



1956 - 2006

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
50 NĂM XÂY DỰNG VÀ PHÁT TRIỂN

TS. NGUYỄN VĂN CÁCH

CÔNG NGHỆ LÊN MEN CÁC CHẤT KHÁNG SINH



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT



TS. NGUYỄN VĂN CÁCH

**CÔNG NGHỆ LÊN MEN
CÁC CHẤT KHÁNG SINH**



**NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI**

Lời nói đầu

Sự phát triển như vũ bão của vi sinh vật học, với phát minh vĩ đại về penicillin, cùng với việc phát triển và hoàn thiện của công nghệ lên men hiện đại đã tạo ra cho nhân loại các chất kháng sinh, công cụ hữu hiệu mới để đấu tranh chống lại bệnh nhiễm khuẩn và mở ra “kỷ nguyên vàng” cho ngành công nghệ sản xuất các sản phẩm này.

Để đáp ứng nhu cầu chăm sóc y tế cho tám mươi triệu dân, Việt nam có nhu cầu lớn về các loại thuốc kháng sinh; trong khi đó hiện tại hầu như chúng ta vẫn phải nhập khẩu. Với mục tiêu từng bước tiếp cận công nghệ hiện đại và đáp ứng nhu cầu đào tạo nguồn nhân lực kỹ thuật-công nghệ để tiến tới sản xuất một phần thuốc kháng sinh trong nước, cuốn “Công nghệ sinh học các chất kháng sinh” được biên soạn làm tài liệu giảng dạy cho đối tượng kỹ sư công nghệ sinh học trong trường đại học và có thể sử dụng làm tài liệu tham khảo cho các đối tượng liên quan, nhằm cung cấp cho học viên và bạn đọc những kiến thức cơ bản về chất kháng sinh và công nghệ lên men một số chất kháng sinh phổ dụng trong điều trị hiện nay.

Tác giả rất mong nhận được sự đóng góp của độc giả để hiệu chỉnh cho lần in sau được hoàn chỉnh hơn. Xin chân thành cảm ơn sự khích lệ và ủng hộ của đồng nghiệp và bạn đọc.



TS. Nguyễn Văn Cách
Hà Nội, 2004

MỤC LỤC

LỜI NÓI ĐẦU	<i>Trang</i> 3
MỤC LỤC	5
1. MỞ ĐẦU	9
1.1. Đại cương về chất kháng sinh	9
1.2. Chức năng sinh học của chất kháng sinh	16
1.3. Hiện tượng kháng thuốc, bản chất sự kháng thuốc của vi sinh vật và hội chứng loạn khuẩn khi sử dụng thuốc kháng sinh	19
1.3.1. Hiện tượng và bản chất kháng thuốc của vi sinh vật	19
1.3.2. Hội chứng loạn khuẩn trong điều trị	22
1.4. Điều chỉnh sinh tổng hợp chất kháng sinh	24
1.4.1. Tuyển chọn và tạo ra các chủng công nghiệp siêu tổng hợp chất kháng sinh	24
1.4.2. Tối ưu hoá thành phần môi trường, thiết bị lên men và điều kiện vận hành quá trình lên men	25
2. CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH PENICILLIN	28
2.1. Điểm lịch sử phát hiện và sản xuất penicillin	28
2.2. Cơ sở công nghệ sinh tổng hợp penicillin nhờ nấm mốc	31
2.2.1. Lịch sử tuyển chọn chủng công nghiệp <i>P. chrysogenum</i>	31
2.2.2. Cơ chế sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc <i>P. chrysogenum</i>	33
2.2.3. Phương pháp kiểm tra và định lượng penicillin	36

2.2.4.	Tác động của các thông số công nghệ đến quá trình sinh tổng hợp penicillin	39
2.3.	Quy trình lên men sản xuất penicillin trong công nghiệp	45
2.3.1.	Đặc điểm chung	45
2.3.2.	Chuẩn bị lên men	47
2.3.3.	Kỹ thuật tiến hành lên men	48
2.3.4.	Hiệu quả kinh tế chung của quá trình lên men	51
2.4.	Xử lý dịch lên men và tinh chế thu penicillin tự nhiên	52
2.4.1.	Lọc dịch lên men	52
2.4.2.	Trích ly	53
2.4.3.	Tẩy màu	54
2.4.4.	Kết tinh, lọc, rửa và sấy thu penicillin tự nhiên	54
2.5.	Sản xuất các β-lactam bán tổng hợp từ penicillin G	55
2.5.1.	Nhu cầu sản xuất các penicillin bán tổng hợp	55
2.5.2.	Sản xuất axit 6-aminopenicillanic và sản xuất penicillin bán tổng hợp	57
2.5.3.	Sản xuất axit 7-aminodeacetoxy-cephalosporanic (7-ADCA) và sản xuất cephalosporin bán tổng hợp	59
2.5.4.	Sản xuất các β -lactam bán tổng hợp có hoạt tính kìm hãm β -lactamaza	60
2.6.	Sản xuất và ứng dụng penicillin-acylaza	60
2.6.1.	Đại cương	60
2.6.2.	Tuyển chọn chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzym penicillin-acylaza	62
2.6.3.	Sản xuất chế phẩm enzym penicillin-acylaza	62
2.6.4.	Sử dụng enzym penicillin-acylaza để sản xuất axit 6-aminopenicillanic	65
3.	CÔNG NGHỆ LÊN MEN CEPHALOSPORIN VÀ CEPHAMYCIN	69
3.1.	Đại cương	69

3.2. Điểm công nghệ lên men	71
4. CÔNG NGHỆ LÊN MEN AXIT CLAVULANIC	74
4.1. Đại cương	74
4.2. Điểm công nghệ lên men	76
5. CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH AMINOGLYCOZIT	80
5.1. Đại cương	80
5.2. Cơ chế sinh tổng hợp	87
5.3. Điểm công nghệ lên men	91
5.4. Xử lý dịch lên men và tinh chế thu sản phẩm	94
5.5. Ứng dụng	96
6. CÔNG NGHỆ LÊN MEN TETRACYCLIN	99
6.1. Đại cương	99
6.2. Điểm công nghệ lên men	102
6.2.1. Đặc điểm chung	102
6.2.2. Lên men sản xuất clotetracyclin	103
6.2.3. Lên men sản xuất oxytetracyclin	105
6.2.4. Lên men oxytetracyclin và lên men demetylclotetracyclin	106
6.2.5. Xử lý dịch lên men và tinh chế thu các tetracyclin	107
6.3. Ứng dụng	108
7. CÔNG NGHỆ LÊN MEN CLORAMPHENICOL	110
7.1. Đại cương	10
7.2. Điểm công nghệ lên men	111
7.2.1. Cơ chế sinh tổng hợp cloramphenicol	111
7.2.2. Lên men và tinh chế cloramphenicol	112

7.3. Cơ chế tác dụng và ứng dụng	114
8. CÔNG NGHỆ LÊN MEN GRISEOFULVIN	116
8.1. Đại cương	116
8.2. Điểm công nghệ lên men	117
8.3. Cơ chế tác dụng và ứng dụng	120
9. CÔNG NGHỆ LÊN MEN CYCLOHEXEMIDE	121
9.1. Đại cương	121
9.2. Điểm công nghệ lên men	122
9.3. Cơ chế tác dụng và ứng dụng	124
10. CÔNG NGHỆ LÊN MEN BLEOMYCIN	126
10.1. Đại cương	126
10.2. Điểm công nghệ lên men và tính chế	126
10.3. Cơ chế tác dụng và ứng dụng	129
11. CÔNG NGHỆ LÊN MEN DAUNORUBICIN VÀ ADRIAMYCIN	130
11.1. Đại cương	130
11.2. Điểm công nghệ lên men và tính chế	131
11.2.1. Lên men sản xuất daunorubicin	131
11.2.2. Lên men sản xuất adriamycin	134
11.3. Cơ chế tác dụng và ứng dụng	136
12. CÔNG NGHỆ LÊN MEN NISIN	137
12.1. Đại cương về bacteriocin và nisin	137
12.2. Điểm công nghệ lên men và tính chế	139
12.3. Cơ chế tác dụng và ứng dụng	140

1 MỞ ĐẦU

1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ CHẤT KHÁNG SINH

Trong suốt tiến trình phát triển của nhân loại, trên con đường hoàn thiện mình, loài người luôn luôn phải đấu tranh để vượt qua mọi trở ngại, thách thức khác nhau. Bệnh tật chính là một trong vô số các trở ngại đó và rất nhiều bệnh có nguyên nhân do vi sinh vật gây ra. Từ rất xa xưa trong lịch sử, bằng con đường tìm tòi, khám phá và tích lũy kinh nghiệm thực tiễn, con người đã phát hiện và ứng dụng hiệu quả rất nhiều nguồn dược liệu động vật và thực vật dưới dạng các bài thuốc cổ truyền trong các cộng đồng dân cư vào mục đích điều trị y học. Sự phát triển về vi sinh vật học nói chung, và vi sinh vật công nghiệp nói riêng, với bước ngoặt lịch sử là phát minh vĩ đại về chất kháng sinh của Alexander Fleming (1928) đã mở ra kỷ nguyên mới trong y học: khai sinh ra ngành công nghệ sản xuất chất kháng sinh và ứng dụng thuốc kháng sinh vào điều trị cho người.

Thuật ngữ “chất kháng sinh” lần đầu tiên được Pasteur và Joubert (1877) sử dụng để mô tả hiện tượng kìm hãm khả năng gây bệnh của vi khuẩn *Bacillus anthracis* trên động vật nhiễm bệnh nếu tiêm vào các động vật này một số loại vi khuẩn hiếu khí lạnh tính khác. Babes (1885) đã nêu ra định nghĩa hoạt tính kháng khuẩn của một chủng là đặc tính tổng hợp được các hợp chất hóa học có hoạt tính kìm hãm các chủng đối kháng. Ông và các đồng nghiệp đã xác định được dịch trích ly từ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (được nhóm nghiên cứu của ông đặt tên là “pyocyanase”) ở nồng độ rất loãng cũng kìm hãm được *Corynebacterium diptheriae*,

Salmonella typhi, *Pasteurella pestis* và nhiều loài cầu khuẩn gây bệnh khác (*pyrocyanase* đã được ứng dụng trong điều trị, nhưng do độc tính cao nên sau đó không được triển khai rộng rãi). Nicolle (1907) là người đầu tiên phát hiện ra hoạt tính kháng khuẩn của *Bacillus subtilis* có liên quan đến quá trình hình thành bào tử của loài trực khuẩn này. Gratia và đồng nghiệp (1925) đã tách được từ nấm mốc một chế phẩm có thể sử dụng để điều trị hiệu quả các bệnh truyền nhiễm trên da do cầu khuẩn và ông là người đầu tiên xây dựng hoàn chỉnh phương pháp nghiên cứu tìm kiếm và phát hiện vi sinh vật tổng hợp chất kháng sinh trong tự nhiên. Mặc dù vậy, trong thực tế mãi tới năm 1929 thuật ngữ “chất kháng sinh” mới được Alexander Fleming mô tả một cách đầy đủ và chính thức trong báo cáo chi tiết về penicillin.

Việc lên men, tinh chế thành công và xác định được hiệu quả điều trị to lớn của penicillin (Florey và Chain, 1939) cùng với việc phát hiện ra *tyrothrixin* (Dubos, 1939 - về sau người ta đã xác định được chất này là hai chất kháng sinh *tyrocidin* và *gramicidin*) ở vi khuẩn *Bacillus brevis* đã chính thức mở ra “kỷ nguyên vàng” của công nghệ sản xuất chất kháng sinh và sử dụng thuốc kháng sinh trong điều trị y học. Theo đó, ngay thập kỷ 40 và 50 của thế kỷ XX đã ghi nhận những bước tiến vượt bậc của ngành công nghệ sản xuất kháng sinh non trẻ, với hàng loạt sự kiện như:

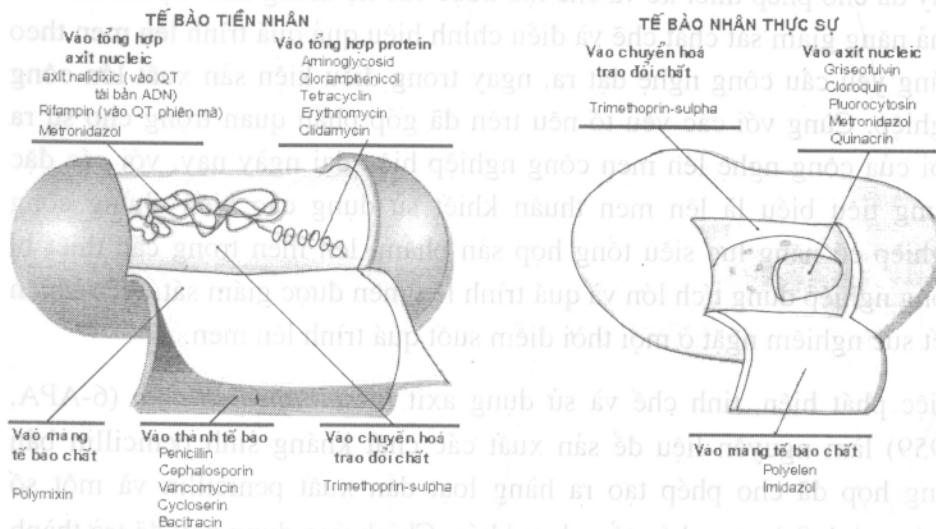
- Khám phá ra hàng loạt chất kháng sinh, thí dụ như griseofulvin (1939), gramicidin S (1942), streptomycin (1943), bacitracin (1945), cloramphenicol và polymycin (1947), clotetracyclin và cephalosporin (1948), neomycin (1949), oxytetracyclin và nystatin (1950), erythromycin (1952), cycloserin (1954), amphotericin B và vancomycin (1956), metronidazol, kanamycin và rifamycin (1957)...
- Áp dụng phối hợp các kỹ thuật tuyển chọn và tạo giống tiên tiến (đặc biệt là các kỹ thuật gây đột biến, kỹ thuật dung hợp tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp gen...) đã tạo ra những biến chủng công nghiệp có năng lực “siêu tổng hợp” các chất kháng sinh cao gấp hàng ngàn vạn lần các chủng ban đầu. Kết quả là ngày nay hầu như toàn bộ các cơ sở sản xuất chất kháng sinh nói riêng và các cơ sở công nghệ lên men hiện đại nói chung đều sử dụng các biến chủng công nghiệp làm giống cho sản xuất. Đồng thời, người ta

tiến hành nghiên cứu, kiểm tra, giám sát chặt chẽ đặc tính sinh lý, sự phát triển của chủng vi sinh vật và các đường hướng trao đổi chất tạo ra sản phẩm của chúng, trên cơ sở đó tối ưu hóa thành phần môi trường và các điều kiện tiến hành lên men, sử dụng các tiền chất, các chất cảm ứng hay các tác nhân định hướng... Việc áp dụng đồng bộ hàng loạt giải pháp công nghệ trên đã cho phép làm tăng đáng kể tốc độ và hiệu quả tích tụ sản phẩm, đồng thời định hướng được sản phẩm tạo thành.

- Triển khai thành công công nghệ lên men chìm quy mô sản xuất công nghiệp để sản xuất *penicillin G* (1942) và việc hoàn thiện công nghệ lên men này trên các sản phẩm khác trong những năm tiếp theo cho đến ngày nay đã cho phép thiết kế và chế tạo được các hệ thống thiết bị lên men có khả năng giám sát chặt chẽ và điều chỉnh hiệu quả quá trình lên men theo đúng yêu cầu công nghệ đặt ra, ngay trong điều kiện sản xuất lớn công nghiệp. Cùng với các yếu tố nêu trên đã góp phần quan trọng cho sự ra đời của công nghệ lên men công nghiệp hiện đại ngày nay, với các đặc trưng tiêu biểu là lên men thuần khiết sử dụng các biến chủng công nghiệp có năng lực siêu tổng hợp sản phẩm, lên men trong các thiết bị công nghiệp dung tích lớn và quá trình lên men được giám sát, điều khiển hết sức nghiêm ngặt ở mọi thời điểm suốt quá trình lên men.
- Việc phát hiện, tinh chế và sử dụng axit *6-aminopenicillanic* (6-APA, 1959) làm nguyên liệu để sản xuất các chất kháng sinh penicillin bán tổng hợp đã cho phép tạo ra hàng loạt dẫn xuất penicillin và một số kháng sinh β -lactam bán tổng hợp khác. Chính ứng dụng này đã trở thành điểm khởi đầu tạo ra diện mạo hoàn toàn mới cho công nghệ sản xuất và ứng dụng thuốc kháng sinh. Ngày nay, hầu hết các loại thuốc kháng sinh thương mại sử dụng trong điều trị đều được bào chế từ các chế phẩm kháng sinh bán tổng hợp.

Chất kháng sinh được hiểu là các chất hóa học xác định, không có bản chất enzym, có nguồn gốc sinh học (trong đó phổ biến nhất là từ vi sinh vật), với đặc tính là ngay ở nồng độ thấp (hoặc rất thấp) đã có khả năng ức chế mạnh mẽ hoặc tiêu diệt được các vi sinh vật gây bệnh mà vẫn đảm bảo an toàn cho người hay động vật được điều trị.

Cơ chế tác dụng lên vi sinh vật gây bệnh (hay các đối tượng gây bệnh khác - gọi tắt là mầm bệnh) của mỗi chất kháng sinh thường mang đặc điểm riêng, tùy thuộc vào bản chất của kháng sinh đó; trong đó, những kiểu tác động thường gặp là làm rối loạn cấu trúc thành tế bào, rối loạn chức năng điều tiết quá trình vận chuyển vật chất của màng tế bào chất, làm rối loạn hay kiềm tỏa quá trình sinh tổng hợp protein, rối loạn quá trình tái bản ADN, hoặc tương tác đặc hiệu với những giai đoạn nhất định trong các chuyển hóa trao đổi chất (hình 1.1).



Hình 1.1. Vị trí tác dụng chính của một số chất kháng sinh

Năng lực tích tụ kháng sinh của chủng hay nồng độ chất kháng sinh thường được biểu thị bằng một trong các đơn vị là: mg/ml, $\mu\text{g/ml}$, hay đơn vị kháng sinh UI/ml (hay UI/g, *International Unit* - đơn vị của mỗi kháng sinh được định nghĩa là lượng kháng sinh tối thiểu pha trong một thể tích quy ước dung dịch có khả năng ức chế hoàn toàn sự phát triển của chủng vi sinh vật kiểm định đã chọn, thí dụ, với penicillin là số miligam penicillin pha vào trong 50ml môi trường canh thang và sử dụng *Staphylococcus aureus* 209P).

làm chủng kiểm định; với streptomycin là số miligam pha trong 1ml môi trường canh thang và kiểm định bằng vi khuẩn *Escherichia coli*).

Hiệu quả ứng dụng điều trị của mỗi chất kháng sinh được xác định qua việc xem xét hàng loạt chỉ tiêu khác nhau, trong đó một số chỉ tiêu chính là: hoạt tính kháng sinh đặc hiệu, phổ kháng sinh, đáp ứng phản hồi của mầm bệnh đối với kháng sinh đó, phản ứng phụ của thuốc, đường cấp thuốc, sự chuyển hóa thuốc trong cơ thể bệnh nhân, đường hướng đào thải thuốc và tương tác qua lại giữa các loại thuốc khi sử dụng phối hợp.

Hoạt tính kháng sinh đặc hiệu là đặc tính cho thấy năng lực kìm hãm hay tiêu diệt một cách chọn lọc các chủng vi sinh gây bệnh, trong khi không gây ra các hiệu ứng phụ quá ngưỡng cho phép trên người bệnh được điều trị. Đặc tính này được biểu thị qua hai giá trị là nồng độ kìm hãm tối thiểu (*Minimum Inhibitory Concentration* – viết tắt là MIC) và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (*Minimum Bactericidal Concentration* – viết tắt là MBC), xác định trên các đối tượng vi sinh vật gây bệnh kiểm định lựa chọn tương ứng cho mỗi chất kháng sinh. Phổ kháng khuẩn của chất kháng sinh biểu thị số lượng các chủng gây bệnh bị tiêu diệt bởi kháng sinh này. Theo đó, chất kháng sinh có thể tiêu diệt được nhiều loại mầm bệnh khác nhau được gọi là chất kháng sinh phổ rộng, chất kháng sinh chỉ tiêu diệt được ít mầm bệnh là chất kháng sinh phổ hẹp. Việc phân loại chất kháng sinh thường căn cứ vào mục đích riêng mà người ta có thể dựa theo một trong các nguyên tắc khác nhau sau: phân loại theo nguồn gốc sinh học của chúng sinh ra chất kháng sinh, phân loại theo phổ kháng sinh, phân loại theo cơ chế tác dụng hay phân loại theo cơ chế sinh tổng hợp ra chất kháng sinh đó.

Ngày nay, chất kháng sinh có vai trò hết sức quan trọng đối với việc chăm sóc sức khỏe con người và ngành công nghệ sản xuất chất kháng sinh là một trong số ít ngành công nghiệp mang lại hiệu quả kinh tế rất to lớn. Chính vì vậy, hiện trên thế giới có rất nhiều công ty tham gia sản xuất thuốc kháng sinh (xem thí dụ trong bảng 1.1).

Bảng 1.1. Một số công ty có sản phẩm kháng sinh ở Nhật Bản

Ashahi Chemical Industries Co., Osaka
Banyu Pharmaceutical Company, Tokyo
Chungai Pharmaceutical Company, Tokyo
Fujisawa Pharmaceutical Company, Osaka
Hokko Kagaku Kogyo Company, Tokyo
Kaken Chemical Company, Tokyo
Kakenyaku Kako Company, Tokyo
Kanegafuchi Chemical Industries, Osaka
Daiichi Seiyaku Co., Tokyo
Dainippon Pharmaceutical Co., Tokyo
Kayaku Antibiotics Research Comp. Ltd., Tokyo
Kowa Company, Nagoya
Kureha Chemical Industry Ltd., Tokyo
Kyowa Hakko Kogyo Company, Tokyo
Meiji Seika Kaisha Company Ltd., Tokyo
Nikken Chemicals Company Ltd., Tokyo
Nippon Kayaku Company, Tokyo
Nippon Nohuyaku Company, Tokyo
Pfizer Taito Company, Tokyo
Sankyo Company Ltd., Tokyo
Sanraku Ocean Company Ltd., Tokyo
Shionogi Company Ltd., Osaka
Sumitomo Chemical Industries Company, Osaka
Takara Shuzo Company Ltd., Kyoto
Takeda Chemical Industries, Osaka
Tanabe Seiyaku Ltd., Osaka
Toyama Chemical Company Ltd., Tokyo
Toyo Jozo Company Ltd., Shizuoka
Ymanouchi Pharmaceutical Company, Tokyo
Mochida Pharmaceutical Company, Tokyo

Hàng năm thế giới tiêu thụ một lượng đáng kể các chất kháng sinh (trong năm 1995 riêng thị trường các nước tư bản đã tiêu thụ khoảng 20.000 tấn), với xu thế về sản lượng công nghiệp của các sản phẩm nhóm này liên tục tăng trong suốt mấy chục năm qua và vai trò tiên phong trong nghiên cứu tìm kiếm các kháng sinh mới cũng như tiềm lực sản xuất chất kháng sinh trong những năm cuối thế kỷ XX phải kể đến ba cường quốc công nghiệp hàng đầu là Mỹ, Anh và Nhật Bản.

Đồng thời, bài học kinh nghiệm từ thực tiễn ứng dụng điều trị cũng cho thấy nhu cầu nghiên cứu, sản xuất các chất kháng sinh đã biết với các đặc tính ưu việt hơn và việc tìm kiếm phát hiện các kháng sinh mới vẫn luôn luôn là vấn đề mang tính thời sự và rất cấp thiết, đặt ra không chỉ ở thời điểm hiện tại mà cả trong tương lai. Dự báo ngành công nghệ lên men sản xuất kháng sinh có thể phát triển theo một số hướng chính là:

- Tiếp tục nghiên cứu sản xuất thêm các chế phẩm bán tổng hợp của các chất kháng sinh đã biết nhằm mở rộng phổ điều trị và mang lại cho chúng các đặc tính ưu việt hơn. Theo hướng này, chiếm ưu thế về chủng loại và sản lượng khả năng vẫn là các kháng sinh nhóm β -lactam (các penicillin, cephalosporin, cephamycin bán tổng hợp). Các nhóm chất kháng sinh khác như: tetracyclin, kanamycin, rifamycin, lincomycin, clidamycin... sẽ được ứng dụng điều trị ngày càng phổ biến hơn. Bên cạnh đó, người ta ngày càng quan tâm nhiều đến các kháng sinh có các hoạt tính mới như: kháng nấm, kháng virus, kháng sinh có khả năng kìm hãm sự phát triển của các khối u...
- Hoàn thiện các phương pháp phân lập, tuyển chọn, tạo các biến chủng siêu tổng hợp, điều chỉnh đường hướng các quá trình trao đổi chất và đường hướng quá trình lên men, áp dụng các công nghệ tách và tinh chế mới, hoàn thiện và áp dụng các kỹ thuật phân tích hiện đại (đặc biệt là kỹ thuật "*in vivo assay systems*")... để triển khai sản xuất công nghiệp được các chất kháng sinh quý đã khám phá ra trong giai đoạn trước (nhưng chưa triển khai lên men sản xuất được do hoạt lực sinh tổng hợp của chủng không cao, thí dụ, β -lactam từ xạ khuẩn, monobactam từ vi

khuẩn...) hay điều chỉnh định hướng quá trình lên men để có thể lựa chọn thu các sản phẩm lên men tự nhiên khác nhau theo nhu cầu, trên cùng một đối tượng vi sinh vật và dây chuyền công nghệ.

- Tiếp tục tìm kiếm phát hiện các chất kháng sinh mới, bao gồm cả mở rộng việc tìm kiếm phát hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng sinh sang các nhóm vi sinh vật khác, thí dụ như các vi sinh vật biển, các vi sinh vật có đòi hỏi nghiêm ngặt về không chế điều kiện nuôi, các loài tảo, các loại kháng sinh thực vật..., nhằm triển khai sản xuất thêm các kháng sinh mới có đặc tính ưu việt hơn.
- Sản xuất các chế phẩm điều trị với sự phối hợp nhiều loại thuốc, qua đó mở rộng khả năng ứng dụng và hiệu quả điều trị của các chất kháng sinh đã biết; đồng thời, góp phần làm giảm nguy cơ kháng thuốc và hạn chế bớt các hiệu ứng không mong muốn của mỗi chất kháng sinh.
- Mở rộng thêm khả năng ứng dụng các chất kháng sinh vào các lĩnh vực kinh tế và khoa học khác, thí dụ, ứng dụng trong chăn nuôi, bảo quản thực phẩm, nông nghiệp, bảo vệ môi trường, nghiên cứu khoa học...

1.2. CHỨC NĂNG SINH HỌC CỦA CHẤT KHÁNG SINH

Các chất kháng sinh đã biết đến nay hết sức phong phú về số lượng, đa dạng về chủng loại, về cấu trúc phân tử và khác biệt nhau nhiều cả về cơ chế tác dụng. Tuy nhiên, người ta dễ dàng nhận ra một số điểm đặc trưng của công nghệ sản xuất các chất kháng sinh phổ biến hiện nay là: đại bộ phận các chất kháng sinh đều được sản xuất theo phương pháp lên men gián đoạn hay bán liên tục, các sản phẩm kháng sinh thường được tích tụ trong pha sau của quá trình lên men (*iodophase*), các chủng sinh kháng sinh thường tổng hợp đồng thời một họ gồm một số chất có cấu trúc và đặc tính rất gần gũi nhau (họ các chất kháng sinh), khả năng sinh tổng hợp kháng sinh của chủng dễ dàng bị mất đi do các biến đổi về di truyền (đột biến hay trao đổi plasmid) và dù các chất kháng sinh được chính vi sinh vật tổng hợp ra, song dường như chúng không có vai trò rõ rệt nào đối với sự phát triển sinh lý bình thường

của chủng sinh tổng hợp ra chính chất kháng sinh ấy. Một điểm dễ nhận biết nữa là khả năng sinh tổng hợp các chất kháng sinh không phân bố đồng đều, mà tập trung chủ yếu vào nhóm hẹp các vi sinh vật (trong số khoảng 5.500 chất kháng sinh đã biết đến nay có tới hơn 4.000 chất là từ xạ khuẩn).

Cơ chế quá trình sinh tổng hợp chất kháng sinh xảy ra rất phức tạp và đa dạng, trong đó có rất nhiều điểm chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn. Về vấn đề này, hiện vẫn tồn tại nhiều quan điểm khác biệt nhau, thí dụ, năng lực tích tụ kháng sinh là “sản phẩm dư thừa” của quá trình tiến hoá, chất kháng sinh cũng là những sản phẩm của quá trình trao đổi chất nội bào bình thường, năng lực tích tụ kháng sinh cũng là một đường hướng để dự trữ thức ăn, chất kháng sinh là một thành phần cấu thành của vỏ bào tử hay chất kháng sinh là sản phẩm chuyển hóa các polymer cao phân tử trong tế bào. Trong số này, có hai giả thuyết được nhiều người ủng hộ hơn cả là:

- ***Việc tổng hợp các chất kháng sinh nhằm tạo ra ưu thế phát triển cạnh tranh có lợi cho chủng sinh kháng sinh, nhờ đó chúng có thể tiêu diệt hay kìm hãm được sự phát triển của các loài khác cùng tồn tại và phát triển trong hệ sinh thái cục bộ đó.*** Giả thuyết này dựa trên cơ sở thực tiễn là khả năng tổng hợp chất kháng sinh thường gặp phổ biến hơn ở các loài vi sinh vật sống trong đất và phần lớn các vi sinh vật hoại sinh sống quanh vùng rễ thực vật đều là các loài sinh kháng sinh. Đồng thời, hầu hết các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh đều có thể tổng hợp chất kháng sinh trong môi trường đất vô khuẩn, đất có bổ sung thêm chất hữu cơ và được vô khuẩn hay đất chưa vô khuẩn có trộn thêm một số chất hữu cơ. Nhìn chung đất là môi trường nghèo chất hữu cơ và chỉ quanh vùng rễ mới có nhiều chất hữu cơ hơn. Vì vậy, để tạo ưu thế cạnh tranh sinh tồn, trong quá trình tiến hóa năng lực tổng hợp kháng sinh đã xuất hiện và hoàn thiện dần theo thời gian cho đến ngày nay. Tuy nhiên, giả thuyết này lại không thỏa mãn quy luật của chuỗi thức ăn, trong trường hợp một số chất kháng sinh từ vi khuẩn hay nấm nhưng lại tiêu diệt và kìm hãm được cả nhiều loài nguyên sinh động vật.

- *Việc tổng hợp chất kháng sinh là một đặc tính cần thiết và đảm bảo cho khả năng sống sót cao cho chủng sinh ra chất kháng sinh trong tự nhiên, nhất là với các loài có bào tử.* Ở rất nhiều loài vi sinh vật sinh kháng sinh có bào tử, chất kháng sinh thường được tổng hợp trong giai đoạn chuyển đổi trạng thái tồn tại của tế bào (khi hình thành bào tử hoặc khi bào tử nảy mầm). Phải chăng chất kháng sinh đảm nhiệm những chức năng đặc biệt nhất định nào đó trong giai đoạn biến đổi mạnh mẽ của cơ thể này? Người ta đã xác định được một số chất kháng sinh có tác dụng ức chế sự nảy mầm của bào tử chính chúng sinh ra kháng sinh đó. Như vậy, có thể chất kháng sinh đảm nhiệm chức năng góp phần kìm hãm sự nảy mầm của bào tử, cho đến khi điều kiện môi trường ngoài hoàn toàn thích hợp cho sự phát triển của chúng. Quá trình hình thành (hoặc nảy mầm) bào tử và quá trình tổng hợp chất kháng sinh có thể xảy ra độc lập với nhau, song về nguyên lý chúng đều được kiểm soát bởi cơ chế điều chỉnh chặt chẽ và thống nhất của tế bào chủ. Điểm chưa logic của giả thuyết này là không giải thích được tại sao một số biến chủng mất khả năng sinh kháng sinh nhưng vẫn có thể hình thành bào tử bình thường hay trường hợp có chủng mất khả năng tạo bào tử vẫn có thể sinh tổng hợp được chất kháng sinh.

Một hiện tượng phổ biến được ghi nhận là các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh có thể sống sót hay duy trì được hoạt động sống trong môi trường có chất kháng sinh do nó tích tụ. Song nếu bổ sung chính chất kháng sinh này ngay từ đầu, hiệu ứng kìm hãm rõ rệt sự phát triển của chủng xuất hiện ở rất nhiều trường hợp. Dữ liệu trên cho thấy: vi sinh vật vốn có khả năng tự điều chỉnh để sao cho trong giai đoạn phát triển sinh khối thì quá trình sinh tổng hợp các enzym cần thiết cho việc tổng hợp ra chất kháng sinh sẽ bị kiểm tỏa hay ức chế mạnh mẽ, hoặc chúng có thể tổng hợp ra các yếu tố có thể làm biến đổi cấu trúc (hoặc làm giảm hoạt tính) chất kháng sinh, hay thậm chí chủng sinh kháng sinh có thể tự biến đổi cấu trúc cơ thể để bảo vệ mình trong môi trường kháng sinh đó. Ngoài ra, trong quá trình lên men sản xuất, do thời gian lên men dài nên các chủng vi sinh vật sinh kháng sinh vẫn bị chết dần trong môi trường.

1.3. HIỆN TƯỢNG KHÁNG THUỐC, BẢN CHẤT SỰ KHÁNG THUỐC CỦA VI SINH VẬT VÀ HỘI CHỨNG LOẠN KHUẨN KHI SỬ DỤNG THUỐC KHÁNG SINH

1.3.1. Hiện tượng và bản chất kháng thuốc của vi sinh vật

Hiệu quả điều trị của thuốc kháng sinh (hay của các chất hóa trị liệu nói chung) phụ thuộc rất lớn vào sự nhạy cảm của vi sinh vật gây bệnh với chất kháng sinh đó. Khi điều trị kháng sinh, mầm bệnh bao giờ cũng có những “đáp ứng phản hồi lại” sự có mặt của chất kháng sinh trong môi trường và kết quả là chúng sẽ bị tiêu diệt hay có thể sống sót trong điều kiện này. Hiện tượng mầm bệnh vẫn còn sống sót sau khi đã điều trị kháng sinh được gọi là hiện tượng kháng thuốc (trên phương diện kiểm nghiệm, vi sinh vật gây bệnh được coi là kháng thuốc nếu nồng độ MIC của chất kháng sinh kiểm nghiệm in vitro trên đối tượng này cao hơn nồng độ điều trị tối đa cho phép đối với bệnh nhân). Từ thực tiễn điều trị cho thấy, lịch sử vấn đề kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh gần như đồng hành với lịch sử ứng dụng chất kháng sinh và vấn đề này có xu hướng xuất hiện ngày càng thường xuyên, với mức độ ngày càng trầm trọng hơn.

Khả năng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh có thể được hình thành ngẫu nhiên trong quần thể, nghĩa là khả năng này đã được hình thành ở mầm bệnh ngay khi chúng chưa tiếp xúc với môi trường chứa chất kháng sinh. Dạng kháng thuốc này được gọi là khả năng đề kháng sinh học. Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do đột biến ngẫu nhiên trong nhiễm sắc thể làm trong quần thể vi sinh vật gây bệnh xuất hiện các tế bào (hay thậm chí chỉ cần một vài tế bào) có khả năng kháng thuốc. Do đó, khi bệnh nhân được điều trị kháng sinh trong thời gian nhất định thì chỉ có các tế bào thường bị tiêu diệt, còn các tế bào kháng thuốc này vẫn sống sót, tiếp tục sinh trưởng, phát triển dần bù đắp cho cả số tế bào đã bị tiêu diệt, kết quả làm thay đổi hoàn toàn bản chất vi sinh của bệnh và vô hiệu hóa tác dụng điều trị của thuốc kháng sinh đó. Khả năng này cho phép lý giải hiện tượng kháng thuốc vẫn có thể xảy ra ngay cả với các chất kháng sinh mới đưa vào sử dụng điều

trị. Hiện tượng trên đòi hỏi ngay các chất kháng sinh mới cũng phải được tiến hành kiểm nghiệm toàn diện, kỹ lưỡng và xem xét cân nhắc, đánh giá toàn diện hiệu quả điều trị của chúng trước khi đưa sản phẩm vào lưu hành.

Tuy nhiên, khả năng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh thường xuất hiện phổ biến hơn nhiều sau khi chúng đã tiếp xúc với kháng sinh, vì vậy trường hợp này còn được gọi là khả năng đề kháng điều trị. Nguyên nhân của hiện tượng này là do trong tế bào vi sinh vật có chứa các yếu tố kháng thuốc R tiềm ẩn (*Resistance Factor*). Yếu tố kháng thuốc R có bản chất plasmid. Khi vi sinh vật sống trong môi trường có kháng sinh, các plasmid kháng thuốc của chúng sẽ được hoạt hoá, tự sao chép tổng hợp ra vô số plasmid mới. Chính hoạt tính của các plasmid này sẽ làm tăng sức đề kháng cho tế bào chủ, nhờ vậy chúng vẫn có thể tồn tại và phát triển trong môi trường có kháng sinh. Do có bản chất plasmid nên các yếu tố kháng thuốc R này rất dễ dàng vận chuyển qua lại giữa các loài gần gũi nhau qua biến nạp, tải nạp hay tiếp hợp.

Như vậy, việc sử dụng cùng loại kháng sinh kéo dài hoặc lạm dụng thuốc kháng sinh (tùy tiện sử dụng thuốc không đúng liều lượng, không đúng chỉ định và không đủ thời gian cần thiết) đã vô tình tạo ra ưu thế phát triển cạnh tranh cho các chủng vi sinh vật có khả năng kháng thuốc, đồng thời trở thành liệu pháp kích thích các chủng kháng thuốc này tổng hợp ra vô số plasmid mới. Chính cả hai hiệu ứng trên lại trở thành động lực làm tăng tần suất chuyển vận các plasmid kháng thuốc này sang các loài lân cận khác trong hệ sinh thái, với tần suất chuyển lớn hơn rất nhiều lần trong tự nhiên và bao gồm cả việc chuyển plasmid này sang các loài vi sinh vật gây bệnh. Hậu quả các hiệu ứng này làm tăng thêm nguy cơ mất hiệu lực điều trị của thuốc kháng sinh, mặc dù ngay trước đó kháng sinh này vẫn được sử dụng để điều trị rất hiệu quả (xuất hiện khả năng đề kháng điều trị).

Một thực tế đáng quan ngại khác là xu thế sử dụng tùy tiện chất kháng sinh trong chăn nuôi, đặc biệt là bổ sung vào khi chế biến thức ăn gia súc, gia cầm nuôi lấy thịt, trứng, sữa... Khi đó, ngoài các tác dụng có lợi dự kiến,

chính chất kháng sinh bổ sung sẽ tạo ra môi trường phát triển chọn lọc cho các chủng mang yếu tố kháng thuốc R trên động vật nuôi. Khi sử dụng thịt, trứng, sữa... của chúng làm nguyên liệu chế biến, các chủng kháng thuốc này sẽ kéo theo vào trong các sản phẩm thực phẩm. Kết quả khi người tiêu dùng sử dụng các thực phẩm này, một mặt họ phải tiếp nhận phần dư lượng kháng sinh trong sản phẩm; nhưng mặt khác, nguy hiểm hơn là các loài vi sinh vật kháng thuốc trong các sản phẩm thực phẩm thuộc nhóm này có ưu thế tồn tại, phát triển cao hơn và các plasmid kháng thuốc của chúng lại đang ở trong trạng thái hoạt hoá. Các loài vi sinh vật kháng thuốc này, sau khi xâm nhập được vào cơ thể, chúng có thể truyền khả năng kháng thuốc cho các vi sinh vật gây bệnh, với tần suất cao hơn rất nhiều so với ngoài tự nhiên, tương tự như trường hợp nêu trên. Bên cạnh đó, một số chủng kháng thuốc này có thể cũng là chủng gây bệnh trực tiếp cho người, điển hình là các chủng gây bệnh thuộc giống *Salmonella* và *Listeria*.

Cơ chế của sự kháng thuốc rất đa dạng và thường khác nhau với từng chủng vi sinh vật. Một số loài vi sinh vật có khả năng kháng thuốc tự nhiên với một số kháng sinh nhất định, do thuốc này không tác động lên chúng (thí dụ như nấm, virus, nguyên sinh động vật, do trên thành tế bào không có lớp peptidoglucan nên không chịu tác động của các kháng sinh nhóm β -lactam). Còn nhìn chung, các chủng vốn nhạy cảm với chất kháng sinh lại trở nên kháng thuốc thường xảy ra khi chúng thu nhận được một trong các đặc tính mới như: có khả năng làm vô hoạt hay phá hủy chất kháng sinh (bằng cách tổng hợp ra các enzym ngoại bào làm phá vỡ cấu trúc của chất kháng sinh hay liên kết với chất kháng sinh để tạo ra dạng kém hiệu lực kháng sinh hơn), có thể tự điều chỉnh khả năng hấp thu của màng tế bào chất làm giảm hoặc ngăn ngừa chất kháng sinh xâm nhập vào trong tế bào chất, có khả năng làm biến đổi cấu trúc phân tử của nơi hoặc vị trí mà chất kháng sinh tác dụng vào, hay chúng có thể tự điều chỉnh thay đổi đường hướng trao đổi chất để vô hiệu hóa tác dụng của chất kháng sinh đó...

Bên cạnh hai hiện tượng kháng thuốc nêu trên, trong thực tiễn còn tồn tại hiện tượng kháng chéo (hay kháng nhóm), nghĩa là một chủng khi đã kháng

lại chất kháng sinh nhất định thì chúng cũng có khả năng kháng luôn một số chất kháng sinh khác cùng nhóm cấu trúc hay có các đặc tính tương đồng với chất kháng sinh ấy, thí dụ như một số chủng vi sinh vật gây bệnh đã kháng được penicillin thì cũng có trường hợp kháng luôn nhiều kháng sinh β -lactam khác.

Để khắc phục hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh, giải pháp trực quan và đơn giản là sử dụng các dạng kháng sinh mới. Tuy nhiên, việc tìm kiếm, phát hiện và sản xuất ra một kháng sinh mới là cả một khối lượng công việc khổng lồ, tiêu tốn rất nhiều thời gian, nhân lực và tiền bạc. Đồng thời, để sự kháng thuốc xảy ra cũng đồng nghĩa với việc phải trả giá bằng sức khoẻ và tính mạng của bệnh nhân. Chính vì vậy mọi nỗ lực nhằm hạn chế xuất hiện khả năng kháng thuốc càng trở nên cần thiết và hiệu quả; trong đó, trước hết cần triệt để tôn trọng ba nguyên tắc sử dụng thuốc kháng sinh là:

- Chỉ định điều trị kháng sinh đúng (làm kháng sinh đồ để chọn đúng kháng sinh thích hợp để chỉ định điều trị; dùng thuốc đúng liều, đúng phác đồ, đủ thời gian điều trị; chú ý phát hiện sớm dấu hiệu kháng thuốc);
- Không lạm dụng kháng sinh khi chưa cần thiết (không lạm dụng "điều trị phòng ngừa" bằng thuốc kháng sinh, nghiêm cấm bệnh nhân tự chỉ định điều trị thuốc kháng sinh thay bác sĩ);
- Nghiêm cấm sử dụng tràn lan chất kháng sinh trong chăn nuôi và giám sát chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong thú y.

