

飼糧添加二階段混合型益生菌發酵飼料 對肥育豬免疫反應之影響⁽¹⁾

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

收件日期：104 年 7 月 15 日；接受日期：105 年 4 月 26 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對高畜雜交黑豬肥育期免疫性狀之影響。發酵飼料第一階段以對蛋白質分解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 80 頭平均體重 78.10 ± 0.23 kg 之杜洛克 (D, ♀) × 高畜黑豬 (K, ♂) 雜交肉豬，隨機分置於 4 處理組 (每處理 5 重複，每重複 4 隻，閹公豬及女豬各半)，餵飼等粗蛋白質及等代謝能 (CP 15.5%、ME 3,265 kcal/kg) 之平衡飼糧，即飼糧中添加 3% 魚粉組 (對照組) 與添加 0、2.5 及 5% 發酵飼料組。試驗為期 9 週。結果顯示，飼糧添加 2.5% 發酵飼料能顯著提高血液中 T- 淋巴球細胞亞群 $CD3^+$ 及 $CD4^+ CD8^+$ ($P < 0.05$)，但對其他免疫反應則無顯著影響。發酵飼料添加至 5% 則顯著提高血中干擾素- γ (interferon- γ) 濃度 ($P < 0.05$)，且顯著增強促裂原脂多醣 (lipopolysaccharide) 及刀豆球蛋白 A (concanavalin A) 誘發的淋巴球增生反應 ($P < 0.05$)，提升顆粒性球細胞氧爆反應 ($P < 0.05$)、體液性免疫反應之抗羊紅血球 IgA 力價及增加周邊血液中血液 T- 淋巴細胞亞群百分比 $CD3^+$ ($P < 0.05$)；但對免疫細胞吞噬能力及體液性免疫反應之抗羊紅血球 IgM 及 IgG 力價則無顯著影響。綜上所述，在肥育豬飼糧中添加 5% 二階段混合型益生菌發酵飼料，能顯著提升免疫表現。

關鍵詞：肥育豬、免疫反應、發酵飼料。

緒 言

益生菌被定義為活的微生物，能維持宿主良好的健康或改善腸道微生物平衡 (FAO/WHO, 2001) 和避免因使用抗生素所造成之缺失後遺症 (Isolauri *et al.*, 2004)。益生菌為有益於宿主的活菌形態補給物，其產物如代謝產物，細胞壁成分和 DNA 能影響宿主之免疫系統，進而能調節免疫細胞的功能 (Oelschlaeger, 2010)。研究證實，餵飼益生菌可影響肺、腹膜及腸繫膜淋巴節及全身免疫系統功能 (Schley and Field, 2002)，刺激非特異性免疫球蛋白 IgA 及 IgG 的分泌 (Nahashon *et al.*, 1994)，提高動物血液中 IgG 之濃度 (Lopez *et al.*, 2000) 及巨噬細胞及淋巴細胞的活性 (Perdigon *et al.*, 1986)，增加迴腸絨毛長度及保護腺窩 (Dunham *et al.*, 1993)。Patterson and Burkholder (2003) 指出，使用於家畜禽之主要益生菌菌株以枯草桿菌屬 (*Bacillus*)、腸球菌屬 (*Enterococcus*)、酵母菌 (*Saccharomyces yeast*) 及乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus*) 等較常被當益生菌使用。乳酸桿菌和枯草芽孢桿菌已於各種家畜作為益生菌，因此本試驗選定其作為共生細菌代表。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，且自然棲息於土壤，能單獨或聯合乳酸菌及酵母成益生菌 (Hong *et al.*, 2005)，亦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)。在飼糧中添加枯草芽孢桿菌能誘導促炎性

(1) 行政院農業委會畜產試驗所研究報告第 2410 號。

(2) 行政院農業委會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(3) 國立屏東科技大學生物資源研究所。

