

附件一

第158次農委會智慧財產審議委員會審議通過
日期：108.6.26

液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01於飼料添加物之應用技術

行政院農業委員會高雄區農業改良場
報告人：周浩平助理研究員



飼料添加物產業需求

- 過去的畜牧事業常在飼料中添加**抗生素及礦胺劑**，以促進生長或預防疾病發生，但飼料添加抗生素，可能導致動物腸道細菌對抗生素也產生抗藥性，將形成生態環境的破壞。**(2006年歐盟全面禁止飼料添加抗菌劑，目前已經成為全世界潮流)**
- 飼料添加的酵素有：蛋白質酵素、聚葡萄糖酵素、纖維酵素、其他(脂肪酵素、果酸酵素)...等，能夠加速消化速率，提高營養成分被消化吸收的機會，惟酵素具有降解之風險，較不易保存。
- 利用益生菌之抑菌活性與胞外分解酵素之功能，可取代抗生素與酵素等飼料添加物之功能性，促進動物生長機能。



液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01

- 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 可產生內生孢子(Endospores)，以度過不利於自身生存之環境。並具 **澱粉水解酶(α-amylase)**、**脂質分解酶(lipase)**、**纖維分解酶(cellulase)** 以及 **蛋白酶(protease)** 等能力。
- 本菌株亦可分泌多種 **抗生(抑菌物質)**，經菌株全基因體定序(Next generation sequencing)之結果顯示，其皆具有分泌抗生物質 **iturins, fengycin, surfactin** 等物質之相關基因片段。
- 該菌株因應103年度生物農藥需求，已完成大鼠口服急毒性與肺急性2項毒理試驗評估，並已確認為 **安全微生物**，具有極高的安全性。



