

「益生菌與酵素保健飼料添加物研發與商品化」計畫亮點成果

撰文/李恒夫·劉芳爵·蔡銘洋·葉瑞涵·陳俊位

微生物及酵素為動物保健飼料添加物的要項之一，為因應畜禽產業降低使用抗生素的潮流，本計畫以益生菌為主題，開發芽孢桿菌、乳酸菌以及耐酸複合菌，評估對豬隻和肉雞的健康及生產效率的效益。同時建置一套完整的先導型發酵平臺，作為實驗室研發與商業化量產之間的製程參數建立，以縮短研發期程，加速開發速度。未來將透過專利保障及技轉布局運用研發成果，同時結合產學研相關單位，促使發酵平臺成為合作橋樑。計畫已完成一件技術移轉，技轉金 46 萬元，以及完成乳酸菌液態發酵配方營業秘密二件。

擬解決產業問題

全球人口急速增加，造成糧食需求也跟著急速增加，過去飼料中添加促進生長的抗生素，以確保畜禽的生產效率。然此舉易導致畜禽腸道微生物產生抗藥性或藥物殘留於畜禽產品等問題。飼料中禁用預防用含藥物飼料添加物，同時逐年縮減可添加於畜禽飼料中的抗生素種類，已是目前國內外畜禽生產的發展趨勢。微生物及酵素為動物保健飼料添加物的要項之一，為因應畜禽產業降低使用抗生素的潮流，本計畫以益生菌為主題，開發芽孢桿菌、乳酸菌以及耐酸複合菌，強化畜禽的生長性能、免疫力與健康狀態，達到穩定農民收益之永續發展目

標。同時建置一套完整的先導型發酵平臺，協助計畫所研發之添加物的試量產，提供畜禽飼效試驗所需，並探討放大生產之適當參數，作為產業化量產前之架橋，縮短產品商品化的期程。

團隊組成

本計畫以益生菌為主軸開發畜禽動物保健品飼料添加物，同時建置先導型發酵平臺，結合本所營養組、產業組、加工組、飼料作物組、高雄種畜繁殖場、臺中區農業改良場、財團法人食品工業發展研究所與財團法人農業科技研究院等單位，共同組成研發團隊，從菌種篩選、菌種培養方式、菌粉製作、相關分析，之後大型培養、菌粉凍乾、動物確效試驗等，致力於本土益生菌類飼料添加物的研發（表一）。

研究方向

本計畫完成多種保健功效之益生菌，包括芽孢桿菌、源自食品或動物腸道來源乳酸菌、耐酸性益生菌，並建置完整的益生菌發酵及植生素萃取系統。評估芽孢桿菌改善離乳豬生產效益之效果；探討益生菌培養條件，運用單一菌種或混合菌株乳酸菌於肉雞之效應；以耐酸性複合式有益菌結合農業剩餘資材開發保健飼料添加物；建立益生菌 30 L 液態發酵技術參數以及紫色狼尾草及臺灣香檬果渣等

表一 「益生菌與酵素保健飼料添加物研發與商品化」計畫研究團隊組成

主要功效	計畫名稱	計畫主持人
豬隻生長免疫	芽孢桿菌飼料添加物的研發與商品化開發	畜產試驗所劉芳爵研究員
肉雞生長免疫	開發乳酸菌飼料添加物提升家禽保健效能	畜產試驗所蔡銘助理研究員
肉雞生長免疫	動物腸道來源益生菌飼料添加物之開發	畜產試驗所葉瑞涵助理研究員
畜禽生長免疫異味控制	耐酸性複合式有益菌保健飼料添加物研發與商品化	臺中區農業改良場陳俊位研究員
基礎建設	先導型發酵平臺的建置	畜產試驗所李恒夫副研究員

