

水禽雷氏桿菌發酵培養最適條件之研究

喻昭芳*、陳瑞祥

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要 為提升水禽雷氏桿菌症(*Riemerella anatipestifer*, RA)不活化菌苗之量產，本研究利用液體發酵槽透過不同參數控制與營養物添加等條件進行培養測試，找出高收穫菌量，且免疫原性不改變之最佳發酵培養條件，以符合大規模量產需求。試驗結果顯示，發酵槽培養所獲得之活菌數最高可達 10.74 log CUF/mL (5.5×10^{10})，3 種血清型菌株較搖瓶震盪培養平均可增加 97.3~275%活菌量，添加營養物培養又可增加 43.3~70.3%菌數。以 104 年生產 10 萬劑計算分析，提高菌量後可減少 54.5%培養基使用量，加上離心方式之改良，共可節省 50%器械準備與後續之洗滌以及 67.6%濃縮處理之時間和人力消耗。此外，發酵槽試製菌苗保存 27 個月後於鴨隻免疫效力測試結果發現，對第 1 和 2 型 RA 感染仍具良好保護效果，唯免疫第 6 型菌者於攻毒後無法引起鴨隻過半數死亡，致該型本次難以評估。本研究結果將應用於本所日後商品化 RA 菌苗之製程改良，可有效降低菌苗生產成本及提升市場之競爭力。

關鍵字：水禽雷氏桿菌、發酵槽培養、安定性試驗

緒言

由水禽雷氏桿菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)引起的水禽雷氏桿菌症(鴨傳染性漿膜炎、鴨疫黎氏桿菌、鴨疫里默氏菌感染)為國內重要的水禽傳染性疾病，鴨(鵝)在 1~8 週齡對本病最具感受性，主要引發家禽敗血症、全身性漿膜炎、禽隻生長遲緩及不合格屠體增加。不良的飼養環境及其他疾病併發皆會造成本病的爆發，發病率可由 5% 至 75%，發病場常一再重複發生本病，且不易清除，造成養禽業者不少經濟損失 [3,7]。

本病的主動免疫方面，在世界各地的學者已研製和開發各種菌苗，並可獲取一定的免疫效果 [5,9,10]，本所自行研發完成後亦於 102 年取得第 1、2 和 6 血清型 3 價不活化菌苗之製造許可證，隨即每年量產供應田間水禽場之使用，減少水禽業者因本病造成之損失。該菌苗雖對同血清型感染的免疫保護力良好，但現今仍以傳統震盪培養方式製造生產，而因所能獲得

之活菌數不夠理想，造成原料成本開銷過大與人力成本等過高問題。為克服此項缺點，本研究使用液體發酵槽以取代搖瓶方式培養 RA 菌，加上離心方式之改良，期能有效克服產量受限難題，以迎合現階段本所量產與未來技轉民營藥廠之大規模生產需求。

材料與方法

第 2 血清型 RA 菌苗株於 10 L 發酵槽之不同參數控制培養測試

種菌培養

本病第 2 血清型菌苗株冷凍菌液先培養於血液培養基(blood agar plate, BAP, 啟新)，刮取菌落接種於 350 mL 胰蛋白大豆液體培養基(tryptic soy broth, TSB, BD)之搖瓶，於 37°C 下震盪(210 rpm/min)培養箱中培養(S300R, Firstek)。

發酵培養

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

搖瓶種子菌液接入盛裝7 L TSB之10 L槽中培養(FB-10S, Firstek)，並依下述設定之不同培養控制條件分別測試，同時開啟酸鹼、溶氧(dissolved oxygen)與泡沫(foam)電極全程監控，酸鹼值設定於pH6.8~7.2間，培養液產泡時則加入消泡劑(Dow Corning)消除液面之泡沫。

發酵槽主機不同參數控制條件

包括培養溫度(35、37、39°C)、攪拌轉速(0、100、200、300、400 rpm/min)、空氣通氣量(1、3、6、8、10 L/min)、二氧化碳通氣量(400、800 mL/min)。

其他培養條件

種子菌液接種量(3、5、10%)、以及批次(batch culture)或饋料(fed-batch culture)培養方式分別進行培養測試。批次培養是指發酵槽中內裝7 L培養基直接培養，饋料則指發酵槽先裝3.5 L培養基開始培養，培養至溶氧值(DO;%表示)降至個位數值時(0~9%)，即饋入另外3.5 L培養基繼續培養。