孢外分解酵素之產生

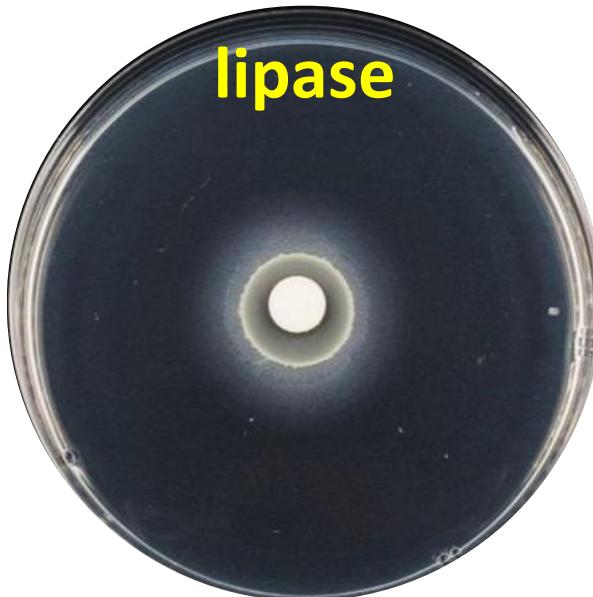
cellulase



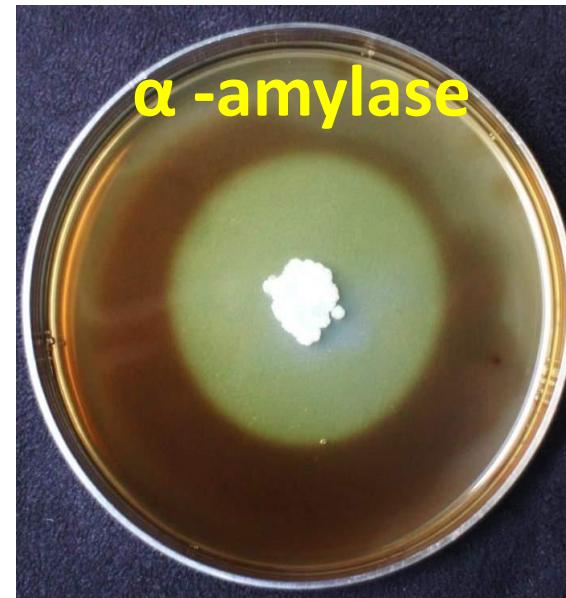
protease



lipase



α -amylase



可供給家畜、家禽、水產動物之飼料添加物

104年12月2日農牧字第1040043326A號公告

所有條文

微生物

1 乳酸桿菌屬

1.1 *Lactobacillus acidophilus*

1.2 *Lactobacillus brevis*

1.3 *Lactobacillus buchneri*

1.4 *Lactobacillus casei*

1.5 *Lactobacillus delbrueckii*

1.6 *Lactobacillus farciminis*

1.7 *Lactobacillus fermentum*

1.8 *Lactobacillus gasseri*

1.9 *Lactobacillus helveticus*

1.10 *Lactobacillus johnsonii*

1.11 *Lactobacillus kefiri*

1.12 *Lactobacillus paracasei*

1.13 *Lactobacillus parapantarum*

1.14 *Lactobacillus pentosus*

1.15 *Lactobacillus plantarum*

1.16 *Lactobacillus reuteri*