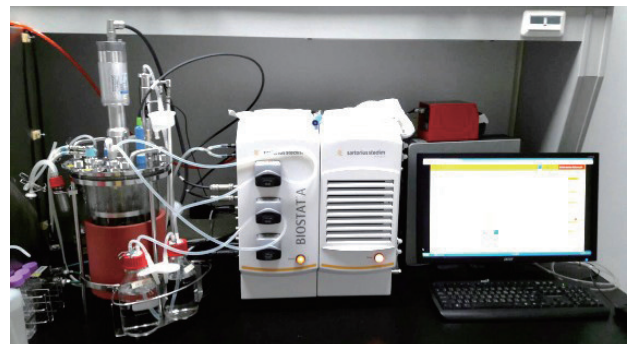
植生素萃取技術參數。

主要成果

(一) 芽孢桿菌飼料添加物的研發與商品化開發

豬隻腸道微生物菌相對提升仔豬免疫力扮演非常重要的角色，同時腸道內微生物產生之短鏈揮發性有機酸（如醋酸、乳酸與酪酸），具有保護結腸與直腸等部位，抑制有害微生物的數量。藉由建立芽孢桿菌 R3 發酵參數（圖一），篩選芽孢桿菌作為畜禽飼料添加物使用，促進畜禽腸道健康，降低病原菌影響與發生下痢等現象。篩選自豬隻糞便與牛瘤胃液之芽孢桿菌候選菌株，分別經培養基篩選、菌株 16S rDNA 核苷酸序列相似度比對、耐酸度 pH 2 與耐膽鹽 2% 與 MALDI-TOF MS 菌種鑑定等分析後（圖二），顯示源自牛瘤胃液凝結芽孢桿菌 R3 有耐酸、耐膽鹽與產生左旋乳酸，並可分泌纖維素分解酵素與木聚醣酶，提升飼料不溶性纖維素的利用率。運用於畜禽飼料添加物使用之潛力，添加 1×10^8 cfu/kg 有助於改善離乳仔豬糞便成型，降低下痢發生率 10%，並可提升離乳仔豬日增重 12% 與改善飼料轉換率 11.6% 等效果。

(二) 開發乳酸菌飼料添加物提升家禽保健效能

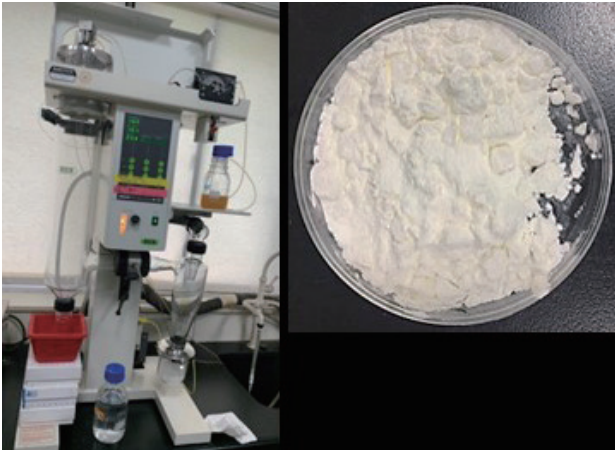


圖一 建立芽孢桿菌R3發酵參數

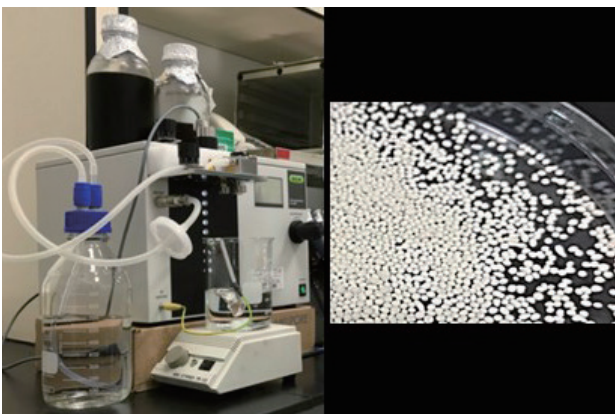


圖二 芽孢桿菌於產孢後外貌 (400 X)

乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* 與 *L. reuteri*（圖三及圖四）於體外測試，可刺激包括介白素 -6 (interleukin 6, IL-6) 及腫瘤壞死因子 - α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 等細胞激素生成，並具有抑制大腸桿菌 (*Escherichia coli* BCRC 10450)、



