

BỘ Y TẾ

KỸ THUẬT SẢN XUẤT DƯỢC PHẨM

TẬP II

KỸ THUẬT SẢN XUẤT THUỐC BẰNG PHƯƠNG PHÁP SINH TỔNG HỢP

SÁCH ĐÀO TẠO DƯỢC SỸ ĐẠI HỌC

MÃ SỐ: Đ20.Z.09

Chủ biên: PGS.TS. Từ Minh Koóng

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

HÀ NỘI - 2007

CHỈ ĐẠO BIÊN SOẠN

Vụ Khoa học & Đào tạo, Bộ Y tế

CHỦ BIÊN:

PGS.TS. Từ Minh Kóng

CÁC TÁC GIẢ BIÊN SOẠN:

PGS.TS. Từ Minh Kóng

Đàm Thanh Xuân

HIỆU ĐÍNH:

Đàm Thanh Xuân

© Bản quyền thuộc Bộ Y tế (Vụ Khoa học & Đào tạo)

LỜI GIỚI THIỆU

Thực hiện một số điều của Luật Giáo dục, Bộ Giáo dục và Đào tạo và Bộ Y tế đã ban hành chương trình khung đào tạo đối tượng là Dược sỹ Đại học. Bộ Y tế tổ chức biên soạn tài liệu dạy – học các môn cơ sở, chuyên môn và cơ bản chuyên ngành theo chương trình trên nhằm từng bước xây dựng bộ sách chuẩn về chuyên môn để đảm bảo chất lượng đào tạo nhân lực y tế.

Sách “*Kỹ thuật sản xuất dược phẩm, tập 2*” được biên soạn dựa trên chương trình giáo dục của Trường Đại học Dược Hà Nội trên cơ sở chương trình khung đã được phê duyệt. Sách được các nhà giáo giàu kinh nghiệm và tâm huyết với công tác đào tạo biên soạn theo phương châm: Kiến thức cơ bản, hệ thống; nội dung chính xác, khoa học; cập nhật các tiến bộ khoa học, kỹ thuật hiện đại và thực tiễn Việt Nam.

Sách “*Kỹ thuật sản xuất dược phẩm, tập 2*” đã được Hội đồng chuyên môn thẩm định sách và tài liệu dạy – học chuyên ngành Dược sỹ Đại học của Bộ Y tế thẩm định vào năm 2006. Bộ Y tế ban hành làm tài liệu dạy – học đạt chuẩn chuyên môn của ngành y tế trong giai đoạn 2006-2010. Trong quá trình sử dụng, sách phải được chỉnh lý, bổ sung và cập nhật.

Bộ Y tế xin chân thành cảm ơn các cán bộ giảng dạy ở Bộ môn Công nghiệp Dược của Trường Đại học Dược Hà Nội đã giành nhiều công sức hoàn thành cuốn sách này, cảm ơn GS. Lê Quang Toàn và PGS. TS. Hoàng Minh Châu đã đọc, phản biện để cuốn sách được hoàn chỉnh, kịp thời phục vụ cho công tác đào tạo nhân lực y tế.

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

VỤ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO
BỘ Y TẾ

LỜI NÓI ĐẦU

Cuốn giáo trình "*Kỹ thuật sản xuất dược phẩm*" được biên soạn để giảng cho sinh viên Đại học Dược vào học kỳ 8 đã được xuất bản lần thứ nhất năm 2001, gồm 2 tập. Theo chương trình cũ, thời lượng giảng dạy môn học này là quá ít so với những kiến thức chung của Dược sỹ Đại học. Đặc biệt trong tình hình hiện nay, sau khi có nghị quyết của Bộ Chính trị (NQ-46/BCT-2005) về phát triển nền Công nghiệp Dược của đất nước trong tình hình mới, phải ưu tiên phát triển công nghiệp sản xuất nguyên liệu làm thuốc, trong đó chú trọng Công nghiệp Hóa dược và Công nghệ Sinh học. Ban chương trình nhà trường quyết định tăng thêm một đơn vị học trình cho học phần "Sản xuất thuốc bằng Công nghệ sinh học".

Bộ môn đã biên soạn lại để xuất bản cuốn giáo trình mới gồm 3 tập. Cả ba tập đều có tên chung của giáo trình: "**KỸ THUẬT SẢN XUẤT DƯỢC PHẨM**".

Giáo trình được biên soạn theo hai nội dung:

1. Kỹ thuật sản xuất các nguyên liệu làm thuốc.
2. Kỹ thuật sản xuất các dạng thuốc thành phẩm.

Trong đó:

Nội dung thứ nhất gồm 2 tập là:

- * **Tập 1.** Kỹ thuật sản xuất thuốc bằng phương pháp tổng hợp hóa dược và chiết xuất dược liệu.
- * **Tập 2.** Kỹ thuật sản xuất thuốc bằng phương pháp sinh tổng hợp.

Nội dung thứ hai gồm 1 tập là:

- * **Tập 3.** Kỹ thuật sản xuất các dạng thuốc.

So với lần xuất bản trước, các tác giả biên soạn đã cố gắng chắt lọc những kiến thức chủ yếu nhất để cung cấp cho người học hiểu được ngành khoa học vừa hấp dẫn vừa quan trọng này. Tuy nhiên, với nội dung phong phú, đa dạng và thời lượng hạn chế nên không thể đi sâu hơn được. Vì vậy cuốn giáo trình không tránh khỏi những thiếu sót. Các tác giả mong nhận được sự góp ý của độc giả để chỉnh sửa cho lần xuất bản sau được hoàn chỉnh hơn. Xin chân thành cảm ơn.

Bộ môn Công nghiệp Dược
Trường Đại học Dược Hà Nội

MỤC LỤC

PHẦN I. TỔNG QUAN VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

CHƯƠNG 1. GIỚI THIỆU VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

- 1.1. Công nghệ sinh học là gì?
- 1.2. Công nghệ sinh học - một sự theo đuổi đa ngành
- 1.3. Công nghệ sinh học - hạt nhân trung tâm ba thành phần
- 1.4. An toàn sản phẩm
- 1.5. Nhận thức của cộng đồng về công nghệ sinh học
- 1.6. Công nghệ sinh học và các nước đang phát triển

Chương 2. Nguyên liệu cho công nghệ sinh học

- 2.1. Chiến lược sinh khối
- 2.2. Nguyên liệu thô thiên nhiên
- 2.3. Tính sẵn có của sản phẩm phụ
- 2.4. Nguyên liệu hoá học và hoá dầu
- 2.5. Nguyên liệu thô và tương lai của công nghệ sinh học

Chương 3. Kỹ thuật lên men

- 3.1. Giới thiệu tổng quát
- 3.2. Các giai đoạn phát triển của vi sinh vật
- 3.3. Thiết bị lên men vi sinh vật
- 3.4. Cung cấp không khí vô trùng cho nhà máy lên men vi sinh vật
- 3.5. Khử trùng môi trường trong công nghệ lên men
- 3.6. Lọc và thiết bị lọc trong công nghiệp sản xuất kháng sinh
- 3.7. Trình tự quá trình lên men
- 3.8. Thiết kế môi trường cho quá trình lên men
- 3.9. Lên men trên cơ chất rắn
- 3.10. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật và thực vật
- 3.11. Quá trình tinh chế để thu sản phẩm

Chương 4. Kỹ thuật sản xuất enzym

4.1.	Đại cương	
4.2.	Các ứng dụng của enzym	
4.3.	Kỹ thuật di truyền trong công nghệ enzym	
4.4.	Kỹ thuật sản xuất enzym	
4.5.	Phương pháp bất động enzym (immobilised enzym)	
Chương 5. Sản xuất Protein đơn bào		
5.1.	Sự cần thiết sản xuất protein đơn bào	
5.2.	Sản xuất sinh khối nấm men	
5.3.	Sản xuất tảo đơn bào	
5.4.	Sản xuất nấm sợi	
5.5.	Sản xuất nấm ăn	64
Chương 6. Sản xuất các sản phẩm trao đổi chất bậc một dùng trong Y học		
6.1	Sản xuất các aminoacid	66
6.2.	Sản xuất acid glutamic	67
6.3.	Sản xuất Dextran	70
6.4.	Sinh tổng hợp Vitamin B12	73
6.4.1.	Đại cương	73
6.4.2.	Cấu trúc hoá học và tính chất	74
6.4.3.	Lên men sinh tổng hợp	75
6.4.4.	Quy trình sản xuất	76
6.4.5.	Quy trình chiết xuất	78
phần II. Công nghệ sản xuất kháng sinh		
Chương 7. Đại cương về kháng sinh		
7.1.	Định nghĩa kháng sinh	83
7.2.	Đơn vị kháng sinh	83
7.3.	Phân loại kháng sinh	83
7.4.	Các phương pháp phân lập vi sinh vật sinh kháng sinh	84
7.5.	Phương pháp gây đột biến vi sinh vật để nâng cao hiệu suất	87
7.6.	Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh phân lập được	89
7.7.	Nghiên cứu chiết xuất và tinh chế kháng sinh	89

7.8. Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn và độc tính	89
7.9. Nghiên cứu về dược lý và điều trị của kháng sinh	90
7.10. Tiêu chuẩn đối với một kháng sinh	90
7.11. Phương pháp định lượng kháng sinh	91
7.12. ứng dụng kháng sinh ngoài lĩnh vực y học	94
Chương 8. Sản xuất kháng sinh nhóm β -lactam	
8.1. Đại cương về các β -lactam	100
8.2. Sinh tổng hợp các kháng sinh Penicillin	100
8.3. Sản xuất 6-APA và các Penicillin bán tổng hợp	110
8.4. Sản xuất các Cephalosporin	116
8.5. Sản xuất 7-ACA; 7-ADCA và các kháng sinh bán tổng hợp nhóm cephalosporin	120
8.6. Sinh tổng hợp acid clavulanic	122
Chương 9. sản xuất kháng sinh nhóm Tetracyclin	
9.1. Đại cương	128
9.2. Công thức cấu tạo và tính chất	128
9.3. Sinh tổng hợp các Tetracyclin tự nhiên	130
9.4. Sinh tổng hợp Clotetracyclin	134
9.5. Sinh tổng hợp Tetracyclin	136
9.6. Sinh tổng hợp Oxytetracyclin	139
9.7. Các Tetracyclin bán tổng hợp	142
Chương 10. sản xuất kháng sinh nhóm aminoglycosid	
10.1. Đại cương chung về các aminoglycosid	146
10.2. Sinh tổng hợp Streptomycin	150
10.3. Sinh tổng hợp Gentamicin	157
Chương 11. sản xuất kháng sinh nhóm macrolid	
11.1. Tổng quan về các Macrolid	162
11.2. Sinh tổng hợp Erythromycin	165
chương 12. sản xuất kháng sinh chống ung thư	
12.1. Đại cương	168
12.2. Các phương hướng điều trị bệnh ung thư	168

12.3. Các kháng sinh chống ung thư nguồn gốc sinh học	170
12.4. Sinh tổng hợp Daunorubicin	172
chương 13. sản xuất kháng sinh có nguồn gốc từ vi khuẩn	
13.1. Sinh tổng hợp Polymyxin	175
13.2. Sinh tổng hợp Bacitracin	178

PHẦN I. TỔNG QUAN VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Chương 1

GIỚI THIỆU VỀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này, sinh viên phải trình bày được:

1. Tên các lĩnh vực khoa học có liên quan đến Công nghệ sinh học và phạm vi ứng dụng của Công nghệ sinh học trong các ngành đó.
2. Tầm quan trọng của Công nghệ sinh học trong xu thế phát triển chung của khoa học trong thế kỷ 21.

1. CÔNG NGHỆ SINH HỌC LÀ GÌ?

Ngày nay không ai còn nghi ngờ gì nữa về những thành tựu của công nghệ sinh học đem lại cho loài người. Chẳng thế mà trong hai thập kỉ cuối cùng của thế kỉ 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 công nghệ sinh học.

- “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”.
- “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 công nghệ sinh học không tạo ra sản phẩm gì nhưng 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 mẽ 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 nuôi cấy tế bào (cell culture technique); kỹ thuật nuôi cấy mô (tissue culture technique); kỹ thuật chuyển phôi (embryo transplantation) và kỹ thuật chuyển nhân tế bào (nucleus transplantation).

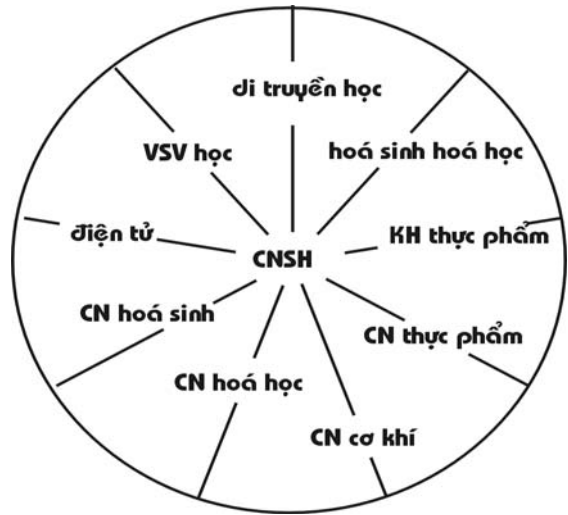
2. CÔNG NGHỆ SINH HỌC - MỘT SỰ THEO ĐUỔI ĐA NGÀNH

Công nghệ sinh học là sự ưu tiên của quá trình theo đuổi đa ngành. Trong những thập kỉ 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 có sự gặp gỡ các ý tưởng của sự hợp tác nhiều ngành 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). 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 học, 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.



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

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 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: phần cứng, phần 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, pho mát, dấm. Chỉ khi công nghệ lên men sản xuất Penicillin trên qui mô lớn thì 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 cũng 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 cái khác.
- Cần phải quản lý: các cơ quan chức năng, nhận thức của cộng đồng, các vấn đề về sức khoẻ 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.

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.

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.

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 khỏe 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 và các giống cây khác nhau, 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 Ủy ban tư vấn về khoa học và công nghệ Mỹ 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, 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 về Công nghệ sinh học nói chung còn thấp không có nghĩa là 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 nói lên và sẽ được bàn đến trong những chương sau.

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 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 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 năm 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.

TỰ LƯỢNG GIÁ

Chương 2

NGUYÊN LIỆU CHO CÔNG NGHỆ SINH HỌC

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. Tên các nguồn nguyên liệu chủ yếu của CNSH.
2. Ưu thế của CNSH so với các ngành khác trong việc tận dụng các sản phẩm phụ.

1. CHIẾN LƯỢC SINH KHỐI

Ước tính sản lượng hàng năm sinh khối thực vật tạo ra do quang hợp khoảng 120 tỉ tấn chất khô trên mặt đất và khoảng 5 tỉ 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 (% 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. 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.

Cần nhận thấy rằng nguồn nguyên liệu 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.

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	Sản lượng (tấn)	Trị giá (tỷ \$)	
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 cửa	200 triệu	60	
	Giấy	-	110	
Hoá chất	Dầu và glycerin	70	-	
	Dầu đậu tương	17	8	
	Dầu cọ	10	3	
	Dầu hướng 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	

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

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

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
Nông nghiệp	Rơm Bã mía, củ cải đường Lõi ngô Vỏ cà phê, côca, dừa Vỏ, lá trái cây Chất thải của chè Bánh ép từ các hạt để lấy dầu Chất thải từ bông Cám Thịt quả cà chua, cà phê, chuối, dứa, chanh, ô liu Chất thải của gia súc
Lâm nghiệp	Chất thải dung dịch thuỷ phân gỗ Dung dịch nước quả đã sulfat hoá Vỏ cây, mùn cưa, các cành cây Giấy và cellulose Sợi phíp
Công nghiệp	Mật đường Chất thải của nhà máy chưng cất rượu Chất lỏng giống như nước sau khi sữa chua đông lại Nước thải công nghiệp từ CN thực phẩm (ô liu, dầu cọ, cà chua, chà là, chanh, sắn) Nước thải (từ ngành sữa, đóng hộp, bánh kẹo, nướng bánh mì, đồ uống không cồn, mạch nha, nước ngâm ngô) Chất thải ngành thuỷ sản Sản phẩm phụ của ngành chế biến thịt Rác đô thị Nước cống Chất thải ở lò sát sinh.

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, acetone, protein đơn bào metan và các sản phẩm khác. Người ta tính toán rằng hàng năm có khoảng 3.3×10^{14} kg CO₂ 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.

3. TÍNH SẢN 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... 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. Người ta 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 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

Nâng cấp chất lượng chất thải thực phẩm để biến chúng thành sản phẩm thích hợp phục vụ việc sử dụng của con người.

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.

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.

Những mục đích chọn lọc khác như dùng trực tiếp làm nhiên liệu, vật liệu xây dựng ...

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 sulfat, 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.

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

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 và có giá trị thương mại, nhất là tinh bột. Tuy nhiên việc này 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 CO₂ 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.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên và đặc điểm các nguồn nguyên liệu chủ yếu của CNSH.
2. Các sản phẩm phụ dùng cho CNSH có những ưu nhược điểm gì?

Chương 3

KỸ THUẬT LÊN MEN

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. Trình bày được tên các phương pháp lên men, các quá trình cơ bản của công nghệ lên men.
2. Kể tên được các thiết bị cơ bản của công nghệ lên men.
3. Nêu được tầm quan trọng của kỹ thuật nuôi cấy tế bào động vật và thực vật.

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... Các quá trình đó được gọi là lên men (bảng 3.1).

Bảng 3.1. Các sản phẩm lên men phân theo lĩnh vực công nghiệp

Lĩnh vực công nghiệp		Hoạt chất
Hoá học	Hữu cơ (Số lượng lớn)	Ethanol, aceton, butanol
	Hữu cơ (Số lượng ít)	Acid hữu cơ (citric, itaconic), enzym Các chất dùng cho mỹ phẩm Các polymer (các polysaccharid)
Dược phẩm		Các chất kháng sinh, vitamin Các kit chẩn đoán (enzym, kháng thể đơn dòng) Các enzym ức chế, các steroid, các vaccin
Năng lượng		Ethanol (gasohol), methan (biogas)
Thực phẩm		Các sản phẩm từ sữa (phomat, sữa chua, ...) Đồ uống (các loại rượu, trà, cà phê), men làm nở bánh mì, các chất phụ gia cho thực phẩm (chất chống oxy hoá, chất màu, chất bảo quản) Các thực phẩm đặc biệt (đậu tương lên men, các loại nước sốt để trộn), các acid amin, vitamin. Các sản phẩm từ tinh bột Glucose và siro fructose nồng độ cao Các pectin, các protein biến đổi chức năng

Nông nghiệp	Protein đơn bào, các vaccin cho động vật Ủ thức ăn cho gia súc, ủ phân bón Vi sinh vật trừ sâu hại, côn trùng Rhizobium và các vi khuẩn cố định nitơ Lên men mô và tế bào để nhân giống cây trồng...
-------------	--

Chỉ khi công nghệ lên men chìm sản xuất penicillin 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, amino acid, 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 (penicillin, 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 ...).

Các quá trình lên men để sản xuất ra các sản phẩm nêu trên hiện nay 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. Lên men 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). Lên men tế bào động vật để chế tạo vaccin. Kỹ thuật lên men còn tạo ra các protein có hoạt tính như interferon, interleukin...

Một số sản phẩm do công nghệ sinh học tạo ra, bằng phương pháp hoá học không thể sản xuất được (bảng 3.2). 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/cm².

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...) để chúng tạo ra hoạt chất ta mong muốn.

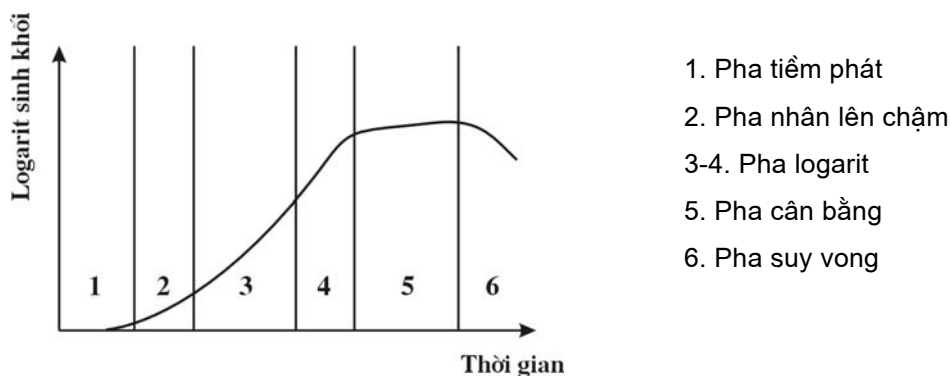
Bảng 3.2. Ưu nhược điểm của phương pháp sinh tổng hợp
(so với phương pháp hoá học)

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

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 3.1).

Hình 3.1. 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/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 penicillin ta thu được benzylpenicillin (penicillin G), còn nếu ta thêm vào môi trường chất acid phenoxyacetic ta lại thu được phenoxymethylpenicillin (penicillin 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.

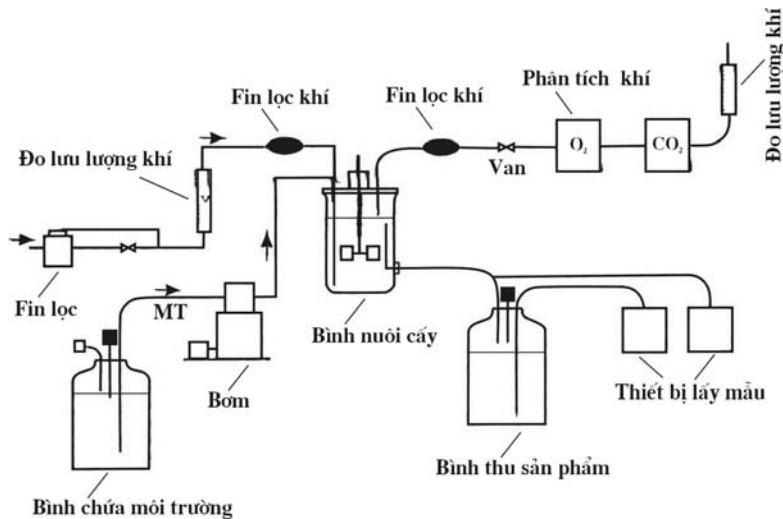
Trong công nghệ lên men, người ta cũng phân ra các kiểu lên men (nuôi cấy) sau: lên men chu kỳ (batch fermentation), lên men bán liên tục (semi – continuous fermentation) và lên men liên tục (continuous fermentation).

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 3.1) 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 (hydrat carbon) 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.



Hình 3.2. Sơ đồ đơn giản mô tả nguyên tắc lên men liên tục

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 3.2).

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

Bảng 3.3. Đặc điểm của các phương pháp lên men

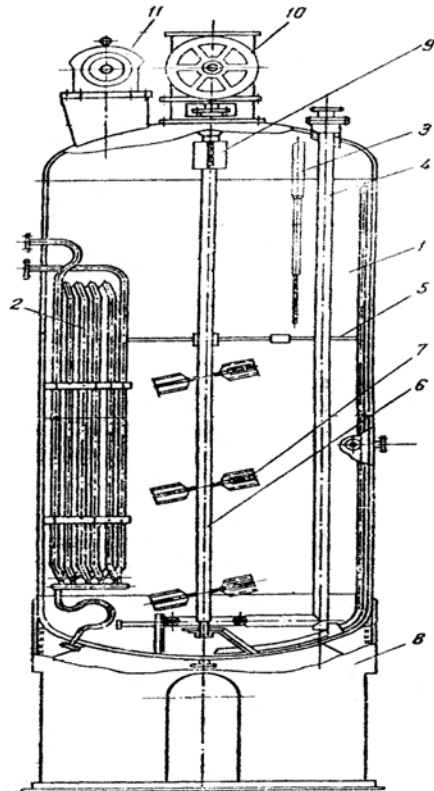
Phương pháp lên men	Các đặc điểm thao tác
Môi trường xốp	Đơn giản, rẻ, có thể chọn lọc
Nuôi bề mặt	Các khuẩn lạc từ tế bào đơn; kiểm tra quá trình bị giới hạn
Lên men chìm đồng thể phân phối tế bào chu kỳ	Các kiểu bình lên men khác nhau; lọc tia, đĩa quay, ống quay bình phản ứng tạo bọt tự động phản ứng, các kiểu bình phản ứng khác nhau: liên tục bình phản ứng có khuấy, bình elip, vòng ... 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.

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.

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.

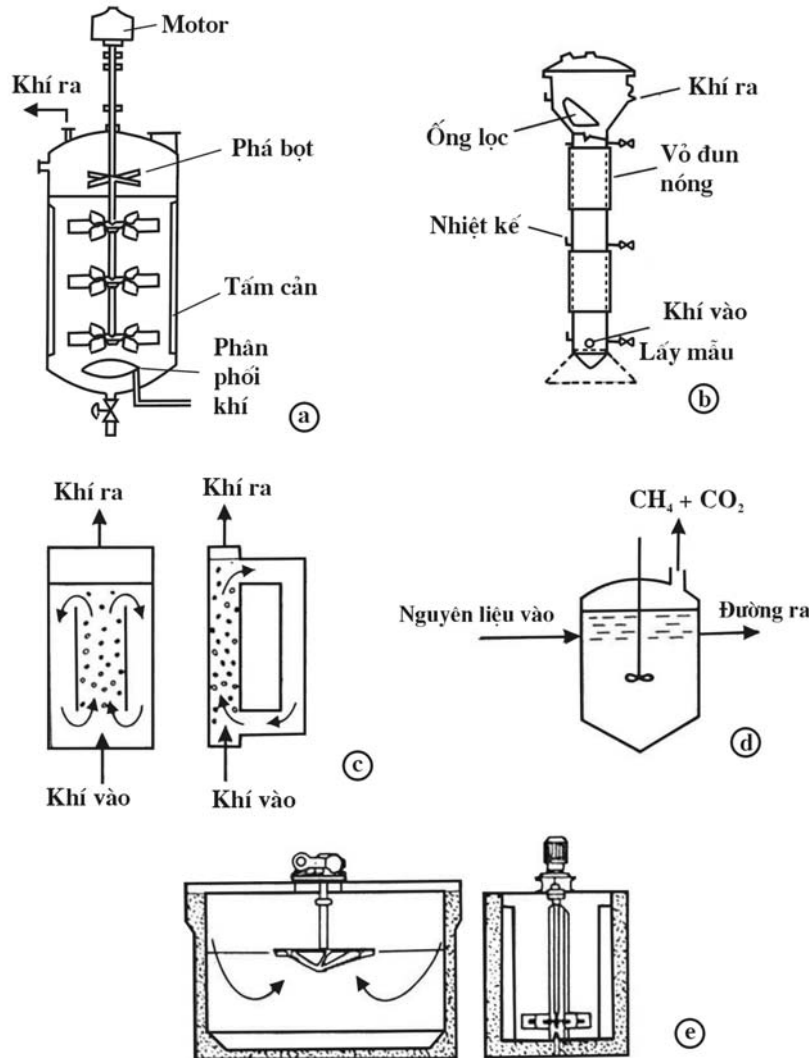
3. THIẾT BỊ LÊN MEN VI SINH VẬT (FERMENTOR)



1. Thân nồi
2. Bộ phận trao đổi nhiệt
3. Ống đựng nhiệt kế
4. Ống dẫn khí vào
5. Giàn trục khuấy
6. Trục khuấy
7. Cánh khuấy
8. Bộ đỡ nồi
9. Nối trục
10. Bộ phận truyền động
11. Động cơ

Hình 3.3. Sơ đồ cấu tạo thiết bị lên men chìm

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°C-30°C.



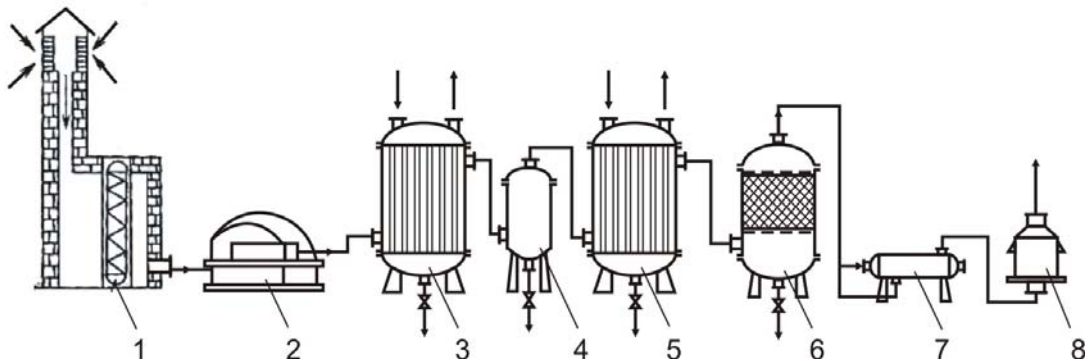
Hình 3.4. Các dạng thiết bị lên men vi sinh vật

- 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.

Kể từ khi penicillin 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 một thiết bị có hình trụ chế tạo bằng thép không gỉ (stainless steel) có dung tích khác nhau từ 5-10 lít dùng trong phòng thí nghiệm, 50-500 lít ở qui mô 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 3.3).

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. VẤN ĐỀ CUNG CẤP KHÔNG KHÍ VÔ TRÙNG CHO NHÀ MÁY LÊN MEN VI SINH VẬT

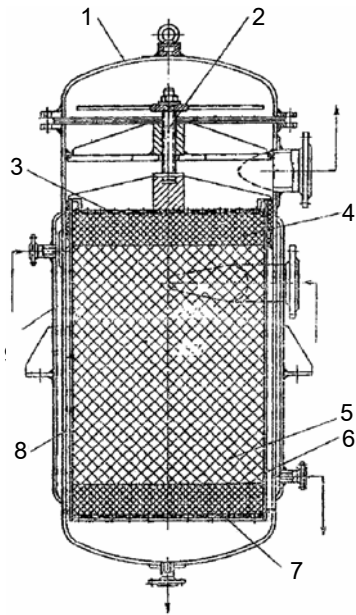


Hình 3.5. Sơ đồ hệ thống thiết bị lọc không khí vô trùng

1. Lọc sơ bộ; 2. Máy nén khí; 3, 5. Thiết bị làm nguội khí;
4. Bình chứa khí; 6. Thiết bị lọc khí lần thứ nhất;
7. Thiết bị sấy khí; 8. Thiết bị lọc khí lần hai.

Trong quá trình lên men các vi sinh vật hiếu khí để thu nhận sản phẩm, vấn đề cung cấp không khí vô khuẩn là một trong những vấn đề khó nhất của công nghệ lên men. Đặc biệt những vùng khí hậu nóng ẩm quanh năm như Việt Nam lại càng cần phải quan tâm. Bởi vì nếu không tách hết hơi ẩm có trong không khí thì vật liệu lọc sẽ bị ẩm và không còn khả năng lọc sạch vi khuẩn có trong không khí. Trong không khí do gió cuốn theo bụi bẩn từ đất, từ vùng dân cư nên nồng độ vi sinh vật có trong không khí phụ thuộc rất nhiều vào vị trí xây dựng nhà máy. Nếu nhà máy xây dựng ở ven rừng, xa cách khu dân cư thì khả năng gây nhiễm ít hơn. Yêu cầu không khí cung cấp cho các quá trình lên men phải sạch gần như tuyệt đối (loại đi 99,9999%) các hạt bụi

và các vi sinh vật có kích thước (0,5-2,0 μm). Chi phí điện năng cho công nghệ lọc khí vô khuẩn cũng rất lớn. Thành công hay thất bại của công nghệ lên men chính là vấn đề vô khuẩn của không khí.

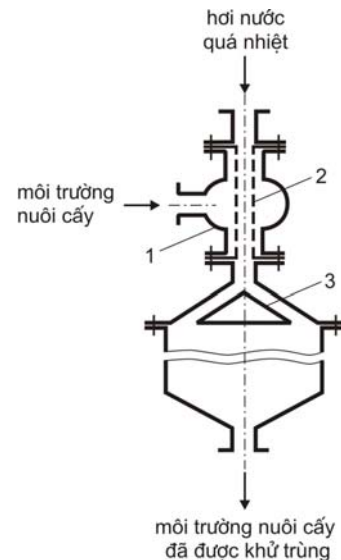


1. Bộ phận ép vật liệu lọc
2. Lưới trên
3. Vật liệu lọc
4. Than hoạt
5. Ngăn để chứa vật liệu lọc
6. Lưới đỡ vật liệu lọc
7. Thân thiết bị lọc
8. Vỏ ngoài.

Hình 3.6. Thiết bị lọc khí vô trùng

5. KHỬ TRÙNG MÔI TRƯỜNG TRONG CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Trong công nghệ lên men chìm để thu sản phẩm, nếu các thiết bị lên men có dung tích từ 30 lít đến 10.000 lít thường môi trường được pha chế trực tiếp trong thiết bị lên men. Sau đó dùng hơi nóng đun đến nhiệt độ khử trùng qua bộ phận truyền nhiệt giữ nhiệt độ và thời gian khử trùng thích hợp. Khử trùng xong, môi trường được làm nguội đến nhiệt độ thích hợp (25-30 $^{\circ}\text{C}$). Khi lên men vi sinh vật ở thiết bị lớn hơn (50.000-300.000 lít) nếu đun nóng trực tiếp để khử trùng thì đòi hỏi công suất của thiết bị cung cấp hơi lớn, nếu không thời gian đun đến nhiệt độ khử trùng quá dài sẽ làm ảnh hưởng đến chất lượng các thành phần dinh dưỡng có trong môi trường, từ đó sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của vi sinh vật lên men để thu sản phẩm. Vì vậy trong công



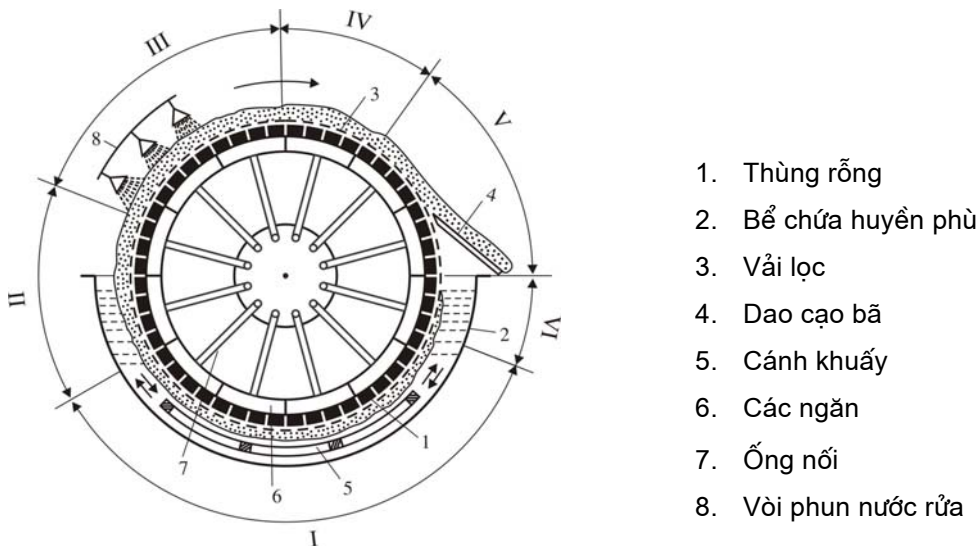
Hình 3.7. Sơ đồ cấu tạo thiết bị khử trùng liên tục

1. Thân cột. 2. Ống trao đổi nhiệt
3. Bộ phận ổn nhiệt

nghe lên men chìm người ta đã chế tạo ra thiết bị khử trùng liên tục (cột khử trùng) để khắc phục các nhược điểm trên. Cột khử trùng liên tục còn có ưu điểm nữa là: cho phép pha chế riêng từng thành phần môi trường và khử trùng ở những chế độ riêng nên môi trường dinh dưỡng không bị phá huỷ (hình 3.7).

6. LỌC VÀ THIẾT BỊ LỌC TRONG CÔNG NGHIỆP SẢN XUẤT KHÁNG SINH

Trong công nghiệp vi sinh vật nói chung và công nghiệp kháng sinh nói riêng, thường phải lọc một thể tích lớn môi trường lên men trong đó chứa vi sinh vật (xạ khuẩn, nấm mốc, vi khuẩn). Chúng là những cá thể kích thước vừa nhỏ lại nằm trong môi trường có độ nhớt cao do các sản phẩm trao đổi chất của vi sinh vật cùng với thành phần môi trường dinh dưỡng chưa sử dụng hết, dầu phá bọt... nồng độ các chất kháng sinh trong môi trường thấp, nhiều chất lại không bền vững. Vì vậy để chiết xuất và tinh chế được hoạt chất, công đoạn quan trọng bậc nhất là phải lọc để phân riêng sinh khối và dịch lọc trong khoảng thời gian ngắn cho phép. Để lọc được nhanh cần phải thêm các chất trợ lọc, các chất có khả năng làm đông vón protein... Tuy nhiên thiết bị lọc cũng rất quan trọng. Có thể dùng lọc ép khung bản để lọc dịch lên men. Song nhược điểm của thiết bị lọc ép là làm việc không liên tục. Khi sinh khối đã chất đầy các khoang lại phải tháo bã và lắp lại thiết bị rồi mới tiến hành lọc tiếp được. Vì vậy trong các nhà máy sản xuất kháng sinh thường sử dụng thiết bị lọc trống quay (hình 3.8). Ưu điểm của thiết bị này là có thể làm việc liên tục, tự động hoá việc loại bã. Máy chỉ ngừng làm việc khi nào năng suất lọc giảm, máy có diện tích bề mặt lọc lớn nên năng suất lọc cao.

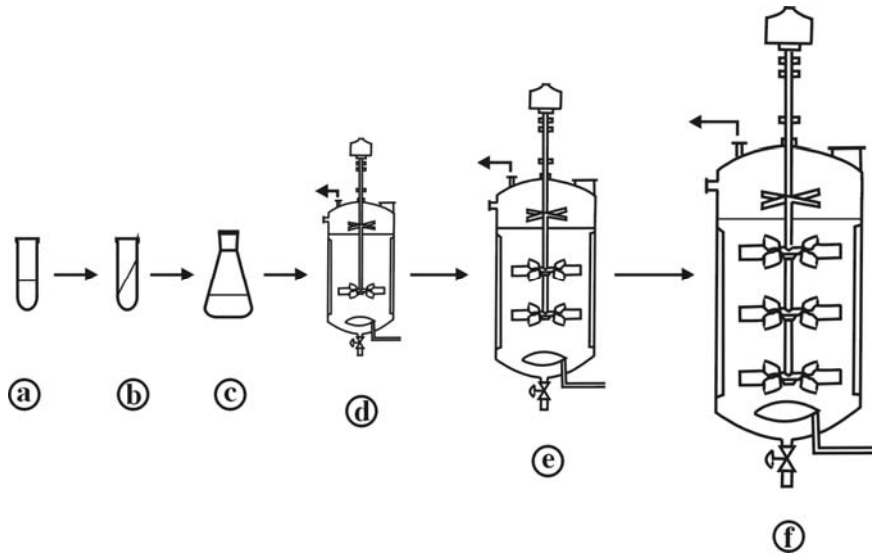


1. Thùng rỗng
2. Bể chứa huyền phù
3. Vỏ lọc
4. Dao cạo bã
5. Cánh khuấy
6. Các ngăn
7. Ống nối
8. Vòi phun nước rửa

Hình 3.8. Sơ đồ cắt ngang máy lọc chân không hình trống quay

7. 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 3.9).



Hình 3.9. 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.

8. 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 hòa tan vào nước, từ đó các vi sinh vật mới có thể hấp thu và đồng 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 hydrat carbon. 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 3.5).

Bảng 3.5. Nguồn hydrat carbon và nitơ dùng cho công nghiệp lên men

Nguồn hydrat carbon	Dạng dùng	Nguồn nitơ (% nitơ/ trọng lượng)
Glucose	Monohydrat tinh khiết, tinh bột thủy 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) Bột lạc (8,0) Bột yến mạch (1,5-2,0) 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 B₁₂ nhờ vi khuẩn *Propioni bacterium shermanii* cần bổ sung vào môi trường chất 5, 6 dimethylbenzimidazol để tạo ra phân tử vitamin B₁₂ thật, và hiệu suất cũng cao hơn. Các nhân tố phát triển hay các tiền chất chỉ cần với số lượng nhỏ mg/lít, 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. Quá trình lên men có thành công hay không phụ thuộc chính vào chất lượng môi trường dinh dưỡng và kỹ thuật khử trùng môi trường.

9. 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*... 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 ... 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 3.6).

Bảng 3.6. Một vài ví dụ lên men trên cơ chất rắn

Ví dụ	Cơ chất	Vi sinh vật sử dụng
Trồng nấm (Âu châu 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 <i>protozoa</i>

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 ... 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 3.3).

10. 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 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 lên men 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 là 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 và sục không khí vô trùng 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 lên men vi sinh vật. Tuy đã có những sản phẩm 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 ...), 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 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 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 $7 \text{ cm}^2/\text{mg}$. Các hạt này 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.

11. QUÁ TRÌNH TINH CHẾ ĐỂ THU SẢN PHẨM

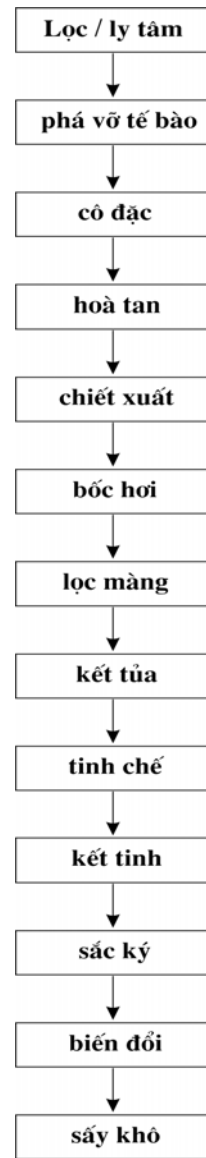
Sau khi kết thúc công đoạn nuôi cấy vi sinh vật hoặc tế bào động vật, phải tìm cách chiết xuất lấy hoạt chất và tinh chế sản phẩm đạt được các tiêu chuẩn cần thiết theo qui định dùng điều trị. Quá trình này gọi là quá trình xuôi dòng (downstream processing), tùy theo sản phẩm chứa trong môi trường lên men 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 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 lên men bởi vì các sản phẩm thuộc nhóm này thường rất không bền vững, hàm lượng chứa trong môi trường lên men 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 penicillin, những năm 60 của thế kỷ XX chiết xuất chỉ lấy ra được 60% hiệu suất môi trường. Hiện nay do cải tiến kỹ thuật đã có thể chiết ra được 90% hiệu suất môi trường.

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 (hình 3.10).



Hình 3.10. Các công đoạn tinh chế sản phẩm

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên các bộ phận và yêu cầu thiết kế của thiết bị lên men vi sinh vật.
2. Trình bày các phương pháp lọc không khí vô trùng và tầm quan trọng của lọc khí vô trùng cho nhà máy lên men.
3. Tại sao phải khử trùng môi trường trong công nghệ lên men?
4. Nêu cấu tạo các thiết bị lọc trong công nghiệp sản xuất kháng sinh.
5. Nêu trình tự quá trình lên men.
6. Nêu trình tự quá trình tinh chế để thu sản phẩm.

Chương 4

KỸ THUẬT SẢN XUẤT ENZYM

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. *Kỹ thuật sản xuất enzym nói chung và enzym dùng trong y học để điều trị bệnh.*
2. *Nguyên tắc và ứng dụng của phương pháp bất động enzym.*

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 in vitro. Nhờ tính chất kì diệu đó đã làm tăng khả năng sử dụng enzym trong các quá trình công nghiệp. Hàng năm công nghiệp enzym thế giới sản xuất hàng ngàn tấn tập trung vào một số enzym sau: proteinase, amyloglucosidase, amylase, glucose isomerase, rennet, pectinase...

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 1 gram vi khuẩn lactic có thể biến đổi một tấn lactose thành acid lactic trong vòng 1 giờ! 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 ...

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 lên men 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.

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 4.1). 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.

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 thuỷ 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 penicillin đòi hỏi những hiểu biết mới để lên men ở qui mô lớn vi 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 nhận enzym cũng là một công nghệ lên men nuôi vi sinh vật để thu enzym, 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 1 gram enzym tinh khiết giá vài trăm đôla, trái lại enzym dạng thô hoạt lực 1% giá chỉ có 1 đôla/kg. Thường sử dụng enzym dạng thô cho công nghệ chế biến thực phẩm, làm trong bia, nước quả ... 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, penicillinamidase (penicillinacylase) dùng để sản xuất 6-APA từ penicillin làm nguyên liệu bán tổng hợp kháng sinh nhóm beta lactam.

Bảng 4.1. Các enzym vi sinh vật và ứng dụng của chúng

Enzym	Vi sinh vật	Ứng dụng	Công nghiệp
Amylase (phân giải tinh bột)	<ul style="list-style-type: none"> • Nấm mốc • Vi khuẩn • Nấm mốc • Vi khuẩn • Nấm mốc • Vi khuẩn • Vi khuẩn 	<ul style="list-style-type: none"> • Bánh mì • Bao bột • Sản xuất glucose • Hồ hoá vải • Trợ giúp tiêu hoá • Rũ hồ vải • Tẩy vết bẩn 	<ul style="list-style-type: none"> • Bánh mì • Giấy • Thực phẩm • Tinh bột • Dược phẩm • Dệt • Giặt là
Protease (phân giải protein)	<ul style="list-style-type: none"> • Nấm mốc • Vi khuẩn • Vi khuẩn • Vi khuẩn • Vi khuẩn • Vi khuẩn 	<ul style="list-style-type: none"> • Bánh mì • Tẩy vết bẩn • Làm mềm thịt • Làm sạch vết thương • Xử lý sợi • Ở gia đình 	<ul style="list-style-type: none"> • Bánh mì • Giặt khô • Thịt • Y học • Dệt • Giặt là
Invertase (thuỷ phân saccharose)	Nấm men	Kẹo xốp có nhân	Kẹo xốp
Glucose oxydase	Nấm mốc	<ul style="list-style-type: none"> • Loại bỏ glucose • Kít giấy thử tiểu đường 	<ul style="list-style-type: none"> • Thực phẩm • 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

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 (65-70⁰C) để quần áo được sạch, trong khi đó ở Mỹ và Canada thường giặt ở 55⁰C. 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 (20-30⁰C).

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 và Công nghiệp Hoa Kỳ 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%.

Bảng 4.2. Sản xuất enzym công nghiệp ở một số nước phương Tây

Một số nước phương tây	Sản lượng enzym (tấn)	Tỷ lệ %
USA	6.360	12
Nhật	4.240	8
Đan Mạch	24.910	47
Pháp	1.590	3
Đức	3.180	6
Hà Lan	10.070	19
Anh	1.060	2
Thụy Sĩ	1.060	2
Các nước khác	530	1
Tổng số	53.000	100

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 kết chẩn đoán hay điều trị một số bệnh hiếm nghèo số lượng dùng rất nhỏ (mg hoặc microgram) nhưng giá cực kỳ đắt (100.000 đôla/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 1 kg penicillinamidase bất động trên mạng polyacriamid có thể sản xuất được 1000 kg 6-APA.

