



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106376597 A

(43)申请公布日 2017.02.08

(21)申请号 201610765402.X

(22)申请日 2016.08.30

(71)申请人 北京达成生物科技有限公司
地址 100096 北京市昌平区回龙观镇回南路10号楼2层207

(72)发明人 徐占勇 郑长龙

(74)专利代理机构 北京力量专利代理事务所
(特殊普通合伙) 11504

代理人 宋林清

(51) Int. Cl.

A01N 63/00(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

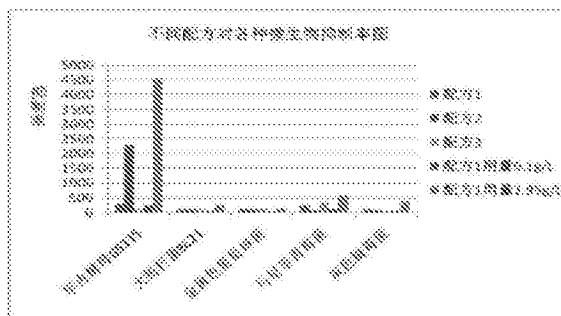
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种多酶复合抑菌剂

(57)摘要

本发明涉及一种多酶复合抑菌剂,主要解决体外诊断试剂盒中常用抑菌剂不能有效抑制霉菌、酵母菌及放线菌的问题。本发明的复合抑菌剂主要成分及配比为:几丁质内切酶0.1%-20%、β-1,3葡聚糖酶0.1%-30%、纤维素酶0.01%-10%、磷酸甘露糖酶0.1%-30%、EDTA(或EGTA)10-90%。其可以为固态组合物加入含菌试剂,也可以溶液状态加入含菌试剂。本发明的多酶复合抑菌剂对各种微生物均有抑制作用,真核微生物对其尤为敏感。相对于抗生素而言,环境友好,本发明抑菌剂可降解,无残留,无产生抗药菌的风险;对于叠氮钠等化学防腐剂而言具有无毒、无害等优点。



1. 一种多酶复合抑菌剂,其特征在于,包括如下组分:几丁质内切酶; β -1,3葡聚糖酶;纤维素酶;磷酸甘露糖酶。
2. 如权利要求1所述的多酶复合抑菌剂,其特征在于:几丁质内切酶基于抑菌剂总重量的0.1%—20%。
3. 如权利要求1所述的多酶复合抑菌剂,其特征在于: β -1,3葡聚糖酶基于抑菌剂总重量的0.1%—30%。
4. 如权利要求1所述的多酶复合抑菌剂,其特征在于:纤维素酶基于抑菌剂总重量的0.01%—10%。
5. 如权利要求1所述的多酶复合抑菌剂,其特征在于:磷酸甘露糖酶基于抑菌剂总重量的0.1%—30%。
6. 如权利要求1所述的多酶复合抑菌剂,其特征在于:多酶复合抑菌剂中还添加EDTA、EGTA,其用量为基于抑菌剂总重量的10%—90%。
7. 一种权利要求1-6任一项所述的多酶复合抑菌剂的用途,其特征在于:将多酶复合抑菌剂以固态形式加入到含菌物料。
8. 一种权利要求1-6任一项所述的多酶复合抑菌剂的用途,其特征在于:将多酶复合抑菌剂溶解成溶液形式加入到含菌物料。
9. 一种权利要求1-6任一项所述的多酶复合抑菌剂的用途,其特征在于:将多酶复合抑菌剂溶解后喷涂到含菌物表面。

一种多酶复合抑菌剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多酶复合抑菌剂,属于多酶复合物抑制微生物生长领域。

背景技术

[0002] 体外诊断试剂盒中由于存在各种蛋白、营养物质,所以很容易长菌,造成试剂失效,所以各种试剂均添加抑菌剂。

[0003] 目前试剂盒中常用的抑菌剂有以下几类:

[0004] 1) 叠氮钠、MVP、物质,这类物质通常有毒甚至剧毒,抑制的目标主要为细菌、放线菌。对酵母菌、霉菌抑菌作用不明显。

[0005] 2) 柠檬酸钠、山梨酸钾等防腐剂,在酸性条件下可以明显抑制酵母与霉菌的生长,但是在中性或碱性环境中抑制作用较低。

[0006] 3) 各种抗生素,虽然绝大部分微生物都有与之相应的抗生素,但是由于抗生素容易产生耐药菌,因此不建议使用。

[0007] 除以上几类抑菌剂外最近有人有使用溶菌酶作为抑菌剂,这种抑菌剂只对革兰氏阳性菌有较大的抑菌作用,对革兰氏阴性菌抑制效果不佳,对真核微生物没有明显抑菌效果。

