

ICS

点击此处添加中国标准文献分类号

团 体 标 准

T/ CVMA XXXXX—XXXX

鸭疫里默氏杆菌弱毒株的发酵工艺

LIQUID FERMENTATION TECHNOLOGY OF RIEMERELLA ANATIPESITIS

ATTENUATED STRAIN

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中国兽医协会 发布

目 录

| | |
|-------------------|-----|
| 前 言..... | II |
| 引 言..... | III |
| 1 范围..... | 1 |
| 2 规范性引用文件..... | 1 |
| 3 术语和定义..... | 1 |
| 4 原料要求..... | 1 |
| 4.1 水..... | 1 |
| 4.2 TSA 培养基..... | 2 |
| 4.3 发酵培养基..... | 2 |
| 4.4 消泡剂溶液..... | 2 |
| 5. 仪器和设备..... | 2 |
| 6. 环境要求..... | 3 |
| 7. 发酵流程..... | 3 |
| 7.1 发酵种子液的制备..... | 3 |
| 7.2 发酵罐发酵..... | 3 |
| 7.3 发酵结束..... | 3 |
| 8. 质量检验..... | 4 |
| 9 废弃物的管理..... | 4 |
| 10 储存、运输..... | 4 |
| 11 生产记录..... | 4 |
| 附录 A..... | 5 |

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

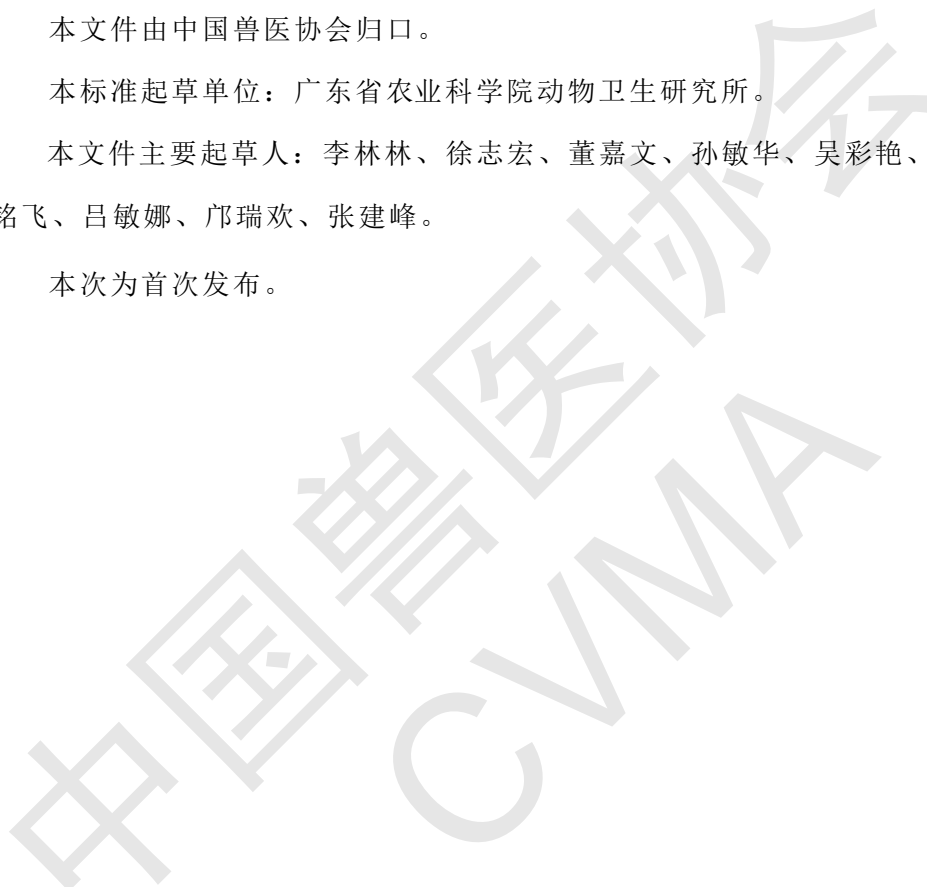
本文件由广东省农业科学院动物卫生研究所提出。

本文件由中国兽医药学会归口。

本标准起草单位：广东省农业科学院动物卫生研究所。

本文件主要起草人：李林林、徐志宏、董嘉文、孙敏华、吴彩艳、廖申权、孙铭飞、吕敏娜、邝瑞欢、张建峰。

本次为首次发布。



引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，条目 4 和条目 7 的部分内容可能涉及到相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：广东省农业科学院动物卫生研究所

