

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710031166.X

[43] 公开日 2008年5月7日

[11] 公开号 CN 101173231A

[22] 申请日 2007.10.30

[21] 申请号 200710031166.X

[71] 申请人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路 381 号

[72] 发明人 蔡俊鹏 王泽秀

[74] 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司

代理人 盛佩珍

权利要求书 2 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术

[57] 摘要

本发明是指一种高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，其技术包括如下步骤：1) 将宿主菌摇床培养，离心后加入 DNB 液后得宿主菌悬浮液；2) 在 DNB 液中加入宿主菌悬浮液，再接入蛭弧菌斑后培养，离心后加入 DNB 液即得蛭弧菌浓缩液；3) 往 DNB 液中先加入谷氨酸钠，再接入宿主菌悬浮液，最后接入蛭弧菌浓缩液，使其浓度为 $1 \sim 10^3$ PFU/mL，然后置于发酵罐中培养 4 ~ 6 天，即得到密度为 $10^8 \sim 10^{14}$ PFU/mL 的蛭弧菌发酵液体，离心浓缩即得蛭弧菌游泳体浓缩液。本发明成本低，蛭弧菌终浓度高，应用范围广，使其不但在水源性、食源性致病菌防治方面，而且在医学、环境污染、农业、工业、军事领域等方面均可使用。

1、高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，其特征在于：该技术的步骤及其工艺条件如下：

步骤一：宿主菌悬浮液的制备：

将宿主菌接种于常规培养基中，置于 20~40°C 摇床中培养 12~24h，使其处于对数生长期，培养液在 2~15°C，5000~8000rpm 离心 15~40min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 0.05~2%稀营养肉汤 DNB 培养液，即得到浓度达 $10^{18} \sim 10^{26}$ CFU / mL 的宿主菌悬浮液，然后置于 2~15°C 冰箱中保存备用；

步骤二：蛭弧菌游泳体浓缩液的制备：

在稀营养肉汤 DNB 培养液中先加入步骤一制备的宿主菌悬浮液，使宿主菌在 DNB 液体中的浓度达 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL，再接入用常规方法培养出来的蛭弧菌斑，然后将此培养液在 20~40°C 培养 20~60h，再在 2~15°C，5000~8000rpm 离心 15~40min，保留上清液弃去沉淀，将上清液再在 2~15°C，10000~20000rpm 离心 15~40min，保留沉淀弃去上清液，沉淀为蛭弧菌游泳体，往沉淀中加入与其体积比为 0.05~2%DNB 培养液，混匀即得到浓度达 $10^6 \sim 10^8$ PFU / mL 蛭弧菌游泳体浓缩液，然后将此浓缩液置于 2~15°C 冰箱保存备用；

步骤三：高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺：

配制大量稀营养肉汤 DNB 培养液，并加入经纤维素滤膜过滤处理后的谷氨酸钠溶液，使谷氨酸钠溶液在培养液中的浓度达 0.05~10mM，再接入步骤一制得的宿主菌悬浮液，使宿主菌起始浓度达 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL，然后接入步骤二制备的蛭弧菌游泳体浓缩液，使混合培养液中的蛭弧菌起始浓度达 $1 \sim 10^3$ PFU / mL 后，装入发酵罐，于 20~40°C 进行常规发酵培养，培养过程中至少加两次宿主菌，每次间隔 18~30h，并保证每次的培养液中宿主菌浓度达 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL，发酵培养 4~6 天后，即可得到浓度达 $10^8 \sim 10^{14}$ PFU / mL 的蛭弧菌发酵液，最后将此发酵液先在 2~15°C，5000~8000rpm 离心 15~40min，弃去沉淀，保留上清液，上清液再在 2~15°C，10000~20000rpm 离心 15~40min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 0.05~2%稀营养肉汤 DNB 培养液混匀，即得到蛭弧菌游泳体发

