HaeIII*.

Khoảng 3.000 RE đã được phát hiện với hơn 230 trình tự nhận biết khác nhau. Phần lớn các RE được tìm thấy ở vi khuẩn. Khoảng 25% vi khuẩn có ít nhất một RE, nhưng nó cũng được phát hiện ở virus, vi khuẩn cổ (*Archeabacteria*) *Eukaryotae*.

RE được đặt tên như sau (ví dụ *Eco*RI) : ***E*** từ *Escherichia*, ***co*** từ *coli*, ***R*** là dòng vi khuẩn R và I là thứ tự RE được phát hiện (I là đầu tiên). RE HindIII từ vi khuẩn ***Haemophilus influenzae*** dòng ***d***, phát hiện thứ III.

b) Enzyme nối (Ligase)

Quá trình nối 2 phân tử DNA với nhau để tạo phân tử DNA tái tổ hợp mới được xúc tác bởi một nhóm *enzyme nối (ligase)*. Các enzyme này xúc tác *phản ứng nối* bằng cách hình thành *cầu phosphodiester* gắn các nucleotide kề cận hay chụm đầu với nhau (hình 3.2). Ligase có thể thực hiện 2 kiểu phản ứng nối (đầu mút tà với nhau hoặc đầu mút so le của các đoạn DNA).



Hình 3.2. Cơ chế tạo liên kết phosphodiester của ligase

c) Enzyme phiên mã ngược (Reverse transcriptase)

Enzyme *reverse transcriptase* có khả năng tổng hợp nên *DNA một mạch* được gọi là *c-DNA* (complementary DNA) từ *khuôn mRNA* hoặc từ một đoạn polyribonucleotide tổng hợp hoá học. Nhờ enzyme reverse transcriptase này có thể tổng hợp hầu như bất cứ gen riêng biệt nào miễn có mặt mRNA của gen đó. Các c-DNA mạch đơn có thể được biến thành mạch kép nhờ DNA polymerase và được gọi là *c-DNA kép* (c-DNA duplex). Đoạn c-DNA kép được gắn vào plasmid và biến nạp vào vi khuẩn để tạo dòng c-DNA.

d) Các enzyme khác

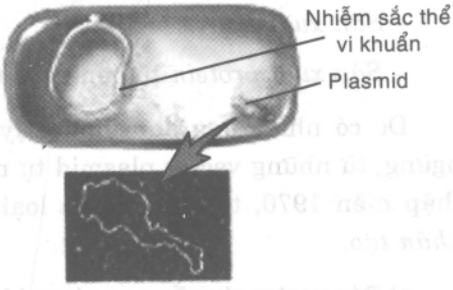
Một số enzyme thường dùng khác được nêu trên bảng 3.1.

Bảng 3.1. Một số enzyme thường dùng khác trong KTDT

Enzyme	*Chức năng*
Dnase I	Phân huỷ DNA mạch kép bằng thuỷ giải nội liên kết phosphodiester.
Nuclease BAL31	Phân huỷ cả 2 đầu mút 3' và 5' của DNA không cắt nội liên kết.
S1 nuclease	Phân huỷ DNA mạch đơn.
Đoạn Klenow	DNA polymerase chỉ còn hoạt tính exonuclease 3' –> 5'
Taq DNA polymerase	DNA polymerase chịu nhiệt từ vi khuẩn *Thermophilus aquatus*

2. Các vector chuyển gen

Ý tưởng về *vector chuyển gen* bắt nguồn từ các *plasmid của vi khuẩn*. Plasmid là những đoạn DNA nhỏ vòng tròn, có khả năng *sao chép* để tồn tại độc lập trong tế bào. Chúng có khả năng *mang một số gen* của vi khuẩn và các gen này có thể biểu hiện ra protein. Do đó các vật chuyển gen (vector) được sử dụng đầu tiên và dạng đơn giản nhất là các plasmid của vi khuẩn (hình 3.3).



Hình 3.3. Tế bào *E. Coli* có Plasmid với ảnh hiển vi điện tử

Vector chuyển gen là phân tử DNA có khả năng tự tái sinh, tồn tại độc lập trong tế bào và mang được gen cần thiết. Các vector chuyển gen phải thoả mãn các yêu cầu tối thiểu :

– Có các trình tự *khởi sự sao chép (ori)* để tự sao chép mà tồn tại độc lập.

– Có các *trình tự nhận biết*, nơi cắt để hở làm chỗ ráp đoạn gen lạ vào.

– Các *trình tự điều hòa* (promoter) tạo thuận lợi cho sự phiên mã gen lạ.

– Đảm bảo sự di truyền *bền vững của DNA tái tổ hợp*.

– Có *các gen đánh dấu* để dễ dàng phát hiện ra chúng hoặc các gen lạ.

Ngoài ra, nó còn có những đặc tính khác để cho việc tạo dòng dễ thực hiện :

– Chứa các gen làm vô hiệu hoá đoạn DNA không mong muốn bị gắn vào.

– Có nhiều bản sao để tách được ra khỏi tế bào với số lượng lớn và đảm bảo sự khuếch đại của gen gắn vào.

– Có các trình tự nucleotide cần thiết cho sự biểu hiển gen như *promoter, rbs* (ribosome binding site - trình tự gắn với ribosome để dịch mã).

Giá trị của các vector ở chỗ nó được cấu tạo thuận tiện cho mục đích sử dụng. Không có vector toàn năng cho chuyển gen, mà cần chọn lựa tuỳ đối tượng, tuỳ kích thước đoạn gen được tạo dòng. Chúng được cấu tạo với nhiều tính chất chuyên biệt để mang được các trình tự nucleotide như mong muốn.

Các vector chuyển gen có 5 ứng dụng quan trọng chủ yếu :

– *Tạo dòng* và *khuếch đại* trình tự của DNA (nhiều bản sao giống nhau).

– Nghiên cứu sự *biểu hiện* của một đoạn trình tự DNA.

– *Chuyển gen* vào tế bào các sinh vật khác.

– *Sản xuất RNA.*

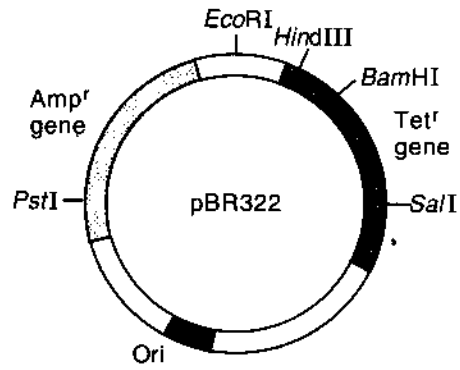
– *Sản xuất protein* từ gen được tạo dòng.

Do có nhiều ứng dụng như vậy, nên các vector được hoàn thiện không ngừng, từ những vector plasmid tự nhiên ở vi khuẩn vào đầu những năm của thập niên 1970, tiến tới nhiều loại *vector phức tạp*, rồi đến *nhiễm sắc thể nhân tạo.*

a) Các vector chuyển gen plasmid

Ở các *Prokaryotae,* các vector thường được sử dụng là các plasmid của vi khuẩn và các bacteriophage. Các plasmid được sử dụng đầu tiên làm vector chuyển gen. Chúng được cải biến để ngày càng thuận tiện hơn cho kĩ thuật tái tổ hợp DNA qua nhiều thế hệ.

Một trong những plasmid được sử dụng rộng rãi nhất là *pBR322* (hình 3.4). Như mô tả, plasmid này có gen kháng ampicilline (amp^R), gen kháng tetracyline (tet^R), trình tự xuất phát sao chép (*ori*) và nhiều trình tự nhận biết đặc hiệu cho các RE như *EcoRI* , *HindIII, BamHI, SalI*,... Nó có khả năng sao chép độc lập với bộ gen tế bào *E.coli* và tồn tại với số lượng trung bình 20 – 30 bản sao cho mỗi tế bào.



Hình 3.4. Plasmid pBR322.

Trong những điều kiện nuôi cấy nhất định có thể khuếch đại có chọn lọc làm tăng số plasmid đến hơn 1000 bản sao.

b) Các vector phage λ

Các phage (virus của vi khuẩn) cũng được dùng làm vector chuyển gen vì nhiều phage có khả năng thực hiện *tải nạp* mang gen từ tế bào vi khuẩn cho (donor) sang tế bào nhận (recipient). *Vector phage λ* được sử dụng rộng rãi để *lập ngân hàng gen*, vì nó mang được đoạn DNA lớn hơn (15 – 23 Kb), dễ bảo quản, dễ tách ra để phân tích. Ưu điểm nổi bật của các phage là chúng có *hệ thống tự động xâm nhập* và *sinh sản* trong tế bào vi khuẩn với hiệu quả cao hơn nhiều so với việc đưa plasmid vào tế bào vi khuẩn bằng biến nạp. Tuy nhiên, thao tác ban đầu phức tạp hơn.

DNA của *phage λ* có thể ở dạng vòng tròn hay thẳng nhờ 2 đoạn *cos* (12 nucleotide) ở 2 đầu mút, khi bị cắt ở giữa tách rời ra thành *2 vai (phải* và *trái)*. Đoạn *cos* này được ráp vào plasmid để tạo ra *vector cosmid* hoặc với *phage M13* tạo ra *phagemid*.

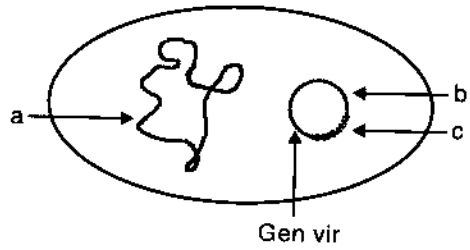
c) Các vector khác ở Prokaryotae

– *Cosmid* : Vector được cấu tạo nên từ *plasmid* có gắn đoạn *cos* của phage λ. *Cos* giúp cho DNA của phage λ từ dạng thẳng nối đầu lại thành vòng tròn. Cosmid chứa đoạn gen lạ dài đến 45Kb, được dùng để lập thư viện gen ở ruồi dấm, chuột, người,

– *Phage M13* là phage có *DNA sợi mạch đơn*. Vector *phage M13* có nhiều ứng dụng : xác định *trình tự nucleotide* của gen, sản xuất các *mẫu dò DNA* (probes) và gây *đột biến điểm định hướng* (site-directed mutagenesis).

d) Plasmid Ti

Plasmid Ti được sử dụng rộng rãi trong chuyển gen *ở thực vật*. Nó bắt nguồn từ vi khuẩn trong đất là *Agrobacterium tumifaciens* gây bệnh tạo khối u (tumor) ở thực vật. Nhân tố gây khối u là *plasmid Ti* (Tumor-inducing) có DNA vòng tròn khoảng 200Kb (hình 3.5). T-DNA là phần quan trọng của plasmid, nó được chuyển và gắn xen ngẫu nhiên vào bộ gen của tế bào thực vật chủ.



Hình 3.5. Tế bào *Agrobacterium tumifaciens* có plasmid Ti

a) DNA vi khuẩn. *b)* Plasmid Ti. *c)* T-DNA

Các chức năng thực hiện chuyển gen nằm ngoài T-DNA, nhưng trên plasmid *Ti* có nhiều cải biến được thực hiện để plasmid Ti trở thành vector thuận tiện trong chuyển gen vào thực vật.

e) Nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men YAC

Cho đến nay, ở *Eukaryotae* chỉ tìm được một loại plasmid duy nhất đó là *plasmid vòng tròn 2 micromet*, có nhiều trong tế bào *Saccharomyces cerevisiae*. Sự cải tiến plasmid này qua nhiều bước tạo thành *nhiễm sắc thể* (NST) *nhân tạo* nấm men được gọi tắt là *YAC* (yeast artificial chromosome).

YAC có khả năng chứa các đoạn DNA lạ dài đến 2000Kb.

Bảng 3.3. Khả năng mang xen đoạn DNA của một số vector

Hệ thống vector	*Tế bào chủ*	*Độ dài xen đoạn (Kb)**
Plasmid	*E. coli*	0,1 - 10
Bacteriophage λ	λ/*E. coli*	10 – 20
Cosmid	*E. coli*	35 – 45
Bacteriophage P1	*E. coli*	80 – 100
BAC (NST nhân tạo vi khuẩn)	*E. coli*	50 - 300
P1AC (NST nhân tạo phage P1)	*E. coli*	100 - 300
YAC (NST nhân tạo nấm men)	*S. cerevisiae*	100 – 2.000
MAC (NST nhân tạo động vật có vú)	Tế bào động vật được nuôi cấy	> 2.000
huAC (NST nhân tạo người)	Tế bào người nuôi cấy	> 2000

* *bp* (1 cặp base), *Kb* (Kilobase = 1000bp), *Mb* (Megabase = 1000000 base).

Tiếp theo, các *nhiễm sắc thể nhân tạo* được thiết lập cho các hệ thống tế bào chủ khác như :

– *BAC* (Bacterial artificial chromosome) – NST nhân tạo vi khuẩn.

– *MAC* (Mammalian AC) – NST nhân tạo động vật có vú.

– *P1AC* (P1 bacteriophage derived AC) – NST nhân tạo từ Phage P1.

3. Các hệ thống tế bào chủ

Nhiều hệ thống tế bào chủ khác nhau được sử dụng nhằm mục đích :

– Nuôi số lượng lớn để tách plasmid cho thí nghiệm tạo dòng.

– Dùng để biểu hiện gen, đặc biệt ở *Eukaryotae* bậc cao như động, thực vật.

– Dùng để sản xuất các protein tái tổ hợp.

Tuỳ mục đích sử dụng mà chọn một hệ thống thích hợp.

a) Vi khuẩn Escherichia coli (E. coli)

Một tế bào lí tưởng là một tế bào dễ nuôi cấy và dễ nhân giống, dễ dàng chấp nhận nhiều loại vector. Vi khuẩn *E.coli* đáp ứng các yêu cầu này và được sử dụng rất nhiều trong kĩ thuật tạo dòng. *E.coli* được nghiên cứu rất tỉ mỉ, rất nhiều chủng khác nhau đã được phân lập. Các nghiên cứu đó đã làm cơ sở cho sự ra đời của KTDT.

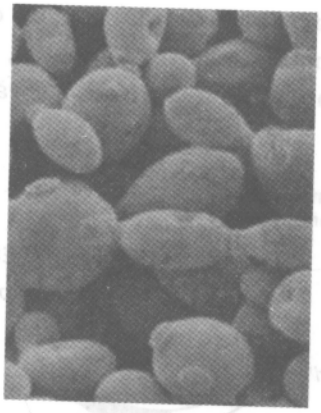
E.coli là vi khuẩn *Gram âm, hình que* (khoảng 1 micromet), không độc, thường gặp trong ruột người. Bộ gen là một phân tử DNA (nhiễm sắc thể) vòng tròn khoảng 4,6 x 10^6 cặp base, nằm ở *vùng nhân* (nucleoid) của tế bào. *E.coli* có thể được coi là một trong những tế bào vật chủ đơn giản nhất.

Ngoài *E.coli*, các vi khuẩn khác cũng được dùng làm vật chủ như : *Bacillus*, *Pseudomonas* và *Streptomyces*. Tuy nhiên, có những hạn chế nhất định với các vật chủ này, vì thường có rất ít vector thích hợp.

b) Nấm men Saccharomyces cerevisiae

Nấm men *S. cerevisiae* (hình 3.6) được sử dụng rộng rãi làm tế bào chủ trong KTDT vì rất nhiều lí do :

– Thứ nhất, nó là một *Eukaryotae* đơn bào (khoảng 5 micromet), được biết rất chi tiết về di truyền và sinh lí, nên là *đối tượng mô hình* nghiên cứu sinh vật *Eukaryotae*. Có thể nuôi tế bào nấm men quy mô lớn trong các bioreactor và dễ dàng thu sinh khối tế bào.



Hình 3.6 . Tế bào nấm men *S. cerevisiae*

– Thứ hai, vài promoter mạnh được phân lập từ *S. cerevisiae* và có plasmid gọi là *vòng tròn 2 micromet* dùng làm vector YAC biểu hiện gen.

– Thứ ba, *S. cerevisiae* có khả năng thực hiện các biến đổi sau dịch mã như đường hoá hay phosphoril hoá,... để protein có đủ hoạt tính sinh học.

– Thứ tư, nấm men này bình thường *tiết ra rất ít loại protein*, nếu được thiết kế phóng thích các protein tái tổ hợp ngoại bào, sản phẩm dễ làm tinh sạch.

– Thứ năm, nó được sử dụng từ nhiều thế kỉ qua trong sản xuất bánh mì và bia. Do đó FDA (Cơ quan Kiểm tra thuốc và thực phẩm Mĩ) đã đưa nó vào danh sách *sinh vật an toàn*, nên ít đòi hỏi cao về thử độc tố.

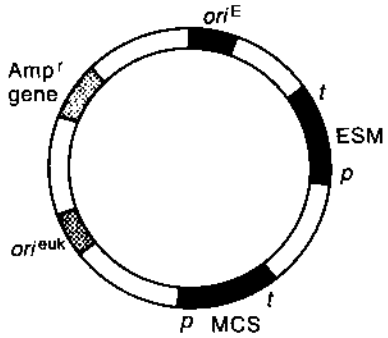
Bộ gen của *S. cerevisiae* có khoảng 1,3 x10^7 cặp base, đã được giải kí tự chuỗi vào năm 1996, nhiều hơn của *E.coli* khoảng 3,5 lần.

Thông thường, sau khi protein của tế bào *Eukaryotae* được tổng hợp xong, nó phải được biến đổi tiếp như đường hoá hay phosphoril hoá mới có hoạt tính sinh học. Tế bào *E. coli* và các *Prokaryotae* khác không có khả

năng thực hiện các biến đổi này. Do đó, *S. cerevisiae* có nhiều lợi thế trong biểu hiện gen của tế bào *Eukaryotae* hơn *E. coli*.

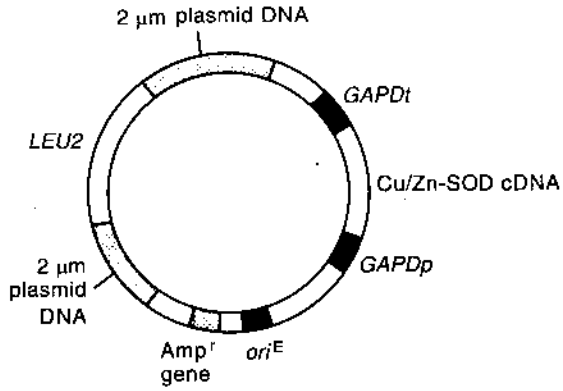
Các nấm khác cũng được dùng trong các thí nghiệm tạo dòng gen là *Pichia pastoris, Aspergillus nidulans* và *Neurospore crassa*.

Chức năng quan trọng của hệ thống nấm men và các hệ thống tế bào *Eukaryotae* khác là được dùng để biểu hiện, sản xuất các protein tái tổ hợp của *Eukaryotae*. Về nguyên tắc, vector biểu hiện gen ở tế bào *Eukaryotae* không khác với vector ở *Prokaryotae*. Các vector biểu hiện gen ở tế bào *Eukaryotae* và nấm men được thiết kế cho sự biểu hiện gen gồm có promoter, các tín hiệu stop, trình tự gắn poly-A vào mRNA và các gen đánh dấu như trên các hình 3.7 và 3.8.



Hình 3.7. Vector tổng quát biểu hiện gen ở tế bào *Eukaryotae*

Ori^E – sao chép ở *E. coli* ; ori^{euk} – sao chép ở tế bào *Eukaryotae* ; p – promoter ; t – terminator (điểm kết thúc) ; ESM – gen đánh dấu chọn lọc *Eukaryotae* ; MCS (multicloning site) – nhiều điểm nhận biết của RE



Hình 3.8. Vector biểu hiện gen ở tế bào *Saccharomyces cerevisiae*

Cu/Zn-SOD cDNA – đoạn CDNA mã hoá enzyme Cu/Zn Supeoxide dismutase chèn giữa promoter GAPDp và ter.minator GAPDt ; Ori^E – sao chép ở *E. Coli*; LEU2 và Amp^r các gen đánh dấu

c) Các hệ thống tế bào thực vật

Có một số loại tế bào thực vật được sử dụng như các hệ thống vật chủ trong các thí nghiệm thao tác gen. Tảo đơn bào, chẳng hạn như *Chlamydomonas reinhardii,* có tất cả mọi ưu việt của vi sinh vật cộng với cấu trúc và chức năng của các tế bào thực vật, chúng sẽ được sử dụng ngày càng nhiều trong các thí nghiệm thao tác di truyền.

Các tế bào thực vật và động vật khác thường được nuôi cấy trong các môi trường thích hợp, và ở điều kiện này, chúng được sử dụng dễ dàng hơn

nhiều trong các thí nghiệm thao tác gen so với các tế bào trong cơ thể. Một số khía cạnh của KTDT trong các tế bào động vật và thực vật nuôi cấy sẽ được trình bày ở các phần sau.

d) Các hệ thống tế bào động vật

Các hệ thống tế bào động vật nuôi rất phức tạp, nhưng trong nhiều trường hợp cần thiết cho sự biểu hiện ra protein có hoạt tính sinh học. Các hệ thống chủ yếu gồm :

– Tế bào thận khỉ xanh châu Phi (African green monkey kidney (COS).

– Tế bào thận chuột đồng con (Baby hamster kidney (BHK).

– Tế bào thận phôi người (Human embryonic kidney (HEK-239).

– Tế bào tử cung chuột bạch (Chinese hamster ovary (CHO).

– Tế bào côn trùng nuôi *Baculovirus* biểu hiện protein người.

– Tế bào tuyến trùng *Caenorhabditis elegans*.

III. CÁC KĨ THUẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP CĂN BẢN

1. Lai nucleic acid

Công nghệ gen sử dụng các kĩ thuật hoá lí thông dụng như : *tách chiết* và *tinh sạch DNA và RN*, xác định số lượng và đánh dấu DNA, điện di trên gel, ...

Sử dụng đặc tính biến chất rồi hồi tính, có thể tiến hành *lai DNA* với DNA, DNA với RNA và RNA với RNA. 3 phương pháp lai trên pha rắn được sử dụng rộng rãi nhất :

– Thấm Southern (Southern blot), do ông E. Southern tìm ra, dùng cho DNA.

– Thấm Northern (Northern blot) dùng cho RNA.

– Phương pháp dot (điểm) và slot (khe) blot dùng cho RNA và DNA.

Lai tại chỗ (in situ hybridisation) là một kiểu lai phân tử, trong đó trình tự nucleic acid cần tìm (trình tự đích) nằm ngay trong tế bào hay trong mô. Lai tại chỗ cho phép nghiên cứu nucleic acid ngay trên nhiễm sắc thể, khuẩn lạc hay mô tế bào mà không cần tách chiết chúng. Kiểu lai này có nhiều ứng dụng rất đa dạng.

2. Thu nhận gen

Có thể thu nhận gen để thực hiện kĩ thuật tái tổ hợp DNA bằng 3 phương pháp khác nhau.

a) Thư viện DNA từ bộ gen

Đây là phương pháp được sử dụng rộng rãi ngay từ buổi đầu của sự phát triển kĩ thuật tái tổ hợp DNA. Toàn bộ DNA của một sinh vật được cắt đoạn nhỏ bằng lắc cơ học hay bởi các RE rồi gắn vào các vector tạo dòng, nên được gọi bằng tiếng Anh là phương pháp *Shotgun* (bắn đạn chài).

Hiện nay, nó được sử dụng trong việc lập *ngân hàng của DNA bộ gen* (Bank of genomic DNA) hay *thư viện của DNA bộ gen* (genomic DNA libraries). Thư viện DNA bộ gen người được xây dựng như sau : đầu tiên là các đoạn dài DNA 300000 – 400000bp được gắn vào YAC hoặc BAC tạo dòng, từ các dòng này cắt đoạn nhỏ trung bình 30000 – 40000bp gắn vào cosmid và cuối cùng là các đoạn trung bình 4000bp gắn vào plasmid để giải kí tự chuỗi .

b) Tổng hợp gen bằng phương pháp hoá học

Muốn tổng hợp hoá học phải *biết trình tự nucleotide của gen*. Sự hiểu biết bộ gen thúc đẩy nhanh đáng kể việc tổng hợp nhân tạo các gen và đã có máy tự động tổng hợp DNA (DNA synthetiser).

Lần đầu tiên vào năm 1977, K. Itakura và Boyer đã thành công trong tổng hợp nhân tạo *gen mã hoá hormone somatostatin* (chỉ 14 amino acid) và biểu hiện trong tế bào *E.coli*. Sau đó, tạo ra các nòi *E.coli* mang gen tổng hợp hoá học này và cho chúng sản sinh ra *insulin, hormone tăng trưởng ở người* (somatotropin) và các hormone peptide như bradikinin và angiotensin, neuropeptide leuencephalin.... Các tế bào *E.coli* mang plasmid tái tổ hợp đã tạo ra khoảng 3 triệu phân tử hormone tăng trưởng ở người trong một tế bào. Polypeptide này hoàn toàn tương tự hormone tăng trưởng tự nhiên ở người.

c) Lập ngân hàng c-DNA

Trong thực tiễn, phương pháp thứ ba *tạo gen từ các mRNA* thông tin được sử dụng rộng rãi nhờ enzyme *phiên mã ngược* (reverse transcriptase). Nó có khả năng tổng hợp nên *DNA mạch đơn* được gọi là *c-DNA* (complementary DNA) từ khuôn mRNA hoặc từ một đoạn polyribonucleotide tổng hợp hoá học. Nhờ enzyme này có thể tổng hợp hầu như bất cứ gen nào miễn có mặt mRNA của gen đó. Các c-DNA mạch đơn được biến thành mạch kép nhờ DNA polymerase và được gọi là *c-DNA kép*. Đoạn c-DNA kép được gắn vào plasmid và biến nạp vào vi khuẩn để tạo dòng c-DNA (hình 3.11).

Các dòng c-DNA chỉ chứa những đoạn gen đã được phiên mã ra mRNA và vì tế bào của các mô đã được biệt hoá sẽ có các loại mRNA khác nhau, nên ngân hàng c-DNA nhận được sẽ phụ thuộc vào kiểu tế bào được sử dụng.

Sử dụng *ngân hàng c-DNA* sẽ có nhiều ưu thế :

– Thứ nhất, các dòng c-DNA chứa *trình tự mã hoá liên tục* của một gen (các gen gián đoạn có các intron không mã hoá đã bị loại bỏ).

– Thứ hai, những tế bào chuyên hoá tạo một số lớn các protein một loại và *mRNA* tương ứng *của protein giàu* đó sẽ dễ tách ra để tạo ngân hàng c-DNA. Nhờ vậy, giảm nhẹ đáng kể việc xác định đúng dòng mong muốn từ ngân hàng gen. Ví dụ, hemoglobine được tạo ra với số lượng lớn ở hồng cầu, các mRNA globine có tỉ lệ cao, nên các gen globine thuộc số những gen đầu tiên được tạo dòng.

Bằng con đường này, đã nhận được và tạo dòng các gen mã hoá cho globine của người, động vật và chim, cho protein thuỷ tinh thể mắt bò, cho ovalbumine (protein lòng trắng trứng), cho fibroin tơ tằm,...

3. Phương pháp tạo plasmid tái tổ hợp

Bước tiếp theo của KTDT là gắn các đoạn DNA hay các c-DNA vào vector chuyển gen để tạo nên plasmid có mang DNA lạ được gọi là *plasmid tái tổ hợp* (recombinant plasmid) hay *khảm* (chimeric). Có nhiều phương pháp gắn các đoạn DNA vào vector chuyển gen. Phản ứng sau cùng được thực hiện nhờ enzyme DNA ligase.

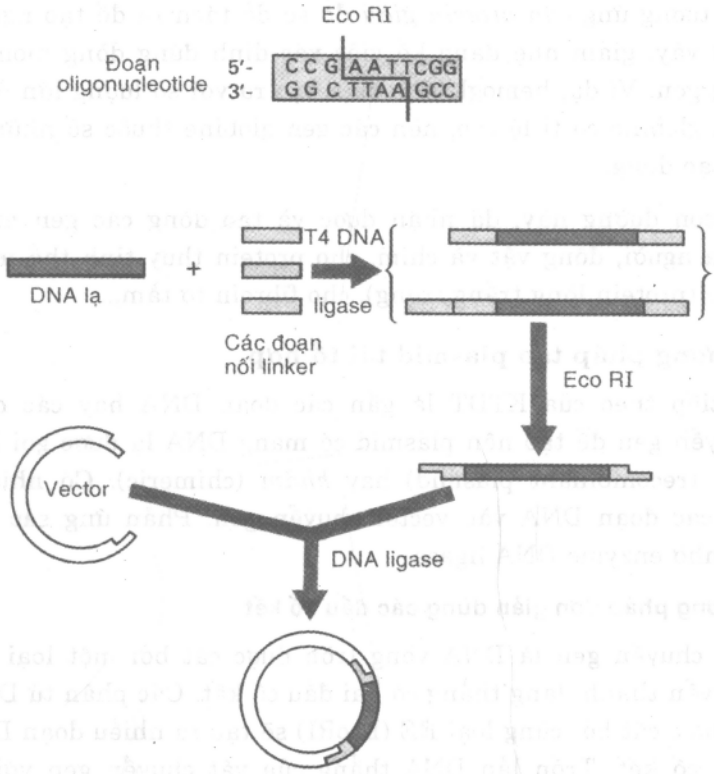
a) Phương pháp đơn giản dùng các đầu cố kết

Vector chuyển gen là DNA vòng tròn được cắt bởi một loại RE (ví dụ EcoRI) chuyển thành dạng thẳng có hai đầu cố kết. Các phân tử DNA của bộ gen khác được cắt bởi cùng loại RE (EcoRI) sẽ tạo ra nhiều đoạn DNA thẳng có các đầu cố kết. Trộn lẫn DNA thẳng của vật chuyển gen với các đoạn DNA lạ. Các đầu cố kết của 2 loại DNA bổ sung bắt cặp với nhau. Enzyme ligase hàn dính các loại DNA lại với nhau tạo ra plasmid tái tổ hợp (hình 3.1, phía trên). Phương pháp này được sử dụng rộng rãi để lập ngân hàng gen của một sinh vật.

b) Phương pháp dùng các đoạn nối (linkers)

Các đoạn *oligonucleotide* (đoạn DNA hay RNA ngắn có 10 đến 20 nucleotide) có thể được tổng hợp hoá học nhân tạo. Như trên hình 3.9 mô tả, các phân tử oligonucleotide ngắn được tổng hợp sao cho ở giữa có *trình tự palindrom đặc hiệu* đối với một RE (ví dụ, EcoRI) để làm *các đoạn nối* (linkers). *Ligase DNA* của phage T4 có đặc tính nối các đoạn DNA đó lại với nhau. Nhờ vậy đoạn DNA lạ có thể gắn với các đoạn oligonucleotide tổng hợp với trình tự cần thiết. Các đoạn nối sẽ gắn vào 2 đầu của đoạn DNA lạ và khi cắt bằng RE (ví dụ, EcoRI) nó sẽ có *2 đầu cố kết* của *EcoRI*. Nó có thể

được gắn vào vector chuyển gen cũng bị cắt bởi *EcoRI*, mặc dù bản thân nó trước đó không có các trình tự nhận biết đặc hiệu đối với RE. Phương pháp này thường được sử dụng để *gắn các c-DNA* và các đoạn *DNA có đầu mút tà* vào plasmid.



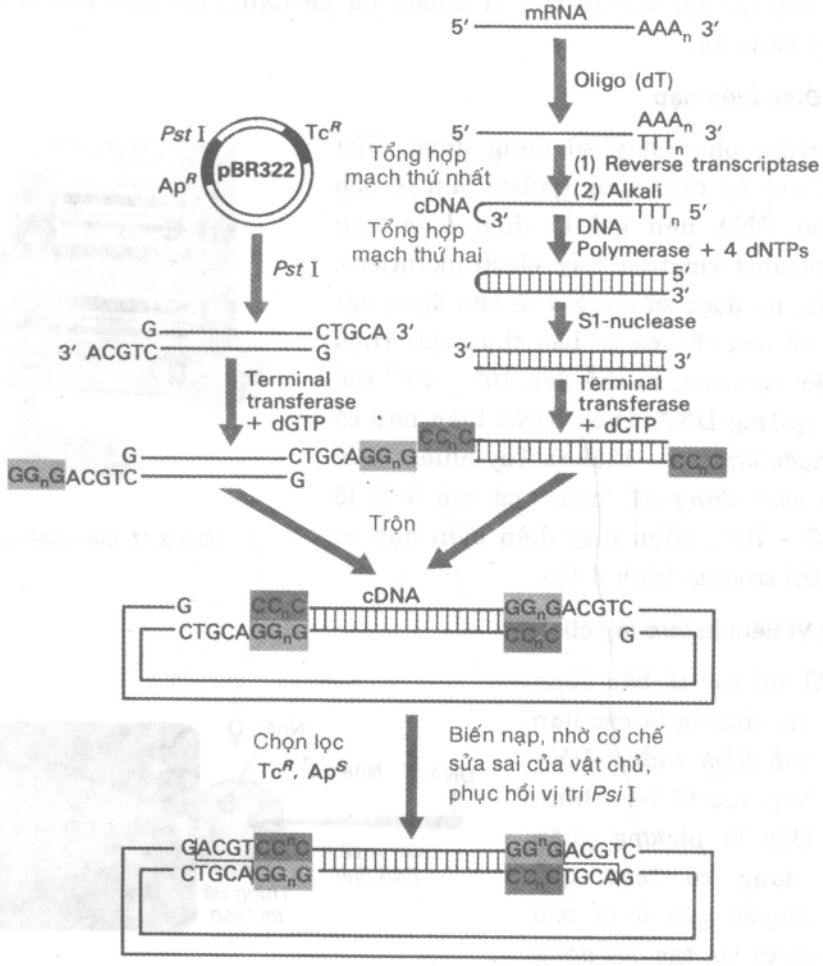
Hình 3.9. Dùng các đoạn nối linkers tạo DNA tái tổ hợp

c) Phương pháp dùng enzyme terminal transferase

Phương pháp thứ ba này dựa vào khả năng đặc biệt của enzyme *terminal nucleotidyl transferase,* có thể *gắn cùng một loại nucleotide thành chuỗi (homopolymer)* vào đầu mút 3'OH của mạch DNA.

Như hình 3.10 mô tả, một loại DNA có *đầu hydroxy-3'OH* hở do bị cắt bởi exonuclease hay RE, được *ủ với enzyme terminal transferase* và được thêm vào *một loại nucleotide* (ví dụ, *dGTP*). Plasmid có điểm nhận biết đặc hiệu do RE*PstI* cắt, sau khi ủ với terminal transferase nó tạo 2 đầu mút *3'GGGGG*. Đồng thời, DNA lạ cũng được cắt và xử lí với terminal transferase, chỉ khác là thêm vào loại nucleotide bắt cặp bổ sung, đó là *dCTP,* để tạo các đuôi *3'CCCCC*. Khi trộn lẫn 2 loại DNA với nhau, các đầu

mút của 2 loại homopolymer có trình tự bổ sung với nhau sẽ bắt cặp (---GGGGG3'/3'CCCCC---) nên đoạn DNA lạ có thể gắn vào plasmid. Enzyme DNA polymerase I sẽ gắn các nucleotide tương ứng vào các chỗ trống và ligase sẽ hàn dính lại. Trên plasmid khảm có 2 điểm nhận biết của *PstI*, điều này tạo thuận lợi về sau khi muốn cắt đoạn DNA lạ rời ra.



Hình 3.10. Dùng enzyme terminal transferase gắn DNA lạ vào plasmid. Sinh tổng hợp gen từ mRNA và tạo c-DNA mạch kép.

4. Biến nạp DNA tái tổ hợp vào tế bào

Sau khi tạo *DNA tái tổ hợp*, việc tiếp theo là *biến nạp* đưa nó vào lại tế bào chưa mang plasmid. *Biến nạp* được thực hiện với nhiều cách khác nhau.

a) Hoá biến nạp

DNA tái tổ hợp được ủ với số lượng lớn *tế bào vi khuẩn* chưa có plasmid, có khả năng dung nạp (competent). Xử lí $CaCl_2$ lạnh, kèm sốc nhiệt (42^0C trong 2 phút) thì hiệu quả tạo các *thể biến nạp* (transformants) cao (10^5-10^6 thể biến nạp/1mg của DNA siêu xoắn). Những cải tiến tiếp theo đã tăng hiệu quả lên gấp 100 – 1000 lần. Từ năm 1970 trở đi, vấn đề đưa plasmid tái tổ hợp trở lại vào tế bào vi khuẩn đã dễ dàng, coi như không có khó khăn gì đáng kể.

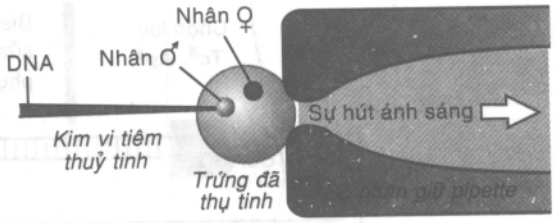
b) Điện biến nạp

Phương pháp này sử dụng *dòng điện cao thế cục bộ theo xung* (pulse) làm tế bào hấp thụ DNA nên gọi là *điện biến nạp* (electrotransformation hay electroporation). Lúc đầu, nó được sử dụng ở tế bào động vật có vú, về sau cho cả tế bào thực vật. Hiệu quả biến nạp cao, có thể đến 10^9 – 10^{10} thể biến nạp/1mg DNA. Đoạn DNA biến nạp có kích thước lớn (25 – 135kb). Tuy nhiên, tỉ lệ *tế bào chết đáng kể*, hiệu quả cao ở tỉ lệ chết 50 – 70%. Hiện máy điện biến nạp có bán ở thị trường (hình 3.11).

Hình 3.11. Máy điện biến nạp

c) Vi tiêm (micro-injection)

Đối với các tế bào động vật có vú, thường là các hợp tử, có thể *tiêm thẳng DNA* tái tổ hợp vào tế bào (hình 3.12). Đây là phương pháp thông dụng có hiệu quả trong chuyển gen ở tế bào động vật có vú, tạo các *động vật chuyển gen* (transgenic animals).



Hình 3.12. Vi tiêm (Microinjection)

d) Bắn DNA vào tế bào

Các *hạt kim loại tungsten* hay *vàng* (đường kính trung bình 4 micromet) mang DNA hoặc RNA, được bắn (theo đúng nghĩa) với tốc độ nhanh và xuyên thủng vách tế bào để đưa DNA hoặc RNA vào trong bằng súng bắn

DNA (hình 3.13). Phương pháp này có nhiều ưu thế và được dùng nhiều trong tạo các *thực vật nhiễm gen* (transgenic plants).

Ngoài ra, còn nhiều phương pháp khác đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào như dùng *màng lipid* (*liposome*) bao DNA để đưa vào tế bào.

Các *vector virus* tự động thực hiện *tải nạp* (transduction) đưa DNA tái tổ hợp vào tế bào với hiệu suất cao hơn nhiều, nên cũng được sử dụng rộng rãi ở cả tế bào người, động và thực vật.

Hình 3.13. Súng bắn DNA

5. Chọn lọc, tạo dòng và sự biểu hiện của gen

Công việc tiếp theo là kiểm tra sự hiện diện của gen mong muốn, *chọn lọc* đúng dòng tế bào như ý. Khi xác nhận DNA tái tổ hợp đã xâm nhập vào tế bào và mang đúng gen cần thiết thì cho chúng sinh sản để *tạo dòng* và tạo điều kiện cho gen *biểu hiện*.

a) Xác định dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp

Trong thí nghiệm tạo plasmid tái tổ hợp, các dòng vi khuẩn mọc lên có 3 loại như sau :

– Tế bào vi khuẩn không nhận được plasmid.

– Tế bào nhận được plasmid không có gen lạ vào.

– Tế bào vi khuẩn nhận được đúng plasmid tái tổ hợp.

Vì vậy việc xác định đúng các dòng vi khuẩn chứa plasmid tái tổ hợp phải mất nhiều công sức. Các số liệu sau đây cho thấy công việc phức tạp cỡ nào. Nếu muốn tạo dòng một gen bất kì nào từ *thư viện bộ gen* người thì phải lấy 1 đoạn từ 100000 đoạn khác nhau. Hiệu quả biến nạp thường khoảng 1/10000 plasmid vào được tế bào, mà chỉ số ít có mang gen. Tính ra xác suất mà một tế bào bất kì mang được đoạn gen mong muốn từ thư viện gen của người *thấp hơn 1 phần tỉ*.

Có 3 hướng chính trong thử nghiệm tách dòng từ thư viện DNA là : *lai nucleic acid, phát hiện kiểu hình* và *phản ứng miễn nhiễm*. Ngoài ra, có phương pháp *mất hoạt tính do xen đoạn* chỉ có thể sử dụng đối với các vector (ví dụ : pBR322) có mang 2 hoặc nhiều hơn các *gen kháng thuốc*.

Sau khi đã chọn lọc xong, tế bào được sinh sản để tạo dòng và cho gen biểu hiện.

b) Sự biểu hiện của gen được tạo dòng

Muốn gen tạo dòng có biểu hiện ra protein cần cấu tạo vector có đủ *các yếu tố phiên mã* và *dịch mã*. Các vector này gọi là *vector biểu hiện*.

Mục đích của việc tạo dòng các gen của các động vật có vú, nhất là của người, là tạo ra các sản phẩm đúng như trong cơ thể với số lượng lớn và có giá trị thương mại. Sự biểu hiện của *các gen Eukaryotae* trong tế bào vi khuẩn nhiều khi gặp trở ngại, do đó cần phải tìm các nhân tố cho gen biểu hiện tối đa như :

– *Số lượng hợp lí* các bản sao của vector plasmid đối với một tế bào.

– Chọn *promoter mạnh* để phiên mã tốt.

– Có trình tự tạo điểm bám vào ribosome *(rbs)* và *DNA phụ* cho dịch mã tốt.

– Chọn lựa các *codon tốt* cho dịch mã trong gen được tạo dòng.

– DNA tái tổ hợp có sự *ổn định lâu dài*.

– Tránh sự *thuỷ giải protein* (proteolysis) do các enzyme của tế bào.

Kĩ thuật tái tổ hợp DNA nêu trên phải qua nhiều bước phức tạp mới tạo được dòng tế bào như mong muốn và nó giúp giải quyết có hệ thống nhiều vấn đề từ gen đến sự biểu hiện của chúng thành các phân tử protein.

IV. PHƯƠNG PHÁP PCR

Vào năm 1985, K. Mullis đã phát minh ra phương pháp đơn giản để khuếch đại nhanh nhiều bản sao (amplification) của các đoạn DNA mà không qua tạo dòng. Kĩ thuật này được gọi là *polymerase chain reaction*, viết tắt là *PCR*, được hiểu là *phản ứng polymerase dây chuyền*. Sự khuếch đại bằng PCR được thực hiện *in vitro* trong một ống nghiệm plastic nhỏ (ependoff), khác hẳn với sự tạo dòng các đoạn DNA *in vitro* được gắn vào plasmid của tế bào vi khuẩn hay nấm men. Kĩ thuật này được ứng dụng nhanh và có ý nghĩa cách mạng đối với sự phát triển của sinh học phân tử và KTDT.

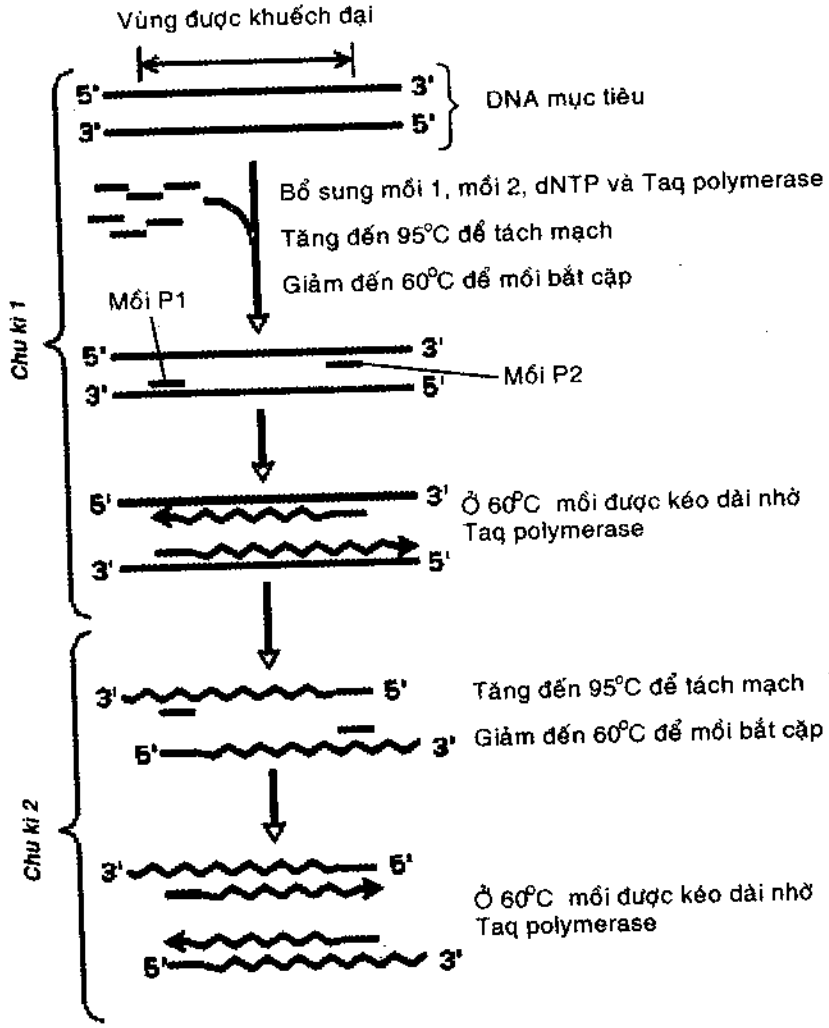
1. Nguyên tắc thực hiện

PCR là kĩ thuật *khuếch đại* một đoạn trình tự DNA đặc hiệu *in vitro* do sự xúc tác của enzyme *DNA polymerase*. Sự khuếch đại này được thực hiện nhờ các *chu trình nhiệt lặp lại* (có thể đến 35 lần) gồm đun nóng (95^0C), làm nguội (37 – 65^0C) và ủ dài ở 72^0C. Trong dung dịch có các *primer* (đoạn mồi) P1 và P2, mỗi loại sẽ bắt cặp bổ sung với đầu mạch đơn tương ứng (hình 3. 14).

Nhờ vậy 1 mạch kép DNA, sau phản ứng do DNA polymerase thực hiện sẽ thành 2 mạch DNA kép và có thể thực hiện chu trình khuếch đại mới : 2 thành 4 và 4 thành 8 theo cấp số nhân.

Phản ứng được thực hiện trong ống nghiệm plastic nhỏ, có mẫu DNA, primer và DNA polymerase, được gắn vào hệ thống nung nóng có điều chỉnh thành chu kì nung nóng và làm nguội theo chương trình định sẵn gọi là *thermocycler*, đây chính là *máy PCR*.

2. Các cấu phần của phản ứng



Hình 3.14. Sự khuếch đại một đoạn DNA bằng PCR qua 2 chu kì

Trong các ống nghiệm plastic nhỏ có các thành phần chủ yếu sau :

– *Khuôn mẫu* (template) tức đoạn DNA cần khuếch đại. Ưu thế khác đối với mẫu là không cần *sự tinh sạch* cao.

– Các *oligonucleotide primer* (các mồi) còn gọi là *amplifier* (nhân tố khuếch đại), *oligo* hay *primer*. Trước hết, primer cần có *kích thước hợp lí*, khoảng 18 và 25 nucleotide. Thiết kế *primer* hợp lí có ý nghĩa quan trọng.

– *Polymerase chịu nhiệt* (*Taq-polymerase*) từ *Thermophilus aquatus*.

– *dNTP* : Các loại nucleotide triphosphate.

– *Dung dịch đệm* (buffer) thích hợp và $MgCl_2$.

3. Giá trị sử dụng

Phương pháp này có ý nghĩa lớn vì nhiều lí do :

– Thời gian thực hiện *cực nhanh*, chỉ cần mất 3 giờ để khuếch đại một trình tự DNA được quan tâm. Trong khi đó phương pháp tạo dòng của kĩ thuật tái tổ hợp DNA phải mất cả tuần hoặc lâu hơn.

– *Đơn giản* và *ít tốn kém* : Nó được thực hiện trong ống nghiệm plastic nhỏ gồm các thành phần tối thiểu và được sử dụng đồng thời. Trong khi đó, phương pháp tạo dòng điển hình cần các vật liệu đắt tiền như màng, nucleotide triphosphate mang dấu phóng xạ và việc thực hiện cần các thao tác khéo léo đặc biệt.

– *Độ tinh sạch* của mẫu *không cần cao* : PCR có thể thực hiện với các mẫu nucleic acid thô. Ví dụ, mẫu máu hay các dấu vết trong phân tích pháp y. Điều này ngược lại với kĩ thuật tái tổ hợp DNA, đoạn gen hoặc vector đều cần tương đối tinh khiết.

Nhờ các ưu thế trên, PCR đã có sức hấp dẫn ngay từ lúc ra đời trong việc khuếch đại các trình tự nucleic acid đặc hiệu và chẩn đoán phân tử.

Giới hạn duy nhất đối với phương pháp này là phải biết trình tự nucleotite (hoặc ít nhất một phần) của đoạn cần khuếch đại. Nó không thay thế kĩ thuật tái tổ hợp DNA mà góp phần đáng kể bổ sung cho kĩ thuật này.

4. Sự hoàn thiện nhanh và mở rộng ứng dụng của PCR

Từ khi ra đời đến nay, PCR có vai trò cách mạng hoá trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu và ứng dụng khác nhau như chẩn đoán nhanh, giải kí tự chuỗi bộ gen, gây đột biến điểm định hướng,... Có thể thực hiện PCR *in situ* (ngay trong tế bào) với cả DNA và RNA. Sức mạnh của PCR kết hợp với các

kĩ thuật khác của tạo dòng phân tử giúp sinh học xâm nhập vào nhiều lĩnh vực mà trước đây khó với tới.

Do dễ thực hiện, đơn giản và có nhiều ứng dụng rộng rãi, nên PCR được hoàn thiện không ngừng. Trong một thời gian ngắn, nhiều biến dạng PCR mới ra đời.

– *RT-PCR* (reverse transcriptase PCR) là kĩ thuật mà RNA có thể được dùng làm khuôn mẫu cho sự khuếch đại PCR sau khi chuyển đổi thành c-DNA, còn gọi RNA-PCR hay RT-PCR. RT-PCR nhạy hơn các phương pháp khác được dùng cho sự phân tích RNA.

– *RT-PCR cạnh tranh* (*Competitive RT-PCR*) là kĩ thuật thường được dùng trong định lượng các loại mRNA chuyên biệt.

– *Real-Time PCR* là phương pháp có thể giúp phát hiện những sản phẩm PCR tích luỹ được tại *thời điểm thực tế* trong quá trình khuếch đại gen. Nhờ vậy, có thể đánh giá sự tích luỹ sản phẩm và định lượng *qPCR* (quantitative PCR – là PCR định lượng).

– *PCR-ELISA* (enzyme linked immunoassay) là sự kết hợp với miễn dịch trong chẩn đoán.

Tóm lại, PCR đã phát triển nhanh từ mẫu ban đầu là DNA đến cả mẫu RNA, từ định tính tiến tới định lượng và cả các loại hình khác, mà ở đây chưa kể hết.

V. XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ CÁC NUCLEOTIDE CỦA GEN

Bằng kĩ thuật tạo dòng, con người có thể nhận được DNA của một gen hoặc một đoạn dài với số lượng tùy ý. Nhờ đó, phân tử DNA trở nên dễ nghiên cứu và phương pháp có ý nghĩa quan trọng hàng đầu là *xác định trình tự các nucleotide* hay *giải kí tự chuỗi* (Sequencing) của DNA đã ra đời.

1. Phương pháp hoá học Maxam và Gilbert

Phương pháp *xác định trình tự các nucleotide* của Maxam và Gilbert (1977), còn gọi là phương pháp hoá học. Các đoạn nucleotide giống nhau được đánh dấu đồng vị phóng xạ P^{32} ở đầu 5' và chia thành 4 nhóm, mỗi nhóm chịu một xử lí hoá học làm biến đổi 1 hay 2 base. Xử lí được thực hiện để trung bình mỗi đoạn nucleotide chỉ hỏng ở 1 base. Sau xử lí, mỗi nhóm chứa một số đoạn nucleotide có chiều dài khác nhau. 4 nhóm được đưa lên 4 bản *gel acrylamide* riêng ở phía cực âm, các đoạn ngắn hơn sẽ di chuyển xa hơn về phía cực dương. Dựa vào kết quả điện di có thể xếp các đoạn DNA

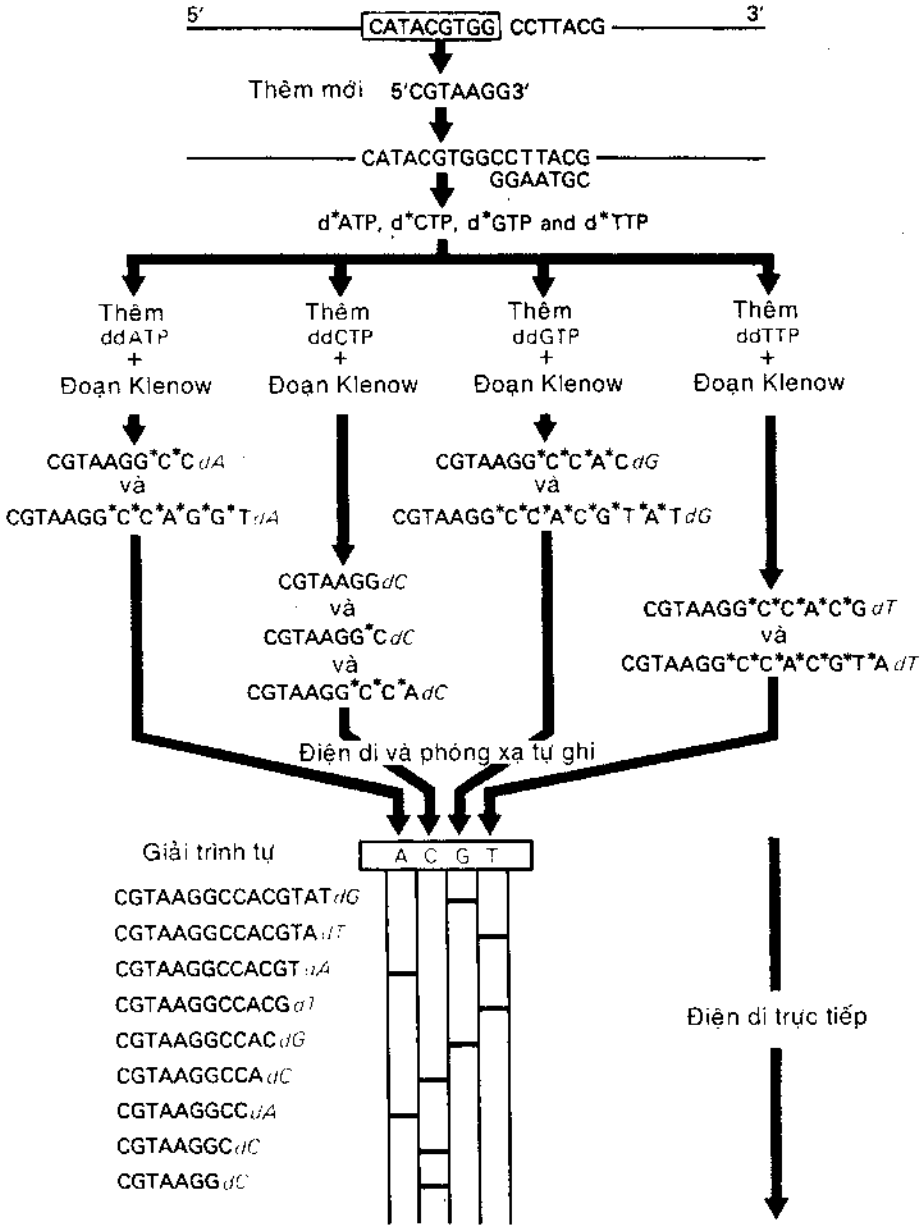
theo thứ tự từ ngắn đến dài có điểm mốc chuẩn là đầu 5' mang dấu phóng xạ P^{32}. Tổng hợp kết quả của cả 4 nhóm trên 4 bản điện di phản ánh đầy đủ trình tự của các nucleotide của đoạn DNA kể từ đầu 5'.

2. Phương pháp didesoxy của F. Sanger

F. Sanger (1977) nêu ra *phương pháp didesoxy* và nay đã có máy tự động xác định trình tự các nucleotide của DNA. Hiện nay, phương pháp này thông dụng hơn cả (hình 3.15). Phương pháp này dựa trên nguyên tắc là khi mạch DNA đang được tổng hợp, nếu gặp dideoxy nucleotide thì bị dừng và các đoạn nucleotide có độ dài khác nhau được tạo ra. Phản ứng cũng được chia thành 4 lô trên 4 bản điện di như ở phương pháp hoá học.

Kĩ thuật tái tổ hợp DNA đã mang lại *vũ khí mới* mạnh mẽ hơn, tạo nên cuộc *cách mạng CNSH mới*. Điều căn bản là kĩ thuật này đã đưa đến *tư duy* và *phương pháp luận mới* cao hơn hẳn về chất trong nghiên cứu bản chất sự sống cũng như giải quyết nhiều vấn đề thực tiễn. Hơn thế nữa, nhiều *phương pháp dẫn xuất* được xây dựng đã nhân lên đáng kể quyền lực của kĩ thuật di truyền. Các phương pháp này không những giúp hiểu sâu bản chất sự sống, mà còn là các phương tiện mới để cải tạo sinh giới, chúng ta sẽ hiểu rõ hơn ở chương tiếp theo.

Đến nay, sau hơn 30 năm phát triển, đóng góp to lớn của KTDT cho sinh học đi sâu vào bản chất sự sống được coi có tầm quan trọng tương tự *phát minh ra kính hiển vi* vào thế kỉ XVII, và về mặt ứng dụng thực tiễn có thể sánh với *chế tạo thành công bom nguyên tử, và* có thể nói nó chỉ bị giới hạn bởi *đạo lí sinh học*.



Hình 3.15. Phương pháp didesoxy của Sanger

TÓM TẮT CHƯƠNG

Kĩ thuật tái tổ hợp DNA được xây dựng nhờ các công cụ của sinh học phân tử giúp tách, cắt, nối, ghép và chuyển gen. Các công cụ gồm : 1) Các enzyme như *restriction endonuclease* để cắt và các *ligase* để nối các đoạn DNA ; 2) Nhiều loại *vector chuyển gen* như plasmid, phage λ, cosmid, phage M13, phagemid, plasmid Ti và nhiễm sắc thể nhân tạo ; 3) Các hệ thống tế bào chủ như *E. coli, S. cerevisiae,...*

Các gen có thể được thu nhận từ DNA bộ gen, tổng hợp hoá học hoặc sinh tổng hợp từ mRNA tạo cDNA và gắn vào plasmid tạo DNA tái tổ hợp nhờ 3 phương pháp khác nhau : dùng các đầu cố kết, các linker và enzyme terminal transferase.

DNA tái tổ hợp được đưa vào tế bào bằng *hoá biến nạp, điện biến nạp, vi tiêm, bắn DNA* hay tải nạp do virus. Việc *chọn đúng dòng* tế bào mong muốn tốn nhiều công phu. Sự *biểu hiện của gen* tạo dòng ra RNA hay protein phải được hỗ trợ bởi các điều kiện thiết yếu như promotor, rbs...

Kĩ thuật PCR đơn giản, dễ thực hiện nên có nhiều ứng dụng.

Nhờ kĩ thuật tạo dòng, DNA được thu nhận số lượng lớn, trở nên dễ nghiên cứu và nhờ đó phương pháp giải kí tự chuỗi DNA ra đời.

Kĩ thuật di truyền có nhiều ứng dụng quan trọng trong *nghiên cứu sinh học* và *thực tiễn sản xuất* của xã hội loài người.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Kĩ thuật tái tổ hợp DNA có các công đoạn chủ yếu nào ?

2. Các nhóm công cụ chủ yếu nào sử dụng trong kĩ thuật tái tổ hợp DNA ?

3. Các công cụ enzyme có những ứng dụng gì ?

4. Các loại vector chủ yếu nào của *Prokaryotae* thường được sử dụng ?

5. Loại vector nào mang được đoạn DNA lạ dài nhất ? Nó được cấu tạo thích hợp cho vi khuẩn, động vật có vú và người với tên gọi tắt thế nào ?

6. Các hệ thống tế bào chủ vi sinh vật nào thông dụng nhất ?

7. Từng phương pháp thu nhận gen có ưu điểm và nhược điểm gì ?

8. DNA tái tổ hợp được tạo ra nhờ các phương pháp nào ?

9. Có những phương pháp nào đưa plasmid tái tổ hợp vào tế bào ?

10. Để gen tạo dòng có biểu hiện cần những điều kiện gì ?

11. Vì sao PCR được ứng dụng nhanh ?

12. Việc sử dụng *Taq* polymerase có ý nghĩa quan trọng như thế nào ?

13. Nêu một số cải biến của PCR.

CHƯƠNG 4

CÁC ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

Từ những năm 1970 đến nay, KTDT không những giúp con người hiểu sâu cơ chế phân tử của sự sống, mà còn là các công cụ mới để vượt giới hạn tiến hoá cải tạo sinh giới. *Bộ gen người* là một cột mốc lịch sử, nó mở ra tiền đồ rộng lớn với nhiều ngành KHCN mới như *genomics, proteomics, công nghệ RNA và protein, chẩn đoán phân tử, pharmacogenomics,...* Ngoài ra, hàng loạt sản phẩm có giá trị đã được tạo ra từ các *sinh vật biến đổi gen*. Những kết quả đạt được mở ra nhiều triển vọng to lớn hơn trong tương lai.

I. KHAI THÁC DNA CÁC BỘ GEN

1. Genomics

Cho đến đầu những năm 1970, DNA là phân tử của tế bào *khó phân tích sinh hoá nhất*. Đến nay, có thể tách từng đoạn đặc hiệu DNA của bộ gen, nhân bản chúng với số lượng vô hạn và *giải kí tự chuỗi* của chúng ngay trong một đêm. Ở thời cao điểm của *Dự án bộ gen người*, các máy giải kí tự chuỗi (sequencer) đạt tốc độ 1000 nucleotide/giây.

Từ 1990 đến nay, việc *giải kí tự chuỗi* DNA của hàng loạt sinh vật mô hình đã được thực hiện (bảng 4.1).

Sự giải kí tự chuỗi thành công ở bộ gen người và hàng trăm các sinh vật khác đã tạo nên *khoa học về bộ gen* gọi là *genomics* (genome - bộ gen) hay *bộ gen học*. *Genomics* là một lãnh vực tương đối mới của KHCN giúp xác định nhanh chóng trình tự nucleotide của DNA bộ gen và các chức năng của chúng. Các tri thức bắt nguồn từ *genomics* không những cho phép chúng ta hiểu chi tiết các cơ chế phân tử của sự sống mà còn *cách mạng hoá* nông nghiệp, y học và nhiều lĩnh vực kĩ thuật. Nó đồng thời cung cấp nhiều cách tiếp cận mới để *phát hiện, bảo tồn và sử dụng đa dạng sinh học* của hành tinh chúng ta. Cuối cùng, tri thức của *genomics* có thể dẫn đến thế hệ máy điện toán và phần mềm mới dựa trên cơ sở bắt chước cách truyền tín hiệu chính xác và tinh vi của các tế bào.

Cho đến nay, loài người mới chỉ sử dụng một số lượng hạn chế cây trồng, vật nuôi và vi sinh vật (VSV). Trong thế kỉ XXI, *công nghệ genomics* cho phép sử dụng bất kì gen nào và nguồn tài nguyên sinh vật to lớn ngày nay trở nên vô tận với khả năng sử dụng từng gen và vô số tổ hợp của

chúng. Ví dụ, gen tạo chất PHB (polyhydroxybutyrate) của VSV có thể đưa vào thực vật để sản xuất chất dẻo (plastic).

Bảng 4.1. Kết quả giải kí tự chuỗi bộ gen của các sinh vật mô hình

Các sinh vật	*Kích thước (Mb)*	*Năm kết thúc*	*Số lượng gen*	**Mật độ gen*
Virus HIV	9700bp		9	
Vi khuẩn *Escherichia coli* *(Prokaryotae)*	4,6	1997	4200	932
Nấm men *Saccharomyces cerevisiae* *(Eukaryotae)*	12,1	1996	6034	483
Tuyến trùng *Caenorhabditis elegans* *(Eukaryotae)*	97	1998	19099	197
Thực vật *Arabidopsis thaliana* *(Eukaryotae)*	100	2000	25000	221
Ruồi giấm *Drosophila melanogaster* *(Eukaryotae)*	180	2000	13061	117
Chuột thí nghiệm *Mus musculus* *(Eukaryotae)*	2600	2002	30000	
Người *Homo sapiens* *(Eukaryotae)*	3200	2000 2001	35000 – 45000	12
	3200	2003	~ 30000	

* Mật độ gen tính trên 1Mb = 1000000bp (cặp base).

Sắp tới con người sẽ khai thác nguồn tài nguyên sinh vật biển mà theo đánh giá có sự phong phú gấp nhiều lần trên cạn.

Để nghiên cứu *genomics* với quy mô lớn, các phòng thí nghiệm hiện đại trên thế giới được trang bị các máy móc kĩ thuật cao như máy PCR, sequencer tự động (hình 4.1).

Hình 4.1. Phòng thí nghiệm có 42 máy sequencer tự động ở Nhật Bản

Sự hiểu biết chi tiết về *bộ gen người và các sinh vật khác* là đỉnh cao của *công nghệ gen*.

2. Proteomics

Proteomics nghiên cứu toàn bộ các phức hợp của protein gồm : cấu hình (conformation), vị trí (localization), các biến đổi (modifications), các tương tác (interactions), chức năng (function).

Nhờ biết được các đặc tính của nhiều loại protein sẽ giúp sản xuất các hormone và vaccin có hiệu quả với số lượng lớn. Nếu như *genomics* giúp cho chẩn đoán sớm thì việc ngăn ngừa và chữa trị bệnh sẽ nhờ các kết quả của *proteomics*. Các nghiên cứu *proteomics* cho thấy ở một số bệnh, phân tử protein ở người bệnh thiếu biến đổi sau dịch mã.

Tuy nhiên, nghiên cứu proteomics *khó hơn gấp nghìn lần* so với genomics, ví dụ như tất cả các tế bào người đều có bộ gen như nhau (trừ các tế bào sinh dục), nhưng mỗi loại tế bào có bộ protein riêng. Ngoài ra, *một gen* có thể tạo ra *nhiều loại phân tử protein*. Đó là chưa kể đến cấu trúc không gian 3 chiều của phân tử protein rất tinh vi, phức tạp nên rất nhạy cảm với tác động của môi trường.

3. Bộ gen người

Đầu năm 1990, *Dự án bộ gen người* bắt đầu với kinh phí 3 tỉ USD trong 15 năm và sẽ kết thúc vào 2005 (hình 4.2). Thực hiện dự án do nhóm các Viện Sức khỏe quốc gia của Mĩ (National Institutes of Health – NIH) giữ vai trò chủ yếu và phối hợp với các nước Anh, Pháp, Đức, Trung Quốc và Nhật Bản thành *Consortium* (Liên hiệp các phòng thí nghiệm). Tất cả có 16 cơ quan khoa học lớn trên thế giới trực tiếp tham gia. Nhóm thứ hai *Celera Genomics* do Craig Venter chủ trì, ra đời chậm hơn nhưng đạt kết quả nhanh với chi phí thấp hơn.

a) Các mục tiêu của dự án

– Xác định tất cả các gen của DNA người.

– Giải kí tự chuỗi của hơn 3 tỉ cặp base (base pair - bp) của DNA người.

– Lưu giữ thông tin trong cơ sở dữ liệu (databases).

– Cải tiến các công cụ (tools) cho phân tích dữ liệu.

– Chuyển giao kĩ thuật cho khu vực tư nhân.

– Vạch ra những vấn đề đạo đức, luật pháp và xã hội (the ethical, legal, and social issues - ELSI) có thể nảy sinh từ dự án.

b) Những mốc căn bản trong công bố kết quả :

– Ngày 26/6/2000 : Công bố *bản thảo hành động* (working draft) của nguyên bộ gen người (> 90% với số base phân tích gấp 3 – 4 lần bộ gen).

– Tháng 2/2001 : Các phân tích của *bản thảo hành động* được công bố.

– Ngày 14/4/2003 : *Dự án bộ gen người* hoàn thành và tuyên bố kết thúc sớm 2 năm ở Hội nghị khoa học của NIH kỉ niệm *50 năm chuỗi xoắn kép DNA*. Việc lập bản đồ (mapping) cuối cùng cẩn trọng hơn gấp 300 lần so với công bố năm 2000, các lỗ trống (400 gaps) được lấp kín và các nhà khoa học Mĩ chỉ tiêu tốn 2,7 tỉ USD. Đây là sự kiện trọng đại như ý kiến của các nhà khoa học : "Đây là ngày chúng ta hoàn tất lần xuất bản đầu tiên *Cuốn sách của sự sống* (the Book of Life)." hay "Trong nhiều thế kỉ tới, ngày hôm nay sẽ được nhớ đến như một cột mốc lịch sử".

Các đột phá kĩ thuật góp phần hoàn thành *dự án* có giá trị to lớn trong tất cả các lĩnh vực sinh học.

c) Bản phác thảo bộ gen người năm 2001 nói lên điều gì ?

– Về số lượng :

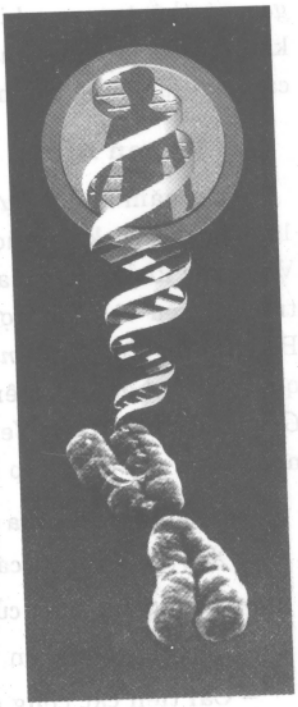
+ Bộ gen người chứa 3164,7 triệu cặp base (A, C, T và G), lấy số tròn là *3,2 tỉ* bp hay *3,2Gb* (Gigabase tương tự Gigabytes bên tin học). Nếu đánh máy in tất cả cần 75490 trang giấy chuẩn.

+ Gen trung bình gồm 27000 base, nhưng dao động lớn, với gen dài nhất ở người biết được cho đến nay là *gen dystrophin* có 2,4Mb (triệu base).

+ Tổng số gen được đánh giá khoảng 30000 đến 35000 gen, ít hơn rất nhiều so với các dự kiến trước đây là 50000 đến 140000 gen.

+ Gần như toàn bộ trình tự base (99,9%) giống nhau một cách chính xác ở tất cả mọi người. Điều này cho thấy không có sự phân biệt chủng tộc.

+ Gần 50% các gen chưa biết chức năng.



Hình 4.2. Biểu tượng bộ gen người

d) Một số điều ngoài dự kiến

– Ít hơn 2% (1,1 – 1,4%) bộ gen mã hoá cho protein.

– 5% đến 28% trình tự được phiên mã ra RNA.

– Các trình tự lặp lại (repeated sequences) không mã hoá cho protein (DNA rác) chiếm ít nhất 50% bộ gen người.

e) Các biến dị và đột biến

Các nhà khoa học đã xác định được khoảng 1,4 – 2,0 triệu điểm có sự khác nhau 1 base trên DNA giữa các cá thể người. Tính trung bình, giữa các cá thể người khác nhau khoảng 1/1000 base. Sự khác nhau này gọi là *sự đa hình đơn nucleotide* (single nucleotide polymorphism – SNP). *SNP* là những dấu chuẩn (markers) để xác định cơ sở di truyền của nhiều bệnh và cung cấp thông tin về phản ứng của từng cá thể trong chữa trị bệnh. Một lĩnh vực mới được hình thành là *Y học cá thể hóa* (Individualized medecine). Phát hiện này hứa hẹn cách mạng hoá sự truy tìm các trình tự base gắn với bệnh tật và vạch ra bí ẩn trong lịch sử phát sinh loài người.

Ngoài ra, sự phân tích SNP sẽ giúp tìm ra cơ sở di truyền học trong sự khác nhau của từng người về khả năng toán học, trí nhớ, thể thao,... .

Tỉ lệ đột biến ở tế bào sinh dục (tế bào trứng và tinh trùng) là 2 : 1 ở nam giới so với nữ giới. Các nhà khoa học cho rằng tốc độ đột biến cao ở tế bào sinh dục nam giới do số lượng lần phân bào tạo ra tinh trùng lớn hơn nhiều so với tạo tế bào trứng.

f) Thời đại sau bộ gen

Có người cho rằng *Thời đại sau bộ gen* (Post–Genomics Era) đã bắt đầu với các dấu hiệu :

– Sử dụng các công cụ và công nghệ để khai thác bộ gen người.

– Sinh học phát triển ở mức cao hơn như *Sinh học các hệ thống* (the Systems Biology).

– Sự phát triển hàng loạt các công nghệ then chốt (key tehnologies) mới như *Tin – sinh học* (Bioinformatics), *Biochip và microarrays*, *Công nghệ sinh học nano* (Nanobiotechnology),...

Nguồn tri thức đầy ý nghĩa từ bộ gen người sẽ xác định các nghiên cứu trong nhiều thập niên tới, giúp hiểu được *các hệ thống sinh học* của bản thân con người chúng ta. Nhiệm vụ khổng lồ này sẽ đòi hỏi tài năng chuyên môn và *sự sáng tạo của hàng chục ngàn các nhà khoa học* từ nhiều lĩnh vực khác nhau trên toàn thế giới. Một trong những đóng góp vĩ đại nhất sẽ là xây dựng *lối tiếp cận hoàn toàn mới* trong nghiên cứu sinh học là *nghiên cứu đồng bộ tất cả các gen của bộ gen*. Ví dụ, nghiên cứu tất cả các bản phiên mã trong một mô hay cơ quan đặc hoặc khối u, hay có thể *nghiên cứu hàng chục ngàn gen* và *protein hoạt động đồng thời* trong những mạng tương tác với nhau để điều khiển các quá trình sinh hoá của sự sống.

4. Các – omics khác

Tiếp theo *genomics, proteomics,* hàng loạt các – *omics* khác cũng ra đời.

– *Cellomics* : Nghiên cứu chức năng tế bào và tác động của thuốc ở cấp độ tế bào nhờ sự gắn kết với công nghệ thông tin (IT). Sử dụng các *thuật toán* (algorithm) để phân tích tự động hoá *hình thái học* của các tế bào và cung cấp các *kết quả định lượng* giúp cho tầm soát dung lượng cao (high content screening).

– *Metabolomis* : Ứng dụng công nghệ gen *điều khiển trao đổi chất*. Bước đầu thực hiện ở vi sinh vật như chuyển gen mã hóa naphthalene dioxygenase từ *Pseudomonas putida* vào *E. coli*, làm nó có khả năng tổng hợp *indigo xanh* trong môi trường chứa tryptophan. *Indigo xanh* là chất tạo màu xanh của quần áo jean (doanh số bán chất này là 200 triệu USD/năm). Trong tương lai, *metabolomics* sẽ can thiệp vào các quá trình sinh lí để chữa trị hoặc ngăn ngừa bệnh.

– Ionomics : Nghiên cứu cơ chế các gen chi phối sự điều hoà tất cả các ion trong tế bào.

Sắp tới sẽ có nhiều – *omics* khác ra đời. Điều này cho thấy, *công nghệ gen* can thiệp đến DNA bộ gen cả chiều rộng lẫn chiều sâu và đó là đặc điểm nổi bật của CNSH thế kỉ XXI – *CNSH kiểu gen*.

II. CÔNG NGHỆ RNA

Những thành tựu của *sinh học phân tử* cho thấy, các phân tử RNA xuất hiện sớm hơn DNA và protein trong lịch sử tiến hoá. Tuy nhiên, vai trò đa dạng và quan trọng của các loại RNA chỉ được sáng tỏ trong 2 thập niên cuối của thế kỉ XX và dẫn đến hình thành *công nghệ RNA*.

1. Những bước tiến trong nghiên cứu RNA

– Trong hai thập niên 1960 và 1970 là giai đoạn cổ điển với phát hiện *3 loại* RNA (rRNA, tRNA, mRNA) và *vai trò thụ động* của chúng trong sinh tổng hợp protein.

– Thập niên 1980 : Phát hiện *ribozyme* (1981) là các RNA có khả năng *xúc tác* và quá trình *splicing* trong phiên mã ở *Eukaryotae* cho thấy sự *biến động và vai trò tích cực* của chúng.

– Thập niên 1990 : Các *chức năng đa dạng* của RNA ngày càng rõ hơn, nhất là *kiểm soát sau phiên mã* (posttranscriptional regulation). Phát hiện các RNA mới như *RNA interfering* hay *RNAi* và *microRNA*.

– Từ năm 2000 đến nay : Xác định *mạng lưới RNA trong tế bào* và hình thành *công nghệ RNA*.

Một số vấn đề mới phát hiện cho thấy *tầm quan trọng của RNA* :

– Làm sao 300000 protein có thể được tạo ra từ 30000 gen ? Chìa khóa là *splicing*.

– Sự hoàn chỉnh bộ gen người cho thấy, các *gen mã hoá protein không có sự khác nhau lớn* giữa người và ruồi giấm. Các *RNA không mã hoá có sự khác nhau lớn* giữa người và ruồi giấm. 98% RNA người không mã hoá protein. Như vậy, ở các *RNA không mã hoá* còn nhiều bí ẩn cần làm sáng tỏ.

– *Phát minh các peptide anticodon giúp biết được cơ chế đọc mã codon stop (rất lâu chưa biết) và hiểu hoàn toàn quá trình đọc mã di truyền sau 40 năm kể từ khi phát hiện.*

Hơn thế nữa, quá trình sinh tổng hợp protein ở tế bào *Eukaryotae* được chi tiết hoá hơn nhiều với hàng loạt các biến đổi phức tạp trên RNA :

– Đầu tiên từ DNA đến RNA có *bản phiên mã sơ cấp* (primary transcrip) và tương ứng có *bộ phiên mã sơ cấp*, gọi là *transcritome* và tương ứng là *transcriptomics*.

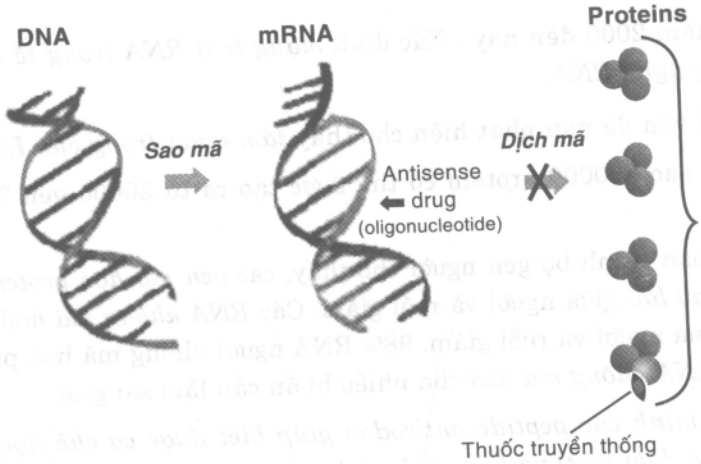
– Tiếp theo, *bản phiên mã sơ cấp* phải qua *splicing*, tức được cắt bỏ các intron và nối các exon, và tương ứng có *bộ cắt intron và nối các exon*, gọi là *spliceosome* và *spliceosomics*. Trong *splicing*, các exon có thể ráp lại thành nhiều tổ hợp khác nhau, nên 1 gen có thể tạo nhiều phân tử protein.

Như vậy, *công nghệ RNA có thể thực hiện ở nhiều cấp độ khác nhau* trong chuỗi sinh tổng hợp của tế bào.

2. Antisense RNA (Phản RNA)

Năm 1981, Tomizawa phát hiện ra hiện tượng *phản RNA* (antisense RNA), những RNA được sao chép từ mạch bổ sung với mạch mã gốc tạo ra mRNA có *trình tự nucleotide ngược chiều* (do đó gọi là antisense).

Các antisense RNA này có thể kìm hãm tổng hợp protein của gen tương ứng bằng bắt cặp bổ sung với mRNA của nó (hình 4.3). Hơn nữa, việc làm "*im lặng*" gen không đòi hỏi cả phân tử antisense RNA mà chỉ cần *1 đoạn ngắn oligonucleotide antisense*. Phương pháp làm ngưng hoạt động của bất kì gen nào gọi là *knock-out gen* (hạ đo ván). Quá trình từ DNA đến protein có thể kìm hãm ở nhiều chỗ do oligonucleotide antisense gắn vào như ức chế các nhân tố phiên mã gắn vào DNA, ngăn trở giai đoạn mRNA trưởng thành, đi ra ngoài nhân và dịch mã ở tế bào chất.



Hình 4.3. Cơ chế tác động của antisense RNA (bắt cặp bổ sung với mRNA)

Từ đầu thập niên 1980, các *antisense* được tổng hợp để ức chế các gen gây bệnh ung thư, tim mạch,... Tuy nhiên kết quả chưa như mong đợi, vì các enzyme cơ thể cắt bỏ các *oligo-antisense*. Các thuốc *oligo-antisense* đã được cải biến đến *thế hệ thứ ba* và đang trở thành "có nghĩa" (sense) do tốt hơn nhiều về tính bền vững, tính đặc hiệu, hiệu quả và giá thành thấp.

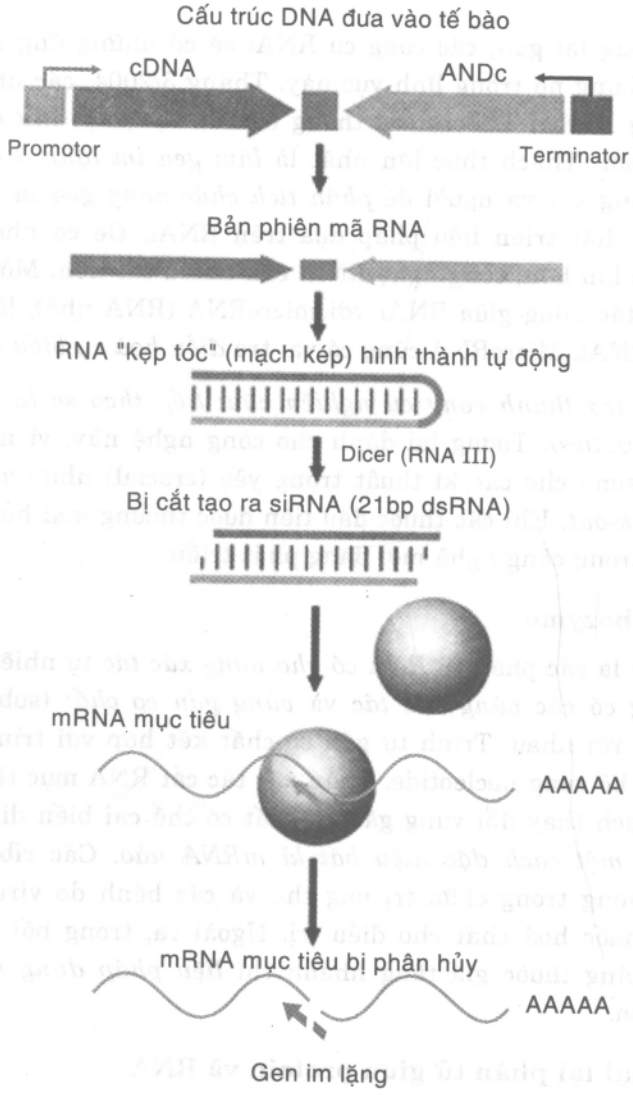
3. RNA can thiệp (Interfering RNA – RNAi) và microRNA

Phát minh *RNAi* vào những năm 1990 và các ứng dụng của chúng vào tế bào động vật có vú từ năm 2001 đã tạo nên sự thay đổi lớn trong nghiên cứu sinh học và tìm thuốc mới. Khi thêm *RNA mạch kép* (double strand RNA – dsRNA) vào tế bào động vật thì gây hậu quả *giảm sự biểu hiện gen*. Việc "*làm gen im lặng*" ("gene silencing") này, mà đặc biệt làm giảm nồng độ mRNA mục tiêu đến 90%, là thuận nghịch vì không biến đổi DNA tế bào. Hiện tượng này được gọi là *sự can thiệp RNA* và chúng xảy ra một cách tự nhiên ở ruồi, giun đất, thuỷ tức, cá vàng và chuột.

RNAi cung cấp cho các nhà nghiên cứu một phương tiện có hiệu quả để *đóng* hay "*làm im lặng*" sự biểu hiện của một gen và như vậy nó trở thành *công cụ đơn giản và thuận tiện* cho *xác định* chức năng gen và các tương tác sinh học giữa các gen. Do vậy các tập đoàn dược phẩm đổ xô chế tạo các *siRNA nhỏ* (small interfering RNA) dùng cho trị liệu.

Phương pháp đơn giản sản xuất siRNA, được gọi là *DNA định hướng RNAi (DNA directed RNA interfering – ddRNAi)*, nêu trên hình 4.4. Sự kết hợp các *công cụ RNAi* với các *công nghệ tầm soát dung lượng cao* (high-content screening technologies) sẽ giúp các nhà nghiên cứu chọn được mục

tiêu tốt nhất. Những tiến bộ trong *hiển vi đồng hội tụ* (confocal microscopy) và các *thuật toán hình ảnh hoá* (image-processing algorithms) cho phép *tự động hoá* việc ghi nhận nhiều dữ liệu về tế bào mà sinh học tế bào trước kia khó định lượng được.



Hình 4.4. DNA định hướng RNAi (DNA directed RNA interfering – ddRNAi)

Các thành phần cấu trúc để tạo ddRNAi nêu ở phần trên hình 4.4 là 1 đoạn gen *cDNA xuôi gắn sau promoter* (chỗ bám của RNA polymerase để phiên mã) nối qua 1 đoạn ngắn với 1 đoạn cDNA tương tự nhưng *ngược chiều* và ở cuối là trình tự kết thúc *terminator*. Khi được đưa vào tế bào, RNA polymerase tạo ra các đoạn ngắn RNA *mạch kép dạng "kẹp tóc"*. Sau khi vào tế bào chất,

trình tự "kẹp tóc" bị cắt đoạn vòng bởi *Dicer*, một loại *enzyme đặc hiệu cắt RNA mạch kép* (dsRNA specific nuclease), gây nên sự tích tụ siRNA mạch kép (21 bp dsRNA). Các siRNA này gắn vào *phức hợp làm im lặng* (RNA-induced silencing complex – RISC). Với một mạch của siRNA gắn phức hợp *này tương tác với mRNA* nội hay ngoại lai (endogenous or exogenous) dẫn đến *cắt trình tự mục tiêu và phân huỷ bản phiên mã* như ở phần dưới hình.

Trong tương lai gần, các công cụ RNAi sẽ có những ứng dụng rộng rãi hơn và có sự bùng nổ trong lĩnh vực này. Tháng 3/2004, các nhà nghiên cứu ở Cold Spring Harbor Laboratory thông báo đã tạo được *thư viện các dòng RNAi của người*. Thách thức lớn nhất là *làm gen im lặng* ở cấp độ cơ thể trên nhiều động vật và người để *phân tích chức năng gen in vivo* (trong cơ thể sống) và phát triển liệu pháp dựa trên RNAi. Để có những ứng dụng rộng rãi và to lớn hơn, công nghệ RNAi cần nhiều cải tiến. Một vấn đề khác là phân biệt tác động giữa RNAi với microRNA (RNA nhỏ), là loại RNA có quan hệ với RNAi. MicroRNA cũng có vai trò *điều hoà sự biểu hiện gen*.

RNAi đã trở thành công cụ nghiên cứu; tiếp theo sẽ là RNAi trị liệu (RNAi theuraputics). Tương lai dành cho công nghệ này, vì nó có thể cung cấp hoặc bổ sung cho các kĩ thuật trọng yếu (crucial) như *antisense* và các *mô hình knock-out*. Khi các thuốc đầu tiên được thương mại hoá, chúng sẽ có hấp dẫn lớn trong công nghệ mới đang phát triển.

4. Các ribozyme

Ribozyme là các phân tử *RNA có khả năng xúc tác* tự nhiên (các enzyme RNA). Chúng có các *vùng xúc tác* và *vùng gắn cơ chất* (substrate-binding domain) tách rời nhau. Trình tự gắn cơ chất kết hợp với trình tự mục tiêu bằng bắt cặp bổ sung nucleotide. Phần xúc tác cắt RNA mục tiêu ở điểm đặc hiệu. Bằng cách thay đổi vùng gắn cơ chất có thể cải biến di truyền tạo ra *ribozyme cắt một cách đặc hiệu bất kì mRNA nào*. Các ribozyme này có nhiều triển vọng trong chữa trị ung thư và các bệnh do virus mà chưa có vaccin hay thuốc hoá chất cho điều trị. Ngoài ra, trong bối cảnh nhiều vi khuẩn đề kháng thuốc gia tăng nhanh thì *liệu pháp dùng ribozyme* đáng được quan tâm.