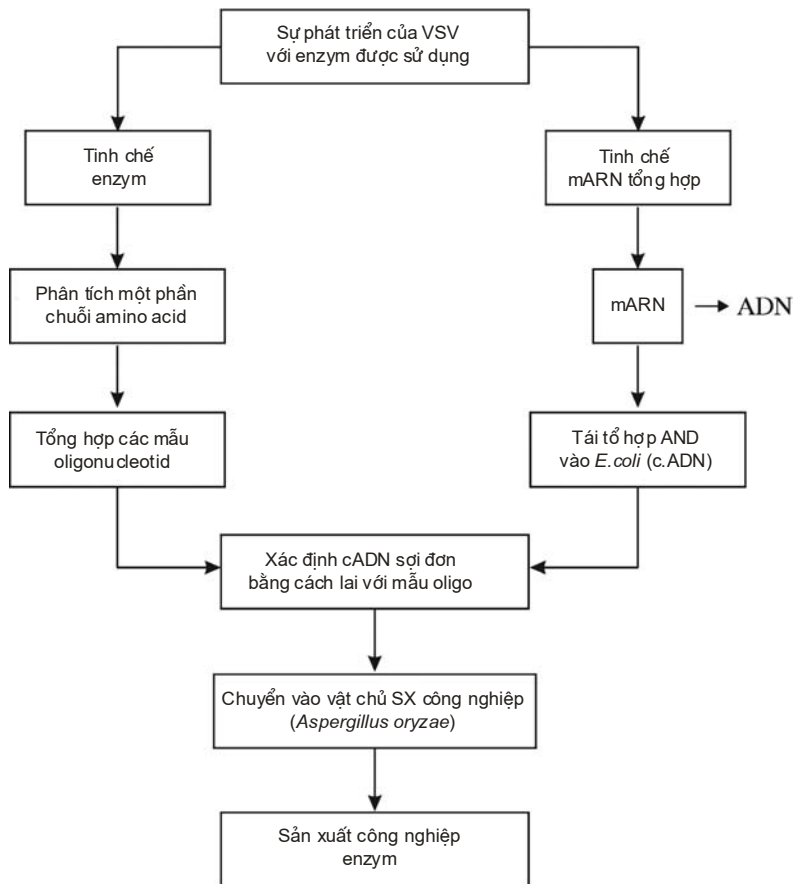
Sự tăng trưởng của thị trường enzym trên thế giới theo hai xu hướng sau: sản xuất các enzym dùng trong công nghiệp với số lượng lớn và các enzym có độ tinh khiết cao với số lượng nhỏ dùng trong phân tích, chẩn đoán và điều trị. Hai quốc gia nhỏ bé ở Châu Âu là Hà Lan và Đan Mạch được coi là những “cường quốc” sản xuất enzym dùng trong công nghiệp (bảng 4.2).

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.

3. KỸ THUẬT DI TRUYỀN TRONG CÔNG NGHỆ 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. Nguyên tắc chuyển gen để tạo enzym được minh họa ở sơ đồ hình 4.1.

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 nghiên cứu enzym. Công nghiệp tẩy rửa đạt hiệu quả kinh tế cao. Lipolase bền vững ở nhiệt độ và các pH khác nhau. Sự 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 4.4 cho ta thấy các mục tiêu chính để nghiên cứu enzym.



Hình 4.1. Nguyên tắc chuyển gen để tạo enzym

Bảng 4.4. 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 amino acid 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 A2 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 ...

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:

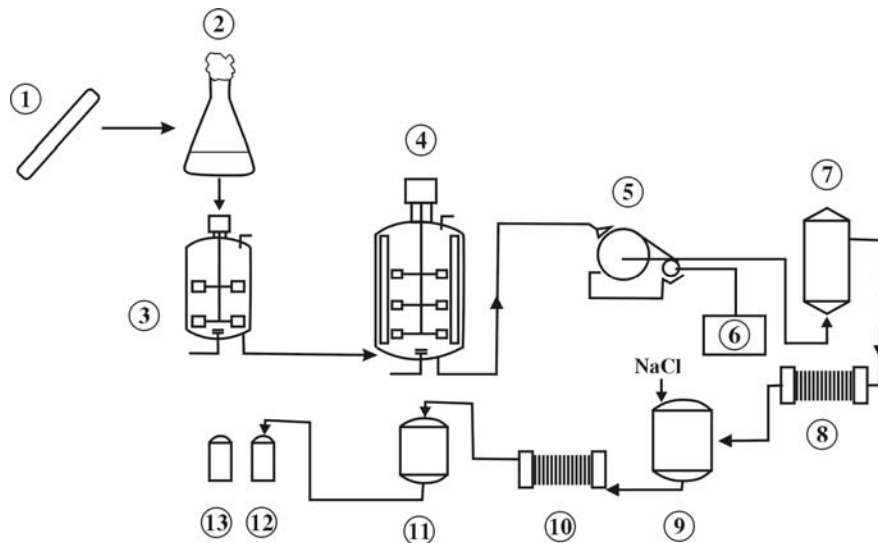
- Hoạt tính cao trên một đơn vị sản phẩm tính theo trọng lượng khô.
- Không phụ thuộc vào thời tiết, thời vụ do quá trình thực hiện trong thiết bị kín có điều khiển.

- 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... 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 lên men 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. Tùy 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 3. Kỹ thuật lên men.

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 vùng 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 4.2).

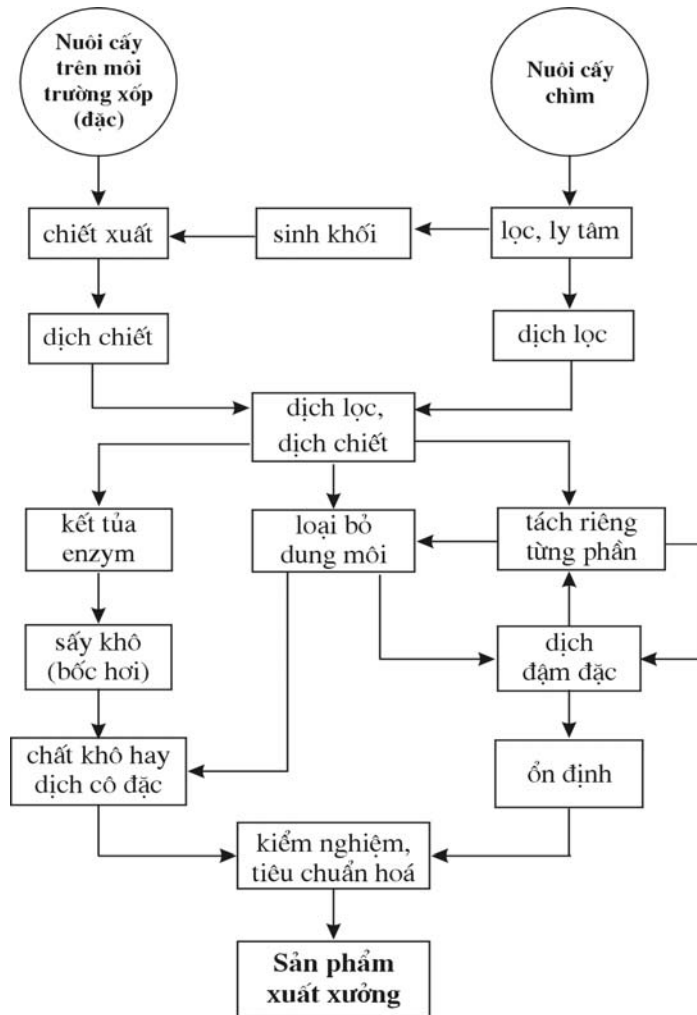


Hình 4.2. Sơ đồ minh họa các giai đoạn sản xuất enzym dạng dung dịch

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

Môi trường lên men cũng bao gồm các chất cung cấp năng lượng như hydrat carbon, 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 m³.

Enzym thương phẩm được sản xuất dưới hai dạng: dạng bột khô và dạng lỏng, có thể là dạng thô hoặc dạng tinh khiết (hình 4.3).



Hình 4.3. Sơ đồ chiết xuất và tinh chế enzym

Tuy nhiên, dù sản xuất ở dạng nào đi nữa nếu các enzym 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 enzym 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.

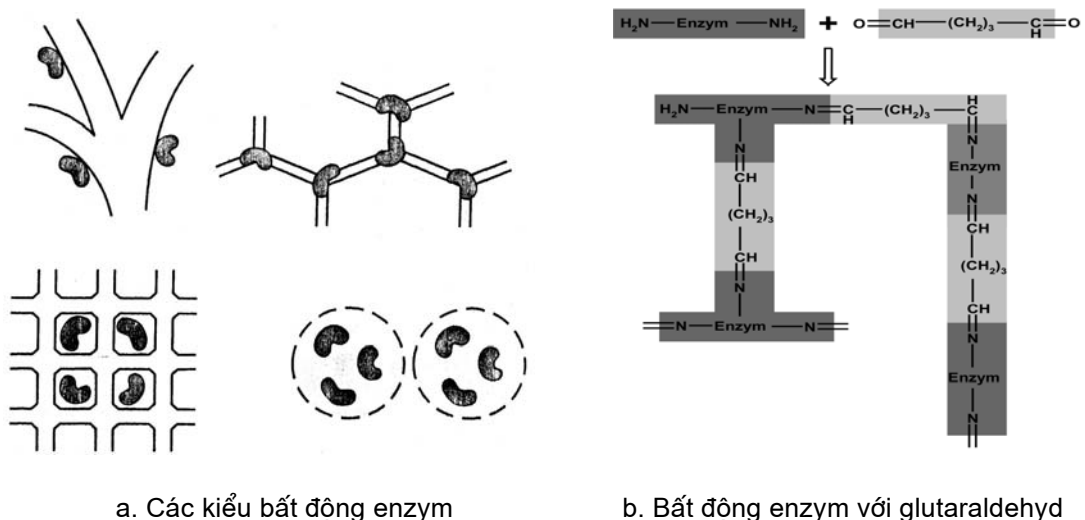
5. PHƯƠNG PHÁP BẤT ĐỘNG ENZYM (IMMOBILISED ENZYM)

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, hoặc hấp phụ trên các chất trơ vô cơ hoặc hữu cơ. 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 hoá các enzym hoặc các tế bào vi sinh vật chứa enzym tương ứng (hình 4.4).

Khi enzym hoặc tế bào đã bất động hoá 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 cái khuôn không hoà tan, hoặc được gói vào trong một gel, hoặc trong capsul thành các hạt vi nang, hoặc dán vào phía sau một màng bán thấm (hình 4.4).



Hình 4.4. Kỹ thuật bất động enzym và tế bào

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, thủy tinh, sắt, titan ... hoặc với các polymer thiên nhiên như sepharose và cellulose, với các polymer tổng hợp như nylon, 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 4.5.

Bảng 4.5. Những hạn chế của kỹ thuật bất động enzym

Phương pháp	Ưu điểm	Nhược điểm
Sự gắn kết đương lượng	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
Polymer hoá đương lượng	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
Hấp phụ	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
Bẫy bằng hoá học	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 đồng tụ. Polyacriamid, collagen, silicagel ... 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 4.6).

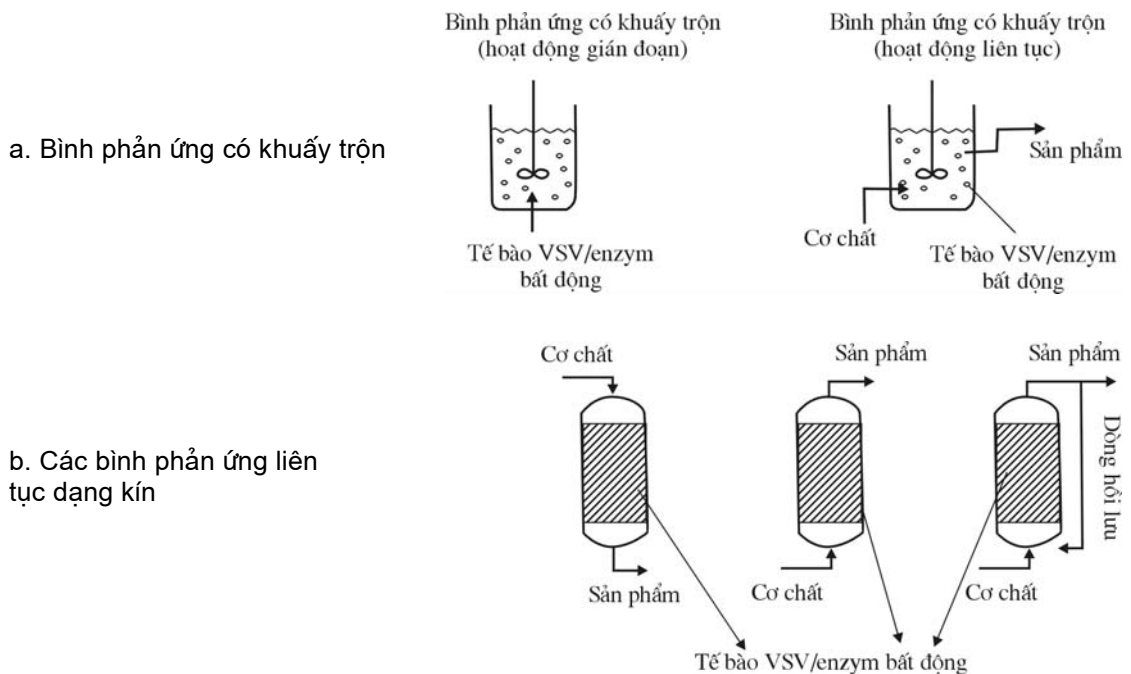
Bảng 4.6. Những ưu điểm của các chất xúc tác sinh học bất động

- 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.

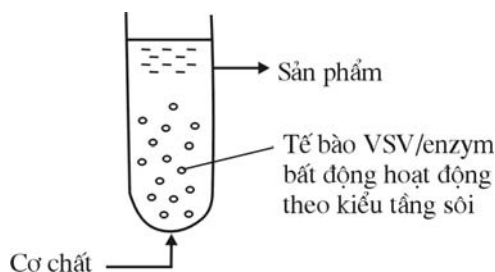
Do kết quả ứng dụng thành công các phương pháp bất động enzym và tế bào tạo ra các nang, các hạt, các cột và các màng chứa các enzym, nhiều kiểu bình phản ứng sinh học được chế tạo để đáp ứng cho nghiên cứu trong phòng thí nghiệm cũng như trong sản xuất công nghiệp.

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 4.2).

Một số nước đã sử dụng phương pháp bất động penicillin-acylase để sản xuất 6-APA từ penicillin G hoặc V. Từ 6-APA có thể thay thế các mạch bên khác nhau mà 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.

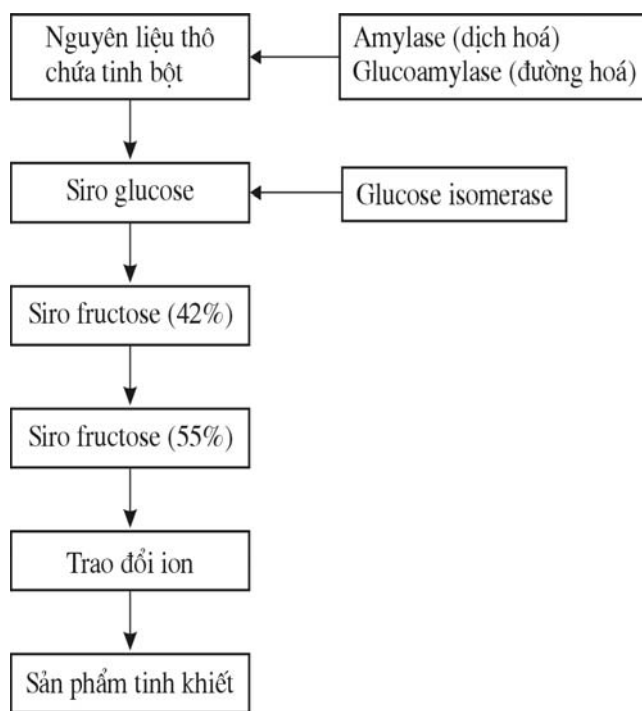


c. Bình phản ứng liên tục kiểu tầng sôi



Hình 4.5. Các kiểu bình phản ứng sinh học chứa enzym hoặc tế bào bất động

Hàng ngàn tấn siro fructose đã được sản xuất bằng phương pháp bất động enzym (hình 4.6).

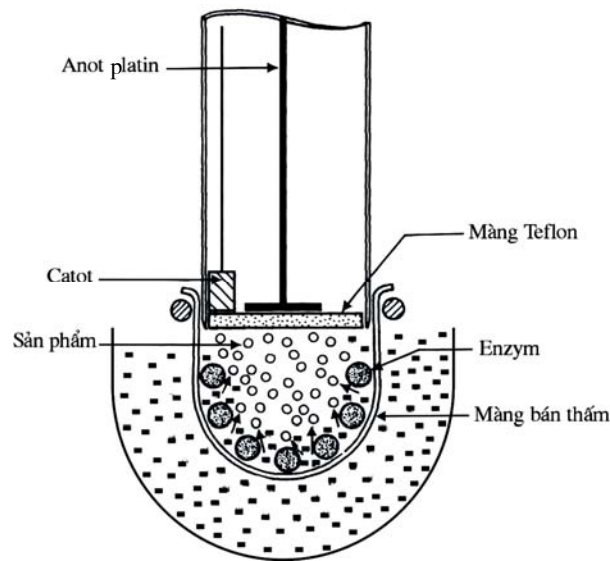


Hình 4.6. Sơ đồ sản xuất fructose từ tinh bột

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 kilogram 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, amino acid,

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 enzym có thể thấm qua màng bán thấm để phản ứng với cơ chất (hình 4.7).



Hình 4.7. 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 ... có ý nghĩa rất to lớn sẽ lần lượt được xem xét ở các chương tiếp theo. Trong tương lai những thành tựu nghiên cứu mới trong lĩnh vực enzym sẽ giải quyết những vấn đề thiết yếu của cuộc sống như: để bảo vệ môi trường, vấn đề năng lượng, thực phẩm và những nhu cầu cao cấp khác của loài người.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên các vi sinh vật được sử dụng trong công nghiệp để sản xuất enzym. Nêu ưu thế của vi sinh vật trong sản xuất enzym.
2. Kể tên các phương pháp lên men được dùng chủ yếu trong sản xuất enzym.
3. Kể tên các phương pháp bất động enzym, tên và đặc điểm các cơ chất thường được sử dụng trong bất động enzym?

Chương 5

SẢN XUẤT PROTEIN ĐƠN BÀO

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. Tầm quan trọng của sản xuất protein đơn bào, các ưu nhược điểm cơ bản của protein đơn bào.
2. Tên các chủng vi sinh vật thường sử dụng để sản xuất protein đơn bào và đặc điểm của quá trình lên men từng chủng.

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 tỉ người. Mức tăng bình quân hàng năm khoảng 95 triệu. Dự tính đến năm 2050 dân số thế giới là 10 tỉ. 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 thỏa 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. Đa 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 12 g 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 ... 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 5.1).

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 ... 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 xảy ra 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 thế chiến 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.

Bảng 5.1. 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 (%)	96,0	94,2	91,0
Protein thô (% N x 6,25)	55,0	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/16 g N)	1,9	1,23	1,0
Cystin và Cystein (g/16 g N)	1,0	0,75	1,0

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 g 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:

- Thủy 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 5.2). 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 200 g 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.

Bảng 5.2. 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
Bò cừu	4-6 tuần
Trâu, bò (còn nhỏ)	1-2 tháng
Người (sơ sinh)	3-6 tháng

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 5.3).

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 β caroten...

Bảng 5.3. Thành phần acid amin trong protein của tế bào *Saccharomyces*

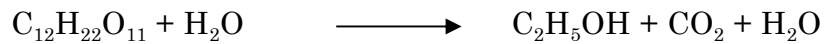
Acid amin	mmol/100 g protein năm men	Acid amin	mmol/100 g protein năm men
Alanin	114,70	Leucin	74,08
Arginin	40,18	Lysin	1,54
Asparagin	25,43	Methionin	12,66
Acid aspartic	74,38	Phenylalanin	33,44
Cystein	1,65	Prolin	41,13
Acid glutamic	75,45	Serin	46,33
Glutamin	26,33	Threonin	47,85
Glycin	72,56	Tryptophan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

Nuôi vi sinh vật để sản xuất SCP có nhiều ưu điểm chính như sau:

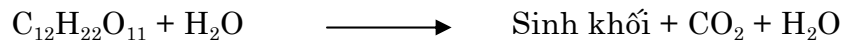
- Vi sinh vật phát triển với tốc độ nhanh ở điều kiện tối ưu, một vài loài có thể tăng gấp đôi sinh khối sau 0,5 - 1 giờ.
- Vi sinh vật dễ dàng bị biến đổi gen hơn thực vật và động vật, do đó có thể tạo ra các loài mới bằng biến đổi gen nhằm tăng tốc độ phát triển, chịu được các điều kiện sống khắc nghiệt 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.

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 ...). 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:



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 nó 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 5.4).

Bảng 5.4. 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
Inositol	(mg/kg)	5.000-8000	2.500-6.000
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.

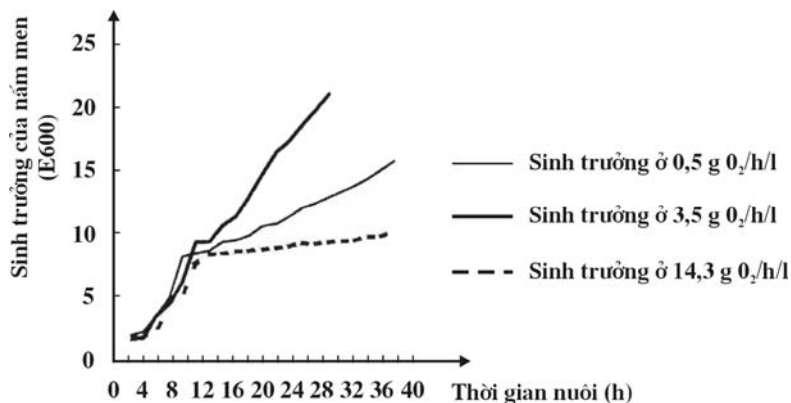
Rỉ đường cần được xử lý trước khi pha chế môi trường để nuôi cấy. Thường được acid hoá bằng acid sulfuric tới pH 4 và nâng nhiệt độ lên 120 - 125°C trong 1 phút để kết tủa một số chất lơ lửng. Đồng thời bổ sung thêm những thành phần cần thiết cho men phát triển. Rỉ đường cũng là môi trường tốt cho một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

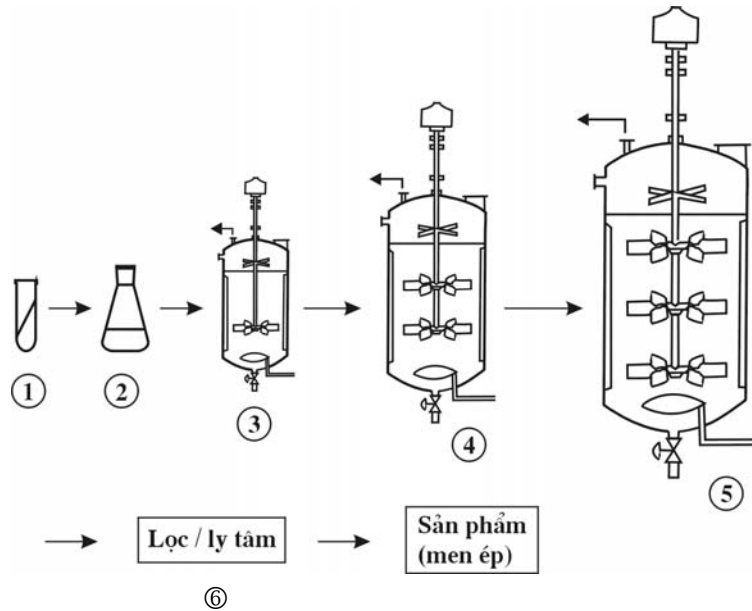
S. cerevisiae là loại vi sinh vật có thể sống và phát triển trong cả điều kiện có oxy và không có oxy. Khi sinh trưởng trong điều kiện hiếu khí chúng cần biotin, còn nhu cầu về inositol và acid pantothenic thay đổi theo từng chủng. Ngoài các nhu cầu trên, nấm men còn cần các thành phần khác như acid béo không no và ergosterol, 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 ôxy 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 5.1).



Hình 5.1. 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 thì 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 mì có thể minh họa bằng sơ đồ (hình 5.2).



Hình 5.2. Sơ đồ qui trình sản xuất men bánh mì

1. Men giống, 2. Nuôi trên máy lắc, 3. Nhân giống,
4. Nhân giống, 5. Nuôi để thu sản phẩm, 6. Lọc để thu men

• 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 logarit.

- ***Lên men để thu hoạch sinh khối nấm men***

Thiết bị nuôi men dùng trong sản xuất có dung tích từ 50-300 m³. Môi trường nuôi chiếm 70% dung tích của thiết bị nuôi. Nhiệt độ nuôi men thường giữ ở 30°C - 32°C. Cấp khí liên tục với lưu lượng 1VVM (1 thể tích không khí/1 thể tích môi trường/phút).

- ***Thu sinh khối nấm men***

Tiêu chuẩn chủ yếu dùng để xem xét men bánh mì thương phẩm khi kết thúc nuôi 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 mRNA 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 sinh khối nấm 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 rửa 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 *S. 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.

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 tỉ 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 α -amylase bên với nhiệt vào men bánh mì. 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 tỉ 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 *S. cerevisiae* trong những điều kiện đặc biệt, chúng sẽ tạo ra hàm lượng cao vitamin D hoặc ergosterin là những thuốc quý.

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 betacaroten, vitamin B₁₂ 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*.

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 penicillin đã tạo ra lượng lớn sinh khối nấm *Penicillium chrysogenum*. Lượng sinh khối này coi như chất phế thải của công nghệ penicillin 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 vi 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*, *Fuarium 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 5.5).

Bảng 5.5. Hàm lượng protein thô, N α -amin và N phi protein ở một số loài nấm

Loài nấm	Nguồn C	Protein thô	N α -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. sitophyla</i>	rỉ đường	50,6	33,7	33,5
<i>Fusarium graminearum</i>	tinh bột	54,0	42,1	22,0
<i>F. moniliorme</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>	-	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 20-30 g/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 ...

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.

5. SẢN XUẤT NẤM ĂN

Các chất thải của nông nghiệp như rơm, rạ, bã mía, của công nghiệp như gỗ vụn, mùn cưa ... 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

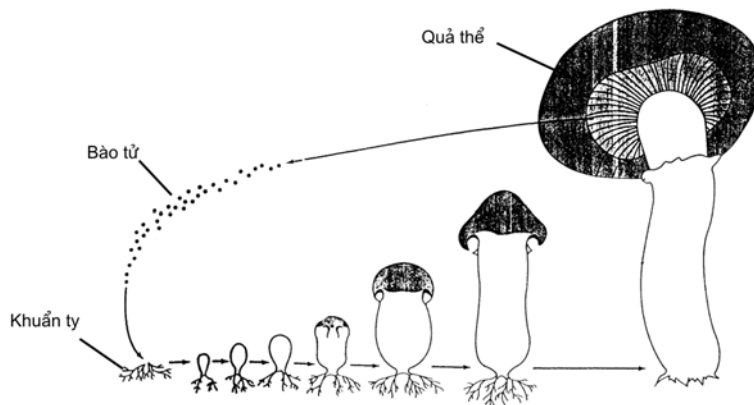
phân giải được dùng làm phân bón hữu cơ, hoặc chế biến thành các thức ăn cho cá hoặc một số động vật có giá trị kinh tế.

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 lí 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 hữu cơ 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.



Hình 5.3. Sự phát triển của quả thể nấm từ bào tử

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 Mĩ. 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 Philipin, Việt nam và Indonecia.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Phân tích các ưu nhược điểm cơ bản của protein đơn bào
2. Các chủng nào thường được dùng trong sản xuất sinh khối nấm men? Nêu ứng dụng của nấm men và sinh khối nấm men trong đời sống và trong ngành Dược.
3. So sánh quy trình sản xuất protein đơn bào từ tảo và từ nấm sợi.

Chương 6

SẢN XUẤT CÁC SẢN PHẨM TRAO ĐỔI CHẤT BẬC MỘT DÙNG TRONG Y HỌC

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này, sinh viên phải trình bày được:

1. *Nêu được khái niệm và tên các chủng loại sản phẩm bậc một của vi sinh vật.*
2. *Trình bày được quy trình sản xuất một số sản phẩm cụ thể.*

Vi sinh vật sống và phát triển trong điều kiện tự nhiên hay trong điều kiện được nuôi trong phòng thí nghiệm. Chúng muốn tồn tại cần phải đồng hoá các chất dinh dưỡng có chứa trong môi trường xung quanh. Quá trình hấp thu và biến đổi các chất dinh dưỡng ở môi trường xung quanh để tạo ra năng lượng cần thiết cho sự phát triển của chúng gọi là quá trình đồng hoá. Vi sinh vật sử dụng năng lượng của quá trình đồng hoá để tổng hợp nên các thành phần cấu trúc của tế bào, để sinh trưởng, phát triển và duy trì nòi giống. Trong quá trình đó, một số vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp thừa ra một số lượng các chất mà chính tế bào không dùng hết thải ra môi trường ngoài như các acid amin, vitamin, các enzym ... Các chất đó được gọi là các chất trao đổi bậc một. Lợi dụng những đặc điểm tự nhiên đó của vi sinh vật, các nhà khoa học đã tìm ra được phương pháp chọn giống và tác động làm biến đổi một số đặc điểm di truyền của chúng và nghiên cứu các đặc điểm sinh lý hoá sinh của chúng nhằm nuôi cấy các vi sinh vật đó để “siêu tổng hợp” ra những hoạt chất mà ta mong muốn.

1. SẢN XUẤT CÁC ACID AMIN

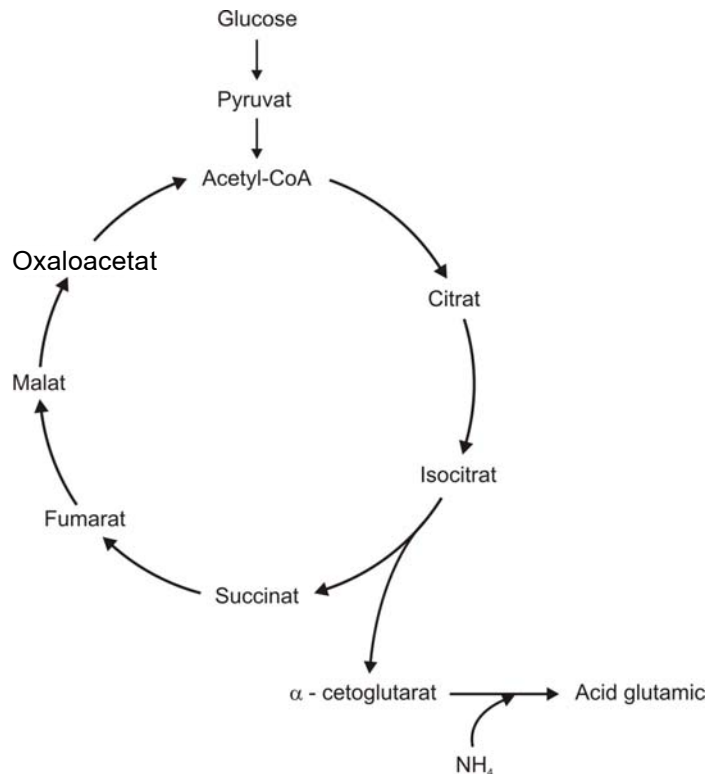
Trong thành phần của protein thường chứa 20 acid amin chính. Trong số đó có đến 8 acid amin cơ thể người và động vật không thể tự tổng hợp được đó là: lysin, methionin, threonin, tryptophan, phenylalanin, isoleucin, leucin và valin. Người ta gọi đó là những acid amin không thay thế. Nếu thiếu một trong số những chất này cơ thể sẽ bị rối loạn chuyển hoá và sinh ra các bệnh tật, hoặc không thể phát triển được. Trong thiên nhiên thức ăn thường chứa một lượng nhỏ các acid amin không thay thế đó. Để đảm bảo có các acid amin

quan trọng trên cần phải nghiên cứu sản xuất bằng phương pháp công nghiệp. Sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hoá học thường bao giờ cũng tạo ra một acid amin dạng DL, việc tách riêng để chỉ lấy đồng phân dãy L vừa khó, giá thành lại đắt. Sinh tổng hợp acid amin thuận tiện hơn vì chỉ tạo ra dạng acid amin dãy L. Trên thế giới hiện nay hàng năm sản xuất trên 500 ngàn tấn acid amin, doanh thu khoảng 4,5 tỉ USD. Hai acid amin sản xuất với số lượng lớn nhất là acid glutamic và lysin. Trong giáo trình này giới thiệu phương pháp sinh tổng hợp acid glutamic.

2. SẢN XUẤT ACID GLUTAMIC

2.1. Đại cương

Acid glutamic được sản xuất với số lượng lớn nhất trong tất cả các acid amin vì acid này được dùng một phần trong sản xuất dược phẩm, còn số lượng lớn được dùng trong thực phẩm làm chất điều vị được sản xuất dưới dạng mononatri glutamat. Acid glutamic có thể sản xuất bằng phương pháp thuỷ phân protein của bột lúa mì (gluten). Hiện nay các nhà máy sản xuất acid glutamic trên thế giới đều tiến hành bằng phương pháp lên men vi sinh vật vì vừa có năng suất cao giá thành lại thấp hơn nhiều so với phương pháp sản xuất bằng hoá học.



Hình 6.1. Quá trình chuyển hóa thành acid glutamic bằng enzym hoặc hoá học

Sản xuất acid glutamic bằng phương pháp lên men vi sinh vật cũng có hai cách. Lên men trực tiếp một vi sinh vật có khả năng siêu tổng hợp acid glutamic sau đó chiết xuất và tinh chế thu lấy sản phẩm. Một số vi sinh vật khác lại có khả năng sinh tổng hợp với một số lượng lớn acid α -cetoglutarat. Vì vậy có thể nuôi cấy các vi sinh vật này để chúng tạo ra acid α -cetoglutarat. Sau đó biến đổi bằng enzym hoặc hoá học acid này thành acid glutamic theo hình 6.1.

2.2. Lên men sinh tổng hợp acid glutamic

2.2.1. Chủng giống

Có nhiều chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp acid glutamic. Tuy nhiên những chủng sau đây được nhiều nhà máy sử dụng để sản xuất vì cho hiệu suất cao (80-120 g/lít): *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*, *B. divaricatum*. Đây là những vi khuẩn Gram (+) hiếu khí. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp 34-37°C và thời gian lên men là 40 - 48 giờ.

2.2.2. Nhu cầu dinh dưỡng

Môi trường dinh dưỡng dùng để lên men sinh tổng hợp acid glutamic rất đơn giản. Tùy theo đặc điểm chủng sản xuất yêu cầu cần nghiên cứu để có môi trường tối ưu cho năng suất sinh tổng hợp cao nhất. Nguồn carbon thường là glucose, sacharose. Thực tế sản xuất thường sử dụng glucose từ dịch thủy phân tinh bột kết hợp với sacharose trong rỉ đường (mía hoặc củ cải đường). Đây là những nguyên liệu rẻ tiền. Nguồn nitơ thường dùng là urê với tỉ lệ 1,5 - 2,0%, cũng có thể dùng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl với nồng độ 0,5%. Quá trình lên men tạo ra acid glutamic làm cho pH môi trường giảm xuống. Vì vậy thường bổ sung urê để giữ cho pH môi trường đạt trung tính, đảm bảo không ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn làm giảm hiệu suất sinh tổng hợp, đồng thời urê lại có tác dụng bổ sung thêm nguồn nitơ làm chất dinh dưỡng cho vi khuẩn.

Yếu tố rất quan trọng ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất sinh tổng hợp acid glutamic là nồng độ biotin. Nồng độ biotin thích hợp từ 2,0 - 5,0 mcg/lít môi trường. Nếu quá nồng độ này vi khuẩn sinh tổng hợp acid glutamic sẽ tạo ra alanin, acid lactic, acid aspartic, sinh khối tăng mạnh còn acid glutamic hình thành rất ít. Trong rỉ đường thường chứa hàm lượng biotin khá cao, vì vậy cần phải khống chế nồng độ cho thích hợp. Một yếu tố khác cũng ảnh hưởng nhiều đến hiệu suất sinh tổng hợp acid glutamic là các chất kháng sinh thêm vào môi trường lên men. Khi thêm các chất kháng sinh có tác dụng lên thành tế bào vi khuẩn như penicillin G, polymyxin người ta nhận thấy hiệu suất sinh tổng hợp acid glutamic tăng lên. Nồng độ và thời điểm cho kháng sinh vào môi trường thích hợp có thể làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp acid glutamic lên từ 15 - 45%.

2.2.3. Quy trình lên men và chiết xuất

Sản xuất acid glutamic thường áp dụng phương pháp lên men chu kì (theo mẻ) trên các thiết bị lên men có dung tích từ 100.000 - 300.000 lít trong điều kiện hiếu khí và vô trùng tuyệt đối.

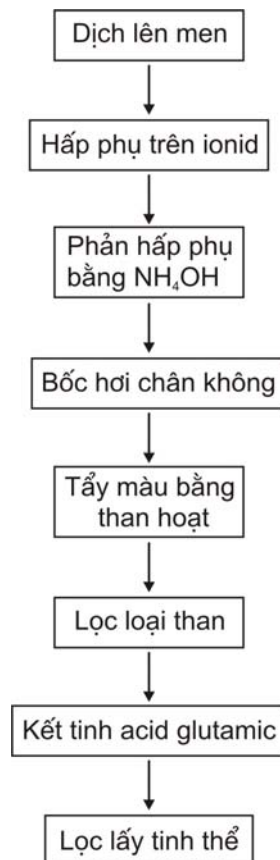
Để chiết xuất và tinh chế acid glutamic có nhiều phương pháp. Tuy nhiên chỉ có hai phương pháp được áp dụng trong công nghiệp.

- *Phương pháp điểm đẳng điện*

Sau khi kết thúc quá trình lên men, dịch lên men được cô chân không ở nhiệt độ 50-60°C đến nồng độ nhất định. Sau đó tẩy màu bằng than hoạt, lọc loại than, điều chỉnh pH bằng acid clohydric đến điểm đẳng điện là 3,2. Acid glutamic kết tinh. Lọc hay ly tâm lấy tinh thể. Phương pháp thu hồi sản phẩm này khá đơn giản, tuy nhiên hiệu suất thu hồi thấp thường chỉ đạt 50 - 60%.

- *Phương pháp trao đổi ion*

Trong công nghiệp hiện nay để chiết xuất acid glutamic thường áp dụng phương pháp chiết bằng trao đổi ion theo hình 6.2.



Hình 6.2. Sơ đồ các công đoạn chiết xuất acid glutamic

2.3. Sản xuất mì chính

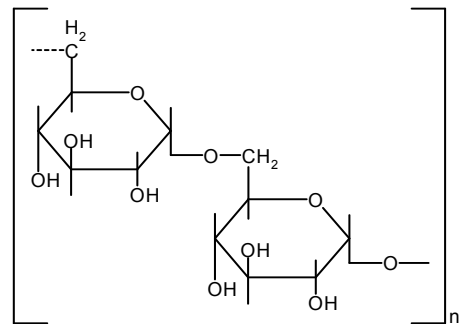
Trong thực tế, acid glutamic được dùng chủ yếu để chế tạo mì chính dùng trong thực phẩm làm chất điều vị. Để sản xuất mì chính chỉ cần hoà tan acid glutamic đến nồng độ nhất định, sau đó tạo muối mononatri glutamat bằng Na_2CO_3 hoặc NaOH ở pH 6,8-7,0, khử sắt, tẩy màu. Dung dịch glutamat Natri đem cô dưới áp suất giảm đến nồng độ khoảng 30 - 30,5 độ Bé. Thêm vài tinh thể mì chính làm mầm kết tinh. Tiếp tục cô đến đậm độ 31 - 31,8 Bé, các tinh thể mì chính kết tinh dạng hình trụ đều đặn. Điều kiện để kết tinh mì chính cần tuân thủ là: áp suất chân không: 600 mmHg; nồng độ glutamat: 31,5 - 31,8 Bé. Nhiệt độ cô đặc: 60 - 65°C.

Sản phẩm có hàm lượng mononatri glutamat đạt 98 - 98,5%. Hiệu suất chuyển đổi thành glutamat đạt 85 - 90%. Ly tâm lấy tinh thể. Nước ốt không kết tinh được bổ sung thêm natri clorid để tạo ra dạng bột ngọt có chứa 20 - 25% mononatri glutamat dùng làm bột gia vị.

3. SẢN XUẤT DEXTRAN

3.1. Đại cương

Dextran là các polysaccharid có trọng lượng phân tử rất khác nhau, thường là dextran 1, 40, 60, 70 hay 110 kDa tương ứng với 1.000, 40.000, 60.000, 70.000 và 110.000. Dextran là một polymer được trùng hợp bởi nhóm vi khuẩn *Lactic* nhờ các liên kết 1,6 glucosid.



Dextran được sử dụng trong y học như một chất dùng thay thế huyết tương khi bị choáng do mất máu, chấn thương, bỏng, nhiễm độc, viêm tụy, viêm màng bụng. Dextran “gia công” hay sephadex được coi như những sàng phân tử dùng trong kỹ thuật lọc gel để tinh chế các protein có trọng lượng phân tử khác nhau thường dùng để tinh chế các enzym hoặc các peptid làm thuốc. Dextran cũng được sử dụng làm các chất keo bảo vệ, hoặc các chất độn có tính trợ dùng trong dược học.

3.2. Phương pháp sản xuất

Có nhiều chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp dextran như *Streptobacterium dextranicum*, *Streptococcus mutans*. Tuy nhiên trong công nghiệp thường sử dụng chủng *Leuconostoc mesenteroides ATCC10830*, chủng này tạo ra tới 95% polymer dextran có liên kết α -1,6 glucosid (phần còn lại là liên kết α -1,3) và trọng lượng phân tử là $4-5 \times 10^7$ dalton.

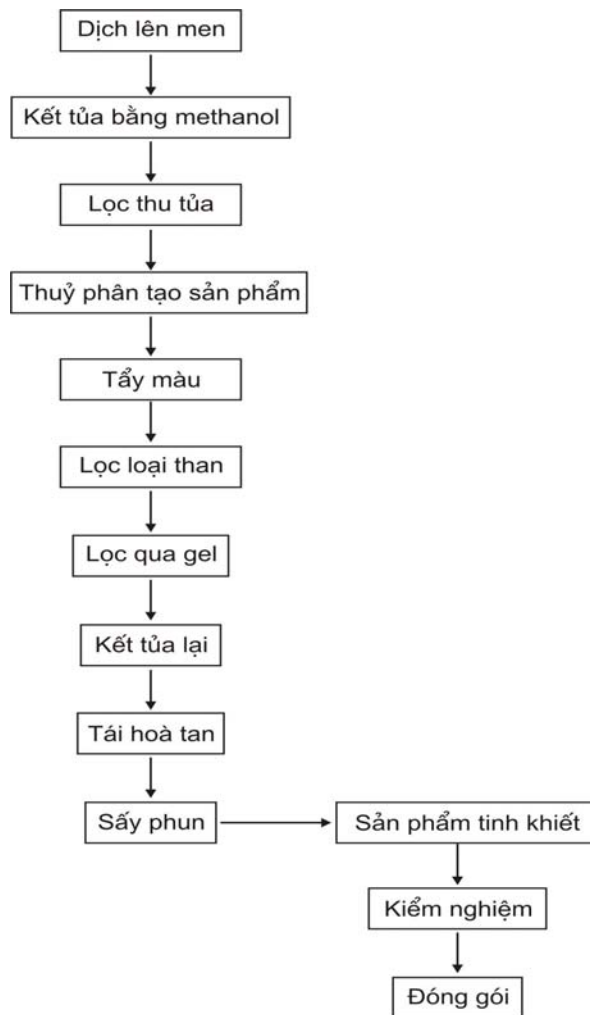
Môi trường để sinh tổng hợp dextran rất đơn giản gồm có saccharose 6%, cao ngô hoặc cao nấm men 2%, KH_2PO_4 0,1% và các vi lượng, pH 5,0-6,0. Quá

trình lên men được tiến hành ở 25°C, lúc ban đầu thông khí nhẹ và khuấy trộn liên tục. Khi dextran được hình thành dung dịch trở nên đặc sánh và có độ nhớt cao thì phải tăng tốc độ khuấy và cung cấp đủ không khí vô trùng. Kết thúc lên men sau 72-96 giờ. Sản phẩm chính là khối keo dextran được hình thành, một ít fructose tự do, acid lactic.

3.3. Tinh chế và chế tạo dextran được dụng

Kết thúc quá trình lên men dùng methanol để kết tủa dextran (1/3). Lọc thu dextran để tinh chế tiếp. Dịch thải được cất để thu hồi methanol.

Dextran có trọng lượng phân tử lớn được thuỷ phân bằng acid hydrochloric ở nhiệt độ 95-100°C. Khống chế trọng lượng phân tử bằng phương pháp đo độ nhớt của hỗn hợp phản ứng. Trung tính hoá dung dịch bằng natri hydroxyd. Tẩy màu bằng than hoạt, lọc loại than. Dịch lọc được lọc qua gel. Sau cùng là kết tủa lại bằng methanol, tái hoà tan và sấy phun (hình 6.3).



Hình 6.3. Sơ đồ các công đoạn tinh chế dextran

4. SINH TỔNG HỢP VITAMIN B₁₂ (CYANOCOBALAMIN)

4.1. Đại cương

Các vitamin đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp nhờ vi sinh vật là vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin), vitamin B₂ (Riboflavin).

Từ giữa thế kỷ XIX (1849) đến đầu thế kỷ XX, nguyên nhân của bệnh thiếu máu ác tính không ai giải thích được. Mãi đến năm 1926, khi G. R. Minot và W. P. Murphy phát hiện được tác dụng điều trị bệnh thiếu máu ác tính của cao gan thì hướng nghiên cứu mới được mở ra. Năm 1927, Castle nhận xét rằng trong dịch tiêu hoá có 1 chất được gọi là "nhân tố nội", khi nó kết hợp với 1 chất gọi là "nhân tố ngoại" có trong protein của gia súc giúp cho cơ thể hấp thu được "tác nhân chống thiếu máu ác tính". Đến năm 1948, Ricker và cộng sự ở Mỹ và Smith-Parkers ở Anh đã chiết và kết tinh được những tinh thể hình kim màu đỏ đậm từ cao gan động vật và gọi là vitamin B₁₂. Parker chứng minh được đó là "nhân tố ngoại" và cũng là tác nhân chữa thiếu máu ác tính. Từ 1 tấn gan lấy được 20 – 25 mg vitamin B₁₂.

