

## 研究报告

# 基于响应面分析的高抗原活性鸭疫里默氏杆菌疫苗培养基的研制及其效果评价

牛得权<sup>#1,2</sup>, 万强<sup>#3</sup>, 苗森<sup>1,2</sup>, 刘翔<sup>1,2</sup>, 张阳阳<sup>2</sup>, 蒋富凤<sup>3</sup>, 曲晓莹<sup>3</sup>, 张菊梅<sup>2</sup>, 蔡芷荷<sup>3</sup>, 陈博<sup>3</sup>, 吴清平<sup>\*1,2</sup>

1 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601

2 广东省科学院微生物研究所 华南应用微生物国家重点实验室 广东省微生物安全与健康重点实验室 农业农村部农业微生物组学与精准应用重点实验室, 广东 广州 510070

3 广东环凯生物科技有限公司, 广东 肇庆 526238

牛得权, 万强, 苗森, 刘翔, 张阳阳, 蒋富凤, 曲晓莹, 张菊梅, 蔡芷荷, 陈博, 吴清平. 基于响应面分析的高抗原活性鸭疫里默氏杆菌疫苗培养基的研制及其效果评价[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3526-3537.

NIU Dequan, WAN Qiang, MIAO Sen, LIU Xiang, ZHANG Yangyang, JIANG Fufeng, QU Xiaoying, ZHANG Jumei, CAI Zhihe, CHEN Bo, WU Qingping. Development and effect evaluation of *Riemerella anatipestifer* vaccine medium with high antigenic activity based on response surface analysis[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3526-3537.

**摘要:**【背景】鸭疫里默氏杆菌广泛存在于养殖场, 引起雏鸭发生传染性浆膜炎, 严重危害养鸭业的发展。【目的】提高鸭疫里默氏杆菌发酵培养水平和抗原活性, 为鸭疫里默氏杆菌灭活疫苗的研制提供技术指引。【方法】利用单因素及响应面的试验设计方法, 针对鸭疫里默氏杆菌进行疫苗培养基的研制, 并探究不同发酵时间点该菌的抗原活性, 选择抗原活性最高点时制备灭活疫苗, 通过动物免疫保护试验评价疫苗免疫效果。【结果】使用研制的疫苗培养基发酵培养鸭疫里默氏杆菌, 其活菌数能够达到  $4.68 \times 10^{10}$  CFU/mL, 较市面上该菌专用的培养基提高 2.29 倍。该菌发酵 12 h 后抗原活性达到最高, 在此时制备的灭活疫苗诱导小鼠产生的抗体水平显著高于商品化灭活疫苗, 攻毒保护率达到了 100%。【结论】本研究研制的培养基具有优异的增菌效果, 可作为生产鸭疫里默氏杆菌灭活疫苗抗原的发酵培养基, 疫苗生产过程中可选择菌株抗原活性达到最高时收集菌体。**关键词:** 鸭疫里默氏杆菌; 疫苗培养基; 抗原活性; 响应面

资助项目: 国家自然科学基金(32222068); 广东省重点研发计划(2022B1111070006); 广东省科学院创新发展专项(2020GDASYL-20200103033)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32222068), the Key Research and Development Project of Guangdong Province (2022B1111070006), and the Special Project for Innovation and Development of Guangdong Academy of Sciences (2020GDASYL-20200103033).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: wuqp203@163.com

Received: 2023-03-10; Accepted: 2023-04-02; Published online: 2023-04-18

## Development and effect evaluation of *Riemerella anatipestifer* vaccine medium with high antigenic activity based on response surface analysis

NIU Dequan<sup>#1,2</sup>, WAN Qiang<sup>#3</sup>, MIAO Sen<sup>1,2</sup>, LIU Xiang<sup>1,2</sup>, ZHANG Yangyang<sup>2</sup>, JIANG Fufeng<sup>3</sup>, QU Xiaoying<sup>3</sup>, ZHANG Jumei<sup>2</sup>, CAI Zhihe<sup>3</sup>, CHEN Bo<sup>3</sup>, WU Qingping<sup>\*1,2</sup>

1 School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, Key Laboratory of Agricultural Microbiomics and Precision Application, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Microbiology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong, China

3 Guangdong Huankai Biotechnology Limited Company, Zhaoqing 526238, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] The widespread presence of *Riemerella anatipestifer* in poultry farms causes contagious serositis in ducklings, which seriously endangers the development of the poultry industry. [Objective] To improve the fermentation level and antigenic activity of *R. anatipestifer* and provide technical guidance for the development of *R. anatipestifer* inactivated vaccines. [Methods] The single factor test and response surface methodology were employed to optimize the vaccine medium for *R. anatipestifer*. The antigenic activity of *R. anatipestifer* was determined at different time points of fermentation, and the inactivated vaccine was prepared at the time point with the highest antigenic activity. The immune effect of the vaccine was evaluated by animal immunization test. [Results] The viable cell count of *R. anatipestifer* in the developed vaccine medium reached  $4.68 \times 10^{10}$  CFU/mL, which was 2.29 times higher than that of the commercial medium for *R. anatipestifer*. The antigenic activity of the strain peaked after 12 h of fermentation. The inactivated vaccine prepared at this time point induced significantly higher antibody level in mice than the commercial inactivated vaccines, with 100% protection from virus attack. [Conclusion] The medium developed in this study had excellent enrichment effect and can be used for the production of antigens for *R. anatipestifer* inactivated vaccine. The bacteria can be collected when the antigenic activity of the selected strain reaches the highest level during the vaccine production.