採樣與收穫菌液測定

發酵培養完成時採樣與收穫菌液進行下列培養與檢測，以5或10倍稀釋菌液進行OD600吸光值測量(CE 2501, Cecil)，再乘回稀釋倍數後即得到菌液吸光值，可初步得知採樣菌液總菌量範圍；以10倍連續稀釋法稀釋待測菌液後，取3階稀釋液塗抹培養於胰蛋白大豆固體培養基(tryptic soy agar, TSA, BD)，進行CFU活菌數計算(colony forming unit)，並以對數值表示(log CFU/mL)；待測菌液畫線培養於TSA進行純化檢查。

第2血清型RA菌苗株於10 L發酵槽之各式營養物添加培養測試

不同培養基測試

種菌培養、發酵培養與採樣菌液等培養與測定步驟同上，但是將7 L TSB更換為腦心浸液液體培養基(brain heart infusion broth, BHIB, BD)、蛋白胨液體培養基(tryptone broth, TB, BD)或LB培養基(Luria-Bertani broth, BD)分別進行測試。

營養物添加測試

種菌培養、發酵培養與採樣菌液測定等步驟同上，並於7 L胰蛋白大豆液體培養基中額外添加綜合營養素(iso-vitaleX enrichment, BD)、牛肉萃取(beef extract, BD)、水解乳清蛋白(lactoalbumin hydrolysate, Oxoid)、明膠蛋白胨(gelysate peptone, BD)、蛋白胨(peptone, Oxoid)、新鮮酵母浸液(自行配製)、酵母萃取(yeast extract, BD)或NAD(nicotinamide adenine dinucleotide, Sigma)，所需比例則依該營養物製造廠建議約0.3~6%不等比例添加培養測試，NAD則分別添加175~1,400 mg培養測試。

血清添加測試

種菌培養、發酵培養與採樣菌液測定等步驟同上，另外於7 L TSB中添加3%雞、牛或馬血清分別培養測試。

第1和6血清型RA菌苗株於10 L發酵槽培養測試

第2型RA菌完成10 L槽各式培養測試後，將上述所得最適條件套入第1和第6型RA菌進行發酵測試培養。

第1、2和6血清型RA菌苗株於50 L發酵槽放大培養測試與製程改良

種菌培養

第2型RA菌苗株冷凍菌液先培養於BAP，刮取菌落接種於內裝3.5 L TSB之10 L槽培養，於37°C攪拌(300 rpm/min)與通氣(8 L/min)等控制條件下進行培養。

發酵培養

3.5 L種子菌液接入盛裝31.5 L TSB之50 L槽中培養(FB-50, Firstek)，於37°C、180 rpm/min攪拌與30 L/min通氣等控制條件下進行培養，採樣與收穫菌液之吸光值、活菌數與純化檢查等測定步驟同上。第2型RA菌完成發酵培養測試後再進行第1和第6型RA菌大槽測試培養。

製程改良測試

除上述以搖瓶震盪培養改進為發酵槽培養菌苗外，所得不活化菌液由單瓶離心瓶盛裝離心方式更改為蠕動幫浦連續進料離心方式進行濃縮菌液。

發酵槽培養第 1、2 和 6 血清型 3 價不活化菌苗於貯存 27 個月後對北京鴨免疫效力之安定性測試

自畜產試驗所宜蘭分所購入外觀健康 1 日齡北京雛鴨，並飼養於本所動物舍，於 1 週齡時肌肉注射 39 隻 1 劑量 (0.3 mL) 4~8°C 冰箱保存 27 個月發酵槽培養產製之 3 價 RA 菌苗，並於 2 週齡時補強免疫 1 次，另 39 隻為未注射對照組。屆 4 週齡時免疫與對照組鴨隻以第 1、2 與 6 血清型 3 種同型 (homologous) 攻毒菌株，分別各以 2~3 階段稀釋菌液肌肉注射攻毒 1 mL (第 1 型 3 階菌液 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} ；第 2 型 3 階菌液 10^8 、 10^9 、 10^{10} ；第 6 型 2 階菌液 10^{11} 、 10^{12})，每階濃度免疫與對照組各 5 隻試驗鴨隻，並於攻毒後連續觀察 14 天並計算死亡隻數，最後計算出 3 種血清型免疫組存活率以及對照組死亡率，免疫組存活率須達 80% (含) 以上且對照組死亡率須達 80% (含) 以上 (RA 菌苗效力試驗國家檢驗標準) [1]。

