

TỪ MINH KOÓNG

**CƠ SỞ  
CÔNG NGHỆ  
SINH HỌC**  
*Và*  
**SẢN XUẤT,  
DƯỢC PHẨM**



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

TỪ MINH KOÓNG

**CƠ SỞ CÔNG NGHỆ SINH HỌC  
VÀ  
SẢN XUẤT DƯỢC PHẨM**

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

HÀ NỘI - 2004

## LỜI NÓI ĐẦU

Kể từ năm 1982 khi cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm của Mỹ (FDA) cho phép sử dụng insulin (chế phẩm sản xuất nhờ kỹ thuật tái tổ hợp ADN) vào điều trị trong y học. Một cuộc cách mạng lớn trong tư duy mới về sản xuất các dược phẩm có bản chất là protein (dùng điều trị) đã nổ ra và liên tiếp sau đó là hàng loạt các chế phẩm đã được phép dùng trong điều trị như: interferon, interleukin, vaccin viêm gan B bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Đến cuối năm 2000 doanh số các dược phẩm được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN đã đạt khoảng 10 tỷ USD.

Công nghệ sản xuất dược phẩm trước đây dựa vào 3 phương pháp:

1. Sản xuất từ nguồn dược liệu
2. Sản xuất bằng tổng hợp hóa học
3. Sản xuất bằng công nghệ lên men vi sinh vật (kháng sinh, vitamin, acid amin).

Hiện nay lại có thêm một công nghệ mới để sản xuất thuốc, đó là sản xuất các protein dùng điều trị bằng công nghệ gen. Các thuốc sản xuất bằng công nghệ sinh học sẽ chiếm tỷ trọng từ 40-50% trong toàn bộ các thuốc dùng để điều trị. Vì vậy, trong chương trình đào tạo dược sỹ, không thể thiếu mảng kiến thức quan trọng này. Cuốn sách nhỏ này còn cung cấp những kiến thức chọn lọc cần thiết cho chương trình cao học, chuyên ngành CNDP nhằm giúp các học viên có những kiến thức cơ bản để hiểu được ngành khoa học vừa lý thú, vừa quan trọng này, và giúp cho việc hướng dẫn sử dụng thuốc an toàn, hiệu quả, hoặc tham gia vào các công trình nghiên cứu có liên quan đến CNSH. Sách cũng có thể làm tài liệu tham khảo cho các sinh viên thuộc chuyên ngành sinh học của các trường đại học khác. Công nghệ sinh học cùng với vi điện tử đang được coi là những ngành khoa học then chốt của đất nước. Nếu được đầu tư thích đáng, đất nước sẽ có cơ hội thoát nghèo và nhanh chóng đuổi kịp các nước phát triển.

Với thời lượng hạn chế, thông tin lại quá nhiều, vì vậy cuốn sách không tránh khỏi những thiếu sót. Tác giả mong nhận được những ý kiến bổ sung của các bạn đồng nghiệp và bạn đọc

Xin chân thành cảm ơn.

Hà Nội, tháng 10 năm 2004

Tác giả

# MỤC LỤC

| Nội dung                                                   | Trang     |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Lời nói đầu</i>                                         | 3         |
| <i>Những chữ viết tắt</i>                                  | 9         |
| <b>Chương 1</b>                                            |           |
| <b>GIỚI THIỆU VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC</b>                    | <b>11</b> |
| 1.1. Công nghệ sinh học là gì ?                            | 11        |
| 1.2. Công nghệ sinh học - một sự theo đuổi đa ngành        | 12        |
| 1.3. Công nghệ sinh học - hạt nhân trung tâm ba thành phần | 15        |
| 1.4. An toàn sản phẩm                                      | 16        |
| 1.5. Nhận thức của cộng đồng về công nghệ sinh học         | 16        |
| 1.6. Công nghệ sinh học và các nước đang phát triển        | 17        |
| <b>Chương 2</b>                                            |           |
| <b>NGUYÊN LIỆU CHO CÔNG NGHỆ SINH HỌC</b>                  | <b>18</b> |
| 2.1. Chiến lược sinh khối                                  | 18        |
| 2.2. Nguyên liệu thô thiên nhiên.                          | 21        |
| 2-3. Tính sẵn có của sản phẩm phụ                          | 22        |
| 2.4. Nguyên liệu hoá học và hoá dầu                        | 24        |
| 2.5 Nguyên liệu thô và tương lai của công nghệ sinh học    | 25        |
| <b>Chương 3</b>                                            |           |
| <b>KỸ THUẬT GEN VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC</b>                  | <b>27</b> |
| 3.1 Giới thiệu chung                                       | 27        |
| 3.2. Di truyền công nghiệp                                 | 28        |
| 3.3. Protoplast và kỹ thuật dung hợp tế bào                | 28        |
| 3.4. Kỹ thuật gen (gentic engineering)                     | 30        |
| 3.4.1 Hệ thống chuyển gen                                  | 31        |
| 3.4.2. Plasmid là những vector chuyển gen                  | 32        |
| 3.4.3. Bacteriophages như những vector chuyển gen          | 33        |
| 3.4.4. Các vector dựa trên cơ sở phage λ                   | 34        |

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 3.4.5 Các vector dựa trên cơ sở phage M13    | 36 |
| 3.5. Phương pháp đưa ADN vào tế bào chủ      | 37 |
| 3.5.1 Biến nạp và tải nạp                    | 37 |
| 3.5.2 Phương pháp gói ADN của phage in vitro | 38 |
| 3.5.3 Các phương pháp truyền ADN khác        | 40 |

## **Chương 4**

### **KỸ THUẬT LÊN MEN 42**

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 4.1 Giới thiệu tổng quát                          | 42 |
| 4.2 Các giai đoạn phát triển của vi sinh vật      | 44 |
| 4.3 Thiết bị lên men vi sinh vật                  | 47 |
| 4.4. Trình tự quá trình lên men                   | 49 |
| 4.5. Thiết kế môi trường cho quá trình lên men    | 50 |
| 4.6. Lên men trên cơ chất rắn                     | 51 |
| 4.7. Kỹ thuật lên men tế bào động vật và thực vật | 52 |
| 4.8. Quá trình tinh chế để thu sản phẩm           | 53 |

## **Chương 5**

### **KỸ THUẬT SẢN XUẤT ENZYM 55**

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| 5.1. Đại cương                                        | 55 |
| 5.2. Các ứng dụng của enzym                           | 56 |
| 5.3. Kỹ thuật di truyền và kỹ thuật protein của enzym | 59 |
| 5.4. Kỹ thuật sản xuất enzym                          | 61 |
| 5.5. Phương pháp bất động enzym                       | 64 |

## **Chương 6**

### **SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO 70**

|                                              |    |
|----------------------------------------------|----|
| 6.1. Sự cần thiết sản xuất protein đơn bào   | 70 |
| 6.2. Sản xuất sinh khối nấm men              | 74 |
| 6.2.1 Sản xuất sinh khối nấm men từ rỉ đường | 74 |
| 6.2.2. Ứng dụng của men ép                   | 79 |
| 6.3. Sản xuất tảo đơn bào                    | 79 |
| 6.4. Sản xuất nấm sợi                        | 80 |
| 6.5. Sản xuất nấm ăn                         | 81 |

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Chương 7</b>                                                                   |           |
| <b>CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ Y HỌC</b>                                                | <b>83</b> |
| 7.1. Giới thiệu tổng quát                                                         | 83        |
| 7.2. Dược phẩm và dược sinh học                                                   | 84        |
| 7.3. Sản xuất các kháng sinh                                                      | 84        |
| 7.4. Công nghệ sản xuất penicilin và các kháng sinh bán tổng hợp nhóm beta lactam | 89        |
| 7.4.1. Giới thiệu chung về penicilin                                              | 89        |
| 7.4.2. Lên men sinh tổng hợp penicilin G                                          | 90        |
| 7.4.3. Chiết xuất penicilin G                                                     | 92        |
| 7.4.4. Sản xuất 6-APA và các penicilin bán tổng hợp                               | 92        |
| 7.4.4.1. Sản xuất 6-APA bằng phương pháp hoá học                                  | 93        |
| 7.4.4.2. Sản xuất 6-APA bằng phương pháp enzym                                    | 93        |
| 7.4.4.3. Sản xuất các penicilin bán tổng hợp từ 6-APA                             | 94        |
| 7.4.4.4. Sản xuất các kháng sinh cephalosporin bán tổng hợp từ penicilin          | 95        |
| 7.5. Vaccin                                                                       | 98        |
| 7.5.1. Vaccin giảm độc lực                                                        | 99        |
| 7.5.2. Vaccin bất hoạt                                                            | 100       |
| 7.5.3. Vaccin chế từ các thành phần của vi sinh vật                               | 100       |
| 7.5.4. Vaccin vector                                                              | 100       |
| 7.5.5. Nghiên cứu sản xuất vaccin chống AIDS                                      | 101       |
| 7.5.5.1. Giới thiệu về HIV                                                        | 101       |
| 7.5.5.2. Nguyên lý sản xuất vaccin chống AIDS                                     | 104       |
| 7.6. Các protein dùng trong điều trị (biopharmaceuticals)                         | 104       |
| 7.6.1. Insulin                                                                    | 105       |
| 7.6.1.1. Cấu trúc phân tử insulin                                                 | 106       |
| 7.6.1.2. Sản xuất insulin bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN                            | 107       |
| 7.6.2. Hormon tăng trưởng người                                                   | 112       |
| 7.6.2.1. Tác dụng sinh học của GH                                                 | 114       |
| 7.6.2.2. Sử dụng GH trong điều trị                                                | 114       |

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.6.2.3. Kích tố tăng trưởng tái tổ hợp (rhGH) và bệnh lùn tuyến yên | 116 |
| 7.6.2.4. Tác dụng chuyển hoá của hGH                                 | 117 |
| 7.6.3. Cytokin - các chất thuộc nhóm interferon                      | 118 |

## **Chương 8**

### **LIỆU PHÁP ACID NUCLEIC 121**

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| 8.1. Liệu pháp gen                          | 121 |
| 8.2. Cơ sở của liệu pháp gen                | 122 |
| 8.3. Các vector sử dụng trong liệu pháp gen | 124 |
| 8.4. Các vector retrovirus                  | 124 |
| 8.5. Sản xuất các vector virus              | 127 |
| 8.6. Các vector không phải virus            | 129 |
| 8.7. Sản xuất ADN plasmid                   | 129 |
| 8.8. Liệu pháp gen và các bệnh di truyền    | 131 |
| 8.9. Liệu pháp gen và ung thư               | 133 |
| 8.10. Liệu pháp gen và bệnh AIDS            | 133 |
| Kết luận                                    | 134 |
| Phụ lục 1                                   | 135 |
| Phụ lục 2                                   | 146 |
| Tài liệu tham khảo                          | 150 |

## NHỮNG CHỮ VIẾT TẮT

- 7-ACA : acid - 7 - amino - cephalosporinic
- 7-ADCA : acid - 7 - amino - desacetoxy-cephalosporinic
- 6-APA : acid - 6 - amino - penicilanic
- ADA: Adenosin desaminase
- AIDS: aquired immuno deficiency syndrome
- BDNF (brain derived neurotrophic factor) - Yếu tố dẫn truyền thần kinh vỏ não
- BHK (baby hamster kidney) - Thận chuột hamster nhỏ
- CNDP : Công nghệ dược phẩm
- CNSH : Công nghệ sinh học
- CHO (Chinese hamster ovary) - Trứng chuột hamster Trung Quốc
- EGF (epidermal growth factor) - Yếu tố phát triển nguyên bào sợi
- EPO (erythropoietin) - Tạo hồng cầu.
- EFB (the European federation of biotechnology) - Liên đoàn công nghệ sinh học châu Âu
- FSH (follide stimulating hormone) - Hormon kích thích rụng trứng
- TSH (thyroid stimulating hormone) - Hormon kích thích tuyến giáp
- G-CSF (granulocyte - colony sitimulating factor) - Yếu tố kích thích bạch cầu hạt.
- GHRH (growth hormone releasing hormone) - Yếu tố gây tiết hormon tăng trưởng
- GHRF (growth hormone releasing factor) - Yếu tố gây tiết hormon tăng trưởng
- GHs (growth hormone somatotrophin) - Hormon tăng trưởng somatotrophin
- GHRIF (growth hormone inhibitory factor) - Yếu tố ức chế phóng thích hormon tăng trưởng
- GM-CSF (granulocyte macrophage - colony sitimulating factor) - Yếu tố kích thích bạch cầu hạt - đại thực bào
- HAT : Hypoxanthin - aminopterin - Thimidin
- HBsAg (hepatitis B surface antigen) - Kháng nguyên bề mặt viêm gan B
- hGH (human growth hormone) - Hormon tăng trưởng người
- HIV (human immunodeficiency virus)
- HPLC ( hight performance liquid cromatographia)

- HPRT : Hypoxanthin phosphoribotransferase
- IL (interleukin)
- IFN (interferon)
- LIF (leukaemia inhibitory factor) - Yếu tố kìm hãm bạch cầu
- M-CSF (macrophage colony stimulating factor) - Yếu tố kích thích đại thực bào.
- Mab (monoclonal antibody) - Kháng thể đơn dòng.
- MIF  $1\alpha$ ,  $1\beta$  (macrophage inflammatory protein factor) - Các protein chống viêm đại thực bào.
- NGF (nerve growth factor) - Yếu tố tăng trưởng thần kinh.
- NT-3 (neutrophin 3)- Thần kinh 3
- NT-4 (neutrophin 4) - Thần kinh 4
- PDGF (platelet derived growth factor) - Yếu tố phát triển tiểu cầu.
- rADN (recombinant ADN) - ADN tái tổ hợp
- RF (replicative form) - Dạng sao chép
- SCID (reverse combine immunodeficiency) - Hội chứng thiếu hụt miễn dịch hỗn hợp trầm trọng.
- SCP (single cell protein) -Protein đơn bào
- TNF (tumour necrotic factor) - Yếu tố hoại tử ung thư
- TNFR (tumour necrosis factor receptor) - Thụ thể của yếu tố hoại tử ung thư.
- tPA (tissue plasminogen activator)- Hoạt hoá plasminogen mô.
- VSV : Vi sinh vật

## Chương 1

# GIỚI THIỆU VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

### 1.1. Công nghệ sinh học là gì?

Ngày nay không còn ai nghi ngờ gì nữa về những thành tựu của công nghệ sinh học đem lại cho loài người. Chẳng thế mà trong hai thập kỷ cuối cùng của thế kỷ XX, khoảng 20 giải Nobel đã được trao cho những khám phá trong lĩnh vực nghiên cứu này. Để hiểu công nghệ sinh học là gì ta có thể nêu ra đây một vài định nghĩa về CNSH:

- “Việc ứng dụng những sinh vật, hệ thống và quá trình chế biến vào sản xuất và công nghiệp dịch vụ”.
- “Việc kết hợp sử dụng hoá sinh, vi sinh và khoa học công nghệ để tạo ra những khả năng ứng dụng các vi sinh vật, mô tế bào và các bộ phận của chúng”.
- “Một công nghệ sử dụng các hiện tượng sinh học để sao chép và sản xuất ra những vật phẩm hữu ích”.
- “Việc ứng dụng các ngành khoa học và kỹ thuật vào quá trình biến đổi nguyên liệu bằng các tác nhân sinh học để sản xuất hàng hoá và cung cấp dịch vụ”.
- “Công nghệ sinh học thực sự chỉ là một cái tên được đặt cho một tập hợp các quá trình và kỹ thuật.”
- “Công nghệ sinh học là việc sử dụng những cơ thể sống và các thành phần của chúng trong nông nghiệp, thực phẩm và các quá trình công nghiệp khác”.
- “Công nghệ sinh học là việc giải mã và sử dụng các kiến thức về sinh học”.

Có thể coi định nghĩa về công nghệ sinh học sau đây của liên đoàn công nghệ sinh học châu Âu (EFB) là hoàn chỉnh hơn cả:

“Công nghệ sinh học là sự kết hợp của các ngành khoa học tự nhiên và khoa học công nghệ để đạt tới những sự ứng dụng của vi sinh vật, các tế bào, một số thành phần của tế bào nhằm tạo ra những sản phẩm và những sự phục vụ (services) có lợi cho con người”.

Sở dĩ nói đến cả một số thành phần của tế bào vì ngày nay công nghệ enzym (enzyme technology) với các enzym bất động hoá (immobilized enzymes) không cần tới tế bào vẫn tạo ra được sản phẩm ở qui mô lớn. Sở dĩ nói đến những sự phục vụ vì trong việc xử lý chống ô nhiễm môi trường tuy không tạo ra sản phẩm gì nhưng công nghệ sinh học có một vai trò rất quan trọng.

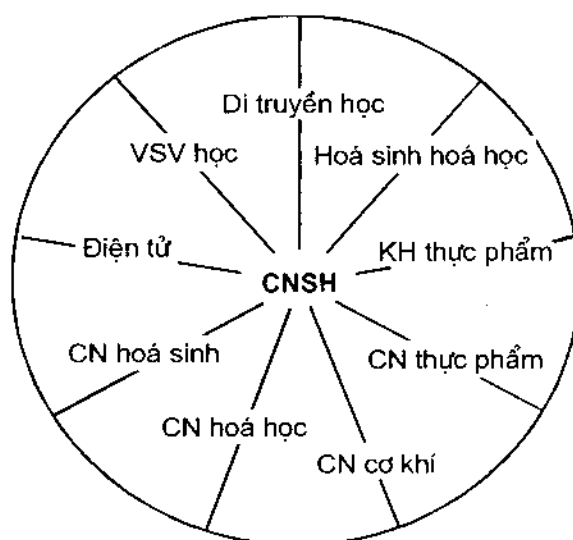
Công nghệ sinh học đang phát triển nhanh chóng trên cơ sở của một số kỹ thuật hoàn toàn mới mẻ thường gọi là kỹ thuật chìa khoá (Key-Technology). Đó là kỹ thuật di truyền (genetic engineering); kỹ thuật dung hợp tế bào (cell fusion); kỹ thuật sử dụng phản ứng sinh thể (bioreaction technology) bao gồm kỹ thuật lên men (fermentation technology), kỹ thuật enzym (enzyme technology) và bình phản ứng sinh vật (bioreactor); kỹ thuật lên men tế bào (cell culture technique); kỹ thuật lên men mô (tissue culture technique); kỹ thuật chuyển phôi (embryo transplantation) và kỹ thuật chuyển nhân tế bào (nucleus transplantation).

## **1.2. Công nghệ sinh học - một sự theo đuổi đa ngành**

Công nghệ sinh học là sự ưu tiên của sự theo đuổi đa ngành. Trong những thập kỷ gần đây nét đặc trưng của sự phát triển khoa học và công nghệ là phương pháp dùng những chiến lược đa ngành để đạt được giải pháp cho các vấn đề khác nhau. Điều này dẫn đến sự ra đời những lĩnh vực nghiên cứu đa ngành và cuối cùng sẽ tạo ra những ngành mới với những khái niệm và phương pháp đặc trưng. Kỹ thuật hoá học và hoá sinh là hai ví dụ dễ nhận thấy nhất của những ngành khoa học đã cho chúng ta hiểu sâu sắc về quá trình hoá học và những cơ sở hoá sinh của các hệ thống sinh học.

Thuật ngữ đa ngành (multidisciplinary) mô tả sự mở rộng về lượng của cách tiếp cận những vấn đề thường xảy ra trong phạm vi một lĩnh vực nhất định. Nó đòi hỏi việc sắp đặt những khái niệm và phương pháp từ một loạt các ngành riêng rẽ và ứng dụng chúng vào một vấn đề đặc biệt của một ngành khác. Trái lại, ứng dụng đa ngành xảy ra khi sự gặp gỡ các ý tưởng của sự hợp tác nhiều ngành xảy ra và dẫn đến việc hình thành một ngành học mới với những khái niệm và phương pháp riêng. Trong thực tế, các tổ chức kinh doanh nhiều ngành hầu như được định hướng cố định. Tuy nhiên, khi sự tổng hợp đa ngành thực sự xảy ra lĩnh vực mới sẽ mở ra một loạt vấn đề nghiên cứu mới. Công nghệ sinh học đã xuất hiện thông qua sự tác động qua lại lẫn nhau giữa những phần khác nhau của sinh học và kỹ thuật.

Một nhà công nghệ sinh học có thể sử dụng các kỹ thuật: hoá học, vi sinh học, hoá sinh, và tin học (hình 1.1).



**Hình 1.1.** Tính chất đa ngành của công nghệ sinh học.

Mục đích chính là sự sáng tạo, phát triển và tối ưu hoá các quá trình trong đó chất xúc tác hoá sinh giữ vai trò nền tảng và không gì có thể thay thế được. Nhà công nghệ sinh học phải biết hợp tác chặt chẽ với các chuyên gia trong những lĩnh vực liên quan như y học, dinh dưỡng, hoá học, dược học, bảo vệ môi trường và xử lý chất thải. Việc ứng dụng công nghệ sinh học ngày càng cho thấy tính chất phụ thuộc lẫn nhau của khoa học liên ngành, muốn đạt được thành công trong nghiên cứu của ngành mình, cần hiểu được ngôn ngữ kỹ thuật của các ngành khác, hiểu được những tiềm năng cũng như những hạn chế của các ngành khác.

Công nghệ sinh học có yêu cầu rất cao các kỹ năng về chuyên môn, nghiệp vụ. Biết đầu tư vào việc phát triển ngành công nghệ này sẽ được hưởng lợi ích lâu dài. Công nghệ sinh học có một số lĩnh vực hoạt động như sau:

- *Điều trị học*: Các dược phẩm dùng để điều trị bệnh cho người bao gồm các chất kháng sinh, vaccin, liệu pháp gen.
- *Chẩn đoán*: Các kit dùng để xét nghiệm chẩn đoán trong lâm sàng, thực phẩm, môi trường, nông nghiệp.
- *Nông nghiệp, lâm nghiệp, làm vườn*: Các giống cây mới, động vật, thuốc trừ sâu.
- *Thực phẩm*: Bao gồm sản xuất thực phẩm, đồ uống, các phụ gia, phân bón.
- *Môi trường*: Xử lý chất thải, các chất có bản chất sinh học, sản xuất năng lượng.
- *Các hoá chất trung gian*: Các hoá chất cần thiết cho công nghệ sinh học như: các enzym, ADN, ARN, các hoá chất đặc biệt.

- *Thiết bị*: Phân cứng, phân mềm tin học, bình phản ứng sinh học và những thiết bị khác có tính hỗ trợ cho công nghệ sinh học.

Nhiều quá trình công nghệ sinh học hiện nay có nguồn gốc từ các quá trình lên men cổ truyền như lên men rượu, bia, men bánh mì, sữa chua, phomat, dấm. Chỉ khi công nghệ lên men sản xuất penicilin trên qui mô lớn, ngành công nghệ lên men mới thực sự có những bước nhảy vọt. Từ đó đến nay chúng ta đã chứng kiến sự phát triển phi thường của công nghệ này. Biết bao sản phẩm mới do công nghệ lên men cung cấp làm phong phú thêm cuộc sống và cứu chữa được bao nhiêu mạng sống thoát khỏi tử thần. Nhìn về tương lai các nhà khoa học đều cho rằng thế kỷ XXI sẽ là kỷ nguyên của công nghệ sinh học. Như hoá học và vật lý là đặc trưng của thế kỷ XX.

Về mặt lý thuyết công nghệ sinh học có thể chuyển một gen từ một sinh vật bất kỳ sang một sinh vật khác, vi sinh vật khác, thực vật hay động vật khác (xem chương 3), trên thực tế có rất nhiều yếu tố chi phối như những gen nào phải tạo dòng vô tính và cách chọn gen đó như thế nào. Yếu tố hạn chế nhất trong việc ứng dụng kỹ thuật di truyền là sự thiếu kiến thức khoa học cơ bản về cấu trúc của gen chức năng. Đối với thực vật phải lưu ý rằng chỉ khoảng 150 gen thực vật trong tổng số 10.000 cho đến nay đã biết được đặc điểm ở mức ADN.

Công nghệ sinh học đang phát triển với tốc độ gần với tốc độ phát triển của vi điện tử vào những năm 70. Tuy nhiên, các nhà nghiên cứu về công nghệ sinh học luôn hướng các nghiên cứu vào mục đích thương mại nhằm mục đích vừa phục vụ, vừa thu lợi nhuận. Công nghệ sinh học mới sẽ có những ảnh hưởng to lớn đến tất cả các ứng dụng công nghiệp của các khoa học về sự sống. Càng ngày người ta càng nhận thấy rằng nguồn nhiên liệu lỏng có nguồn gốc hoá thạch trên trái đất chẳng bao lâu nữa sẽ hết, các nguồn năng lượng khác sẽ được nghiên cứu để thay thế, công nghệ sinh học sẽ giúp các nhà nghiên cứu tìm ra các nguồn năng lượng mới vừa rẻ tiền vừa an toàn hơn. Những quốc gia có điều kiện khí hậu phù hợp với điều kiện sản xuất sinh khối sẽ có những ưu thế lớn lao về mặt kinh tế hơn các quốc gia có điều kiện kém phù hợp. Những nước nhiệt đới phải nắm được tiềm năng to lớn của mình để đẩy mạnh phát triển công nghệ sinh học.

Công nghệ sinh học mới dường như xuất hiện sớm nhất trong lĩnh vực bảo vệ sức khoẻ và y học, tiếp sau là công nghệ thực phẩm. Năm 1982 bằng công nghệ gen đã tạo ra được insulin để chữa bệnh đái tháo đường. Gen để sản xuất insulin từ tuyến tụy của người đã được tách ra đem ghép vào ADN của *E. coli*, nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* thu lấy insulin bằng các kỹ thuật thích hợp của hoá sinh. Trong việc chẩn đoán lâm sàng hiện nay đã có hàng trăm bộ kit chuẩn khác nhau vừa chính xác vừa cho kết quả nhanh chóng. Đặc biệt để phát hiện các mầm gây bệnh có trong máu giúp cho việc

truyền máu an toàn hơn. Công nghệ sinh học giúp cho việc cải thiện chất lượng thực phẩm, tăng dinh dưỡng, tạo ra các thực phẩm chức năng giúp cho con người sống lâu hơn và chất lượng cuộc sống cũng tốt hơn.

Những ngành công nghiệp dựa trên cơ sở công nghệ sinh học sẽ không cần nhiều nhân công, mặc dù chúng tạo ra một khối lượng vật chất có giá trị lớn. Tuy nhiên những lao động này đòi hỏi phải có tri thức hơn là lao động cơ bắp.

Nhiều công ty công nghệ sinh học mới ra đời do những doanh nhân là những nhà khoa học từ môi trường hàn lâm, họ muốn xây dựng và phát triển một ngành khoa học mới có hàm lượng chất xám cao, một ngành công nghệ mang tính “bác học”.

Những công ty công nghệ sinh học mới có những đặc điểm mà thường không gặp ở những công ty khác. Có thể tóm tắt như sau:

- Công nghệ có thể điều chỉnh và gồm nhiều ngành, việc phát triển sản phẩm có liên quan đến các nhà sinh học phân tử, các nhà nghiên cứu lâm sàng.
- Môi trường thương mại được đặc trưng bởi sự thay đổi nhanh chóng và sự rủi ro đáng kể, một sự đổi mới công nghệ sinh học có thể nhanh chóng làm thay đổi những cái khác.
- Cần phải quản lý: các cơ quan chức năng, nhận thức của cộng đồng, các vấn đề về sức khỏe và an toàn, đánh giá về sự rủi ro.
- Sự phát triển về thương mại công nghệ sinh học phụ thuộc rất nhiều vào sự đầu tư, thường là nhu cầu đầu tư rất lớn, trước khi thu được lợi nhuận.

### **1.3. Công nghệ sinh học - hạt nhân trung tâm ba thành phần**

Nhiều quá trình công nghệ sinh học có thể được coi là có hạt nhân trung tâm ba thành phần. Trong đó thành phần thứ nhất liên quan đến chất xúc tác sinh học làm nhiệm vụ đặc biệt của quá trình. Thành phần thứ hai giúp cho thành phần thứ nhất thực hiện được quá trình kỹ thuật tốt nhất, còn thành phần thứ ba thường gọi là quá trình xuôi dòng (*downstream processing*) liên quan đến việc tách và tinh chế sản phẩm chính, hoặc các sản phẩm của quá trình lên men.

Trong đa số các chất xúc tác đã được sử dụng đến nay hiệu quả bền vững và thuận tiện nhất của quá trình sinh học là vi sinh vật nguyên vẹn. Vì vậy phần lớn các quá trình công nghệ sinh học đều liên quan đến các quá trình vi sinh. Điều này cũng không loại trừ việc sử dụng các sinh vật bậc cao, đặc biệt các tế bào động vật và thực vật ngày càng có vai trò quan trọng trong công nghệ sinh học hiện đại.

Trong thiên nhiên các vi sinh vật được coi như nhân tố đầu tiên trong việc cố định năng lượng quang hợp, cũng như những hệ thống dẫn đến những thay đổi về hoá học trong hầu hết các loại phân tử hữu cơ tự nhiên và tổng hợp. Vi sinh vật chứa một nguồn gen vô cùng phong phú và khả năng tổng hợp cũng như phân huỷ hầu như vô tận. Mặt khác vi sinh vật có tốc độ sinh trưởng cực kỳ nhanh mà không động vật nào có được.

Từ nguồn vi sinh vật phong phú đó, người ta phân lập ra những vi sinh vật thuần khiết rồi đột biến cải tạo nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp của chúng bằng các kỹ thuật di truyền thông thường, hay các kỹ thuật di truyền hiện đại để thu được con giống có những ưu điểm mà ta mong muốn (chương 3).

Những vi sinh vật đã được chọn lọc cần phải nghiên cứu các biện pháp nuôi giữ để sao cho không bị mất hoạt tính để có thể dùng sản xuất lâu dài. Một số trường hợp chất xúc tác được dùng ở dạng đã tách và tinh chế như các enzym. Việc tách và tinh chế enzym cho mục đích xúc tác sinh học sẽ trình bày ở chương 5.

#### **1.4. An toàn sản phẩm**

Trong công nghệ sinh học, những qui định của nhà nước sẽ quyết định về đầu tư cho nghiên cứu, và cho phép đưa sản phẩm nghiên cứu vào sử dụng. Các cơ quan chức năng có thể đóng vai trò “người gác cổng” cho phép nghiên cứu hay sản xuất một sản phẩm mới và sử dụng chúng. Các qui định có thể là các rào cản đáng kể cho sự phát triển của công nghệ sinh học. Trên thực tế những rào cản này có nguồn gốc từ chi phí cho việc thử các sản phẩm có đáp ứng các tiêu chuẩn qui định hay không? Sự chậm trễ và hay thay đổi trong việc thông qua các qui định và thậm chí phản đối thẳng thừng những sản phẩm mới vì lý do an toàn. Việc sử dụng công nghệ tái tổ hợp ADN đã tạo ra mối lo ngại về độ an toàn của sản phẩm. Thái độ của cộng đồng đối với công nghệ sinh học phần lớn liên quan đến vấn đề về sự nguy hiểm tưởng tượng hay cảm tính trong kỹ thuật thao tác gen.

#### **1.5. Nhận thức của cộng đồng về công nghệ sinh học**

Trong khi công nghệ sinh học thể hiện tiềm năng to lớn trong việc bảo vệ sức khoẻ và phát triển sản xuất, việc chế biến và đảm bảo chất lượng thực phẩm bằng kỹ thuật gen, sản xuất phân bón, thuốc trừ sâu sinh học, vaccin, các loại động vật trên cạn và các loài cá sống dưới nước, sự liên quan của những quá trình công nghệ sinh học mới này vượt ra ngoài những lợi ích về mặt kỹ thuật. Việc thực hiện những kỹ thuật mới này sẽ phụ thuộc rất nhiều vào sự chấp nhận của người tiêu dùng. Trong báo cáo về phát triển ngành công nghệ sinh học của Uỷ ban tư vấn về khoa học và công nghệ đã viết: *"Nhận thức của cộng đồng về công nghệ sinh học sẽ có một ảnh hưởng to lớn đến tốc độ và phương hướng phát triển của công nghệ"*

*sinh học, và hiện đang có sự lo ngại ngày càng tăng về những sản phẩm biến đổi gen. Liên quan đến việc thao tác gen là các câu hỏi khác nhau về độ an toàn, đạo đức và việc bảo vệ".*

Cuộc tranh luận của cộng đồng là rất quan trọng cho sự phát triển của công nghệ sinh học, và chắc chắn trong một tương lai gần đây công nghệ sinh học sẽ được xem xét kỹ lưỡng để ngành công nghệ này phát triển đúng hướng và đem lại lợi ích to lớn phục vụ loài người. Tuy nhiên trình độ hiểu biết khoa học thấp (ví dụ: ở Mỹ chỉ có 7% dân số có trình độ hiểu biết khoa học) không có nghĩa là hầu hết mọi người sẽ không có khả năng nhận biết về vấn đề quan trọng này của công nghệ sinh học. Trên thực tế đang xảy ra vấn đề có một vài nhà hoạt động tranh cãi chống lại kỹ thuật gen với giọng điệu cảm động và thiếu cơ sở làm cho các chính trị gia và cộng đồng nhầm lẫn. Những lợi ích to lớn của công nghệ sinh học đem lại sẽ tự nó nổi lên và sẽ được bàn đến trong những chương sau.

### **1.6. Công nghệ sinh học và các nước đang phát triển.**

Một nền nông nghiệp thắng lợi là câu trả lời cho việc rút ngắn khoảng cách giữa các nước giàu và các nước nghèo. Ở những nước phát triển khoa học về nông nghiệp được chú ý thích đáng nên phát triển rất mạnh, sản xuất ra một lượng lớn các sản phẩm chất lượng cao. Công nghệ sinh học nông nghiệp sẽ càng cải tiến chất lượng, chủng loại và sản lượng nông nghiệp. Liệu những loài cây mới được cải biến bằng kỹ thuật gen có tìm được đường đến với những nước đang phát triển đảm bảo năng suất cao hơn, sức đề kháng bệnh tốt hơn và dễ được thị trường chấp nhận hơn? Chưa có gì rõ ràng, cái gì sẽ xảy ra khi các nước giàu ngày càng được cung cấp thừa thãi thực phẩm. Liệu có đủ lương thực cho mọi người nhưng vẫn tiếp tục phân bố không đều không? Sự phát triển công nghệ sinh học rất cần đầu tư cả tiền của và lực lượng lao động lành nghề rất cao. Cả hai yếu tố chính đó các nước đang phát triển đều thiếu.

Trước đây một số quốc gia đang phát triển đã hợp tác có hiệu quả với các công ty công nghệ sinh học phương tây. Song ngày càng thấy sự đầu tư này bị giảm dần. Ví dụ từ 1986 - 1991 tỷ lệ các thoả thuận được các công ty sinh học Mỹ thực hiện với các nước đang phát triển giảm từ 30% còn 3%. Các nước đang phát triển cần nhìn rõ tiềm năng của công nghệ sinh học mà có phương hướng phát triển sao cho phù hợp với trình độ và tiềm năng của đất nước mình, phải biết đi tắt đón đầu, nhanh chóng hội nhập và cố gắng có những phát minh riêng của mình.

Cuối cùng cũng cần nói rằng hầu hết các ngành khoa học đều trải qua thời kỳ vàng son của mình khi mà những cách tiếp cận mới mở ra con đường cho sự phát triển cơ bản và nhanh chóng. Công nghệ sinh học chỉ mới bắt đầu, hãy nhớ lấy lời nhắn nhủ "*hoặc bắt đầu ngay hoặc không bao giờ*". Tương lai sáng lạn đang chờ ta ở phía trước.

## Chương 2

# NGUYÊN LIỆU CHO CÔNG NGHỆ SINH HỌC

### 2.1. Chiến lược sinh khối

Ước tính sản lượng hàng năm sinh khối thực vật tạo ra do quang hợp khoảng 120 tỷ tấn chất khô trên mặt đất, và khoảng 5 tỷ tấn từ đại dương. Trong số sinh khối sản ra trên mặt đất có khoảng 50% ở dưới dạng lignocellulose. Tỷ lệ lớn nhất của sinh khối trên mặt đất (44%) là từ rừng (bảng 2.1).

**Bảng 2.1.** Phân chia sản lượng sinh khối sản xuất trên trái đất

| Sinh khối sản xuất trên trái đất | Năng suất thực<br>(% trên tổng số ) |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| - Rừng và vùng có cây cối.       | 44,3%                               |
| - Đồng cỏ.                       | 9,7%                                |
| - Đất canh tác.                  | 5,9%                                |
| - Hoang mạc và bán hoang mạc.    | 1,5%                                |
| - Nước ngọt.                     | 3,2%                                |
| - Đại dương.                     | 35,4%                               |

Điều ngạc nhiên là thu hoạch nông nghiệp chỉ chiếm 6% của hầu hết sản lượng quang hợp, phần lớn lương thực cho người và động vật, sản phẩm cho dệt và giấy đều từ nguồn này (bảng 2.2). Nhiều sản phẩm nông nghiệp truyền thống có khả năng sẽ được khai thác hơn nữa cùng với nhận thức công nghệ sinh học ngày càng tăng. Đặc biệt những cách tiếp cận mới chắc chắn sẽ có đủ khả năng để xử lý một khối lượng chất thải từ quá trình chế biến thực phẩm theo cách cổ truyền mà gần đây đã không còn thông dụng.

Nền kinh tế quốc gia, đặc biệt ở những nước nhiệt đới. Thực tế phát triển của công nghệ sinh học ở những vùng đang phát triển nơi có sự tăng trưởng thực vật trội hơn, có khả năng dẫn đến thay đổi trong cán cân kinh tế.

**Bảng 2.2.** Sản lượng hàng năm của một số sản phẩm nông, lâm nghiệp trên thế giới  
(nguồn: từ tổ chức vì sự phát triển và hợp tác kinh tế, 1992)

| Ngành                         | Sản phẩm             |        | Tấn       | Trị giá<br>(tỷ USD) |
|-------------------------------|----------------------|--------|-----------|---------------------|
| Lương thực và thức ăn gia súc | Ngũ cốc              |        | 1,8 tỷ    | 250                 |
|                               | Đường                | mía    | 120 triệu | -                   |
|                               |                      | củ cải | 1,8 triệu | -                   |
|                               | Cá                   |        | 85 triệu  |                     |
|                               | Tinh bột thô         |        | 1,0 tỷ    | 17                  |
|                               | Tinh bột đã tinh chế |        | 20 triệu  | -                   |
| Vật liệu                      | Tiềm năng gỗ         |        | 13 tỷ     | -                   |
|                               | Gỗ thu hoạch         |        | 1,6 tỷ    | -                   |
|                               | Gỗ nhiên liệu        |        | -         | 100                 |
|                               | Gỗ cưa               |        | 200 triệu | 60                  |
|                               | Giấy                 |        | -         | 110                 |
| Hoá chất                      | Dầu và glycerin      |        | 70        | -                   |
|                               | Dầu đậu tương        |        | 17        | 8                   |
|                               | Dầu cọ               |        | 10        | 3                   |
|                               | Dầu hương dương      |        | 8         | 4                   |
|                               | Dầu hạt cải          |        | 8         | 3                   |
|                               | Tinh bột             |        | 2         | -                   |
|                               | Cao su tự nhiên      |        | 4         | 4                   |
| Khác                          | Các loại hoa         |        | 4         | 10                  |
|                               | Thuốc lá             |        | -         | 15                  |

Cần nhận thấy rằng nguồn dầu mỏ và năng lượng không tái chế được mà xã hội hiện đại quá phụ thuộc như dầu mỏ, than đá đều có nguồn gốc từ sinh khối cổ đại. Những quốc gia có công nghiệp hiện đại ngày càng phụ thuộc vào dự trữ nguồn năng lượng này cũng như nguồn nguyên liệu cho

hàng loạt các ngành sản xuất. Gần một thế kỷ qua, thế giới công nghiệp hoá đã phải nhờ đến nguyên liệu hoá thạch mà phải mất hàng trăm triệu năm để hình thành dưới lòng đại dương hay sâu trong lòng đất. Hơn nữa việc sử dụng lại rất không công bằng. Hiện tại nước Mỹ với 6% dân số và Tây Âu với 8% dân số thế giới sử dụng 31% và 20% tương ứng toàn bộ sản lượng dầu và khí trên thế giới.

Trong khi dự trữ than có thể kéo dài hàng trăm năm thì nguồn dầu và khí với mức tiêu thụ như hiện nay sẽ cạn kiệt vào một lúc nào đó của thế kỷ XXI này. Câu trả lời về vấn đề này là phải dùng sinh khối từ quang hợp để cung cấp năng lượng và nguyên liệu cho công nghiệp. Những năm gần đây cho thấy hàng năm năng lượng được sinh ra từ quang hợp gấp hơn 10 lần so với lượng con người sử dụng. Việc khai thác sinh khối qui mô lớn dùng cho nhiên liệu và nguyên liệu bị hạn chế bởi giá thành còn đắt hơn giá nguyên liệu hoá thạch.

Sử dụng sinh khối trực tiếp như là nguồn nguyên liệu chỉ ở những vùng công nghiệp hoá như Mỹ la tinh, Ấn Độ, châu Phi. Ở những nước phát triển, sinh khối từ nông nghiệp và lâm nghiệp được dùng chủ yếu trong công nghiệp và thực phẩm (bảng 2-2). Hiện nay sinh khối được sử dụng để sản xuất những sản phẩm công nghiệp và thương mại quan trọng (bảng 2-3) và những chất dùng trong công nghệ sinh học sẽ được nêu bật và nói rõ trong những chương sau.

**Bảng 2.3. Những sản phẩm quan trọng từ sinh khối**

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nhiên liệu</b>       | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Methan (biogas) đặc biệt ở các nước phát triển</li> <li>- Sản phẩm của sự nhiệt phân (khí, than)</li> <li>- Ethanol (thông qua lên men rỉ đường và cellulose)</li> <li>- Dầu (từ hydro hoá)</li> <li>- Đốt trực tiếp chất thải sinh khối.</li> </ul> |
| <b>Nguyên liệu</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ethanol (nguồn nguyên liệu có tiềm năng cho công nghiệp)</li> <li>- Khí tổng hợp (từ quá trình khí hoá)</li> <li>- Phân bón.</li> <li>- Phân trộn (compost)</li> <li>- Bùn.</li> </ul>                                                               |
| <b>Thức ăn gia súc.</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bổ sung trực tiếp vào thức ăn gia súc.</li> <li>- Đạm đơn bào</li> </ul>                                                                                                                                                                             |

## 2.2. Nguyên liệu thô thiên nhiên

Nguyên liệu thô thiên nhiên phần lớn có nguồn gốc từ nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm và lâm nghiệp. Đó là những hợp chất hoá học khác nhau, trong đó chủ yếu là đường, tinh bột, hemicellulose và gỗ. Một loạt các sản phẩm phụ lấy từ nguyên liệu thô và được dùng trong công nghệ sinh học được thể hiện ở bảng 2.4.

**Bảng 2.4.** Các loại sản phẩm phụ có thể làm cơ chất trong CNSH

| Ngành              | Các sản phẩm phụ có thể dùng làm cơ chất                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Nông nghiệp</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Rơm</li><li>- Bã mía, củ cải đường</li><li>- Lõi ngô</li><li>- Vỏ cà phê, cô ca, dừa</li><li>- Vỏ, lá trái cây</li><li>- Chất thải của chè</li><li>- Bánh ép từ các hạt để lấy dầu</li><li>- Chất thải từ bông</li><li>- Cám</li><li>- Thịt quả cà chua, cà phê, chuối, dưa, chanh, ôliu.</li><li>- Chất thải của gia súc.</li></ul>                                                                                                                                                                         |
| <b>Lâm nghiệp</b>  | <ul style="list-style-type: none"><li>- Chất thải dung dịch thuỷ phân gỗ</li><li>- Dung dịch nước quả đã sulphat hoá</li><li>- Vỏ cây, mùn cưa, các cành cây</li><li>- Giấy và cellulose</li><li>- Sợi phíp</li></ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Công nghiệp</b> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Mật đường</li><li>- Chất thải của nhà máy chưng cất rượu</li><li>- Chất lỏng giống như nước sau khi sữa chua đông lại</li><li>- Nước thải công nghiệp từ CN thực phẩm (ô lưu, dầu cọ, cà chua, chà là, chanh, sắn)</li><li>- Nước thải (từ ngành sữa, đóng hộp, bánh kẹo, nướng bánh mì, đồ uống không cồn, mạch nha, nước ngâm ngô)</li><li>- Chất thải ngành thuỷ sản</li><li>- Sản phẩm phụ của ngành chế biến thịt</li><li>- Rác đô thị</li><li>- Nước cống</li><li>- Chất thải ở lò sát sinh.</li></ul> |

Những nguyên liệu thô có chứa đường như củ cải đường, mía rất sẵn và thích hợp để dùng làm nguyên liệu cho công nghệ sinh học. Do việc sử dụng đường truyền thống có thể được thay thế bằng các đường có hiệu quả tương đương sẽ dẫn đến thừa đường hàng hoá và khuyến khích phát triển những cách sử dụng mới. Nhiều ngành kinh tế nhiệt đới sẽ phá sản nếu như thị trường đường bị mất đi. Đường mía được sử dụng ở Brazil làm nguyên liệu cho chương trình khí gas, một số quốc gia khác cũng đang nghiên cứu để áp dụng tiềm năng to lớn này.

Những sản phẩm nông nghiệp chứa tinh bột có nhược điểm là phải thuỷ phân thành monosaccharid hay oligosaccharid trước khi lên men. Tuy nhiên nhiều quá trình sinh học đã được thực hiện, bao gồm cả sản xuất nguyên liệu.

Nguồn nguyên liệu vô tận từ thiên nhiên là cellulose sẽ trở thành nguyên liệu chính cho công nghệ sinh học. Bởi vì không có cây xanh thì sự sống trên trái đất cũng không còn. Tuy nhiên hàng loạt khó khăn về mặt công nghệ cần phải khắc phục trước khi có được lợi ích kinh tế từ hợp chất phong phú này. Cellulose nguyên chất có thể phân huỷ bằng hoá học hoặc enzym thành đường, sau đó lên men để tạo thành các sản phẩm khác nhau như ethanol, aceton, protein đơn bào methan và các sản phẩm khác. Người ta tính toán rằng hàng năm có khoảng  $3.3 \times 10^{14}$  kg CO<sub>2</sub> được cố định trên bề mặt trái đất và khoảng 6 % số này, tức 22 ngàn triệu tấn một năm sẽ thành cellulose. Trên thế giới cây cối hàng năm sản xuất 24 tấn cellulose trên một đầu người. Thời gian sẽ cho chúng ta thấy rằng lignocellulose là nguồn carbon hữu ích cho sự phát triển của công nghệ sinh học.

### 2.3. Tính sẵn có của sản phẩm phụ

Nhiều quá trình công nghệ sinh học sử dụng sản phẩm nông nghiệp như đường, tinh bột, dầu thực vật, v.v... làm nguyên liệu thì rất nhiều chất thải từ nông nghiệp hiện nay chưa được dùng, chắc chắn sẽ được nghiên cứu để sử dụng trong tương lai không xa. Chất thải nông nghiệp và lâm nghiệp rất đa dạng về chủng loại như: rơm ngũ cốc, vỏ và lõi ngô, chất thải từ đậu tương, vỏ dừa, vỏ hạt cà phê, rỉ đường mía. Chất thải lâm nghiệp gồm: vỏ gỗ, mùn cưa vỏ cây, ... (bảng 2.4) mới chỉ là một phần nhỏ của những chất thải trên được dùng ở qui mô công nghiệp, phần còn lại hiện chưa được sử dụng.

Mục đích chủ yếu của công nghệ sinh học là cải tiến cách quản lý và sử dụng một số lượng lớn các chất thải hữu cơ của nông nghiệp, công nghiệp và đô thị trên toàn cầu. Xử lý các chất thải đó sẽ làm giảm thiểu các nguồn ô nhiễm, đặc biệt là ô nhiễm nước và biến một số chất thải thành những sản phẩm có ích.

Xử lý nước thải ô nhiễm có thể bằng công nghệ sinh học, hoặc bằng phương pháp siêu lọc. Sử dụng một màng xốp cho nước đi qua nhưng không cho các chất rắn hoặc các chất có phân tử lớn đi qua. Tuy nhiên phương pháp này giá thành đắt, hiện được dùng ở một số lĩnh vực như sản xuất nước ngọt (phục vụ cho những người đang sống trên biển thiếu nước ngọt), hoặc loại những chất rắn không độc ra khỏi nước.

Trên thực tế nhiều sản phẩm phụ của công nghệ thực phẩm thường bị vứt vào nước thải và gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Cần phải xử lý các chất thải đó trước khi thải vào môi trường là điều bắt buộc. Nếu các chất thải đó được tận dụng như là một nguyên liệu ban đầu cho một công nghệ nào đó thì càng có ích, và giá thành sản phẩm càng thấp. Xu hướng thế giới hiện nay là phải hợp tác trong lĩnh vực bảo vệ môi trường, các qui định về chất thải, nước thải sẽ chặt chẽ hơn, nghiêm ngặt hơn, sẽ tăng tiền phạt nặng hơn cho những ai vi phạm, từ đó có khái niệm gọi chất thải như một nguyên liệu có “chi phí âm”. Mỗi chất thải được đánh giá mức độ phù hợp đối với các quá trình công nghệ sinh học. Chỉ khi một chất thải có sẵn với khối lượng lớn và tồn tại với một khoảng thời gian kéo dài thì một phương pháp sử dụng phù hợp mới được xem xét (bảng 2.5).

**Bảng 2.5.** Chiến lược CNSH sử dụng chất thải hữu cơ phù hợp.

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Nâng cấp chất lượng chất thải thực phẩm để biến chúng thành sản phẩm thích hợp phục vụ việc sử dụng của con người.</li><li>- Đưa chất thải thực phẩm trực tiếp hoặc qua xử lý vào làm thức ăn cho lợn, gia cầm, cá hoặc các vật nuôi khác.</li><li>- Sản xuất biogas (methan) và những sản phẩm lên men khác nếu chi phí cho việc xử lý chất thải làm thức ăn gia súc quá tốn kém.</li><li>- Những mục đích chọn lọc khác như dùng trực tiếp làm nhiên liệu, vật liệu xây dựng, v.v...</li></ul> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Hai chất thải có nhiều được ứng dụng để lên men là rỉ đường và nước thải của công nghệ sản xuất sữa chua. Rỉ đường là sản phẩm phụ của công nghệ đường có chứa khoảng 50% đường khử. Rỉ đường được sử dụng rộng rãi làm nguyên liệu lên men sản xuất kháng sinh, acid amin, acid hữu cơ, nấm men thương mại để sản xuất bánh mì, và dùng trực tiếp để nuôi gia súc. Nước thải của công nghệ sữa chua, phomat cũng được sử dụng cho công nghệ lên men.

Những chất thải như rơm rạ, bã mía rất sẵn và ngày càng được sử dụng nhiều hơn do quá trình phân huỷ lignocellulose ngày càng được cải tiến (bảng 2.6).

**Bảng 2.6.** Các xử lý cần thiết để cơ chất có thể sử dụng lên men.

| Nguyên liệu                         | Cơ chất                                                                         | Xử lý                                                                                                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Các nguyên liệu chứa đường          | Mía, củ cải đường, rỉ đường, nước ép hoa quả, nước sữa.                         | Cần pha loãng hoặc khử trùng                                                                            |
| Các nguyên liệu chứa tinh bột       | Ngũ cốc, rau quả, chất thải lỏng từ quá trình chế biến.                         | Cần xử lý thủy phân bằng acid hoặc enzym, có thể tách những thành phần không phải tinh bột ra trước.    |
| Các nguyên liệu chứa lignocellulose | Lõi ngô, trấu, rơm rạ, bã mía, chất thải gỗ, dung dịch sulphat, chất thải giấy. | Cần làm vụn nguyên liệu sau đó thủy phân bằng hoá học hoặc enzym, đòi hỏi nhiều năng lượng và đắt tiền. |

Các chất thải từ gỗ gồm gỗ chất lượng thấp, vỏ cây, mùn cưa cũng tìm được cách xử lý thích hợp bằng phương pháp công nghệ sinh học. Tỷ lệ lớn nhất trong toàn bộ chất thải là từ ngành chăn nuôi (phân, nước tiểu), tiếp đến là chất thải trong nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm, và cuối cùng là chất thải gia đình. Việc sử dụng nhiều loại chất thải, đặc biệt là chất thải từ gia súc trong nông nghiệp truyền thống thường sử dụng làm phân bón. Tuy nhiên khi chăn nuôi gia súc phát triển thì việc gây ô nhiễm môi trường cũng ngày càng tăng.