**Keywords:** *Riemerella anatipestifer*; vaccine medium; antigenic activity; response surface

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)为革兰氏阴性菌<sup>[1]</sup>,是危害养鸭业的重要致病菌之一,多感染1-8周龄雏鸭<sup>[2]</sup>。RA对雏鸭的感染率和死亡率都很高,给养鸭业造成严重的经济损失<sup>[3]</sup>。在临床上,针对RA的防治主要以药物治疗和接种灭活苗为主<sup>[4]</sup>,但由于在养殖环节中大量抗生素的不合理使用,使得RA

耐药性不断增强,纯粹依赖药物防治的效果越来越差<sup>[5]</sup>,同一种药物也因各地流行毒株不同难以广泛使用<sup>[6]</sup>。另外,随着我国对食品安全问题高度重视,药物在动物疫病防控中的使用也会日趋严格,因此接种灭活疫苗是防治RA的更优途径<sup>[7]</sup>。灭活疫苗的制备对细菌发酵密度有较高要求,市面上虽然有RA专用型培养

基,但其存在成本较高、发酵密度不理想等缺点,难以用于 RA 的大规模发酵生产,导致 RA 灭活疫苗的生产成本偏高。因此,迫切需要研制出适合 RA 工业化大规模发酵生产、原料易获得且价格低廉并能大幅度提高增菌效果的疫苗培养基。

Lu 等<sup>[8]</sup>和 Leth 等<sup>[9]</sup>研究发现,培养基是影响细菌高密度培养的关键因素,一般培养基中要有碳源、氮源、无机盐等基本营养物质。培养基的组分对 RA 的高密度发酵具有很大影响,合理的培养基组分选择及组成比例对菌株的高密度培养尤为重要<sup>[10]</sup>。为了满足大量菌体生长和高效表达基因产物的需求,经常需要添加几倍生物量的培养基<sup>[11]</sup>,但仅仅通过增加营养物质剂量的方法并不能完成高密度发酵<sup>[12]</sup>,也会导致培养基的成本较高,不能用于大规模工业生产。当培养基中营养物质的浓度超过一定的限度时,会使发酵液中积累大量生长抑制物,影响细菌的生长繁殖和目的基因的表达<sup>[13]</sup>,使活菌数下降。本研究以 RA 血清 2 型 ZZY7 株为试验菌株,在改良酵母肉汤培养基的配方基础上,采用单因素及响应面的试验设计方法研制新型 RA 培养基,探究不同培养阶段 RA 的抗原活性,并通过动物试验评价其效果,以期制备 RA 灭活疫苗提供有效帮助。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

RA 血清 2 型 ZZY7 株,保存于广东环凯生物科技有限公司。

### 1.2 培养基

种子液培养基:胰酪大豆胨肉汤培养基(TSB);平板计数培养基:胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA);对照组培养基:商品化 RA 培养基。以上培养基均由广东环凯生物科技有限公司

提供。

### 1.3 主要试剂和仪器

酵母粉、牛肉浸粉、水解乳蛋白、氯化钠、促生长肽、商品化 RA 灭活疫苗、RA 免疫血清,广东环凯生物科技有限公司;TMB 显色液和 TMB 显色终止液,上海碧云天生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体,生工生物工程(上海)股份有限公司。振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;恒温培养箱,广东环凯微生物科技有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,株式会社平山制作所;酶标仪,赛默飞世尔有限公司;生物反应器,上海启为生物科技有限公司。

### 1.4 试验动物

6 周龄体重 20 g 左右的 Balb/c 雌性小鼠,购自广东斯嘉景达生物科技有限公司,广东省科学院微生物研究所伦理委员会伦理编号为 GT-IACUC202208101。

### 1.5 菌株培养方法

#### 1.5.1 菌株活化

将菌种按照平板划线的方法涂布接种到 TSA 平板上,在 37 °C 的条件下培养 24 h。

#### 1.5.2 种子液的制备

取上述活化过的菌株,挑取单菌落接种于 TSB 中,在 37 °C、150 r/min 条件下培养 12–16 h。

#### 1.5.3 菌株发酵

按 3% (体积分数)的接种量将种子液接种于发酵培养基中,培养基 pH 值 7.2–7.4,摇床温度 37 °C,转速 150 r/min,培养 15 h。

### 1.6 试验设计

#### 1.6.1 单因素试验

在改良酵母肉汤培养基的基础上,通过改变各营养组分配比关系,验证不同浓度 A (牛肉浸粉)、B (酵母粉)、C (水解乳蛋白)、D (促生长肽)、E (氯化钠)对 RA 菌体密度的影响,每次均改变某一成分的含量并保持其他成分的含

量不变, 根据结果调整培养基成分, 基础培养基各组分详细添加剂量见表 1。

### 1.6.2 Plackett-Burman (PB) 试验设计

在单因素试验的基础上选择 A (牛肉浸粉)、B (酵母粉)、C (水解乳蛋白)、D (促生长肽)、E (氯化钠) 这 5 个因子进行 PB 试验, 使用 Design-Expert 软件进行  $n=13$  的 PB 试验设计, 考察 5 个影响因子。每个因子各取 2 个水平, 单因素试验所得最佳剂量为低水平“-1”, 高水平“1”取低水平 1.5 倍, 筛选出影响 RA 生长的显著因素。各因子水平设计见表 2, 每组 3 个平行。

### 1.6.3 最陡爬坡试验

根据 PB 试验选择影响显著的因素进行下一步试验, 根据各因素效应值的大小确定最陡爬坡试验的步长, 根据效应值的变化方向确定爬坡方向, 以最陡爬坡试验结果作为 Box-Behnken 试验设计的中心参考。

表 1 单因素试验

Table 1 Single factor optimization test

因素	添加剂量(质量分数, %)					
Factor	Dose of addition (mass fraction, %)					
A	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
B	0.40	0.60	0.80	1.00	1.20	1.40
C	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
D	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
E	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60

表 2 PB 试验因素和水平

Table 2 PB test factors and levels

因素	水平 Level	
	-1	1
A	0.20	0.30
B	1.20	1.80
C	0.40	0.60
D	0.30	0.45
E	0.10	0.15

### 1.6.4 Box-Behnken (BB) 试验设计

响应面分析法主要是研究各因子的交互作用, 以及它们达到最大响应值时所对应的组合条件。本试验根据 PB 试验得到的影响显著的因素: 酵母粉( $X_1$ )、促生长肽( $X_2$ )、氯化钠( $X_3$ ), 以及最陡爬坡试验的结果确定响应面试验的中心点, 利用 Design-Expert.V8.0.6.1 软件设计出响应面分析试验。各组因子水平设计见表 3, 每组 3 个平行。

