

飼料中添加益生菌 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 及其所產乳果糖與果聚糖產物 對點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 成長之影響

黃美瑩 · 朱惠真* · 曾亮瑋 · 曾福生

行政院農業委員會水產試驗所水產養殖組

摘 要

本研究探討 *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 對於胃酸與膽鹽之耐受情形，並探究點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 分別飼餵 (1) 對照組、(2) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g)+乳果糖 (0.15%) 的培養液及 (3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g)+果聚糖 (0.15%) 的培養液飼料 10 週，對於魚隻成長、消化酵素活性及腸道細菌數之影響。結果顯示，*B. licheniformis* FRI MY-55 可以耐受 pH 2.5 及 1.0% 膽鹽。點帶石斑經分別餵食 (1) 對照組、(2) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55+乳果糖的培養液及 (3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55+果聚糖的培養液飼料，試驗組魚隻之最終平均體重及增重率稍高於對照組，與對照組比較，在統計上無顯著差異 ($p > 0.05$)，試驗組與對照組魚隻之飼料轉換率 (Feed conversion ratio, FCR) 在統計上亦無顯著差異 ($p > 0.05$)。消化酵素活性方面，試驗組魚隻腸道中蛋白酶及脂肪酶之活性顯著高於對照組 ($p < 0.05$)，而澱粉酶活性與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$)。試驗組魚隻腸道中弧菌數均明顯較對照組為低。以上結果顯示，益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產乳果糖與果聚糖有增加石斑魚消化酵素活性之趨勢。

關鍵詞：點帶石斑、*Bacillus licheniformis* FRI MY-55、乳果糖、果聚糖、消化酵素、腸道細菌數

前 言

石斑魚具有肉質佳、味道鮮美、成長快速、飼料效率佳及經濟價值高等特性，為世界重要的養殖魚種之一 (Heemstra and Randall, 1993)。由於石斑魚在較高密度環境下仍能生存且快速成長，因此，石斑魚集約式的養殖方式在台灣已相當普遍。

益生菌 (probiotics) 通常定義為用以提升宿主健康所使用的微生物，而水產的益生菌尚包括可以改善水質的微生物 (Nayak, 2010)。水產上所使用益生菌的範圍較陸上動物為廣，而主要種類為芽孢桿菌類 (*Bacillus* spp.)、乳酸菌 (lactic acid bacteria) 及酵母菌 (yeast) 等 (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008)。

水產的益生菌其功能包含下列幾項：改善水質、增加營養及改進飼料消化性、提升生物免疫能力、與病原菌競爭進而排斥病菌及抵抗病毒等。因此在水產養殖上使用益生菌可以 (1) 改善養殖環境 (Garriques and Arevalo, 1995; Gatesoupe, 1999)；(2) 促進養殖生物成長 (Tucker and Kennedy, 2001; Wang *et al.*, 2008)；(3) 降低養殖生物疾病之發生 (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008)、(4) 增加抗病能力 (Nayak, 2010; Swapna *et al.*, 2015)；(5) 減低死亡率 (Gobi *et al.*, 2016; Gobi *et al.*, 2018) 及 (6) 減少抗生素的濫用 (Promnuan and Kiriratnikom, 2018; Qin *et al.*, 2020)。

益生素 (prebiotics) 是定義為非消化性的食物原料，此類原料可選擇性的刺激體內益生菌的生長，進而促進宿主健康；益生素主要是非消化性的碳水化合物，包括寡糖及聚糖等 (Gibson and Roberfroid, 1995)。研究報告指出，以益生素作為飼料添加物可有效增進魚蝦類的成長及免疫能

*通訊作者 / 基隆市和一路 199 號, TEL: (02)2463-3101
轉 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjeng@mail.tfrin.gov.tw

力，如：果寡糖 (fructo-oligosaccharides) (He *et al.*, 2003)、甘露寡糖 (mannan-oligosaccharides) (Geng *et al.*, 2007)、聚葡萄糖 (β -glucan) (Yano *et al.*, 1989; Matsuyama *et al.*, 1992; Jeney and Anderson, 1993; Itami *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1994)、果聚糖 (levan) (Gupta *et al.*, 2008) 及葡萄糖寡糖 (gluco-oligosaccharides) (Hasan *et al.*, 2018) 等，可增強鯉魚 (*Cyprinus carpio*)、青甘鱔 (*Seriola quinqueradiata*)、虹鱔 (*Oncorhynchus mykiss*)、野鯪 (*Labeo rohita*)、斑節蝦 (*Marsupenaeus japonicus*) 及牙鯨 (*Paralichthys olivaceus*) 等水產生物成長及對細菌性疾病的抵抗力。

一般合益素 (synbiotic) 為結合使用益生菌及益生素，其所產生提升水產生物成長及細菌性疾病的抵抗力之效益，通常比二者單獨使用效果的總合還高；飼料中添加甘露寡糖配合乳酸菌-糞腸球菌 (*Enterococcus faecalis*)，可以增加虹鱔成長並活化免疫系統 (Rodriguez-Estrada *et al.*, 2009)。而牙鯨飼料添加甘露寡糖、果寡糖及益生菌 (*Bacillus clausii*) 飼料後，發現二者對於成長及抗病力有加乘的效用 (Ye *et al.*, 2011)。飼料中添加果寡糖及 *B. subtilis* 不只提升大黃魚 (*Larimichthys crocea*) 的成長及飼料利用情形，也提高疾病抵抗力 (Ai *et al.*, 2011)。而飼料中適量的幾丁聚糖及 *B. subtilis* 的添加，明顯提升海鱸 (*Rachycentron canadum*) 生長及抵抗病菌感染的能力 (Geng *et al.*, 2011)。飼料添加商業的合益素可增加虹鱔成長、活存率、血清總蛋白及白蛋白等，並能提升飼料效率 (Mehrabi *et al.*, 2012)。牙鯨飼料含有 *Bacillus* spp. + β -gluco-oligosaccharides 飼料，對於成長及抗病力有加乘的效用 (Hasan *et al.*, 2018)。鯉魚飼料添加 *B. subtilis* + β -glucan 飼料，有助於提升魚隻成長、腸道中消化酵素活性、魚隻肉片的品質及血液中多項免疫指標 (Cao *et al.*, 2019)。

有關現今市場應用較廣泛之寡糖與聚糖的來源，其中寡糖依原料不同而其製造方式也有所不同，除了大豆寡糖萃取自大豆，乳酮糖 (lactulose) 是利用化學合成外，其他寡糖多是使用酵素方式取得 (Nakakuki, 2005)，而聚糖方面，聚葡萄糖主要從真菌及酵母菌等微生物或部分藻類之細胞壁萃取純化 (Robertson *et al.*, 1994)；上述方式大多須要經過繁瑣之萃取及純化等步驟，取得較為不易，

因此價格高昂，雖然作為養殖生物的免疫激活物之功效良好，因價位仍然偏高，因此推廣不易。

黃等 (2017) 先前研究中述及自鱸魚腸道篩選出 *Leuconostoc mesenteroides* B4，該菌在特殊醣類條件下會產生寡糖與葡聚糖。*L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖之產物有助於增加白蝦 (*Litopenaeus vannamei*) 成長、降低肝胰腺之弧菌數、提升免疫反應、抗腸炎弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 感染及提高白蝦在腸炎弧菌攻擊後之存活率 (Huang *et al.*, 2017, 2018)。黃等 (2018) 指出，點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 飼料添加 *L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖產物的飼料，有助於提升石斑魚隻的成長。又，*L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖之產物有助於降低石斑腸道之弧菌數、提升免疫反應及提高石斑在哈維氏弧菌 (*V. harveyi*) 攻擊後之存活率 (黃等, 2019)。此外，黃 (2019) 近期在吳郭魚田間試驗顯示，飼料中添加 1% 益生菌 *L. mesenteroides* B4 及其葡聚糖產物飼食吳郭魚 2 個月，有助於提升魚隻成長及健康情形，縮短養殖時間 1 個月，有效降低養殖成本及減少風險。

乳果糖 (lactosucrose) (4G- β -D-lactosylfructoside, galactosylsucrose) 是一種 3 糖的寡糖，由葡萄糖、半乳糖及果糖組成，已知有多種微生物可以以分泌的果聚糖蔗糖酶 (levansucrase) 作用蔗糖及乳糖而產生乳果糖 (Han, 1990)。嘉鱔、虹鱔及鯉魚腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸 (Kihara *et al.*, 1995; Kihara and Sakata, 2001, 2002)。乳果糖為益生素的一種，人類、狗、貓及雞攝食乳果糖後顯著增加腸道內益生菌-乳酸桿菌 (*Lactobacillus* spp.) 及雙歧桿菌 (bifidobacteria)，而減少害菌-產氣莢膜梭狀芽孢桿菌 (*Clostridium perfringens*) (Silverio *et al.*, 2015)。

果聚糖是一種果糖的聚合物 (fructan)，已知有多種微生物可以以分泌的果聚糖蔗糖酶作用蔗糖而產生果聚糖 (Han, 1990)。果聚糖具有抗腫瘤 (黃等, 2010; Calazans *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2004)、具益生素功能 (Dal Bello *et al.*, 2001; Korakli *et al.*, 2002; Semjonovs and Zikmanis, 2007; Huang *et al.*, 2013) 及提升免疫能力 (Calazans *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2004) 等保健功效。

在水產養殖研究上，果聚糖對於鯉魚及野鯪稚魚具有免疫調節效果，並可提升其對病原菌 *Aeromonas hydrophila* 之抵抗能力 (Rairakhwada *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2008, 2014, 2018)。Gupta *et al.* (2010) 將果聚糖添加於鯪稚魚飼料中餵食後，魚隻體內熱休克蛋白質 70 (heat shock protein 70) 含量明顯增加，而且魚隻對於較高溫 (35°C) 環境之耐受能力明顯提高。因此，Gupta *et al.* (2011) 認為，微生物所產果聚糖在水產養殖上是很理想的免疫激活物。此外，Huang *et al.* (2015) 指出，點帶石斑經餵食添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 所產果聚糖飼料後，試驗組最終體重及增重率均較對照組明顯增加 ($p < 0.05$)。餵食添加果聚糖組石斑魚腸道中的總好氣性生菌數及弧菌數均明顯較對照組為低 ($p < 0.05$)，此外，血清中免疫指數及以病原菌 *V. harveyi* 攻擊後存活率，均以餵食含果聚糖飼料的魚隻最高，且統計上與對照組有明顯差異 ($p < 0.05$)。