## 2.4. Nguyên liệu hoá học và hoá dầu

Bên cạnh việc phát triển sản xuất protein đơn bào (single cell protein, viết tắt là SCP) và các sản phẩm hữu cơ khác, một số nguyên liệu hoá dầu, hoá học đã trở thành nguyên liệu quan trọng cho công nghệ lên men. Những nguyên liệu này có nhiều ưu điểm như sẵn có với khối lượng lớn và có cùng chất lượng ở các địa điểm khác nhau trên thế giới. Do vậy khí tự nhiên hay metan và dầu khí được coi như nguyên liệu thô bởi chúng dễ chế biến. Mối quan tâm chính về mặt thương mại là các n-parafin, methanol, ethanol. Các chất này được sử dụng vào mục đích khác nhau của công nghệ sinh học, đặc biệt để sản xuất SCP sẽ được nói kỹ ở phần sau. Trong tương lai các quá trình công nghệ sinh học ngày càng tận dụng được những nguyên liệu có thể tái chế trong thiên nhiên, bởi vì các chất thải kém giá trị hiện nay gây ô nhiễm môi trường. Bảng 2.7 tóm tắt về mặt kỹ thuật cần lưu ý khi tiếp cận với các chất thải muốn sử dụng làm nguyên liệu.

**Bảng 2.7.** Những cân nhắc về kỹ thuật cho việc sử dụng chất thải.

| Nội dung                           | Đặc điểm                                                                                                                                                                                                                       |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Sự sẵn có về mặt sinh học          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Thấp (cellulose)</li> <li>- Trung bình (tinh bột, lactose)</li> <li>- Cao (rỉ đường, đường hoa quả)</li> </ul>                                                                        |
| Nồng độ                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chất rắn (phần còn lại sau khi xay rác)</li> <li>- Cô đặc (mật mía)</li> <li>- Loãng (lactose, đường trong hoa quả)</li> <li>- Rất loãng (dung dịch xử lý trong quá trình)</li> </ul> |
| Chất lượng                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sạch (mật mía, lactose)</li> <li>- Trung bình (rơm).</li> <li>- Bẩn (rác, chất thải gia súc)</li> </ul>                                                                               |
| Vị trí                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tập trung (nơi đặt các thiết bị lớn)</li> <li>- Tập trung chuyên môn hoá (dầu cọ, ôliu, chà là, cao su, hoa quả)</li> <li>- Phân tán (rơm, rừng)</li> </ul>                           |
| Mùa                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Kéo dài (dầu cọ, lactose)</li> <li>- Rất ngắn (chất thải của ngành đóng hộp rau quả).</li> </ul>                                                                                      |
| Cách sử dụng tương đương           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Một số cách (rơm)</li> <li>- Không có (rác)</li> <li>- Cách tiêu cực (nước thải)</li> </ul>                                                                                           |
| Tiềm năng công nghệ của địa phương | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cao (Mỹ)</li> <li>- Trung bình (Brazil)</li> <li>- Thấp (Malaysia)</li> </ul>                                                                                                         |

## 2.5 Nguyên liệu thô và tương lai của công nghệ sinh học

Chúng ta biết rằng sự phát triển trong tương lai của các quá trình công nghệ sinh học qui mô lớn không thể tách rời việc cung cấp các nguyên liệu thô và giá trị của chúng. Tiêu chuẩn quan trọng nhất quyết định việc chọn nguyên liệu thô cho một quá trình công nghệ sinh học bao gồm sự sẵn có, giá cả, thành phần và hình thức, tình trạng oxy hoá nguồn carbon. Nguyên liệu được sử dụng rộng rãi nhất là ngô, đường thô, rỉ đường, methanol.

Tóm lại, ngũ cốc sẽ là những nguyên liệu thô chính ngắn hạn và trung hạn cho các quá trình công nghệ sinh học. Hơn nữa, người ta tin rằng việc này sẽ không ảnh hưởng và có giá trị thương mại nhất là tinh bột, không ảnh hưởng gì đến sự cung cấp lương thực cho người và vật nuôi. Sự khủng

hoảng thừa ngũ cốc xảy ra ở những nơi mà công nghệ sinh học được ứng dụng rộng rãi. Đây là một ví dụ chứng minh về hiệu quả cho sự đầu tư phát triển ngành khoa học đầy triển vọng này.

Mặc dù người ta chú ý nhiều đến việc sử dụng những chất thải trong công nghệ sinh học. Nhưng vẫn còn nhiều khó khăn to lớn cần vượt qua. Ví dụ: chất thải nông nghiệp chỉ có theo mùa và theo vùng địa lý, đôi khi các chất thải này còn chứa cả độc tố. Sự tồn tại các chất thải này sẽ gây ô nhiễm môi trường, vì vậy vẫn phải tìm mọi biện pháp để xử lý. Về lâu dài công nghệ sinh học phải tìm cách sử dụng cellulose và lignocellulose làm nhiên liệu hay nguyên liệu, tuy có khó khăn về mặt kỹ thuật.

Gỗ là nguồn cung cấp nhiên liệu, vật liệu cho xây dựng, nguyên liệu cho công nghiệp giấy. Việc cung cấp cho nhu cầu trên hiện đang giảm đi nhanh chóng. Nguyên nhân là việc phá rừng tràn lan ở nhiều quốc gia. Phá rừng dẫn đến sa mạc hoá và xói mòn đất. Công nghệ sinh học đã tạo ra những cây trồng mới để phủ xanh đồi trọc như cây keo lá tràm. Những cây phát triển nhanh như keo lá tràm còn hấp thụ nhiều khí  $\text{CO}_2$  nên còn có tác dụng khắc phục hiệu ứng nhà kính. Công nghệ sinh học sẽ tạo ra những cây trồng biến đổi gen có khả năng kháng sâu bệnh, năng suất cao chất lượng vượt trội so với giống cũ, vì vậy trong tương lai một nền nông nghiệp sạch, hiệu quả và tiên tiến sẽ làm cho nhiều người muốn trở thành “nông dân” hơn.

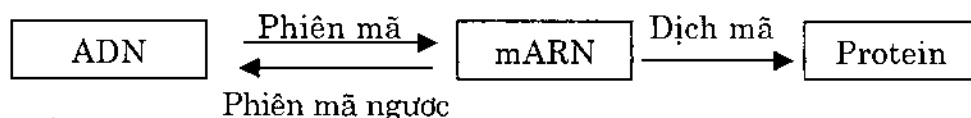
## Chương 3

# KỸ THUẬT GEN VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

### 3.1 Giới thiệu chung

Mỗi sinh vật đều giống tổ tiên ở hầu hết đặc điểm. Di truyền là sự duy trì các đặc điểm qua nhiều thế hệ. Đơn vị di truyền là gen, gen là một đoạn ADN đảm nhiệm một chức năng nhất định trong quá trình truyền thông tin di truyền, chẳng hạn đọc mã cho một chuỗi polypeptid, một đoạn ARN (tARN, mARN và các loại ARN khác có chức năng điều chỉnh) hoặc đóng vai trò điều khiển sự hoạt động của genom. Ở một số virus vật chất di truyền là ARN (như virus cúm, virus dại, virus HIV,...) thì gen là một đoạn ARN thường đọc mã (nhờ bộ máy dịch mã của tế bào chủ) cho một protein xác định nào đó. Phần lớn gen nằm trong nhân tế bào, phần nhỏ gặp ở các yếu tố di truyền ngoài nhiễm sắc thể như plasmid (plasmid F, plasmid R) và các yếu tố di truyền di động (transposon).

Dòng thông tin di truyền chảy theo một chiều từ ADN đến protein qua trung gian là ARN thông tin (mARN). Quá trình tổng hợp ARN trên khuôn ADN gọi là *phiên mã* (transcription), sau đó thông tin trên ARN được sử dụng để tổng hợp phân tử protein, quá trình này được gọi là *dịch mã* (translation). Mô hình dòng chảy thông tin như trên được gọi là *lý thuyết trung tâm* của sinh học phân tử.



Ngày nay với kỹ thuật thao tác gen cho phép chuyển đổi dễ dàng vật chất di truyền không chỉ ở cùng loài mà còn thực hiện ở khác loài. Bằng kỹ thuật dung hợp tế bào, nuôi cấy mô tế bào mà nông nghiệp đã tạo ra được nhiều giống cây trồng mới có năng suất và chất lượng cao hơn giống ban đầu. Bằng kỹ thuật thao tác ADN còn gọi là kỹ thuật tái tổ hợp ADN đã làm cho những nhà nghiên cứu về công nghệ sinh học có những thay đổi mạnh mẽ cả trong tư duy lẫn trong thực tế hành động. Nhiều hợp chất hữu cơ mới, nhiều phân tử mới do công nghệ gen tạo ra phục vụ cho y học thật là kỳ diệu tưởng như “thượng đế” đã ban phát cho loài người để cứu chữa

những bệnh hiểm nghèo như các chất: insulin, interferon, interleukin, v.v... Các chất này sẽ được nói kỹ hơn ở các chương sau.

### **3.2. Di truyền công nghiệp**

Công nghệ sinh học đóng vai trò trung gian giữa hai bộ phận đó là chọn được xúc tác sinh học đặc biệt cho một quá trình nào đó và tạo được điều kiện tối ưu để cho xúc tác đó hoạt động thu được hiệu quả tối đa.

Dạng xúc tác sinh học thuận tiện và hiệu quả nhất trong các trường hợp là toàn bộ cơ thể vi sinh vật như: vi khuẩn, nấm men, nấm mốc. Phần lớn các vi sinh vật sử dụng trong các quá trình công nghệ sinh học được phân lập từ môi trường thiên nhiên, thường chúng có hoạt tính thấp không thể sử dụng để sản xuất ở qui mô công nghiệp. Vì vậy sau khi phân lập một vi sinh vật có khả năng tạo ra một hợp chất có hoạt tính sinh học quý (các chất kháng sinh) cần phải nghiên cứu để nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp của vi sinh vật đó để có thể sản xuất với mục đích thương mại. Các nhà di truyền học sẽ phải cộng tác với các nhà công nghệ để cùng thực hiện mục đích đó. Nhiệm vụ cải tạo giống nhằm tăng hoạt tính của những chất chuyển hoá bậc một và những phân tử lớn (các enzym) đơn giản hơn là cải tạo giống để thu nhận các hợp chất chuyển hoá thứ cấp như các chất kháng sinh.

Trong di truyền công nghiệp cơ sở để làm thay đổi genom của vi sinh vật thường dùng các tác nhân đột biến như: tia UV, X, các hoá chất gây đột biến. Các phương pháp thông thường đó có thể làm mất đi các đặc điểm không mong muốn của vi sinh vật, đồng thời xuất hiện những đặc điểm mới mà ta mong muốn. Chọn lấy những cá thể thích hợp và bắt đầu một chương trình sàng lọc để thu được những chủng phục vụ cho sản xuất. Các chủng giống để sản xuất hoặc nghiên cứu thường được bảo quản ở những điều kiện đặc biệt để không bị thoái hoá như: trong nitơ lỏng, lạnh sâu, v.v...

Những năm gần đây di truyền công nghiệp đã sử dụng phương pháp mới của di truyền học phân tử để chọn giống. Đó là các thao tác ADN, kỹ thuật dung hợp tế bào, nhờ những kỹ thuật đó mà những người làm việc trong lĩnh vực này được gọi là những nhà khoa học có bộ óc mang tính "ảo thuật".

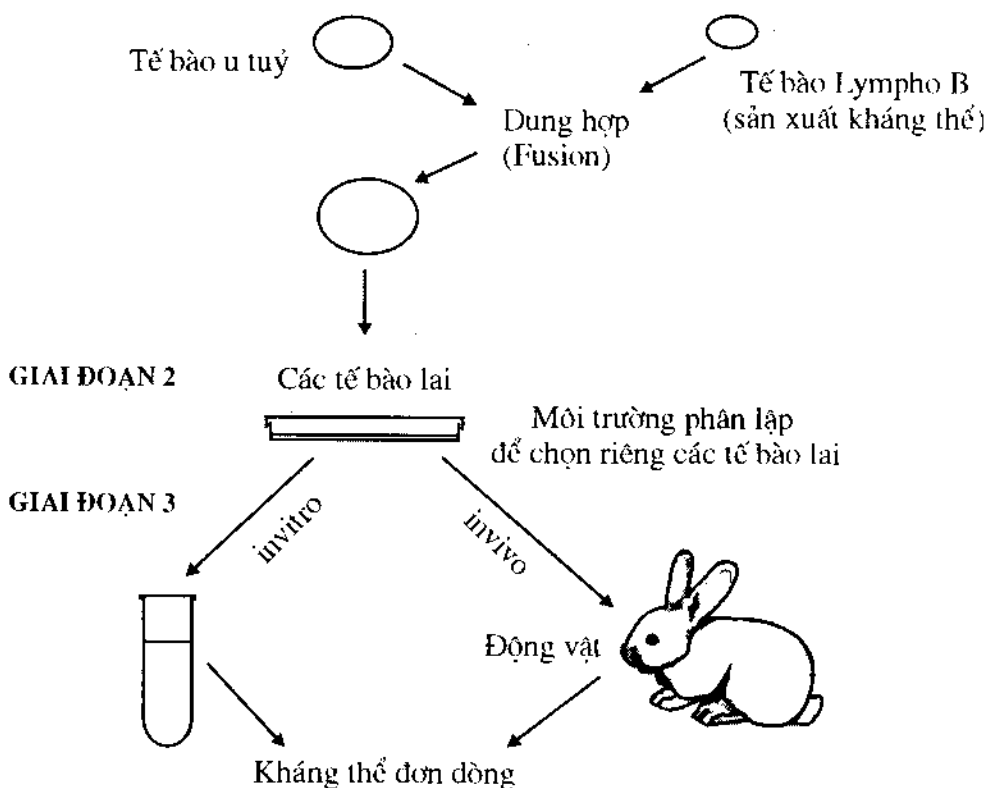
### **3.3. Protoplast và kỹ thuật dung hợp tế bào**

Tế bào vi sinh vật được bao bọc bằng một lớp vỏ khá bền vững. Để thực hiện quá trình dung hợp tế bào, cần phải bóc lớp vỏ đó đi bằng enzym thích hợp để thu lấy tế bào trần (protoplast). Sau đó cho các tế bào đã bóc vỏ tiếp xúc với nhau trong một môi trường đặc biệt, vật chất di truyền của hai cá thể cùng loài hoặc khác loài sẽ trao đổi với nhau (tái tổ hợp được thực hiện). Con lai tạo thành sẽ biểu hiện những tính trạng của cả bố và mẹ. Chọn ra những cá thể mà ta mong muốn để nghiên cứu tiếp. Kỹ thuật

dung hợp tế bào được thực hiện cả với vi sinh vật, tế bào động vật và thực vật. Một trong những thành tựu lớn của kỹ thuật dung hợp tế bào là sản xuất thành công kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies).

Theo thuyết chọn dòng (clon) của Burnett thì mỗi lympho bào chỉ có khả năng nhận dạng một kháng nguyên và chỉ tạo thành một dòng kháng thể đặc hiệu chống lại kháng nguyên đó. Tuy nhiên hầu như các kháng nguyên đều có nhiều nhóm quyết định (kháng nguyên đa giá) nên sẽ tạo thành một phức hợp kháng thể. Muốn nhận biết chỉ một loại kháng thể trong phức hợp ấy cần phải tách ra dạng tinh khiết, đây là một việc làm khó khăn. Năm 1975 Milstein và Kohler đã đưa ra kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng ngoài cơ thể dựa trên nguyên tắc lai tế bào u tủy (myeloma) với tế bào lympho B đã hoạt hoá (hình 3.1).

#### GIAI ĐOẠN 1



Hình 3.1. Sơ đồ sản xuất kháng thể đơn dòng.

Ưu điểm của tế bào u tủy là khả năng phân chia rất nhanh, nhưng không tạo thành kháng thể. Ngược lại tế bào lympho B có khả năng sản xuất kháng thể nhưng không có khả năng phân chia vì chúng là các tế bào tận cùng của sự biệt hoá. Do đó không nuôi in vitro được. Mặt khác họ chọn trong số tế bào ung thư tủy loại tế bào đặc biệt chỉ có thể tổng hợp ADN với các acid amin đơn giản

là: glutamin và urenucleosid monophosphat, môi trường nuôi các tế bào này chỉ gồm: hypoxanthin - aminopterin - thimidin (môi trường HAT). Tế bào u tuy không có enzym hypoxanthin phosphoribotransferase (HPRT) nên không đồng hoá được hypoxanthin để nhận guanin tham gia vào tổng hợp ADN, do đó chúng không thể sinh sản. Vì vậy, chỉ có tế bào lai nhờ có gen HPRT từ tế bào lympho mới có thể tổng hợp được ADN và do đó mới tiếp tục phân chia trong môi trường HAT.

Tế bào lai mang ưu điểm của hai loại tế bào trên nên chúng vừa phân chia nhanh, lại vừa có khả năng tổng hợp kháng thể. Nếu tiến hành pha loãng liên tục trong các giếng của phiến nhựa sao cho mỗi giếng chỉ chứa một tế bào. Từ một tế bào đơn sẽ chỉ sản xuất một dòng kháng thể thuần khiết. Do vậy kháng thể đơn dòng là kháng thể do một dòng tế bào lympho B sinh ra để chống lại một quyết định kháng nguyên.

Việc phát minh ra kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng được đánh giá là thành tựu lớn, tạo ra một cuộc cách mạng trong miễn dịch học. Tác giả của công trình này đã được nhận giải thưởng Nobel năm 1984.

Kỹ thuật kháng thể đơn dòng đã nhanh chóng được áp dụng rộng rãi và thay thế dần cho một số phương pháp miễn dịch và huyết thanh thông thường. Dùng kỹ thuật kháng thể đơn dòng để:

- Phát hiện một kháng nguyên chưa biết trên bề mặt tế bào.
- Xác định nồng độ hormon trong máu để đánh giá chức năng nội tiết.
- Xác định một số protein có ý nghĩa trong chẩn đoán ung thư.
- Dùng trong định loại vi sinh vật.
- Xác định các thuốc cấm sử dụng có trong máu (kiểm tra doping).
- Ước chế phản ứng thải loại khi ghép cơ quan (tạo kháng thể đơn dòng chống lại kháng nguyên đặc hiệu của lympho T).

Phát minh ra kỹ thuật sản xuất kháng thể đơn dòng là một ví dụ điển hình của một nghiên cứu cơ bản. Song kết quả của nó đã nhanh chóng được ứng dụng vào sản xuất phục vụ nhu cầu bảo vệ sức khỏe cộng đồng và một số lĩnh vực khác. Doanh số của sản phẩm này đã đạt vài tỷ USD vào năm 2000.

### **3.4. Kỹ thuật gen (genetic engineering)**

Thuật ngữ kỹ thuật gen hay kỹ thuật di truyền đã được sử dụng phổ biến. Tuy nhiên còn có một số thuật ngữ khác cũng dùng để chỉ khái niệm này như: thao tác gen (gen manipulation), tách dòng gen (gen cloning), kỹ thuật tái tổ hợp ADN (recombinant ADN technology), v.v...

Mặc dù có nhiều kỹ thuật đa dạng và phức tạp được sử dụng, nhưng các nguyên lý cơ bản của kỹ thuật di truyền lại khá đơn giản. Cơ sở của

công nghệ này là thông tin di truyền được mã hoá trong ADN, tồn tại ở dạng các gen. Thông tin này có thể sửa đổi theo nhiều cách khác nhau để đạt được mục tiêu nhất định của người nghiên cứu khoa học cơ bản và khoa học ứng dụng. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật gen để tạo ra những sản phẩm sinh học vô cùng quý giá như insulin, hormon sinh trưởng người, interferon, interleukin, v.v... Kỹ thuật gen đã tạo ra nhiều sản phẩm thương mại và sự phát triển dường như không có giới hạn.

Cơ sở của kỹ thuật gen là tách, tinh khiết những gen đặc biệt, sau đó thực hiện việc chuyển các gen đó vào những đối tượng mà ta định chọn để tái tổ hợp tạo ra những cá thể mới có thể sản xuất ra những sản phẩm mà ta mong muốn cho mục đích nào đó.

### **3.4.1. Hệ thống chuyển gen**

Chuyển gen là kỹ thuật cơ bản nhất của sinh học phân tử. Để thực hiện việc chuyển gen trước tiên cần phải tách lấy các gen đặc biệt dưới dạng tinh khiết. Về mặt lý thuyết có thể tách riêng các đoạn ADN chỉ chứa một gen bằng enzym cắt giới hạn (restrictase). Trên thực tế thấy rằng ngay cả như tế bào *E. coli* gen tiêu biểu nằm ngoài genom cũng có kích thước từ 1-2 kilobas (kb), toàn bộ bộ gen của nó là 4.700 kb. Trung bình một gen của *E. coli* chiếm khoảng 0,05% trên toàn bộ ADN của nó.

Ở người trung bình mỗi gen lại không lớn hơn nhiều so với một gen ở *E.coli*, nhưng genom thì 1000 lần lớn hơn. ADN của *Bacteriophage lambda* chỉ có 50 kb. Còn ADN của một vài plasmid khoảng 5 kb. Các đơn vị di truyền chứa gen đơn trung bình chiếm khoảng 2-40% của ADN.

Chiến lược cơ bản của chuyển gen là muốn chuyển một gen hoặc một phức hợp gen vào một vật chủ nào đó có thể tiếp nhận nó để tạo ra một cá thể mới có những đặc điểm ưu việt mà ta mong muốn. Rất may là sự hiểu biết của chúng ta về cấu trúc ADN cũng như về kỹ thuật enzym cho phép có thể cắt đứt phân tử ADN ra từng đoạn có kích thước mong muốn invitro và thực hiện quá trình tái tổ hợp invitro. Enzym cắt giới hạn, ADN ligase và ADN synthase là những chất không thể thiếu để thực hiện việc tái tổ hợp invitro.

#### **Công việc chuyển gen có thể chia ra các bước sau:**

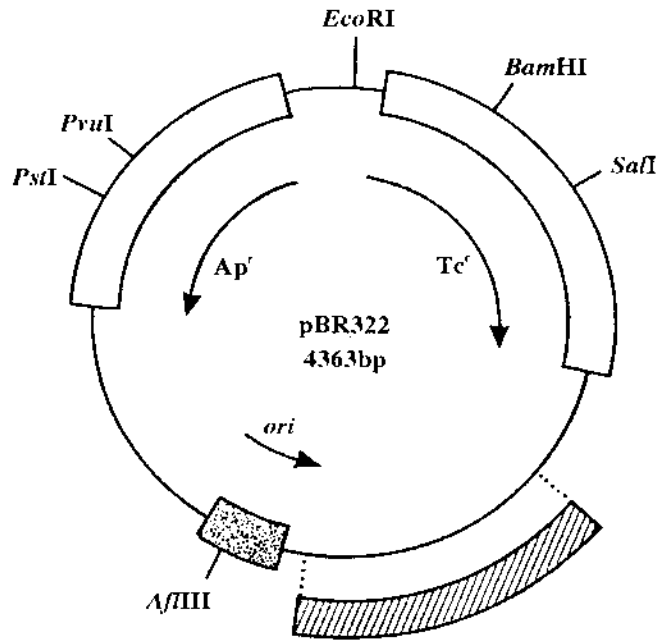
- Cô lập và cắt đoạn ADN nguồn của toàn bộ ADN genom của một cơ thể nào đó mà ta quan tâm; tổng hợp ADN từ ARN khuôn bằng quá trình sao chép ngược, hoặc cũng có thể tổng hợp ADN từ các nucleotid invitro. Nếu nguồn ADN là ADN genom ta có thể cắt thành từng đoạn bằng enzym, rồi lấy các đoạn đó cho vào hỗn hợp phản ứng.

- Gắn các đoạn ADN vào vector cloning bằng ADN ligase, hoặc một số các đơn vị di truyền có thể sao chép độc lập, sử dụng bản sao là các vector cloning đã biết.
- Hợp nhất vào vật chủ: Phân tử ADN tái tổ hợp được chuẩn bị invitro được đưa vào vật chủ. Vật chủ là một tế bào vi khuẩn đã bị nhiễm phage, sự gắn kết ADN vào vật chủ thường tạo ra một hỗn hợp clon. Một vài tế bào có chứa gen mà ta mong muốn, một số tế bào khác lại chứa ADN còn gắn cả các vector. Vì vậy cần tiếp tục chọn lọc để tách riêng được những cá thể tái tổ hợp có chứa gen mà ta mong muốn.

### **3.4.2. Plasmid là những vector chuyển gen**

Plasmid có nhiều đặc điểm thuận lợi như những vector chuyển gen. Chúng là những phân tử ADN mạch vòng, kích thước tương đối nhỏ so với nhiễm sắc thể của tế bào chủ và dễ chiết xuất bằng các hoá chất đặc biệt. Plasmid tồn tại chủ yếu ở ngoài nhiễm sắc thể. Plasmid nói chung không cần cho quá trình sinh trưởng và phân chia tế bào. Song chúng lại có thể truyền các tính trạng khác như tính chống chịu cao đối với môi trường xung quanh, đặc biệt nguy hiểm là truyền tính đề kháng đối với chất kháng sinh cho vi sinh vật chủ. Các gen bền vững với kháng sinh do ADN plasmid mã hoá thường được sử dụng để thiết kế các vector dùng cho kỹ thuật di truyền vì chúng cung cấp một phương tiện thuận lợi để lựa chọn các tế bào có mang plasmid (giống như tế bào được đánh dấu).

Các plasmid chia thành hai nhóm: *tiếp hợp* và *không tiếp hợp*. Các plasmid tiếp hợp có thể tự truyền từ vi khuẩn này sang vi khuẩn khác bằng con đường tiếp hợp. Các plasmid không tiếp hợp thì không tự truyền đi được. Trong kỹ thuật di truyền, các plasmid gặp trong tự nhiên không thể sử dụng ngay để làm vector được, mà cần phải sửa đổi (gia công) lại để tạo ra các vector có đặc điểm mong muốn. Để đặt tên plasmid thường dùng chữ p để chỉ plasmid và tiếp theo đó thường là tên của người đã phân lập hoặc thiết kế plasmid. Ngoài ra còn dùng các chữ số để phân loại các chủng cụ thể. Một trong những plasmid được sử dụng rộng rãi là pBR322, nó được thiết kế bởi Francisco Bolivar và cộng sự. Plasmid pBR322 có tất cả các đặc tính của một vector cần thiết như: trọng lượng phân tử thấp, có các gen kháng kháng sinh, có điểm khởi đầu sao chép và có một số điểm cắt riêng biệt bởi các enzym cắt giới hạn (hình 3.2).



**Hình 3.2.** Cấu trúc của plasmid pBR322.

Sự có mặt của hai gen kháng kháng sinh ( $Ap^r$  và  $Tc^r$ ) cho phép lựa chọn các tế bào có mang plasmid, vì các tế bào đó sẽ kháng với cả ampicilin và tetracyclin. Một ưu việt nữa là các điểm cắt giới hạn duy nhất nằm trên các gen kháng kháng sinh cho phép lựa chọn được các đoạn ADN tách dòng, và được gọi là bất hoạt do xen đoạn (insertional inactivation). Khi có đoạn ADN xen vào làm gián đoạn mã hoá của gen kháng kháng sinh dẫn đến việc làm thay đổi kiểu hình của tế bào mang ADN tái tổ hợp vì vậy tách riêng các cá thể mang gen tái tổ hợp một cách dễ dàng.

Vector plasmid pBR322 được sử dụng rộng rãi trong nhiều ứng dụng để tách dòng gen. Ngoài pBR322 ra người ta cũng thiết kế một loạt các vector khác có những đặc điểm riêng biệt để phù hợp cho những thí nghiệm tách dòng khác nhau như pUC18, pAT153.

### **3.4.3. Bacteriophages như những vector chuyển gen**

Các vector dựa trên cơ sở phage về nhiều phương diện đặc hiệu hơn các vector plasmid. Chúng cũng thực hiện chức năng chuyển gen nhưng ADN của phage lớn hơn ADN của plasmid nhiều nên việc thao tác và tải nạp được một khối lượng gen lớn hơn. Có hai loại phage ( $\lambda$  và M13) được nghiên cứu kỹ và hoàn thiện để phục vụ cho mục đích tách dòng (hình 3.3).

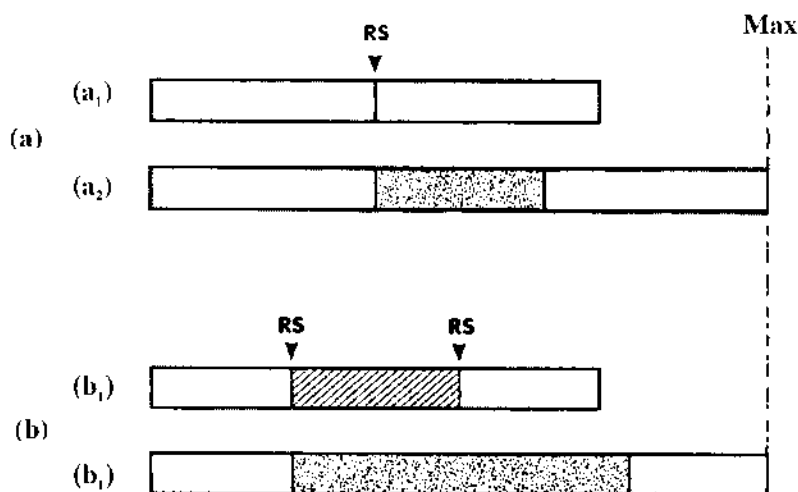
Về cấu trúc của phage thì khá đơn giản. Phage chỉ gồm một vỏ là protein gọi là capsid và lõi mang vật chất di truyền có thể là ADN mạch đơn, mạch kép hoặc ARN. Thường thấy các ADN mạch kép (dsADN: double

strated ADN). Cấu trúc của phage đơn giản như vậy nên chúng được sử dụng rộng rãi như các mô hình để nghiên cứu sự biểu hiện của gen.

Các phage có thể phân thành phage độc (virulent) và phage ôn hoà (temperate), tùy thuộc vào chu trình sống của chúng. Khi phage xâm nhập vào trong một tế bào vi khuẩn, nó có thể nhân lên thành nhiều hạt phage và giết chết tế bào đó, đó là chu trình sinh tan (lytic), hoặc phage có thể nhập vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và ở lại đó mà không giết chết tế bào chủ. Hiện tượng đó gọi là chu trình tiềm tan (lysogenic). Phage độc là phage chỉ có chu trình sinh tan. Phage ôn hoà là phage có chu trình tiềm tan, tuy nhiên chúng cũng có thể trở thành phage độc trong những điều kiện thích hợp.

#### 3.4.4. Các vector dựa trên cơ sở phage $\lambda$

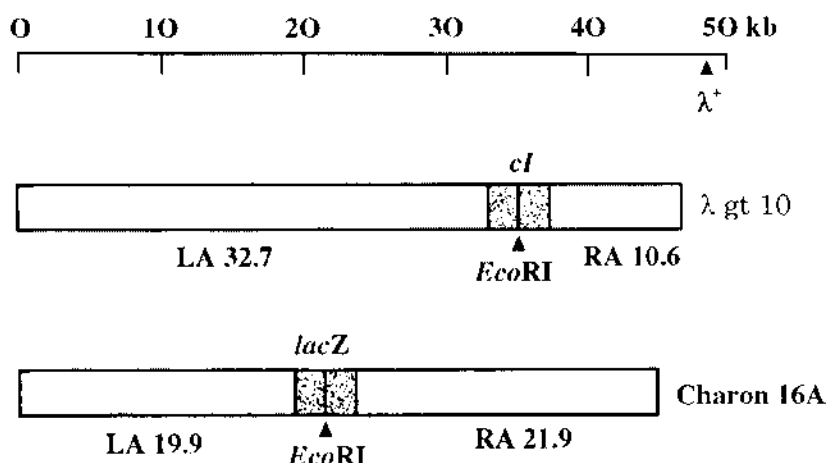
Việc sử dụng phage  $\lambda$  làm vector tách dòng cần lưu ý rằng không phải toàn bộ hệ gen của phage  $\lambda$  đều cần thiết cho phage hoạt động chức năng. Có thể loại bỏ đi những đoạn gen không cần thiết của phage  $\lambda$  và đưa vào đó những gen ngoại lai cần thiết cho quá trình sau này. Thật may mắn là vùng trung tâm của hệ gen  $\lambda$  nằm giữa các vị trí 20 và 35 của bản đồ gen là một đoạn lớn có thể bỏ qua được mà không cần có sự sắp xếp lại invitro một cách phức tạp đối với hệ gen. Vùng trung tâm này chủ yếu kiểm soát các tính chất tiềm tan của phage, vùng này có thể cắt bỏ hoàn toàn mà không ảnh hưởng gì đến chu trình sinh tan. Một trong những điểm yếu lớn nhất của vector phage  $\lambda$  là capsid chỉ có thể bọc gói một số lượng ADN nhất định trong quá trình lắp ráp phage, do đó nó giới hạn kích thước của các ADN ngoại lai cần tách dòng. Để khắc phục nhược điểm này người ta đã thiết kế sao cho các vector có thể tiếp nhận các đoạn ADN có chiều dài tối đa tùy từng trường hợp cụ thể. Đó là các vector xen đoạn và vector thay thế (hình 3.3).



Hình 3.3. Các vector phage xen đoạn và vector phage thay thế.

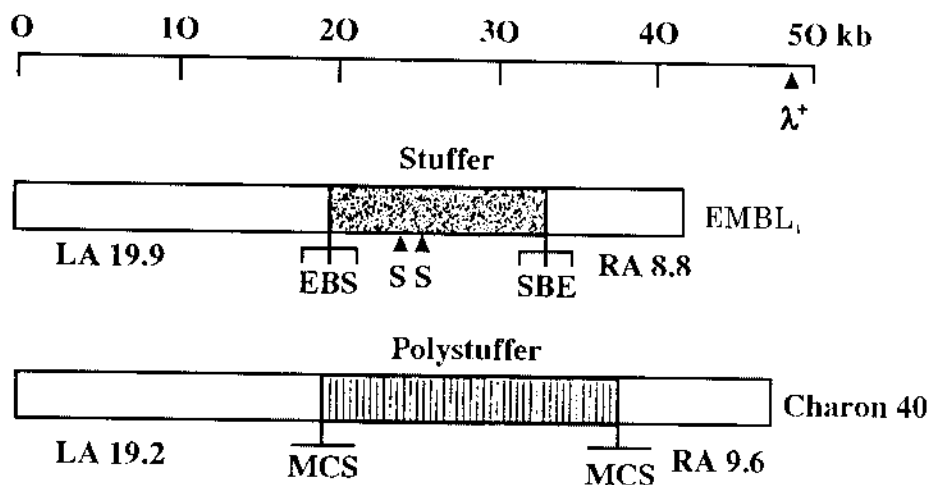
(a<sub>1</sub>) Vector xen đoạn trên phần a<sub>1</sub>; các vector đó có một điểm giới hạn (RS). Để tạo ra nó, một ADN tái tổ hợp được xen vào điểm này. Kích thước của đoạn tách dòng được xác định bằng độ khác biệt giữa kích thước vector và kích thước cực đại của đoạn được gói vào (max). Đoạn ADN bôi đậm (a<sub>2</sub>).

(a<sub>2</sub>) Một vector thay thế nêu trên phần (b<sub>1</sub>). Các vector này có hai điểm giới hạn (RS) được bôi đậm gọi là đoạn stuffer. Như vậy một phần gen của phage được thay thế trong quá trình tách dòng vào điểm này (b<sub>2</sub>). Rõ ràng cách làm này cho phép đưa được những đoạn gen lớn hơn so với các vector xen đoạn.



**Hình 3.4.** Các vector phage  $\lambda$  xen đoạn  $\lambda$  gt 10 và Charon 16A.

Các vùng bôi đậm là các gen *cI* và *lacZ* lần lượt trong các vector  $\lambda$  gt 10 và Charon 16 A. Bên trong các gen này có điểm *EcoRI* dùng để tách dòng. Chiều dài các nhánh trái và nhánh phải (LA và RA được đo bằng kb). Kích thước hệ gen  $\lambda$  trên thang đo có độ dài 50 kb. Các vector xen đoạn có một điểm nhận biết duy nhất cho một hoặc một số enzym giới hạn. Nhờ đó mà các đoạn ADN được xen vào hệ gen phage  $\lambda$ . Phage  $\lambda$  gt 10 và Charon 16 là những ví dụ về vector xen đoạn (hình 3.4).



Hình 3.5. Các vector phage  $\lambda$  thay thế EMBL<sub>4</sub> và Charon 40

Mỗi vector có một điểm *EcoRI* duy nhất mà ADN có thể xen vào được. Trong  $\lambda$  gt10 (43,3kb), nó tạo ra hai nhánh trái và phải với chiều dài tương ứng 32,7 và 10,6 kb, về mặt lý thuyết nó có thể tiếp nhận các đoạn xen ADN có chiều dài tới 7,6 kb. Trong Charon 16A (41,8kb), các nhánh được sinh ra bởi *EcoRI* có chiều dài 19,9 kb (nhánh trái) và 21,9kb (nhánh phải), và các đoạn có chiều dài khoảng 9kb có thể được tách dòng. Điểm *EcoRI* trong Charon 16A nằm trong gen  $\lambda$  galactosidase (*lacZ*), gen này giúp cho việc phát hiện các thể tái tổ hợp bằng cách sử dụng X- gal.

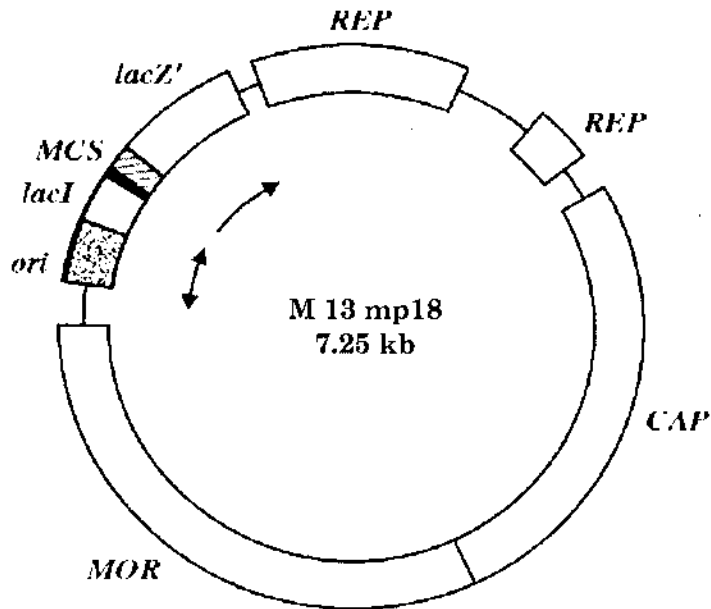
Các vector xen đoạn cung cấp một phạm vi giới hạn để tách dòng các đoạn ADN lớn, vì vậy các vector thay thế được hoàn thiện với vùng trung tâm bị loại bỏ và được thay bằng các đoạn ADN xen đoạn

Đoạn stuffer trong EMBL<sub>4</sub> dài 13,2 kb, và được chặn hai đầu bằng các polylinker đảo ngược có chứa các điểm cắt *EcoRI* (E), Bam HI (B) và Sall (S). Trong Charon 40 polystuffer bao gồm các đoạn lặp ngắn có thể bị cắt bởi NaeI. Điểm đa tách dòng (MCS) trong Charon 40 mang nhiều điểm giới hạn hơn trong EMBL<sub>4</sub>.

### 3.4.5 Các vector dựa trên cơ sở phage M13

Phage M13 dùng trong kỹ thuật di truyền có hai đặc điểm cần lưu ý. Đó là dạng sao chép RF rất giống với plasmid, vì vậy có thể áp dụng kỹ thuật tách chiết và thao tác giống như đối với plasmid. Đặc điểm thứ hai của phage M13 là ADN sợi đơn sinh ra trong quá trình nhiễm rất dễ dàng xác định trình tự bằng phương pháp dùng dideoxynucleotid. Chỉ riêng ưu điểm này đã khiến cho M13 trở thành một vector có tiềm năng hết sức hấp

dẫn. Khác với phage  $\lambda$  M13 không mang các gen không quan trọng. Hệ gen gồm 6407 cặp base của nó đều rất quan trọng, trong đó có 507 cặp base nằm ở vùng giữa các gen. Vùng này được sử dụng để thiết kế một loạt các vector M13mp bằng cách xen một đoạn polyliker/lac z $\lambda$ -peptid vào đó (hình 3.6). Nhờ đặc điểm này mà có thể sử dụng hệ thống sàng lọc X-gal để phát hiện các thể tái tổ hợp.



Hình 3.6. Sơ đồ vector phage M13 mp18.

### 3.5. Phương pháp đưa ADN vào tế bào chủ

Công việc thiết kế các vector có xen các đoạn ADN cần thiết để tạo ra các phân tử tái tổ hợp được thực hiện invitro. Bước tiếp theo là phải đưa được ADN tái tổ hợp đó vào trong tế bào chủ để nhân lên. Hiệu quả của công đoạn này là yếu tố quyết định thắng lợi của một thí nghiệm tách dòng. Các phương pháp hiện nay đang tiến hành phụ thuộc vào kiểu loại của hệ thống giữa vật chủ và vector có thể nêu ra đây một vài phương pháp.

#### 3.5.1 Biến nạp và tải nạp (lây nhiễm)

Kỹ thuật biến nạp và tải nạp là những phương pháp đơn giản nhất để đưa ADN tái tổ hợp vào trong các tế bào. Trong trường hợp tế bào chủ là *E. coli* thì biến nạp có nghĩa là đưa ADN plasmid vào trong tế bào, còn tải nạp là đưa ADN phage vào trong các tế bào. Biến nạp còn được sử dụng với nghĩa rộng hơn, cụ thể là đưa bất kỳ ADN nào vào bất kỳ tế bào nào.

Hiện tượng biến nạp ở vi khuẩn đã được F. Griffith mô tả vào năm 1928 trong thí nghiệm nổi tiếng của ông gọi là "nguyên lý biến nạp". Tuy

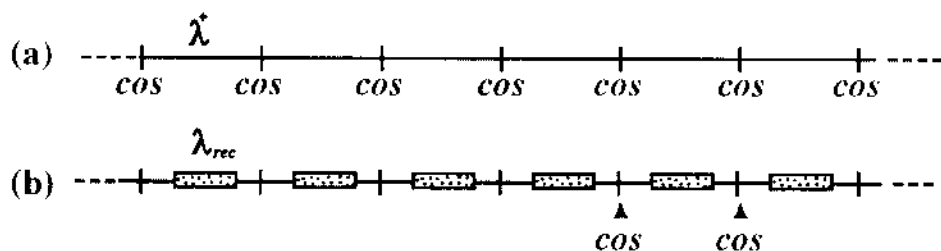
nhiên không phải tất cả các vi khuẩn đều có thể được biến nạp một cách dễ dàng. Để cho sự biến nạp ở *E.coli* các tế bào cần trở nên khả biến. Để đạt được mục đích này cần phải cho thêm vào dung dịch vi khuẩn một lượng calci chlorid và hạ nhiệt độ để dung dịch đông thành băng, khi đó tế bào trở nên khả biến theo một cơ chế nào đó mà tới nay vẫn chưa giải thích được. Quá trình biến nạp các tế bào khả biến được thực hiện bằng cách trộn ADN plasmid với các tế bào, rồi ủ trong đá 20-30 phút, sau đó tạo một sốc nhiệt ngắn (2 phút/42°C), bằng cách làm như vậy ADN sẽ chui vào tế bào. Các tế bào biến nạp sau đó được ủ vào môi trường canh thang và giữ ở nhiệt độ 37°C / 60-90 phút để làm cho các plasmid ổn định và biểu hiện các tính trạng của chúng ra kiểu hình, sau đó các tế bào biến nạp được nuôi trên môi trường chọn lọc để tách riêng các tế bào có mang plasmid đã tái tổ hợp.

Quá trình biến nạp chỉ có một số tế bào khả biến được biến nạp đây là nhược điểm cơ bản của sự biến nạp. Tuy nhiên phương pháp biến nạp vẫn được ứng dụng trong kỹ thuật di truyền vì nó khá đơn giản và dễ thực hiện. Thực nghiệm cho thấy khi đưa 1 mcg ADN vào thí nghiệm có thể thu được  $10^6$ - $10^7$  tế bào biến nạp.

Tải nạp là quá trình tương tự với biến nạp, ở đây chỉ khác là ADN plasmid được thay thế bằng ADN của phage. Quá trình này cũng không diễn ra 100% với các tế bào. Trên thực tế thường thay bằng phương pháp gói ADN của phage in vitro rồi mới đưa vào tế bào *E.coli*.

### 3.5.2. Phương pháp gói ADN của phage in vitro

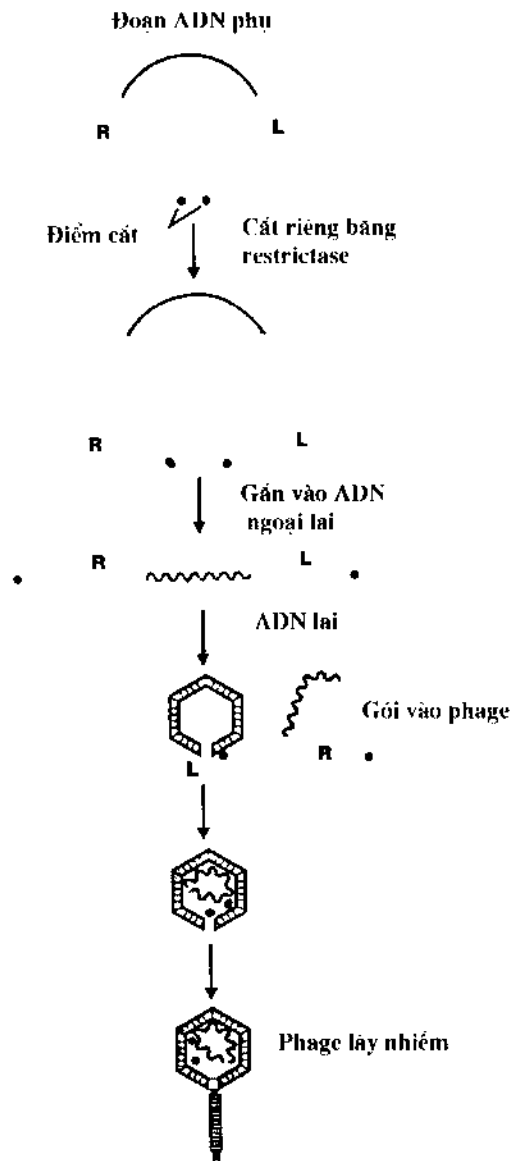
Trong quá trình sinh tan của phage  $\lambda$ , ADN của phage được sao chép để tạo thành chuỗi khảm (concatemere). Đó là phân tử ADN rất dài bao gồm nhiều bản sao của hệ gen  $\lambda$  được nối liền với nhau bởi các điểm cos:



Khi các hạt phage được lắp ráp thì ADN được gói trong các capsid, quá trình này bao gồm việc cắt ADN tại các điểm cos bằng endonuclease do phage mã hoá. Các hạt phage trưởng thành sau khi lắp ráp xong thì được phóng thích ra khỏi tế bào đồng thời tế bào bị tan ra. Các hạt phage lại tiếp tục lây nhiễm sang tế bào khác. Quá trình này thường xảy ra in vivo dưới sự chỉ huy của các gen phage. Tuy nhiên cũng có thể thực hiện trong ống nghiệm.

Phân tử ADN dạng chuỗi khảm được tạo thành từ ADN của phage  $\lambda$ . Các hệ gen riêng biệt được nối với nhau tại các điểm cos. Các hệ gen tái tổ

hợp ( $\lambda$  rec ) được bọc gói in vitro thành tiểu phân phage hoàn chỉnh. Để tạo được hạt phage hoàn chỉnh in vitro cần các thành phần của capsid phage  $\lambda$  endonuclease và ADN ngoại lai. Trên thực tế sử dụng hai nòi vi khuẩn để tạo ra dịch tan gọi là dịch chiết bọc gói (packaging extract). Mỗi nòi mang đột biến về một chức năng trong quá trình phát sinh hình thái của phage. Khi trộn dịch chiết với ADN tái tổ hợp dạng chuỗi khảm trong những điều kiện thích hợp với đầy đủ các thành phần thì các hạt phage sẽ được tạo ra. Các hạt phage này sau đó có thể sử dụng để gây nhiễm cho các tế bào *E.coli* và tạo ra các vết tan. Quá trình tạo tiểu phân phage in vitro (hình 3.7).

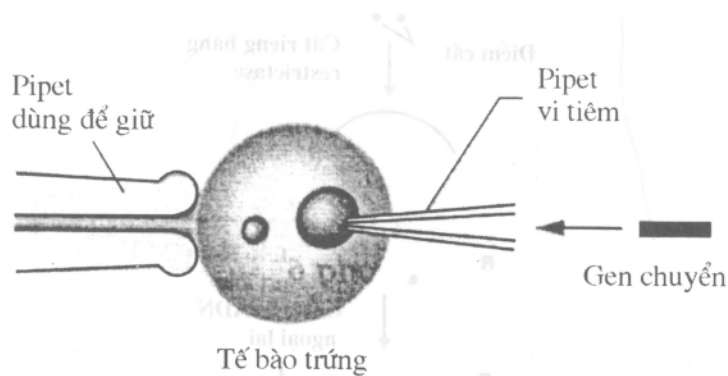


**Hình 3.7.** ADN phage và sự bọc gói

### 3.5.3 Các phương pháp truyền ADN khác

Các phương pháp dùng để đưa ADN vào các tế bào vi khuẩn thường khó áp dụng cho các loại tế bào khác như tế bào thực vật và động vật. Vì vỏ tế bào thực vật rất cứng ngăn cản không cho ADN chui vào. Tuy nhiên người ta có thể khắc phục bằng cách tạo ra các tế bào trần (protoplasts), sau đó các tế bào trần có thể thực hiện biến nạp bằng các kỹ thuật như khoan các lỗ bằng điện. Dùng xung điện để tạo ra các lỗ trên màng tế bào. Chính các lỗ này là nơi để ADN chui qua vào trong tế bào. Sau đó các tế bào trần được tái sinh (tạo vỏ mới). Ngoài ứng dụng này các tế bào trần còn được ứng dụng để tạo ra các tế bào lai thực vật bằng kỹ thuật dung hợp với nhau.

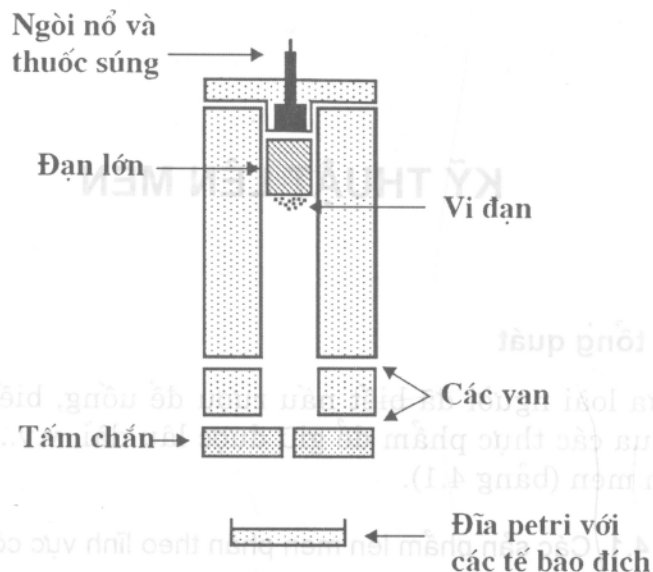
Cũng có thể dùng phương pháp vi tiêm để đưa ADN vào bên trong các tế bào khác. Kỹ thuật này đã được sử dụng thành công đối với cả tế bào động vật và thực vật (hình 3.8).



Hình 3.8. Biến nạp ADN bằng phương pháp vi tiêm.

Kỹ thuật này cần phải có một máy vi thao tác cùng một kính hiển vi và đòi hỏi có kỹ năng thực hành siêu tinh vi.

