

# 大貓熊腸道乳酸菌粉末

## 臨床應用之前期研究

王怡敏<sup>(1)</sup> 邱彥安<sup>(2)</sup> 何基瑋<sup>(2)</sup>

劉晉廷<sup>(1)</sup> 陳玉燕<sup>(1)</sup> 王翰聰<sup>(2)</sup>

(1) 臺北動物園

(2) 臺灣大學動物科學技術學系



# 報告大綱

## 一、前言

- 本園大貓熊雄性個體團團腸道菌相問題與可能的成因
- 以乳酸菌等益生菌添加可否改善大貓熊腸道健康

## 二、研究成果

- 自腸道菌相平衡雌性個體圓圓糞便純化篩選乳酸菌
- 體外測試大貓熊乳酸菌穩定性試

## 三、結論

# 雄性大貓熊團團腸胃道問題

- 雄性大貓熊團團成年後平均每一年有後腸菌相不平衡的紀錄



圖、2018年6月10日大貓熊團團異常排便

# 圈養大貓熊 消化道菌相紊亂的可能原因

較早離開  
母獸

無足夠時間於幼年  
特定時期自母獸或  
環境接種適當且平  
衡之菌群

飼養管理  
不當

精料給予過多，纖  
維性食物攝取不足

抗生素  
使用不當

抗生素使用不當

(王等，1998)

# 團團腸胃道菌相不穩定可能原因

較早離開  
母獸

1. 雙胞胎兄弟交替予母熊哺育，搭配人工育幼，於6個月與母熊分離，無法於幼年期自母熊或環境接種合適的腸道菌群。
2. 在人類中也有研究指出，腸道菌相的建立於幼年期是關鍵，可能會影響個體健康狀況。

(王等，1998; 卞等，2018; Francino, 2014; Matamoros *et. al.*, 2013)

# 以腸道健康個體 篩選乳酸菌改善動物健康



在畜產界將自動物體分離之益生菌，添加於飼料餵飼動物，從而改善動物健康狀況，已經被廣泛應用於豬和雞等物種的餵飼管理上(Angelis *et al.*, 2006; Musa *et al.*, 2009)