5. Sự nhại lại phân tử giữa protein và RNA

Nhiều loại phân tử RNA cuộn lại thành cấu trúc không gian 3 chiều phức tạp, mà trong một số trường hợp giống với phân tử protein như trên hình 4.5. Từ đó, ý tưởng về sử dụng phân tử RNA nhại lại protein ra đời.

Sự nhại lại phân tử có thể thực hiện giữa các nhân tố dịch mã và tRNA.

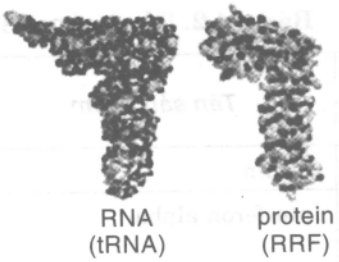
Sự nhại lại phân tử giữa protein-RNA :

– Sự nhại lại cấu trúc.

– Sự nhại lại chức năng.

Sự nhại lại phân tử có thể là chìa khóa giải quyết nhiều vấn đề thực tiễn.

Đây là một hướng mới hứa hẹn nhiều ứng dụng trong tương lai, khi tổng hợp các phân tử RNA có thể thực hiện tự động bằng máy.



Hình 4.5. Sự giống nhau trong cấu trúc hình thái giữa tRNA và một loại protein

Có thể nói, *công nghệ RNA* đang và sẽ có nhiều ứng dụng to lớn. Ngoài những ứng dụng nêu trên, sự can thiệp vào các bản *phiên mã sơ cấp* hay splicing sẽ dẫn đến nhiều sản phẩm đa dạng và độc đáo.

III. CÔNG NGHỆ PROTEIN TÁI TỔ HỢP

Từ lâu, các nhà khoa học mong muốn sản xuất các protein với số lượng lớn. Mãi đến khoảng giữa năm 1963 và 1965 việc tổng hợp hoá học insulin mới được thực hiện. Quá trình này rất phức tạp, gồm 170 phản ứng và giá thành cao không thể sản xuất công nghiệp được. Công nghệ gen cho phép sản xuất nhiều loại *protein tái tổ hợp* (recombinant protein – rprotein) khác nhau không những với *số lượng lớn* mà còn có *chất lượng protein tốt hơn*. *Công nghệ r-protein* thật sự đang phát triển với nhiều thành tựu rất ngoạn mục.

1. Sản xuất số lượng lớn các r-protein

Nhiều protein trị bệnh được biểu hiện ở các hệ thống vi khuẩn, nấm men, côn trùng hay tế bào động vật có vú được nuôi. Chúng cần cho chữa trị một số bệnh, nhưng chiết tách từ cơ thể thì số lượng ít.

Bước đầu, các r-protein (cả các peptide) được sản xuất nhờ các vi sinh vật như *E. coli* hay nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Tiếp theo, các *thực vật* và *động vật chuyển gen* (trangenic plants and animals) được sử dụng ở dạng "trang trại gen" (gene farming). Đến nay có hàng trăm r-protein được sản xuất, trong đó hàng chục loại được bán ra thị trường. Bảy loại protein trị liệu với tổng doanh số không dưới 15 tỉ USD, mà patent đã hoặc sắp hết hạn (hạn sử dụng patent thường khoảng 15 – 20 năm), được nêu trên bảng 4.2.

Bảng 4.2. Bảy loại protein trị liệu mà patent đã hoặc sắp hết hạn

Số tt	*Tên sản phẩm*	*Các bệnh được điều trị*	*Năm hết hạn patent*
1	Insulin	Tiểu đường	2001
2	Interferon alpha	Viêm gan siêu vi C, mụn cóc qua đường tình dục, ung thư	2002
3	Interferon beta	Xơ cứng (Multiple sclerosis)	2003
4	Hormone tăng trưởng người	Thiểu năng tăng trưởng (Growth defiency)	2003
5	Erythropoetin	Thiếu máu	2004
6	t-PA (Tissue plasminogen activator)	Nhồi máu cơ tim cấp	2005
7	G-CSF (Granulocyte- Colony Stimulating Factor)	Chemotherapy-induced neutropenia	2006

Các protein tái tổ hợp được sản xuất gồm các nhóm chủ yếu :

– Các protein trị liệu như một số nêu trên bảng 4.2.

– Các enzyme : Dnase I, alginate lyase, phenylalanine ammonia lyase, alpha-1-antitrypsin.

– Các kháng thể dùng trong chẩn đoán và chữa trị nhiều bệnh.

2. Đột biến điểm định hướng và kĩ thuật chế tạo protein

Một trong những hệ quả quan trọng của KTDT là gây *đột biến điểm định hướng* (site-directed mutagenesis) hay *đột biến điểm chuyên biệt* (site-specific mutagenesis). Có thể chủ động biến đổi các gen bằng nhiều cách :

– Nối các đoạn gen với nhau để tạo protein dung hợp (fusion protein).

– Làm mất đoạn hoặc tăng đoạn gen.

– Thay thế một nucleotide này bằng nucleotide khác.

Một gen, khi đã biết trình tự nucleotide, có thể thay đổi nucleotide ở bất cứ điểm nào tuỳ ý và tương ứng dẫn đến những thay đổi trên protein. Nó có thể được tạo ra bằng vài phương pháp như : *dùng oligonucleotide, đột biến ngẫu nhiên với nucleotide tương đồng* (random mutagenesis with nucleotide analogues) và *PCR-sai* (error-prone PCR).

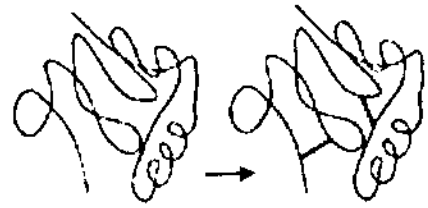
Thế hệ r-protein đầu tiên vẫn giữ nguyên trạng cấu trúc phân tử của chúng. Kĩ thuật mới tạo ra *thế hệ protein* mà các phân tử được cải biến chi tiết để có nhiều đặc tính ưu việt hơn. Sử dụng đột biến điểm định hướng

thay thế các amino acid then chốt để nâng cao chất lượng protein. Để chọn đúng điểm thay thế, sự can thiệp của *điện toán* là không thể thiếu được, dẫn đến *thí nghiệm in silico* (thí nghiệm trên máy điện toán) mà đến nay đã phát triển thành chuyên ngành mới là *Tin-sinh học (Bioinformatics)*.

a) Bổ sung các cầu nối disulfide

Sự bổ sung cầu nối S-S làm tăng tính bền vững của protein với nhiệt độ, pH cực đoan. Ví dụ : Cải biến lysozyme của phage T4. Enzyme này có 2 cystein (vị trí 54 và 97) nhưng không tạo cầu disulfide (S–S). Sau khi nghiên cứu cấu trúc bậc ba của lysozyme T4, isoleucine ở vị trí 3 được thay bằng cysteine để có thể tạo cầu S–S với cysteine ở vị trí 97 (hình 4.6).

Đột biến điểm định hướng biến codon ATA của isoleucine thành TGT của cysteine. Có thể tạo thêm 2 hoặc 3 nối S–S : amino acid 3 với 97, 9 với 164 và 21 với 142 của enzyme. Lysozyme đã được biến đổi thực hiện phản ứng tốt hơn, có độ bền vững lâu hơn.



Hình 4.6. Lysozyme tự nhiên và sau khi được bổ sung 2 cầu nối S–S

Các biến đổi cũng đã thực hiện với *xylanase* tăng hoạt tính ở nhiệt độ cao và pH thấp và với *ribonuclease tuyến giáp người* (human pancreatic ribonuclease) để thành tác nhân trị liệu tốt hơn.

b) Tăng hoạt tính enzyme

Tăng ái lực với cơ chất : Enzyme tyrosyl-tRNA synthetase từ vi khuẩn *Bacillus stearothermophilus* được biến đổi để có ái lực tốt hơn với cơ chất. Thay thế gốc threonie ở vị trí 51 bằng proline tạo enzyme mới có hoạt tính tăng gấp 2 lần.

Thay đổi cofactor : Subtilin bình thường là enzyme phụ thuộc calcium, khi gặp điều kiện thiếu calcium thì mất hoạt tính. *Subtilin không phụ thuộc calcium* đã được chế tạo ra.

Thay đổi tính ổn định và đặc hiệu của enzyme : *tPA* là một *phức hợp enzyme protease serine* dùng làm tan các cục máu đông. Tuy nhiên, nó dễ dàng bị thải khỏi dòng máu nên phải tăng nồng độ ban đầu trong xử lí, mà điều này có thể gây hại. Do vậy, *tPA mới* đã ra đời với thiết kế như sau : thứ nhất, thay Thr 103 bằng Asn làm *tăng tính bền vững* lên gấp 10 lần trong dòng máu ; thứ hai, thay đoạn amino acid 296 – 299 từ Lys-His-Arg-Arg thành Ala-Ala-Ala-Ala làm enzyme có *tính đặc hiệu cao hơn với fibrin*

(protein làm đông máu) của cục máu ; thứ ba, thay Asn-117 làm hồi phục hoạt tính phân huỷ fibrin như enzyme tự nhiên. Hơn thế nữa, sự tổ hợp cả ba đột biến điểm trên sẽ tạo ra tPA đồng thời có cả 3 hoạt tính.

c) Các thay đổi đa dạng khác

Ví dụ 1 : Insulin phần lớn ráp lại ở *dạng lục phân* (hexamer) liên kết với kẽm (Zn) trong dung dịch trung hoà chữa trị bệnh. Sự tự ráp đó hạn chế sự hấp thụ. Năm 1988, bằng thay thế một amino acid, insulin mới được tạo ra có cấu trúc căn bản đơn phân (monomeric) ở dung dịch trị liệu. Insulin mới không những giữ nguyên hoạt tính, mà được hấp thụ nhanh hơn hai đến ba lần.

Ví dụ 2 : Công trình về *biến đổi subtilin* là một bằng chứng về sức mạnh của kĩ thuật chế tạo protein. Hầu như *tất cả các tính chất* của serine protease này đã được biến đổi như: *tốc độ xúc tác, tính đặc hiệu với cơ chất, biên độ pH* và *sự bền vững* đối với nhiều tác động làm mất hoạt tính của oxy hoá, nhiệt và alkaline. Nhiều biến đổi đã được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng của subtilin trong công nghiệp. Ví dụ, làm tăng hoạt tính thuỷ giải protein của subtilin dùng trong chất tẩy rửa (detergent).

Các gen mã hoá *bacteriorhodopsin* (protein dùng làm bộ nhớ máy điện toán), *protein tơ nhện* đã được tạo dòng và biến đổi chất lượng để thích ứng với nhu cầu kĩ thuật trong sử dụng.

Sự kết hợp các protein khác loại có thể toàn phần hoặc từng phần tạo ra hàng loạt các *protein dung hợp mới* khác nhau. Ví dụ, có thể tạo ra nhiều kiểu dạng khác nhau của các kháng thể.

Với sự hỗ trợ của *genomics, công nghệ RNA, bioinformatics* và nhiều công cụ khác, kĩ thuật chế tạo protein sẽ tạo nhiều sản phẩm ưu việt ngoài mong đợi.

IV. CHẨN ĐOÁN PHÂN TỬ

Trên thế giới, công nghiệp sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ cho *chẩn đoán bệnh* ước tính có doanh số nhiều tỉ USD/năm. Các phương pháp chẩn đoán *dựa vào DNA* (DNA-based diagnostics), *lai nucleic acid, RFLP và PCR* đã tạo nên bước chuyển biến mới, đạt doanh số 500 triệu USD năm 1999. Từ năm 1999, các *biochip* (bọ mẫu dò) và *microarray* (bản mẫu dò) bắt đầu thử nghiệm và đến 2002 được triển khai rộng, hứa hẹn một thị trường sôi động các mẫu dò chẩn đoán bộ gen người phục vụ cho y học cá thể hoá và đây là phương pháp thông dụng trong thế kỉ XXI.

1. Các phương pháp chẩn đoán mới và những ưu thế

Nói chung, bất kì phương pháp chẩn đoán nào đều phải dựa trên các nguyên tắc : đặc hiệu, nhạy, chính xác và đơn giản. Tính đặc hiệu thể hiện ở kết quả dương tính chỉ với sinh vật hay phân tử mục tiêu. Sự nhạy của thử nghiệm thể hiện ở chỗ xác định được mục tiêu ở nồng độ rất thấp trong hỗn hợp nhiều nhân tố khác nhau. Tính đặc hiệu và nhạy sẽ cho thử nghiệm có độ chính xác cao. Thử nghiệm cần đơn giản để có thể thực hiện rộng rãi và nhiều người sử dụng.

Chẩn đoán phân tử gồm các kĩ thuật chủ yếu :

– *Lai phân tử nucleic acid* : Nhằm xác định sự hiện diện của trình tự nucleotide đặc hiệu của một đoạn gen hay DNA.

– *PCR* : Dùng primer (mồi) đặc hiệu để khuếch đại số lượng 1 đoạn gen.

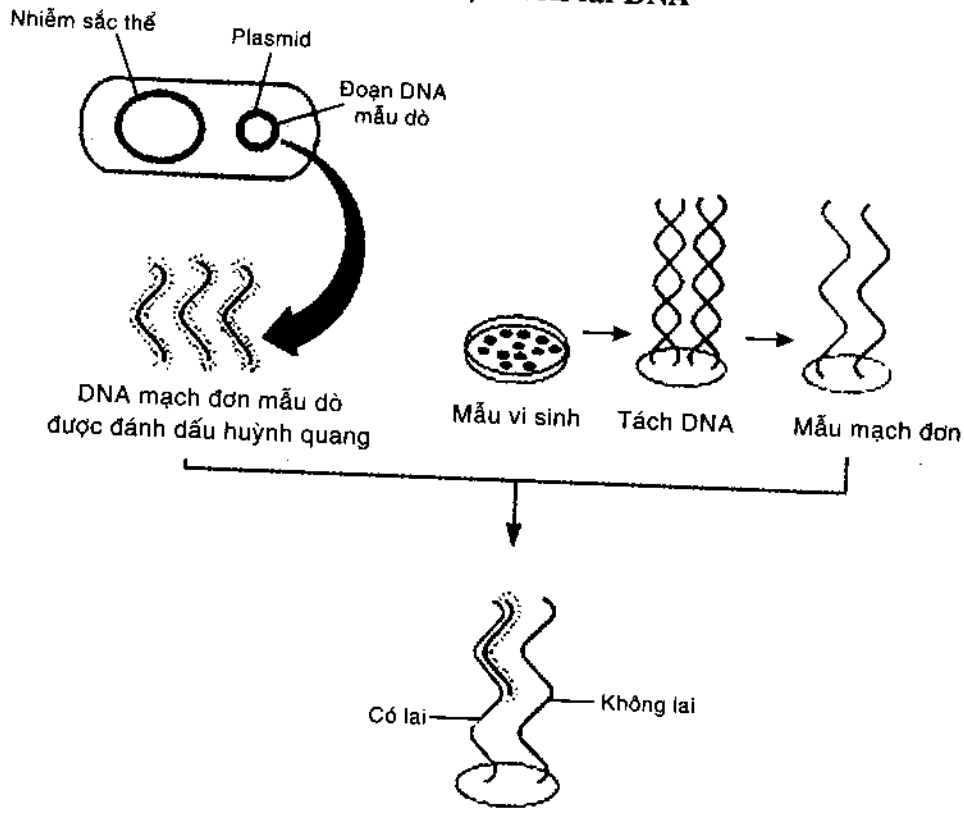
– *RFLP* (Restriction fragment length polymorphism) : Dựa vào vệt trên bản điện di do các đoạn DNA di chuyển tạo ra (xem hình 4.12).

Các phương pháp này có tính đặc hiệu cao, nhạy và nhanh. Thuận tiện lớn là các mẫu dò (probes), primer có bán rộng rãi trên thị trường hoặc các công ti làm dịch vụ tổng hợp theo đặt hàng.

Chẩn đoán phân tử đối với các bệnh nhiễm trùng có nhiều ưu thế. Thứ nhất, nếu tác nhân gây bệnh hiện diện với số lượng đủ cho phân tích thì *không cần nuôi cấy* chúng. Điều này giảm bớt thời gian và có hiệu quả cao. Ví dụ, năm 1988, kĩ thuật PCR đã phát hiện DNA của virus HIV-1 ở các tế bào máu ngoại vi chỉ trong 1 ngày thay vì 3 – 4 tuần theo phương pháp bình thường. Thứ hai, kĩ thuật lai phân tử có thể ứng dụng được cả khi sinh vật gây bệnh *không nuôi được*. Điều này thường xảy ra đối với các bệnh nhiễm virus. Thứ ba, một mẫu có thể xác định đại diện cho tất cả các serotype, trong khi đó một kháng thể chỉ dùng được cho một kiểu. Cuối cùng, có thể tạo dòng ngay từ chính gen gây bệnh để sản xuất ra mẫu thử tương ứng.

Chẩn đoán bằng lai phân tử không chỉ hạn chế trong y học mà còn được dùng rộng rãi trong thực phẩm, nông nghiệp. Chẩn đoán các virus gây bệnh thực vật có ý nghĩa quan trọng để bảo vệ cây trồng. Ví dụ : *Phát hiện các viroid* ở thực vật ; vì chúng không có vỏ protein nên không thể phát hiện bằng các thủ thuật miễn dịch như dùng ELISA. Nó cũng được dùng để nghiên cứu sinh thái vi sinh vật .

2. Các hệ thống chẩn đoán dựa trên lai DNA



Hình 4.7. Sơ đồ khái quát sản xuất và sử dụng mẫu dò lai DNA

Lai nucleic acid là cơ sở của các thử nghiệm nhanh và hữu hiệu. Cơ sở của các hệ thống này là *sự bắt cặp chính xác* giữa các nucleotide trên một mạch đơn với các nucleotide đối diện tương ứng trên mạch bổ sung (hình 4.7).

Quy trình thực hiện qua các bước sau :

– Tạo dòng plasmid để nhân bản, tách mẫu dò và đánh dấu (ví dụ : huỳnh quang).

– Gắn DNA mạch đơn mục tiêu lên giá đỡ màng (membrane support).

– Cho mẫu dò DNA đánh dấu (DNA probe) vào và tạo điều kiện thích hợp cho sự bắt cặp base với DNA mục tiêu.

– Rửa giá đỡ màng để loại bỏ mẫu dò DNA không bắt cặp lai.

– Phát hiện các trình tự lai do bắt cặp giữa mẫu dò với DNA mục tiêu.

Thử nghiệm chẩn đoán lai nucleic acid có 3 thành phần căn bản : *mẫu dò DNA, DNA mục tiêu* và *bộ phát hiện tín hiệu*. Kiểu chẩn đoán này có tính *đặc hiệu và nhạy cảm cao*.

3. Các loại DNA marker

Về căn bản, bất cứ chuỗi DNA nào cũng được dùng để phân biệt giữa 2 cá thể, 2 dòng hoặc giống khác nhau, đều có thể được xem như là một *DNA marker* (dấu chuẩn). Hàng loạt DNA marker được ứng dụng rộng rãi (Bảng 4.3).

Bảng 4.3. Các loại DNA marker thông dụng

Marker	*Tên đầy đủ*
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Sự đa hình các đoạn do cắt bởi RE)
ALP	Amplicon length polymorphism (Sự đa hình đoạn khuếch đại)
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Sự đa hình các đoạn khuếch đại)
RAPD	Random amplified polymorphic DNA (Sự đa hình đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên)
DAF	DNA amplification fingerprinting (In dấu di truyền khuếch đại DNA)
SSR	Simple sequence repeat (microsatellite) (Lặp đoạn đơn)
AP-PCR	Arbitrary primer-PCR (PCR mồi tùy chọn)
SSCP	Single strand conformation polymorphism (Sự đa dạng cấu hình mạch đơn)
MRDHV-DNA	Moderately repeated, dispersed, and highly variable DNA (minisatellite) (DNA lặp lại trung bình, phân tán và biến dị cao)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Sự đa hình đơn nucleotide)

Các DNA markers có thể được chia làm 2 nhóm như sau :

– Nhóm dựa vào PCR (PCR-based) : ALP, AFLP, SSR, SSCP.

– Nhóm dựa vào lai DNA/DNA (hybridization-based) : RFLP, minisatellite.

Những lợi ích của DNA markers so với marker hình thái và isozyme marker là :

– Đo lường trực tiếp các vật liệu di truyền.

– Có nhiều marker trong quần thể.

– Đo lường không chi phối ảnh hưởng môi trường và ảnh hưởng có tính chất phát triển.

Các phương pháp chẩn đoán phân tử này được dùng để phát hiện các vi sinh gây bệnh trong *y học, thực phẩm, chẩn đoán các bệnh di truyền*, trong nghiên cứu các tính trạng và lai tạo các giống cây trồng vật nuôi.

Trước kia, việc phát hiện *bệnh di truyền do gen lặn* ở cả cha lẫn mẹ đều dị hợp tử rất khó thực hiện và chỉ biết khi đứa trẻ ra đời. Hướng giải quyết là chẩn đoán sớm bệnh ở thai nhi trong bụng mẹ để cho sẩy thai sớm.

Hiện nay, trong y học lâm sàng nhiều bệnh di truyền và sai hỏng bẩm sinh được chẩn đoán ở các bà mẹ mang thai hoặc trẻ sơ sinh. Tuy nhiên tiến bộ kĩ thuật làm nảy sinh nhiều vấn đề xã hội, đạo lí (bioethics).

4. Các biomarker

Biomarker (dấu chuẩn sinh học) là vấn đề nổi cộm hiện nay với rất nhiều ứng dụng trong nghiên cứu và chữa trị bệnh, nhưng đồng thời có không ít định nghĩa được nêu ra. Nói chung, biomarker là bất cứ *tác nhân đo lường sinh học* nào cung cấp thông tin thể hiện được về diễn biến các quá trình bệnh lí, dược học hoặc độ an toàn của thuốc,... Có hàng loạt kiểu biomarker : định bệnh (disease marker), hiệu quả, đại diện (surrogate), độc tố (toxicity), cơ chế (mechanism) và mục tiêu (target). Một ví dụ về *biomarker cơ chế* là *các chất ức chế* (inhibitors) *dipeptidyl peptidase* (DPP-IV). DPP-IV là protease trong máu làm bất hoạt GLP-1, mà sự giải thoát GLP-1 sẽ kích thích tiết ra insulin và ức chế phóng thích glucagon. Do vậy, biomarker này còn điều hoà bệnh tiểu đường. Vấn đề biomarker rất rộng, đến nỗi FDA phải có hướng dẫn chuyên biệt.

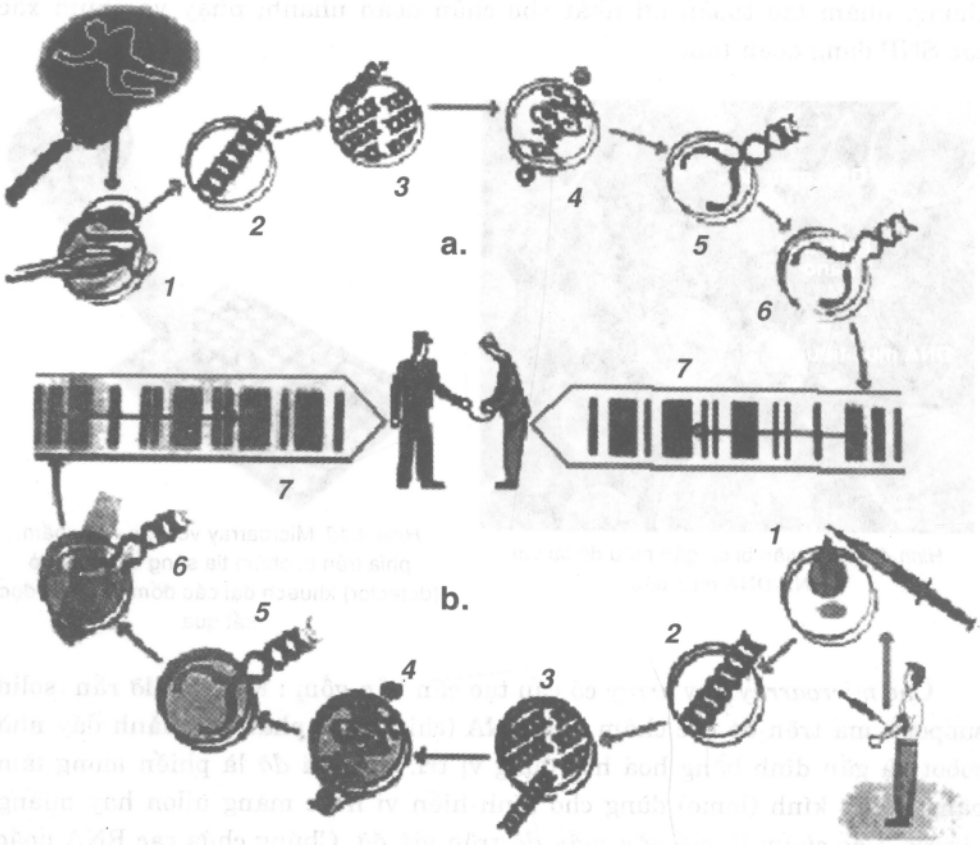
5. In dấu di truyền DNA (DNA fingerprinting)

In dấu di truyền dựa vào các *trình tự lặp đoạn nối tiếp với số lượng dao động* (variable number tandem repeats - VNTR) trong DNA mini-satellite. Loại DNA này thể hiện sự khác nhau rất lớn giữa những người không có họ hàng và thể hiện *tính cá thể của từng người*.

Nhiều trình tự lặp đoạn có *trình tự lõi* từ tổ tiên chung. Jeffreys (1985) đã sử dụng các *trình tự lõi* và dẫn xuất làm mẫu thử lai nucleic acid để xác định các cá thể. Hiện nó được dùng nhiều, đặc biệt trong *pháp y* (forensis science) để xác định tội phạm (hình 4.8). Phương pháp này dựa vào RFLP (restriction fragment length polymorphism) thể hiện bằng cách vệt trên bản điện di hoặc PCR. Bảng điện di DNA ở hình 4.8 thể hiện rõ tính đặc hiệu từng cá thể vì nó đặc hiệu như dấu lăn ngón tay của từng người.

In dấu DNA được sử dụng trong phân tích phả hệ ở chó, mèo và trong lai tạo giống. Nó còn được dùng để xác định nguồn gốc và sự di cư của các quần thể người cổ. Nó có nhiều ưu thế như tính đặc hiệu cao, mẫu dơ bẩn hay thu được sau nhiều năm vẫn có thể dùng để xác định phạm nhân.

Lần đầu tiên phương pháp này được sử dụng ở toà án Anh năm 1987. Sau Anh, Mĩ và nhiều nước khác cũng đã sử dụng rộng rãi và lập *thư viện in dấu DNA* của nhiều tội phạm. Đến nay có nhiều ví dụ rất rõ về uy lực của phương pháp này.



Hình 4.8. Chẩn đoán tội phạm

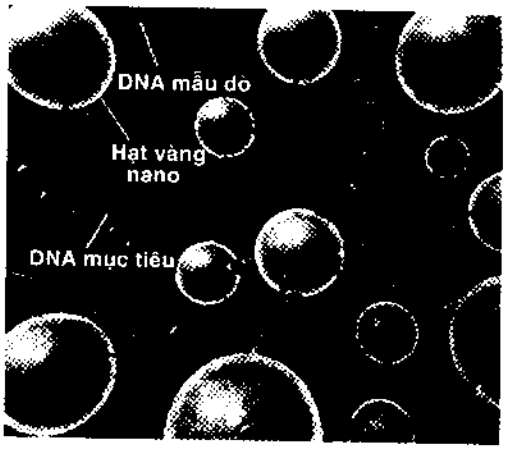
a. Phần phân tích mẫu hiện trường : Phía trên góc trái hình là mẫu ở hiện trường (vệt máu, sợi tóc hoặc lông) ; Sự phân tích mẫu DNA được thực hiện theo thứ tự từ 1 đến 7 (phần b).

b. Phần phân tích mẫu kẻ bị tình nghi : 1. Lấy mẫu ; 2. Chiết tách DNA ; 3. Nếu mẫu ít thì khuếch đại ; 4. Cắt DNA toàn phân tử với RE hoặc chuẩn bị primer cho PCR ; 5. Tách DNA chuẩn bị lai ; 6. Lai với mẫu dò ; 7. Chạy điện di so kết quả. Sự trùng hợp giữa mẫu ở hiện trường với mẫu từ kẻ bị tình nghi sẽ khẳng định đúng tội phạm

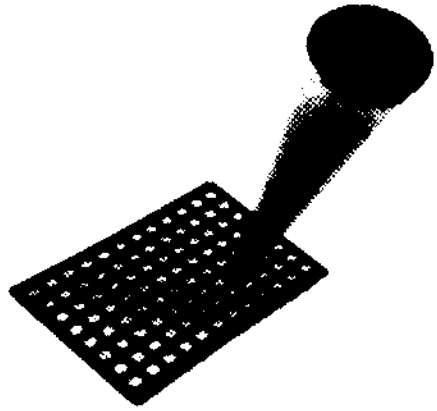
6. Microarrays và Biochips

Từ năm 1999, sự phát triển của *Genomics* và *Proteomics* dẫn đến *Công nghệ microarray* (Microarray technology) và đến năm 2002 sản phẩm đầu tiên có mặt trên thị trường. Xuất phát từ nhu cầu thực tế chẩn đoán, các hãng dược phẩm cũng như các trung tâm nghiên cứu lớn đã cho ra đời nhiều sản phẩm dùng cho phát hiện nhanh (như xác định SNP) có thể ở dạng chip (bọ điện tử), dạng bi (bead) có từ tính (hình 4.9) hay các microarray (hình 4.10) và có thể ở nhiều dạng khác hoặc là sự kết hợp của các dạng trên. Tựu

chung, nhằm tạo thuận lợi nhất cho chẩn đoán nhanh, nhạy và chính xác các SNP đang quan tâm.



Hình 4.9. Các viên bi có gắn mẫu dò lai với RNA/DNA mục tiêu



Hình 4.10. Microarray với các dãy chấm, phía trên là chùm tia sáng của đầu dò (detector) khuếch đại các đốm sáng để đọc kết quả

Các *microarray* hay *array* có cấu tạo căn bản gồm : Một giá đỡ rắn (solid support) mà trên đó các chấm nhỏ DNA (chip) được phân bố thành dãy nhờ robot và gắn dính bằng hoá học đúng vị trí. Các *giá đỡ* là phiến mỏng làm bằng phiến kính (lame) dùng cho kính hiển vi hoặc màng nilon hay miếng plastic. Các *chấm* là nơi *gắn mẫu dò* trên giá đỡ. Chúng chứa các RNA hoặc DNA (RNA/DNA) như oligonucleotide (25N và 70N), khung dịch mã được khuếch đại bằng PCR (PCR-amplified ORFs (Open reading frame là phần của gen được phiên mã), hay *cDNA*. *Kích thước chấm* (50 – 250mm) tuỳ theo đầu nhỏ giọt và nồng độ DNA. *Mục tiêu* là RNA hoặc DNA được *đánh dấu phát huỳnh quang* (fluorescently-labeled RNA/DNA). *Phương pháp in thạch bản quang học* (photolithography) thực hiện bằng robot (robotic).

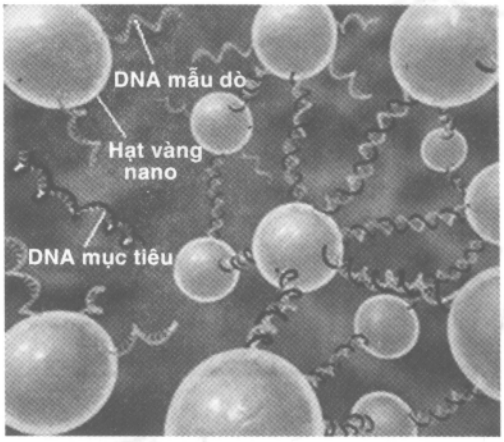
Các chấm khác (với protein) dùng cho *protein array*.

Các đầu dò (detector) đọc kết quả dựa vào phát huỳnh quang. Máy chuyên dùng cho đọc kết quả đã có bán trên thị trường.

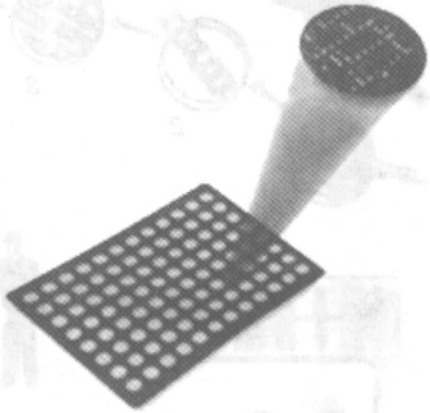
Microarray có thể được dùng để định lượng sự biểu hiện gen hay sự dư thừa DNA.

Công nghệ microarray phát triển với tốc độ cực nhanh, cách nay vài năm với giá đỡ kích cỡ 1 đồng xu có thể phân tích cùng lúc *500000 điểm* trên bộ gen người. Nay mai, trên thị trường sẽ có microarray cùng lúc xác định *cả triệu SNP* trên bộ gen người.

chung, nhằm tạo thuận lợi nhất cho chẩn đoán nhanh, nhạy và chính xác các SNP đang quan tâm.



Hình 4.9. Các viên bi có gắn mẫu dò lai với RNA/DNA mục tiêu



Hình 4.10. Microarray với các dãy chấm, phía trên là chùm tia sáng của đầu dò (detector) khuếch đại các đốm sáng để đọc kết quả

Các *microarray* hay *array* có cấu tạo căn bản gồm : Một giá đỡ rắn (solid support) mà trên đó các chấm nhỏ DNA (chip) được phân bố thành dãy nhờ robot và gắn dính bằng hoá học đúng vị trí. Các *giá đỡ* là phiến mỏng làm bằng phiến kính (lame) dùng cho kính hiển vi hoặc màng nilon hay miếng plastic. Các *chấm* là nơi *gắn mẫu dò* trên giá đỡ. Chúng chứa các RNA hoặc DNA (RNA/DNA) như oligonucleotide (25N và 70N), khung dịch mã được khuếch đại bằng PCR (PCR-amplified ORFs (Open reading frame là phần của gen được phiên mã), hay *cDNA*. *Kích thước chấm* (50 – 250mm) tuỳ theo đầu nhỏ giọt và nồng độ DNA. *Mục tiêu* là RNA hoặc DNA được *đánh dấu phát huỳnh quang* (fluorescently-labeled RNA/DNA). *Phương pháp in thạch bản quang học* (photolithography) thực hiện bằng robot (robotic).

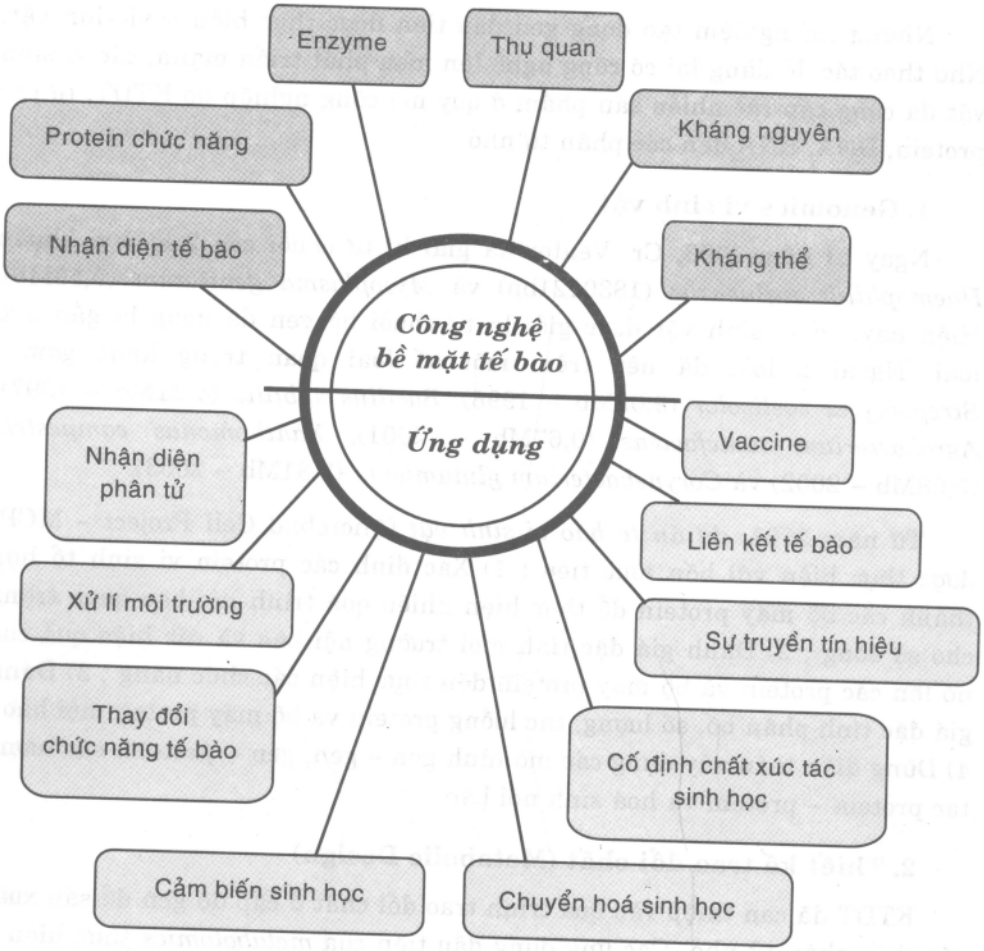
Các chấm khác (với protein) dùng cho *protein array*.

Các đầu dò (detector) đọc kết quả dựa vào phát huỳnh quang. Máy chuyên dùng cho đọc kết quả đã có bán trên thị trường.

Microarray có thể được dùng để định lượng sự biểu hiện gen hay sự dư thừa DNA.

Công nghệ microarray phát triển với tốc độ cực nhanh, cách nay vài năm với giá đỡ kích cỡ 1 đồng xu có thể phân tích cùng lúc *500000 điểm* trên bộ gen người. Nay mai, trên thị trường sẽ có microarray cùng lúc xác định *cả triệu SNP* trên bộ gen người.

3. Công nghệ bề mặt tế bào nấm men

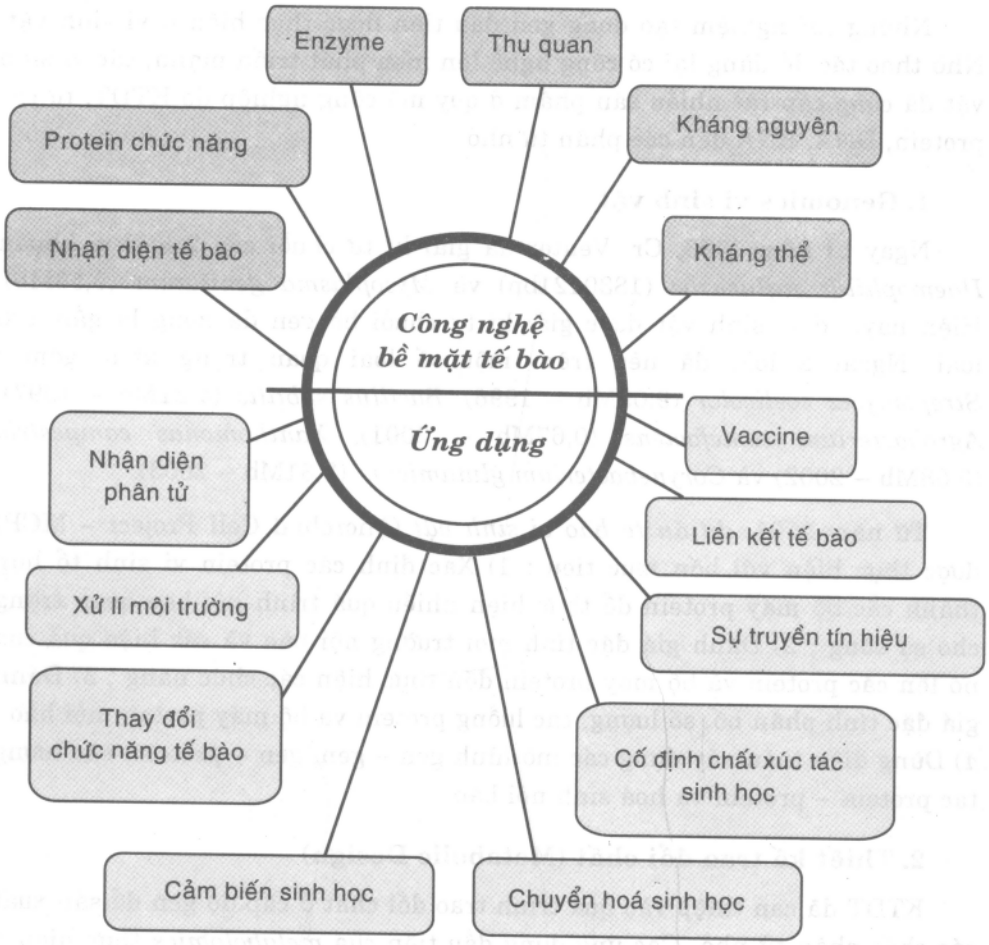


Hình 4.11. Công nghệ bề mặt tế bào và các ứng dụng

Các protein trên bề mặt tế bào nấm men cũng được tổng hợp bên trong tế bào, nhưng sau đó chúng được đưa ra gắn lên bề mặt tế bào. Dựa vào sự hiểu biết các gen tương ứng, *công nghệ bề mặt tế bào* (cell surface technology) đã ra đời. Sử dụng CN gen để cố định protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nhằm thay đổi và cải thiện chức năng của tế bào. Tiềm năng ứng dụng đa dạng của nó được nêu trên hình 4.11.

Bước đầu, các nhà nghiên cứu đã thành công trong biểu hiện các enzyme như glycosyl hydrolse, glucoamylase, lipase,... PTN Công nghệ sinh học phân tử của ĐH KHTN TPHCM đã tạo được chủng nấm men gắn protein GFP (green fluorescense protein – protein phát huỳnh quang xanh lục của sứa) và chủng gắn alpha-amylase.

3. Công nghệ bề mặt tế bào nấm men



Hình 4.11. Công nghệ bề mặt tế bào và các ứng dụng

Các protein trên bề mặt tế bào nấm men cũng được tổng hợp bên trong tế bào, nhưng sau đó chúng được đưa ra gắn lên bề mặt tế bào. Dựa vào sự hiểu biết các gen tương ứng, *công nghệ bề mặt tế bào* (cell surface technology) đã ra đời. Sử dụng CN gen để cố định protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nhằm thay đổi và cải thiện chức năng của tế bào. Tiềm năng ứng dụng đa dạng của nó được nêu trên hình 4.11.

Bước đầu, các nhà nghiên cứu đã thành công trong biểu hiện các enzyme như glycosyl hydrolse, glucoamylase, lipase,... PTN Công nghệ sinh học phân tử của ĐH KHTN TPHCM đã tạo được chủng nấm men gắn protein GFP (green fluorescense protein – protein phát huỳnh quang xanh lục của sứa) và chủng gắn alpha-amylase.

VI. CÁC THỰC VẬT CHUYỂN GEN

Chuyển gen vào *thực vật* là một trong những lĩnh vực phát triển nhanh nhất của Công nghệ sinh học phân tử. Ngay trong năm 2000, diện tích cây trồng chuyển gen trên thế giới đã đạt 42 triệu ha.

1. Các đặc điểm chuyển gen ở thực vật

Sự can thiệp của công nghệ gen vào thực vật có những đặc điểm sau :

– DNA bộ gen của đa số thực vật có kích cỡ rất lớn (10^{10} – 10^{11}bp), hơn gấp 10 đến 100 lần bộ gen người. Do đó, *genomics thực vật* chỉ thực hiện trên vài đối tượng ngoại lệ đặc biệt như *Arabidopsis thaliana* (một loài cỏ hoang với DNA khoảng 100Mb), lúa, cà chua. Tuy nhiên, điều đó không hạn chế việc chuyển gen vào thực vật cũng như can thiệp từng phần như *ionomics* đã nêu trên.

– Thực vật có vách tế bào dày nên khó biến nạp trực tiếp DNA vào tế bào mà phải qua trung gian là vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chuyển *plasmid Ti,* hoặc nhờ công cụ bắn DNA vào trong tế bào.

– Bào quan *lục lạp* (chloroplast) của tế bào thực vật có cấu trúc giống tế bào vi khuẩn nên qua nó có thể thực hiện chuyển gen.

– Thực vật xanh là những *sinh vật sản xuất* có vai trò sinh môi to lớn cho sự sống trên hành tinh, và cây trồng là nguồn cung cấp lương thực thực phẩm chủ yếu cho nhân loại nên việc ứng dụng các *sinh vật biến đổi gen* (genetically modified organism – GMO) là vấn đề gây nhiều tranh cãi.

Từ năm 1980, nhờ vượt qua khó khăn kĩ thuật, chuyển gen ở thực vật đã có những bước tiến ngoạn mục và đã đạt đến thế hệ thứ ba.

2. Cải thiện giống cây trồng

Bước phát triển đầu tiên của các thực vật chuyển gen (transgenic plants) là *đưa vào các giống cây trồng* các *đơn gen* như *kháng thuốc diệt cỏ* (herbicide) và *kháng bệnh*. Gần đây có các nỗ lực hướng vào sự *chuyển đa gen*. Các phương pháp khác nhau được ứng dụng nhằm :

– Vô hiệu hoá sự nhiễm virus vào cây trồng để có kiểu hình *kháng virus* tương ứng.

– Tạo giống cây *kháng bệnh nấm* như ở thuốc lá và cải dầu (*Brassica napus*) kháng *Rhizoctonia solani*.

– Chuyển gen *Bt* của *Bacillus thuringiensis* vào cà chua, thuốc lá, bông vải giúp *kháng sâu hại*.

– *Tạo sắc tố* ở các thực vật chuyển gen. Nhiều thực vật được dùng làm cây cảnh nên việc biến đổi màu sắc của chúng rất được quan tâm. Sắc tố của hoa chủ yếu do 3 nhóm chất: flavonoid, carotenoid và betacyanin. Nhiều *gen tạo flavonoid* đã được tạo dòng và đang tìm nhiều cách khác nhau cho biểu hiện ở thực vật .

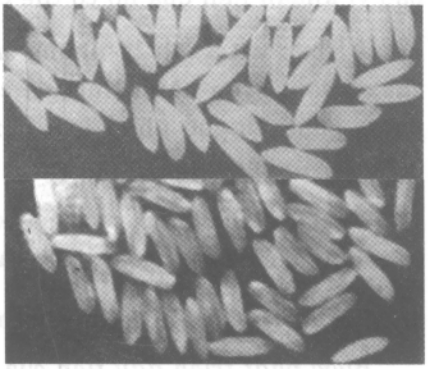
3. Biến đổi chất lượng thực phẩm của cây trồng

Đây là *bước phát triển lớn thứ hai* của thực vật chuyển gen và đã thành công trong biến đổi hàng loạt tính chất như tăng amino acid có giá trị (lysine, methionine, cysteine), lipid tốt hơn, tăng lượng vitamin, độ ngọt, chất bột... Sau đây chỉ nêu một số ví dụ điển hình.

– Năm 1988, 2 nhóm các nhà khoa học đã sử dụng antisense RNA làm cho *cà chua chín chậm* và *khó bị dập* hơn khi vận chuyển.

– *Thực vật sản xuất vaccine* đã thu được kết quả đầu tiên ở *khoai tây*, tiếp theo là ở *chuối* và gần đây ở *cà chua*. Người ăn chuối có vaccine sẽ khỏi phải tiêm (chích) vào cơ thể và một hướng phát triển mới hình thành là *ăn trị bệnh*, còn gọi là *dinh dưỡng dược* (nutriceutical).

Mặc dù gạo được một nửa dân số thế giới ăn hàng ngày, nhưng nó thiếu một số chất dinh dưỡng và vitamin A. Khoảng 124 triệu trẻ em trên thế giới bị thiếu vitamin A và hậu quả là 1 – 2 triệu trẻ em chết hằng năm. Bằng biến nạp nhờ *Agrobacterium*, con người đã chuyển gen quy định toàn bộ chuỗi sinh tổng hợp beta-carotene (tiền chất vitamin A) vào lúa. Giống lúa cho hạt gạo giàu beta-carotene có màu vàng (hình 4.12), nên được gọi là "lúa vàng" (golden rice).



Hình 4.12. Hạt gạo "vàng" từ giống gốc IR64 hạt trắng (trên)

Giống lúa đã được chuyển 3 gen là gen mã hoá *ferritin* (protein trữ sắt hàm lượng cao) từ đậu ve (green bean *Phaseolus vulgaris*), gen mã hoá *phytase* và gen mã hoá *metallothionein* từ nấm *Aspergillus fumigatus,* làm tăng hấp thu sắt và *cho hạt gạo giàu sắt* dễ hấp thụ.

Monellin là protein có trong một loại trái cây ở châu Phi, nó ngọt gấp 3000 lần đường ăn khi so cùng khối lượng. Gen mã hoá monellin được biến đổi đã được chuyển thành công vào cà chua và rau xà lách.

Ngoài ra, KTDT còn có thể cải thiện *thành phần protein* của thực vật hay loại bỏ các độc tố của thực phẩm.

c) Thực vật sản xuất các loại hoá chất đặc biệt

Đây là *bước tiến thứ ba* với các kết quả như sau :

– *Dầu nhờn công nghiệp* : Thực vật bậc cao tạo ra hơn 200 loại acid béo và một số được dùng làm thực phẩm. Tuy nhiên, một số dầu thực vật có giá trị công nghiệp cao hơn dầu ăn. Đã tạo ra nhiều *giống cải dầu* chuyển gen làm *biến đổi thành phần các acid béo* để có nhiều ứng dụng rộng rãi hơn (bảng 4.4).

Bảng 4.4. *Các giống cải dầu (Brassica napus) chuyển gen có lipid biến đổi trong hạt*

Sản phẩm hạt	*Ứng dụng thương mại*
1. 40% Stearic acid	Bơ thực vật (Margarine), bơ cocoa.
2. 40% Lauric	Chất tẩy rửa (Detergents).
3. 60% Lauric	Chất tẩy rửa.
4. 80% Oleic	Thực phẩm, dầu bóng (lubricants), mực in.
5. 40% Myrystate	Chất tẩy rửa, xà phòng, mĩ phẩm.
6. 90% Erucic	Polymer, mĩ phẩm, mực in, dược phẩm.
7. Ricinoic	Dầu bóng, mĩ phẩm, dược phẩm, chất tạo plastic.

– *Chất dẻo plastic* : Ví dụ, cây *Arabidopsis* mang gen vi khuẩn *sản xuất chất dẻo polyhydroxybutyrate* (PHB) là chất dự trữ ở vi khuẩn và có tính chất tương tự celophan (giấy bóng). Năm 1996, đã có thông báo nhận được 1kg chất dẻo *PHB từ cây thuốc lá chuyển gen*.

– *Các protein trị liệu* : Đã tạo ra các thực vật sản xuất *enkephalin* ở cây cải dầu làm chất giảm đau, *serum albumin* ở khoai tây để tăng máu. Các gen của *globine máu* được đưa vào cây thuốc lá (1996). Các gen *immunoglobin* được biểu hiện ở thực vật có thể đạt 1% protein hoà tan của lá. Gần đây đã tạo được giống lúa biểu hiện các r-protein người là *lysozyme* và *lactoferrin*, hứa hẹn có thể sản xuất hàng tấn (hình 4.13). Các thực vật có thể sẽ cung cấp nhiều protein quan trọng cho việc chữa trị các bệnh ở người, kể cả máu.

Hình 4.13. Lúa biểu hiện r-protein người (lactoferrin và lysozyme)

Xu hướng hiện nay là chú trọng chuyển gen người vào thực vật do nhiều lợi điểm :

– Có thể trồng với quy mô lớn nhờ năng lượng mặt trời, ít tốn kém hơn.

– Virus thực vật không đáng sợ cho người.

– Cho gen biểu hiện ở *mô tạo dầu* thực vật nên rất dễ tách và thu nhận protein.

Trong tương lai các chất trong thuốc chữa bệnh sẽ được sản xuất và chiết tách từ thực vật như hiện nay chiết tách aspirin. Tuy nhiên, tế bào thực vật không thực hiện biến đổi sau dịch mã giống tế bào động vật, do đó phải *"người hoá" tế bào thực vật* mới sản xuất được nhiều hơn các protein trị liệu cho người.

VII. CÁC ĐỘNG VẬT CHUYỂN GEN

1. Các đặc điểm chuyển gen ở động vật

Một số động vật có nhiều gen gần giống với các gen của người, nên chúng được nghiên cứu chi tiết và việc giải kí tự chuỗi bộ gen đã hoàn tất ở các đối tượng mô hình như ruồi giấm, tuyến trùng *Caenorhabditis elegans*, chuột.

Vi tiêm là phương pháp chuyển gen thông dụng hơn cả (hình 3.12) : DNA được bơm thẳng vào hợp tử ở giai đoạn *nhân non* (pronucleus). Ngoài ra có thể sử dụng các virus, tế bào phôi gốc hay điện biến nạp để chuyển gen. Chuyển gen ở cá dễ thực hiện nhờ thụ tinh ngoài.

Sự biểu hiện gen ở tế bào động vật giống với tế bào người, nhất là các biến đổi sau dịch mã, nên có nhiều hệ thống dùng cho sản xuất r-protein trị liệu như :

– Các dòng tế bào người và chuột thí nghiệm như dòng tế bào CHO.

– *Baculovirus* ở tế bào côn trùng.

– Tuyến trùng *Caenorhabditis elegans*. Thậm chí có thể nuôi nó trong bồn lên men để sản xuất protein người như lactoferrin.

Nhược điểm lớn nhất là các virus động vật có nhiều khả năng gây bệnh cho người.

Đặc biệt, sự ra đời của kĩ thuật *tạo dòng vô tính động vật*, bằng cách *chuyển nhân* tế bào soma vào các *tế bào trứng mất nhân* (enucleated eggs), mở rộng đáng kể khả năng tạo các động vật mang gen lạ ổn định qua nhiều thế hệ. Tiếp theo là việc hình thành kĩ thuật *chuyển gen vào tế bào gốc* đã tạo nên bước phát triển mới.

2. Các động vật mang gen người làm mô hình thí nghiệm

Công nghệ gen tạo các động vật mang gen bệnh làm mô hình nghiên cứu được ứng dụng phổ biến hiện nay. Hàng loạt chuột mang các bệnh ung thư (hình 4.14), Alzheimer, thoái hoá cơ, viêm khớp,... đã được tạo ra.

Các chuột chuyển gen cũng được dùng làm các hệ thống thử nghiệm như các dòng mang gen mã hoá CFTR protein (Cystic fibrosis transmembrane receptor) để nghiên cứu trị bệnh hoá xơ nang CF (cystic fibrosis).

Hình 4.14. Chuột ung thư

3. Các động vật nuôi chuyển gen sản xuất r-protein

Con người đã tiến khá xa trong sử dụng các động vật (bò, dê, cừu, heo, thỏ) chuyển gen để sản xuất r-protein người như cho gen biểu hiện ở tuyến sữa để có thể thu nhận nhiều lần một cách dễ dàng với số lượng đáng kể. Ở đây, tuyến sữa trở thành bioreactor sản xuất r-protein. Nếu một con bò sữa giống tốt cho 10000 lít sữa/năm, mà mỗi lít có 1 gr r-protein với hiệu suất tinh sạch chỉ 50%, thì từ 20 con sẽ thu được 100kg r-protein. Nhu cầu sử dụng protein C để ngăn cản tạo các cục mấu là 100kg/năm. Đối với bệnh máu khó đông (hemophilia) thì một con bò chuyển gen đủ cung cấp nhân tố IX làm đông máu cho nhu cầu cả năm.

Nhiều thành tựu đáng kể trong tạo các động vật (bò, dê, cừu, heo, thỏ) chuyển gen và dẫn đến "chăn nuôi gen" (gene farming) để sản xuất vài chục loại protein trị liệu như nêu trên bảng 4.5. Ở Mĩ, từ năm 1995 đã có nông trại nuôi trên 500 con dê sản xuất r-protein trị liệu.

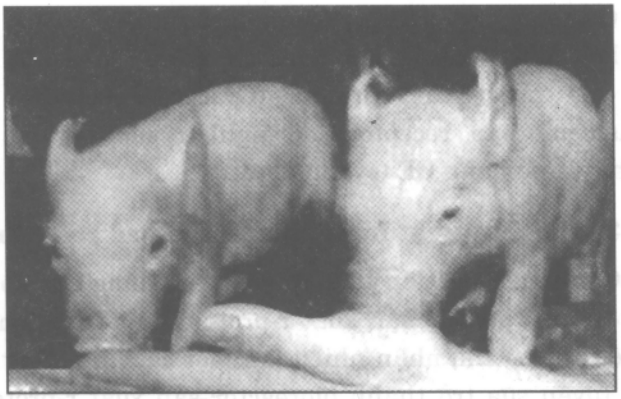
Bảng 4.5. Các r-protein được biểu hiện ở tuyến sữa vật nuôi.

1. Antithrombin III 2. Calcitonin 3. Erythropoetin 4. Factor IX 5. Factor VIII 6. Fibrinogen 7. Hemoglobin 8. Insulin 9. Interleukin 2	10. Lactoferrin 11. Lysozyme 12. Protein C 13. α 1-Antitrypsin 14. α-Glucosidase 15. α-Lactalbumin 16. Hormone tăng trưởng người 17. Super dismutase	18. G-CSF (Granulocyte- Colony Stimulating Factor) 19. t-PA (Tissue plasminogen activator) 20. Peptide tương tự glucagon 21. Albumin huyết tương người 22. Insulin tương tự nhân tố tăng trưởng 1 (Insulin-like growth factor1) 23. Nhân tố tăng trưởng neuron beta 24. Các kháng thể đơn dòng

Lactoferrin và protein C được tạo ra ở bò (hình 4.15) và dùng trong công thức ăn cho trẻ con và làm tan máu đông (Gen-Pharm). Alpha-1 antitrypsin sản xuất ở cừu để trị bệnh emphasema.

Chăn nuôi gen có thể đưa đến sự sản xuất ở quy mô công nghiệp các *protein phức tạp* không biểu hiện được ở vi khuẩn và nấm men như collagen của người có ứng dụng quan trọng trong làm lành da, ghép mô và trị bệnh da.

Hình 4.15. Bò chuyển gen



Hình 4.16. Heo mini bị knockout (làm im) 2 gen (Bất hoạt gen GGTA1 nên khi ghép không bị thải)

Nhiều bệnh nhân cần thay thế cơ quan mới sống được. Để thực hiện dị ghép (xenotransplantation) thành công cần phải ức chế phản ứng thải ghép cơ quan lạ. Từ đầu thập niên 1990, đã tạo ra heo mang gen mã hoá *protein DAF* của người ức chế phản ứng miễn dịch khi dị ghép. Gần đây, các nhà khoa học đã tạo được giống heo mini (hình 4.16) bị làm im lặng (knockout) 2 gen : hormone tăng trưởng và tạo thụ thể GGTA1 giúp cơ thể nhận biết cơ quan lạ.

VIII. CÁC ỨNG DỤNG CỦA KĨ THUẬT DI TRUYỀN ĐỐI VỚI CON NGƯỜI

KTDT đã thể hiện quyền lực to lớn trong cải biến sinh giới về nhiều mặt, không những thay đổi các tính trạng khác nhau, mà can thiệp cả đến chi tiết các thành phần và quá trình trao đổi chất. Hiện nay, Y học bộ gen (Genomic Medecine) phát triển chủ yếu trên các lĩnh vực : SNP, proteomics, pharmacogenomics.

1. Các xét nghiệm SNP

Việc giải trình tự toàn bộ bộ gen người đã mở ra hàng ngàn thông tin về các SNP hữu ích. Các xét nghiệm *SNP* giữ vai trò *then chốt trong việc thiết kế thuốc cho từng cá nhân*. Vấn đề tiếp theo của *Bộ gen người* là làm thế

nào để xác định *chức năng của từng gen* và quan trọng hơn là *vị trí nào* có liên quan đến kiểu hình khác thường mà kiểu gen đó biểu hiện. Ngoài ra, một số bệnh liên quan đến di truyền đa gen như bệnh ung thư, tiểu đường, mà những chẩn đoán được thực hiện nhiều trong những năm gần đây là *xác định kiểu SNP*. Tuy nhiên, việc xác định một nhóm các trình tự SNP trong toàn bộ bộ gen lại là một việc bất khả thi, do vậy các hãng dược phẩm lớn đã cho ra đời nhiều phương tiện và cách thức khác nhau trong việc tiếp cận SNP. Sản phẩm dùng xác định SNP ở dạng *chip*, nay gọi là *microarray*.

Việc phân tích SNP giúp nhận dạng các tiểu quần thể bệnh nhân, những người mà có đáp ứng khác biệt với phương thức điều trị so với những người còn lại, hay giúp hiểu thêm tại sao một số bệnh chỉ hiện diện ở người này mà không biểu hiện ở người khác.

2. Dược học bộ gen (Pharmacogenomics)

Pharmacogenomics là sự kết hợp giữa *dược học* với *genomics* nhằm nghiên cứu về gen, sự điều hoà và đóng góp của chúng với sự phát triển của bệnh tật ở mỗi cá thể riêng biệt. Nó là cơ sở cho sự phát triển *Y học cá thể hoá* nên là một trong những khuynh hướng quan trọng nhất nổi lên cho sự phát triển *Dược học hiện đại*. Mục tiêu tối thượng của *pharmacogenomics* là cung cấp cho từng người bệnh sự *chữa trị an toàn và hiệu quả hơn* so với kiểu chữa trị hiện hành (một loại thuốc cho tất cả). Ngoài ra, nó mở đường cho *y học dự phòng* (predictive medecine) hiệu quả nhờ biết kí tự chuỗi của gen, dữ liệu biểu hiện gen trong lâm sàng gồm bệnh án, tương tác của thuốc và thể trạng từng người. *Pharmacogenomics* sẽ biến y học từ các phương pháp "chờ và thấy" (wait and see) và "được chăng hay chớ" (hit or miss) sang những *dự báo cá thể* dựa trên các gen.

Thống kê hiện nay cho thấy 900 triệu USD là cái giá phải trả để đưa ra một loại thuốc thành công trên thị trường, mà ước chừng 75% là thất bại và hơn 175 tỉ USD được tiêu pha hằng năm cho các vấn đề cảm ứng với dược phẩm. Những kĩ thuật mới có thể góp phần làm giảm thất bại nhờ sự loại trừ một cách hiệu quả vào thời gian sớm hơn trong quá trình khám phá thuốc.

Tổ chức FDA đang khuyến khích việc sử dụng các dữ liệu về gen trong pharmacogenomics để đánh giá các loại thuốc mới, đồng thời tăng thêm các thử nghiệm gen nhằm phát hiện các đột biến gây bệnh. Các bác sĩ cũng được yêu cầu tăng thử nghiệm gen nhằm đề ra chế độ uống thuốc tối ưu cho bệnh nhân của mình.

Một lĩnh vực mới khác là *toxicogenomics* (độc tố học bộ gen). Nó xác định sự nhạy cảm cá thể với các chất ô nhiễm môi trường hoặc thuốc.

3. Liệu pháp gen

Chữa trị các bệnh di truyền ở người trong thời gian dài là vấn đề nan giải. Việc sản xuất các r-protein có thể khắc phục hậu quả bằng *can thiệp vào kiểu hình* như :

– Chữa trị bệnh *thiểu năng miễn dịch hỗn hợp cấp* (severe combined immune defiency –SCID) bằng bổ sung enzyme *adenosine deaminase*, mà người bệnh bị thiếu bẩm sinh.

– Chữa bệnh *máu khó đông* (hemophilia) bằng bổ sung các nhân tố r-protein làm đông máu.

Bảng 4.6. Các thử nghiệm lâm sàng bằng liệu pháp gen (1990 – 1999)

Bệnh	*Số lần thử nghiệm*	*Bệnh*	*Số lần thử nghiệm*
AIDS	19	Bệnh máu khó đông A	2
Xơ cứng cơ bên	1	Bệnh máu khó đông B	2
Bệnh Canavan	2	Bệnh Hunter	1
Ung thư	280	Thiếu kết dính bạch cầu	1
Bệnh tim mạch	20	Bệnh đa xơ cứng	1
Bệnh xơ cứng cổ tay	1	Loạn dưỡng cơ	1
Bệnh granulomatosis kinh niên	2	Thiếu Ornithine transcarbamylase	1
Xơ nang	24		
Dư cholesterol trong máu	1	Thiếu Purine nucleoside phosphorylase	1
Thiếu máu Fanconi	1		
Bệnh Gaucher	3	Viêm thấp khớp	2
		Suy giảm miễn dịch	3

Tuy nhiên cách chữa trị này không căn bản và phải dùng thuốc đắt giá trong một thời gian dài. Từ năm 1990, *liệu pháp gen* ra đời, sử dụng KTDT *thay thế gen bệnh bằng gen lành* để chữa trị các bệnh di truyền ở người. Khác với kiểu chữa trị truyền thống bằng thuốc và phẫu thuật, *liệu pháp gen làm thay đổi một bộ phận kiểu gen của con người*. Về mặt đạo lí, việc chuyển gen vào các *tế bào sinh dục* dễ gây các biến đổi nguy hiểm nên bị cấm và hiện nay chỉ được thực hiện đối với *tế bào soma*. Do nhìn thấy triển vọng to lớn của liệu pháp này, lại có nhiều người tình nguyện chữa trị, nên từ 1990 đến 1999 đã có hàng trăm ca được thực hiện (bảng 4.6). Tuy nhiên, hầu hết đều thất bại, chỉ vài ca thành công và thậm chí xảy ra *sự cố làm chết người*. Đó là cái chết của Jesse Gilsinger ở Mĩ vào năm 1999 khi liệu pháp gen thực hiện bằng *Adenovirus*. Điều này cảnh báo về *sự an toàn* của liệu pháp gen.

a) Các phương pháp chuyển gen

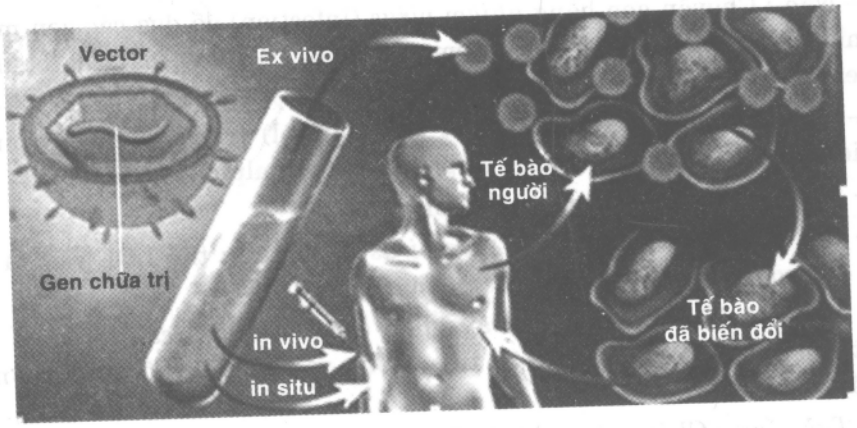
Có thể sử dụng các *vector virus* hoặc DNA trần hay gói trong *liposome* (màng bao lipid) để thực hiện chuyển gen. Các nhóm virus thông dụng là *Retrovirus, Adenovirus* và Adeno-associated virus. Việc sử dụng các virus cho thấy khi hiểu biết sâu về kiến thức cơ bản thì con người có thể sử dụng *kẻ thù* (virus gây ung thư) làm *công cụ có ích* trong việc chữa trị bệnh cho con người.

b) Các phương pháp đưa gen vào người bệnh

– *In situ* (chữa tại chỗ) : Bơm vector mang gen lành vào thẳng phần cơ quan cần chữa trị.

– *In vivo* (trong cơ thể) : Bơm vector mang gen lành vào cơ thể như chữa bệnh xơ nguyên bào bằng *đưa virus vào phổi* qua bơm hơi.

– *Ex vivo* (ngoài cơ thể) gồm các bước : 1) Tách các tế bào của người bệnh (tế bào tạo máu của tuỷ sống hay nguyên bào sợi (fibroblast) có thể sản xuất máu mang đi khắp cơ thể) ; 2) Tách gen bình thường gắn vào virus và cho nhiễm vào tế bào người bệnh ; 3) Chọn lọc dòng tế bào tốt (có gen lắp đúng chỗ) ; 4) Đưa dòng tế bào chọn lọc trở lại vào cơ thể (hình 4.17).

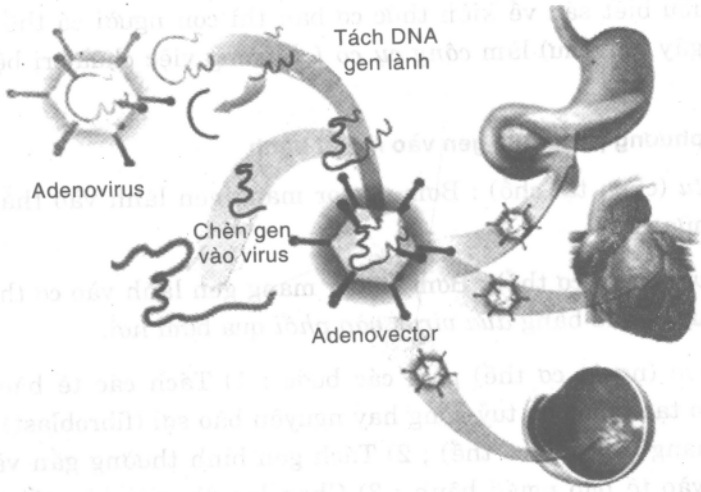


Hình 4.17. Liệu pháp gen : *ex vivo, in vivo và in situ.*

Do gen chữa trị được phóng thích ở dạng DNA nên có thể được hấp thu bởi các tế bào không phải mục tiêu và phản ứng của cơ thể khó dự đoán, nên phương pháp *ex vivo* là tốt và an toàn hơn. Trong trường hợp lí tưởng là gen lành được chèn đúng vị trí gen bệnh trên nhiễm sắc thể. Gần đây đã có cải biến sử dụng virus đưa gen sản xuất protein vào đúng chỗ bệnh.

c) Các tính trạng chữa trị và phương pháp thực hiện

Liệu pháp gen được thực hiện với hàng loạt tính trạng ở các mô và cơ quan khác nhau trên cơ thể người nhờ nhiều phương pháp (hình 4.18).



Hình 4.18. Liệu pháp gen (Adenovirus đưa gen sản xuất protein vào đúng chỗ bệnh)

– *Não :* Chuyển gen bằng *nhiễm virus* (infection) để đưa các gen mã hoá các nhân tố tăng trưởng, các enzyme để chữa trị hàng loạt các bệnh như Alzheimer, Huntington, Parkinson, thương tổn dây thần kinh cột sống,...

– *Phổi :* Chuyển gen bằng *bơm khí* (aerosol) trị bệnh xơ nguyên bào (cystic fibrosis), bệnh khí thũng (emphysema) nhờ alpha-1-antitrypsin.

– *Máu :* DNA trần trị máu khó đông.

– *Gan :* Chuyển gen qua *cấy retrovirus* để đưa thụ thể LDL vào và chữa bệnh dư cholesterol (hypercholesterolemia).

– *Nội mô* (Endothelium) : Cấy ghép (implantation) các nhân tố đông máu trị máu khó đông, insulin trị tiểu đường và các nhân tố tăng trưởng trị lùn bẩm sinh.

– *Tuỷ sống :* Ghép mô trị bệnh Gaucher, thiểu năng miễn dịch (adenosine desaminase severe combine immune defiency).

– *Cơ :* Chuyển gen qua myoplast nhờ virus và liposome.

Hơn thế nữa, liệu pháp gen có khả năng rất lớn trong cải biến cơ thể người về nhiều mặt :

– Hồi phục chức năng bình thường của tế bào hay mô.

– Hồi phục sai hỏng di truyền.

– Thêm chức năng mới cho tế bào.

4. Công nghệ gen tác động đến từng người

Ngay khi *Dự án bộ gen người* bắt đầu, đã xuất hiện các cụm từ "*trẻ em theo đơn đặt hàng*" (l' enfants à la carte) hay "*thiết kế trẻ em*" (designer babies), mà ngay trong thế kỉ XXI này có thể trở thành hiện thực. Tuy nhiên, trong 5 – 10 năm tới mỗi người sẽ có thể hiểu rõ hơn về các tính trạng di truyền của bản thân mình như chiều cao và khối lượng cơ thể, màu tóc và mắt, tài năng và tính tình, kể cả nguyên nhân bị bệnh. Điều đó có thể sẽ làm cho cuộc sống con người thú vị hơn, nhưng quan trọng hơn là mỗi người cần có những tri thức tối thiểu để đối mặt với hàng loạt vấn đề như :

– Cần những thử nghiệm gì trước khi trở thành cha hoặc mẹ ?

– Cần có thông báo trước về bộ gen đứa con hay không ?

– Ăn các thực phẩm chuyển gen hay không ?

– Thuốc nào có hiệu quả nhất cho bản thân và con cháu ?

– Dùng thuốc sản xuất nhờ các sinh vật chuyển gen hay không ?

– Có thể nhận cơ quan ghép từ heo không ?

– Các thử nghiệm microarray có ích như thế nào trong bảo hiểm và xin việc làm ?

Tóm lại, nhiều phát minh nối tiếp ra đời đã tạo nên *quyền lực ghê gớm* của KTDT không những trong chọn giống mà có thể tác động trực tiếp đến cơ thể con người.

Sau hơn 30 năm phát triển, đóng góp to lớn của KTDT cho sinh học đi sâu vào bản chất sự sống và được coi là có tầm quan trọng tương tự *phát minh ra kính hiển vi* vào thế kỉ XVII, và về mặt ứng dụng thực tiễn có thể sánh với *chế tạo thành công bom nguyên tử*. Cho đến nay, có thể nói nó chỉ bị giới hạn bởi *đạo lí sinh học*.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Kĩ thuật di truyền có nhiều ứng dụng quan trọng trong *nghiên cứu sinh học* và *thực tiễn sản xuất* của xã hội loài người. Nhờ kĩ thuật tạo dòng phân tử, DNA trở nên dễ nghiên cứu, mà kết quả là sự ra đời của *genomics, proteomics* và các *–omics* khác. *Bộ gen người* đánh dấu một cột mốc lịch sử của nhân loại, đồng thời nó mở ra *thời đại sau bộ gen* với những ứng dụng sâu hơn và to lớn hơn. *Công nghệ RNA* và *r-protein* đã có nhiều ứng dụng cụ thể và nhiều sản phẩm đang có mặt trên thị trường. Các phương pháp và chế phẩm *chẩn đoán phân tử*, đặc biệt là *microarray*, được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực.

Hàng loạt các *sinh vật chuyển gen* ra đời tạo nhiều sản phẩm đa dạng có giá trị cao, nhưng đồng thời đặt ra nhiều vấn đề tranh cãi.

KTDT cũng có hàng loạt các ứng dụng cho con người. *Chẩn đoán SNP* sẽ có vai trò cách mạng trong tương lai với sự phát triển của *Y học cá thể hoá*. *Pharmacogenmics* sẽ tạo ra nhiều loại thuốc mới tác động chính xác và hữu hiệu hơn. Từ năm 1990, *liệu pháp gen* can thiệp trực tiếp vào kiểu gen để chữa trị bệnh di truyền cho con người, đồng thời cho thấy tiềm năng to lớn trong cải biến cơ thể người. Những thành tựu to lớn của *công nghệ gen* sẽ có tác động trực tiếp đến mỗi người trong tương lai không xa.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao phân tử DNA trở nên dễ nghiên cứu ?
2. Genomics, proteomics và –omics khác có ý nghĩa ứng dụng như thế nào ?
3. Dự án bộ gen người đã cho biết những số liệu cụ thể nào ?
4. Thời đại sau bộ gen có những đặc điểm gì ?
5. Nêu các ứng dụng của antisense RNA.
6. Vì sao RNAi thu hút sự chú ý của giới khoa học và các công ti dược ?
7. Vì sao gọi là công nghệ protein ?
8. Nêu ví dụ về biến đổi chất lượng protein do kĩ thuật di truyền.
9. Nêu các ưu điểm của phương pháp chẩn đoán mới.
10. Microarray là gì và có những ứng dụng nào ?
11. In dấu di truyền dựa trên cơ sở nào và có ứng dụng vào lĩnh vực nào ?
12. Nêu ví dụ về thay đổi trao đổi chất để sản xuất các chất phân tử nhỏ.
13. Nêu các bước tiến chủ yếu của chuyển gen ở thực vật.
14. Nêu các ví dụ về chuyển gen ở động vật và ứng dụng.
15. Vì sao nói chẩn đoán SNP sẽ có vai trò cách mạng trong tương lai ?
16. Pharmacogenomics là gì và có những ứng dụng nào ?
17. Liệu pháp gen có thể thực hiện với những tính trạng nào ?

CHƯƠNG 5

CÔNG NGHỆ SINH HỌC PROTEIN VÀ ENZYME

Các protein và enzyme đã được con người sử dụng từ lâu, nhưng việc thu nhận chúng dễ dàng với số lượng lớn và nhiều chủng loại từng là ước mơ của các nhà khoa học. Trước đây, công nghệ protein và enzyme là phần chủ yếu của *kĩ thuật hoá sinh* (biochemical engineering). Ngày nay, nó phát triển mạnh, nhất là với sự ra đời của *Genomics* và *Proteomics*, với các đặc điểm :

– Các phân tử protein có *cấu trúc phức tạp nhất*, nên để thu các chế phẩm có *đầy đủ hoạt tính sinh học* đòi hỏi không những các *kĩ thuật chiết tách, tinh sạch tốt*, mà còn bảo quản được lâu dài.

– Nhiều ứng dụng trong trị liệu cho người và các lĩnh vực khác nhau.

– Nhiều protein truyền thống được thay thế dần bằng các r-protein.

I. CẤU TRÚC PHÂN TỬ PROTEIN

1. Các bậc cấu trúc

Protein là polymer gồm các *amino acid* nối với nhau bằng *cầu nối peptide* và hình thành *cấu trúc không gian 3 chiều* khi *ở dạng tự nhiên*.

Tham gia thành phần cấu tạo protein có *20 loại L-amino acid* với các chữ viết tắt gồm ba chữ hoặc với chỉ một chữ. Ví dụ : Lysine (Lys - K), Arginine (Arg - R), Histidine (His - H),...

Phân tử protein có thể có 4 bậc cấu trúc (hình 5.1) như sau :

– *Cấu trúc bậc một*: Chuỗi polypeptide mạch thẳng.

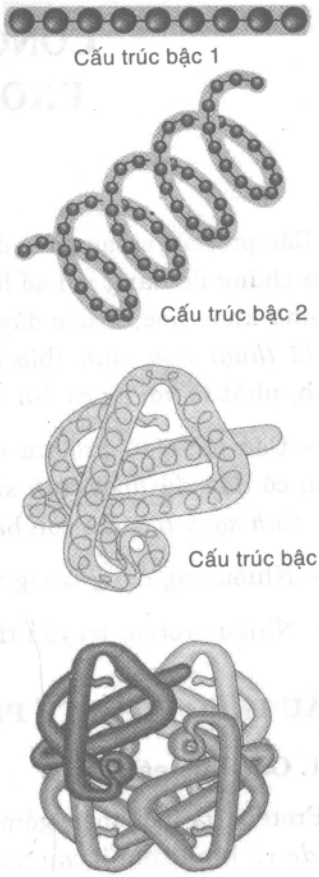
– *Cấu trúc bậc hai* : Chuỗi polypeptide mạch thẳng xoắn theo kiểu lò xo (xoắn alpha và beta).

– *Cấu trúc bậc ba* : Chuỗi polypeptide cấu trúc bậc hai cuộn xếp theo kiểu đặc trưng tạo cấu trúc không gian ba chiều phức tạp (dạng sợi, cuộn hay khối cầu).

– *Cấu trúc bậc bốn* : 2 hay nhiều chuỗi polypeptide cấu trúc bậc ba liên kết với nhau.

2. Sự ổn định và gấp cuộn

Khi protein vừa được tổng hợp xong, nó *gấp cuộn* thành cấu trúc không gian ba chiều xác định *chức năng sinh học*, đồng thời *ổn định cấu trúc*. Trong nhiều năm, các nhà hoá sinh học cho rằng sự cuộn gấp của phân tử protein *được xác định tự động bởi cấu trúc bậc một*. Nhưng thực tế cho thấy, trình tự này không đủ đảm bảo cho polypeptide tạo dạng hình có tính đặc hiệu cao để đáp ứng đúng chức năng của nó. Nhóm *các protein chaperone* giúp các polypeptide *gấp cuộn đúng* dạng hình không gian ba chiều có *đủ hoạt tính sinh học* và một số *enzyme* như *disulfide isomerase* giúp tạo *cầu nối disulfide*.



Hình 5.1. Các bậc cấu trúc của protein

Các protein gấp cuộn không đúng có thể gây ra bệnh. Một số bệnh như Alzheimer, chứng xơ nang (cystic fibrosis), nhiều căn bệnh ung thư ... mà nguyên nhân bị bệnh không rõ ràng. Gần đây những nghiên cứu chỉ ra rằng tất cả những bệnh này là *kết quả của sự gấp nếp sai trong cấu trúc protein*.

Các enzyme *peptidyl prolyl isomerase* và các *enzyme protein disulfide isomerase* cũng tham gia vào việc gấp cuộn chính xác và hữu hiệu của nhiều protein *in vivo*.

3. Các biến đổi sau dịch mã

Nhiều polypeptide chịu những *biến đổi hoá trị* trong hoặc sau dịch mã trên ribosome. Các biến đổi này ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học hoặc ổn định cấu trúc của polypeptide.

– *Sự cắt xén bởi protease* : Cắt bớt một đoạn peptide của protein làm hoạt hoá chức năng protein hay enzyme. Biến đổi có tính *đặc hiệu* và *không thuận nghịch*. Thường gặp ở các tiền enzyme và các protein đích được đưa vào các bào quan hoặc xuất ra khỏi tế bào. Ví dụ, các enzyme tiêu hoá như trypsin, chymotrypsin và pepsin.

– *Glycosyl hoá* : Gắn thêm các gốc hoặc chuỗi đường. Thường gặp ở các protein màng hoặc các protein ngoại bào ở *Eukaryotae*. Glycosyl hoá có nhiều chức năng : trực tiếp làm trung gian cho các hiệu ứng sinh học của một số protein (hCG và erythropoetin), định hướng mục tiêu (các enzyme của lysosome), nhận biết (các thụ thể), ổn định cấu trúc, thay đổi độ hoà tan, tăng bán chu kì tồn tại của phân tử.

– *Phosphoryl hoá* : *Gắn thêm nhóm phosphate* vào protein, mà *chất cho* chủ yếu là *ATP*. Quá trình có thể thuận nghịch nhờ hệ thống 2 enzyme : kinase và phosphatase. Nó làm thay đổi hoạt tính sinh học hoặc tính chất hoá lí của polypeptide.

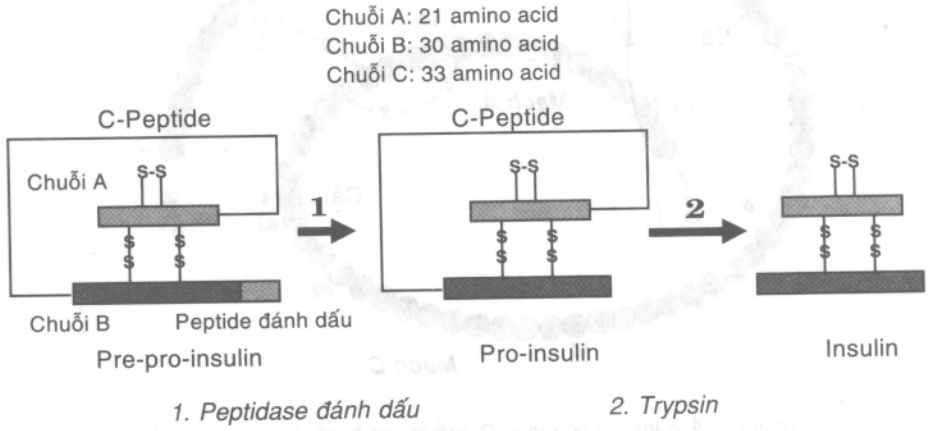
Ngoài ra, còn có nhiều kiểu biến đổi sau dịch mã khác như *acetyl hoá* (acetylation), *acyl hoá* (acylation), *amid hoá* (amidation), *sulfate hoá* (sulfation), *hydroxyl hoá* (hydroxylation), *tạo nối S–S*,...

4. Insulin tự nhiên và thương phẩm

Ví dụ về insulin giúp hiểu rõ hơn *sự phức tạp* khi hình thành cấu trúc phân tử protein có *hoạt tính sinh học* và KTDT làm biến đổi phân tử để tạo sản phẩm dùng cho trị liệu.

Insulin người có hoạt tính sinh học được hình thành qua các bước sau (hình 5.2) :

– Đầu tiên, *pre-pro-insulin có peptide tín hiệu* (signal peptide) được tổng hợp.



Hình 5.2. Quá trình hình thành insulin có hoạt tính sinh học

– Tiếp theo, *peptide tín hiệu bị cắt mất bởi enzyme signal peptidase thành pro-insulin* (hình 5.3), gồm mạch A (21 amino acid), mạch B (30 amino acid) và mạch C (33 amino acid).

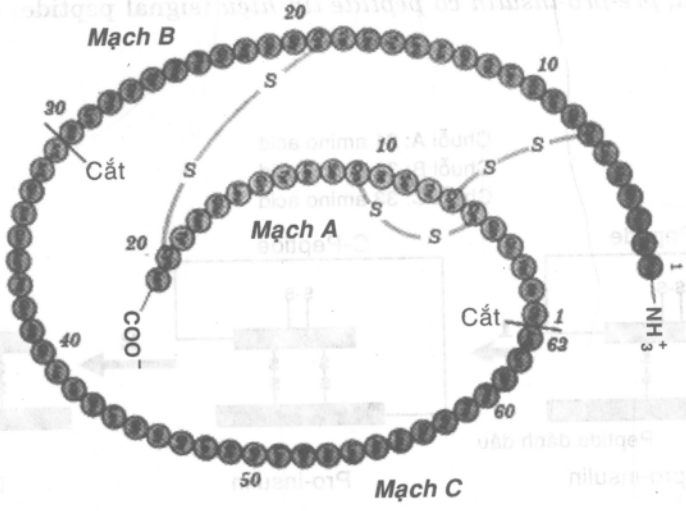
– Cuối cùng, mạch *C bị cắt bỏ bởi enzyme trypsin* còn lại 2 mạch A và B gắn nhau qua 2 cầu disulfide. Cấu trúc không gian của insulin nêu trên hình 5.3.

Thị trường insulin trên thế giới ước tính 3 tỉ USD, chủ yếu do 3 tập đoàn dược phẩm sản xuất : Novo Nordish (Đan Mạch – chiếm 45% thị phần), Eli Lilly (Mĩ), Aventis-Hoechst (Đức). Lúc đầu, chiết tách *insulin từ tuyến tuỵ của heo* và *bò*. Ở chế phẩm dùng cho người : *alanine ở vị trí 30 mạch B của insulin heo* được thay thế bằng *threonine* đúng như *insulin người*. Ngày nay, chủ yếu sản xuất *insulin tái tổ hợp* với nhiều *công thức* khác nhau :

– Insulin của Novo Nordish được tạo ra nhờ *tế bào nấm men*, gồm hai họ: *họ Novolin* (insulin người) có *8 công thức* và *họ Novolog* (mạch B P28D) có *2 công thức*.

– Eli Lilly sử dụng *tế bào chủ E. coli*, insulin cũng gồm 2 họ : *Humulin* (insulin người) có *5 công thức* và *Humalog* (mạch B P28K/K29P) có *2 công thức*.

– Aventis-Hoechst chỉ có một công thức insulin (mạch A N21G) dùng tiêm dưới da và loại để xông hơi qua đường hô hấp.



Hình 5.3. Pro-insulin có mạch C, mà khi nó bị cắt bỏ mới tạo ra insulin. Hai mạch A và B nối qua 2 cầu disulfide.

II. CÁC PROTEIN TRỊ LIỆU (THERAPEUTIC PROTEIN)

1. Các protein từ máu và sản phẩm liên quan

Hệ tuần hoàn của người trưởng thành chứa khoảng *5 – 6 lít máu*, chiếm 8,5 – 9,0% tổng khối lượng cơ thể. Máu gồm các *tế bào hồng cầu* (99% tổng số các tế bào máu), *bạch cầu* và *tiểu cầu*, lơ lửng trong dịch *huyết tương*. Khi *máu đông cục* (clot), các tế bào bị nhốt trong mạng lưới các *protein sợi fibrinogen*, chất lỏng còn lại là *huyết thanh*. Huyết tương về căn bản gồm huyết thanh và fibrinogen. Máu có vai trò quan trọng sống còn trong nhiều chức năng sinh lí như vận chuyển oxygen, các chất dinh dưỡng, các enzyme, hormone,... Nhiều chức năng đặc hiệu của máu do các protein quy định và chúng được sử dụng chủ yếu ở các dạng : *máu toàn phần* (whole blood), *chất đông máu* (coagulation factors), *chất chống đông máu* (anticoagulants) và *tác nhân làm tan máu* (thrombolitic agents).