Một phương pháp hiện đại khác nữa để đưa ADN vào tế bào là kỹ thuật dùng súng bắn gen (hình 3.9).



**Hình 3.9.** Biến nạp ADN bằng súng bắn gen

Dùng ADN để bọc các hạt Vonfam cực nhỏ gọi là vi đạn, vi đạn chuyển động với vận tốc cực lớn do súng bắn tạo được áp suất cao trong nòng súng. Trên đường đi của đạn có một tấm chắn, trên màng chắn đó có các khe để *đạn gen* có thể chui qua và đâm xuyên vào tế bào, và trong một số trường hợp biến nạp đã thực hiện thành công.

## Chương 4

# KỸ THUẬT LÊN MEN

### 4.1 Giới thiệu tổng quát

Từ xa xưa loài người đã biết nấu rượu để uống, biết làm tương, muối dưa, biết ủ chua các thực phẩm để giữ được lâu dài, v.v... Các quá trình đó được gọi là lên men (bảng 4.1).

**Bảng 4.1.** Các sản phẩm lên men phân theo lĩnh vực công nghiệp.

| Lĩnh vực công nghiệp |                           | Hoạt chất                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hoá học              | Hữu cơ<br>(tấn lượng lớn) | Ethanol, aceton, butanol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                      | Hữu cơ<br>(Số lượng ít)   | Acid hữu cơ (citric, itaconic), enzym<br>Các chất dùng cho mỹ phẩm<br>Các polymer (các polysaccharid)                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Dược phẩm            |                           | Các chất kháng sinh, vitamin<br>Các kit chẩn đoán (enzym, kháng thể đơn dòng)<br>Các enzym ức chế, các steroid, các vaccin                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Năng lượng           |                           | Ethanol (gasohol), methan (biogas)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Thực phẩm            |                           | Các sản phẩm từ sữa (phomat, sữa chua, ...)<br>Đồ uống (các loại rượu, trà, cà phê). Men làm nở bánh mì.<br>Các chất phụ gia cho thực phẩm (chất chống oxy hoá, chất màu, chất bảo quản)<br>Các thực phẩm đặc biệt (đậu tương lên men, các loại nước xốt để trộn). Các acid amin, vitamin.<br>Các sản phẩm từ tinh bột<br>Glucose và siro fructose nồng độ cao<br>Các pectin, các protein biến đổi chức năng |
| Nông nghiệp          |                           | Protein đơn bào, các vaccin cho động vật<br>Ủ thức ăn cho gia súc, ủ phân bón<br>Vi sinh vật trừ sâu hại, côn trùng<br>Rhizobium và các vi khuẩn cố định nitơ<br>Lên men mô và tế bào để nhân giống cây trồng, ...                                                                                                                                                                                           |

Chỉ khi công nghệ lên men chìm sản xuất penicilin ra đời (1947) thì công nghệ lên men mới thực sự phát triển và trở thành một ngành khoa học thực sự - *ngành công nghệ lên men*.

Các quá trình lên men truyền thống chủ yếu sản xuất các thực phẩm và đồ uống, hiện tại vẫn còn nguyên giá trị thương mại. Song hiện nay các quá trình đó đã được sản xuất trên qui mô công nghiệp với các thiết bị hiện đại và tự động hoá, nên giá thành sản phẩm hạ đi rất nhiều. Có thể gọi các quá trình lên men đó bằng các tên sau:

- Các chất chuyển hoá bậc một như: acid acetic, acid lactic, glycerol, alcol butylic, acid amin, vitamin và polysaccharid;
- Các chất chuyển hoá bậc hai, là những chất ít đóng vai trò trong chuyển hoá và tạo ra sản phẩm. Nó phụ thuộc nhiều vào thành phần môi trường lên men chúng. Ví dụ như sự hình thành các chất kháng sinh (penicilin, streptomycin), kích tố sinh trưởng cây (giberellin),...
- Các enzym sử dụng trong công nghiệp gồm enzym ngoại bào (amylase, pectinase, protease), các enzym nội bào (invertase, asparaginase, endonuclease, v.v...).

Các quá trình lên men để sản xuất ra các sản phẩm nêu trên hiện nay nó vẫn là những đòi hỏi thiết yếu của xã hội hiện đại. Bên cạnh những sản phẩm đó kỹ thuật sinh học cũng tạo ra những sản phẩm mới rất quan trọng từ tế bào thực vật và động vật. Nuôi cấy tế bào thực vật nhằm mục đích tạo ra các sản phẩm chuyển hoá bậc hai (các tinh dầu, các chất gia vị, các dược liệu). Nuôi cấy tế bào động vật để chế tạo vaccin. Kỹ thuật lên men còn tạo ra các protein có hoạt tính như interferon, interleukin, v.v...

Một số sản phẩm do công nghệ sinh học tạo ra, bằng phương pháp hoá học không thể sản xuất được (bảng 4.2). Có những sản phẩm nếu vi sinh vật sinh tổng hợp thì chỉ cần thực hiện ở nhiệt độ bình thường. Song nếu thực hiện bằng phương pháp hoá học đòi hỏi phải có áp suất đến hàng trăm kg/cm<sup>2</sup>.

Một đặc điểm nữa của kỹ thuật lên men là các sản phẩm khác nhau do vi sinh vật tạo ra đều được thực hiện trong cùng một thiết bị gọi là bình lên men (fermentor). Mỗi vi sinh vật tạo ra một sản phẩm nào đó được nuôi dưỡng ở điều kiện tối ưu (nhiệt độ, pH, thành phần môi trường, v.v...) để chúng tạo ra hoạt chất ta mong muốn.

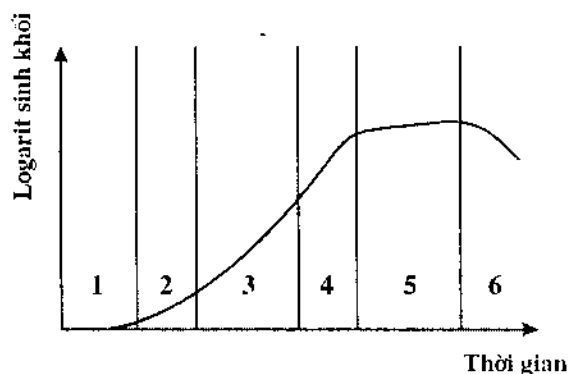
**Bảng 4.2.** Ưu nhược điểm của phương pháp sinh tổng hợp  
(so với phương pháp hoá học)

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ưu điểm</b>    | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Các phân tử phức tạp như protein, kháng sinh không thể tổng hợp bằng hoá học.</li> <li>- Biến đổi sinh học cho năng suất cao hơn</li> <li>- Sinh tổng hợp thực hiện ở nhiệt độ thấp</li> <li>- pH gần trung tính.</li> <li>- Xúc tác phản ứng có nhiều đặc điểm hơn.</li> <li>- Sản phẩm thu được không có đồng phân.</li> </ul> |
| <b>Nhược điểm</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sinh tổng hợp dễ bị nhiễm trùng.</li> <li>- Các sản phẩm mong muốn thường lẫn trong phức hợp, cần phải tách riêng.</li> <li>- Cần xử lý một thể tích môi trường lớn.</li> <li>- Quá trình lên men cần thời gian lâu hơn so với biến đổi hoá học.</li> </ul>                                                                      |

## 4.2 Các giai đoạn phát triển của vi sinh vật

Quá trình sinh trưởng của vi sinh vật diễn ra theo các giai đoạn khác nhau được gọi là các pha phát triển, bao gồm pha tiềm phát, pha logarit, pha cân bằng và pha suy vong (hình 4.1).

1. Pha tiềm phát
2. Pha nhân lên chậm
- 3-4. Pha logarit
5. Pha cân bằng
6. Pha suy vong.



**Hình 4.1.** Đặc điểm phát triển của vi sinh vật trong lên men chu kỳ.

Khi nghiên cứu quá trình sinh trưởng của vi sinh vật trong bình lên men, người ta chú ý trước hết đến các quá trình trong đó sản phẩm mong muốn là một sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật. Có hai loại chất trao đổi chủ yếu được gọi là sản phẩm bậc một và sản phẩm bậc hai. Một chất trao đổi bậc một là một chất được tạo thành trong pha sinh trưởng đầu tiên của vi sinh vật, trong khi một chất trao đổi bậc hai là một chất được tạo

thành gần vào lúc kết thúc quá trình sinh trưởng, thường vào gần hoặc vào chính pha cân bằng.

Nghiên cứu quá trình sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật trong bình lên men để điều khiển quá trình sao cho vi sinh vật phát triển tốt nhất và tạo ra được tối đa sản phẩm mà ta mong muốn. Để theo dõi sự phát triển của vi sinh vật trong bình lên men thường tiến hành phân tích một số chỉ tiêu cơ bản như trọng lượng sinh khối trong một đơn vị thể tích, hàm lượng protein hoặc ADN trong tế bào, số lượng tế bào trong đơn vị thể tích. Sự tăng sinh khối trong một đơn vị thể tích bao hàm sự tăng về số lượng tế bào và sự tăng về kích thước mỗi tế bào.

Thời gian trung bình để tăng gấp đôi tế bào đối với các vi sinh vật như sau:

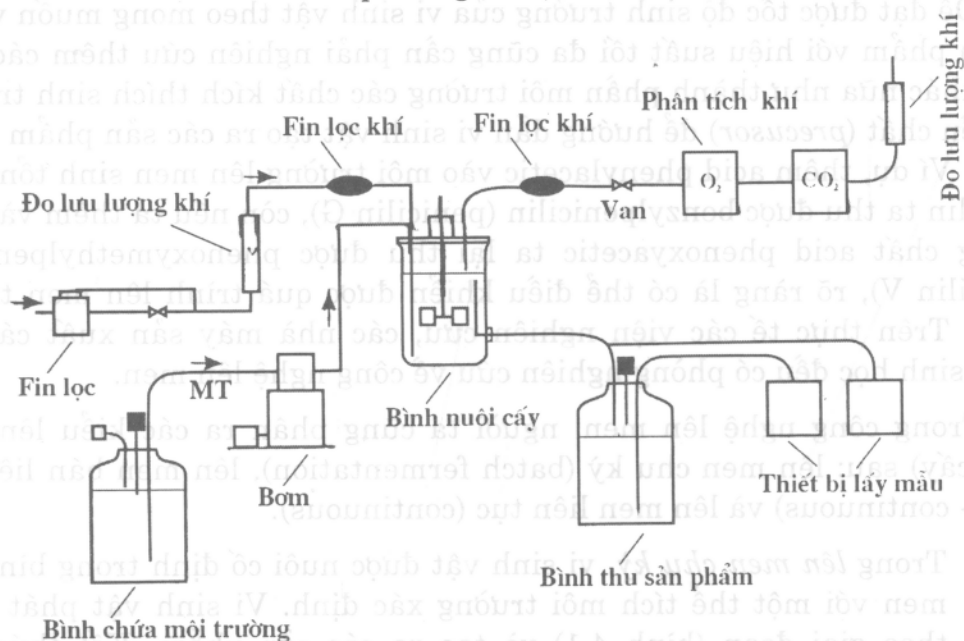
- Vi khuẩn : 0.25 - 1 giờ
- Nấm men : 1-2 giờ
- Nấm mốc : 2 - 6.5 giờ
- Tế bào thực vật : 20 - 70 giờ
- Tế bào động vật : 15 - 48 giờ.

Để đạt được tốc độ sinh trưởng của vi sinh vật theo mong muốn và tạo ra sản phẩm với hiệu suất tối đa cũng cần phải nghiên cứu thêm các điều kiện khác nữa như thành phần môi trường các chất kích thích sinh trưởng, các tiền chất (*precursor*) để hướng dẫn vi sinh vật tạo ra các sản phẩm mong muốn. Ví dụ, thêm acid phenylacetic vào môi trường lên men sinh tổng hợp penicilin ta thu được benzylpenicilin (penicilin G), còn nếu ta thêm vào môi trường chất acid phenoxyacetic ta lại thu được phenoxymethylpenicilin (penicilin V), rõ ràng là có thể điều khiển được quá trình lên men theo ý muốn. Trên thực tế các viện nghiên cứu, các nhà máy sản xuất các chế phẩm sinh học đều có phòng nghiên cứu về công nghệ lên men.

Trong công nghệ lên men, người ta cũng phân ra các kiểu lên men (nuôi cấy) sau: lên men chu kỳ (batch fermentation), lên men bán liên tục (semi - continuous) và lên men liên tục (continuous).

- Trong *lên men chu kỳ*, vi sinh vật được nuôi cố định trong bình lên men với một thể tích môi trường xác định. Vi sinh vật phát triển theo giai đoạn (hình 4.1) và tạo ra các sản phẩm. Kết thúc quá trình, người ta tiến hành các công đoạn cần thiết để thu lấy sản phẩm. Phương pháp lên men chu kỳ được ứng dụng để sản xuất nhiều hoạt chất quan trọng như acid amin, các chất kháng sinh.

- *Lên men chu kỳ có cải tiến* cũng được áp dụng nhằm nâng cao hiệu quả sử dụng bình lên men. Ví dụ nuôi các nấm men để thu sinh khối tế bào, nhằm thu được năng suất cao trong một đơn vị thể tích nuôi cấy, trong quá trình nuôi thường bổ sung thêm dinh dưỡng (carbohydrat) và các yếu tố cần thiết khác nhằm làm cho mật độ tế bào trong bình tăng lên.
- *Lên men bán liên tục* là quá trình lên men vi sinh vật trong điều kiện xác định khi vi sinh vật phát triển trong một thời gian đủ để tạo ra nồng độ sinh khối cần thiết người ta lấy bớt đi một thể tích môi trường bao gồm cả sinh khối, đồng thời bổ sung thêm một thể tích môi trường mới bằng chính lượng môi trường đã lấy đi. Bằng cách làm như vậy chỉ cần truyền giống một lần vẫn có thể thu hoạch sản phẩm nhiều lần.
- *Lên men liên tục* là quá trình nuôi vi sinh vật trong thiết bị được cấu tạo đặc biệt để sao cho khi vật nuôi đã phát triển đến một giai đoạn nào đó thích hợp cho việc lấy đi một thể tích môi trường lên men cùng tế bào và các sản phẩm trao đổi chất của chúng, lại bổ sung đúng một thể tích môi trường dinh dưỡng mới vào bình nuôi cấy, lúc đó ta có được trạng thái cân bằng động. Vi sinh vật trong bình nuôi luôn luôn ở pha logarit (hình 4.2).



**Hình 4.2.** Sơ đồ đơn giản mô tả nguyên tắc lên men liên tục

Phương pháp lên men liên tục được ứng dụng để sản xuất protein đơn bào (nấm men) sản xuất acid acetic, ethanol và xử lý nước thải của một số

nhà máy. Tuy nhiên do nhiều nguyên nhân nên phương pháp lên men chu kỳ vẫn hay được ứng dụng hơn (bảng 4.3).

**Bảng 4.3.** Ưu điểm của kỹ thuật lên men chu kỳ và chu kỳ có bổ sung môi trường.

|                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| - Cung cấp sản phẩm theo yêu cầu với số lượng nhỏ ở bất kỳ thời gian nào, hoặc đôi khi có yêu cầu. |
| - Vòng đời của sản phẩm ngắn.                                                                      |
| - Sản xuất với nồng độ cao trong dịch lên men yêu cầu quá trình thao tác phải tối ưu.              |
| - Một vài sản phẩm chuyển hoá được tạo ra chỉ ở pha cân bằng của chu kỳ phát triển.                |
| - Tính không ổn định của một vài chủng sản xuất cần lưu ý thường xuyên phải chọn lọc.              |
| - Quá trình lên men liên tục đòi hỏi kỹ thuật phức tạp.                                            |

**\* Đặc điểm của các phương pháp lên men vi sinh vật.**

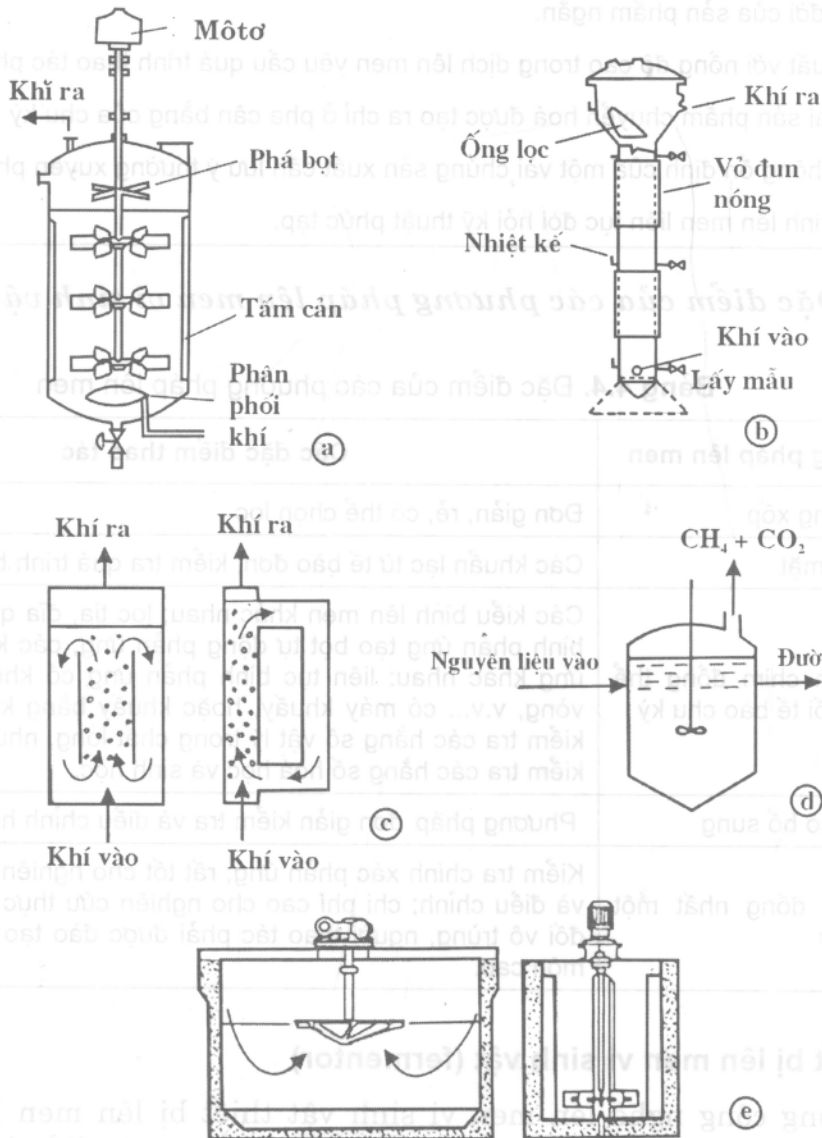
**Bảng 4.4.** Đặc điểm của các phương pháp lên men

| Phương pháp lên men                           | Các đặc điểm thao tác                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Môi trường xốp                                | Đơn giản, rẻ, có thể chọn lọc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Nuôi bề mặt                                   | Các khuẩn lạc từ tế bào đơn; kiểm tra quá trình bị giới hạn                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Lên men chìm đồng thể phân phối tế bào chu kỳ | Các kiểu bình lên men khác nhau; lọc tia, đĩa quay, ống quay bình phản ứng tạo bọt tự động phản ứng, các kiểu bình phản ứng khác nhau: liên tục bình phản ứng có khuấy, bình elip, vòng, v.v... có máy khuấy, hoặc khuấy bằng khí nén, có thể kiểm tra các hằng số vật lý trong chất lỏng, nhưng chủ yếu là kiểm tra các hằng số hoá học và sinh học. |
| Chu kỳ có bổ sung                             | Phương pháp đơn giản kiểm tra và điều chỉnh hiệu quả.                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Liên tục đồng nhất một giai đoạn              | Kiểm tra chính xác phản ứng; rất tốt cho nghiên cứu động học và điều chỉnh; chi phí cao cho nghiên cứu thực nghiệm, tuyệt đối vô trùng, người thao tác phải được đào tạo và có chuyên môn cao.                                                                                                                                                        |

### 4.3 Thiết bị lên men vi sinh vật (fermentor)

Trong công nghệ lên men vi sinh vật thiết bị lên men là vấn đề vô cùng quan trọng. Vi sinh vật sống và phát triển trong điều kiện vô trùng tuyệt đối, phải cung cấp đủ oxy hoà tan trong môi trường cho vi sinh vật hô hấp. Thiết bị khuấy trộn có cấu tạo đặc biệt vì vừa phải hoà tan oxy vào môi trường, vừa phải khuấy trộn một hỗn hợp các tế bào sống đặc quánh không tan trong nước, lại làm việc liên tục trong thời gian dài (thường từ 4-7 ngày). Thiết bị lên men cần có bộ phận trao đổi nhiệt hữu hiệu, vì đa số vi sinh vật sống và phát triển ở nhiệt độ từ 26<sup>0</sup>- 30<sup>0</sup>C. Kể từ khi penicilin

được sản xuất bằng phương pháp lên men chìm (1947), cho đến nay thiết bị lên men đã được cải tiến và hoàn thiện rất nhiều. Về nguyên lý chung đó là ống hình trụ chế tạo bằng thép không rỉ có thể tích khác nhau từ 5-10 lít dùng trong phòng thí nghiệm, 50-500 lít ở qui mô thử nghiệm (pilot), 50.000-150.000 lít dùng lên men tạo kháng sinh, 300.000 - 500.000 lít dùng lên men sản xuất acid amin (hình 4.3).



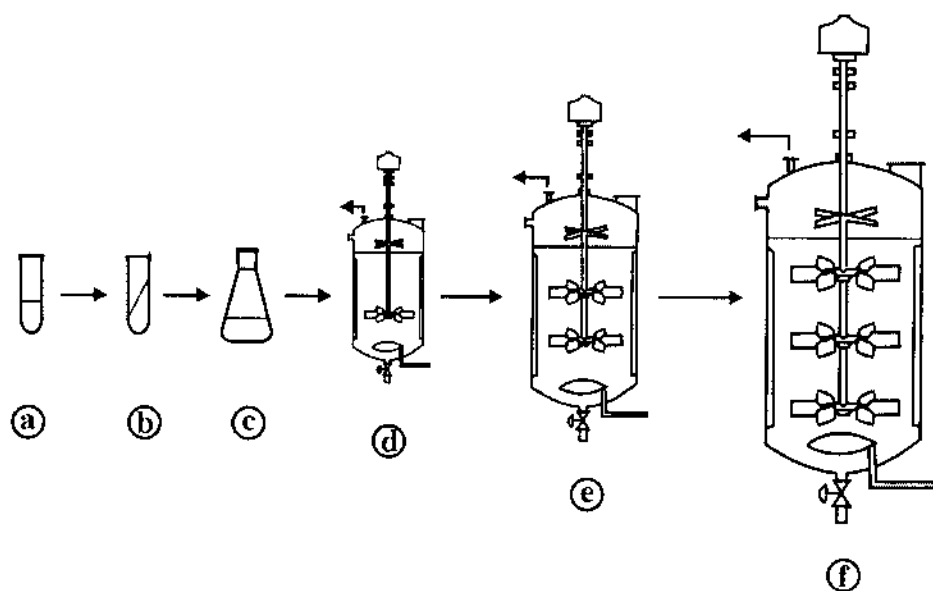
**Hình 4.3. Các dạng thiết bị lên men vi sinh vật.**

- a) Thiết bị lên men có khuấy liên tục.
- b) Thiết bị lên men hình tháp.
- c) Thiết bị lên men kiểu vòng (loop).
- d) Thiết bị lên men kỵ khí.
- e) Bình lên men tạo methan từ nước cống, phân gia súc.

Các thiết bị lên men hiện nay được chế tạo theo kiểu dáng không khác trước. Song nó được gắn các điện cực để đo pH, nhiệt độ, oxy hoà tan, điện cực dò bọt và các bộ cảm biến (sensor) được khuếch đại và gắn với các máy phân tích tự động các thành phần môi trường, rồi lại tự động điều chỉnh mở các van điện từ bổ sung các chất cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật. Nhờ quá trình tự động hoá và máy tính cài đặt sẵn chương trình điều khiển nên công nghệ lên men đã trở thành một ngành công nghệ vừa hiện đại vừa có sức hấp dẫn những ai đang làm việc trong lĩnh vực này.

#### 4.4. Trình tự quá trình lên men

Để chuẩn bị cho lên men ở qui mô công nghiệp, trước tiên giống được chọn lọc trên hộp petri, lấy một khuẩn lạc nuôi trên thạch nghiêng rồi nuôi cho phát triển ở nhiệt độ thích hợp, tiếp sau chuyển vào bình tam giác (erlanmayer) nuôi trên máy lắc để cho vi sinh vật tiếp tục phát triển. Các bước tiếp sau đó giống được nuôi trong các bình lên men có khuấy trộn từ thể tích nhỏ đến thể tích lớn hơn (2 cấp). Giống nuôi trên bình nhân giống cấp hai được kiểm tra cẩn thận về tất cả các tiêu chuẩn cần thiết, nếu đạt yêu cầu mới chuyển vào thiết bị lên men nuôi tiếp để thu sản phẩm (hình 4.4).



**Hình 4.4.** Sơ đồ quá trình chuẩn bị giống để lên men.

- a. Ống giống
- b. Giống nuôi trên thạch nghiêng
- c. Giống nuôi trên máy lắc
- d. Bình nhân giống cấp 1
- e. Bình nhân giống cấp 2
- f. Bình lên men tạo sản phẩm.

#### 4.5. Thiết kế môi trường cho quá trình lên men

Nước là thành phần chính là trung tâm của mọi quá trình sinh học. Các thành phần dinh dưỡng môi trường đều hoà tan vào nước, từ đó các vi sinh vật mới có thể hấp thu và đường hoá để phát triển. Sau khi quá trình lên men kết thúc việc loại bỏ nước để tinh chế thu sản phẩm là một vấn đề khá phức tạp. Chi phí cho công đoạn này chiếm phần lớn giá thành sản phẩm. Trong công nghệ lên men sử dụng khá nhiều các nguyên liệu dạng thô có thể coi nước cũng là nguyên liệu thô. Trong các quá trình lên men, vi sinh vật cần nhiều năng lượng. Nguồn cung cấp năng lượng đó thường sử dụng carbohydrat. Nguồn nitơ để xây dựng nên các thành phần của cơ thể, trong đó có dạng nitơ vô cơ và nitơ hữu cơ, các nguyên tố vô cơ (bảng 4.5).

**Bảng 4.5.** Nguồn carbohydrat và nitơ dùng cho công nghệ lên men.

| Nguồn carbohydrat | Dạng dùng                                                  | Nguồn nitơ (% nitơ/ trọng lượng)                                                |
|-------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Glucose           | Monohydrat tinh khiết, tinh bột thuỷ phân                  | Lúa mạch (1.5-2.0)                                                              |
| Lactose           | Lactose tinh khiết, bột sữa                                | Mật rỉ củ cải đường (1.5-2.0)                                                   |
| Tinh bột          | Lúa mạch, bột lạc, yến mạch, bột gạo, bột đậu tương        | Cao ngô (4.5)<br>Bột lạc (8.0)<br>Bột yến mạch (1.5-2.0)<br>Bột đậu tương (8.0) |
| Saccharose        | Mật rỉ củ cải đường, đường thô, mật, đường kính tinh khiết | Bột sữa (4.5)                                                                   |

Trong một vài trường hợp còn cần các nhân tố phát triển hoặc các tiền chất để điều khiển vi sinh vật tạo ra các chất mà ta yêu cầu. Ví dụ lên men sinh tổng hợp vitamin B<sub>12</sub> nhờ vi khuẩn *Propioni bacterium shermanii* cần bổ sung vào môi trường chất 5, 6 dimethylbenzimidazol để tạo ra phân tử vitamin B<sub>12</sub> thật, và hiệu suất cũng cao hơn. Các nhân tố phát triển hay các tiền chất chỉ cần với số lượng nhỏ mcg/L, thiếu nó quá trình sinh tổng hợp sẽ thất bại.

Môi trường nuôi vi sinh vật cần được khử trùng để loại đi tất cả các vi sinh vật tạp nhiễm lẫn trong nguyên liệu. Công đoạn khử trùng môi trường cũng rất quan trọng. Vì nếu còn lại những cá thể vi sinh vật lạ chưa bị tiêu diệt, chúng sẽ tiếp tục phát triển cùng với vi sinh vật nuôi cấy làm hỏng quá trình lên men. Thường gọi đây là sự nhiễm trùng. Trong những năm 50 của thế kỷ XX công nghệ lên men cho phép nhiễm trùng 10%, vì khi đó kỹ thuật lên men mới bắt đầu phát triển. Vấn đề khử trùng môi trường và lọc không khí để đạt được tuyệt đối vô trùng là điều cực kỳ khó khăn. Từ

những năm 70 của thế kỷ XX công nghệ lên men không cho phép được nhiễm trùng. Quá trình lên men nếu bị nhiễm trùng phải đổ đi sẽ làm thiệt hại to lớn về kinh tế và quá trình lên men có thành công hay không phụ thuộc chính vào chất lượng môi trường dinh dưỡng.

#### 4.6. Lên men trên cơ chất rắn

Trên thực tế quá trình lên men trên cơ chất rắn (xốp) cũng được ứng dụng rộng rãi từ lâu đời. Nuôi nấm mốc *A. oryzae*, *A. niger*, v.v... trên cơm gạo hay ngô để làm tương theo phương pháp truyền thống hay công nghiệp. Nuôi các nấm mốc trên cám và trấu để tạo amylase dùng trong công nghiệp lên men rượu, trồng nấm trên cơ chất là rơm, rạ, mùn cưa bông thải loại, v.v... và nhiều thí dụ khác nữa. Lên men trên cơ chất rắn có ưu điểm là dễ thực hiện, không đòi hỏi thiết bị đắt tiền, điều kiện vô trùng cũng không cần tuyệt đối do đó người thao tác cũng không cần có trình độ cao. Thường gọi công nghệ lên men trên cơ chất rắn là công nghệ gia đình, công nghệ lên men truyền thống. Chính công nghệ này đã bổ sung được rất nhiều sản phẩm quý hiếm, đặc biệt là những thực phẩm lên men cần số lượng ít giàu dinh dưỡng trong khi công nghệ lên men chìm không thể thực hiện được (bảng 4.6).

**Bảng 4.6.** Một vài ví dụ lên men trên cơ chất rắn

| Ví dụ                                 | Cơ chất                      | Vi sinh vật sử dụng                                                               |
|---------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Trồng nấm<br>(châu Âu và phương đông) | Rơm, phân                    | <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Lentinula edodes</i> , <i>Volvariella volvaceae</i> |
| Dưa cải bắp                           | Cải bắp                      | Vi khuẩn <i>lactic</i>                                                            |
| Tương                                 | Đậu tương và gạo             | <i>Rhizopus oligosporus</i>                                                       |
| Chao                                  | Đậu tương                    | <i>Rhizopus oligosporus</i>                                                       |
| Phomat                                | Bột sữa                      | <i>Penicillium roquefortii</i>                                                    |
| Acid hữu cơ                           | Rỉ đường                     | <i>Aspergillus niger</i>                                                          |
| Các enzym                             | Cám gạo, mì                  | <i>Aspergillus niger</i>                                                          |
| Phân trộn                             | Hỗn hợp các chất hữu cơ      | Nấm mốc, vi khuẩn, xạ khuẩn                                                       |
| Xử lý nước thải                       | Các thành phần của nước thải | Vi khuẩn, nấm mốc và protozoa                                                     |

Các nước phương tây thường áp dụng phương pháp lên men này để trồng nấm, sản xuất phomat. Một ưu điểm nữa của kỹ thuật lên men trên cơ chất rắn là có thể lên men cùng một lúc một hoặc hai, ba vi sinh vật trên cơ chất đó mà không gọi là nhiễm trùng. Một vi sinh vật tạo ra sản phẩm lên men chính, vi sinh vật thứ hai có thể tạo ra hương vị, v.v... làm cho sản phẩm lên men thêm hấp dẫn và giá trị. Nấu rượu bằng bánh men thuốc bắc là ví dụ điển hình.

Người ta cũng chế tạo ra các thiết bị để lên men các cơ chất rắn, tuy nhiên cấu tạo của nó đơn giản hơn nhiều so với thiết bị lên men chìm (hình 4.3).

#### **4.7. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật và thực vật**

Các phần trên đã mô tả các quá trình kỹ thuật lên men vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc). Trong những năm gần đây kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật và thực vật đã được đẩy mạnh nghiên cứu và có nhiều ứng dụng trong thực tế. Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật để chuyển vi sinh vật vào một loại cây trồng nào đó bằng kỹ thuật di truyền sẽ đề cập đến ở một chương riêng. Ở đây ta chỉ xem xét đến khả năng nuôi cấy tế bào thực vật thuần túy trong các bình lên men để thu sản phẩm, giống như nuôi cấy vi sinh vật. Trên thực tế người ta cũng đã thu được những kết quả gây ấn tượng và có thể chấp nhận được nếu như tiến hành trên đối tượng những cây có giá trị kinh tế cao như cây dương địa hoàng (*digitalis*), nhài (*jasmine*), lưu lan hương (*spearmint*).

Nuôi cấy tế bào thực vật bằng phương pháp nuôi cấy chìm có khuấy trộn về nguyên tắc cũng giống như lên men vi sinh vật. Tuy nhiên mức độ cung cấp không khí và tốc độ khuấy ở đây thấp hơn nhiều so với nuôi cấy vi sinh vật. Tuy đã có những sản phẩm do nuôi cấy tế bào thực vật trên thị trường nhưng người ta cũng ít hy vọng là nó sẽ có những sản phẩm hàng hoá cạnh tranh trên thị trường trong tương lai. Nuôi cấy mô tế bào thực vật được áp dụng để nhân giống vô tính, sạch bệnh cung cấp giống cây trồng. Nuôi cấy tế bào và mô động vật trong vài chục năm trở lại đây cũng phát triển rộng rãi do áp dụng kỹ thuật di truyền. Hàng loạt tế bào và mô đã được nuôi cấy nhân tạo như: tế bào tuỷ xương, sụn, gan, phổi, vú, da, ruột, thận, thần kinh, tuyến yên và nhiều loại tế bào ung thư khác. Sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào trên qui mô công nghiệp để sản xuất ra những chế phẩm sinh học có giá trị cao dùng trong y học như các vaccin (bại liệt, sởi, quai bị, dại, v.v...), interferon, các hormon, insulin, plasminogen và các kháng thể. Vấn đề khó khăn chính trong kỹ thuật nuôi cấy tế bào là tế bào nuôi rất nhạy cảm với những vi sinh vật nhiễm trong môi trường. Do đó nuôi cấy tế bào phải thực hiện ở điều kiện vô trùng tuyệt đối. Khi tách lấy một tế bào từ một cơ quan của động vật đã biết gọi là tế

bào gốc (tế bào mầm) chuẩn bị cho nuôi cấy tiếp sau, ở giai đoạn này các tế bào thường không đồng nhất, sau đó phải tìm ra được tế bào đại diện cho tế bào kiểu cha mẹ biểu hiện những đặc điểm của mô học. Sau một vài lần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, dòng tế bào chọn được chẳng những không chết mà chuyển thành dòng tế bào liên tục. So sánh với dòng tế bào nuôi cấy ban đầu thì thấy rõ chúng đã có những thay đổi trong hình thái của tế bào chất, tế bào phát triển nhanh hơn, tăng thêm một số đặc điểm ở nhiễm sắc thể. Tế bào động vật không những phát triển khi nuôi cấy ở dạng nhũ dịch mà còn mọc được trên bề mặt môi trường đặc. Các tế bào như kiểu HeLa (các tế bào đã biến đổi từ một tế bào u ác ở người) cũng có thể phát triển trong môi trường nuôi cấy huyền dịch, trong khi đó các tế bào gốc hoặc tế bào diploid bình thường chỉ mọc trên bề mặt môi trường đặc. Nuôi cấy bề mặt các tế bào động vật bị ảnh hưởng bởi diện tích bề mặt mà tế bào tiếp xúc, do vậy phải tạo ra các thiết bị nuôi sao cho bề mặt tiếp xúc của tế bào đạt được tối đa. Có nhiều kiểu bình nuôi được thiết kế theo các hình dáng khác nhau như dạng ống, hoặc chai bệt cốt để cho mặt thoáng rộng để tế bào dễ dàng hô hấp.

Nuôi cấy dạng huyền dịch có thể tiến hành trong các bình lên men như nuôi vi sinh vật. Gần đây còn kết hợp nuôi cấy dạng huyền dịch có bề mặt tiếp xúc rộng bằng cách nuôi tế bào trên những hạt mang tế bào dạng đặc biệt giống như Sephadex - DEAE. Các hạt này có diện tích bề mặt  $7\text{cm}^2/\text{mg}$  và nổi trên huyền dịch. Bằng các kỹ thuật nuôi cấy tế bào người ta đã sản xuất thành công những dược phẩm quan trọng kháng virus và ung thư.

#### **4.8. Quá trình tinh chế để thu sản phẩm**

Sau khi kết thúc *công đoạn nuôi cấy* vi sinh vật hoặc tế bào động vật, phải tìm cách chiết xuất lấy hoạt chất và tinh chế sản phẩm đạt được các tiêu chuẩn cần thiết theo qui định dùng điều trị. Quá trình này gọi là quá trình xuôi dòng (downstream processing), tùy theo sản phẩm chứa trong môi trường nuôi cấy mà chọn phương pháp xử lý thích hợp.

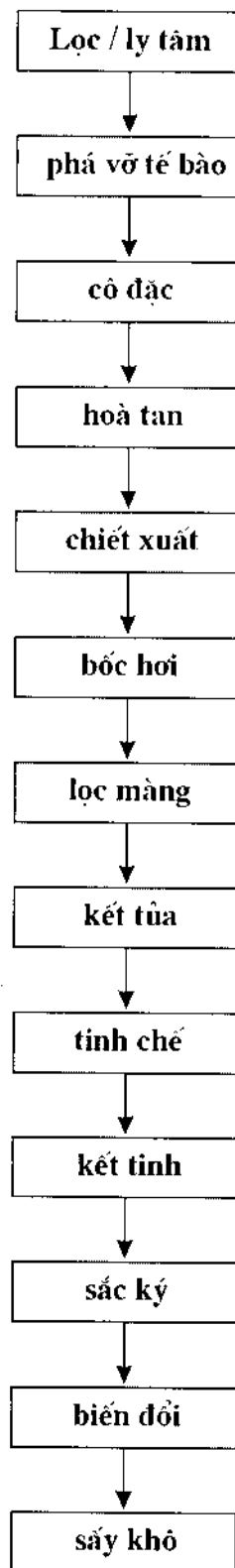
*Công đoạn tinh chế* sản phẩm đòi hỏi nhiều nhân công, những nhân công này phải có kiến thức và kỹ năng cao về chuyên môn. Thường sử dụng các cán bộ hoá sinh, hoá học, ví dụ ở nhà máy Eli Lilly sản xuất insulin người, có 200 cán bộ thì hơn 90% số người này làm việc ở công đoạn tinh chế sản phẩm.

*Công đoạn chiết xuất* để thu sản phẩm còn quan trọng hơn công đoạn nuôi cấy bởi vì các sản phẩm thuộc nhóm này thường rất không bền vững, hàm lượng chứa trong môi trường nuôi cấy hoặc trong tế bào thường rất thấp (0.1 - 3.0%). Do đó chiết để lấy ra được là vô cùng khó khăn. Công đoạn tinh chế sản phẩm còn quyết định tới giá thành của sản phẩm. Ví dụ

công nghệ lên men sản xuất penicilin, những năm 60 của thế kỷ XX chiết xuất chỉ lấy ra được 60% hiệu suất lên men. Hiện nay do cải tiến kỹ thuật đã có thể chiết ra được 90% hiệu suất lên men.

Các phương pháp sử dụng bao gồm: lọc, ly tâm, chiết bằng dung môi, bốc hơi chân không, hấp phụ, điện di, thẩm tích, lọc màng chọn lọc, ...

Công đoạn chiết xuất và tinh chế sản phẩm bao gồm nhiều bước (sơ đồ 4.1).



Sơ đồ 4.1. Các công đoạn tinh chế sản phẩm

## Chương 5

# KỸ THUẬT SẢN XUẤT ENZYM

### 5.1. Đại cương

Enzym là những phân tử protein phức tạp tồn tại trong các tế bào sống, tại đó chúng đóng vai trò xúc tác sinh học làm biến đổi hoá học các cơ chất. Do sự phát triển của hoá sinh phân tử người ta đã hiểu biết khá rõ vai trò của các enzym trong tế bào sống. Cho dù enzym được hình thành trong tế bào sống, nhưng nếu tách rời enzym ra khỏi tế bào nó vẫn thực hiện được chức năng xúc tác sinh học invitro. Nhờ tính chất kỳ diệu đó đã làm tăng khả năng sử dụng enzym trong các quá trình công nghiệp (bảng 5.1).

**Bảng 5.1.** Sản lượng một vài enzym công nghiệp trên thế giới.

| Enzym               | Sản lượng (tấn) |
|---------------------|-----------------|
| Protease (Bacillus) | 550             |
| Amyloglucosidase    | 350             |
| Amylase (Bacillus)  | 350             |
| Glucose isomerase   | 60              |
| Rennet vi khuẩn     | 25              |
| Amylase (nấm mốc)   | 20              |
| Pectinase           | 20              |
| Protease (nấm mốc)  | 15              |

Hoạt tính của enzym là đặc điểm xúc tác tự nhiên của nó. Mỗi enzym thực hiện xúc tác cho một phản ứng, trong tế bào sống có hàng loạt enzym khác nhau để thực hiện một chuỗi phản ứng liên tục như các enzym trong mạch hô hấp tế bào. Các phản ứng xúc tác của enzym được thực hiện ở nhiệt độ bình thường, cũng phản ứng ấy nếu thực hiện bằng hoá học đòi hỏi ở nhiệt độ và áp suất cao. Khả năng phân giải của enzym cũng thật kỳ diệu, ví dụ 1gram vi khuẩn lactic có thể biến đổi một tấn lactose thành acid lactic trong vòng 1giờ. Enzym tách khỏi tế bào dưới dạng tinh khiết có thể thực hiện phản ứng xúc tác biến đổi cơ chất nhiều lần với kỹ thuật đặc biệt có thể kéo dài thời gian sử dụng enzym đến 6 tháng. Chức năng xúc tác của enzym còn phụ thuộc vào cấu hình không gian của chúng, chỉ cần làm thay đổi cấu hình không gian bằng pH hay nhiệt độ là enzym bị bất hoạt. Một

vài enzym có gắn thêm coenzym, các coenzym này có thể là các ion kim loại, các nucleotid, các vitamin, v.v...

Do cấu trúc khác nhau nên các enzym có thể thực hiện các phản ứng xúc tác ở nhiệt độ (0-11°C) và ở pH từ 2-14. Enzym không độc, sản xuất enzym không đòi hỏi các thiết bị chống ăn mòn như trong công nghệ hoá học. Kỹ thuật enzym bao gồm nuôi cấy vi sinh vật, chiết xuất, tinh chế rồi sử dụng enzym ở dạng hoà tan hoặc dạng enzym bất động. Enzym được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau của đời sống hàng ngày, trong các lĩnh vực nghiên cứu khoa học, dùng trong y học và bảo vệ môi trường.

## 5.2. Các ứng dụng của enzym

Hàng ngàn năm trước đây loài người đã biết ủ chua để giữ thực phẩm được lâu hơn, biết làm bánh mì, phomat, làm tương, nấu rượu và làm vang từ quả nho (bảng 5.2). Hai trường ca nổi tiếng cổ Hy Lạp là Iliad và Odysei (khoảng 700 năm trước công nguyên) cũng nói tới cách làm phomat, chế rượu nho nhưng chẳng ai biết được “thủ phạm” của quá trình đó là enzym vi sinh vật.

**Bảng 5.2.** Các enzym vi sinh vật và ứng dụng của chúng.

| Enzym                            | Vi sinh vật | Ứng dụng                | Công nghiệp    |
|----------------------------------|-------------|-------------------------|----------------|
| Amylase (phân giải tinh bột)     | Nấm mốc     | Bánh mì                 | Bánh mì        |
|                                  | Vi khuẩn    | Bao bột                 | Giấy           |
|                                  | Nấm mốc     | Sản xuất glucose        | Thực phẩm      |
|                                  | Vi khuẩn    | Hồ hoá vải              | Tinh bột       |
|                                  | Nấm mốc     | Trợ giúp tiêu hoá       | Dược phẩm      |
|                                  | Vi khuẩn    | Rũ hồ vải               | Dệt            |
|                                  | Vi khuẩn    | Tẩy vết bẩn             | Giặt là        |
| Protease (phân giải protein)     | Nấm mốc     | Bánh mì                 | Bánh mì        |
|                                  | Vi khuẩn    | Tẩy vết bẩn             | Giặt khô       |
|                                  | Vi khuẩn    | Làm mềm thịt            | Thịt           |
|                                  | Vi khuẩn    | Làm sạch vết thương     | Y học          |
|                                  | Vi khuẩn    | Xử lý sợi               | Dệt            |
|                                  | Vi khuẩn    | Ở gia đình              | Giặt là        |
| Invertase (thủy phân saccharose) | Nấm men     | Kẹo xốp có nhân         | Kẹo xốp        |
| Glucose oxidase                  | Nấm mốc     | Loại bỏ glucose         | Thực phẩm      |
|                                  |             | Kít giấy thủ tiểu đường | Dược phẩm      |
| Glucose isomerase                | Vi khuẩn    | Siro fructose từ ngô    | Đồ uống nhẹ    |
| Pectinase                        | Nấm mốc     | Lọc làm trong           | Vang, nước quả |
| Rennin                           | Nấm mốc     | Đông tụ sữa             | Phomat         |
| Cellulase                        | Vi khuẩn    | Tẩy rửa                 | Giặt là        |

Ở các nước phương tây công nghiệp enzym được hiểu biết chỉ xung quanh vấn đề nấm men và malt, nghề truyền thống của họ xem như chỉ có công nghiệp làm bánh mì là phát triển. Do đó ở nhiều nước phát triển hoá sinh tập trung vào lên men sản xuất men cho công nghiệp làm bánh mì và biến đổi tinh bột thành đường. Trái lại các nước phương Đông chú ý nhiều đến chế biến thực phẩm bằng lên men. Họ sử dụng các nấm ăn làm nguồn enzym. Năm 1896 ở các nước phương Tây có giới thiệu bán enzym đầu tiên từ vi sinh vật là takadiastase từ *Aspergillus oryzae*, đó là enzym thủy phân. Phương pháp sản xuất enzym này đã được bắt đầu hàng ngàn năm trước ở châu Á. Otto Rohm nhà hoá học nổi tiếng người Đức đã tách được protease đầu tiên từ phân chó, sau đó đã tiến hành chiết enzym này từ các tạng của động vật.

Năm 1905 người ta đã tách được pancrease từ gan bò và lợn. Vào giữa những năm 1950 kỹ thuật enzym phát triển nhanh chóng. Do công nghệ lên men chìm sản xuất penicilin đòi hỏi những hiểu biết mới để lên men ở qui mô lớn vì sinh vật sản xuất enzym, người ta đặc biệt chú trọng đến enzym từ vi sinh vật vì các lý do sau:

- Sự hiểu biết cơ bản về các đặc điểm của enzym đã dẫn đến việc sử dụng rộng rãi enzym vào các lĩnh vực khác nhau của đời sống.
- Hầu hết các enzym ứng dụng trong công nghiệp đều do vi sinh vật tạo ra.

Lên men vi sinh vật ở qui mô công nghiệp để thu lấy enzym nhận thấy vi sinh vật tiết các enzym vào môi trường để phân giải cơ chất đồng hoá thức ăn từ môi trường, enzym còn dư thừa trong môi trường được nghiên cứu để thu hồi. Nồng độ enzym tạo ra trong môi trường thường rất thấp (1-2%), việc chiết tách để thu enzym dưới dạng tinh khiết cũng rất khó khăn, nhất là các enzym có yêu cầu tinh khiết cao dùng trong y học. Ví dụ 1gram enzym tinh khiết giá vài trăm USD, trái lại enzym dạng thô hoạt lực 1% giá chỉ có 1USD/kg. Thường sử dụng enzym dạng thô cho công nghệ chế biến thực phẩm, làm trong bia, nước quả, v.v... Phần lớn enzym sử dụng trong công nghiệp đều là những enzym ngoại bào, một số enzym khác cũng được sản xuất công nghiệp, nhưng lại là enzym nội bào. Ví dụ glucose oxydase dùng bảo quản thực phẩm, asparaginase dùng điều trị ung thư máu, penicilinamidase (penicilinacylase) dùng để sản xuất 6-APA từ penicilin làm nguyên liệu bán tổng hợp kháng sinh nhóm betalactam. Nghiên cứu các enzym nội bào vẫn còn là vấn đề hấp dẫn nhằm tìm ra các enzym đặc hiệu dùng trong chẩn đoán và điều trị. Việc phát hiện ra tính chất tẩy rửa của enzym đã làm cho công nghệ này phát triển nhanh chóng trong những năm gần đây, nó làm giảm bớt đi lao động đơn giản, giảm đi sự ô nhiễm môi trường. Các nước Tây Âu thường giặt quần áo bằng nước nóng (65-70°C) để quần áo được sạch, trong khi đó ở Mỹ và Canada thường giặt ở 55°C. Ngược lại ở Nhật Bản lại giặt ở nhiệt độ bình thường nhưng

thời gian giặt kéo dài hơn. Nói chung đa số dân chúng ưa thích bột giặt sử dụng ở nhiệt độ bình thường (20-30°C).

Do kỹ thuật sản xuất enzym ngày càng được cải tiến, nên giá thành liên tục giảm đi trong những năm qua. Theo thống kê của phòng thương mại công nghiệp Mỹ thì doanh thu enzym trên toàn thế giới khoảng 750 - 850 triệu USD. 80% doanh số này thuộc vào 3 enzym sau đây: biến đổi tinh bột 40%, tẩy rửa 30 %, chế biến sữa 10 %.

Trong những năm gần đây, kỹ thuật tái tổ hợp ADN ngày càng có nhiều ứng dụng, những vi sinh vật được biến đổi gen có năng suất tạo enzym cao hơn, cùng với kỹ thuật lên men và thu hồi sản phẩm ngày càng hoàn thiện nên giá thành enzym liên tục giảm. Những enzym dùng trong y học làm kit chẩn đoán hay điều trị một số bệnh hiểm nghèo số lượng dùng rất nhỏ (mg hoặc mcg) nhưng giá cực kỳ đắt (100.000 USD/kg). Đặc biệt, kỹ thuật bất động enzym ra đời đã làm cho các quá trình sản xuất tự động hoá nên hiệu quả sử dụng enzym rất cao. Kỹ thuật bất động enzym có thể coi như những vi chip điện tử trong máy tính, làm cho công nghệ enzym trở thành một ngành khoa học hấp dẫn và hiệu quả. Chỉ cần 1kg penicilinamidase bất động trên mạng polyacriamid có thể sản xuất được 1000 kg 6-APA.

Sự tăng trưởng của thị trường enzym trên thế giới theo hai xu hướng sau: sản xuất các enzym dùng trong công nghiệp với tấn lượng lớn và các enzym có độ tinh khiết cao với số lượng nhỏ dùng trong phân tích, chẩn đoán và điều trị. Hai quốc gia nhỏ bé ở châu Âu là Hà Lan và Đan Mạch được coi là những “cường quốc” sản xuất enzym dùng trong công nghiệp (xem bảng 5.3).