黃等 (2011) 先前研究中述及自海水吳郭魚養殖池中篩選出果聚糖產生量較高之益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55，且能產生乳果糖，菌株能耐受 7.0% 鹽分；Huang *et al.* (2015) 指出，飼料中添加 2.5% 果聚糖可以有效促進點帶石斑的成長及疾病抵抗能力。由於 *B. licheniformis* 為許多水產生物腸道中天然菌相之一 (Ramesh *et al.*, 2015)，且具有抑制多種病原菌之功能 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Andriani *et al.*, 2017)，因此，*B. licheniformis* 具有做為益生菌的特點，而其寡糖與果聚糖產物具有作為益生素之特性，結合該菌及其寡糖與聚糖產物的合益素在水產養殖應該有良好的發展潛力，不過，目前文獻上很少有此類合益素組合於水產養殖的相關應用，因此本研究添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其乳果糖與果聚糖產物的培養液於飼料中，探討其對於石斑魚隻成長、腸道消化酵素及腸道細菌數之影響，並探究 *B. licheniformis* FRI MY-55 耐受胃酸及膽鹽的情形，以作為將來水產養殖應用之參考。

材料與方法

一、益生菌來源

本研究用以產生乳果糖及果聚糖之益生菌為黃等 (2011) 自海水吳郭魚養殖池中篩選出的 *B. licheniformis* FRI MY-55 菌株。

二、益生菌耐胃酸及膽鹽之測試

Pepsin 溶液先以 0.22 μ m 濾膜過濾，分別加入 pH 1.0、2.0、2.5 及 3.0 之胰化蛋白大豆培養液 (tryptic soy broth, TSB, 購自 Difco)，最終濃度為 1,000 units/mL。菌株先在 28°C 培養 24 hr，然後離心 (4,000 $\times$ g, 10 min, 4°C)。將細胞收集後再懸浮於滅菌過的生理食鹽水 (0.85% NaCl)，接種 10⁶ CFU/mL 於上述不同 pH 之 TSB，然後於 28°C 培養 3 hr，於含有 0.15% β -glycerophosphate (Sigma) 的胰化蛋白大豆培養基 (tryptic soy agar, TSA, 購自 Difco) TSA 平板上計數細菌數 (Oh *et al.*, 2000)。膽鹽的耐受程度測試 (Chung *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000) 係將菌株於 TSB，25°C 培養 24 hr，離心 (4,000 $\times$ g, 10 min, 4°C)，收集細胞懸浮液於生理食鹽水中 (0.85% NaCl)，然後接種於含有 0.2、0.4、0.7 及 1.0% 膽酸 (oxgall, Difco) 的 TSB 中，再於 28°C 培養 24 hr 後於 TSA 平板中計數。

三、益生菌、乳果糖及果聚糖之製備

(一) 益生菌及乳果糖之製備

乳果糖及果聚糖之製備方式參考 Park *et al.* (2001) 之方法，益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55 用以產生乳果糖及果聚糖之培養液組成參考黃等 (2011)。將益生菌接種於含 10% 乳糖及 10% 蔗糖之培養液 28°C 震盪培養 48 hr，可以得到含有益生菌+乳果糖的培養液，菌數達 10⁹ CFU/mL 以上，此益生菌+乳果糖的培養液作為飼料中益生菌+乳果糖的添加來源。

以 HPLC 分析估算所產乳果糖含量，將含有益生菌及乳果糖之培養液經離心 (9,000 $\times$ g 30 min)，再以 0.22 μ m 無菌過濾膜 (nylon syringe filters, 13 mm; Millipore, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 過濾後，下層濾液使用高效能液相色層分析儀 (high performance liquid chromatography, HPLC; Waters, 1515 isocratic HPLC pump) 檢測上

澄液中的不同醣類 (Euzenat *et al.*, 1997)。本試驗使用高效能液相層分析儀搭配 HPLC 管柱 Sugar-Pak™ 1 (6.5 × 300 mm column) 進行分析，並且以折射計 [refractive index (RI) detector; Waters, 2414] 為檢測器來檢測蔗糖、葡萄糖、果糖及寡糖等。溶析液為 50 mg/L EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid)，流速為 0.5 mL/min，管柱溫度維持在 90°C。分析後之圖譜以 Breeze 軟體 (Waters) 計算出滯留時間對應各糖類之標準曲線，換算成蔗糖、葡萄糖、果糖及寡糖各組成含量。

(二) 益生菌及果聚糖之製備

將益生菌接種於含 20% 蔗糖之培養液 28°C 震盪培養 48 hr，可以得到含有益生菌 + 果聚糖的培養液，菌數達 10^9 CFU/mL 以上，此益生菌 + 果聚糖的培養液作為飼料中益生菌 + 果聚糖的添加來源。

以重複乙醇沉澱及水洗估算果聚糖產量，將細菌培養液離心後，加入 3 倍的冷乙醇 (99%)，於 4°C 放置隔夜後，於 4°C, $10,000 \times g$ 離心 30 min，沉澱物為果聚糖，再以蒸餾水溶解後重複乙醇沉澱及水洗步驟共 3 次，得到純化之果聚糖，進行凍結乾燥 (EYELA Freeze Dryer FDU-2200; Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan) 後稱重，以估算果聚糖產量 (Shih *et al.*, 2005)。

四、實驗用飼料之製作

由於 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖之培養菌液呈現黏稠狀，無法以簡單的離心將 *B. licheniformis* FRI MY-55 與果聚糖有效分離，因此本試驗主要進行合益素 - *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖及 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖之培養菌液直接使用於飼料之製作。

實驗飼料共有 3 組，分別為 (1) 對照組；(2) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + 乳果糖 (0.15%) 的培養液及 (3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + 果聚糖 (0.15%) 的培養液。

各組飼料製作方式如下：(1) 對照組係以未接種細菌之培養液直接添加於商業飼料；(2) 添

加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液組則以三 (一) 所製備含有 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖之培養液添加於飼料；(3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組則以三 (二) 所製備含有 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖之培養液添加於飼料。各組培養液添加比例為 1 kg 飼料添加 30 ml 培養液 (菌)，以烘箱加熱乾燥 (45°C, 48 hr)。

將上述各培養液 (菌) 添加在成鰻配合飼料 (福壽牌，福壽實業股份有限公司，台中，臺灣) 並攪拌均勻，以烘箱加熱乾燥飼料後，再添加 5% 沙拉油於飼料表層，以避免投餵魚隻後，包覆在飼料外層之益生菌、寡糖或聚糖迅速溶於水中。所製成之飼料於 4°C 冷藏 1 個月，含益生菌組之飼料 (第 2 及 3 組) 每週取樣，檢測飼料內益生菌殘存量，在益生菌含量仍為 10^7 CFU/g 期限內投餵與石斑魚，進行動物試驗。

秤取定量含益生菌組之飼料，加入適量生理食鹽水稀釋後，以均質刀充分打碎，適當稀釋後塗抹於胰化蛋白大豆培養基 (tryptic soy agar, TSA, 購自 Difco) 上面，於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 48 hr 後，計數 *B. licheniformis* FRI MY-55 菌落數 (Hoseinifar *et al.*, 2011)。

五、益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚隻之生長研究

(一) 實驗動物

實驗所用之 300 尾點帶石斑購自民間養殖場，蓄養於水產試驗所內 4 個循環 FRP (500 L) 桶中 2 週，水溫維持在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

(二) 益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚隻之生長研究

實驗共有 3 組，取體型大小約 34 g 的魚 180 隻進行實驗，每缸 20 尾魚 3 重複，隨機選取魚隻並放置於 9 座 82 L 的玻璃缸。於每日上午 9 點及下午 5 點投餵飼料，投餵量為魚隻體重的 2.0%，每 2 週量測魚隻體重一次並調整投餵量，每次投餵 30 min 後，將未被攝食的殘餌撈起，計數殘餌數量，自投餵量中扣除。實驗期間水溫控制在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ ，每日換水三分之一。試驗共進行 10 週。

(三) 成長分析

成長實驗期間每 2 週量測魚隻體重一次，測量當天不予餵食魚隻。分析增重率 (percent weight gain, PWG) 及飼料轉換率 (feed conversion ratio, FCR)。

$PWG (\%) = [(\text{最後體重}) - (\text{最初體重}) / (\text{最初體重})] \times 100\%$

$FCR = \text{總飼料攝取量} / [(\text{最後體重}) - (\text{最初體重})]$

六、飼料中添加益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚類消化酵素活性之影響

魚隻餵食 3 組不同飼料 10 週後，每缸採集 1 尾魚，每組共採集 3 隻魚隻腸道，分別進行消化酵素活性分析。採樣前魚隻禁食 48 hr，需採樣的魚先以丁香酚麻醉劑鎮靜後，用濕毛巾包裹避免其掙扎，採樣前將魚隻以 75% 酒精進行表面殺菌，以滅菌後之剪刀剪開魚隻腹部，配合滅菌後之鑷子取出腸道，秤重後剪成數小段，加入定量無菌的生理食鹽水 (0.85% NaCl) 稀釋後，以均質機 (T18 basic Ultra Turrax®, IKA® Works Inc., Wilimington, NC, USA) 配合已滅菌之均質刀 (S18N-10 G Dispersing Tool, IKA® Works Inc.) 充分打碎，加入 2 倍蒸餾水，於 4°C 下，以 $10,000 \times g$ 離心 10 min 後，取上清液即為粗酵素抽取液，供酵素分析用。

(一) 澱粉酶

澱粉酶的測定依據 Shan *et al.* (2009) 的方法，以澱粉為基質，將澱粉溶於 Tris-HCl 緩衝液 (50 mM, pH 6.7)，取定量粗酵素抽取液加入後於 28°C 反應 30 min，添加碳酸鈉與 DNS (dinitrosalicylic acid) 試劑，於 100°C 加熱 15 min，最後加入蒸餾水稀釋，於 O.D. 550 nm 測定吸光值；以葡萄糖之標準曲線，換算樣品中葡萄糖含量。酵素比活性單位以 $\mu\text{g glucose/min/mg}$ 蛋白質表示。