### 1.6.5 发酵罐验证试验

根据单因素试验以及响应面试验得出以下配方: 酵母粉 18.9 g/L、牛肉浸粉 6 g/L、促生长肽 5.05 g/L、水解乳蛋白 4 g/L 和氯化钠 2.03 g/L, 使用此配方进行 10 L 发酵罐验证试验。

### 1.6.6 不同发酵时间菌株抗原活性的检测

使用研制的新型 RA 疫苗培养基发酵菌株, 分别在发酵 4、6、8、10、12 和 14 h 时取出适量发酵液, 利用超声破碎仪在 300 W、37% 功率的条件下, 破碎 30 min (工作 5 s, 间歇 10 s), 收集各发酵液中的全菌抗原, 利用 BCA 法测定抗原浓度, 然后将各发酵液中的抗原稀释到 10  $\mu$ g/mL, 使用 RA 免疫血清按照间接 ELISA 法测定不同发酵时间点 RA 对应的 IgG 抗体效价, 根据 IgG 抗体效价的水平评估不同时间点细菌的抗原活性。

### 1.6.7 动物免疫保护试验

利用研制的疫苗培养基发酵 RA, 分别在抗原活性和活菌数最高时收集菌体, 经 0.2% 甲醛

表 3 响应面试验设计水平

Table 3 Experimental design level of response surface

因素	水平 Level		
	-1	0	1
$X_1$	1.50	1.80	2.10
$X_2$	0.45	0.50	0.55
$X_3$	0.15	0.20	0.25

溶液灭菌后, 6 500 r/min 离心 10 min, 使用 PBS 溶液重悬 3 次, 调整菌液浓度为  $2.0 \times 10^{10}$  CFU/mL, 按照 1:1 的体积比添加白油佐剂制成灭活疫苗, 佐剂、含菌量、菌株血清型均与商品化 RA 灭活疫苗一致。选取 40 只小鼠, 随机分成 4 组(每组 10 只): A 组(抗原活性最高组)、B 组(活菌数最高组)、C 组(商品化灭活组)、D 组(空白组)。各组均免疫 2 次, 接种量为 0.1 mL/只, 每隔 14 d 进行一次免疫, 空白组仅注射等量 PBS, 在免疫后 14 d 和 28 d 收集血液, 检测血清抗体水平。在二次免疫 14 d 后, 分别对各疫苗组小鼠注射 10 倍  $LD_{50}$  ( $6 \times 10^8$  CFU) 的剂量, 空白组注射等剂量的 PBS。观察并记录 7 d 内小鼠出现的临床症状和死亡情况。

### 1.7 分析方法

菌密度测定: 取不同发酵时间段的菌液, 分别用酶标仪测定波长 620 nm 处的吸光值。

菌落计数: 采用平板计数的方法进行活菌数的测定。

数据处理: 采用 SPSS 21.0 软件对试验数据进行统计分析; 采用 GraphPad Prism 8.1.1 进行绘图; 采用 Design-Expert 软件进行 Plackett-Burman 试验和 Box-Behnken 响应面分析及数据处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

通过单因素试验的方法验证不同浓度牛肉浸粉、酵母粉、水解乳蛋白、促生长肽、氯化钠对 RA 菌体密度的影响, 结果如图 1 所示。在牛肉浸粉添加量为 0.2% 时菌株  $OD_{620}$  值高于其他浓度; 随着酵母粉及水解乳蛋白添加量的增加, 菌株  $OD_{620}$  值呈现先增加而后下降的趋势, 当酵母粉添加量在 1.2% 及水解乳蛋白添加量为 0.4% 时, 菌株  $OD_{620}$  值达到最大; 同时,

随着促生长肽、氯化钠添加量的不断增加, 菌株  $OD_{620}$  值有不同程度的升高; 当促生长肽含量超过 0.3%、氯化钠添加量超过 0.1% 时, 不利于菌株生长。

### 2.2 Plackett-Burman 试验设计结果

在单因素试验后, 利用 Design-Expert 软件进行 PB 试验设计, 以筛选出对 RA 菌体生长影响显著因素, 试验设计见表 4, 依次进行培养基的配制, 以 RA 菌体密度  $OD_{620}$  为响应值, 使用 Design-Expert 软件进行结果分析, 分析结果如表 5 所示。

根据表 5 可知, 在所有因素中, 酵母粉、促生长肽和氯化钠的  $P$  值均小于 0.05, 说明这 3 个因素对 RA 的生长具有显著影响<sup>[14]</sup>。因此根据试验结果选择酵母粉、氯化钠和促生长肽这 3 个因素进行最陡爬坡试验和响应面试验。对于另外 2 个不显著的因素, 在后续的试验中保持单因素优化后的水平。

### 2.3 最陡爬坡试验结果

根据 PB 试验结果可知, 以酵母粉、氯化钠和促生长肽这 3 个显著因素进行最陡爬坡试验, 而酵母粉、氯化钠和促生长肽的相关系数  $t$  值为正, 说明其添加量与菌体密度呈正相关<sup>[15]</sup>, 应依次增加, 根据上述结果设计试验方案, 最陡爬坡试验设计及结果如表 6 所示。

当酵母粉添加量为 1.8%、促生长肽添加量为 0.5% 以及氯化钠添加量为 0.2% 时, 所得到的菌体密度最高。因此本试验选择第 4 组数据作为后续响应面试验的中心点。

### 2.4 Box-Behnken 试验设计及响应面分析

根据 PB 试验结果选择酵母粉( $X_1$ )、促生长肽( $X_2$ )和氯化钠( $X_3$ )这 3 个因素, 再通过最陡爬坡试验确定中心点, 然后使用 Design-Expert 软件进行 BB 试验设计与结果分析。响应面试验的设计方案及结果如表 7 所示, 通过方差分析和二次

