



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112877246 B

(45) 授权公告日 2022.01.18

(21) 申请号 202110200360.6

C12R 1/63 (2006.01)

(22) 申请日 2021.02.23

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102724997 A, 2012.10.10

申请公布号 CN 112877246 A

CN 108285885 A, 2018.07.17

CN 110408582 A, 2019.11.05

(43) 申请公布日 2021.06.01

KR 101449628 B1, 2014.10.22

(73) 专利权人 山东省滨州畜牧兽医研究院

CN 109355221 A, 2019.02.19

地址 256600 山东省滨州市黄河二路169号

F.O. Eko等.Characterization and immunogenicity of Vibrio cholerae ghosts expressing toxin-coregulated pili.

专利权人 山东绿都生物科技有限公司

(72) 发明人 程立坤 赵修报 沈志强 赵群

《Journal of Biotechnology》.2000,第83卷(第1-2期),第115-123页,参见全文.

张莎莎 林初文 何诚 姜忠兴

付强 李增亮

姬生乐等.高效制备霍乱弧菌菌影及其增强猪瘟疫苗免疫效果的研究.《中国预防兽医学报》.2020,第42卷(第7期),第696-700,738页,参见全文.

(74) 专利代理机构 北京瑞盛铭杰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11617

代理人 郭晓迪

审查员 陈东骥

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

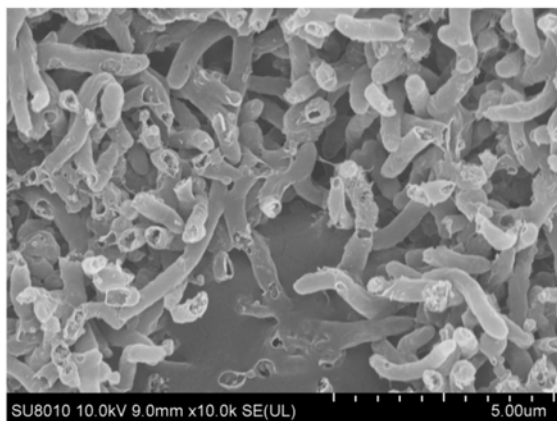
权利要求书1页 说明书8页 附图12页

(54) 发明名称

一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法,包括:在霍乱弧菌工程菌的培养过程中加入阿拉伯糖进行诱导,诱导培养1~3h后,再次加入阿拉伯糖进行二次诱导;在诱导阶段,当检测到溶氧值突然下降时,添加卡那霉素,继续培养0.5~1.5h后活菌数目为0;诱导培养4~6h后,菌影形成率达到99%以上。本发明利用二次诱导策略,缩短诱导时间,收获菌影量提高了16%以上,且内毒素含量降低至初始工艺的1/5以下,显著提高了生产效率,降低生产成本;本发明制备的霍乱弧菌菌影形态均匀、完整,活菌数目为0,无需再进行灭活处理,安全性更高。



1. 一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、挑取霍乱弧菌工程菌株的单菌落,接种至种子培养基中,培养8~14h,获得霍乱弧菌种子液;所述霍乱弧菌工程菌株是含有目的质粒pBAD-sE的菌株,所述质粒pBAD-sE是将裂解蛋白E基因片段连接到pBAD-24质粒获得的重组质粒;

S2、将霍乱弧菌种子液接种至发酵培养基中,培养至菌液的吸光度值在600nm为4.5~5.5时,加入1.0~4.0 g/L阿拉伯糖进行诱导,溶氧水平控制在20~30%;

S3、在S2开始诱导培养1~3 h后,再次加入1.0~4.0 g/L阿拉伯糖进行二次诱导;

S4、在S2开始诱导培养3.5~4.5h检测到溶氧值下降至低于20%时,添加卡那霉素,继续培养0.5~1.5 h后活菌数目为0;

S5、在S2开始诱导培养4~6 h后结束发酵,菌影形成率达到99%以上;

步骤S2中,所述发酵培养基包括如下组分:葡萄糖2.0~8.0 g/L、酵母粉2.0~10.0 g/L、蛋白胨1.0~5.0 g/L、柠檬酸1.0~2.0 g/L、KCl 1.0~3.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0~3.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.0~3.0 g/L、甜菜碱0.5~1.5 g/L、V_{BI} 15~25 mg/L、V_H 3~8 mg/L、氨苄霉素50~150 mg/L和氯化胆碱0.5~1.5 mL/L,其pH值为7.30~7.50。

2. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,在所述诱导培养的同时,按照1.0 mL/min的补加速率补加营养物质与抗生素,所述营养物质与抗生素包括:甘油5.0~8.0mL/L、酵母粉50~80g/L和氨苄霉素150~250mg/L。

3. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,所述诱导阶段的pH值维持在7.30~7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在28~30℃。

4. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,在步骤S2中,所述霍乱弧菌种子液的接种量按5%~10%进行。

5. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,在步骤S2中,所述培养是在33~35℃、溶氧水平20~30%、pH值7.30~7.50的条件下,培养时间为5~8 h。

6. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,在步骤S2中,所述阿拉伯糖的加入量为2.0 g/L。

7. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,在步骤S3中,所述阿拉伯糖的再次加入量为2.0 g/L。

8. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,在步骤S4中,所述卡那霉素的添加量为30~100 mg/L。

9. 如权利要求1所述高效制备霍乱弧菌菌影的方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1、挑取霍乱弧菌工程菌株的单菌落,接种至种子培养基中,培养12h,获得霍乱弧菌种子液;

S2、将霍乱弧菌种子液按照5%接种量接种至发酵培养基中,培养至菌液的吸光度值在600nm为5.0左右时,加入2.0 g/L阿拉伯糖进行诱导;开始诱导后,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在30℃,同时以1.0 mL/min的补加速率补加一定营养物质与抗生素,所述营养物质与抗生素组成:甘油 5.0 mL/L、酵母粉50 g/L、氨苄霉素200 mg/L;

S3、在S2开始诱导培养2 h后,再次加入2.0 g/L阿拉伯糖进行二次诱导;

S4、在S2开始诱导4.1h时检测到溶氧值下降至低于20%,添加30 mg/L卡那霉素;

S5、在S2开始诱导培养5 h结束发酵,菌影形成率达到99%以上,活菌数目为0。

一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物培养技术领域,具体涉及一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法。

背景技术

[0002] 20世纪80年代奥地利学者Lubitz W等首先研发了一种新型疫苗——菌影疫苗(Vaccine of Bacterial Ghost)。细菌菌影(Bacterial Ghost, BG)是一种不含胞浆成分的完整细菌空壳,其基本原理是噬菌体PhiX174的E蛋白能将革兰阴性菌裂解,裂解后的革兰阴性菌在细胞膜形成一个跨膜孔道结构,使菌内胞质内容物由孔道排出。这种灭活的细菌空壳作为疫苗使用其免疫原性要优于传统灭活疫苗。霍乱弧菌菌影(Vibrio Cholerae Ghosts, VCG)可作为递呈系统,且VCG载体本身具有佐剂的性质,可产生很好的体液和细胞免疫应答。VCG在疫苗生产中的应用,不仅能够有效刺激机体的免疫应答,抵抗病原的感染,同时能够产生免疫记忆,抵抗病原的再次感染,同时具有无需佐剂、无致病性、安全性好、能够长时间稳定存在、可作为载体构建多价重组疫苗等优点。

[0003] 在我们之前的研究(CN109355221B)中,通过培养基组分筛选、诱导时间确定、以及诱导条件优化等,实现了霍乱弧菌菌影的高密度发酵。但是,在该工艺中,诱导时间(菌影形成率达到99%以上时需要诱导11h)过长,降低了设备利用率,增加了工人工作时间。同时,较长的诱导时间,一方面导致部分菌影破碎,失去了完整的菌影结构,另一方面,由于菌影破碎导致较高的内毒素含量;部分菌影的破碎和内毒素的升高,均会影响霍乱弧菌菌影作为疫苗及疫苗佐剂的品质。另外,利用该工艺虽然菌影形成率可以达到99%以上,但是仍有少数丢失质粒的霍乱弧菌存在,极大地影响了霍乱弧菌菌影作为疫苗的安全性,进而需要进一步灭活处理,例如添加0.4%甲醛37℃灭活48h进行处理。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明目的在于提供一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法,主要是制定了一种全新的菌影诱导培养及制备策略。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0006] 一种高效制备霍乱弧菌菌影的方法,包括如下步骤:

[0007] S1、挑取霍乱弧菌工程菌株的单菌落,接种至种子培养基中,培养8~14h,获得霍乱弧菌种子液;

[0008] S2、将霍乱弧菌种子液接种至发酵培养基中,培养至菌液的吸光度值在600nm为4.5~5.5时,加入阿拉伯糖进行诱导;

[0009] S3、诱导培养1~3h后,再次加入阿拉伯糖进行二次诱导;

[0010] S4、在诱导阶段,当检测到溶氧值突然下降时(即“溶氧拐点”),添加卡那霉素,继续培养0.5~1.5h后活菌数目为0;

[0011] S5、诱导培养4~6h后,菌影形成率达到99%以上。

[0012] 进一步地,在所述诱导培养的同时,按照1.0mL/min的补加速率补加营养物质与抗

生素,所述营养物质与抗生素包括:甘油5.0~8.0mL/L、酵母粉50~80g/L和氨苄霉素150~250mg/L。

[0013] 优选地,所述营养物质与抗生素包括:甘油5.0mL/L、酵母粉50g/L、氨苄霉素200mg/L。

[0014] 优选地,在步骤S2中,所述霍乱弧菌种子液的接种量按5%~10%进行。

[0015] 优选地,在步骤S2中,所述培养是在33~35℃、溶氧水平20~30%、pH值7.30~7.50的条件下,培养时间为5~8h;所述发酵培养基包括如下组分:葡萄糖2.0~8.0g/L、酵母粉2.0~10.0g/L、蛋白胨1.0~5.0g/L、柠檬酸1.0~2.0g/L、KCl 1.0~3.0g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0~3.0g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.0~3.0g/L、甜菜碱0.5~1.5g/L、V_{B1} 15~25mg/L、V_H 3~8mg/L、氨苄霉素50~150mg/L和氯化胆碱0.5~1.5mL/L,其pH值为7.30~7.50。

