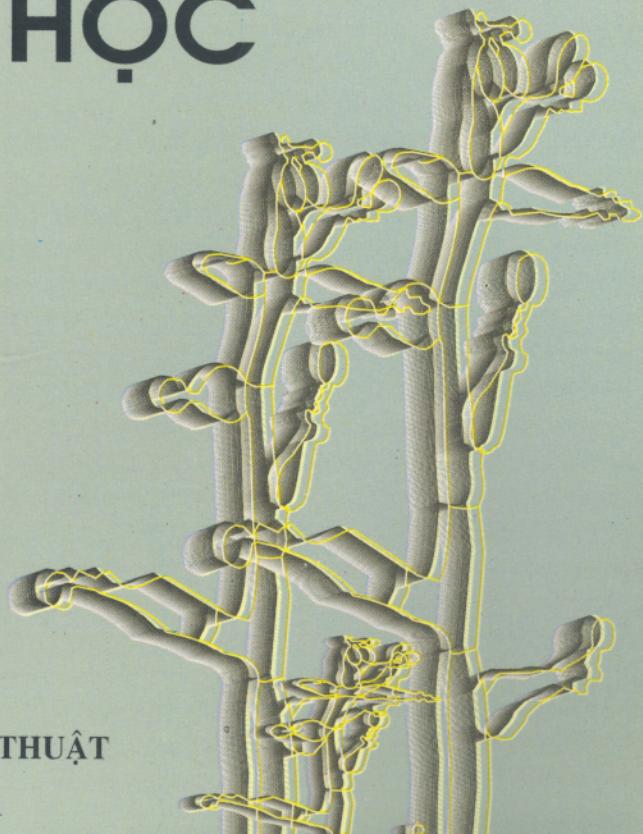


BÙI XUÂN ĐỒNG
NGUYỄN HUY VĂN

Vì nấm DÙNG TRONG CÔNG NGHỆ SINH HỌC



NHÀ XUẤT BẢN
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT

BÙI XUÂN ĐỒNG, NGUYỄN HUY VĂN

VI NẤM
DÙNG TRONG
CÔNG NGHỆ SINH HỌC



NHÀ XUẤT BẢN KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT
HÀ NỘI - 2000

Lời nói đầu

Hiện nay ở nước ta, tài liệu về sinh học và công nghệ sinh học quá thiếu thốn. Chúng tôi viết tập sách này nhằm góp phần nhỏ khắc phục tình hình trên.

Tập sách gồm 3 chương độc lập :

Chương 1 : Kỹ thuật lén men aflatoxin

(Thạc sĩ Nguyễn Huy Văn,

GS.TS. Bùi Xuân Đồng)

Chương 2 : Công nghệ biến đổi sinh học

(GS.TS. Bùi Xuân Đồng)

Chương 3 : Vì nám dùng trong công nghệ sinh học

(GS.TS. Bùi Xuân Đồng)

Nội dung trên được viết nhằm phục vụ việc đào tạo trong và trên đại học ở các trường có chuyên ngành vi sinh vật, làm tài liệu tham khảo đối với các cán bộ giảng dạy, nghiên cứu sinh học, công nghệ sinh học, những người làm công tác chuyên môn có liên quan và các bạn đọc quan tâm đến các chuyên ngành này. Chúng tôi rất mong nhận được sự giúp đỡ, góp ý kiến của bạn đọc.

Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn

MỤC LỤC

Lời nói đầu

Chương I – Kỹ thuật lên men aflatoxin

1. Chọn lọc các chủng vi nấm có khả năng tạo thành các aflatoxin B1, B2, G1, G2
2. Lên men và chiết xuất aflatoxin

Tài liệu tham khảo chính

Chương II – Công nghệ biến đổi sinh học

1. Những vi sinh vật có hoạt tính biến đổi sinh học
2. Những phương pháp sử dụng trong công nghệ biến đổi sinh học
3. Cơ chất biến đổi sinh học
4. Phản ứng biến đổi steroid của các loài vi sinh vật