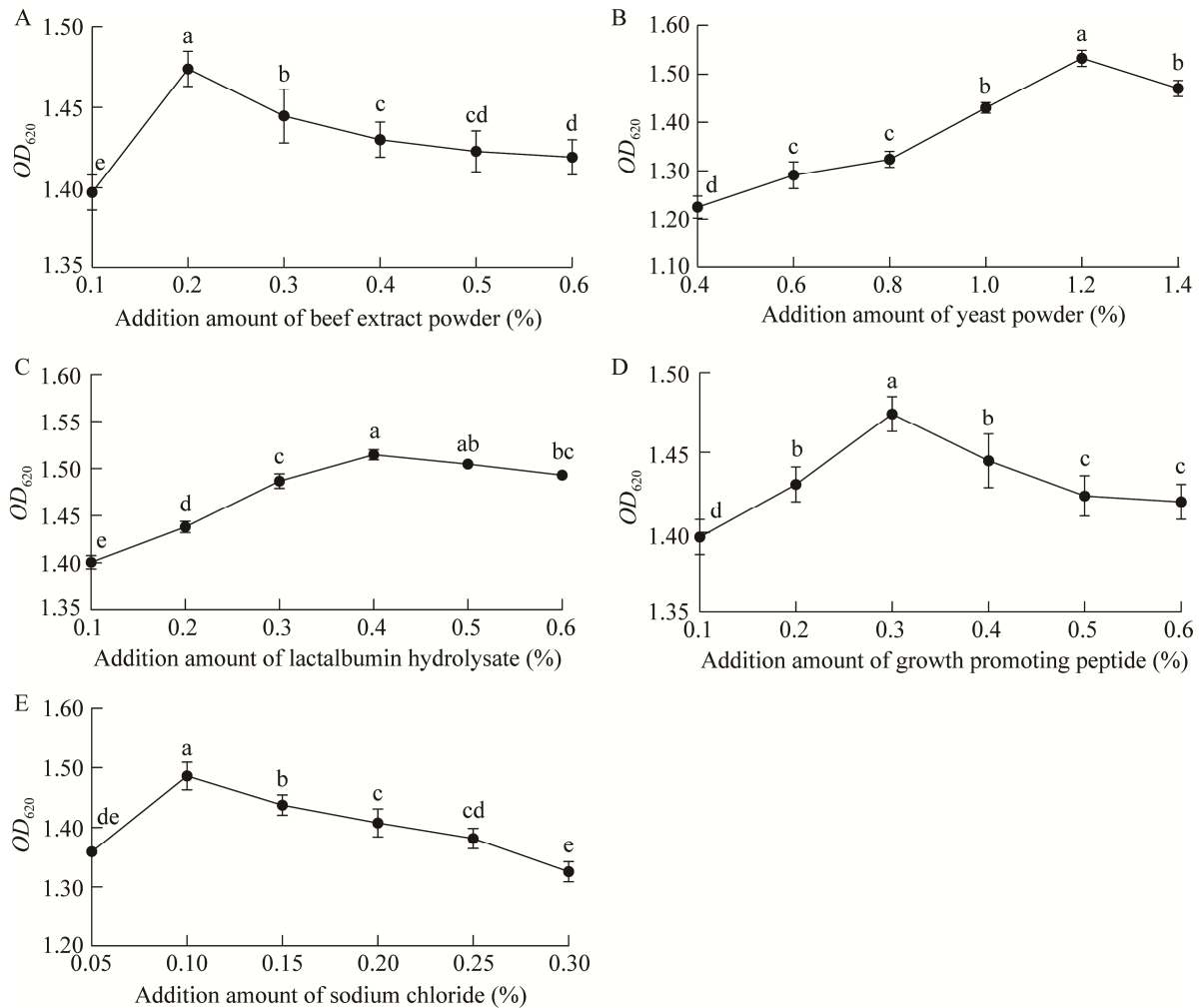


图 1 单因素试验的结果 不同添加量的牛肉浸粉(A)、酵母粉(B)、水解乳蛋白(C)、促生长肽(D)和氯化钠(E)对 RA 菌体密度的影响; 图中标记的不同小写字母表示各因素的不同添加量对 RA 菌体密度差异显著( $P<0.05$ )

Figure 1 Results of single factor optimization tests. Effects of beef extract powder (A), yeast powder (B), lactalbumin hydrolysate (C), growth promoting peptide (D) and sodium chloride (E) with different doses on cell density of RA; The lowercase letters in the figures indicated that the different addition levels of each factor had significant differences in the cell density of RA at  $P<0.05$ .

多项回归拟合, 得到酵母粉( $X_1$ )、促生长肽( $X_2$ )、氯化钠( $X_3$ )与  $OD_{620}$  值之间的多元二次回归方程为:  $OD_{620}=1.6+0.042X_1+0.013X_2+0.013X_3+0.031X_1X_2+0.0097X_1X_3-0.034X_2X_3-0.076X_1^2-0.097X_2^2-0.10X_3^2$ 。

根据表 8 可知, 模型的  $P$  值小于 0.001, 表明该模型的效应极显著, 模型失拟项的  $P$  值大

于 0.1, 说明失拟项无显著性意义, 该模型可以很好地拟合实际情况, 模型的可信度分析如表 9 所示, 模型的校正相关系数与预测相关系数差值小于 0.2, 说明此回归方程的拟合度良好, 失拟不显著。因此该模型符合统计学要求, 可用于 RA 新型培养基的研制。