[0016] 优选地,在步骤S2中,所述阿拉伯糖的加入量为1.0~4.0g/L;更优选地,所述阿拉伯糖的加入量为2.0g/L。

[0017] 优选地,在步骤S3中,所述阿拉伯糖的再次加入量为1.0~4.0g/L;更优选地,所述阿拉伯糖的加入量为2.0g/L。

[0018] 优选地,在步骤S4中,在诱导培养3.5~4.5h时添加卡那霉素。

[0019] 优选地,所述诱导阶段的pH值维持在7.30~7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在28~30℃。

[0020] 本发明的有益效果在于:

[0021] 本发明利用二次诱导策略,缩短诱导时间,菌影形成率达到99%以上所需的诱导培养时间由技术改进前的11h缩短至4h,且收获菌影量提高了16%以上,显著提高了生产效率,降低生产成本;

[0022] 本发明创造性地利用在诱导阶段的溶氧拐点时添加卡那霉素,使霍乱弧菌活菌数目降至0,提高霍乱弧菌菌影制备的安全性,并且避免了采用甲醛等进一步灭活处理对菌影安全性影响和增加繁重的工作量;

[0023] 本发明工艺不仅有效缩短诱导培养时间,高效制备霍乱弧菌菌影,并且使内毒素含量降至改进前工艺的1/5以下,且制备的菌影形态均匀、完整,降低了霍乱弧菌菌影的生产成本,提高其安全性和有效性。

附图说明

[0024] 图1a:二次诱导时阿拉伯糖添加浓度对霍乱弧菌细菌浓度的影响;

[0025] 图1b:二次诱导时阿拉伯糖添加浓度对活菌数目(抗性平板)的影响;

[0026] 图1c:二次诱导时阿拉伯糖添加浓度对活菌数目(非抗性平皿)的影响;

[0027] 图1d:二次诱导时阿拉伯糖添加浓度对菌影形成率(通过抗性平皿菌数计算)的影响;

[0028] 图1e:二次诱导时阿拉伯糖添加浓度对菌影形成率(通过非抗性平皿菌数计算)的影响;

[0029] 图2a:二次诱导时阿拉伯糖添加时间对霍乱弧菌细菌浓度的影响;

[0030] 图2b:二次诱导时阿拉伯糖添加时间对活菌数目(抗性平板)的影响;

[0031] 图2c:二次诱导时阿拉伯糖添加时间对活菌数目(非抗性平皿)的影响;

- [0032] 图2d:二次诱导时阿拉伯糖添加时间对菌影形成率(通过抗性平皿菌数计算)的影响;
- [0033] 图2e:二次诱导时阿拉伯糖添加时间对菌影形成率(通过非抗性平皿菌数计算)的影响;
- [0034] 图3a:诱导培养阶段搅拌转速的变化情况;
- [0035] 图3b:诱导培养阶段溶氧水平的变化情况
- [0036] 图4:抗生素种类对活菌数目的影响;
- [0037] 图5:卡那霉素的添加浓度对活菌数目的影响;
- [0038] 图6a:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后细菌浓度的比较;
- [0039] 图6b:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后活菌数目(抗性平皿)的对比;
- [0040] 图6c:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后活菌数目(非抗性平皿)的对比;
- [0041] 图6d:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后菌影形成率(通过抗性平皿菌数计算)的对比;
- [0042] 图6e:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后菌影形成率(通过非抗性平皿菌数计算)的对比;
- [0043] 图6f:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后收获菌泥质量的对比;
- [0044] 图7a:本发明工艺制备的霍乱弧菌菌影形态;
- [0045] 图7b:改进前工艺制备的霍乱弧菌菌影菌影形态;
- [0046] 图8:霍乱弧菌菌影制备工艺对内毒素含量的影响。

具体实施方式

[0047] 下面通过具体的实施方案叙述本发明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0048] 本发明使用的术语“溶氧拐点”是指在发酵培养过程中当发酵罐的溶氧电极检测到发酵液中溶氧数值突然/急剧下降时的时间点。

[0049] 实施例1:霍乱弧菌菌影诱导策略的确定

[0050] 1.1材料

[0051] 1.1.1菌株:霍乱弧菌工程菌株,由中国农业大学动物医学院何诚教授提供,其制备方法已申请专利(专利名称:一种霍乱弧菌菌影制备方法及其在家禽疫苗中的应用;专利申请号:201711461847.X),由该方法构建并鉴定为阳性的单个菌落(含有目的质粒pBAD-sE)即为本发明所用菌株。

[0052] 1.1.2.1培养基

[0053] 1.1.2.2种子培养基:LB培养基(蛋白胨10.0g/L、酵母粉5.0g/L、NaCl10.0g/L),用4.0mol/LNaOH溶液调pH至7.50。

[0054] 发酵培养基:葡萄糖5.0g/L、酵母粉5.0g/L、蛋白胨2.0g/L、柠檬酸1.5g/L、KCl 2.0g/L、MgSO₄·7H₂O 1.5g/L、(NH₄)₂SO₄ 2.0g/L、甜菜碱1.0g/L、氯化胆碱1.0mL/L、V_{B1}

20.0mg/L、 V_H 5.0mg/L;其制备方法为:分别称取葡萄糖、酵母粉、蛋白胨、柠檬酸、KCl、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $(NH_4)_2SO_4$ 、甜菜碱、 V_{B1} 、 V_H ,量取氯化胆碱,加入去离子水,定容后充分摇匀溶解,利用4mol/L NaOH溶液调节pH值至7.50,高温灭菌(121℃,15min);冷却后,按照无菌要求加入氨苄霉素100mg/L。

[0055] 1.2方法

[0056] 1.2.1种子培养:挑取霍乱弧菌工程菌株单菌落,接种至装有200mL种子培养基的500mL三角瓶中,35℃160rpm,培养12h。

[0057] 1.2.2发酵培养:将种子液按照5%接种量接种至发酵培养基中,培养温度维持在35℃,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,35℃培养8h,菌体浓度(OD_{600})至5.0左右时,按照一定诱导策略(具体操作见于本实施例3结果部分)添加阿拉伯糖进行诱导;诱导阶段,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在30℃。同时,在诱导过程中,以1.0mL/min的补加速率补加一定营养物质与抗生素(甘油5.0mL/L、酵母粉50g/L、氨苄霉素200mg/L)。

[0058] 1.2.3测定方法

[0059] 1.2.3.1温度、pH及溶氧水平:分别利用发酵罐附属温度电极、pH电极、溶氧电极进行测定。

[0060] 1.2.3.2菌体浓度:利用分光光度计在600nm处测定发酵液光密度,记为 OD_{600} ,测量值在0.2~0.9之间。

[0061] 1.2.3.3葡萄糖浓度:利用生物传感分析仪(SBA-40E)测定。

[0062] 1.2.3.4活菌数目:将发酵液10倍梯度稀释,涂布平板,观察平板上菌落数,计算发酵液中所含活菌数目(CFU/mL)。

[0063] 1.2.3.5质粒稳定性:将稀释后发酵液分别涂布于含100mg/L氨苄霉素的抗性平板与不含氨苄霉素的非抗性平板,抗性平板与非抗性平板的活菌数目比值即为质粒稳定性(%)。

[0064] 1.2.3.6菌影形成率:取诱导0h及不同诱导时间的发酵液,分别做不同时间的活菌计数,不同诱导时间的活菌数目与诱导0h时的活菌数目之间的比值即为该诱导时间的菌影形成率(%)。

[0065] 1.3结果

[0066] 1.3.1二次诱导时阿拉伯糖添加浓度

[0067] 按照上述1.2.2在霍乱弧菌发酵培养至8h时,添加2.0g/L阿拉伯糖进行诱导;随后,在诱导进行了3h时,再次分别添加1.0g/L、2.0g/L、3.0g/L及4.0g/L阿拉伯糖进行二次诱导,结果如图1所示。其中,a为细菌浓度、b为活菌数目(抗性平皿)、c为活菌数目(非抗性平皿)、d为菌影形成率(通过抗性平皿菌数计算)、e为菌影形成率(通过非抗性平皿菌数计算)。

[0068] 由图1(a、b、d)可知,在诱导3h后再次添加阿拉伯糖进行二次诱导,与只进行一次诱导的工艺(专利号:ZL 201811313599.9)相比,显著缩短了菌影形成率达到99%以上所需的诱导时间;当二次诱导添加阿拉伯糖浓度为1g/L时,诱导7h时(诱导时间是以首次添加阿拉伯糖时开始计,下文若无特别说明也同样)菌影形成率达到99%以上;当二次添加阿拉伯糖的浓度为2g/L或者大于2g/L时,菌影形成率达到99%以上,所需诱导时间均为6h;因此,

优选第二次添加阿拉伯糖的浓度为2g/L。此外,由图1(c、e)可知,在诱导后期,由于丢失质粒霍乱弧菌的生长,在非抗性平皿上的活菌数目逐渐增多。

[0069] 1.3.2二次诱导时阿拉伯糖添加时间

[0070] 按照上述1.2.2在霍乱弧菌发酵培养至8h时,添加2.0g/L阿拉伯糖进行诱导;随后,分别在诱导进行了1h、2h、3h、4h时,再次添加2.0g/L阿拉伯糖进行二次诱导,结果如图2所示。其中,a为细菌浓度、b为活菌数目(抗性平皿)、c为活菌数目(非抗性平皿),d为菌影形成率(通过抗性平皿菌数计算)、e为菌影形成率(通过非抗性平皿菌数计算)。

