

植物分子農場在水產功能性飼料上之開發與應用

撰文/蔡錦燕·洪明昌·劉俊宏·王冠登·吳宗孟

水產功能性飼料的重要性

全球人口持續攀升對海鮮的需求也日益增高，然而全球之漁撈產量已達上限，所以水產養殖在世界糧食供應上扮演舉足輕重之角色。隨著世界各國大量的投入，2013 年全球水產飼料的需求量與產值分別達 3,760 萬公噸與 626 億美元，並預期 2014 -2020 年間年複合成長率將達到 11%。隨著水產養殖的擴展，人類對魚粉的需求持續增加，相對的使用高品質替代蛋白質來源是目前的趨勢，但這些替代性蛋白質均需要特殊之製程或添加酵素作用才能發揮實質效力。例如大豆粉具有良好的營養價值，加上其低廉及供應量穩定，是常用的替代性植物性蛋白質。但大豆粉中所含之抗營養因子，如胰蛋白酶抑制因子 (trypsin inhibitor)、大豆球蛋白 (glycinin)、果寡糖 (oligosaccharides)、凝血素 (lectin/hemagglutinins)、植酸 (phytate) 和皂苷 (saponin) 等，皆大大地影響養殖生物對其利用率。因此，為了有效利用大豆粉，除了熱處理外，亦利用添加酵素、微生物醱酵，甚至基因轉殖的方式來改善，使大豆粉成為一具功能性的飼料原料。Cheng 等人 (2017) 指出大豆粉經微生物醱酵後，可產生抗菌肽用來預防蝦類養殖的弧菌感染。現今水產飼料開發不單只著重養殖生物快速成長，也開始重視

健康、環境污染以及經濟成本等方面，因而許多可增進水產生物健康、提升飼料利用率或提高經濟價值之二次代謝物（例如：免疫刺激物、類胡蘿蔔素、抗氧化物）、蛋白質（例如：植酸酶、抗菌蛋白）或微生物（例如：益生菌）開始被添加入飼料中，並開發出含有促進生長、揚色、降低環境汙染或增強免疫力特殊效果之功能性飼料。然而，所需添加之二次代謝物、酵素或蛋白質從何而來、如何降低生產成本以及食品生物安全將是主要之關鍵問題，若可開發出一種具有改善本身缺失特性及富含高營養價值的植物性蛋白質來源，可謂是一種兩全其美的辦法。

植物分子農場的應用與潛力

植物分子農場 (Plant Molecular Farming) 係指利用植物生產具有高經濟價值的蛋白質與二次代謝物，例如人類醫療與檢測用藥物蛋白、工業用途酵素及食品或飼料添加物等。此項技術取決於植物基因工程技術之進展，因此，在過去二十年間，在植物分子生物學的知識及研究技術不斷地進步之下，使植物基因工程技術成為研究基礎分子生物學與農業生物科技重要之工具，並達到成熟階段。

另一方面，由於植物可進行醱基化作用後修飾

表現之重組蛋白，確保其結構與功能的完整性，故植物有能力製造具有醫療活性之功能性哺乳動物蛋白質，如人類血清蛋白、生長調節因子、抗體、疫苗、荷爾蒙、細胞激素以及酵素等。隨著生物製藥需求的上升，加上現存利用微生物、動物細胞或轉殖動物之高成本、低效率的表現系統無法滿足市場的需求。因此，世界上許多公司、大學以及研究機構投注非常多心力在植物分子農場上，欲使基因轉殖植物成為新一代生物反應器 (bioreactor)。