(4) 國立嘉義大學微生物免疫與生物藥學系。

(5) 國立嘉義大學動物科學系。

(6) 通訊作者，E-mail：jengyong@mail.tlri.gov.tw；ckl@mail.ncyu.edu.tw。

細胞激素 (proinflammatory cytokine) 的介白素 1 (interleukin 1, IL-1) 與腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及 Th1 細胞激素表現量的增加, 並刺激周邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 產生干擾素- γ , 強化吞噬能力 (phagocytosis) 引起發炎反應, 並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, 可以參與細胞介導的免疫反應, 在某些情況下, 有監管和抗炎作用 (Wood and Sawitzki, 2006)。在細胞性免疫方面, 添加枯草桿菌的飼料會改變 CD3、CD4、CD8 等分子之比例, 這是免疫系統重新調節回復平衡的機制, 且提升周邊血液淋巴球增生反應, 藉此來增加對流行性感冒的抵抗力 (Schierack *et al.*, 2007), 而使免疫功能有所改變。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。Perdigon *et al.* (1995) 的研究發現小鼠餵飼乳酸菌可提高 IgA 生成細胞的數量, 而不同乳酸菌刺激動物產生抗體的能力也有所不同。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。

目前益生菌之研究焦點在對畜主的保護及對抗病原體上。而益生菌之間的相互作用研究是值得探討的。Deng *et al.* (2012) 指出, 混合唾液乳酸桿菌 *BI* 與枯草芽孢桿菌 *RJGP16* 兩種益生菌 (2.5×10^9 CFU/mL 之 *RJGP16* 與 2.5×10^9 CFU/mL 之 *BI*) 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。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酶結構, 促進角蛋白降解, 使其飼料產品中富含對動物有利的可利用胺基酸, 可有效改善動物生長, 並可提高飼料嗜口性及保存性 (張, 2009), 且生產成本低、效率高及動物產品能符合衛生安全的目的 (Lee and Yu, 2013)。利用微生物混合發酵之發酵飼料較單一添加益生菌粉之效果更佳, 例如 Chen *et al.* (2009) 以 *Bacillus subtilis natto* + *Saccharomyces cerevisiae* 二階段混合發酵飼料可顯著改善雞隻體增重, 並證明並非由於水份、益生菌粉或單一菌種發酵所致, 須經過二階段發酵才有此效果。製作枯草芽孢桿菌 + 乳酸桿菌之二階段發酵應用在肥育豬隻飼糧中, 因未見於相關文獻討論, 因此本研究目的為將大豆粕與羽毛粉結合調整成約 CP 62% (60:40) 之混合原料, 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。擬將此發酵飼料添加飼予肥育豬隻, 觀察其促進免疫反應之效果, 期待能開發成替代性飼料原料, 發展多元化農業再生能源。

材料與方法

I. 試驗菌株

本試驗以自行篩選並確認效果良好之蛋白質分解能力強之枯草桿菌 *Bacillus subtilis natto* N21 (Bac) 及具有角蛋白分解能力之篩選菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* Da16 (Da16)、*Bacillus sp.* Da15 (Da15)、*Providencia rettgeri* strain Da6 (Da6) 及 *Bacillus sp.* Da2 (Da2) 搭配產酸能力佳、生長速率快之 *Saccharomyces cerevisiae* Y10 (Y10) 作為共生細菌, 進行二階段混合式發酵羽毛混合粉。

II. 發酵飼料之製備

發酵製程參考 Chen *et al.* (2009) 之方法。將發酵基質外加 30% 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 *Bacillus subtilis natto* (Bac)、*Bacillus amyloliquefaciens* Da16 (Da16)、*Bacillus sp.* Da15 (Da15)、*Providencia rettgeri* strain Da6 (Da6) 及 *Bacillus sp.* Da2 (Da2) 等 5 種菌粉, 並調整發酵原料之菌數至 10^6 CFU/g feed, 外加水 10%, 於 37°C 下好氧發酵 2 天。第二段發酵, 調整第一階段發酵原料之 *Saccharomyces cerevisiae* Y10 (Y10) 5 種菌粉, 使經第一階段發酵之原料含 Y10 菌數達 10^6 CFU/g feed, 外加水 10%, 於室溫 25°C 發酵 5 天, 發酵完畢後, 放入 65°C 烘箱乾燥至水分達到 12% 以下, 即成發酵飼料原料。其水分含量 11.5 ± 0.4 %。本試驗之發酵終點菌數量 (Bacteria analysis, log CFU/g), 其 N21 菌為 6.30 ± 0.20 及 L12 菌可達 9.83 ± 0.33 。

III. 發酵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 100g, 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。胺基酸之分析為精準測氮含量 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 440 nm 及 570nm 進行偵測, 以分析樣品中胺基酸組成, 其營養組成列示於表 1。

表 1. 發酵飼料之營養組成

Table 1. Analyzed nutrient composition of fermented feedstuff (%; as-fed basis)