酵浓缩液。

2、根据权利要求 1 所述的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，其特征在于：步骤一所述的宿主菌悬浮液的制备中工艺条件为：将宿主菌接种于营养肉汤培养基中，置于 28~32°C 摇床中培养 14~16h，使其处于对数生长期，培养液在 4~5°C，5500~6500rpm 离心 18~25min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 0.1~0.5%稀营养肉汤 DNB 培养液。

3、根据权利要求 1 所述的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，其特征在于：步骤三所述的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺，发酵培养 5 天，前 3 天每间隔 24h 加一次宿主菌，共加三次，使宿主菌在培养液中的浓度维持在 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL，然后继续发酵培养至满 5 天，即得到最终浓度为 $10^8 \sim 10^{14}$ PFU / mL 的蛭弧菌发酵液。

4、根据权利要求 1 或 3 所述的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，其特征在于：步骤三所述培养液中谷氨酸钠的浓度为 0.5~1mM。

5、根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，其特征在于：所述宿主菌是指：可被蛭弧菌裂解的各种弧菌、大肠杆菌、气单胞菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、假单胞菌或爱德华菌类致病菌菌株。

高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术

技术领域

本发明属于发酵工程领域，具体是指一种可应用于减少、甚至完全消除有害菌的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，不仅在水源性、食源性致病菌防治方面，而且在医学、环境污染、农业、工业、军事领域等方面将具有巨大的应用和发展前景。

背景技术

虽然采用生物防治的手段消除致病菌是当今世界工、农、医等各个领域的研究热点，但是目前消除致病菌的主要手段仍是各种物理和 / 或化学的方法，包括各种抗生素的使用。这些方法都存在着明显的弊端，首先，抗生素大量滥用，会导致一些副作用的产生，如病原菌的抗药性、抑制有益菌群等。其次，酸碱处理的方法虽可达到一定的灭菌 / 杀菌效果，但在有害菌形成生物膜后，这些方法的效果就相当的不理想。最后，物理的方法对各种致病菌的消除作用只能应用于相关领域的某一环节，而难以扩展到整个领域的所有环节。然而，生物防治的方法则可具有强大的优越性，极有可能使其服务于日常生活的病害防治以及生物战和恐怖袭击中大规模的水源性、食源性污染的处理等。

蛭弧菌能降解保护性细胞外聚合物并裂解宿主细胞的特性使其具有巨大的应用前景。首先，蛭弧菌的宿主范围广泛，对动物、日常生活等常见致病菌都有较强的清除作用，且对致病菌的裂解能力明显大于非致病菌，蛭弧菌制剂在清除致病菌的同时，对环境中的有益菌危害不大，而以有益菌作为宿主菌培养蛭弧菌的则例外；其次，蛭弧菌作为一种抗微生物因子几乎没有宿主抗性，能对致病菌发挥稳定持久的裂解作用，它能有效地预防自身基因组与其它细菌基因组之间发生基因重组和基因水平转移，并且也没有噬菌体所具有宿主过于专一的缺点；再次，蛭弧菌还可抵御自然界中某些有毒物质，其基因组可以编码多种有毒物质的抗阻蛋白，这预示蛭弧菌有可能成为新型抗生素或消毒剂。有研究表明，蛭弧菌不能存活于真核细胞内，由此揭示它对人体的危害极小；最后，蛭弧菌在没有宿主菌存在的环境中会因为“饥饿”

而死，因此，使用蛭弧菌制剂不存在残留问题。

目前，中国200610039346.8号发明专利申请中提出了一种生产噬菌蛭弧菌制剂的方法，该方法所生产的蛭弧菌制剂的应用，虽然可解决目前用抗生素等方法导致的副作用问题，但其所生产的蛭弧菌制剂密度较低，导致使用量较大，成本较高，且是以有益菌作为宿主菌培养蛭弧菌、以蛭质体或 / 和游泳体混合物的形式作为终产品，存在着杂菌带入、作用滞后、潜在使用范围窄、对有益菌裂解能力过强等缺点。

