

Các ứng dụng thực tế

Bởi:

Nguyễn Lâm Dũng

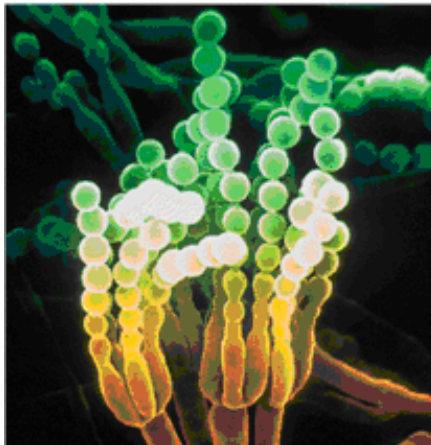
PGS. TS. Phạm Thành Hồ

Chọn giống đột biến

Các thành tựu của Công nghiệp vi sinh vật không thể tách rời với những tiến bộ nhảy vọt trong *chọn lọc các chủng có năng suất cao*. Các phương pháp chọn lọc đột biến được ứng dụng vào chọn giống làm *tăng năng suất* tạo các sản phẩm, làm *biến đổi bản chất hoá học* các chất và *khắc phục một số nhược điểm* của chủng được dùng trong sản xuất công nghiệp.

Phương pháp chọn giống này có các đặc điểm:

- Thu nhận kết quả rất nhanh.
- Chỉ đánh giá sản phẩm thu được, không quan tâm các biến đổi sinh lí, sinh hoá.



Vi nấm Penicillium chrysogenum

Quá trình chọn giống các chủng *Penicillium chrysogenum* ở Mỹ có thể lấy làm ví dụ điển hình cho phương pháp này. Từ dòng ban đầu có sản lượng 60mg/l, chọn các đột biến ngẫu nhiên được dòng 150mg/l, và sau đó sử dụng các đột biến nhận được do tác động tia X và UV. Việc chọn lọc theo nguyên tắc: lấy dòng có sản lượng cao nhất đem gây đột biến rồi chọn chủng có năng suất cao hơn. Qua nhiều bước trung gian cuối cùng cho đến nay nhận được dòng E.15.1 có sản lượng 7000mg/l. Trong bảng 20.2 không nêu

Các ứng dụng thực tế

một thành tựu quan trọng là tạo chủng không sản sinh ra *sắc tố độc*, phải tốn kém nhiều cho việc loại bỏ sắc tố. Việc nhận các *đột biến không tổng hợp sắc tố* đã làm giảm đáng kể chi phí sản xuất và các dòng này được sử dụng để nâng cao năng suất trong quá trình chọn giống tiếp theo.

Phương pháp chọn giống đột biến được sử dụng để tạo các chủng sản sinh ra nhiều axit amin (như glutamic axit) hay các nucleotit. Ngoài ra còn có thể nhận các đột biến liên quan đến cơ chế điều hoà trao đổi chất:

– Các *đột biến cơ cấu* (constitutive mutants): tạo sản phẩm không cần chất cảm ứng (inducer).

– Các *đột biến kháng ức chế ngược* là các đột biến tạo sản phẩm nhiều mà không bị ức chế bởi sản phẩm cuối (end product repression).

Phương pháp này đã đem lại những thành tích ngoạn mục, góp phần tích cực cho sự phát triển của công nghiệp lên men vi sinh như:

– Chủng *Penicillium chrysogenum* ban đầu có năng suất 60 mg/l và nay đạt 60000 mg/l, hơn chủng ban đầu đến 1.000 lần.



• Vi khuẩn *Corynebacterium glutamicum*

Chủng *Corynebacterium glutamicum* tạo glutamic axit đạt hơn 200g/l (ban đầu 20g/l).

– Chủng *Serratia marcescens* sinh ra biotin đạt 600mg/l.



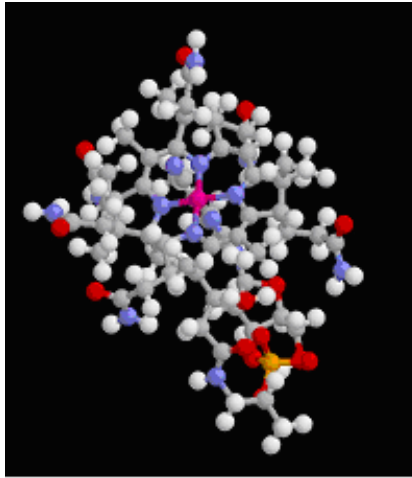
Vi khuẩn *Serratia marcescens*

- *Riboflavin* (vitamin B₂) là sản phẩm thương mại được tổng hợp bằng phương pháp lên men và phương pháp hoá học. Siêu sản xuất riboflavin do 2 chủng vi nấm *Eremothecium ashbyii* và *Ashbya gossypii* với sản lượng hơn 20 g/l, gấp 40000 lần nhu cầu của nó.



