

飼糧添加二階段混合型發酵飼料原料對生長豬生長性能及免疫性狀之影響⁽¹⁾

黃憲榮⁽²⁾⁽⁴⁾ 王漢昇⁽²⁾ 李秀蘭⁽²⁾ 許晉賓⁽²⁾ 王治華⁽³⁾ 林正鏞⁽²⁾
許岩得⁽⁴⁾ 翁博群⁽⁵⁾ 陳國隆⁽⁶⁾⁽⁷⁾

收件日期：103 年 5 月 21 日；接受日期：103 年 10 月 1 日

摘 要

本試驗旨在探討飼糧添加二階段混合型益生菌發酵飼料原料，對高畜雜交黑豬生長期之生長及免疫性狀之影響。第一階段利用對蛋白質能力較好的枯草桿菌 (N21)，將飼料進行分解後，於第二階段使用產酸能力較好的乳酸菌 (L12) 進行發酵。試驗選用 64 頭平均體重 27.71 ± 1.26 kg 之杜洛克 (D, ♀) × 高畜黑豬 (K, ♂) 雜交肉豬，逢機分置於 4 處理組，即飼糧中 5% 魚粉組 (對照組)，與 5、10 及 15% 發酵飼料原料組。每處理 4 重複，每重複 4 頭，閩公豬及女豬各半，飼料及飼料等蛋白質及等代謝能 (CP 18.0%、ME 3,265 kcal/kg) 飼糧，試驗為期 9 週，飼料及飲水任食。試驗結果顯示，5 及 10% 發酵飼料原料組與 5% 魚粉組之三組間之每隻日飼料採食量及飼料轉換率無顯著差異。但飼糧添加至 15% 發酵飼料原料，其日增重顯著較其他各處理組低 ($P < 0.05$)。5 及 10% 發酵飼料原料組血液中之干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、促裂原脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 與伴刀豆球蛋白 (concanavalin A, con A) 濃度及氧爆 (oxygen burst) 作用顯著較 5% 魚粉組高 ($P < 0.05$)。而吞噬作用 (phagocytosis) 於各處理組間則無顯著影響。5 及 10% 發酵飼料原料組之 IgA 力價顯著較 5% 魚粉組高 ($P < 0.05$)；IgG 力價，以 10% 發酵飼料原料組顯著較 5% 魚粉組及 15% 發酵飼料原料組高 ($P < 0.05$)。綜上所述，在生長豬飼糧中添加 5% 二階段發酵飼料原料組能取代 5% 魚粉，獲得相近的生長性能及較佳免疫反應。

關鍵詞：生長豬、生長、免疫、發酵飼料。

緒 言

發酵技術應用於動物飼料已盛行多年 (Scholten, 2001; Boguhn *et al.*, 2006)。利用微生物發酵所產生的角蛋白酶可以改變角蛋白結構，促進角蛋白降解，微生物發酵產品中富含對動物有利的可利用胺基酸 (張, 2009)。利用發酵技術，其生產成本低且效率高能取代抗生素，提高飼料利用效率及營養價值進而促進動物成長，且其動物產品能符合衛生安全的目的 (Lee and Yu, 2013)。Patterson and Burkholder (2003) 指出家畜禽方面，主要的益生菌菌株以枯草桿菌屬 (*Bacillus*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、酵母菌 (*Saccharomyces*) 及乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 較常當益生菌使用。乳酸桿菌和枯草芽孢桿菌已於各種家畜作為益生菌，因此試驗選定為共生細菌代表。枯草芽孢桿菌是兼性菌，有很強的抑菌特性及蛋白質分解能力，能為動物體提供多種維生素、消化酶等營養物質，能自然棲息於土壤，能單獨或聯合乳酸菌及酵母成益生菌 (Hong *et al.*, 2005)。且可在腸道消耗游離氧 (free oxygen) 及增強原有乳酸桿菌的生長能力 (Kaur *et al.*, 2002)。Chen *et al.*

(1) 行政院農業委會畜產試驗所研究報告第 2158 號。

(2) 行政院農業委會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委會畜產試驗所。

(4) 國立屏東科技大學生物資源研究所系。

(5) 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系。

(6) 國立嘉義大學動物科學系。

(7) 通訊作者，E-mail：ckl@mail.ncyu.edu.tw。

(2009) 以 *Bacillus subtilis natto* + *Saccharomyces cerevisiae* 二階段混合發酵飼料原料可顯著改善雞隻體增重，並證明並非由於水分、益生菌粉或單一菌種發酵所致，並須經過二階段發酵才有此效果。游 (2009) 等比較發現 FBL (fermented Bac + Lac) 組對肉雞之體重及增重效果，顯著較 FBS (fermented Bac + Sac) 組效果佳，且經乾燥後仍可促進雞隻體增重及改善飼料效率，並可改善骨骼性狀，此意味顯示本乾燥發酵試驗確實有改善羽毛粉在動物之飼料利用性及生物價值品質，而具有成為商業飼糧之潛力。