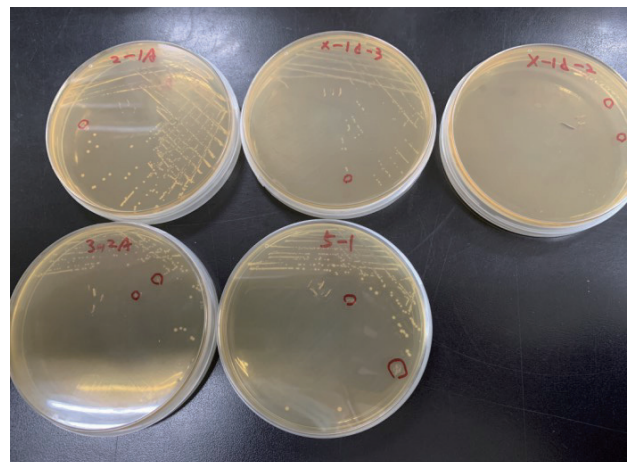
圖三 乳酸菌G1噴霧乾燥製劑



圖四 乳酸菌G1微膠囊包埋初產品

(三) 動物腸道來源益生菌飼料添加物之開發

自食品或動物腸道來源篩選益生菌並探討其開發為雞隻飼料添加物之可行性。具備耐酸耐膽鹽能力的動物腸道來源乳酸菌共計 12 株，其中 2-1A 及 X1d-3 之固態及液態培養活能化力最佳，而克菲爾為本所開發之混合菌種，試驗建立 2-1A、X1d-3 及克菲爾的液態培養基及培養條件，菌液經冷凍乾燥製成菌粉後活菌數可達 10^9 、 10^9 及 10^7 cfu/g 以上（圖五及圖六）。單獨添加 0.1% 的 2-1A、X1d-3 及克菲



圖五 菌種以MRS agar培養活化乳酸菌並觀察菌落外觀

沙門氏菌 (*Salmonella* BCRC 10451) 及金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* BCRC 10747) 等生長之能力。另於白肉雞飼養試驗結果，*L. plantarum* + *L. reuteri* 混合菌株 (5×10^8 cfu/kg) 處理組於 0 - 35 日齡飼料採食量顯著高於對照組，而飼料換肉率則顯著優於泰黴素組，細胞免疫能力 IL-6 則以 *L. plantarum* + *L. reuteri* 混合菌株組表現最高；泰黴素組腸道內菌相歧異度指標 (Shannon diversity index) 顯著降低，而餵飼菌株組及抗生素組比控制組顯著降低 *Salmonella* 菌屬之表現，而乳酸桿菌處理組顯著增加乳酸菌種 *Lactobacillus salivarius* 在菌相中數量。



圖六 菌液冷凍乾燥後的外觀

爾菌粉可顯著改善肉雞 22 - 35 及 0 - 35 日齡增重及飼料換肉率，且不同菌粉對盲腸總生菌數、總乳酸菌數及大腸桿菌數達到顯著影響。將 2-1A、X1d-3 及克菲爾製成混合菌粉，其生產效率因子表現最佳，分別較對照組及市售益生菌組改善 11.5% 及 5.0%。

（四）耐酸性複合式有益菌保健飼料添加物研發與商品化

(1) 運用益生菌（如芽孢桿菌、酵母菌）與發酵基質如乳清蛋白、海草粉、蝦蟹殼粉與糖蜜進行發酵生產複合菌甲殼素合劑飼料添加物，黑羽土雞飼糧中添加 1% 混合益生菌，雞隻平均重量高於對照組，且添加物菌種與抑菌墊料可降低雞舍臭味 80 - 90%（圖七）。(2) 4 週齡離乳豬餵飼空白料組、泰黴素組、香菇粉佐劑添加耐酸性複合式有益菌組、玉米芯佐劑添加耐酸性複合式有益菌組及耐酸性複合式有益菌組五組飼糧（圖八），顯示香菇粉佐劑添加耐酸性複合菌在 0 - 6 週有較佳的飼料換肉率的趨勢。豬舍糞便氣味降低效果方面，除臭效果以香菇粉佐劑最佳，硫化氫的產生量 36.52 ppm，低於空白料組的 49.69 ppm 及泰黴素組的 40.49 ppm。(3) 1 日齡白肉雞分別餵飼基礎飼糧組、添加 0.5% 耐酸性複合式有益菌、添加 1% 耐酸性複合式有益菌與添加



