

## 枯草桿菌對大豆粕抗原蛋白降解效果及對離乳仔豬生長性能之影響

廖柔鸞<sup>1</sup> 曹博宏<sup>1</sup> 陳淑德<sup>2</sup> 鄭永祥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>國立宜蘭大學 動物科技學系

<sup>2</sup>國立宜蘭大學 食品科學系

本研究為利用大豆粕作為基質，添加枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 進行固態發酵，以產製發酵大豆粕 (Fermented soybean meal, FSBM)，分析大豆蛋白降解的最佳條件，並配製飼料以提供離乳仔豬，評估對豬隻生長性能和血液抗大豆抗原 IgG 力價之表現。結果顯示，大豆粕含有 53.5% 起始水分較含 36.5% 者，經枯草桿菌發酵兩日後，有較佳之蛋白酶活性，與明顯的降解大豆球蛋白。而大豆粕 53.5% 含水量條件下，分別添加 2.5% 黑糖、葡萄糖、蔗糖和澱粉作為碳源，經由枯草桿菌發酵後，顯示不添加醣類的對照組，有較佳的蛋白酶活性之趨勢，且呈現較佳的大豆球蛋白降解程度。動物試驗方面，以最適化條件下製備發酵大豆粕，大量生產並取代豬隻飼料中的魚粉和部分大豆粕。豬隻生長性能顯示，餵飼發酵大豆粕有增加每週採食量和體增重之趨勢。另外血清抗體力價分析顯示，發酵大豆粕組的抗大豆抗原 IgG 含量，於第二週和第三週皆比對照組呈現減低情形。枯草桿菌發酵大豆粕取代魚粉和部分大豆粕的動物試驗結果得知，添加 10% 枯草桿菌發酵大豆粕具較佳嗜口性，具有取代魚粉之潛能。

**關鍵字：**枯草桿菌，發酵大豆粕，離乳仔豬

\* Corresponding author: Email:yhcheng@niu.edu.tw

### ***Bacillus subtilis* on Soy Antigenic Protein Degradation and Effects on Growth Performance in Weaning Piglets**

Rou-Wan Liao<sup>1</sup>, Po-Hung Tsao<sup>1</sup>, Su-Der Chen<sup>2</sup>, and Yeong-Hsiang Cheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, National Ilan University, Ilan, Taiwan

<sup>2</sup>Department of Food Science, National Ilan University, Ilan, Taiwan

This study was to investigate fermentation of soybean meal parameter optimized by *Bacillus subtilis* inoculation, moreover, as alternative protein resources to evaluate effects on growth performance and anti-soybean allergens-specific antibody titer expression in weaning piglets. Results showed the initial moisture of soybean meal fermentation by *B. subtilis* at 53.5% moisture exhibited higher protease activity and digestion than 36.5% moisture. When 2.5% exogenous carbon resources was added, glucose showed amylase activity improvement. Nevertheless, soybean meal fermentation by *B. subtilis* showed better hydrolysis without combined with any carbon resources. A piglets feeding experiment was performed by using *B. subtilis* fermented soybean meal to replace fish meal, results demonstrated a tendency towards increase feed intake and weight gain weekly, and piglet fed with fermented soybean meal revealed lower levels of serum anti-soybean IgG than control after the 2nd and 3rd weeks. Our current result implies soybean meal fermentation by *B. subtilis* improve the palatability and growth performance in weaning piglets, the high potential for fish meal substitution were observed.

**Key words:** *Bacillus subtilis*, Fermented soybean meal, Weaned piglets

## 前言

離乳過程是仔豬飼養的關鍵期，影響之後的生長速度、飼料換肉率以及屠體品質等肉豬飼養目標，除了受到環境中的微生物影響，飼料中蛋白質來源也會影響豬隻消化功能<sup>(1)</sup>，引發消化不良造成生長遲緩和腹瀉發生。大豆粕 (soybean meal, SBM) 提供豬隻飼料中主要植物性蛋白質來源，是大豆經正己烷 (hexane) 溶劑採油後，再以 100-130℃ 脫溶劑並乾燥的副產品<sup>(2)</sup>。然而大豆粕含有多種的抗營養因子 (anti-nutrition factors, ANFs)，例如胰蛋白酶抑制因子 (trypsin inhibitor)、凝集素 (lectins) 和大豆球蛋白 (soybean globulins) 等，其中對熱具穩定的大豆球蛋白不易於大豆粕製造過程中受到高溫破壞，而具有過敏性的大豆球蛋白 (glycinin) 和大豆伴球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin) 會導致動物腸道異常表現<sup>(3, 4)</sup>。大豆球蛋白 (glycinin) 有較多的半胱氨酸和甲硫氨酸<sup>(5)</sup>，結構上由 5 個單體 (G1、G2、G3、G4 和 G5) 組成，其中 G1 和 G2 有抗原性<sup>(6)</sup>，每一個單體由 37-40 kDa 酸性次單位和 19.9-23 kDa 鹼性次單位以雙硫鍵和氫鍵結合<sup>(7)</sup>。大豆伴球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin) 由三個  $\alpha$ 、 $\alpha'$  和  $\beta$  次單位以疏水性和氫鍵結合形成三元體醣蛋白<sup>(5)</sup>，分子量分別為 58-77 kDa、58-83 kDa 和 42-53 kDa<sup>(8)</sup>，只有  $\alpha$  次單位具有抗原活性<sup>(9)</sup>。研究顯示大豆抗原蛋白會降低豬隻體增重和飼料採食量，及增加腹瀉發生率<sup>(10)</sup>；會增加小鼠血液中 IgG 和 IgE 及組織胺濃度，並且造成小腸的絨毛萎縮和腺窩不正常的分裂和增生<sup>(11)</sup>。

枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 是重要的菌種<sup>(12)</sup>，一般認為是安全的菌種 (general recognized as safe, GRAS)，具有水解蛋白質之能力，大量生成胺基酸、胜肽和氨類物質，氨的存在使其發酵環境之 pH 增加，並具有提高大豆基質溶解性和消化性<sup>(13)</sup>，由於發酵使大豆粕進行預消化作用，可降低動物腸道的消化酵素分泌量<sup>(14)</sup>，進而增加養分利用率。先前文獻提出地衣芽孢桿菌 (*Bacillus licheniformis*) 分泌出的細菌素 (bacteriocin)，於大豆粕發酵 2 天具有最高表現量<sup>(15)</sup>。藉由微生物分泌的酵素，經水解作用以提供基質特殊質地與風味，並移除抗營養因子而改善產品營養價，因此微生物發酵應用於大豆粕，可提升蛋白質利用性。本研究目的為探討枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 參與大豆粕發酵，對起始水分和碳源最適化條件及對仔豬生長性能之影響。

## 材料與方法

### 一、菌株來源

枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*, ATCC 6051) 購自台灣食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute)，以凍乾形式保存於真空玻璃管中。

### 二、枯草桿菌發酵大豆粕製備

配製 50 mL 液態培養基 (brain heart infusion, BHI) 於 250 mL 三角錐形瓶中，加入 1 mL 冷藏菌液，混合後在 30℃ 震盪培養 18 小時，使用菌液稀釋液 (0.85% NaCl, 0.1% peptone, pH 7) 將菌液 10 倍連續稀釋，取出 100  $\mu$ L 稀釋液加於平板培養基 (nutrient agar, NA) 中央，用塗菌棒均勻塗抹於平板表面，放置 30℃ 培養箱，18 小時後計數，使用 BHI 液態培養基將菌液定量為  $2.4 \times 10^7$  cfu/mL。

試驗一之大豆粕採用 36.5% 和 53.5% 起始水分處理。商業購買的大豆粕含有水分 13%，水分處理方式以 100 g 大豆粕為例，再加入 10 mL 菌液和 27 mL 蒸餾水，水分計算為 (大豆粕水分+菌液+蒸餾水)/(大豆粕水分+菌液+蒸餾水+大豆粕乾物質) $\times$ 100%，使水分達 36.5%；而水分為 53.5% 的大豆粕分別加入 10 mL 菌液和 77 mL 蒸餾水。試驗二為基質起始水分控制在 53.5% 下，添加佔有 2.5% 基質量的醣類，分別為黑糖、葡萄糖、蔗糖和玉米澱粉。採用 48% 的脫殼大豆粕，分別秤量各處理所需量裝入太空袋中，套上塑膠環並在環口塞滿棉花，準備補水量的糖水或蒸餾水與

袋裝大豆粕分開滅菌 30 分鐘，待冷卻後加入各處理之水量，於 4℃ 浸泡一小時，再接入佔有固態培養基 1/10 量的活化菌液，於 30℃ 發酵 2 天。收集發酵產物鋪平於鐵盤上，以 50℃ 熱風乾燥 12-24 小時，再將乾燥後產物以均質機粉碎，置於 4℃ 冷藏儲存備用。

### 三、發酵大豆粕之特性分析

#### 1、酵素活性分析

蛋白酶活性分析為取 1 g 發酵大豆粕加入 19 mL 新鮮配製的酵素稀釋液（含有 0.03 M L-Cysteinhydrochlorid 和 6 mM EDTA · 2Na, pH 4.5），混合後以 13000 g 離心 5 分鐘，取 1 mL 上清液注入試管中，在 37℃ 恆溫水浴預熱 5 分鐘，快速地注入 5 mL 新鮮配製且已 37℃ 預熱的 0.6% 酪蛋白基質液，反應 10 分鐘後注入 5 mL 沉澱劑，放置 40 分鐘後以 13000 g 離心 5 分鐘，以純水作校正測上清液於 275 nm 之吸光值。另外，製備空白試驗以及 50 µg/mL 溶於 0.1 N HCl 的酪胺酸 (L-tyrosine) 標準溶液，於 275 nm 之下測定吸光值。酪蛋白消化單位 (casein digestion unit, CDU) 定義為酵素於 37℃ 與酪蛋白基質液作用 1 分鐘後，可產生 1 µg 酪胺酸 (tyrosine) 之酵素活性<sup>(16)</sup>。

#### 2、發酵大豆粕蛋白質之萃取

取 1 g 樣品與蒸餾水混合，以 13000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液加入等體積的無水酒精，於 -20℃ 沉澱 24 小時後離心，加入 1 mL 無水酒精清洗沉澱物 3 次，各以 8000 rpm 離心 5 分鐘，最後倒掉上清液，將沉澱物置入抽風櫃風乾，再注入蒸餾水以超音波震盪回溶蛋白質。以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作為標準溶液，利用分光光度計 595 nm 測其吸光值，求得樣品中蛋白質的濃度，將預備進行聚丙烯醯胺膠電泳之樣品蛋白質定量為 10 µg/well。