1.3.2. Hội chứng loạn khuẩn trong điều trị

Qua lịch sử trên nửa thế kỷ ứng dụng chất kháng sinh đã cho thấy, bên cạnh hiệu quả điều trị to lớn, việc sử dụng thuốc kháng sinh không những làm xuất hiện nguy cơ kháng thuốc, mà còn có thể gây ra sự biến đổi bất lợi không mong muốn về bản chất hệ vi sinh vật trong cơ thể bệnh nhân. Ngày nay y học đã khẳng định trong mỗi cơ thể người khoẻ mạnh đều tồn tại hệ

sinh thái các vi sinh vật lành tính, thực hiện các chức năng có ích cho cơ thể chủ, và sức khỏe của con người gắn liền với việc duy trì sự phát triển cân bằng và cân đối của hệ vi sinh vật có lợi đó. Điển hình cho nhóm các vi sinh vật này là hệ vi sinh vật lành tính có lợi khu trú trong đại tràng. Khi bệnh nhân sử dụng thuốc kháng sinh, đặc biệt trong trường hợp sử dụng thuốc kháng sinh kéo dài, song song với hiệu quả tiêu diệt mầm bệnh, cũng đồng thời có thể tiêu diệt cả các loài vi sinh vật khác, trong đó bao gồm cả các loài vi sinh vật lành tính đã nêu trên. Hiện tượng này cũng tăng theo phổ kháng khuẩn của chất kháng sinh, nghĩa là nguy cơ xuất hiện càng cao khi sử dụng kháng sinh phổ càng rộng. Kết quả là sau khi kết thúc phác đồ điều trị kháng sinh, ngoài để lại nguy cơ kháng thuốc, còn ngẫu nhiên tạo ra điều kiện phát triển thuận lợi hơn cho các chủng vi sinh vật mới xâm nhập (do không phải phát triển trong môi trường cạnh tranh vì hệ vi sinh vật có ích đã bị tiêu diệt) dẫn tới làm thay đổi hoàn toàn bản chất hệ vi sinh vật trong cơ thể theo chiều hướng có hại cho sức khỏe. Hội chứng bệnh lý do hiện tượng trên gây ra được gọi chung là bệnh loạn khuẩn. Liệu pháp điều trị hiệu quả nhất cho trường hợp này là nhanh chóng khôi phục lại hệ sinh thái vi sinh vật lành tính có ích cho cơ thể, song đây lại là vấn đề rất nan giải và khó khăn, hơn nữa lúc này cũng là thời điểm năng lực tự vệ của bệnh nhân đã bị suy giảm, do sức khỏe của họ chưa kịp bình phục.

Trên quan điểm ứng dụng, các chất kháng sinh phổ rộng có ưu thế chỉ định điều trị cao hơn trong trường hợp trường hợp công tác chẩn đoán xác định mầm bệnh khó khăn hay khi cần điều trị phòng ngừa; song phổ kháng khuẩn càng rộng thì nguy cơ rủi ro sẽ càng cao, trên cả hai vấn đề làm tăng nguy cơ kháng thuốc và nguy cơ loạn khuẩn. Chắc chắn trong tương lai người ta vẫn nỗ lực để khai thác hiệu quả hơn ưu thế của mỗi nhóm kháng sinh. Cùng với việc hoàn thiện các trang thiết bị phục vụ chẩn đoán lâm sàng và cận lâm sàng, kết hợp với nâng cao không ngừng năng lực chẩn đoán xác định của thầy thuốc điều trị sẽ cho phép sử dụng các kháng sinh phổ hẹp ngày một rộng rãi hơn; nghĩa là, trên phương diện của người sản xuất, cần nhận thức, đánh giá đúng mức và chuẩn bị trước cho xu hướng tăng dần tỉ trọng kháng sinh phổ hẹp được sản xuất ra trong tương lai.

1.4. ĐIỀU CHỈNH SINH TỔNG HỢP CHẤT KHÁNG SINH

Cũng như với tất cả các quá trình lên men khác, việc điều chỉnh sinh tổng hợp chất kháng sinh trên nguyên tắc có thể được thực hiện qua hàng loạt cơ chế khác nhau, thí dụ, cơ chế cảm ứng, cơ chế kiểm soát, cơ chế ức chế ngược... Trong thực tiễn, đây là một bài toán khó khăn chỉ có thể được giải quyết thông qua việc phối hợp hàng loạt giải pháp khoa học và công nghệ, trong đó có thể phân chia thành hai nhóm lớn là:

- Tuyển chọn và tạo ra các chủng công nghiệp siêu tổng hợp chất kháng sinh; và
- Tối ưu hóa thành phần môi trường, thiết bị lên men và điều kiện vận hành quá trình lên men.

1.4.1. Tuyển chọn và tạo ra các chủng công nghiệp siêu tổng hợp chất kháng sinh

Việc nghiên cứu tìm kiếm thu thập các chủng có năng lực sinh tổng hợp kháng sinh cao đã được triển khai mang lại hiệu quả kinh tế ngay từ những năm 40 của thế kỷ XX và ngày càng được hoàn thiện ở trình độ công nghệ cao hơn. Trong thực tế, các chủng công nghiệp “siêu tổng hợp chất kháng sinh” đã thu được cho đến nay là thành quả của sự phối kết hợp đồng bộ hàng loạt giải pháp kỹ thuật tuyển chọn giống và tạo chủng tiên tiến, đặc biệt có sự đóng góp của các kỹ thuật gây đột biến, kỹ thuật dung hợp tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp và các giải pháp kỹ thuật gen khác. Nhìn chung, quá trình tuyển chọn tạo chủng công nghiệp siêu tổng hợp kháng sinh cũng thường trải qua sáu giai đoạn cơ bản là: phân lập từ thiên nhiên, nghiên cứu xử lý tạo các biến chủng “siêu tổng hợp” có hoạt lực cao, tuyển chọn sơ bộ, tuyển chọn lại thu các chủng có hoạt tính cao quy mô phòng thí nghiệm, thử nghiệm và tuyển chọn lại trên quy mô sản xuất thử nghiệm pilot, thử nghiệm và chọn lọc lại các chủng phù hợp với điều kiện lên men sản xuất lớn công nghiệp. Trong các giai đoạn trên, bước tuyển chọn lại quy mô phòng thí nghiệm là công đoạn tuyển chọn toàn diện và kỹ lưỡng nhất; nó bao gồm cả việc nghiên

cấu đặc tính sinh lý, sinh hoá, động học phát triển của chủng, động học quá trình tạo sản phẩm, xác định nguồn cơ chất và điều kiện lên men tối ưu và nghiên cứu các điều kiện công nghệ thích ứng để xử lý dịch lên men thu sản phẩm... Còn giai đoạn tuyển chọn lại trên quy mô sản xuất thử và quy mô sản xuất công nghiệp được định hướng vào hiệu quả kinh tế nhằm loại bỏ các chủng chưa hội đủ các điều kiện phù hợp với sản xuất lớn, tương ứng với cơ sở trang thiết bị hiện tại, nguồn nguyên liệu sẵn có, trình độ công nghệ và năng lực vận hành của lực lượng sản xuất... một cách hiệu quả.

Mục tiêu của quá trình tuyển chọn tạo biến chủng công nghiệp không chỉ dừng lại ở năng lực siêu tổng hợp kháng sinh của chủng, mà còn định hướng đồng thời vào các mục tiêu khác như: tạo ra các biến chủng tích tụ ít các sản phẩm không mong muốn, các biến chủng tổng hợp ra các sản phẩm hoàn toàn mới (nhất là các sản phẩm có cấu trúc và đặc tính mong muốn theo “thiết kế” của con người), các biến chủng rất nhạy cảm với chất kháng sinh hay các chủng có sức đề kháng cao với những chất kháng sinh nào đó... Việc tuyển chọn và tạo chủng công nghiệp là công việc lâu dài và tiêu tốn rất nhiều nhân lực, đòi hỏi phải được tiến hành nghiêm túc, liên tục và thường xuyên. Các biến chủng siêu tổng hợp thu được sau đó được bảo quản hết sức cẩn thận với nhiều biện pháp bảo quản khác nhau; trong quá trình sản xuất phải định kỳ kiểm tra lại hoạt tính của chủng.

1.4.2. Tối ưu hóa thành phần môi trường, thiết bị lên men và điều kiện vận hành quá trình lên men

Thành phần môi trường và điều kiện tiến hành lên men chất kháng sinh nhìn chung thường không được công bố công khai, mà được bảo hộ chặt chẽ dưới dạng các sáng chế độc quyền hay được lưu giữ trong từng cơ sở sản xuất công nghiệp và được xem như những bí mật thương mại. Thực tế này cho thấy, việc tối ưu hóa thành phần môi trường lên men có vai trò rất quan trọng, quyết định năng lực và hiệu quả chung của toàn quá trình. Sự đa dạng của các chủng được sử dụng cùng với nhu cầu đa dạng tương ứng về nguồn dinh dưỡng làm cho thành phần môi trường và nồng độ cần thiết của các cấu

tử trong các môi trường sẽ khác nhau. Với bất kỳ dự án nghiên cứu triển khai nào trong công nghệ lên men kháng sinh (và công nghệ lên men hiện đại nói chung), việc xác định nguồn nguyên liệu chính, thành phần môi trường lên men và nồng độ tương ứng của từng cấu tử trong từng thời điểm cụ thể của quá trình đều được xác định qua con đường thực nghiệm, trên cơ sở kiểm tra trên hàng loạt cơ chất dự kiến chính, các tiền chất, các chất dinh dưỡng khác, các chất phụ gia kỹ thuật... Nhìn chung, nguồn thức ăn cacbon thường được lựa chọn là: các loại bột và hạt ngũ cốc, cám mỳ, cám gạo, vỏ khoai tây, rỉ đường, các loại đường (glucoza, fructoza, maltoza, lactoza...), dextrin, glycerin, axit axetic, manit, các loại rượu, dịch thủy phân gỗ, nước thải hồ sulfit... Nguồn thức ăn nitơ có thể là: bột đậu tương, nước chiết ngô, cao nấm men, nước chiết nấm men, pepton, các muối NO_3^- , NH_4^+ ...; các nguyên tố khoáng đa lượng thường gặp như: photpho, lưu huỳnh, ma nhê, sắt, canxi, kali, natri; các nguyên tố vi lượng như: đồng, kẽm, coban, molipden; và các chất sinh trưởng...

Việc thay đổi thành phần môi trường, nồng độ các cấu tử và sự biến thiên nồng độ của chúng trong suốt quá trình có quan hệ chặt chẽ với hoạt động trao đổi chất của vi sinh vật, nghĩa là có quan hệ chặt chẽ với phổ các sản phẩm tạo thành của quá trình (ảnh hưởng này xuất hiện cả với các cấu tử đa lượng cũng như các cấu tử vi lượng, các ion khoáng, vitamin, chất điều hòa sinh trưởng...). Đặc biệt trong công nghệ lên men chất kháng sinh, mỗi cơ chất nhất định có thể tác động lên quá trình lên men theo những chiều hướng khác nhau (cảm ứng, kiểm tỏa hoặc hỗn hợp...) và tác động này biến đổi phụ thuộc vào mỗi chủng vi sinh vật trong bối cảnh tương tác chung với các yếu tố khác của quá trình, xảy ra vào thời điểm đó. Thí dụ, trong công nghệ lên men penicillin, glucoza dư sẽ cảm ứng tốt cho sự phát triển hệ sợi nấm mốc, song lại kiểm tỏa mạnh mẽ sinh tổng hợp penicillin; với nhiều quá trình lên men chất kháng sinh khác, nguồn thức ăn NH_4^+ thường được ưu tiên đồng hóa nhanh nhưng hiệu quả tích tụ sản phẩm lại cao hơn khi sử dụng bột đậu tương hay prolin hoặc, mặc dù cường độ trao đổi chất gắn liền với tốc độ tổng hợp các hợp chất cao năng ATP, song tốc độ tích tụ nhiều chất kháng sinh chỉ bắt đầu xảy ra rõ rệt khi nguồn thức ăn phosphat đã giảm xuống dưới khoảng nhất định hay có dấu hiệu cạn kiệt...

Xét trên một góc độ khác, quá trình sinh tổng hợp các chất kháng sinh cũng là một quá trình chuyển hóa sinh học qua hàng loạt phản ứng với sự xúc tác của nhiều enzym khác nhau. Do đó người ta cũng có thể điều chỉnh cường độ quá trình thông qua việc tác động trực tiếp lên một giai đoạn hay một mắt xích trong quá trình chuyển hóa đó, thí dụ, sử dụng các tác nhân để cảm ứng sinh tổng hợp một số enzym nhất định, tác nhân để kiểm tỏa hoạt động của một số enzym khác, sử dụng các cơ chất cạnh tranh để thay đổi đường hướng chuyển hóa hay tạo ra điều kiện nhằm duy trì ổn định nồng độ một vài cấu tử trung gian..., qua đó cũng có thể làm tăng tốc độ tích tụ sản phẩm hay định hướng tổng hợp ra những kháng sinh khác nhau. Xuất phát từ cơ sở lý luận trên, trong công nghệ sản xuất chất kháng sinh đã ra đời kỹ thuật lên men hai pha và kỹ thuật lên men định hướng. Với các công nghệ lên men này, việc sử dụng các cấu tử trên (các tiền chất, chất cảm ứng, chất kim hãm, chất định hướng... và cả chất phá bọt) đúng liều lượng và đúng thời điểm sẽ có ý nghĩa rất quan trọng, tác động trực tiếp đến chất lượng và hiệu quả chung của cả quá trình lên men. Đương nhiên, việc điều chỉnh năng lực tổng hợp chất kháng sinh qua thành phần môi trường lên men hay tác động trực tiếp vào một mắt xích chuyển hóa của quá trình trước hết nhằm tạo ra nhiều sản phẩm với hiệu suất chuyển hóa cao, nhưng đồng thời phải đảm bảo được yêu cầu sống còn đối với sản xuất là: khả thi trong điều kiện sản xuất thực tiễn và đáp ứng được các chỉ tiêu về hiệu quả kinh tế, góp phần hạ giá thành sản phẩm.

Đồng thời với các giải pháp trên, trong quá trình lên men người ta bao giờ cũng cố gắng khai thác hiệu quả tác động của các yếu tố khác trong môi trường như: nhiệt độ lên men tối ưu, pH, nồng độ oxy, thế oxy hoá-khử, cường độ sục khí, cường độ khuấy trộn dịch lên men..., nghĩa là hiệu quả sinh tổng hợp sản phẩm thu được bao giờ cũng là kết quả của sự phối hợp tác dụng của tất cả các yếu tố, các điều kiện trang thiết bị và công nghệ cấu thành nên công nghệ lên men sản phẩm đó.

2 CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH PENICILLIN

2.1. ĐIỂM LỊCH SỬ PHÁT HIỆN VÀ SẢN XUẤT PENICILLIN

Chất kháng sinh penicillin được phát hiện tình cờ vào năm 1928: trong khi làm vệ sinh phòng thí nghiệm của mình, Alexander Fleming đã chú ý đến một hộp petri nuôi *Staphylococcus* bị nhiễm nấm mốc *Penicillium notatum* có xuất hiện hiện tượng vòng vi khuẩn bị tan xung quanh khuẩn lạc nấm. Khi ông cấy nấm mốc trên thử nghiệm lại trên một số loài vi khuẩn gây bệnh khác thì vẫn thấy hiện tượng tương tự xảy ra. Từ đó ông kết luận là nấm mốc đã tiết ra môi trường một chất nhất định làm tan vi khuẩn và ông đã sử dụng ngay tên giống nấm *Penicillin* để đặt tên cho chất kháng sinh này (1929). Công trình khoa học của Fleming ngay lập tức thu hút được sự quan tâm chú ý của nhiều nhà khoa học trên thế giới. Gần như đồng thời, nhiều phòng thí nghiệm ở các nước đều triển khai nghiên cứu thu nhận penicillin và chỉ sau khoảng thời gian ngắn các nhà khoa học Mỹ đã triển khai lên men thành công penicillin theo phương pháp lên men bề mặt (1931). Tuy nhiên, cũng trong khoảng thời gian đó mọi nỗ lực nhằm tách và tinh chế penicillin từ dịch lên men đều thất bại do không bảo vệ được hoạt tính kháng sinh của chế phẩm tinh chế và, do đó vấn đề penicillin tạm thời bị lãng quên.

Năm 1938 ở Oxford, khi tìm lại các tài liệu khoa học đã công bố, Ernst Boris Chain lại để tâm đến phát minh của Fleming và ông đã đề nghị Howara Walter Florey cho tiếp tục triển khai nghiên cứu này. Chỉ sau hai năm phòng thí nghiệm của ông đã tinh chế được một lượng lớn penicillin, đủ để thử nghiệm trên các loạt động vật thí nghiệm và kết quả điều trị thử nghiệm đã

thành công mỹ mãn: ngày 25/05/1940 penicillin đã được thử nghiệm rất thành công trên chuột. Một thời gian ngắn sau đó, trong nỗ lực cuối cùng nhằm cứu sống các thương binh bị nhiễm khuẩn rất nặng đang ở trong tình trạng không còn cơ may sống sót, lần đầu tiên kể từ khi phát hiện, penicillin đã được chỉ định điều trị cho người và cũng thật bất ngờ, kết quả điều trị này đã thành công vượt khỏi sự trông đợi: chỉ duy nhất một thương binh bị tử vong do lượng thuốc tại chỗ không còn đủ liều yêu cầu để điều trị cho thương binh đó (1941).



Sir Alexander
Fleming
1881 - 1955, Vương quốc Anh



Ernst Boris Chain
1906 - 1979, Vương quốc Anh



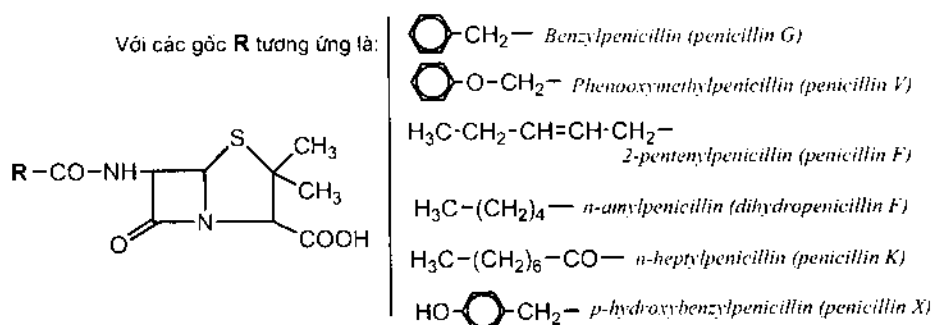
Sir Howard
Walter Florey
1898 - 1968, Úc

Các tác giả giải thưởng Nobel y học năm 1945 về công trình penicillin

Nhóm nghiên cứu của Chain đã báo cáo lên chính phủ Hoàng gia Anh, nhưng do chính phủ đang tập trung mọi nỗ lực cho chiến tranh nên đã không tài trợ cho dự án. Vì vậy, đề xuất trên được chuyển sang triển khai tiếp ở Peoria (Illinois, Mỹ). Nhận thức được ý nghĩa to lớn của nghiên cứu này, chính quyền bang Illinois và cả chính quyền liên bang đã xếp chương trình penicillin vào loại đặc biệt ưu tiên và chính phủ trực tiếp đứng ra tổ chức triển khai: Nhà nước đã kêu gọi nỗ lực của mọi cơ quan và trực tiếp cung cấp cho các cơ sở nghiên cứu, các công ty công nghiệp từ chủng giống vi sinh vật đến cả trợ giúp tài chính và hỗ trợ kỹ thuật cần thiết. Nhờ vậy, chỉ sau một

thời gian ngắn người ta đã triển khai thành công công nghệ lên men chìm sản xuất penicillin (1942); đã tuyển chọn được chủng công nghiệp *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 (1943) và sau đó đã tạo được biến chủng *P. chrysogenum* Wis Q-176 (chủng này được xem là chủng gốc của hầu hết các chủng công nghiệp đang sử dụng hiện nay trên toàn thế giới); đã thành công trong việc điều chỉnh đường hướng quá trình lên men để lên men sản xuất penicillin G (bằng sử dụng tiền chất phenylacetic, 1944)...

Để đáp ứng nhu cầu điều trị, ngay trong thời gian chiến tranh, rất nhiều hãng công nghiệp đã triển khai sản xuất penicillin, thí dụ như *Pfizer*, *Merck*, *Squibb*, *Eli Lilly*, *Abbott*, *Upjohn*, *Lederle*, *Hoffman-La-Roche* (Mỹ), *Glaxo*, *International Chemicals Industries* (Anh)... Hãng *Gist-Brocades* (Hà Lan) trước chiến tranh thế giới thứ II chủ yếu sản xuất các loại rượu. Ngay trong thời gian chiến tranh, khi được tin ở Anh đã sản xuất được penicillin, công ty này đã nỗ lực sưu tầm các chủng nấm mốc; khi chiến tranh kết thúc họ triển khai ngay chương trình nghiên cứu kháng sinh và đến năm 1948 đã sản xuất được penicillin, rồi dần vươn lên trở thành hãng sản xuất penicillin lớn nhất thế giới vào những thập kỷ cuối thế kỷ XX.



Hình 2.1. Sản phẩm penicillin lên men tự nhiên nhờ *P. chrysogenum*

Penicillin được xem là loại kháng sinh phổ rộng, được ứng dụng rộng rãi trong điều trị và được sản xuất ra với lượng lớn nhất trong số các chất kháng

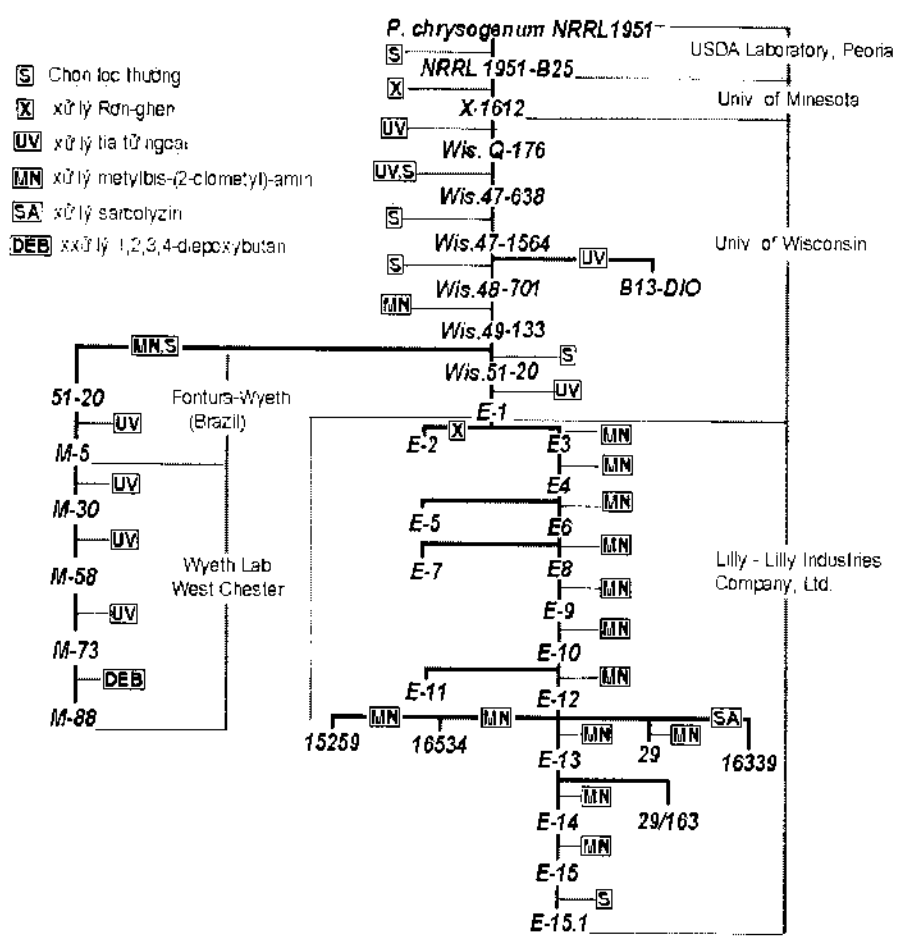
sinh đã biết hiện nay. Chúng tác dụng lên hầu hết các vi khuẩn Gram dương và thường được chỉ định điều trị trong các trường hợp viêm nhiễm do liên cầu khuẩn, tụ cầu khuẩn, thí dụ như viêm màng não, viêm tai-mũi-họng, viêm phế quản, viêm phổi, lậu cầu, nhiễm trùng máu... Thời gian đầu penicillin được ứng dụng điều trị rất hiệu quả. Tuy nhiên, chỉ vài năm sau đã xuất hiện các trường hợp kháng thuốc và hiện tượng này ngày càng phổ biến hơn. Trên con đường nhằm vô hiệu hóa khả năng kháng thuốc của vi khuẩn và mở rộng thêm tính năng ứng dụng điều trị của penicillin, năm 1959 Batchelor và đồng nghiệp đã tách ra được axit 6-aminopenicillanic. Về sau, axit này được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất ra hàng loạt chế phẩm penicillin bán tổng hợp khác nhau. Nguyên lý sản xuất chế phẩm bán tổng hợp trên đã mở ra con đường mới rất hiệu quả và kinh tế để đấu tranh chống lại sự kháng thuốc. Ngày nay, trên thế giới đã sản xuất được trên 500 chế phẩm penicillin (trong đó chỉ lên men trực tiếp hai sản phẩm là penicillin V và penicillin G) và xu thế nghiên cứu sản xuất các chế phẩm penicillin bán tổng hợp mới vẫn được triển khai tiếp tục.

2.2. CƠ SỞ CÔNG NGHỆ SINH TỔNG HỢP PENICILLIN NHỜ NẤM MỐC

2.2.1. Lịch sử tuyển chọn chủng công nghiệp *P. chrysogenum*

Vào những năm đầu, việc nghiên cứu sản xuất penicillin thường sử dụng các chủng có hoạt lực cao thuộc loài *P. notatum* và *P. bacillatum*. Nhưng từ khi trường đại học Wisconsin (Mỹ) phân lập được chủng *P. chrysogenum* có hoạt tính cao hơn thì chủng này dần dần đã thay thế và từ khoảng sau những năm 50 của thế kỷ XX đến nay tất cả các công ty sản xuất penicillin trên thế giới đều sử dụng các biến chủng *P. chrysogenum* công nghiệp. Việc tuyển chọn và cải tạo chủng này thời kỳ đầu được tiến hành ở ba cơ sở là: *Carnegie Institute in Washington*, *University of Minnesota* và *University of Wisconsin*. Thời gian tiếp theo, hầu hết các cơ sở công nghiệp sản xuất chất kháng sinh đều cùng triển khai tuyển chọn nhằm phục vụ cho mục đích sản xuất riêng và từ khoảng những năm 70 đến nay có sự tham gia đồng thời của cả các cơ sở chuyên nghiên cứu tuyển chọn giống khác. Việc tuyển chọn chủng công

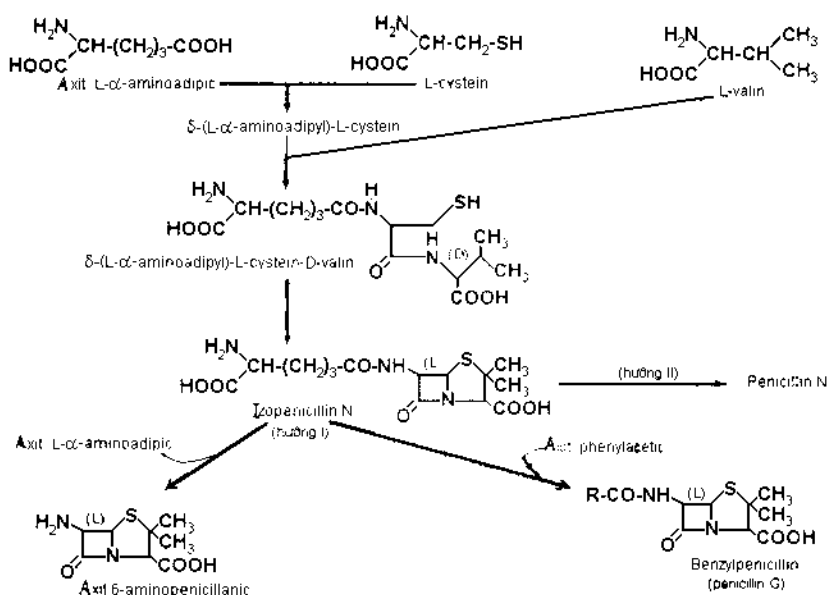
nghiệp để lên men sản xuất penicillin trên nguyên tắc cũng trải qua sáu giai đoạn cơ bản đã mô tả trong mục 1.3.1, trong đó giải pháp kỹ thuật đã được áp dụng hiệu quả để thu nhận biến chủng “siêu tổng hợp” penicillin lại chính là các kỹ thuật gây đột biến thường như: xử lý tia Rơn-ghen, xử lý tia cực tím và tạo đột biến bằng hóa chất, thí dụ như Metylbis-amin (metyl-2-β-clo-etylamin), N-mustar (tris-β-clo-etylamin), Sarcrolyzin, HNO₂, Dimetylsulfat, 1,2,3,4-diepoxybutan... Xuất xứ của một số chủng công nghiệp để lên men sản xuất penicillin được chỉ ra trong sơ đồ hình 2.2.



Hình 2.2. Xuất xứ của một số chủng *P. chrysogenum* công nghiệp

2.2.2. Cơ chế sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc *P. chrysogenum*

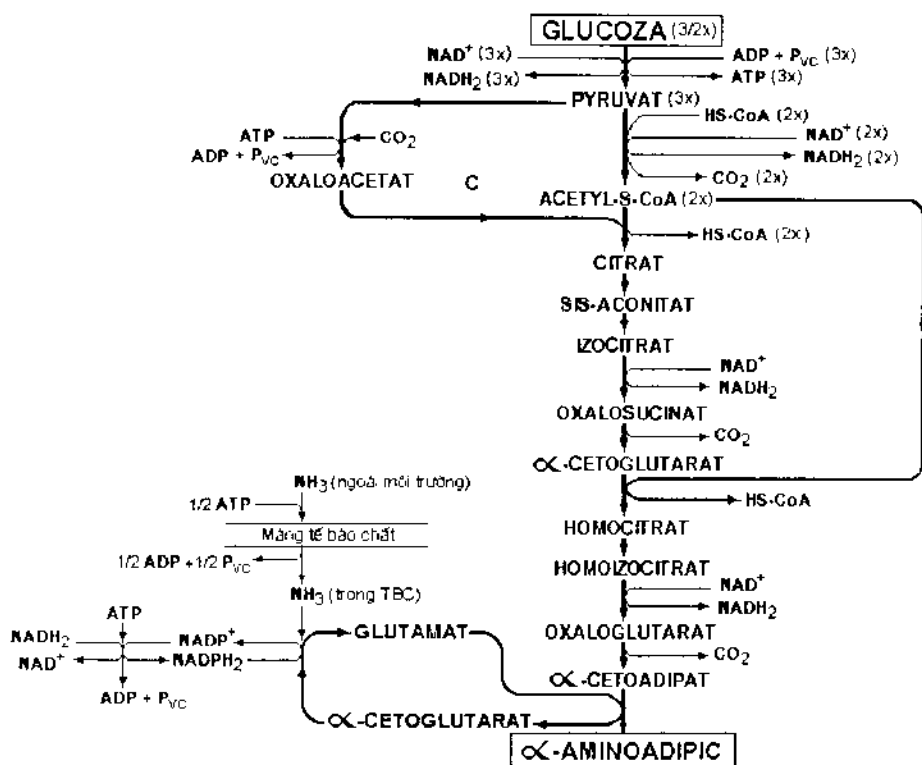
Theo quan điểm phổ biến hiện nay, quá trình sinh tổng hợp penicillin ở nấm mốc *P. chrysogenum* có thể tóm tắt như sau: từ ba tiền chất ban đầu là α -aminoadipic, cystein và valin sẽ ngưng tụ lại thành tripeptit δ -(α -aminoadipyl)-cysteinyl-valin; tiếp theo là quá trình khép mạch tạo vòng β -lactam và vòng thiazolidin để tạo thành izopenicillin-N; rồi trao đổi nhóm α -aminoadipyl với phenylacetic (hay phenooxyacetic) tạo thành sản phẩm penicillin G (hay penicillin V, xem sơ đồ tổng hợp penicillin G trong hình 2.3).



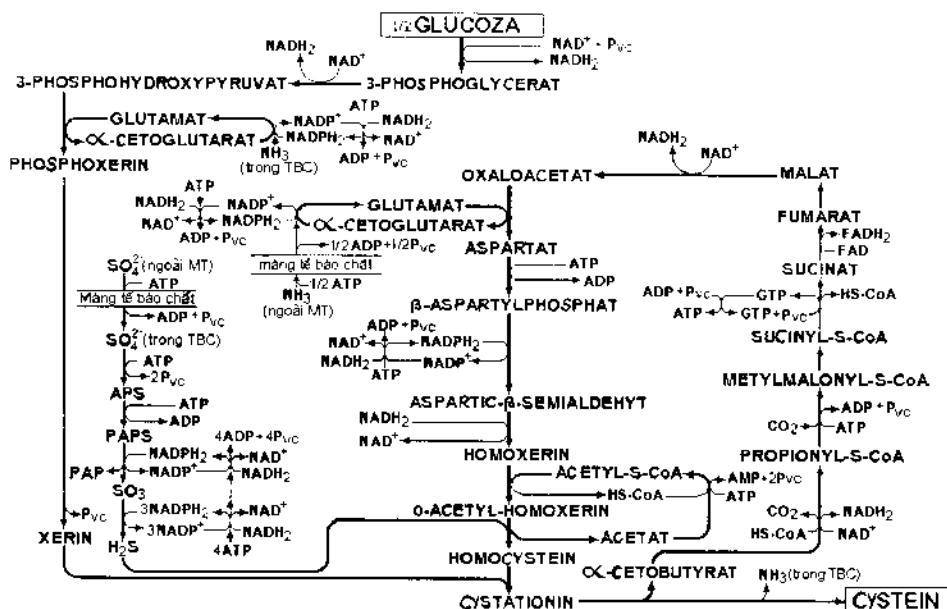
Hình 2.3. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp penicillin từ axit L- α -aminoadipic, L-cystein và L-valin

Tuy nhiên, có một số vấn đề liên quan đến cơ chế sinh tổng hợp nêu trên, sự tích tụ penicillin trong tế bào và quá trình đào thải chúng từ trong ra ngoài môi trường cho đến nay vẫn chưa hoàn toàn được sáng tỏ. Trong ba axit amin tiền chất trên thì cystein có thể được tổng hợp bằng một trong ba con đường là: được tổng hợp từ xerin (hình 2.6a), từ homoxerin với việc tuần hoàn chuyển hóa α -cetobutyrat qua oxaloacetat (hình 2.6b) hay từ homoxerin với sự chuyển hóa α -cetobutyrat qua izolơcin (hình 2.6c). Đồng thời, α -

α -aminoadipic được giải phóng ra trong sơ đồ (hình 2.4) có thể được tuần hoàn để tham gia vào quá trình ngưng tụ ban đầu, song cũng có thể được giải phóng ra và tích tụ lại trong môi trường (bằng chứng là khi lên men sản xuất penicillin V bao giờ cũng phát hiện thấy trong dịch lên men lượng lớn α -aminoadipic dạng vòng). Như vậy, quá trình sinh tổng hợp penicillin, phụ thuộc vào điều kiện lên men cụ thể nhất định, có thể xảy ra theo sáu đường hướng khác nhau. Do đó, hiệu suất chuyển hóa cơ chất-sản phẩm cũng biến đổi và phụ thuộc vào đường hướng sinh tổng hợp tương ứng. Theo lý thuyết thì hiệu suất lên men sẽ trong khoảng 683-1544 UI penicillin/g glucoza; song, trong thực tế, với những chủng có hoạt tính sinh tổng hợp cao nhất cũng mới chỉ đạt khoảng 200 UI/g glucoza.



Hình 2.4. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp α -aminoadipic

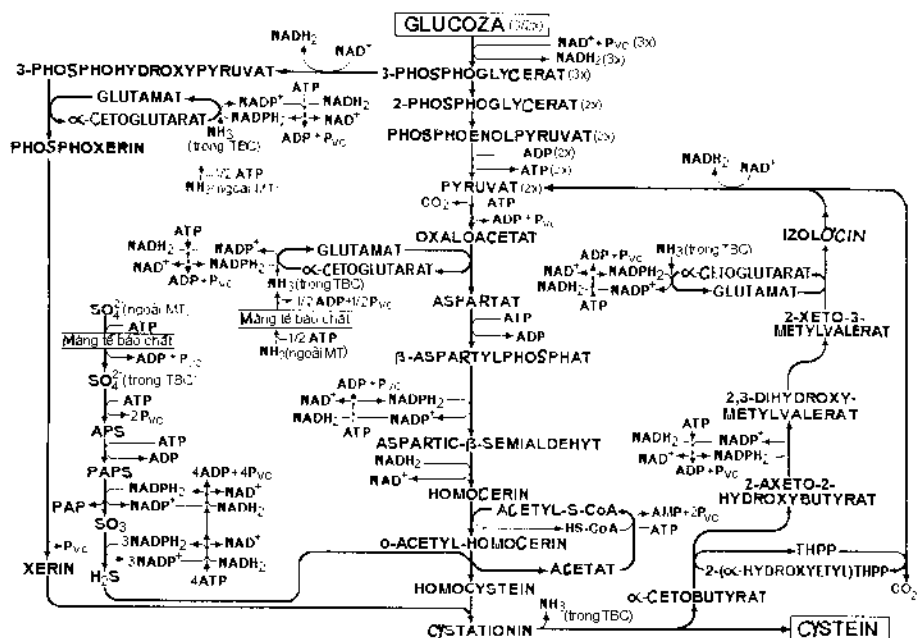


Hình 2.6b. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp cistein từ homoxerin với sự biến đổi α -cetobutyrat thành oxaloacetat

2.2.3. Phương pháp kiểm tra và định lượng penicillin

Để kiểm tra và định lượng penicillin có thể áp dụng nhiều phương pháp khác nhau, trong đó một số phương pháp thường được sử dụng là:

- Phương pháp kiểm định sinh học:** đây là phương pháp được áp dụng sớm nhất để định tính và định lượng penicillin. Cơ sở của phương pháp này là dựa vào khả năng ức chế sự phát triển lên các chủng vi sinh vật nhạy cảm với penicillin, thường sử dụng là các chủng vi khuẩn Gram dương. Để nhận biết định tính penicillin có thể sử dụng một trong các phương pháp là: cấy vuông góc trên mặt thạch, phương pháp đặt cột thạch đã cấy vi sinh vật kiểm tra hay phương pháp đặt giấy lọc đã thấm vi sinh vật kiểm tra lên trên hộp thạch nuôi vi sinh vật chỉ thị.



Hình 2.6c. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp cistein từ homoxerin với sự biến đổi α -cetobutyrate thành izolocin

Để định lượng, người ta thường áp dụng phương pháp đục lỗ trên thạch hay phương pháp khoan giấy lọc và xác định kết quả bằng sử dụng thang so sánh dung dịch penicillin chuẩn, theo vòng kìm hãm tương đương. Ưu điểm lớn của phương pháp này là thao tác đơn giản và cho hiệu quả tác dụng trực tiếp (hoạt tính kháng khuẩn biểu hiện ngay qua kích thước vòng kháng khuẩn). Tuy nhiên, phương pháp này tốn thời gian và sức lao động thủ công.

b. Phương pháp đo phổ hấp thụ: thường áp dụng bốn phương pháp sau:

- **Phương pháp iot:** hoạt động dựa trên cơ sở axit penicillanic, tạo thành khi thủy phân penicillin bằng dung dịch kiềm hay nhờ enzym penicillinhydrolaza, sẽ phản ứng với I₂. Lượng iot dư trong môi trường được xác định qua phổ hấp thụ cực đại của phức iot-linh bột, đo ở bước sóng 620nm. Phương pháp này dễ thực hiện, do nhu cầu về hóa chất và thiết bị đơn giản, song thường xuất hiện sai số vì nhiều cấu tử khác trong

môi trường cũng có khả năng phản ứng với I^- (hiện phương pháp này thường được áp dụng để hiện màu bản sắc ký giấy).

- **Phương pháp axit cloroplatinic** (có màu rượu vang đỏ): dựa trên cơ sở axit penicillanic có khả năng phản ứng với thuốc thử cloroplatinic tạo ra sản phẩm không màu. Tuy nhiên, thuốc thử cloroplatinic phản ứng đồng thời cả với các axit amin chứa lưu huỳnh. Vì vậy, phương pháp này thường chỉ được sử dụng để hiện màu vòng penicillin quanh khuẩn lạc khi phân lập và tuyển chọn sơ bộ.
 - **Phương pháp hydroxylamin**: dựa trên cơ sở hydroxylamin dễ dàng phản ứng với penicillin để tạo thành axit hydroxylamic; axit này sẽ tạo phức bền với ion sắt và có thể trích ly được phức này bằng butanol. Tuy nhiên, hydroxylamin cũng phản ứng cả với các hợp chất hữu cơ chứa nhóm chức $-COOH$ khác trong môi trường.
 - **Phương pháp thủy ngân-imidazol**: dựa trên cơ sở imidazol phản ứng với penicillin làm mở vòng β -lactam và vòng thiazolidin; sản phẩm tạo thành sau khi đã mở vòng sẽ phản ứng với Hg^{2+} tạo thành phức penicillanic-mercaptit thủy ngân, có phổ hấp phụ cực đại ở sóng 235-245nm.
- c. **Phương pháp sắc ký lỏng cao áp (HPLC)**: sử dụng cột trao đổi ion để tách mẫu và đo trực tiếp phổ hấp phụ tử ngoại của penicillin. Đây là phương pháp có độ chọn lọc cao, nhanh và chính xác nhất so với tất cả các phương pháp nêu trên. Bên cạnh đó, phương pháp này còn cho phép xác định đồng thời nhiều thành phần khác nhau có trong mẫu phân tích. Chính nhờ ưu điểm này, phương pháp HPLC được áp dụng để định lượng penicillin trong hầu hết các cơ sở công nghiệp.
- d. **Phương pháp enzym**: là phương pháp mới được hoàn thiện trong thời gian gần đây. Phương pháp này thường sử dụng màng enzym penicillinaza cố định kết hợp với thiết bị đo pH độ nhạy cao để đo sự biến đổi pH trước và sau màng khi xử lý, qua đó xác định hàm lượng penicillin trong mẫu.