Cấu trúc hoá học của vitamin B₁₂ do D. C. Hodgkin (giải thưởng Nobel 1964) xác định. Trong động vật và thực phẩm B₁₂ tồn tại dạng coenzym liên kết với acid amin.

Vitamin B₁₂ là yếu tố sinh trưởng, điều trị bệnh thiếu máu ác tính. Nhu cầu cho người bình thường 1 mcg/ngày. Thiếu vitamin B₁₂ sẽ ảnh hưởng đến chức năng tạo hồng cầu gây ra suy nhược toàn thân. Công dụng chính của vitamin B₁₂ là chữa bệnh thiếu máu ác tính và các chứng thiếu máu khác. Vitamin B₁₂ phối hợp với vitamin B₁, B₆ dùng điều trị viêm dây thần kinh gây đau khớp, liệt chân, tay rất hiệu quả. Calci - B₁₂ giúp trẻ con chống còi xương, chậm lớn...



Dorothy Crowfoot Hodgkin (1910-1994)

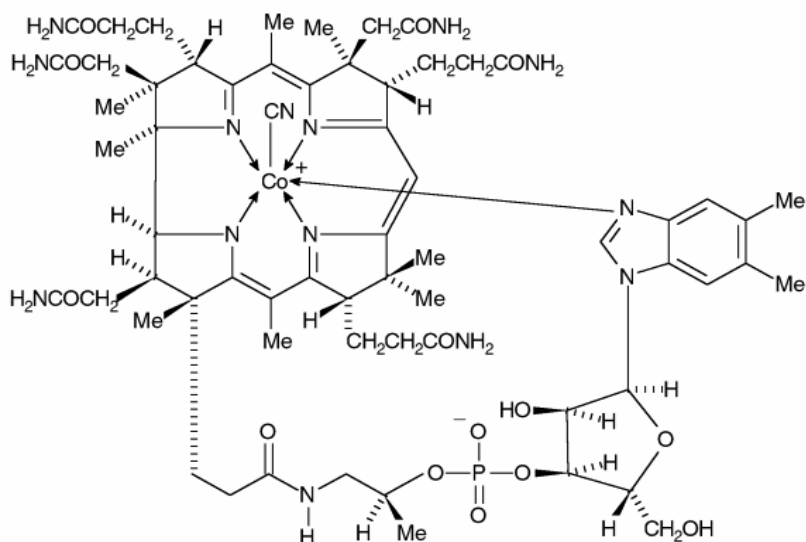
Vitamin B₁₂ tham gia vào nhiều phản ứng trao đổi chất ở cơ thể, kích thích quá trình tổng hợp protein (thường gọi là nhân tố protein động vật) vì vậy gia súc, gia cầm ăn thức ăn có chứa B₁₂ sẽ tăng trọng nhanh (10 - 15%). Tăng tỷ lệ đẻ trứng ở gà và tăng tỷ lệ trứng nở thành gà con.

Vitamin B₁₂ thuộc loại hợp chất hoạt động sinh lý và được tổng hợp trong tự nhiên hoàn toàn bởi vi sinh vật. Sinh vitamin B₁₂ mạnh nhất là các vi khuẩn propionic và vi khuẩn metan, vitamin B₁₂ nằm trong tế bào của các vi khuẩn này. Ngoài ra còn một số xạ khuẩn cũng sinh vitamin B₁₂ như: *Str. griseus*, *Str. aureofaciens*, *Str. rimosus*...

Thực vật không tạo được vitamin B₁₂. Ở người, vitamin B₁₂ do vi sinh vật tạo ra ở ruột già vì thế nó không được hấp thu vào máu. Phân người, gia súc có vitamin B₁₂. Ở động vật: thịt bò, gan, thận, tim (10 mcg/100 g); ở hải sản: cua,

cá, trứng cá; trong các sản phẩm phomat, kem, sữa... đều có chứa 1 lượng nhỏ vitamin B₁₂.

4.2. Cấu trúc hoá học và tính chất



Công thức cấu tạo cyanocobalamin (C₆₃H₈₈CoN₁₄O₁₄ P; 1355) theo BP 2003

TT	Tên gọi	Tên cobalamin	R
1	Vitamin B ₁₂	Cyanocobalamin	CN
2	Vitamin B _{12a}	Hydroxocobalamin	OH
3	Vitamin B _{12b}	Aquacobalamin	H ₂ O
4	Vitamin B _{12c}	Nitrosocobalamin	NO
5	Coenzym B ₁₂	5'-deoxy-adenosylcobalamin	
6	Methyl vitamin B ₁₂	Methylcobalamin	CH ₃

Phân tử vitamin B₁₂ có dạng coenzym liên kết với acid amin, bao gồm 2 phần chính: phần Corin (còn gọi là nhân tố B) và phần nucleotid gồm base chứa nitơ là 5, 6 dimethylbenzimidazol, đường ribose và phân tử H₃PO₄. Nhân Corin phức hợp với nguyên tử cobalt; cobalt gắn với 1 gốc R và gọi chung là cobalamin. Tùy theo gốc R mà ta có các vitamin B₁₂ có tác dụng sinh học.

Tất cả các cobalamin đều có thể chuyển được thành cyanocobalamin khi cho tác dụng với nhóm -CN. Cyanocobalamin và hydroxocobalamin là 2 dạng hay dùng trong y học.

Cyanocobalamin là tinh thể hình kim màu đỏ thẫm. Độ chảy 300°C. Tinh thể dễ tan trong nước, cồn, phenol. Không tan trong ether, cloroform, aceton. Dung dịch vitamin B₁₂ trong nước có cực đại hấp thụ trong UV ở 278, 361 và

550 nm. Đỉnh 361 nm dùng để định lượng vitamin B₁₂ bằng quang phổ. Vitamin B₁₂ bị ánh sáng phân huỷ.

4.3. Lên men sinh tổng hợp

Để sản xuất vitamin B₁₂ có 3 con đường sau:

4.3.1. Chiết từ bùn cống hoạt hoá

Một số vi sinh vật đặc biệt thuộc nhóm vi khuẩn sinh metan sống kỵ khí trong bùn cống, ruộng, ao... có khả năng sản sinh ra vitamin B₁₂ với hàm lượng 0,5 - 1 mcg/1g bùn khô. Nếu ủ bùn trong điều kiện kỵ khí hàm lượng vitamin B₁₂ có thể tăng lên. Có thể chiết lấy vitamin B₁₂ thô từ bùn rồi bổ sung vào thức ăn chăn nuôi gà lợn. Hiện nay không sử dụng phương pháp này để sản xuất mà chỉ để kiểm tra độ ô nhiễm môi trường.

4.3.2. Chiết từ nước thải của công nghiệp kháng sinh

Một số xạ khuẩn như *Streptomyces griseus* sinh tổng hợp streptomycin, *Str. aureofaciens* tạo ra tetracyclin, *Str. rimosus* tạo oxytetracyclin..., ngoài các kháng sinh còn sinh tổng hợp ra 1 lượng vitamin B₁₂ từ 0,5 ÷ 1cg/ml môi trường. Vì vậy sau khi chiết kháng sinh là sản phẩm chính người ta còn chiết lấy vitamin B₁₂ từ nước thải bỏ đi đó. Từ 100 lít nước thải có thể thu được 40 mg vitamin B₁₂.

4.3.3. Lên men sinh tổng hợp

Chủng giống: trong sản xuất dùng vi khuẩn *Propionibacterium shermanii* vì cho hiệu suất cao nhất.

Đặc điểm hình thái chủng vi khuẩn sinh vitamin B₁₂: vi khuẩn *Propionibacterium shermanii* thuộc Gram (+), là trực khuẩn nhỏ, xếp thành đôi hoặc chuỗi ngắn không di động, sống kỵ khí hay hiếu khí không bắt buộc. Trong điều kiện kỵ khí có hình cầu đường kính 0,5 - 0,6 µm, trong điều kiện hiếu khí lại có hình que. Phát triển mạnh mẽ khi ở điều kiện kỵ khí.

Điều kiện nuôi cấy: sinh trưởng trong phạm vi pH 4,5 - 7,5 nhưng thích hợp nhất là pH = 6,8 - 7,0. Nhiệt độ thích hợp cho sinh tổng hợp vitamin B₁₂ là 28 - 30°C. Giới hạn tối đa cho sinh tổng hợp là 32°C.

Nguồn carbon: lên men được nhiều loại đường nhưng thích hợp nhất là glucose.

Nguồn nitơ: các acid amin, các muối amoi. Methionin có tác dụng làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp B₁₂ từ 10 - 12%.

Các ion kim loại: bổ sung một lượng nhỏ muối cobalt (clorid hoặc nitrat) sẽ tăng đáng kể hiệu suất sinh tổng hợp B₁₂, còn các kim loại sắt, đồng, kẽm, mangan làm giảm hiệu suất sinh tổng hợp B₁₂ nhất là sắt.

Các vitamin: có tác dụng kích thích sinh trưởng và làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp vitamin B₁₂ gồm (thiamin, biotin, acid nicotinic, acid folic...).

4.4. Quy trình sản xuất

Môi trường thạch giữ giống có thành phần gồm (%):

Glucose	3,0
Cao ngô	0,5
KH ₂ PO ₄	0,1
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,01
Agar-agar	1,0
pH	6,8 ÷ 7,2

Khử trùng 110°C/20 phút, cấy vi khuẩn và nuôi trong điều kiện kỵ khí bắt buộc ở 30°C trong 72 giờ.

Môi trường nhân giống (%):

Glucose	3,0
Cao ngô	1,5
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,015
pH	6,8 ÷ 7,2.

Khử trùng 115°C/30'. Nuôi giống trong điều kiện kỵ khí ở 30°C/48 giờ. Cấy giống với tỷ lệ 10% là thích hợp.

Môi trường lên men tạo vitamin B₁₂ (%):

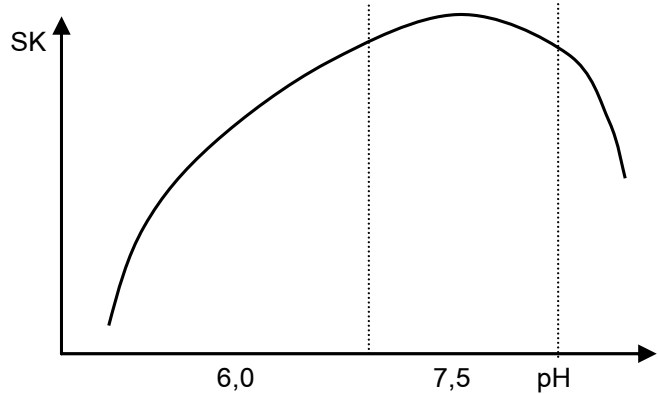
Glucose	8,0
Cao ngô	2,5
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,015
5,6 DMB	0,015
pH	6,8 ÷ 7,2

Khử trùng 115°C/30 phút. Lên men trong 6 - 7 ngày.

Vi khuẩn *Propionibacterium shermanii* sống kỵ khí tùy thích nhưng không thể phát triển được trong điều kiện hiếu khí mạnh. Hàm lượng vitamin B₁₂ tạo thành nhiều trong điều kiện kỵ khí, do đó trong 50h đầu nếu hiếu khí sẽ làm giảm sinh khối và hiệu suất sinh tổng hợp. Trong lên men công nghiệp nhất thiết phải kỵ khí ở 2 - 3 ngày đầu, từ ngày thứ tư thổi khí nhẹ hoặc cách 1 giờ cấp khí khoảng 15 phút.

Vi khuẩn *Propionibacterium shermanii* sinh trưởng trong phạm vi pH 4,5 - 7,5 nhưng vitamin B₁₂ tích tụ cao nhất ở pH = 6,8 - 7,2 (hình 6.1). Trong quá

trình lên men vi khuẩn phát triển sẽ tạo ra acid propionic làm pH môi trường giảm xuống. Một trong những dấu hiệu của quá trình lên men tốt là pH môi trường nuôi cấy giảm rõ rệt trong những ngày đầu. Vì vậy luôn luôn phải kiểm tra pH môi trường và điều chỉnh bằng amoniac để giữ pH luôn bằng 7,0.



Hình 6.4. Ảnh hưởng của pH môi trường đến tốc độ sinh trưởng của *Propionibacterium shermanii*

Môi trường nhân giống và môi trường lên men về cơ bản giống nhau, tuy nhiên ở môi trường lên men lượng glucose cần nhiều hơn và cần bổ sung tiền chất 5,6 DMB (dimethylbenzylimidazol) với nồng độ 1 - 10 mg/l. Do vi khuẩn có khả năng tạo thành hàng loạt chất tương tự vitamin B₁₂ nên cần bổ sung 5,6 DBM là base trong nucleotid của vitamin B₁₂, nó có nhiệm vụ chuyển toàn bộ các nhân tố B thành vitamin B₁₂ thật và hiệu suất sinh tổng hợp cao hơn. Thời gian bổ sung 5,6 DMB có thể bất kỳ nhưng nếu cho muện quá nhân tố B chưa kịp chuyển hết thành vitamin B₁₂ sẽ làm giảm hiệu suất sinh tổng hợp.

Thời gian lên men kéo dài 6 - 7 ngày. Ba ngày đầu nuôi kỵ khí rồi bổ sung 5,6 DMB vào giờ thứ 72. Nếu cho muện quá nhân tố B không chuyển hết thành vitamin B₁₂ được. Trên qui mô 100 m³ hiện nay hiệu suất có thể đạt 80 ÷ 100mg/1 lít môi trường.

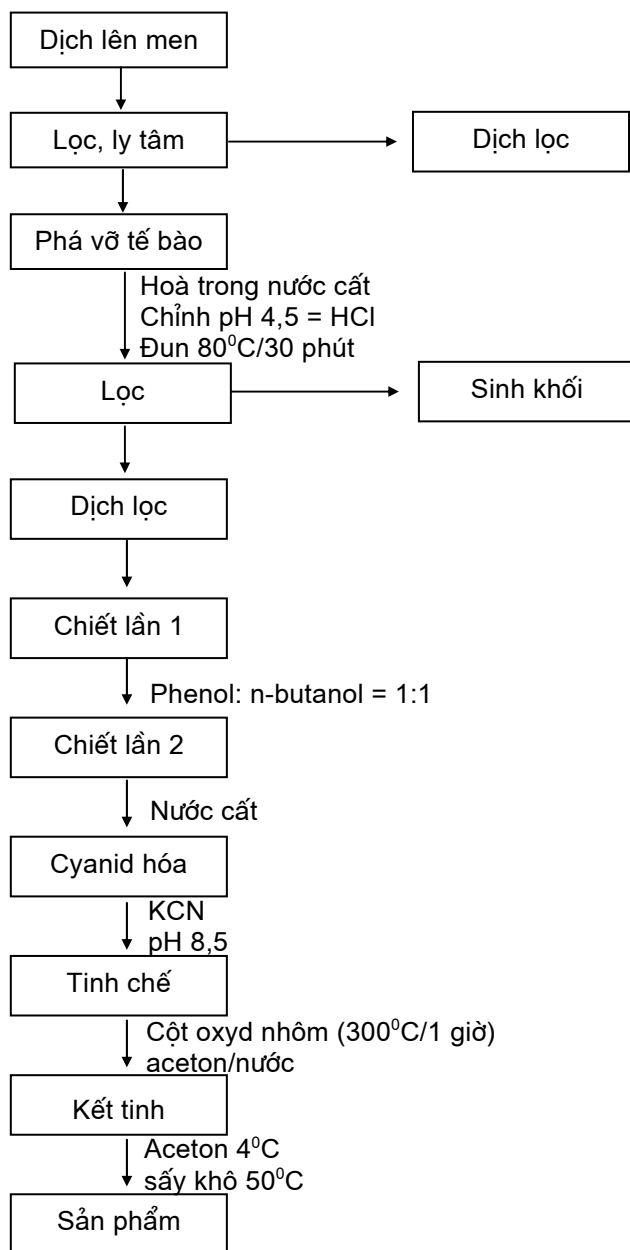
4.5. Quy trình chiết xuất

Vitamin B₁₂ là sản phẩm nội bào nên tồn tại trong sinh khối vi khuẩn. Sau khi kết thúc lên men, dịch lên men được đem lọc hoặc ly tâm thu lấy sinh khối, loại dịch trong. Tiến hành chiết xuất bằng dung môi hữu cơ hoặc nhựa trao đổi ion.

Hoà sinh khối vào nước tạo hỗn dịch và chỉnh pH về 4,5 bằng HCl 10% và thêm chất ổn định. Đun nóng hỗn dịch lên 80°C trong 30 phút để giải phóng vitamin B₁₂ vào dung dịch. Lọc lấy dịch lọc, bỏ bã hoặc tận thu làm thức ăn chăn nuôi. Chiết vitamin B₁₂ từ dung dịch nước sang pha hữu cơ bằng hỗn hợp dung môi phenol: n-butanol (1:1) với tỷ lệ V pha hữu cơ: V pha nước là 1:10. Dịch chiết hữu cơ này được pha loãng bằng tricrezol và carbon tetrachlorid (CCl₄) – sau đó chiết vitamin B₁₂ trở lại pha nước nhiều lần bằng nước.

Chỉnh pH pha dung dịch nước về 8,0 - 8,5 và tiến hành cyanid hoá. Sử dụng KCN để chuyển dạng vitamin B₁₂ coenzym thành Cyanocobalamin trong 3 giờ. Chỉnh pH về trung tính, cô chân không ở ≤ 60°C đến nồng độ vitamin B₁₂ đạt khoảng 10.000 mcg/ml.

Quá trình tinh chế Vitamin B₁₂ được tiến hành trên cột oxyd nhôm (Brochman alumium oxide) đã hoạt hoá 300°C/1 giờ. Hấp phụ dung dịch vitamin B₁₂ lên cột trong dung dịch aceton - nước 75%. Chuyển dịch vitamin B₁₂ trên cột bằng aceton - nước (80%). Sau đó phản hấp phụ bằng aceton - nước (50%) thu lấy phân đoạn đậm đặc nhất. Pha loãng dịch đậm đặc bằng aceton, khuấy nhẹ và để kết tinh 12 giờ ở 4°C. Lọc thu tinh thể hình kim màu đỏ đậm, rửa bằng aceton nguyên chất và sấy khô ở nhiệt độ thấp ($\leq 50^{\circ}\text{C}$). Trong công nghiệp sản xuất vitamin B₁₂ hiện nay người ta dùng phương pháp chiết bằng nhựa hấp phụ XAD₂ (hình 6.5)



Hình 6.5a. Các công đoạn chiết xuất và tinh chế vitamin B₁₂ bằng dung môi hữu cơ

Vitamin B₁₂ tinh thể phải có hàm lượng $\geq 95\%$. Định lượng vitamin B₁₂ bằng quang phổ tử ngoại ở bước sóng 361 nm. Cũng có thể định lượng vitamin B₁₂ bằng phương pháp vi sinh vật - chủng kiểm định là *E. coli* M113-3.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Trình bày quy trình lên men sinh tổng hợp acid glutamic và các phương pháp chế tạo mì chính.
2. Trình bày quy trình lên men sinh tổng hợp, phương pháp tinh chế và chế tạo dextran được dụng.
3. Kể tên các phương pháp sản xuất vitamin B₁₂.
4. Trình bày quy trình sản xuất vitamin B₁₂ bằng phương pháp lên men *Propionibacterium shermanii*.

PHẦN II. CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT KHÁNG SINH

Chương 7

ĐẠI CƯƠNG VỀ KHÁNG SINH

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. Các bước cần tiến hành khi đi tìm một chất kháng sinh dùng trong y học.
2. Các phương pháp gây đột biến vi sinh vật để nâng cao hiệu suất.
3. Các ứng dụng kháng sinh ngoài lĩnh vực y học.

Hiện nay các nhà khoa học đã thông báo phát minh ra hơn 8.000 chất kháng sinh, trong đó có khoảng hơn 100 chất đã được nghiên cứu kỹ và đưa vào sử dụng trong y học và một số lĩnh vực khác. Các chất còn lại hoặc là độc tính cao, hoặc là mất tác dụng khi vào cơ thể. Do vậy việc tìm ra một kháng sinh mới là rất khó. Nếu không có phương pháp đặc biệt sẽ dễ nhầm lẫn với các kháng sinh đã được phát hiện làm tiêu tốn công sức và tiền của vô ích. Ví dụ: theo tính toán của các nhà khoa học Mỹ, muốn phát minh ra một kháng sinh có hoạt phổ rộng cần 55 nhà khoa học làm việc liên tục 2,5 năm để phân tích 100 ngàn mẫu đất và tiêu tốn khoảng 4 triệu đôla. Để phát minh ra một kháng sinh điều trị lao cần 11 năm nghiên cứu và tiêu tốn vài triệu đôla.

Vậy thì nguyên nhân nào đã kích thích các nhà nghiên cứu, các hãng sản xuất dược phẩm lớn lao vào con đường nghiên cứu tìm ra các kháng sinh mới? Có lẽ do các nguyên nhân sau đây:

1. Nhiều chất kháng sinh là những hoá trị liệu không có gì thay thế được để điều trị các bệnh nhiễm trùng hiểm nghèo, bệnh ung thư.
2. Một số kháng sinh mang lại hiệu quả cao cho cây trồng và vật nuôi.
3. Ngày càng có nhiều vi sinh vật gây bệnh kháng lại thuốc kháng sinh nên phải nghiên cứu tìm ra các chất kháng sinh mới thay thế các chất kháng sinh cũ ít còn tác dụng.
4. Một vài kháng sinh dùng bảo quản có hiệu quả các thực phẩm như cá, thịt, phomát v.v...

Vì vậy nghiên cứu để phát minh ra các chất kháng sinh mới luôn là vấn đề thời sự hấp dẫn các nhà kinh tế và các nhà nghiên cứu thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau như: vi sinh vật học, hoá sinh học, di truyền học, hoá học, dược lý học và các nhà kỹ thuật... Nghiên cứu kháng sinh là ví dụ điển hình về sự kết hợp nhiều nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực khác nhau, chỉ có biết phối hợp chặt chẽ mới đem lại thắng lợi và hiệu quả.

1. ĐỊNH NGHĨA KHÁNG SINH

Có rất nhiều định nghĩa khác nhau về chất kháng sinh, song có thể nêu lên một định nghĩa được coi là hoàn chỉnh nhất: "*Kháng sinh là những sản phẩm đặc biệt nhận được từ vi sinh vật hay các nguồn tự nhiên khác có hoạt tính sinh học cao, có tác dụng kìm hãm hoặc tiêu diệt một cách chọn lọc lên một nhóm vi sinh vật xác định (vi khuẩn, nấm, protozoa...) hay tế bào ung thư*" ở nồng độ thấp.

Cần phân biệt một số chất cũng do vi sinh vật tạo ra nhưng không được gọi là kháng sinh như: rượu ethylic, các acid hữu cơ... vì chúng tác dụng lên vi sinh vật khác không mang tính chọn lọc và ở nồng độ cao.

2. ĐƠN VỊ KHÁNG SINH

Để biểu thị độ lớn giá trị hoạt tính của chất kháng sinh - trong 1 ml (đv/ml) dung dịch hay 1 mg chế phẩm (đv/mg) thường dùng đơn vị (đv) kháng sinh. Đó chính là lượng kháng sinh tối thiểu hoà tan trong một thể tích môi trường xác định có tác dụng ức chế hay tiêu diệt vi sinh vật kiểm định.

Ví dụ: Đơn vị hoạt tính của penicillin G là lượng penicillin G ít nhất hoà tan vào 50 ml canh thang có tác dụng ức chế sự phát triển của *Staphylococcus aureus* 209 P. Đơn vị hoạt tính của Streptomycin là lượng Streptomycin ít nhất hoà vào 1 ml canh thang có tác dụng ức chế sự phát triển của *E. coli*... Vì mỗi kháng sinh có đơn vị hoạt tính sinh học riêng nên phải ghi rõ để tiện khi sử dụng. Ví dụ: penicillin G 1 đơn vị bằng 0,6 mcg, nghĩa là 1mg chứa 1.667 đơn vị; còn streptomycin 1 đơn vị = 1 mcg (1 mg = 1.000 đv); 1mg Neomycin chứa 300 đơn vị (1 đv = 3,3 mcg); 1 đơn vị bacitracin chứa 20 mcg...

3. PHÂN LOẠI KHÁNG SINH

Danh sách các chất kháng sinh được phát minh ngày càng dài thêm mãi. Việc phân loại các kháng sinh là cần thiết vì nó giúp cho các nhà khoa học tốn ít thời gian khi nghiên cứu các kháng sinh mới về cấu trúc hoá học, cơ chế tác dụng, độc tính...

Có thể phân loại kháng sinh theo nguồn gốc (kháng sinh do xạ khuẩn, vi khuẩn, nấm) tạo ra. Song có chất kháng sinh do một vài loài vi sinh vật cùng tạo ra thì xếp sắp thế nào, do đó cách sắp xếp này không thích hợp. Có thể phân loại kháng sinh theo cơ chế tác dụng (kháng sinh tác dụng lên thành tế

bào, lên tổng hợp protein, tổng hợp ADN, ARN ...). Cách phân loại này thích hợp cho các nhà Dược lý học. Các nhà Hoá học thì đề nghị phân loại kháng sinh theo cấu trúc hoá học. Phân loại kháng sinh theo cấu trúc hoá học là khoa học nhất vì nó giúp cho người nghiên cứu nhanh chóng định hướng được các đặc điểm của chất kháng sinh mới phát hiện khi biết được cấu trúc hoá học của nó, tránh lãng phí thời gian để nghiên cứu về các đặc điểm khác. Phân loại kháng sinh theo cấu trúc hoá học thường chia ra các nhóm chất sau đây:

- + Các chất kháng sinh có cấu trúc β -lactam (penicillin, cephalosporin)
- + Các kháng sinh chứa nhân thơm (chloramphenicol)
- + Các kháng sinh có cấu trúc aminoglycosid (streptomycin, gentamicin)
- + Các kháng sinh có cấu trúc 4 vòng (các tetracyclin)
- + Các kháng sinh polypeptid (polymyxin, bacitracin)
- + Các kháng sinh macrolid (erythromycin, spiramycin)
- + Các kháng sinh polyen (nystatin, amphotericin B)
- + Các kháng sinh chống ung thư nhóm antracyclin (daunorubicin)
- + Các kháng sinh chống ung thư nhóm actinomycin (dactinomycin D)
- + ...

4. CÁC PHƯƠNG PHÁP PHÂN LẬP VI SINH VẬT SINH KHÁNG SINH

Để phân lập vi sinh vật sinh kháng sinh người ta phải lấy mẫu từ các nguồn cơ chất khác nhau: đất ở ruộng, đất quanh rễ cây, đất nền ở chuồng gia cầm, gia súc, bùn, nước ở sông hồ... Từ các mẫu trên đem phân lập thuần khiết những vi sinh vật sinh kháng sinh mà ta mong muốn bằng các phương pháp đặc trưng và trên các môi trường chọn lọc.

Để phân lập xạ khuẩn thường dùng môi trường có thành phần sau:

Môi trường 1		Môi trường 2	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g	KNO_3	1 g
K_2HPO_4	1 g	K_2HPO_4	3 g
NaCl	1 g	NaCl	0,2 g
MgSO_4	1 g	MgCO_3	0,3 g
Tinh bột	10 g	Tinh bột	10 g
Agar – agar	20 g	FeSO_4	0,001 g
Nước máy vừa đủ	1.000 ml	CaCO_3	0,5g
		Agar - agar	20 g
		Nước máy vừa đủ	1.000 ml

pH trước khi tiệt trùng 6,8 ÷ 7,0

Để phân lập nấm mốc thường sử dụng môi trường có thành phần:

NaNO ₃	6 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄	0,05 g
Saccharose	20 g
Agar – agar	20 g
Nước máy vừa đủ	1.000 ml

pH trước khi tiệt trùng 6,0 ÷ 6,2.

Ví dụ: Đa số vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường có thành phần giàu dinh dưỡng (pepton, canh thang - thạch) ở pH 7,0 và nhiệt độ 30 ÷ 37°C. Trong các điều kiện trên nấm mốc và xạ khuẩn phát triển chậm hơn.

Có thể khái quát hoá thành nguyên tắc để thực hiện dễ dàng như sau:

1. Mỗi chất kháng sinh được tạo ra bởi một hoặc vài loài vi sinh vật xác định. Ví dụ: tetracyclin do *Str. aureofaciens*, *Str. viridifaciens* tạo ra; penicillin do *P. chrysogenum* hoặc *P. notatum* tạo ra.
2. Mỗi loài vi sinh vật xác định có thể sinh tổng hợp ra một hoặc vài chất kháng sinh theo đặc điểm di truyền của chúng. Ví dụ: *Str. fradiae* có thể tạo ra neomycin A, neomycin B, neomycin C. *Str. rimosus* tạo ra oxytetracyclin ... Biết được nguyên tắc trên việc đi tìm các kháng sinh đã được mô tả rất dễ dàng. Ví dụ: muốn có kháng sinh streptomycin chỉ cần phân lập xạ khuẩn thuộc chi *Streptomyces* và loài là *griseus*. Muốn có kháng sinh fumagillin ta cần phân lập nấm mốc thuộc chi *Aspergillus* và loài *fumigatus*. Muốn có kháng sinh gramyxidín chỉ cần phân lập vi khuẩn có bào tử chi *Bacillus* loài *brevis*...

Rõ ràng để phân lập một vi sinh vật cho một chất kháng sinh đã biết công việc không phức tạp lắm, song để phân lập những vi sinh vật sinh chất kháng sinh mới đòi hỏi công việc phức tạp hơn nhiều, nhất là những kháng sinh chống virus và ung thư.

4.1. Phương pháp cấy dịch chiết đất lên bề mặt thạch

Cân chính xác một lượng đất, nghiền trong cối sứ với một lượng nước, sau đó cho vào bình lắc khoảng 5 phút. Dùng nước vô trùng pha loãng thành những nồng độ cần thiết. Nhỏ dung dịch đã pha loãng lên môi trường thạch dinh dưỡng gạt nhẹ lên bề mặt thạch cho phân tán đều. Nuôi trong tủ ấm 30°C, sau một thời gian 3 - 5 ngày xuất hiện các khuẩn lạc mọc riêng rẽ. Cấy tách khuẩn lạc đó lên thạch nghiêng cho thuần khiết, sau đó nghiên cứu hoạt tính kháng sinh của các vi sinh vật phân lập được.

4.2. Phương pháp cấy đất trực tiếp lên bề mặt thạch đã chứa sẵn vi sinh vật kiểm định

Trên hộp petri có môi trường dinh dưỡng và chứa vi sinh vật kiểm định, đem gieo cấy trực tiếp các "hạt" đất lên bề mặt thạch, để ủ ấm 24 - 48 giờ mang ra quan sát. Nếu xung quanh các hạt đất có vòng vô khuẩn, ta biết được vi sinh vật trong hạt đất đó có sinh ra chất kháng sinh chống lại vi sinh vật kiểm định. Từ cục đất đó ta tiến hành phân lập và được vi sinh vật sinh kháng sinh để nghiên cứu tiếp. Phương pháp này cho biết được ngay là vi sinh vật đối kháng phân lập được có khả năng ức chế được vi sinh vật gây bệnh thuộc loại gì.

4.3. Phương pháp làm giàu đất

Đất trước khi đem phân lập vi sinh vật sinh kháng sinh được đưa vào chậu thủy tinh, giữ độ ẩm xác định - thỉnh thoảng ta lại cho thêm một ít vi sinh vật kiểm định vào, trộn đều. Nuôi ở tủ ấm sau một thời gian đem ra phân lập theo phương pháp nêu ở mục 4.1. Bằng phương pháp này người ta dễ dàng thu được vi sinh vật đối kháng với vi sinh vật kiểm định mặc dù ban đầu vi sinh vật đối kháng đó có trong đất rất ít.

4.4. Phương pháp thêm kháng sinh vào trong môi trường phân lập

Xạ khuẩn phát triển chậm hơn vi khuẩn và nấm mốc. Vì vậy để dễ dàng phân lập xạ khuẩn, người ta cho thêm kháng sinh chống nấm và kháng khuẩn với nồng độ từ 5 - 25 mcg/ml vào môi trường phân lập. Các kháng sinh thường dùng là: tetracyclin, neomycin, nystatin, streptomycin, penicillin, chloramphenicol. Bằng cách này người ta dễ dàng phân lập được xạ khuẩn sinh chất kháng sinh.

4.5. Phân lập vi sinh vật sinh kháng sinh chống ung thư

Hầu hết các kháng sinh chống ung thư vừa có tác dụng tiêu diệt tế bào ung thư, lại vừa có tác dụng tiêu diệt tế bào vi khuẩn. Vì vậy để sàng lọc các vi sinh vật tạo ra kháng sinh chống ung thư ta có thể dùng vi khuẩn làm mô hình để thử ban đầu, vừa đỡ nguy hiểm vừa đỡ tốn kém. **Nguyên lý của phương pháp** có thể tóm tắt như sau: trao đổi chất của tế bào ung thư khác với tế bào bình thường. Sự khác biệt đó được đặc trưng ở bộ máy hô hấp của tế bào, đo cường độ hô hấp của tế bào nhận thấy cường độ hô hấp của tế bào ung thư thấp hơn nhiều so với tế bào bình thường. Trên cơ sở đó Gauze (1958) đã nêu ý kiến dùng tác nhân gây đột biến các tụ cầu để nhận được các chủng đột biến có cường độ hấp thu oxy thấp hơn chủng ban đầu từ 20-80% làm vi sinh vật kiểm định để thử tác dụng chống ung thư của kháng sinh. Umesawa (1961) đã sử dụng các nấm men đột biến có cường độ hô hấp thấp làm test để thử tác dụng chống ung thư của kháng sinh. Sau đó so sánh độ nhạy của phương pháp dùng tế bào ung thư và tế bào của vi sinh vật đột biến nhận thấy

dùng vi sinh vật đột biến có độ nhạy hơn. Khi đã chọn lọc ban đầu được chất kháng sinh chống ung thư rồi, cần phải thử tiếp trên các dòng tế bào ung thư in vitro và in vivo để khẳng định chính xác xem chất kháng sinh tìm thấy có tác dụng trên tế bào ung thư hay không? Công việc này hiện nay thực hiện tương đối dễ dàng vì đã có nhiều dòng tế bào ung thư được nuôi cấy thuần chủng trong phòng thí nghiệm.

5. PHƯƠNG PHÁP GÂY ĐỘT BIẾN VI SINH VẬT ĐỂ NÂNG CAO HIỆU SUẤT

Vi sinh vật sinh tổng hợp kháng sinh phân lập được từ cơ chất thiên nhiên thường có hoạt tính rất thấp. Ví dụ: các chủng *Penicillium* phân lập từ đất chỉ đạt từ 30 - 50đv/ml dịch nuôi cấy. Vì vậy để thu được các chủng có hoạt tính cao đưa vào sản xuất đòi hỏi phải cải tạo chọn giống bằng các phương pháp khác nhau và nghiên cứu điều kiện nuôi cấy thích hợp.

5.1. Chọn chủng có hoạt tính cao bằng phép chọn lọc tự nhiên

Các vi sinh vật có sự biến dị tự nhiên theo tần số khác nhau trong ống giống thuần khiết, có cá thể hoạt tính kháng sinh mạnh gấp 10 - 20 lần những cá thể khác. Cần phải chọn lấy cá thể có hoạt tính cao nhất trong ống giống để nghiên cứu tiếp.

Tiến hành cấy giống trên hộp petri sao cho mỗi hộp chỉ có 10 - 20 khuẩn lạc tách riêng biệt, sau đó tiến hành kiểm tra hoạt tính kháng sinh của chúng bằng các cách sau:

- Đổ lớp thạch có chứa vi khuẩn kiểm định lên bề mặt hộp petri đã nuôi vi sinh vật sinh kháng sinh. Đặt hộp petri vào tủ ấm, 24 giờ sau đọc kết quả. Vòng ức chế càng lớn hoạt tính kháng sinh do khuẩn lạc tạo ra càng mạnh.
- Có thể khoan các cục thạch có chứa các khuẩn lạc vi sinh vật sinh kháng sinh đặt lên hộp petri khác đã chứa sẵn vi sinh vật kiểm định, sau đó nuôi ở tủ ấm 24 giờ và đọc kết quả. Từ khuẩn lạc có hoạt tính kháng sinh mạnh nhất cấy ra thạch nghiêng để nghiên cứu tiếp tục. Waskman N.S. và cộng sự (1946) đã sử dụng streptomycin cho vào môi trường nuôi cấy *Str. griseus* là xạ khuẩn sinh ra streptomycin với nồng độ 100 mcg/ml. Kết quả cho thấy chỉ những cá thể nào có khả năng tạo ra streptomycin với nồng độ lớn hơn 100 mcg/ml mới sống sót và phát triển. Đây cũng là phương pháp để chọn các chủng cho hoạt tính cao.

Trong thực tế việc chọn lọc tự nhiên các cá thể có hoạt tính cao chỉ để nghiên cứu ban đầu, nó không có giá trị áp dụng vào sản xuất. Để thu được những chủng có khả năng siêu tổng hợp chất kháng sinh người ta áp dụng phương pháp đột biến nhân tạo.

5.2. Đột biến nhân tạo

Các tác nhân gây đột biến mạnh như tia UV, X hay những hoá chất: iverit, ethylenimin, dimethylsulfat... Cho tác dụng với liều lượng và thời gian thích hợp sẽ giết chết các vi sinh vật. Những cá thể nào nếu còn sống sót sẽ có sự đột biến gen, làm thay đổi các tính trạng dẫn đến hoặc là mất khả năng tạo ra kháng sinh (đột biến âm tính) hoặc làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp kháng sinh lên nhiều lần (đột biến dương tính).

Bảng 7.1. Kết quả chọn giống các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh

Vi sinh vật sinh kháng sinh	Tác nhân gây đột biến	Hiệu suất tạo kháng sinh (đv/ml)	
		Chủng ban đầu	Chủng sau gây đột biến
Penicillin	R, UV, I, EI	220	5200
Streptomycin	R, UV	250	4200
Clotetracyclin	R, UV	600	2200
Erythromycin	UV, EI	500	1000

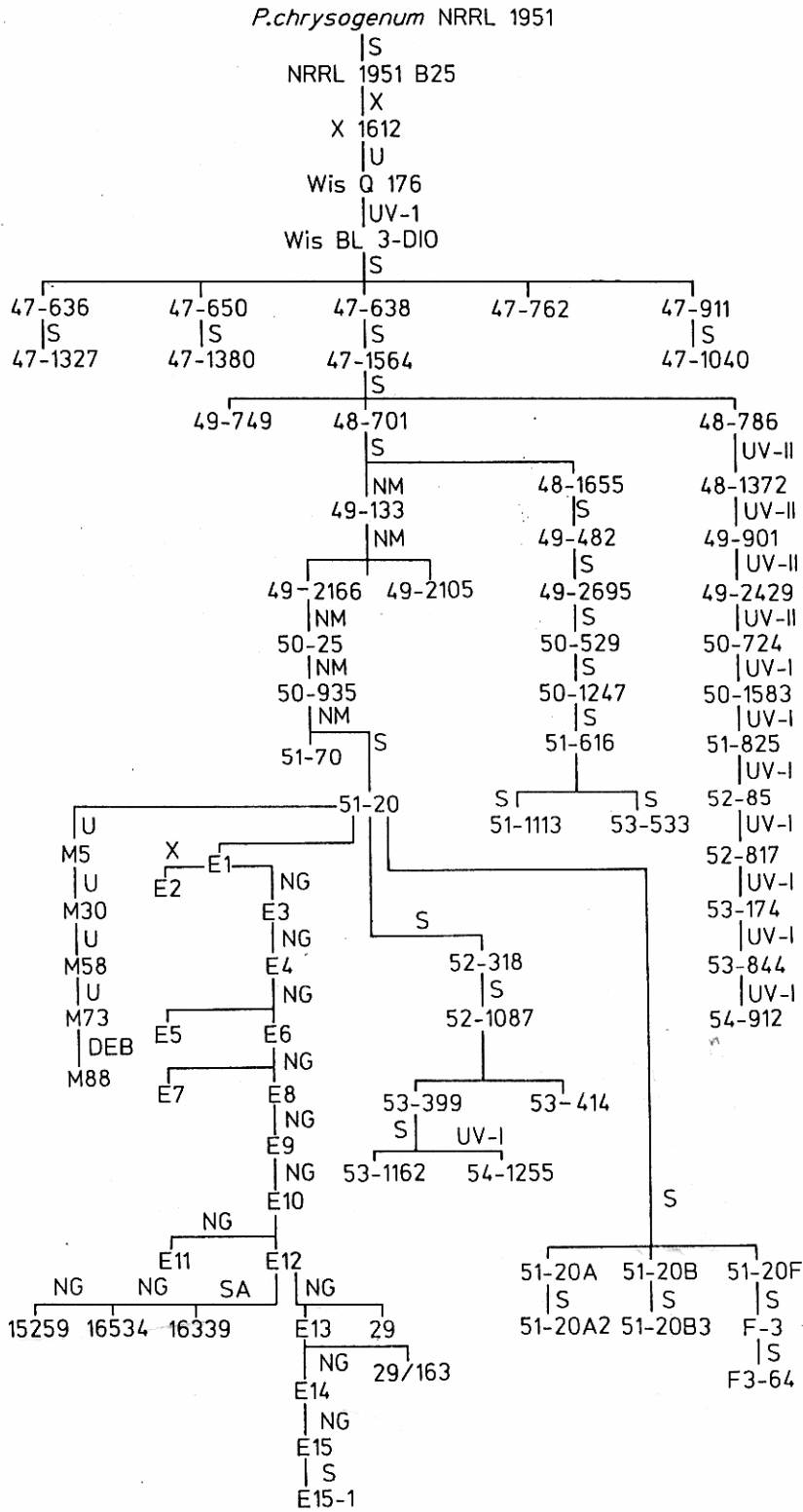
Chú thích: R - Rơnghen UV - Cực tím
I - Iperit EI - Etylenimin

Để tạo ra các chủng có hiệu suất sinh tổng hợp kháng sinh cao phải tiến hành đột biến bậc thang, kết hợp với các phương pháp di truyền phân tử như tái tổ hợp định hướng các gen. Kỹ thuật tách dòng gen, kỹ thuật tạo và dung hợp tế bào trần đã đem lại nhiều kết quả không những nâng cao được hiệu suất sinh tổng hợp của chủng giống mà còn rút ngắn được thời gian tạo giống mới. Sơ đồ chọn giống bậc thang *P. chrysogenum* NRRL 1951 cho thấy sự phức tạp của công việc và lòng kiên trì không biết mệt mỏi của các nhà nghiên cứu để đạt được hiệu quả cho một chủng giống dùng trong công nghiệp sản xuất penicillin (hình 7.1).

6. NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY CÁC CHỦNG VI SINH VẬT SINH KHÁNG SINH PHÂN LẬP ĐƯỢC

Sau khi đã gây đột biến và chọn lọc được các chủng cho năng suất cao cần phải nghiên cứu tiếp điều kiện nuôi cấy thích hợp như: thành phần môi trường, nhu cầu oxy hoà tan, pH, nhiệt độ, tiền chất... có thể tăng hiệu suất lên 2 - 3 lần. Ví dụ: để lên men sản xuất penicillin V người ta cho thêm tiền chất (precursor) là acid phenoxyacetic, để tạo penicillin G cho thêm acid phenylacetic.

Nghiên cứu điều kiện nuôi cấy vi sinh vật sinh kháng sinh là công đoạn quan trọng của công nghệ lên men, nó giúp cho việc tối ưu hoá các thông số của kỹ thuật lên men và làm tăng năng suất sinh tổng hợp, hạ giá thành sản phẩm.



Hình 7.1. Sơ đồ đột biến chọn giống *P. chrysogenum*

7. NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ KHÁNG SINH

Kháng sinh là những sản phẩm trao đổi chất thứ cấp. Tùy theo đặc tính của loài mà sản phẩm thứ cấp đó được tiết vào môi trường nuôi cấy (penicillin, streptomycin...) hay giữ lại trong tế bào (gramicidin, tetracyclin...). Để thu lấy các hoạt chất có độ tinh khiết cao cần tìm phương pháp chiết thích hợp. Nếu chiết bằng dung môi hữu cơ thì dung môi cần thoả mãn các yêu cầu sau:

- Dung môi dễ kiếm, rẻ tiền, không độc, khó cháy.
- Có tính chọn lọc cao: hoà tan tốt hoạt chất ít hoà tan tạp chất.
- Dễ cất thu hồi.

Có kháng sinh lại chiết bằng phương pháp kết tủa (các tetracyclin, fumagillin...), hoặc bằng nhựa trao đổi ion (kháng sinh nhóm aminoglycosid, polymyxin...), vì vậy phải nghiên cứu chọn được chất phụ gia cho quá trình kết tủa (các amoni bậc 4) hoặc các cationit có dung lượng trao đổi lớn, để phản hấp phụ để không phá huỷ hoạt chất. Kỹ thuật chiết xuất và tinh chế kháng sinh thích hợp làm cho sản phẩm đạt chất lượng cao, bảo quản được lâu hơn đồng thời còn làm tăng tỷ lệ thu hồi và hạ giá thành sản phẩm. Ví dụ: trong những năm 60 - 70 tỷ lệ chiết xuất penicillin từ môi trường lên men chỉ đạt 60 - 70%. Hiện nay tỷ lệ đó đã đạt 90 - 92%.

8. NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN VÀ ĐỘC TÍNH

Sau khi chiết xuất và tinh chế được kháng sinh tinh khiết, phải kiểm tra hoạt lực của nó (phổ tác dụng) đối với vi sinh vật kiểm định: vi khuẩn Gram (+), Gram (-), nấm... xác định được MIC (nồng độ tối thiểu có tác dụng ức chế). Ngoài ra còn phải kiểm tra độ vô trùng của kháng sinh xem có lẫn vi sinh vật lạ, đặc biệt các bào tử của vi sinh vật gây bệnh. Để làm được việc đó phải khử hoạt tính của kháng sinh, sau đó cấy trên các môi trường đặc biệt: canh thang, thạch máu..., khử hoạt tính penicillin bằng penicillinase hay clohydrat hydroxylamin; streptomycin khử bằng hydroxylamin hay cystein. Nhiều kháng sinh không có chất khử đặc trưng thì độ vô trùng của nó chỉ xác định được đối với những vi sinh vật không bị tác dụng của kháng sinh đó.

Độc tính kháng sinh được kiểm tra bằng động vật thí nghiệm. Người ta thường dùng chuột, tiêm tĩnh mạch, phúc mạc hay dưới da, uống các liều lượng kháng sinh cần nghiên cứu. Theo dõi chúng cẩn thận sau 12 - 15 ngày thí nghiệm mới có kết luận về độc tính của kháng sinh đem thử.