发明内容

本发明的目的在于克服现有技术的不足之处，提供一种高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养技术，进而生产一种能广泛适用于水源性、食源性致病菌防治以及医学、环境污染、农业、工业、军事领域等的高密度的蛭弧菌游泳体制剂。

为达到上述目的，本发明的主要技术方案如下：高密度蛭弧菌游泳体发酵培养技术，该技术的步骤及其工艺条件如下：

步骤一：宿主菌悬浮液的制备：

将宿主菌接种于常规培养基（即营养肉汤培养基）中，置于 20~40°C 摇床中培养 12~24h，使其处于对数生长期，培养液在 2~15°C，5000~8000rpm 离心 15~40min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 0.05~2%稀营养肉汤 DNB 培养液，即得到浓度达 $10^{18} \sim 10^{26}$ CFU / mL 的宿主菌悬浮液，然后置于 2~15°C 冰箱中保存备用；

步骤二：蛭弧菌游泳体浓缩液的制备：

在稀营养肉汤 DNB 培养液中先加入步骤一制备的宿主菌悬浮液，使宿主菌在 DNB 液体中的浓度达 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL，再接入用常规方法培养出来的蛭弧菌斑，然后将此培养液在 20~40°C 培养 20~60h，再在 2~15°C，5000~8000rpm 离心 15~40min，保留上清液弃去沉淀，将上清液再在 2~15°C，10000~20000rpm 离心 15~40min，保留沉淀弃去上清液，沉淀为蛭弧菌游泳体，往沉淀中加入与其体积比为 0.05~2%DNB 培养液，混匀即得到浓度达 $10^6 \sim 10^8$ PFU / mL 蛭弧菌游泳体浓缩液，然后将此浓缩液置于 2~15°C 冰箱保存备用；

步骤三：高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺：

配制大量稀营养肉汤 DNB 培养液, 并加入经纤维素滤膜过滤处理后的谷氨酸钠溶液, 使谷氨酸钠溶液在培养液中的浓度达 $0.05\sim 10\text{mM}$, 再接入步骤一制得的宿主菌悬浮液, 使宿主菌起始浓度达 $10^{10}\sim 10^{18}\text{CFU} / \text{mL}$, 然后接入步骤二制备的蛭弧菌游泳体浓缩液, 使混合培养液中的蛭弧菌起始浓度达 $1\sim 10^3\text{PFU} / \text{mL}$ 后, 装入发酵罐, 于 $20\sim 40^\circ\text{C}$ 进行常规的发酵培养, 培养过程中至少加两次宿主菌, 每次间隔 $18\sim 30\text{h}$, 并保证每次的培养液中宿主菌浓度达 $10^{10}\sim 10^{18}\text{CFU} / \text{mL}$, 发酵培养 $4\sim 6$ 天后, 即可得到浓度达 $10^8\sim 10^{14}\text{PFU} / \text{mL}$ 的蛭弧菌发酵液, 最后将此发酵液先在 $2\sim 15^\circ\text{C}$, $5000\sim 8000\text{rpm}$ 离心 $15\sim 40\text{min}$, 弃去沉淀, 保留上清液, 上清液再在 $2\sim 15^\circ\text{C}$, $10000\sim 20000\text{rpm}$ 离心 $15\sim 40\text{min}$, 保留沉淀弃去上清液, 往沉淀中加入与其体积比为 $0.05\sim 2\%$ 稀营养肉汤 DNB 培养液混匀, 即得到蛭弧菌游泳体发酵浓缩液。

步骤一所述的宿主菌悬浮液的制备中优选工艺条件为: 将宿主菌接种于营养肉汤培养基中, 置于 $28\sim 32^\circ\text{C}$ 摇床中培养 $14\sim 16\text{h}$, 使其处于对数生长期, 培养液在 $4\sim 5^\circ\text{C}$, $5500\sim 6500\text{rpm}$ 离心 $18\sim 25\text{min}$, 保留沉淀弃去上清液, 往沉淀中加入与其体积比为 $0.1\sim 0.5\%$ 稀营养肉汤 DNB 培养液。