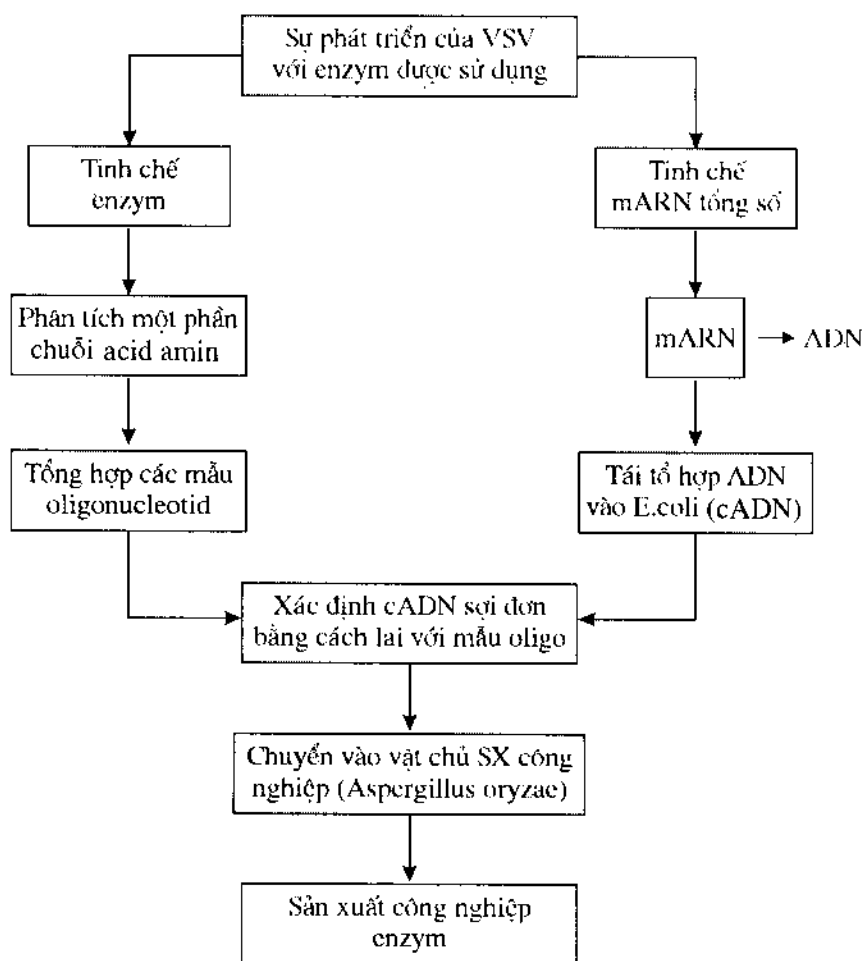
**Bảng 5.3.** Sản xuất enzym công nghiệp ở một số nước phương tây

| Một số nước phương tây | Sản lượng enzym (tấn) | Tỷ lệ %    |
|------------------------|-----------------------|------------|
| USA                    | 6360                  | 12         |
| Nhật                   | 4240                  | 8          |
| Đan Mạch               | 24.910                | 47         |
| Pháp                   | 1590                  | 3          |
| Đức                    | 3180                  | 6          |
| Hà Lan                 | 10.070                | 19         |
| Anh                    | 1060                  | 2          |
| Thụy Sĩ                | 1060                  | 2          |
| Các nước khác          | 530                   | 1          |
| <b>Tổng số</b>         | <b>53.000</b>         | <b>100</b> |

Trong lĩnh vực nghiên cứu về enzym hiện nay người ta tập trung vào việc xử lý nguồn cơ chất vô tận là lignocellulose, mong muốn biến đổi chúng thành những sản phẩm có ích phục vụ cho loài người.

### 5.3. Kỹ thuật di truyền và kỹ thuật protein của enzym

Kỹ thuật tái tổ hợp ADN cho phép chuyển một gen điều khiển sinh tổng hợp một enzym có ích nào đó từ cơ thể này sang một cơ thể khác. Cơ thể nhận gen ngoại lai gọi là vật chủ. Mục đích của quá trình chuyển gen này là để tạo ra một vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzym có ích mà việc nuôi vi sinh vật này trong điều kiện đơn giản hơn, quá trình chiết xuất và tinh chế enzym dễ dàng hơn. Như vậy sẽ hiệu quả kinh tế hơn. Có thể minh họa bằng sơ đồ sau (sơ đồ 5.1)



Sơ đồ 5.1. Nguyên tắc chuyển gen để tạo enzym.

Bằng kỹ thuật chuyển gen nêu trên hãng Novo Nordisk đã thực hiện chuyển đoạn ADN gen từ nấm mốc *Humicola lanuginosa* sang cho *Aspergillus oryzae* tạo được enzym lipolase sản xuất thích hợp trên qui mô công nghiệp dùng trong công nghiệp tẩy rửa đạt hiệu quả kinh tế cao. Lipolase bền vững ở nhiệt độ và các pH khác nhau. Nghiên cứu biến đổi các enzym nhằm cải thiện đặc điểm xúc tác của chúng chỉ mới thực hiện trong vài thập kỷ vừa qua. Trước đây, công việc đó xảy ra một cách ngẫu nhiên, còn hiện nay mọi sự thay đổi đều có thể thiết kế mô hình và thực hiện nó một cách chủ động và có hiệu quả. Bảng 5.4 cho ta thấy các mục tiêu chính để nghiên cứu enzym.

**Bảng 5.4.** Những vấn đề cần nghiên cứu để biến đổi enzym

- Nâng cao hoạt tính của enzym.
- Tăng độ ổn định.
- Cho phép enzym hoạt động ở môi trường thay đổi.
- Thay đổi pH hoặc nhiệt độ tối ưu.
- Thay đổi bản đặc tính của enzym như chúng có thể xúc tác cho sự biến đổi một cơ chất hoàn toàn khác.
- Thay đổi phản ứng xúc tác.
- Nâng cao hiệu quả của quá trình.

Kỹ thuật protein còn được gọi là “phẫu thuật phân tử” đã được sử dụng để thực hiện biến đổi các phân tử enzym. Kỹ thuật protein của enzym có liên quan đến mô hình không gian ba chiều của một enzym tinh khiết khi tiến hành nhiễu xạ phân tử bằng tia X. Sự thay đổi cấu trúc của enzym cũng có thể là kết quả làm tăng tính ổn định của enzym. Ví dụ, pH và nhiệt độ, yêu cầu biến đổi phân tử enzym được thực hiện bằng chính sự thay đổi mã di truyền của vi sinh vật tạo ra enzym. Có hai con đường chính để nghiên cứu thực hiện mục tiêu đó. Thứ nhất là đột biến gen để vi sinh vật tạo ra enzym có cấu trúc mà thành phần và trình tự các acid amin thay đổi. Phương pháp thứ hai có liên quan đến chiết xuất enzym tự nhiên và làm biến đổi cấu trúc phân tử của chính enzym đó bằng hoá học - đôi khi còn gọi là đột biến “hoá học”. Một ví dụ để minh hoạ cho điều đó là đã làm biến đổi cấu trúc của enzym phospholipase A<sub>2</sub> bền vững hơn trong môi trường acid và enzym này được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến sữa. Rõ ràng là kỹ thuật gen và kỹ thuật protein đã đóng vai trò quan trọng trong việc nghiên cứu enzym dùng trong công nghiệp. Kỹ thuật gen góp phần làm giảm giá thành sản phẩm, tạo ra các enzym mới từ vi sinh vật, các chương trình nghiên cứu sẽ phát triển nhanh hơn, v.v...

#### 5.4. Kỹ thuật sản xuất enzym

Mặc dù có nhiều enzym được sử dụng có nguồn gốc từ thực vật và động vật. Song nguồn enzym đó không thể thoả mãn nhu cầu của cuộc sống vì vậy phải tìm nguồn enzym phong phú từ vi sinh vật. Ngay cả quá trình đường hoá tinh bột trước đây sử dụng malt (thóc mầm), thì ngày nay cũng đã được thay thế bằng amylase từ vi sinh vật hiệu quả hơn.

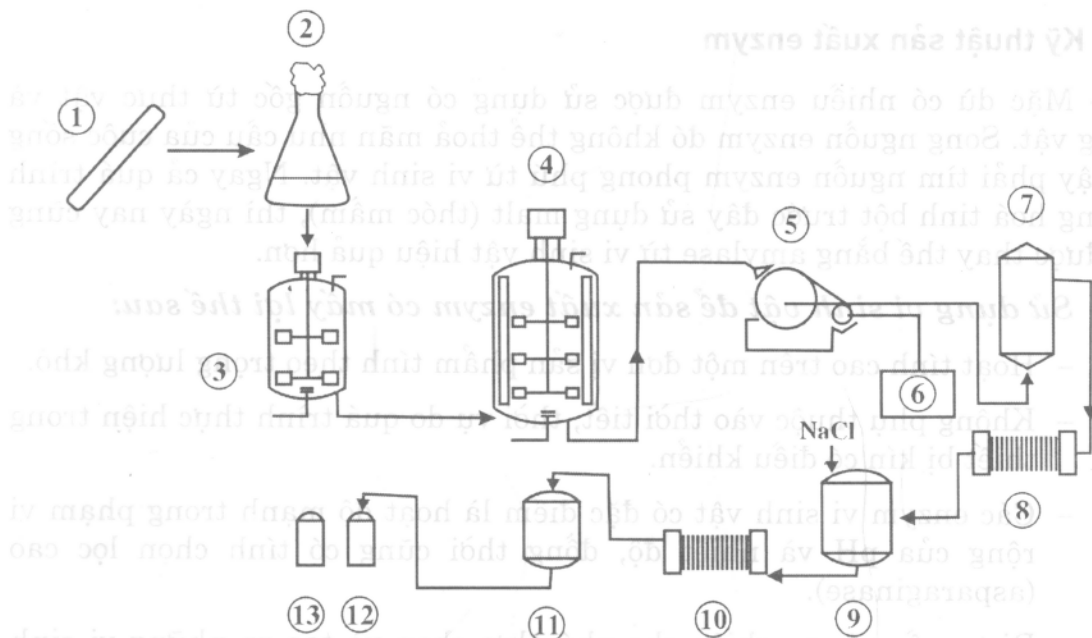
***Sử dụng vi sinh vật để sản xuất enzym có mấy lợi thế sau:***

- Hoạt tính cao trên một đơn vị sản phẩm tính theo trọng lượng khô.
- Không phụ thuộc vào thời tiết, thời vụ do quá trình thực hiện trong thiết bị kín có điều khiển.
- Các enzym vi sinh vật có đặc điểm là hoạt độ mạnh trong phạm vi rộng của pH và nhiệt độ, đồng thời cũng có tính chọn lọc cao (asparaginase).
- Di truyền công nghiệp cho phép lựa chọn và tạo ra những vi sinh vật cho hiệu suất enzym cao, dễ dàng lên men và chiết xuất, tinh chế, v.v.. Các enzym đặc biệt khó sản xuất thường được chuyển gen vào những vật chủ như *Aspergillus oryzae* vì đã biết rõ đặc điểm phát triển của chúng, nên không cần phải nghiên cứu tốn kém.

Để chọn những vi sinh vật sản xuất enzym cần chú ý các tiêu chuẩn sau đây: vi sinh vật đó đòi hỏi điều kiện nuôi cấy đơn giản, enzym ngoại bào, qui trình thu sản phẩm và tinh chế không phức tạp, enzym ổn định trong khoảng nhiệt độ và pH rộng. Tuỳ theo mục đích sử dụng mà chọn các enzym cho phù hợp. Ví dụ, các enzym dùng trong y học cần hoạt tính enzym cao ở pH trung tính. Các enzym dùng trong công nghiệp tẩy rửa cần có hoạt tính cao ở pH kiềm. Nguyên liệu cho công nghiệp lên men sản xuất enzym phải đơn giản, rẻ tiền. Thường dùng bột của các loại ngũ cốc hoặc rỉ đường, cao ngô. Sản xuất enzym công nghiệp có thể dùng phương pháp lên men xộp hay lên men chìm như đã mô tả ở chương 4.

Phương pháp lên men xộp sản xuất enzym thường áp dụng nuôi nấm mốc đã được ứng dụng từ lâu ở một số nước như Nhật Bản, các nước Viễn đông để sản xuất amylase, protease, pectinase và cellulase.

Lên men chìm sản xuất enzym được tiến hành trong các thiết bị giống như lên men sản xuất kháng sinh (hình 5.1).

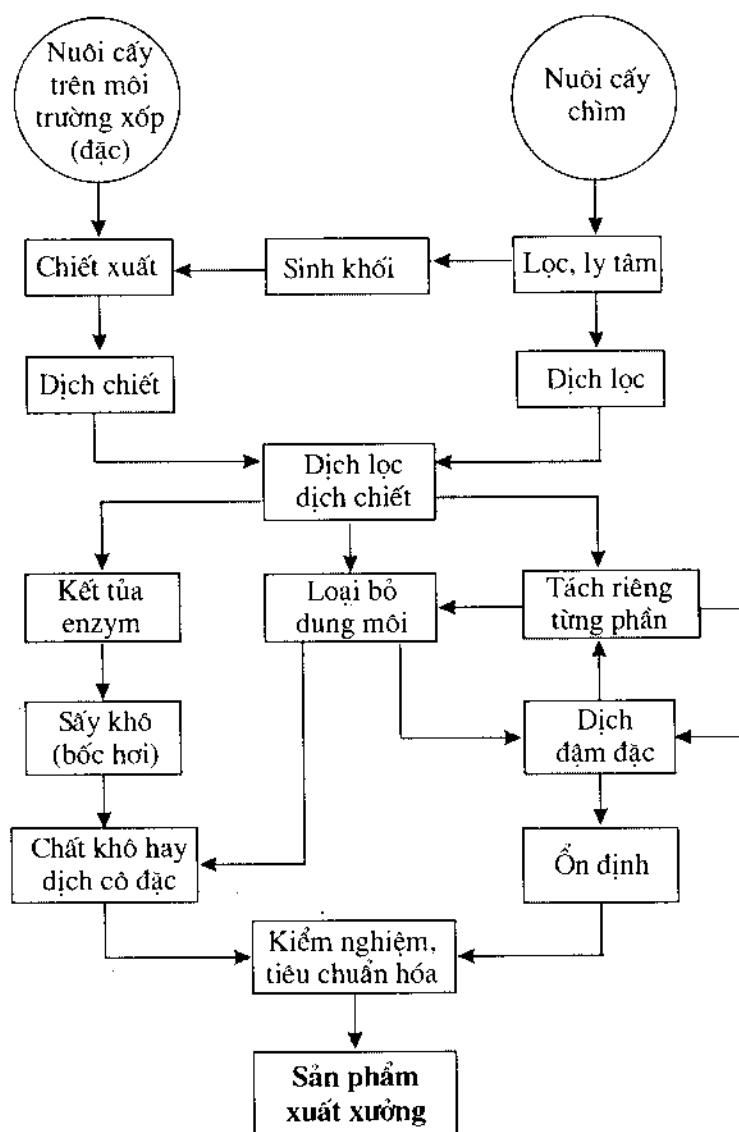


**Hình 5.1.** Sơ đồ minh họa các giai đoạn sản xuất enzyme dạng dung dịch.

- |                           |                                  |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1. Ống giống              | 8. Lọc vi khuẩn                  |
| 2. Nuôi trên máy lắc      | 9. Làm lạnh và kết tủa bằng NaCl |
| 3. Bình nhân giống        | 10. Lọc thu sản phẩm             |
| 4. Thiết bị lên men chính | 11. Sấy khô.                     |
| 5. Lọc hình trống         | 12. Kiểm tra chất lượng          |
| 6. Sinh khối,             | 13. Bao gói xuất xưởng,          |
| 7. Cột thẩm thấu ngược.   |                                  |

Môi trường lên men cũng bao gồm các chất cung cấp năng lượng như carbohydrat, nguồn nitơ, môi trường được khử trùng trong thiết bị lên men, sau đó truyền giống và tiến hành lên men từ 30 - 150 giờ tùy theo chủng vi sinh vật. Công nghiệp sản xuất thường sử dụng thiết bị từ 10-50 m<sup>3</sup>.

Enzym thương phẩm được sản xuất dưới hai dạng: dạng bột khô và dạng lỏng, có thể là dạng thô hoặc dạng tinh khiết (sơ đồ 5.2).



**Sơ đồ 5.2.** Sơ đồ chiết xuất và tinh chế enzyme.

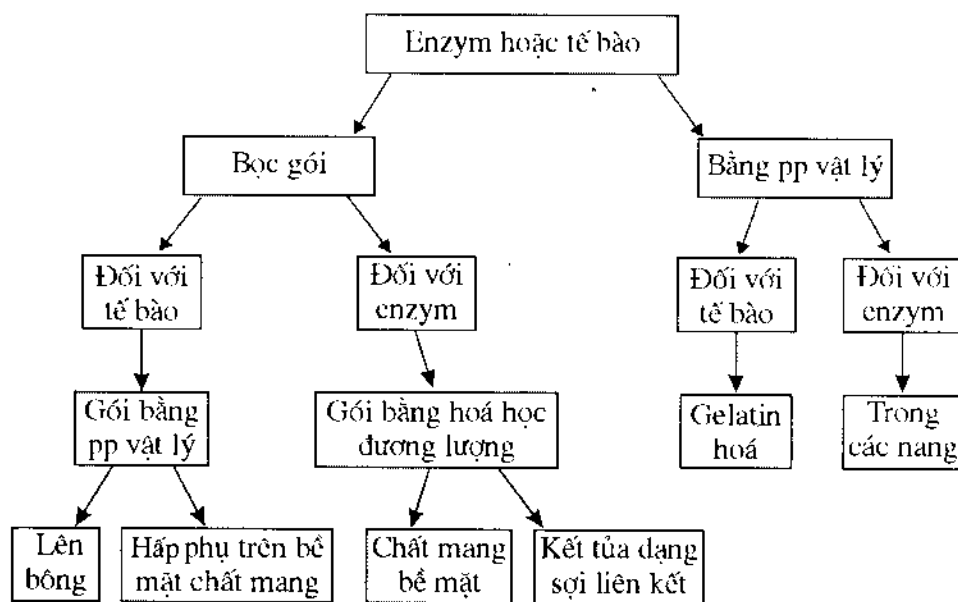
Tuy nhiên, dù sản xuất ở dạng nào đi nữa nếu các enzyme đó sử dụng trong thực phẩm hay y học đều phải thử độc tính của chúng rồi mới cho phép dùng. Trên thực tế để sản xuất enzyme có độ an toàn cao cần chọn những vi sinh vật không tạo ra độc tố, đồng thời nguyên liệu dùng sản xuất cũng lưu ý đến việc có tạo ra độc tố hay không. Ví dụ, nếu nuôi *Aspergillus flavus* trên môi trường có khô lạc, hay bột lạc nhất định sẽ tạo ra *Aflatoxin* là chất gây ung thư gan.

Cho đến nay mới chỉ có một số lượng nhỏ vi sinh vật được sử dụng để sản xuất enzym. Vì vậy hướng nghiên cứu tìm kiếm enzym từ vi sinh vật vẫn còn là vấn đề thời sự và hấp dẫn.

### 5.5. Phương pháp bất động enzym (immobilised enzym).

Việc sử dụng enzym để phân giải cơ chất cần lưu ý đến tính chất sau đây của enzym để khỏi lãng phí. Nếu enzym ở dạng hoà tan hoặc tự do trộn vào cùng với cơ chất để tiến hành phản ứng thì enzym chỉ sử dụng được một lần. Vì khi phản ứng kết thúc ta không thể lấy lại enzym đó để sử dụng lần sau.

Do đó kỹ thuật bất động enzym ra đời, về nguyên lý có thể mô tả tóm tắt như sau: enzym đã tinh chế ở dạng tinh khiết được gắn hoặc gói trong những polymer không hoà tan trong nước. Các hạt enzym này được nhồi vào các cột hình trụ có kích thước thích hợp, sau đó cho dung dịch cơ chất chảy qua, enzym sẽ thực hiện phản ứng phân cắt cơ chất thành sản phẩm tương ứng. Thu lấy sản phẩm để thực hiện các bước tinh chế tiếp sau. Có thể bất động các enzym hoặc các tế bào vi sinh vật chứa enzym tương ứng (sơ đồ 5.3).



Sơ đồ 5.3. Kỹ thuật bất động enzym và tế bào.

Khi enzym hoặc tế bào đã bất động thì phản ứng phân giải cơ chất được thực hiện liên tục với hiệu suất cao, nếu duy trì được các điều kiện phản ứng không thay đổi thì quá trình có thể giữ được hàng ngàn giờ, có những quá trình phản ứng kéo dài được 100 ngày mới phải thay đổi enzym

mới. Do đó enzym được sử dụng nhiều lần giá thành sản xuất một đơn vị sản phẩm sẽ giảm đi rất nhiều.

Enzym được bất động bằng cách nào? Trên thực tế sử dụng cả phương pháp vật lý và hoá học để bất động enzym.

Bằng phương pháp vật lý, enzym có thể được hấp phụ lên trên một chiếc khuôn không hoà tan, hoặc được gói vào trong một gel, hoặc trong capsul thành các hạt vi nang, hoặc phía sau một màng bán thấm (sơ đồ 5.3).

Bằng phương pháp hoá học, phân tử enzym được nối lại với nhau tạo thành các sợi ngang dọc bằng phản ứng giữa các nhóm amin của enzym với tác nhân polymer hoá của một hoá chất như glutaraldehyd. Có nhiều phản ứng hoá học có thể sử dụng để bất động enzym bằng cách này các nhóm chức năng không chính yếu của chúng được gắn với các chất mang vô cơ như gốm, thuỷ tinh, sắt, titan, v.v... hoặc với các polymer thiên nhiên như sepharose và cellulose, với các polymer tổng hợp như nilon, polyacriamid, các polymer vinyl khác và chính các polymer này giữ được các nhóm hoá chức hoạt động trở lại. Trong nhiều thủ thuật thực hiện để gói enzym với chất mang bằng phương pháp này nhận thấy các nhóm hoạt động hoá học bị phân tán lộn xộn. Vì thế các nghiên cứu gần đây đã chú ý đến kỹ thuật bất động enzym sao cho các enzym khi gắn với chất mang không bị mất hoặc giảm đi hoạt tính của mình. Giới hạn của kỹ thuật bất động enzym được trình bày ở bảng 5.5.

**Bảng 5.5.** Những hạn chế của kỹ thuật bất động enzym.

| Phương pháp                    | Ưu điểm                                                                     | Nhược điểm                                                                                                                                  |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Sự gắn kết đương lượng</i>  | Không bị ảnh hưởng của pH, ion của môi trường hoặc nồng độ cơ chất          | Lưới hoạt động có thể biến đổi giá thành đắt                                                                                                |
| <i>Polymer hoá đương lượng</i> | Enzym hoạt động mạnh, chậm mất hoạt tính                                    | Hoạt tính bị mất trong khi không hiệu quả đối với các cơ chất có phân tử lượng lớn; không có khả năng tái sinh                              |
| <i>Hấp phụ</i>                 | Đơn giản, enzym không bị biến đổi, có thể thu hồi chất mang, giá thành thấp | Bị thay đổi trong môi trường ion hoá mạnh, enzym bị đẩy ra dùng cho protease                                                                |
| <i>Bẫy bằng hoá học</i>        | Enzym không bị biến đổi về hoá học                                          | Cơ chất khuếch tán vào trong sản phẩm đi ra ngoài, chuẩn bị khó khăn, enzym bị mất hoạt tính, không hiệu quả đối với cơ chất có phân tử lớn |

Kỹ thuật “bẫy” enzym vào trong các gel là một thành công khi tiến hành polymer hoá hoặc tạo hạt bằng các phản ứng đông tụ. Polyacriamid, collagen, silicagel, v.v... là những chất tỏ ra thích hợp cho kỹ thuật này. Tuy nhiên quá trình tạo gel khó khăn và hiệu quả hoạt tính của enzym thấp.

Trên thực tế thường có khuynh hướng bất động tế bào hơn là bất động enzym. Vì bỏ qua được công đoạn chiết xuất và tinh chế enzym mất thời gian, tốn kém.

Bất động tế bào đang là vấn đề có tiềm năng to lớn, bởi vì nó cho phép thực hiện không chỉ đối với việc tạo ra các sản phẩm chuyển hoá sơ cấp, mà còn ứng dụng để biến đổi để tạo ra các sản phẩm chuyển hoá thứ cấp rất có giá trị, như các kháng sinh bán tổng hợp, các steroid, điều khiển liên tục các quá trình hoá học thông qua các điện cực enzym, xử lý nước thải, cố định nitơ, ... (bảng 5.6).

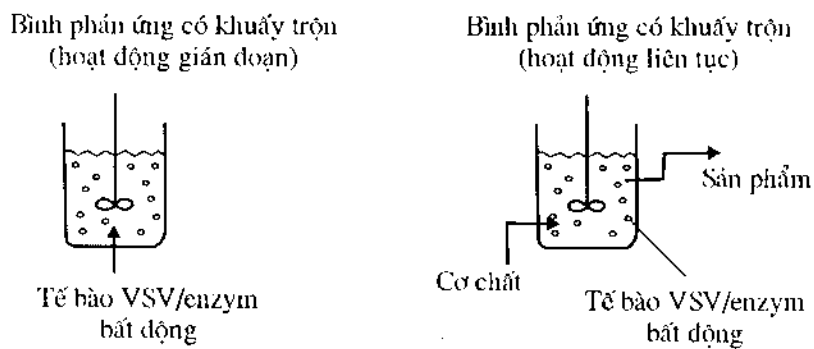
**Bảng 5.6.** Những ưu điểm của các chất xúc tác sinh học bất động.

- Cho phép sử dụng enzym nhiều lần
- Có thể tiến hành quá trình liên tục
- Sản phẩm là những enzym tự do
- Cho phép kiểm tra chặt chẽ hơn quá trình xúc tác
- Cải thiện được độ ổn định của enzym
- Cho phép phát triển hệ thống phản ứng nhiều enzym
- Cung cấp tiềm năng to lớn cho công nghiệp và y học.

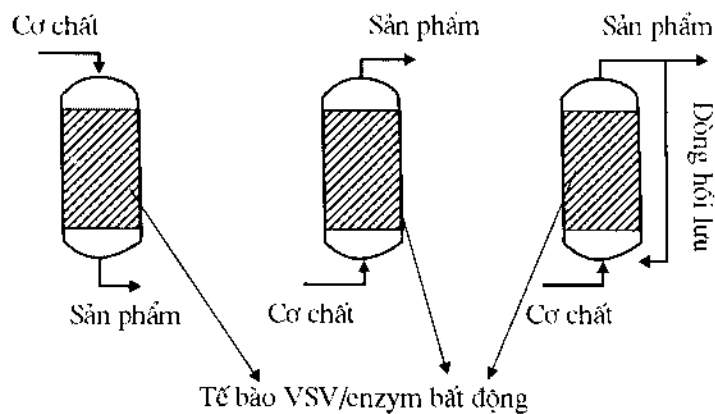
Do kết quả ứng dụng thành công các phương pháp bất động enzym và tế bào tạo ra các nang, các hạt, các cột, và các màng chứa các enzym, nhiều kiểu bình phản ứng sinh học được chế tạo để đáp ứng cho nghiên cứu trong phòng thí nghiệm, cũng như trong sản xuất công nghiệp.

Trên thực tế các đặc điểm xúc tác của các enzym cô lập, bất động các enzym hay tế bào được thực hiện trong các bình phản ứng sinh học. Hệ thống bình phản ứng sinh học có nhiều kiểu dáng khác nhau, nó phụ thuộc vào kiểu phản ứng và độ ổn định của các enzym (hình 5.2)

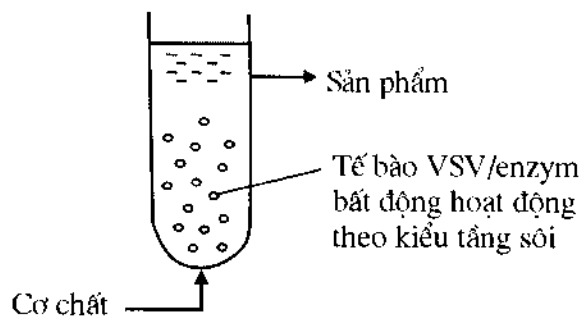
**Hình. 5.2.** Các kiểu bình phản ứng sinh học chứa enzym hoặc tế bào bất động.



**Hình 5.2a.**



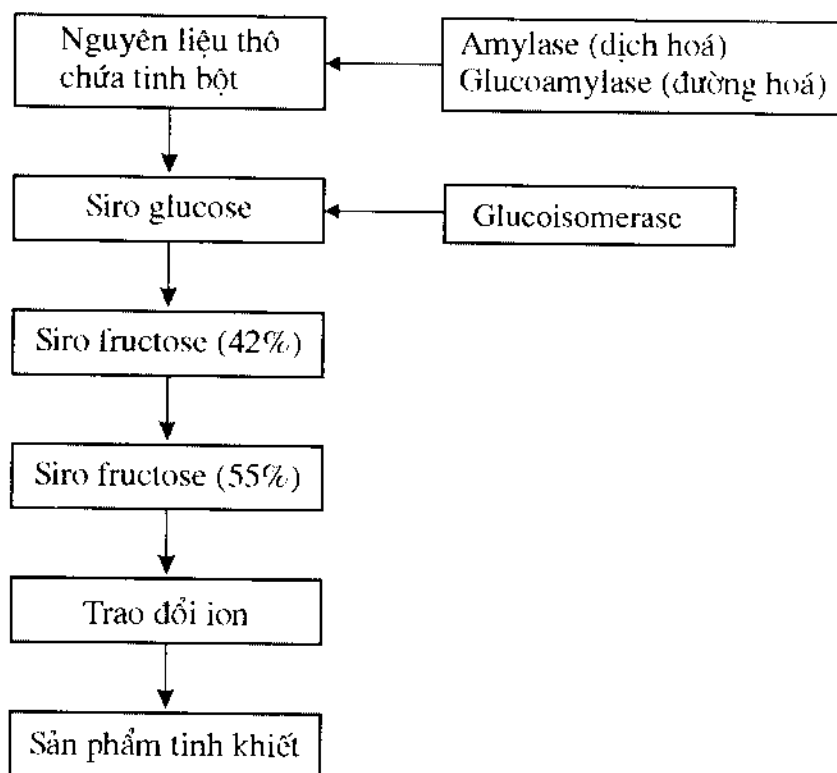
**Hình 5.2b.** Các bình phản ứng liên tục dạng kín.



**Hình 5.2c.** Bình phản ứng liên tục kiểu tầng sôi.

Một số nước đã dùng phương pháp bất động penicilinacylase để sản xuất 6-APA từ penicilin G hoặc V. Từ 6-APA có thể thay thế các mạch bên khác nhau để thu được các kháng sinh bán tổng hợp có hoạt phổ khác nhau dùng trong y học. Trung bình mỗi năm toàn thế giới sản xuất khoảng 5000 tấn 6-APA. Glucoisomerase được sử dụng ở Mỹ, Nhật Bản và châu Âu để sản xuất siro fructose từ tinh bột.

Hàng ngàn tấn siro fructose đã được sản xuất bằng phương pháp bất động enzym (sơ đồ 5.4).

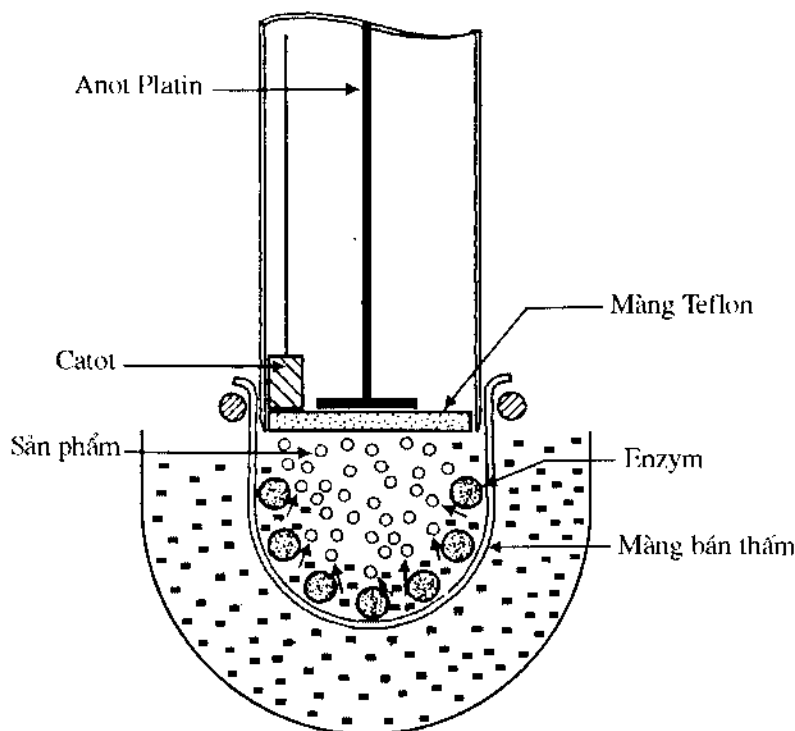


**Sơ đồ 5.4.** Sơ đồ sản xuất fructose từ tinh bột.

Một đối tượng khác cũng rất quan trọng đó là sử dụng phương pháp bất động enzym aminoacylase để sản xuất acid amin. Các cột chứa aminoacylase được sử dụng ở Nhật Bản để sản xuất hàng ngàn kg L - methionin, L - phenylalanin, L - tryptophan và L - valin.

Enzym liên kết dạng polymer được sử dụng rộng rãi trong phân tích hoá học và hoá lâm sàng. Các cột enzym bất động được sử dụng nhiều lần coi như những xúc tác đặc biệt để phát hiện cơ chất. Các điện cực enzym được chế tạo giống như những detector kiểu mới hoặc cái cảm biến sinh học

(biosensor) dùng thử nghiệm đo thể hoặc dòng điện dùng cho cơ chất như urê, acid amin, glucose, alcol và acid lactic. Trong thiết kế chế tạo sao cho điện cực có tác dụng như cái cảm biến điện hoá khi đóng mạch enzyme có thể thấm qua màng bán thấm để phản ứng với cơ chất (hình 5.3)



**Hình 5.3.** Sơ đồ đơn giản của biosensor gắn với điện cực điện hoá và enzym bất động trên màng bán thấm.

Các enzym gắn vào màng tạo oxy, các ion hydro, amoni, carbonic và các phân tử nhỏ khác tùy thuộc vào phản ứng của enzym. Mặc dù các thành phần sinh học ở cái cảm biến sinh học có thể là enzym hoặc hệ thống nhiều enzym, nó cũng có thể là một kháng thể, một tế bào vi sinh vật hoặc các mẫu của mô. Kỹ thuật enzym thực nghiệm là một quá trình rất lý thú, như các quá trình chế biến thực phẩm, dược phẩm, công nghiệp hoá học, xử lý nước thải, v.v... có ý nghĩa rất to lớn sẽ lần lượt được xem xét ở các chương tiếp theo. Nhìn về tương lai ta có quyền hy vọng vào những thành tựu nghiên cứu mới trong lĩnh vực enzym để bảo vệ môi trường, giải quyết vấn đề năng lượng, vấn đề thực phẩm và những nhu cầu cao cấp khác của loài người.

## Chương 6

# SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO

### 6.1. Sự cần thiết sản xuất protein đơn bào

Vấn đề chính bao trùm thế giới là vấn đề dân tộc và dân số. Vấn đề dân tộc hay sắc tộc thuộc phạm trù của chính trị xã hội. Vấn đề dân số là vấn đề phát triển riêng của mỗi quốc gia. Hiện nay dân số thế giới khoảng 6 tỷ người. Mức tăng bình quân hàng năm khoảng 95 triệu. Dự tính đến năm 2050 dân số thế giới là 10 tỷ. Với trình độ phát triển nông nghiệp như hiện nay thì không thể cung cấp đủ lương thực thực phẩm cho nhân loại đặc biệt là nguồn protein không thể thoả mãn đòi hỏi của nhu cầu. Tổ chức lương thực và nông nghiệp thế giới (FAO) đã cảnh báo về sự thiếu hụt protein giữa các quốc gia phát triển và các quốc gia đang phát triển. Ít nhất 25% dân số thế giới hiện nay đói và thiếu dinh dưỡng. Đại đa số trong số này là ở các nước đang phát triển. Dân số ở các nước đang phát triển tiêu thụ protein chỉ ở mức 12g protein động vật / người / ngày. Việc trồng các giống cây có hàm lượng protein cao như đậu tương, lạc cũng khó khăn vì còn phải phụ thuộc nhiều vào thời tiết mưa nắng không thuận hoà, sâu bệnh phá hoại, v.v... Để đảm bảo nguồn protein cần thiết đó cho loài người không thể có con đường nào khác là con đường sản xuất protein từ vi sinh vật.

Protein đơn bào (single cell protein - SCP) là thuật ngữ được gọi theo qui ước dùng để chỉ vật chất tế bào vi sinh vật (bao gồm cả đơn bào lẫn đa bào như vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, nấm ăn và tảo) được sử dụng làm thức ăn cho người và động vật. Thuật ngữ này thật ra không hoàn toàn chính xác vì sản phẩm tạo ra không phải là một protein nguyên chất, mà là sinh khối tế bào của vi sinh vật, trong đó chỉ chứa khoảng 40-80% protein (bảng 6.1).

**Bảng 6.1.** Thành phần hoá học của tế bào một số loại nấm được sử dụng làm protein đơn bào (SCP)

| Thành phần              | <i>Pacilomyces vaioti</i> | <i>Fusarium graminearum</i> | <i>Candida utilis</i> |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Trọng lượng khô (%)     | 96                        | 94,2                        | 91                    |
| Protein thô (% Nx 6,25) | 55                        | 54,1                        | 48                    |
| Chất béo (%)            | 1,0                       | 1,0                         | 1,35                  |

|                             |     |      |      |
|-----------------------------|-----|------|------|
| Tro (%)                     | 5,0 | 6,1  | 11,0 |
| Lysin (g/16g N)             | 6,5 | 3,5  | 7,2  |
| Methionin (g/16g N)         | 1,9 | 1,23 | 1,0  |
| Cistin và Cystein (g/16g N) | 1,0 | 0,75 | 1,0  |

Từ cổ xưa cả hai nền văn hoá phương Đông và phương Tây đã biết chế biến thực phẩm bằng vi sinh vật. Trong khẩu phần ăn đã có chứa các vi sinh vật đó cho cả người và vật nuôi. Sữa chua, dưa chua, chao, tương, mắm chua, v.v... đều chứa vi sinh vật. Tuy nhiên quá trình *sản xuất công nghiệp* đầu tiên các vi sinh vật cho mục đích dinh dưỡng đã có ở Đức vào thời kỳ Đại chiến thế giới lần thứ nhất, lúc đó được gọi là nấm men "Torula". Sau chiến tranh mối quan tâm của Đức giảm đi, song nó lại được phục hồi vào những năm 30, và trong Đại chiến thế giới lần thứ hai khoảng 15.000 tấn nấm men đã được sản xuất mỗi năm nhằm phục vụ nhu cầu protein cho binh lính và thường dân. Chủ yếu để nấu súp và làm xúc xích. Sau Đại chiến thế giới lần thứ hai Mỹ và Anh cũng quan tâm đến sản xuất sinh khối nấm men để phục vụ nhu cầu chăn nuôi công nghiệp. Từ giữa những năm 50, công nghiệp sản xuất nấm men mới được thúc đẩy mạnh mẽ.

Hội nghị lần thứ nhất về SCP tại viện kỹ thuật Massachusetts năm 1967 đã có nhiều dự án thực nghiệm sản xuất SCP. Riêng hãng British Petroleum (BP) đã trình bày báo cáo về sản xuất công nghiệp SCP. Đến hội nghị lần thứ hai vào năm 1973 thì nhiều hãng thuộc nhiều nước khác nhau đã sản xuất trên qui mô công nghiệp và chứng minh được khả năng kỹ thuật của họ. Cũng chính năm 1973 sản xuất SCP từ hydrocarbon cũng được đẩy mạnh.

Nguyên nhân nào đã thúc đẩy nhiều nước phải sản xuất SCP ?

Ở các nước phát triển có mức sống cao, các thức ăn hỗn hợp giành cho động vật đòi hỏi phải chứa các nguồn protein có chất lượng cao (bột cá, bột đậu tương) để sản xuất ra trứng, thịt bò, lợn, gà đủ tiêu chuẩn. Tuy nhiên nếu dùng các thức ăn có chất lượng cao kể trên giá thành sản phẩm sẽ cao. SCP dùng chăn nuôi để sản xuất thịt, trứng, sữa đã mang lại hiệu quả to lớn, giá thành sản phẩm giảm. Công nghiệp chăn nuôi đã bước sang một trang mới, người ta nói đến canh tác không cần đất đai, không phụ thuộc vào thời tiết, khí hậu. Canh tác trong nồi lên men chính là ý nghĩa đó.

So với sản xuất các nguồn protein truyền thống, sản xuất SCP có những ưu thế sau:

- Tốc độ sản xuất tăng nhanh.
- Hàm lượng protein cao (30-80% tính theo trọng lượng khô)

- Có thể dùng các nguồn carbon khác nhau (mà một số chất được coi là chất thải)
- Nhiều chủng vi sinh vật cho năng suất cao, hàm lượng protein cao và chất lượng tốt.
- Diện tích sản xuất nhỏ, sản lượng cao .
- Không phụ thuộc vào mùa vụ, thời tiết.

Một nhược điểm quan trọng của SCP là do chúng chứa một hàm lượng acid nucleic cao, đặc biệt là ở vi khuẩn và nấm men. Nếu các loại này được sử dụng cho người thì sẽ là một vấn đề cần quan tâm, vì ở người thiếu enzym uricase xúc tác cho sự oxy hoá acid uric thành allantoin dễ hoà tan. Nếu ăn nhiều các dẫn chất chứa purin sẽ làm tăng hàm lượng acid uric trong máu, acid này sẽ tạo thành các sỏi đọng lại ở khớp xương và trong bể thận, dễ sinh ra sỏi thận. Hàng ngày mỗi người lớn chỉ nên ăn 20 gram nấm men (tính theo trọng lượng khô). Đã có những phương pháp nêu ra nhằm làm giảm hàm lượng acid nucleic trong SCP. Tuy nhiên các phương pháp xử lý ấy sẽ dẫn đến việc làm giảm giá trị sinh học của protein đơn bào. Các phương pháp đó có thể là:

- Thuỷ phân bằng kiềm.
- Chiết bằng hoá chất.
- Hoạt hoá ARNase (bằng xử lý nhiệt).

Về hiệu suất sinh tổng hợp protein của vi sinh vật thì cao hơn nhiều lần so với động vật chăn nuôi trong các trang trại (bảng 6.2).

**Bảng 6.2.** Thời gian cần thiết để tăng gấp đôi sinh khối của một số loài

| Tên loài               | Thời gian   |
|------------------------|-------------|
| Vi khuẩn và nấm men    | 20-120 phút |
| Nấm và tảo             | 2- 6 giờ    |
| Cỏ và một vài thực vật | 1-2 tuần    |
| Gà con                 | 2-6 tuần    |
| Bồ câu                 | 4-6 tuần    |
| Trâu, bò (còn nhỏ)     | 1-2 tháng   |
| Người (sơ sinh )       | 3-6 tháng   |

Thường so sánh năng suất tạo protein của một con bò nặng 250 kg với 250 g vi sinh vật. Trong khi con bò chỉ tổng hợp được 200g protein mỗi ngày,

thì vi sinh vật nếu tính trên lý thuyết (trong điều kiện phát triển lý tưởng) chúng có thể tạo được 25 tấn cũng trong thời gian ấy. Tuy nhiên con bò cũng có khả năng đặc biệt của nó đó là biến đổi cỏ thành sữa giàu protein.

Protein từ SCP cũng chứa khá đầy đủ các chất dinh dưỡng quan trọng như acid amin, vitamin các nguyên tố vô cơ cần thiết cho cơ thể (bảng 6.3).

**Bảng 6.3.** Thành phần acid amin trong protein của tế bào *Saccharomyces*.

| Acid amin     | mmol/100g protein nấm men |
|---------------|---------------------------|
| Alanin        | 114,70                    |
| Arginin       | 40,18                     |
| Asparagin     | 25,43                     |
| Acid aspactic | 74,38                     |
| Cystein       | 1,65                      |
| Acid glutamic | 75,45                     |
| Glutamin      | 26,33                     |
| Glycin        | 72,56                     |
| Histidin      | 16,55                     |
| Isoleucin     | 48,17                     |
| Leucin        | 74,08                     |
| Lysin         | 1,54                      |
| Methionin     | 12,66                     |
| Phenilalanin  | 33,44                     |
| Prolin        | 41,13                     |
| Serin         | 46,33                     |
| Treonin       | 47,85                     |
| Tryptophan    | 7,10                      |
| Tyrosin       | 25,49                     |
| Valin         | 66,18                     |

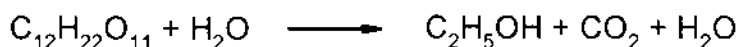
Cũng có thể điều khiển quá trình lên men vi sinh vật để tạo ra sinh khối có chứa những chất cần thiết có giá trị sử dụng cao. Ví dụ như nuôi *Saccharomyces uvarum* trong môi trường có chứa selenid sẽ tạo ra sinh khối có chứa các hợp chất selen hữu cơ dùng làm thuốc antioxydant và điều trị ung thư, nuôi tảo *Spirullina* chứa  $\beta$  caroten, ...

Nuôi vi sinh vật để sản xuất SCP có nhiều ưu điểm có thể tóm tắt như sau:

- Vi sinh vật phát triển với tốc độ nhanh ở điều kiện tối ưu, một vài loài có thể tăng gấp đôi sinh khối sau 0,5 - 1 giờ.
- Vi sinh vật dễ dàng bị biến đổi gen hơn thực vật và động vật, do đó có thể tạo ra các loài mới bằng biến đổi gen nhằm tăng tốc độ phát triển, chịu được các điều kiện sống khắc nghiệt và điều kiện lên men dễ dàng.
- Vi sinh vật chứa hàm lượng protein cao, và giá trị dinh dưỡng cao.
- Vi sinh vật có thể tạo ra một lượng sinh khối lớn trong một thiết bị lên men dung tích nhỏ và thực hiện quá trình liên tục điều khiển tự động. Diện tích để sản xuất nhỏ, không phụ thuộc vào thời vụ, thời tiết.
- Vi sinh vật có thể phát triển trên môi trường chứa nguyên liệu thô rẻ tiền, cũng có khi chỉ là chất thải. Một vài loài vi sinh vật có thể phát triển trên cơ chất là cellulose-nguồn nguyên liệu thiên nhiên vô tận.

## 6.2. Sản xuất sinh khối nấm men

Trong công nghiệp sản xuất sinh khối nấm men thường hay dùng *Saccharomyces cerevisiae* là loài được sử dụng vào nhiều lĩnh vực của công nghiệp thực phẩm (lên men rượu, bia, làm nở bột mì, làm thức ăn gia súc, v.v...). Tùy theo điều kiện lên men hiếu khí hay kỵ khí mà ta có các sản phẩm khác nhau. Khi lên men kỵ khí để tạo ra alcol ethylic, nấm men đã biến đổi đường theo phản ứng sau:



Trong điều kiện lên men hiếu khí, nấm men sử dụng đường để phát triển tăng tích lũy sinh khối là chính. Tuy nhiên vẫn tạo thành một lượng nhỏ alcol ethylic. Phương trình biểu diễn biến đổi đường trong lên men hiếu khí như sau :



### 6.2.1. Sản xuất sinh khối nấm men từ rỉ đường

Trong công nghệ sản xuất đường từ củ cải đường hoặc từ mía, sau khi kết tinh đường, phần còn lại không kết tinh được nữa gọi là rỉ đường. Rỉ đường dùng làm nguyên liệu cho nhiều quá trình lên men vì có giá thành rất rẻ. Trong rỉ đường ngoài thành phần chính là saccharose còn chứa một số chất vô cơ, hữu cơ và vitamin có giá trị. Sản lượng trung bình của rỉ đường chứa 50% saccharose dao động từ 3,5% đến 4,5% tính theo nguyên

liệu dùng chế đường. Hàm lượng saccharose chứa trong rỉ đường phụ thuộc rất nhiều vào hàm lượng các muối vô cơ. Muối K và Na làm cản trở quá trình kết tinh đường, ngược lại muối Mg lại làm tăng khả năng kết tinh đường. Thành phần của rỉ đường mía và củ cải là khác nhau (bảng 6.4).

**Bảng 6.4.** Thành phần của rỉ đường củ cải và rỉ đường mía chứa 75% chất khô

| Thành phần         | Đơn vị tính | Rỉ đường củ cải | Rỉ đường mía |
|--------------------|-------------|-----------------|--------------|
| Đường tổng số      | (%)         | 48-52           | 48-56        |
| Chất hữu cơ        | (%)         | 12-17           | 9-12         |
| Protein ( Nx 6,25) | (%)         | 6-10            | 2-4          |
| K                  | (%)         | 2,0-7,0         | 1,5-5,0      |
| Ca                 | (%)         | 0,1- 0,5        | 0,4- 0,8     |
| Mg                 | (%)         | 0,09            | 0,06         |
| P                  | (%)         | 0,02-0,07       | 0,6-2,0      |
| Biotin             | ( mg/ kg)   | 0,02-0,15       | 1,0-3,0      |
| Acid pantothenic   | ( mg/ kg)   | 50-110          | 15-55        |
| Inozitol           | ( mg/ kg)   | 5000-8000       | 2500-6000    |
| Thiamin            | ( mg/ kg)   | ~ 1,3           | ~1,8         |

Sự khác biệt giữa rỉ đường mía và rỉ đường củ cải là hàm lượng biotin. Rỉ đường mía chứa khoảng 2,5 mcg biotin/g, gấp khoảng 20 lần rỉ đường củ cải. Rỉ đường củ cải có hàm lượng acid pantothenic gấp 2-4 lần rỉ đường mía. Vì vậy khi sử dụng rỉ đường mía để sản xuất men bánh mì cần phải bổ sung acid này.

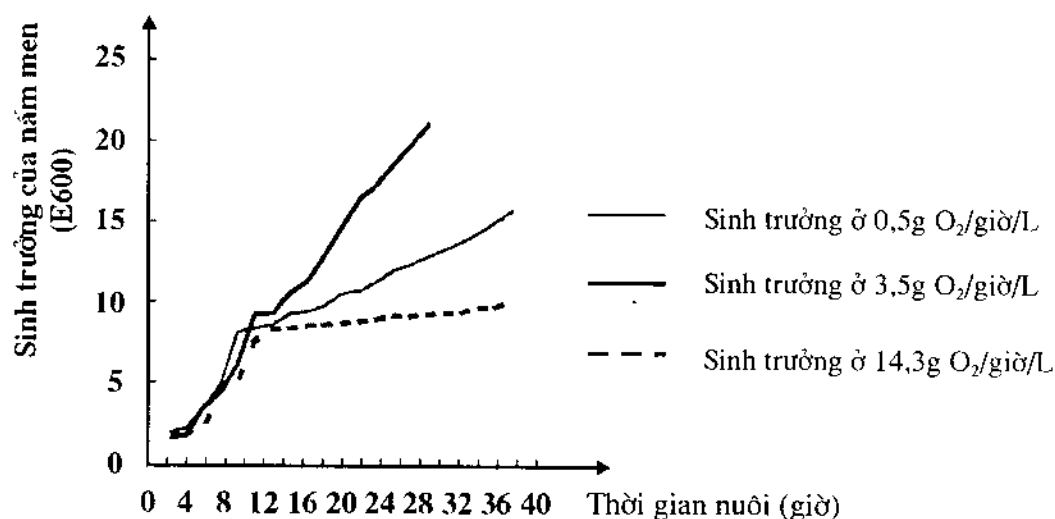
Rỉ đường cần được xử lý trước khi pha chế môi trường để nuôi cấy. Thường được acid hoá bằng acid sulfuric tới pH 4 và nâng nhiệt độ lên 120 - 125°C trong 1 phút để kết tủa một số chất lơ lửng. Đồng thời bổ sung thêm những thành phần cần thiết cho men phát triển. Rỉ đường cũng là môi trường tốt cho một số vi sinh vật lạ phát triển làm hỏng quá trình nuôi men, nên môi trường pha chế xong cần được khử trùng.

Để sản xuất men bánh mì thường chỉ sử dụng *Saccaromyces cerevisiae*. Cũng có nhiều nghiên cứu tìm cách sử dụng các loài *Torula*, *Candida* và *Ospora* để sản xuất men bánh mì nhưng chưa thành công trong sản xuất công nghiệp.

Ở Anh có loại “nấm men bông” lên men nổi, có xu hướng tạo thành bông mạnh và do đó chúng dễ dàng tách khỏi môi trường mà không cần đến ly tâm, rất thuận tiện cho sản xuất. Chúng cũng được sử dụng làm men bánh mì.