[0008] 本发明的复合酶抑菌剂主要能够抑制各种微生物生长。对真核微生物尤其是酵母菌抑制效果更佳。

发明内容

[0009] 本发明要解决的技术问题是克服上述试剂盒中常用抑菌剂的不足,使用不同类型的酶对不同种类微生物对细胞壁进行分解而抑制其生长。

[0010] 本发明所依据的原理:酵母菌的细胞壁主要成分是葡聚糖、甘露聚糖以及少量脂类与蛋白质, β -1,3葡聚糖酶能够分解葡聚糖,磷酸甘露糖酶可以分解其中的甘露聚糖,最终使细胞壁溶解,使细胞容易破裂。霉菌细胞壁的主要成分为几丁质与纤维素,本发明中几丁质内切酶和纤维素酶能够分别分解霉菌(及部分酵母菌)细胞壁中的几丁质和纤维素使细胞容易破裂。 Mg^{2+} , Ca^{2+} 以及其他一些微量元素是微生物部分酶的必要辅基,也是细胞表面的组成部分,螯合剂EDTA或EGTA加入后可以络合这些离子使微生物难以生长并且使细胞壁结构松散更加容易破裂。

[0011] 为实现上述目的,本发明的多酶复合抑菌剂主要成分为:几丁质内切酶; β -1,3葡聚糖酶;纤维素酶;磷酸甘露糖酶。其中,基于抑菌剂总重量,几丁质内切酶0.1%—20%; β -1,3葡聚糖酶0.1%—30%;纤维素酶0.01%—10%;磷酸甘露糖酶0.1%—30%;多酶复合抑菌剂中还添加EDTA、EGTA,10%—90%。

[0012] 其可以为固态组合物加入含菌试剂,固态时加入比例为0.1-5g/L试剂。也可以溶液状态加入含菌试剂。

附图说明

[0013] 图1为本发明不同配方对各种微生物抑制率图

[0014] 图2为本发明不同配方对各种微生物抑制率对数图

具体实施方式

[0015] 实施例1:多酶复合抑菌剂配方1对毕赤酵母GS115、大肠杆菌BL21、金黄色葡萄球菌、马尼菲青霉菌、灰色链霉菌的抑制作用

[0016] 配方1:

[0017] 分别称取几丁质内切酶2mg (3.39%), β -1,3葡聚糖酶3mg (5.08%),纤维素酶1mg (1.69%),磷酸甘露糖酶3mg (5.08%),EDTA50mg (84.75%),总重量59mg。加入100mM pH7.4磷酸钾缓冲液溶解至10ml,终浓度为几丁质内切酶200mg/L, β -1,3葡聚糖酶300mg/L,纤维素酶100mg/L,磷酸甘露糖酶300mg/L,EDTA 5000mg/L。此配方为配方1。

[0018] (1)多酶复合抑菌剂配方1对毕赤酵母GS115的抑制作用

[0019] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 1ml,加入到1ml菌浓度为 10^5 CFU/ml毕赤酵母GS115菌液和8ml YPD培养基中(抑菌剂总量为0.59g/L),30度作用16h,之后在YPD培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为1ml水加入到1ml菌浓度为 10^5 CFU/ml毕赤酵母GS115菌液和8ml YPD培养基中,30度作用16h,之后在YPD培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为303。

[0020] (2)多酶复合抑菌剂配方1对大肠杆菌BL21的抑制作用

[0021] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 1ml,加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml大肠杆菌BL21菌液和8ml LB培养基中,37度作用5h,之后在LB固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为1ml水加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml大肠杆菌BL21菌液和8ml LB培养基中,37度作用5h,之后在LB固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为117。

[0022] (3)多酶复合抑菌剂配方1对金黄色葡萄球菌的抑制作用

[0023] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 1ml,加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml金黄色葡萄球菌菌液和8ml营养肉汤培养基中(牛肉膏3g水1000mL蛋白胨5g PH 7.2~7.4),37度作用5h,之后在营养肉汤固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为1ml水加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml金黄色葡萄球菌菌液和8ml营养肉汤培养基中,37度作用5h,之后在营养肉汤固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为128。