步骤三所述的高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺, 优选方案为发酵培养 5 天, 前 3 天每间隔 24h 加一次宿主菌, 共加三次, 使宿主菌在培养液中的浓度维持在 $10^{10}\sim 10^{18}\text{CFU} / \text{mL}$, 然后继续发酵培养至满 5 天, 即得到浓度为 $10^8\sim 10^{14}\text{PFU} / \text{mL}$ 的蛭弧菌发酵液。

步骤三所述培养液中谷氨酸钠的最佳浓度为 $0.5\sim 1\text{mM}$ 。

所述宿主菌是指: 可被蛭弧菌裂解的各种弧菌、大肠杆菌、气单胞菌、沙门氏菌、绿脓杆菌、单假胞菌或爱德华菌类致病菌菌株。

本发明与现有技术相比具有如下优点:

1、本实验中所述的宿主菌是指: 各种弧菌、大肠杆菌、气单胞菌、沙门氏菌、绿脓杆菌类、假单胞菌、爱德华菌等等一系列可被蛭弧菌裂解的致病菌菌株。宿主菌作为一种活菌, 保证了蛭弧菌的裂解活性, 提高防治效果。避免了长期使用有益菌培养蛭弧菌而导致后者对有益菌裂解能力的提升、对真正有害菌裂解能力的钝化的潜在结果。

2、本发明生产出来的高密度蛭弧菌游泳体制剂具有广泛的应用价值。例

如，在实验中，当九孔鲍苗大量掉板死亡时，加入本蛭弧菌游泳体制剂对致病菌消除率达 **94.1%**；在针对牡蛎、南美白对虾和鲈鱼等携带的致病菌的实验中，加入本蛭弧菌游泳体清除剂对副溶血弧菌的清除率可达 **99%**以上；同时本实验分离的某些蛭弧菌例如 **BDZ - 100**、**BDZ - 103** 等针对非 **O1** 霍乱弧菌、溶藻胶弧菌、大肠杆菌、气单胞菌、沙门氏菌、绿脓杆菌等对人类具有致病性、可以导致人类发生食物中毒的常见菌，其裂解率高达 **88%**、**83.3%**、**90.8%**、**89.2%**、**95%**和 **90.7%**，由此阐明蛭弧菌在食品卫生安全等方面的应用价值。

3、避免使用蛭弧菌蛭质体或游泳体和蛭质体的混合物而使其在应用中的作用时间滞后，且避免其它细菌的带入而限制其潜在使用范围等缺点。

4、本发明中蛭弧菌在进行发酵培养时，蛭弧菌的起始密度极低，有利于节约成本，且与其它方法相比，经发酵后得到的发酵液中蛭弧菌的浓度高，再经离心浓缩后也将得到高浓度的蛭弧菌制剂，减少了实际中制剂的使用量。

5、本技术所采用的蛭弧菌既可是实验室菌株、野生株也可是突变株，既可是来自海水、咸水、淡水、陆地，也可是人源、动物源和植物源的。

6、本发明以游泳体作为终产品，大大拓宽其应用范围，使其不但在水源性、食源性致病菌防治方面，而且在医学、环境污染、农业、工业、军事领域等方面均可使用。

具体实施方式

实施例 1

高密度蛭弧菌游泳体发酵培养技术，该技术的步骤及其工艺条件如下：

步骤一：宿主菌悬浮液的制备：

将本实验室分离出来的一株大肠杆菌 / 绿脓杆菌作为宿主菌接种于营养肉汤培养基中，置于 **20°C** 摇床中培养 **14h**，使其处于对数生长期，培养液在 **4°C**，**5000rpm** 离心 **35min**，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 **0.05%**稀营养肉汤 **DNB** 培养液，即得到浓度达 $10^{18} \sim 10^{26}$ CFU / mL 的宿主菌悬浮液，然后置于 **2~4°C** 冰箱中保存备用；