2.2.4. Tác động của các thông số công nghệ đến quá trình sinh tổng hợp penicillin

2.2.4.1. Sự phát triển hệ sợi và đặc điểm hình thái hệ sợi nấm

Sự phát triển hệ sợi nấm trong quá trình lên men bao gồm cả sự tăng trưởng về kích thước hệ sợi (tăng độ dài sợi, sự lớn lên về kích thước, mức độ phân nhánh của hệ sợi...) và sự biến thiên về số lượng khóm sợi nấm trong môi trường. Thông thường, sự phát triển này được đánh giá qua hai chỉ tiêu là: hàm lượng sinh khối và tốc độ biến thiên hàm lượng sinh khối trong môi trường. Hai chỉ tiêu này có thể xác định bằng nhiều phương pháp khác nhau như: hàm lượng sinh khối (sinh khối tươi hoặc sinh khối khô), mật độ quang dịch lên men, trở lực lọc của dịch lên men, hàm lượng nitơ, hàm lượng hydratecarbon, hàm lượng axit nucleic... Trong các phương pháp trên, được áp dụng phổ biến hơn cả trong sản xuất công nghiệp là phương pháp xác định qua hàm lượng sinh khối. Người ta đã xác định được rằng tốc độ phát triển hệ sợi nấm phụ thuộc vào hàng loạt yếu tố khác nhau trong quá trình lên men và sự tích tụ penicillin thường chỉ xảy ra mạnh mẽ khi hệ sợi phát triển đạt trạng thái cân bằng. Trạng thái này có thể xác lập được nếu chỉ cung cấp đủ và liên tục cho nấm mốc lượng thức ăn tối thiểu (với cơ chất là glucoza mức tương ứng là $0,12 \pm 0,03 \text{ mmol glucoza/g sợi khô.giờ}$). Nếu thiếu thức ăn, hệ sợi nấm mốc sẽ tự phân; song nếu cung cấp quá nhu cầu trên, hệ sợi sẽ phát triển, nhưng lại không tích tụ mạnh penicillin mà tích tụ nhiều axit gluconic và axit malic).

Đặc điểm hình thái và cấu trúc hệ sợi nấm: trong quá trình lên men, do nhiều nguyên nhân khác nhau như: do tạo bào tử, do tự phân xảy ra trên hệ sợi, do sự phân hủy thành tế bào, do sự đứt gãy cơ học khi kích thước sợi quá dài..., số lượng khóm sợi nấm bao giờ cũng có xu hướng tăng lên, ngay cả trong quá trình lên men tĩnh. Trong điều kiện lên men có sự khuấy và khuấy trộn, do tác dụng va đập cơ học với cánh khuấy và các chuyển động dòng xoáy trong môi trường, một mặt sự đứt gãy hệ sợi nấm xảy ra nhiều hơn và hệ sợi nấm bao giờ cũng có xu hướng vón cuộn lại thành cấu trúc búi sợi cuộn xoắn, được gọi là các pellet. Trên phương diện cấu trúc pellet người ta thường phân chia chúng thành ba dạng là:

- *Pellet xốp (fluffy loose pellets)* là dạng pellet có phần bên trong hệ sợi cuộn thành khối chắc và mịn, lớp sợi phía bên ngoài cuộn lỏng lẻo tạo thành cấu trúc xốp hơn. Với cấu trúc pellet này, việc vận chuyển vật chất giữa môi trường bên ngoài vào cho phần hệ sợi bên trong cũng như sự đào thải các sản phẩm trao đổi chất từ lớp sợi giữa pellet ra ngoài môi trường xảy ra thuận lợi hơn.
- *Pellet chắc và mịn (compact smooth pellets)* có đặc điểm là phần sợi phía bên trong pellet cuộn tương đối chặt chẽ ra đến gần sát lớp sợi phía ngoài, lớp sợi phía ngoài cùng cũng cuộn đủ chắc thành lớp sợi mịn. Cấu trúc này cuộn đủ chắc và mịn nhưng vẫn không quá chặt chẽ để đảm bảo sao cho quá trình vận chuyển vật chất từ ngoài môi trường đến tất cả các phần hệ sợi của pellet và sự vận chuyển sản phẩm trao đổi chất từ trong hệ sợi ra ngoài vẫn xảy ra thuận lợi.
- *Pellet rỗng (hollow pellets)* là dạng pellet mà phần sợi bên trong bị tự phân tạo thành khoảng rỗng, hệ sợi phía bên ngoài cuộn rất chặt thành lớp sợi mịn và chắc chắn. Nguyên nhân của hiện tượng này là do hệ sợi pellet cuộn quá chặt đến mức làm cản trở cả quá trình vận chuyển vật chất từ bên ngoài vào cung cấp cho phần hệ sợi bên trong. Dần dần, do thiếu thức ăn kéo dài nên phần sợi bên trong sẽ bị chết và bị tự phân tạo thành khoảng rỗng giữa pellet.

Sự hình thành, số lượng, kích thước và đặc điểm cấu trúc của pellet là kết quả tác động qua lại của hàng loạt yếu tố như: sự đứt gãy do va đập với cánh khuấy khi khuấy trộn, sự hấp phụ các bào tử và các tiểu thể nhỏ trong môi trường lên hệ sợi, sự tương tác qua lại giữa các pellet với nhau, sự va đập giữa pellet với thành thiết bị, với hệ ống xoắn trao đổi nhiệt hay với hệ thống ống cấp khí, lượng giống cung cấp, thành phần môi trường, pH dịch lên men hay do các tác động khác... Trong các yếu tố nêu trên, thông số có ảnh hưởng lớn nhất và thường được lựa chọn để điều chỉnh là kiểu khuấy và cường độ khuấy trộn. Ngược lại, số lượng, kích thước và cấu trúc của pellet lại có tác động phản hồi trở lại đến các chỉ tiêu công nghệ như: độ nhớt dịch lên men, khả năng vận chuyển vật chất giữa tế bào nấm với môi trường ngoài, hiệu suất chuyển hóa tạo sản phẩm, phổ sản phẩm phụ của quá trình... Khi khuấy trộn dưới nhu cầu sẽ tạo ra pellet lớn và xốp, tiêu tốn ít năng lượng cho khuấy

trộn, quá trình chuyển khối thuận lợi hơn.... nhưng lại không đảm bảo cung cấp đủ oxy. Ngược lại, khi khuấy trộn quá ngưỡng sẽ tiêu tốn nhiều năng lượng khuấy trộn hơn, tăng nồng độ oxy hòa tan trong dịch lên men, nhưng quá trình chuyển khối xảy ra khó khăn hơn, xu hướng tạo pellet rỗng tăng lên... dẫn tới làm giảm hiệu suất chuyển hóa chung toàn quá trình, trong khi lại làm tăng chi phí tính chế sản phẩm (do xuất hiện lượng đáng kể các sản phẩm tự phân phân hệ sợi nấm trong ruột các pellet rỗng).

Như vậy, hiệu quả chung của quá trình lên men có quan hệ hữu cơ với số lượng, kích thước và cấu trúc pellet nấm. Trong thực tiễn sản xuất công nghiệp, người ta thường điều chỉnh các thông số công nghệ theo hướng ưu tiên tạo ra dạng pellet đủ nhỏ và mịn, hạn chế tạo pellet xốp và ngăn ngừa hình thành các pellet rỗng. Điều kiện công nghệ tương ứng với mục tiêu trên thường áp dụng là: tỉ lệ cấy giống 10%, với mật độ dịch giống $(2-10) \cdot 10^{11}$ bào tử/m³; phối hợp điều chỉnh giữa sục khí và khuấy trộn để đảm bảo cung cấp oxy hòa tan dư so với nhu cầu tương ứng với thời điểm lên men, và để tạo ra pellet mịn và nhỏ (kích thước pellet thích hợp nhất khoảng 0,2-0,5mm), trong điều kiện đã cân đối với nhu cầu tiết kiệm mức tiêu tốn năng lượng do khuấy trộn.

2.2.4.2. Đặc tính nhiệt động của dịch lên men

Trong các thiết bị lên men dung tích lớn có sục khí và khuấy trộn, thực tế không thể xác lập được sự đồng đều tại tất cả mọi vùng thể tích làm việc của thiết bị. Tại các vùng chảy rối (vùng gần cánh khuấy) tốc độ trao đổi nhiệt, tốc độ chuyển khối xảy ra mạnh mẽ hơn nên sẽ tạo điều kiện thuận lợi hơn cho sự phát triển của nấm; nhưng trong vùng này xu hướng các pellet bị đứt gãy và vón cuộn chặt cũng xảy ra mạnh mẽ hơn. Trong khi đó, tại các vùng chảy màng (vùng sát thành thiết bị, vùng gần các ống xoắn trao đổi nhiệt, vùng kém hiệu quả hay vùng chết của thiết bị...) tốc độ chuyển khối và tốc độ truyền nhiệt cũng giảm đi. Ngoài ra, trong quá trình lên men tại những khu vực nhất định trong thiết bị có thể xuất hiện các vùng xoáy cục bộ hay các dòng chảy thứ cấp (sự xuất hiện và dịch chuyển của các vùng chảy thứ cấp này mang tính chu kỳ và biến đổi phụ thuộc vào chế độ làm việc của thiết bị)... Vùng chảy thứ cấp này thường gắn liền với việc thiếu hụt về hàm lượng oxy hòa tan. Các yếu tố nêu trên sẽ tác động trực tiếp hay gián tiếp đến

năng lực sinh tổng hợp của chủng, hiệu quả chuyển hóa tạo sản phẩm và hiệu quả kinh tế chung của toàn quá trình lên men. Trong thực tiễn, nhằm giảm bớt ảnh hưởng của hiện tượng nêu trên, người ta thường chọn chế độ khuấy trộn hơi dư trên mức yêu cầu.

2.2.4.3. Thành phần môi trường lên men

Trong sản xuất penicillin V và penicillin G nói riêng, hay trong công nghệ lên men sản xuất các sản phẩm có hoạt tính sinh học giá trị kinh tế cao nói chung, để duy trì ưu thế cạnh tranh, các hãng sản xuất thường bảo mật chặt chẽ thành phần môi trường và điều kiện công nghệ lên men của mình. Chính điều này đã gián tiếp khẳng định vai trò rất quan trọng của thành phần môi trường và ảnh hưởng to lớn của môi trường lên men đến năng lực sinh tổng hợp kháng sinh của chủng và hiệu quả kinh tế của toàn quá trình sản xuất. Môi trường cơ sở để lên men penicillin, vào thời kỳ đầu trong những năm 40-50, là môi trường lactoza-nước chiết ngô, với thành phần chính nêu trong bảng 2.1.

Nguồn cơ chất chính lactoza có thể được thay thế từng phần hoặc toàn bộ bằng các cơ chất khác như: các loại đường hexoza, đường pentoza, disaccarit, dextrin hay thay thế bằng dầu thực vật. Trong các cơ chất nêu trên, hiệu quả cao hơn cả vẫn là glucoza (vài chục năm gần đây, trong hầu hết các cơ sở, người ta đã hoàn thiện công nghệ lên men theo hướng sử dụng hoàn toàn đường glucoza, trong điều kiện giám sát chặt chẽ nồng độ cơ chất này). Cũng cần chú ý rằng, khi sử dụng các cơ chất có thế oxy hoá-khử cao hơn glucoza sẽ kéo theo nhu cầu phụ thêm về O_2 và cần phải giải tỏa nhiệt thải nhiều hơn. Ngoài ra, khi sử dụng dầu thực vật làm chất phá bọt phải xét đến hiệu ứng nấm mốc sử dụng một phần dầu này làm nguồn cung cấp thức ăn cacbon, để tính toán điều chỉnh nồng độ glucoza trong môi trường lên men (và cả sự cản trở quá trình chuyển khối do ảnh hưởng của dầu phá bọt). Hàm lượng các chất khoáng bổ sung được tính toán, phụ thuộc vào lượng dịch chiết ngô sử dụng; pH môi trường được điều chỉnh trước khi thanh trùng, sau đó trong suốt quá trình lên men được giám sát chặt chẽ và điều chỉnh theo yêu cầu công nghệ.

Bảng 2.1. Thành phần môi trường lên men cơ bản để lên men sản xuất penicillin

- Lactoza 20-50kg/m³
- Glucoza 0-10kg/ m³, bổ sung gián đoạn hoặc liên tục trong quá trình lên men
- Dịch chiết ngô cô đặc 15-50kg/ m³
- Các khoáng chất

NaNO ₃ 0-5kg/ m ³	Na ₂ SO ₄ 0-1kg/ m ³
CaCO ₃ 0-10kg/ m ³	KH ₂ PO ₄ 0-4kg/ m ³
MgSO ₄ .7H ₂ O 0-0,25kg/ m ³	MgSO ₄ 0-0,02kg/ m ³
ZnSO ₄ 0-0,04kg/ m ³	
- Tiền chất tạo nhánh (phenylacetic hoặc dẫn xuất) bổ sung liên tục theo nhu cầu
- Chất chống tạo bọt bổ sung liên tục theo nhu cầu

Nguồn cung cấp thức ăn nitơ có thể sử dụng là bột đậu tương, bột hạt bông, các loại dầu cám. Nhu cầu về thức ăn nitơ cũng có thể được đáp ứng bằng cách cung cấp liên tục (NH₄)₂SO₄, nhưng duy trì ở nồng độ thấp, khoảng 250-340g/l (nếu dư thừa hiệu quả sinh tổng hợp penicillin sẽ giảm, nếu thiếu sẽ xảy ra hiện tượng tự phân hệ sợi).

Trong quá trình sinh tổng hợp penicillin, việc kết gắn mạch nhánh của phân tử penicillin không mang tính đặc hiệu chặt chẽ. Nhờ vậy, nếu duy trì nồng độ tiền chất tạo nhánh cần thiết phenylacetat (hoặc phenooxyacetat) sẽ cho phép thu nhận chủ yếu một loại penicillin G trong dịch lên men (hoặc penicillin V). Theo lý thuyết, nhu cầu về phenylacetat là 0,47g/gam penicillin G (hoặc phenooxyacetat là 0,50g/gam penicillin V). Cần chú ý cả hai cấu tử trên thực chất đều gây độc cho nấm nên người ta thường lựa chọn giải pháp bổ sung liên tục cấu tử này và khống chế chặt chẽ nồng độ theo yêu cầu, để không làm suy giảm năng lực lên men của chủng sản xuất.

2.2.4.4. Điều kiện tiến hành lên men

Nhiệt độ là thông số có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển của nấm mốc, khả năng sinh tổng hợp và năng lực tích tụ penicillin của chủng. Nhìn chung nấm mốc phát triển thuận lợi hơn ở dải nhiệt độ khoảng 30°C. Tuy nhiên, ở dải nhiệt độ này tốc độ phân hủy penicillin cũng xảy ra mạnh mẽ. Trong thực tế, ở giai đoạn nhân giống sản xuất người ta thường nhân ở dải nhiệt độ 30°C; sang giai đoạn lên men thường áp dụng một trong hai chế độ nhiệt là:

- Lên men ở một dải nhiệt độ: thường duy trì nhiệt độ trong suốt quá trình lên men ở dải nhiệt độ 25-27°C.
- Lên men ở hai chế độ nhiệt độ: giai đoạn lên men ban đầu tiến hành ở 30°C cho đến khi hệ sợi phát triển đạt yêu cầu về hàm lượng sinh khối thì điều chỉnh nhiệt độ sang chế độ lên men penicillin ở dải nhiệt độ 22-25°C (có công nghệ điều chỉnh xuống 22-23 °C, giữ ở nhiệt độ này tiếp hai ngày rồi chuyển sang lên men tiếp ở 25°C cho đến khi kết thúc quá trình lên men).

pH môi trường thuận lợi cho sự phát triển hệ sợi và cho quá trình sinh tổng hợp penicillin thường dao động trong khoảng pH=6,8-7,4. Tuy nhiên ở điều kiện pH cao xu hướng phân hủy penicillin cũng tăng lên. Vì vậy, trong sản xuất pH môi trường thường được khống chế chặt chẽ ở giá trị lựa chọn trong khoảng pH=6,2-6,8.

Nồng độ oxy hòa tan và cường độ khuấy trộn dịch lên men: với nhiều chủng nấm mốc, nồng độ oxy hòa tan thuận lợi cho quá trình sinh tổng hợp penicillin dao động quanh mức 30% nồng độ oxy bão hòa. Nếu nồng độ oxy hòa tan dưới dải nồng độ trên sẽ làm cho năng lực sinh tổng hợp penicillin của chủng giảm, đặc biệt nếu để thiếu oxy xuống dưới mức 10% thì hoạt tính sinh tổng hợp penicillin sẽ suy giảm mạnh và hầu như chúng mất khả năng phục hồi sớm, ngay cả khi tăng nồng độ oxy hòa tan ngay lên mức 30%. Tốc độ tích tụ penicillin cũng chịu sự tác động đáng kể của kiểu khuấy trộn và cường độ khuấy trộn dịch lên men. Khuấy trộn quá mãnh liệt dịch lên men thường kéo theo hiệu ứng tăng hàm lượng sinh khối, nhưng lại rút ngắn thời

gian pha tích tụ penicillin và có xu hướng tích tụ thêm nhiều sản phẩm không mong muốn, gây khó khăn thêm cho công đoạn tinh chế thu sản phẩm sau này. Trong thực tế, để đảm bảo lượng oxy hòa tan người ta thường phối hợp điều chỉnh cả hai thông số cường độ sục khí và khuấy trộn, theo hướng đủ tạo ra pellet nhỏ và mịn trong điều kiện khuấy trộn hơi dư ở mức cân đối với yêu cầu tiết kiệm năng lượng tiêu tốn.

Nồng độ CO_2 trong dịch lên men ở mức nhất định cũng cần thiết cho quá trình nảy mầm của bào tử nấm mốc; tuy nhiên, nếu nồng độ CO_2 quá cao sẽ làm cản trở quá trình hấp thu và chuyển hóa cơ chất của chúng, nghĩa là làm cản trở quá trình sinh tổng hợp penicillin. Trong thực tiễn sản xuất lớn khi áp dụng phương pháp lên men chìm, do sục khí và khuấy trộn liên tục đã giải thoát phần lớn CO_2 đủ không để xảy ra sự ức chế nêu trên.

2.2.4.5. Sự tích tụ và phân hủy penicillin

Trong quá trình lên men, do nhiều nguyên nhân khác nhau, trong đó có ảnh hưởng của nồng độ penicillin tích tụ trong môi trường ngày càng tăng, làm cho năng lực sinh tổng hợp penicillin của chúng có xu hướng giảm dần theo thời gian lên men. Đồng thời, phụ thuộc vào nhiệt độ và pH môi trường, một phần lượng penicillin đã được tích tụ cũng bị phân hủy theo thời gian. Tùy theo từng trường hợp cụ thể, trong sản xuất người ta bao giờ cũng phải chấp nhận tỉ lệ tổn hao sản phẩm penicillin do phân hủy trong khoảng 10-20%. Nhằm giảm tổn thất trên, ngay sau khi kết thúc quá trình lên men, cần xử lý thu sản phẩm sớm hoặc có giải pháp hạ thấp nhanh nhiệt độ dịch lên men.

2.3. QUY TRÌNH LÊN MEN SẢN XUẤT PENICILLIN TRONG CÔNG NGHIỆP

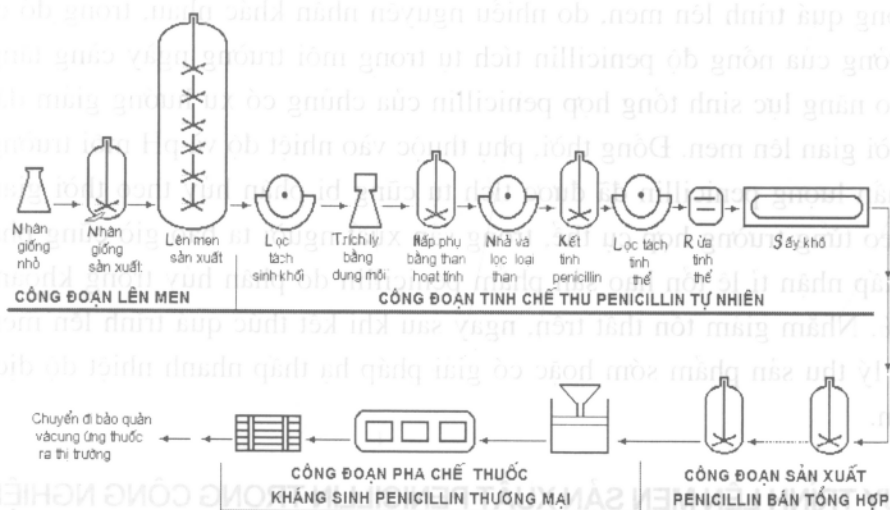
2.3.1. Đặc điểm chung

Công nghệ lên men sản xuất penicillin mang nét đặc thù riêng của từng cơ sở sản xuất và các thông tin này rất hạn chế cung cấp công khai, ngay mỗi bảng

sáng chế thường cũng chỉ giới hạn ở những công đoạn nhất định; vì vậy rất khó đưa ra được công nghệ tổng quát chung. Theo công nghệ lên men của hãng Gist-Brocades (Hà Lan), toàn bộ dây chuyền sản xuất thuốc kháng sinh penicillin có thể phân chia làm bốn công đoạn chính như sau (xem sơ đồ hình 2.7):

- Lên men sản xuất penicillin tự nhiên (thường thu penicillin V hoặc penicillin G).
- Xử lý dịch lên men tinh chế thu bán thành phẩm penicillin tự nhiên.
- Sản xuất các penicillin bán tổng hợp (từ nguyên liệu penicillin tự nhiên).
- Pha chế các loại thuốc kháng sinh penicillin thương mại.

Một vài thông số công nghệ của quá trình chuẩn bị lên men và lên men sản xuất của hãng như sau:



Hình 2.7. Sơ đồ dây chuyền sản xuất penicillin (theo Gist-Brocades Copr.)

2.3.2. Chuẩn bị lên men

Giống, bảo quản và nhân giống cho sản xuất: giống công nghiệp *P. chrysogenum* được bảo quản lâu dài ở dạng đông khô, bảo quản siêu lạnh ở -70°C hoặc bảo quản trong nitơ lỏng. Giống từ môi trường bảo quản được cấy chuyển ra trên môi trường thạch hộp để hoạt hóa và nuôi thu bào tử. Dịch huyền phù bào tử thu từ hộp petri được cấy chuyển tiếp sang môi trường bình tam giác, rồi sang thiết bị nhân giống nhỏ, qua thiết bị nhân giống trung gian... và cuối cùng là trên thiết bị nhân giống sản xuất. Yêu cầu quan trọng nhất của công đoạn nhân giống là phải đảm bảo cung cấp đủ lượng giống cần thiết, với hoạt lực cao, chất lượng đảm bảo đúng thời điểm cho các công đoạn nhân giống kế tiếp và cuối cùng là cung cấp đủ lượng giống đạt các yêu cầu kỹ thuật cho lên men sản xuất. Trong thực tiễn, để đảm bảo cho quá trình lên men thuận lợi người ta thường tính toán lượng giống cấp sao cho mật độ giống trong dịch lên men ban đầu khoảng $1-5 \cdot 10^9$ bào tử/m³. Với tỉ lệ cấy chuyển khi cấp giống thường áp dụng là 10% thì chất lượng giống sản xuất tương ứng là: hàm lượng sinh khối của giống cần đạt mức 20kg sợi khô/m³ dịch giống, mật độ bào tử thích hợp khoảng 10^{11} bào tử/m³ và chiếm ưu thế là pellet mịn với kích thước (0,2-0,5)mm.

Thành phần môi trường nhân giống cần được tính toán để đảm bảo cung cấp đủ nguồn thức ăn C, N, các chất khoáng và các thành phần khác, đảm bảo cho sự hình thành và phát triển thuận lợi của pellet. Trong tất cả các công đoạn nhân giống phải đảm bảo kiểm tra thường xuyên về tốc độ phát triển giống, đặc điểm hình thái và cấu trúc pellet, nồng độ các cấu tử trong môi trường nhân giống, giám sát chặt chẽ tình trạng nhiễm tạp... để đưa ra được quyết định kịp thời và đúng đắn để tiếp tục cấy chuyển hay cần thiết phải bổ sung các giải pháp xử lý thích ứng.

Chuẩn bị môi trường lên men và thiết bị: các thành phần môi trường lên men sản xuất thường được cân đong rồi được pha chế riêng rẽ trong các thùng chứa phù hợp, sau đó được thanh trùng gián đoạn ở 121°C (hay thanh trùng liên tục ở khoảng 140-146°C) hoặc lọc qua các vật liệu siêu lọc rồi mới bơm vào trong thùng lên men. Nếu đặc tính công nghệ của thiết bị lên men

cho phép, có thể pha chế rồi thanh trùng đồng thời dịch lên men ngay trong thiết bị. Tất cả các cấu tử bổ sung vào môi trường lên men đều phải được xử lý khử khuẩn trước và sau đó phải được bổ sung vào theo chế độ vận hành vô khuẩn (*monoseptic operation*). Thiết bị lên men trước khi đưa vào sử dụng phải được vô khuẩn trước, thường được thanh trùng bằng hơi quá nhiệt 2.5-3,0 at trong thời gian 1-3 giờ. Đồng thời với việc khử khuẩn thiết bị lên men, phải đảm bảo khử khuẩn nghiêm ngặt tương ứng với tất cả các hệ thống ống dẫn, khớp nối, van, phin lọc và tất cả các thiết bị phụ trợ khác... Sau khi khử khuẩn xong, thiết bị thường được đưa vào sử dụng ngay và kể từ sau thời điểm khử khuẩn cho đến khi kết thúc mẻ lên men người ta thường cố gắng duy trì áp suất dư trong thiết bị nhằm hạn chế rủi ro do nhiễm tạp. Không khí thường được khử khuẩn sơ bộ bằng nén đoạn nhiệt, sau đó được lọc khử khuẩn bằng cách lọc lại qua màng lọc vô khuẩn hay màng siêu lọc (các hệ thống lọc này phải được xử lý khử khuẩn từ trước và trong quá trình vận hành phải định kỳ vệ sinh và khử khuẩn lại).

2.3.3. Kỹ thuật tiến hành lên men

Kỹ thuật lên men bề mặt được áp dụng nhiều trong thời kỳ những năm 40-60 của thế kỷ XX, hiện nay hầu như không còn được triển khai trong sản xuất lớn nữa. Phương pháp lên men bề mặt gồm hai kỹ thuật là lên men trên nguyên liệu rắn (cám mỳ, cám ngô bổ sung đường lactoza) và lên men trên bề mặt môi trường lỏng tĩnh (phổ biến sử dụng môi trường cơ bản lactoza-nước chiết ngô). Trong điều kiện này, do đường lactoza được nấm mốc đồng hóa chậm nên không xảy ra hiện tượng dư thừa đường trong tế bào; dịch chiết ngô cung cấp cho nấm mốc nguồn thức ăn nitơ, các chất khoáng và chất sinh trưởng, trong đó phenylalanin khi bị thủy phân sẽ tạo thành phenylacetic và sẽ đảm nhiệm vai trò cung cấp tiền chất tạo mạch nhánh cho phân tử penicillin. Khi lên men trong môi trường lỏng người ta áp dụng công nghệ bổ sung liên tục phenylacetic vào môi trường lên men, hàm lượng bổ sung phụ thuộc nhiều vào pH môi trường và tổng lượng bổ sung thường dao động trong khoảng (0,2-0,8)kg phenylacetic/m³ dịch lên men (trong điều kiện đó lượng penicillin G được tổng hợp ra tăng rõ rệt và hàm lượng các penicillin khác

cũng giảm đi). Để hạn chế quá trình oxy hóa tiền chất người ta thường bổ sung vào môi trường một lượng nhỏ axit axetic (hay các hợp chất hữu cơ không no có nối đôi ở vị trí $\beta \rightarrow \gamma$). Trong kỹ thuật lên men lỏng gián đoạn không điều chỉnh pH, thời kỳ đầu quá trình lên men pH môi trường thường tăng nhẹ, sau đó tương đối ổn định và vào cuối quá trình lên men thường trong khoảng pH=6,8-7,4. Khi sử dụng cơ chất chính là lactoza, người ta đã xác định được penicillin chỉ được tổng hợp và tích tụ mạnh mẽ trong môi trường khi nấm mốc đã chuyển sang sử dụng đường này và khi lactoza có dấu hiệu cạn kiệt thì sợi nấm cũng bắt đầu bị tự phân. Vì vậy, người ta thường kết thúc quá trình lên men vào thời điểm sắp hết đường lactoza.

Kỹ thuật lên men chìm là kỹ thuật được áp dụng trong hầu hết các cơ sở sản xuất penicillin công nghiệp hiện nay và thường được vận hành theo phương pháp lên men bán liên tục, gồm phương án lên men gián đoạn theo mẻ có bổ sung liên tục (hay bán liên tục) một hay một vài cấu tử kết hợp với phương án tuần hoàn lại một phần hệ sợi của mẻ lên men trước (hoặc không). Quá trình lên men được vận hành theo phương pháp lên men hai pha, với pha đầu nuôi thu sinh khối trong kháng 2-3 ngày, sau đó chuyển sang pha lên men thu sản phẩm. Trong hầu hết các trường hợp người ta thay thế phần lớn (hoặc hoàn toàn) đường lactoza bằng đường glucoza. Lượng glucoza này có thể được bổ sung liên tục hay bán liên tục nhưng phải giám sát chặt chẽ nồng độ glucoza trong suốt quá trình vận hành pha sau để duy trì nồng độ glucoza luôn ở mức thích hợp nhằm vừa giữ khối lượng hệ sợi ổn định, vừa đảm bảo sinh tổng hợp nhiều penicillin. Trong thực tiễn, để tránh xảy ra thiếu hụt nhất thời glucoza người ta có thể kết hợp bổ sung lượng nhỏ đường lactoza (khi đó, nếu chưa bổ sung kịp glucoza thì nấm mốc sẽ tự điều chỉnh để sử dụng đường lactoza nên không xảy ra hiện tượng tự phân hệ sợi). Ngoài nguồn nitơ trong nước chiết ngô, người ta thường sử dụng phối hợp $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để vừa cung cấp thức ăn N và S, vừa sử dụng để điều chỉnh pH trong quá trình lên men (pH dịch lên men ban đầu thường được điều chỉnh về khoảng pH=6,5-6,8; bằng dung dịch NaOH hoặc H_3PO_4); nồng độ NH_4^+ thường không chế trong khoảng 0,3-0,4kg/m³ dịch lên men. Chất phá bọt thường sử dụng là các loại dầu béo như: mỡ lợn, dầu đậu tương, dầu vừng, dầu cám... Tiền chất tạo nhánh phenylacetic trong lên men sản xuất penicillin G (hoặc

phenooxyacetic trong lên men sản xuất penicillin V) được bổ sung liên tục (hoặc bổ sung gián đoạn làm nhiều lần) trong suốt thời gian pha lên men penicillin, để duy trì nồng độ trong khoảng $0,1-1,0\text{kg/m}^3$ dịch (nếu ít quá nấm mốc sẽ tổng hợp đồng thời nhiều penicillin khác, nếu nhiều quá sẽ gây độc cho nấm và tăng cường thúc đẩy quá trình hydroxyl hóa sản phẩm penicillin). Nhiệt độ lên men pha đầu không chế ở 30°C , sau đó sang pha sau giữ ở $22-25^\circ\text{C}$. Tốc độ sục khí và khuấy trộn được điều chỉnh để duy trì nồng độ oxy hòa tan trong dịch trong khoảng 30%. Trong điều kiện trên thời gian lên men mỗi mẻ thường kéo dài khoảng 144-180 giờ. Kết thúc quá trình lên men người ta cố gắng lọc sớm dịch lên men, làm lạnh rồi chuyển sang công đoạn trích ly và tinh chế thu penicillin.

Đặc điểm về thiết bị lên men: quá trình lên men sản xuất penicillin ngày nay chủ yếu được tiến hành trong thiết bị lên men chìm chế tạo bằng nhôm thép chịu ăn mòn CT2 với khuấy trộn kiểu tuốcbin (gồm nhiều tầng cánh khuấy, kết hợp bố trí hệ vách dẫn dòng trong thùng). Công suất khuấy trộn tiêu hao được thiết kế khoảng $3\text{kW/m}^3/\text{giờ}$. Không khí nén đã vô khuẩn được cấp vào qua hệ ống phân phối kiểu vòng xoáy hay kiểu rơ quạt đục lỗ lắp đặt sát dưới đáy (hay phía dưới cánh tuốc-bin). Bên trong thiết bị được lắp đặt nhiều tầng ống trao đổi nhiệt kiểu vòng xoắn kết hợp đồng thời với trao đổi nhiệt qua thành thiết bị hai lớp vỏ, đảm bảo điều nhiệt hiệu quả trong suốt quá trình lên men. Dung tích thiết bị phổ biến trong khoảng $150-300\text{m}^3$, hệ số đổ đầy thường chọn khoảng 80%V (phụ thuộc vào kỹ thuật và thiết bị phá bọt). Thiết bị nhân giống sản xuất có dung tích khoảng 10%V thiết bị lên men, được thiết kế tương tự và thường được ghép cứng với thiết bị lên men. Toàn bộ thiết bị lên men sản xuất, thiết bị nhân giống lớn và hệ thống các trang thiết bị phụ trợ được thiết kế và lắp đặt đảm bảo có thể vệ sinh và thao tác vận hành theo chế độ vô khuẩn cao (tốt nhất nên bố trí sao cho có thể áp dụng chế độ thanh trùng đồng thời cho toàn bộ hệ thiết bị này). Các thông số kiểm tra quá trình lên men bao gồm: pH môi trường, nồng độ oxy hòa tan, nhiệt độ, hàm lượng sinh khối và tốc độ biến thiên lượng sinh khối, số lượng, kích thước và cấu trúc pellet, nồng độ các cấu tử cơ chất, nồng độ penicillin, thành phần khí thải và các chỉ tiêu kiểm tra về vi sinh vật. Việc giám sát và điều chỉnh quá trình lên men được xây dựng trên cơ sở khai thác cả hai kiểu

tương tác trực tuyến (*online control*) và tương tác không phản hồi theo quy luật (*offline control*), phụ thuộc vào khả năng đáp ứng của hệ thiết bị hiện có. Đồng thời xu hướng máy tính hóa trong kiểm tra và giám sát quá trình lên men đang dần chiếm ưu thế trong sản xuất công nghiệp.

2.3.4. Hiệu quả kinh tế chung của quá trình lên men

Năng lực sinh tổng hợp và tích tụ penicillin trong dịch lên men là kết quả của mối tương tác đồng thời của hàng loạt yếu tố công nghệ như: hoạt tính sinh tổng hợp của chủng, công nghệ lên men áp dụng, chất lượng nguyên liệu, đặc tính thiết bị và năng lực đáp ứng các yêu cầu công nghệ của thiết bị, chế độ giám sát và điều chỉnh các thông số công nghệ, năng lực và kỹ năng vận hành của công nhân... Với nguồn cơ chất chính là glucoza và lên men theo phương pháp chìm, hệ số phân bố nguyên liệu dự tính khoảng 25% glucoza được nấm mốc sử dụng để tổng hợp hệ sợi, 65% đường được sử dụng để duy trì sự sống sót của hệ sợi, còn lại chỉ khoảng 10% được nấm mốc sử dụng để tổng hợp penicillin. Hệ số sử dụng thức ăn nitơ và lưu huỳnh để tổng hợp penicillin tương ứng là 20% và 80%. Nồng độ penicillin G trong dịch lên men những năm 80-90 của thế kỷ XX đạt khoảng 80.000 UI/ml (tương ứng năng suất khoảng 40-50kg penicillin G/m³ dịch lên men).

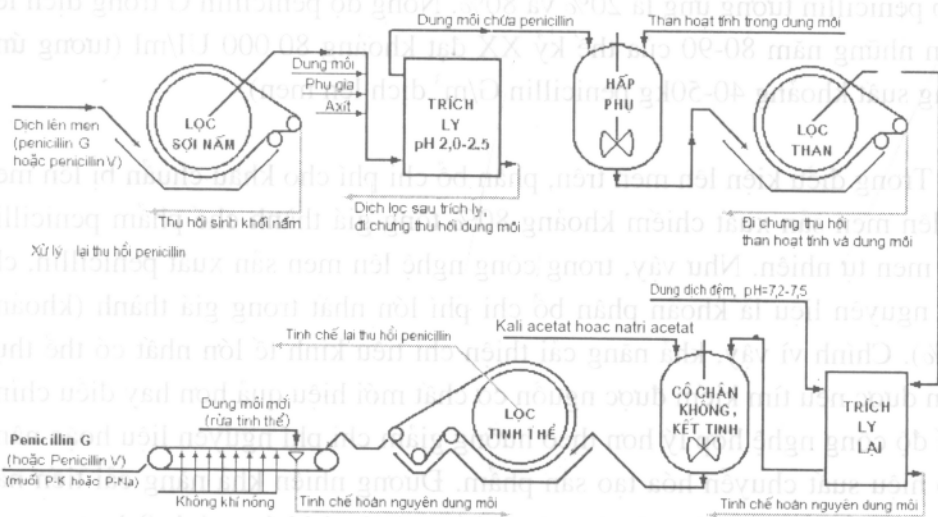
Trong điều kiện lên men trên, phân bổ chi phí cho khâu chuẩn bị lên men và lên men sản xuất chiếm khoảng 80% tổng giá thành chế phẩm penicillin lên men tự nhiên. Như vậy, trong công nghệ lên men sản xuất penicillin, chi phí nguyên liệu là khoản phân bổ chi phí lớn nhất trong giá thành (khoảng 50%). Chính vì vậy, khả năng cải thiện chỉ tiêu kinh tế lớn nhất có thể thực hiện được nếu tìm kiếm được nguồn cơ chất mới hiệu quả hơn hay điều chỉnh chế độ công nghệ hợp lý hơn theo hướng giảm chi phí nguyên liệu hoặc nâng cao hiệu suất chuyển hóa tạo sản phẩm. Đương nhiên khả năng cải tiến này không nhằm thay thế xu hướng tìm kiếm các loại kháng sinh β -lactam mới với các đặc tính ưu việt và đa dạng hơn, đặc biệt khi hiện tượng kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh ngày càng có xu hướng phổ biến và trở nên trầm trọng trong những năm gần đây.

2.4. XỬ LÝ DỊCH LÊN MEN VÀ TINH CHẾ THU PENICILLIN TỰ NHIÊN

Công đoạn xử lý dịch lên men thu chế phẩm penicillin tự nhiên được tóm tắt trong sơ đồ hình 2.8, bao gồm các công đoạn chính sau đây:

2.4.1. Lọc dịch lên men

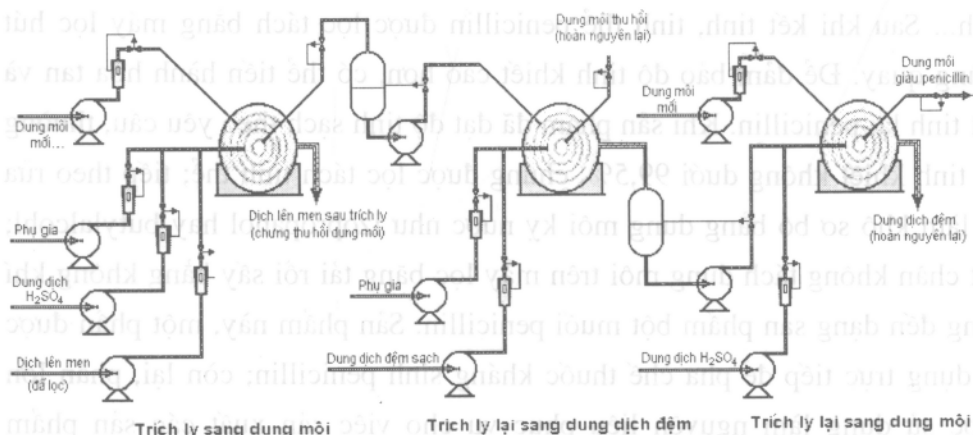
Penicillin là sản phẩm lên men ngoại bào. Vì vậy, ngay sau khi kết thúc quá trình lên men người ta thường tiến hành lọc ngay để giảm tổn hao do phân hủy penicillin và giảm bớt khó khăn khi tinh chế, do các tạp chất tạo ra khi hệ sợi nấm tự phân. Thiết bị lọc phổ biến là thiết bị lọc hút kiểu băng tải hoặc kiểu thùng quay. Thông thường, người ta chỉ cần lọc một lần rồi làm lạnh dịch ngay để chuyển sang công đoạn tiếp theo. Chỉ trong những trường hợp rất đặc biệt mới cần phải xử lý kết tủa một phần protein và lọc lại dịch lần thứ hai. Hiện tượng tự phân hệ sợi nấm thường kéo theo hậu quả làm cho dịch khó lọc hơn. Phần sinh khối nấm được rửa sạch, sấy khô và sử dụng để chế biến thức ăn gia súc.



Hình 2.8. Sơ đồ tóm tắt công đoạn xử lý dịch lên men thu penicillin tự nhiên

2.4.2. Trích ly

Penicillin thường được trích ly ở dạng axit ra khỏi dịch lọc bằng dung môi amylacetat hoặc butylacetat ở pH=2,0-2,5, nhiệt độ 0-3°C. Nhằm hạn chế lượng penicillin bị phân hủy, quá trình trích ly được thực hiện trong thời gian rất ngắn trong thiết bị trích ly ngược dòng liên tục kiểu ly tâm nhiều tầng cánh. Đồng thời, trong thời gian trích ly cần giám sát chặt chẽ các thông số công nghệ như: nhiệt độ, pH, độ vô khuẩn... để hạn chế tổn thất do phân hủy penicillin. Dịch lên men sau khi lọc được bơm trộn đồng thời với dung dịch H_2SO_4 hoặc H_3PO_4 loãng có bổ sung thêm chất chống tạo nhũ và bơm song song cùng với dung môi trích ly vào trong thiết bị. Tỷ lệ dịch lọc: dung môi thường chọn trong khoảng 4-10V dịch lọc/1V dung môi. Trong một số công nghệ, nhằm cải thiện chất lượng sản phẩm, người ta có thể áp dụng phương pháp trích ly hai lần dung môi, với lần đầu trích ly penicillin bằng amylacetat hoặc butylacetat; tiếp theo, penicillin lại được trích ly ngược sang dung dịch đậm pH=7,2-7,5, thường là dung dịch KOH loãng hoặc dung dịch $NaHCO_3$; sau đó penicillin lại được trích ly sang dung môi lần thứ 2, với lượng dung môi ít hơn (xem sơ đồ hình 2.9).



Hình 2.9. Sơ đồ công nghệ trích ly hai lần dung môi tinh chế penicillin

2.4.3. Tẩy màu

Để tẩy màu và loại bỏ một số tạp chất khác, người ta thường bổ sung trực tiếp chất hấp phụ vào dung môi chứa penicillin sau trích ly, sử dụng phổ biến nhất là than hoạt tính. Sau đó than hoạt tính được tách và rửa lại bằng sử dụng thiết bị lọc hút bằng tải hoặc thiết bị lọc hút kiểu thùng quay. Phần than sau lọc được đưa đi chưng thu hồi dung môi và xử lý hoàn nguyên, phục vụ cho các mẻ sau.

