

海鱸魚腸道乳酸菌之篩選與應用

海鱸魚(*Rachycentron canadum*)為熱帶以及亞熱帶地區中重要的水產養殖經濟來源之一。由於肉質良好且快速的生長，自 1990 年開始，海鱸魚已成為台灣重要的養殖魚類，並隨著水產養殖技術的提升，品質上等的海鱸魚成為台灣漁業重要出口項目之一，需求量大增，使得養殖密度的增加，導致海鱸在養殖期間易受到發光桿菌症(俗稱巴斯德桿菌, photobacteriosis)的影響造成養殖上的重大損失。雖可利用抗生素和疫苗控制發光桿菌造成的疾病，但效果受限且伴隨抗藥性與藥物殘留的問題，並非治本的方法，必須尋求更綠色且優質的養殖方式。根據研究指出，以飼糧來增強腸道微生物活性是提升魚體健康與抗病力的有效方法，益生菌可直接添加飼糧或水質裡，對水產動物發揮效果，成為近幾年養殖漁業關心的議題之一。

許多研究指出，益生菌應用於水產養殖可經由多種機制來改善動物健康與促進養殖收益，包括益生菌利用在腸道的定殖能力減少腸道害菌的數量、產生代謝產物抑制有害菌的生長、改善腸道結構或產生酵素促進機體對營養的吸收，亦或是調節體內最大的免疫器官-腸道，促進調節免疫能力抵禦疾病等。而乳酸菌因是腸道常駐菌、可有效吸附腸道細胞、產生抑菌物質與保健腸道功能等特性，成為益生菌種類中佔比最大的族群。

當挑選適合的菌株時，忽略不同來源的乳酸菌株對物種上發揮效果的差異性是最常犯的錯誤，從該物種腸道篩選的菌株，會是最貼近該物種生理特性的菌株，但具有益生潛力的乳酸菌株僅占腸道菌中 1-10%，故適用於水產養殖的乳酸菌株必須有足夠的基礎研究數據，了解特性後，再以多重試驗測試其功效性或應用性，確認功能性與經濟性，才能有效應用到產業上。下列將以生合公司獨創 SYNTEK® thorough 菌種優化技術，並與澎湖科技大學、國立台灣大學共同開發，以海鱸魚腸道篩選水產適用乳酸菌的研究過程作為最佳範例，加以陳述之。

適合水產動物體質

第一步選擇菌株來源的魚種評估時，因淡水與海水的環境不同，海水的導電度、碳酸鹽硬度(KH 值)與鹽度等環境對菌株生存條件最為嚴苛，故初步鎖定以海水魚的腸道菌株作為篩選對象，如此的菌株應用性廣泛，效果受環境的影響較小。魚腸道菌相容易受到環境、培養條件與飼糧成分所改變，故須從腸道內容物中尋找佔比較高的優勢乳酸菌株。開發過程中，從成年海鱸魚隻的腸道中分離出四百多株菌株，經過消化道耐受性與吸附等特性測試中挑選 3 株表現優異菌株，其中發現了編號為 LAB 4012 菌株在試管試驗(*in vitro*)中，表現出抑

制發光桿菌生長與提升免疫細胞清除害菌等優異特性，因此入選了作為魚隻潛在益生菌的候選菌株。

接下來，將篩選出來的 LAB 4012 分別進行身分確認與功能確效，前者以 16S rDNA 序列做系統樹分析，並將結果比對 GenBank 中相似菌株，包括最低的演變和最大簡約法(bootstrap value=100)，分類結果應為戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*) (如圖 1)，屬於乳酸球菌的一種。其 LAB 4012 之 16S rDNA 於 Genbank 中的登錄號為 JN674456，其產業化後，編號更變為 PP4012。