Máu toàn phần thu nhận vô trùng từ người hiến máu và xử lí ngay với chất chống đông. Ngoài việc dùng cho truyền máu trực tiếp, nó là nguồn cung cấp các thành phần khác nhau : các tế bào *hồng cầu, tiểu cầu ; các nhân tố đông máu* khác nhau ; *immunoglobine* và các thành phần bổ sung của *huyết tương*. Trước khi sử dụng, máu phải được đảm bảo không có bất kì tác nhân gây bệnh nào.

Albumin huyết thanh là loại protein chủ yếu, chiếm khoảng 60% tổng số protein huyết tương, được tinh lọc từ huyết thanh, huyết tương hoặc từ nhau thai của người cho khỏe mạnh.

α1-Antitrypsin là một *glycoprotein huyết thanh*, mà sự thiếu nó thường gây *bệnh khí thũng* (emphysema). Liệu pháp bổ sung α1-Antitrypsin qua tĩnh mạch có thể ngăn chặn bệnh này. *α1-Antitrypsin tái tổ hợp* đã được sản xuất thành công trong sữa của cừu và chuột.

Các chất đông máu làm hình thành *cục máu* (thrombus) tại vị trí tổn thương. Sự đông máu là một quá trình phức tạp gồm chuỗi phản ứng nối tiếp nhau của 13 nhân tố (đánh số La Mã từ I đến XIII). Đáng lưu ý là *nhân tố VIII và IX* liên quan đến *bệnh di truyền máu khó đông* (hemophilia), có thể được tinh chế từ huyết tương. Ngày nay, cả hai r-protein *VIII và IX* đều đã được sản xuất.

Các chất chống đông máu được sử dụng cho những người bị bệnh *đau tim, đột quỵ* hay mắc *chứng nghẽn mạch*. *Chứng nghẽn mạch* (thrombosis) liên quan đến sự đông kết cục máu. Sự *tắc nghẽn động mạch vành* sẽ gây ra cơn đau tim, thường gây chết do *nhồi máu cơ tim*. Các cục máu ngăn chặn sự di chuyển của dòng máu lên mô não thường gây ra hậu quả là *đột quỵ*.

Các chất chống đông truyền thống gồm :

– *Heparin* có bản chất là glucosaminoglycan. Chế phẩm heparin thương mại thường được chiết xuất từ màng nhầy ruột heo hoặc phổi bê.

– *Hirudin* là peptid chống đông máu được tiết ra từ tuyến nước bọt của *con đỉa* (*Hirudo medicinalis*). Hirudin được ứng dụng rộng rãi do có nhiều ưu điểm trong điều trị : tác động trực tiếp lên thrombin, không đòi hỏi đồng yếu tố (cofactor) để có hiệu quả ức chế, ở nồng độ cao vẫn ít gây chảy máu và ít gây đáp ứng miễn dịch.

– *Ancrod* là một serine protease chống đông, được tinh chế từ nọc độc của một loài rắn ở Malaysia, xúc tác sự phân cắt các phân tử fibrin.

Các tác nhân làm tan máu gồm *t-PA* (tissue plasminogen activator – nhân tố hoạt hóa plasminogen mô), *urokinase* và *streptokinase* là các protein làm tan (phân hủy) các cục máu. Chúng được chỉ định trong điều trị các chứng *nhồi máu cơ tim, tắc mạch, đột quỵ*. Hằng năm, toàn thế giới có trên 600000 bệnh nhân được điều trị bằng các tác nhân này.

2. Hormone và các nhân tố tăng trưởng

Nhiều hormone đã được dùng trong trị liệu như *insulin, glucagon, gonadotrophin* (gồm FSH, LH, hCG, hormone tăng trưởng (bảng 5.1).

Bảng 5.1. Một số hormon thương phẩm tách chiết từ động vật

Protein	*Nguồn gốc*	*Ứng dụng*
Insulin	Tuyến tuỵ của heo (lợn), bò.	Điều trị bệnh tiểu đường.
Glucagon	Tuyến tuỵ của heo, bò.	Ngược với insulin, làm tăng đường huyết bằng phân giải glycogen tạo glucose.
Hormon kích thích tạo nang trứng (Follicle-stimulating hormone – FSH)	Tuyến yên của heo hay nước tiểu phụ nữ sau mãn kinh.	Cảm ứng siêu rụng trứng ở động vật. Điều trị rối loạn chức năng sinh sản ở người.
Gonadotrophin màng ối người (Human chorionic gonadotrophin - hCG)	Nước tiểu phụ nữ mang thai.	Điều trị rối loạn chức năng sinh sản.
Hormone hoàng thể LH (Luteinizing hormone)	Thuỳ trước tuyến yên	Kích thích tạo hormone sinh dục (estrogen và progesteron ở nữ và testosteron ở nam)

Một nhược điểm liên quan tới việc chữa bệnh của nhiều protein có nguồn gốc từ động vật là sự hiện diện của các tác nhân gây bệnh (như virus) có trong các vật liệu thô.

3. Các cytokine : interleukine và interferon

Thuật ngữ *cytokine* được nêu ra vào thập niên 1970 để chỉ các *nhân tố điều hoà* kích thích các tế bào thuộc *hệ miễn dịch*. Các cytokine được tổng hợp chủ yếu do *bạch cầu*. Khác với các hormone truyền thống, các cytokine đều là *polypeptide* hoặc *glycoprotein* và được sản sinh ra do *các tế bào không tổ chức thành tuyến*. Chúng thường được tổng hợp bởi nhiều hơn một kiểu tế bào, tác động đến vài loại tế bào mục tiêu và kích hoạt nhiều phản ứng ở các tế bào này.

Các nhóm chủ yếu gồm :

– *Các interleukin* gồm ít nhất 15 loại (IL-1 – IL-15). Interleukine-2 được nghiên cứu chi tiết nhất và cho rằng có vai trò quan trọng trong các *phản ứng miễn dịch chống tế bào ung thư và nhiễm virus*. IL-2 đã được sử dụng trong *liệu pháp miễn nhiễm* (immunotherapy) để chữa trị bệnh.

– *Các interferon* gồm các dạng IFN-α, IFN-β, IFN-γ, IFN-ω và IFN-τ. Nói chung, các interferon *tăng cường sự đề kháng không đặc hiệu* như giúp tế bào đích *chống virus*, ức chế sự tăng sinh của nhiều loại tế bào và *điều hoà sự biểu hiện* của các kháng nguyên MHC lớp I. Nhiều interferon được sản xuất nhờ công nghệ gen.

– *Các nhân tố kích thích tạo tập đoàn* (Colony-stimulating factor).

– *Các nhân tố gây hoại tử khối u* (Tumor necrosis factor – TNF).

4. Các vaccine và kháng thể

Vaccine là một chế phẩm thành phần của kháng nguyên thông thường hoặc được lấy từ mầm bệnh, hoặc có liên quan tới mầm bệnh. Khi tiêm vaccine vào cơ thể, nó kích thích phản ứng miễn dịch ở người nhận giúp ngừa bệnh đặc hiệu do tác nhân tương ứng gây ra. Việc sản xuất vaccine có ý nghĩa quan trọng trong ngăn ngừa nhiều bệnh dịch. Hầu hết các quốc gia thực hiện đầy đủ chương trình tiêm ngừa vaccine có hệ thống chống lại các loại bệnh nhiễm trùng.

Các kháng thể được sử dụng rộng rãi trong chẩn đoán *in vitro*. Các *kháng thể đa dòng* (polyclonal antibodies) chiết từ máu người và động vật đã được dùng trong nhiều thập niên để chẩn đoán và trị liệu, gồm chủ yếu các loại sau : *immunoglobulin uốn ván, kháng độc tố (antitoxin) uốn ván, antitoxin botilin, kháng huyết thanh (antisera) nọc rắn, antisera bò cạp, antisera nhện,...*

Từ năm 1975, sự ra đời các chế phẩm *kháng thể đơn dòng* (monoclonal antibodies – Mab) mở ra hàng loạt ứng dụng mới trong nghiên cứu và trị liệu.

Tóm lại, nhiều loại protein khác nhau đã được ứng dụng trong trị liệu, mà hiện nay phần lớn được thay thế bằng các r-protein.

III. CÁC ENZYME CÔNG NGHIỆP

1. Khái quát về enzyme

Từ hàng ngàn năm trước đây, loài người đã sử dụng các enzyme trong chế biến thực phẩm và nước giải khát. Năm 1897, E.Buchner thu dịch nấm men nghiền nát và thấy hoạt tính lên men rượu của nó. Ông gọi chúng là *enzyme* (tiếng Hi Lạp : *en = trong, zyme = nấm men* và *enzyme* có nghĩa *trong nấm men).*

Nhờ có enzyme các phản ứng hoá học được thực hiện trong tế bào sống với *sự hoàn hảo* trong điều kiện *đẳng nhiệt* (nhiệt độ không đổi), *đẳng áp* (áp suất không đổi) và có các đặc điểm sau : phản ứng có *hiệu quả cao*, nhiều phản ứng xảy ra đồng thời theo *dây chuyền*, không phải tinh sạch sản phẩm ở từng công đoạn, các phản ứng chịu *sự điều hòa hợp lí* và *tiết kiệm nhất*, lại *ít tiêu tốn năng lượng*. Có người cho rằng: "*Sự sống* có thể định nghĩa là *hệ thống tích hợp (integrated) được điều phối (cooperating) của các phản ứng enzyme*". Chúng có *tính đặc hiệu cao* và có hiệu quả hơn gấp nhiều lần so với các chất xúc tác vô cơ.

Về cấu tạo, tất cả enzyme đều là *protein*. Ở nhiều enzyme, phần protein cần gắn một phân tử thứ hai như với *cofactor* (các ion kim loại như Mg^{++}, Zn^{++},...) hoặc *coenzyme* (phân tử không phải peptid như coenzyme A) hay *nhóm prosthetic* (như các heme) mới có hoạt tính. Điều này cần tính đến khi chiết tách và tinh sạch enzyme và thường phải có biện pháp bổ sung các nhóm tương ứng để nhận enzyme có hoạt tính. Một biện pháp khác là sử dụng enzyme trong tế bào nguyên vẹn.

Tính đặc hiệu của enzyme gồm 2 dạng :

– *Đặc hiệu phản ứng* chỉ biểu hiện với *một loại liên kết hóa học* nhất định như lipase chỉ cắt liên kết ester nối glycerol và acid béo của nhiều loại lipid khác nhau.

– *Đặc hiệu cơ chất* thể hiện chuyên biệt cho những cơ chất nhất định như urease chỉ phân hủy urea thành ammonia và CO_2, nhưng không tác dụng đối với các chất khác.

Các enzyme có thể phân biệt được những cơ chất thậm chí rất giống nhau, như các *đồng phân* (isomer). Ví dụ : enzyme sucrase chỉ phân huỷ saccharose (sucrose) thành glucose và fructose, nhưng không tác dụng đối với 2 đồng phân khác là maltose và lactose.

Các enzyme có bản chất *protein*, nên chúng *nhạy cảm* với các tác động của môi trường như nồng độ cơ chất, nồng độ enzyme, nhiệt độ, pH và các chất ức chế (kìm hãm).

Có khoảng *3000 enzyme* đã được biết và được phân loại thành 6 nhóm dựa vào loại phản ứng mà chúng xúc tác : 1) *Oxi hóa - khử* (Oxido-reductase); 2) *Transferase* (chuyển các nhóm chức năng có chứa C–, N–, hay S–) ; 3) *Hydrolase* (tách các liên kết C–C, C–O, C–N, C–S, C–halogen) ; 4) *Lyase* (thêm vào các nối đôi) ; 5) *Isomerase* ; 6) Ligase.

Rõ ràng các enzyme có khả năng xúc tác rất nhiều loại phản ứng hoá học khác nhau. *Sự đa dạng* này còn tăng lên đáng kể khi nó kết hợp với các nhóm chất bổ sung như coenzyme. Do vậy, một xu hướng quan trọng trong phát triển *công nghệ hoá học* hiện nay là sử dụng chúng trong tổng hợp hoá học để vừa giảm ô nhiễm môi trường, lại vừa ít tiêu tốn năng lượng hơn.

2. Thị trường các enzyme công nghiệp chủ yếu

Trừ protease papain lấy từ nhựa cây đu đủ và bromelain lấy từ quả dứa (thơm, khóm), hầu hết các enzyme khác được sản xuất công nghiệp đều có nguồn gốc vi sinh vật nhờ công nghệ lên men. Theo tài liệu 1987, sản lượng và giá bán của một số enzyme chủ yếu được nêu trên bảng 5.2. Giá bán phụ thuộc vào mức độ tinh sạch và nồng độ.

Bảng 5.2. Sản lượng và giá bán tương đối của các enzyme chủ yếu

Loại enzyme	*Sản lượng (tấn/năm)*	*Giá bán (kg)*
α-Amylase & Glucoamylase	≈ 50000	≈ 2 – 3 USD/kg
Rennin	≈ 10000	≈ 3 – 4 USD/kg
Pectinase	≈ 5000	≈ 5 USD/kg
Protease	≈ 8000	≈ 10 USD/kg
Glucoisomerase	≈ 2000	≈ 30 USD/kg
Các enzyme tinh	< 0,100	> 10000 USD/kg

3. Các enzyme biến đổi carbohydrate

– *Alpha-amylase* (1,4 α-D-glucan glucanohydrolase) là *enzyme nội thuỷ giải* (endo-hydrolysis) cắt phân tử bột tạo *dextrin* (chứa 3 hay nhiều hơn các đơn vị glucan). Tác động của nó làm giảm nhanh khối lượng phân tử của bột

và độ nhớt. Các chủng sản xuất là *Aspergillies niger* và *A. oryzae* (tác động ở 40 – 70°C, pH = 6,0 – 6,5), còn *Bacillus licheniformis* và *B. amyloliquefaciens* tạo ra *α-amylase chịu nhiệt* (90 – 105°C, pH = 6,0 – 6,5). Các *α-amylase chịu nhiệt* được dùng tẩy hồ bột trong công nghiệp dệt.

– *Glucoamylase* còn gọi *amyloglucosidase* (exo α-1,4 D-glucosidase) là exo-hydrolase cắt rời từng glucose từ đầu ngắn α-1,4 mạch glucan của dextrin, nhờ đó phân hủy bột đến tận cùng thành glucose. Chủng sản xuất là *Aspergillies niger* và *Rhizopus sp.* (40 – 70°C, pH = 6,0 – 6,5), được chọn giống làm mất sự ức chế ngược của glucose.

Các amylase được sử dụng rộng rãi trong *công nghiệp rượu bia, bánh mì, sản xuất glucose* từ bột. Do nhu cầu ngày càng cao nên sản xuất enzyme tăng nhanh, đạt doanh số lớn nhất.

– *Glucose isomerase* (D-xylose ketol-isomerase) được tạo ra do nhiều *chủng VSV như Bacillus. coagulans, Streptomyces olivaceus, Microbaclerium arborescens,... Chọn* giống đã tạo ra các chủng sản xuất enzyme liên tục, thậm chí trên môi trường có chứa glucose. Các *glucose isomerase cố định* là thành phần chủ yếu trong *sản xuất chất ngọt từ bột*, tạo ra *sirop gluco-fructose* ngọt hơn đường thường saccharose.

– *Pullulanase* là enzyme phân giải bột nhận từ *Klebsiella aerogenes.*

4. Các protease

– *Rennin (*còn gọi *chymosin)* là enzyme từ dạ dày bê non (chưa cai sữa), dùng *đông tụ sữa* trong sản xuất phomat (tiếng Pháp là fromage và tiếng Anh là cheese). Rennin là một aspartic proteinase (cắt ở aspartic acid) được tổng hợp ở dạng *preprorennin*. Dịch chiết thô từ dạ dày bê gọi là *rennet* có chứa 2 – 3% rennin. Rennin có 2 ưu điểm đặc biệt là *đông tụ sữa nhanh* và casein bị nó phân hủy tạo nên *phomat có hương vị thơm ngon*. Do vậy, trong thời gian dài khó tìm protease khác thay thế. Sau này, đã tìm ra các chủng mốc *Mucor miehei* và *Mucor pusillus* sản sinh protease có hoạt tính tương tự rennin.

Công nghiệp sản xuất phômai phát triển mạnh với doanh số gần 30 tỉ USD, nên rennin có sản lượng lớn thứ hai sau các amylase.

– *Protease acid* từ chủng *Aspergillus sp.* Dùng thay thế rennin.

– *Protease kiềm* (alkaline) từ các chủng *Aspergillus oryzae* và *Bacillus sp.*, dùng trong bột giặt (chất tẩy rửa). Sản lượng enzyme này tăng nhanh.

– *Protease trung tính* (neutral) từ các chủng *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus thermoproteoliticus* dùng dịch hoá các chất phụ gia cho bia.

– *Papain, bromelain và ficin* là các *protease thực vật* được sử dụng làm *mềm thịt, làm trong* rượu bia và dịch nước trái cây.

5. Các enzyme khác

– *Pectinase* : Phần lớn các *chế phẩm pectinase* nhận từ các loài *Aspergillus* và *Penicillinum*. Chúng làm *tăng hiệu suất chiết tách* và *làm trong* dịch nước trái cây trong công nghiệp nước ép quả.

– *Cellulase* dùng trong chất tẩy rửa, sản xuất thức uống có cồn và glucose.

– Lipase dùng trong chất tẩy rửa, chế biến phomat và các chế phẩm tạo hương.

– Catalase và glucose oxidase dùng chống oxi hoá thực phẩm.

– *Các enzyme trong nghiên cứu* được sản xuất với số lượng rất ít như *DNA polymerase, restriction endonuclease, ligase...*

6. Các enzyme và protein cực đoan

Việc phát hiện nhiều VSV cực đoan (extremophlies) đã mở ra khả năng thu nhận các enzyme để ứng dụng vào thực tiễn. Phần lớn các VSV cực đoan chưa nuôi được, nhưng sử dụng KTDT hứa hẹn sẽ chinh phục được các enzyme và protein từ các VSV.

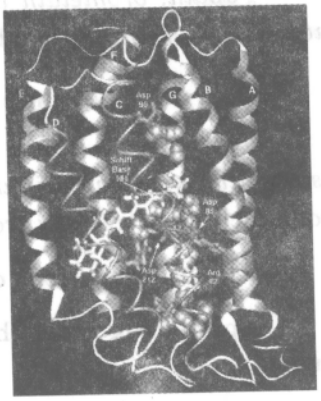
– *Các enzyme từ sinh vật chịu nhiệt cao* là mục tiêu cần hướng tới trong các quy trình chế biến công nghiệp, vì thực hiện ở nhiệt độ cao sẽ giảm nhiễm bởi nhiều VSV khác và có phản ứng nhanh hơn. Hiện DNA polymerase chịu nhiệt được sử dụng rộng rãi. Ngoài ra, nhiều *amylase, protease,... chịu nhiệt cao* (có thể đến 118°C) đã được phát hiện.

– Các *glycoprotein "chống đông đá"* ức chế sự hình thành các tinh thể nước đá ở các sinh vật chịu lạnh như cá ở các cực của Trái đất chịu được nhiệt độ –1,8^{O}C liên tục mà dịch cơ thể không đông đặc.

– Các enzyme nội bào và ngoại bào được sản xuất bởi *vi khuẩn chịu mặn* có độ bền cao, kháng lại các tác nhân có khả năng gây biến tính như nhiệt độ, môi trường dung môi hữu cơ.

– *Bacteriorhodopsin* là protein trên màng *vi khuẩn chịu mặn Halobacterium halobium* (chịu độ mặn cao gấp 7 lần của nước biển) nó *biến màu dưới tác động ánh sáng* như rhodopsin mắt người (hình 5.4). Do tính chất đặc biệt này, nó được tập trung nghiên cứu làm *vật liệu bộ nhớ cho máy điện toán* và ứng dụng trong lĩnh vực *điện tử sinh học* (bioelectronics).

– *Các enzyme cực đoan trong dung môi hữu cơ :* Mãi đến gần đây có quan niệm phổ biến là khi cho enzyme vào *các dung môi hữu cơ* (bezene, acetone, toluene,...), chúng *sẽ mất hoạt tính*. Thực tế cho thấy, nhiều enzyme khi bổ sung vào các dung môi hữu cơ khác nhau, chúng *vẫn có hoạt tính xúc tác* dù trong hệ thống có ít hoặc không có nước. Việc sử dụng các enzyme trong những điều kiện như vậy hứa hẹn một tiềm năng lớn, vì có nhiều lợi thế : *tăng tính hoà tan* của các chất phản ứng (reactants) hoặc các sản phẩm; *tăng tính chịu nhiệt* của enzyme ; dễ thu hồi sau sử dụng nhờ lọc và li tâm ; các dung môi hữu cơ ngăn chặn các VSV gây nhiễm.



Hình 5.4. Bacteriorhodopsin (Ở giữa là nhóm cảm màu)

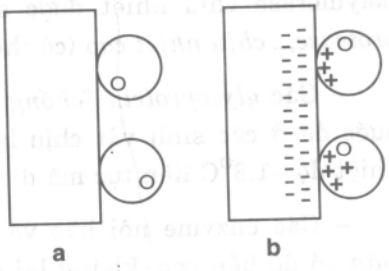
IV. CỐ ĐỊNH ENZYME VÀ TẾ BÀO

Các enzyme thường sử dụng trong dung dịch và sau đó không thu hồi được, mà việc chiết tách chúng rất tốn kém làm giá thành cao. Để sử dụng enzyme nhiều lần và hiệu quả hơn, kĩ thuật *cố định enzyme* hay *giữ im* (enzyme immobilisation) ra đời mở rộng khả năng ứng dụng chúng.

1. Các phương pháp cố định enzyme

Có 4 phương pháp cố định enzyme :

– *Phương pháp gắn cơ học hay hấp phụ* (Absortion) : Sử dụng các *vật liệu chất nền* (matrix material) xốp có nhiều lỗ hỏng như chất trao đổi ion, nhựa resin, than hoạt tính, đất sét, oxide nhôm, sợi thủy tinh xốp, sành, sứ, ...có thể làm cho các enzyme hoặc tế bào gắn vào những khe và khi sử dụng enzyme không bị mất (hình 5.5).

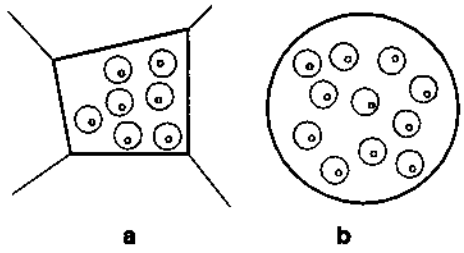


Hình 5.5. Cơ chất gắn cơ học vào chất nền (a) và chất trao đổi ion (b)

– *Phương pháp liên kết chéo* (Cross-linking) : Dùng các chất trung gian như *glutaraldehyde, bisisocyanate, bisdiazobenzidine, BSA* (bovine serum albumin) để gắn enzyme vào chất nền. Hoạt tính enzyme thường mạnh và ổn định hơn nếu *liên kết chéo với glutaraldehyde* hay với *BSA*.

– *Liên kết cộng hoá trị* (Covalent coupling) : *agarose, cellulose, PVC* (polyvinyl chloride), *chất trao đổi ion, sợi thủy tinh xốp* (porous glass) là các chất nền. Phương pháp này rất phức tạp, nhưng nó làm cho hoạt tính của enzyme được khôi phục và ổn định hơn.

– Phương pháp nhốt (Entrapment) : Sử dụng cho cả enzyme và tế bào. Các chất nền có acid alginic $(C_6H_8O_6)_n$, carageenan, collagen, polyacrylamide, gelatin, silicon rubber, polyurethans. Các chất nhốt bao bên ngoài, nhưng vẫn cho các cơ chất cần biến đổi có thể ra vào qua màng (hình 5.6). Alginat, carageenan chiết tách từ tảo thường được sử dụng.



Hình 5.6. Nhốt trong mạng gel (a) và trong chất nền (b)

Có thể sử dụng các enzyme cố định *nhiều lần*, thậm chí trong nửa năm hoặc cả năm. Hiện nay, phương pháp này được sử dụng nhiều hơn cả.

Phương pháp nhốt được ứng dụng cho *tế bào nguyên vẹn*. Khi *cố định tế bào*, phải tạo điều kiện để tế bào chết được thay thế bằng tế bào mới. Cố định tế bào nguyên vẹn có nhiều ưu điểm :

– *Đơn giản hơn*, vì không phải tốn kém nhiều cho chiết tách tinh sạch enzyme, nên giá thành thấp.

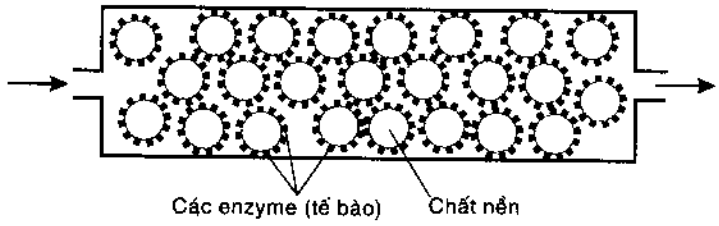
– Các *enzyme hoàn chỉnh* được hình thành trong tế bào nên *không cần bổ sung các cofactor* hay *coenzyme* như enzyme tinh chế ngoài tế bào.

2. Sản xuất sirop giàu fructose

Một *ví dụ điển hình* về ứng dụng các *enzyme cố định* với quy mô lớn trong công nghiệp là sản xuất *chất ngọt từ bột*. Mĩ đã sản xuất hơn 8 triệu tấn *sirop giàu fructose* từ bột bắp (ngô).

Chất bột dưới tác dụng của α-amylase biến thành dextrin, chất này nhờ glucoamylase thủy giải đến tận cùng tạo glucose có độ ngọt thấp hơn đường thường (saccharose hay sucrose). *Glucose được biến thành fructose nhờ glucose isomerase* tạo ra sirop gluco-fructose ngọt hơn đường saccharose. Phản ứng do glucose isomerase thực hiện là *thuận nghịch*. Để tăng tỉ lệ fructose là chất ngọt gấp 1,7 lần đường thường, các *glucose isomerase cố định* được sử dụng trong *bioreacor* (lò phản ứng sinh học, hình 5.7). Dung dịch glucose khi qua bioreactor chứa glucose isomerase sẽ biến thành fructose rồi thoát ra ngoài để được thu hồi. Nhờ vậy, dịch sirop glucose-

fructose từ bột giàu fructose (42% fructose, 50% glucose và 8% các đường khác). Enzyme cố định thể hiện rõ vai trò quan trọng của nó.



Hình 5.7. Bioreactor sử dụng enzyme hoặc tế bào cố định

Các enzyme *glucose isomerase* thường được sử dụng ở dạng *enzyme cố định liên kết với cầu nối glutaraldehyde*, trong một số chế phẩm cobalt và magnesium làm tăng hoạt tính. Khi bảo quản enzyme này cần tránh O_2. *Người bệnh tiểu đường* có thể ăn loại chất ngọt này.

Một *xu hướng mới* hiện nay là sản xuất chất ngọt theo phương pháp này, vì *ít tiêu tốn năng lượng hơn* và *không phụ thuộc mùa vụ* như đường làm từ mía. Sản xuất đường mía phải quy hoạch vùng nguyên liệu cho nhà máy, đến mùa thu hoạch phải tốn nhiều năng lượng chế biến : chặt và chuyên chở khối lượng lớn (chỉ 10% đường), ép mía, nấu cô đặc, kết tinh và li tâm thu đường.

3. Các enzyme cố định biến đổi amino acid

– *Enzyme cố định L-amino acid acylase* dùng acyl hoá để tách L-amino acid. Nhiều L-amino acid được sản xuất bằng lên men, nhưng có những L-amino acid phải tổng hợp hoá học, mà sản phẩm có cả 2 đồng phân (isomers) D và L. Quy trình thực hiện qua các bước sau :

+ *Bước 1* : Hỗn hợp D, L-amino acid (do tổng hợp hoá học) được xử lí *acetyl anhydride* thành D, L-acyl amino acid.

+ *Bước 2* : D, L-acyl amino acid dưới tác động đặc hiệu của *L-amino acid acylase cố định* cắt nhóm acyl tạo L-amino acid có độ hoà tan khác với D-acyl amino acid.

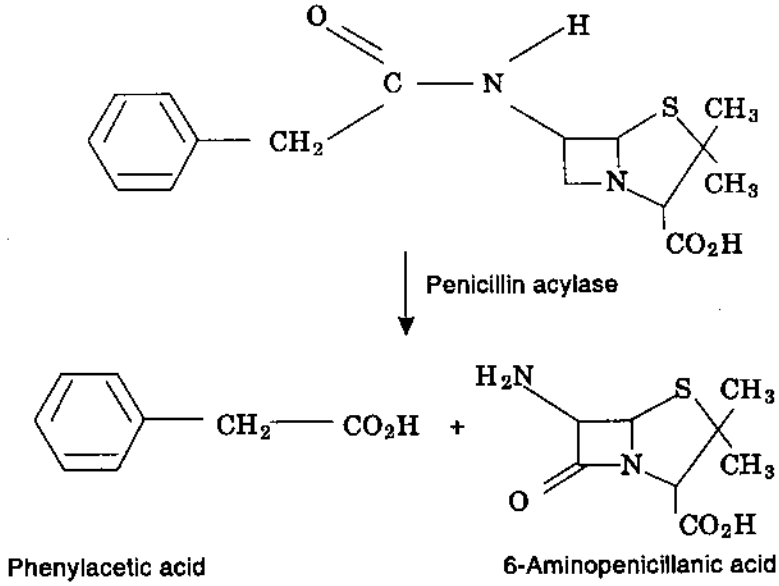
+ *Bước 3* : Tách L-amino acid khỏi D-acyl amino acid.

+ *Bước 4* : D-acyl amino acid có thể được triền quang hoá (racemization) rồi tái sử dụng.

– *Sản xuất L-aspartic acid* nhờ enzyme aspartase của *tế bào E. coli cố định trong carageenan*. L-aspartic acid là thành phần gốc của *aspartame* (aspartyl phenylalanine methyl ester) là chất ngọt gấp 160 lần sucrose.

4. Enzyme cố định trong sản xuất penicillin bán tổng hợp

Enzyme penicillin acylase cố định đóng vai trò thiết yếu trong quá trình *sản xuất penicillin bán tổng hợp* trong công nghiệp kháng sinh. Penicillin bán tổng hợp được tạo ra bằng cách loại bỏ chuỗi bên của *penicillin G* tự nhiên thu được lượng lớn trong quá trình lên men, sau đó gắn nhánh mới vào lõi 6-aminopenicillanic acid (hình 5.8).



Hình 5.8. Tác động của enzyme penicillin acylase trên penicillin G

Dung dịch *penicillin G* đi qua bioreactor chứa *penicillin acylase cố định* và sản phẩm *đầu ra là 6-aminopenicillanic acid* (kết tủa ở pH 4,2 – 4,3) và được thu nhận.

Ngoài ra, các enzyme cố định được sử dụng trong biosensor để chẩn đoán và các mục đích khác. Có thể sử dụng tế bào cố định trong làm giấm ăn (acid acetic) và sản xuất ethanol nhiên liệu.

Tóm lại, sử dụng VSV trong công nghiệp bằng cách cố định thì sản phẩm nhiều hơn, tốt hơn, nhanh hơn.

V. BIOSENSOR (CẢM BIẾN SINH HỌC)

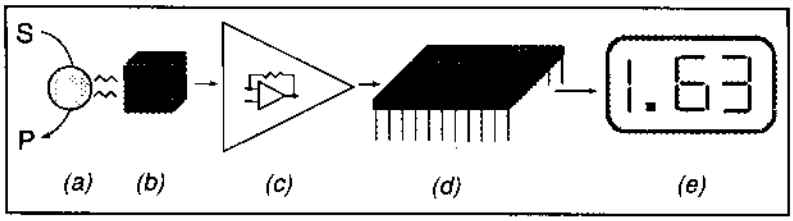
1. Tổng quan về chất cảm biến sinh học (biosensor)

Một biosensor gồm 2 thành phần chủ yếu (hình 5.9) : 1 *thụ thể sinh học* và 1 *hệ thống chuyển tiếp* (transducer).

Biosensor = *Bioreceptor* + *Transducer*

Cảm biến sinh học = *Thụ thể sinh học* + *Hệ chuyển tiếp*

Thụ thể sinh học (bioreceptor) là phân tử sinh học *nhận biết được nhân tố đích* (mục tiêu) và sự nhận biết đó được nhân tố chuyển tiếp (thiết bị hay máy) *biến thành tín hiệu có thể đo* được. Tính độc đáo của biosensor ở đây là 2 thành phần trên được hợp lại thành *một đầu dò duy nhất*. Sự kết hợp này giúp đo được nhân tố đích cần phân tích mà không cần các chất phản ứng. Ví dụ, nồng độ glucose trong máu có thể được đo trực tiếp nhờ biosensor bằng cách nhúng đầu dò vào mẫu cần đo. Điều này thuận lợi với xét nghiệm qua nhiều bước và mỗi bước phải sử dụng một chất phản ứng đối với mẫu. Cách *đo đơn giản và nhanh* là thuận lợi chính của biosensor. Các biosensor có thể cho kết quả *định tính và định lượng*.



Hình 5.9. Hệ thống biosensor

a) Bioreceptor ; b) Transducer ; c) Tín hiệu theo mạch điện được khuếch đại ; d) Bộ vi xử lí ; e) Bộ phận hiển thị.

Enzyme là biosensor nhờ khả năng *nhận biết đặc hiệu*. Các bioreceptor gồm kháng thể, nucleic acid và các protein thụ thể. *Sự nhận biết* này thông qua các tương tác yếu giữa các nhóm trên bề mặt trình diện của protein và ở các phân tử khác không là protein.

Yêu cầu chính của biosensor là các phân tử phải được ổn định trong vùng tiếp cận với máy biến năng. Sự ổn định được thực hiện bằng tương tác vật lí hoặc hoá học. Yêu cầu của các phân tử bioreceptor là định lượng trong thời gian tính bằng phút và được tái sử dụng.

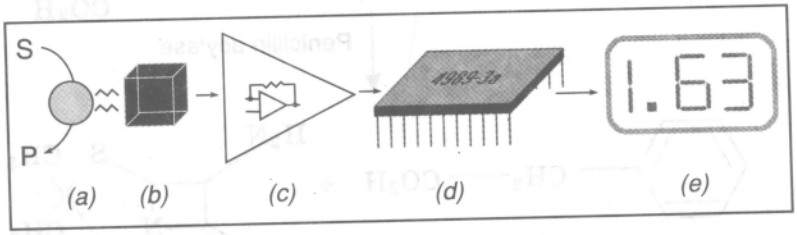
2. Transducer và các loại biosensor

Transducer phải có khả năng chuyển yếu tố nhận biết sinh học thành một *tín hiệu đo lường được*. Cụ thể là đo sự thay đổi xảy ra trong phản ứng biosensor. Ví dụ, enzyme *glucose oxidase* (sử dụng như bioreceptor trong phát hiện glucose được xem là một biosensor) xúc tác phản ứng :

Biosensor = *Bioreceptor* + *Transducer*

Cảm biến sinh học = *Thụ thể sinh học* + *Hệ chuyển tiếp*

Thụ thể sinh học (bioreceptor) là phân tử sinh học *nhận biết được nhân tố đích* (mục tiêu) và sự nhận biết đó được nhân tố chuyển tiếp (thiết bị hay máy) *biến thành tín hiệu có thể đo* được. Tính độc đáo của biosensor ở đây là 2 thành phần trên được hợp lại thành *một đầu dò duy nhất*. Sự kết hợp này giúp đo được nhân tố đích cần phân tích mà không cần các chất phản ứng. Ví dụ, nồng độ glucose trong máu có thể được đo trực tiếp nhờ biosensor bằng cách nhúng đầu dò vào mẫu cần đo. Điều này thuận lợi với xét nghiệm qua nhiều bước và mỗi bước phải sử dụng một chất phản ứng đối với mẫu. Cách *đo đơn giản và nhanh* là thuận lợi chính của biosensor. Các biosensor có thể cho kết quả *định tính và định lượng*.



Hình 5.9. Hệ thống biosensor

a) Bioreceptor ; b) Transducer ; c) Tín hiệu theo mạch điện được khuếch đại ; d) Bộ vi xử lí ; e) Bộ phận hiển thị.

Enzyme là biosensor nhờ khả năng *nhận biết đặc hiệu*. Các bioreceptor gồm kháng thể, nucleic acid và các protein thụ thể. *Sự nhận biết* này thông qua các tương tác yếu giữa các nhóm trên bề mặt trình diện của protein và ở các phân tử khác không là protein.

Yêu cầu chính của biosensor là các phân tử phải được ổn định trong vùng tiếp cận với máy biến năng. Sự ổn định được thực hiện bằng tương tác vật lí hoặc hoá học. Yêu cầu của các phân tử bioreceptor là định lượng trong thời gian tính bằng phút và được tái sử dụng.

2. Transducer và các loại biosensor

Transducer phải có khả năng chuyển yếu tố nhận biết sinh học thành một *tín hiệu đo lường được*. Cụ thể là đo sự thay đổi xảy ra trong phản ứng biosensor. Ví dụ, enzyme *glucose oxidase* (sử dụng như bioreceptor trong phát hiện glucose được xem là một biosensor) xúc tác phản ứng :

$$\text{Glucose} + O_2 \xrightarrow{\textit{Glucose Oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

Để đo nồng độ glucose, có thể sử dụng 3 loại transducer khác nhau :

– Oxygen sensor để đo nồng độ oxygen.

– pH sensor để đo sản phẩm là acid gluconic.

– Peroxide sensor để đo nồng độ H_2O_2.

Chú ý là oxygen sensor, transducer có thể chuyển nồng độ oxygen *thành dòng điện. pH sensor* là transducer có thể chuyển sự biến thiên pH thành *biến đổi điện thế. Peroxide sensor* là transducer *chuyển nồng độ H_2O_2 thành dòng điện.*

Các loại biosensor gồm :

– Cảm biến *năng lượng* (Calorimetric biosensor)

– Cảm biến *điện thế* (Potentiometric)

– Cảm biến *dòng điện* (Amperometric)

– Cảm biến *quang học* (Optical)

– Cảm biến *điện áp* (Piezo-electric)

– Cảm biến *miễn dịch* (Immunosensor)

3. Các ứng dụng của biosensor

Định lượng sản phẩm biến dưỡng : Động lực đầu tiên thúc đẩy việc phát triển kĩ thuật biosensor là từ lĩnh vực *chăm sóc sức khỏe*, đó là những nhu cầu về việc đo lượng khí trong máu, lượng ion và các chất biến dưỡng. Kĩ thuật này nhạy và cho phép đánh giá tốt hơn về tình trạng biến dưỡng trong cơ thể bệnh nhân. Chẳng hạn trong các khoa chăm sóc đặc biệt, các bệnh nhân thường có những thay đổi đột ngột về mặt hoá sinh, do đó cần phải có sự can thiệp tức thời.

Hàng loạt các biosensor được sử dụng ở dạng *biomarker* (phân tử đánh dấu) để chẩn đoán và trị bệnh. Thị trường biosensor luôn được mở rộng và do đó cần các biosensor có giá thấp.

Các *bệnh nhân tiểu đường* có sự thiếu hụt thường xuyên insulin, do đó insulin được tiêm dưới da. Nhưng cần theo dõi sự tăng hoặc giảm đường huyết. Ngày nay, chính các bệnh nhân tiểu đường có thể sử dụng các biosensor để kiểm tra tình trạng bệnh của mình.

Các phương pháp tốt hơn để điều trị bệnh tiểu đường phụ thuộc insulin đã được thử nghiệm và các hệ thống *tiêm truyền insulin* một cách liên tục

đã được phát triển. Liệu pháp insulin đánh giá lượng đường huyết của bệnh nhân. Tuy nhiên, với liệu pháp insulin, cần có sự tiêm truyền insulin hàng ngày để điều chỉnh lượng insulin trong máu.

Tuyến tụy nhân tạo là một *hệ thống tự động* kiểm soát chặt chẽ lượng glucose trong máu thông qua một glucose sensor được cấy dưới da theo một chương trình lập sẵn. Do đó, nó được gọi là một tuyến tụy nhân tạo và bệnh nhân sẽ được giảm bớt các xét nghiệm, nhất là việc tiêm truyền insulin hàng ngày.

Kiểm soát bioreactor : Chủ yếu là kiểm soát nguồn carbon, khí hòa tan, ..v...v... trong các quá trình vận hành lên men. Có thể làm tăng lợi nhuận nhờ giá thành của nguyên liệu giảm. Hệ thống này chỉ đo một vài biến số thông dụng như pH, nhiệt độ, CO_2, O_2.

Các ứng dụng trong quân đội chủ yếu là các thử nghiệm phân tích nhanh để xác định vũ khí sinh học, thường dùng các kháng thể đơn dòng.

Có thể nói, các biosensor có nhiều ứng dụng trong đời sống, công nghiệp và các lĩnh vực khác.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các phân tử protein là những công cụ phân tử hiện thực hoá thông tin di truyền chứa trên DNA. Chúng trực tiếp thực hiện các chức năng sinh lí rất đa dạng nên có *cấu trúc phức tạp nhất*. Phân tử protein có nhiều bậc cấu trúc cần được cuộn gấp đúng và có thể biến đổi sau dịch mã mới có *đầy đủ hoạt tính sinh học*.

Hàng loạt các protein được sử dụng trong *trị liệu* như : *các chất chống đông, làm đông và tan máu ; các hormone, cytokine, interferon, kháng thể,* ..

Các enzyme là nhóm protein quan trọng nhất, có nhiều ứng dụng, đặc biệt là các enzyme công nghiệp. *Kĩ thuật cố định enzyme* và tế bào làm tăng khả năng và hiệu quả sử dụng của enzyme.

Các biosensor gồm *bioreceptor*, mà đa phần là *enzyme*, và *transducer* chuyển tín hiệu thành đo được. Chúng dùng cho các *thử nghiệm phân tích nhanh* nên được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao nói các protein là những phân tử phức tạp nhất trong thiên nhiên ?
2. Các protein chaperone có vai trò gì ?
3. Hãy kể 3 kiểu biến đổi sau dịch mã chủ yếu.
4. Insulin có hoạt tính sinh học trải qua quá trình biến đổi như thế nào ?
5. Nêu các chất chống đông, làm đông và tan máu chủ yếu là đối tượng của CNSH.
6. Các hormone nào có ứng dụng trong CNSH ?
7. Các cytokine, interferon và kháng thể nào được ứng dụng nhiều ?
8. Enzyme có những đặc điểm cấu trúc gì ?
9. Vì sao enzyme dễ nhạy cảm với các biến đổi của môi trường ?
10. Tính đặc hiệu của enzyme biểu hiện như thế nào?
11. Các loại enzyme công nghiệp nào có sản lượng lớn nhất ?
12. Có các phương pháp cố định enzyme nào ?
13. Các enzyme cố định có những ứng dụng gì ?
14. Biosensor là gì ?
15. Nêu các ứng dụng của biosensor.

Phần III
CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT

CHƯƠNG 6
CƠ SỞ CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT

Trước khi có thuật ngữ Công nghệ sinh học vi sinh vật người ta đã nói đến *Vi sinh vật ứng dụng* hay còn gọi là *Vi sinh vật công nghiệp*, *Công nghệ vi sinh vật* hay *Công nghệ lên men*. Đây là bộ phận lớn nhất của công nghệ sinh học, nó ra đời sớm nhất và có quá trình phát triển lâu dài nhất, có nhiều sản phẩm và doanh số lớn nhất. Công nghệ sinh học vi sinh vật được phát triển trên cơ sở các kiến thức về thế giới vi sinh vật, cũng như các kĩ thuật và quy trình công nghệ đặc trưng.

I. HAI SIÊU GIỚI VI KHUẨN THỰC VÀ VI KHUẨN CỔ

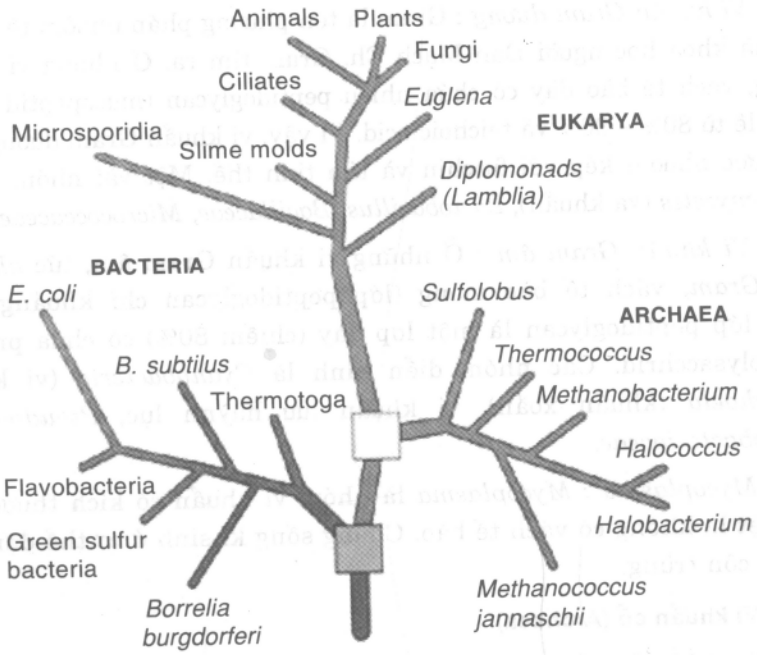
Vi sinh vật (Microorganisms) là tên chung dùng để chỉ tất cả các sinh vật nhỏ bé mà muốn thấy rõ chúng người ta phải *dùng kính hiển vi quang học*. Chúng giống nhau về kích thước nhỏ bé, nhưng thuộc về các nhóm phân loại khác nhau.

Các nhóm vi sinh vật (VSV) chủ yếu trong CNSH là : *vi khuẩn* (Bacteria), *nấm men*, *nấm mốc*, *vi tảo* (tảo đơn bào)..

Trong lịch sử tiến hoá của sinh giới, vi khuẩn là những sinh vật đầu tiên xuất hiện cách nay khoảng 3,5 tỉ năm (hay 3,8 tỉ năm). Chúng phát triển trong hơn 2 tỉ năm đầu khi có sự sống và gây những *biến đổi địa hoá* (geochemical) *lớn* trên hành tinh, mà *bầu khí quyển* O_2 do các *vi khuẩn quang hợp* tạo ra là một ví dụ, và đồng thời từ chúng hình thành nên các sinh vật đa bào ngày nay. Các vi sinh vật rất linh hoạt và đa dạng. *Tiềm năng ứng dụng của chúng còn rất lớn.*

Vào năm 1977, C. Woese phát hiện rằng *rRNA 16S* của *ribosome* là một "*công cụ lí tưởng*" cho xác định mối quan hệ chủng loại phát sinh của các *Prokaryotae*. Hệ thống phân loại dựa trên rRNA chia *Sinh giới* thành 3 siêu giới là Vi khuẩn (*Eubacteria*), Vi khuẩn cổ *(Archaea)* và *Sinh vật nhân*

chuẩn (Eukarya). Eukarya gồm 3 giới là Nấm, Thực vật, Động vật (hình 6.1). *Có khoảng 200 loài vi khuẩn gây bệnh, nhưng nhiều loài có ích.*



Hình 6.1. Hệ thống sinh gồm 3 siêu giới : *Bacteria, Archaea và Eukarya*

1. Vi khuẩn (*Eubacteria*)

Vi khuẩn *(Eubacteria)* thuộc nhóm *Prokaryotae* với các đặc điểm : tế bào không có màng nhân, kích thước nhỏ, đa phần đơn bào. Vi khuẩn được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1676 ; và đến giữa thế kỉ XIX, L. Pasteur đã đặt nền móng cho các nghiên cứu chi tiết hơn về các vi sinh vật nhỏ bé này.

a) Đặc tính chung của vi khuẩn :

– Tế bào có hình *cầu* (cocci), hình *que* (baclli), hình dấu *phẩy* (vibrio), hình *xoắn* (spiro) và có thể đứng riêng hoặc xếp thành từng đôi (diplococcus), từng chuỗi (streptococcus) hay từng chùm (staphilococcus).

– Kiểu trao đổi chất rất khác nhau : phần lớn là *háo khí*, một số *yếm khí*, một số có khả năng *cố định đạm không khí*.

– Khả năng di động : có 2 loại là *di động* và *không di động*.

– Một số loài vi khuẩn có khả năng tạo *bào tử* chịu đựng các điều kiện bất lợi và tồn tại trong một thời gian dài thiếu nước và chất dinh dưỡng.

b) Đặc tính riêng của các nhóm :

– Giới vi khuẩn gồm 3 nhóm chính : *vi khuẩn Gram dương, Gram âm và Mycoplasma.*

– *Vi khuẩn Gram dương* : Gram là tên phương pháp nhuộm tế bào vi khuẩn do nhà khoa học người Đan Mạch Ch. Gram tìm ra. Ở những vi khuẩn Gram dương, vách tế bào dày có chứa nhiều peptidoglycan (mucopeptid hay murein) với tỉ lệ từ 80% – 90% và teichoic acid. Vì vậy, vi khuẩn Gram dương có màu tím khi được nhuộm kép với fuschin và tím tinh thể. Một vài nhóm điển hình là *Actinomycetes* (xạ khuẩn), *Lactobacillus, Bacillaceae, Micrococcaceae.*

– *Vi khuẩn Gram âm :* Ở những vi khuẩn Gram âm, tức *không nhuộm màu Gram,* vách tế bào mỏng (lớp peptidoglycan chỉ khoảng 10%). Mặt ngoài lớp peptidoglycan là một lớp dày (chiếm 80%) có chứa protein, lipid, lipo-polysacchrid. Các nhóm điển hình là *Cyanobacteria* (vi khuẩn lam), *Spirochaeta* (khuẩn xoắn), vi khuẩn lưu huỳnh lục, *Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.*

– *Mycoplasma : Mycoplasma* là nhóm vi khuẩn có kích thước nhỏ nhất, đặc biệt là không có vách tế bào. Chúng sống kí sinh ở cơ thể động vật, thực vật và côn trùng.

2. Vi khuẩn cổ (Archaea)

Các vi khuẩn cổ hiện nay được coi là sinh vật *cổ nhất.* Chúng khác với các vi khuẩn ở nhiều đặc tính sinh hoá. Vách tế bào không có peptidoglucan như ở vi khuẩn (*Eubacteria).* Màng tế bào có thành phần lipid khác thường. ARN-polymerase của vi khuẩn cổ giống với của *Eukaryotae* nhiều hơn. Các *Archaea* đạt đến tất cả các kỉ lục về khả năng sống ở những điều kiện ranh giới cực đoan của sự sống.

– Vi khuẩn metan *(Methanogene Archaebacteria)* : Các vi khuẩn metan thu năng lượng từ sự *khử* CO_2 *bằng* H_2 để tạo ra khí metan (CH_4). Các vi khuẩn metan sống ở các môi trường yếm khí bắt buộc và giàu các chất hữu cơ. Kiểu trao đổi chất đặc biệt này cho thấy các vi khuẩn sinh metan là những sinh vật sống ở sinh quyển cổ xưa.

– Vi khuẩn chịu nhiệt–acid *(Thermoacidophile)* : Nhóm này sống được trong những điều kiện về nhiệt độ và acid cực đoan. *Sulfolobus* được phân lập từ suối nước nóng lưu huỳnh và *Thermoplasma* được phân lập từ đống than bốc khói. *Sulfolobus* oxy hoá các chất lưu huỳnh tạo acid sulfuric, làm acid hoá nơi cư ngụ của chúng.

Sự hiện diện của H_2S, bắt nguồn từ sự khử S, thường gắn với trao đổi chất của các *Archacbacteria* chịu nhiệt. Một số cổ vi khuẩn chịu nhiệt sử

dụng các chất hữu cơ làm nguồn dinh dưỡng bằng cách *khử lưu huỳnh* như ở động vật khử oxy trong hô hấp. Ngược với các cổ vi khuẩn *dị dưỡng* (heterotroph), các cổ vi khuẩn *tự dưỡng* (autotroph) chỉ sử dụng các khí của núi lửa dưới đáy đại dương như CO_2 và H_2 để khử các chất sulfur hay nitrat. *Pyrolobus*, có họ hàng với *Pyrodictium*, đạt kỉ lục về nhiệt độ : nó sống ở 113^0C. Các cổ vi khuẩn *chịu acid* có thể sống ở điều kiện acid pH < 2.

– *Các vi khuẩn cực đoan khác :* Nhiều nhóm vi khuẩn cổ khác sống trong điều kiện cực đoan như nhóm chịu lạnh *Archaebacteria psychrophile* sống ở 0 – 20^0C ; nhóm chịu kiềm *Archaebacteria alcalophile* có thể sống ở pH > 9 ; nhóm chịu mặn *Archaebacteria halophile* sống ở độ muối 5 – 30% ; nhóm chịu áp suất cao *Archaebacteria barophile*.

II. ĐẶC ĐIỂM CHUNG CỦA VI SINH VẬT

Đặc điểm nổi bật nhất của các vi sinh vật là kích thước rất nhỏ bé. Đặc điểm này chi phối hình dạng, hoạt động trao đổi chất và cả sự phân bố rộng trong tự nhiên.

1. Kích thước nhỏ bé

Phần lớn các vi khuẩn có đường kính vài micromet (1/1000mm). Tế bào nấm men rượu *Saccharomyces cerevisiae* có lớn hơn nhiều nhưng cũng không quá 10 micromet. Tế bào nấm men và vi khuẩn đều phải nhìn dưới kính hiển vi quang học mới thấy, còn virus thì phải cần đến hiển vi điện tử. Chúng có mặt ở khắp mọi nơi mà ta không thấy. Khi nhiễm trên mẫu vật ở mức ít thì không thấy được, khi trông thấy dấu vết thì chúng đã sinh sản đến hàng tỉ tỉ tế bào. Do đó, việc đánh giá sự hiện diện và số lượng của chúng có khó khăn. Hơn nữa, các thao tác nuôi cấy và phân tích mẫu đều phải thực hiện trong điều kiện vô trùng.

2. Dinh dưỡng

a) Hấp thụ chất dinh dưỡng trực tiếp qua bề mặt tế bào

Đa số VSV là đơn bào nên chúng nhận các chất dinh dưỡng bằng *hấp thụ* (absorbtion) qua bề mặt tế bào, khác với thực vật là *tự dưỡng* (autotrophic) và động vật là *nội tiêu hoá* (ingestion) qua ống tiêu hoá. Chính điều này mà việc nuôi các VSV được thực hiện dễ dàng và nhanh chóng.

b) Kiểu dinh dưỡng đa dạng

– Quang tự dưỡng *(Photoautotroph)* : VSV dùng năng lượng ánh sáng khử CO_2 như ở các vi khuẩn tía (purple bacteria), *Cyanobacteria*, tảo và thực vật.

– Quang dị dưỡng *(Photoheterotroph)* : VSV dùng năng lượng ánh sáng để khử các hợp chất hữu cơ như ở các vi khuẩn tía và lục không lưu huỳnh (purple nonsulfur and green nonsulfur bacteria).

– Hoá tự dưỡng *(Chemoautotroph)* : VSV thường dùng các điện tử từ các hợp chất vô cơ để khử CO_2 như ở các vi khuẩn hydrogen, sulfur, sắt và nitrit hoá (hydrogen, sulfur, iron and nitrifying bacteria).

– Hoá dị dưỡng *(Chemoheterotroph)* : VSV thường dùng các điện tử từ các hợp chất hữu cơ để khử các hợp chất hữu cơ như ở phần lớn các vi khuẩn, nấm và động vật. Đa phần các VSV sử dụng trong CNSH thuộc kiểu dinh dưỡng này và glucose là chất cung cấp năng lượng chủ yếu. Nhờ vậy mà các VSV dễ nuôi từ các nguồn phụ phế phẩm khác nhau có glucose và một số loại đường khác. Ngoài ra, các điều kiện yếm khí và háo khí có ảnh hưởng đáng kể đến thu hồi sản phẩm.

3. Sự phân bố và vai trò trong sinh quyển

Nếu như sự phân bố rộng rãi của thực vật dễ nhận thấy qua màu xanh ở trên Trái đất thì các vi khuẩn là một thế giới *vô hình* khó nhìn thấy bằng mắt thường, nhưng chúng *hiện diện ở khắp nơi*, cả ở những nơi có điều kiện sống khắc nghiệt như băng giá ở các cực của Trái đất, hay như ở dưới đáy đại dương. Hiện nay, tổng số lượng tế bào vi khuẩn trên Trái đất ước tính khoảng 5.10^{30}, tổng sinh khối của nó gần bằng của thực vật trên cạn. Lượng carbon chứa trong vi khuẩn khoảng 350 – 550 tỉ tấn với khối lượng khô khoảng 700 – 1100 tỉ tấn. Trong khi đó, lượng carbon của thực vật trên cạn khoảng 550 tỉ tấn. Vi khuẩn chứa số lượng nitrogen và phosphore 10 lần nhiều hơn của thực vật, ước khoảng 85 – 130 tỉ tấn nitrogen và 9 – 14 tỉ tấn phosphore.

Các VSV hiện diện hầu như trong tất cả các hệ sinh thái và có vai trò rất quan trọng trong sinh quyển ; thiếu chúng sự sống trên Trái đất khó tồn tại, đặc biệt là các *vi sinh vật phân hủy* (decomposers).

Một số vi khuẩn dị dưỡng sử dụng các chất hữu cơ có sẵn. Các loài vi khuẩn quang hợp tổng hợp chất hữu cơ từ các chất vô cơ nhờ năng lượng mặt trời. Nhiều VSV phân hủy các chất hữu cơ làm sạch môi trường, số khác phân hủy độc tố.

4. Cường độ trao đổi chất mạnh và sinh sản nhanh

Do tỉ lệ của bề mặt/thể tích lớn nên hoạt động sống vi sinh vật diễn ra nhanh hơn nhiều so với động vật và thực vật, thể hiện ở bảng so sánh cường độ hô hấp căn cứ vào số lượng khí O_2 được sử dụng (bảng 6.1).

Bảng 6.1. Cường độ hô hấp của VSV và một số mô của các sinh vật khác

Sinh vật	*Nhiệt độ(°C)*	*Cường độ hô hấp (*Q_{O2})*
Azotobacter	28	2000
Acetobacter	30	1800
Men bánh mì	28	110
Gan và thận	37	10 – 20
Rễ và lá cây	20	0,5 – 4,0 ...

* Q_{O2} là hệ số sử dụng khí O_2

Như vậy so với thực vật và động vật, vi khuẩn có tốc độ hô hấp gấp trăm, gấp ngàn lần. Tương ứng với hoạt *động sống mạnh,* nhịp độ tăng trưởng của VSV rất cao, thời gian thế hệ ngắn nên sinh sản nhanh, tạo sinh khối lớn khi có đủ dinh dưỡng. Tế bào *E. coli* nhân đôi chỉ trong 20 phút. Nấm men nhân đôi chậm hơn, nhưng cũng chỉ trong 2 – 3 giờ nếu có đủ điều kiện thích hợp.

5. Sự đa dạng của các phản ứng hoá học

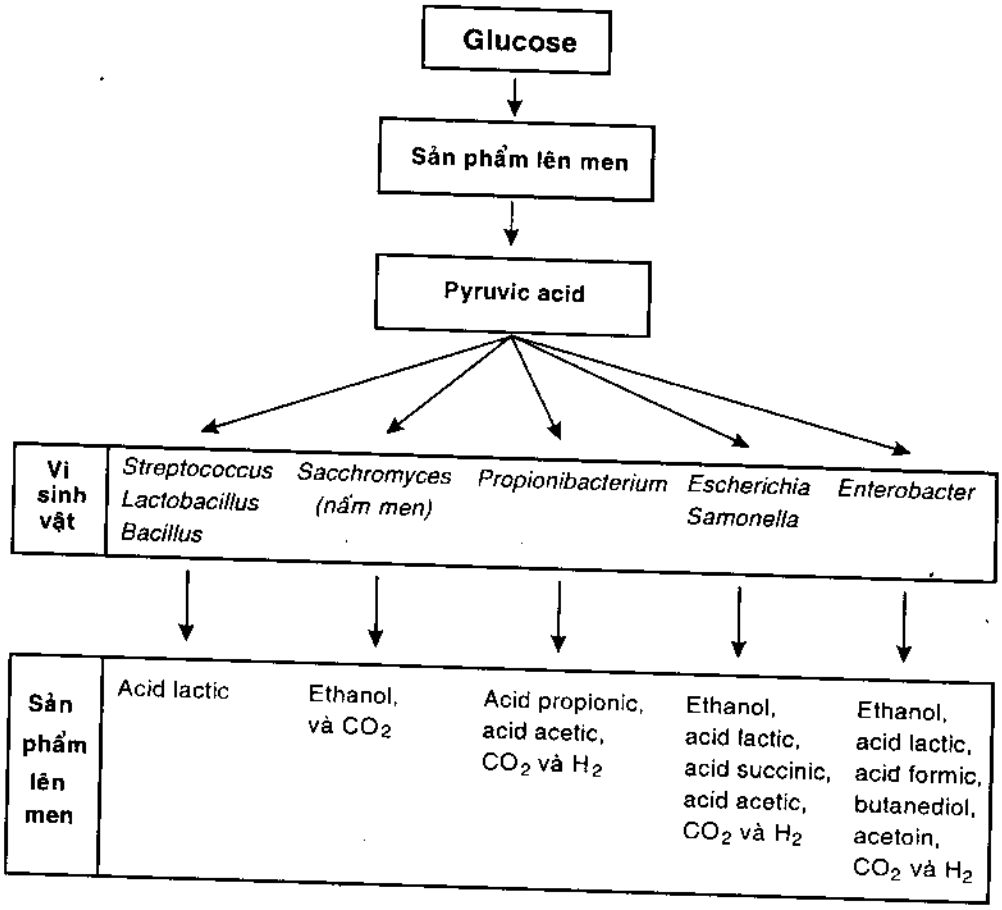
Các phản ứng sinh hoá trong cơ thể VSV thường *đơn giản* hơn nhiều so với trong cơ thể động, thực vật. Nhưng mỗi loài có một số phản ứng riêng nên các phản ứng sinh hoá của các loài VSV khác nhau *rất đa dạng*, ví dụ, các sản phẩm lên men của các loài khác nhau từ piruvic acid nêu trên hình 6.2. Dù một hợp chất có phức tạp đến đâu, trong thiên nhiên đều có các VSV sử dụng hoặc phân hủy chúng. Sản phẩm do loài này tạo ra có thể được loài khác sử dụng.

Mỗi loài thường tạo ra một số *chất trao đổi thứ cấp* (secondary metabolites) đặc hiệu giúp cho chúng phát triển tốt hơn và kìm hãm một số loài khác. Ví dụ : các loài nấm men rượu thích nghi với nồng độ đường cao và tạo ra rượu là chất hạn chế sự phát triển nhiều loài khác. Do đặc điểm này, sản phẩm *khi bị nhiễm* sẽ kìm hãm sự tăng trưởng của các chủng sản xuất.

Từ những đặc điểm chung của các vi sinh vật vừa nêu, trong sản xuất cần lưu ý :

– Cách tốt nhất để tránh nhiễm là tạo *môi trường chọn lọc* thích hợp cho đối tượng sản xuất. Xu hướng hiện nay là sử dụng các VSV cực đoan nhằm hạn chế nhiễm các VSV bình thường.

– Sản xuất bằng các VSV có nhiều biến động và diễn biến nhanh, cần xử lí kịp thời.



Hình 6.2. Sơ đồ về sự đa dạng các sản phẩm lên men từ các loài VSV khác nhau

III. KĨ THUẬT VÔ TRÙNG

Kiểm soát sự tăng trưởng của VSV (Control of Microbial Grow) bao gồm nhiều biện pháp như *khử trùng* (sterilisation), *tẩy trùng* (disinfection) và *sát trùng* (antiseptsis). Mục đích cuối cùng của *kĩ thuật vô trùng* là diệt sạch các tế bào và bào tử của VSV trong môi trường ban đầu.

Sự nhiễm trùng là mối đe dọa vô hình ở bất cứ công đoạn hay quy trình CNSH nào, từ nghiên cứu đến sản xuất trên các đối tượng VSV, thực vật hay động vật.

Sự nhiễm VSV sẽ gây nhiều hậu quả :

– Chủng VSV sản xuất sẽ không thuần.

– Cạnh tranh dinh dưỡng và làm biến đổi môi trường nuôi cấy, gây bất lợi cho sự phát triển của chủng VSV sản xuất, của tế bào thực vật và động vật trong nuôi cấy mô.

– Có thể tạo độc tố.

Nói chung, sự nhiễm VSV làm cho năng suất giảm, thậm chí sản xuất bị ngừng.

1. Thiết bị vô trùng

Trong không khí có nhiều vi sinh vật và các bào tử của chúng, đây là nguồn nhiễm khi nuôi cấy các VSV, tế bào động, thực vật. Các thao tác với đối tượng nuôi cấy đều được thực hiện trong *phòng vô trùng* hay *phòng cấy*.

Hình 6.3. Thực hiện liệu pháp gen trong tủ cấy vô trùng

Hình 6.4. Nghiên cứu virus Ebola

Muốn cấy ít nhiễm, công việc tiến hành trong các phòng đặc biệt gọi là *phòng vô trùng* hay *phòng cấy* và *tủ cấy vô trùng*. Phòng vô trùng chuẩn thường có vách bằng thủy tinh trong suốt để các VSV và các bào tử khó bám, khó phát triển và dễ làm sạch bề mặt. Đặc biệt, có thể dùng kính không dính bụi.

Nguyên tắc chung là làm thế nào để khi cấy thì bầu không khí trong sạch, ít có vi sinh vật trong không khí. Ngày nay có máy lọc không khí khỏi các VSV và bào tử nên có thể tiến hành thao tác cấy trong tủ trước luồng không khí vô trùng.

Những thí nghiệm cần điều kiện vô trùng tuyệt đối thì phòng được *thổi khí vô trùng tạo áp suất cao bên trong phòng* để khí từ ngoài không xâm nhập vào, trước khi vào phòng mỗi người phải qua phòng riêng tắm và mặc quần áo phủ kín toàn thân. Hình 6.3 mô tả thao tác thò tay qua bao tay nằm phía trong tủ cấy để thực hiện liệu pháp gen. Các nghiên cứu trên các đối tượng gây chết người như virus *Ebola* thì người mặc quần áo phủ kín như các

nhà du hành vũ trụ, đồng thời bơm khí vô trùng căng phồng để tác nhân nguy hiểm không thể chạm vào người (hình 6.4).

2. Các phương pháp khử trùng

Một vật được coi là *vô trùng* khi không còn mang bất kì một sinh vật nào. Thường các VSV và bào tử khó thấy nên khái niệm vô trùng dùng để chỉ sự vắng mặt hoàn toàn của chúng.

Có nhiều phương pháp khử trùng, thường dùng là nhiệt độ cao, lọc, bức xạ và hoá học.

a) Nhiệt độ cao

– *Đốt cháy* : Dùng lửa đèn cồn hoặc gas đốt cháy các dụng cụ kim loại như que cấy, kẹp, kéo, dao.

– *Nhiệt khô* dùng để diệt trùng các dụng cụ kim loại hay thủy tinh trong *lò Pasteur* (180^0C trong 30 phút hay 160^0C trong 2 giờ).

– *Nước sôi* diệt được các tế bào sinh dưỡng.

– *Hơi nước bão hoà dưới áp suất cao* sẽ cho nhiệt độ cao hơn 100^0C như ở áp suất thường (1atm), áp suất hơi nước tương ứng với 121^0C. Dụng cụ để khử trùng thông dụng là *nồi hấp áp suất* (autoclave).

– *Hấp Pasteur (Pasteurisation)* : Một số thực phẩm như sữa ở nhiệt độ cao sẽ mất một phần phẩm chất, và phương pháp hấp Pasteur được sử dụng để khử trùng cho sữa (đun nóng 1 lần ở 63^0C trong 30 phút hoặc ở 72^0C trong 15 giây).

b) Phương pháp lọc

Dùng cho vật lỏng, trong và có độ nhạy tương đối yếu nhưng không chịu được nhiệt độ cao trên 60^0C. Vật đem lọc qua một màng lọc xốp có những lỗ với đường kính nhỏ hơn đường kính của tế bào vi sinh vật nhỏ nhất. Vi trùng sẽ bị giữ lại trên màng lọc còn dung dịch đi qua sẽ vô trùng.

Màng xốp có thể bằng sứ, amiante, cellulose... Trong các phòng vô trùng hiện đại thường dùng màng bông thủy tinh lọc khí để hạn chế nhiễm.

c) Diệt trùng bằng bức xạ

Tia tử ngoại (UV), tia X và các tia phóng xạ ion hoá như tia alpha, beta, gamma, ... đều có khả năng diệt trùng. Tia tử ngoại thường được dùng nhất trong diệt trùng không khí các bệnh viện hoặc các phòng cấy vi sinh vật. Tia tử ngoại chỉ diệt trùng bề mặt, không thấm sâu vào phẩm vật.

d) Phương pháp hoá học

Nhiều hoá chất có khả năng diệt trùng. *Rượu cồn* (trên 70°) thường được dùng để sát trùng ngoài da. *Oxyde ethylene* thường dùng để khử trùng các dụng cụ làm bằng plastic.

Ngoài ra, nhiều hoá chất khác nhau như phenol, formaline,... cũng là những chất sát trùng có thể dùng khử trùng phòng cấy, cần lưu ý một số chất sát trùng có tác dụng độc với người.

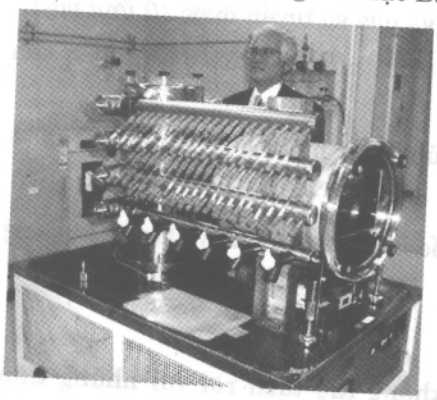
Có nhiều phương pháp khử trùng khác nhau. Tùy đối tượng, tùy tính chất công việc mà sử dụng phương pháp này hay phương pháp khác.

IV. GIỮ GIỐNG VÀ CHỌN GIỐNG

Giống là yếu tố quan trọng đầu tiên chi phối giá thành sản phẩm. Công nghiệp VSV thành công lớn nhờ vào các giống có năng suất cao.

1. Bảo tàng giống

Để có các chủng năng suất cao, công việc căn bản đầu tiên là *thu thập rất nhiều chủng* từ thiên nhiên, lập *bộ sưu tập giống* (culture collection) và giữ chúng trong các *bảo tàng giống* (museum). Các nước có *công nghiệp VSV* phát triển đều có bảo tàng giống lớn như ATCC (American Type Culture Collection – Mĩ),... Các bảo tàng lớn lưu giữ hàng trăm nghìn, thậm chí hàng triệu chủng đã được định danh và mô tả các đặc tính sinh học. Các chủng vi khuẩn thường được *sấy thăng hoa* (*đông khô* – lyophilization) trong các ống thủy tinh (ampule) hàn kín và giữ trong nitrogen lỏng *ở 192°C* (ở nhiệt độ này trao đổi chất của tế bào hầu như dừng lại). Các chủng mốc và nấm giữ ở nhiệt độ lạnh. Các hình 6.5 và 6.6 minh hoạ một số công cụ dùng giữ giống của một Bảo tàng giống ở Nhật Bản.



Hình 6.5. Máy sấy thăng hoa có gắn các ống thủy tinh nhỏ chứa vi khuẩn

Hình 6.6. Các bình chứa nitrogen lỏng giữ giống vi khuẩn (mỗi cái giá 200000 USD)

2. Tầm soát giống

Tầm soát có định hướng (goal-oriented screening) các chủng từ thiên nhiên hay bảo tàng giống là công việc cần thiết để tiến tới tạo ra giống sản xuất. Trong CNSH, có nhiều ví dụ thành công điển hình trong tầm soát như:

– Tìm ra chủng tạo penicillin đầu tiên tăng trưởng tốt trong bồn lên men khuấy (well-mixed fermenter) từ vết mốc trên trái bưởi ở Peoria (Illinois,Mĩ).

– Chủng VSV đầu tiên sản sinh *cephalosporin* phân lập từ nước thải ở Sardinia.

Đây là *công việc phức tạp* nên cần có sự phối hợp chặt chẽ giữa *các nhà VSV học, sinh học, hoá học* và phải tiến hành qua nhiều bước. Ví dụ như tầm soát chủng VSV sản sinh một loại enzyme cần qua 8 bước : 1) Chọn chủng VSV *thích hợp nhất* ; 2) Chủng này tạo enzyme *năng suất cao* trong *thời gian ngắn* khi *lên men chìm* ; 3) Chủng tạo enzyme từ *cơ chất rẻ tiền* ; 4) Tế bào *dễ tách khỏi dịch lên men* ; 5) *Enzyme ngoại bào* thì tốt hơn và *dễ chiết tách khỏi dịch lên men* ; 6) VSV không gây bệnh ; 7) Không tạo độc tố và các chất có hoạt tính sinh học khác ; 8) Chủng ổn định về mặt di truyền và kháng bacteriophage.

Các nhà VSV học Nhật Bản được coi là *thành công nhất* trong tầm soát các chủng vi sinh công nghiệp như chủng *Corynebacterium glutamicum* sinh glutamic acid, chủng tạo enzyme *nitrilase* dùng chuyển acrylonitrile thành acrylamide để *sản xuất nhựa polyacrylamide* (PVC) ở quy mô công nghiệp,... Họ đã dùng lực lượng đông đảo của các trường đại học để phân lập và tầm soát. Các số liệu sau giúp hình dung *khối lượng công việc* và *phí tổn công sức* trong tầm soát các chủng tạo các chất thuốc có giá trị :

– Từ *1 – 3 năm* : Phân lập *100000 chủng* và qua sơ tuyển được *10 ứng viên*.

– Trong *4 – 5 năm* : Qua xác định hoạt tính thuốc thì từ *10 ứng viên* còn lại 2 – 5 chủng vào vòng sau.

– Cần *3 – 7 năm* để chọn từ 2 – 5 chủng còn một cho đến *chấp thuận ứng dụng lâm sàng*.

Do vậy, tổng chi phí cho một loại thuốc bán ra thị trường trong khoảng 200 triệu đến 750 triệu USD.

3. Chọn giống đột biến

Các thành tựu của công nghiệp VSV không thể tách rời với những tiến bộ nhảy vọt trong *chọn lọc các chủng có năng suất cao*. Các phương pháp chọn lọc đột biến được ứng dụng vào chọn giống làm *tăng năng suất* tạo các

sản phẩm, làm *biến đổi bản chất hoá học* các chất và *khắc phục* một số *nhược điểm* của chủng được dùng trong sản xuất công nghiệp.

Phương pháp chọn giống này có các đặc điểm :

– Thu nhận kết quả rất nhanh.

– Chỉ đánh giá sản phẩm thu được, không quan tâm các biến đổi sinh lí, sinh hoá.

Quá trình chọn giống các chủng *Penicillium chrysogenum* ở Mĩ có thể lấy làm ví dụ điển hình cho phương pháp này (bảng 6.2).

Bảng 6.2. Quá trình chọn giống Penicillium chrysogenum trong sản xuất penicilline

Sản lượng (mg/l)	*Kí hiệu chủng*	*Tác nhân và các bước chọn*	*Nơi thực hiện*
60	NRRL - 1951		
	↓	Đột biến ngẫu nhiên	Northern Regional Research Lab.
150	NRRL-1951-B 25		
	↓	Tia X	Carnegie institute
300	X - 1612		
	↓	Tia UV	University of Wisconsin
500	Wis - Q - 176↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	Tia UV (6 bước)	
	↓ ↓ . . . ↓	Tia UV (12 bước)	
7000	E.15.1		Eli-Lilly Ltd.

Từ dòng ban đầu có sản lượng 60mg/l, chọn các đột biến ngẫu nhiên được dòng 150mg/l, và sau đó sử dụng các đột biến nhận được do tác động tia X và UV. Việc chọn lọc theo nguyên tắc : lấy dòng có sản lượng cao nhất đem gây đột biến rồi chọn chủng có năng suất cao hơn. Qua nhiều bước trung gian cuối cùng nhận được dòng E.15.1 có sản lượng 7000mg/l. Trong

bảng 6.2 không nêu một thành tựu quan trọng là tạo chủng không sản sinh ra *sắc tố độc*, phải tốn kém nhiều cho việc loại bỏ sắc tố. Việc nhận các *đột biến không tổng hợp sắc tố* đã làm giảm đáng kể chi phí sản xuất và các dòng này được sử dụng để nâng cao năng suất trong quá trình chọn giống tiếp theo.

Phương pháp chọn giống đột biến được sử dụng để tạo các chủng sản sinh ra nhiều amino acid (như glutamic acid) hay các nucleotide. Ngoài ra còn có thể nhận các đột biến liên quan đến cơ chế điều hoà trao đổi chất :

– Các *đột biến cơ cấu* (constitutive mutants) : tạo sản phẩm không cần chất cảm ứng (inducer).

– Các *đột biến kháng ức chế ngược* là các đột biến tạo sản phẩm nhiều mà không bị ức chế bởi sản phẩm cuối (end product repression).

Phương pháp này đã đem lại những thành tích ngoạn mục, góp phần tích cực cho sự phát triển của công nghiệp lên men vi sinh như :

– Chủng *Penicillium notatum* Oxford sinh ra 5mg/l penicillin, tiếp theo chủng *Penicillium chrysogenum* năng suất cao hơn và nay đạt 60000mg/l.

– Chủng *Corynebacterium glutamicum* tạo glutamic acid đạt 100g/l (ban đầu 20g/l).

– *Serratia marcescens* sinh ra biotin đạt 600mg/l.

– Siêu sản xuất riboflavin do 2 chủng nấm mốc *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii* với sản lượng hơn 20g/l.

Các chủng đột biến sản sinh một lượng chất lớn hơn rất nhiều so với nhu cầu của tế bào, thậm chí lớn hơn nhiều lần khối lượng khô của nó. *Ashbya gosspii* sinh ra riboflavin gấp 40000 lần nhu cầu của nó. *Pseudomonas denitrificans* sinh ra vitamin B_{12} gấp 100000 lần nhu cầu của nó.

4. Tạo các giống vi sinh vật nhờ kĩ thuật di truyền

E. coli, Saccharomyces cerevisiae là những đối tượng đầu tiên sử dụng KTDT để tạo ra các chủng sản xuất các r-protein người, tiếp đó là nhiều VSV khác.

V. CÁC NHÓM VI SINH VẬT CÔNG NGHIỆP CHỦ YẾU

1. Vi khuẩn lactic

Nguồn gốc của lên men lactic acid công nghiệp có từ năm 1857, khi L. Pasteur xuất bản cuốn sách "*Mémoire sur la fermentation applelée lactique*" (Ghi nhớ về sự lên men lactic) nổi tiếng của ông.

– Các đặc điểm sinh học gồm :

+ *Lactobacillus* là vi khuẩn Gram dương, hình que, không bào tử. Căn cứ vào sự *lên men lactic*, có thể phân biệt 2 loại : *vi khuẩn lên men lactic đồng hình và dị hình*. Nhóm đồng hình gồm các loài : *L. casei, L. plantarum, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. helveticus, Streptococcus thermophilus*,... Chúng tạo sản phẩm chính chủ yếu là lactic acid. Các chủng sản xuất trong công nghiệp thuộc loại này. Nhóm dị hình sản sinh lactic acid và một số sản phẩm phụ khác như acetic acid, ethanol, CO_2. Chúng gồm các loài như *L. brevis, L. kefir, Leuconostoc lactis*.

+ *Vi khuẩn nhiệt trung và chịu nhiệt* : Dãy nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn lactic *nhiệt trung* (mesophilic) là 28 – 45°C và của vi khuẩn lactic *chịu nhiệt* (thermophilic) là 45 ÷ 62°C.

+ *Khá nhạy cảm với các acid* : Sự lên men lactic acid bị ức chế mạnh mẽ ở pH 5 và ngừng ở pH dưới 4,5, mặc dù vi khuẩn sản sinh lactic acid như sản phẩm biến dưỡng chính.

+ *Vi khuẩn lactic là sinh vật kị khí không bắt buộc*. Do đó, trong thực tế khi nồng độ oxygen thấp thì hoạt động sống được duy trì bình thường, nhưng không bắt buộc luôn phải như vậy.

+ *Vi khuẩn lactic có các nhu cầu dinh dưỡng phức tạp* : Các nhu cầu này bao gồm các vitamin, amino acid và thậm chí là các peptide ngắn.

+ *Nguồn carbon* là glucose, fructose, lactose, maltose và sucrose. Vài chủng vi khuẩn lactic có thể sử dụng tinh bột như *L. amylophilus* và *L. amylovorus*.

– Các chủng sản xuất chủ yếu : *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. bulgaricus*.

2. Pseudomonas

– Đặc điểm hình thái học chung cho *Pseudomonas* là Gram âm, tế bào hình que, di động nhờ roi ở đầu và không có bào tử.

– Các đặc điểm sinh lí là dị dưỡng, không lên men, linh hoạt về dinh dưỡng, không quang hợp hoặc cố định nitrogen.

– Các ứng dụng của Pseudomonas :

+ Sự tích lũy polyester polyhydroxybutyrate (PHB) dự trữ là một đặc tính quan trọng của các *Pseudomonas* hiếu khí. PHA (polyhydroxyalkanoate) được tạo ra chủ yếu từ *Pseudomonas oleovorans* và *Alcaligenes eutropus*.

+ Sản xuất protease chịu nhiệt và các lipase. Lipase P của *P. fluorescens* và lipase CC của *Candida cylindrica* được dùng nhiều nhất.

+ Một loại amylase dùng sản xuất các maltooligosaccharide từ tinh bột .

+ Trifluoromethylbenzene bị hydroxyl hoá thành diol tương ứng nhờ *Pseudomonas putid*. Diol được tạo ra từ toluen được dùng để sản xuất các chất trung gian chiral prostaglandin.

+ Một số chủng dùng sản xuất công nghiệp acrylamide.

+ *Pseudomonas putida* tạo thành các alcohol có hoạt tính quang học từ những cơ chất là achiral hoặc racemic, ... , trong sự biến đổi acid isobutyric thành acid (S)-β-hydroxybutyric.

+ Ứng dụng tiềm ẩn nhờ khả năng phân giải nổi tiếng các hợp chất xenobiotic, đặc biệt là những chất hữu cơ bị halogen hoá, thuốc diệt cỏ, plastic, dung môi và những chất tẩy nhờn. Một số loài *Pseudomonas* phân giải glyphosate của thuốc diệt cỏ.

P. syringae có một protein màng làm nhân đông đá (ice nucleation) để nước dễ đóng băng. Vi khuẩn này gây hại cho cây trồng, nhưng protein của nó được dùng làm tuyết nhân tạo.

3. Bacillus

– Các đặc điểm sinh học : Vi khuẩn Gram dương, hình que, có khả năng tạo nội bào tử, chịu nhiệt, hiếu khí. Khoảng 150 loài cực đoan : chịu nhiệt, chịu lạnh, ưa kiềm, ưa acid. Một số loài có thể thực hiện chuyển hoá sinh học .

– Các ứng dụng chủ yếu :

+ Món ăn truyền thống của Nhật "itohiki – natto" đã có từ 400 năm, được chế biến từ đậu nành dưới tác động của *Bacillus natto* (*Bacillus subtilis*). Sản lượng 10^8kg/năm.

+ *Bacillus thuringensis* : thuốc trừ sâu vi sinh và nguồn gen *Bt*.

• *B. licheniformis* và *B. amyloliquefaciens* : alpha amylase chịu nhiệt.

• *B. alcalophilus* : serine protease subtilin trong bột giặt.

4. Corynebacteria

– *Corynebacterium glutamicum*, vi sinh vật đầu tiên được tìm thấy vào 1957 có khả năng sản sinh lượng lớn glutamic acid, mà muối monosodium glutamate (MSG) dùng làm chất tăng vị (bột ngọt hay mì chính).

– Con đường điều hoà sinh tổng hợp nhóm amino acid aspartate (L-Lysine, L-Threonine, L-Methyonin và L-Isoleucine) của các chủng *Corynebacterium glutamicum* và *Brevibacterium flavum* là đơn giản hơn so với của *E. coli*. Các chủng đột biến của *Corynebacterium glutamicum* được dùng để sản xuất lysin với số lượng lớn.

5. Streptomycetes

– Giống *Streptomyces* thuộc nhóm xạ khuẩn *Euactinomycetes*.

– Đặc điểm sinh học : Vi khuẩn Gram dương ; tế bào dạng sợi ; khuẩn lạc có tia nên gọi là xạ khuẩn. Phân rã lignocellulose, polyphenol, chitosan, keratin, pectin và nhiều chất khác nhờ tiết ra một lượng lớn hydrolase. *Streptomyces* ưa nhiệt (tăng trưởng tối ưu ở 50 – 60°C)

– Các ứng dụng của *Streptomyces* (xạ khuẩn) :

+ Kháng sinh đầu tiên của nhóm này là *Streptomycin*, đến nay gồm hơn 90% antibiotics.

+ Nhiều enzyme của *Streptomyces* được sử dụng.

+ Nhiều chất có hoạt tính khác như 7 nhóm chất diệt cỏ, các chất diệt kí sinh trùng,...

+ Nhiều chủng *Streptomyces* được lên men quy mô lớn để sản xuất kháng sinh từ thập niên 1940.

6. Vi nấm

– Đặc điểm sinh học :

+ Các sinh vật của giới nấm là những sinh vật tiêu thụ không có khả năng di chuyển. Các vi nấm như nấm mốc, nấm men là những *Eucaryotae* đơn bào hay đa bào, hấp thụ dinh dưỡng qua vách tế bào và màng sinh chất nhờ phân giải các sinh vật chết hay phế thải của môi trường.

+ Nấm có thể *sinh sản vô tính* hoặc *hữu tính* bằng bào tử tương ứng. *Bào tử* là những tế bào đơn bội hay lưỡng bội bay trong không khí và phát tán nấm đến nhiều địa điểm xa hơn. Các bào tử có sức chống chịu cao đối với nhiệt độ cao hoặc thấp, cũng như với sự mất nước và có thể sống sót ở những điều kiện bất lợi khác.

– Các ứng dụng :

+ Ngoài nấm men truyền thống *Saccharomyces cerevisiae* có nhiều ứng dụng rộng rãi trong CNSH và kĩ thuật di truyền, còn có nhiều loài nấm men khác gọi là *không truyền thống* như *Candida. torula* dùng trong sản xuất protein, sắc tố,...

+ Nhiều loài nấm mốc dùng *sản xuất enzyme* như : *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger.*

+ Các nấm mốc *Mucor miehei* và *Mucor pusillus* có thể sản sinh *enzyme thay thế rennin* làm đông tụ sữa để chế fromage.

+ Nấm mốc *Aspergillus niger* là chủng sản xuất *citric acid* quy mô công nghiệp lớn từ đầu thập niên 1920. Citric acid là acid hữu cơ chính được sản xuất nhờ lên men và xếp thứ hai trong tất cả các sản phẩm lên men về sản lượng, sau ethanol công nghiệp. Hiện nay, sản lượng ước tính khoảng 700000 tấn/năm.

7. Vi tảo

Các vi tảo có ứng dụng trong CNSH gồm :

– *Chlorella, Scenedesmus* dùng trong sản xuất protein đơn bào.

– *Chlamydomonas reinhardii* dùng trong chuyển gen qua lục lạp.

– *Dunaliella* là vi tảo chịu mặn dùng sản xuất glycerol và carotene.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các vi sinh vật rất đa dạng. Trong 3 siêu giới thì riêng vi sinh vật đã thuộc 2 siêu giới là *Bacteria* và *Archae*. Các vi nấm và vi tảo thuộc *Eukarya*. Chúng có các đặc điểm : kích thước tế bào nhỏ, tốc độ sinh sản nhanh, có mặt ở khắp nơi mà mắt thường không nhìn thấy, cường độ trao đổi chất mạnh, thực hiện nhiều phản ứng sinh hoá khác nhau và giữ vai trò quan trọng trong các chu trình tuần hoàn vật chất.

Kĩ thuật vô trùng có vai trò quan trọng hầu như trong tất cả các công đoạn của CNSH vi sinh vật, thực vật và động vật.

Một trong những thành công của công nghiệp vi sinh là tạo được các chủng sản xuất có năng suất rất cao. Kết quả đạt được nhờ đầu tư lớn vào các khâu : bảo tàng giống, tầm soát chủng mục tiêu và chọn giống đột biến.

Các nhóm VSV công nghiệp chủ yếu gồm : vi khuẩn lactic, *Pseudomonas, Bacillus, Corynebacterium, Streptomyces*, vi nấm và vi tảo.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Vì sao nói các VSV đa dạng ?
2. Các *Bacteria* gồm những nhóm chủ yếu nào ?
3. Các VSV cực đoan thuộc siêu giới nào và gồm những nhóm chủ yếu nào ?
4. Các VSV có vai trò gì trong sinh quyển ?
5. Vì sao kĩ thuật vô trùng có ý nghĩa quan trọng trong tất cả các lĩnh vực của CNSH ?.