9. NGHIÊN CỨU VỀ DƯỢC LÝ VÀ ĐIỀU TRỊ CỦA KHÁNG SINH

Tác dụng điều trị của kháng sinh được tiến hành trên động vật thí nghiệm (thường dùng chuột). Tiến hành gây bệnh thực nghiệm cho động vật bằng một loại vi sinh vật gây bệnh xác định. Thường sử dụng liều gây chết 50% động vật thí nghiệm (LD_{50}) và liều gây chết 100% động vật thí nghiệm

(LD₁₀₀). LD₅₀ được coi là liều gây chết tối thiểu. Chia động vật thí nghiệm thành 3 nhóm:

- Nhóm 1: dùng kháng sinh điều trị ngay sau khi gây nhiễm động vật bằng vi khuẩn gây bệnh.
- Nhóm 2: dùng kháng sinh điều trị sau khi gây nhiễm động vật ít nhất 5 giờ. Trong cả 2 trường hợp trên được phép dùng kháng sinh với liều tối đa để cứu sống động vật thí nghiệm.
- Nhóm 3: là nhóm đối chứng.

Dựa vào số lượng động vật sống sót mà kết luận về tác dụng điều trị của kháng sinh. Liều kháng sinh tối thiểu cứu được động vật thoát chết là liều điều trị tối thiểu. Mỗi kháng sinh dùng trong điều trị đều có độc tính nhất định. Nếu liều điều trị thấp hơn độ độc cho phép thì kháng sinh đó được sử dụng trong điều trị. Trong tất cả các trường hợp liều điều trị bằng hoặc gần với liều độc thì không cho phép sử dụng kháng sinh đó trong y học.

10. TIÊU CHUẨN ĐỐI VỚI MỘT KHÁNG SINH

Kháng sinh là những hoá trị liệu, nhiều kháng sinh được phát hiện (> 8.000 chất) nhưng chỉ có khoảng 150 chất được ứng dụng trong y học. Trong số đó cũng chỉ có khoảng 30 chất được ứng dụng rộng rãi. Những kháng sinh còn lại không được sử dụng phần vì chúng độc hại với cơ thể hoặc bị giảm tác dụng khi tiếp xúc với dịch cơ thể. Những yêu cầu của y học đối với một kháng sinh là:

- Kháng sinh phải không độc hoặc rất ít độc đối với cơ thể.
- Hoạt tính kháng khuẩn phải nhanh và mạnh đối với vi sinh vật gây bệnh.
- Dễ hoà tan trong nước và bền vững khi bảo quản lâu dài.
- Hoạt tính kháng khuẩn không bị giảm khi tiếp xúc với dịch cơ thể.

Trên thực tế, ngoài penicillin ra không có một kháng sinh nào thoả mãn cả 4 yêu cầu trên. Vì vậy người thầy thuốc điều trị phải hiểu biết đầy đủ về cơ chế tác dụng và các phản ứng phụ của kháng sinh để kê đơn chính xác, nên phối hợp các kháng sinh với nhau hoặc kháng sinh với các chế phẩm khác để tăng cường tác dụng điều trị, giảm các phản ứng phụ và độc tính.

11. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG KHÁNG SINH

Định lượng kháng sinh trong môi trường nuôi cấy hay trong các chế phẩm được thực hiện bằng các phương pháp hoá học, hoá lý hay sinh học. Phương pháp sinh học rất hay dùng vì tương đối chính xác lại không đòi hỏi thiết bị đắt tiền.

11.1. Phương pháp vi sinh vật

Định lượng kháng sinh bằng vi sinh vật dựa trên nguyên tắc kháng sinh tác dụng kìm hãm sự phát triển của vi sinh vật kiểm định; so sánh tác dụng với kháng sinh chuẩn đã biết sẽ tính toán được hàm lượng của kháng sinh cần phân tích. Tuy nhiên phương pháp vi sinh vật cũng có một số nhược điểm, phụ thuộc vào nhiều yếu tố bên ngoài nên độ chính xác cho phép $\pm 5\%$.

11.1.1. Phương pháp pha loãng liên tục

Dùng để định lượng kháng sinh trong dịch nuôi cấy hay trong dịch chiết. *Nguyên tắc*: pha loãng kháng sinh trong môi trường canh thang (trong suốt) trong các ống nghiệm đã tiệt trùng thành các nồng độ khác nhau:

1 : 10 ; 1 : 20 ; 1 : 40 ; 1 : 80 ; 1 : 160...

hay 1 : 100 ; 1 : 200 ; 1 : 300 ; 1 : 4001 : 800...

hay 1 : 2 ; 1 : 4 ; 1 : 8 ; 1 : 16 ; 1 : 32...

Tại mỗi nồng độ kháng sinh trong các ống nghiệm đó, cho vào một lượng xác định vi sinh vật kiểm định. Đặt các ống nghiệm vào tủ ấm $37^{\circ}\text{C}/20 - 24$ giờ đem ra đọc kết quả. Nếu ống nào trong suốt tức là tại nồng độ pha loãng đó kháng sinh đã giết chết vi sinh vật kiểm định.

Ví dụ: định lượng Streptomycin trong môi trường nuôi cấy *Str. griseus*. Dung dịch streptomycin chuẩn 10mcg/ml.

Tiến hành theo bảng sau:

Kháng sinh	Số ống nghiệm											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Độ pha loãng	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:28	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
Streptomycin chuẩn 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Streptomycin thử	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Chú thích: dấu (-) vi khuẩn bị giết chết
 dấu (+) vi khuẩn phát triển

Ở ống nghiệm số 5 (độ pha loãng 1:32) của kháng sinh chuẩn vi khuẩn kiểm định không phát triển được.

Và ống số 10 (độ pha loãng 1:1024) của dịch kháng sinh cần định lượng vi khuẩn kiểm định không phát triển được. Có thể tính toán nồng độ kháng sinh theo công thức sau:

$$X = \frac{Dt}{Dc} \times X_o$$

trong đó:

Dc: độ pha loãng của kháng sinh chuẩn

Dt: độ pha loãng của kháng sinh thử

X: nồng độ kháng sinh cần định lượng

X_o: nồng độ ban đầu của kháng sinh chuẩn

trong thí nghiệm trên ta có:

$$X = \frac{1024}{32} \times 10 = 320 \text{mcg / ml}$$

Để kết quả được chính xác khi định lượng kháng sinh bằng phương pháp pha loãng cần chú ý những điểm sau:

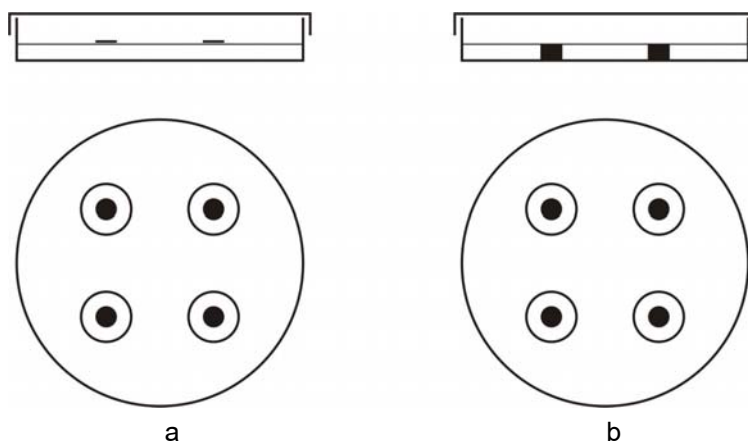
- (1) Dùng môi trường để pha loãng có thành phần ổn định
- (2) Thao tác phải tuyệt đối vô trùng
- (3) Lượng vi khuẩn kiểm định cho vào các ống nghiệm phải bằng nhau.
- (4) Thời gian ủ để cho vi sinh vật kiểm định phát triển phải hằng định.

Có thể pha loãng kháng sinh cần thử vào môi trường thạch - canh thang sau đó đổ ra hộp petri dẹt thạch đông ta cấy các vi sinh vật kiểm định vào, để tủ ấm cho vi sinh vật phát triển sau 20 - 24 giờ mang ra đọc kết quả. Ưu điểm của phương pháp này là trên 1 hộp Petri ta có thể thử nhiều vi sinh vật kiểm định.

11.1.2. Phương pháp khuếch tán trên thạch

Nguyên tắc: kháng sinh khuếch tán vào môi trường thạch có chứa vi sinh vật kiểm định tạo ra các vòng ức chế sự phát triển của vi sinh vật kiểm định. Đo độ lớn của vòng ức chế kháng sinh chuẩn và kháng sinh thử rồi tính toán hay tra bảng tính sẵn nồng độ sẽ cho kết quả cần phân tích.

Phương pháp khuếch tán trên thạch rất hay dùng để định lượng kháng sinh. Song để chính xác cần lưu ý đến chất lượng thạch, độ dày lớp thạch, pH môi trường và nhiệt độ nuôi cấy. Những kháng sinh polypeptid rất khó khuếch tán trong thạch, nên thường cho vào môi trường định lượng các chất làm tăng độ khuếch tán của kháng sinh (CaCl₂ làm tăng khả năng khuếch tán của gramicidin C). Hoặc đặt các hộp petri có vi khuẩn kiểm định vào tủ lạnh (+ 4°C) trong khoảng 5 - 6 giờ để kháng sinh kịp khuếch tán vào trong thạch, sau đó mới đem để tủ ấm 37°C cho vi khuẩn phát triển (hình 7.2).



Hình 7.2. Các phương pháp định lượng kháng sinh

a. Định lượng kháng sinh dùng phương pháp khoan giấy lọc

b. Định lượng kháng sinh dùng phương pháp đục lỗ thạch

11.2. Phương pháp hoá học và hoá lý

Trong thực tế một số kháng sinh được định lượng bằng phương pháp hoá học và hoá lý. Ưu điểm của phương pháp này là thực hiện nhanh, cho kết quả ngay. Để định lượng penicillin bằng phương pháp hoá học tiến hành như sau: phá huỷ penicillin bằng kiềm, trung hoà rồi oxy hoá các sản phẩm phân huỷ bằng iod. Định lượng iod thừa bằng Natri thiosulfat sẽ tính được iod đã tiêu thụ cho phản ứng oxy hoá và từ đó tính ra hàm lượng penicillin.

Nguyên tắc của phương pháp hoá lý dựa trên phản ứng tạo màu của kháng sinh hoặc sản phẩm phân huỷ của chúng rồi đo bằng quang phổ tử ngoại hoặc máy so màu rồi tính kết quả.

Ví dụ: để định lượng các kháng sinh nhóm tetracyclin cho tạo phức với FeCl_3 ; đo phổ tử ngoại xác định sự biến mất các đỉnh hấp thụ cực đại của kháng sinh sau khi phân huỷ bằng kiềm.

Phương pháp so màu định lượng erythromycin dựa trên phản ứng tạo màu của kháng sinh với acid sulfuric (27N). Định lượng kháng sinh bằng phương pháp nào là chính xác và thuận tiện đã được qui định rõ trong các dược điển của mỗi nước. Chỉ các kháng sinh đã được kiểm nghiệm theo các qui định ở trong dược điển mới có giá trị về pháp lý.

12. ỨNG DỤNG KHÁNG SINH NGOÀI LĨNH VỰC Y HỌC

Sau khi penicillin được áp dụng điều trị bệnh nhiễm trùng cho người vào năm 1943 người ta đã nghiên cứu ngay việc ứng dụng penicillin vào chữa bệnh cho gia súc. Các nhà nghiên cứu và nhà kinh tế kết hợp với nhau rất chặt chẽ nhằm phát huy tính hiệu quả tối đa của kháng sinh.

12.1. Kháng sinh dùng trong chăn nuôi

Gia súc, gia cầm cũng bị vi sinh vật gây bệnh tấn công gây chết hàng loạt. Bác sĩ thú y đã sử dụng kháng sinh làm vũ khí hữu hiệu để điều trị các bệnh cho động vật. Kháng sinh griseoviridin dùng điều trị bệnh viêm phổi cấp, viêm vú của trâu, bò, metimyxin hoặc chloramphenicol dùng điều trị các bệnh do *Brucella* gây ra; fumagillin điều trị bệnh ỉa chảy do *Protozoa* gây ra ở ong làm chết cả đàn ong.

Kháng sinh còn được sử dụng như chất kích thích tăng trọng đàn gia súc, gia cầm. Giảm chi phí thức ăn; kích thích tăng sản lượng trứng ở gà, vịt. Ở Mỹ, các nước Tây Âu và Nhật dùng bacitraxin, flavomycin, avoparxin, monenzin làm chất kích thích tăng trọng. Một số nước khác còn dùng kháng sinh nhóm tetracyclin. Các chế phẩm Biovit (biomycin và vitamin B₁₂), Terravit (teramycin + Vitamin B₁₂) là chất kích thích tăng trọng lợn, gà, vịt. Thường bổ sung Biovit hay Terravit có hàm lượng 15 - 20 g kháng sinh và 8 - 12 mg vitamin B₁₂ vào 1 tấn thức ăn cho lợn, gà vừa phòng được bệnh ỉa chảy, vừa kích thích tăng trọng đến 20 - 25% so với lô chứng. Về cơ chế kích thích tăng trọng của vật nuôi bằng kháng sinh ở nồng độ thấp có nhiều công trình nghiên cứu nhưng vẫn chưa rõ. Người ta giải thích có thể do hai nguyên nhân sau đây:

12.1.1. Tác dụng của kháng sinh lên hệ vi khuẩn chí ở ruột

Kháng sinh làm tăng số lượng vi sinh vật có ích trong ruột, tăng cường tổng hợp vitamin, tăng cường tái hấp thu các thức ăn. Làm giảm đi các vi sinh vật có hại thường tiết ra các chất độc, hoặc sử dụng mất các vitamin, kháng sinh làm giảm pH ở ruột, giảm sức căng bề mặt của tế bào và làm tăng cường sự sinh trưởng... Tất cả các nguyên nhân đó đã giúp cho động vật tăng cường trao đổi chất và lớn nhanh hơn.

12.1.2. Tác dụng gián tiếp của kháng sinh lên cơ thể động vật

Kháng sinh làm thay đổi hệ vi sinh vật ở ruột dẫn tới các tác dụng sau:

- Tăng cường tốc độ hấp thu chất dinh dưỡng, kích thích sử dụng các chất chuyển hoá đồng thời làm giảm tiêu hao năng lượng để phân giải thức ăn.
- Tăng cường quá trình điều tiết các hormon, đặc biệt là hormon sinh trưởng giúp cơ thể lớn nhanh hơn.
- Tăng cường quá trình tổng hợp đường và vitamin A từ caroten; Vì vậy tác dụng kích thích của kháng sinh lên cơ thể động vật, đặc biệt động vật còn non là quá trình phức tạp gián tiếp qua hệ vi khuẩn chí ở ruột do nhiều nhân tố khác nhau làm ảnh hưởng đến chuyển hoá cơ bản các thức ăn dùng nuôi động vật.

12.2. Kháng sinh dùng trong trồng trọt

Các nấm, vi khuẩn, virus gây ra nhiều loại bệnh cho cây trồng làm mùa màng thất thu lớn.

Mầm bệnh có thể nhiễm từ hạt giống, từ các phế thải còn lại của mùa màng, từ phân chuồng, từ đất hoặc trong bụi không khí. Việc chọn kháng sinh để tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng không chỉ chú ý đến tác dụng kháng sinh mà còn phải quan tâm đến hiệu quả kinh tế.

Nghiên cứu quá trình phát triển nông nghiệp trên thế giới dễ nhận thấy một hiện tượng có tính qui luật: sản xuất ngày càng đi sâu vào thâm canh thì mức độ phát triển và tác hại của sâu bệnh càng nghiêm trọng. Theo số liệu của Tổ chức FAO, hàng năm tổng số thiệt hại mùa màng do sâu bệnh và cỏ chiếm tới 34%, trong đó thiệt hại do bệnh cây chiếm 11,6%.

Trong số các bệnh của cây được mô tả, bệnh nấm chiếm 83%. Thuốc hoá học dùng trong bảo vệ thực vật đưa lại hiệu quả phòng trị rõ rệt, song cũng tồn tại một số nhược điểm: đó là tính độc không chọn lọc, đặc tính khó phân huỷ trong đất, sự tích lũy các chất độc trong môi trường không những làm thay đổi đáng kể các mối quan hệ phong phú giữa các loài sinh vật trong các hệ sinh thái, ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất mà còn nhiễm độc môi trường sống của con người, nhiều trường hợp dẫn đến tử vong. Những thành tựu to lớn trong trị liệu bệnh nhiễm trùng ở người bằng thuốc kháng sinh vào những năm 50 của thế kỷ XX đã gợi mở xu hướng sử dụng kháng sinh trong lĩnh vực bảo vệ thực vật.

Kháng sinh dùng để đấu tranh với bệnh thực vật phải thoả mãn các yêu cầu sau:

- Có hoạt tính kháng sinh mạnh đối với mầm gây bệnh.
- Dễ thấm vào các tế bào của cây.
- Liều điều trị không có hại đến cây.
- Kháng sinh phải bền vững trong một thời gian đủ ở bề mặt hay đã thấm sâu vào trong cây.

Thông dụng nhất là xử lý hạt bằng kháng sinh trước khi đem gieo trồng, xử lý đất trồng bằng kháng sinh hoặc các vi sinh vật đối kháng trong đất.

Hiện nay có khoảng 30 chất kháng sinh đã được sử dụng để đấu tranh với các bệnh của cây trồng do nhiễm khuẩn và nấm gây ra. Trong điều kiện thiên nhiên kháng sinh bị phân huỷ nhanh, vì vậy phải tìm kiếm các chất kháng sinh có độ bền vững cao, tiêu diệt mầm bệnh nhanh, không nên dùng các chất kháng sinh ứng dụng trong y học để điều trị bệnh của cây trồng. Ở Nhật, Mỹ, Liên Xô cũ, các nước châu Âu khác đã sản xuất với lượng lớn các kháng sinh dùng trong thực vật. Ví dụ: Nhật Bản đã sản xuất trên qui mô công nghiệp hơn 10 chất kháng sinh chuyên dùng cho bảo vệ cây trồng như: blastixidin (kasugamycin), validamycin.

Những kháng sinh thường dùng trong trồng trọt là:

- Griseofulvin: dùng chống lại các bệnh do *Botrytis* gây ra (bệnh rỉ sắt ở lúa mì).
- Trichotexin: tác dụng với nhiều loại nấm gây bệnh như *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium* gây bệnh cho bông.
- Blastixidin S (kháng sinh chiết từ *Str. griseochromogenes*). Có thể tiêu diệt nhiều vi sinh vật gây bệnh cho cây ở nồng độ 50 - 100 mcg/ml. Ở Nhật dùng đấu tranh với bệnh vàng lụi gây ra bởi *Piricularia oryzae*.
- Kasugamyxin do *Str. kasugaensis* tạo ra (Umezawa, 1965) nồng độ 1 mcg/ml đủ để tiêu diệt *Piricularia oryzae* (hoạt tính mạnh hơn blastixidin 50 - 100 lần). Hiện nay dùng kasugamyxin thay thế cho blastixidin để chống bệnh vàng lụi vì không độc đối với người.
- Polyoxin: được tạo ra bởi *Str. cacaoi* có hoạt tính chống nấm mạnh: *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Piricularia* (Misato, 1975).
- Validamyxin: do *Str. hygrosopicus var. limoneus* là kháng sinh được sản xuất ở Nhật Bản, Trung Quốc dùng để diệt nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh khô vằn hại lúa rất hữu hiệu. Thời gian bán phân huỷ của validamyxin trong đất là 4 giờ.
- Herbicidin A và B: là kháng sinh diệt cỏ do *Str. saganonensis* tạo ra (Mamoru, Tatsuo 1976). Herbicidin kìm hãm sự phát triển của *Xanthomonas oryzae* gây bệnh cho lúa.

12.3. Kháng sinh dùng trong công nghiệp thực phẩm

Bảo quản thực phẩm tươi và các thực phẩm đóng hộp là vấn đề rất quan trọng được nhiều nhà khoa học quan tâm. Thực phẩm đóng hộp để giữ được lâu thường dùng phương pháp khử trùng bằng nhiệt, để trong lạnh. Tuy nhiên khi khử trùng bằng nhiệt sẽ làm thay đổi giá trị của thực phẩm, đặc biệt là hương vị, một số vitamin bị phân huỷ. Nguyên nhân làm hỏng thực phẩm là do vi sinh vật (vi khuẩn, nấm men, nấm mốc). Sau khi phân huỷ thực phẩm vi khuẩn còn tiết ra các độc tố, ăn phải thực phẩm đó sẽ bị ngộ độc nguy hiểm.

Để tiêu diệt vi sinh vật có trong thực phẩm thường dùng các tác nhân vật lý và hoá học.

- Tác nhân vật lý: khử trùng bằng nhiệt, tia X, UV.
- Tác nhân hoá học: acid benzoic, nipazin, SO₂... Một vài kháng sinh là những chất bảo quản lý tưởng thực phẩm tươi và đóng hộp. Chỉ cần nồng độ kháng sinh rất thấp đã có thể giữ cho thực phẩm bảo quản được lâu dài.

Các chất kháng sinh như subtilin (do *B. subtilis* tạo ra), nisin (do *B. licheniformis* tạo ra) dùng bảo quản thực phẩm đóng hộp, cho thêm kháng sinh vào thì thời gian khử trùng bằng nhiệt ngắn đi, nhiệt độ khử trùng giảm

xuống làm cho chất lượng sản phẩm tốt hơn các vitamin không bị phá huỷ, hương vị ít bị biến đổi. Đặc biệt bào tử các vi khuẩn ưa nhiệt như *Clostridium* chết nhanh hơn khi khử trùng nhiệt độ thấp có kháng sinh dùng bảo quản.

Kháng sinh nisin không dùng trong y học. Nó được coi như một "hoá chất" lý tưởng để bảo quản thực phẩm đóng hộp như: cà chua, đậu xanh, bắp cải và các loại rau khác và đặc biệt là phomat. Trong bảo quản thực phẩm cũng thường sử dụng phương pháp lên men lactic (muối dưa, cà, làm mắm, làm nem chua...) Nguyên tắc của phương pháp này là khi acid lactic do vi khuẩn lactic tạo ra trong môi trường đạt đến nồng độ nhất định làm cho pH giảm xuống 3 - 3,5. Các thực phẩm này bảo quản được rất lâu và vẫn giữ được dinh dưỡng.

Sử dụng kháng sinh trong chăn nuôi, trồng trọt và công nghiệp thực phẩm cần phải lưu ý đến khả năng xuất hiện những vi sinh vật kháng kháng sinh sẽ rất nguy hại cho việc điều trị các bệnh nhiễm trùng ở người. Thực phẩm đặc biệt là các sản phẩm thịt, cá, tôm hoặc sữa. Nếu xuất khẩu tiêu chuẩn kiểm nghiệm đầu tiên cần xác định là có chứa kháng sinh hay không? Nếu có vết kháng sinh phía nhập khẩu sẽ trả lại.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên một số đại diện của kháng sinh tự nhiên được sinh tổng hợp từ nấm mốc, từ xạ khuẩn, từ vi khuẩn.
2. Chứng minh ý nghĩa tích cực của công tác đột biến trong chọn giống để sản xuất kháng sinh.
3. Kể tên các kháng sinh được dùng trong ngành khác với mục đích tăng trọng, chữa bệnh cho cây trồng và gia súc, bảo quản thực phẩm.

Chương 8

SẢN XUẤT CÁC KHÁNG SINH NHÓM β -LACTAM

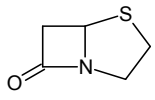
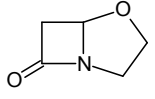
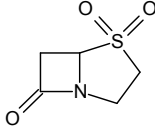
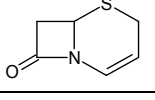
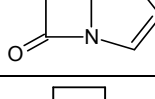
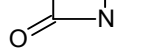
MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này, sinh viên phải trình bày được:

1. Tên các chủng vi sinh vật được dùng trong sản xuất các kháng sinh nhóm beta-lactam.
2. Quy trình lên men và chiết xuất penicillin G và V.
3. Các phương pháp sản xuất nguyên liệu để điều chế các beta-lactam bán tổng hợp.
4. Quy trình lên men và chiết xuất acid clavulanic.

1. ĐẠI CƯƠNG VỀ CÁC β -LACTAM

Bảng 8.1. Các nhân cơ bản của kháng sinh β -lactam

Tên nhóm	Cấu trúc hoá học chung	Kháng sinh đại diện
Nhân Penam		Các penicillin tự nhiên và bán tổng hợp
Nhân Clavam		Các penicillin kháng β -lactamase (acid clavulanic)
		Các penicillin kháng β -lactamase (sulbactam, tazobactam)
Nhân Cephem		Các cephalosporin và cephamycin
Nhân Carbapenem		Các carbapenem bán tổng hợp từ thienamycin (imipenem, meropenem)
Nhân Monobactam hay β -lactam		Aztreonam

Kháng sinh nhóm β -lactam bao gồm các chất có chứa vòng β -lactam (vòng amid 4 cạnh) và có cấu trúc nhân cơ bản như trong bảng 8.1.

Theo cấu trúc hoá học các kháng sinh nhóm β -lactam có thể chia thành những nhóm sau:

- Các Penicillin
- Các Cephalosporin
- Các Carbapenem
- Các Monobactam

Đặc tính chung của các kháng sinh β -lactam là tác dụng lên thành tế bào vi khuẩn bằng cách ức chế sự tổng hợp peptidoglycan của thành tế bào vi khuẩn. 2 nhóm kháng sinh quan trọng nhất của họ β -lactam là các penicillin và các cephalosporin. Trong khuôn khổ của giáo trình này chỉ giới thiệu về quy trình sinh tổng hợp và nguyên tắc bán tổng hợp một số kháng sinh tiêu biểu của họ β -lactam.

2. SINH TỔNG HỢP CÁC PENICILLIN

2.1. Đại cương

Các penicillin là đại diện tiêu biểu cho các kháng sinh có nguồn gốc từ nấm mốc. Ngoài ra còn một vài kháng sinh khác như griseofulvin, trichotexin, fumagillin... cũng được sinh ra từ các chủng nấm mốc khác nhau.

Các penicillin có cấu trúc hoá học chung gồm vòng β -lactam nối với vòng thiazolidin. Penicillin G là chất kháng sinh tiêu biểu được Alexander Flemming tìm ra đầu tiên vào năm 1928 trong khi nghiên cứu về tụ cầu khuẩn. Ông nhận thấy trên hộp petri nuôi cấy tụ cầu có nhiễm nấm mốc *Penicillium notatum* và tạo thành vòng vô khuẩn. Fleming gọi chất ức chế tạo vòng vô khuẩn này là *penicillin*. Đến năm 1941, các nhà bác học Anh là Howard Walter Florey và Ernst Boris Chain mới tinh chế được penicillin dưới dạng tinh khiết và nghiên cứu phương pháp lên men. Năm 1943, penicillin đã được sản xuất ở quy mô công nghiệp ở Mỹ để phục vụ điều trị các bệnh nhiễm trùng cho thương binh trong chiến tranh thế giới thứ hai. Penicillin cũng là kháng sinh đầu tiên được sản xuất lên men chìm ở quy mô công nghiệp (1947). Việc phát minh ra penicillin tạo ra một bước ngoặt quan trọng trong lĩnh vực y học thế giới và được đánh giá là một trong các phát minh quan trọng bậc nhất của thế kỷ XX. Do các đóng góp to lớn đó Fleming, Florey và Chain đã được tặng giải Nobel về y học (hình 8.1).

Cơ chế tác dụng của penicillin lên tế bào vi khuẩn nhạy cảm là ngăn cản việc tổng hợp thành tế bào ở vi khuẩn, có phổ kháng khuẩn hẹp: tác dụng lên cầu khuẩn Gram (+) như tụ cầu, phế cầu, liên cầu, một số vi khuẩn Gram (-) lậu cầu, màng não cầu và còn có tác dụng điều trị bệnh giang mai do xoắn khuẩn gây ra.



Alexander Flemming
(1881 – 1955)



Ernst Boris Chain
(1906 – 1979)



Howard Walter Florey
(1898 – 1968)

Hình 8.1. Các nhà bác học nhận giải Nobel y học năm 1945 về công trình penicillin

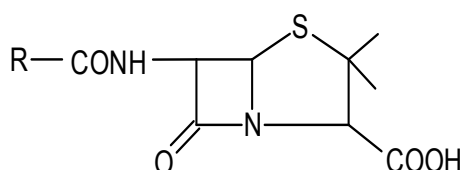
Penicillin được coi là kháng sinh có nhiều ưu điểm nhất trong các kháng sinh sử dụng: hiệu quả điều trị cao, ít độc và giá rẻ nhất. Tuy nhiên penicillin cũng có một số nhược điểm:

- Kém bền vững khi gặp ẩm;
- Gây dị ứng, sốc phản vệ vì vậy bắt buộc phải thử test dị ứng trước khi tiêm;
- Ít tác dụng lên các vi khuẩn Gram (-);
- Nhanh chóng bị kháng thuốc do các loại vi khuẩn có thể tiết penicillinase và β - lactamase phá hủy chất kháng sinh.

Tuy có một số nhược điểm nhất định nhưng hiện nay penicillin vẫn là kháng sinh được sản xuất với số lượng lớn nhất trong tất cả các kháng sinh hiện có (sản lượng toàn thế giới hơn 45.000 tấn/năm - trong đó Hà Lan chiếm 15.000 tấn/năm, Trung Quốc 10.000 tấn/năm, sau đó là Ấn Độ, Mỹ, Anh, Đức, Pháp...). Lượng penicillin lớn này chủ yếu được dùng làm nguyên liệu để bán tổng hợp tạo ra các kháng sinh mới thuộc nhóm β -lactam, còn trong y học và thú y chỉ dùng một lượng nhỏ.

1.2. Cấu trúc hoá học, phân loại và tính chất

Các penicillin được cấu tạo bằng 2 vòng: β -lactam và thiazolidin và chỉ khác nhau ở gốc R của mạch ngang. Tuy nhiên có ý nghĩa lớn nhất trong điều trị cũng như trong thương mại là penicillin G và V (bảng 8.2).



Bảng 8.2. Phân nhóm các penicillin

TT	Tên nhóm	Tên kháng sinh	Nguồn gốc
1	Các penicillin tự nhiên	Penicillin G, V, N, K, F...	Sinh tổng hợp
2	Các penicillin bán tổng hợp		Bán tổng hợp
	- Các aminopenicillin	<i>Ampicillin</i> <i>Amoxycillin</i> Bacampicillin	
	- Các chất kháng lại penicillinase	<i>Cloxacillin</i> <i>Dicloxacillin</i> <i>Flucloxacillin</i> Oxacillin <i>Nafcillin</i> <i>Methicillin</i>	
	- Các penicillin phổ rộng (Carboxypenicillin)	<i>Carbenicillin</i> <i>Ticarcillin</i> Temocillin	
	- Các penicillin phổ rộng (Ureidopenicillin)	<i>Mezlocillin</i> <i>Azlocillin</i> <i>Piperacillin</i>	
	- Các chất kháng β -lactamase	<i>Clavulanic acid</i> <i>Sulbactam</i> Tazobactam	Sinh tổng hợp Tổng hợp hoá học

2.3. Quy trình sinh tổng hợp

TT	Gốc R	Tên gọi gốc	Tên penicillin
1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5 - \text{CH}_2 -$	Heptylpenicillin	Penicillin K (IV)
2	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2\text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2$	2-pentenylpenicillin	Penicillin F (I)
3	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_3 - \text{CH}_2 -$	Amylpenicillin	Dihydropenicillin F
4	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 -$	Benzylpenicillin	Penicillin G
5	$\text{C}_6\text{H}_5 - \text{O} - \text{CH}_2 -$	Paraoxybenzylpenicillin	Penicillin X (III)
6	$\text{HO} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 -$	Phenoxymethylpenicillin	Penicillin V
7	NH_2 $\text{HOOC} - \text{CH}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}_2 -$	1-amino-4-carboxy-butylpenicillin	Penicillin N

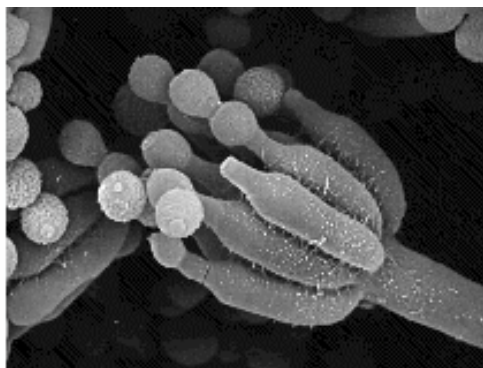
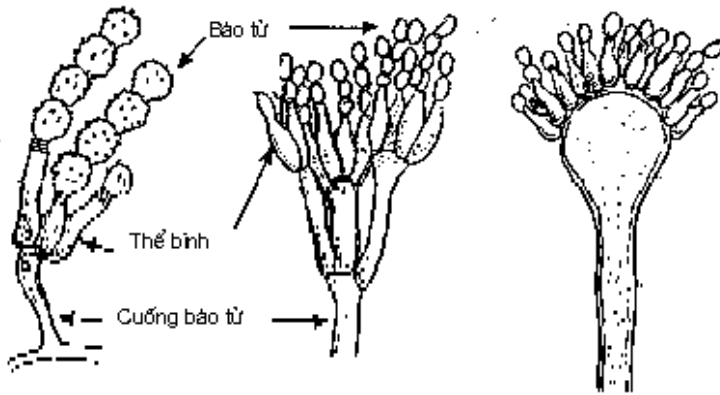
Trong môi trường lên men *P. chrysogenum* nếu không có chất tiền thể sẽ xuất hiện một hỗn hợp gồm 4 - 6 penicillin khác nhau (bảng 8.3). Trong số này có penicillin G và V là 2 chất có nhiều ưu điểm nên được sản xuất để dùng trong y học. Dạng acid tự do của penicillin G không bền vững, vì vậy thường dùng dạng muối Na, K dễ tan trong nước. Penicillin G dạng bột khô rất bền vững, khi gặp ẩm rất dễ bị phân huỷ vì vậy lọ bột khô khi hoà tan vào nước phải tiêm ngay.

- 1 đơn vị penicillin G Na = 0,60 mcg hay 1 mg chứa 1.667 UI;
- 1 đơn vị penicillin G K = 0,64 mcg hay 1 mg chứa 1.530 UI;

Penicillin G không bền trong môi trường acid: khi bị tác dụng của dung dịch acid loãng (ở 30°C) vòng β -lactam bị mở, do đó ít hấp thu qua đường uống (15 – 30%), chỉ dùng tiêm (tốt nhất là tiêm tĩnh mạch). Ngoài ra penicillin G cũng dễ bị kiềm hoặc penicillinase phân huỷ. Penicillin V được dùng đường uống (hấp thu khoảng 60%).

2.3.1. Chủng giống

Cho đến nay phương pháp duy nhất để sản xuất penicillin G và V là sinh tổng hợp từ nấm mốc *P. chrysogenum*.



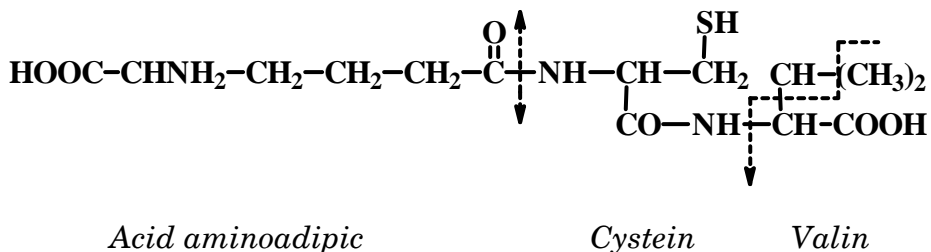
Hình 8.2. Khuẩn ty *P. chrysogenum*

Vào những năm 1940 – 1950, việc nghiên cứu sản xuất penicillin thường sử dụng các chủng *P. notatum* và *P. baculatum*. Từ khi trường Đại học Wisconsin (Mỹ) phân lập được chủng *P. chrysogenum* có hoạt tính cao hơn thì chủng này đã dần thay thế và từ khoảng sau những năm 50 của thế kỷ XX, tất cả các công ty sản xuất penicillin trên thế giới đều sử dụng các biến chủng *P. chrysogenum* công nghiệp. Biến chủng *P. chrysogenum* Wis Q-176 (được tuyển chọn từ chủng *P. chrysogenum* URRL 1951) được xem là chủng gốc của hầu hết các chủng công nghiệp đang sử dụng hiện nay trên toàn thế giới. Năng suất năm 1947 chỉ đạt từ 60 - 80 UI/ml nhưng nhờ có các kỹ thuật của công nghệ di truyền học như khuếch đại gen các chủng sản xuất hiện nay đã đạt tới 85.000UI/ml (1993).

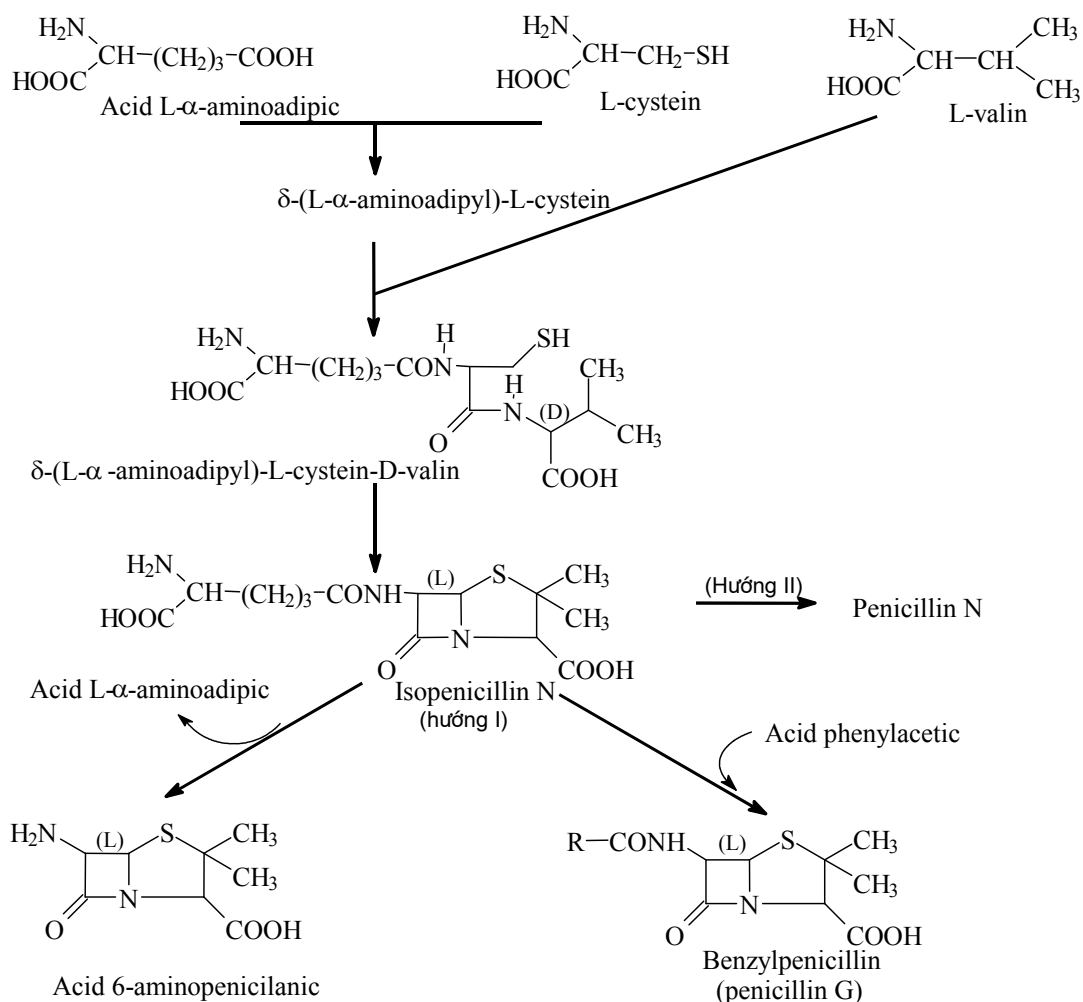
Chủng nấm mốc *P. chrysogenum* thuộc họ nấm cúc (*Aspergillaceae*), chi mốc xanh (*Penicillium*) thường gặp trên các chất hữu cơ mục nát, thể sợi trắng roi xám xanh. Giống công nghiệp được bảo quản lâu dài ở dạng đông khô, bảo quản siêu lạnh ở -70°C hoặc bảo quản trong nitơ lỏng.

2.3.2. Thành phần môi trường dinh dưỡng

Nhìn vào công thức cấu tạo của phân tử penicillin cho thấy đây là một tripeptid vòng gồm 3 acid amin là: acid aminoadipic, cystein và valin. Theo quan điểm phổ biến hiện nay 3 acid amin này là tiền chất để tổng hợp ra nhân cơ bản của penicillin là 6-APA. Có thể biểu diễn cấu tạo của tripeptid đó như sau:



Vì vậy để lên men sinh tổng hợp penicillin với hiệu suất cao môi trường cần có nguồn đạm giàu acid amin để tế bào nấm xây dựng nên phân tử penicillin. Nguồn dinh dưỡng đóng vai trò rất quan trọng đến hiệu suất của quá trình sinh tổng hợp tạo kháng sinh. Về nguyên tắc nếu nguồn dinh dưỡng được cung cấp đầy đủ thì sự tích tụ penicillin sẽ xảy ra mạnh mẽ khi hệ sợi phát triển đạt trạng thái cân bằng. Nếu thiếu thức ăn sẽ xảy ra hiện tượng tự phân của sợi, còn nếu thừa thì sợi phát triển nhanh quá sẽ không tích tụ penicillin mà tích tụ nhiều acid gluconic và acid malic.



Hình 8.3. Quá trình sinh tổng hợp penicillin từ các acid amin

Thành phần môi trường dinh dưỡng bao gồm những nguồn chính sau:

Nguồn carbon: Glucose hay lactose là nguồn năng lượng chính để nấm phát triển. Nguồn hydrat carbon thích hợp nhất là glucose nên trong pha phát triển để tăng sinh khối (48 giờ đầu) của quá trình, nấm đồng hoá hầu như toàn bộ glucose. Vì vậy khi chuyển sang pha thứ 2 - pha tổng hợp ra phân tử penicillin thì nguồn năng lượng bị cạn kiệt dẫn đến giảm hiệu suất sinh tổng hợp. Để khắc phục, môi trường lên men tạo penicillin cần bổ sung lactose (thường tỷ lệ glucose và lactose là 1:1). Trong trường hợp không có lactose thì có thể thay hoàn toàn bằng glucose. Song phải định lượng và bổ sung glucose trong suốt quá trình lên men. Ngoài ra nấm còn có khả năng đồng hoá tinh bột, dextrin, saccharose, các acid hữu cơ như acid lactic, acid acetic...

Nguồn nitơ: Nấm mốc có khả năng đồng hoá nitơ vô cơ như các muối amoni và nitrat, nguồn nitơ hữu cơ phải là nguồn đậm giàu acid amin để nấm

xây dựng nên phân tử penicillin, do đó trong môi trường sản xuất luôn có mặt cao ngô. Có thể thay thế một phần cao ngô bằng bột đậu tương, bột lạc hoặc bột hạt bông. *P. chrysogenum* có khả năng tiết ra proteinase khá mạnh nên các hợp chất protein trong cao ngô hay bột lạc rất dễ được nấm sử dụng. Tuy nhiên lượng N phải vừa đủ vì nếu thiếu sẽ xảy ra hiện tượng tự phân của sợi, còn nếu thừa thì sợi phát triển nhanh quá cũng làm giảm hiệu suất sinh penicillin.

Nguồn lưu huỳnh: Có ý nghĩa đặc biệt trong quá trình sinh tổng hợp penicillin vì nó tham gia vào cấu trúc phân tử để tạo nên vòng thiazolidin. Nguồn lưu huỳnh thường dùng là các muối sulfat của kali, natri và amoni. Các chất này tham gia vào tổng hợp methionin, cystin, biotin, thiamin... Hay sử dụng nhất là Natri thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Nguồn kim loại vi lượng: Một số kim loại như Mg, Mn, Fe, Zn, Na, Cu ... thường được bổ sung dưới dạng muối sunfat hoặc có sẵn trong nước máy hoặc nguồn nguyên liệu tạo môi trường.

Chất tiền thể: *P. chrysogenum* trong quá trình phát triển tạo ra 4 - 6 penicillin có gốc R ở mạch bên khác nhau có hoạt tính kháng khuẩn khác nhau. Trong công nghệ lên men penicillin người ta phải điều khiển để tạo ra penicillin G (benzyl penicillin) và penicillin V (phenoxymethyl penicillin) là hai chất có tác dụng mạnh khi đưa vào cơ thể. Thêm acid phenylacetic vào môi trường lên men nhận thấy hiệu suất penicillin G tăng thêm 30 - 50%. Trong cao ngô có chất phenyl etylamin ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{NH}_2$) nên cũng làm tăng hiệu suất sinh tổng hợp penicillin. Người ta cho rằng phenyl ethylamin cũng là một chất tiền thể (cung cấp gốc R) để sinh tổng hợp phân tử penicillin G. Để tạo ra phân tử penicillin V chất tiền thể dùng là acid phenoxyacetic. Theo lý thuyết, nhu cầu về phenylacetat là 0,47 g/g penicillin G (hoặc 0,47g phenoxylacetat/g penicillin V). Trên thực tế cả 2 cấu tử này đều gây độc cho nấm nên người ta thường lựa chọn giải pháp bổ sung liên tục và khống chế chặt chẽ nồng độ theo yêu cầu để không làm giảm năng lực lên men của chủng sản xuất.

Môi trường nhân giống có thành phần gồm:

- | | |
|---|-----------|
| - Cao ngô | 20 g |
| - Glucose | 40 g |
| - KH_2PO_4 | 0,5 g |
| - NaNO_3 | 3,0 g |
| - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,125 g |
| - CaCO_3 | 5,0 g |
| - Nước máy vừa đủ | 1 lít |
| - pH sau khi khử trùng | 6,0 - 6,1 |

Môi trường lên men tạo penicillin có thành phần (%):

- Cao ngô	0,5
- Glucose	0,5
- Lactose	0,3
- NH_4NO_3	0,125
- $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1
- $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,05
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002
- ZnSO_4	0,002
- KH_2PO_4	0,2
- CaCO_3	0,3
- Acid phenylacetic	0,1
- Dầu phá bọt	theo nhu cầu

2.3.3. Điều kiện lên men

Nhiệt độ: Thường tiến hành nhân giống ở 30°C , lên men ở $23 - 25^\circ\text{C}$.

pH: pH thích hợp trong khoảng 6,0 - 6,5. Trong quá trình lên men pH môi trường thay đổi tùy thuộc vào tốc độ sử dụng các chất carbon và nitơ. Để ổn định pH người ta cho CaCO_3 vào môi trường lên men.