在膳食中草藥添加在發酵液中顯示其枯草桿菌菌株在微氧環境較能快速的生長，在試管消化過程中較能提供足夠且穩定的生菌數 (陳, 2009)。在厭氧環境下其代謝的過程中，可分泌營養物質及消化酵素 (具產蛋白酶能力)，促進宿主對營養之吸收利用，更可調節其免疫系統，達到幫助宿主改善腸道菌群平衡免受病原侵襲及生長性能之功用 (Steiner, 2006)。其孢子可在空腸和迴腸發芽有其重大意義，因能在空腸和迴腸發芽生長達到顯著數量 (Casula and Cutting, 2002)，並誘導促炎性細胞激素 (proinflammatory cytokine) 的介白素 1 (interleukin 1, IL-1)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及 Th1 細胞激素表現，其量的增加能刺激周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 產生干擾素- γ (IFN- γ)，強化吞噬能力引起發炎反應，並具趨化能力能吸引遠處白血球到發炎的位置，阻止腫瘤發生和病毒複製 (Duc *et al.*, 2004)。Th1 淋巴細胞，其主要的執行的細胞因子是干擾素- γ ，能激活抗原提呈細胞，通過上調轉錄因子 T-bet 而促進 I 型輔助 T 細胞 (Th1 細胞) 的分化，而具有抗病毒、免疫調節及抗腫瘤特性 (Wood and Sawitzki, 2006)。乳酸桿菌的代謝產物中含有大量的有機酸能夠顯著降低胃腸道的 pH 值，抑制致病性細菌的生長 (Dunne *et al.*, 2001)。Patrascanu *et al.* (2011) 指出乳酸菌 (*Lactobacillus sporogenes*) 所產生的乳酸及醋酸能降低腸道之 pH 值，抑制致病菌的生長；且可些微增加白血球數目及顯著增加血清球蛋白、免疫球蛋白，刺激動物體免疫系統，並提高免疫力及降低膽固醇含量。而 Takahashi *et al.* (1998) 研究也顯示，乳酸菌細胞質的成分可以使培耶氏斑 (peyer's patch) 產生 IgA，與活菌體造成的免疫相似。Aattouri *et al.* (2002) 指出飼料乳酸菌益生菌可以增加腸道相關淋巴組織中免疫球蛋白的產生，並且可以調節培耶氏斑中免疫相關細胞的數量及活性。

目前，對於益生菌之研究在於得以調整體內的菌叢，提高有益微生物來取代有害微生物，使其可以改變宿主某部分體內之菌叢 (藉由培植或菌落繁殖)，進而產生有益宿主的效果，而益生菌之間的相互作用研究是值得探討的。Hosoi *et al.* (2000) 指出枯草桿菌因能生產過氧化氫酶 (catalase) 及枯草桿菌素 (subtilisin) 進而提升乳酸菌種生長及生存能力。Kaur *et al.* (2002) 指出兼性厭氧菌枯草桿菌能消耗小腸中游離氧及增強固有的乳酸菌之成長。Deng *et al.* (2012) 指出，混合唾液乳酸桿菌 *BJ* 與枯草桿菌 *RJGP16* 兩種益生菌 (2.5×10^9 CFU/ml *RJGP16* and 2.5×10^9 CFU/ml *BJ*) 添加於飼糧中，能刺激樹突細胞增加下游 T 細胞分泌 IFN- γ ，同時促進 TLR2 (Toll-like receptor 2) 表現及增加 IgA 分泌量，提高腸道粘膜之免疫能力。

NRC (1988) 指出水解羽毛粉之飼料營養組成可利用率僅 40%。此乃因羽毛粉之蛋白質組成主要為角蛋白，不易被動物消化酶所分解利用，如欲提高其分解能力需角蛋白酶，而添加大豆粕於培養液可誘導角蛋白酶的生產 (Brandelli and Riffel, 2005)。若能利用大豆粕與羽毛粉結合予以枯草桿菌 (N21) 與乳酸桿菌 (L12) 二階段發酵應用在豬隻飼糧中，因未見於相關文獻討論，因此此研究內容目的為將大豆粕與羽毛粉結合調整成約 CP 60% (60:40) 之混合後為原料，以自行培養並確認效果之枯草芽孢桿菌和乳酸桿菌菌株作為共生細菌，進行二階段混合型益生菌固態發酵，以生產新型式的蛋白質飼料原料，因原料中含大量益生菌，並含酵素、代謝產物及重組產物，可改善適口性及提高動物之利用性，具提高飼料採食量、促進生長與改善飼料利用效率及提高免疫反應之潛能，若能於動物試驗證明其效果及具經濟效益，未來可廣泛應用添加於豬等各種畜禽中，不僅可協助國內屠宰雞隻羽毛能再生利用處理，亦可作為國產優質飼料原料。

材料與方法

I. 發酵飼料原料之製備

本試驗參考 Chen *et al.* (2009) 之方法。先調整發酵基質之水分，並以 121°C 滅菌 30 分鐘，靜置冷卻後進行發酵。發酵分為二階段：第一段發酵為原料中加入與嘉義大學合作篩選研發 *Bacillus subtilis natto* (N21) 菌粉，並調整發酵原料之菌數至 10^6 CFU/g feed，外加水分 10%，總水分 21%，於 37°C 下好氧發酵 2 天。第二段發酵，於第一階段發酵原料中添加與嘉義大學合作篩選研發 *Lactobacillus*

sporogenes (L12) 菌粉，使經第一階段發酵之原料含 L12 菌數達 10^6 CFU/g feed，外加水分 13%，總水分 34%，於 25 – 35°C 發酵 3 天，發酵完畢後，將發酵飼料於 60°C 以下進行乾燥至含水分 12% 以下，即為本試驗之發酵飼料原料，其水分含量 $11.5 \pm 0.4\%$ 。本試驗之發酵終點菌數量 (bacteria analysis, log CFU/g feed)，其 N21 菌為 6.30 ± 0.20 單位及 L12 菌可達 9.83 ± 0.33 單位。

II. 發酵飼料原料測定項目及分析

發酵豆粕羽毛粉混合於基礎飼糧前、後分別採集樣本，每組飼料隨機採樣 5 個部位約 100 g，裝入封口袋中混合後，以均質機磨成細粉後，放入 -20°C 凍存待測。一般成分分析參考 AOAC (2000) 之方法，進行水分、灰分、粗蛋白質、鈣及磷之分析。胺基酸之分析為將精測氮含量 10 mg 樣品，其樣品中的蛋白質成分水解為胺基酸，採用離子交換層析法進行分離，分離後的成分以 ninhydrin 進行後段衍生反應，採用 Hitachi L-8900 (Tokyo, Japan) 儀器進行 440 nm 及 570 nm 波長讀值偵測，以分析樣品中胺基酸組成。