表4 PB 试验设计及结果

Table 4 Level of the variables and the analysis for PB design

试验号 Test No.	A	B	C	D	E	OD <sub>620</sub>
1	1	-1	-1	-1	1	1.491
2	-1	1	-1	1	1	1.599
3	1	1	-1	-1	-1	1.564
4	1	-1	1	1	-1	1.480
5	-1	-1	-1	-1	-1	1.426
6	-1	-1	-1	1	-1	1.470
7	-1	1	1	1	-1	1.567
8	1	-1	1	1	1	1.526
9	1	1	1	-1	-1	1.543
10	-1	-1	1	-1	1	1.496
11	-1	1	1	-1	1	1.576
12	1	1	-1	1	1	1.584

表5 PB 试验设计结果分析

Table 5 PB test design results analysis

因素 Factor	<i>t</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性排序 Significance
A	0.004 592	1.16	0.322 4	5
B	0.046 000	114.18	0.000 1	1
C	0.004 625	1.18	0.319 2	4
D	0.011 000	6.36	0.045 2	3
E	0.019 000	19.26	0.004 6	2

表6 最陡爬坡试验设计与结果

Table 6 The steepest climb test design and results

试验 编号 Test No.	酵母粉 Yeast powder	促生长肽 Growth promoting peptide	氯化钠 Sodium chloride	OD <sub>620</sub>
1	1.20	0.35	0.05	1.474±0.048d
2	1.40	0.40	0.10	1.560±0.056c
3	1.60	0.45	0.15	1.581±0.036b
4	1.80	0.50	0.20	1.601±0.051a
5	2.00	0.55	0.25	1.567±0.091c
6	2.20	0.60	0.30	1.453±0.083e

表中标记的不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Different lowercase letters marked in the table indicate significant differences at  $P<0.05$ .

表7 响应面试验设计方案及结果

Table 7 Response surface test design scheme and results

试验编号 Test No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	OD <sub>620</sub>
1	0	0	0	1.633
2	1	1	0	1.556
3	0	0	0	1.650
4	0	0	0	1.655
5	0	1	1	1.427
6	0	-1	1	1.483
7	-1	1	0	1.415
8	0	0	0	1.628
9	0	-1	-1	1.389
10	1	0	1	1.530
11	-1	0	1	1.421
12	-1	-1	0	1.437
13	-1	0	-1	1.415
14	0	0	0	1.629
15	1	-1	0	1.454
16	1	0	-1	1.485
17	0	1	-1	1.468

使用 Design-Expert 软件绘制响应面图, 通常响应面的等高线图越呈椭圆形, 各因素之间交互作用越显著<sup>[16]</sup>。从图 2A 中可知, 酵母粉与促生长肽之间的交互作用对菌株生长影响显著, 固定促生长肽含量在 0.49%–0.51% 区间时, 酵母粉含量在 1.80%–1.90% 区间内菌体密度最高, 当酵母粉含量低于该区间时, 菌体密度随酵母粉含量增加而增加; 在图 2B 中, 当酵母粉含量在 1.80%–1.90% 且氯化钠含量在 0.19%–0.21% 时, 菌体密度最高; 由图 2C 可知, 固定氯化钠含量在 0.19%–0.21% 区间内, 当促生长肽含量在 0.49%–0.51% 区间时, 菌体密度大致与促生长肽含量呈正相关。

对回归方程求最优解, 可得各营养因子在培养基中的最佳添加量, 即酵母粉含量为 1.890%、促生长肽含量为 0.505% 以及氯化钠含量为 0.203% 时, 预测的最大响应值为 1.646。利用新配方

表 8 响应面试验设计分析

Table 8 Response surface experimental design analysis

因素 Factor	自由度 <i>df</i>	平方和 SS	均方 MS	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Significance
模型 Model	9	0.144 5	0.016 1	103.78	<0.000 1	**
$X_1$	1	0.014 1	0.014 1	91.16	<0.000 1	**
$X_2$	1	0.001 3	0.001 3	8.52	0.022 4	*
$X_3$	1	0.001 3	0.001 3	8.41	0.023 0	*
$X_1X_2$	1	0.003 9	0.003 9	25.29	0.001 5	*
$X_1X_3$	1	0.000 4	0.000 4	2.43	0.162 8	NS
$X_2X_3$	1	0.004 6	0.004 6	29.71	0.001 0	**
$X_1^2$	1	0.024 5	0.024 5	158.53	<0.000 1	**
$X_2^2$	1	0.039 9	0.039 9	258.03	<0.000 1	**
$X_3^2$	1	0.042 1	0.042 1	272.40	<0.000 1	**
残差 Residual	7	0.001 1	0.000 2			
失拟项 Lack of fit	3	0.000 5	0.000 2	0.96	0.492 9	NS

\*: 差异显著( $P<0.05$ ); \*\*: 差异极显著( $P<0.01$ ); NS: 差异不显著

\*: Significant difference at  $P<0.05$ ; \*\*: Significant difference at  $P<0.01$ ; NS: Difference is not significant.

表 9 模型可信度分析

Table 9 Model reliability analysis

复相关系数 <i>R</i> -squared	校正相关系数 Adj <i>R</i> -squared	预测相关系数 Pred <i>R</i> -squared	变异系数 C.V. (%)
0.992 6	0.983 0	0.943 4	0.820 0

进行多次摇瓶试验, 得到平均菌体密度值为 1.634, 与预测值接近。本试验也充分验证了基于响应面法研制培养基的可靠性, 具有一定实用性。

## 2.5 发酵罐验证试验结果

对最终得到的 RA 新型疫苗培养基配方进行 10 L 发酵罐验证, 重复发酵 3 次。由图 3 可知, RA 在商品化的 RA 培养基中 8 h 达到平台期, 此时  $OD_{620}$  约为 1.38, 活菌数约  $2.04 \times 10^{10}$  CFU/mL。使用新型疫苗培养基进行发酵 RA, 发酵 10 h 到达平台期, 此时  $OD_{620}$  约为 1.62, 活菌数能够达到约  $4.68 \times 10^{10}$  CFU/mL。新型疫苗培养基较商品化 RA 培养基的增菌效果提高 2.29 倍。数据证明, 自制 RA 新型疫苗培养基的发酵密度更高、效果更稳定, 可用于 RA 的发酵