現今主要透過植物分子農場所生產之蛋白質或二次代謝物可分為五大類：

1. 醫藥用中間產物

例如凝血酶、膠原蛋白、胰蛋白酶與抑肽酶等。以色列 Protalix Biotherapeutics 公司與 Pfizer 合作生產的治療成人第一型高雪氏症 (Gaucher disease) 產品 Elelyso 是利用其專利的 ProCellEx™ 基因表達系統，在轉殖胡蘿蔔懸浮細胞系之儲藏蛋白質液泡 (protein storage vacuole) 中大量累積治療此病的關鍵酵素 glucocerebrosidase，於大規模生產後加以純化，以做為酵素替代療法之用，並在 2012 年五月通過美國 FDA 核准上市，是全球第一個利用植物生產上市的人類疾病醫療用蛋白質。

2. 工業用酵素

包含糖苷酶與蛋白酶等水解酵素、漂白纖維與木製品生物黏著劑之 laccase 以及參與生產酒精過程之生物量轉化分解酵素等，此類酵素通常具備使用量大以及低廉成本之特性；上述工業用酵素的生產，多利用玉米進行量產。此外，2011 年二月美國農業部已經通過先正達公司 (Syngenta) 所開發之 Enogen 核可上市，該商品為大量表達來自於耐高溫 *Thermococcales* 菌屬的耐熱 α -Amylase 轉殖玉米，該耐熱 α -Amylase 的活性可於酒精製程所產生的高溫情形下保持穩定，因此預估可有效提升生質酒精的生產，並降低成本。

3. 單株抗體

優勢在於利用植物生產單株抗體具有潛力突破許多動物平臺以及微生物反應器遭遇之瓶頸，最大的優點是成本低廉、施用容易，利用植物生產除了可以大面積栽培降低成本，亦可將免疫蛋白表現在果實中，直接食用果實獲得免疫，而成為第四類之口服疫苗，比如 2013 年時，非洲爆發有史以來最嚴重的伊波拉病毒疫情，研究機構就利用菸草表達三種對抗伊波拉病毒之單株抗體 ZMapp 的開發，雖未達上市階段，但可顯現出植物分子農場之前景與重要性。

4. 口服疫苗

利用植物表達特殊之蛋白質作為抗原，同時利用植物細胞壁特性，保護抗原避免遭於受腸道蛋白酶之破壞，使其能於動物或人類口服後引起體液免疫，根據 Lamphear 等人 (2004) 的研究結果，藉由此方式進行免疫後，其效果甚至優於市售疫苗。

5. 食品或飼料添加物

主要是在植物體中表達其生化代謝路徑上之關鍵基因，造成植物體合成與累積較多具商業價值之二次代謝物，例如類胡蘿蔔素。

因此，若可找出適合作為水產飼料替代性蛋白質來源的植物品種，衍伸成為植物分子農場用於改良或生產機能性添加物，在水產養殖上將有極高的發展潛力。

浮萍在水產功能性飼料開發的可行性與優勢

浮萍 (Duckweed) (圖一) 屬於單子葉被子水生植物分布於世界各地，為世界上最小、生長最快以及最簡單的開花植物，在植物分類學上為單子葉植物綱 (Monocotyledon)，浮萍科 (Lemnaceae)，並由四屬所組成：*Lemna*、*Spirodela*、*Wolffia* 和 *Wolffiella*。浮萍具有生長快速 (倍增時間約 36 小時)、容易生長與收穫、蛋白質含量高 (20-35%

乾重，隨培養環境與種類而有所差異)、木質素 (lignin) 含量低、可製造細菌與真菌無法合成之較複雜蛋白質、相較於動物表現系統之低成本以及可食用性等優勢，因此是一個理想表達重組蛋白之植物分子農場平臺。