6. Có các phương pháp khử trùng nào ?

7. Các chủng VSV được thu thập và lưu giữ như thế nào ?

8. Nêu vài ví dụ về sự thành công trong tầm soát giống ?

9. Chọn giống đột biến có vai trò quan trọng như thế nào đối với công nghiệp vi sinh ?

10. Tính đặc hiệu của enzyme biểu hiện như thế nào ?

11. Nêu các nhóm vi khuẩn chủ yếu trong CNSH và các ứng dụng của chúng.

12. Nêu các chủng nấm mốc quan trọng trong CNSH và các ứng dụng của chúng.

CHƯƠNG 7

CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Chương này nói về các nguyên lí của quy trình công nghệ cho phép *thiết kế* và *vận hành* ở quy mô lớn các *thiết bị máy móc* để tạo ra *thương phẩm* sau quá trình *tinh chế*. Phần này có thể gọi *Công nghệ sinh học kĩ thuật* (Engineering biotechnology). Trong những thập niên 1960 và 1970, *công nghệ lên men* đã phát triển thành một *ngành công nghiệp lớn* trên thế giới với doanh số gần trăm tỉ USD/năm. Sự hoàn thiện trang thiết bị ở tất cả các khâu và sự kiểm soát, điều khiển phản ứng của tế bào ở trình độ cao làm tăng sản lượng đáng kể.

I. KHÁI QUÁT VỀ SỰ LÊN MEN CÔNG NGHIỆP

1. Khái niệm lên men

Thuật ngữ *fermentation* (*lên men*) từ tiếng Latinh *fervere* có nghĩa là *làm chín*, dùng để diễn tả *hoạt động của nấm men* trong dịch chiết trái cây hay dịch đường hoá ngũ cốc. L. Pasteur đã gọi *sự lên men là sự sống thiếu không khí* (kị khí, thiếu O_2). Tuy nhiên, thuật ngữ *lên men* đến nay được hiểu là *tất cả các quá trình biến đổi do vi sinh vật thực hiện trong điều kiện yếm khí (thiếu O_2) hay hiếu khí*. Lên men là sự tích lũy các sản phẩm trao đổi chất hữu ích cho con người trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật.

Việc nuôi vi sinh vật với quy mô lớn (trong khoảng 10 lít đến 1000000 lít) thường được gọi là *lên men công nghiệp* (industrial fermentation). *Công nghiệp lên men* đã hình thành từ cuối thế kỉ XIX và phát triển mạnh trong nửa cuối thế kỉ XX với hàng loạt thương phẩm (bảng 6.1).

2. Ưu thế của tế bào VSV công nghiệp

– Nhờ kích thước nhỏ, chúng có tỉ lệ bề mặt/thể tích rất lớn nên *hấp thụ* chất dinh dưỡng nhanh và *đồng hoá ở tốc độ cao*.

– Nguồn *nguyên liệu* ban đầu cho sản xuất *đơn giản* như các chất đường bột và nhiều phế phụ phẩm rẻ tiền.

– Chúng có thể thực hiện rất *nhiều các phản ứng hoá sinh* khác nhau.

– *Thích ứng* với nhiều loại môi trường khác nhau và một số các điều kiện sinh trưởng khác khi nuôi trong phòng thí nghiệm, trong thiết bị của nhà máy.

– Dễ dàng sử dụng KTDT để tăng sản lượng, biến đổi sản phẩm cuối.

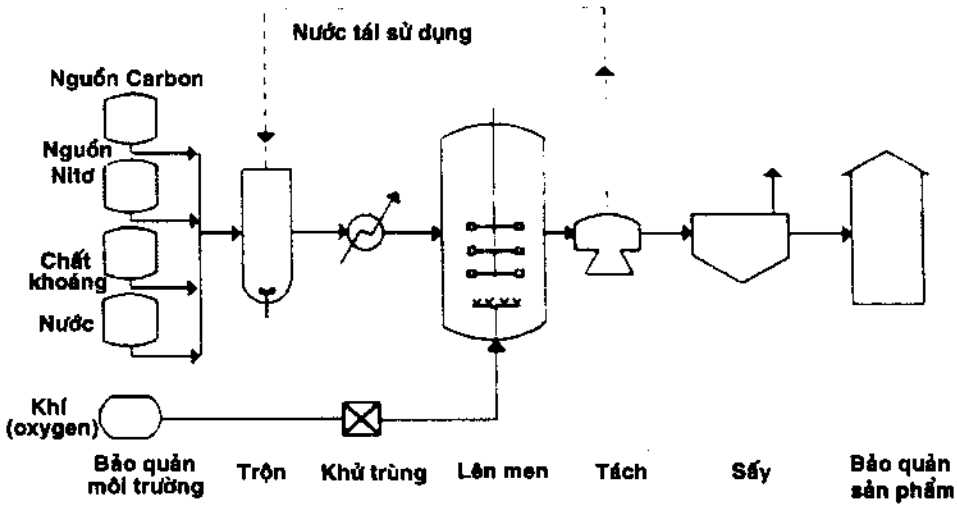
– Có khả năng tạo các *chất đối quang* hay *đối hình* (enantiomer) có hoạt tính, khi mà tổng hợp hoá học khó hoặc không thể thực hiện.

Thực tế sản xuất đã chứng minh nhiều sản phẩm của công nghiệp lên men có thể *cạnh tranh với tổng hợp hoá học* ở ngay cả các phân tử đơn giản như L-glutamic acid, mặc dù vài sản phẩm đến nay vẫn được tổng hợp bằng phương pháp hoá học (acetone, butanol).

Các quá trình công nghiệp vượt xa các cơ chế điều hoà tự nhiên. Mặc dù VSV sinh ra nhiều sản phẩm có giá trị, nhưng *cơ chế điều hoà của chúng giới hạn* việc tạo ra một *lượng lớn sản phẩm theo ý muốn* của con người. Trong lúc đó, các nhà công nghiệp mong đợi các chủng tạo ra *sản lượng lớn các chất đặc biệt* để có thể tách chiết và tinh sạch. Các nhà VSV học tìm kiếm các chủng có cơ chế điều hoà tự nhiên kém hiệu quả thông qua việc biến đổi môi trường nuôi cấy, phát hiện các dạng đột biến hay dùng KTDT để làm tăng sản lượng sản phẩm. Lí do chính để dùng VSV tổng hợp các chất thay cho tổng hợp hoá học là *dễ dàng tăng lượng sản phẩm và thực hiện các biến đổi di truyền.*

3. Sơ đồ tổng quát và các công đoạn chính

Sơ đồ sau đây mô tả khái quát quá trình *lên men công nghiệp* với quy mô lớn (hình 7.1).



Hình 7.1. Sơ đồ khái quát quá trình *lên men công nghiệp* với quy mô lớn

Quá trình lên men trong *bioreactor là trung tâm*, nên thường chia thành *3 công đoạn chính* :

– *Trước lên men* (Upstream) : Xử lí, chế biến, phối trộn và khử trùng nguyên liệu ban đầu.

– *Lên men* (Fermentation) trong bioreactor được *thông khí* tốt (cần phá bọt), trong dịch lên men diễn ra quá trình *truyền khối, truyền nhiệt, tăng sinh khối tế bào* và *điều chỉnh hoạt tính sinh học* để tạo nhiều sản phẩm mục tiêu.

– *Sau lên men* (Downstream) : Tách tế bào bằng li tâm hay lọc, phải phá vỡ tế bào để giải phóng các *chất nội bào* ; tủa, *tinh sạch* các chất ; thực hiện *phản ứng bổ sung* tạo đúng thương phẩm ; tinh chế ; sấy ; thương phẩm ở dạng hoàn chỉnh được bảo quản ; tận dụng phụ phế phẩm.

II. SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA TẾ BÀO TRONG BIOREACTOR

1. Tỉ lượng (Stoichiometry) của tế bào

Tế bào chứa một lượng nước rất lớn, chiếm 70% khối lượng khô của tế bào. Vì thế, thông thường tỉ lệ các thành phần hoá học của tế bào được xác định trên khối lượng khô. *E. coli*, thường được nghiên cứu nhiều nhất, có các nguyên tố đặc trưng như trên bảng 7.1.

Bảng 7.1. Thành phần nguyên tố của E. coli

Nguyên tố	*Tỉ lệ (%khô)*
C	50
O	20
N	14
H	8
P	3
S	1
K	1
Na	1
Ca	0.5
Mg	0.5
Cl	0.5
Fe	0.2
Các nguyên tố khác	0.3

Gần một nửa khối lượng khô tế bào là carbon và các nguyên tố C, O, N và H, chiếm khoảng 92% tổng số. Đây là quan sát từ *E. coli* và điều này cũng phù hợp cho các tế bào VSV khác. Theo nhiều tính toán, công thức hoá học rút gọn xấp xỉ cho tế bào của các loài là $CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}$. Khối lượng phân tử của tế bào là : 12 + 1,8 + 0,5.(16) + 0,2.(14) = 24,6. Do vậy, 12,2 g là lượng glucose tối thiểu cần để tạo ra 10g chất khô tế bào.

2. Phản ứng tăng trưởng (Growth reaction)

Trong thí dụ trên, giả định rằng tất cả nguồn carbon cơ chất (glucose) đều tạo ra sinh khối. Tuy nhiên, tế bào cần oxy hoá hoặc hô hấp từ một số

nguồn carbon để tạo ra năng lượng cho sinh tổng hợp và duy trì trao đổi chất. Thêm vào đó, tế bào có thể tạo ra những sản phẩm ngoại bào và tích lũy trong dung dịch. Do đó, có thể hình dung sự phát triển như sau :

Tế bào + Môi trường nuôi + Oxygen →

→ Nhiều tế bào + Sản phẩm ngoại bào + CO_2 + H_2O

Môi trường nuôi cung cấp dinh dưỡng cho tế bào nhằm đáp ứng tất cả các nguyên tố cần thiết (gồm C, N, P, S, K, Na, Ca...) cho tế bào tăng trưởng hoặc sinh tổng hợp và tạo thành các sản phẩm. CO_2 và H_2O là sản phẩm cuối của hô hấp oxy hoá glucose.

Phản ứng phát triển có thể trình bày :

Tế bào + [nguồn C + nguồn N + các chất khác] + O_2 →

→ Nhiều tế bào + Sản phẩm ngoại bào + CO_2 + H_2O

Nếu như không quan tâm đến các nguồn dinh dưỡng khác, phương trình trên, tính từ một mol glucose (nguồn C) tiêu thụ, có thể viết lại :

$$C_6H_{12}O_6 + a\ NH_3 + b\ O_2 \rightarrow \alpha\ CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + \beta\ CH_xO_yN_z + \gamma\ CO_2 + \delta\ H_2O$$

Ở đây, *ammonia* (NH_3) thay mặt cho nguồn N. Người ta gọi phản ứng này là *phản ứng tăng trưởng*. Căn cứ theo phương trình này, có thể tính được lượng cơ chất ban đầu (chủ yếu nguồn glucose) cần cho việc thu nhận sinh khối cần thiết cho sự lên men.

Cần lưu ý là mọi nguồn N trong môi trường được biểu thị *tương đương với nitrogen dưới dạng ammonia*. Tế bào cần nitrogen dưới dạng hữu cơ hoặc vô cơ. Trong đa số quy trình, *glucose* là nguồn carbon. Tuy nhiên, để giảm giá thành sản phẩm có thể thay thế bằng nguồn carbon rẻ hơn như *mật rỉ đường* hoặc *bột* được thủy giải thành glucose.

Dựa theo phương trình tăng trưởng, các công thức toán học được thiết lập để tính toán lượng *nguyên liệu ban đầu* cần cho sản xuất căn cứ vào *sản lượng đầu* ra.

3. Động học (Kinetics) của sự tăng trưởng

Nếu nhu cầu dinh dưỡng và O_2 được đáp ứng đầy đủ, các tế bào sẽ sinh sản và phát triển theo *đường cong tăng trưởng* qua các pha *lag*, *pha logarit (hàm mũ)*, *pha ổn định* (stationary) và *pha suy tàn hay chết* (decline or death). Trong lên men, các *pha logarit* và *ổn định* có vai trò quyết định để tạo sản phẩm. Sẽ có lợi hơn khi *giảm thiểu pha lag*, bằng bổ sung giống mạnh hay tăng lượng giống, để tăng năng suất. Thường tốc độ chết của tế

bào không quan trọng, nhưng nó có ý nghĩa trong công nghệ thực phẩm và xử lí nước thải.

Sự toả nhiệt do tăng trưởng : Một phần năng lượng trao đổi chất của tế bào thoát ra ở dạng nhiệt. Lượng nhiệt toả ra là đáng kể nhất là khi lên men trên 10000 lít. Do đó, cần có *thiết bị giải nhiệt* để nhiệt độ môi trường lên men dao động trong khoảng $\pm$ *0,5*^{o}*C*, nhằm duy trì các điều kiện sinh lí tối ưu cho sự *tăng trưởng*.

Ngoài ra, sự tăng trưởng tế bào chịu tác động của hàng loạt nhân tố :

– *Giới hạn cơ chất* (substrate limitation) : Tốc độ tăng trưởng tối đa *giảm 50%* ở nồng độ 10^{-5}mol đối với glucose và các hợp chất N, 10^{-6}mol đối với vitamin và các nhân tố tăng trưởng.

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

– *Ức chế sản phẩm :* Nồng độ sản phẩm cao làm tốc độ tăng trưởng tối đa giảm 50%. Loại ức chế này thường gặp ở *ethanol, các acid hữu cơ, amino acid, các antibiotic,...* Điển hình là ethanol ở nồng độ 1mol sẽ ức chế nấm men và vi khuẩn.

Các yếu tố như nhiệt độ, pH, nồng độ CO_2 hoà tan cũng ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng.

III. NGUỒN DINH DƯỠNG VÀ NGUYÊN LIỆU BAN ĐẦU

Thuật ngữ *cơ chất* (substrate) được dùng để chỉ các thành phần của môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng của VSV hoặc cho việc tạo ra các sản phẩm mục tiêu.

Môi trường nuôi có các cơ chất ở dạng dễ hấp thụ nhất cho các VSV thường ở dạng lỏng. Tuy nhiên, trong một số trường hợp có thể sử dụng một số môi trường rắn. Ngoài những thành phần chủ yếu, trong môi trường còn có các chất phụ gia.

1. Môi trường tự nhiên và tổng hợp

Môi trường tự nhiên phức tạp khác với *môi trường tổng hợp* ở chỗ chúng được chế ra từ nguyên liệu tự nhiên có nguồn gốc động, thực vật ; thành phần hoá học chính xác của các vật liệu này đến nay chưa biết hoặc xác định rất khó khăn. Một số môi trường phức tạp được pha chế bằng cách hoà tan các chất tự nhiên trong nước và tiếp theo được xử lí bằng thủy giải, làm trong

hay bổ sung các chất dinh dưỡng, kích thích tố tăng trưởng hay các nguyên tố vi lượng. *Môi trường tổng hợp* (synthetic) có thành phần xác định.

Sự tăng trưởng của vi sinh vật trong nhiều trường hợp đòi hỏi môi trường chế biến rất nghiêm ngặt, sự thay đổi chút ít của môi trường sẽ ảnh hưởng đến sự thu hồi sản phẩm. Ví dụ, cùng một nguyên liệu ban đầu (như casein) nhưng do các công ti khác nhau cung cấp có thể cho kết quả khác nhau trong sản xuất vaccin, thuốc kháng sinh. Trong nhiều trường hợp, cùng loại môi trường nhưng có mẻ có năng suất cao, có mẻ có năng suất thấp mà chưa rõ nguyên nhân.

Một thực tế là nhiều loại thực phẩm lên men cổ truyền có hương vị ngon phụ thuộc vào nguyên liệu ban đầu như bia làm từ malt (hạt đại mạch mọc mầm) là ngon nhất, tuy về nguyên tắc vẫn là lên men rượu.

2. Nước

Nước là thành phần chính của tế bào và thể hiện nhiều vai trò khác nhau. Chất lượng nước rất quan trọng trong sản xuất các sản phẩm từ VSV. Ví dụ : *rượu bàu đá* ngon nổi tiếng của Bình Định chỉ có thể được sản xuất từ nước suối *BàuĐá* (bàu có nghĩa một thủy vực).

Trong sản xuất vaccine, nguồn nước phải qua nhiều công đoạn làm tinh sạch, chưng cất 2 lần rồi mới được sử dụng để nuôi các chủng VSV.

Lên men trong môi trường nước có ưu điểm là độ đồng nhất cao, dễ dàng theo dõi pH và nhiệt độ ; nhược điểm là khi chiết suất sản phẩm thì tỉ lệ nước cao gây tốn kém năng lượng và thời gian.

3. Nguồn carbon

Carbon là nguồn dinh dưỡng quan trọng, vừa cung cấp năng lượng, vừa là thành phần cấu trúc tế bào. Trong sản xuất từ VSV, nguồn carbon chủ yếu là đường đơn như glucose, oligosaccharide (lactose, saccharose) ; những đường này thường từ nguyên liệu ban đầu là mật rỉ đường và thường được xử lí để có glucose. Trong quá trình chuyển hoá thành bột ngọt, mật rỉ đường được xử lí thành đường đơn nhờ acid hoặc các amylse. Ví dụ, trong sản xuất bột ngọt ở nước ta hiện nay thường dùng bột khoai mì (thủy phân bằng acid hoặc enzyme) và mật rỉ đường làm nguồn C chủ yếu. Tỉ lệ C/N thường được chú ý.

4. Nguồn nitrogen

Thông dụng nhất là cung cấp nitrogen vô cơ dưới dạng muối ammonium (như ammonium phosphate), nitrogen hữu cơ thường được cung cấp như amino acid hoặc sản phẩm thủy giải từ protein.

– *Nguồn nitrogen tổng hợp* : SA (sulfat ammonium), DAP (Diammonium phosphate) , urê.

– *Nguồn nitrogen tự nhiên* : Nước chiết bắp (corn stup liquor), *cao bắp* có 15 loại amino acid, *cao nấm men* (yeast extract) giàu amino acid, các vitamin, ... Ngoài ra, có thể sử dụng bột đậu nành hay bột đậu khác giàu đạm.

5. Các nguyên tố khác và vitamin

Ngoài nguồn C và N, môi trường dinh dưỡng cần đủ các nguyên tố đa lượng và vi lượng khác như P, S, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Co,... Ngoài các vitamin có sẵn trong cơ chất ban đầu, trong một số quy trình cần bổ sung vitamin như *biotin*.

6. Các chất phá bọt

Trong quá trình sục khí, bọt tạo ra nhiều lớp ngăn cách không khí. Các chất phá bọt thường dùng là các loại dầu : *dầu dừa, dầu đậu nành, dầu hướng dương, dầu hạt cải, dầu cá không có mùi, dầu silicol 1%*. Dầu phải đạt yêu cầu : *hoạt tính phá bọt cao, mùi dễ chịu, màu sáng và không có tạp chất*.

IV. HỆ THỐNG THIẾT BỊ

Theo sơ đồ khái quát (hình 7.1), các thiết bị chủ yếu bao gồm 3 phần : *thiết bị trước lên men, lên men* và *sau lên men*. Các *bioreactor* (bồn lên men) là trung tâm của hệ thống.

1. Các thiết bị trước lên men

Thường gồm các loại :

– Bể hay bồn (tank) chứa cơ chất ban đầu. Các nhà máy lớn có những bồn chứa hàng chục nghìn mét khối (m^3) để trữ nguyên liệu cho sản xuất.

– Thiết bị *làm gãy vụn và nghiền* nguyên liệu thô.

– Thiết bị để *xử lí nguyên liệu* như đường hoá bột.

– Thiết bị để *trộn đều nguyên liệu và pha chế môi trường nuôi*.

– Thiết bị *khử trùng* : Thường dùng *hơi nước dưới áp suất* và trong sản xuất lớn dùng nồi hơi (chaudière). Khử trùng bằng lọc ít được sử dụng.

Các thiết bị này nói chung được làm bằng vật liệu không bị tác động của hoá chất như sắt không rỉ (inox) hoặc bằng sắt thép được bọc nhựa epoxy ở bề mặt tiếp xúc với các chất lỏng.

2. Nhu cầu oxygen và các kiểu lên men

Nhu cầu trao đổi oxygen của một sinh vật phụ thuộc vào đặc điểm của tế bào và điều kiện môi trường nuôi. Nhu cầu oxygen của hầu hết các tế bào được thoả mãn nếu nồng độ oxygen khoảng 1mg/l. Nếu mức oxygen thấp hơn thì sự lên men yếm khí xảy ra và kết quả là tốc độ tăng trưởng cũng giảm.

Sự phát triển nhanh của các tế bào VSV đòi hỏi một lượng lớn oxygen ở dạng hòa tan để có thể tiếp xúc trực tiếp với màng tế bào.

Một trở ngại lớn căn bản là *oxygen rất khó tan* trong môi trường lỏng và độ hoà tan của nó giảm khi *nhiệt độ tăng* và khi nồng độ các chất trong nước gia tăng. Khó khăn thứ hai là sự tăng trưởng của *VSV dạng sợi* như nấm sợi hay xạ khuẩn làm dịch nuôi rất nhớt và oxygen hoà tan trong chất lỏng cũng khó tiếp xúc với tế bào. Hơn nữa, nhu cầu trao đổi oxygen tăng liên tục khi *mật độ tế bào tăng* cao. Vì thế phải duy trì cung cấp oxygen liên tục trong bất kì quá trình lên men hiếu khí nào.

Phụ thuộc vào việc cung cấp oxygen, có các kiểu lên men sau :

– *Lên men bề mặt* : Môi trường lỏng chứa trong khay với chiều sâu không quá 5cm và tế bào mọc lớp trên bề mặt tiếp xúc trực tiếp với không khí. Kiểu này còn gọi là *lên men tĩnh*. Tế bào vi khuẩn *Acetobacter xylinum* tạo màng cellulose vi khuẩn (bacterial cellulose – BC) dùng làm thạch dừa (nata de coco) cho năng suất cao nhất khi lên men tĩnh.

– *Nuôi cấy lắc* thường dùng trong phòng thí nghiệm và oxygen cung cấp do môi trường bị khuấy trộn nhờ máy lắc. Đối với nuôi nhỏ ít hơn 1 lít môi trường có thể dùng bình Erlenmeyer đặt trên máy lắc. Sự lắc tạo thuận lợi cho oxygen không khí dễ dàng chuyển vào dịch lỏng. Nếu môi trường tăng trưởng chỉ chiếm 10 – 20% thể tích bình, có thể đạt mật độ tế bào là 1 – 2g khô/1lít. Nuôi trong bình nhỏ thường dùng ở giai đoạn đầu nhân giống.

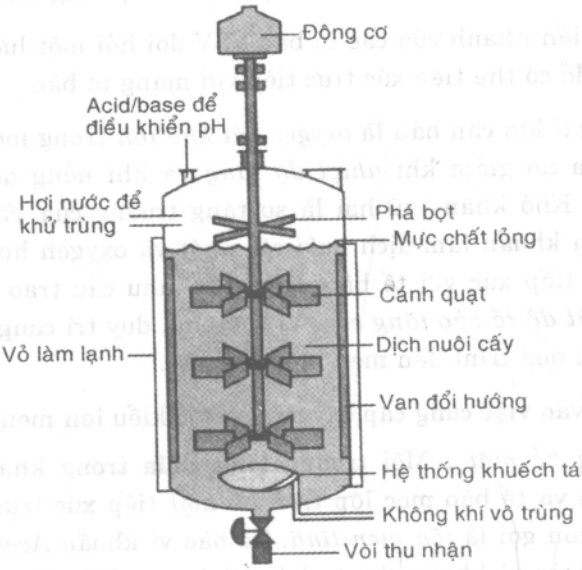
– *Lên men bán rắn* : Cơ chất rắn ẩm để lớp mỏng trên khay.

– *Lên men chìm* (submerged fermentation) là kiểu lên men chủ yếu trong công nghiệp. Khi nuôi với quy mô lớn hay mật độ tế bào cao, nhu cầu oxygen chỉ được thỏa mãn bằng thông khí mạnh nhờ bơm khí (compressor). Thiết bị chủ yếu là bồn lên men (fermenter hay bioreactor).

3. Bioreactor

Bioreactor (fermenter) là *vật chứa* (vessel) *các tế bào, chiết xuất tế bào* hay các *enzyme* thực hiện *phản ứng sinh học*. Trước đây thuật ngữ fermenter thông dụng, nay bioreactor phổ biến hơn, có lẽ còn thêm nghĩa thực hiện phản ứng. Một bioreactor trong sản xuất được minh hoạ ở hình 7.2. Đây là

thiết bị có dung tích từ 100 lít đến 100000 lít, được làm bằng thép không rỉ, có hệ thống đo lường và điều chỉnh nhiệt độ, pH và oxygen hoà tan. Bioreactor thường có hình trụ với một hệ thống cánh quạt như chân vịt tàu thủy nhằm trộn đều và cung cấp oxygen (hình 7.3).



Hình 7.2. Hệ thống nhân giống đến bioreactor 100m^3

Thiết kế bioreactor phải đảm bảo độ vô trùng và cung cấp tiết kiệm nguyên liệu. Nó có các *bộ cảm biến* (sensor) để giám sát nhiều thông số như nhiệt độ, pH, oxygen hoà tan và có thể tự điều chỉnh về giá trị cho phép. Sự phát triển của công nghiệp VSV liên quan đến việc hoàn thiện các bioreactor công nghiệp. Chúng phải thỏa mãn các điều kiện phát triển tối ưu của các VSV.

Hình 7.3. Trong lòng một bioreactor cỡ lớn

Mẫu bioreactor căn bản gồm một bồn kín được lắp khít cho luồn khí vào và khuấy. Ngoài ra bồn còn phải thỏa mãn các đòi hỏi khác như sau :

– *Các vật cản* : Việc gắn thêm các vật cản trên thành bioreactor có thể làm tăng hiệu quả chuyển oxygen nhờ làm tăng dòng xoáy của môi trường nuôi khi được khuấy.

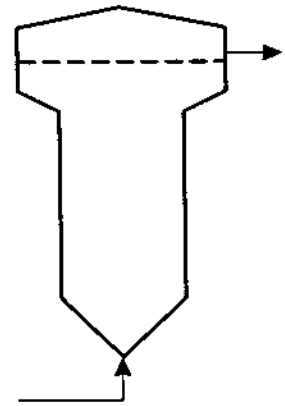
– *Kiểm soát phá bọt* : Việc khuấy và thổi khí mạnh vào môi trường nuôi có thể tạo nên nhiều bọt, nhất là khi mật độ tế bào cao hay khi môi trường chứa các chất bổ sung như cao nấm men (yeast extract) hoặc dịch chiết đậu nành. Sự tạo bọt có thể phát hiện bằng cách lấy mẫu phía trên bề mặt môi trường và có thể kiểm soát tự động việc phá bọt.

– *Kiểm soát nhiệt độ* : Các VSV khi biến đổi cơ chất sẽ tạo nhiệt. Các vòng trao đổi nhiệt bên trong hoặc bao bồn được dùng để đo nhiệt độ đó. Khi quá trình lên men diễn ra, mật độ tế bào tăng lên, nhiệt tỏa ra và nước lạnh được lưu thông trong các vòng trao đổi nhiệt hay vỏ bọc bồn lên men. Nước lạnh cũng được dùng tương tự để làm lạnh môi trường nuôi ngay sau khi môi trường vừa được khử trùng (hãy còn nóng).

– *Kiểm soát pH* : Quá trình trao đổi chất của phần lớn sinh vật làm thay đổi pH của môi trường nuôi kèm theo những biến đổi sinh lí của sinh vật. Trong thực tế thường phải khống chế liên tục pH của dịch lên men với mẫu thử và bổ sung acid hay kiềm để giữ pH ổn định.

– *Các cửa phụ* : Một số cửa phụ được tạo ra để bổ sung tế bào nuôi và các chất thiết yếu của môi trường.

Đối với các sản phẩm *lên men yếm khí* như trong sản xuất rượu bia, có thể dùng bioreactor dạng bồn lớn đáy hình phễu như hình 7.4. Khí thoát ra phía trên, tế bào sẽ lắng ở đáy phễu và lấy ra ngoài dễ dàng.



Hình 7.4. Bioreactor hình phễu

4. Các thiết bị sau lên men

– Thiết bị *tách tế bào :* Các bồn lắng, các loại máy li tâm, bộ lọc ép hoặc lọc chân không trống quay. Đây là các thiết bị thường sử dụng trong công nghệ thực phẩm.

– Thiết bị *phá vỡ tế bào* : Dùng thu nhận các *sản phẩm nội bào*.

– Thiết bị *cô đặc* : Làm bốc hơi, lọc màng, trao đổi ion, hấp thu.

– Thiết bị dùng cho phản ứng tạo sản phẩm.

– Thiết bị *kết tinh* dùng cho một số sản phẩm như bột ngọt (monosodium glutamate – MSG), citric acid.

– Sắc kí dùng cho tinh chế sản phẩm

– Thiết bị *sấy*.

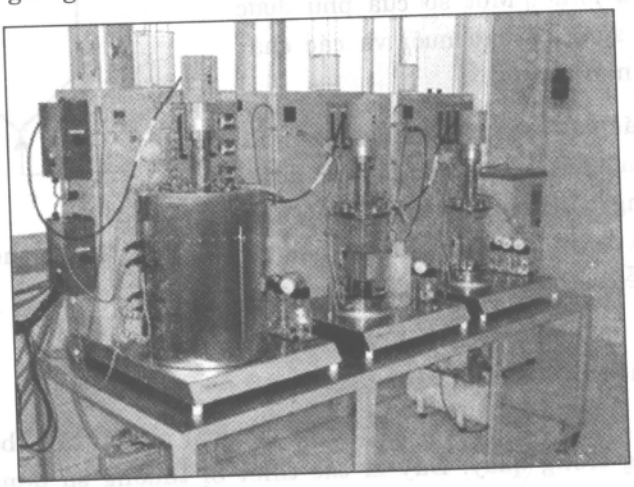
– Các thiết bị để chế biến và bảo quản sản phẩm như rửa, sấy....

V. VẬN HÀNH QUY TRÌNH LÊN MEN

Vận hành các bồn lên men là khâu trung tâm của quá trình sản xuất có sử dụng các VSV. Quá trình lên men tốt sẽ tạo ra sản phẩm với năng suất và chất lượng cao.

1. Nhân giống

Khâu đầu của quá trình lên men là tẩy sạch bồn bằng khử trùng và cho môi trường vô trùng vào. Tiếp theo là cho giống ban đầu (starter culture) vào để nuôi. Thông thường, số lượng giống ban đầu chiếm khoảng 1 – 10% tổng khối lượng của môi trường nuôi. Nếu số lượng giống cấy vào ít, thời gian lên men bị kéo dài và dễ bị nhiễm. Trong giai đoạn đầu của quá trình lên men phải tạo điều kiện cho sự sinh sản của VSV đạt số lượng nhất định. Quá trình nhân giống bắt đầu với quy mô nhỏ tăng dần lên quy mô lớn hơn. Đối với các bình lên men nhỏ từ 10 lít – 20 lít (hình 7.5) trong phòng thí nghiệm có thể sử dụng giống nuôi từ bình Erlenmeyer.

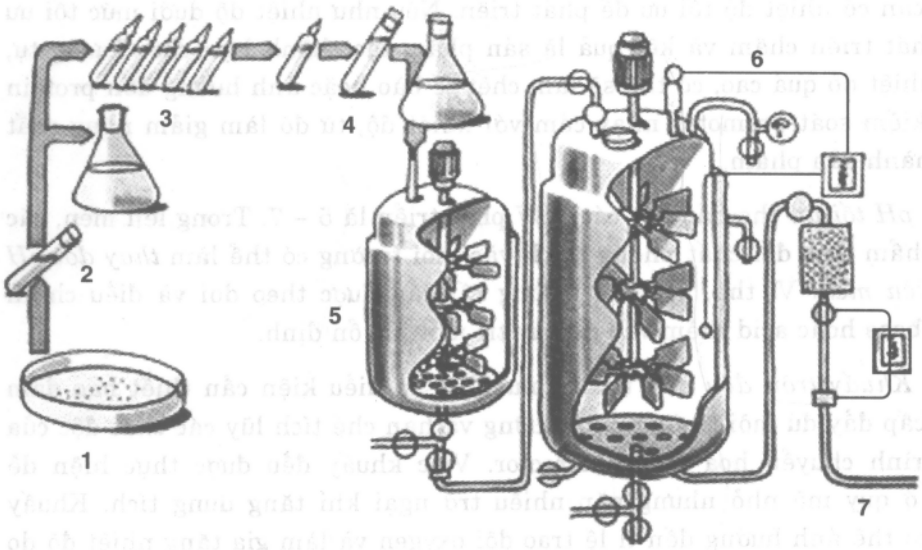


Hình 7.5. Hệ thống nhân giống trong phòng thí nghiệm với các bioreactor 10 lít – 20 lít

Trong sản xuất công nghiệp, để cung cấp đủ giống cho bồn lên men lớn cuối cùng, người ta sử dụng một chuỗi các bồn lên men. Tiến trình nhân giống thực hiện như sau : ống giống được giữ ở nhiệt độ thấp → nuôi với 10ml môi trường → nuôi 200ml → nuôi 3 lít → nuôi 30 lít → 300 lít và có thể tiếp tục đến cả chục hoặc trăm khối (hình 7.6). Quá trình nhân giống này đảm bảo tăng nhanh số lượng và chất lượng các giống VSV cần thiết. Thời gian nhân giống nhanh hay chậm phụ thuộc vào chủng VSV sử dụng.

Có 2 vấn đề lớn liên quan đến lên men với quy mô lớn công nghiệp.

– Thứ nhất là *sự ổn định* của các chủng sản xuất. Các chủng này thường phải trải qua một quá trình chọn lọc nhiều lần có sử dụng các tác nhân gây đột biến. Các chủng "siêu sản xuất" mà con người mong muốn thì các tế bào của chúng hoạt động sống không bình thường. Do vậy, trong quần thể VSV có số lượng lớn thường xuất hiện các dạng *hồi biến* (revertant) có năng suất kém hơn và làm giảm sản lượng.



Hình 7.6. Sơ đồ hệ thống nhân giống trong lên men công nghiệp

1. Nuôi VSV trong hộp Petri ; 2. Nhân giống trong ống nghiệm ;
3. Một phần có thể đông lạnh giữ giống ; 4. Có thể nhân giống từ ống đông lạnh ;
5. Nhân giống đế quy mô 10 m^3 ; 6. Bioreactor sản xuất (100 m^3) ; 7. Hệ thống kiểm soát.

– Thứ hai là *các biến đổi của những chỉ số vật lí và hoá học* khi mở rộng quy mô. Những điều kiện tối ưu cho quy mô 100 lít có thể không còn thích hợp cho các quy mô lớn hơn. Một số kĩ thuật đã được tìm ra để vượt qua các khó khăn này, tuy nó không thỏa mãn hoàn toàn như mong muốn.

2. Các thông số kĩ thuật của bioreactor

Điều cần thiết là phải theo dõi và kiểm soát các thông số nuôi cấy như *lượng oxygen hoà tan, pH, nhiệt độ và sự khuấy trộn* trong quá trình nuôi cấy. Sự thay đổi các thông số này có ảnh hưởng lớn đến quá trình tạo thành sản phẩm và ổn định hoạt tính sản phẩm.

– *Oxygen hoà tan* trong nước rất hạn chế (8,4mg/l ở 25°C) nên cần được cung cấp liên tục, thường là khí vô trùng trong quá trình nuôi cấy. Không khí được sục vào và khuấy đều trong dung tích của bioreactor. Nếu như lượng không khí cung cấp không phù hợp như sục vào quá ít thì tỉ lệ oxygen chuyển vào trong tế bào rất thấp và không đủ đáp ứng nhu cầu oxygen của chúng. Do vậy, cần có *thiết bị theo dõi lượng oxygen hoà tan* trong môi trường để cung cấp oxygen có hiệu quả vào môi trường nuôi cấy được khuấy trộn đồng nhất.

– *Nhiệt độ* cũng là một thông số vật lí cần được theo dõi và điều chỉnh. VSV cần có nhiệt độ tối ưu để phát triển. Nếu như nhiệt độ dưới mức tối ưu thì phát triển chậm và kết quả là sản phẩm tạo thành hạn chế. Tương tự, nếu nhiệt độ quá cao, có thể sẽ làm chết tế bào hoặc ảnh hưởng đến protein đích kiểm soát promoter nhạy cảm với nhiệt độ, từ đó làm giảm năng suất tạo thành sản phẩm.

– *pH tối ưu* cho hầu hết các VSV phát triển là 5 – 7. Trong lên men, các sản phẩm trao đổi chất phóng thích vào môi trường có thể làm *thay đổi pH dịch lên men*. Vì thế, pH môi trường rất cần được theo dõi và điều chỉnh bằng base hoặc acid thêm vào để duy trì một pH ổn định.

– *Khuấy trộn đều* môi trường nuôi cấy là điều kiện cần thiết bảo đảm cung cấp đầy đủ môi trường dinh dưỡng và hạn chế tích lũy các chất độc của quá trình chuyển hoá trong biorector. Việc khuấy đều được thực hiện dễ dàng ở quy mô nhỏ nhưng gặp nhiều trở ngại khi tăng dung tích. Khuấy trộn có thể ảnh hưởng đến tỉ lệ trao đổi oxygen và làm gia tăng nhiệt độ do ma sát. Sự khuấy trộn quá mức có thể gây ảnh hưởng xấu đến tế bào VSV và nhất là tế bào động vật. Do đó, cần khuấy trộn hợp lí để tránh xâm hại tế bào.

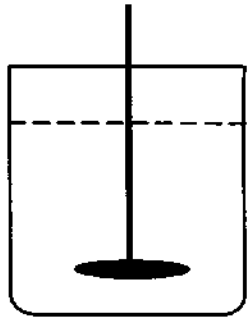
Trong quá trình thiết kế nên lưu ý đến vấn đề *bảo vệ môi trường*. Mặc dù đa số những chất do VSV tổng hợp không nguy hại cho môi trường, nhưng phải bảo đảm trong thiết kế không có sơ suất để chế phẩm thải vào môi trường. Do đó, nên xem xét trong thiết kế về tính an toàn của hệ thống và vận hành thiết bị nhằm tránh xảy ra sự cố. Hơn nữa, tất cả các chất do VSV tổng hợp cần phải được nghiên cứu và kiểm tra chặt chẽ nhằm chứng

tỏ rằng chúng vô hại trước khi đưa vào sản xuất đại trà ; và cả dịch thải ra sau nuôi cấy phải đảm bảo không tạo ra hiểm hoạ môi sinh.

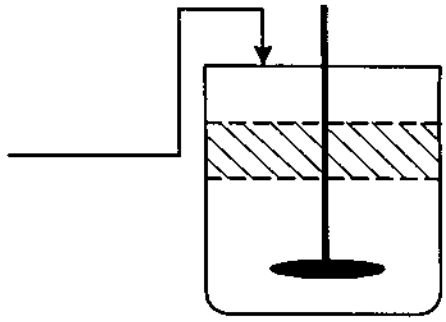
3. Các phương thức lên men

Cung cấp môi trường dinh dưỡng theo nhiều phương thức khác nhau.

– *Lên men gián đoạn hay từng mẻ* (Bath fermentation). Đây là dạng lên men được sử dụng đầu tiên khi bắt đầu có công nghiệp lên men. *Môi trường nuôi cho một lần* vào bồn lên men, cấy giống và thực hiện lên men đến thu sản phẩm (hình 7.7).



Hình 7.7. Lên men gián đoạn hay từng mẻ



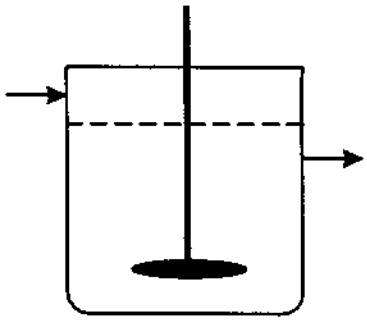
Hình 7.8. Lên men bổ sung dinh dưỡng

Ví dụ như trong sản xuất glutamic acid : Đầu tiên nhân giống, tiếp đến là sục khí, điều khiển phản ứng, thu sản phẩm glutamic acid. Xong một mẻ hay một đợt như vậy, làm lại mẻ mới.

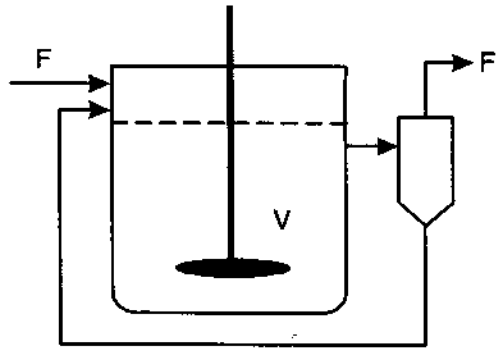
– *Lên men gián đoạn bổ sung* (fed-bath fermentation) dinh dưỡng : Khi nguồn dinh dưỡng ban đầu giảm, có thể bổ sung thêm (hình 7.8).

– *Lên men liên tục* (Continuous fermentation) : Trong quá trình lên men, nguồn dinh dưỡng đầu vào được *bổ sung liên tục* và dịch lên men (gồm các tế bào và sản phẩm tạo ra) được *lấy bớt ra liên tục* và như vậy tạo được cân bằng hợp lí (hình 7.9). Phương thức cung cấp dinh dưỡng này làm cho các điều kiện trong bioreactor luôn ở trạng thái ổn định, do đó sản phẩm tạo ra tốt hơn. Môi trường đi ra có thể để lắng tế bào rồi lấy bổ sung nó cho bioreactor (hình 7.10). Một ưu thế khác của lên men kiểu này là không phải nhân giống lại sau mỗi mẻ và *thời gian lên men có thể kéo dài hơn*. Ví dụ, lên men rượu gián đoạn diễn ra trong 5 – 7 ngày, còn lên men liên tục có thể cả tháng, thậm chí cả năm. Cùng một thể tích thì lên men liên tục cho *sản phẩm nhiều hơn* lên men gián đoạn .

Tuy nhiên, lên men liên tục không thể áp dụng cho tất cả các quy trình sản xuất ; ví dụ, không thể áp dụng cho sản xuất amino acid.



Hình 7.9. Lên men liên tục



Hình 7.10. Lên men liên tục để lắng tế bào và bổ sung

4. Điều khiển phản ứng sinh học

Mục đích cuối cùng là các tế bào phải *có hoạt tính được lựa chọn như mong muốn*. Thông thường, quá trình nuôi trải qua 2 giai đoạn đòi hỏi những điều kiện khác nhau. *Ở giai đoạn đầu* cần các điều kiện cho tế bào sinh sản nhanh, nhiều để tạo sinh khối (biomass) lớn. Ở *giai đoạn sau* các tế bào được khống chế để thực hiện tối đa các phản ứng mong muốn. Ví dụ, trong sản xuất glutamic acid, penicilline được thêm vào ở giai đoạn sau để tế bào vi khuẩn tiết ra nhiều sản phẩm hơn.

5. Thu sản phẩm và tinh chế

Thu sản phẩm là công việc tốn kém. Chi phí cho công đoạn này chiếm tới 50% giá thành sản phẩm hoặc cao hơn. *Các kĩ thuật của công nghệ hoá học, công nghệ thực phẩm* được sử dụng chủ yếu ở bước này. Khó khăn lớn đầu tiên của công đoạn này là *tách nước* của tế bào ra khỏi sản phẩm. Tiếp theo, từ dịch lên men *thu đúng sản phẩm mong muốn.*

Tất cả các bước liên quan chặt chẽ với nhau, nhưng *các bước đầu đa dạng, biến hoá và khó kiểm soát*, vì tế bào rất nhạy với những thay đổi của ngoại cảnh dù rất nhỏ. Một đặc điểm của sản xuất CNSH là *dễ dao động*, thậm chí thay đổi của thời tiết có thể ảnh hưởng đến kết quả cuối cùng. Các kĩ thuật mới nhằm *tự động điều khiển* các thông số kĩ thuật, góp phần đáng kể trong *ổn định sản* xuất.

VI. QUY TRÌNH SẢN XUẤT CITRIC ACID

Quá trình sản xuất citric acid thương phẩm sẽ cho chúng ta hình dung rõ hơn về công nghệ lên men. Citric acid là acid hữu cơ chính *xếp thứ hai* trong các sản phẩm của *công nghiệp lên men*, chỉ sau ethanol công nghiệp. Sản lượng trên thế giới ước tính khoảng 700000 tấn/năm.

1. Các đặc điểm của lên men citric acid

– *Chủng giống : Aspergillus niger* là nấm sợi tạo nhiều bào tử màu đen, thích nghi *pH thấp* (2,5 – 3,5) và nhu cầu tiêu thụ oxygen cao. Bào tử được sử dụng trong nhân giống. Đa số các chủng sản xuất cho sản lượng đạt trên 90% so với lượng glucose trong nguyên liệu ban đầu.

– *Môi trường nuôi* tính theo g/lit gồm : sucrose (125 – 150) ; nguồn N là NH_4NO_3 (2,0 – 2,5), KH_2PO_4 (0,75), $MgSO_4.7H_2O$ (0,20 – 0,25) và HCl bổ sung đến pH = 3,4 – 3,5 ; nguồn glucose thường dùng là rỉ đường, nếu được xử lí ferrocyanide kali (FCN = $K_4Fe(CN)_6$) thì năng suất cao hơn.

2. Quy trình công nghệ

Quy trình lên men citric acid trong công nghiệp được nêu khái quát trên hình 7.11 và gồm các bước sau :

– *Lên men bề mặt* trên các khay nhôm được thực hiện trong một thời gian dài ở các nhà máy. Các bào tử mọc thành màng dày trên bề mặt môi trường tiếp xúc trực tiếp với oxygen của không khí. Kiểu lên men này chiếm nhiều diện tích và bẩn do nhiều bào tử trên bề mặt.

– *Lên men chìm* được ứng dụng chậm hơn và hiện nay là chủ yếu.

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

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

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

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

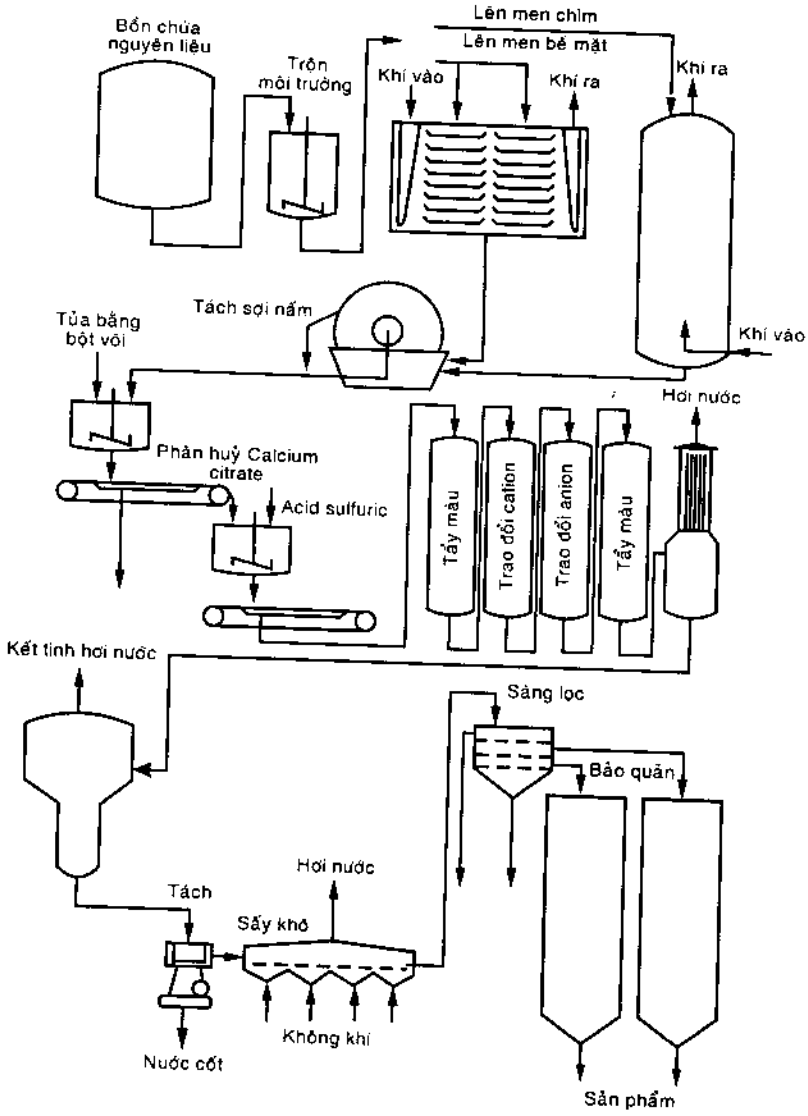
– *Kết tinh :* Dịch tinh sạch đưa vào thiết bị cho bốc hơi và kết tinh.

– *Li tâm tách nước cốt* để thu tinh thể.

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

– *Bảo quản thương phẩm.*

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



Hình 7.11. Quy trình lên men citric acid trong công nghiệp

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các VSV có nhiều ưu điểm thuận tiện cho nuôi quy mô lớn công nghiệp trong bioreactor (có thể đạt tới một triệu lít). Quá trình lên men công nghiệp gồm 3 công đoạn chủ yếu : *trước lên men, lên men* và *sau lên men*. Để thực hiện tốt sự lên men cần biết rõ về *tỉ lượng tế bào, phản ứng tăng trưởng* và *động học* của sự tăng trưởng tế bào trong dịch lên men. Đây là cơ sở để pha chế môi trường nuôi thích hợp từ nguồn nguyên liệu ban đầu giá thấp. Sản xuất lớn cần hệ thống *thiết bị* tương ứng với các công đoạn của quy trình công nghệ. *Bioreactor* là thiết bị trung tâm có cấu tạo thích hợp để đảm bảo tốt các điều kiện cho sự phát triển của giống sản xuất, bao gồm *cung cấp oxy, giữ pH và nhiệt độ* ổn định.

Quá trình sản xuất bắt đầu từ *trước lên men* : phối trộn nguyên liệu và khử trùng. Sự *lên men* bắt đầu từ khâu nhân giống, gia tăng số tế bào đạt cực đại và điều khiển phản ứng tế bào để tạo sản phẩm tối đa. Quá trình *sau lên men* tốn kém bắt đầu từ tách tế bào, nếu là sản phẩm nội bào phải phá vỡ tế bào, thu sản phẩm, xử lí tạo thương phẩm và bảo quản.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Sự lên men công nghiệp là gì ?

2. Lên men công nghiệp gồm những công đoạn chủ yếu nào ?

3. Các VSV có những ưu điểm gì trong lên men công nghiệp ?

4. Vì sao cần biết rõ về *tỉ lượng tế bào, phản ứng tăng trưởng* và *động học* của sự tăng trưởng tế bào ?

5. Nêu các nguồn cơ chất chủ yếu dùng trong môi trường nuôi các VSV.

6. Nêu các thiết bị chủ yếu trong công nghiệp lên men.

7. Bioreactor có cấu tạo như thế nào ?

8. Trong công nghiệp lên men, cung cấp oxygen có đặc điểm gì ?

9. Có các kiểu lên men nào ?

10. Trong lên men chìm, có những phương thức cung cấp dinh dưỡng gì ?

11. Lên men liên tục có những ưu điểm gì ?

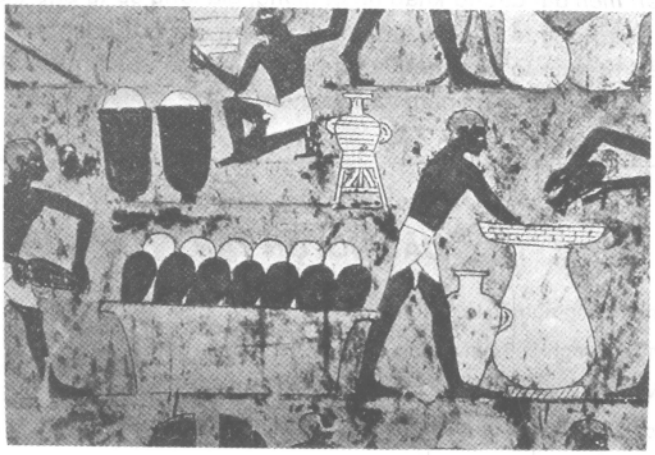
12. Hãy kể về quá trình sau lên men trong sản xuất citric acid.

CHƯƠNG 8

CÁC SẢN PHẨM CỦA CÔNG NGHỆ LÊN MEN

CNSH vi sinh vật có *lịch sử lâu đời* (hình 8.1), nhiều quy trình được đưa vào sản xuất công nghiệp từ cuối thế kỉ XIX, đầu thế kỉ XX. Những *sản phẩm phong phú* và *đa dạng của công nghệ lên men* (CNLM) được ứng dụng rộng rãi vào các lĩnh vực kinh tế xã hội khác nhau và không ít sản phẩm lên men cổ truyền thể hiện nét độc đáo của văn hoá các dân tộc.

Ngày nay, khi mà ngành *công nghiệp hoá dầu* bộc lộ nhiều nhược điểm thì việc phát triển những sản phẩm sẵn có và tìm công nghệ mới được hướng vào CNSH vi sinh vật.



Hình 8.1. Bức tranh mô tả cảnh làm bia và bánh mì
(từ ngôi mộ cổ Ai Cập có niên đại 4000 năm trước Công nguyên)

I. TỔNG QUAN VỀ CÁC SẢN PHẨM CỦA CÔNG NGHỆ LÊN MEN

1. Các nhóm sản phẩm căn bản

a) Sinh khối vi sinh vật : Gồm giống ban đầu cho sản xuất, nấm men bánh mì và men chăn nuôi, vaccine, protein đơn bào, phân vi sinh, chế phẩm diệt côn trùng, probiotic.

b) Enzyme vi sinh vật : Phổ biến hiện nay là α-amylase, β-glucanase, amyloglycosidase, glucose isomerase, glucose oxidase, cellulase, hemicellulase, pectinase, invertase, protease, lactase, lipase, streptokinase...

c) Các sản phẩm trao đổi chất : Gồm các sản phẩm sơ cấp và thứ cấp. Sản phẩm sơ cấp gồm rượu bia, amino acid, acid hữu cơ, nucleotide, vitamin,...

Sản phẩm thứ cấp gồm thuốc kháng sinh, lipid VSV, sidephore, các chất tăng trưởng và chất có hoạt tính sinh học.

d) Sản phẩm tái tổ hợp gen : Các r-protein và các sản phẩm khác được tạo ra nhờ các tế bào vi sinh vật chuyển gen.

e) Sản phẩm của chuyển hoá sinh học gồm các steroid, vitamin C, acrylamide,... được sản xuất bằng tế bào VSV hoặc enzyme.

f) Các biopolymer và biosurfactant : Các polysacchride ngoại bào như xanthan, gellan, alginat vi sinh, celluose vi khuẩn,... và các chất hoạt động bề mặt (biosurfactant) được sản xuất bằng CNLM.

2. Doanh số các sản phẩm chủ yếu

Bảng 8.1. Doanh số các sản phẩm của công nghệ VSV tính vào năm 1981, trước khi sản phẩm đầu tiên của CN gen bán ra thị trường.

TT	*Sản phẩm*	*Doanh số (triệu USD)*
1.	Nước giải khát (rượu, bia,...)	36800 (36,8 tỉ)
2.	Phomat (Fromage, Cheese)	23800 (23,8 tỉ)
3.	Kháng sinh	7900 (7,9 tỉ)
4.	Cồn công nghiệp (năm 1983)	3625 (3,625 tỉ)
5.	Sirop giàu fructose	1360 (1,365 tỉ)
6.	Amino acid	1275 (1,275 tỉ)
7.	Nấm men bánh mì	920
8.	Các steroid	850
9.	Các vitamin	560
10.	Citric acid	360
11.	Các enzyme	340
12.	Các loại vaccine	255
13.	Nhựa dẻo polysaccharide (Polysaccharide gums)	100

II. SẢN XUẤT SINH KHỐI VI SINH VẬT

1. Giống ban đầu cho các quy trình lên men vi sinh vật

Tất cả các quy trình lên men VSV đều cần giống ban đầu (starter culture), tức phải có đủ số lượng tế bào cần thiết cho thực hiện phản ứng sinh học trong lên men. Khâu này phải đảm bảo 2 điều kiện :

– Đủ số lượng tế bào cần thiết.

– Các tế bào có số lượng lớn nhưng hoạt tính không thay đổi.

Trong đa số quy trình, các tế bào sinh sản tốt trong điều kiện thổi khí đủ. Tuy nhiên, trong một số trường hợp tế bào lên men yếm khí, nếu thổi khí mạnh tế bào sinh sản nhanh có thể sản phẩm kém chất lượng. Ví dụ, trong làm bia nếu thổi khí mạnh cho tế bào sinh sản nhanh ở giai đoạn đầu thì hương vị bia có thể giảm.

2. Sản xuất men bánh mì

Ngay từ năm 1858, Pasteur phát hiện sự tăng nhanh sinh khối tế bào nấm men khi *sục khí mạnh*, nhưng mãi đến năm 1919 quy trình sản xuất men bánh mì mới ra đời. Men bánh mì thực chất là sinh khối tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* được nuôi trong môi trường giàu đường (mật rỉ đường) có bổ sung phosphore và ammonium như DAP (diammonium phosphate), urea,.....

Tế bào nấm men có 3 vai trò trong sản xuất bánh mì : làm nở bột mì nhão do lên men rượu sinh ra khí CO_2, các bọt khí làm xốp bánh và góp phần tạo hương. Men bánh mì được bán ra ở dạng sấy khô hay tươi, được ép thành bánh (paste). Nhu cầu tiêu thụ trên thế giới rất lớn (bảng 8.1).

3. Phân vi sinh (Microbial Fertilizer)

Sinh khối tế bào VSV dùng trong phân vi sinh ở nhiều dạng :

– Phân vi khuẩn *Rhizobium* : Đây là vi khuẩn cố định đạm cộng sinh với rễ cây (có trong nốt sần của cây họ Đậu). Loại phân này làm tăng năng suất cây họ Đậu, hiệu quả rõ nhất ở đất lần đầu tiên trồng đậu. Ngoài *Rhizobium* cộng sinh, người ta còn sử dụng các vi khuẩn cố định đạm dạng tự do như *Azospirillum* ở rễ cây lúa.

– *Phân vi sinh hỗn hợp* gồm nhiều tác dụng như phân hủy phức hợp lignocellulose, cố định đạm không khí, làm tan các hợp chất phosphore để cây trồng dễ hấp thu,... Đây là loại phân phổ biến hiện nay, chúng có tác dụng làm tăng năng suất cây trồng, làm tốt đất và không gây ô nhiễm nên được khuyến khích sử dụng. Thường mật độ tế bào sống phải đạt tối thiểu

10^9/1gr phân. Cơ chất thường dùng để trộn là than bùn, mà khi bị phân hủy nó sẽ phóng thích các chất tăng trưởng thực vật.

4. Chế phẩm diệt côn trùng (Insecticides)

Các hoá chất diệt côn trùng (pesticide) gây những hậu quả bất lợi cho môi trường và tạo ra các dạng đề kháng. Có nhiều vi khuẩn và virus gây bệnh và diệt côn trùng. 3 loài vi khuẩn hiện được dùng làm chế phẩm diệt côn trùng là *Bacillus thuringiensis* (BT), *B. sphaericus* và *B. popilliae*. *Vi khuẩn BT* có thể nuôi trong bioreactor dễ dàng và nó tạo bào tử chứa *protein tinh thể nội độc tố* (δ-endotoxin) *diệt côn trùng*. Độc tố δ-endotoxin có thể chiếm đến 30% khối lượng khô của các tế bào tạo bào tử. Khi côn trùng ăn tế bào BT vào, *δ-endotoxin* sẽ thành *độc tố có hoạt tính gắn lên màng tế bào*, phá hỏng tính thấm ion và gây chết. Nhiều chủng *B. thuringiensis* tạo độc tố có hoạt tính diệt các loài *Lepidoptera* (bướm và bướm đêm), *Diptera* (ruồi, muỗi mắt (midges) và muỗi) hay *Coleoptera* (bọ cánh cứng).

Chế phẩm BT ít gây ô nhiễm, nhưng tế bào BT phải tạo độc tố ổn định. Một vấn đề không kém phần quan trọng là *chất bám dính*. Chất bám dính tốt giúp cho vi khuẩn khi được phun sẽ dính vào lá, không dễ trôi khi mưa hoặc tưới nước và không có mùi làm côn trùng tránh ăn. Hiện nay, *gen BT* đã được đưa vào hàng loạt cây trồng biến đổi gen kháng côn trùng.

Nhiều virus gây bệnh cho côn trùng đã được phát hiện. Hơn 100 loài côn trùng khác nhau nhạy cảm với *Baculovirus*, là tác nhân sinh học diệt côn trùng đầy hứa hẹn vì *chúng không có mối liên hệ sinh học* với bất kì động vật có xương sống và thực vật nào, lại có vật chủ hạn chế (vài loại côn trùng) và không gây hại cho các côn trùng khác và động vật có xương sống.

Công nghệ gen đã tạo ra *vi khuẩn diệt côn trùng thế hệ mới, chỉ diệt côn trùng có hại* mà hoàn toàn không ảnh hưởng đến người. Chủng được tạo ra theo nguyên tắc : tác động vào *thụ thể ecdison* (hormone lột xác chỉ riêng của côn trùng nên không ảnh hưởng tới người) và chọn thụ thể ecdison đặc hiệu cho loài có hại để tác động.

5. Probiotic (Chế phẩm trợ sinh)

Probiotic, hay còn gọi là *chế phẩm trợ sinh*, chứa các VSV sống (vô hại hoặc có lợi) có tác dụng làm cải thiện cân bằng VSV trên cơ thể vật chủ. Probiotic tác dụng theo 4 cơ chế chủ yếu : 1) Trung hoà độc tố ; 2) Cạnh tranh với mầm bệnh ; 3) Thay đổi chuyển hoá của VSV ; 4) Kích thích tính miễn dịch của chủ thể.

Bacillus subtilis được dùng từ lâu như *probiotic*. *B. subtilis* được sử dụng qua đường uống để phòng và chữa các rối loạn tiêu hoá sau khi dùng kháng sinh, mà nhiều trường hợp dẫn đến tiêu chảy. *B. subtilis* có tác dụng hồi phục hệ vi sinh vật tự nhiên trong ống tiêu hoá của người sau khi dùng kháng sinh kéo dài hoặc bị bệnh. Các chế phẩm *B. subtilis* được bán ở hầu hết các nước châu Âu, mặc dù người ta còn biết ít về cơ chế tác dụng của chúng. Bào tử của *B. subtilis* có thể qua được rào chắn đường tiêu hoá, một phần bào tử nảy mầm trong ruột non và sinh sôi trong đường ruột. Ngoài ra, một số tác dụng lâm sàng của *B. subtilis* đã được biết như làm *tác nhân kích thích miễn dịch* trong một số bệnh.

Nhiều chế phẩm Probiotic *B. subtilis* hiện có trên thị trường với nhiều tên gọi khác nhau được sản xuất ở trong nước như *Biosubtyl* (Công ti Sinh phẩm Y học Biopharco – Đà Lạt)) và *Subtyl* (XNDPTW 24).

Một số chế phẩm sử dụng nấm men (*Saccharomyces boulardii*) như Biolactine,...

Nhiều loại chế phẩm Probiotic sản xuất trong và ngoài nước được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản (tôm, cá tra) để hạn chế dịch bệnh.

III. CÔNG NGHIỆP VACCINE

Ở các nước đang phát triển, bệnh truyền nhiễm vẫn chiếm 30 – 50 % các trường hợp tử vong. *Các vaccine* là công cụ quan trọng và *có hiệu quả nhất* để chống lại chúng.

Tầm quan trọng của vaccine còn do chi phí tiêm chủng ít tốn kém hơn nhiều so với điều trị người đã bị bệnh và do có khả năng phòng ngừa cho số đông người trên diện rộng ở những vùng xa. Ngoài ra, nhờ tính *hiệu quả cao* của chủng ngừa vaccine có hệ thống, một số bệnh truyền nhiễm đã bị loại bỏ hoàn toàn như bệnh đậu mùa. Cuối cùng, các vaccine còn đóng vai trò quan trọng trong *thú y*.

1. Các loại vaccine

a) Vaccine cổ điển

– *Vaccine vi khuẩn chết :* Ho gà, Sốt thương hàn.

– *Độc tố vi khuẩn bất hoạt :* Bạch hầu, Uốn ván.

– *Vaccine virus sống :* Bại liệt, Quai bị, Sởi, Rubella, Sốt vàng da.

– *Vaccine virus bất hoạt :* Cúm.

b) Vaccine công nghệ gen

– *Vaccine tái tổ hợp :* Viêm gan B.

2. Vaccine cổ điển

Các vaccine hữu hiệu có thể được làm theo cách *cổ điển* và hiện chúng vẫn còn được dùng để phòng ngừa nhiều bệnh.

a) Có 2 loại vaccine cổ điển

– *Vaccine sống* chứa các chủng vi khuẩn hay virus bị làm yếu. Nó được sản xuất từ sinh khối vi khuẩn và sau đó xử lí bằng nhiệt, bằng muối nồng độ cao hoặc formalin để tế bào yếu đi và có thể chết, khi tiêm nó vào cơ thể sẽ kích thích tạo kháng thể. Những chủng yếu như vậy phần lớn nhận được qua các quá trình làm hoàn toàn theo kinh nghiệm.

– *Vaccine chết* gồm hoặc là những tế bào nguyên vẹn của vi khuẩn bị làm chết hoặc là các protein độc tố bị bất hoạt (được gọi là các giải độc tố – toxoid).

b) Những vấn đề của vaccine cổ điển

– Trước hết là mối nguy hiểm của việc *phục hồi tình trạng gây bệnh*. Các chủng đột biến với những biến đổi ít có thể phục hồi dần theo thời gian. Vào khoảng giữa những năm 1973 – 1984, việc sử dụng vaccine Sabin tạo ra sự cố chừng 1 ca bại liệt cho mỗi 520000 liều uống lần đầu.

– Nguy hiểm khác là các virus dùng trong vaccine cổ điển phải cho phát triển trên các tế bào nuôi cấy có thể đã nhiễm sẵn các virus khác. Đã từng phát hiện một dòng tế bào sản xuất vaccine polio có chứa một virus tạo khối u trên súc vật thí nghiệm.

– Một hạn chế khác là ngay cả các tác nhân gây bệnh bị làm yếu cũng có thể gây bệnh cho người có hệ miễn dịch suy yếu.

– Rắc rối chính của loại *vaccine cổ điển chết* là chúng có khả năng gây những phản ứng phụ trầm trọng. Ví dụ, vaccine thương hàn, ho gà và vài vaccine khác chứa các tế bào nguyên vẹn, màng ngoài của chúng chứa lipopolysaccharide (LPS). LPS cũng còn gọi là nội độc tố (endotoxin).

– Có khả năng các VSV hay các độc tố trong vaccine chưa bị diệt hay bất hoạt hoàn toàn và có thể gây hại cho người.

3. Vaccine công nghệ gen

Sự phát triển *công nghệ gen* đã tạo khả năng sản xuất các loại *vaccine mới, vaccine công nghệ gen*. Một số nhằm vào những mục tiêu mới, một số khác chỉ đơn giản là làm cho vaccine cổ điển hiệu quả hơn và ít gây phản ứng phụ.

Vaccine cổ điển là những sản phẩm của tác nhân gây bệnh, hoặc là VSV sống hoặc là chất tiết của chúng. Ngược lại, vaccine mới được sản xuất bởi những vi sinh vật an toàn, không gây bệnh như *E. coli* hay nấm men và có thể sản xuất chúng cả khi tác nhân gây bệnh không thể nuôi cấy.

Do các vaccine mới chỉ chứa một phần nhỏ của tác nhân gây bệnh ban đầu nên chúng thường được gọi là các *r-vaccine tái tổ hợp* (recombinant vaccine) hay *subunits vaccine*. r-vaccine viêm gan B đang được dùng rộng rãi cho người, vài loại vaccine khác đang thử nghiệm.

Virus viêm gan B có thể lây qua các kim tiêm bị nhiễm và qua tiếp xúc giới tính. Ước tính có khoảng 300000 người Mĩ bị nhiễm mỗi năm, 20000 người mang virus, 1/5 số người mang virus bị chết vì xơ gan và 1/20 số người mang virus bị chết vì ung thư gan. Virus không phát triển trên tế bào nuôi cấy, nó chỉ có thể lây từ huyết tương của người mang virus. Vaccine được sản xuất hoặc bằng cách tinh chế kháng nguyên bề mặt virus hoặc bởi các virus sống bị bất hoạt bằng xử lí hóa chất (ví dụ với formaldehide).

r-HBvax (Vaccine viêm gan B tái tổ hợp) là loại vaccine được sản xuất ở Công ti Vắcxin và chế phẩm sinh học I Hà Nội. r-HBvax là một loại vaccine virus tiểu đơn vị tái tổ hợp, bất hoạt, không gây nhiễm. Đây là một sản phẩm dạng nước, màu hơi trắng đục, được sản xuất bằng cách nuôi cấy tế bào nấm men có mang gen mã hoá sinh tổng hợp HbsAg, sau đó được tinh chế và bất hoạt bằng kĩ thuật hoá lí như siêu li tâm, sắc kí cột và xử lí với formalin.

Kháng nguyên bề mặt hay *glycoprotein bề mặt của virus* được biết là một *vaccine hiệu quả*. Vì vậy, bước đầu tiên trong sản xuất vaccine tái tổ hợp là dòng hoá gen mã hoá cho protein này từ bộ gen virus. Bộ gen của virus viêm gan B gồm sợi DNA kép, một phần mã hoá cho một protein lõi S.

Các *r-vaccine* nếu hiệu quả sẽ có nhiều thuận lợi hơn so với vaccine cổ điển. Chúng có thể được sản xuất dễ dàng, an toàn và không đắt, tránh được tác động phụ của tác nhân bệnh. Thuận lợi khác là hoàn toàn không thể có một tác nhân gây bệnh sống hiện diện trong r-vaccine. Tuy nhiên, r-vaccine vẫn còn đầy rẫy những vấn đề kĩ thuật như gen có thể có mức độ biểu hiện thấp và *sự ngắn ngủi của phản ứng miễn dịch tạo bởi nhiều vaccine tái tổ hợp.*

4. Vaccine tả uống

Quy trình sản xuất *vaccine tả uống* giúp hình dung rõ hơn về công nghệ sản xuất vaccine.

Vaccine tả điều chế từ các chủng vi khuẩn tả, thuộc típ sinh học cổ điển, El Tor và chủng mới là O.139. Là vaccine toàn thân vi khuẩn đã được bất hoạt bởi formalin hoặc nhiệt độ. Vaccine này có chứa *kháng nguyên đồng điều hoà độc tố* (TCP).

Một liều vaccine 1,5ml gồm các thành phần :

– 25 tỉ vi khuẩn Cairo 50, típ sinh học cổ điển, típ huyết thanh Ogawa.

– 25 tỉ vi khuẩn 569B, típ sinh học cổ điển, típ huyết thanh Inaba.

– 50 tỉ vi khuẩn Phil 6973, típ sinh học El Tor, típ huyết thanh Inaba.

– 50 tỉ vi khuẩn O.139, típ sinh học mới.

Quy trình sản xuất vaccine tả uống gồm các bước :

– Bước 1 : Chủng sản xuất (Đơn chủng tả, gồm 4 chủng).

– Bước 2 : Nhân chủng lần I và lần II trên thạch máu.

– Bước 3 : Nhân chủng lần III trên nồi lên men 50 lít.

– Bước 4 : Nuôi chủng thu sinh khối (trên nồi lên men 200 và 300 lít).

– Bước 5 : Bất hoạt chủng bằng formalin hoặc nhiệt độ.

– Bước 6 : Thu cặn đơn chủng bằng lọc tiếp tuyến hoặc li tâm lạnh.

– Bước 7 : Pha vaccine thành phẩm (Hỗn hợp 4 chủng theo công thức).

– Bước 8 : Đóng ống.

– Bước 9 : Đóng hộp, dán nhãn.

IV. PROTEIN ĐƠN BÀO (SCP)

Sinh khối vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, vi tảo có nhiều protein nên gọi là *protein đơn bào* (Single cell protein – SCP). Do lịch sử, khái niệm *protein đơn bào* hiểu theo 2 nghĩa khác thường :

– Gồm cả *sinh khối của tế bào* với nhiều chất chứ không chỉ protein.

– Không chỉ sinh vật đơn bào, mà có thể là nấm sợi *đa bào*.

Sau cuộc *Cách mạng xanh* vào những năm của thập niên 1960, nạn đói protein vẫn chưa khắc phục được. Con người tính đến nguồn protein từ VSV do chúng đa dạng, lại có tốc độ sinh sản nhanh.

Sinh khối của tế bào VSV luôn có *hàm lượng protein cao. Năng suất* tạo protein của các VSV cao hơn nhiều so với chăn nuôi nhờ tốc độ sinh sản nhanh. Hơn nữa, các VSV có thể tạo SCP từ các *nguyên liệu rẻ tiền*, thậm chí từ nhiều *phụ phế liệu* công, nông, lâm nghiệp.

1. SCP từ nguồn carbohydrate

Thực ra, việc sử dụng VSV làm nguồn thực phẩm đã được Đức thực hiện với nấm men *Torula* trong Thế chiến I. Đến 1930, bắt đầu ứng dụng VSV để tạo nguồn thực phẩm và trong Thế chiến II đạt 15000 tấn. Để nhân sinh khối, các loài *Torula* và *Candida* cho hiệu quả tốt hơn. Năm 1967, tập đoàn BP (British Petroleum) đã thông báo về kết quả sản xuất SCP nhờ lên men công nghiệp bằng nấm men từ parafin dầu mỏ, n-alkane. Đến năm 1973, các kết quả tốt hơn được thông báo. Protein nấm men có tên thương mại là Toprina từ dầu mỏ. Do đó có lúc người ta nói đến "biptết từ dầu mỏ". Tương tự, ở Ý và Nhật đã sản xuất SCP từ n-paraffin với công xuất 100000 – 200000 tấn/năm.

Ngoài ra, vi khuẩn *Methylophilus methylotrophus* sử dụng *methanol*, một phụ phẩm dồi dào của công nghiệp dầu mỏ, để *tạo SCP* và đã đạt 100000 tấn/năm.

Trong thập niên 1980, Liên xô là nước sản xuất SCP lớn nhất, đã đạt 1 triệu tấn protein nấm men từ nguyên liệu gỗ thủy giải với 90 cơ sở sản xuất trong 1 năm.

Những protein này là tế bào nấm men, tế bào vi khuẩn nên chất lượng tốt. Nhưng cho đến nay, SCP chủ yếu vẫn chỉ được làm *thức ăn gia súc*. Trong những thập niên sau này, sản xuất SCP đã dừng do phải tốn nhiều năng lượng sục khí trong khi giá dầu mỏ tăng cao.

Do vậy, cho đến nay, chỉ có sản phẩm *protein từ nấm* (mycoprotein) được sản xuất theo công nghệ của Công ti Ranks Hovis McDougall (Anh), là protein vi sinh vật duy nhất được công nhận sử dụng làm thực phẩm cho cả người và gia súc. *Mycoprotein* là dạng thực phẩm chứa sợi nấm *Fusarium graminearum*. Hiện nay *mycoprotein thương phẩm* được bán rộng rãi ở Anh có thành phần : protein – 47%, mỡ – 14%, chất xơ – 25%, carbohydrate – 10%, tro – 3% và RNA – 1% khối lượng khô.

2. Vi tảo và Cyanobacteria

Vi tảo *Chlorella* được dùng sản xuất sinh khối vào những năm 1960 và sau đó được đưa lên vũ trụ. Nhưng *Chlorella* có *vỏ tế bào dày* không tiêu được nên sử dụng trong chăn nuôi không thích hợp, nhưng vẫn dùng bổ sung trong thức ăn cho người (như "sữa xanh") có tác dụng *tăng lực*. *Scenedesmus* sinh sản nhanh nhưng ít được sử dụng.

Hiện nay, các nhà khoa học đang đặt hi vọng vào vi khuẩn lam *Spirulina*, thuộc *Cyanobacteria*. Ở Mexico, *Spirulina* được nuôi trong hồ có

pH = 11 ; ở nước Cộng hoà Chad người ta vớt những vi khuẩn lam này đem bán để dùng làm thực phẩm cho người. Nó đã được dùng ăn từ lâu đời nên không sợ độc tố ; hàm lượng protein rất cao (65%) và có nhiều amino acid có giá trị ; vách tế bào mềm, dạng tảo sợi dài nên dễ thu sinh khối. Tảo dễ nuôi trong môi trường kiềm nhưng phải dùng hoá chất (như $NaHCO_3$) để giữ pH cao.

V. CÔNG NGHIỆP RƯỢU BIA VÀ CỒN NHIÊN LIỆU

Đây là lĩnh vực CNSH chiếm *tỉ lệ và doanh số lớn nhất*. Sản xuất có thể ở quy mô công nghiệp lớn và ở gia đình. Nhiều sản phẩm nổi tiếng gắn liền với tên các dân tộc hay địa phương như rượu Champagne, Cognac, Bordeaux (Pháp), Vodka (Nga), Saké (Nhật Bản).

Ngoài ra, *ethanol nhiên liệu là vấn đề nổi cộm* được tập trung nghiên cứu và tăng nhanh quy mô sản xuất để trước mắt giải quyết *nhu cầu cấp thiết* khi giá xăng dầu lên cao và về lâu dài sẽ *thay thế nguồn năng lượng cố sinh cạn kiệt*.

1. Lên men rượu

Lên men các đường thành rượu được thực hiện bởi *nhiều loại nấm men*, chủ yếu là các loài *Saccharomyces* và một số vi khuẩn.

Nguyên liệu làm rượu có thể chia thành 3 nhóm :

– Các cơ chất *giàu đường* như rỉ đường, nước mía, củ cải đường, nước trái cây chín,... Sự lên men rượu xảy ra trực tiếp từ loại nguyên liệu này và không cần xử lí.

– *Tinh bột* từ các loại ngũ cốc như lúa mì, gạo, ngô,... và các loại củ như khoai tây, sắn,... Ngũ cốc là nguồn nguyên liệu lớn từ trồng trọt, nhưng trước khi lên men phải được *thủy giải thành đường*, rồi mới lên men đường thành rượu.

– *Phức hợp lignocellulose* từ gỗ, phế thải nông, lâm nghiệp, giấy in báo,... Đây là nguồn nguyên liệu dồi dào nhất trên Trái đất từ sinh khối thực vật, nhưng việc xử lí phân cắt cellulose thành glucose khó khăn và tốn kém hơn nhiều.

Sản phẩm rượu có thể dùng ở dạng *không chưng cất* hay *chưng cất*.

2. Các loại rượu bia chủ yếu

Bảng 8.2. Một số loại rượu bia chủ yếu

Loại	*Nguồn nguyên liệu*
1. Không chưng cất :	
– Bia	Malt (mầm lúa đại mạch).
– Cider (cidre)	Nước ép trái táo
– Vang (vin, wine)	Nho
– Sakê (saké)	Gạo loại đặc biệt
– Rượu cần	Gạo, nếp, bắp, khoai mì,...
– Rượu nếp than	Nếp than .
2. Chưng cất :	
- Rượu đế (Vodka)	Gạo, nếp, khoai tây, khoai mì, bắp,...
- Rượu Whisky	Bắp, lúa đại mạch
- Rượu Rhum	Mật rỉ đường
- Cognac	Nho

Rượu không chưng cất ra đời sớm hơn nhiều so với *rượu chưng cất.*

a) Bia có thể hiểu đơn giản là thức uống có độ rượu thấp, sủi bọt mạnh, được tạo ra từ *lên men rượu* trên dịch malt (hạt đại mạch nẩy mầm) với hoa houblon (hops). Về nguyên lí, bia tạo ra do lên men rượu nên các ngũ cốc khác đều có thể dùng làm bia, nhưng không sánh được với malt.

Quá trình lên men bia trong bồn yếm khí gồm 2 giai đoạn : lên men và ủ chín bia.

– *Lên men nổi* lúc đầu khi nồng độ đường cao chủ yếu do *Saccharomyces cerevisiae* sinh ra nhiều khí CO_2 làm sủi bọt nổi phía trên và *lên men chìm* do *S. carlsbergensis* ở dưới đáy bồn. Ngày nay, chỉ sử dụng *S. carlsbergensis* là giống có vai trò quyết định chất lượng bia. Sự lên men diễn ra ở nhiệt độ $20^{o}C$ trong 5 – 7 ngày.

– *Ủ chín bia* kéo dài ít nhất 4 – 5 tuần đủ để hình thành hương vị đặc trưng và giảm thiểu hình thành các chất bất lợi như chất tạo mùi khắm.

Hoa houblon tạo vị đắng đặc trưng và có vai trò ức chế vi khuẩn trong lên men.

b) Rượu cần (tube wine) là loại không chưng cất và có *lịch sử lâu đời, từ chế độ Mẫu hệ* (người phụ nữ là chủ gia đình trực tiếp làm rượu). Nguyên liệu ban đầu là bột từ gạo tẻ, gạo nếp, ngô (bắp), sắn (khoai mì),... được nấu

chín không nhão. *Về giống* thì trước đây *dùng rễ cây* có hoạt tính ức chế vi khuẩn để các loài mốc phân hủy bột thành đường và nấm men tự nhiên chuyển hoá đường thành rượu. Ngày nay, sản xuất hầu như từ *bánh men rượu* có đồng thời nấm mốc và nấm men nên đạt kết quả tốt hơn.

Rượu được làm trong ché nên còn gọi *rượu ché*. Nguyên liệu bột nấu chín *trộn với bột bánh men rượu* và trộn với *trấu* hoặc xếp giữa lớp trấu dằn đáy (dày 10cm) và lớp phủ trên (10cm). Phía trên cùng nhét lá tươi (lá mít, lá ổi,...) đến miệng ché để giữ hỗn hợp lên men không trồi lên (có thể dùng nẹp tre dưới lớp lá) và bịt ché bằng nắp tro tẩm nước, bằng lá chuối hoặc nilon.

Cách uống rượu cần : Tên gọi của rượu bắt nguồn từ *ống hút dài* gọi là *cần*, làm bằng đoạn cây mây (hoặc trúc) tròn cỡ ngón tay người, dài 1,5 – 2,0m, có dùi lỗ thông suốt bên trong từ đầu trên kề miệng để hút rượu lên uống đến đầu dưới cắm xuống tận đáy ché nơi rượu tụ xuống. Trước khi uống lấy lá cũ đã khô ra, nhét lá mới vào và đổ nước đầy đến miệng ché. Khi uống hút rượu lên thì mực nước trên mặt hạ xuống sẽ biết được rượu đã uống đi bao nhiêu và nước bổ sung từng li (cốc) phía trên theo chuẩn mỗi người uống, nếu nước tràn là uống chưa đủ lượng.

c) Rượu sakê (saké) là loại *rượu không chưng cất truyền thống của dân tộc Nhật Bản*. Nó có nhiều đặc điểm thú vị :

– Là loại rượu không chưng cất duy nhất có độ cồn cao đến 20 – 22%.

– Chủng nấm men là *Saccharomyces cerevisiae* var. *saké*.

– Quy trình công nghệ khác với làm bia và rượu vang.

Sự lên men sakê bắt đầu bằng công đoạn chuẩn bị *mốc* (koji) *Aspergillus orizae*, có tác dụng *đường hoá tinh bột gạo* thành glucose. Sau đó, cho nấm men sakê vào thì sự lên men mới bắt đầu. Sự đường hoá và lên men xảy ra cùng lúc tại cùng một thời điểm, nên gọi là "sự lên men song song". Đây là đặc tính phân biệt quá trình lên men sakê và các quá trình lên men khác. Rượu sakê rất dễ làm tại nhà, gọi là "doburoku" (tiếng Nhật). Doburoku là một phần của *nền văn hóa Nhật Bản*.

d) Rượu vang nho là loại rượu không chưng cất có truyền thống lâu đời. Nho thu hái về làm dập, ép lấy nước cho vào thùng lên men. Sự lên men được thực hiện bằng chủng sản xuất *S. cerevisiae* hay do các loài nấm men tự nhiên như *Saccharomyces sp, Zygosaccharomyces sp,...* . 2 loại nho đỏ và trắng tạo ra tương ứng vang đỏ và trắng.

Champange là vang nho mà ở giai đoạn cuối có *bổ sung đường* để tạo khí CO_2 áp lực mạnh.

Gần đây phát hiện trong *rượu nho đỏ* có chất *polyphenol tự nhiên* ***resveratrol*** có tác dụng làm tăng tuổi thọ và trong thí nghiệm kéo dài tuổi thọ *S. cerevisiae* 70%.

e) Rượu Cognac là một loại *rượu nho chưng cất*. Cognac là tên một địa phương ở Pháp nổi tiếng nhờ loại rượu này. Đặc điểm sản xuất là nho được lên men thành rượu vang và tiếp theo được chưng cất. Sau đó, rượu có độ cồn cao cho vào thùng gỗ sồi, rượu này sẽ hút các chất từ gỗ sồi tạo hương vị đặc trưng. Rượu trữ càng lâu càng ngon.

f) Rượu đế hay **rượu trắng** và **vodka** đều là *rượu chưng cất nguyên chất* có độ cồn cao (40° trở lên) làm từ bột. Ở nước ta, một số rượu nổi tiếng là rượu Làng Vân (Bắc Ninh), Gò Đen (Long An), Bàu Đá (Bình Định). Nước Nga nổi tiếng với rượu Vodka.

3. Chuyển hoá sinh khối thực vật thành ethanol nhiên liệu

Quá trình phát triển lâu dài của nghề làm rượu đã đạt tới trình độ kĩ thuật cao trong chưng cất và thu hồi rượu ở quy mô lớn. Bên cạnh vai trò là một nước giải khát, ethanol còn được xem như một *nguồn nhiên liệu, vật liệu ban đầu* cho sản xuất các hoá chất như acetic acid, acetaldehyde, butanol và ethylen (chất trung gian trong công nghiệp hoá dầu). Ưu điểm của cồn nhiên liệu là ít gây ô nhiễm.

Đặc biệt trong thời gian gần đây khi giá dầu biến động và nguồn dầu mỏ sắp cạn kiệt thì các nhà khoa học nhiều nước tiên tiến như Mĩ, Nhật,... đang nghiên cứu sản xuất "chất hoá học xanh" (green chemistry), mà nguồn nguyên liệu được sử dụng đầu tiên là sinh khối thực vật. Sản phẩm đầu tiên của sự biến đổi sinh khối là glucose để lên men tạo ethanol.

a) Các giống vi sinh vật lên men ethanol nhiên liệu

Trong sản xuất *ethanol nhiên liệu* đáng chú ý là các loài :

– Nấm men *S. cerevisiae* lên men các loại đường glucose, fructose, galactose, maltose, maltriose, xylulose.

– Vi khuẩn *Zymommonas mobilis* lên men glucose, fructose, sucrose.

– Các *vi nấm chịu nhiệt* có khả năng lên men ethanol từ *cellulose* : *Clostridium thermocellum* lên men glucose, cellobiose, cellulose và *C. thermohydrosulfurium* lên men glucose, xylose, sucrose, cellobiose và bột.

Trong các VSV lên men rượu, các chủng *Saccharomyces* đáp ứng tốt nhất những đặc điểm nêu trên. Mặc dù là giống thuận lợi cho quá trình sản xuất ethanol lí tưởng, nhưng chúng chưa sử dụng một số đường khác như *xylose*

và khả năng *chịu đựng nồng độ cồn cao* hạn chế. Do vậy, cần cải thiện các chủng nấm men và tìm các VSV khác hữu hiệu hơn đáp ứng yêu cầu sản xuất công nghiệp.

Công nghệ gen đã tạo được chủng nấm men *S. cerevisiae lên men cả đường xylose* và nó làm tăng 40% sản lượng cồn khi lên men dịch thủy phân rơm rạ, bẹ ngô.

Zymomonas mobilis là vi khuẩn có thể dùng trong sản xuất ethanol thay thế nấm men. *Zymomonas mobilis* sử dụng glucose tạo thành ethanol với tốc độ nhanh hơn nấm men 3 – 4 lần, sản lượng ethanol tối đa theo lí thuyết là 97%. Hơn nữa, không giống như nấm men, *Zymomonas* không cần oxygen và nó có thể phát triển trong môi trường tối thiểu không có một hợp chất hữu cơ nào. Nhiều giống *Zymomonas* phát triển được ở nhiệt độ 38 – 40°C.

Zymomonas chịu được áp suất thẩm thấu cao, hầu hết các giống đều phát triển trong dung dịch chứa 40% glucose (theo khối lượng), nhưng khả năng chịu đựng muối thấp, không giống nào chịu được nồng độ NaCl 2%, trong khi đó nhiều loại nấm men chịu được nồng độ muối cao hơn. Các giống *Z. mobilis* có thể chịu được cồn, sản lượng lên men lên đến 13% (theo thể tích) cồn ở 30°C. Một vài vi khuẩn có thể tồn tại trong dung dịch có nồng độ cồn cao.

