

CONTENTS

	Page
1. Effect of feed push-up during nighttime hours using automated feed pusher on milk yield and milk components of Holstein cows <i>Yi-Hsin Yeh, Hsiao-Han Liao, Yi-Hsuan Chen, Yi-Ming Chen, Tsung-Yi Lin and Po-An Tu</i>	219
2. Study on the treatment of wastewaters collected from indoor rearing operation of geese <i>Chao-Hung Chiang, Chien-Lung Hu and Tsung-Yi Lin</i>	231
3. Effects of high levels of dietary iron, selenium or manganese on growth performance, blood traits and immune response of piglets <i>Fang-Chueh Liu and Yu-Chun Lin</i>	239
4. Evaluation of the moisture removal effect of pangolagrass round bales with reformed hay barn in the rainy season <i>Chia-Sheng Chen, Hsin-Hung Liu and Tsui-Huang Yu</i>	250
5. The reutilization technology of chicken by-products <i>Ruei-Han Yeh, Meng-Ju Lee, Ling-Tsai Wu, Chia-Te Chu and Rung-Jen Tu</i>	259
6. Purification and characterization of a novel esterase Est03 derived from an activated sludge metagenome <i>Tzu-Hsuan Huang and Ren-Bao Liaw</i>	273
7. Impact of dairy wastewater on the soil properties and groundwater quality after irrigation on Pangolagrass pasture <i>Ya-Ling Huang, Chu-Hsin Liu, Tein-Ming Su, Ting-Hsun Hsiao and Hsin-Jung Lee</i>	282
8. Effects of dietary supplementation of <i>Bacillus subtilis</i> TLRI 211-1 on growth performance, carcass, and blood characteristics of broilers <i>Tsung-Yu Lee, Ren-Bao Liaw, Chia-Hui Wang, Bor-Ling Shih, Geng-Jen Fen and Yih-Fwu Lin</i>	292

行政院新聞局出版事業登記證局版台省誌字第六七七號
中華郵政新營字第十八號執登記為雜誌交寄

畜產研究

第五十四卷 第四期

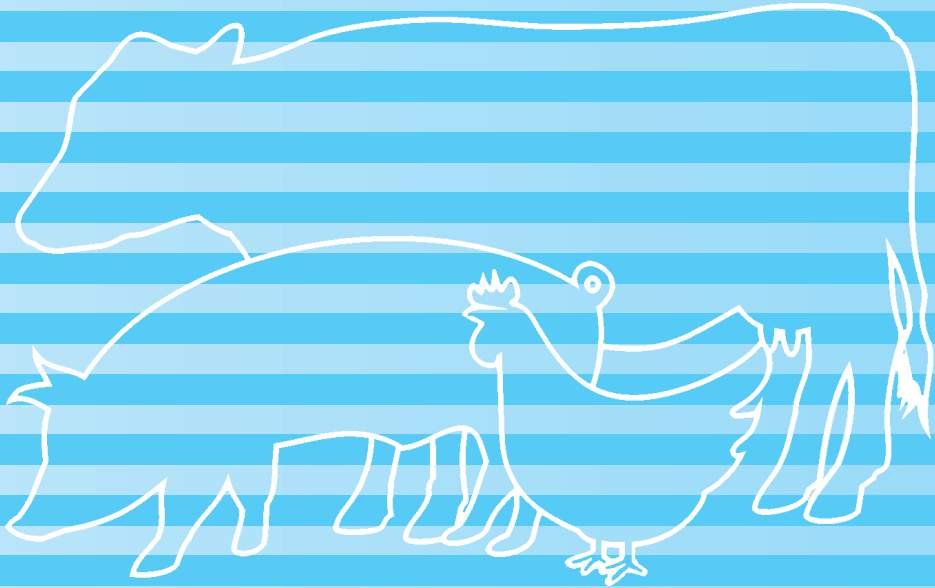
行政院農業委員會畜產試驗所

畜產研究

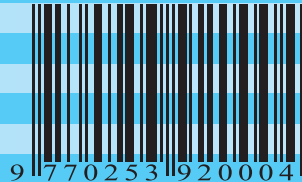
第五十四卷 第四期 中華民國一一〇年 十二月 季刊

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

Vol. 54 No. 4 December 2021



ISSN 0253-9209
DOI: 10.6991/JTLR



GPN: 2005200015
定價：新臺幣二〇〇元



行政院農業委員會畜產試驗所

LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE,
COUNCIL OF AGRICULTURE, EXECUTIVE YUAN

畜產研究編審委員會

主任委員：黃振芳

審查委員：丁詩同 方珍玲 王佩華 王尚禮 王紓愍 王淑音 王勝德 成游貴
朱有田 朱志成 余 祺 余 碧 吳信志 吳勇初 吳錫勳 李固遠
沈朋志 沈韶儀 阮喜文 周明顯 林旻蓉 林俊臣 林義福 林德育
姜樹興 施宗雄 施意敏 唐品琦 徐阿里 徐濟泰 張秀鑾 張菊犁
梁筱梅 章嘉潔 莊士德 許振忠 許福星 郭卿雲 郭猛德 陳仁炫
陳文賢 陳志峰 陳宗禮 陳明造 陳洵一 陳秋麟 陳綵慈 黃文理
黃英豪 楊鎮榮 葉茂生 廖仁寶 廖宗文 劉世賢 劉秀洲 劉振發
劉登城 鄭裕信 盧虎生 盧啟信 蕭庭訓 蕭振文 謝清祥 謝豪晃
(以姓名筆劃為序)

編輯委員：林幼君 林德育 王斌永 洪哲明 郭卿雲 陳立人 廖仁寶
(以姓名筆劃為序)

JOURNAL OF TAIWAN LIVESTOCK RESEARCH

J. F. HUANG, EDITOR-IN-CHIEF,
DIRECTOR GENERAL,
LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE, COUNCIL OF AGRICULTURE
HSINHUA, TAINAN, TAIWAN

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

S. T. DING	C. L. FANG	P. H. WANG	S. L. WANG	S. M. WANG
S. Y. WANG	S. D. WANG	Y. K. CHENG	Y. T. JU	C. C. CHU
C. YU	P. YU	H. C. WU	Y. C. WU	H. H. WU
G. Y. LI	P. C. SHEN	T. F. SHEN	S. I. SHEN	S. W. ROAN
M. J. LIN	C. C. LIN	Y. F. LIN	D. Y. LIN	S. H. CHIANG
C. H. SHIH	Y. M. SHY	P. C. TANG	A. L. HSU	C. T. HSU
H. L. CHANG	C. L. CHANG	H. M. LIANG	C. C. CHANG	S. T. CHUANG
C. C. HSU	F. H. HSU	C. Y. KUO	M. T. KUO	J. H. CHEN
W. S. CHAN	C. F. CHEN	C. L. CHEN	M. T. CHEN	H. I. CHEN
T. L. CHEN	T. T. CHEN	W. L. HUANG	I. H. HWANG	J. R. YANG
M. S. YEH	R. B. LIAW	C. W. LIAO	T. C. LIU	H. C. LIU
J. F. LIOU	S. S. LIU	Y. S. CHENG	H. S. LUR	C. H. LU
T. H. HSIAO	J. W. SHIAU	C. H. HSIEH	H. H. HSIEH	

EDITORS:

Y. C. LIN	D. Y. LIN	B. Y. WANG	C. M. HUNG	C. Y. KUO
L. R. CHEN	R. B. LIAW			



畜 產 研 究

編 者：行政院農業委員會畜產試驗所

發 行 人：黃振芳

發 行 所：行政院農業委員會畜產試驗所

地 址：臺南市新化區牧場 112 號

電 話：(06) 5911211

網 址：<http://www.tlri.gov.tw>

編輯\印製者：沐福商行

電 話：0985-187287

出 版 日 期：中華民國 110 年 12 月出版

定 價：新台幣 200 元

展售處：

國家書店松江門市：臺北市中山區松江路 209 號 1 樓

五 南 文 化 廣 場：臺中市北屯區軍福 7 路 600 號

國 家 網 路 書 店：<http://www.govbook.com.tw>

GPN : 2005200015

ISSN : 0253-9209

畜產研究

第 54 卷第 4 期

中華民國 110 年 12 月

目 錄

	頁
1. 應用自動推料機進行夜間推料對荷蘭泌乳牛乳量及乳成分之影響葉亦馨、廖曉涵、陳怡璇、陳一明、林宗毅、涂柏安	219
2. 以模型場設施探討舍飼養鵝廢水之處理性能江兆弘、胡見龍、林宗毅	231
3. 提高飼糧鐵、硒或錳含量對仔豬生長性能、血液性狀與免疫反應之影響劉芳爵、林幼君	239
4. 乾草倉貯通風改良對梅雨期盤固草圓形乾草包去濕效果測試陳嘉昇、劉信宏、游翠鳳	250
5. 雞隻副產物之再利用技術葉瑞涵、李孟儒、吳鈴彩、朱家德、涂榮珍	259
6. 源自活性污泥多源基因體新穎酯酶 Est03 之蛋白純化與特性分析黃子瑄、廖仁寶	273
7. 養牛廢水施灌盤固拉草地對土壤性狀及地下水水質之影響黃雅玲、劉主欣、蘇天明、蕭庭訓、李欣蓉	282
8. 飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 對白肉雞生長性能、屠體性狀及血液生化值之影響李宗育、廖仁寶、王嘉惠、施柏齡、范耕榛、林義福	292

應用自動推料機進行夜間推料對荷蘭泌乳牛 乳量及乳成分之影響⁽¹⁾

葉亦馨⁽²⁾ 廖曉涵⁽²⁾ 陳怡璇⁽²⁾ 陳一明⁽²⁾ 林宗毅⁽²⁾ 涂柏安⁽²⁾⁽³⁾

收件日期：110 年 6 月 8 日；接受日期：110 年 12 月 28 日

摘 要

荷蘭牛為溫帶牛種，夏季日間高溫採食情形不佳，透過自動推料機進行夜間多次的推料作業，在夜晚可進行穩定的餵養作業，本試驗目的探討夜間使用推料機進行推料對荷蘭種泌乳牛乳量及乳成分的影響。本研究使用開放式牛欄飼養荷蘭牛，餵飼完全混合日糧 (total mixed ration, TMR)，同時記錄牛隻胎次、泌乳月數，探討應用自動推料機於夜間進行推料 5 次對泌乳牛乳量及乳成分之影響。結果顯示：以自動推料機進行夜間推料可顯著提升荷蘭牛的泌乳量及乳成分產量；整體泌乳期可提升乳量約 16%、能量校正乳量 (energy corrected milk, ECM) 約 10%、乳脂肪量約 9%、乳蛋白質量約 8%、乳糖量約 16%、乳糖率約 1%、酪蛋白量約 8%、無脂固形物量 (solid-not-fat, SNF) 約 13%、多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 濃度約 8% 及游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 濃度約 13%；但會些微降低乳脂肪率約 4%、乳蛋白質率約 4%、酪蛋白率約 4% 及飽和脂肪酸 (saturated fatty acid, SFA) 濃度約 5%。本研究認為自動推料機可應用於商業牧場泌乳牛的飼養現場，並實際帶來乳量及乳成分產量提升的優點。

關鍵詞：夜間推料、自動推料機、乳量、乳成分。

緒 言

行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所 (以下略稱新竹分所) 於 106 年引進自動推料機 (簡稱推料機)，將飼糧推往飼料槽，確保牛隻可隨時自由採食。全臺灣在彰化、桃園及苗栗等多個乳牛場皆引進使用，推料機依廠牌有超音波感應、磁石感應或實體軌道等不同設計，能與行動裝置連線遙控行走或是搭配精料桶投餵精料等功能。在夏季時，透過推料機每日夜晚多次的推料作業，與傳統人工推料相比在夜晚可進行多次穩定的餵養作業，與省人工。至 109 年底，於全臺各縣市已有 50 家乳牛場導入推料機 (行政院農業委員會，2020)。牛隻泌乳情形與採食量息息相關，相關研究也顯示提升餐間推料次數可提升牛隻採食意願，於人員休息時間採用自動推料機進行多次推料，可使較為膽怯、無法在餵料時間採食的牛隻持續於深夜時段進行採食。乳牛場推料攸關牛隻採食意願及採食量之提升，於夜間使用推料機進行推料以促進牛隻採食意願，葉等 (2020) 之研究顯示，推料機對於牛隻各類行為均有不同程度的影響，影響的強度取決於推料時段而有不同的反應，且推料機並不大幅度改變牛隻日常作息，而是可提升部分時段及整體泌乳牛群採食 (整體提升 4%， $P < 0.01$) 及反芻 (整體提升 6%， $P < 0.01$) 行為時間，並降低靜止 (整體降低 7%， $P < 0.01$) 與整體其他活動 (整體降低 4%， $P < 0.01$) 時間。

乾物質採食量是促進牛隻乳汁生成的首項要素 (Bargo *et al.*, 2002)。許多研究著重於改變飼糧中營養組成分，以促進泌乳牛乾物質採食量，但是乾物質採食量受到採食行為、環境、管理方式、健康及社交行為等影響 (Grant and Albright, 2000)。DeVries *et al.* (2003) 則表示餵飼次數與擠乳後回到畜舍這兩種因子皆會增加牛隻採食量。給予新鮮飼料則特別能吸引牛隻採食 (DeVries and von Keyserlingk, 2005)。有許多研究探討不同餵飼管理 (feed manipulation) 包含飼糧給予次數、時段及推料的方式以增加乳量與乳成分 (DeVries and von Keyserlingk, 2005; DeVries *et al.*, 2005; Watters *et al.*, 2013; King *et al.*, 2016)。部分研究認為少量多餐的飼養方式對牛隻有增加乳脂肪或乳量等好處 (Gibson, 1984)，研究亦顯示乳蛋白率、乳蛋白量、乳總固形物率及量皆有增加的趨勢 (李等，2003)。少量多餐 (1 天餵飼 1

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2687 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(3) 通訊作者，E-mail: tpa@mail.tlri.gov.tw。

次以上)的概念是藉由多次餵飼吸引牛隻採食,增加每日總採食量,並且能避免精料一次過量進入瘤胃,進而穩定瘤胃 pH 值 (French and Kennelly, 1990),有些研究認為亦能增加乳脂肪量 (Gibson, 1984)、可消化纖維 (Dhiman *et al.*, 2002) 及生產效率 (Mäntysaari *et al.*, 2006)。

餵飼頻率對於乳量的影響,不同研究的結果不盡相同。Gibson (1984) 研究指出每天增加餵飼次數達 1 至 3 次時,由於採食量增加,使乳量、乳脂肪量、乳脂肪率及乳蛋白量顯著增加。Shabi *et al.* (2005) 表示採食時間增加與乳量增加呈正相關,可能藉由促進牛隻採食而提升乳量。Shabi *et al.* (1999) 的研究顯示,比較每日餵飼 2 次及 4 次,餵飼相同的穀物下,餵飼 4 次的乳蛋白率、乳蛋白量、乳脂肪率、乳脂肪量、乳糖率及乳糖量皆較高。但亦有其他不同餵飼次數研究顯示,每日餵飼 1、2 及 3 次的乾物質採食量有顯著差異,但是乳量及生產效率則無顯著差異 (Hart *et al.*, 2014),然而牛隻胎次則影響乳量,進一步分析經產牛與初產牛的乾物質採食量差異,顯示由於初產牛採食次數較少、採食速率較慢,因此初產牛的乾物質採食量低於經產牛。Le Liboux and Peyraud (1999) 與 Shabi *et al.* (1999) 的研究表示,完全混合日糧餵飼次數由 1 次增加至 2 次,及 4 次增加到 6 次,均會增加乾物質採食量,但是對於乳量卻沒有影響。另有研究餵飼 TMR 及 PMR (partial mixed ration) 的試驗組合,結果顯示完全混合日糧及部分混合日糧的加總採食量不改變,其乳量、乳脂肪、乳蛋白及乳糖等乳成分亦無顯著差異 (Paddick *et al.*, 2019)。另有研究顯示一天餵飼 1 次與 4 次相比較,一天餵飼 1 次有較高的乾物質採食量與乳量,且經常性餵飼乳牛會導致乳量減少 (Phillips and Rind, 2001)。此外,另一項研究顯示高餵飼次數 (每天 11 次) 與低餵飼次數 (每天 6 次) 相比,高餵飼次數甚至會造成牛隻乳量顯著降低及躺臥時間下降 (Mattachini *et al.*, 2019)。對於乳量與乳成分的關係而言,一篇比較餵飼不同牧草對泌乳牛採食量與乳成分的研究報告顯示 (Johansen *et al.*, 2018),每日乾物質採食量及乳量分別增加 1.3 及 1.6 kg,但是每 kg 乳蛋白及乳脂肪卻減少 0.5 及 1.4 g,顯示乳量的增加可能對於乳成分有稀釋的趨勢。

本試驗的目的在比較夜間有無以自動推料機進行推料對荷蘭牛的泌乳量及乳成分的影響。本試驗使用開放式牛欄飼養荷蘭牛,並餵飼完全混合日糧,記錄牛隻胎次、泌乳月數,量測推料與否對牛隻乳量及乳成分的影響。

材料與方法

本研究涉及之動物試驗於新竹分所執行,動物之使用、飼養及實驗內容皆依據新竹分所實驗動物照護與使用委員會批准之文件 (IACUC No.109 - 7) 與試驗準則進行。

I. 動物和畜舍型態

本試驗試驗分組、泌乳牛飼糧配方、夜間推料時間與頻率及其他管理作為依據 (葉等, 2020) 同一試驗分組進行。試驗分為 2 組,推料組與未推料組,兩組皆每日擠乳 2 次 (05:00, 16:00),飼糧、飲水及礦鹽皆為自由採食。兩組皆於每日早上 05:30 配製 1/3 量及下午 14:00 配製 2/3 量,完全混合日糧組成 (乾基) 如表 1,所有試驗牛隻的飼糧依據 NRC (2001) 表 14-6,泌乳量約 35 公斤,乳脂肪 3.5%,真蛋白質 3.0%,泌乳天數約 90 天之乳牛營養標準配製 TMR,為確保飼糧充足、任食,每日總飼糧皆有至少 5% 之剩料,推料組與未推料組之頸項夾數量皆多於牛隻頭數,且兩組早晚上料欄位數皆為牛頭數 +2,剩料於下一餐前清除 (05:00, 14:00)。推料組與未推料組於日間 06:00、11:00、15:00 皆以人工推料;推料組使用奧地利 HETWIN 製 Stallboy feed pusher 自動推料機,參考 Miller-Cushon and DeVries (2017) 及臺灣酪農戶使用推料機情形於晚上 19:00、20:30、22:00、23:30 及 1:00 各進行自動推料一次,未推料組則不進行夜間推料。每週隨機分配牛隻為推料組與未推料組。兩組再依照泌乳天數、胎次調整,維持兩組於試驗開始前泌乳天數與胎次無顯著差異。泌乳天數為扣除分娩後 5 日初乳階段後開始計算。推料與未推料組於泌乳期第 1 週泌乳量分別為 16.40 ± 3.03 vs 18.30 ± 1.75 kg/d,無顯著差異。畜舍為開放式牛欄飼養,全天候自由進出運動場。

II. 生乳數據收集及編輯

數據來自 125 頭新竹分所的荷蘭牛,試驗期間由 2017 至 2019 年。未推料組累計 62 頭 (胎次 2.02 ± 1.19 ; 月齡 48.69 ± 22.07),推料組累計 63 頭 (胎次 2.11 ± 1.26 ; 月齡 52.42 ± 21.61),試驗期間牛隻精神不佳、食慾不振、乳量下降、反芻下降或不明疾病則暫停試驗,待獸醫判定恢復健康才重新進行試驗,且牛隻於分娩前 2 個月進行乾乳並停止試驗。牛欄分為左右兩邊,均為長 40 公尺、寬 30 公尺,均可飼養至少 27 頭牛,配合擠乳作業每週進行生乳採樣。全日乳量由單日上午及下午乳量加總;全日乳成分則應用自動乳成分與體細胞測定儀 (MilkoScan TM FT+, Denmark) 分別測定上午及下午擠乳採集之生乳樣品,依據國際畜牧聯盟指南 (ICAR, 2014) 進行樣品處理與檢測。生乳樣本於上機分析前首先於 40°C 之水浴槽進行預熱並混勻後,以傅立葉轉換紅外光譜

(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 原理，測量乳樣的乳脂肪 (%)、乳蛋白質 (%)、乳糖 (%)、酪蛋白 (%)、無脂固形物 (%)、飽和脂肪酸 (g/100 g milk)、不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acids, UFA) (g/100 g milk)、單元不飽和脂肪酸 (monounsaturated fatty acids, MUFA) (g/100 g milk)、多元不飽和脂肪酸 (g/100 g milk) 及游離脂肪酸 (mmol/ 100 g milk fat)。儀器皆以原廠及 ISO (international organization for standardization) 規範進行定期校正。

表 1. 應用自動推料機進行夜間推料之試驗牛完全混合日糧組成與成分

Table 1. Total mixed ration for cows in the experiment for the effect of feed push-up during nighttime hours using automated feed pusher

Ingredients	(%), Dry matter basis
Corn silage	19.11
Bermuda grass hay	30.09
Alfalfa hay	15.05
Soybean hull, pellet	12.47
Wheat bran	6.09
Corn, ground	10.11
Soybean meal, 44% CP	4.90
Fish meal	0.52
Molasses	0.86
Iodized salt	0.21
Sodium bicarbonate	0.14
Limestone	0.30
Premix ¹	0.15
Total	100.00
CP, %	17.00
NE _l ² , Mcal/kg	1.50

¹ Each kilogram of premix contained: Vit. A, 10,000,000 IU; Vit. D₃, 1,600,000 IU; Vit. E, 70,000 IU; Fe, 50 g; Cu, 10 g; Zn, 40 g; I, 0.5 g; Se, 0.1 g; and Co, 0.1 g.

² NE_l value was calculated according to NRC (2001).

計算能量校正乳量 (energy corrected milk, ECM, kg/d) = 12.55 × 乳脂肪 (kg/d) + 7.39 × 乳蛋白質 (kg/d) + 0.2595 × 產乳量 (kg/d) (NRC, 2001)，以牛乳能量數值 0.74 Mcal/kg 為基礎計算泌乳淨能 (net energy of lactation, NE_l)，能量校正乳量中的乳脂肪和乳蛋白質都經過校正，可以用來比較不同品種和不同牛隻之間的產乳量差異 (Tyrrell and Reid, 1965)。

當日上、下午乳樣中乳脂肪濃度異常 (< 2% 或 > 8%) 或乳蛋白質濃度異常 (< 2% 或 > 6%) 者之乳成分及對應之乳量紀錄不列入後續統計。單筆數據由受測乳牛牛號、胎次 (1 – 6 胎)、泌乳月數 (1 – 18 月)、乳量及乳成分組成。個別受測乳牛泌乳月數超過 12 個月、個別受測乳牛資料筆數小於 3 筆的數據不列入後續統計。經編輯後可供後續統計為 3,256 筆乳量及乳成分資料。

III. 牛隻紀錄

每頭試驗牛皆配戴電子腳環 (AfiTag II Tag assy, Afimilk, Kibbutz Afikim, Israel) 作為牛號辨識，記錄個別牛隻分娩日期、泌乳月數、胎次，收集每次的乳量，當每次擠乳結束後，數據自動儲存於 Afimilk 系統中。

IV. 統計分析

試驗收集有及無夜間應用自動推料機泌乳牛之乳量及乳成分資料，以評估夜間應用自動推料機對於乳量及乳成分之影響，應用 SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) 的 MIXED 程序進行分析：

$$y_{ijklm} = \mu + FP_i + PAR_j + MIM_k + (FP \times PAR)_{ij} + (FP \times MIM)_{ik} + (PAR \times MIM)_{jk} + cow_m + e_{ijklm}$$

y_{ijklm} 為乳量及乳成分； μ 為整體平均； FP_i 為自動推料機組別固定因子 ($i = N, Y$)、 PAR_j 為胎次固定因子 ($j = 1, 2, 3, 4, 5+$)； MIM_k 為泌乳月數固定因子 ($k = 1 - 12$ ，其中第一級為 5 – 35 天，之後每 30 天一級距)； $(FP \times PAR)_{ij}$

為自動推料機與胎次固定交感因子； $(FP \times MIM)_{ik}$ 為自動推料機與泌乳月數固定交感因子； $(PAR \times MIM)_{jk}$ 為胎次與泌乳月數固定交感因子； cow_m 為第 m 頭牛的隨機因子 ($m = 1 - 125$) $\sim N(0, \sigma_{cow}^2)$ ； e_{ijklm} 為隨機殘差 $\sim N(0, \sigma_{cow}^2)$ 。模型中變異數－共變異數矩陣結構 (variance-covariance matrix structure) 選擇自迴歸模型 (autoregressive model) 並根據 Schwarz 貝氏資訊準則 (Bayesian information criterion, BIC) 評估模型配適資料的程度。事後檢定以 Bonferroni 校正法進行自動推料機組別、胎次、泌乳月數及其交感作用的均值多重比較，並以 $P < 0.05$ 為顯著差異水準。

結 果

結果顯示，推料組與未推料組泌乳牛之乳量 (23.04 ± 0.55 vs. 19.78 ± 0.64 kg/d) 及 ECM (23.51 ± 0.49 vs. 21.26 ± 0.58 kg/d) 皆有顯著差異 ($P < 0.05$)，整體泌乳期提升乳量約 16% 及 ECM 約 10% (表 2)，推料與胎次對每日泌乳量具有顯著差異 ($P < 0.05$) (表 3)，胎次 1、2、3、4 及 5 以上的推料組與未推料組平均乳量分別為 22.71 ± 0.71 vs. 20.00 ± 0.79 、 26.72 ± 0.75 vs. 23.85 ± 0.82 、 26.12 ± 0.74 vs. 22.73 ± 0.87 、 19.27 ± 0.91 vs. 16.93 ± 1.09 及 20.38 ± 1.41 vs. 15.39 ± 1.63 kg/d，使用推料機之所有胎次的試驗牛平均乳量皆顯著高於未推料組。推料與否與不同泌乳月數的交感效應顯著 ($P < 0.001$) (表 2)，推料組於泌乳期 1－10 月的平均乳量皆顯著高於未推料組 ($P < 0.05$) (表 4)；泌乳期 11－12 月推料組與未推料組的平均乳量無顯著差異。夜間應用自動推料機對於不同泌乳階段的牛隻能量校正乳量結果如圖 1，推料組與未推料組泌乳期 1－5 個月的能量矯正乳量分別為 27.32 ± 0.66 vs. 18.34 ± 0.91 、 29.20 ± 0.59 vs. 21.80 ± 0.77 、 27.26 ± 0.59 vs. 21.55 ± 0.74 、 26.15 ± 0.57 vs. 22.31 ± 0.83 、 24.81 ± 0.57 vs. 23.15 ± 0.78 ，推料組於泌乳期前 5 個月的能量矯正乳量顯著高於未推料組 ($P < 0.05$)，其餘 6－12 月則無顯著差異。

各項乳成分與固定效應之 P 值，及夜間應用自動推料機效應對應各項乳成分的最小平方均值結果如表 2，推料組與未推料組除了在 UFA 與 MUFA 產量無顯著差異外，其餘在乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、酪蛋白率、無脂固形物率、乳脂肪量、乳蛋白質量、乳糖量、酪蛋白量、無脂固形物量皆有顯著差異。整體泌乳期可提升乳脂肪量約 9%、乳蛋白質量約 8%、乳糖量約 16%、乳糖率約 1%、酪蛋白量約 8% 及無脂固形物量約 13%；但會些微降低乳脂肪率約 4%、乳蛋白質率約 4%、酪蛋白率約 4% 及無脂固形物率約 1%。胎次對乳蛋白質率、乳糖率、酪蛋白率、無脂固形物率、乳脂肪量、乳蛋白質量、乳糖量、酪蛋白量及非脂固形物量均有顯著差異 ($P < 0.05$)。泌乳月數對乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、酪蛋白率、無脂固形物率、乳脂肪量、乳蛋白質量、乳糖量、酪蛋白量及非脂固形物量亦均有顯著差異 ($P < 0.05$)。推料與胎次的交感效應皆對各測定項目無顯著差異。推料與泌乳月數的交感效應皆對各測定項目有顯著差異 ($P < 0.05$)。胎次與泌乳月數的交感效應在乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、乳脂肪量、乳蛋白質量、乳糖量、酪蛋白量及非脂固形物量有顯著差異 ($P < 0.05$)。

表 2. 固定效應對乳量、乳成分及脂肪酸組成分的 P 值，及夜間應用自動推料機效應對於各性狀的最小平方均值（標準誤差）

Table 2. P-Value of fixed effects included in the statistical analysis of milk yield, quality traits, and fatty acid composition, and least squares means (standard errors) of the studied traits for using feed pusher during nighttime

Trait ^d	P-Value						RSD ²		FP ¹	
	FP ³	PAR ³	MIM ³	FP × PAR	FP × MIM	PAR × MIM			N	Y
Milk yield, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.444	<0.001	<0.001	6.371		19.778 (0.636)*	23.039 (0.549) [†]
ECM, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.463	<0.001	<0.001	5.780		21.261 (0.581)*	23.508 (0.493) [†]
Quality traits										
Fat, %	0.003	0.211	<0.001	0.088	<0.001	0.005	0.735		4.183 (0.073)*	4.018 (0.056) [†]
Protein, %	<0.001	0.003	<0.001	0.184	<0.001	0.042	0.468		3.538 (0.044)*	3.379 (0.030) [†]
Lactose, %	<0.001	<0.001	<0.001	0.139	<0.001	<0.001	0.251		4.677 (0.024)*	4.749 (0.020) [†]
Casein, %	<0.001	0.010	<0.001	0.140	<0.001	0.088	0.375		2.753 (0.035)*	2.635 (0.025) [†]
SNF, %	0.008	0.031	<0.001	0.386	<0.001	0.262	0.454		8.943 (0.044)*	8.851 (0.032) [†]
Fat, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.320	<0.001	<0.001	0.255		0.857 (0.025)*	0.938 (0.021) [†]
Protein, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.144	<0.001	<0.001	0.185		0.725 (0.018)*	0.785 (0.015) [†]
Lactose, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.702	<0.001	<0.001	0.304		0.955 (0.031)*	1.116 (0.027) [†]
Casein, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.098	<0.001	<0.001	0.146		0.564 (0.014)*	0.612 (0.012) [†]
SNF, kg/d	<0.001	<0.001	<0.001	0.752	<0.001	<0.001	0.522		1.825 (0.053)*	2.067 (0.045) [†]
Fatty acids, g/100 g milk										
SFA ⁴	<0.001	<0.001	<0.001	0.164	<0.001	0.002	0.529		2.798 (0.054)*	2.651 (0.044) [†]
UFA ⁴	0.133	0.060	<0.001	0.475	0.054	<0.001	0.277		1.139 (0.028)	1.172 (0.021)
MUFA ⁴	0.275	0.054	<0.001	0.243	0.046	<0.001	0.260		1.059 (0.026)	1.082 (0.019)
PUFA ⁴	<0.001	<0.001	<0.001	0.238	<0.001	0.032	0.024		0.086 (0.002)*	0.093 (0.001) [†]
FFA ⁴ , mmol/100 g milk fat	0.015	<0.001	<0.001	0.747	0.340	<0.001	0.453		0.681 (0.042)*	0.769 (0.029) [†]

¹ N: w/o feed pusher; Y: w/ feed pusher. Least squares means with different symbols (*, †) within a row are significantly different (P < 0.05).² RSD: residual standard deviation.³ FP: feed pusher; PAR: parity; MIM: month in lactation. Significance of FP effect was tested on the herd-test-date within FP variance.⁴ SNF: solid not fat; SFA: saturated fatty acids; UFA: unsaturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; FFA: free fatty acids.

表 3. 夜間自動推料機及胎次對荷蘭牛每日泌乳量的最小平方均值 (標準誤差)

Table 3. Least squares means (standard errors within brackets) of milk yield, for the effect between feed pusher and parity

Parity ²	FP ¹ , kg/d	
	N	Y
1	20.00 (0.79)*	22.71 (0.71) [†]
2	23.85 (0.82)*	26.72 (0.75) [†]
3	22.73 (0.87)*	26.12 (0.74) [†]
4	16.93 (1.09)*	19.27 (0.91) [†]
≥ 5	15.39 (1.63)*	20.38 (1.41) [†]

¹ FP: feed pusher; N: w/o feed pusher; Y: w/ feed pusher. Significance of FP effect was tested on the herd-test-date within FP variance.

² Least squares means with different symbols (*, [†]) within a row were significantly different ($P < 0.05$).

表 4. 夜間自動推料及泌乳月數對每日泌乳量的最小平方均值 (標準誤差)

Table 4. Least squares means (standard errors within brackets) of milk yield, for the effect between feed pusher and MIM

MIM ² , month	FP ¹ , kg/d	
	N	Y
1	17.18 (0.96)*	26.71 (0.70) [†]
2	22.06 (0.83)*	29.79 (0.64) [†]
3	22.90 (0.80)*	28.40 (0.65) [†]
4	21.74 (0.88)*	26.37 (0.62) [†]
5	22.30 (0.84)*	24.93 (0.63) [†]
6	21.46 (0.82)*	22.76 (0.63) [†]
7	21.07 (0.94)*	22.66 (0.64) [†]
8	19.78 (0.88)*	21.58 (0.64) [†]
9	18.88 (0.95)*	20.54 (0.67) [†]
10	16.75 (1.01)*	18.74 (0.67) [†]
11	16.76 (1.35)	17.26 (0.73)
12	16.47 (1.52)	16.72 (0.79)

¹ FP: feed pusher; N: w/o feed pusher; Y: w/ feed pusher. Significance of FP effect was tested on the herd-test-date within FP variance.

² MIM: month in milk (1-12 months). Least squares means with different symbols (*, [†]) within a row were significantly different ($P < 0.05$).

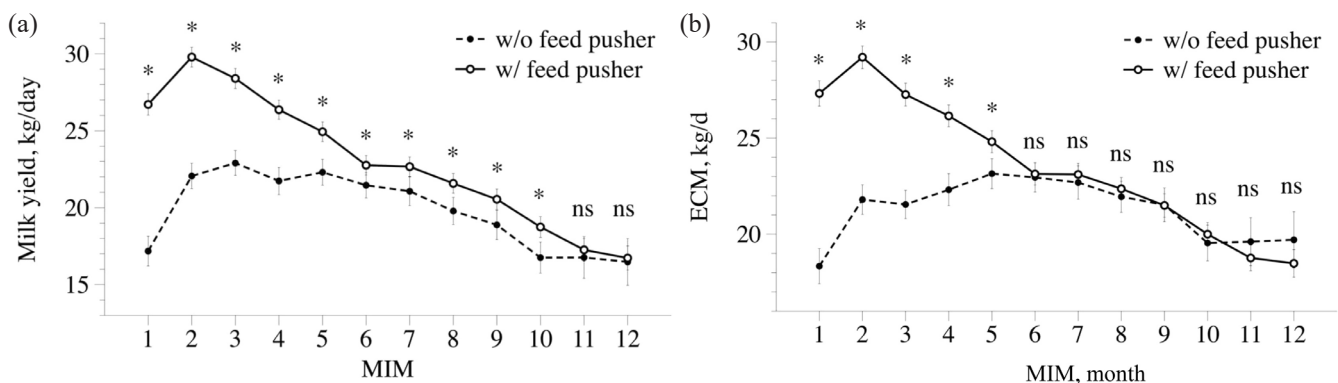
圖 1. 夜間應用自動推料機與不同泌乳階段牛隻對於牛隻泌乳量 (a) 及能量校正乳量 (b) 的交互影響。各泌乳階段差異顯著於線上標註。ns, 無顯著差異; * $P < 0.05$ 。

Fig. 1. Least squares means of milk yield (a) and ECM (b) for the interaction between effect of using feed pusher during nighttime or not and the effect of months in milk (MIM). Significance of the differences between least squares means of using feed pusher during nighttime or not within each class of MIM is reported above the line. ns, not significant; * $P < 0.05$.

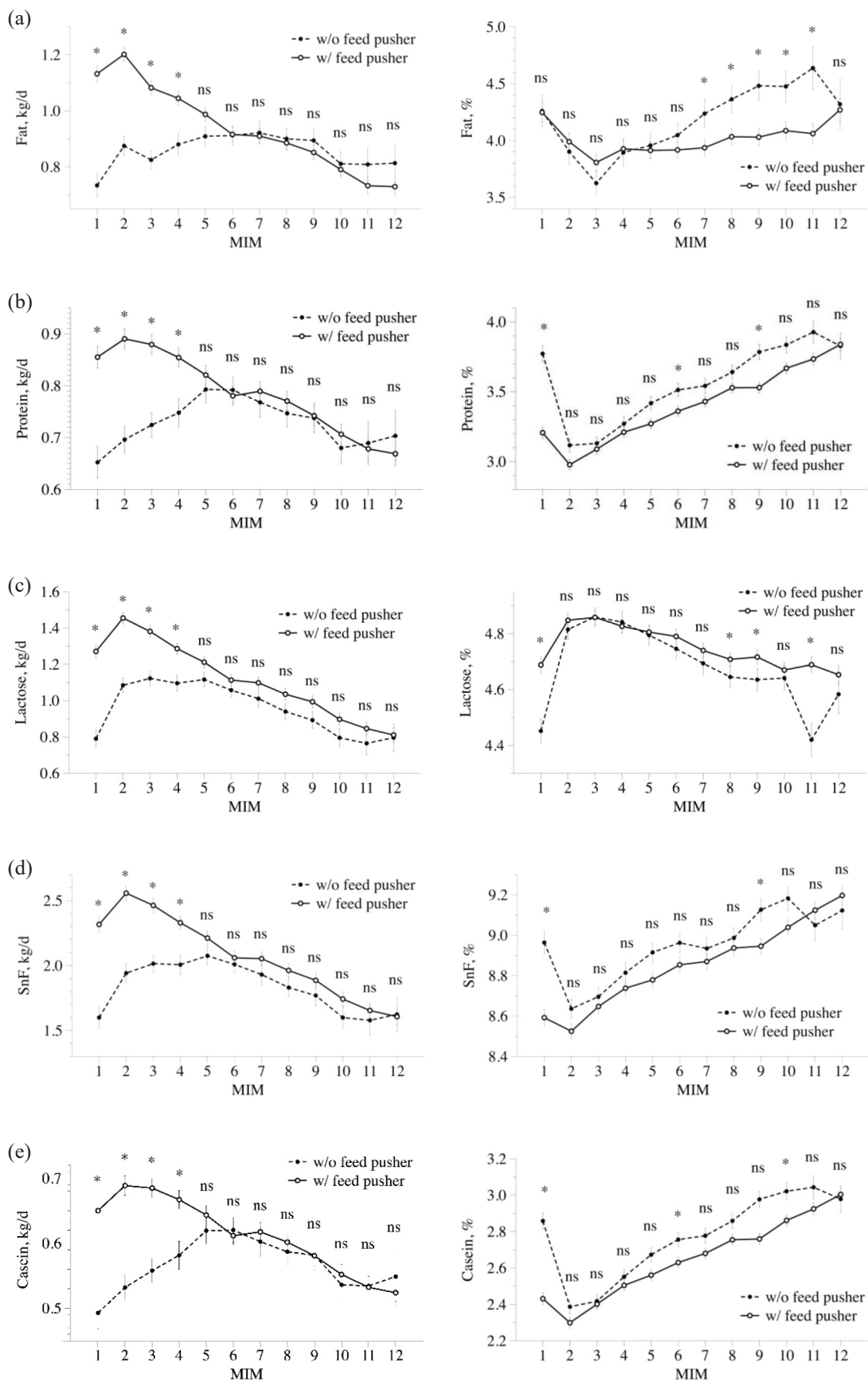


圖 2. 夜間應用自動推料機與不同泌乳階段牛隻對於生乳中乳脂肪 (a)、乳蛋白質 (b)、乳糖 (c)、無脂固形物 (d) 及酪蛋白 (e) 濃度與產量的最小平方均值。各泌乳月數差異顯著於線上標註。ns, 無顯著差異; * $P < 0.05$ 。

Fig. 2. Least squares means of milk fat (a), milk protein (b), lactose (c), solid-not-fat (d), and casein (e) concentration and yield for the interaction between effect of using feed pusher during nighttime or not and the effect of month in milk (MIM). Significance of the differences between least squares means of using feed pusher during nighttime or not within each class of MIM is reported above the line. ns, not significant; * $P < 0.05$.

夜間應用自動推料機對不同泌乳階段牛隻於生乳中乳脂肪、乳蛋白質、乳糖、無脂固形物及酪蛋白濃度與產量的最小平方均值如圖 2。推料組與未推料組的乳脂肪率於泌乳期 7 – 11 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，乳脂肪率分別為 (3.94 ± 0.07 vs. 4.23 ± 0.13 %、 4.03 ± 0.07 vs. 4.36 ± 0.12 %、 4.03 ± 0.08 vs. 4.48 ± 0.13 %、 4.08 ± 0.08 vs. 4.48 ± 0.14 %、 4.06 ± 0.09 vs. 4.64 ± 0.19 %)，其餘月份之乳脂肪率則無顯著差異；而推料組與未推料組的乳脂肪量於泌乳期 1 – 4 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，乳脂肪量分別為 (1.13 ± 0.03 vs. 0.73 ± 0.04 kg/d、 1.20 ± 0.03 vs. 0.87 ± 0.03 kg/d、 1.08 ± 0.03 vs. 0.82 ± 0.03 kg/d、 1.04 ± 0.02 vs. 0.88 ± 0.04 kg/d)，其餘月份之乳脂肪量無顯著差異。推料組與未推料組的乳蛋白率於泌乳期 1、6、9 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，分別為 (3.21 ± 0.04 vs. 3.77 ± 0.057 %、 3.36 ± 0.04 vs. 3.51 ± 0.05 %、 3.53 ± 0.04 vs. 3.78 ± 0.05 %)，其餘月份之乳蛋白率無顯著差異；而推料組與未推料組的乳蛋白量於泌乳期 1 – 4 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，乳蛋白量分別為 (0.86 ± 0.02 vs. 0.65 ± 0.03 kg/d、 0.89 ± 0.02 vs. 0.70 ± 0.02 kg/d、 0.88 ± 0.02 vs. 0.72 ± 0.02 kg/d、 0.85 ± 0.02 vs. 0.75 ± 0.03 kg/d)，其餘月份之乳蛋白量無顯著差異。推料組與未推料組的乳糖率於泌乳期 1、8、9、11 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，乳糖率分別為 (4.69 ± 0.03 vs. 4.45 ± 0.04 %、 4.71 ± 0.03 vs. 4.65 ± 0.04 %、 4.72 ± 0.03 vs. 4.64 ± 0.04 %、 4.68 ± 0.03 vs. 4.42 ± 0.06 %)，其餘月份之乳糖率無顯著差異；而推料組與未推料組的乳糖量於泌乳期 1 – 4 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，乳糖量分別為 (1.27 ± 0.04 vs. 0.79 ± 0.05 kg/d、 1.45 ± 0.03 vs. 1.08 ± 0.04 kg/d、 1.38 ± 0.03 vs. 1.12 ± 0.04 kg/d、 1.29 ± 0.03 vs. 1.10 ± 0.04 kg/d)，其餘月份之乳糖量無顯著差異。推料組與未推料組的無脂固形物率於泌乳期 1、9 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，無脂固形物率分別為 (8.59 ± 0.04 vs. 8.96 ± 0.06 %、 8.95 ± 0.04 vs. 9.13 ± 0.06 %)，其餘月份之無脂固形物率無顯著差異；而推料組與未推料組的無脂固形物量於泌乳期 1 – 4 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，無脂固形物量分別為 (2.32 ± 0.06 vs. 1.60 ± 0.08 kg/d、 2.56 ± 0.054 vs. 1.94 ± 0.07 kg/d、 2.46 ± 0.05 vs. 2.01 ± 0.07 kg/d、 2.33 ± 0.05 vs. 2.01 ± 0.08 kg/d)，其餘月份之無脂固形物量無顯著差異。推料組與未推料組的酪蛋白率於泌乳期 1、6、10 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，酪蛋白率分別為 (2.43 ± 0.03 vs. 2.86 ± 0.05 %、 2.63 ± 0.03 vs. 2.76 ± 0.04 %、 2.86 ± 0.03 vs. 3.02 ± 0.05 %)，其餘月份之酪蛋白率無顯著差異；而推料組與未推料組的酪蛋白量於泌乳期 1 – 4 月有顯著差異 ($P < 0.05$)，酪蛋白量分別為 (0.65 ± 0.02 vs. 0.49 ± 0.02 kg/d、 0.69 ± 0.01 vs. 0.53 ± 0.02 kg/d、 0.68 ± 0.01 vs. 0.56 ± 0.02 kg/d、 0.67 ± 0.01 vs. 0.58 ± 0.02 kg/d)，其餘月份之酪蛋白量無顯著差異。

牛乳脂肪酸組成分的結果顯示如表 2，夜間是否進行推料、胎次對於 SFA、PUFA 及 FFA 有顯著差異 ($P < 0.05$)，整體泌乳期可提升 PUFA 濃度約 8% 及 FFA 濃度約 13%；SFA 濃度些微降低約 5%；泌乳期及其與胎次交感因子對於 SFA、UFA、MUFA、PUFA 及 FFA 濃度有顯著差異 ($P < 0.05$)；夜間是否進行推料與胎次交感因子對於脂肪酸組成無顯著差異；夜間是否進行推料與泌乳期交感效應對於 SFA、MUFA 及 PUFA 濃度有顯著差異 ($P < 0.05$)。推料組相對於未推料組其 PUFA ($P < 0.05$) 與 FFA ($P < 0.05$) 濃度則較高。

討 論

本試驗結果顯示夜間推料組的乳量顯著高於未推料組 ($P < 0.05$)。根據葉等 (2020) 先前研究顯示使用自動推料機進行夜間推料可顯著提升泌乳牛群夜間採食時間，進一步提升整體採食時間。而 Grinter *et al.* (2019) 研究則表示，市售的動物行為監測頸圈與人為觀察的動物行為為具有高度相關性，採食量與採食時間亦呈現高度相關。此外，自動推料機推料頻率造成的採食頻率改變也會進一步影響乳量，此與 Gibson (1984) 的研究結果相似，研究指出每天增加餵飼次數達 1 – 3 次，乳量隨採食量增加顯著增加。但亦有部分研究的結果卻是餵飼頻率與乳量無顯著相關 (Mäntysaari *et al.*, 2006)，該研究結果顯示每日推料 5 次確實每次都可以立即吸引牛隻採食，相較於每日只餵飼 1 次，每日只會產生 2 次明顯的採食高峰，每日餵飼 5 次的牛隻花較多時間在採食上，相對地，在躺臥的時間則比餵飼 1 次的組別少，推論過高的餵飼頻率反而因為減少牛隻休息時間而造成乳量降低。Munksgaard *et al.* (2005) 表示對牛隻來說，躺臥時間的重要性勝於增加餵飼次數提升採食量的效果。而 Mattachini *et al.* (2019) 則分為每日進行餵飼 6 次與 11 次，每日餵飼 6 次 (32.15 kg/d) 的乳量高於餵飼 11 次 (31.32 kg/d)，表示過多餵飼次數導致牛隻躺臥時間顯著減少，由於牛隻躺臥時間與乳量呈正相關，躺臥時間減少亦造成乳量減少。但本團隊先前研究發現若僅於夜間推料 5 次並不影響牛隻日常作息 (葉等, 2020)，並能提升採食與反芻時間，其中反芻行為又與牛隻休息狀態高度重疊。而於本試驗更進一步發現推料有助於提升乳量，推測牛隻乳量應與採食與反芻時間呈正相關。Shabi *et al.* (2005) 亦表示採食時間與乳量呈正相關，可藉由促進牛隻採食而提升乳量。雖然 DeVries *et al.* (2005) 認為低乳量的原因不完全是因為低乾物質採食量造成，即便藉由增加餵飼頻率也未必能達到高乾物質採食量與高乳量的結果，但是多數研究仍顯示適當餵飼次數有較長的採食時間可提升乳量。本試驗結果顯示，乳量與胎次亦有顯著交感作用，且推料組顯著高於未推料組。在 Hart *et al.* (2014) 的研究中，不同餵飼次數與乳量沒有顯著差異，但是但進一步分析經產牛