制苗生产。

## 2.6 不同发酵时间菌株抗原活性的检测结果

将各发酵液中的抗原调整到相同浓度, 采用间接 ELISA 法测定不同发酵时间点细菌对应的 IgG 抗体效价, 根据 IgG 抗体效价的水平评估不同时间点细菌的抗原活性, 结果如表 10 所示。在发酵 4 h 后, 菌株的  $OD_{620}$  和诱导的效价随着发酵时间的增加而增加; 当发酵 10 h 时, 菌株  $OD_{620}$  达到最高, 但此时的抗原对应的血清抗体效价并未达到最高; 当发酵 12 h 时, 菌株抗原对应的血清效价最高, 可达 1:96 000。

## 2.7 动物免疫保护试验结果

通过间接 ELISA 法测定了各组小鼠血清的特异性抗体滴度, 如表 11 所示。结果显示, 疫苗免疫均诱导了可检测的 IgG 反应, 在首免后第 14 天, 疫苗免疫后在血清中刺激的 IgG 滴度普遍偏低, 二免 14 d 后小鼠血清中 IgG 抗体水平与一免 14 d 相比均有大幅度升高, 在 RA 抗原活性最高时研制的灭活疫苗在一免和二免诱导的血清 IgG 抗体效价水平均为最高。



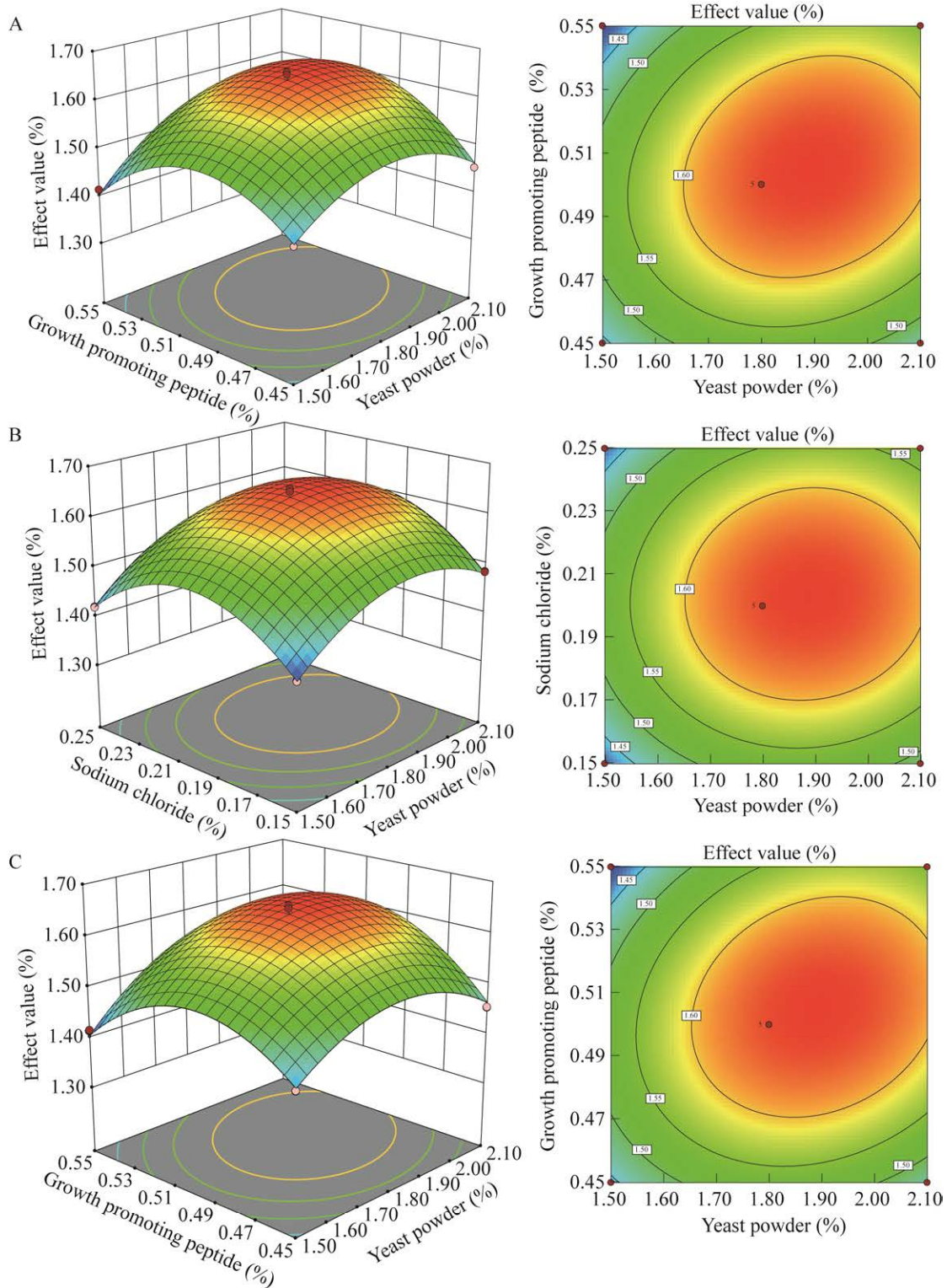


图 2 不同营养成分的交互作用 A: 酵母粉-促生长肽. B: 酵母粉-氯化钠. C: 促生长肽-氯化钠

Figure 2 Interaction of different nutrient components. A: Yeast powder and growth promoting peptide. B: Yeast powder and sodium chloride. C: Growth promoting peptide and sodium chloride.