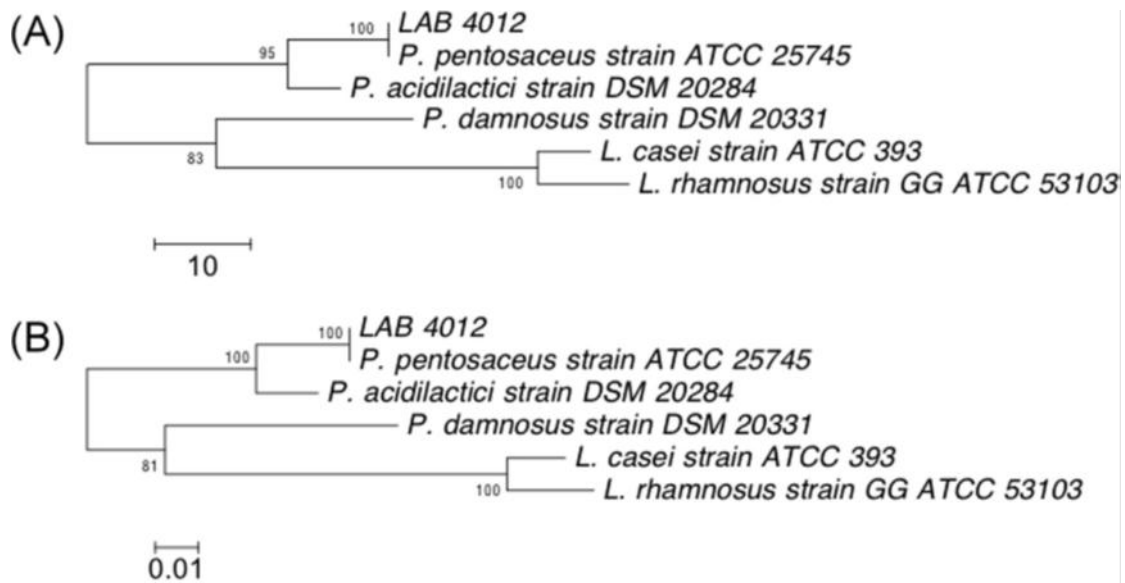


圖 1、海鱧魚腸道分離之 LAB 4012 以系統樹分析比對確認菌種為戊糖片球菌 (A)最大簡約法分析。(B)最低演變分析。 bootstrap value=100。

PP4012 的代謝產物抑制發光桿菌的生長

乳酸菌可以抑制害菌的代謝產物，包括分泌有機酸、細菌素或抗菌肽等物質，從 PP4012(圖中的 LAB 4012)發酵培養液的基礎研究數據看來(圖 2)，其所產生的抑菌物質與 pH 值有相當大的關聯，當 PP4012 發酵液的 pH 調到 6.2 時，它失去抑菌功效，如以純乳酸在 pH4.6 條件下，可產生部分抑菌功效，並無法完全抑菌，因此推測 PP4012 雖是乳酸菌，產生的有機酸也以乳酸佔比較高，但其抑制發光桿菌生長的物質，除了高量的乳酸外，還有其他有機酸或酸性活性物質。