與初產牛的乳量，經產牛的乳量顯著高於初產牛，並發現不同餵飼頻率的組別，其總採食時間亦沒有差異。推測經產牛的乳量比初產牛多，其原因為初產牛採食次數較低、採食速度較慢，使得乾物質採食量比經產牛少。本試驗結果亦為經產牛的乳量高於初產牛，推料使得牛隻可以充分採食，因此在同一胎次裡，推料組與未推料組之乳量有顯著差異。本試驗推料組的 ECM 高於未推料組，分析泌乳期、ECM 與推料的關係發現，推料組與未推料組於泌乳期 1 – 5 個月的 ECM 有顯著差異，此顯示在泌乳高峰期進行推料能有效促進 ECM 增加；雖然此結果與部分前人餵飼頻率研究 (Dhiman *et al.*, 2002; Mäntysaari *et al.*, 2006; Hart *et al.*, 2014) 相反，但本試驗設計著重於夜間推料與否對於增加餵飼頻率、採食量與乳量的關係，各類型研究由於試驗設計及環境不同，結果會有所差異，影響因子包含飼養方式、試驗動物頭數、乾物質採食量測量方式、泌乳期及胎次 (Hart *et al.*, 2014)。

本試驗推料組與未推料組除了在 UFA 與 MUFA 產量無顯著差異外，其餘在乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、酪蛋白率、無脂固形物率、乳脂肪量、乳蛋白質量、乳糖量、酪蛋白量、無脂固形物量皆有顯著差異 ($P < 0.05$)，此與 Gibson (1984) 早期的研究相似，顯示提升餵飼頻率可能增加乳脂肪量、乳脂肪率及乳蛋白量，但該研究無法確知此結果是由於泌乳期或餵飼次數的效應，本試驗則證實夜間進行推料是影響乳成分的其中一個因子。Mäntysaari *et al.* (2006) 發現在試驗中每日餵飼 1 次與 5 次，其乳蛋白率、乳脂肪率、乳糖率、乳蛋白量、乳脂肪量及乳糖量皆無顯著差異；但 Shabi *et al.* (1999) 的研究顯示，比較每日餵飼 2 次及 4 次，餵飼相同的穀物下，餵飼 4 次的乳蛋白率、乳蛋白量、乳脂肪率、乳脂肪量、乳糖率及乳糖量皆較高，此結果與本試驗相似。亦有部分研究的結果卻是餵飼頻率與乳脂肪率及乳蛋白率無顯著相關 (Dhiman *et al.*, 2002; Mäntysaari *et al.*, 2006)。在 Shabi *et al.* (1999) 與 Phillips and Rind (2001) 也觀察到類似的狀況，雖然乳蛋白率增加但卻是因提高餵飼頻率而乳量減少所致，顯示乳量與乳蛋白率應有部分之負相關。Gibson (1984) 認為與其討論增加餵飼頻率，採食量提升才更能精準探討乳量及乳脂肪量的改變。一篇餵飼泌乳牛 PMR 的研究 (Paddick *et al.*, 2019) 顯示，在各組總乾物質採食量沒有顯著差異的狀況下，擠乳次數、乳量、乳脂肪量及乳蛋白量皆無顯著差異，牛隻躺臥時間及自願擠乳次數亦沒有差異。本試驗中泌乳期及胎次皆對乳脂肪量、乳蛋白質率及乳蛋白量有顯著影響。Hart *et al.* (2014) 發現泌乳月數對乳量有顯著影響，隨著泌乳月數增加乳量會逐漸下降，而乳蛋白率則逐漸提升，此部分與本試驗相似。該研究亦比較每日餵飼 1、2 及 3 次對經產牛與初產牛乳成分的影響，但結果顯示乳脂肪率與乳蛋白質率皆不受餵飼頻率與胎次影響，則與本研究相反。有研究表示不論泌乳期及胎次，反芻時間皆與乳量呈正相關，但是乳量增加則造成乳脂肪率的下降 (Kaufman *et al.*, 2017)，此與本研究觀察到的趨勢相符。

泌乳階段及泌乳牛能量平衡對於牛乳中脂肪酸組成影響甚大，並且受到飼糧、乳腺合成、瘤胃微生物氫化反應 (biohydrogenation) 及體脂肪利用等多重因子的影響 (Kay *et al.*, 2005; Stoop *et al.*, 2009; Gross *et al.*, 2011)。本試驗觀察到多數脂肪酸比例顯著受到夜間推料與否、胎次、泌乳月數及相關交感效應影響。由於牛隻在泌乳初期容易產生能量負平衡的現象，使泌乳牛動用體組成 (體脂肪及部分蛋白質) 以克服能量負平衡，體脂肪分解過程中釋放非酯化脂肪酸 (non-esterified fatty acid, NEFA) 進入血液循環後進入乳腺及肝臟中被利用；牛隻乳腺大量利用來自體組成分解後的長鏈脂肪酸亦會抑制乳腺中乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl coenzyme A carboxylase) 活性，影響脂肪酸的新生作用 (de novo synthesis)，降低乳中短鏈脂肪酸產量比例 (Gross *et al.*, 2011)，因此泌乳初期乳中 SFA 較低而來自於脂肪酶分解脂肪球產生之 FFA 較高 (Palmquist *et al.*, 1993)。隨著泌乳月數增加，泌乳牛採食量及能量負平衡的狀態逐漸改善，牛隻的各類脂肪酸分布會顯著改變 (Gross *et al.*, 2011)，SFA 會隨著泌乳月數增加提高 (Vranković *et al.*, 2017)，相對降低生乳中 UFA 的比例。此外，研究顯示胎次對於牛隻能量代謝狀態亦有影響 (Piñeyrua *et al.*, 2018)，由於初產母牛體需要額外的能量需求提供身體發育，其能應用於泌乳的體蓄積較經產母牛少，使其泌乳初期乳中 FFA 產量較經產母牛更高，但經產母牛可能由於多次分娩造成體蓄積不足使得能量負平衡的時間持續較久 (Wathes *et al.*, 2007)。本研究中觀察到夜間推料組生乳中 SFA 及 FFA 比例分別較未推料組低及高，而先前研究發現牛隻在推料時會提升採食量，顯示可能由於推料組的乳量及乳成分顯著的提升仍然造成輕微的能量負平衡的狀態，未來應可進一步探討改善飼料配方或餵飼策略。而推料組 PUFA 產量顯著的較非推料組高，則可能由於夜間進行推料使得牛隻採食量增加影響瘤胃通過速率，造成瘤胃微生物氫化植物性脂肪酸不完全，使其進入小腸中並提高乳中 PUFA 產量，此效應顯示應用推料機具有可提升牛乳中有益於人類飲食及心血管健康的脂肪酸產量的潛力 (Kala *et al.*, 2018)。

結 論

本研究探討應用自動推料機於夜間進行推料 5 次對泌乳牛乳量及乳成分影響之探討，結果顯示以自動推料機進行夜間推料可顯著提升荷蘭牛的乳量及乳成分產量，並於泌乳期前 4 個月推料機組之乳脂肪量、乳蛋白質量、乳糖

量、無脂固形物量、酪蛋白量皆顯著高於未推料組。本研究認為自動推料機應用於商業牧場泌乳牛的飼養現場，加強泌乳前期推料次數，充分供應 TMR，具有乳量及乳成分產量提升的優點。未來可進一步針對應用自動推料機進行夜間推料的牛隻，探討搭配不同飼料配方及管理方法對於牛隻行為影響及乳成分濃度提升之效果，同時進行經濟效益層面之探討。

參考文獻

行政院農業委員會。2020。智慧農業計畫(109 年辦理情形)。

https://www.angrin.tlri.gov.tw/Productivity_4.0/productivity_4.0.htm。

李春芳、陳吉斌、吳奇儒、蕭宗法。2003。加強熱季夜間飼養對荷蘭乳牛泌乳性能及瘤胃消化的影響。中畜會誌 32(2)：99-110。

葉亦馨、陳怡璇、陳一明、李國華、吳明哲、涂柏安。2020。夜間應用自動推料機對荷蘭種泌乳牛採食、反芻及靜止行為之影響。中畜會誌 49(2)：167-180。

Bargo, F., L. D. Muller, J. E. Delahoy, and T. W. Cassidy. 2002. Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 85: 2948-2963.

DeVries, T. J. and M. A. G. von Keyserlingk. 2005. Time of feed delivery affects the feeding and lying patterns of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 625-631.

DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, and K. A. Beauchemin. 2003. Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 4079-4082.

DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, and K. A. Beauchemin. 2005. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 3553-3562.

Dhiman, T. R., M. S. Zaman, I. S. MacQueen, and R. L. Boman. 2002. Influence of corn processing and frequency of feeding on cow performance. *J. Dairy Sci.* 85: 217-226.

French, N. and J. J. Kennelly. 1990. Effects of feeding frequency on ruminal parameters, plasma insulin, milk yield, and milk composition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 73: 1857-1863.

Gibson, J. P. 1984. The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: an analysis of published results. *Anim. Prod.* 38: 181-189.

Grant, R. J. and J. L. Albright. 2000. Feeding behaviour. Pages 365-382 in *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. J. P. F. D'Mello, ed. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.

Grinter, L. N., M. R. Campler, and J. H. C. Costa. 2019. Technical note: validation of a behavior-monitoring collar's precision and accuracy to measure rumination, feeding, and resting time of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102: 3487-3494.

Gross, J., H. A. van Dorland, R. M. Bruckmaier, and F. J. Schwarz. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *J. Dairy Res.* 78: 479-488.

Hart, K. D., B. W. McBride, T. F. Duffield, and T. J. DeVries. 2014. Effect of frequency of feed delivery on the behavior and productivity of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 1713-1724.

ICAR. 2014. International agreement of recording practices: ICAR Recording Guidelines.

Johansen, M., P. Lund, and M. R. Weisbjerg. 2018. Feed intake and milk production in dairy cows fed different grass and legume species: a meta-analysis. *Animal* 12(1): 66-75.

Kala, R., E. Samková, J. Koubová, L. Hasoňová, M. Kváč, T. Pelikánová, J. Špička, and O. Hanuš. 2018. Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. *Acta Univ. Agric. et Silv. Mendelianae Brun.* 66: 69-76.

Kay, J. K., W. J. Weber, C. E. Moore, D. E. Bauman, L. B. Hansen, H. Chester-Jones, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2005. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 88: 3886-3893.

Kaufman, E. I., V. H. Asselstine, S. J. LeBlanc, T. F. Duffield, and T. J. DeVries. 2017. Association of rumination time and health status with milk yield and composition in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101: 1-10.

King, M. T. M., R. E. Crossley, and T. J. DeVries. 2016. Impact of timing of feed delivery on the behavior and productivity

- of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99: 1471-1482.
- Le Liboux, S. and J. L. Peyraud. 1999. Effect of forage particle size and feeding frequency on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 76: 297-319.
- Mäntysaari, P., H. Khalili, and J. Sariola. 2006. Effect of feeding frequency of a total mixed ration on the performance of high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 4312-4320.
- Mattachini, G., J. Pompe, A. Finzi, E. Tullo, E. Riva, and G. Provolo. 2019. Effects of feeding frequency on the lying behavior of dairy cows in a loose housing with automatic feeding and milking system. *Animals* 9: 121.
- Miller-Cushon, E. K. and T. J. DeVries. 2017. Short communication: Associations between feed push-up frequency, feeding and lying behavior, and milk yield and composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100: 2213-2218.
- Munksgaard, L., M. G. Jensen, L. J. Pedersen, S. W. Hansen, and L. Mathews. 2005. Quantifying behavioural priorities- Effects of time constraints on behaviour of dairy cows, *Bos taurus*. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 92: 3-14.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. The National Academies Press, Washington, DC.
- Paddick, K. S., T. J. DeVries, K. Schwartzkopf-Genswein, M. A. Steele, M. E. Walpole, and G. B. Penner. 2019. Effect of the amount of concentrate offered in an automated milking system on dry matter intake, milk yield, milk composition, ruminal digestion, and behavior of primiparous Holstein cows fed isocaloric diets. *J. Dairy Sci.* 102: 2173-2187.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu, and D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76: 1753-1771.
- Phillips, C. J. C. and M. I. Rind. 2001. The effects of frequency of feeding a total mixed ration on the production and behavior of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 1979-1987.
- Piñeyrúa, J. T. M., S. R. Fariña, and A. Mendoza. 2018. Effects of parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 191: 9-21.
- Shabi, Z., I. Bruckental, S. Zamwell, H. Tagari, and A. Arieli. 1999. Effects of extrusion of grain and feeding frequency on rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 1252-1260.
- Shabi, Z., M. R. Murphy, and U. Moallem. 2005. Within-day feeding behavior of lactating dairy cows measured using a real-time control system. *J. Dairy Sci.* 88: 1848-1854.
- Stoop, W. M., H. Bovenhuis, J. M. L. Heck, and J. A. M. van Arendonk. 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 92: 1469-1478.
- Tyrrell, H. F. and J. T. Reid. 1965. Prediction of the energy value of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 48: 1215-1223.
- Vranković, L., J. Aladrović, D. Octenjak, D. Bijelić, L. Cvetnić, and Z. Stojević. 2017. Milk fatty acid composition as an indicator of energy status in Holstein dairy cows. *Arch. Anim. Breed.* 60: 205-212.
- Wathes, D. C., D. R. E. Abayasekara, and R. J. Aitken. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77: 190-201.
- Watters, M. E. A., K. M. Meijer, H. W. Barkema, K. E. Leslie, M. A. G. von Keyserlingk, and T. J. Devries. 2013. Associations of herd- and cow-level factors, cow lying behavior, and risk of elevated somatic cell count in free-stall housed lactating dairy cows. *Prev. Vet. Med.* 111: 245-255.

Effect of feed push-up during nighttime hours using automated feed pusher on milk yield and milk components of Holstein cows ⁽¹⁾

Yi-Hsin Yeh ⁽²⁾ Hsiao-Han Liao ⁽²⁾ Yi-Hsuan Chen ⁽²⁾ Yi-Ming Chen ⁽²⁾
Tsung-Yi Lin ⁽²⁾ and Po-An Tu ⁽²⁾⁽³⁾

Received: Jun. 8, 2021; Accepted: Dec. 28, 2021

Abstract

Poor feed ingestion during summer daytime can be improved by feed push-ups using an automated feed pusher at nighttime. This could stabilize the feeding management, compared with the conventional manual push-ups. In this study, we aimed to assess the effects of feed push-up during nighttime hours using an automated feed pusher on milk yield and milk components of dairy cattle. Lactating Holstein cows were housed in semi-open free stalls and fed with total mixed ration (TMR). Parity and lactating records were also collected. The feed push-up during nighttime hours significantly increased milk yield (overall 16%), energy corrected milk (ECM) (overall 10%), milk fat yield (overall 9%), lactoprotein (8%), lactose yield (overall 16%), lactose concentration (overall 1%), casein yield (overall 8%), solid-not-fat (SNF) yield (overall 13%), polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration (overall 8%), and free fatty acid (FFA) concentration (overall 13%). However, we also observed minor decrease in milk fat concentration (overall 4%), milk protein (overall 4%), casein concentration (overall 4%), SNF concentration (overall 1%), and saturated fatty acid concentration (overall 5%) using automated feed pusher in nighttime. We believe that an automated feed pusher is beneficial for commercial dairy farms, with the advantage of improving milk yield and milk quality.

Key words: Nighttime feed push-up, Automated feed pusher, Milk yield, Milk component.

(1) Contribution No. 2687 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: tpa@mail.tlri.gov.tw.

以模型場設施探討舍飼養鵝廢水之處理性能⁽¹⁾

江兆弘⁽²⁾⁽⁴⁾ 胡見龍⁽²⁾ 林宗毅⁽³⁾

收件日期：109 年 8 月 13 日；接受日期：111 年 1 月 3 日

摘 要

鑒於高病原性禽流感疫情對養鵝產業造成嚴重經濟損失，過去開放式飼養轉型為舍飼飼養儼然已成為趨勢。為探討傳統開放式及舍飼養鵝廢水處理系統之差異，本研究先使用小型反應槽 (10 L) 進行批式饋料處理小型養鵝場廢水。結果顯示，養鵝廢水分別以小型反應槽在厭氧 (水力停留時間 HRT = 5 天) 或好氧 (HRT = 3 天) 狀況下處理，處理後廢水之懸浮固體 (SS)、生化需氧量 (BOD) 及化學需氧量 (COD) 分別為厭氧 (HRT 5 天) 的 110.0、60.2 及 476.0 mg/L 及好氧 (HRT 3 天) 的 89.0、29.0 及 201.0 mg/L，去除率分別可達 94.5、93.7 及 80.4% 和 95.2、97.0 及 91.8%。另依小型模型槽好氧處理模式，建置大型好氧槽 (有效容積 600 L) 進行養鵝廢水處理研究，結果顯示在好氧反應 (HRT 3 天) 之條件下，處理水 SS、BOD 及 COD 分別為 89.4、39.0 及 134.0 mg/L，其去除率分別為 92.4、94.5 及 96.0%。研究結論為鵝舍廢水經 HRT 三天之批式處理法，可達放流水標準。處理後水樣之微生物超出 50 CFU/mL 水禽用水含量之建議值，不適合直接回收使用。

關鍵詞：養鵝廢水、舍飼飼養、處理模式。

緒 言

國內肉鵝大部分為舍外開放式飼養，鵝隻容易遭受野外禽鳥影響而有罹病風險。為防範野鳥成為禽流感病毒傳染途徑，舍內飼養將成為養鵝產業永續經營之趨勢。依據胡 (2005) 研究結果顯示，鵝隻每日平均排泄糞尿量為 466 ± 12 g，理化性質分別為生化需氧量 (biochemical oxygen demand, BOD) 30 g/隻/日、濃度 65,000 mg/L；化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 77 g/隻/日、濃度 166,000 mg/L；懸浮固體 (suspended solids, SS) 32 g/隻/日、濃度 70,000 mg/L。傳統開放式養鵝場設施包含水池、運動場及遮棚等，如推測三個區域堆置等量之糞尿量，則有 1/3 糞尿量經排泄於戲水池後排放。一般水池深度約 30 cm，經以直徑 1 mm 孔目進行固液分離後雖可濾除大部分鵝毛等雜質，但對於固液分離前後測量廢水水質並無顯著差異。具有水池之養鵝場每週如排放池水 2 次，每隻鵝產生廢水量 9 L，經固液分離鵝毛等雜質後再初步沉澱，少量濃稠部分以厭氧處理 3 至 5 天，大部分廢水直接經活性污泥法好氧處理 1 至 1.5 天即可達放流水標準。郭等 (1999) 指出飼養於舍內有水池或籠飼採用大量廢水沖洗之鴨隻，每日每隻用水量 36 L 左右，其 BOD 與 COD 濃度分別為 900 與 1,900 mg/L，亦建議可於固液分離後直接採活性污泥法處理。

傳統養鵝場排放水之 BOD、COD 及 SS 濃度分別為 21 – 167、51 – 975 及 26 – 1,305 mg/L，檢測結果雖因各養鵝場型態不同而有所差異，但大部分鵝場糞尿經大量池水稀釋後，廢水中所含之污染物質含量相對較養豬廢水低，經二段式處理後即可達放流水標準 (胡，2005)。當鵝隻飼養方式改為舍飼飼養後，舍內糞尿沖洗過程未經水池稀釋或因舍內池水量體較少，該鵝舍排放之廢水將有別於傳統開放式鵝場排放水之基本理化性質。廢水處理流程乃是依據廢水之水質項目及其濃度設計，有機廢水處理普遍採用生物處理方式 (蕭等，2011)，因此舍飼養鵝廢水處理模式需另行評估。故此，本研究探討舍飼養鵝廢水之水質特性，並建置模型場進行廢水處理試驗，期建立相關模式供產業參考。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2688 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。

(4) 通訊作者，E-mail: chjiang@tlri.gov.tw。

材料與方法

I. 機械設備

包括 0.5 馬力鼓風機 1 臺、直立式厭氧發酵槽及曝氣設施各 1 組。

II. 小型模型槽試驗

(i) 試驗材料

本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場(以下簡稱彰化場)進行,使用 6 月齡之舍飼白羅曼鵝 381 隻,試驗期間以完全配合飼料餵飼,飼養期為 105 年 5 至 11 月,廢水處理及檢測期間為同年 9 至 11 月。鵝隻飲水及每週 3 次洗舍用水量平均為 3,000 L/日,平均隻日用水量為 7.80 L。

(ii) 試驗方法:以模型槽進行厭氧及好氧試驗。

1. 厭氧試驗:測定不同水力停留時間(hydraulic retention time, HRT)對廢水處理之效果。將廢水以 1 mm 孔目篩網濾除鵝毛等雜質,使用有效容積 10 L 之直立式小型厭氧發酵槽 3 座進行試驗,每座槽體每日分別批次置換 2.00、1.00 或 0.67 L 廢水以模擬厭氧處理 HRT 5、10 及 15 天後,並分別採取 8 L 進行水質檢測。上述步驟經重複進行 4 批次處理後取得之 BOD、COD 及 SS 數值再換算去除率。
2. 好氧試驗:以曝氣馬達做為供氣來源,使用有效容積為 90 L 之槽體 3 座進行活性污泥馴養,馴養期間量測並記錄各組污泥沉降量(sludge volume 30, SV30)及模型槽內溶氧量(dissolved oxygen, DO)。將廢水以 1 mm 孔目篩網濾除鵝毛等雜質,每座槽體分別以 HRT 分別為 1、2 及 3 天進行好氧處理並分別採 8 L 廢水進行檢測。上述步驟經重複進行 4 批次處理後,取得之 BOD、COD 及 SS 數值再換算去除率。

III. 大型模型槽試驗

(i) 試驗材料

本試驗使用 17 月齡之彰化場舍飼白羅曼鵝 426 隻,試驗期間以完全配合飼料餵飼,廢水處理及檢測期間為 106 年 8 至 11 月。鵝舍每週清洗 3 次,沖洗之用水量平均為 4,285 L/日,平均隻日用水量為 10.06 L。

(ii) 試驗方法

於鵝舍建置集水井及好氧處理槽 3 座,槽體體積各為 1,000 L,有效處理容積為 600 L,試驗期間以曝氣馬達作為供氣來源進行活性污泥馴養,馴養期間量測並記錄各組污泥之 SV30 及模型槽內之 DO 值。將廢水以 1 mm 孔目篩網濾除鵝毛等雜質後,各槽體分別以批次進水方式,以 HRT 分別為 1.5、2 及 3 天等 3 種好氧條件處理,並分別採集 8 L 廢水進行檢測。上述步驟經重複進行 4 批次處理後取得 SS、BOD 及 COD 之數值再換算去除率。

IV. 民間開放式及舍飼養鵝場排放水質調查

(i) 試驗材料

挑選嘉義及雲林地區各 1 場民間種鵝場及嘉義地區 1 場民間肉鵝場,於各場進行鵝舍清洗作業時,採集中段之排放水及舍內戲水池水 8 L 進行檢測。

(ii) 水質檢測

檢測項目包括 pH 值、導電度、SS、BOD、COD、總磷及總氮。

V. 微生物檢測

採集嘉義地區肉鵝場及雲林地區種鵝場各 1 場廢水樣品及彰化場大型廢水處理槽體處理後之排放水樣品各 100 mL,共計 3 場次之廢水樣品,委由國立中興大學獸醫學院動物疾病診斷中心進行微生物檢測,檢驗項目以水中大腸桿菌群及大腸桿菌檢測方法—酵素呈色濾膜法(NIEA E237.52B)計算大腸桿菌之 CFU (Colony-forming unit),另以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)檢測水中是否含有沙門氏菌(*Salmonella* spp.)、巴氏桿菌(*Pasteruella multocida*)及雷氏桿菌(*Riemerella anatipestifer*)之核酸。

VI. 分析方法

- (i) COD 以密閉迴流滴定法(NIEA W517.52B)分析(行政院環境保護署,2009a)。
- (ii) BOD 以微生物氧化水中物質所消耗之溶氧(NIEA W510.55B)計算(行政院環境保護署,2011)。
- (iii) SS 以水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法:103 – 105°C 乾燥(NIEA W210.58A)分析(行政院環境保護署,2013)。
- (iv) 氫離子濃度以電極法(NIEA W424.52A)分析(行政院環境保護署,2009b)。
- (v) 導電度以導電度計法(NIEA W203.51B)分析(行政院環境保護署,2001)。

(vi) 總磷以分光光度計／維生素丙法 (NIEA W427.53B) 分析 (行政院環境保護署, 2010)。

(vii) 總氮以水中總氮檢測法 (NIEA W423.52C) 分析 (行政院環境保護署, 2004)。

VII 統計分析

試驗資料依統計分析系統 (SAS, 2014) 進行統計分析, 使用一般線性模式程序 (General linear model procedure, GLM) 進行變方分析, 呈顯著差異者再以最小平方平均值法 (Least squares means, LSMEANS) 計算平均值並比較組間差異, 本次試驗顯著差異水準設為 $P < 0.05$ 。

結果與討論

I. 小型模型槽試驗

使用小型模型槽處理 6 月齡舍飼白羅曼鵝 381 隻產出之廢水, 經 1 mm 直徑孔目篩網濾除鵝毛等雜質後, 檢測排放水之 SS、BOD 及 COD 之濃度分別為 1,983、967 及 2,460 mg/L (表 1)。

表 1. 以 10 L 小型模型槽處理舍飼養鵝廢水－HRT 對處理效果之影響

Table 1. Effect HRT on the performance of wastewater treatment by the 10 L tank

Item	SS ¹ (mg/L)	BOD ¹ (mg/L)	COD ¹ (mg/L)	H ⁺ (pH)
----- Anaerobic treatment -----				
Raw wastewater	1,983 ^a	967 ^a	2,460 ^a	7.1
HRT, 5 days	110 ^b	60.2 ^b	476 ^b	7.0
HRT, 10 days	78.4 ^b	43.4 ^b	330 ^b	7.3
HRT, 15 days	118 ^b	78.9 ^b	427 ^b	7.3
Pooled SEM	117	90.7	257	0.1
----- Anaerobic treatment removal efficiency, % -----				
HRT, 5 days	94.5	93.7	80.4	—
HRT, 10 days	96.0	95.5	86.4	—
HRT, 15 days	93.3	91.2	79.5	—
Pooled SEM	1.9	1.8	3.6	
----- Aerobic treatment -----				
Raw wastewater	1,983 ^a	967 ^a	2,460 ^a	7.1 ^a
HRT, 1.5 day	347 ^b	376 ^b	1,090 ^{ab}	7.5 ^b
HRT, 2 days	116 ^b	44.8 ^b	342 ^b	8.0 ^b
HRT, 3 days	89.0 ^b	29.0 ^b	201 ^b	8.0 ^b
Pooled SEM	127	117	300	0.1
----- Aerobic treatment removal efficiency, % -----				
HRT, 1.5 day	84.4 ^b	58.1	52.0	—
HRT, 2 days	93.9 ^{ab}	95.1	85.4	—
HRT, 3 days	95.2 ^a	97.0	91.8	—
Pooled SEM	1.9	9.2	9.3	—

N = 4.

^{a, b} Means in the same column and category with the different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Pooled SEM: pooled standard error of means.

¹ SS: suspended solids; BOD: biochemical oxygen demand; COD: chemical oxygen demand.

每日收集注入 3 座小型直立式厭氧模型槽 (有效容積 10 L) 之廢水, 每座每日分別各批次置換廢水 2、1 或 0.67 L, 以分別模擬厭氧處理 HRT 5、10 及 15 天, 取得各項數值換算去除率後進行統計分析。試驗結果顯示, 不同 HRT 處理後廢水之 SS 濃度分別為處理 5 天的 110.0 mg/L、10 天的 78.4 mg/L 及 15 天的 117.0 mg/L, 其 SS 去除率分別為 94.5、96.0 及 93.3%; 處理後廢水之 BOD 分別為處理 5 天的 60.2 mg/L、10 天的 43.4 mg/L 及 15 天的 78.9 mg/L, 去除率分別為 93.7、95.5 及 91.2%; 處理後廢水之 COD 分別為處理 5 天的 476.0 mg/L、10 天的 330.0 mg/L 及 15 天的 427.0 mg/L, 去除率分別為 80.4、86.4 及 79.5% (表 1)。其中 15 天處理組之 SS、BOD 及 COD 值雖較 10 天處理組稍高, 仍在放流水標準之內, 其各項去除率在統計上亦無顯著差異, 推測為採樣及檢測過程之誤差所致。依行政院環境保護署 (2019) 資料顯示, 畜牧業非草食性動物放流水標準之 SS、BOD 及 COD 分別為 150、80 及 600 mg/L, 本試驗以 10 L 小型厭氧模型槽處理後之排放水質均可符合標準。

在好氧處理試驗方面, 小型模型槽試驗組之舍飼養鵝廢水經直徑 1 mm 孔目進行固液分離後, 使用 3 組各 90 L 蓄水槽直接曝氣處理, 經完成活性污泥馴養後, 每日批次置換 2/3、1/2 或 1/3 槽體內廢水量, 分別模擬 HRT 1.5、2 及 3 天之處理效率。結果顯示, 3 種 HRT 處理後 SS 濃度分別為處理 1.5 天的 346.5 mg/L、2 天的 116.3 mg/L 及 3 天的 89.0 mg/L, 去除率則分別為 84.4、93.9 及 95.2%; BOD 方面, 分別為處理 1.5 天的 376.0 mg/L、2 天的 44.8 mg/L 及 3 天的 29.0 mg/L, 去除率為 58.1、95.1 及 97.0%; COD 方面, 分別為處理 1.5 天的 1,089.3 mg/L、2 天的 342.0 mg/L 及 3 天的 200.7 mg/L, 去除率為 52.0、85.4 及 91.8% (表 1)。研究指出, 高濃度有機廢水 (COD 高於 4,000 mg/L) 及低濃度有機廢水 (COD 低於 1,000 mg/L) 分別以厭氧及好氧處理較為合適 (Chan *et al.*, 2009), 本研究利用小型模型槽之試驗結果, 以好氧處理即可在短日數內得到良好之廢水處理成效, 與前述試驗結果相近似。Chan *et al.* (2009) 亦指出好氧生物處理放流水之水質濃度, 可較厭氧生物處理者為低, 而好氧生物處理分解可溶性有機物之效率亦較厭氧生物處理者為佳 (Grady *et al.*, 1999), 相較小型模型槽厭氧及好氧處理試驗結果 (表 1), 以好氧模擬 HRT 2 天即可獲得與厭氧方式模擬 HRT 10 天相似之處理效率, 因此本研究設計大型模型槽試驗針對好氧處理進行探討。

II. 大型模型槽試驗

大型模型槽處理 17 月齡舍飼白羅曼鵝 426 隻產出之廢水, 經 1 mm 直徑孔目篩網濾除鵝毛等雜質後, 檢測原廢水 SS、BOD 及 COD 之濃度分別為 1,994、726 及 1,445 mg/L (表 2)。收集經濾除鵝毛等雜質後之廢水, 批次注入好氧處理槽 (有效容積 600 L), 並分別曝氣處理 1、2 及 3 天, 採集處理水後樣送驗, 各 HRT 之 SV30 與 DO 值分別低於 250 mL/L 及 6 mg/L。結果顯示, 不同 HRT 經檢測 SS 之濃度分別為處理 1 天的 405.0 mg/L、2 天的 153.5 mg/L 及 3 天的 89.4 mg/L, 去除率分別為 74.3、88.9 及 92.4%, BOD 之濃度分別為處理 1 天的 103.7 mg/L、2 天的 54.0 mg/L 及 3 天的 39.0 mg/L, 去除率分別為 85.0、92.5 及 94.5%, COD 之濃度分別為處理 1 天的 294.5 mg/L、2 天的 184.5 mg/L 及 3 天的 134.0 mg/L, 去除率分別為 79.1、87.1 及 90.6% (表 2)。經好氧處理 3 天後, SS、BOD 及 COD 濃度即可符合排放水標準。

以小型好氧模型槽裝載 90 L 廢水進行曝氣處理, 並於每日分別置換 2/3、1/2 及 1/3 槽體內廢水量模擬 HRT 1.5、2 及 3 天之結果顯示, 不同 HRT 對 SS 去除率分別為 84.4 至 95.2%; BOD 去除率為 58.1 至 97%; COD 去除率為 52.0 至 91.8%。相較於以有效容積 600 L 大型槽進行曝氣處理, 小型與大型好氧模型槽 HRT 於處理 2 天與 3 天後之 SS、BOD 及 COD 去除率結果相近 (表 3)。顯示在好氧處理下, 小型及大型模型槽在經過 HRT 至少 2 天之處理均可得到良好成效。本研究利用大型模型槽組之舍飼養鵝廢水 BOD/COD 比值約為 0.5 (726/1,445 mg/L), 與 Tchobanoglous *et al.* (2003) 建議廢水 BOD/COD 比值 ≥ 0.5 適合生物處理之研究結果相呼應, 顯示以批次活性污泥法進行好氧處理, 能有效應用於較高濃度之舍飼養鵝廢水。依據蕭等 (2011) 研究指出, 國內有色肉雞屠宰廢水之 COD、BOD 及 SS 平均為 1,127、551 及 459 mg/L, 廢水 BOD/COD 比值約為 0.49, 亦適用好氧生物處理, 經採批次活性污泥法在水力停留時間 24 h 處理後, 屠宰廢水之排放水 SS、COD 及 BOD 之去除率達 94.8、98.9 及 90.9%, 並符合法定放流水標準。肉雞屠宰廢水主要成分以脂肪、蛋白質、血液及其他有機物為主, 相較之下鵝舍排放廢水因摻雜細鵝毛及飼料導致 SS 濃度較高, 因此除應加強過濾效率外, HRT 處理 2 天以上可獲得較佳之去除率, 相較於本試驗之 BOD/COD 比值約為 0.5, 亦符合蕭等 (2011) 試驗須處理 2 天以上較佳之結論。

表 2. 以 1,000 L 大型模型槽處理舍飼養鵝廢水－HRT 對處理效果之影響

Table 2. Effects of HRT on the performance of wastewater treatment by the 1,000 L tank

Item	SS ¹ (mg/L)	BOD ¹ (mg/L)	COD ¹ (mg/L)	H ⁺ (pH)	Conductivity (μmho/cm at 25°C)
Aerobic treatment					
Raw wastewater	1,994	726 ^a	1,445 ^a	6.7	4,480 ^a
HRT, 1 day	405	104 ^b	295 ^b	7.6	1,440 ^b
HRT, 2 days	154	54.0 ^b	185 ^b	7.8	1,375 ^b
HRT, 3 days	89.4	39.0 ^b	134 ^b	7.9	1,485 ^b
Pooled SEM	544.7	43.1	67.2	0.1	340.8
----- Aerobic treatment removal efficiency, % -----					
HRT, 1 day	74.3	85.0	79.1	—	—
HRT, 2 days	88.9	92.5	87.1	—	—
HRT, 3 days	92.4	94.5	90.6	—	—
Pooled SEM	7.5	3.7	3.9	—	—

N = 4.

^{a, b} Means within items in the same column and category with the different superscripts differ significantly (P < 0.05).

Pooled SEM: pooled standard error of means.

¹ SS: suspended solids; BOD: biochemical oxygen demand; COD: chemical oxygen demand.

表 3. 小型 (10 L) 及大型 (1,000 L) 模型槽好氧處理對養鵝廢水之處理性能比較

Table 3. Comparisons of removal efficiency of pollutants from the teated geese wastewater by aerobic mode with small (10 L) and large (1,000 L) tank

Item	Tank	Removal efficiency (%)		
		SS	BOD	COD
HRT, 1 day	Small	84.4	58.1	52.0
	Large	74.3	85.0	79.1
	Pooled SEM	7.5	14.8	14.3
HRT, 2 day	Small	93.9	95.1	85.4
	Large	88.9	92.5	87.1
	Pooled SEM	3.4	1.3	4.2
HRT, 3 day	Small	95.2	97.0 ^a	91.8
	Large	92.4	94.5 ^b	90.6
	Pooled SEM	3.5	0.5	0.6

SS: suspended solids; BOD: biochemical oxygen demand; COD: chemical oxygen demand.

^{a, b} Means within items in the same column with the different superscripts differ significantly (P < 0.05).

Pooled SEM: pooled standard error of means.

III. 民間養鵝場水質及微生物調查

為瞭解民間養鵝場之洗舍型態及排放水質，本研究於 105 至 106 年間至嘉義 (2 場) 及雲林 (1 場) 地區之民間養鵝場進行水樣採集。位於嘉義地區之 A 養鵝場飼養 10.5 月齡白羅曼種鵝 2,000 隻，鵝舍型態為水簾式高床鵝舍，飼養面積為 500 坪，舍內戲水池水量約 17,600 L，鵝糞以地下水沖洗清除，每日沖洗水量估計為 12,600 L，沖洗後之廢水匯流至舍內戲水池後一併排放，平均隻日用水量 (含戲水池與沖洗水用量) 為 15.0 L。嘉義地區 B 養鵝場飼養 15 週齡白羅曼肉鵝 2,500 隻，分飼於 2 棟非開放式鵝舍，鵝舍地面為磚造，舍內均設有戲水池，蓄水量總計 18,000 L，每日換水 2 次且不洗舍，平均隻日用水量為 14.4 L。雲林地區 C 養鵝場則飼養 3 歲齡白羅曼種鵝 2,000 隻，鵝舍型態為水簾式高床鵝舍，飼養面積為 500 坪，鵝糞以地下水沖洗清除，沖洗水

量每日估計為 7,000 L，沖洗後之污水匯流至舍內水溝後排放，平均隻日用水量為 3.5 L。本試驗分別採集 A、C 場沖洗鵝舍之廢水與 B 場戲水池之池水各 8 L 進行水質檢測，結果顯示，各場因飼養型態不同，導致用水量及所產生之水體濃度有所差異。經檢測民間鵝場排放水之 SS 為 543 – 5,260 mg/L，BOD 為 256 – 1,140 mg/L 及 COD 為 842 – 2,470 mg/L (表 4)，其中 C 場之沖洗水量較低，因此所採集之廢水濃度相較於其他 2 場有較大之差異。民間蛋鴨場依水池、飲水及床面等用途而異，廢水的物理化性狀亦產生極大差異，尤以籠飼蛋鴨舍之廢水之 SS、BOD 及 COD 濃度可達 $13,758 \pm 7,273$ 、 $6,032 \pm 3,017$ 及 $22,501 \pm 11,904$ mg/L (郭等, 1999)，一般鴨及鵝場等水禽廢水之 SS 濃度相較於本研究之大型模型槽試驗高出許多，建議可於進行廢水處理前加強固液分離及濾除羽毛雜質加以改善。

表 4. 養鵝廢水水質及微生物檢測結果

Table 4. Water qualities and microbes in goose wastewater

Item	Goose farm ¹			Large tank ¹
	A	B	C	
WC ² (L)	15.00	14.40	7.00	10.06
SS ³ (mg/L)	543	555	5,260	1,994
BOD ³ (mg/L)	256	425	1,140	726
COD ³ (mg/L)	842	723	2,470	1,445
H ⁺ (pH)	7.90	7.30	6.50	6.70
Conductivity ($\mu\text{mho}/\text{cm}$ at 25°C)	1,650	1,140	2,360	4,480
TP ³ (mg/L)	4.32	1.49	3.08	—
TN ³ (mg/L)	124	52.40	113	—
<i>E.coli</i> (CFU/mL)	—	1.8×10^5	6.6×10^5	2.3×10^2
<i>Salmonella</i> spp.	—	ND ⁴	ND	ND
<i>Pasteruella multocida</i>	—	ND	ND	ND
<i>Riemerella anatipestifer</i>	—	ND	ND	ND

¹ Farms A and B located in Chiayi area; Farm C located in Yunlin area; Large tank: wastewater of indoor goose house stored in the large tank with aerobic mode.

² WC: Water consumption (goose/day).

³ SS: suspended solids; BOD: biochemical oxygen demand; COD: chemical oxygen demand; TP: total phosphorus; TN: total nitrogen.

⁴ ND: not detected.

為瞭解鵝舍沖洗水中之微生物含量，分別取 B、C 養鵝場戲水池水及沖洗水樣，另自本試驗使用之大型好氧處理槽採集處理後水樣本進行大腸桿菌數等微生物檢測。結果顯示，採自 B、C 鵝場之廢水及大型好氧處理槽之處理水樣所含大腸桿菌數分別為 1.8×10^5 、 6.6×10^5 及 2.3×10^2 CFU/mL，顯示含菌量與每單位面積水禽飼養隻數相關，與 Abulreesh *et al.* (2004) 調查野生鴨與鵝出沒水池之含菌量得到相同之結論。另各場水樣中之 *Salmonella* spp.、*P. multocida* 及 *R. anatipestifer* 核酸 PCR 檢測結果均為陰性。本調查雖未於鵝舍內沖洗後之排放水或池水中檢測到 *Salmonella* spp.、*P. multocida* 及 *R. anatipestifer* 等水禽常見病原菌，惟水樣中之大腸桿菌數偏高，且本試驗以大型槽體經好氧處理後之水樣亦含有 2.3×10^2 CFU/mL 之大腸桿菌數，相較於水禽飲用水大腸桿菌數低於 50 CFU/mL 含量之建議 (劉等, 2013) 仍屬偏高，處理後之放流水應進行消毒降低大腸桿菌數至標準範圍後，再回收應用於沖洗鵝舍較符合生物安全之考量。

結 論

舍飼養鵝模式產生之廢棄物集中於沖洗廢水，相較於具有水池之傳統養鵝方式所產出之廢水有較高濃度之污染物。以小型模型槽模擬舍飼養鵝排放廢水厭氧及好氧處理模式，經好氧處理 2 天之 SS、BOD 及 COD 即可達放流水排放標準，而厭氧處理得到近似之去除效果需耗時 10 天。另以大型槽體進行舍飼養鵝廢水好氧處理，結果顯示

僅需停留處理 3 天，其 SS、BOD 及 COD 皆可符合放流水標準。由於處理後之放流水所含之大腸桿菌數仍偏高，在未經消毒處理前應不宜回收運用於鵝隻可接觸之範圍。

誌 謝

本研究承行政院農業委員會提供研究經費【105 農科－2.4.3－畜－L1 (2)】，試驗期間承蒙行政院農業委員會畜產試驗所經營組蕭庭訓組長提供直立式小型厭氧發酵槽等器材，以及彰化種畜繁殖場王勝德場長、練慶儀主任及新竹分所涂柏安副研究員之協助，使研究得以順利完成，特此申謝。

參考文獻

- 行政院環境保護署。2001。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水中導電度測定方法－導電度計法，NIEA W203.51B。https://www.epa.gov.tw/nica/CEF7F53949423F26。
- 行政院環境保護署。2004。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水中總氮檢測方法，NIEA W423.52C。https://www.epa.gov.tw/nica/3F83B9E9B37CAB8D。
- 行政院環境保護署。2009a。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水中化學需氧量檢測方法－密閉迴流法，NIEA W517.52B。https://www.epa.gov.tw/nica/9DFD1C9FBE6FA134?q=NIEA%20W517.52B。
- 行政院環境保護署。2009b。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水之氫離子濃度指數 (pH 值) 測定方法－電極法，NIEA W424.52A。https://www.epa.gov.tw/nica/9DFD1C9FB E6FA134?q=NIEA%20W517.52B。
- 行政院環境保護署。2010。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水中磷檢測方法－分光光度計／維生素丙法，NIEA W427.53B。https://www.epa.gov.tw/nica/2B74ED49B0407E51。
- 行政院環境保護署。2011。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水中生化需氧量檢測方法，NIEA W510.55B。https://www.epa.gov.tw/nica/1DE7C315036837B8。
- 行政院環境保護署。2013。行政院環境保護署環境檢驗所水質檢驗方法，水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法：103－105℃乾燥，NIEA W210.58A。https://www.epa.gov.tw/nica/545E417902E919B7。
- 行政院環境保護署。2019。放流水標準第二條附表 8。全國法規資料庫 https://law.moj.gov.tw/LawClass/LawGetFile.ashx?FileId=0000247694&lan=C。
- 郭猛德、郭春芳、黃祥吉。1999。鴨糞廢水處理之研究。中國畜牧學會會誌 28：69-80。
- 胡見龍。2005。鵝：廢棄物管理。臺灣農家要覽畜牧篇。豐年社，臺北市，第 333-338 頁。
- 劉朝鑫、許振忠、張聰洲、林志勳。2013。水禽飼養管理與安全用藥手冊。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。臺北市，第 37-38 頁。
- 蕭庭訓、蘇天明、郭猛德、黃裕益、程梅萍。2011。以活性污泥法處理有色肉雞屠宰場廢水之研究。畜產研究 44：71-80。
- Abulreesh, H. H., T. A. Paget, and R. Goulder. 2004. Waterfowl and the bacteriological quality of amenity ponds. J. Water Health 2: 183-189.
- Chan, Y. J., M. F. Chong, L. L. Chung, and D. G. Hassell. 2009. A review on anaerobic-aerobic treatment of industrial and municipal wastewater. Chem. Eng. J. 155: 1-18.
- Grady, Jr. C. P. L., G. T. Daigger, and H. C. Lim. 1999. Biological Wastewater Treatment. 2nd ed. Marcel Dekker. New York, USA.
- SAS Institute. 2014. SAS® University Edition. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Tchobanoglous, G., F. L. Burton, and H. D. Stensel. 2003. Wastewater Engineering: Treatment and Reuse. 4th ed. McGraw-Hill, USA.

Study on the treatment of wastewaters collected from indoor rearing operation of geese ⁽¹⁾

Chao-Hung Chiang ⁽²⁾⁽⁴⁾ Chien-Lung Hu ⁽²⁾ and Tsung-Yi Lin ⁽³⁾

Received: Aug. 13, 2020; Accepted: Jan. 3, 2022

Abstract

In view of the severe economic losses caused by the highly pathogenic avian influenza epidemic in the goose industry, the shift from feeding model from outdoor rearing to indoor rearing has become the inexorable trend. To understand the differences of wastewater treatment system between traditional outdoor-rearing and indoor-rearing lab-scale tanks, operated in anaerobic and aerobic modes, were used in current study to compare their performances for treatment of wastewaters collected from indoor and outdoor geese-rearing operations. Different hydraulic retention time (HRT) for testing wastewater in the lab-scale tanks was adopted for the study. Results showed that with the anaerobic mode operated at a HRT of 5 days, treated wastewater with SS 110.0, BOD 60.2, and COD 476.0 mg/L, corresponding to removal rate of 94.5, 93.7, 80.4%, respectively, was obtained. With the aerobic mode operated at a HRT of 3 days, effluent wastewater with SS 89.0, BOD 29.0, and COD 201.0 mg/L and rate of 94.5, 93.7, 80.4%, respectively, was obtained. Wastewater treated by a full-scale tank operated in aerobic mode with a HRT of 3 days had SS, BOD, and COD values of 89.4, 39.0, 134.0 mg/L and removal efficiencies of 92.4, 94.5, 90.6%, respectively. This study concludes that geese-rearing wastewater can be treated by a fed-batch operation mode with a HRT of 3 days for the wastewater in the tank. The reuse of the treated wastewater is not recommended because the microbial contents in the waste exceed the standard of waterpool usage of 50 CFU/mL.

Key words: Goose wastewater, Indoor rearing, Treatment model.

(1) Contribution No. 2688 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Changhua Animal Propagation Station, COA-LRI, Changhua 52149, Taiwan, R. O. C.

(3) Hsinchu Branch, COA-LRI, Miaoli 36841, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: chjiang@tlri.gov.tw.