Thông khí: *P. chrysogenum* là chủng rất hiếu khí nên quá trình nuôi cấy cần thổi khí (đối với lên men bề mặt), lắc hoặc khuấy trộn kèm theo sục khí (đối với lên men chìm). Nhu cầu cấp khí khi có khuấy trộn liên tục là 1,2 - 1,5 VVM.

Thời gian: Trong 6 - 7 ngày.

2.3.4. Quy trình lên men

Trong những năm 40 của thế kỷ XX việc sản xuất penicillin được thực hiện bằng phương pháp lên men, bề mặt có thể là cơ chất rắn hoặc lỏng. Cơ chất rắn là các loại hạt hoặc cám. Để lên men ở cơ chất lỏng người ta nuôi nấm trong các chai thủy tinh bệt (chai Roux) có chứa môi trường dinh dưỡng. Váng mốc sau khi lên men có thể dùng cho lên men lần thứ 2 bằng cách cho môi trường dinh dưỡng mới vào dưới lớp váng này. Quá trình tiến hành ở 24°C trong 6 - 7 ngày. Trong quá trình lên men cần thổi khí vô trùng. Vào thời đó, một số nước sử dụng phương pháp này để sản xuất dịch lọc penicillin để rửa vết thương. Ở Việt Nam trong những năm 1951 - 1953, dưới sự lãnh đạo của

Giáo sư Đặng Văn Ngữ, các nhà khoa học của nước ta cũng đã sản xuất được dịch lọc Penicillin phục vụ điều trị vết thương. Tuy nhiên phương pháp này có hiệu suất lên men thấp, chỉ đạt < 200 UI/ml môi trường nuôi cấy nên hiện nay không được áp dụng.

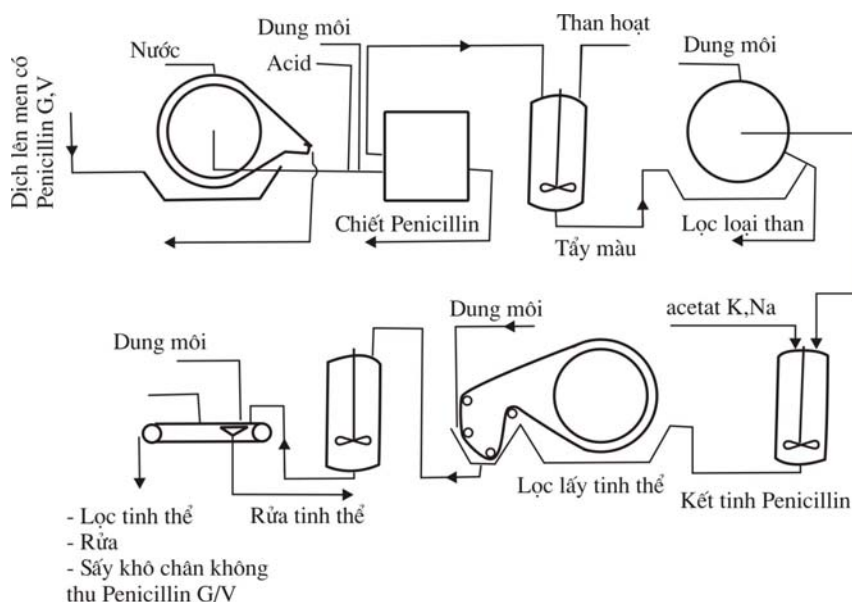
Hiện nay người ta chỉ sử dụng phương pháp lên men chìm để sản xuất các penicillin. Penicillin G là kháng sinh đầu tiên được sản xuất bằng công nghệ lên men chìm vào năm 1947. Quá trình lên men tạo penicillin G có 2 pha: pha sinh trưởng và pha sinh kháng sinh. Ở pha lên men thứ nhất nấm phát triển hệ sợi mạnh, sinh khối tăng nhanh, chất dinh dưỡng được đồng hoá nhiều, cường độ hô hấp tăng dần đến cực đại, pH tăng dần và penicillin G được tạo thành ít. Ở pha lên men thứ hai hệ sợi phát triển chậm, lactose được đồng hoá, pH tăng đến khoảng 7 – 7,5 và Penicillin G được tạo thành chủ yếu trong pha này. Hiệu suất sinh tổng hợp phụ thuộc nhiều vào lượng sinh khối trong môi trường.

Trước đây do hiệu suất chủng thấp, kỹ thuật lên men chưa phát triển nên giá thành 1 kg penicillin ở Mỹ (1943) là 227.270 USD. Đến năm 1953 đã hạ xuống 169 \$/kg, năm 1993 là 34 - 36 \$/kg và tới năm 2000 chỉ còn 10 \$/kg do hiệu suất đã tăng cao nhờ áp dụng các công nghệ mới và có thiết bị hiện đại trong lên men, áp dụng những tiến bộ trong di truyền học phân tử vào cải tạo giống (chủng sản xuất đạt tới 85.000 UI/ml).

2.3.5. Chiết xuất và tinh chế penicillin

Kháng sinh penicillin được tiết ra môi trường lên men. Kết thúc lên men, môi trường được bơm vào các bồn chứa. Vì kháng sinh rất dễ bị phân huỷ nên phải hạ nhiệt độ dịch lên men đến 4°C. Thêm phụ gia để lọc (thường thêm 0,1% diatomits) rồi lọc bằng lọc chân không hình trống quay. Dạng acid tự do penicillin tan nhiều trong dung môi hữu cơ nên dịch lọc được acid hoá bằng H₂SO₄ 30% đến pH 2,5. Chiết penicillin trên máy ly tâm siêu tốc bằng dung môi hữu cơ không trộn lẫn với nước (thường dùng butyl acetat). Bốc hơi chân không đến nồng độ nhất định; thêm than hoạt (1%) vào để tẩy màu. Dịch lọc sau khi loại than được loại nước bằng cách hạ nhiệt độ xuống -20°C.

Kết tinh penicillin K, hay Na bằng cách trung hoà dịch kháng sinh bằng acetat K hay acetat Na. Lọc lấy tinh thể, rửa tinh thể bằng butanol. Sấy tinh thể trong chân không ở nhiệt độ 50°C. Kiểm nghiệm và đóng gói kháng sinh trong điều kiện tuyệt đối vô trùng.



Hình 8.4. Quá trình chiết xuất và tinh chế penicillin từ môi trường lên men

3. SẢN XUẤT 6 - APA VÀ CÁC KHÁNG SINH PENICILLIN BÁN TỔNG HỢP

3.1. Đại cương về các penicillin bán tổng hợp

Năm 1941, penicillin G là kháng sinh có hiệu quả cao, chống lại hầu hết các chủng *Staphylococcus aureus*. Tuy nhiên đến năm 1947 phần lớn các vi khuẩn phân lập được trong bệnh viện đều có tính kháng penicillin. Để giải quyết vấn đề này người ta đã nỗ lực tìm các penicillin mới có tác dụng điều trị tốt hơn.

Về nguyên tắc, để tạo ra một penicillin mới trong lên men sinh tổng hợp có thể dùng phương pháp thay đổi mạch nhánh bằng cách sử dụng các tiền chất khác nhau. Tuy nhiên bằng con đường lên men trực tiếp hiện nay người ta mới chỉ có khả năng tiến hành với penicillin G và V. Còn để triển khai trong sản xuất công nghiệp, người ta sử dụng chính penicillin G hay V để chế tạo ra 6-APA là nguyên liệu chủ yếu trong quá trình bán tổng hợp ra các penicillin mới.

Theo cấu trúc hoá học, các penicillin tự nhiên đều là những hợp chất dị vòng của các acid amin có tên gọi là acid 6 - aminopenicillanic (6-APA). Việc tìm ra phân tử 6 - APA đã mở ra một hướng mới để sản xuất các penicillin bán tổng hợp bằng cách gắn kết các mạch nhánh khác nhau vào phân tử 6-APA bằng con đường hoá học hay sinh học. Có hai hướng chính là acyl hoá nhóm -NH₂ ở vị trí số 6 và ester hoá nhóm -COOH ở vị trí số 3. Tùy theo cơ chế tác dụng các penicillin bán tổng hợp có thể chia thành 3 nhóm chính như sau:

Nhóm 1: Phổ hoạt tính hẹp như các penicillin tự nhiên, chủ yếu tác dụng lên các vi khuẩn Gram (+) như liên cầu, tụ cầu không có khả năng tiết ra

enzym penicillinase và một số nhỏ vi khuẩn Gram (-) như lậu cầu. Thường dùng để uống, đại diện của nhóm này là phenethicillin và azidocillin.

Nhóm 2: Phổ hoạt tính hẹp nhưng có ưu điểm kháng lại penicillinase nên được dùng để điều trị các bệnh do các vi khuẩn đã kháng lại penicillin nhóm 1 gây ra. Thường dùng tiêm, trong đó có một số có hoạt tính khi dùng uống như oxacillin, cloxacillin...

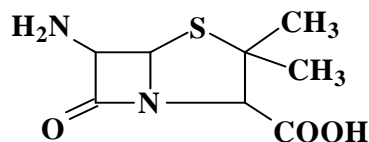
Nhóm 3: Gồm các chất có phổ hoạt tính rộng lên nhiều loại vi khuẩn Gram (+), Gram (-) và vững bền trong đường tiêu hoá. Được dùng để điều trị các bệnh nhiễm trùng đường hô hấp, tiết niệu, sinh dục và nhiễm khuẩn máu. Có thể uống hoặc tiêm. Tuy nhiên chúng vẫn có nhược điểm là nhanh chóng bị phá huỷ bởi các vi khuẩn có khả năng sinh penicillinase (hay β - lactamase) như amoxicillin, ampicillin. Nhóm penicillin này cũng được gọi là các penicillin không pseudomonas và được chia theo cấu trúc thành 2 nhóm: Nhóm carboxypenicillin (ticarcillin và carbenicillin) và nhóm acylureido penicillin (piperacillin và mezlocillin).

Một số đại diện penicillin bán tổng hợp phổ biến hiện nay là:

- Benzathin benzylpenicillin (Benzathin penicillin G) bán tổng hợp từ penicillin G có tính hoà tan thấp, được giải phóng chậm từ vị trí tiêm bắp và thuỷ phân thành penicillin G có tác dụng đặc trị để phòng và điều trị bệnh thấp tim ở trẻ em.
- Ampicilin: là penicillin bán tổng hợp phổ rộng trên cả cầu khuẩn Gram (+) và (-). Có tác dụng ức chế sinh tổng hợp mucopeptid thành tế bào. Dạng uống hoặc tiêm bắp hay tĩnh mạch thật chậm.
- Amoxicillin (amino penicillin) là penicillin bán tổng hợp bền trong acid, phổ tác dụng rộng hơn penicillin G (đặc biệt có tác dụng chống trực khuẩn Gram (-), tác dụng ức chế sinh tổng hợp mucopeptid thành tế bào của nhiều vi khuẩn Gram (+) và (-) trong giai đoạn nhân đôi chủ động. Amoxicillin được hấp thu gần như hoàn toàn qua đường tiêu hoá.
- Amoxicillin natri phối hợp với clavulanat kali (với biệt dược Augmentin): có khả năng bất hoạt nhiều β - lactamase thường gặp ở những vi khuẩn đề kháng với kháng sinh β - lactam.

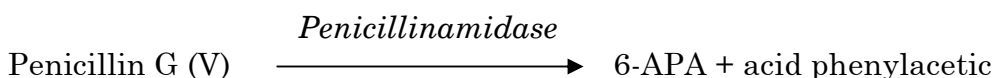
3.2. Đại cương về 6-APA

Như đã biết, cấu trúc hoá học của các penicillin là những hợp chất dị vòng của acid 6 - aminopenicillanic (6-APA) - đóng vai trò nhân penicillin.



6 – APA (6 – aminopenicillanic) được Kato ở Nhật tìm thấy vào năm 1953 trong môi trường nuôi cấy *P. chrysogenum* không có chất tiền thể.

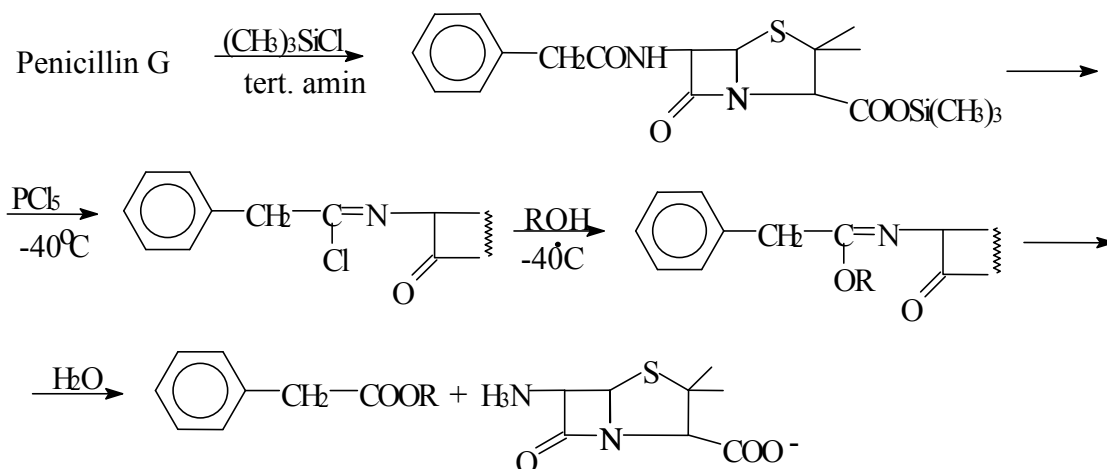
Năm 1959 Batchelor và cộng sự đã chiết được 6 - APA từ môi trường nuôi cấy *P. chrysogenum* (W - 5120) không có chất tiền thể sau khi đã chiết hết penicillin. Ông cho rằng sự hình thành 6 - APA là giai đoạn gắn kết thúc của quá trình sinh tổng hợp penicillin và đã công bố phát minh sản xuất 6 – APA. Sau này người ta phát hiện thấy nhiều vi sinh vật (đặc biệt nhóm vi khuẩn đường ruột) như *E. coli*, *B. megatherium*... tiết ra penicillinamidase có khả năng thủy phân penicillin G hoặc penicillin V tạo ra 6 - APA và acid phenyl acetic.



6-APA là chất không có hoạt tính kháng sinh đối với tụ cầu và cũng bị penicillinase phá huỷ. Tinh thể màu trắng, khá bền, độ chảy 209 - 210°C. Tan ít trong nước và các dung môi hữu cơ.

3.3. Các phương pháp sản xuất 6-APA

3.3.1. Phương pháp hoá học

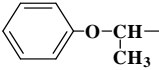
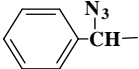
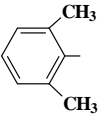
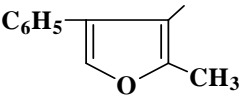
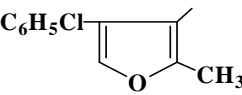
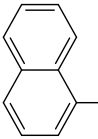
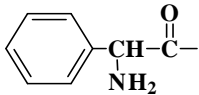
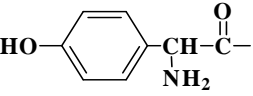
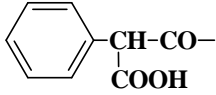
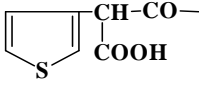
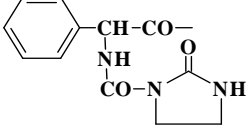


Hình 8.5. Sơ đồ phản ứng tổng hợp hoá học 6-APA từ penicillin G

Phương pháp hoá học có hiệu suất chuyển hoá cao (đến 90 - 95%) và tốc độ phản ứng nhanh, tuy nhiên lại tiêu hao nhiều năng lượng, nhiều dung môi và chứa đựng nguy cơ ô nhiễm môi trường cao, đòi hỏi các điều kiện phản ứng rất khó (nhiệt độ -40°C , hoá chất đắt tiền...).

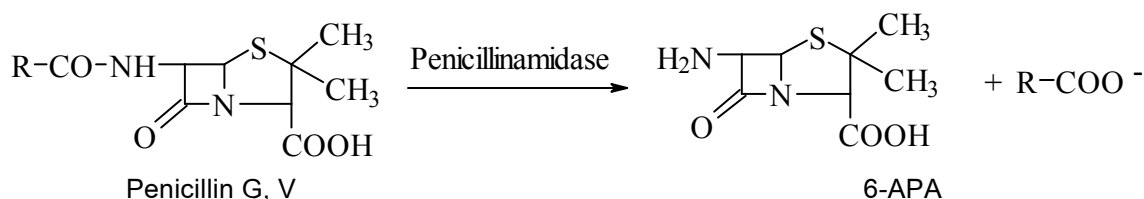
Công thức một số Penicillin bán tổng hợp được thể hiện ở bảng 8.3.

Bảng 8.3. Công thức một số penicillin bán tổng hợp

	R	Tên kháng sinh	Phổ kháng khuẩn
		Phenethicillin	Phổ kháng khuẩn hẹp, chủ yếu chống lại các vi khuẩn Gram (+) và bị phân huỷ bởi betalactamase
		Azidocillin	
		Methicillin	Phổ kháng khuẩn hẹp, chống lại được các vi khuẩn sinh betalactamase
		Oxacillin	Ức chế sự phát triển vi khuẩn Gram (+), đặc biệt trên tụ cầu <i>Staphylococcus</i> sinh penicillinase
		Cloxacillin	Ức chế sự phát triển vi khuẩn Gram (+), đặc biệt trên tụ cầu <i>Staphylococcus</i> sinh penicillinase mạnh hơn oxacillin
		Nafcillin	
		Ampicillin	Phổ rộng, chống lại được các tụ cầu kháng penicillin G
		Amoxicillin	Bền trong môi trường acid, phổ rộng hơn ampicillin, có hoạt tính trên phần lớn vi khuẩn Gram (+) và Gram (-) nhưng vẫn chịu tác dụng của betalactamase
		Carbenicillin	Tác dụng chủ yếu trên vi khuẩn hiếu khí Gram (-)
		Ticarcillin	Tác dụng chủ yếu trên vi khuẩn hiếu khí Gram (-), hoạt tính mạnh gấp 2 – 4 lần carbenicillin
		Azlocillin	

3.3.2. Phương pháp sinh học

6-APA có thể được sản xuất bằng phương pháp lên men từ các chủng *Penicillium*. Động học quá trình lên men tạo 6-APA tương tự với lên men tạo penicillin: đồng hoá hydrat carbon nhanh, pH tăng dần và trong giai đoạn tạo 6-APA có khi lên đến 7,0 - 7,4. Thời gian lên men kéo dài từ 108 - 120 giờ. Tuy nhiên quá trình này cho hiệu suất thấp vì 6-APA được tạo thành đồng thời với các penicillin tự nhiên khác, mặt khác chi phí cho việc tách chiết cao. Vì vậy thực tế trong công nghiệp người ta không sử dụng phương pháp này. Hiện nay phương pháp enzym vi sinh vật là phương pháp phổ biến để sản xuất 6-APA trong công nghiệp. Người ta sử dụng penicillinacylase để cắt mạch nhánh của penicillin G hay V. Phương pháp này có nhiều ưu điểm, điều kiện phản ứng dễ dàng nên mang lại hiệu quả kinh tế cao. Hiện nay nhiều hãng dược phẩm trên thế giới đã sản xuất 6-APA với tấn lượng lớn theo phương pháp này, điển hình là hãng dược phẩm Snam Progetti (Italia) với sản lượng khoảng 40 tấn/năm;



Có nhiều vi sinh vật có khả năng sinh enzym penicillinamidase: xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc có chứa penicillinamidase ngoại bào. Loại enzym này có khả năng thuỷ phân các penicillin K, F, V nhanh, còn đối với penicillin G lại thuỷ phân rất chậm (thấp hơn khoảng 100 lần). Penicillinamidase nội bào chủ yếu có trong vi khuẩn có tác dụng thuỷ phân nhanh phân tử penicillin G, cắt đứt dây nối peptid ở mạch bên 6 - APA. Enzym nội bào và ngoại bào có pH hoạt động khác nhau: nội bào hoạt động mạnh ở pH = 7,3 - 8,5; còn enzym ngoại bào hoạt động mạnh ở pH = 9,0. Trong công nghiệp hay dùng *E. coli* và *B. megatherium* vì chúng cho hoạt tính enzym mạnh nhất. Vi khuẩn *E. coli* 9637 hay *B. megatherium* được nuôi dưỡng trong môi trường có thành phần môi trường dinh dưỡng như sau:

Cao ngô	2%
Pepton	0,5%
Glucose	2%
Acid phenylacetic	0,15%
Nhiệt độ	30°C
Thời gian	24 giờ

Kết thúc quá trình nuôi cấy chiết xuất lấy penicillinamidase rồi cố định enzym trên polyacrylamid - thực hiện quá trình deacyl liên tục phân tử penicillin G - thu lấy 6-APA. Cũng có nhà máy dùng phương pháp bất động tế

bào *E.coli* hay *B. megatherium* để sản xuất 6-APA hiệu quả cao như dùng phương pháp enzym bất động. Phương pháp này có thể sử dụng nhiều lần và dịch penicillin G chưa bị deacetyl hoá có thể sử dụng lại. 6-APA được tách ra và tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion, sấy phun sương hoặc kết tủa ở điểm đẳng điện (pH = 4,3).

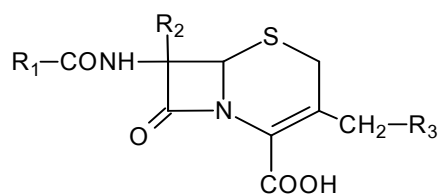
Phương pháp enzym bất động để sản xuất 6-APA cho hiệu suất tương đối cao (90 – 95%) và đã được áp dụng rộng rãi ở nhiều nước, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Hơn 50% sản lượng 6-APA trên toàn thế giới được sản xuất theo phương pháp bất động enzym. Hiện nay một số nhà máy lên men penicillin chỉ cho xuất xưởng thành phẩm là 6-APA.

Để tạo ra các penicillin bán tổng hợp có thể sử dụng cả phương pháp hoá học và sinh học bằng cách acyl hoá 6-APA. Tuy nhiên ở công đoạn này người ta sử dụng phổ biến con đường hoá học như đã đề cập ở trên vì enzym acylase thường thể hiện đồng thời cả 2 hoạt tính synthetase và hydrolase, thay đổi tùy theo điều kiện phản ứng nên cho hiệu suất thấp.

4. SẢN XUẤT CÁC CEPHALOSPORIN

4.1. Đại cương

Các cephalosporin là nhóm thuốc quan trọng nhất trong các thuốc kháng sinh hiện nay. Nhóm này đứng thứ 7 trong số 10 loại thuốc dùng nhiều nhất để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn với doanh số 7,2 tỷ đôla năm 1999, sau đó là các penicillin và các nhóm kháng sinh khác. Riêng sản lượng cephalosporin C trên toàn thế giới khoảng 3.000 tấn/năm và phần lớn được dùng để điều chế 7-ACA – một nguyên liệu trung gian để bán tổng hợp ra nhiều cephalosporin thế hệ mới.



Năm 1945, Giuseppe Brotzu từ nguồn nước biển tại Cagliari (Italia) đã phân lập được chủng nấm *Cephalosporium acremonium*. Dịch lọc môi trường nuôi cấy nấm này có tác dụng ức chế sự phát triển của tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus* và có tác dụng điều trị bệnh nhiễm khuẩn do tụ cầu vàng và bệnh thương hàn ở người. Từ năm 1948 đến năm 1956, Abraham và Neuton (Anh) từ môi trường nuôi cấy nấm này (nay được gọi là *Acremonium chrysogenum*) đã chiết được một hỗn hợp kháng sinh cephalosporin P₁, cephalosporin C và penicillin N. Năm 1971, từ chủng *Nocardia*, Nagarazan chiết xuất được cephamycin cũng có cấu trúc gần với cephalosporin C.

Có nhiều cephalosporin tự nhiên được sinh tổng hợp từ các chủng nấm mốc khác nhau (xem bảng 8.4) nhưng chúng hầu như không có ý nghĩa trong trị liệu. Vì vậy người ta đã tìm cách tạo ra các cephalosporin bán tổng hợp trên cơ sở cấu trúc vòng β -lactam. Ưu thế của các cephalosporin là có tác dụng kháng khuẩn đối với cả các cầu khuẩn có hoạt tính β -lactamase, nhiều vi khuẩn Gram (-) và độc tính rất thấp. Vì vậy chúng nhanh chóng chiếm vị trí quan trọng trong trị liệu.

Bảng 8.4. Một vài cephalosporin và cephamycin tự nhiên

Tên kháng sinh	R ₁	R ₂	R ₃
Cephalosporin C	$\begin{array}{l} \text{HOOC} \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$	- H	- OCOCH ₃
Cephamycin A	$\begin{array}{l} \text{HOOC} \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$	- OCH ₃	$-\text{OCOC}=\overset{\text{OCH}_3}{\text{C}}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$
Cephamycin B	$\begin{array}{l} \text{HOOC} \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$	- OCH ₃	$-\text{OCOC}=\overset{\text{OCH}_3}{\text{C}}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$
Cephamycin C	$\begin{array}{l} \text{HOOC} \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$	- OCH ₃	$-\text{OCOC}=\overset{\text{OCH}_3}{\text{C}}-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OSO}_3\text{H}$
Oganomycin G	$\begin{array}{l} \text{HOOC} \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$	- OCH ₃	$-\text{S}-\text{N}(\text{N})_2-\text{N}(\text{N})-\text{CH}_3$
Oganomycin H	$\begin{array}{l} \text{HOOC} \\ \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{CH}-(\text{CH}_2)_3-$	- OCH ₃	$-\text{S}-\text{N}(\text{N})-\text{S}-\text{CH}_3$

4.2. Cấu trúc hoá học và phân loại

Bảng 8.5. Phân loại các thế hệ cephalosporin

Tên nhóm	Tên kháng sinh	Phổ tác dụng
- Các Cephalosporin thế hệ 1	Cephalexin Cephalothin Cefazolin Cephradin	<i>Streptococci, Staphylococcus aureus</i>
- Các Cephalosporin thế hệ 2	Cefuroxim Cefaclor Cefamandol	<i>E.coli, Klebsiella, Proteus</i> <i>H.influenzae, Moraxella catarrhalis</i> không có tác dụng lên các vi khuẩn Gram (+) <i>Bacteroides Pragensis</i> và các <i>Bacteroides</i> khác
Các Cephamycin (được xếp cùng với cephalosporin thế hệ 2)	Cefoxitin Cefmetazol Latamocef	
- Các Cephalosporin thế hệ 3	Cefotaxim Ceftriaxon Ceftazidim Cefoperazon Moxalactam	<i>E.coli, Klebsiella, Proteus</i> <i>H.influenzae, Moraxella catarrhalis</i> , ít tác dụng lên các vi khuẩn Gram (+) <i>Bacteroides pragensis</i> và các <i>Bacteroides</i> khác
- Các Cephalosporin thế hệ 4	Cefepine Cefpirome Cefaclidine	Giống như thế hệ 3 nhưng có hoạt tính mạnh hơn chống lại các vi khuẩn tiết <i>betalactamase</i>

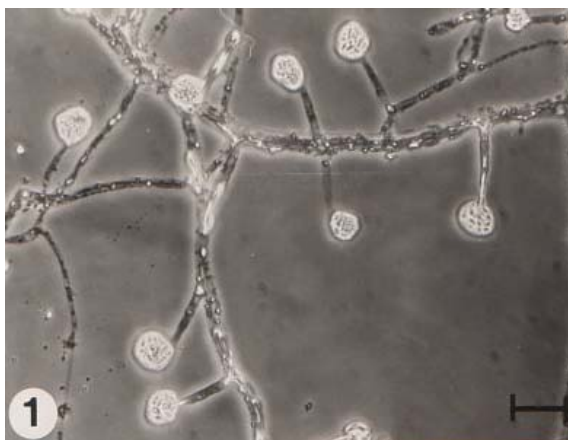
Các cephalosporin và cephamycin có cấu trúc gồm vòng β -lactam liên kết với dị vòng dihydrothiazin (nhân cephem). Các cephamycin khác với các cephalosporin ở nhóm $-\text{OCH}_3$ tại vị trí C_7 (R_2).

Những cephalosporin có tác dụng điều trị trong y học đều là các cephalosporin bán tổng hợp. Chúng được phân loại thành các thế hệ không chặt chẽ tùy theo phổ tác dụng và thời gian công bố thuốc. Hiện nay có 4 thế hệ kháng sinh cephalosporin (bảng 8.5).

Tuy cephalosporin C không có ý nghĩa trong điều trị nhưng nó lại là nguồn nguyên liệu để tạo ra 7-ACA và 7-ADCA là những nguyên liệu trung gian quan trọng để tạo ra các cephalosporin bán tổng hợp sẽ được đề cập đến trong phần sau.

4.3. Quy trình sinh tổng hợp cephalosporin C

Để sản xuất Cephalosporin C người ta thường sử dụng các chủng giống *Cephalosporium acremonium* có hoạt lực cao. Tuy nhiên việc hoàn thiện và triển khai sản xuất công nghiệp cephalosporin C gặp nhiều khó khăn hơn so với sản xuất penicillin vì hoạt tính sinh kháng sinh của chủng gốc thường rất thấp và việc tuyển chọn, cải tạo hoạt tính của chủng chưa tạo ra chủng có năng lực siêu tổng hợp như chủng sinh penicillin. Mặt khác các chủng lên men cephalosporin dường như không có hoạt tính enzym acyltransferase nên việc sử dụng tiền chất tạo nhánh nhằm thay đổi hoạt tính của sản phẩm tạo thành trong quá trình lên men cephalosporin không mang lại kết quả đáng kể.



Hình 8.3. Hình thái chủng nấm mốc *C. acremonium*

Trong lên men công nghiệp người ta thường sử dụng các chủng giống *Cephalosporium acremonium* ATCC 48272, 11550, 20339 và biến chủng của chúng. Hoạt lực khoảng 2000 mcg/ml môi trường nuôi cấy.

Trong môi trường lên men, chủng *C. acremonium* sinh tổng hợp đồng thời cephalosporin C, cephalosporin P₁ và penicillin N. Trong quá trình sinh tổng hợp cephalosporin các acid amin L-alpha-aminoadipic acid, L-valin và L-cystein cũng đóng vai trò như các tiền chất tạo thành cấu trúc penicillin N (xem chuyên luận penicillin) để từ đó hình thành nên phân tử cephalosporin C theo con đường trình bày trong hình 8.4.

Môi trường nuôi cấy để sinh tổng hợp Cephalosporin có thành phần như sau (w/v):

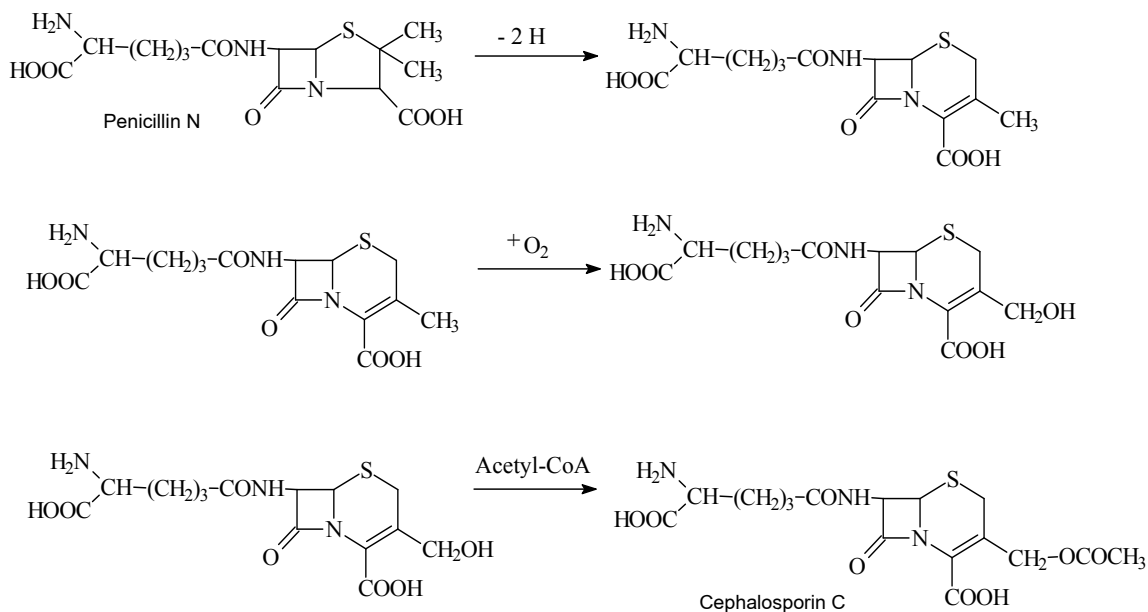
Saacharose	36,0 g
Glucose	27,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	7,5 g
Oleic acid	1,5 g
Methionin	3,0 g

Các yếu tố vi lượng (K, Fe, Mn, Mg, Zn, Cu...)

Nước máy vđ 1 lít

pH 7,3

Về nguyên lý, quy trình lên men cephalosporin C có nhiều điểm tương đồng với công nghệ lên men sinh tổng hợp penicillin về thành phần môi trường nuôi cấy, thông khí... cũng như các thông số khác.

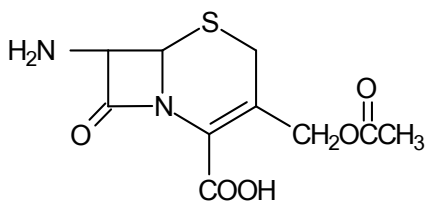


Hình 8.4. Cơ chế sinh tổng hợp cephalosporin C (giai đoạn cuối từ penicillin N)

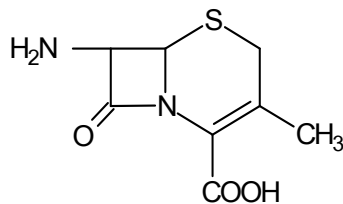
5. SẢN XUẤT 7-ACA; 7-ADCA VÀ CÁC KHÁNG SINH BÁN TỔNG HỢP NHÓM CEPHALOSPORIN

5.1. Đại cương

Khi phân tích cấu trúc của cephalosporin C người ta nhận thấy nhân cơ bản của phân tử cephalosporin C là acid 7-amino-cephalosporanic (7-ACA). Vì vậy từ nhân cơ bản này người ta đã tìm cách tạo ra các cephalosporin bán tổng hợp. Khác với các penicillin, các cephalosporin bán tổng hợp bao gồm cả nhóm sản phẩm acyl hoá gốc 7-amin ở vị trí bên cạnh vòng β -lactam và nhóm sản phẩm thay thế gốc acetoxy ở vị trí số 3. Xuất phát từ 7-ACA, năm 1962 Chauvette đã tổng hợp được cephalothin có hiệu lực mạnh gấp 100 lần penicillin G, phổ kháng khuẩn rộng, có hiệu lực trên cả vi khuẩn Gram (-).



7-ACA



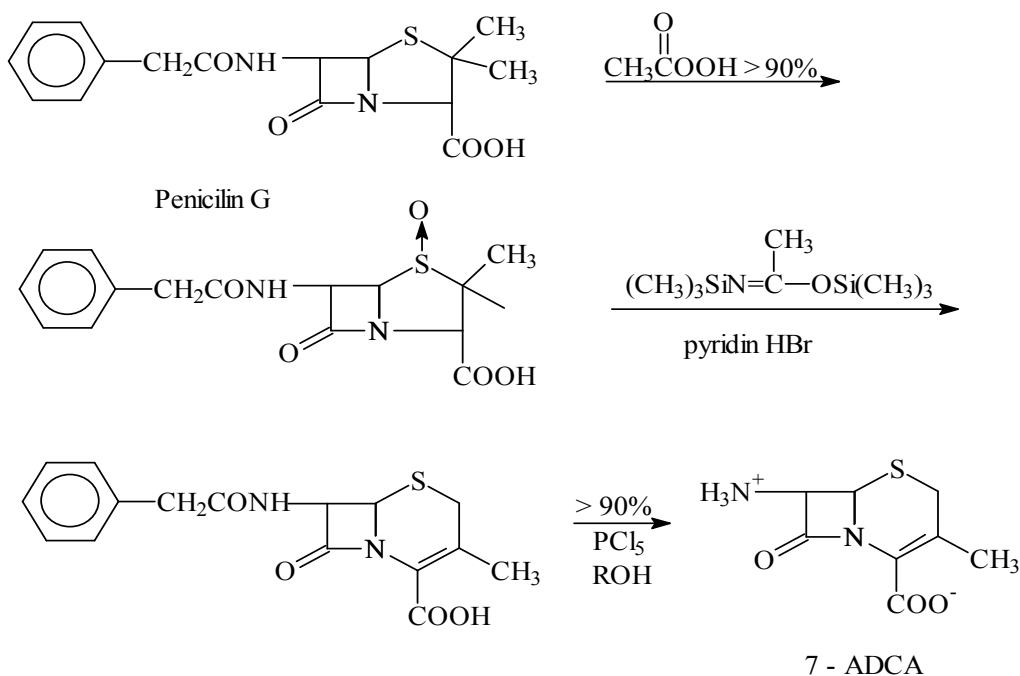
7-ADCA

Nếu loại nhóm acetoxy ở vị trí C3 của 7-ACA thì sẽ nhận được 7.amino deacetoxy cephalosporanic (7-ADCA). Đây cũng là một nguyên liệu trung gian quan trọng để tạo ra các cephalosporin bán tổng hợp.

5.2. Phương pháp sản xuất 7-ACA và 7-ADCA

Trước đây 7-ACA chủ yếu được sản xuất theo phương pháp hoá học bằng cách cắt mạch nhánh của cephalosporin C. Tuy nhiên người ta nhận thấy rằng trong môi trường lên men *Cephalosporium acremonium* tồn tại đồng thời một hỗn hợp kháng sinh cephalosporin P, cephalosporin C và penicillin N. Sự tồn tại đồng thời của penicillin N và cephalosporin C trong môi trường lên men đã gợi nên ý tưởng bán tổng hợp các kháng sinh mới nhóm cephalosporin từ penicillin.

Bằng phương pháp hoá học, từ penicillin G người ta đã tổng hợp được 7-ADCA theo sơ đồ phản ứng sau:



Hình 8.5. Sơ đồ phản ứng hoá học điều chế 7-ADCA từ penicillin G

Từ 7-ACA và 7-ADCA đã tạo ra các cephalosporin bán tổng hợp được dùng trong y học (bảng 8.6)

Bảng 8.6. Công thức một số cephalosporin bán tổng hợp từ 7-ACA và 7-ADCA

Gốc	Tên KS	Công thức
Từ 7-ADCA	Cephalexin	
	Cefaclor	
	Cephtracin	
	Cefadroxil	
Từ 7-ACA	Cephalothin	
	Cefazolin	
	Cefuroxim	
	Cefotaxim	

6. SINH TỔNG HỢP ACID CLAVULANIC

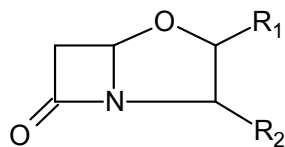
6.1. Đại cương

Acid clavulanic là một chất kháng sinh có cấu trúc vòng β -lactam được Brown và cộng sự tìm ra vào năm 1976 trong môi trường nuôi cấy *Streptomyces clavuligerus* (Napier và cs. cũng phát hiện ra acid clavulanic vào năm 1981 độc lập với nghiên cứu của Brown).

Acid clavulanic là một kháng sinh phổ rộng, tác dụng lên nhiều loài vi khuẩn bao gồm cả vi khuẩn Gram (+) và vi khuẩn Gram (-) nhưng hoạt tính kháng khuẩn của chúng rất yếu. Tuy nhiên ưu điểm của acid clavulanic là có hoạt tính kháng betalactamase, đặc biệt nó có tác dụng ức chế mạnh các betalactamase truyền qua plasmid gây kháng các penicillin và các cephalosporin. Vì vậy acid clavulanic được phối hợp với amoxicilin thành biệt dược mang tên Augmentin được bào chế ở nhiều dạng khác nhau như bột uống, viên nén bao phim, tiêm của hãng Glaxo Smithkline. Sự phối hợp với acid clavulanic giúp cho amoxicilin không bị betalactamase phá huỷ, đồng thời mở rộng thêm phổ kháng khuẩn của amoxicilin một cách hiệu quả với nhiều vi khuẩn thông thường đã kháng lại amoxicilin, kháng lại các penicillin và cephalosporin. Khi sử dụng riêng ampicillin thì nồng độ diệt vi khuẩn tối thiểu MBC (minimum bactericidal concentration) trên *Staphylococcus aureus* là 500 mcg/ml, song nếu sử dụng phối hợp với acid clavulanic ở nồng độ 5 mcg/ml thì liều MBC hiệu quả giảm xuống 5000 lần – tức là chỉ cần 0,1 mcg/ml. Việc phối hợp amoxicilin với acid clavulanic là một ví dụ điển hình của các nhà dược học về nghiên cứu bào chế phối hợp các dược chất để tạo ra các biệt dược mới tác dụng tốt trong điều trị nhằm ngăn cản sự kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn.

6.2. Cấu trúc hoá học và tính chất

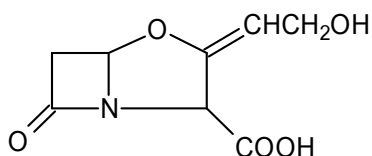
Về cấu trúc của acid clavulanic cũng tương tự như các kháng sinh nhóm β -lactam khác. Phân tử acid clavulanic cũng chứa vòng β -lactam (được xếp vào nhóm β -lactam không chứa S). Người ta đã tìm ra 6 sản phẩm lên men tự nhiên có cấu trúc tương tự với acid clavulanic và xếp chúng vào nhóm clavam.



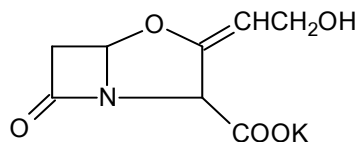
Bảng 8.7. Cấu trúc các kháng sinh clavam tự nhiên

Tên clavam	R ₁	R ₂
Acid clavulanic	- COOH	= CHCH ₂ OH
Acid β-hydroxypropionylclavulanic	- COOH	= CHCH ₂ COCH ₂ CH ₂ OH
Acid clavam - 2 - cacboxylic	- H	- COOH
2-hydroxymethylclavam	- H	- CH ₂ OH
2-formyloxymethylclavam	- H	- CH ₂ OCHO
2-(3 - alanyl) - clavam	- H	- CH ₂ CH(NH ₂)COOH
2-(2 - hydroxyethyl) - clavam	- H	- CH ₂ CH ₂ OH

Khi phối hợp với amoxicilin người ta sử dụng dạng muối kali của acid clavulanic có công thức hoá học C₈H₈KNO₅, ptl. 237,25.



Acid clavulanic



Kali clavulanat

Clavulanat dạng muối kali là bột tinh thể trắng, dễ hút ẩm, tan trong nước, tan ít trong cồn, rất ít tan trong acetone.

6.3. Lên men sinh tổng hợp acid clavulanic

6.3.1. Chủng giống

Trong công nghiệp người ta sử dụng chủng *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 hay NRRL 3858 để sản xuất acid clavulanic. Trong môi trường nuôi cấy ngoài acid clavulanic thường tích tụ đồng thời một vài clavam khác, một số dẫn xuất cephalosporin và penicillin N.

6.3.2. Quy trình lên men

Quy trình sinh tổng hợp của hãng Beecham Laboratories Ltd. có những công đoạn chính sau:

Bào tử giống được nuôi cấy trên bình Roux, nuôi trên môi trường đặc ở 26°C trong thời gian 10 ngày. Nhân giống ở 26°C trong 72 giờ, cấp khí 1VVM, tốc độ khuấy 140 vòng/ph.

Thành phần môi trường lên men sinh tổng hợp (w/v):

Bột đậu tương	3,0
Tinh bột	4,7
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
KH ₂ PO ₄	0,01
CaCO ₃	0,3
Dầu phá bọt	0,05
Nước máy	vđ

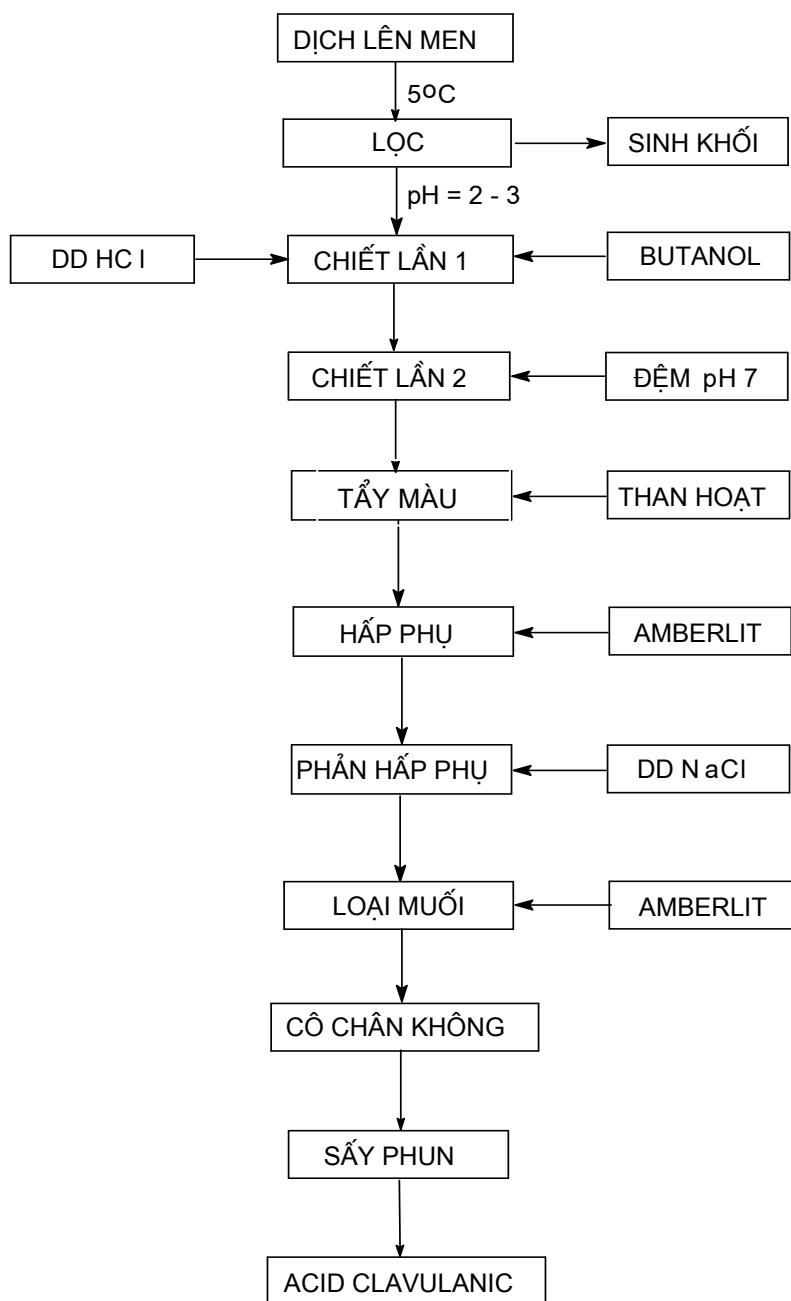
Môi trường lên men được chỉnh pH = 7,0, tiệt trùng bằng hơi ở 121°C trong thời gian 30 phút, làm nguội rồi cấy truyền 5 lít dịch giống sang. Quá trình lên men tiến hành ở 26°C, tốc độ khuấy 100 – 110 v/ph, cấp khí lưu lượng 0,75VVM. Thời gian nuôi cấy từ 90 – 100 giờ. Hiệu suất quá trình lên men thường đạt 500 mcg/ml dịch lên men.