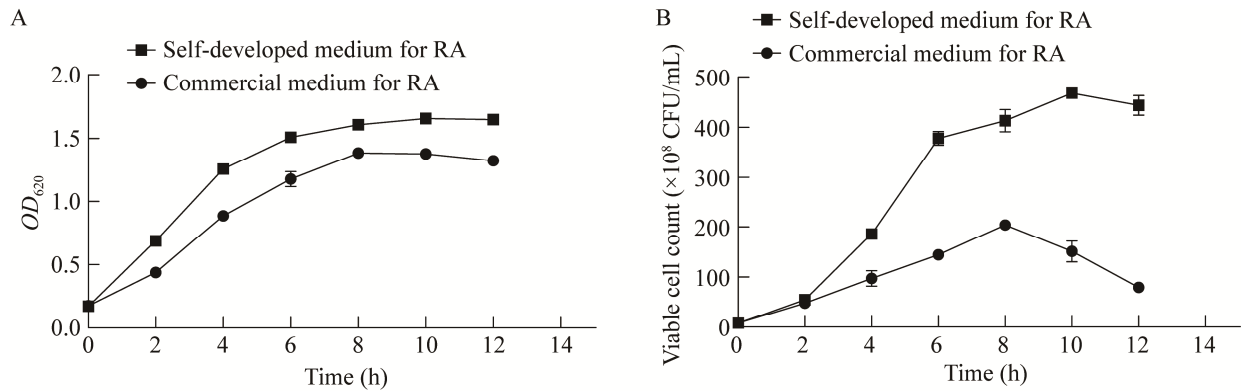


图 3 RA 在 2 种培养基中  $OD_{620}$  与活菌数的变化曲线 A:  $OD_{620}$ . B: 活菌数

Figure 3 Change curves of  $OD_{620}$  and viable cell count of RA in two kinds of culture media. A:  $OD_{620}$ . B: Viable cell count.

表 10 不同发酵时间段菌株的抗原活性

Table 10 Antigenic activity of strains from different fermentation time periods

Time (h)	$OD_{620}$	IgG antibody
4	0.512	1:6 400e
6	0.724	1:25 600d
8	1.125	1:48 000c
10	1.632	1:64 000b
12	1.521	1:96 000a
14	1.486	1:96 000a

表中标记的不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )

Different lowercase letters marked in the table indicate significant differences at  $P<0.05$ .

表 11 免疫小鼠血清抗体滴度的测定

Table 11 Determination of serum antibody titers in immunized mice

Group	Serum IgG antibody titer of one-immune mice	Serum IgG antibody titer of two-immune mice
A	1:2 800a	1:120 000a
B	1:2 000b	1:90 000b
C	1:1 600c	1:68 000c

表中标记的不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ ); A: 抗原活性最高组; B: 活菌数最高组; C: 商品化疫苗组  
Different lowercase letters marked in the table indicate significant differences at  $P<0.05$ ; A: The group with the highest antigen activity; B: The group with the highest number of viable count; C: Commercial vaccine group.

攻毒试验结果显示(图 4), 抗原活性最高组存活率为 100%, 活菌数最高组和商品化疫苗组存活率均为 90%, 空白组所有小鼠均表现出病症, 最终全部死亡。试验证明, 利用研制的培养基发酵 RA 制作的灭活疫苗效果良好且无不良反应, 在菌株发酵到抗原活性最高时收集菌体制备的灭活疫苗免疫保护率最高。

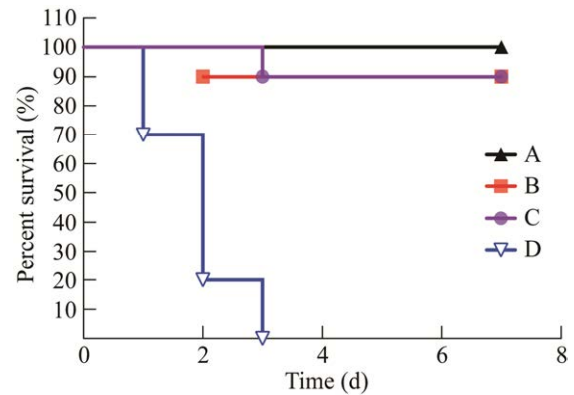


图 4 RA 攻击各组小鼠的存活率 A: 抗原活性最高组. B: 活菌数最高组. C: 商品化疫苗组. D: 空白组

Figure 4 Survival rate of mice challenged with *Riemerella anatipestifer*. A: The group with the highest antigen activity. B: The group with the highest number of viable count. C: Commercial vaccine group. D: Blank group.

### 3 讨论与结论

截至目前,虽然关于 RA 的研究报道比较多,但是其培养方面的相关报道很少,尤其是缺少 RA 疫苗培养基。在疫苗的生产过程中,培养基的使用量无疑最大,提高培养过程中的菌体密度就成了降低疫苗成本的关键。因此,本研究通过单因素试验、Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验和 Box-Behnken 响应面试验调控培养基中各成分之间的比例,得到了 RA 专用型疫苗培养基的配方:酵母粉 18.9 g/L、牛肉浸粉 6 g/L、促生长肽 5.05 g/L、水解乳蛋白 4 g/L 以及氯化钠 2.03 g/L。利用研制的培养基发酵 RA,活菌量能够稳定在  $4.68 \times 10^{10}$  CFU/mL 以上,较国内商品化 RA 培养基提高了 2.29 倍。研制的培养基能够满足菌体生长和表达基因产物的需求,极大地提高了发酵密度,有效地降低了疫苗生产成本。

研究发现,抗原活性是影响灭活疫苗质量和免疫保护效果的关键因素<sup>[17-18]</sup>。本研究测定不同发酵时间 RA 的抗原活性,发现在发酵 12 h 后 RA 的抗原活性达到最高,在此时制备的灭活疫苗具有良好的免疫效果,在相同含菌量下,与商品化疫苗和活菌数最高点制备的疫苗相比,诱导小鼠产生了更高的抗体滴度和攻毒保护率。综观前人研究的成果,同时结合本研究自研的 RA 疫苗培养基和灭活疫苗在实验室条件下取得的试验结果,发现自研培养基的发酵增菌效果优异,且成本低,使用该培养基发酵 RA,制备的灭活疫苗取得了出色的免疫效果,无不良反应,能够为 RA 灭活疫苗的研制提供有效参考。