(二) 中性/鹼性蛋白酶

中性/鹼性蛋白酶的測定依據 Alvarez-

Gonzalez *et al.* (2006) 方法，以酪蛋白為基質，將酪蛋白溶於 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5 / pH 9.0)，取定量粗酵素抽取液加入後於 28°C 反應 30 min，以 20% TCA (trichloroacetic acid) 溶液終止反應，再以 0.45 μm 濾膜過濾後，於 O.D. 280 nm 測定吸光值，以 tyrosine 之標準曲線，換算樣品中 tyrosine 含量。酵素比活性單位以 $\mu\text{g tyrosine/min/mg}$ 蛋白質表示。

(三) 酸性蛋白酶

酸性蛋白酶的測定依據 Alvarez-Gonzalez *et al.* (2006) 方法，以血紅素為基質，將血紅素溶於 glycine-HCl 緩衝液 (pH 2.0)，取定量粗酵素抽取液加入後於 28°C 反應 20 min，以 20% TCA 溶液終止反應，再以 0.45 μm 濾膜過濾後，測定 O.D. 280 nm 之吸光值，以 tyrosine 之標準曲線，換算樣品中 tyrosine 含量。酵素比活性單位以 $\mu\text{g tyrosine/min/mg}$ 蛋白質表示。

(四) 脂肪酶

脂肪酶的測定依據 Pinsirodon and Parkin (2001) 方法，取定量粗酵素抽取液加入含 P-nitrophenol laurate 之 Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) 後，於 28°C 反應 15 min，以醋酸終止反應，於 O.D. 410 nm 測定吸光值，以 P-nitrophenol 之標準曲線，換算樣品中 P-nitrophenol 含量。酵素比活性單位以 $\mu\text{g P-nitrophenol/min/mg}$ 蛋白質表示。

七、飼料中添加益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚隻腸道中總生菌數、*B. licheniformis* FRI MY-55、弧菌數及乳酸菌數之影響

魚隻餵食 3 組不同飼料 10 週，停止餵食 2 天後，每組分別採集 3 隻魚腸道混和後進行總生菌、弧菌數及乳酸菌數量計算。需採樣的魚先以丁香酚麻醉劑鎮靜後，用濕毛巾包裹避免其掙扎，以酒精進行表面殺菌，以滅菌後之剪刀剪開魚隻腹部，配合滅菌後之鑷子取出腸道，秤重後剪成數小段，加入適量生理食鹽水稀釋後以均質刀充分打碎，適當稀釋後分別塗抹於含有 2.5% 氯化鈉之胰化蛋白大豆培養基 (tryptic soy agar, TSA, 購自

Difco) 及硫代硫酸鹽-檸檬酸鹽-膽鹽-蔗糖洋菜培養基 (thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar, TCBS, 購自 Difco) 上面, 於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 48 hr 後計數菌落數, 以分別計數總生菌數量及弧菌數量, 在胰化蛋白大豆培養基上, 根據 *B. licheniformis* FRI MY-55 菌落的特性估算該菌數量。另將腸液樣品塗抹於含有 2.5% 氯化鈉之 MRS 培養基 (de Man, Rogosa, Sharpe, 購自 Difco), 於厭氧缸 (anaerobic jar, Oxoid Limited, Hampshire, UK) 內配合厭氧包 (generating packet, AnaeroPack Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan) 於 $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養 96 hr 後計數菌落數, 以計數乳酸菌數量 (Hoseinifar *et al.*, 2011)。

八、統計分析方法

各試驗結果以 SAS 套裝軟體 (Version 14.0) 進行變異數 (one way analysis of variance, ANOVA) 統計分析, 並以 Duncan's test 測試各處理組間是否有顯著差異, 所有試驗使用顯著水準為 $p < 0.05$ 。

結果與討論

一、益生菌耐胃酸及膽鹽試驗

選擇用以添加飼料的益生菌時, 益生菌主要是作為平衡腸道菌相的功能, 因此最重要的考量因素是該益生菌之耐低 pH 及膽鹽的能力 (Kim and Austin, 2008)。 *B. licheniformis* FRI MY-55 之耐胃酸試驗 (pH 1.0 - 3.0) 結果顯示, *B. licheniformis* FRI MY-55 在 pH 2.0 以下活存率低於 20%, pH 2.5 以上達 80% 以上活存率 (Fig. 1)。Kim *et al.* (2005) 指出, *B. licheniformis* 於 pH 2.0 以下不安定, pH 3.0 - 7.0 具有耐受性。而發酵粥 (fermented congee) 中分離的 *B. licheniformis* 可以耐受 pH 2.5 的環境, 該菌可以通過胃前往腸道, 在腸道的活存率達到 90% 以上 (Wang *et al.*, 2010)。自鯉魚腸道分離出的 *B. licheniformis*, 在 pH 2.0 的環境具有耐受性, 活存率達 80% (Ramesh *et al.*, 2015)。Andriani *et al.*

(2017) 報導, *B. licheniformis* 可以耐受 pH 2.0 的環境。

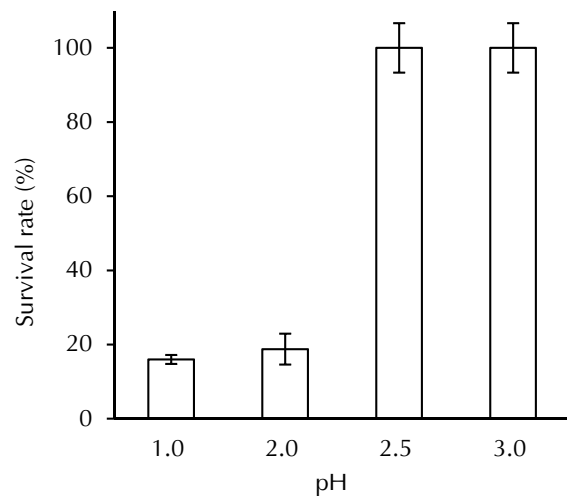


Fig. 1 Survival rates of *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 after 3 hr of exposure to stimulated gastric fluid.

本研究 *B. licheniformis* FRI MY-55 在 pH 2.0 活存率較低, 試驗結果與 Kim *et al.* (2005) 結果相近, 但與 Ramesh *et al.* (2015) 及 Andriani *et al.* (2017) 報導, *B. licheniformis* 在 pH 2.0 的環境具有耐受性不同; 而 *B. licheniformis* FRI MY-55 在 pH 2.5 環境下, 活存率達 80% 以上, 與 Wang *et al.* (2010) 分離自發酵粥的 *B. licheniformis* 相近, 該菌可以通過胃前往腸道, 在腸道有高的活存率, 因此推測 *B. licheniformis* FRI MY-55 被魚隻攝食後, 在魚隻體內應該可以耐胃酸, 通過胃前往腸道。

B. licheniformis FRI MY-55 之耐膽鹽試驗結果顯示, *B. licheniformis* FRI MY-55 在含有 0.2 - 1.0% 膽鹽的條件下, 活存率為 80.0 - 92.0% (Fig. 2)。膽鹽耐受性是益生菌在腸道生長及活存的必備條件 (Axelsson, 2004)。 *B. licheniformis* 於 25% 膽酸的環境具有耐受性 (Kim *et al.*, 2005)。發酵粥中分離的 *B. licheniformis* 可以耐受 0.6% 膽鹽的環境, 可以通過胃前往腸道, 在腸道的活存率仍高 (Wang *et al.*, 2010)。自鯉魚腸道分離出的 *B. licheniformis*, 在 2.5 - 10.0% 的膽鹽環境具有耐受性, 活存率達 72 - 56%, 在腸道的活存率達到 75% 以上 (Ramesh *et al.*, 2015)。Andriani *et al.* (2017) 報導, *B. licheniformis* 可以耐受 0.3 及 0.5% 的膽鹽環境。

本研究 *B. licheniformis* FRI MY-55 可以耐受 1.0% 膽鹽環境，試驗結果與分離自發酵粥 (Wang *et al.*, 2010) 及 Andriani *et al.* (2017) 報導的 *B. licheniformis* 耐受膽鹽的結果 (0.3 – 0.6%) 相近。益生菌可以耐受膽鹽表示，該益生菌應該可以在腸道生長及活存。

本研究 *B. licheniformis* FRI MY-55 可以耐受 pH 2.5 及 1.0% 膽鹽，推測 *B. licheniformis* FRI MY-55 被魚隻攝食後，在魚隻體內應該可以耐受胃酸及膽鹽考驗，通過胃前往腸道定殖。

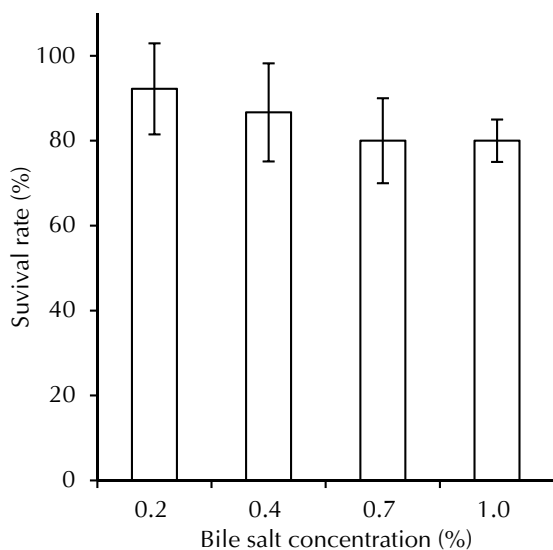


Fig. 2 Survival rates of *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 after 24 hr of exposure to stimulated intestinal fluid.