1.17 *Lactobacillus rhamnosus*

1.1.18 *Lactobacillus salivarius*

1.2 乳酸球菌屬

1.2.1 *Lactococcus lactis*

1.3 足球菌屬

1.3.1 *Pediococcus acidilactici*

1.3.2 *Pediococcus pentosaceus*

1.4 鏈球菌屬

1.4.1 *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

1.5 腸球菌屬

1.5.1 *Enterococcus faecium*

1.5.2 *Enterococcus faecalis*

1.6 芽孢桿菌屬

1.6.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

1.6.2 *Bacillus badius*

1.6.3 *Bacillus cereus*

1.6.4 *Bacillus coagulans*

1.6.5 *Bacillus licheniformis*

1.6.6 *Bacillus pumilus*

1.6.7 *Bacillus subtilis*

1.7 麴黴屬

1.7.1 *Aspergillus niger*

1.7.2 *Aspergillus oryzae*

1.8 酵母屬

1.8.1 *Saccharomyces cerevisiae*

1.9 畢赤酵母屬

1.9.1 *Pichia pastoris*

1.10 梭菌屬

1.10.1 *Clostridium butyricum*

1.11 雙歧桿菌屬

1.11.1 *Bifidobacterium animalis*

1.11.2 *Bifidobacterium adolescentis*

1.11.3 *Bifidobacterium bifidum*

1.11.4 *Bifidobacterium breve*

1.11.5 *Bifidobacterium longum*

1.11.6 *Bifidobacterium pseudolongum*

1.11.7 *Bifidobacterium thermophilum*

1.12 *Lysinibacillus*屬

1.12.1 *Lysinibacillus sphaericus*

<http://www.rootlaw.com.tw/LawArticle.aspx?LawID=A040270071017200-1041202>

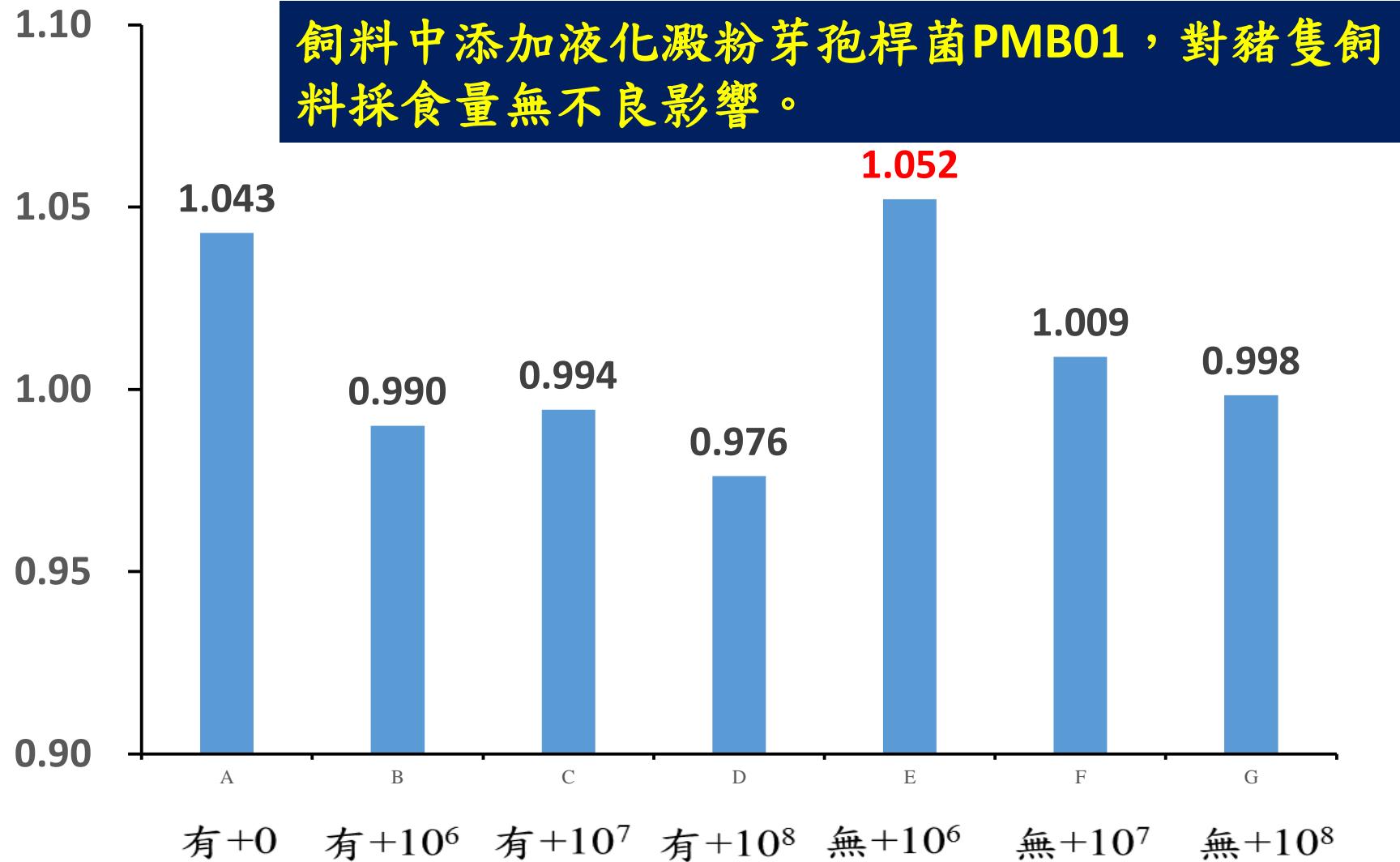


離乳豬生長性能評估

◆ 產品添加比例為**每1000公斤飼料中含1公斤的PMB01**，測試飼料中菌量濃度不同時的效能，組別如下：

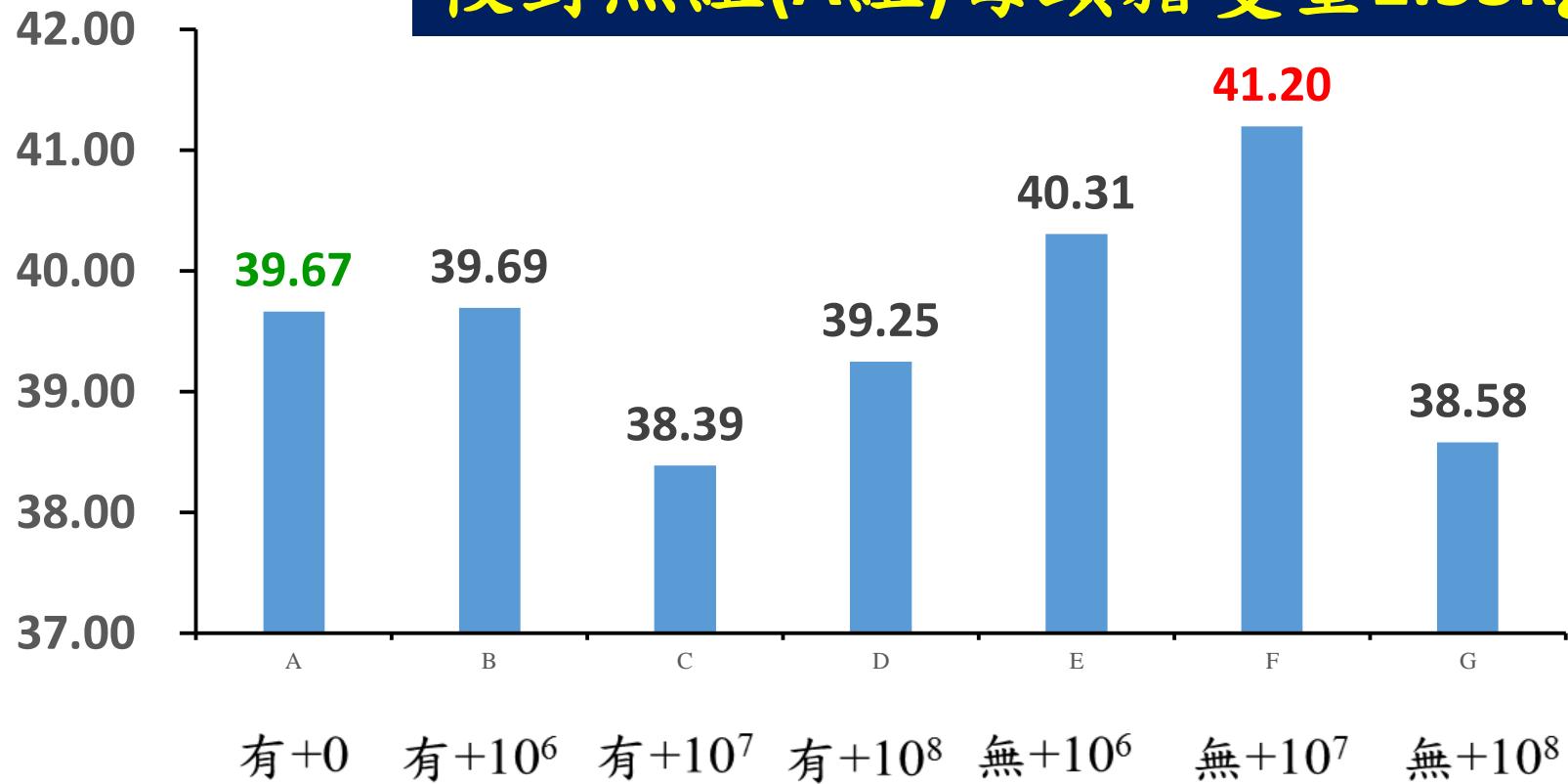
組別	預防性藥物	PMB01菌量	
		產品 (cfu/g)	飼料 (cfu/g)
A	有	0	0
B	有	10^9	10^6
C	有	10^{10}	10^7
D	有	10^{11}	10^8
E	無	10^9	10^6
F	無	10^{10}	10^7
6	G	10^{11}	10^8