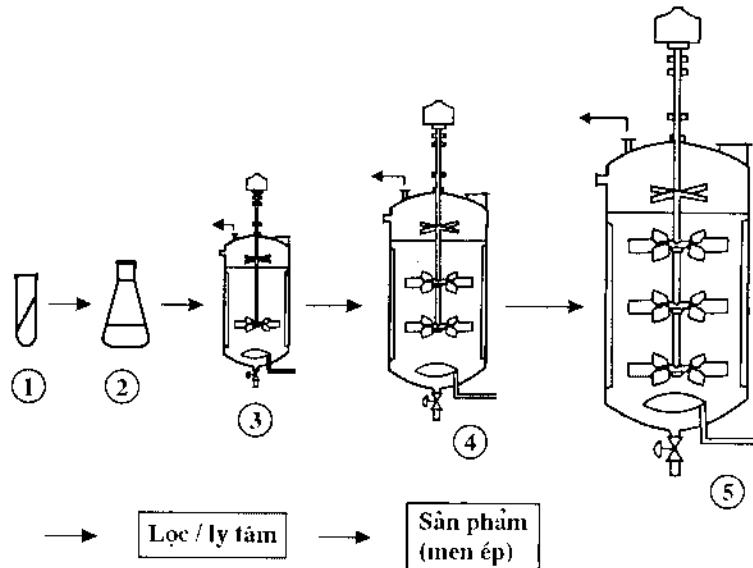
*Saccharomyces cerevisiae* là loại vi sinh vật có thể sống và phát triển trong cả điều kiện có oxy và không có oxy. Khi sinh trưởng trong điều kiện hiếu khí chúng cần biotin, còn nhu cầu về inisitol và acid pantothenic thay đổi theo từng chủng. Ngoài các nhu cầu trên, nấm men còn cần các thành phần khác như acid béo chưa no và ecgosterol, một số chủng còn cần cả acid nicotinic. Trong điều kiện kỵ khí bắt buộc nếu thiếu các thành phần này, nấm men chỉ phát triển trong một vài thế hệ sau đó dừng lại hoàn toàn.

Quan hệ của nấm men với oxy là mối quan hệ phức tạp, điều này đã được kiểm chứng qua nghiên cứu về hiệu ứng trao đổi oxy của nấm men. Ngoài hiệu ứng Pasteur, còn có hiệu ứng Pasteur ngược, hiệu ứng glucose hay sự kiểm chế dị hoá. Tốc độ sinh trưởng của nấm men phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ oxy trong môi trường (hình 6.1).



Hình 6.1. Ảnh hưởng của oxy lên sự phát triển của *S. cerevisiae*.

Nồng độ oxy chứa trong môi trường có ảnh hưởng gián tiếp lên các enzym điều khiển quá trình biến đổi glucose. Có thể kiểm chế dị hoá đó bằng cách nuôi nấm men ở nồng độ glucose thấp như trong hệ thống lên men liên tục. Có thể tính toán nồng độ glucose cần thiết để men phát triển bình thường, sau đó bổ sung đường theo chu kỳ, khống chế để men phát triển với tốc độ tối đa. Nếu đường nạp vào thừa nấm men sẽ chuyển hướng trao đổi chất từ thuần túy hô hấp sang lên men lúc đó có thể phát hiện thấy ethanol trong khí thải ra. Qui trình sản xuất men bánh mỳ có thể minh họa bằng sơ đồ (hình 6.2).



**Hình 6.2.** Sơ đồ quy trình sản xuất men bánh mì

- |                      |               |                          |
|----------------------|---------------|--------------------------|
| 1. Men giống         | 3. Nhân giống | 5. Nuôi để thu sản phẩm. |
| 2. Nuôi trên máy lắc | 4. Nhân giống |                          |

- *Men giống*

Năng suất và chất lượng của men thu hoạch phụ thuộc rất nhiều vào việc chuẩn bị men giống. Men thành phẩm sau khi thu hoạch có thể lẫn vi sinh vật lạ, nên không thể sử dụng làm men giống được. Một vài nhà máy đã sử dụng men thành phẩm làm men giống, song hiệu quả không cao. Vì vậy phải bắt đầu bằng một ống giống thuần khiết, sau đó nhân giống dần dần trong điều kiện vô trùng.

- *Nhân giống*

Giống được nuôi trong điều kiện vô trùng, thường chuẩn bị giống theo ba cấp. Môi trường nuôi men giống cấp 1 và cấp 2 ngoài đường là thành phần chính, cần có thêm nitơ dạng hữu cơ để men phát triển nhanh. Đến bình nhân giống cấp 3 và bình lên men để thu hoạch men thì chỉ cần nguồn nitơ vô cơ. Trong quá trình nhân giống phải theo dõi sự phát triển của men, đồng thời cung cấp không khí với lưu lượng cần thiết. Khi truyền giống từ cấp độ lên men này sang cấp độ lên men khác tỉ lệ giống truyền thường là 10% và giống đang phát triển ở pha lôgarit.

- *Lên men để thu sinh khối.*

Thiết bị nuôi nấm men dùng trong sản xuất có dung tích từ 50-300m<sup>3</sup>. Môi trường nuôi chiếm 70% dung tích của thiết bị nuôi. Nhiệt độ nuôi men thường giữ ở 30° - 32°C. Cấp khí liên tục với lưu lượng 1/1/phút (1 thể tích không khí/ một thể môi trường / phút).

- *Thu sinh khối nấm men.*

Tiêu chuẩn chủ yếu dùng để xem xét men bánh mì thường phẩm khi kết thúc nuôi nấm men là có sản lượng cao, tế bào men phải đảm bảo các tính chất của nấm men, có hoạt tính lên men cao và chất lượng bảo quản tốt hay không. Tiêu chuẩn này dễ dàng được đánh giá chính xác nhờ vào việc phân tích hàm lượng mARN và các loại ARN khác hoặc hàm lượng protein tổng số. Trong công nghiệp để thu hoạch men thường sử dụng phương pháp ly tâm vắt để loại bỏ môi trường sau đó rửa bằng nước sạch 2-3 lần để loại bỏ toàn bộ môi trường còn dính bám vào tế bào men nhằm không cho các tế bào men còn có thể lên men tiếp. Tế bào men thu được ở dạng men ép có độ ẩm khoảng 80% được bao gói thành từng đơn vị nhỏ từ 1-5 kg trong giấy nhôm và bảo quản ở nhiệt độ 4 - 8°C. Cũng có thể sấy khô men ở điều kiện áp suất và nhiệt độ thấp đến độ ẩm còn 4-6% và vẫn giữ được hoạt tính lên men cao.

- *Vi sinh vật tạp nhiễm trong quá trình sản xuất men.*

Trong sản xuất men nếu thực hiện trong điều kiện vô trùng tuyệt đối như sản xuất các chất kháng sinh thì không có vi sinh vật tạp nhiễm. Trong điều kiện đó đòi hỏi phải đầu tư lớn, đặc biệt là các màng lọc không khí vô trùng. Lúc đó giá thành sản xuất men sẽ cao vì chi phí lớn. Trên thực tế sản xuất men bánh mì, thường sử dụng qui trình đơn giản, thiết bị không cần đắt tiền, hệ thống lọc không khí không cần hiện đại. Thủ thuật chính để đảm bảo quá trình nuôi men thành công là xử lý môi trường ri đường bằng acid sulfuric đến pH 2,5 - 3,0. Đun sôi môi trường để khử trùng ban đầu, sau điều chỉnh pH = 3,5 - 4,0. Trong khoảng 4 - 5 giờ đầu nuôi men ở điều kiện kỵ khí hoặc hiếu khí nhẹ. Nấm men sẽ lên men rượu và tạo ra một lượng cồn nhất định có khả năng ức chế sự phát triển của một số vi sinh vật nếu nhiễm vào môi trường trong điều kiện pH môi trường thấp. Sau đó tiếp tục nuôi men ở điều kiện hiếu khí mạnh để cho men phát triển tối đa.

Các vi sinh vật gây nhiễm trong quá trình nuôi men thường là vi khuẩn lactic (đa số các trường hợp là các vi khuẩn lactic dị hình), các vi khuẩn acetic và đặc biệt các vi khuẩn butyric thường có ảnh hưởng tới sự phát triển của nấm men một cách rõ rệt. Do có sự tạo thành acid butyric bởi các *Clostridium* trong men ép mà xuất hiện mùi thiu khó chịu.

Nếu quá trình nuôi men có lẫn các loài men khác như *Torula*, *Candida*, ... chúng thường phát triển rất nhanh và lấn át *Saccharomyces cerevisiae*. Các loài nấm men kể trên thường khó ép và làm giảm đáng kể năng lực lên men của men ép.

Hàng loạt vi sinh vật khác xâm nhập về sau vào men ép làm hỏng men. Đáng sợ nhất là *Oidiumlactis* thường gây cho men có mùi ủng khó chịu. Các nấm khác như *Penicillium* tạo nên các đám màu lục trên men ép, *Aspergillus* tạo nên các đám màu vàng nhạt tới màu xám, *Mucor* và *Fusarium* tạo các vết vàng và đỏ trên men ép. *Dematium pullutans* tạo nên các vết màu nâu bẩn, còn các vi khuẩn acetic tạo nên những vùng ố trên bề mặt, còn *Serratia marcescens* lại tạo nên các vết đỏ trên men ép.

### 6.2.2. Ứng dụng của men ép

Men bánh mì được sử dụng trong công nghiệp sản xuất bánh mì, bánh bao và các loại bánh làm từ bột nhào dùng trong gia đình. Để sản xuất bánh mì trắng cần một tỷ lệ nấm men khoảng 2%, với các loại bánh ngọt nhỏ cần từ 3-5%, bánh sữa 4-5% (so với trọng lượng bột mì). Thường nhào bột mì với men giống trộn đều và ủ men ở nhiệt độ thích hợp. Nấm men sẽ lên men saccharose, glucose và fructose có sẵn trong bột, sau đó lên men maltose hoặc glucose được tạo thành nhờ các amylase có trong bột nhào. Thông thường thì bột nhào không chứa đủ lượng amylase cần thiết nên thường người ta cần bổ sung  $\alpha$ -amylase bên với nhiệt vào men bánh mì.  $\text{CO}_2$  được tạo ra do quá trình lên men làm khối bột nở phồng lên. Quá trình lên men tạo ra khoảng 0,5%- 1% rượu và có mùi thơm đặc biệt. Khi nướng bánh, nhiệt độ trong lò đạt tới 50-60°C thì nấm men sẽ bị chết.

Men ép còn được sử dụng để sản xuất cao nấm men hay bột nấm men dùng làm môi trường lên men các vi sinh vật trong các phòng thí nghiệm. Cách chế tạo cao nấm men hay bột nấm men rất đơn giản. Men ép đem hoà trong nước tỷ lệ 1/4 rồi để ở nhiệt độ 35-37°C, các protein nội bào sẽ thuỷ phân protein của nấm men (autolyse) để tạo ra các acid amin và giải phóng các vitamin có trong tế bào men ra môi trường nước. Để quá trình thuỷ phân được triệt để hơn có thể thuỷ phân tiếp bằng acid hoặc papain. Điều chỉnh pH về trung tính rồi lọc trong, cô dưới áp suất giảm đến dạng cao mềm hay sấy phun để tạo ra bột nấm men. Bột hay cao nấm men chứa hàm lượng cao vitamin nhóm B và các acid amin không thay thế. Có thể bào chế ra các dạng viên nén, viên nang, viên bao đường hoặc dạng thuốc nước dùng làm thuốc bồi bổ cơ thể rất quý.

Cũng bằng phương pháp nuôi *Saccharomyces cerevisiae* trong những điều kiện đặc biệt, chúng sẽ tạo ra hàm lượng cao vitamin D hoặc ecgosterin là những thuốc quý.

### 6.3. Sản xuất tảo đơn bào

Để sản xuất SCP thường dùng ba chi là *Chlorella*, *Scenedesmus* và *Spirulina*, các loài này chúng có thể phát triển nhờ quang dưỡng, hoá dưỡng hoặc dị dưỡng. Phương pháp nuôi tảo nhờ quang hợp được ứng dụng

nhiều vì giá thành rẻ nhất. Nhân tố quyết định cho quá trình này là ánh sáng mặt trời. Vì vậy thường sử dụng các ao hồ hoặc ruộng để nuôi tảo dưới ánh sáng mặt trời. Tuy nhiên khi tiến hành nuôi trên qui mô lớn thì khó giữ được các điều kiện vô trùng. Trong những trường hợp này nguy cơ nhiễm tạp là nghiêm trọng. Hơn nữa mật độ tế bào nuôi theo phương pháp này thường thấp (khoảng 1-2 g/lít SCP tính theo trọng lượng khô). Riêng tảo sợi *Spirulina* phát triển mạnh hơn, hàm lượng protein cao hơn và đặc biệt là chứa beta caroten, vitamin B<sub>12</sub> là những thuốc quý. Dân cư ở Mehico và vùng bờ Bắc hồ Tchad thuộc châu Phi thường sử dụng loài tảo này làm nguồn dinh dưỡng protein. Nhật Bản sử dụng *Chlorella* như một nguồn protein và vitamin để bổ sung vào một vài thực phẩm như sữa chua, kem và bánh mì. Gần đây còn chứng minh được tác dụng chống phóng xạ của các chất có trong tảo *Spirulina*.

#### 6.4. Sản xuất nấm sợi

Nấm sợi cũng là nguồn protein đơn bào phong phú. Tốc độ sinh trưởng của nấm sợi thấp hơn vi khuẩn và nấm men, tuy nhiên cũng có những chủng nấm sợi có tốc độ sinh trưởng nhanh như nấm men, đặc biệt những chủng này nếu nuôi trên cơ chất đặc và bằng phương pháp bề mặt. Hàm lượng protein thô trong nấm sợi đạt 50-55%, khi sinh trưởng nhanh hàm lượng acid nucleic có thể rất cao (ARN tới 15%). Cần lưu ý đến thành phần kitin chứa trong thành tế bào nấm. Công nghiệp sản xuất penicilin đã tạo ra lượng lớn sinh khối nấm *penicillium chryosenum*. Lượng sinh khối này coi như chất phế thải của công nghệ penicilin có thể sấy khô và sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau như làm thức ăn giàu protein cho chăn nuôi, hoặc thủy phân để tạo ra các acid amin làm môi trường giàu dinh dưỡng để nuôi vi khuẩn (*bacillus subtilis*) sinh tổng hợp protease hoặc amylase rất kinh tế. Có những loài nấm sợi phát triển rất nhanh trên môi trường bột sắn hoặc sắn lát nghèo protein (~1,0-1,5%) có bổ sung thêm khoáng vì lượng nuôi trong 40-48 giờ, nấm phát triển, đem sấy khô và nghiền thành bột làm thức ăn cho gia súc. Bột này có hàm lượng protein tổng số lên tới 10%.

Nấm sợi có thể được nuôi trên nhiều loại cơ chất để thu nhận SCP như rỉ đường, các loại bột (sắn, khoai lang, khoai tây gạo, ...). Thường sử dụng các loài nấm sợi: *Cladosporium*, *Spicaria elegans*, *Fusarium graminearum*, *Grafium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, và các loại khác. Các loài nấm này thường được nuôi ở pH (3,0-4,5) trong điều kiện này sẽ ngăn cản sự phát triển của những vi khuẩn nhiễm vào môi trường nuôi. Hàm lượng protein thô của các loài nấm sợi được lựa chọn để lên men đạt trung bình từ 40-60% (bảng 6.5).

**Bảng 6.5.** Hàm lượng protein thô, N  $\alpha$ -amin và N phi protein ở một số loài nấm

| Loài nấm                    | Nguồn C   | Protein thô | N $\alpha$ -amin | N phi protein (kể cả kitin) |
|-----------------------------|-----------|-------------|------------------|-----------------------------|
| <i>Aspergillus oryzae</i>   | Tinh bột  | 50,2        | 28,7             | 42,6                        |
| <i>A. oryzae</i>            | Rỉ đường  | 42,3        | 26,1             | 38,2                        |
| <i>A. niger</i>             | Rỉ đường  | 47,9        | 25,5             | 46,6                        |
| <i>P. chrysogenum</i>       | Đường sữa | 56,3        | 41,5             | 26,0                        |
| <i>P. chrysogenum</i>       | Rỉ đường  | 48,2        | 26,8             | 44,3                        |
| <i>Neurospora sitophila</i> | Tinh bột  | 65,7        | 35,6             | 45,6                        |
| <i>N. sitophila</i>         | Rỉ đường  | 50,6        | 33,7             | 33,5                        |
| <i>Fusarium graminearum</i> | Tinh bột  | 54,0        | 42,1             | 22,0                        |
| <i>F. moniliforme</i>       | Rỉ đường  | 51,5        | 35,6             | 30,9                        |
| <i>Alternaria tenuis</i>    | Tinh bột  | 51,5        | 28,3             | 49,4                        |
| <i>A. tenuis</i>            | Rỉ đường  | 49,5        | 22,3             | 55,0                        |
| <i>Agaricus bispora</i>     | Rỉ        | 32,8        | 19,4             | 41,0                        |

*Paecilomyces elegans*, *Aspergillus oryzae*, *myrothecium verrucaria* và *Trichoderma reesei* là những loài nấm thích hợp đối với sự tạo thành sinh khối trên nước thải của công nghiệp sản xuất cà phê và rượu rum. Nếu lên men ở điều kiện vô trùng pH ban đầu 4,2, thì sau 6-8 ngày lên men sản lượng sinh khối có thể đạt 20-30g/lít dịch nuôi, và hàm lượng protein đạt 20-34%. Sau khi nuôi nấm hàm lượng chất hữu cơ trong nước thải giảm đi, từ 13-15% giảm còn 2-3%. Các kết quả tương tự cũng thấy khi lên men *Verticillium sp.* trên nước thải sản xuất cà phê; *Aspergillus fumigatus* trên bã mía, nước thải của công nghiệp thực phẩm, bột giấy từ gỗ; *Penicillium digitatum* trên nước thải sản xuất tinh bột khoai tây, v.v...

Trong trường hợp dùng nấm sợi để cho ăn trực tiếp, cần lưu ý đến hàm lượng kitin cao trong thành tế bào nấm và độc tố của nấm có thể có trong thành phẩm. Cần tiến hành kiểm tra trước khi sử dụng. Về chất lượng protein của nấm sợi, nhiều phân tích cho thấy rằng hàm lượng các acid amin chứa lưu huỳnh như cystein và methionin trong nấm sợi thấp hơn protein của động vật.

## 6.5. Sản xuất nấm ăn

Các chất thải của nông nghiệp như rơm, rạ, bã mía, của công nghiệp như gỗ vụn, mùn cưa, v.v... Những nguyên liệu này một phần bị đốt cháy thành tro, một phần được ủ để phân giải nhờ vi sinh vật. Bằng các kỹ thuật khác nhau các chất thải này đã được dùng làm cơ chất để trồng các loài

nấm quý vừa làm thực phẩm, vừa làm dược phẩm. Cơ chất trồng nấm sau khi thu hoạch nấm là những sản phẩm đã được phân giải, được dùng làm phân bón hữu cơ hoặc chế biến thành các thức ăn cho cá hoặc một số động vật có giá trị kinh tế.

Các bã thải hữu cơ nhờ công nghệ trồng nấm đã mang lại những hiệu quả sau:

- Chất thải được loại bỏ đã được xử lý thành những sản phẩm an toàn trả lại cho môi trường xung quanh và hoà nhập vào môi trường sinh thái nhờ các quá trình chuyển hoá tự nhiên.
- Chất thải rắn hay chất thải lỏng đều có thể dùng làm cơ chất cho công nghệ trồng nấm.
- Lignin không tiêu hoá được cùng các thành phần của thành tế bào đã bị lignin hoá cao như cellulose và hemicellulose đều có thể bị phân huỷ nhờ các enzym của nấm làm biến đổi hoàn toàn.
- Các nguồn carbon từ các chất thải hầu như không sử dụng được nhờ trồng nấm ta thu được sinh khối giàu protein có giá trị dinh dưỡng cao (nấm rơm, nấm mỡ, nấm sò, nấm hương, mộc nhĩ,...), nấm dược liệu (linh chi,...).

***Quy trình trồng nấm ăn có thể tổng quát về nguyên tắc như sau:***

Giống nấm được chuẩn bị và nhân giống trong phòng thí nghiệm nhằm tạo ra một số lượng lớn bào tử. Sau đó đem rắc bào tử nấm lên cơ chất trồng nấm đã được chuẩn bị sẵn, cơ chất có thể ủ thành luống nhỏ (trồng nấm rơm), hay bó lại thành các bịch hình trụ và xếp thứ tự trên các giá, nuôi trong nhà kính, hay nuôi hở ngoài trời, hoặc nhà có mái che. Điều quan trọng là giữ được nhiệt độ và độ ẩm thích hợp để bào tử nấm nảy mầm, sau đó tạo quả thể. Trong quá trình chăm sóc cho quả thể phát triển thường tưới hoặc phun thêm các dung dịch có chứa dinh dưỡng (N,P,K, ...). Nếu chăm sóc đúng kỹ thuật sẽ thu hoạch quả thể được nhiều lần, và năng suất sẽ cao. Trồng nấm hiện nay là một nghề phụ của nhiều gia đình nông dân Việt Nam góp phần xoá đói giảm nghèo, làm trong sạch môi trường sống.

Nấm ăn được trồng ở nhiều nước trên thế giới ở các điều kiện khí hậu khác nhau. Các chất thải của nông và công nghiệp là những cơ chất thích hợp của nghề trồng nấm. Nấm mỡ được trồng nhiều ở châu Á, châu Úc và bắc Mỹ. Đài loan là nơi sản xuất nấm ăn đứng thứ ba thế giới. Trung Quốc là nước sản xuất nấm rơm nhiều nhất, nấm này cũng được trồng nhiều ở Philippin, Việt Nam và Indonesia.

## Chương 7

# CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ Y HỌC

### 7.1. Giới thiệu tổng quát

Cho tới đầu thế kỷ XX nhân loại luôn phải đối đầu với cái chết do các bệnh dịch gây ra, tỷ lệ chết sơ sinh lên tới 25%, chết trẻ em cũng lên đến 25%. Các bệnh dịch làm chết hàng loạt người không loại trừ lứa tuổi nào. Chỉ có khoảng 2% dân số sống được quá 65 tuổi. Đời sống của mọi người vất vả nghèo đói, thiếu dinh dưỡng, dịch bệnh gây chết hàng loạt mà không phương cứu chữa, chính những hiểm họa đó đã thúc đẩy việc nghiên cứu để tìm ra nguyên nhân gây bệnh và các thuốc đặc trị tiêu diệt các mầm bệnh đó như các chất sát trùng, kháng sinh, các vaccin, v.v... Với sự cải thiện điều kiện sống, cùng với các vũ khí hữu hiệu tiêu diệt các vi khuẩn, virus là các vaccin và các chất kháng sinh, tuổi thọ của con người đã tăng từ 35 lên đến 80 tuổi. Điều kiện sống ngày càng được cải thiện, các bệnh nhiễm khuẩn bị đẩy lùi thì các bệnh hiểm nghèo khác lại xuất hiện đe dọa tính mạng của nhân loại như các bệnh ung thư, tim mạch, AIDS, tiểu đường, bệnh alzheimer, v.v... Các bệnh hiểm nghèo đó đang có xu hướng tăng nhanh. Người ta hy vọng sẽ điều trị được các bệnh đó một cách có hiệu quả nhờ kỹ thuật di truyền phân tử và công nghệ sinh học hiện đại. Một lĩnh vực y học mới ra đời đó là y học di truyền (*genic medicine*). Một số bệnh ung thư có liên quan đến gen gây ung thư mang tính di truyền qua các thế hệ trong gia đình. Do sự khám phá ra bản đồ gen người mà các nhà điều trị học biết được gen gây bệnh nằm ở vị trí nào, chỉ cần loại bỏ gen đó là cơ thể trở lại bình thường.

Các sản phẩm của công nghệ sinh học dùng trong y học có đặc điểm là chỉ sản xuất trên qui mô nhỏ (bình lên men chỉ vài lít), sản lượng chỉ tính bằng gam nhưng cũng có giá trị lớn và có thể điều trị cho nhiều người (interferon, somatostatin, ...).

Sản phẩm của công nghệ sinh học dùng trong y học có thể chia ra như sau:

- Các sản phẩm dùng cho điều trị: các hormon, các protein điều hoà, các kháng thể.
- Các kit chẩn đoán các bệnh di truyền trước khi sinh.
- Các vaccin.

- Chẩn đoán miễn dịch và các mẫu ADN để xác định bệnh.
- Liệu pháp điều trị gen.

Thị trường thương mại hiện tại và tương lai sẽ còn giới thiệu nhiều sản phẩm mới của công nghệ sinh học phục vụ y học. Tuy nhiên để đầu tư vào nghiên cứu sản xuất các dược phẩm kỳ diệu này đòi hỏi phải có nhiều tiền, có kỹ thuật cao, và cũng mang nhiều tính may rủi. Các nhà chiến lược phải có kiến thức, sáng suốt và có quyết sách đúng đắn nếu không sẽ nhận được những tổn thất cay đắng.

## 7.2. Dược phẩm và dược sinh học

Một khối lượng khổng lồ các dược phẩm hiện đang được sử dụng trong y học được sản xuất bằng tổng hợp hoá học hoàn toàn, hoặc là sự biến đổi bằng hoá học các chất có nguồn gốc sinh học. Dược sinh học (biopharmaceuticals) là những chất được xem như những protein thuốc do kết quả tái tổ hợp di truyền, các vaccin tái tổ hợp, các kháng thể đơn dòng (monoclonal antibodies) dùng cho điều trị các bệnh khác nhau. Hiện nay các dược phẩm do công nghệ sinh học tạo ra mới chiếm một thị phần nhỏ trong công nghiệp dược. Song trong tương lai gần các sản phẩm do công nghệ này sản xuất sẽ phát triển nhanh chóng và chiếm địa vị quyết định trong điều trị những bệnh hiểm nghèo. Nghiên cứu tìm các thuốc mới bằng công nghệ sinh học là mục tiêu trước mắt cũng như lâu dài của y học hiện đại. Kỹ thuật hoá sinh cũng sẽ thúc đẩy công việc tìm kiếm, thử nghiệm các thuốc mới và giải thích cơ chế tác dụng của thuốc trên cơ thể ở mức phân tử.

## 7.3. Sản xuất các kháng sinh

Năm 1928, Alexander Fleming, nhà vi khuẩn học người Anh trong khi nghiên cứu tụ cầu khuẩn ông nhận thấy xung quanh khuẩn lạc mọc xanh nhiễm vào hộp Petri nuôi tụ cầu tạo thành vòng vô khuẩn. Hiện tượng kỳ lạ đó đã được Fleming nghiên cứu và phân lập thuần khiết và xác định được mốc xanh đó là *Penicillium notatum*. Các nghiên cứu về *P. notatum* tiếp theo không mang lại kết quả gì vì Fleming và cộng sự không thu được hoạt chất “kỳ diệu” đã tiêu diệt tụ cầu khuẩn vì hoạt lực của chất tạo ra đó nồng độ quá thấp và có lẽ cũng dễ bị phân huỷ. Phát minh của Fleming bị lãng quên. Đến năm 1939 hai nhà khoa học Florey & Oxfor đã nghiên cứu lại vấn đề này và hai ông đã thành công. Hoạt chất chiết ra được từ môi trường lên men nấm *P. notatum* đó được đặt tên là penicilin. Đến năm 1941 penicilin được nghiên cứu sản xuất phục vụ điều trị cho thương binh trong đại chiến thế giới thứ hai. Tuy nhiên lúc bấy giờ mới chỉ biết kỹ thuật lên men bề mặt hiệu quả thấp. Giá thành 1kg penicilin (1944) là 227.270 USD; và kỷ nguyên của chất kháng sinh được thừa nhận tính từ năm 1941. Cho

đến nay người ta đã phát hiện và mô tả khoảng hơn 8000 chất kháng sinh khác nhau có nguồn gốc từ nấm mốc, xạ khuẩn và vi khuẩn. Thuật ngữ kháng sinh (*antibiotic*) được Watsman N.A gọi từ 1944 khi ông phát minh ra streptomycin từ môi trường nuôi cấy *Streptomyces griseus*. Thuật ngữ này đã được quen dùng cho đến bây giờ. Song khái niệm về chất kháng sinh cũng đã có những thay đổi do các nhà khoa học ở các lĩnh vực khác nhau muốn mở rộng khái niệm về chất kháng sinh để gọi cho một số hợp chất khác nữa, và cũng muốn cái chất do mình phát minh ra cũng được đứng vào danh mục của các hợp chất “kỳ diệu” này.

Theo các nhà sinh học định nghĩa Kháng sinh là những hợp chất hoá học do vi sinh vật tiết ra có tác dụng ức chế sự phát triển hay tiêu diệt một cách chọn lọc một nhóm vi sinh vật xác định (vi khuẩn, nấm, xạ khuẩn, protozoa, virus) hay cả tế bào ung thư ở nồng độ thấp. Còn các nhà hoá học thì muốn định nghĩa kháng sinh phải bao hàm cả các chất tổng hợp bằng hoá học có tác dụng diệt khuẩn như các chất thuộc quinolon (pefloxacin, norfloxacin, v.v...) Song đa số các nhà khoa học khẳng định chỉ nên gọi các chất kháng sinh là các chất có nguồn gốc từ tế bào sống (vi sinh vật, tế bào động vật, thực vật). Các chất tổng hợp bằng hoá học nếu được gọi là kháng sinh thì tiêu chuẩn chất đó phải do vi sinh vật tạo ra, sau đó các nhà hoá học bắt chước tổng hợp lại bằng hoá học để giải quyết vấn đề kinh tế (chloramphenicol do *Streptomyces venezuela* tạo ra). Các chất tổng hợp bằng hoá học thuộc nhóm quinolon nên gọi là các chất kháng khuẩn (antibacterial).

Kháng sinh đã được sử dụng trong y học từ 1945 (penicilin) sau đó một loạt các chất kháng sinh khác từ xạ khuẩn được phát minh ra và nhanh chóng được sử dụng để điều trị các bệnh nhiễm trùng hiểm nghèo (bảng 7.1).

**Bảng 7.1.** Một vài kháng sinh quan trọng có giá trị kinh tế cao.

| Tên kháng sinh | Vi sinh vật sản xuất kháng sinh  | Hoạt phổ      |
|----------------|----------------------------------|---------------|
| Penicilin G    | <i>Penicillium chrysogenum</i>   | Kháng khuẩn   |
| Streptomycin   | <i>Str. griseus</i>              | Kháng khuẩn   |
| Tetracyclin    | <i>Str. aureofaciens</i>         | Kháng khuẩn   |
| Chloramfenicol | <i>Str. venezuela</i>            | Kháng khuẩn   |
| Oxytetracyclin | <i>Str. rimosus</i>              | Kháng khuẩn   |
| Cephalosporin  | <i>Cephalosporium acremonium</i> | Kháng khuẩn   |
| Actinomycin D  | <i>Str. antibioticus</i>         | Kháng ung thư |
| Bleomycin      | <i>Str. verticillium</i>         | Kháng ung thư |
| Daunorubicin   | <i>Str. peucetius</i>            | Kháng ung thư |
| Mitomycin C    | <i>Streptomyces sp</i>           | Kháng ung thư |

**Bảng 7.1. (tiếp)**

|              |                                 |                    |
|--------------|---------------------------------|--------------------|
| Kanamycin    | <i>Str. kanamyceticus</i>       | Kháng khuẩn        |
| Nistatin     | <i>Str. noursei</i>             | Kháng nấm          |
| Fumagillin   | <i>Aspergillus fumigatus</i>    | Kháng protozoa     |
| Griseofulvin | <i>Penicillium griseofulvum</i> | Kháng nấm          |
| Nisin        | <i>Streptococcus sp.</i>        | Bảo quản thực phẩm |
| Natamycin    | <i>Streptococcus sp.</i>        | Bảo quản thực phẩm |
| Rifamycin    | <i>Nocardia sp.</i>             | Kháng lao          |
| Polymyxin B  | <i>Bacillus polymyxa</i>        | Kháng khuẩn        |
| Gentamycin   | <i>Micromonospora sp.</i>       | Kháng khuẩn        |

Kháng sinh còn được sử dụng trong thú y để điều trị các bệnh nhiễm trùng của động vật như viêm phổi ở trâu bò, tụ huyết trùng ở lợn, v.v... Ngày nay, kháng sinh còn được ứng dụng trong nông nghiệp trước hết để tiêu diệt các nấm và vi khuẩn gây bệnh cho cây trồng như các bệnh khô vằn, vàng lụi ở lúa (*validamycin*, *blasticidin S*, *kasugamycin*, v.v...) bệnh thối cổ rễ ở các cây có củ, v.v... Kháng sinh còn kích thích nảy mầm của hạt. Thường ngâm hạt trong dung dịch kháng sinh trước khi gieo vừa để kích thích nảy mầm, vừa tiêu diệt mầm bệnh có trong hạt. Cũng có thể phun dung dịch kháng sinh cho cây trồng đang bị bệnh, hoặc trộn các vi sinh vật sinh kháng sinh vào trong đất để tiêu diệt mầm bệnh có trong đất. Trong chăn nuôi kháng sinh được sử dụng làm chất bổ sung vào thức ăn nhằm kích thích tăng trọng. Rất nhiều chất kháng sinh được ứng dụng với mục đích này (các kháng sinh nhóm tetracyclin, bacitracin, monelzin, ...). Kháng sinh còn được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm để bảo quản thực phẩm đóng hộp. Nếu dùng kháng sinh thực phẩm đóng hộp sẽ bảo quản được lâu hơn, khử trùng ở nhiệt độ thấp hơn nên chất lượng thực phẩm giữ được tốt hơn (trên thực tế thường sử dụng nizin là kháng sinh do *B. likeniformis* tạo ra). Tuy nhiên cũng cần lưu ý khi dùng kháng sinh trong chăn nuôi và bảo quản thực phẩm, nếu còn dư lượng kháng sinh thì thực phẩm đó sẽ không bán được, người ta lo sợ sẽ ảnh hưởng đến vấn đề kháng thuốc của các vi sinh vật gây bệnh. Vì vậy chỉ nên sử dụng những kháng sinh nào không dùng trong y học vào mục đích bảo quản thực phẩm, và trong chăn nuôi, hoặc phải có những kỹ thuật thích hợp.

Hàng năm toàn thế giới sản xuất khoảng 100.000 tấn kháng sinh các loại với tổng giá trị khoảng 10 tỷ USD. Riêng nhóm kháng sinh betalactam (penicilin và cephalosporin) chiếm tới 7 tỷ USD. Kháng sinh dùng điều trị các bệnh nhiễm trùng chủ yếu do vi khuẩn gây ra. Hàng trăm chất kháng sinh dùng trong y học hiện nay đã được coi là những “thần dược” của

những năm 70 của thế kỷ XX. Song do nhiều nguyên nhân khác nhau nên hiện nay xuất hiện nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh kháng lại kháng sinh, cho nên những kháng sinh kinh điển không còn tác dụng đối với một số bệnh nhiễm trùng nữa. Việc tìm ra các chất kháng sinh mới bổ sung phổ tác dụng là cần thiết. Hàng năm các nhà nghiên cứu công bố phát hiện khoảng 100 chất kháng sinh mới. Tuy nhiên để đưa được một kháng sinh mới vào điều trị không phải đơn giản, vì nhiều kháng sinh phát hiện ra có phổ kháng khuẩn rất tốt trên invitro. Nhưng khi nghiên cứu trên invivo thì kháng sinh đó lại bị loại vì nhiều lý do khác nhau như: độc tính cao, không có tác dụng khi tiếp xúc với dịch cơ thể, và nếu sản xuất được thì giá thành quá cao, v.v... Sinh học phân tử đã tìm ra được gen điều khiển sinh tổng hợp kháng sinh. Song việc nghiên cứu để tìm các kháng sinh mới vẫn là quá trình phân lập và sàng lọc hàng ngàn mẫu đất khác nhau rất tốn kém. Phương hướng nghiên cứu và sản xuất các kháng sinh mới có hiệu quả điều trị hiện nay thường kết hợp các phương pháp sinh học và hoá học. Một kháng sinh mới được tìm ra khi biết rõ cấu trúc hoá học, có thể biến đổi cấu trúc hoá học bằng bán tổng hợp để có thêm những ưu điểm mới của phân tử như tăng tác dụng kháng sinh, giảm các tác dụng phụ và độc tính, v.v... Kháng sinh nhóm betalactam lúc đầu chỉ có penicilin G, V và cephalosporin C hiện nay đã bán tổng hợp bằng hoá học hàng ngàn chất khác nhau và sử dụng trong điều trị hàng trăm chất.

Để có được một chất kháng sinh dùng trong y học phải trải qua nhiều công đoạn, trong phạm vi cuốn sách này không đề cập đến được vì quá dài. Tuy nhiên có thể tổng quát bằng các bước sau:

- **Bước 1.** Phân lập vi sinh vật sinh kháng sinh (vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm) dưới dạng thuần khiết. Chọn được chủng có hoạt phổ kháng sinh mong muốn. Định tên vi sinh vật tuyển chọn được.
- **Bước 2.** Nuôi cấy vi sinh vật sinh kháng sinh trong thiết bị lên men dung tích từ 5-100 lít. Chiết xuất, tinh chế để thu kháng sinh tinh khiết, xác định cấu trúc hoá học, thử sơ bộ về độc tính và một vài hằng số lý hoá của kháng sinh tìm được. Nếu là kháng sinh mới, có triển vọng thì tiếp tục nghiên cứu các bước tiếp theo.
- **Bước 3.** Nghiên cứu các đặc điểm sinh lý, sinh hoá của vi sinh vật sinh kháng sinh, tìm môi trường tối ưu để nuôi cấy. Đột biến cải tạo giống bằng các kỹ thuật di truyền cổ điển và kỹ thuật gen để thu được chủng giống có năng suất cao, ổn định.
- **Bước 4.** Nghiên cứu dược lý của kháng sinh tìm được, tác dụng điều trị của kháng sinh bằng cách gây bệnh thực nghiệm trên động vật thí nghiệm.
- **Bước 5.** Nghiên cứu sản xuất kháng sinh trên qui mô công nghiệp bao gồm: môi trường lên men, các thông số kỹ thuật của quá trình lên

men, phương pháp chiết xuất và tinh chế để đạt tiêu chuẩn dùng làm thuốc, v.v...

• **Bước 6.** Nghiên cứu về kinh tế và thị trường.

Hơn 8000 chất kháng sinh đã được phát minh. Vì vậy để phát minh thêm một kháng sinh mới không trùng với các chất đã mô tả là vấn đề khó khăn. Tuy nhiên cũng có những nguyên tắc nhất định để nhanh chóng nhận biết chất kháng sinh tìm thấy có phải là chất mới hay không? Về tác dụng sinh học, có nguyên tắc liên quan giữa cấu trúc hoá học và tác dụng kháng sinh. Các chất kháng sinh được phân loại theo cấu trúc hoá học (bảng 7.2).

**Bảng 7.2.** Phân loại các chất kháng sinh dựa theo cấu trúc hoá học.

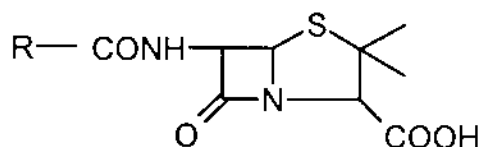
| Phân loại                                               | Nhóm kháng sinh          | Kháng sinh cụ thể        |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. Các kháng sinh có chứa đường trong phân tử           | Aminoglycosid            | Streptomycin, neomycin   |
|                                                         | Orthosomycin             | Everninomycin            |
|                                                         | N- glycosid              | Streptothricin           |
|                                                         | C- glycosid              | Vancomycin               |
|                                                         | Glycolipid               | Moenomycin               |
| 2. Kháng sinh chứa vòng lacton lớn (macrocyclic lacton) | Kháng sinh macrolid      | Erythromycin             |
|                                                         | Kháng sinh polyen        | Candididin, nistatin     |
|                                                         | Ansamycin                | Rifamycin                |
|                                                         | Macrotetrolid            | Tetranactin              |
| 3. Quinon và các kháng sinh cùng họ.                    | Anthracyclin             | Adriamycin               |
|                                                         | Naphthoquinon            | Actinorhđin              |
|                                                         | Benzoquinon              | Mitomycin                |
|                                                         | Các tetracyclin          | Tetracyclin, terramycin  |
| 4. Các kháng sinh aminoacid và peptid                   | Dẫn xuất aminoacid       | Cycloserin               |
|                                                         | Kháng sinh betalactam    | Penicilin, Cephalosporin |
|                                                         | Kháng sinh peptid        | Bacitraxin, polymycin    |
|                                                         | Chromopeptid             | Actinomycin              |
|                                                         | Depsipeptid              | Valinomycin              |
| 5. Kháng sinh dị vòng chứa nitơ                         | Các kháng sinh nucleosid | Polyoxin                 |
| 6. Kháng sinh dị vòng chứa oxy                          | Các kháng sinh polyether | Monensin                 |
| 7. Các kháng sinh nhân thơm                             | Dẫn xuất benzen          | Cloramfenicol            |
|                                                         | Các ether thơm           | Novobiocin               |

Các chất kháng sinh cùng nhóm cấu trúc thì các tính chất hoá học, hoá lý, tác dụng phụ và tác dụng điều trị gần như nhau, chỉ khác nhau về cường độ tác dụng và liều dùng. Các kháng sinh nhóm betalactam có khung 6-APA hay 7-ACA đều có tác dụng phụ là có thể gây sốc phản vệ, dễ bị enzym betalactamase phá huỷ,... Các kháng sinh thuộc nhóm aminoglycosid có cấu trúc bao gồm phần đường nối với nhau bằng dây nối osid và phần aglycol, chúng có tính base yếu nên để chiết xuất các kháng sinh nhóm này chỉ cần dùng nhựa trao đổi ion thuộc loại có nhóm trao đổi là carboxy cationid. Chính vì qui luật đó mà có thể phát hiện các kháng sinh nhóm này rất dễ dàng. Muốn tìm một chất kháng sinh tiêu diệt được loại vi khuẩn gây bệnh nào đó thường sử dụng chính vi khuẩn đó làm vi khuẩn kiểm định ban đầu. Muốn tìm một kháng sinh chống ung thư thì vấn đề phức tạp hơn nhiều. Thường phải sử dụng các dòng tế bào ung thư và nuôi cấy tế bào đó trong môi trường đặc biệt, rồi tiến hành thử trực tiếp hoặc gián tiếp. Tìm một kháng sinh có tác dụng chống virus cũng rất khó khăn, thường phải sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào. Vì virus là loại ký sinh bắt buộc trên tế bào sống. Cho tới nay đã có hàng chục kháng sinh chống ung thư được sử dụng trong điều trị có hiệu quả. Song chưa có một kháng sinh nào có tác dụng để điều trị virus. Các bệnh do virus gây ra thường sử dụng các vaccin và interferon sẽ được nói tới ở phần sau.

## 7.4. Công nghệ sản xuất penicilin và các kháng sinh bán tổng hợp nhóm betalactam

### 7.4.1. Giới thiệu chung về penicilin

Penicilin là tên gọi chung của một nhóm chất có cấu trúc hoá học giống nhau, gồm vòng betalactam nối với vòng thiazolidin.

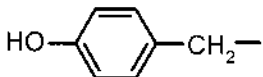
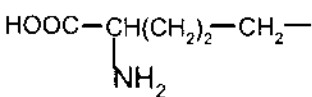


Các penicilin chỉ khác nhau ở cấu trúc mạch bên. Khi lên men *P.chrysogenum* trong môi trường không có tiền chất ta thấy xuất hiện nhiều penicillin khác nhau.

Penicilin là kháng sinh được phát minh vào 1928, là kháng sinh được nghiên cứu để sản xuất công nghệ lên men chìm đầu tiên vào 1945. Penicilin và các dẫn chất bán tổng hợp cùng với các cephalosporin bán tổng hợp là nhóm kháng sinh quan trọng nhất hiện nay để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Penicilin là kháng sinh được sản xuất với tấn lượng lớn nhất

trong tất cả các kháng sinh hiện có, doanh số của penicilin và các chất cùng nhóm chiếm đến 80% doanh số của tất cả các kháng sinh hiện đang sử dụng trong điều trị (khoảng 7 tỷ USD mỗi năm). Penicilin là kháng sinh sản xuất khó nhất vì nó chứa vòng betalactam nên không bền vững trong môi trường nước. Thiết bị cũng như công nghệ sản xuất penicilin cũng hiện đại nhất trong công nghệ kháng sinh. Penicilin là kháng sinh vẫn còn triển vọng nhất vì nó vừa là thuốc, vừa là nguyên liệu để sản xuất ra các kháng sinh nhóm betalactam. Trong môi trường lên men *Penicilium chrysogenum*, nếu không có tiền chất nấm sẽ tạo ra hàng loạt các penicilin có các mạch ngang khác nhau (bảng 7.3).

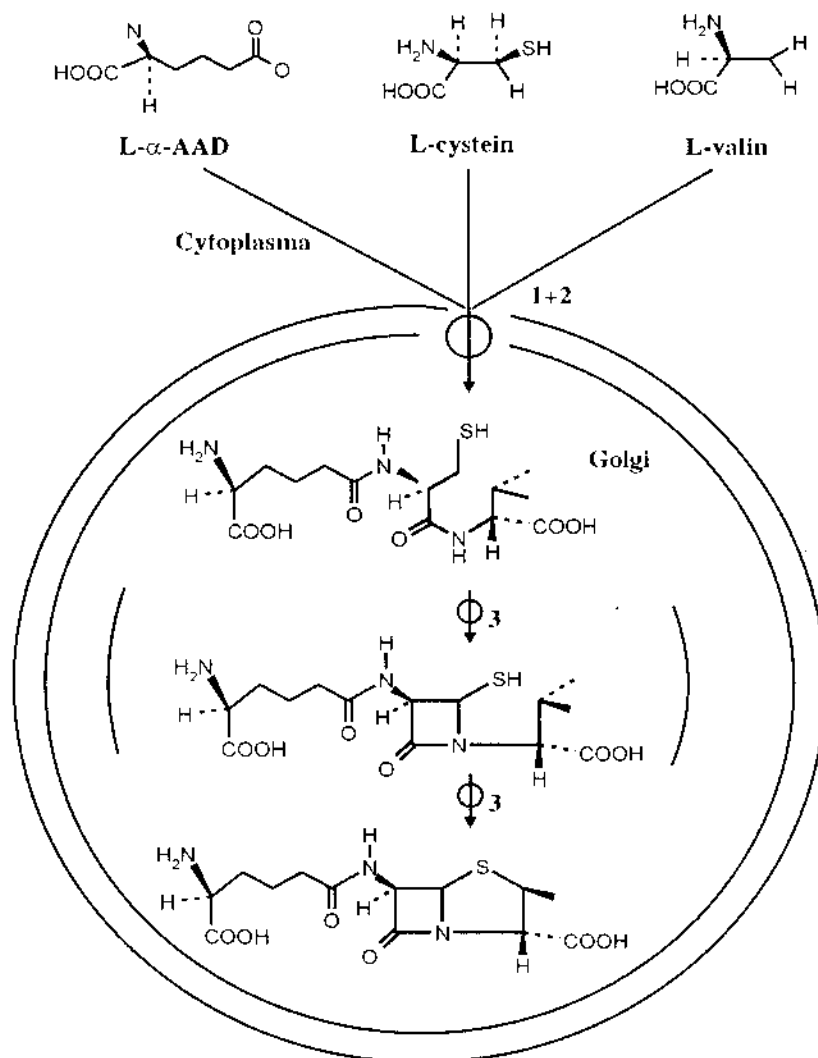
**Bảng 7.3.** Cấu trúc phân tử của các penicilin thiên nhiên

| Gốc R                                                                               | Tên gọi gốc                       | Tên penicilin      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5 - \text{CH}_2 -$                                        | Hepthylpenicilin                  | Penicilin K (IV)   |
| $\text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2$                      | 2-pentenylpenicilin               | Penicilin F (I)    |
| $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH}_2 -$                                     | Amylpenicilin                     | Dihydropenicilin F |
| $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 -$                                              | Benzylpenicilin                   | Penicilin G        |
|   | Phenoxymethylpenicilin            | Penicilin V        |
|  | 1-amino-4-carboxy-buthylpenicilin | Penicilin N        |
| $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{O} - \text{CH}_2 -$                                   | Paraoxybenzylpenicilin            | Penicilin X (III)  |

Nhưng nếu nuôi nấm trên môi trường chứa cao ngô và tiền chất là acid phenylacetic nấm sẽ tạo ra penicilin G (benzylpenicilin). Cũng trong điều kiện như trên, nếu cho tiền chất là acid phenoxyacetic nấm sẽ tạo ra penicilin V (phenoxymethyl – penicilin) là một chất bền vững với acid nên có thể dùng đường uống được.

#### 7.4.2. Lên men sinh tổng hợp penicilin G

Nhìn vào công thức cấu tạo của phân tử penicilin cho thấy đây là một tripeptid vòng gồm 3 acid amin là: acid aminoadipic, cystein và valin. Có lẽ các acid này là tiền chất để tổng hợp ra nhân cơ bản của penicilin là 6-APA (hình 7.1).



**Hình 7.1.** Sự hình thành 6-APA trong tế bào *P.chrysogenum*.

Vì vậy, để lên men sinh tổng hợp penicilin nhờ *Penicillium chrysogenum* trong môi trường lên men, ngoài glucose hay lactose là nguồn năng lượng chính để nấm phát triển, cần phải bổ sung thêm nguồn đạm giàu acid amin (thường dùng cao ngô) để nấm xây dựng nên phân tử penicilin. Vì trong cao ngô có chất phenylethylamin  $C_6H_5 - CH_2 - CH_2 - NH_2$ . Nếu tiến hành lên men trên môi trường tự nhiên không có tiền chất, *penicilium chrysogenum* sẽ tạo ra các penicilin (bảng 7.3).

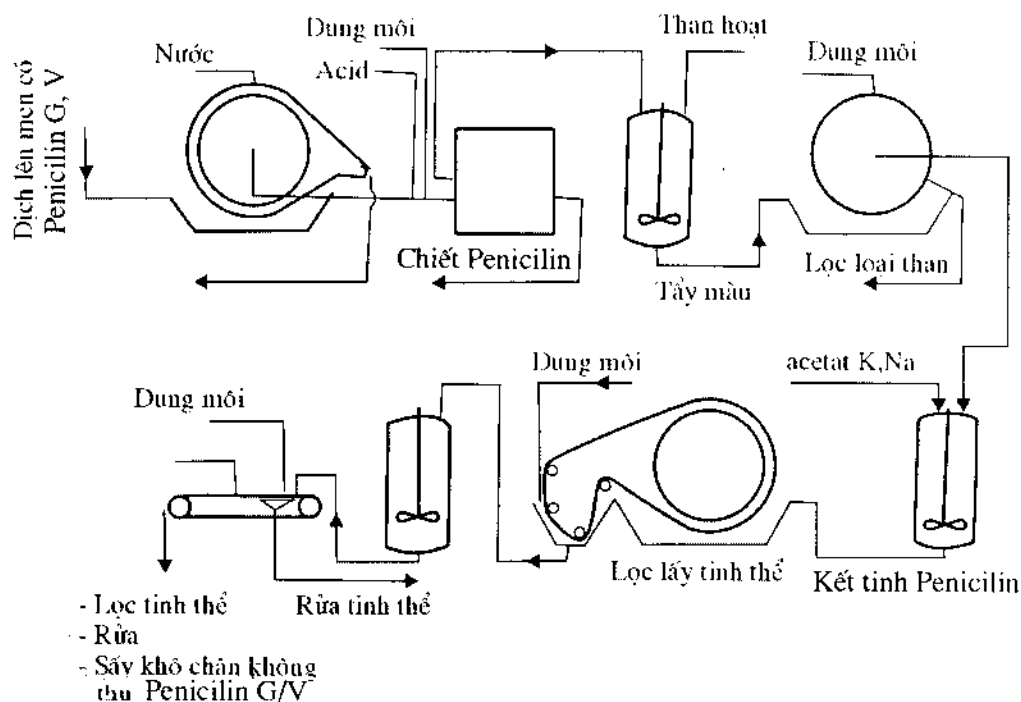
Trên thực tế, chỉ có penicilin G,V là có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất và được ứng dụng trong điều trị. Do đó, trong quá trình lên men, người ta đã cho tiền chất acid phenoxyacetic để tạo ra penicilin V.

Quá trình lên men được thực hiện ở nhiệt độ 26°C, trong thời gian 170 - 190h, có khuấy trộn và cung cấp không khí vô trùng, với lưu lượng 1 / 1 / phút (1 thể tích không khí / 1 thể tích môi trường / 1 phút).