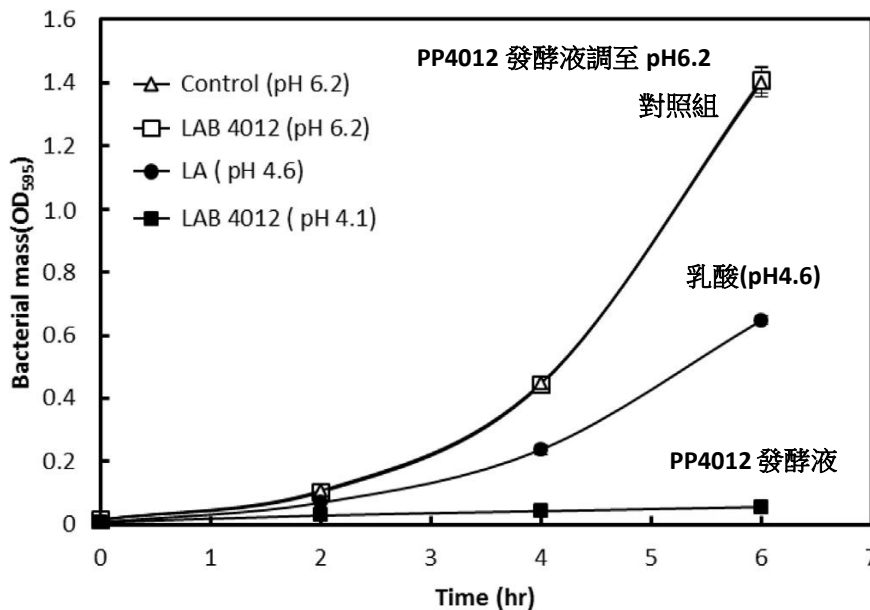


圖 2、LAB 4012 發酵代謝上清液與乳酸對發光桿菌生長的影响

PP4012 促進海鱺仔苗生長與調節免疫力

水產動物在甫孵化或仔苗時，因體內最大的免疫器官-腸道尚未發育，沒有完善的免疫系統做為防禦，對於環境的敏感性非常高，為整個養殖期間損失最高的階段，建議的處理方式就是藉由益生菌作為建立機體本身的防禦力與促進生長之用。

試驗前分析海鱺仔魚腸道中未見有 PP4012 的存在，PP4012 乃篩自成年海鱺發育較完整的腸道，提早將 PP4012 接種到免疫尚未完善的仔魚腸道，評估其對魚苗的生長與抗病力的效果。短短兩週的餵飼時間，也成功在仔魚腸道發現了 PP4012，表示 PP4012 可通過仔魚腸胃道，不受腸胃道的消化或抑菌物質而影響活性，且從生長數據(圖 3)顯示 PP4012 可促進仔魚的生長速率。另外，免疫指標評估了仔魚白血球的呼吸爆發能力與進行攻毒發光桿菌動物試驗，呼吸爆發代表機體對排除病菌或病原的能力，圖 4 顯示 PP4012 對仔魚有提升清除病菌的能力，故增強仔魚對抗發光桿菌的感染，提升了存活率(圖 4)，也再度呼應了 PP4012 可產生抑菌物質與調節免疫力，使得提升機體抗病力的結果。

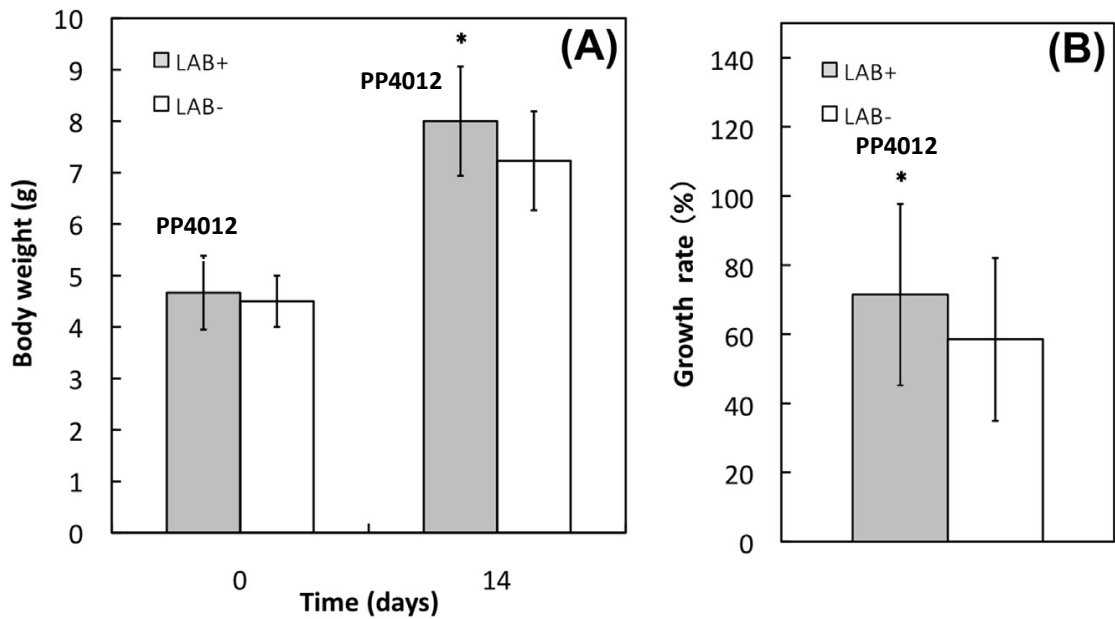


圖 3、飼料添加 LAB 4012 給予海鱺魚飼養 2 週後之生長表現

(A)平均體重變化；(B)生長速率表現

LAB+表示有給予 LAB 4012 菌株組別；LAB-表示無任何處理組別。*星號表示與其他條數據有顯著差異($P < 0.05$, $N=17$)