Tài liệu tham khảo chính

Chương III – Vi nấm dùng trong công nghệ sinh học

1. Nấm tiếp hợp dùng trong công nghệ sinh học
2. Nấm bắt toàn dùng trong công nghệ sinh học

Tài liệu tham khảo chính

Chương I

KỸ THUẬT LÊN MEN AFLATOXIN

Từ năm 1960, loài vi nấm *Aspergillus flavus* được phát hiện là nguyên nhân gây chết khoảng 10 vạn gà tây con ở nước Anh với các tổn thương ở gan (gan bị hoại tử, chảy máu trong gan, tăng sinh ống mật, v.v.), và tiếp theo đó phát hiện mycotoxin do loài vi nấm này tạo thành trong thức ăn và trong môi trường nuôi cây cũng gây cùng loại tổn thương gan ở súc vật thí nghiệm và gia cầm, súc vật chăn nuôi khác (vịt con, chuột, thỏ, khỉ, lợn, bò, cừu, v.v.). Mycotoxin đó được chiết xuất tinh khiết và được gọi là aflatoxin. Năm 1961, nghĩa là chỉ một năm sau khi phát hiện aflatoxin, mycotoxin này đã được xác định là ngoài bệnh cấp tính nói trên, còn có khả năng gây ung thư gan với liều lượng nhỏ ăn nhiều ngày ở các động vật thí nghiệm. Các điều tra dịch tễ học ở các vùng dân cư khác nhau trên thế giới cũng cho thấy ở các vùng mà khẩu phần thức ăn hàng ngày có chứa một hàm lượng aflatoxin tương đối cao, tỷ lệ người bị bệnh ung thư gan cao hơn ở các vùng khác. *Aspergillus flavus* Link ex Fries cùng với loài *A.parasiticus* Speare đã được xác định là hai loài vi nấm có tỷ lệ chủng tạo thành aflatoxin cao nhất trong môi trường nuôi cây, cũng như trên nhiều loại thực phẩm, ngũ cốc (lạc, đỗ tương, ngô, gạo, lúa mì, v.v.) và cả trên một số vị thuốc nam, thuốc bắc nguồn gốc thực vật như ngưu tất (radix Achyranthis bidentatae), liên nhục (semen Nelumbii), nhân sâm (radix Ginseng), v.v. bị mốc (Cl.Moreau 1974, B.X.Đồng và ct. 1998).

Vài thí dụ về kết quả nghiên cứu khả năng gây ung thư gan thực nghiệm trên súc vật và điều tra dịch tễ học (bảng 1.1 và bảng 1.2) :

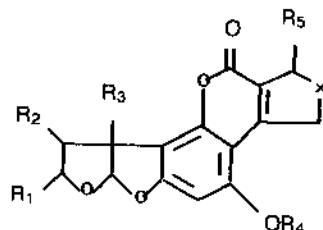
Bảng 1.1. Kết quả thử nghiệm trên chuột về khả năng gây ung thư gan của aflatoxin (Theo B.X.Đặng, 1976)

Lượng aflatoxin trong thức ăn (mg aflatoxin/kg chuột)	Thời gian ăn (ngày)	Tỷ lệ chuột bị ung thư gan
5,0	370	14/15
3,5	340	11/15
1,0	294	5/9
1,0	223	8/15
0,2	360	2/10
0,1	361	1/10
0,005	384	0/10

Bảng 1.2. Tỷ lệ dân số bị ung thư gan và hàm lượng aflatoxin trung bình có trên thực phẩm (Theo Alain Reilly, 1993).

Tên nước hoặc vùng	Hàm lượng aflatoxin trong thực phẩm (μg/kg)	Số người mắc ung thư gan trên 100.000 người/năm
Vùng cao Kenya	0,1	1,2
Song Kha (Thái Lan)	0,2	2,0
Thảo nguyên vùng cao (Swaziland)	0,2	2,2
Vùng cao trung bình Kenya	0,2	2,5
Thảo nguyên cao trung bình (Swaziland)	0,3	3,8
Vùng thấp Kenya	0,3	4,0
Ratbari (Thái Lan)	16	4,0
Thảo nguyên vùng thấp (Swaziland)	1,5	9,2
Mozambique	7,8	13,0

Về hóa học, aflatoxin là nhóm các hợp chất có nhân difuranocumarin. Người ta đã phát hiện và xác định cấu trúc được 16 hợp chất này, kể cả các dẫn chất đã biến đổi trong cơ thể động vật (hình 1.1. và bảng 1.3).



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học của các aflatoxin

Bảng 1.3. Các nhóm hóa chất của các aflatoxin

Aflatoxin	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	X
B ₁	H	H	H	CH ₃	O	H ₂
G ₁	H	H	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
B ₂	H ₂	H ₂	H	CH ₃	O	H ₂
G ₂	H ₂	H ₂	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
B ₂ a	OH	H ₂	H	CH ₃	O	H ₂
G ₂ a	OH	H ₂	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
1-methoxy-B ₁	OCH ₃	H ₂	H	CH ₃	O	H ₂
2-methoxy-B ₁	H ₂	OCH ₃	H	CH ₃	O	H ₂
2-ethoxy-B ₁	H ₂	OCH ₂ CH ₃	H	CH ₃	O	H ₂
2-ethoxy-G ₁	H ₂	OCH ₂ CH ₃	H	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
Aflatoxinol (Ro)	H	H	H	CH ₃	OH	H ₂
P ₁	H	H	H	H	O	H ₂
M ₁	H	H	OH	CH ₃	O	H ₂
M ₂	H ₂	H ₂	OH	CH ₃	O	H ₂
BGM1	H	H	OH	CH ₃	O	-OCH ₂ (lacton)
Dihydro-aflatoxin	H ₂	H ₂	H	CH ₃	OH	H ₂

Trong 16 aflatoxin đã được phát hiện, người ta đặc biệt chú ý đến các aflatoxin B₁, G₁, B₂ và G₂ vì đó là 4 aflatoxin có độc tính cao nhất, đồng thời là các aflatoxin được sinh ra với số lượng nhiều nhất cả trong tự nhiên cũng như trong môi trường nuôi cấy.