二、含益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55、乳果糖及果聚糖之飼料製備

將 *B. licheniformis* FRI MY-55 接種於含蔗糖及乳糖之培養液培養後，得到含有益生菌及乳果糖之培養液，益生菌菌數達 10^9 CFU/mL 以上，依據 HPLC 分析結果顯示，培養液中產生約 50 mg/mL 乳果糖 (Fig. 3)。而將 *B. licheniformis* FRI MY-55 接種於含蔗糖之培養液培養後，得到含有益生菌及果聚糖之培養液，益生菌菌數達 10^9 CFU/mL 以上，將細菌培養液離心後，重複乙醇沉澱及水洗，得到純化之果聚糖約 50 mg/mL。

實驗飼料共有 3 組，分別為 (1) 對照組、(2) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + 乳

果糖 (0.15%) 的培養液及 (3) 添加 *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + 果聚糖 (0.15%) 的培養液。所製成之飼料於 4°C 冷藏 1 個月，含益生菌組之飼料 (2 及 3 組) 每週取樣，檢測飼料內益生菌殘存量。結果顯示，含益生菌組之飼料於 4°C 冷藏 1 個月後，菌數仍能維持 10^7 CFU/g，符合預設飼料含益生菌量 10^7 CFU/g 的標準，因此動物試驗期間，所製飼料於 4°C 冷藏 1 個月內使用。

三、點帶石斑魚飼食添加益生菌、乳果糖及果聚糖飼料對魚隻成長之影響

點帶石斑魚分別飼食 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液之飼料 10 週，各組魚隻之平均體重自 34.87 – 35.35 g 分別增加為 79.39g、85.74 g 及 84.07 (Table 1)，試驗組最終體重稍高於對照組，但與對照組比較，在統計上無顯著差異 ($p > 0.05$)。各組之平均增重率分別為 124.60% (控制組)、142.75% (*B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液)、141.11% (*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液)，試驗組的平均增重率稍高於對照組，但與對照組比較，在統計上無顯著差異 ($p > 0.05$)。而飼料轉換率方面，分別為 1.06 (控制組)、1.06 (*B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液) 及 1.08 (*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液)，試驗組與對照組間亦無明顯差異 (Table 1)。

淡水長臂大蝦 (*Macrobrachium rosenbergii*) 分別飼食對照組及含 *B. licheniformis* (1.0×10^6 – 1.0×10^9 CFU/g) 的飼料，試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$)，飼料轉換率低於對照組 ($p < 0.05$) (Kumar *et al.*, 2013)。尼羅吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) 分別飼食對照組及含 *B. licheniformis* (4.0×10^6 – 2.0×10^7 CFU/g) 的飼料後，試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$)，此外，試驗組魚隻腸道的絨毛較對照組完整 (Han *et al.*, 2015)。白蝦分別飼食對照組及含 *B. licheniformis* (10^6 CFU/g) 的飼料，試驗組蝦隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.01$) (Swapna *et al.*, 2015)。非洲鯰魚

Table 1 Growth performance of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) specimens fed with a control diet, a diet supplemented with *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + lactosucrose (0.15%) culture medium, and a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + levan (0.15%) culture medium for 10 weeks

	Dietary		
	Control	<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55+ lactosucrose culture medium	<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55+ levan culture medium
Initial weight (g)	35.35 ± 8.54 ^a	35.32 ± 6.93 ^a	34.87 ± 8.55 ^a
Final weight (g)	79.39 ± 23.72 ^a	85.74 ± 25.07 ^a	84.07 ± 29.16 ^a
PWG (%)	124.6% ± 26.92 ^a	142.75% ± 28.70 ^a	141.11% ± 25.71 ^a
FCR	1.06 ± 0.09 ^a	1.06 ± 0.12 ^a	1.08 ± 0.09 ^a

PWG: percent weight gain.

FCR: Feed conversion rate.

Rows with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

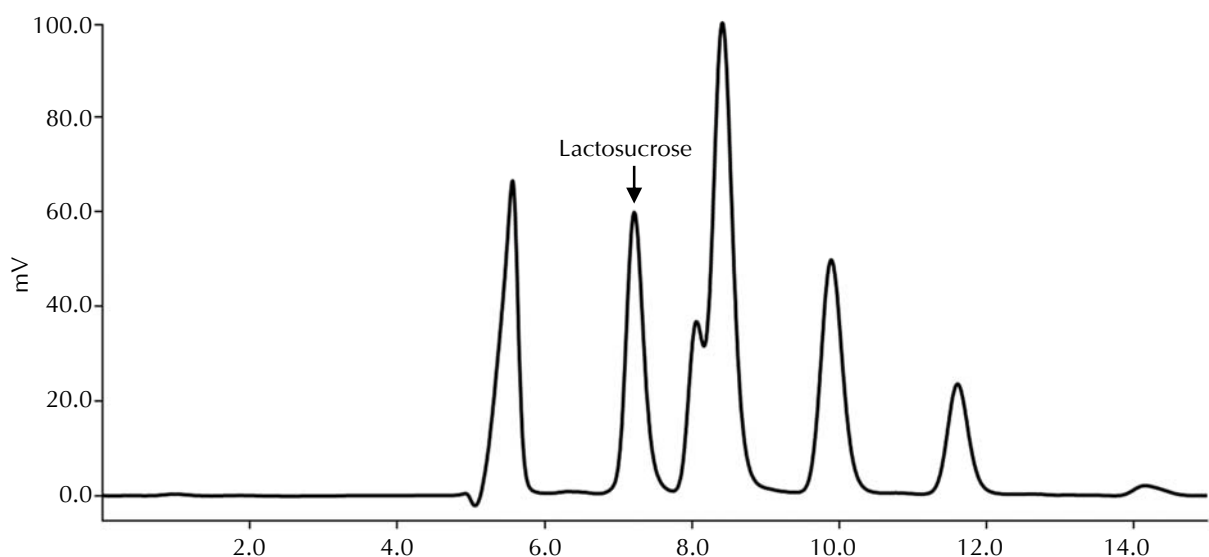


Fig. 3 Chromatogram of lactosucrose produced by *B. licheniformis* FRI MY-55 after 48 hr of incubation (28°C) in a medium supplemented with sucrose and lactose. Column, Sugar-Pak™ 1; temperature, 90°C; eluent, 50 mg/L EDTA; flow rate, 0.5 mL/min; injection, 20 µL; refractometric detection.

(*Pangasianodon hypophthalmus*) 分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* (10^5 與 10^7 CFU/g) 的飼料後，餵食 *B. licheniformis* 10^5 CFU/g 試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$) (Gobi *et al.*, 2016)。吳郭魚 (*Oreochromis* spp.) 分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* (10^5 與 10^7 CFU/g) 的飼料，試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$)，飼料轉換率低於對照組 ($p < 0.05$) (Gobi *et al.*, 2018)。雜交紅色吳郭魚(*O. mossambicus* × *O. niloticus*) 分別餵食對

照組及含 *B. licheniformis* (10^5 – 10^8 CFU/g) 的飼料後，餵食 10^5 CFU/g 試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$) (Promnuan and Kiriratnikom, 2018)。草魚 (*Ctenopharyngodon idella*) 分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* (10^5 – 10^6 CFU/g) 的飼料後，試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$)，此外，試驗組魚隻腸道的絨毛較對照組長，顯示腸道對於外來病菌之屏障較強 (Qin *et al.*, 2020)。

有些學者是合併應用 *B. licheniformis* 及它種

益生菌於水產生物，白蝦分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* (10^8 CFU/g) + *B. subtilis* (10^4 CFU/g) 的飼料，試驗組蝦隻的最終平均體重、增重率及活存率均高於對照組 ($p < 0.05$) (Madani *et al.*, 2018)。金頭鯛 (*Sparus aurata*) 分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + *B. pumilus* 的飼料後，試驗組魚隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$)，試驗組魚隻的成長及代謝相關基因之表現高於對照組 (Avella *et al.*, 2010)。印度明對蝦 (*Fenneropenaeus indicus*) 分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + *B. polymyxa* + *B. laterosporus* + *B. circulans* 的飼料後，試驗組蝦隻的最終平均體重及增重率均高於對照組 ($p < 0.05$)，試驗組蝦隻的活存率亦明顯較對照組提高 ($p < 0.05$) (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006)。

然而，虹鱔分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* (4.0×10^4 CFU/g) + *B. subtilis* (4.0×10^4 CFU/g) 的飼料後，試驗組魚隻的最終平均體重及增重均高於對照組，但統計上並無明顯差異 ($p > 0.05$) (Raida *et al.*, 2003)。

B. licheniformis 及它種益生菌有助於魚隻之活存率，鋸齒魚 (*Pristis microdon*) 分別飼養於對照組及池水中添加 *B. licheniformis* (10^5 CFU/mL) + *B. amyloliquefaciens* (10^5 CFU/mL) 試驗組，試驗組魚隻的活存率高於對照組 ($p < 0.05$)，經過運送過程 (30 min) 後，試驗組魚隻的活存率也高於對照組 ($p < 0.05$) (Tarnecki *et al.*, 2019)。

草魚分別餵飼對照組及添加乳果糖 (1.5%) 飼料，試驗組魚隻最終平均體重、增重率及飼料轉換率均高於對照組 ($p < 0.05$) (Chu *et al.*, 2013)。然而，比目魚 (*Psetta maxima*) 分別餵飼對照組及添加乳果糖 (2.0%) 飼料後，試驗組魚隻最終平均體重及增重率與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$) (Mahious *et al.*, 2006)。嘉鱾 (*Pagrus major*) 分別餵飼對照組及添加乳果糖 (0.25%) 飼料後，試驗組魚隻最終平均體重及增重率較對照組低，但，試驗組魚隻鱗片中鈣質含量增加 ($p < 0.05$) (Kihara *et al.*, 2007)。嘉鱾分別餵飼對照組及添加乳果糖 (0.24%) 飼料後，試驗組魚隻最終平均體重及增重率與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$) (Kihara *et al.*, 2008)。

Gupta *et al.* (2015) 研究指出，野鯪稚魚分別餵食對照組及添加果聚糖飼料，試驗組魚隻的成

長及活存率高於對照組 ($p < 0.05$)，認為果聚糖可能可以增加腸內益生菌作用之活性，影響益生菌在宿主腸道定殖，且分泌促進成長的營養，因此增強飼料轉換率及蛋白質利用等。Gupta *et al.* (2013) 研究顯示，鯉魚飼料中添加果聚糖，可以提升魚隻的成長 ($p < 0.05$)，且魚隻受到殺蟲劑不良影響之程度較對照組低。Huang *et al.* (2015) 指出，點帶石斑經餵食添加 2.5% *B. licheniformis* FRI MY-55 所產果聚糖飼料後，試驗組最終體重及增重率均較對照組明顯增加 ($p < 0.05$)。

Li and Kim (2013) 研究指出，分別添加 0% (對照組)、0.05 – 0.2% 果聚糖於飼料中餵食豬隻，試驗組豬隻的日增重率顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。Zhao *et al.* (2013a) 報導，豬分別攝食含 0% (對照組)、1.0% 及 2.0% 果聚糖飼料後，試驗組豬隻的生長率及總腸道消化率明顯較對照組高 ($p < 0.05$)。Zhang and Kim (2014) 研究指出，分別以對照組及添加 0.1% 果聚糖飼料餵食豬隻，試驗組豬隻的增重率顯著高於對照組 ($p < 0.05$)，且，試驗組腸道中食物的消化能力較對照組強。Zhao *et al.* (2013b) 報導，雞分別攝食含 0% (對照組)、0.25% 及 0.50% 果聚糖飼料後，試驗組雞隻的生長率及胸肉量明顯較對照組高 ($p < 0.05$)。