2.4.4. Kết tinh, lọc, rửa và sấy thu penicillin tự nhiên

Việc kết tinh penicillin V hay penicillin G dưới dạng muối có thể được thực hiện rất đơn giản, bằng cách bổ sung trực tiếp vào dung môi sau khi tẩy màu một lượng nhỏ kali acetat (hay natri acetat) hoặc người ta trích ly lại sang dung dịch KOH loãng (hay NaOH loãng), tiến hành cô chân không ở nhiệt độ thấp, sau đó bổ sung BuOH để penicillin tự kết tinh. Các thông số công nghệ có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả kết tinh là: nồng độ penicillin, nồng độ muối acetat, pH dung môi hay pH dung dịch cô đặc, nhiệt độ kết tinh... Sau khi kết tinh, tinh thể penicillin được lọc tách bằng máy lọc hút thùng quay. Để đảm bảo độ tinh khiết cao hơn, có thể tiến hành hòa tan và kết tinh lại penicillin. Khi sản phẩm đã đạt độ tinh sạch theo yêu cầu, thường độ tinh khiết không dưới 99,5%, chúng được lọc tách tinh thể; tiếp theo rửa và làm khô sơ bộ bằng dung môi kỵ nước như izopropanol hay butylalcohol; hút chân không tách dung môi trên máy lọc băng tải rồi sấy bằng không khí nóng đến dạng sản phẩm bột muối penicillin. Sản phẩm này, một phần được sử dụng trực tiếp để pha chế thuốc kháng sinh penicillin; còn lại, phần lớn được sử dụng làm nguyên liệu phục vụ cho việc sản xuất các sản phẩm penicillin và cephalosporin bán tổng hợp khác. Ngoài ra, để sản xuất ra các sản phẩm penicillin có độ tinh khiết rất cao, người ta cần phải sử dụng phối hợp thêm một số giải pháp công nghệ khác.

Trong công đoạn tinh chế penicillin, cũng như với nhiều chất kháng sinh khác nói chung, người ta sử dụng lượng lớn các dung môi khác nhau. Vì vậy, chất lượng trang thiết bị và việc sử dụng hiệu quả dung môi có ý nghĩa to lớn, một mặt nó tác động trực tiếp vào giá thành chung của sản phẩm, nhưng mặt khác chúng ảnh hưởng đến an toàn cháy nổ trong phân xưởng và có thể trở thành nguyên nhân gây ô nhiễm không khí cục bộ nên vấn đề này bao giờ cũng phải được xem xét, đánh giá một cách nghiêm túc.

2.5. SẢN XUẤT CÁC β -LACTAM BÁN TỔNG HỢP TỪ PENICILLIN G

2.5.1. Nhu cầu sản xuất các penicillin bán tổng hợp

Tác dụng điều trị chính của penicillin và các kháng sinh khác thuộc họ β -lactam được xác định là: cấu trúc penicillin có nhiều điểm gắn gũi với dipeptit D-alanin-D-alanin, là một hợp phần cấu trúc trong lớp peptidoglycan thành tế bào. Do sự tương đồng về đặc tính và cấu trúc này làm cho hoạt tính các enzym tham gia vào quá trình tổng hợp thành tế bào bị biến đổi, các enzym này đã nhận “nhầm” cơ chất. Kết quả là phân thành tế bào mới tổng hợp với sự “nhầm lẫn” trên sẽ không được hình thành, làm cho thành tế bào của mầm bệnh chỉ có từng phần hay chúng hoàn toàn không có thành tế bào, do đó chúng dễ dàng bị tự phân trong môi trường và bị các công cụ tự vệ của cơ thể bệnh nhân tiêu diệt. Đồng thời, các kháng sinh β -lactam còn liên kết đặc hiệu với một số protein trên màng tế bào chất (đến nay đã xác định được chín protein trên). Sự liên kết này đã làm “bất hoạt” và “hòa tan” các protein đặc hiệu trên màng, dẫn đến làm mất hoạt tính polymeraza và ATPaza (người ta đã xác định được trong môi trường kháng sinh chỉ có các D-alanin-carboxypeptidaza còn hoạt động và một số ACPaza này lại có hoạt tính β -lactamaza yếu). Ngoài ra, người ta còn phát hiện thấy ảnh hưởng của penicillin đến các chuyển hóa photpholipit trong tế bào.

Tuy nhiên, nhiều trường hợp điều trị với penicillin đã xuất hiện dấu hiệu kháng thuốc. Bên cạnh đó, người ta đã tách được biến chủng *E. coli* Gram âm và một số biến chủng *B. subtilis* kháng thuốc, vẫn có thể phát triển bình thường trong môi trường chứa penicillin. Nguyên nhân chính của hiện tượng kháng penicillin này là chúng tổng hợp được một trong hai enzym penicillinaza và đặc biệt là enzym β -lactamaza. Gen mã hóa sinh tổng hợp enzym β -lactamaza được lưu giữ trên các plasmid (hoặc trasporon). Vì vậy, cùng với thời gian điều trị, năng lực kháng thuốc của chúng sẽ trở nên thành thực. Để vô hiệu khả năng kháng thuốc nêu trên, về nguyên lý, giải pháp đơn giản hơn cả là làm vô hiệu khả năng tương tác của enzym với cơ chất, bằng cách làm biến đổi cấu trúc phân tử penicillin.

Trên phương diện điều trị, trong từng trường hợp cụ thể mà người thầy thuốc mong muốn có những chế phẩm kháng sinh tương ứng với những đặc tính khác nhau, thí dụ, thuốc có phổ kháng khuẩn rộng hơn hoặc có phổ kháng khuẩn hẹp hơn, thuốc bền với enzym β -lactamaza, thuốc dễ hấp thu, thuốc ít phản ứng phụ, thuốc đào thải nhanh... hay đối với bệnh nhân các loại thuốc có thể uống qua đường miệng thường an toàn và dễ được chấp nhận hơn. Nghĩa là người ta luôn mong muốn tìm ra các chế phẩm penicillin mới với đặc tính đa dạng và khả năng chỉ định điều trị phong phú hơn.

Để tạo ra các penicillin khác nhau, trên nguyên tắc có thể hoàn thiện theo hướng lên men trực tiếp với các tiền chất tạo nhánh thích hợp để thu các penicillin mong muốn hay lên men không sử dụng tiền chất thu axit 6-aminopenicillanic làm nguyên liệu để tổng hợp ra các penicillin khác. Tuy nhiên, bằng con đường lên men trực tiếp cho đến nay người ta mới chỉ có khả năng lên men được một vài loại penicillin. Trong khi đó, con đường kinh tế hơn cả và được triển khai trong sản xuất lớn lại là chỉ lên men trực tiếp thu penicillin G (hoặc penicillin V) làm nguyên liệu, để từ đó tổng hợp ra các penicillin bán tổng hợp khác. Ngoài ra, bằng con đường bán tổng hợp từ penicillin G (hoặc penicillin V), có thể sản xuất ra cả một số dẫn xuất β -

lactam có giá trị cao như các cephalosporin bán tổng hợp hay các penicillin có hoạt tính kìm hãm β -lactamaza.

2.5.2. Sản xuất axit 6-aminopenicillanic và sản xuất penicillin bán tổng hợp

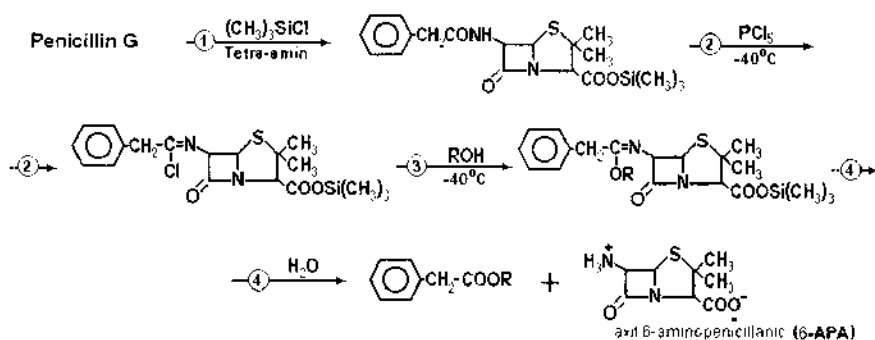
Axit 6-aminopenicillanic tuy không có hoạt tính kháng khuẩn, nhưng có thể sử dụng làm nguyên liệu để tổng hợp ra nhiều loại penicillin khác nhau và cephalosporin. Để sản xuất axit 6-aminopenicillanic, con đường hiệu quả hơn cả hiện nay là lên men sản xuất penicillin G (hoặc penicillin V); sau đó áp dụng phương pháp hóa học hay sử dụng enzym acylaza để phân cắt mạch nhánh bên (xem sơ đồ hình 2.10). Phương pháp hóa học có hiệu suất chuyển hóa cao, tới 90-95%, và tốc độ phản ứng nhanh, song lại tiêu hao nhiều năng lượng, nhiều dung môi và chứa đựng nguy cơ ô nhiễm môi trường cao. Trong khi đó, phương pháp enzym, tuy hiệu quả chuyển hóa thấp hơn nhưng điều kiện phản ứng êm dịu và mang lại hiệu quả kinh tế cao hơn nên được triển khai phổ biến trong thực tiễn sản xuất công nghiệp. Đồng thời, cũng nhờ ưu thế trên, phương pháp enzym được hoàn thiện liên tục và ngày nay đã đạt được ưu thế vượt trội so với phương pháp hóa học (xem bảng 2.2). Một vài đặc tính kỹ thuật và công nghệ trong thu nhận và ứng dụng enzym này được giới thiệu trong phần 2.6.

Từ axit 6-aminopenicillanic có thể dễ dàng tạo ra được nhiều chế phẩm penicillin bán tổng hợp khác nhau, thí dụ như propicillin, ampicillin, amoxycillin..., bằng cả hai con đường: acyl hóa trực tiếp axit 6-aminopenicillanic theo phương pháp hóa học hay sử dụng enzym acylaza vi khuẩn (xem sơ đồ hình 2.10). Tuy nhiên, enzym acylaza thường thể hiện đồng thời cả hai hoạt tính synthetaza và hydrolaza, thay đổi phụ thuộc vào điều kiện phản ứng, nên ở công đoạn này người ta lại áp dụng phổ biến con đường acyl hóa trực tiếp theo phương pháp tổng hợp hóa học.

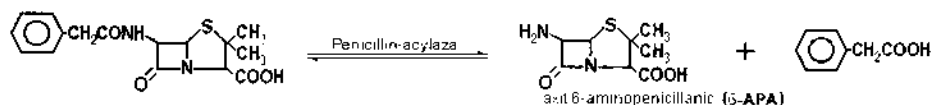
Bảng 2.2. Phân bố chi phí trong sản xuất axit 6-aminopenicillanic
(40 tấn/năm, theo Hãng Snam Progetti, Italia)

Phân bố chi phí	Phương pháp hóa học	Phương pháp enzym (chế phẩm enzym cố định trong triacetatcelluloza)	
		Sử dụng penicillin G tinh khiết	Sử dụng penicillin G thô
Penicillin V	43,72	46,01	39,65
Hóa chất	7,19	0,78	1,39
Chế phẩm enzym	---	2,67	2,67
Vật tư khác	4,64	0,91	0,91
Nhân công	3,12	3,05	3,95
Khấu hao thiết bị	6,16	4,99	3,85
Chi phí khác	2,28	3,18	2,90
Tổng cộng	68,41	62,49	55,28

Sơ đồ tổng hợp bằng phương pháp hóa học



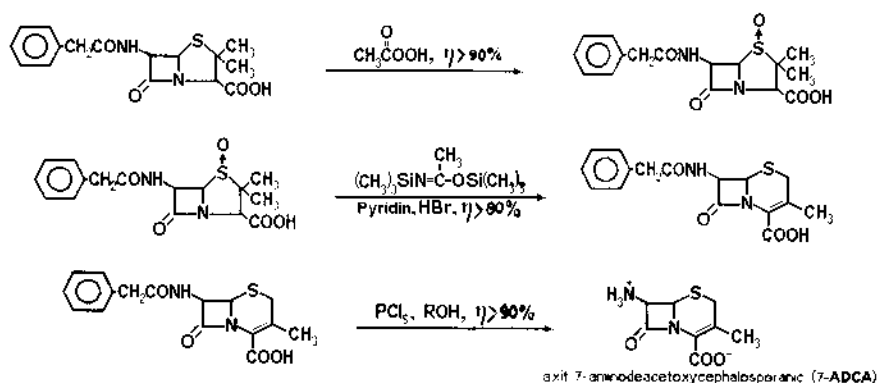
Sơ đồ tổng hợp bằng phương pháp enzym



Hình 2.10. Sơ đồ tổng hợp axit 6-aminopenicillanic từ penicillin G

2.5.3. Sản xuất axit 7-aminodeacetoxy-cephalosporanic (7-ADCA) và sản xuất cephalosporin bán tổng hợp

Cephalosporin là họ chất kháng sinh thuộc nhóm β -lactam với đặc tính quý nhờ ít bị kháng thuốc hơn penicillin và được đánh giá là an toàn hơn cho người bệnh. Các sản phẩm cephalosporin bán tổng hợp khác nhau đều được tổng hợp từ sản phẩm trung gian là axit 7-aminodeacetoxy-cephalosporanic (7-ADCA, xem mục 3). Sản phẩm 7-ADCA này có thể được tổng hợp từ penicillin G, từ axit 6-aminopenicillanic hay từ cephalosporin C (là một sản phẩm lên men tự nhiên), trong đó cho đến cuối thế kỷ XX con đường hiệu quả kinh tế nhất vẫn là tổng hợp từ penicillin G theo sơ đồ hình 2.11.



Hình 2.11. Sơ đồ tổng hợp hóa học axit 7-ADCA từ penicillin G

Từ sản phẩm 7-ADCA người ta dễ dàng acyl hóa bằng các mạch nhánh tương ứng để sản xuất ra các cephalosporin bán tổng hợp, trong đó bao gồm theo cả hai hướng là thay thế nhánh tại vị trí C_7' (thí dụ như cephalacin, cephradrin, cephadroxil...), hay thay thế đồng thời mạch nhánh tại cả hai vị trí C_3' và C_7' (như: cephalozin, cephatrizin, cefoperazon, cephamadol, cefotiam...).

2.5.4. Sản xuất các β -lactam bán tổng hợp có hoạt tính kìm hãm β -lactamaza

Bên cạnh các ứng dụng nêu trên, axit 6-aminopenicillanic còn được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất một số chế phẩm penicillin bán tổng hợp có cả hoạt tính kìm hãm β -lactamaza (thí dụ như oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin, flucloxacillin...), hay kết hợp sử dụng axit clavulanic hoặc axit olivanic làm mạch nhánh để làm tăng hiệu quả điều trị (hai axit này tuy có hoạt tính kháng sinh yếu, nhưng lại có hoạt tính kìm hãm β -lactamaza đặc hiệu) hoặc được sử dụng để sản xuất một số chất kìm hãm β -lactamaza (thí dụ như axit bromopenicillanic).

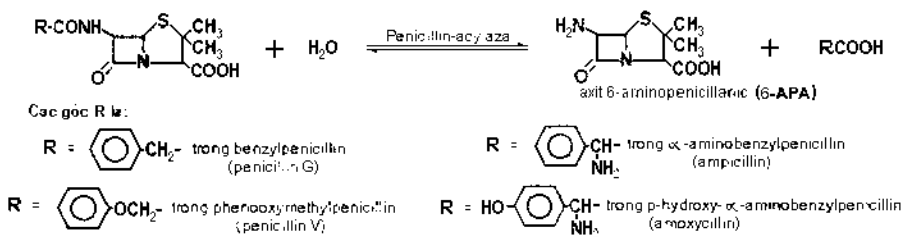
2.6. SẢN XUẤT VÀ ỨNG DỤNG PENICILLIN-ACYLAZA

2.6.1. Đại cương

Năm 1959 Bachelor cùng đồng nghiệp đã tách và xác định được đặc tính của axit 6-aminopenicillanic từ dịch lên men penicillin. Tiếp theo, có thể sử dụng axit này làm nguyên liệu để sản xuất ra nhiều loại penicillin bán tổng hợp khác nhau. Công trình này đã mở ra hướng phát triển mới to lớn cho công nghệ sản xuất chất kháng sinh bán tổng hợp họ β -lactam nói riêng và với toàn bộ ngành công nghiệp sản xuất chất kháng sinh nói chung. Axit 6-aminopenicillanic bao giờ cũng xuất hiện trong môi trường lên men penicillin. Tuy nhiên, việc lên men trực tiếp axit 6-aminopenicillanic không kinh tế do nồng độ cấu tử này trong dịch lên men rất thấp mà lại khó tách khi tinh chế. Vì vậy, trong sản xuất công nghiệp người ta lựa chọn con đường lên men sản xuất penicillin G (hoặc penicillin V), sau đó sử dụng enzym acylaza phân cắt mạch nhánh để thu axit 6-aminopenicillanic (xem sơ đồ hình 2.10). Việc sử dụng enzym acylaza trong thời kỳ đầu những năm 60 của thế kỷ XX còn gặp nhiều khó khăn do hiệu quả kinh tế thấp, bước sang thập kỷ 70 người ta đã sản xuất và ứng dụng hiệu quả chế phẩm enzym acylaza cố định vào

mục đích trên. Giải pháp chế phẩm cố định đã tạo ra bước đột phá về giá thành và ngày nay công nghệ sử dụng enzym acylaza đã trở thành công nghệ chủ đạo trong lĩnh vực này (trong đó enzym acylaza chủ yếu được sử dụng dưới một trong hai dạng là: chế phẩm enzym cố định hay chế phẩm tế bào cố định).

Enzym penicillinacylaza (hay penicillinamidaza) có tên khoa học là penicillin-amidohydrolaza (E.C.3.5.1.11), trong các danh pháp trên người ta sử dụng phổ biến hơn cả tên penicillin-acylaza. Enzym này xúc tác đồng thời cả hai phản ứng thuận và nghịch, với cân bằng phản ứng dịch chuyển phụ thuộc vào điều kiện môi trường (trong thực tiễn công nghiệp, người ta chỉ khai thác phản ứng theo chiều thuận; còn chiều ngược bị bỏ qua, do hiệu quả kinh tế thấp hơn nhiều so với phương pháp tổng hợp hóa học). Trong tự nhiên có rất nhiều loài vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp enzym penicillin acylaza. Các chủng công nghiệp có hoạt lực cao thuộc các loài: *E. coli* (Bayer A.G.), *Streptomyces lavendulae* (Beecham), *Alcaligenes faecalis* (Bristol-Myers), *Proteus rettgeri* (Pfizer)... Một đặc điểm thường thấy ở enzym này là: dường như enzym có nguồn gốc vi khuẩn thường tác dụng hiệu quả hơn khi cơ chất là penicillin G; song enzym từ nấm lại phản ứng đặc hiệu cao hơn trên cơ chất penicillin V. Dựa theo đặc điểm trên người ta thường gọi tên enzym kèm theo cơ chất chính của chúng, thí dụ, belzylpenicillinacylaza (tương ứng với penicillin G), phenoxymethylpenicillin-acylaza (tương ứng với penicillin V), D- α -aminobelzylpenicillin-acylaza (tương ứng với ampicillin)...



Hình 2.12. Phản ứng acyl hóa một số penicillin nhờ penicillinacylaza

2.6.2. Tuyển chọn chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzym penicillin-acylaza

Việc phân lập và tuyển chọn sơ bộ chủng vi sinh vật sinh tổng hợp enzym penicillinacylaza thường bắt đầu bằng tuyển chọn trong các chủng kháng penicillin, hay nuôi các vi sinh vật bằng môi trường chỉ chứa thức ăn khoáng và sử dụng benzylpenicillin (hoặc phenylacetic) làm nguồn thức ăn cacbon duy nhất, hay làm giàu vi sinh vật đất khi chỉ sử dụng phenooxyacetic và penicillin V làm nguồn cung cấp thức ăn cacbon và nitơ.

Các chủng phân lập được sau đó được tuyển chọn kỹ lưỡng, với việc áp dụng nhiều giải pháp kỹ thuật tạo giống và cải tạo hoạt lực chủng khác nhau để thu chủng công nghiệp (xem mục 1.3.1). Các giải pháp xử lý tạo biến chủng đã được sử dụng hiệu quả vào mục đích này như: xử lý tia cực tím, xử lý etylmethansulfonat (EMS), xử lý *n*-metyl-*n*-nitro-*n*-nitro-guanidin (NTG) hay áp dụng kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Trong quá trình tuyển chọn chủng phải kiểm tra thường xuyên nhằm loại bỏ các chủng có hoạt tính β -lactamaza. Đồng thời với quá trình tuyển chọn chủng, người ta phải tiến hành nghiên cứu đặc tính sinh lý và sinh hóa chủng, tìm kiếm nguồn nguyên liệu, thiết bị công nghệ và tối ưu hóa điều kiện lên men đến quy mô sản xuất công nghiệp (xem mục 1.3.2)

2.6.3. Sản xuất chế phẩm enzym penicillin-acylaza

Công nghệ sản xuất enzym penicillin-acylaza hiện nay bao gồm ba công đoạn chính là: lên men, xử lý dịch lên men và sản xuất chế phẩm enzym cố định. Với vi khuẩn *E. coli*, công đoạn lên men có thể tóm tắt qua các bước sau: biến chủng *E. coli* được giữ giống phục vụ sản xuất trong ống thạch nghiêng; từ môi trường trên, giống được cấy chuyển ra bình tam giác, nuôi hiếu khí trên máy lắc tròn với nước chiết mầm hạt 1,2%, pH=7, trong 24 giờ; tiếp theo, giống được nhân sang fermentor dung tích tăng dần, với tỉ lệ cấp giống 5%, cho đến khi đủ lượng giống cho lên men sản xuất. Một vài đặc

điểm chính của quá trình nhân giống và lên men là: phenylacetat được sử dụng làm chất cảm ứng (thường dưới dạng phenylacetatamon, bổ sung liên tục) và tránh mọi nguồn thức ăn cacbon khác, khuấy trộn và sục khí thấp ($0,4-0,9v_{kh}/V_{dịch,phút}$), nhiệt độ lên men trong khoảng 24-31°C, enzym penicillin-acylaza được tổng hợp cực đại sau khoảng 20 giờ lên men. Sau khi kết thúc quá trình lên men, người ta tiến hành xử lý ngay dịch lên men thu sinh khối rồi xử lý tiếp để thu enzym hay sử dụng trực tiếp toàn bộ các tế bào này làm nguyên liệu để sản xuất chế phẩm enzym cố định. Để xử lý thu enzym, có thể áp dụng một trong hai quy trình:

- Lọc dịch lên men thu sinh khối; nghiền tế bào bằng thiết bị nghiền phun đồng hóa cao áp; kết tủa loại bỏ axit nucleic và thành tế bào; kết tủa phân đoạn bằng amon sulfat và polyetylenglycol thu phân đoạn enzym; tách tinh chế tiếp qua cột diethylaminoethylcelluloza DEAE.
- Lọc dịch lên men thu sinh khối; nghiền tế bào bằng thiết bị nghiền phun đồng hóa cao áp; kết tủa tanin 20%; đồng hóa lại trong aceton lạnh; bổ sung tiếp aceton để kết tủa enzym; hòa tan lại trong nước; tách hấp phụ qua cột cacboxymethylcellulose CMC; rửa thu enzym nhờ đệm photphat pH=8,0.

Enzym penicillin-acylaza công nghiệp (phổ biến là benzylpenicillin-acylaza), sau đó được cố định vào chất mang thành dạng chế phẩm enzym cố định. Với mục tiêu này, trong thực tiễn các hãng sản xuất đã lựa chọn nhiều chất mang khác nhau (cả chất mang không tan trong nước và chất mang tan trong nước), trong đó sử dụng cả ba dạng kỹ thuật liên kết để cố định là: hấp phụ đơn giản hoặc hấp phụ và liên kết mạng lưới, liên kết cộng hóa trị hay sử dụng kỹ thuật nhốt giữ trong gel (xem bảng 4). Trong các giải pháp này, phương pháp hoạt hóa cyanogenbromit-Sephadex G-200 được xem là giải pháp có nhiều ưu điểm hơn về đặc tính lọc, độ ổn định và hiệu quả ứng dụng. Phương pháp tạo chế phẩm này bao gồm các công đoạn chính sau: ngâm qua đêm Sephadex G-200 trong nước đã khử hết ion để trương nở; sau đó bổ sung cyanogenbromit từ từ và khuấy nhẹ để tạo hạt gel, lọc tách và rửa kỹ gel bằng nước đã khử hết ion; ngâm gel qua đêm trong dung dịch enzym tinh khiết ở

pH=7,5, 4°C; cuối cùng lọc và rửa lại bằng nước đã khử ion thu chế phẩm enzym cố định. Trong kỹ thuật nhốt giữ enzym trên sợi triacetatcelluloza người ta tiến hành qua các bước chính là: pha dung dịch enzym penicillin-acylaza (trong đệm phosphat pH=8, có bổ sung glycerol 30%v/V, ở 4°C); khuấy đều và bổ sung nhỏ giọt từ từ triacetatcelluloza (hòa tan trước trong metylenclorit) để tạo nhũ tương. Khuấy đều hoàn toàn rồi để lắng 30 phút; sau đó nén phun thẳng dịch nhũ vào thùng chứa toluen để làm đông tụ triacetatcelluloza (qua cửa lỗ tạo sợi); vớt thu sợi, sấy chân không loại dung môi, xe các sợi nhỏ thành sợi lớn hơn, bện lại thành bó rồi đưa bảo quản ở 5°C chờ đưa đi sử dụng.

Chế phẩm enzym penicillin-acylaza ở dạng cố định toàn bộ tế bào vi sinh vật lần đầu tiên được sử dụng vào năm 1976. So với các chế phẩm khác, chế phẩm cố định toàn bộ tế bào có ưu điểm là khi chuẩn bị đã bỏ qua khâu tách và tinh chế enzym, nhưng nhược điểm là tính đặc hiệu thấp. Hạn chế này có thể khắc phục theo các hướng: tuyển chọn các chủng có hoạt lực cao và tính đặc hiệu phản ứng cao hơn; tối ưu hóa thiết bị và điều kiện lên men thu nhiều sinh khối hơn; và lựa chọn kỹ thuật bắt giữ có khả năng cải thiện và nâng cao năng lực sống sót cho tế bào nhằm kéo dài thời gian sử dụng. Để sản xuất chế phẩm enzym benzylpenicillin-acylaza dạng cố định tế bào người ta thường sử dụng vi khuẩn *E. coli* (chủng *E. coli* ATCC 11105 hay biến chủng *E. coli* K5/pHM 12). Các kỹ thuật nhốt bắt giữ tế bào tạo chế phẩm đã được sử dụng gồm: kết tủa đơn giản sử dụng polymer tổng hợp “Eudragit”, sử dụng gel alginat đã được xử lý hoạt hóa ion bề mặt bằng Ca^{2+} , tạo mạng polymer hóa methacrilamit, ngưng tụ polymer hóa polyurethan và ngưng tụ nhựa epoxy. Trong các giải pháp này, phương pháp ngưng tụ epoxy có ưu thế hơn ở năng lực và hiệu quả nhốt giữ, độ bền cơ học và thuận lợi khi hoàn nguyên chế phẩm. Kỹ thuật này tiến hành gồm các công đoạn sau: trộn các tiền chất tạo nhựa epoxy và chất phụ gia với dịch huyền phù sinh khối vi khuẩn, khuấy đều trong 36 giờ; bổ sung dịch canxi alginat và khuấy trộn đều; tiếp theo bổ sung gián đoạn dung dịch $CaCl_2$ để làm đông tụ lớp gel alginat trên bề mặt các hạt nhựa; tách thu hạt và sấy chân không làm khô; cuối cùng

ngâm lại hạt trong dung dịch đậm phốt phát để hòa tan phân alginat bên trong rồi lọc tách thu hạt chế phẩm.

Để sản xuất chế phẩm enzym phenoxymethylpenicillin-acylaza, người ta lại thường sử dụng các chủng nấm mốc có hoạt lực cao thuộc các giống *Fusarium*, *Penicillium*, *Pleurotus* và *Bovista*. Quy trình sản xuất chế phẩm enzym penicillin V-acylaza quy mô nhỏ, sử dụng nấm *Bovista plumbea* NRRL 3501 có thể tóm tắt gồm các bước chính: giống bảo quản được nuôi hoạt hóa trên môi trường Sabouraud-aga trong 14 ngày ở 24°C; chuyển cả bào tử và sợi nấm sang nhân giống tiếp trong bình tam giác nuôi trên máy lắc tròn ở 24°C, 96 giờ (trong môi trường cao nấm men 1%, glucoza 5% và các muối khoáng khác, pH=6,0); chuyển nhân giống tiếp trong fermentor 5 lít; sử dụng cùng môi trường, nuôi có sục khí và khuấy trộn ở 24°C, 96 giờ; kết thúc lên men lọc và làm trong dịch, làm lạnh dịch trong xuống nhiệt độ thấp và điều chỉnh về pH=4,5, hấp phụ enzym bằng betonit, tách thu betonit và rửa nhả bằng nước muối sinh lý pH=10,0, cô đặc chân không ở nhiệt độ 10°C, rồi đưa sang công đoạn sản xuất chế phẩm enzym cố định.

2.6.4. Sử dụng enzym penicillin-acylaza để sản xuất axit 6-aminopenicillanic

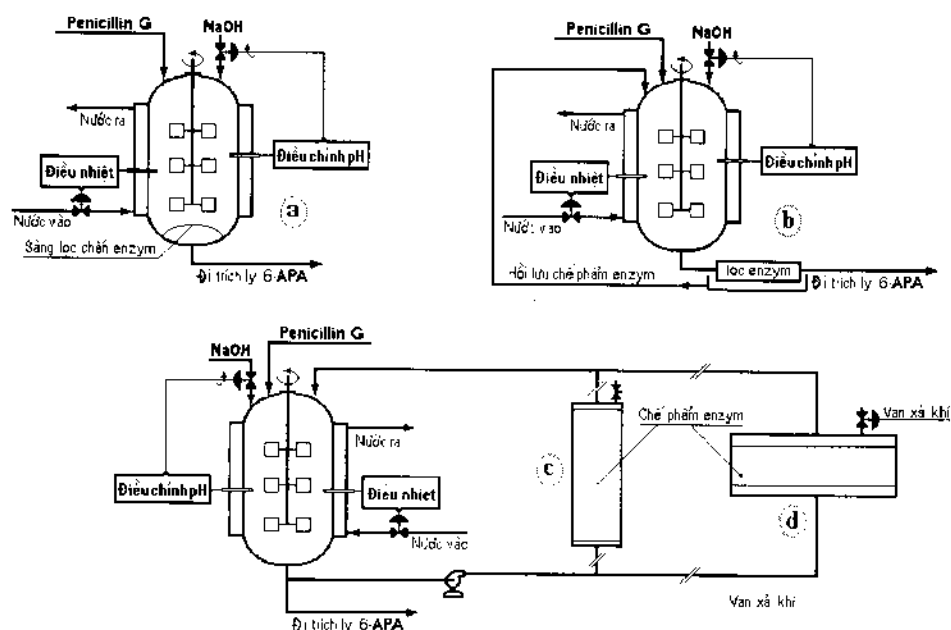
Công đoạn sản xuất axit 6-aminopenicillanic từ penicillin G (hoặc penicillin V) có thể phân làm hai bước chính là giai đoạn phản ứng thủy phân cơ chất và giai đoạn trích ly và tinh chế thu sản phẩm. Để thủy phân cơ chất có thể sử dụng nhiều kiểu thiết bị phản ứng khác nhau, được lựa chọn phù hợp với dạng chế phẩm enzym cố định sử dụng (hình 2.13). Yêu cầu chung của thiết bị phản ứng là phải có khả năng đảm bảo phân bố đồng đều và hiệu quả các cấu tử trong toàn thiết bị, đặc biệt là với lượng NaOH bổ sung để ổn định pH, trong điều kiện khuấy trộn hợp lý nhằm hạn chế phá vỡ cấu trúc cơ học enzym. Đồng thời có giải pháp công nghệ phù hợp để thu hồi, hoàn nguyên tái sử dụng chế phẩm enzym và hạn chế nhiễm tạp vi sinh vật trong quá trình phản ứng.

Bảng 2.3. Bản chất liên kết áp dụng để cố định enzyme benzylpenicillin-acylaza

Bản chất liên kết	Kỹ thuật áp dụng
Chất mang không tan trong nước - Hấp phụ giản đơn - Hấp phụ với enzyme đã được xử lý làm tăng lực hấp phụ - Hấp phụ và liên kết mạng - Liên kết cộng hóa trị - Nhốt giữ trong gel	- Hấp phụ enzyme bằng ngâm trực tiếp bột bentonit và diatomit, pH=6,2-6,3 trong thời gian 1 giờ (Hãng Snam Progetti) - Xử lý enzyme bằng anhydric suxinic (hoặc anhydric malic), sau đó hấp phụ bằng DEAE-Sephadex (Hãng Otsuka) - Tạo liên kết đồng hóa trị với glutaraldehyt và hấp phụ trên nhựa polymetacrylat (nhựa Amberlite XAD-7; Hãng Beecham) ở pH=5,0 - Xử lý hoạt hóa bằng cyanogenbromit CNBr để gắn vào Sephadex G-200 (Hãng Asrra) hay gắn vào dextran (Hãng Bayer) - Xử lý hoạt hóa anhydrit để liên kết vào polymer hỗn hợp; gồm acrylamit, anhydrit maleic và N, N'-metylen-bis-acrylamit - Nhốt giữ trong gel polyacrylamit (Hãng Tanabe Sci-yaku; Hãng Squibb), hay nhốt trong gel triacetatcelluloza (Hãng Pharmaceutical Industries; Hãng Snam Progetti)
Chất mang tan trong nước - Liên kết cộng hóa trị	- Xử lý hoạt hóa bằng cyanogenbromit CNBr để liên kết vào polymer hỗn hợp tan trong nước giữa Saccaroza và epichlohydrin - Xử lý hoạt hóa anhydrit để liên kết vào polymer hỗn hợp kỵ nước giữa etylen anhydric maleic và <i>n</i>-octadecylamin

Trong thiết bị phản ứng dạng huyền phù (hình 14a và 14b) người ta trộn chế phẩm enzyme vào trong dung dịch cơ chất, khuấy trộn nhẹ dung dịch và

khống chế nghiêm ngặt điều kiện phản ứng ở 35-37°C, pH=7,8-8,0 (bằng dung dịch NaOH). Kết thúc phản ứng, dịch được thu đưa sang công đoạn trích ly tinh chế sản phẩm, còn chế phẩm enzym được giữ lại để thủy phân tiếp mẻ sau (bằng sàng chặn đơn giản hay lọc thu hồi). Thiết bị phản ứng kiểu phin lọc thường được áp dụng phổ biến hơn với chế phẩm enzym cố định dạng sợi nhót giữ enzym triacetatcelluloza (hình 14b và 14c). Kích thước phin lọc được tính toán sao cho trong quá trình vận hành thời gian lưu của dịch trong phin đủ nhỏ nhằm tránh xuất hiện sự giảm pH cục bộ do axit tạo thành, trong điều kiện giám sát biến đổi trở lực lọc giới hạn cho phép, đảm bảo không làm ảnh hưởng lớn đến cấu trúc chế phẩm.



Hình 2.13. Một số dạng thiết bị acyl hóa trong sản xuất axit 6-aminopenicillanic

Dịch phản ứng thủy phân sau khi tách thu hồi chế phẩm enzym được làm lạnh nhanh xuống nhiệt độ thấp (khoảng 4°C), điều chỉnh về pH=2,5 bằng

dung dịch HCl rồi sử dụng methyl-izobutylceton (0,5v/V) để trích ly phenylacetic và penicillin G dư. Sau khi tách phân pha loại dung môi, sử dụng dung dịch NaOH điều chỉnh pH pha nước về pH=7,8 rồi cô chân không ở nhiệt độ thấp (dưới 35°C) đến nồng độ 6-APA khoảng (12-15)%. Tiếp theo, sử dụng HCl điều chỉnh pH dịch đặc về điểm đẳng điện của 6-APA ở pH=4,3 để kết tinh. Tinh thể axit 6-aminopenicillanic được rửa nhanh bằng nước, làm khô bằng aceton rồi sấy chân không ở nhiệt độ thấp đến khô hoàn toàn. Nếu kiểm soát tối ưu điều kiện thủy phân, điều kiện trích ly và kết tinh, có thể đạt hiệu suất thủy phân penicillin tới 94-96% và hiệu suất thu hồi axit 6-aminopenicillanic tới 94%.

3 CÔNG NGHỆ LÊN MEN CEPHALOSPORIN VÀ CEPHAMYCIN

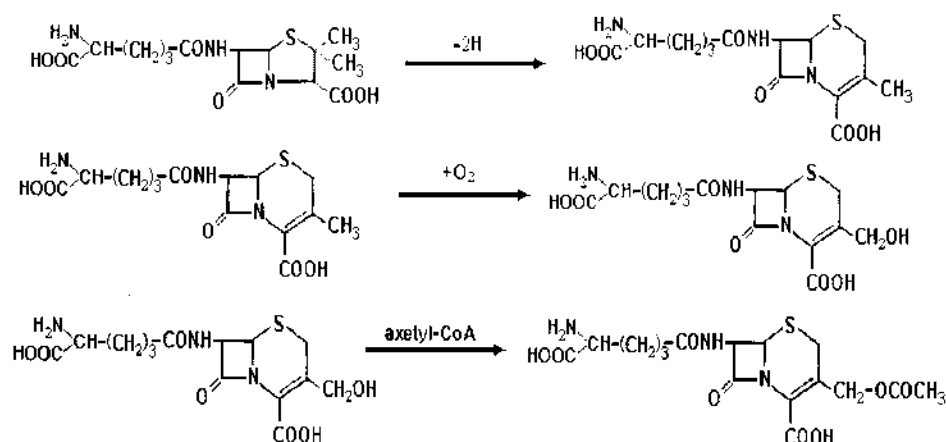
3.1. ĐẠI CƯƠNG

Cephalosporin và cephamycin thuộc họ chất kháng sinh có cấu trúc vòng chính gồm vòng β -lactam liên kết với vòng dihydrotiazin (hình 3.1). Ngày nay, người ta đã phát hiện được nhiều loài nấm, xạ khuẩn và vi khuẩn khác nhau có khả năng tổng hợp cephalosporin; nhưng khả năng tổng hợp cephamycin mới chỉ tìm thấy ở xạ khuẩn và một vài chủng *Norcardia*.

Tên kháng sinh	R ₁	R ₂	R ₃
Cephalosporin C	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	-H	$-\text{OCOCH}_3$
Desacetoxycephalosporin C	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	-H	-H
C-1778a	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-$	-H	-H
C-1778b	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-$	-H	-OH
C-1778c	$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-$	-H	$-\text{OCOCH}_3$
Cephamecin A	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{OCOC}-\text{CH}(\text{OCH}_3)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$
Cephamecin B	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{OCOC}-\text{CH}(\text{OCH}_3)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$
Cephamecin C	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{OCOC}-\text{CH}(\text{OCH}_3)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OSO}_3\text{H})_2$
C-2801X	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{OCOCH}-\text{CH}(\text{OCH}_3)-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OSO}_3\text{H})_2$
Oganomycin G	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{S}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{CH}_3$
Oganomycin F	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{S}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{SCH}_2\text{COOH}$
Oganomycin H	$\text{HOOC}-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	$-\text{OCH}_3$	$-\text{S}-\text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3-\text{CH}_3$

Hình 3.1. Một vài sản phẩm cephalosporin và cephamycin lên men tự nhiên

Chất kháng sinh điển hình cho họ này là cephalosporin C được Newton và Abraham phát hiện năm 1956 (Nagarajan và đồng nghiệp phát hiện được cephamycin muộn hơn, vào năm 1971). Ưu điểm lớn của cephalosporin C là có tác dụng kháng khuẩn đối với cả các cầu khuẩn có hoạt tính β -lactamaza, nhiều vi khuẩn Gram âm và hầu như không độc (liều tiêm dưới da LD_{50} là 4g/kg thể trọng). Để sản xuất cephalosporin C, người ta thường sử dụng các chủng xạ khuẩn có hoạt lực cao của loài *Cephalosporium acremonium*. Cơ chế quá trình tổng hợp cephalosporin C cũng qua sản phẩm trung gian penicillin N (xem phần “Công nghệ lên men penicillin”) rồi chúng được chuyển hóa tiếp tục theo sơ đồ hình 3.2. Tiếp theo, cephalosporin C qua quá trình metoxyl hóa tại vị trí C_7 sẽ hình thành cephamycin. Điểm đặc biệt của quá trình hình thành cephalosporin C là mạch nhánh α -aminoadipyl liên kết đặc hiệu hơn với vòng β -lactam (hoặc chính các chủng này không có enzym acyltransferaza), nên việc sử dụng các tiền chất tạo nhánh thay thế trong quá trình lên men nhằm thu nhận các cephalosporin khác hầu như không thu được hiệu quả đáng kể.