# 以乳酸菌作為益生菌的潛在優點

抗氧化  
能力

協助治療  
惡性腫瘤

增強免疫  
系統

緩解腸道  
疾病

抑制壞菌  
生長

安全性  
較高

# 以乳酸菌作為益生菌的潛在優點

抗氧化  
能力

協助治療  
惡性腫瘤

增強免疫  
系統

緩解腸道  
疾病

抑制壞菌  
生長

安全性  
較高

# 純化篩選大貓熊乳酸菌強化動物健康



目前照養管理方式

強化飼養管理方式



研究目標

目前在大貓熊益生菌研究中，相關研究仍舊十分缺乏

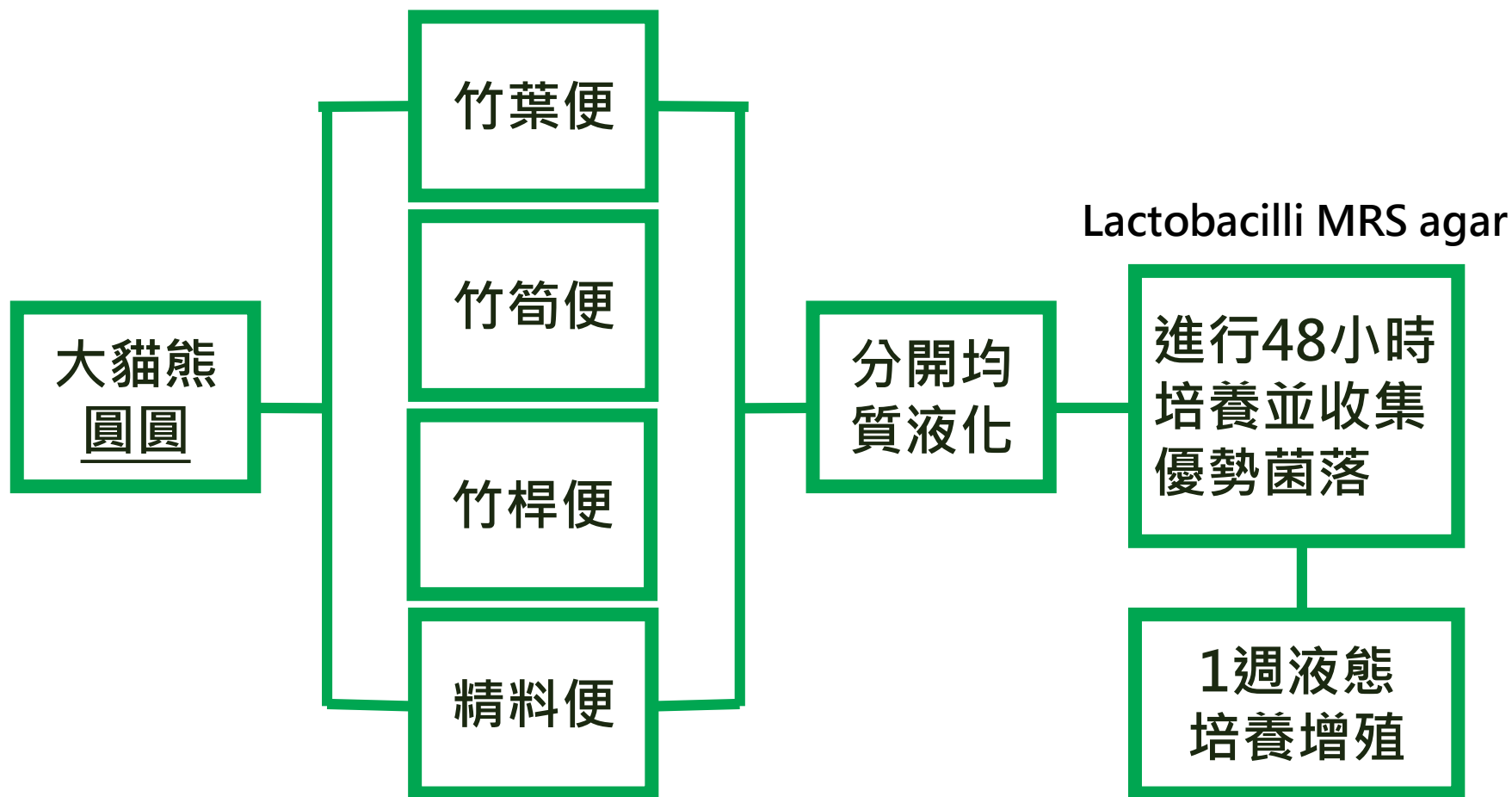
# 研究目標



大貓熊乳酸菌粉末  
製備流程建立

1. 建立自大貓熊圓圓糞便，純化篩選乳酸菌株之操作流程。
2. 進行體外試驗，檢測純化乳酸菌之耐酸性與耐膽鹽能力
3. 建立一公升MRS broth培養模式，求得較大量培養時最佳收菌時機點
4. 實際產製出乳酸菌粉末