飼料日採食量



體重

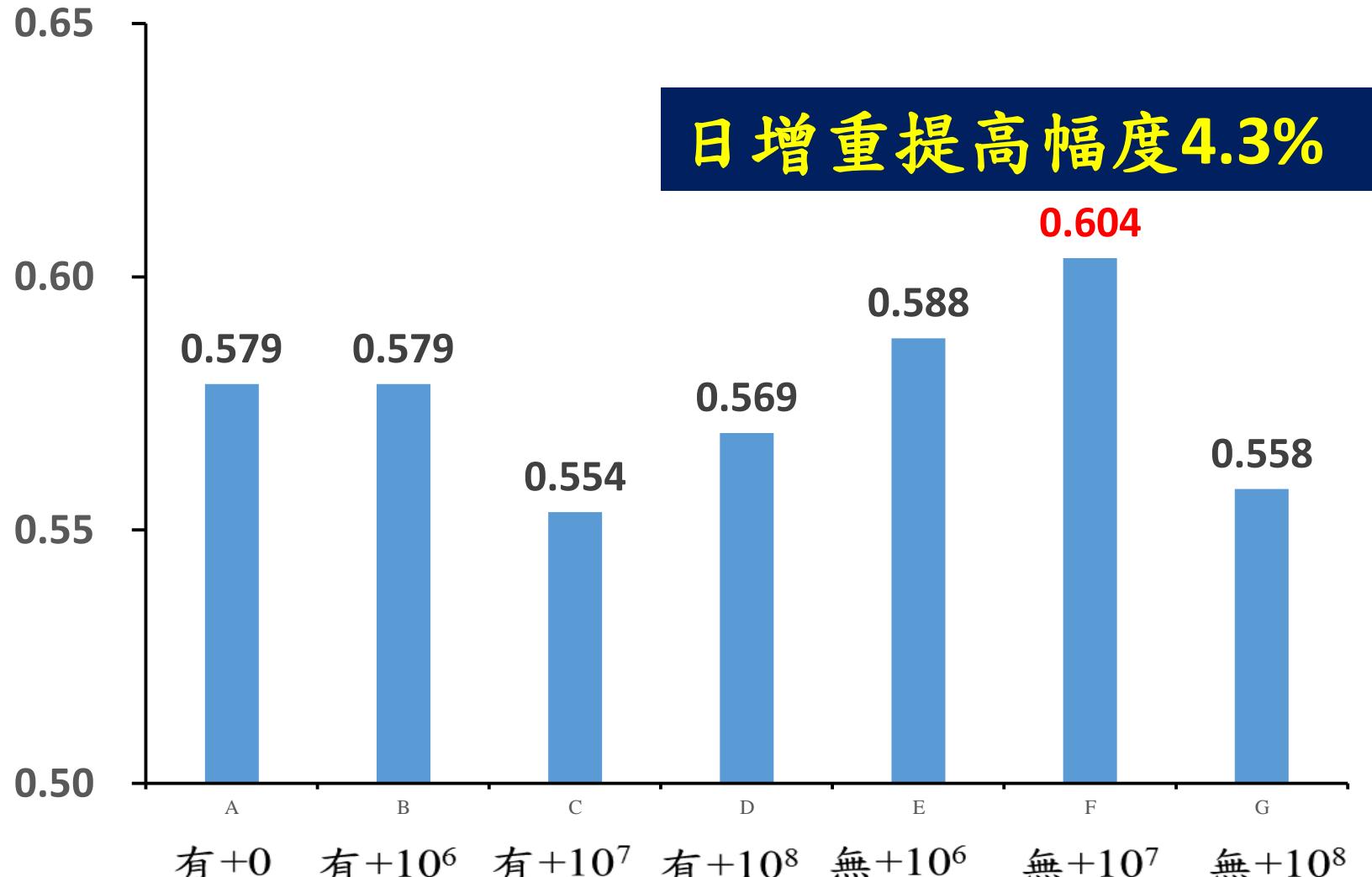
較對照組(A組)每頭豬隻重1.53kg



有+0 有+ 10^6 有+ 10^7 有+ 10^8 無+ 10^6 無+ 10^7 無+ 10^8

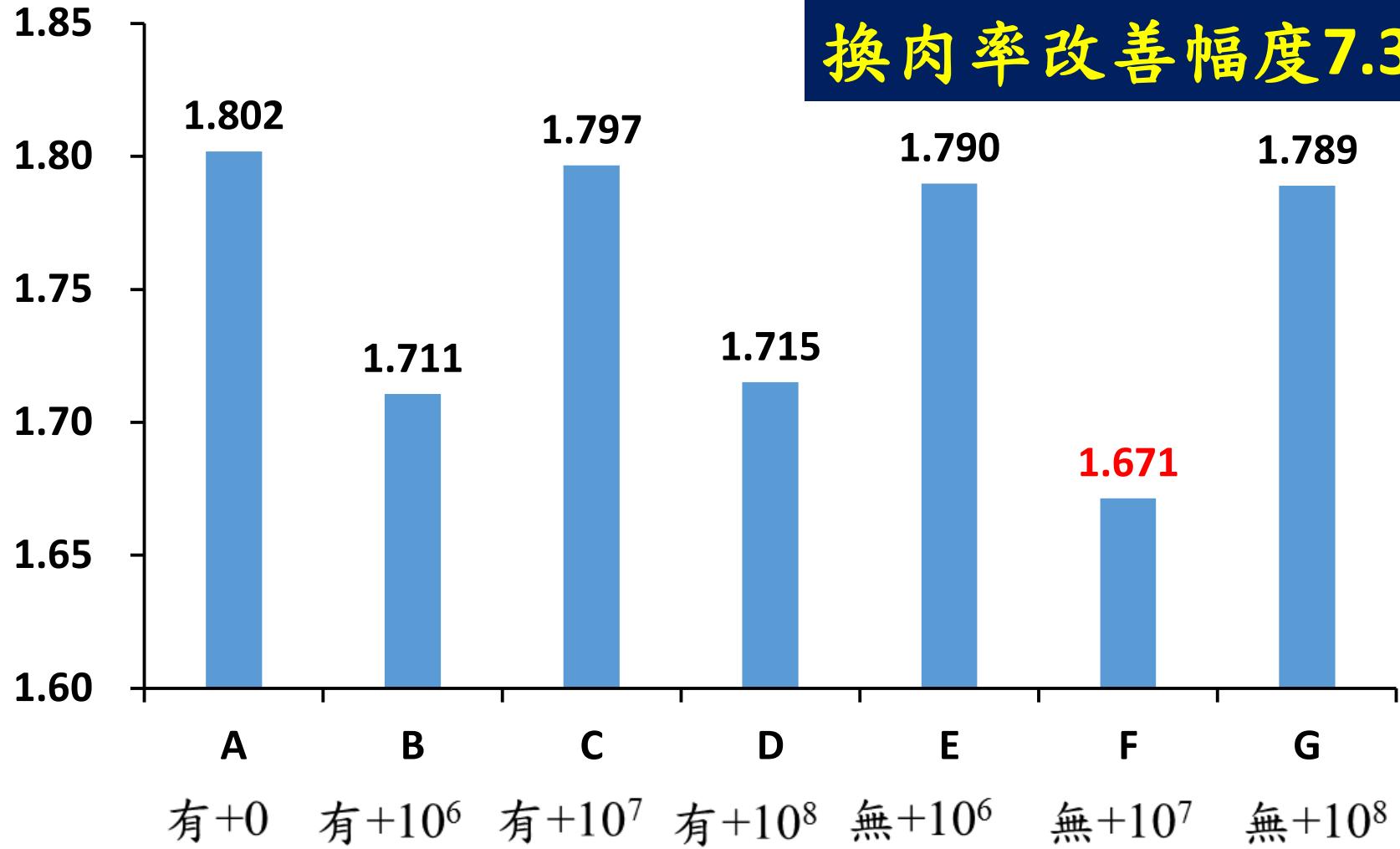


日增重0-8週



飼料換肉率

換肉率改善幅度7.3%



免疫與糞便菌相分析結果

項目	有	有	有	有	無	無	無	SEM	P-value
	0	10^6	10^7	10^8	10^6	10^7	10^8		
• 免疫, mg/mL									
IgA	0.27	0.35	0.22	0.24	0.27	0.17	0.33	0.02	0.63
IgG	14.43	12.24	11.75	10.46	13.07	10.03	12.31	0.55	0.40
• 粪便菌相, log CFU/g									
乳酸菌	5.69	5.68	5.98	5.69	6.22	6.05	6.14	0.10	0.67
大腸桿菌	5.82	6.15	6.46	6.10	6.05	6.76	6.65	0.17	0.77
PMB01	5.00	6.37	7.29	8.03	6.43	7.65	8.57	0.25	0.001

- ◆ 飼料中添加液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株，對免疫指標(IgA、IgG)無顯著影響，表示豬隻可在抵抗緊迫同時亦不會耗損過多能量在免疫反應上。
- ◆ 在飼料中添加液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株，糞便中硫化氫(H_2S)或氨氣(NH_3)在統計上與其他各組無顯著影響。