Items	Analysed value, %	
	Unfermented feedstuff	Fermented feedstuff*
CP, %	62.04	62.75
DP, %	52.66	53.64
Ca, %	0.30	0.34
P, %	0.66	0.68
Indispensable AA		
Arg, %	4.10	3.89
His, %	0.92	0.88
Ile, %	2.72	2.69
Leu, %	4.83	4.99
Lys, %	2.30	2.32
Met, %	0.59	0.63
Phe, %	2.91	2.99
Thr, %	2.58	2.63
Val, %	3.76	3.82
Dispensable AA		
Ala, %	3.96	4.05
Asp, %	5.06	5.12
Cys, %	1.88	2.05
Glu, %	8.08	8.59
Gly, %	3.85	3.89
Pro, %	4.83	5.43
Ser, %	5.55	5.59
Tyr, %	1.88	1.83

Fermented feedstuff*: 60% soybean meal + 40% feather meal + *Bacillus* + *Lactobacillus* two stage mix-probiotics fermented.

IV. 動物飼養管理及試驗設計

選取 80 頭杜洛克 (D, ♀) × 高畜黑豬 (K, ♂) 之雜交肉豬 (DK) 進行試驗，最初平均體重 78.10 ± 0.23 kg，各試驗組飼料之粗蛋白質及代謝能分別為 CP = 15.5%；ME = 3,265 kcal/kg，動物逢機分置於 4 個試驗組，每處理 5 重複，每重複 4 隻，閹公豬及女豬各半，以玉米—大豆粉為基礎飼糧原料，配製分別為 3% 魚粉組 (對照組)、0、2.5 及 5% 發酵飼料組，飼料配方及其營養組成列示於表 2。豬隻飼養於 3.84 m × 2.56 m 之欄位中，試驗期 9 週，飼料及飲水採任食，於試驗結束時從下顎竇進行採血。

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 依據螢光抗體方法發展出來之方法，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 (phagocytosis) 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 mix (phagocyte: *E. coli* = 1 : 50)，之後放入水浴槽 (37°C，10 分鐘) 培養後同時取出試管，立即加入 50 μ L 的淬鍊溶液到各管，震盪混合樣品後各管加入 3 mL 的清洗液，混合樣品和離心 (250 g，5 分鐘，4°C) 後去除上清液，再加入 3 mL 的清洗液重新懸浮沈澱物顆粒，混合樣品和離心 (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 重新懸浮沈澱物顆粒，混合後在室溫下培養 20 分鐘，後離心 (250 g，5 分鐘，4°C)，

去除上清液，再加入 3 mL 的清洗液重新懸浮沈澱物顆粒，混合樣品和離心 (250 g，5 分鐘，4°C) 後去除上清液，最後加入 1 mL HBSS 重新懸浮沈澱物顆粒，最後用流式細胞儀分析。

表 2. 試驗飼糧組成

Table 2. Composition of experiment diets (as-fed basis)

Ingredients, %	3% FM	Fermented feed, %		
		0	2.5	5
Ground corn	76.44	73.84	74.95	75.71
Soybean meal, 43.8%	17.96	22.84	18.98	15.50
Fish meal (Peru), 65%	3.00	0.00	0.00	0.00
Fermented feed	0.00	0.00	2.50	5.00
Ground limestone	0.85	0.90	0.90	0.90
Dicalcium phosphate	0.64	1.00	1.04	1.05
Soybean oil	0.56	0.82	0.98	1.14
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25
Choline chloride 50%	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin premix ^a	0.10	0.10	0.10	0.10
Micromineral premix ^b	0.10	0.10	0.10	0.10
L-Lys · HCl (78%)	0.00	0.02	0.07	0.11
DL-Met	0.00	0.03	0.03	0.04
Total	100.0	100.0	100.0	100.0
Analyzed composition				
CP, %	15.39	15.56	15.57	15.52
Ca, %	0.63	0.66	0.67	0.67
Total P, %	0.49	0.51	0.51	0.52
Lys, %	0.81	0.85	0.85	0.84
Met, %	0.30	0.31	0.32	0.32

FM: Fish meal.

^a Vitamin supplied the following per kilogram of premix: vitamin A, 5,000 IU; vitamin D₃, 1,500 IU; vitamin E, 40 mg; vitamin K, 3 mg; vitamin B₁, 2.6 mg; vitamin B₁₂, 0.04 mg; niacin, 35 mg; pantothenic acid, 23 mg.