6.3.3. Tách chiết và tinh chế acid clavulanic

Acid clavulanic là sản phẩm ngoại bào và có thể được chiết bằng cách dùng nhựa trao đổi ion (thường sử dụng anionit như Amberlite IR4B hay Zeolite FFIP...).

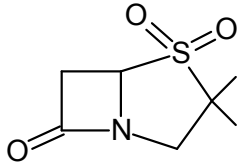
Kết thúc quá trình nuôi cấy hạ nhiệt độ dịch lên men xuống 5°C, lọc hoặc ly tâm loại sinh khối, acid hoá dịch lọc bằng acid hydrocloric hoặc sulfuric đến pH = 2–3, đồng thời bổ sung dung môi không tan trong nước như n-butanol hoặc ethylacetat. Acid clavulanic chuyển sang pha dung môi. Chiết acid clavulanic khỏi pha dung môi bằng các dung dịch có pH trung tính như dung dịch đệm natri bicarbonat hoặc kali hydrophosphat, hỗn dịch CaCO₃ hoặc nước. Dịch chiết đem hấp phụ bằng nhựa trao đổi ion để thu sản phẩm tinh khiết hoặc thu chế phẩm thô dạng muối bằng cách cô ở nhiệt độ thấp (≤ 40°C) và áp suất giảm hoặc sấy phun để thu sản phẩm.

Quá trình chiết xuất và tinh chế có thể tóm tắt bằng sơ đồ sau:

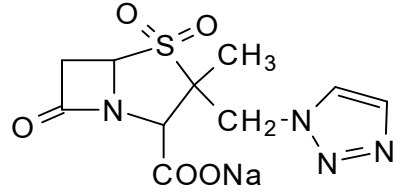


Hình 8.6. Sơ đồ các công đoạn tách chiết và tinh chế acid clavulanic

Các kháng sinh khác có cấu trúc clavam được xếp vào nhóm này là sulbactam và tazobactam. Đây là 2 kháng sinh được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hóa học. Sulbactam thường được phối hợp với amoxicillin, còn tazobactam được phối hợp với piperacillin.



Sulbactam



Tazobactam

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên các chủng vi sinh vật được sử dụng dùng để sản xuất các kháng sinh nhóm beta-lactam.
2. Tìm mối liên hệ giữa cấu trúc hoá học với chủng giống và quy trình sinh tổng hợp của 2 nhóm kháng sinh penicillin và cephalosporin.
3. Nêu phương pháp điều khiển quá trình sinh tổng hợp từ chủng nấm *Penicillium chrysogenum* để nhận được kháng sinh penicillin mong muốn?
4. Trình bày phương pháp sản xuất 6-APA bằng con đường sinh học.
5. Nêu nguyên tắc sản xuất các kháng sinh bán tổng hợp nhóm cephalosporin.
6. Trình bày phương pháp lên men và chiết xuất acid clavulanic.

Chương 9

SẢN XUẤT KHÁNG SINH NHÓM TETRACYCLIN

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này, sinh viên phải trình bày được:

1. Nguồn gốc các kháng sinh tự nhiên và bán tổng hợp nhóm tetracyclin.
2. Quy trình lên men nhận từng kháng sinh cụ thể.
3. Phương pháp có hiệu quả nhất trong 3 phương pháp chiết xuất kháng sinh từ dịch lên men.

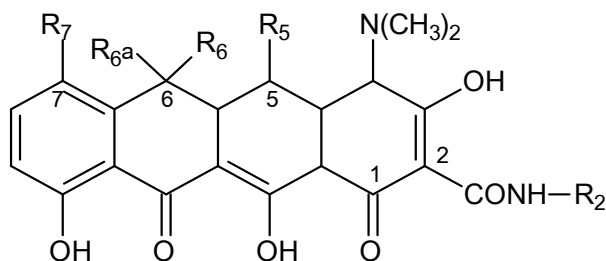
1. ĐẠI CƯƠNG

Các tetracyclin được phát hiện rất sớm (từ năm 1948), là nhóm chất kháng sinh phổ rộng đầu tiên ức chế hầu hết các vi khuẩn Gram (-), Gram (+) và Rickettsia... nên được sử dụng rộng rãi cho đến những năm 80 của thế kỷ XX, nhất là ở các nước đang phát triển. Hiện nay các kháng sinh tự nhiên của nhóm này như tetracyclin, clotetracyclin, oxytetracyclin chủ yếu được sử dụng trong chăn nuôi để điều trị bệnh cho gia súc, gia cầm và được phối hợp với vitamin B₁₂ để bổ sung vào thức ăn trong chăn nuôi có tác dụng kích thích tăng trọng. Các kháng sinh tetracyclin bán tổng hợp được dùng rộng rãi hơn để điều trị một số bệnh nhiễm trùng như mắt hột, mắt đỏ, viêm giác mạc, viêm phế quản, viêm tiết niệu do lậu cầu ... và đặc biệt để điều trị bệnh dịch hạch.

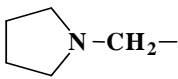
Các tetracyclin đều dễ bị kháng thuốc (Theo số liệu của ASTS – Chương trình giám sát quốc gia về tính kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh - Antibiotic Sensitivity Testing Studies): ở VN 92,9% *Salmonella typhi*; 41,4% *H. influenzae*; 87,9% *Klebsiella pneumoniae* kháng lại tetracyclin... Cơ chế tác dụng của các tetracyclin là phong toả hoạt động của nhiều enzym chính của quá trình trao đổi chất, ức chế quá trình tổng hợp protein của vi khuẩn (gắn vào đơn vị 30S của ribosom và ức chế chức năng của ribosom là tổng hợp protein của vi khuẩn). Khi kháng thuốc: vị trí gắn tetracyclin trên ribosom bị biến đổi do đó tetracyclin không gắn được vào ribosom và mất tác dụng.

2. CÔNG THỨC CẤU TẠO VÀ TÍNH CHẤT

Các kháng sinh nhóm tetracyclin có bộ khung chính là octahydro naphthaxenic:



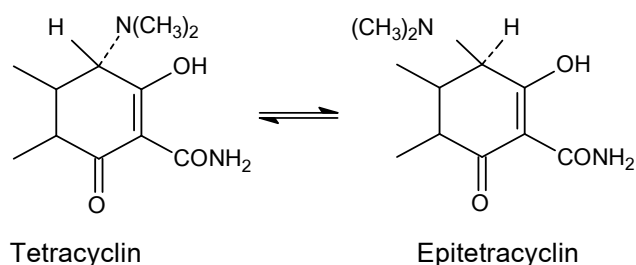
Bảng 9.1. Công thức cấu tạo một số kháng sinh nhóm tetracyclin

Tên	R ₂	R ₅	R _{6a}	R ₆	R ₇
Clotetracyclin	- H	- H	- OH	- CH ₃	- Cl
Oxytetracyclin	- H	- OH	- OH	- CH ₃	- H
Tetracyclin	- H	- H	- OH	- CH ₃	- H
6-Demethyl tetracyclin	- H	- H	- H	- H	- H
Demeclocyclin	- H	- H	- OH	- H	- Cl
Methacyclin	- H	- OH	= CH ₂		- H
Doxycyclin	- H	- OH	- H	- CH ₃	- H
Minocyclin	- H	- H	- H	- H	- N (CH ₃) ₂
Rolitetracyclin		- H	- OH	- CH ₃	- H

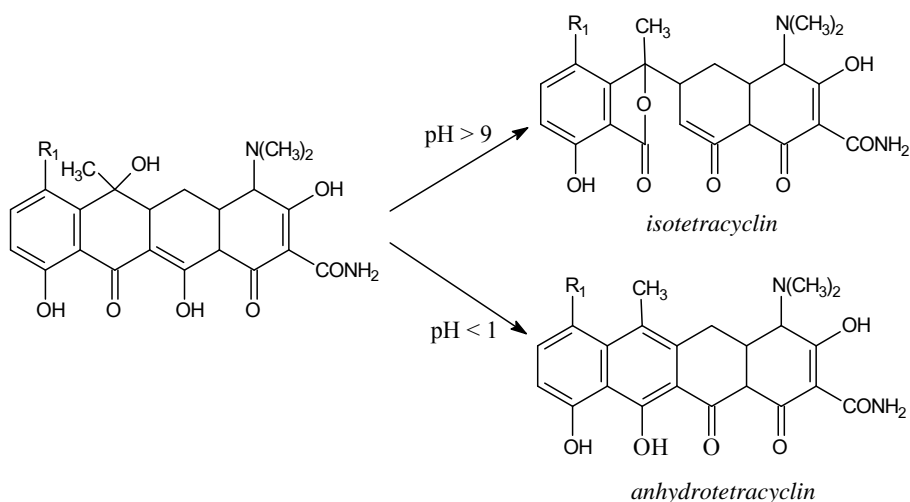
Đặc tính chung của các tetracyclin là bền với acid nên dùng để uống được nhưng do nhiều tác dụng phụ - đặc biệt là tạo phức calci bền vững làm răng bị vàng ố nên cấm dùng cho trẻ em dưới 10 tuổi. Một số tính chất của nhóm kháng sinh này cần được quan tâm trong quá trình chiết xuất là:

- *Tính lưỡng tính:* Do trong phân tử của các kháng sinh nhóm tetracyclin có chứa nhóm dimethylamino có khả năng tạo muối với acid và các nhóm hydroxyl có khả năng tạo muối với kiềm hoặc với các ion Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ (tạo tetracyclinat).
- Không bền vững với các tác nhân oxy hóa ngay cả oxy trong không khí. Trong dung dịch kiềm dễ bị oxy hóa tạo dẫn chất có màu thẫm.
- Bị phân hủy bởi ánh sáng.

- Dễ bị đồng phân hóa (do cấu trúc hydro naphtaxenic) trong dung dịch nước ở pH 2,0 – 6,0 tạo ra epitetracyclin không có tác dụng kháng sinh. Hiện tượng đồng phân hóa xảy ra nhanh hơn ở tetracyclin và clotetracyclin.



- Ở môi trường quá kiềm hay quá acid (pH > 9 hoặc pH < 1) các tetracyclin bị khử hoạt tính do tạo thành các dẫn chất anhydro và isotetracyclin



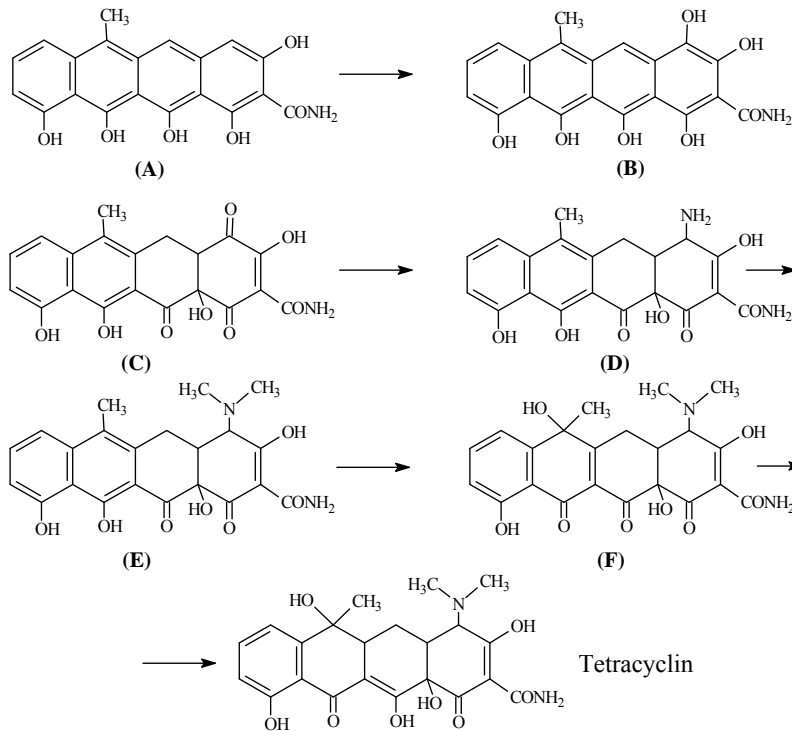
3. SINH TỔNG HỢP CÁC TETRACYCLIN TỰ NHIÊN

Có gần 10 tetracyclin tự nhiên nhưng thực tế người ta chỉ sản xuất ở quy mô công nghiệp 4 sản phẩm là clotetracyclin, tetracyclin, oxytetracyclin và demeclocyclin.

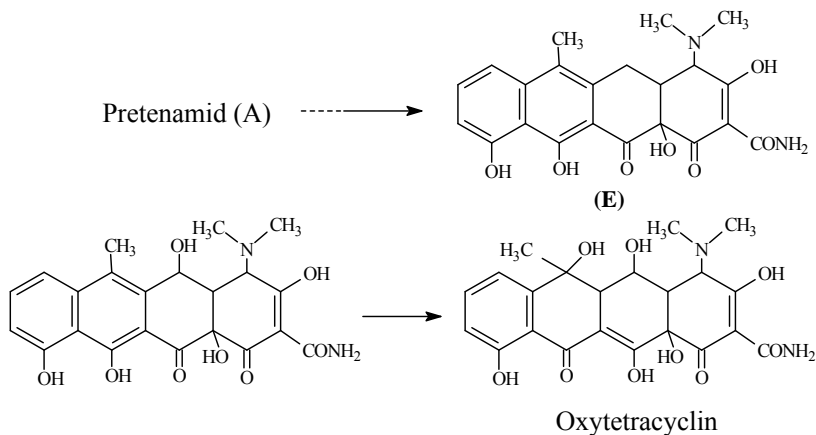
3.1. Chủng giống

Khả năng sinh tổng hợp kháng sinh nhóm tetracyclin tập trung chủ yếu ở xạ khuẩn. Các giống xạ khuẩn sinh kháng sinh nhóm tetracyclin gồm những chủng *Streptomyces rimosus*; *Str. aureofaciens*; *Str. platensis*; *Str. gilvus*... Cơ chế sinh tổng hợp các tetracyclin rất phức tạp với sự chuyển hoá qua nhiều giai đoạn trung gian khác nhau (cơ chế sinh tổng hợp clotetracyclin gồm 72 phản ứng). Quá trình sinh tổng hợp này có thể chia làm 3 giai đoạn chính:

- Sinh tổng hợp chuỗi oligo- β -ketoamid mạch thẳng từ các nguồn hydratcarbon.
- Khép vòng chuỗi oligo- β -ketoamid tạo thành bộ khung pretetramit (hoặc 6- methylpretetramit).
- Chuyển hoá tiếp pretetramit (hoặc 6- methylpretetramit) để tạo các tetracyclin.



Hình 9.1. Cơ chế sinh tổng hợp tetracyclin từ pretenamid (A)



Hình 9.2. Cơ chế sinh tổng hợp Oxytetracyclin từ anhydrotetracycline (E)

3.2. Đặc điểm quá trình lên men

Các chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh nhóm tetracyclin là những chủng vi sinh vật hiếu khí nên quá trình nuôi cấy cần lắc hoặc khuấy trộn kèm theo sục khí với lưu lượng khoảng 1VVM. Việc đảm bảo thông khí hợp lý và liên tục trong suốt quá trình lên men có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất sinh kháng sinh, đặc biệt là trong 6 – 12 giờ đầu tiên (quá trình có thể bị huỷ hoàn toàn nếu ngừng cấp oxy chỉ trong 5 phút). pH tối ưu cho sự phát triển là 6,6 – 7,2. Mỗi bào tử nảy 2-4 chồi tạo thành hệ sợi. Kháng sinh nằm trong sinh khối xạ khuẩn. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp từ 27 – 28⁰C. Thời gian lên men thường khoảng 110 – 140 giờ.

3.3. Nhu cầu dinh dưỡng

Nguồn hydrat carbon chủ yếu là bột ngô, bột mì, tinh bột khoai tây hoặc tinh bột ngô. Ngoài ra người ta còn bổ sung vào môi trường nuôi cấy một số loại đường như glucose (thích hợp với *S. rimosus*) hoặc maltose (thích hợp với *S. aureofaciens*). Các chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh nhóm tetracyclin không có khả năng phân giải saccharose và lactose.

Nguồn nitơ: Môi trường sản xuất cần có cả nguồn nitơ vô cơ như $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ cũng như Nitơ hữu cơ (cao ngô, bột đậu tương, bột lạc...).

Nguồn phospho: Đối với quá trình sinh tổng hợp các tetracyclin hàm lượng phospho vô cơ hoà tan trong môi trường lên men (chủ yếu từ cao ngô) có ý nghĩa rất quan trọng đến hiệu suất tạo kháng sinh: thiếu phospho giống phát triển kém và hiệu suất lên men thấp, thừa phospho giống phát triển nhanh nhưng hoạt lực kháng sinh giảm đáng kể do sự tích tụ acid acetic và acid pyruvic trong môi trường. Để tránh thừa phospho người ta bổ sung CaCO_3 để tạo thành các phosphat calci không tan. Ngoài ra nó còn có tác dụng giảm nồng độ các kháng sinh hoà tan để tránh độc tính của kháng sinh đối với giống.

Nguồn kim loại vi lượng: Các chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh nhóm tetracyclin cũng cần một số kim loại như Mg, Mn, Fe, Cu... và thường được bổ sung dưới dạng muối sulfat. Nếu môi trường có cao ngô, bột đậu, bột lạc... thì không cần bổ sung vì bản thân các loại nguyên liệu này đã sẵn có các muối kim loại. Cần chú ý đặc biệt đến hàm lượng sắt vì nếu sắt thừa sẽ kết hợp với Tetracyclin tạo ra những phức chất không có hoạt tính kháng sinh.

Ở pha phát triển thứ nhất trong điều kiện lên men chìm, các chủng xạ khuẩn này sinh trưởng mạnh trong khoảng từ 24 – 48 giờ và khối lượng khuẩn ty đã đạt tới 70 – 80% mức tối đa, lượng chất dinh dưỡng tiêu thụ từ 60 – 80%. Bước sang pha lên men thứ hai quá trình phát triển chậm lại nên tốc độ tiêu thụ chất dinh dưỡng giảm đi rất nhiều, sự tăng sinh khối (lượng khuẩn ty) chậm lại dần đạt tới mức độ cực đại rồi ổn định và xạ khuẩn bước sang giai đoạn tự phân. Trong giai đoạn này lượng chất dinh dưỡng trong môi trường còn lại rất ít và hầu như không được sử dụng.

Sự tổng hợp kháng sinh: Nghiên cứu động thái của quá trình lên men cho thấy các chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh nhóm tetracyclin bắt đầu pha thứ hai ở khoảng thời gian 25 - 35 giờ; sinh khối đạt mức cao nhất ở 45 - 50 giờ (đối

với *Str. aureofaciens*) và ở 48 - 55 giờ (đối với *Str. rimosus* là chủng phát triển chậm hơn). Lượng kháng sinh đạt tối đa ở 120 -144 giờ. Hiệu suất sinh tổng hợp lên tới 20.000 mcg/ml môi trường lên men với những chủng siêu tổng hợp.

3.4. Nguyên tắc chiết xuất kháng sinh từ môi trường lên men

Các kháng sinh nhóm tetracyclin có tính chất lưỡng tính nên có thể dùng cả 3 phương pháp sau để chiết tách sản phẩm ra khỏi dịch lên men:

- Chiết bằng dung môi hữu cơ có chất mang
- Chiết bằng phương pháp kết tủa
- Chiết bằng phương pháp trao đổi ion

Tùy theo loại kháng sinh cụ thể, độ tinh khiết cần thiết của sản phẩm mà người ta lựa chọn phương pháp thích hợp. Dưới đây mô tả quy trình sinh tổng hợp và chiết xuất một số kháng sinh cụ thể của nhóm tetracyclin.

4. SINH TỔNG HỢP CLOTETRACYCLIN

4.1. Chủng giống

Clotetracyclin còn có tên khác là biomycin, aureomycin và được tìm ra lần đầu vào năm 1948 trong môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Str. aureofaciens*. Trong sản xuất công nghiệp hiện nay người ta sử dụng một số biến chủng cho hiệu suất sinh tổng hợp cao như *Str. aureofaciens* A377 (NRRL 2009), *Str. aureofaciens* ATCC 13908-13911.

Muối clohydrat của clotetracyclin là dạng bột tinh thể màu vàng, không mùi, vị đắng, bền vững trong không khí khô ở nhiệt độ phòng, nếu để ra ánh sáng thì dần dần mất hoạt tính. Clotetracyclin bền trong dung dịch acid (pH 0,6 – 2,6), không bền trong dung dịch kiềm.

4.2. Điều kiện lên men

Nhu cầu dinh dưỡng và điều kiện lên men sinh tổng hợp của chủng *Str. aureofaciens* mang những đặc điểm chung như phần tổng quan nêu trên. Tuy nhiên cần chú ý thêm một số yếu tố riêng như sau:

Thành phần môi trường lên men (%):

Bột ngô	12,0
Cao ngô	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
NaCl (hoặc NH ₄ Cl, NH ₄ NO ₃)	0,6
Muối khoáng ...	0,01
CaCO ₃	1,5
Benzylthiocyanid	0,0001

pH sau khử trùng	6,6 - 7,2
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C
Thời gian lên men	100-120 giờ
Cung cấp khí vô trùng	1VVM

Môi trường lên men phải cung cấp ion clo để tạo Clotetracyclin. Thích hợp nhất là amoni clorid, natri clorid hoặc amoni nitrat.

Các tiền chất sử dụng trong sinh tổng hợp clotetracyclin là các hợp chất mạch vòng, thích hợp nhất là benzylthioxyanid ($C_6H_5CH_2-SCN$) với hàm lượng 1-3 mg/l môi trường có thể làm tăng hiệu suất đến 30 - 40%.

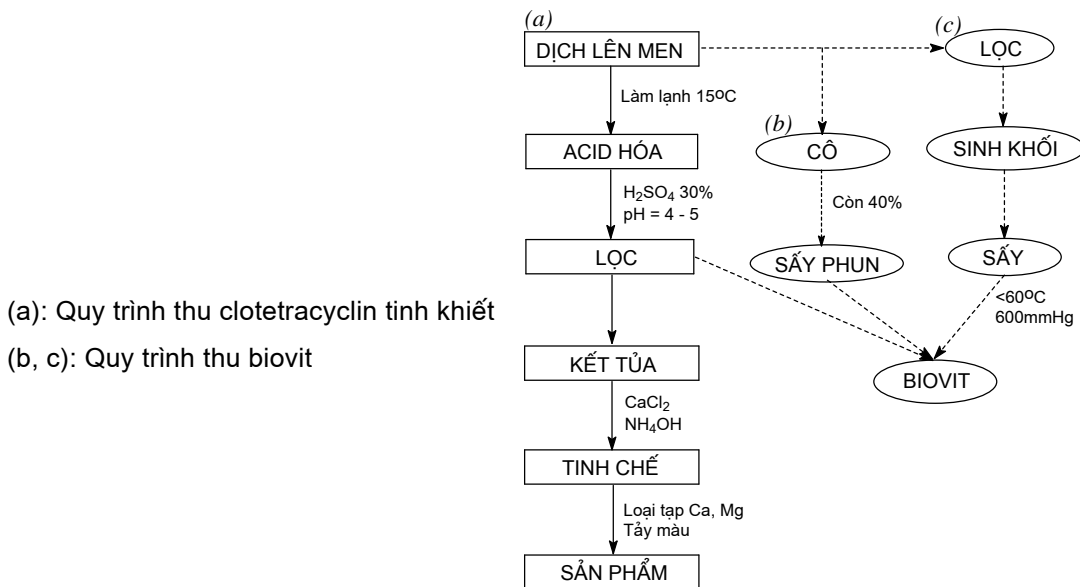
4.3. Phương pháp chiết xuất

Có thể sử dụng phương pháp kết tủa để thu clotetracyclin từ dịch lên men theo sơ đồ hình 9.3a. Các bước tiến hành như sau:

Dịch lên men được hạ nhiệt độ xuống 15°C. Sau đó acid hoá bằng H_2SO_4 30% đến pH = 4,5. Lọc loại sinh khối và thêm 0,1% $CaCl_2$. Kiểm hoá bằng NH_4OH đến pH 8,5 – 9 kháng sinh sẽ kết tủa dạng phức calci. Lọc thu kết tủa để tinh chế tiếp qua các công đoạn loại tạp, tẩy màu...

Clotetracyclin có hoạt tính kháng khuẩn mạnh gấp 4 lần tetracyclin (Test là *Staphylococcus aureus*) song độc tính cao hơn Tetracyclin nên hiện không dùng trong y học. Trước đây có sử dụng chế phẩm mỡ tra mắt (dạng clohydrat) và viên nén (dạng base). Hiện nay clotetracyclin được sản xuất dạng thô (chế phẩm Biovit) dùng trong chăn nuôi gia súc, gia cầm.

Qui trình sản xuất Biovit: Có thể áp dụng một trong hai quy trình sau (hình 9.3b và c):



(a): Quy trình thu clotetracyclin tinh khiết

(b, c): Quy trình thu biovit

Hình 9.3. Quy trình xử lý dịch lên men clotetracyclin

Dịch lên men được cô chân không đến 40% chất đặc, sau đó sấy phun thu sản phẩm. Hoặc dịch lên men đem lọc lấy sinh khối (Biomaca) và sấy chân không ở nhiệt độ $\leq 60^{\circ}\text{C}$ và $p = 600 \text{ mmHg}$. Sau đó xay thành bột, xác định hoạt tính kháng sinh của bột này để phân loại sản phẩm. Có các loại Biovit 80, Biovit 120 hay Biovit 150 (Mỗi kg Biovit có chứa 80, 120 hay 150 g biomyxin và 4 mg vitamin B_{12}).

5. SINH TỔNG HỢP TETRACYCLIN

5.1. Đại cương

Tetracyclin được phát hiện lần đầu vào năm 1953 bằng phương pháp khử clo của clotetracyclin. Sau này người ta tìm thấy chủng xạ khuẩn *Str. viridifaciens* có khả năng sinh tổng hợp ra tetracycline nhưng thực tế trong sản xuất sử dụng chủng *Str. aureofaciens* trong điều kiện nuôi cấy đặc biệt (có bổ sung các chất ức chế quá trình Clo hoá).

Tetracyclin base là bột kết tinh vàng sẫm, ít tan trong nước và dung môi hữu cơ. Dạng base này không bền nên thực tế sản xuất tetracyclin clohydrat là bột vàng sáng tan trong nước vừa bền vững, vừa dễ sử dụng.

5.2. Quy trình lên men

Điều kiện và đặc điểm của quá trình lên men tạo tetracyclin bởi chủng *Str. aureofaciens* gần giống với lên men tạo clotetracyclin. Tuy nhiên điểm khác biệt quan trọng nhất là thành phần môi trường nuôi cấy. Dựa vào thành phần môi trường cung cấp cho xạ khuẩn mà người ta có thể định hướng được sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men.

Str. aureofaciens trong điều kiện nuôi cấy bình thường tạo ra clotetracyclin; nhưng khi nuôi dưỡng trong điều kiện đặc biệt có chất ức chế quá trình clo hoá xạ khuẩn sẽ tạo ra chủ yếu tetracyclin. Để nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp tetracyclin phải loại những vết Cl^- ra khỏi môi trường. Trong phòng thí nghiệm để loại ion Cl^- có thể dùng muối bạc, tuy nhiên phương pháp này không thực tế. Hiện nay người ta dùng những chất ức chế quá trình clo hoá như brom, iod, thiocyanid... Tuy nhiên nếu tăng hàm lượng bromid trong môi trường xạ khuẩn sẽ tổng hợp ra cả 7 – bromtetracyclin và ức chế sinh tổng hợp tetracyclin. Vì vậy ngoài NaBr còn cho thêm các chất ức chế quá trình clo hoá khác như 2-mercaptobenzothiazol, 2 - thiouracyl, dẫn chất của acid dithiocarbamic ... Cơ chế tác dụng của các chất này chưa được rõ vì chúng không có tác dụng cạnh tranh với ion clo, có thể sự có mặt của nhóm sulfuhydryl (-SH) có tác dụng kích thích phản ứng oxy hoá khử làm loại Cl ra khỏi phân tử kháng sinh.

Thành phần môi trường lên men (%):

Bột ngô	10,0
---------	------

Cao ngô	0,5
NaBr	0,2
Benzylthiocyanid (C ₆ H ₅ CH ₂ -SCN)	0,0001
2-mercaptobenzothiazol	0,001
CaCO ₃	0,5
Dầu phá bọt	theo nhu cầu
pH sau khử trùng	6,8 – 7,2
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C
Thời gian lên men	120 giờ – 144 giờ
Cung cấp khí vô trùng	0,8 – 1 VVM

5.3. Quy trình chiết xuất tetracyclin

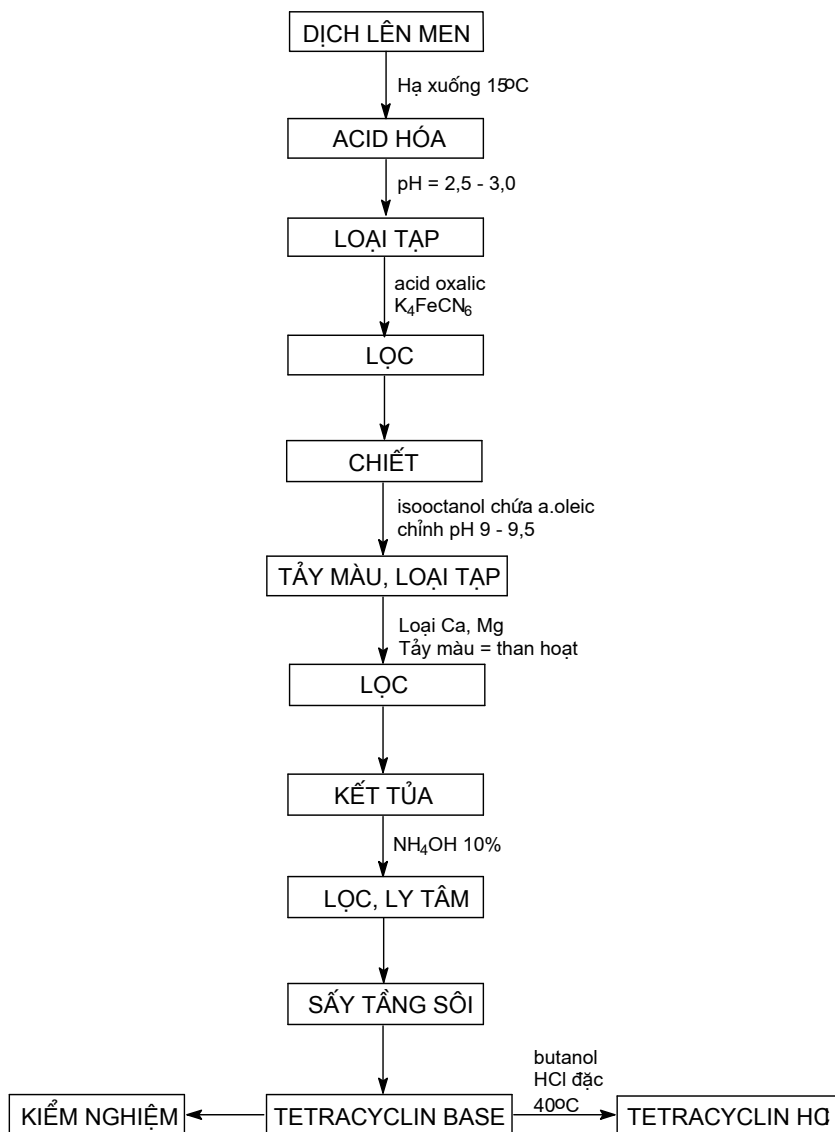
Cũng như các kháng sinh khác thuộc nhóm này, tetracyclin có thể được chiết bằng cả 3 phương pháp. Ở đây giới thiệu phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ:

Dịch lên men xong, bơm vào thùng chứa, hạ nhiệt độ xuống 15°C. Thêm acid oxalic và hạ pH = 2,5 – 3,0. Thêm Na₂CO₃ khuấy pH = 3,5. Thêm K₄Fe(CN)₆ khuấy tiếp 15 phút để loại sắt. Lấy mẫu phân tích Ca⁺⁺ và Fe⁺⁺: yêu cầu Ca⁺⁺ ≤ 0,4 - 0,6 g/lít. Fe⁺⁺ không có. Trong thiết bị chiết thêm hỗn hợp isoctanol có chứa 1,5 - 2,5% acid oleic tỉ lệ dung môi/dung dịch kháng sinh là 1 : 3 - 1 : 4, thêm NH₄OH 5% vào và khuấy pH = 9 - 9,5. Tetracyclin chuyển sang dung môi, dịch thải chuyển về phân xưởng thu hồi dung môi. Dịch chiết isoctanol bơm vào thiết bị chứa cùng với acid oxalic (dung dịch 5%) thêm vào với lượng 0,5 - 0,6% theo tỉ lệ dịch kháng sinh. Tại đây sẽ loại đi Ca⁺⁺ và các kim loại khác dạng oxalat. Ly tâm loại oxalat. Tẩy màu bằng than hoạt 0,25 - 0,3%. Sau khi lọc loại than trên lọc hút chân không thì kết tinh tetracyclin base bằng dung dịch NH₄OH 10%. Khuấy để kết tinh ở nhiệt độ 15°C và pH 3,9 - 4,5. Ly tâm thu sản phẩm và sấy khô bằng máy sấy tầng sôi. Hiệu suất chiết đạt 70 – 75%.

Trên thực tế, tetracyclin không bền vững, ít hoà tan trong nước nên khó sử dụng. Vì vậy thường chế tạo dạng muối clohydrat tetracyclin bền vững hơn (có dạng viên nén). Tại bộ môn Công nghiệp Dược, Trường Đại học Dược Hà Nội làm như sau:

Trong nồi phản ứng có máy khuấy đảo 30 lít butanol và 4 kg tetracyclin base vào khuấy liên tục và thêm 0,6 lít acid clohydric đặc. Khuấy đến tan hết, hạ nhiệt độ xuống 5°C giữ 1 giờ - lọc loại tủa nếu có. Nếu để chế tạo tetracyclin clohydrat tiêm phải lọc qua lọc Seitz. Dịch lọc được kết tinh trong thiết bị thủy tinh hay tráng men khi nâng nhiệt độ lên 40°C. Lọc hoặc ly tâm lấy tinh thể. Rửa tinh thể bằng acetone để loại butanol. Sấy chân không ≤ 40°C.

Hiệu suất chế tạo clohydrat tetracyclin đạt 90%.



Hình 9.4. Quy trình chiết tetracyclin bằng dung môi hữu cơ

6. SINH TỔNG HỢP OXYTETRACYCLIN

Oxytetracyclin được phát hiện lần đầu vào năm 1950 trong môi trường nuôi cấy *Str. rimosus*. Giai đoạn đầu kháng sinh này được sử dụng cho người ở dạng dihydrat hay muối clohydrat với các biệt dược Abbocin, Clinimycin, Berkmycen, Imperacin, Oxymycin. Hiện nay oxytetracyclin chủ yếu được dùng trong thú y và chăn nuôi với các sản phẩm mang tên teravit, terramycin, biostat.

Oxytetracyclin base là bột kết tinh màu vàng, không mùi, vị đắng.

6.1. Chủng giống

Trong công nghiệp sử dụng *Str. rimosus*. Ngoài ra các chủng *Str. griseoflavus*, *Str. armilatus* cũng sinh oxytetracyclin.

Môi trường lên men (%):

Bột ngô	6,0
Cao ngô	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
CaCO ₃	0,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01
pH sau khử trùng	6,8 – 7,0
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C
Thời gian lên men	120 giờ – 144 giờ

Cung cấp khí vô trùng: 0,8 – 1 thể tích không khí/1 thể tích môi trường/phút, áp suất nổi lên men: 0,3 – 0,4 at.

6.2. Điều kiện lên men

Trong điều kiện nuôi cấy chìm và khuấy trộn có cấp khí, giống xạ khuẩn *Str. rimosus* phát triển chậm hơn so với *Str. aureofaciens*. Tuy nhiên tốc độ sử dụng chất béo ở *Str. rimosus* nhanh hơn ở *Str. aureofaciens*, do đó quá trình lên men tạo oxytetracyclin cần nhiều dầu phá bọt hơn đối với lên men tạo tetracyclin và clotetracyclin. Tiến hành lên men ở 28°C, cấp khí với lưu lượng 1VVM. Thời gian lên men từ 120 giờ – 144 giờ.

Quá trình lên men oxytetracyclin xảy ra theo 2 pha: trong 60 giờ đầu xạ khuẩn phát triển rất mạnh. Từ giờ thứ 60 trở đi bắt đầu pha thứ 2. Khuẩn ty đứt ra lại nảy mầm tạo thành hệ khuẩn ty thứ cấp mảnh hơn. Đây là pha sinh tổng hợp ra kháng sinh. Trong quá trình này cần theo dõi chặt chẽ các thông số như pH, tốc độ tạo bọt, nồng độ đường... để bổ sung kịp thời.

6.3. Phương pháp chiết xuất kháng sinh

Để chiết xuất oxytetracyclin tốt nhất là dùng phương pháp kết tủa. Tuy nhiên ở đây giới thiệu quy trình chiết oxytetracyclin bằng phương pháp trao đổi ion. Quy trình chiết bao gồm các bước sau:

Tạo dịch lọc chứa kháng sinh:

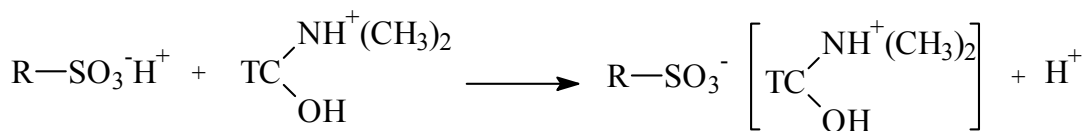
Dịch lên men được hạ nhiệt độ xuống 15°C. Thêm K₄Fe(CN)₆ 10% (khoảng 3 lít/m³) để loại sắt. Thêm acid oxalic (khoảng 5 kg/m³) và khuấy đến pH = 1,9 – 2,0 để loại ion Ca⁺⁺. Thêm dần Na₂CO₃ và khuấy cho đến khi đạt pH = 3,0 - 3,2 và khuấy tiếp 15 phút. Lấy mẫu phân tích Ca⁺⁺ và Fe⁺⁺ (yêu cầu Ca⁺⁺ ≤ 0,4 – 0,6

g/l; Fe⁺⁺ không có). Dịch được đem lọc bằng lọc trống quay hay ép khung bản. Dịch lọc tinh khiết đem hấp phụ trên cột chứa nhựa trao đổi ion.

Hấp phụ trên nhựa:

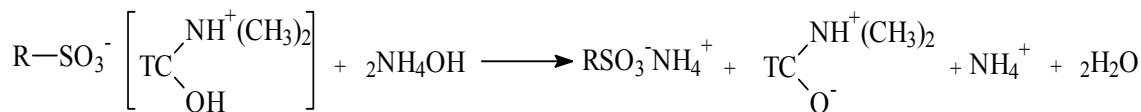
Dịch chứa kháng sinh được làm lạnh xuống 7 – 8°C. Bơm qua lọc chứa bông thủy tinh để loại protein và các tạp khác. Dịch lọc trong suốt được bơm qua cột trao đổi ion (cột được coi là bão hoà kháng sinh khi dịch đi qua lọc còn chứa ≤ 200 đơn vị/ml. Rửa cột bằng nước cất.

Trong dung dịch acid xuất hiện cation tetracyclin có thể thay thế các cation hydro của phân tử nhựa.



Phản hấp phụ:

Dùng dung dịch đệm borat amoni có pH = 9,6 – 10. Thường dùng dung dịch NH₄OH 0,3N rồi thêm acid boric để đạt nồng độ NH₄OH 0,25N. Tốc độ phản hấp phụ khoảng 600 l/giờ. Kháng sinh chuyển vào dung dịch dưới dạng anion



Để phản hấp phụ oxytetracyclin cần lượng amoniac sao cho không chỉ thay thế các cation kháng sinh trên nhựa mà còn đủ để hoà tan oxytetracyclin được đẩy ra. Phân đoạn đầu và cuối để riêng để hấp phụ lại; phân đoạn giữa đem kết tinh.

Kết tinh Oxytetracyclin base:

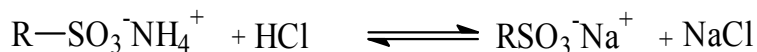
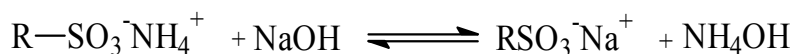
Trong nồi phản ứng có máy khuấy, dịch phản hấp phụ được acid hoá bằng HCl đến pH = 5 – 5,5. Để kết tinh 2 giờ ở 10°C. Ly tâm lấy tinh thể.

Tinh chế:

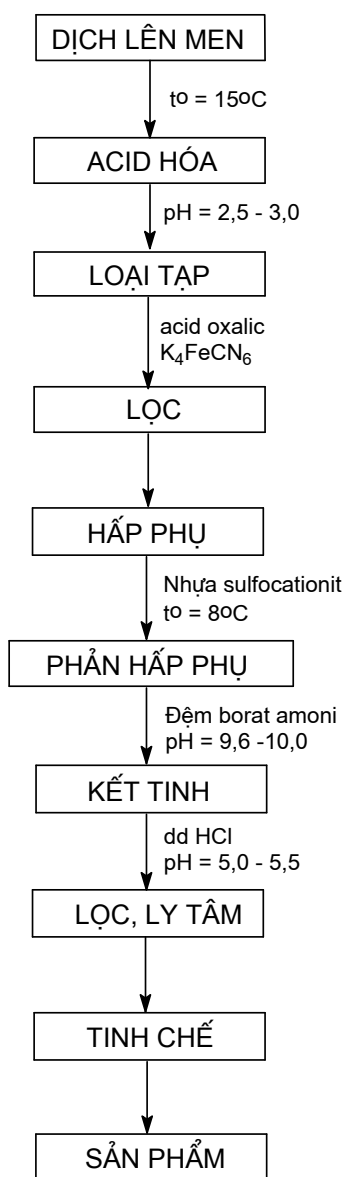
Hoà tan oxytetracyclin base trong HCl 0,1N. Tẩy màu bằng than hoạt. Lọc loại than được dịch lọc chứa oxytetracyclin từ 30 – 40 g/l. Dùng dung dịch NH₄OH 10N chỉnh dịch lọc đến pH 3,8 – 4 để kết tinh ở 10°C trong 2 giờ. Sau đó ly tâm lấy tinh thể. Sấy chân không ở nhiệt độ ≤ 60°C hoặc sấy tầng sôi. Thành phẩm đạt khoảng 900 UI/mg.

Hoàn nguyên nhựa:

Phương trình hoàn nguyên nhựa như sau:



Cho dung dịch NaOH 3N chảy qua cột với tốc độ 300 l/giờ. Rửa cột bằng nước đã loại ion đến khi dịch chảy ra có pH = 8 – 9,0. Sau đó cho dung dịch HCl 1N chảy qua cột với tốc độ 400 l/giờ đến khi pH của dịch chảy ra đạt 2 – 2,5 là được.



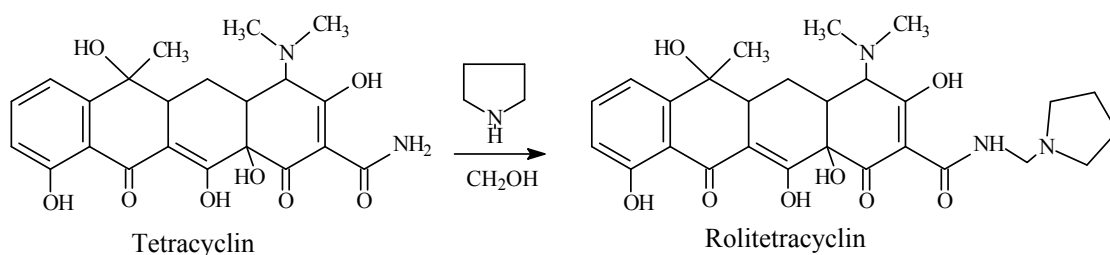
Hình 9.5. Các công đoạn chiết oxytetracyclin bằng dung môi hữu cơ

7. SẢN XUẤT MỘT SỐ TETRACYCLIN BÁN TỔNG HỢP

Do các nhược điểm về độc tính của các tetracyclin tự nhiên như đã trình bày ở trên, người ta đã tìm cách tạo ra các kháng sinh mới của nhóm này. Xu hướng tạo các tetracyclin tự nhiên mới bằng cách thay đổi các tiền chất hoặc định hướng sinh tổng hợp (VD: tạo bromtetracyclin bằng cách cung cấp ion brom thay cho clo; hoặc tạo các 6-demetyl của tetracyclin, clotetracyclin hay oxytetracyclin bằng cách thêm vào môi trường các chất ức chế quá trình methyl hoá như dẫn suất sulfonamid...) chưa đem lại kết quả khả quan. Hiện nay các kháng sinh tự nhiên của nhóm Tetracyclin chủ yếu chỉ được dùng trong ngành chăn nuôi, một phần trở thành nguyên liệu trung gian bán tổng hợp ra các tetracyclin mới. Có khoảng trên 3.000 chất kháng sinh bán tổng hợp nhóm tetracyclin đã được công bố, tuy nhiên chỉ một số ít trong chúng được sử dụng trong điều trị vì tác dụng phụ (nhất là đối với trẻ em). Nhóm các tetracyclin bán tổng hợp được chia thành 2 loại:

7.1. Các kháng sinh là dẫn xuất amid

Từ tetracyclin người ta cho phản ứng với formaldehyd và một amid tương ứng thì sẽ tạo nên một kháng sinh mới như rolitetracyclin (1958), limecyclin hoặc mepicyclin. Các kháng sinh này có tính tan trong nước tốt hơn.