[0071] 由图2(a、b、d)可知,第二次添加阿拉伯糖的时间显著影响霍乱弧菌菌影形成;分别在诱导进行了1h、2h、3h、4h时添加阿拉伯糖进行二次诱导,霍乱弧菌菌影形成率达到99%以上所需的诱导时间分别是5h、4h、6h、7h;因此,优选在诱导2h时添加2g/L阿拉伯糖进行二次诱导。此外,由图2(c、e)可知,在诱导后期,由于丢失质粒霍乱弧菌工程菌的生长,非抗性平皿上的活菌数目逐渐增多。

[0072] 1.4小结

[0073] 在添加诱导剂诱导外源蛋白表达时,诱导剂的多次添加,可以避免一次性添加过高浓度诱导剂造成的抑制作用,且可以多次刺激启动子及目的基因的表达,提高外源基因的表达水平。在诱导霍乱弧菌菌影形成时,在第一次添加阿拉伯糖后,第二次添加阿拉伯糖可显著缩短霍乱弧菌菌影形成率达到99%以上时所需的诱导时间;且通过考察阿拉伯糖二次添加浓度和添加时间,优选在第一次添加阿拉伯糖诱导2h后再添加2g/L阿拉伯糖进行二次诱导;诱导培养4h后,菌影形成率达到99%以上。此外,虽然阿拉伯糖是在霍乱弧菌工程菌在较高质粒稳定性时添加诱导的,但在诱导过程中及诱导结束后仍有丢失质粒的霍乱弧菌存在,由于丢失质粒霍乱弧菌工程菌的存在,培养后期丢失质粒的霍乱胡军工程菌逐渐增多,严重影响霍乱弧菌菌影安全性及其品质。

[0074] 实施例2:霍乱弧菌菌影诱导过程中抗生素的添加

[0075] 2.1材料

[0076] 2.1.1菌株:霍乱弧菌工程菌株(同实施例1)。

[0077] 2.1.2培养基

[0078] 2.1.2.1种子培养基:同实施例1。

[0079] 2.1.2.2发酵培养基:同时实例1。

[0080] 2.2方法

[0081] 2.2.1种子培养:同实施例1。

[0082] 2.2.2发酵培养:在种子液按照5%接种量接种至发酵培养基中,培养温度维持在35℃,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,35℃培养8h,菌体浓度(OD_{600})至5.0左右时,添加2.0g/L阿拉伯糖进行诱导,且2h后再次添加2.0g/L阿拉伯糖进行二次诱导;诱导阶段,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在30℃。同时,在诱导过程中,以1.0mL/min的补加速率补加一定营养物质与抗生素(甘油5.0mL/L、酵母粉50g/L、氨苄霉素200mg/L)。另外,根据本实施例实验要求,在诱导阶段添加一定浓度的抗生素(具体操作见于本实施例3结果部分)。

[0083] 2.2.3测定方法

[0084] 2.2.3.1温度、pH及溶氧水平:同实施例1。

[0085] 2.2.3.2菌体浓度:同实施例1。

[0086] 2.2.3.3葡萄糖浓度:同实施例1。

[0087] 2.2.3.5质粒稳定性:同实施例1。

[0088] 2.2.3.6菌影形成率:同实施例1。

[0089] 2.3结果

[0090] 2.3.1霍乱弧菌工程菌培养过程中的溶氧变化

[0091] 在霍乱弧菌菌影诱导阶段,在第一次添加阿拉伯糖后,将通气量、罐压分别调至 $1.0\text{m}^3/\text{h}$ 、 0.06MPa ,进而通过调节搅拌转速来维持溶氧水平,搅拌转速及溶氧水平如图3所示,其中a为搅拌转速、b为溶氧水平。

[0092] 由图3可知,在开始诱导之后直到4.1h时,耗氧量逐渐下降,需要逐步降低搅拌转速来维持溶氧水平维持在 $20\%\sim 30\%$ 。而在诱导进行了4.1h时,溶氧水平突然降低,表明耗氧量增加;且在4.1h后,耗氧量逐渐增加,需要不断增加搅拌转速来维持一定的溶氧水平,表明4.1h后霍乱弧菌工程菌开始繁殖,所以在此时(即“溶氧拐点”)添加合适抗生素可有效抑制其生长繁殖。

[0093] 2.3.2抗生素的添加种类

[0094] 在溶氧拐点(4.1h)时,分别添加 $100\text{mg}/\text{L}$ 青霉素、 $50\text{mg}/\text{L}$ 卡那霉素以及 $10\text{mg}/\text{L}$ 多粘菌素B,且添加后0.5h、1.0h的活菌数目(非抗性平皿)如图4所示。

[0095] 由图4可知,在诱导后期,添加抗生素可显著降低活菌数目。与青霉素和多粘菌素B相比,卡那霉素可以更有效地抑制细菌生长,并且在添加后0.9h内(即:诱导培养5h)活菌数目为0,因此,优选在诱导阶段添加卡那霉素。

[0096] 2.3.3卡那霉素的添加浓度

[0097] 在溶氧拐点(4.1h)时,分别添加 $20\text{mg}/\text{L}$ 、 $30\text{mg}/\text{L}$ 、 $50\text{mg}/\text{L}$ 以及 $100\text{mg}/\text{L}$ 卡那霉素,添加后0.5h、0.9h的活菌数目(非抗性平皿)如图5所示。

[0098] 由图5可知,添加卡那霉素可有效抑制细菌生长;并且当卡那霉素添加浓度大于 $30\text{mg}/\text{L}$ 时,其抑菌效果无显著差异。因此,优选在诱导阶段的“溶氧拐点”时添加 $30\text{mg}/\text{L}$ 卡那霉素。

[0099] 2.4小结

[0100] 溶氧水平是微生物发酵的重要参数,溶氧水平高低和耗氧速率均可反映细菌的生长状况。在霍乱弧菌工程菌经阿拉伯糖诱导以后,由于霍乱弧菌工程菌不断形成霍乱弧菌菌影,霍乱弧菌工程菌耗氧量逐渐降低,培养液中的溶解氧逐渐升高,则溶氧电极测定的溶氧值逐渐升高。在此过程中,通过降低搅拌转速、通气量及罐压维持在合适的溶氧水平;但是,当丢失质粒的霍乱弧菌工程菌开始生长时,耗氧量增加,培养液中的溶解氧降低,则溶氧电极测定的溶氧值急速下降;因此,在此过程中溶氧值会出现一个拐点。在此溶氧拐点时,添加合适抗生素可有效抑制丢失质粒的霍乱弧菌生长;若在此溶氧拐点前添加抗生素,会影响菌影正常形成及形态;若在此溶氧拐点之后添加抗生素,会降低抗生素对细菌的抑制效果。

[0101] 多种抗生素可以抑制革兰氏阴性菌的生长,其中: β -内酰胺类(青霉素类、头孢菌素类)抗生素通过抑制细菌细胞壁的生物合成来抑制细菌生长;氨基糖苷类(链霉素、庆大霉素、卡那霉素等)抗生素的作用机制为抑制细菌蛋白质的合成;多粘菌素类抗生素的作用

机制为药物分子中含有带正电荷的游离氨基能与革兰氏阴性菌细胞膜的磷脂中带负电荷的磷酸根结合,对生长繁殖期和停止生长的细菌均有效,且临床上常用多粘菌素B和多粘菌素E。

[0102] 基于诱导后溶氧水平变化,确定“溶氧拐点”时添加抗生素来抑制细菌生长,且此时霍乱弧菌菌影形成率达99%以上。同时,通过比较不同抗生素及添加浓度,优选添加30mg/L卡那霉素,且诱导培养5h时活菌数目为0,有效保障了霍乱弧菌菌影作为疫苗及佐剂的安全性,且省去了添加甲醛灭活这一操作。

[0103] 实施例3:霍乱弧菌菌影制备工艺改进前后的对比

[0104] 3.1材料

[0105] 3.1.1菌株:霍乱弧菌工程菌株(同实施例1)。

[0106] 3.1.2培养基

[0107] 3.1.2.1种子培养基:同实施例1。

[0108] 3.1.2.2发酵培养基:同时实例1。

[0109] 3.2方法

[0110] 3.2.1种子培养:同实施例1。

[0111] 3.2.2发酵培养:

[0112] (1)本发明改进后工艺,一种优选实施方式:将种子液按照5%接种量接种至发酵培养基中,培养温度维持在35℃,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,35℃培养8h,菌体浓度(OD_{600})至5.0左右时,添加2.0g/L阿拉伯糖进行诱导,并且2h后再次添加2.0g/L阿拉伯糖进行二次诱导;诱导阶段,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在30℃。同时,在诱导过程中,以1.0mL/min的补加速率补加一定营养物质与抗生素(甘油5.0mL/L、酵母粉50g/L、氨苄霉素200mg/L)。另外,在诱导阶段,当溶氧电极检测的溶氧值突然降低时(诱导4.1h时),添加30mg/L卡那霉素;诱导5h时结束发酵。

[0113] (2)改进前工艺(来源于ZL 201811313599.9):将种子液按照5%接种量接种至发酵培养基中,培养温度维持在35℃,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,35℃培养8h,菌体浓度(OD_{600})至5.0左右时,加入2.0g/L阿拉伯糖进行诱导;诱导阶段,pH维持在7.50,溶氧水平控制在20~30%,温度控制在30℃。同时在诱导过程中,以1.0mL/min的补加速率补加一定营养物质与抗生素(甘油5.0mL/L、酵母粉50g/L、氨苄霉素200mg/L);诱导11h时,结束发酵。