綜合上述文獻顯示，飼料中添加 *B. licheniformis* 有助於提升淡水長臂大蝦、吳郭魚、白蝦、非洲鯰魚及草魚等的增重率 (Kumar *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015; Swapna *et al.*, 2015; Gobi *et al.*, 2016; Gobi *et al.*, 2018; Promnuan and Kiriratnikom, 2018; Qin *et al.*, 2020)。添加乳果糖飼料中，可以增加草魚的成長 (Chu *et al.*, 2013)。而添加果聚糖於飼料中則有助於野鯪、鯉魚、石斑、豬隻及雞隻的增重率 (Gupta *et al.*, 2013; Li and Kim, 2013; Zhao *et al.*, 2013a,b; Zhang and Kim, 2014; Huang *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2015)。本試驗是分別合併 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液應用於石斑，試驗組的平均增重率高於對照組，但與對照組比較，在統計上無顯著差異 ($p > 0.05$)，與上述文獻 *B. licheniformis*、乳果糖及果聚糖有助於提升水產生物成長之趨勢的結果相近。

Table 2 Specific protease activities (U/mg protein) in the intestines and livers of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) specimens fed with a control diet, a diet supplemented with *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + lactosucrose (0.15%) culture medium, and a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + levan (0.15%) culture medium for 10 weeks

Treatment	Neutral protease		Alkaline protease		Acid protease	
	Intestine	Liver	Intestine	Liver	Intestine	Liver
Control	7.37 $\pm$ 0.25 ^a	3.66 $\pm$ 0.23 ^a	9.06 $\pm$ 0.15 ^a	5.38 $\pm$ 0.09 ^a	8.83 $\pm$ 0.12 ^a	5.02 $\pm$ 0.24 ^a
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + lactosucrose culture medium	7.89 $\pm$ 0.02 ^b	4.14 $\pm$ 0.31 ^a	9.37 $\pm$ 0.19 ^a	5.76 $\pm$ 0.09 ^b	9.67 $\pm$ 0.20 ^b	5.58 $\pm$ 0.20 ^a
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + levan culture medium	10.69 $\pm$ 0.10 ^c	4.54 $\pm$ 0.14 ^b	10.81 $\pm$ 0.36 ^b	5.58 $\pm$ 0.13 ^{ab}	10.32 $\pm$ 0.09 ^c	6.73 $\pm$ 1.84 ^a

Values in the same row with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

四、飼料中添加益生菌、乳果糖及果聚糖對於魚隻腸道及肝臟消化酵素活性之影響

腸道蛋白酶方面，點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料 10 週，各組腸道中性蛋白酶分別為 7.37、7.89 及 10.69，試驗組明顯高於對照組，統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 2)。點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組鹼性蛋白酶分別為 9.06、9.37 及 10.81。(3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組明顯高於對照組，統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 2)。(1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料各組酸性蛋白酶分別為 8.83、9.67 及 10.32，試驗組明顯高於對照組，統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 2)。

肝臟中性蛋白酶分析，點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組肝臟中性蛋白酶分別為 3.66、4.14 及 4.54，(3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組明顯高於對照組，統

計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 2)。點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組鹼性蛋白酶分別為 5.38、5.76 及 5.58，(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液明顯高於對照組 ($p < 0.05$) (Table 3)。(1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組各組酸性蛋白酶分別為 5.02、5.58 及 6.73，統計上試驗組與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$) (Table 2)。

各組魚隻腸道及肝臟之蛋白酶分析數據顯示，點帶石斑分別餵食含 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液組魚隻腸道內中性、酸性蛋白酶與肝臟鹼性蛋白酶之活性顯著高於對照組 ($p < 0.05$) (Table 2)。而 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組魚隻腸道內中性、酸性及鹼性蛋白酶與肝臟中性蛋白酶之活性，顯著較對照組高 ($p < 0.05$)。推測 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液或 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液對於點帶石斑之蛋白質消化能力有提升之效果。

腸道脂肪酶方面，點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組脂肪酶分別為 2.43、3.05 及 3.14，試驗組明顯高於對照組，統計上與對照組有

Table 3 Specific lipase and amylase activities (U/mg protein) in the intestines and livers of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) specimens fed with a control diet, a diet supplemented with *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + lactosucrose (0.15%) culture medium, and a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + levan (0.15%) culture medium for 10 weeks

Treatment	Lipase		Amylase	
	Intestine	Liver	Intestine	Liver
Control	2.43 ± 0.03 ^a	2.12 ± 0.02 ^a	9.25 ± 0.60 ^a	10.45 ± 0.98 ^a
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + lactosucrose culture medium	3.05 ± 0.04 ^b	2.14 ± 0.03 ^a	9.52 ± 0.58 ^a	11.67 ± 1.01 ^a
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + levan culture medium	3.13 ± 0.04 ^b	2.23 ± 0.02 ^b	9.34 ± 0.90 ^a	10.89 ± 0.69 ^a

Values in the same row with different superscript letters differ significantly ($p < 0.05$).

顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 3)。肝臟脂肪酶方面，點帶石斑分別餵飼 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組脂肪酶分別為 2.12、2.14 及 2.23，(3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖組明顯高於對照組，統計上與對照組有顯著差異 ($p < 0.05$) (Table 3)。

腸道澱粉酶方面，點帶石斑分別餵飼(1)對照組、(2)*B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及(3)*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組澱粉酶分別為 9.25、9.52 及 9.34，統計上試驗組與對照組無顯著差異 ($p > 0.05$) (Table 3)。肝臟澱粉酶方面，點帶石斑分別餵飼(1)對照組、(2)*B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及(3)*B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料，各組澱粉酶分別為 10.45、11.67 及 10.89，統計上試驗組與對照組亦無顯著差異 ($p > 0.05$) (Table 3)。

各組魚隻腸道及肝臟之脂肪酶分析數據顯示，點帶石斑分別餵食含 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液後，試驗組魚隻腸道內脂肪酶之活性顯著高於控制組 ($p < 0.05$)，而 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組魚隻肝臟脂肪酶亦高於控制組 ($p < 0.05$) (Table 3)。推測 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖或 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液對點帶石斑之脂肪消化能力有提升之效果。而澱粉酶活

性方面，試驗組魚隻腸道及肝臟之澱粉酶活性與控制組無顯著差異 (Table 3)。推測 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖或 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液對點帶石斑之澱粉消化能力無提升之效果。

印度明對蝦分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + *B. polymyxa* + *B. laterosporus* + *B. circulans* 的飼料後，試驗組肝胰腺中消化酵素-脂肪酶、蛋白酶及澱粉酶的活性均明顯較對照組提高 ($p < 0.05$) (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006)。

Gupta *et al.* (2015) 研究指出，野鯪稚魚分別餵食對照組及含有果聚糖飼料後，分析魚隻腸道中消化酵素顯示，果聚糖組魚隻之蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶均顯著高於對照組 ($p < 0.05$)。Gupta *et al.* (2015) 認為，果聚糖可能可以增加腸內益生菌作用及消化酵素的活性。

魚隻成長及飼料利用提升的效益，可能來自益生菌誘導宿主增加消化酵素活性 (Suzer *et al.*, 2008)，而有些益生菌可以分泌胞外消化酵素，有助於宿主的成長 (Skrodenyte-Arbaciauskiene, 2007)。自野鯪腸道分離出的 *B. licheniformis*，可以分泌澱粉酶及蛋白酶 (Ramesh *et al.*, 2015)。Kumar *et al.* (2013) 指出，芽孢桿菌 (*Bacillus* spp.) 具有調節腸道菌相、提高消化酵素的分泌及增加飼料營養的吸收與利用。益生菌使益生菌增殖，產生較強的消化酵素，包括：蛋白酶、澱粉酶及脂肪酶等，這些酵素增加生物對於飼料中蛋白質、澱粉及脂

Table 4 Counts of cultivable bacteria, *Vibrio* spp., *Bacillus licheniformis* FRI MY-55, and lactic acid bacteria in the intestines of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) specimens fed with a control diet, a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + lactosucrose (0.15%), and a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + levan (0.15%) culture for 10 weeks

Treatment	Total bacteria (CFU/g)	<i>Vibrio</i> spp. (CFU/g)	<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 (CFU/g)	LAB (CFU/g)
Control	7.35×10^6	1.75×10^5	$<10^1$	$<10^1$
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + lactosucrose culture medium	3.94×10^6	1.75×10^4	3.49×10^3	$<10^1$
<i>B. licheniformis</i> FRI MY-55 + levan culture medium	3.68×10^6	1.49×10^4	3.50×10^3	$<10^1$

肪的消化，提高飼料中營養物質之消化吸收的效率，因此魚隻成長較佳 (Tovar *et al.*, 2002)。

本試驗結果顯示，分別合併 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖及 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液應用於石斑，魚隻腸道中蛋白酶及脂肪酶之活性顯著高於對照組，與印度明對蝦飼食含有多種芽孢桿菌及野鯪飼食含有果聚糖的飼料後，魚隻腸道中蛋白酶及脂肪酶之活性顯著高於對照組的結果一致 (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2015)。而澱粉酶活性與對照組無顯著差異的結果則與上屬 2 篇文獻有差異 (Ziaei-Nejad *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2015)。因此，推測 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產乳果糖與果葡聚糖的培養液均有助於提升石斑魚消化系統的蛋白酶及脂肪酶之活性，提高飼料中營養物質之消化吸收的效率，增進魚隻成長。

五、飼料中添加益生菌、乳果糖及果聚糖對魚隻腸道中總生菌數、弧菌數及乳酸菌數之影響

點帶石斑動物試驗第 10 週，魚隻腸道中總生菌數在 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組飼料分別為 7.35×10^6 、 3.94×10^6 及 3.68×10^6 CFU /g，3 組的總生菌數並無很大差異。弧菌數在 (1) 對照組、(2) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖的培養液及 (3) *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液組分別為 1.75×10^5 、