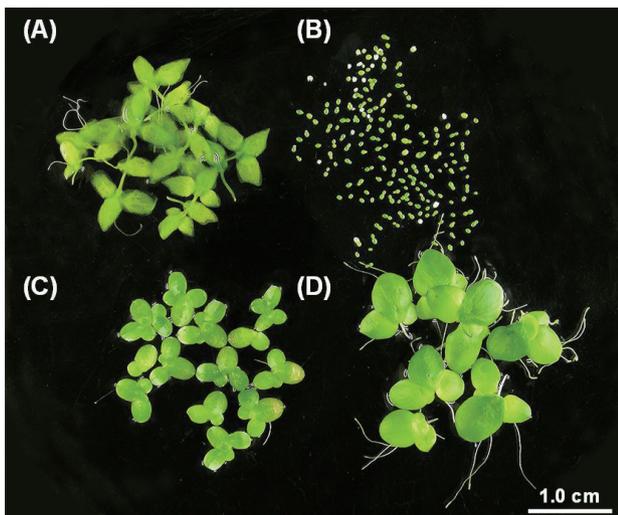
另外，浮萍早被認為是許多動物（例如：反芻動物、家禽與魚類）的高營養價值與易消化食物來源，可直接新鮮餵食作為單一飼料或者成為人工飼料之添加物。研究已證實透過醱酵浮萍粉來取代魚粉，可促進白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 之成長與抗緊迫基因之表現 (Flores-Miranda *et al.*, 2015)。此外，Bertran 等人 (2015) 透過小浮萍 (*L. minor*) 生產禽流感病毒的 H5 血球凝集素蛋白片段作為抗原，進行白 (色) 來亨雞的免疫，在攻擊試驗中得到正面的效果。Ghosh 等人 (2015) 亦利用小浮萍表達來自於小巢狀麴菌 (*Aspergillus nidulans*) 的植酸酶，與市售來自於大腸桿菌生產的植酸酶進行蛋雞餵食的成長試驗，結果發現餵食含植酸酶小浮萍粉飼料之組別，其成長表現、產蛋量、蛋的品質以及飼料

利用率皆有顯著提升，且排泄物中磷的含量顯著下降，效果比市售大腸桿菌所生產的植酸酶組別更好。

然而，到目前為止，雖無研究利用浮萍表達系統進行水產飼料的開發，但不同來源之重組蛋白的使用，已有一段歷史。舉例來說，Toullec 等人 (1991) 餵食大腸桿菌表達之重組人類生長激素可顯著提升白蝦幼苗的成長與對鹽度逆境之耐受性；Xu 等人 (2000) 餵食利用酵母菌重組表達之鮭魚生長激素，可提高明蝦 (*Penaeus chinensis*) 之成長以及兩倍的存活率；日本北里大學的 Shunsuke Moriyama 教授及其團隊發現透過浸泡、注射或餵食鮭魚生長激素，可有效提高鮑魚 (*Haliotis discus hannai*) 之成長。多數重組生長激素皆使用大腸桿菌系統進行表現，雖生產之重組生長激素一樣具有促進水生動物成長之效果，但由於大腸桿菌之轉譯後修飾能力較差，使得具活性之重組蛋白產生較少且多累積於包涵體 (inclusion bodies) 中，為了獲得具有生物活性之重組生長激素，必須經過複雜的處理程序，讓蛋白質重新摺疊回復其該有之構型。因此，許多研究利用不同之重組蛋白表現系統來生產生長激素，藉以提升整體生產效率以及生物利用率，例如：酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae* 以及 *Pichia pastoris*)、擬球藻 (*Nannochloropsis oculata*) 以及高等植物 (菸草、玉米與大豆)。因此，基於浮萍本身適合成為水產生物飼料的生理特性，以及水生生物對各種來源重組蛋白的接受性，浮萍分子農場在水產飼料上的應用將具有無限的可能與潛力。

浮萍基因轉殖系統之研究

浮萍基因轉殖系統早在 20 世紀末就有學者開發研究，最早由 Rolfe 與 Tobin (1991) 使用 *Lemna gibba* 為平臺，透過暫時性表現方式測試單子葉植物 *rbcS* 啟動子之活性，緊接著此項方法亦被其他學者應用於其它種浮萍，例如 *L. minor*、*Spirodela oligorrhiza* 以及 *Wolffia columbiana*。穩定性表達系統則在 1990 年末期由兩個研究團隊成功開發農桿菌轉殖法 (*Agrobacterium tumefaciens*)，第一個