- ◆ 飼料中添加液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株並不會抑制豬隻消化道之乳酸菌數，飼料中添加藥物則會抑制乳酸菌增生，但對液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株之增殖則無影響。



白肉雞生長性能評估

◆ 產品添加比例為每1000kg飼料中含1kg的 益生菌PMB01，測試飼料中菌量濃度不同時的效能，組別如下：

組別	預防性藥物	PMB01 菌量	
		產品(cfu/g)	飼料(cfu/g)
(1)空白料組	無	0	0
(2)藥物組	有	0	0
(3)藥物+益生菌-高劑量組	有	10^{11}	10^8
(4)益生菌-低劑量組	無	10^9	10^6
(5)益生菌-中劑量組	無	10^{10}	10^7
(6)益生菌-高劑量組	無	10^{11}	10^8



生長性能測定

- 隨著益生菌添加濃度增加，雞隻體重也隨之增加。此外，提高益生菌的添加濃度亦可提高雞隻日增重。
- 飼料採食量於第1-21天以藥物+高濃度益生菌組採食量最高，其次為不同濃度處理組，最低為空白組。第22-32天數值上以高濃度益生菌組的飼料採食量最高，空白組最低，而不同益生菌濃度組的飼料採食量隨益生菌濃度增加，其飼料採食量隨之提高。**實驗全期(1-32天)日採食量以藥物+高濃度益生菌組、高濃度益生菌組及中濃度益生菌組為最高，空白組最低。**
- 飼料換肉率於第1-21天以藥物組及藥物+高濃度益生菌組為最佳，空白組最差。第22-32天各組間無統計上顯著差異，數值上以藥物組最佳。**實驗全期(1-32天)的飼料換肉率，統計上以藥物組最佳，在數值上以藥物+高濃度益生菌組的表現次之。**