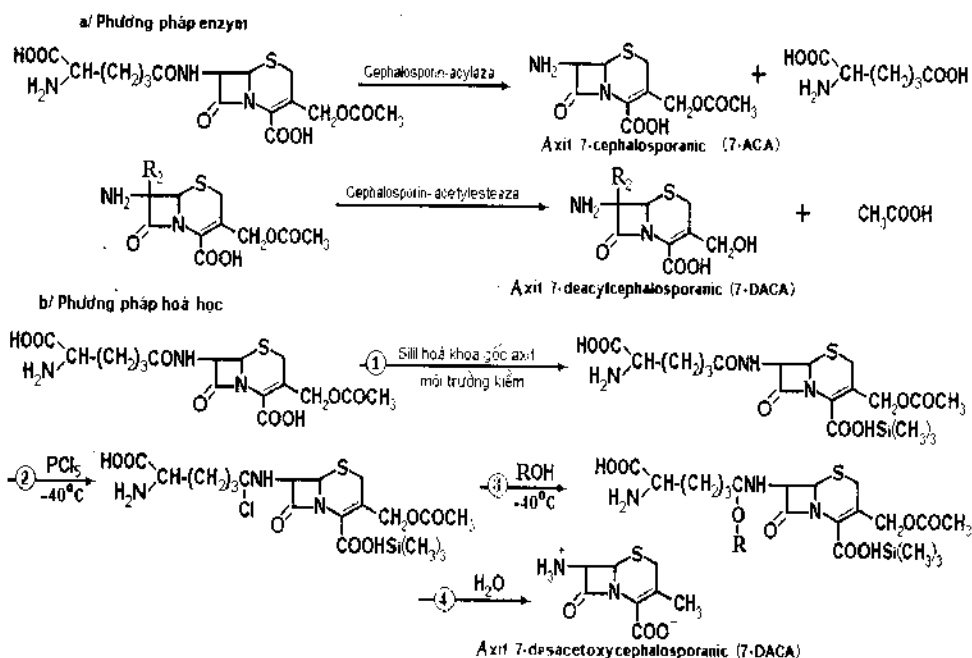


Hình 3.2. Cơ chế tổng hợp cephalosporin C (giai đoạn cuối từ penicillin N)

3.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Cũng như với hầu hết các chất kháng sinh khác, công nghệ lên men sản xuất cephalosporin C được các hãng bảo mật. Về nguyên lý công nghệ, quá trình lên men cephalosporin C có nhiều điểm tương đồng với công nghệ lên men sản xuất penicillin, với việc sử dụng các chủng công nghiệp hoạt lực cao, thành phần môi trường và các thông số công nghệ lên men được tối ưu hóa... Sau đó, từ cephalosporin C, bằng phương pháp enzym hoặc phương pháp tổng hợp hóa học, có thể tổng hợp được axit 7-amino-cephalosporanic (7-ACA) hay axit 7-aminodeacetoxycephalosporanic (7-ADCA - hình 3.3). Từ sản phẩm trung gian này có thể sản xuất ra nhiều chế phẩm cephalosporin bán tổng hợp khác. Tuy nhiên, việc nghiên cứu hoàn thiện và triển khai sản xuất công nghiệp cephalosporin C gặp khó khăn hơn nhiều so với quá trình lên men sản xuất penicillin. Năng lực tích tụ cephalosporin (hay cephamycin) của các chủng gốc thường rất thấp và việc tuyển chọn, cải tạo hoạt tính chủng trong khoảng thời gian dài chưa tạo ra được các chủng có năng lực siêu tổng hợp cao như mong muốn. Đồng thời, các chủng lên men cephalosporin dường như không có hoạt tính enzym acyltransferaza nên việc sử dụng tiền chất tạo nhánh nhằm thay đổi phổ sản phẩm tạo thành trong quá trình lên men cephalosporin không mang lại kết quả đáng kể. Trong khi đó, bằng phương pháp hóa học từ penicillin G (hay penicillin V) người ta dễ dàng thu được axit 7-ADCA với hiệu quả kinh tế cao hơn so với từ cephalosporin C (hình 2.11). Đây cũng có thể là một trong những nguyên nhân làm cho việc nghiên cứu tìm kiếm cephalosporin hay cephamycin tự nhiên mới và việc hoàn thiện công nghệ lên men hai họ kháng sinh này trong khoảng thời gian dài không được triển khai mạnh mẽ như nhiều họ sản phẩm kháng sinh khác. Khoảng hai mươi năm gần đây, việc áp dụng các kỹ thuật tạo chủng tiên tiến, các phương pháp nghiên cứu hiện đại sử dụng trang thiết bị phân tích có độ chính xác cao đã cho phép khám phá ra cơ chế phân tử của quá trình lên men; phối hợp với việc áp dụng kỹ thuật vận hành và điều chỉnh quá trình lên men hiện đại, đã mở ra triển vọng mới cho nhóm sản phẩm này. Vì vậy, hướng nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện công nghệ lên men cephalosporin tự nhiên trong vài năm gần đây đã lại được tiếp tục triển khai.

Các sản phẩm cephalosporin bán tổng hợp bao gồm cả nhóm sản phẩm acyl hóa gốc 7-amin và nhóm sản phẩm thay thế gốc acetoxy- ở vị trí C³; công thức hóa học của một số sản phẩm bán tổng hợp thương mại phổ dụng được giới thiệu trong hình 18. Về cấu trúc, cephalosporin và cephamycin cùng thuộc nhóm kháng sinh β -lactam nên chúng có cùng cơ chế tác dụng lên quá trình tổng hợp thành tế bào của mầm bệnh, tương tự như penicillin. Tuy nhiên, so với trường hợp penicillin, người ta đã phát hiện thấy có sự khác biệt về loại protein đặc hiệu trên màng liên kết với cephalosporin và cephamycin. Về hoạt tính kháng khuẩn, ngoài phổ kháng khuẩn rộng trên các vi khuẩn Gram dương, nhiều kháng sinh nhóm này tác dụng lên cả một số vi khuẩn Gram âm và một số khác tác dụng hiệu quả lên cả các chủng vi khuẩn có hoạt tính β -lactamaza điển hình.



Hình 3.3. Sơ đồ phản ứng biến đổi cephalosporin C thành axít 7-ADCA

<i>Danh pháp kháng sinh</i>	R_1	R_2	R_3
Cephalothin		-H	-OCOCH ₃
Cephalexin		-H	-H
Cephaloridin		-H	-N
Cefoxitin		-OCH ₃	-OCONH ₂
Cefuroxime		-H	-OCONH ₂
Cefotaxime		-H	-OCOCH ₃

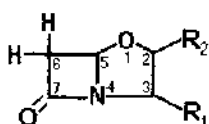
Hình 3.4. Cấu trúc một số kháng sinh cephalosporin bán tổng hợp phổ dụng

4 CÔNG NGHỆ LÊN MEN AXIT CLAVULANIC

4.1. ĐẠI CƯƠNG

Axit clavulanic là một kháng sinh tự nhiên được Brown và đồng nghiệp phát hiện năm 1976 (Napier và đồng nghiệp cũng phát hiện ra năm 1981, độc lập với nhóm của Brown). Axit này là một kháng sinh phổ rộng, tác dụng lên nhiều loài vi khuẩn, bao gồm cả vi khuẩn Gram dương và vi khuẩn Gram âm, nhưng hoạt tính kháng khuẩn của chúng rất yếu. Tuy nhiên, axit clavulanic lại có ưu thế đặc biệt nhờ hoạt tính kháng β -lactamaza cao. Vì vậy, khi sử dụng phối hợp axit clavulanic với một kháng sinh phổ rộng khác thì chế phẩm phối hợp này lại rất hiệu quả để điều trị cả đối với các loài vi khuẩn có hoạt tính β -lactamaza. Thí dụ, khi sử dụng riêng ampicillin thì liều MBC trên *Staphylococcus aureus* là 500 μ g/ml, song nếu sử dụng phối hợp với axit clavulanic ở nồng độ 5 μ g/ml thì liều MBC hiệu quả giảm xuống chỉ cần 0.1 μ g/ml. Ngày nay, người ta đã phát hiện được sáu sản phẩm lên men tự nhiên khác tương tự với axit clavulanic và xếp chung chúng vào nhóm clavam (hình 4.1).

Ngày nay, người ta đã phân lập và tuyển chọn được nhiều chủng vi sinh vật có khả năng tích tụ lượng đáng kể axit clavulanic, thí dụ như *Streptomyces clavurigerus* ATCC 27064 (Beecham Laboratories), *S. clavurigerus* NRRL 3585 (Lilly Research Laboratories), *S. Jumonjinensis* FERM No. 1545 (Sankyo Corp.), *S. Katsurahamanus* FERM No. 3944 (Takeda Chemical Industries Ltd.), *S. sp.* FERM No. 2804 (Sankaru-Ocean Co. Ltd.)...

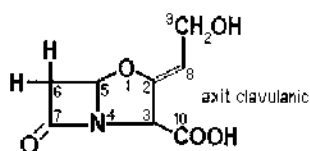


Danh pháp không sinh

Axit clavulanic
 Axit β -hydroxypropionylclavulanic
 Axit clavam-2-carboxylic
 2-Hydroxymethylclavam
 2-formyloxymethylclavam
 2-(3-Alanyl)-clavam
 2-(2-Hydroxyethyl)-clavam

R₁

-COOH
 -COOH
 -H
 -H
 -H
 -H
 -H



R₂

=CHCH₂OH
 =CHCH₂COCH₂CH₂OH
 -COOH
 -CH₂OH
 -CH₂OCHO
 -CH₂CH(NH₂)COOH
 -CH₂CH₂OH

Hình 4.1. Cấu trúc các kháng sinh clavam tự nhiên

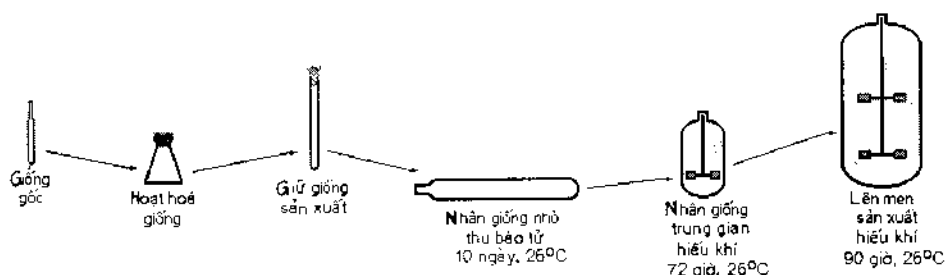
Về cấu trúc, tương tự penicillin và cephalosporin, trong phân tử axit clavulanic cũng chứa vòng β -lactam. Mặt khác, trong môi trường lên men tổng hợp axit clavulanic, xạ khuẩn *Streptomyces clavuligerus* thường tích tụ đồng thời một vài clavam khác, một số dẫn xuất cephalosporin và penicillin N. Có điều, người ta vẫn chưa phát hiện thấy mối liên quan nào về cơ chế sinh tổng hợp axit clavulanic với hai nhóm chất này. Bằng cách sử dụng nguồn dinh dưỡng ¹³C đánh dấu, người ta đã xác định được nguyên tố cacbon tại các vị trí C², C³, C⁸, C⁹ và C¹⁰ là từ acetat trong chu trình *Crebs*, còn các nguyên tố C⁵, C⁶ và C⁷ là từ glycerin. Ngoài ra, người ta cũng đã xây dựng được bản đồ gen của *Streptomyces clavuligerus* và xác định được gen mã hóa sinh tổng hợp axit này phân bố trên nhiễm sắc thể.

4.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Về công nghệ, quy trình lên men sản xuất axit clavulanic sử dụng chủng *S. clavuligerus* ATCC 27064 (hoặc chủng *S. clavuligerus* NRRL 3858) quy mô pilot 2000 lít của Hãng Beecham Laboratories Ltd. gồm những công đoạn chính sau đây:

Giống xạ khuẩn đầu tiên được nuôi hoạt hóa trong bình tam giác trên máy lắc tròn 240 vòng/phút, ở 26°C, trong thời gian 3-5 ngày, sử dụng môi trường *Bennett's* (gồm glucoza 1%, nước chiết thịt bò 0,1%, nước chiết nấm men 0,1%, N-Z amin A 0,2% và agar-agar 1,5%, pH=7,3). Kết thúc lên men, kiểm tra hoạt tính tích tụ axit clavulanic (bằng phương pháp sinh học, phương pháp enzym hoặc bằng HPLC), chọn các canh trường tốt để thu bào tử rồi đem xử lý đông khô bảo quản (hay bảo quản trong cát, trong đất và bảo quản lạnh trên môi trường ống thạch nghiêng).

Bào tử giống từ môi trường bảo quản được chuyển bằng nước vô trùng sang bình roux, nuôi trên môi trường đặc ở 26°C, trong 10 ngày; sau đó chuyển sang nhân giống trung gian trong fermentor 100 lít (chứa 75 lít dịch lên men), nuôi hiếu khí ở 26°C, 72 giờ, tốc độ khuấy 140 vòng/phút, lưu lượng khí cấp $1V_{\text{khí}}/V_{\text{dịch}}$. Thành phần môi trường lên men gồm: bột đậu tương 1%, dextrin 2%, dầu phà bột 0,03% $V_{\text{dịch}}$ (dung dịch 10% pluronic L81, là polymer kích thước lớn từ etylenoxyt và propylenoxyt, pha trong dầu đậu tương; có thể thay thế dầu đậu tương bằng dầu lạc, dầu ngô hay mỡ lợn, nhưng hiệu quả kém hơn).



Hình 4.2. Sơ đồ công nghệ lên men axit clavulanic (theo Beecham Ltd.)

Thiết bị lên men PILOT 2.000 lít được chế tạo bằng thép chịu an mòn; khuấy trộn nhờ hai tầng cánh khuấy kiểu bơi chèo, mỗi tầng gồm sáu cánh khuấy, tỉ lệ $D_{\text{cánh khuấy}}/D_{\text{thùng}}$ là 0,43. Môi trường lên men gồm bột đậu tương

1,5%; glycerin 1,0%; KH_2PO_4 0,01% và dầu phá bọt 0,02% $V_{\text{dịch}}$ (dung dịch pluronic 10% trong dầu đậu tương). Việc thay thế glycerin bằng dầu lạc, dầu ngô hay mỡ lợn có thể thu được kết quả cao hơn, nhưng hiệu suất cao nhất là sử dụng Prichem P224 (triglycerit của hỗn hợp axit béo trong đó có 65% là axit oleic). Dịch lên men được đổ đầy vào thiết bị, ở mức 1.500 lít, điều chỉnh về pH=7,0 rồi được thanh trùng trực tiếp bằng hơi quá nhiệt ở 121°C, trong thời gian 30 phút. Sau đó, làm nguội rồi cấy chuyển toàn bộ 5 lít dịch giống sang. Quá trình lên men hiếu khí được tiến hành ở 26°C, tốc độ khuấy 106 vòng/phút, lưu lượng cấp khí $0,75V_{\text{khí}}/V_{\text{dịch}}$.phút. Trong điều kiện lên men mô tả trên, hàm lượng axit clavulanic thường đạt giá trị cao nhất khoảng 500µg/ml sau 90 giờ lên men.

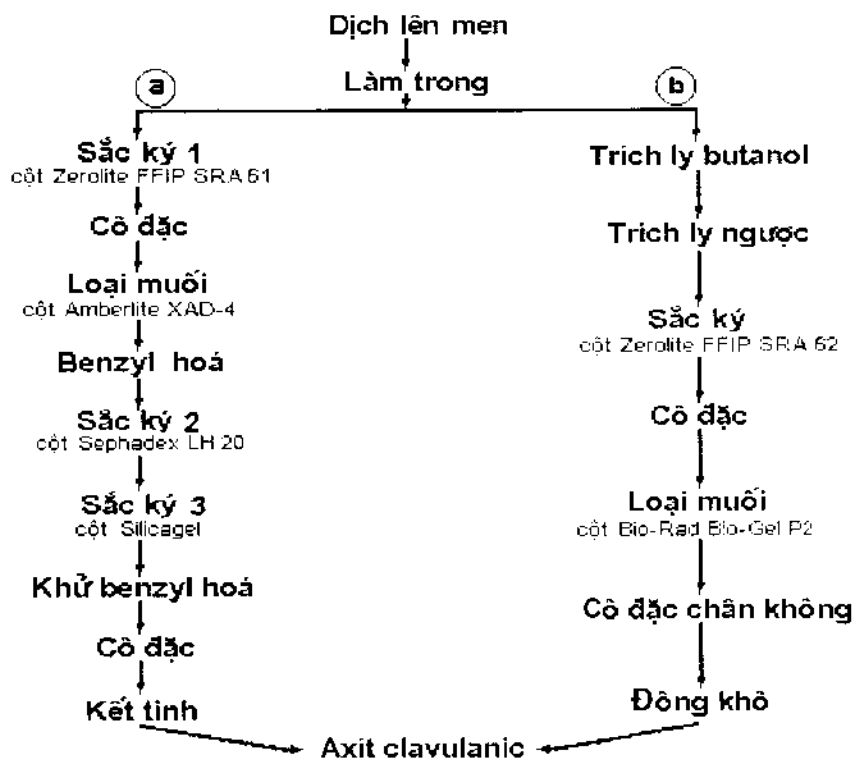
Bảng 4.1. Thành phần môi trường lên men axit clavulanic

Chủng xạ khuẩn	Thành phần môi trường lên men
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Bột đậu tương 3,0%, tinh bột tan 4,7%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, KH_2PO_4 0,01% và silicon phá bọt 0,05% $V_{\text{dịch}}$ (theo bằng sáng chế số 1.543.563, Vương quốc Anh)
<i>S. jumonjinensis</i>	Bột đậu tương 1%, glucoza 2%, CaCO_3 0,2%, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,001%, Na_2SO_4 0,5% và dầu phá bọt 0,5% (theo bằng sáng chế số 1.563.103, Vương quốc Anh)
<i>Streptomyces katsuahamanus</i>	Bột đậu tương 1,5%, bột hạt bông 1,5%, glucoza 3%, tinh bột ngũ cốc 3%, pH=6,5 (theo bằng sáng chế số 53-104796, Nhật Bản)

Axit clavulanic là sản phẩm ngoại bào. Vì vậy, sau khi kết thúc lên men người ta lọc hay ly tâm loại bỏ sinh khối và thu dịch trong. Tiếp theo, dịch lọc trong có thể được xử lý tiếp bằng hấp phụ trên than hoạt tính rồi nhả bằng dung dịch aceton nước 90%; hấp phụ trên cột nhựa Diaion PA 306 (hay trên nhựa Zerolite FFIP SRA61), nhả bằng dung dịch NaCl rồi tách loại muối qua

cột Amberlite X-4 (hoặc qua cột nhựa Hokeutsu HS); hoặc trích ly ở pH=2 bằng butanol và trích ly lại bằng nước ở pH=7 để thu dịch axit clavulanic thô. Lượng clavulanic thô được tinh chế lại để thu axit clavulanic tinh khiết, bằng áp dụng nhiều giải pháp công nghệ khác nhau (phổ biến là tách sắc ký với một số loại cột tách và tất cả mọi giải pháp đều trải qua rất nhiều công đoạn). Sơ đồ hình 4.3 mô tả tóm tắt hai phương pháp tách axit clavulanic, quy mô sản xuất, bao gồm các công đoạn chính là:

- a. Dịch lên men sau khi làm trong được axit hóa xuống pH axit (pH=6,2) rồi được chạy qua cột nhựa trao đổi ion mạnh Zerolite FFIP SRA 61; sau đó, chạy nhả khỏi cột bằng dung dịch NaCl 1,0M ở nhiệt độ thấp 0- 5°C; gom các phân đoạn có hoạt tính được cô đặc, chạy tách loại muối qua cột nhựa Amberlite XAD-4 (5°C, pH=6,2) rồi lại nhả bằng nước tinh khiết (5°C) và cô đặc; tiếp theo, chuyển axit clavulanic sang dạng benzyl este bằng xử lý với benzylbromit trong môi trường có chứa dimetylformamit ở 4°C; chạy tách sắc ký qua cột Sephadex LH 20 (sử dụng dung môi tách là cyclohexan:cloroform = 1v:1v); tách tiếp qua cột Silicagel (với dung môi tách là cyclohexan:etylacetat = 1v:1v) để thu dịch benzyl clavulanat tinh sạch; khâu cuối cùng là chuyển benzyl clavulanat sang dạng natri clavulanat bằng cách xử lý trong môi trường nước chứa NaHCO₃ và 10% than paladi, lọc tách dịch trong để cô đặc và kết tinh thu sản phẩm.
- b. Dịch lên men sau khi làm trong được làm lạnh nhanh xuống 2-5°C và axit hóa xuống pH axit mạnh (pH=2,0) và trích ly bằng *n*-butanol (tỉ lệ dung môi : nước = 0,75; sử dụng thiết bị phân ly liên tục kiểu ly tâm nhiều tầng); sau đó, trích ly lại bằng 1/20v nước ở pH=7, hòa tan 20% NaCl. Dịch trích ly lại được chạy tách qua cột nhựa trao đổi ion Permutit zerolit FFIP SRA 62 và nhả tách bằng dung dịch NaCl với trường nồng độ biến thiên (0-0,35)M. Các phân đoạn tách có hoạt tính được gom tập trung, cô đặc rồi được chạy loại muối qua cột Bio-Rad Bio-Gel P2 và nhả tách bằng 1% *n*-butanol (hoặc loại muối bằng cột Amberlite XAD-4, nhả bằng nước đã khử ion, pH 7). Dung dịch axit clavulanic được cô chân không loại phần lớn dung môi; sau đó, làm đông khô thu sản phẩm dạng bột.



Hình 4.3. Sơ đồ tóm tắt công nghệ tách và tinh chế axit clavulanic

Axit clavulanic là một kháng sinh yếu nhưng lại có hoạt tính kháng β -lactamaza điển hình nên được ứng dụng rộng rãi trong điều trị ở dạng phối hợp với một kháng sinh nhóm β -lactam khác. Sản phẩm điều trị phổ biến nhất là dạng phối hợp giữa kali clavulanat với amoxycillin dưới tên thương mại *Augmentin* (sản phẩm bảo hộ độc quyền của Hãng Beecham Research Laboratories, đăng ký bảo hộ 1981, với tỉ lệ ban đầu là kali clavulanat /amoxycillin trihydrat = 1:2 theo khối lượng. Tỉ lệ áp dụng hiện nay thường thay đổi trong khoảng 1: 2-4). *Augmentin* là thuốc kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng; tác dụng trên nhiều loài vi khuẩn, bao gồm cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm, cả hiếu khí và yếm khí; được cấp cho bệnh nhân phổ biến qua đường uống (hoặc tiêm) để điều trị các hội chứng nhiễm khuẩn thường đường hô hấp trên, đường hô hấp dưới, đường tiêu hóa...

5 CÔNG NGHỆ LÊN MEN KHÁNG SINH AMINOGLYCOZIT

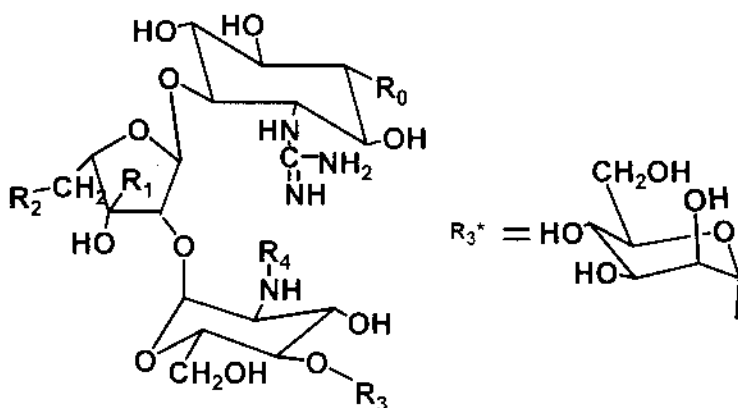
5.1. ĐẠI CƯƠNG

Aminoglycozit là một họ gồm rất nhiều chất kháng sinh khác nhau (riêng số lượng kháng sinh aminoglycozit tự nhiên đã vượt quá 150 chất) với đặc điểm chung trong cấu trúc phân tử gồm hai thành phần chính là các nhóm amin liên kết với gốc glycozit. Phần lớn các chất kháng sinh aminoglycozit đều dễ tan trong nước, có phổ kháng khuẩn rộng, bền nhiệt và bền pH. Ngoài ra, với nhiều kháng sinh thuộc nhóm này, các chủng vi sinh vật sinh tổng hợp kháng sinh thường tích tụ đồng thời một họ gồm nhiều chất có cấu trúc rất gần gũi nhau. Trên phương diện ứng dụng, mặc dù nhiều kháng sinh aminoglycozit còn có những hạn chế nhất định (khả năng hấp thu qua đường tiêu hóa kém, ảnh hưởng xấu đến chức năng tai và thận...), nhưng nhờ ưu thế về hoạt tính kháng khuẩn và bền vững trong môi trường nên nhìn chung, các chất kháng sinh họ aminoglycozit được chỉ định điều trị rộng rãi đối với nhiều bệnh nhiễm trùng khác nhau. Một vài kháng sinh phổ dụng điển hình là: streptomycin (Waksman tách từ dịch lên men của xạ khuẩn *Streptomyces griseus*; New Jersey Agricultural Experiment Station of Rutgers Univ., USA, 1944) trong điều trị mầm bệnh lao *Mycobacterium tuberculosis*, kanamycin trong điều trị nhiều loài vi khuẩn gây bệnh Gram âm, gentamycin trong điều trị các bệnh do *Pseudomonas*... Ngoài ra, một số kháng sinh nhóm này còn được ứng dụng trong nông nghiệp.

Dựa theo đặc điểm cấu trúc phân tử, họ kháng sinh aminoglycozit có thể phân chia thành ba nhóm chính là:

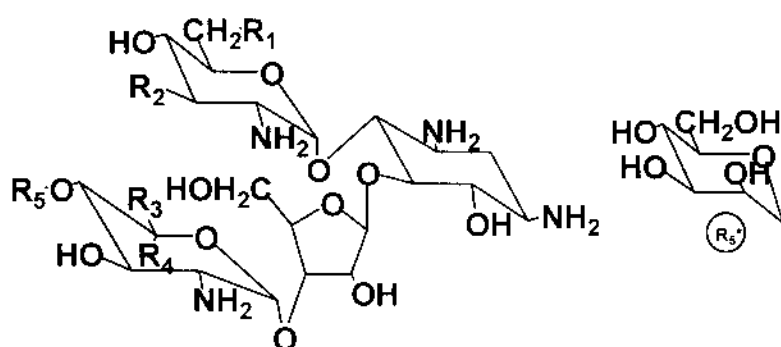
- Nhóm kháng sinh aminoglycozit chứa streptamin và dẫn xuất với aminocyclitol;
- Nhóm kháng sinh aminoglycozit chứa cyclitol và monoamino-cyclitol; và
- Nhóm kháng sinh aminoglycozit không chứa cyclitol.

Cấu trúc phân tử của một số chất kháng sinh aminoglycozit được mô tả trong hình 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6. và 5.7.



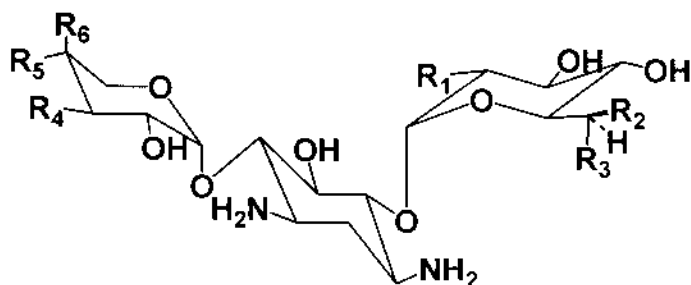
Tên kháng sinh	R ₀	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1 Streptomycin	-NHC(=NH)NH ₂	-CHO	-H	-H	-CH ₃
2 Dihydrostreptomycin	-NHC(=NH)NH	-CH ₂ OH	-H	-H	-CH ₃
3 Mannosidostreptomycin	-NHC(=NH)NH ₂	-CHO	-H	(-R ₃ [*])	-CH ₃
4 N-Demethylstreptomycin	-NHC(=NH)NH ₂	-CHO	-H	-H	-H
5 Hydroxystreptomycin	-NHC(=NH)NH ₂	-CHO	-OH	-H	-CH ₃
6 Mannoxydohydroxystreptomycin	-NHC(=NH)NH ₂	-CHO	-OH	(-R ₃ [*])	-CH ₃
7 Bluensomycin	-OCONH ₂	-CH ₂ OH	-H	-H	-CH ₃

Hình 5.1. Cấu trúc một vài kháng sinh nhóm streptomycin



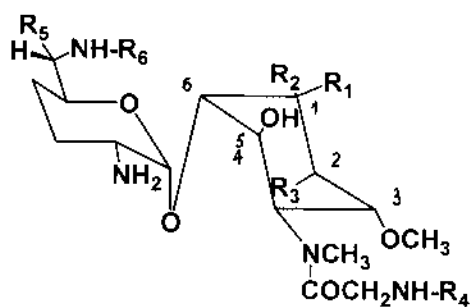
Tên kháng sinh	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1 Neomycin B	-NH ₂	-OH	-H	-CH ₂ NH ₂	-H
2 Streptothricin B1	-NH ₂	-OH	-CH ₂ NH ₂	-H	-H
3 Paromycin I	-OH	-OH	-H	-CH ₂ NH ₂	-H
4 Paromycin II	-OH	-OH	-CH ₂ NH ₂	-H	-H
5 Lividomycin A	-OH	-H	-H	-CH ₂ NH ₂	(R ₅ [*])
6 Lividomycin B	-OH	-H	-H	-CH ₂ NH ₂	-H
7 Mannosylparomomycin	-OH	-OH	-H	-CH ₂ NH ₂	(R ₅ [*])

Hình 5.2. Cấu trúc một vài kháng sinh nhóm neomycin



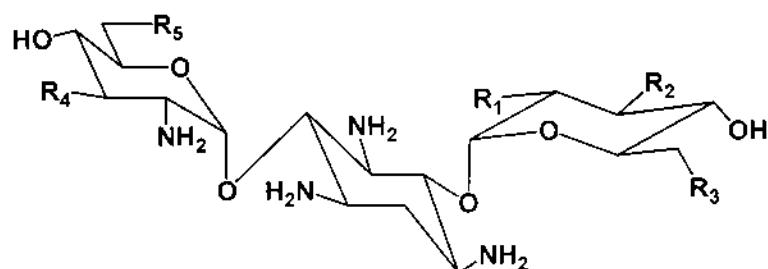
Tên kháng sinh	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1 Gentamycin A	-NH ₂	-H	-OH	-NHCH ₃	-OH	-H
2 Gentamycin A1	-NH ₂	-H	-OH	-NHCH ₃	-H	-OH
3 Gentamycin A2	-NH ₂	-H	-OH	-OH	-OH	-H
4 Gentamycin A3	-OH	-H	-NH ₂	-NHCH ₃	-H	-OH
5 Gentamycin A4	-NH ₂	-H	-OH	-NCH ₃ CHO	-OH	-H
6 Gentamycin B	-OH	-H	-NH ₂	-NHCH ₃	-CH ₃	-OH
7 Gentamycin B1	-OH	-CH ₃	-NH ₂	-NHCH ₃	-CH ₃	-OH
8 Gentamycin X2	-NH ₂	-H	-OH	-NHCH ₃	-CH ₃	-OH
9 G - 418	-NH ₂	-CH ₃	-OH	-NHCH ₃	-CH ₃	-OH
10 JI - 20A	-NH ₂	-H	-NH ₂	-NHCH ₃	-CH ₃	-OH

Hình 5.3. Cấu trúc một vài kháng sinh nhóm gentamycin



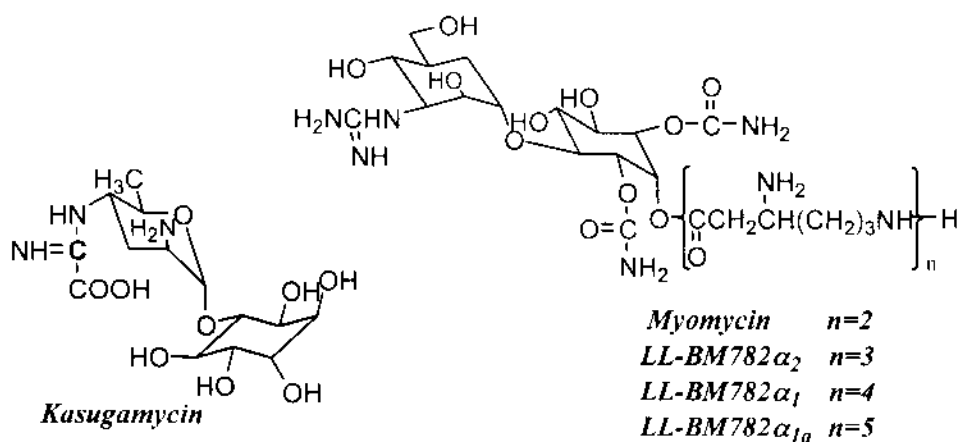
Tên kháng sinh	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1 Fortimycin A	-NH ₂	-H	-OH	-H	-CH ₃	-H
2 Fortimycin C	-NH ₂	-H	-OH	-CONH ₂	-CH ₃	-H
3 Fortimycin D	-NH ₂	-H	-OH	-H	-H	-H
4 Spararicin	-H	-NH ₂	-H	-H	-CH ₃	-H
5 Istamycin A	-NH ₂	-H	-H	-H	-H	-CH ₃
6 Istamycin B	-H	-NH ₂	-H	-H	-H	-CH ₃
7 Istamycin C	-NH ₂	-H	-H	-H	-H	-CH ₂ CH ₃
8 Istamicin A2	-NH ₂	-H	-H	-CONH ₂	-H	-CH ₃
9 N-Formimidoylistamycin A	-NH ₂	-H	-H	-CH=NH	-H	-CH ₃
10 N-Formimidoylistamycin B	-H	-NH ₂	-H	-CH=NH	-H	-CH ₃
11 Dactimicin	-NH ₂	-H	-OH	-CH=NH	-CH ₃	-H

Hình 5.4. Cấu trúc một vài kháng sinh nhóm fortimycin

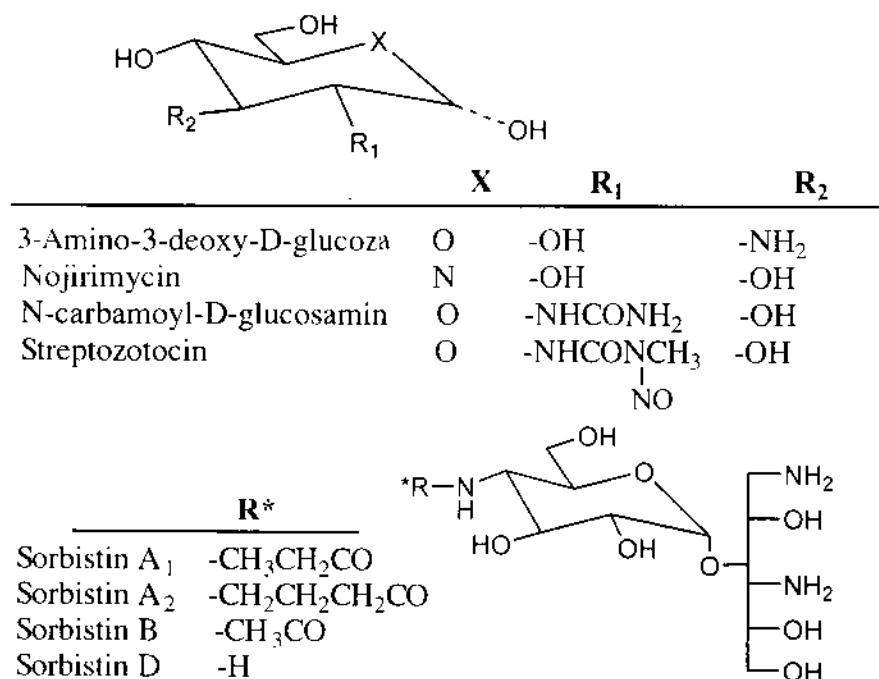


Tên	kháng sinh	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	Kanamycin	-OH	-OH	-NH ₂	-NH ₂	-OH
2	Kanamycin B	-NH ₂	-OH	-NH ₂	-NH ₂	-OH
3	kanamycin C	-NH ₂	-OH	-OH	-NH ₂	-OH
4	NK - 1001	-OH	-OH	-NH ₂	-OH	-OH
5	NK - 1012 - 1	-NH ₂	-OH	-NH ₂	-OH	-OH
6	Tombramycin	-NH ₂	-H	-NH ₂	-NH ₂	-OH
7	Nebramycin 4	-NH ₂	-OH	-NH ₂	-NH ₂	-OCONH ₂
8	Nebramycin 5'	-NH ₂	-H	-NH ₂	-NH ₂	-OCONH ₂

Hình 5.5. Cấu trúc một vài kháng sinh nhóm kanamycin



Hình 5.6. Cấu trúc kasugamycin và một vài kháng sinh nhóm myomycin



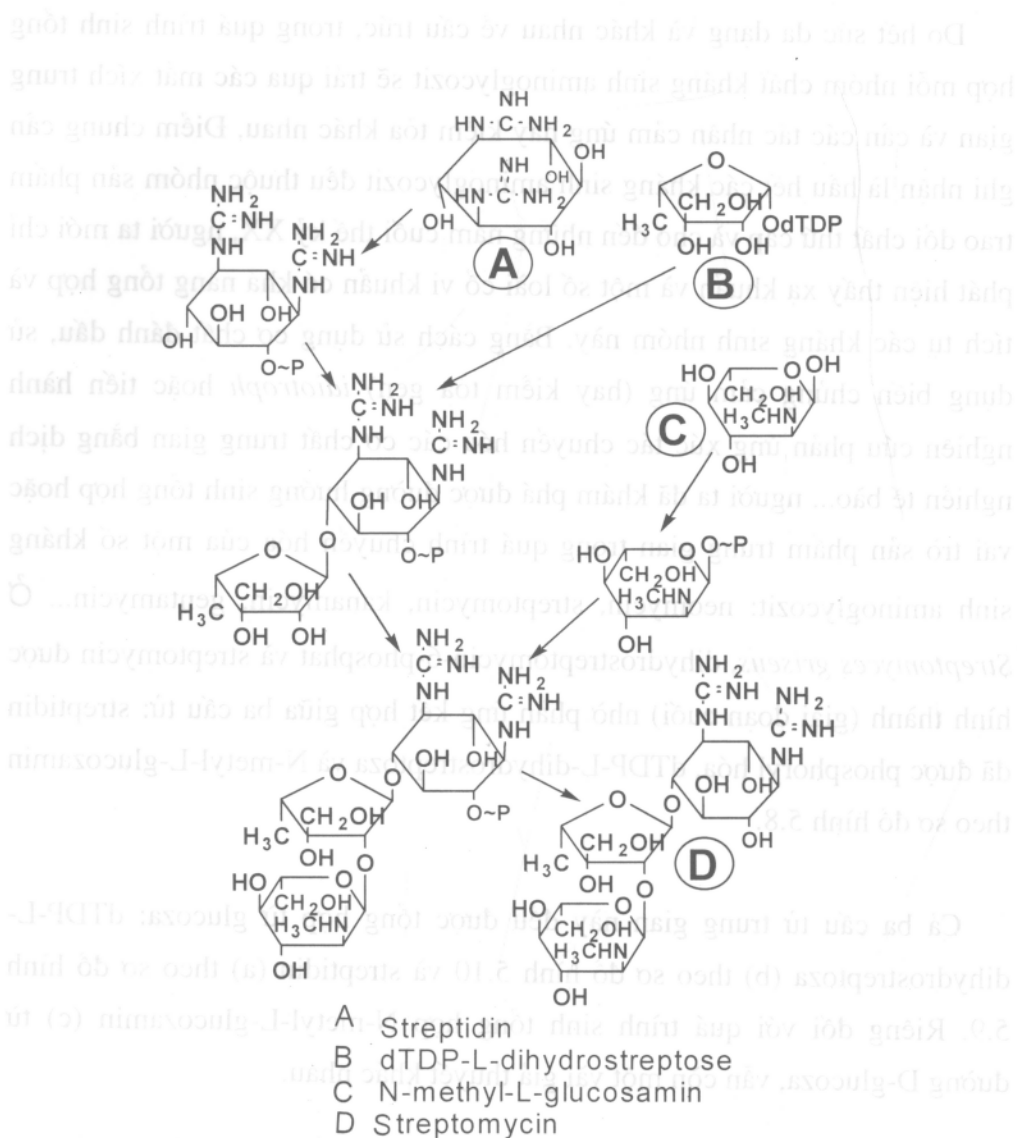
Hình 5.7. Cấu trúc phân tử của một số monosaccarit khác

5.2. CƠ CHẾ SINH TỔNG HỢP

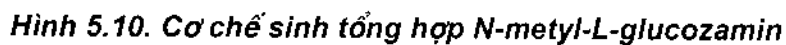
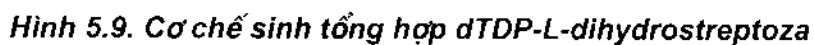
Do hết sức đa dạng và khác nhau về cấu trúc, trong quá trình sinh tổng hợp mỗi nhóm chất kháng sinh aminoglycozit sẽ trải qua các mắt xích trung gian và cần các tác nhân cảm ứng hay kiểm tỏa khác nhau. Điểm chung cần ghi nhận là hầu hết các kháng sinh aminoglycozit đều thuộc nhóm sản phẩm trao đổi chất thứ cấp và cho đến những năm cuối thế kỷ XX, người ta mới chỉ phát hiện thấy xạ khuẩn và một số loài cổ vi khuẩn có khả năng tổng hợp và tích tụ các kháng sinh nhóm này. Bằng cách sử dụng cơ chất đánh dấu, sử dụng biến chủng cảm ứng (hay kiểm tỏa gen) *idiotroph* hoặc tiến hành nghiên cứu phản ứng xúc tác chuyển hóa các cơ chất trung gian bằng dịch nghiền tế bào... người ta đã khám phá được đường hướng sinh tổng hợp hoặc vai trò sản phẩm trung gian trong quá trình chuyển hóa của một số kháng sinh aminoglycozit: neomycin, streptomycin, kanamycin, gentamycin... Ở *Streptomyces griseus*, dihydrostreptomycin-6-phosphat và streptomycin được hình thành (giai đoạn cuối) nhờ phản ứng kết hợp giữa ba cấu tử: streptidin đã được phosphoryl hóa, dTDP-L-dihydrostreptoza và N-metyl-L-glucozamin theo sơ đồ hình 5.8.

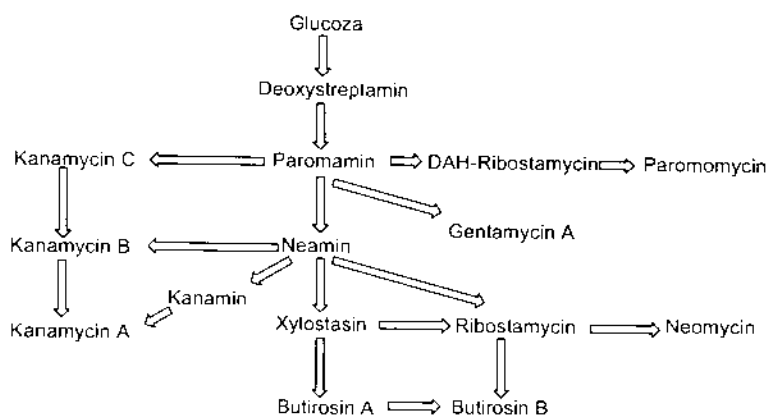
Cả ba cấu tử trung gian này đều được tổng hợp từ glucoza: dTDP-L-dihydrostreptoza (b) theo sơ đồ hình 5.10 và streptidin (a) theo sơ đồ hình 5.9. Riêng đối với quá trình sinh tổng hợp N-metyl-L-glucozamin (c) từ đường D-glucoza, vẫn còn một vài giả thuyết khác nhau.

Từ nguồn cơ chất glucoza, bằng cách sử dụng các biến chủng và áp dụng chế độ công nghệ tương ứng khác nhau, người ta đã lên men được hàng loạt các aminoglycozit. Cơ chế tóm tắt đường hướng sinh tổng hợp một vài sản phẩm aminoglycozit được giới thiệu tóm tắt trong hình 5.11.