最適條件發酵培養第 1、2 和 6 血清型 RA 菌生物學特性測試

細菌型態與生化性狀檢驗

發酵槽培養採樣之 RA 菌液先培養於 TSA，隔日挑取菌落塗抹玻片後染色，並於顯微鏡下觀察細菌型態；之後挑取菌落以市售 API 20E 細菌生化鑑定套組 (Biomérieux) 進行 RA 菌生化特性鑑定 [4]；菌落另外接種培養於固形 MacConkey agar (MA, BD) 與一種測試運動性培養基 (motility test medium, 啟新)。

血清型鑑定

將上述培養於 TSA 之 RA 菌落，分別與 20 種 RA 血清型免源高度免疫血清進行平板凝集試驗，並觀察與記錄其凝集反應 [4]。

結果

第 2 血清型 RA 菌苗株於 10 L 發酵槽之不同參數控制培養測試

發酵槽主機設定在不同溫度、轉速、空氣通氣量與二氧化碳通氣量之培養測試，結果 (詳如圖 1~4) 顯示 37°C 培養溫度、200~300 rpm/min 攪拌轉速、

8~10 L/min 空氣通氣以及不給予二氧化碳通氣等狀況，可獲得較高量之活菌數。

此外，5~10% 種子培養接菌量可得到較佳活菌數結果 (詳如圖 5)。而由 5% 或 10% 種子菌液之批次和饋料培養測試方面，發現半饋料方式可較單槽獲得更佳活菌數，可達 $10.42 \log \text{CFU/mL}$ ($2.67 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$)，詳見圖 6。

第 2 血清型 RA 菌苗株於 10 L 發酵槽之各式營養物添加培養測試

10 L 槽中 TSB、BHIB、TB 與 LB 不同培養基培養測試結果 (詳見圖 7) 顯示，TSB 可得較佳活菌數。

10 L 槽 TSB 培養基中添加各式營養物培養測試方面，結果顯示加入綜合營養素、牛肉萃取、酵母萃取、明膠蛋白胨、蛋白胨與水解乳清蛋白後，所得活菌數並未提高，而添加新鮮酵母浸液和 NAD 可得較為理想活菌數，可達 $10.53 \log \text{CFU/mL}$ ($3.4 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$)，詳見圖 8~10。

在 10 L 槽 TSB 添加不同動物血清培養測試，結果 (詳見圖 11) 發現加入雞、牛或馬血清培養後所得活菌數並未比空白無添加組多。

第 1 和 6 血清型 RA 菌苗株於 10 L 發酵槽培養測試

第 1 和第 6 型 RA 菌於 10 L 槽培養可達 $10.48 \sim 10.63 \log \text{CFU/mL}$ ($3.0 \sim 4.3 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$) 活菌數。

第 1、2 和 6 血清型 RA 菌苗株於 50 L 發酵槽放大培養測試與製程改良

由 10 L 槽測試條件放大至 50 L 槽培養測試第 1、2 和 6 血清型 RA 菌，分別可獲得 10.47、10.51 和 $10.48 \log \text{CFU/mL}$ (2.96、3.23 和 $3.0 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$) 活菌數，較搖瓶培養 10.18、10.0、9.90 $\log \text{CFU/mL}$ (1.5 、 1.0 、 $0.8 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$) 分別可增加 97.3、223 和 275% 之菌量。之後於大槽中加入新鮮酵母浸液培養 3 種血清型 RA 菌，活菌數可達 10.65、10.74 和 $10.63 \log \text{CFU/mL}$ (4.5、5.5 和 $4.3 \times 10^{10} \text{CFU/mL}$)，因此添加上述酵母浸液營養物組較未添加組增加 52.0、70.3 和 43.3% 活菌數。

綜合 3 種血清型不活化菌苗製程改良測試結果，

以104年生產10萬劑3價菌苗之結果作統計分析與比較，發現使用50 L槽取代搖瓶培養RA菌後可提高97.3~275%菌量，從而減少54.5%培養基使用量(231升 → 105升)以及省下50%器械準備前置作業和後續洗滌之時間與人力(96 → 48小時)。此外，加上以連續式離心取代單瓶離心方式濃縮調製菌液，又可節省67.6%濃縮處理時間與人力耗費(37 → 12小時)。