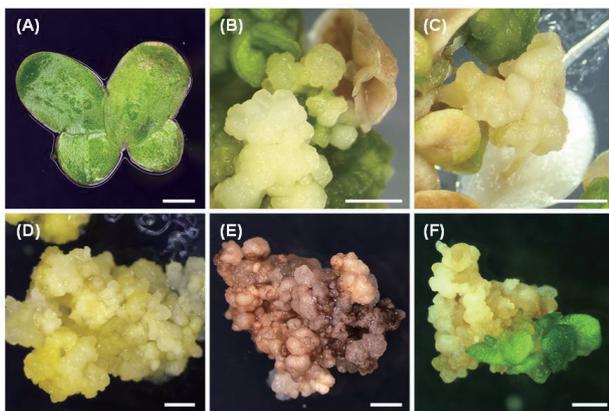


(A) 品萍 (*Lemna trisulca*) ;
(B) 無根萍 (*Wolffia arrhiza*) ;
(C) 青萍 (*L. aequinoctialis*) ;
(D) 水萍 (*Spirodela polyrrhiza*) 。

圖一 浮萍外觀。

為 Stomp 教授團隊建立 *L. gibba* 以及 *L. minor* 穩定性轉殖系統；第二個為 Edelman 教授團隊建立 *L. gibba* 以及 *S. oligorrhiza* 穩定性轉殖系統。

目前浮萍基因轉殖技術可透過基因槍法與農桿菌轉殖法進行，所轉殖之基因可穩定存在於浮萍染色體中並持續表現，現今更有超過 20 種醫藥用蛋白，例如：plasminogen、aprotinin、monoclonal antibody、avian influenza H5N1 hemagglutinin 以及 interferon $\alpha 2$ ，都已經透過浮萍來生產，藉由此方式所生產的重組蛋白含量更可達總可溶性蛋白質之 7%；Vunsh 等人 (2007) 則曾將綠色螢光基因表達於紫萍 (*S. oligorrhiza*)，並獲得佔總可溶性蛋白質 25% 之重組蛋白，使之成為透過核轉殖方式下具有高表現量之表達系統；另外，美國 Biolex 公司所開發出 LEX(Lemna-based expression) 表達系統就是利用浮萍當作生產醫藥用蛋白之平臺，開發之產品有治療 C 型肝炎的 Locteron® 以及另兩個臨床試驗中之 BLX-155(a human plasmin) 與 BLX-301(an anti-CD20 mAb)。



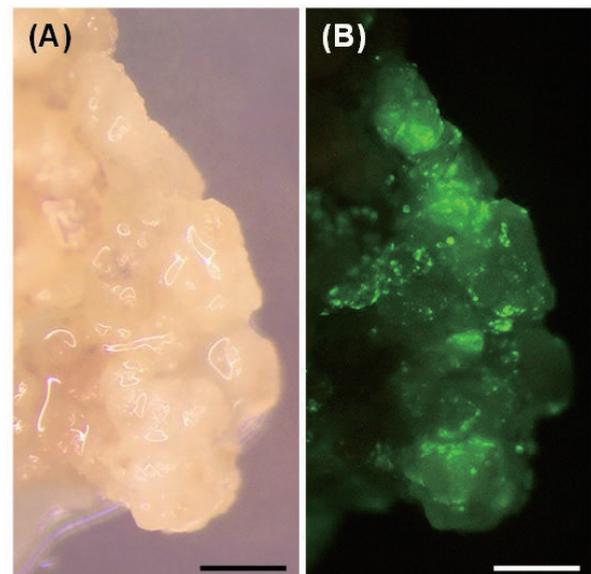
(A) 青萍外觀；
(B, C) 癒傷組織的誘導；
(D) 癒傷組織的增殖；
(E) 褐化之癒傷組織；
(F) 青萍植株的再生。尺規 = 1.0 mm。