[0114] 3.2.3测定方法

[0115] 3.2.3.1温度、pH及溶氧水平:同实施例1。

[0116] 3.2.3.2菌体浓度:同实施例1。

[0117] 3.2.3.3葡萄糖浓度:同实施例1。

[0118] 3.2.3.5质粒稳定性:同实施例1。

[0119] 3.2.3.6菌影形成率:同实施例1。

[0120] 3.2.3.7内毒素含量测定:根据鲎试剂盒(试管定量显色基质法)使用说明进行内毒素含量测定。

[0121] 3.3结果

[0122] 3.3.1发酵过程比较

[0123] 采用本发明工艺和改进前工艺制备霍乱弧菌菌影,发酵过程如图6所示,其中a为细菌浓度、b为活菌数目(抗性平皿)、c为活菌数目(非抗性平皿)、d为菌影形成率(通过抗性平皿菌数计算)、e为菌影形成率(通过非抗性平皿菌数计算)、f为收获菌泥质量。

[0124] 由图6(a、b、d)可知,采用本发明工艺和改进前工艺制备霍乱弧菌菌影时,分别在诱导4h、11h时菌影形成率达到99%以上。由图6(b、c、e)可知,采用本发明工艺,诱导5h时,活菌数目为0;采用改进前工艺,诱导11h、12h时,活菌数目逐渐升高,且12h时活菌数(非抗性平板)为 9.0×10^8 CFU/mL。由图6(f)可知,采用本发明工艺收获细菌湿重为12.31g/L,相比改进前工艺(10.57g/L)提高了16.46%。

[0125] 3.3.2霍乱弧菌菌影形态

[0126] 利用扫描电镜观察不同制备工艺的霍乱弧菌菌影形态,结果如图7所示,其中a为采用本发明工艺制备的霍乱弧菌菌影形态、b为采用改进前工艺制备的霍乱弧菌菌影形态。

[0127] 由图7可知,采用本发明工艺制备的霍乱弧菌菌影均匀、形态完整;而利用改进前工艺制备的霍乱弧菌菌影不均匀、且有部分菌影破裂。因此,本发明提供的工艺更有利于霍乱弧菌菌影的高效制备,并且可以显著提高霍乱弧菌菌影品质。

[0128] 3.3.3内毒素含量

[0129] 分别取本发明工艺诱导后5h、改进前工艺诱导后11h的发酵液,测定其内毒素含量,结果如图8所示。

[0130] 由图8可知,霍乱弧菌菌影制备工艺会显著影响内毒素含量。采用本发明工艺和改进前工艺时,内毒素含量分别为152万EU/mL、783万EU/mL;本发明工艺所产生的内毒素含量是改进前工艺的1/5以下。结合图8所示,采用本发明工艺诱导时间短,菌影保持完整形态,内毒素含量低;而采用改进前工艺由于诱导时间长导致部分菌影破裂,造成内毒素含量升高。

[0131] 3.4小结

[0132] 采用本发明工艺制备霍乱弧菌菌影,菌影形成率达到99%以上所需诱导周期从改进前工艺的11h缩短至4h;且诱导后5h时活菌数目为0,则可省去改进前工艺需用甲醛等进行灭活这一操作;收获霍乱弧菌菌影量提高了16%以上,内毒素含量降低至改进前工艺的1/5以下,且菌影形成均匀、形态完整。因此,本发明提供的霍乱弧菌菌影制备方法,具有诱导周期缩短、活菌数目为0、内毒素含量低以及菌影形态完整等优点,显著降低了霍乱弧菌菌影的生产成本、提高其安全性和有效性,促进其在疫苗制备产业的广泛应用。

[0133] 虽然本发明已经以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何本领域技术人员,在不脱离本发明的精神和原理的情况下,可以对这些实施例进行各种形式和细节的变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物所限定。

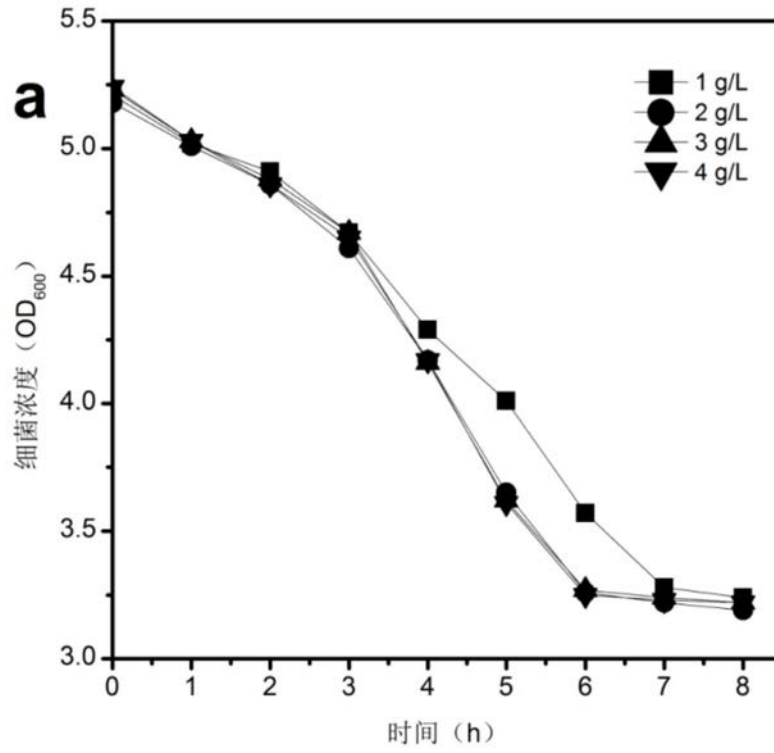


图1 (a)

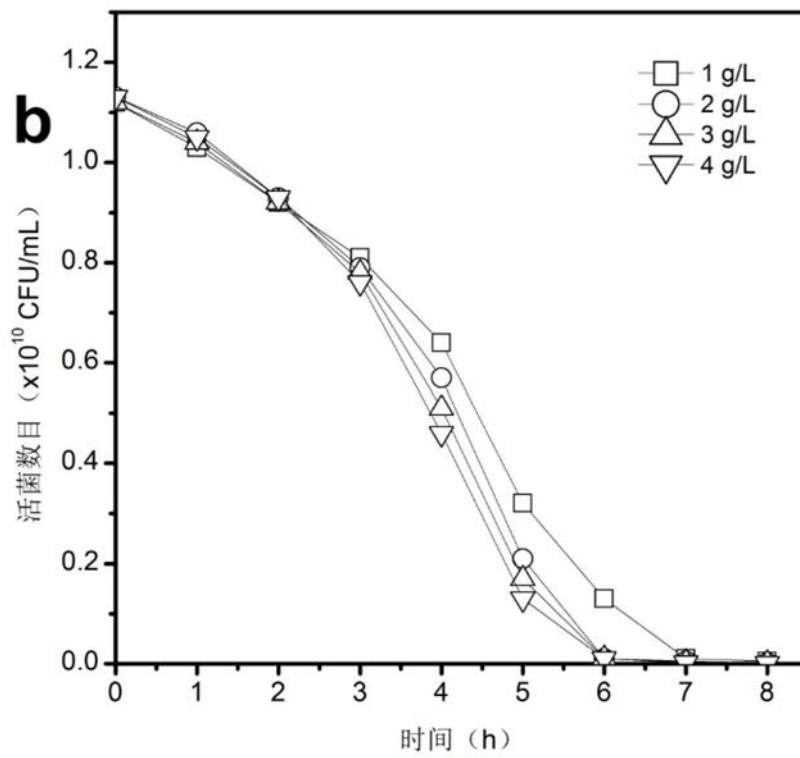


图1 (b)

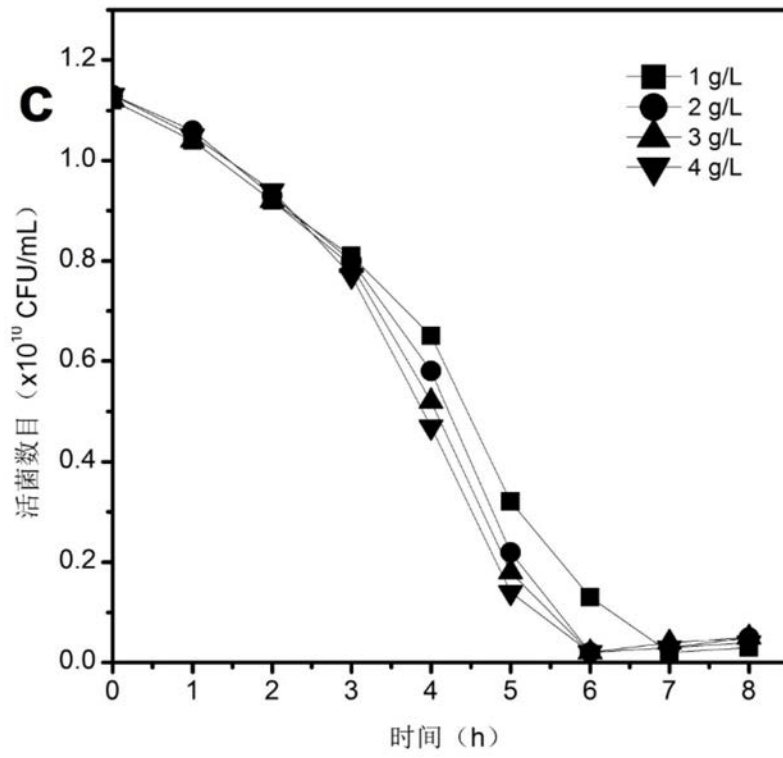


图1 (c)