發酵槽培養第 1、2 和 6 血清型 3 價不活化菌苗於貯存 27 個月後對北京鴨免疫效力之安定性測試

發酵槽培養之3價菌苗貯存於4°C冰箱27個月後免疫北京鴨之效力安定性試驗結果顯示，鴨隻以第1和第2型RA菌攻毒後，免疫組與對照組鴨隻之存活率出現明顯差異，3價菌苗對北京鴨具良好保護效果(攻毒第1型:免疫組存活率100%、對照組死亡率100%;攻毒第2型:免疫組存活率100%、對照組死亡率80%);但攻毒第6型時，出現無法引起過半數鴨隻死亡情形(免疫組存活率80%、對照組死亡率僅40%)，因此本次之第6型測試結果尚無法評估其免疫效力，詳見表1。

最適條件發酵培養第 1、2 和 6 血清型 RA 菌生物學特性測試

發酵槽培養採樣之RA菌抹片於顯微鏡下觀察，可見單一或成對革蘭氏陰性短桿菌，不具運動性且不產芽孢。由API 20NE生化鑑定套組檢驗後，3種血清型RA菌可得生物碼0010004，其氧化酶測試均為陽性，均可液化明膠，且不會在MA培養基與運動性培養基上生長，此與搖瓶培養之測試RA菌特性一致。

血清型鑑定

發酵槽培養3種血清型RA菌可與同型高免兔血清產生++~++++凝集反應，且與其他19種血清型無凝集反應，此與搖瓶培養所得RA菌之血清型結果相同。

討論

本研究先以10 L發酵槽透過參數控制與營養物

添加等多項測試培養進行比較與探討，獲得初步最適發酵培養RA菌條件，之後再進一步放大至50 L發酵槽進行測試，第1、2和6型之3種血清型RA菌苗株均測試完成，且應用於一批商品化3價不活化菌苗之生產。

不同於搖瓶震盪培養，發酵槽的優勢為可調控培養過程中液體培養基之酸鹼值與溶氧度，即時偵測其pH值後加入酸或鹼性之液體，以維持培養基之pH值落在特別設定數值之範圍內。RA菌培養後培養基因細菌代謝產生銨離子(NH₄⁺)致pH值逐漸偏高不適合其生長，若可將其pH值維持在設定範圍內，則有利於後續之生長，搖瓶培養培養基之pH值常會較偏鹼性，因此所能獲得第2型RA菌在上述兩種培養環境中之生長菌數，呈現提高平均約80%活菌數(搖瓶約10.0 log CFU/mL; 1×10¹⁰ CFU/L → 小槽10.20~10.30 log CFU/mL; 1.6~2.0×10¹⁰ CFU/mL)。另外，藉著通氣與攪拌系統共同運作下，進而增加KLa氧氣傳送係數(volumetric oxygen transfer coefficient)數值，以有效提供培養基中細菌所需氧氣，由小槽攪拌轉速與通氣量測試結果分析，轉速與通氣量於最適合條件下(300 rpm、8 L/min)與無轉速或無通氣培養比較，所得第2型RA菌分別可增加171.2%和952.6%活菌數(轉速:約9.77 log CFU/mL; 5.9×10⁹ CFU/mL → 約10.20 log CFU/mL; 1.6×10¹⁰ CFU/mL; 圖2。通氣:約9.28 log CFU/mL; 1.9×10⁹ CFU/mL → 約10.30 log CFU/mL; 2.0×10¹⁰ CFU/mL; 圖3)，但是更高轉速或更高通氣量測試時，RA菌活菌數卻未呈相對應之增加，此應是高轉速在槽內形成剪切力反而對RA菌造成傷害，而高通氣量亦會造成攪拌葉片在氣泡中旋轉，降低攪拌葉片對液體之攪拌動力，因此，維持培養基pH與增加氧氣溶解速度此兩點對提高培養RA菌活菌數關係十分密切[2,6]。此外，比較與分析3種血清型RA菌於搖瓶和發酵槽培養所得活菌數，搖瓶培養時第6型活菌數明顯較第1和2型為低(RA6:9.48~9.90 log CFU/mL; 3~8×10⁹ CFU/mL);(RA1:約10.18 log CFU/mL; 1.5×10¹⁰ CFU/mL);(RA2:約10.0 log CFU/mL; 1.0×10¹⁰ CFU/mL)，但於發酵槽培養3株RA菌時所得活菌數卻

相似(皆可達約 $10.48 \log \text{ CFU/mL}$; $3.0 \times 10^{10} \text{ CFU/mL}$)，此結果可能與上述槽內培養基之pH值變化和溶氧率兩項因素頗有關係，因此造成這株第6型RA菌生長具相當程度之影響。