Mặc dù có những ưu điểm trên nhưng *Z. mobilis* vẫn không thể thay thế nấm men ở quy mô sản xuất lớn, bởi chỉ có thể sử dụng 3 loại carbohydrate là glucose, fructose và sucrose.

b) Sự can thiệp của KTDT vào sản xuất ethanol nhiên liệu

Do tầm quan trọng chiến lược cấp thiết, hiện tại và trong tương lai có rất nhiều nỗ lực được tập trung cho cải thiện chủng giống nhằm sử dụng tốt hơn nguồn nguyên liệu đa dạng và thuận tiện cho quy trình công nghiệp. Các nghiên cứu chủ yếu nhằm thiết kế :

– *Các chủng sử dụng lactose* để tận dụng phụ phẩm công nghiệp sữa.

– *Các chủng vi sinh có khả năng chuyển hoá xylose* mà nấm men không đồng hoá.

– *Các chủng nấm men phân giải tinh bột* để lên men bột khỏi phải qua đường hoá.

– *Các chủng VSV để sản xuất ethanol từ pentose.*

Ngoài ra, vấn đề quan trọng khác là sản xuất enzyme cellulse giá rẻ để giá thành ethanol nhiên liệu đủ sức cạnh tranh với xăng dầu.

Chuyển hoá sinh khối thực vật thành ethanol nhiên liệu là một điểm nóng của CNSH hiện đại.

VI. CÁC METABOLITE SƠ CẤP

1. Sinh tổng hợp amino acid

Amino acid được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm như các chất tăng hương vị, chất chống oxide hoá, chất dinh dưỡng bổ sung, chất phụ gia thức ăn chăn nuôi, các thành phần dịch truyền cho xử lí hậu phẫu trong y dược, các vật liệu khởi động quá trình sản xuất polymer và mĩ phẩm. Ước tính có khoảng hơn 800000 tấn amino acid (trị giá hơn 5 tỉ USD) được sản xuất hàng năm, trong đó hơn 50% là L-glutamic acid trong công nghiệp sản xuất bột ngọt.

Bảng 8.3. Ứng dụng thương mại của các amino acid

Amino acid	*Ứng dụng*
Alanine	Chất tăng hương vị.
Arginine	Trị các bệnh về gan.
Aspartic acid	Chất tăng hương, tổng hợp các chất tạo ngọt.
Asparagine	Thuốc lợi tiểu.
Cysteine	Làm bánh mì ; trị bệnh viêm phế quản ; antioxidant.
Glutamic acid	Chất tăng hương.
Glutamine	Trị ung nhọt.
Glycine	Tổng hợp chất làm ngọt.
Histidine	Trị ung nhọt ; chất chống oxide hoá (antioxidant).
Lysine	Chất phụ gia trong thực phẩm và thức ăn gia súc.
Methionine	Chất phụ gia thức ăn gia súc.
Phenylalanin	Tổng hợp chất làm ngọt ; dịch truyền.
Serine	Mĩ phẩm.
Threonine	Chất phụ gia cho thức ăn gia súc.
Tryptophan	Dịch truyền tĩnh mạch ; chất chống oxide hoá.
Tyrosine	Dịch truyền tĩnh mạch ; tiền chất của L-DOPA.
Isoleucine, Leucine, Proline, Valine	Dịch truyền tĩnh mạch.

2. Công nghiệp sản xuất MSG (Monosodium glutamate)

Glutamic acid là amino acid chiếm tỉ lệ lớn trong số các amino acid tạo protein cơ thể (15 – 20% khối lượng cơ thể). *Monosodium glutamate (MSG)*, được tạo thành từ glutamic acid bằng con đường lên men, là một chất điều vị

khá thân thuộc đối với chúng ta qua tên gọi *bột ngọt* hay *mì chính*. Chúng được dùng khá nhiều trong chế biến thức ăn hàng ngày của con người trên toàn thế giới.

Sản lượng glutamic acid trên thế giới năm 1980 đạt khoảng 300000 tấn, năm 1990 khoảng 400000 tấn. Ở Việt Nam, công nghiệp lên men sản xuất MSG năm 1997 đạt sản lượng là 68710 tấn, năm 1999 là 82490 tấn.

a) Sơ lược lịch sử lên men glutamic acid

Năm 1908, K. Ikeda đã chứng minh rằng chất glutamic acid từ tảo bẹ (*Lamarina japonica*) khiến cho các món ăn của Nhật Bản có mùi vị ngon và đặc trưng. Từ năm 1909, glutamic acid được sản xuất bằng cách thủy phân các nguồn protein có chứa nhiều glutamic acid như đậu nành, gluten của lúa mì, nhưng hiệu suất rất thấp (chỉ đạt 50g/kg đậu). Năm 1957, Kinoshita đã phát hiện vi khuẩn có khả năng tổng hợp và tiết glutamic acid với hàm lượng khá cao. Sau đó, Asai (bản quyền Nhật Bản số No. 8698-1957) cũng đã báo cáo về tổng hợp glutamic acid của một số chủng vi khuẩn đặc biệt.

Năm 1962, Kinoshita đã trình bày cơ chế lên men glutamic acid từ *Corynebacterium glutamicum* một cách hoàn chỉnh. Từ đó đến nay hàng loạt nhà máy lên men glutamic acid đã và đang được xây dựng tại hơn 20 nước trên thế giới như Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài Loan, Trung Quốc, Thái Lan, Việt Nam, Indonesia, Philipines, Malaysia, Pháp, Mĩ, Brasil, ...

b) Cấu trúc và đặc tính của glutamic acid

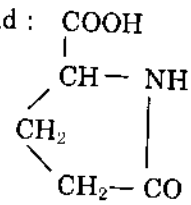
– Công thức phân tử của glutamic acid : $C_5H_9O_4N$.

– Trong tự nhiên, glutamic acid tồn tại dưới 3 dạng :

+ L-α-glutamic acid : $HOOC-CH_2-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-COOH$

+ L-β-glutamic acid : $HOOC-CH_2-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-CH_2-COOH$

+ Pyrrolidone carboxylic acid :



– L-glutamic acid tan tốt trong nước, khả năng tan của dạng α cao hơn dạng β. L-α-glutamic acid là dạng hiện đang được sản xuất công nghiệp nhờ

lên men và có ích đối với con người. Tên chung glutamic acid chỉ cho dạng L-α-glutamic acid.

c) Vi sinh vật lên men glutamic acid

Có rất nhiều VSV có khả năng tạo và tiết glutamic acid ra ngoài. Hiện nay, *Corynebacterium glutamicum* (*Micrococcus glutamicus*) đang được sử dụng phổ biến trong công nghiệp, hầu hết đều là *chủng đột biến*. Các chủng này có khả năng tạo từ 40 đến 50g/l glutamic acid trong dịch lên men. Trong điều kiện phòng thí nghiệm có thể thu được 100g/l glutamic acid trong dịch lên men.

d) Môi trường lên men glutamic acid

– *Nguồn carbon* : Nguyên liệu hiện đang được sử dụng nhiều nhất là mật rỉ đường mía hoặc củ cải đường và tinh bột khoai mì được xử lí để tạo thành dung dịch glucose nhờ amylase.

– *Nguồn nitrogen* : Mỗi VSV đòi hỏi một tỉ lệ nhất định giữa carbon và nitrogen, thông thường tỉ lệ C/N khoảng 100/15 đối với nhu cầu của vi khuẩn lên men glutamic acid.

Trong lên men glutamic acid, nitrogen có thể được cung cấp từ nguyên liệu vô cơ và hữu cơ, gồm ammonium sulphate, ammonium chloride, ammonium phosphate, khí ammonia.

– *Nguồn dinh dưỡng khoáng* được bổ sung vào môi trường dưới dạng muối sulfate hoặc phosphate để đảm bảo các nhu cầu về P, K, S cũng như các nguyên tố khoáng đại lượng và vi lượng khác cần cho sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật (thường đã có trong mật rỉ đường).

– *Vitamin* : Biotin đóng vai trò quan trọng nhất trong lên men glutamic acid. Biotin không chỉ là chất kích thích sinh trưởng mà còn quyết định thành phần và số lượng các sản phẩm lên men.

e) Điều kiện lên men glutamic acid

Có rất nhiều yếu tố ảnh hưởng đến quá trình lên men glutamic acid, nhưng 3 yếu tố (pH, chế độ thông khí, nhiệt độ) là quan trọng nhất và cần kiểm soát suốt quá trình lên men để thu được glutamic acid như mong muốn.

– *pH môi trường* thích hợp là vào khoảng 7 đến 8 .

– *Chế độ thông khí* theo lí thuyết :

1 mol Glucose + 2,33 mol O_2 –> 0,82 mol Glutamic acid + 1,94 mol CO_2

– *Nhiệt độ tối ưu* cho lên men glutamic acid là vào khoảng 30 – 35°C.

3. Các acid hữu cơ

a) Sản xuất citric acid

Citric acid hay acid limonic ($C_6H_8O_7$) có nhiều trong thiên nhiên (trong các loại quả cam, chanh, quýt, bưởi, lá bông, thuốc lá,...) và được dùng trong sản xuất bánh kẹo, đồ uống, trong công nghiệp in, trong y dược, sản xuất sơn, chất dẻo, v.v...

Có 3 phương pháp sản xuất citric acid : tổng hợp hoá học, chiết từ quả, lên men VSV.

Phản ứng tạo acid từ glucose : $C_6H_{12}O_6 + 3O \rightarrow C_6H_8O_7 + 2H_2O$

Năm 1891, quan sát đầu tiên cho thấy citric acid là một sản phẩm từ nấm. Năm 1916, J. N. Currie là người đầu tiên phát hiện nhiều chủng *Aspergillus niger* sản sinh một lượng đáng kể citric acid ở pH thấp 2,5 – 3,5 và tích lũy một lượng lớn. Đầu thập niên 1920, các nhà máy sản xuất citric acid bắt đầu hoạt động và quy trình được hoàn thiện với chủng giống là *Aspergillus niger*. Đây là chủng mốc tạo nhiều bào tử và chúng được sử dụng trong nhân giống. Cho đến nay, citric acid được sản xuất chủ yếu bằng lên men (xem chương 7).

b) Lactic acid

Các vi khuẩn lactic đóng vai trò quan trọng trong nhiều loại thực phẩm cổ truyền như sữa chua, nem chua, dưa rau quả,... Sản lượng lactic acid không thay đổi lớn trong thập kỉ cuối thế kỉ 20 và ước tính khoảng 50000 tấn/năm, khoảng 2/3 được sản xuất bởi sự lên men.

Nguyên liệu monosaccharide và disaccharide là các cơ chất truyền thống cho sản xuất lactic acid : glucose (dextrose) và các glucose syrup, maltose là sản phẩm của sự chuyển hoá tinh bột nhờ enzyme ; lactose là nước sữa.

Có vài quy trình lên men lactic acid công nghiệp như lactate calcium cổ điển, phương pháp ammonium lactate.

Lactic acid là một chất có độ hút ẩm cao, là chất lỏng sánh đặc có sẵn trên thị trường ở những dạng khác nhau về chất lượng ; và phụ thuộc vào độ tinh sạch có *nhiều tiêu chuẩn* khác nhau : *lactic acid kĩ thuật, thực phẩm, dược phẩm và lactic acid plastic*. Một tiêu chuẩn chất lượng quan trọng của lactic acid tinh sạch cao là sự bền nhiệt, ví dụ : không màu tạo thành khi làm nóng dung dịch 80% lactic acid đến 180°C.

4. Các nucleotide

Sản xuất công nghiệp các nucleotide đã bắt đầu từ năm 1961 ở Nhật Bản, từ khi một vài loại nucleotide được tìm thấy có hoạt tính tăng cường

mùi vị (flavour enhancer). Nucleotide và các hợp chất liên quan được sử dụng không những như các hợp chất tăng cường mùi vị mà còn như những chất sinh hoá hoặc dược phẩm. Hơn thế nữa những nghiên cứu gần đây cho thấy các nucleotide có vai trò cực kì quan trọng.

Ngày nay, các nucleotide được sản xuất công nghiệp bằng lên men VSV. Phần lớn việc sản xuất các nucleotide này đều phát triển ở Nhật Bản, với mục tiêu cuối cùng là tạo ra các chất tăng cường mùi vị như 5'-inosine(IMP) và 5'-guanylate(GMP).

Các chủng *Bacillus subtilis* và *Brevibacterium ammonigenes* đã được nghiên cứu chi tiết để phục vụ sản xuất inosine trên quy mô công nghiệp.

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* AJ-1987 là *dạng đột biến sinh inosine* và cần adenine để tăng trưởng và *chủng AJ-1993* kháng 8-azaguanine (8AG) được tìm thấy để sản xuất cùng lúc cả 2 chất là *guanosine* (4.3 mg/ ml) và *inosine* (3.1 mg/ ml).

Năm 1992, Tang đã cải tiến quá trình sản xuất guanosine bởi chủng đột biến *B. subtilis* cho sản lượng guanosine tăng lên và cao nhất là 15,6 g/l.

5. Các vitamin

– *Riboflavin* (vitamin B_2) là sản phẩm thương mại được tổng hợp bằng phương pháp lên men và phương pháp hoá học. Siêu sản xuất riboflavin do 2 chủng nấm mốc *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii* với sản lượng hơn 20 g/l. *Siêu sản xuất riboflavin* liên quan tới một chất kháng với hiệu quả ức chế của sắt, chất này ức chế và cho phép sản xuất riboflavin với hàm lượng vừa phải ở *Clostridia* và *Candida sp.* nhưng không hiệu quả đối với *Eremothecium ashbya gossypii*. Ở các VSV thông thường, sắt ức chế enzyme sinh tổng hợp riboflavin hay tạo một dẫn xuất ức chế enzyme đầu tiên của con đường này (GTP cyclohydrolase II). Phương pháp mới sử dụng các loài *Candida* hoặc chủng *Bacillus subtilus* tái tổ hợp cho sản lượng 20 – 30g/l.

– Sản xuất *vitamin B_{12}* trong công nghiệp do các chủng *Propionibacterium shermanii* hoặc *Pseudomonas denitrificans*. Mấu chốt là tránh sự ức chế ngược bởi vitamin B_{12}. Giai đoạn đầu, tiến hành nuôi cấy *Propionibacterium shermanii* trong điều kiện kị khí có bổ sung tiền chất 5,6- dimethylbenzimidazole để ngăn cản tổng hợp vitamin B_{12} và cho phép tích tụ các chất trung gian (cobinamide). Sau đó là giai đoạn nuôi cấy hiếu khí và thêm dimethylbenzimidazole vào biến đổi cobonamide thành vitamin.

– *Sản xuất biotin* : acetyl-coenzyme A carboxylase biotin holoenzyme synthetase gây hiệu quả ức chế ngược với chất đồng ức chế 5-adenylate. Các loài

Serratia marcescens sinh ra biotin (600mg/l) khi có mặt sulfur và sắt ở nồng độ cao, có thể cạnh tranh với tổng hợp hoá học.

– *Tổng hợp các tiền chất của vitamine :* Gần đây (1990) đã thành công trong tạo dòng các gene cho sự *sinh tổng hợp carotenoid vòng*, chứa β-carotene từ *Erwinia uredovora*. Sau khi 4 gene sinh tổng hợp β-carotene được chuyển vào *Z. mobilis* và *Agrobacterium tumefaciens*, các khuẩn lạc màu vàng thu được trên các đĩa thạch. Các thể tiếp hợp sản xuất 220 – 350γg β-carotene trên gram khối lượng khô ở phase ổn định trong môi trường nuôi.

– *Sinh tổng hợp L-ascorbic acid* được cải biến nhờ KTDT. *L-ascorbic acid* (Vitamin C) được hiện tổng hợp thương mại theo một quy trình đắt tiền, bao gồm 1 giai đoạn lên men VSV và một số giai đoạn hóa học bắt đầu với D-glucose. Giai đoạn cuối cùng trong quá trình là sự *chuyển hoá 2-keto-L-gluconic acid* (2-KLG) thành *L-ascorbic acid* dưới xúc tác là acid. Do đó, cách tốt nhất để chuyển hoá glucose thành 2-KLG là *chế tạo một VSV* có mang tất cả các enzyme cần thiết. Việc chuyển hóa D-glucose thành 2,5-DKG bằng *Erwinia herbicola* bao gồm nhiều bước xúc tác bởi enzyme, trong khi đó sự chuyển đổi 2,5-DKG thành 2-KLG do *Corynebacterium sp.* đòi hỏi chỉ một bước. Chiến lược đơn giản nhất để thiết kế một sinh vật có khả năng *chuyển D-glucose thành 2-KLG* là tách gen 2,5-DKG reductase từ *Corynebacterium sp.* và cho biểu hiện trong *Erwinia herbicola*.

Các tế bào *Erwinia được biến nạp gen 2,5-DKG reductase* có khả năng *chuyển hoá trực tiếp D-glucose thành 2-KLG*, vì các enzyme nội bào của Erwini nằm ở màng trong của vi khuẩn *chuyển glucose thành 2,5-DKG* và *2,5-DKG reductase* xúc tác *chuyển 2,5-DKG thành 2-KLG*. Do đó, bằng thao tác gen, khả năng chuyển hoá của 2 VSV rất khác nhau lại được kết hợp thành một và do đó có khả năng tạo sản phẩm cuối của *quá trình chuyển hoá được thiết kế*. Sinh vật loại này rất hữu ích như là một nguồn 2-KLG cho sản xuất L-ascorbic acid, bằng cách đó thay thế 3 công đoạn đầu của quy trình hiện đang được sử dụng.

Thông qua *đột biến điểm định hướng* bằng oligonucleotide đã thu được đột biến 2,5-DKG reductase có hoạt tính cao hơn khoảng 2 lần và bền với nhiệt hơn dạng enzyme tự nhiên.

VII. THUỐC KHÁNG SINH (ANTIBIOTICS)

Các antibiotic chiếm vị trí hàng đầu trong các metabolite thứ cấp.

Từ khi Flemming khám phá ra penicilline vào năm 1928 đã có hơn 6000 chất kháng sinh với tính đặc hiệu khác nhau và các kiểu tác động đa dạng

đã được phân lập từ các VSV khác nhau. Công dụng chung của kháng sinh trong việc *chữa trị các bệnh do vi khuẩn* đã cải thiện rất nhiều sức khỏe con người và cứu sống hàng triệu sinh mạng. Phần lớn các chất kháng sinh quan trọng nhất được tách chiết từ *Streptomyces* (là một vi khuẩn đất Gram dương) mặc dù nấm và các vi khuẩn gram âm và gram dương khác cũng là những nguồn cung cấp chất kháng sinh. Trên toàn thế giới có hơn *100000 tấn kháng sinh* được sản xuất mỗi năm với doanh thu khoảng 5 tỉ USD, bao gồm cả hơn 100 triệu USD cho các kháng sinh sử dụng trong thức ăn gia súc và sử dụng như là các kích tố tăng trưởng ở động vật.

Khoảng 100 đến 200 chất kháng sinh mới được phát hiện mỗi năm. Tuy nhiên, giá thành phát triển và thử nghiệm lâm sàng cao, có nghĩa là chỉ có những hợp chất có tính chữa bệnh nổi bật và hứa hẹn về kinh tế mới được thương mại hoá (chỉ khoảng 1 – 2%). Kĩ thuật DNA tái tổ hợp có thể tác động theo 2 cách : tạo kháng sinh mới có cấu trúc lạ và tăng năng suất để giảm giá thành.

Một vấn đề hệ trọng đối với công nghiệp kháng sinh là sự xuất hiện các đột biến đề kháng từ phía vi khuẩn.

1. Penicillin (penicillin G, aka benzylpenicillin)

Alexander Fleming được thế giới hoan nghênh và phong tước hiệp sĩ nhờ khám phá của ông năm 1928 về khả năng diệt khuẩn của *Penicillium notatum*. Nhưng phải mất đến 15 năm nỗ lực của những nhà khoa học khác để cho ra đời các loại thuốc chất lượng đủ khả năng chữa bệnh cho người. Nhà khoa học người Anh (Ernst Boris Chain) đã chiết xuất thành công các hoạt tính của nấm mốc, trong khi Howard Walter (được sự uỷ nhiệm của các nhà khoa học USA) tìm ra cách sản xuất một lượng lớn penicillin cho kịp Thế chiến II. Fleming, Chain, và Florey đã giành được giải Nobel năm 1945 cho công trình của họ.

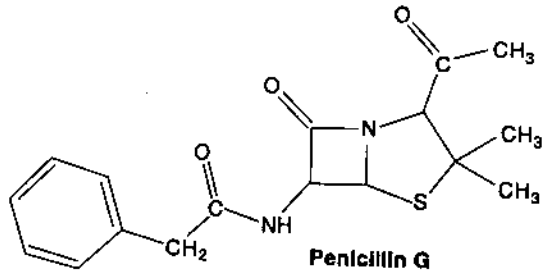
Hình 8.2. A. Fleming

– *Sinh vật sản xuất : Penicillin notatum và P. Chrysogenum.*

– *Lớp hoá học* : Beta-lactam.

– *Hoạt tính* : Kháng khuẩn, ức chế sự phát triển của hầu hết vi khuẩn Gram dương và các dạng Gram âm.

– *Vị trí hay phương thức tác động* : Các penicillin ức chế sự trao đổi chéo giữa các chuỗi polypeptide nhỏ trong peptidiglycan, polymer vách chính ở vi khuẩn.



Hình 8.3. Công thức penicillin G

– *Dùng để chữa các bệnh* : Viêm phổi, bệnh bạch hầu, sốt ban đỏ, giang mai tiềm ẩn, ghẻ chóc, bejel (bệnh giang mai đặc hữu), pinta (bệnh khuẩn xoắn đặc hữu), sốt thấp khớp hay chứng múa giật, viêm thận tiểu cầu, bệnh than.

2. Neomycin

– *Sinh vật sản xuất : Streptomyces fradiae*

– *Lớp hoá học :* Aminoglycoside

– *Hoạt tính :* Kháng khuẩn, ức chế vi khuẩn Gram dương và Gram âm, bao gồm *Staphalococcus aureus, E. coli*, các loài *Klebsiella, Haemophilus influemzae, S. typhi, Shigella*, và *Mycobacterium tuberculosis*. Không có hoạt tính kháng nấm và virus.

– *Vị trí hay phương thức tác động :* ribosome vi khuẩn ; tạo các nối không thay đổi với một hay nhiều protein receptor trên tiểu đơn vị 30S của ribosome và cản trở sự dịch mã dẫn đến đọc sai DNA và tạo protein không chức năng.

3. Penicillamine

– *Sinh vật sản xuất : Penicillium chrysogenum*

– *Lớp hoá học :* Amine (tương tự như cysteine), chất chuyển hoá penicillin.

– *Hoạt tính :* thuốc kháng viêm, non-steroid và tác nhân kìm kẹp (chelating agent) ; tác động lên các kim loại nặng để chữa ngộ độc và có hoạt tính ngăn các tế bào T và IgM (protein phản ứng miễn dịch), tác động lên cysteine.

– *Vị trí hay phương thức tác động :* hoạt động như tác nhân kìm kẹp trong máu trước khi máu chuyển vào gan ; nó kìm kẹp thuỷ ngân, chì, đồng và sắt tạo nên các phức hợp hoà tan để được loại bỏ trong nước tiểu ; hoạt động trong hệ thống miễn dịch để giảm IgM và trên tế bào T để ngăn hoạt

tính của chúng (đối với chứng viêm khớp của bệnh thấp khớp) ; tác động lên cystein trong máu tạo dạng rắn hoà tan thải vào nước tiểu để ngăn sự hình thành sỏi thận.

4. Cephalosporin

– *Sinh vật sản xuất : Cephalosporium acremonium*

– *Lớp hoá học :* Beta lactam

– *Hoạt tính :* kháng khuẩn, ức chế sự phát triển của trực khuẩn gram âm (hiệu quả hơn penicillin) và cầu khuẩn Gram dương.

– *Vị trí hay phương thức tác động :* vách tế bào vi khuẩn ; ức chế sự tạo vách tương tự như hoạt động của penicillin.

5. Cyclosporin

– *Sinh vật sản xuất : Tolypocladium inflatum gams*

– *Lớp hoá học :* polypepide vòng.

– *Hoạt tính :* ức chế miễn dịch và phản ứng miễn dịch hoàn toàn.

– *Vị trí hay phương thức tác động :* hệ thống miễn dịch/bạch huyết, các tế bào T; ức chế sản xuất và giải phóng interleukin-2, chất cần thiết để kích thích quá trình sản xuất các tế bào lympho T (các tế bào máu trắng) trong phản ứng miễn dịch.

6. Streptomycin

– *Sinh vật sản xuất : Streptomyces griseus*

– *Lớp hoá học :* Aminoglycoside.

– *Hoạt tính :* kháng khuẩn và kháng vi khuẩn kháng axit ; có hoạt tính chống lại một số trực khuẩn gram âm hiếu khí *(Francisella tularensis, Yersinia pestis, Brucelle)* và một số vi khuẩn gram dương; hầu hết sử dụng như chất chống lao diệt *Mycobacterium tuberculosis và M. bovis.*

– *Vị trí hay phương thức tác động :* các ribosome ở vi khuẩn, gắn bền với một hay nhiều protein thụ quan trên tiểu đơn vị 30S của ribosome và cản trở sự dịch mã dẫn đến đọc sai DNA và tạo protein không chức năng.

7. Erythromycin

– *Sinh vật sản xuất : Streptomyces erythreus*

– *Lớp hoá học :* Phân tử vòng lớn (chất kháng sinh là phân tử vòng lớn đầu tiên).

– *Hoạt tính :* tác nhân kháng khuẩn ; tác nhân chống mụn ; ức chế các vi khuẩn gram dương và âm (đặc biệt là các loài liên cầu khuẩn và tụ cầu

khuẩn), *Chlamydia trachomatis*, khuẩn xoắn và dịch khuẩn ; tăng tiêu hoá ; ức chế phiên mã từ DNA thành RNA ở vi khuẩn.

– *Vị trí hay phương thức tác động :* ribosome vi khuẩn ; ngăn quá trình chuyển peptide (transpeptide) trong tổng hợp protein.

VIII. CHUYỂN HOÁ SINH HỌC

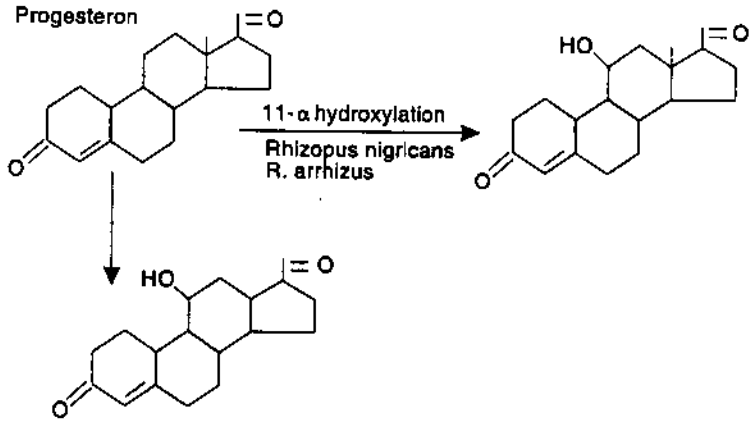
Chuyển hoá sinh học là việc sử dụng *enzyme hay tế bào* thực hiện các *phản ứng hoá học*. Chuyển hoá sinh học có khả năng xúc tác phản ứng có tính *chuyên biệt về vị trí và cấu trúc không gian*, mà các phản ứng hoá học thông thường khó thực hiện và làm giá thành cao hơn. Một số enzyme VSV có khả năng thực hiện một số phản ứng đặc hiệu, nhờ đó, người ta ứng dụng vào những quy trình sản xuất và những ứng dụng này giúp rút ngắn quy trình. Việc thực hiện phản ứng có thể chỉ dùng phản ứng VSV, phổ biến là kết hợp phản ứng hoá học và phản ứng VSV.

Có 2 chiến lược cơ bản để thực hiện những chuyển hoá sinh học : 1) Sử dụng enzyme tinh sạch hoàn toàn hay không hoàn toàn, được tách chiết do nhà nghiên cứu hay được cung cấp từ các dịch vụ thương mại ; 2) Sử dụng các tế bào nguyên vẹn.

Chuyển hoá sinh học có thể thực hiện rất nhiều loại phản ứng hoá học khác nhau ; ở đây chỉ nêu 3 loại : chuyển hoá các steroid, sản xuất vitamin C và sản xuất polyacrylamide.

1. Chuyển hoá các steroid

Chuyển hoá progesteron trong điều chế cortisol (hình 8.4).



Hình 8.4. Phản ứng gắn nhóm OH đặc hiệu vào vị trí 11-α (11-α hydroxylation)

Trường hợp này cho thấy VSV có thể thực hiện phản ứng một cách đặc hiệu ở những vị trí đặc biệt. *Phản ứng gắn nhóm OH đặc hiệu vào vị trí 11-α* (11-α hydroxylation) được thực hiện do 2 chủng mốc *Rhizopus nigricans* và *R. arrhizus*. Chủng *Curvularia lunata* thực hiện gắn nhóm OH đặc hiệu vào vị trí 11-β (11-β hydroxylation). Nhờ các phản ứng chuyển hoá đặc hiệu mà sản xuất các steroid rút ngắn công đoạn, tiết kiệm hoá chất.

Trong sản xuất các chất steroid như *cortisol*, nếu bằng con đường hoá học phải qua 37 công đoạn, giá thành là 200 USD/g, nhưng sử dụng VSV rút được còn 11 công đoạn và giá thành là 6 USD/g .

2. Sản xuất vitamin C

Trong trường hợp này có sự kết hợp *giữa hoá học* và phản ứng chuyên hoá sinh học biến D-sorbitol thành L-sorbose. Bước đầu tiên thực *phản ứng hoá học* biến glucose thành D-sorbitol. Bước tiếp theo thực hiện *phản ứng chuyển hoá sinh học biến* D-sorbitol thành L-sorbose nhờ chủng *Acetobacter suboxydans*. Khâu cuối cùng là *phản ứng hoá học* biến L-sorbose thành L-ascorbic acid (Vitamin C).

3. Sản xuất acrylamide và nhựa PVC

Vào thập niên 1980, quy trình lên men VSV *chuyển hoá acrylonitrile thành acrylamide* ra đời với sản lượng hàng tấn. Đây là quy trình lên men tạo thương phẩm có ý nghĩa quan trọng không chỉ bởi *giá rẻ, ít gây ô nhiễm môi trường*, mà nó còn chứng minh rằng nhiều hoá chất thông dụng có thể *sản xuất công nghiệp nhờ chuyển hoá sinh học*. Acrylamide được dùng trong thu hồi dầu mỏ và chất kết cục (floccukants) hay phụ gia trong nhiều sản phẩm khác nhau. Mỗi năm 200000 tấn được sản xuất bằng *chất xúc tác hoá học* là muối đồng (Cu) gây hậu quả nặng nề. Quy trình xúc tác sinh học mới do enzyme vi khuẩn *nitrile hydratase* chuyển hoá *acrylonitrile thành acrylamide* không gây những bất lợi và có hiệu quả kinh tế.

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas chlororaphis* B23 đã được phân lập từ đất là vi khuẩn sử dụng isobutyronitrile (isobutyronitrile-utilizing bacterium), thực hiện chuyển hoá sinh học có tính thương mại biến acrylonitrile thành acrylamide. Ở pha ổn định của tế bào *P. chlororaphis* B23, sự tích lũy acrylamide trong môi trường đạt đến 40% khối lượng khô. Sự tích lũy acrylamide do 3 nguyên nhân : 1) Phản ứng xúc tác chuyển hoá *acrylonitrile thành acrylamide* nhanh hơn 4000 lần phản ứng kế tiếp ; 2) Nitrile hydratase không bị ức chế ngược bởi acrylamide ; 3) Nitrile hydratase không nhạy cảm với acrylonitrile.

Việc chọn giống và cố định enzyme nâng cao hiệu quả quy trình.

IX. CÁC BIOPOLYMER VÀ BIOSURFACTANT

1. Các polymer sinh học (Biopolymer)

Polymer sinh học (biopolymer) là những đại phân tử thu nhận từ các sinh vật sống. Ở VSV nhiều biopolymer là các *polysaccharide ngoại bào* (exopolysaccharide) như là một sản phẩm phụ của quá trình chuyển hoá. Một số biopolymer có những giá trị đặc biệt được ứng dụng trong thực phẩm, dược phẩm, mĩ phẩm và thậm chí trong công nghiệp dầu mỏ. Trong bối cảnh các polymer hoá học gây ô nhiễm do chậm phân hủy thì việc nghiên cứu và ứng dụng chúng ngày càng được quan tâm. Biến đổi di truyền *Xanthomonas campetris* nhằm sản xuất *xanthan gum* với giá rẻ.

2. Xanthan

Vẫn chưa có nhiều polysaccharide VSV có giá trị thương mại, nhưng số lượng biopolymer và ứng dụng của chúng ngày càng nhiều hơn. Một số polymer VSV đã là những sản phẩm công nghiệp và có thị trường ổn định. Xanthan là biopolymer từ *Xathomonas campestris* là một sản phẩm có ứng dụng rộng rãi, doanh số đạt 100 triệu USD/năm.

X. campetris là một *vi khuẩn đất hiếu khí bắt buộc, gram âm*, có khả năng sản sinh một biopolymer thương mại quan trọng là nhựa dẻo (gum) *xanthan gum*, một exopolysaccharide. *Xanthan gum* có độ dẻo cao, bền trong các môi trường lí hoá khắc nghiệt và có những tính chất lí hoá tương tự như plastic. Đặc biệt nó được sử dụng như các tác nhân làm ổn định, làm đặc, nhũ hoá hay tạo huyền phù.

Xanthan là *chất tăng cường thu hồi dầu mỏ* (oil recovery enhancer – ORE). Năm 1969, xanthan được phép dùng trong công nghiệp dệt, mĩ phẩm và thực phẩm.

3. Các biopolymer khác trong công nghiệp

Nhiều polysaccharid có ý nghĩa trong công nghiệp, đặc biệt như chất nhớt, chất thạch, hiện nay đã được sản xuất với quy mô lớn .

– *Alginat vi sinh* thu nhận từ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Alginat thông dụng lấy từ rong nâu dùng in dấu răng để làm răng giả.

– *Gellan* sản sinh từ *Pseudomonas elodea ATCC 31461*, là chất tạo gel (thạch) tương tự agar nhưng tốt hơn agar (độ trong cao hơn, đông đặc ở pH thấp, độ độc ít, không bị tác động enzyme).

– *Zanflo* thu nhận từ *Erwinia tahitica*, có tính chất tương tự xanthan, nhưng ở nhiệt độ cao hơn 60°C *zanflo* có những biến đổi thuận nghịch và hiện nay nó được sử dụng nhiều như sơn kẻ đường do tính chịu lạnh, chịu ma sát và khi quét nó sẽ trải lên bề mặt tương đối đều.

– *Pullulan* do VSV *Aureolebacidium pullulan tạo ra*, có tính chất tương tự cellophane (giấy bóng), đặc biệt là dễ bị phân hủy bởi enzyme pullulanase, không bị phân hủy bởi amyllase. Trong tương lai, pullulan sẽ thay thế cho cellophane và các chất dẻo hoá học vì ít gây ô nhiễm môi trường.

– *Polyhydroxybutyrate (PHB)* là chất dự trữ của vi khuẩn, là một polyester chịu nhiệt có công thức : – CH – (CH_3) – CH_2 – CO –

4. Các chất hoạt động bề mặt sinh học (biosurfactants)

a) Giới thiệu khái quát

Chất có hoạt tính bề mặt sinh học (*Biosurfactant*) của VSV là những sản phẩm rất quan trọng, hiện đang được ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp. Những đặc tính có giá trị của chúng là làm *thay đổi hoạt động bề mặt* do làm *giảm sức căng* bề mặt và giữa 2 bề mặt (interface), hoạt tính *làm ẩm* hoặc *xuyên thấm* (penetrating), tính *lan toả* (spreading), *ưa nước* và *kị nước*, *nhũ tương hoá* và *khử nhũ tương hoá* (de-emulsification), *tẩy rửa* (detergency), *tạo gel* (làm đông đặc), *tạo bọt*, *kết tụ* (floculation), gia tăng phát triển vi khuẩn, *thu hút kim loại* (metal sequestration) và *kháng VSV*.

Hầu hết các chất hoạt động bề mặt đang được sử dụng hiện nay đều từ tổng hợp hoá học. Các biosurfactant vẫn chưa được ứng dụng rộng rãi.

Nếu so sánh với chất hoạt động bề mặt hoá học thì các biosurfactant có nhiều ưu điểm hơn, như :

– *Có khả năng phân hủy sinh học.*

– *Nhìn chung các chất đều có độ độc thấp.*

– *Có tính dung hợp sinh học* (biocompatibility) và *tính tiêu hóa được* (digestibility) nên thường dùng trong mĩ phẩm, dược phẩm, hay thậm chí làm chất phụ gia thực phẩm.

– *Nguồn nguyên liệu ban đầu sẵn có* : Các nguồn vật liệu thô, rẻ tiền như hydrocarbon, carbohydrate hay lipid có thể được tận dụng tối đa để sản xuất ra *biosurfactant*.

– *Sản xuất có hiệu quả kinh tế* : Phụ thuộc vào việc ứng dụng, *biosurfactant* có thể được sản xuất từ phụ phế phẩm công, nông nghiệp rẻ

tiền và điều này có ý nghĩa quan trọng cho sản xuất lớn. Do vậy chi phí nguyên liệu sản xuất không đáng kể.

– *Sử dụng trong kiểm soát môi trường* : Dùng trong xử lí các vụ dầu tràn, trong *phân huỷ sinh học* và *giải độc* hay trong *bồi hoàn sinh học* (bioremediation) xử lí đất bị ô nhiễm.

– *Tính đặc hiệu* : Các *biosurfactant* ở dạng *phức hợp chất hữu cơ* với các nhóm chức đặc trưng nên thường có *hoạt tính chuyên biệt* ; điều này có giá trị đặc biệt trong giải độc (detoxification) các chất ô nhiễm (pollulants), *khử nhũ tương hoá* các nhũ tương công nghiệp và những ứng dụng đặc biệt trong mĩ phẩm, dược phẩm hay thực phẩm.

– *Tính hiệu quả ở các điều kiện cực đoan về nhiệt độ, pH* và *muối.*

b) Các nhóm biosurfactant

– *Biosurfactant của vi khuẩn :* Nhiều loại vi khuẩn có khả năng tạo ra glycolipid. Đầu mang gốc đường của glycolipid có thể chứa nhiều loại đường khác nhau như rhamnose, trehalose (còn gọi là đường nấm men), sucrose, và glucose.

Rhamnolipid chứa 1 hoặc 2 đơn vị rhamnose và phần còn lại thường là 2 acid β-hydroxydecanoic. Trehalose lipid có liên hệ với vách tế bào. Các acid béo β-hydroxy phân nhánh α thường bị este hoá tại nhóm 6 và 6' hydroxyl của đơn vị trehalose.

– *Biosurfactant của nấm men :* Sophrose lipid dạng lacton và acid của Torulopsis magnoliae (bombicola).

– *Chất nhũ hoá sinh học ở dạng polysaccharide ngoại bào :* Polysaccharide ngoại bào của vi khuẩn là những polymer có khối lượng phân tử lớn mang nhiều tính chất vật lí và cơ học rất hữu ích như có tính nhớt cao, tính co giãn, khả năng chịu đựng sự biến dạng,... Trong công nghiệp, các chất này được sử dụng rộng rãi ở dạng gôm, chất biến đổi, tác nhân làm dày, chất ổn định có độ nhớt cao...

Một trong những chất nhũ hoá sinh học được nghiên cứu nhiều nhất là *Emulsan*, được tiết ra từ vi khuẩn phân hủy dầu *Acinetobacter calcoaceticus.*

c) Các ứng dụng

Bảng 8.4 Các ứng dụng và hiệu quả của biosurfactant trong công nghiệp

Ngành công nghiệp & đối tượng ứng dụng	*Tác dụng của chất hoạt động bề mặt*
Giấy	
– Xử lí bột giấy	– Khử nhựa và rửa sạch.
– Máy làm giấy	– Khử sự tạo bọt, phủ và trải màu cho đều.
– Lịch	– Làm ẩm và làm bằng mặt giấy, phủ và tô màu.
Sơn và phủ chất bảo vệ ngoài	
– Chuẩn bị màu	– Phân tán và làm ẩm màu trong quá trình nghiền.
– Sơn	– Tạo nhũ tương, phân tán màu, ổn định nhựa, làm chậm sự đóng cặn và phân li màu, ...
– Xáp và xi đánh bóng	– Nhũ tương xáp, ổn định hệ nhũ tương, giảm hậu quả tĩnh điện.
Nông nghiệp	
– Phân phosphate	– Ngăn ngừa sự vón cục trong quá trình cất trữ.
– Các loại thuốc xịt	– Làm ẩm, phân tán chất diệt côn trùng ; tạo nhũ tương dung dịch thuốc trừ sâu ; làm ẩm, làm lan rộng thuốc và giúp chất độc thấm vào trong.
Kiến trúc, xây dựng	
– Tô trát	– Làm tăng tính liên kết giữa sỏi đá và cát.
– Bê tông	– Đẩy mạnh sự thông khí.
Thực phẩm	
– Trái cây và rau	– Rửa bụi, thuốc trừ sâu, phấn sáp trên rau, vỏ trái cây.
– Bánh nướng và kem	– Hoà tan dầu tạo hương, chống ôi thiu.
– Kết tinh đường	– Cải thiện việc rửa, giảm thời gian.
– Mỡ và dầu ăn	– Chống dầu, mỡ bắn tung tóe khi chiên, xào.
Thuộc da	
– Da	– Tẩy và tạo nhũ tương khi tẩy chất nhờn ở da.
– Thuộc da, nhuộm	– Cải thiện việc làm ẩm và tính thấm.

X. CÔNG NGHỆ SINH HỌC KHAI KHOÁNG

Luyện kim bằng vi sinh vật (microbial hydrometallurgy) còn được gọi là *CNSH khai khoáng* (Mineral biotechnology).

1. Khai thác quặng đồng và uranium bằng VSV

Trong những năm 1950–1960, phát hiện vi khuẩn *Thiobacillus ferrooxydans* sống trong điều kiện cực đoan (tăng trưởng ở pH thấp, chịu điều kiện khắc nghiệt của nhiều loại khoáng chất và còn làm một số chất trong quặng tan ra). VSV này chịu được các điều kiện khắc nghiệt như : nhiệt độ, acid arsenic (20g/l), đồng (60g/l), Zn(130 g/l). VSV này thực hiện các phản ứng oxy hoá pyrit (FeS) và gián tiếp biến Fe không tan thành hoà tan ; phản ứng oxy hoá lưu huỳnh tạo sulfuric acid, do đó pH thấp.

Hiện nay có Cu và U được khai thác công nghiệp. Ví dụ :

(Quặng Cu - Halkorit) $Cu_2S + 2\ Fe_2\ (SO_4)_3 \rightarrow 2CuSO_4 + 4FeSO_4 + S$

(Uranit) $UO_2 + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow UO_2SO_4 + 2FeSO_4$

2 phản ứng này được sử dụng vừa trực tiếp vừa gián tiếp để tách Cu. Khi tách nếu tỉ lệ Cu nhỏ hơn 4% thì luyện kim không có hiệu quả. *Thiobacillus ferroxidans* ở pH thấp và cho nước chứa vi khuẩn chảy qua quặng Cu và có thể thu được 2g Cu/l dung dịch.

Khai thác quặng uranium U_3O_8 ở mỏ Denison (Canada) cũng dùng *Thiobacillus ferroxidans*. Năm 1986, mỏ khai thác được 360000kg uranium.

Người ta có thể khai thác vàng (Au). Au thường lẫn trong quặng FeS_2. Nếu lấy hoá chất để tẩy FeS_2 thì khó, tốn kém nhiều và không hiệu quả kinh tế. Các nước Mĩ, Úc, Liên xô (cũ),... sử dụng VSV để làm tan phần quặng có S phía ngoài và thu được Au. Tính ra nếu xử lí 100 tấn quặng bằng con đường khác thì tốn khoảng 748000 USD. Nếu bằng con đường VSV chỉ tốn 3778000 USD.

Hướng luyện kim VSV có nhiều lợi điểm :

– Ít tốn nhiên liệu.

– Ít làm ô nhiễm và ít huỷ hoại môi trường tự nhiên.

– Nhiều VSV có khả năng hấp phụ các kim loại trên bề mặt của tế bào.

+ Có chủng tảo *Chlorella* có khả năng gắn Au ở vách tế bào ; và sự việc này làm cho các nhà "giả kim mới" (the new alchemist) đi tìm chủng tảo *Chlorella* có tính chất đặc biệt để lấy vàng.

+ Chủng nấm men hấp thu nhiều uranium cũng đã được phát hiện.

2. Đánh giá về hiệu quả kinh tế

Hiện nay, khai thác khoáng sử dụng VSV còn chưa phổ biến vì thực hiện chậm và tốn nhiều diện tích, nhưng do có một số ưu điểm nhất định nên trong tương lai sẽ được sử dụng rộng rãi. Các ưu điểm là : thu kim loại có tính chọn lọc đặc hiệu, ít gây hại vỏ Trái đất, ít ảnh hưởng sinh môi, có thể thu nhận kim loại từ những quặng phế thải, có thể khai thác những kim loại ở độ sâu.

Dự kiến có thể dùng phương pháp này để xử lí than đá, lấy bớt đi lưu huỳnh (S) trong than đá, khi đốt than đá sẽ giảm độc hại.

Hiện nay luyện kim bằng VSV chưa được phổ biến nhưng có nhiều hứa hẹn. Khả năng của CNSH rất rộng, có thể can thiệp vào cả ngành luyện kim.

3. Sử dụng khả năng VSV hấp thu, tích lũy các kim loại

Xử lí nước thải là công việc cần thiết của xã hội công nghiệp. Có thể dùng biện pháp vật lí và hoá học để xử lí nước thải, nhưng biện pháp này tốn kém và ít hiệu quả. Biện pháp sinh học sử dụng các VSV để xử lí nước thải có hiệu quả hơn, ít tốn kém, đồng thời còn tận dụng được các kim loại trong đó. Việc xử lí này dựa trên nguyên tắc là tế bào VSV có khả năng :

– Biến một số chất độc thành dạng bay hơi (methyl hoá) có thể thực hiện đối với các chất arsen, telure, selene.

– Mặt khác, các VSV làm kim loại tủa xuống đáy (Fe, Mm, Mo, Ni).

– Tích lũy các chất khác nhau bên trong tế bào.

– Hấp thu bề mặt các chất như uranium, vàng ; có khi như Pb, uranium có thể được tích luỹ bên trong tế bào gấp triệu lần so với bên ngoài.

TÓM TẮT CHƯƠNG

Các sản phẩm của CNSH VSV gồm các nhóm : sinh khối tế bào; các enzyme, các metabolite sơ cấp và thứ cấp, các sản phẩm tái tổ hợp gen, các sản phẩm chuyển hoá sinh học, biopolymer và biosurfactant. Sự phát triển của CNSH VSV đã dẫn đến sự hình thành nhiều ngành công nghiệp sinh học (bioindustryes) như sản xuất men bánh mì, phân vi sinh, thuốc trừ sâu, vaccine, rượu bia và bioethanol nhiên liệu, công nghiệp kháng sinh,...

Trong tương lai, CNSH VSV sẽ tiếp tục phát triển với nhiều ứng dụng mới nhằm giải quyết nhiều vấn đề trọng đại như biến sinh khối thực vật thành nguồn năng lượng hay SCP để giải quyết nạn thiếu hụt protein của nhân loại.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. CNSH VSV có những nhóm sản phẩm chủ yếu nào ?
2. Sinh khối VSV có những ứng dụng nào ?.
3. Phân vi sinh gồm những loại gì ?
4. Loài vi khuẩn nào được sử dụng làm tác nhân diệt côn trùng ?
5. SCP là gì và có vai trò như thế nào ?
6. Công nghệ vaccine phát triển như thế nào ?
7. Lên men rượu bia có những đặc điểm gì ?
8. Bioethanol được phát triển như thế nào ?
9. Nêu các đặc điểm chính trong công nghiệp sản xuất glutamic acid.
10. Sản xuất các acid hữu cơ bằng lên men có những đặc điểm gì ?
11. Nêu vài loại antibiotic thông dụng và nhóm chất của chúng.
12. Nêu các loại biopolymer chính và các ứng dụng.

Phần IV
CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT VÀ ĐỘNG VẬT

CHƯƠNG 9
CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

Công nghệ sinh học thực vật (CNSH TV) liên quan đến lương thực, thực phẩm, dược phẩm, vật liệu tiêu dùng và nguồn năng lượng trong quá khứ, hiện tại và tương lai của con người. Ngoài ra, nó cũng liên quan tới môi trường và khí hậu toàn cầu.

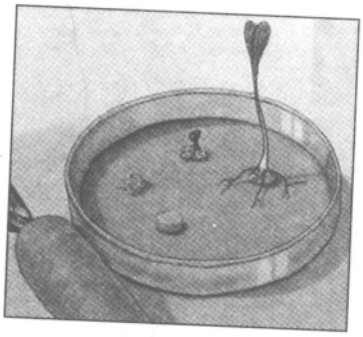
I. KHÁI QUÁT VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT

1. Sơ lược lịch sử phát triển

Cuối thế kỉ XIX con người thử tách tế bào TV ra nuôi. Kĩ thuật nuôi cấy mô thực vật đến những năm 1930 – 1940 mới có những kết quả ban đầu và được hoàn thiện dần đến nay. Sự phát triển của CNSH TV có thể chia thành 4 giai đoạn :

– *Giai đoạn I (1902 – 1930)* : Thử nghiệm ban đầu.

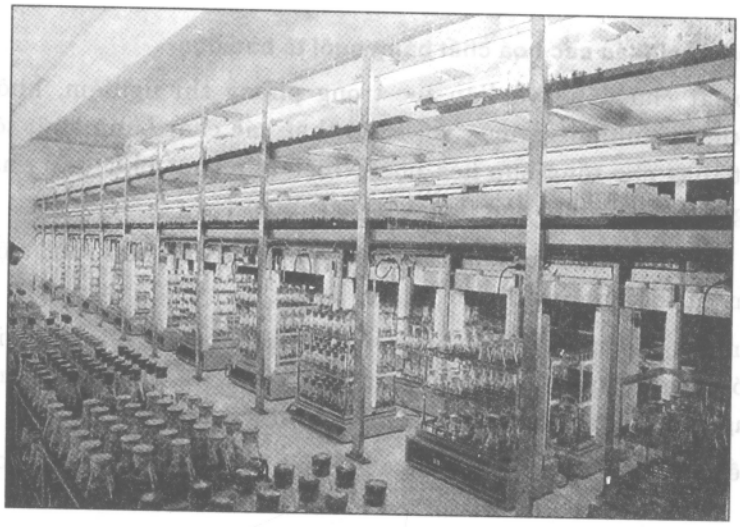
– *Giai đoạn II (1934 – 1954)* : Năm 1937, Gautheret đã *nuôi thành công mô tế bào* cà rốt (hình 9.1). Phát hiện vai trò của các *vitamin*, các chất điều hoà tăng trưởng auxin và *cytokinin*.



Hình 9.1. Cà rốt cấy mô

– *Giai đoạn III (1957 – 1992)* : Thực hiện *tách* và *nuôi tế bào đơn*. Biết vai trò của tỉ lệ *cytokinin/auxin* ; tạo protoplast và tái sinh cây ; *tạo cây đơn bội từ nuôi cấy túi phấn* và từ 1980 là phát triển *công nghệ gen thực vật*.

– *Giai đoạn IV* : Ứng dụng các thành tựu vào sản xuất với quy mô lớn và diện rộng (hình 9.2).



Hình 9.2. Một góc nhà máy nuôi cấy mô tế bào thực vật

2. Những ưu thế của nuôi cấy mô

Nhờ sự hoàn thiện nhanh các khâu kĩ thuật, *CNSH TV* đã phát triển với quy mô lớn trên diện rộng và các kết quả đã chứng tỏ kĩ thuật mới có nhiều ưu thế.

a) Thứ nhất, vi nhân giống (micropropagation) bằng nuôi cấy mô :

– Thực hiện trong phòng thí nghiệm với các chuẩn mực ổn định, không chịu ảnh hưởng dao động thất thường của thời tiết và không phụ thuộc mùa vụ. Có thể chủ động sản xuất giống đón đầu mùa vụ.

– Sinh sản vô tính tạo ra số lớn cây giống con giữ nguyên các đặc tính tốt như cây gốc ban đầu đã lựa chọn cho năng suất tốt và chúng có sự đồng đều cao, thuận tiện cho thu hoạch và chế biến ở quy mô công nghiệp.

– Hệ số nhân giống cao, tốc độ tăng trưởng nhanh và rút ngắn thời gian ra hoa quả với những cây lâu năm.

b) Thứ hai, chọn giống in vitro dựa trên các công nghệ tế bào :

– Rút ngắn thời gian nhiều năm và đưa nhiều thử nghiệm đồng ruộng vào PTN hoặc nhà kính như chọn các dòng kháng virus, chịu lạnh,...

– Sử dụng các biomarker sàng lọc nhanh các tính trạng từ bộ sưu tập giống và các cây lai mà khỏi mất thời gian chờ cây mọc từ hạt.

– Các cây lưỡng bội (2n) thuần chủng sẽ thu được nhờ đa bội hoá dòng đơn bội ưu việt nhận được qua sàng lọc.

– Tận dụng gen im lặng thường không biểu hiện trong tự nhiên.

c) Thứ ba, khai thác các hoá chất bằng nuôi tế bào đơn

– Sản xuất chủ động và liên tục trong phòng thí nghiệm, không phụ thuộc điều kiện tự nhiên và mùa vụ. Khai thác các chất bằng sinh tổng hợp của thực vật thay cho tổng hợp hoá học. Nhiều hợp chất phức tạp nhận được từ sinh tổng hợp của các tế bào thực vật được nuôi.

– Chọn dòng tế bào sản sinh các chất với năng suất cao vượt trội so với cây tự nhiên và thời gian sản xuất nhanh hơn.

– Thu nhận nhiều chất quý hiếm mà tổng hợp hoá học đắt giá ; bản thân cây đó tăng trưởng chậm, sinh sản khó khăn thì nhân giống nuôi cấy mô và khống chế tạo mô (như rễ) sẽ sản sinh nhiều chất đó.

– Chuyển hoá sinh học có thể thực hiện nhờ tế bào đơn hay tế bào được cố định.

3. Vai trò của CNSH TV trong tương lai

Sự bùng nổ dân số toàn cầu trong thế kỉ XX đã mang lại hậu quả bi thảm cho hành tinh của chúng ta. Những vùng sinh thái tự nhiên rộng lớn giàu thực vật và nhiều động vật sinh sống đã chuyển thành vùng nông nghiệp, gây nhiều tai hại cho môi trường. Thách thức đối với nhân loại thế kỉ XXI là tăng sản lượng lương thực gấp đôi bằng phát triển nông nghiệp bền vững (sustainable agriculture). CNSH TV sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc giải quyết hài hoà các vấn đề nêu trên.

Trong 50 năm qua, nhờ cách mạng xanh và những tiến bộ của CNSH TV, sản xuất lương thực đã tăng nhanh kịp đà bùng nổ dân số và đảm bảo đủ nhu cầu lương thực, mặc dù vẫn còn nạn đói. Nông nghiệp hiện đại vẫn phải tiếp tục đảm bảo an toàn lương thực trong thế kỉ XXI, nhưng đồng thời phải gia tăng chất lượng sản phẩm và trồng trọt cần đáp ứng nhu cầu lớn hơn cho chăn nuôi. Việc mở rộng diện tích trồng trọt đến những vùng hoang sơ như sa mạc là vấn đề đáng quan tâm. Để thực hiện những nhiệm vụ trên, CNSH TV phải giải quyết hàng loạt vấn đề như : chọn giống có chất lượng thực phẩm tốt, thích nghi với những điều kiện khác nhau ; biện pháp chống sâu bệnh, cỏ dại ; phát triển nền nông nghiệp sạch và "xanh hơn" (greener agriculture).

Năm 2001, hơn 5,5 triệu nhà nông canh tác khoảng 52,6 triệu ha cây trồng biến đổi gen (GMO). Liệu đây có phải là xu hướng phát triển tất yếu không, khi mà vấn đề GMO đang tranh cãi gay gắt ?

Ngoài những nhiệm vụ truyền thống có từ nhiều thiên niên kỉ vừa nêu trên, CNSH TV còn phải gánh vác các ngành sản xuất mới với các mục tiêu :

– Tăng sinh khối để sản xuất năng lượng thay thế nguồn dầu mỏ.

– Phát triển hoá học xanh để một mặt cung cấp sinh khối cho sản xuất hoá chất, mặt khác phải biến thực vật thành nhà máy hoá chất.

II. NUÔI CẤY MÔ VÀ CƠ QUAN THỰC VẬT

Do tế bào thực vật có *tính toàn thế* (totipotency), nên dễ nuôi cấy hơn so với tế bào động vật. Ví dụ, mô ở đỉnh sinh trưởng hay chóp rễ qua nuôi cấy sẽ tăng trưởng thành cây đến ra hoa, tạo hạt. *Tính toàn thế* là khả năng ít bị biệt hoá và phát triển tốt, những tế bào bình thường có khả năng như tế bào phôi. Nhờ vậy nuôi cấy mô tế bào thực vật dễ dàng hơn. Để nuôi cấy mô thực vật (NCMTV) có hiệu quả cần thành thạo các *kĩ thuật vô trùng*, biết cách pha chế *môi trường thích hợp* và kèm theo là các dụng cụ trang thiết bị tương ứng.

1. Môi trường nuôi cấy tế bào thực vật

Môi trường gồm các nhóm chất căn bản :

– *Các chất vô cơ đa lượng :* N (NO_3 và NH_4), P, K, S, Ca và Mg.

– *Các nguyên tố vi lượng :* Fe, Mn, Zn, Br, Cu, Co và Mo.

– *Các vitamin :* nhiều loại (nicotinic acid, biotin,...) mà quan trọng nhất là thiamine (vitamin B1) dưới dạng thiamine-HCl.

– *Nguồn carbon :* sucrose hoặc glucose.

– *Các chất điều hoà tăng trưởng thực vật* : Các *auxin* và *cytokinin* kích thích sự phân bào, kiểm soát sự biệt hoá tế bào và phát sinh hình thái. Các *auxin* thường dùng : 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid), IAA (indole 3-acetic acid), IBA (indole 3-butyric acid). Các *cytokinin* có BAP (6-benzylaminopurine), zea (zeatin),... Ngoài ra còn có GA (gibberillic acid) và ABA (abscisic acid).

Agar sử dụng cho môi trường đặc. Hệ thống chiếu sáng hợp lí cần cho sự phát triển của tế bào thực vật.

2. Mẫu dùng cho nuôi cấy mô

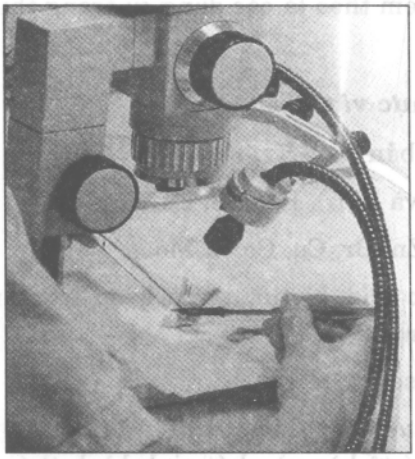
Nói chung, gần như tất cả các phần của cây tươi đều có thể dùng làm mẫu để nuôi cấy mô như rễ, lá và thân hay phấn hoa, noãn, thịt lá là các kiểu mô chuyên biệt. Tuỳ theo mục đích nghiên cứu mà chọn mẫu tương ứng. Tuy nhiên, nguyên tắc căn bản là mẫu cấy phải chứa các tế bào sống từ các mô non có các tế bào đang phân chia mạnh chiếm tỉ lệ lớn, nhất là dễ tạo mô sẹo. Dĩ nhiên là cây gốc phải có phẩm chất tốt, năng suất cao và không có dấu hiệu bệnh cũng như đang không ở trạng thái ngủ (dormancy).

Một điểm quan trọng cần ghi nhớ là trạng thái sinh lí của mẫu không có ảnh hưởng đến các phản ứng của mô trong quá trình nuôi.

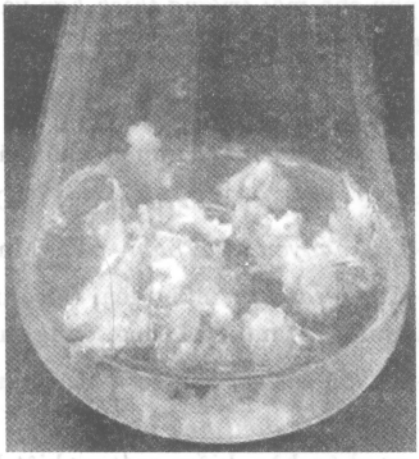
Mẫu cấy phải được vô trùng khi đưa vào môi trường nuôi. Do vậy, mọi thao tác đều phải thận trọng ngay từ đầu. Dao mổ, kéo cần sắc bén để tránh làm dập và được khử trùng trước khi cắt mẫu (hình 9.3). Mẫu vô trùng có thể thu được theo 2 cách :

– Từ hạt : Khử trùng bề mặt hạt và gieo hạt vào điều kiện vô trùng để mọc thành cây và lấy mẫu.

– Mẫu cấy : Mẫu lấy trực tiếp từ cây tươi được xử lí bằng ngâm trong dung dịch chất sát trùng, mà chất thường dùng là sodium hypochlorite (5 – 20%). Nồng độ và thời gian xử lí tùy theo loại mẫu.



Hình 9.3. Cắt mẫu

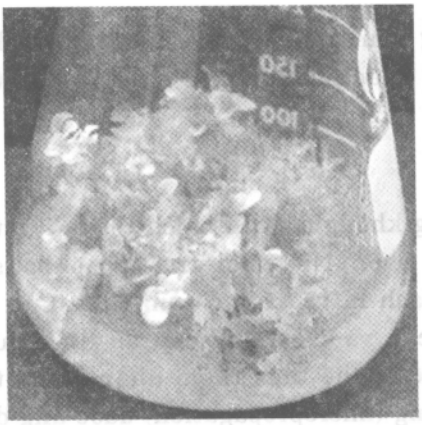


Hình 9.4. Mô sẹo hình thành

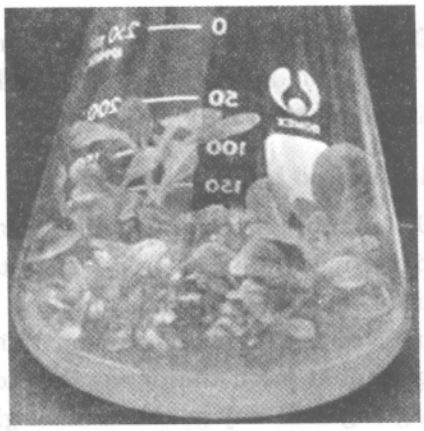
3. Nuôi cấy mô phân sinh

Mẫu cho nuôi cấy có nhiều loại, nhưng thường dùng là đỉnh sinh trưởng (meristem). Công việc tiến hành theo trình tự : Mẫu cây (meristem) → Khử trùng bề mặt → Rửa mẫu nhiều lần cho sạch chất sát trùng → Môi trường nuôi → Tạo mô sẹo → Tạo cụm chồi → Nhân giống.

Meristem được cắt, khử trùng và đặt trên môi trường thạch trong hộp Petri hay chai lọ vô trùng. Nếu môi trường thích hợp thì trên mẫu cấy có các tế bào sống phân chia tạo thành một khối nổi lên gọi là mô sẹo (hình 9.4). Thời gian hình thành mô sẹo thường sau 3 – 8 tuần cấy mẫu. Việc hình thành mô sẹo có tầm quan trọng then chốt trong cả quá trình nuôi cấy mô tế bào thực vật. Ở giai đoạn tiếp theo có thể sử dụng mô sẹo theo nhiều hướng khác nhau :



Hình 9.5. Cụm chồi phát triển

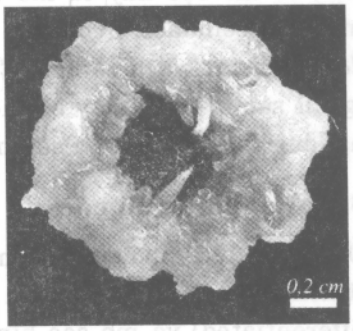


Hình 9.6. Chồi thành cây con

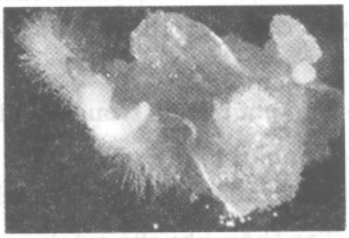
– Tạo cụm chồi : Nếu để tiếp thì các chồi sẽ mọc lên thành cụm (hình 9.5) và các chồi sẽ phát triển thành cây con (hình 9.6). Có thể tách các chồi ra để chúng mọc rễ đưa ra trồng (hình 9.7).

– Tách ra nhiều phần và duy trì : Có thể tách mô sẹo non ra thành nhiều dòng thứ cấp (subculture) và tiếp tục nhân khối tế bào tăng trưởng nhanh để phục vụ cho nhiều mục đích khác nhau như tạo tế bào trần (protoplast) hay xử lí thành tế bào rời để nuôi tế bào đơn.

Hình 9.7. Cây con ra rễ



Hình 9.8. Phương pháp nuôi cấy mô cắt lát mỏng (các mô sẹo mọc rìa tròn mảnh cây)



Hình 9.9. Bao phấn tạo mô sẹo

Dựa trên những nguyên tắc chung nêu trên, nhiều phương pháp khác nhau được thực hiện trên các loại mẫu khác nhau như từ chóp rễ hay thân cắt lát mỏng (hình 9.8).

4. Nuôi cơ quan thực vật

Đặt mảnh meristem vào môi trường không có kích thích tố thực vật thì từ nó sẽ mọc lên cấu trúc tương tự chồi. Nếu môi trường có bổ sung cytokinin, mẫu sẽ mọc chồi nhánh ở nách lá và sẽ tạo cụm chồi. Các cụm chồi này có thể tách thành cụm thứ cấp và nếu cung cấp đủ dinh dưỡng chúng sẽ phát triển thành cây con hoặc có thể tách thêm nhân giống tiếp. Nhân giống kiểu này gọi là vi nhân giống (micropropagation) được ứng dụng vào sản xuất. Rễ cây có thể được nhân ra liên tục theo cách tương tự, chỉ khác là bổ sung auxin vào môi trường.

5. Tế bào trần (Protoplast)

Nếu các tế bào mô sẹo được xử lí bằng 2 enzyme *cellulase và pectinase* làm tiêu hủy vách tế bào thì sẽ nhận được các *tế bào trần*, mà chúng thường có dạng khối cầu. Các tế bào trần, thậm chí khác loài, có thể kết hợp nhau tạo tế bào lai và quá trình này gọi là sự *dung hợp tế bào trần* (protoplast fusion). Tế bào trần có thể được tạo ra bằng nhiều cách : từ dịch huyền phù tế bào ; từ mô sẹo hay từ mô tươi nguyên trạng như lá qua tác động của pectinase và cellulase. *Pectinase* cắt mảnh mô rời ra từng tế bào riêng lẻ và *cellulase* làm tan vách tế bào. Các tế bào trần nếu để trên môi trường dinh dưỡng thì sau 5 – 10 ngày sẽ tạo vách tế bào và phân chia. Nuôi trong môi trường lỏng thì tế bào trần sẽ không sinh sản.

6. Sự tái sinh của các mô nuôi cấy

Ở trường hợp nuôi meristem nêu trên, khi trong môi trường nuôi giàu kích thích tố tăng trưởng (auxin và cytokininin) thì các tế bào mất biệt hoá (de-differentiated) và mô sẹo hình thành. Ngược lại, trong môi trường giảm nồng độ các chất điều hoà tăng trưởng thì nó có thể hình thành nhiều cấu trúc tái biệt hoá (redifferentiated structures) như phôi soma (somatic embryo), chồi hay rễ. Dựa vào khả năng tái sinh này, có thể điều khiển sự phát triển của mô sẹo như sau :

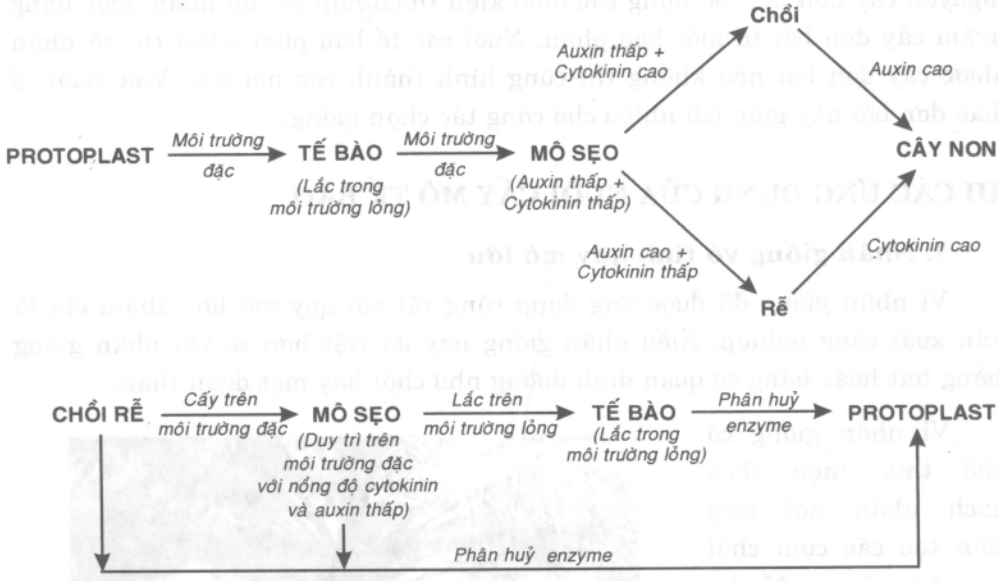
– Tạo phôi soma trong môi trường với nồng độ kích thích tố nhất định.

– Vi nhân giống : Nếu nồng độ auxin và cytokinin thấp (tùy loại cây) thì nó sẽ tạo cụm chồi và có thể tách cụm hoặc cắt mẫu lá đem nhân giống tiếp.

– Tạo thân khi cho cytokinin nhiều trong môi trường.

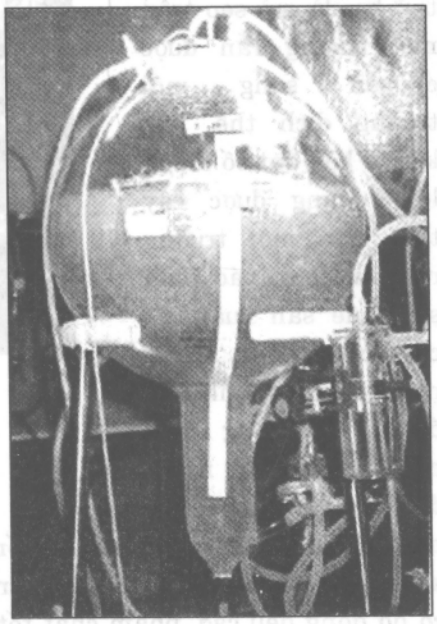
– Tạo rễ nếu auxin có nhiều trong môi trường.

Có thể tóm tắt các khả năng điều hoà khác nhau trong nuôi tế bào, mô và cơ quan thực vật trên sơ đồ sau (hình 9.10).



Hình 9.10. Sơ đồ tóm tắt các khả năng tái sinh khác nhau trong nuôi tế bào

Một ví dụ minh họa rõ ứng dụng của các phương pháp này là việc nuôi rễ nhân sâm cấy mô. Cây nhân sâm (Penax ginseng) tạo chất sâm saponin chủ yếu ở rễ. Dùng nuôi cấy mô cho nhiều auxin kích thích tạo rễ thu được nhiều saponin với thời gian nhanh hơn nhiều so với trồng tự nhiên (hình 9.11).



Hình 9.11. Nuôi cấy mô rễ nhân sâm trong bioreactor

7. Nuôi bao phấn (Anther) và hạt phấn (pollen)

Các hạt phấn là những tế bào mà sự phát triển bình thường dẫn đến hình thành ống phấn và các giao tử đực. Khi đặt trên môi trường thích hợp, phần lớn hạt phấn sẽ phát triển theo lối bình thường, nhưng một số ít hạt phấn sẽ tạo mô sẹo. Thay vì nuôi hạt phấn riêng lẻ có thể nuôi các bao phấn nguyên chứa

các hạt phấn đang phát triển (hình 9.9), và cách này dẫn đến sự hình thành phôi soma trực tiếp từ hạt phấn. Các phôi này được kích thích có thể tạo ra nguyên cây đơn bội. Sử dụng các điều kiện thích hợp có thể nhận được hàng trăm cây đơn bội từ một bao phấn. Nuôi các tế bào phôi soma thì sẽ nhận được cây đơn bội nếu không thì cũng hình thành các mô sẹo. Việc nuôi tế bào đơn bội này giúp ích nhiều cho công tác chọn giống.

III CÁC ỨNG DỤNG CỦA NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

1. Nhân giống vô tính quy mô lớn

Vi nhân giống đã được ứng dụng rộng rãi với quy mô lớn, thậm chí là sản xuất công nghiệp. Kiểu nhân giống này ưu việt hơn so với nhân giống bằng hạt hoặc bằng cơ quan dinh dưỡng như chồi hay một đoạn thân.

Vi nhân giống có thể thực hiện theo cách nhân nối tiếp liên tục các cụm chồi mọc từ mô sẹo để thu số lượng lớn cây con giống. Phương pháp thứ hai là mô sẹo trên môi trường rắn được chuyển sang môi trường dịch thể, sau khi tế bào đạt số lượng lớn, chúng được cấy trải trên môi trường rắn và chọn các phôi soma để sản xuất các cây con giống. Kiểu nhân dòng vô tính này được áp dụng cho nhiều cây trồng nhiệt đới ở quy mô thương mại. Ví dụ điển hình là nhân giống cây cọ dầu ở Malaysia : từ một cây cao sản giống gốc nhập từ châu Phi, trong một năm nhân ra hàng nghìn cây con có độ đồng đều cao, phẩm chất tốt (hình 9.12). Nếu nhân giống bằng hạt sẽ phải chờ lâu mới có số lượng nhiều mà các cây con không đồng đều và sẽ khó hơn trong thu hoạch, chế biến công nghiệp.

Hình 9.12. Các cây cọ dầu nuôi cấy mô (lưu ý về độ đồng đều)

Sự đồng đều của cây giống có ý nghĩa quan trọng về kinh tế như trường hợp chuối và dứa (hình 9.13). Chuối và dứa có quả nặng, lại phải thu hoạch lúc già mới chín. Nếu xuất khẩu phải chở bằng tàu thủy thì việc thu hoạch nhanh, đúng phẩm chất là yêu cầu không thể thiếu được. Hơn nữa, nếu thu hoạch và chuyên chở cơ giới quy mô lớn thì không thể đi chọn từng buồng chuối già, quả dứa chín. Hơn nữa sự đồng đều của quả dứa sẽ thuận tiện cho làm đồ hộp.

Hiệu suất nhân giống cao là một ưu điểm nữa của giống nuôi cấy mô. Tốc độ nhân giống in vitro cao và nhanh hơn nhiều so với nhân giống truyền thống, thể hiện rõ trong ví dụ nhân giống khoai tây (bảng 9.1).

Rút ngắn giai đoạn phát triển và sử dụng ưu thế lai những cây lâu năm cũng đem lại hiệu quả kinh tế đáng kể. Những cây lâu năm như măng cụt, sầu riêng nếu trồng từ hạt thì thời gian ra hoa và quả kéo dài, có khi cả chục năm, nhưng cây nuôi cấy mô sớm cho hoa và quả vì không phải trải qua toàn bộ chu kì phát triển. Tận dụng trực tiếp ưu thế lai F_1 của cây rừng lâu năm là một ưu thế quan trọng của cây vi nhân giống : tuyển chọn ngay các cây có ưu thế lai từ hạt mọc lên và nuôi cấy mô nhân giống duy trì đặc tính tốt mà khỏi phải sản xuất giống bằng hạt.

Hình 9.13. Chuối và dứa nuôi cấy mô.

Sự đồng đều của 2 hàng chuối thể hiện ở các tấm nylon bao các buồng chuối già, tránh sự xâm hại của côn trùng. Các cây dứa cấy mô cũng mọc tương đối đều.

Bảng 9.1. So sánh hiệu suất của 2 phương pháp nhân giống khoai tây

Phương pháp truyền thống	*Phương pháp vi nhân giống*
Năm 1 100g củ ↓ Cây trưởng thành ↓ 1600g củ ↓	100g củ ↓ Cây con ↓ 10 mầm nuôi cấy ↓ Nhân giống các meristem ↓ 65000 củ bi (minitubers).
Năm 2 16 cây trưởng thành ↓ 16 x 600g củ = 25,6kg	617500 cây trưởng thành ↓ 617500 x 500g củ = 308750kg

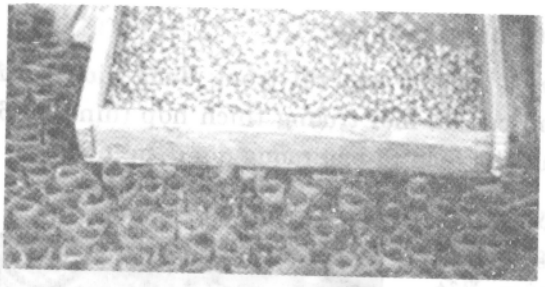
Ngoài ra, chủ động mùa vụ mang lại lợi ích kinh tế đáng kể. Ví dụ, khoai tây ở miền Bắc nước ta trồng vào mùa lạnh, 1 hộ gia đình có khi phải giữ hàng tạ hàng tấn củ khoai giống cho vụ sau vào mùa nóng với điều kiện bảo quản khó khăn và hao hụt đáng kể. Giống nuôi cấy mô giúp chủ động sản xuất theo kế hoạch.

Nhược điểm đáng lưu ý của giống nuôi cấy mô là có nhiều cây biến dị cần sớm loại bỏ. Do có nhiều ưu điểm nên xu hướng chung là tiến tới tự động hoá sản xuất giống nuôi cấy mô trên quy mô lớn.

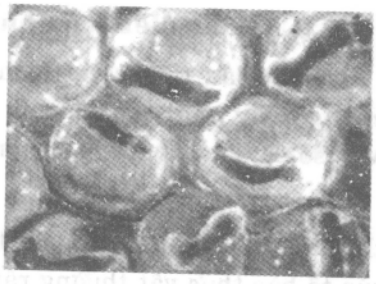
2. Củ khoai bi và hạt giống nhân tạo (artificial seeds)

Một phương pháp vi nhân giống khác đã có ứng dụng thương mại ở khoai tây là sản xuất củ bi. Khi các chồi phụ nuôi cấy mô của khoai tây được trồng trong điều kiện có cytokinin và gibberillic acid thích hợp, chúng sẽ ra nhiều củ nhỏ gọi là củ bi. Các củ bi này rất thuận tiện cho bảo quản và cung cấp giống khoai tây. Trong sản xuất thường dùng củ bi kích cỡ như hạt đậu Hà Lan, đường kính khoảng 1cm (hình 9.14).

Hạt nhân tạo là dạng phôi soma thu được từ nuôi cấy mô dòng lưỡng bội trộn với các chất dinh dưỡng và hormone ; và tất cả được bao trong chất tương tự gel (hình 9.15). Hạt giống kiểu này đang được phát triển và phổ biến rộng.



Hình 9.14. Khoai tây củ bi đang gieo vào bầu



Hình 9.15. Hạt nhân tạo

3. Sản xuất cây giống sạch mầm bệnh

Nhiều cây trồng và cây cảnh (ornamental) thường bị nhiễm các mầm bệnh vi sinh vật như viroid, virus, mycoplasma, vi khuẩn, nấm và tuyến trùng. Chúng gây thiệt hại nặng có khi đến 90% sản phẩm thu hoạch. Cách đơn giản hơn cả đối với vi khuẩn, nấm, tuyến trùng là chọn cành nhánh không nhiễm để thực hiện vi nhân giống.

Đối với các cây bị nhiễm viroid, virus và mycoplasma thì xử lí khó hơn nhiều. Dùng phương pháp nuôi cấy mô có thể loại được virus bằng 3 cách :

– Qua nhiều dòng cấy truyền, dòng nào bị nhiễm virus thì loại bỏ.

– Xử lí nhiệt độ : Tăng nhiệt độ lên cao để giảm hoặc loại bỏ sự sao chép của virus. Thường xử lí mô nuôi cấy ở 30 – 37°C trong 10 – 14 ngày hoặc 50 – 60°C với thời gian 5 – 10 phút để loại virus.

– Xử lí xanh malachite hoặc thiouracil : Khi mẫu mô đặt trên môi trường có các chất này, sự sinh sản của virus giảm.

4. Lập ngân hàng gen thực vật

Nhờ những thành tựu của những năm 1980, nuôi cấy tế bào, mô và cơ quan được ứng dụng vào bảo tồn nguồn gen trong phòng thí nghiệm (*ex situ*). Cách giữ giống có hiệu quả hơn cả đối với tế bào nuôi cấy mô và meristem là bảo tồn lạnh (cryopreservation). Vấn đề quan trọng trong lưu trữ giống là không để xuất hiện biến dị, phải kiểm tra thường xuyên sức sống và tính ổn định của giống. Lập ngân hàng gen thực vật bằng tế bào nuôi cấy mô là một cách bảo vệ sự đa dạng sinh học của thực vật.

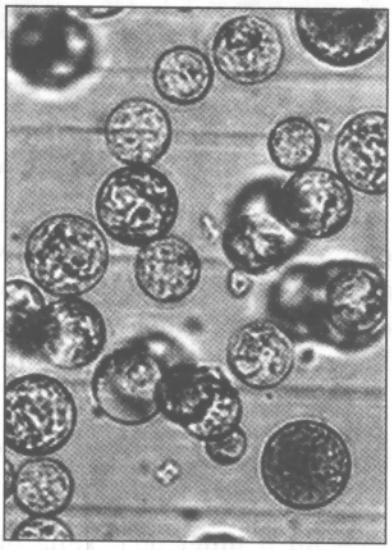
IV. NUÔI TẾ BÀO THỰC VẬT

Nếu chuyển mô sẹo vào môi trường lỏng và lắc sẽ có dịch các tế bào rời, các tế bào kết cục nhỏ và cục to. Dịch các tế bào rời có thể nuôi cấy tiếp vô hạn khi chuyển sang môi trường mới như nuôi tế bào VSV hay động vật. Dĩ nhiên phải chọn môi trường có thành phần thích hợp để đạt mật độ tế bào cao.

1. Các đặc điểm của nuôi tế bào thực vật

Điểm đầu tiên cần ghi nhận là các tế bào rời trong dung dịch có *độ không đồng nhất cao,* thường dính cục dù môi trường thích hợp (hình 9.16). Một số cây như thuốc lá, đậu nành cho dịch tế bào tương đối đồng nhất.

So với tế bào VSV, nuôi cấy tế bào thực vật khó khăn hơn. Sự tăng trưởng của tế bào thực vật thường rất chậm. Rất khó kiểm soát quá trình nuôi cấy và mức độ ổn định của các dòng tế bào. Hàm lượng các chất mong muốn nhận được thường thấp và dao động do ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy. Hơn nữa, do tế bào thực vật có kích thước lớn nên chúng dễ bị phá hủy hơn các tế bào VSV khi bị lắc hay sục khí mạnh. Sự tăng trưởng chậm kéo theo năng suất thấp và không ổn định. Hàm lượng các chất trao đổi thường thấp.



Hình 9.16. Tế bào rời trong dung dịch không đồng nhất

Nuôi tế bào rời có nhiều ưu điểm hơn nuôi cấy mô, cơ quan thực vật cho vi nhân giống. Những ưu điểm của việc nuôi tế bào thực vật làm chất xúc tác sinh học là :

– Có thể cung cấp liên tục nhiều sản phẩm trong mọi điều kiện thời tiết, trong khi các cây từ vi nhân giống phải được trồng mới cho kết quả và do đó phụ thuộc vùng lãnh thổ và mùa vụ.

– Chất lượng sản phẩm được cải tiến và ổn định nhờ khả năng chọn được các dòng tế bào có phẩm chất tốt và các điều kiện nuôi cấy được tối ưu hoá. Trong tương lai, tế bào rời sẽ là nguồn chất xúc tác đầy triển vọng cho các phản ứng sinh học để tạo ra các chất trao đổi sơ cấp đặc trưng ở thực vật.

– Nếu kiểm soát được điều kiện nuôi cấy, ta có thể tăng năng suất sản phẩm đặc hiệu do thực vật tạo ra.

– Trong quá trình nuôi cấy, tế bào thực vật phát triển còn nhanh hơn cây giống ban đầu. Điều này mở ra triển vọng tăng sản lượng cây trồng trong tương lai. Triển vọng tăng năng suất cây trồng còn được thúc đẩy bởi các điều kiện nuôi cấy tối ưu.

2. Quá trình nuôi tế bào

Quy trình nuôi tế bào được thực hiện theo sơ đồ :

Thực vật → Mẫu nuôi → Mô sẹo →

→ Sinh sản trong dịch nuôi → Thu tế bào

So với VSV, nuôi tế bào TV cho sinh sản chậm hơn. Nếu nuôi VSV người ta tính phút, giờ, còn nuôi tế bào thực vật phải tính ngày, tháng. Nuôi tế bào thực vật có thể lên men gián đoạn, lên men liên tục như VSV. Tăng trưởng của tế bào thực vật và VSV gần giống nhau .

Quần thể tế bào hình thành trong quá trình nuôi có độ đồng nhất rất nhỏ, gồm những tế bào riêng lẻ có kích thước và hình dạng khác nhau và nhiều nhóm tế bào cụm với nhau nên kết quả thu được không đồng đều.

Các tế bào thực vật trong môi trường lỏng thì sức sống yếu hơn so với các tế bào VSV. Ở VSV thì trong quá trình sinh sản có thể tạo sản phẩm nhưng ở thực vật chỉ ở giai đoạn cuối mới tạo sản phẩm.

Các nhà sinh học đang cố gắng ổn định các dòng tế bào và tìm cách cải thiện năng suất và tạo ra các hợp chất hữu dụng.

3. Những sản phẩm của nuôi tế bào

a) Shikonin

Nhờ kĩ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật, có thể thu nhận các vật liệu cho *chọn giống ở mức tế bào in vitro*. Khi nuôi cấy mô tế bào thực vật trên môi trường nhân tạo, chúng sinh sản thành nhiều dòng với biến dị cao hơn mức bình thường, được gọi là *biến dị dòng soma*. Một hiện tượng thường gặp là xuất hiện các dòng tế bào có số lượng nhiễm sắc thể thay đổi.

Chọn giống theo phương pháp này đã thu được nhiều kết quả cụ thể như giống cà chua đặc ruột (hình 9.17), khoai tây kháng bệnh,...

Tế bào thuộc loài *Lithospermum erythrorhizon* được sử dụng vào công nghệ sản xuất chất *shikonin* và các dẫn xuất của chất này.

Shikonin được dùng làm chất tạo màu trong mĩ phẩm. Đây là một dẫn chứng điển hình cho những ứng dụng của quá trình nuôi cấy tế bào thực vật trong việc sản xuất các chất trao đổi hữu ích.

Shikonin được sử dụng ở Nhật làm thuốc nhuộm cao cấp và dược phẩm thô từ lâu. Sắc tố đỏ hồng có cấu tạo phân tử gồm khung naphthazalin. Đó là một ester của axit béo ở rễ của loài thực vật này. Thành phần chính của *shikonin* gồm : acetyl, isobutyl, isovaleryl, 3 hydroxy isovalerin. Các nhà

khoa học Nhật Bản đã phát triển được hệ thống sản xuất *shikonin* thương mại thông qua việc nghiên cứu rộng rãi các quá trình chọn dòng tế bào có năng suất cao. Đồng thời, họ tìm cách cải thiện chất và lượng môi trường nuôi cấy tế bào. Kết quả họ chọn được 2 loại môi trường thích hợp.