圖二 青萍癒傷組織誘導和增殖以及青萍植株再生之情形。

然而，不同種類或不同品系的浮萍，通常具有不同之生理特性，例如組織再生能力、植物荷爾蒙的需求以對農桿菌感染之感受性。因此，針對不同品系之浮萍需要專屬的再生與轉殖條件。先前筆者已透過搭配不同類型與濃度之基礎培養基、植物生長調節劑以及蔗糖，了解其對青萍 (*L. aequinoctialis*) 癒傷組織誘導和增殖以及青萍植株再生和增殖的影響 (圖二)。除此之外，初步使用農桿菌轉殖法將綠色螢光蛋白基因轉殖入青萍中，在成功轉殖之細胞系中可明顯觀測到綠色螢光的訊號 (圖三)，相信此技術將能夠應對未來在開發功能性水產飼料所面臨之挑戰。

基因改造植物當作飼料添加原料之風險

植物基因改造過程中，由於外源基因隨機的插入，可能導致植物本身內生基因表現的改變，而有非預期的結果，若因而改變了植物本身所含營養成分、抗營養因子或固有毒素的含量，將會影響此基改植物作為飼料添加物的品質。



(A) 明視野；
(B) 綠色螢光濾鏡視野。尺規 = 0.5 mm。

圖三 大量表達綠色螢光蛋白之轉殖青萍癒傷組織細胞。

自從 1996 年來，全世界生產基改作物的比例大幅上升。於 2008 年時，基改大豆占全球大豆產量的 77%，也造成飼料公司不易取得非基改大豆原料。因此，水產飼料添加基改植物蛋白質原料應用於現場養殖已是常態，因此進行完善的安全評估有其必要性，包括重組蛋白之毒性與過敏原試驗、評估各項影響以及是否有基因水平轉移之情形，其中基因水平轉移是讓大家擔憂的一項議題。

此議題可分為兩部分，一為基因轉殖時所使用來自細菌的抗抗生素基因片段與外界環境或腸道內微生物作用的潛在風險；二為轉基因序列片段進入生物體中，是否會造成不好的影響。雖然根據 Schubert 等人 (1998) 的研究指出，外源 DNA 確實可透過動物的攝食而進入生物體內，但這是自然發生的事情，並非因為吃基改作物才會發生。現今水產飼料的製程大多使用高溫高壓擠壓製粒技術，因此飼料當中僅能偵測到 DNA 的碎片，故當此類 DNA 碎片進入動物腸道後，應再被胃酸以及腸道上皮細胞所分泌的核酸酶降解成更小的片段，而失去轉錄成蛋白質的功能，同時，此類短小的 DNA 片段，最終會被腸道黏膜吸收，並運輸到身體的不同部位。另一方面，根據 Sissener 等人 (2011) 的研究指出，雖然該作用機制尚未明瞭，但目前尚無直接的證據證明轉基因序列會較一般植物 DNA 序列容易進入生物體中，亦或對魚類帶來負面的影響。

然而，為了克服上述的潛在風險與顧慮，目前已運用如 CRISPR-Cas9 的基因編輯技術 (Genome

Editing) 進行誘變以輔助育成不含外源基因序列的基因改造物種，最知名的範例 Waltz(2016) 發表的「基因編輯蘑菇」，美國農業部認定不屬基改作物而可合法上市且不受基改法律的規範。

困境與結語

臺灣基因轉殖技術的發展一直相當具有國際競爭力，根據科技部與農業國家型計畫資料顯示，相關研究到目前已累積許多成果，例如食用肝炎疫苗、禽流感病毒表面抗原蛋白、腸病毒疫苗等次單位疫苗的開發，亦有乳鐵蛋白、人類表皮生長因子、人類血清蛋白等醫療用蛋白質生產，雖大多成果已概念性驗證其可行性，但離商品化仍有一段路要走。