提高飼糧鐵、硒或錳含量對仔豬生長性能、 血液性狀與免疫反應之影響⁽¹⁾

劉芳爵⁽²⁾⁽³⁾ 林幼君⁽²⁾

收件日期：110 年 6 月 11 日；接受日期：111 年 1 月 10 日

摘 要

為及早因應政府禁用抗生素作為畜禽生長促進劑，可能影響仔豬的生長與健康狀況，本試驗旨在運用提高飼糧鐵、硒與錳等含量，以提升仔豬的先天性免疫力，改善仔豬的生長性能與免疫力。試驗共採用 48 頭 32 — 35 日齡之 LYD 三品種雜交仔豬，依性別與體重 4 處理組，每處理 6 重複，每重複 2 頭（公母各半）。對照組飼糧含 20% 粗蛋白質與 3,400 kcal/kg 可消化能，鐵、硒與錳含量分別為 140 mg/kg、0.15 mg/kg 與 20 mg/kg。三個處理組飼糧分別含 2 倍鐵、硒或錳，試驗共進行 4 週。試驗結果顯示，在餵飼仔豬鐵、硒和錳正常量與 2 倍量鐵、硒或錳飼糧，仔豬的體重、日增重、飼料採食量與飼料轉換率均無顯著差異。另外在仔豬血液性狀，亦不受飼糧處理的影響。在免疫反應，餵飼 2 倍硒飼糧，在免疫球蛋白 IgA、IFN- γ 、TNF- α 與抗菌勝肽 pBD-2 濃度均顯著地高於對照組 ($P < 0.05$)，而餵飼 2 倍鐵或錳飼糧與對照組比較，則無顯著差異。綜上結果顯示，餵飼 2 倍硒飼糧，雖然沒有顯著改善仔豬的生長性能，但有提升 IgA、IFN- γ 、TNF- α 與抗菌勝肽 pBD-2 等性狀，有助於提升仔豬的免疫力。

關鍵詞：抗菌勝肽、礦物元素、仔豬、免疫力。

緒 言

鐵、硒與錳等微量礦物質，均為豬隻不可缺乏的營養元素。為了預防哺乳仔豬發生貧血，慣常於仔豬出生後 3 天注射 100 — 200 mg 鐵劑 (Almond *et al.*, 2017)。不過有研究指出，儘管新生仔豬有注射鐵劑，在每胎哺乳仔豬中，生長最快速與體型最大的仔豬，經常於離乳時發生缺鐵性貧血，導致仔豬的生長性能下降 (Perri *et al.*, 2015)，鐵為製造血紅素必需的營養分，缺乏時會造成豬隻貧血的問題。依據行政院農業委員會編輯委員會 (1990) 與 National Research Council (NRC) (2012)，推薦仔豬的鐵需要量為 80 — 150 mg/kg，在養豬飼料中鐵的慣行用量為 140 mg/kg，以避免仔豬發生缺鐵性貧血。至於硒部分，依據 NRC (2012) 於豬隻推薦需要量為 0.2 — 0.15 mg/kg，而國內養豬飼料中硒的慣行用量為 0.15 mg/kg (行政院農業委員會編輯委員會，1990)。由於硒是抗氧化物「麩胺基硫過氧化酶」(glutathione peroxidase) 的成分，硒對豬隻具有調節免疫與抗氧化的作用 (Rotruck *et al.*, 1973; Gelderman and Clapper, 2013)。另外，依據 NRC (2012) 與行政院農業委員會編輯委員會 (1990) 推薦豬隻錳的需要量為 2 — 4 mg/kg，在養豬飼料中錳的慣行用量為 20 mg/kg。錳具有維持碳水化合物、脂肪及蛋白質正常代謝的作用，提高錳含量有助於增加線粒體超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和骨骼發育 (Kerkaert *et al.*, 2019)。

仔豬於離乳後需要適應新的生長環境、飼料與同伴，同時需要克服包括下痢、生長停滯、低採食量和高死亡率等問題 (Blecha and Charley, 1990; Pluske *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2012)。抗菌勝肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 屬於宿主 (動物) 先天性免疫 (innate immunity) 的一部分，具有抑制革蘭氏陽性和陰性細菌和真菌的作用 (Zasloff, 2002; Brogden *et al.*, 2005)。在哺乳類動物先天性免疫，常見的抗菌勝肽有抗菌肽 (cathelicidin) 與禦菌素 (defensins) 兩大類。Cathelicidin 抗菌勝肽一般由 12 — 80 個氨基酸組成，富含離胺酸、精胺酸和組胺酸等陽離子胺基酸，為帶正電的勝肽，並具有親水性 (hydrophilicity) 與疏水性 (hydrophobicity) 等兩性特徵，主要存在於白血

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2689 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 通訊作者，E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw。

球與巨噬細胞中 (Zanetti, 2004)。豬隻 cathelicidin 分成 3 類，直線型富脯胺酸 (proline-rich) 的 cathelicidin (如 PR-39、Prophenin 1 與 2)、富 disulfide bond 胜肽 (如 disulfide-rich protegrins 1 – 5) 以及骨髓中富 arginine/histidine 的 AMP (Sang and Blecha, 2009)。其中有關抗菌胜肽 PR-39 研究指出，PR-39 分泌自巨噬細胞，出現於受傷組織的體液中，干擾細菌細胞膜正常的功能造成細菌的溶解，而且可以干擾細菌 DNA 與蛋白質合成，進而改變細菌細胞膜的完整性與抑制細菌細胞內的生理代謝作用 (Boman *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2001)。

第二類禦菌素 (defensins) 一般由 15 – 20 個胺基酸組成，包括 6 – 8 個半胱胺酸，屬陽離子胜肽，具有很強抗細菌、真菌和具外套膜病毒作用，其前驅物 (胜肽) 儲存於豬隻迴腸上皮細胞層、腸道嗜中性球及潘氏細胞 (paneth cell) 顆粒內，當仔豬腸道受細菌感染造成發炎反應時，此禦菌素的前驅物經過蛋白酶切割成有活性的型態後大量釋放出，以對抗侵入的病原。常見如豬隻迴腸上皮細胞層表現的禦菌素有 β -禦菌素 1 (β -defensin 1, pBD-1) 與 2 (pBD-2) (Shi *et al.*, 1999; Sang and Blecha, 2009)，其中抗菌胜肽 pBD-2 於細菌感染時表現量會上升，可以藉由提高表現量改善豬隻腸道的健康 (Veldhuizen *et al.*, 2006)。因此，本試驗運用提高飼糧鐵、錳與硒含量，評估其對提升仔豬生長性能、血液性狀、免疫球蛋白、白血球數量與分類計數、細胞激素、PR-39 與 pBD-2 等含量的影響。

材料與方法

本試驗於行政院農業委員會畜產試驗所營養組試驗豬舍進行，試驗動物之使用、飼養管理及試驗內容，經畜產試驗所實驗動物管理小組以畜試動字 106-22 號核准在案。

I. 試驗動物及飼糧處理

試驗採用 32 – 35 日齡 LYD 三品種雜交仔豬 48 頭，依照體重與性別分成四處理，每 2 頭關一欄，共 24 欄 (公母各半)，每處理 6 重複，每頭仔豬飼養空間面積為 0.5 m² 並提供 30 kg 容量的飼料槽。試驗期間採任食，提供充分清潔飲水，維持舍溫 28 – 30°C，並配合通風扇定時通風換氣，以維持畜舍內的空氣品質，試驗進行 4 週。飼糧處理，對照組仔豬飼糧含 20% 粗蛋白質與 3,400 kcal/kg 可消化能，鐵、硒與錳分別為 140 mg/kg、0.15 mg/kg 與 20.0 mg/kg；處理組飼糧分別提高對照組飼糧中鐵或硒與或錳量，各達 2 倍量 (如表 1)。

II. 測定項目

每週秤量與記錄仔豬體重和飼料採食量，計算仔豬的生長性能。分別在試驗開始日與結束日，分別採集 48 頭試驗仔豬血液樣品 5 mL (採樣前禁食 4 – 6 小時、頸部靜脈竇採集、使用含 EDTA 的 10 mL 採血管) 供分析血液性狀、免疫球蛋白、白血球數量與分類計數、細胞激素濃度、PR-39 與 pBD-2 等濃度。

(i) 血液性狀分析

分別於試驗開始日與結束日，採集血液樣品，供分析血液之總蛋白質、總膽固醇、三酸甘油酯、血液尿素氮與肌酸酐等性狀含量，分析儀器為 Hitach 血清生化分析儀 (Hitach 7170, Japan) 並以血液生化值套組分析總蛋白值 (No. 993-52901)、總膽固醇 (No. 21.862.1175)、三酸甘油酯 (No. 21.862.1705) 以及肌酸酐 (No. 277-10501) 等含量 (Wako Chemical Com., Japan)。

(ii) 免疫球蛋白、PR-39、pBD-2 含量分析

血液樣品經血球分析儀 (Sysmex XN-1000, Japan) 測定白血球數量、嗜酸性白血球、嗜鹼性白血球、淋巴球、單核球與分葉型嗜中性白血球百分比。

血液免疫球蛋白與抗菌胜肽含量測定，以 Multiskan™ FC Microplate Photometer 分析儀 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 與 Bethyl Laboratories 公司生產之 Pig IgA 酵素免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 套組 (No. E101-102)、Pig IgM ELISA 套組 (No. E101-117)、Pig IgG ELISA 套組 (No. E101-104) 以及 Porcine ELISA PR-39 (BlueGene, China) 和 Porcine ELISA pBD-2 (ABclonal, USA) 等商業套組，以波長 450 nm 量測吸光度，並配合標準曲線，計算血液樣品的 IgA、IgM、IgG、PR-39 與 pBD-2 濃度。

(iii) 細胞激素分析

以 Merck Millipore Milliplex 類似酵素免疫吸附法，利用抗體抗原免疫鍵結原理來偵測 (Pereira *et al.*, 2012)。將分析用抗體鍍膜在微珠上，藉由混合紅光及遠紅外光螢光染劑，混合成多種的顏色編碼 (color – code)。將每種不同顏色編碼微珠接上具專一性辨識特定蛋白的抗體，辨識血液樣品中細胞激素的特定蛋白，接續與標誌生物素 (biotin) 的偵測抗體作用，最後加入 SAPE (streptavidin phycoerythrin) 螢光抗體反應，以 Luminex 200 型機器 (Luminex Corporation, USA)，偵測介白素 (Interleukin, IL)-1 β (IL-1 β)、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL10、IL-12、Interferon- γ (IFN- γ) 與 Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) 等含量。

III. 統計分析

試驗收集之各項資料，利用 SAS (2005) 的套裝統計軟體，依一般線性模式 (general linear model procedure, GLM) 進行變方分析，並以鄧肯氏多變域測定法 (Duncan's multiple range test) 進行處理組平均值間之差異顯著性分析，當 $P < 0.05$ 表差異顯著，而 $P < 0.01$ 表差異極顯著。

表 1. 試驗仔豬之飼糧組成

Table 1. The feed formulation for piglets experiment

Ingredients, kg	Dietary mineral treatment			
	Control diet	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
Yellow corn, CP 7.5%	620.0	620.0	620.0	620.0
Soybean meal, CP 43.5%	257.5	256.8	257.5	257.5
Limestone (pulverized)	8	8	8	8
Dicalcium phosphate	16	16	16	16
Fish meal, CP 65%	50	50	50	50
Skimmed milk	20	20	20	20
Whey powder	20	20	20	20
Choline-Cl, 50%	1	1	1	1
Salt (iodized)	5	5	5	5
Vitamin premix ^a	1	1	1	1
Mineral premix ^b	1.5	1.5	1.5	1.5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0	0.7	0	0
Na ₂ SeO ₃	0.0003	0	0.0006	0
MnSO ₄ · H ₂ O	0	0	0	0.06
Total	1,000	1,000	1,000	1,000
Calculated value				
Crude protein, %	20.1	20.1	20.2	20.2
Digestible energy kcal/kg	3,439	3,439	3,448	3,448
Lysine, %	1.14	1.14	1.10	1.10
Iron, mg/kg	140	280	140	140
Selenium, mg/kg	0.15	0.15	0.3	0.15
Manganese, mg/kg	20	20	20	40
Analyzed value				
Crude protein, %	20.0	20.2	19.9	20.4
Lysine, %	1.10	10.8	1.05	1.09
Calcium, %	0.85	0.86	0.83	0.84
Total phosphorus, %	0.63	0.65	0.64	0.63
Iron, mg/kg	140.4	280.5	140.3	140.6
Selenium, mg/kg	0.15	0.15	0.3	0.15
Manganese, mg/kg	20.1	20.1	20.2	40.3

^a Supplied per kg of diet: Vitamin A, 6,000 IU; Vitamin D₃, 800 IU; Vitamin E, 20 IU; Vitamin K₃, 4 mg; Vitamin B₁, 2 mg; Vitamin B₂, 4 mg; Vitamin B₆, 1 mg; Vitamin B₁₂, 0.02 mg; Niacin, 30 mg; Calcium pantothenate, 16 mg; Folic acid, 0.6 mg; Biotin, 0.01 mg.

^b Supplied per kg of diet: Fe, 140 mg; Cu, 7 mg; Mn, 20 mg; Zn, 120 mg; Se, 0.15 mg; Cobalt (+2) sulfate heptahydrate 0.5 mg; I, 0.45 mg.

結果與討論

I. 仔豬的生長性能

飼餵仔豬鐵、硒與錳正常量或各 2 倍量飼糧對仔豬生長性能的影響，如表 2 與 3 所示。試驗結果顯示，在

仔豬的體重、日增重、採食量與飼料轉換率方面，各試驗組間沒有顯著效應。相關文獻指出，鐵、硒與錳等礦物質飼料原料，分別與豬隻的血紅球形成、軟骨組織的生長與骨骼發育以及免疫力與抗氧化能力相關，但是這些礦物質元素對豬隻的生長性能作用甚小 (Cao *et al.*, 2014; Estienne *et al.*, 2019; Kerkaert *et al.*, 2019)，本研究亦有類似的現象。因此，餵飼 2 倍量的鐵、硒或錳飼糧，並沒有顯著改善仔豬生長性能的作用。

表 2. 餵飼鐵、硒與錳正常量或 2 倍量飼糧對仔豬體重的影響

Table 2. Effect of feeding Fe, Se or Mn or double amount on body weight of LYD piglets

Period	Dietary mineral treatment			
	Control diet ¹	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
n	12	12	12	12
Initial, kg	10.3 ± 2.2*	10.1 ± 1.8	10.1 ± 1.7	10.2 ± 1.6
8 th -d, kg	12.1 ± 2.4	12.4 ± 1.9	12.8 ± 2.7	12.7 ± 2.2
14 th -d, kg	15.9 ± 2.7	16.0 ± 2.1	16.5 ± 3.0	16.2 ± 2.6
22 th -d, kg	19.5 ± 3.1	19.7 ± 2.6	20.6 ± 3.6	19.8 ± 2.4
28 th -d, kg	23.6 ± 3.5	23.3 ± 2.8	24.8 ± 2.3	24.0 ± 1.8

¹ Control diet: Fe, 140 mg/kg; Se, 0.15 mg/kg; Mn, 20 mg/kg; Initial at the age 32 - 35 days for 4 weeks; body weight at each stage is not affected by the source and amount of mineral-added ($P > 0.05$).

* Mean ± SD.

表 3. 餵飼鐵、硒與錳正常量或 2 倍量飼糧對仔豬生長性能的影響

Table 3. Effect of feeding Fe, Se or Mn or double amount on growth performance of LYD piglets

Items	Dietary mineral treatment			
	Control diet ¹	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
ADG, kg ²				
n	12	12	12	12
1 st wk	0.35 ± 0.12*	0.34 ± 0.11	0.37 ± 0.11	0.36 ± 0.12
2 nd wk	0.45 ± 0.10	0.49 ± 0.10	0.54 ± 0.06	0.50 ± 0.09
3 rd wk	0.51 ± 0.08	0.53 ± 0.13	0.59 ± 0.07	0.52 ± 0.10
4 th wk	0.61 ± 0.11	0.56 ± 0.20	0.60 ± 0.18	0.58 ± 0.15
Whole period	0.47 ± 0.07	0.49 ± 0.08	0.53 ± 0.08	0.50 ± 0.10
ADFI, kg ²				
n	6	6	6	6
1 st wk	0.52 ± 0.16	0.47 ± 0.09	0.53 ± 0.14	0.48 ± 0.08
2 nd wk	0.79 ± 0.14	0.67 ± 0.10	0.80 ± 0.14	0.65 ± 0.10
3 rd wk	0.98 ± 0.13	0.84 ± 0.08	0.99 ± 0.13	0.85 ± 0.08
4 th wk	1.21 ± 0.16	1.12 ± 0.13	1.16 ± 0.24	1.09 ± 0.15
Whole period	0.89 ± 0.13	0.77 ± 0.09	0.90 ± 0.13	0.78 ± 0.09
FC (Feed/gain) ²				
n	6	6	6	6
1 st wk	1.49 ± 0.38	1.34 ± 0.32	1.43 ± 0.37	1.33 ± 0.39
2 nd wk	1.76 ± 0.53	1.37 ± 0.37	1.46 ± 0.29	1.30 ± 0.42
3 rd wk	1.88 ± 0.49	1.66 ± 0.38	1.66 ± 0.31	1.63 ± 0.29
4 th wk	1.98 ± 0.42	1.93 ± 1.90	1.93 ± 0.55	1.88 ± 0.44
Whole period	1.88 ± 0.44	1.59 ± 0.26	1.66 ± 0.41	1.59 ± 0.39

¹ Control diet: Fe, 140 mg/kg; Se, 0.15 mg/kg; Mn, 20 mg/kg; Growth performance at each stage is not affected by the source and amount of mineral-added ($P > 0.05$).

* Mean ± SD.

² ADG: average daily gain; ADFI: average daily feed intake; FC: feed conversion rate.

II. 仔豬的血液性狀

餵飼仔豬鐵、硒與錳正常量或 2 倍量的飼糧對仔豬血液的總蛋白、血漿尿素氮、三酸甘油酯、總膽固醇與肌酸酐濃度，各組間亦無顯著差異，如表 4 所示。依據生醫產業用畜禽動物應用手冊 (2011) 顯示，前述血液性狀在試驗第 1 與 28 天，各項血液性狀除總膽固醇含量較參考值高外，其餘均在正常血液生理範圍，另外血液尿素氮與三酸甘油酯濃度第 28 天高於第 1 天約為 2 倍。此現象可能因第 28 天豬隻採食量較高所致 (Gowanlock *et al.*, 2013)。另外，血液總膽固醇濃度偏高，主要受飼糧脂肪、膽固醇與粗纖維攝取量的影響。在仔豬階段，為滿足與促進仔豬的生長速率，餵飼飼糧為含高能量與低纖維的飼料配方，可能因此而使得血液總膽固醇含量有偏高的現象 (Costa *et al.*, 1994)。由前述血液性狀結果顯示，餵飼仔豬鐵、硒與錳正常量或各提高 2 倍量的鐵、硒或錳飼糧，並不顯著影響仔豬之總蛋白、尿素氮、三酸甘油酯、總膽固醇與肌酸酐濃度等血液性狀。

表 4. 餵飼鐵、硒與錳正常量或 2 倍量飼糧對仔豬血液性狀的影響

Table 4. Effect of feeding Fe, Se or Mn or double amount on blood traits of LYD piglets

Traits	Dietary mineral treatment			
	Control diet ¹	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
Day 1				
n	12	12	12	12
Total protein, g/dL ²	5.80 ± 0.26*	4.36 ± 0.64	4.68 ± 0.17	5.58 ± 0.42
Blood urea nitrogen, mg/dL	4.65 ± 1.03	4.88 ± 0.88	5.23 ± 0.60	5.23 ± 0.84
Triglyceride, mg/dL	24.75 ± 3.77	26.40 ± 8.74	23.83 ± 7.08	25.87 ± 8.60
Total cholesterol, mg/dL	108.75 ± 20.89	98.20 ± 16.12	95.83 ± 7.93	96.67 ± 15.57
Creatinine, mg/dL	1.62 ± 0.17	1.92 ± 0.11	1.35 ± 0.08	1.19 ± 0.07
Day 28				
n	12	12	12	12
Total protein, g/dL	4.38 ± 0.36	5.28 ± 0.27	5.05 ± 0.41	5.25 ± 0.21
Blood urea nitrogen, mg/dL	8.90 ± 2.37	9.67 ± 0.99	9.78 ± 2.26	9.85 ± 1.52
Triglyceride, mg/dL	48.51 ± 8.32	45.43 ± 7.59	48.67 ± 9.15	49.87 ± 12.79
Total cholesterol, mg/dL	79.75 ± 5.27	82.60 ± 5.27	91.00 ± 19.67	93.50 ± 6.79
Creatinine, mg/dL	1.72 ± 0.15	1.43 ± 0.16	1.53 ± 0.18	1.42 ± 0.14

¹ Control diet: Fe, 140 mg/kg; Se, 0.15 mg/kg; Mn, 20 mg/kg.

² Reference values: total protein 3.5 - 6.0 g/dL, blood urea nitrogen 10 - 30 mg/dL, triglyceride 20 - 52 mg/dL, total cholesterol 28 - 48 mg/dL and creatinine 1.0 - 2.7 mg/dL. Data source: application manual of livestock and poultry Animals for biomedical industry (2011).

* Mean ± SD.

III. 仔豬的白血球數量與分類計數

餵飼仔豬 2 倍量的鐵、硒或錳以及正常量飼糧對仔豬血液白血球分類計數 (differential count, DC) 的影響如表 5 所示。依據生醫產業用畜禽動物應用手冊 (2011) 顯示，無論第 1 與 28 天時，測定之仔豬白血球數量與白血球分類計數，均在正常值範圍。在白血球數量第 1 與 28 天均有偏高現象 (接近於最高量)。此現象可能因採血造成短暫的緊迫作用，使白血球數量偏高。Weijenberg *et al.* (1996) 文獻指出，白血球數量會因激烈的運動或壓力等原因，造成暫時性偏高。在第 28 天時，餵飼 2 倍硒飼糧，在白血球數量顯著低於餵飼正常鐵、硒與錳飼糧的對照組，而餵飼 2 倍鐵或 2 倍錳飼糧與對照組比較，則沒有顯著差異。此現象可能因 2 倍硒 (0.3 mg/kg) 飼糧具有降低緊迫的作用，讓白血球數量比對照組低 (Spallholz *et al.*, 1990)。另外，在嗜鹼性白血球、嗜酸性白血球、淋巴球、單核球與分葉型嗜中性白血球等白血球分類計數，均在正常值範圍 (生醫產業用畜禽動物應用手冊, 2011)，且餵飼鐵、硒與錳正常量對比於 2 倍量的鐵、硒或錳飼糧組間，前述白血球分類計數均沒有顯著差異。此現象可能因鐵、硒或錳等礦物質對白血球分類計數影響不顯著 (Cao *et al.*, 2014; Estienne *et al.*, 2019;

Kerkaert *et al.*, 2019)。由上述結果顯示，2 倍硒飼糧具有降低白血球數量的現象，不過對於白血球分類計數與對照組或 2 倍之鐵或錳飼糧，沒有顯著差異。

表 5. 餵飼鐵、硒與錳正常量或 2 倍量飼糧對仔豬白血球數量與分類計數的影響

Table 5. Effect of feeding Fe, Se or Mn or double amount of on cell count and differential count of white blood

Traits	Dietary mineral treatment			
	Control diet ¹	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
Day 1				
n	12	12	12	12
White blood cell count, cells/uL ²	19,240 ± 222.2*	20,409 ± 165.4	21,280 ± 405.6	21,877 ± 496.2
Basophils, %	1.08 ± 0.52	1.24 ± 1.62	1.19 ± 0.49	0.98 ± 0.56
Eosinophils, %	1.16 ± 0.52	0.99 ± 0.77	1.06 ± 0.44	1.27 ± 0.52
Lymphocytes, %	55.39 ± 4.21	53.44 ± 5.42	57.22 ± 8.26	59.98 ± 12.56
Monocytes, %	5.38 ± 1.37	5.90 ± 1.10	5.72 ± 1.24	5.43 ± 1.35
Neutrophil Segmented, %	48.30 ± 4.23	45.60 ± 3.21	42.67 ± 10.25	49.35 ± 7.29
Day 28				
n	12	12	12	12
White blood cell count, cells/uL	21,289 ± 326.2 ^a	20,299 ± 375.6 ^{ab}	18,140 ± 706.0 ^b	20,717 ± 395.2 ^{ab}
Basophils, %	0.84 ± 0.52	1.14 ± 1.26	0.79 ± 0.29	0.83 ± 0.49
Eosinophils, %	1.06 ± 0.81	0.93 ± 0.37	0.96 ± 0.64	0.79 ± 0.41
Lymphocytes, %	52.49 ± 3.61	50.64 ± 4.52	54.03 ± 10.44	58.96 ± 13.72
Monocytes, %	4.59 ± 2.73	4.90 ± 1.00	5.46 ± 0.24	5.43 ± 1.46
Neutrophil Seg, %	41.03 ± 5.02	42.10 ± 4.71	48.76 ± 11.20	44.01 ± 3.38

¹ Control diet: Fe, 140 mg/kg; Se, 0.15 mg/kg; Mn, 20 mg/kg.

² Reference values: white blood cell count 11 - 22 × 10³ cells/uL, basophils 0 - 1.3%, eosinophils 0 - 7.7%, lymphocytes 38.1 - 73.1 %, monocytes 0 - 15% and neutrophil Segmented 40 - 70%. Data source: application manual of livestock and poultry Animals for biomedical industry (2011).

* Mean ± SD.

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

IV. 仔豬的免疫球蛋白與細胞激素含量

餵飼仔豬對照組或 2 倍量的鐵、硒或錳飼糧對仔豬血液免疫球蛋白與細胞激素含量的影響如表 6 所示。在第 28 天時，餵飼 2 倍硒飼糧，仔豬血液免疫球蛋白 IgA 濃度高於對照組與 2 倍鐵或錳飼糧 (P < 0.05)。在 IgG 與 IgM 濃度，各組間沒有顯著差異。在 Blodgett *et al.* (1986) 文獻指稱，以相同硒濃度餵飼離乳仔豬對血液 IgG 與 IgM 濃度，亦沒有顯著的提升作用。不過在 Gelderman and Clapper (2013) 文獻指出，餵飼含 0.3 mg/kg 硒飼糧提高新母豬與哺乳仔豬血液免疫球蛋白 IgA、IgG 與 IgM 濃度的作用。此現象可能因哺乳仔豬受到母豬初乳移行抗體的影響，亦可能因不同抗原對應產生的抗體不同所致。在細胞激素濃度，餵飼 2 倍飼糧比對照組顯著提高 IFN-γ 與 TNF-α 濃度，但是在餵飼 2 倍之鐵或錳飼糧與對照組比較，則沒有顯著差異。此結果顯示，餵飼仔豬 2 倍硒飼糧，可能經由 TNF-α 活化免疫系統 (van Heugten *et al.*, 1994)，亦可能經由致活 T-細胞和自然殺手細胞 (NK 細胞) 提高 IFN-γ 產生量，進而提升仔豬抵抗病原菌與免疫調節等作用，改善仔豬的免疫力 (Schroder *et al.*, 2004)。另外，在 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 與 IL-12 等細胞激素的濃度，四組飼糧組間沒有顯著差異。此現象可能因飼糧鐵、錳與硒等飼料原料，對於上述細胞激素濃度影響較小，不及其本身具有調控血紅素形成、軟骨組織的生長與骨骼發育以及抗氧化等相關作用 (Cao *et al.*, 2014; Estienne *et al.*, 2019; Kerkaert *et al.*, 2019)。由以上結果顯示，僅有 2 倍硒飼糧有調節 IFN-γ 與 TNF-α 等免疫相關的性狀，而 2 倍之鐵或錳飼糧對提高仔豬的 IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 與 IL-12 等細胞激素含量作用不顯著。

表 6. 飼餵鐵、硒與錳正常量或 2 倍量飼糧對仔豬免疫球蛋白與細胞激素含量之影響

Table 6. Effects of feeding Fe, Se or Mn or double amount of on the concentration of immunoglobulins and cytokines

Traits	Dietary mineral treatment			
	Control diet ¹	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
Day 1				
n	12	12	12	12
Immunoglobulin				
IgG, × 10 ⁶ ng/mL	4.60 ± 1.07	5.60 ± 1.28	6.04 ± 1.30	5.76 ± 0.62
IgA, × 10 ⁵ ng/mL	2.66 ± 0.76	2.48 ± 0.12	2.54 ± 0.58	2.47 ± 0.82
IgM, × 10 ⁶ ng/mL	1.08 ± 0.48	1.12 ± 0.26	1.35 ± 0.47	1.33 ± 0.58
Cytokine				
IFN-γ, pg/mL	0.53 ± 0.07	1.38 ± 0.25	0.33 ± 0.04	1.29 ± 0.31
IL-1β, pg/mL	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.07	0.32 ± 0.05	0.28 ± 0.05
IL-2, pg/mL	0.02 ± 0.001	0.05 ± 0.01	0.28 ± 0.07	0.21 ± 0.05
IL-4, pg/mL	0.10 ± 0.06	0.29 ± 0.04	1.04 ± 0.24	0.73 ± 0.01
IL-6, pg/mL	0.02 ± 0.008	0.03 ± 0.001	0.23 ± 0.06	0.11 ± 0.03
IL-8, pg/mL	0.16 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.46 ± 0.03
IL-10, pg/mL	0.05 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.42 ± 0.01	0.33 ± 0.08
IL-12, pg/mL	0.55 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.68 ± 0.05	0.68 ± 0.03
TNF-α, pg/mL	0.009 ± 0.0005	0.02 ± 0.002	0.001 ± 0.0005	0.009 ± 0.0003
Day 28				
n	12	12	12	12
Immunoglobulin				
IgG, × 10 ⁶ ng/mL	8.80 ± 1.40	7.88 ± 1.42	8.97 ± 1.27	9.49 ± 1.02
IgA, × 10 ⁵ ng/mL	3.94 ± 0.54 ^b	3.97 ± 0.35 ^b	6.58 ± 0.98 ^a	3.85 ± 0.82 ^b
IgM, × 10 ⁶ ng/mL	2.66 ± 0.72	2.15 ± 0.59	2.44 ± 0.43	2.50 ± 0.61
Cytokine				
IFN-γ, pg/mL	0.66 ± 0.01 ^b	2.72 ± 0.51 ^{ab}	5.81 ± 0.86 ^a	1.54 ± 0.31 ^{ab}
IL-1β, pg/mL	0.62 ± 0.06	0.37 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.77 ± 0.08
IL-2, pg/mL	0.59 ± 0.05	0.38 ± 0.04	0.31 ± 0.03	0.85 ± 0.09
IL-4, pg/mL	1.70 ± 0.12	0.94 ± 0.12	0.96 ± 0.01	2.49 ± 0.33
IL-6, pg/mL	0.27 ± 0.03	0.21 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.37 ± 0.05
IL-8, pg/mL	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.33 ± 0.02
IL-10, pg/mL	1.03 ± 0.09	0.66 ± 0.07	0.61 ± 0.06	1.34 ± 0.15
IL-12, pg/mL	0.43 ± 0.02	0.75 ± 0.03	0.88 ± 0.03	0.72 ± 0.05
TNF-α, pg/mL	0.05 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.01 ^{ab}	0.22 ± 0.03 ^a	0.09 ± 0.01 ^{ab}

¹ Control diet: Fe, 140 mg/kg; Se, 0.15 mg/kg; Mn, 20 mg/kg.

* Mean ± SD.

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

V. 仔豬的血液 pBD-2 與 PR-39 含量

飼餵仔豬鐵、硒與錳正常量或提高各 2 倍飼糧對仔豬血液抗菌胜肽 pBD-2 與 PR-39 含量之影響如表 7 所示。在第 1 天時，飼餵鐵、硒與錳正常量或提高各 2 倍飼糧組間，仔豬血液抗菌胜肽 pBD-2 與 PR-39 含量，沒有顯著差異。但是在第 28 天時，仔豬飼餵 2 倍飼糧，抗菌胜肽 pBD-2 含量顯著高於對照組與 2 倍鐵飼糧 (P < 0.05)。而抗菌胜肽 PR-39 含量，則各飼糧組間沒有顯著差異。此現象可能因僅有硒具有調節免疫力作用 (Cao *et al.*, 2014)，當飼糧硒含量為 0.3 mg/kg 時，提升抗菌胜肽 pBD-2 濃度，不過在提升抗菌胜肽 PR-39 含量的作用，僅比對照組提高 15.5%，並沒有達到顯著水準。此現象可能因抗菌胜肽 PR-39 是由巨噬細胞分泌，富含脯

胺酸與精胺酸胜肽，出現於受傷組織的體液中，而本研究可能因仔豬處於健康狀態（沒有受傷組織）下，因此在 PR-39 表現量較低 (Bao *et al.*, 2001)。由上述結果顯示，餵飼仔豬 2 倍硒飼糧具有提升抗菌胜肽 pBD-2 濃度的作用，不過對於提升抗菌胜肽 PR-39 含量的作用，餵飼 2 倍量之鐵、硒或錳飼糧沒有顯著的作用。

表 7. 餵飼鐵、硒與錳正常量或 2 倍量飼糧對仔豬血液 pBD-2 與 PR-39 含量的影響

Table 7. Effect of feeding Fe, Se or Mn or double amount of on the concentration of pBD-2 and PR-39

Traits	Dietary mineral treatment			
	Control diet ¹	Fe (× 2)	Se (× 2)	Mn (× 2)
Day 1				
n	12	12	12	12
pBD-2, pg/mL	241.75 ± 61.95*	207.50 ± 73.86	268.14 ± 32.98	182.93 ± 56.56
PR-39, pg/mL	164.65 ± 45.03	174.88 ± 33.88	199.86 ± 39.83	183.23 ± 56.84
Day 28				
n	12	12	12	12
pBD-2, pg/mL	195.09 ± 68.34 ^b	205.16 ± 64.24 ^b	399.86 ± 39.41 ^a	259.52 ± 35.72 ^{ab}
PR-39, pg/mL	168.90 ± 22.37	178.67 ± 23.99	199.78 ± 42.26	186.85 ± 31.52

¹ Control diet: Fe, 140 mg/kg; Se, 0.15 mg/kg; Mn, 20 mg/kg.

* Mean ± SD.

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

結 論

在仔豬生長性狀，餵飼仔豬 2 倍量之鐵、硒或錳飼糧，相較於餵飼鐵、硒與錳正常量飼糧，兩者對日增重、採食量與飼料轉換率等生長性能沒有顯著差異。而在總蛋白、膽固醇、三酸甘油酯、肌酸酐與尿素氮等血液性狀，亦沒有顯著的差異。

餵飼 2 倍量硒飼糧，仔豬血液 IgA、IFN- γ 、TNF- α 與抗菌胜肽 pBD-2 含量顯著高於餵飼對照組飼糧，而餵飼 2 倍量之鐵或錳飼糧，則沒有顯著影響。綜上所述，餵飼仔豬含 0.3 mg/kg 硒飼糧，具有提升前述血液性狀表現與仔豬免疫力的效果。

誌 謝

試驗期間感謝畜產試驗所營養組同仁嚴世俊先生與蕭合芬小姐，試驗進行過程中之協助與相關資料之收集與分析工作，使試驗能順利完成。

參考文獻

- 行政院農業委員會編輯委員會。1990。臺灣地區飼養標準—豬。行政院農業委員會出版，臺北市。
- 生醫產業用畜禽動物應用手冊編輯委員會。2011。無特定病原豬 (Specific pathogen free, SPF)。生醫產業用畜禽動物應用手冊，中華實驗動物學會編印，臺北市，第 2-27 頁。
- Almond, G., E. Byers, J. Seate, and P. Boyer. 2017. Supplemental iron dextran injections: influence on hemoglobin concentrations and piglet growth. *J. Swine Health Prod.* 25: 308-312.
- Bao, J., K. Sato, M. Li, Y. Gao, R. Abid, W. Aird, M. Simons, and M. J. Post. 2001. PR-39 and PR-11 peptides inhibit ischemia-reperfusion injury by blocking proteasome-mediated IkB- α degradation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H2612-H2618.
- Blecha, F. and B. Charley. 1990. Rationale for using immune potentiators in domestic food animals. *Adv. Vet. Sci. Comp.* 35: 3-19.

- Blodgett, D. J., G. G. Schurig, and E. T. Kornegay. 1986. Immunomodulation in weanling swine with dietary selenium. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1517-1519.
- Boman, H. G., B. Agerberth, and A. Boman. 1993. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect. Immunol.* 61: 2978-2984.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria ? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250.
- Cao, J., F. Guo, L. Zhang, B. Dong, and L. Gong. 2014. Effects of dietary selenomethionine supplementation on growth performance, antioxidant status, plasma selenium concentration, and immune function in weaning pigs. *J. Anim. Sci. Biotech.* 5: 46-53.
- Costa, N. M. B., A. G. Low, A. F. Walker, R. W. Owen, and H. N. Englyst. 1994. Effect of baked beans (*phaseolus vulgaris*) on sterol metabolism and non-starch polysaccharide output of hypercholesterolemia pigs with or without an ileo-rectal anastomosis. *Brit. J. Nutri.* 71: 871-886.
- Estienne, M., S. Clark-Deener, and K. Williams. 2019. Growth performance and hematology characteristics in pigs treated with iron at birth and weaning and fed a nursery diet supplemented with a pharmacological level of zinc oxide. *J. Swine Health Prod.* 27: 64-75.
- Gelderman, A. and J. Clapper. 2013. Effects of inorganic or organic selenium on immunoglobulins in swine. *J. Anim. Sci. Biotech.* 4: 47-55.
- Gowanlock, D. W., D. C. Mahan, J. S. Jolliff, S. J. Moeller, and G. M. Hill. 2013. Evaluating the NRC levels of Cu, Fe, Mn, and Zn using organic and inorganic mineral sources for grower-finisher swine. *J. Anim. Sci.* 91: 5680-5686.
- Kerkaert, H. R., J. C. Woodworth, J. M. DeRouchey, S. S. Dritz, M. D. Tokach, and R. D. Goodband. 2019. Determining the effects of manganese source and level on growth performance, carcass characteristics, and economics of growing-finishing pigs. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports: Vol. 5: 8.* <https://doi.org/10.4148/2378-5977.7853>.
- Li, J., M. Post, R. Volk, Y. Gao, M. Li, C. Metais, K. Sato, J. Tsai, W. Aird, and R. D. Rosenberg. 2000. PR-39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat. Med.* 6: 49-55.
- National Research Council. 2012. *Nutrient Requirements of Swine*. 11th Revised. Ed. National Academies Press, Washington D. C., USA. <https://doi.org/10.17226/13298>.
- Pereira, C. G., S. P. Pereir, C. V. Pereir, J. A. Lumini, J. Magalhaes, A. Ascensao, M. S. Santos, A. J. Moreno, and P. J. Oliveira. 2012. Mitochondrionopathy phenotype in doxorubicin-treated wistar rats depends on treatment protocol and is cardiac-specific. *PLoS one* 6: e38867.
- Perri, A. M., R. M. Friendship, J. C. S. Harding, and T. L. O' Sullivan. 2015. An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on post-weaning performance. *J. Swine Health Prod.* 24: 10-20.
- Pluske, J. R., D. J. Hampson, and I. H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest. Prod. Sci.* 51: 215-236.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman, and W. G. Hoekstra. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- Sang, Y. and F. Blecha. 2009. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 334-343.
- SAS. 2005. *User's guide: Statistic*, version 9.1 edition. SAS Inc., Cary, NC, USA.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75: 163-89.
- Shi, J., G. Zhang, H. Wu, C. Ross, F. Blecha, and T. Ganz. 1999. Porcine epithelial *beta*-defensin 1 is expressed in the dorsal tongue at antimicrobial concentrations. *Infect. Immunol.* 67: 3121-3127.
- Spallholz, J. E., L. M. Boylan, and H. S. Larsen. 1990. Advances in understanding selenium role in the immune-system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 587: 123-139.
- van Heugten, E., J. W. Spears, and M. T. Coffey. 1994. The effect of dietary protein on performance and immune response in weanling pigs subjected to an inflammatory challenge. *J. Anim. Sci.* 72: 2661-2669.
- Veldhuizen, E. J., H. G. Hendriks, A. Hogenkamp, A. van Dijk, W. Gaastra, P. C. Tooten, and H. P. Haagsman. 2006. Differential regulation of porcine β -defensins 1 and 2 upon salmonella infection in the intestinal epithelial cell line IPI-

21. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 14: 94-102.

Weijenberg, M. P., E. J. Feskens, and D. Kromhout. 1996. White blood cell count and the risk of coronary heart disease and all-cause mortality in elderly men. *Arterio. Throm. Vascu. Biol.* 16: 499-503.

Yao, K., Y. Yin, X. Li, P. Xi, J. Wang, J. Lei, Y. Hou, and G. Wu. 2012. Alpha-ketoglutarate inhibits glutamine degradation and enhances protein synthesis in intestinal porcine epithelial cells. *Amino Acids* 42: 2491-2500.

Yin, Y. L., K. Yao, Z. J. Liu, M. Gong, Z. Ruan, D. Deng, B. Tan, Z. Q. Liu, and G. Y. Wu. 2010. Supplementing L-leucine to a low-protein diet increases tissue protein synthesis in weanling pigs. *Amino Acids* 39: 1477-1486.

Zanetti, M. 2004. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* 75: 39-48.

Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Effects of high levels of dietary iron, selenium or manganese on growth performance, blood traits and immune response of piglets ⁽¹⁾

Fang-Chueh Liu ⁽²⁾⁽³⁾ and Yu-Chun Lin ⁽²⁾

Received: Jun. 11, 2021; Accepted: Jan. 10, 2022

Abstract

The purpose of this experiment was to provide double amount of iron (Fe), selenium (Se) or manganese (Mn) in weaning pig diet to stimulate the growth and innate immunity. The experiment used 48 LYD crossbred piglets, aged 32 - 35 days. The pigs were divided into 24 pens by gender (half male and half female) and bodyweight, with 6 replicates per each treatment. The control diet contained 20% crude protein, 3,400 kcal/kg digestible energy, 140 mg/kg iron, 0.15 mg/kg selenium and 20 mg/kg manganese. Three treatment diets contained double amount of iron, selenium or manganese, respectively. The experiment was implemented for 4 weeks. The results showed that feeding piglets with double amount of dietary iron, selenium or manganese had no effect on the daily weight gain, feed intake and feed conversion rate. Moreover, there was no difference found on blood traits of pigs. The concentrations of immunoglobulin, IgA, IFN- γ , TNF- α and the antimicrobial peptide pBD-2 (immune-related traits) of piglets fed with double amount of Se were remarkably higher than those fed with controlled diet. However, piglets fed with double amount of dietary Fe or Mn did not have a significant effect on the immune response when compared with feeding with controlled diet. In conclusion, the provision of double amount of Se in diet did not improve the growth performance of piglets but increased the IgA, IFN- γ , TNF- α concentration and the antibacterial peptide pBD-2 contents.

Key words: Antimicrobial peptides, Mineral elements, Piglets, Immunity.

(1) Contribution No. 2689 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw.

乾草倉貯通風改良對梅雨期盤固草圓形乾草包 去濕效果測試⁽¹⁾

陳嘉昇⁽²⁾⁽³⁾ 劉信宏⁽²⁾ 游翠凰⁽²⁾

收件日期：110 年 6 月 28 日；接受日期：111 年 1 月 7 日

摘 要

臺灣夏季高溫多濕，不利乾草貯藏，本研究以現有草庫進行改造，利用物理環境控制原理，加強草庫之自然通風與去濕能力，做為一個低投入倉貯改良案例。設施改造完成後，以未改造之半邊草庫為對照，於夏季梅雨期間置入盤固草圓形乾草包，比較 6 週期間之乾草重量與品質變化。本項改造含立面與地板結構，結合草包堆疊成為通風井，以改善風壓通風 (wind-driven ventilation) 與浮力通風 (buoyancy-driven ventilation)。經兩草庫間微氣象差異之比較，改良草庫會提高草包間通風井之風速，而夜間提速更多。連續 6 週測量草包結果，改良草庫之草包於第 1 週平均減輕 0.55 kg，對照草庫之草包則增重 0.94 kg，差異達顯著水準；至第 6 週，改良草庫之乾草包平均增重 0.11 kg，對照草庫則增重 1.39 kg，差異亦達顯著水準。營養成分方面，粗蛋白質與中洗纖維含量於兩個草庫之調查期前後均無差異，而對照草庫乾草包之酸洗纖維含量在調查期前後差異達顯著水準。針對草包底部的觀察，對照草庫下層草包底部有霉斑出現，改良草庫者則無。乾草氣味評分最高者為改良草庫之上層草包，但與對照組上層差異不顯著；下層雖亦以改良草庫較高，但與對照組下層差異不顯著。初步實證結果顯示改良草庫於梅雨期的去濕效果優於對照草庫，對乾草的倉貯品質具有正面的效益。

關鍵詞：乾草庫、浮力通風、乾草品質。

緒 言

對同為熱帶禾本科牧草而言，國內盤固乾草的飼養價值與進口百慕達草相當，除可協助調整反芻動物飼糧乾物率外，也提供維持家畜健康的有效纖維，但因天候及收穫後處理因素，國產乾草長期以來存在乾燥度與耐貯性不足的問題。為提升國產乾草品質，畜試所近年除改良牧草收穫調製技術，也著手耐貯設施的探討，以提供國產優質乾草從生產到貯藏各環節的技術基礎。

乾草儲存期間品質的變化程度視打包時含水率、儲存期間環境之溫、濕度狀況而異 (劉等, 1986; Rotz and Muck, 1994; 張, 2000)。國產乾草於夏季面臨雙重不利問題，一為夏季多雨，打包時的含水率不易穩定達到安全含水率之下，二為儲存期間，乾草庫環境之高溫度及濕度使乾草品質更易於劣變。以恆春分所乾草庫為例，含水率 18 – 22% 之乾草包，在經過夏季 1 – 2 月的儲存後品質明顯劣變，外觀上，草包由黃綠轉為黃褐、深褐，出現黴斑及黴味，中洗纖維與酸洗纖維百分率提高，消化率降低 (張, 2000)。

除儘可能降低打包時含水率以減少倉貯損失外，國內尚無改善倉貯環境以維持乾草品質之研究。國外對於乾草庫建置的建議包括：適應當地氣候的方位選擇、防雨、通風及便於機械操作等 (Buckmaster *et al.*, 1989; Huhnke, 1993; 2003)，也少見透過物理環境的設計，以強化乾草庫的通風、去濕的探討。以稻穀貯藏而言，新式的穀倉雖都已有機械通風的導入 (盧, 1983)，但早在無機械通風可利用的土塊倉年代，穀倉地板須留甚大空間，空氣可由倉外之通風口進入，再由地板下面之通風口上升而進入穀層，以此達到通風及去濕的效果 (盧, 1995)。

如前述，臺灣夏季高溫多濕，乾草生產、貯藏面臨雙重不利，探討低投入的倉貯改善，以減少吸濕、結露帶來的不良效應有其實用性。若能在不耗費能源成本下，改良倉貯設施，提升乾草貯藏品質與耐貯性，對乾草產業發展具極正面效益。本研究以現有草庫進行改造，利用物理環境控制原理，加強草庫之自然通風與去溼能力，做為一個

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2690 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(3) 通訊作者，E-mail: chencsg@mail.tlri.gov.tw。

防潮倉貯改良的案例。並於設施改造完成後，以未改造之半邊草庫為對照，於夏季梅雨季期間置入乾草包，比較 6 週間之乾草包吸濕或去濕情形、品質狀況及草庫內微氣象變化，以做為倉貯改良的參考。

材料與方法

I. 乾草庫原況

乾草庫牆面為水泥磚造結構，屋頂為鋁鋅鋼板結構；寬 17 m、長 25 m、屋簷高 5 m，屋頂高 7.8 m，中央有高 5 m 水泥磚牆，將草庫從中分成左、右兩個空間，兩個空間各有高 4.5 m、寬 3.5 m 之前、後出口（圖 1）。

II. 乾草庫改造

以原草庫分隔之左邊空間進行改造（改造草庫），右邊未改善的空間做為對照（對照草庫）；將中央 5 m 高之隔間磚牆上方至屋脊處以塑膠布將左、右兩邊完全分隔，使成為空氣不對流，完全獨立之空間（圖 1）。改造項目如下：

- (i) 立面：將建物前後立面封頂浪板（由屋頂封至下方水泥牆面）切割出長 10 cm、向外 3 cm 之開口，共 70 孔洞，以增加風壓通風（圖 1）。

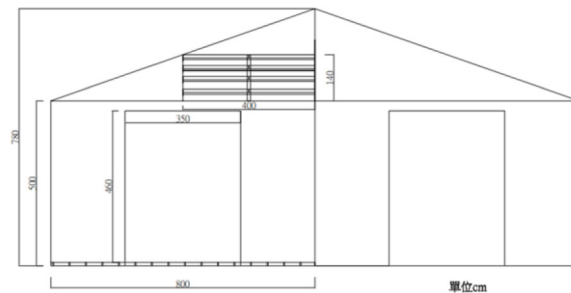


圖 1. 乾草庫正面。以左邊空間進行改造，右邊未改善的空間做為對照。左邊屋頂下方封頂浪板及下方地板均設有孔洞以利通風。

Fig. 1. Elevation view of hay barn reformed in this study. Left side: reformed space. Right side: original space as control. On the left side, the corrugated steel sheet under the roof and the floor below were provided with holes to facilitate ventilation.