# 純化篩選乳酸菌株之操作流程



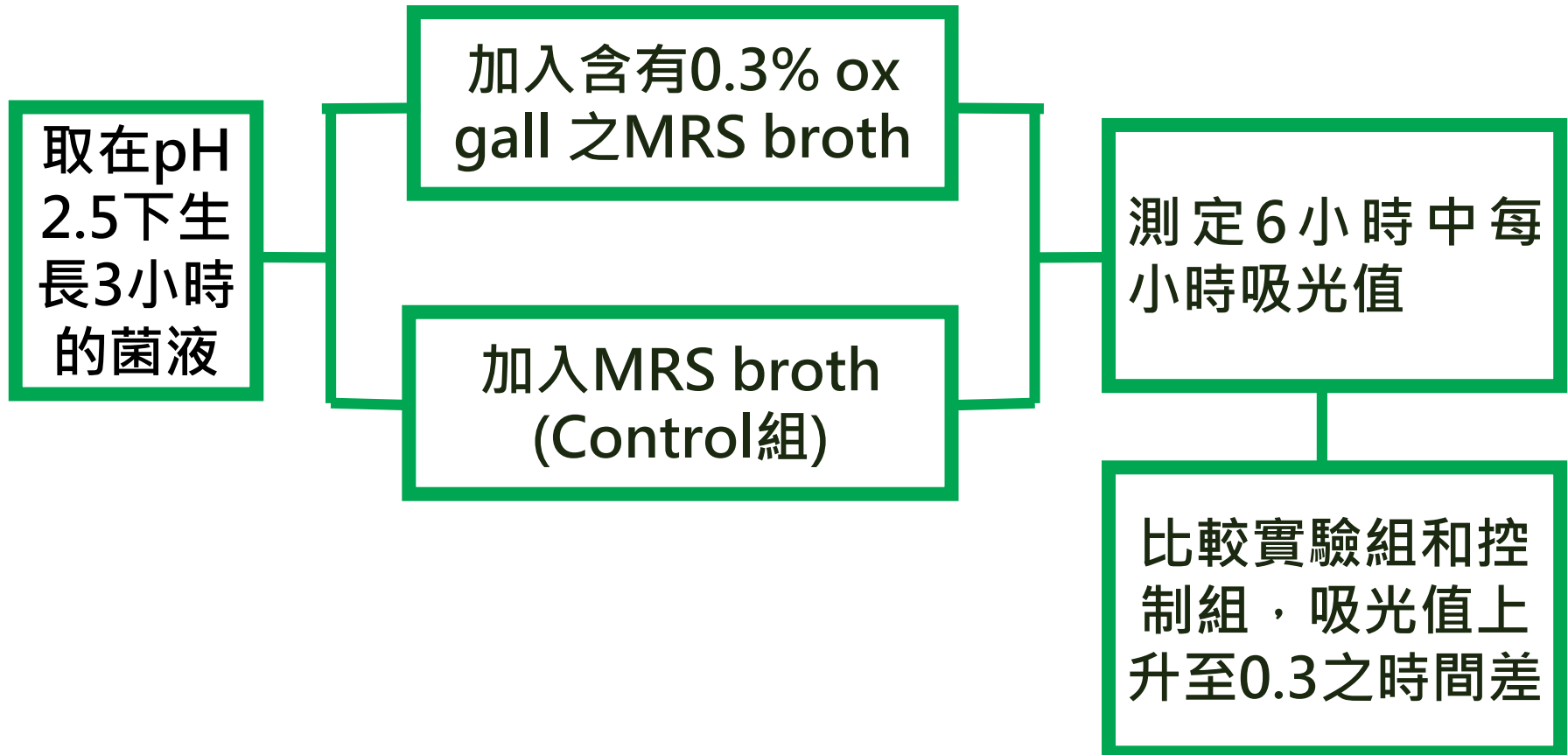
# 耐酸性試驗操作流程

兩次  
乳酸菌  
活化

酸性環境培養  
pH 2、2.5、3、5、  
7.3(控制組)