基因轉殖在臺灣是個政治議題，轉殖植物要實際應用於產業實屬不易，但有趣的是，目前飼料添加所使用的大豆粉，也多是基改大豆，甚至添加的微生物或酵素，或多或少都與基因改造有所關聯。想當然爾，植物分子農場在水產功能性飼料上之開發與應用有其可行性與發展潛力，但必須遵守政府所頒布「飼料管理法」中的「基因改造飼料或飼料添加物許可查驗辦法」的相關規範，以確保基因改造飼料或飼料添加物之衛生安全，保障國內飼料品質及農漁牧產品衛生安全。

AgBIO

蔡錦燕	國立屏東科技大學	食品科學系	講師
洪明昌	國立高雄海洋科技大學	水產養殖系暨研究所	助理教授
劉俊宏	國立屏東科技大學	水產養殖系	特聘教授
王冠登	國立屏東科技大學	水產養殖系	研究生
吳宗孟	國立屏東科技大學	水產養殖系	助理教授

參考文獻

- Bertran, K., Thomas, C., Guo, X., Bublot, M., Pritchard, N., Regan, J. T., Cox, K. M., Gasdaska, J. R., Dickey, L. F., Kapczynski, D. R., Swayne, D. E. (2015) *Expression of H5 hemagglutinin vaccine antigen in common duckweed (Lemna minor) protects against H5N1 high pathogenicity avian influenza virus challenge in immunized chickens.* Vaccine 33:3456-3462.
- Cheng, A. C., Lin, H. L., Shiu, Y. L., Tyan, Y. C., Liu, C. H. (2017) *Isolation and characterization of antimicrobial peptides derived from Bacillus subtilis E20-fermented soybean meal and its use for preventing Vibrio infection in shrimp aquaculture.* Fish & Shellfish Immunology 67:270-279.
- Ghosh, M., Huynh, D., Sodhi, S. S., et al. (2015) *Impact of a novel phytase derived from Aspergillus nidulans and expressed in transgenic Lemna minor on the performance, mineralization in bone and phosphorous excretion in laying hens.* Pakistan Veterinary Journal 35:360-364.

參考文獻

4. Lamphear, B. J., Jilka, J. M., Kesl, L., Welter, M., Howard, J. A., Streatfield, S. J. (2004) *A corn-based delivery system for animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine*. *Vaccine* 22:2420-2424.
5. Rolfe, S. A. and Tobin, E. M. (1991) *Deletion analysis of a phytochrome-regulated monocot rbcS promoter in a transient assay system*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:2683-2686.
6. Schubert, R., Hohlweg, U., Renz, D. and Doerfler, W. (1998) *On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus*. *Molecular Genetics and Genomics* 259:569-576.
7. Sissener, N. H., Sanden, M., Krogdahl, A., Bakke, A. M., Johannessen, L. E., Hemre, G. I. (2011) *Genetically modified plants as fish feed ingredients*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 68:563-574.
8. Toullec, J. Y., Le Moullac, G. L., Gérard, C. and Van Wormhoudt, A. (1991) *Immunoreactive human growth hormone like peptides in tropical Penaeids and the effect of dietary hGH on Penaeus vannamei larval development*. *Aquatic Living Resources* 4:125-132.
9. Vunsh, R., Li, J. H., Hanania, U., et al. (2007) *High expression of transgene protein in Spirodela*. *Plant Cell Reports* 26:1511-1519.
10. Waltz E. (2016) *Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation*. *Nature* 532:293.
11. Xu, B., Zhang, P. J., Mai, Y. L. and Miao, H. Z. (2000) *Studies of the effects of recombinant fish growth hormone on survival and growth enhancement of chinese prawn Penaeus chinensis*. *Marine Sciences* 24:54-56.