III. 動物飼養管理及試驗設計

選取 64 頭杜洛克 (D, ♀) × 高畜黑豬 (K, ♂) 雜交種 (DK) 進行試驗，最初平均體重 27.71 ± 1.26 kg，逢機分置於 4 處理組，即飼糧中 5% 魚粉組 (對照組)，與 5、10% 及 15% 發酵飼料原料組。每處理 4 重複，每重複 4 隻，閹公豬及女豬各半，試驗期 9 週。飼糧以玉米—大豆粕為基礎飼糧原料，含粗蛋白質 18.0% 及代謝能 3,265 kcal/kg。飼糧及飲水採任食。豬隻飼養於 3.84 m × 2.56 m 之欄位中。飼料配方如表 1。

表 1. 試驗飼糧組成

Table 1. Composition of experiment diets (as-fed basis)

Ingredients, %	Fermented feedstuff, %			
	0	5	10	15
Yellow corn	72.86	70.59	72.07	73.53
Soybean meal, CP 44%	5.50	5.50	5.50	5.50
Soybean meal dehulled, solvent	15.00	15.70	8.80	2.00
Fish meal, CP 65%	5.00	0.00	0.00	0.00
Fermented feedstuff	0.00	5.00	10.00	15.00
Soybean oil	0.13	0.78	1.03	1.25
Limstone	0.74	0.81	0.80	0.80
Dicalcium phosphate	0.22	0.90	0.97	0.99
Choline chloride, 50%	0.10	0.10	0.10	0.10
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamin premix ¹	0.10	0.10	0.10	0.10
Mineral premix ²	0.10	0.10	0.10	0.10
L-LYS • HCL (78%)	0.00	0.11	0.20	0.29
DL-Met	0.00	0.06	0.08	0.09
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Analysed chemical components (%)				
CP, %	17.89	17.97	17.92	17.86
Ca, %	0.58	0.61	0.63	0.64
Total phosphorous, %	0.49	0.50	0.52	0.51
Lys, %	1.01	1.03	1.02	0.98
Met, %	0.30	0.32	0.33	0.31

¹ Vitamin supplied the following per kilogram of premix: vitamin A, 5000 IU ; vitamin D₃, 1500 IU ; vitamin E, 40 mg ; vitamin K, 3 mg ; vitamin B₁, 2.6 mg ; vitamin B₁₂, 4 mg ; niacin, 35 mg ; pantothenic acid, 23 mg.

² Mineral supplied the following per kilogram of premix: Fe (FeSO₄ • 7H₂O , 20.09% Fe), 217 mg; Cu (CuSO₄ • 5H₂O , 25.45% Cu), 125 mg; Mn (MnSO₄ • H₂O , 32.49% Mn), 40 mg; Zn (ZnSO₄ , 80.35% Zn), 110 mg; Se (NaSeO₃ , 45.56% Se), 0.36 mg; Co (CoSO₄ • H₂O , 32% Co), 0.7 mg.

IV. 生長性狀

試驗開始後，每週進行飼料採食量秤量，並分別於第三、六及九週進行體重秤量，並計算其增重及飼料轉換率。

V. 血清免疫球蛋白分析

血清中免疫球蛋白 IgA、IgG 及 IgM 之測定皆以酵素鍵結免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，輔以免疫球蛋白分析套組 (Bethyl Lab. Inc., USA) 進行含量分析。ELISA 依據螢光抗體發展出來之方法，將酵素連接到抗原或抗體分子上來偵測抗原抗體反應，依其呈色強弱來表示之。以測定抗體為例，將抗原連接到一固定物上，先加檢體後，再加酵素連接的免疫球蛋白，將測得之酵素活性即代表抗體含量之高低。

VI. 吞噬作用測定

取 10 ml 新鮮血液，置於 100 單位的肝素 (heparin) 中混合。取全血 50 μ l 加入 10 μ l 的 *E. coli*-FITC 混和 (phagocyte : *E. coli* = 1 : 50) 後，置於 37°C 水溶槽培養 10 分鐘後，立即加入 50 μ l 的淬鍊溶液，震盪混和樣品，後各管加入 3 ml 的清洗液，混和樣品和離心 (250 g, 5 分鐘, 4°C)，後去除上清液，再加入 3 ml 清洗液重新懸浮沉澱物顆粒，混和樣品和離心 (250 g, 5 分鐘, 4°C)，後去除上清液，之後加入已回溫到室溫的裂解液 2 ml 重新懸浮沉澱物顆粒，混和後在室溫下培養 20 分鐘，後離心 (250 g, 5 分鐘, 4°C)，去除上清液，再加入 3 ml 的清洗液重新懸浮沉澱物顆粒，混和樣品和離心 (250 g, 5 分鐘, 4°C)，後去除上清液，最後加入 1 ml HBSS 的懸浮沉澱物顆粒，最後用螢光活性細胞分類計 (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter) 了解嗜中性白血球之細胞吞噬作用的螢光改變情形。

VII. 氧爆作用測定

取 10 ml 新鮮血液，置於 100 單位的肝素混合。取全血 50 μ l，加入 10 μ l 的 *E. coli* 混和 (phagocyte : *E. coli* = 1 : 50)，之後放入水溶槽 (37°C, 10 分鐘) 培養，後同時取出試管，分別加入 10 μ l 的沉澱物溶液到各管，震盪混和樣品，置於 37°C 水溶槽培養 10 分鐘，之後同時取出所有的試管，加入已回溫到室溫的裂解液 2 ml，混和後在室溫下培養 20 分鐘，後離心 (250 g, 5 分鐘, 4°C)，去除上清液，再加入 3 ml 的懸浮沉澱物顆粒，混和樣品和離心 (250 g, 5 分鐘, 4°C)，後去除上清液，最後加入 1 ml HBSS 懸浮沉澱物顆粒，最後用螢光活性細胞分類計 (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter) 了解嗜中性白血球之細胞氧爆作用的螢光改變情形。