0小時及3小時各取  
0.1mL 菌液加進  
9.9mL MRS broth  
裡，培養12小時後  
測660nm的吸光值

# 耐膽鹽試驗操作流程



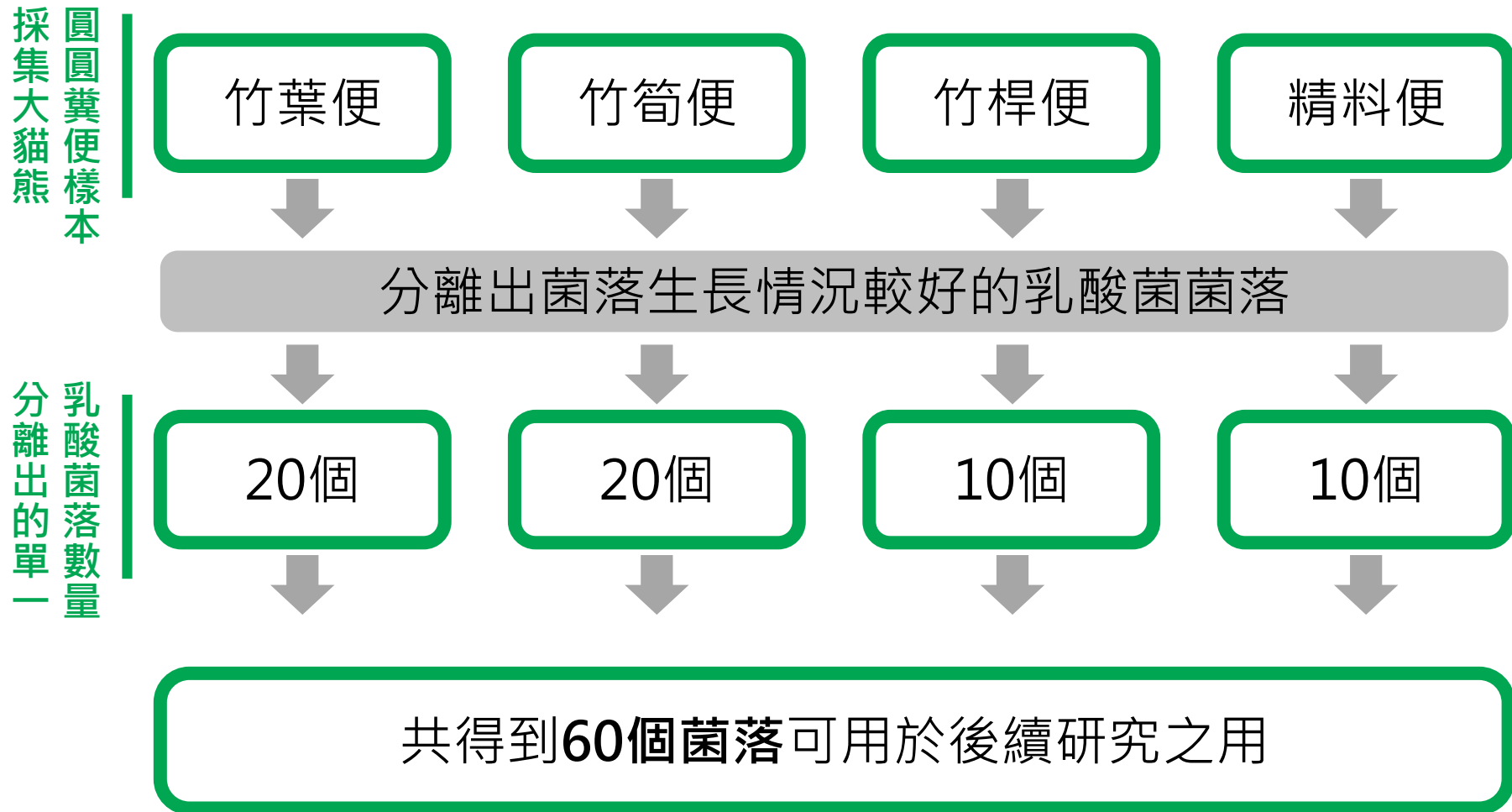
# 乳酸菌大量培養試驗操作流程

乳酸菌以  