1.75×10^4 及 1.49×10^4 CFU /g，試驗組的弧菌數較對照組降低約 1 個對數值。試驗組魚隻腸道中有 $3.49 - 3.50 \times 10^3$ CFU/g 投餵之益生菌 *B. licheniformis* FRI MY-55。對照組及試驗組魚隻腸道樣品以 MRS 培養基培養後，均未發現典型的乳酸菌菌落，表示各組的乳酸菌量均低於傳統微生物培養方式可以檢測的極限 (Table 4)。

白蝦分別飼養於對照組及池水中添加 *B. licheniformis* (10^5 CFU/mL) 試驗組，試驗組池水中弧菌量明顯較對照組下降 ($p < 0.05$) (Li *et al.*, 2007)。草魚分別飼養於對照組及池水中添加 *B. licheniformis* (1.0×10^8 CFU/m³) 試驗組，腸道中益生菌 - 芽孢桿菌及乳酸桿菌數量上升 ($p < 0.05$)，又，試驗組水中總氮、亞硝酸及硝酸的含量下降 (Liang *et al.*, 2015)。

Nakayama *et al.* (2009) 指出，*B. licheniformis* 培養溶液的上清液具有抑制哈維氏弧菌生長之特性，降低哈維氏弧菌的溶血能力，也會減弱哈維氏弧菌的毒性。Cladera-Olivera *et al.* (2004) 指出，*B. licheniformis* 會產生類似 bacteriocin 的抗菌物質，該物質可以抑制食品中的李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 及鏈球菌 (*Streptococcus* spp.) 等致病菌。自發酵粥中分離的 *B. licheniformis* 可以抑制多種食品的病原菌，包括金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、李斯特菌、痢疾志賀氏菌 (*Shigella flexneri*)、鼠傷寒沙門氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 及大腸菌 (*Escherichia coli*) (Wang *et al.*, 2010)。Andriani *et al.* (2017) 報導，*B. licheniformis* 可以抑制金黃色葡萄球菌及大腸菌。

研究指出，嘉鱚腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸 (Kihara *et al.*, 1995)。虹鱚腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸，其中以異丁酸含量最高 (Kihara and Sakata, 2001)。鯉魚腸內菌可發酵乳果糖產生氣體及短鏈脂肪酸，其中醋酸、丙酸及丁酸等之總含量較未添加乳果糖組高 (Kihara and Sakata, 2002)。綜合上述文獻顯示，草食、雜食及肉食性魚類的腸內菌均可以發酵乳果糖。嘉鱚分別餵飼對照組及添加乳果糖 (0.24%) 飼料後，試驗組魚隻腸道內容物的短鏈脂肪酸含量較對照組增加 ($p < 0.001$)，試驗組魚隻胃及腸的重量明顯大於對照組 ($p < 0.05$) (Kihara *et al.*, 2008)。Vázquez *et al.* (2005) 指出，分離自凝乳 (pressed cured) 的 *L. mesenteroides* 所產之乳酸及醋酸是抑制病原弧菌生長之主要原因，而非抑菌素 (bacteriocin)。Tran *et al.* (2020) 指出，魚隻腸道中短鏈脂肪酸 (醋酸、丙酸及丁酸等) 主要來自腸道中厭氧菌發酵碳水化合物，短鏈脂肪酸有助於提升魚隻成長、食物消化、活存率、免疫反應及疾病抵抗能力，也有助於強化腸道構造與功能。

乳果糖為益生素，老鼠、雞、狗、貓及人類分別攝食含有乳果糖的飼料及食品後，增加腸道中益生菌-乳酸菌量，減少壞菌-產氣莢膜梭狀芽孢桿菌，增加腸道中短鏈脂肪酸含量，降低糞便 pH 值，有利於腸道中鈣質、鎂及磷的溶解及吸收，確定乳果糖可以被老鼠、雞、狗、貓及人類腸道中的細菌發酵，且，糞便中的氮及酚含量下降，但是停止攝食含有乳果糖飼料及食品後，恢復原狀，建議人類對於乳果糖的攝食量為 1-3 g/day (Silverio *et al.*, 2015)。此外，嘉鱚分別餵飼對照組及添加乳果糖飼料後，試驗組魚隻腸道肌層 (tecnica muscularis) 較對照組厚且強韌，表示乳果糖可以刺激腸道肌層的發展 (Kihara *et al.*, 1995)。

果聚糖亦為益生素 (Huang *et al.*, 2013)，Li and Kim (2013) 研究指出，分別添加 0% (對照組)、0.05 - 0.2% 果聚糖於飼料中餵食豬隻後，試驗組豬隻糞便中的乳酸桿菌量依果聚糖添加量提高而上升。Zhao *et al.* (2013a) 報導，豬分別攝食含 0% (對照組)、1.0% 及 2.0% 果聚糖飼料，試驗組豬隻糞便中乳酸桿菌量較對照組增加，大腸菌減少 ($p < 0.001$)，又，試驗組糞便中的氮及硫化氫含量亦較對照組下降 ($p < 0.05$)。Zhao *et al.* (2013b) 報導，雞

分別攝食含 0% (對照組)、0.25% 及 0.50% 果聚糖飼料後，試驗組雞隻腸道中乳酸菌量增加，大腸菌及產氣莢膜梭狀芽孢桿菌減少。Huang *et al.* (2015) 指出，點帶石斑經餵食添加 0.5 - 5.0% *B. licheniformis* FRI MY-55 所產果聚糖飼料，試驗組石斑魚腸道中的弧菌數均明顯較對照組為低 ($p < 0.05$)。

合益素的應用方面，斑節蝦分別餵食對照組及含 *B. licheniformis* + *B. subtilis* + 異麥芽寡糖的飼料，試驗組蝦隻肝胰腺中弧菌數量明顯較對照組減少 ($p < 0.05$) (Zhang *et al.*, 2011)。褐鱒分別餵食對照組與 *B. subtilis* (10^6 CFU/g) + *B. licheniformis* (10^6 CFU/g) + 異麥芽寡糖 (0.2%)，試驗組魚隻腸道中總生菌數及乳酸菌數較對照組高 (Aftabgard *et al.*, 2017)。

本試驗分別合併 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 乳果糖及 *B. licheniformis* FRI MY-55 + 果聚糖的培養液應用於石斑，試驗組魚隻腸道中弧菌數較對照組低的趨勢與白蝦及草魚一致 (Li *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2015)；但乳酸菌量低於檢測極限與草魚及其他動物與人類的結果有差異 (Li and Kim, 2013; Zhao *et al.*, 2013a,b; Liang *et al.*, 2015; Silverio *et al.*, 2015)。綜合上述文獻顯示，*B. licheniformis* 具有抑制哈維氏弧菌及多種人類病原菌之特性 (Cladera-Olivera *et al.*, 2004; Nakayama *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Andriani *et al.*, 2017)。魚隻腸內細菌可以發酵乳果糖，產生短鏈脂肪酸 (Kihara and Sakata, 2001, 2002; Kihara *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2020)。乳果糖及果聚糖均為益生素，動物及人類攝食含有乳果糖飼料或果聚糖食物後，顯著增加腸道內益生菌，減少壞菌 (Li and Kim, 2013; Zhao *et al.*, 2013a, b; Huang *et al.*, 2013; Silverio *et al.*, 2015)，此外，乳果糖具有刺激腸道肌層的發展之功效 (Kihara *et al.*, 1995)。本試驗結果顯示，試驗組 *B. licheniformis* FRI MY-55 及其所產乳果糖與果聚糖的培養液均有降低石斑魚腸道中弧菌數之功用，推測試驗組中 *B. licheniformis* FRI MY-55 具有抑制弧菌的特性，或者是乳果糖或果聚糖可以增加石斑腸道內細菌發酵基質，或腸道中益生菌作用益生素的效率較佳，產生較多的短鏈脂肪酸，使腸道造成較酸的環境，抑制有害微生物之繁生，有利於維持飼養生物的健康。但，乳酸菌量低於檢測極限，沒有明顯增加的現象有待進一步探討。

參考文獻

- 黃美瑩, 黃詩涵, 方佩琪, 林金榮 (2010) 以微生物生產果聚糖及其應用. 水試專訊, 31: 20-24。
- 黃美瑩, 陳柏璇, 黃詩涵, 林金榮, 潘崇良 (2011) 海水吳郭魚養殖池中果聚糖生產菌之篩選. 水產研究, 19(2): 77-91。
- 黃美瑩, 朱惠真, 曾亮瑋, 許晉榮 (2017) 美洲大嘴鱸腸道中葡聚糖產生菌 (*Leuconostoc mesenteroides* B4) 之篩選. 水產研究, 25(2): 23-33。
- 黃美瑩, 朱惠真, 曾亮瑋 (2018) 飼料中添加益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物對於點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 成長之影響. 水產研究, 26(2): 1-19。
- 黃美瑩, 朱惠真, 曾亮瑋 (2019) 點帶石斑 (*Epinephelus coioides*) 飼料中添加益生菌 *Leuconostoc mesenteroides* B4 及其異麥芽寡糖與葡聚糖產物對於魚隻抵抗病原菌之影響. 水產研究, 27(2): 23-39。
- Aftabgard, M., A. Salarzadeh, M. Mohseni, A. H. B. Shabanipour and M. E. J. Zorriehzahra (2017) The combined efficiency of dietary isomaltooligosaccharides and *Bacillus* spp. on the growth, hemato-serological, and intestinal microbiota indices of caspian brown trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877). Probiotics antimicro., 10:1-9.
- Ai, Q., H. Xu, K. Mai, W. Xu, J. Wang and W. Zhang (2011) Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture, 317: 155-161.
- Alvarez-González, C. A., M. Cervantes-Trujano, D. Tovar-Ramírez, D. E. Conklin, H. Nolasco, E. Gisbert and R. Piedrahita (2006) Development of digestive enzymes in California halibut *Paralichthys californicus* larvae. Fish Physiol. Biochem., 31: 83-93.
- Andriani, Y., R. Safitri, E. Rochima and S. D. Fakhruhin (2017) Characterization of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* potentials as probiotic bacteria in Vanamei shrimp feed (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Nusantara Biosci., 9(2): 188-193.
- Avella, M. A., G. Gioacchini, O. Decamp, P. Makridis, C. Bracciatelli and O. Carnevali (2010) Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. Aquaculture, 305(1-4): 12-19.
- Axelsson, L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., A.V. Wright and A. Ouwehand, Eds., lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 3rd Edition, Marcel Dekker, New York, 1-67.
- Calazans, G. M. T., C. E. Lopes, R. M. O. C. Lima and F. P. de França (1997) Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. Biotechnol. Lett., 19(1): 19-21.
- Calazans, G. M. T., R. C. Lima, F. P. de França and C. E. Lopes (2000) Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. Int. J. Biol. Macromol., 27: 245-247.
- Cao, H., R. Yu, Y. Zhang, B. Hu, S. Jian, C. Wen, K. Kajbaf, V. Kumar and G. Yang (2019) Effects of dietary supplementation with β -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). Aquaculture, 508: 106-112.
- 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 additives. Aquaculture, 402: 50-57.
- Chu, W. Y., X. L. Liu, D. X. Chen, J. Shi, Y. H. Chen, Y. L. Li, G. Q. Zeng, Y. A. Wu and J. S. Zhang (2013) Effects of dietary lactosucrose on the gene transcript profile in liver of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquacult. Nutr., 19(5): 798-808.
- Chung, H. S., Y. B. Kim, S. L. Chun and G. E. Ji (1999) Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. Int. J. Food Microbiol., 47: 25-32.
- Cladera-Olivera, F., G. R. Caron and A. Brandelli (2004) Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. Lett. Appl. Microbiol., 38(4): 251-256.
- Dal Bello, F. D., J. Walter, C. Hertel and W. P. Hammes (2001) In vitro study of prebiotic properties of leaven-type exopolysaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. Syst. Appl. Microbiol., 24: 232-237.
- Euzenat, O., A. Guibert and D. Combes (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. Proc. Biochem., 32: 237-243.
- Garriques, D. and G. Arevalo (1995) An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to