#### 3、西方墨漬法 (Western blot)

配製下層 15% 分離膠體與上層 4% 焦集膠體。蛋白質樣品以 4:1 與 sample buffer (1 M Tris-HCl, pH 6.8, 36.5% (v/v) glycerol、10% SDS、1% BPB 和 2-ME) 混合，於 100℃ 乾浴槽上加熱 10 分鐘，取 10 µL 蛋白質樣品注入膠片上齒模的孔洞，以 70 V 跑完焦集膠體，再以 110 V 跑完全程。剪裁膠片大小的轉印膜 (polyvinyl difluoride membrane, PVDF) 以 53.5% 甲醇活化 10 分鐘後，與切除焦集膠體部分的膠片分別浸在 1X 轉漬緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) 15 分鐘。將浸潤的海綿、濾紙、轉印膜和膠片從正極到負極依序疊放置轉印夾中，上下皆以濾紙和海綿覆蓋，以 100 V 轉印 45 分鐘。取出轉印膜先加入 5% 脫脂奶粉 (skim milk) 以塞填膜上無蛋白質轉印的空間，加入 1000 倍稀釋的 rabbit anti β-conglycinin antibody 作用 1 小時，再加入 2000 倍稀釋的 goat anti-rabbit IgG, peroxidase conjugated 作用 1 小時，過程中需以 1X PBST (含有 0.05% Tween-20) 清洗三次，每次 5 分鐘。最後 DAB peroxidase substrate solution 避光反應 2-4 分鐘使其呈色，放入水中以終止反應。取出轉印膜於陰暗處風乾後掃描，使用 image j v1.46f 影像分析軟體系統，以脫殼脫脂大豆粕作為組內對照組，相對定量出每處理的降解程度。

### 四、動物試驗

發酵大豆粕生產依試驗之最佳條件，採用大豆粕含有 53.5% 的水分和不添加碳源的處理，製備方法同上 (二、枯草桿菌發酵大豆粕製備) 所述。製備的發酵大豆粕的粗蛋白質為 53%，符合市面上發酵大豆粕比大豆粕提高 4-5% 粗蛋白含量。

試驗飼料為購買商業飼料廠零售的玉米、大豆粕和魚粉等原料，自行配製符合仔豬生長營養標

準 (NRC, 1998) 的飼料。利用橫臥式螺旋帶狀混合機將主原料、微量礦物質和維生素均勻混合，將混合後的飼料以小量分袋包裝，置於大型冷藏櫃備用。飼料配方如表五所示。

試驗動物採用 16 頭 21 日齡二品種雜交 (Landrace × Yorkshire) 離乳公豬，依體重逢機分成二個處理組，分別為一般大豆粕對照組和 10% 發酵大豆粕處理組。每處理組以欄為重複單位，各有兩欄，每欄飼養 4 頭仔豬。試驗為期 3 週，試驗期間採任食方式給予飼料及飲水。試驗期每週秤量豬隻體重及飼料採食量，以計算平均日增重 (average daily gain, ADG) 和飼料效率 (feed efficiency, FE)，作為評估豬隻生長表現。試驗第二週和第三週進行前腔靜脈採血，收集血清以酵素免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 分析大豆蛋白抗體表現量。

## 五、血清抗體分析

真空採血管收集豬隻的前腔靜脈血液，先於 4℃ 靜置 12 小時已沉降血球和血漿，再使用高速離心機於條件 1500 g 下遠心分離 10 分鐘，將上層血清分裝於微量離心管，儲放於 -20℃ 冷凍保存，以備大豆蛋白抗體分析。

萃取大豆粕蛋白作為抗原蛋白，方法同發酵大豆粕之蛋白質萃取。以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作為標準溶液，利用分光光度計 595 nm 測其吸光值，求得蛋白質的濃度。

大豆抗原蛋白以 coating buffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 6.9) 稀釋成 1 ng/μL，取 100 μL 稀釋的大豆抗原加入 96 孔盤 (96 well plate) 內，室溫培養 1 小時後以 wash solution (1X PBS, 0.05% Tween-20) 清洗 3 次，再加入 200 μL blocking solution (1X PBS, 5% skin milk) 培養 30 分鐘，再清洗 3 次後每 well 加入 100 μL 以 sample diluent (1X PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA) 2 的次方倍連續稀釋的血清樣品，室溫培養 1 小時，再清洗 3 次後加入 100 μL 以 sample diluents 75000:1 稀釋 pig IgG ELISA quantitation set 套組 (Level Biotechnology Inc. BTLE100-102/104) 提供的 HRP conjugated pig IgG detection antibody 培養 1 小時，清洗後加入 TMB substrate solution，室溫避光下反應 8-10 分鐘，再加入 stop solution (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 以終止反應，顏色由藍色轉變為黃色，於 450 nm 測定吸光值。

## 六、統計分析

試驗結果使用 Statistical Analysis System 9.0 (2005) 軟體進行分析，以 ANOVA 單因子變方分析後，再利用鄧肯氏新多次變域測試 (Duncan's New Multiple Range Test) 比較各處理間差異之顯著性，每一試驗數值當樣品數 n=2 以平均值和相對百分差異 (relative percent difference, RPD) (mean ± R%) 表示，R% 計算公式為  $| (X_1 - X_2) | / (X_1 + X_2) / 2 * 100\%$ ；樣品數 n>2 之數值以平均值和標準偏差 (mean ± SD) 呈現，顯著水準為  $\alpha = 0.05$ 。