- (ii) 地板結構：底層主結構材料為截面（長×寬×厚）4 cm×8 cm×0.28 cm 之扁方形鍍鋅鋁管，以長 600 cm 與 26.5 cm 搭配鉗接固定，採寬面 8 cm 立於地面為主結構支撐；上鋪網孔 3.6 cm×10.1 cm 之鍍鋅擴張網，鍍鋅擴張網寬 152 cm，長 304 cm，原料厚度 0.58 cm，網目切料寬度 0.68 cm。使底層依倉貯二端開口順向全線通風、排水及排濕。
- (iii) 設計增加浮力通風：利用日間太陽幅射使倉庫屋頂浪板產生高溫層，與地板之較低溫狀態產生之溫差，產生浮力通風效應，再以圓乾草包直立堆疊，其間隙成通風井狀（圖 2），以利風道形成。

III. 氣象資料及微氣候測量

大氣環境氣象資料來源為中央氣象局恆春測站。微氣候環境偵測方面，溫濕度以 HOBO U12-013 資料收集器內建溫度及相對濕度偵測器進行測量；風速紀錄器 PRODUAL IVL02 置於牧草堆形成之通風井中，距草包頂端約 40 cm 處，並串接至 Onset HOBO data logger，每 10 分鐘記錄一次量測平均值。

VI. 乾草包調查

- (i) 倉貯期間草包重量調查：

乾草庫改造施作完成後，於梅雨季開始前置入乾草包，依中央牆面左右對稱排列，乾草包之平面排列如圖 2，以上、中、下三個草包垂直堆疊成筒狀，草包堆疊整齊，確保相鄰草包堆間的上下風道暢通。108 年 5 月 1 日開始至 6 月 12 日，以選定的草包為調查對象（如圖 2 中所示，A、B、C 三堆為對照組，D、E、F 三堆為試驗組，每堆含上、中、下層草包共 18 個），每週進行乾草包秤重，調查倉貯期間草包重量差異（= 調查時草包重量 - 開始調查時重量），選定草包起始乾物率介於 86.0 - 87.6% 之間。秤重方法為每週固定時段將堆疊草包取下分別以 1 噸地磅（地磅面積 150 cm×150 cm）秤重後，依原位置擺放堆疊。

- (ii) 草包一般成分分析：

5月1日及6月12日秤重調查開始前及結束後，各乾草包取樣進行一般分析，一般成分分析以 Foss-6500 NIRS 進行 (陳及王，2004)。

(iii) 草包品質感官評分：

於秤重調查結束後，將選定之6個草包堆上、下層草包共12個取樣進行綜合感官評分。以畜試所恆春分所長於乾草調製及動物餵飼之技工同仁12人為評分員，依乾草色澤及是否有黴味等進行綜合評分 (Ball *et al.*, 2001)，採三級制，判定為差者1分，中等2分，優等為3分，由12位評分員個別獨立進行評分。此外亦進行12個草包底部是否出現黴斑的目視調查。

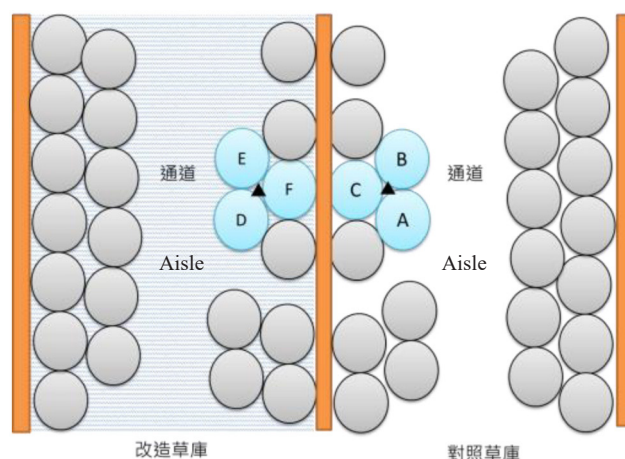


圖 2. 乾草包排列之上視圖，草包依同樣的方式對稱堆疊放置於左右倉庫，各疊有上、中、下三個乾草包。▲所示為偵測器位置。

Fig. 2. Plan view of the arrangement of hay bales. The hay bales were laid and stacked on left and right sides of the barn symmetrically in the same way. Three hay bales were vertically stacked from bottom, middle, to top. ▲ The position of the detector shown.

V. 統計分析

(i) 兩草庫間微氣象差異之比較：

擷取試驗期間雨天及非雨天各3天中，白天(11時至15時)及夜間(23時至3時)各4小時資料平均，進行改良草庫及對照草庫間之風速、溫度及相對濕度成對t值測驗 (paired t test)。差值 (= 改良草庫測值 - 對照草庫測值) 再進行雨天與否及日夜時段兩因子變方分析，以 SAS 軟體 (SAS, 2002) 進行。

(ii) 草包重量變化：

草包重量變化以 SAS 軟體 (SAS, 2002) 之 GLM Procedure 進行兩因子變方分析，主效應為草庫 (改良及對照) 及草包分層 (上、中、下層草包)，各主效應均為固定型，以鄧肯氏法 (Duncan's test) 測驗比較處理間的差異顯著性。

(iii) 草包品質變化：

一般成分分析以各處理試驗前及試驗後平均值 t 值測驗 (t test) 進行。感官分數進行兩因子變方分析，主效應為草庫 (改良及對照) 及草包分層 (上、下層草包)，各主效應均為固定型，以鄧肯氏法 (Duncan's test) 測驗處理間的差異顯著性。

結果與討論

本研究以改善原乾草庫之通風性為主要目的，並於梅雨季測試改良之效果。通風可依其驅動力來源區分為自然通風與機械通風，自然通風是依靠建築物內外的氣壓差異或溫度差異所造成的空氣流動；機械通風雖風量穩定，可隨需要來控制通風量，但缺點為消耗能量。由於乾草價格不高，基於節能與經濟性，本項改造以增強自然通風為考量。自然通風又可分为風壓通風與浮力通風，風壓通風是由自然風力作用在建築上所形成的風壓差異，造成空氣流動與室內外的空氣交換；浮力通風則藉由空氣溫度差異所造成的浮力，促使空氣對流 (李，2008)。本項改造含：(1) 風壓通風 (有風狀況)：依靠建築物內外的氣壓差異所造成的空氣流動，增加倉貯內部通風及導引空氣流向；(2) 浮力通風 (無風狀況)：依靠太陽熱能在倉貯內改變不同微氣候，利用冷與熱空氣產生的空氣對流所引發的效應及 (3)

改變地板結構：地板結構結合草包堆疊成為通風井，以利通風、排水、排濕。

設施改造完成後，以未改造之半邊草庫為對照，於夏季梅雨季開始前置入乾草包，觀測草庫內微氣象變化，比較 6 週期間之乾草包吸濕或去濕，以及品質變化狀況。

I. 乾草觀測期間氣象狀況

108 年 5 月 1 日開始入梅，較往年為早，試驗期間 42 天中有 22 天有雨量紀錄，日雨量介於 1 – 40 mm 之間；試驗期間每日最高溫 23 – 30°C，每日最低溫 21 – 28°C，日平均相對濕度達 80% 以上之天數佔一半以上（圖 3、4），為典型臺灣梅雨季及夏季高溫多濕之氣候狀態，適於測試改造乾草庫與對照之差異。

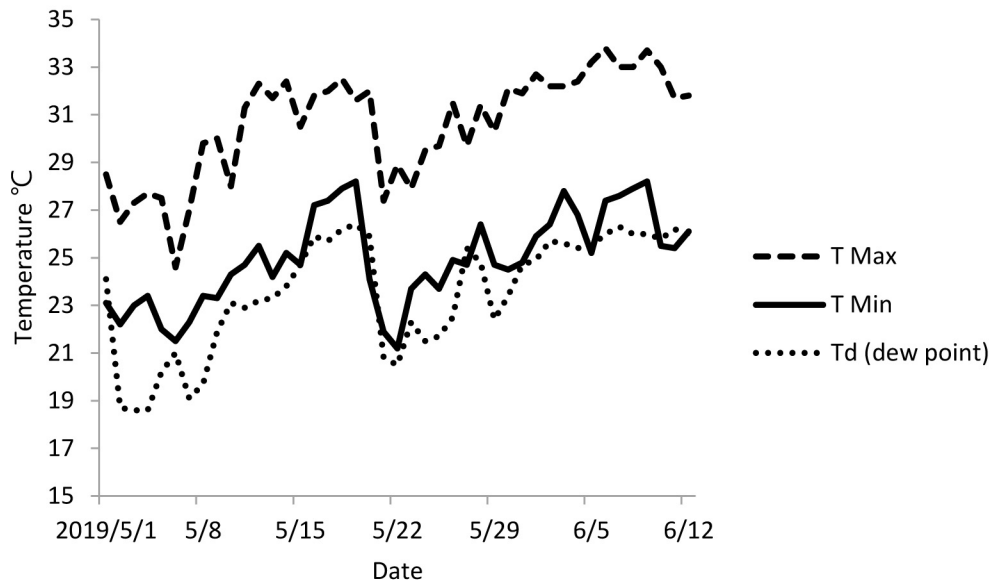


圖 3. 試驗期間每日大氣最高溫、最低溫及露點溫度。

Fig. 3. The daily maximum, minimum air temperatures and dew point during the experimental period.

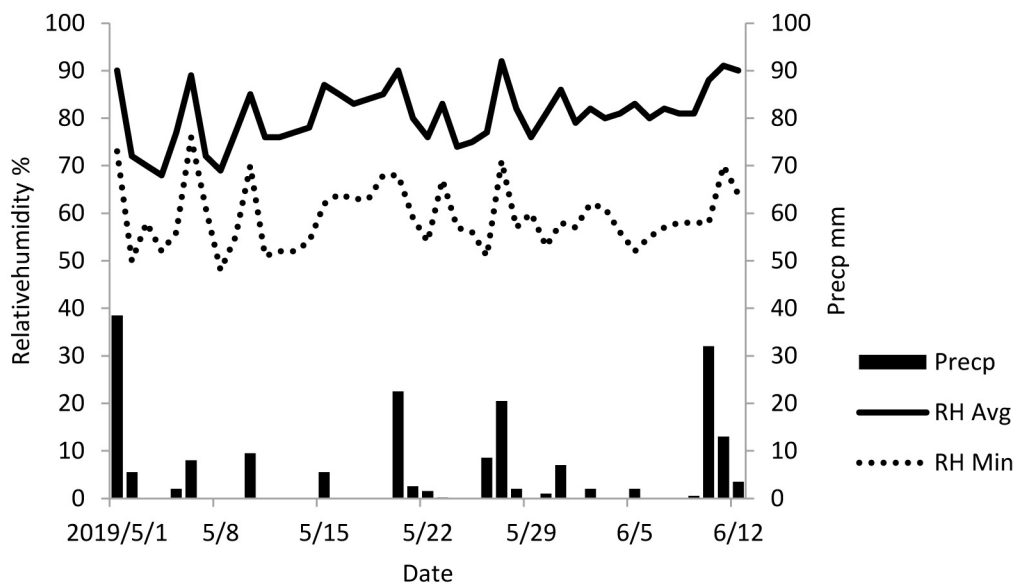


圖 4. 試驗期間每日平均相對濕度、最低相對濕度及降雨量。

Fig. 4. The daily mean and minimum relative humidity and precipitation during the experimental period.

另一值得注意為露點溫度。露點，是指含有一定量水蒸氣（絕對濕度）的空氣，當溫度下降到一定程度時，空氣所含的水蒸氣會達到飽和狀態（飽和濕度）並開始液化成水，這種現象稱為結露，水蒸氣開始液化成水時的溫度叫做「露點溫度」，簡稱「露點」。本試驗期間露點溫度介於 19 – 27°C 之間，42 天之中，日最低溫相等於、或低於露點溫度者有 9 天（圖 3），尤其地板散熱較快，試驗期間草包底部具備充分的結露條件。

II. 微氣象觀測

微氣象偵測器置於受測草包通風井中 (圖 2)，每隔 10 分鐘紀錄風速、溫度及相對濕度之平均值，48 小時之風速連續紀錄如圖 5。

擷取試驗期間雨天及非雨天各 3 天中，白天 (11 時至 15 時) 及夜間 (23 時至 3 時) 各 4 小時資料平均，進行改良草庫及對照草庫間成對 *t* 值測驗 (paired *t* test) 結果，兩草庫間的風速差異達 0.05 顯著水準，溫度及相對濕度差異均達 0.001 極顯著水準 (表 1)，顯示風速、溫度及相對濕度三者兩個草庫間具明顯的差異。探討造成差異的因子，結果發現，雨天與非雨天間二草庫之風速、溫度及相對濕度三項微氣象差均無差異，白天與夜晚之間則三項差值數據均顯有不同，顯示日夜因子較晴雨因子重要 (表 2)。綜言之，相較於對照草庫，改良草庫會提高風速，而夜間提速更多；會降低室內溫度，而白天降低更多；也會升高相對濕度，而白天升高更多。

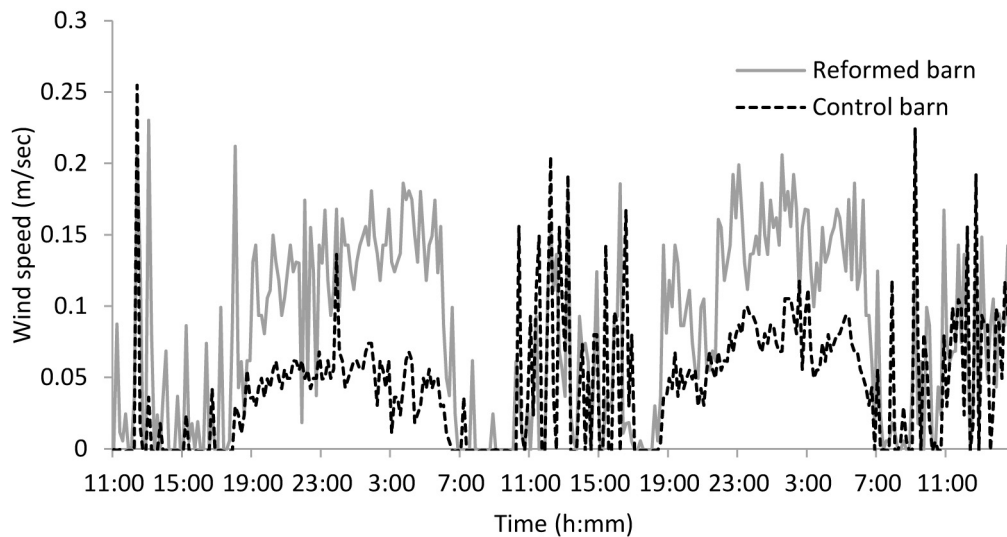


圖 5. 改造草庫及對照草庫之 48 小時風速連續紀錄。

Fig. 5. The continuous records of wind speed in the reformed and control barns for 48 hours.

表 1. 10 個不同時段微氣象資料於改造草庫與對照草庫間成對 *t* 值測驗

Table 1. The paired *t*-test of microclimate data between reformed and control barns for ten different periods

Item	N	*Difference	Stand deviation	t-value	Pr > t
Wind speed, m/sec	10	0.038	0.016	2.27	0.049
Temperature, °C	10	-1.160	0.207	-5.59	0.0003
Relative humidity, %	10	3.074	0.453	6.78	< .0001

* Difference = reformed – control.

由表 2 及圖 5 顯示，促進通風的主要效果發生於夜間通風。夜間降溫後由於倉庫屋頂與底部的溫差變大，屋頂的較高溫度氣流持續逸出，帶動室外較低溫氣流進入草庫底部，形成穩定的浮力通風，改造草庫頂部之排氣孔可以讓高溫氣流快速排出，地板及堆疊似通風井的草包間隙形成暢通風道，風速穩定高於對照草庫，雖然大多於每秒 0.5 公尺以下，但相較於對照草庫，增加了長時間穩定的夜間風流。白天之風速相對較不穩定 (圖 5)，兩個草庫間白天風速平均差異不顯著 (表 2)，應為草庫內外溫差不明顯，無法形成穩定的浮力通風 (吳，2010)，相對的風壓通風影響力較大所致。

本觀測結果，改造倉庫有降低通風井溫度的效果 (表 2)，尤其白天約低 1.5°C。利用通風以達到降溫效果是建築物或穀倉通風的目的，而其幅度依狀況而異 (盧，1983；李，2008；吳，2010)。另，改造倉庫草包間隙的相對濕度高於對照，其一可能為在絕對水分不變之下，溫度降低致使相對濕度提高，另亦可能在部分情況下由於通風帶動微量水氣散出。

表 2. 改造草庫與對照草庫間微氣象資料差值於晴雨及日夜之比較

Table 2. Comparison of the *difference of microclimate data between reformed and control barns in rainy/non-rainy day and day/night time

Effect	Wind speed, m/sec	Temperature, °C	Relative humidity, %
Rainy day	0.039	-0.95	0.66
Non-rainy day	0.037	-1.37	0.49
Day time	0.012 ^b	-1.56 ^b	3.92 ^a
Night time	0.078 ^a	-0.55 ^a	1.81 ^b

^{a, b} Means with different superscripts are significantly different at 5%.

* As shown in Table 1.

III. 乾草包重量變化

以草庫(改良與對照)及分層草包(上、中、下層)兩因子變方分析結果,草庫的 F 值從第一週至第六週均達顯著水準,分層則前期不顯著,至第五週及第六週達顯著水準;交感則不顯著。因交感不顯著,僅列草包累積重量變化之主效應平均值比較於表 3,改良草庫之草包於第一週平均失重 0.55 kg,對照草庫之草包則增重 0.94 kg,差異達顯著水準;之後兩者之間維持大於 1 kg 的差距,直至第六週,改良草庫平均增重 0.11 kg,對照草庫之草包則增重 1.39 kg,差異亦達顯著水準(表 3)。

表 3. 圓形乾草包於貯存試驗期間與起始值之重量變化

Table 3. The changes of round bale weight from beginning to the end of the storage experiment

Main effect	Time of storage (weeks)					
	1	2	3	4	5	6
Layer	kg/bale					
Upper	0.33	0.58	0.58	0.75	0.83 ^a	1.00 ^a
Middle	0.25	0.50	0.50	0.75	0.75 ^a	0.82 ^a
Lower	0.00	0.42	0.25	0.33	-0.17 ^b	0.33 ^b
Barn						
Control	0.94 ^a	1.28 ^a	1.17 ^a	1.39 ^a	1.11 ^a	1.39 ^a
Reformed	-0.55 ^b	-0.28 ^b	-0.28 ^b	-0.17 ^b	-0.17 ^b	0.11 ^b

^{a, b} Means with different superscripts in the same main effect are significantly different at 5%.

由表 3 結果,改良草庫去濕效果主要發生於第一週,對照草庫的吸濕亦主要發生於第一週,且上、中、下層草包的表現一致,第一週調查結果上層的改良與對照組分別為 0 與 +0.67 kg,中層分別為 -0.83 與 +1.33 kg,下層分別為 -0.83 與 +0.83 kg。第一週之後,改良組與對照組草包均緩慢吸濕與增重。

改良草庫去濕效果主要發生於第一週的原因,推測可能與第一週為本試驗調查期間大氣日平均相對濕度較低的一週,且露點溫度較低有關,第一週雖有 4 天降雨,但僅 5 月 1 日雨量較多(38.5 mm),平均相對濕度達 90% 外,之後的大氣日平均相對濕度與露點溫度均較低,因此,在通風較佳的條件下,改良草庫中的草包發生去濕效果;而對照草庫並無改善通風,一週內顯著發生吸濕現象,因而增加重量。一週之後各草庫內乾草進入相對較平衡狀態,之後逐漸平衡,變化減小;而大氣濕度高於第一週的狀況,即使通風較多者(改造草庫)因通風之濕度高,除減少凝結水氣外,無法再進一步排除乾草包內水分,因此兩草庫乾草呈現些微增重。此結果亦可印證張(2000)之觀察,中及低含水率草包於第一期草第一個月均呈現吸濕,高含水率者於前兩週亦吸濕增重,之後又下降;劉等(1986)以小方包之試驗則於第一個月草包失重最明顯,蓋因其大氣環境不同與試驗處理草包之含水率均較高之故。

雖然草庫與草包分層位置之交感未達顯著水準,但從數據可看出兩草庫間上層草包的差異較小,而中、下層的差異較大,推測可能對照組上層水氣仍較下層易於往上蒸散,改良組則由於風道暢通,中、下層草包水分較易帶出之故。

VI. 品質成分分析與感官調查

因跨區收穫及田間均勻度等因素，草包間存有相當程度的差異，故本成分調查採各處理草包倉貯前後差異之 *t* 值測驗 (表 4)，結果顯示，4 個處理的粗蛋白質含量於調查期前後均無差異，中洗纖維亦無顯著差異；而對照草庫上層與下層的酸洗纖維含量在調查期前後均提高，差異達顯著水準，改良草庫之上層與下層的酸洗纖維含量在調查期前後則無改變。

表 4. 貯存試驗開始 (5 月 1 日) 及結束 (6 月 12 日) 時乾草包營養成分之比較

Table 4. Comparison of nutrient components at the beginning (May 1st) and the end (Jun 12th) of the storage experiment

Bale	CP ¹		NDF ¹		ADF ¹	
	May 1 st	Jun 12 th	May 1 st	Jun 12 th	May 1 st	Jun 12 th
	----- % -----					
Upper of control barn	9.7	9.0	68.1	69.0	36.4 ^b	37.9 ^a
Lower of control	9.7	10.2	69.5	70.2	38.4 ^b	39.6 ^a
Upper of reform	9.5	9.3	72.3	70.3	40.3	39.1
Lower of reform	8.6	8.6	71.0	72.3	41.2	41.5

^{a, b} Means with different superscripts in the same component at the same location between May 1st and Jun 12th are significantly different at 5% level by *t*-test.

¹ CP: crude protein; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber.

酸洗纖維含量一般隨儲存時間而提高，尤其儲存狀況不良之下更為顯著 (Rotz and Muck, 1994; 張，2000; Rhein, 2002)；在前人研究中，儲存期間粗蛋白質含量的變化較不一致，但品質劣變者的蛋白質消化率大幅降低 (劉等，1986; Neres *et al.*, 2014)。

除成分分析外，本試驗於第 42 天觀察草包底部霉斑之有無，及進行乾草氣味的外觀與嗅覺評分。針對草包底部的觀察，對照組下層草包底部局部區塊有黑色霉斑，處理組草包底部壓出網狀印痕，呈現膨鬆狀，無霉斑出現。乾草感官評分改良組與對照組兩組間差異不顯著；上層草包之氣味評分均顯著高於下層草包，下層改良組與對照組差異不顯著 (表 5)。處理組下層草包底部雖無觀察到霉斑，但由氣味評分結果可知，即使在有設計改良通風狀況下，相對於上層草包，下層 (底層) 仍是相對較為不良的儲存狀態，然因風流改善、防止草包底部緊貼地面，減少水氣凝結 (或排出露點下凝結的露水)，有減少霉斑出現的效果。

表 5. 貯存試驗結束時改良草庫與對照草庫上、下層乾草的綜合感官評分及乾草包底部霉斑觀察

Table 5. Comparison of the sensory score and observed appearance of mold spot of the hays at upper and lower locations for control and reformed barns at the end of storage experiment

Bale	Sensory score	Mold spot
	Mean \pm SD	
Upper of control barn	2.28 \pm 0.78 ^a	-
Lower of control	1.67 \pm 0.72 ^b	+
Upper of reform	2.53 \pm 0.65 ^a	-
Lower of reform	1.83 \pm 0.81 ^b	-

^{a, b} Means with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level by *t*-test.

+, - : appearance or absence of mold spot.

通風是倉庫去濕的重要手段，建物的通風、降溫或去濕設計是一門古老的智慧，至講求節能減碳的今日，以設計之綠色建築又重新獲得重視 (李，2008; 吳，2010)；導入機械通風或降溫設備前的穀倉，以及目前的非環控的畜舍建築，如何通風、降溫設施都是不可或缺的設計。經本研究改造之乾草庫，對乾草的倉貯品質具有正面的效益。在高溫多雨的乾草貯藏危險期，可降低夜間低溫時導致水氣凝結的風險，及其後續帶來之劣變。本項改造之材料成本約 30 萬元 (新建草庫則僅工項取代，成本應更低)，所改造草庫底層可放置 120 個乾草包，售價 20 萬以上，無另附加成本，有助保全商品價值，甚具經濟效益。

結 論

- I. 本研究依原草庫現況加以三項改造：增加風壓通風、改變地板結構，再以草包堆疊間隙形成通風井，導入浮力通風，於梅雨期實證優於對照草庫的去濕的效果，對乾草的倉貯品質具有正面的效益。
- II. 本研究為現況改造之一案例，其效果仍有加強的空間。如：提高屋脊高度、利用自然通風裝置、提高地板通風量及降低亂流等，新建乾草庫若以物理環境控制為優先設計考量，應可獲更大效果。
- III. 國草乾草大都為商品型生產，優質與穩定是良好商品的前提，因應夏季高溫多濕環境，改善乾草庫的耐貯性可協助保全商品價值，也是國產優質乾草產業發展重要一環。本改造構想不僅可應用於供貨端，也可用於畜牧場倉貯。

參考文獻

- 吳玉婷。2010。太陽熱能煙囪之自然通風效益解析—以綠色魔法學校展覽室為例。國立成功大學建築研究所，碩士論文，臺南市。
- 李芝嫻。2008。垂直導光通風塔於室內通風性能之研究。國立臺灣科技大學建築與都市設計研究所，碩士論文，臺北市。
- 陳嘉昇、王紓愍。2004。盤固草化學成分近紅外光分析檢量線之建立。畜產研究 37：97-104。
- 張定偉。2000。盤固草倉儲期間品質變化之研究。畜產研究 33：339-351。
- 劉明宗、李春芳、陳茂墻。1986。打包時含水率及貯存時間對盤固草品質的影響。畜產研究 18：43-54。
- 盧福明。1983。穀倉機械化作業之研究 II。機械強制通風方式控制貯倉稻穀溫度之效果。農業工程學報 29：52-61。
- 盧福明。1995。稻穀儲存管理技術。稻穀倉儲加工作業技術手冊。財團法人農業機械化發展中心，臺北市，第 27-39 頁。
- Ball, D. M., M. Collins, G. D. Lacefield, N. P. Martin, D. A. Mertens, K. E. Olson, D. H. Putnam, D. J. Undersander, and M. W. Wolf. 2001. Understanding Forage Quality. American Farm Bureau Federation Publication 1-01, Park Ridge, IL.
- Buckmaster, D. R., C. A. Rotz, and D. R. Mertens. 1989. A model of alfalfa hay storage. Trans. Amer. Soc. Agric. Eng. 32: 30-36.
- Huhnke, R. L. 1993. Round bale hay orientation effect on alfalfa hay storage. Appl. Eng. Agri. 9: 349-351.
- Huhnke, R. L. 2003. Round bale hay storage. Oklahoma State Coop. Ext. Serv. F-1716.
- Neres, M. A., D. D. Castagnara, L. M. Mufatto, T. Fernandes, C. A. Hunoff, J. R. Wobeto, and C. D. Nath. 2014. Changes in Tifton 85 bermudagrass hay storage in the field or under shed. Arch. Zootec. 63: 555-558.
- Rhein, R. T. 2002. Changes in nutritive value of bermudagrass hay during storage. Agron. J. 94: 109-117.
- Rotz, C. A. and R. E. Muck. 1994. Changes in forage quality during harvest and storage. In: Forage quality, evaluation and utilization. ed. Fahey, Jr. G. C. American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA. pp. 828-868.
- SAS. 2002. SAS® 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Evaluation of the moisture removal effect of pangolagrass round bales with reformed hay barn in the rainy season ⁽¹⁾

Chia-Sheng Chen ⁽²⁾⁽³⁾ Hsin-Hung Liu ⁽²⁾ and Tsui-Huang Yu ⁽²⁾

Received: Jun. 28, 2021; Accepted: Jan. 7, 2022

Abstract

The high temperature and humidity in summer are unfavorable for the storage of hay in Taiwan. This study aimed to use the existing hay barn reformed as a low-input storage improvement case by adopting the principles of physical environment control and strengthening the natural ventilation and moisture removal capacity. After completing the renovation of the facility, the unmodified half of the barn was used as the control. The round hay bales were placed in the barn for six weeks to compare the weight and quality of the hay during the rainy season. This transformation included the facade and floor structures, combined with the stacking of bales to become a ventilation funnel to improve the wind-driven ventilation and buoyancy-driven ventilation. Comparing the micro-climate difference between the two barns, the reformed barn increased the wind speed of the ventilation funnel between the bale stacks and increased the wind speed more at night. The reformed barn also decreased the temperature and increased the relative humidity. For the results of measuring the baled weights for 6 consecutive weeks, the bales of the reformed barn lost 0.55 kg per bale in average in the first week, while the weight of the bales of the control barn increased by 0.94 kg per bale, which reached a significant difference. At the sixth week, the hay bales of the reformed barn increased 0.11 kg per bale in average, while those of the control barn increased 1.39 kg per bale, and the difference was significant. In terms of nutrient content, there was no difference in the contents of neutral detergent fiber and crude protein before and after the survey period, while the acid-washed fiber content of the hay bales in the control barn had a significant difference before and after the storage experiment. According to the observation of the bottom of hay bales, mold spots appeared on the bottom of bales in the control barn, but not in the reformed barn. The upper layer of bale had the highest hay smell score in the reformed barn. It was not significantly different from that the upper of the control barn. No difference was observed for the scores of lower layers of bales between reformed and control barns. This study empirically demonstrate that the reformed barn had better moisture removal effect than that of the control barn during the rainy season, and had positive effect on the storage quality of hay.

Key words: Hay barn, Buoyancy-driven ventilation, Hay quality.

(1) Contribution No. 2690 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: chencsg@mail.tlri.gov.tw.

雞隻副產物之再利用技術⁽¹⁾

葉瑞涵⁽²⁾ 李孟儒⁽²⁾ 吳鈴彩⁽²⁾ 朱家德⁽³⁾ 涂榮珍⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：109 年 12 月 30 日；接受日期：111 年 1 月 11 日

摘 要

本報告將雞隻副產物再利用技術分為羽毛及其他副產物二部分進行探討。常用的羽毛再利用技術為水解技術、複合材料技術、熱裂解技術及化學修飾技術。水解技術可分解羽毛蛋白質結構，以供應生物養分或作為其他產品的原料。複合材料技術是將羽毛與其他材料結合，藉此改變材料特性，如物理性狀、隔熱性及纖維特性。熱裂解技術是將羽毛經熱化學轉化為合成氣、生物油和生物炭（羽毛炭），而羽毛炭可應用於污染吸附及電化學材料。化學修飾技術是利用化學物質改變羽毛蛋白的結構或官能基，進而改變吸附性、電化學性或溶解性。羽毛以外副產物的研究方面，高溫高壓處理技術可簡單的處理大量副產物，並應用於飼料原料。酵素水解技術能保留更多營養或機能性物質，因此產品的附加價值及應用性更佳。萃取純化研究方面，膠原蛋白萃取的文獻較豐富，可供研究人員和業者應用。而軟骨素和透明質酸提取、生物油生產和肉類加工等技術，使副產品潛在價值更加多樣化。在未來我們應該妥善應用各種再利用技術，以提升雞隻副產物再利用率並增加產品附加價值，使生態環境和產業永續發展。

關鍵詞：雞、羽毛、副產物、再利用。

緒 言

臺灣每年屠宰雞隻數量達 37,377 萬隻（108 年農業統計年報），過程中產生許多廢棄副產物，如羽毛及內臟。由此可看出，如何以全雞利用的觀點減少廢棄物並增加其利用價值是畜禽產業需要面對之重要議題。因此本報告針對雞隻副產物，彙整了國、內外具有明確製程條件之研究文獻，希望能供國內研究人員或產業先進參考應用。

雞隻副產物包含羽毛、內臟、骨骼、雞頭、雞腳、砂囊、結締組織及雞皮等。由於羽毛容易分離及清潔，且相關設備已經完備，因此有利於進行研究。此外，羽毛在自然環境下難以分解，會對掩埋場空間及使用年限造成負面影響，若以焚燒處理又造成空氣汙染（Tesfaye *et al.*, 2017），因此吸引許多研究人員探討羽毛再利用技術並產出豐富文獻。本文將彙整目前最新的羽毛研究文獻，並依據技術原理分類，以利讀者了解與應用。而其他副產物的研究文獻較為缺乏，不利於達到全雞利用的理想，因此本文將深入探討其他副產物再利用技術，說明其基礎製程架構、重要測定項目及分析結果，期望這些資訊能對國內研究人員及業者有所助益。

羽毛再利用技術

家禽羽毛約占活體重量之 5 – 7%，其蛋白質含量達 84 – 90%，主要由 β -角蛋白組成（90%），為不溶性纖維蛋白質。由於其蛋白質結構通過雙硫鍵、氫鍵和疏水鍵的相互作用產生高度強韌性，因此對許多消化酶具有抗性（如：胃蛋白酶及胰蛋白酶）（Gupta and Ramnani, 2006）。現今禽肉消費量大，再加上羽毛難以分解的特性，可能會造成環境污染（Grazziotin *et al.*, 2006），因此開發出許多再利用技術。目前常見的羽毛再利用技術依其原理可分為 4 類：水解技術、複合材料技術、熱裂解技術及化學修飾技術。

水解技術

利用微生物發酵、酵素、化學或高溫高壓水解等方式將羽毛分解為角蛋白、胜肽、胺基酸或其他水解產物。此

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2691 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所遺傳育種組。

(4) 通訊作者，E-mail: jctu@tlri.gov.tw。

技術目的為分解羽毛強韌的蛋白質結構，進而提升對動物、植物或微生物的營養利用率，因此可應用於飼料、肥料及培養基。此外，亦可分離出水解產物進行利用，例如抗氧化肽可作為保健產品原料、水解後純化的角蛋白可作為角蛋白酶生產基質或複合材料之原料。

I. 發酵水解技術

此技術是利用微生物在發酵時產生的酵素來分解羽毛，因此需要探討液態或固態發酵條件對微生物繁殖、角蛋白酶活性及蛋白質分解之影響，最後再評估其應用價值。

在飼料應用方面，Huang *et al.* (2021) 將大豆粕和羽毛粉以 1:1 的比例混合後，於 121°C 下滅菌 30 min。滅菌後冷卻至 45°C 並將混合菌液 (5 種蛋白質分解能力強的菌株 *Bacillus subtilis* var. natto N21、*B. subtilis* Da2、*B. subtilis* Da15、*Bacillus amyloliquefaciens* Da6 及 *B. amyloliquefaciens* Da16) 接種其中，使菌數達 10^6 CFU/g，並加入 50% 無菌水，而後於 37°C 好氧發酵 2 天。好氧發酵完畢後，再接種 *Bacillus coagulans* L12 菌液，使發酵基質菌數達 10^6 CFU/g，並於 28°C 下厭氧發酵 5 天。發酵完畢後以熱風循環乾燥至水分 12% 以下。結果發現，於飼糧添加 2.5 – 5% 發酵大豆粕-羽毛粉可改善肥育豬的採食量和飼料換肉率。雷 (2013) 以角蛋白分解菌 *B. amyloliquefaciens* Da16 及酸化能力佳的 *Saccharomyces cerevisiae* Y10 進行羽毛粉 (羽毛經過粉碎或研磨) 二階段固態發酵，結果亦發現，飼糧添加量 2.5 – 10% 時，肉雞生長性狀表現良好，甚至優於添加魚粉組。由此可知，發酵水解技術可應用於羽毛粉飼料原料加工技術。

肥料應用方面，Gurav and Jadhav (2012)、Sobucki *et al.* (2019) 及 Sun *et al.* (2021) 分別於液態羽毛培養基 (羽毛為唯一碳氮源) 中接種 *Chryseobacterium* sp. RBT、*Bacillus pumilus* JYL 及 *Bacillus* sp. CL18 菌液進行發酵水解，水解後以過濾及離心方式去除雜質並滅菌之，即完成羽毛的發酵水解液。將此應用於香蕉、小麥及萵苣栽培，發現其肥料應用價值良好，對作物栽培發育具有正面效果。

甲烷生產應用方面，Schommer *et al.* (2020) 研究豬糞-羽毛共同發酵生產甲烷的系統，結果發現，羽毛碎片 (羽毛經過切碎) 經過 *B. sp.* CL18 液態發酵處理後，可以提升甲烷產量。Yusuf *et al.* (2019) 亦以相似方法將羽毛與牛糞或屠宰場廢棄物進行共同培養，結果再次證實，羽毛粉經過微生物預處理後可促進降解並增加甲烷產量。羽毛經過微生物發酵處理後，可提升其降解速率並增加可溶性蛋白，而此現象有助於釋出氮源供微生物利用，進而可能提升甲烷產量 (Yusuf *et al.*, 2019; Schommer *et al.*, 2020)。

發酵水解產物方面，Bezus *et al.* (2021) 發現微生物發酵水解產物可能具有抗氧化活性之潛力，其抗氧化活性與發酵分解產生的游離胺和胺基酸有關，因此嘗試將羽毛液態培養基 (羽毛為唯一碳氮源) 以 *Pedobacter* sp. 3.14.7 進行發酵，而後以離心過濾方式排除雜質，結果發現此發酵水解產物具有良好 ABTS (2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) 自由基清除率、NO 清除活性及 Fe^{3+} 還原能力，具有成為抗氧化產品之潛力。

II. 酵素水解

由於此技術直接使用純化的酵素來分解羽毛，因此不需要進行微生物培養，所以操作較為簡潔且穩定。Pfeuti *et al.* (2020) 於羽毛粉中添加 200% 水、0.5% 市售酵素 (Savinase® 16 L, Sigma-Aldrich Inc.) 及 2% 亞硫酸鈉後進行混合，然後於 55°C 下振盪 24 hr 進行酵素水解。水解後以微波爐加熱至 90°C 維持 5 min，使酵素失去活性，最後進行冷凍乾燥並研磨之。結果發現，羽毛粉經過酵素水解之後，明顯改善對肉雞的標準迴腸胺基酸消化率。Jeampakdee *et al.* (2020) 將 0.5 g 羽毛粉、10 mL 的磷酸鹽緩衝液 (濃度 20 mmol, pH 7.2) 及 1 – 5% 的酵素 (alcalase、flavourzyme 及 neutrase, brenntag) 混合後於 150 rpm、50°C 水解 4 hr。水解完畢後以 80 – 90°C 加熱 15 min 以中止酵素活性，最後以離心及過濾方式收集上清液。結果顯示，添加 5% neutrase 所產生的酵素水解產物，表現出較佳 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 及 ABTS 自由基清除率，具有成為抗氧化產品之潛力。

III. 化學水解

本技術主要以酸水解、鹼水解或其他化學方式來破壞羽毛角蛋白質的雙硫鍵及肽鍵，進而水解出角蛋白、肽或胺基酸等物質。Veerapandiana *et al.* (2020) 將羽毛粉以 6 N HCl 進行二階段酸水解 (先以 70°C 加熱 24 hr，再以 130°C 加熱 24 hr)，水解完畢後以 5 N NaOH 溶液進行中和。將水解液過濾去除雜質後，進行蒸發濃縮及烘乾，即取得羽毛水解蛋白，並證實此蛋白可應用於微生物培養，可作為培養基原料。在鹼水解方面，Fagbemi *et al.* (2020) 將羽毛粉與鹼性溶液 (1.78% NaOH 和 1.78% NaHSO_3) 混合後於密封鋼製容器加熱水解 (87°C, 111 min)，水解完畢冷卻後以 2 M HCl 中和之。將水解液透析後 (regenerated cellulose tubes, MWCO 3500 – 500 Da，蒸餾水透析 72 hr，每天換水 3 次) 冷凍乾燥，即產出羽毛水解蛋白。

由於上述方法使用大量高濃度酸性、鹼性溶液，易產生對環境負面影響的疑慮，因此 Khumalo *et al.* (2020) 使用環境友好性較佳的化學物質進行化學水解。將 15 g 羽毛粉浸入混合水解溶液中 (0.2 – 0.4 M NaHSO_3 、0.035 – 0.07 M SDS (sodium dodecyl sulphate) 及 1.5 M urea) 進行加熱水解 (50 – 90°C, 2 – 4 hr)。NaHSO₃ 可減少雙硫鍵的形成；SDS 可作為界面活性劑，避免蛋白質堆疊，穩定水解效率；urea 能增加溶解度，避免水解過程中的蛋白質產生摺疊，藉由這些特性進行水解。水解完畢後以離心及過濾的方式去除雜質，而後以纖維素膜透析管在蒸餾水中透析 5 天，最後進行冷凍乾燥，獲得羽毛分解後的角蛋白，具有應用於生物膜、纖維、水凝膠、海綿等材料之潛力。

IV. 高溫高壓水解

將羽毛以高溫高壓下蒸煮 (2.7 – 3.5 kg/cm² 蒸氣蒸煮 30 – 60 min) 可改善羽毛溶解情形 (Davis *et al.*, 1961)。魏等 (2005) 的研究結果亦指出，蒸氣壓力 3.2 – 3.4 kg/cm²、溫度 115°C、蒸煮 60 min 的羽毛粉具有最佳體外蛋白質消化率。利用此技術，可將羽毛水解後進行乾燥粉碎，製作為蛋白質飼料原料 (Papadopoulos, 1985)。在動物性原料成本漸漸增加並供不應求的現在，此技術在國內外皆被大量應用。

除了用作飼料原料之外，Nurdiawati *et al.* (2017) 將羽毛碎片與水混合 (混合比例 1 : 5) 放入高壓反應器 (autoclave reactor, MMJ-500, Japan) 進行高溫高壓水解 (180°C, 30 min)，水解後濾去雜質發現，水解液含有 3.4% 氮及 13.6% 胺基酸，稀釋後可應用於液態肥料。Nurdiawati *et al.* (2019) 亦以相似方法將羽毛與水混合 (混合比例 1 : 3) 後進行高溫高壓水解 (160°C、6.1 kg/cm² 或 180°C、9.2 kg/cm², 30 min)。將羽毛水解液與家禽墊料水解液 (提供鉀和其他微量礦物質) 混合製成肥料，結果發現可促進廣藿香 (*Pogostemon cablin*) 及綠豆 (*Vigna radiata*) 的生長及產量。

複合材料技術

此技術目的並非將羽毛結構破壞，而是利用羽毛 (如：完整羽毛、羽毛纖維或角蛋白) 本身強韌性、隔熱及纖維等特性，與其他材料進行結合，製作出複合材料。目前相關特性研究成果如下：

I. 改善材料物理性狀

Adediran *et al.* (2020) 將羽毛碎片 (1 – 5%)、木屑 (1 – 5%)、紙漿 (75 – 80%) 和水泥 (20%) 進行混合後，以 0.2 kpa 壓力壓置 5 min。結果發現，當羽毛和木屑比例達到 3 : 2 時，斷裂模數 (modulus of ruptures) 和彈性模數 (modulus of elasticity) 表現良好。Dalhat *et al.* (2020) 於瀝青混凝土的材料中添加 0.15% 的羽毛碎片，結果證實可改善瀝青混凝土的抗車轍性 (rutting resistance)、穩定性和對濕氣的敏感性，且瀝青亦能減少羽毛的生物降解，達到相輔相成之效果。Saravanan and Prakash (2018) 將纖維 (羽毛、黃麻和聚丙烯) 混合後以微型梳理機生產出纖維網，纖維網經過 115°C 加熱 24 hr 除去水分後，放入模具中並以不同加熱加壓條件使其成型。結果發現，最佳的纖維混合比例為 12.5% 羽毛、37.5% 黃麻和 50.0% 聚丙烯，而最佳熱壓條件為 185°C、15 Bar 及 3 min，此條件之混合材料抗彎強度 (flexural strength) 表現最佳。由上述文獻可知，羽毛與適宜的複合材料結合後，可能具有改善物理性狀的效果。若能妥善應用羽毛這種可持續性供應的原料，對產業發展及環境保護皆有所助益。

然而並非所有研究成果皆可改善物理性狀。Taghiyari *et al.* (2020) 將脲醛樹脂 (urea-formaldehyde resin) 和矽灰石凝膠 (wollastonite gel, Mehrabadi Manufacturing Company, 劑量為脲醛樹脂 10%) 混合後，以噴霧方式塗在羽毛—木纖維網，並熱壓 (163 kg/cm², 175°C、6 min) 製成木材複合板。然而，木材複合板羽毛含量達到 10% 對物理性狀 (吸水膨脹、內部裂痕、脆性及彈性模數) 產生負面影響。Taghiyari *et al.* (2021) 利用羽毛纖維網和環氧樹脂 (epoxy resin) 製作複合材料亦發現，隨著羽毛含量由環氧樹脂用量的 5% 提升至 15% 時，硬度 (hardness) 和抗彎強度有負面影響。由於羽毛前處理方式、使用量及製程條件可能會影響材料之間的結合性，進而對部分物理性狀造成不良影響，因此這類文獻皆會針對這些項目評估材料品質之影響。

II. 改善材料隔熱性

由於羽毛具有良好隔熱特性，因此可應用於建材等材料，進而達到減少控溫成本的效果。Ouakarrouch *et al.* (2020) 以石膏為主原料，添加羽毛粉碎片 (0 – 5%) 和水 (添加量為材料的 60%) 混合後放入模具，於環境溫度下 24 hr 定型，而後再以 60°C 乾燥 2 天。結果發現，混合材料熱導率 (thermal conductivity) 和熱擴散率 (thermal diffusivity) 分別降低了約 30.2% 和 18%。Babalola *et al.* (2020) 使用木薯澱粉、甘油、羽毛粉及膨潤土 (bentonite) 製作隔熱性混合材料，亦證實添加羽毛可改善隔熱性。

III. 纖維特性

紡織業需要廉價及可持續性的纖維原材，以達到降低生產成本及穩定生產的目標。而利用起絨機及混紡

技術進行羽毛加工，為具有潛力的方式。Kakonke *et al.* (2020) 將羽毛以起絨機 (fluffer) 研磨成纖維，而後以 50 : 50 的比例與棉纖維混合。經由梳理機 (carding machine) 製成單層纖維後，再將多層纖維合併，經由針刺機 (needle-punched machine) 混織後，即制成羽毛－棉纖維的混合織物，此可作為無紡布原料。

熱裂解技術

熱裂解技術是材料的熱化學轉化技術，是指在惰性氣體下將樣品加熱至到高溫時，生物質轉化為合成氣 (syngas)、生物油 (bio-oil) 和生物炭 (biocarbon) 的過程。而生物炭具有應用於耐火材料、潤滑劑、制動器、電池、耐化學材料及吸附劑的潛力。若能將此技術應用於羽毛廢棄物，則有助於穩定產出生物炭資源。

不同文獻使用的熱裂解條件有所差異。Rangaraj *et al.* (2020) 將羽毛碎片於氬氣環境 (argon gas) 中，以每分鐘 5°C 的升溫速率在 600°C 下炭化 2 hr，而後將羽毛炭應用於電池原料。Hastuti *et al.* (2020) 亦探討電池原料之應用，首先將羽毛於 215°C 下熱裂解 15 hr，再於真空環境下加熱至 450°C 維持 1 hr 即完成羽毛炭。Rahmani-Sania *et al.* (2020) 將羽毛放入不銹鋼反應器並通入氮氣 (nitrogen gas, 150 mL/min) 進行第一階段加熱 (215°C, 24 hr)，而後再將溫度提升至 650°C 進行第二階段加熱 2 hr，並將其應用於水中污染物吸附材料。Li *et al.* (2020) 嘗試探討不同溫度 (300 和 600°C) 熱裂解羽毛 30 min 對羽毛炭產量之影響，結果發現，溫度愈高產量愈低，此可能是較高溫度下，羽毛中氫氧被去除所致。此外，X 光繞射分析 (X-ray diffraction analysis) 發現，溫度愈低的樣品具有更多的非晶態 (amorphous)，而溫度較高的樣品則具有更多的石墨 (graphite) 含量，不同熱裂解條件會影響其結構。