飼料中添加液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株之白肉雞生長表現

			藥物	空白組	空白組	空白組	SEM	P-value
	空白組	藥物組 ¹	+	+	+	+		
			高濃度10 ⁸	低濃度10 ⁶	中濃度10 ⁷	高濃度10 ⁸		
體重, g								
第1天	46.21 ^b	48.23 ^{ab}	48.18 ^{ab}	49.12 ^a	50.42 ^a	49.91 ^a	0.38	0.02
第21天	920.27 ^c	1005.81 ^{ab}	1033.98 ^a	967.66 ^b	980.83 ^b	991.28 ^b	8.24	<0.05
第32天	1833.49 ^b	1947.90 ^a	1969.82 ^a	1884.02 ^{ab}	1905.94 ^{ab}	1940.09 ^a	13.89	0.06
日增重, g								
第1-21天	41.622 ^d	45.599 ^{ab}	46.943 ^a	43.740 ^c	44.305 ^{bc}	44.827 ^{bc}	0.39	<0.05
第22-32天	83.020	85.644	85.077	83.306	84.100	86.256	0.91	0.92
第1-32天	55.853 ^b	59.365 ^a	60.051 ^a	57.341 ^{ab}	57.985 ^{ab}	59.068 ^a	0.43	0.06
日採食量, g								
第1-21天	61.094 ^b	62.039 ^{ab}	64.652 ^a	63.564 ^{ab}	64.412 ^{ab}	63.838 ^{ab}	0.46	0.20
第22-32天	137.153 ^b	138.231 ^{ab}	142.242 ^{ab}	138.382 ^{ab}	142.737 ^{ab}	145.838 ^a	1.10	0.16
第1-32天	87.239 ^b	88.230 ^{ab}	91.324 ^a	89.283 ^{ab}	91.336 ^a	92.025 ^a	0.56	0.06
飼料換肉率								
第1-21天	1.468 ^a	1.361 ^b	1.377 ^b	1.453 ^a	1.454 ^a	1.424 ^{ab}	0.01	0.01
第22-32天	1.652	1.614	1.672	1.661	1.697	1.691	0.01	0.43
第1-32天	1.562 ^{ab}	1.486 ^c	1.521 ^{bc}	1.557 ^{ab}	1.575 ^a	1.558 ^{ab}	0.01	<0.05
育成率, %	99	97	100	97	99	96	—	—



免疫分析

- 雞隻血清 IgY 含量以高濃度益生菌組為最高，藥物組為最低。雞隻血清 IgA 含量以藥物+高濃度益生菌組、高濃度益生菌組及低濃度益生菌組為最高，藥物組為最低。

mg/m L	空白組	藥物組 ¹	藥物	空白組	空白組	空白組	SEM	P-value
			+	+	+	+		
IgY	25.41 ^{ab}	23.11 ^b	28.33 ^{ab}	27.75 ^{ab}	25.53 ^{ab}	28.94 ^a	0.70	0.15
IgA	0.93 ^{ab}	0.45 ^c	1.15 ^a	1.20 ^a	0.68 ^{bc}	1.08 ^a	0.06	<0.05

¹藥物組使用之藥物為Amoxicillin，藥物之使用皆依照產品建議用量與停藥期規範。

²不同字母^{abc}表示組間有顯著性差異。

³高、中、低濃度指飼料中實驗用益生菌的濃度(cfu/g)。



屠體組成

- 胸肉百分比在各組間無統計上顯著差異。腿肉百分比以飼料中以藥物+高濃度益生菌組及高濃度益生菌組為最高，隨益生菌濃度增加有提高腿肉百分比之趨勢。腹脂百分比以低濃度益生菌組為最低，不同益生菌濃度之間無特定趨勢。

項目	空白組	藥物組- Amoxicillin	藥物	空白組	空白組	空白組	SEM	P-value
			+ 高濃度 10^8	+ 低濃度 10^6	+ 中濃度 10^7	+ 高濃度 10^8		
體重 ⁴ , g	2084.22 ^{ab}	2074.88 ^{ab}	2184.00 ^{ab}	2198.75 ^a	1981.88 ^b	2122.75 ^{ab}	27.74	0.24
胸肉, g	396.67	374.50	408.50	403.00	376.00	386.50	8.12	0.80
胸肉百分比, %	18.98	17.96	18.67	18.32	18.79	18.18	0.23	0.79
腿肉, g	386.44 ^{ab}	373.75 ^{ab}	411.75 ^a	390.25 ^{ab}	359.25 ^b	399.75 ^{ab}	5.78	0.12
腿肉百分比, %	18.50 ^{ab}	18.00 ^{ab}	18.90 ^a	17.75 ^b	18.17 ^{ab}	18.84 ^a	0.14	0.12
腹脂, g	14.89	17.13	18.38	15.25	19.00	19.38	0.66	0.20
腹脂百分比, %	0.72 ^{ab}	0.83 ^{ab}	0.86 ^{ab}	0.70 ^b	1.01 ^a	0.91 ^{ab}	0.04	0.21

