

培养基、接种菌量和 pH 值对破伤风梭状芽孢杆菌产毒的影响*

高 娜, 衡 燮, 姬秋彦, 梁疆莉, 顾 琴, 马 艳, 史 荔, 孙明波**
(中国医学科学院 & 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

[摘 要] 目的: 探讨培养基、接种菌量与 pH 值对破伤风梭状芽孢杆菌产毒的影响。方法: 采用示豚三号、示豚二号、胃蛋白胨及自制肉汤 4 种培养基培养破伤风梭状芽孢杆菌, 比较毒素产量; 选择最优培养基, 按照培养基体积的 1%、2%、3%、4% 接种破伤风梭状芽孢杆菌, 培养 160 h, 选取合适接种菌量; 使用最优培养基与接种量, 分别用初始 pH 7.5、7.2、7.0 的 3 种培养基培养破伤风梭状芽孢杆菌, 比较毒素产量。结果: 示豚三号产毒量优于其他 3 种蛋白胨, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 接种菌量大于 2% 时产毒量最优, 3 种初始 pH 培养条件对产毒量无明显影响($P > 0.05$)。结论: 初步筛选出最优破伤风毒素培养基及接种量, 为破伤风疫苗工艺研究及扩大化生产提供依据。

[关键词] 破伤风梭状芽孢杆菌; 类毒素; 培养基; 培养技术; 接种菌量

[中图分类号] Q939.93; Q939.99 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2018)10-1237-04
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.022

Studies on Effect of Culture Medium, Inoculum Amount and pH Value on the Toxin Production of *Clostridium Tetanus*

GAO Na, HENG Xie, JI Qiuyan, LIANG Jiangli, GU Qin, MA Yan, SHI Li, SUN Mingbo
(Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of
Medical Sciences, Kunming, Yunnan 650118, China)

[Abstract] Objective: To investigate effect of culture medium, inoculum amount and pH Value on the toxin production of *Clostridium Tetanus*. Methods: Comparative analysis was performed using three types of medium: peptone 3, peptone 2 and stomach peptone, together with lab-made solution as culture medium to cultivate *Clostridium Tetanus* to compare toxin production; then selecting rime culture medium; inoculate *Clostridium Tetanus* according to 1%, 2%, 3%, 4% of culture medium size respectively for 160h, then selecting inoculum ratio. In the meantime, using the best culture medium and inoculum amount to cultivate *Clostridium Tetanus* with initial pH value of 7.5, 7.2 and 7.0 to analyze the toxin production. Results: Peptone 3 showed significantly better results than the other two peptones, difference was statistically significant ($P < 0.05$). When the inoculation amount was greater than 2%, toxin production could produce the optimal yield. There was no significant difference between the three initial pH levels, it has no effect on the final amount of toxin production ($P < 0.05$). Conclusion: The experiment confirmed the cultivation process of inoculum amount and pH value of tetanus toxin, and provide guarantee for the research and expansion of tetanus vaccine technology.

[Key words] *Clostridium tetanus*; toxoid; culture; culture technology; amount of inoculum

*[基金项目] 重大新药创制科技重大专项基金资助项目(2015ZX09101031); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程资助项目(2016-12M-1-019)
** 通信作者 E-mail: smb@imbcams.com.cn
网络出版时间:2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.004.html>

破伤风梭状芽孢杆菌是革兰阳性细菌,可通过污染的伤口或组织损伤处进入人体,其产生的破伤风痉挛毒素可阻断中枢神经系统的抑制性神经递质,引起破伤风典型的肌肉强直和痉挛^[1-2]。破伤风类毒素(tetanus toxoid, TT)疫苗及含 TT 疫苗(TT-containing vaccine, TTCV)仍然是目前预防孕妇及新生儿破伤风(maternal and neonatal tetanus, MNT)以及损伤导致破伤风的主要方式^[3]。因此,WHO 提出全球消灭 MNT 及通过常规儿童期免疫程序达到、并维持 TTCV 6 剂接种的高覆盖率,是 2017 年预防破伤风的新目标^[4]。现有生产 TT 的培养基大多采用自制酪蛋白、牛肉等在较温和的条件下水解后制成基础液,虽然可以获得相对稳定的产毒量,但是原材料的标准化困难,并且制作过程中不可避免的会发生一些钙沉淀和美拉德反应,这些都将影响毒素产量^[5-6]。为了使培养过程更加可控,本研究从自制肉类蛋白胨培养基和利于质量控制的商业化的蛋白胨培养基中筛选 TT 产量更高的培养基^[7-9],并观察接种菌量和 pH 值对破伤风梭状芽孢杆菌产毒的影响,进一步优化培养条件、提高产量、降低外源因子污染风险,从而提高疫苗的质量。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