Eremothecium ashbyii sinh vitamin B₂ ngay trên môi trường

? Sản xuất vitamin B₁₂ trong công nghiệp do các chủng vi khuẩn *Propionibacterium shermanii* hoặc *Pseudomonas denitrificans*. Các chủng đột biến sản sinh một lượng sản phẩm lớn hơn rất nhiều so với nhu cầu của tế bào, thậm chí lớn hơn nhiều lần khối lượng khô của nó. *Pseudomonas denitrificans* sinh ra vitamin B₁₂ gấp 100000 lần nhu cầu của nó.



Cấu trúc của vitamin B12

Cuộc Cách mạng công nghệ sinh học

Công nghệ sinh học (Biotechnology, CNSH) là một thuật ngữ khoa học do kỹ sư người Hungary là Karl Ereky nêu ra vào năm 1917 để chỉ quá trình nuôi lợn với quy mô lớn bằng thức ăn là củ cải đường *lên men nhờ các vi sinh vật*. Sau đó vào năm 1961, tạp chí khoa học “*JouARNI of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*” (Tạp chí kỹ thuật và công nghệ vi sinh sinh hóa) được đổi tên thành “*Biotechnology and Bioengineering*” (“Công nghệ sinh học và kỹ thuật sinh học”). Tuy nhiên, thuật ngữ này ít được nhắc đến trong hơn 50 năm và chỉ được sử dụng rộng rãi sau phát minh ra Kỹ thuật di truyền-Gentic engineering (KTDT) vào đầu những năm 70 của thế kỷ trước, cho nên có lúc người ta coi đó là sự “*bùng nổ*” của CNSH.



CNSH thuở khởi đầu

Trước thập kỷ 70, CNSH được hiểu là sự *lên men công nghiệp (industrial fermentation)* vi sinh vật để tạo thương phẩm. Trong những thập kỷ 60 và 70, *công nghệ lên men* đã

phát triển thành một *ngành công nghiệp lớn* trên thế giới với doanh số gần trăm tỉ USD/năm. Sự hoàn thiện các trang thiết bị ở tất cả các khâu và sự kiểm soát, điều khiển phản ứng của tế bào ở trình độ cao làm tăng sản lượng đáng kể. Tuy nhiên, khâu quyết định làm giảm đáng kể giá thành là *năng suất chủng giống*. Phương pháp chọn giống cổ điển được thực hiện với những chủng phân lập từ thiên nhiên và sau đó gây đột biến bằng tia tử ngoại, tia phóng xạ hay bằng hóa chất.

Đầu thập niên 1970, CNSH đã chuyển sang một *giai đoạn mới cao hơn hẳn về chất nhờ KTDĐ*. Các kĩ thuật mới cho phép *tạo giống trực tiếp nhanh hơn, tận dụng nguồn gen* từ nhiều sinh vật khác nhau để tạo các chủng sản lượng cao, mà ít tốn công sức để phân lập và gây đột biến như trước đây. Nhờ *khả năng vượt giới hạn tiến hóa của KTDĐ*, các vi sinh vật, các tế bào động thực vật có thể được sử dụng như các “*nhà máy sinh học*” (biological factories) để sản xuất hàng loạt các protein người như insulin, hormone tăng trưởng, interferon,... Các động vật và thực vật có thể trở thành *bioreactor tự nhiên* tạo các sản phẩm từ gen lạ đưa vào, không cần lai tạo và chọn lọc các biến dị bằng lai trong loài như trước đây. Ngoài ra, KTDĐ đồng thời cung cấp các phương pháp trị liệu và chẩn đoán mới để chữa trị bệnh ở người. Cần nhấn mạnh rằng, KTDĐ là *công nghệ cao*, gồm nhiều công đoạn phức tạp và nó thực sự đã tạo nên một cuộc cách mạng.