Hình 5.8. Cơ chế sinh tổng hợp streptomycin từ streptidin, dTDP-L-dihydrostreptose và N-metyl-L-glucosamin





Hình 5.11. Cơ chế sinh tổng hợp một vài aminoglycozit từ glucoza

Trong quá trình tổng hợp kháng sinh aminoglycozit, do tính đặc hiệu cơ chất của các enzym tham gia vào quá trình không cao, nên ở một vài biến chủng idiotroph có thể tổng hợp ra các kháng sinh mới khi lựa chọn được các “tiền chất tương đồng” phù hợp, thí dụ, *Streptomyces fradiae* có khả năng sinh tổng hợp neomycin, nhưng một vài biến chủng *S. fradiae* lại chỉ sinh tổng hợp neomycin khi trong môi trường lên men có chứa tiền chất deoxystreptamin (DOS). Vẫn với điều kiện lên men tương tự, nhưng nếu bổ sung vào môi trường streptidin (tương tự với DOS) thì chúng lại tổng hợp ra hybrimycin (hiện tượng này cũng xuất hiện ở nhiều biến chủng *iodotroph* sinh tổng hợp kanamycin, paromomycin, ribostamycin, sisomycin, butirosin...). Quá trình sinh tổng hợp các sản phẩm mới ở biến chủng *iodotroph* với các tiền chất tương đồng thích hợp được gọi chung là quá trình sinh tổng hợp cảm ứng thể đột biến (*mutational biosynthesis*). Ngày nay, việc triển khai áp dụng kỹ thuật này không chỉ dừng lại ở họ kháng sinh aminoglycozit mà ngày càng được triển khai rộng rãi với các họ kháng sinh khác để tạo thêm các sản phẩm mới với hiệu quả kinh tế cao hơn. Việc áp

dụng công nghệ tái tổ hợp gen với mục tiêu sản xuất các kháng sinh aminoglycozit cho đến những năm cuối thế kỷ XX đã được triển khai, song kết quả đạt được còn rất khiêm tốn. Người ta đã tách dòng được một số gen kháng sinh nhóm này như: neomycin-phosphotransferaza, neomycin-acetyltransferaza, ribostamycin-phosphotransferaza và kanamycin-6'-acetyltransferaza.

5.3. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Cũng như các chất kháng sinh khác, quy trình công nghệ lên men sản xuất kháng sinh aminoglycozit đều được nhà sản xuất bảo mật chặt chẽ và đăng ký bảo hộ công nghiệp. Điểm chung về công nghệ lên men các kháng sinh nhóm này theo nguồn dữ liệu công khai được trình bày sau đây.

Trong sản xuất, hầu như tất cả các hãng đều sử dụng các biến chủng công nghiệp siêu tổng hợp. Nhiều biến chủng công nghiệp có năng lực siêu tổng hợp cao thường có xuất xứ từ giống *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Streptoverticillium*, *Dactylosporangium*, *Norcadia*, *Saccharopolyspora* và *Bacillus*, trong đó phổ biến hơn cả là các chủng thuộc giống *Streptomyces* và *Micromonospora*. Kỹ thuật sử dụng chủng sinh tổng hợp cảm ứng thể đột biến mutansynthesis được áp dụng rộng rãi trong sản xuất nhiều kháng sinh aminoglycozit khác nhau.

Nguồn nguyên liệu cacbon thường được sử dụng là: dịch thủy phân tinh bột, dextrin, glucoza, glycerin hay các nguồn thức ăn cacbon hữu cơ khác (ở cả hai dạng nguyên liệu tự nhiên và sản phẩm kỹ thuật). Thông thường, glucoza là nguồn thức ăn cacbon tốt cho sự phát triển của rất nhiều vi sinh vật, nhưng nhiều oligosaccarit và polysaccarit lại thích hợp hơn cho sinh tổng hợp chất kháng sinh và trong một vài trường hợp nồng độ glucoza cao lại ức chế quá trình tổng hợp chất kháng sinh (thí dụ, glucoza ức chế sinh tổng hợp kanamycin do kìm hãm sinh tổng hợp enzym cuối trong sơ đồ N-acetylkanamycin-amidohydrataz). Nguồn thức ăn nitơ phổ biến là nitơ hữu cơ như: bột đậu tương, dịch chiết mầm hạt, dịch thủy phân casein, cao nấm men... Đôi khi người ta cũng sử dụng phối hợp với một vài nguồn nitơ vô cơ

(dưới dạng muối amon, muối nitrat). Ngoài hai nhóm nguyên liệu chính trên, bao giờ cũng bổ sung thêm một số muối khoáng và dầu phá bọt. Nhìn chung, việc sử dụng nguồn nguyên liệu tự nhiên để pha chế môi trường rất phổ biến trong công nghệ lên men sản xuất nhiều kháng sinh aminoglycozit, một mặt do giá thành môi trường rẻ hơn, nhưng mặt khác, chính khó khăn khi sử dụng nguồn cơ chất này sẽ làm cho cân bằng thành phần thức ăn C-N-P dịch chuyển theo hướng thuận lợi hơn cho sinh tổng hợp chất kháng sinh. Trong nhiều quy trình lên men công nghiệp, giải pháp không chế chặt chẽ nồng độ cơ chất và bổ sung liên tục thức ăn cũng được áp dụng.

Về công nghệ, kỹ thuật lên men bề sâu được triển khai rộng rãi trong sản xuất hầu hết các sản phẩm aminoglycozit. Sự tích tụ sản phẩm thường xảy ra mạnh mẽ ở cuối giai đoạn phát triển logarit, hoặc ở giai đoạn phát triển cân bằng, hoặc ở pha sau iodophase. Thông thường, quá trình lên men được giám sát và điều khiển chặt chẽ, bao gồm cả thành phần môi trường và điều kiện tiến hành lên men, đặc biệt là nồng độ của các cấu tử tiền chất cảm ứng hay định hướng tạo sản phẩm.

Mặc dù các chủng vi sinh vật tổng hợp ra chất kháng sinh, song do các kháng sinh aminoglycozit có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nên khi nồng độ sản phẩm tích tụ càng tăng thì sự ức chế ngược trở lại quá trình sinh tổng hợp sản phẩm sẽ càng lớn. Vì vậy, việc hoàn thiện, tối ưu hóa các thông số công nghệ lên men và việc tuyển chọn, cải thiện hoạt tính chủng có ý nghĩa rất lớn đến hiệu quả kinh tế chung của toàn quá trình. Ngoài ra, trong quá trình lên men, các chủng thường tổng hợp ra họ sản phẩm gồm nhiều chất gần gũi nhau, nhưng trong sản xuất công nghiệp, người ta thường áp dụng các điều kiện công nghệ theo định hướng chỉ thu nhận một hay một vài sản phẩm có giá trị cao nhất, còn bỏ qua cả các cấu tử kháng sinh phụ khác trong quá trình tinh chế.

Để lên men sản xuất streptomycin, người ta thường sử dụng các biến chủng công nghiệp loài *Streptomyces griseus* có khả năng kháng actinophage. Giống gốc từ môi trường bảo quản (dạng bào tử đông khô, bảo quản trong cát, trong đất, bảo quản trong dầu glycerin...) được cấy nuôi hoạt

hóa thu bào tử trên môi trường thạch nghiêng sau 5-7 ngày, thu huyền phù bào tử và chuyển sang bình nhân giống nhỏ trong bình tam giác trên máy lắc ở 28°C, hay nuôi hiếu khí trong các fermentor trong khoảng 24-48 giờ. Sau đó, giống tiếp tục được nhân tiếp tục với tỉ lệ cấp giống 5-10% cho đến khi đủ lượng giống sản xuất. Giai đoạn nhân giống nhỏ có thể sử dụng môi trường với thành phần: glucoza 2,0 g/l; pepton 0,5 g/l; cao thịt 0,5 g/l; NaCl 0,5g/l; pH=6,8-7,2; thanh trùng ở 0,5at trong 20 phút. Môi trường nhân giống lớn và lên men sản xuất có thể sử dụng thành phần: glucoza 4,0 g/l; bột đậu tương 3,0 g/l; (NH₄)₂SO₄ 0,6 g/l; NaCl 0,25 g/l; CaCO₃ 0,6 g/l; KH₂PO₄ 0,01 g/l; pH=6,8-7,0; thanh trùng gián đoạn ở 121°C trong 1 giờ (hoặc thanh trùng liên tục ở 140-145°C trong thời gian vài phút). Quá trình lên men tiến hành trong các fermentor dung tích lớn 50-100m³, ở 28°C trong điều kiện có sục khí và khuấy trộn liên tục ($0,5-1,0 \frac{V_{\text{khí}}}{V_{\text{dịch}}}$ phút) và sử dụng dầu lạc để phá bọt, đồng thời giám sát chặt chẽ các thông số công nghệ và kiểm soát nhiễm tạp, đặc biệt nhiễm phage. Trong điều kiện trên, pha sinh trưởng thường kết thúc sau khoảng 40 giờ đầu, pha sinh tổng hợp thường kéo dài khoảng 160 giờ và nồng độ streptomycin trong dịch lên men có thể đạt trên 8500µg/ml. Hiệu quả quá trình sinh tổng hợp streptomycin được cải thiện qua tác động hợp lý của các yếu tố cảm ứng như: sự dư thừa tỉ lệ prolin, sự có mặt yếu tố A-factor (3S-izocapryloyl-4S-hydroxymetyl-γ-butyrolacton), nồng độ hợp lý của một số cấu tử tác động lên cấu trúc thành tế bào (penicillin hay bacbitur)...

Để lên men sản xuất spectinomycin, có thể sử dụng các biến chủng công nghiệp *Streptomyces flavopersicus* hay *S. spectabilis*. Giống từ môi trường bảo quản được nuôi hoạt hóa thu bào tử trên môi trường thạch nghiêng (hay thạch hộp), trong 3-7 ngày. Bào tử được thu chuyển bằng nước vô trùng sang môi trường lỏng trong bình tam giác, nuôi tiếp trên máy lắc ở 32°C, 30-36 giờ; sau đó nhân giống tiếp tục trong fermentor cho đến khi đủ giống sản xuất. Môi trường nhân giống có thể sử dụng gồm: glucoza 1,0%; trypton 0,5%; cao nấm men 0,5%; bacto-caseton 0,1% và NaCl 0,5%; pH=5,7. Môi trường lên men bao gồm: dịch thủy phân tinh bột đủ 25g glucoza/lít; bột đậu tương 20g/lít; dầu đậu tương 5g/lít; NaCl 5g/lít; CaCO₃ 1g/lít và dầu phá bọt silicon 1g/lít; pH môi trường dao động quanh khoảng pH=5,7. Giai đoạn lên

men sản xuất được tiến hành ở 28°C, pH ban đầu được điều chỉnh về pH=6,4, sục khí và khuấy trộn liên tục để duy trì nồng độ oxy hòa tan ở 50% nồng độ bão hoà. Trong điều kiện trên, pha tích lũy sinh khối có thể kết thúc sau 24 giờ và thời gian lên men có thể kéo dài 5-7 ngày. Để duy trì hiệu quả tích tụ sản phẩm, glucoza được khống chế chặt chẽ và bổ sung liên tục trong suốt pha sau.

Sagamycin được sản xuất nhờ biến chủng công nghiệp *Micromonospora sagamiensis*. Giống từ môi trường bảo quản được nuôi hoạt hóa thu bào tử trên môi trường thạch nghiêng. Sau đó, bào tử được thu chuyển bằng nước vô trùng sang môi trường lỏng trong bình tam giác, nuôi tiếp trên máy lắc ở 30°C, trong 5 ngày. Tiếp theo, giống được nhân tiếp tục trong các fermentor nhân giống (với chu kỳ 2 ngày, ở 30°C, khuấy trộn 150-250 vòng/phút và sục khí $V_{khí}/V_{dịch}$ ·phút, tỉ lệ cấy chuyển giống 5-10%), qua hai chu kỳ cho đến khi đủ giống sản xuất. Lên men sản xuất được tiến hành trong thiết bị 1000 lít, ở 30°C, trong 4-5 ngày, tốc độ cấp khí $V_{khí}/V_{dịch}$ ·phút và khuấy trộn 150v/ph.

5.4. XỬ LÝ DỊCH LÊN MEN VÀ TÍNH CHẾ THU SẢN PHẨM

Nhìn chung, các chất kháng sinh aminoglycozit đều dễ tan trong nước, tương đối bền nhiệt, bền pH, dễ phát hiện thu sản phẩm, dễ tách riêng khỏi các thành phần khác trong dịch khi tinh chế... nên việc lựa chọn giải pháp kỹ thuật để tách và tinh chế sản phẩm tương đối thuận lợi hơn một vài nhóm kháng sinh khác. Tuy nhiên, phần lớn các biến chủng sản xuất thường tích tụ đồng thời một họ, gồm nhiều chất kháng sinh aminoglycozit có cấu trúc rất gần gũi nhau, trong khi người ta thường chỉ tách thu một hay một vài cấu tử có giá trị điều trị nhất. Vì vậy, để tách riêng các cấu tử này cần phải áp dụng phối hợp tuần tự (hay đan xen) rất nhiều giải pháp tinh chế khác nhau. Ngoài ra, cũng có một số chủng có thể tích tụ một vài chất kháng sinh với đặc tính khác biệt tương đối rõ rệt; với những trường hợp này, các cấu tử kháng sinh dễ dàng tách khỏi nhau, nhờ đó việc tinh chế sẽ bớt khó khăn hơn.

Giải pháp tách sắc ký sử dụng cột nhựa trao đổi ion được áp dụng rộng rãi để tách và tinh chế sản phẩm. Phụ thuộc vào đặc tính cấu tử cần tách, các chất mang thường được lựa chọn là cacboxymethylcellulose, CM-sepharose, SP Sephadex, phosphocellulose, sulfoethylcellulose... Trong các công đoạn tách đầu tiên thường người ta sử dụng nhựa trao đổi cation. Sau đó, tùy thuộc vào mỗi kháng sinh, người ta có thể lựa chọn các loại nhựa khác. Tên sản phẩm thương mại của một số nhựa trao đổi ion được liệt kê trong bảng 5.1.

Bảng 5.1. Một vài loại nhựa trao đổi ion sử dụng để tinh chế kháng sinh aminoglycozid

Tên cột nhựa	Hãng sản xuất
Amberlite IR-120 Amberlite IRC-50 Amberlite CG-50 Amberlite XAD-2 Amberlite XAD-4	Rohm & Haas Co.
Diaion SK-1B Diaion WK-10 Diaion PK-204	Mitsubishi Kasei Ind. Co.
Dowex 50W X2 Dowex 1x2 Dowex 44	The Dow Chemical Co.
Duolite C-3 Duolite ES-26 Duolite CC-3	Chemical Process Co.

Một số chất kháng sinh aminoglycozid là sản phẩm nội bào hoặc tồn tại ở dạng liên kết với màng tế bào. Với các kháng sinh dạng này việc xử lý trước dịch lên men (axit hóa, kiềm hóa, sử dụng các chất làm thay đổi tính thấm thành tế bào...) là công đoạn cần thiết và có ảnh hưởng lớn đến hiệu quả thu sản phẩm. Do nhiều kháng sinh aminoglycozid tan tốt trong nước nên người ta thường chuyển chúng sang dạng dẫn xuất của muối reineckat

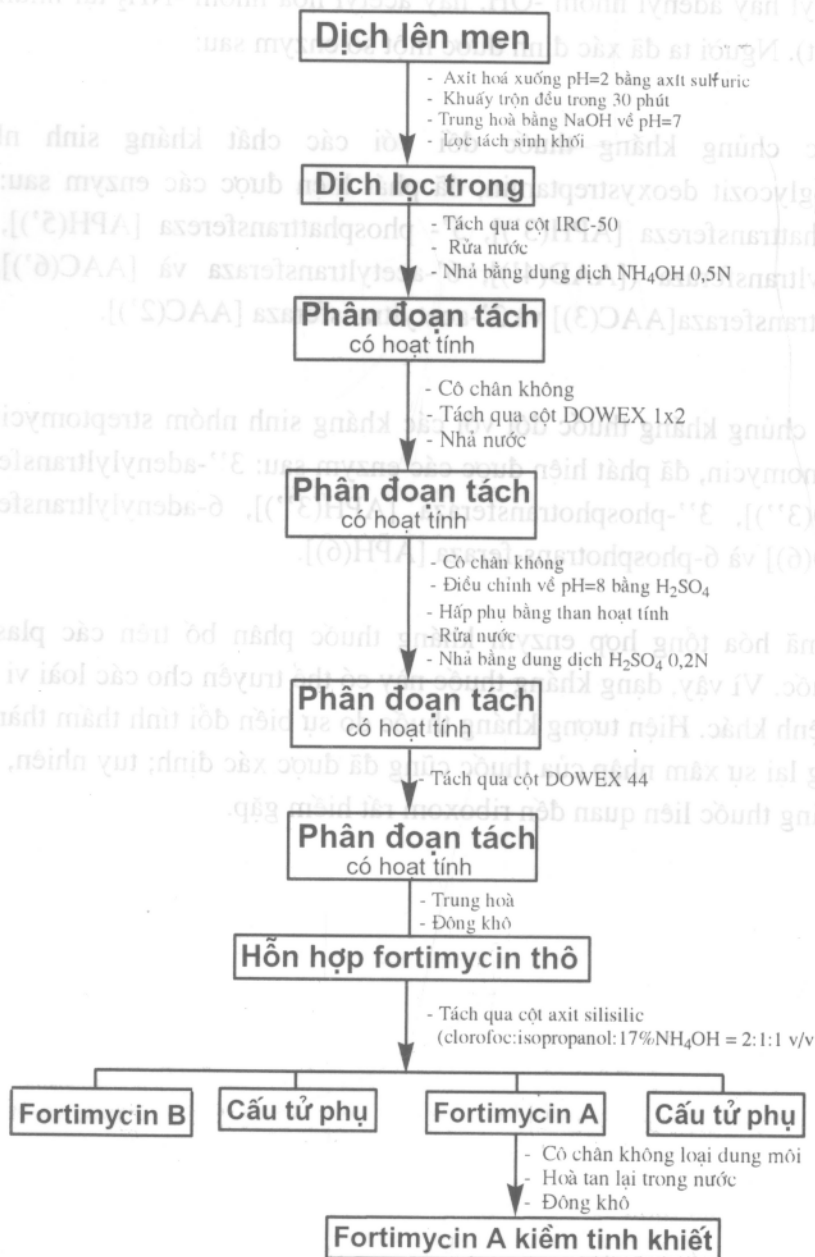
[HICr(NCS)₄(NH₃)₂], helianthal, picrat hay *p*-hydroxyazo-benzenesulfonat để kết tinh; sau cùng, chuyển thu sản phẩm dưới dạng muối hydroclorit hay muối sulfat của các chất kháng sinh đó.

Quy trình công nghệ tinh chế streptomycin tóm tắt bao gồm các công đoạn chính sau: dịch lên men được axit hóa bằng H₂SO₄ xuống pH=2,5-3,0, lọc tách sinh khối, bổ sung natri oxalat để kết tủa cation (Ca²⁺, Mg²⁺) rồi trung hòa bằng NaOH về pH=7,0-7,5; tiếp theo, hấp phụ streptomycin bằng cột nhựa trao đổi cation và rửa bằng dung dịch H₂SO₄ loãng (5%), tẩy màu qua than hoạt, loại muối qua cột nhựa trao đổi ion, rồi cô đặc chân không các phân đoạn có hoạt tính, cuối cùng sấy phun thu bột streptomycin. Sinh khối xạ khuẩn *S. griseus* được sử dụng để thu vitamin, phần còn lại chế biến làm thức ăn gia súc. Quy trình công nghệ tinh chế thu fortimycin A được tóm tắt theo sơ đồ hình 5.13.

5.5. ỨNG DỤNG

Nhìn chung, các kháng sinh aminoglycozit có phổ kháng khuẩn rộng, tác dụng tốt trên cả các vi khuẩn Gram âm *Enterobacteriaceae*. Chất kháng sinh aminoglycozit đầu tiên là streptomycin được ứng dụng rộng rãi trên phạm vi toàn thế giới để điều trị hiệu quả bệnh lao do *Mycobacterium tuberculosis*. Mặc dù thời gian gần đây người ta đã sản xuất được nhiều loại kháng sinh mới, nhưng một số kháng sinh aminoglycozit như gentamycin, sagamycin hay dibekacin vẫn được xem là sự lựa chọn hiệu quả để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* được xem là mầm bệnh kháng được hầu hết chất kháng sinh đã biết hiện nay). Nhược điểm thường thấy ở phần lớn kháng sinh aminoglycozit là khả năng hấp thu qua đường tiêu hóa kém và ảnh hưởng xấu đến chức năng tai và thận.

Cũng như với các chất kháng sinh khác, hiện tượng kháng thuốc đối với một số kháng sinh aminoglycozit cũng đã xuất hiện. Nguyên nhân của hiện tượng kháng thuốc tùy thuộc vào từng trường hợp cụ thể, thường gặp là do các chủng kháng thuốc tổng hợp được các enzym làm vô hoạt thuốc



Hình 5.14. Sơ đồ công nghệ tách và tinh chế thu fortimycin A

(phosphoryl hay adenyl nhóm -OH, hay acetyl hóa nhóm -NH₂ tại những vị trí đặc biệt). Người ta đã xác định được một số enzym sau:

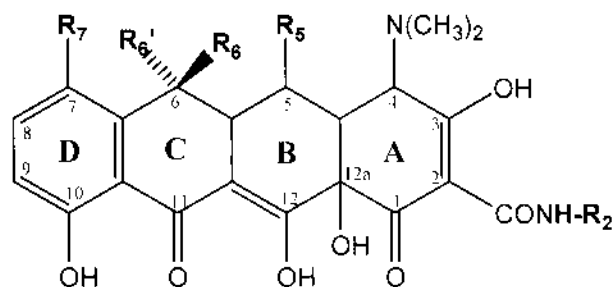
- Ở các chủng kháng thuốc đối với các kháng sinh nhóm aminoglycosit deoxystreptamin, đã phát hiện được các enzym sau: 3'-phosphattransferaza [APH(3')], 5'-phosphattransferaza [APH(5')], 4'-adenyltransferaza ([AAD(4')], 6'-acetyltransferaza và [AAC(6')], 3-acetyltransferaza [AAC(3)] và 2'-acetyltransferaza [AAC(2')].
- Ở các chủng kháng thuốc đối với các kháng sinh nhóm streptomycin và spectinomycin, đã phát hiện được các enzym sau: 3''-adenyltransferaza [AAD(3'')], 3''-phosphotransferaza [APH(3'')], 6-adenyltransferaza [AAD(6)] và 6-phosphotransferaza [APH(6)].

Gen mã hóa tổng hợp enzym kháng thuốc phân bố trên các plasmid kháng thuốc. Vì vậy, dạng kháng thuốc này có thể truyền cho các loài vi sinh vật gây bệnh khác. Hiện tượng kháng thuốc do sự biến đổi tính thấm thành tế bào chống lại sự xâm nhập của thuốc cũng đã được xác định; tuy nhiên, hiện tượng kháng thuốc liên quan đến riboxom rất hiếm gặp.

6 CÔNG NGHỆ LÊN MEN TETRACYCLIN

6.1. ĐẠI CƯƠNG

Tetracyclin là họ chất kháng sinh phổ rộng được phát hiện rất sớm (clotetracyclin năm 1948, oxytetracyclin năm 1950, demetyltetracyclin năm 1957 ...). Công thức cấu tạo của một số tetracyclin như sau:



Tên kháng sinh	R ₂	R ₅	R ₆	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
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
Rolitetrayclin	-CH ₂ -N 	H	OH	CH ₃	H

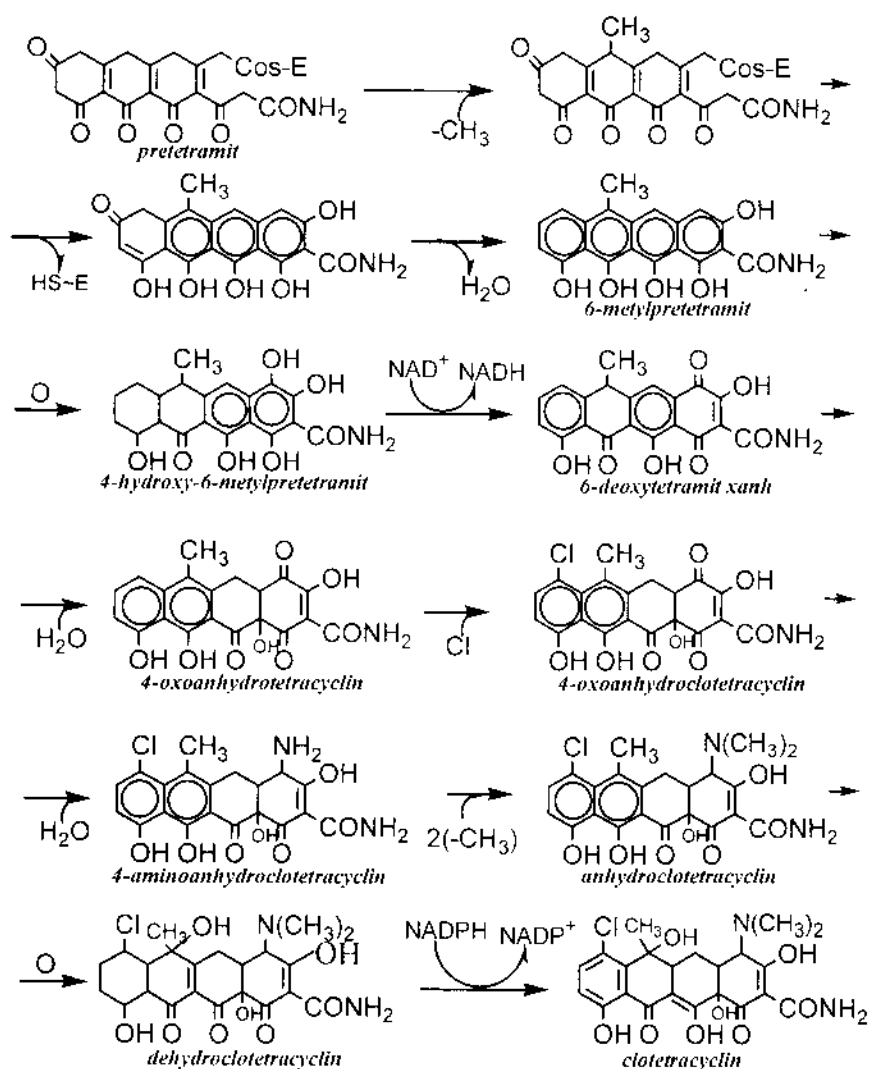
Hình 6.1. Cấu trúc một số tetracyclin điển hình

Khả năng sinh tổng hợp tetracyclin tập trung chủ yếu ở xạ khuẩn. Ngày nay, người ta đã tuyển chọn được nhiều chủng xạ khuẩn có năng lực sinh tổng hợp tetracyclin cao như: *Streptomyces aureofaciens* A377 (NRRL 2209), *S. aureofaciens* ATCC 13908-13911, *S. rimosus* S-3279 (NRRL 2234), *S. sp.* MA-590 (NRRL 2963), *S. platensis*, *S. gilvus*, *S. vendagensis*, *S. pseudolysogenicus*, *Actinomyces varsovensis*... Cơ chế quá trình sinh tổng hợp các tetracyclin rất phức tạp, với sự chuyển hóa 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 ba giai đoạn là:

- Sinh tổng hợp chuỗi oligoketidamit mạch thẳng, bắt đầu từ sự ngưng tụ giữa phân tử malonyl~CoA với phân tử malonamoyl~CoA, sau đó mạch được kéo dài nhờ ngưng tụ tiếp bảy phân tử malonic khác. Malonyl~CoA được biến đổi trực tiếp từ glucoza hoặc qua decarboxyl hóa oxy hóa oxaloacetat.
- Khép vòng chuỗi oligoketidamit tạo thành bộ khung cấu trúc cơ sở pretetramit (hoặc 6-metylpretetramit), do xảy ra các chuyển hóa: metyl hóa ở C₆, khử ở C₈, dehydrat hóa ở C₇-C₈, khép vòng nhờ aldol hóa ở C_{4a}-C_{12a}, C_{5a}-C_{11a} và C_{6a}-C_{10a} và acyl hóa tại C₂-C₁ nhờ một phân tử thioleste.
- Chuyển hóa tiếp pretetramit (hoặc 6-metylpretetramit) để tạo ra các tetracyclin (tham khảo sơ đồ hình 6.2). Trong ba giai đoạn trên, người ta đã xác định được tất cả các sản phẩm trung gian của giai đoạn 3 bằng thực nghiệm.

Năng lực sinh tổng hợp oxytetracyclin ở *S. rimosus* và *S. aureofaciens* được quyết định nhờ hai nhóm gen: các gen mã hóa sinh tổng hợp oxytetracyclin phân bố trên chuỗi ADN nhân và gen kháng oxytetracyclin có bản chất plasmid giúp chúng tồn tại được trong môi trường có oxytetracyclin. Khả năng sinh tổng hợp tetracyclin của chủng cũng chịu ảnh hưởng của hàng loạt yếu tố môi trường như: nguồn thức ăn cacbon, nitơ, muối phosphat vô cơ, các ion khoáng, các chất cảm ứng hay ức chế, nhiệt độ, pH môi trường,

nồng độ oxy hòa tan... Ngoài ra, người ta đã xác định được năng lực sinh tổng hợp tetracyclin còn phụ thuộc cả vào đường hướng chuyển hóa trao đổi chất bậc một của chủng.



Hình 6.2. Cơ chế sinh tổng hợp clotetracyclin từ pretetramin ở *S. aureofaciens*

Để định lượng các tetracyclin người ta thường phổ biến sử dụng phương pháp so màu và phương pháp sinh học. Phương pháp so màu dựa trên cơ sở đo phổ hấp phụ của anhydrotetracyclin ở 440nm, là sản phẩm tạo thành khi phân hủy các tetracyclin trong môi trường axit. Phương pháp sinh học thường sử dụng kỹ thuật đo độ đục với chủng chỉ thị là *Micrococcus pyogenes* ATCC 6538-P, hay sử dụng phương pháp cột thạch với chủng chỉ thị *Bacillus cereus* ATCC 9634.

6.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

6.2.1. Đặc điểm chung

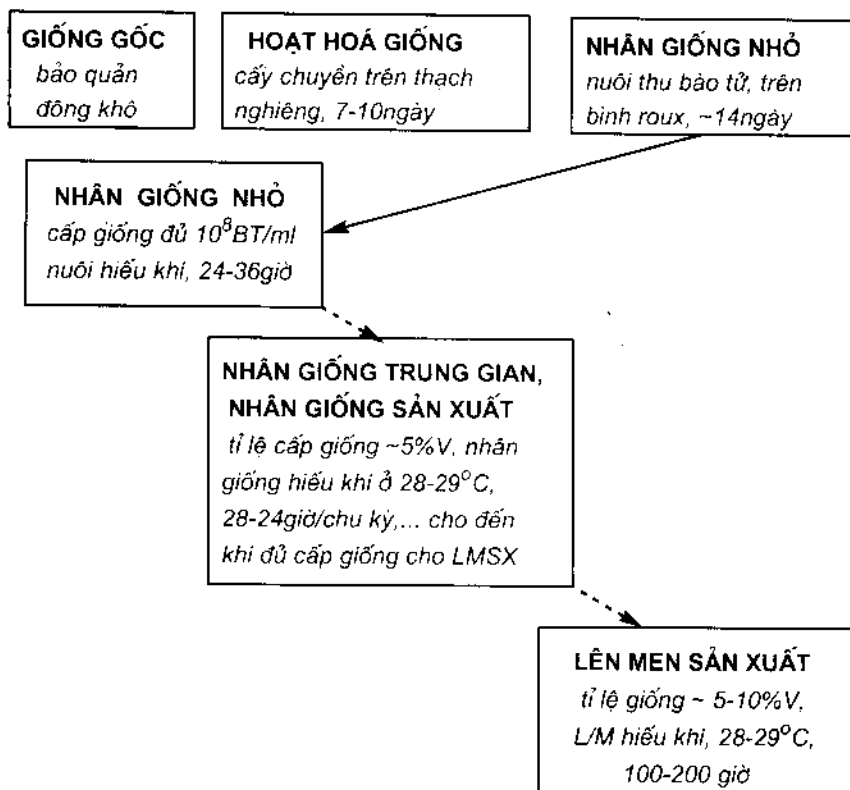
Cũng như hầu hết các chất kháng sinh khác, công nghệ lên men tetracyclin được bảo mật chặt chẽ trong từng cơ sở sản xuất công nghiệp. Trong khi các sáng chế độc quyền thường có thời gian bảo hộ quá dài và nhìn chung, từng sáng chế đơn lẻ chưa đủ thông tin để có thể triển khai sản xuất công nghiệp được. Một số điểm chung nhất về công nghệ lên men họ kháng sinh này có thể khái quát như sau:

- Trong sản xuất lớn người ta thường có xu hướng sử dụng các biến chủng công nghiệp có năng lực sinh tổng hợp tetracyclin cao (thường là *S. aureofaciens* hay *S. rimosus*). Có rất nhiều giải pháp kỹ thuật được áp dụng để tạo chủng siêu tổng hợp. Tuy nhiên, để tạo biến chủng siêu tổng hợp tetracyclin, giải pháp hiệu quả và được áp dụng phổ biến là xử lý tia cực tím, riêng rẽ hay kết hợp với xử lý bằng etylenimin hoặc với xử lý X-quang. Việc xử lý bằng tia phóng xạ, mù tạt nitơ [đẫn xuất -N(CH₂CH-Cl)₂ của alcan] hay N-nitrosodimetylurea hiệu quả kém hơn. Do tính ổn định về di truyền của các biến chủng *S. aureofaciens* không cao nên việc tuyển chọn và tuyển chọn lại có ý nghĩa rất lớn trong việc duy trì năng lực sinh tổng hợp của chủng, thí dụ, tuyển chọn lại thường xuyên để loại bỏ các biến chủng tự dưỡng ra khỏi các chủng khuyết dưỡng, tuyển chọn các chủng có sức đề kháng cao hơn trong môi trường có tetracyclin...

- Về mặt công nghệ, trong việc lên men sản xuất tetracyclin, người ta có xu hướng lựa chọn các công nghệ đơn giản và điều chỉnh chế độ công nghệ theo định hướng lên men trực tiếp một loại tetracyclin. Quá trình lên men được tiến hành gián đoạn theo mẻ, trong các fermentor dung tích lớn, thường $100-150\text{m}^3$, khuấy trộn kiểu tuốc bin nhiều tầng, tốc độ khuấy trộn khoảng 500vòng/phút , công suất khuấy trộn thiết kế tương ứng khoảng 3kW/m^3 giờ và sục khí liên tục với lượng khí cấp khoảng $0,4-0,8V_{\text{khí}}/V_{\text{lịch}}\cdot\text{phút}$, đảm bảo duy trì tốc độ cung cấp oxy đạt không dưới $(0,4-0,8)\mu\text{mol/lít/phút}$. Nồng độ các cấu tử trong môi trường được giám sát chặt chẽ, một vài cấu tử có thể được khống chế và bổ sung liên tục trong quá trình lên men. Thời gian lên men mỗi mẻ thường kéo dài $100-200$ giờ. Sơ đồ công nghệ tổng quát quá trình lên men sản xuất các tetracyclin được trình bày trong hình 6.3.

6.2.2. Lên men sản xuất clotetracyclin

Để lên men sản xuất clotetracyclin người ta thường sử dụng các biến chủng công nghiệp *S. aureofaciens*, với nguyên liệu cacbon chính là saccaroza, glycerin và dịch thủy phân tinh bột, nguồn thức ăn nitơ là bột đậu tương, khô lạc, bột hạt bông và cao ngô (*S. aureofaciens* có khả năng phát triển và tích tụ clotetracyclin ngay trên môi trường dinh dưỡng đơn giản, thí dụ như môi trường chỉ có glycerin và muối amon). Sự có mặt ion Cl^- trong môi trường là yếu tố rất cần thiết và cần ứng cho sinh tổng hợp clotetracyclin. Bên cạnh các yếu tố nêu trên, sự phát triển của chúng và hiệu quả tích tụ clotetracyclin trong môi trường còn chịu sự tác động của rất nhiều yếu tố khác như: bản chất nguồn thức ăn cacbon, thức ăn nitơ, nguồn phospho, nồng độ các ion kim loại (đặc biệt là các ion kim loại hóa trị hai như Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+})...



Hình 6.3. Sơ đồ tóm tắt công nghệ lên men tetracyclin

Giống từ canh trường bảo quản được nhân giống tuân tự theo quy trình nhân giống thông thường, nuôi hiếu khí và chu kỳ cấy chuyển thường sau 24 giờ, với tỉ lệ cấp giống dao động trong khoảng 2-10%V dịch lên men. Thành phần môi trường nhân giống được xác định phụ thuộc vào chủng sử dụng và thành phần môi trường lên men sản xuất. Trong thực tiễn, khi nhân giống người ta thường sử dụng môi trường nghèo dinh dưỡng hơn môi trường lên men, với pH ban đầu pH=5,6-6,2.

Quá trình lên men thường được tiến hành ở 28°C, pH ban đầu trong khoảng pH=5,5-6,5 ($pH_{\text{opt}}=5,8-6,0$), tốc độ cấp khí $0,4-0,8V_{\text{khí}}/V_{\text{dịch}} \cdot \text{phút}$, đảm bảo nồng độ oxy hòa tan $\geq 20\%$ nồng độ bão hoà, nồng độ CO_2 trong

khoảng 20-80µg/ml. Động học quá trình lên men của chủng có thể chia làm ba giai đoạn chính là: giai đoạn phát triển mạnh mẽ sinh khối (1), giai đoạn tích tụ mạnh mẽ clotetracyclin (2) và giai đoạn tích tụ kháng sinh chậm dần khi hệ sợi tự phân (3). Về hình thái, trong giai đoạn phát triển sinh khối, hệ sợi xạ khuẩn thường to, chắc, có nhiều bào tử đảm và hàm lượng ARN cao. Khi chuyển sang giai đoạn tích tụ kháng sinh (2 và 3) hệ sợi trở nên mảnh hơn và hàm lượng ARN trong sợi thấp hơn. Người ta cũng ghi nhận được trong quá trình lên men sự chuyển biến trạng thái sợi sang dạng sợi mảnh còn phụ thuộc đáng kể vào nồng độ phosphat trong môi trường và năng lực tích tụ clotetracyclin cao thường tương ứng với tốc độ phát triển hệ sợi trong pha sau thấp (khoảng 0,02-0,03%/giờ). Việc đảm bảo thông khí hợp lý và liên tục trong suốt quá trình lên men có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chung của quá trình, đặc biệt là thời gian lên men trong khoảng từ 6-12 giờ đầu tiên (quá trình lên men clotetracyclin và oxytetracyclin có thể bị đình chỉ nếu để xảy ra sự gián đoạn cung cấp oxy kéo dài quá 10 phút).

6.2.3. Lên men sản xuất oxytetracyclin

Để lên men sản xuất oxytetracyclin người ta thường sử dụng các biến chủng công nghiệp *S. rimous*. Nguồn nguyên liệu cacbon thường dùng là: tinh bột, nhiều loại đường đơn và đường đôi và glycerin, trong đó thích hợp hơn cả là tinh bột hay đường maltoza. Một vài axit hữu cơ cũng có thể được sử dụng làm nguồn thức ăn cacbon bổ sung. Bên cạnh đó, các chủng *S. rimous* còn có khả năng sử dụng cả lipid làm nguồn cung cấp thức ăn cacbon thay thế (trong trường hợp sử dụng chúng làm chất phá bột). Nguồn dinh dưỡng nitơ thường sử dụng là: bột đậu tương, gluten bột mỳ, bột ép hạt bông, cao nấm men hay phối hợp sử dụng cả nguồn nitơ vô cơ như các muối NH_4^+ , NO_3^- . Nước chiết nấm là nguồn thức ăn nitơ tốt cho chủng *S. rimous*, tuy nhiên lượng sử dụng bị hạn chế do hàm lượng phosphat cao sẽ cản trở quá trình lên men. Thí dụ sau đây cho thấy thành phần môi trường lên men oxytetracyclin quy mô bán sản xuất công nghiệp bao gồm: tinh bột 12%+4% (bổ sung tiếp trong quá trình lên men), enzym amylaza kỹ thuật, cao nấm men 1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; axit lactic 0,13%; CaCO_3 1,5%; hỗn hợp các muối

khoảng 0,01% và mỡ lợn 2%; thanh trùng môi trường trong 40 phút, ở 120°C (hãy thanh trùng liên tục, thời gian 1 phút ở 140°C). Về môi trường, khác với quá trình lên men clotetracyclin, trong sinh tổng hợp oxytetracyclin hầu như không có sự khác biệt đáng kể về thành phần giữa môi trường nhân giống và môi trường lên men sản xuất.

Quá trình lên men oxytetracyclin là quá trình lên men hai pha. Trong pha đầu xạ khuẩn phát triển sinh khối mạnh, granula trong màng tế bào chất bắt màu đồng nhất, tốc độ sử dụng nguồn cacbon và nitơ cao, pH môi trường giảm nhanh. Sau đó, khi chuyển sang pha tích tụ sản phẩm tốc độ phát triển hệ sợi yếu, granula bắt màu không đồng nhất và có sự cạn kiệt về nguồn thức ăn phosphat trong môi trường. Nhiệt độ lên men duy trì ở 28°C, sục khí và khuấy trộn liên tục trong suốt quá trình lên men để đảm bảo tốc độ hòa tan oxy vào môi trường trong khoảng 14-25mg/lít/phút.

6.2.4. Lên men oxytetracyclin và lên men demetylclotetracyclin

Để lên men sản xuất tetracyclin người ta thường sử dụng các biến chủng siêu tổng hợp tetracyclin cao từ *S. aureofaciens*. Thông thường, các chủng *S. aureofaciens* sinh tổng hợp tetracyclin tích tụ đồng thời clotetracyclin (trừ các biến chủng *S. aureofaciens* ATCC 13908-13911). Do đó, công nghệ lên men tetracyclin có nhiều điểm tương đồng với công nghệ lên men clotetracyclin, ngoại trừ sự khác biệt lớn nhất là phải đảm bảo nồng độ ion Cl^- trong dịch lên men luôn luôn ở mức rất thấp (hoặc được loại bỏ hoàn toàn) để không cảm ứng tạo ra clotetracyclin. Một số tác giả đã đề xuất sử dụng chất kìm hãm cạnh tranh với ion Cl^- như: ion Br^- , I^- , các thiocyanat, N-acetylbenzylidithiocarbamat, N-benzoyl-benzylidithiocarbamat, N-metyl-carbamat, 2-benzoxazolyl hay các dẫn xuất của thiourea.

Để lên men sản xuất tetracyclin, người ta thường sử dụng các biến chủng siêu tổng hợp demetylclotetracyclin *S. aureofaciens* ATCC12551-12554 hay sử dụng chủng *S. psammoticus* ATCC 14215. Thành phần môi trường và điều kiện lên men demetyl-clotetracyclin có nhiều điểm tương đồng với công

nghe lên men clotetracyclin và tetracyclin. Để lên men sản phẩm này, về cơ chế phải ngăn ngừa được phản ứng methyl hóa vòng tetracyclin ở vị trí C₆; quá trình này có thể thực hiện được bằng cách sử dụng các sulfonamid hay các dẫn xuất của axit *p*-aminopenzoic hoặc axit folic.