由於絕大多數RA菌不發酵任何醣類[7]，細菌應是利用氮源中之碳作為能量供應源，於小槽測試時培養基中加入各式蛋白胍營養物，但卻未能提高RA菌活菌數；此外，添加營養物質豐富之各類動物血清測試時，亦無法提高菌數。最終於培養基添加新鮮酵母浸液或NAD時，可獲得較高活菌數；酵母浸液含有豐富胺基酸氮源與維生素B群，而NAD則為V因子、輔酶(coenzyme 1)，為輔酶形式的維生素B3(菸鹼酸)，這些物質應為RA菌大量生產時之有利因子。市售NAD價格昂貴，各批次之品質差異又大，培養RA菌後所獲得收穫量不穩，因此剔除不考慮繼續再使用之，而僅添加營養成分更多元之自製新鮮酵母浸液作為量產RA菌之使用。

為了維持發酵槽中營養源濃度，使細菌有足夠營養生長到空間限制或代謝物累積為止，本次研究對液體培養基營養源兩種給予方式即批次和饋料培養兩方式亦進行比較。結果顯示使用半饋料培養所得第2型RA菌活菌數稍優於批次方式，但操作程序增加相對提高培養污染風險，而批次培養具有控制單純、批次間產量相近與穩定性高之優點，因此之後仍以單槽批次培養方式進行量產培養。

小槽測試完成後套入50 L槽測試，3種血清型RA菌可得 $10.47 \sim 10.51 \log \text{ CFU/mL}$ ($2.96 \sim 3.23 \times 10^{10} \text{ CFU/mL}$)活菌數，較搖瓶培養可增加97.3~275%菌量，添加新鮮酵母液培養亦可得 $10.63 \sim 10.74 \log \text{ CFU/mL}$ ($4.3 \sim 5.5 \times 10^{10} \text{ CFU/mL}$)活菌數，又可增加43.3~70.3%活菌量，小槽放大至大槽後培養結果似乎更加理想。另外，以104年生產10萬劑3價菌苗計算與分析，使用發酵槽取代搖瓶培養後除可提高其活菌量外，同時還可減少54.5%培養基使用量以及省下50%前置作業準備工作與後續洗滌之時間和勞力，再加上離心方式之改良，又可節省67.6%濃縮處理時間與人力消耗。

本研究以各式發酵培養取樣菌液之評估採用CFU

活菌數計算方法，在固體培養基上肉眼觀察與計算RA菌落再推算出每mL活菌數，此為最直接且較精確評估菌量之方法；而測定吸光值方法亦即混濁度檢測，是利用可見光測定菌液在特定波長內光之吸收度進行定量定性分析，再計算轉成菌液濃度，吸光值與樣品濃度成正比，但此法只是估計值，且無法區別活菌與死菌數，因此在本研究僅將之作為測定之參考應用，實際上仍以CFU活菌數作為主要評估依據。

綜合上述發酵槽測試結果，50 L槽TSB添加6%新鮮酵母浸液，接種10%種菌液，於37°C溫度、30 L/min通空氣量、180 rpm/min轉速，同時開啟酸鹼、溶氧與泡沫電極即時控制，培養液酸鹼值控制在pH 6.8~7.2之間進行培養，於培養8~16小時間可獲得最高活菌數。

以最適條件發酵培養RA菌後評估該菌生物學特性之各項檢測結果，第1、2和6型RA菌之菌體型態、生化性狀以及血清型均未發現改變，與搖瓶震盪培養RA菌結果一致。

搖瓶培養3價菌苗保存27個月後由動物測試具有足夠保護效力，於前幾年本所研發本病3價菌苗申請新藥許可證時多次測試後已獲證實，但改為發酵槽培養RA菌後，是否仍具同樣效力與保存期限則需進一步動物試驗測試。而由本次研究保存27個月發酵槽產製3價菌苗對北京鴨之測試，結果顯示鴨隻可耐過第1和2型RA菌攻毒，仍具足夠免疫保護效果，但第6型攻毒後未引起對照組鴨隻足夠死亡數，致本次試驗無法將之拿來作為判斷。使用發酵槽量產RA菌苗方式，應該對RA菌之免疫原性不會造成影響，因此仍保有足夠免疫效力，之後將繼續對另一批次發酵槽3價菌苗重複上述保存27月進行其安定性之測試，以證實其確實不會造成免疫保護力之影響。