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

VII 氧爆作用 (oxygen burst) 測定

取 10 mL 新鮮血液，置於 100 單位的肝素中混合。取全血 50 µL，加入 10 µL 的 *E. coil* mix (phagocyte : *E.coil* = 1 : 50)，之後放入水浴槽 (37°C，10 分鐘) 培養後同時取出試管，分別加入 10 µL 的沈澱物容液到各管，震盪混合樣品，再放入水浴槽 (37°C，10 分鐘) 培養後同時取出所有的試管，加入已回溫到室溫的 1 裂解液 2 mL，混合後在室溫下培養 20 分鐘後離心 (250 g，5 分鐘，4°C)，去除上清液，再加入 3 mL 的清洗液重新懸浮沈澱物顆粒，混合樣品和離心 (250 g，5 分鐘，4°C) 後去除上清液，最後加入 1 mL HBSS 重新懸浮沈澱物顆粒，最後用流式細胞儀分析。

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 µg/mL 伴刀豆球蛋白 (concanavalin A, con A)、10 µg/mL 植物血凝素 (phytohemagglutinin, PHA)、5 µg/mL 美洲商陸裂殖原 (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 µCi/well 3H- 胸腺嘧啶 (specific activity 50 Ci/mmol, Moravek Biochemicals, Brea, CA) 共同培養 18 h 後，測定各處理之 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 (interferon- γ , IFN- γ) 測定

先將標準液作連續稀釋 (1,000、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 終止液來終止反應，最後使用儀器測量 450 nm minus 550 nm 的吸光值。

X. 免疫細胞次群百分比測定

取 $1-5 \times 10^5$ 血液細胞數置於流式細胞儀專用管中 (352052, FALCON, BD, USA)，每管加入 0.5 μ L 不同螢光標定抗體，Mouse-anti-Rat-CD3-FITC antibody (MR5104, Invitrogen)。將各抗體與細胞液均勻混和後，於 4°C 以及避光作用 30 分鐘，以流式細胞儀 (flow cytometry; CyFlow, Partech, Germany) 與 WinMDI 2.8 軟體進行分析，數據呈現的方式是以細胞次群百分比表示。

XI. 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, GLM) 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

飼糧添加二階段混合型益生菌之發酵飼料對肥育豬血清中淋巴細胞增生及干擾素 γ 之影響列於表 3。淋巴細胞增生反應所添加之不同促裂原，如刀豆球蛋白 A (concanavalin A, con A) 及脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 為刺激 T 淋巴細胞活化。本試驗結果顯示，5% 發酵飼料組之 LPS 及 con A 反應顯著較其他處理組高 ($P < 0.05$)。而 PMA/ION (Ionomycin) 於各處理組間雖無顯著差異，但以 5% 發酵飼料組最高。干擾素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 以 5% 發酵飼料組顯著較其他組高 ($P < 0.05$)，且 2.5% 發酵飼料組亦顯著較 0% 發酵飼料組高 ($P < 0.05$)。淋巴細胞增生反應所添加之不同促裂原，如 con A 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 濃度及開啟鈣離子通道，以增加細胞內 Ca^{2+} 濃度，進而促進生長因子的產生，加快 T 細胞的增生，但 con A 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 (或稱為內毒素，endotoxin)，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 (例如：LPS 或 lipoteichoic acid 等) 的刺激時，會釋放出許多的細胞激素 (cytokines)、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、干擾素 γ 、脂質代謝產物 (前列腺素) 及一氧化氮 (nitric oxide; NO) 的產生，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 (phorbol-12-myristate-13-acetate) 為刺激單核球蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 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，刺激巨噬細胞之分化，以強化其吞噬能力。在細胞內 PKC 可被二脂酰甘油 (Diacylglycerol, DAG) 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 細胞內之 PKC 可被進一步激活。可見，PMA 與 Ionomycin 協同活化 T 細胞 (Chatila *et al.*, 1989)。意即飼糧添加 5% 發酵飼料會顯著 ($P < 0.05$) 增強促裂原 LPS 或 con A 誘發的淋巴球增生反應及刺激干擾素 γ 之分泌。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 、介白質 -2 (Interleukin, 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)。益生菌 *Lactobacillus acidophilus* (10^6 CFU/g) 處理組可顯著提昇雞隻 PBMC 釋放 NO 之能力及提昇 LPS、con A、IFN- γ 與脾臟細胞之增生反應 (王, 2012)。