## 結果與討論

### 一、酵素活性之變化

試驗一為不同起始水分來觀察  $2.4 \times 10^7$  cfu/mL 枯草桿菌量以分解大豆蛋白之效果，結果顯示菌種於 53.5% 起始水分的大豆粕進行發酵作用，蛋白酶表現程度顯著優於含有 36.5% 起始水分的大豆粕 (表一)。基質的最適水分決定於微生物對水的需求，微生物最適生長的水活性 (water activity, A<sub>w</sub>) 為水之結合力的指標。枯草桿菌水活性為 0.90，表示需要高水分的環境下生長。先前研究顯示枯草桿菌發酵大豆，粗蛋白含量原約為 17.2% 增加至 18.8%<sup>(17)</sup>；另外發酵後蛋白的溶解性、吸收性和消化性各別從 22%、6% 和 29% 增加到 65%、40% 和 43%<sup>(13)</sup>，顯示枯草桿菌分泌酵素將大豆儲存性蛋白水解，增加胜肽和胺基酸的含量，以促進蛋白的可溶性。Frias 等人<sup>(18)</sup>

分析枯草桿菌發酵大豆的胺基酸變化，結果顯示可以提高天冬胺酸 (Aspartic acid)、穀胺酸 (Glutamic acid)、絲胺酸 (Serine)、甲硫胺酸 (Methionine)、半胱胺酸 (Cysteine)、苯丙胺酸 (Phenylalanine) 和酪胺酸 (Tyrosine) 等胺基酸含量，以酸性胺基酸和含硫胺基酸為主，改善大豆缺乏含硫胺基酸的缺點。枯草桿菌主要分泌鹼性蛋白酶或枯草菌素 (subtilisin)<sup>(19)</sup> 和中性金屬蛋白酶 (neutral metalloproteinases)<sup>(20, 21)</sup>，兩者佔有總蛋白酶活性的 96-98%。另外，生長於大豆的枯草桿菌會將分解的胺基酸轉變為  $\gamma$ -聚谷胺酸 ( $\gamma$ -polyglutamic acid,  $\gamma$ -PGA)，是造成大豆表面產生黏性的化合物<sup>(22, 23)</sup>。

表一 起始水分對枯草桿菌蛋白酶表現之影響。

Table 1. Effect of protease activity of initial moisture content on soybean meal fermented with *Bacillus subtilis*.

	Initial moisture 36.5%		Initial moisture 53.5%	
	Mean	SD	Mean	SD
Protease activity, CDU/g	2184.17 <sup>b</sup>	212.83	5340.15 <sup>a</sup>	441.33

<sup>1</sup> Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

<sup>2</sup> a, b Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

試驗二為提供大豆粕額外的不同碳源，結果對枯草桿菌發酵過程的蛋白酶活性和澱粉酶活性表現，無顯著差異 (表二)，除對照組與蔗糖組外，添加黑糖、葡萄糖和玉米澱粉，對桿菌分泌蛋白酶之活性有降低趨勢。此外，可觀察到添加糖類的組別均較對照組有增加澱粉酶活性之趨勢 (資料未提供)。枯草桿菌發酵產生具有大量水解蛋白質之能力，釋放胜肽、胺基酸和氨類物質，使得環境的 pH 上升<sup>(24, 25)</sup>。在自然條件下，微生物分泌鹼性  $\alpha$ -澱粉酶產量低，因此 Yang 等人<sup>(26)</sup> 將 *Bacillus alcalophilus* 之  $\alpha$ -澱粉酶載體轉殖入枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 使其在 37 °C 作用下，pH 9-10 以及培養基含有 0.6-2.4% 澱粉有最佳鹼性  $\alpha$ -澱粉酶活性。另外，枯草桿菌的代謝會產生具有針對革蘭氏陰性和革蘭氏陽性菌達抑菌和殺菌作用的化合物，具有作為益生菌之效果<sup>(27)</sup>。

表二 不同碳源對枯草桿菌蛋白酶表現之影響。

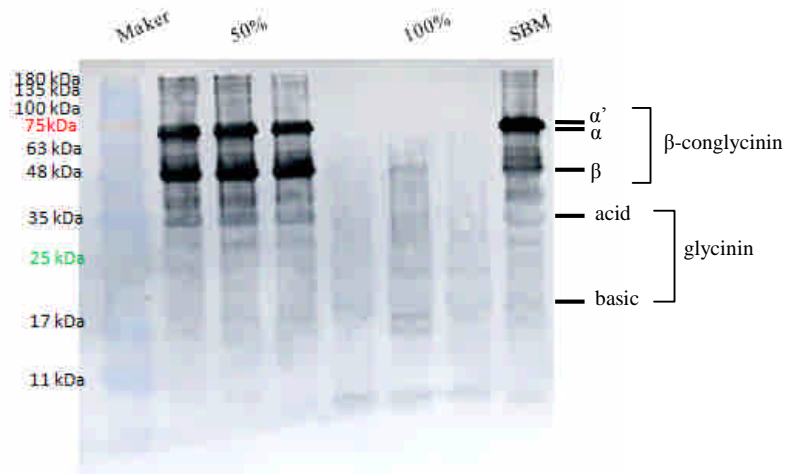
Table 2. Effect of different carbon sources on protease activity of soybean meal fermented with *Bacillus subtilis*.

Carbon sources	Protease activity, CDU/g	
	Mean	R%
CTRL	5290.95	6.06
Brown sugar	4830.84	0.67
Glucose	4677.36	0.16
Sucrose	5569.33	7.60
Starch	4538.63	1.22

<sup>1</sup> Values are expressed as mean  $\pm$  R% (n=2). R%, relative percent different,  $| (X_1 - X_2) | / (X_1 + X_2) / 2 * 100\%$ .