VIII. 淋巴細胞增生反應測定

周邊血液單核球 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 與消化道相關淋巴組織淋巴細胞之增生能力，係參考 Boyum (1968) 和 Schultz and Adams (1978) 之方法進行淋巴細胞之分離與純化，主要為測定 1×10^5 血球對 5 μ g/mL 伴刀豆球蛋白 (concanavalin A, con A)、10 μ g/mL 植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA)、5 μ g/mL 商陸分裂素裂殖原 (pokeweed mitogen, PWM) 及含 10% 胎牛血清之 RPMI-1640 培養液 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 共同培養 72 h 後，添加 0.5 μ Ci/well 3H-胸腺嘧啶 (specific activity 50 Ci/mmol, Moravsek Biochemicals, Brea, CA) 共同培養 18 h 後，測定各處理組之 cpm 值與對照組未經裂殖原刺激之 cpm 值之比值，以計算其增生指數。

IX. 干擾素 - γ 測定

先將標準液作連續稀釋 (1000、400、100、64、25.6、0 pg/ml)，接著用 50 μ l 生物素基化抗體加入每個孔中，再加入 50 μ l 標準液和所要測的樣品，在室溫下搖晃 2 個小時，接著浸洗 3 次，然後加入 100 μ l streptavidin-HRP，在室溫下搖晃 30 分鐘，接著浸洗 3 次，加入受質 100 μ l TMB (tetramethyl benzidine)，在室溫下避光搖晃 30 分鐘，加入 100 μ l 終止液 (40 mM Tris-HCl、pH 7.4 與 10 mM EDTA) 來終止反應，最後使用儀器測量 450 nm minus 550 nm 的吸光值。

X. 統計分析

試驗獲得之資料，利用統計分析系統 (SAS, 2002)，以一般線性模式程序 (general linear model Procedure) 進行變方分析，並以杜凱氏新多次變域測試 (Tukey's new multiple range test) 比較各組平均值

差異之顯著性。

結果與討論

飼糧中添加二階段混合型益生菌發酵飼料原料於對生長豬生長性能之影響列於表 2。全期生長試驗顯示，試驗結果顯示，5 及 10% 發酵飼料原料組與 5% 魚粉組之三組間之活體重、隻日飼料採食量及飼料轉換率無顯著差異。但飼糧添加至 15% 發酵飼料原料，其日增重顯著較其他各處理組低 ($P < 0.05$)。隻日飼料採食量顯著較 10% 發酵飼料原料組低 ($P < 0.05$)。飼料轉換率顯著較 5% 發酵飼料原料組低 ($P < 0.05$)。由此可知，全期以餵飼 5% 發酵飼料原料組之生長性能較 5% 魚粉組可改善飼料效率 4.0%，顯示該發酵飼料原料具有商業開發潛力。

表 2. 飼糧添加二階段混合型益生菌發酵飼料對生長豬生長性狀之影響

Table 2. Effects of diets supplemented with two stage mix-probiotics fermented feedstuff on growth performance of growing pigs

Item	fermented feedstuff, %				SEM
	0	5	10	15	
Initial BW, kg	27.82	27.59	27.81	27.62	1.08
0 to 21 d					
21 d BW, kg	39.08 ^{ab}	38.12 ^{ab}	40.09 ^a	36.45 ^b	1.55
Average daily gain, kg	0.54 ^b	0.50 ^{ab}	0.59 ^a	0.42 ^b	0.06
Average daily feed intake, kg	1.33	1.31	1.32	1.32	0.04
FCR*	2.46 ^b	2.62 ^{ab}	2.24 ^b	3.14 ^a	0.38
22 to 42 d					
42 d BW, kg	49.58 ^{ab}	49.32 ^{ab}	51.79 ^a	46.59 ^b	1.74
ADG, kg	0.50	0.53	0.56	0.48	0.05
ADFI, kg	1.56 ^a	1.50 ^{ab}	1.58 ^a	1.46 ^b	0.05
FCR*	3.12	2.83	2.82	3.04	0.39
43 to 63 d wk					
63 d BW, kg	62.28 ^{ab}	62.80 ^a	63.78 ^a	58.58 ^b	2.00
ADG, kg	0.61	0.64	0.57	0.57	0.06
ADFI, kg	1.77 ^a	1.76 ^{ab}	1.85 ^a	1.66 ^b	0.05
FCR*	2.90 ^{ab}	2.75 ^b	3.19 ^a	2.91 ^{ab}	0.40
Overall (0 to 63 d)					
ADG, kg	0.55 ^a	0.56 ^a	0.57 ^a	0.49 ^b	0.03
ADFI, kg	1.55 ^{ab}	1.52 ^{ab}	1.59 ^a	1.48 ^b	0.04
FCR*	2.82 ^{ab}	2.71 ^b	2.79 ^{ab}	3.02 ^a	0.13

FM: Fish meal.

The data are given as mean. n = 16.

*FCR: Feed conversion ratio, kg of feed disappearance per kg of gain.

^{a, b, c} Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Jonsson and Conway (1992) 指出，添加枯草桿菌於飼糧中能提高豬隻消化道內乳酸量與消化率，及抑制未發芽種子中（如大豆）之植酸 (phytic acid)，對鈣磷吸收及骨骼形成的干擾，進而改善生長性能及健康情形。Pollmann *et al.* (1980) 指出，添加乳酸菌於飼糧中，可使第二階段之乳酸菌發酵，利用半乳糖或蔗糖為基質進行增殖，並提高豬隻小腸內蔗糖酶、乳糖酶和三肽酶的活性 (Collington *et al.*, 1990)，及產生較高的乳酸量，且增加分子較小之蛋白質含量比例，使其在動物體內較易被消化吸收利用 (Chen *et al.*,