6.2.5. Xử lý dịch lên men và tinh chế thu các tetracyclin

Nhìn chung, để tách và tinh chế mỗi loại tetracyclin có thể lựa chọn một vài kỹ thuật khác nhau. Trong tất cả các giải pháp công nghệ áp dụng đều phải chú ý đến đặc tính của các tetracyclin là: có tính điện ly lưỡng tính, dễ bị polymer hóa hoặc dễ dàng sắp xếp lại thành dạng cấu trúc khác. Một số công đoạn chính trong các giải pháp công nghệ tách và tinh chế các tetracyclin thường được sử dụng là:

- Hấp phụ bằng đất hấp phụ hoặc than hoạt tính; tiếp theo tinh chế bằng phương pháp sắc ký hoặc trích ly chọn lọc tetracyclin.
- Trích ly ở pH axit, hoặc ở pH kiềm.
- Kết tủa Ca²⁺ bằng amon oxalat, bổ sung hợp chất amon bậc bốn làm chất mang, và trích ly sản phẩm bằng dung môi hữu cơ, thường dùng metylalkyl ceton.
- Kết tủa muối tetracyclin bằng thuốc nhuộm axit arylsulfonic. Tetracyclin được kết tủa dưới dạng phức với một kim loại kiềm thổ hoặc dưới dạng aryl-amin.
- Trích ly bằng dung môi-muối, thường dùng butanol và có bổ sung muối ăn NaCl (nhằm làm tăng hệ số phân bố của sản phẩm sang pha dung môi).

Để thu clotetracyclin (demetyltetracyclin) có thể áp dụng sơ đồ sau:

- Kết thúc quá trình lên men, dịch lên men được làm lạnh xuống nhiệt độ thấp, bổ sung K₄Fe(CN)₆ và axit oxalic để kết tủa ion sắt và canxi rồi điều chỉnh pH về pH=8,9 và trích ly bằng dung môi butylacetat, hay butanol. Tiếp theo, clotetracyclin được trích ly ngược trở lại pha nước ở pH=1,5-1,7, sử dụng dung dịch H₂SO₄ để axit hóa. Sau khi loại dung môi, người

ta thường bổ sung thêm dung dịch NaCl bão hòa vào dung dịch để kết tinh clotetracyclin, dưới dạng muối hydroclorit-tetracyclin.

- Từ dịch lên men, sau khi được làm lạnh xuống nhiệt độ thấp, clotetracyclin được kết tủa trực tiếp khi trong dịch xử lý có mặt một quater amon sulfat. Khi trong môi trường có chất mang và ở pH kiềm nhẹ, clotetracyclin sẽ phản ứng với ion Ca^{2+} , Mg^{2+} và chất mang tạo thành phức ít tan trong nước (nhưng tan tốt trong dung môi hữu cơ); sử dụng dung môi hữu cơ trích ly thu phức, rồi trích ly lại clotetracyclin bằng nước ở pH=1,5-1,7 để tinh chế thu sản phẩm.

Để thu tetracyclin (hay oxytetracyclin), có thể tiến hành như sau:

- Kết thúc quá trình lên men, dịch lên men được axit hóa nhẹ, bổ sung $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ và ZnSO_4 để tạo kết tủa rồi lọc tách phần tủa. Dịch lọc tiếp theo được tách lipid bằng trích ly butylacetat, kết tủa Ca^{2+} bằng axit oxalic; sau đó bổ sung vào dịch lọc EDTA, Na_2SO_3 và axit xitric để kết tủa tetracyclin.
- Dịch lên men sau khi lọc được bổ sung chất mang quater amon, dung dịch Ca^{2+} , Mg^{2+}) để tạo phức; thu phức bằng trích ly dung môi; trích ly lại tetracyclin sang pha nước ở pH=1,5-1,7 (trước đó có thể trích ly bằng nước ở pH=2,5 để loại clotetracyclin), rồi bổ sung thuốc nhuộm aryl-azo-sulfonic để kết tinh tetracyclin.
- Dịch lên men sau khi được xử lý, lọc và làm lạnh xuống nhiệt độ thấp, được đưa sang hấp phụ tetracyclin bằng các vật liệu hấp phụ thích hợp; sau đó rửa cột rồi nhả và tinh chế tiếp.

6.3. ỨNG DỤNG

Tetracyclin là một họ kháng sinh phổ rộng, có thể tiêu diệt được nhiều loài vi khuẩn Gram dương, Gram âm, rickettsia, spirochetes, mycoplasma và cả một vài loài virus lớn (trong đó clotetracyclin tác dụng tốt hơn trên các cầu khuẩn Gram dương, còn tetracyclin lại tác dụng tốt hơn trên các trực khuẩn Gram âm). Phần lớn các tetracyclin đều có hoạt tính kháng khuẩn điển

hình với các mầm bệnh *Pseudomonas*, *Proteus* và *Salmonella*. Song chúng lại không có hoạt tính kháng khuẩn đối với *Mycobacteria*, *Protozoa* và các loài nấm sợi.

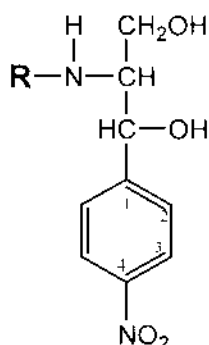
Cơ chế tác dụng chính của các tetracyclin là chúng phong tỏa hoạt động của nhiều enzym chính của quá trình trao đổi chất, kìm hãm quá trình sinh tổng hợp protein trên ribosom và làm thay đổi tính thấm của màng tế bào chất. Người ta đã xác định được hiệu ứng kìm hãm sinh tổng hợp protein của tetracyclin là do chúng tạo phức amin bậc bốn với các tARN và do chúng phong tỏa đầu cuối các đoạn peptit, dẫn tới làm đình chỉ quá trình kéo dài mạch này.

Cùng với các kháng sinh họ β -lactam, các kháng sinh họ tetracyclin được sản xuất và ứng dụng rất rộng rãi trong đời sống. Trong thực tiễn người ta chủ yếu chỉ lên men trực tiếp bốn sản phẩm là: clotetracyclin, oxytetracyclin, tetracyclin và demeclocyclin. Chuẩn độ kháng sinh có thể đạt 20.000 μ g/mL sau khoảng 200 giờ lên men, với phân bố giá thành lên men xấp xỉ 100USD/m³ (khoảng 50% giá thành sản phẩm). Sau đó, từ bốn kháng sinh này người ta đã tổng hợp ra gần 3.000 sản phẩm bán tổng hợp khác. Nhìn chung các kháng sinh tetracyclin có phổ kháng khuẩn rộng và bền vững trong môi trường axit nên có ưu thế trong chỉ định điều trị nhiều bệnh. Tuy nhiên, gần đây người ta đã phát hiện thấy nhiều tác dụng phụ của chúng đối với bệnh nhân, đặc biệt là trẻ em. Chính vì vậy, trong điều trị y học, người ta chủ yếu sử dụng các chế phẩm bán tổng hợp như: metacyclin (hay rodomylin: 6-deoxy-6-demetyl-6-methylene-5-hydroxy-tetracycline), minocyclin (minocin: 7-dimethylamino-6-demetyl-6-deoxytetracycline), rolitetracyclin (reverin: pyrrolidinoemetyl-tetracycline) và phổ biến nhất là doxycyclin (vibramycin: 6-deoxy-5-hydroxytetracycline); còn lại phần lớn lượng tetracyclin sản xuất ra được sử dụng trong chăn nuôi - thú y.

7 CÔNG NGHỆ LÊN MEN CLORAMPHENICOL

7.1. ĐẠI CƯƠNG

Cloramphenicol là chất kháng sinh được phát hiện đồng thời do ba nhóm nghiên cứu độc lập với nhau: nhóm của Ehrlich (Parke Davis Comp., 1947), nhóm Gottlieb (Univ. of Illinois, 1948) và nhóm của Umezawa (1948). Họ cloramphenicol được xem là họ kháng sinh có cấu trúc đơn giản nhất (cấu trúc phân tử của một vài chất kháng sinh điển hình trong họ này được mô tả trong hình 7.1) và, ngay từ khi phát hiện, rất nhiều nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu sản xuất các kháng sinh này. Nhờ vậy, chỉ trong vòng hai năm người ta đã xác định được cấu trúc phân tử và triển khai thành công lên men sản xuất công nghiệp. Đồng thời, chính nhờ những nỗ lực trên, cloramphenicol đã trở thành chất kháng sinh đầu tiên được tổng hợp hoàn toàn bằng phương pháp hóa học (1949).



Trong đó:

Cloramphenicol	R = Cl ₂ CHO-
Nitrophenylserinol	R = H-
Corynecin I	R = CH ₃ CO-
Corynecin II	R = CH ₃ CH ₂ CO-
Corynecin III	R = (CH ₃) ₂ CHCO-

Hình 7.1. Cấu trúc phân tử của một vài kháng sinh họ cloramphenicol thường gặp

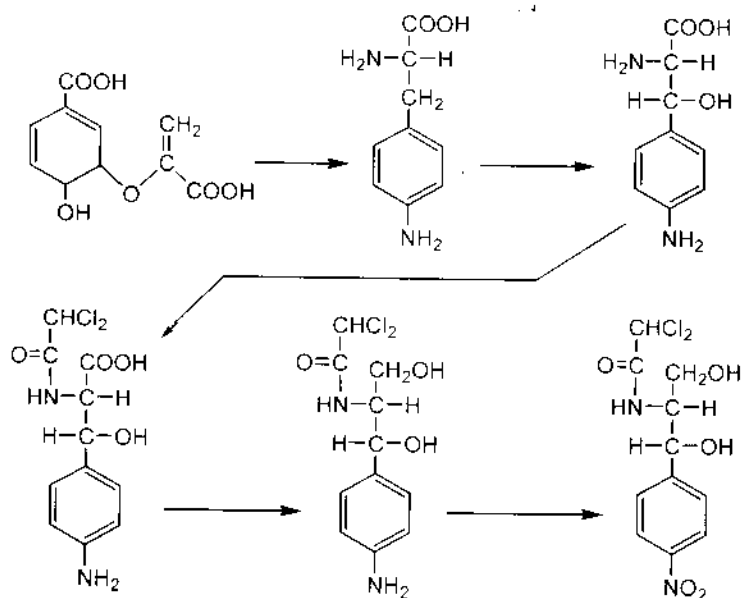
Cloramphenicol là một kháng sinh phổ rộng và trước đây đã được sử dụng rộng rãi để điều trị hiệu quả nhiều mầm bệnh Gram dương và Gram âm khác nhau. Song, do các hiệu ứng phụ không mong muốn, việc ứng dụng cloramphenicol trong điều trị có xu hướng hạn chế dần. Đồng thời, việc sử dụng và kiểm tra phát hiện dư lượng cloramphenicol đã trở thành vấn đề nhạy cảm, được quy định chặt chẽ và giám sát nghiêm ngặt ở nhiều nước, đặc biệt là các nước công nghiệp phát triển.

7.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

7.2.1. Cơ chế sinh tổng hợp cloramphenicol

Ngày nay, người ta đã phân lập được nhiều vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp kháng sinh họ cloramphenicol như: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*... Trong đó các chủng có hoạt lực cao thường thuộc loài: *Streptomyces venezuelae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. omiyaensis*, *Streptosporangium viridogriseum* và *Corynebacterium hydrocarboclastus*.

Do trong phân tử cloramphenicol có chứa vòng phenylpropanoit nên về cơ chế, chất kháng sinh này cũng có thể được tổng hợp qua các axit amin vòng phenylalanin hoặc tyrosin (tương tự với cơ chế tổng hợp nhiều alkaloid thực vật có chứa vòng phenyl-propanoit). Trong môi trường nghèo với muối nitrat là nguồn thức ăn nitơ, sinh tổng hợp cloramphenicol được cảm ứng rõ rệt khi bổ sung vào môi trường một trong hai axit amin này. Tuy nhiên, hiệu ứng cảm ứng cũng xảy ra cả khi bổ sung một số axit amin không vòng khác. Đồng thời khi sử dụng nguồn dinh dưỡng đánh dấu ^{14}C , kết quả thực nghiệm không tìm thấy bằng chứng hai axit amin vòng trên là sản phẩm trung gian cho quá trình sinh tổng hợp. Từ các dữ liệu trên, người ta cho rằng ở *S. venezuelae*, trong sơ đồ sinh tổng hợp các axit amin vòng có đường rẽ nhánh sinh tổng hợp cloramphenicol tại vị trí axit shikimic theo sơ đồ hình 7.2.



Hình 7.2. Sơ đồ cơ chế sinh tổng hợp cloramphenicol từ axit shikimic

7.2.2. Lên men và tinh chế cloramphenicol

Công nghệ lên men sản xuất cloramphenicol được hoàn thiện chủ yếu cho đến thời kỳ đầu thập kỷ 50 của thế kỷ XX. Sau đó, từ khi công nghệ tổng hợp hóa học xuất hiện, với hiệu quả kinh tế cao hơn, đã dần thay thế hoàn toàn công nghệ lên men. Trong vài năm gần đây, việc áp dụng thành tựu khoa học và công nghệ mới đã mở ra triển vọng hoàn thiện công nghệ lên men sản xuất cloramphenicol với hiệu quả kinh tế có khả năng cạnh tranh được với phương pháp tổng hợp hóa học.

Để lên men cloramphenicol, người ta thường sử dụng các chủng có hoạt tính cao thuộc loài *S. venezuelae* (khi chỉ lên men cloramphenicol có thể sử

dùng chủng *Streptomyces* sp. 3022; để lên men corynecin thường sử dụng *C. hydrocarboclastus*). Nguồn dinh dưỡng cacbon có thể sử dụng là glucoza, lactoza, maltoza và glycerin, trong đó ưu thế hơn cả là glycerin, galactoza và xenlobioza. Nguồn dinh dưỡng nitơ tốt nhất là trypton. Amoniac, asparagin, glutamin cảm ứng sự phát triển sinh khối, nhưng không cải thiện hiệu quả tích tụ kháng sinh; trong khi bổ sung phenylalanin, lécin, hay izolécin xạ khuẩn phát triển chậm, nhưng cải thiện được lượng kháng sinh tích tụ. Trong việc lên men sản xuất, với nguồn nitơ người ta thường sử dụng nguyên liệu thay thế rẻ tiền hơn, thí dụ, dạ dày lợn, nấm men thủy phân, dịch nuôi nấm nem (đồng thời cung cấp thêm các chất khoáng).

Giống xạ khuẩn được nuôi hoạt hóa thu bào tử, rồi cấy chuyển sang môi trường lỏng trong bình tam giác và nuôi ở 25°C sau khoảng 72 giờ, tiếp theo cấy chuyển sang fermentor dung tích lớn hơn đến khi đủ giống cho sản xuất, nhân giống ở 25°C, tốc độ cấp khí $0.8-1.0 v_{khí}/v_{dịch}$, phút và chu kỳ nhân giống 65-70 giờ. Môi trường nhân giống có thể sử dụng gồm: glycerin 10g/l, DL-cerin 5g/l, natri lactat 11g/l, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.39g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/l và NaCl 3g/l. Quá trình sinh tổng hợp cloramphenicol xảy ra gần như đồng thời với sự phát triển sinh khối và phần lớn lượng kháng sinh được sinh tổng hợp và tích tụ trong pha cân bằng. Với các chủng hoạt lực cao, nồng độ cloramphenicol trong dịch thường đạt khoảng 130-150mg/lít sau khoảng 3 ngày lên men. Nồng độ cloramphenicol được định lượng bằng phương pháp sinh học (sử dụng *Sarcina lutea* làm vi sinh vật chỉ thị), phương pháp khử amin hóa, phương pháp đo phổ hấp phụ cực đại ở 278nm, phương pháp sắc ký khí và hiệu quả nhất là phương pháp HPLC.

Kết thúc quá trình, dịch lên men được axit hóa nhẹ xuống pH=4,0, lọc tách sinh khối, rồi điều chỉnh đến pH kiềm nhẹ (pH=8,5-9,0) để trích ly sang etylacetat hay aminacetat. Sau khi phân ly, dịch trích ly được cô chân không loại dung môi rồi lại hòa tan lại bằng dầu lửa. Dung dịch này lại được rửa liên tiếp bằng dung dịch axit acetic loãng, dung dịch natri bicarbonat loãng rửa nước và sau khi phân ly pha sẽ được cô chân không loại dầu lửa. Sau khi rửa phần không bay hơi còn lại (bằng ete dầu lửa để loại lipid) người ta thu

được bột cloramphenicol thô. Bột kháng sinh thô này được hòa tan lại trong dung môi hữu cơ để xử lý tẩy màu qua cột than hoạt tính hay cột nhôm rồi lại cô đặc thu bột bán thành phẩm. Tiếp theo, lượng bột trên được hòa tan lại trong nước nóng, tẩy màu lại qua than hoạt tính, lọc, cô chân không rồi làm lạnh xuống nhiệt độ thấp để kết tinh thu cloramphenicol dạng tinh thể. Để đạt độ tinh sạch cao hơn, có thể hòa tan và kết tinh lại trong etylen diclorit hoặc trong dung môi hỗn hợp ete-ete dầu lửa.

7.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG VÀ ỨNG DỤNG

Cloramphenicol là một kháng sinh phổ rộng và có hoạt tính kháng khuẩn cao (có $MIC \leq 10\mu g/ml$ đối với hầu hết các chủng kiểm tra), do chúng liên kết với tiểu thể lớn 50S của ribosom dẫn tới kìm hãm quá trình tổng hợp protein. Kháng sinh này bền trong môi trường axit nên rất thuận lợi cấp qua đường uống, thuốc phân bố tốt trong mô của nhiều cơ quan và tổ chức trong cơ thể. Bên cạnh đó, cloramphenicol còn có ưu điểm là dễ dàng được đào thải qua gan và nước tiểu (với thời gian bán hủy khoảng 2-3 giờ). Cloramphenicol có thể được sử dụng hiệu quả để điều trị nhiều loại mầm bệnh khác nhau như: phần lớn vi khuẩn Gram âm yếm khí, *Rickettsiae*, *Chlamydia* và nhiều loài *Mycoplasma*; đặc biệt là các chủng *Salmonella*, *Haemophilus influenza*, *Bacteriodes fragilis*, *Aerobacter aerogenes*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* và *Brucella sp.* Trước đây, cloramphenicol được ứng dụng hết sức rộng rãi trong điều trị y học và trong thú y, dưới rất nhiều sản phẩm thương mại khác nhau như: clorocid, cloromycetin, ampicol, chemicetina, cloramphilin, levomycetin, paracin, unimycin, cloranphetina, enteromycetin... Thậm chí trong một thời gian khá dài, ở nhiều nơi, người ta còn bổ sung thêm cloramphenicol trực tiếp vào thức ăn gia súc nhằm phòng ngừa dịch bệnh và cải thiện hiệu quả tăng trọng gia súc gia cầm.

Tuy nhiên, sau gần 30 năm sử dụng, người ta đã phát hiện thấy nhiều hiệu ứng phụ nguy hiểm của cloramphenicol như: kìm hãm sự phát triển tủy xương khi điều trị kéo dài và có thể gây ra ngộ độc máu dẫn đến tử vong (thể

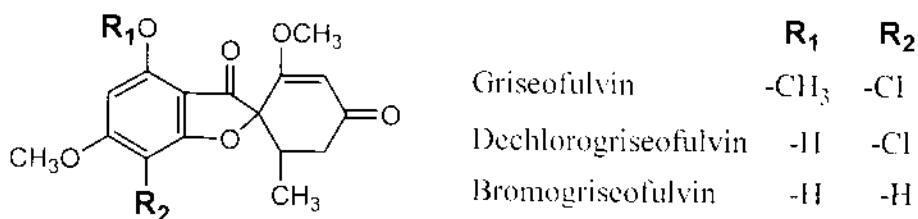
không phụ thuộc liều sử dụng, với rủi ro khoảng 1/20.000 trường hợp). Đặc biệt, khi được sử dụng trong chăn nuôi, một phần kháng sinh chưa đào thải sẽ tồn dư sang sản phẩm thực phẩm và một lượng đáng kể trong thức ăn thừa sẽ thoát ra và lắng đọng vào môi trường, theo thời gian có thể dẫn tới các biến đổi về hệ sinh thái. Chính vì những lý do này, trong bối cảnh nguy cơ kháng thuốc ngày càng trở nên trầm trọng, xu thế chung hiện nay là giới hạn chỉ định điều trị bằng cloramphenicol đang bị thu hẹp dần. Hầu hết các nước công nghiệp phát triển đã ban bố luật nghiêm cấm sử dụng cloramphenicol trong chăn nuôi gia súc gia cầm nếu các sản phẩm của chúng (thịt, trứng sữa...) được sử dụng làm nguồn nguyên liệu sản xuất thực phẩm. Đồng thời, cloramphenicol được xem là chỉ tiêu thường trực trong các tiêu chuẩn nhà nước về quy định kiểm tra giám sát dư lượng kháng sinh trong sản phẩm thực phẩm.

8

CÔNG NGHỆ LÊN MEN GRISEOFULVIN

8.1. ĐẠI CƯƠNG

Griseofulvin ($C_{17}H_{17}O_6Cl$) là chất kết tinh không màu và được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1939, khi Oxford và đồng nghiệp tách tinh chế từ hệ sợi nấm *Penicillium griseofulvum*. Một thời gian ngắn sau đó, người ta cũng phát hiện thấy chất này ở nấm mốc *P. janczewskii*, trong nốt sần và đầu sợi nấm *Botrytis allii*. Ngày nay, người ta đã xác định được năng lực sinh tổng hợp griseofulvin có ở rất nhiều loài nấm sợi khác nhau, thí dụ như *P. janczewskii*, *P. nigricans*, *P. urticae*, *P. raistrickii*, *P. albidum*, *P. patulum*, *P. menili*, *Aspergillus versicolor*, *Nigrospora musae*, *N. oryzae*, *N. saccharii*, *N. sphaerica*, *Khauskia oryzae*, *Carpenteles brefeldianum*...



Hình 8.1. Công thức cấu tạo của kháng sinh nhóm griseofulvin

Là một sản phẩm sinh tổng hợp từ nấm sợi, nhưng hoạt tính kháng sinh điển hình của griseofulvin là tính kháng nấm. Hoạt tính này biểu hiện rất điển hình đối với các loài nấm có chứa kitin trong thành tế bào, thí dụ như các giống *Trichophyton*, *Epidermophyton* và *Microsporum* (griseofulvin hầu như không tác dụng lên nguyên sinh động vật, vi khuẩn, nấm men và các loài nấm sợi khác).

8.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Trong công nghệ lên men sản xuất griseofulvin, người ta thường sử dụng các biến chủng có hoạt lực cao thuộc các loài nấm *Penicillium griseofulvum*, *P. nigricans* hay *P. patulum*. Để kích thích tạo biến chủng có thể sử dụng tia cực tím, etylmetansulfonat, nitrometyl-ure... Thực tiễn cho thấy, năng lực và hiệu suất tích tụ griseofulvin cũng biến đổi nhiều giữa các chủng và thành phần môi trường lên men. Về hình thái, thường các chủng tạo phần bào tử mạnh (*conidium*) có xu hướng tích tụ nhiều griseofulvin hơn, trong khi các chủng tạo hạch sần, cứng và sẫm màu (*sclerotium*) thường tích tụ ít sản phẩm hơn.

Giống sử dụng được nuôi thu bào tử trên tấm mảnh rồi sấy khô bảo quản, hoặc bảo quản bào tử trong cát. Canh trường tấm mảnh sau sấy có thể được bảo quản lâu dài hoặc sử dụng để cấy giống thường xuyên cho sản xuất. Giống sản xuất cũng có thể được giữ trên môi trường Czapeck-Dox trong ống thạch nghiêng.

Giống từ canh trường bảo quản được hoạt hóa và nhân trực tiếp vào môi trường lỏng nuôi trên máy lắc 280v/ph ở 25°C trong khoảng 48 giờ. Thành phần môi trường nhân giống có thể sử dụng gồm: protopepton 20g/l; dịch chiết malt 10g/l; glucoza 40g/l; tinh bột tan 20g/l; NaNO₃ 3g/l; KH₂PO₄ 1g/l; MgSO₄.7H₂O 0,5g/l và FeSO₄.7H₂O 0,02g/l. Sau đó, giống được nhân tiếp tục trong các fermentor cho đến khi đủ cấp cho sản xuất, với điều kiện nhân giống ở 25°C, chu kỳ cấy chuyển khoảng 40 giờ và có thể sử dụng môi

trường gồm: nước chiết nấm 3g/l, đường vàng 20g/l, dầu ngô 10g/l, vôi bột 10g/l và Hodag MF 0,3g/l (U.S. Patent No. 3,038,839).

Lên men công nghiệp griseofulvin cũng có thể tiến hành theo phương pháp nuôi lỏng tĩnh trên môi trường nhân giống trung gian mô tả trên trong thời gian 65-85 ngày, hay lên men bề mặt trong các khay trong 21-24 ngày với thành phần môi trường gồm đường kính 210g/l, nước chiết nấm 2,5g/l, KCl 1,5g/l, Na_2SO_4 2,0g/l và KH_2PO_4 8,0g/l. Tuy nhiên, đạt hiệu quả cao nhất vẫn là phương pháp lên men chìm. Theo sáng chế của hãng Glaxo (U.S. Patent No. 3,069,328), trong pha đầu, người ta sử dụng môi trường lên men nghèo thức ăn cacbon (môi trường gồm: nước chiết nấm 1,75g/l, đá vôi 4g/l; KH_2PO_4 4g/l, KCl 1,5g/l và dầu phá bột 0,55g/l). Quá trình lên men được tiến hành trong thiết bị 4500 lít, ở 25°C, khuấy trộn 220v/ph, tỉ lệ cấp giống 10%, tốc độ sục khí 5 giờ đầu là $0,25V_{\text{đỉnh}}/\text{ph}$, rồi tăng lên $0,50 V_{\text{đỉnh}}/\text{ph}$ trong thời gian từ 5-10 giờ và cuối cùng tăng lên $0,80 V_{\text{đỉnh}}/\text{ph}$ kể từ sau 10 giờ lên men. Sau khi hệ sợi nấm phát triển và pH môi trường tăng dần lên đến pH trung tính, người ta mới bổ sung từ từ dung dịch glucoza 50% (0,5-5,0 lít/giờ) và giữ ổn định pH trong khoảng pH=6,8-7,2 để sinh tổng hợp griseofulvin. Trong điều kiện trên sau 260 giờ lên men, nồng độ griseofulvin có thể đạt 11g/l.

Tương tự như trong công nghệ lên men penicillin, sự phát triển của chủng và hiệu quả sinh tổng hợp griseofulvin trong quá trình lên men cũng được kiểm soát và điều chỉnh hiệu quả thông qua việc giám sát và cung cấp nguồn thức ăn cacbon, nhất là trong trường hợp sử dụng glucoza. Trong thực tiễn, nhiều giải pháp công nghệ ứng dụng trong lên men sản xuất penicillin cũng được khai thác hiệu quả để sản xuất ra kháng sinh này. Trong việc kiểm tra định lượng griseofulvin trong môi trường, có thể áp dụng phương pháp sinh học (thường sử dụng *Microsporum gypseum* làm chủng chỉ thị), phương pháp trích ly sang butylacetat rồi đo phổ hấp phụ tử ngoại của griseofulvin ở sóng 288-300nm, hay sử dụng phương pháp HPLC. Trong điều kiện tương ứng với các chế độ công nghệ trên, khi thay thế môi trường lên men bằng môi trường Czapek-Dox (đường kính 30,0g/l; NaNO_3 3,0g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g/l;

KCl 0,5g/l; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g/l; K_2HPO_4 1,0g/l; nước cất đủ 1.000ml; pH điều chỉnh về pH=7,2), sẽ thu được sản phẩm chính là decolorogriseofulvin, hoặc với môi trường Czapek-Dox, khi thay KCl bằng KBr sẽ thu được sản phẩm là debromogriseofulvin.

Griseofulvin tan rất kém trong nước và các dung môi không phân cực, trong khi chúng lại tan tốt trong các dung môi phân cực mạnh như etanol, cloroform, aceton, etylacetat... Vì vậy, kết thúc quá trình lên men, người ta tiến hành lọc thu và sấy khô sinh khối. Tiếp theo, hệ sợi khô được xử lý trích ly bằng dầu nhẹ, rồi trích ly tiếp bằng ete. Phần đoạn trích ly ete được cô chân không loại dung môi và hòa tan lại trong benzen nóng. Sau đó, dịch benzen được làm nguội để kết tinh loại bỏ các chất chứa nitơ. Phần còn lại trong dịch chứa griseofulvin được cô loại dung môi, hòa tan lại trong cồn và kết tinh thu sản phẩm.

Theo phương pháp của Hãng Glaxo (Anh, British Patent No. 784,618), dịch lên men được lọc tách thu sinh khối, rồi trích ly ba lần bằng butylacetat. Lượng dung môi thu được sau trích ly được ly tâm loại cặn, cô chân không ở nhiệt độ thấp 50°C rồi làm lạnh kết tinh thu griseofulvin thô. Tiếp theo, rửa tinh thể bằng cloroform, hòa tan lại và kết tinh trong hỗn hợp aceton-nước; cuối cùng lọc thu tinh thể và làm khô nhờ rửa lại bằng butylacetat.

Ở Liên Xô cũ, người ta đã áp dụng sơ đồ tách như sau: kết thúc quá trình lên men, dịch lên men được lọc thu sợi nấm, sau đó, xử lý trích ly hệ sợi ba lần trong thiết bị đồng hóa với metylen clorit. Qua mỗi lần, dung môi được gạn tách, thu gom lại, cô đặc chân không ở 50°C xuống còn khoảng 2/3 thể tích rồi ly tâm thu dịch trong. Tiếp theo, dịch ly tâm được tẩy màu bằng than hoạt tính, lọc tách than rồi cô đặc chân không ở nhiệt độ thấp xuống còn khoảng 1/15 thể tích ban đầu. Cuối cùng, làm lạnh dịch cô đặc xuống nhiệt độ dưới 8°C để kết tinh, lọc tách tinh thể, rửa và làm khô bằng aceton để thu griseofulvin.

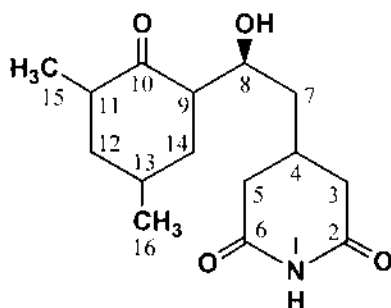
8.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG VÀ ỨNG DỤNG

Cơ chế kháng sinh điển hình của griseofulvin là: chúng kìm hãm quá trình phát triển và hoạt động của hệ sợi thoi và sự vận động của riboxom trong giai đoạn phân bào metaphase của nấm, kết quả làm xuất hiện các tế bào bất bình thường có vô số nhân. Griseofulvin tác dụng hiệu quả trên các loài nấm có chứa kitin trong thành tế bào như: *Mycosporum*, *Epydermophyton*, *Trichophyton*... Trong thực tiễn, chất kháng sinh này thường được chỉ định để điều trị các bệnh hắc bào, nấm tóc, nấm móng chân và móng tay.

9 CÔNG NGHỆ LÊN MEN CYCLOHEXEMIDE

9.1. ĐẠI CƯƠNG

Cyclohexemide được phát hiện lần đầu tiên trong canh trường nuôi *Streptomyces griseus* vào năm 1946 (đến năm 1947, người ta đã tinh chế thu tinh thể và xác định được cấu trúc vào năm 1949). Ngày nay, người ta đã xác định được nhiều loài vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp được cyclohexemide như: *S. noursei*, *S. naraensis*, *S. pulveraeus*, *S. albus* và *S. ornatus*. Công thức cấu tạo của cyclohexemide được thể hiện trong hình 9.1. Cyclohexemide là chất kháng sinh có hoạt tính kháng nấm, chúng kìm hãm hiệu quả quá trình sinh tổng hợp protein. Đặc tính này được khai thác tích cực trong việc chuẩn bị pha chế nhiều loại môi trường chọn lọc. Trong thực tiễn, phần lớn chất kháng sinh này được sử dụng để làm thuốc diệt nấm phục vụ nông nghiệp.



Hình 9.1. Cấu trúc của cyclohexemide

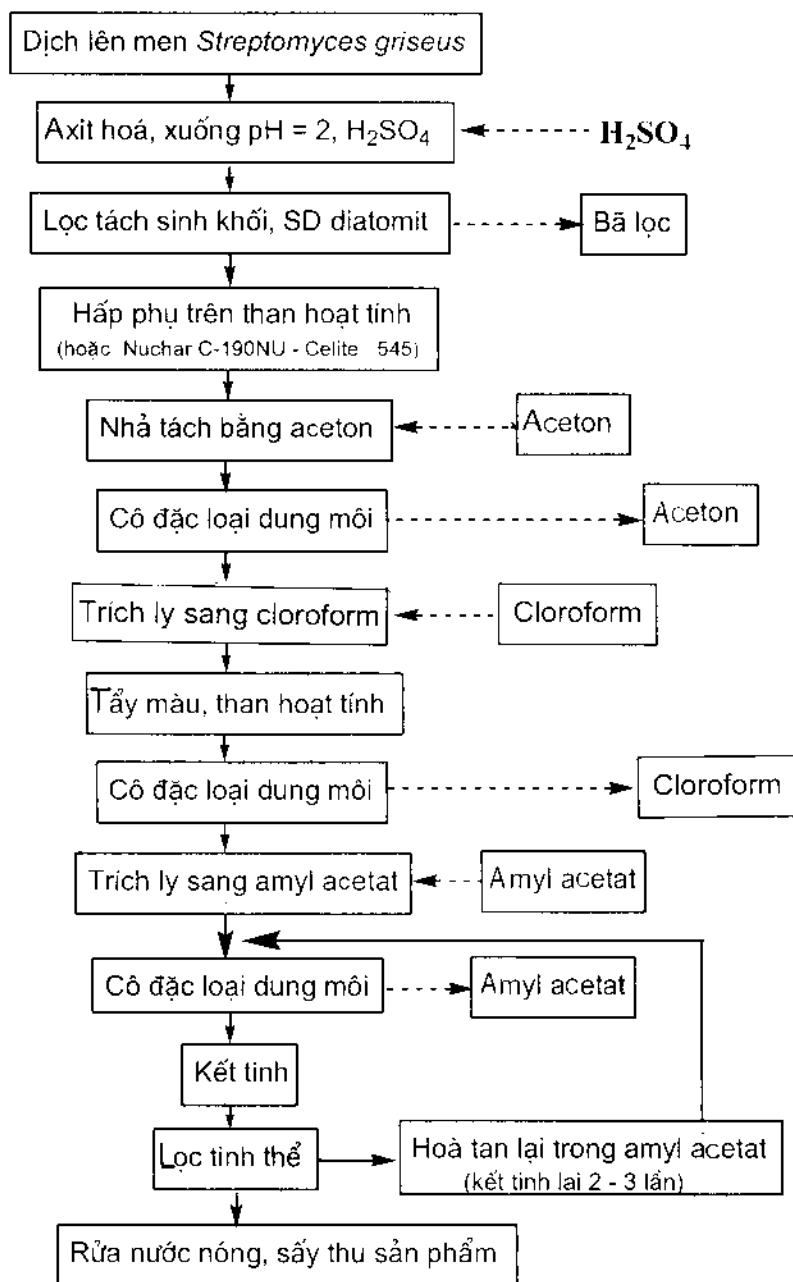
Về mặt động học, phân tử cyclohexemide được tổng hợp qua chuỗi phản ứng ngưng tụ sáu phân tử malonic. Tốc độ quá trình sinh tổng hợp tỉ lệ nghịch với nồng độ sản phẩm trong môi trường. Hiệu ứng này vẫn tồn tại khi thay thế cyclohexemide bằng izocyclohexemide hay anhydrocyclohexemide. Nghiên cứu ảnh hưởng của glucoza đến quá trình sinh tổng hợp và tích tụ cyclohexemide trong môi trường cho thấy: trong điều kiện lên men gián đoạn, hàm lượng glucoza bắt đầu giảm nhanh bắt đầu từ ngày lên men thứ hai cũng tương ứng với thời kỳ tích tụ mạnh mẽ cyclohexemide. Sau đó, khi hàm lượng glucoza cạn kiệt thì sản phẩm cyclohexemide sẽ bị phân hủy dần. Tuy nhiên, trong điều kiện bổ sung duy trì nồng độ glucoza trong môi trường sẽ không thấy xuất hiện sự phân hủy sản phẩm và nồng độ cyclohexemide tích tụ tăng dần cho đến cuối quá trình lên men.

9.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN

Để lên men sản xuất cyclohexemide, người ta thường sử dụng các chủng xạ khuẩn hoạt lực cao của loài *Streptomyces griseus* hay *S. noursei*. Quy trình công nghệ có thể tóm tắt như sau: giống xạ khuẩn *S. griseus* được giữ bảo quản trong thạch nghiêng và nhân hoạt hóa giống trong môi trường gồm: glucoza 10g, cao thịt bò 5g, pepton 5g, NaCl 5g, nước máy đủ 1.000ml; thanh trùng môi trường ở 121°C trong 25 phút; nhân giống nhỏ trên máy lắc tròn ở 27°C, tỉ lệ cấy giống cây chuyển là 2%.

Lên men thu sản phẩm trên thiết bị 250 lít với tốc độ cấp khí $1V_{kh}/V_{dịch}$ ·phút, tốc độ khuấy trộn 300 vòng/phút, ở 25°C, trong thời gian lên men khoảng 5 ngày. Môi trường lên men gồm: glucoza 60g/l, bột đậu tương đã tách chất béo 15g/l, cao nấm men 2,5g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 5 g/l, $CaCO_3$ 8g/l, NaCl 5g/l và KH_2PO_4 0,2g/l.

Trong quá trình lên men, bên cạnh cyclohexemide, *S. griseus* thường tổng hợp đồng thời streptomycin và một vài kháng sinh khác; nghĩa là sản phẩm của quá trình lên men thường không phải chỉ thu một mình chất kháng sinh này. Cyclohexemide tan tốt trong các dung môi phân cực như cloroform hay ete và bền vững trong môi trường axit (trong khi streptomycin lại tan kém trong hai dung môi trên). Để tách tinh chế sản phẩm, có thể áp dụng sơ đồ công nghệ sau (xem hình 9.2).



Hình 9.2. Sơ đồ công nghệ tách và tinh chế cycloheximide

Đầu tiên, dịch lên men được lọc tách sinh khối (sử dụng đất trợ lọc), rồi hấp phụ cyclohexemide trên cột than hoạt tính (hoặc sử dụng các vật liệu hấp phụ khác, thí dụ như hỗn hợp nhựa Nuchar C-190NU với Celite #545 – 1.800;4.500kg; yêu cầu streptomycin không hấp phụ trên cột này). Tiếp theo, rửa tách bằng dung dịch aceton 80%, cô chân không tách loại hết dung môi (xuống khoảng 52:1). Phần dịch còn lại chuyển qua trích ly cyclohexemide bằng cloroform, rồi tẩy màu qua cột than hoạt tính, cô chân không loại dung môi để thu cyclohexemide thô. Công đoạn tinh chế được thực hiện qua nhiều lần hòa tan, cô đặc chân không rồi kết tinh lại, sử dụng dung môi amylacetat, cuối cùng rửa lại tinh thể bằng nước nóng. Cyclohexemide cũng có thể được tách thu theo sơ đồ hình 9.3 hay, thời gian gần đây, người ta còn áp dụng xen kẽ các công đoạn sắc ký, sử dụng nhựa trao đổi ion để cải thiện chất lượng quá trình tinh chế, thí dụ, Dowex 50-X, Dowex 50-X2, Dowex 1-X8 (Dow Chemical Co.); XAD-2, XAD-4, XAD-7, XE-348 (Rohm and Haas), hay BACM (Mitsubishi).

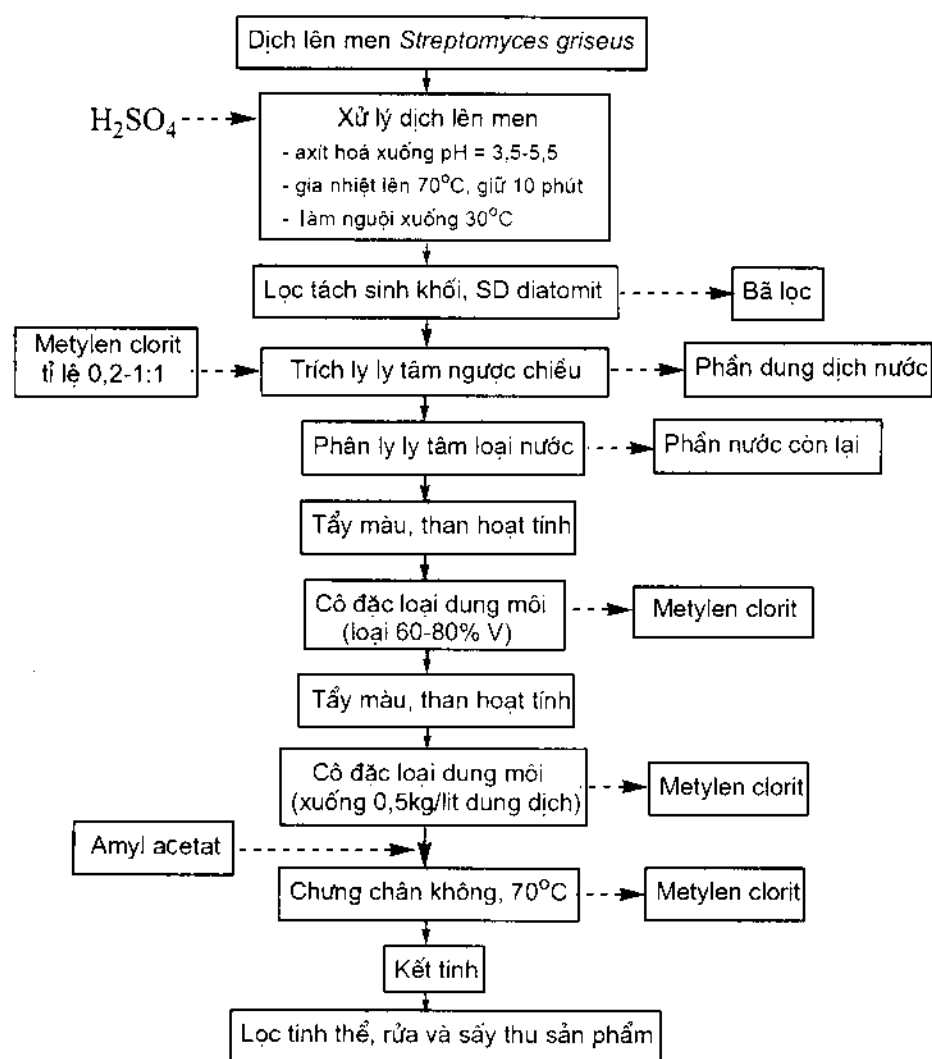
9.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG VÀ ỨNG DỤNG

Về cơ chế tác dụng, cyclohexemide là chất kìm hãm hiệu quả quá trình sinh tổng hợp protein, do chúng ngăn cản quá trình kết nối các axit amin vào chuỗi peptit trong quá trình sinh tổng hợp protein. Bên cạnh đó, cyclohexemide còn có hoạt tính ức chế đặc hiệu vi khuẩn bacteriocide.