[0024] (4)多酶复合抑菌剂配方1对马尼菲青霉菌的抑制作用

[0025] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 1ml,加入到1ml OD₆₀₀=0.1的马尼菲青霉菌培养液和8ml察氏培养基(硝酸钠3g/L磷酸氢二钾1g/L硫酸镁(MgSO₄·7H₂O) 0.5g/L氯化钾0.5g/L硫酸亚铁0.01g/L蔗糖30g/L),25度震荡48h,之后在测定600nm下吸光度(光径1cm):OD₁。测定方法为发酵液4000rpm离心5min,适用PBS重悬至1ml,测定重悬液600nm下的吸光度,除以10即为发酵液吸光度。对照组为1ml水加入到1ml OD₆₀₀=0.1的马尼菲青霉菌培养液和8ml察氏培养基中,25度震荡48h,之后在测定600nm下吸光度(光径1cm):OD₀。抑菌率=OD₀/OD₁。OD测定方法同上。本实验最终抑菌率为267。

[0026] (5)多酶复合抑菌剂配方1对灰色链霉菌的抑制作用

[0027] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 1ml,加入到1ml OD600=0.1的灰色链霉菌培养液和8ml LA1液体培养基(酵母膏6.0%,葡萄糖4.0%,K₂SO₄1.0%,MgSO₄1.0%,pH7.8,121℃灭菌30min),30震荡培养24h,之后在测定OD600:OD₁。OD测定方法同(4)。对照组为1ml水加入到1ml OD600=0.1的灰色链霉菌培养液和8ml LA1液体培养基中,30度震荡24h,之后在测定OD600:OD₀。抑菌率=OD₀/OD₁。OD测定方法同(4)。本实验最终抑制率为113。实施例2:多酶复合抑菌剂配方2对毕赤酵母GS115、大肠杆菌BL21、金黄色葡萄球菌、马尼菲青霉菌、灰色链霉菌的抑制作用

[0028] 配方2:

[0029] 分别称取几丁质内切酶10mg(17.18%),β-1,3葡聚糖酶8mg(13.74%),纤维素酶0.02mg(0.03%),磷酸甘露糖酶0.2mg(0.34%),EDTA40mg(68.70%),总重量58.22mg。加入100mM pH7.4磷酸钾缓冲液溶解至10ml,终浓度为几丁质内切酶1000mg/L,β-1,3葡聚糖酶800mg/L,纤维素酶2mg/L,磷酸甘露糖酶20mg/L,EDTA 4000mg/L。此配方为配方2。

[0030] (1)多酶复合抑菌剂配方2对毕赤酵母GS115的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为2314。

[0031] (2)多酶复合抑菌剂配方2对大肠杆菌BL21的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为108。

[0032] (3)多酶复合抑菌剂配方2对金黄色葡萄球菌的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为105。

[0033] (4)多酶复合抑菌剂配方2对马尼菲青霉菌的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为89。

[0034] (5)多酶复合抑菌剂配方2对灰色链霉菌的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为76。

[0035] 实施例3:多酶复合抑菌剂配方3对毕赤酵母GS115、大肠杆菌BL21、金黄色葡萄球菌、马尼菲青霉菌、灰色链霉菌的抑制作用

[0036] 配方3:

[0037] 分别称取几丁质内切酶0.1mg(0.17%),β-1,3葡聚糖酶0.5mg(0.83%),纤维素酶5mg(8.25%),磷酸甘露糖酶15mg(24.75%),EDTA40mg(66.01%),总重量60.6mg。加入100mM pH7.4磷酸钾缓冲液溶解至10ml,终浓度为几丁质内切酶10mg/L,β-1,3葡聚糖酶50mg/L,纤维素酶500mg/L,磷酸甘露糖酶1500mg/L,EDTA 4000mg/L。此配方为配方3。

[0038] (1)多酶复合抑菌剂配方3对毕赤酵母GS115的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为116。

[0039] (2)多酶复合抑菌剂配方3对大肠杆菌BL21的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为99。

[0040] (3)多酶复合抑菌剂配方3对金黄色葡萄球菌的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为122。

[0041] (4)多酶复合抑菌剂配方3对马尼菲青霉菌的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为355。

[0042] (5)多酶复合抑菌剂配方3对灰色链霉菌的抑制作用方法同实施例1,本实验最终抑菌率为72。

[0043] 实施例4:降低多酶复合抑菌剂配方1用量对毕赤酵母GS115、大肠杆菌BL21、金黄色葡萄球菌、马尼菲青霉菌、灰色链霉菌的抑制作用

[0044] 配方1:同实施例1

[0045] (1)降低多酶复合抑菌剂配方1用量对毕赤酵母GS115的抑制作用

[0046] 将多酶复合抑菌剂(配方1)0.2ml,加入到1ml菌浓度为 10^5 CFU/ml毕赤酵母GS115菌液和8.8mlYPD培养基中(抑菌剂总量为0.118g/L),30度作用16h,之后在YPD培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为0.2ml水加入到1ml菌浓度为 10^5 CFU/ml毕赤酵母GS115菌液和8.8mlYPD培养基中,30度作用16h,之后在YPD培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为260。