2010)。Hentges (1992) 亦指稱，枯草桿菌能產生有益的酵素如 α -澱粉酶、纖維素酶、葡聚糖酶、果聚糖酶、麥芽糖酶、阿拉伯糖酶、 β -葡聚糖酶、鹼性蛋白酶及中性蛋白酶。Chen *et al.* (2009) 使用 *B. subtilis* natto N21+*L. sporogens* L12 製成發酵飼料餵飼雞隻發現，經過發酵處理後之飼料處於活化狀態，可使大分子分解或轉化成較小的分子，而更容易為動物吸收且微生物菌會分泌一些蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶，可改善雞隻蛋白質利用率進而有利於雞隻生長。Chen *et al.* (2010) 指出，發酵飼料之乾燥溫度範圍設定在 50 到 60°C 之間，能避免產生梅納反應 (Maillard reaction)，同時於乾燥處理過程中，能增加發酵飼料之適口性，包括嗅覺和味覺。但本試驗添加發酵飼料至 15%，其日採食量、日增重及飼料轉換率於試驗第一階段即顯著變差，且持續全期。作者認為可能原因有三點，第一點為水解羽毛粉為高蛋白發酵基質，其所提供之碳源比例甚低，進而限制其發酵程度，而使菌種分解羽毛粉之分解率至 72 小時，最高為 77.3%，尚未較魚粉好，其可能為限制改善其羽毛粉營養價值之功效 (雷，2013)。再來，自表 1. 知飼糧組成中 5% 發酵飼料原料組所含 Lysine 含量 1.03% 為最高量，而 15% 發酵飼料組之含量 0.98%，Lysine/ME 比 (g/Mcal) 分別為 3.15 及 3.00，由於 15% 發酵飼料組之 Lysine/ME 比值較低，其可能造成 15% 發酵飼料組之豬隻生長性能表現較差。Smith *et al.* (1999) 指出豬隻生長期提高 Lysine : calorie 比，會改善日增重及飼料攝食量。最後為發酵試驗水分含量之前兩天為 21%，後三天增至為有 34%，雖最終有烘乾至約 11.3%，但飼料具有濕腐味，其可能為影響飼料採食量及營養價值之原因。

使用二階段混合型益生菌發酵飼料原料於飼糧中對免疫球蛋白抗體產量之影響列於表 3。結果顯示，IgA 抗體產量以 5 及 10% 發酵飼料組顯著較 5% 魚粉組及 15% 發酵飼料原料組高 ($P < 0.05$)。IgG 抗體產量以 10% 發酵飼料原料組顯著較 5% 魚粉組及 15% 發酵飼料原料組高 ($P < 0.05$)。IgM 抗體產量於各處理組間無顯著差異。

Lessard and Brisson (1987) 指出飼糧含 0.1% *Lactobacillus* fermentation product (LFP) 能刺激離乳仔豬生長、增加飼料攝食量及增加 IgG 血清濃度，其會促進生長表現在於發酵代謝的過程中，可改善腸道菌群數量及平衡，提高免疫力保護黏膜組織及防止細菌或病毒的侵犯達到健康情況改善所致。Shu and Gill (2002) 指出 *L. rhamnosus* 可以增加大鼠腸道產生拮抗大腸桿菌的 IgA 濃度與吞噬性白血球的活性，進而降低大腸桿菌的感染。Steiner (2006) 指出，給予動物口服益生菌，可增加免疫球蛋白及培耶氏斑細胞之產生。Zhang *et al.* (2008) 亦指出口服乳酸菌可顯著提升豬隻腸道 IgA 活性及 IgG 的力價。無菌鼠 (gnotobiotic rat) 於小腸及盲腸部位，以乳酸桿菌與大腸桿菌結合 (*L. plantarum* + *E. coli*) 比單獨大腸桿菌 (*E. coli*) 定植，其一週後發現血清中有顯著較高 IgA 水平及對抗 *E. coli* 之稍高 IgM 和 IgA 抗體含量 (Herias *et al.*, 1999)。Lee and Salminen (1995) 的報告指出飼糧中添加 *B. globosumrum* 及 *L. acidophilus* 能激發豬隻免疫系統，而增加血清中 IgG 的濃度。添加以乳酸桿菌 (*L. plantarum* 或 *L. plantarum* + *L. paracasei*) 發酵之液態飼料，可顯著提高血清中 IgM 及 IgG 之抗體力價，及脾臟細胞增生 (Koenen *et al.*, 2004)。本試驗飼糧中 5% 發酵飼料較 5% 魚粉組，明顯提高血清中免疫球蛋白 IgA 抗體產量。而添加至 10% 其 IgA 及 IgG 抗體產量更加顯著提升。

表 3. 飼糧添加二階段混合方式發酵飼料對血清中免疫球蛋白抗體產量之影響

Table 3. Effects of diets supplemented with two stage mix-probiotics fermented feedstuff on serum immunoglobulin antibody production of growing pigs

Item	fermented feedstuff, %				SEM
	0	5	10	15	
	-----mg/dl-----				
IgA	1.45 ^b	1.89 ^a	1.92 ^a	1.48 ^b	0.16
IgM	1.77	1.84	1.87	1.81	0.21
IgG	9.95 ^b	11.01 ^{ab}	11.79 ^a	10.08 ^b	1.11

FM: Fish meal.

The data are given as mean. n = 16.

Ig: Immunoglobulin.