飼糧添加二階段混合型益生菌的發酵飼料對肥育豬血液中噬菌作用和氧爆作用之影響列於表 4。在發炎反應中，噬菌細胞中的多形核性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 mechanisms) 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，進而借由趨化作用 (chemotaxis)，讓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)。本試驗之結果顯示，各處理組間之吞噬作用雖無顯著差異，但添加發酵飼料有較高之情形，也就是能刺激免疫反應的活化 (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，而使飼糧添加該益生菌飼料，能改善豬隻健

康狀況，使離乳仔豬有較佳飼料效率且減少腹瀉的發病率 (Taras *et al.*, 2005)。

5% 發酵飼料組之氧爆作用顯著較 3% 魚粉組高 ($P < 0.05$)。意即 5% 發酵飼料組能增加多形核性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，增加粘著分子表現及補體趨化，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，增強免疫反應，改善飼料效率。

表 3. 飼糧添加二階段混合型益生菌的發酵飼料對肥育豬血清中淋巴細胞增生及干擾素 γ 之影響

Table 3. Effect of two-stage solid-state of fermented powder supplemented feed on serum peripheral blood lymphocyte and interferon- γ of finishing pigs

Item	3% FM	Fermented feed, %			SEM	P > F
		0	2.5	5		
		------(pg/ml)-----				
Lipopolysaccharide	234.25 ^b	235.06 ^b	262.55 ^b	356.86 ^a	12.67	< 0.0001
Concanavalin A	268.88 ^b	232.44 ^b	241.05 ^b	330.71 ^a	20.23	0.0002
PMA/ION	437.85	439.69	401.41	447.36	38.28	0.6362
Interferon-γ	115.96 ^{bc}	111.70 ^c	122.75 ^b	135.24 ^a	4.39	< 0.0001

FM: Fish meal; PMA/ION: phorbol-12-myristate-13-acetate/Ionomycin.

The data are given as mean $n = 20$.

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

表 4. 飼糧添加二階段混合型益生菌的發酵飼料對肥育豬血中噬菌作用和氧爆作用之影響

Table 4. Effect of two-stage solid-state of fermented powder supplemented feed on serum phagocytosis and oxygen burst of finishing pigs

Item	3% FM	Fermented feed, %			SEM	P > F
		0	2.5	5		
	-----mean fluorescence intensity-----					
Phagocytosis	52.04	49.36	54.32	53.75	2.81	0.1469
Oxygen burst	142.46 ^b	154.46 ^{ab}	170.15 ^{ab}	180.13 ^a	8.9	< 0.0001

FM: Fish meal.

The data are given as mean $n = 20$.

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

飼糧添加二階段混合型益生菌的發酵飼料對血清中免疫球蛋白 (immunoglobulin) 抗體產量之影響列於表 5。試驗結果顯示，抗羊紅血球之 IgA 抗體產量以 5% 發酵飼料組顯著較 3% 魚粉組高 ($P < 0.05$)，而 IgM 及 IgG 之力價於各處理組間則無顯著差異。Steiner (2006) 指出，給予動物口服益生菌，可增加免疫球蛋白及派亞氏腺 (peyer's patch) 細胞之產生。悉生鼠 (gnotobiotic rats) 於小腸及盲腸混合定植植物性乳桿菌與大腸桿菌 (*L. plantarum* + *E. coli*) 比單獨定植大腸桿菌者 (*E. coli*)，於一週後發現血清中有顯著較高之 IgA 及抵抗大腸桿菌之稍高 IgM 和 IgA 抗體水平 (Herias *et al.*, 1999)。Lee and Salminen (1995) 之報告指出，飼糧中添加 *B. globosum* 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)。本試驗結果與前述報告相似。