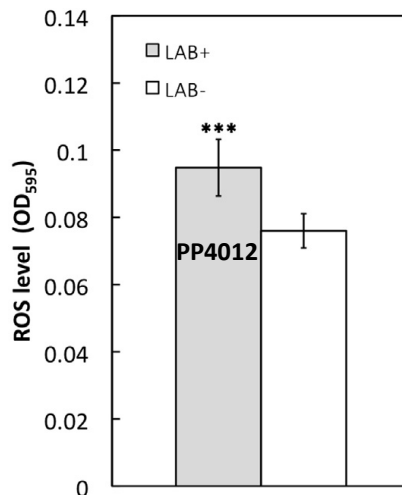


圖 4、飼料添加 LAB 4012 給予海鱺魚 2 週對周邊血液白血球呼吸爆發之影響

LAB+表示有給予 LAB 4012 菌株組別；LAB-表示無任何處理組別。***星號表示與其他條數據有極顯著差異($P < 0.001$)

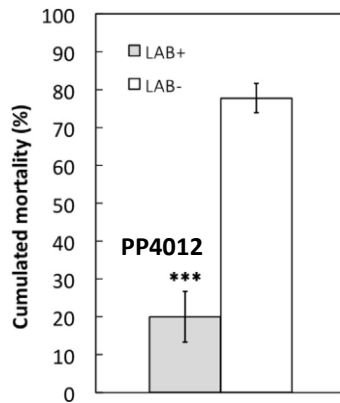


圖 5、飼料添加 LAB 4012 給予海鱺魚 2 週後對發光桿菌感染之死亡率影響
LAB+表示有給予 LAB 4012 菌株組別；LAB-表示無任何處理組別。***星號表示與其他條數據有極顯著差異(P <0.001)

PP4012 提升疫苗預防疾病的效果

養殖現場也常使用疫苗增強魚隻防禦疾病的能力，乳酸菌也常被報導與施打疫苗共同使用，可增加機體產生更多的抗體，故進行了海鱺仔苗施打發光桿菌疫苗時，餵飼 PP4012 與否對抗體表現(圖 6)，並觀察了 4 週。第 2 週時發現，同時使用疫苗與 PP4012 可顯著提升了抗體的表現，意指 PP4012 有提升發光桿菌疫苗在海鱺仔魚的力價，簡單的說，疫苗搭配 PP4012 更有效提升仔魚對疾病防禦力。

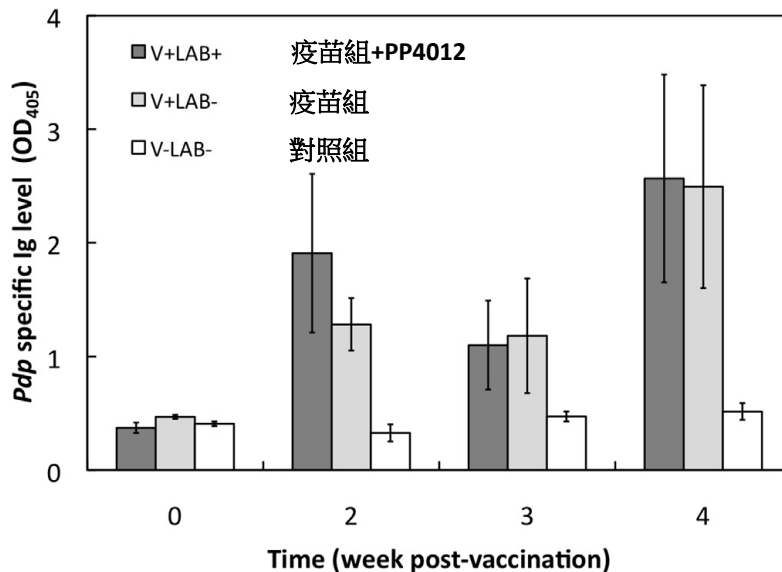


圖 6、飼料添加 LAB 4012 與接種疫苗與否對海鱺魚抗發光桿菌專一性免疫球蛋白之影響
V+LAB+表示有接種疫苗以及給予 LAB 4012 菌株組別；V+LAB-表示僅接種疫苗；V-LAB-表示無任何處理組別。(N=12)