地址：广东省广州市天河区五山白石岗街 21 号

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

鸭疫里默氏杆菌弱毒株的发酵工艺

1 范围

本文件规定了鸭疫里默氏杆菌弱毒株的发酵工艺的原料要求、仪器设备、发酵流程、质量检验、废弃物管理、储存、运输和生产记录。

本文件适用于一般细菌培养的鸭疫里默氏杆菌弱毒株的发酵工艺。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 16293 医药工业洁净室（区）

GB/T 16294 医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法

GB/T 19923 城市污水再生利用工业用水水质

GB/T 25915.1 洁净室及相关受控环境第1部分：空气洁净度等级

GB/T 25916.1 洁净室及相关受控环境生物污染控制第1部分：一般原理和方法

3 术语和定义

下列术语和定义、缩略语适用于本文件。

3.1

培养基 nutrient medium

培养基是指由人工方法配制而成的，专供微生物培养、分离、鉴别、研究和保存使用的混合营养物制品。

3.2

大豆酪蛋白琼脂培养基

Tryptose Soya Agar, TSA

4 原料要求

4.1 水

鸭疫里默氏杆菌弱毒株发酵用水应符合 GB/T 6682 的规定。

4.2 TSA 培养基

称取胰蛋白胨 17.5g、大豆蛋白胨 7.5g、酵母提取物 7.5g、葡萄糖 2.5g、磷酸氢二钾 2.5g、氯化钠 5.0g、琼脂粉 20.0g，将上述物质溶于水中定容至 1L，调整 pH 至 7.5，混匀后分装于试剂瓶中，121°C 高压灭菌 30min，待其自然冷却至 40°C ~ 50°C，加入 5%新生牛血清，混匀后制成平板。

4.3 发酵培养基

推荐配制体积为 1L 培养基的步骤如下：

称取胰蛋白胨 17.5 g、大豆蛋白胨 7.5 g、酵母提取物 7.5 g、葡萄糖 2.5 g、磷酸氢二钾 2.5 g、氯化钠 5.0 g，将上述物质溶于水中定容至 1L，调整 pH 至 7.5，混匀后倒入发酵罐或分装于试剂瓶，于 121°C 高压灭菌 30min。待其自然冷却至 37°C 以下，使用前加入 5%新生牛血清（具体配置要求请见附录 A）。

注：若改变发酵培养基的组成、配比或 pH，应先研究其适用性。

4.4 消泡剂溶液

配制体积为 1L 的消泡剂溶液的步骤如下：

量取 1mL 204 消泡剂，定容于 1L 水中，转入发酵罐消泡泵补料瓶中，121°C 高压灭菌 30min。

5. 仪器和设备

鸭疫里默氏杆菌弱毒株的发酵工艺需要的仪器设备如下：

- a) BF 型生物反应器；
- b) 洁净工作台；
- c) 空气压缩泵；
- d) 冷凝水循环系统；
- e) 紫外分光光度计；
- f) 细菌培养箱和恒温摇床；
- g) 高压蒸汽灭菌锅；
- h) 发酵罐；
- i) 试剂瓶。

6. 环境要求

6.1 车间环境的空气洁净度等级应符合 GB/T 25915.1 中的 ISO5 级的要求。

6.2 车间环境的染菌密度按 GB/T25916.1 中空气生物污染测定方法进行检测，染菌密度应不大于 20 个/cm²。

6.3 车间环境的浮游菌按 GB/T16293 的规定进行检测应不大于 500CFU/m²。

6.4 车间环境的沉降菌按 GB/T16294 的规定进行检测应不大于 200CFU/m²。

7. 发酵流程

7.1 发酵种子液的制备

7.1.1 鸭疫里默氏杆菌弱毒株单菌落接种于 4%~6%新生牛血清的发酵培养基中，在 36.5℃~37.5℃ 温度条件下，振荡培养 16h~20h。

7.1.2 取样，按体积比 1%~2%接种于 4%~6%新生牛血清的发酵培养基中，调整转速 150r/min~170r/min, 在 37℃ 温度条件下振荡培养 12h~14h 作为种子液。