Sự ra đời của *Cách mạng sinh học mới* làm cho thuật ngữ *Công nghệ sinh học* trở nên thông dụng vào nửa sau những năm 70. Trước 1973, người ta thường dùng các từ “*Vi sinh công nghiệp, Công nghệ lên men, Kĩ thuật sinh hoá*”... *Công nghệ sinh học* là một thuật ngữ *rất đạt*, đã bao hàm trong nó tất cả những tên đã gọi về các lĩnh vực ứng dụng trước đây và với nội dung mới. Nó phản ánh những thành tựu hết sức to lớn của sự phát triển sinh học trong nhiều thập niên trước đó. Cách mạng sinh học mới cao hơn hẳn về chất so với “*Cách mạng xanh*” vào những năm 60.

Từ thuở sơ khai thời cổ La Mã-Hi Lạp, khoa học là một hệ thống nhất. Đến thời Phục hưng, sự phát triển khoa học dẫn đến sự tách biệt thành các ngành và chuyên ngành. Điều này cũng thể hiện rõ trong sinh học cho đến nay. Sự xuất hiện của cách mạng mới đã tạo ra các lĩnh vực đa ngành và *hợp nhất các ứng dụng sinh học ở cấp độ tế bào và phân tử*, đồng thời *gắn liền với công nghệ*, dưới tên gọi chung là CNSH và được coi như “*quyền lực ghê gớm nhất mà loài người giành được kể từ sau thành tựu phân hạch nguyên tử*” hay “*Chúa tể của thế kỉ 21*”.

Khó kể hết những thành tựu vô cùng to lớn của CNSH đến mức mà thế kỷ 21 được mang danh là *thế kỷ công nghệ sinh học*. Ở đây chỉ nêu tiếp một số ứng dụng chủ yếu liên quan đến các đối tượng vi sinh vật.

Giải mã các bộ gen của vi sinh vật

Ngay từ năm 1995, Cr. Venter đã hoàn tất việc giải kí tự chuỗi của 2 loài vi khuẩn *Haemophilus influenzae* (1830121bp) và *Mycoplasma genitalium* (0,58Mb). Hiện nay,

số vi sinh vật được giải kí tự chuỗi bộ gen đã xong là hơn 200 loài. Ngoài ra, nhiều loài quan trọng khác gồm: *Streptomyces coelicolor* (9,05Mb – 1996), *Bacillus subtilis* (4,21Mb – 1997), *Agrobacterium tumefaciens* (6,67Mb – 2001), *Xanthomonas campestris* (5,08Mb – 2002) và *Corynebacterium glutamicum* (3,31Mb – 2003) đã biết được chi tiết về bộ gen.

Sự hiểu biết genomeics vi sinh vật có ý nghĩa hết sức quan trọng về mặt khoa học cơ bản cũng như ứng dụng, mà dự án nêu sau là một ví dụ về nghiên cứu đi sâu vào bản chất sự sống.

Từ năm 2001, *dự án tế bào vi sinh vật* (Microbial Cell Project – MCP) được thực hiện với bốn mục tiêu: 1) Xác định các protein vi sinh tổ hợp thành các bộ máy protein để thực hiện nhiều quá trình nội bào quan trọng cho sự sống ; 2) Đánh giá đặc tính môi trường nội bào và các hiệu quả của nó lên các protein và bộ máy protein đến thực hiện các chức năng ; 3) Đánh giá đặc tính phân bố, số lượng, các luồng protein và bộ máy protein nội bào ; 4) Dùng điện toán xây dựng các mô hình gen ? gen, gen – protein, các tương tác protein – protein và hoá sinh nội bào.

Công nghệ protein tái tổ hợp

Những thí nghiệm tạo dòng gen đầu tiên được thực hiện ở vi sinh vật. Nhờ thao tác dễ dàng lại có công nghệ lên men phát triển mạnh, các vi sinh vật đã cung cấp rất nhiều sản phẩm ở quy mô công nghiệp do KTDT, từ các protein, ADN, ARN đến các phân tử nhỏ.

Từ lâu, các nhà khoa học mong muốn sản xuất các protein với số lượng lớn. Công nghệ gen cho phép sản xuất nhiều loại *protein tái tổ hợp* (recombinant protein – r-protein) khác nhau không những với *số lượng lớn* mà còn có *chất lượng protein tốt hơn*. Công nghệ *r-protein* thật sự đang phát triển với nhiều thành tựu rất ngoạn mục.