步骤二：蛭弧菌游泳体浓缩液的制备：

在稀营养肉汤 **DNB** 培养液中先加入步骤一制备的宿主菌悬浮液，使宿主菌在 **DNB** 液体中的浓度达 10^{12} CFU / mL，再接入用常规方法培养出来的蛭

弧菌斑,然后将此培养液在 20°C 培养 48h, 再在 4°C, 5000rpm 离心 35min, 保留上清液弃去沉淀, 将上清液再在 4°C, 10000rpm 离心 35min, 保留沉淀弃去上清液, 沉淀为蛭弧菌游泳体, 往沉淀中加入与其体积比为 0.05%DNB 培养液, 混匀即得到浓度达 $10^6 \sim 10^8$ PFU / mL 蛭弧菌游泳体浓缩液, 然后将此浓缩液置于 4°C 冰箱保存备用;

步骤三: 高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺:

配制大量 DNB 培养液, 并加入经纤维素滤膜过滤处理后的谷氨酸钠溶液, 使谷氨酸钠溶液在培养液中的浓度达 0.5mM, 再接入步骤一制得的宿主菌悬浮液, 使宿主菌起始浓度达 10^{12} CFU / mL, 然后接入步骤二制备的蛭弧菌游泳体浓缩液, 使混合培养液中的蛭弧菌起始浓度达 10^3 PFU / mL 后, 将此混合培养液装入 10L 发酵罐, 于 20°C 进行发酵培养 5 天, 前 3 天内每间隔 18h 加一次宿主菌, 使宿主菌在培养液中的浓度维持在 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL, 然后继续发酵培养至满 5 天, 即可得到最终浓度为 $10^8 \sim 10^{14}$ PFU / mL 的蛭弧菌发酵液。最后将此发酵液先在 4°C, 5000rpm 离心 35min, 弃去沉淀, 保留上清液, 上清液再在 4°C, 10000rpm 离心 35min, 保留沉淀弃去上清液, 往沉淀中加入与其体积比为 0.05%稀营养肉汤 DNB 培养液混匀, 即得到蛭弧菌游泳体发酵浓缩液。

实施例 2

高密度蛭弧菌游泳体发酵培养技术, 该技术的步骤及其工艺条件如下:

步骤一: 宿主菌悬浮液的制备:

将本实验室分离出来的一株副溶血弧菌或溶藻弧菌或爱德华菌作为宿主菌接种于营养肉汤培养基中, 置于 26°C 摇床中培养 18h, 使其处于对数生长期, 培养液在 10°C, 6000rpm 离心 20min, 保留沉淀弃去上清液, 往沉淀中加入与其体积比为 0.5%稀营养肉汤 DNB 培养液, 即得到浓度达 $10^{18} \sim 10^{26}$ CFU / mL 的宿主菌悬浮液, 然后置于 2~4°C 冰箱中保存备用;

步骤二: 蛭弧菌游泳体浓缩液的制备:

在稀营养肉汤 DNB 培养液中先加入步骤一制备的宿主菌悬浮液, 使宿主菌在 DNB 液体中的浓度达 10^{14} CFU / mL, 再接入用常规方法培养出来的蛭弧菌斑, 然后将此培养液在 26°C 培养 36h, 再在 10°C, 6000rpm 离心 20min, 保留上清液弃去沉淀, 将上清液再在 10°C, 16000rpm 离心 20min, 保留沉

淀弃去上清液，沉淀为蛭弧菌游泳体，往沉淀中加入与其体积比为 0.5%DNB 培养液，混匀即得到浓度达 $10^6 \sim 10^8$ PFU / mL 蛭弧菌游泳体浓缩液，然后将此浓缩液置于 6~8°C 冰箱保存备用；