化學修飾技術

本技術利用特定化學物質，改變羽毛蛋白的結構或官能基，進而使其吸附性、電化學性、溶解性等特性發生改變，進而提升應用性。

Suna *et al.* (2020) 將 8 g 羽毛碎片浸入於硝酸溶液 (400 mL 水 + 2 mL 硝酸)，密封後以 60°C 加熱 24 hr，而後過濾、清洗並乾燥之。硝酸溶液使部分羽毛蛋白陽離子化，並激活內部某些官能基，進而改善其吸附 Cr (VI) 離子之效果。Chakraborty *et al.* (2020) 將 4 g 羽毛碎片放入 100 mL 的 2% NaOH 溶液中 (內含 4.0 mL 乙二胺 (ethylenediamine))，於室溫下反應 2 hr 再以蒸餾水清洗並乾燥之。NaOH 及乙二胺會對羽毛蛋白的羥基 (hydroxyl group) 及羧基 (carboxyl group) 進行修飾，進而改善金屬離子吸附性。電化學性方面，化學修飾技術亦有明顯貢獻。Rangaraj *et al.* (2020) 將 7 g 羽毛碎片浸入 50 mL 的 0.5 M 醋酸鋅六水合物 (Zinc acetate hexahydrate) 溶液中以 180°C 加熱 12 hr，使形成硫化鋅羽毛蛋白複合物，而後再於氬氣中 600°C 熱裂解 2 hr，製成硫化鋅羽毛炭複合物，應用於鋰電池電極有良好表現。Hastuti *et al.* (2020) 以相似原理亦開發出羽毛炭的電極材料，再次證實此技術可應用於電池材料。化學修飾技術亦可改善羽毛蛋白之溶解性，Yang *et al.* (2013) 將羽毛蛋白與 40% 甲醛及 10% NaHSO₃ 溶液混合攪拌 3 hr，使羽毛蛋白接上 -SO₃Na 基，藉此提升其水溶性，提升應用於複合材料之可行性。

多種技術綜合應用 (或其他技術)

上述的水解技術、複合材料技術、熱裂解技術及化學修飾技術，經過綜合使用可產生更複雜專業的產品。Li *et al.* (2020) 利用熱裂解技術將羽毛粉製成羽毛炭後，再以複合材料技術結合聚乳酸 (poly lactic acid, PLA)，製作出可生物降解的生物基塑料並應用於包裝或填料。Yang *et al.* (2013) 將羽毛粉鹼水解 (40% NaOH 溶液, 95°C 加熱 2 hr) 後進行化學修飾 (40% 甲醛及 10% NaHSO₃ 溶液混合攪拌，使羽毛蛋白連接 -SO₃Na 官能基)，而後與液化玉米秸稈結合成複合材料並作為尿素的塗層材料，此複合塗層尿素肥料具有緩慢釋放氮肥及高保水性的效果。Siriorn and Jatuphorn (2020) 以化學水解技術 (NaHSO₃、SDS 及 urea) 將羽毛碎片水解為角蛋白之後，再結合 PLA、二氧化鈦 (TiO₂) 及黏土 (clay) 等材料，以電紡絲設備 (electrospinning set, comprised of Gamma high voltage power supply and Syringe pump) 製出納米纖維複合材料，以開發有機染料過濾器。Rahmani-Sania *et al.* (2020) 將羽毛以硝酸溶解之蛋殼溶液進行化學修飾，而後經由熱裂解製成羽毛炭，並製成吸附金屬離子的除污材料。Hastuti *et al.* (2020) 及 Rangaraj *et al.* (2020) 分別使用六水醋酸鋅溶液 (Zinc acetate hexahydrate, 0.5 M) 及氫氧化鉀溶液 (KOH, 5 M) 對羽毛碎片進行化學修飾，而後經由熱裂解產生羽毛炭複合材料，可製成鋰電池的負極或陽極材料。上述文獻結合多種技術，創造出高技術價值產品或材料製程，有助於羽毛廢棄物回收利用及增值。

雞隻羽毛以外之副產物再利用技術

本文彙整的研究文獻中，雞隻羽毛以外副產物可應用於製作飼料原料、酵素水解產物、萃取膠原蛋白及其他生醫或食品材料開發。由於此類副產物亦富含蛋白質，可利用高溫高壓處理技術 (即化製) 製作成肉骨粉與脂肪等產

品，並應用於牲畜或寵物飼糧中 (Zier *et al.*, 2004)。由於此技術較簡單且可處理大量副產物，是目前此類副產物常用的處理方式。而在酵素水解產物方面，利用酵素可以進行更溫和、快速且可控制的分解作用，可製作出營養價值更高或是具有機能性的產品，進而提升副產物附加價值 (Kristinsson and Rasco, 2000; Slizyte *et al.*, 2009)。除了以溫度或酵素水解利用之外，此類副產物中富含之膠原蛋白、軟骨素 (chondroitin sulfate)、玻尿酸 (hyaluronic acid) 或其他可利用物質 (如：油脂)，因此許多文獻將其萃取純化並評估其應用價值。以下將對這些應用方式說明其基礎製程架構、重要測定項目及分析結果。

利用雞隻羽毛以外之副產物製作蛋白質飼料原料

I. 製程架構

此類研究方法主要用高溫高壓處理技術製作飼料原料。使用原料種類多而繁雜，包含雞隻羽毛、內臟、頭、腳、砂囊或死禽。原料冷凍保存，製備前解凍。原料解凍後直接進行均質化及加熱滅菌程序。加熱溫度約為 140℃，加熱時間介於 45 – 60 min，壓力 3.5 – 4.0 kg/cm²。加熱滅菌後冷卻至室溫，再以篩網分離出固體及液體。液體可經由離心 (3,000 rpm, 60 min) 分離油脂，而固體經過壓碎及均質化後，以烘乾 (80℃, 6 hr) 或真空乾燥 (4 hr) 方式，排除多餘水分。獲得的乾燥物料在混合機中研磨後進行粒度分析 (2 mm 篩網)，並適當標識以用於後續的質量評估，包含物理化學，微生物學和穩定性分析 (Awachat *et al.*, 2011)。

II. 重要測定項目及應用方向

此類製程之目的為供應動物飼料原料，因此測定項目多以一般成分 (水分、粗灰分、粗蛋白、粗脂肪、粗纖維、無氮抽出物)、鈣磷含量及熱量為主 (Costa *et al.*, 2008; Awachat *et al.*, 2011)，並另外評估胃蛋白酶消化率、黃麴毒素、粒徑及保存期間酸度、pH 值、沙門氏菌、硫代巴比妥酸反應物 (2-thiobarbituric acid reacting substances, TBARS assay) 等保存性試驗 (Costa *et al.*, 2008)。相關文獻分析值如表 1。此外，由於副產物加工時，碳水化合物、脂肪及蛋白質的降解會產生酸味、硫醇 (mercaptans)、胺 (amines)、醛 (aldehydes) 或其他臭味物質 (Cheremisinoff, 1993)，因此 Kruger *et al.* (2009) 將家禽副產物飼料原料製作過程的廢氣進行冷凝收集，而後以頂空固相微萃取 (headspace solid phase microextraction) 抽取氣體樣品，再以氣相層析儀 / 質譜檢測器 (gas chromatograph/mass spectrometric detector, GC/MSD) 分析氣體分子。此研究可用於評估製程的廢氣處理效率或調整製程條件之參考。

表 1. 雞隻羽毛以外之副產物蛋白質原料之成分分析值

Table 1. The compositions of protein materials made from chicken by-product

Composition	Costa <i>et al.</i> (2008)	Awachat <i>et al.</i> (2011)
Types of by-products	Viscera	Head, feet, viscera, liver, gizzard, feathers
Gross energy, kcal/kg	5,098	6,060
Moisture, %	5.53	7.73
Crude protein, %	60.7	60.6
Crude fat, %	27.1	20.3
Crude ash, %	4.34	14.8
Crude fiber, %	0.78	No detection
Carbohydrate, %	1.54	No detection
Calcium, %	0.21	3.01
Phosphorus, %	1.10	1.64
Pepsin digestibility, %	82.4	No detection
Acidity, mg NaOH/g	9.40	No detection
pH	6.32	No detection
TBARS assay, mg MA/kg	1.57	No detection
Aflatoxin, ppb	No detection	0
Salmonella, CFU/g	0	No detection
2 mm sieve retention values, %	0.28	No detection

利用雞隻羽毛以外之副產物製作酵素水解產物

I. 製程架構

此類研究方法主要用於製作雞隻羽毛以外之副產物之酵素水解產物，如頭部、腳、臟器、血液、皮膚、骨骼。樣品前處理方面，血液以離心 (2,500 g, 15 min) 分離出血球及血漿後再進行酵素水解 (Wongngam *et al.* 2020; Nikhita and Sachindra, 2021)；皮膚以冷凍乾燥脫水後，再以丙酮脫脂，最後加水均質成漿液後再進行酵素水解 (Onuh *et al.*, 2014; Onuh *et al.*, 2015)；其他副產物清洗後，加水絞碎或均質，而後加熱消毒 (85 – 100°C, 5 – 20 min)，並於冷卻後進行酵素水解 (Cheng *et al.*, 2008; Taheri *et al.* 2013)。酵素水解時，依使用酵素所需的環境要求調整 pH 值及溫度，而後加入酵素開始水解過程。之後加熱終止酵素反應 (95 – 100°C, 10 – 20 min)，並以離心或過濾方式分離出水解產物 (Taheri *et al.* 2013; Onuh *et al.*, 2015; Nikhita and Sachindra, 2021)。

由於原料來源、酵素種類、酵素基質比例及產品應用目的皆不相同，所以不同文獻記載之酵素處理條件有所差異。雞血球酵素水解方面，Nikhita and Sachindra (2021) 以 2.5% Alcalase、60°C 進行酵素水解，而 Wongngam *et al.* (2020) 則以 4% Alcalase、51.1°C、pH 9.6 為最佳酵素水解條件。雞皮以 3% Alcalase、pH 8.0、55°C 進行酵素水解，或以 1% 胃蛋白酶、pH 2.0、37°C 進行第一階段分解後，再以 1% 胰蛋白酶、pH 7.5、37°C 進行第二階段分解 (Onuh *et al.*, 2014; Onuh *et al.*, 2015)。Taheri *et al.* (2013) 使用鹼性蛋白酶 0.07 U/g，於 52°C 下震盪培養分解家禽頭部及腿部副產物。Cheng *et al.* (2008) 則分別以 Alcalase (pH 8.0, 50°C)、胃蛋白酶 (pH 3.0, 37°C) 或胰蛋白酶 (pH 8.0, 37°C)，在酵素與基質 1:50 的條件下進行白肉雞腿骨的酵素水解，陳 (2011) 亦使用相似的酵素處理條件來開發雞腿骨水解產物。而 Jamdar and Harikumar (2008) 的製程較為特殊，使用未消毒的雞隻內臟 (腸、脾、膽) 及結締組織，以鹽酸調整 pH 值至 2.8 後，在未添加酵素的狀況下以 55°C 攪拌培養，利用本身微生物及酵素進行分解。

II. 重要測定項目及應用方向

開發這些技術需要設定關鍵的測定項目，作為修正製程之參考。常見的測定項目包含酵素活性、可溶性蛋白質含量、胜肽含量及水解度 (degree of hydrolysis, DH)，藉此評估水解時酵素活性是否保持良好、可溶性蛋白質是否順利分解並釋出胜肽 (Cheng *et al.*, 2008; Jamdar and Harikumar, 2008; Taheri *et al.*, 2013)。利用上述方法評估酵素水解效果後，可進一步分析水解產物的一般成分、胺基酸組成及產量，以建立這些製程或產品的基礎資訊。最後，相關文獻依據產品之應用目的進行下列評估：

- (i) 開發細菌培養基：Jamdar and Harikumar (2008) 發現雞隻內臟水解產物的胺基酸組成及含量豐富，具有成為飼料或細菌培養基蛋白質來源之潛力。由於細菌培養基的原料需要在各種 pH 值條件下具有良好的溶解度 (solubility)，故進行水解產物在 pH 1 – 12 的溶解度評估，並證實溶解度皆可達到 93% 以上。Taheri *et al.* (2013) 酵素水解產物之研究結果亦表現出良好溶解度。
- (ii) 食品原料：Balti *et al.* (2010) 指出，魚類及雞隻副產物可能具有成為食品粘合劑、乳化劑或膠凝劑之潛力。此外，Taheri *et al.* (2013) 亦針對魚類 (虹鱒魚內臟) 及家禽 (頭部和腿部) 副產物的水解產物進行溶解度、保水性 (water holding capacity)、吸油量 (oil absorption capacity)、乳化性 (emulsifying properties)、起泡性 (foaming properties) 及色澤等項目之評估，研究結果發現魚副產物之水解產物評估結果較雞隻副產物的為佳。未來仍可參考此文獻方法，找出適宜的雞隻副產物種類，開發食品原料。
- (iii) 機能性食品：由於國內去骨雞腿肉產品漸漸盛行，陳 (2011) 嘗試研究雞腿骨副產物之機能性產品，並發現雞腿骨之酵素水解產物富含 L-精胺酸 (L-Arg)，具有開發為改善勃起功能產品之潛力，故測定雞腿骨酵素水解產物對公鼠交配實驗、睪丸重量、貯精囊重量、精液品質及血液睪固酮含量之影響。結果顯示，公鼠灌食雞腿骨酵素水解產物後交配次數顯著上升，並提升配種成功率。而 Cheng *et al.* (2008) 為了探討雞腿骨副產物應用於機能性產品之潛力，測定雞腿骨酵素水解液之抗氧化能力及血管收縮素轉換酶 (angiotensin I converting enzyme, ACE) 抑制活性，結果發現，使用 Alcalase 酵素水解之 DH 表現較胃蛋白酶和胰蛋白酶佳，且其水解產物表現出更高的 ACE 抑制活性。除了雞骨之外，雞血及雞皮的酵素水解產物亦被發現具有抗氧化及 ACE 抑制活性的效果。進一步以動物試驗證實，餵飼雞血或及雞皮的酵素水解產物，皆可降低自發性高血壓大鼠之收縮壓 (Onuh *et al.*, 2015; Wongngam *et al.*, 2020)。由上述文獻可知，雞隻副產物酵素水解產物具有成為機能性食品之潛力。

利用雞隻羽毛以外之副產物萃取膠原蛋白

I. 製程架構

雞隻副產物萃取膠原蛋白的文獻較多，如雞爪、胸軟骨及雞皮等。雞隻副產物萃取膠原蛋白技術：樣品前

處理及萃取方式之之比較，如表 2。

表 2. 雞隻副產物萃取膠原蛋白技術：樣品前處理及萃取方式之比較

Table. 2. The collagen extraction technology of chicken by-products: Comparison of sample preparation and extraction methods

Reference	Sample preparation	Extraction
Feet		
Zhou <i>et al.</i> , 2016	Samples were soaked in a solution of 20% NaCl in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) at a ratio of 1:20. The mixture was cen-trifuged at 10,000 g for 20 min and the precipitate was washed repeatedly with distilled water to remove fats and bubbles.	1. The salt soluble collagen: pretreated samples were soaked in a salt solution (0.45 M NaCl in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.5) at a ratio of 1:80 for 48 h. 2. The acid soluble collagen: undissolved matter from salt soluble collagen extraction was soaked in 0.5 M acetic acid at a ratio of 1:80 for 48 h. 3. The pepsin soluble collagen: Undissolved matter from acid soluble collagen extraction was soaked in 0.5 M acetic acid (pH 2) containing 0.1% pepsin (4,500 units/mg) at a ratio of 1:80 for 48 h.
Araujo <i>et al.</i> , 2021	Samples were soaked in a 0.5 M acetic acid solution for 24 h in the ratio of 1:10.	Pretreated samples were homogenized for 10 min at 5,000 g. In hy-drolysis, 1% pepsin was used for 12 h at 4°C with continuous agitation.
Araujo <i>et al.</i> , 2019	Samples were soaked in a 0.3 M acetic acid solution for 24 h in the ratio of 1:10.	Pretreated samples were homogenized for 10 min at 5,000 g. In hy-drolysis, 1% pepsin was used for 12 h at 4°C with continuous agitation.
Potti and Fahad, 2017	Samples were soaked in a 0.1 N NaOH solution for 24 h to remove non collagenous substance and to make the tissue very loose.	Pretreated samples were soaked in 0.5 M acetic acid at a ratio of 1:20 for 48 h at 25°C.
Sternal cartilage		
Akram and Zhang, 2019	1. Samples were soaked in a solution of 20% NaCl in 0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) at a ratio of 1:20 to remove the noncollagenous substances, and then washed with distilled water to remove bubbles and fats. 2. Cartilage pieces were soaked in a 0.5 M Na ₂ CO ₃ solu-tion at a ratio of 1:10 to remove pigments. 3. Cartilage pieces was soaked in a 0.3 M EDTA disodi-um salt (pH 7.4) solution at a ratio of 1:10 for 24 h to de-mineralize the cartilage pieces.	Pretreated samples were soaked in a 0.5 M acetic acid at a ratio of 1:6. The pH was adjusted at 2.8 with formic acid and then stirred for 96 h at 4 °C.
Skin		
Zeng <i>et al.</i> , 2013	1. Samples were soaked in a 5% NaCl solution for 12 h in the ratio of 1:10 to reduce noncollagen proteins. 2. The soaked skin samples were washed with distilled water, and then soaked in a 6% Na ₂ CO ₃ solution for 24 h in the ratio of 1:10 to remove the fat.	Pretreated samples were mixed with 1000 volumes of distilled water and 1 g compound enzyme (papain: trypsin: flavourzyme = 1: 1: 1) and then allowed to hydrolyze at 50°C for 3 h.

萃取膠原蛋白的基本架構，首先將原料絞碎，增加原料與溶液的接觸面積。而後將原料浸泡於緩衝液、酸溶液、鹼溶液或鹽溶液中進行樣品前處理。雖然各種文獻的前處理方式有所差異，但主要目的皆是為了去除雜質，例如：以 NaOH 溶液去除雞腳非膠原蛋白 (Potti and Fahad, 2017)；以 Na₂CO₃ 及 EDTA disodium salt 溶液去除雞胸軟骨的色素及礦物質 (Akram and Zhang, 2019)；以 NaCl 及 Na₂CO₃ 溶液去除雞皮的非膠原蛋白及脂肪 (Zeng *et al.*, 2013)。接著將前處理後的樣品進行鹽溶性、酸溶性或酵素溶性萃取。Zhou *et al.* (2016) 探討鹽溶性、酸溶

性或酵素溶性萃取對雞腳膠原蛋白萃取之影響，結果發現膠原蛋白產率以酵素溶性製程表現最佳，其次為酸溶性，而鹽溶性則最差，因此目前膠原蛋白萃取的研究方向多為酵素溶性及酸溶性製程。酵素溶性製程在酵素與醋酸的共同作用下，膠原蛋白以醋酸膨鬆化後，再以酵素進行分解，其產量可達酸溶性製程 3.4 倍，為較具商業化潛力的製程 (Zhou *et al.*, 2016)。此外，Akram and Zhang (2019) 發現超音波處理 (ultrasound-treated) 可進一步提升雞胸軟骨酸溶性膠原蛋白產率，為改善萃取效率的技術。原料分解完畢後，以加鹽鹽析的方式，使蛋白質沉澱，並以透析技術排除鹽分，最後將膠原蛋白進行乾燥即完成萃取製程。膠原蛋白可利用烘乾、噴霧乾燥或冷凍乾燥等方式排除多餘水分，其中冷凍乾燥是保留膠原蛋白功能特性的最佳方法，但若欲降低乾燥成本或提高產量，則可考慮使用噴霧乾燥 (Zeng *et al.*, 2013)。

II. 重要測定項目及應用方向

在評估萃取成效方面，膠原蛋白產率是主要的測定項目，其公式為 (膠原蛋白萃取乾重 / 原料重) $\times 100$ ，數值愈高表示萃取出膠原蛋白的比例愈高。萃取之膠原蛋白會測定一般成分 (水分、粗灰分、粗蛋白、無氮抽出物) 及胺基酸分析，以建立或比對各文獻成分資料。在膠原蛋白之蛋白質特性方面，十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳分析 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS PAGE) 可用於對比萃取膠原蛋白樣品與標準品之間的電泳環帶 (band) 位置，藉此判定為何種膠原蛋白及純度。傅里葉變換紅外光譜 (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)、圓二色光譜分析 (circular dichroism spectroscopy)、原子力顯微鏡 (atomic force microscopy) 及掃描電子顯微鏡 (scanning electron microscopy) 則用於分析膠原蛋白結構 (Zhou *et al.*, 2016; Potti and Fahad, 2017; Akram and Zhang, 2019)。

在評估膠原蛋白應用價值方面，需要依據產品應用方向，制定符合產品目的的測定項目。為探討其應用於製藥、食品或醫材原料之潛力，需建立保水性、吸水性、乳化性、溶解性、吸油性及起泡性等資料。若能進一步建立不同溫度的流變性質 (如黏性及彈性) 則更具參考價值 (Zeng *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016; Akram and Zhang, 2019)。在生醫敷料應用方面，徐 (2007) 針對膠原蛋白敷料測定色澤、pH、物性、乳化性及離心分離性，並測定抗 UV、抗氧化及皮膚保濕能力，以突顯其應用於敷料之價值。結果顯示，烏骨雞之膠原蛋白較白肉雞膠原蛋白具有更佳的光吸收光譜，且膠原蛋白濃度愈高其抗氧化力亦愈高。實際以皮膚水分蒸散測定儀測定膠原蛋白面霜保濕性，結果發現膠原蛋白面霜顯著降低皮膚水分散失。由此可知，雞隻副產物具有應用於敷料之潛力。Araujo *et al.* (2019; 2021) 將雞腳膠原蛋白應用於低脂雞肉香腸之開發，因此測定感官品評、一般成分、脂肪酸、色澤及口感分析 (texture profile analysis)，結果顯示膠原蛋白可以取代部分油脂且不影響香腸品質，具有成為低脂食品原料的潛力。

其它雞隻羽毛以外之副產物應用文獻

I. 萃取軟骨素及玻尿酸

軟骨素及玻尿酸可廣泛應用於醫療、製藥、化妝品、食品及養身保健 (Uebelhart *et al.* 2004; Volpi, 2009; Srisantisaeng *et al.*, 2013)。而雞隻骨骼組織 (如雞胸軟骨) 富含軟骨素、雞冠富含玻尿酸，經過萃取後可提升其副產物附加價值 (Kogan *et al.*, 2007; Collins and Birkinshaw, 2012; Srichamroen *et al.*, 2013)。因此部分文獻嘗試以軟骨組織 (Srichamroen *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2019b)、肉雞機械去骨副產品 (Nakano *et al.*, 2012) 及雞爪 (Widyaningsih *et al.*, 2016) 來萃取軟骨素，並探討雞冠萃取玻尿酸之可行性 (Rosa *et al.*, 2012; Srisantisaeng *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2017)。

在軟骨素萃取方面，高溫水煮萃取 (100°C 加熱 2.5 hr)、化學萃取 (調整 pH 值至 4.5) 及酵素分解萃取皆可萃取出軟骨素 (Widyaningsih *et al.*, 2016)。但酵素分解萃取耗能較少，且對生態環境較友善，因此目前以此為主要萃取技術 (Nakano *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2019a; 2019b)。Shen *et al.* (2019b) 進一步應用高溫高壓 (120°C, 1.5 hr) 將雞胸軟骨液化並使用複合酵素 (胰蛋白酶及木瓜蛋白酶)，結果證實可改善軟骨素的萃取效率。而雞冠萃取玻尿酸方面，雖然不同文獻條件有差異，但亦以酵素分解萃取法為主 (Rosa *et al.*, 2012; Srisantisaeng *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2017)。雞冠經過細切後，浸泡於丙酮或氯仿-甲醇溶液 (2:1, v/v) 中以去除脂肪及水分 (Rosa *et al.*, 2012; Srisantisaeng *et al.*, 2013)，而後調整適宜的溫度及 pH 值進行酵素分解。軟骨素及玻尿酸的樣品分解後，以陰離子樹脂 (anionic resin) 吸附、膜過濾、離心或蛋白質沉澱等技術 (如三氯醋酸 (trichloroacetic acid) 或乙醇) 分離出雜質 (Srichamroen *et al.*, 2013; Srisantisaeng *et al.*, 2013; Widyaningsih *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017)。由於硫酸軟骨素及玻尿酸皆含有醣醛酸 (uronic acid) 的結構，因此可利用卡唑反應 (carbazole reaction) 測定醣醛酸含量，進而評估萃取效果 (Nakano *et al.*, 2012; Rosa *et al.*, 2012; Srichamroen *et al.*, 2013; Srisantisaeng *et al.*, 2013; Widyaningsih *et al.*, 2016)。

II. 應用於生物油生產

近年來，部分文獻嘗試探討將廢棄物轉換為生物油，希望藉此將廢棄物轉換為能源 (Maher and Bressler, 2007; Fernandez *et al.*, 2009; Wisniewski *et al.*, 2010)，而雞隻皮膚及脂肪亦為富含油脂的副產物，因此 Idris *et al.* (2015) 探討雞隻皮膚及脂肪的油脂萃取技術。將雞皮及脂肪切碎後，將樣品於 60°C 溶劑中 (己烷和水) 加熱 60 min 進行萃取。結果發現，此方法可成功萃取油脂，且在萃取過程中進行超音波處理可提升 23% 的油脂產量。進一步以 FTIR 分析油脂，結果發現其光譜分析結果與棕櫚油相似，以三酸甘油酯 (triglyceride) 為主要的成分，顯示其具有加工純化成為生物汽油的潛力。

III. 應用於肉加工製品

雞隻為人類重要蛋、肉等食物來源，因此亦有文獻直接將副產物應用於加工製品，其中雞皮及脂肪為較常見研究材料 (Peña-Saldarriaga *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2021)。Peña-Saldarriaga *et al.* (2020) 探討以雞隻脂肪副產物，部分取代乳化型 (emulsion-type) 香腸中雞皮對其產品品質之影響。結果顯示，脂肪取代雞皮會降低香腸水分、提升脂肪含量並影響色澤，但這些影響仍符合哥倫比亞香腸製品的規定。而感官品評方面發現，以脂肪取代 40% 雞皮之香腸顏色、風味和肉味表現較 50% 佳，因此以此為較佳取代量。Lima *et al.* (2021) 探討添加雞皮、脂肪及同時添加雞皮和脂肪對香腸品質之影響。結果顯示，添加雞皮會提升香腸蛋白質含量、硬度、保水能力並減少烹飪損失，而添加脂肪則提升脂質含量並顯示較佳的感官品評可接受性。由上述文獻可知，雞皮及脂肪不但可應用於香腸，而且藉由調整添加比例可改變香腸成分及感官接受度，可作為加工業產品開發的策略技術。

結 論

常用的羽毛再利用技術為水解技術、複合材料技術、熱裂解技術及化學修飾技術。水解技術可分解羽毛蛋白質結構，以供應動物、植物及微生物養分或其他產品原料 (如：抗氧化產品或角蛋白)。複合材料技術是將羽毛與其他材料結合，藉由羽毛強韌、隔熱及纖維的特性來改變材料特性，可改善材料物理性狀、隔熱性或成為紡織原料。熱裂解技術是將羽毛經熱化學轉化為合成氣、生物油和羽毛炭，並主要利用羽毛炭做為污染吸附及電化學材料。化學修飾技術是利用特定化學物質改變羽毛蛋白的結構或官能基，增進吸附性、電化學性或溶解性，進而提升羽毛應用性。

相較於羽毛，其他副產物可能由於成分複雜、難以收集清洗分類及容易腐敗等因素，因此主要以高溫高壓處理技術為主。高溫高壓處理技術可簡單且大量的處理副產物，多應用於飼料原料。而酵素水解技術能保留更多營養或機能性成分，因此附加價值及應用性更佳。萃取純化技術方面，膠原蛋白之文獻較為豐富且萃取條件及測定項目皆已建立完整，可供相關學者及業者參考。而其它應用技術如軟骨素及玻尿酸萃取、生物油生產及肉加工製品技術，更是將羽毛以外副產物的應用潛力，拓展至生醫、藥物、能源及食品領域，呈現出更多元化的應用價值。未來應合理搭配各種再利用技術，以有效提高雞隻副產物資源再利用並增加產品附加價值，進而能兼顧環境保護及產業發展之目標。

參考文獻

- 徐楓雯。2007。利用烏骨雞雞爪萃取含黑色素之膠原蛋白與其功能特性探討。國立中興大學動物科學系。碩士論文。臺中市。
- 陳厚典。2011。以雞腿骨水解物改善勃起功能障礙之研究。國立中興大學動物科學系。碩士論文。臺中市。
- 雷大德。2013。篩選羽毛分解菌進行二階段混合型發酵羽毛粉促進肉雞生長之探討。國立嘉義大學動物科學系。碩士論文。嘉義市。
- 行政院農業委員會。2019。農業統計年報。
- 魏恆巍、許家鳳、陳保基。2005。以試管試驗方法評估國產羽毛粉之品質。中畜會誌。34：39-46。
- Adediran, A. A., I. O. Oladele, T. F. Omotosho, O. S. Adesina, T. M. A. Olayanju, and I. M. Fasemoyin. 2020. Water absorption, flexural properties and morphological characterization of chicken feather fiber-wood sawdust hybrid reinforced waste paper-cement bio-composites. Mater. Today Proc. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.1166>.
- Akram, A. N. and C. Zhang. 2019. Effect of ultrasonication on the yield, functional and physicochemical characteristics of

- collagen-II from chicken sternal cartilage. *Food Chem.* 307: 125544.
- Araujo, I. B. S., D. A. S. Lima, S. F. Pereira, and M. S. Madruga. 2019. Quality of low-fat chicken sausages with added chicken feet collagen. *Poult. Sci.* 98: 1064-1074.
- Araujo, I. B. S., D. A. S. Lima, S. F. Pereira, R. P. Paseto, and M. S. Madruga. 2021. Effect of storage time on the quality of chicken sausages produced with fat replacement by collagen gel extracted from chicken feet. *Poult. Sci.* 100: 1262-1272.
- Awachat, V. B., S. Majumdar, A. B. Mandal, and S. K. Bhanja. 2011. Slaughter byproduct yields of poultry, their rendering into poultry byproduct meal, and evaluation of its nutrient composition and aflatoxin content. *Anim. Sci. Report.* 5: 135-140.
- Babalola, R., A. O. Ayeni, P. S. Joshua, A. A. Ayoola, U. O. Isaac, U. Aniediong, V. E. Efeovbokhan, and J. A. Omoleye. 2020. Synthesis of thermal insulator using chicken feather fibre in starch-clay nanocomposites. *Heliyon* 6: e05384.
- Balti, R., A. Bougatef, N. El-Hadj Ali, D. Zekri, A. Barkia, and M. Nasri. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *J. Sci. Food Agric.* 90: 2006-2014.
- Bezus, B., F. Ruscasso, G. Garmendia, S. Vero, I. Cavello, and S. Cavalitto. 2021. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 32: 101925.
- Chakraborty, R., A. Asthana, A. K. Singh, S. Yadav, M. A. B. H. Susanb, and S. A. C. Carabineiro. 2020. Intensified elimination of aqueous heavy metal ions using chicken feathers chemically modified by a batch method. *J. Mol. Liq.* 312: 113475.
- Cheng, F. Y., Y. T. Liu, T. C. Wan, L. C. Lin, and R. Sakata. 2008. The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. *Anim. Sci. J.* 79: 122-128.
- Cheremisinoff, P. N. 1993. Air pollution control and design for industry. New York, USA: Marcel Dekker.
- Collins, M. N. and C. Birkinshaw. 2012. Hyaluronic acid based scaffolds for tissueengineering-a review. *Carbohydr. Polym.* 92: 1262-1279.
- Costa, D. P. S., P. F. Romanelli, and E. Trabuco. 2008. Use of non-edible poultry viscera for the preparation of meat meal. *Food Sci. Technol.* 28: 746-752.
- Dalhat, M. A., S. A. Osman, A. A. Alhuraish, F. K. Almarshad, S. A. Qarwan, and A. Y. Adesina. 2020. Chicken feather fiber modified hot mix asphalt concrete: rutting performance, durability, mechanical and volumetric properties. *Constr. Build. Mater.* 239: 117849.
- Davis, J. G., E. P. Mecchi, H. Lineweaver, and E. C. Naber. 1961. Processing of poultry byproducts and their utilization in feeds. U. S. Department of Agriculture Utilization Research Report no. 3: 40.
- Fagbemi, O. D., B. Sithole, and T. Tesfaye. 2020. Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques. *Sustain. Chem. Pharm.* 17: 100267.
- Fernandez, Y., A. Arenillas, M. A. Diez, J. J. Pis, and J. A. Menendez. 2009. Pyrolysis of glycerol over activated carbons for syngas production. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 84: 145-150.
- Grazziotin, A., F. A. Pimentel, E. V. de Jong, and A. Brandelli. 2006. Nutritional improvement of feather protein by treatment with microbial keratinase. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126: 135-144.
- Gupta, R. and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: An overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 21-33.
- Gurav, R. G. and J. P. Jadhav. 2012. A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 4532-4539.
- Hastuti, E., A. Subhan, and A. Auwala. 2020. Performance of carbon based on chicken feather with KOH activation as an anode for Li-ion batteries. *Mater. Today Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.11.429>.
- Huang, H. J., B. C. Weng, Y. D. Hsuuw, Y. S. Lee, and K. L. Chen. 2021. Dietary supplementation of two-stage fermented feather-soybean meal product on growth performance and immunity in finishing pigs. *Animals* 11: 1527.
- Idris, A. I. M., A. Salmiaton, and R. Omar. 2015. Pyrolysis-solvent extraction of chicken fats and skins for bio-oil production. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects* 37: 2543-2549.
- Jamdar, S. N. and P. Harikumar. 2008. A rapid autolytic method for the preparation of protein hydrolysate from poultry

- viscera. *Bioresour. Technol.* 99: 6934-6940.
- Jeampakdee, P., S. Puthong, P. Srimongkol, P. Sangtanoo, T. Saisavoey, and A. Karnchanatat. 2020. The apoptotic and free radical-scavenging abilities of the protein hydrolysate obtained from chicken feather meal. *Poult. Sci.* 99: 1693-1704.
- Kakonke, G., T. Tesfaye, B. Sithole, and M. Ntunka. 2020. Production and characterization of cotton-chicken feather fibres blended absorbent fabrics. *J. Clean Prod.* 243: 118508.
- Khumalo, M., B. Sithole, and T. Tesfaye. 2020. Valorisation of waste chicken feathers: Optimisation of keratin extraction from waste chicken feathers by sodium bisulphite, sodium dodecyl sulphate and urea. *J. Environ. Manage.* 262: 110329.
- Kogan, G., L. Soltés, R. Stern, and P. Gemeiner. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.* 29: 17-25.
- Kristinsson, H. G. and B. A. Rasco. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 43-81.
- Kruger, R. L., R. M. Dallago, I. N. Filho, and M. D. Luccio. 2009. Study of odor compounds in gaseous effluents generated during production of poultry feather and viscera meal using headspace solid phase microextraction. *Environ. Monit. Assess.* 158: 355-363.
- Li, Z., C. Reimer, M. Picard, A. K. Mohanty, and M. Misra. 2020. Characterization of chicken feather biocarbon for use in sustainable biocomposites. *Front. Mater.* 7: 3. <https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00003>.
- Lima, J. L., B. B. T. Assis, L. S. Olegario, M. S. Galvao, A. J. Soares, N. M. O. Arcanjo, A. Gonzalez-Mohino, T. K. A. Bezerra, and M. S. Madruga. 2021. Effect of adding byproducts of chicken slaughter on the quality of sausage over storage. *Poult. Sci.* 100: 101178.
- Maher, K. D. and D. C. Bressler. 2007. Pyrolysis of triglyceride materials for the production of renewable fuels and chemicals. *Bioresour. Technol.* 98: 2351-2368.
- Nakano, T., Z. Pietrasik, L. Ozimeka, and M. Betti. 2012. Extraction, isolation and analysis of chondroitin sulfate from broiler chicken biomass. *Process Biochem.* 47: 1909-1918.
- Nikhita, R. and N. M. Sachindra. 2021. Optimization of chemical and enzymatic hydrolysis for production of chicken blood protein hydrolysate rich in angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity. *Poult. Sci.* 100: 101047.
- Nurdiawati, A., B. Nakhshiniev, I. N. Zaini, N. Saidov, F. Takahashi, and K. Yoshikawa. 2017. Characterization of potential liquid fertilizers obtained by hydrothermal treatment of chicken feathers. *Environ. Prog. Sustain. Energy.* 37: 375-382.
- Nurdiawati, A., C. Suherman, Y. Maxiselly, M. A. Akbar, B. A. Purwoko, P. Prawisudha, and K. Yoshikawa. 2019. Liquid feather protein hydrolysate as a potential fertilizer to increase growth and yield of patchouli (*Pogostemon cablin Benth*) and mung bean (*Vigna radiata*). *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 8: 221-232.
- Oliveira, S. A., B. C. Silva, I. C. Riegel-Vidotti, A. Urbano, P. C. S. Faria-Tischer, and C. A. Tischer. 2017. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *Int. J. Biol. Macromol.* 97: 642-653.
- Onuh, J. O., A. T. Girgih, R. E. Aluko, and M. Aliani. 2014. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* 150: 366-373.
- Onuh, J. O., A. T. Girgih, S. A. Malomo, R. E. Aluko, and M. Aliani. 2015. Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods.* 14: 133-143.
- Ouakarrouh, M., N. Laaroussi, and M. Garoum. 2020. Thermal characterization of a new bio-composite building material based on plaster and waste chicken feathers. *Renew. Energy Environ. Sustain.* 5: 2. <https://doi.org/10.1051/rees/2019011>.
- Papadopoulos, M. C. 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agric. Wastes* 14: 275-290.
- Peña-Saldarriaga, L. M., J. A. Pérez-Alvarez, and J. Fernández-López. 2020. Quality properties of chicken emulsion-type sausages formulated with chicken fatty byproducts. *Foods* 9: 507.
- Pfeuti, G., L. S. Brownb, J. G. Longstaffec, F. Peyroneld, D. P. Bureaua, and E. G. Kiariea. 2020. Predicting the standardized ileal digestibility of crude protein in feather meal fed to broiler chickens using a pH-stat and a FTIR method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 261: 114340.
- Potti, R. B. and M. O. Fahad. 2017. Extraction and characterization of collagen from broiler chicken feet (*Gallus gallus*

- domesticus*) - biomolecules from poultry waste. *J. Pure Appl. Microbiol.* 11: 315-322.
- Rahmani-Sania, A., P. Singhb, P. Raizadab, E. C. Limac, I. Anastopoulod, D. A. Giannakoudakise, S. Sivamanif, T. A. Dontsovag, and A. Hosseini-Bandegharaci. 2020. Use of chicken feather and eggshell to synthesize a novel magnetized activated carbon for sorption of heavy metal ions. *Bioresour. Technol.* 297: 122452.
- Rangaraj, V. M., A. A. Edathil, P. Kadirvelayutham, and F. Banat. 2020. Chicken feathers as an intrinsic source to develop ZnS/carbon composite for Li-ion battery anode material. *Mater. Chem. Phys.* 248: 122953.
- Rosa, C. S., A. F. Tovar, P. Mourao, R. Pereira, P. Barreto, and L. H. Beirão. 2012. Purification and characterization of hyaluronic acid from chicken combs. *Cienc. Rural.* 42: 1682-1687.
- Saravanan, K. and C. Prakash. 2018. Effect of processing conditions on flexural strength properties of chicken feather fibre (CFF) and its hybrid composites with polypropylene resin. *J. Nat. Fibers* 17: 933-944.
- Schommer, V. A., B. M. Wenzel, and D. J. Daroit. 2020. Anaerobic co-digestion of swine manure and chicken feathers: effects of manure maturation and microbial pretreatment of feathers on methane production. *Renew Energy* 152: 1284-1291.
- Shen, Q., C. Zhang, W. Jia, X. Qin, X. Xu, M. Ye, H. Mo, and A. Richel. 2019a. Liquefaction of chicken sternal cartilage by steam explosion to isolate chondroitin sulfate. *Carbohydr. Polym.* 215: 73-81.
- Shen, Q., C. Zhang, W. Jia, X. Qin, Z. Cui, H. Mo, and A. Richel. 2019b. Co-production of chondroitin sulfate and peptide from liquefied chicken sternal cartilage by hot-pressure. *Carbohydr. Polym.* 222: 115015.
- Siriorn, I. N. A. and W. Jatuphorn. 2020. Investigation of morphology and photocatalytic activities of electrospun chicken feather Keratin/PLA/TiO₂/Clay nanofibers. *E3S Web of Conferences* 141: 01003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014101003>.
- Slizyte, R., R. Mozuraityte, O. Martinez-Alvarez, E. Falch, M. Fouchereau-Peron, and T. Rustad. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from Cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochem.* 44: 668-677.
- Sobucki, L., R. F. Ramos, E. Gubiani, G. Brunetto, D. R. Kaiser, and D. J. Daroit. 2019. Feather hydrolysate as a promising nitrogen-rich fertilizer for greenhouse lettuce cultivation. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* 8: 493-499.
- Srichamroen, A., T. Nakano, Z. Pietrasik, L. Ozimek, and M. Betti. 2013. Chondroitin sulfate extraction from broiler chicken cartilage by tissue autolysis. *LWT-Food Sci. Technol.* 50: 607-612.
- Srisantisaeng, P., W. Garnjanagoonchorn, S. Thanachasai, and A. Choothesa. 2013. Proteolytic activity from chicken intestine and pancreas: extraction, partial characterization and application for hyaluronic acid separation from chicken comb. *J. Sci. Food Agric.* 93: 3390-3394.
- Sun, Z., X. Li, K. Liu, X. Chi, and L. Liu. 2021. Optimization for production of a plant growth promoting agent from the degradation of chicken feather using keratinase producing novel isolate *Bacillus pumilus* JYL. *Waste Biomass Valorization* 12: 1943-1954.
- Suna, P., G. Zhua, T. Lia, X. Lia, Q. Shia, M. Xuea, and B. Li. 2020. Acidification chicken feather as sorbent for selectively adsorbing of Cr (VI) ions in aqueous solution. *Mater. Today Commun.* 24: 101358.
- Taghiyari, H. R., R. Majidi, A. Esmailpour, Y. S. Samadi, A. Jahangiri, and A. N. Papadopoulos. 2020. Engineering composites made from wood and chicken feather bonded with UF resin fortified with wollastonite: a novel approach. *Polymers* 12: 857. <https://doi.org/10.3390/polym12040857>.
- Taheri, A., A. A. S. Auvar, H. Ahari, and V. Fogliano. 2013. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iran. J. Fish. Sci.* 12: 154-169.
- Tesfaye, T., B. Sithole, and D. Ramjugernath. 2017. Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route-current status and future prospects. *Clean Technol. Environ. Policy* 19: 2363-2378.
- Uebelhart, D., M. Malaise, R. Marcolongo, F. DeVathaire, M. Piperno, E. Mailleux, A. Fioravanti, L. Matoso, and E. Vignon. 2004. Intermittent treatment of knee osteoarthritis with oral chondroitin sulfate: a one-year, randomized, double-blind, multicenter study versus placebo. *Osteoarthr. Cartil. Open.* 12: 269-276.
- Veerapandiana, B., S. R. Shanmugama, S. Varadhana, K. K. Sarwareddyb, K. P. Manib, and V. Ponnusamia. 2020. Levan production from sucrose using chicken feather peptone as a low cost supplemental nutrient source. *Carbohydr. Polym.* 227: 115361.

- Vinodh kumar, S., K. Prasanth, M. Prashanth, S. Prithivirajan, and P. A. Kumar. 2021. Investigation on mechanical properties of chicken feather fibers reinforced polymeric composites. *Mater. Today Proc.* 37: 3767-3770.
- Volpi N. 2009. Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 61: 1271-1280.
- Widyaningsih, T. D., W. D. Rukmi, E. Sofia, S. D. Wijayanti, N. Wijayanti, R. Ersalia, N. Rochmawati, and D. Nangin. 2016. Extraction of Glycosaminoglycans containing glucosamine and chondroitin sulfate from chicken claw cartilage. *Res. J. Life Sci.* 3: 181-189.
- Wisniewski, J. A., V. R. Wiggers, E. L. Simionatto, H. F. Meier, A. A. C. Barros, and L. A. S. Madureira. 2010. Biofuels from waste fish oil pyrolysis: chemical composition. *Fuel* 89: 563-568.
- Wongngam, W., T. Mitani, S. Katayama, S. Nakamura, and J. Yongsawatdigul. 2020. Production and characterization of chicken blood hydrolysate with antihypertensive properties. *Poul. Sci.* 99: 5163-5174.
- Yang, Y., Z. Tong, Y. Geng, Y. Li, and M. Zhang. 2013. Biobased polymer composites derived from corn stover and feather meals as double-coating materials for controlled-release and water-retention urea fertilizers. *J. Agric. Food Chem.* 61: 8166-8174.
- Yusuf, I., K. I. Arzai, and A. S. Dayyab. 2019. Evaluation of pre-treatment methods and anaerobic co-digestions of recalcitrant melanised chicken feather wastes with other wastes for improved methane and electrical energy production. *Jordan J. Biol. Sci.* 13: 413-418.
- Zeng, Q., M. Zhang, B. P. Adhikari, and A. S. Mujumdar. 2013. Effect of drying processes on the functional properties of collagen peptides produced from chicken skin. *Dry Technol.* 31: 1653-1660.
- Zhou, C., Y. Li, X. Yu, H. Yang, H. Ma, A. E. A. Yagoub, Y. Cheng, J. Hu, and P. N. Y. Otu. 2016. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *Lwt-food Sci. Technol.* 74: 145-153.
- Zier, C. E., R. D. Jones, and M. J. Azain. 2004. Use of pet food grade poultry byproduct meal as an alternate protein source in weanling pig diets. *J. Anim. Sci.* 82: 3049-3057.

The reutilization technology of chicken by-products ⁽¹⁾

Ruei-Han Yeh ⁽²⁾ Meng-Ju Lee ⁽²⁾ Ling-Tsai Wu ⁽²⁾ Chia-Te Chu ⁽³⁾ and Rung-Jen Tu ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Dec. 30, 2020; Accepted: Jan.11, 2022

Abstract

The purpose of this study was to investigate the reutilization technology of chicken by-product in two parts: feathers and other by-products. Commonly used feather reutilization technologies include hydrolysis technology, composites technology, pyrolysis technology and chemical modification technology. The hydrolysis technology can decompose feather protein into biological nutrients or as raw materials for other products. The composite material technology combines feathers with other materials to change the property of the material, including the physical, thermal insulator and fiber properties. The pyrolysis technology is the thermochemical conversion of feathers into synthesis gas, bio-oil and bio-carbon (feather carbon). Feather carbon can be applied to the adsorption of pollution and electrochemical materials. The chemical modification technology uses chemical substances to change the structure or functional groups of feather proteins, thereby changing the absorptive, electrochemical, or solubility properties. With regard to the research and application of other by-products, high-temperature and high-pressure processing technology can process a large amount of by-products and then can be applied to feed materials. Enzyme hydrolysis technology can retain more nutrients or functional substances, and hence adding value and more applicability in these products. In terms of extraction and purification research, there are abundant sources of literature on collagen extraction, , which can be adopted by researchers and industry practitioners. Moreover, chondroitin sulfate and hyaluronic acid extraction, bio-oil production and meat processing technologies add more diversity to the potential value of by-products. In the future, we should properly adopt the various reutilization technologies to improve the reutilization rate of chicken by-products and increase the added-value of products, thereby to prolong the sustainable development in the ecological environment and industrial operations.

Key words: Chicken, Feather, By-product, Reutilization.