由本研究以發酵槽取代搖瓶培養產製3價菌苗之製程改良測試結果，雖無法明顯降低生產材料成本，但可大幅節省製造時間與人力消耗，亦即減少勞動成本開銷與縮短生產週期，以此應用於未來商品化量產製造供應水禽養殖戶，以期有效防疫水禽產業因感染本病造成之損失。

誌謝

本研究承蒙本所公務預算計畫(計畫編號：104農科-10.3.1-衛-H7)支應相關經費，謹此致謝。

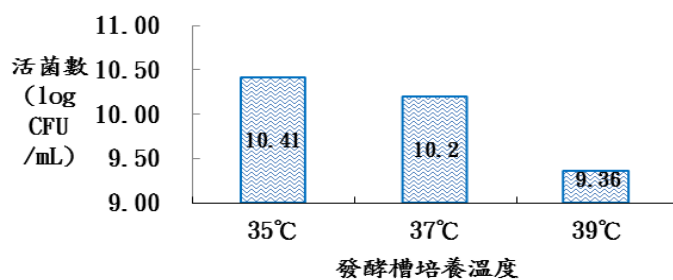


圖 1、不同溫度對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

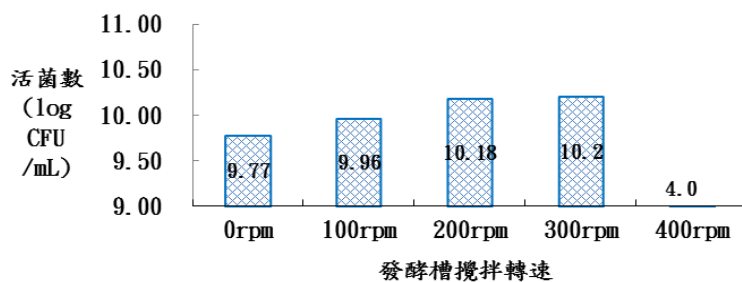


圖 2、不同攪拌轉速對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

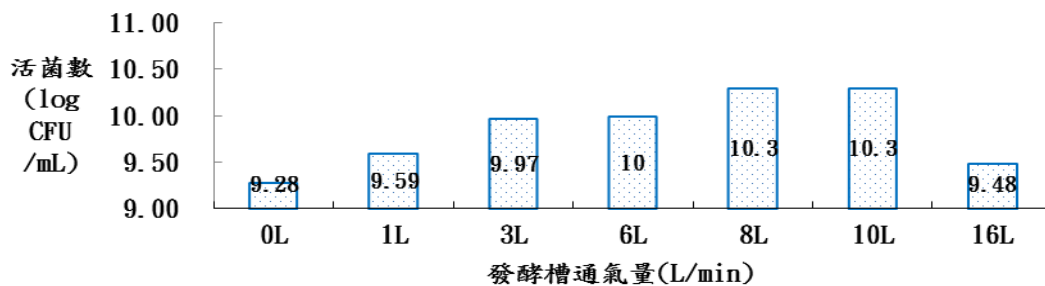


圖 3、不同空氣通氣量對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

水禽雷氏桿菌發酵培養最適條件之研究

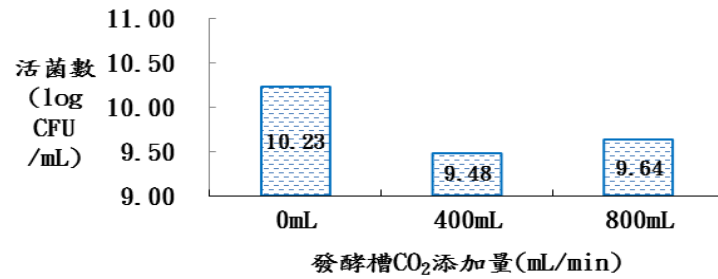


圖 4、二氧化碳之添加對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

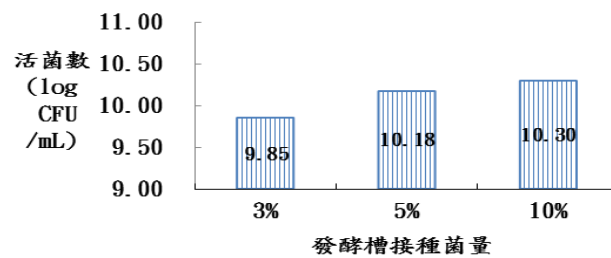


圖 5、接種不同種子菌液對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

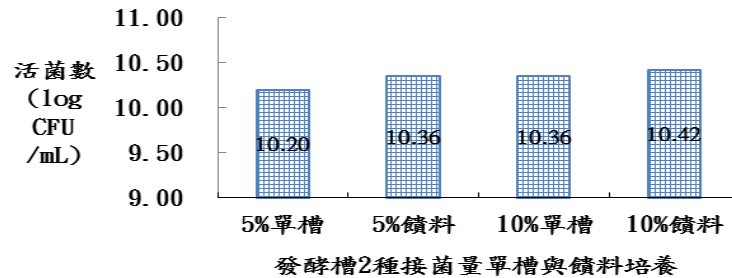


圖 6、10 L 發酵槽批次與饋料培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

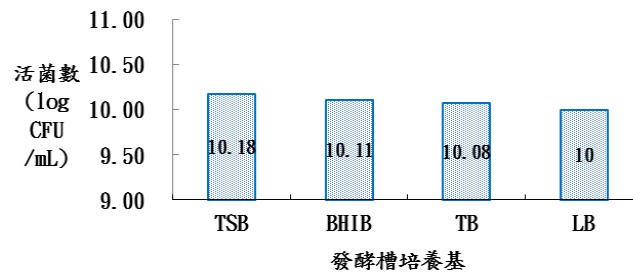


圖 7、不同培養基對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

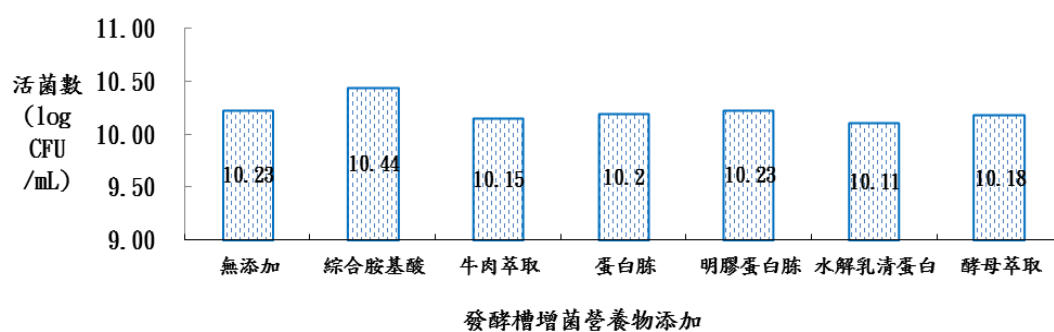


圖 8、各式營養物添加對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

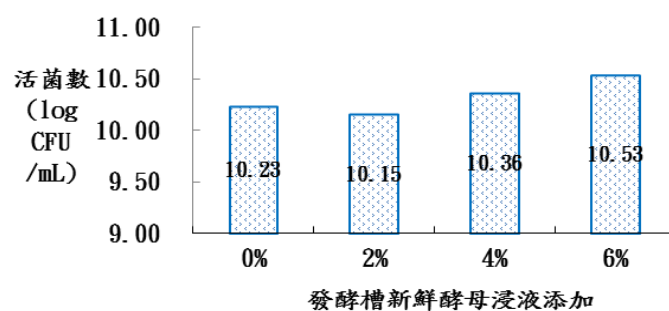


圖 9、新鮮酵母浸液添加對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

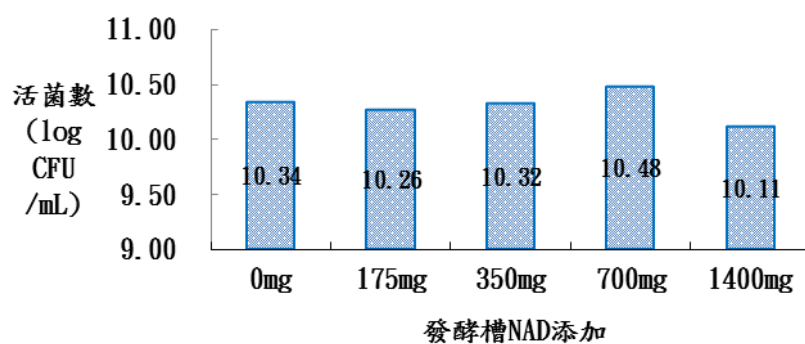


圖 10、NAD 添加對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

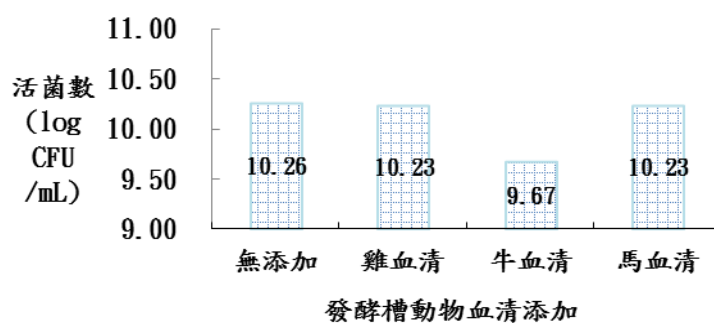