### 7.4.3. Chiết xuất penicilin G

Penicilin G dạng acid tự do hoà tan nhiều trong dung môi hữu cơ như buthylacetat, amylacétat.

Trong công nghiệp thường sử dụng buthylacetat, vì có khả năng tốt nhất để tách penicilin khỏi môi trường nước. Vì penicilin dễ bị mất hoạt tính trong môi trường nước nên phải hạ nhiệt độ dịch lên men xuống 4°C, sau đó lọc loại sinh khối. Dịch lọc được chiết bằng buthylacetat trên máy ly tâm phân lập siêu tốc. Dịch chiết được tẩy màu bằng than hoạt, lọc loại than, dịch kháng sinh tinh khiết được kết tinh dạng muối penicilinat K hoặc Na bằng cách cho phản ứng với kali acetat hay natri acethat. Lọc lấy tinh thể, rửa tinh thể bằng butanol. Sấy khô sản phẩm dưới áp suất giảm (hình 7.2).

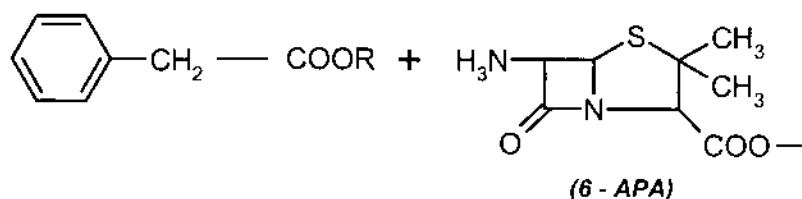
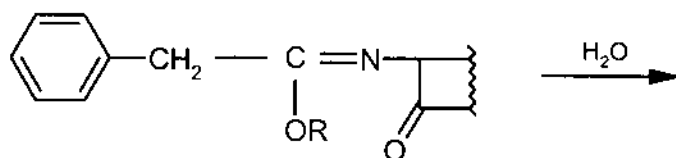
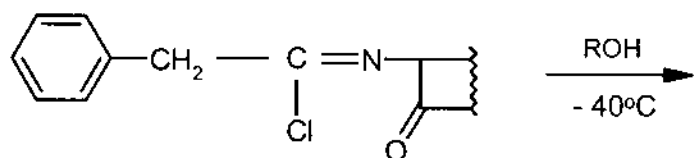


Hình 7.2. Sơ đồ chiết xuất Penicilin G từ môi trường lên men *P. chrysogenum*.

### 7.4.4. Sản xuất 6-APA và các penicilin bán tổng hợp

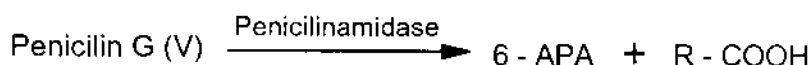
6-APA (acid-6-amino-penicilanic) là khung cơ bản của các penicilin bán tổng hợp, được phát hiện thấy trong môi trường lên men *P. chrysogenum*. Chất này không có hoạt tính kháng sinh, nhưng cũng bị

#### 7.4.4.1. Sản xuất 6-APA bằng phương pháp hoá học



## 93

penicilinamidase). Enzym này cắt đứt dây nối peptid ở mạch ngang của phân tử penicilin để tạo ra 6-APA theo phương trình:

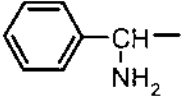
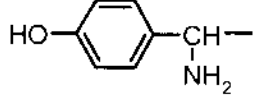
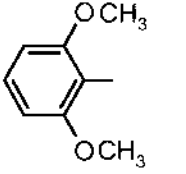
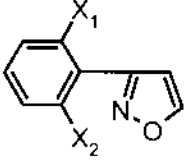
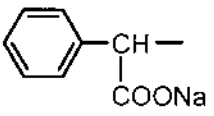


Nuôi *E.coli* hay *B. megatherium* trên môi trường có cao ngô, dịch tự phân nấm men, có thêm chất gây cảm ứng để tạo enzym là acid phenylacetic ở nhiệt độ 30°C/30 giờ. Ly tâm thu sinh khối, rửa sinh khối để loại hết môi trường. Trong bình phản ứng sinh học cho sinh khối *E. coli* hay *B. megatherium* vào để thực hiện phản ứng cắt đứt mạch bên của phân tử penicilin (nồng độ 0,15%) ở môi trường đệm có pH 8,5 và nhiệt độ 42°C. Kết thúc phản ứng chiết hết penicilin thừa chưa phản ứng bằng buthylacetat ở pH 2,5. Điều chỉnh pH về 7,0, lọc loại bỏ cặn. Cô đặc dung dịch 6-APA ở áp suất giảm và nhiệt độ <35°C còn 10% thể tích ban đầu. Kết tủa 6-APA ở pH đẳng điện (3,9-4,3). Lọc lấy sản phẩm và sấy khô ở áp suất giảm và nhiệt độ <50°C. Sản xuất 6-APA bằng phương pháp như trên enzym từ vi sinh vật chỉ sử dụng có một lần hiệu quả thấp, 1kg sinh khối *E. coli* chỉ phản ứng hết 5-20 kg penicilin. Khi công nghệ sinh học phát triển (sau năm 80 của thế kỷ XX), người ta đã tạo được các chủng *E. coli* và *B.megatherium* có hoạt tính enzym cao, đồng thời công nghệ sản xuất 6-APA đã thực hiện bằng phương pháp bất động enzym hoặc tế bào, nên qui trình sản xuất đã tự động hoá, đồng thời *penicilinamidase* dạng tinh khiết hay trong tế bào bất động được sử dụng để phản ứng nhiều lần mới phải thay thế. Công nghệ hiện đại và đơn giản hơn nên giá thành đã giảm đi rất nhiều. Hiệu suất phản ứng đạt đến 99,5%.

#### 7.4.4.3. Sản xuất các penicilin bán tổng hợp từ 6-APA

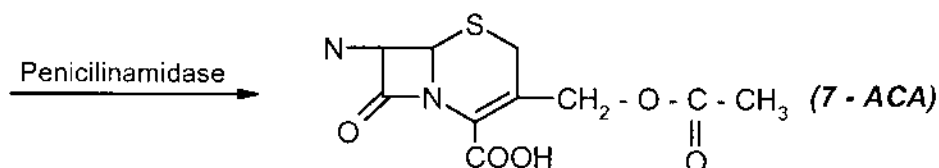
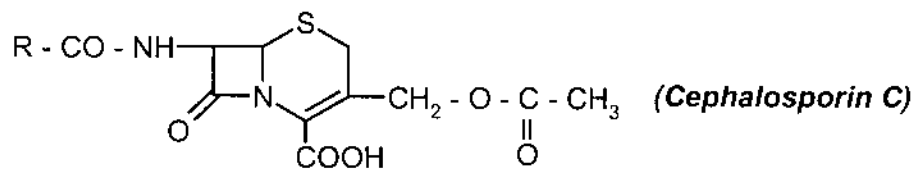
Penicilin G,V là những kháng sinh thiên nhiên do công nghệ lên men *P. chrysogenum* tạo ra hiện vẫn còn được sử dụng trong y học để điều trị một số bệnh nhiễm khuẩn. Benzathinpenicilin dùng điều trị bệnh thấp tim do liên cầu khuẩn gây ra ở trẻ em, bệnh do xoắn khuẩn. Rất nhiều chủng tụ cầu, phế cầu, liên cầu hiện đã kháng lại các penicilin thiên nhiên và bán tổng hợp thế hệ 1 và 2. Do đó việc nghiên cứu để tạo ra các dẫn chất bán tổng hợp mới từ 6-APA vẫn còn là vấn đề thời sự. Hiện đã có nhiều chất có hiệu quả điều trị cao được ứng dụng (bảng 7.4).

**Bảng 7.4.** Một số penicilin bán tổng hợp từ 6 - APA

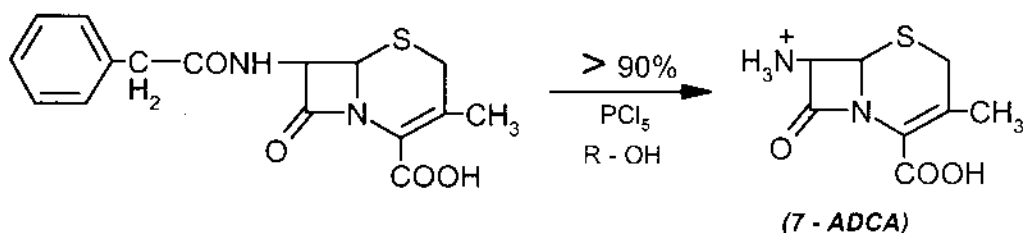
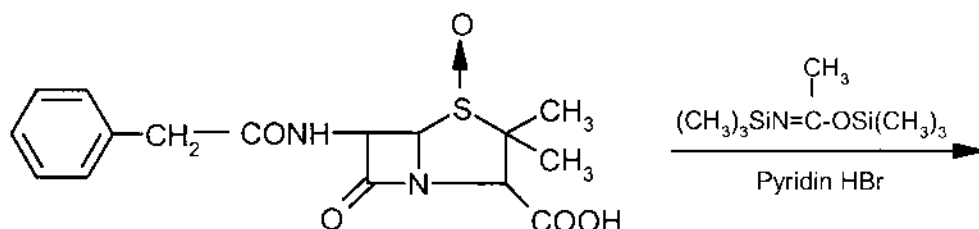
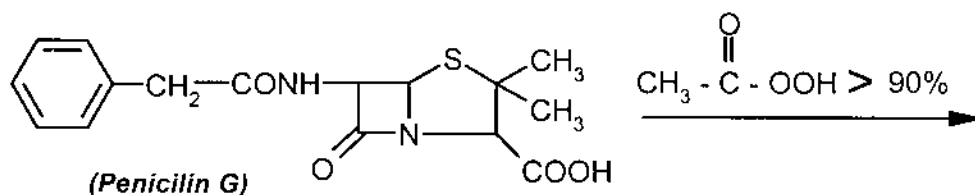
| Tên penicilin bán tổng hợp | Cấu tạo gốc                                                                                                           | Hoạt phổ                                                     | Sử dụng         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------|
| <i>Ampicilin</i>           |                                      | Phổ rộng, bền với acid.                                      | Uống hoặc tiêm. |
| <i>Amoxycyclin</i>         |                                      | Giống Ampicilin, ưu điểm hơn về dược động học.               | Uống hoặc tiêm. |
| <i>Methycilin</i>          |                                      | Giống Penicilin G, nhưng bền vững với betalactamase.         | Tiêm.           |
| <i>Oxacilin</i>            | <br>$X_1 = \text{H}; X_2 = \text{H}$ | Giống Penicilin G, nhưng bền vững với acid và betalactamase. | Uống hoặc tiêm. |
| <i>Cloxacilin</i>          | $X_1 = \text{Cl}; X_2 = \text{H}$                                                                                     |                                                              |                 |
| <i>Dicloxacinlin</i>       | $X_1 = \text{Cl}; X_2 = \text{Cl}$                                                                                    |                                                              |                 |
| <i>Carbenicilin</i>        |                                    | Phổ rộng                                                     | Tiêm.           |

#### 7.4.4.4. Sản xuất các Cephalosporin bán tổng hợp từ penicilin

Cephalosporin C là kháng sinh được chiết xuất từ môi trường lên men *Cephalosporium acremonium* có hoạt phổ tương tự như penicilin, cũng bị penicilinase phá vỡ vòng betalactam. Cephalosporin có nhân cơ bản là acid-7-amino-cephalosporinic (7-ACA). Nếu sử dụng enzym penicilinamidase phản ứng với cephalosporin C ta cũng thu được 7-ACA theo sơ đồ phản ứng sau:



Từ penicilin G,V bằng phương pháp hoá học có thể tạo được nhân 7-ADCA (acid 7-amino-deacetoxycephalosporinic). Sau đó enzym penicillinamidase lại thuỷ phân cắt đứt mạch bên để tạo ra nhân cơ bản 7-ADCA theo sơ đồ phản ứng sau:



Từ 7-ACA và 7-ADCA bằng các phản ứng hoá học đã tạo ra hàng ngàn các cephalosporin mới có hoạt phổ kháng khuẩn khác nhau, nhiều chất trong số đó đã được dùng điều trị các bệnh nhiễm khuẩn nặng mà các vi khuẩn đã kháng lại các penicilin (bảng 7.5)

**Bảng 7.5. Cephalosporin bán tổng hợp từ 7-ACA và 7-ADCA.**

| Nguồn gốc | Tên kháng sinh | Công thức |
|-----------|----------------|-----------|
| Từ 7-ADCA | Cephalexin     |           |
|           | Cephaclo       |           |
|           | Cephadrin      |           |
|           | Cephadrocin    |           |
| Từ 7-ACA  | Cephalexin     |           |
|           | Cephazolin     |           |
|           | Cefuroxim      |           |
|           | Cefotaxim      |           |

## 7.5. Vaccin

Vaccin là chế phẩm kháng nguyên gây trạng thái miễn dịch mà không gây bệnh. Vaccin dùng để kích thích đáp ứng miễn dịch nguyên phát, làm tăng tế bào nhớ và khả năng đáp ứng miễn dịch nhớ khi tiếp xúc với kháng nguyên lần sau. Vaccin khi vào cơ thể giúp cơ thể sản sinh kháng thể hoặc cytokin. Kháng thể hoặc tế bào T sản sinh cytokin sẽ phản ứng với kháng nguyên gây bệnh thực sự.

Vaccin được tạo ra dưới dạng tế bào chết hoặc tế bào đã làm bất hoạt không còn khả năng gây bệnh. Có thể nêu một vài loại vaccin đã được sử dụng trong y học sau đây (bảng 7.6):

**Bảng 7.6.** Vaccin phòng bệnh virus

| Tên Vaccin                | Dạng chế tạo            |
|---------------------------|-------------------------|
| - Đậu mùa (Small pox)     | - Virus sống đã làm yếu |
| - Sốt vàng (Yellow fever) | - Virus sống đã làm yếu |
| - Viêm gan B (Hepatitis)  | - Tái tổ hợp            |
| - Sởi (Measles)           | - Virus sống đã làm yếu |
| - Quai bị (Mumps)         | - Virus sống đã làm yếu |
| - Sởi Đức (Rubella)       | - Virus sống đã làm yếu |
| - Bại liệt (Polio)- Salk  | - Virus bất hoạt        |
| - Bại liệt (Polio)- Sabin | - Virus sống đã làm yếu |
| - Cúm (Influenza)         | - Virus bất hoạt        |
| - Đại (Rabies)            | - Virus bất hoạt        |

**Bảng 7.7.** Vaccin phòng bệnh vi khuẩn

| Tên Vaccin                                     | Dạng sản xuất                                                          |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| - Bạch hầu                                     | - Giải độc tố                                                          |
| - Uốn ván                                      | - Giải độc tố                                                          |
| - Ho gà                                        | - Dịch chiết từ <i>Bordetella pertusis</i>                             |
| - Viêm màng não                                | - Từ 4 chủng <i>Neisseria meningitidis</i>                             |
| - Nhiễm khuẩn <i>H. influenzae</i> typ b (hib) | - Từ <i>H. influenzae</i> typ 4 tiếp hợp với protein vi khuẩn bạch hầu |
| - Tả ( <i>cholera</i> )                        | - <i>Vibrio cholerae</i> chết                                          |
| - Dịch hạch ( <i>plague</i> )                  | - <i>Yersinia pestis</i> chết                                          |
| - Thương hàn ( <i>typhoid</i> )                | - <i>Salmonella typhi</i> chết                                         |
| - Viêm phổi liên cầu                           | - Từ 23 chủng <i>Streptococcus pneumoniae</i>                          |

Đa số vaccin được dùng cho trẻ em trong chương trình tiêm chủng mở rộng đã có tác dụng trong phòng chống các bệnh nhiễm trùng. Nhiều dịch bệnh nguy hiểm trước đây như tả, bại liệt, uốn ván sơ sinh, ho gà, v.v... nay đã bị đẩy lùi. Một số vaccin dùng cho người lớn, và một số sử dụng với mục đích đặc biệt. Người đi du lịch, đi công tác được tiêm vaccin để đảm bảo an toàn cho bản thân và cho nhân dân địa phương nơi họ đến. Hiện nay một số bệnh hiểm nghèo mới xuất hiện trong một vài thập niên trở lại đây đang có nguy cơ gia tăng, như HIV/ AIDS, SART. Song với những thành tựu của sinh học phân tử và kỹ thuật gen dựa trên nguyên lý của L. Pasteus ta có thể khẳng định được rằng sẽ tìm ra được các vaccin tương ứng để bảo vệ sức khoẻ cộng đồng.

#### **7.5.1. Vaccin giảm độc lực (*attenuated vaccins*)**

Sau khi nuôi cấy các chủng vi sinh vật để sản xuất vaccin, người ta thường xử lý chúng bằng nhiệt hay hoá chất như phenol, formalin để làm mất khả năng gây bệnh của chúng. Các vaccin đó được gọi là vaccin giảm độc lực. Tuy nhiên về nguyên tắc các chủng giảm độc lực vẫn có thể tái đột biến để trở thành chủng có độc tính và gây bệnh cho người. Vì vậy khâu kiểm định an toàn vaccin có qui chuẩn nghiêm ngặt để đề phòng những bất chắc có thể xảy ra.

Phần lớn vaccin giảm độc lực là vaccin virus. Người ta tuyển chọn virus đã gây đột biến có độc tính không đáng kể, rồi cho virus nhân lên trên tế bào chủ (có thể là tế bào thận, não, v.v...) ở nhiệt độ thấp. Vaccin bại liệt Sabin đã chọn được 3 chủng virus Polio khác nhau có thể nhân lên trong đường tiêu hoá và tuyến nước bọt. Chúng không có khả năng xâm nhập vào mô thần kinh do đó không gây được bệnh bại liệt. Tương tự như vậy vaccin sởi, quai bị, sởi Đức (*Rubella*) và sốt vàng dùng các chủng virus sống đã làm giảm độc lực. Các chủng virus dại (*Rabies*) làm giảm độc lực bằng cách sấy khô rồi cho nhân lên trong mô thần kinh trung ương của thỏ hay nhân tiếp trong phôi gà.

Vaccin BCG (*Bacille Calmette Guerin*) của Anh là ví dụ về vaccin vi khuẩn giảm độc lực dùng trong phòng lao cho trẻ em từ 10-14 tuổi. Chủng *Mycobacterium* này được phân lập từ con bò bị lao được cấy truyền qua 10 năm trên môi trường chứa glycerol, dịch mật bò và khoai tây. Cấy truyền liên tục trên môi trường có thành phần xác định nêu trên, vi khuẩn lao đã đột biến thành chủng không còn độc lực, và không còn khả năng gây bệnh nữa. Đến nay đã gần 80 năm chúng vẫn không đột biến ngược trở lại để thành chủng gây bệnh.

### 7.5.2. Vaccin bất hoạt

Một số vaccin được sản xuất từ vi sinh vật đã làm bất hoạt hay chết để chúng không thể nhân lên được trong cơ thể và không thể gây bệnh. Khi xử lý bằng chiếu xạ, hoá chất hay nhiệt độ thì kháng nguyên vẫn còn nguyên vẹn, nên tránh được rủi ro mà vi sinh vật sống có thể mang lại.

Tuy là vaccin bất hoạt nhưng vẫn có những trường hợp trẻ em dùng vaccin bị dị ứng. Điều đó không thể tránh khỏi, vì một số người quá mẫn cảm với vaccin hoặc thuốc nói chung. Dùng vaccin không thể gây chết người nếu dùng đúng theo chỉ định và hướng dẫn. Tuy nhiên trước đây đã có trường hợp dùng vaccin bại liệt Salk chế từ virus Polio chưa bất hoạt hoàn toàn đã gây ra bại liệt ở người được tiêm chủng.

### 7.5.3. Vaccin chế từ các thành phần của vi sinh vật

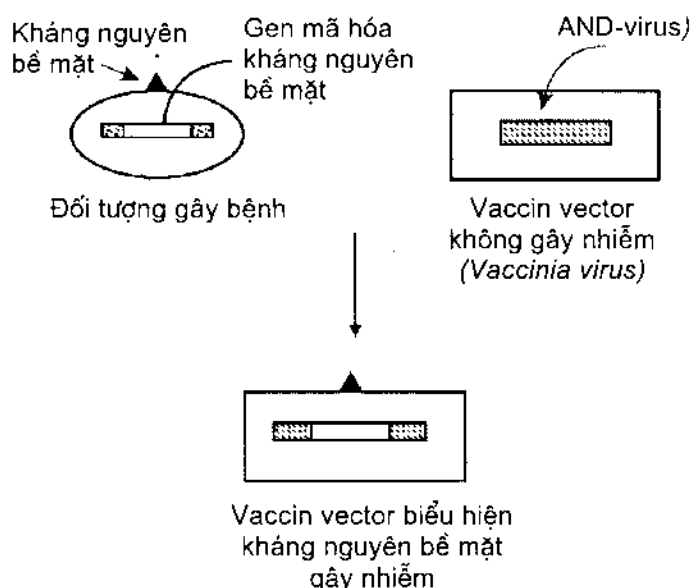
Có thể dùng các thành phần riêng rẽ của tế bào vi sinh vật làm kháng nguyên. Ví dụ dùng vỏ (capsul) polysaccharid của *Streptococcus pneumoniae* làm vaccin chống viêm phổi, hoặc vỏ polysaccharid của *Haemophilus influenzae* tip b để chế tạo vaccin Hib phòng bệnh viêm não trẻ em.

Vaccin đầu tiên chống viêm gan B (Hepavax-B) được sản xuất từ kháng nguyên bề mặt (HBsAg) được tinh chế từ huyết thanh bệnh nhân viêm gan B mạn tính. Vaccin này được dùng chủ yếu cho những người thuộc nhóm có nguy cơ lây nhiễm cao (các nhân viên y tế chăm sóc bệnh nhân viêm gan B) và đạt đáp ứng miễn dịch 85%-95%. Hiện nay vaccin này đã được sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN (recombivax HB). Người ta đưa gen mã hoá kháng nguyên HBsAg của virus viêm gan B vào tế bào nấm men (*Saccharomyces cerevisiae*), nuôi nấm men trên thiết bị lên men vi sinh vật. Sau đó chiết xuất và tinh chế để thu kháng nguyên.

Vaccin chống AIDS cũng được thử nghiệm từ kháng nguyên bề mặt gp 120 và gp 160 của virus HIV. Hiện vaccin phòng HIV còn trong giai đoạn thử nghiệm lâm sàng.

### 7.5.4. Vaccin vector

Kỹ thuật tái tổ hợp ADN đang được sử dụng để sản xuất vaccin chứa gen mã hoá cho kháng nguyên bề mặt của nhiều loại vi sinh vật gây bệnh. Bằng kỹ thuật này trong tương lai không xa nhân loại sẽ tạo ra hầu hết các vũ khí cần thiết để phòng và chống lại các bệnh nhiễm khuẩn. Vaccin vector hoạt động như một vật mang kháng nguyên bề mặt của vi sinh vật gây bệnh. Nếu như vector tái tổ hợp biểu hiện được kháng nguyên trên bề mặt, và sẽ xuất hiện miễn dịch chống lại mầm gây bệnh mà ta quan tâm (hình 7.3).



**Hình 7.3.** Sơ đồ minh họa sự tạo thành vaccin vector

Hầu hết các vaccin vector đều phát triển dựa trên cơ sở virus. Ví dụ dùng virus đậu mùa bất hoạt làm vector mang kháng nguyên của nhiều loại vi sinh vật gây bệnh khác nhau.

***Ưu điểm của virus đậu mùa làm vector là do:***

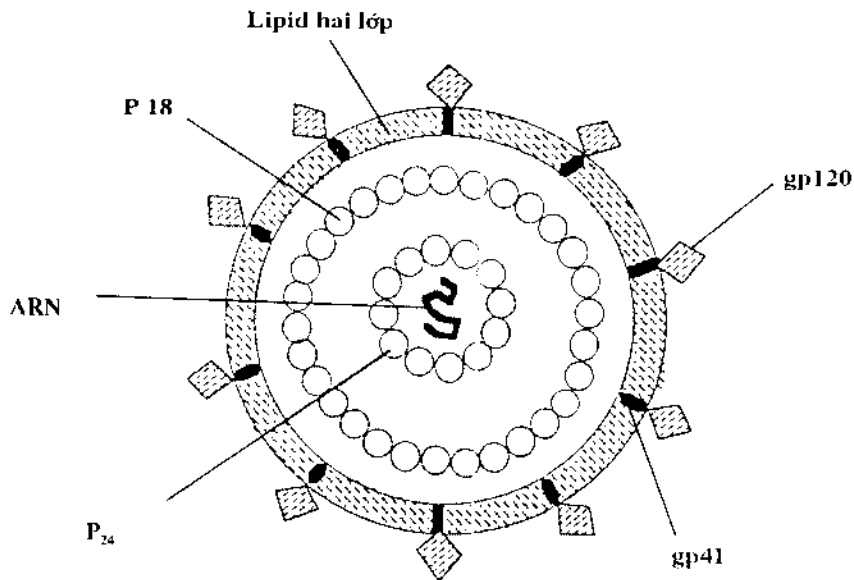
- Có khả năng dung nạp một lượng lớn ADN vào genom của nó.
- Về lịch sử, đây là vaccin đầu tiên được dùng để phòng bệnh đậu.
- Giữ được miễn dịch lâu dài.
- Dễ sản xuất và giá thành thấp.

### **7.5.5. Nghiên cứu sản xuất vaccin chống AIDS**

#### **7.5.5.1. Giới thiệu về HIV**

Triệu chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS-Acquired immuno deficiency syndrome) đã được mô tả đầu tiên ở Mỹ (1981). Tuy nhiên hiện tượng này đã được biết ít nhất 20 năm trước đó. Đến năm 1983 thì nguyên nhân gây bệnh mới được xác định chính xác. Thủ phạm chính là virus HIV (Human immunodeficiency virus).

HIV là thành viên thuộc chi Lentivirus, họ Retroviridae có genom chỉ là ARN sợi đơn và enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase). Cũng như các retrovirus khác, HIV có cấu tạo hình cầu, có đường kính là 100 - 150 nm, có vỏ ngoài cùng là một màng lipid kép (hình 7.4)



**Hình 7.4.** Sơ đồ cấu tạo virus HIV

Trên màng là các phân tử glycoprotein, có trọng lượng 120 kDa, ký hiệu là gp 120. Xuyên màng lipid kép là các phân tử glycoprotein, có trọng lượng 41 kDa, được ký hiệu là gp 41. Gp 120 và gp 41 gắn với nhau tạo ra gp 160. Gp 120 có thể gắn với tế bào TCD<sup>+</sup><sub>4</sub> (T<sub>H</sub>). Bạch cầu đơn nhân to, dòng đại thực bào như tế bào tua ở da (dendritic cells of skin), tế bào thần kinh đệm (brain microglia) của hệ thần kinh trung ương.

Lõi của HIV có hình trụ, được bao bọc bởi lớp protein có trọng lượng phân tử là 24 kDa (P<sub>24</sub>), bên trong là 2 sợi ARN đơn, enzym phiên mã ngược (ADN polymerase phụ thuộc ARN), 1 phân tử ARN vận chuyển dùng làm mẫu (primer) và các protein lõi như P<sub>9</sub>, P<sub>7</sub>. Cả 4 protein P<sub>24</sub>, P<sub>17</sub>, P<sub>9</sub>, P<sub>7</sub> đều được tách ra từ phân tử 53 kDa (P<sub>53</sub>) do gen gag (group specific antigen - kháng nguyên đặc hiệu nhóm) mã hóa. Các gen khác là gen pol (polymerase) mã cho enzym RT và integrase. Gen env (envelope) mã cho protein vỏ ngoài.

Khi bị nhiễm HIV, cơ thể tạo ra kháng thể chống lại gp 120, gp 41 và các protein gag, đặc biệt là P<sub>24</sub>. Việc xác định virus rất khó, nên thường xác định gián tiếp thông qua sự hình thành trong huyết thanh kháng thể chống các kháng nguyên trên mà kết luận dương tính hay âm tính với HIV.

Virus HIV nhân lên bằng cách nào trong tế bào chủ? Sau khi tương tác giữa gp 120 với thụ thể CD4 của tế bào T<sub>H</sub>, protein gp 41 trên vỏ virus sẽ đóng vai trò chính làm thủng màng tế bào và đưa ARN của HIV vào trong tế bào. Nhờ có enzym phiên mã ngược, sợi ARN đơn của virus được dùng làm khuôn để sao chép thành ADN đơn trung gian, rồi sợi này lại được dùng làm khuôn để tổng hợp sợi ADN bổ sung. ARN của virus sau đó

bị huỷ bỏ. Hai sợi ADN đơn xoắn lại tạo thành ADN xoắn kép, đi vào nhân, gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào T<sub>4</sub>, lúc đó gọi là provirus (tiền virus).

Sự biểu hiện của gen HIV-1 được kích thích lúc đầu bởi các yếu tố phiên mã của tế bào chủ với vị trí gắn ở đoạn đầu lặp lại (LTR- Long terminal repeats), dẫn đến tổng hợp ARN thông tin khác nhau của virus. Sợi ARN thông tin đầu tiên xấp xỉ 2 kb mã hóa cho protein điều hòa Tat, Rev và Nef. Sau đó các protein cấu trúc của virus được tổng hợp như protein tạo thành capsid, có loại tạo thành vỏ ngoài của virus. ARN virus mới tổng hợp được lắp ráp với capsid và vỏ ngoài của virus tạo thành hạt virus hoàn chỉnh chui ra ngoài và lại tiếp tục chu trình sinh sản mới trong các tế bào cảm thụ khác.

Sự xâm nhập (lây nhiễm) của HIV vào tế bào thường phải vài tuần lễ, khi kháng nguyên P<sub>24</sub> của virus chưa tách vào máu, ta không nhận thấy triệu chứng gì. Khi P<sub>24</sub> đã vào máu, triệu chứng lâm sàng giống như người bị cảm cúm, giai đoạn này khoảng 3 - 4 tuần lễ. Hệ thống miễn dịch của cơ thể (đặc biệt là tế bào lympho T) tiết ra lượng kháng thể tối đa để chống lại HIV, nhưng hiệu quả trung hòa kháng nguyên rất yếu. Sau giai đoạn bùng phát ban đầu này là giai đoạn *tiềm ẩn* (provirus), các hạt virus tự do ít đi, việc tấn công vào tế bào máu giảm đi, thường dưới mức có thể phát hiện được. "Giai đoạn tiềm ẩn" này có thể kéo dài đến 10 năm hoặc lâu hơn. Trong suốt thời gian này, hệ thống miễn dịch của cơ thể liên tục sản sinh ra kháng thể để trung hòa kháng nguyên HIV. Song hiệu quả rất hạn chế. Đến một thời điểm nào đó, cơ thể hoàn toàn hết khả năng chống đỡ và bệnh AIDS xuất hiện. Hiện đã có khoảng 40 triệu người nhiễm HIV và đã có đến hơn 20 triệu người chuyển thành bệnh AIDS. Riêng năm 2001, đã có hơn 3 triệu người chết vì bệnh AIDS. Số lượng người nhiễm HIV tính đến năm 2001 được nêu trong bảng 7.8. Khoảng 75% trong số đó là ở châu Phi.

**Bảng 7.8.** Số lượng người bị nhiễm HIV trên thế giới (theo WHO-2001)

| Khu vực bị nhiễm           | Số lượng bị nhiễm (triệu) |
|----------------------------|---------------------------|
| Saharan - châu Phi         | 28,5                      |
| Nam Á                      | 5,6                       |
| Nam Mỹ                     | 1,5                       |
| Bắc Mỹ                     | 1,0                       |
| Đông Âu, Trung Á           | 1,0                       |
| Tây Á, Tây Thái Bình Dương | 1,0                       |
| Bắc Phi, Địa Trung hải     | 0,5                       |
| Tây Âu                     | 0,5                       |
| Vùng Caribe                | 0,4                       |
| Australia và Newzeland     | 0,015                     |

#### 7.5.5.2. Nguyên lý sản xuất vaccin chống AIDS

Để nghiên cứu sản xuất vaccin phòng chống AIDS người ta vẫn áp dụng 2 nguyên lý cơ bản:

- *Theo nguyên lý của L. Pasteur*: Nuôi virus HIV bằng phương pháp nuôi cấy tế bào để cho virus phát triển. Sau đó xử lý bằng formaldehyd để làm giảm độc tính hoặc dùng hóa chất để loại bỏ vỏ bọc của virus. Phần "lõi" là ARN được xử lý bằng tia  $\gamma$  để khử hoạt lực của genom virus. Sản phẩm thu được thêm những tá được cần thiết để đạt được vaccin sản xuất đem thử nghiệm.
- *Bằng kỹ thuật gen*: Người ta tách gen gp 160 khỏi HIV, nhân lên bằng phương pháp công nghệ di truyền, sau đó gắn vào baculovirus của một loại côn trùng nào đó (bướm chẳng hạn). Virus phát triển trong tế bào nuôi cấy mô, sau đó dùng kỹ thuật tách chiết, tinh chế protein từ mô tế bào để làm vaccin.

Các vaccin sản xuất bằng hai phương pháp trên, đã được thử nghiệm điều trị lâm sàng cho một số loài khỉ, tinh tinh đã được gây nhiễm HIV. Các kết quả thu được rất đáng khích lệ. Với trình độ hiểu biết về sinh học phân tử và công nghệ gen hiện nay, việc sản xuất thành công vaccin chống HIV nhất định sẽ đạt được trong tương lai không xa.

#### 7.6. Các protein dùng trong điều trị (biopharmaceuticals)

Các dược phẩm được sử dụng trong y học được biết cho đến nay là các chất có cấu trúc xác định được tổng hợp toàn phần bằng phương pháp hoá học hoặc chiết xuất từ thực vật hay vi sinh vật hoặc bán tổng hợp bằng hoá học các hợp chất thiên nhiên nhằm làm tăng tác dụng và giảm đi các tác dụng không mong muốn.

Do những thành tựu của sinh học phân tử và kỹ thuật tái tổ hợp ADN mà tạo ra những sản phẩm mới được gọi là những sản phẩm "kỳ diệu" dùng điều trị những bệnh nan y như ung thư, tiểu đường, virus, các bệnh về di truyền, v.v... Các dược phẩm đặc hiệu này được gọi là *protein trị liệu* (therapeutic protein). Doanh thu bán các sản phẩm cao cấp này đã đạt tới 10 tỷ USD vào năm 2000. Các phát minh liên tiếp về các protein trị liệu được công bố vào khoảng 10 năm liên tiếp ở các nước châu Âu và bắc Mỹ (bảng 7.8).

**Bảng 7.9.** Các protein dùng trong phòng và chữa bệnh được bán trên thị trường (1982-1992)

| Tên sản phẩm             | Sử dụng để điều trị | USA  | Châu Âu |
|--------------------------|---------------------|------|---------|
| Insulin                  | Tiểu đường          | 1983 | 1982    |
| Hormon sinh trưởng người | Người chậm lớn      | 1985 | 1985    |
| Interferon- $\alpha$     | Ung thư, virus      | 1986 | 1985    |
| Tế bào kháng T           | Trong ghép tạng     | 1986 | 1986    |
| Vaccin viêm gan B        | Phòng viêm gan B    | 1987 | 1986    |
| Hoạt hoá plasminogen     | Các bệnh tim mạch   | 1987 | 1987    |
| Interleukin-2            | Ung thư             | 1992 | 1989    |

Insulin, hormon sinh trưởng người (somatostatin) và interferon là những sản phẩm đầu tiên được sản xuất bằng công nghệ gen. Người ta chuyển gen mã hoá điều khiển các quá trình tổng hợp ra các hormon trên của người vào vi sinh vật tương ứng. Nuôi các vi sinh vật trong các bình lên men rồi chiết xuất lấy các hoạt chất tương ứng để sử dụng.

### 7.6.1. Insulin

Insulin là hormon polypeptid được sản xuất bởi các tế bào beta của đảo langerhans tuyến tụy. Insulin giữ vai trò quan trọng điều hoà nồng độ glucose trong máu. Giới hạn cần giữ ở nồng độ 3,5-8,0 mmol/lít. Nếu thiếu insulin hoặc vì một nguyên nhân bệnh lý nào đó, glucose trong máu không thể chuyển hoá bình thường trong chu trình tricarboxylic để tạo ra  $\text{CO}_2$  và  $\text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$ . Đường glucose tồn tại trong máu cao gây ra bệnh lý gọi là bệnh tiểu đường (diabetes). Insulin còn giữ vai trò trong chuyển hoá protein và lipid, đến hoạt tính phân bào. Hoạt tính phân bào giống như những receptor trung gian thông qua nhân tố phát triển 1 giống như insulin (IGF-1). Giải thích cơ chế sinh lý của vấn đề này vẫn còn nhiều tranh cãi. Mặc dù có rất nhiều tế bào trong cơ thể biểu hiện là chất nhận insulin nhưng quan trọng nhất vẫn là các tế bào của cơ bắp, hepatocyt và adipocyt (tế bào tạo mỡ), ở đó nó thường đối kháng tác dụng của glucagon (bảng 7.10).

**Bảng 7.10.** Hiệu quả chuyển hoá của insulin

| Con đường chuyển hoá | Mô đích | Hiệu quả của insulin | Hiệu quả của glucagon |
|----------------------|---------|----------------------|-----------------------|
| Tổng hợp glycogen    | Gan     | ↑                    | ↓                     |
| Thủy phân glycogen   | Gan     | ↓                    | ↑                     |
| Tái sinh glucose     | Gan     | ↓                    | ↑                     |
| Tổng hợp glycogen    | Cơ bắp  | ↑                    |                       |
| Thủy phân glucogen   | Cơ bắp  |                      |                       |
| Tổng hợp acid béo    | Mỡ      | ↑                    | ↓                     |
| Thủy phân acid béo   | Mỡ      | ↓                    | ↑                     |

Insulin được tiết ra từ tụy vào máu, nồng độ cao nhất định lượng được là lúc sau bữa ăn. Insulin điều tiết thích hợp để hấp thu glucose và các chất dinh dưỡng khác theo một số cách sau đây:

- Kích thích vận chuyển glucose (và vận chuyển acid amin, ion  $K^+$  và các chất dinh dưỡng khác).
- Kích thích (hoặc hỗ trợ kích thích) đồng hoá bằng các con đường chuyển hoá như tổng hợp glycogen làm chất dự trữ trong tế bào (bảng 7.10).
- Kìm hãm (hoặc hỗ trợ kìm hãm) các con đường dị hoá ví dụ như phân giải glycogen.
- Kích thích tổng hợp protein và ADN (thường chịu sự điều khiển của chất khởi động tăng trưởng phụ thuộc insulin).

#### 7.6.1.1. Cấu trúc phân tử insulin

Insulin là một polypeptid bao gồm 2 chuỗi a và b. Chuỗi a gồm 21 gốc acid amin, chuỗi b gồm 30 gốc acid amin. Chúng nối với nhau bằng 2 cầu nối disulfid (hình 7.5.)

Trình tự 21 acid amin của insulin lợn (mạch a) giống như insulin người. Trình tự 30 acid amin (mạch b) của lợn và người chỉ khác nhau một gốc acid amin ở vị trí 30. Ở lợn là alanin, ở người là threonin. Dùng trypsin

để xử lý insulin lợn loại đi 8 gốc acid amin chuỗi (b) và gắn peptid chứa 8 gốc acid amin của insulin người ta sẽ được insulin người.

#### 7.6.1.2. Sản xuất insulin bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN

Sản xuất insulin người bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN lần đầu tiên được sử dụng trong y học vào năm 1982 ở Mỹ, Tây Đức, Anh, Hà Lan. Đây cũng là được phẩm đầu tiên được chế tạo bằng kỹ thuật gen và được ứng dụng trong điều trị. Hiện nay số lượng người bị bệnh tiểu đường ngày càng gia tăng, có đến 5% dân số thế giới mắc bệnh này ở các mức độ khác nhau. Nếu chế tạo insulin từ tụy của các động vật như bò, lợn, cừu,... thì không thể đáp ứng được nhu cầu điều trị. Insulin chiết được từ tụy một con bò chỉ dùng cho một bệnh nhân trong 3 ngày. Kỹ thuật tái tổ hợp ADN để chế tạo insulin đã đáp ứng được nhu cầu về điều trị bệnh tiểu đường typ 2.

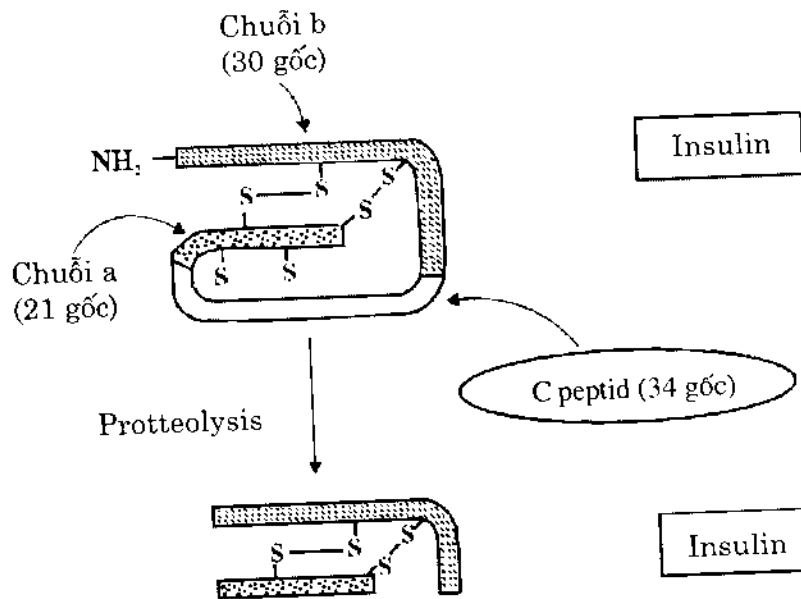
Nguyên lý của phương pháp có thể tổng quát như sau: gắn một gen mã hoá cho việc tổng hợp insulin chuỗi a và chuỗi b vào hai tế bào *E. coli* thường sử dụng *E. coli* K12. Nuôi riêng biệt hai tế bào này vào các bình lên men, để chúng tổng hợp ra insulin chuỗi a và b. Ly tâm thu lấy tế bào, chiết xuất để lấy riêng insulin chuỗi a và b, tinh chế để thu sản phẩm. Insulin chuỗi a và b được cho vào bình phản ứng xử lý bằng hoá học để hai chuỗi a và b gắn vào nhau bởi cầu nối disulfid tạo ra sản phẩm insulin người. Quy trình này được thực hiện bởi các nhà khoa học viện nghiên cứu Gentech.

Cũng bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN các nhà khoa học thuộc viện nghiên cứu



Hình 7.5. Sơ đồ cấu trúc của phân tử insulin

Eli Lilly đã gắn gen mã hoá tổng hợp proinsulin người vào tế bào *E. coli*, sau đó lên men và chiết rút lấy ra proinsulin. Thuỷ phân bằng enzym protease trong điều kiện đặc biệt để cắt đi mạch peptid C gồm 34 gốc acid amin (hình 7.6).



**Hình 7.6.** Thuỷ phân proinsulin bằng protease để tạo thành insulin người

Cũng có thể gắn gen mã hoá sinh tổng hợp insulin vào tế bào *Saccharomyces cerevisiae* và cũng tiến hành nuôi cấy nấm men, thu sinh khối, chiết xuất lấy proinsulin và xử lý bằng enzym như tiến hành với *E.coli*.

Có thể tổng quát các loại insulin được chế tạo trên thị trường như sau:

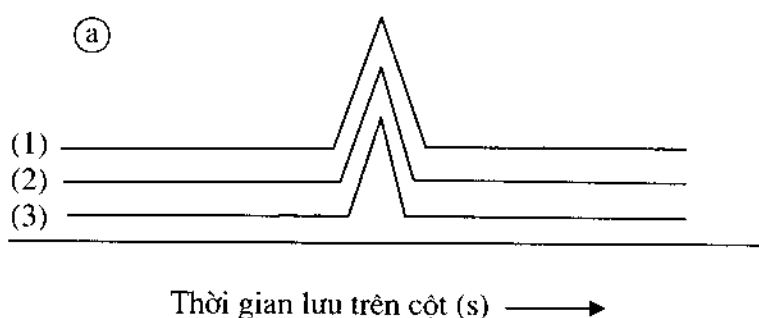
**Các loại insulin được sản xuất có qui định trong các dược thư**

- Các loại insulin qui ước: insulin bò, lợn tinh chế bằng phương pháp kết tinh.
- Insulin một pic: insulin lợn/bò tinh chế bằng phương pháp sắc ký trên gel cephadex.
- Insulin tinh khiết cao: insulin tinh chế bằng phương pháp lọc gel và sắc ký trao đổi ion, trên HPLC.
- Insulin người (emp): insulin người được chế tạo bằng biến đổi từ insulin lợn.
- Insulin người (crb): insulin tái tổ hợp ADN vào vi khuẩn để tạo ra chuỗi a và b vào hai vi khuẩn riêng biệt.

- Insulin người (prb): insulin người tái tổ hợp proinsulin vào vi khuẩn để sản xuất ra proinsulin, sau đó xử lý bằng enzym để tạo ra insulin.
- Insulin người (pyr): insulin người tái tổ hợp vào tế bào nấm men để sản xuất.
- Insulin B.P, Eur.P, USP. Insulin nguồn gốc từ bò, lợn.
- Insulin người B.P, Eur.P. Insulin được sản xuất bằng biến đổi enzym của insulin lợn, hoặc bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN.
- Insulin người USP: insulin được sản xuất bằng biến đổi enzym của insulin lợn, hay insulin tái tổ hợp ADN.
- Insulin dung dịch là những insulin pha chế trong dung môi thích hợp có tác dụng kéo dài.
- Protamin-zinc-insulin: phức hợp của insulin có tác dụng kéo dài.
- Isophan insulin: pha chế một mol insulin với một mol protamin để có tác dụng kéo dài.

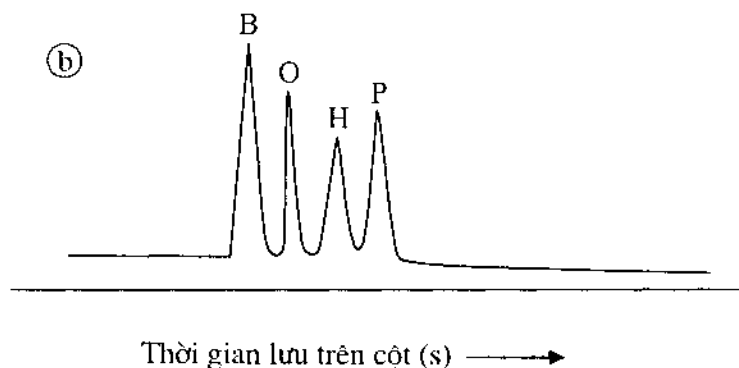
***Nhũ dịch insulin-zinc: tinh thể insulin-zinc được pha chế trong dung môi thích hợp để có tác dụng kéo dài.***

Insulin sản xuất từ tạng động vật cũng như bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN sau khi tinh chế trên gel, sắc ký trên máy HPLC cho thấy chúng đều là những sản phẩm tinh khiết (hình 7.7.). Insulin chiết ra từ tuyến tụy người và insulin sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN giống nhau hoàn toàn (hình 7.7.)



Ở đây:

- (1) - Insulin người tái tổ hợp
- (2) - Insulin người thủy phân bằng pancreatin.
- (3) - Hỗn hợp insulin người tái tổ hợp và thủy phân bằng pancreatin.



Ở đây: B - insulin bò. O - insulin cừu. H - insulin người. P - insulin lợn.

**Hình 7.7.** Sắc ký lỏng để tinh chế insulin.

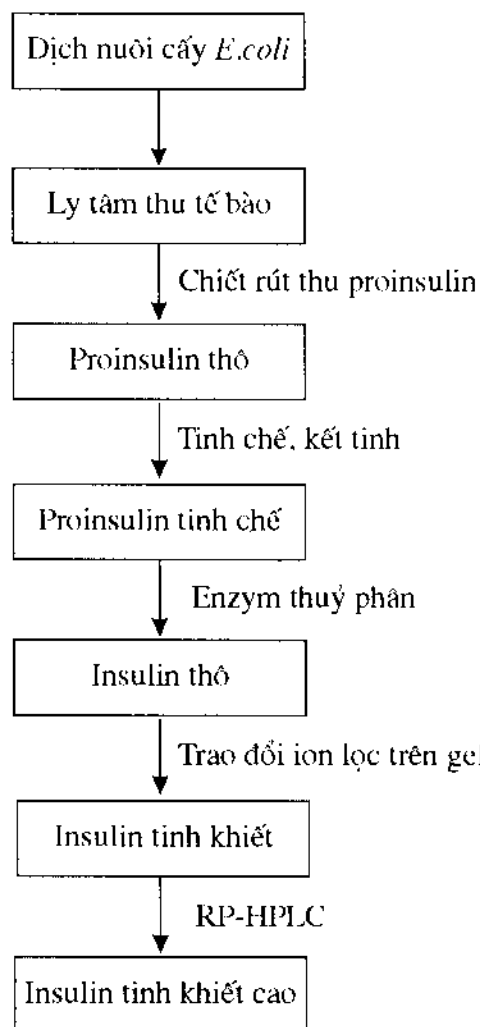
Bằng kỹ thuật nhiễu xạ tia X để xác định cấu trúc phân tử, phương pháp miễn dịch phóng xạ và các thử nghiệm khác đã chứng minh tác dụng sinh học của insulin thiên nhiên và insulin sản xuất bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN là như nhau. Ngày nay sản xuất insulin bằng phương pháp nuôi cấy vi sinh vật chuyển gen được tiến hành trên qui mô công nghiệp trên các thiết bị lên men 10.000 lít ở một số công ty dược phẩm (bảng 7.11.).

**Bảng 7.11.** Insulin người của một số công ty dược phẩm.

| Sản phẩm                                                              | Tên công ty            |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Humulin (rh-insulin) rh=recombinant human                             | Eli lilly              |
| Novolin (rh-insulin)                                                  | Novo Nordisk           |
| Humalog (insulin Lispro, tương tự insulin)                            | Eli lilly              |
| Insuman (rh-insulin)                                                  | Hoechst AG             |
| Liprolog (Bio Lysprol, insulin tác dụng ngắn)                         | Eli lilly              |
| NovoRapid (insulin Aspart, tác dụng ngắn, tương tự rh-insulin)        | Novo Nordisk           |
| Novomix 30 (chứa insulin Aspart, tác dụng ngắn, tương tự rh-insulin)  | Novo Nordisk           |
| Novolog (Insulin Aspart, tác dụng ngắn rh-insulin)                    | Novo Nordisk           |
| Actrapid/Velosulin/monotard (rh-insulin SX bằng <i>S.cerevisiae</i> ) | Novo Nordisk           |
| Lantus (insulin glargine, rh-insulin tác dụng kéo dài)                | Aventis Pharmaceutical |
| Optisulin (insulin glargine, rh-insulin tương tự Lantus)              | Aventis Pharma         |

Sản xuất insulin bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN vào vi khuẩn *E. coli* cần lưu ý trong công đoạn chiết xuất và tinh chế. Nếu sản phẩm không đảm bảo độ tinh khiết và còn lẫn dù chỉ một lượng rất nhỏ sản phẩm chuyển hoá khác của *E. coli* sẽ gây ra những phản ứng phụ nguy hiểm. Coi đó như những kháng nguyên lạ chưa được kiểm soát. Vì vậy các công đoạn chiết xuất và tinh chế đòi hỏi phải có những thiết bị hiện đại, chuyên dụng, và đặc biệt con người thao tác phải có kỹ năng và trình độ cao.

**Sơ đồ tinh chế insulin có thể tóm tắt như sau:**



**Sơ đồ 7.1.** Sơ đồ chiết và tinh chế insulin người.

Sau khi kết thúc quá trình lên men vi sinh vật, tiến hành lọc hoặc ly tâm để giữ lại sinh khối, phá vỡ tế bào, lọc, kết tủa proinsulin dạng thô. Tinh chế để thu được proinsulin tinh khiết. Thủy phân bằng proteinase để

loại đi mạch peptid C (sơ đồ 7.1). Thu được insulin vẫn chưa tinh khiết. Tiến hành sắc ký trao đổi ion và lọc trên gel cephadex G -75 thu được insulin tinh chế có độ tinh khiết 95%. Để có insulin đạt tinh khiết 99,5% cần phải tiến hành sắc ký pha đảo trên HPLC (RP-HPLC) dùng cột C8 hay C18 RP-HPLC thể tích 801 hoặc lớn hơn. Pha động là acetonitril (15-30%). Với cột 801 có thể tinh chế được 1200 g insulin.