^{a, b} Means in the same row with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

使用二階段混合型益生菌發酵飼料原料於飼糧中對豬隻血液之噬菌作用 (phagocytosis) 和氧爆作用 (oxygen burst) 反應之影響列於表 4。結果顯示，血液之噬菌作用於各處理組間無顯著差異，但添加發酵飼料原料有提高情形。在發炎反應中，噬菌細胞中的多核形白血球扮演著一個重要的角色。發炎後啟動先天免疫機制 (innate immune mechanism) 做為第一道的防禦，這樣的反應會影響血液中的白血球活化，進而藉由趨化作用 (chemotaxis) 噬菌細胞到達發炎部位之周邊血管，白血球會穿過血管到達發炎組織處，來進行噬菌作用和氧爆作用去達成毒殺細菌的作用 (Goldsby *et al.*, 2002)。本試驗之吞噬作用於添加發酵飼料原料稍有提高，也就是能刺激發炎反應的活化 (activation of inflammatory response)，結合到免疫細胞的專一補體受器上來啟動免疫反應和免疫調節分子的釋放，且增加嗜中性白血球或巨噬細胞釋出顆粒進行吞噬。枯草芽孢桿菌能有效刺激巨噬細胞啟動和激活基因表達，其蠟樣芽孢桿菌變種 *toyoi* (*B. cereus var. toyoi*) 可能會刺激腸粘膜，激活粘膜免疫系統 (Duc le *et al.*, 2004)。

血液之氧爆作用以 5% 及 10% 發酵飼料原料處理組顯著較 5% 魚粉處理組高 ($P < 0.05$)。意即 5 及 10% 發酵飼料原料組能增加多核形白血球對大腸桿菌的呼吸氧爆的作用，提升顆粒性球細胞氧爆反應，增加嗜中性白血球與內皮細胞的黏著 (adhesion) 作用及補體活化放出的 C3a、C5a 能夠讓 mast cell 放出組織胺，使更多白血球參與發炎反應，來吞噬外來入侵病菌進行毒殺的效果。Cha *et al.* (2013) 於飼糧添加 0.5% *Bacillus spp* (1×10^{10} CFU/ g) 能顯著增加呼吸氧爆和超氧化物歧化酶活動及改善飼料效率。

表 4. 飼糧添加二階段混合方式發酵飼料對生長豬血清中噬菌作用和氧爆作用之影響

Table 4. Effects of diets supplemented with two stage mix-probiotics fermented feedstuff on serum phagocytosis and oxygen burst of growing pigs

Item	fermented feedstuff, %				SEM
	0	5	10	15	
	-----mean fluorescence intensity-----				
Phagocytosis	45.63	45.11	48.64	47.41	2.98
Oxygen burst	140.76 ^b	182.96 ^a	190.85 ^a	169.42a ^b	7.32

FM: Fish meal.

The data are given as mean. n = 16.

^{a, b} Means with the same letter are not significantly different ($P < 0.05$).

使用二階段混合方式發酵飼料原料於飼糧中對淋巴細胞增生反應之影響列於表 5。淋巴細胞增生反應所添加之不同促裂原，如 ConA 具有促進 T 細胞活化之功能。可經由 T 細胞膜上專一性受體 (concanavalin A receptor) 活化 T 細胞，提高細胞內 cAMP 濃度及開啓鈣離子通道，以增加細胞內 Ca^{++} 濃度，進而促進生長因子的產生，加快 T 細胞的增生，但 ConA 不會使 B 細胞釋放專一性抗體或產生記憶細胞 (memory cell)，因此只會引起 T 細胞的發炎反應 (Whitesell *et al.*, 1977)。LPS 是所有革蘭氏陰性細菌在其外膜上 (outer membrane) 共有的醣脂質 (glycolipid) 成分為刺激 B 細胞之裂殖原，其誘發生物性反應主要為發炎反應。當體內免疫系統受到微生物本身或其分泌物質 (例如：LPS 或 lipoteichoic acid 等) 的刺激時，會釋放出許多的細胞激素 (cytokine)、腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干擾素 (interferon- γ , IFN- γ)、脂質代謝產物 (前列腺素) 及一氧化氮產生，並且進一步活化補體系統 (complement system)、白血球和血管內皮細胞等，產生不同的免疫反應，以抵抗外來微生物的侵襲 (Cohen, 2002)。PMA 為 PKC (蛋白激酶 C) 的激活物，PKC 則可激活下游眾多的蛋白激酶的磷酸化，形成級聯反應，導致許多蛋白的表達，進而引起 T 細胞的活化。在細胞內 PKC 可被 DAG (二脂酰甘油) 和 Ca^{2+} 的共同作用而激活，因此在 Ionomycin (Ca^{2+} 的轉運劑，可將細胞器內的 Ca^{2+} 轉運至胞漿內) 的參與下，T 細胞內 PKC 可被進一步激活。可見，PMA 與 Ionomycin 協同活化 T 細胞 (Chatila *et al.*, 1989)。結果顯示，IFN- γ 濃度與內毒素及 ConA 淋巴細胞增生反應，以 5 及 10% 發酵飼料原料組顯著 ($P < 0.05$) 較 5% 魚粉組高。PMA/Ionomycin 於各組間並無顯著差異。意即飼糧添加至 5% 發酵飼料原料，即會顯著 ($P < 0.05$) 增強促裂原脂多醣或 ConA 誘發的淋巴球增生反應及刺激 IFN- γ 之分泌，而 IFN- γ 是可抑制腫瘤及參與免疫反應。乳酸菌近年來被廣泛添加在食品，研究證實微生物細胞膜表面含有脂多醣，其會刺激抗原呈現細胞增生，抗原呈現細胞會活化 T 細胞，並分泌

IFN- γ 、IL-2 和 IL-10 分泌，IL-10 分泌會直接刺激 B cell 產生 IgG (Gill *et al.*, 2000)。高水平之 IL-6 能顯著藉由脂多醣刺激 IgA⁺ B 細胞，進而增進 IgA 分泌，且腸上皮細胞 (IEC) 可能是 IL-6 之重要來源，其能加強局部黏膜 IgA⁺ B 細胞反應。王 (2012) 亦指出雞隻以益生菌 *Lactobacillus acidophilus* (10^6 CFU/g feed) 處理可顯著提昇 PBMC 釋放 NO 之能力及提昇脂多醣、刀豆球蛋白 A、干擾素 - γ 與脾臟細胞之增生反應。

表 5. 飼糧添加二階段混合方式發酵飼料對生長豬血清中淋巴細胞增生及干擾素 - γ 之影響

Table 5. Effects of diets supplemented with two stage mix-probiotics fermented feedstuff on serum peripheral blood lymphocyte and IFN- γ in growing pigs

Mitogens	fermented feedstuff, %				SEM
	0	5	10	15	
	------(pg/ml)-----				
ConA	241.89 ^b	309.11 ^a	336.56 ^a	255.17 ^b	19.23
LPS	230.68 ^b	382.61 ^a	367.90 ^a	270.90 ^b	18.23
PMA/Ionomycin	424.52	463.41	476.62	443.23	28.28
IFN- γ	125.96 ^b	145.70 ^a	152.75 ^a	135.24 ^{ab}	3.49

FM: Fish meal.