圖 11、動物血清添加對 10 L 發酵槽培養第 2 血清型水禽雷氏桿菌生長之影響。

表 1、發酵槽培養第 1、2 和 6 血清型水禽雷氏桿菌 3 價不活化菌苗於貯存 27 個月後對北京鴨免疫效力之安定性測試結果。

攻毒 血清型	菌液 濃度	免疫組存活率 (%) (存活數/攻毒數) ^a	對照組死亡率 (%) (死亡數/攻毒數) ^a
第 1 型	10 ^{11b}	80(4/5)	80(4/5)
	10 ^{10b}	100(5/5)	100(5/5)
	10 ⁹	80(4/5)	60(3/5)
第 2 型	10 ^{10b}	100(5/5)	80(4/5)
	10 ⁹	100(5/5)	20(1/5)
	10 ⁸	100(5/5)	20(1/5)
第 6 型	10 ¹²	80(4/5)	40(2/5)
	10 ¹¹	100(4/4)	0(0/4)

^a 我國 RA 菌苗效力試驗國家檢驗標準:免疫組存活率 ≥ 80%且對照組死亡率 ≥ 80%。

^b 表效力檢定合格菌階。

參考文獻

1. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。動物用藥品檢驗標準。2015。
2. 吳俊儒。利用發酵策略提升納豆菌之產量。南台科技大學生物科技系學生專題。2010。
3. 黃國安。鴨疫黎氏桿菌(*Riemerella anatipestifer*)毒力相關蛋白基因vapD1之次單位疫苗及DNA疫苗建構及對鴨隻免疫保護效果。碩士論文，國立臺灣大學獸醫學研究所。2002。
4. 喻昭芳、黃金城、趙磐華。水禽雷氏桿菌不活化多價菌苗之研發與應用。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告43：43-51，2008。
5. 喻昭芳、黃金城。水禽雷氏桿菌3價不活化菌苗之效力試驗。行政院農業委員會家畜衛生試驗所研究報告44：63-71，2009。
6. 劉吉山。鴨疫里默氏菌2型製苗菌株的篩選及其高密度發酵條件優化的研究。碩士論文，中國農業大學預防獸醫研究所。2006。
7. 劉育宗。鴨*Riemerella anatipestifer*感染症之研究：保菌及排菌研究、聚合酶連鎖反應診斷技術之建立及外膜蛋白A基因序列分析。碩士論文，國立臺灣大學獸醫學研究所。2002。
8. 劉杰。產毒素多殺巴氏桿菌的發酵培養及其生物學特性的研究。碩士論文，東北農業大學預防獸醫學研究所。2001。
9. Layton HW and Sandhu TS. Protection of ducklings with a broth-grown *Pasteurella anatipestifer* bacterin. Avian Dis 28:718-726, 1984.
10. Sandhu TS. Immunogenicity and safety of a live *Pasteurella anatipestifer* vaccine in white Pekin ducklings: laboratory and field trials. Avian Pathol 20:423-432, 1991.

Study on the Most Suitable Culture Conditions in a Fermenter for Producing *Riemerella anatipestifer* Bacterin

CF Yu*, RS Chen

Animal Health Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Abstract The study aimed to improve production process for large scale production of *Riemerella anatipestifer* bacterin. Various control parameters and nutrients addition were tested in a fermenter. The results showed that the optimized fermentation process has enhanced 97.3-275% productivity in contrast to incubator shaker, and additional nutrients supplemented in a fermenter has increased 43.3-70.3% more the number of bacteria. From manufacturing 100,000 doses of trivalent RA bacterin, production by fermentation has decreased 54.5% culture medium uses and speeded up 50% preparation time as well as greatly cut down manpower consumption. With improvement in centrifugation, it has also saved 67.6% purification time. In addition, the bacterin manufactured in a fermenter stored in a refrigerator for 27 months could still provide enough protection against serotype 1 and 2 challenges in ducks. The study finding would apply to commercial bacterin production to lower production cost and promote market competition of vaccine in waterfowl industry.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, fermenter, stability test