破伤风梭状芽孢杆菌(CMCC64008)购自中国食品药品检定研究院,由此制备破伤风工作种子。

1.2 主要试剂及仪器

示胨三号、示胨二号、胃蛋白胨及酵母浸出物购自 BD(Becton, Dickinson and company)公司,培养基其他成分包括结晶乙酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、丙三醇、葡萄糖、硫酸锌、七水合硫酸镁、盐酸及无水乙醇等均购自西陇化工有限公司,胱氨酸购自国药集团化学试剂有限公司,破伤风标准絮状反应抗毒素购自中国食品药品检定研究院。1.5 L 生物反应器(BioBundle, 购自 Applikon), pH 计(SevenCompact, 购自 METTLEDR TOLEDO 公司),智能生化培养箱(上海飞越实验仪器有限公司)。

1.3 菌种培养

将破伤风梭状芽孢杆菌工作种子接种于破伤风菌种培养基(10 mL 试管,自制肉汤),35 ℃ 普通培养箱条件下静置培养 24 ~ 48 h,为第一代(P1);培养到期的 P1 代,采用相同方法继续传代,为第二代(P2);将种子培养物接种于破伤风毒素培养基

中(100 mL 三角瓶,自制肉汤),为第三代(P3),35 ℃ 静置培养 24 ~ 48 h。

1.4 絮状单位实验

参考《中国药典》三部(2015 版)通则 3506 类毒素絮状单位测定法测定毒素絮状单位。精密量取 100 Lf/mL 的抗毒素絮状反应标准品溶液 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 分别加入絮状反应管,精密量取供试品溶液 1 mL,快速准确加入上述各絮状反应管内,摇匀置 45 ~ 50 ℃ 水浴中,连续观察,并记录絮状出现次序和时间。再取 5 支絮状反应管,重复上述试验,将最先出现絮状之管放中间,前后各加两管不同量抗毒素絮状反应标准品溶液,每管间隔 0.05 mL,再向各管中加入供试品 1 mL,观察絮状出现情况。重复上述实验,观察并记录结果,以 2 次相同值为最终测定值。 $\text{TT 絮状单位(Lf/mL)} = \text{稀释抗毒素絮状反应标准品使用量(mL)} \times \text{待检样品稀释倍数} \times 100$ 。

1.5 产毒培养的培养基筛选

将种子扩大培养物 P3 分别接种于示胨三号、示胨二号、胃蛋白胨及自制肉汤 4 种培养基(500 mL 三角瓶)中,35 ℃ 静置培养,按 1.4 项下方法检测收获的破伤风培养液中的毒素含量。试验分 3 个批次进行。

1.6 产毒培养的接种量筛选

选取 1.5 项下产毒量高的培养基作为种子扩大培养基,培养 P3 代,从 P3 取菌液接种至 4 个小发酵罐(A)和 4 个 250 mL 三角瓶(B),发酵罐装量为 1 L 产毒培养基,三角瓶装量为 200 mL 产毒培养基,接种菌量均为培养基体积的 1%、2%、3%、4%,分别命名为 A-1%、A-2%、A-3%、A-4%、B-1%、B-2%、B-3%、B-4%,35 ℃ 静置培养 160 h,按 1.4 项下方法检测接种后 12、18、24、42、48、72、80、96、120、144、160 h 时培养液中的毒素量,比较各组毒素产量的动态变化。

1.7 产毒培养的初始 pH 筛选

从 P3 取菌液分别接种至培养基 pH 为 7.5、7.2、7.0 的 3 个 1.5L 小发酵罐中,接种量为 1.7 项下筛选的最佳接种量,培养基用量为 1 L;按 1.4 项下方法检测培养液毒素含量,对各组毒素量进行比较。试验分 3 个批次进行。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 软件对数据进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 产毒培养的培养基筛选

示胨三号、示胨二号、胃蛋白胨与自制肉汤作

为主要蛋白胨来源的4种培养基培养破伤风毒素产量结果见表1,示胨三号培养基产毒量最高,与其他3种培养基产毒量比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。自制肉汤的变异系数大于其它3组,说明批间差异较大。

表1 不同培养基对破伤风梭状芽孢杆菌产毒量的影响

Tab.1 Effects of different media on the production of tetanus toxin

培养基	产毒(Lf/mL)			$\bar{x} \pm s$ (Lf/mL)	变异系数
	第1批	第2批	第3批		
示胨三号	140	120	110	123.33 ± 15.28	0.124
自制肉汤	70	100	80	83.33 ± 15.28 ⁽¹⁾	0.183
示胨二号	80	70	60	70.00 ± 10.00 ⁽¹⁾	0.143
胃蛋白胨	60	50	50	53.33 ± 5.77 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.108