Bằng cách sử dụng đồng thời cả 2 môi trường này trong quá trình nuôi cấy gồm 2 bước. Song song, quá trình bổ sung các chất tiêm chủng, độ thông khí và việc kiểm soát tác động khác của các chất tham gia phản ứng phải được tối ưu hóa cho quá trình phát triển của tế bào. Sau công đoạn tối ưu hoá các thông số của môi trường, các nhà khoa học áp dụng phương pháp chọn lọc môi trường nuôi cấy phôi vào quá trình chọn lọc cuối cùng các dòng tế bào. Các tế bào được chọn lọc theo phương pháp này có thể duy trì năng suất sản xuất *shikonin* cao và ổn định ít nhất là 8 tháng. Sau 14 ngày nuôi cấy, người ta thu được hơn 2g/l *shikonin*.

b) Anthocyanin

Theo dõi quá trình sản xuất *anthocyanin* ở tế bào nho đỏ (*Vitis*) trong môi trường nuôi cấy nhũ tương cho thấy : nồng độ đường cao và nồng độ muối phosphat thấp, điều kiện chiếu sáng bởi ánh sáng mặt trời sẽ kích thích quá trình tạo sắc tố. Quá trình tạo sắc tố bị ức chế bởi nồng độ cao của muối nitrat và 2,4-D. Độ thông khí cũng là một nhân tố quan trọng. Các tế bào *Euphorbia millii* được chọn lọc theo phương pháp dòng hoá tập hợp tế bào cũng có khả năng tổng hợp *anthocyanin*. Năng suất tạo sắc tố ở các tế bào này tương đối cao và ổn định.

c) Ubiquinon 10 hoặc coenzyme Q10

Dù được nuôi cấy trong môi trường dịch treo, khả năng tạo coenzyme ở tế bào *Nicotina tabacum* rất thấp. Người ta chọn được nhiều chủng có năng suất cao trong sản xuất coenzyme bằng kĩ thuật dòng hoá tế bào trong môi trường nuôi tế bào thuốc lá được đề cập ở trên. Các tế bào được chọn lọc ở trên có khả năng đạt được 15mg/l hay 1,9mg/g tế bào khô coenzyme Q10 trong điều kiện nuôi cấy ưu việt.

d) Berberine

Các tế bào thuộc loài *Coptis Japonica* có thể tạo *berberine*. Quá trình tổng hợp *berberine* bị ức chế bởi ánh sáng, nhưng lại được tăng cường bởi độ thông khí cao. Các dòng tế bào được chọn lọc thành công cho thấy có khả năng tạo *berberine* cao hơn tế bào không được chọn lọc. Dòng tế bào có khả năng tạo *berberine* cao nhất có thể đạt 13,2% / khối lượng khô hay 1,39g/l sau 3 tuần nuôi cấy.

e) Reserpine

Các tế bào *Rauwolfia serpentina* có khả năng tạo *reserpine* với hàm lượng khoảng 0,03 – 0,06%. Các tế bào được chọn lọc có khả năng tạo *reserpine* nhiều hơn *ajmaline*.

f) Tropane alkaloid

Các tế bào của *Hyoscyamus niger* có khả năng tổng hợp các tropane alkaloid như *hyoscyamine* và *scopolamine*.

Các rễ phụ mọc thêm dưới ảnh hưởng kích thích trong môi trường nuôi cấy nhũ tương của *H. niger* có khả năng sản xuất nhiều *scopolamin* (0,12 – 0,30%) hơn *hyoscyamine* (0,04 – 0,08%). Hơn nữa, rễ của tế bào *Duboisia leichhardtiic* tạo các alkaloid có hàm lượng cao hơn : 0,53% *hyoscyamine* và 1,16% *scopolamine*/khối lượng khô.

g) Ginseng saponin

Các nhà sinh học đã chọn được 2 dòng tế bào có thể tạo một lượng lớn *saponin* từ mô sẹo của loài sâm *Penax ginseng*. Nếu nuôi trong môi trường lắc, các tế bào sẽ phát triển mạnh hơn gấp 1,8 lần môi trường bình thường. Hàm lượng *saponin* tích lũy trong 2 môi trường này gần như bằng nhau, khoảng 0,7% khối lượng khô.

h) Biotin

Biotin có thể được tổng hợp ở nhiều loài thực vật như *Lavandula vera, Nicotiana tabacum, Glycine max*. Tế bào *L. vera* xanh lục tăng trưởng trong điều kiện chiếu sáng có thể tạo một lượng lớn *biotin*. Quá trình chọn lọc các dòng tế bào có tiềm năng trên được thực hiện bởi quy trình chiếu sáng tia-γ. Chúng có thể tạo được 0,5g/g khối lượng tươi *biotin*. Khi nuôi trong môi trường có bổ sung các hợp chất lưu huỳnh như : L-cysteine, DL-homocysteine, L-cystine hay DL-homocystine, chúng có khả năng tích lũy sắc tố xanh lam.

4. Các ứng dụng của tế bào được cố định

Cố định tế bào thực vật được mô tả lần đầu tiên năm 1979. Nó hứa hẹn khắc phục nhiều khuyết điểm của nuôi tế bào như : sự bất ổn định của tế bào, tỉ lệ tăng trưởng thấp,... Tuy nhiên, ứng dụng của các tế bào cố định vẫn còn nhiều hạn chế. Bởi lẽ, trong quá trình tổng hợp, một số chất bị bài tiết khỏi tế bào.

Đã có quan sát và theo dõi quá trình chuyển hoá *codeinone* thành *codeine*, một loại thuốc quan trọng do tế bào *Papaver somniferum* nhốt trong

alginate. Các tế bào trên không có khả năng sản xuất *codeine* trong điều kiện thí nghiệm, nhưng chúng có khả năng biến *codeinone* thành *codeine*.

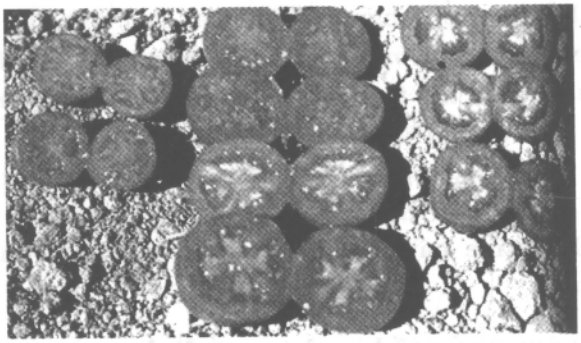
Yamada đã khám phá khả năng *tạo biotin* của tế bào họ *Lanvandula vera*. Họ thấy loài này còn có khả năng tổng hợp và thải ra sắc tố xanh lam khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy một lượng L-cysteine. Mô sẹo của *L. vera* được xử lí bằng cơ học hoặc bằng enzyme thì có thể duy trì trạng thái nhũ tương thích hợp cho cố định tế bào.

Ngoài enzyme, tế bào vi sinh vật, tế bào động vật, tế bào thực vật cũng là một trong những chất xúc tác sinh học quan trọng. Trong trường hợp các chất được bài xuất ra khỏi tế bào, phương pháp cố định tế bào là một kĩ thuật tốt để cải thiện các đặc tính của tế bào thực vật. Để có ứng dụng rộng rãi cần tìm kiếm và phát triển các chất liệu gel thích hợp và các phương pháp duy trì sự ổn định của các dòng tế bào.

V. CHỌN GIỐNG DỰA VÀO CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

Nhờ những thành tựu của nuôi cấy mô, cơ quan, tế bào trần và nuôi tế bào, chọn giống thực vật có thêm nhiều phương tiện mới để cải thiện giống cây trồng.

1. Biến dị dòng soma (Somaclonal variation)



Hình 9.17. Cà chua đặc ruột biến dị dòng soma (giữa)

2. Chọn giống các dòng giao tử

Các hạt phấn riêng lẻ có thể mọc trên môi trường nhân tạo thành *dòng tế bào đơn bội*. Các dòng này mang các kiểu gen khác nhau, biểu hiện sự đa dạng của các giao tử, sản phẩm của giảm phân. Chúng có bộ gen đơn bội nên các allele lặn có sự biểu hiện bình thường. Phương pháp này đặc biệt có hiệu quả cao khi mục tiêu chọn là các dạng đề kháng với các tác nhân bất

lợi của môi trường như kháng thuốc diệt cỏ, chịu lạnh, kháng bệnh, kháng phèn, mặn. Ví dụ : Muốn chọn dòng lúa chiêm chịu lạnh, các nhà chọn giống lấy hạt phấn của lúa chiêm cấy trên môi trường nhân tạo trong các hộp Petri (thường dùng để nuôi VSV) và đưa vào điều kiện lạnh 8 – 10°C. Các dòng chịu lạnh sẽ mọc, còn các dòng khác không mọc. Như vậy, từ một số lượng lớn các giao tử có kiểu gen khác nhau sẽ chọn được các dòng chịu lạnh.

Các dòng đơn bội qua chọn lọc được *lưỡng bội hoá* bằng 2 cách :

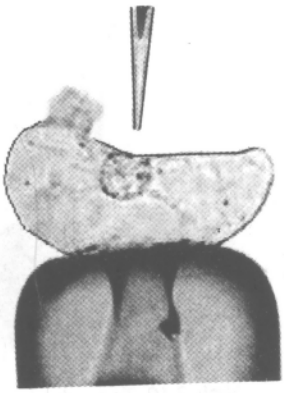
– Lưỡng bội hoá dòng tế bào (n) thành (2n) cho cây lưỡng bội.

– Cho cây đơn bội (n) lưỡng bội hoá thành cây lưỡng bội (2n).

Ưu điểm thứ hai của phương pháp chọn giống *in vitro* này là các dòng nhận được đều *thuần chủng*, vì chúng là kết quả của sự lưỡng bội hoá từ bộ gen đơn bội ban đầu.

3. Dung hợp tế bào trần

Nếu những tế bào mô sẹo cho xử lí các enzyme làm tan vỏ tế bào, tế bào sẽ mất vách trở thành *tế bào trần* (protoplast) (hình 9.18). Những tế bào trần có thể lai hay dung hợp với nhau. *Sự dung hợp tế bào trần* có thể được thực hiện giữa các loài khác nhau để tạo giống. Lúc đầu, nhiều người hi vọng có thể tạo được giống mới do sự kết hợp những tính trạng tốt của 2 loài. Tuy nhiên, các dung hợp này thường có sự loại bớt nhiễm sắc thể trong phân bào và không ổn định. Cho đến nay, người ta chỉ nhận được cây *pomato* là cây lai giữa cà chua và khoai tây và phải giữ giống khó khăn trong PTN.



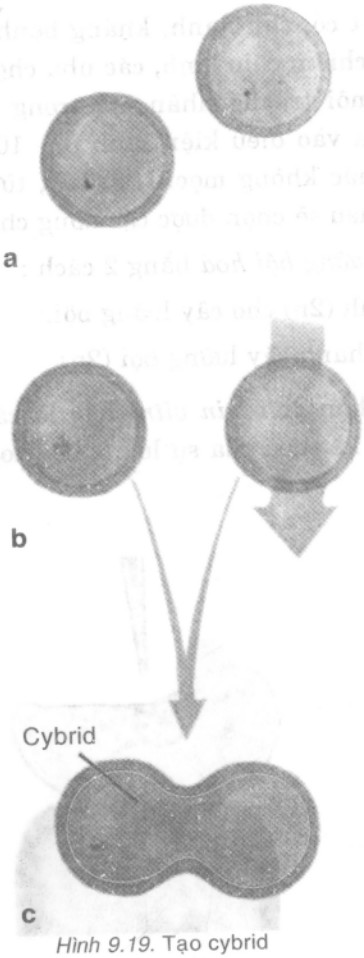
Hình 9.18. Vi tiêm vào tế bào

4. Cybridization, chlybridization và mibridization

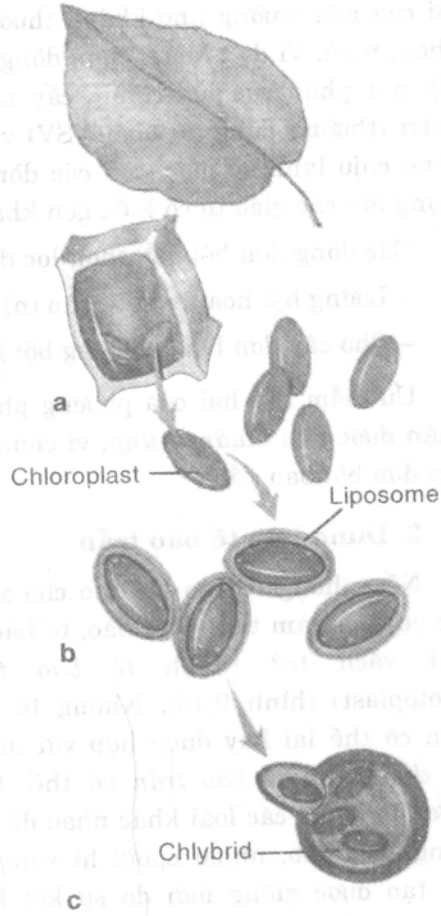
Nhờ phương pháp vi tiêm vào tế bào thực vật (hình 9.18), có thể tạo dòng tế bào mang các bào quan lạ :

– *Cybridization* (cy – cytoplasm – tế bào chất) + (hybrydization – lai) : Tế bào lai gọi là *cybrid* mang tế bào chất 2 loại tế bào nhưng có một nhân (hình 9.19).

– *Chlybridization* (Chl – chloroplast – lục lạp + hybridization) : Đưa lục lạp từ loài khác vào tế bào tạo thể lai chlybrid (hình 9.20).



Hình 9.19. Tạo cybrid
(tế bào phải bị mất nhân)



Hình 9.20. Tạo chlybrid (lục lạp tế bào lạ được bao trong màng lipid – liposome)

– *Mibridization* (mi – mitochondria – ti thể) : Đưa ti thể từ loài khác vào tế bào tạo thể lai mibrid.

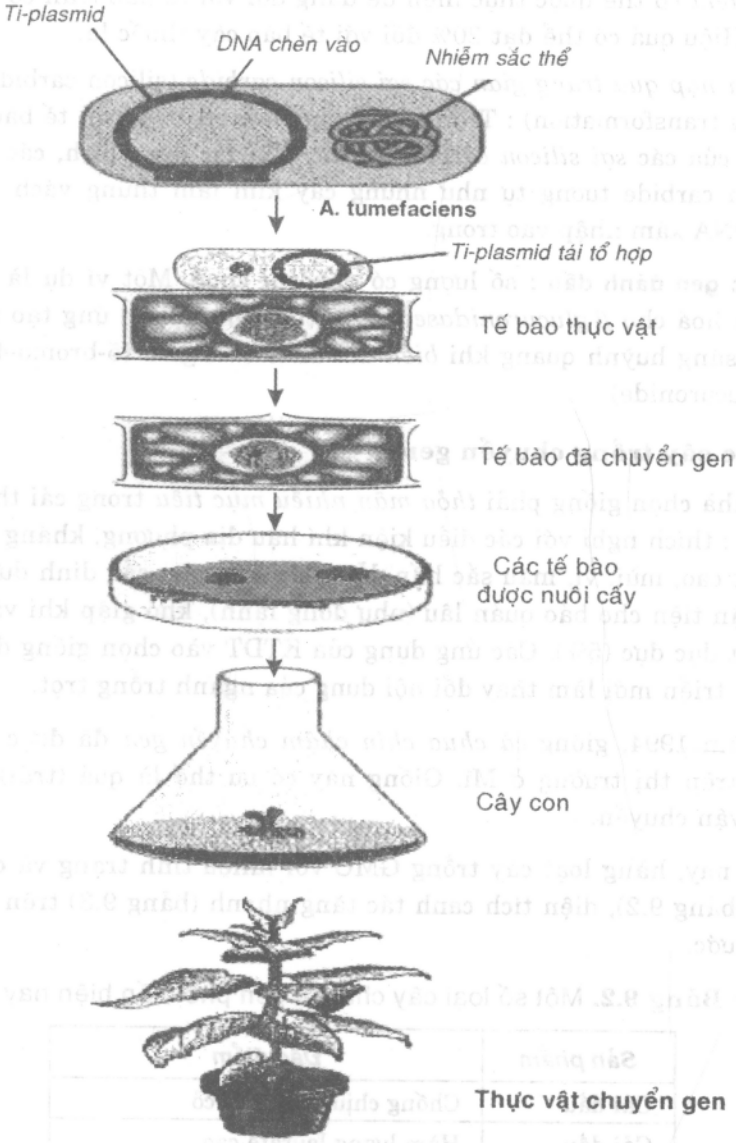
VI. SỰ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ GEN THỰC VẬT

1. Các phương pháp chuyển gen ở thực vật

Từ sau 1980, nhờ phát hiện vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* gây khối u ở thực vật, việc chuyển gen ở thực vật có bước nhảy vọt. Việc tạo giống bằng KTDT đã mở ra nhiều ứng dụng mới cho trồng trọt : không chỉ sản xuất các chất bột đường với năng suất cao, mà còn có thể sản xuất các protein trị liệu, máu, các kháng thể và chất dẻo. Các thực vật chuyển gen mới đã đạt đến thế hệ thứ ba (xem chương IV). Ngoài ra, thời gian chọn giống được rút ngắn đáng kể.

Do tế bào thực vật có vách cứng nên các nhà nghiên cứu đã tìm nhiều phương pháp khác nhau để đưa gen vào bên trong tế bào.

a) Chuyển gen qua trung gian Agrobacterium tumefaciens : Được thực hiện nhờ vi khuẩn tạo khối u ở thực vật, chủ yếu qua *Ti-plasmid* (hình 9.21). Đây là phương pháp thông dụng và dễ thực hiện ở thực vật.



Hình 9.21. Chuyển gen qua trung gian vi khuẩn A. tumefaciens

b) Chuyển gen trực tiếp : Có nhiều phương pháp như sử dụng lyposome, điện biến nạp (electroporation), vi tiêm, bắn gen, dùng silicon carbide.

+ *Bắn gen* là sử dụng *tốc độ cao của vi đạn đạo* mang RNA hay DNA (microprojectile) xuyên vào trong tế bào. Các *vi đạn* là những hạt *tungsten hay vàng* (đường kính 1 – 4μ) tẩm DNA.

+ *Vi tiêm* có thể được thực hiện dễ dàng đối với tế bào trần cố định trên alginate. Hiệu quả có thể đạt 20% đối với tế bào cây thuốc lá.

+ *Biến nạp qua trung gian các sợi silicon carbide* (silicon carbide whisker - mediated transformation) : Trộn chung các plasmid DNA với tế bào trong sự hiện diện của các *sợi silicon carbide* và lắc. Khi lắc dung dịch, các sợi mảnh của silicon carbide tương tự như những cây kim làm thủng vách tế bào để plasmid DNA xâm nhập vào trong.

c) Các gen đánh dấu : số lượng có đến vài chục. Một ví dụ là gen *gusA* (*uidA*) mã hoá cho *β-glucuronidase* (GUS) thực hiện phản ứng tạo màu xanh dưới ánh sáng huỳnh quang khi *biến đổi cơ chất X-gluc* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide).

2. Các cây trồng chuyển gen

Các nhà chọn giống phải *thỏa mãn nhiều mục tiêu* trong cải thiện giống cây trồng : thích nghi với các điều kiện khí hậu địa phương, kháng sâu bệnh, năng suất cao, mùi, vị, màu sắc hấp dẫn, đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng và vệ sinh, thuận tiện cho bảo quản lâu (như đông lạnh), khó giập khi vận chuyển và tạo bất dục đực (5%). Các ứng dụng của KTDT vào chọn giống đã tạo nên bước phát triển mới làm thay đổi nội dung của ngành trồng trọt.

Từ năm 1994, giống *cà chua chín chậm chuyển gen* đã được phép bán rộng rãi trên thị trường ở Mĩ. Giống này có ưu thế là quả (trái) không bị giập khi vận chuyển.

Hiện nay, hàng loạt cây trồng GMO với nhiều tính trạng và chất lượng cải biến (bảng 9.2), diện tích canh tác tăng nhanh (bảng 9.3) trên diện rộng ở nhiều nước.

Bảng 9.2. Một số loại cây chuyển gen phổ biến hiện nay

Sản phẩm	*Đặc điểm*
Cải dầu	Chống chịu chất diệt cỏ
Cải dầu	Hàm lượng laurate cao
Cải dầu	Hàm lượng oleic acid cao
Bắp	Chống chịu chất diệt cỏ
Bắp	Kháng côn trùng

Bông	Chống chịu chất diệt cỏ
Bông	Kháng côn trùng
Đu đủ	Kháng virus
Khoai tây	Kháng côn trùng
Khoai tây	Kháng virus
Đậu tương	Chống chịu chất diệt cỏ
Đậu tương	Hàm lượng oleic acid cao
Bí	Kháng virus
Cà chua	Chín chậm

Bảng 9.3. Diện tích cây trồng GMO trên thế giới từ 1996 – 2001 (triệu ha)

	1997	*1998*	*1999*	*2000*	*2001*
Các nước phát triển	9,5 (86%)	23,4 (84%)	32,8 (82%)	33,5 (76%)	39,1 (74%)
Các nước đang phát triển	1,5 (14%)	4,4 (16%)	7,1 (18%)	10,7 (24%)	13,5 (26%)
Tổng số	**11,0**	**27,0**	**39,9**	**44,2**	**52,6**

Tại Mĩ, người ta đã ghi nhận những lợi ích cơ bản trong mùa vụ 1999 – 2000 như sau : sử dụng ít thuốc hoá học hơn (bảng 9.4) và tăng sản lượng. Doanh số bán hạt giống biến đổi gen trên toàn cầu đã gia tăng nhanh chóng kể từ năm 1995 khi hạt giống biến đổi gen lần đầu tiên được trồng thương mại hoá. Năm 2002 ước tính đạt 4 tỉ USD, cao hơn so với trị giá 3,7 tỉ USD trong năm 2001 (bảng 9.5). Trị giá thị trường cây GMO được tính toán căn cứ trên doanh số bán hạt giống biến đổi gen cộng với bất cứ chi phí ứng dụng công nghệ nào khác.

Bảng 9.4 . Lợi nhuận của cây trồng biến đổi gen (GMO)

Cây trồng	*Lợi nhuận*
Đậu nành kháng thuốc diệt cỏ	Tiết kiệm 216 triệu USD/năm trong trừ cỏ dại. Giảm dùng 19 triệu liều thuốc diệt cỏ (1999).
Bông kháng thuốc diệt cỏ	Giảm dùng 19 triệu liều thuốc diệt cỏ (2000).
Bông kháng sâu	Sử dụng thuốc trừ sâu ít hơn 2,7 triệu liều. Giảm sử dụng 15 triệu liều thuốc trừ sâu/ năm. Tổng thu nhập tăng 99 triệu USD.
Bắp kháng sâu	66 triệu ha ruộng tránh được sâu đục bắp.

Bảng 9.5. Doanh số bán hạt giống biến đổi gen trên toàn cầu.

Năm	*Trị giá ước tính (USD)*	*Trị giá tăng giảm (USD)*
1995	1000000	
1996	148000000	+ 147000000
1997	859000000	+ 711000000
1998	1970000000	+ 1.111000000
1999	2950000000	+ 977000000
2000	3044000000	+ 94000000
2001	3700000000	+ 656000000
2002	> 4000000000	

Năm 2002 lần đầu tiên doanh số vượt quá 4 tỉ USD : đậu tương biến đổi gen chiếm 2,34 tỉ USD, bông biến đổi gen đạt 849 triệu USD, ngô biến đổi gen đạt 658 triệu USD và cải dầu biến đổi gen đạt 220 triệu USD.

Ước tính năm 2001, hạt giống biến đổi gen chiếm khoảng 13% trong tổng thị trường hạt giống toàn cầu trị giá là 30 tỉ USD. Năm 2003, trị giá thị trường cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu ước tính đạt từ 4,5 tới 4,75 tỉ USD, tăng so với con số 4 tỉ USD năm 2002, chiếm 15% trong tổng trị giá 31 tỉ USD thị trường bảo vệ cây trồng trên toàn cầu và chiếm 13% trong tổng trị giá 30 tỉ USD thị trường hạt giống toàn cầu. Giá trị thị trường cây trồng GMO trên toàn cầu dự kiến đạt 5 tỉ USD hoặc hơn thế nữa vào năm 2005.

3. Những bàn cãi về GMO

Một số nước như Mĩ, Canada, Argentina,... và những tập đoàn khổng lồ sản xuất giống cây trồng như Monsanto, Arventis, du Pont,... đã *ca ngợi nhiều đặc tính ưu việt*, an toàn thực phẩm và môi sinh của các cây GMO như vừa nêu trên. Có thể nói, chưa bao giờ các cây trồng được nghiên cứu kĩ ở nhiều khía cạnh (môi sinh, an toàn thực phẩm) như đối với các GMO. Quả thật, nếu được ứng dụng rộng rãi thì các cây GMO không những làm tăng vọt sản lượng mà còn có thể phát triển trên diện rộng ở những vùng đất mới khắc nghiệt (mặn, khô hạn, phèn,...) khó canh tác cho đến nay.

Mặt khác, việc ứng dụng rộng rãi GMO gặp phải sự phản đối gay gắt từ nhiều nhà khoa học, vì cho rằng chúng tạo nên :

– Các thực phẩm có độc tố tiềm ẩn, mà các thí nghiệm ngắn hạn chưa thể ghi nhận được.

– Tác động xấu đến môi trường về nhiều mặt và cả đến sự đa dạng sinh học.

Ngoài ra, tâm lí người tiêu dùng ngại sử dụng những sản phẩm bị biến đổi quá đặc biệt phi tự nhiên là một vấn đề rất quan trọng. Do đó, hiện nay đã đạt đến quy định là các sản phẩm từ cây trồng biến đổi gen phải dán nhãn để người tiêu dùng có sự lựa chọn.

Các nước châu Âu rất thận trọng trong áp dụng các cây trồng biến đổi gen, nhưng đến nay từng bước đã cho du nhập. Xu hướng chung hiện nay trên thế giới là phát triển các cây trồng biến đổi gen.

Tuy vấn đề đang bàn cãi, nhưng trên thực tế các sản phẩm cây trồng biến đổi gen đã xâm nhập vào nhiều nước. Ngay ở châu Âu, một số thức ăn chăn nuôi cũng có sản phẩm biến đổi gen và ở Việt Nam tình hình cũng tương tự.

Trên thế giới, các nhà khoa học cho rằng cần đánh giá về sự an toàn của GMO ở 3 mặt.

– Thứ nhất, *cần xác định tất cả vật liệu di truyền đưa vào cây* trồng : Có khoảng 14 gen sử dụng trong biến đổi gen là có vấn đề, đặc biệt là 5 loại gen chủ yếu đưa vào cây trồng :

+ Các gen kháng côn trùng như *Bt* tạo độc tố Cry1A từ *B. thuringiensis*.

+ Các gen kháng thuốc diệt cỏ.

+ Các gen kháng thuốc kháng sinh làm gen đánh dấu để chọn lọc.

+ Các gen bất dục đực kiểu "*Terminater*" biểu hiện ở hạt phấn hoa.

+ Các antisense-RNA.

– Thứ hai, *cần đánh giá nguy cơ truyền gen sang các cây hoặc sinh vật khác*. Trong tự nhiên, quá trình chuyển gen giữa các sinh vật là phổ biến, thậm chí có thể xảy ra chuyển gen từ vi khuẩn vào tế bào thực vật như trường hợp vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* tạo khối u ở thực vật và hiện vi khuẩn này đang được sử dụng để đưa gen vào thực vật. Nếu các gen kháng thuốc kháng sinh được truyền sang nhiều loại vi khuẩn sẽ làm tăng nguy cơ kháng thuốc của nhiều vi trùng gây bệnh. Mối nguy này cần được đánh giá kĩ trong thời gian dài.

– Thứ ba, *cần đánh giá độ an toàn của các sản phẩm gen* : Thực phẩm an toàn là vấn đề rất nhạy cảm cho người tiêu dùng. Ngày nay, yêu cầu đối với thực phẩm rất cao : không những không làm hại đến sức khỏe, mà còn không ảnh hưởng đến thế hệ tiếp theo và không tác động xấu đến môi trường.

Việc theo dõi và đánh giá những vấn đề nêu trên khó thực hiện và cần thời gian dài. Ngoài ra, theo chúng tôi : các nhà khoa học cho đến nay chú ý nhiều đến mối nguy về độc tố và môi trường, mà chưa đề cập nhiều các tác động tiến hoá chung đối với quần xã sinh vật khi mà nồng độ các gen như *cry1A* tăng vọt trong một thời gian dài.

TÓM TẮT CHƯƠNG

CNSH TV liên quan đến *đời sống hàng ngày* của nhân loại và sự phát triển của nó có ảnh hưởng toàn cầu. Sự phát triển các kĩ thuật *in vitro* ở thực vật như *nuôi cấy mô tế bào, nuôi cơ quan, hạt phấn, tế bào trần* có nhiều ứng dụng quan trọng trong vi nhân giống và lai tạo giống.

Sự hình thành *mô sẹo* là giai đoạn then chốt trong nuôi cấy meristem. Từ *mô sẹo* có thể điều khiển sự phát triển theo nhiều hướng khác nhau dưới tác động của auxin và cytokinin.

Vi nhân giống chứng tỏ nhiều lợi thế như không phụ thuộc mùa vụ, các cây con có độ đồng đều cao, hiệu suất nhân giống cao, rút ngắn giai đoạn tăng trưởng,...

Nuôi tế bào thực vật khó hơn tế bào VSV, nhưng nhiều chất đã được thu nhận nhờ nó và hứa hẹn được mở rộng ứng dụng.

Chọn giống *in vitro* có nhiều phương pháp mới ở cấp độ tế bào nhờ những tiến bộ của kĩ thuật nuôi cấy mô : *biến dị dòng soma, chọn giống giao tử, dung hợp tế bào trần, cybridization, chlybridization và mibridization.*

Công nghệ gen thực vật phát triển mạnh và cải biến nhiều tính trạng cây trồng, các GMO được canh tác trên diện rộng đạt trên 50 triệu ha vào năm 2001. Tuy nhiên, GMO là vấn đề còn đang tranh cãi.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. CNSH TV có vai trò gì đối với loài người ?
2. CNSH TV có những ưu thế chủ yếu nào ?
3. Sự xuất hiện cấu trúc gì giữ vai trò then chốt trong nuôi cấy meristem ?
4. Chất điều hoà tăng trưởng TV có vai trò gì trong kĩ thuật *in vi tro* ?
5. Nêu các nguồn cơ chất chủ yếu dùng trong môi trường nuôi các VSV.
6. Tế bào trần được ứng dụng như thế nào ?

7. Nuôi bao phấn và hạt phấn thực hiện như thế nào ?

8. Vi nhân giống có những ưu điểm gì ?

9. Nuôi tế bào rời của thực vật có những đặc điểm gì ?

10. Chất shikonin được thu nhận bằng nuôi tế bào như thế nào ?

11. Các công nghệ tế bào nào được ứng dụng vào chọn giống ?

12. Cybridization, chlybridization và mibridization là gì ?

13. Chuyển gen ở thực vật có những đặc điểm gì ?

14. Các cây GMO có những ưu điểm gì và đã phát triển thế nào ?

15. Vì sao có tranh cãi về GMO ?

CHƯƠNG 10

CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẾ BÀO NGƯỜI VÀ ĐỘNG VẬT

CNSH tế bào người và động vật hiện nay bao gồm các lĩnh vực chủ yếu như nuôi cấy các tế bào, tạo kháng thể đơn dòng, cấy ghép cơ quan và cấy phôi, tạo dòng vô tính động vật (animal cloning), tế bào gốc (stem cell), các phương pháp sinh sản nhân tạo, cấy ghép cơ quan, kĩ thuật chế tạo mô (tissue engineering). Tuy ra đời chậm hơn so với CNSH VSV, nhưng nó có *nhiều ứng dụng liên quan trực tiếp đến con người* nên phát triển mạnh và nhanh với các đặc điểm :

– Kĩ thuật phức tạp và khó thực hiện.

– Đáp ứng nhiều nhu cầu cấp thiết cho phòng và chữa trị bệnh.

– Nhiều phát minh ở động vật rất dễ ứng dụng cho người nên là những vấn đề *nhạy cảm đối với dư luận xã hội.*

– Nhiều ứng dụng trong chăn nuôi.

Chỉ trong 4 năm cuối của thế kỉ XX đã có 3 phát minh nền tảng của CNSH động vật gây chấn động dư luận thế giới và những thành tựu mới được thông báo thường xuyên trên các phương tiện truyền thông đại chúng như nhân bản vô tính cừu Dolly, tế bào gốc và kháng thể đơn dòng.

I. NUÔI CẤY TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

Từ năm 1907, nuôi cấy tế bào động vật *in vitro* lần đầu tiên được chứng minh có khả năng thực hiện. Đến năm 1949, J.F. Enders nuôi mô động vật thành công và đã cho thấy virus gây bại liệt (*Poliovirus*) có thể phát triển trong các tế bào nuôi *in vitro.*

Đầu thập niên 1950, tế bào động vật có vú được nuôi với số lượng lớn để nuôi nhiều virus bại liệt *(Poliomyelite virus)* dùng chế vaccine chống bệnh bại liệt. Sau đó, việc nuôi các tế bào người được phát triển để nhân các virus khác và sản xuất các protein đặc hiệu như các kháng thể và interferon. Việc nuôi tế bào trong môi trường lỏng có lắc đạt quy mô trên nghìn lít. Nhu cầu tăng mạnh trong sản xuất các chế phẩm miễn dịch dẫn đến sự phát triển *Công nghệ vaccine và các chế phẩm miễn dịch.*

Nuôi tế bào động vật có vú là một trong những lĩnh vực phát triển mạnh của CNSH. Nó được ứng dụng chủ yếu vào các lĩnh vực như sản xuất

vaccine virus ; sản xuất các protein, hormone trị liệu, r-protein bằng các tế bào động vật ; sản xuất các kháng thể đơn dòng. Nó có thể góp phần phục hồi các cơ quan bị thương tổn hay chế tạo các cơ quan nhân tạo trong *Y học phục hồi* (Regenerative medecine).

1. Những khó khăn trong nuôi cấy tế bào động vật có vú

Nuôi tế bào động vật có vú và người khó hơn rất nhiều so với nuôi tế bào VSV. Các tế bào cơ thể của phần lớn động vật có sự chuyên hoá ở mức cao nên chúng không có *tính toàn thể* (totipotency) như tế bào thực vật. Khi tách các tế bào động vật ra khỏi cơ thể để nuôi trong môi trường nhân tạo, chúng có nhiều biểu hiện đặc biệt và không phát triển được đến cơ thể trưởng thành. Trong quá trình nuôi thường xuất hiện các loại tế bào với *số bội thể khác nhau*. Hơn thế nữa, các tế bào bình thường sinh sản đến một lúc nào đó thì *bị chết* theo chương trình. Mật độ tế bào nuôi rất thấp, tính chung đạt khoảng 1 triệu tế bào/1ml sau nuôi cấy so với 10 tỉ tế bào/ml ở vi khuẩn. Nồng độ tế bào cao trong nuôi cấy là điều cần có nhằm tăng tốc độ sản xuất và năng suất của bioreactor để giảm thiểu dung tích sử dụng.

a) Sinh sản rất chậm : Tế bào động vật có vú cần 15 đến 40 giờ để tăng gấp đôi số lượng, trong khi các vi khuẩn chỉ cần vài chục phút hay nhiều lắm là 1 đến 2 giờ. Quá trình sản xuất có thể thực hiện trong vài giờ hoặc vài ngày đối với tế bào vi khuẩn và nấm men, còn đối với tế bào động vật có vú thì đòi hỏi nhiều ngày, thậm chí vài tuần.

b) Rất nhạy cảm với các yếu tố môi trường nuôi cấy như chỉ chịu đựng được nhiệt độ trong một giới hạn rất hẹp giữa 35 – 39^{0}C, đòi hỏi sự cung cấp oxygen ổn định và nhạy cảm hơn với khuấy động nước.

Nói chung, một quần thể tế bào động vật nhạy cảm khi sử dụng hết nguồn dinh dưỡng thường nhanh chóng chuyển sang pha chết của các tế bào. Vấn đề không phải chỉ do mất thế năng sinh tổng hợp mà còn ở chỗ các tế bào chết bị tan và phóng thích ra môi trường các protease cùng nhiều chất bất lợi. Các chất không mong muốn này gây trở ngại đáng kể đến hiệu quả thu hồi sản phẩm và làm phức tạp hơn việc tách sản phẩm khỏi môi trường nuôi và tinh sạch chế phẩm.

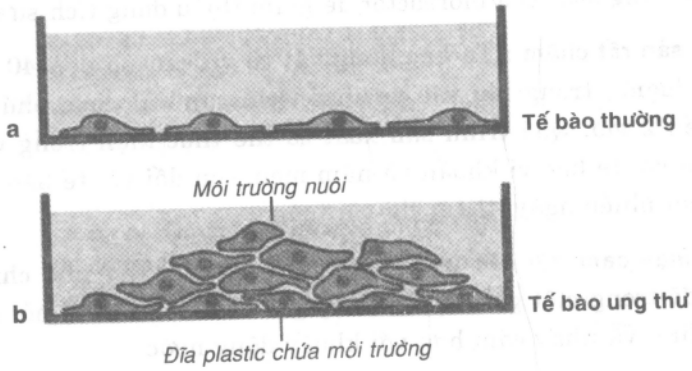
Xét từ gốc độ kinh tế, sự hoàn thiện kĩ thuật nuôi cấy tế bào động vật và chủ động sử dụng chúng trong công nghiệp là vấn đề không đơn giản.

2. Phương pháp xác định các tế bào để nuôi

Khởi đầu một mảnh mô được tách ra trong các điều kiện vô trùng rồi đem xử lí với enzyme protease, thường là *trypsin*, để cắt mô tách các tế bào

rời nhau ra. Sau khi lấy trypsin ra, dịch tế bào được cấy vào bình thuỷ tinh hay bình nhựa có đáy phẳng rộng chứa môi trường dinh dưỡng lỏng thích hợp cho sự phát triển của tế bào. Các tế bào sau khi trải qua *pha lag* sẽ bám vào đáy bình chứa và bắt đầu nguyên phân. Dòng tế bào nuôi bắt nguồn trực tiếp từ mô đã biệt hoá được gọi là *dòng nuôi sơ cấp* (primary culture). Các tế bào phân chia đã nhanh chóng tạo thành một lớp tế bào lấp kín khít đáy bình nên được gọi là *lớp đơn* (monolayer) (hình 10.1a). Việc tạo lớp đơn là biểu hiện đặc biệt của các tế bào bình thường do tính chất được gọi là *kìm hãm tiếp xúc* (contact inhibition). Sự kìm hãm bởi tiếp xúc được thấy rõ khi lớp đơn tế bào bị lấy mất một lõm, các tế bào rìa lõm trống sẽ lại chia đến khi lấp kín lõm trống thì dừng không chia nữa. Các tế bào từ mô ung thư hoặc đã biến đổi (transformed) thì mất sự kìm hãm tiếp xúc, nên chia liên tục tạo thành nhiều lớp tế bào chồng lên nhau (hình 10.1b).

Ngoài phương pháp thông dụng nêu trên có thể nuôi các mảnh của các cơ quan cơ thể, các phôi nguyên vẹn, các mô được cắt mảnh hoặc nghiền nhỏ.



Hình 10.1. Hiện tượng kìm hãm tiếp xúc
a. Kìm hãm tiếp xúc ở tế bào bình thường.
b. Không có kìm hãm tiếp xúc ở tế bào ung thư.

Để nhân các dòng tế bào sơ cấp qua *xử lí trypsin*, thuận tiện hơn cả là sử dụng các *mô của phôi* như mô cơ-da, thận, phổi,... Các tế bào phôi có hoạt tính hấp thu dinh dưỡng mạnh khi tách khỏi cơ thể và bộ gen của chúng tương đối ổn định trong quá trình nuôi. Có thể nuôi cấy tốt các mô của khối u. Tuy nhiên, từ các mô ung thư hiếm khi nhận được dòng nuôi sơ cấp phát triển nhanh so với từ phôi ; trong khi đó sự chuyển tế bào sang các dòng sống sót để phát triển tiếp thì các tế bào ung thư biểu hiện mạnh hơn so với các tế bào phôi. Trên thực tế, dòng nuôi tế bào có thể nhận được từ bất kì mô nào.

Các tế bào dòng nuôi sơ cấp có thể tách khỏi bình bằng xử lí với trypsin hay EDTA (tác nhân kiềm). Chúng có thể được dùng để tạo *dòng nuôi thứ cấp* (secondary cultures) bằng cách đưa chúng vào môi trường dinh dưỡng mới với nồng độ cao. Các tế bào của dòng sơ cấp có thể chuyển qua *hàng loạt cấy chuyền*. Các tế bào sinh sản với tốc độ ổn định qua nhiều lần chuyền và chúng tạo nên *chủng tế bào* (cell strain). Các dòng tế bào không phải tồn tại vô hạn mà chúng phân chia chỉ một số lần nhất định trước khi tốc độ tăng trưởng của chúng giảm và chết. Ví dụ, các tế bào người nói chung chỉ chia 50 – 100 lần trước khi chết.

3. Các dòng tế bào liên tục (Continuous cell lines)

Không phải tất cả các tế bào cơ thể động vật đều cho các dòng sơ cấp mà tất cả các thế hệ thứ cấp của chúng đều chết. Phần lớn các tế bào chuột chết sau khi chia 30 – 50 lần, nhưng một số ít tế bào đã biến đổi dẫn đến có hình thái khác, tăng trưởng nhanh hơn và có khả năng bắt đầu dòng nuôi từ một số lượng ít tế bào. Thế hệ bắt nguồn từ những tế bào ngoại lệ đó có sự tồn tại vô hạn, khác với các *chủng tế bào* mà từ đó chúng bắt nguồn, chúng được gọi là các *dòng tế bào* (cell lines).

Trong quá trình cấy chuyền, hàng loạt dòng tế bào chịu những biến đổi rất mạnh. Ví dụ, mật độ tế bào khi ngừng phân chia có nhiều xu hướng tạo thành cục hơn là tạo lớp đơn và các tế bào định hướng lẫn nhau không đều. Các dòng tế bào như vậy được gọi là *bị biến đổi* (transformed) và nói chung là *mô ung thư*, chúng sẽ gây ung thư khi cấy mô vào các động vật tương ứng của chúng. Các tế bào ung thư thường ở dạng *đa bội lệch* (aneuploid) và còn có các biến đổi kiểu gen khác.

Do các dòng tế bào có xu hướng biến đổi liên tục qua nhiều lần nuôi lặp lại, nên nói chung chúng được giữ ở trạng thái *đông lạnh*. Các tế bào được giữ bằng cách này duy trì sức sống được trong nhiều năm và khi cần chúng tạo ra các dòng nuôi mới. Các tế bào của những dòng nuôi có những tính chất khác với các tế bào bình thường, cả ở quá trình trao đổi chất.

4. Môi trường dinh dưỡng và cách pha chế

Tế bào động vật có vú có nhu cầu dinh dưỡng hết sức phức tạp. Yếu tố hàng đầu là phải chọn môi trường dinh dưỡng tốt nhất cho tăng trưởng và sinh sản của tế bào khi tách mô khỏi cơ thể.

a) Môi trường nuôi tự nhiên : Do sự phức tạp của môi trường dinh dưỡng nuôi tế bào động vật có vú nên có thể dùng ngay các môi trường tự nhiên như các cục máu đông, dịch huyết tương, nước ối bào thai, dịch chiết phôi,...

b) Môi trường nuôi tổng hợp : Một thành phần không thể thiếu được cho tất cả các loại môi trường tổng hợp là *huyết tương* của máu, chiếm khoảng 5 – 10%. Tất cả các môi trường tổng hợp đều phải có thêm thành phần căn bản là *dung dịch sinh lí* hay *dung dịch muối cân bằng* gồm hỗn hợp các muối vô cơ, mà chức năng của nó là duy trì pH, áp suất thẩm thấu và cung cấp chất vô cơ.

c) Các thành phần căn bản của môi trường : Nhu cầu dinh dưỡng của tế bào động vật rất phức tạp nên môi trường chứa nhiều thành phần khác nhau. Ví dụ, muối gồm NaCl, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $NaHCO_3$, đường, phenol đỏ,... Ngoài các chất trong huyết tương, cần bổ sung các loại amino acid (khoảng 20 loại) và 7 loại vitamin. Môi trường dinh dưỡng phải thoả mãn các điều kiện :

– Có đủ những ion vô cơ căn bản (Na, Ca, K..).

– Áp suất thẩm thấu phải chính xác.

– pH phải chính xác (thường được giữ ở 7 – 7,3).

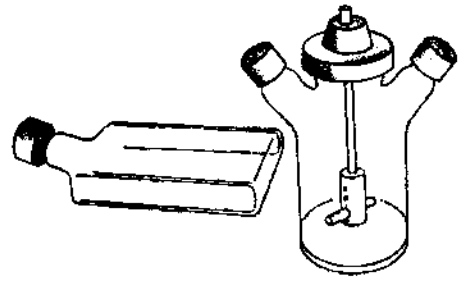
– Nguồn năng lượng lấy từ glucose.

– Có phenol để dễ theo dõi pH.

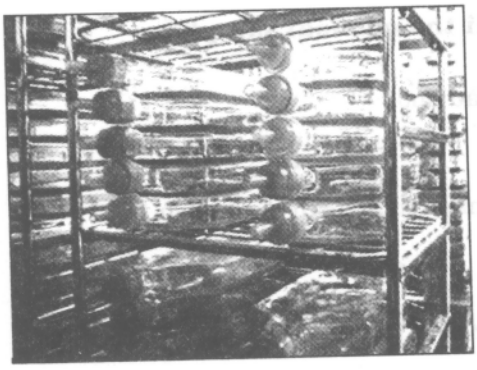
Thường môi trường chứa 5 – 10% huyết tương bò con (trong bụng mẹ).

Giữ pH ổn định rất khó nên cần dung dịnh đệm, ngoài ra còn thêm soda. Việc duy trì lượng CO_2 (5%) ở một áp suất hợp lí là yếu tố không thể thiếu được. Nếu môi trường càng giàu dinh dưỡng thì càng dễ nhiễm VSV khác nên trong môi trường nuôi phải thêm *chất kháng vi khuẩn* và *nấm* (penicillin diệt khuẩn, nystatin diệt nấm,...).

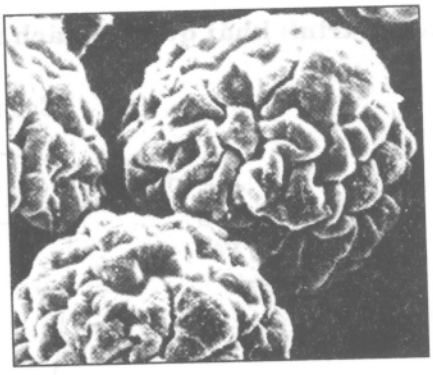
Thiết bị nuôi : Có thể dùng bình Roux và bình trụ để nuôi ở quy mô nhỏ (hình 10.2). Trong sản xuất công nghiệp nuôi bình lớn trên giàn kệ (hình 10.3). Sau này người ta cải tiến dùng bi trong bioreactor (hình 10.4 và 10.5) thì hiệu quả cao gấp 60 lần, và mới đây có bioreactor loại mới bằng túi plastic dùng nuôi tế bào côn trùng.



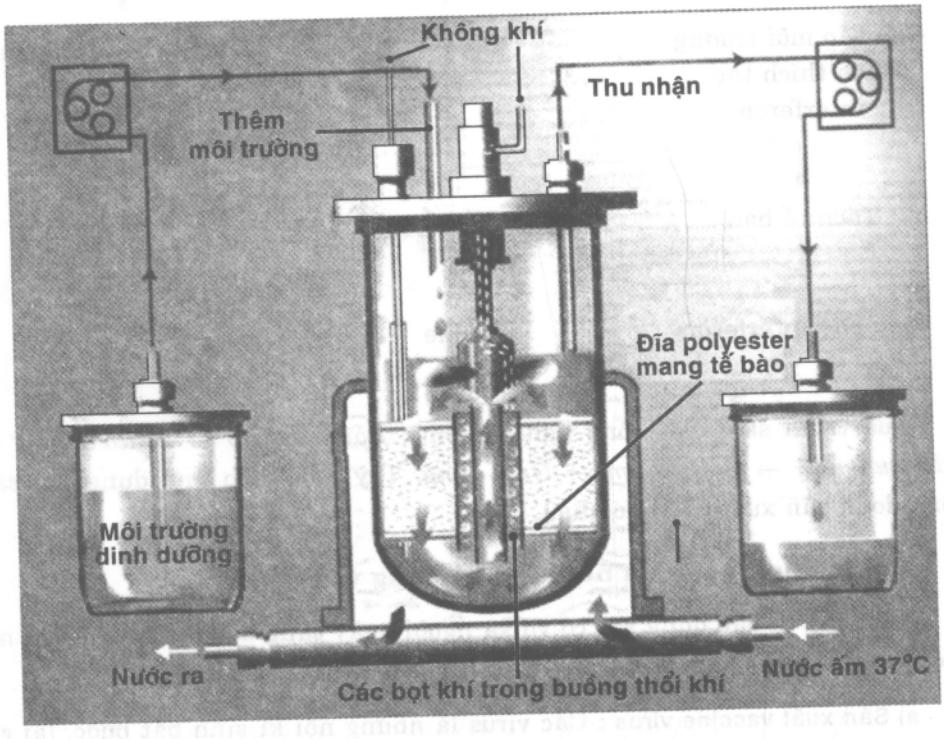
Hình 10.2. Bình Roux và bình trụ



Hình 10.3. Các bình Roux to xếp trên kệ

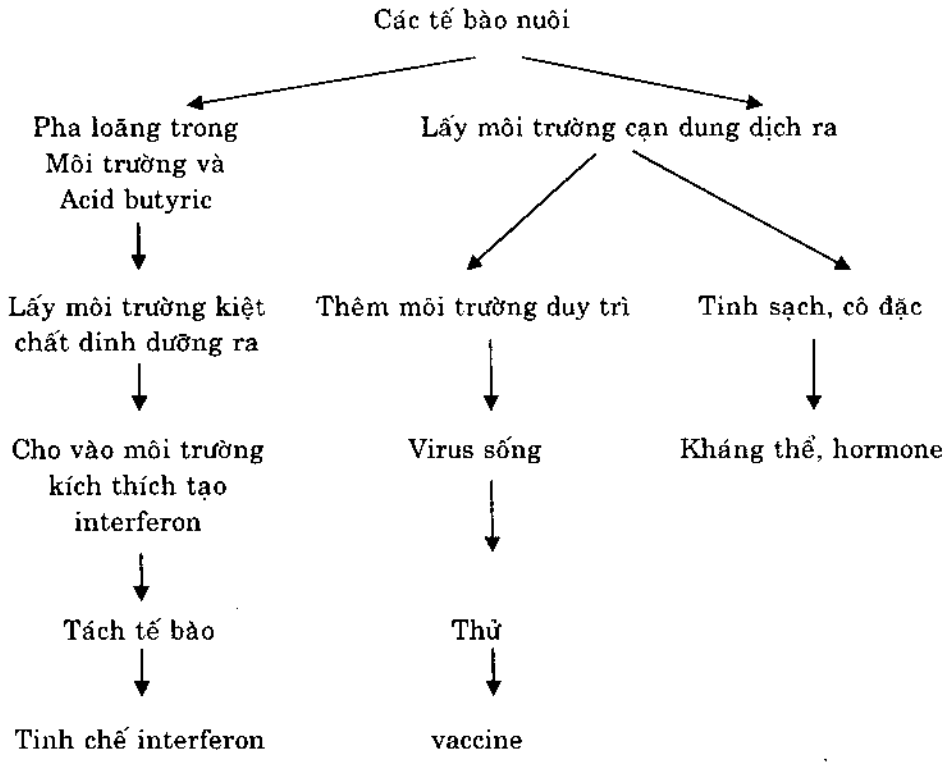


Hình 10.4. Tế bào bao quanh viên bi



Hình 10.5. Bioreactor nuôi tế bào động vật

5. Quy trình khái quát và cách xử lí thu các loại sản phẩm



Quá trình sản xuất công nghiệp gồm : *Dòng sơ cấp → Nhân giống → Sản xuất lớn → Sản phẩm → Ứng dụng.* Tuỳ mục đích ứng dụng mà các công đoạn sản xuất có khác nhau.

5. Các ứng dụng của nuôi tế bào động vật

Nuôi cấy tế bào động vật có vú và người ngày càng được phát triển vì nó tạo ra nhiều chế phẩm thiết yếu trong y dược.

a) Sản xuất vaccine virus : Các virus là những nội kí sinh bắt buộc, lại có tính đặc hiệu cao với từng loại tế bào chủ. Do đó, muốn nhân nhiều số virion làm vaccine cho người thì phải nuôi tế bào động vật có vú hoặc tốt hơn cả là nuôi tế bào người rồi gây nhiễm virus để chúng sinh sản. Có thể gây nhiễm virus cho các động vật như khỉ để sản xuất vaccine virus, nhưng số lượng hạn chế, khó chủ động thực hiện với quy mô công nghiệp và giá thành cao. Đến nay, một số vaccine chủ yếu đã được sản xuất :

– Vaccine chống bệnh bại liệt, viêm gan virus B.

– Vaccine chống bệnh quai bị, bệnh sởi, bệnh dại.

– Vaccine chống 1 loại virus gây bệnh sán lá ở động vật.

– Vaccine chống lở mồm, long móng ở gia súc (hơn 1,5 tỉ liều/năm).

b) Sản xuất các protein như interferon, kháng thể và các hormone dùng trị liệu. Chúng là sản phẩm vốn có của tế bào sống, nên nuôi nhiều tế bào và tạo điều kiện thích hợp để chúng được tiết ra với số lượng lớn rồi chiết tách thu nhận sản phẩm. Các protein trị liệu loại này tuy giá thành có cao, nhưng hiệu quả trị liệu rất tốt vì chúng được tạo ra gần điều kiện tự nhiên của tế bào. Do vậy loại sản xuất này hiện vẫn được duy trì.

c) Các protein trị liệu như các α-, β-interferon, thymosin, interleukine, plasmanogen activator (t-pA) do tế bào sản xuất ra có *hoạt tính tốt*. Trong buổi đầu của KTDT, các r-protein như interferon do *E. coli* tạo ra không có hoạt tính do thiếu sự biến đổi sau dịch mã như ở tế bào người. Do vậy, nuôi tế bào để thu các chất trên vẫn còn giá trị và được ưa chuộng cho dù giá thành rất cao.

d) Sản xuất các protein tái tổ hợp bằng chuyển gen như tPA, các nhân tố máu VIII và IX, erythropoietine,... Các tế bào động vật được nuôi thực hiện tốt các *biến đổi sau dịch mã* cần thiết đối với các r-protein và do vậy chúng là những hệ thống tốt cho sản xuất các protein trị liệu và chẩn đoán. Cần nhắc lại rằng, trong buổi đầu sản xuất các protein tái tổ hợp, một số protein như interferon từ vi khuẩn hay nấm men không có hoạt tính. Cũng vì lí do này mà việc thu nhận các chất trực tiếp từ nuôi tế bào vẫn còn sử dụng và các protein được sản xuất bằng cách này có hoạt tính cao.

e) Các chế phẩm miễn dịch chủ yếu được sản xuất là các kháng thể đơn dòng ; các kháng thể này dùng cho chẩn đoán bệnh, thuốc hướng đúng mục tiêu chữa trị (ví dụ, các tế bào ung thư) và dùng trong nghiên cứu.

f) Các hocmone như hormone tăng trưởng của người, prolactin được sản xuất bằng nuôi tế bào (tương tự trường hợp interferon).

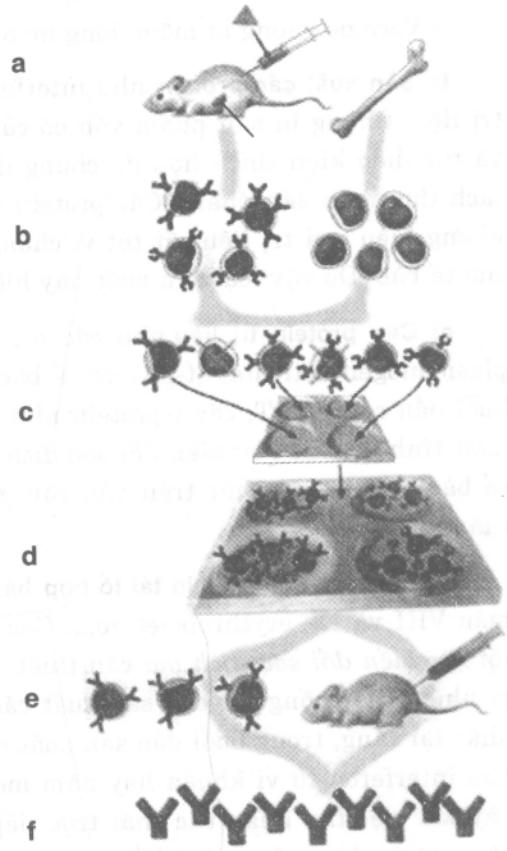
g) Sản xuất virus diệt côn trùng bằng nuôi tế bào côn trùng và cho nhiễm virus rồi thu chế phẩm. Hiện nay, sử dụng hệ thống biểu hiện nhờ *Bacolovirus* đã có thể sản xuất virus diệt sâu nhờ nuôi tế bào côn trùng.

Đặc biệt, gần đây các *tế bào gốc* được nuôi để dùng trong *liệu pháp tế bào*, nhằm đưa tế bào bình thường thay thế tế bào bệnh.

II. HYBRIDOMA VÀ CÁC KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG

1. Các kháng thể đơn dòng

Các kháng thể đơn dòng (Monoclonal antibodies - Mab) là những sản phẩm của một dòng tế bào bạch cầu, bắt nguồn từ một dòng tế bào được kích thích. Khi tiêm một *kháng nguyên vào chuột*, kháng nguyên sẽ kích thích *phản ứng miễn nhiễm đặc hiệu* tạo dòng tế bào B có *kháng thể đặc hiệu* chống lại kháng nguyên. Nhưng *dòng tế bào bình thường* tạo kháng thể đặc hiệu *sẽ chết* sau một thời gian nuôi cấy. Trong khi đó *tế bào myeloma* (tế bào bạch cầu ung thư) có khả năng *sinh sản vô hạn*, nhưng không tạo kháng thể đặc hiệu. Từ năm 1975, kĩ thuật tạo *hybridoma* ra đời tạo nên cuộc cách mạng trong sản xuất các kháng thể đơn dòng. Hybidoma, được tạo ra khi lai một tế bào bạch cầu tạo kháng thể đặc hiệu với tế bào myeloma, có khả năng *sinh sản vô hạn* (nhận từ tế bào myeloma) và tiết ra *kháng thể đặc hiệu* (nhận từ tế bào bạch cầu) (hình 10.6).



Hình 10.6. Tạo kháng thể đơn dòng.
a. Kích thích tạo kháng thể ở chuột.
b. Tế bào chuột tạo kháng thể và tế bào myeloma tuỷ xương. c. Lai 2 loại tế bào.
d. Chọn lọc dòng tế bào mục tiêu.
e. Tiêm cho chuột. f. Các kháng thể đơn dòng.

2. Các ứng dụng

Kháng thể đơn dòng có nhiều ứng dụng rộng rãi :

– *Tăng độ nhạy* của các chất thử dùng phản ứng miễn nhiễm các kháng nguyên không dung nạp (histocompability) thử các kháng nguyên của nhóm máu, của tinh trùng ; thử có progesterol hay không để phát hiện thai ; thử các yếu tố làm đông máu.

– *Chẩn đoán* : Dùng trong chẩn đoán các bệnh như ung thư,... hoặc xác định một bệnh có truyền theo đường tình dục hay không.

– *Trị liệu* : Chỉnh lại thuốc quá liều, giảm nguy hiểm trong trường hợp ghép tuỷ sống,...

– *Thuốc hướng đúng mục tiêu : Gắn độc tố* vào kháng thể đơn dòng đặc hiệu *với tế bào bệnh* như tế bào ung thư và như vậy thuốc hướng đúng tế bào ung thư và diệt. Đây là cách chữa trị ung thư đúng chỗ, đúng vị trí cần thiết, mà không ảnh hưởng đến các loại tế bào khác của cơ thể. Độc tố hiện thường lấy từ *Pseudomonas*, có tác dụng làm giảm chức năng tổng hợp protein trong tế bào và chết.

– Kháng thể gắn với các chất đồng vị phóng xạ phát các tia beta, gamma diệt tế bào.

– *Tinh sạch các sản phẩm* (nhất là protein) : Dùng kháng thể đơn dòng tủa đặc hiệu với protein mục tiêu để tách khỏi dịch lên men.

– *Công cụ nghiên cứu :* Giúp người ta phát hiện vị trí của protein qua kháng thể có gắn chất chỉ thị (như phát huỳnh quang).

3. Người hoá kháng thể đơn dòng

Trong một thời gian dài, các kháng thể đơn dòng không được dùng trong trị liệu cho *người* vì chúng là kháng thể sản xuất ở chuột. Nhiều cố gắng "người hoá" kháng thể chuột (hình 10.7), nhưng hiệu quả không cao, lại đắt giá.

Hình 10.7. Kháng thể chuột được thay dần phần kháng thể người (bìa phải là kháng thể người 100%)

Mãi đến trước năm 2000, trở ngại này mới được tháo gỡ bằng 2 cách :

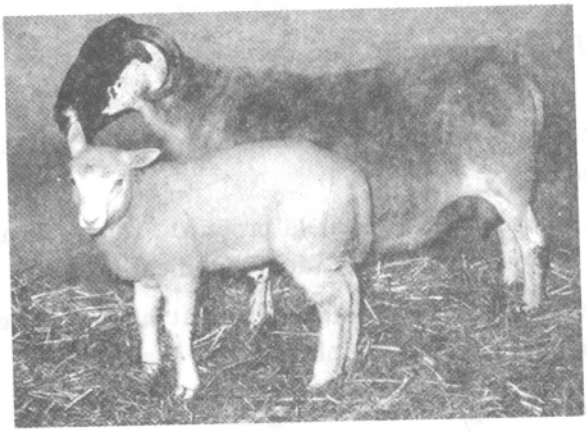
– Chuyển gen tạo kháng thể người vào chuột để sản sinh ra đúng kháng thể người.

– Đưa gen người vào virus để biểu hiện ra đúng kháng thể người.

Năm 2000, *sản xuất kháng thể đơn dòng thế hệ mới* được coi là *sự kiện nổi bật* với kì vọng đặc biệt vào thế hệ mới của thuốc hướng đúng mục tiêu.

III. TẠO DÒNG HAY NHÂN BẢN VÔ TÍNH ĐỘNG VẬT (ANIMAL CLONING)

Năm 1997, Wilmut công bố *tạo dòng* hay *nhân bản vô tính* (cloning) cừu Dolly (hình 10.8) gây chấn động dư luận thế giới.

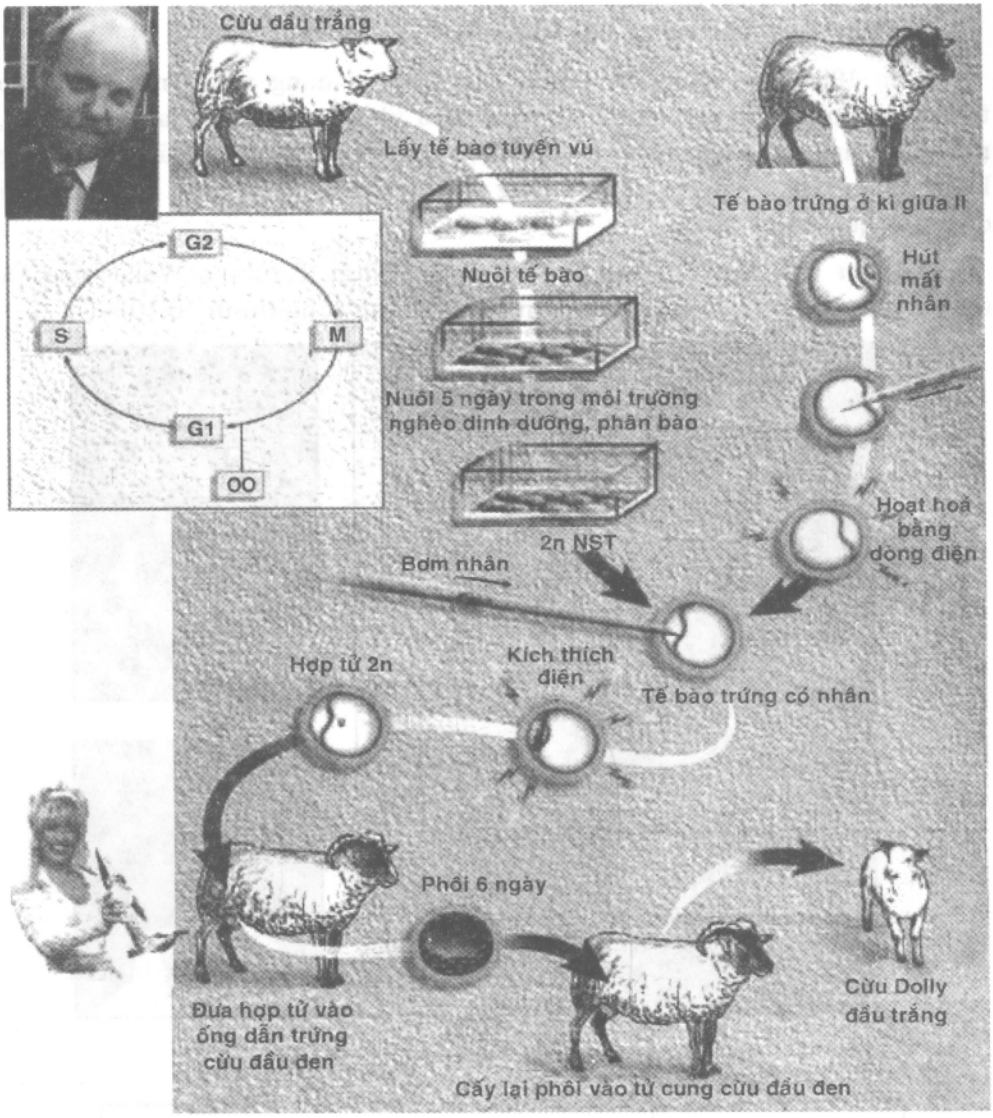


Hình 10.8. Cừu Dolly trắng và mẹ đẻ đầu đen giống Blackface

1. Tạo dòng vô tính cừu Dolly

Quá trình tạo cừu Dolly do Wilmut và các cộng sự thực hiện được nêu trên hình 10.9. Các nhà nghiên cứu Scotland đã tách *tế bào tuyến vú* của cừu mẹ (cho nhân) màu trắng 6 năm tuổi, thuộc giống Finn Dorset. Cừu mẹ trắng này đang mang thai ở cuối tháng thứ ba, khi các tế bào tuyến vú biệt hoá mạnh hơn cả và đang phân bào. Các tế bào tách ra được nuôi *in vitro*, sau đó đặt chúng vào môi trường nghèo dinh dưỡng để từng bước làm *dừng hoàn toàn chu trình tế bào* (giai đoạn G_0). *Nhân của các tế bào nuôi* (bộ nhiễm sắc thể 2n) *được hút ra và bơm vào tế bào trứng mất nhân* của cừu mặt đen Blackface. *Trứng đã mang nhân* của cừu mẹ trắng được *đưa vào tử cung của cừu mẹ đen* cho mang thai. Kết quả *cừu mẹ mặt đen trực tiếp sinh ra cừu Dolly trắng* biểu hiện các tính trạng của nhân tế bào nuôi bắt nguồn từ tuyến vú *cừu mẹ cho nhân* có màu trắng. Trong thí nghiệm tế bào trứng được kích thích bằng dòng điện 2 lần : trước và sau khi bơm nhân vào.

Cho đến cuối tháng giêng năm 1996, có ít nhất 277 phôi đã được tạo ra, đưa vào ống dẫn trứng của các cừu cái khác nhau và thu lại 247 phôi. Trong số đó có 29 phôi đã phát triển đến giai đoạn phôi nang hoặc phôi vị và chúng được đưa vào tử cung của 13 cừu mang thai. *Chỉ một* trong số đó phát triển thành thai và cừu con sống có biểu hiện các tính trạng bình thường là Dolly.



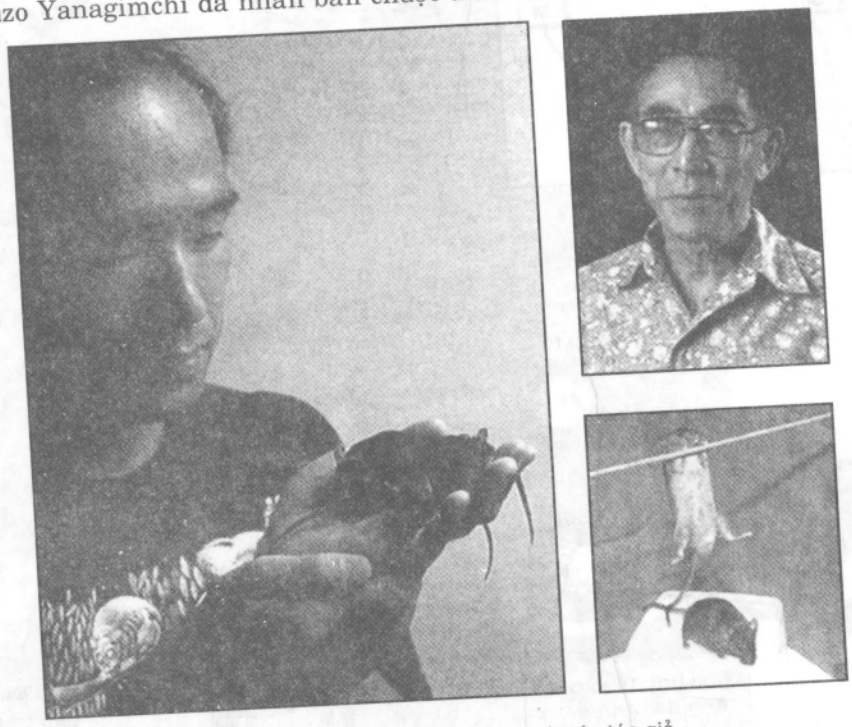
Hình 10.9. Quy trình tạo cừu Dolly
Góc trên là I. Wilmut và dưới là Dolly Parton
(ca sĩ nhạc đồng quê nổi tiếng của Mĩ), có tên đặt cho cừu.

Cừu Dolly nổi tiếng vì nó là *động vật có vú đầu tiên được nhân bản* và phát minh này có ý nghĩa lớn về mặt khoa học, đồng thời nhạy cảm về xã hội, vì nó mở ra khả năng nhân bản người. Tuy nhiên, cho đến nay *kết quả ở cừu chưa lặp lại được* do phần lớn chết non và cừu Dolly chóng già cũng đã chết. Các nhà khoa học cho rằng cần nghiên cứu lại từ đầu quá trình *tái hoạt hoá nhân tế bào soma* đã biệt hoá. Phát minh *tế bào gốc* tiếp theo mở ra triển vọng mới cho tạo dòng vô tính bằng cách *sử dụng nhân tế bào gốc*.

2. Nhân bản các động vật khác

Năm 1952, lần đầu tiên thành công tạo ra nòng nọc sống từ tế bào trứng mất nhân và cho nhận nhân tế bào biểu bì da ếch. Sau cừu Dolly, nhiều thí nghiệm nhân bản vô tính được thực hiện với kết quả thành công khác nhau. Nói chung là thành công còn hạn chế và thường chưa lặp lại được kết quả như ý muốn.

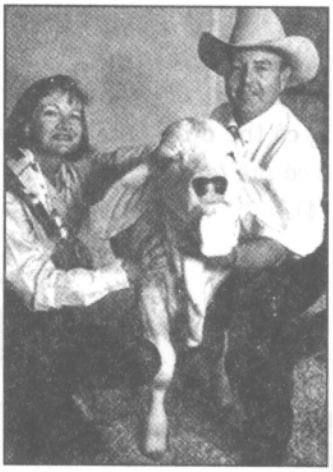
– *Nhân bản chuột* : Các nhà khoa học Nhật Teruhiko Wakayama và thầy Ryuzo Yanagimchi đã nhân bản chuột thành công (hình 10.10).



Hình 10.10. Chuột nhân bản vô tính và các tác giả

Hình 10.11. Bò nhân bản vô tính từ nhân tế bào phôi

– *Nhân bản vô tính bò :* Hàng tá bò nhân bản vô tính đã ra đời, nhưng *nhân* được lấy không phải từ tế bào soma mà *từ tế bào phôi* (hình 10.11 và 10.12).



Hình 10.12. Bò con nhân bản

Hình 10.13. Chó Missy

– Ở chó, mèo, khỉ thì việc nhân bản rất khó. Con chó Missy (hình 10.13) được chủ là một triệu phú đặt hàng với số tiền 2,3 triệu USD đang chờ được tạo dòng.

Ngoài ra, các động vật dòng vô tính có những biểu hiện khác thường như chứng béo phì.

3. Các ứng dụng

Thành công của tạo dòng vô tính ở động vật có vú mở ra nhiều ứng dụng trong chăn nuôi.

– *Nhân bản các vật nuôi kỉ lục* trong sản xuất : Một con bò sữa cho nhiều sữa đạt kỉ lục, nhưng thế hệ con của nó không được như vậy. Nhân bản vô tính sẽ giúp tái tạo các vật nuôi có năng suất cao.

– *Nhân giống các động vật chuyển gen :* Các động vật này khi sinh sản hữu tính có thể thế hệ con không nhận được gen mục tiêu. Sự can thiệp của tạo dòng vô tính là cần thiết.

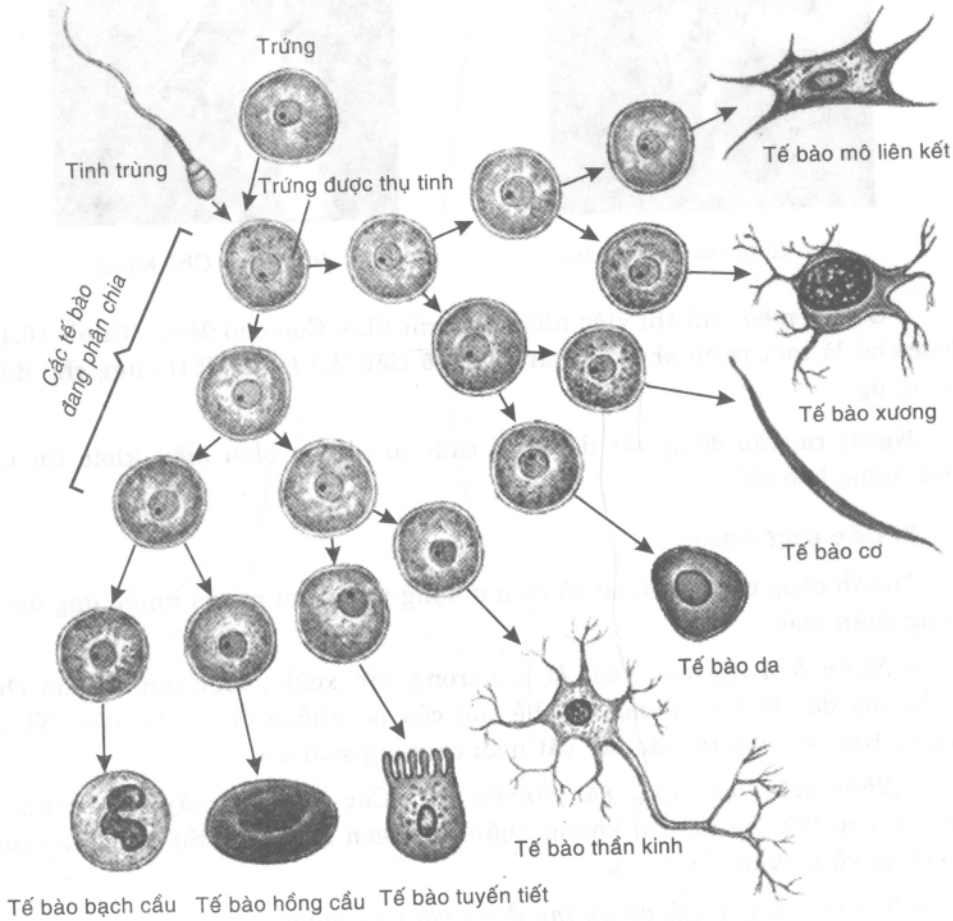
– *Bảo tồn nguồn gen và những động vật quý hiếm.*

IV. CÁC TẾ BÀO GỐC (STEM CELLS)

1. Tế bào gốc phôi và tế bào gốc soma

Từ đầu thập niên 1940, các nhà nghiên cứu đã phát hiện các dòng *tế bào gốc phôi* (embryonic stem cell) ở chuột và cho thấy chúng có tiềm năng sinh sản

và phát triển không giới hạn như có thể biệt hoá tạo cơ, xương, các tế bào gan,... Trong nhiều thập kỉ qua, các nhà khoa học chú trọng các *tế bào gốc phôi chuột* nhằm tạo các động vật chuyển *gen* hơn là tạo ra các mô tăng trưởng *in vivo*. Cho đến cuối 1998, 2 nhóm nghiên cứu độc lập dẫn đầu bởi J. Thomson, Madison và John Gearhart (Mĩ) mới tuyên bố họ đã *nuôi cấy thành công tế bào gốc của người*. Đến nay tuy còn tranh cãi nhưng có thể định nghĩa *tế bào gốc là những tế bào có khả năng tự tái sinh vô hạn và có thể tạo ra ít nhất một kiểu tế bào hậu duệ được biệt hoá ở mức cao* (hình 10.14).



Hình 10.14. Tế bào gốc phôi sinh sản tạo nhiều dòng tế bào biệt hoá khác nhau

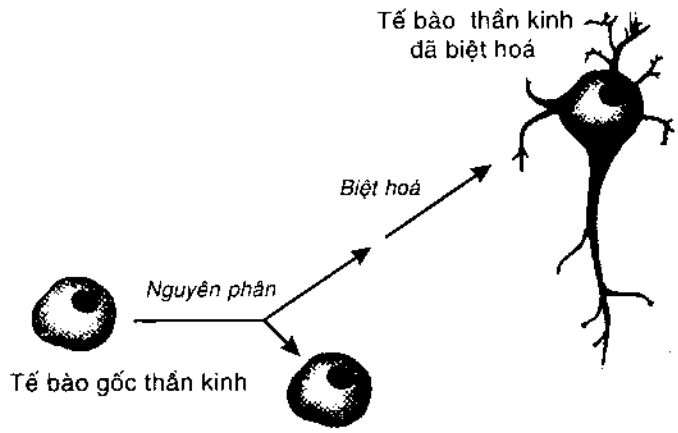
Trước phát hiện của M. Goodell về các *tế bào gốc soma* (somatic stem cell) ở các tế bào cơ trưởng thành, các nhà khoa học cho rằng chỉ các tế bào ở *giai đoạn sớm của phôi* mới có *tính toàn thế* (totipotency) hay *đa thế*

(pluripotency) tức khả năng *phát triển tạo cá thể hoàn chỉnh* hay thành *nhiều loại tế bào biệt hoá*.

Trong khi Gearhart đang loay hoay vật lộn với các *tế bào gốc phôi* thì Goodell tập trung vào các *tế bào gốc soma*. Họ đã thiết kế một thí nghiệm phục hồi tuỷ xương cho chuột bị chiếu xạ bằng các *tế bào gốc cơ* lấy từ những con chuột trưởng thành. 6 tuần sau khi đưa các tế bào gốc cơ vào, các con chuột bị chiếu xạ đã có những dấu hiệu phục hồi hoàn toàn. Tế bào gốc cơ đã biệt hoá tạo các tế bào máu với năng suất bình quân cao gấp 50% so với lô đối chứng.

Các *tế bào gốc tuỷ xương* có thế năng đa biệt hoá mạnh hơn. Dòng tế bào này có thể phát triển thành các tế bào tiền thân của tế bào não, gan và 3 loại cơ (cơ tim, cơ xương, cơ trơn). Chúng hầu như giống hoàn toàn các tế bào gốc phôi về tính đa thế.

Các tế bào gốc có *2 con đường để tự tái sinh và biệt hoá*. Một là chúng tạo ra trực tiếp các tế bào biệt hoá bằng cách *phân chia bất đối xứng* (1 tế bào gốc cho ra 2 tế bào con, 1 vẫn là tế bào gốc, còn cái kia là tế bào tiền biệt hoá sẽ trải qua biệt hoá) (hình 10.15). Hai là tạo ra nhiều quần thể tế bào và dưới tác động của các nhân tố đặc hiệu sẽ tạo ra các tế bào biệt hoá.



Hình 10.15. Tế bào gốc thần kinh phân chia bất đối xứng
(Một dòng tế bào biệt hoá và dòng kia vẫn là tế bào gốc thần kinh)

Các tế bào nội bì (*endoderm*) của chuột có thể được kích chuyển biệt hoá thành các tế bào có tính đa thế năng trong biệt hoá *in vivo*. Các tế bào mầm sơ khai của người và chuột trong môi trường pha trộn nhiều yếu tố tín hiệu

(*signaling factors*) đều có thể phát triển thành các tế bào gốc phôi có tính đa thế trong biệt hoá và tự tái sinh.

Hầu như tất cả các *mô biểu bì đều chứa các tế bào gốc*. Bởi vì chúng có trách nhiệm tái tạo mô ngay trong điều kiện bình thường hoặc trong phục hồi sau tổn thương. Một số nghiên cứu thành công cho thấy các *mô biểu bì có khả năng tái lập chương trình phát triển* hướng biệt hoá thông qua những thay đổi môi trường ngoại mô của chúng.

Các tế bào gốc thần kinh của lớp thú gây nhiều sự chú ý nhất. Chúng cũng có thể được thu nhận từ các tế bào gốc phôi sơ khai với các đặc tính : 1) có thể tạo ra mô thần kinh hoặc được lấy từ hệ thần kinh ; 2) có khả năng tự tái sinh ; 3) có thể tạo ra các tế bào khác tế bào ban đầu qua sự phân chia bất đối xứng.

Có sự phân biệt các *tế bào gốc toàn thế* (totipotent stem cell) với các *tế bào gốc đa thế* (pluripotent stem cell). Một tế bào gốc toàn thế có thể được cấy vào dạ con và cho ra một cơ thể hoàn chỉnh có cả hệ thần kinh trung ương lẫn hệ thần kinh ngoại vi (như một hợp tử). Còn các tế bào gốc đa thế thì có thể biệt hoá được thành bất kì loại tế bào nào kể cả tế bào thần kinh, ngoại trừ tế bào cuống nhau của nhau thai.

Các tế bào gốc là *đơn vị cơ sở* không những của quá trình tạo phôi, mà cả của quá trình tân tạo đối với một cơ thể trưởng thành, quá trình tái tạo đa dạng các loại mô. Các nghiên cứu cho thấy có thể tất cả các mô và cơ quan đều phát sinh từ các tế bào gốc và cũng chứa tế bào gốc.

Hiện đã xác định được trong máu người có 1 tế bào gốc/1 triệu tế bào và đã có máy tự động sàng lọc tế bào gốc từ máu để sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau.

2. Khả năng ứng dụng

Rõ ràng những nghiên cứu thành công các tế bào gốc phôi sẽ mở ra một viễn cảnh ứng dụng vô cùng sáng sủa. Đặc biệt nó tháo gỡ hàng loạt các trở ngại then chốt trong các kĩ thuật khác của CNSH động vật và có thể nói về vai trò cách mạng hoá CNSH động vật.

Thứ nhất, *nuôi cấy mô tế bào động vật* sẽ gặp khó khăn là tế bào bình thường không nuôi được thành dòng vì *chết theo chương trình* và hơn 50 năm qua vẫn sử dụng các dòng tế bào ung thư để nuôi cấy. Nuôi tế bào gốc sẽ được thực hiện dễ dàng hơn với nguồn tế bào dồi dào có thể thu được từ các loại mô khác nhau của người.

Thứ hai, *đáp ứng chính xác đặc hiệu miễn dịch của từng cá thể* nhờ nguồn tế bào gốc có thể thu được từ mỗi người và chữa trị ngay cho chính họ. Điều này mở ra lĩnh vực mới là *liệu pháp tế bào* (dùng tế bào gốc khoẻ mạnh bình thường thay thế tế bào bệnh). Ứng dụng cấy ghép các tế bào gốc để điều trị các bệnh thoái hoá ngày càng trở nên quan trọng và phổ biến. *Liệu pháp tế bào* sẽ đưa y học lên tầm cao mới.

Thứ ba, *kháng thể đơn dòng* sẽ tạo dễ dàng với tế bào gốc người.

Thứ tư, *nhân bản vô tính* sẽ dễ dàng hơn với *nhân* của tế bào gốc.

Thứ năm, *kĩ thuật thay thế và ghép mô hay cơ quan ở người* sẽ thực hiện dễ dàng hơn với tế bào gốc của người được điều khiển để phát triển thành cơ quan như mong muốn.

Có thể nói, sự kết hợp kĩ thuật tế bào gốc với các lĩnh vực khác sẽ tạo nhiều bước đột phá trong CNSH động vật.

Vấn đề lớn nhất hiện nay đối với *tế bào gốc soma* là sự *tắt dần khả năng phân chia* và *biệt hoá* sau một thời gian nuôi cấy. Chính điều này ảnh hưởng đến các ứng dụng trong y học. Goodell cho biết các tế bào gốc phôi chuột lại không có hạn chế này, thời gian nuôi cấy lên đến 10 năm.

3. Một số ứng dụng điển hình

– Ghép các tế bào gốc tạo máu trong điều trị các tình trạng khác nhau của sự suy thoái hệ thống tạo máu. Để tăng số lượng các tế bào gốc, người ta kết hợp sử dụng thêm yếu tố tăng trưởng tế bào gốc (*stem cell factor*), một cytokin tạo máu và kích thích tế bào gốc đa thế của tuỷ xương.

– *Chữa trị các bệnh thuộc hệ thần kinh* do sự thoái biến các tế bào thần kinh. Ví dụ như bệnh Parkinson, trong đó các tế bào tiết dopamine bị chết ; bệnh Alzheimer, trong đó các tế bào sản xuất các chất dẫn truyền thần kinh bị chết ; bệnh teo cơ (*amyotrophic lateral sclerosis)* do các tế bào thần kinh vận động bị chết v.v...

– *Tái tạo da* sau chữa trị bỏng.

– *Tái tạo mô cơ – xương* qua thủ thuật ghép các tế bào gốc phôi trung bì hay các bệnh xương, sụn ... trong chấn thương chỉnh hình.

– Nghiên cứu *liệu pháp tế bào gốc* (stem cells therapy) nhằm làm giảm tổn thương sau cơn nhồi máu cơ tim ở người bệnh.

– Ứng dụng vào các thủ thuật *ghép tuỷ xương*.

– *Các tế bào gốc dùng như vector chuyển gen* trong thủ thuật ghép tự thân nhằm cải tiến tình trạng sức khoẻ nhiều loại bệnh nhờ khả năng phục hồi về số lượng và chất lượng tế bào.

– *Chữa trị các bệnh tự miễn dịch, suy giảm miễn dịch* như đái tháo đường týp 1, AIDS. Năm 2001, đã có thông báo về thành công trong liệu pháp gen ghép tự thân qua các tế bào gốc để chữa trị nhiễm HIV. Gen anti-HIV-1 đã được đưa thành công vào các tế bào gốc ghép với các tế bào CD4. Bằng cách này, gen antisense anti-HIV-1 sẽ gắn vào mRNA và ức chế được chức năng di truyền của virus HIV.

Hỗ trợ cho các liệu pháp chống ung thư hiện nay như giúp phục hồi tuỷ xương sau hoá trị liệu, phóng xạ trị liệu,... Ngoài ra, hiện nay đang hướng vào liệu pháp thay thế cơ quan.

V. GHÉP CƠ QUAN ĐỘNG VẬT

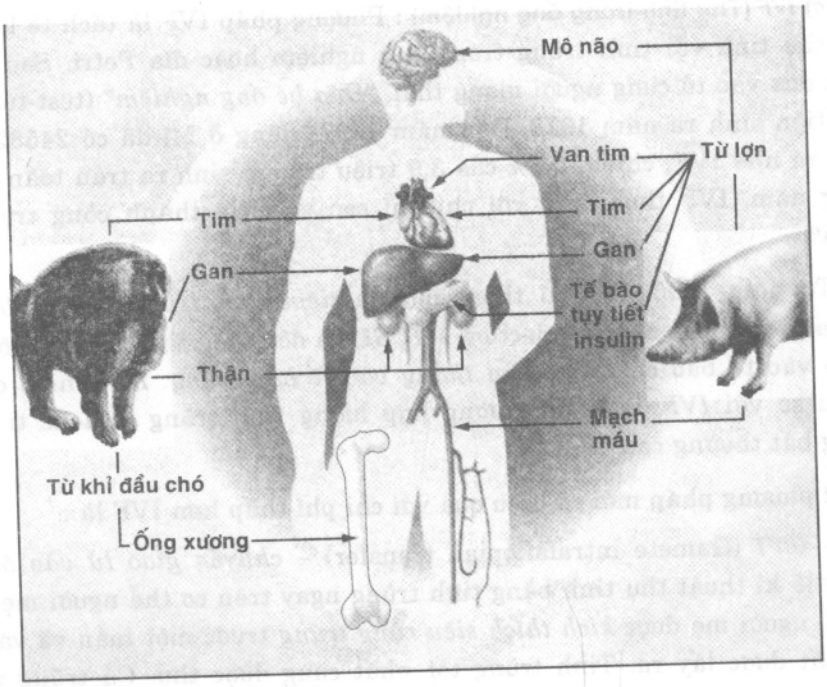
1. Dị ghép (xenotransplantation)

Nhiều bệnh nhân cần thay thế cơ quan mới sống được. Thường 15% số người bệnh bị chết trước khi nhận được cơ quan thay thế. Để khắc phục khiếm khuyết này, phương pháp sử dụng cơ quan của động vật được nhắm tới. Các cơ quan của heo (lợn) là đối tượng có nhiều hứa hẹn vì van tim heo dùng thay thế cho van tim người trong hơn 30 năm qua chưa có vấn đề và chỉ cần nuôi heo 4 – 5 tháng đã thu được cơ quan thay thế. Để thực hiện *dị ghép* (xenotransplantation) thành công cần phải *ức chế phản ứng thải ghép cơ quan lạ*. Một thành tựu đáng kể là từ thập niên 1990, một trang trại ở Anh nuôi cả nghìn con heo mang gen tạo *protein DAF* của người chống phản ứng miễn dịch khi ghép cơ quan heo cho người. Gần đây, các nhà khoa học đã tạo được giống heo mini (hình 4.16) có 2 gen bị làm im lặng (knockout) là gen tạo hormone tăng trưởng và gen tạo thụ thể GGTA1 (thụ thể giúp cơ thể mới nhận biết cơ quan lạ).