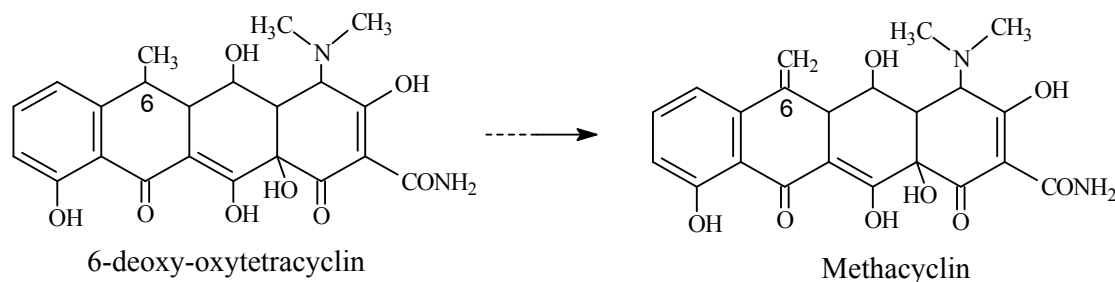


Phản ứng tạo Rolitetracyclin

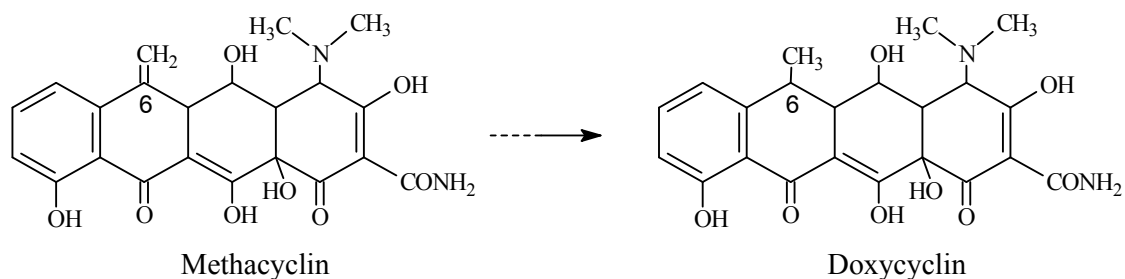
7.2. Các kháng sinh được thay thế các nhóm chức ở vị trí số 6 và 7

Đại diện tiêu biểu của nhóm này là 3 kháng sinh: methacyclin (1960), Doxycyclin (1962) và minocyclin (1967).

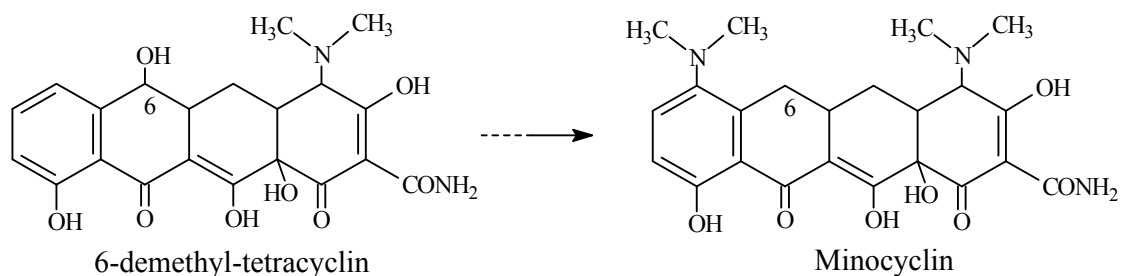
Methacyclin được bán tổng hợp từ 6-deoxy-oxytetracyclin theo sơ đồ sau:



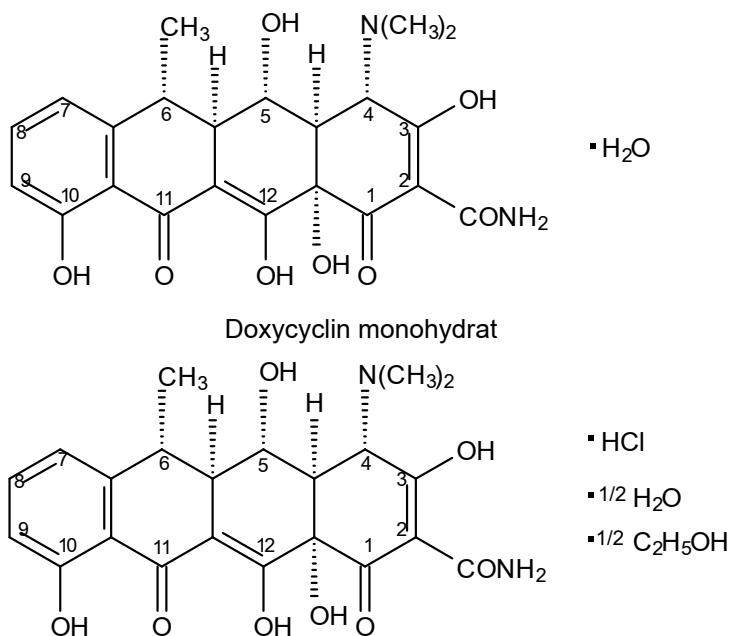
Doxycyclin được bán tổng hợp từ methacyclin theo sơ đồ:



Minocyclin được bán tổng hợp từ 6-demethyl-tetracyclin:



Ưu điểm của các kháng sinh này là liều dùng thấp hơn nên ít độc hơn và có tác dụng kéo dài. Trong số này doxycyclin được sử dụng phổ biến hơn cả dưới dạng monohydrat hay hylat.



Doxycyclin hylat (Doxycyclin hydrochlorid hemihydrat hemiethanolat)

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Chủng xạ khuẩn *Str. aureofaciens* trong điều kiện nào thì tạo ra sản phẩm clotetracyclin, điều kiện nào thì tạo ra tetracyclin?
2. Tại sao trong chiết xuất kháng sinh nhóm tetracyclin phải loại tạp Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{++} ?
3. Nêu vai trò của kháng sinh nhóm tetracyclin trong y học và trong đời sống hiện nay?

Chương 10

SẢN XUẤT KHÁNG SINH NHÓM AMINOGLYCOSID

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này, sinh viên phải trình bày được:

1. Nguồn gốc các kháng sinh tự nhiên và bán tổng hợp nhóm aminoglycosid.
2. Nguyên tắc chung trong tìm kiếm và sản xuất kháng sinh nhóm aminoglycosid.

1. ĐẠI CƯƠNG CHUNG VỀ CÁC AMINOGLYCOSID

1.1. Đại cương, phân loại

Các kháng sinh thuộc nhóm aminoglycosid chiếm vị trí quan trọng thứ 2 sau nhóm beta-lactam trong điều trị các bệnh nhiễm trùng. Đây là các kháng sinh có tác dụng chủ yếu trên các vi khuẩn hiếu khí, vi khuẩn Gram (-) như *Pseudomonas*, *Enterobacter*...

Bảng 10.1. Một số kháng sinh tiêu biểu nhóm aminoglycosid

Tên KS	Năm	Chủng xạ khuẩn	Thế hệ	Đường dùng
Streptomycin	1944	<i>Str. griseus</i>	I	Tiêm
Dihydrostrep		bán TH từ streptomycin	I	Tiêm
Neomycin	1949	<i>Str. fradiae</i>	I	Ngoài da, uống
Kanamycin	1957	<i>Str. kanamyceticus</i>	I	Tiêm, uống
Paronomycin	1959	<i>Str. rimosus</i>	I	Tiêm
Gentamicin	1963	<i>M. purpurea</i>	II	Tiêm, mắt
Sisomicin	1970	<i>Micromonospora inyoensis</i>	II	Tiêm
Netilmicin	1975	bán tổng hợp từ sisomicin	II	Tiêm
Tobramycin	1975	<i>Str. tenebrarius</i>	II	Tiêm, mắt
Amikacin	1976	bán tổng hợp từ kanamycin	II	Tiêm

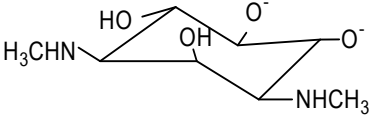
Các aminoglycosid phổ biến được phân lập từ các chủng xạ khuẩn *Streptomyces* hoặc *Micromonospora*, ngoài ra có một số chủng *Bacillus* cũng có khả năng sinh kháng sinh nhóm này. Các aminoglycosid được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces* có tên gọi kết thúc bằng *-mycin*, còn những kháng sinh được phân lập từ chủng xạ khuẩn *Micromonospora* có tên gọi kết thúc bằng *-micin*. Số lượng các aminoglycosid tự nhiên lên tới hơn 150 chất kháng sinh. Những kháng sinh quan trọng của nhóm này phải kể đến: amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, streptomycin... Các aminoglycosid có thể chia thành 2 thế hệ dựa trên độc tính và phổ kháng khuẩn (bảng 10.1).

Các kháng sinh thế hệ I của nhóm aminoglycosid ngày nay ít được sử dụng do độc tính và phổ kháng khuẩn kém hơn các kháng sinh thế hệ II bao gồm các kháng sinh sinh tổng hợp và bán tổng hợp như gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin... trong đó gentamicin được sử dụng phổ biến hơn cả.

1.2. Cấu trúc hoá học các aminoglycosid

Bảng 10.2. Các aminocyclitol của kháng sinh

Aminocyclitol		Kháng sinh tiêu biểu
Tên nhóm	Cấu trúc	
Streptidin		Streptomycin Dihydrostreptomycin
Bluesin		Bluensomycin
2-deoxy streptamin		Neomycin Paromomycin Kanamycin Gentamicin Sisomicin Apramycin Tobramycin...

Actinamin		Spectinomycin Kasugamicin Validomycin Hygromycin Destomycin
-----------	---	---

Phần lớn các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp kháng sinh nhóm aminoglycosid trong quá trình sinh tổng hợp có khả năng tạo ra đồng thời nhiều chất có cấu trúc rất gần nhau như chủng *Str. fradiae* sinh tổng hợp đồng thời neomycin A, B và C; chủng *Micromonospora purpurea* sinh tổng hợp đồng thời các gentamicin C₁, C_{1a} và C₂...

Về cấu trúc các aminoglycosid là một họ gồm rất nhiều chất kháng sinh khác nhau có cấu trúc phân tử gồm 2 thành phần chính là các nhóm amin liên kết với gốc glycosid. Theo đặc điểm cấu trúc hoá học có thể phân loại các aminoglycosid dựa theo nhóm aminocyclitol của chúng:

Nhóm kháng sinh chứa 2-deoxystreptamin còn được chia thành 2 phân nhóm nhỏ với các phân tử đường được gắn ở vị trí số 4 và 5 (đại diện là neomycin) và các phân tử đường được gắn ở vị trí số 4 và 6 (đại diện là kanamycin, gentamicin).

Nhóm chứa actinamin còn có tên gọi là nhóm chứa các acid amin khác nhau: gồm spectinomycin, kasugamicin, validomycin, hygromycin, destomycin. Trong số này chỉ có spectinomycin được sử dụng trong y học, các kháng sinh còn lại chủ yếu sử dụng trong nông nghiệp và chăn nuôi để trị bệnh cho cây trồng và gia súc.

1.3. Tính chất hoá học chung và cơ chế tác dụng

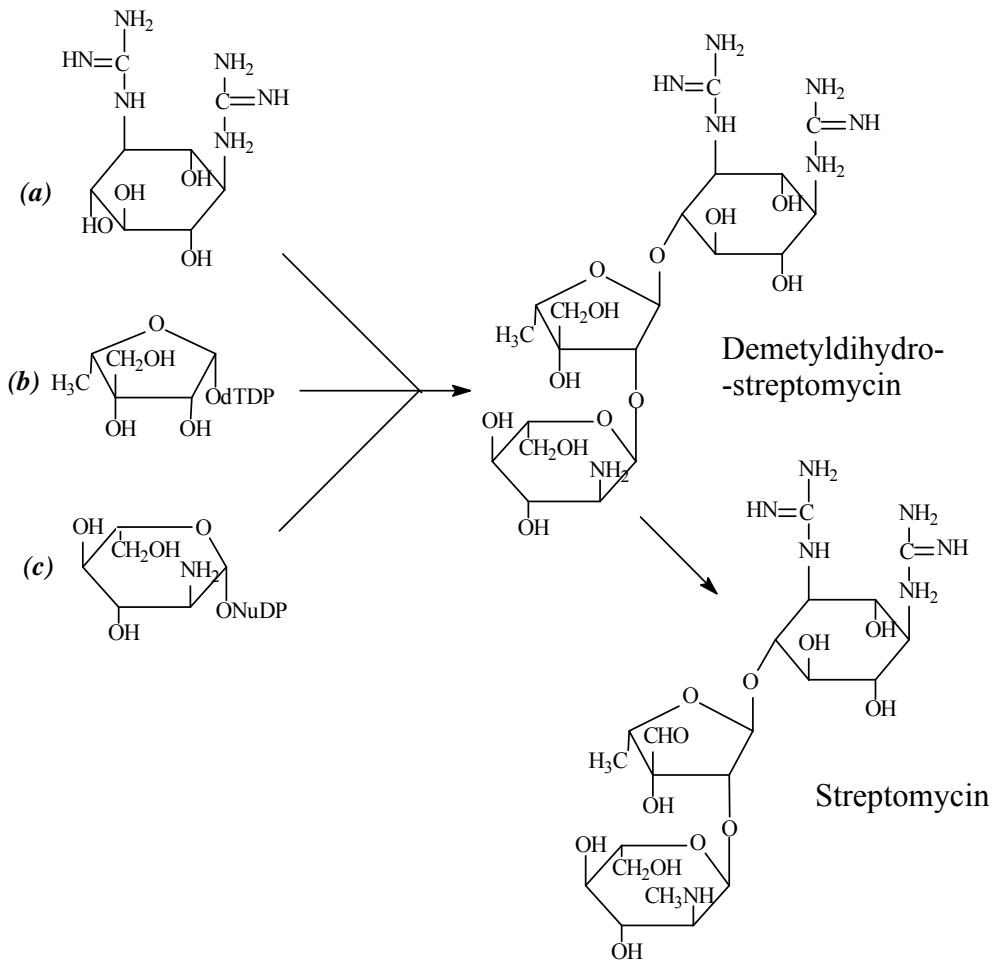
Phần lớn aminoglycosid dễ tan trong nước, phổ kháng khuẩn rộng, bền với nhiệt và pH. Hầu hết kháng sinh nhóm này được sử dụng chủ yếu ở dạng tiêm hoặc thuốc dùng tại chỗ, rất hiếm hữu có dạng uống. Chỉ riêng neomycin được dùng đường uống trong điều trị bệnh nhiễm khuẩn não và gan vì độc tính cao. Hai phản ứng có hại chủ yếu của các kháng sinh aminoglycosid là độc cho cơ quan thính giác và thận không hồi phục khi dùng kéo dài (nhất là streptomycin và neomycin), chủ yếu là ở ốc tai (neomycin) và tiền đình (streptomycin).

Cơ chế tác dụng của các aminoglycosid là gắn kết vững chắc với một trong hai vị trí gắn aminoglycosid trên tiểu phân 30S của ribosom, kết quả là thuốc ức chế tổng hợp protein của vi khuẩn.

Các aminoglycosid hoàn toàn không có tác dụng trên các vi khuẩn kỵ khí, nấm và virus. Kể từ khi xuất hiện các penicillin bán tổng hợp và các tetracyclin vị trí của các kháng sinh nhóm aminoglycosid trở nên ít có ý nghĩa hơn. Tuy nhiên ưu điểm của các kháng sinh aminoglycosid là giá thành rẻ nên

thích hợp với các nước kinh tế còn nghèo. Ngày nay các kháng sinh nhóm aminoglycosid được coi là các chất kháng sinh dự trữ, chỉ được sử dụng chủ yếu khi các kháng sinh khác không mang lại hiệu quả. Một số kháng sinh nhóm này được sử dụng trong nông nghiệp như ở Nhật sử dụng kasugamicin để trị bệnh vàng lụi cho lúa do chủng *Piricularia oryzae* gây ra; các kháng sinh khác được sử dụng chữa bệnh cho gia súc như hygromycin được sinh tổng hợp từ chủng *S. hygrosopios*, destomycin được sinh tổng hợp từ chủng *S. rimofaciens*, validomycin được sinh tổng hợp từ chủng *S. hygrosopicus*...

1.4. Cơ chế sinh tổng hợp



Hình 10.1. Cơ chế sinh tổng hợp streptomycin từ streptidin đã được phosphoryl hoá (a), dTDP-L-dihydrostreptose (b) và N-metyl-glucosamin (c)

NuDP: nucleotiddiphosphat

dTDP: deoxythymidindiphosphat

Do cấu trúc hết sức đa dạng và khác nhau, trong quá trình sinh tổng hợp các nhóm chất aminoglycosid sẽ trải qua các mắt xích trung gian và cần các tác nhân cảm ứng hay kiềm chế khác nhau. Ở *Str. Griseus*, dihydrostreptomycin-6-phosphat và streptomycin được hình thành ở giai đoạn cuối nhờ phản ứng kết hợp giữa 3 cấu tử: streptidin đã được phosphoryl hoá, dTDP-L-dihydrostreptose và N-metyl-glucosamin (hình 10.1). Từ nguồn cơ chất glucose, bằng cách sử dụng các biến chủng và áp dụng các chế độ công nghệ tương ứng khác nhau người ta đã lên men được hàng loạt các aminoglycosid khác nhau.

1.5. Quá trình tách chiết sản phẩm

Các kháng sinh nhóm aminoglycosid đều là những chất có tính base yếu, tương đối bền với nhiệt, với pH, tuy nhiên trong môi trường lên men thường tồn tại đồng thời một họ gồm nhiều kháng sinh có cấu trúc gần giống nhau với hoạt tính kháng sinh khác nhau. Do đó trong công nghiệp người ta thường lựa chọn phương pháp sắc ký bằng nhựa trao đổi ion để tách và tinh chế sản phẩm. Trong các công đoạn tách đầu tiên người ta thường sử dụng cationit, sau đó tùy thuộc vào loại aminoglycosid cần tách mà người ta chọn các loại nhựa khác nhau. Các chất mang thường được lựa chọn là carboxymethylcellulose (CMC), CM-sepharose, sephadex, phospho-cellulose, sulfoethylcellulose... Một số cationit bán trên thị trường hay được sử dụng là Amberlit IR-120, Amberlit IRC-50, Diaion SK-1B, Diaion PK-204, Dowex 44, Dowex 50W X2, Duolite C-3, Duolite ES-26...

2. SINH TỔNG HỢP STREPTOMYCIN

2.1. Đại cương

Streptomycin đặc biệt có tác dụng trên trực khuẩn lao (*Mycobacterium tuberculosis*) và được phát hiện lần đầu tiên vào tháng 4 năm 1944 do Waksman S. A và cộng sự chiết được từ môi trường nuôi cấy *Streptomyces griseus*. Đây là một mốc quan trọng trong lịch sử y học vì đó là chất kháng sinh đầu tiên có khả năng khống chế được bệnh lao.

Mặc dù có nhược điểm là độc tính cao trên cơ quan thính giác nếu dùng lâu, song streptomycin vẫn là kháng sinh được sử dụng để điều trị lao kết hợp với một số thuốc khác có hiệu quả. Hiện nay ở các nước phát triển streptomycin đã được thay thế bằng một số kháng sinh bán tổng hợp khác vì một mặt streptomycin gây tổn thương cho cơ quan thính giác, mặt khác ngày càng có nhiều vi khuẩn có khả năng kháng lại streptomycin. Một số chủng xạ khuẩn được sử dụng để sinh tổng hợp streptomycin là: *Str. reticuli*, *Str. bikiniensis*, *Str. raneus*, *Str. humidus*,

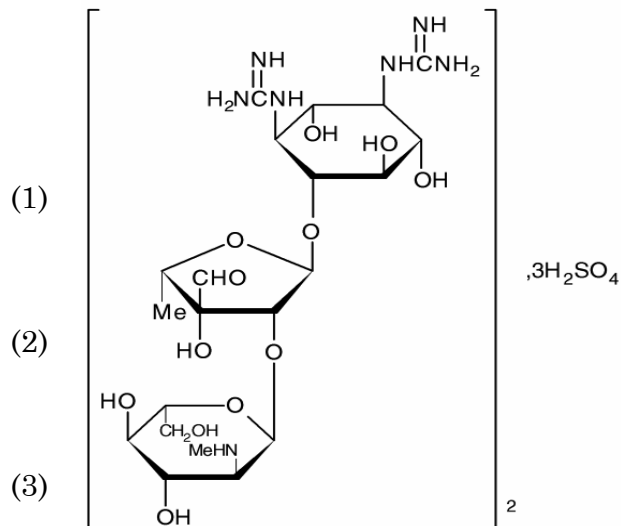


Hình 10.2. Nhà bác học Selman Abraham Waksman (1888 – 1973)

Str. griseocarneus. Tuy nhiên trong công nghiệp chủ yếu người ta sử dụng một số biến chủng *Str. griseus* có khả năng kháng actinophage cao.

2.2. Cấu trúc hoá học và tính chất

Công thức hoá học của streptomycin được xác định từ những năm 1946 – 1948. Phân tử streptomycin bao gồm 3 phần chính được liên kết với nhau bằng dây nối glycosid:



1- Streptidin là dẫn chất diguanidin của meso - inosid

2- Streptose là loại đường L có chứa nhóm aldehyd ở C₃

3- Metyl glucosamin là đường loại L có chứa nhóm metylamin ở C₂.

Hai phần sau liên kết với nhau bằng dây nối glycosid tạo ra phân tử gồm hai loại đường được gọi là streptobiosamin.

Streptomycin chỉ có hoạt tính khi phân tử còn nguyên vẹn. Nếu cắt bỏ phần nào trong phân tử đều làm kháng sinh mất tác dụng. Tuy nhiên nếu khử nhóm aldehyd (bằng H_2/Pd) thành nhóm alcol tạo ra dihydrostreptomycin lại có tác dụng mạnh trên trực khuẩn lao nên dihydrostreptomycin được sử dụng điều trị lao. Tuy nhiên sau này người ta nhận thấy dihydrostreptomycin tuy ít độc hơn streptomycin nhưng lại dễ gây điếc hơn nên hiện nay không sử dụng nữa.

Streptomycin là bột trắng, không mùi, vị đắng, hút ẩm mạnh. Dễ tan trong nước do có nhiều nhóm hydroxyl và amin, ít tan trong etanol, không tan trong ete và cloroform. Được sử dụng nhiều hơn cả là dạng muối sulfat. Dạng muối này bền trong không khí và ánh sáng.

Streptomycin không hấp thu qua đường ruột nên dùng để tiêm bắp. Có tác dụng diệt khuẩn bằng cách ngăn cản quá trình tổng hợp protein của vi

khuẩn. Phổ kháng khuẩn của streptomycin gồm các vi khuẩn Gram (-) hiếu khí và một số vi khuẩn Gram (+), streptomycin không có tác dụng trên các vi khuẩn kỵ khí.

2.3. Quy trình lên men sinh tổng hợp

2.3.1. *Chủng giống*

Trong sản xuất công nghiệp người ta sử dụng các biến chủng của *Streptomyces griseus* như ATCC11429.

Xạ khuẩn *S. griseus* là vi sinh vật hiếu khí mạnh nên quá trình nuôi cấy cần lắc hoặc khuấy trộn kèm theo sục khí. Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp từ 26 – 28°C. pH tối ưu cho sự phát triển là 6,8 – 7,2. Thời gian lên men khoảng 96 – 120 giờ – 144 giờ.

2.3.2. *Điều kiện lên men*

Nguồn carbon: Nguồn hydratcarbon *Str. griseus* đồng hoá được là tinh bột, dextrin, maltose, fructose... Chủ yếu sử dụng tinh bột và glucose vì cả 3 thành phần cấu tạo của Streptomycin đều có nguồn gốc từ glucose. Tuy nhiên ngoài streptomycin trong môi trường lên men còn tạo thành manosidostreptomycin (hay còn gọi là streptomycin B) có hoạt tính kháng sinh yếu. Khi môi trường chứa quá nhiều glucose thì sẽ tạo thành một hỗn hợp không mong muốn của cả 2 loại streptomycin. Nguồn carbon vừa giúp cho vi sinh vật phát triển, cung cấp năng lượng cho vi sinh vật, đồng thời tham gia trực tiếp vào phân tử kháng sinh streptomycin.

Nguồn nitơ: Nguồn nitơ vô cơ thích hợp là các muối amoni và không thích hợp với các muối nitrat.

Str. griseus còn có khả năng sinh trưởng và tạo kháng sinh streptomycin trên môi trường chứa protein như bột đậu tương, bột cá, men khô, gluten bột mì vì loài xạ khuẩn này có hệ protease mạnh nên có khả năng phân huỷ các protein thành các acid amin và sử dụng các acid amin này trong quá trình trao đổi chất.

Nguồn phospho: Cần phospho vô cơ hoà tan có trong KH_2PO_4 để cho giống sinh trưởng và phát triển bình thường. Thiếu phospho hoà tan thì sinh trưởng của khuẩn ty yếu do sự đồng hoá carbon và nitơ bị chậm và hoạt lực kháng sinh thấp. Tuy nhiên thừa phospho sẽ tăng nhanh tốc độ sử dụng hydratcarbon làm cho quá trình tạo bào tử rút ngắn, do đó ức chế sự tổng hợp streptomycin.

NaCl: Thực nghiệm cho thấy thêm NaCl vào môi trường lên men thì hiệu suất sinh tổng hợp streptomycin tăng. Có lẽ NaCl có tác dụng làm thay đổi tính thấm của thành tế bào nên kháng sinh tiết vào môi trường dễ dàng hơn và không gây ức chế lên chủng sinh streptomycin.

$CaCO_3$: Trong môi trường nuôi cấy cần có $CaCO_3$ với mục đích làm ổn định pH.

Nguồn kim loại vi lượng: Chủng xạ khuẩn sinh streptomycin cũng cần một số kim loại như Mg, Mn, Fe, Cu... và thường được bổ sung dưới dạng muối sulfat. Nếu môi trường có cao ngô, bột đậu, bột lạc... thì không cần bổ sung vì bản thân các loại nguyên liệu này đã sẵn có các muối kim loại.

Quá trình lên men kéo dài khoảng 120 - 144 giờ, nhiệt độ thích hợp 26 - 28°C, pH môi trường 6,8 - 7,2. Cấp khí với lưu lượng 1 VVM. Ở pha phát triển thứ nhất, chủng xạ khuẩn này sinh trưởng mạnh sau 6 - 8 giờ. Các bào tử nảy chồi, mỗi bào tử nảy 1 chồi tạo thành hệ sợi. Khuẩn ty thẳng và phân nhánh yếu, tế bào chất ưa kiềm. Bước sang pha lên men thứ hai quá trình phát triển chậm lại hệ sợi không phát triển nữa mà bước vào giai đoạn tự phân ở ngày thứ 3 (khoảng 72 giờ). Chủng *Str. griseus* rất nhạy cảm với phage, do đó quá trình lên men cần giữ vô khuẩn rất chặt chẽ và cần kiểm tra độ vô trùng 4 giờ/lần.

Trong điều kiện tối ưu hiệu suất sinh tổng hợp tạo streptomycin của xạ khuẩn *Str. griseus* đạt tới 20.000 – 25.000 đv/ml môi trường.

Các môi trường sinh tổng hợp có thành phần như sau:

Môi trường giữ giống (%)

Glucose	2,0
Pepton	0,5
Cao thịt	0,5
NaCl	0,5
Agar – agar	2,0
pH	6,8 – 7,2
Khử trùng	115°C trong 20 phút.
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C
Thời gian nuôi cấy	5 – 7 ngày.

Môi trường nhân giống (%)

Glucose	4,0
Bột đậu	3,0
$(NH_4)_2SO_4$	0,6
NaCl	0,3
$CaCO_3$	0,6
KH_2PO_4	0,01

Dầu phá bọt	0,5
pH	6,8 – 7,2

Khử trùng bằng hơi nóng ở 120°C trong 60 phút. Khi môi trường hạ nhiệt độ xuống 28 - 30°C thì cấy giống vào với tỷ lệ 0,5 lít/600 lít môi trường. Giống được nuôi trong vòng 40 – 48 giờ ở nhiệt độ 28°C. Cấp khí vô trùng với lưu lượng 1 VVM. Máy khuấy với tốc độ 110 vòng/phút. Phá bọt tự động bằng dầu lạc đã khử trùng.

Giống được truyền sang nồi nhân giống cấp 2 và được nuôi dưỡng trong điều kiện như trên trong thời gian 36 – 40 giờ.

Môi trường lên men tạo streptomycin (%)

Glucose	4,0
Bột đậu	3,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,6
NaCl	0,25
CaCO ₃	0,6
KH ₂ PO ₄	0,01
Dầu phá bọt	0,2
pH	6,8 – 7,2

Môi trường được chuẩn bị trong nồi pha chế, sau đó bơm qua cột khử trùng liên tục ở 134°C. Khi môi trường hạ nhiệt độ xuống 28 – 30°C thì truyền giống từ nồi ủ sang bằng khí nén vô trùng.

Tiến hành lên men kháng sinh trong điều kiện nhiệt độ 28°C trong thời gian 120 – 144 giờ. Cấp khí vô trùng với lưu lượng 0,5 – 1VVM. Máy khuấy với tốc độ 110 vòng/phút. Phá bọt tự động bằng dầu lạc đã khử trùng. Cứ 4 giờ lấy mẫu phân tích 1 lần để kiểm tra độ vô trùng, có nhiễm phage hay không? Có cần bổ sung thành phần gì vào môi trường nuôi cấy hay không? Cần kiểm soát chặt chẽ hàm lượng glucose trong môi trường lên men để thu được chủ yếu streptomycin A.

Hiện nay người ta vẫn chưa xác định được tiền chất trong quá trình sinh tổng hợp streptomycin.

2.4. Quy trình chiết xuất kháng sinh Streptomycin

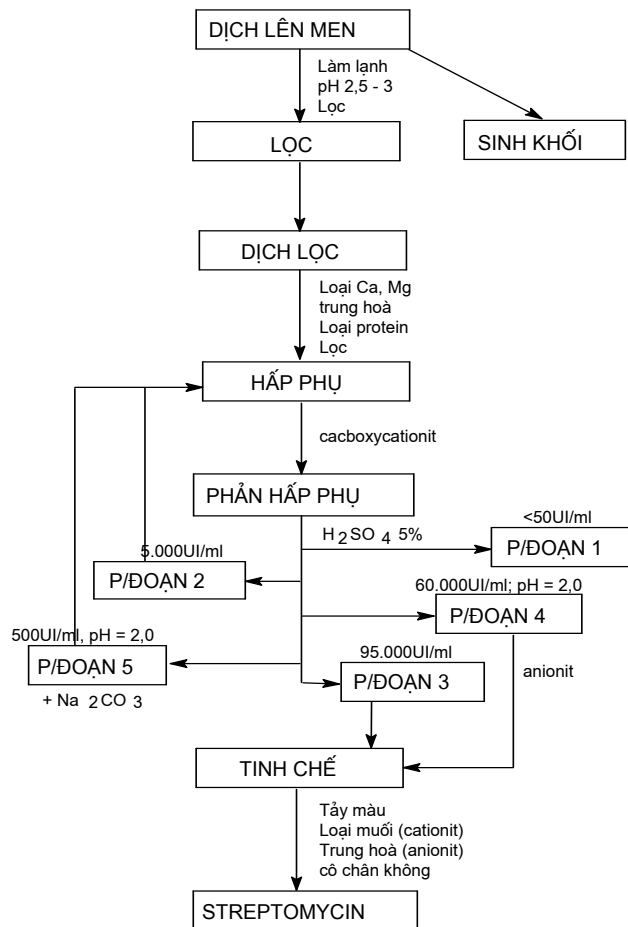
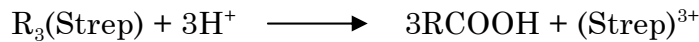
Streptomycin là chất kháng sinh có tính base yếu nên có thể sử dụng cacboxycationit dạng Na⁺ để tách chiết sản phẩm. Quá trình hấp phụ của Streptomycin trên cationit có thể biểu diễn bằng phương trình:



Dịch lên men được xử lý trước khi tách chiết kháng sinh bằng cách acid hoá bằng dung dịch H_2SO_4 30% đến pH 2,5 - 3,0. Khuấy nhẹ để cho quá trình kết tủa tốt hơn. Lọc trên lọc ép khung bản, hay lọc trống quay loại sinh khối. Khuẩn ty *Str. griseus* rất mảnh nên quá trình lọc cần cho chất trợ lọc.

Khả năng hấp phụ của streptomycin phụ thuộc vào lượng tạp chất có trong dịch lên men, đặc biệt là các cation Mg^{++} , Ca^{++} vì vậy phải loại các ion đó trước khi hấp phụ kháng sinh bằng cách thêm oxalat natri vào dịch lọc. Khuấy 30 phút. Lọc loại tủa. Dịch lọc bơm vào thiết bị chứa và hạ nhiệt độ đến $8^\circ C$. Thêm 1% formalin để bảo quản. Trung tính bằng NaOH đến pH = 7,0 - 7,5. Dịch đã tinh chế lọc qua bông thuỷ tinh rồi đem hấp phụ trên cột.

Dịch lọc chứa kháng sinh cho hấp phụ trên cột với tốc độ 800 lít/giờ. Thời gian bão hoà cột khoảng 24 giờ. Khi nào dịch chảy qua còn khoảng 100 đv/ml thì ngừng. Rửa cột bằng nước mềm để loại tạp chất hữu cơ và sắc tố. Hiệu suất giai đoạn hấp phụ đạt 95%. Phản hấp phụ streptomycin bằng H_2SO_4 5%, quá trình phản hấp phụ được biểu diễn bằng phương trình:



Hình 10.2. Quy trình chiết xuất và tinh chế streptomycin

Phân loại dịch phản hấp phụ ra các phân đoạn và có chế độ xử lý khác nhau tùy theo hàm lượng kháng sinh trong các phân đoạn đó:

Phân đoạn 1: Cho chảy vào ống thoát đến khi khi hoạt tính đạt 50 đv/ml.

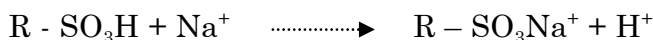
Phân đoạn 2: Có hoạt tính thấp, từ 50 - 20.000 đv/ml. Hoạt tính trung bình 5000đv/ml và có pH 3,5. Dem hấp phụ trở lại để thu hồi.

Phân đoạn 3: Có hoạt tính cao từ 20.000 đv/ml trở lên. Trung bình là 95.000 đv/ml và pH = 6,5. Tinh chế tiếp bằng than hoạt.

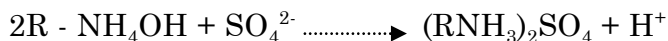
Phân đoạn 4: Phần có hoạt tính cao và pH = 2,0. Hoạt tính trung bình 60.000 đv/ml được trung tính hoá bằng anionit dạng OH⁻.

Phân đoạn 5: Hoạt tính thấp vào khoảng 500đv/ml và pH = 2,0. Trung hoà bằng Na₂CO₃ rồi hấp phụ lại để thu hồi.

Phân đoạn 3, 4 được tẩy màu bằng than hoạt với lượng 2,5 - 3% (tính theo trọng lượng kháng sinh). Lọc loại than. Rửa than bằng nước mềm để lấy hết kháng sinh. Hiệu suất 96% (tính từ dịch dem tẩy màu). Dịch kháng sinh đã tẩy màu cho chảy qua cột trao đổi ion để loại muối. Phương trình loại muối như sau:



Do xuất hiện ion H⁺ nên dung dịch kháng sinh có pH acid. Dịch lại được trung tính hoá bằng cột anionit.



Dung dịch streptomycin đã loại muối và trung tính hoá được bốc hơi trong chân không ở 740 - 750 mmHg đến đậm độ 170.000 - 210.000 đv/ml, sau đó phun sấy để thu bột streptomycin. Đóng gói trong điều kiện tuyệt đối vô trùng.

3. SINH TỔNG HỢP GENTAMICIN

3.1. Đại cương

Gentamicin được phát hiện lần đầu vào năm 1963 trong môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Micromonospora purpurea*. Cùng với tobramycin (1975) và amikacin (1976), gentamicin có thể được coi như kháng sinh thế hệ 2 của nhóm aminoglycosid. Gentamicin được sử dụng rộng rãi nhất trong số các aminoglycosid vì có phổ kháng khuẩn rộng và đặc biệt có tác dụng trên các vi khuẩn Gram (-).

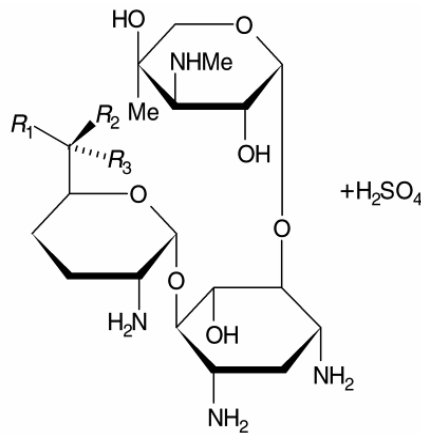
3.2. Cấu trúc hoá học và tính chất

Gentamicin sulfat là một phức hợp sulfat của 3 chất chủ yếu có cấu trúc gần giống nhau được gọi là gentamicin C₁, gentamicin C_{1a} và gentamicin C₂,

ngoài ra còn một phần rất nhỏ gentamicin C_{2a} và gentamicin C_{2b}. Các chất này đều là dẫn chất của DOS (2-deoxystreptamin).

Gentamicin có tác dụng trên cả vi khuẩn Gram (+) và Gram (-). Phổ diệt khuẩn chủ yếu trên các vi khuẩn hiếu khí Gram (-) và các tụ cầu khuẩn, kể cả các chủng tạo ra penicillinase và kháng methicillin.

Gentamicin không hấp thu qua đường tiêu hoá, được sử dụng dạng tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm bắp (thường bào chế dạng dung dịch tiêm chứa 2; 10 mg/ml và 40; 80; 160 mg/2 ml). Gentamicin thường được dùng phối hợp với các kháng sinh khác (β -lactam) hoặc cùng với các chất diệt khuẩn khác để mở rộng phổ tác dụng và tăng hiệu lực



Bảng 10.3. Cấu trúc hoá học của gentamicin theo Dược điển Anh BP 2003

Tên gentamicin	Thành phần %	Công thức cấu tạo	R ₁	R ₂	R ₃
C ₁	20 - 35	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	CH ₃	NH ₂ CH ₃	H
C _{1a}	10 - 30	C ₁₉ H ₃₉ N ₅ O ₇	H	NH ₂	H
C ₂	40 - 60	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	CH ₃	NH ₂	H
C _{2a}		C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	H	NH ₂	CH ₃
C _{2b}		C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇	CH ₃	NH ₂	H

3.3. Quy trình lên men sinh tổng hợp

3.3.1. Chủng giống

Gentamicin do một số chủng xạ khuẩn thuộc chi *Micromonospora* tạo ra. Trong thực tế chủng *M. purpurea* var. *nigrecens* và *M. echinospora* là những chủng quan trọng nhất được ứng dụng vào sản xuất công nghiệp.

M. purpurea var. *nigrecens* là chủng vi sinh vật hiếu khí, không hoặc rất ít tạo bào tử, do đó giống cần giữ trong điều kiện lạnh sâu tới -20 đến -30°C.

Micromonospora hầu như chỉ có khuẩn ty cơ chất phân nhánh, không hình thành khuẩn ty khí sinh. Đường kính khuẩn ty từ 0,4 – 0,8mcm. Khi chưa tạo bào tử bề mặt khuẩn lạc có màu vàng sáng đến màu da cam hoặc nâu đỏ tùy thuộc vào môi trường và điều kiện nuôi cấy.

3.3.2. Quy trình lên men

Môi trường giữ giống (%):

Pepton	0,6
Cao nấm men	0,3
Cao thịt	0,15
Casein thuỷ phân	0,4
Glucose	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,35
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Thạch	2%
Nước máy	vd
pH	6,8 – 7,0
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C

Môi trường nhân giống (%):

Tinh bột khoai tây	1,0
Bột đậu tương	1,0
Saccharose	1,0
CaCO ₃	0,4
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002
Nước máy	vd
pH	6,8 – 7,0
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C
Nhiệt độ nuôi cấy	28°C

Môi trường lên men (%):

Bột ngô	2,5
Bột đậu tương	3,0
Saccharose	1,0
CaCO ₃	0,4
Alpha amylase	0,001
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,002
Dầu phá bọt	0,6
Nước máy	vd
pH	6,5 – 6,7

Lên men tạo gentamicin được thực hiện theo phương pháp nuôi cấy chìm. Quá trình này được thực hiện theo các bước cơ bản:

Giống → Hoạt hoá giống → Nhân giống các cấp → Lên men.

Giống thạch nghiêng được hoạt hoá trong môi trường giữ giống ở 28°C trong 4 -5 ngày rồi cấy vào môi trường nhân giống cấp 1 và lắc 200 – 250 v/ph trong khoảng 48 giờ, tiếp tục nhân giống cấp 2 với lượng giống cấy truyền 2 - 4% (nếu trong bình nón) và tiếp tục nhân giống, lượng giống cấy vào nồi lên men là 10 - 15%. Quá trình lên men kéo dài khoảng 96 – 120 giờ, nhiệt độ thích hợp 26 – 28°C, pH môi trường 6,8 – 7,2. Cấp khí với lưu lượng 1 VVM. Hiệu suất chủng lên men thường không ổn định do sản phẩm là một hỗn hợp nhiều loại gentamicin, có thể đạt tới 1500 mcg/ml hoặc cao hơn.

3.3.3. Chiết xuất và tinh chế

Dịch lên men được acid hoá bằng acid sulfuric 4N đến pH 2,0 – 2,5 để giải phóng các kháng sinh bám vào khuẩn ty, bổ sung chất trợ lọc, khuấy trộn rồi lọc bằng lọc trống hay lọc ép khung bản lấy dịch lọc. Trung tính hoá dịch lọc bằng dung dịch NaOH 40%, loại ion Ca⁺⁺ bằng acid oxalic đến pH = 3 – 3,5. Khuấy trộn rồi trung tính hoá lại đến pH = 7,0 – 7,5. Lọc loại tủa. Dịch lọc đã xử lý được chiết tách kháng sinh bằng nhựa trao đổi ion (thường sử dụng Amberlit IRC50 đã được hoạt hoá ở dạng R-COO-Na⁺). Sau khi cột bão hoà rửa cột bằng nước đã khử ion, phản hấp phụ kháng sinh bằng dung dịch acid sulfuric 4N. Phân đoạn đậm đặc nhất được chỉnh về pH = 4,5 bằng trietylamin, tẩy màu bằng than hoạt. Lọc loại than rồi dùng methanol rửa lấy sản phẩm thô với tỷ lệ dung dịch kháng sinh: methanol là 1:8,5. Lọc rửa tủa thô bằng methanol và acetone, sấy chân không ở 40°C và 30 – 70 mmHg. Sản phẩm thu được là gentamicin thô ở dạng muối sulfat.

Quá trình tinh chế gentamicin thô được tiến hành như sau: Hoà gentamicin sulfat thô vào nước cất, chỉnh pH = 7,0 -7,5. Tẩy màu bằng than hoạt (khoảng 5%). Dịch lọc được đem sắc ký trao đổi ion với nhựa cationit Amberlit CG50 dạng hoạt hoá NH₄. Phản hấp phụ bằng dung dịch NH₄OH 0,3N. Lấy phân đoạn đậm đặc nhất. Cô chân không. Tẩy màu bằng than hoạt. Sau khi lọc loại than thì rửa kháng sinh bằng methanol. Rửa tủa bằng acetone. Tinh thể sấy khô trong chân không ở 40°C và 30 – 70 mmHg. Sản phẩm thu được đem đi kiểm nghiệm và đóng gói.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh nhóm aminoglycosid.
2. Tìm mối liên hệ giữa cấu trúc của streptomycin với thành phần môi trường lên men.
3. Nêu quy trình chiết xuất streptomycin từ môi trường lên men.
4. Nêu tên chủng vi sinh vật sinh gentamicin và trình bày quy trình lên men sinh tổng hợp gentamicin?

Chương 11

SẢN XUẤT KHÁNG SINH NHÓM MACROLID

MỤC TIÊU

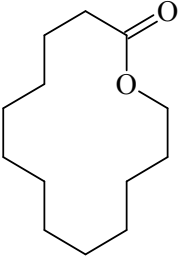
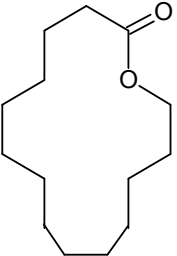
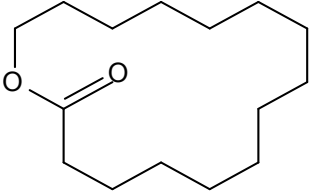
Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. Tên các chủng vi sinh vật có khả năng sinh kháng sinh nhóm macrolid.
2. Quy trình lên men và chiết xuất erythromycin.

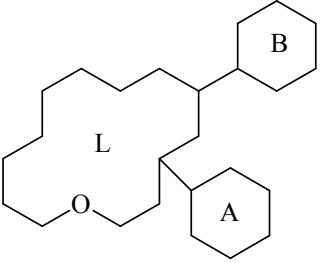
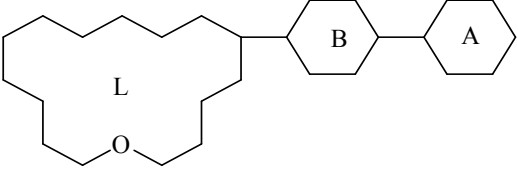
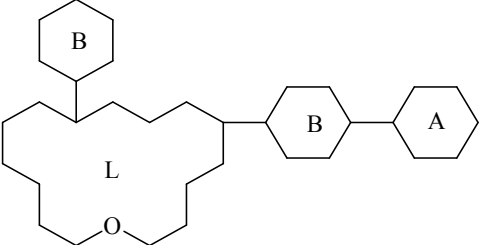
1. TỔNG QUAN VỀ CÁC MACROLID

Các Macrolid là những kháng sinh có cấu trúc heterosid mà phần genin là một vòng lacton có chứa nhiều nguyên tử (thường từ 12 – 17 hoặc nhiều hơn) và được chia thành 2 nhóm chính: nhóm kháng khuẩn và nhóm kháng nấm hay còn gọi là các polyen.

Nhóm macrolid kháng khuẩn bao gồm các macrolid có cấu trúc vòng lacton (chứa từ 12 - 17 cấu tử – còn gọi là vòng ester) có chứa 1 hay nhiều đường (deoxy sugar), (thường là cladinose và desosamin).

		
Vòng lacton 14- cấu tử (erythromycin, oleandomycin, clarithromycin)	Vòng lacton 15- cấu tử (azithromycin)	Vòng lacton 16- cấu tử (leucomycin, josamycin, spiramycin, tylosin)

Phổ biến nhất trong nhóm này là các kháng sinh chứa vòng lacton 14 cấu tử bao gồm erythromycin, oleandomycin, troeandomycin và roxithromycin. Đây là những kháng sinh macrolid thế hệ 1.