## 二、大豆抗原蛋白的變化

試驗一結果經西方墨漬法分析顯示，經由枯草桿菌發酵作用在添加 53.5% 總水量的大豆粕，明顯有儲存性蛋白被分解之片段化現象。當大豆粕的含水量在 36.5% 時，發酵的降解程度與生大豆蛋白表現差異不大，但是仍可看出比生大豆組有較少的 75 kDa 以上以及較多 48 kDa 以下的胜肽片段（圖一）。



圖一 起始水分對枯草桿菌發酵大豆粕之抗原蛋白變化。SBM 為脫殼大豆粕。

Fig. 1. Effects of initial moisture on antigenic protein degradation in soybean meal fermented with *Bacillus subtilis*. Maker, protein molecule weight marker; SBM, dehulled soybean meal.

藉由 image j 影像分析軟體進行蛋白降解相對定量分析，將經過試驗處理的發酵大豆粕與商業購買的大豆粕所測定的值作比值，獲得相對的數值愈小，表示發酵作用的效力愈佳。結果顯示大豆粕 53.5% 含水量較 36.5% 含水量，可顯著促進枯草桿菌分泌蛋白酶與水解大豆抗原蛋白（相對分解程度分別為 127.47% 和 54.65%）（表三）。Frias 等人<sup>(18)</sup> 收集對大豆具有過敏症的病患血清以作免液活性反應脂抗體，測定枯草桿菌發酵大豆的抗原性，結果顯示只殘留 20 kDa 的胜肽片段且無抗原反應。發酵前處理影響發酵後蛋白質降解程度，水煮處理可將大豆伴球蛋白移除，然而大豆球蛋白仍存在。水煮後再經發酵作用，隨著作用時間增加，大豆球蛋白的酸鹼次單位消失，同時間出現 6.5 kDa 低分子量蛋白<sup>(28)</sup>。

表三 起始水分對枯草桿菌發酵大豆粕之抗原蛋白相對分解程度的影響。

Table 3. Effect of initial moisture on degree of relative antigen protein degradation in soybean meal fermentation with *Bacillus subtilis*.

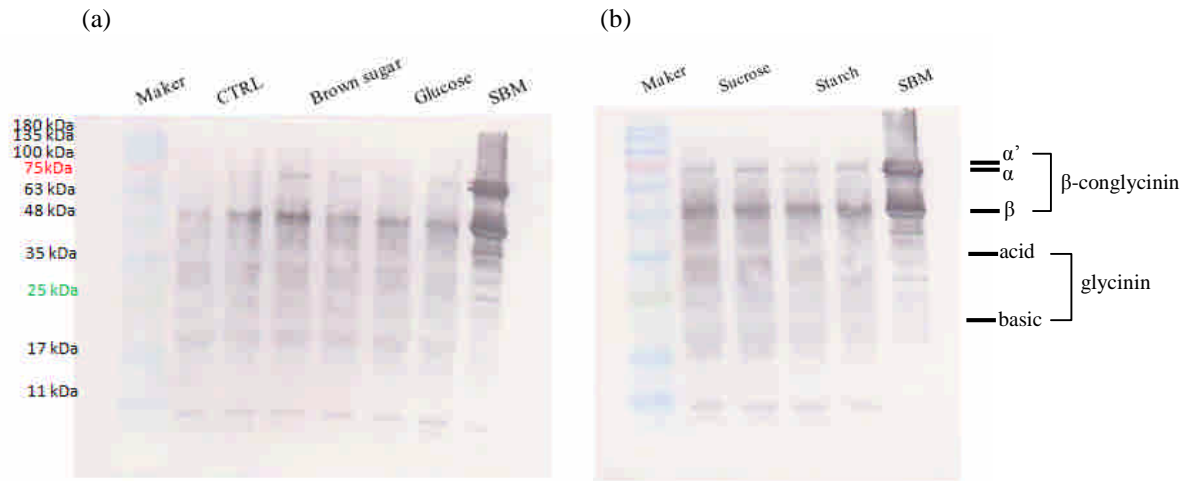
	Initial moisture 36.5%		Initial moisture 53.5%	
	Mean	SD	Mean	SD
Relative of SBM, %	127.47 <sup>b</sup>	5.00	54.65 <sup>a</sup>	10.02

<sup>1</sup>Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). SBM, dehulled and defatted soybean meal.

<sup>2</sup>a, b Means with different superscript letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

試驗二結果顯示，添加黑糖、葡萄糖、蔗糖和玉米澱粉比脫殼脫脂大豆粕有明顯增加 25 kDa 以下的蛋白質（圖二）。對照組與葡萄糖組的發酵大豆粕經由西方墨漬法分析其降解程度優於其他組別，75 kDa 以上的大豆儲存性蛋白明顯大量減少，以及較多的 48 kDa 以下胜肽片段化現象。添

加蔗糖和玉米澱粉組對大豆粕的蛋白質之分解效果最差，仍殘留較多的 75 kDa 以上大豆儲存性蛋白質，但是大豆抗原蛋白片段作相對定量後，統計分析顯示不同碳源添加，對大豆抗原蛋白降解程度無顯著差異（表四）。



圖二 不同碳源對枯草桿菌發酵大豆粕之抗原蛋白變化。SBM 為脫殼大豆粕。

Fig. 2. Effect of different carbon sources on antigenic protein degradation in soybean meal fermentation with *Bacillus subtilis*. Marker, protein molecule weight marker; SBM, dehulled soybean meal.