2. Các cơ quan dùng cho ghép

Heo và khỉ bamboo có thể cung cấp nhiều cơ quan cho dị ghép ở người (hình 10.16).

Tuy nhiên, vấn đề là khi ghép cơ quan của heo có thể bị nhiễm virus gây hại cho người hay không ? Do đó có khuyến cáo là "*Chớ vì lợi ích của một số cá nhân mà ảnh hưởng lợi ích cộng đồng*". Tình hình càng nghiêm trọng hơn khi nhiều loại virus gây các bệnh mới xuất hiện như virus gây dịch cúm gia cầm có thể nhiễm sang cơ thể người.



Hình 10.16. Khả năng cung cấp các cơ quan dị ghép từ heo và khỉ bamboo

VI. CÁC CÔNG NGHỆ SINH SẢN NHÂN TẠO Ở NGƯỜI

1. Can thiệp vào sinh sản ở người

a) Các nguyên nhân vô sinh ở người : *Vô sinh* (Infertility) là hiện tượng phổ biến ở người. Có nhiều nguyên nhân dẫn đến vô sinh từ phía nam giới cũng như nữ giới.

– Ở nam giới, nguyên nhân có thể do số lượng tinh trùng thấp, tinh trùng không di động hay có kháng thể chống lại tinh trùng.

– Ở nữ giới, nguyên nhân có thể do sự cố trong rụng trứng, tiết chất chống tinh trùng, ống dẫn trứng bị nghẽn.

Nhiều trường hợp có thể chữa trị và khi chữa không được thì phải nhờ các biện pháp sinh sản nhân tạo như : *bơm tinh nhân tạo* (artificial insemination – AI), *thụ tinh trong ống nghiệm* (in vitro fertilization – IVF).

b) Bơm tinh nhân tạo : Bơm tinh nhân tạo là kĩ thuật ra đời sớm nhất. Ca đầu tiên thực hiện vào năm 1790. Đến năm 1953, tinh trùng được đông lạnh và bảo quản nên biện pháp này trở nên phổ biến. Hiện nay, hơn 250000 trẻ em trên toàn thế giới được sinh ra mỗi năm nhờ phương pháp này.

c) *IVF* (Thụ tinh trong ống nghiệm) : Phương pháp IVF là tách tế bào trứng cho thụ tinh với tinh trùng trong ống nghiệm hoặc đĩa Petri. Sau đó phôi được đưa vào tử cung người mang thai. "*Đứa bé ống nghiệm*" (test-tube baby) đầu tiên sinh ra năm 1978. Đến năm 1997, riêng ở Mĩ đã có 24582 trẻ em sinh ra nhờ IVF, chiếm 0,6% của 3,9 triệu trẻ em sinh ra trên toàn thế giới hàng năm. IVF thực hiện với chi phí cao và tỉ lệ thành công trung bình là 14%.

Từ năm 1995, một kĩ thuật mới là *tiêm tinh trùng vào tế bào chất* (intracytoplasmic sperm injection – ***ICSI***) ra đời. Nếu tinh trùng không xâm nhập vào tế bào chất thì *tiêm thẳng vào tế bào trứng*. *ICSI* hiệu quả hơn nhiều so với *IVF*, nhất là trường hợp lượng tinh trùng ít hoặc tỉ lệ tinh trùng bất thường cao.

2 phương pháp mới có hiệu quả với chi phí thấp hơn IVF là :

– ***GIFT*** (Gamete intrafallopian transfer) – *chuyển giao tử vào ống dẫn trứng* là kĩ thuật thụ tinh bằng tinh trùng ngay trên cơ thể người mẹ. Trong GIFT, người mẹ được *kích thích siêu rụng trứng* trước một tuần và vài trứng to nhất được lấy ra. Tinh trùng tốt nhất cũng được thu. Cả trứng và tinh trùng cùng được *đặt vào ống dẫn trứng* cho tiếp xúc với nhau để thụ tinh. GIFT cho kết quả 26% với giá rẻ chỉ một nửa so với IVF. Ngoài ra, một số tôn giáo chấp nhận kiểu sinh sản này.

– ***ZIFT*** (Zygote intrafallopian transfer) – *chuyển hợp tử vào ống dẫn trứng* là biến dạng của GIFT khi *hợp tử IVF được đưa vào ống dẫn trứng* với kết quả trung bình 23%.

2. Các biện pháp sinh sản nhân tạo động vật nuôi

a) Thụ tinh nhân tạo

Thụ tinh nhân tạo được áp dụng ở động vật (chó) từ năm 1782. Đặc biệt từ năm 1949 đã sử dụng chất chống đông để đông lạnh và rã đông tinh trùng động vật thành công. Năm 1952, con bò đầu tiên sinh ra nhờ tinh trùng đông lạnh.

Sản xuất tinh đông viên : Thu nhận tinh trùng, loại bỏ nước, pha loãng trong môi trường thích hợp và nhờ chất chống đông, chất bảo quản lạnh có thể bảo quản tinh trùng lâu dài trong nitrogen lỏng (–196°C) ở dạng viên. *Kĩ thuật giải đông* được áp dụng trước khi gieo tinh nhân tạo. Sản xuất tinh đông viên áp dụng rộng rãi ở lợn, bò, cá. Nhờ tinh đông viên mà thụ tinh nhân tạo được ứng dụng cho hơn 80% bò, 60% lợn ở các nước phát triển. Vấn đề quan trọng là phải có phương pháp đánh giá và *chọn được con đực có năng suất cao* như nhiều sữa, tăng trưởng nhanh ....

Năm 1959, *con thỏ đầu tiên ra đời nhờ IVF*. Kĩ thuật thụ tinh trong ống nghiệm được áp dụng cho động vật quý hiếm.

b) Cấy chuyển phôi (Embryo transplantation)

Từ năm 1951, con bò đầu tiên ra đời nhờ cấy chuyển phôi. Quy trình tiến hành qua các bước :

– *Thu nhận hợp tử* : Trước tiên gây siêu rụng trứng nhờ hormone ; tiếp theo thu, nuôi trứng ; kế tiếp thụ tinh trong ống nghiệm để có hợp tử và tạo phôi.

– *Cấy chuyển phôi* vào động vật cái là bước tiếp theo. Cấy chuyển phôi cần các kĩ thuật liên quan khác như nuôi trứng chín *in vitro*, tạo hàng loạt phôi từ động vật năng suất cao, cắt phôi,...

Xác định giới tính phôi (sexing embryos) nhằm tăng hiệu quả cấy chuyển phôi bằng cách sử dụng mồi đặc hiệu nhiễm sắc thể Y khuếch đại gen bằng PCR.

Ngoài ra, còn có thể cấy ghép phôi giữa các loài tạo các động vật khảm.

VII. SỰ PHÁT TRIỂN CÔNG NGHỆ GEN Ở ĐỘNG VẬT

1. Các phương pháp chuyển gen ở động vật

Các phương pháp chuyển gen ở động vật gồm (hình 10.17) :

– *Tải nạp nhờ virus :* Gen của người được chèn vào bộ gen *herpes virus* và nó nhiễm vào tế bào người để chuyển gen.

– *Tải nạp nhờ retrovirus :* Bộ gen RNA của retrovirus mang gen người, xâm nhập tế bào soma người và phiên mã ngược để tạo CDNA mạch kép, chèn vào nhiễm sắc thể người.

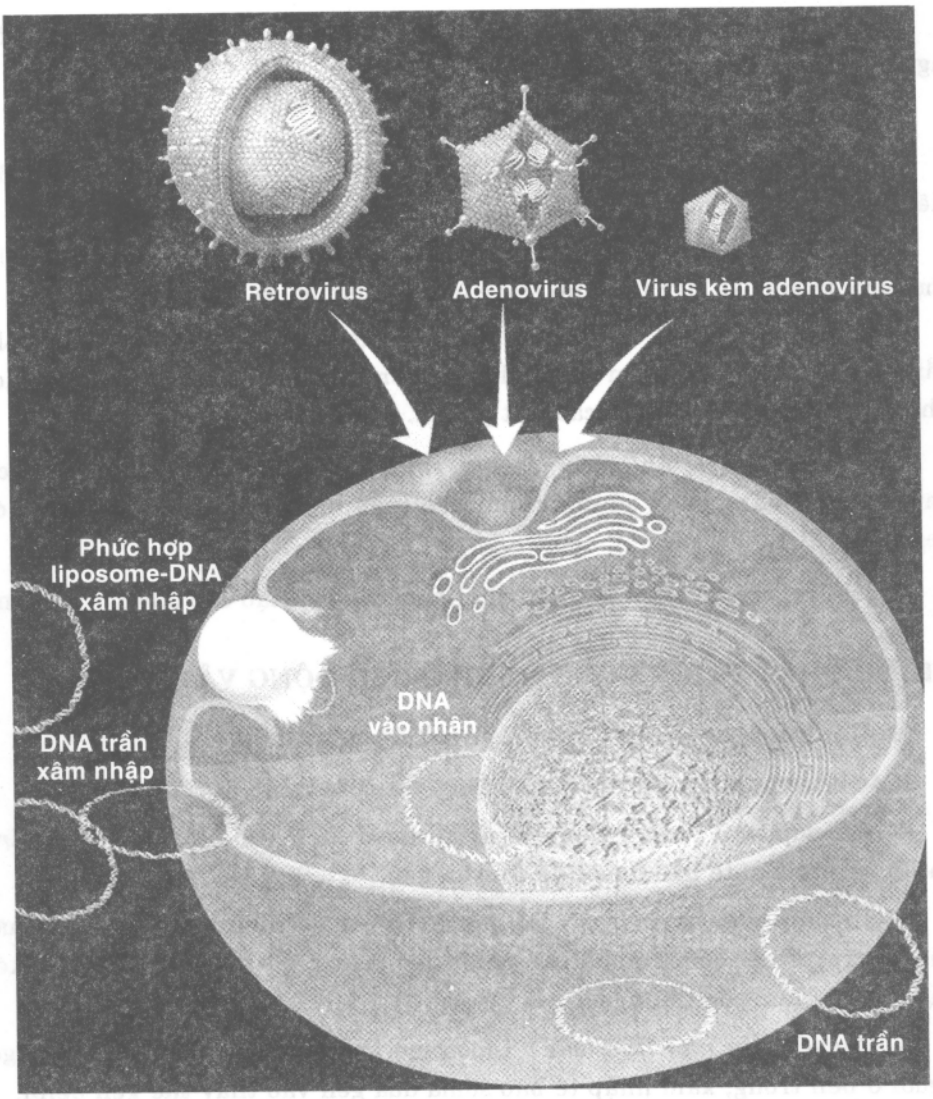
– *Chuyển gen nhờ liposome :* Liposome là các màng lipid gói DNA gen người ở bên trong, xâm nhập tế bào soma đưa gen vào thay thế gen bệnh.

– *Hoá biến nạp : Calcium phosphate* hay *dextran sulfate* mở các lỗ trên màng để DNA xâm nhập.

– *Điện biến nạp :* Dòng điện mở các lỗ trên màng để DNA xâm nhập.

– *Vi tiêm :* Dùng kim nhỏ bơm DNA vào tế bào.

– *Bắn vi đạn đạo :* Dùng luồng khí mạnh thổi các viên đạn (vàng hoặc tungsten) được bao DNA xâm nhập tế bào.



Hình 10.17. Các phương pháp biến nạp gen vào tế bào người và động vật

– Tải nạp nhờ các virus : Retrovirus (RT), Adenovirus (ADV) và Adeno-associated virus (AAV).

– Phức hợp DNA-liposome và biến nạp DNA trần.

2. Các tính trạng chuyển gen ở động vật nuôi

Ngoài việc sản suất các protein trị liệu và cơ quan để ghép, công nghệ gen còn cải thiện nhiều tính trạng của động vật nuôi.

– *Các tính trạng năng suất :* Khả năng đồng hoá thức ăn cao, tăng chất lượng của thịt, sữa, lông và giảm mỡ.

– *Gen hormone tăng trưởng :* Đã tạo được dòng heo mang gen mã hoá *hormone tăng trưởng của bò*, mà cuối năm 1989 nhận được thế hệ thứ hai. Heo này có tốc độ tăng trưởng nhanh hơn, mỡ ít hơn nhưng mang rất nhiều bệnh.

– *Kích thích sự tăng trưởng cơ :* Ở gà có *gen cSKI* kích thích sự tạo cơ mạnh hơn (hypertrophy) bình thường, giảm mỡ. Việc đưa gen này vào heo sẽ tạo nên giống có nhiều thịt và ít mỡ hơn. Trên thực tế, đã tạo được 5 con heo với mức tăng trưởng cơ cao hơn bình thường ở 3 tháng tuổi : 3 con có vai và đùi to hơn, còn 2 con kia thì sự tăng trưởng cơ quá mức bình thường nên chỉ có vai to hơn. Những con heo này có chân yếu và cơ trơn yếu nên cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện.

– *Tăng năng suất tạo lông (ở cừu) :* Chuyển *gen hấp thụ cystein* từ các vi khuẩn vào cừu để tăng năng suất lông.

TÓM TẮT CHƯƠNG

CNSH động vật có nhiều ứng dụng trực tiếp cho con người. Tế bào động vật có vú *khó nuôi nhất* do sinh sản chậm, mật độ tế bào thấp và rất nhạy cảm với nhiều yếu tố khác nhau. Việc tách dòng tế bào để nuôi và môi trường nuôi cũng phức tạp. Tuy nhiên, nuôi tế bào động vật có hàng loạt ứng dụng quan trọng như sản xuất các *vaccine virus, các protein trị liệu, các chế phẩm miễn dịch, hormone và chế phẩm diệt côn trùng.*

Sự ra đời của *kháng thể đơn dòng* là một bước tiến quan trọng với nhiều ứng dụng, đặc biệt trong chẩn đoán và triển vọng lớn trong sản xuất *thuốc hướng đúng mục tiêu.*

Sự ra đời của cừu Dolly bằng *nhân dòng vô tính từ nhân tế bào soma* mở ra triển vọng nhân bản nhiều loài động vật khác nhau.

Các thành tựu của *tế bào gốc phôi và tế bào gốc soma* có vai trò cách mạng hoá đối với nhiều lĩnh vực CNSH động vật. Sự kết hợp các kĩ thuật tế bào gốc với nuôi tế bào, sản xuất kháng thể đơn dòng và nhân bản vô tính sẽ mở ra nhiều ứng dụng to lớn và khó lường. Do vậy, vấn đề được bàn cãi là có nên cho phép nghiên cứu hay không, nhưng cấm nhân bản người là vấn đề dứt khoát.

Cấy ghép cơ quan và *can thiệp vào sinh sản* đã có những ứng dụng trong y dược học và chăn nuôi.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Những thành tựu nào của CNSH động vật đã gây chấn động dư luận ở cuối thế kỉ XX ?
2. Nuôi tế bào động vật có những khó khăn gì ?
3. Nuôi tế bào động vật có những ứng dụng gì ?
4. Kháng thể đơn dòng được tạo ra như thế nào ?
5. Nêu các ứng dụng của kháng thể đơn dòng.
6. Cừu Dolly được tạo ra như thế nào ?
7. Khó khăn chủ yếu của nhân bản vô tính động vật là gì ?
8. Tế bào gốc phôi và tế bào gốc soma là gì ?
9. Vì sao nói thành tựu tế bào gốc có vai trò cách mạng hoá đối với CNSH động vật ?
10. Nêu các ứng dụng cụ thể của tế bào gốc.
11. Dị ghép là gì và có thể thực hiện với những cơ quan nào ?
12. Thế nào là IVF, ICSI, GIFT, ZIFT ?
13. Cấy chuyển phôi được thực hiện như thế nào ?
14. Nêu các phương pháp chuyển gen chủ yếu ở động vật.
15. Vì sao nhiều thành tựu của CNSH động vật rất nhạy cảm với dư luận xã hội ?

Phần V
MỘT SỐ LĨNH VỰC ỨNG DỤNG

CHƯƠNG 11
MỘT SỐ ỨNG DỤNG VÀO CÁC LĨNH VỰC KINH TẾ XÃ HỘI

Nhiều ứng dụng của CNSH đã được nêu ở các phần trước, chương này nhằm hệ thống hoá, nêu các xu hướng phát triển và bổ sung một số thành tựu của các lĩnh vực kinh tế xã hội khác nhau, gồm chủ yếu là các lĩnh vực : y dược, thực phẩm, năng lượng, hoá học, vật liệu, nông lâm nghiệp và môi trường.

I. CÔNG NGHỆ SINH HỌC Y DƯỢC

Từ thuở ban sơ đến nay, loài người đã tiến hành *cuộc chiến không ngừng nghỉ* chống lại các bệnh tật để kéo dài mạng sống của mình. *Y học* là lĩnh vực mà CNSH có nhiều ứng dụng *trực tiếp nhất* cho con người nên phát triển mạnh, nhanh và có nhiều thành tựu lớn. Nhiều phát minh lớn tạo nên những cuộc *cách mạng của y học* như tìm ra *vaccine, thuốc kháng sinh*. CNSH thế kỉ XXI đang đưa Y học lên tầm cao mới trong *chiến lược bảo vệ sức khoẻ và môi trường sống cho con người*. CNSH không những giúp *chẩn đoán bệnh* nhanh và chính xác, tăng nguồn *thuốc* và nhiều *phương pháp chữa trị mới* có hiệu quả hơn, mà còn có thể can thiệp làm *biến đổi cơ thể con người*.

1. Tiếp tục khai thác nguồn dược liệu từ thiên nhiên

Loài người từ khi còn hái lượm đã biết sử dụng nhiều loại cây thuốc để trị bệnh. Y học cổ truyền có lịch sử lâu đời (hình 11.1) và liên tục phát triển đến nay. Các cây cỏ là nguồn dược liệu sẵn có ở từng địa phương. Các loại thuốc này có khi không mất tiền mua, giá rẻ nên được sử dụng rộng rãi.

Hơn 25% dược phẩm Tây y hiện nay mà con người sử dụng được bào chế trực tiếp từ thực vật hoặc có nguồn gốc thực vật. Vài dược chất lúc đầu chiết suất từ thực vật nay được sản xuất bằng cách tổng hợp như *aspirin*, vì giá rẻ hơn.

Tuy nhiên, các chất phức tạp như *taxol* có thể tổng hợp được, nhưng giá cực kì đắt nên phải chiết từ *thông đỏ* (*Taxus brevifolia* Nutall).

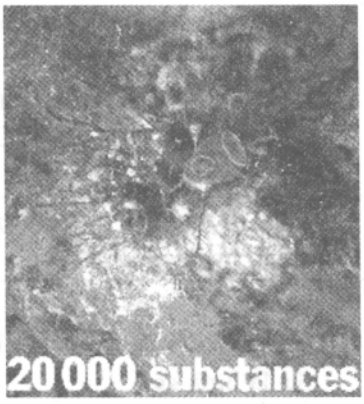
Hình 11.1. Thầy thuốc nam ở Sài Gòn đầu thế kỉ XX
(Tranh của Trường Mĩ thuật Gia Định - năm 1923,
được treo ở Hội trường khoa Dược ĐH Y Dược TPHCM)

Ngày nay, các dược phẩm tự nhiên vẫn rất được ưa chuộng và nhiều loại được tinh chế để tiện dụng. Ngay ở các nước phát triển, xu hướng dùng *nguồn thuốc từ cây cỏ tự nhiên* cũng được người dân coi trọng. Ở nước ta, nhiều loại cây cỏ mới được sử dụng và phổ biến rộng. Một ví dụ là *chè đắng Cao Bằng (Ilex kuyshue)* được quảng bá từ năm 1995, nay được bán rộng rãi khắp cả nước (hình 11.2). Nhiều sách cổ Trung Quốc nói rằng trà đắng (*Ilex kudingcha/kaushue)* là một loại trà nổi tiếng, được sản suất và sử dụng như trà thuốc và như một vật phẩm quý để dâng tặng trong lịch sử. Nó làm tăng tuần hoàn máu, giảm huyết áp, và hạ thấp lipid của máu (gồm cả cholesterol). Nó nổi tiếng về tác dụng ngăn chặn suy tim và chức năng não, duy trì khối lượng cơ thể (không béo) và giã rượu. Thành phần có hoạt tính chủ yếu là triterpene glycoside (saponin), có chứa kudinoside và kudinlactone ; nó cũng đồng thời chứa polyphenol và flavonoid tương tự như trong trà thường.

Việc tầm soát các *nguồn dược liệu quý từ thiên nhiên* đang được tiến hành với quy mô rộng lớn hơn. CNSH đã tích cực góp phần cho sự phát triển các loại dược phẩm này bằng nhiều biện pháp hữu hiệu : *vi nhân giống, nuôi tế bào, chọn giống năng suất cao,...*

Những nghiên cứu gần đây cho thấy nguồn đa dạng sinh vật biển lớn hơn trên cạn và ước tính có thể khai thác tới *20000 chất cho công nghiệp dược* (hình 11.3).

Hình 11.2. Chè đắng Cao Bằng bày bán ở siêu thị TPHCM



Hình 11.3. 20000 chất từ biển

Mặc dù các thuốc thực vật và kháng sinh đã được sử dụng từ lâu, nhưng hiệu năng chung có hạn chế do các vi trùng đề kháng. Do đó, có sự chuyển hướng sang tìm các chất có tiềm năng dược học ở môi trường biển. Ví dụ :

– Loài *Trididemnum solidum* có vỏ tạo chất chống ung thư : *didemnum B*, là sản phẩm biển đầu tiên được thử nghiệm lâm sàng để *chống ung thư.*

– Loài *Bugula neritina* có chất *bryostatin* có tác dụng *kháng ung thư rất mạnh*, đồng thời đây cũng là chất cực độc. Để có *18g* chất này, phải chiết từ *38000kg* của *Bugula neritina.*

2. Sự phát triển của Y sinh học hiện đại

Y học sẽ phát triển theo xu hướng chung dự kiến như sau :

– Những năm *1990* : bệnh nhân → bác sĩ → chẩn đoán → chữa trị.

– Những năm *2000* : chẩn đoán DNA → điều khiển trao đổi chất → xử lí phòng bệnh.

Trong thế kỉ XXI *Y học dự phòng* sẽ phát triển nhờ những hiểu biết chi tiết về *genomics, proteomics và* có khả năng thực hiện *metabolomics.*

a) Sự hoàn thiện cách chữa trị qua các giai đoạn

– Trước 1970 là Y học lâm sàng với phương pháp hoá sinh.

– 1975 – 1995 là Y học phân tử (Molecular Medicine) với tạo dòng gen, xác định gen bệnh, các r-protein như hormone tăng trưởng (GH), insulin, EGF, CF và cơ chế bệnh như tế bào chết theo chương trình (apoptosis).

– Từ 1995 là Y học bộ gen (Genomic Medicine) với SNP, Proteomics, Pharmacogenomics, Bioinformatics,...

Y học bộ gen phát triển theo sơ đồ :

Genomic y học

Kĩ thuật bộ gen (Genome Engineering)	***Kĩ thuật Protein/RNA***	***Kĩ thuật tế bào/mô*** (Cell/Tissue Engineering)
Dữ liệu bộ gen (Genome database) Sự đa hình gen (Gene polymorphism)	Kĩ thuật RNA (RNA Engineering) Proteomics	Kĩ thuật tế bào gốc (Stem cell Engineering)
↓	↓	↓
Chẩn đoán gen (Gene diagnosis) *Y học cá thể hoá* (Individualized Medicine)	Mục tiêu phân tử (Molecular Target) *Dược học bộ gen* (Pharmacogenomics)	Liệu pháp tế bào và gen (Cell & Gene Therapy) *Y học phục hồi* (Generative Medicine)

Sinh học đã tạo ra sự chuyển hướng và cấu trúc lại công nghiệp dược để hình thành *Dược sinh học* (Biopharmaceutical).

CNSH cũng có thể làm cho *y học* đảm nhận một phần công việc của *giáo dục*. Các nghiên cứu về cơ chế của trí nhớ và tìm ra các gen, các chất tăng trí nhớ hứa hẹn sự can thiệp làm *biến đổi trí thông minh* con người.

b) Sự phát triển nhanh của kĩ thuật

Những thành tựu gần đây trong công nghệ genomics và proteomics không thể tách rời các tiến bộ kĩ thuật.

Tầm soát hiệu suất cao (High-throughput screening – HTS) là quy trình *tự động hoá* kết hợp *kĩ thuật robot* (robotics) với dữ liệu phần mềm để thực hiện hàng nghìn thử nghiệm song song trên một mẫu ở tốc độ cao hơn đáng kể so với thực hiện thủ công. Các công nghệ *HTS tự động hoá* là những công cụ thiết yếu *cách mạng hoá* tất cả các công đoạn trong dò tìm thuốc từ việc đánh giá, đến *y học cá thể hoá* và *thử nghiệm lâm sàng*. Hiện HTS mới gồm 3 nhóm chính : các *công nghệ microarray mới, đánh dấu* và *phát hiện* (labelling and detection), và *tin học mới* (xem bảng 11.1).

Bảng 11.1. Khả năng các lĩnh vực công nghệ HTS mới (hè 2004)

Công nghệ HTS	*Đã sử dụng*	*Mới và đang áp dụng*
Các khả năng của công nghệ microarray		
Mật độ lỗ nhỏ	96 lỗ/vĩ (plate)	1536 đến 8640/vĩ
Tốc độ tầm soát chất	<100000 chất/ngày	100000 đến 300000 chất/ngày
Tổng hợp chuỗi N (Oligonucleotide)	2 triệu trình tự/năm	Khả năng chế tạo 5 triệu trình tự oligonucleotide/năm
Thử nghiệm tế bào	1 kiểu tế bào/1 lỗ	10 kiểu tế bào/1 lỗ
Protein array	192 đốm/ $1cm^2$	25 triệu đốm/ $1cm^2$
Tốc độ chuyển mẫu	1 mẫu trong 10 giây	1 mẫu trong 1 giây
Kích thước mẫu	100 microlit	< 5 microlit
Các khả năng của công nghệ đánh dấu và phát hiện		
Giới hạn khối lượng phát hiện	$10^{-13} - 10^{-16}$ mole	$10^{-18} - 10^{-20}$ mole
Giới hạn nồng độ phát hiện	$10^{-5} - 10^{-8}$ molar	$10^{-14} - 10^{-16}$ molar
Các khả năng của tin học		
Tốc độ tầm soát chất	<100000 chất/ngày	10 triệu chất/ngày

Các công nghệ đánh dấu và phát hiện : Phương pháp phát hiện truyền thống, như phát huỳng quang, được thay thế bằng các tinh thể bán dẫn phát quang (illuminating semicoductor crystals) và cộng hưởng plasma bề mặt (surface plasmon resonance – SPR). Phương pháp phát hiện mới không cần đánh dấu này tiết kiệm thời gian và công sức tinh sạch mẫu.

Tin học mới : Sự bùng nổ của dữ liệu các thí nghiệm HTS đòi hỏi các phần mềm mạnh và hiệu quả hơn để xử lí thông tin. Phương pháp *in silico* được dùng bổ sung cho thực nghiệm. Máy điện toán được sử dụng cho tầm soát hàng đống dữ liệu. Cơ sở để dự đoán hiệu quả các phân tử qua dữ liệu dựa trên các cấu trúc protein, mô hình hoá tương đồng (homology modeling), và so sánh với các chất hoá sinh đã biết. Có công ti đã lập thư viện 3,3 triệu chất phân tử nhỏ thương phẩm để tầm soát tiềm năng ứng dụng qua đánh giá hoạt tính sinh học. Các ứng viên tiềm năng sẽ được thử nghiệm *in vitro* để xác nhận hiệu quả.

Những kĩ thuật tiên tiến thời thượng vừa nêu trên là cơ sở vững chắc cho sự phát triển nhanh và hiệu quả cao hơn của Y sinh học thế kỉ XXI.

3. Y học phục hồi

Y học phục hồi xoay quanh vấn đề *tái tạo* và *phục hồi chức năng* cho cơ thể người. Các phương pháp phục hồi những tổn thương của cơ thể người có thể được tóm tắt như sau :

– *Liệu pháp gen* (chi tiết ở chương IV) được coi như một *đứa con ngỗ nghịch* của công nghệ sinh học và y học. Trở ngại lớn nhất là khó xác định chính xác các vị trí để gắn các gen mới vào nhiễm sắc thể của cơ thể.

– *Công nghệ mô* (Tissue engineering) : Chế tạo ra các bộ phận mới thay thế các bộ phận đã bị tổn thương của cơ thể. Ví dụ như tạo ra các mạch máu, các sụn hay các tế bào thần kinh.

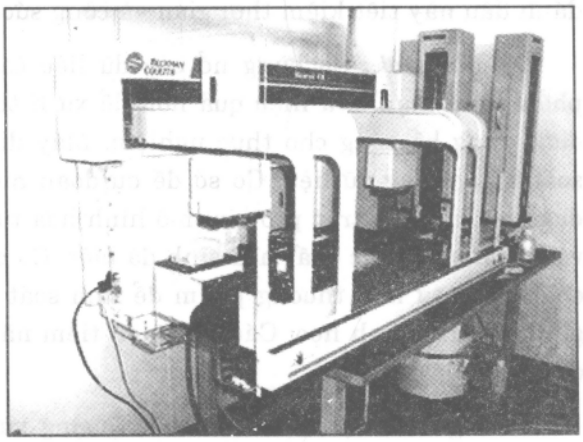
– *Liệu pháp tế bào* : *Cấy tế bào gốc* để phục hồi những phần tổn thương và hao mòn của cơ thể người.

– *Chế tạo các cơ quan nhân tạo* thay thế cho các cơ quan đã bị hư hỏng.

Một dạng của y học phục hồi đang được ứng dụng vào thực tiễn là bảo quản *tế bào gốc tạo máu của dây rốn bào thai* của đứa bé sơ sinh. Nguồn tế bào này có thể dùng chữa trị hàng loạt bệnh máu và hệ miễn dịch cho ngay đứa bé mà không sợ phản ứng miễn dịch. Một dạng ứng dụng công nghệ tế bào gốc khác là bảo quản *tế bào gốc tạo máu hay tuỷ sống* của chính bệnh nhân bị chiếu xạ hoặc hoá trị liệu (chemotherapy) bị giảm đáng kể số lượng tế bào máu. Sự bổ sung tế bào gốc vào dịch truyền máu sẽ giúp hồi phục số lượng tế bào máu và nhờ vậy có thể chịu đựng liều trị liệu cao.

Các tế bào gốc sau cơn nhồi máu cơ tim : Tháng 7 năm 2004 đã có thông báo về hiệu quả trị liệu lâm sàng của *tế bào gốc tuỷ sống làm hồi phục cơ tim* (myocarde) sau cơn nhồi máu cơ tim. 6 tháng sau cơn nhồi máu cơ tim, người bệnh có hoạt động tim tốt hơn nhiều nhờ nhận tế bào gốc của chính mình được bơm vào động mạch vành ngay sau khi xảy ra sự cố. Cơ chế của hiệu quả này vẫn chưa rõ.

Hệ thống nuôi tế bào tự động : Nuôi tế bào người là công việc hết sức khó khăn và phức tạp. Ngày nay, hệ thống nuôi tế bào tự động nhờ robot đang được sử dụng ở một số PTN trên thế giới (hình 11.4).



Hình 11.4. Hệ thống nuôi tế bào tự động nhờ robot

4. Tình hình sản xuất vaccine - tác nhân phòng bệnh có hiệu quả

Hiện nay, vaccine vẫn là tác nhân phòng bệnh có hiệu quả nhất. Công nghệ vaccine phát triển mạnh với nhiều loại khác nhau : vaccine cổ điển ; vaccine protein cải tiến như vaccine từ protein, vaccine peptide, vaccine peptide tổng hợp, vaccine kháng đa bệnh ; và vaccine DNA. Các vaccine tái tổ hợp ngày nay đang được mở rộng sản xuất và ứng dụng.

Vaccine DNA : Có thể tạo dòng gen sản sinh kháng nguyên chủ yếu vào virus hay vi khuẩn sống để kích thích tạo kháng thể chống bệnh. Khả năng thứ hai là gen hay đoạn sản sinh kháng nguyên chủ yếu của tác nhân gây bệnh được gắn vào plasmid cho biểu hiện và thu sản phẩm số lượng lớn cho trị liệu.

Tính đến nay, hơn 30 loại vaccine được sản xuất đáp ứng nhu cầu phòng nhiều bệnh dịch (bảng 11.2).

Bảng 11.2. Các loại vaccine thông dụng

Tác nhân gây bệnh	*Bệnh*
Virus	
Virus thuỷ đậu	Bệnh thuỷ đậu
Cytomegalovirus	Nhiễm trùng khi tổn hại hệ miễn dịch
Virus sốt xuất huyết	Sốt xuất huyết
Virus viêm gan A	Sốt cao, gây tổn hại gan
Virus viêm gan B	Gây tổn hại gan lâu dài
Virus mụn giộp đơn hình loại 2	Loét đường sinh dục
Virus cúm A và B	Bệnh đường hô hấp cấp tính
Virus viêm não Nhật Bản	Viêm não
Virus gây bệnh khó thở ở trẻ em	Viêm đường hô hấp trên
Virus bệnh dại	Viêm não
Virus hợp bào hô hấp	Nhiễm trùng đường hô hấp trên và dưới
Rotavirus	Viêm dạ dày ruột cấp tính ở trẻ nhỏ
Virus sốt vàng da	Tổn thương tim, gan và thận
Virus HIV gây suy giảm miễn dịch	AIDS
Vi khuẩn	
Vibrio cholerae	Bệnh tả
Các dòng *E. coli* gây độc trong ruột	Bệnh tiêu chảy
Neisseria gonorrhoeae	Bệnh lậu
Haemophilus influenzae	Nhiễm trùng máu, viêm màng não

Mycobacterium leprae	Bệnh phong
Neisseria meningitidis	Viêm màng não
Bordetella pertussis	Ho gà
Các dòng *Shigella*	Bệnh lị
Streptococcus nhóm A	Đau họng, ban đỏ, sốt thấp khớp
Streptococcus nhóm B	Gây nhiễm trùng đường sinh dục
Streptococcus pneumoniae	Viêm phổi, viêm màng não
Clostridium tetani	Bệnh uốn ván
Mycobacterium tuberculosis	Bệnh lao
Salmonella typhi	Bệnh thương hàn
Kí sinh trùng	
Onchocerca volvulus	Bệnh giun chỉ u
Các loài *Leishmania*	Nhiễm trùng ngoài và trong cơ thể
Các loài *plasmodium*	Bệnh sốt rét
Schistosoma mansoni	Bệnh sán máng
Các loài *Trypanosoma*	Bệnh buồn ngủ
Wuchereria bancrofti	Bệnh giun chỉ

Ngày 6/6/2005 đã có thông báo chế tạo thành công vaccine chống virus Ebola và virus Marburg gây bệnh chết người và thử nghiệm trên 12 khỉ macaque đạt hiệu quả 100%.

Nhiều nỗ lực tìm vaccine chống ung thư nhưng đến nay chưa thu được kết quả mong đợi. Vaccine chống ung thư là tác nhân kích thích phản ứng miễn dịch loại bỏ tế bào ung thư chứ không như vaccine kháng thể truyền thống.

5. Tác động đến sinh, lão, bệnh và tử

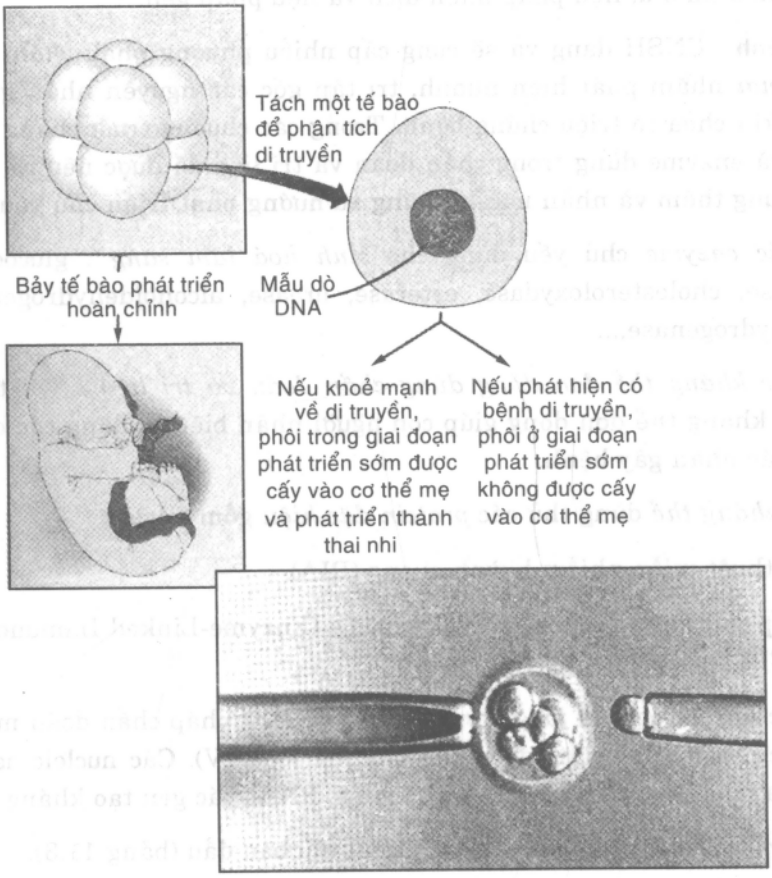
Nhờ sự phát triển của KHCN, của y dược học và CNSH, con người chưa bao giờ có nhiều phương tiện và phương pháp chữa bệnh như hiện nay.

Trước tiên, *sự hiểu biết về bộ gen người* sẽ giúp soi sáng nhiều nguyên nhân bệnh tật để có liệu pháp thích hợp. Sự *hiểu biết về bộ gen của các vi trùng gây bệnh* sẽ cung cấp nhiều biện pháp ngăn chặn hữu hiệu.

Vào năm 2000, chi phí giải kí tự chuỗi bộ gen của mỗi người là 50 triệu USD, năm 2003 là 10 triệu và dự báo vào năm 2010 chỉ còn 1000 USD. Như vậy, việc hiểu biết bộ gen của mỗi người không còn xa vời và mỗi người sẽ biết chi tiết về tình trạng sức khoẻ của mình cần được tác động như thế nào.

a) Sinh : Trên thế giới mỗi năm có khoảng 40 triệu ca vô sinh. Nhờ sự hiểu biết chi tiết đến từng hormone của chu trình sinh sản, cho phép chẩn đoán, chữa trị nhanh, chính xác rối loạn xảy ra. Ngoài ra, nhiều biện pháp sinh sản nhân tạo giúp sinh con đang được thực hiện như IVF, ICSI và GIFT.

Chẩn đoán thai nhi có thể thực hiện sớm ngay lúc hợp tử vừa tạo 8 tế bào (hình 11.5).



Hình 11.5. Chẩn đoán phôi ở giai đoạn 8 tế bào

b) Lão : Do tuổi thọ trung bình của loài người kéo dài hơn, số người già bị bệnh trong các bệnh viện chiếm đến 45%. 5 loại bệnh phổ biến ở người già với các biện pháp chữa trị như sau :

– *Tai biến mạch máu não :* Đang sử dụng các chất chống đông máu như tPA, sẽ áp dụng các chất bảo vệ não, chất chống oxi hoá, liệu pháp gen.

– *Loãng xương :* Hiện chữa trị bằng các hormone như oestrogene, prgesterone ; đang nghiên cứu các gen tạo xương.

– *Bệnh Alzheimer :* Thử nghiệm ngăn chặn bằng các chất bảo vệ tế bào thần kinh và liệu pháp tế bào.

– *Bệnh Parkinson :* Nghiên cứu các gen liên quan, thử nghiệm các chất bảo vệ tế bào thần kinh, liệu pháp tế bào và liệu pháp gen.

– *Ung thư tuyến tiền liệt :* Nghiên cứu các gen ức chế sự hình thành mạch máu ở khối u, liệu pháp miễn dịch và liệu pháp gen.

c) Bệnh : CNSH đang và sẽ cung cấp nhiều phương pháp *chẩn đoán và trị liệu mới* nhằm phát hiện nhanh, trị tận gốc các nguyên nhân gây bệnh ngay cả khi chưa có triệu chứng bệnh. Trong các chương trước, hàng loạt các protein và enzyme dùng trong chẩn đoán và trị liệu đã được nêu ra. Chương này bổ sung thêm và nhấn mạnh những xu hướng phát triển chủ yếu.

– *Các enzyme* chủ yếu dùng cho *sinh hoá lâm sàng* : glucooxydase, hexokinase, cholesteroloxydase, esterase, urease, alcoholdehydrogenase và lactatdehydrogenase,...

– *Các kháng thể đơn dòng dùng chẩn đoán và trị liệu :* Với tính đặc hiệu cao, kháng thể đơn dòng giúp con người nhận biết dễ dàng các chất đặc hiệu và tác nhân gây bệnh.

Các *kháng thể* dùng thử các *protein đặc hiệu* gồm 2 loại :

– Kĩ thuật miễn nhiễm huỳnh quang (RIA).

– Hấp thụ miễn nhiễm gắn với enzyme (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA).

– *Các nucleic acid là tác nhân trị liệu :* Phương pháp chẩn đoán mới bằng nucleic acid ngày nay cũng được phổ biến (chương IV). Các nucleic acid được dùng chữa trị như anti-sense RNA, ribozyme, RNAi, các gen tạo kháng thể.

Pharmacogenomics đã có những thành tựu ban đầu (bảng 11.3).

Bảng 11.3. Một số kết quả pharmacogenomics ở quy mô nhỏ

Bệnh	*Liên hệ giữa thuốc với kiểu gen*
– Alzheimer	– Những người có kiểu apolipoprotein E4 không phản ứng với thuốc tacrine.
– Ung thư vú	– Sự hiện diện các thụ thể oestrogen ở tế bào ung thư cho thấy tiềm năng phản ứng với *tamoxifen*.
– Động mạch vành	– Những người có gen chuyển hoá HDL có phản ứng tốt với thuốc giảm cholesterl *pravastatin*.

d) Tử : Kéo dài tuổi thọ và trở nên bất tử là ước mơ nghìn đời của loài người. Các gen sống lâu đang được nghiên cứu. Các nghiên cứu 500 người sống trăm tuổi ở Iceland phát hiện một đoạn DNA dài 3,4 triệu base (3,4Mb) liên quan đến sống lâu. Sắp tới, việc nghiên cứu 10000 người thọ trăm tuổi trên thế giới sẽ soi sáng nhiều vấn đề.

Vào năm 2003, ở loài tuyến trùng *Caenorhabditis elegans,* bằng *chuyển gen sống lâu* đã tạo được một dòng có *tuổi thọ kéo dài gấp 6 lần* so với bình thường. Đầu thế kỉ XXI đã thành công ở tuyến trùng như vậy thì đến giữa và cuối thế kỉ khả năng kéo dài tuổi thọ con người có thể tới đâu ?

6. Nhiều thách thức vẫn tồn đọng

Tuy con người đã có những nỗ lực rất lớn, nhưng cơ thể người và sự sống vô cùng phức tạp nên vẫn phải đối mặt với hàng loạt bệnh tật nan y và các vấn đề khác.

a) Bệnh ung thư : Mặc dù có nhiều phương tiện hiện đại để hiểu biết chi tiết hơn về bệnh ung thư, nhưng việc chữa trị vẫn chưa được như mong muốn. Những hi vọng giải quyết dứt điểm căn bệnh này trong thế kỉ XX đã không thành. Các bệnh ung thư vú, tuyến tiền liệt, trực tràng, phổi, bạch huyết (lymphoma), melanoma, tử cung, não, đầu, cổ xuất hiện ở 2 triệu người mới với khoảng 1 triệu người tử vong trong năm 2004.

b) Thuốc trị bệnh virus : Hiện chưa có nên chủ yếu vẫn dùng vaccine và tác nhân tăng cường miễn dịch không đặc hiệu như interferon. Trong khi đó nhiều dịch bệnh virus mới xuất hiện gần đây như SARS, cúm gia cầm,...

c) Sự đề kháng thuốc kháng sinh : Nhược điểm của thuốc kháng sinh là luôn xuất hiện các dòng vi khuẩn đề kháng. Sự kết hợp phản ứng sinh hoá và hoá học để tạo các họ kháng sinh mới như ampicillin (họ penicillin), cũng không ngăn được các dòng vi khuẩn kháng thuốc mới. Do khó khăn nêu trên, công nghiệp kháng sinh gặp khủng hoảng. Việc tầm soát thuốc mới rất tốn kém mà khi ra đời sớm vẫn làm xuất hiện vi khuẩn kháng thuốc mới và giá thuốc nhanh chóng giảm nên khó bù chi phí bỏ ra. Tình hình đó làm cho các công ti sản xuất kháng sinh chỉ tập trung cải biến các loại sẵn có mà không tầm soát các loại kháng sinh mới. Kết quả là trong 50 năm qua, chỉ có 2 loại kháng sinh hoàn toàn mới được tìm ra.

d) Chống chiến tranh và khủng bố sinh học : Tiếp ngay sau sự kiện Trung tâm Thương mại Quốc tế (WTC) sụp đổ ngày 11/9/2001 là sự xuất hiện của khủng bố sinh học với vi khuẩn bệnh than. Một bất ngờ lớn đối với nhân loại là ngay trong năm đầu tiên của thế kỉ XXI đã phải chứng kiến khủng bố

bằng vũ khí sinh học. Tiếc rằng điều mà loài người lo sợ đã không tránh khỏi và khủng bố sinh học đã trở thành mối đe doạ thường trực không riêng ở Mĩ mà còn ở nhiều nước khác.

Trong thế kỉ XX, loài người đã phải đấu tranh để ngăn chặn vũ khí hạt nhân ; vừa bước vào thế kỉ XXI loài người đã phải đối mặt với một tai hoạ mới là khủng bố sinh học. Cuộc đấu tranh lần này sẽ khó khăn hơn nhiều. Nhưng với đà phát triển cực nhanh của khoa học, đặc biệt là Công nghệ sinh học, hi vọng loài người sẽ vượt qua được mối hiểm nguy và sẽ có cuộc sống an bình.

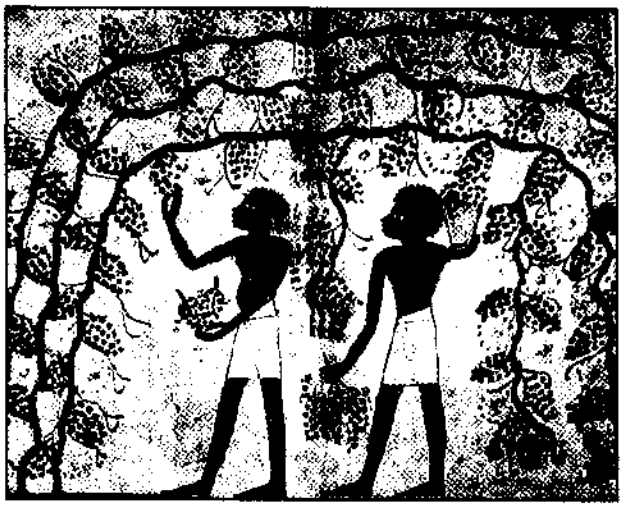
Điều đáng phấn khởi là sự phát triển nhanh chưa từng thấy của khoa học trong khai thác bộ gen người là xu hướng thắng thế vượt trội. Nhiều lĩnh vực y – dược học mới ra đời với công nghệ tiến bộ hơn hẳn, với nhiều chế phẩm mới có cơ chế tác động chính xác và nhanh nhạy hơn. Đó là sự ra đời và phát triển nhanh của *Y học cá thể* (Individualized Medecine), sự lớn mạnh của *Y học phục hồi* (Generative Medecine) với nhiều kết quả bất ngờ, việc dùng robot sản xuất các *microsystems* và *microarrays* dùng trong chẩn đoán và phân tích. Sự hỗ trợ tích cực của nhiều ngành khoa học khác như tin học, vật lí, hoá học đã cung cấp những phương tiện kĩ thuật được cải tiến với công suất cao gấp nhiều nghìn lần.

II. CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC PHẨM

CNSH thực phẩm có tác động hằng ngày đến cuộc sống của hầu hết cư dân trên hành tinh của chúng ta. Ngày nay, nhu cầu về *thực phẩm* đòi hỏi phải đảm bảo cân bằng dinh dưỡng (đủ các chất), an toàn, và nhiều sản phẩm mới để *ăn ngon mà không bệnh và ăn trị bệnh*.

1. Giá trị của thực phẩm lên men cổ truyền

Thực phẩm lên men cổ truyền (traditional fermented foods) là những thực phẩm được tạo ra nhờ sự chuyển hoá do các vi sinh vật tự nhiên (gọi là sự lên men). Loại thực phẩm này có *lịch sử lâu đời* gắn liền với sự phát triển của loài người (hình 11.6). Chúng có nguồn *nguyên liệu đa dạng nhất* (rau quả, cá thịt, sữa,...) nên có *nhiều loại sản phẩm nhất*. Sản phẩm mang *sắc thái riêng biệt của từng dân tộc* nên gắn liền với *nếp sống văn hoá của dân tộc* nhất. Được nhiều người trên hành tinh sử dụng nhiều nhất (từ người trong cảnh đói nghèo đến các bậc vương giả, vua chúa). Đa số quy trình sản xuất thực phẩm lên men cổ truyền *đơn giản* và được truyền qua dân gian. Ngoài ra, nhiều quy trình chế biến có thể thực hiện ở gia đình và sản xuất *ít tiêu tốn năng lượng nhất*.



Hình 11.6. Bức tranh cổ mô tả cảnh hái nho làm rượu

Cần nhấn mạnh rằng phần lớn *các chủng sản xuất trong công nghiệp lên men* bắt nguồn từ các thực phẩm lên men cổ truyền như các vi khuẩn lactic, nấm men *S. cerevistae, A. oryzae,...*

Thực phẩm lên men cổ truyền gồm các nhóm chủ yếu : rượu bia, sản phẩm lên men thuỷ sản, thịt, sữa, đậu nành,...

Rượu bia và nước giải khác có cồn đã được nêu ở chương 8.

2. Thực phẩm lên men từ thuỷ sản

Nhóm thực phẩm lên men cổ truyền từ các nguồn thuỷ sản như cá, tôm và cua có sản lượng lớn, giữ vai trò quan trọng chế biến thuỷ sản và có mặt trong bữa ăn hằng ngày của mọi người Việt Nam. Các thực phẩm lên men từ cá như nước mắm và mắm có thời gian chế biến rất lâu vì các biến đổi diễn ra ở nồng độ muối cao. Chúng có nhiều loại như nước mắm, mắm cá, mắm tôm cua.

a) Nước mắm

Nước mắm là nước chấm (sauce) thu được từ sự thuỷ phân cá bằng lên men tự nhiên ở nồng độ muối trung bình. Nhìn chung, nước mắm là mặt hàng chính của ngành thuỷ sản Việt Nam, nó tiêu thụ 40 – 60% tổng số cá đánh bắt được và chế biến khắp nơi trong toàn quốc. Tuy nhiên cho đến nay, sản xuất vẫn theo phương pháp cổ truyền, quy trình thô sơ, thời gian kéo quá dài (từ 9 tháng đến 1 năm) và hiệu quả kinh tế thấp.

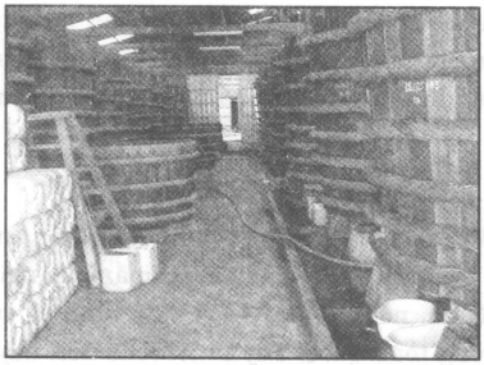
Có 2 phương pháp sản xuất chủ yếu theo truyền thống :

– *Quy trình đánh khuấy (đảo trộn) ở đảo Cát Hải* : Ở miền Bắc từ Nghệ An trở ra về căn bản theo quy trình này. Xí nghiệp quốc doanh nước mắm Cát Hải là cơ sở sản xuất nước mắm lớn nhất ở miền Bắc Việt Nam (hình 11.7). Nhìn toàn cảnh thấy rõ các loại bể chứa để chế biến nước mắm gồm chum, bể xi măng. Điểm khác căn bản của quy trình đánh khuấy so với các nơi khác là cho *muối nhiều lần*, cho thêm *nước lã* (thường 20 – 30%, có khi tới 40% so với cá) và *đánh khuấy* liên tục (hình 11.8).

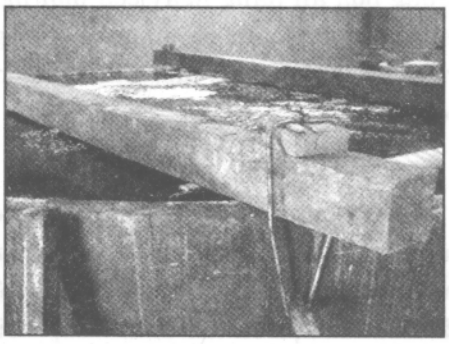
Hình 11.7. Toàn cảnh xí nghiệp quốc doanh nước mắm Cát Hải

Hình 11.8. Đảo trộn cá-muối

– *Phương pháp gài nén của Phú Quốc và Phan Thiết* : Cá được trộn đều với muối, cho đủ muối ngay từ đầu hoặc cho muối nhiều lần, ướp vào thùng hoặc bể ximăng rồi *gài nén*, không cho nước lã và không đánh khuấy.



Hình 11.9. Hai dãy thùng gỗ



Hình 11.10. Các thanh nẹp phía trên

Sản xuất chượp thường dùng thùng gỗ tròn chứa được 1 – 15 tấn cá (hình 11.9). Phía dưới thùng có đục lỗ thông vòi ra thùng nhỏ để hứng nước

bổi. Miệng thùng phía trên có mấu để gắn chặt 2 thanh nẹp làm điểm tựa cho việc nén xuống dưới (hình 11.10), do đó có tên gọi *gài nén*.

Nước mắm là một loại thực phẩm bổ dưỡng có sự kết hợp hài hoà giữa các chất dinh dưỡng cơ bản và các chất có giá trị cảm quan tốt.

b) Mắm cá tôm

Làm mắm là phương pháp chế biến kết hợp việc ướp muối thuỷ sản với quá trình lên men trong một khoảng thời gian nhất định và trong điều kiện thích hợp sản phẩm sẽ phân giải ngấu chín thành mắm tạo ra mùi vị đặc trưng và có thể tồn trữ lâu dài. Mắm cá là sản phẩm dạng bán rắn, sản xuất từ cá đồng (cá nước ngọt) hoặc cá biển trộn với muối.

Lưu ý : *Mắm thái* có nghĩa mắm được cắt nhỏ chứ không có nghĩa từ Thái Lan.

– *Mắm cá thu* : Kĩ thuật sản xuất mắm cá thu (nhóm cá khoảng 10 loài) tương đối đơn giản, phụ thuộc vào phương pháp chế biến và kinh nghiệm ở từng địa phương, chỉ khác ở phương pháp ướp và tỉ lệ muối. Thời gian chế biến trung bình từ 75 – 90 ngày.

– *Mắm tôm cua* : Là thực phẩm lên men dạng bán rắn hay bột nhão (paste), sản xuất từ các loại tôm tép, con ruốc, ba khía,... với tỉ lệ muối tuỳ loại nguyên liệu.

– *Mắm ruốc* : Nói chung nguyên lí chế biến mắm ở các địa phương nước ta là giống nhau, chỉ khác vài chi tiết nhỏ ở kĩ thuật chế biến và nồng độ muối. Qua đó có thể nhận ra nét đặc trưng của sản phẩm mỗi vùng. *Mắm ruốc (con ruốc* – Acetes japonicus*)* được sản xuất ở 3 dạng : *đặc, sệt, lỏng.*

Quy trình công nghệ sản xuất mắm ruốc miền Nam và miền Trung :

Nguyên liệu → Ướp muối một đêm → Ép sơ bộ → Phơi nắng → Xay (quết) → Phơi nắng → Để ngấu chín → Mắm ruốc đặc.

Nước ép ruốc có thể đem làm nước mắm hoặc trộn vào ruốc, sau xay được mắm ruốc lỏng (sệt).

3. Các loại thực phẩm lên men cổ truyền khác

a) Các loại dưa chua

Các loại dưa chua làm từ rau quả tươi : dưa bắp cải, dưa cải, dưa giá, dưa rau muống, dưa hành, dưa cà pháo, cà muối, dưa chuột muối, dưa củ cải,... Vị chua được tạo ra do lên men lactic do nhiều loại VSV khác nhau như *Bacterium brassicae acidi, B. brassicae fermentati, Lactobacillus cucumeris,*

L. pentoacceticus, Saccharomyces brassicae fermentati. Măng chua cũng do lên men lactic bởi các chủng : *Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus brevis, L. buchneri, L. fermentum, L. plantarum, L. pentosus.*

b) Các sản phẩm lên men từ sữa : sữa chua và phô-mai

Vị chua của các loại sữa chua như yorghourt, kefir,... được tạo ra nhờ sự lên men lactic của các vi khuẩn thuộc chi *Lactobacillus* như *Lactobacillus casei, L. plantarum, L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. helveticus, Streptococcus thermophilus*,... Sản xuất phát triển ở quy mô công nghiệp.

Trong sản xuất phomat, protein casein của sữa được lên men bằng vi khuẩn lactic hay nấm mốc.

c) Các sản phẩm lên men từ đậu nành

Ở nước ta, 2 loại sản phẩm chủ yếu là tương và chao. Sự lên men chủ yếu do các chủng nấm mốc như *Aspergillus oryzae, Mucor*,... Các protease nấm mốc phân huỷ các protein đậu nành tạo sản phẩm dễ tiêu và có hương vị đặc trưng.

Tương và nước tương đậu nành : Sự thuỷ giải các protein đậu nành bởi các protease nấm mốc trong điều kiện muối mặn. Sự lên men lactic và chuyển hoá các cơ chất khác do VSV tạo ra hương vị đặc trưng. Các chủng VSV tham gia là *Aspergillus oryzae, Aspergillus soyae, Lactobacillus delbrueckii, Penicillium* sp., *Mucor* sp. Tương Bần nổi tiếng trong cả nước ta.

d) Các sản phẩm từ thịt

Nem chua là hỗn hợp thịt heo tươi trộn đường được gói trong lá và diễn ra sự lên men lactic tạo vị chua. Trong quá trình ủ chua, các protease VSV thuỷ giải một phần protein. Các chủng VSV tham gia là *Lactobactecillus, Streptococcus lactic*,...

CNSH can thiệp vào các loại thực phẩm này theo hướng :

– *Xây dựng cơ sở khoa học* : Chọn lọc các chủng VSV chủ yếu, xác định điều kiện lên men tối ưu để thu sản phẩm tốt hơn, hạn chế thất bại.

– *Công nghiệp hoá sản xuất* : Nhiều loại đang được sản xuất công nghiệp như bia, số khác cần tiến tới sản xuất công nghiệp để đảm bảo an toàn thực phẩm.

4. Các sản phẩm mới của công nghệ thực phẩm

Ngoài nhiều sản phẩm mới cho CN thực phẩm đã nêu ở các chương trước như *các chất tăng vị* (bột ngọt MSG, các nucleotide), các *chất phụ gia*

(chất tạo gel, chất tạo nhũ tương,...), *sirop giàu fructose* ; cần kể đến các *chất ngọt thay đường* khác và *thực phẩm chức năng*.

a) Các chất ngọt ít năng lượng thay đường

Nhiều protein có độ ngọt cao gấp trăm nghìn lần đường thường khi so cùng khối lượng (bảng 11.4).

Monellin, một loại protein tìm thấy ở một loại trái cây châu Phi (*Dioscoreophyllum cumminsii* Diels), có độ ngọt hơn 3000 lần đường thường (sucrose). Phân tử *monellin* gồm 2 mạch A (45 amino acid) và B (50 amino acid) được gắn nhau bởi liên kết yếu. Ưu điểm nổi bậc của monellin là chất ngọt polypeptide dễ bị phân huỷ nên thay thế đường mà không gây tích mỡ trong trao đổi chất như đường.

Bảng 11.4. Tính chất một số chất ngọt protein

Tên protein	*Nguồn thực vật*	*Độ ngọt so cùng lượng đường*	*Số amino acid*
1. Thaumatin	*Thaumatococcus danielli* Benth	3000 lần	207
2. Monellin	*Dioscoreophyllum cumminsii* Diels	3000 lần	45 mạch A + 45 mạch B
3. Mabinlin	*Capparis masakai* Levl	100 lần	33A + 72B
4. Brazzein	*Pentadiplandra brazzeeana* Baillon	2000 lần	54
5. Curculin	*Curculingo latifolia*	550 lần	114

b) Các thực phẩm chức năng hay khoẻ mạnh

Các thực phẩm chức năng hay khoẻ mạnh (Functional or health foods) được định nghĩa là các thực phẩm hay thành phần của chúng *mang lại lợi ích cho sức khoẻ ngoài giá trị dinh dưỡng căn bản*. Chúng bao gồm các thực phẩm truyền thống ; các chất tăng lực (fortified), giàu dinh dưỡng (enriched) hay tăng cường (enhanced) ; và các thức ăn kiêng (dietary).

Thực phẩm chức năng đảm bảo đủ lượng dinh dưỡng căn bản cho sự tăng trưởng và phát triển bình thường đồng thời góp phần có lợi cho sức khoẻ hoặc các hiệu ứng sinh lí mong muốn.

Trong một thời gian dài thực phẩm được dùng để cải thiện sức khoẻ. Ngày nay, tri thức về sức khoẻ cho phép cải thiện thực phẩm và thực phẩm chức năng gắn kết giữa dinh dưỡng và trị bệnh. Khoa học đã chứng minh vai

trò của thực phẩm bổ sung trong giảm nguy cơ bị bệnh và người tiêu dùng cần nhận thức đúng hơn rằng thực phẩm có vai trò lớn hơn như quan niệm trước đây.

Thực ra, nhiều loại rau ăn đã có sẵn giá trị chữa bệnh như rau giấp cá (*Houttuynia cordata* Thumb) chữa táo bón, lòi dom, viêm tai giữa hay rau tía tô (*Perilla frutescens* L. Britton) chữa sổ mũi, đau đầu, ho,.... Nhờ KTDT nhiều loại thực phẩm mang thêm chức năng trị bệnh như chuối hay cà chua có vaccine. Các sinh vật biến đổi gen loại này ngày càng gia tăng nên hiện nay FDA bắt đầu quan tâm để có những quy định cụ thể.

III. CÔNG NGHỆ SINH HỌC NĂNG LƯỢNG

Trước năm 1970, nền công nghiệp chỉ có một mục tiêu là *lợi nhuận*. Sau 1970, sự phát triển công nghiệp phải tính đến *hậu quả môi sinh*. Từ năm 1990, sản xuất công nghiệp phải thoả mãn nhiều yêu cầu kinh tế xã hội khác nhau để phát triển bền vững (suistanable). Trong bối cảnh đó, CNSH với những ưu thế sẵn có phải gánh vác những nhiệm vụ to lớn trong công nghiệp và bảo vệ môi sinh.

– *Về năng lượng* : Sử dụng năng lượng từ sinh khối thực vật (SKTV) và tìm nhiều nguồn năng lượng mới.

– *Về hoá chất* : Phát triển *hoá học xanh* thay thế các quy trình hoá học gây ô nhiễm và biến *thực vật thành nhà máy hoá chất*.

– *Về vật liệu* : Sản xuất các *vật liệu mới phân huỷ sinh học*.

– *Về bảo vệ môi sinh* : *Xử lí ô nhiễm* và thực hiện *bồi hoàn sinh học* (bioremedation).

Theo tính toán hiện nay, sau năm 2050 (hoặc 2080) nguồn dầu mỏ sẽ cạn kiệt. Có 4 ứng viên nặng kí về năng lượng cho tương lai gồm : hydrogen, điện, methanol/ethanol và khí nén. Do vậy, có nhiều nỗ lực của CNSH tập trung vào các nguồn năng lượng mới như ethanol từ sinh khối, sự lên men methane và đặc biệt là biohydrogen.

1. Chiến lược sử dụng sinh khối thực vật

CNSH sử dụng sinh khối thực vật theo các hướng :

– *Thay thế nguyên liệu cổ sinh* bằng nguyên liệu tái sinh từ sinh khối trong cung cấp năng lượng và hoá chất.

– *Thay các quá trình không sinh học truyền thống* bằng các quá trình dựa trên các hệ thống sinh học như tế bào hay enzyme thực hiện phản ứng hay chất xúc tác.

– *Nguồn nguyên liệu tái sinh* (renovable materials) như các phụ phế liệu nông, lâm nghiệp giá tương đối rẻ được sử dụng thay dầu mỏ đang tăng giá và có lợi cho môi trường.

– *Thực vật có thể làm nhà máy sản xuất các hoá chất* như acid lactic, lysine và citric acid,... Một lối tiếp cận mới là *thực vật sản xuất plastic*. 1999, Monsanto dùng nho và cải xoong tổng hợp PHA (chất có thể bị phân huỷ bởi vi sinh vật – biodegradable) bằng chuyển gen vi khuẩn *Ralstonia eutropha*, vì nó sản sinh nhiều PHA trong thực vật thí nghiệm. Tuy nhiên, PHA từ vi khuẩn rất đắt giá trong khi từ thực vật rẻ tiền hơn.

Các nhà nghiên cứu đang tìm nhiều biện pháp gia tăng sinh khối thực vật.

– *Tăng cường hiệu quả của quang hợp* : Các cây trồng có hiệu quả quang hợp khoảng 0,5 – 2%. Biện pháp chọn giống thực vật có hiệu suất quang hợp cao thực hiện theo các hướng : tầm soát các cây có tốc độ tăng trưởng nhanh, nghiên cứu các phương pháp thử nhanh để phát hiện dòng có *hiệu quả quang hợp cao*.

Trên cơ sở biết rõ bộ gen của thực vật, nhất là sự di truyền ở lục lạp, mà điều khiển sự phát triển theo hướng tăng cường quang hợp. Các nhà nghiên cứu thực hiện việc chuyển gen từ các thực vật quang hợp C4 vào các thực vật C3 để gia tăng cường quang hợp.

– *Tăng năng suất cây trồng và cây rừng* : Bằng các phương tiện chọn giống khác nhau, tạo các thực vật có năng suất cao cho sinh khối lớn trong thời gian ngắn nhờ nhiều đặc tính tốt như thích nghi tốt với các điều kiện bất lợi, kháng sâu bệnh, ít bón phân.

2. Sự phát triển sản xuất ethanol nhiên liệu

Ngành công nghiệp hiện nay sản xuất nhiên liệu và hoá chất hữu cơ chủ yếu từ các nguyên liệu hoá thạch (dầu hoả, khí tự nhiên), nhưng vào những năm 1970 do giá dầu hoả đột ngột tăng cao bắt buộc các nhà sản xuất phải tìm nhiên liệu thay thế có nhiều hứa hẹn đặc biệt. Vào cuối thế kỉ XIX, ethanol khan đã được sử dụng như nhiên liệu cho động cơ nổ trong.

Sự kết hợp của an toàn quốc gia và sự cần thiết của việc thông qua Hiệp định Kyoto là hướng đến các nguồn *nhiên liệu sinh học*, đặc biệt là *ethanol sinh học*. Viễn cảnh thải ra lượng CO thấp cho thấy ethanol như là một nguồn năng lượng quan trọng cho cả nền công nghiệp và vận chuyển. Trong tương lai không xa, nguồn nhiên liệu ethanol zero-emission có thể được tạo ra từ các nguồn sinh khối và nông nghiệp có thể dùng được. Bột ngô (ở Mĩ) và đường mía (ở Brazil) là các nguồn nguyên liệu chính để sản xuất ethanol ; và ethanol có thể dùng pha với dầu xăng hay chỉ sử dụng mình nó.

Gần đây ở Mĩ đã có cố gắng sản xuất ethanol nhiên liệu đạt 5,67 tỉ lít/năm, và 2,25 tỉ lít ở Illinois có 12% xăng dầu được pha cồn.

Tất cả các tập đoàn sản xuất xe lớn đều chứng nhận xe hơi của họ dùng nhiên liệu E-10 (10% ethanol + 90% xăng dầu). Ngày nay, họ chế tạo ra nhiều xe dùng nhiên liệu hỗn hợp (flexible fuel vehicles (FFV)) với máy móc có thể chấp nhận lượng thể tích ethanol trên 85%. Có trên 1,2 triệu xe E-85 FFV đã gia nhập đoàn xe Mĩ vào mùa xuân năm 2001.

Hiện nay, ngoài Brazil và Mĩ, nhiều nước khác đang nghiên cứu tăng cường sử dụng ethanol nhiên liệu.

Sinh khối sử dụng làm nguồn năng lượng ngày càng gia tăng thể hiện ở số patent ứng dụng trong 2 năm 1999 – 2000 như trên bảng 11.5.

Bảng 11.5. Các ứng dụng patent sử dụng sinh khối (1999 – 2000)

Năng lượng sinh học (Bioenergy) (1001 patent)	*Năng lượng từ phế liệu (2336 patent)*
1. Nhật Bản chiếm 52%	1. Nhật Bản chiếm 81%
2. Châu Âu 30%	2. Châu Âu 9%
3. Mĩ 16%	3. Mĩ 9%
4. Các nước khác 2%	4. Các nước khác 1%

3. Lên men methane

Các vi khuẩn methane thu năng lượng từ sự *khử CO_2 bằng H_2* để tạo ra khí methane (CH_4). Các vi khuẩn methane sống ở các môi trường yếm khí bắt buộc giàu các chất hữu cơ. Sự trao đổi chất đặc biệt này cho thấy các vi khuẩn sinh methane là những sinh vật sống ở sinh quyển cổ xưa.

Sự lên men methane trong điều kiện yếm khí bắt buộc là một quá trình phức tạp được thực hiện bởi nhiều loại vi khuẩn mà chủ yếu là *Methanobacterium formecicum, Methanospirillus hungati,...* tạo ra khí CH_4 gọi là biogas. Quá trình tạo biogas qua 4 giai đoạn : sự thuỷ giải các đại phân tử tạo đơn phân ; sự lên men các đơn phân tạo acid hữu cơ và rượu ; tạo các tiền chất của methane ; tạo khí methane.

Phương trình tổng quát : $4\ C_6H_5COOH + 18\ H_2O \rightarrow 15\ CH_4 + 13\ CO_2$

Các loại phân chuồng trong điều kiện yếm khí lên men tạo biogas làm nguồn nhiên liệu. Quy trình lên men tạo bigas đơn giản có thể thực hiện khắp nơi, vừa giải quyết vấn đề ô nhiễm môi trường vừa cung cấp năng lượng. Hai nước điển hình về sản xuất biogas là Ấn Độ và Trung Quốc.

Lợi ích của lên men methane :

– Giải quyết được nguồn năng lượng đáng kể từ phân chuồng, rác.

– Giải quyết được nạn ô nhiễm môi trường (làm sạch phân chuồng).

– Sử dụng nước thải để nuôi tảo.

Các chất phế thải của công nghiệp thực phẩm có thể dùng sản xuất biogas (ví dụ, xác nho của CN làm rượu) vừa tạo nguồn năng lượng vừa thanh lí phế thải. Hiện nay, cơ chế lên men methane *được chú ý đặc biệt* vì như ta thấy trong điều kiện yếm khí mà các chất hữu cơ được phân huỷ tạo CH_4 (4 H) là chất khử trữ năng lượng.

4. Biohydrogen - nguồn năng lượng lí tưởng

Hiện nay, hydrogen được coi là nguồn năng lượng lí tưởng cho hiện tại và tương lai. Đó là chất khí nhẹ nhất nhưng trữ một năng lượng rất lớn : 119 Mj/kg so với 50 Mj/kg khí đốt tự nhiên. Phản ứng đốt sinh năng lượng tạo ra H_2O hoàn toàn không gây ô nhiễm, kể cả không tạo phụ phẩm. Khác với các nhiên liệu thông thường khi đốt thì mất luôn, hydrogen được coi là vector năng lượng vì sản phẩm tạo ra là H_2O vẫn chứa hydrogen và phân huỷ nước sẽ nhận lại được nó.

Trên thực tế, hydrogen được dùng làm năng lượng đẩy cho máy bay phản lực, tên lửa và ngày nay bắt đầu thử nghiệm làm nguồn năng lượng cho xe hơi. Trong các nguồn hydrogen thì từ các sinh vật (biohydrogen) là an toàn nhất và dồi dào nhất. Thực ra, hằng ngày các sinh vật trên Trái Đất tạo ra một lượng hydrogen khổng lồ. Vấn đề đặt ra là làm thế nào khai thác được biohygrogen giá rẻ với số lượng lớn.

– *Quang thuỷ giải nước (Photolyse H_2O) :* Trong quang hợp, nhờ phức hợp enzyme đặc biệt, ánh sáng mặt trời thực hiện quang thuỷ giải nước ($2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2$).

H_2 có thể chuyển vào hệ thống máy nổ hoặc dùng vào pin sinh học.

Sử dụng năng lượng mặt trời nhờ quang hợp để phân huỷ H_2O tạo H_2 và tạo O_2 sẽ cung cấp một nguồn năng lượng lí tưởng cho loài người.

– *Một số sinh vật quang hợp tạo năng lượng và hoá chất :* Trong các vi sinh vật, có một số nhóm vi sinh vật cần lưu ý :

+ *Các vi khuẩn quang dưỡng* tạo ra H_2 và ATP.

+ *Các Cyanobacteria* H_2 NH_3 Acid amine $NADPH_2$.....

+ *Thực vật thượng đẳng* qua màng thylakoide tạo H_2 và $NADPH_2$.

Có thể cố định cấu trúc tế bào như *màng thylakoide để thu năng lượng hoặc cố định tế bào để thu năng lượng* dùng trong thiết bị cảm biến.

Sinh giới sản sinh một lượng lớn hydrogen trong điều kiện bình thường và tiềm năng vô tận này nếu được khai thác thì loài người sẽ có nguồn năng lượng lí tưởng với giá rẻ. Trong tính toán về nhu cầu năng lượng, có ý kiến cho rằng từ nay đến khoảng năm 2050 thì năng lượng sinh khối sẽ thoả mãn nhu cầu, nhưng sau đó thì hydrogen mới đáp ứng đủ.

5. Pin sinh học (Biofuell cell)

Thí nghiệm đầu tiên được Potter thực hiện (1910) : Nhúng điện cực platin vào dịch nuôi cấy yếm khí có H_2 và nấm men hoặc *E. coli*, thấy xuất hiện điện thế âm so với điện thế dương của điện cực Pt này đặt trong môi trường vô trùng có O_2 đạt hiệu thế 0,3 – 0,5V, cường độ dòng điện 0,2mA.

Ngày nay, pin sinh học được phát triển và có nhiều ứng dụng. *Pin sinh học đơn giản (H_2 – O_2)* sử dụng các chất không tích điện (hình 11.11).

Hình 11.11. Pin sinh học sử dụng vi khuẩn

$$\text{Glucose} \xrightarrow{\text{Các vi sinh vật lên men}} H_2$$

– *Vi sinh vật :*

$$H_2 \longrightarrow 2H^+ + 2e \text{ (anode)}$$

$$2H^+ + 1/2\ O_2 + 2e \longrightarrow H_2O \text{ (cathode)}$$

– *Hệ thống dùng enzyme :*

$$H_2 \xrightarrow{\text{Hydrogenase}} 2H^+ + 2e \text{ (anode)}$$

$$2H^+ + 1/2\ O_2 + 2e \xrightarrow{\text{Laccase}} H_2O \text{ (cathode)}$$

IV. CÔNG NGHỆ SINH HỌC TRONG HOÁ HỌC

1. Các sản phẩm hoá học từ sinh khối tự nhiên

Từ ngàn xưa, sinh giới đã cung cấp những phương tiện sống căn bản cho loài người. Khó kể hết những lĩnh vực sống của con người mà thực vật đóng một vai trò quan trọng hay thậm chí có tính chất sống còn. Ngũ cốc, trái cây, rau đã nuôi sống con người. Quần áo, gỗ xây dựng, giấy viết,... đều không thể thiếu được cho cuộc sống hằng ngày. Màu hoa trang điểm cho cuộc sống. Nhiều cây cỏ là thuốc trị bệnh. Nhiều ngành hoá chất sử dụng nguyên liệu thực vật như thuốc nhuộm, chất đánh bóng, dầu, hương liệu.

Thêm vào đó là các sản phẩm động vật như mỡ, dầu, một số chất đặc biệt (tinh dầu cà cuống cho nước mắm, xạ chồn hương, mỡ cá voi,...). Công nghệ lên men đã góp nhiều sản phẩm cho công nghiệp hoá chất (bảng 11.6), chưa kể nhiều chất trao đổi sơ cấp và thứ cấp.

Bảng 11.6. Các hoá chất công nghiệp do lên men VSV (năm 1978)

Hoá chất	*Nguồn VSV*	*Ứng dụng*	*Doanh số (triệu USD)*
1. Ethanol	*Saccharomyces*	Tăng độ octane, dung môi, chất trung gian (CTG) cho sản xuất giấm, ethylene, butadiene, ester và ether.	9000
2. Acetic acid	Acetobacter	Dung môi, CTG cho sản xuất nhiều hoá chất và phụ gia thực phẩm.	620
3. Isopropanol	*Clostridium*	Dung môi, mĩ phẩm, mực chịu lạnh.	500
4. Acetone	*Clostridium*	Dung môi, chất trung gian cho sản xuất nhiều chất hữu cơ.	460
5. Acrylic acid	*Bacillus*	Chất trung gian cho sản xuất plastic.	360
6. Glycerol	*Saccharomyces*	Dung môi, tạo plastic, chất ngọt, thuốc nổ, in, mĩ phẩm, chống đông.	250
7. Citric acid	*Aspergillus*	Thực phẩm.	190
8. Sorbitol	*Acetobacter*	Công nghiệp bánh kẹo.	90

Trong thế kỉ XX, con người đã khai thác một phần rất nhỏ nguồn tài nguyên thực vật để sản xuất một số hoá chất. Thế kỉ XXI sẽ chứng kiến sự

phát triển mạnh của *hoá học xanh* bằng các quy trình CNSH phù hợp với thiên nhiên và an toàn cho môi trường.

2. Vật liệu mới

Nhiều sản phẩm của CNSH được coi là các vật liệu mới phân huỷ sinh học như các biopolymer. Một số sản phẩm được nghiên cứu mở thêm nhiều úng dụng.

a) Cellulose vi khuẩn (Bacterial Cellulose – BC) : *Thạch dừa* (Nata-de-Coco) là một loại thực phẩm phổ biến. Thạch dừa thực chất là *sinh khối của vi khuẩn Acetobacter xylinum* (nuôi trên môi trường nước dừa già), mà thành phần chủ yếu là cellulose nên được gọi là cellulose vi khuẩn. Hiện nay trên thế giới, *Acetobacter xylinum* và BC đã được nghiên cứu rất nhiều, cho thấy tiềm năng ứng dụng độc đáo trong các lĩnh vực khác nhau như thực phẩm, y học, mĩ phẩm, khoa học vật liệu,...

Trong thực phẩm có các ứng dụng : món tráng miệng (thạch dừa, kem ít calori, thức ăn nhanh, kẹo) ; chất nhũ hoá trong nước ép trái cây và những thức uống khác ; chất làm đặc (trong kem, dầu giấm để trộn salad).

Trong y học : màng trị bỏng và băng vết thương, da nhân tạo, vật liệu cấy ghép có tính dung hợp, mạch máu nhân tạo trong vi phẫu thuật,...

b) Polylactic (PLA) : PLA là một ví dụ điển hình sản xuất vật liệu mới từ nguồn nguyên liệu tái sinh. *PLA là plastic phân huỷ sinh học* có ưu điểm dùng làm màng mỏng cho bao bì. Nó là polymer do sự trùng hợp các L-lactic acid, là sản phẩm lên men của vi khuẩn lactic. Loại vật liệu mới này có lợi cho môi trường nên đã có thông báo về việc xây dựng nhà máy 140000 tấn PLA/năm từ lactic acid do lên men bột bắp vào cuối năm 2001.

3. Các quy trình sinh học phát triển nhanh và chiếm ưu thế

Xu hướng phát triển tất yếu của công nghệ hoá học tăng cường các *quy trình sinh học* (bioprocessing) để một mặt thay thế các quy trình gây nhiễm, mặt khác có hiệu quả kinh tế cao hơn.

Mặc dù các enzyme được dùng làm chất tẩy rửa từ thập niên 1950, nhưng mãi gần đây vai trò hàng đầu đó mới được công nhận trong công nghiệp hoá tinh vi (fine chemicals). Đến nay, nhiều nhược điểm của enzyme trong công nghệ hoá học đã được khắc phục như enzyme cải biến có hoạt tính trong dung môi hữu cơ.

a) Các ưu thế của quy trình sinh học :

– *Nhiệt độ và áp suất thấp* là ưu điểm đầu tiên so với nhiều quy trình hoá học cần nhiệt độ cao và áp suất lớn.

– *Các enzyme thực hiện nhiều kiểu phản ứng hoá học* như oxy hoá, khử, trùng hợp, phân huỷ,... mà 10% enzyme sử dụng ở quy mô công nghiệp.

– *Sự kết hợp với nguồn nguyên liệu tái sinh* sẽ mang lại hiệu quả kinh tế.

b) Các ví dụ điển hình cho thấy rõ ưu việt của quy trình sinh học :

– *Vitamin B_2, riboflavin* trong 50 năm trước được sản xuất từ glucose qua 6 công đoạn hoá học. Từ năm 1990, các quy trình hoá học đã dừng. Quy trình sinh học gồm một bước lên men tạo riboflavin trực tiếp từ glucose nhờ chủng vi khuẩn GM *Bacillus subtilis*.

– *Lysine làm chất phụ gia thực phẩm* : Lysine trong một thời gian dài được sản xuất nhờ các chủng vi khuẩn *Corynebacterium và Brevibacterium*, nhưng giá thành rất đắt do nhiều phế phụ phẩm và sản phẩm bị mất nhiều khi thu hồi trong sau lên men. Quy trình sáng chế mới làm phế phụ phẩm giảm gần đến không và sự thay đổi nguyên liệu cùng quy trình lên men thu hồi lysine cùng phụ phẩm ở dạng khô mà lysine chiếm 60%. Nhà máy lysine 100 triệu USD được xây dựng để sản xuất 75000 tấn/năm đã bắt đầu hoạt động từ tháng 6 năm 2000.

– *1,3-propadienol* (PDO) còn gọi là trimethylene glycol được dùng *sản xuất một loại polyester mới* là polytrimethylene terephthalate. Hiện có 2 quy trình sản xuất PDO đơn phân (monomer) từ *nguyên liệu hoá dầu mỏ*. Quy trình sinh học mới sản xuất PDO chỉ qua *1 bước lên men* từ nguyên liệu *đường bột bắp*. Giá nguyên liệu rẻ có tính cạnh tranh.

Thị trường thế giới của các sản phẩm và quy trình sinh học tăng nhanh. Dĩ nhiên, dẫn đầu trong công nghệ dược đạt doanh số 1 tỉ USD năm 1998 và tăng 17% so với các năm trước. Thị trường enzyme tăng doanh số gấp đôi. Hiện nay, các quy trình sinh học sản xuất hơn 15 triệu tấn hoá chất thương phẩm/năm, bao gồm các amino acid, acid hữu cơ, kháng sinh, các enzyme thực phẩm và công nghiệp, hoá chất tinh vi, các chất có hoạt tính sinh học, dược phẩm và ethanol nhiên liệu.

4. Thực vật sẽ trở thành các nhà máy hoá chất

Nhờ KTDT con người có thể cải biến các tính chất của thực vật, biến nó thành nhà máy sản xuất hoá chất với giá rẻ.

a) Sinh khối thực vật là nguồn hoá chất khổng lồ : Ngoài những chất căn bản cần cho trao đổi chất như ở các sinh vật khác, các thực vật khác nhau tổng hợp hơn 50000 loại chất trao đổi thứ cấp (bảng 11.7).

Bảng 11.7. Sự đa dạng các cấu trúc hoá học do thực vật tạo ra

Cấu trúc phân tử	*Số cấu trúc đã biết*	*Các ví dụ*
1. Các isoprenoid	> 25000	Menthol, cao su.
2. Alkaloid	> 12000	Caffeine, nicotine
3. Phenolic	> 8000	Vanillin, anthocyani
4. Acid béo và dẫn suất	> 500	Dầu ăn
5. Các chất khác nhau	> 5000	Sorbitol

b) Sản xuất hoá chất từ thực vật sẽ rẻ hơn lên men VSV : Thực tế cho thấy nhờ sử dụng năng lượng mặt trời và tự tổng hợp nhiều hoá chất nên các kết quả ban đầu cho thấy sản phẩm của thực vật rẻ hơn. Ví dụ, sản xuất chất plastic phân huỷ sinh học polyhydroxybutyrate (PHB) ở cây *Arabidopsis* cho thấy rẻ hơn.

V. CÔNG NGHỆ SINH HỌC NÔNG NGHIỆP

Sự phát triển của CNSH nông nghiệp sẽ nâng cao đáng kể chất lượng cuộc sống của con người. Lĩnh vực này có những đặc điểm sau :

– *Về trồng trọt :* Phát triển *nông nghiệp bền vững* (suistanable) *để giải quyết nạn đói* và đáp ứng *nhu cầu gia tăng mạnh cho chăn nuôi;* thực hiện các chức năng mới như *sản xuất hoá chất và dược phẩm.*

– *Về chăn nuôi :* Tăng hiệu quả cải thiện giống và nhân giống, cung cấp các sản phẩm mới như dược phẩm và cơ quan cấy ghép.

– *Về an toàn sinh học* (biosafety) : Các sản phẩm không gây hại cho người và môi trường.

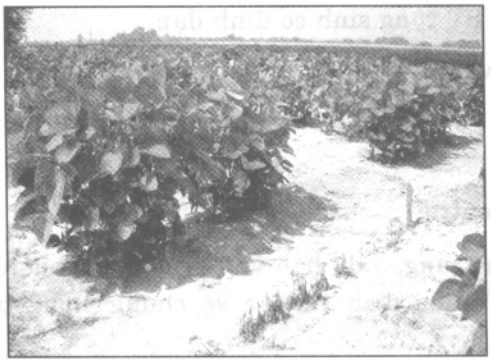
– *Về phụ phế liệu :* Tận dụng có hiệu quả cao.

1. CNSH trong trồng trọt

CNSH trong trồng trọt đã có những bước tiến ngoạn mục nhờ những thành tựu của chọn giống thực vật. Một mặt trồng trọt tiếp tục phát triển để xoá hẳn nạn đói lương thực vào những năm 2025 – 2030, mặt khác nó phải thoả mãn nhu cầu thực phẩm chất lượng cao và cân bằng dinh dưỡng.

a) Những thành tựu chọn giống :

Nhờ các công nghệ tế bào thực vật và KTDT, chọn giống cây trồng đã có những bước tiến dài. Các sản phẩm có nhiều ưu thế. Ví dụ : cây trồng có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và virus (hình 11.12 và 11.13).



Hình 11.12. Đậu nành kháng thuốc diệt cỏ (phía trước cỏ chết do thuốc)

Hình 11.13. Thuốc lá kháng virus

Thêm vào đó, các phương pháp nhân giống mới như vi nhân giống giúp cho sản xuất lớn thu nhiều sản phẩm nhanh và đồng nhất hơn.

Ngoài ra, thời gian chọn giống được rút ngắn đáng kể nhờ kĩ thuật *in vitro* và hàng loạt các marker phân tử. Ví dụ như trong phân tích các tính trạng số lượng (quantitative trait loci – QTL).

Trong thời gian tới, chọn giống cây trồng phải hướng đến chinh phục những vùng đất mới mà cây trồng khó phát triển trước đây như đất khô cằn, sa mạc, phèn, mặn.