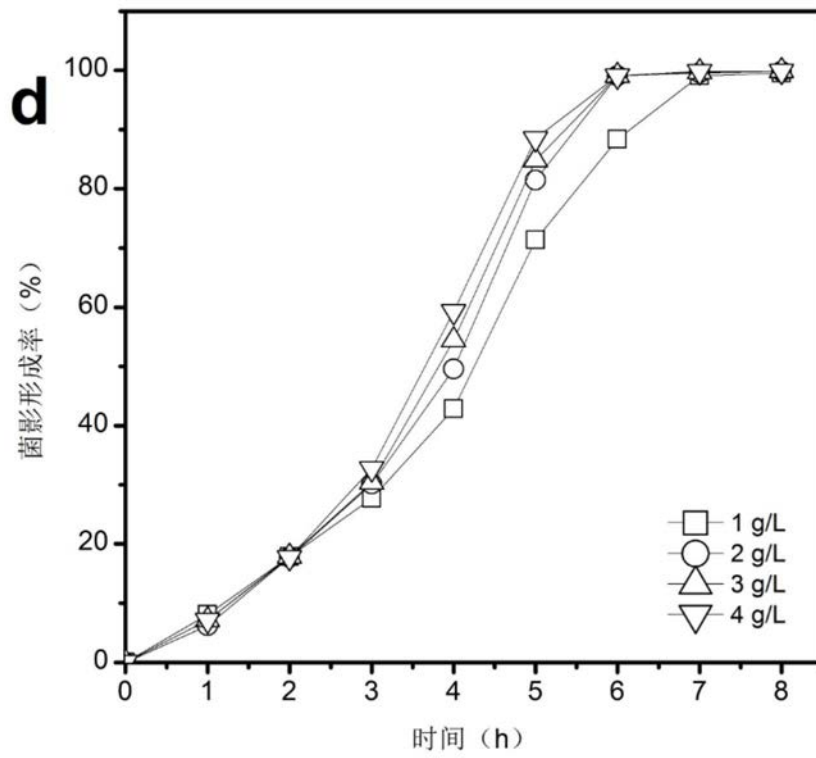


图1 (d)

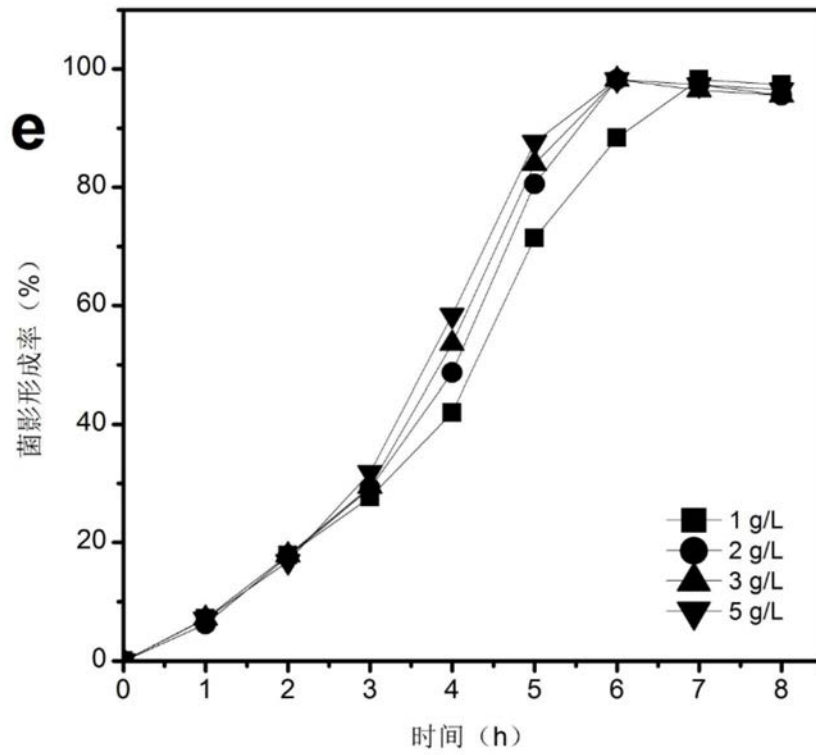


图1 (e)

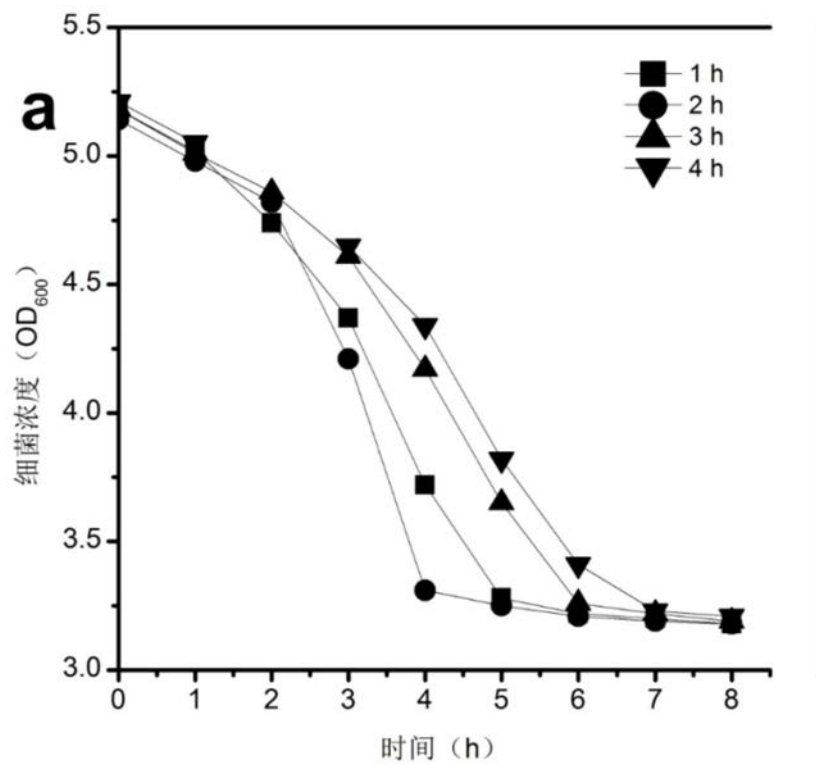


图2 (a)

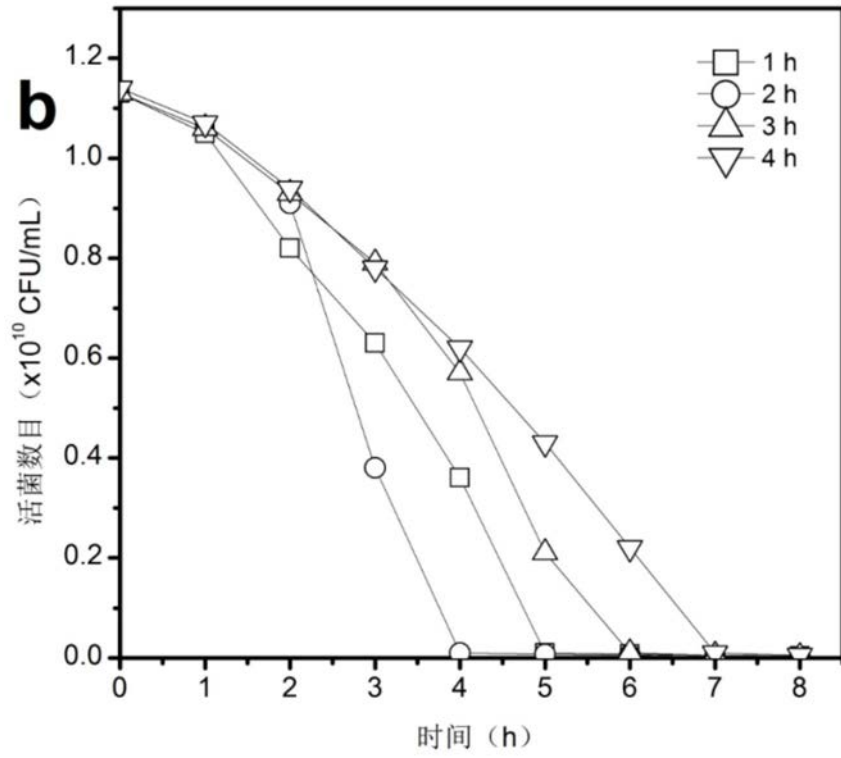


图2 (b)

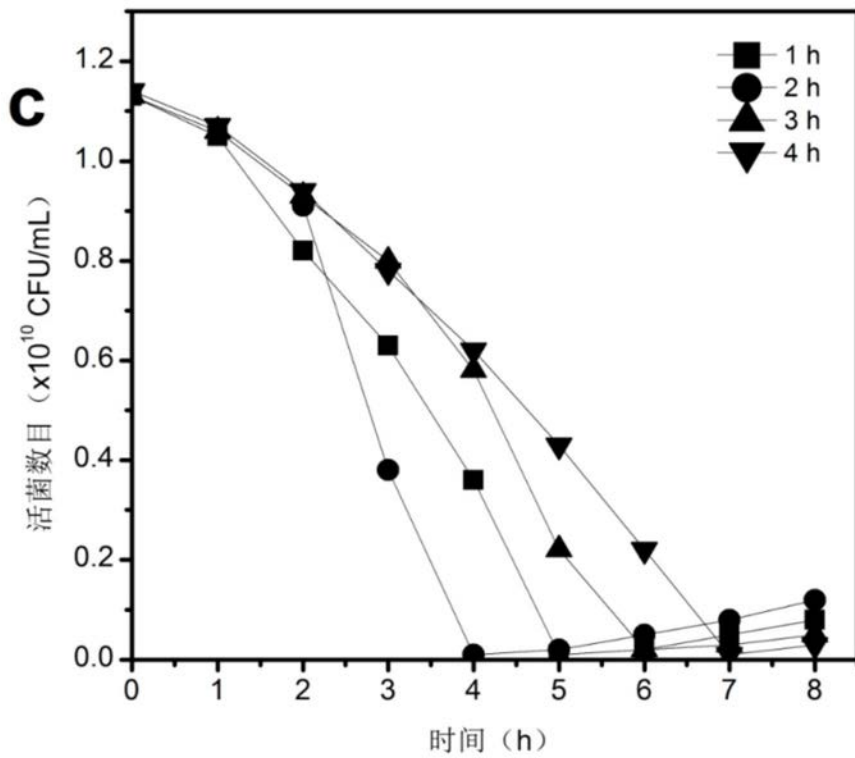


图2 (c)