圖七 飼料添加耐酸性複合式菌之土雞存活率達 96~100%



圖八 耐酸性複合式有益菌保健飼料添加物應用於離乳豬

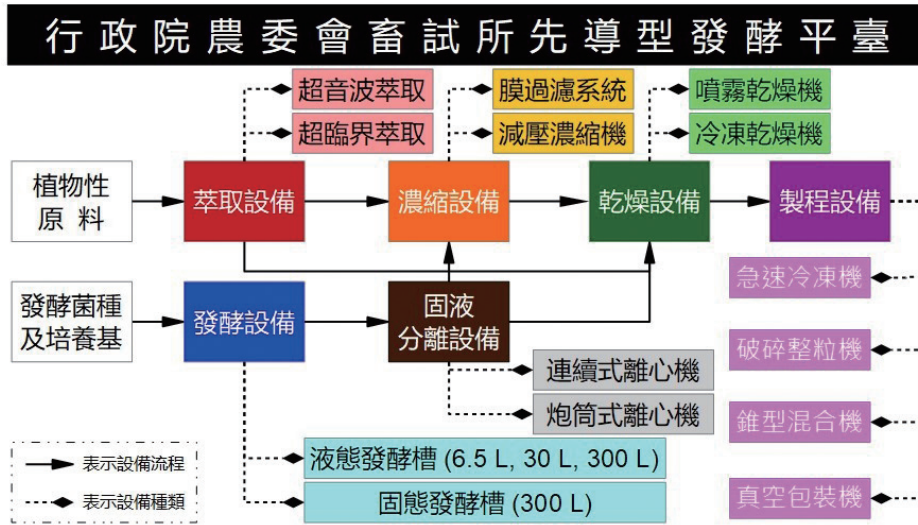
50 ppm 泰黴素組。結果顯示，雞隻飼糧中添加 1% 耐酸性複合式有益菌製劑可提高白肉雞前期生長表現以及有效刺激雞隻血清中 IL-1 β 之表現，對於白肉雞之飼養仍具有促進免疫調節之優勢。

（五）先導型發酵平臺的建置

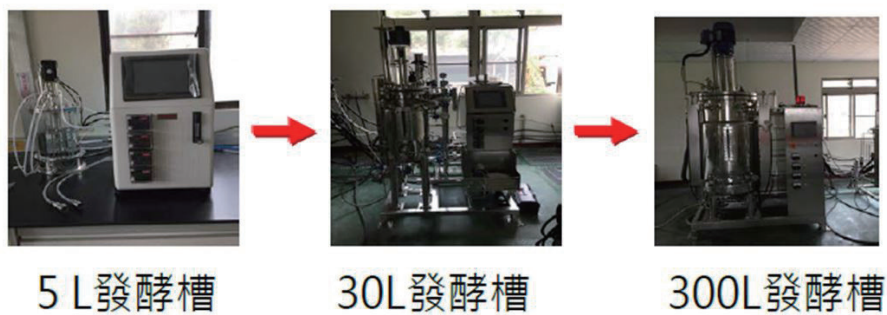
本計畫基礎建設先導型發酵平臺，目前共建置了萃取設備、濃縮設備、發酵設備、固液分離設備、乾燥設備、製程設備及其相關附屬設備，詳細內容如圖九所示，平臺可供進行大型量產前的先導性規模測試，用以評估大型量產所需參數的先期發酵作業（圖十），也可提供各項原料進行濃縮、萃取並製成飼料添加物。目前已完成乳酸菌飼料添加物標準化製作流程，從篩選菌種、培養配方最佳化、先導量產驗證並完成飼料添加物，其產量可供動物試驗使用，大幅減少試驗前的準備步驟及時間。同時利用全基因體序列分析，完成 6 株發酵菌醃之學名鑑定與菌株品系分型鑑別。另外也輔導業者透過先導型平臺的製程設備，完成新產品之測試樣品，透過測試結果後已計畫進行完整的生產計畫。

技轉情形

1. 智慧財產佈局方面，本計畫所研發之成果芽孢桿菌及乳酸菌，規劃先取得專利保障後，再與合適



圖九 行政院農業委員會畜試所先導型發酵平臺設備一覽



圖十 先導型發酵平臺之液態發酵槽

技轉對象，辦理菌株之技術移轉。

- 以耐酸複合式益生菌研發運用在雞隻飼養及墊料堆肥製作技術，開發「複合式堆肥發酵菌種接種劑製作技術及其應用於雞舍墊料與堆肥製作之方法」授予本璋實業股份有限公司技術移轉，技轉金46萬元。
- 依據先導型發酵平臺試驗流程及結果，已提出兩菌乳酸菌株(*Lactobacillus plantarum*及*Lactobacillus reuteri*)培養配方設計之營業祕密申請。