Tuy nhiên, để cho nông nghiệp phát triển bền vững cần duy trì sự đa dạng sinh học và không được xem thường chọn giống bằng phương pháp cổ điển và công nghệ tế bào.

b) Phân bón :

Phân bón mà chủ yếu là nguồn nitrogen rất cần cho sự phát triển của cây trồng. Cách mạng xanh đã mang lại một hậu quả xấu là làm gia tăng việc sử dụng phân hoá học, gây nhiều biến đổi môi trường bất lợi làm phát sinh nhiều sâu bệnh cỏ dại. Sự gia tăng này thể hiện ngay ở các nước chậm phát triển. Việc sử dụng phân hoá học không đúng cách làm mất đi một lượng đạm đáng kể, mà theo đánh giá là từ 0% đến 80%. Có nước đã cấm dùng phân urea bón ruộng. Nước ta có năm xuất được 600 triệu USD gạo, nhưng nhập phân hết 500 triệu USD. Do đó, việc dùng phân hữu cơ sinh học cần được khuyến khích bằng nhiều nguồn khác nhau như :

– Xử lí phế thải và phân chuồng làm phân bón bằng các chủng VSV có hiệu quả cao.

– Các chế phẩm phân vi sinh.

– Tăng cường hoạt động của các VSV cộng sinh cố định đạm.

c) Phòng trừ sâu bệnh, tuyến trùng và diệt cỏ :

Ngoài chọn các giống đề kháng, *kiểm soát sinh học* còn có nhiều biện pháp khác nhau.

– *Kiểm soát sinh học* (Biological control) :

+ Sử dụng các thiên địch (kí sinh trùng,...) để bảo vệ cây trồng. Thường xuyên phóng thích số lượng lớn các thiên địch và bảo vệ chúng trong tự nhiên.

+ Các chế phẩm VSV diệt côn trùng và tuyến trùng gây bệnh cho các tác nhân có hại. Ngoài ra, còn sử dụng các VSV mà sự phát triển của chúng hạn chế sự phát sinh của các loài gây bệnh.

+ *Kích thích khả năng miễn dịch* của thực vật.

– *Kiểm soát sinh sản và di truyền :*

+ Dùng các marker phân tử chẩn đoán nhanh các tác nhân gây bệnh để sớm có biện pháp thích hợp.

+ Phóng thích hàng loạt *các con gây hại bất thụ* vào môi trường.

+ Đưa các gen có hại vào quần thể côn trùng hoặc tuyến trùng gây hại.

Đối với cỏ thì biện pháp hiện nay là tạo giống kháng thuốc diệt cỏ. Như vậy, biện pháp còn nhược điểm là chưa loại trừ được việc sử dụng các hoá chất độc.

2. Công nghệ sinh học ứng dụng vào cây rừng

Đa phần cây rừng là cây lâu năm nên chọn giống bằng lai khó thực hiện vì thời gian quá dài. Các biện pháp vi nhân giống đã được ứng dụng rộng rãi ở cây rừng. Biện pháp thường dùng là sàng lọc *những cây tốt nhất* từ quần thể rừng tự nhiên hoặc được gieo trồng từ hạt và nhân giống *in vitro*. Thế hệ cây con do vi nhân giống sẽ tạo quần thể cây rừng mới có phẩm chất trội hơn hẳn và có độ đồng đều cao, thuận tiện cho khai thác.

Một phương pháp sử dụng ưu thế lai có hiệu quả là lựa chọn cây lai F_1 tốt nhất và nhân giống *in vitro*.

Ngoài ra, để cây rừng phát triển tốt có thể sử dụng các loài nấm cộng sinh với rễ cây (*mycorhizae*). Các nấm này hỗ trợ cho cây hấp thụ dinh dưỡng từ đất tốt hơn.

Trong tương lai, trồng rừng sẽ phát triển theo hướng thu sinh khối lớn trong thời gian ngắn để phục vụ cho sản xuất năng lượng và hoá chất. Gần đây, cây liễu thấp ở xứ lạnh được coi là một đối tượng sáng giá vì có tốc độ tăng trưởng nhanh và mọc được ở vùng đất lạnh.

3. CNSH trong chăn nuôi

Các sản phẩm của CNSH trong chăn nuôi có nhiều đặc điểm khác với trồng trọt. Các động vật nuôi rất nhạy cảm với nhiều tác động kĩ thuật. Sinh lí của chúng rất phức tạp nên việc ứng dụng các công nghệ tế bào không đơn giản. Ngoài ra, nhiều virus gây bệnh có thể gây hại cho người như H5N1 đang gây dịch cúm gia cầm. Chọn giống động vật gặp rất nhiều khó khăn do số lượng cá thể ít, giá trị con vật cao và giao phối không đơn giản như thực vật. Tuy nhiên, CNSH trong chăn nuôi đã có những bước tiến vượt bậc làm tăng nhanh sản lượng. Ví dụ, Ở Mĩ doanh số chăn nuôi đạt 90 tỉ USD/năm, trong đó xuất khẩu 11 tỉ.

a) Nhân giống và cải thiện giống động vật nuôi :

Các thành tựu ấn tượng nhất của CNSH thể hiện ở sinh sản nhân tạo các động vật nuôi như thụ tinh nhân tạo, cấy chuyển phôi (chương 10).

– *Kiểm soát sự sinh sản của các động vật nuôi :* Nhờ hiểu rõ cơ chế sinh lí sinh sản và các hormone, con người có khả năng chủ động thực hiện *kiểm soát nội tiết chức năng sinh sản* và điều hoà chu trình sinh sản hữu tính ở động vật. Kĩ thuật sử dụng các hormone để điều khiển sự rụng trứng trong chăn nuôi và để thúc đẻ cho cá đã được áp dụng.

– *Các kĩ thuật khác :* Nhiều biện pháp sinh sản nhân tạo khác đã được ứng dụng rộng rãi, mang lại hiệu quả kinh tế cao và một số mới thành công trong thí nghiệm.

+ *Kĩ thuật tạo dòng và phân chia phôi* từ các phôi bào : Phôi ở giai đoạn sớm có 4 hoặc 8 tế bào được tách rời từng tế bào và tạo dòng. Kĩ thuật này cho phép nhận 4 hoặc 8 phôi từ một hợp tử. Đối với những động vật đẻ mỗi lứa một con, kĩ thuật này giúp tăng nhanh số động vật con.

+ Kĩ thuật sử dụng *marker phân tử* trong xác định giới tính phôi, chọn lọc các gen tốt, theo dõi sự di truyền các tính trạng ở con lai,...

+ Một số các kĩ thuật đã được thiết lập trong thực nghiệm nhưng vẫn chưa được ứng dụng rộng rãi trong chăn nuôi : kĩ thuật sản xuất *tinh theo giới tính* (đã tách riêng tinh trùng mang nhiễm sắc thể Y hoặc X), kĩ thuật tạo ra các động vật chuyển gen bằng phương pháp *chuyển gen trực tiếp*, kĩ

thuật tạo ra các động vật chuyển gen dựa trên *thao tác gen của tinh dịch* và tạo dòng động vật hay *nhân bản vô tính*.

b) Tình hình nghiên cứu các động vật chuyển gen :

Các động vật chuyển gen không phát triển mạnh trên diện rộng như ở thực vật, nhưng cũng tiến triển nhanh (bảng 11.8). Một trở ngại lớn là động vật có khả năng di chuyển nên phải tính hiệu quả sinh môi (có lấn át các loài khác trong tự nhiên hay không).

Bảng 11.8. Tình hình nghiên cứu các động vật chuyển gen

Động vật	*Tình trạng*	*Động vật*	*Tình trạng*
1. Chuột	Sản xuất mở rộng cho thí nghiệm	9. Cá trê sông	Thí nghiệm thường
		10. Cá rô Phi (*Tilapia*)	Đã thương mại hoá
2. Bò	Đã thương mại hoá	11. Cá ngựa (*Zebrafish*)	Mới có kết quả
3. Cừu	Đã thương mại hoá	12. ĐV giáp xác	Mới có kết quả
4. Dê	Đã thương mại hoá	13. ĐV thân mềm	Mới có kết quả
5. Heo	Đã thương mại hoá	14. Ruồi giấm *Drosophila*	Thực nghiệm thường
6. Thỏ	Đã thương mại hoá	15. Muỗi	Mới có kết quả
7. Gà	Mới có kết quả		
8. Cá hồi Atlantic	Đã thương mại hoá		

c) Thú y :

Tình hình bùng nổ nhiều bệnh dịch khác nhau trên thế giới gần đây như bệnh bò điên, lở mồm long móng ở Anh, cúm gia cầm ở nhiều nước châu Á và nước ta làm cho thú y có tầm quan trọng đặc biệt. Thú y không những đảm bảo sức khoẻ cho động vật nuôi, chất lượng thương phẩm, mà còn có thêm vai trò ngăn ngừa lây lan bệnh sang người.

CNSH ứng dụng vào thú y ở các khâu :

– *Vaccine* : Phương tiện ngừa bệnh có hiệu quả được mở rộng về chủng loại và gia tăng số lượng. *Vaccine chống bệnh lở mồm long móng* là vaccine đầu tiên được sản xuất cho chăn nuôi và ngày nay đạt hàng tỉ liều/năm. KTDT đang được ứng dụng để sản xuất *nhiều loại vaccine mới* cho chăn nuôi. Nhiều nỗ lực đang tập trung cho *vaccine chống bệnh cúm gia cầm* và các kết quả ban đầu đã được thông báo.

– *Chẩn đoán nhanh* : Có thể thực hiện nhờ *các kháng thể đơn dòng* và các *marker DNA/RNA*. Các chẩn đoán nhanh có vai trò rất quan trọng trong

phát *hiện dịch bệnh và kiểm dịch* nội địa và qua biên giới nên đang được đầu tư phát triển.

– *Chọn giống đề kháng bệnh :* Có ý nghĩa lâu dài và tốn kém.

– *Trị bệnh bằng antibiotic :* Nhiều kháng sinh được dùng trị bệnh và gặp phải tình trạng vi trùng kháng thuốc tương tự như xảy ra ở người.

Nói chung, phòng bệnh vẫn là biện pháp tốt nhất.

4. Công nghệ sinh học trong thuỷ sản

CNSH đóng góp tích cực cho ngành thuỷ sản ở nhiều mặt và được ứng dụng rộng trong sản xuất.

a) Chọn giống : Phát triển mạnh và đạt nhiều kết quả, điển hình là *chọn giống cá chép* ở nước ta. Hiện nhiều giống cá mới được nhập nội và đem lại hiệu quả kinh tế cao như giống cá rô Phi lai. Các marker phân tử cũng được sử dụng trong chọn giống tôm. Ví dụ, ở Mĩ đã dùng PCR để xác định gen tăng trưởng nhanh ở tôm trong chọn giống.

b) Sinh sản nhân tạo : Đã được áp dụng từ lâu với nhiều loại cá. Những năm gần đây, sản xuất cá tra, cá ba sa ở đồng bằng sông Cửu Long (chủ yếu là 2 tỉnh An Giang và Đồng Tháp) phát triển mạnh nhờ cá ba sa sinh sản nhân tạo đáp ứng đủ và nhanh nguồn giống cá con.

c) Các chế phẩm sinh học : Nhiều chế phẩm sinh học được bán rộng rãi phục vụ cho nuôi tôm, cá. Đa phần là các chế phẩm *enzyme và vi sinh vật* dùng xử lí môi trường nuôi như phân huỷ các chất hữu cơ làm sạch đáy ao nuôi. Phổ biến là các *chế phẩm probiotic* ngăn chặn sự phát triển của VSV gây bệnh và tăng cường sức khoẻ cho cá tôm.

d) Chẩn đoán nhanh các bệnh : *Marker phân tử* cũng đang được dùng chẩn đoán như với bệnh *virus đốm trắng ở tôm.*

5. Thể trạng và sức khoẻ động vật sinh sản nhân tạo và biến đổi gen

Vấn đề thể trạng và sức khoẻ của động vật chuyển gen rất được xã hội quan tâm và cần được nghiên cứu để có những hiểu biết thấu đáo. Nó bao gồm nhiều khía cạnh kể cả yếu tố đạo đức.

Các kĩ thuật thụ tinh nhân tạo IVF, chuyển phôi và chuyển nhân ngày nay được sử dụng phổ biến, nhưng chúng ảnh hưởng đến sức khoẻ và thể trạng của các động vật thực hiện.

a) Sử dụng kĩ thuật sản xuất in vitro (IVP) : Phôi và động vật con tạo thành có sự phát triển bất thường như *hội chứng LOS* (Large-offspring syndrome) với

các triệu chứng như bê non có khối lượng sơ sinh lớn hơn bình thường, thời gian mang thai dài hơn, tỉ lệ chết trong tử cung cao và nhiều dị tật khác.

b) Phương pháp vi tiêm : Có hiệu quả thấp (tỉ lệ thành công thấp hơn 1% và chỉ khoảng một nửa trong số này có sự biểu hiện gen mục tiêu). Hiệu quả của phương pháp vi tiêm khoảng 0 – 4% đối với heo, trâu bò, cừu và dê vào khoảng 80 – 90% trường hợp chết ngay ở giai đoạn đầu của phôi, trước khi trứng có thể cấy cho con cái mang phôi.

c) Các bất thường ở động vật chuyển gen :

– *Chuyển gen mã hoá hormone tăng trưởng của bò cho heo :* Mục tiêu là nhằm giúp heo tăng trọng nhanh và giảm mỡ. Nhưng kết quả là tỉ lệ mỡ có giảm, hiệu quả sử dụng thức ăn tăng nhưng không tăng trưởng nhanh, và chúng mang rất nhiều bệnh như tiêu chảy, con đực có tuyến vú phát triển bất thường, ngủ li bì, bị viêm khớp, què quặt, có vấn đề ở da và mắt, mất đi sự ham muốn tình dục, và bộ máy phân bào bị phá huỷ.

– *Chuyển gen mã hoá hormone tăng trưởng cho cá hồi :* Kết quả tạo nên giống cá hồi có kích thước lớn, nhưng có sự phát triển bất thường ở đầu và hàm. *Cá hồi bạc chuyển gen* có các bất thường như hộp sọ dị dạng và nắp mang phát triển vượt mức.

Tóm lại, các phương pháp can thiệp vào sinh sản động vật và chuyển gen hiện vẫn ở giai đoạn đầu nên có nhiều biểu hiện bất thường. Điều này cho thấy cơ thể động vật rất tinh vi và nhạy cảm với nhiều tác động nhân tạo từ phía con người.

VI. CÔNG NGHỆ SINH HỌC MÔI TRƯỜNG

CNSH góp phần bảo vệ môi sinh bằng các quy trình sản xuất ít gây ô nhiễm, thay thế các sản phẩm khó phân huỷ hoặc gây độc và xử lí chất thải. Các vi sinh vật giữ vai trò căn bản trong vòng tuần hoàn vật chất toàn cầu bằng sự giải phóng C, N, P và S từ khối lượng khổng lồ các chất hữu cơ phức tạp và đa dạng để chúng tái sử dụng. Đặc biệt là vi khuẩn, vi tảo và vi nấm với sự uyển chuyển độc đáo của trao đổi chất được sử dụng trong 3 lĩnh vực sau : xử lí *rác và nước thải*, xử lí các *chất dị sinh* (xenobiotics) và *thu hồi kim loại*.

1. Sự phân huỷ sinh học

Căn cứ vào sự phân huỷ, các chất hoá học chia thành 3 dạng sau :

– *Các chất phân huỷ sinh học* (biodegradable) là các chất chịu sự chuyển hoá sinh học.

– *Các chất hữu cơ dai dẳng* (persistent) là những chất không chịu sự phân huỷ sinh học trong một số môi trường.

– *Các chất hữu cơ "cứng đầu"* (recalcitrant) kháng phân huỷ sinh học trong nhiều môi trường.

Sự phân huỷ sinh học không phải lúc nào cũng như ý. Trong một số trường hợp sự biến đổi có thể tạo ra *chất độc hơn* hoặc làm *chất độc tích luỹ* để tạo sản phẩm gây độc cho nhiều sinh vật hơn. Sự phân huỷ sinh học có thể ở mức *sơ cấp* khi chỉ thực hiện một phản ứng đơn giản, có thể phân huỷ một phần và sự phân huỷ hoàn toàn khi chất hữu cơ được *khoáng hoá* (mineralization) thành sản phẩm cuối cùng là CO_2, nước và các chất vô cơ khác.

Các vi sinh vật sử dụng nhiều hợp chất hữu cơ khác nhau (tự nhiên hay tổng hợp nhân tạo) làm nguồn dinh dưỡng hay năng lượng. Nhiều chất tổng hợp nhân tạo như các chất tẩy rửa, dung môi (trichloethane, xilene, toluene) khác xa các hợp chất tự nhiên, nhưng vẫn bị phân huỷ. Có lẽ trong lịch sử tiến hoá hàng tỉ năm trên Trái Đất, các vi sinh vật đã từng gặp và có nhiều đột biến đã xuất hiện tạo các enzyme tương ứng biến đổi chúng.

Cơ sở vi sinh vật học của sự phân huỷ sinh học là các vi sinh vật cùng sống chung nhau trong quần xã có sự phụ thuộc lẫn nhau. Sự phụ thuộc này có thể là *hội sinh* (commensalism) khi một quần thể thu lợi từ sự chung sống còn quần thể khác thì không. Sự *cộng sinh* (symbiosis) khi cả 2 bên đều có lợi khi sống chung. Gần như thành quy luật là các chất hữu cơ được phân huỷ tốt hơn trong môi trường gồm hỗn hợp nhiều loài vi sinh vật so với chỉ thuần một loài.

Các chất hữu cơ bị phân huỷ sinh học được nêu trên bảng 11.9.

Bảng 11.9. Sự phân huỷ sinh học tại chỗ do vi khuẩn đối với các chất ô nhiễm hữu cơ thường gặp

Hoá chất	*Nguồn chủ yếu*
Anthracene	– Công nghệ hoá học.
Benzene	– Công nghệ hoá học (trong hoá dầu là chất trung gian điều chế styrene, phenol và cyclohexane).
Benzo(a)pyrene	– Hydrocarbon hắc ín.
Naphthalene	– CN hoá học (hydrocarbon hắc ín dùng chế nhựa dẻo (resin), các hoá chất khác và băng phiến).
Pentachlorophenol	– Chất bảo quản gỗ.
Phenathrene	– Hydrocarbon hắc ín.

Phenol	– CN hoá học (nguyên liệu khởi đầu cho tổng hợp nhiều hoá chất công nghiệp quan trọng).
Polychlorinated biphenyl (PCBs)	– Chất chuyển hoá dầu, làm mềm sơn và plastics.
Toluene	– CN hoá học (nguyên liệu khởi đầu cho tổng hợp nhiều hoá chất công nghiệp quan trọng).
Trichloroethylene	– Dung môi tẩy khô, làm sạch kim loại.
Xylene	– CN hoá học (nguyên liệu khởi đầu cho tổng hợp nhiều hoá chất công nghiệp quan trọng).

2. Xử lí rác và nước thải

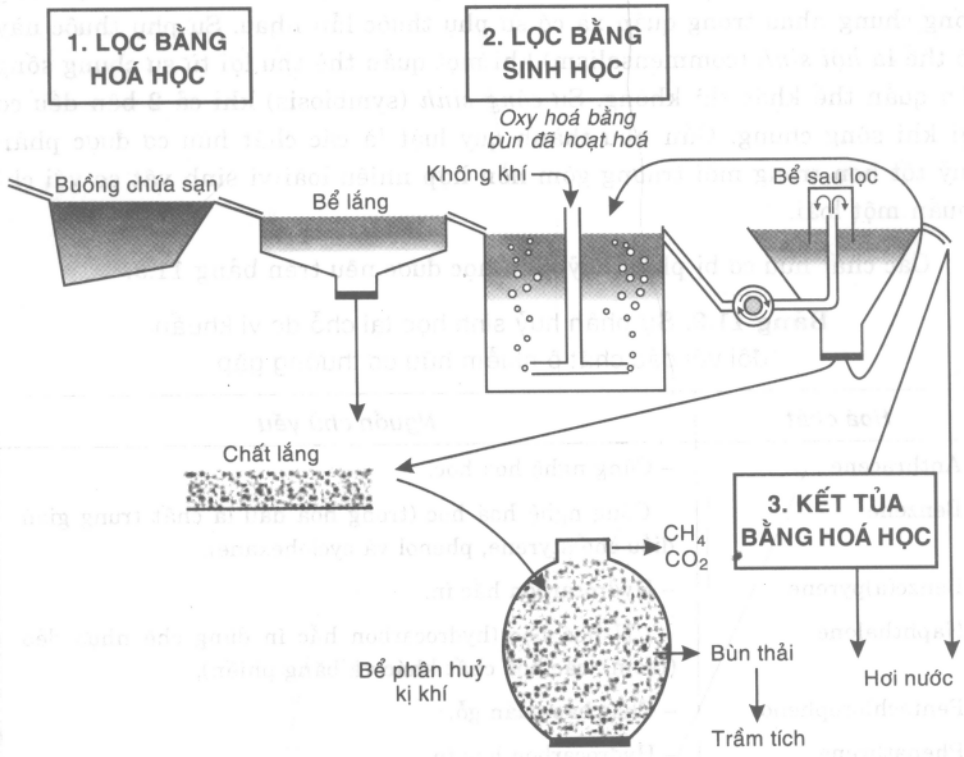
Quy trình xử lí rác và nước thải gồm 3 công đoạn (hình 11.14) :

– Sàng lọc cơ học và vào bể lắng.

– Làm sạch sinh học có sục khí bằng bùn hoạt hoá vào bể lắng và chuyển vào bồn phân huỷ yếm khí.

– Tủa hoá học : Sau làm sạch sinh học có thể tủa bằng hoá chất.

3. Sự phân huỷ các chất dị sinh (xenobiotics) bằng vi sinh vật



Hình 11.14. Quy trình xử lí nước thải thường dùng

Các chất dị sinh (xenobiotics từ *xenos* – ngoại lai) là những chất hoá học do con người tổng hợp. Công nghiệp hoá chất thải ra nhiều *chất dị sinh* và phần lớn chúng bền vững trong các điều kiện háo khí và yếm khí.

a) Sự bồi hoàn sinh học (Bioremedation) được hiểu là quá trình tự nhiên hay có điều khiển, trong đó sự xúc tác sinh học tác động lên các chất gây nhiễm và làm bồi hoàn hay loại bỏ sự ô nhiễm môi trường. Sự bồi hoàn sinh học hiện được sử dụng rộng rãi để làm giảm các chất thải hữu cơ.

Kĩ thuật bồi hoàn sinh học gồm một số loại chủ yếu :

– *Sự bồi hoàn sinh học tại chỗ* : Sử dụng các chủng vi sinh vật nơi bị nhiễm hay dùng chủng từ ngoài nhưng có bổ sung dinh dưỡng. Ví dụ, xử lí vụ tràn dầu của tàu *Exxon Valdez* ở Alaska có bổ sung dinh dưỡng nitrate và phosphate cho sự phát triển của vi sinh vật đồng hoá dầu.

– *Mùn hoá* (Composting) : Sự ủ đống rác có đảo trộn giúp cho sự phát triển các vi sinh vật phân huỷ các chất nhiễm.

– *Sử dụng bioreactor* : Đưa vào bồn lên men (fermentor) khuấy trộn.

b) Ứng dụng các đột biến và kĩ thuật di truyền : Các nhà nghiên cứu phát hiện một số vi khuẩn như *Pseudomonas* có khả năng thích nghi với môi trường có chất ô nhiễm. Các nghiên cứu tiếp theo cho thấy có nhiều loại plasmid có khả năng phân huỷ nhiều chất từ môi trường, gọi là *các plasmid tự nhiên thoái dưỡng*.

Trong tương lai KTDT sẽ được sử dụng rộng rãi để thực hiện bồi hoàn sinh học.

4. Sử dụng khả năng VSV hấp thu, tích luỹ các kim loại

Khi công nghiệp phát triển mạnh, vấn đề lớn đặt ra là nước thải công nghiệp chứa nhiều chất độc gây ô nhiễm môi trường. Các nước công nghiệp phát triển phải xử lí nước thải. Có thể dùng biện pháp vật lí và hoá học để xử lí nước thải nhưng bằng biện pháp này tốn kém, ít hiệu quả. Biện pháp sinh học sử dụng các VSV, các loài vi tảo,... có hiệu quả hơn, ít tốn kém, đồng thời còn tận dụng được các kim loại đó. Hiện nay, nhiều nước sử dụng phương pháp này rộng rãi. Việc xử lí này dựa trên nguyên tắc là tế bào VSV có khả năng :

– Biến một số chất độc trở nên bay hơi (methyl hoá), có thể thực hiện đối với các chất như arsen, telure, selene.

– Làm kim loại tủa xuống đáy (Fe, Mn, Mo, Ni).

– Tích luỹ các chất khác nhau bên trong tế bào.

– Hấp thu bề mặt các chất như uranium, vàng, chì. Uranium có thể tích luỹ gấp triệu lần bên trong tế bào so với bên ngoài.

Đối với một số trường hợp tích luỹ bên trong tế bào, muốn thu hồi các chất này phải phá vỏ tế bào.

TÓM TẮT CHƯƠNG

CNSH y dược là lĩnh vực phát triển nhanh nhất, vì nó tác động trực tiếp đến mạng sống con người. Nó phát triển vượt bậc một cách toàn diện : khai thác nhiều hơn nguồn dược liệu tự nhiên, sản xuất nhiều loại vaccine, các phương pháp chẩn đoán và trị liệu mới có hiệu quả hơn. *Y dược học bộ gen* có 3 mũi nhọn : *Y học cá thể hoá, Pharmacogenmics* và *Y học phục hồi*. Tuy còn tồn đọng nhiều thách thức, y học hiện đại đã can thiệp tích cực vào các vấn đề sinh, lão, bệnh và tử của con người.

Các thực phẩm lên men cổ truyền có lịch sử lâu đời và được sử dụng hằng ngày. Các loại bia, nước chấm, phomat, sữa chua,... đã ghi dấu ấn vào sinh hoạt văn hoá của các dân tộc. Nhiều thực phẩm mới được sản xuất như các chất tăng vị, các protein ngọt thay thế đường chống béo phì.

Sinh khối thực vật là nguồn cung cấp năng lượng và hoá chất. Nhiều nỗ lực hướng đến nguồn năng lượng tái sinh từ sinh khối thực vật như bioethnol và biogas. Biohydrogen là nguồn năng lượng lí tưởng cho tương lai, hứa hẹn một tiềm năng lớn.

Nhiều hoá chất đã được sản xuất từ sinh khối thực vật. Hoá chất xanh sẽ được phát triển mạnh trong tương lai. Các quy trình sinh học khẳng định nhiều ưu thế và phát triển mạnh trong những năm gần đây. Các sản phẩm mới như lysin, riboflavin, 1,3-propanediol, BC, PLA là những ví dụ điển hình về ứng dụng CNSH thay thế các quy trình hoá học.

Nông nghiệp phải phát triển bền vững để giải quyết nạn đói và đáp ứng nhu cầu gia tăng mạnh cho chăn nuôi. Trồng trọt phát triển để xoá đói lương thực vào những năm 2025 – 2030 và thoả mãn nhu cầu chăn nuôi để sản xuất thực phẩm chất lượng cao và cân bằng dinh dưỡng. Hàng loạt cây chuyển gen ra đời với nhiều tính trạng ưu việt hơn, tuy vấn đề còn tranh cãi. Cần tăng cường phân vi sinh hữu cơ và các biện pháp kiểm soát sinh học cho cây trồng.

Chăn nuôi phát triển mạnh với các kĩ thuật sinh sản nhân tạo và chuyển gen. Sự phát triển vaccine đang là nhu cầu cấp thiết cho chăn nuôi. Tuy nhiên, không ít các sinh vật được tạo ra qua sinh sản nhân tạo và chuyển gen có các biến đổi bất thường ngoài ý muốn.

CNSH góp phần bảo vệ môi sinh bằng các quy trình sản xuất ít gây ô nhiễm, thay thế các sản phẩm khó phân huỷ hoặc gây độc và xử lí chất thải. Các VSV được sử dụng trong xử lí rác, nước thải, các chất dị sinh (xenobiotics) và thu hồi kim loại.

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Khai thác nguồn dược liệu từ thiên nhiên có ý nghĩa như thế nào ?
2. Những tiến bộ kĩ thuật nào hỗ trợ cho sự phát triển nhanh của y học bộ gen ?
3. Y học phục hồi được thực hiện bằng những phương pháp nào ?
4. Pharmacogenomics đã có những thành tựu đầu tiên nào ?
5. Có những khả năng nào giải quyết vấn đề vô sinh ?
6. Y học hiện đại còn phải đối mặt với những thách thức gì ?
7. Nêu ví dụ về thực phẩm lên men cổ truyền gắn với nếp sống văn hoá.
8. Nước mắm được sản xuất như thế nào ?
9. Vì sao phải tìm các chất ngọt thay đường ? Nêu vài chất.
10. Thực phẩm chức năng là gì ?
11. Trong tương lai nguồn năng lượng nào sẽ thay dầu mỏ ?
12. Sản xuất ethanol nhiên liệu phát triển như thế nào ?
13. Vì sao nói hydrogen là nguồn năng lượng lí tưởng ?
14. Các quy trình CNSH trong sản xuất hoá chất có ưu điểm gì ?
15. Nêu các loại chất hữu cơ đối với sự phân huỷ sinh học.
16. Như thế nào là bồi hoàn sinh học ?
17. Các phân vi sinh hữu cơ có vai trò như thế nào đối với trồng trọt ?
18. Kiểm soát sinh học có vai trò như thế nào ?
19. Sự phát triển cây rừng trong tương lai có vai trò gì ?
20. CNSH có những ứng dụng gì trong thuỷ sản ?

CHƯƠNG 12

NHỮNG VẤN ĐỀ XÃ HỘI CỦA CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Những người chế bom nguyên tử có mục tiêu rõ ràng là *huỷ diệt*. Ngược lại, các nhà CNSH cải biến các sinh vật nhằm *phục vụ cho lợi ích con người*. Nhưng *nhiều vấn đề nảy sinh* khi tác động đến các sinh vật mà một số không ít là kẻ thù nguy hiểm như các vi trùng gây bệnh, mặt khác nhiều liệu pháp đối với con người liên quan đến những vấn đề đạo lí. Ngay từ năm 1973, khi thực hiện kĩ thuật tạo dòng đầu tiên, phát minh tạo nên *cách mạng CNSH*, các nhà khoa học đã phải *dừng thí nghiệm giữa chừng* vì sợ rằng mình tạo ra một VSV mới có khả năng làm *bùng phát dịch bệnh mà loài người chưa có thuốc chữa trị*. Nhiều vấn đề như GMO, nhân bản vô tính động vật, tế bào gốc,... đều gây tranh cãi làm nảy sinh nhiều vấn đề pháp lí. Các nhà khoa học kháo nhau rằng trong sự phát triển CNSH có 2 giới được hưởng lợi thoải mái là *các luật gia* và *các nhà cung cấp thiết bị*.

I. ĐẠO LÍ VÀ AN TOÀN SINH HỌC

Các công nghệ mang tính cách mạng có tác động rất lớn đối với xã hội theo nhiều hướng khác nhau như hậu quả về kinh tế, xã hội và đạo đức. CNSH phân tử cũng không phải là một ngoại lệ. Hơn nữa, do liên quan đến sự sống, nên nó có ảnh hưởng đến nhiều vấn đề nhạy cảm của xã hội. Ngay trong dự án bộ gen người, 5% kinh phí được dành cho nghiên cứu những hậu quả kinh tế xã hội (Ethics, Legacy and Social Issues - ELSI) mà trọng tâm xoay 2 vấn đề chính là *đạo lí sinh học* (Bioethics) và *an toàn sinh học* (Biosafety).

1. Đạo lí sinh học

Đạo lí sinh học không phải là vấn đề mới, nó đã được nêu lên từ thời *Hypocrates*. Vấn đề đầu tiên được đề cập đến là *chết tự nguyện*. Tiếp sau là vấn đề *sinh sản nhân tạo* (IVF). Đặc biệt là từ khi KTDT ra đời nhiều kĩ thuật mới được áp dụng như thử nghiệm di truyền, chẩn đoán hình sự, các GMO,... đã gây lo ngại cho xã hội. Năm 1983, UNESCO đã thành lập *Uỷ ban quốc tế về đạo lí sinh học IBC* (International Bioethics Commitee). Tổ chức này đã nêu ra các dự án, thu thập ý kiến để đi đến *các luật lệ về đạo đức sinh học*. Uỷ ban này tuyên bố rằng "*Bộ gen người là tài sản chung của loài*

người". Nó là đối tượng cần được bảo vệ và không ai có quyền sử dụng nó vào mục đích thương mại cũng như để phân biệt giữa người với người trên các đặc tính về di truyền. Uỷ ban này kêu gọi các quốc gia cần theo dõi các nghiên cứu và có biện pháp *bảo vệ bộ gen người*.

Bên cạnh những đóng góp to lớn cho nhân loại, sự phát triển của di truyền học đồng thời gây không ít những điều đáng lo ngại. Thậm chí, có nơi trên thế giới có những nhà khoa học (được giải Nobel) đề nghị *trưng cầu dân ý để cấm* các nghiên cứu di truyền học. Đa số cho rằng không thể cấm, nhưng phải có những luật lệ để *bảo vệ bộ gen người*, phù hợp với đạo lí.

KTDT ngay từ lúc ra đời đã làm nhiều nhà khoa học lo sợ. Trải qua quá trình phát triển trong 25 năm, nhiều vấn đề tâm lí - xã hội được đặt ra. Có thể phân biệt 2 loại vấn đề : tâm lí - xã hội và các thí nghiệm phi đạo lí.

a) Các vấn đề tâm lí - xã hội

Nhiều vấn đề tâm lí - xã hội nảy sinh khi biết rõ về bộ gen người là :

– Chẩn đoán sớm có ảnh hưởng xã hội như thế nào khi biết rằng một số người mạnh khoẻ nhưng có mang gen bệnh ?

– Việc biết trước người có mang gen bệnh có ảnh hưởng đến tâm lí và hôn nhân trong tương lai của người đó không và con cái họ sẽ như thế nào ?

– Khi biết trước về bộ gen của mỗi người thì xã hội sẽ đối xử với họ như thế nào ? Ví dụ, một số người có thể sẽ khó xin việc làm.

– Bảo hiểm nhân thọ sẽ ra sao ? Trên thực tế ở Mĩ đã xảy ra tranh cãi về vấn đề này.

Ngoài ra còn hàng loạt vấn đề khác như các GMO,...

b) Các thí nghiệm phi đạo lí

Vấn đề mà loài người lo sợ hơn cả là *một số thí nghiệm tạo ra các sản phẩm không hoàn chỉnh* mà xã hội phải chịu hậu quả hoặc vài cá nhân có thể *lợi dụng KTDT tạo ra các dạng sinh vật phi đạo lí*. Điều này cần được sớm ngăn chặn. Tuy nhiên, hiện vẫn còn nhiều tranh cãi và chưa có sự nhất trí. Ví dụ, năm 2001, sau phát hiện tế bào gốc soma, ở Mĩ đã cấm các nghiên cứu xa hơn vì sợ dẫn đến tạo dòng người (human cloning). Vấn đề này hiện còn bàn cải vì cấm thì khoa học không phát triển ở lĩnh vực tương ứng. Gần đây, thành công về nghiên cứu tế bào gốc ở Hàn Quốc và một số nước khác làm Mĩ có thể xem xét lại vấn đề này. Cộng đồng châu Âu và một số nước đã nêu ra các luật lệ để kiểm soát các nghiên cứu tế bào gốc. Những người bảo vệ môi sinh kịch liệt phản đối việc tạo dòng người và cả GMO.

Trong khi đó, J. Lederberg (giải Nobel về y học) bảo vệ quan điểm cần tạo dòng người như phương tiện để sản sinh ra "các cá thể ưu việt". H. Varmus, tổng giám đốc của NIH (National institutes of Health), đã giải trình trước Quốc hội Mĩ rằng : "Trong một số tình huống hiếm hoi, nó có thể có lợi như một đứa bé được tạo ra từ tuỷ sống của người đàn ông bất thụ, khi sử dụng tế bào trứng của mẹ".

c) Liệu pháp gen người

Liệu pháp gen người, theo nghĩa rộng, là sự đưa một hay nhiều gen chức năng vào tế bào người với mục tiêu điều chỉnh những rối loạn do khiếm khuyết di truyền. Có 2 dạng có khả năng điều trị bệnh di truyền. Thứ nhất, các tế bào sinh dưỡng có thể trở thành mục tiêu để biến nạp gen. Với chiến lược này, việc sửa chữa các khiếm khuyết gen được hạn chế trong những cơ quan hoặc mô riêng biệt. Thứ hai, các tế bào mầm (tinh trùng hoặc trứng) hoặc trứng thụ tinh (hợp tử) có thể được biến đổi gen để tạo một cá thể mang gen trị liệu trong tất cả các tế bào của anh ta hoặc cô ta. Hậu quả của liệu pháp gen dòng mầm là sự thay đổi gen được truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác.

Ngoài ra, đã và đang có rất nhiều tranh luận về *tính đạo đức của các thao tác trên gen người*. Không có câu trả lời dễ dàng cho các câu hỏi về vấn đề đạo đức, pháp luật, và xã hội được đặt ra cho các ứng dụng của CNSH phân tử. Tuy nhiên, vì cuộc đấu tranh quá cao độ nên nhiều vấn đề đang được thẩm định ở khắp nơi.

Sau cái chết bi thương của Jeese Gelsinger 18 tuổi vào năm 1999 do một sản phẩm chuyển gen, quy trình phê chuẩn và giám định các thí nghiệm chuyển gen người được tái lập. Ngoài ra, trách nhiệm của tất cả các thí nghiệm chuyển gen người phụ thuộc trực tiếp hay gián tiếp vào NIH.

d) Tạo dòng con người ?

Qua nhiều năm, khi nghiên cứu *sinh học sinh sản động vật có vú và chuyển gen các loài động vật có vú* phát triển, có vẻ như khả năng tạo dòng một con người sẽ thật sự xảy ra vào một thời điểm nào đó trong tương lai. Nhận thức này trở thành hiện thực vào năm 1997, khi cừu Dolly ra đời và tiếp sau là phát hiện tế bào gốc soma vào 1999. Hiện nay, không quá cường điệu để tin rằng có thể *tạo dòng con người*.

Không cần thắc mắc, việc dòng hoá con người đang là một đề tài gây nhiều tranh cãi và bị công kích cao. Vào thời điểm hiện nay, những nghiêm cấm luật pháp này phải có đủ hiệu lực ngăn chặn việc tạo dòng con người. Tuy nhiên, câu hỏi *liệu việc dòng hoá con người có đáng để thực hiện không* sẽ phải được giải đáp.

2. An toàn sinh học (Biosafety)

An toàn sinh học được hiểu là sự bảo vệ con người, xã hội và môi trường khỏi các tác động có hại hoặc nguy hiểm đối với sức khoẻ con người của thế hệ hôm nay và mai sau do các độc tố hay các sản phẩm của công nghệ gen. Nó đòi hỏi phải đánh giá mức độ an toàn của tất cả các biện pháp sử dụng như các tác nhân chẩn đoán và trị liệu ; dị ghép cơ quan ; các tác nhân bảo vệ cây trồng vật nuôi,...

Ngay từ lúc khởi đầu vào năm 1973, nhiều nghi ngờ đã được đưa ra về *tính an toàn của công nghệ DNA tái tổ hợp*. Những mối lo ngại này đã thúc đẩy các nhà khoa học chấp nhận các nguyên tắc chỉ đạo quản lí chính thức được đưa ra, nhằm đảm bảo các vi sinh vật tái tổ hợp không có khả năng phát triển bên ngoài các phòng thí nghiệm, và các nhân viên phòng thí nghiệm phải được bảo vệ để không bị bất kì một rủi ro nào. Nội dung của các điều luật này được tiến hành vào năm 1974 và 1975 trong các phiên họp mở dưới sự giám sát của báo chí. Vì vậy, công chúng đã biết đến các khả năng có thể xảy ra mang tính tiêu cực cũng như tích cực của các vi sinh vật đã được biến đổi di truyền.

Vào năm 1998, một *chiến dịch ầm ĩ và đầy tranh cãi* đã chống lại việc trồng các cây GMO và các sản phẩm mua bán từ những loại cây trồng này.

Ba ứng dụng thử nghiệm GMO được thừa nhận vào năm 1982. Hai thử nghiệm về thực vật biến đổi gen là bắp và cây thuốc lá. Đề xuất thứ ba liên quan đến việc kiểm tra dòng vi sinh vật *Pseudomonas syringae* biến đổi gen để xác nhận liệu nó có thể giới hạn khả năng làm chết cóng cây. Sự đệ trình đặc biệt này trở thành sự kiện bước ngoặt cho việc cải tiến các thủ tục quản lí việc phóng thích các GMO vào môi trường.

Năm 1999, khoảng 6000 thử nghiệm ngoài thiên nhiên được thực hiện tại Mĩ và một số thực vật chuyển gen được chấp thuận. Tuy nhiên, vì nhiều cây GMO được trồng hơn và các thử nghiệm ngoài thiên nhiên cũng bắt đầu thực hiện, nên có vài nhóm bắt đầu tích cực phản đối các cây trồng chuyển gen. Ban đầu, việc phản đối kĩ thuật này dựa trên các lo ngại về sức khoẻ, kinh tế, môi trường và triết học.

Các nông dân, chính phủ, và người tiêu dùng châu Âu lo lắng về GMO ngay từ ban đầu. Phản ứng này một phần có lẽ là do tác động bi kịch của bệnh viêm não ở bò (chứng bò điên) hoành hành ở Anh suốt những năm của thập niên 1990. Một nghiên cứu đã quả quyết rằng hệ thống miễn dịch của chuột đã bị tổn thương sau khi cho chuột ăn khoai tây chuyển gen. Nghiên cứu khác đề nghị rằng hạt phấn từ cây bắp Bt đã huỷ hoại quần thể bướm

"hoàng hậu" (Monarch butterflies). Việc rắc rối thứ ba liên quan đến một lỗ hổng trong hệ thống quản lí ở Mĩ nên đã cho phép một sản phẩm chuyển gen chủ ý chỉ dùng làm thức ăn cho động vật nhưng lại chuyển sang làm nguồn cung cấp thực phẩm cho người. Những sự kiện này đã giúp khởi động chiến dịch chống cây trồng GMO (hình 14.1).

Hình 12.1. Biểu tình của nhóm *Hoà bình Xanh* mang hình bướm phản đối GMO

II. QUẢN LÍ CÁC ỨNG DỤNG CỦA CÔNG NGHỆ GEN

Nhiều vấn đề đặt ra gồm các hướng nghiên cứu DNA tái tổ hợp, quy định đối với các sản phẩm GMO, các chính sách để đưa các vi sinh vật biến đổi gen vào môi trường một cách thận trọng, tiêu chuẩn để phê chuẩn các thử nghiệm liệu pháp gen ở người, và việc cấp bằng sáng chế cho các phát minh CNSH.

1. Quản lí công nghệ DNA tái tổ hợp

Năm 1974, khi nhận ra kĩ thuật DNA tái tổ hợp có thể được sử dụng để biến đổi các sinh vật với các gen mới, các nhà khoa học, công chúng và những cơ quan chính phủ đã nêu ra những lo lắng về tính an toàn, đạo đức, và những hậu quả không thể đoán trước. Các cụm từ như "đùa giỡn với thượng đế", "dùng tay để biến đổi sự sống", "nghiên cứu khoa học kinh hoàng nhất đang diễn ra" và "cuộc cách mạng do con người tạo ra" thường được báo chí đại chúng sử dụng khi miêu tả công nghệ DNA tái tổ hợp. Sự lo ngại chính yếu là : vô tình hay cố ý phục vụ cho mục đích chiến tranh, các vi sinh vật đặc biệt chưa bao giờ tồn tại trước đây đang được phát triển và sẽ gây nên những thảm hoạ môi trường và bệnh dịch. Nhằm đáp lại sự lo lắng

của công chúng về những "con vi trùng ngày tận thế", một nhóm các nhà sinh học phân tử lỗi lạc, xuất chúng đã yêu cầu ngưng hoạt động một số nghiên cứu DNA tái tổ hợp, đặc biệt những thí nghiệm liên quan đến các vi sinh vật gây bệnh.

Sau đó, vào năm 1976, Viện Y tế quốc gia của Mĩ (NIH), cơ quan tài trợ nghiên cứu chủ yếu của Mĩ về y học và khoa học sức khoẻ, đã ban bố "các điều luật đối với việc nghiên cứu liên quan đến phân tử DNA tái tổ hợp" (NIH Guidelines).

Nguyên tắc chỉ đạo của NIH đầu tiên là không được phóng thích có chủ ý bất kì một vi sinh vật mang DNA tái tổ hợp vào môi trường. Tuy nhiên, không thể tránh khỏi việc GMO có thể phát triển trong điều kiện tự nhiên.

Vào năm 1980, nguyên tắc NIH ban đầu đã được nới lỏng nhiều nhờ vào kinh nghiệm và những dữ liệu thí nghiệm đặc biệt từ những đề tài nghiên cứu do NIH bảo trợ.

Kết quả là việc sử dụng công nghệ DNA tái tổ hợp trở nên phổ biến và ngày càng phát triển.

2. Quản lí thực phẩm và các thành phần trong thực phẩm

Tại Mĩ, Cục Quản lí thực phẩm và dược phẩm (Food and Drug Administration - FDA) chịu trách nhiệm quản lí việc đưa các loại lương thực, thuốc, dược phẩm và các dụng cụ y khoa vào thị trường. Tính an toàn của các lương thực từ cây trồng cũng như thành phần thực phẩm bao gồm hương vị và chất phụ gia phải được đánh giá kĩ lưỡng trước khi cho phép tiêu thụ. FDA có một hệ thống đã được thiết lập từ lâu, tuy không thật sự rõ ràng, để phê chuẩn các thức ăn mới và các sản phẩm lương thực. Tuy nhiên, các nhà chỉ trích của FDA đã và đang tranh cãi rằng có khuynh hướng thiên về các lợi ích của công nghiệp và quá nhẹ nhàng trong việc ép buộc thực hiện các nguyên tắc quản lí. Tuy nhiên, FDA cho rằng sau khi đã chứng minh tính an toàn của sản phẩm, phải thông báo với người tiêu thụ bằng cách dán nhãn lên trên bao bì các sản phẩm GMO.

Chymosin : FDA đã chấp thuận enzyme chymosin được sản xuất bằng công nghệ gen để dùng làm phomat mà không cần phải qua tất cả các xét nghiệm. FDA lập luận rằng, nếu chymosin tái tổ hợp tương đồng với chymosin được sản xuất tự nhiên, người đệ đơn phải chứng tỏ rằng chúng có cùng khối lượng phân tử với chymosin được tinh chế từ bê, và các hoạt tính sinh học của 2 enzyme này là giống nhau.

Sự cố với Tryptophan : Suốt năm 1989 và 1990 ở Mĩ, có một số lượng lớn bất bình thường của các ca *bệnh hội chứng đau cơ* (eosinophilia-myalgia syndrome - EMS) được công bố. Căn bệnh hiếm gặp này gây đau cơ nghiêm trọng, yếu cơ và có thể gây chết do không thể hô hấp. Đặc tính thường thấy ở EMS là các bệnh nhân sử dụng liều lượng lớn amino acid tryptophan làm nguồn thức ăn bổ sung. Những cuộc điều tra sâu hơn cho thấy tất cả các đợt tryptophan "hư hỏng" bị nghi ngờ được sản xuất từ dòng vi khuẩn công nghệ gen, được tạo ra để sản xuất vượt mức tryptophan.

Hậu quả là, L-tryptophan, thậm chí tinh khiết, cũng bị cấm dùng cho người dân Mĩ. Mặc dù công nghệ gen không có vấn đề, nhưng bài học từ điều này là không nên thừa nhận tính tương đương sinh học giữa một giống và bản sao bị biến đổi di truyền của nó.

Somatotropin bò : Cuộc tranh luận về *somatotropin ở bò* (*BST*, bST, bovine somatotrophin, hoặc hormone tăng trưởng ở bò) là điển hình cho các sự kiện có thể phát sinh từ việc sử dụng sản phẩm DNA tái tổ hợp. FDA đã phê chuẩn cho bán BST tái tổ hợp trên thị trường (rBST, hoặc Posilac). Nhưng nhiều nước khác nhau không đồng ý với vài kết luận của FDA.

Từ thập niên 1930, người ta thấy rằng việc tiêm BST vào bò sữa sẽ làm tăng sản lượng sữa một cách đáng kể. Do việc thu nhận số lượng lớn BST tự nhiên vừa khó và chi phí lại cao, nên nó không thường được dùng làm chất phụ gia trong công nghệ sữa. Tuy nhiên, với công nghệ rBST do tế bào *E. coli* tạo ra được thu nhận, tinh chế và kiểm tra. Dưới các điều kiện thử nghiệm, lượng sữa trong các con bò sữa tăng 20 – 25% sau khi tiêm rBST.

Tính an toàn của BST tự nhiên trong sữa được nghiên cứu kĩ lưỡng. Trong các con bò đã qua xử lí, lượng BST trong sữa không cao hơn so với các con đối chứng. Hơn nữa, BST không có hoạt tính trong cơ thể người, và tất cả các xét nghiệm kiểm tra độc tính cho thấy không có tác động gây hại trên những sinh vật thử nghiệm. Sử dụng tất cả các kết quả nghiên cứu có thể thu thập, FDA đã kết luận thịt và sữa từ những con bò đã được xử lí với rBST an toàn cho con người.

Tuy nhiên, vấn đề chính chống lại rBST là "các hormone công nghệ gen" trong "sữa chứa hormone" sẽ có hại và gây bệnh ung thư cho người. Những người phản đối rBST cho rằng việc sử dụng rBST sẽ làm gia tăng nguy cơ nhiễm vi khuẩn vào tuyến sữa (chứng viêm vú) ở các gia súc nuôi lấy sữa. Tranh cãi sâu hơn nữa là lượng kháng sinh phải được sử dụng nhiều hơn bình thường nhằm ổn định sức khoẻ của các gia súc được xử lí rBST, vì vậy, dẫn đến lượng kháng sinh gia tăng trong sữa bò, điều này có thể gây những phản ứng dị ứng ở nhiều người tiêu dùng.

Mặc dù FDA cho rằng rBST không gây bất kì một nguy hiểm nào cho con vật đã bị xử lí, nhưng tổ chức tương đương với FDA tại Canada, Y tế Canada, và Liên bang châu Âu đã từ chối chấp thuận rBST dựa trên các luận chứng là gây hại cho những con vật bị xử lí.

III. CẤP BẰNG SÁNG CHẾ CHO CÁC PHÁT MINH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Trong lịch sử, có rất nhiều lí do để cấp bằng sáng chế. Bằng sáng chế được xem là sự đẩy mạnh đổi mới và công nhận quyền lợi của nhà phát minh. Sáng chế, phát minh bắt buộc phải chứa đựng những tri thức mới, không phải sẵn có, và hữu dụng. Ngoài ra, phát minh không phải là một "sản phẩm của tự nhiên".

Mục tiêu chính của CNSH là sản xuất các sản phẩm thương mại có lợi về kinh tế. Đối với CNSH, bằng sáng chế là hình thức sở hữu về mặt trí tuệ quan trọng nhất.

Các quyết định và luật cấp bằng sáng chế thay đổi giữa các quốc gia, mặc dù có những cố gắng đang được thực hiện để phát triển những tiêu chuẩn quốc tế. Thời gian độc quyền của một bằng sáng chế là 20 năm kể từ ngày ứng dụng được đệ trình ở tất cả các quốc gia. Tuy nhiên, tại Mĩ, nếu có một tranh cãi nào về quyền ưu tiên thì người đưa đơn đã nhận được bằng sáng chế đầu tiên có quyền hạn trong 20 năm (nguyên tắc phát minh đầu tiên).

1. Cấp bằng sáng chế cho nghiên cứu vi sinh vật đã bị biến đổi gen

Thông thường, đối với một sản phẩm hay một quy trình có khả năng được cấp bằng sáng chế, phải thoả mãn bốn yêu cầu cơ bản sau : không hề tồn tại một bằng sáng chế nào khác như thế ; được chứng thực bởi cơ quan cấp bằng sáng chế ; phát minh phải hữu ích theo nhiều hướng khác nhau ; và phải miêu tả thật chi tiết để một người có hiểu biết trong cùng lĩnh vực có thể thực hiện nó.

Ngày nay, việc xin cấp bằng sáng chế CNSH không gặp trở ngại đáng kể nào. Tuy nhiên, lần đầu tiên một nhà khoa học xin cấp bằng sáng chế về một vi sinh vật đã bị biến đổi gen đã là sự kiện gây tranh cãi gay gắt. Vi khuẩn biến đổi gen này có khả năng phân huỷ nhiều thành phần của dầu thô, do A. Chakrabarty phát minh. Mặc dù có ích lợi làm sạch dầu tràn, nhưng *đơn xin cấp bằng sáng chế này đã bị từ chối* dựa trên lập luận rằng vi sinh vật này là sản phẩm của tự nhiên. Năm 1980, Toà án tối cao của Mĩ

đã quyết định công trình nghiên cứu về vi khuẩn này có thể được cấp bằng sáng chế theo đạo luật cấp bằng sáng chế của Mĩ, vì cho rằng vi sinh vật này cũng là sản phẩm sáng tạo của con người như mọi sản phẩm sáng tạo khác.

2. Cấp bằng sáng chế cho các trình tự DNA

Kể từ năm 1980, hàng ngàn đơn xin cấp bằng sáng chế cho các nghiên cứu về toàn bộ các gen đã được phê chuẩn. Bằng sáng chế liên quan với gen người có hiệu quả nhất là sản xuất erythropoietin tái tổ hợp, đạt doanh thu khoảng 4 tỉ USD vào năm 2001. Erythropoietin hoạt hoá sự hình thành các tế bào hồng cầu và được sử dụng để ngăn ngừa bệnh thiếu máu. Nhiều nghiên cứu trình tự gen sử dụng làm các mẫu dò chẩn đoán (các marker sinh học) đã được cấp bằng sáng chế.

Việc cấp bằng sáng chế cho các nghiên cứu giải những trình tự các phân tử DNA người cũng đã gây tranh cãi kịch liệt. Tuy nhiên, năm 1997, hơn 350 đơn xin cấp bằng sáng chế cho việc giải hơn 500000 đoạn trình tự DNA đã được thông qua, hầu hết bởi các công ti tư nhân đã tự tuyên bố là đáp ứng tiêu chuẩn về tính hữu dụng.

Sau khi đã giám định chi tiết hơn tất cả các vấn đề, các gen và trình tự DNA từng phần được cấp bằng sáng chế, ngày 5/1/2001, một bộ nguyên tắc chỉ đạo việc cấp bằng sáng chế cho các nghiên cứu về gen được ban hành. Yêu cầu chủ yếu là mỗi trình tự DNA phải có "tính thiết thực đáng tin cậy và đặc biệt". Ngoài ra, bản ghi chi tiết viết tay và lời khẳng định cho mỗi trình tự phải rõ ràng và chỉ rõ ứng dụng thật sự của mỗi trình tự, không chỉ đơn thuần là có chức năng tiềm ẩn.

3. Cấp bằng sáng chế cho những nghiên cứu sinh vật đa bào

Việc *cấp bằng sáng chế cho những nghiên cứu sinh vật đa bào chuyển gen* vẫn tiếp tục *gây lo lắng về khía cạnh đạo đức* và *xã hội*. Tuy nhiên, hiện nay, việc cấp bằng sáng chế cho các nghiên cứu động vật biến đổi gen được phê chuẩn ở hầu hết các quốc gia, bao gồm Mĩ, các thành viên của Liên minh châu Âu, Nhật, Úc, New Zealand, và nhiều quốc gia khác.

TÓM TẮT CHƯƠNG

CNSH có thể tác động đến nhiều mặt của một xã hội hiện đại, bao gồm việc sản xuất nông nghiệp và điều trị y khoa, nên nhiều vấn đề quan trọng về *đạo đức, luật pháp, kinh tế, và xã hội* cần được xem xét. Cần tiến hành nghiên cứu những hậu quả kinh tế xã hội mà trọng tâm xoay quanh 2 vấn đề chính là *đạo lí sinh học, an toàn sinh học.*

Sự phát triển CNSH làm nảy sinh nhiều vấn đề cần quản lí chặt chẽ như tính an toàn, sự phóng thích các GMO vào môi trường, an toàn thực phẩm, an toan trong liệu pháp gen và khả năng có thể tạo dòng người.

Sự kiện quan trọng là nghiên cứu vi sinh vật biến đổi gen bởi A. Chakrabarty đã được cấp bằng sáng chế. Tiếp theo là các bằng sáng chế cấp cho các nghiên cứu về trình tự nucleotide DNA, về các động vật và thực vật chuyển gen,...

CÂU HỎI ÔN TẬP

1. Đạo lí sinh học là gì ?

2. Cho biết về khả năng tạo dòng người hiện nay ?

3. Thế nào là an toàn sinh học ?

4. Những vấn đề gì của KTDT cần quản lí chặt chẽ ?

5. Enzyme tái tổ hợp nào được ứng dụng đầu tiên ?

6. Có thể rút ra kết luận gì từ sự cố *tryptophan* do VSV tái tổ hợp tạo ra ?

7. Bạn có suy nghĩ gì về việc nhân bản người ?

8. Vì sao lúc đầu không cấp bằng sáng chế cho nghiên cứu trên VSV biến đổi gen ?

9. Vì sao các nghiên cứu về trình tự DNA và về sinh vật đa bào chuyển gen đã được cấp bằng sáng chế ?

10. Quan điểm của bạn như thế nào về GMO ?

LỜI KẾT

Trong lịch sử loài người hiếm khi Sinh học và các ứng dụng của nó có vị trí trang trọng như ngày nay. Ba phát minh sinh học quan trọng trong thế kỉ XIX đặt nền móng cho sự phát triển của CNSH hiện đại. Theo thứ tự thời gian, đó là học thuyết tế bào, học thuyết về gen và sự lên men vi sinh vật. *Sự lên men* VSV sớm được ứng dụng ở quy mô công nghiệp từ đầu thế kỉ XX và phát triển cho đến nay.

Suốt thế kỉ XX, các nghiên cứu tập trung *giải quyết vấn đề gen* và đưa đến cuộc *Cách mạng công nghệ sinh học* hiện nay với nhiều ứng dụng to lớn chưa lường được giới hạn.

Theo đà phát triển chung, Sinh học thế kỉ XXI sẽ tiến lên các cấp độ tổ chức cao hơn mà bước đầu là *Sinh học của các hệ thống và tế bào*. Như vậy, đối tượng trọng tâm của thế kỉ XXI sẽ là tế bào mà hoạt động của nó càng nghiên cứu càng thấy hết sức phức tạp. Những kết quả ban đầu về chuyển nhân tế bào để nhân bản vô tính động vật và các ứng dụng của tế bào gốc đã gây chấn động dư luận. Những hiểu biết sâu sắc và chi tiết hơn về tế bào sẽ hứa hẹn *những ứng dụng thần kì*.

Có người hi vọng rằng cuối thế kỉ XX đã biết được 3,2 tỉ nucleotide của bộ gen người thì cuối thế kỉ XXI sẽ hiểu chi tiết 10 tỉ neuron của bộ não người.

Những dòng cuối cùng này dành cho một hình ảnh giả tưởng để cùng suy ngẫm là *chó mang lông cừu*. Hình ảnh cho thấy con người có thể thực hiện được điều đó không khó khăn với những kĩ thuật hiện nay ; và như vậy giữa giả tưởng và hiện thực hầu như không còn khoảng cách.

Hình 12.2. Chó mang lông cừu

PHỤ LỤC

GIẢI THÍCH CÁC THUẬT NGỮ TIẾNG NƯỚC NGOÀI

I. THUẬT NGỮ LATINH THÔNG DỤNG

In vivo : Trong cơ thể sống.

In vitro : Trong ống nghiệm (*vitr–* có nghĩa thuỷ tinh).

In silico : Trên máy điện toán (từ chất liệu *silicium).*

Ex vivo : Tách mẫu khỏi sinh vật, thao tác xong đưa trở lại cơ thể.

In situ : Tại chỗ.

Ex situ : Chỗ khác.

II. NGHĨA MỘT SỐ TỪ GỐC LATINH

A–, an– : thiếu, không có. Ví dụ : *abiotic* là không có sự sống.

Amyl– : tinh bột. Ví dụ : *amylase* là enzyme phân giải tinh bột.

Ant–, anti– : ức chế, ngăn cản, kháng. Ví dụ : *antibiotic* là thuốc kháng sinh.

Archae– : cổ, xưa. Ví dụ : *Archaebacteri* là cổ vi khuẩn.

Aut–, auto– : tự mình. Ví dụ : *autotroph* là tự dưỡng.

Bacillo– : hình que. Ví dụ : *Bacillus*.

Bio– : sự sống, sống. Ví dụ : *bioethics* là đạo lí sinh học.

Chloro– : màu xanh lục. Ví dụ : *chloroplast* là lục lạp.

Chrom– : màu, nhuộm màu. Ví dụ : *chromosome* là NST.

–cide : tiêu diệt, giết chết. Ví dụ : *pesticide* là chất diệt côn trùng.

Co–, con– : cùng nhau, đồng. Ví dụ : *cotransformation* là đồng biến nạp.

Cocci– : hình cầu. Ví dụ : *Micrococcus*.

Cyt– : tế bào. Ví dụ : *cytology* là tế bào học.

De– : mất, đảo ngược. Ví dụ : *deoxiribose* hoặc *detoxification* là giải độc.

Di–, diplo– : hai, đôi. Ví dụ : *diploid* là thể lưỡng bội (2n)

Ec–, ex–, exo–, ecto– : ngoài, bên ngoài. Ví dụ : *exopolysaccharide*.

En–, em– : bên trong. Ví dụ : *endonuclease* là enzyme cắt DNA bên trong.

Entero– : ruột. Ví dụ : *enterotoxin* là độc tố đường ruột.

Eu– : thật, đúng. Ví dụ : *Eubacteria* là vi khuẩn thực.

Extra– : ngoại, ngoại vi. Ví dụ : *extracellular* là ngoại bào.

–gen : tác nhân, tác nhân gây ra. Ví dụ : *pathogen* là tác nhân gây bệnh.

Germ–, germin– : mầm, chồi. Ví dụ : *germination* là sự nảy mầm.

Halo– : mặn. Ví dụ : *halophile* là chịu mặn.
Haplo– : đơn, một. Ví dụ : *haploid* là thể đơn bội.
Hema–, hemato–, hemo– : máu, huyết. Ví dụ : hemoglobin.
Hepat– : gan. Ví dụ : *hepatitis* là viêm gan.
Hetero– : khác, dị. Ví dụ : *heterozygote* là dị hợp tử.
Hom–, homo– : giống nhau, đồng. Ví dụ : *homozygote* là đồng hợp tử.
Hydr–, hydro– : nước. Ví dụ : *dehydratation* là mất nước.
Hyper– : thái quá, cao, hơn. Ví dụ : *hypertonic* là áp suất thẩm thấu ưu trương.
Hypo– : thấp, nhược. Ví dụ : *hypotonic* là áp suất thẩm thấu nhược trương.
Im– : không. Ví dụ : *immobilization* là bất động, giữ im.
Inter– : giữa, trong. Ví dụ : *intercellular* là giữa các tế bào.
Intra– : bên trong. Ví dụ : *intracellular* là nội bào, bên trong tế bào.
Iso– : bằng, giống. Ví dụ : isozyme.
Lacti– : sữa. Ví dụ : *lactose* là đường sữa.
Leuko– : trắng. Ví dụ : *leukocyte* là bạch cầu.
Lip–, lipo– : béo, lipid. Ví dụ : *lipase* là enzyme phân huỷ lipid.
–lysis : phân giải, phá vỡ. Ví dụ : *hydrolysis* là thuỷ giải.
Macro– : đại, lớn. Ví dụ : *macromolecule* là đại phân tử.
Meso– : giữa, trung bình. Ví dụ : *mesophile* là chịu nhiệt trung bình.
Meta– : giữa, chuyển. Ví dụ : *metabolism* là trao đổi chất hay chuyển hoá.
Micro– : nhỏ, vi. Ví dụ : *microtubule* là vi ống.
Mono– : đơn, một. Ví dụ : *monomer* là đơn phân.
Morpho– : dạng, hình dạng. Ví dụ : *morphology* là hình thái học.
Multi– : nhiều, đa. Ví dụ : *multinuclear* là đa nhân.
Myco–, –mycetoma, –myces : nấm. Ví dụ : *Basidiomycetes* là nấm đảm.
Phago– : ăn, thực. Ví dụ : *phage.*
–phore : mang, cầm. Ví dụ : *chromophore* là chất phát màu.
–phyll : lá. Ví dụ : *chlorophyll.*
Poly– : nhiều, đa. Ví dụ : *polymer.*
Post– : sau, hậu. Ví dụ : *posttranslation* là sau dịch mã.
Pre–, pro– : trước, sớm. Ví dụ : *proinsuli* là tiền chất insulin.
Psychro– : lạnh. Ví dụ : *psychrophile* là chịu lạnh.
Rhizo– : rễ. Ví dụ : *Rhizobium.*
Saccharo– : đường. Ví dụ : *polysaccharide.*
Semi– : một nửa. Ví dụ : *semiconservative* là bán bảo tồn.
Soma– : cơ thể. Ví dụ : *somatic embryo* là phôi sinh dưỡng.

Sub– : thấp, phụ. Ví dụ : *subclone* là dòng phụ.

Super– : trên, cao. Ví dụ : *superior* là trội.

Sym–, syn– : với, cùng. Ví dụ : *symbiosis* là cộng sinh.

Therm– : nhiệt, nóng. Ví dụ : *thermophile* là chịu nhiệt.

Tox– : độc, hại. Ví dụ : *toxin* là độc tố.

Trans– : chuyển. Ví dụ : *transfert* là chuyển.

Tri– : ba. Ví dụ : ATP – adenosine triphosphate.

–troph : dinh dưỡng. Ví dụ : *autotroph* là tự dưỡng.

Uni– : một, đơn. Ví dụ : *unicellular* là đơn bào.

Xeno– : lạ, dị. Ví dụ : *xenobiotic* là dị sinh.

III. MỘT SỐ THUẬT NGỮ VÀ CHỮ VIẾT TẮT TIẾNG ANH

AAV (Adeno-associated virus) : Virus kèm adenovirus.

ABA : Abscisic acid.

Acetylation : Acetyl hoá ($-COCH_3$).

Acylation : Acyl hoá (–COR).

ADA : Adenosine desaminase.

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) : Sự đa hình các đoạn khuếch đại.

African green monkey kidney : Thận khỉ xanh châu Phi.

8AG : 8-azaguanine

AI (Artificial insemination) : Bơm tinh nhân tạo.

AIDS (Acquired immunodefiency syndrome) : Bệnh AIDS (SIDA).

ALP (Amplicon length polymorphism) : Sự đa hình đoạn khuếch đại.

Amidation : Amid hoá ($- NH_2$).

AMP cyclic : Adenosine monophosphate vòng.

Amperometric biosensor : Cảm biến sinh học đo nhờ dòng điện.

Amp^r (Ampicillin resistant) : Kháng ampicillin.

Antisense RNA : Phản RNA.

Antitoxin botilin : Kháng độc tố botulin.

AP-PCR (Arbitrary primer-PCR) : PCR mồi tuỳ chọn.

Aspartame (Aspartyl phenylalanine methyl ester) : Chất ngọt hơn đường.

ATCC (American Type Culture Collection) : Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật Mĩ.

ATP : Adenosine triphosphate.

Auxin : Một loại chất điều hoà tăng trưởng thực vật.

Baby hamster kidney : Thận chuột đồng con.

BAC (Bacterial artificial chromosome) : NST nhân tạo vi khuẩn.

Bank of genomic DNA : Ngân hàng của DNA bộ gen.

BAP : 6-benzylaminopurine.

BC (Bacterial cellulose) : Cellulose vi khuẩn.

BCG : Vaccine chống lao.

Bidimensionel electrofocalisation : Điện định vị 2 chiều.

Biochemical engineering : Kĩ thuật hoá sinh.

Biochip : Bọ mẫu dò sinh học.

Biocompatibility : Dung hợp sinh học.

Biocomputer : Máy điện toán sinh học.

Bioelectrochemistry : Kĩ thuật hoá điện sinh học.

Bioethics : Đạo lí sinh học.

Bioinformatics : Tin-Sinh học.

Biomarker : Dấu chuẩn sinh học.

Biopolymer : Chất đa phân sinh học.

Bioreactor : Lò phản ứng sinh học.

Bioreceptor : Thụ thể sinh học.

Bioremedation : Bồi hoàn sinh học.

Biorobot : Người máy sinh học.

Biosafety : An toàn sinh học.

Biosensor : Cảm biến sinh học.

Biosurfactant : Chất hoạt động bề mặt sinh học.

Biotransformation : Chuyển hoá sinh học.

BSA (Bovine serum albumin) : Huyết thanh bò.

Calorimetric biosensor : Loại cảm biến đo bằng năng lượng.

c-DNA duplex : c-DNA mạch kép.

c-DNA (Complementary DNA) : DNA bổ sung với khuôn mRNA được tạo ra nhờ enzyme reverse transcriptase.

Cell surface technology : Công nghệ bề mặt tế bào.

Cellomics : Nghiên cứu chức năng tế bào và tác động thuốc ở cấp độ tế bào nhờ gắn kết với công nghệ thông tin.

CFTR protein (Cystic fibrosis transmembrane receptor) : Protein thụ thể màng bệnh u xơ nang phổi.

Chaperone : Protein cuộn gấp (folding).

Chemotherapy-induced neutropenia : Sự thiếu hụt bạch cầu (neutrophil) do trị liệu hoá học gây ra.

Chinese hamster ovary : Tử cung chuột bạch.

Chip : Bọ điện tử.

Chlybrid : Thể lai lục lạp.

Chlybridization : Lai lục lạp.

CHO : Một dòng tế bào động vật.

Colony-stimulating factor : Nhân tố kích thích tạo tập đoàn.

Competitive RT-PCR : RT-PCR cạnh tranh.

Cross-linking : Phương pháp cố định enzyme bằng liên kết chéo.

Cry1A : Protein độc tố diệt côn trùng.

Cu/Zn-SOD cDNA : Đoạn cDNA mã hoá enzyme Cu/Zn superoxide dismutase.

Culture collection : Bộ sưu tập giống.

Cybrid : Thể lai tế bào chất.

Cybridization : Lai tế bào chất.

DAF (DNA amplification fingerprinting) : In dấu di truyền khuếch đại DNA.

ddRNAi (DNA directed RNA interfering) : DNA định hướng RNAi can thiệp.

2,4-D : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid.

De-differentiated : Mất biệt hoá.

De-emulsification : Khử nhũ tương hoá.

Detector : Đầu dò.

Dicer : Một loại enzyme đặc hiệu cắt RNA mạch kép gây nên sự tích tụ siRNA mạch kép.

Didesoxy nucleotide : Nucleotide mất 2 nguyên tử oxygen.

2,5-DKG : 2,5- diketo-D-gluconic acid.

DNA fingerprinting : In dấu di truyền DNA.

DNA ligase : Enzyme nối DNA.

DNA marker : Dấu chuẩn DNA.

DNA mini-satellite : DNA tiểu vệ tinh.

DNA recombinant technology : Kĩ thuật tái tổ hợp DNA.

DNA synthetiser : Máy tự động tổng hợp DNA.

DNA-based diagnostics : Chẩn đoán dựa vào DNA.

DPP-IV : Dipeptidyl peptidase.

DPT : Vaccine kháng các bệnh bạch hầu (Diphtheria), ho gà (Pertussis), uốn ván (Tetanus).

dsRNA (Double strand RNA) : RNA mạch kép.

dsRNA (Double strand RNA) specific nuclease : Nuclease đặc hiệu RNA mạch kép.

Electrotransformation / electroporation : Điện biến nạp.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) : Thử nghiệm enzyme liên kết hấp thu miễn dịch.

ELSI (Ethics legacy and social issues) : Những vấn đề đạo đức, luật pháp và xã hội.

Embryo transplantation : Cấy chuyển phôi

Embryonic stem cell : Tế bào gốc phôi.

Endo-hydrolysis : Nội thuỷ giải.

Entrapment : Phương pháp cố định enzyme bằng nhốt.

Enucleated egg : Tế bào trứng mất nhân.

Environmental genomics : Sinh môi dựa vào bộ gen.

Enzyme immobilisation : Cố định enzyme hay giữ im enzyme.

Error-prone PCR : PCR-sai.

ESM : Gen đánh dấu chọn lọc tế bào *Eukaryotae.*

Extremophile : Vi sinh vật cực đoan.

Factor IX, Factor VIII : Các nhân tố đông máu.

FDA (Food and Drug Administration) : Cục Kiểm soát Thực phẩm và Thuốc ở Mĩ.

Fluorescently-labeled RNA/DNA : RNA hoặc DNA được đánh dấu phát huỳnh quang.

FSH (Follicle-stimulating hormone) : Hormon kích thích tạo nang trứng .

Fusion protein : Protein dung hợp.

GA (Gibberillic acid) : Một chất điều hoà tăng trưởng thực vật.

G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) : Nhân tố kích thích tạo granulocyte.

Gene engineering : Kĩ thuật gen hay kĩ thuật di truyền.

Gene knock-out : Gen im lặng.

Gene manipulation : Thao tác gen.

Gene silencing : Làm gen im lặng.

Genetic technology hay gentech : Công nghệ gen.

Genomic medecine : Y học bộ gen.

Genomics : Khoa học về bộ gen.

GFP (Green fluorescense protein) : Protein phát quang xanh lục của sứa.

GGTA1 (1,3-galactosyl-transferase) : Enzyme gây phản ứng thải ghép.

GIFT (Gamete intrafallopian transfer) : Chuyển giao tử vào ống dẫn trứng.

GMO (Genetically Modified Organism) : Sinh vật biến đổi gen.

GMP : 5'-guanylate.

Goal-oriented screening : Tầm soát có định hướng.

Green chemistry : Hoá học xanh.

GUS (β-glucuronidase) : Gen GUS.

HBcAg (Hepatitis B core protein) : Protein lõi viêm gan siêu vi B.

HCG (Human chorionic gonadotropin) : Gonadotrophin màng ối người.

High content screening : Tầm soát dung lượng cao.

Histocompatibility : Sự dung nạp mô.

HIV (Human immunodefiency virus) : Virus gây bệnh AIDS.

Homopolymer : Polymer cùng một loại nucleotide.

HST (High-content screening technology) : Công nghệ tầm soát dung lượng cao.

huAC (Human artificial chromosome) : NST nhân tạo người.

Human emryonic kidney : Tế bào thận phôi người.

Human pancreatic ribonuclease : Ribonuclease tuyến giáp người.

Human / computer interfaces : Con người trực diện với máy điện toán.

IAA (Indole 3-acetic acid) : Chất điều hoà tăng trưởng thực vật.

IBA (Indole 3-butyric acid) : Chất điều hoà tăng trưởng thực vật.

Ice nucleation : Nhân đông đá.

ICSI(intracytoplasmic sperm injection) : Tiêm tinh trùng vào tế bào chất.

IgM : Immunoglobulin M.

Image-processing algorithm : Thuật toán hình ảnh hoá.

Immobilized enzyme : Enzyme cố định

Immunosensor : Loại cảm biến đo nhờ phản ứng miễn dịch.

IMP : 5'-inosine.

Individualized medecine : Y học cá thể hoá.

Insulin-like growth factor 1 : Insulin tương tự nhân tố tăng trưởng 1.

Ionomics : Các gen chi phối sự điều hoà tất cả các ion trong tế bào.

Isozyme marker : Dấu chuẩn isozyme.

IVF (*In vitro fertilization*) : Thụ tinh trong ống nghiệm.

2-KLG : 2-keto-L-gluconic acid.

LDL (Low density lipid) : Lipid tỉ trọng thấp.

LH (Luteinizing hormone) : Hormone hoàng thể.

Liposome : Màng bao lipid.

LPS : Lipopolysaccharide.

Mab (Monoclonal antibodies) : Kháng thể đơn dòng.

MAC (Mammalian artificial chromosome) : NST nhân tạo động vật có vú.

Marker : Dấu chuẩn.

Mass spectroscopy : Khối phổ.

MCP (Microbial Cell Project) : Dự án tế bào vi sinh vật.

MCS (Multicloning site) : Nhiều điểm nhận biết của RE.

Medico-pharmaceutical genomics : Bộ gen Y dược học.

Metabolomics : Công nghệ gen điều khiển trao đổi chất.

Mibridization : Đưa ti thể từ loài khác vào tế bào tạo thể lai.

Microarray : Bản mẫu dò.

Microarray technology : Công nghệ microarray.

Microbial hydrometallurgy : Luyện kim bằng vi sinh vật (thuỷ luyện kim).

Microprojectile : Vi đạn đạo.

Micropropagation : Vi nhân giống.

MicroRNA : RNA nhỏ có vai trò điều hoà sự biểu hiện gen.

Molecular cloning : Tạo dòng phân tử.

MRDHV-DNA (Moderately repeated, dispersed, and highly variable DNA) : DNA lặp lại trung bình, phân tán và biến dị cao.

MSG (Monosodium glutamate) : Bột ngọt hay mì chính.

Myeloma : Một dạng ung thư tuỷ sống.

Nanobiotechnology : Công nghệ sinh học siêu nhỏ.

NMR (Nuclear magnetic resonance) : Cộng hưởng từ hạt nhân.

Nutriceutical : Ăn trị bệnh (dinh dưỡng dược).

Office of Technology Assesment : Cơ quan đánh giá công nghệ.

Optical biosensor : Loại cảm biến đo bằng quang học.

ORE (Oil recovery enhancer) : Chất tăng cường thu hồi dầu mỏ.

ORF (Open reading frame) : Khung dịch mã.

Ori (Origine) : Điểm khởi sự sao chép.

Ori^{E} *:* Sao chép ở *E. coli.*

Ori^{euk} *:* Sao chép ở tế bào *Eukaryotae.*

P1AC (P1 artificial chromosome) : NST nhân tạo phage P1.

PCR (Polymerase chain reaction) : Phản ứng polymerase chuỗi.

PCR in situ : PCR trong tế bào sống.

PCR-ELISA : PCR kết hợp miễn dịch.

PHA : Chất polyhydroxyalkanoate tương tự giấy bóng (cellophan).

PHB : Chất polyhydroxybutyrate.

Pharmacogenomics : Bộ gen dược học.

Photolithography : Phương pháp in thạch bản quang học.

Piezo-electric biosensor : Loại cảm biến đo nhờ điện áp.

Plasmid Ti (Tumor-inducing plasmid) : Plasmide từ *A. tumefaciens* tạo khối u ở thực vật.

Pluripotency : Tính đa thế.

Pluripotent stem cell : Tế bào gốc đa thế.

Polyclonal antibody : Kháng thể đa dòng.

Potentiometric biosensor : Loại cảm biến đo nhờ điện thế.

Predictive medecine : Y học dự phòng.

Pre-messager RNA : Tiền mRNA.

Probe : Mẫu dò.

Probiotic : Trợ sinh.

Pronucleus : Nhân non.

Protein-based computer : Máy điện toán dựa vào protein.

Proteome : Bộ protein.

Proteomics : Khoa học về bộ protein.

Protoplast : Tế bào trần

Protoplast fusion : Dung hợp tế bào trần.

Purple nonsulfur and green nonsulfur bacteria : Vi khuẩn lục không lưu huỳnh.

qPCR (Quantitative PCR) : PCR định lượng.

Racemization : Triền quang hoá.

RMNA (Random mutagenesis with nucleotide analogues) : Đột biến ngẫu nhiên với nucleotide tương đồng.

RAPD (Random amplified polymorphic DNA) : Sự đa hình đoạn DNA khuếch đại ngẫu nhiên.

Rbs (Ribosome binding site) : Chỗ gắn với ribosome.

Real-Time PCR

Redifferentiated structure : Cấu trúc tái biệt hoá.

Regenerative medecine : Y học phục hồi.

RFLP (Restriction fragment length polymorphism) : Sự đa hình các đoạn cắt bằng restriction endonuclease.

r-Hbvax : Vaccine viêm gan siêu vi B tái tổ hợp.

RISC (RNA-induced silencing complex) : Phức hợp làm im lặng.

RNAi (Interfering RNA) : RNA can thiệp.

RNAi therapeutics : Trị liệu nhờ RNAi.

r-protein (Recombinant protein) : Protein tái tổ hợp.

RT-PCR (Reverse transcriptase PCR) : PCR với mẫu RNA nhờ reverse transcriptase chuyển thành DNA.

r-vaccine (Recombinant vaccine) : Vaccine tái tổ hợp.

SCID (Severe combined immune defiency) : Bệnh thiểu năng miễn dịch hỗn hợp cấp.

SCP (Single cell protein) : Protein đơn bào.

Sensor : Bộ cảm biến.

Sequencing : Giải kí tự chuỗi.

Sexing embryo : Xác định giới tính phôi.

Shotgun (Bắn đạn chài) : Cắt DNA bộ gen thành nhiều đoạn nhỏ và tạo dòng

Signal peptide : Peptide tín hiệu.

siRNA (Small interfering RNA) : RNA can thiệp nhỏ.

SNP (Single nucleotide polymorphism) : Sự đa hình đơn nucleotide.

Somatic embryo : Phôi soma.

Somatic stem cell : Tế bào gốc soma.

SSCP (Single strand conformation polymorphism) : Sự đa dạng cấu hình mạch đơn.

SSR (Simple sequence repeat) : Trình tự lặp lại đơn.

Stem cell factor : Yếu tố tăng trưởng tế bào gốc.

Stem cells therapy : Liệu pháp tế bào gốc.

TCP : Kháng nguyên đồng điều hoà độc tố.

T-DNA : Đoạn DNA của plasmid Ti.

Thermocycler : Máy luân nhiệt.

Thrombolitic agent : Tác nhân làm tan máu.

Thrombosis : Chứng nghẽn mạch.

TNF (Tumor necrosis factor) : Nhân tố gây hoại tử khối u.

Totipotent stem cell : Tế bào gốc toàn thế.

Toxicogenomics : Độc tố học bộ gen.

t-pA (Tissue-plasmanogen activator) : Nhân tố hoạt hoá plasmanogen mô.

Transcriptome : Bộ các bản phiên mã RNA.

Transcriptomics : Khoa học về bộ các bản phiên mã RNA.

Upstream : Trước lên men.

VNTR (Variable number tandem repeats) : Trình tự lặp đoạn nối tiếp với số lượng dao động.

Xenobiotic : Chất dị sinh

Xenotransplantation : Dị ghép.

X-gluc : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide.

YAC (Yeast artificial chromosome) : Nhiễm sắc thể nhân tạo của nấm men.

ZIFT (Zygote intrafallopian transfer) : Chuyển hợp tử vào ống dẫn trứng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Hữu Ảnh. 1999. ***Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp***. NXB KH & KT. Hà Nội.
2. Nguyễn Trọng Cán – Đỗ Minh Phương. 1989. ***Công nghệ chế biến thực phẩm thuỷ sản.*** *Tập II. Chế biến nước mắm*. NXB Nông nghiệp.
3. Nguyễn Lân Dũng, Phạm Văn Ty, Nguyễn Đình Quyến. 1998. ***Vi sinh vật học***. NXB Giáo dục. Hà Nội.
4. Phạm Thành Hổ. 2002. ***Di truyền học***. NXB Giáo dục. TPHCM.
5. Lê Đình Lương – Quyền Đình Thi. 2003. ***Kỹ thuật di truyền và ứng dụng***. NXB ĐHQG Hà Nội.
6. Trần Thị Thanh. 2000. ***Công nghệ vi sinh***. NXB Giáo dục. TPHCM.
7. Trần Linh Thước. 2002. ***Phương pháp phân tích vi sinh vật***. NXB Giáo dục. TPHCM.
8. Phạm Văn Ty. 2001. ***Miễn dịch học***. NXB ĐHQG Hà Nội.
9. Nguyễn Văn Uyển và Nguyễn Tiến Thắng. 1998. ***Những kiến thức cơ bản về Công nghệ sinh học*** - NXB Giáo dục.
10. ***Animal Biotechnology*** : *Science-based Concerns*. 2002. The National Academies Press. Washington.
11. ***The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability***. 2001. OECD (Organization for Economic co-operation and Development).
12. M. Arora. 1998. ***Biological Control of Environmental Polluior***, vol. 1. Anmol Publications PVT. LTD.
13. M.J. Chrispeels & D.E. Sadava. 2003. ***Plants, Genes, and Crop Biotechnology***. John and Bartlett Publishers.
14. A.N. Glazer, H. Nikaido. 1995. ***Microbial Biotechnology*** : *Fundamentals of Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company.
15. Gen : ***Genetic Engineering News*** (international). Tạp chí bán nguyệt san tất cả các số từ năm 1999 đến tháng 6 năm 2005.
16. B.R. Glick, J. J. Pasternak. 2004. ***Molecular biotechnology :*** *principles and applications of recombinant DNA*. ASM, Washington.
17. ***Drug Discovery & Development***. Tạp chí nguyệt san tất cả các số từ năm 2000 đến tháng 6 năm 2005.

18. D.R. Kelly. 1998. ***Biotechnology*** – *vol.8a. Biotransformation I.* Weinheim.

19. H. Kleinkauf And H. Von Dohren. 1997. ***Biotechnology***. *vol.7.* ***Products of Secondary Metabolism Products of Primary Metabolism*** . Weinheim.

20. B. Lewin. 2004. ***Genes VIII***. Pearson – Prentice Hall.

21. H. Loish, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. Darnell. 2003. ***Molecular Cell Biology***. W.H. Freeman and Company.

22. S.Manlik, S.D.Patel. 1997. ***Molecular biotechnology***. Wiley Liss Inc.

23. R. Lewis. 2001. ***Human Genetics*** : *Concepts and Applications*. Fourth edition. Mc Graw Hill.

24. R.W. Old & S.B. Primrose. 1994. ***Principles of Gene Manipulation***. Blackwell Scientific Publications.

25. G.Reed And T.W.Nagodawithana. 1995. ***Biotechnology***. *vol.9.* ***Enzymes, Biomass, Food and Feed*** . Weinheim.

26. S.M. Roberts, N.J. Turner, A.J. Willets, M.K. Turner. 1995. ***Introduction to Biocatalis using Enzymes and Micro-organisms***. Cambridge University Press.

27. G.Roehr. 1996. ***Biotechnology*** – *vol.6.* ***Products of Primary Metabolism*** Weinheim.

28. A.H. Rose And J.S. Harrison. 1993. ***The Yeasts***, *vol. 5.* ***Yeast Technology***. Academic Press.

29. V.S. Shevelukha. 2003. ***Agricultural Biotechnology*** (tiếng Nga). Vysshaya shkola, Moscow.

30. C.A. Smith & E.J. Wood. 1991. ***Molecular Biology & Biotechnology***. Chapman & Hall.

31. H. Uhlig. 1998. ***Industrial Enzymes and their Applications***. John Wiley & Sons, INC.

32. Gr. Walsh. 2002. ***Proteins*** : *Biochemistry and Biotechnology*. John Wiley & Sons LTD.

MỤC LỤC

PHẦN III. CÔNG NGHỆ SINH HỌC VI SINH VẬT

PHẦN IV. CÔNG NGHỆ SINH HỌC THỰC VẬT VÀ ĐỘNG VẬT

Chịu trách nhiệm xuất bản :

Chủ tịch HĐQT kiêm Tổng Giám đốc : NGÔ TRẦN ÁI

Phó Tổng Giám đốc kiêm Tổng biên tập : NGUYỄN QUÝ THAO

Biên tập nội dung :
ĐỖ MẠNH HÙNG

Biên tập kĩ - mĩ thuật :
TRẦN THÀNH TOÀN

Trình bày bìa :
TRẦN MINH HẠNH

Sửa bản in :
PHÒNG SBI (NXBGD TẠI TP.HCM)

Chế bản :
VÕ HỒNG NGỌC

NHẬP MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số : 7K604m5 - CNH

In 3.000 bản, khổ 16 x 24 cm tại **Cty In Bao Bì Hưng Phú**
Số: 755 Phạm Thế Hiển – F.4 – Q.8. ĐT 08.8 504 710. Số in: 1008.
Số xuất bản 89/104-05. In xong nộp lưu chiểu tháng 10 năm 2005.

TÌM ĐỌC CÁC SÁCH THAM KHẢO SINH HỌC CỦA NHÀ XUẤT BẢN GIÁO DỤC

Di truyền học	Phạm Thành Hổ
Sinh học phân tử	Hồ Huỳnh Thuỳ Dương
Sinh thái và môi trường	Nguyễn Văn Tuyên
Sinh học của sự sinh sản	Phan Kim Ngọc
	Hồ Huỳnh Thuỳ Dương
Những kiến thức cơ bản về công nghệ sinh học	NguyễnVăn Uyển (CB)
	Nguyễn Tiến Thắng
Công nghệ vi sinh	Trần Thị Thanh
Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước , thực phẩm và mĩ phẩm	Trần Linh Thước
Cây cỏ có ích ở Việt Nam - Tập 1 và 2	Võ Văn Chi (CB)
	Trần Hợp

Bạn đọc có thể mua tại các Công ti Sách và thiết bị trường học ở địa phương hoặc các cửa hàng sách của Nhà xuất bản Giáo dục:

81 Trần Hưng Đạo hoặc 187 Giảng Võ - Hà Nội
15 Nguyễn Chí Thanh - TP. Đà Nẵng
104 Mai Thị Lựu Quận 1 hoặc 240 Trần Bình Trọng Quận 5 - TP. Hồ Chí Minh

8 934980 534168

Giá: 29.300đ