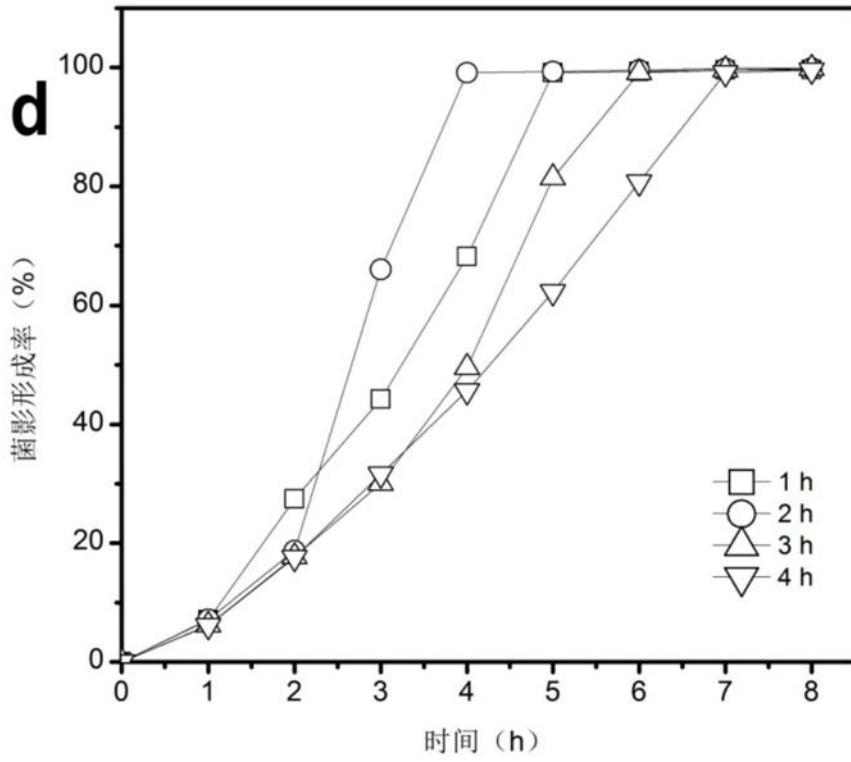


图2 (d)

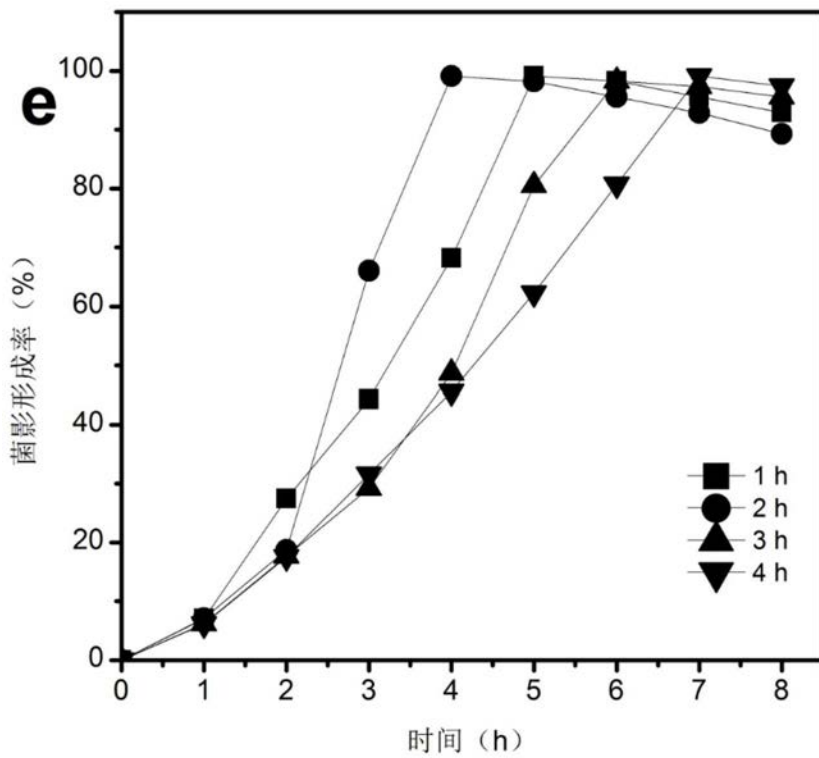


图2 (e)

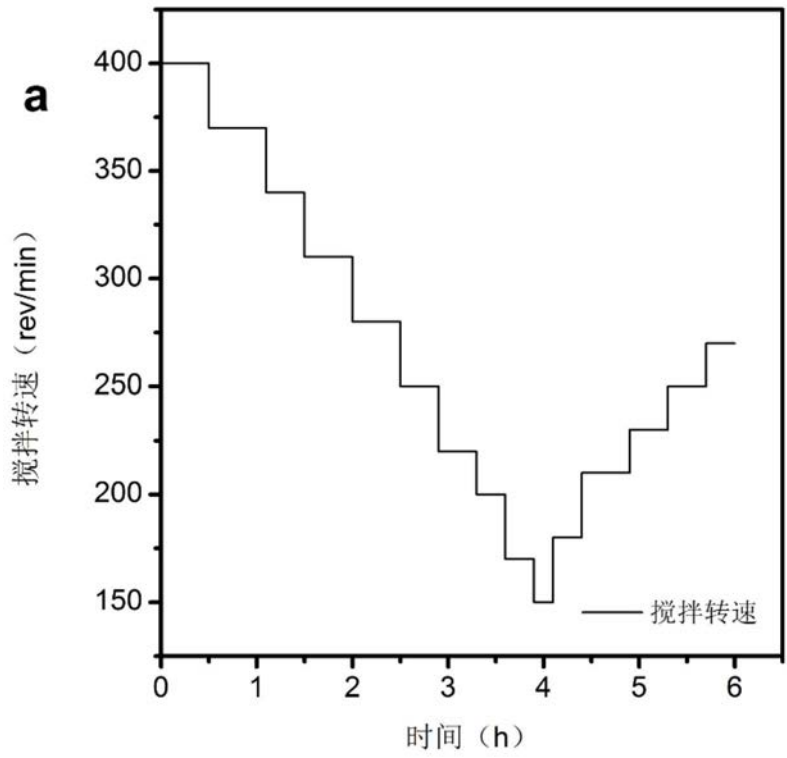


图3 (a)

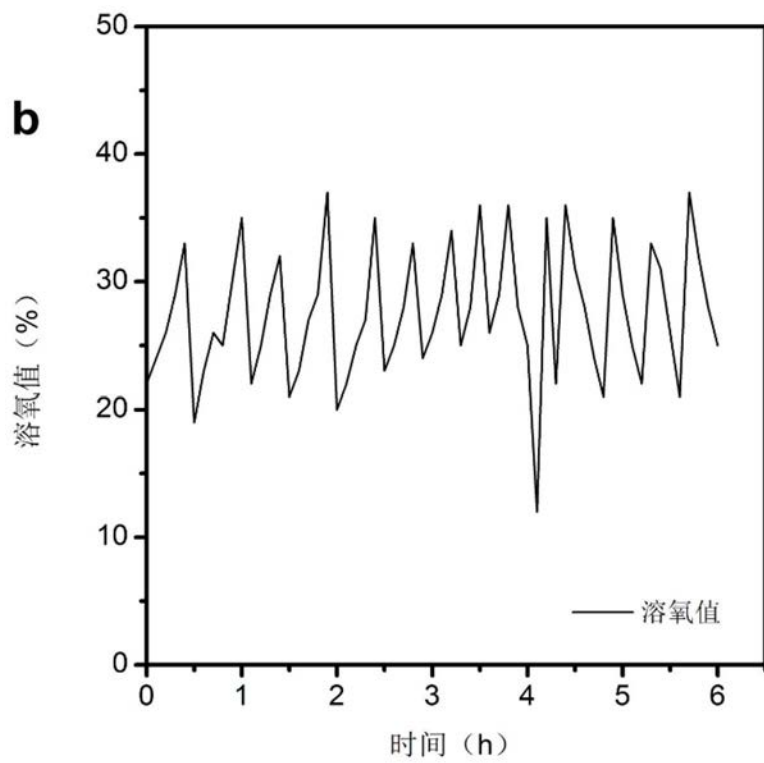


图3 (b)