[0047] (2)降低多酶复合抑菌剂配方1用量对大肠杆菌BL21的抑制作用

[0048] 将多酶复合抑菌剂(配方1)0.2ml,加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml大肠杆菌BL21菌液和8.8ml LB培养基中,37度作用5h,之后在LB固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为0.2ml水加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml大肠杆菌BL21菌液和8.8ml LB培养基中,37度作用5h,之后在LB固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为60。

[0049] (3)降低多酶复合抑菌剂配方1用量对金黄色葡萄球菌的抑制作用

[0050] 将多酶复合抑菌剂(配方1)0.2ml,加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml金黄色葡萄球菌菌液和8.8ml营养肉汤培养基中,37度作用5h,之后在营养肉汤固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为0.2ml水加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml金黄色葡萄球菌菌液和8.8ml营养肉汤培养基中,37度作用5h,之后在营养肉汤固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为42。

[0051] (4)降低多酶复合抑菌剂配方1用量对马尼菲青霉菌的抑制作用

[0052] 将多酶复合抑菌剂(配方1)0.2ml,加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的马尼菲青霉菌培养液和8.8ml察氏培养基,25度震荡48h,之后在测定600nm下吸光度(光径1cm): OD_1 。测定方法为同实施例1。对照组为0.2ml水加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的马尼菲青霉菌培养液和8.8ml察氏培养基中,25度震荡48h,之后在测定600nm下吸光度(光径1cm): OD_0 。抑菌率= OD_0/OD_1 。实验最终抑菌率为138。

[0053] (5)降低多酶复合抑菌剂配方1用量对灰色链霉菌的抑制作用

[0054] 将多酶复合抑菌剂(配方1)0.2ml,加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的灰色链霉菌培养液和8.8ml LA1液体培养基(酵母膏6.0%,葡萄糖4.0%, K_2SO_4 1.0%, $MgSO_4$ 1.0%,pH7.8,121℃灭菌30min),30震荡培养24h,之后在测定 $OD_{600}:OD_1$ 。OD测定方法同实施例1。对照组为0.2ml水加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的灰色链霉菌培养液和8.8ml LA1液体培养基中,30度震荡24h,之后在测定 $OD_{600}:OD_0$ 。抑菌率= OD_0/OD_1 。本实验最终抑制率为68。

[0055] 实施例5:增加多酶复合抑菌剂配方1用量对毕赤酵母GS115、大肠杆菌BL21、金黄色葡萄球菌、马尼菲青霉菌、灰色链霉菌的抑制作用

[0056] 配方1:同实施例1

[0057] (1)增加多酶复合抑菌剂配方1用量对毕赤酵母GS115的抑制作用

[0058] 将多酶复合抑菌剂(配方1)5ml,加入到1ml菌浓度为 10^5 CFU/ml毕赤酵母GS115菌液和4ml $2\times$ YPD培养基中(抑菌剂总量为2.95g/L),30度作用16h,之后在YPD培养基平板上

涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为5ml水加入到1ml菌浓度为 10^5 CFU/ml毕赤酵母GS115菌液和4ml 2×YPD培养基中,30度作用16h,之后在YPD培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为4538。

[0059] (2) 增加多酶复合抑菌剂配方1用量对大肠杆菌BL21的抑制作用

[0060] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 5ml,加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml大肠杆菌BL21菌液和4ml 2×LB培养基中,37度作用5h,之后在LB固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为5ml水加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml大肠杆菌BL21菌液和4ml 2×LB培养基中,37度作用5h,之后在LB固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为266。

[0061] (3) 增加多酶复合抑菌剂配方1用量对金黄色葡萄球菌的抑制作用

[0062] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 5ml,加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml金黄色葡萄球菌菌液和4ml 2倍浓度营养肉汤培养基中,37度作用5h,之后在营养肉汤固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_1 。对照组为5ml水加入到1ml菌浓度为 10^6 CFU/ml金黄色葡萄球菌菌液和4ml 2倍浓度营养肉汤培养基中,37度作用5h,之后在营养肉汤固体培养基平板上涂布,计算菌浓度 C_0 。抑菌率= C_0/C_1 。本实验最终抑菌率为142。