(1) Contribution No. 2691 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Animal Products Processing Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Breeding and Genetics Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: jctu@tlri.gov.tw.

源自活性污泥多源基因體新穎酯酶 Est03 之蛋白純化與特性分析⁽¹⁾

黃子瑄⁽²⁾ 廖仁寶⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：110 年 5 月 24 日；接受日期：111 年 1 月 19 日

摘 要

本研究目的為針對從活性污泥多源基因體篩選而得的新穎酯酶基因 *est03* 進行次選殖、表現、純化及特性分析，以期供後續研究與應用。*est03* 基因長 762 bp，可轉譯為含 253 個胺基酸的酯酶，分子大小約為 28.8 kDa，稱為 Est03。將新穎酯酶基因 *est03* 次選殖於表現載體 pPAL7 上，轉形於表現宿主大腸桿菌 (*Escherichia coli* BL21 (DE3)) 中。轉形株經 IPTG 誘導大量表現標的蛋白質後，利用套組純化並切除後成為與原始胺基酸序列相同的純化酵素。經特性分析後發現，Est03 對於短鏈脂肪酸受質有較高喜好度，尤其對二碳受質 (C2) 活性顯著高於其他 ($P < 0.001$)，在溫度試驗中顯示它在 35 – 50°C 具有較佳活性，最適溫度為 45°C，比活性為 12.15 unit/mg， k_{cat}/K_m 為 $1.58 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 。Est03 在 pH 6.5 至 pH 9.0 間，相較於在其他 pH 值有較佳活性，且於 pH 8.0 時活性最高。同時，Est03 在常用種類與濃度之有機溶劑、金屬離子及介面活性劑環境中皆具有活性。綜而論之，Est03 具有值得關注的生化特性，期能進一步開發應用於生物技術產業。

關鍵詞：活性污泥多源基因體、新穎酯酶、特性分析。

緒 言

生物催化劑 (biocatalysts) 可取代傳統的化學物質，具有低價、減少有害化合物、高效率高製程表現與增進產率等特性，使全球產業對於新穎生物酵素之需求逐年增加 (Berini *et al.*, 2017)。解脂酶 (lipolytic enzymes) 是普遍存在的 α/β 水解酶，存在於動物、植物和微生物中，包含酯酶 (esterases, EC3.1.1.1) 及脂肪酶 (lipases, EC3.1.1.3) (Arpigny and Jaeger, 1999)。脂肪酶可定義為可合成及水解 C_{10} 以上的長鏈三酸甘油酯 (long-chain triglycerides)；羧酸酯酶 (carboxylesterase) 則可合成及水解 C_{10} 以下之短鏈三酸甘油酯 (Verger, 1997)。由於微生物酵素具有較廣泛的受質專一性與在有機溶劑中之穩定性，微生物來源之解脂酶被廣泛用於工業生物技術，如精細化學品與藥物生產 (Straathof *et al.*, 2002) 及食品工業 (Raveendran *et al.*, 2018)。

廢水處理廠藉由微生物處理移除廢水中大部分的有機物，具有高酵素活性 (enzymatic activities) (Molina-Muñoz *et al.*, 2010)。臺灣地區養豬廢水大多以三段式廢水處理系統進行降解，分別為固液分離 (solid-liquid separation)、厭氧消化 (anaerobic digestion) 及好氧消化 (aerobic digestion)，其中好氧活性污泥能夠快速降解大量有機物，藉由微生物酵素活性作用降低放流水之化學需氧量 (chemical oxygen demand, COD) 及生物需氧量 (biological oxygen demand, BOD)，因此活性污泥中的微生物是相當值得探索的生物資源寶庫，但研究估計活性污泥中 85 – 99% 之微生物無法或難以進行培養 (Amann *et al.*, 1995)。因此直接利用生物技術進行微生物的基因選殖、重組與純化蛋白是個可行的方向。

近年來生物技術之發展，使用多源基因庫 (metagenomics libraries) 技術可大量篩選基因庫 (gene pool) 中之新穎基因片段及了解相關資訊，不受限於可培養之微生物 (Uchiyama *et al.*, 2009)。在先前的研究中，直接自活性污泥樣本中萃取 DNA，將平均約 5.1 kb 之基因片段插入於質體系統，並轉形於宿主細胞大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之中，以形成基因庫。在約 3,818 個株系 (clones) 中，顯示 12 個株系具有三丁酸甘油酯 (tributyrin) 分解活性，透過 DNA 定

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2692 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(4) 通訊作者，E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw。

序與序列分析則發現了 16 個預測為解脂基因的開放閱讀框 (open reading frames, ORFs)。由其胺基酸序列與現有蛋白質資料庫比對結果相同度為低到中等 (28 – 55%)。其中 Lipo3 以系統發生學分析 (phylogenetic analysis) 顯示其為解脂酶第五家族 (family V) (Liaw *et al.*, 2010)。第五家族解脂酶可在許多中溫 (mesophilic)、嗜溫 (psychrophilic)、嗜熱 (thermophilic) 及鹽耐受 (salt tolerance) 細菌 (Arpigny and Jaeger, 1999) 中找到，具有多樣的受質專一性及特性，而這些細菌源自於反芻動物瘤胃 (Privé *et al.*, 2013)、土壤 (Chen *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; Istvan *et al.*, 2018)、釀酒發酵 (Sumby *et al.*, 2013) 及深海沉澱物 (Peng *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018)。因此，本研究針對 Lipo3 ORF 進行次選殖，並將此基因命名為 *est03*，進行表現、純化及特性分析，以瞭解此新穎酯酶的相關生化性質，並期可應用於相關產業。

材料與方法

I. *est03* 酯酶基因表現載體建構

依據先前從活性污泥建構多源基因庫篩得具解脂活性的株系 ASL03 (Liaw *et al.*, 2010)，進行標的 Lipo3 ORF 之次選殖，並命名此基因為 *est03*。設計引子對 Est03F7：5'-CCAAGCTTTGATGGATATTTTTTCGAATGA-3' 與 Est03R7：5'-CCCTCGAGTTAAACTAAAAATTCCATGGTC-3'，粗斜體分別為限制酶 *Hind*III 與 *Xho*I 辨識與分切序列。PCR 組成分總體積為 50 μ L，含 *miliQ* 水 40.5 μ L、10 \times *PfuUltra* II reaction buffer (Stratagene, USA) 5.0 μ L、dNTP mix (25 mM each dNTP, TaKaRa, Japan) 0.5 μ L、模板 DNA (pASL03、100 ng/ μ L) 1.0 μ L、Est03F7 (10 μ M) 1.0 μ L、Est03R7 (10 μ M) 1.0 μ L、*PfuUltra* II fusion HS DNA polymerase (Stratagene, USA) 1.0 μ L。PCR 條件為預變性 94 $^{\circ}$ C、5 min；循環增幅 35 次循環：變性 95 $^{\circ}$ C、30 s，黏合 58 $^{\circ}$ C、30 s，延長 72 $^{\circ}$ C、15 s，後延長 72 $^{\circ}$ C、10 min。PCR 反應增幅標的基因片段純化後，經限制酶 *Hind*III 與 *Xho*I 作用，再接合於經 *Hind*III 與 *Xho*I 處理之表現載體上 (pPAL7, BioRad, USA)，轉形於宿主細胞 *Escherichia coli* DH5 α (ECOSTM X, Yeastern Biotech Co., Ltd., Taiwan)。隨機挑選轉形株 (transformant) 於 LB 培養液 (Luria-Bertani (LB) broth, Difco, USA)，35 $^{\circ}$ C、150 rpm 過夜培養後，利用萃取試劑組 (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, Germany) 所提供之操作方法，進行質體 DNA 分離純化，利用 Sanger 定序法，以 DNA 定序儀 (ABI 3730 DNA Sequencer, Applied Biosystems, USA) 定序，再以軟體 Vector NTI Advance 11.5.0 (Invitrogen, USA) 處理與比對序列，以確認構築重組質體插入片段序列正確性。

II. Est03 酯酶分子分析

利用軟體 Vector NTI Advance 11.5.0 (Invitrogen, USA) 進行 Est03 酯酶分子分析，包 pI 值、分子量、胺基酸組成等，並利用 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站之程式 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)，進行 Est03 胺基酸序列與現有資料庫比對分析，以找出相近的蛋白質或酵素。

III. Est03 酯酶表現與純化

將經定序確認所構築之序列正確的重組質體 pPAL7-*est03* 轉形於表現宿主細胞 *E. coli* BL21 (DE3) (ECOSTM 21 (DE3), Yeastern Biotech Co., Ltd., Taiwan) 中，用以大量表現酯酶 Est03。挑選轉形株單一菌落於 3 mL 含有 50 μ g/mL 安比西林 (ampicillin, Amresco, USA) LB 液態培養基中，35 $^{\circ}$ C、150 rpm 振盪培養過夜。翌日接種預培養液 (1%，v/v) 於 100 mL LB 液態培養基中，35 $^{\circ}$ C、150 rpm 振盪培養。當菌液濃度 OD_{600 nm} 值達約 0.6 時，加入 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.25 mM) 誘導酯酶基因表現，並設定培養條件 18 $^{\circ}$ C、150 rpm，振盪培養 24 h。培養終止後，以離心機 (himac CR-30NX, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Japan) 設定 5,000 \times g、15 min、4 $^{\circ}$ C 離心條件以收集菌體，並保存在 -80 $^{\circ}$ C 冷凍櫃中。

取出凍存之菌體，並以親和性蛋白質純化套組 (Profinity eXact Expression and Purification Starter Kit, Bio-Rad, USA) 進行純化。操作流程簡述如下，以 5 mL 分解萃取試劑 (BugBuster[®] Protein Extraction Reagent, Merck, USA) 回溶冷凍菌株，於室溫下搖晃作用 10 min，並以 10,000 \times g、4 $^{\circ}$ C 離心 30 min，取上清液並保存於 4 $^{\circ}$ C。吸取上清液注入管柱，溫和地將上清液與親和性樹脂 (Profinity eXactTM Purification Resin, Bio-Rad, USA) 充分混合，並於 4 $^{\circ}$ C 搖晃培養 20 min，以 1,000 \times g 離心 30 s，將流出液 (flowthrough) 留存於 4 $^{\circ}$ C。以緩衝清洗溶液 (100 mM sodium phosphate, pH 7.2) 均勻混合後離心，取得清洗液，重複此步驟，同樣留存第二次清洗液。加入溶析緩衝液 (elution buffer) 並與樹脂溫和混合，在室溫下搖晃作用至少 30 min，最後離心得到含標的酯酶 Est03 之溶析液。

IV. Est03 酯酶濃縮

使用離心過濾濃縮裝置 (Amicon® Ultra-15, Millipore, Ireland)，設定離心機 (himac CR-30NX, Eppendorf Himac Technologies Co., Ltd., Japan) 腔室溫度為 4°C，以 $5,000 \times g$ 離心 40 min，逐次置換緩衝液，將純化蛋白質之緩衝溶液由 100 mM sodium phosphate 置換為 50 mM pH 8.0 Tris-buffer，置換率為 99.97%，溶液濃縮倍率為 7 倍。

V. 蛋白質濃度測定與 SDS-PAGE 分析

蛋白質純化套組進行純化後，分別收集分解物、流出液、清洗液、第二次清洗液、溶析液及置換緩衝液濃縮溶析樣品 (concentrated elution sample)，於立式微型凝膠儀 (vertical mini-gel apparatus, Bio-Rad, Canada) 以 4 – 12% 之十二烷基硫酸鈉聚丙烯酰胺凝膠電泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 確認蛋白質質量。在本次實驗中使用分子量標記 (Bio-Rad, Canada) 與樣品染色緩衝液 (Bio-Rad, Canada)。純化蛋白質濃度由檢驗套組 (Qubit® protein assay kit, Life Technologies, USA) 藉由螢光儀 (Qubit® Fluorometer, Life Technologies, USA) 進行定量。

VI. 受質專一性分析

以不同碳數之受質包括對硝基苯乙酸酯 (p-nitrophenyl acetate, C2 受質)、對硝基苯丙酸酯 (p-nitrophenyl propionate, C3 受質)、對硝基苯丁酸酯 (p-nitrophenyl butyrate, C4 受質)、對硝基苯戊酸酯 (p-nitrophenyl valerate, C5 受質) 及對硝基苯辛酸酯 (p-nitrophenyl caprylate, C8 受質) 酯酶之受質專一性分析。將受質溶於乙腈 (acetonitrile) 中，使其最終濃度為 50 mM。以 40°C 處理 5 min，測量其吸光值 (412 nm)。在不同測試條件下，每次試驗皆同時測定空白組，從結果中減去受質非專一性之水解值。酯酶對於對硝酸苯酚酯類 (p-nitrophenyl esters, pNPL) 基質之活性測定，藉由測定酯酶催化水解釋放之對硝基苯基 (p-nitrophenyl, pNP) 之量來確定活性。簡而言之，以 2 μ L 受質加入適量酯酶之緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中，使最終體積為 150 μ L，以水浴定溫反應 5 min，並以分光光度法 (412 nm) 測定。以不同濃度之對硝基苯酚 (4-nitrophenol) 之分光吸光值繪製檢量線，活性單位 (U) 定義為在測定條件下每 min 釋放 1 μ mol 的 pNP。

VII. 酵素動力學分析

Est03 的酵素動力學分析，係在 45°C 於緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中以 100 – 400 μ M 濃度的對硝基苯乙酸酯 (C2) 為受質進行反應。依據 Michaelis-Menten 方程式，以 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法，分別將受質濃度與反應速率倒數以求出酵素最大反應速率 (V_{max})、代表酵素與受質親和力之米氏常數 (K_m) 及轉換率 (k_{cat}) 等參數。

VIII. 溫度及 pH 對於 Est03 活性之影響

為了解 Est03 活性之最適溫度，將解脂酶置於緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中，以對硝基苯乙酸酯作為受質 (1 μ M)，分別於 25 – 55°C 作用 5 min。pH 對於 Est03 酵素活性的影響試驗如下：受質分別在不同酸鹼值之緩衝溶液 100 mM sodium citrate buffer (pH 5.0)、100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0、7.0、8.0)、100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0、9.0)、100 mM Glycine-HCl (pH 10.0) 中，於 40°C 下各作用 5 min，以波長 348 nm (此波長吸光值與對硝基苯氧及對硝基苯酚之酸鹼值表現無關) 測定其吸光值並推算相對活性。

IX. 金屬離子、有機溶劑與介面活性劑對於 Est03 活性之影響

pNP 釋放試驗被用於檢視金屬離子、有機溶劑與介面活性劑對於解脂酶活性之影響，化學物質被溶入緩衝溶液 (50 mM Tris-buffer, pH 8.0) 中至特定濃度，分別為 1 mM 之金屬離子、1% (v/v 或 w/v) 之介面活性劑及 10% 及 20% (v/v) 有機溶劑。受質於 40°C 下作用 5 min，再依據材料方法 VI. 之方法測定 Est03 活性，以未添加上述化學物質之水解條件為對照組 (活性 100%)。

X. 統計分析

各處理組間以單因子變異數分析 (One-way analysis of variance, ANOVA) 及 Tukey's Test 進行顯著性分析。結果以平均值 \pm 標準差 (Standard Deviation, SD) 表示， $P < 0.05$ 視為具顯著性差異。分析軟體為 Prism6, Graphpad Software, San Diego, (<http://www.graphpad.com>)。

結果與討論

I. *est03* 基因次選殖與分子分析

先前研究，從活性污泥篩選而得具解脂活性的株系 ASL03 與其重組質體 pASL03，經由 DNA 與胺基酸序列分析得知含有一個稱為 Lipo3 的 ORF，具有分解三丁酸甘油酯的活性。經選殖試驗，已成功將此 Lipo3 次

選殖於表現載體 (pPAL7) 上，並重新命名為 *est03* 基因。此基因長 762 bp，可轉譯為含 253 個胺基酸的酯酶 Est03，蛋白質分子大小約為 28.8 kDa，pI 為 5.87。由 Est03 胺基酸序列與 NCBI 資料庫比對結果，比對分數前三高的蛋白質分別為源自 freshwater metagenome 中 *Bacteroidia bacterium* 的 α/β 水解酶 (accession number: MBL0912272.1)，比對分數 331，期望值 $2e-111$ ，相同度為 58.33%；次高者為 *Flavobacterium* sp. FPG59 的 α/β 水解酶 (accession number: WP_086452924.1)，比對分數 273，期望值 $9e-89$ ，相同度為 49.40%；第三高者為 *Flavobacterium sediminis* 的 α/β 水解酶 (accession number: WP_109569374.1)，比對分數 270，期望值 $2e-87$ ，相同度為 49.80%，然三者皆為序列推估而來的酵素，並未經過特性分析。

II. Est03 酯酶純化

藉由親和性純化套組，可將酵素蛋白質自菌體蛋白中分離與純化，重組標的酵素蛋白 rEst03 (recombinant Est03) 藉由其胺基端長 75 個胺基酸的親和性標籤 (profinitiy eXact tag) 吸附於純化樹脂，其他雜蛋白則透過洗脫步驟而與標的蛋白質分離，待將雜質洗淨後施以溶析液進行截切作用後，使 Est03 被切除親和性標籤而成為原始態 Est03。由 SDS-PAGE Lane 1 與 Lane 2 (圖 1) 比較可見，具親和性標籤之 rEst03 與分子量約為 36 kDa，Lanes 2 的重組標的酵素蛋白 rEst03 大於 lane 6 的 Est03，符合估算之 Est03 分子質量 (約為 28 kDa)，並與先前研究預測解脂酶第五家族之分子質量平均為 30 kDa 之特徵相符 (Hausmann *et al.*, 2010)。藉由離心過濾濃縮裝置，可置換緩衝溶液，減少後續實驗中之干擾，並且提高蛋白質酵素濃度。由螢光檢驗套組檢驗蛋白質濃度得知濃縮前為 51.2 $\mu\text{g/mL}$ ，濃縮後濃度為 120 $\mu\text{g/mL}$ 。

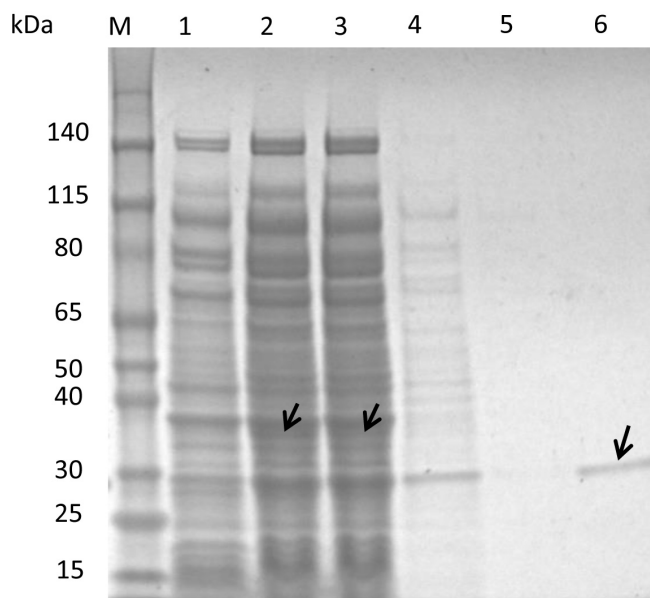


圖 1. 以 SDS-PAGE 分析之 Est03 純化情形。

變性樣品在梯度 4 - 12% 膠片上進行電泳分析。Lane M 為蛋白質大小標記，Lane 1 為無轉形之 pPAL7 表現載體總溶解細胞蛋白質，Lane 2 為總溶解細胞蛋白質，Lane 3 為流出液，Lanes 4 - 5 為清洗液，Lane 6 為去標籤之 Est03 溶析液。黑色箭頭所指分別為帶有純化標籤與切除純化標籤的 Est03。

Fig. 1. The Est03 purification was profiled with SDS-PAGE.

Samples were run on a gradient (4 - 12%) gel under denaturing conditions. Lane M, protein molecular mass ladder; lane 1, total soluble cell protein of cells only transforming expression vector pPAL7; lane 2, total soluble cell protein of cells with regenerating EST03; lane 3, flowthrough; lanes 4 - 5, washed fractions; lane 6, elution of tag-free Est03; lane 6, purified and concentrated Est03 in 50 mM Tris/HCl buffer (pH 8). The arrows indicate the Profinitiy eXact tagged Est03 and tag-free Est03, respectively.

III. 受質專一性與酵素動力學分析

Est03 的酵素活性分析顯示其水解受質活性僅限為對硝基苯乙酸酯、對硝基苯丙酸酯、對硝基苯丁酸酯、對硝基苯戊酸酯及對硝基苯辛酸酯等 C2 - C8 對硝酸苯酚酯類 (圖 2)，證實其為酯酶 (esterase)。其中，Est03 對於 C2 之對硝基苯乙酸酯具有高度專一性，比活性為 12.15 unit/mg，最高催化速率 (V_{\max}) 為 $6.44 \times 10^{-1} \mu\text{Ms}^{-1}$ 、最佳親和力濃度 (K_m) 為 98.17 μM 、 k_{cat} 為 $1.55 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$ ， k_{cat}/K_m 為 $1.58 \times 10^{-3} \text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ 對 C2 水解活性顯著地高於其他短鏈之對硝基苯酯受質。此特性與酵素蛋白 Est8 相似，推測是由於活性位空間相對狹小，缺乏可延伸的受

質通道，因此對於對硝基苯乙酸酯之活性較高 (Pereira *et al.*, 2017)。

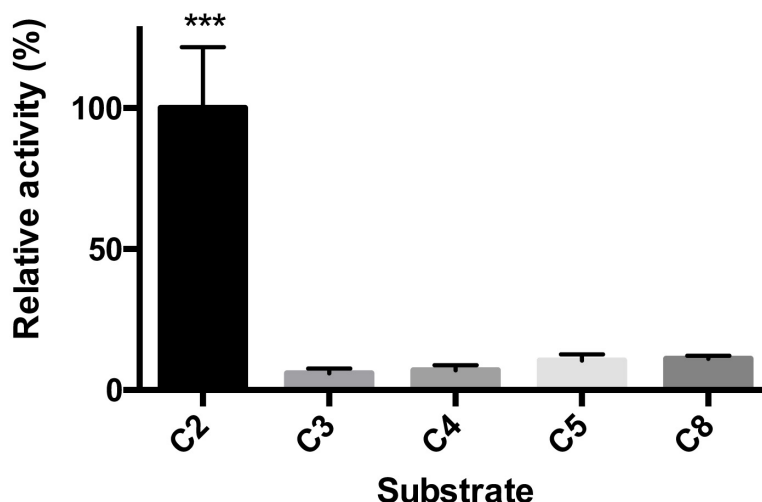


圖 2. 酯酶 Est03 受質專一性分析結果。

Est03 與 C2 受質對硝基苯乙酸酯反應之相對活性定為 100%。*** Est03 對 C2 受質活性顯著 ($P < 0.001$) 高於其他受質試驗組。

Fig. 2. The substrate specificity of the purified esterase Est03.

The relative activity of Est03 in reaction buffer with the substrate p-nitrophenyl acetate, C2 was defined as 100%. *** The C2 substrate specificity of Est03 are statistically significant ($P < 0.001$) higher than other substrates in the experiment.

IV. 溫度與 pH 對於酵素活性影響

基於受質專一性試驗結果，以對硝基苯乙酸酯作為受質做進一步的酵素特性分析。藉由檢測 20 – 55°C 時 Est03 酵素水解硝基苯乙酸酯程度，了解溫度對 Est03 酵素活性之影響，並以酵素活性最高的 45°C 值為 100%。結果顯示 Est03 為一種中溫酶，在 45°C 時具有最佳活性，但在 20°C 時相對活性高於 49%，在 50°C 時相對活性仍有 84%，此後其活性才急速下降 (圖 3)。其溫和的熱穩定性可能是由於 Est03 是為單體蛋白，並且在催化域中的離子對並不會相互作用 (Manco *et al.*, 2001)。此種溫度耐受範圍大的特性，使之更適合做為產業應用。

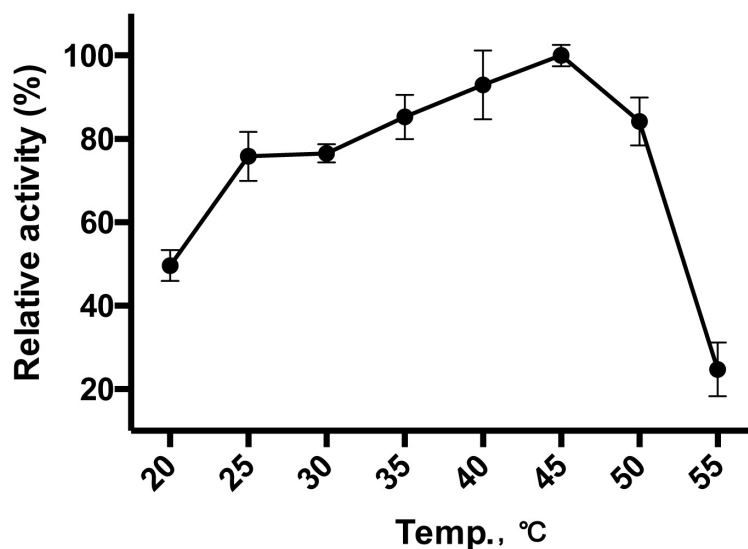


圖 3. 溫度對酯酶 Est03 活性之影響。

在不同溫度與在 pH 8.0 環境下，以不同溫度測定 Est03 之酵素活性，並以 45°C 測得之酵素活性定為相對 100%。誤差棒表示為標準差。

Fig. 3. The effect of temperature on the activity of esterase Est03.

Enzyme activity was measured at various temperatures at pH 8.0 under standard assay conditions. The relative activity obtained at 45°C was taken as 100%. Error bars indicate standard deviations.

許多研究顯示，源自於多源基因體的酯酶在 pH 8.0 – 9.0 間的緩衝液中有較佳的活性表現 (Peng *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2015)。此外，大部分第五家族酯酶在 pH 8.0 – 9.5 間具有最高的活性，而少數具有極端的鹼穩定性 (pH 10.0 – 12.0) (Yang *et al.*, 2018)。Est03 在不同酸鹼值的誤差範圍較大，酸鹼度對其影響較為和緩，不同緩衝溶液也會對其活性造成些許影響，如 pH 8.0 下 sodium phosphate buffer 與 Tris-HCl buffer 影響酵素活性百分比並未重疊，但也未有顯著差異。Est03 在 pH 6.5 至 pH 9.0 間有大於 50% 之相對活性，但於 pH 10.0 則無偵測到酵素活性。結果顯示 pH 8.0 (Tris-HCl buffer) 的 Est03 活性優於在其他 pH 值。

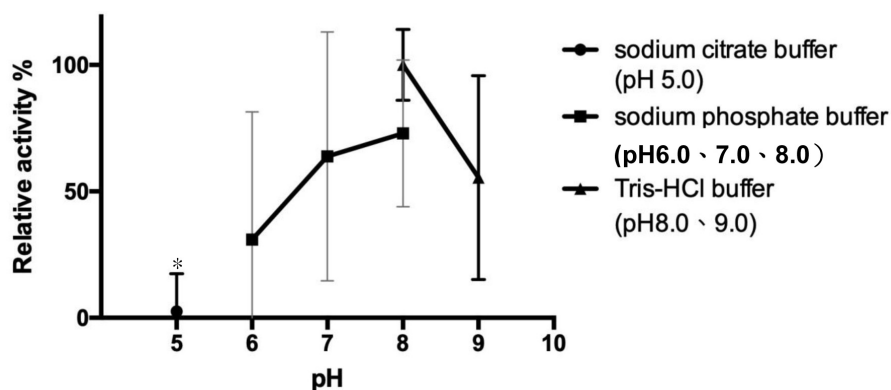


圖 4. pH 值對酯酶 Est03 活性之影響。

Est03 在不同 pH 緩衝液之酵素活性，以測定 348 nm 之吸光值呈現，並將在 Tris-HCl buffer pH 8.0 的作用條件測得之酵素活性定為 100%。誤差棒表示為標準差。* 於 pH 5.0 下之活性顯著 ($P < 0.05$) 小於對照組 (Tris-HCL buffer pH 8.0)。

Fig. 4. The effect of pH on the activity of esterase Est03.

The enzyme activity was measured at absorbance 348 nm in various pH buffers. The value obtained at Tris-HCl pH 8.0 buffer was taken as 100%. Error bars indicate standard deviations. * pH 5.0 are statistically significant ($P < 0.05$) difference from control (Tris-HCL buffer pH 8.0).

V. 金屬離子、介面活性劑及有機溶劑之影響

許多利用生物技術來製造產物之製程中反應介質會存有離子，因而使酵素活性受到影響 (Bofill *et al.*, 2010)。因此，本試驗評估 Est03 在濃度 1 mM 之不同金屬離子存在時的活性 (表 1)。在 K^+ 存在的狀況下，Est03 之活性與對照組相比，並沒有顯著的差別，此外，在 Ni^{2+} 存在下，相對活性則可升高 14%，不似其他第五家族解脂酶活性被 Ni^{2+} 抑制 (Peng *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Istvan *et al.*, 2018)。相反的，Est03 在 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 存在的情況下，酵素活性略微降低，分別被抑制 9% 及 11%。

表 1. 不同化合物與介面活性劑對 Est03 相對酵素活性的影響

Table 1. The effect of various compounds on the stability of Est03

Compound	Relative activity [§] (%)
Cation (1 mM)	
CaCl ₂	91.36 ± 0.09
MgCl ₂	89.02 ± 0.03
KCl	102.80 ± 0.06
NiSO ₄	114.25 ± 0.12
Surfactant (1%)	
Tween 20	167.76 ± 0.10
Tween 40	62.51 ± 0.08
Tween 80	107.69 ± 1.04
Triton X-100	82.42 ± 0.39
SDS	-

[§] The relative activity of Est03 in reaction buffer without any cation or surfactant was defined as 100%. All values are statistically significant difference from control ($P < 0.001$).

- Not detectable.

介面活性劑如 Tween-20 常被用作乳化劑以增強受質之乳化性，增加受質之加工彈性。在 1% (v/v 或 w/v) 之濃度下，觀測到介面活性劑 Tween-40 對於酵素活性有抑制效果，剩 62.51%；SDS 使之失去活性；然而在 Tween-20 存在下，反而會增進酵素活性達 67.76%，其他第五家族解脂酶則不受影響 (Zhang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018) 或是受到抑制 (Chen *et al.*, 2013; Istvan *et al.*, 2018)。整體而言，Est03 之活性顯著受介面活性劑促進或是抑制。

在特定製程中，酵素常需要在有機溶劑中作用，然而在有機質中的酵素活性與其本身特質具有高度相關 (Krieger *et al.*, 2004)。酵素為蛋白質組成，存於 10 – 20% 有機溶劑之溶液時易喪失活性 (Verger *et al.*, 1997)，因此非常少見酵素活性在有機溶劑中具增強效果 (Kamal *et al.*, 2013)。因此，本實驗中使用不同種類 10 及 20% (v/v) 有機溶液作為共同溶劑以測定其活性。Est03 之活性在 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) (129.3%)、20% DMSO (145.51%) 皆增強，其他第五家族酵素之活性在 DMSO 中不變 (Zhang *et al.*, 2017)，或有增強及減弱者 (Tchigvintsev *et al.*, 2015)。在 10% 乙醇 (81.05%) 及 20% 乙醇 (58.35%) 下抑制酵素活性。10% 異丙醇 (19.83%) 及 10% 丙酮 (35.97%) 使酵素活性大幅下降，而在 20% 丙酮 (5.74%) 存在下，酵素喪失超過 90% 活性，20% 異丙酮則使酵素失活。

表 2. 有機溶劑對酯酶 Est03 穩定度之影響

Table 2. The effect of organic solvents on the stability of esterase Est03

Solvent	Relative activity [§] (%)	
	10	20
Ethanol	81.05 ± 0.18	58.35 ± 0.15
Isopropanol	19.83 ± 0.09	-
Acetone	35.97 ± 0.08	5.74 ± 0.05
DMSO	129.30 ± 0.18	145.51 ± 0.12

[§] The relative activity of Est03 in reaction buffer without organic solvent was defined as 100%.

All values are statistically significant difference from control (P < 0.001).

- Not detectable.

結 論

本研究結果顯示，來自養豬廢水處理活性污泥之多源基因庫的新穎酯酶 Est03，在較寬的溫度範圍、中性至微鹼性、有機溶劑及介面活性劑環境下，皆有一定的活性表現，且特別對極短碳鏈脂肪酸 (C2) 具有最高的活性，因此，未來可利用此種特性而應用於乳酪或生質柴油產業。

參考文獻

- Arpigny, J. L. and K. E. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* 343: 177-183.
- Amann, R. I., Ludwig W, and Schleifer K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-69.
- Berini, F., C. Casciello, G. L. Marcone, and F. Marinelli. 2017. Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiol. Lett.* 364: 1-19.
- Bofill, C., N. Prim, M. Mormeneo, A. Manresa, F. I. Javier Pastor, and P. Diaz. 2010. Differential behaviour of *Pseudomonas* sp. 42A2 LipC, a lipase showing greater versatility than its counterpart LipA. *Biochimie.* 92: 307-316.
- Brault, G., F. Shareck, Y. Hurtubise, F. Lépine, and N. Doucet. 2014. Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. *PLoS One.* 9: e91872.
- Chen, K., Y. Liu, D. M. Mao, X. M. Liu, S. P. Li, and J. D. Jiang. 2013. An essential esterase (BroH) for the mineralization of bromoxynil octanoate by a natural consortium of *Sphingopyxis* sp. strain OB-3 and *Comamonas* sp. strain 7D-2. *J. Agric. Food Chem.* 61: 11550-11559.
- Culligan, E. P., R. D. Sleator, J. R. Marchesi, and C. Hill. 2014. Metagenomics and novel gene discovery: promise and

- potential for novel therapeutics. *Virulence* 5: 399-412.
- Hausmann, S. and K. E. Jaeger. 2010. Lipolytic Enzymes from Bacteria. In: K. N. Timmis, editor. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 1099-1126.
- Istvan, P., A. A. Souza, A. V. Garay, D. F. K. dosSantos, G. M. deOliveira, R. H. Santana, F. A. C. Lopes, S. M. deFreitas, J. A. R. G. Barbosa, and R. H. Krüger. 2018. Structural and functional characterization of a novel lipolytic enzyme from a Brazilian Cerrado soil metagenomic library. *Biotechnol. Lett.* 40: 1395-1406.
- Kamal, Z., P. Yedavalli, M. V. Deshmukh, and N. M. Rao. 2013. Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. *Protein Sci.* 22: 904-915.
- Krieger, N., T. Bhatnagar, J. C. Baratti, A. M. Baron, V. M. DeLima, and D. Mitchell. 2004. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 279-286.
- Liaw, R. B., M. P. Cheng, M. C. Wu, and C. Y. Lee. 2010. Use of metagenomic approaches to isolate lipolytic genes from activated sludge. *Bioresour. Technol.* 101: 8323-8329.
- Manco, G., L. Mandrich, and M. Rossi. 2001. Residues at the active site of the Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* involved in substrate specificity and catalytic activity at high temperature. *J. Biol. Chem.* 276: 37482-37490.
- Molina-Muñoz, M., J. M. Poyatos, B. Rodelas, C. Pozo, M. Manzanera, E. Hontoria, and J. Gonzalez-Lopez. 2010. Microbial enzymatic activities in a pilot-scale MBR experimental plant under different working conditions. *Bioresour. Technol.* 101: 696-04.
- Privé, F., N. N. Kaderbhai, S. Girdwood, H. J. Worgan, E. Pinloche, N. D. Scollan, S. A. Huws, and C. J. Newbold. 2013. Identification and characterization of three novel lipases belonging to families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST. *PLoS One.* 8.
- Peng, Q., X. Zhang, M. Shang, X. Wang, G. Wang, B. Li, G. Guan, Y. Li, and Y. Wang. 2011. A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. *Microb. Cell Fact.* 10: 1-11.
- Pereira, M. R., G. F. Mercaldi, T. C. Maester, A. Balan, and E. G. M. Lemos. 2015. Est16, a new esterase isolated from a metagenomic library of a microbial consortium specializing in diesel oil degradation. *PLoS One.* 10: 1-16.
- Pereira, M. R., T. C. Maester, G. F. Mercaldi, E. G. M. Lemos, M. Hyvönen, and A. Balan. 2017. From a metagenomic source to a high-resolution structure of a novel alkaline esterase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 4935-4949.
- Raveendran, S., B. Parameswaran, S. B. Ummalyma, A. Abraham, A. K. Mathew, A. Madhavan, S. Rebello, and A. Pandey. 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technol. Biotechnol.* 56: 16-30.
- Rodrigues, R. C., J. J. Virgen-Ortiz, J. C. S. Dos Santos, Á. Berenguer-Murcia, A. R. Alcantara, O. Barbosa, C. Ortiz, and R. Fernandez-Lafuente. 2019. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol. Adv.* 37: 746-770.
- Straathof, A. J. J., S. Panke, and A. Schmid. 2002. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 548-556.
- Sumby, K. M., P. R. Grbin, and V. Jiranek. 2013. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine-associated lactic acid bacteria *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J. Appl. Microbiol.* 114: 413-422.
- Tchigvintsev, A., H. Tran, A. Popovic, F. Kovacic, G. Brown, R. Flick, M. Hajighasemi, O. Egorova, J. C. Somody, D. Tchigvintsev, A. Khusnutdinova, T. N. Chernikova, O. V. Golyshina, M. M. Yakimov, A. Savchenko, P. N. Golyshin, K. Jaeger, and A. F. Yakunin. 2015. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 2165-2178.
- Uchiyama, T. and K. Miyazaki. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 616-622.
- Verger, R. 1997. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15: 32-38.
- Yang, X., L. Wu, Y. Xu, C. Ke, F. Hu, X. Xiao, and J. Huang. 2018. Identification and characterization of a novel alkalistable and salt-tolerant esterase from the deep-sea hydrothermal vent of the East Pacific Rise. *Microbiologyopen* 7: 1-10.
- Zhang, Y., J. Hao, Y. Q. Zhang, X. L. Chen, B. B. Xie, M. Shi, B. C. Zhou, Y. Z. Zhang, and P. Y. Li. 2017. Identification and characterization of a novel salt-tolerant esterase from the deep-sea sediment of the South China sea. *Front. Microbiol.* 8: 1-10.

Purification and characterization of a novel esterase Est03 derived from an activated sludge metagenome ⁽¹⁾

Tzu-Hsuan Huang ⁽²⁾ and Ren-Bao Liaw ^{(3) (4)}

Received: May 24, 2021; Accepted: Jan.19, 2022

Abstract

The purpose of this research was to perform sub-cloning, expression, purification, and characterization of the novel esterase gene *est03* selected from the activated sludge metagenome for subsequent research and application. The *est03* gene is 762 bp in length and can be translated into an esterase, namely Est03, which contains 253 amino acids with a molecular mass of about 28.8 kDa. The *est03* gene was sub-cloned on the expression vector pPAL7 and transformed into the expression host *Escherichia coli* BL21 (DE3). After the transformant was induced by IPTG to express a large number of target proteins, the expressed esterase was purified and excised using the purification kit to become a purified enzyme with the same amino acid sequence of the original esterase. It was found that Est03 had a higher preference for short-chain fatty acid substrates, and particularly the two-carbon substrate (C2) activity was significantly higher than others ($P < 0.001$). The temperature test showed that the esterase expressed higher activity between 35 - 50°C, with the optimal temperature of 45°C. The specific activity and k_{cat}/K_m of Est03 was 12.15 unit/mg and $1.58 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$, respectively. Est03 had greater than 50% activity between pH 6.5 and pH 9.0, with the highest activity at pH 8.0. At the same time, Est03 was active in common types and concentrations of organic solvents, metal ions, and surfactants. In summary, Est03 has noteworthy biochemical properties and the potential for development in the applications of the biotechnology industry

Key words: Activated sludge metagenome, Novel esterase, Characterization.

(1) Contribution No. 2692 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: liawrb@mail.tlri.gov.tw.

養牛廢水施灌盤固拉草地對土壤性狀及地下水水質之影響⁽¹⁾

黃雅玲⁽²⁾ 劉主欣⁽³⁾ 蘇天明⁽²⁾ 蕭庭訓⁽²⁾ 李欣蓉⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：110 年 6 月 28 日；接受日期：111 年 1 月 13 日

摘 要

畜牧廢水經處理後仍含有植物所需的部分營養分，可供作物肥分來源，但其成分中所含的銅、鋅與氮，未被植物吸收的部分可能造成土壤及地下水污染。因此，本試驗旨在探討經厭氧發酵處理後之養牛廢水施灌於盤固拉草地，對土壤及地下水水質之影響。試驗於 2015 至 2017 年間進行，將養牛廢水施灌於 34.88 公頃的盤固拉草地，依地形地貌分為 A10、A13 與 A14 等三區，每月以槽車載運輸流施灌其中一區，因此各區每 3 個月施灌 1 次，施灌量依照盤固拉草氮需求量及養牛廢水總氮濃度計算。期間每月分析養牛廢水成分並採集各區土壤及上游井與下游井的地下水，分析成分 1 次，並以 2014 年的土壤及地下水成分作為背景值，以了解各項成分之消長情形。結果顯示，試驗三年期間養牛廢水平均總氮濃度 721 mg/L，A10、A13 與 A14 區土壤的導電度 (electrical conductivity, EC) 分別為 135、117 及 206 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (背景值分別為 152、171 及 192 $\mu\text{S}/\text{cm}$)，全銅含量分別為 6.86、5.92 及 8.25 mg/kg (背景值分別為 6.16、5.59 及 5.11 mg/kg)，全鋅含量則分別為 38.1、25.4 及 38.8 mg/kg (背景值分別為 25.0、24.0 及 21.9 mg/kg)。下游井地下水的氨氮 (NH_4^+-N) 及硝酸鹽氮 (NO_3^--N) 濃度分別為 0.61 mg/L (背景值為 0.68 mg/L) 與 0.12 mg/L (背景值為 0.14 mg/L)，試驗期間土壤性狀及地下水各項成分與背景值有些變化，但皆在高限範圍內。綜上，經過 3 年監測結果，盤固拉草地經施灌本試驗經厭氧發酵處理後之養牛廢水，其土壤性狀及地下水水質成分皆與背景值無明顯差異，惟隨著施灌期間的延長是否會造成影響，將持續進行監測評估。

關鍵詞：厭氧發酵、養牛廢水、土壤、地下水。

緒 言

近年來，行政院農業委員會 (簡稱農委會) 與行政院環境保護署 (簡稱環保署) 已針對畜牧廢水資源化再利用相繼訂定法源，也據以積極推動畜牧廢水回歸農田等相關政策。畜牧廢水施灌作物有諸多的優點，例如：廢水中含氮、磷、鉀等植物生長所需要的營養素，可用以替代部分化學肥料 (盧及許，2009)，降低作物生產成本 (Kriska *et al.*, 2018)，另廢水中所含的有機質亦為維持土壤生產力及肥力必需的營養分 (Rusan *et al.*, 2007)。相較於一般灌溉水，以畜牧廢水施灌農地不僅可降低土壤總體密度，亦可改善土壤性質，提升土壤之保水性、氫離子濃度 (pH 值)、EC 值、有機碳、總氮、有效磷以及交換性陽離子等 (Biswas *et al.*, 2017)。

然應用畜牧廢水資源化再利用時，如未經妥善處理及管理可能對環境產生潛在的污染風險，例如在施灌過程可能會導致土壤重金屬與鹽分累積，過度施用亦可能進一步使廢水中的營養素逕流至地表水及地下水，衍生土壤及 (或) 地下水污染之疑慮 (Kriska *et al.*, 2018)。畜牧廢水施用於砂質土尤需注意，因砂質土質地較粗、保水性較差、表面積較低及土壤吸附陽離子的能力較差 (Hamarashid *et al.*, 2010)。Fried *et al.* (1976) 評估長期施用氮肥於作物對地下水遭受氮污染之影響指出，施用於土壤的氮若能充分被作物所吸收，即提升作物對氮的利用效率，則可降低地下水遭受污染之風險。在公共衛生方面，廢水中可能含有寄生蟲、病毒及細菌等病原，若未經處理直接施灌於作物，亦可能影響作物健康 (Navarro *et al.*, 2015)。厭氧處理是最有效的豬糞尿處理方法之一，包括病原體的減少等 (Hu *et al.*, 2021)。用於施灌農作之廢水必須經過適當的處理，除轉化成可利用的養分外 (盧及許，2009)，若可降低作物受

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2693 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所經營組。

(3) 南投縣政府農業處。

(4) 通訊作者，E-mail: hjlee@mail.tlri.gov.tw。

病原污染之機率，才可更安全的使用而降低對環境之污染 (Yamrot *et al.*, 2015)。

國內有關畜牧廢水施用於農地之相關研究，大部分都針對廢水施用於農地對作物生長之評估，至於關注長期施灌對土壤及地下水之影響尚不多。隨著地球暖化、氣候變遷所造成的降雨量不均現象日趨嚴重，灌溉水源日益短缺，畜牧廢水除可提供作物肥分外，經評估後或許亦可供為長期的灌溉水源。為了配合政府循環農業的還肥於田政策，本試驗將長期施灌經厭氧發酵後的養牛廢水於牧草地，定期分析施灌地的土壤及地下水水質，針對土壤 EC 值、銅與鋅，以及地下水氨氮 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) 及硝酸鹽氮 ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) 的濃度進行監測，建立施灌畜牧廢水對土壤性狀及地下水水質成分的消長情形，階段性提出監測結果，以供施政、法令修正及農民應用之參考依據。

材料與方法

I. 施灌地與施灌方式

- (i) 施灌地位於臺南市新化區畜產試驗所之盤固拉草地，共 34.89 公頃，依地形地貌分為 A10、A13 及 A14 等 3 區 (圖 1)，分別為壤土、壤土及極細砂土，各自面積分別為 13.63、15.11 及 6.15 公頃。經厭氧發酵後之養牛廢水取自畜產試驗所乳牛試驗場，以槽車載運至施灌地，每車次約 5.5 m^3 。盤固拉草氮肥需求量則參考作物施肥手冊 (行政院農業委員會農糧署，2005) 之推薦量 ($320 - 480 \text{ kg/ha/yr}$)，並依據試驗期間養牛廢水的平均總氮濃度換算施灌量。

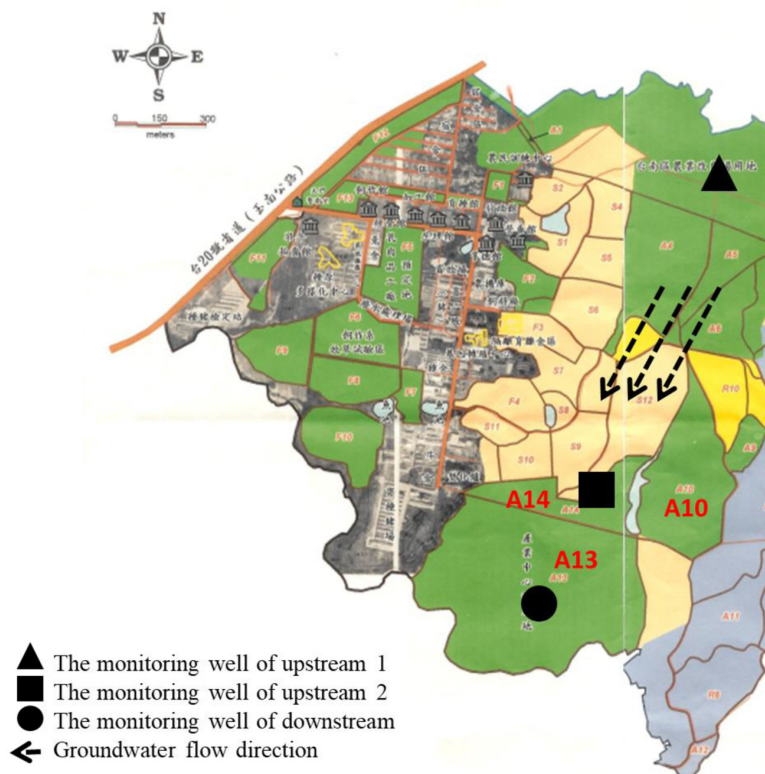


圖 1. 三區 (A10、A13 及 A14) 施灌地及地下水監測井位置圖。(A10、A13 及 A14 等三區面積分別為 13.63、15.11 及 6.15 公頃)。

Fig. 1. The map of three irrigation areas (A10, A13 and A14) and groundwater monitoring wells.