Về cơ chế gây bệnh, các kết quả thí nghiệm *in vivo* và *in vitro* cho thấy aflatoxin liên kết với ADN trong nhân tế bào (một phân tử gam aflatoxin có mối liên kết với 600 phân tử gam ADN). Sự liên kết này gây ức chế enzym polymeraza của ARN. Mặt khác, tác dụng hạn chế trong tổng hợp ARN và tác dụng ức chế polymeraza t-ARN là các nguyên nhân làm giảm sút tổng hợp protit trong tế bào. Người ta cũng đã chứng minh rằng vòng α , β -lacton không bão hòa có trong phân tử aflatoxin làm cho hợp chất này có hoạt tính gây ung thư, và cũng chính vòng lacton này gây ức chế tổng hợp ADN nhân tế bào, do đó làm rối loạn sự tăng trưởng bình thường của tế bào (M.F. Nexterlin và V.I.A. Vixxarionova, 1971).

Như chúng ta biết, cũng như các chất độc hại khác, aflatoxin qua đường tiêu hóa vào một số tế bào gan, tích tụ và bị chuyển hóa thành các dẫn chất giảm độc tính hay mất hẳn độc tính, đồng thời, với một hàm lượng aflatoxin nhất định, các tế bào này bị tổn thương như trên vừa nói, có nghĩa là gan đã bị tổn thương.

Ở Việt Nam, thông báo khoa học đầu tiên về phát hiện aflatoxin (từ một số chủng vi nấm dùng để lên men sản xuất nước chấm bàng đồ tương) vào năm 1970. Từ đó đến nay, nhiều công trình nghiên cứu về aflatoxin, các mycotoxin khác và các loài vi nấm tương ứng đã được thực hiện về điều tra phát hiện trên lương thực, thực phẩm, dược liệu, về lên men aflatoxin về thực nghiệm trên súc vật thí nghiệm, về dược lý học, về thú y v.v.

Hầu như tất cả các thí nghiệm, các công trình nghiên cứu nói trên đều cần có aflatoxin tinh khiết. Mặt khác, các phương pháp kiểm nghiệm aflatoxin hiện nay trên thế giới đều cần đến aflatoxin chuẩn. Giá loại hóa chất chuẩn này rất đắt (vài nghìn USD/1g), nước ta đang hoàn toàn phải nhập từ nước ngoài. Vì vậy, việc từng bước biểu biết và nám vững công nghệ sản xuất loại hóa chất này là một trong các mục tiêu của công nghệ sinh học nước ta.

Cũng như đối với các sản phẩm lên men vi sinh vật khác (enzim, acid amin, acid hữu cơ, thuốc kháng sinh, v.v.), việc nghiên cứu sản xuất aflatoxin gồm các giai đoạn sau :

- Chọn lọc các chủng có khả năng tạo thành các aflatoxin B1, B2, G1, G2, trước hết là các aflatoxin B1, G1.
- Cân cứ vào các đặc điểm sinh học của loài *Aspergillus flavus* (hoặc *A. parasiticus*) như nhu cầu dinh dưỡng, nhu cầu oxy, pH môi trường, nhiệt độ, thời gian nuôi cấy, v.v., xác định các thông số lên men tối ưu.
- Lên men và chiết xuất aflatoxin.
- Kiểm tra sản phẩm

I. CHỌN LỌC CÁC CHỦNG VI NẤM CÓ KHẢ NĂNG TẠO THÀNH CÁC AFLATOXIN B1, B2, G1, G2

Như trên đã trình bày, các aflatoxin B1, G1, B2, G2 là các aflatoxin có độc tính cao nhất (giảm dần theo thứ tự), nghĩa là có khả năng gây bệnh lớn nhất, đặc biệt là các aflatoxin B1, G1. Vì vậy trừ các nghiên cứu riêng biệt, việc kiểm nghiệm aflatoxin đối với lương thực, thực phẩm, thức ăn gia súc, gia cầm thông thường chỉ tiến hành với các aflatoxin B1, G1, do đó nhu cầu chất chuẩn về aflatoxin chủ yếu là 2 aflatoxin này.