	<p>Erythromycin Oleandomycin</p>
	<p>Leucomycin Josamycin</p>
	<p>Spiramycin</p>

Hình 11.1. Sơ đồ cấu trúc kháng sinh nhóm macrolid

Vòng L: Vòng lacton; Vòng A: đường đơn, Vòng B: Đường chứa gốc amin;
Các liên kết glycosid không chỉ ra ở đây

Các kháng sinh thuộc nhóm macrolid thế hệ II gồm một số kháng sinh bán tổng hợp từ erythromycin như azithromycin (chứa vòng lacton 15 cấu tử - được công bố năm 1980 với biệt dược của hãng Pfizer 1991 là Zithromax®); và clarithromycin (chứa vòng lacton 14 cấu tử). Nhóm này có phổ kháng khuẩn rộng hơn erythromycin.

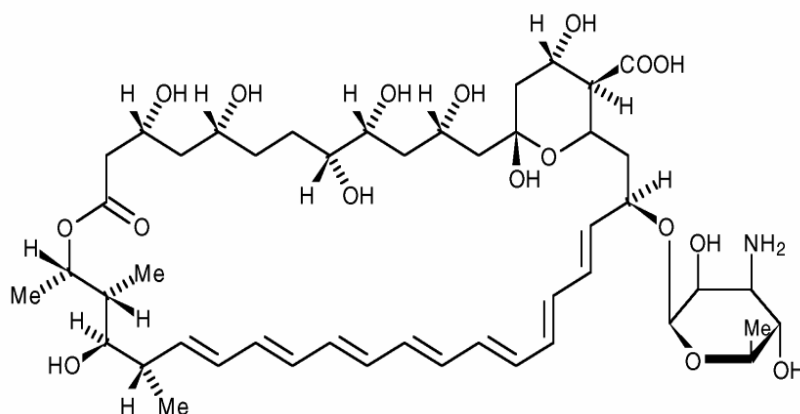
Được xếp vào danh sách các kháng sinh nhóm macrolid thế hệ II còn bao gồm các chất có cấu trúc vòng lacton 16 cấu tử như spiramycin, leucomycin, josamycin, tylosin hay tylocicin. Trong đó tylosin chủ yếu được sử dụng trong thú y.

Một số kháng sinh macrolid được xếp riêng vào nhóm các kháng sinh cấu trúc ketolid hay còn gọi là nhóm macrolid thế hệ 3. Điển hình cho nhóm này là telithromycin được bán tổng hợp từ erythromycin vào năm 1998.

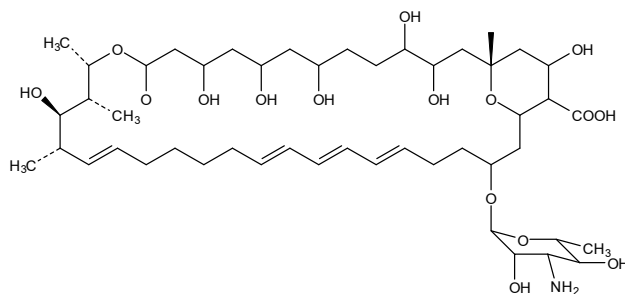
Bảng 11.1. Một số kháng sinh nhóm macrolid

Tên	Năm phát hiện	Chủng sinh KS
<i>Nhóm kháng khuẩn</i>		
Erythromycin	1952	<i>Str. erythreus</i>
Oleandomycin	1954	<i>Str. antibioticus</i>
Azithromycin (Zithromax®)	1980	Bán tổng hợp
Clarithromycin (Clacid®)	197?	Bán tổng hợp
Roxithromycin (Rulid®)	1987	Bán tổng hợp
Spiramycin	1955	<i>Str. ambefaciens</i>
Leucomycin	1953	<i>Str. kitasatoensis</i>
Josamycin	1964	<i>Streptomyces sp.</i>
Tylosin	1961	<i>Str. fradie</i>
Terithromycin	1998	Bán tổng hợp
<i>Nhóm kháng nấm</i>		
Nystatin	1955	<i>Str. noursei</i>
Amphotericin B	1957	<i>Str. nodosus</i>

Nhóm macrolid kháng nấm (cấu trúc polyen): Có tài liệu xếp nystatin và amphotericin B vào nhóm kháng sinh đại lacton (chứa 26 – 38 carbon) có tác dụng chống nấm. Trong nhiều năm, amphotericin B là kháng sinh chống nấm toàn thân có hiệu quả cao tuy có độc tính cao. Nystatin thường được sử dụng để điều trị bệnh do *Candida albicans* ở da, niêm mạc (miệng, đường tiêu hoá, âm đạo) và không có tác dụng khi nhiễm nấm toàn thân vì không hấp thu qua đường tiêu hoá.



Amphotericin



Nystatin

Cơ chế tác dụng của 2 thuốc này là gắn vào sterol (chủ yếu là ergosterol) ở màng tế bào nấm làm biến đổi tính thấm của màng.

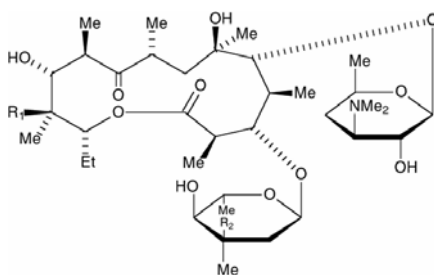
2. SINH TỔNG HỢP ERYTHROMYCIN

2.1. Đại cương

Erythromycin được nhóm các nhà nghiên cứu của hãng Lilly tách chiết từ chủng *Streptomyces erythreus* (sau này có tên là *Saccharopolyspora erythraea*) vào năm 1949 và đưa vào sử dụng trên lâm sàng từ năm 1952. Đây là kháng sinh được sử dụng phổ biến nhất trong nhóm macrolid. Erythromycin có phổ kháng khuẩn rộng, chủ yếu là kìm khuẩn đối với các vi khuẩn Gram (+), Gram (-) và các vi khuẩn khác như *Mycoplasma*, *Spirochetes*, *Chlamydia* và *Rickettsia*. Tuy nhiên ở nồng độ cao erythromycin cũng có tác dụng diệt khuẩn đối với các chủng rất nhạy cảm. Cơ chế tác dụng của erythromycin là gắn với tiểu đơn vị 50S của ribosom vi khuẩn nhạy cảm và ức chế tổng hợp protein. Thuận lợi của erythromycin là có thể dùng cho phụ nữ có thai và trẻ nhỏ; dùng trong các trường hợp bị dị ứng với kháng sinh β -lactam và có thể dùng thay thế penicillin trong dự phòng dài hạn thấp khớp cấp tính.

Erythromycin dạng base không bền, dễ bị phá hủy bởi dịch vị nên thường được sử dụng ở các dạng muối để tăng sinh khả dụng. Erythromycin stearat, ethylsuccinat, estolat thường được sử dụng các chế phẩm dạng uống; Erythromycin gluceptat, lactobionat được dùng ngoài ở dạng mỡ tra mắt 0,5%; dung dịch 2% điều trị trứng cá.

2.2. Cấu trúc và tính chất hoá học



Erythromycin	R ₁	R ₂
A	OH	OMe
B	H	OMe
C	OH	OH

Erythromycin base là hỗn hợp của 3 erythromycin A, B và C trong đó chủ yếu là erythromycin A. Erythromycin base là bột tinh thể trắng hoặc hơi ánh vàng, dễ hút ẩm, tan ít trong nước (độ tan giảm khi nhiệt độ tăng), tan trong ethanol, methanol, tan trong acid loãng.

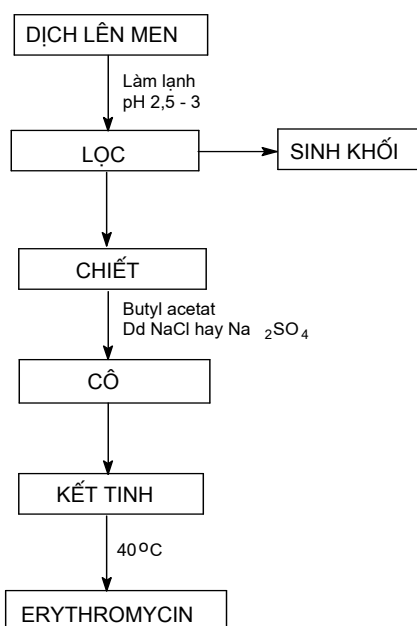
Chủng giống: Streptomyces erythreus (sau này có tên là *Saccharopolyspora erythrae*).

2.3. Lên men sinh tổng hợp

Saccharopolyspora erythrae là chủng vi sinh vật hiếu khí, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp trong khoảng 30 – 33°C. Quy trình lên men cũng có những đặc điểm tương tự như lên men tạo các kháng sinh nhóm tetracyclin. Thành phần môi trường lên men như sau (w/v):

Glucose	5,0 %	CaCO ₃	0,6
Bột đậu	3,0	pH	7,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3	t ⁰ nuôi cấy	33°C
NaCl	0,5		

Erythromycin có thể được chiết khỏi dịch lên men bằng dung môi hữu cơ. Quy trình chiết xuất tiến hành như sau:



Hình 11.2. Quy trình chiết xuất và tinh chế erythromycin từ dịch lên men

Dịch lên men được lọc bằng lọc ép khung bản hay lọc trống. Dịch lọc được bổ sung dung môi hữu cơ như butyl acetat. Khuấy trộn để tạo thành một hỗn hợp đồng nhất. Thêm dung dịch muối vô cơ như NaCl hay Na_2SO_4 và khuấy trộn kỹ. Hỗn hợp sẽ phân lớp và kháng sinh chuyển sang pha hữu cơ. Kháng sinh được tách khỏi dung môi hữu cơ bằng cách cô chân không và kết tinh ở 40°C .

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh nhóm macrolid.
2. Trình bày quy trình lên men và chiết xuất erythromycin.

Chương 12

SẢN XUẤT KHÁNG SINH CHỐNG UNG THƯ

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này, sinh viên phải trình bày được:

1. *Nêu được tên và nguồn gốc các dược phẩm được dùng trong điều trị ung thư. Phân loại được các kháng sinh dùng điều trị bệnh ung thư.*
2. *Trình bày được quy trình lên men và chiết xuất daunorubicin.*

1. ĐẠI CƯƠNG

Có thể định nghĩa ung thư là tên gọi chung cho một nhóm bệnh khoảng trên hai trăm loại khác nhau mà nguyên nhân chủ yếu của chúng là do sự phân chia không kiểm soát được của tế bào, rất nhanh và không theo quy luật trật tự. Các tế bào này có khả năng xâm lấn và chèn ép vào các cơ quan và tổ chức xung quanh. Khi các ung thư chèn ép hoặc di căn vào các cơ quan giữ chức năng sống của cơ thể như não, phổi, gan, thận thì bệnh nhân sẽ tử vong.

Bệnh ung thư không phải do một nguyên nhân gây ra. Mỗi loại ung thư có những nguyên nhân riêng biệt. Một tác nhân sinh ung thư có thể gây ra một số ung thư và ngược lại một loại ung thư có thể do một số tác nhân. Một trong những tác nhân chính gây ung thư có thể kể đến là khói thuốc lá, các yếu tố gây ung thư trong thiên nhiên hoặc tạo ra do chế biến thực phẩm, bệnh nhiễm trùng mạn tính, một số loại virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, rượu...

2. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU TRỊ BỆNH UNG THƯ

Ung thư có thể được điều trị bằng phẫu thuật, hoá trị liệu, xạ trị liệu hay miễn dịch trị liệu. Việc chọn lựa phương pháp trị liệu phụ thuộc vào vị trí và độ của khối u, giai đoạn của bệnh cũng như tình trạng của bệnh nhân.

Điều trị bằng phẫu thuật: Khi khối u còn nhỏ có khả năng điều trị triệt để.

Điều trị bằng hoá chất (hoá trị liệu):

Hoá chất và thuốc sử dụng trong điều trị ung thư với các mục đích khác nhau như điều trị triệt để; hỗ trợ cho phẫu thuật và xạ trị hoặc điều trị tạm thời (thường ít dùng, chỉ sử dụng khi đã di căn toàn thân vì loại hoá chất này

thường rất độc). Có thể được phân chia thành các nhóm chính sau (vừa theo cơ chế tác dụng, vừa theo nguồn gốc hoá chất):

a. Hoá chất chống ung thư:

- Dacarbazin; busulphan; các chất alkyl hoá: cyclophosphamid, melphalan, iphosphamid, lomustin.
- Các chất chống chuyển hóa: methotrexat, mercaptopurin, cytarabin; fluorouracin (chống ung thư kìm hãm sự phát triển của tế bào)
- Các alkaloid từ thực vật và các sản phẩm tự nhiên khác: vinblastin, vincristin (dừa cạn); etoposid, teniposid, paclitaxel, các taxoid (từ thông đỏ).

b. Các kháng sinh:

Nhóm các actinomycin: dactinomycin.

Các antracyclin và các chất liên quan: doxorubicin (adriamycin); daunorubicin; idarubicin.

Các kháng sinh độc tế bào khác: bleomycin.

c. Hoá chất chống ung thư khác:

Hợp chất platin hữu cơ: cisplatin, carboplatin.

Các methylhydrazin: procarbazin.

Các chất khác: asparaginase; estramustin, tretinoin...

Điều trị nội tiết: Dùng nội tiết tố hoặc kháng nội tiết tố bao gồm:

Hormon và các chất liên quan như ethinylestradiol, megestrol, medroxyprogesteron, buserelin...

Các thuốc đối kháng hormon và các chất liên quan: tamoxifen, formestan.

Điều trị miễn dịch: Mục đích kích thích miễn dịch, tăng khả năng đề kháng của cơ thể để diệt tế bào ung thư, bao gồm:

- Các cytokin và các chất điều hoà miễn dịch.
- Các yếu tố kích thích tăng trưởng cụm bạch cầu: filgrastim.
- Các interferon: tự nhiên (interferon alpha và beta) ... interferon alpha 2a, 2b, n1, interferon beta 1a, 1b.
- Các interleukin: aldesleukin, interleukin.

Điều trị bằng tia xạ: Sử dụng tia phóng xạ γ để diệt tế bào ung thư. Cùng với phẫu thuật đây là phương pháp điều trị ung thư phổ biến và hiệu quả.

Việc chọn lựa phương pháp điều trị phụ thuộc vào vị trí, kích thước của khối u, giai đoạn của bệnh cũng như tổng trạng của bệnh nhân. Trong các

phương pháp này hoá trị và xạ trị có thể gây tổn thương đến các mô lành; phẫu thuật không thể triệt để khi đã có di căn.

3. CÁC KHÁNG SINH CHỐNG UNG THƯ NGUỒN GỐC SINH HỌC

Các kháng sinh có nguồn gốc sinh học được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư có thể chia thành phân nhóm chính theo cấu trúc hoá học như sau:

Nhóm các actinomycin

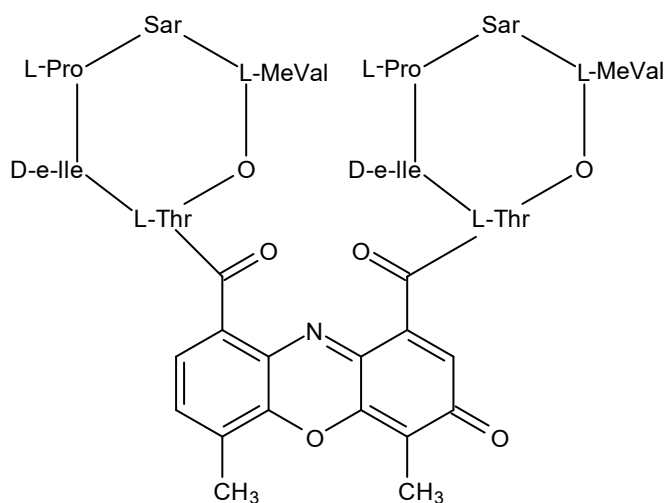
Nhóm các bleomycin

Nhóm chứa vòng antracyclin

Bảng 12.1. Các kháng sinh chống ung thư nguồn gốc sinh học

Kháng sinh	Năm phát hiện	Chủng vi sinh vật
Actinomycin F ₁ , C...	1952	<i>Str. chrysomallus</i>
Actinomycin D	1952	<i>Str. antibioticus</i>
Actinomycetin	1941	<i>Str. albus</i>
Bleomycin	1956	<i>Str. verticillus</i>
Daunorubicin	1963	<i>Str. peuceuticus</i> ; <i>Str. coeruleorubidus</i>
Doxorubicin (adriamycin)	1968	<i>Str. peuceutius var. caesius</i>
Carminomycin		<i>Actinomadura carmirtana</i>

3.1. Nhóm các Actinomycin

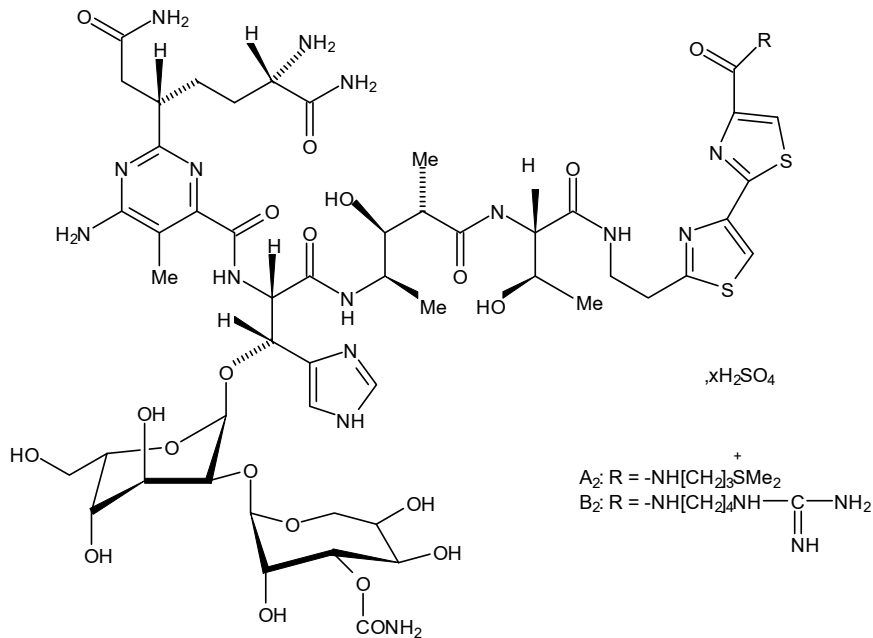


Hình 12.1. Cấu trúc actinomycin D

Actinomycin D hay dactinomycin là chất kháng sinh đầu tiên có khả năng kìm hãm sự phát triển của tế bào ung thư do C. Hackman tìm thấy vào năm 1952 được chiết xuất từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces antibioticus*. Nhóm này còn có các actinomycin C, C₁, K, F... nhưng chỉ có actinomycin D được dùng phổ biến hơn cả trong trị liệu.

3.2. Nhóm các bleomycin

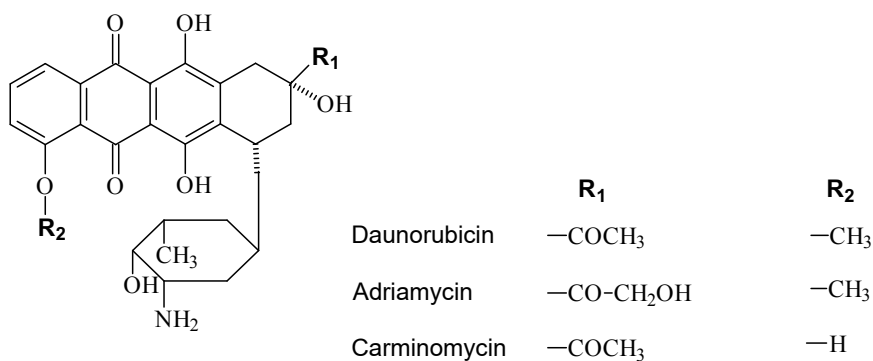
Bleomycin được Hamao Umezawa (1914 – 1983) tìm ra vào năm 1956 từ chủng xạ khuẩn *Streptomyces verticillus*. Trong môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn này sinh tổng hợp ra một hỗn hợp nhiều bleomycin khác nhau. Người ta đã tìm ra 9 bleomycin tự nhiên và hơn 100 dẫn xuất bleomycin bán tổng hợp nhưng chỉ có hỗn hợp chứa bleomycin A₂ không chứa ion kim loại chiếm 55 – 70% và bleomycin B₂ (25 – 30%) là dạng được sử dụng nhiều để điều trị các bệnh ung thư vẩy nến, tinh hoàn và ung thư bạch cầu.



Hình 12.2. Cấu trúc hoá học của một vài bleomycin

3.3. Nhóm chứa vòng antracyclin

Gồm có daunorubicin (rubomycin), adriamycin (doxorubicin) và carminomycin. Kháng sinh đầu tiên của nhóm này là daunorubicin có độc tính cao nhưng lại có tác dụng kìm hãm một cách hiệu quả một số dạng ung thư trên động vật nên trong thời kỳ đầu được sử dụng để điều trị ung thư. Sau này người ta tìm ra adriamycin từ biến chủng của *S. peuceticus* có hoạt tính cao hơn và phổ điều trị ung thư rộng hơn. Hiện nay adriamycin là kháng sinh trị ung thư được sử dụng phổ biến hơn cả.



Hình 12.3. Cấu trúc hoá học của một vài kháng sinh antracyclin

4. SINH TỔNG HỢP DAUNORUBICIN

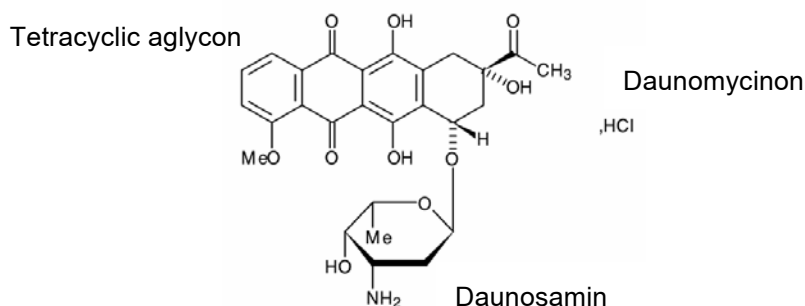
4.1. Đại cương

Daunorubicin được tìm ra lần đầu tiên vào năm 1963 trong môi trường nuôi cấy chủng xạ khuẩn *S. peuceticus* hay chủng *S. coeruleorubidus*. Daunorubicin và adriamycin là 2 kháng sinh có phổ kháng khuẩn vừa phải trên vi khuẩn Gram dương nhưng hoạt tính rất yếu trên vi khuẩn Gram âm và rất độc. Tuy nhiên chúng có khả năng kìm hãm sự phát triển của tế bào ung thư theo cơ chế tác động trực tiếp lên cấu trúc phân tử xoắn kép làm biến đổi cấu trúc sinh học của phân tử ADN, dẫn tới kìm hãm quá trình sao chép ADN và quá trình phiên mã sang mRNA. Trong y học, cả 2 kháng sinh này được sử dụng dưới dạng chỉ định độc lập hay phối hợp để điều trị nhiều dạng ung thư khác nhau, trong đó có hiệu quả nhất là bệnh ung thư bạch cầu cấp tính, ung thư vú và ung thư phổi. Tuy nhiên các kháng sinh này cũng có nhiều phản ứng phụ như: độc tính cao, kìm hãm sự phát triển của tuỷ xương, nếu tích tụ nhiều trong cơ thể thì sẽ gây ngộ độc tim.

4.2. Cấu trúc hoá học và tính chất

Daunorubicin là một glycosid bao gồm 3 thành phần: tetracyclic aglycon, daunomycinon và một đường amin là daunosamin.

Daunorubicin hydroclorid là bột tinh thể màu đỏ cam, dễ hút ẩm, tan trong nước và methanol, tan ít trong ethanol, không tan trong aceton.



Daunorubicin hydroclorid có dạng bột pha tiêm, còn daunorubicin citrat có ở dạng vi hạt lipid dùng pha loãng truyền tĩnh mạch. Do rất kích ứng với các mô nên daunorubicin chỉ được dùng ở dạng tiêm tĩnh mạch. Bảo quản tránh ánh sáng. Dạng vi hạt lipid phải bảo quản ở 2 - 8°C và tránh đóng băng.

4.3. Điều kiện lên men

Chủng xạ khuẩn sinh daunorubicin *S. coeruleorubidus* là vi sinh vật hiếu khí, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp từ 26 - 27°C

Môi trường nhân giống (% w/v)

Pepton	0,6
Nấm men khô	0,3
Ca(NO ₃) ₂ .H ₂ O	4,0
Nước máy	vđ
pH	7,2

Môi trường lên men (% w/v)

Bột đậu tương	4,0
Dịch bã rượu	0,5
Tinh bột	4,0
Dầu đậu nành	0,5
NaCl	1,0
Nước máy	vđ
pH	7,2

Cấp khí với lưu lượng 0,5 VVM; thời gian lên men: 60 - 80 giờ

Daunorubicin và các dẫn suất khác được hình thành trong quá trình lên men đều là những chất độc mạnh và được xem như tác nhân gây đột biến. Vì vậy quá trình tách và tinh chế yêu cầu độ an toàn nghiêm ngặt (thường tiến hành trong dây chuyền kín)

4.4. Quy trình chiết xuất

Daunorubicin là sản phẩm nội bào. Kết thúc lên men dịch được acid hoá bằng acid oxalic dư ở 50°C để thuỷ phân các glycosid liên kết với daunorubicin. Giữ trong thời gian 60 – 90 phút, sau đó lọc loại sinh khối. Dịch lọc được chỉnh về pH = 4,5 rồi hấp phụ daunorubicin trên nhựa Amberlite IRC-50. Rửa cột triệt để theo trình tự dung môi nước, methanol 50% trong nước và bằng hệ dung môi methanol - nước (9:1). Phản hấp phụ daunorubicin

bằng hệ 1% NaCl trong methanol - nước (9:1). Dịch phản hấp phụ được cô đặc còn 1/5 thể tích; chỉnh về pH = 8,5 rồi chiết bằng cloroform (tỷ lệ bằng khoảng một nửa so với dung môi). Phân đoạn cloroform trên được cô chân không xuống còn khoảng 1/100 rồi bổ sung vào 10V hexan để kết tinh thu được daunorubicin thô.

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Kể tên và phân loại các kháng sinh chống ung thư được sản xuất bằng con đường sinh học.
2. Nêu tên chủng vi sinh vật sinh tổng hợp daunorubicin và điều kiện lên men tạo daunorubicin.

Chương 13

SẢN XUẤT MỘT SỐ KHÁNG SINH CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI KHUẨN

MỤC TIÊU

Sau khi học xong chương này sinh viên phải trình bày được:

1. Tên các kháng sinh được sản xuất từ vi khuẩn trong công nghiệp.
2. Quy trình lên men và chiết xuất Polymyxin.

Trong danh sách các kháng sinh đã mô tả có đến 140 chất có nguồn gốc từ vi khuẩn, nhưng chỉ có một số rất ít chất có ứng dụng trong y học như: Polymyxin, gramicidin, bacitracin ..., Ngoài ra còn có nisin chỉ được dùng trong chăn nuôi và công nghiệp thực phẩm. Các chất khác không được ứng dụng vì có độc tính cao đối với cơ thể. Về cấu trúc hoá học, các kháng sinh do vi khuẩn tạo ra là các polypeptid. Nghiên cứu con đường sinh tổng hợp kháng sinh polypeptid sẽ là mô hình để tổng hợp các peptid nói chung có hoạt tính sinh học là một vấn đề có ý nghĩa lý thuyết rất lớn. Sau đây giới thiệu một vài kháng sinh quan trọng do vi khuẩn tạo ra.

1. SINH TỔNG HỢP POLYMYXIN

1.1. Đại cương

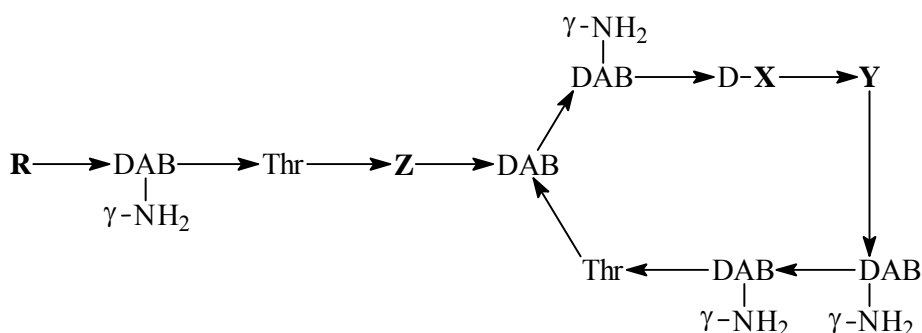
Polymyxin là tên gọi của một nhóm kháng sinh có cấu trúc polypeptid do vi khuẩn *Bacillus polymyxa* và *Bacillus circulans* tạo ra. Năm 1947, ba nhóm các nhà khoa học gồm nhóm Ainsworth, nhóm Benedict và nhóm Stansly đã phân lập được từ chủng vi khuẩn *Bacillus polymyxa* một hỗn hợp gồm 5 polymyxin A, B, C, D và E. Các nghiên cứu sau này cho thấy polymyxin B, D và E lại chia ra B₁ - B₂, D₁ - D₂ và E₁ - E₂. Danh sách các polymyxin được tìm thấy từ các chủng vi khuẩn ngày càng nhiều như polymyxin M, polymyxin F₁, F₂, F₃... Do độc tính cao đối với thận nên chỉ 2 trong các chất trên là polymyxin B và polymyxin E được dùng dưới dạng muối sulfat để điều trị các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn Gram (-).

Đến năm 1950, Koyama và cộng sự đã chiết được từ môi trường nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus colistinus* chất colistin (hay colimyxin) bao gồm 3

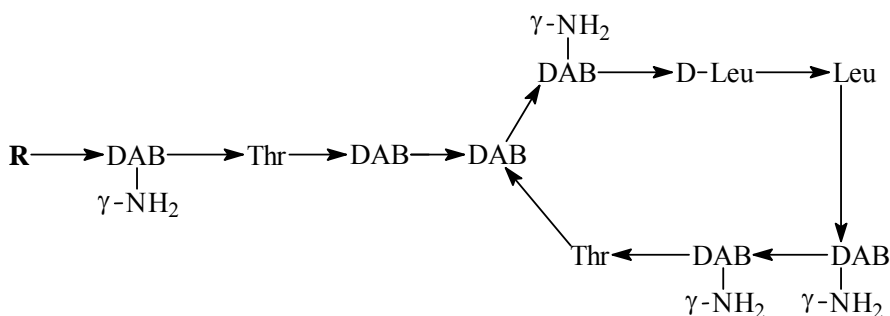
chất colistin A, B và C có hoạt tính kháng khuẩn mạnh gấp 4 lần polymyxin mà độc tính lại thấp hơn. Các phân tích về cấu trúc hoá học sau này cho thấy colistin A chính là polymyxin E₁.

1.2. Cấu trúc hoá học và tính chất

Các polymyxin đã được nghiên cứu kỹ, riêng polymyxin B, đã tổng hợp được. Về cấu tạo chúng là 1 polypeptit vòng chỉ khác nhau về thành phần và số lượng acid amin. Phân tử polymyxin M có chứa D-leucin, 3 gốc treonin và 6 gốc acid α , γ diaminobutyric (DAB). Ngoài ra còn chứa 1 gốc acid -6-metyloctanoic.



Tên	R	X	Y	Z
Polymyxin B ₁	(+)-6-methyloctanoyl	Phe	Leu	DAB
Polymyxin B ₂	6-methylheptanoyl	Phe	Leu	DAB
Polymyxin D ₁	(+)-6-methyloctanoyl	Leu	Thr	D-Ser
Polymyxin D ₂	6-methylheptanoyl	Leu	Thr	D-Ser



Tên	R
Polymyxin E ₁ hay Colistin A	(+)-6-methyloctanoyl
Polymyxin E ₂	6-methylheptanoyl
Polymyxin M	

Hình 13.1. Cấu trúc hoá học của một số polymyxin theo Merck Index 1996

DAB: L- α , γ - diaminobutyric acid R: acid béo, X, Y, Z: các acid amin

Các polymyxin có tác dụng diệt khuẩn, thuốc gắn vào phospholipid làm thay đổi tính thấm và thay đổi cấu trúc màng tế bào của vi khuẩn. Hoạt tính kháng khuẩn của polymyxin B chỉ giới hạn trên một số chủng vi khuẩn Gram (-) như *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Salmonella*, *Proteus*... và đặc biệt trên trực khuẩn mủ xanh *Ps. aeruginosa*. Trong y học polymyxin B được dùng tại chỗ, đơn độc hay phối hợp với một số hợp chất khác như neomycin sulfat, oxytetracyclin, hydrocortison... điều trị nhiễm khuẩn mắt, tai mũi họng và một số nhiễm khuẩn khác. Polymyxin E hay colistin được dùng trong y học dưới dạng muối sulfat để điều trị tại chỗ nhiễm khuẩn đường tiết niệu hay đường tiêu hoá. Dạng muối colistin natri mesilat được dùng dạng tiêm để điều trị nhiễm khuẩn huyết, viêm màng não, nhiễm khuẩn thận... và chỉ sử dụng khi không dùng được những thuốc khác do độc tính cao.

1.3. Điều kiện lên men

Để sinh tổng hợp polymyxin người ta nuôi cấy *B. polymyxa* trên môi trường thạch có thành phần (%):

Cao ngô	0,5
Cao nấm men	0,5
Glucose	2,0
Agar	2,0
pH	6,8 ÷ 7,2

Khử trùng 110°C/20 phút. Nuôi ở 28°C trong thời gian 24 giờ.

Môi trường nhân giống gồm (%):

Cao ngô	1,0
Bột đậu tương	1,0
Glucose	2,0
Sulfat amoni	0,3
pH	6,8 ÷ 7,2

Khử trùng 115°C/20 phút. Cấy giống vào và nuôi 18- 20 giờ/28°C.

Môi trường lên men tạo kháng sinh có thành phần (%):

Cao ngô	1,0
Bột đậu tương	2,0
Glucose	3,0

và một số muối: MgSO₄ · 7H₂O; KH₂PO₄; NaCl ...

Khử trùng môi trường và cấy giống vào với lượng 2 ÷ 2,5%. Tiến hành lên men ở điều kiện: nhiệt độ 28 - 30°C. Thông khí với lưu lượng 1VVM. Thời gian lên men 30 - 36 giờ.

1.4. Chiết xuất polymyxin từ môi trường lên men

Trong công nghiệp để chiết polymyxin đã sử dụng phương pháp trao đổi ion. Bản chất hoá học của kháng sinh là polypeptid. Các acid amin trong phân tử polymyxin có chứa các nhóm amin tự do, có khả năng trao đổi với nhóm carboxyl của phân tử nhựa loại carboxycationit. Như KB-2, KB-HP-2, Amberlit, IRC-50 ... Quá trình chiết có thể tiến hành như sau:

Dịch lên men xong được acid hoá đến pH 3,5 ÷ 4,0 để giải phóng kháng sinh (có thể sử dụng acid oxalic để loại ion calci). Lọc loại sinh khối. Dịch lọc trung hoà bằng NaOH. Có thể chiết polymyxin từ dịch lọc này bằng dung môi hữu cơ n-butanol. Sau đó kết tủa bằng acetone.

Dịch lọc đã trung hoà được lọc qua bông thủy tinh đến trong suốt rồi bơm qua các cột trao đổi ion dạng $\text{Na}^+(\text{R}-\text{COO}^-\text{Na}^+)$. Cột đã bão hoà kháng sinh rửa bằng nước cất hay nước đã khử khoáng.

Phản hấp phụ kháng sinh bằng acid hydrochloric hay sulfuric 10%. Dịch phản hấp phụ tẩy màu bằng than hoạt, lọc loại than. Dịch lọc đem loại các cation kim loại bằng sulfocationit ví dụ: KU-2-20 hay SBS - 1. Trung hoà dịch bằng cách cho chảy qua cột anionit dạng OH^- .

Dịch kháng sinh đã trung hoà được bốc hơi trong chân không ở nhiệt độ $\leq 35^\circ\text{C}$, áp suất 10 – 15 mmHg. Sau đó phun sấy để thu lấy kháng sinh.

2. SINH TỔNG HỢP BACITRACIN

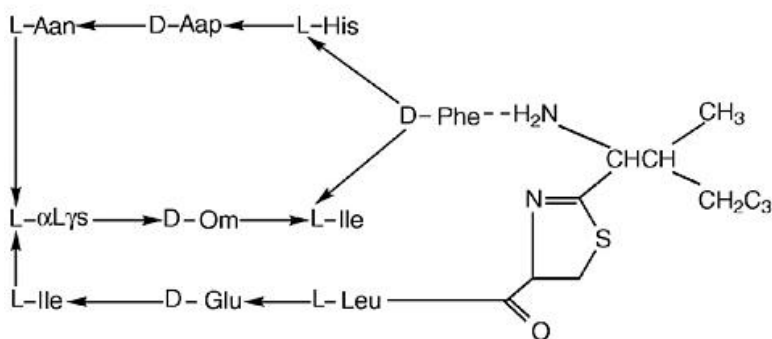
2.1. Đại cương

Bacitracin là kháng sinh polypeptid do các chủng vi khuẩn *B. licheniformis* tạo ra (Johnson, Anker et al 1945). Sau đó Newton (1949) và Abraham (1950) đã chiết được từ môi trường nuôi cấy *B. subtilis* một hỗn hợp kháng sinh gọi là eifaivin. Eifaivin có bản chất polypeptid giống với bacitracin. Thực tế trong công nghiệp để sản xuất bacitracin đã sử dụng *B. licheniformis*.

2.2. Cấu trúc hoá học

Bằng phương pháp sắc ký người ta đã xác định bacitracin là 1 hỗn hợp gồm 10 kháng sinh khác nhau. Đó là bacitracin A, A₁, B, C, D, E, F₁, F₂, F₃, và G trong đó bacitracin A chiếm khoảng 37%. Độ tính của các kháng sinh trên cũng khác nhau. Bacitracin C độc hơn bacitracin A và B, bacitracin F ít độc nhất.

Newton và Abraham (1953) đã xác định được cấu trúc phân tử bacitracin A gồm 10 gốc acid amin kết hợp với một vòng thiazol. Trong đó có 3 gốc L-isoleucin, các acid amin khác là: L-leucin; L-cystein, L-histidin, L-lysin, L-asparaginic, D-phenylalanin, D-ornitin, D-asparaginic và D-glutamic.



Hình 13.2. Cấu trúc hóa học của phân tử bacitracin A

Chế phẩm bacitracin chứa chủ yếu bacitracin A là bột trắng xám, vị đắng gắt, tan trong nước và ethanol. Không tan trong ether, chloroform, aceton. Bên trong dung dịch acid, không bên trong dung dịch kiềm. Hoạt tính kháng sinh thấp dần từ bacitracin A đến bacitracin F.

Bảng 13.1. Hoạt tính kháng sinh của các bacitracin

Bacitracin	Hoạt lực tương đương đối của bacitracin trên <i>Corynebacterium xerosis</i>
A	1
B	0,075
C	0,500
D	0,014
E	0,008
F ₁	0,055
F ₂	0,028
F ₃	0,014
G	0,140

Bacitracin có tác dụng kìm khuẩn hay diệt khuẩn nhờ khả năng ức chế tổng hợp vỏ tế bào của vi khuẩn. Nó có hoạt tính cao đối với các vi khuẩn Gram (+) hoạt phổ giống với penicillin, ít tác dụng trên vi khuẩn Gram (-). Trước đây bacitracin được dùng để tiêm nhưng do độc tính cao trên thận nên hiện nay chỉ dùng tại chỗ để điều trị các vết thương ngoài da, một số bệnh về mắt. Thường được sử dụng dưới dạng phức hợp bacitracin kẽm hay dưới dạng hỗn hợp với neomycin hoặc polymyxin B.

Trong nông nghiệp, phức hợp bacitracin kẽm được dùng để làm chất kích thích tăng trưởng.

2.3. Điều kiện lên men

2.3.1. Chủng giống

B. licheniformis là những trực khuẩn có bào tử, sống hiếu khí, nhiệt độ nuôi cấy thích hợp là 37°C. Trong công nghiệp để sản xuất bacitracin đã sử dụng các chủng có số hiệu ATCC 9945, 10716, 11945, 11946 và 14580.

2.3.2. Môi trường dinh dưỡng

Tỷ lệ giữa hydrat carbon và nitơ rất quan trọng trong thành phần môi trường nuôi cấy *B. licheniformis* để sinh tổng hợp bacitracin. Nếu tỷ lệ này thích hợp sẽ tạo ra bacitracin và nếu tỷ lệ trên không thích hợp sẽ tạo ra licheniformin có hoạt tính kháng khuẩn rất thấp.

Môi trường thạch nghiêng giữ giống (w/v):

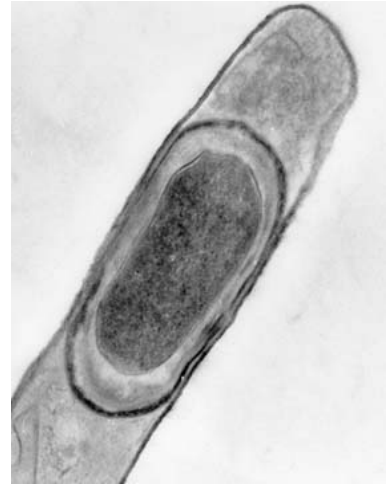
Trypton	5,0
D-glucose	1,0
Dịch chiết nấm men	2,5
Agar	15,0

Môi trường nhân giống (w/v):

Pepton	10,0
Glucose	5,0
Cao thịt	5,0
NaCl	2,5
MnCl ₂	0,167
pH	7,0

Môi trường lên men (w/v):

Citric acid	1,0
Glucose	0,5
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0,01



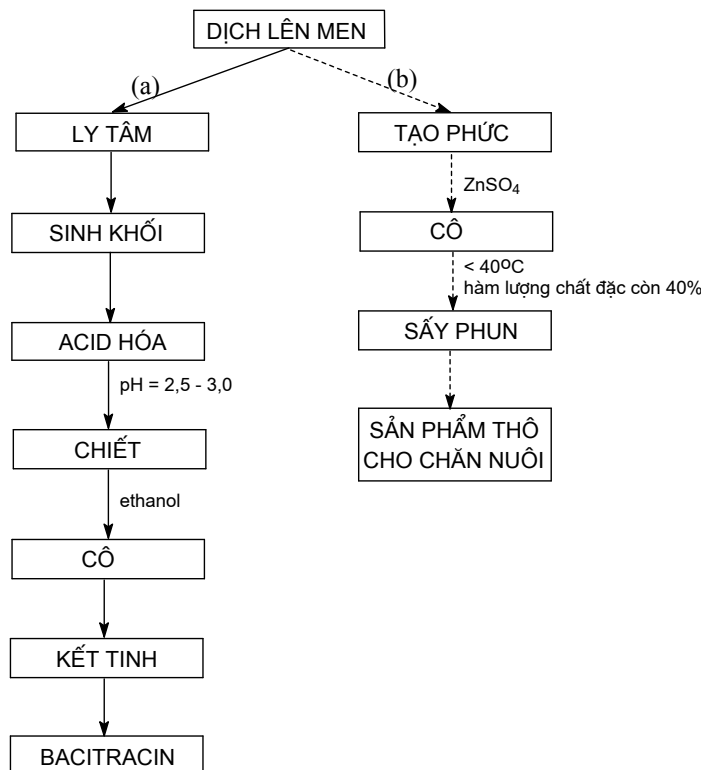
Hình 13.2. Trực khuẩn *B. licheniformis* sinh bacitracin

FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
Dầu phá bọt	theo nhu cầu
pH	7,0

Tiến hành lên men ở 37°C. *B. licheniformis* là chủng hiếu khí nên cần cấp khí mạnh với lưu lượng 1VVM (nhất là trong 6 giờ đầu). Máy khuấy tốc độ 110 vòng/phút. Phá bọt bằng dầu cọ hoặc dầu lạc. Thời gian lên men khoảng 45-50 giờ.

Bacitracin có thể được chiết xuất bằng dung môi hữu cơ (n-butanol hay ethanol) theo quy trình sau: Dịch lên men được ly tâm để loại nước, acid hoá sinh khối để chiết kháng sinh ra khỏi tế bào vi khuẩn. Lọc loại tế bào. Dịch lọc đem chiết kháng sinh bằng ethanol hoặc n-butanol. Cô kết tinh lấy tinh thể bacitracin.

Dạng muối kẽm của bacitracin bền vững hơn nên người ta có thể tạo muối ngay từ khi chiết kháng sinh khỏi môi trường lên men. Phương pháp này hay áp dụng để lấy sản phẩm dùng trong chăn nuôi. Kết thúc lên men thêm dung dịch ZnSO₄ 0,01% để tạo phức kẽm – bacitracin bền vững. Dịch thu được được cô chân không ở nhiệt độ ≤ 40°C đến hàm lượng chất đặc là 40%, sau đó phun sấy sẽ thu được bột bacitracin thô dùng trong chăn nuôi. Bảo quản ở chỗ khô mát, nhiệt độ ≤ 25°C.



Hình 13.3. Quy trình chiết xuất bacitracin trong y học (a) và trong chăn nuôi (b)

TỰ LƯỢNG GIÁ

1. Tìm mối liên hệ chung về cấu trúc giữa polymycin và bacitracin.
2. Nêu tên chủng vi sinh vật sinh tổng hợp polymycin và điều kiện lên men tạo kháng sinh.
3. Trình bày quy trình lên men và chiết xuất bacitracin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kiều Hữu Ảnh - *Giáo trình vi sinh vật học công nghiệp*. NXB Khoa học và Kỹ thuật. 1999.
2. Bộ môn Công nghiệp Dược – *Kỹ thuật sản xuất dược phẩm, tập 1*. Trường Đại học Dược Hà nội. 2001.
3. Từ Minh Koóng - *Cơ sở công nghệ sinh học và sản xuất dược phẩm*. NXB Y học. 2004.
4. Nguyễn Văn Cách – *Công nghệ lên men các chất kháng sinh*. NXB Khoa học và Kỹ thuật. 2004.
5. Edward Alcamo - *Fundamentals of microbiology* (Third Edition). The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1991
6. K.P. Gaponov - *Process and equipments of microbiology's production*. Light and food industry. Moskva. 1981. (bản tiếng Nga)
7. John E. S. *Biotechnology*. Third edition. Cambridge University Press; 1996.
8. Lantini D., Parenti F. - *Antibiotics*. Springer-Verlag New York Inc. 1982 (bản tiếng Nga)
9. Thomas D. B., Michael T. M., John M. M., Jack P. – *Biology of Microorganisms*. Seventh edition. Prencice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632.
10. Wolfgang Fritsche - *Cơ sở hoá sinh của vi sinh vật học công nghiệp*. NXB Khoa học và Kỹ thuật. 1983.