二階段混合型益生菌的發酵飼料對周邊血液單核細胞增生反應之影響，列於表 6。體內組織之淋巴細胞具有不同之表面分子，其中成熟的 T 淋巴細胞表面均可表達 CD³⁺ 分子，而其可再細分成 CD⁴⁺ 之 T 細胞—輔助型 T 淋巴細胞 (Th) 及 CD⁸⁺ 之 T 細胞—毒殺型 T 淋巴細胞 (Tc) 亞群。本試驗結果顯示，周邊血液中 T 淋巴球次群之 CD³⁺ 含量以 2.5% 與 5% 發酵飼料組顯著較 3% 魚粉組及 0% 組高 ($P < 0.05$)。2.5% 與 5% 發酵飼料組之 CD⁴⁺ (誘導性 T 細胞 / 輔助性 T 細胞，在免疫反應中扮演中間過程角色，藉由增生擴散，來激活產生直接免疫反應類型的免疫細胞) 及 CD⁴⁺/CD⁸⁺ 比值顯著較 0% 組高 ($P < 0.05$)。CD³⁺/CD⁸⁺ 比值以 5% 發酵飼料組顯著較 0% 組高 ($P < 0.05$)。2.5% 發酵飼料組之 CD⁴⁺CD⁸⁺ 含量顯著較 3% 魚粉組與 0% 發酵飼料組高 ($P < 0.05$)，5% 發酵飼料組之 CD⁴⁺CD⁸⁺ 含量亦顯著較 0% 發酵飼料組高 ($P < 0.05$)。CD³⁺ 與 T 淋巴細胞之信號傳導有關 (Tizard, 2009)，因此意謂肥育期豬隻之 T 細胞可能因飼糧添加發酵飼料而提高，且亦可經 LPS 刺激增加干擾素 γ 生成量，因此提高細胞免疫功能。CD⁴⁺ 細胞

在 T 細胞的表面，CD⁴⁺ 細胞又稱為免疫系統的「輔助手」(helper)，能指揮身體對抗微生物。CD⁴⁺ 細胞起到“通風報信”的作用。CD⁸⁺ 細胞(細胞毒性 T 細胞，於免疫反應中對產生特殊抗原反應的目標細胞進行殺滅)有殺傷被感染細胞和癌細胞的作用。CD⁸⁺ T 細胞可增強細胞 IL-2 的產生，而使 B 細胞增生，產生更多的自體免疫抗體 (Linker *et al.*, 1990)。Wang *et al.* (2009) 指出，離乳仔豬每天口服 *Lactobacillus fermentum* (10^8 CFU/ml) 20 mL 能增加血液的 CD⁴⁺ T 淋巴細胞亞群的百分比，但 CD⁸⁺ 含量與 CD⁴⁺/CD⁸⁺ 比值(判斷人體免疫功能紊亂的臨床診斷指標)並沒有受到影響。Schierack *et al.* (2007) 之研究指出，仔豬飼糧添加 *B. cereus var. toyoi* (1.35×10^6 CFU/g)，其周邊血液單核球之 CD⁴⁺/CD⁸⁺ 比值顯著較未添加組提高。Shimizu *et al.* (1996) 指出，感染豬繁殖與呼吸綜合徵候群 (PRRS) 病毒之豬隻外周血淋巴細胞群變化顯示，CD⁴⁺ 及 CD⁴⁺/CD⁸⁺ 之比值減少。而本試驗研究結果顯示，添加 2.5% 或 5% 之發酵飼料，確實能提高血液中 CD³⁺ 與 CD⁴⁺ 含量及 CD⁴⁺/CD⁸⁺ 與 CD³⁺/CD⁸⁺ 比值，對於預防豬繁殖與呼吸綜合徵候群 (PRRS) 病毒感染可能有幫助。

淋巴球幹細胞在骨髓製造，釋出到週邊循環，由特定組織捕獲來決定淋巴球分化成 B 或 T，T 淋巴球是在胸腺、淋巴結前皮質成熟，B 淋巴球是在扁桃腺、脾臟、腸道、淋巴結芽胚成熟。淋巴球約有 5 – 15% 屬於 B cell 負責抗體的製造，約有 60 – 80% 屬於 T cell 負責細胞免疫的調節及細胞激素的生產。T cell (CD3) 主要又分為 helper T cell (CD³⁺ CD⁴⁺)、Cytotoxic/suppressor T cell (CD³⁺ CD⁸⁺)，輔助 T 細胞 (Helper T cell) 在免疫反應中扮演中間過程的角色，激活免疫反應的「輔助細胞」。DP T (Double positive T cell) 細胞若高，其表達 CD4 和 CD8 alphabeta 異源二聚體 (co-receptors) 之子集 (CH4 (HI) CD8 (HI))，已能在自身免疫性和慢性炎症疾病中做鑑別 (Parel and Chizzolini, 2004)。

表 5. 飼糧添加二階段混合型益生菌的發酵飼料對血清中免疫球蛋白抗體產量之影響

Table 5. Effect of two-stage solid-state of fermented powder supplemented feed on serum immunoglobulin antibody production of finishing pigs

Item	3% FM	Fermented feed, %			SEM	P > F
		0	2.5	5		
-----mg/dl-----						
IgA	1.52 ^b	1.59 ^{ab}	1.66 ^{ab}	1.88 ^a	0.14	0.0200
IgM	1.79	1.74	1.74	1.81	0.17	0.9549
IgG	9.75	9.96	10.39	11.38	1.26	0.4032

FM: Fish meal; Ig: Immunoglobulin.