- (ii) 本試驗於 2015 年至 2017 年間進行，並以 2014 年該等試驗區的土壤及地下水質作為背景值。試驗前已依行政院農業委員會 (2013) 農業事業廢棄物再利用管理辦法規定取得個案再利用許可，並依照該辦法規定，試驗期間遇中央氣象局發布大雨、豪雨特報或強風預報，即暫停施用；風雨停息後，俟人員及車輛可於田間作業時，再恢復施灌。

II. 分析項目、頻率及方法

(i) 監測項目與頻率

監測土壤及地下水，每月採樣 1 次。每區逢機選擇 5 - 8 處採樣點，距離表土 0 - 20 cm 進行土壤採

樣並混合。地下水則抽取上游井 1 (upstream 1) [2015 年新增，並以 2015 年枯水期 (2015D) 作為背景值]、上游井 2 (upstream 2) 及下游井 (downstream) 等 3 口監測井 (圖 1)、深度分別為 112、51 及 78 m 處之地下水，並區分枯水期 (dry period, D) 及豐水期 (wet period, W)。養牛廢水則每月採樣分析 1 次。

(ii) 土壤化學性質分析方法

pH 值以 pH meter 測定 pH 值 (土水比 = 1 : 1)；以電導度計測定 EC 值 (土水比 = 1 : 5)；總磷參考陳及鄒 (2008) 方法，以 500°C 灼燒後再以鉬藍法測定；全銅及全鋅參考蘇 (2003) 方法，以濃過氯酸及硫酸消化土壤後測定。

(iii) 養牛廢水及地下水水質分析方法

檢測方法皆依據行政院環境保護署公告之水質檢測方法，pH 值以 NIEA W424.52A (行政院環境保護署環境檢驗所，2008)、EC 值以 NIEA W203.51B 測定 (行政院環境保護署環境檢驗所，2000)、總磷以 NIEA W427.53B 測定 (行政院環境保護署環境檢驗所，2010)、NO₃⁻-N 以 NIEA W419.51A 測定 (行政院環境保護署環境檢驗所，2006)、NH₄⁺-N 以 NIEA W448.51B (行政院環境保護署環境檢驗所，2005)、總氮以 NIEA W423.52C 測定 (行政院環境保護署環境檢驗所，2004)、銅及鋅以 NIEA W306.54A 測定 (行政院環境保護署環境檢驗所，2014)。

III. 統計分析

以 Excel 2016 計算試驗養牛廢水、土壤化學性質及地下水水質之平均值與標準差。利用 SAS 統計分析套裝軟體的一般線性模式程序 (General linear model procedure) 進行變方分析，以鄧肯氏新多變域測定法 (Duncan's New Multiple Range Test)，檢定差異顯著性 (P < 0.05)。

結 果

I. 施灌於盤固拉草之養牛廢水水質及施灌量

試驗期間 (2015 – 2017 年) 養牛廢水每月取樣分析，共分析 36 次，其水質如表 1 所示。試驗期間養牛廢水平均 pH 值為 7.7，總氮為 721 mg/L，其中 2016 年養牛廢水顯著較低，銅濃度平均為 2.35 mg/L，2015 年與 2017 年間有顯著差異，鋅濃度平均為 3.07 mg/L，其中 2017 年顯著較低。本試驗施灌量依盤固拉草氮肥需求量及養牛廢水總氮量計算，2015 至 2017 年試驗期間之施灌量如圖 2 所示，A10 區以 2016 年施灌量最高約 336.9 ton/ha/yr，其次為 2017 年的 225.4 ton/ha/yr，2015 年最低約 153.6 ton/ha/yr；A13 區以 2016 年施灌量最高約 226 ton/ha/yr，其次為 2017 年施灌約 147 ton/ha/yr，而以 2015 年施灌量最低約 100 ton/ha/yr；A14 區以 2015 年施灌量最高約 455 ton/ha/yr，其次為 2017 年施灌約 301 ton/ha/yr，2016 年最低約 173 ton/ha/yr。試驗期間如遇槽車檢修或因天候不佳，中央氣象局發布大雨、豪雨特報或強風預報起則停止施灌。

表 1. 試驗三年期間養牛廢水之水質分析 (n = 12 次 / 年)

Table 1. Characteristics of irrigation water during three-year experimental period (n = 12/year)

Items	2015	2016	2017	Average	SEM
n	12	12	12	36	12
pH	7.5	7.8	7.6	7.7	0.1
EC ¹ , mS/cm	4.72 ^a	3.86 ^b	3.78 ^b	4.1	0.23
----- mg/L -----					
Total-N, mg/L	881 ^a	480 ^b	868 ^a	721	65
NH ₄ ⁺ -N, mg/L	489 ^a	282 ^b	238 ^b	339	63
NO ₃ ⁻ -N, mg/L	146	122	151	141	23
Total-P, mg/L	105	74	126	103	14
Cu, mg/L	3.48 ^a	2.42 ^{ab}	2.19 ^b	2.35	0.40
Zn, mg/L	2.47 ^b	2.34 ^b	3.76 ^a	3.07	0.34

¹ EC: electrical conductivity.

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

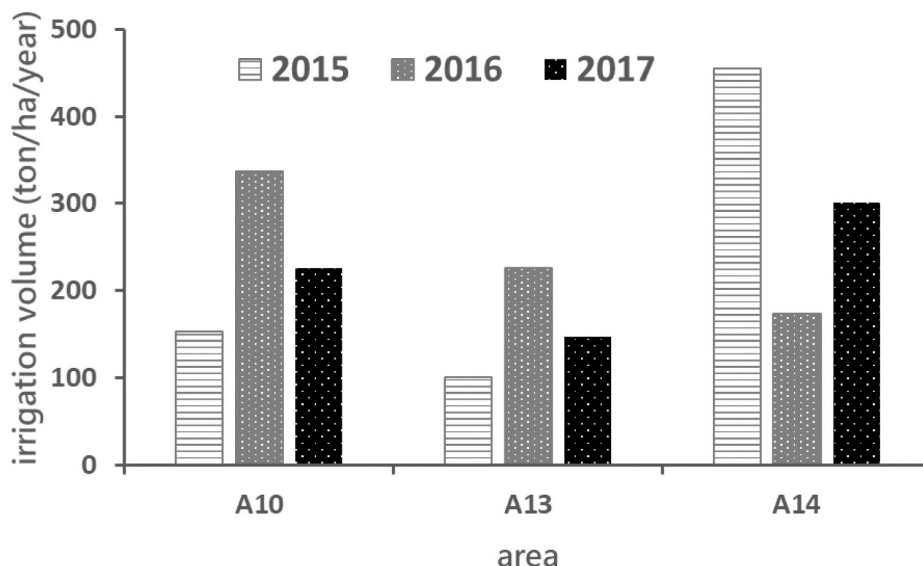


圖 2. 試驗期間 (2015 至 2017 年) 三區 (A10、A13 及 A14) 施灌地之單位面積施灌量。

Fig. 2. Irrigation amount in three irrigation areas (A10, A13 and A14) during the irrigation period (2015 to 2017).

收集試驗期間距試驗區最近的交通部中央氣象局－臺南市虎頭埤觀測站資料，以每年 5 至 10 月為豐水期、11 月至隔年 4 月為枯水期，進行降雨量統計 (圖 3)。豐水期之降雨量明顯高於枯水期，又以 5－9 月份降雨較為集中。試驗期間之年降雨量，以 2016 年最高約 3,059 mm，2015 年與 2017 年降雨量相當，分別為 1,622 mm 及 1,629 mm。

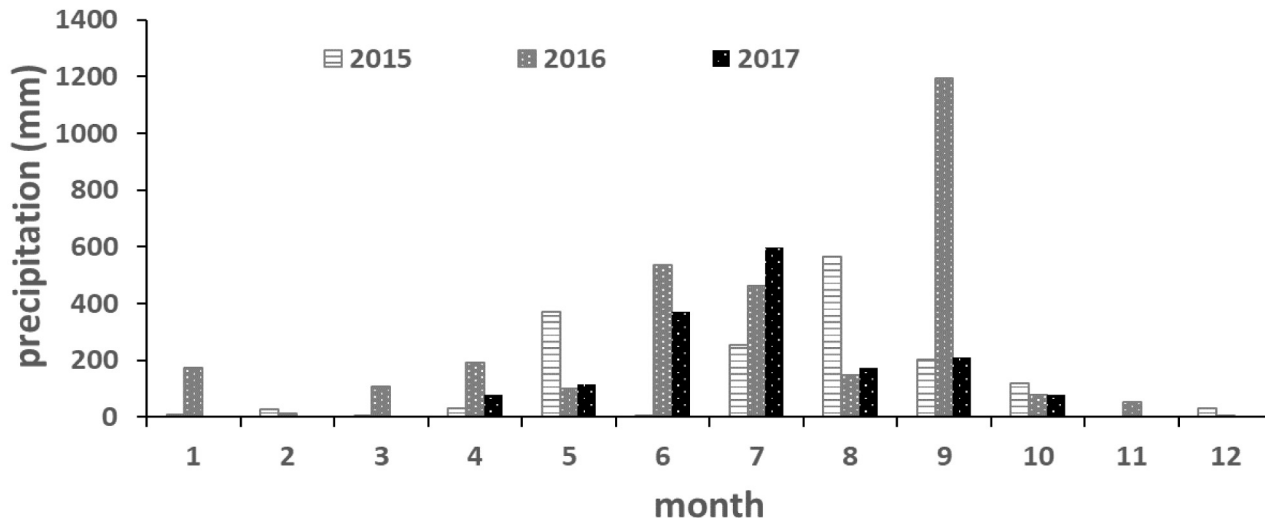


圖 3. 試驗期間 (2015 至 2017 年) 每月降雨量 (資料來源：交通部中央氣象局 - 臺南市虎頭埤觀測站)。

Fig. 3. Monthly rainfall during the irrigation period (2015 to 2017) (Source: Central Weather Bureau, Ministry of Transportation and Communications - Hutoupi Observatory).

II. 施灌對盤固拉草地土壤品質之影響

本試驗係以 2014 年分析結果作為背景值與其後三年之結果進行比較。試驗期間 A10 區土壤 pH 值平均為 5.2，其中 2017 年顯著低於 2014 年之背景值。EC 值與總磷皆無顯著變化，平均分別為 135 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 及 267 mg/kg 。土壤重金屬方面，全銅含量於 2016 年顯著高於 2014 年之背景值，平均為 6.86 mg/kg ，2016 與 2017 年全鋅含量顯著上升 (表 2)。

A13 區試驗期間，土壤 pH 值平均為 5.1，無顯著變化。EC 值平均為 117 $\mu\text{S}/\text{cm}$ ，於 2016 及 2017 年顯著低於背景值。總磷平均為 243 mg/kg ，以 2017 年最低並達顯著差異。土壤重金屬方面，全銅含量於試驗期間無顯著變化，平均為 5.92 mg/kg ；全鋅含量平均約 25.4 mg/kg ，於 2016 及 2017 年顯著高於背景值 (表 3)。

表 2. 養牛廢水對 A10 區盤固拉草地土壤之影響 (n = 12 次 / 年)

Table 2. Effects of irrigation water on the soil of Pangolagrass pasture in the A10 area (n = 12/year)

Items	pH	EC ¹	TP ²	TCu ³	TZn ⁴
		μS/cm	-----	mg/kg	-----
2014 ⁵	5.4 ^a	152	302	6.16 ^b	25.0 ^b
2015	5.4 ^a	133	322	6.38 ^{ab}	27.5 ^b
2016	5.3 ^a	120	304	7.92 ^a	44.0 ^a
2017	5.1 ^b	146	218	6.27 ^{ab}	42.5 ^a
Average ⁶	5.2	135	267	6.86	38.1
SEM	0.1	17	39	0.55	1.1

¹ EC: electrical conductivity; ² TP: total phosphorus; ³ TCu: total copper; ⁴ TZn: total zinc; ⁵ Background value; ⁶ Average: from 2015 to 2017.

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

表 3. 養牛廢水對 A13 區盤固拉草地土壤之影響 (n = 12 次 / 年)

Table 3. Effects of irrigation water on the soil of Pangolagrass pasture in the A13 area (n = 12/year)

Items	pH	EC ¹	TP ²	TCu ³	TZn ⁴
		μS/cm	-----	mg/kg	-----
2014 ⁵	5.2	171 ^a	310 ^a	5.59	24.0 ^a
2015	4.9	160 ^a	321 ^a	5.53	17.1 ^b
2016	5.0	115 ^b	257 ^{ab}	6.99	30.7 ^a
2017	5.1	114 ^b	197 ^b	5.24	29.9 ^a
Average ⁶	5.1	117	243	5.92	25.4
SEM	0.1	10	25	0.69	2.6

¹ EC: electrical conductivity; ² TP: total phosphorus; ³ TCu: total copper; ⁴ TZn: total zinc; ⁵ Background value; ⁶ Average: from 2015 to 2017.

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

A14 區試驗期間，土壤 pH 值平均為 6.6，於 2015 及 2016 年顯著高於背景值，2017 年則下降至與背景值無顯著差異。EC 值平均為 206 μS/cm，於 2015 及 2017 年顯著高於背景值。總磷平均為 344 mg/kg，2016 及 2017 年顯著低於背景值。土壤重金屬方面，全銅含量平均為 8.25 mg/kg，於 2015 及 2016 年顯著高於背景值；全鋅含量平均為 38.8 mg/kg，於 2015 年起皆顯著高於背景值 (表 4)。

表 4. 養牛廢水對 A14 區盤固拉草地土壤之影響 (n = 12 次 / 年)

Table 4. Effects of irrigation water on the soil of Pangolagrass pasture in the A14 area (n = 12/year)

Items	pH	EC ¹	TP ²	TCu ³	TZn ⁴
		μS/cm	-----	mg/kg	-----
2014 ⁵	5.9 ^b	192 ^{ab}	399 ^a	5.11 ^c	21.9 ^d
2015	6.7 ^a	229 ^a	380 ^{ab}	8.33 ^{ab}	32.9 ^c
2016	6.5 ^a	166 ^b	337 ^{bc}	9.85 ^a	48.7 ^a
2017	6.0 ^b	214 ^a	322 ^c	7.11 ^{bc}	41.6 ^b
Average ⁶	6.6	206	344	8.25	38.8
SEM	0.2	16	17	0.61	1.7

¹ EC: electrical conductivity; ² TP: total phosphorus; ³ TCu: total copper; ⁴ TZn: total zinc; ⁵ Background value; ⁶ Average: from 2015 to 2017.

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

III. 施灌對盤固拉草地地下水水質之影響

2015 至 2017 年試驗期間，共設置 3 口地下水監測井進行監測，分別為上游井 1、上游井 2 與下游井，各項測值如表 5 所示。試驗期間之 pH 值，上游 1 監測井平均為 7.4，其中以 2015 W 最高、2017 W 最低，並達顯著差異。上游 2 及下游監測井皆無顯著變化，平均分別為 7.0 及 7.8。EC 值方面，上游 1 監測井於試驗期間無顯著變化，而上游 2 及下游監測井僅 2015 W 顯著高於背景值。氮濃度方面，下游監測井之 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 濃度平均為 0.61 mg/L。NO₃⁻-N 濃度於試驗期間下游監測井皆無顯著變化，平均為 0.12 mg/L。總磷方面，平均為 0.18 mg/L，其中 2016 – 2017 D 顯著高於背景值 (2014 D)。重金屬分析中，下游監測井銅及鋅濃度平均分別為 0.02 mg/L 及 0.02 mg/L，試驗期間皆無顯著變化。

討 論

畜牧廢水經厭氧發酵處理後，水中的氮多以無機氮形態 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$ 及 $\text{NO}_3^-\text{-N}$) 存在，其中又以 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的型態最多 (盧及許，2009)。本試驗廢水 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的平均濃度約 370 mg/L，施用至土壤後，因 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 帶正電，土壤帶負電的關係，部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 被土壤所吸附，部分經硝化作用 (nitrification) 後轉換成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 提供地上作物氮源，部分 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 會揮散損失。然因 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 帶負電，不被土壤所吸附，導致 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 於土壤中比 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 容易移動及淋溶 (賴等，2011)，如在一定時間內給予土壤過多氮，恐導致作物奢侈型吸收外，亦可能增加逕流及深層滲漏機率而污染地下水 (盧及許，2009)。 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 其滲漏程度可能因施肥用量、降雨量、土壤質地、田間操作管理、作物種類及放牧密度等因素而有差異 (Bolan *et al.*, 1991)。本試驗施灌 3 年結果顯示，地下水下游之 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 濃度，尚未顯示隨施灌時間而有顯著上升之趨勢。

長期以廢水施灌可能會改變土壤 pH 值。Schipper *et al.* (1996) 發現長期施灌廢水會提高土壤 pH 值，其可能與廢水中含較高濃度之陽離子如鈉、鈣及鎂離子所致，亦可能與廢水中養分循環 (nutrient cycle) 的改變有關。在施灌廢水下，土壤的脫氮作用 (denitrification) 會加速，而硝酸鹽 (nitrate) 的應用可能較易於被作物吸收 (Bolan *et al.*, 1991)。當植體中硝酸鹽還原成 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 時，會產生氫氧根離子以維持離子平衡，氫氧根離子亦會在脫氮過程中產生 (Bolan *et al.*, 1991)，此兩過程皆會使土壤 pH 值上升。然施用廢水雖導致土壤 pH 值的上升，但若土壤 pH 值仍接近中性，並不會改變土壤的生物功能 (biological functioning) (Schipper *et al.*, 1996)。也有研究發現，施用廢水後的土壤 pH 值有下降趨勢，可能係因有機物的氧化及 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 於硝化過程中產生氫離子所致 (Mohammad and Mazahreh, 2003)。本試驗 A10 區於 2017 年 pH 值顯著下降，A13 區於 2015 年顯著下降，但仍均屬強酸性範圍，而 A14 區則於 2015 年顯著上升，但仍在微酸性範圍。

為了解施灌盤固拉草地之土壤鹽分的累積程度，以測定土壤飽和抽出液的 EC 值表示，土壤 EC 值高者，表示其內可溶性鹽類，如鉀、鈣、鈉、鎂等離子含量高，即土壤鹽分高。Mohammad and Mazahreh (2003) 指出施灌廢水後會使土壤 EC 值增加，土壤 EC 值的增加係因廢水中所含高濃度的總溶解固體物 (total dissolved solids) 所致；Steinich *et al.* (1998) 之研究亦指出 EC 值與土壤鹽分變化有關。本試驗 3 區土壤 EC 值在畜牧廢水施灌期中，雖有部分升高或降低現象，且 3 試驗區之 EC 值皆於 2016 年最低，其變化應與當年度降雨量增加所致。本試驗於施灌期間，土壤尚無鹽分累積之現象。且遠低於行政院農業委員會 (2020) 畜牧糞尿水施灌農作個案再利用許可申請撰寫範例 (簡稱個案再利用許可規範) 之停灌標準 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

施灌地 3 區總磷含量於 2016 年及 2017 年皆有下降之趨勢，推測 2016 年之降低可能是受當年降雨量較高 (3,059 mm) 導致總磷隨著逕流水流失所致，2017 年持續下降除降雨逕流外，亦可能受當年底施灌量及盤固拉草吸收所致。嚴 (1995) 試驗指出，豬糞尿中磷雖為水污染之重要素，然除非隨著表面逕流而流失外，否則其在土壤中相當安定亦不易淋失，致污染地下水之機會不高。盧及許 (2009) 使用經過厭氧發酵豬糞尿廢水施灌於狼尾草地，結果雖施用之豬糞尿水含高濃度之磷，但土壤中磷並未因而顯著增加，且其試驗於旱季施灌廢水後，無法於 1 m 深處採集滲漏液，僅能於大雨後採集，部分的磷可能隨著雨水逕流而流失。

A14 於施灌後土壤全銅含量雖有上升趨勢，但仍遠低於行政院農業委員會 (2020) 個案再利用許可規範所訂之停灌標準規定 (102 mg/kg) 及行政院環境保護署 (2011) 土壤污染監測標準 (食用作物農地) 規定 (120 ppm)；全鋅含量於 2015 年起有顯著增加趨勢，然試驗期間皆遠低於行政院農業委員會 (2020) 個案再利用許可規範所訂之停灌標準規定 (221 mg/kg) 及行政院環境保護署 (2011) 土壤污染監測標準 (食用作物農地) 規定 (260 mg/kg)。豬廢水中所含銅和鋅會對環境造成負面影響 (Cestonaro do Amaral *et al.*, 2014)，受到鋅污染的土壤其呼吸作用下降程度比未污染土壤高，而土壤的呼吸作用可反映對有機物的分解能力 (Tobor-Kaplon *et al.*, 2006)，也因此土壤呼吸作用被廣泛用於

檢測土壤功能的各種擾動的影響 (Stefanowicz *et al.*, 2008)，這也是目前畜牧廢水資源化再利用相關法令中，皆有規定定期監測土壤中銅鋅含量的主因。本試驗期間，施灌地尚無顯著重金屬累積之現象。

表 5. 養牛廢水對地下水水質之影響

Table 5. Effects of irrigation water on the quality of the underground water

Items	pH		EC ¹	NH ₄ ⁺ -N	NO ₃ ⁻ -N	TP ²	Cu	Zn
			μS/cm	----- mg/L -----				
Upstream 1 ³								
2015 ⁴ (n = 4)	D ⁵	7.2 ^{bc}	553	0.08 ^b	0.08	0.09 ^b	0.02	0.02
2015 (n = 6)	W ⁶	7.8 ^a	596	0.08 ^b	0.08	0.11 ^{ab}	0.02	0.01
2015 — 2016 (n = 6)	D	7.6 ^{ab}	623	0.12 ^{ab}	0.13	0.06 ^b	0.02	0.03
2016 (n = 6)	W	7.3 ^{abc}	653	0.12 ^{ab}	0.10	0.21 ^a	0.01	0.02
2016 — 2017 (n = 6)	D	7.4 ^{abc}	587	0.20 ^a	0.12	0.20 ^a	0.02	0.02
2017 (n = 6)	W	7.0 ^c	629	0.11 ^{ab}	0.08	0.15 ^{ab}	0.01	0.03
2017 (n = 2)	D	7.6 ^{ab}	571	0.21 ^a	0.11	0.09 ^b	0.02	0.03
Average ⁷ (n = 32)		7.4	612	0.13	0.10	0.14	0.02	0.02
SEM		0.1	22	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00
Upstream 2								
2014 ⁴ (n = 4)	D	7.2	394 ^e	0.07 ^{abc}	0.12 ^{abc}	0.08 ^c	0.03	0.05
2014 (n = 6)	W	7.3	421 ^e	0.12 ^{abc}	0.19 ^a	0.14 ^{abc}	0.03	0.01
2014 — 2015 (n = 6)	D	6.9	439 ^{de}	0.04 ^c	0.10 ^{bc}	0.08 ^{bc}	0.02	0.02
2015 (n = 6)	W	7.2	577 ^{ab}	0.15 ^{ab}	0.17 ^{ab}	0.12 ^{bc}	0.02	0.01
2015 — 2016 (n = 6)	D	7.0	594 ^a	0.17 ^a	0.15 ^{abc}	0.10 ^{bc}	0.01	0.01
2016 (n = 6)	W	7.1	554 ^{abc}	0.14 ^{ab}	0.13 ^{abc}	0.26 ^a	0.01	0.02
2016 — 2017 (n = 6)	D	7.0	499 ^{cd}	0.10 ^{abc}	0.09 ^c	0.18 ^{abc}	0.02	0.02
2017 (n = 6)	W	6.9	499 ^{cd}	0.07 ^{bc}	0.09 ^c	0.22 ^{ab}	0.01	0.03
2017 (n = 2)	D	7.1	515 ^{bc}	0.09 ^{abc}	0.16 ^{abc}	0.10 ^{bc}	0.02	0.02
Average ⁸ (n = 38)		7.0	533	0.11	0.12	0.15	0.02	0.02
SEM		0.1	16	0.02	0.01	0.03	0.00	0.00
Downstream								
2014 ³ (n = 4)	D	7.5	461 ^b	0.68 ^{ab}	0.14	0.11 ^b	0.06	0.04
2014 (n = 6)	W	7.8	481 ^b	0.67 ^{ab}	0.15	0.14 ^{ab}	0.04	0.01
2014 — 2015 (n = 6)	D	7.5	496 ^b	0.60 ^{ab}	0.12	0.14 ^{ab}	0.03	0.02
2015 (n = 6)	W	7.9	568 ^a	0.50 ^{ab}	0.16	0.20 ^{ab}	0.03	0.02
2015 — 2016 (n = 6)	D	7.9	555 ^a	0.72 ^{ab}	0.14	0.17 ^{ab}	0.02	0.02
2016 (n = 6)	W	7.6	570 ^a	0.52 ^b	0.10	0.19 ^{ab}	0.01	0.02
2016 — 2017 (n = 6)	D	7.9	581 ^a	0.81 ^a	0.09	0.22 ^a	0.02	0.02
2017(n = 6)	W	7.6	573 ^a	0.52 ^{ab}	0.09	0.18 ^{ab}	0.01	0.03
2017 (n = 2)	D	7.9	556 ^a	0.46 ^b	0.12	0.11 ^b	0.03	0.02
Average ⁸ (n = 38)		7.8	564	0.61	0.12	0.18	0.02	0.02
SEM		0.1	8	0.06	0.02	0.02	0.01	0.00

¹ EC: electrical conductivity ²TP: total phosphorus; ³Upstream 1: 2015 added; ⁴Background value; ⁵D: dry period, November - April (next year); ⁶W: wet period, May - October; ⁷Average: from 2015W to 2017D; ⁸Average: from 2014 - 2015D to 2017D.

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

地下水下游井的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 明顯高於上游 1 及上游 2，因其背景值即高於上游 2 口監測井，所以並非因施灌廢水所導致。試驗期間，下游井重金屬銅及鋅濃度，皆遠低於行政院農業委員會 (2003) 公告灌溉用水水質標準規定 0.2 mg/L 及 2.0 mg/L。盧及許 (2009) 的試驗結果顯示，施用經厭氧發酵後之豬糞尿廢水於狼尾草地，對 1 m 深處之土層滲漏液的 pH 值及 EC 值在處理組 (施灌不同濃度的豬糞尿廢水) 與對照組 (未施灌) 間無顯著差異。Kriska *et al.* (2018) 探討施灌生活污水於多種不同質地之土壤 (壤土、砂土、壤質砂土)，試驗土壤填充於 2 m 高的過濾器，試驗結果顯示， $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 於表層的濃度約 17 ± 1 mg/L，然於深度 1.1 m 處測得的值僅剩 2.0 mg/L，因此作者建議欲以廢水進行施灌之地下水深度不應低於 1.5 m。本施灌地 A10 區及 A13 區屬壤土，A14 區屬極細砂土，地下水需鑿 50 m 以上，故應無深層滲漏污染地下水之疑慮。下游地下水於試驗期間，其各項測值無論在豐水期或枯水期，皆無明顯變化，顯示本施灌牛糞尿厭氧後廢水之試驗 3 年，對試驗地土壤和地下水並未造成污染的問題。

結 論

雖然畜牧廢水中含有可能污染環境之物質，如鹽分及重金屬等，但本試驗的結果顯示，在本試驗盤固拉草地連續施灌厭氧發酵後之養牛廢水 3 年後，尚未衍生土壤及地下水污染問題，惟考量持續施灌恐有累積疑慮，故將繼續進行土壤及地下水定期監測。

參考文獻

- 行政院農業委員會。2003。公告灌溉用水水質標準。中華民國 92 年 11 月 7 日公告。<https://law.coa.gov.tw/glrnewsout/LawContent.aspx?id=GL000066>。
- 行政院農業委員會。2013。農業事業廢棄物再利用管理辦法。中華民國 102 年 6 月 3 日修正。<https://law.coa.gov.tw/glrnewsout/LawContentHistory.aspx?hid=1484>。
- 行政院農業委員會。2020。畜牧糞尿水施灌農作個案再利用許可申請撰寫範例。中華民國 109 年 12 月。https://www.coa.gov.tw/theme_list.php?theme=online_service&type=M。
- 行政院農業委員會農糧署。2005。作物施肥手冊。中華肥料協會，臺中市，第 152 頁。
- 行政院環境保護署。2011。土壤污染監測標準。中華民國 100 年 1 月 31 日公告。<https://law.moj.gov.tw/LawClass/LawAll.aspx?pcode=O0110012>。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2000。水中導電度測定方法—導電度計法 (NIEA W203.51B)。中華民國 89 年 11 月 23 日公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2004。水中總氮檢測方法 (NIEA W423.52C)。中華民國 93 年 8 月 9 日公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2005。水中氨氮檢測方法—靛酚比色法 (NIEA W448.51B)。中華民國 94 年 8 月 15 日公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2006。水中硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法 (NIEA W419.51A)。中華民國 95 年 8 月 8 日公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2008。水中氫離子濃度指數 (pH 值) 測定方法—電極法 (NIEA W424.52A)。中華民國 97 年 9 月 18 日公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2010。水中磷檢測方法—分光光度計 / 維生素丙法 (NIEA W427.53B)。中華民國 99 年 9 月 15 日公告。
- 行政院環境保護署環境檢驗所。2014。水中銀、鎘、鉻、銅、鐵、錳、鎳、鉛及鋅檢測方法—火焰式原子吸收光譜法 (NIEA W306.54A)。中華民國 103 年 5 月 2 日公告。
- 陳仁炫、鄒裕民。2008。土壤化學性質分析。土壤與肥料分析手冊 (一)。中華土壤肥料學會，臺北市，第 43-46 頁。
- 盧啟信、許福星。2009。施灌經厭氧發酵豬糞尿廢水對狼尾草生長及牧草地土壤與滲漏水性質之影響。環境與生物資訊 6：113-123。
- 賴鴻裕、劉程煒、陳柏青。2011。農業上的氮。科學發展 467：40-45。
- 嚴式清。1995。長期施用豬糞尿有機肥對地下水污染之影響及合理施用量之評估。有機質肥料合理施用技術研討會專刊。臺灣省農業試驗所，臺中縣，第 14-1~14-12 頁。
- 蘇德銓。2003。長期施用動物糞堆肥對番荔枝果園土壤重金屬與磷之累積影響。臺東區農業改良場研究彙報 14：97-108。

- Biswas, S. K., M. A. Mojid, and G. C. L. Wyseure. 2017. Physicochemical properties of soil under wheat cultivation by irrigation with municipal wastewater in Bangladesh. *Commun Soil Sci. Plan.* 48: 1-10.
- Bolan, N. S., M. J. Hedley, and R. E. White. 1991. Processes of soil acidification during nitrogen cycling with emphasis on legume based pastures. *Plant Soil.* 134: 53-63.
- Cestonaro do Amaral, A., A. Kunz, R. L. Radis Steinmetz, and K. C. Justi. 2014. Zinc and copper distribution in swine wastewater treated by anaerobic digestion. *J. Environ. Manag.* 141: 132-137.
- Fried, M., K. K. Tanji, and R. M. Van De Pol. 1976. Simplified long-term concept for evaluating leaching of nitrogen from agricultural land. *J. Environ. Qual.* 5: 197-200.
- Hamarashid, N., M. Othman, and M. A. Hussain. 2010. Effects of soil texture on chemical compositions, microbial populations and carbon mineralization in soil. *Egypt J. Exp. Biol.* 6: 59-64.
- Hu, Y., M. Kumar, Z. Wang, X. Zhan, and D. B. Stengel. 2021. Filamentous microalgae as an advantageous co-substrate for enhanced methane production and digestate dewaterability in anaerobic co-digestion of pig manure. *Waste Manage.* 119: 399-407.
- Kriska, M., M. Nemcova, and E. Hyankova. 2018. The influence of ammonia on groundwater quality during wastewater irrigation. *Soil & Water Res.* 13: 161-169.
- Mohammad, M. J. and N. Mazahreh. 2003. Changes in soil fertility parameters in response to irrigation of forage crops with secondary treated wastewater. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 34: 1281-1294.
- Navarro, I., A. Chavez, J. A. Barrios, C. Maya, E. Becerril, S. Lucario, and B. Jimenez. 2015. Wastewater reuse for irrigation-practices, safe reuse and perspectives. In: Javaid M.S. ed.: *Irrigation and Drainage - Sustainable Strategies and Systems*. InTech.
- Rusan, M. J. M., S. Hinnawi, and L. Rousan. 2007. Long term effect of wastewater irrigation of forage crops on soil and plant quality parameters. *Desalination* 215: 143-152.
- Schipper, L. A., J. C. Williamson, H. A. Kettles, and T. W. Speir. 1996. Impact of land-applied tertiary-treated effluent on soil biochemical properties. *J. Environ. Qual.* 25: 1073-1077.
- Stefanowicz, A. M., M. Niklińska, and R. Laskowski. 2008. Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. *Environ. Ecotoxicol. Chem.* 27: 591-598.
- Steinich, B., O. Escolero, and L. E. Marín. 1998. Salt-water intrusion and nitrate contamination in the Valley of Hermosillo and El Sahuaral coastal aquifers, Sonora, Mexico. *Hydrogeol. J.* 6: 518-526.
- Tobor-Kapłon, M. A., J. Bloem, P. F. A. M. Römkens, and P. C. de Ruiter. 2006. Functional stability of microbial communities in contaminated soils near a zinc smelter (Budel, The Netherlands). *Ecotoxicology* 15: 187-197.
- Yamrot, M. A., K. Rajkumari, and A. Farrukh. 2015. A probabilistic QMRA of *Salmonella* in direct agricultural reuse of treated municipal wastewater. *Water Sci. Tech.* 71: 1203-1211.

Impact of dairy wastewater on the soil properties and groundwater quality after irrigation on Pangolagrass pasture ⁽¹⁾

Ya-Ling Huang ⁽²⁾ Chu-Hsin Liu ⁽³⁾ Tein-Ming Su ⁽²⁾ Ting-Hsun Hsiao ⁽²⁾ and Hsin-Jung Lee ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Jun. 28, 2021; Accepted: Jan. 13, 2022

Abstract

Livestock wastewater after anaerobic treatment still contains some nutrients needed for plants and can be used as a source of fertilizers. However, this nutrients containing copper, zinc, and nitrogen, while the substances unabsorbed by the plants could pollute the soil and groundwater. Therefore, the purpose of this study aimed to explore the impact of cow wastewater after anaerobic treatment (irrigation water) on the soil properties and groundwater quality after irrigation on the Pangolagrass pasture. The present study was carried out between 2015 and 2017. The dairy wastewater was irrigated on the Pangolagrass pasture in the area of 34.88 hectares. The irrigation areas were divided into three areas (A10, A13, and A14) by the type of topography, and each of the areas was irrigated once by the irrigation tank truck monthly in turn, namely each area was irrigated once every three months. The irrigation volume was determined by the nitrogen requirement of Pangolagrass and the concentration of total nitrogen in irrigation water. During the experimental period, the change of composition in irrigation water was analyzed with the collection of soils in each area and groundwater in upstream and downstream collected monthly. The data of soil and groundwater in 2014 were adopted as the background values to comprehend the changes in all compositions. The results showed that the total nitrogen of the irrigation water was about 721 mg/L during the irrigation period. In soil, the electrical conductivity (EC) in A10, A13, and A14 during the irrigation period were about 135, 117, and 206 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively (background values were 152, 171, and 192 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively). The contents of total copper in three areas were 6.86, 5.92, and 8.25 mg/kg, respectively (background values were 6.16, 5.59, and 5.11 mg/kg, respectively). The contents of total zinc in three areas were 38.1, 25.4, and 38.8 mg/kg, respectively (background values were 25.0, 24.0, and 21.9 mg/kg, respectively). With regards to groundwater, the concentrations of ammonium nitrogen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) and nitrate nitrogen ($\text{NO}_3^-\text{-N}$) were 0.61 mg/L (background value was 0.68 mg/L) and 0.12 mg/L (background value was 0.14 mg/L), respectively. In summary, the results showed that after three years of monitoring, the irrigation of cow wastewater after anaerobic treatment in this study did not significantly change the soil properties and groundwater quality on Pangolagrass pasture. However, the impact by long-term irrigation merits further monitoring and evaluation.

Key words: Dairy wastewater, Anaerobic fermentation, Soil, Groundwater.

(1) Contribution No. 2693 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Livestock Management Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Agriculture Department, Nantou County Government, Nantou 54001, Taiwan, R. O. C.

(4) Corresponding author, E-mail: hjlee@mail.tlri.gov.tw.

飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 對白肉雞生長性能、屠體性狀及血液生化值之影響⁽¹⁾

李宗育⁽²⁾ 廖仁寶⁽³⁾ 王嘉惠⁽²⁾ 施柏齡⁽²⁾ 范耕榛⁽⁴⁾ 林義福⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：110 年 7 月 12 日；接受日期：111 年 1 月 18 日

摘 要

枯草芽孢桿菌為我國飼料管理法中可供給畜禽之飼料添加物，其具生長快速、耐酸、耐鹼、耐熱及可形成內孢子等特性。本研究以篩選自活性污泥之枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 (*Bacillus subtilis* TLRI 211-1) 添加於飼糧中，探討對白肉雞生長、屠體性狀及血液生化值之影響。將篩選自活性污泥之枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 培養後，調整菌數為 1×10^8 CFU/mL。以 1 日齡 ROSS 308 白肉雞 192 隻，分配於對照組 (0%)、添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 菌液 0.1、0.3% 或商用枯草芽孢桿菌組 0.1%，各組 4 重複 (欄)，每欄 12 隻。試驗為期 5 週。結果顯示，飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 0.1% 組之雞隻增重、生產效率及屠體重顯著高於對照組及商用菌組 ($P < 0.05$)。飼糧添加枯草芽孢桿菌處理組與對照組比較，雞隻腹脂明顯較低，但腸道重顯著較高 ($P < 0.05$)。各組間在血液生化炎症指標酵素—麩胺酸草醋酸轉胺酶、丙酮酸轉胺酶、肌酸磷酸酶及 γ - 麩胺酸轉胺酶等均無顯著差異。綜上所述，飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 菌數達 1×10^8 CFU/kg，可提高白肉雞增重及生產效率，因此可作為促進雞隻生長性能之益生菌飼料添加物。

關鍵詞：白肉雞、枯草芽孢桿菌、生長性能。

緒 言

近年來細菌抗藥性和畜產品藥物殘留問題一直受到關注，歐盟在 2006 年已禁用促進生長用抗生素，我國近年減少飼料可添加之抗生素品項，自 2019 年起僅 9 項可使用於飼料中 (行政院農業委員會，2019)。益生菌、益生素和有機酸為應用最多的飼料添加物，其對家禽在飼料能量和蛋白質利用上有助益 (Houshmand *et al.*, 2012)。益生菌如乳酸桿菌屬 (*Lactobacillus* sp.)、雙歧桿菌屬 (*Bifidobacterium* sp.) 及芽孢桿菌屬 (*Bacillus* sp.) 可作為飼料添加物或發酵菌元，菌株在動物體內可直接作用，增加和維持腸道有益菌，或分泌酵素以提高飼糧營養吸收利用，進而改善動物經濟性能 (Goldin, 1998)。

在諸多應用於家禽生產之益生菌產品中，可芽孢化之芽孢桿菌屬在飼料生產上有利於儲存及降低造粒過程中溫度的破壞，進而提供較長的儲存期限 (Cartman *et al.*, 2008; Chaiyawan *et al.*, 2010)。枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*) 為我國飼料管理法中可供給畜禽之飼料添加物，其具生長快速、耐酸、耐鹼、耐熱及形成內孢子等生物特性。內孢子在經過飼料加工之擠壓造粒過程和動物胃中暴露於強酸性環境後，仍可達腸道內生長及繁殖，對恢復和維持動物腸道菌群平衡，提高免疫功能，增強動物抗病能力，促進其生長發育具有重要意義 (Rajput *et al.*, 2013)。

白肉雞飼糧添加枯草芽孢桿菌可改善腸道菌群 (Fritts *et al.*, 2000)、增重及飼料轉換率 (Teo and Tan, 2006)。腸道菌群中產氣莢膜梭菌數量隨著枯草芽孢桿菌 PB6 用量增加而下降 (Teo and Tan, 2004)；體外試驗顯示，枯草芽孢桿菌 PB6 對產氣莢膜梭菌具抑制作用 (Teo and Tan, 2005)，並可增加腸道中乳桿菌屬有益菌 (Teo and Tan, 2006; 2007)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2694 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。

(5) 通訊作者，E-mail: yflin@mail.tlri.gov.tw。

益生菌作為飼料添加物之應用，受到益生菌菌株、添加量、使用方式及飼養環境等因素影響 (Yang *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2012)。行政院農業委員會畜產試驗所 (以下簡稱畜試所) 自活性污泥篩選之枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 菌株，其飼養效果尚待雞隻生長試驗評估，本研究擬探討枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 菌株於飼糧中不同添加量對白肉雞生長、屠體性狀及血液生化值之影響。

材料與方法

I. 枯草芽孢桿菌菌液製備

以取自畜試所活性污泥篩選之枯草芽孢桿菌 (*Bacillus subtilis*)，經菌種鑑定、耐高溫 (50°C) 及產孢能力測試後，選取枯草芽孢桿菌菌株 TLRI 211-1 接種於 TSB 培養液 (Tryptic Soy Broth, Merck®)，並放置於 37°C 培養箱培養 24 小時後，調整菌液為 1×10^8 CFU/mL。

II. 試驗動物與處理

動物試驗經過畜試所實驗動物照護及使用小組審核通過 (編號 108-35)，並於畜試所營養組雞舍進行。以 1 日齡 (ROSS 308 品系) 白肉雞 192 隻 (體重 42 ± 1 g)，分配於對照組 (空白組)、對照組飼糧添加枯草芽孢桿菌液 0.1%、0.3% 或商用枯草芽孢桿菌 0.1% 組 (益生康, The Best Nutrition Technology Co. Ltd., Taiwan, R.O.C.) (飼料菌數 1×10^8 CFU/kg)，每處理 4 重複，每重複 12 隻，公母各半，試驗至 35 日齡結束，飼料及飲水均為任飼。雞隻飼養期間分為育雛期 (0 – 21 日齡) 及生長期 (22 – 35 日齡)，營養分標準依 NRC (1994) 營養推薦調配，並依 AOAC (2000) 分析粗蛋白質、鈣及磷等含量，飼糧配方如表 1。

表 1. 試驗基礎飼糧組成

Table 1. The composition of experimental basal diets

Ingredients, %	1 – 21 days of age	22 – 35 days of age
Yellow corn, grain	55.17	62.95
Full-fat soybean meal, CP 38%	5.75	6.87
Soybean meal, CP 43%	27.26	19.57
Fish meal, CP 60%	7.00	7.00
Soybean oil	2.00	1.00
Dicalcium phosphate	0.92	0.71
Limestone, pulverized	1.16	1.03
Salts	0.30	0.30
DL-Methionine	0.14	0.18
L-Lysine	0.10	0.19
Vitamin premix ¹	0.10	0.10
Mineral premix ²	0.10	0.10
Total	100.00	100.00
Calculated value		
Crude protein, %	23.00	21.00
ME, kcal/kg	3,150.00	3,120.00
Calcium, %	0.96	0.87
Available phosphorus, %	0.48	0.43
Analyzed value, %		
Crude protein	23.12	21.22
Calcium	0.95	0.89
Total phosphorus	0.68	0.63

¹ Supplied per kilogram of diet: vitamin A, 3,000 IU; vitamin D₃, 400 IU; vitamin E, 10 IU; vitamin K₃, 1 mg; vitamin B₁, 3.6 mg; vitamin B₂, 5.4 mg; vitamin B₆, 7.0 mg; Ca-pantothenate, 20.0 mg; nia-cin, 70 mg; biotin, 0.3 mg; folic acid, 1.1 mg; and vitamin B₁₂, 0.02 mg.

² Supplied per kilogram of diet: Cu (CuSO₄ · 5H₂O, 25.45% Cu), 8 mg; Fe (FeSO₄ · 7H₂O, 20.09% Fe), 80 mg; Mn (MnSO₄ · H₂O, 32.49% Mn), 60 mg; Zn (ZnO, 80.35% Zn), 40 mg; and Se (Na₂SeO₃, 45.7% Se), 0.15 mg.

III. 動物試驗測定項目

- (i) 生長性狀：雞隻分別於 0、21 及 35 日齡進行秤重，並於 21 及 35 日齡時記錄採食量及雞隻死亡率，並計算雞隻增重、飼料轉換率、育成率及生產效率 (Production efficiency factor, PEF) (Rehman *et al.*, 2017)， $PEF = \text{育成率}(\%) \times \text{最終活體重}(\text{kg}) / (\text{屠宰日齡}(\text{d}) \times \text{飼料轉換率}) \times 100$ 。
- (ii) 育成率：於試驗期間記錄雞隻死亡隻數，以計算雞隻累加育成率。
- (iii) 屠體性狀：試驗結束時，各處理組取 8 隻，公母各半，人道犧牲後進行屠宰並測定屠宰率，並採取心臟、肝臟、腹脂、腺胃—砂囊及腸道 (小腸 + 大腸) 秤重，計算與體重之重量百分比。
屠體重測定：雞隻經人道犧牲，移除腹脂與內臟後之屠體重。
屠宰率 (Dressing, %) = 屠體重 / 體重 $\times 100$ 。
腹脂重 (%) = 腹脂重 / 體重 $\times 100$ 。
各器官重 (%) = 各器官重 / 體重 $\times 100$ 。
- (iv) 血液生化學性狀：於試驗結束時各組選取 8 隻白肉雞，公母各半，自雞隻翼靜脈採取血液 6 mL，靜置 1 小時後置入離心機，以 $3,000 \times g$ ，離心 10 分鐘，取血清凍存於 -20°C 備檢。以血液生化分析儀 (Hitachi 7150, Japan) 分析血清中之總蛋白質 (total protein, TP)、白蛋白 (albumin, ALB)、球蛋白 (globulin, GLO)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐 (creatinine, CREA)、尿酸 (uric acid, UA) 及三酸甘油酯 (triglycerides, TG) 之含量，以及麩胺酸草醋酸轉胺酶 (glutamate oxaloacetate transaminase, GOT)、丙酮酸轉胺酶 (glutamic phosphate transaminase, GPT)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、 γ -麩胺酰轉胺酶 (γ -glutamyltransferase, γ -GT) 及肌酸磷酸酶 (creatine kinase, CK) 之活性。

IV. 統計分析

試驗所獲得之資料，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，若有顯著性，再以杜凱確實差異檢定 (Tukey honestly significant difference test) 比較各組平均值差異之顯著性，差異顯著性訂為 $P < 0.05$ 。

結果與討論

I. 生長性能

飼糧添加枯草芽孢桿菌對白肉雞生長性能之影響，如表 2 所示。雞隻 1 — 21 日齡，各組間飼料採食量及飼料轉換率均無顯著差異，但枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 添加 0.1% 組肉雞體增重顯著高於對照組 ($P < 0.05$)。雞隻 22 — 35 日齡，枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 添加 0.1% 及 0.3% 組，體增重及飼料轉換率顯著高於對照組 ($P < 0.05$)。試驗全期 (1 — 35 日齡) 顯示，枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 添加 0.1% 及 0.3% 組在增重及飼料轉換率顯著優於對照組 ($P < 0.05$)，其中枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 添加 0.1% 組在飼料轉換率顯著優於商用枯草芽孢桿菌 0.1% 組，在生產效率則顯著高於對照組 ($P < 0.05$)。

枯草芽孢桿菌被認為具良好益生菌生物特性 (Jeong and Kim, 2014; Latorre *et al.*, 2014)，可耐高溫和飼料加工破壞，以及低 pH 值及厭氧環境 (Nakano and Zuber, 1998; Shivaramaiah *et al.*, 2011)，以枯草芽孢桿菌添加於飼料對 35 日齡白肉雞可改善增重 (Knap *et al.*, 2011; Aliakbarpour *et al.*, 2012; Gadde *et al.*, 2017)。但也有對生長性能無影響者 (Santoso *et al.*, 1995; Jeong and Kim, 2014)，因此 Lee *et al.* (2010) 以不同枯草芽孢桿菌菌株進行白肉雞飼養試驗，發現僅有部分菌株可增加體重。本試驗添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 0.1 及 0.3% 組生長皆顯著高於對照組，並與商用菌組在飼料轉換率及採食量無明顯差異，顯示 TLRI 211-1 菌株之添加有助於白肉雞生長。

飼糧中枯草芽孢桿菌 $10^6 - 10^9$ CFU/kg 可促進腸道益生菌菌相發展，進而改善白肉雞生長性能 (Teo and Tan, 2007; Zhang *et al.*, 2012)；但 Lee *et al.* (2010) 指出，飼糧銀飼枯草芽孢桿菌 1.5×10^5 CFU/g 不會影響肉雞 (第 1 — 22 天) 的增重。枯草芽孢桿菌具備耐酸，並於腸道繁殖生長，以維持動物腸道菌群平衡 (Rajput *et al.*, 2013)，而不同研究間的枯草芽孢桿菌效果差異，可能與菌株之功能性不足，致使高添加量，仍未能改善雞隻生長性狀。本試驗結果顯示，畜試所枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1，調整菌數為 1×10^8 CFU/mL，添加 0.1% 於飼糧中即可改善白肉雞生長性狀，亦即飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 菌數達 1×10^8 CFU/kg，可改善白肉雞生長性狀。

Leser *et al.* (2008) 指枯草芽孢桿菌在腸道中的競爭性黏附和免疫調節，與枯草芽孢桿菌分泌的分解酵素及其他分泌物質，有助於改善飼料轉換率和體增重，而本試驗使用枯草芽孢桿菌可改善生長性能或許與上述能力有關。

表 2. 飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 白肉雞生長性狀之影響

Table 2. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* TLRI 211-1 on growth performance of broilers

Items	Control	TLRI 211-1 ¹ (%)		COM ²	SEM
		0.1	0.3		
1 to 21 d					
Weight gain, g/bird	727 ^b	796 ^a	746 ^{ab}	770 ^{ab}	6.67
Feed intake, g/bird	1,310	1,290	1,288	1,401	29.8
Feed conversion ratio, feed intake/weight gain	1.81	1.61	1.72	1.83	0.043
22 to 35 d					
Weight gain, g/bird	1,250 ^b	1,478 ^a	1,462 ^a	1,356 ^{ab}	17.9
Feed intake, g/bird	1,665	1,742	1,688	1,670	19.9
Feed conversion ratio, feed intake/weight gain	1.34 ^a	1.18 ^b	1.15 ^b	1.23 ^{ab}	0.014
1 to 35 d					
Weight gain, g/bird	1,977 ^b	2,274 ^a	2,208 ^a	2,126 ^{ab}	20.6
Feed intake, g/bird	2,975	3,033	2,965	3,073	25.3
Feed conversion ratio, feed intake/weight gain	1.51 ^a	1.33 ^c	1.34 ^{bc}	1.45 ^{ab}	0.012
Survival rate, %	93.7	93.7	93.7	93.7	1.6
PEF*	353 ^b	458 ^a	443 ^{ab}	395 ^{ab}	12.1

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

* Production efficiency factor, $PEF = (\text{Survival rate (\%)} \times \text{BW (kg)}) / (\text{age (d)} \times \text{feed conversion ratio}) \times 100$.