雖然醱類處理對蛋白酶活性和澱粉酶活性無統計上差異，但影響微生物利用非蛋白作為養分來源的機會。其中蔗糖具有較高的兩者酵素活性之趨勢，而不添加碳源的對照組相對具有較高的蛋白酶活性，於西方墨漬圖片中觀察出明顯分解 48-75 kDa 大豆蛋白（圖二）。

表四 不同碳源對枯草桿菌發酵大豆粕之抗原蛋白相對分解程度。

Table 4. Effect of different carbon sources on degree of relative antigenic protein degradation in soybean meal fermentation with *Bacillus subtilis*.

Carbon sources, 2.5%	Relative of SBM, %	
	Mean	R%
CTRL	93.66	2.93
Brown sugar	99.12	2.58
Glucose	85.26	2.06
Sucrose	98.99	1.69
Starch	78.98	2.49

<sup>1</sup>Values are expressed as mean  $\pm$  R% (n=2). R%, relative percent different,  $| (X_1 - X_2) | / (X_1 + X_2) / 2 * 100\%$ . SBM, dehulled and defatted soybean meal.

### 三、離乳仔豬之生長性能

離乳豬生長試驗結果如表六所示，兩組的初始體重相同，均為 5.16 kg，表示初始體重不會對本試驗造成起始條件受到誤差影響；對照組和發酵大豆粕組在試驗結束的體重分別為  $12.06 \pm 0.33$  kg 和  $13.09 \pm 0.23$  kg，發酵大豆粕組的豬隻平均體重大於對照組，但是經統計分析後無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。平均日增重在飼養的每週以發酵大豆粕組有較高的增重效果，但仍無統計上差異。飼料採食量方面，發酵大豆粕組比對照組在飼養第二週和第三週以及全期有較高的採食量，但無顯著差

異。將平均日採食量與平均日增重相除計算飼料效率，結果得知飼養第一週、第三週和全期的發酵大豆粕組比對照組有較佳的飼料效率，但兩組之間仍無顯著差異。

表五 離乳仔豬試驗用飼料配方

Table 5. Nutrient composition of experiment diets for weaning piglets

Ingredient	CTRL	10% FSBM
	%	
Corn, yellow	58.00	55.42
Soybean meal, 43% CP	31.50	26.50
Fish meal	5.00	0.00
Soybean oil	2.60	4.00
CaCO <sub>3</sub> , 38%	1.10	1.60
CaHPO <sub>4</sub>	2.00	2.30
Salt	0.40	0.40
Choline-Cl, 50%	0.08	0.08
Vitamin, premix <sup>1</sup>	0.10	0.10
Mineral, premix <sup>2</sup>	0.10	0.10
L-Lysine, 98%	0.10	0.10
Fermented soybean meal, 53% CP	0.00	10.00
Total	100.98	100.60
Chemical composition		
Crude protein, %	21.24	21.20
ME, kcal/kg	3352.18	3358.26
Ca, %	1.27	1.28
P, %	0.89	0.82
Lysine, %	1.39	1.35
Methionine + Cystine, %	0.77	0.71
Phenylalanine + Tyrosine, %	1.97	1.92

<sup>1</sup>Supplied per kg diet: vitamin A, 6000 IU; vitamin D, 900 IU; vitamin E, 30 IU; vitamin K<sub>3</sub>, 3 mg; vitamin B<sub>2</sub>, 6 mg; pantothenic acid, 18 mg; niacin, 60 mg and vitamin B<sub>12</sub>, 30 µg

<sup>2</sup>Supplied per kg diet: Cu, 20 mg; Zn, 100 mg; Fe, 140 mg; Mn, 4 mg; Se, 0.1 mg and I, 0.2 mg

綜合上述結果，添加發酵大豆粕有增加採食量之趨勢，由於大豆粕經由枯草桿菌發酵，蛋白質



大量分解成胺基酸和氨基酸，產生似肉的氣味，以及過去文獻提到發酵作用使其增加穀胺酸 (glutamic acid) 含量，具有良好的嗜口性<sup>(29)</sup>。發酵作用為預消化作用 (predigestion)，先將大分子蛋白分解為肽或氨基酸以幫助仔畜增加養分利用率<sup>(13)</sup>，因此本動物試驗結果顯示，體增重效果優於對照組。過去研究也有相同結果，Feng 等人<sup>(14)</sup> 證實餵飼仔豬隻以枯草桿菌發酵的大豆粕可以改善腸道形態和消化酶活性，且具有抗菌作用可抑制腸道病原<sup>(30)</sup>，Kiers 等人<sup>(31)</sup> 亦指出以枯草桿菌發酵的大豆可降低仔豬腹瀉發生率。

表六 發酵大豆粕對離乳仔豬生長性能之影響

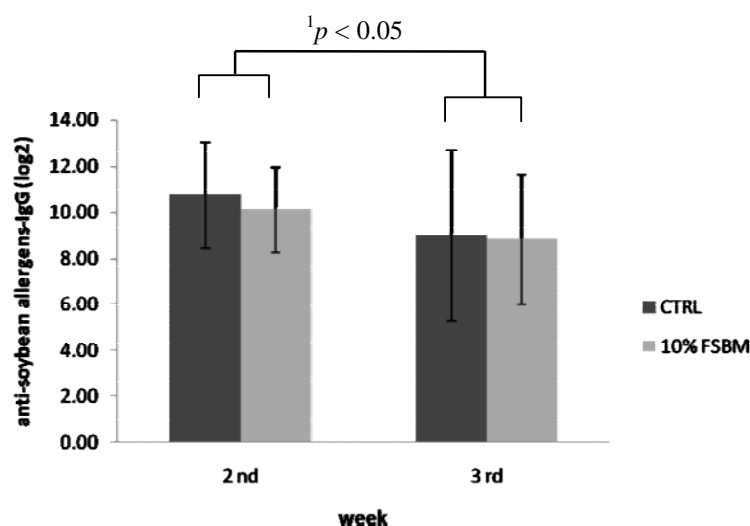
Table 6. Effect of fermented soybean meal on growth performance of piglets for 21 days after weaning