The data are given as mean n = 20.

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

表 6. 二階段混合型益生菌的發酵飼料對血液 T – 淋巴細胞亞群百分比之影響

Table 6. Effect of two-stage solid-state of fermented powder supplemented feed on the percentage of blood T-lymphocyte subsections finishing pigs

Item	3% FM	Fermented feed, %			SEM	P > F
		0	2.5	5		
CD ³⁺	79.66 ^b	78.59 ^b	84.69 ^a	85.79 ^a	1.79	0.0005
CD ⁴⁺	21.86 ^{ab}	19.44 ^b	23.74 ^a	24.46 ^a	1.25	0.0019
CD ⁸⁺	39.90	40.54	38.80	37.39	1.85	0.3856
CD ³⁺ /CD ⁸⁺	2.01 ^{ab}	1.95 ^b	2.20 ^{ab}	2.33 ^a	0.13	0.0284
CD4+/CD ⁸⁺	0.55 ^{ab}	0.48 ^b	0.62 ^a	0.66 ^a	0.05	0.0040
CD ³⁺ CD ⁴⁺	24.16	24.58	24.00	24.13	0.99	0.9426
CD ³⁺ CD ⁸⁺	30.48	30.73	28.73	30.75	1.55	0.5129
CD ⁴⁺ CD ⁸⁺	9.28 ^{bc}	8.85 ^c	10.40 ^a	10.06 ^{ab}	0.29	< 0.0001

FM: Fish meal.

The data are given as mean n = 20.

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

結 論

飼糧添加發酵飼料由於能改善飼料利用性及生物價品質，確實具有提升肥育豬隻免疫能力，能刺激干擾素- γ 分泌、增強淋巴球增生反應、提升顆粒性球細胞氧爆反應、刺激免疫球蛋白 IgA 力價及提升周邊血液中 T 淋巴球次群之成熟 T 淋巴細胞之 CD^{3+} 與 $CD^{4+}CD^{8+}$ 與 CD^{3+}/CD^{8+} 比值。因此透過發酵飼料之添加，來達到改善生長及健康的目標，進而提高豬隻產業競爭力應該是可行努力的方向。

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。碩士論文。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。
- 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(5): 1580-1591.
- Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97-97.
- 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, 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.
- 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(1): 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 (15-16): 1873-1885.
- Dunham, H. J., C. Williams, F. W. Edens, I. A. Casas and W. J. Dobrogosz. 1993. *Lactobacillus reuteri* immunomodulation of stressor associated diseases in newly hatched chickens and turkeys. Poult. Sci. 72(S2): 103.
- FAO, WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria; report of a joint fao/who expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Cordoba, Argentina, 1-4 October.
- 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, 5th ed, New York.
- Herias, M. V., C. Hessle, E. Telemo, T. Midtvedt, L. A. Hanson and A. E. Wold. 1999. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. Clin. Exp. Immunol. 116(2): 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 Astrophysical Journal. 635: 907-919.
- Kaur, I. P., K. Chopra and A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. Phar. 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.
- Lee, T. T. and B. Yu. 2013. Application of biologics to feedstuff. Afri. J. Biotech. 12(6): 526-530.