Nhiều protein trị bệnh được biểu hiện ở các hệ thống vi khuẩn, nấm men. Chúng cần cho chữa trị một số bệnh, nhưng chiết tách từ cơ thể thì số lượng ít. *Các r-protein đầu tiên* được sản xuất nhờ các *vi sinh vật chủ* như *E. coli* hay nấm men *S. cerevisiae*. Cụ thể là sáu trong bảy loại protein trị liệu với tổng doanh số không dưới 15 tỉ USD, mà bằng sáng chế (patent) *đã hết hạn* (thường khoảng 15 ? 20 năm), được nêu trên bảng dưới đây

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

Bảng: Sáu loại r-protein trị liệu do E. coli hay S. cerevisiae tạo ra

STT	Tên sản phẩm	Các bệnh được điều trị	Năm hết hạn patent
1	Insulin	Tiểu đường	2001

2	Interferon alpha	Viêm gan siêu vi C, mụn cóc qua đường tình dục, ung thư	2002
3	Interferon beta	Xơ cứng (Multiple sclerosis)	2003
4	Hormone tăng trưởng người	Thiếu năng tăng trưởng (Growth deficiency)	2003
5	Erythropoetin	Thiếu máu	2004
6	G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor)	Hóa trị liệu giảm bạch cầu trung tính (Chemotherapy-induced neutropenia)	2006

- Các protein trị liệu như một số nêu ở bảng trên
- Các enzym: ADNz I, alginat lyaz, phenylalanin amoni lyaz, alpha-1-antitrypsin.
- Các kháng thể dùng trong chẩn đoán và chữa trị nhiều bệnh.

Tạo các giống vi sinh vật nhờ kĩ thuật di truyền

E. coli, *Saccharomyces cerevisiae* là những đối tượng đầu tiên được sử dụng KTDT để tạo ra các chủng sản xuất các r-protein người, tiếp đó là nhiều vi sinh vật khác. Sau đây là vài ví dụ cụ thể.

a. Thiết kế trao đổi chất (Metabolic Design)

KTDT đã *can thiệp vào quá trình trao đổi chất ở cấp độ gen* để sản xuất các chất phân tử nhỏ. Các ứng dụng đầu tiên của *metabolomics*, công nghệ gen *điều khiển trao đổi chất*, thực hiện ở vi sinh vật. Hai ví dụ điển hình đầu tiên là tạo dòng tế bào *E. coli* sinh tổng hợp các chất, mà vốn nó không có khả năng này, như *xanhindigo* và sắc tố đen *melanin*. Sự tạo dòng một gen từ *Pseudomonas putida* vào *E.coli* làm nó có khả năng tổng hợp *indigo xanh* trong môi trường có tryptophan. Sự tạo dòng gen *tyrosinaz* cho *E. coli* làm nó biến tyrozin thành *dopaquinone* và chất này ngẫu biến thành *melanin* khi có không khí.

Tiếp theo, các sản phẩm trao đổi chất sơ cấp và thứ cấp được sản xuất từ các dòng thiết kế như *các chủng sử dụng lactoz, chuyển hoá xyloz, sản xuất etanol từ pentoz, phân giải các chất dị sinh (xenobiotics),...*

b. Công nghệ bề mặt tế bào nấm men

Các protein trên bề mặt tế bào nấm men cũng được tổng hợp bên trong tế bào, nhưng sau đó chúng được đưa ra gắn lên bề mặt tế bào. Dựa vào sự hiểu biết các gen tương

Các ứng dụng thực tế

ứng, công nghệ bề mặt tế bào (cell surface technology) đã ra đời. Sử dụng CN gen để cố định protein ngoại lai trên bề mặt tế bào nhằm thay đổi và cải thiện chức năng của tế bào. Tiềm năng ứng dụng đa dạng của nó gồm: sản xuất các enzym, kháng thể, kháng nguyên, thụ thể,....

Bước đầu, các nhà nghiên cứu đã thành công trong biểu hiện các enzym như glycosyl hydrolase, glucozylaz, lipaz,... PTN Công nghệ sinh học phân tử của Đại học KHTN (TPHCM) đã tạo được chủng nấm men gắn protein GFP (green fluorescence protein – protein phát huỳnh quang xanh lục của sứa) và chủng gắn alpha-amylaz.

c. Sự can thiệp của KTĐT vào sản xuất etanol nhiên liệu

Nấm men *S. cerevisiae* và vi khuẩn *Zymomonasmobilis* là 2 vi sinh vật chủ yếu có khả năng sử dụng trong lên men etanol nhiên liệu. Nấm men vẫn giữ vai trò chủ yếu, nhưng nó không lên men xyloz, pentoz và một số loại đường khác. Do tầm quan trọng chiến lược cấp thiết, hiện tại và trong tương lai có rất nhiều nỗ lực được tập trung cho cải thiện chủng giống nhằm sử dụng tốt hơn nguồn nguyên liệu đa dạng và thuận tiện cho quy trình công nghiệp. Các nghiên cứu chủ yếu nhằm thiết kế:

- Các chủng sử dụng lactoz để tận dụng phụ phẩm công nghiệp sữa.
- Các chủng vi sinh có khả năng chuyển hoá xyloz mà nấm men không đồng hoá.
- Các chủng nấm men phân giải tinh bột để lên men bột khỏi phải qua đường hoá.
- Các chủng vi sinh vật để sản xuất etanol từ pentoz.