The data are given as mean. n = 16.

^{a, b} Means with the same letter in the row are not significantly different ($P < 0.05$).

綜合本試驗結果發現，生長期豬隻飼糧中，添加 5% 二階段固態發酵乾燥之發酵飼料原料 (60% 大豆粕 + 40% 水解羽毛粉)，即能獲得 5% 魚粉組之生長性能及較佳免疫反應。

參考文獻

- 王彥智。2012。複合乳酸桿菌對白肉雞與離乳仔豬生長、腸道性狀與免疫力之影響。碩士論文。國立中興大學動物科學系。臺中市。
- 游上輝。2009。乾燥混合型益生菌發酵飼料對白肉雞生長性狀及骨骼性狀之影響。國立嘉義大學動物科學系。碩士論文。嘉義市。
- 雷大德。2013。篩選羽毛分解菌進行二階段混合型發酵羽毛粉促進肉雞生長之探討。碩士論文，國立嘉義大學動物科學系。嘉義市。
- 陳欽榮。2009。飼料用益生菌 (*Bacillus subtilis*) 之發酵條件與菌株探討。碩士論文，朝陽科技大學應用化學系。臺中市。
- 張日俊。2009。現代飼料生物技術。化學工業出版社。pp.156-157。
- Aattouri, N., M. Bouras, D. Tome, A. Marcos and D. Lemonnier. 2002. Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- γ production. *Br. J. Nutr.* 87: 367-373.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th edition. Association of Official Analytical Chemistry. Maryland, USA.
- Boguhn, J., H. Kluth and M. Rodehutschord. 2006. Effect of total mixed ration composition on fermentation and efficiency of ruminal microbial crude protein synthesis in vitro. *J. Dairy Sci.* 89: 1580-1591.
- Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97: 7, Suppl.
- Brandelli, A. and A. Riffel. 2005. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. *Electronic J. Biotechnol.* 8: 35-42.
- Casula, G. and S. M. Cutting. 2002. *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2344-2352.
- Cha, J. H., S. Rahimnejad, S. Y. Yang, K. W. Kim and K. J. Lee. 2013. Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys*

- olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additive. *Aquaculture* 402-403: 50-57.
- Chatila, T., L. Silverman, R. Miller and R. Geha. 1989. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol.* 143: 1283-1289.
- Chen, C. C., Y. C. Shih, P. W. S. Chiou and B. Yu. 2010. Evaluating nutritional quality of single stage- and two stage-fermented soybean meal. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23: 598-606.
- Chen, K. L., W. L. Kho, C. F. Yung, C. W. Hsieh and B. C. Weng. 2009. Effects of *Bacillus subtilis natto* and *Saccharomyces cerevisiae* mixture fermented feed on the growth performance enhancement of broilers. *Poult. Sci.* 88: 309-315.
- Cohen, J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885-891.
- Collington, G. K., D. S. Parker and D. G. Armstrong. 1990. The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. *Br. J. Nutr.* 64: 59-70.
- Deng, J., Y. Li, J. Zhang and Q. Yang. 2012. Co-administration of *Bacillus subtilis RJGP16* and *Lactobacillus salivarius B1* strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. *Res. Vet. Sci.* 94: 62-68.
- Duc, le. H., H. A. Hong, N. Q. Uyen and S. M. Cutting. 2004. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine* 22: 1873-1885.
- Dunne, C., L. O'Mahony, L. Murphy, G. Thornton, D. Morrissey, S. O'Halloran, M. Feeney, S. Flynn, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, G. C. O. Sullivan, F. Shanahan and J. K. Collins. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am. J. Clinical. Nutr.* 73: 386-392.
- Gill, H. S., K. J. Rutherford, J. Prasad and P. K. Gopal. 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* 83: 167-176.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osbourne and J. Kuby. 2002. *Immunology*, W. H. Freeman and Company, Fifth Edition, New York.
- Hentges, D. 1992. Gut flora and disease resistance. In: *Probiotics: The Scientific Basis* (Ed. R. Fuller). Chapman and Hall, London. pp.87-110.
- Herías, M. V., C. Hesse, E. Telemo, T. Midtvedt, L. Å. Hanson and A. E. Wold. 1999. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clin. Exp. Immunol.* 116: 283-290.
- Hong, J., V. D. Berg, M. Schlegel, E. M. Grindlay, J. E. Koenig, X. Laycock and S. Zhao. 2005. X-Ray processing of chaMPlane fields: Methods and initial results for selected anti-galactic center fields. *The Astroph. J.* 635: 907-919.
- Hong, K. J., C. H. Lee and S. W. Kim. 2004. *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improve nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals. *J. Med. Food.* 7: 430-434.
- Hosoi, T., A. Ametani, K. Kiuchi and S. Kaminogawa. 2000. Improved growth and viability of *lactobacilli* in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or subtilisin. *Can. J. Microbiol.* 46: 892-897.
- Jonsson, E. and P. Conway. 1992. Probiotics for pigs. in *Probiotics: The Scientific Basis*. R. Fuller, ed. Chapman and Hall, London, UK. pp.260-316.
- Lee, T. T. and B. Yu. 2013. Application of biologics to feedstuff. *African J. Biotechnol.* 12: 526-530.
- Lee, Y. K. and S. Salminen. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 241-244.
- Lessard, M. and G. J. Brisson. 1987. Effect of a *Lactobacillus* fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 67: 509-516.
- Kaur, I. P., K. Chopra and A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15: 1-9.
- Koenen, M. E., J. Karmer, R. van der Hulst, L. Heres, S. H. Jeurissen and W. J. Boersma. 2004. Immunomodulation by probiotic lactobacilli in layer and meat-type chickens. *Br. Poult. Sci.* 45: 355-366.
- NRC. 1988. *Nutrient Requirements of Swine* (9th Ed.). National Academy Press, Washington, DC.
- Patrascanu, M. E., R. M. Vlagioiu, C. I. Pavel, I. Radoi and C. Vlagioiu. 2011. The impact of probiotic administration on clinical, hematological and biochemical parameters in pregnant sows. *Bul. UASVM, Vet.*