### 7.6.2. Hormon tăng trưởng (human growth hormone)

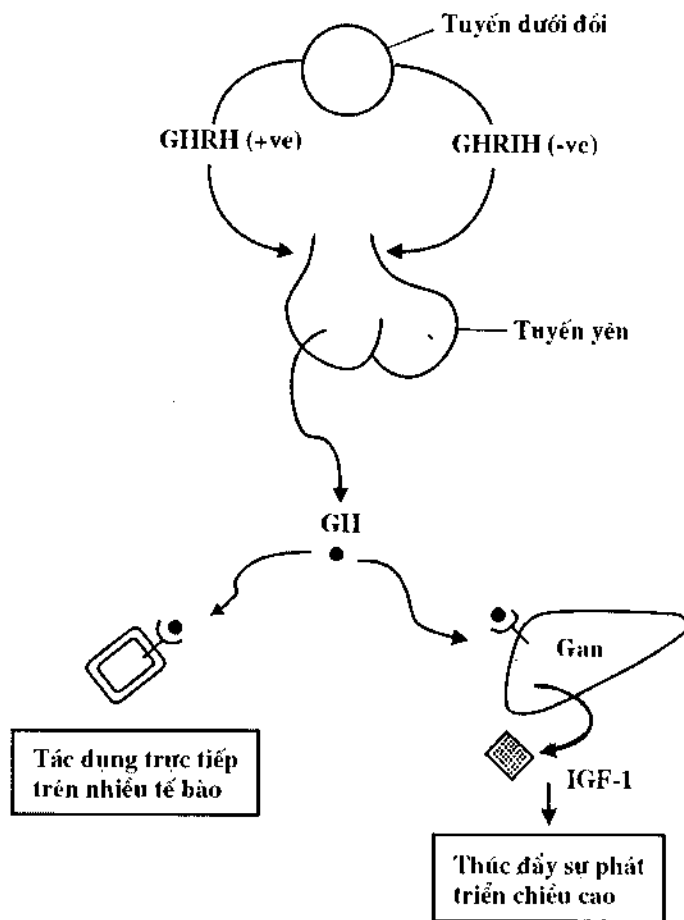
Hormon tăng trưởng người (hGH, somatotrophin) là một polypeptid hormon được tổng hợp ở thùy trước tuyến yên giữ vai trò điều hoà sự phát triển bình thường của người, nếu thiếu hormon này sự phát triển về chiều cao của người bị ảnh hưởng, thường gặp những người lùn đặc biệt (lùn do thiếu năng tuyến yên). Hormon tăng trưởng người chứa 191 gốc acid amin có khối lượng phân tử 22 kDa, gồm 2 chuỗi đặc biệt nối với nhau bằng cầu disulphid.

**Bảng 7.12.** Những yếu tố làm tăng tiết GH.

|                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Các yếu tố làm tăng tiết GH         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Đói</li> <li>- Ngủ</li> <li>- Căng thẳng</li> <li>- Vận động</li> <li>- Glucose trong máu thấp</li> <li>- Một số acid amin</li> <li>- Glucagon</li> <li>- Chất chủ vận <math>\alpha</math>-adrenalin</li> <li>- Đối kháng tiết <math>\beta</math>-adrenalin</li> </ul> |
| Các yếu tố thúc đẩy sự giảm tiết GH | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Béo phì</li> <li>- Glucose huyết cao</li> <li>- Đối kháng tiết <math>\beta</math>-adrenalin</li> <li>- Chất chủ vận <math>\beta</math>-adrenalin</li> </ul>                                                                                                            |

Hormon tăng trưởng (hGH) giữ vai trò cực kỳ quan trọng, mặc dầu không hoàn toàn tuyệt đối về những đặc trưng của loài. GHs được chiết ra từ các động vật linh trưởng là những chế phẩm có hoạt tính sinh học trên người (trước đó người ta đã sử dụng các chế phẩm có nguồn gốc từ bò và lợn dùng cho người).

Hormon tăng trưởng được tổng hợp và phóng thích từ tuyến yên phụ thuộc vào sự điều chỉnh bởi hai yếu tố là hormon gây tiết hormon tăng trưởng GHRH (growth hormone releasing hormone) hay còn gọi là yếu tố phóng thích hormon tăng trưởng GHRF (growth hormone releasing factor) hay somatorelin và hormon ức chế phóng thích hormon tăng trưởng (GHRIH) hay somatostatin. GH là chất trung gian trực tiếp cho một số hoạt tính sinh học của chính nó, ảnh hưởng gián tiếp lên sự lớn của cơ thể thông qua chất trung gian IGF-1. GHRH, GHRIH, GH và IGF-1 (hình 7.8.).



**Hình 7.8.** Minh họa về cơ chế điều tiết GH

Hầu như các yếu tố ảnh hưởng đến giải phóng GH đều có tác dụng gián tiếp của nồng độ GHRH và GHRIH.

Yếu tố phóng thích hormon tăng trưởng (GHRF) và yếu tố ức chế (GHRFI) là những peptid được tiết ra từ tuyến dưới đồi gọi là “cảm ứng thần kinh nội tiết (tên gọi mang ý nghĩa trung gian giữa thần kinh và hệ nội tiết). Các yếu tố điều khiển sự tiết hormon hiện vẫn chưa hiểu biết đầy

đủ về cơ chế của nó. Nhưng nó nhất định bao gồm cả hai yếu tố là yếu tố chỉ huy của vỏ não và cơ chế phản hồi bao gồm các hormon của tuyến yên.

37, 40 và 44 acid amin của các loại GHRF đã được xác định. Những yếu tố thúc đẩy sự phóng thích GH từ tuyến yên và hoạt tính của nó có liên quan tới 29 acid amin đầu của phân tử. Điều khiển quá trình tiết GH tăng hay giảm liên quan đến sự tăng trưởng của cơ thể.

GHRIF tiết ra từ tuyến dưới đồi là một peptid vòng gồm 14 acid amin, chúng ức chế sự giải phóng không chỉ GH mà còn cả tyrotrophin và corticotrophin từ tuyến yên, insulin và glucagon từ tuyến tụy.

#### 7.6.2.1. Tác dụng sinh học của GH

Trước hết GH biểu hiện tác dụng là chất chuyển hoá. Chúng kích thích sự phát triển xương, cơ, gắn kết GH với receptor của gan kết quả dẫn đến việc tổng hợp và giải phóng yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF-1), yếu tố trung gian này thúc đẩy sự phát triển của GH, ví dụ như xương, khung xương. Tác dụng sinh học của hGH thường là tác dụng trực tiếp, bên cạnh tác dụng trực tiếp còn có tác dụng gián tiếp qua trung gian IGF-1 (bảng 7.13).

**Bảng 7.13.** Tác dụng sinh học chính của hormon tăng trưởng hGH

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Tăng phát triển cơ thể (đặc biệt là xương và khung xương)</li><li>- Kích thích tổng hợp protein ở nhiều mô</li><li>- Giảm béo do có tác dụng thủy phân mỡ</li><li>- Làm tăng glucose trong máu (đối kháng với insulin)</li><li>- Làm phát triển cơ bắp và dự trữ glycogen</li><li>- Tăng kích thước thận và tăng cường chức năng của thận</li><li>- Tiêu huỷ các tổ chức hình lưới được hình thành trong tuỷ xương.</li></ul> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### 7.6.2.2. Sử dụng GH trong điều trị

GH được ứng dụng rộng rãi trong điều trị, song ứng dụng chính là điều trị bệnh lùn do thiếu năng tuyến yên. hGH được chiết ra từ đảo gladns của tuyến yên người, lần đầu tiên được ứng dụng để điều trị bệnh nhân lùn vào năm 1958. Sau đó dùng điều trị bệnh lùn do các nguyên nhân khác nhau như: vóc người lùn tự phát, suy thận mạn. Sử dụng hGH chiết được từ tuyến yên của người chết tồn tại cho tới năm 1985 thì ngừng. Vì phát hiện thấy có sự liên quan giữa bệnh điều trị và bệnh rối loạn thần kinh gây chết người - bệnh bò điên (creufeld-Jacob-CJD) rất ít gặp nhưng vô cùng

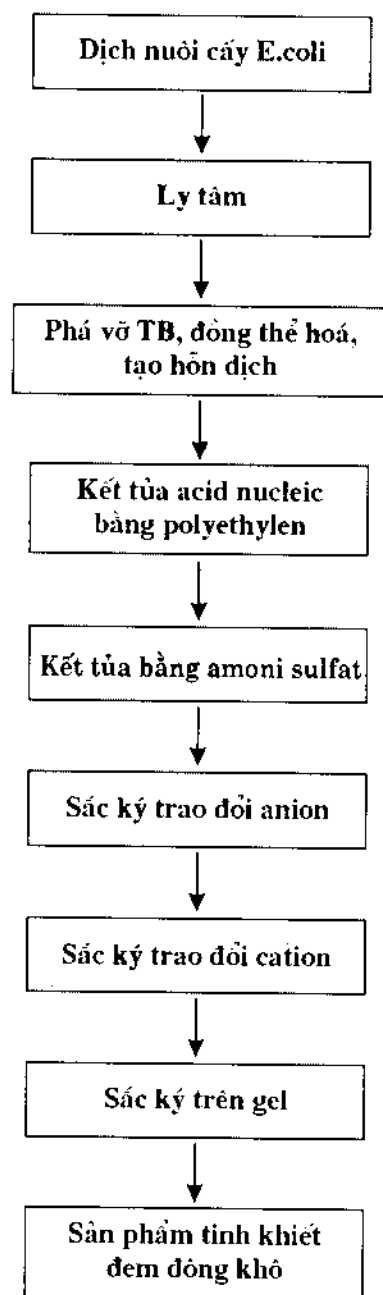
nguy hiểm. Trong năm đó một thanh niên trẻ đã chết vì bệnh CJD tìm nguyên nhân thì thấy anh ta được sử dụng hGH 15 năm trước đó. Nghiên cứu nguyên nhân cái chết của anh bạn trẻ đã phát hiện ra là bệnh nhân có tiếp xúc với dịch chiết tuyến yên bị nhiễm trùng (prion – một dạng virus chính là thủ phạm gây ra bệnh CJD). Sau đó còn phát hiện thêm được 12 trường hợp bị CJD nữa. Thật may là các nghiên cứu về tái tổ hợp ADN đã chế tạo được hGH (rhGH) kịp thời phục vụ cho điều trị bệnh này. Hiện nay tất cả hGH chế tạo dùng trong lâm sàng đều là sản phẩm tái tổ hợp ADN. Khoảng 20.000 người đã được điều trị bằng rhGH.

**Bảng 7.14.** Hormon tăng trưởng người tái tổ hợp (rhGH) đang được sử dụng trong y học.

| Tên sản phẩm<br>(Biệt dược) | Công ty sản xuất     | Chỉ định dùng                                     |
|-----------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| Humatrope                   | Eli Lilly            | Trẻ con thiếu hGH                                 |
| Nutropin                    | Genentech            | Trẻ con thiếu hGH                                 |
| Nutropin AQ                 | Schwartz Pharma AG   | Chậm phát triển                                   |
| BioTropin                   | Biotechnology Genral | Trẻ con thiếu hGH                                 |
| Genotropin                  | Pharmacia ADN Upjohn | Trẻ con thiếu hGH                                 |
| Saizen                      | Serono Laboratories  | Trẻ con thiếu hGH                                 |
| Serostim                    | Serono Laboratories  | Điều trị hỗ trợ AIDS                              |
| Norditropin                 | Novo Nordisk         | Điều trị chậm phát triển ở trẻ con khi thiếu hGH. |

rhGH lần đầu tiên được sản xuất bởi tế bào *E.coli* vào năm 1980. rhGH khác với insulin người do có thêm một gốc acid amin là methionin (do gắn bộ ba mã hoá là AUG vào điểm bắt đầu của gen). Sau đó người ta đã tiến hành chiến lược chuyển gen khác để nhận được sản phẩm rhGH không còn chứa methionin nữa.

Phân tích thành phần acid amin, thử nghiệm về miễn dịch để so sánh hGH của người và rhGH sản xuất bởi *E. coli* đã nhận thấy cả hai sản phẩm như nhau. Thử nghiệm trên lâm sàng để so sánh hai loại hormon thấy tác dụng tương đương. rhGH đầu tiên được tinh chế bởi các nhà khoa học thuộc viện Genntech (sơ đồ 7.2)



**Sơ đồ 7.2.** Chiết xuất và tinh chế rhGH từ E.coli được chuyển gen

### 7.6.2.3. Hormon tăng trưởng tái tổ hợp (rhGH) và bệnh lùn tuyến yên

Nhiều nghiên cứu khác nhau đã xác nhận rằng rhGH làm tăng chiều cao ở những trẻ em bị bệnh lùn do thiếu năng tuyến yên (thiếu hormon tăng trưởng). Liệu điều trị được quyết định theo từng bệnh nhân và tính chung trên cơ sở hàng tuần, dùng dưới dạng tiêm bắp. Thời gian điều trị từ 6 tháng đến 2 năm, có trường hợp kéo dài đến 4 năm. Chiều cao tăng thêm

được vài cm có thể quan sát thấy trong thời gian đầu điều trị, sau đó tốc độ lớn chậm dần. Hiệu quả điều trị phụ thuộc vào lứa tuổi và giới.

#### 7.6.2.4. Tác dụng chuyển hoá của hGH

hGH có tác dụng tăng cường tổng hợp protein của cơ thể và tăng hoạt tính thủy phân lipid, làm cho thay đổi tỷ lệ nạc/mỡ, nên có thể sử dụng đặc tính này để điều trị bệnh béo phì cũng như một số bệnh của tuổi già. Nghiên cứu lâm sàng đối với người béo phì phải ăn kiêng cho thấy dùng GH (từ 3-12 tuần) không nhận thấy giảm cân hơn so với người ăn kiêng không dùng GH. Vì vậy nghiên cứu sử dụng rhGH để chữa bệnh béo phì vẫn chưa có cơ sở chắc chắn.

Nghiên cứu lâm sàng cũng cho thấy vai trò của rhGH trong điều trị những người có thân nhiệt cao đặc biệt ở trẻ con. Sự sợ hãi và dễ xúc động do chấn thương (có dấu hiệu rối loạn sinh lý) do quá sợ hãi gây ra thường gọi là bị stress. Tất cả những dấu hiệu nêu trên được biểu hiện bằng các đặc điểm sau:

- Dị hoá protein
- Giảm cân
- Tăng chuyển hoá
- Thân nhiệt cao
- Chu trình chuyển hoá vật chất không hiệu quả và giảm mỡ.

rhGH dùng điều trị nhằm mục đích chính là làm chậm lại quá trình dị hoá protein.

Nuôi cấy *E. coli* mang gen tái tổ hợp để sản xuất ra rhGH trong điều kiện thích hợp rhGH trong tế bào vi khuẩn, nên cần phải ly tâm hay lọc để thu lấy sinh khối (biomass). Sinh khối *E.coli* được phá vỡ tế bào để giải phóng ra rhGH tạo hỗn hợp đồng thể rồi kết tủa loại bỏ acid nucleic và các thành phần của màng tế bào. Lọc để thu lấy dịch chứa rhGH, thêm amoni sulphat để kết tủa rhGH. Lọc hoặc ly tâm thu lấy rhGH. Sắc ký trao đổi ion để loại hết cation và anion. Tiếp tục sắc ký trên gel cephadex, sau đó phân liều và đông khô sản phẩm.

Đặc biệt những bệnh nhân có thân nhiệt cao (chuyển hoá cơ bản năng lượng biến thành nhiệt) nên ăn nhiều mà người vẫn gầy. Những người như trên GH điều chỉnh làm giảm lượng protein mất đi 50% so với đối chứng.

Sự sản sinh GH thì biến đổi theo lứa tuổi. Mức sản sinh cao nhất là trẻ sơ sinh, sau đó đến tuổi dậy thì, sau tuổi 40 thì khả năng tiết GH giảm đi. Vì thế tuổi càng cao GH tiết ít đi làm giảm cơ bắp, xương và khối lượng da, những biểu hiện đó làm cho cơ thể yếu đi.

Những năm gần đây một vài bệnh viện đã nghiên cứu và đánh giá hiệu quả điều khiển của GH trên những người lớn. Những người này được sử dụng GH với liều lượng qui định trong thời gian 4-6 tháng nhận thấy ở nhóm A tăng 7% khối lượng thịt nạc và da thì dày hơn, trong số đó 14% giảm béo.

### 7.6.3. Cytokin - các chất thuộc nhóm interferon

Cytokin là tên gọi của một nhóm chất mà bản chất là một protein hoặc glucoprotein, phân loại chúng vẫn còn chưa hợp lý (bảng 7.15).

**Bảng 7.15.** Các protein thuộc nhóm chất cytokin

- Các interleukin (IL-1 đến IL-15)
- Các interferon (IFN-  $\alpha$ , -  $\beta$ , -  $\gamma$ , -  $\tau$ , -  $\omega$ )
- Các nhân tố kích thích (G-CSF, M-CSF, GM-CSF)
- Các yếu tố hoại tử ung thư (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ )
- Các chất hướng thần kinh (NGF, BDNF, NT-3, NT-4)
- Yếu tố hướng neuron thần kinh (ciliary neurotrophin factor)
- Tế bào thần kinh đệm - yếu tố nguồn gốc thần kinh
- Yếu tố phát triển da (EGF)
- Yếu tố tạo hồng cầu
- Yếu tố phát triển fibroblast (FGF)
- Yếu tố kim hãm tạo bạch cầu (LIF)
- Yếu tố phát triển tiểu cầu (PDGF)
- Các protein chống viêm đại thực bào (MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$ )
- Các yếu tố biến đổi sự phát triển (TGF- $\alpha$ , - $\beta$ )
- Thromboietin.

Cytokin được sản sinh với một lượng vô cùng nhỏ trong cơ thể và hoạt động như những chất liên lạc giữa các tế bào, có tác dụng gây cảm ứng để có sự liên kết đặc biệt với các receptor trên bề mặt tế bào, tạo ra được những tín hiệu cần thiết trong tế bào.

Các cytokin hoạt động trên cơ sở được tạo ra bởi bạch cầu, tạo thành hệ thống miễn dịch và chống viêm. Chúng đóng vai trò trung tâm để điều chỉnh chức năng miễn dịch và chống viêm và các quá trình có liên quan đến sự tạo máu (sản sinh các tế bào máu từ hệ thống tế bào tạo máu của tủy xương người lớn) và làm lành vết thương. Thật vậy một số bệnh được miễn dịch và một số thuốc chống viêm được biết cho đến nay đều do kết quả các tác dụng sinh học được điều chỉnh và sản sinh các cytokin.

Thuật ngữ cytokin được gọi lần đầu tiên vào giữa những năm 70 khi mà một polypeptid được ứng dụng để kiểm soát các yếu tố tăng trưởng và điều chỉnh các tế bào của hệ thống miễn dịch. Interferon (IFNs) và interleukin (ILs) là những đại diện chính cho các chất polypeptid được phân loại lúc bấy giờ. Tên gọi cytokin còn bao gồm các lymphokin [cytokin như: interleukin-2 (IL-2) và interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) được sản sinh bởi bạch cầu lympho] và các monokin [các cytokin như yếu tố hoại tử ung thư (TNF- $\alpha$ ) được sản sinh bởi bạch cầu đơn nhân (monocyt)]. Việc phân loại dựa trên các sản phẩm được sản sinh ra bởi các tế bào có phần không hợp lý, vì hầu hết các cytokin đều do một loại tế bào sản sinh ra, cả tế bào lympho và bạch cầu đơn nhân đều sản sinh ra IFN- $\alpha$ .

Phân loại đầu tiên của một vài cytokin dựa trên cơ sở hoạt tính sinh học đặc biệt của chúng ví dụ như TNF có tác dụng độc đối với một vài dòng tế bào ung thư, các yếu tố kích thích định khu (CSFs) thúc đẩy tăng trưởng in vitro các bạch cầu khác nhau trong các cụm hay khóm. Cũng có ý kiến đề nghị phân loại theo cơ chế tác dụng nhưng cũng không thích hợp, sau đó người ta thấy rằng hầu hết các cytokin biểu hiện hoạt tính sinh học chính là tác nhân gây chết các tế bào ung thư. TNF biểu hiện tác dụng điều hoà miễn dịch và chống viêm. Gần đây khi phân tích cấu trúc của các cytokin nhận thấy cytokin thuộc vào một nhóm gồm 6 chất (bảng 7.16.).

**Bảng 7.16.** Các cytokin - phân nhóm dựa trên cấu trúc.

| Các cytokin cùng họ                   | Các thành viên tham gia                                                                                                                     |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Các $\beta$ - cytokin cấu trúc bậc ba | Các yếu tố phát triển nguyên bào xơ<br>Interleukin-1                                                                                        |
| Các chemokin                          | Interleukin- 8<br>Các protein chống viêm đại thực bào                                                                                       |
| Các cytokin có cystein ở nút          | Yếu tố phát triển thần kinh<br>Thay đổi các yếu tố phát triển<br>Các dẫn xuất của yếu tố phát triển                                         |
| Các chất cùng họ EGF                  | Yếu tố phát triển da<br>Sự thay đổi yếu tố phát triển- $\alpha$                                                                             |
| Các yếu tố tạo máu                    | Interleukin 2-7, 9,13<br>Các yếu tố kích thích tạo bạch cầu hạt<br>Các yếu tố kích thích tạo đại thực bào hạt<br>Các yếu tố ức chế bạch cầu |
| Các chất cùng họ TNF                  | Yếu tố hoại tử ung thư $\alpha$ và $\beta$                                                                                                  |

Vì các chất gần giống nhau nhưng chỉ có một tên gọi chung nên phải thêm vào các chỉ số để dễ phân biệt. Ví dụ interleukin-1 (IL-1) được biết như một yếu tố hoạt hoá lympho bào (LAF), chất gây sốt nội sinh, chất trung gian nội sinh, chất chuyển hoá và yếu tố tế bào đơn nhân. Tất cả những điều đó làm phức tạp thêm vấn đề về cytokin.

Trong những năm 80 của thế kỷ XX kỹ thuật tái tổ hợp ADN phát triển rất nhanh, với việc sản xuất thành công kháng thể đơn dòng đã cho phép hiểu sâu sắc hơn sinh học của cytokin đó là:

- Kỹ thuật gen cho phép sản xuất một số lượng lớn hơn các cytokin, do đó cho phép nghiên cứu về cấu trúc, chức năng của các cytokin và các receptor của nó.
- Phân tích các gen điều khiển hình thành cytokin cho ta hiểu sâu sắc hơn mối quan hệ về tiến hoá giữa các phân tử đó.
- Sự phát hiện ra mRNA cytokin và receptor mRNA cytokin cho phép xác định toàn bộ nguồn gốc của tế bào đích sản sinh ra các cytokin.
- Nhờ có kỹ thuật lai tế bào nên dễ dàng thực hiện các thử nghiệm miễn dịch và định lượng được các cytokin.
- Tìm hiểu hoạt tính của các cytokin in vivo bằng cách điều khiển kháng thể đơn dòng, và gần đây đã nghiên cứu liệu pháp thay gen sẽ tiếp tục chứng minh vai trò sinh lý và sinh lý bệnh của các cytokin.

Các chất cytokin đồng loại mới sẽ còn tiếp tục được phát hiện đó chính là các protein điều hoà giữ vai trò quan trọng trong điều trị và phòng bệnh.

#### ***Có thể tổng quát hoá những đặc trưng của các cytokin như sau:***

- Chúng là những phân tử điều hoà có uy lực, hoạt tính sinh học rất mạnh, có tác dụng chỉ ở nồng độ nanomol (nM) đến picomol (pM).
- Hầu hết các cytokin được sản sinh ra bởi các loại tế bào, như các tế bào bạch cầu hoặc không phải là bạch cầu. Ví dụ IL-1 được sản sinh ra bởi các tế bào như đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, các tế bào giết tự nhiên (NK cells), các bạch cầu B và T, và cả các tế bào không phải là bạch cầu như các tế bào cơ bắp, các tế bào nội mạch, các nguyên bào sợi.
- Rất nhiều loại tế bào có thể sản sinh ra không phải một cytokin mà nhiều cytokin, như tế bào bạch cầu có thể sản sinh ra ILs, CSFs, TNF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ . Nguyên bào sợi có thể sản sinh IL-1, IL-6, IL-8 và IL-11, CSFs, INF- $\beta$  và TNF.
- Nhiều cytokin đóng vai trò điều hoà trong các quá trình miễn dịch và chống viêm.

## Chương 8

### LIỆU PHÁP ACID NUCLEIC (NUCLEIC ACID THERAPEUTIC)

Trong suốt thập niên 80 của thế kỷ XX, thuật ngữ dược phẩm sinh học (biopharmaceuticals) đã thực sự đồng nghĩa với các protein sử dụng điều trị. Các dược phẩm được sản xuất bằng phương pháp biến đổi gen đã làm nên một cuộc cách mạng mới trong y học. Nếu như các chất kháng sinh, các chất kháng khuẩn, cùng với các vaccin là những vũ khí hữu hiệu để phòng và chống lại các bệnh nhiễm trùng, thì liệu pháp gen được coi như những con “dao mổ phân tử” dùng để phẫu thuật lấy đi các gen khuyết tật gây những bệnh nan y bẩm sinh hoặc không bẩm sinh (các bệnh hồng cầu lưỡi liềm, bệnh thiếu hụt miễn dịch do thiếu enzym adenosin desaminase, ...) và thay vào đó bằng các gen bình thường nhằm khôi phục chức năng của gen đó. Liệu pháp điều trị gen chỉ có giá trị khi một số kỹ thuật hiện rất khó thực hiện trong y học trở thành kỹ thuật thường qui thì mới có ý nghĩa áp dụng.

#### 8.1. Liệu pháp gen (gen therapy)

Vấn đề lý thuyết về liệu pháp gen không phức tạp, nhưng lại rất khó áp dụng vào thực tế. Nguyên tắc là tách loại đi khỏi cơ thể những gen khuyết tật gây bệnh bẩm sinh hay gen gây ung thư, sau đó ghép các gen bình thường vào vị trí các gen đã lấy đi để cơ thể sống và phát triển bình thường. Y học ngày càng hiểu biết sâu sắc hơn về bệnh học phân tử đặc biệt là các bệnh ung thư, bệnh AIDS và một vài bệnh về thần kinh. Bảng 8-1 thống kê một số loại bệnh chính đã được áp dụng liệu pháp điều trị gen để đánh giá điều trị lâm sàng.

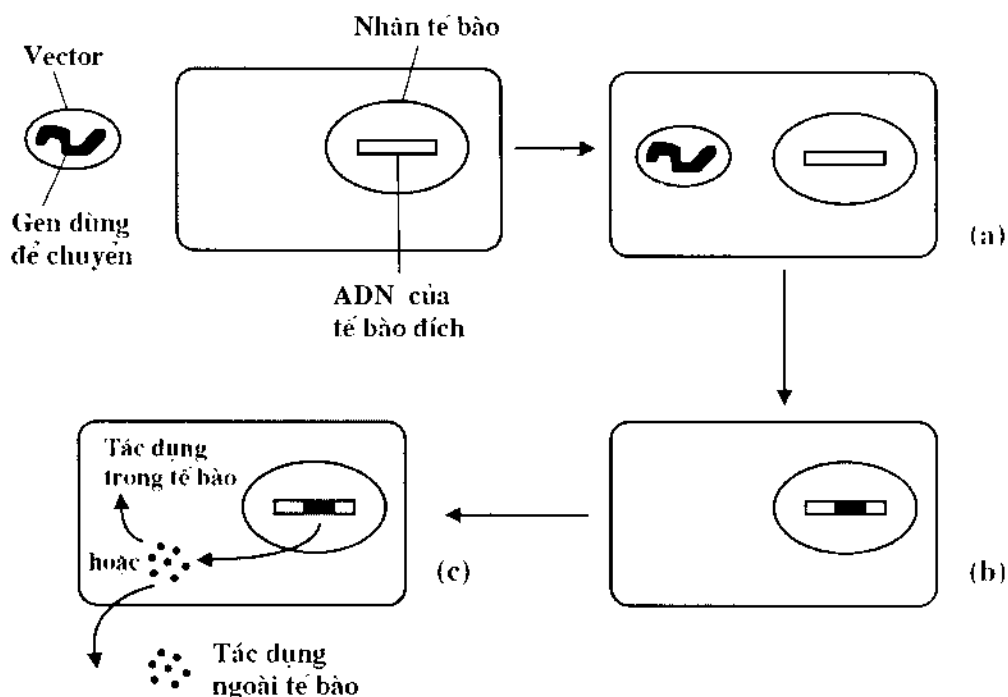
**Bảng 8.1.** Một số bệnh được thí nghiệm điều trị bằng liệu pháp gen

|                                           |                                          |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|
| - Các thể ung thư khác nhau               | - Bệnh ưa chảy máu                       |
| - Bệnh hoá xơ nang                        | - Bệnh thiếu hụt miễn dịch               |
| - Bệnh Gaucher                            | - Bệnh thiếu hụt $\alpha_1$ -antitrypsin |
| - Bệnh thiếu hụt miễn dịch do thiếu enzym | - Bệnh phồng tĩnh mạch                   |
| - Bệnh viêm khớp                          | - Bệnh ung thư hạt mạn tính.             |
| - AIDS                                    |                                          |

Trường hợp đầu tiên được điều trị bằng liệu pháp gen được tiến hành tại Mỹ vào năm 1990, hơn 400 thí nghiệm lâm sàng đã được tiến hành. Có đến 6000 người tình nguyện xin được điều trị thử nghiệm, nhưng chỉ một vài người được chọn. Cũng như các thử nghiệm điều trị khác, liệu pháp điều trị gen cũng không tránh khỏi những rủi ro. Một bệnh nhân ở Mỹ đã chết năm 1999 do tham gia vào thử nghiệm điều trị gen. Cơ quan quản lý thực phẩm và thuốc (FDA) còn điều tra và thông báo cho thấy không phải một trường hợp mà có ít nhất là sáu trường hợp chết do các cuộc thử nghiệm này. Những kết quả không mong đợi đó không cản trở việc nghiên cứu thử nghiệm liệu pháp điều trị gen, trái lại nó như một thách thức đối với các nhà khoa học cần đẩy mạnh nghiên cứu để khắc phục những thiếu sót đó.

## 8.2. Cơ sở của liệu pháp gen

Nguyên tắc của liệu pháp gen được minh họa theo (hình 8-1).



**Hình 8.1.** Sơ đồ giải thích liệu pháp điều trị gen.

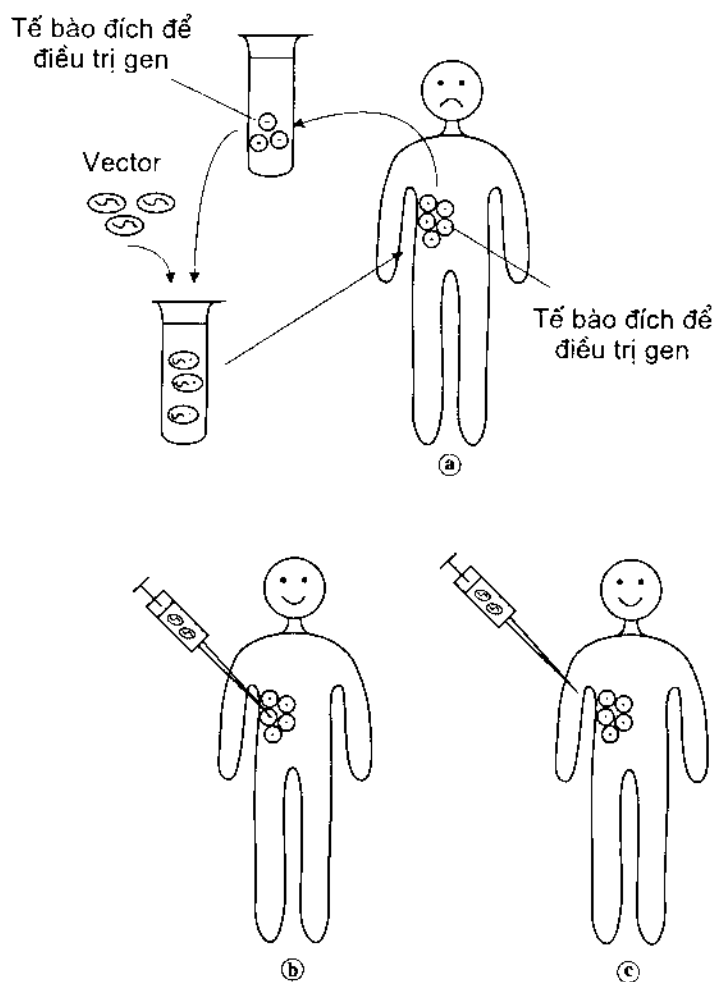
Gen mong muốn được gắn vào vector để chuyển đến tế bào nhận. Vector chuyển gen này có thể sử dụng virus (thường là adeno virus hay retro virus), hoặc một plasmid (bảng 8-2).

**Bảng 8.2.** Hệ thống vector sử dụng để chuyển gen vào tế bào động vật

| Sử dụng virus làm vector                                                                                                                                                                      | Hệ thống vector không phải virus                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retrovirus</li> <li>- Adenovirus</li> <li>- Adeno-associated virus</li> <li>- Herpes virus</li> <li>- Polio virus</li> <li>- Vaccin virus</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Acid nucleic chứa liposom</li> <li>- Các tiếp hợp phân tử</li> <li>- Tiêm trực tiếp ADN trần</li> <li>- Sự kết tủa <math>\text{CaPO}_4</math></li> <li>- Dùng xung điện</li> <li>- Súng bắn gen</li> </ul> |

Mỗi loại vector có những ưu nhược điểm riêng sẽ bàn tới sau.

Các acid nucleic ngoại lai đó được tế bào chủ tiếp nhận (đồng hoá) gắn vào nhân tế bào. Cơ chế chuyển gen nhờ vector retrovirus, vector liposom hay ADN trần hiện vẫn chưa rõ. Trên thực tế những qui định về liệu pháp gen có thể thực hiện theo một trong ba phương pháp khác nhau (hình 8-2).



**Hình 8.2.** Sơ đồ chuyển vector có gắn gen tới tế bào đích

**Cách thứ nhất:** Cho các tế bào đích tách ra từ cơ thể tiếp xúc với các vector mang gen cần thay thế nuôi cấy trong điều kiện đặc biệt để có sự trao đổi gen vào vị trí cần thiết của tế bào đích. Sau đó đưa tế bào đã được thay đổi gen đó trở lại cơ thể bệnh nhân. Kỹ thuật này đã thực hiện thành công ở một số loại tế bào như tế bào máu, tế bào gốc (tế bào mầm), tế bào biểu mô, tế bào cơ bắp và tế bào gan (hepatocytes).

**Cách thứ hai:** Thực hiện tiêm trực tiếp hoặc dùng dưới dạng phun sương (aerosol) để đưa các acid nucleic có chứa vector gắn gen cần thay thế đến tế bào đích cần thay thế.

**Cách thứ ba:** Tiêm trực tiếp các vector có gắn gen thay thế vào tế bào lân cận của tế bào đích. Phương pháp này thì khó thực hiện vì một số loại tế bào luôn chuyển động không đứng yên một chỗ (tế bào máu). Trong những trường hợp như vậy người ta phải tạo ra các vector có khả năng nhận biết tế bào đích, rồi tiến hành tiêm vào tĩnh mạch. Các vector mang gen thay thế có gắn thêm chất nhận diện để tìm đến tế bào cần thay thế.

Tuy nhiên cũng còn nhiều khó khăn trong việc nghiên cứu để đưa được các vector tới tế bào đích một cách dễ dàng và trở thành thường qui.

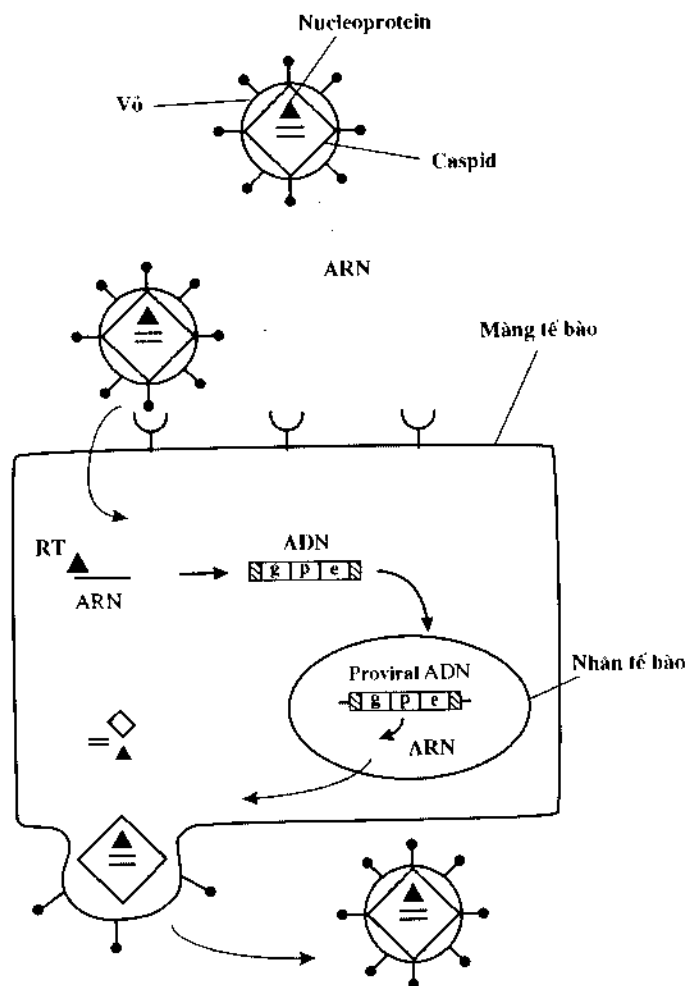
Người ta thấy rằng có thể gắn vào vector một kháng thể bề mặt, kháng thể này có thể liên kết đặc biệt với một kháng nguyên bề mặt để trợ giúp cho tế bào đích tiếp nhận gen bổ sung. Cũng có thể chế tạo các vector biểu đạt như một hormon đặc biệt, hormon này cũng chỉ gắn với tế bào đóng vai trò như một receptor hormon. Ý tưởng này có thể thực hiện được nếu sử dụng retrovirus làm vector.

### 8.3. Các vector sử dụng trong liệu pháp gen

Bảng 8-2 đã liệt kê một số vector có thể sử dụng để chuyển các gen khác nhau vào tế bào nhận. Hai hệ thống vector chính được sử dụng gồm các vector là virus và không phải virus.

### 8.4. Các vector retrovirus

Cho đến nay người ta đã sử dụng các vector là retrovirus để thực hiện các quá trình chuyển gen là chủ yếu (nó chiếm đến 80%). Retrovirus gồm các typ khác nhau, chúng là những virus có vỏ, genom của chúng chỉ có ARN sợi đơn (ssARN) độ dài từ 5-8 kb. Sau khi virus xâm nhập vào tế bào cảm thụ ARN của virus thực hiện quá trình phiên mã ngược để tạo ra ADN. Sau đó gắn vào genom của tế bào chủ (hình 8-3).

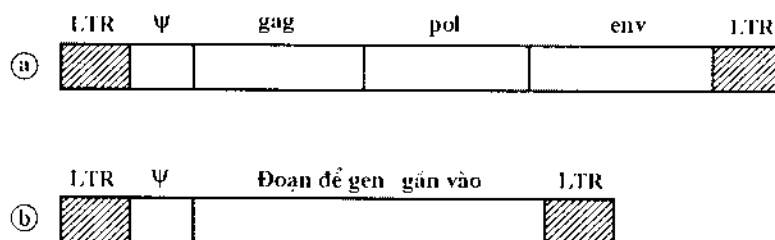


**Hình 8.3.** Sơ đồ mô tả quá trình nhân lên của retrovirus.

Phần cơ bản của genom retrovirus có chứa một lượng tối thiểu gen cấu trúc bậc ba; gag (mã hoá cho tổng hợp protein nhân của virus), pol (mã hoá cho quá trình sao chép ngược) và env (mã hoá cho việc tổng hợp protein vỏ virus). Sau khi đã điều khiển genom của tế bào chủ tổng hợp đầy đủ các thành phần của virus thì quá trình lắp ráp các thành phần đó để tạo ra một virus hoàn chỉnh xảy ra ngay tức khắc nhờ sự chỉ huy của ARN của virus.

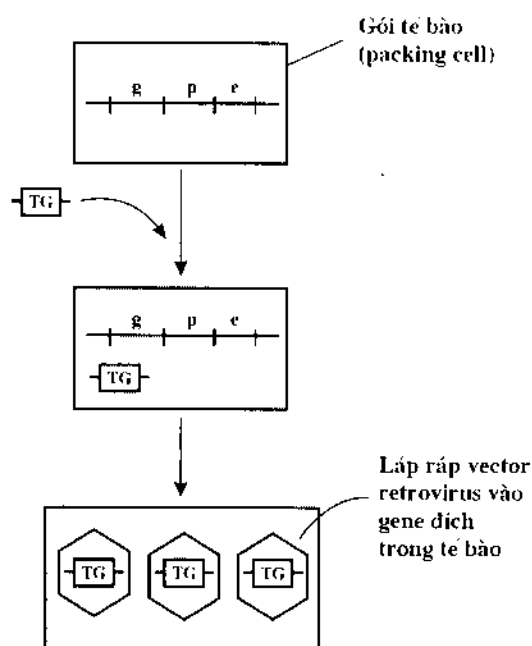
Khả năng của retrovirus xâm nhập vào các tế bào khác nhau và hoà nhập genom của chúng vào genom của tế bào chủ thành một thể ổn định lâu dài chính là cơ sở để sử dụng chúng trong liệu pháp điều trị gen.

Cấu trúc các retrovirus cho chức năng làm vector chuyển gen bắt buộc chúng phải thực hiện việc sao chép trên gen virus nội sinh, yêu cầu cho việc sao chép bình thường như những gen ngoại sinh mà ta quan tâm (8.4).



**Hình 8.4.** Sơ đồ mô tả genom provirus của retrovirus.

Sự dịch chuyển các gen cấu trúc của virus làm cho các vector không thể tự sao chép được. Để thu được các hạt virus trưởng thành thì các vector acid nucleic, vật liệu di truyền cần phải trình diện trong tế bào gói sẵn "packing cell" (hình 8.5).



**Hình 8.5.** Sơ đồ mô tả tế bào khuôn chứa vector retrovirus dùng chuyển gen

Các retrovirus có một số đặc điểm, các đặc điểm này có ảnh hưởng đáng kể tới khả năng làm vector trong liệu pháp điều trị gen. Có thể tóm tắt như sau:

- Các retrovirus là nhóm virus đã được nghiên cứu kỹ và hiểu rõ những đặc điểm hoá sinh và sinh học phân tử.

- Hầu hết các retrovirus có thể hợp nhất ADN provirus của chúng vào các tế bào sao chép hoạt động.
- Hiệu số chuyển gen đối với hầu hết các tế bào nhạy cảm rất cao, thường là 100%.
- Việc hợp nhất ADN có thể tiến hành lâu và biểu thị ở mức độ cao.
- Sự hoà nhập ADN provirus xảy ra một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ.
- Retrovirus có thể gây nhiễm các dạng tế bào khác nhau trong giai đoạn phân chia.
- Các bản sao hoàn chỉnh của ADN provirus được truyền sang tế bào con nếu tế bào nhận là tế bào gốc phân chia.
- Nghiên cứu về độ an toàn khi sử dụng retrovirus làm vector đã được thực hiện trên các loài động vật khác nhau.

Trên thực tế đã nghiên cứu rất kỹ và nhận thấy hiệu số tải nạp đạt gần như 100% đối với tế bào khả biến và quá trình chuyển gen này thường kéo dài, các vector retrovirus biểu hiện khả năng chuyển gen với ái lực cao. Đó chính là lý do để người ta mong đợi áp dụng vào thực tế.

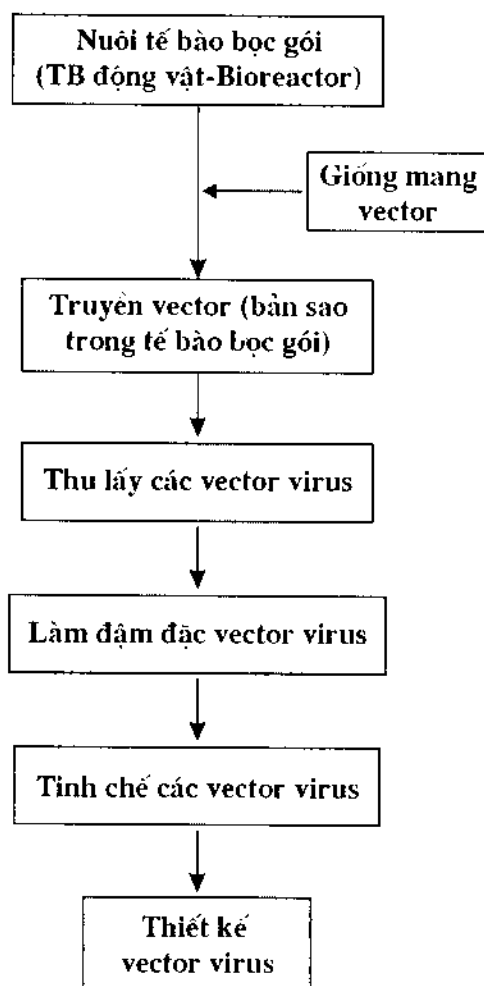
### **8.5. Sản xuất các vector virus**

Trong một số tài liệu có mô tả qui trình sản xuất các vector virus trên qui mô lớn nhằm mục đích ứng dụng cho liệu pháp điều trị gen. Tuy nhiên việc áp dụng chắc còn xa.

Qui trình sản xuất đã được một số công ty nêu ra, nó hoàn toàn khác với qui trình sản xuất các protein dùng điều trị. Có thể tổng quát hoá trên sơ đồ 8.1.

Việc lựa chọn các vector virus để sản xuất có thể thực hiện theo một cách gần như nhau. Đầu tiên là nuôi các tế bào đã được thiết kế mang gen nào đó mà ta có chủ định chứa các bản sao do vector virus tạo ra (sơ đồ 8.1) trong các tế bào động vật thích hợp (các bioreactor). Nuôi cấy tế bào động vật thực hiện trong điều kiện phức tạp hơn nuôi tế bào vi sinh vật ở một vài đặc điểm sau:

- Môi trường nuôi cấy đòi hỏi nhiều thành phần và các thành phần đó cũng phức tạp hơn.
- Thời gian nuôi kéo dài hơn vì tế bào động vật phát triển chậm.
- Tế bào động vật dễ vỡ hơn tế bào vi sinh vật vì chúng không có thành tế bào.



**Sơ đồ 8.1.** Sơ đồ qui trình sản xuất các vector virus

**Môi trường nuôi cấy tế bào động vật thường gồm các thành phần:**

- Hầu hết các L- acid amin.
- Một số vitamin cần thiết.
- Các muối vô cơ ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ )
- Glucose.
- Kháng sinh để chống nhiễm trùng (thường dùng penicilin hay streptomycin)
- Bổ sung thêm huyết thanh thích hợp (thường dùng huyết thanh bò)
- Nuôi trong môi trường chứa khí  $\text{CO}_2$ .

Nuôi tế bào được tiến hành trong các thiết bị lên men dung tích từ 10-100 lít. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy tiến hành siêu lọc để thu tế bào có chứa vector, tinh chế bằng các kỹ thuật thường dùng để tinh chế các protein (lọc trên gel, sắc ký trên HPLC, v.v...)

## **8.6. Các vector không phải virus**

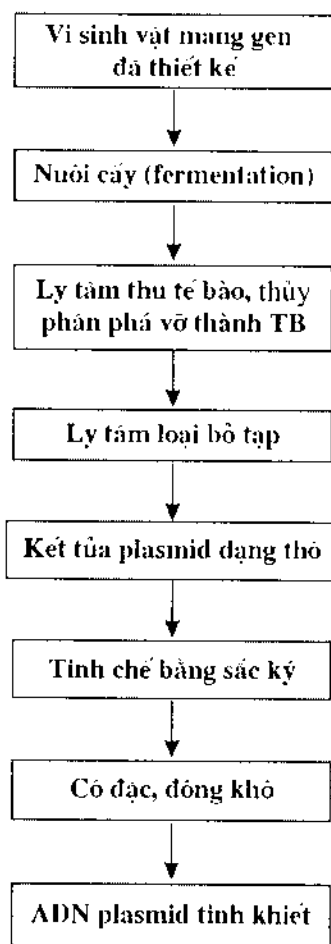
Như trên đã nêu khoảng 80% các vector chuyển gen do virus thực hiện. Như vậy vẫn còn từ 20-25% các vector dùng chuyển gen là các vector khác. Ưu điểm của các vector này là khả năng sinh miễn dịch thấp hoặc không có, đồng thời các gen này không gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ do đó không làm biến dạng gen của vật chủ và không có khả năng hoạt hoá tác nhân gây ung thư của tế bào chủ.

Thí nghiệm đầu tiên được thực hiện bằng việc tiêm ADN plasmid vào cơ bắp của chuột vào năm 1990 và nhận thấy ADN plasmid biểu hiện trong tế bào của cơ bắp. ADN plasmid có liên quan đến sự định vị của gen  $\beta$ -galactosidase giống như một người tiếp nhận. Hoạt tính của  $\beta$ -galactosidase còn biểu hiện thêm một vài tháng trong đời sống của chuột. Sự nhiễm ADN plasmid vào vật chủ chỉ đạt 1-2%. Các ADN plasmid này lại không gắn vào nhiễm sắc thể của tế bào vật chủ. Với thí nghiệm này người ta cho rằng việc tiêm ADN trần vào động vật không phải là tự nhiên mà là cưỡng ép để đưa vật liệu di truyền vào tế bào chủ. Cũng do kết quả của thí nghiệm này mà FDA và một số nhà nghiên cứu khác mong chờ các chế phẩm ADN tự do có trong danh mục các dược phẩm sinh học dùng điều trị.

Các nhà nghiên cứu còn bào chế tạo ra các dạng ADN đặc biệt như các pellet, vi cầu để bắn qua da bằng “súng bắn gen”. Bằng những thủ thuật hiện đại này người ta đã áp dụng để đưa các kháng nguyên là virus vào cơ thể nhằm tạo ra các kháng thể cần thiết để phòng các bệnh virus. Đây cũng chính là nguyên lý sản xuất vaccin vector.

## **8.7. Sản xuất ADN plasmid**

Việc chiết xuất ADN plasmid từ các tế bào vi sinh vật là công việc làm khá đơn giản đối với các nhà di truyền học. Tuy nhiên để sản xuất trên qui mô công nghiệp với độ tinh khiết cao đáp ứng yêu cầu của một dược phẩm lại không dễ dàng. Cũng giống như những qui trình sản xuất các protein tái tổ hợp dùng cho mục đích điều trị nêu trong chương 7, qui trình sản xuất ADN plasmid có thể mô tả theo sơ đồ 8.2.



**Sơ đồ 8.2.** Quy trình sản xuất ADN plasmid

Trước tiên các nhà nghiên cứu phải thiết kế một gen thích hợp gắn vào vật mang như *E.coli* chẳng hạn. Sau đó nuôi cấy *E.coli* trên thiết bị lên men trong những điều kiện thích hợp. Kết thúc giai đoạn nuôi cấy ly tâm hoặc vi lọc để thu tế bào. Để chiết xuất ADN plasmid từ tế bào vi khuẩn cần phá vỡ tế bào bằng những tác nhân thủy phân đặc biệt như NaOH và SDS (sodium dodecyl sulphat). Dưới tác dụng của SDS ở pH cao, thành tế bào bị phá vỡ, ADN plasmid được giải phóng, ly tâm loại sinh khối, ADN plasmid dạng thô được tinh chế bằng các phương pháp khác nhau để thu sản phẩm tinh khiết theo yêu cầu. Các tạp chất lẫn trong ADN plasmid dạng thô cần loại bỏ gồm: các mảnh vỡ thành tế bào, protein, ADN genom, ARN, các chất chuyển hoá có khối lượng phân tử thấp, endotoxin.