然而,回顾研究过程中遇到的问题,以下内容还需要进一步去探究:虽然本研究在小鼠模型上的试验取得了较好的效果,但是该疫苗

对鸭的效果仍未可知,仍需以鸭作为动物模型进一步探究;RA 血清型众多,危害养鸭业的病原菌也众多,多价疫苗和多联疫苗是未来的研究趋势。这几个方面的内容将是今后进行更深入研究的主要内容。

### REFERENCES

- [1] REN XM, WANG XL, SHI HY, ZHANG XM, CHEN ZC, MALHI KK, DING C, YU SQ. *Riemerella anatipestifer* AS87\_RS09170 gene is responsible for biotin synthesis, bacterial morphology and virulence[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 14645.
- [2] 冯雅婷,朱敏,刘丹,沈如玉,牛朋飞,郭容,于圣青. 鸭疫里默氏杆菌流行菌株的分离鉴定及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4778-4785.  
FENG YT, ZHU M, LIU D, SHEN RY, NIU PF, GUO R, YU SQ. Isolation, identification and biological characterization of *Riemerella anatipestifer* epidemic strains[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4778-4785 (in Chinese).
- [3] 李林林,孙敏华,董嘉文,吴彩艳,廖申权,孙铭飞,吕敏娜,邝瑞欢,张建峰,徐志宏. 鸭疫里默氏杆菌弱毒株的发酵培养[J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(6): 90-94.  
LI LL, SUN MH, DONG JW, WU CY, LIAO SQ, SUN MF, LYU MN, KUANG RH, ZHANG JF, XU ZH. Industrial fermentation technology of the attenuated strain of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2021, 29(6): 90-94 (in Chinese).
- [4] ZHU XH, LI YL, WANG ZW, PANG ZY, SI ZS, LIU C, LU JB, CAO SL, PEI LY, LI YB. Antibiotic resistance of *Riemerella anatipestifer* and comparative analysis of antibiotic-resistance gene detection methods[J]. Poultry Science, 2023, 102(3): 102405.
- [5] CHANG FF, CHEN CC, WANG SH, CHEN CL. Epidemiology and antibiogram of *Riemerella anatipestifer* isolated from waterfowl slaughterhouses in Taiwan[J]. Journal of Veterinary Research, 2019, 63(1): 79-86.
- [6] LIU SQ, LIU JF, FU N, KORNMATITSUK B, YAN ZQ, LUO JR. Phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide could enhance neomycin-sensitivity on *Riemerella anatipestifer* *in vitro* and *in vivo*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 13: 985789.

- [7] WU HC, CHANG WC, WU MC, WANG HY, CHU CY. Assessment of immunization regimens of duck *Riemerella anatipestifer* vaccines[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(5): 1185-1192.
- [8] LU Y, XING SQ, HE LP, LI CQ, WANG X, ZENG XF, DAI YF. Characterization, high-density fermentation, and the production of a directed vat set starter of *Lactobacilli* used in the food industry: a review[J]. Foods (Basel, Switzerland), 2022, 11(19): 3063.
- [9] LETH IK, McDONALD KA. Media development for large scale *Agrobacterium tumefaciens* culture[J]. Biotechnology Progress, 2017, 33(5): 1218-1225.
- [10] ZHOU YX, SU XB, ZHAO WZ, XIA DP, FU HJ, WANG G. Culture medium optimization for producing biomethane by coal anaerobic digestion[J]. Journal of Biotechnology, 2022, 348: 26-35.
- [11] MOREIRA DMB, GÓMEZ OC, HIRATA DB, LUIZ JHH. Optimizing the culture medium of *Lasiodiplodia* sp. to improve the yield of ethyl acetate extract as an antimicrobial source[J]. Current Microbiology, 2022, 79(8): 222.
- [12] GERMEC M, OZCAN A, TURHAN I. Effect of process parameters and media on the production of ethanol by *Scheffersomyces stipitis* in shake flask fermentation[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023: 1-10.
- [13] JARVIS NA, O'BRYAN CA, RICKE SC, JOHNSON MG, CRANDALL PG. A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2016, 66: 256-269.
- [14] 张雯, 王明钰, 尤静观, 倪莉. 冠突散囊菌抑菌产物培养基优化及分离鉴定[J]. 中国食品学报, 2022, 22(2): 345-356.
- [15] ZHANG W, WANG MY, YOU JG, NI L. Fermentation optimization of culture medium and isolation and identification of antimicrobial active substances from *Eurotium cristatum*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(2): 345-356 (in Chinese).
- [15] 亓秀晔, 张志焱, 谢全喜, 刘乃芝, 郭杨丽, 徐海燕, 谷巍. 丁酸梭菌的生物学特性分析及发酵培养基优化[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 71-76.
- QI XY, ZHANG ZY, XIE QX, LIU NZ, GUO YL, XU HY, GU W. Biological characteristics and fermentation medium optimization of *Clostridium butyricum*[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 71-76 (in Chinese).
- [16] 常婷婷, 赵妍, 杨焕玲, 宋晓霞, 董沁, 陈明杰. 香菇复配氨基酸培养基优化及其对香菇菌丝生长生理的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 545-555.
- CHANG TT, ZHAO Y, YANG HL, SONG XX, DONG Q, CHEN MJ. Optimization of compound amino acid medium for *Lentinula edodes* and the effect on mycelial growth and physiology[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 545-555 (in Chinese).
- [17] RAHMAN MS, RAHMAN MK, SAHA S, KAYKOBAD M, RAHMAN MS. Antigenic: an improved prediction model of protective antigens[J]. Artificial Intelligence in Medicine, 2019, 94: 28-41.
- [18] AGUILAR-BRETONES M, FOUCHIER RA, KOOPMANS MP, van NIEROP GP. Impact of antigenic evolution and original antigenic sin on SARS-CoV-2 immunity[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2023, 133(1): e162192.