- Lee, Y. K. and S. Salminen. 1995. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 241-244.
- Linker-Israeli, M., F. J. Quismorio and D. A. Horwitz. 1990. CD⁸⁺ lymphocytes from patients with SLE sustain rather than suppress spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD⁴⁺ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis Rheum.* 33: 1216-1225.
- Lopez, P. H., F. J. Irazoqui and G. A. Nores. 2000. Normal human plasma contains antibodies that specifically block neuropathy-associated human anti-GM1 IgG-antibodies. *J. Neuroimmunol.* 105: 179-183.
- Isolaauri, E., S. Salminen and A. C. Ouwehand. 2004. Probiotics best practice and research in clinical gastroenterology. 18: 299-313.
- Nahashon, S. N., H. S. Nakau and L. W. Mirosh. 1994. Production variables and nutrient retention in single comb white leghorn laying pullets fed diets supplemented with direct fed microbials. *Poult. Sci.* 73: 1699-1711.
- Oelschlaeger, T. A. 2010. Mechanisms of probiotic actions-A review. *Inter. J. Med. Microbiol.* 300: 57-62.
- Parel, Y. and C. Chizzolini. 2004. CD⁴⁺ CD⁸⁺ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev.* 3(3): 215-220.
- 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(2): 240-247.
- Patterson, J. A. and K. M. Burkholder. 2003. Application of probiotics and periotics in poultry production. *Poult. Sci.* 82: 627-631.
- Perdigon, G. N., M. M. de. Macias, S. Alvarez, G. P. Oliver and H. A. De. Ruiz. 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun.* 53: 104-410.
- Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Aguero and N. Gobbato. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 78: 1597-1606.
- SAS. Institute. 2002. SAS/STAT User's guide: Statistics. Version 9. 1st ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.
- Schley, P. D. and C. J. Field. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br. J. Nutr.* 87 (Suppl. 2): 221-230.
- Schierack, P., H. W. Lothar, T. David, H. Volker, T. Babila, H. Andreas, F. Michael, G. Schmidt and S. Lydia. 2007. *Bacillus cereus* var. *toyoi* enhanced systemic immune response in piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 118: 1-11.
- 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(4): 721-753.
- Shimizu, M., S. Yamada, K. Kawashima, S. Ohashi, S. Shimizu and T. Ogawa. 1996. Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immunol Immunopathol.* 50 (1-2): 19-27.
- 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.
- Taras, D., W. Vahjen, M. Macha and O. Simon. 2005. Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch. Anim. Nutr.* 59 (6): 405-417.
- Tizard, I. 2009. General features of the immune response. *Veterinary Immunology-An Introduction*, 8 ed. Saunders Company, London, UK.
- Wang, A., H. Yu, X. Gao, X. Li and S. Qiao. 2009. Influence of *Lactobacillus fermentum* 15007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. *Antonie van Leeuwenhoek.* 96: 89-98.
- 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.

Effects of added fermented feedstuff inclusion of two-phase of solid-state on immune response of finishing pigs ⁽¹⁾

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

Received: Jul. 15, 2015; Accepted: Apr. 26, 2016

Abstract

The study was to determine the effects of two-stage solid-state of fermented powder (TSFP) supplemented feed on immunity of finishing Duroc × KHAPS (bred by the Kaohsiung Animal Propagation Station) black pigs. The is carry on two-stage fermentation with different selected bacteria. *Bacillus subtilis natto* (N21), a selected strain with higher proteolytic capacity was supplemented at the first fermentation stage. The specific strain of *Lactobacillus sporogenes* (L12) with higher acidic capacity was added in the second 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-nitrogen (CP = 15.5%) and iso-energy diets (ME = 3,265 kcal/kg). A total of 80 Duroc × KHAPS black pigs with initial body weight of 78.10 ± 0.23 kg were randomly assigned into 4 treatment groups of both genders. Control diet was formulated with 3% fish meal, whereas treatment groups was replaced fish meal by 0, 2.5 or 5% TSFP respectively. The feeding span was 9-wks by *ad libitum*. The result showed that the immunity competence in the 2.5% TSFP were significantly higher than in the 3% fish meal group on the percentage of blood T-lymphocyte subsections of CD³⁺ and CD⁴⁺CD⁸⁺ concentration ($P < 0.05$). The 5% TSFP were significantly higher ($P < 0.05$) than the 3% fish meal group on lymphocyte proliferative response (lipopolysaccharide and concanavalin A), interferon- γ , oxygen burst, IgA and percentage of blood T-lymphocyte subsections of CD³⁺ concentration. There were no significant difference in phagocytosis activity and humoral immune responses of IgM and IgG concentration. Summarized our current results indicate that the 5% TSFP group showing better immunocompetence than other dietary teratments.

Key words: Finishing pigs, Immune response, Fermentation meal.

(1) Contribution No. 2410 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

(3) The Graduate Institute of Biotechnology, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R.O.C.

(4) Department of Microbiology, Immunology and Biopharmaceuticals, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, R.O.C.

(5) Department of Animal Science, National Chiayi University, Chiayi, Taiwan, R.O.C.

(6) Corresponding author, E-mail: jengyong@mail.tlri.gov.tw; ckl@mail.ncyu.edu.tw.