Hỗn hợp tế bào sau khi thủy phân được trung hoà bằng dung dịch muối có nồng độ cao, thường dùng kali acetat, tạp chất đi kèm theo là ADN

genomic (gADN) và phức hợp SDS - protein. Các chất này được loại đi bằng ly tâm hay lọc. Kết tủa plasmid bằng cách thêm vào một dung môi thích hợp (thường dùng isopropanol hay ethanol). Hoà tan kết tủa và tiếp tục tinh chế bằng sắc ký. Tạp chất đi kèm theo thường là ARN, các đoạn gADN, nội độc tố và một vài loại plasmid khác. Tiếp tục sắc ký trên gel có thể loại đi các tạp chất trên. Tiến hành sắc ký trao đổi ion sẽ loại được các plasmid không phải mạch vòng, các protein cũng như các ARN. Tuy nhiên vẫn còn lẫn gADN và nội độc tố đi kèm với ADN plasmid. Bằng phương pháp sắc ký pha đảo sẽ thu được sản phẩm tinh khiết.

## **8.8. Liệu pháp gen và các bệnh di truyền**

Hiện đã biết hơn 4000 loại bệnh về di truyền khác nhau, nguyên nhân của phần lớn các bệnh đó là do khiếm khuyết các gen bẩm sinh, hoặc do đột biến gen gây ra làm cho cơ thể không thực hiện được chức năng bình thường. Liệu pháp điều trị gen chính là phương pháp sửa chữa những khuyết tật di truyền đó của cơ thể. Về nguyên lý thì có vẻ đơn giản, tuy nhiên áp dụng vào thực tế điều trị chắc còn lâu mới có thể thực hiện được do một số nguyên nhân sau đây:

- Một số lớn các bệnh di truyền do chính gen gây ra tuy đã được nhận dạng và nghiên cứu nhưng sự hiểu biết căn kẽ vẫn còn khiêm tốn. Năm 2001 đã công bố việc nghiên cứu giải mã xong bản đồ gen người nhưng để hiểu sâu sắc các bệnh về gen chắc cũng cần nhiều nghiên cứu hơn nữa.
- Như đã phân tích ở trên cho thấy chưa có một vectơ nào thực hiện việc chuyển gen đạt được thành công.
- Một vài bệnh di truyền thực sự rất phức tạp, một vài kiểu tế bào, cơ quan bị ảnh hưởng, gần đây người ta đã chứng minh trên thực tế để đưa được một gen mong muốn vào trong tất cả các tế bào khuyết tật là rất khó khăn.
- Việc điều chỉnh quá trình chuyển gen còn nhiều vấn đề phải nghiên cứu.
- Các công ty sản xuất thuốc thường thể hiện sự quan tâm lớn vào việc áp dụng liệu pháp gen đối với một số bệnh ung thư. Số lượng bệnh nhân mắc bệnh về gen ít, trong một vài trường hợp số lượng bệnh nhân quá ít, nên các công ty không muốn đầu tư vốn vào nghiên cứu tạo ra những thuốc chỉ chữa cho một số ít người, vì như vậy bao giờ mới thu được vốn đầu tư cho nghiên cứu.
- Một số yếu tố di truyền do khuyết tật về gen đã được xác định.

**Bảng 8.3.** Một vài bệnh di truyền do thiếu hụt gen tương ứng được xác định

| Tên bệnh                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Khiếm khuyết gen sản xuất protein                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chứng ưa chảy máu A</li> <li>- Chứng ưa chảy máu B</li> <li>- Thiếu máu vùng biển (thalassemia)</li> <li>- Hồng cầu lưới liềm</li> <li>- Cholesterol cao mang tính di truyền</li> <li>- Thiếu hụt miễn dịch hỗn hợp trầm trọng</li> <li>- Bệnh niemann-pick</li> <li>- Bệnh Gaucher</li> <li>- Bệnh hoá sơ nang</li> <li>- Bệnh khí thũng</li> <li>- Bệnh thiếu chất kết dính bạch cầu</li> <li>- Bệnh ưa chảy máu</li> <li>- Bệnh phenylketon niệu</li> <li>- Bệnh thiếu năng tyrosin typ 1</li> <li>- Bệnh thiếu hụt glycogen typ 1A</li> <li>- Mucopolysaccharid nhầy typ VII</li> <li>- Bệnh polysaccharid nhầy typ I</li> <li>- Bệnh galactose huyết</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Factor VIII</li> <li>- Factor IX</li> <li>- <math>\beta</math>-globin</li> <li>- <math>\beta</math>-globin</li> <li>- Receptor protein mật độ thấp</li> <li>- Adenosin deaminase, purin nucleosid phosphorylase</li> <li>- Sphingomyelinase</li> <li>- Glucocerebrosidase</li> <li>- Điều khiển sơ nang qua màng</li> <li>- <math>\alpha</math>-1-antitrypsin</li> <li>- CD 18</li> <li>- Ornitin transcarbamylase</li> <li>- Phenylalanin hydroxylase</li> <li>- Fumarylacetoacetat hydrolase</li> <li>- Glucose-6-phosphatase</li> <li>- <math>\beta</math>-Glucuronidase</li> <li>- <math>\alpha</math>-L- iduronidase</li> <li>- Galactose-1-phosphat uridyl transferase</li> </ul> |

Người ta đặc biệt chú ý đến liệu pháp gen để giải quyết bệnh huyết sắc tố như bệnh hồng cầu lưới liềm. Bệnh này có nguyên nhân thiếu mất gen  $\lambda$  và  $\lambda$  - globin điều khiển để tạo hemoglobin. Hơn thế nữa các tế bào đích trong tủy xương cũng có thể loại đi để thay vào đó những tế bào tương tự một cách dễ dàng. Tuy vậy để chọn được gen thay thế cũng không phải đơn giản. Việc sản xuất một số lượng thích hợp hemoglobin chức năng không chỉ phụ thuộc vào sự có mặt của gen  $\lambda$  và  $\lambda$ -globin mà còn vào sự điều chỉnh khác của gen điều hoà.

Một bệnh di truyền khác cũng được phát hiện sớm đó là hội chứng thiếu hụt miễn dịch hỗn hợp trầm trọng SCID (severe combine immunodeficiency). Bệnh này gây ra do thiếu hụt enzym adenosin desaminase (ADA). ADA là một enzym đóng vai trò trung tâm trong việc phân giải purin nucleotid (nó xúc tác cho việc loại bỏ amoni của adenosin, để hình thành inosin và cuối cùng tạo thành acid uric).

## 8.9. Liệu pháp gen và ung thư

Các liệu pháp dùng điều trị ung thư hiện nay bao gồm: phẫu thuật cắt bỏ, hoá trị liệu và xạ trị. Các nhà nghiên cứu mong muốn bổ sung thêm một liệu pháp điều trị ung thư khác hữu hiệu hơn các phương pháp hiện đang thực hiện, nhằm tiêu diệt tế bào gây ung thư từ sớm và diệt tận gốc-đó là liệu pháp gen. Riêng ở Mỹ hàng năm thống kê cho thấy có đến 1,4 triệu ca ung thư các thể khác nhau. Các phương pháp điều trị hiện tại mới chỉ thu nạp được 50% bệnh nhân. Liệu pháp gen điều trị ung thư hiện nay vẫn mới chỉ là thử nghiệm, đang trong giai đoạn truyền thông cho cộng đồng. Người ta dự đoán và hy vọng trong khoảng 10 - 15 năm nữa điều trị ung thư bằng liệu pháp gen sẽ được áp dụng rộng rãi ở các nước có nền y học tiên tiến.

Thí nghiệm đầu tiên điều trị ung thư bằng liệu pháp gen được tiến hành vào năm 1991. Các nhà nghiên cứu đã đề ra chiến lược điều trị bằng liệu pháp gen trên một số hướng nghiên cứu sau:

- Cải tạo các dòng bạch cầu để tăng hoạt tính chống ung thư của chúng.
- Cải biến các tế bào ung thư để tăng khả năng miễn dịch của chúng.
- Gắn gen diệt ung thư vào tế bào ung thư.
- Gắn gen tạo toccin vào tế bào ung thư để thúc đẩy quá trình diệt tế bào ung thư.
- Gắn gen "tự sát" (suicide) vào tế bào ung thư.
- Gắn gen, giống như các gen đa đề kháng thuốc vào tế bào mầm nhằm bảo vệ tế bào không bị ảnh hưởng của hoá trị liệu.

Trong những năm gần đây thử nghiệm áp dụng các cytokin để điều trị một số bệnh ung thư như: ung thư vú, u hắc tố ác tính, buồng trứng, phổi, thận, v.v... đã cho thấy những triển vọng đáng quan tâm.

Nhiều dẫn liệu cho thấy liệu pháp gen dùng điều trị ung thư chưa thật hiệu quả rõ ràng nguyên nhân chính có thể là: có quá nhiều dạng ung thư mà nguyên nhân còn chưa biết rõ. Chưa tạo ra được các vector thích hợp để mang các gen tới tế bào đích một cách hiệu quả. Cần hiểu biết sâu sắc hơn về cơ chế đáp ứng miễn dịch tế bào. Tế bào ung thư nào thì không chịu tác động của miễn dịch tế bào? Người ta vẫn hy vọng trong một tương lai không xa những thắc mắc đó sẽ được chứng minh.

## 8.10. Liệu pháp gen và bệnh AIDS

Như đã trình bày ở trên, liệu pháp gen cũng có phổ điều trị rộng không chỉ dừng lại việc nghiên cứu áp dụng để điều trị bệnh di truyền, ung thư, các nhà nghiên cứu còn muốn áp dụng vào thử nghiệm điều trị bệnh

AIDS - một căn bệnh nguy hiểm của thế kỷ XXI. Virus HIV chỉ có thể nhân lên được khi chúng xâm nhập vào tế bào lympho T. Dựa vào vòng đời của nó nên có thể đưa một gen mã hoá cho việc tổng hợp một trong những thành phần cấu tạo nên hạt virus HIV như gen gag (mã hoá cho tổng hợp protein bao quanh nhân HIV), gen pol (mã hoá cho enzym sao chép ngược), gen env (mã hoá cho tổng hợp protein vỏ HIV), ... vào tế bào có khả năng bị nhiễm HIV. Các tế bào tự miễn đó sẽ không bị tấn công bởi HIV và bệnh sẽ không xảy ra.

Các nhà nghiên cứu còn muốn dùng kỹ thuật tái tổ hợp di truyền để tạo ra các tế bào có khả năng tổng hợp và tiết ra các chất có thể hoà tan được các receptor bề mặt của HIV, như kháng nguyên CD4. Các kháng nguyên đó sẽ tuần hoàn trong máu và khi gặp HIV chúng sẽ “tóm lấy” và giữ chặt không cho HIV hoạt động. Ý tưởng này mới chỉ thực hiện được trên invitro, chắc còn phải đợi thêm một thời gian nữa mới thực hiện được trên người.

## KẾT LUẬN

Y sinh học phân tử đã phát triển nhanh chóng trong hơn hai thập kỷ qua do ra đời một ngành khoa học mới - ngành bệnh học phân tử. Cùng với việc khoa học đã giải mã xong bộ gen người vào năm 2001, chắc chắn những bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS, ... sẽ được điều trị một cách có hiệu quả hơn. Công nghệ sinh học sẽ đóng vai trò chủ đạo trong nghiên cứu và sản xuất ra những dược phẩm sinh học có giá trị để phòng và điều trị những bệnh mà trước đây không bao giờ nghĩ là có thể chữa được.

Thuốc sản xuất bằng công nghệ sinh học sẽ là những thuốc có giá trị cao về chữa bệnh cũng như kinh tế mà không thể có con đường sản xuất khác thay thế được. Các nhà sinh học phân tử, hoá sinh và dược học sẽ là những chuyên gia đi tiên phong trong việc sản xuất, thử nghiệm các dược phẩm sinh học.

## PHỤ LỤC

Các dược phẩm sinh học sử dụng ở USA hoặc EC

### Chú thích:

- Một vài chế phẩm đã được sử dụng đa chỉ định, trong bảng chỉ nêu có 1 chỉ định được dùng chính.
- "Vet" được chỉ định dùng cho thú y.

Tất cả các sản phẩm khác được sử dụng trong y học

## PHỤ LỤC 1

**Bảng 1.** Các sản phẩm của máu tái tổ hợp

| Tên sản phẩm                                                                                                      | Công ty sản xuất                      | Chỉ định điều trị           | Ngày cho phép                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <b>Bioclata</b> (rh Factor VIII được sản xuất bằng các tế bào trứng) CHO                                          | Ceteon                                | Haemophilia A               | 1993<br>(USA)                  |
| <b>Benefix</b> (rh Factor IX được sản xuất trong các tế bào trứng) CHO                                            | Gentic Institute                      | Haemophilia B               | 1997<br>(USA, EU)              |
| <b>Kogenate</b> (rh Factor VIII được sản xuất trong các tế bào BHK)                                               | Bayer                                 | Haemophilia A               | 1993<br>(USA),<br>2000<br>(EU) |
| <b>Helixate Nex Gen</b> (octocog- $\alpha$ , rh Factor VIII được sản xuất trong tế bào BHK)                       | Bayer                                 | Haemophilia A               | 2000<br>(EU)                   |
| <b>Novo Seven</b> (rh Factor VIIIa được sản xuất trong tế bào BHK)                                                | Novo Nordisk                          | Một vài thể của Haemophilia | 1995<br>(EU)<br>1999<br>(USA)  |
| <b>Recobinate</b> (rh Factor VIII được sản xuất trong một số dòng tế bào động vật)                                | Baxter Heath care (Gentics Institute) | Haemophilia A               | 1992<br>(USA)                  |
| <b>Refacto</b> (Monoctocog - $\alpha$ , i, e. B - domain - deleted rh Factor VIII được sản xuất trong tế bào CHO) | Gentics Institute                     | Haemophilia A               | 1999<br>(EU)<br>2000<br>(USA)  |

**Bảng 2. Các sản phẩm hoạt hóa Plasminogen mô tái tổ hợp**

| Tên sản phẩm                                                                                     | Công ty sản xuất            | Chỉ định điều trị   | Ngày cho phép |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|---------------|
| <b>Activase</b> (Alteplase, rh, tPA được sản xuất trong tế bào CHO)                              | Gentech                     | Nhồi máu cơ tim cấp | 1987 (USA)    |
| <b>Ecokinase</b> được sản xuất trong tế bào <i>E.coli</i>                                        | Galenus Mannheim            | Nhồi máu cơ tim cấp | 1996 (EU)     |
| <b>Retavase</b> (Reteplase, rt PA xem Ecokirase)                                                 | Boehringer Mannheim/Cetacor | Nhồi máu cơ tim cấp | 1996 (USA)    |
| <b>Rapilysin</b> (Reteptase, rtPA xem Ecokinase)                                                 | Boehringer Mannheim         | Nhồi máu cơ tim cấp | 1996 (EU)     |
| <b>Tenecteplase</b> tương tự Metalyse (TNR - tPA được sản xuất trong tế bào CHO)                 | Boehringer Ingelheim        | Nhồi máu cơ tim     | 2001 (EU)     |
| <b>TN Kase</b> (Tenecteplase, dẫn xuất của rtPA được sản xuất trong tế bào CHO xem Tenecteplase) | Gentech                     | Nhồi máu cơ tim     | 2000 (USA)    |

**Bảng 3. Các hormon tái tổ hợp**

| Tên sản phẩm                                                                                       | Công ty sản xuất | Chỉ định điều trị | Ngày cho phép  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|----------------|
| <b>Humulin</b> (rhInsulin được sản xuất bằng <i>E.coli</i> )                                       | Eli Lilly        | Tiểu đường        | 1982 (USA)     |
| <b>Novolin</b> (rhInsulin)                                                                         | Novo Nordisk     | Tiểu đường        | 1991 (USA)     |
| <b>Humalog</b> (Insulin Lispro được sản xuất bằng <i>E.coli</i> )                                  | Eli Lilly        | Tiểu đường        | 1996 (USA, EU) |
| <b>Insuman</b> (rhInsulin được sản xuất bằng <i>E.coli</i> )                                       | Hoechst AG       | Tiểu đường        | 1997 (EU)      |
| <b>Liprolog</b> (Bio Lyspol được sản xuất bằng <i>E.coli</i> )                                     | Eli Lilly        | Tiểu đường        | 1997 (EU)      |
| <b>NovoRapid</b> (insulin Aspart, Shortacting rhInsulin analogue)                                  | Novo Nordisk     | Tiểu đường        | 1999 (EU)      |
| <b>Novomix 30</b> (contains Insulin Aspart, short acting rhInsulin analogue)                       | Novo Nordisk     | Tiểu đường        | 2000 (EU)      |
| <b>Novolog</b> (Insulin Aspart, shortacting rhInsulin analogue, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> ) | Novonordisk      | Tiểu đường        | 2001 (USA)     |
| <b>Novolog 70/30</b> (gồm Insulin Aspart, tác dụng ngắn giống rhInsulin)                           | NovoNordisk      | Tiểu đường        | 2001 (USA)     |

**Bảng 3. (tiếp)**

|                                                                                                                                                                            |                            |                                                                                 |                                |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Actrapid/Velosulin/Monotard<br/>Insulatard/Protaphane/Mixtard/A<br/>ctraphane Hetratard</b> (đều là<br>những Insulin tái tổ hợp, sản xuất<br>bởi <i>S. Cerevisiae</i> ) | NovoNordisk                | Tiểu đường                                                                      | 2002<br>(EU)                   |
| <b>Lantus</b> (Insulin alargin, tương tự<br>rhInsulin tác dụng kéo dài, sản<br>xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                                    | Aventis<br>Pharmaceuticals | Tiểu đường                                                                      | 2000<br>(EU)                   |
| <b>Optisulin</b> (Insulin alargin, tương<br>tự rhInsulin tác dụng kéo dài, sản<br>xuất bởi <i>E.coli</i> (xem Lantus)                                                      | Aventis<br>Pharmaceuticals | Tiểu đường                                                                      | 2000<br>(EU)                   |
| <b>Protropin</b> (rhGH khác với hormon<br>người chỉ 1 gốc methionin ở điểm<br>cuối chuỗi polypeptid, được sản<br>xuất bởi <i>E.coli</i> )                                  | Gentech                    | Thiếu hormon tăng<br>trưởng (hGH) ở trẻ em                                      | 1985<br>(USA)                  |
| <b>Glucagen</b> (rh Glucagon, được sản<br>xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )                                                                                                   | Novo Nordisk               | Giảm đường huyết                                                                | 1998<br>(USA)                  |
| <b>Thyrogen</b> (thyrotropin - $\alpha$ , rh TSH<br>sản xuất bởi tế bào CHO)                                                                                               | Genzyme                    | Điều trị ung thư<br>tuyến giáp                                                  | 1998<br>(USA)<br>2000<br>(EU)  |
| <b>Humatrope</b> (rhGH, sản xuất bởi<br><i>E.coli</i> )                                                                                                                    | Eli Lilly                  | Thiếu năng hormon<br>tăng trưởng ở trẻ em                                       | 1987<br>(USA)                  |
| <b>Nutropin</b> (rhGH, sản xuất bởi<br><i>E.coli</i> )                                                                                                                     | Gentech                    | Thiếu năng hormon<br>tăng trưởng ở trẻ em                                       | 1994<br>(USA)                  |
| <b>Nutropin AQ</b> (rhGH, sản xuất bởi<br><i>E.coli</i> )                                                                                                                  | Schwarz Pharma<br>AG       | Suy tụy, hội chứng<br>Turner (bệnh có cấu<br>trúc nhiễm sắc thể<br>XO ở phụ nữ) | 2001<br>(EU)                   |
| <b>Saizen</b> (rhGH)                                                                                                                                                       | Serono<br>laboratories     | Thiếu năng hormon<br>tăng trưởng ở trẻ em                                       | 1996<br>(USA)                  |
| <b>Serostion</b> (rhGH)                                                                                                                                                    | Serono<br>Laboratories     | Trợ giúp (hỗ trợ)<br>trong điều trị AIDS                                        | 1996<br>(USA)                  |
| <b>Norditropin</b> (rhGH)                                                                                                                                                  | Novo Nordisk               | Làm tăng tiết hormon<br>sinh trưởng đường<br>trong trẻ em chậm<br>lớn           | 1995<br>(USA)                  |
| <b>Gonal F</b> (rh FSH sản xuất trong tế<br>bào CHO)                                                                                                                       | Serono                     | Kích thích rụng trứng<br>hoặc rụng trứng nhiều                                  | 1995<br>(EU);<br>1997<br>(USA) |

**Bảng 3. (tiếp)**

|                                                                            |               |                                             |                         |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Puregon</b> (rh FSH, sản xuất trong tế bào CHO)                         | N.V Organon   | Kích thích rụng trứng hoặc rụng trứng nhiều | 1996 (EU)               |
| <b>Follistim</b> (follitropin - $\beta$ , rhFSH sản xuất trong tế bào CHO) | Organon       | Một vài thể vô sinh                         | 1997 (USA)              |
| <b>Luveris</b> (Lutropin - $\alpha$ ; rhLH sản xuất trong tế bào CHO)      | Ares - Serono | Một vài thể vô sinh                         | 2000 (EU)               |
| <b>Ovitrelle</b> hoặc <b>Ovidrelle</b> (rhCG, sản xuất trong tế bào CHO)   | Serono        | Sử dụng trong trợ giúp sinh sản             | 2001 (EU)<br>2000 (USA) |
| <b>Forcaltonin</b> (r salmon calcitonin sản xuất bởi <i>E.coli</i> )       | Unigen        | Bệnh Paget                                  | 1999 (EU)               |

**Bảng 4. Các yếu tố tăng sự tạo máu (Haemopoietic growth Factors)**

| Tên sản phẩm                                                                                                                       | Công ty sản xuất      | Chỉ định điều trị       | Ngày cho phép  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------|
| <b>Epogen</b> (rh EPO, được sản xuất bởi 1 dòng tế bào động vật)                                                                   | Amgen                 | Thiếu máu               | 1989 (USA)     |
| <b>Procrit</b> (rh EPO được sản xuất bởi 1 dòng tế bào động vật)                                                                   | Ortho Biotech         | Thiếu máu               | 1990 (USA)     |
| <b>Neorecormon</b> (rh EPO được sản xuất trong tế bào CHO)                                                                         | Boehringer - Mannheim | Thiếu máu               | 1997 (EU)      |
| <b>Aranesp</b> (darbepoetin - $\alpha$ ; tác dụng kéo dài tương tự rEPO được sản xuất trong tế bào CHO)                            | Amgen                 | Thiếu máu               | 2001 (EU, USA) |
| <b>Nespo</b> (darbepoetin - $\alpha$ giống Aranesp, tác dụng kéo dài giống như rEPO, được sản xuất trong tế bào CHO)               | Dompe Biotec          | Thiếu máu               | 2001 (EU)      |
| <b>Leukine</b> (r GM - CSF, khác với protein người ở 1 gốc acid amin, Leucin 23, được sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )           | Immunex               | Trong ghép tủy          | 1991 (USA)     |
| <b>Neupogen</b> (Filgrastim, rG-CSF; khác với protein người vì có thêm methionin ở N cuối chuỗi, được sản xuất bởi <i>E.coli</i> ) | Amgen                 | Tạo bạch cầu trung tính | 1991 (USA)     |
| <b>Neulasta</b> (PEG filgrastim, rPEGylated filgrastim - xem Neupogen). Thị trường châu Âu có sản phẩm tương tự Neupogeg)          | Amgen                 | Bạch cầu Trung tính     | 2002 (USA, EU) |

**Bảng 5. Các Interferon và Interleukin tái tổ hợp**

| Tên sản phẩm                                                                                                                          | Công ty sản xuất                         | Chỉ định điều trị                     | Ngày cho phép           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| <b>Intron A</b> (rIFN - $\alpha$ - 2b được sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                               | Schering Plough                          | Ung thư, mụn cóc sinh dục, viêm gan   | 1986 (USA)<br>2000 (EU) |
| <b>PegIntron A</b> (PEGylated rIFN - $\alpha$ - 2b được sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                  | Schering Plough                          | Viêm gan C mạn                        | 2000 (EU)<br>2001 (USA) |
| <b>Viraferon</b> (rIFN - $\alpha$ - 2b, được sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                             | Schering Plough                          | Viêm gan C và B mạn                   | 2000 (EU)               |
| <b>Viraferon Peg</b> (PEGylated rIFN - $\alpha$ - 2b, được sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                               | Schering Plough                          | Viêm gan C mạn                        | 2000 (EU)               |
| <b>Roferon A</b> (rhIFN - $\alpha$ - 2a, được sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                            | Hoffman - La Roche                       | Bạch cầu có tua                       | 1986 (USA)              |
| <b>Actimmune</b> (rhIFN - $\gamma$ - 1b, được sản xuất bởi <i>E.Coli</i> )                                                            | Gentech                                  | Bệnh U hạt mạn                        | 1990 (USA)              |
| <b>Betaferon</b> (rIFN - $\beta$ - 1b, khác với protein người ở vị trí cystein 17 thay bằng serin, được sản xuất bởi <i>E.coli</i> ). | Schering AG                              | Đa xơ hóa                             | 1995 (EU)               |
| <b>Betaseron</b> (rIFN - $\beta$ - 1b, khác với protein người ở vị trí cystein 17 thay bằng Serin, được sản xuất bởi <i>E.Coli</i> .) | Berlex Laboratories và Chison            | Đa xơ hóa tái phát                    | 1993 (USA)              |
| <b>Avonex</b> (rhIFN - $\beta$ - 1a sản xuất trong tế bào CHO)                                                                        | Biogen                                   | Đa xơ hóa tái phát                    | 1997 (EU)<br>1996 (USA) |
| <b>Infergen</b> (rhIFN - $\alpha$ , interferon typ 1 được sản xuất bởi <i>E.Coli</i> )                                                | Amgen (USA)<br>Yamanouchi<br>Europe (EU) | Viêm gan C mạn tính                   | 1997 (USA)<br>1999 (EU) |
| <b>Rebif</b> (rhIFN - $\beta$ - 1a, sản xuất trong tế bào CHO)                                                                        | Ares - Seron                             | Đa xơ hóa tái phát                    | 1998 (EU)<br>2002 (USA) |
| <b>Robetron</b> (kết hợp ribavirin và rhIFN - $\alpha$ - 2b sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                              | Schering Plough                          | Viêm gan C mạn                        | 1999 (USA)              |
| <b>Alfatronol</b> (rhIFN - $\alpha$ - 2b, sản xuất bởi <i>E.Coli</i> )                                                                | Schering Plough                          | Viêm gan B, C và các thể ung thư khác | 2000 (EU)               |
| <b>Virtron</b> (rhIFN - $\alpha$ - 2b sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                                    | Schering Plough                          | Viêm gan B và C                       | 2000 (EU)               |
| <b>Pegasys</b> (PE Ginterferon $\alpha$ - 2a sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                             | Hoffman - La Roche                       | Viêm gan C                            | 2002 (EU, USA)          |

**Bảng 5. (tiếp)**

|                                                                                                                                                             |                  |                                  |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------------|------------|
| <b>Vibragen</b> Omega (rFeline interferon $\omega$ )                                                                                                        | Virbac           | Dùng cho thú y các bệnh do virus | 2001 (EU)  |
| <b>Proleukin</b> (rIL - 2, khác với phân tử ở người ở vị trí điểm rút N - alanin và ở vị trí 125 cystein được thay bằng serin, sản xuất bởi <i>E.coli</i> ) | Chiron           | Ung thư thận                     | 1992 (USA) |
| <b>Neumega</b> (rIL-1 $\alpha$ , sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                                                               | Gentic Institute | Ngăn cản đóng vón tiểu cầu       | 1997 (USA) |
| <b>Kineret</b> (anakinra; rIL - 1 receptor đối kháng, sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                                                          | Amgen            | Viêm khớp cấp                    | 2001 (USA) |

**Bảng 6. Các vaccin tái tổ hợp**

| Tên sản phẩm                                                                                                                                                               | Công ty sản xuất    | Chỉ định điều trị                                                                         | Ngày cho phép |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Recombivax</b> (rHBsAg sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )                                                                                                               | Merk                | Ngừa viêm gan B                                                                           | 1986 (USA)    |
| <b>Comvax</b> vaccin phối hợp, có chứa rHBsAg một thành phần sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )                                                                            | Merk                | Dùng cho trẻ em ngừa <i>H.influenzae</i> typ B và viêm gan B                              | 1996 (USA)    |
| <b>Engerix B</b> (rHBsAg, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )                                                                                                               | Smith Kline Beecham | Ngừa viêm gan B                                                                           | 1998 (USA)    |
| <b>Tritanrix - HB</b> (vaccin phối hợp có chứa rHBsAg đơn thành phần, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )                                                                   | Smith Kline Beecham | Ngừa viêm gan B, bạch hầu, uốn ván, ho gà                                                 | 1996 (EU)     |
| <b>Lymerix</b> (rOspA, một chất lipoprotein phát hiện thấy trên bề mặt của <i>Borrelia burgdorferi</i> thủ phạm chính gây bệnh bạch cầu, được sản xuất bởi <i>E.coli</i> ) | Smith Kline Beecham | Vaccin phòng ngừa bệnh bạch cầu                                                           | 1998 (USA)    |
| <b>Infanrix - Hep B</b> (vaccin phối hợp có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> như một thành phần)                                                              | Smith Kline beecham | Tạo miễn dịch chống lại bạch hầu, uốn ván, ho gà và viêm gan B                            | 1997 (EU)     |
| <b>Infanrix hexa</b> (vaccin kết hợp có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> như một thành phần)                                                                  | Smith Kline Beecham | Tạo miễn dịch phòng bạch hầu, uốn ván, ho gà, polio, <i>H. influenzae</i> b và viêm gan B | 2000 (EU)     |
| <b>Infanrix - Penta</b> (vaccin phối hợp, có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> như một thành phần)                                                             | Smith Kline Beecham | như trên                                                                                  | 2000 (EU)     |
| <b>Ambirix</b> (vaccin phối hợp có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> như một thành phần)                                                                       | Glaxo Smith Kline   | Tạo miễn dịch phòng viêm gan A và B                                                       | 2002 (EU)     |

**Bảng 6. (tiếp)**

|                                                                                                                                                            |                                                     |                                                                                      |                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>Twinrix</b> (các dạng cho người lớn và trẻ em. Vaccin phối hợp có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S. cerevisiae</i> như một thành phần)                    | Smith Kline Beecham (EU)<br>Glaxo Smith Kline (USA) | Tạo miễn dịch phòng viêm gan A và B                                                  | 1996, EU, cho người lớn<br>1997, EU, cho trẻ em<br>2001 (USA) |
| <b>Primavax</b> (vaccin phối hợp có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S. cerevisiae</i> như một thành phần)                                                     | Pasteur Mérieux MSD                                 | Tạo miễn dịch phòng bạch hầu, uốn ván và viêm gan B                                  | 1998 (EU)                                                     |
| <b>Procomvax</b> (vaccin phối hợp có chứa rHBsAg như một thành phần)                                                                                       | Pasteur Mérieux MSD                                 | Tạo miễn dịch phòng H.influenzae type B và viêm gan B                                | 1999 (EU)                                                     |
| <b>Hexavax</b> (vaccin phối hợp có chứa rHBsAg, sản xuất bởi <i>S. cerevisiae</i> như một thành phần)                                                      | Aventis Pasteur                                     | Tạo miễn dịch phòng bạch hầu, uốn ván, ho gà, viêm gan B polio và H.influenzae typ B | 2000 (EU)                                                     |
| <b>Triacelluvax</b> (vaccin phối hợp có chứa r (cải tiến) tocin ho gà)                                                                                     | Chiron SpA                                          | Miễn dịch chống lại bạch hầu, uốn ván, ho gà                                         | 1999 (EU)                                                     |
| <b>Hepacare</b> (rS, pre - S và pre - S <sub>2</sub> kháng nguyên bề mặt viêm gan B, được sản xuất bởi dòng tế bào murine)                                 | Medeva Pharma                                       | Tạo miễn dịch phòng viêm gan B                                                       | 2000 (EU)                                                     |
| <b>HBVAXPRO</b> (rHBsAg sản xuất bởi <i>S. cerevisiae</i> )                                                                                                | Aventis Pharma                                      | Tạo miễn dịch phòng viêm gan B em                                                    | 2001 (EU)                                                     |
| <b>Porcilis Porcoli</b> (vaccin phối hợp có chứa chất bám dính r <i>E. coli</i> )                                                                          | Intervet                                            | Tạo miễn dịch phòng bệnh cho lợn                                                     | 1996 (EU)                                                     |
| <b>Fevaxyn Pentofel</b> (vaccin phối hợp, có chứa kháng nguyên virus gây bệnh bạch cầu mèo tái tổ hợp như một thành phần)                                  | Fort Dodge Lab                                      | Phòng các bệnh cho mèo                                                               | 1997 (EU)                                                     |
| <b>Porcilis AR-T DF</b> (vaccin phối hợp có chứa toxsin, biến đổi từ <i>Pasteurella multocida</i> đã tách dòng vào <i>E. coli</i> )                        | Intervet                                            | Phòng bệnh viêm mũi cho lợn con (dùng uống)                                          | 2000 (EU)                                                     |
| <b>Porcilis pesti</b> (vaccin r có chứa kháng nguyên virus E <sub>2</sub> gây sốt ở lợn, được chế tạo trong tế bào côn trùng có chứa <i>baculovirus</i> )  | Intervet                                            | Dùng trong thú y tạo miễn dịch chống lại các bệnh gây sốt bởi virus                  | 2000 (EU)                                                     |
| <b>Bayovac CSF E<sub>2</sub></b> (vaccin r có chứa kháng nguyên virus E <sub>2</sub> gây sốt ở lợn, được sản xuất bởi hệ thống vector <i>baculovirus</i> ) | Bayer                                               | Dùng trong thú y tạo miễn dịch chống lại các bệnh gây sốt bởi virus                  | 2001 (EU)                                                     |

**Bảng 7. Các sản phẩm dựa trên kháng thể đơn dòng**

| Tên sản phẩm                                                                                                                     | Hãng sản xuất                 | Chỉ định điều trị                                       | Thời gian được cấp phép |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>CEA-scan</b> (đoạn Mab chuột (Fab), tác dụng trực tiếp kháng nguyên gây ung thư bào thai người (CEA))                         | Immunomedics                  | Dùng phát hiện sự tái phát ung thư có di căn            | 1996 (USA, EU)          |
| <b>Myoscint</b> (đoạn Mab chuột tác dụng trực tiếp lên myosin cơ tim người)                                                      | Centocor                      | Nhồi máu cơ tim                                         | 1996 (USA)              |
| <b>Oncoscint</b> (đoạn Mab chuột chống lại TAG-72 một glycoprotein có phân tử lượng cao)                                         | Cytogen                       | Dùng phát hiện các thể ung thư khác nhau                | 1992 (USA)              |
| <b>Orthoclone OKT3</b><br>(Muromomab CD <sub>3</sub> , Mab chuột chống lại kháng nguyên bề mặt CD <sub>3</sub> của bạch cầu T)   | Ortho Biotech                 | Chống thải loại trong ghép thận                         | 1986 (USA)              |
| <b>Prosta Scint</b> (Mab chuột tác dụng trực tiếp trên kháng nguyên bề mặt gây ung thư PSMA)                                     | Cytogen                       | Dùng phát hiện ung thư tuyến tiền liệt                  | 1996 (USA)              |
| <b>ReoPro</b> (Abciximab, Fab dẫn xuất của Mab tác dụng chống lại receptor bề mặt tiểu cầu GPII <sub>b</sub> /III <sub>a</sub> ) | Centocor                      | Phòng đông vón tiểu cầu gây tắc mạch                    | 1994 (USA)              |
| <b>Rituxan</b> (Rituximab chimaeric Mab tác dụng trực tiếp trên kháng nguyên CD <sub>20</sub> tìm thấy trên bề mặt của lympho B) | Genentech/IDEC Pharmaceutical | Bạch cầu không phải Hodgkin                             | 1997 (USA)              |
| <b>Verluma</b> (Nofetumomab đoạn Mab chuột (Fab) tác dụng trực tiếp lên kháng nguyên trợ giúp ung thư)                           | Boehringer Ingelheim/NeoRx    | Phát hiện tế bào ung thư phổi                           | 1996 (USA)              |
| <b>Zenapax</b> (Daclizumab, Mab người tác dụng trực tiếp lên chuỗi $\alpha$ của receptor IL-2)                                   | Hoffman - La Roche            | Chống đào thải trong ghép thận                          | 1997 (USA)<br>1999 (EU) |
| <b>Simulect</b> (Baciliximab, Mab tác dụng trực tiếp lên chuỗi $\alpha$ của receptor IL-2)                                       | Novartis                      | Dự phòng và chống đào thải trong ghép thận              | 1998 (EU, USA)          |
| <b>Remicade</b> (Infliximab, chimaeric Mab đối kháng trực tiếp TNF- $\alpha$ )                                                   | Centocor                      | Dùng điều trị bệnh Crohn's                              | 1998 (USA)<br>1999 (EU) |
| <b>Synagis</b> (Palivizumab, humanized Mab tác dụng trực tiếp lên epitope trên bề mặt của virus gây viêm đường hô hấp)           | Med Immune (USA), Abbott (EU) | Phòng các triệu chứng viêm đường hô hấp trẻ em do virus | 1998 (USA)<br>1999 (EU) |

**Bảng 7. (tiếp)**

|                                                                                                                                                                                                |                                                                                                 |                                                             |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Herceptin</b> (Trastuzumab, Humanized, kháng thể tác dụng trực tiếp HER <sub>2</sub> , receptor 2 Factor phát triển da của người)                                                           | Gentech (USA),<br>Roche<br>Registration (EU)                                                    | Điều trị di căn<br>ung thư vú                               | 1998 (USA)<br>2000 (EU) |
| <b>Indimacis 125</b> (Igovo mab, murine Mab fragment (Fab <sub>2</sub> ) tác dụng trực tiếp kháng nguyên CA 125 trợ giúp ung thư)                                                              | CIS Bio                                                                                         | Dùng chẩn đoán<br>ung thư buồng<br>trứng                    | 1996 (EU)               |
| <b>Tecnemab KI</b> (murine Mab fragments (Fab/Fab <sub>2</sub> mix) tác dụng trực tiếp HMW-MAA, là kháng nguyên trợ giúp u hắc tố có trọng lượng phân tử cao)                                  | Sorin                                                                                           | Dùng chẩn đoán<br>u hắc tố da                               | 1996 (EU)               |
| <b>Leuco Scan</b> (Sulesomab, murine Mab fragment (Fab) tác dụng trực tiếp NCA 90, một kháng nguyên không đặc hiệu trên bề mặt bạch cầu hạt)                                                   | Immunomedics                                                                                    | Dùng chẩn đoán<br>nhiễm trùng,<br>viêm xương và<br>viêm tủy | 1997 (EU)               |
| <b>Humasfect</b> (Votumumab, human Mab tác dụng trực tiếp cytokerafin Tamour - chất trợ giúp kháng nguyên)                                                                                     | Organon Teknika                                                                                 | Phát hiện ung thư<br>đại tràng                              | 1998 (EU)               |
| <b>Mabthera</b> (Rituximab, chimaeric Mab tác dụng trực tiếp CD <sub>20</sub> kháng nguyên bề mặt của tế bào lympho B) (xem Ritusan)                                                           | Hoffmann - La<br>Roche                                                                          | Bệnh bạch cầu<br>không phải<br>Hodgkin                      | 1998 (EU)               |
| <b>Mab Campath</b> (Alemtuzumab; một kháng thể đơn dòng người tác dụng trực tiếp CD <sub>52</sub> kháng nguyên bề mặt của Lympho B)                                                            | Millennium & ILEX<br>(EU) Berlex, ILEX<br>Oncology và<br>Millennium<br>Pharmaceuticals<br>(USA) | Bệnh bạch cầu<br>mạn                                        | 2001 (EU)<br>2001 (USA) |
| <b>Mylotarg</b> (Gemtuzumab Zogamicin; là kháng thể người - toxic antibiotic tiếp hợp với đích để chống lại kháng nguyên CD <sub>33</sub> được phát hiện trên các tế bào mầm ung thư bạch cầu) | Wyeth Ayerst                                                                                    | Ung thư tủy cấp                                             | 2000 (USA)              |
| <b>Zevalin</b> (Ibritumomab Tiuxetan, kháng thể đơn dòng chuột, được sản xuất bằng dòng tế bào CHO, đích tác dụng là kháng nguyên CD <sub>20</sub> )                                           | IDEC<br>Pharmaceuticals                                                                         | Bệnh bạch cầu<br>không phải<br>Hodgkin                      | 2002 (USA)              |

**Bảng 8. Các sản phẩm khác**

| Tên sản phẩm                                                                                                      | Hãng sản xuất                                                  | Chỉ định điều trị                                   | Thời gian được cấp phép |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------|
| <b>Beromun</b> (rhTNF- $\alpha$ ) sản xuất bởi <i>E.coli</i>                                                      | Boehringer-Ingelheim                                           | Dùng trợ giúp trong phẫu thuật cắt bỏ khối u        | 1999 (EU)               |
| <b>Revasc</b> (Anticoagulant, hirudin) sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i>                                           | Ciba Novartis<br>Europharm                                     | Ngăn cản viêm tắc tĩnh mạch                         | 1997 (EU)               |
| <b>Refludan</b> (Anticoagulant, hirudin) được sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i>                                    | Hoechst Marion<br>Roussel (in USA)<br>Behringwerke AG (EU)     | Dùng chống kết vón gây nghẽn mạch trợ giúp heparin  | 1998 (USA)<br>1997 (EU) |
| <b>Cerezyme</b> (r $\beta$ -Glucocerebrosidase, sản xuất bởi <i>E.coli</i> )                                      | Genzyme                                                        | Điều trị bệnh Gaucher                               | 1994 (USA)<br>1997 (EU) |
| <b>Pulmozyme</b> (dornase- $\alpha$ , rDNase, được sản xuất bằng dòng tế bào CHO)                                 | Genntech                                                       | Làm tiêu fibrin gây nghẽn mạch                      | 1993 (USA)              |
| <b>Fabrazyme</b> (rh $\alpha$ -Galactosidase, được sản xuất bằng dòng tế bào CHO)                                 | Genzyme                                                        | Bệnh Fabry (một loại bệnh di truyền)                | 2001 (EU)               |
| <b>Replagal</b> (rh $\alpha$ -Galactosidase được sản xuất trong dòng tế bào người liên tục)                       | TKT Europe                                                     | Bệnh Fabry (bệnh thiếu hụt $\alpha$ -galactosidase) | 2001 (EU)               |
| <b>Fasturtec</b> (Elitex USA)<br>(rasburicase; r Urat oxidase, được sản xuất bởi <i>S. cerevisiae</i> )           | Sanofi - Synthelabo                                            | Bệnh tăng cao acid uric                             | 2001 (EU)<br>2002 (USA) |
| <b>Regranex</b> (rh PDGF, được sản xuất bởi <i>S.cerevisiae</i> )                                                 | Ortho - Mc Neil<br>Pharmaceuticals (USA), Janssen - Cilag (EU) | Bệnh tiểu đường gây loét dây thần kinh              | 1997 (USA)<br>1999 (EU) |
| <b>Vitravene</b> (Fomivirsin, là một antisense oligonucleotid)                                                    | ISIS Pharmaceuticals                                           | Điều trị cytomegalovirus (CMV) cho bệnh nhân AIDS   | 1998 (USA)              |
| <b>Ontak</b> (rIL-2-toxin bạch hầu protein dung hợp, được biểu đạt trên bề mặt IL-2 receptor với các tế bào đích) | Seragen inc/Ligand Pharmaceuticals                             | Bạch cầu lympho T                                   | 1999 (USA)              |

**Bảng 8. (tiếp)**

|                                                                                                           |                                    |                                    |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| <b>Enbrel</b> (rTNFR-IgG fragment protein dung hợp, được sản xuất bởi dòng tế bào CHO)                    | Immunex (USA)<br>Wyeth Europa (EU) | Viêm khớp                          | 1998 (USA)<br>2000 (EU) |
| <b>Osteogenic protein 1</b> (rh Osteogenic protein-1-BMP-7, được sản xuất bởi dòng tế bào CHO)            | Howmedica (EU)<br>Stryker (USA)    | Điều trị gãy xương chày không liền | 2001 (EU)<br>2001 (USA) |
| <b>Inductos</b> (Dibotermis - $\alpha$ ; rBone morphogenetic protein-2 được sản xuất bởi dòng tế bào CHO) | Gentics Institute BV               | Điều trị gãy xương chày            | 2002 (EU)               |
| <b>Xigris</b> (Drotrecogin - $\alpha$ ; rh activated protein C, được sản xuất bằng dòng tế bào người)     | Eli Lilly                          | Nhiễm trùng cấp                    | 2001 (USA)<br>2002 (EU) |

## PHỤ LỤC 2

### MỘT SỐ ĐỊA CHỈ INTERNET LIÊN QUAN TỚI CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ SẢN XUẤT CÁC DƯỢC PHẨM SINH HỌC

#### **Some biotechnology / pharmaceutical/medical organizations**

##### ***Bio home page***

Site address: <http://www.bio.org>

Home page of the biotechnology industry organization. Also contains many excellent links.

##### ***Pharmaceutical researches and manufactures of America***

Site address: <http://phrma.org>

Excellent site, providing information on a wide range of pharmaceutical issues, including reports such as the annual 'Biotechnology Medicines in Development' series.

##### ***Drug Information Association (DIA)***

Site address: <http://www.diahome.org>

Home page of the DIA, contains information on various facets of the pharmaceutical industry, including pharmaceutical biotechnology.

##### ***European Association of Pharma Biotechnology (EAPB)***

Site address: <http://www.eapb.org>

Home page of the EAPB, containing selected pharmaceutical biotechnology information.

##### ***European Federation of Biotechnology (EFB)***

Site address: <http://www.efbweb.org>

Home page of the EFB, contains information on various facets of biotechnology, including pharmaceutical biotechnology.

##### ***World Health Organization (WHO)***

Site address: <http://www.who.int/en/>

Excellent although general site. Contains information regarding e.g. global disease incidence, vaccination/immunization, etc.

## **Regulatory and associated sites**

### ***Food and Drug Administration (FDA) home page***

Site address: <http://www.fda.gov>

FDA home page. A key reference for regulatory issues (United States) for (bio)pharmaceutical development and production. Also contains information on approved products.

### ***European Medicines Evaluation Agency (EMEA) home page***

Site address: <http://www.emea.eu.int>

EMEA home page. A key reference for regulatory issues (European) for biopharmaceutical development and production. Also contains information on approved products.

### ***International Conference on Harmonization (ICH)***

Site address: <http://www.ich.org>

ICH home page. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), a unique project that brings together the regulatory authorities of Europe, Japan and experts from the pharmaceutical industry.

### ***Pharmacos (European Commission)***

Site address: <http://pharmacos.eudra.org>

Pharmaceutical home page of the EC. Contains documents relating to various aspects of the European pharmaceutical industry, including the text of The Rules Governing Medicinal Products in the EU and a register of all approved pharmaceutical products.

### ***US Patent Office***

Site address: <http://www.uspto.gov>

This site from the US government contains a wealth of information on patenting of materials and has a searchable database of patents.

### ***European Directorate for the Quality of Medicines***

Site address: <http://www.pheur.org>

Houses information relating to various quality aspects of pharmaceuticals, including details of the European Pharmacopoeia.

### ***United States Pharmacopoeia (USP)***

Site address: <http://www.usp.org>

Houses information detailing the USP.

## **Some biopharmaceutical companies**

### ***Amgen***

Site address: <http://www.amgen.com>

### ***Genntech***

Site address: <http://www.genntech.com>

### ***Biogen***

Site address: <http://www.biogen.com>

### ***Gezyme***

Site address: <http://www.gezyme.com>

### ***Wyeth***

Site address: <http://www.wyeth.com>

### ***Eli Lilly***

Site address: <http://www.lilly.com>

### ***Novo***

Site address: <http://www.novodisk.com>

### ***Schering Plough***

Site address: <http://www.sch-plough.com/>

## **Proteins and gens**

### ***The genome database***

Site address: <http://www.gdb.org>

A focal database for human gen mapping that attempts to integrate physical and genetic maps.

### ***The Institute for Genomics Research***

Site address: <http://www.tigr.org/tdb/>

Excellent source of information regarding various completed/ongoing genome sequencing projects.

### ***Databases at the European Bioinformatics Institute (EBI)***

Site address: <http://www.ebi.ac.uk/dbases/topdata/html>

Databases at the EBI for nucleotide/protein searches (data largely overlap that at National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### ***Protein Databank (PDB)***

Site address: <http://www.rcsb.org/pdb>

Searchable repository of 3-D protein structure.

### ***EsPASy***

Site address: <http://www.espasy.org/>

Proteomics server of the Swiss institute of bioinformatics. Dedicated to analysis of protein sequences and structure, as well as 2-D SDS-PAGE.

### ***Predict Protein***

Site address: <http://www.embl-heidelberg.de/services/sander/predictprotein/> Submit a protein sequence and you will receive secondary structure prediction via e-mail.

### ***Principles of Protein Structure***

Site address: <http://www.cryst.bbk.ac.uk/pps2>

Provides information relating to protein structure, including some basic course material.

### ***3D searching with receptor-based queries***

Site address: <http://www.ch.ic.ac.uk:80/ectoc/papers/guner/>

This is an interesting site presenting information on the ability to search for molecules with similar chemical structures.

### ***The Immunology Link***

Site address: <http://www.immunologylink.com>

Site provides links to additional immunology-related sites.

### ***American Society for Gene Therapy***

Site address: <http://www.asgt.org>

### ***European Society for Gene Therapy***

Site address: <http://www.esgt.org>

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Hữu Ảnh; *Vi sinh vật học công nghiệp*; NXB Khoa học kỹ thuật; Hà Nội; 1999.
2. Bộ môn Công nghiệp Dược - *Kỹ thuật sản xuất dược phẩm, tập I*, Trường đại học Dược Hà Nội, 2001.
3. Lê Đình Lương; *Nguyên lý kỹ thuật di truyền*; NXB Khoa học kỹ thuật; Hà Nội; 2001.
4. Phạm Văn Ty; *Miễn dịch học*; NXB đại học quốc gia; Hà Nội; 2001.
5. Jonh E. Smith; *Biotechnology*, Third edition; Cambridge University Press; 1996.
6. Andino, R. et al; Engineering polyvirus as a vaccin vector for the epression of diverse antigens; *Science* **265**, 1448-1457; 1994.
7. Mire-Sluis, A., *Cytokines* . Academic Press, London; 1998
8. Junl, A. Growth hormone in adults; Cambridge University Press, Cambridge; 2000.
9. Vajo,Z. et al. , Recombinant DNA technology in the treatment of diabetes; Insulin analogues. *Endocr. Rev.* 22(5), 706-717, 2001.
10. Gary Walsh; *Biopharmaceutics*; Biochemistry and Biotechnology University of Limerick, Ireland, Secon Edition Wiley, 2003.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

# CƠ SỞ CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ SẢN XUẤT DƯỢC PHẨM

*Chịu trách nhiệm xuất bản*  
**HOÀNG TRỌNG QUANG**

|                          |                    |
|--------------------------|--------------------|
| <i>Biên tập:</i>         | DS. LÊ MINH NGUYỆT |
| <i>Sửa bản in:</i>       | LÊ MINH NGUYỆT     |
| <i>Trình bày bìa:</i>    | CHU HÙNG           |
| <i>Kỹ thuật vi tính:</i> | BÙI THƯƠNG         |

---

In 1.000 cuốn, khổ 19x27cm tại Xưởng in Nhà xuất bản Y học.

Giấy phép xuất bản số: 101-97/XB-QLXB ngày 6/2/2004.

In xong và nộp lưu chiểu quý IV năm 2004.

**NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC**

Địa chỉ: 352 Đội Cấn - Ba Đình - Hà Nội

Điện thoại: 04.7625934 - 7627819 - Fax. 84.4.7625923

E-mail: [xuatbanyhoc@netnam.vn](mailto:xuatbanyhoc@netnam.vn)



MS 61 - 619.3 97 - 2004  
YH - 2004

**GIÁ: 38.500Đ**