注: F 值为17.833,⁽¹⁾与示胨三号比较, $P<0.05$;⁽²⁾与自制肉汤比较, $P<0.05$

2.2 接种量对毒素的影响

使用示胨三号培养基,不同破伤风菌种接种量所得破伤风毒素量动态变化见图1、图2。培养的破伤风菌在24h开始产毒,72h左右达到峰值。A-2%、A-3%、A-4%于培养72h时毒素产量达峰值,为100Lf/mL;A-1%的毒素产量低于其它3个接种量,于120h达到峰值(80Lf/mL)。B-2%、B-3%、B-4%于培养72h毒素产量达峰值,为90Lf/mL,1%接种量也低于其它3个接种量,于120h达到峰值(80Lf/mL)。除1%接种量外,其余接种量毒素产量于80h后逐渐下降。

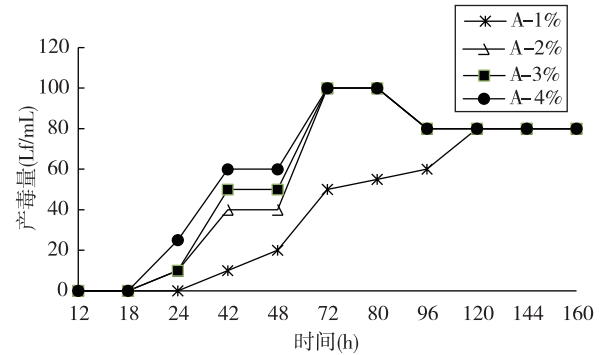


图1 发酵罐内不同接种菌量对破伤风梭状芽孢杆菌产毒量的影响

Fig.1 Effects of different inoculum amount on the production of tetanus toxin (fermentor)

2.3 pH对毒素的影响

使用2%的接种量,接种示胨三号培养基,于pH为7.5、7.2、7.0的3个小发酵罐中培养后的产毒量见表2,3种初始pH条件下的产毒量差异无统计学意义($P>0.05$)。

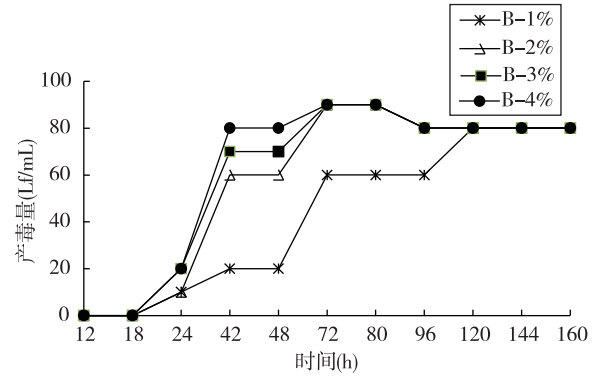


图2 三角瓶内不同接种菌量对破伤风梭状芽孢杆菌产毒的影响

Fig.2 Effects of different inoculum on the production of tetanus toxin (erlenmeyer flask)

表2 不同pH对破伤风梭状芽孢杆菌产毒量的影响(Lf/mL)

Tab.2 Effects of different pH on toxigenic production of tetanus

pH	产毒			$\bar{x} \pm s$
	第1批	第2批	第3批	
7.5	110	90	110	103.33 ± 11.55
7.2	100	100	90	96.67 ± 5.77
7.0	110	90	90	96.67 ± 11.55
F				0.444
P				>0.05

3 讨论

最初破伤风毒素的培养使用威特氏蛋白胨,毒素培养再另加肉汤和葡萄糖^[10]。后期 Kunihiro

Ozutsumi 等^[11]使用牛肝肉汤过夜培养菌种,再转种莱瑟姆培养基以促进细菌产毒,然后提取自溶前的菌体胞内毒素。随着生物制药工艺越来越成熟^[12],超滤、盐析和层析等过程的加入,成为制得高纯度破伤风类毒素的关键步骤。但是,在制作肉汤的时候即使谨慎认真,方式一致,产毒结果也会有很大不同^[13],这也是近些年国内各厂家改进破伤风毒素生产工艺的关键,有厂家使用了肝浸粉、胰酪胨和示胨替代^[14],也有厂家使用酪胨干粉作为基础,后期添加谷氨酰胺、1:1猪肝浸液与锌离子的方案来收获更多毒素量^[15]。