	CTRL		10% FSBM	
	Mean	R%	Mean	R%
<b>Body Weight, kg</b>				
0 d	5.16	0.02	5.16	0.07
7 d	6.27	2.29	6.33	2.19
14 d	8.98	2.09	9.05	2.03
21 d	12.06	0.95	13.09	0.62
<b>Weight gain, kg/d</b>				
0-7 d	0.16	13.00	0.17	11.54
7-14 d	0.39	1.62	0.39	1.66
14-21 d	0.44	2.35	0.60	4.38
0-21 d	0.33	1.68	0.37	1.42
<b>Feed intake, kg/d</b>				
0-7 d	0.24	7.31	0.22	4.86
7-14 d	0.48	4.80	0.49	0.22
14-21 d	0.77	1.75	0.81	3.14
0-21 d	0.50	3.63	0.55	2.94
<b>Feed efficiency, feed/gain</b>				
0-7 d	1.55	5.92	1.38	6.83
7-14 d	1.24	3.19	1.27	1.44
14-21 d	1.74	4.09	1.35	1.25
0-21 d	1.50	1.95	1.47	4.36

<sup>1</sup>Values are expressed as mean ± R% (n=2). R%, relative percent different,  $| (X_1 - X_2) | / (X_1 + X_2) / 2 * 100\%$ .

#### 四、離乳仔豬之血清中抗大豆蛋白抗體力價

採集的豬血液分離出血清後，以 sample diluent (1X PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA) 2 的次方倍作連續稀釋，使用酵素免疫吸附法測定至肉眼無法判斷顏色差異之稀釋倍數作為抗體最高稀釋倍數，取 2 為基的對數 (log) 作圖，結果如圖三所示。豬隻飼養至第二週和第三週收集血液，兩週呈現相同結果，發酵大豆粕組的血清大豆蛋白 IgG 含量低於對照組，但是無統計上差異 ( $p > 0.05$ )。過去報告指出相似情形<sup>(32, 11)</sup>，豬隻餵飼一般大豆粕而有高量的 IgG 抗體產生，由於大豆球蛋白和大豆伴球蛋白是大豆中免疫性最強，而仔豬腸道尚未發育成熟，大豆球蛋白會經由腸道細胞的空隙進入血液和淋巴液，刺激全身免疫系統使得 IgG 大量產生。Liu 等人<sup>(33)</sup> 以小鼠做為動物模式，灌食大豆抗原蛋白，結果顯示小鼠血清中含有高量的抗大豆抗原的 IgE 和 IgG 抗體。另外從結果得知，不論有無提供發酵大豆粕，豬隻於第三週的大豆蛋白抗體濃度均顯著低於飼養第二週 ( $p > 0.05$ )。這情形與仔豬腸道日漸健全可分泌較高量蛋白酶有關，故可以降低大豆抗原蛋白的侵入以減緩免疫反應。



圖三 發酵大豆粕對離乳仔豬血清大豆蛋白抗體濃度之影響。

Fig. 3. Effect of soybean protein-specific IgG levels of weaning piglets fed with fermented soybean meal.

<sup>1</sup>Represent significantly different at  $p < 0.05$  between week of age.

#### 結論

本研究顯示，枯草桿菌可在不需要額外添加碳源，且初始水分 53.5% 的大豆粕基質中進行發酵作用，產生較高的蛋白酶活性表現，有效分解大豆儲存性蛋白質。由離乳仔豬隻生長性能結果顯示，枯草桿菌發酵大豆粕具有較佳嗜口性，可增加仔豬採食量，並減緩對大豆的過敏反應，以促進生長性能。添加 10% 發酵大豆粕可以部分取代一般大豆粕以及全魚粉，可改善仔豬生長性能及減