- Med. 68: 240-247.
- Patterson, J. A. and K. M. Burkholder. 2003. Application of probiotics and perbiotics in poultry production. Poul. Sci. 82: 627-631.
- Pollmann, D. S., D. M. Danielson and E. R. Peo Jr. 1980. Effects of microbial feed additives on performance of starter and growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 51: 577-581.
- SAS. Institute. 2002. SAS/STAT User's guide: Statistics. Version 9. 1st ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Scholten, R. 2001. Fermentation of liquid diets for pigs. Ph. D. Diss., Wageningen Univ, Wageningen, Netherlands.
- Schultz, R. D. and L. S. Adams. 1978. Immunologic methods for the detection of humoral and cellular immunity. Vet. Clin. North. Am. 8: 721-753.
- Shu, Q. and H. S. Gill. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 34: 59-64.
- Smith, J. W., II, M. D. Tokach, P. R. O'Quinn, J. L. Nelssen and R. D. Goodband. 1999. Effects of dietary energy density and lysine:calorie ratio on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 77: 3007-3015.
- Steiner, T. 2006. Managing gut health. Natural growth promoters as a key to animal performance. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, M. N. Assa, G. S. Salvesen and J. C. Reed. 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. J. Biol. Chem. 273: 7787-7790.
- Wegmann, T. G and O. Smithies, 1966. A simple hemagglutination system requiring small amounts of red blood cells and antibodies. Transfusion 6: 67-73.
- Whitesell, R. R., R. A. Johnson, H. L. Tarpley and D. M. Regen. 1977. Mitogen -stimulated glucose transport in thymocytes. Possible role of Ca^{++} and antagonism by adenosine 3':5'-monophosphate. J. Cell Biol. 72: 456-469.
- Wood, K. J. and B. Sawitzki. 2006. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. Trends Immunol. 27: 183-187.
- Zhang, B., Y. Guo and Z. Wang. 2008. The modulating effect of β -1,3/1,6-glucan supplementation in the diet on performance and immunological responses of broiler chickens. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21: 237-244.

Effects of dietary inclusion of two stage mix-probiotics fermented feedstuff on growth performances and immune response of growing pigs⁽¹⁾

Hsien-Jung Huang⁽²⁾⁽⁴⁾ Han-Sheng Wang⁽²⁾ Hsiu-Lan Lee⁽²⁾ Chin-Bin Hsu⁽²⁾
Chin-Hua Wang⁽³⁾ Cheng-Yung Lin⁽²⁾ Yan-Der Hsu⁽⁴⁾
Bor-Chun Weng⁽⁵⁾ and Kuo-Lung Chen⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Received: May 21, 2014; Accepted: Oct. 1, 2014

Abstract

The study was conducted to determine the effects of dietary supplementation of two stage fermented feedstuff (TSFF) supplemented on growth performance and immune response of growing Duroc × KHAPS (Kaohsiung Animal Propagation Station) black pigs. *Bacillus subtilis natto* (N21), a selected strain with higher fibrin proteolytic capacity was supplemented at the initial fermentation stage. The specific strain of *Lactobacillus sporogenes* (L12) with higher acidic capacity was added in the following fermentation stage. The raw ingredients used as substrate for the fermentation was a mixture of 60% soybean meal and 40% hydrolyzed feather meal. Four different dietary treatments were formulated into iso-crude protein (CP = 18.0%) and iso-metabolizable energy diets (ME = 3,265 Kcal/Kg). A total of 64 Duroc × KHAPS black pigs with initial body weight of 27.71 ± 1.26 kg were randomly assigned into 4 treatment groups of both genders. Control diet was formulated with 5% fish meal (control group) and treatment groups used to replace fish meal 5, 10 or 15% TSFF. The feeding duration was 9-wks. Our results showed that the feeding, 5-10% TSFF could improve growth performance. The feeding of 15% TSFF showed that the daily feed intake, weight gain and feed conversion ratio became worst ($P < 0.05$). The immunity competence results showed, the 5% and 10% TSFF were significantly higher ($P < 0.05$) than the 5% fish meal and 15% TSFF group on gamma interferon (IFN- γ), secretion, lymphoblastogenesis and oxygen burst activity of granulocytes. There were no significant difference in phagocytosis activity. The 10% TSFF had significantly increased ($P < 0.05$) IgA concentration in comparison with control group and 15% TSFF. The comparisons of IgG level, Furthermore, the 10% TSFF group was significantly higher in IgG level ($P < 0.05$) among treatment groups. In conclusion, the fed 5% TSFF had similar to growth performance and the better immune response than 5% fish meal during the growing stage.

Key words: Growing pigs, Growth, Immune, Fermented feedstuff.

(1) Contribution No. 2158 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, PingTung, Taiwan.

(3) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan.

(4) The Graduate Institute of Biotechnology, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan.

(5) Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan.

(6) The Graduate Institute of Animal Science, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan.

(7) Corresponding author, E-mail: ckl@mail.ncyu.edu.tw.