步骤三：高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺：

配制大量 DNB 培养液，并加入经纤维素滤膜过滤处理后的谷氨酸钠溶液，使谷氨酸钠溶液在培养液中的浓度达 5mM，再接入步骤一制得的宿主菌悬浮液，使宿主菌起始浓度达 10^{14} CFU / mL，然后接入步骤二制备的蛭弧菌游泳体浓缩液，使混合培养液中的蛭弧菌起始浓度达 10^2 PFU / mL 后，将此混合培养液装入 10L 发酵罐，于 26°C 进行发酵培养 5 天，前 3 天内每间隔 24h 加一次宿主菌，使宿主菌在培养液中的浓度维持在 $10^{10} \sim 10^{18}$ CFU / mL，然后继续发酵培养至满 5 天，即可得到最终浓度为 $10^8 \sim 10^{14}$ PFU / mL 的蛭弧菌发酵液。最后将此发酵液先在 10°C，6000rpm 离心 20min，弃去沉淀，保留上清液，上清液再在 10°C，16000rpm 离心 20min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 0.5%稀营养肉汤 DNB 培养液混匀，即得到蛭弧菌游泳体发酵浓缩液。

实施例 3

高密度蛭弧菌游泳体发酵培养技术，该技术的步骤及其工艺条件如下：

步骤一：宿主菌悬浮液的制备：

将本实验室分离出来的一株气单胞菌或沙门氏菌或假单胞菌，作为宿主菌接种于营养肉汤培养基中，置于 32°C 摇床中培养 24h，使其处于对数生长期，培养液在 15°C，8000rpm 离心 15min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 2%稀营养肉汤 DNB 培养液，即得到浓度达 $10^{18} \sim 10^{26}$ CFU / mL 的宿主菌悬浮液，然后置于 2~4°C 冰箱中保存备用；

步骤二：蛭弧菌游泳体浓缩液的制备：

在稀营养肉汤 DNB 培养液中先加入步骤一制备的宿主菌悬浮液，使宿主菌在 DNB 液体中的浓度达 10^{18} CFU / mL，再接入用常规方法培养出来的蛭弧菌斑，然后将此培养液在 32°C 培养 24h，再在 15°C，8000rpm 离心 15min，保留上清液弃去沉淀，将上清液再在 15°C，20000rpm 离心 15min，保留沉淀弃去上清液，沉淀为蛭弧菌游泳体，往沉淀中加入与其体积比为 2%DNB 培养液，混匀即得到浓度达 $10^6 \sim 10^8$ PFU / mL 蛭弧菌游泳体浓缩液，然后

将此浓缩液置于 4°C 冰箱保存备用；

步骤三：高密度蛭弧菌游泳体的发酵培养工艺：

配制大量 DNB 培养液，并加入经纤维素滤膜过滤处理后的谷氨酸钠溶液，使谷氨酸钠在培养液中的浓度达 10mM，再接入步骤一制得的宿主菌悬浮液，使宿主菌起始浓度达 10^{18} CFU / mL，然后接入步骤二制备的蛭弧菌游泳体浓缩液，使混合培养液中的蛭弧菌起始浓度达 10PFU / mL 后，将此混合培养液装入 10L 发酵罐，于 32°C 进行发酵培养 5 天，前 4 天内每间隔 30h 加一次宿主菌，使宿主菌在培养液中的浓度维持在 10^{10} ~ 10^{18} CFU / mL，然后继续发酵培养至满五天，即可得到最终浓度为 10^8 ~ 10^{14} PFU / mL 的蛭弧菌发酵液。最后将此发酵液先在 15°C，8000rpm 离心 15min，弃去沉淀，保留上清液，上清液再在 15°C，20000rpm 离心 15min，保留沉淀弃去上清液，往沉淀中加入与其体积比为 2%稀营养肉汤 DNB 培养液混匀，即得到蛭弧菌游泳体发酵浓缩液。