Chúng ta cũng biết rằng cho đến nay *Aspergillus flavus* và *A. parasiticus* được xác định là 2 loài có khả năng tạo thành aflatoxin cao nhất. Hai loài vi nấm này, đặc biệt là loài *A. flavus* có tỷ lệ số chủng tạo thành aflatoxin lớn, đồng thời có một số chủng tạo thành nhiều

aflatoxin, nghĩa là có khả năng cho men sinh lên men cao. Vì lẽ đó, khi chọn các chủng vi nấm để lên men aflatoxin, đặc biệt là để lên men aflatoxin B1, người ta phân lập và chọn lọc các chủng thuộc loài *A.flavus*. Các chủng thuộc loài *A.parasiticus* thường tạo thành đồng thời các aflatoxin B1, G1. Thí dụ các chủng *Aspergillus flavus* NRRL 3357 và *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 của một trung tâm nghiên cứu nông học ở Mỹ tạo thành các aflatoxin B1, G1 nuôi cấy trên lạc (bảng 1.4).

Bảng 1.4. Lượng aflatoxin được tạo thành bởi các chủng *Aspergillus flavus* NRRL 3357 và *A.parasiticus* NRRL 2999 (nhiệt độ nuôi cấy 25°C, theo Noris Kimura, 1988)

Các chủng vi nấm	Aflatoxin B1 (ppm)				Aflatoxin G1 (ppm)			
	Số ngày nuôi cấy				Số ngày nuôi cấy			
	3	5	7	9	3	5	7	9
<i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3357	4,8	63,9	43,8	37,6				
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999	3,1	67,4	38,7	30,0	8,7	110,3	90,6	50,7

Để có những chủng vi nấm thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus*, chúng ta có thể mua các chủng đó ở các Bảo tàng giống vi sinh vật trên thế giới hoặc ở một số cơ sở giữ giống vi sinh vật trong nước.

Về các Bảo tàng giống vi sinh vật trên thế giới, có thể kể làm thí dụ một số cơ sở sau :

- ATTC (American Type Culture Collection) - Parklawn Drive Rockville, U. S.A.
- BCCM (British Commonwenth Collections of Microorganisms) - London, England
- CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) - Baarn, Netherlands
- CCF (Culture Collection of Fungi, Department of Sciences) - Prague, Czech.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute) - Kew, Surrey, England.
- IFM (Institute for Food Microbiology) - Chibaken, Japan

- ITCC (Indian Type Culture Collection) New Delhi, India
- ICP (Laboratoire de Cryptogamie, Museum national d'Histoire naturelle) – Paris, France.
- NRRL (Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture) – Peorin, U.S.A.

Ở Việt Nam, các cơ sở sau có thể cung cấp các chủng thuộc 2 loài vi nấm nói trên :

- Bảo tàng giống vi sinh vật, Đại học quốc gia, Hà Nội.
- Bộ môn Thực vật, Đại học Dược, Hà Nội.

Chúng ta cần chú ý là các chủng vi nấm được giữ ở các bảo tàng hay các cơ sở giữ giống thường đã được cấy truyền nhiều lần, do đó đã giảm hoạt tính sinh học, hiệu suất lén men aflatoxin không cao bằng các chủng mới phân lập từ cơ chất tự nhiên hay từ các sản phẩm nông nghiệp.

Để chọn lọc các chủng của các loài *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus* từ lạc nhân, có thể tiến hành theo sơ đồ các thí nghiệm ở bảng 1.5.

Bảng 1.5. Sơ đồ các thí nghiệm chọn lọc các chủng vi nấm thuộc các loài *Aspergillus flavus* và *A.parasiticus* để lén men aflatoxin

Thí nghiệm 1	Mục đích : Phân lập các chủng thuộc nhóm loài <i>Aspergillus flavus</i> Môi trường : Môi trường Czapek (+ kháng sinh) Phương pháp : Ulater
Thí nghiệm 2	Mục đích : Định loại để chọn các chủng thuộc các loài <i>A.flavus</i> và <i>A.parasiticus</i> Môi trường : Môi trường Czapek Phương pháp : Định loại hình thái
Thí nghiệm 3	Mục đích : Lén men các chủng thuộc các loài <i>A.flavus</i> và <i>A.parasiticus</i> Môi trường : Môi trường Czapek sửa đổi Phương pháp : Lén men lỏng trong bình nón
Thí nghiệm 4	Mục đích : Sơ bộ chọn các chủng tạo thành aflatoxin Phương pháp : Sắc ký cột nhỏ
Thí nghiệm 5	Mục đích : Chọn các chủng tạo thành aflatoxin cho hiệu suất cao Phương pháp : Chiết xuất aflatoxin bằng dung môi Định lượng aflatoxin bằng sắc ký bán mờ
Thí nghiệm 6	Mục đích : Lén men kiểm tra chủng tạo thành aflatoxin cho hiệu suất cao nhất Phương pháp : Như ở thí nghiệm 5