¹藥物組使用之藥物為Amoxicillin，藥物之使用皆依照產品建議用量與停藥期規範。

²不同字母^{abc}表示組間有顯著性差異。

³高、中、低濃度指飼料中實驗用益生菌的濃度(cfu/g)。

16 為受採樣的雞隻體重。



糞便菌相及墊料性狀

- 各組雞隻的糞便菌相分析，以飼料中不添加藥物之組別的乳酸菌落數較多，而飼料中添加實驗用的益生菌並不會影響乳酸菌菌落數，在糞便檢體之大腸桿菌菌落方面，單獨添加實驗用益生菌時，雞隻糞便檢體之大腸桿菌菌落數在數值上有較低的趨勢。分析糞便菌相時，一般期望使用飼料添加物產品不會降低乳酸菌菌落數，以表示對動物消化道的原生菌叢無負面影響。
- 墊料中氨氣濃度以空白組及高濃度益生菌組較低。墊料水份含量在數值上以飼料中有添加益生菌但不含藥物組有較低的趨勢。



項目	空白組	藥物組- Amoxicillin	藥物	空白組	空白組	空白組	SEM	P-Value
			+ 高濃度 10^8	+ 低濃度 10^6	+ 中濃度 10^7	+ 高濃度 10^8		
糞便菌相, log CFU/mL								
乳酸菌	8.77 ^a	6.41 ^b	6.52 ^b	8.86 ^a	8.79 ^a	8.83 ^a	0.17	<0.05
大腸桿菌	7.35 ^b	8.59 ^a	8.49 ^a	7.91 ^{ab}	7.70 ^b	7.94 ^{ab}	0.11	<0.05
墊料氣味⁴, ppm								
氨氣	51.33 ^d	80.13 ^{bc}	98.25 ^{ab}	96.00 ^{ab}	107.71 ^a	74.38 ^c	3.57	<0.05
硫化氫	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	—	—
硫醇	N.D.	N.D.	0.93	0.19	0.49	N.D.	—	—
墊料水份	38.87 ^{ab}	42.61 ^a	39.23 ^{ab}	32.95 ^b	37.50 ^{ab}	36.38 ^{ab}	0.93	0.06

¹藥物組使用之藥物為Amoxicillin，藥物之使用皆依照產品建議用量與停藥期規範。

²不同字母^{abc}表示組間有顯著性差異。

³高、中、低濃度指飼料中實驗用益生菌的濃度(cfu/g)。

⁴各氣味檢知管偵測極限值：氨氣，0.2 ppm；硫化氫，0.01 ppm；硫醇，0.01 ppm；如果低於極限值皆以N.D.表示。



結論

- 飼料中添加液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株，可調節離乳豬生理機能、促進日增重及改善飼料換肉率特性，以達到畜牧生產時促進動物生長、平衡菌相與友善環境之效益。
- 飼料中添加液化澱粉芽孢桿菌PMB01菌株，可促進白肉雞生長表現及免疫調節能力，對其屠體組成及糞便菌相則無不良影響，並可改善飼養期間雞舍墊料品質，對維持腸道優勢菌叢與良好的飼養環境有正面意義。



技術授權內容

- + 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 菌株冷凍管。
- + 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 發酵條件(10L與1000L)
- + 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 菌株鑑定與定序資料。
- + 液化澱粉芽孢桿菌 *Bacillus amyloliquefaciens* PMB01 應用於離乳豬與肉雞生長性能影響評估報告。
- + 技術輔導時數：48小時。



計價說明

本案以非專屬技術移轉方式公告徵求業者，授權生產及製造地區限我國管轄區域內，銷售出口地區不限，授權期限為5年，授權金及衍生利益金收取如下表：

項目	授權金(須再加計5%營業稅)		衍生利益金	
	廠商別	合作業者	非合作業者	合作業者
計價	36萬元	45萬元	銷售總額1%	銷售總額1%



非專屬授權條件

■ 接受授權者條件

凡從事畜牧、飼料、飼料添加物、飼料配製或具相關研發能力等公司或法人，皆可提出申請。

授權地區

生產及製造地區限我管轄區域內，銷售出口地區不限。



歡迎洽詢