Ngoài ra, vấn đề quan trọng khác là sản xuất enzym cellulaz giá rẻ để giá thành etanol nhiên liệu đủ sức cạnh tranh với xăng dầu.

Chuyển hoá sinh khối thực vật thành etanol nhiên liệu là một điểm nóng của CNSH hiện đại.

d. Cải biến các chủng vi sinh vật sản xuất vitamin

– Riboflavin (Vitamin B2): Phương pháp mới sử dụng các loài *Candida* hoặc chủng *Bacillus subtilis* tái tổ hợp cho sản lượng 20 – 30g/l.

– Tổng hợp các tiền chất của vitamin: Gần đây (1990) đã thành công trong tạo dòng các gen cho sự sinh tổng hợp carotenoid vòng, chứa β -caroten từ *Erwinia uredovora*. Sau khi 4 gen sinh tổng hợp β -caroten được chuyển vào *Z. mobilis* và *Agrobacterium tumefaciens*, các khuẩn lạc màu vàng thu được trên các đĩa thạch. Các thể tiếp hợp sản xuất 220 ? 350?g β -caroten trên gram khối lượng khô ở phaz ổn định trong môi trường nuôi.

– *Sinh tổng hợp L-ascorbic axit* được cải biến nhờ KTDT. *L-ascorbic axit* (Vitamin C) được hiện tổng hợp thương mại theo một quy trình đất liền, bao gồm 1 giai đoạn lên men Vi sinh vật và một số giai đoạn hóa học bắt đầu với D-glucoz. Giai đoạn cuối cùng trong quá trình là sự *chuyển hoá 2-keto-L-glucoznic axit (2-KLG)* thành *L-ascorbic axit* dưới xúc tác là axit. Do đó, cách tốt nhất để chuyển hoá glucoz thành 2-KLG là *ché tạo một Vi sinh vật* có mang tất cả các enzym cần thiết. Việc chuyển hoá D-glucoz thành 2,5-DKG bằng *Erwinia herbicola* bao gồm nhiều bước xúc tác bởi enzym, trong khi đó sự chuyển đổi 2,5-DKG thành 2-KLG do *Corynebacterium*sp. đòi hỏi chỉ một bước. Chiến lược đơn giản nhất để thiết kế một sinh vật có khả năng *chuyển D-glucoz thành 2-KLG* là tách gen 2,5-DKG reductaz từ *Corynebacterium*sp. và cho biểu hiện trong *Erwinia herbicola*.

Các tế bào *Erwinia* được *biến nạp gen 2,5-DKG reductaz* có khả năng *chuyển hoá trực tiếp D-glucoz thành 2-KLG*, vì các enzym nội bào của *Erwini* nằm ở màng trong của vi khuẩn *chuyển glucoz thành 2,5-DKG* và *2,5-DKG reductaz* xúc tác *chuyển 2,5-DKG thành 2-KLG*. Do đó, bằng thao tác gen, khả năng chuyển hoá của 2 Vi sinh vật rất khác nhau lại được kết hợp thành một và do đó có khả năng tạo sản phẩm cuối của *quá trình chuyển hoá được thiết kế*. Sinh vật loại này rất hữu ích như là một nguồn 2-KLG cho sản xuất L-ascorbic axit, bằng cách đó thay thế 3 công đoạn đầu của quy trình hiện đang được sử dụng.

Thông qua *đột biến điểm định hướng* bằng oligonucleotit đã thu được đột biến 2,5-DKG reductaz có hoạt tính cao hơn khoảng 2 lần và bền với nhiệt hơn dạng enzym tự nhiên.

Tóm lại, KTDT đã thể hiện quyền lực to lớn trong cải biến sinh giới về nhiều mặt, không những thay đổi các tính trạng khác nhau, mà can thiệp cả đến chi tiết các thành phần và quá trình trao đổi chất. Trên các đối tượng vi sinh vật, công nghệ gen được ứng dụng đầu tiên, kỹ thuật đa dạng, hiệu quả hơn cả và hàng loạt sản phẩm đã xâm nhập thị trường từ năm 1982.