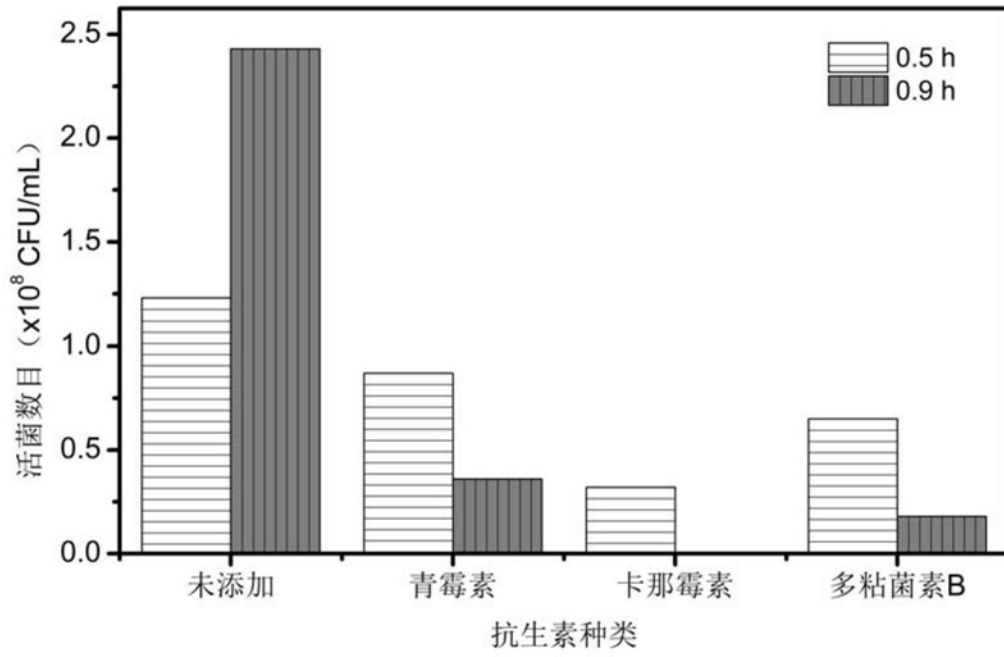


图4

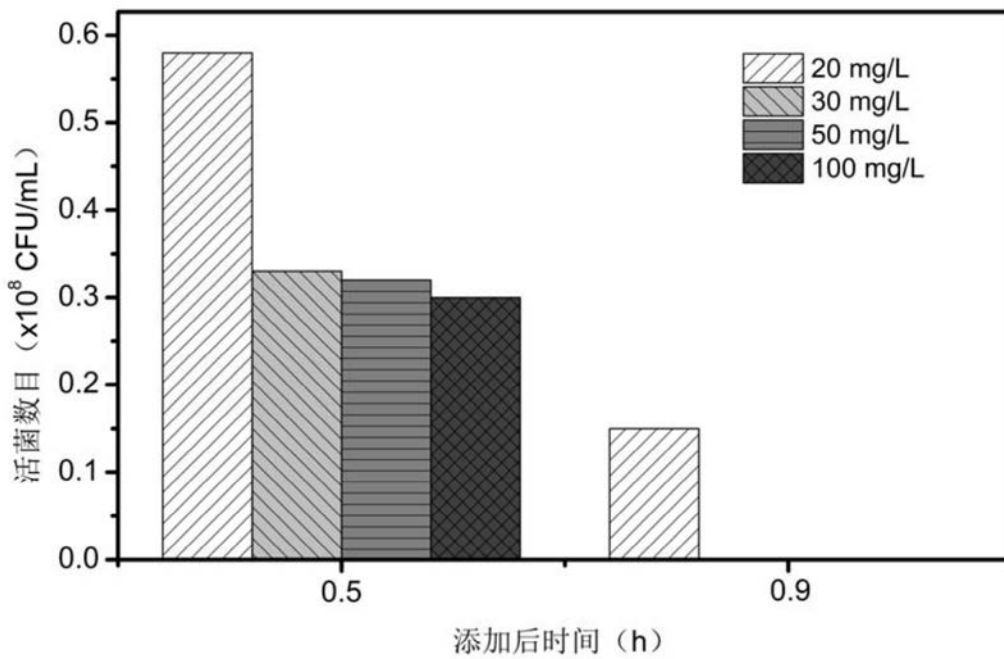


图5

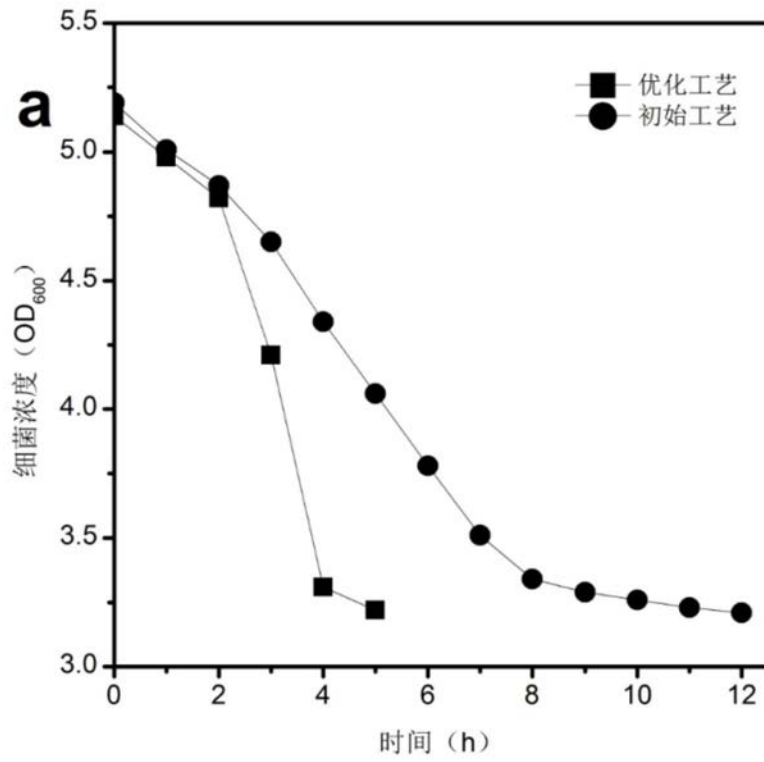


图6(a)

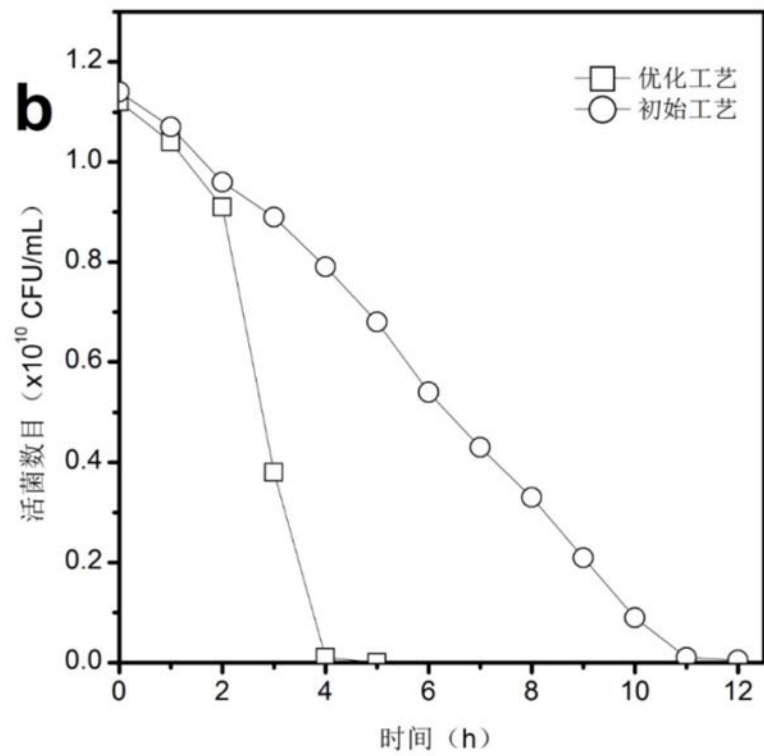


图6(b)

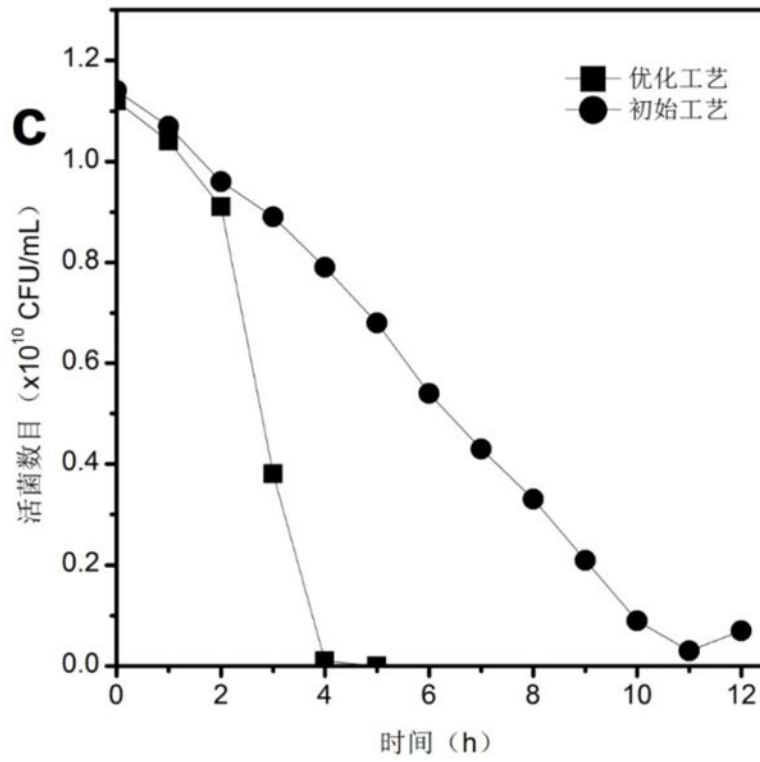


图6(c)