[0063] (4) 增加多酶复合抑菌剂配方1用量对马尼菲青霉菌的抑制作用

[0064] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 5ml,加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的马尼菲青霉菌培养液和4ml 2倍浓度察氏培养基,25度震荡48h,之后在测定600nm下吸光度(光径1cm): OD_1 。测定方法为同实施例1。对照组为5ml水加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的马尼菲青霉菌培养液和4ml 2倍浓度察氏培养基中,25度震荡48h,之后在测定600nm下吸光度(光径1cm): OD_0 。抑菌率= OD_0/OD_1 。实验最终抑菌率为592。

[0065] (5) 增加多酶复合抑菌剂配方1用量对灰色链霉菌的抑制作用

[0066] 将多酶复合抑菌剂(配方1) 5ml,加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的灰色链霉菌培养液和4ml 2倍浓度LA1液体培养基(酵母膏6.0%,葡萄糖4.0%, K_2SO_4 1.0%, $MgSO_4$ 1.0%,pH7.8,121℃灭菌30min),30震荡培养24h,之后在测定 $OD_{600}:OD_1$ 。 OD 测定方法同实施例1。对照组为5ml水加入到1ml $OD_{600}=0.1$ 的灰色链霉菌培养液和4ml 2倍浓度LA1液体培养基中,30度震荡24h,之后在测定 $OD_{600}:OD_0$ 。抑菌率= OD_0/OD_1 。本实验最终抑制率为378。

[0067] 本发明所描述的具体实施例仅是对本发明精神作举例说明。本发明所属技术领域对技术人员可以对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代,但并不会偏离本发明的精神或者超越所附权利要求书所定义的范围。

[0068] 表:不同配方对不同微生物抑菌效果表

[0069]

	配方 1	配方 2	配方 3	配方 1 用量 0.1g/L	配方 1 用量 2.95g/L
菌种	抑菌率	抑菌率	抑菌率	抑菌率	抑菌率
毕赤酵母 GS115	303	2314	116	260	4538
大肠杆菌 BL21	117	108	99	60	266
金黄色葡萄 球菌	128	105	122	42	142
马尼菲青霉 菌	267	89	355	138	592
灰色链霉菌	113	76	72	68	378

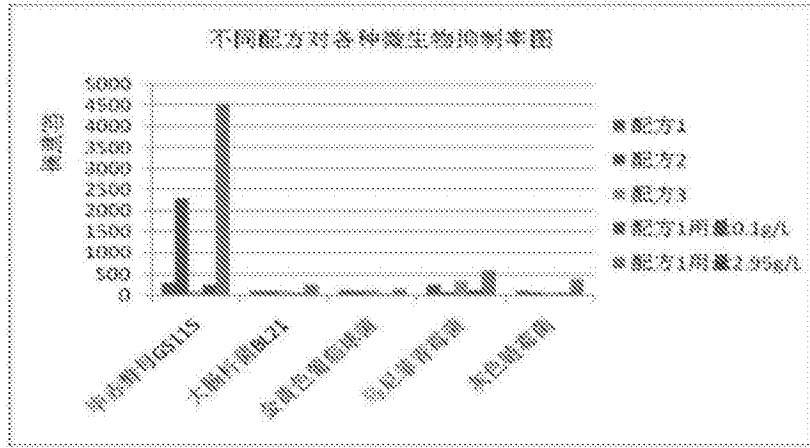


图1

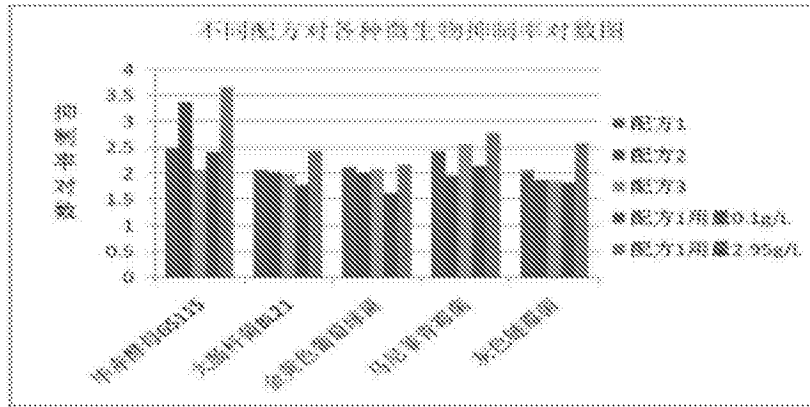


图2