7.2 发酵罐发酵

7.2.1 发酵罐灭罐前，pH 电极、溶氧电极以及补料泵流速依据发酵罐说明书进行。

7.2.2 在发酵容器中加入 pH 范围为 7.4~7.6 的培养基（4.3）及消泡剂（4.4），121℃ 高压灭菌 30min，自然降温冷却。

7.2.3 将发酵罐中的培养基（4.3）及消泡剂（4.4）预热至 36.5℃~37.5℃，然后加入 4%~6%新生牛血清，1%~2%种子液。

7.2.4 培养温度为 36.5℃~37.5℃，在发酵过程中通过调节通气量使溶氧维持在溶解氧值为 10%~40%，发酵罐培养转速控制在 100r/min~200r/min, 发酵时间为 7h~8h。

7.3 发酵结束

将发酵菌液从发酵罐取样孔取出，取样孔取样是在超净台内进行，无菌操作，将装有菌液的样品瓶及时放入 4℃ 冰箱保存。取出菌液后的发酵罐，进行空罐灭菌，121℃ 蒸汽灭菌 30min。所有涉及到细菌的器皿及废弃物，使用后均需高压灭菌后再丢弃或清洗。

8. 质量检验

8.1 发酵良好的菌液，外观为均一的液体。鸭疫里默氏杆菌弱毒株在发酵 8 小时活菌数达到高峰，收获时每毫升菌液含活菌数 1.0×10^{10} CFU。

8.2 外观、pH、干燥失重及生长试验为型式检验项目，有下列情况时应检验：

- a) 初次检验与定期检验；
- b) 原材料配比发生变化时；
- c) 主材来源发生变化时；
- d) 辅料来源发生变化时；
- e) 发酵工艺、设施发生改变时；
- f) 发酵用菌种改变时。

9 废弃物的管理

- 9.1 废弃物应分类并装入废弃物容器。
- 9.2 废弃物容器应不透水、易清洗消毒、加盖或密封，并有明显的标识。
- 9.3 废弃物应按班次及时清除，运到指定地点加以灭菌处理。
- 9.4 废弃物容器、运送车辆和废弃物临时存放场所应及时进行清理。
- 9.5 污水的排放应符合 GB/T 19923 有关规定。

10 储存、运输

- 10.1 发酵好的栽培基质不宜长久贮存，宜现产现用。
- 10.2 采用干净卫生的车辆进行专业运输，应该采用密封储存的方式，保证无菌， $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 冷藏运输。

11 生产记录

生产全过程中各环节应做生产记录，并建档备查。记录档案保存期为两年。

附录 A

(规范性附录)

鸭疫里默氏杆菌弱毒株发酵培养基的配制方法

A.1 配制方法

1L 培养基的配制方法如下：称取胰蛋白胨 17.5g、大豆蛋白胨 7.5g、酵母提取物 7.5g、葡萄糖 2.5g、磷酸氢二钾 2.5g、氯化钠 5.0g，将上述物质溶于水中定容至 1L，调整 pH 至 7.5，混匀后倒入发酵罐或分装于试剂瓶，于 121℃ 高压灭菌 30min 制成。待其自然冷却至 37℃ 以下，使用前加入 5% 新生牛血清。表附录 A-1 列出了各培养基配方组成及其在培养基中的浓度。

附录 A.1 培养基配方组成及浓度

| 序号 | 名称 | 浓度 (g/L) |
|----|-------|----------|
| 1 | 胰蛋白胨 | 17.5 |
| 2 | 大豆蛋白胨 | 7.5 |
| 3 | 酵母提取物 | 7.5 |
| 4 | 葡萄糖 | 2.5 |
| 5 | 磷酸氢二钾 | 2.5 |
| 6 | 氯化钠 | 5.0 |

A.2 质量要求

A.2.1 外观

应为均一的液体状态。

A.2.2 pH

灭菌后，20℃~25℃ 时，培养基的 pH 应为 7.5±0.2。

A.2.3 干燥失重

应不超过 6.0%。

A.2.4 生长试验

接种 10CFU~100CFU 鸭疫里默氏杆菌，生长良好。

A.3 无菌操作要求

培养基生长试验应严格遵守无菌操作，防止微生物污染。稀释液、培养基、实验器具等灭菌时，应按《中华人民共和国药典》中灭菌法的要求，采用验证合格的灭菌程序灭菌。