- manipulate the microbial flora in the commercial production of *Penaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In *Swimming Through Troubled Waters* (C. L. Browdy and J. S. Hopkin eds), Proc. Spec. Session Shrimp Farming, Aquaculture '95, 53-59.
- Gatesoupe, F. J. (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Genc, M. A., E. Yilmaz, E. Genc and M. Aktas (2007) Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). *Isr. J. Aquacult. - Bamidegh*, 59(1): 10-16.
- Geng, X., X. H. Dong, B. P. Tan, Q. H. Yang, S. Y. Chi, H. Y. Liu and X. Q. Liu (2011) Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *Fish Shellfish Immunol.*, 31: 400-406.
- Gibson, G.R. and M. B. Roberfroid (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125: 1401-1412.
- Gobi, N., B. Malaikozhundan, V. Sekar, S. Shanthi, B. Vaseeharan, R. Jayakumar and A. K. Nazar (2016) GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dabv2 infection and the protective effects of the probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 on the growth, immune and antioxidant responses in *Pangasius hypophthalmus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 52: 230-238.
- Gobi, N., B. Vaseeharan, J. C. Chen, R. Rekha, S. Vijayakumar, M. Anjugam and A. Iswarya (2018) Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dab1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish Shellfish Immunol.*, 74: 501-508.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. Dalvi, V. Kumar and S. C. Mukherjee (2008) Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: Effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. *J. Fish Dis.*, 31: 649-657.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, R. S. Dalvi, M. S. Akhtar, A. K. Jha and K. Baruah (2010) Dietary microbial levan enhances tolerance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles to thermal stress. *Aquaculture*, 306: 398-402.
- Gupta, S. K., P. Das, S. K. Singh, M. S. Akhtar, D. K. Meena and S. C. Mandal (2011) Microbial levan, an ideal prebiotic and immunonutrient in aquaculture. *World Aquacult.*, 42: 61-63, 66.
- Gupta S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, A. K. Jha, M. S. Akhtar, S. C. Mandal, P. Das and A. K. Prusty (2013) Supplementation of microbial levan in the diet of *Cyprinus carpio* fry (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil: effect on growth and metabolic responses. *Fish Physiol. Biochem.*, 39(6):1513-24.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, N. Saharan, S. C. Mandal, C. Prakash, M. S. Akhtar and A. K. Prusty (2014) Dietary microbial levan ameliorates stress and augments immunity in *Cyprinus carpio* fry (Linnaeus, 1758) exposed to sublethal toxicity of fipronil. *Aquacult. Res.*, 45(5): 893-906.
- Gupta, S. K., A. K. Pal, N. P. Sahu, A. K. Jha and S. Kumar (2015) Effects of dietary microbial levan on growth performance, RNA/DNA ratio and some physio-biochemical responses of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles. *Aquacult. Nutr.*, doi: 10.1111/anu.12216.
- Gupta, S. K., B. Sarkar, S. Bhattacharjee, N. Kumar, S. Naskar and K. B. Uppuluri (2018) Modulation of cytokine expression by dietary levan in the pathogen aggravated rohu, *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 495: 496-505.
- Han, Y. W. (1990) Microbial levan. *Adv. Appl. Microbiol.*, 35: 171-194.
- Han, B., W. Q. Long, J. Y. He, Y. J. Liu, Y. Q. Si and L. X. Tian (2015) Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.*, 46(2): 225-231.
- Hasan, M. T., W. J. Jang, H. Kim, B. J. Lee, K. W. Kim, S. W. Hur, S. G. Lim, S. C. Bai and I. S. Kong (2018) Synergistic effects of dietary *Bacillus* sp. SJ-10 plus β -glucan oligosaccharides as a synbiotic on growth performance, innate immunity and streptococcosis resistance in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 82: 544-553.
- He, S., G. Xu, Y. Wu, H. Weng and H. Xie (2003) Effects of IMO and FOS on the growth performance and non-specific immunity in hybrid tilapia. *Chinese Feed.*, 23: 14-15.
- Heemstra, P. C. and J. E. Randall (1993) Groupers of the world. *FAO Species Catalogue*, vol. 125; pp.1-382.
- Hoseinifar S. H., A. Mirvaghefi, B. Mojazi Amiri, H. K.

- Rostami, and D. L. Merrifield (2011) The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. *Aquacult. Nutr.*, 17: 498-504.
- Huang, M. Y., C. F. Lee, S. T. Ho, K. J. Lin and C. L. Pan (2013) High-yield levan produced by *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 in high-sucrose medium and its prebiotic effect. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 7(3): 1585-1599.
- Huang, M. Y., C. I. Chang, C. C. Chang, L. W. Tseng and C. L. Pan (2015) Effects of dietary levan on growth performance, nonspecific immunity, pathogen resistance, and body composition of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides* H.). *Aquacult. Res.*, 46: 2752-2767.
- Huang, M. Y., H. J. Ju, L. W. Tseng and C. J. Hsu (2017) Effects of a probiotic collected from fish's intestine and its dextran product on growth performance, immunity status, and pathogen resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Abstract Book of ISNFF 2017. The 10th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals & Functional Foods. October 22-25, 2017, GSCO, Gunsan, Jeonbuk, Korea, p. 352.
- Huang, M. Y., H. J. Ju, L. W. Tseng and F. C. Wu (2018) The effect of a probiotic, *Leuconostoc mesenteroides* B4, and its dextran product on growth performance and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Asian-Pacific Aquaculture 2018. April 23-26, 2018. Taipei International Convention Center, Taipei, Taiwan.
- Itami, Y., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igusa and M. Kondo (1994) Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). The Third Asian Fisheries Forum. Asian Fish. Soc., Manila, 375-378.
- Jeney, G. and D. P. Anderson (1993) Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 116: 315-329.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M. J. Lategan and L. Gibson (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274: 1-14.
- Kihara, M., K. Ohba and T. Sakata (1995) Trophic effect of dietary lactosucrose on intestinal tunica muscularis and utilization of this sugar by gut microbes in red seabream *Pagrus major*, a marine carnivorous teleost, under artificial rearing. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 112(3-4): 629-634.
- Kihara, M. and T. Sakata (2001) Influences of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in a micro-scale batch culture. *J. Comp. Physiol. B*, 171(6): 441-447.
- Kihara, M. and T. Sakata (2002) Production of short-chain fatty acids and gas from various oligosaccharides by gut microbes of carp (*Cyprinus carpio* L.) in micro-scale batch culture. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, 132(2): 333-340.
- Kihara, M., K. Kiryu and T. Sakata (2007) Dietary lactosucrose affects calcium content in scales of juvenile red sea bream *Pagrus major* under artificial rearing. *Aquacult. Sci.*, 55(2): 271-278.
- Kihara, M. (2008) Production of short-chain fatty acids from dietary lactosucrose in the hindgut and its effects on digestive organs of a marine teleost, red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult. Sci.*, 56(3): 327-333.
- Kim, J. W., K. D. Jun., J. S. Kang, J. S. Jang, B. J. Ha and J. H. Lee (2005) Characterization of *Bacillus licheniformis* as a probiotic. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 20(5): 359-362.
- Kim D. H. and B. Austin (2008) Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Lett. Appl. Microbiol.*, 47(3): 141-147.
- Korakli, M., M. G. Gänzle and R. F. Vogel (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 92: 958-965.
- Kumar, N. R., R. P. Raman, S. B. Jadhao, R. K. Brahmchari, K. Kumar and G. Dash (2013) Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquacult. Int.*, 21(2): 387-403.
- Li, J. and I. H. Kim (2013) Effects of levan-type fructan supplementation on growth performance, digestibility, blood profile, fecal microbiota, and immune responses after lipopolysaccharide challenge in growing pigs. *J. Anim Sci.*, 91:5336-5343.