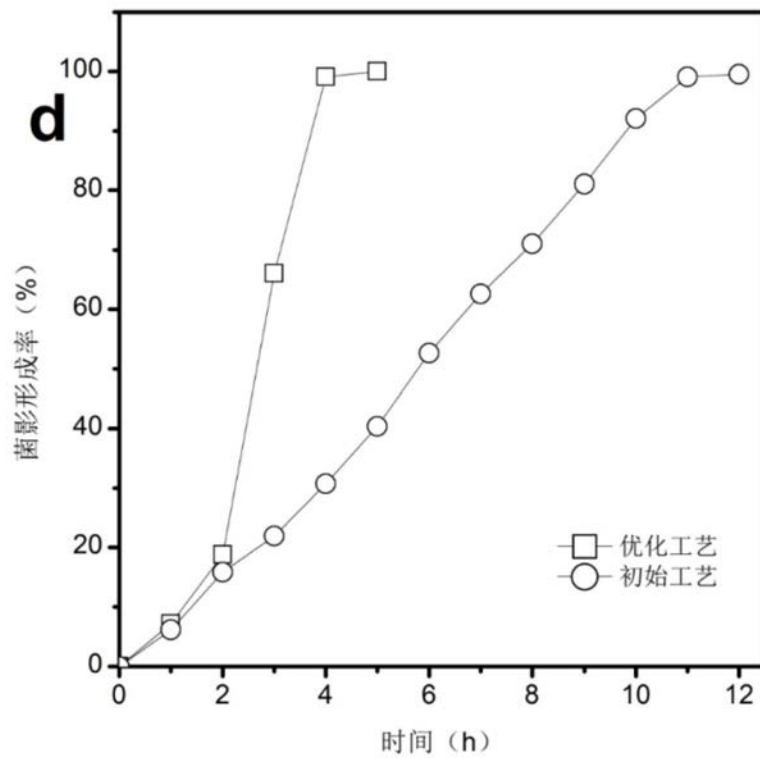


图6(d)

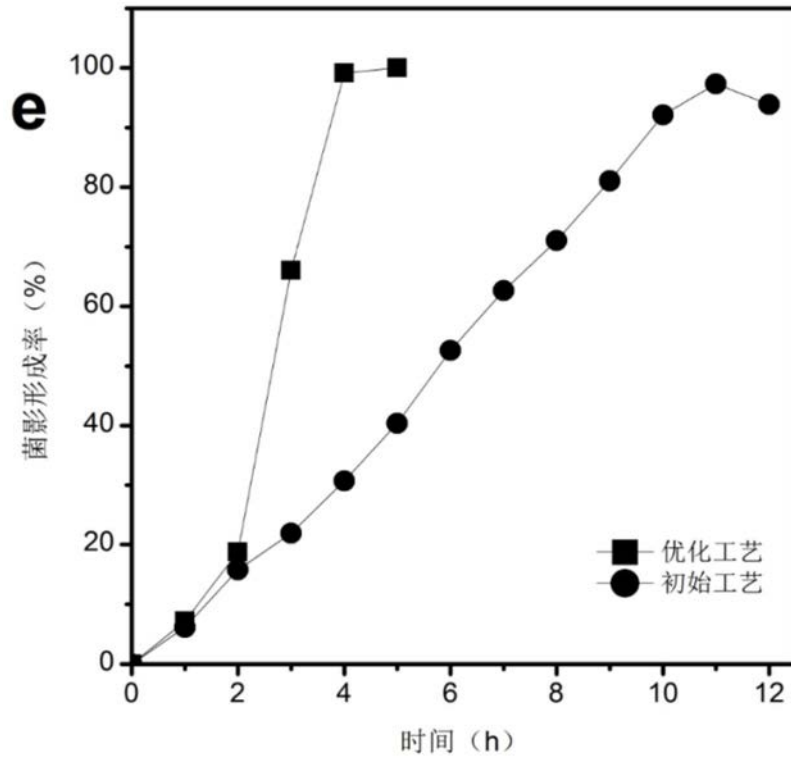


图6(e)

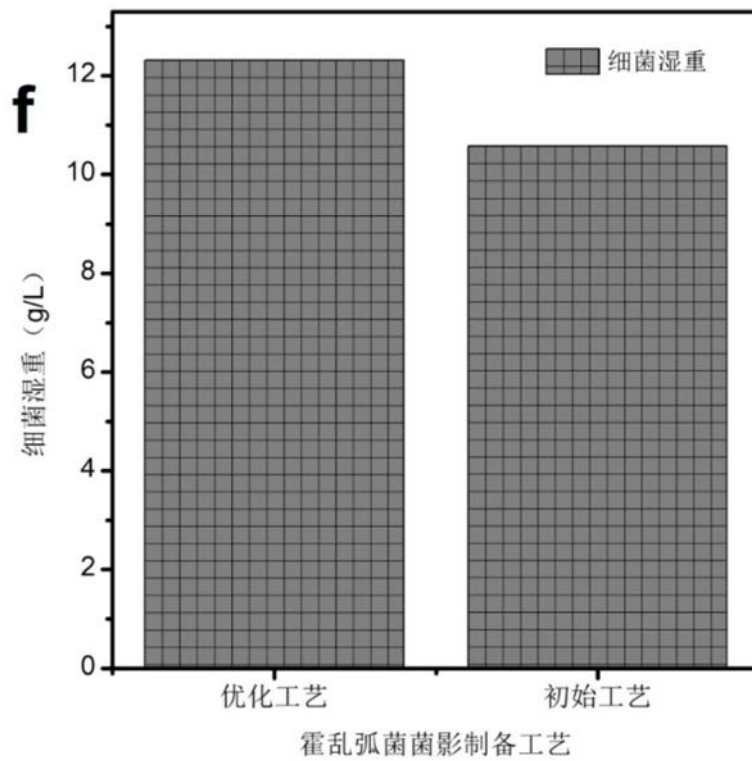


图6(f)



图7a

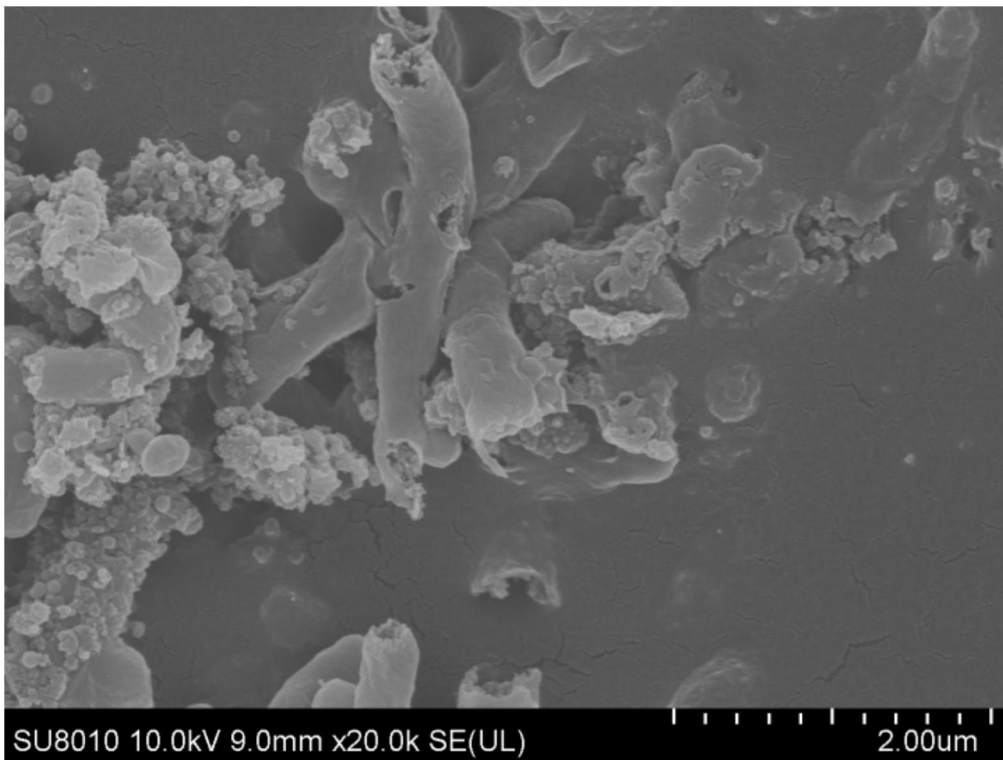


图7 (b)

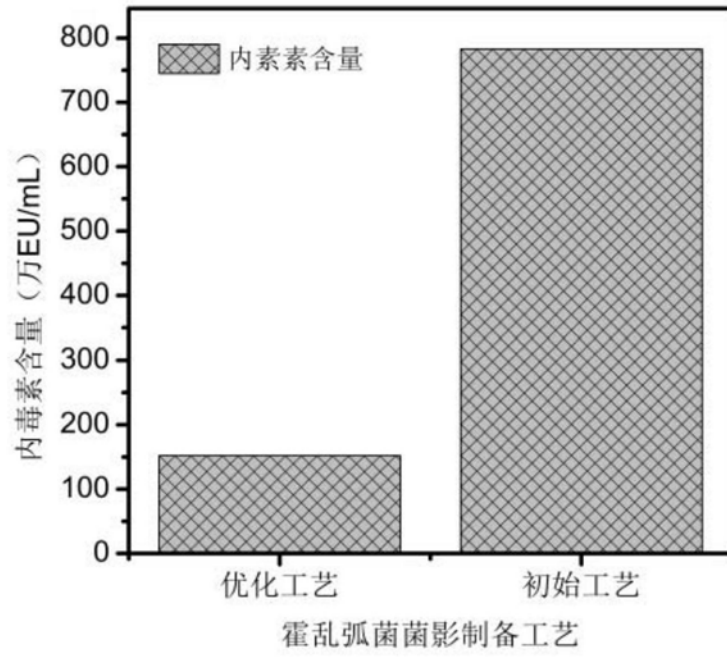


图8