少大豆蛋白之抗體產生。

#### 參考文獻

- (1) J. R. Pluske, I. H. Williams and F. X. Aheme. Nutrition of the neonatal pig. In: *The neonatal pig: development and survival* (M. A. Varley ed.), CAB Int. 187-235 (1995).
- (2) Y. O. Fasina, H. L. Classen, J. D. Garlich, H. E. Swaisgood and D. A. Clare. Investigating the possibility of monitoring lectin levels in commercial soybean meals intended for poultry feeding using steam-heated soybean meal as a model. *Poult. Sci.* **82**: 648-656 (2003).
- (3) C. R. Stokes, T. J. Newby, B. G. Miller and F. J. Bourne. The immunological significance of transient cell mediated immunity to dietary antigens. In: *Cell mediated immunity* (P. J. Quinn ed.), 249 (1984).
- (4) B. G. Miller, P. S. James, M. W. Smith and F. J. Bourne. Effect of weaning on the capacity of pig intestinal villi to digest and absorb nutrients. *J. Agr. Sci.* **107**: 579-589 (1986).
- (5) V. H. Thanh and K. Shibasaki. Major proteins of soybean seeds, Reconstitution of  $\beta$ -conglycinin from its subunits. *J. Agric. Food Chem.* **26**: 692-695 (1978).
- (6) J. M. Renkema, J. H. Knabben and T. Vliet. Gel formation by  $\beta$ -conglycinin and glycinin and their mixtures. *Food Hydrocolloids.* **15**: 407-414 (2001).
- (7) N. C. Nielsen. The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**: 1680-1686 (1985).
- (8) J. R. Brooks and C. V. Morr. Current aspects of soy protein fractionation and nomenclature. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **62**: 1347-1354 (1985).
- (9) V. H. Thanh and K. Shibasaki. Major proteins of soybean seeds: a straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric, Food Chem.* **24**: 1117-1121 (1976).
- (10) Y. Zhao, G. Qin, Z. Sun, X. Zhang, N. Bao, T. Wang, B. Zhang, B. Zhang, D. Zhu and L. Sun. Disappearance of immunoreactive glycinin and  $\beta$ -conglycinin in the digestive tract of piglets. *Arch. Anim. Nutr.* **62**: 322-330 (2008).
- (11) D. F. Li, J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, R. D. Klemm, D. W. Giesting, J. D. Hancock, G. L. Allee and R. D. Goodband. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria. *J. Anim. Sci.* **69**: 3299-3307 (1991).
- (12) K. H. Steinkraus. Indigenous fermented foods involving an alkaline fermentation. In: *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. Ed. Steinkraus, K.H. *Marcel Dekker*: 349-362 (1995).
- (13) J. L. Kiers, A. E. A. Van laeken, F. M. Rombouts and M. J. R. Nout. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *Int. J. Food Microbiol.* **60**: 163-169 (2000).

- (14) J. Feng, X. Liu, Z. R. Xu, Y. P. Lu and Y. Y. Liu. Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. *Digest. Dis. Sci.* **52**: 1845-1850 (2007).
- (15) K. Farzana, S. N. Shah, F. B. Butt and S. B. Awan. Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. *J. Pharm. Sci.* **18**: 55-57 (2005).
- (16) G. R. Dapeau. Methods in enzymology. (L. Lorand ed.), vol. 45. Academic Press 471 (1976).
- (17) J. O. Lee, M. H. Park, Y. H. Choi, Y. L. Ha and C. H. Ryu. New fermentation technique for complete digestion of soybean protein. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 1904-1907 (2007).
- (18) J. Frias, Y. S. Song, C. Martínez-Villaluenga, E. González de Mejia and C. Vidal-Valverde. Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 99-105 (2008).
- (19) J. Millet. Characterization of proteinases excreted by *Bacillus subtilis* Marsburg strain during sporulation. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 207-219 (1970).
- (20) D. Tsuru, H. Kira, T. Yamamota and J. Fukumoto. Studies on bacterial protease. XVI. Purification, crystallization, and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. *amylosacchariticus*. *Agric. Biol. Chem.* **30**: 856-862 (1966).
- (21) H. K. Uehara, Yamane and B. Maruo. Thermosensitive, extracellular neutral protease in *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and genetics. *J. Bacteriol.* **139**: 583-590 (1979).
- (22) H. Fujii. On the formation of mucilage by *Bacillus natto*. Part II. Chemical constituents of mucilage in natto. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **37**: 407-411 (1963).
- (23) F. Yamaguchi, Y. Ogawa, M. Kikuchi, K. Yuasa and H. Motai. Detection of  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) by SDS-PAGE. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 255-258 (1996).
- (24) S. A. Odunfa. Dawadawa. In: *Legume-based fermented foods* (N. R. Reddy, M. D. Pierson, D. K. Salunkhe ed.), CRC Press 173-189 (1986).
- (25) P. K. Sarkar and J. P. Tamang. Changes in the microbial profile and proximate composition during natural and controlled fermentations of soybeans to produce kinema. *Food Microbiol.* **12**: 317-325 (1995).
- (26) H. Yang, L. Liu, J. Li, G. Du and J. Chen. Heterologous expression, biochemical characterization, and overproduction of alkaline  $\alpha$ -amylase from *Bacillus alcalophilus* in *Bacillus subtilis*. *Microb. Cell Fact.* **10**: 77 (2011).
- (27) M. I. Volkov, E. I. Tkachenko, E. V. Vorobeichikov and A. V. Sinitsa. *Bacillus subtilis* metabolites as a novel promising probiotic preparations. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 75-80 (2007).

- (28) W. Visessanguan, S. Benjakul, W. Potachareon, A. Panya and S. Riebroy. Accelerated proteolysis of soy proteins during fermentation of thua-nao inoculated with *Bacillus subtilis*. *J. Food Biochem.* **29**: 349-366 (2005).
- (29) C. C. Chou, R. C. Yu and C. S. Tsai. Production of glutaminase by *Actinomucor elegans*, *A. taiwanensis* and *Aspergillus oryzae*. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.* **31**, 78-86 (1993).
- (30) R. Fuller. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378 (1989).
- (31) J. L. Kiers, J. C. Meijer, M. J. R. Nout, F. M. Rombouts, M. J. A. Nabuurs and J. Meulen. Effect of fermented soya beans on diarrhoea and feed efficiency in weaned piglets. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 545-555 (2003).
- (32) D. F. Li, J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, J. D. Hancock, G. L. Allee, R. D. Goodband and R. D. Klemm. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early weaned pig. *J. Anim Sci.* **68**: 1790-1799 (1990).
- (33) X. Liu, J. Feng, Z. R. Xu, Y. Z. Wang and J. X. Liu. Oral allergy syndrome and anaphylactic reaction in BALB/c mice caused by soybean glycinin and  $\beta$ -conglycinin. *Clin. Exp. Allergy* **38**: 350-356 (2007).