- Li, K., T. Zheng, Y. Tian, F. Xi, J. Yuan, G. Zhang and H. Hong (2007) Beneficial effects of *Bacillus licheniformis* on the intestinal microflora and immunity of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Biotechnol. Lett.*, 29(4): 525-530.
- Liang, Q., X. Zhang, K. H. Lee, Y. Wang, K. Yu, W. Shen, L. Fu, M. Shu and W. Li (2015) Nitrogen removal and water microbiota in grass carp culture following supplementation with *Bacillus licheniformis* BSK-4. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(11): 1711-1718.
- Liu, C., J. Lu, L. Lu, Y. Liu, F. Wang and M. Xiao (2010) Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour. Technol.*, 101: 5528-5533.
- Madani, N. S. H., T. J. Adorian, H. G. Farsani and S. H. Hoseinifar (2018) The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquacul. Res.*, 49(5): 1926-1933.
- Mahious, A. S., F. J. Gatesoupe, M. Hervi, R. Metailler and F. Ollevier (2006) Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758). *Aquacult. Int.*, 14: 219-229.
- Matsuyama, H., R. E. P. Mangindaan and T. Yano (1992) Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. Infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture*, 101: 197-203.
- Mehrabi, Z., F. Firouzbakhsh and A. Jafarpour (2012) Effects of dietary supplementation of synbiotic on growth performance, serum biochemical parameters and carcass composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 96: 474-481.
- Nakakuki, T. (2005) Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan. *J. Appl. Glycosci.*, 52: 267-271.
- Nakayama, T., H. Lu and N. Nomura (2009) Inhibitory effects of *Bacillus* probionts on growth and toxin production of *Vibrio harveyi* pathogens of shrimp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49(6): 679-684.
- Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2-14.
- Oh, S., S. H. Kim and R. W. Worobo (2000) Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic Culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. *J. Dairy Sci.*, 83: 2747-2752.
- Park, J. P., T. K. Oh and J. W. Yun (2001) Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Proc. Biochem.*, 37: 471-476.
- Pinsirodon, P. and K. L. Parkin (2001) Lipase essays In: *Current protocols in food analytical chemistry* (Wrolstad. R. E.). John Wiley & Sons, Inc. C3.1.1-C3.1.13.
- Promnuan, K. and S. Kiriratnikom (2018) Effect of different levels of *Bacillus licheniformis* supplements in diets on growth performance, feed utilization and intestinal bacteria of hybrid red tilapia. *Thaksin Univ. J.*, 21(2): 43-50.
- Qin, L., J. Xiang, F. Xiong, G. Wang, H. Zou, W. Li, M. Li and S. Wu (2020) Effects of *Bacillus licheniformis* on the growth, antioxidant capacity, intestinal barrier and disease resistance of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.*, 97: 344-350.
- Raida, M. K., J. L. Larsen, M. E. Nielsen and K. Buchmann (2003) Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Fish Shellfish Immunol.*, 26(8): 495-498.
- Rairakhwada, D., A. K. Pal, Z. P. Bhathena, N. P. Sahu, A. Jha and S. C. Mukherjee (2007) Dietary microbial levan enhances cellular non-specific immunity and survival of common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Fish Shellfish Immunol.*, 22: 477-486.
- Ramesh, D., A. Vinothkanna, A. K. Rai and V. S. Vignesh (2015) Isolation of potential probiotic *Bacillus* spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*, 45(2): 268-276.
- Robertsen, B., R. E. Ehgstad and J. B. Jorgensen (1994) β -glucan as immunostimulants in fish. In: Stolen, J. S. and T. C. Fletcher. Eds., *Modulators of Fish Immune Response 1*. SOS Publications, Fair Haven, NJ, USA. pp. 83-99.
- Rodriguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga, H. Fushimi and J. Sweetman (2009) Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannanoligosaccharides and

- polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquacult. Sci.*, 57: 609-617.
- Madani, S. H. N., T. J. Adorian, H. Ghafari Farsani and S. H. Hoseinifar (2018) The effects of dietary probiotic *Bacilli* (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquacult. Res.*, 49(5): 1926-1933.
- Semjonovs, P. and P. Zikmanis (2007) An influence of levan on the fermentation of milk by a probiotic ABT-type starter. *J. Food Tech.*, 5(2): 123-130.
- Shan, X. J., W. Huang, L. Cao, Z. Z. Xiao and S. Z. Dou (2009) Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. *Fish Physiol. Biochem.*, 35(3): 385-398.
- Shih, I. L., Y. T. Yu, C. J. Shieh and C. Y. Hsieh (2005) Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 8211-8215.
- Silvério, S. C., E. A. Macedo, J. A. Teixeira and L. R. Rodrigues (2015) Perspectives on the biotechnological production and potential applications of lactosucrose: A review. *J. Funct. Foods*, 19: 74-90.
- Skrodenyte-Arbaciauskiene, V. (2007) Enzymatic activity of intestinal bacteria in roach *Rutilus rutilus* L. *Fish. Sci.*, 73: 964-966.
- Suzer, C., D. Coban, H.O. Kamaci, S. Saka, K. Firat, O. Otgucuoglu and H. Ku'cu'ksari (2008) *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 280: 140-145.
- Swapna, B., C. Venkatrayulu and A. V. Swathi (2015) Effect of probiotic bacteria *Bacillus licheniformis* and *Lactobacillus rhamnosus* on growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Eur. J. Exp. Biol.*, 5(11): 31-36.
- Tarnecki, A. M., M. Wafapoor, R. N. Phillips and N. R. Rhody (2019) Benefits of a *Bacillus* probiotic to larval fish survival and transport stress resistance. *Sci. Rep.*, 9(1): 1-11.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F. J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez and R. Lésel (2002) Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 204:113-123.
- Tran, N. T., Z. Li, S. Wang, H. Zheng, J. J. Aweya, X. Wen and S. Li (2020) Progress and perspectives of short - chain fatty acids in aquaculture. *Rev. Aquacult.*, 12(1): 283-298.
- Tucker, J.W. Jr and S. Kennedy (2001) Snook culture. *Aquaculture 2001, Book of abstract.* p. 651. World Aquaculture Society, USA.
- Vázquez, J. A., M. P. González and M. A. Murado (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture*, 245: 149-161.
- Wang, Y. B., Z. Q. Tian, J. T. Yao and W. F. Li (2008) Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277: 203-207.
- Wang, Y., H. Zhang, L. Zhang, W. Liu, Y. Zhang, X. Zhang and T. Sun (2010) In vitro assessment of probiotic properties of *Bacillus* isolated from naturally fermented congee from Inner Mongolia of China. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(8): 1369-1377.
- Weifen, L., Z. Xiaoping, S. Wenhui, D. Bin, L. Quan, F. Luoqin, Z. Jiajia, W. Yue and Y. Dongyou (2012) Effects of *Bacillus* preparations on immunity and antioxidant activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Physiol. Biochem.*, 38(6): 1585-1592.
- Yano, T., R. E. P. Mangindaan and H. Matsuyama (1989) Enhance of the resistance of carp *Cyprinus carpio* to experimental *Edwardsiella tarda* infection, by β -1,3-glucans. *Nippon Suisan Gakk.*, 55: 1815-1819.
- Ye, J. D., K. Wang, F. D. Li and Y. Z. Sun (2011) Single or combined effects of fructo- and mannan oligosaccharide supplements and *Bacillus clausii* on the growth, feed utilization, body composition, digestive enzyme activity, innate immune response and lipid metabolism of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquacult. Nutr.*, 17: 902-911.
- Yoo, S. H., E. J. Yoon, J. Cha and H. G. Lee (2004) Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms. *Int. J. Biol. Macromol.*, 34: 37-41.
- Yoon, E. J., S. H. Yoo, J. Cha and H. G. Lee (2004) Effect of levan's branching structure on antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 34: 191-194.
- Zhang, Q., B. P. Tan, K. S. Mai, W. B. Zhang, H. M. Ma, Q. H. Ai, X. J. Wang and Z. G. Liufu (2011) Dietary administration of *Bacillus* (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the

- intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquac. Res.*, 42: 943-952.
- Zhang, Z. F. and I. H. Kim (2014) Effects of levan supplementation on growth performance, nutrient digestibility and fecal dry matter content in comparison to apramycin (antibacterial growth promoter) in weanling pigs. *Livest. Sci.*, 159: 71-74.
- Zhao, P. Y., J. P. Wang and I. H. Kim (2013a) Evaluation of dietary fructan supplementation on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, fecal microbial flora, and fecal noxious gas emission in finishing pigs. *J. Anim. Sci.*, 91(11): 5280-5286.
- Zhao, P. Y., J. P. Wang and I. H. Kim (2013b) Effect of dietary levan fructan supplementation on growth performance, meat quality, relative organ weight, cecal microflora, and excreta noxious gas emission in broilers. *J. Anim. Sci.*, 91: 5287-5293.
- Ziaei-Nejad, S., M. H. Rezaei, G. A. Takami, D. L. Lovett, A. R. Mirvaghefi and M. Shakouri (2006). The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. *Aquaculture*, 252(2-4): 516-524.

The Effect of the Probiotic, *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 and Its Lactosucrose and Levan Products on Growth Performance of Orange-spotted Grouper (*Epinephelus coioides*)

Mei-Ying Huang, Huei-Jen Ju*, Liang-Wei Tseng and Fu-Seng Tseng

Aquaculture Division, Fisheries Research Institute

ABSTRACT

The sensitivity of the probiotic *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 to low pH levels and high bile concentrations was tested, as were the effects of the probiotic and its lactosucrose and levan products on the growth performance, digestive enzymes, and viable bacterial counts in the intestines of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Bacillus licheniformis* FRI MY-55 was able to survive in pH 2.5 and 1.0% bile salt. Orange-spotted grouper specimens were fed (1) a control diet, (2) a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + lactosucrose (0.15%) culture medium, or (3) a diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 (10^7 CFU/g) + levan (0.15%) culture medium for up to 10 weeks. The final weights and percent weight gains of the spotted grouper specimens fed the diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 + lactosucrose culture medium and those of the specimens fed the diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 + levan culture medium were higher than those of the control group specimens, but the differences with the control group were not statistically significant ($p > 0.05$). There were also no statistically significant differences in the feed conversion rate (FCR) between the experimental groups and the control group ($p > 0.05$). However, the protease and lipase activities in the digestive tracts of the fish fed the diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 + lactosucrose culture medium and those fed the diet supplemented with *B. licheniformis* FRI MY-55 + levan culture medium were significantly increased over those in the digestive tracts of the control group fish ($p < 0.05$). In contrast, the amylase activities in the digestive tracts of the experimental feed groups were not significantly increased over those in the digestive tracts of the control group fish ($p > 0.05$). The *Vibrio* spp. counts in the intestines of the groupers in both experimental groups were significantly decreased compared to those in the digestive tracts of the control group fish. Overall, the results of this study indicate that dietary *B. licheniformis* FRI MY-55 and its lactosucrose and levan products could provide an effective means for enhancing the activities of the digestive enzymes of orange-spotted grouper.

Key words: orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*, *Bacillus licheniformis* FRI MY-55, lactosucrose, levan, digestive enzyme, viable bacterial count of intestine

*Correspondence: Aquaculture Division, Fisheries Research Institute, 199 Hou-Ih Rd, Keelung 202, Taiwan. TEL: (02)2463-3101 ext. 2819; FAX: (02) 2462-8138; E-mail: jhjeng@mail.tfrin.gov.tw