本研究使用商品化的示胨三号、示胨二号、胃蛋白胨及自制肉汤作为提供主要蛋白胨的基础培养基,另外再添加葡萄糖、无机盐、氨基酸、维生素和铁离子等,制备产毒培养基进行对比研究,发现示胨三号培养基产毒较好,同时产毒的批间差异较小,符合要求^[16],优于自制肉汤培养基。接着,基于筛选的示胨三号培养基,就破伤风接种量和培养基 pH 对产毒的影响进行了考察。合适的接种量不仅有利于最大发挥发酵罐的效率,而且有利于减少发酵时间,降低发酵成本^[17]。菌种接种量为 1% 时,其产毒明显低于 2%、3% 和 4%,而后 3 者产毒量无明显差异,因而 2% 的接种量较为适宜。而在筛选的培养基和优化接种量条件下,培养基 pH 对最终的产毒量没有显著影响。

综上所述,此次试验通过探索不同培养基、接种菌量和 pH 对破伤风梭状芽孢杆菌产毒的影响,初步筛选出完全商品化的示胨三号培养基产毒较好,对该培养基的菌种接种量及 pH 进行了优化。破伤风类毒素生产中,还有其它参数对培养有影响,包括培养温度、通气等^[18-20],需要后期进一步优化,以期能够获得较好的产毒量,提高商品化培养基的培养水平。

4 参考文献

- [1] ERGONUL O, EGELI D, KAHYAOGU B, et al. An unexpected tetanus case[J]. Lancet Infectious Diseases, 2016, 16 (6): 746 - 752.
- [2] THWAITES C L, LOAN H T. Eradication of tetanus[J]. British Medical Bulletin, 2015, 116(1): 69 - 77.
- [3] 王真行, 邹力. WHO 关于破伤风疫苗的意见书[J]. 国际生物制品学杂志, 2017, 40(4): 198 - 204.
- [4] WHO position paper-February 2017. Tetanus vaccines [J]. Releve Epidemiologique Hebdomadaire, 2017, 92 (6): 53.
- [5] STOCK I. Tetanus and clostridium tetani-a brief review [J]. Med Monatsschr Pharm, 2015, 38(2): 57 - 60.
- [6] LICONA-CASSANI C, STEEN J A, ZARAGOZA N E, et al. Tetanus toxin production is triggered by the transition from amino acid consumption to peptides[J]. Anaerobe, 2016, 41 (1): 113 - 124.
- [7] MUELLER J H, MILLER P A. Variable factors influencing the production of tetanus toxin[J]. Journal of Bacteriology, 1954, 67(3): 271.
- [8] MUELLER J H, MILLER P A. Unidentified nutrients in tetanus toxin production [J]. Journal of Bacteriology, 1948, 56(2): 219.
- [9] GLADSTONE G P, FILDBS P A. Simple culture medium for general use without meat extract or peptone[J]. Brit J Exper Path, 1940, 21(4): 161 - 173.
- [10] WILCOX H L. A modification of the hygienic laboratory method for the production of tetanus toxin[J]. Journal of Bacteriology, 1916, 1(3): 333 - 338.
- [11] OZUTSUMI K, SUGIMOTO N, MATSUDA A M. Rapid, simplified method for production and purification of tetanus toxin[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(4): 939 - 943.
- [12] 吴林菁, 姜丰, 苏菊, 等. 艳山姜挥发油提取工艺优选及化学成分 GC-MS 分析[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(6): 655 - 660.
- [13] WILCOX H L. The effect of pepton upon the production of tetanus toxin[J]. J Bacteriol, 1921, 6(4): 407 - 417.
- [14] 曹玲, 杨海珍, 孙一致, 等. 破伤风杆菌产毒培养基主要原材料的替代研究[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42 (1): 31 - 35.
- [15] 邵卉, 孙景致, 恩文山, 等. 探索破伤风双胨干粉产毒培养基配方[J]. 山西医药杂志, 2014, 43 (24): 2926 - 2927.
- [16] 国家药典委员会. 中国药典(3 部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 88 - 89.
- [17] GUILHEN F B, TREZENA A G, PRADO S M, et al. Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins[J]. Biologicals, 2014, 42 (2): 91 - 100.
- [18] MUELLER J H, MILLER P A. Factors affecting the production of tetanus toxin: Temperature [J]. Journal of Bacteriology, 1948, 55 (3): 421 - 423.
- [19] MUELLER J H, MILLER P A, LERNER E M. Factors influencing the production of tetanus toxin: gaseous products of growth [J]. Journal of Bacteriology, 1948, 56 (1): 97 - 98.
- [20] STONE J L. The effect of lysozyme on the production of tetanus toxin I studies with flocculation [J]. Journal of Bacteriology, 1952, 64(3): 299.

(2018-07-28 收稿, 2018-09-27 修回)

中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