¹ Newly isolated *Bacillus subtilis* strain-TLRI 211-1.

² COM = commercial *Bacillus subtilis* product.

II. 屠體性狀

飼糧添加枯草芽孢桿菌對白肉雞屠體性狀之影響列如表 3。結果顯示，飼糧中添加 TLRI 211-1 組 (0.1%、0.3%) 及商用菌組 (0.1%)，在屠體重均顯著高於對照組 ($P < 0.05$)。相對腸道重以枯草芽孢桿菌處理組 (TLRI 211-1 及商業菌株) 顯著高於對照組 ($P < 0.05$)。飼糧中添加 TLRI 211-1 0.1% 組相對腹脂重顯著低於對照組 ($P < 0.05$)。添加枯草芽孢桿菌對雞隻屠宰率、心臟、肝臟及腺胃—砂囊重，於各組間結果相近。

表 3. 飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 對白肉雞屠體性狀之影響

Table 3. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* TLRI 211-1 on carcass characteristics of broilers

Items	Control	TLRI 211-1 ¹ (%)		COM ³	SEM
		0.1	0.3		
Carcass weight, g	1,734 ^b	1,980 ^a	1,956 ^a	1,896 ^a	15.97
----- as percentage of live BW -----					
Dressing ²	84.7	84.5	84.7	84.3	0.14
Heart	0.64	0.64	0.66	0.64	0.008
Liver	2.63	2.48	2.63	2.67	0.043
Abdominal fat	1.10 ^a	0.91 ^b	0.93 ^{ab}	0.95 ^{ab}	0.024
Proventriculus and gizzard	3.24	3.18	3.21	3.34	0.044
Intestine	7.04 ^b	7.58 ^a	7.60 ^a	7.62 ^a	0.11

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

¹ Newly isolated *Bacillus subtilis* strain-TLRI 211-1.

² Dressing = $[(\text{carcass weight} / \text{body weight}) \times 100]$.

³ COM = commercial *Bacillus subtilis* product.

因本試驗添加 TLRI 211-1 0.1% 即可改善雞隻增重及屠體重，但對於屠宰率則無差異。此與 Molnár *et al.* (2011) 於飼料中添加枯草芽孢桿菌 2.27×10^4 CFU/g，可改善 42 日齡白肉雞屠體重結果相似。Santoso *et al.* (2001)

於白肉雞飼料添加 10 – 20 g 枯草芽孢桿菌可增加盲腸長度，並減少腹部脂肪。雞隻腹脂為家禽屠宰廢棄物，同時降低產品價值及增加處理成本，因此減少白肉雞腹脂，有助於白肉雞生產及後續加工利益。另外飼糧添加枯草芽孢桿菌可促進腸道中發展有益之高菌相環境，可改善腸道健康及絨毛性狀，促使食糜通過速率減緩，並增加絨毛吸收率 (Mahmoud *et al.*, 2017)，本試驗枯草芽孢桿菌可能因增加消化道容積，而提高腸道長度及重量，導致採食量及增重改善。

IV. 血液性狀

飼糧添加 TLRI 211-1 0.1% 組血液中鹼性磷酸酶顯著高於各組 ($P < 0.05$)。而在血液中總蛋白質及球蛋白濃度，則以對照組顯著高於飼糧添加 TLRI 211-1 0.1% 組及 0.3% 組 ($P < 0.05$) (表 4)。飼糧添加枯草芽孢桿菌均不影響白肉雞血液中麩胺酸草醋酸轉胺酶、丙酮酸轉胺酶、 γ - 麩胺醯轉胺酶及肌酸磷酸酶之活性與白蛋白、尿素氮、肌酸酐、三酸甘油酯之含量 ($P > 0.05$)。

麩胺酸草醋酸轉胺酶、丙酮酸轉胺酶、 γ - 麩胺醯轉胺酶及肌酸磷酸酶分別為肝臟及肌肉之炎症及疾病指標 (白等, 1997)。枯草芽孢桿菌屬為我國飼料管理法規中可參考採用之菌種，TLRI 211-1 菌株經本研究確認不影響具身體發炎之相關指標酵素，顯示 TLRI 211-1 菌株實際飼予白肉雞無肝炎或毒性反應產生。

當血漿中水分改變或營養提高，將影響血中總蛋白質濃度 (白等, 1997)。Mahmoud *et al.* (2017) 指白肉雞飼糧添加枯草芽孢桿菌，可增加空腸腺窩深度及迴腸粗蛋白質消化率，而改善增重及飼料效率。本試驗未記錄雞隻飲水量，但處理組之腸道重量較高，可能增加水分吸收，導致血中總蛋白質濃度較低，此在白蛋白及球蛋白濃度亦有相似趨勢。

鹼性磷酸酶是成骨細胞增殖的指標，在生長期骨轉換提高會同步增加活性 (Scholz-Ahrens *et al.*, 2016)。Guo *et al.* (2020) 以枯草芽孢桿菌 PB6 添加於白肉雞飼糧可提高雞隻後期增重、脛骨直徑及血中鹼性磷酸酶活性。本試驗 TLRI 211-1 0.1% 組可能因體重最高，而使鹼性磷酸酶活性有相似結果。

表 4. 飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 對白肉雞血液生化值之影響

Table 4. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* TLRI 211-1 on serum biochemical characteristics of broilers

Items ¹	Control	TLRI 211-1 ² (%)		COM ³	SEM
		0.1	0.3		
GOT, U/L	240	256	225	241	7.8
GPT, U/L	2.19	2.25	2.00	2.13	0.077
ALP, U/L	10,286 ^b	13,140 ^a	10,917 ^b	9,299 ^b	282
γ -GT, U/L	21.4	19.6	20.4	23.9	0.89
TP, g/dL	3.59 ^a	3.01 ^b	2.88 ^b	3.40 ^{ab}	0.11
ALB, g/dL	1.73	1.65	1.51	1.66	0.04
GLO, g/dL	1.86 ^a	1.45 ^b	1.36 ^b	1.74 ^{ab}	0.077
CREA, mg/dL	0.15	0.14	0.13	0.16	0.008
BUN, mg/dL	0.42	0.45	0.38	0.28	0.08
UA, mg/dL	4.47	4.50	4.20	4.79	0.23
TG, mg/dL	44.7	35.9	35.0	42.0	2.51
CK, U/L	5,234	4,181	4,661	4,813	322

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

¹ GOT = glutamate oxaloacetate transaminase; GPT = glutamic phosphate transaminase; ALP = alkaline phosphatase; γ -GT = γ -glutamyl transferase; TP = total protein; ALB = albumin; GLO = globulin; BUN = blood urea nitrogen; CREA = creatinine; UA = uric acid; TG = triglycerides; CK = creatine kinase.

² Newly isolated *Bacillus subtilis* strain-TLRI 211.

³ COM = commercial *Bacillus subtilis* product.

結 論

飼糧添加本所自篩枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 菌液 0.1%，可明顯提高雞隻體增重、飼料轉換率及生產效率，並

與商用枯草芽孢桿菌產品飼養效果相近。顯示本所自篩枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 為具市場潛力之益生菌。

參考文獻

- 白火城、黃森源、林仁壽。1997。家畜臨床血液生化學。立字出版社，臺南市。
- 行政院農業委員會。2019。動物用藥品使用準則。臺北，中華民國。
- Aliakbarpour, H. R., M. Chamani, G. Rahimi, A. A. Sadeghi, and D. Qujeq. 2012. The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 25: 1285-1293.
- Association of Official Agricultural Chemists. 2000. Official methods of analysis. 14th ed. Washington, D. C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Cartman, S. T., R. M. L. Ragione, and M. J. Woodward. 2008. *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microb.* 74: 5254-5258.
- Chaiyawan, N., P. Taveeteptakul, B. Wannissorn, S. Ruengsomwong, P. Klungsunya, W. Buaban, and P. Itsaranuwat. 2010. Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler. *Thai J. Vet. Med.* 40: 207-214.
- Fritts, C. A., J. H. Kersey, M. A. Motl, E. C. Kroger, F. Yan, J. Si, Q. Jiang, M. M. Campos, A. L. Waldroup, and P. W. Waldroup. 2000. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* 9: 149-155.
- Gadde, U., S. T. Oh, Y. S. Lee, E. Davis, N. Zimmerman, T. Rehberger, and H. S. Lillehoj. 2017. The effects of direct-fed microbial supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immune status, and epithelial barrier gene expression in broiler chickens. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 9: 397-405.
- Goldin, B. R. 1998. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* 80: 203-207.
- Guo, S., J. Xv, Y. Li, Y. Bi, Y. Hou, and B. Ding. 2020. Interactive effects of dietary vitamin K3 and *Bacillus subtilis* PB6 on the growth performance and tibia quality of broiler chickens with sex separate rearing. *Animal*. 14: 1610-1618.
- Houshmand, M., K. Azhar, I. Zulkifli, M. H. Bejo, and A. Kamyab. 2012. Effects of nonantibiotic feed additives on performance, immunity and intestinal morphology of broilers fed different levels of protein. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 42: 22-32.
- Jeong, J. S. and I. H. Kim. 2014. Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poult. Sci.* 93: 3097-3103.
- Knap, I., A. B. Kehlet, M. Bennedsen, G. F. Mathis, C. L. Hofacre, B. S. Lumpkins, M. M. Jensen, M. Raun, and A. Lay. 2011. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella* in broilers. *Poult. Sci.* 90: 1690-1694.
- Latorre, J. D., X. Hernandez-Velasco, G. Kallapura, A. Menconi, N. R. Pumford, M. J. Morgan, S. L. Layton, L. R. Bielke, B. M. Hargis, and G. Téllez. 2014. Evaluation of germination, distribution, and persistence of *Bacillus subtilis* spores through the gastrointestinal tract of chickens. *Poult. Sci.* 93: 1793-1800.
- Lee, K. W., S. H. Lee, H. S. Lillehoj, G. X. Li, S. I. Jang, U. S. Babu, M. S. Park, D. K. Kim, E. P. Lillehoj, A. P. Neumann, T. G. Rehberger, and G. R. Siragusa. 2010. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89: 203-216.
- Leser, T. D., A. Knarreborg, and J. Worm. 2008. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1025-1033.
- Mahmoud, K. Z., B. S. Obeidat, M. Z. Al-Sadi, and Sh. R. Hatahet. 2017. Effect of *Bacillus subtilis* supplementation and dietary crude protein level on growth performance and intestinal morphological changes of meat type chicken. *Livest. Sci.* 195: 99-104.
- Molnár, A. K., B. Podmaniczky, P. Kürti, I. Tenk, R. Glávits, G. Y. Virág, and Z. S. Szabó. 2011. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 52: 658-665.
- Nakano, M. M. and P. Zuber. 1998. Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 165-190.
- National Research Council. 1994. Nutrient Requirement of Poultry. 9th ed. National Academy Press, Washington, D. C.,

USA.

- Rajput, I. R., L. Y. Li, X. Xin, B. B. Wu, Z. L. Juan, Z. W. Cui, D. Y. Yu, and W. F. Li. 2013. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. *Poult. Sci.* 92: 956-965.
- Rehman, Z. U., N. Chand, and R. U. Khan. 2017. The effect of vitamin E, l-carnitine, and ginger on production traits, immune response, and antioxidant status in two broiler strains exposed to chronic heat stress. *Environ. Sci. Pollut. R.* 24: 26851-26857.
- Santoso, U., K. Tanaka, and S. Ohtani. 1995. Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. *Brit. J. Nutr.* 74: 523-529.
- Santoso, U., K. Tanaka, S. Ohaniand, and M. Saksida. 2001. Effect of fermented product from *Bacillus subtilis* on feed efficiency, lipid accumulation and ammonia production in broiler chicks. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14: 333-337.
- SAS. 2002. SAS User's Guide. Statistical Institute, Inc., Cary. N.C.
- Scholz-Ahrens, K. E., B. Adolphi, F. Rochat, D. V. Barclay, M. de Vrese, Y. Açil, and J. Schrezenmeir. 2016. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. *NFS J.* 3: 41-50.
- Sen, S., S. L. Ingale, Y. W. Kim, J. S. Kim, K. H. Kim, J. D. Lohakare, E. K. Kim, H. S. Kim, M. H. Ryu, I. K. Kwon, and B. J. Chae. 2012. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Res. Vet. Sci.* 93: 264-268.
- Shivaramaiah, S., N. R. Pumford, M. J. Morgan, R. E. Wolfenden, A. D. Wolfenden, A. Torres-Rodríguez, B. M. Hargis, and G. Téllez. 2011. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. *Poult. Sci.* 90: 1574-1580.
- Teo, A. Y. and H. M. Tan. 2004. The effect of CloSTAT on pathogenic and beneficial bacteria in broilers. XXII World Poult. Congr., Istanbul, Turkey. World's Poult. Sci. Assoc., Beekburgen, the Netherlands. 174.
- Teo, A. Y. and H. M. Tan. 2005. Inhibition of *Clostridium perfringens* by a novel strain of *Bacillus subtilis* isolated from the gastrointestinal tracts of healthy chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4185-4190.
- Teo, A. Y. and H. M. Tan. 2006. Effect of *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT) on broilers infected with a pathogenic strain of *Escherichia coli*. *J. Appl. Poult. Res.* 15: 229-235.
- Teo, A. Y. and H. M. Tan. 2007. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broilers fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). *J. Appl. Poult. Res.* 16: 296-303.
- Yang, Y., P. Iji, and M. Choct. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *Worlds Poult. Sci. J.* 65: 97-114.
- Zhang, Z. F., T. X. Zhou, X. Ao, and I. H. Kim. 2012. Effects of β -glucan and *Bacillus subtilis* on growth performance, blood profiles, relative organ weight and meat quality in broilers fed maize-soybean meal based diets. *Livest. Sci.* 150: 419-424.

Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* TLRI 211-1 on growth performance, carcass, and blood characteristics of broilers ⁽¹⁾

Tsung-Yu Lee ⁽²⁾ Ren-Bao Liaw ⁽³⁾ Chia-Hui Wang ⁽²⁾ Bor-Ling Shih ⁽²⁾
Geng-Jen Fen ⁽⁴⁾ and Yih-Fwu Lin ⁽²⁾⁽⁵⁾

Received: Jul. 12, 2021; Accepted: Jan. 18, 2022

Abstract

Bacillus subtilis is a feed additive that can be supplied to livestock and poultry according to the Taiwan Feed Control Act law. *B. subtilis* features characteristics of rapid growth, acid resistance, alkali resistance, heat resistance, and endospore formation. In this study, *B. subtilis* TLRI 211-1, isolated from activated sludge, was added to the diet to explore the effects on the growth performance, carcass, and blood characteristics of broilers. After culture, the number of *B. subtilis* TLRI 211-1 was adjusted to 1×10^8 CFU/mL. A total of 192 day-old broilers were allocated to four groups, including: control group (0%), *B. subtilis* TLRI 211-1 solution 0.1%, 0.3% supplementation groups, and commercial *B. subtilis* 0.1% supplementation group. Each group had 4 replicates (pens) and each replicate had 12 birds. The experiment was conducted for 5 weeks. During the experimental period, growth performance, carcass and blood characteristics were measured. The results showed that the weight gain, production efficiency and slaughter weight of the feed supplemented with TLRI 211-1 bacterial solution 0.1% were significantly higher than those of the control group and the commercial bacteria group ($P < 0.05$). The abdominal fat of birds fed with *B. subtilis* was significantly lower, but the intestinal weight was significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the blood biochemical inflammation index enzymes - GOT, GPT, CK, and γ -GT among all groups. In summary, dietary supplementation of 1×10^8 CFU/kg *B. subtilis* TLRI 211-1 can increase the weight gain and production efficiency of white broilers. Thus, *B. subtilis* TLRI 211-1 strain can be used as a probiotic feed additive to promote chicken growth performance.

Key words: Broiler, *Bacillus subtilis*, Growth traits.

(1) Contribution No. 2694 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Animal Industry Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(5) Corresponding author, E-mail: yflin@mail.tlri.gov.tw.

第五十四卷作者索引

Author Index to Volume 54

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Bao-Ji Chen (陳保基) 173 | Huey-Lang Yang (楊惠郎) 30 |
| Bing-Sian Lin (林秉憲) 57 | I-Heng Chang (張以恆) 206 |
| Bin-Yong Wang (王斌永) 99, 182 | I-Nung Huang (黃懿儂) 173 |
| Bo-Ling Shih (施柏齡) 1, 292 | Jenn-Fa Liou (劉振發) 30 |
| Chao-Hung Chiang (江兆弘) 231 | Jen-Wen Shiao (蕭振文) 30 |
| Chein Tai (戴謙) 30 | Jung-Hsin Lin (林榮新) 48, 82 |
| Cheng-Hsun Chung (鍾承訓) 106 | Kai-Fei Tseng (曾楷扉) 91 |
| Chia-Hui Wang (王嘉惠) 292 | Kwo-Chin Wu (吳國欽) 18 |
| Chia-Sheng Chen (陳嘉昇) 116, 189, 250 | Liang-Yuan Wei (魏良原) 126 |
| Chia-Te Chu (朱家德) 259 | Li-Chung Tsai (蔡立中) 140 |
| Chien-Lung Hu (胡見龍) 231 | Lih-Ren Chen (陳立人) 30 |
| Chih-Chang Hsiao (蕭智彰) 40 | Li-Jen Liao (廖麗貞) 74 |
| Chih-Hsiang Cheng (鄭智翔) 48, 82 | Ling-Tsai Wu (吳鈴彩) 259 |
| Ching-Chi Hung (洪靖崎) 173 | Mei-Huei Chen (陳美惠) 1 |
| Ching-Hua Chien (簡靖華) 9 | Mei-Ping Cheng (程梅萍) 64 |
| Ching-Yi Chen (陳靜宜) 173 | Meng-Ju Lee (李孟儒) 259 |
| Ching-Yi Lien (練慶儀) 40 | Ming-Hung Chu (朱明宏) 189 |
| Chin-Hui Su (蘇晉暉) 48, 82 | Ming-Kuew Yang (楊明桂) 155 |
| Chin-Meng Wang (王錦盟) 57 | Ming-Yang Tsai (蔡銘洋) 99 |
| Chu-Hsin Liu (劉主欣) 282 | Min-Jung Lin (林旻蓉) 18 |
| Churng-Faung Lee (李春芳) 162 | Min-Lang Chang (張敏郎) 74 |
| Fang-Chieh Liu (劉芳爵) 57, 148, 239 | Perng-Chih Shen (沈朋志) 91 |
| Fung-Hsiang Chu (曲鳳翔) 91 | Ping Chung (鍾萍) 140 |
| Geng-Jen Fan (范耕榛) 162, 292 | Po-An Tu (涂柏安) 155, 219 |
| Hsiao-Han Liao (廖曉涵) 155, 219 | Po-Yu Chen (陳勃聿) 198 |
| Hsin-Hung Lin (林信宏) 91 | Ren-Bao Liaw (廖仁寶) 64, 273, 292 |
| Hsin-Hung Liu (劉信宏) 106, 250 | Ruei-Han Yeh (葉瑞涵) 259 |
| Hsin-Jung Lee (李欣蓉) 282 | Rung-Jen Tu (涂榮珍) 259 |
| Hsin-Yu Lin (林芯仔) 48 | Shen-Chang Chang (張伸彰) 18 |
| Hsin-Yun Hsu (許馨云) 48 | Sheng-Der Wang (王勝德) 1, 9 |
| Hsiu-Chou Liu (劉秀洲) 82, 126 | Shih-Chieh Liao (廖士傑) 1, 9 |
| Hsiu-Lan Lee (李秀蘭) 106 | Shih-Yi Shen (沈士怡) 1, 9 |

- Shu-Min Wang (王紓愍) 106, 116
- Shyh-Rong Chang (張世融) 198
- Szu-Han Wang (王思涵) 30, 155
- Tein-Ming Su (蘇天明) 64, 282
- Ting-Chieh Kang (康定傑) 91
- Ting-Hsun Hsiao (蕭庭訓) 64, 282
- Tsai-Fuh Tseng (曾再富) 82
- Tsui-Huang Yu (游翠凰) 106, 116, 250
- Tsung-Yi Lin (林宗毅) 155, 219, 231
- Tsung-Yu Lee (李宗育) 292
- Tswen- Keit Tang (唐存愷) 30
- Tzong-Faa Shiao (蕭宗法) 162
- Tzu-Hsuan Huang (黃子瑄) 273
- Tzu-Rung Li (李姿蓉) 140
- Wen-Shin Lin (林汶鑫) 189
- Ya-Ling Huang (黃雅玲) 282
- Yen-Chun Lin (林彥均) 91
- Yi-Chen Chen (陳怡蓁) 126
- Yih-Fwu Lin (林義福) 173, 292
- Yi-Hsiang Weng (翁義翔) 64
- Yi-Hsin Yeh (葉亦馨) 219
- Yi-Hsuan Chen (陳怡璇) 219
- Yi-Ming Chen (陳一明) 219
- Ying-An Chu (朱盈安) 173
- Yi-Ying Chang (張怡穎) 126
- You-Jun Lin (林幼君) 57
- Yu-An Lin (林育安) 82
- Yu-Chun Lin (林幼君) 148, 239
- Yu-Hsin Chen (陳裕信) 91
- Yu-I Lai (賴佑宜) 99, 182
- Yung-Fen Huang (黃永芬) 116
- Yu-Shine Jea (賈玉祥) 18

第五十四卷中文主題索引

- G 型免疫球蛋白 40
SPAD 值 140
土番鴨 82
土壤 282
大豆 189
山羊 91
公豬 30
日變化 116
仔豬 239
生長 40
生長性狀 1
生長性能 57, 82, 292
白肉雞 173, 292
白羅曼肉鵝 1, 9
白羅曼鵝 18
再利用 259
地下水 282
收穫期 116
羽毛 259
羽毛重 18
自動推料機 219
行動管理系統 99
免疫力 239
免疫去勢 30
形成孢子能力 148
抗生素 173
抗菌肽 239
杏鮑菇下腳料 1
育成期 48
防疫 99
乳成分 219
乳脂肪酸 155
乳量 219
夜間推料 219
季節 155
性別 18
服務主導邏輯 182
舍飼飼養 231
阿爾拜因山羊 162
青割玉米 74, 189
青貯 189
枯草芽孢桿菌 292
活性污泥多源基因體 273
胎次 155
風險來源 206
風險來源屬性構面 206
飛機翼 18
香椿 40
家禽產業 206
氣候變遷 74
浮力通風 250
特性分析 273
狼尾草 140
狼尾草粉 57
畜禽糞堆肥 106
脂肪酸 40
芻料 198
芻料高粱 74
芻料燕麥 116
除臭 106
高溫 140
乾草品質 250

- 乾草庫 250
乾燥方式 116
副產物 259
屠體性狀 82
屠體品質 1
混植 74
甜高粱 198
產蛋性能 48
產業群聚 182
荷蘭種泌乳牛 155
處理模式 231
單植 74, 189
氮磷去除 64
番鴨 126
菜鴨微衛星標記 126
間植 189
黑木耳 48
新穎酯酶 273
椰子粕 162
腸道組織 18
腸道組織形態 173
腹腔鏡卵母細胞收集 91
電解質滲漏率 140
飼養密度 18, 82
飼養價值 9
厭氧發酵 282
綠球藻 64
綠膿桿菌 30
網絡管理 182
增重 162
廢棄栽培介質 48
瘤胃消化 162
瘤胃液 148
盤固草生物炭 106
褐色菜鴨 48
豬場 99
輪作制度 198
養牛廢水 282
養豬廢水 64
養鵝廢水 231
凝結芽孢桿菌 57, 148
激性腺素釋放素 30
燕麥 198
遺傳多態性 126
遺傳結構 126
濕紅茶渣 9
營養組成 116
雙醣酶活性 173
雞 259
雞糞墊料生物炭 106
離乳仔豬 57
礦物元素 239
囊胚率 91

Subject Index to Volume 54

- Activated sludge metagenome 281
Alpine goat 172
Anaerobic fermentation 291
Angel wing 29
Antibiotics 181
Antimicrobial peptides 249
Attributes of risk sources 218
Automated feed pusher 230
Bacillus cagulans 154
Bacillus coagulans 63
Bacillus subtilis 299
Black fungus 56
Blastocyst rate 98
Boars 39
Broiler 299
Broilers 181
Brown Tsaiya duck 56
Buoyancy-driven ventilation 258
By-product 272
Carcass characteristics 8
Carcass traits 90
Characterization 281
Chicken 272
Chlorella sp. 73
Climate change 81
Copra meal 172
Crop rotation mode 205
Dairy wastewater 291
Developer period 56
Disaccharidase activities 181
Diurnal change 125
Drying method 125
Electrolyte leakage rate 147
Epidemic prevention 105
Fatty acid 47
Feather 29
Feather 272
Feeding value 17
Forage 205
Forage corn 81, 197
Forage oat 125
Forage sorghum 81
Genetic diversity 139
Genetic structure 139
Goat 98
Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) 39
Goose 8
Goose wastewater 238
Groundwater 291
Growth 47, 172
Growth performance 8, 63, 90
Growth traits 299
Harvest date 125
Hay barn 258
Hay quality 258
High temperature 147
Holstein milking cows 161
IgG 47
Immunity 249
Immunocastration 39
Indoor rearing 238
Industry cluster 188
Intercropping 197
Intestinal morphology 181

- Intestinal tissue 29
- Laparoscopic oocytes pickup 98
- Laying performance 56
- Livestock manure compost 115
- Milk component 230
- Milk fatty acid 161
- Milk yield 230
- Mineral elements 249
- Mixed planting 81
- Mobile management system 105
- Monocropping 197
- Mule duck 90
- Muscovy duck 139
- Napier grass powder 63
- Napiergrass 147
- Network management 188
- Nighttime feed push-up 230
- Nitrogen and phosphate removal 73
- Novel esterase 281
- Nutrient Compositions 125
- Oat 205
- Odor removal 115
- Pangolagrass biochar 115
- Parity 161
- Pig farm 105
- Pig wastewater 73
- Piglets 249
- Pleurotus eryngii* stump waste 8
- Poultry industry 218
- Poultry litter biochar 115
- Pseudomonas aeruginosa* (PE) 39
- Pure stand 81
- Reutilization 272
- Risk sources 218
- Rumen digestion 172
- Rumen fluid 154
- Season 161
- Service-dominant logic 188
- Sex 29
- Silage 197
- Soil 291
- Soybean 197
- SPAD value 147
- Sporulation ability 154
- Stocking density 29
- Stocking density 90
- Sweet sorghum 205
- Toona sinensis* 47
- Treatment model 238
- Tsaiya duck-derived microsatellite markers 139
- Waste cultivation medium 56
- Weaned piglet 63
- Wet black tea leave residues 17
- White Roman geese 29
- White Roman meat-type goose 17

第五十四卷中文目錄

第一期

1. 杏鮑菇下腳料應用於白羅曼肉鵝飼養價值之評估 王勝德 陳美惠 施柏齡 沈士怡 廖士傑.....	1
2. 濕紅茶渣對白羅曼肉鵝飼養價值之評估 王勝德 簡靖華 廖士傑 沈士怡.....	9
3. 飼養密度、飛機翼及性別對白羅曼鵝羽毛重、血液性狀及腸道組織之影響 林旻蓉 吳國欽 賈玉祥 張仲彰.....	18
4. 應用激性腺素釋放素－重組綠膿桿外毒素接合抗原進行 LYD 公豬之免疫去勢 蕭振文 劉振發 陳立人 王思涵 唐存愷 戴謙 楊惠郎.....	30
5. 飼糧中添加香椿粉對肉鵝生長、免疫及屠體品質之影響 蕭智彰 練慶儀.....	40
6. 褐色菜鴨育成期黑木耳廢棄栽培介質飼糧對其產蛋性能之影響 鄭智翔 蘇晉暉 林榮新 林芯仔 許馨云.....	48
7. 飼料添加凝結芽孢桿菌與狼尾草粉對離乳仔豬生長性能之影響 王錦盟 劉芳爵 林秉憲 林幼君.....	57
8. 應用綠球藻去除養豬廢水中氮磷與沼氣中二氧化碳 蘇天明 翁義翔 廖仁寶 蕭庭訓 程梅萍.....	64

第二期

1. 青割玉米與芻料高粱混植效益評估 張敏郎 廖麗貞.....	74
2. 舍內飼養密度對土番鴨生長性能與屠體性狀之影響 林榮新 林育安 曾再富 鄭智翔 劉秀洲 蘇晉暉.....	82
3. 山羊腹腔鏡卵母細胞採集技術之建立 康定傑 曾楷扉 林彥均 陳裕信 曲鳳翔 林信宏 沈朋志.....	91
4. 豬場智慧化防疫行動管理系統開發 王斌永 賴佑宜 蔡銘洋.....	99
5. 盤固草生物炭或雞糞墊料生物炭對畜禽糞堆肥異味去除研究 王紓愨 劉信宏 游翠凰 鍾承訓 李秀蘭.....	106
6. 芻料燕麥營養成分變動之探討 陳嘉昇 黃永芬 游翠凰 王紓愨.....	116
7. 菜鴨微衛星標記應用於不同番鴨族群遺傳多態性之探討 張怡穎 魏良原 陳怡蓁 劉秀洲.....	126
8. 利用 SPAD 值與電解質滲漏率評估高溫環境下狼尾草生長變化 蔡立中 李姿蓉 鍾萍.....	140

第三期

1. 源自豬隻糞便與牛瘤胃液凝結芽孢桿菌的篩選、鑑定與性狀分析	
劉芳爵 林幼君.....	148
2. 季節變化與胎次對臺灣荷蘭種泌乳牛產乳量、乳成分及乳脂肪酸組成之影響	
王思涵 廖曉涵 涂柏安 楊明桂 林宗毅.....	155
3. 飼糧添加椰子粕對阿爾拜因山羊增重及瘤胃消化之影響	
范耕榛 蕭宗法 李春芳.....	162
4. 飼糧中添加抗生素對肉雞腸道組織形態及雙醣酶活性之影響	
洪靖崎 陳保基 陳靜宜 朱盈安 黃懿儂 林義福.....	173
5. 畜產產業群聚與創新治理：青年從農個案研究	
賴佑宜 王斌永.....	182
6. 大豆及青割玉米之單植與間植青貯特性比較	
朱明宏 陳嘉昇 林汶鑫.....	189
7. 有效益芻料作物甜高粱及燕麥之生產 I. 地區輪作模式之建議	
陳勃聿 張世融.....	198
8. 家禽產業農民從農風險與相關因素之研究	
張以恆.....	206

第四期

1. 應用自動推料機進行夜間推料對荷蘭泌乳牛乳量及乳成分之影響	
葉亦馨 廖曉涵 陳怡璇 陳一明 林宗毅 涂柏安.....	219
2. 以模型場設施探討舍飼養鵝廢水之處理性能	
江兆弘 胡見龍 林宗毅.....	231
3. 提高飼糧鐵、硒或錳含量對仔豬生長性能、血液性狀與免疫反應之影響	
劉芳爵 林幼君.....	239
4. 乾草倉貯通風改良對梅雨期盤固草圓形乾草包去濕效果測試	
陳嘉昇 劉信宏 游翠凰.....	250
5. 雞隻副產物之再利用技術	
葉瑞涵 李孟儒 吳鈴彩 朱家德 涂榮珍.....	259
6. 源自活性污泥多源基因體新穎酯酶 Est03 之蛋白純化與特性分析	
黃子瑄 廖仁寶.....	273
7. 養牛廢水施灌盤固拉草地對土壤性狀及地下水水質之影響	
黃雅玲 劉主欣 蘇天明 蕭庭訓 李欣蓉.....	282
8. 飼糧添加枯草芽孢桿菌 TLRI 211-1 對白肉雞生長性能、屠體性狀及血液生化值之影響	
李宗育 廖仁寶 王嘉惠 施柏齡 范耕榛 林義福.....	292

Contents to Volume 54

Vol. 54 No. 1

1. Evaluation of the feeding value of <i>Pleurotus eryngii</i> stump waste in White Roman meat-type geese <i>Sheng-Der Wang, Mei-Huei Chen, Bo-Ling Shih, Shih-Yi Shen and Shih-Chieh Liao</i>	1
2. Evaluation of the feeding value of wet black tea leave residues in White Roman meat-type geese <i>Sheng-Der Wang, Ching-Hua Chien, Shih-Chieh Liao and Shih-Yi Shen</i>	9
3. Effects of stocking density, angel wing and sex on feather weight, blood biochemical parameters and intestinal tissue in White Roman geese <i>Min-Jung Lin, Kwo-Chin Wu, Yu-Shine Jea and Shen-Chang Chang</i>	18
4. Immunocastration of boars with GnRH-rPE conjugated antigen <i>Jen-Wen Shiau, Jenn-Fa Liou, Lih-Ren Chen, Szu-Han Wang, Tswen-Keit Tang, Chein Tai and Huey-Lang Yang</i>	30
5. Effects of <i>Toona sinensis</i> powder supplemented to diets on growth and immunity and carcass quality of breast meat in geese <i>Chih-Chang Hsiao and Ching-Yi Lien</i>	40
6. Effect of waste cultivation medium of black fungus during developer period on laying performance of Brown Tsaiya ducks <i>Chih-Hsiang Cheng, Chin-Hui Su, Jung-Hsin Lin, Hsin-Yu Lin and Hsin-Yun Hsu</i>	48
7. Effects of applying <i>Bacillus coagulans</i> and Napier grass powder on the growth performances of weaned piglets <i>Chin-Meng Wang, Fang-Chieh Liu, Bing-Sian Lin and You-Jun Lin</i>	57
8. Application of <i>Chlorella</i> sp. to the removal of nitrogen and phosphorus in pig wastewater and carbon dioxide in biogas <i>Tein-Ming Su, Yi-Hsiang Weng, Ren-Bao Liaw, Ting-Hsun Hsiao and Mei-Ping Cheng</i>	64

Vol. 54 No. 2

1. Evaluation of the advantages of mixed planting of forage corn with forage sorghum <i>Min-Lang Chang and Li-Jen Liao</i>	74
2. The effects of stocking density on the growth performance and carcass traits of the mule ducks indoor <i>Jung-Hsin Lin, Yu-An Lin, Tsai-Fuh Tseng, Chih-Hsiang Cheng, Hsiu-Chou Liu and Chin-Hui Su</i>	82
3. Establishment of goat laparoscopic oocytes pick-up technology <i>Ting-Chieh Kang, Kai-Fei Tseng, Yen-Chun Lin, Yu-Hsin Chen, Fung-Hsiang Chu, Hsin-Hung Lin and Perng-Chih Shen</i>	91
4. Development of smart epidemic prevention action management system for pig farms <i>Bin-Yong Wang, Yui-I Lai and Ming-Yang Tsai</i>	99
5. Study on the odor removal of livestock manure compost by pangolagrass biochar or poultry litter biochar <i>Shu-Min Wang, Hsin-Hung Liu, Tsui-Huang Yu, Cheng-Hsun Chung and Hsiu-Lan Lee</i>	106
6. Study on the variation of nutrient compositions of forage oats <i>Chia-Sheng Chen, Yung-Fen Huang, Tsui-Huang Yu and Shu-Min Wang</i>	116
7. Study on the genetic diversities in different Muscovy duck populations with the microsatellite markers derived from Tsaiya duck <i>Yi-Ying Chang, Liang-Yuan Wei, Yi-Chen Chen and Hsiu-Chou Liu</i>	126
8. Evaluation of growth status of napiergrass under high temperature environment using SPAD values and electrolyte leakage rates <i>Li-Chung Tsai, Tzu-Rung Li and Ping Chung</i>	140

Vol. 54 No. 3

1. Selection and identification and characterization of *Bacillus coagulans* from pig excrement and cattle rumen fluid
Fang-Chueh Liu and Yu-Chun Li 148
2. Effects of seasonal change and cow's parity on milk yield, milk component and milk fatty acid composition of Holstein milking cows in Taiwan
Szu-Han Wang, Hsiao-Han Liao, Po-An Tu, Ming-kuew Yang and Tsung-Yi Lin 155
3. Effect of dietary addition of copra meal on growth performance and rumen digestion of Alpine goats
Geng-Jen Fan, Tzong-Faa Shiao and Churng-Faung Lee 162
4. Effects of antibiotics addition on intestinal morphology and disaccharidase activity in broilers
Ching-Chi Hung, Bao-Ji Chen, Ching-Yi Chen, Ying-An Chu, I-Nung Huang and Yih-Fwu Lin 173
5. Aggregation and Innovative Governance of Livestock Products Industry: A Case Study of Young Farmer
Yu-I Lai and Bin-Yong Wang 182
6. Comparison of silage characteristics among monocropping and intercropping of soybean and forage corn
Ming-Hung Chu, Chia-Sheng Chen and Wen-Shin Lin 189
7. Profitable forage production of forage crops -sweet sorghum and oat I. Suggestion of crop rotation for forage production modes
Po-Yu Chen and Shyh-Rong Chang 198
8. Research on farming risks and related factors in Taiwan poultry industry farmers
I-Heng Chang 206

Vol. 54 No. 4

1. Effect of feed push-up during nighttime hours using automated feed pusher on milk yield and milk components of Holstein cows
Yi-Hsin Yeh, Hsiao-Han Liao, Yi-Hsuan Chen, Yi-Ming Chen, Tsung-Yi Lin and Po-An Tu 219
2. Study on the treatment of wastewaters collected from indoor rearing operation of geese
Chao-Hung Chiang, Chien-Lung Hu and Tsung-Yi Lin 231
3. Effects of high levels of dietary iron, selenium or manganese on growth performance, blood traits and immune response of piglets
Fang-Chueh Liu and Yu-Chun Lin 239
4. Evaluation of the moisture removal effect of pangolagrass round bales with reformed hay barn in the rainy season
Chia-Sheng Chen, Hsin-Hung Liu and Tsui-Huang Yu 250
5. The reutilization technology of chicken by-products
Ruei-Han Yeh, Meng-Ju Lee, Ling-Tsai Wu, Chia-Te Chu and Rung-Jen Tu 259
6. Purification and characterization of a novel esterase Est03 derived from an activated sludge metagenome
Tzu-Hsuan Huang and Ren-Bao Liaw 273
7. Impact of dairy wastewater on the soil properties and groundwater quality after irrigation on Pangolagrass pasture
Ya-Ling Huang, Chu-Hsin Liu, Tein-Ming Su, Ting-Hsun Hsiao and Hsin-Jung Lee 282
8. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* TLRI 211-1 on growth performance, carcass, and blood characteristics of broilers
Tsung-Yu Lee, Ren-Bao Liaw, Chia-Hui Wang, Bor-Ling Shih, Geng-Jen Fen and Yih-Fwu Lin 292

行政院農業委員會畜產試驗所「畜產研究」稿約

(民國 94 年 3 月修訂)

(民國 108 年 12 月修訂)

- I. 本刊為學術性刊物，刊載有關畜產科學原創性研究報告、調查報告及學術性專題論著。
- II. 本刊為季刊，每年 3 月、6 月、9 月及 12 月底出版。
- III. 文稿之排列順序為標題、摘要、緒言、材料與方法(學術性專題論著可略)、結果、討論(結果與討論可合為一節)、結論(可略)、誌謝(可略)及參考文獻。以中文撰寫者，須附英文摘要(Abtract)，以英文撰寫者，則附中文摘要。中英文摘要以不超過五百字為原則，須列中英文相對應之 3 至 6 個關鍵詞。
- IV. 文稿書寫格式，主要參考 Journal of Animal Science：
 - (i) 文稿請用 Word 檔 A4 紙張格式，內文以 12 號字型繕打，中文採新細明體，英文採 Times New Roman，圖表置於內文之後。行距採用單行間距，版面設定中等邊界(上下 2.54 cm，左右 1.91 cm)，並編碼連續行號。
 - (ii) 文字敘述之編號依序為 I、(i)、1、(1)、A、(a)。圖表以圖 1、表 1 等順序表示。中文稿件之圖表標題及圖說請中英並列，圖表內文字請以英文呈現。文字敘述用英文者，圖表中之文字僅用英文。
 - (iii) 本刊以黑白印刷為原則，圖表務求印刷後可清楚分辨標示，並請以電腦繪製，以利排版。
 - (iv) 單位及縮寫：
 1. 單位使用公制，習見之符號及縮寫不必另附中文。專門名詞無適當譯名者可從原文。
 2. 以下常用之縮寫可直接撰寫於本刊稿件不須另作定義：
 - (1) 長度：km、m、cm、mm、 μm 。
 - (2) 重量：kg、g、mg、 μg 。
 - (3) 體積：L、mL、 μL 。
 - (4) 時間：wk、d、h、min、s。
 - (5) 其他： $^{\circ}\text{C}$ 、pH、cal、rpm。
 - (v) 統計分析達顯著差異性請以 *、^a、^b、^c 等上標標示，並於表下方說明。
 - (vi) 參考文獻：
 1. 正文中須書出參考文獻之作者姓氏與年份：
 - (1) 西文文獻之作者僅一人者，書一人之姓如 (Johnson, 1991)；作者為二人者，書二人之姓如 (Johnson and Hobbs, 1991)；作者為三人或以上者，用第一人之姓後再書 *et al.* 如 (Johnson *et al.*, 1991)。
 - (2) 中文文獻之作者僅一人者，書一人之姓氏如 (趙, 1990)；作者為二人者，書二人之姓氏如 (趙及錢, 1990)；作者為三人或以上時，則於第一人姓氏後再加一等字如 (趙等, 1990)。
 2. 參考文獻列示以確經引用者為限，排列次序為作者、年份、題目、發表刊物名稱、卷數、頁數等依次書寫，例如：
 - (1) 期刊類
王政騰、朱慶誠。1991。土番鴨繫留、電昏、放血、燙毛等屠宰條件之探討。畜產研究 24：133-140。
胡怡浩、姜延年、陳銘正、潘金水。1991。北京鴨雜交品系與商業品系肉鴨之生長及屠體性能之比較。畜產研究 24：141-148。
Ayub, M. and M. Shoaib. 2009. Studies on fodder yield and quality of sorghum alone and in mixture with guar under different planting techniques. Pak. J. Agri. Sci. 46: 25-29.
Hsu, F. H., C. J. Nelson, and A. G. Matches. 1985. Temperature effects on germination of perennial warm-season forage grasses. Crop Sci. 25: 215-220.

(2) 書本類

- 朱純燕。2001。水禽類小病毒蛋白基因之分子選殖及抗原性分析。國立中山大學生物科學系，博士論文，高雄市。
- 李登元。1979。乳牛學。臺灣商務印書館，臺北市，第 300 - 322 頁。
- American Oil Chemists Society (AOCS). 1980. Official and Tentative Methods of the American Oil chemists Society. 3rd ed. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, USA.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA, USA.
- Tai C. 1985. Duck breeding and artificial insemination in Taiwan. Duck Production Science and World Practice, pp. 193-203. University of New England, Armidale, Australia.
- Wang, Y. C. 1985. Regrowth ability of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schamach) in the dry, cold season in Taiwan. Proceedings of the XV International Grassland Congress, pp. 1239-1241. Kyoto, Japan.

(3) 其他類

- 行政院農業委員會。2018。農業統計年報。<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>。
- 行政院農業委員會。2017。農委會農業資料統計查詢。<http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/maintenance/Announce.aspx>。
- SAS. 2015. SAS/STAT® 14.1. SAS Institute Inc., Cary, NC. USA.
- SPSS. 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. SPSS Inc., Chicago, IL. USA.
3. 中日文獻以第一作者姓氏筆劃多少為序，西文以第一作者姓氏之拼音先後排列，並按中文、日文、西文之次序排列。
4. 西文期刊名稱請用縮寫，縮寫請參照美國國家醫學圖書館線上資料庫 (NLM Catalog) 之 IOS (Information and documentation) 縮寫。
5. 參考文獻皆不編號。
- V. 本刊編輯委員會保有修改與退稿之權利。稿件經本刊接受後，作者進行出刊校稿時，不得擅自更改內容及數據。
- VI. 本刊亦接受短報 (short communication) 與速報 (rapid report)。其寫法亦遵照本稿約之規定，稿長包括圖、表、相片等不得超過 4 個印刷面。
- VII. 稿件經本刊委員會轉請專家審查，編輯委員會根據專家審查意見通知投稿人，是否接受刊載，或須修改後始可刊載。本刊無提供稿費。
- VIII. 稿件經本刊接受後，該稿件之全部或部份，不得投稿其他刊物，以不同語文投稿其他刊物亦所不許。本刊具專屬版權，刊登權屬發行單位畜產試驗所所有，非經本所書面同意，不得轉載或轉移他處發表。如有上述情事，相關法律責任由作者自負，本刊有拒絕接受其投稿之權利。
- IX. 來稿請寄 71246 臺南市新化區牧場 112 號，「行政院農業委員會畜產試驗所技術服務組畜產研究編輯委員會」收，聯絡電話：06-5911211。投稿請以 A4 紙列印，確認收件後，另通知繳交電子檔。
- X. 自民國 93 年開始實施之計畫，其論文如涉及使用脊椎動物進行科學應用計畫者，請撰稿者檢附該計畫經所屬機構動物實驗管理小組審議認可之文件。