計畫亮點

芽孢桿菌可作為益生菌類飼料添加物，代謝物有助於促進仔豬腸道的健康，減少離乳仔豬下痢的發生率，改善仔豬的日增重與飼料轉換率；可分泌纖維素分解酵素與木聚醣酶，提升飼料不溶性纖維素的利用率；產生孢子具有較佳抗外界環境的作用，如製作粒狀飼料，提高該菌株的存活率。

可自行篩選、鑑定及保存關鍵乳酸菌種，研發來源安全性高之益生菌種。透過動物確效試驗，掌握關鍵資源及技術，可提供相關業者參考或技術移

轉，擴散保健飼料添加物效益，符合動物飼養藥物減量之趨勢。

確立耐酸性益生菌發酵量產製程，設計複合式有益菌組合，搭配不同佐劑或者農業剩餘資材，開發保健飼料添加物，透過技術移轉達到改善畜禽生產效益，藉由益生菌的作用減少畜禽舍中產生異味的雜菌，達到降低畜禽舍的臭味，降低畜禽舍異味對環境之衝擊。

先導型發酵平臺建立乳酸菌飼料添加物的生產製作流程，從篩選菌種、搖瓶培養試驗、培養配方最佳化測試、先導量產驗證，搭配固液分離設備、乾燥設備及製程設備，可確保產出品質優良且穩定的添加物，而透過先導量產建立的操控參數與策略建置及試量產擴大醱酵最適化，確保後續大型量產的可行性，可望提高廠商進行技轉的意願並加速產品商業化流程；同時提供其他添加物透過平臺之設備進行完整的先導量產試驗。

未來規劃

透過先導型發酵平臺為媒介，與同業或異業聯盟，拓展基盤與建立夥伴關係，持續開發菌種資源、保存及擴增技術以及植生素萃取技術，評估單一菌種或複合型菌種、益生質或植生素，並搭配農業剩餘資材開發多種劑型之保健型飼料添加物以提升對畜禽健康改善、免疫反應及生長性能之綜合效益。

AgBIO

李恒夫	行政院農業委員會	畜產試驗所	副研究員
劉芳爵	行政院農業委員會	畜產試驗所	研究員
蔡銘洋	行政院農業委員會	畜產試驗所	助理研究員
葉瑞涵	行政院農業委員會	畜產試驗所	助理研究員
陳俊位	行政院農業委員會	臺中區農業改良場	研究員

子項計畫主持人	李恒夫 副研究員
單位	行政院農業委員會 畜產試驗所
EMAIL	herngfulee@mail.tlri.gov.tw
電話	06-5911211#2605

參考文獻

1. 余祁暉、李盼 (2015) 動物保健產品之管理法規與發展趨勢。農業生技產業季刊，44：58-66。
2. 郭卿雲、涂榮珍、黃建榕、劉芳爵、陳希嘉、陳明汝、林幼君 (2015) 飼料添加用乳酸菌之篩選及特性分析。畜產研究，48:178-187。
3. Blottiere, H. M., B. Buecher, J. P. Galmiche and C. Cherbut. (2003) *Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation*. Proc. Nutr. Soc. 62(1): 101-106.
4. Chiu, C. H., T. L. Wu, L. H. Su, C. Chu, J. H. Chia, A. J. Kuo, M.S. Chien, and T. Y. Lin. (2002) The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in salmonella enterica Serotype Choleraesuis. The New England J. Med. 346: 413-419.3.
5. Fuller, R. (1989) *Probiotics in man and animals*. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.5.
6. McEwen, S. A., and P. J. Fedorka-Cray. (2002) *Antimicrobial use and resistance in animals*. Clin. Inf. Dis. 34: S93-S106.
7. Varghese, N. J., S. Mukherjee, N. Ivanova, K. T. Konstantinidis, K. Mavrommatis, N. C. Kyrpides and P. Amrita. (2015). Microbial species delineation using whole genome sequences. Nucleic Acids Res. 43: 6761-6771.
8. Ye, L., X. Zhou, M. S. B. Hudari, Z. Li and J. C. Wu. 2013. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. Bioresour. Technol. 132: 38-44.