Trong thực tiễn, một phân kháng sinh này được ứng dụng để điều trị một số bệnh nấm nhiệt đới trên người, song phần lớn được sử dụng để diệt nấm hại trên cây trồng và xử lý quả khi thu hoạch. Cyclohexemide cho tác dụng hiệu quả trên các loài nấm hại như *Sclerotinia*, *Helminthosporium*, *Curvularia* và loài nấm phấn khác (ưu thế đáng kể của chúng là sau thời gian sử dụng dài ngày vẫn không gây ra tác động tiêu cực làm biến đổi hệ sinh thái, nhờ chúng chỉ có hoạt tính kìm hãm bacteriocide).

Một ứng dụng khác của cyclohexemide là để xử lý hạn chế rụng cuống và dập nhũn quả, nhằm cải thiện chất lượng khi thu hoạch bằng máy hay khi

phân loại quả. Ngoài ra, ở một số nơi, người ta còn thử nghiệm sử dụng để ngăn chặn sự thối hỏng hoa quả trong quá trình vận chuyển sau thu hoạch.



Hình 9.3. Sơ đồ công nghệ tách tinh chế cyclohexemide (theo Churchill)

10 CÔNG NGHỆ LÊN MEN BLEOMYCIN

10.1. ĐẠI CƯƠNG

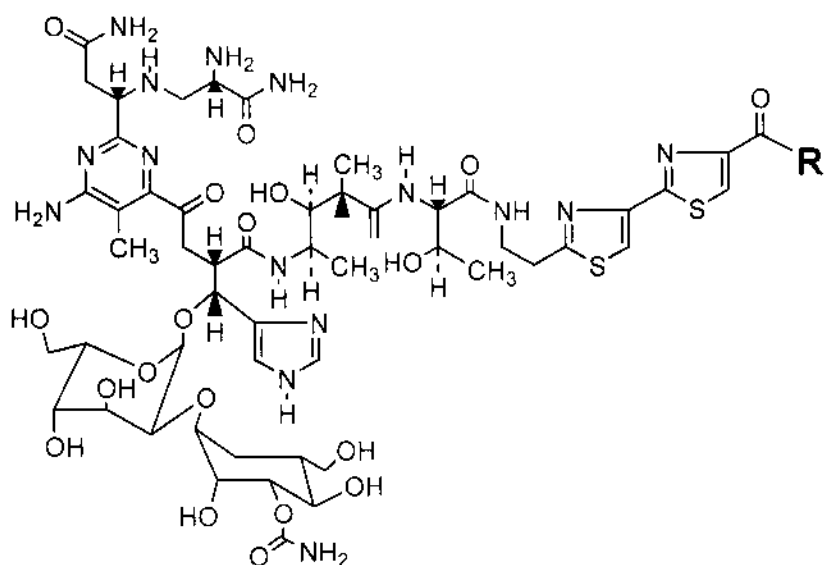
Trong chương trình tìm kiếm các chất kháng sinh mới, Umezawa và đồng nghiệp đã khám phá được phleomycin, một chất kháng sinh kìm hãm hiệu quả tế bào ung thư biểu mô Ehrlich, nhưng lại rất độc trên thận động vật thí nghiệm nên không ứng dụng được. Tuy nhiên, khám phá này đã mở ra hy vọng tìm kiếm được chất kháng sinh để điều trị ung thư. Nhờ vậy, trong chương trình tìm kiếm các kháng sinh tương tự phleomycin, nhưng an toàn hơn, bleomycin đã được khám phá ra vào năm 1956.

Để sinh tổng hợp bleomycin, người ta thường sử dụng chủng xạ khuẩn *Streptomyces verticillus* ATCC15003. Chủng xạ khuẩn này thường tổng hợp ra một họ gồm nhiều bleomycin khác nhau (xem hình 10.1), trong đó hỗn hợp trên với cấu tử bleomycin A2 không chứa ion kim loại chiếm 55-70% và bleomycin B2 (25-30)% là dạng được sử dụng phổ biến nhất trong điều trị y học (trong các trường hợp như ung thư vảy nến, ung thư tinh hoàn và ung thư bạch cầu).

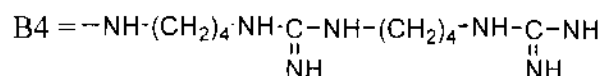
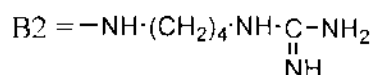
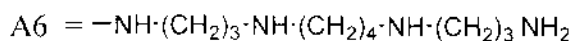
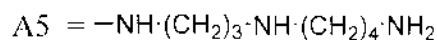
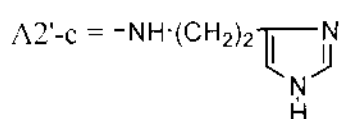
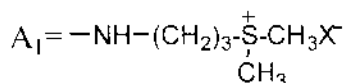
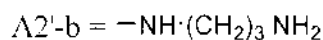
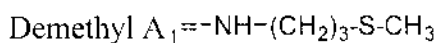
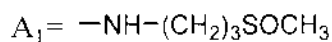
10.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ TINH CHẾ

Theo Kyokuto Seiyaku Co. (Nhật Bản), công nghệ lên men sản xuất bleomycin có thể tóm tắt như sau: đầu tiên, chủng *S. verticillus* ATCC15003 (bảo quản dài ngày ở dạng canh trường đông khô hay dạng bào tử) được nuôi

hoạt hóa trên tấm đại mạch đã hấp chín ở 27°C trong khoảng hai tuần để thu bào tử. Khi bào tử đã phát triển phủ kín hạt tấm, người ta sấy chân không canh trường đến khô, rồi bảo quản ở 0°C để làm giống phục vụ sản xuất.



R



Hình 10.1. Cấu trúc một vài bleomycin của *S. verticillus* ATCC15003

Tiếp theo, canh trường giống tám mảnh trên được hòa vào nước cất thu vào từ để cấp giống cho thiết bị nhân giống sản xuất 6m³. Thành phần môi trường nhân giống sản xuất gồm: glucoza 1%, tinh bột 1%, pepton 0,75% và NaCl 0,3%, pH trước thanh trùng 7,2 (Kyokuto Seiyaku Co. – Hãng Mikuni Kagacu Co. bổ sung thêm nước chiết thịt 0,75%). Quá trình nhân giống tiến hành ở 27-28°C, sục khí và khuấy trộn tích cực, trong khoảng 30-36 giờ rồi cấp giống cho thiết bị lên men sản xuất 125m³. Thành phần môi trường lên men sản xuất gồm: hạt kê 6,4% (nấu nhừ, sản phẩm của Asadaame Shokuhin Co.), glucoza 0,5%, bột đậu tương 3,5%, nước chiết nấm 0,75% (sản phẩm của Ajinomoto Co.), KH₂PO₄ 0,1%, NaCl 0,3%, ZnSO₄.7H₂O 0,05%, CuSO₄.5H₂O 0,01% và NaNO₃ 0,2%; pH trước thanh trùng: pH = 6,5. Quá trình lên men tiến hành trong điều kiện hiếu khí (sục khí và khuấy trộn tích cực), ở 27-28°C trong thời gian 7-8 ngày; pH trong suốt quá trình lên men được khống chế ở mức pH ≤ 7,4 (bằng dung dịch H₂SO₄).

Kết thúc quá trình lên men, người ta điều chỉnh pH môi trường xuống pH = 6,0 rồi lọc thu dịch trong. Tiếp theo, bleomycin được hấp phụ qua cột Amberlite IRC-50 rồi rửa bằng dung dịch HCl 0,3M. Dung dịch thu được sẽ được trung hòa bằng dung dịch NaOH, sau đó lại cho chạy hấp phụ qua cột than hoạt tính, rửa bằng hệ dung môi aceton-HCl 0,2M (tỉ lệ 1:1), trung hòa bằng cách chạy qua cột Dowex 44 và cuối cùng cô đặc chân không thu bleomycin thô.

Bột thô trên được tinh chế tiếp bằng cách hòa tan trong dung dịch metanol 80% (trong nước) để chạy tách sắc ký qua cột bột nhôm; gom các phân đoạn chứa sản phẩm để tinh chế tiếp qua cột Sephadex G-25; cuối cùng chạy tách phân ly các cấu tử sản phẩm bằng cột Sephadex C-25, với trường dung môi biến thiên NH₄Cl 0,1 – 0,5M. Để loại ion Cu²⁺ khỏi sản phẩm bleomycin-Cu²⁺, người ta hòa tan hỗn hợp rồi cho chạy hấp phụ qua cột Amberlite XAD-2, rửa cột bằng dung dịch trung hòa EDTA 4%, rửa lại bằng dung dịch Na₂SO₄ 5% rồi rửa tách bleomycin không chứa kim loại khỏi cột bằng dung dịch metanol 50%.

10.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG VÀ ỨNG DỤNG

Về cơ chế, bleomycin tác dụng trực tiếp vào cấu trúc phân tử ADN, qua tương tác giữa gốc bithiazol, các nhóm amin và các ion kim loại trong cấu trúc của chúng, qua đó làm mất chức năng sinh học của vật liệu di truyền này.

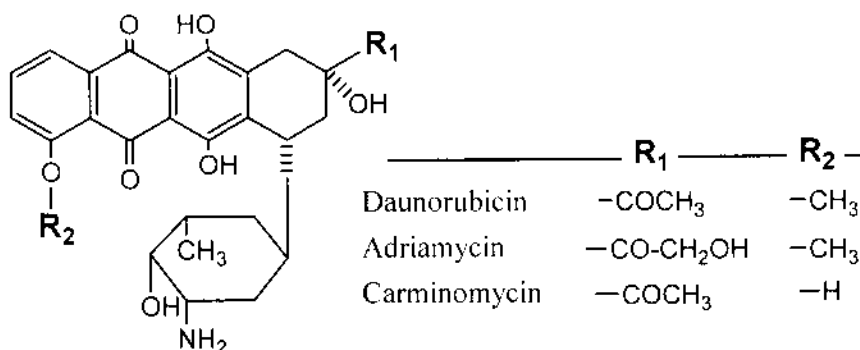
Trong điều trị, bleomycin được chỉ định điều trị các bệnh ung thư vảy nến, ung thư bạch cầu Hodgkin và ung thư tinh hoàn, dưới dạng chỉ định độc lập hay phối hợp với các hóa trị liệu khác (phổ biến nhất là dưới dạng liều tiêm 15mg/liều).

11

CÔNG NGHỆ LÊN MEN

DAUNORUBICIN VÀ ADRIAMYCIN

11.1. ĐẠI CƯƠNG



Hình 11.1. Cấu trúc của nhóm kháng sinh daunorubicin

Daunorubicin và adriamycin thuộc họ các chất kháng sinh có hoạt tính kháng ung thư. Daunorubicin được phát hiện đầu tiên vào năm 1963, nhờ hai nhóm nghiên cứu của hai công ty Farmitalia (Italia, sử dụng *Streptomyces peucetius*) và Rhône-Poulenc (Pháp, sử dụng *S. coeruleorubidus*) triển khai hoàn toàn độc lập với nhau. Mặc dù kháng sinh này có độ độc cao, nhưng chúng lại có thể kìm hãm hiệu quả một số dạng ung thư trên động vật nên thời kỳ đầu daunorubicin vẫn được ứng dụng để điều trị ung thư. Trên con đường tìm kiếm kháng sinh có đặc tính ưu việt hơn daunorubicin, người ta đã khám phá ra adriamycin (sử dụng biến chủng của *S. peucetius*) với hoạt tính cao hơn và phổ điều trị ung thư rộng hơn. Nhờ vậy, adriamycin dần thế chỗ cho các loại kháng sinh khác và trở thành kháng sinh được ứng dụng phổ

biến hơn cả trong điều trị ung thư vào cuối thế kỷ XX. Đồng thời, cũng trong khoảng thời gian trên, nhóm nghiên cứu ở Liên Xô cũ, trên đối tượng xạ khuẩn *Actinomadura carminata*, cũng thu được một dẫn xuất tương đồng khác là carminomycin. Ngày nay, người ta đã biết nhiều loài xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nhóm kháng sinh này, thí dụ về sản phẩm và nguồn gốc chủng công nghiệp được minh hoạ trong bảng sau.

Bảng 11.1. Một số chủng xạ khuẩn sử dụng để sản xuất kháng sinh nhóm daunorubicin

Tên kháng sinh	Danh pháp chủng sử dụng	Nguồn gốc
Daunorubicin	<i>Streptomyces bifurcua</i> 23219	Rhône-Poulenc
	<i>S. coeruleorubidus</i> 8899 và 31723	Rhône-Poulenc
	<i>S. coeruleorubidus</i> ME 130-A	Saraku-Oceana
	<i>S. coeruleorubidus</i>	Gause
	<i>S. griseoruber</i>	Takeda
	<i>S. griseus</i> 32041	Rhône-Poulenc
	<i>S. griseus</i> IMET SA, 3933, 5570, 10086 và 10431	Strauss Jena
	<i>S. peccetius</i>	Farmitalia
	<i>S. viridochromogenes</i>	Pfizer
Adriamycin	<i>S. peccetius</i> var. <i>caesiis</i>	Farmitalia
Carminomycin	<i>Actinomadura carminata</i>	Gause

11.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ TINH CHẾ

11.2.1. Lên men sản xuất daunorubicin

Theo công nghệ của Rhône-Poulenc, giống xạ khuẩn *S. griseus* (bảo quản đông khô) được nuôi hoạt hóa trên thạch nghiêng khoảng 10 ngày. Sau khi bào tử hình thành, dùng nước cất thu bào tử chuyển sang nhân giống trên máy lắc. Nhân giống sản xuất ở 26-27°C, sục khí và khuấy trộn liên tục, với tốc độ cấp khí $0,69 \text{ V}_{\text{khí}}/\text{V}_{\text{dịch}}$ phút, trong thiết bị nhân giống 170 lít (100 L

môi trường, cấp giống 200ml canh trường nuôi lắ trên). Việc lên men sản xuất được triển khai trong thiết bị lên men dung tích 800 lít với 50 lít giống, ở 28°C, khuấy trộn và cấp khí 0,50 $V_{khí}/V_{dịch}$.phút, và kết thúc quá trình lên men sau khoảng 67 giờ. Thành phần môi trường lên men daunorubicin được tóm tắt trong bảng 11.2.

Bảng 11.2. Thành phần môi trường lên men daunorubicin của Rhône-Poulenc

Thành phần	%	Thành phần	%
<i>Môi trường hoạt hóa giống</i>		<i>Môi trường nhân giống lớn</i>	
Đường kính	2,0	Mầm hạt	2,4
Nấm men khô	0,1	Đường kính	3,6
KH_2PO_4	0,2	$CaCO_3$	0,9
$NaNO_3$	0,2	$(NH_4)_2SO_4$	0,24
Agar – agar	0,2	Nước máy	vừa đủ
Nước máy	vừa đủ	pH sau thanh trùng 7,2	
<i>Môi trường nuôi lắ</i>		<i>Môi trường lên men sản xuất</i>	
Pepton	0,6	Bột đậu tương	4,0
Nấm men khô	0,3	Dịch hèm bã rượu	0,5
$Ca(NO_3)_2.H_2O$	0,05	Tinh bột	4,0
Nước máy	vừa đủ	Dầu đậu tương	0,5
pH sau thanh trùng 7,2		NaCl	1,0
		Nước máy	vừa đủ
		pH sau thanh trùng 7,2	

Theo công nghệ của Trung tâm nghiên cứu bệnh ung thư Frederick, giống xạ khuẩn, bảo quản trong nitơ lỏng, được nhân trực tiếp vào bình tam giác, nuôi trên máy lắ ở 28°C trong 60 giờ. Sau đó nhân giống tiếp tục qua hai chu kỳ trong fermentor 100 lít, ở 30°C, trong 1-2 ngày rồi chuyển tiếp sang fermentor 1000 lít với cùng điều kiện ở 30°C, trong 1-2 ngày. Cuối cùng, lên men sản xuất trong thiết bị lên men 10.000 lít, ở 30°C trong khoảng thời gian 7-10 ngày.

Thành phần môi trường nhân giống gồm: bột ngũ cốc 1,5%, bột hạt bông 0,5%, bột đậu tương đã tách dầu 0,5%, dịch tự phân nấm men 0,5%, NaCl 0,25%, CaCO_3 0,5% và dầu phá bột Prochem #51 0,8%.

Thành phần môi trường lên men sản xuất gồm: glucoza 5,0%, bột cá trích 1,2%, bột đậu tương 1,25%, dịch tự phân nấm men 0,75%, NaCl 0,33%, CaCO_3 1,0% và dầu phá bột Prochem #51 1,0%.

Daunorubicin và các dẫn xuất khác, được hình thành trong quá trình lên men, đều là các chất độc mạnh và được xem là các tác nhân gây đột biến. Vì vậy, quá trình tách và tinh chế daunorubicin phải đảm bảo nghiêm ngặt điều kiện an toàn (thường tiến hành trong dây chuyền kín biệt lập với môi trường). Bên cạnh đó, daunorubicin là một sản phẩm nội bào liên kết nên quá trình tách và tinh chế cũng đòi hỏi các điều kiện tương ứng phức tạp hơn.

Ở Rhône-Poulenc, ngay sau khi kết thúc khâu lên men, người ta xử lý sơ bộ dịch, để xạ khuẩn tự phân và thủy phân các glycozit liên kết với daunorubicin, bằng cách bổ sung dư axit oxalic, gia nhiệt lên 50°C, giữ trong khoảng thời gian 60-90 phút rồi đưa sang lọc thu dịch trong. Tiếp theo, dịch lọc được điều chỉnh về pH = 4,5 rồi chạy hấp phụ daunorubicin lên cột nhựa Amberlite IRC-50, rửa cột triệt để theo trình tự dung môi nước, metanol 50% trong nước và bằng hệ dung môi metanol-nước (9:1). Sau đó, daunorubicin được nhả tách khỏi cột bằng hệ 1% NaCl trong metanol-nước (9:1). Dung môi trên được cô đặc xuống còn khoảng 1/5 thể tích, điều chỉnh về pH = 8,5 rồi trích ly bằng cloroform (với lượng bằng khoảng một nửa so với dung môi). Phần đoạn cloroform trên được cô đặc chân không xuống còn khoảng 1/100, rồi bổ sung vào 10V hexan để kết tinh thu daunorubicin thô.

Ở Trung tâm nghiên cứu bệnh ung thư Frederick, đầu tiên người ta axit hóa toàn bộ dịch lên men bằng H_2SO_4 xuống pH=1,5 để xử lý tự phân tế bào làm giải phóng ra glycozit bán thành phẩm, sau đó lọc thu dịch trong. Dịch lọc và dịch rửa bã được gom chung lại rồi trích ly thu bán thành phẩm sang n-butanol ở pH=8,6. Tiếp theo, dung môi được điều chỉnh về pH=4,5 rồi cô

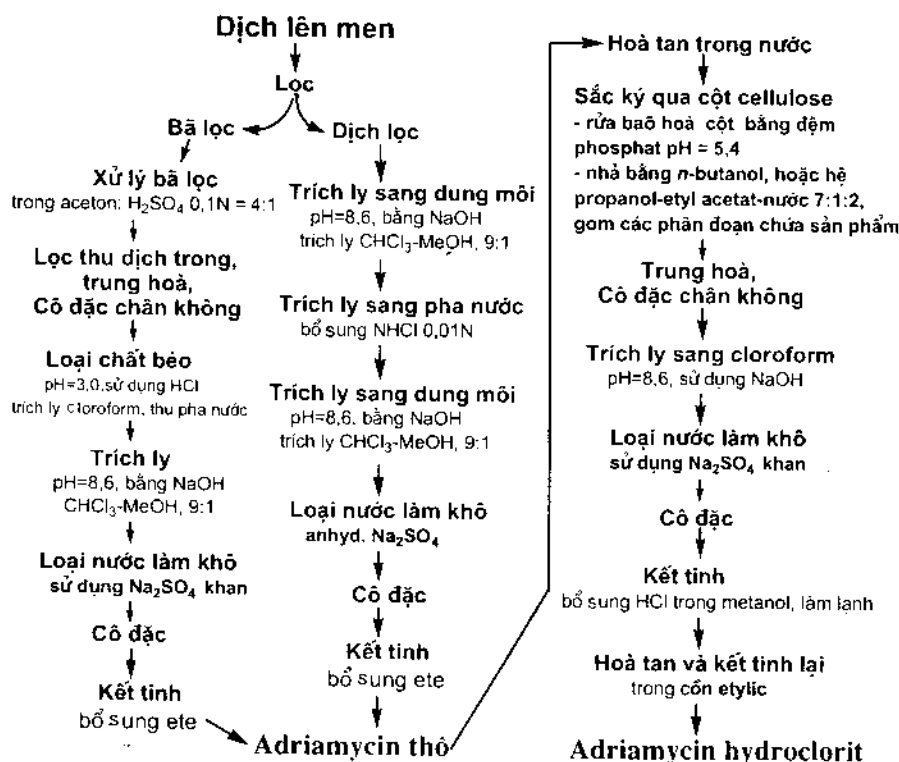
đặc xuống còn khoảng 1/20 V ban đầu; bổ sung thêm heptan rồi trích ly ngược sang dung dịch H_2SO_4 ở pH=2.0. Dung dịch trên được điều chỉnh về pH=8,6 rồi trích ly bán thành phẩm sang metylen clorit. Phân ly thu dung dịch metylen clorit, rồi lại trích ly sang dung dịch axit loãng pH=2,0; từ dung dịch nước lại trích ly sang *n*-butanol; cuối cùng trích ly bằng thiết bị phân ly ngược dòng để thu bán thành phẩm glycozit sang nước tinh khiết. Công đoạn tiếp theo là thủy phân glycozit thu được trên bằng HCl trong etanol ở 47°C, pH=1,5 trong 10 phút, rồi làm lạnh để kết tinh thu daunorubicin thô. Sản phẩm thô được đem hòa tan và kết tinh lại trong hệ dung môi $CHCl_3$ -MeOH-EtOH. Cuối cùng, hòa tan lại kết tủa trong nước tinh khiết rồi sấy chân không siêu lạnh để thu bột daunorubicin hydroclorit. Để đảm bảo an toàn, ngoài dây chuyền xử lý kín biệt lập với người vận hành, toàn bộ chất thải đều phải được xử lý hóa học trước, bằng cách xút hóa đến pH=12, giữ ở 70°C trong 4 giờ (hoặc ở 100°C trong 1 giờ).

11.2.2. Lên men sản xuất adriamycin

Để lên men sản xuất adriamycin, có thể sử dụng biến chủng *Streptomyces peucetis* var. *caesi*us, thu được nhờ xử lý đột biến bằng hóa chất chủng *Streptomyces peucetis* sinh tổng hợp daunorubicin. Quy trình công nghệ lên men có thể tóm tắt như sau: giống xạ khuẩn, từ canh trường giống bảo quản, được nuôi hoạt hóa thu bào tử trong ống thạch nghiêng ở 26-27°C, trong khoảng 10 ngày; sau đó, loại bỏ hệ sợi nấm có màu đỏ đậm rồi nghiền đồng hóa canh trường với nước cất vô trùng để làm giống cấy chuyển sang môi trường bình tam giác 2 lít và nuôi trên máy lắc ở tốc độ 120 v/phút, 28°C trong 2 ngày; sử dụng canh trường nuôi của năm bình này làm giống cấp cho thiết bị nhân giống 170 lít (chứa 120 lít môi trường) và nhân giống ở 26-27°C trong 27 giờ, rồi cấy chuyển tiếp sang thùng lên men 800 lít (chứa 500 lít môi trường). Quá trình lên men kéo dài khoảng 145 giờ.

Sản phẩm adriamycin tồn tại cả trong môi trường lẫn trong hệ sợi, vì vậy người ta phải xử lý cả phần sinh khối và phần dịch trong để thu sản phẩm. Sơ

đồ tóm tắt quá trình tách và tinh chế adriamycin có thể tóm tắt trong hình 11.2.



Hình 11.2. Sơ đồ quy trình tách và tinh chế thu adriamycin

Đầu tiên, dịch lên men được lọc tách phân ly riêng dịch trong và bã lọc. Phần bã lọc được ngâm xử lý trong hỗn hợp dung môi acetone : H₂SO₄ 0,1N (trong nước) theo tỉ lệ 4:1, sau đó lọc tách bã. Phần dịch trong được trung hòa về pH=7,0 và cô đặc chân không xuống nồng độ adriamycin khoảng 250mg/l. Tiếp theo, dịch cô đặc được xử lý loại lipid bằng trích ly với dung môi chloroform ở pH=3,0. Phần pha nước được kiềm hóa bằng NaOH về pH=8,6 rồi trích ly bằng hệ dung môi ChCl₃-MeOH. Dung môi trích ly được

loại nước làm khô bằng natri sulfat khan, lọc, cô đặc, rồi cuối cùng bổ sung ete vào để kết tủa thu adriamycin thô. Phần dịch trong thu được sau khi lọc dịch lên men cũng được xử lý qua các công đoạn tương tự, rồi cuối cùng cũng kết tủa thu adriamycin thô. Bột thô trên được hòa tan lại trong nước để chạy tách qua cột cellulose; rửa bão hòa cột bằng đệm phosphat pH=5,4; tiếp theo rửa bằng *n*-butanol (hay hệ dung môi propanol-acetatetyl-nước, tỉ lệ 7:1:2). Dịch thu gom các phân đoạn sản phẩm được cô đặc chân không rồi trích ly sang cloroform (tỉ lệ dung môi 4:1). Bước tiếp theo là phân ly thu pha dung môi, làm khô bằng NaSO₄ khan, cô đặc chân không rồi bổ sung dung dịch HCl trong metanol và làm lạnh để kết tinh thu kết tủa. Cuối cùng, hòa tan và kết tinh lại kết tủa trên trong etanol để thu sản phẩm adriamycin hydroclorit tinh sạch.

11.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG VÀ ỨNG DỤNG

Daunorubicin và adriamycin là hai kháng sinh có phổ kháng khuẩn vừa phải trên vi khuẩn Gram dương, nhưng hoạt tính lại rất yếu trên vi khuẩn Gram âm và cả hai đều độc. Điểm hấp dẫn nhất của hai kháng sinh này là hoạt tính kìm hãm sự phát triển của khối u. Về cơ chế, chúng tác động trực tiếp vào cấu trúc phân tử xoắn kép làm biến đổi cấu trúc sinh học của phân tử ADN, dẫn tới kìm hãm quá trình tái bản ADN và quá trình phiên mã sang ARN.

Trong y học, cả hai kháng sinh daunorubicin và adriamycin được sử dụng dưới dạng chỉ định độc lập hay phối hợp thuốc để điều trị nhiều bệnh ung thư khác nhau, trong đó hiệu quả điều trị tốt nhất là trong các trường hợp ung thư bạch cầu cấp tính, ung thư vú và ung thư phổi. Phạm vi chỉ định điều trị ung thư bằng kháng sinh này còn phụ thuộc rất nhiều vào các hiệu ứng phụ không mong đợi của chúng như: độc tính cao, kìm hãm sự phát triển của tủy xương và, theo mức độ sử dụng thuốc, chúng sẽ tích tụ dần trong cơ thể dẫn đến gây ra ngộ độc tim.

12 CÔNG NGHỆ LÊN MEN NISIN

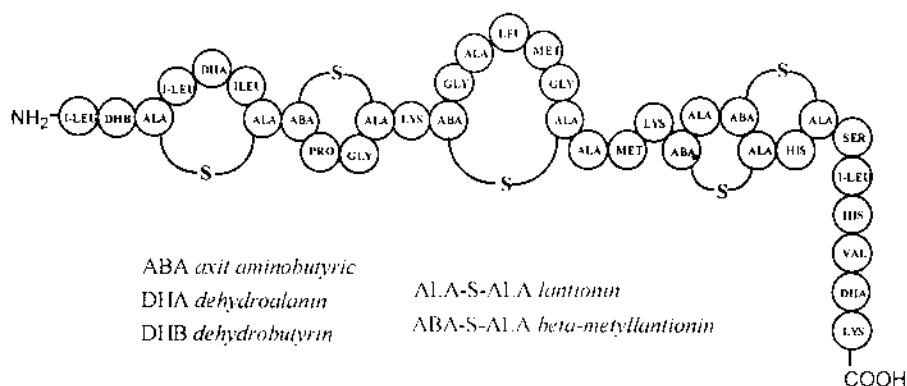
12.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ BACTERIOCIN VÀ NISIN

Bacteriocin là tên chung của các peptit do vi khuẩn sinh tổng hợp có hoạt tính kìm hãm đặc hiệu hay ức chế mạnh mẽ sự sinh trưởng và phát triển của một số vi khuẩn khác. Điểm đặc biệt của các bacteriocin là chúng không có hoạt tính kháng sinh điển hình, nghĩa là chúng chỉ kìm hãm chứ không trực tiếp làm chết vi sinh vật. Chính vì lý do này nên thời kỳ đầu người ta chỉ tập trung vào phát triển các chất kháng sinh, còn các chế phẩm bacteriocin bị xem nhẹ và không được quan tâm đúng mức. Theo thời gian sử dụng chất kháng sinh, hiện tượng kháng thuốc xuất hiện và ngày càng trở nên trầm trọng đã gián tiếp xác nhận đặc tính quý giá của các bacteriocin là nguy cơ gây ra hiệu ứng trên của chúng rất thấp. Nhờ vậy, việc nghiên cứu, sản xuất và sử dụng các bacteriocin đã phục hồi và phát triển. Các chế phẩm bacteriocin điển hình là nisin, diplococin, subtilin, lactostrepcin, bacteriocin S50, monocin (từ *Lactococcus*), pediocin A, pediocin PA-1, pediocin AcH (từ *Pediococcus*), lactocidin, acidolin, acidophilin, reuterin, lactacin F, lactocin 27, helveticin J (từ *Lactobacillus*), leuconocin S, carnocin UI49, micrograd (từ *Leuconostoc*), propionicin PLG-1, Jensenin G (từ *Propionibacterium*)...

Nisin, đại diện điển hình cho các bacteriocin, là một polypeptit có khả năng kìm hãm đặc hiệu nhiều loài vi khuẩn khác nhau, nhất là các vi khuẩn *Clostridium*, chúng dễ dàng bị phân hủy do các enzym đường tiêu hóa và gán

như hoàn toàn không độc với người. Nhờ đặc tính trên nên các chế phẩm nisin hiện được ứng dụng rộng rãi để làm chất bảo quản thực phẩm. Việc phát hiện, nghiên cứu và ứng dụng nisin gần như song hành cùng với lịch sử phát triển của công nghệ chất kháng sinh. Năm 1928, Rogers đã phát hiện thấy nhiều cầu khuẩn lactic có khả năng tổng hợp ra các chất thấm được qua màng phim có hoạt tính kìm hãm sự phát triển của nhiều loài cầu khuẩn khác và kìm hãm năng lực lên men lactic của vi khuẩn *Lactobacillus bulgaricus*. Một thời gian ngắn sau đó, Whitehead và đồng nghiệp đã phân lập được từ sữa cầu khuẩn lactic có khả năng tổng hợp ra chất kìm hãm và xác định được bản chất polypeptit của cấu tử này (1933). Tiếp theo đó đến năm 1947, trong các công trình nghiên cứu về chất kìm hãm do cầu khuẩn lactic tổng hợp ra, thuật ngữ nisin (*N inhibitory substance*) đã chính thức được Mattick và Hirsch sử dụng để đặt tên cho nhóm chất này. Ngày nay người ta đã xác định được nhiều dạng nisin khác nhau là A, B, C, D, E ... trong đó được nghiên cứu và khai thác thương mại nhiều nhất là nisin A.

Nisin A gồm hai tiểu phần với khối lượng mỗi đơn vị khoảng 3.500, trong mỗi chuỗi peptit này (hình 12.1) thường có hai axit amin dị thường chứa lưu huỳnh (lantionin và β -metyllantionin) và hai axit amin không no (dehydroalanin và dehydrobutyrin – viết tắt là DHA và DHB). Độ bền và độ hòa tan của nisin biến đổi phụ thuộc vào pH môi trường: chúng tan tốt hơn ở pH axit, tan rất kém ở pH trung tính và không tan ở pH kiềm.



Hình 12.1. Cấu trúc tiểu phần nisin (theo Gross, 1977)

12.2. ĐIỂM CÔNG NGHỆ LÊN MEN VÀ TINH CHẾ

Mặc dù khả năng sinh tổng hợp nisin phổ biến trong nhiều chủng vi khuẩn *S. lactics* khác nhau; song, khó khăn thường gặp đối với sản xuất công nghiệp là các chủng sinh tổng hợp nisin rất mẫn cảm với phage (hầu hết các chủng công nghiệp có hoạt lực cao đều nhạy cảm với phage, trong khi phần lớn các chủng kháng phage lại có hoạt tính sinh tổng hợp nisin thấp), rất dễ bị nhiễm nấm men dại và đặc biệt là yêu cầu cao về ngăn ngừa nhiễm *Clostridium* (phần lớn chế phẩm nisin được ứng dụng trong bảo quản thực phẩm để kìm hãm họ vi khuẩn *Clostridiace*; do vậy, để nhiễm cũng đồng nghĩa với nguy cơ xuất hiện chủng kháng thuốc và các chủng này kéo theo chế phẩm vào thực phẩm, làm mất tác dụng của chế phẩm).

Chủng công nghiệp, bảo quản đông khô, đầu tiên được nuôi hoạt hóa trong ống nghiệm lỏng ở 30°C, trong 24 giờ rồi cấy chuyển sang môi trường bình tam giác 100ml có bổ sung 500-1000IU/ml nisin (nhằm hạn chế nhiễm *Clostridium*) và nhân tiếp ở 30°C, trong 24 giờ. Trong giai đoạn nhân giống này, người ta thường tiến hành song song nhiều mẫu, thường xuyên kiểm tra nghiêm ngặt độ thuần khiết và loại bỏ sớm các bình nhiễm tạp. Dịch giống trên được nhân tiếp tục sang quy mô 10 lít và 100 lít đến khi đủ giống cấp cho sản xuất. Môi trường nhân giống cần đảm bảo cung cấp đủ các nguồn dinh dưỡng (thường bao gồm glucoza, nước chiết thịt, cao nấm men, các chất khoáng...) và được điều chỉnh về pH trung tính.

Năng lực sinh tổng hợp và đặc tính sản phẩm nisin biến đổi phụ thuộc rất nhiều vào thành phần môi trường và điều kiện lên men (thí dụ, lên men ở 30°C sẽ thu được nisin có hoạt tính kìm hãm tốt *Streptococcus cremoris* và *S. agalactiae*, trong khi lên men ở 20°C sản phẩm thu được chỉ có khả năng kìm hãm *S. cremoris* mà không kìm hãm được *S. agalactiae*). Thành phần môi trường lên men thường bao gồm nước chiết mầm, dịch thủy phân casein, glucoza, KH_2PO_4 , MgSO_4 ... Quá trình lên men thường tiến hành ở 28-30°C, không khuấy trộn (trừ khi điều chỉnh pH) và trong thời gian khoảng 16-18 giờ. Trong quá trình lên men, do tích tụ axit lactic làm pH

giảm dần, nên phải điều chỉnh đảm bảo ổn định pH về dải trung tính pH =6,0-6,8.

Kết thúc quá trình, người ta axit hoá dịch xuống pH=2,0 để xử lý giải phóng nisin, điều chỉnh pH về pH=4,5 rồi phân ly (ly tâm hay lọc) thu dịch trong. Dịch lọc trong được bổ sung 5% cloroform và 0,1% octyl alcohol để trích ly nisin sang cloroform. Sau khi phân ly thu pha nhẹ dạng gel phía trên, người ta bổ sung cồn etylic khan để hoà tan cloroform và kết tủa nisin. Kết tủa được tách thu bằng ly tâm rồi hoà tan lại trong dung dịch HCl 0,05N ở 50°C, kết hợp sục khí và khuấy trộn nhẹ để loại hết cloroform dư. Cuối cùng, qua nhiều lần điều chỉnh pH và trích ly bằng cồn rồi đông khô sẽ thu được nisin. Để tinh sạch nisin, giải pháp đơn giản là tiến hành lặp nhiều lần quy trình hoà tan lại trong HCl 0,01N rồi kết tủa bằng bổ sung NaCl.

Một giải pháp khác để tách thu nisin là: dịch lên men sau khi axit hoá được hoà bổ sung *n*-propanol. Sau đó, người ta bổ sung từ từ dung dịch NaCl để làm giảm độ hoà tan của cả nisin và *n*-propanol. Kết quả hầu hết nisin phân bố sang pha *n*-propanol và người ta phân ly thu pha dung môi trên. Tiếp theo, hoà tan lại trong dung dịch HCl 0,1 N, rồi bổ sung dư NaCl để phân lớp thu pha nổi giàu nisin. Pha chứa bán thành phẩm được kết tủa phân đoạn trong butanol, rồi cuối cùng kết tinh bằng cách bổ sung dư NaCl.

12.3. CƠ CHẾ TÁC DỤNG VÀ ỨNG DỤNG

Nisin kìm hãm hiệu quả nhiều vi khuẩn Gram dương khác nhau (đường như nhạy cảm hơn cả trên các loài vi khuẩn có bào tử, thí dụ: *Streptococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*...), song lại không thể hiện hiệu ứng kìm hãm điển hình đối với vi khuẩn Gram âm (ngoại trừ các chủng vi khuẩn giống *Neisseria*), nấm men, nấm mốc và virut. Cơ chế tác dụng điển hình của nisin là làm giảm khả năng chịu nhiệt và kìm hãm sự nảy mầm của bào tử, ức chế quá trình sinh tổng hợp lớp peptidoglycan và thúc đẩy quá trình tự phân của tế bào.

Ưu điểm lớn của nisin là, do hầu như không tác dụng lên các loài vi khuẩn Gram âm nên, việc sử dụng chúng không làm ảnh hưởng đến hệ vi sinh vật đường ruột có lợi của người, chúng dễ dàng bị phân hủy trong đường tiêu hoá và hầu như hoàn toàn an toàn ở liều sử dụng (thí dụ: liều bảo quản hiệu quả trong phomat là 100-400 UI/g, trong khi đó liều LD₅₀ trên mèo và chuột non thậm chí tới 7g/kg.ngày). Chính nhờ các đặc điểm trên nên nisin hiện đang được triển khai thử nghiệm ứng dụng làm chất bảo quản thực phẩm ở nhiều quốc gia trên thế giới.

Trong công nghệ chế biến sữa, nisin có thể được sử dụng theo một trong hai cách là: bổ sung chế phẩm nisin trực tiếp vào sữa bột hay vào nguyên liệu sữa trước khi lên men chế biến phomat hoặc người ta phối hợp sử dụng các chủng vi khuẩn sinh tổng hợp nisin vào trong quá trình lên men sản xuất phomat, nhằm khắc phục hiện tượng lên men sinh hơi khó chịu và kiểm soát quá trình lên men butyric do vi khuẩn *Clostridium* gây ra (trong công nghệ sản xuất phomat, ở một số nước người ta sử dụng nitrit để khống chế hai quá trình lên men không mong muốn trên, song một số dẫn xuất của chúng rất độc và có hoạt tính gây ung thư nên người ta đang nỗ lực tìm kiếm giải pháp thay thế. Việc sử dụng nisin theo hướng này đã thu được hiệu quả tích cực. Tuy nhiên, vai trò công nghệ của nisin trong sản xuất phomat vẫn chưa thực sự tìm được vị trí vững chắc).

Trong công nghệ chế biến đồ hộp, sau quá trình thanh trùng bào tử của một số loài vi khuẩn bền nhiệt (thí dụ: *Clostridium perfringens*, *C. thermocaccharolyticum* hay *Bacillus stearothermophilus*) trong rất ít trường hợp có thể vẫn có nguy cơ còn sót lại. Việc sử dụng nisin cho các nhóm sản phẩm này nhằm hai mục đích là làm giảm khả năng chịu nhiệt của vi khuẩn (để cải thiện hiệu quả thanh trùng ngay ở chế độ thanh trùng ôn hoà hơn) và kìm hãm, ngăn ngừa quá trình thối rữa (trong trường hợp nếu còn bào tử sót). Nhóm sản phẩm thường áp dụng là: cà chua nghiền, cà rốt nghiền, các sản phẩm nấm mũ, đậu quả đóng hộp...

Trong công nghệ chế biến các sản phẩm thịt (thịt hun khói, dăm bông, xúc xích, thịt băm...) người ta đang nỗ lực tìm kiếm các giải pháp công nghệ

để thay thế cho việc sử dụng nitrit và nisin hiện đang thu hút được sự quan tâm của các nhà sản xuất, trong đó hướng phối hợp nisin – nitrit cho hiệu quả rất tích cực và đang được thử nghiệm tiếp tục.

Một nhóm sản phẩm khác có thể sử dụng hiệu quả nisin là sữa socola. Sản phẩm này, do độ axit thấp nên nguy cơ nhiễm vi khuẩn cao hơn, trong khi đó nhiệt độ thanh trùng cao ảnh hưởng rất tiêu cực đến chất lượng mùi và vị sản phẩm. Việc kết hợp sử dụng nisin cho phép hạ thấp nhiệt độ và thời gian thanh trùng, đồng thời lại cải thiện được chất lượng sản phẩm (ở nồng độ nisin khoảng 80UI/ml đã có khả năng ngăn ngừa hiện tượng lên men thối sản phẩm sữa socola ở nhiệt độ thường trong vòng 6 tháng).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biotechnology, Vol. 3, Bioprocessing, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, 1993.
2. Biotechnology, Vol. 4, Measuring, Modelling and Control, Weinheim-New York-Basel-Cambridge, 1991.
3. Biotechnology, Vol. , Products of Secondary Metabolism, Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokyo, 1996.
4. Biotechnology of Industrial Entibiotics; Erick j. Vandamme; Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
5. Microbiology; McKane, Larry; McGraw-Hill, Inc., 1996.
6. Comprehensive Biotechnology; Harvey W. Blanch. Stephen Drew and Daniel I. C. Wan; Pergamon Press, 1985.
7. Biotechnologie; H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre; VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1987.

TS. NGUYỄN VĂN CÁCH

CÔNG NGHỆ LÊN MEN CÁC CHẤT KHÁNG SINH

Chịu trách nhiệm xuất bản:

PGS. TS. TÔ ĐĂNG HẢI

Biên tập:

NGUYỄN KIM ANH

Vẽ bìa:

HƯƠNG LAN

NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

6.6 C8

KHHT-2004

In 700 cuốn khổ sách 16 x 24cm tại Nhà in KH&CN

Số xuất bản: 469 - 53 ngày cấp : 19/ 04/ 2004.

In xong và nộp lưu chiểu quý IV/ 2004.

205009



Giá: 20.000đ