上述 4 週試驗後，第 5 週給予發光桿菌攻毒，評估力價的提升是否對海鱺仔魚的存活率有幫助。圖 7 的結果顯示，存活率的高低排列為疫苗+PP4012 > 疫苗單獨使用 > 均無使用的對照組，其中疫苗搭配 PP4012 的死亡率僅個位數，與圖 6 結果相呼應，疫苗與 PP4012 一起使用，因抗體力價的提升，大幅提高了仔魚的存活率。

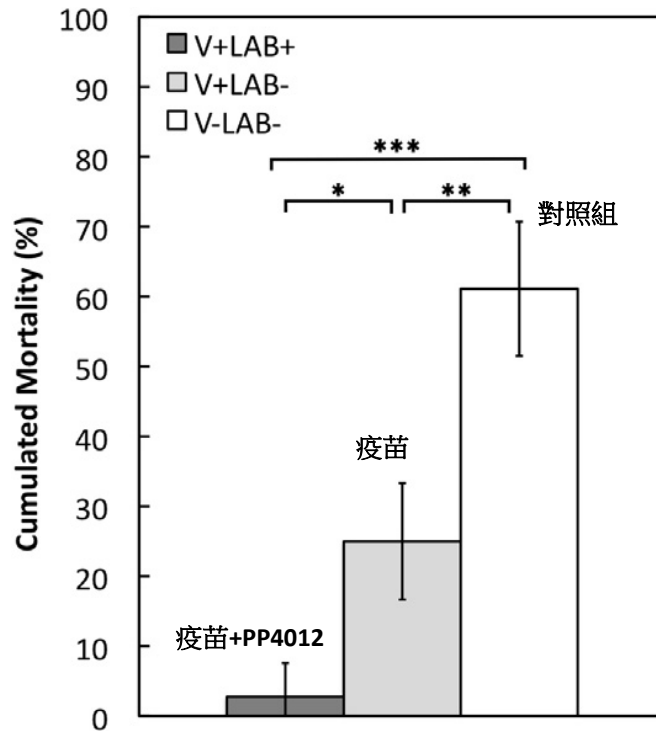


圖 7、飼料添加 LAB 4012 與接種疫苗與否對海鱺魚 5 週後之發光桿菌感染死亡率之影響
 V+LAB+表示有接種疫苗以及給予 LAB 4012 菌株組別;V+LAB-表示僅接種疫苗;V-LAB-表示無任何處理組別。
 星號表示與其他條數據有顯著差異($P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, N=12)。

以上數據，已在 2013 公開發表於 Fish & Shellfish Immunology 國際期刊，生合公司結合學術能量，從台灣養殖海鱺魚腸道所篩選的特殊乳酸菌，也因功能特殊、稀有且確效，已取得發明專利(發明第 I433651 號專利)，藉由如此適合水產動物體質的益生菌種，並以獨創 SYNTEK[®] thorough 菌種優化技術，就菌株的基礎研究、確效到產業化，一步一腳印地不斷深化乳酸菌在各個領域的應用，雖然一路開發過程冗長且艱難，但卻踏實，也成功成為台灣第一家同時擁有適於水產/畜產/植物/人體保健等有效菌株的乳酸菌研發與生產並行的企業，將於今年於南港展覽館舉行的生物科技大展，以「禽畜水產益生菌的獲利方程式」的角度，分別發表敝司開展的畜產或水產專用益生菌株與該商業產品，探討其在田間應用的情形與實際為養殖者帶來的效益評估，時間訂為 7 月 24 日上午 11:00-11:50 在南港展覽館 4 樓 402BC 室，歡迎各位業界先進與有興趣的讀者，蒞臨聆聽或到該展會的南部科學工業園區展區 K916 展位指教。