1L MRS  
broth培養

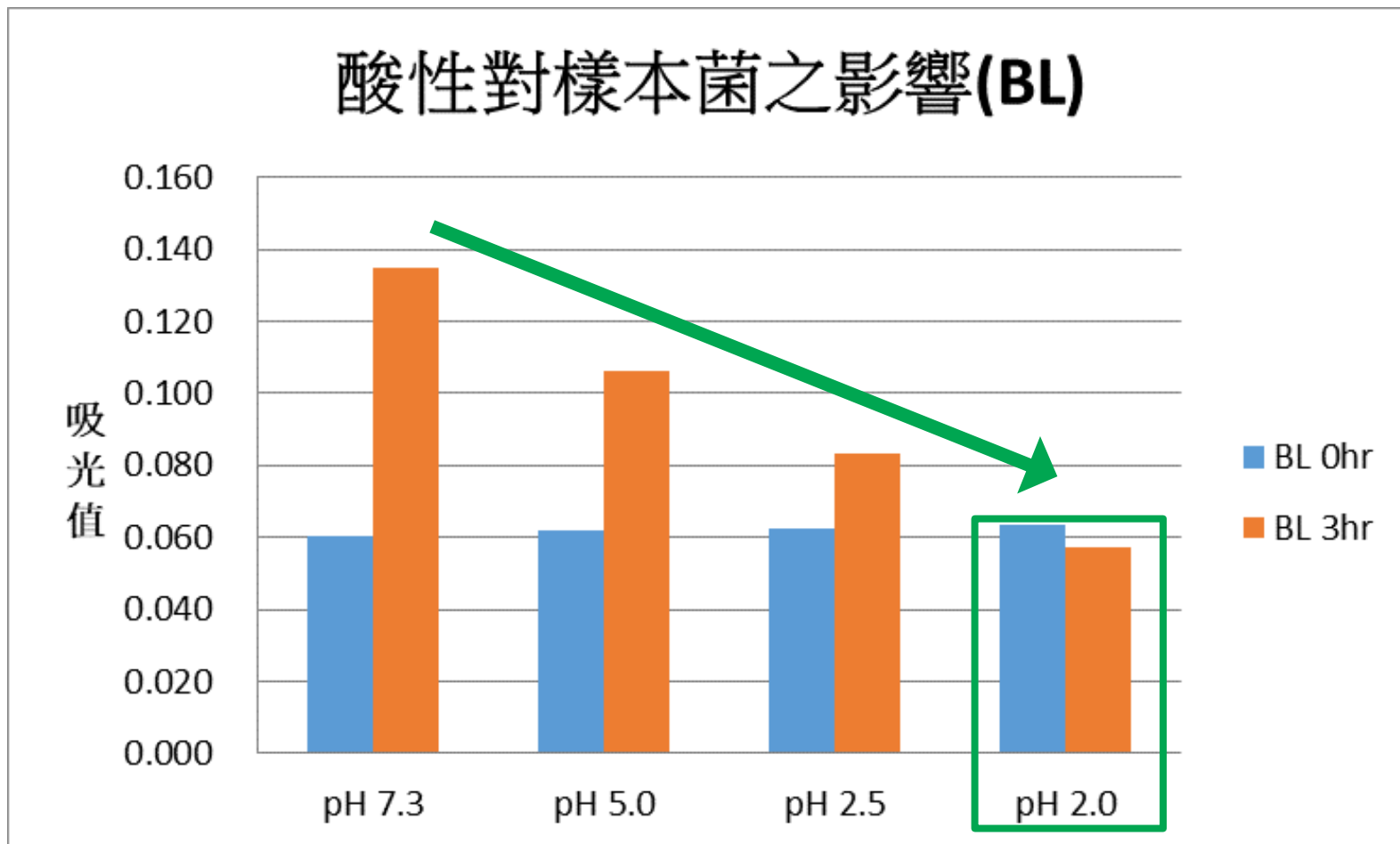
於2、4、8、12、  
24小時測定660nm  
的吸光值及菌數

建立一公升體積培  
養時之生長曲線

# 自腸道菌相健康之大貓熊糞便，製備大貓熊專用乳酸菌

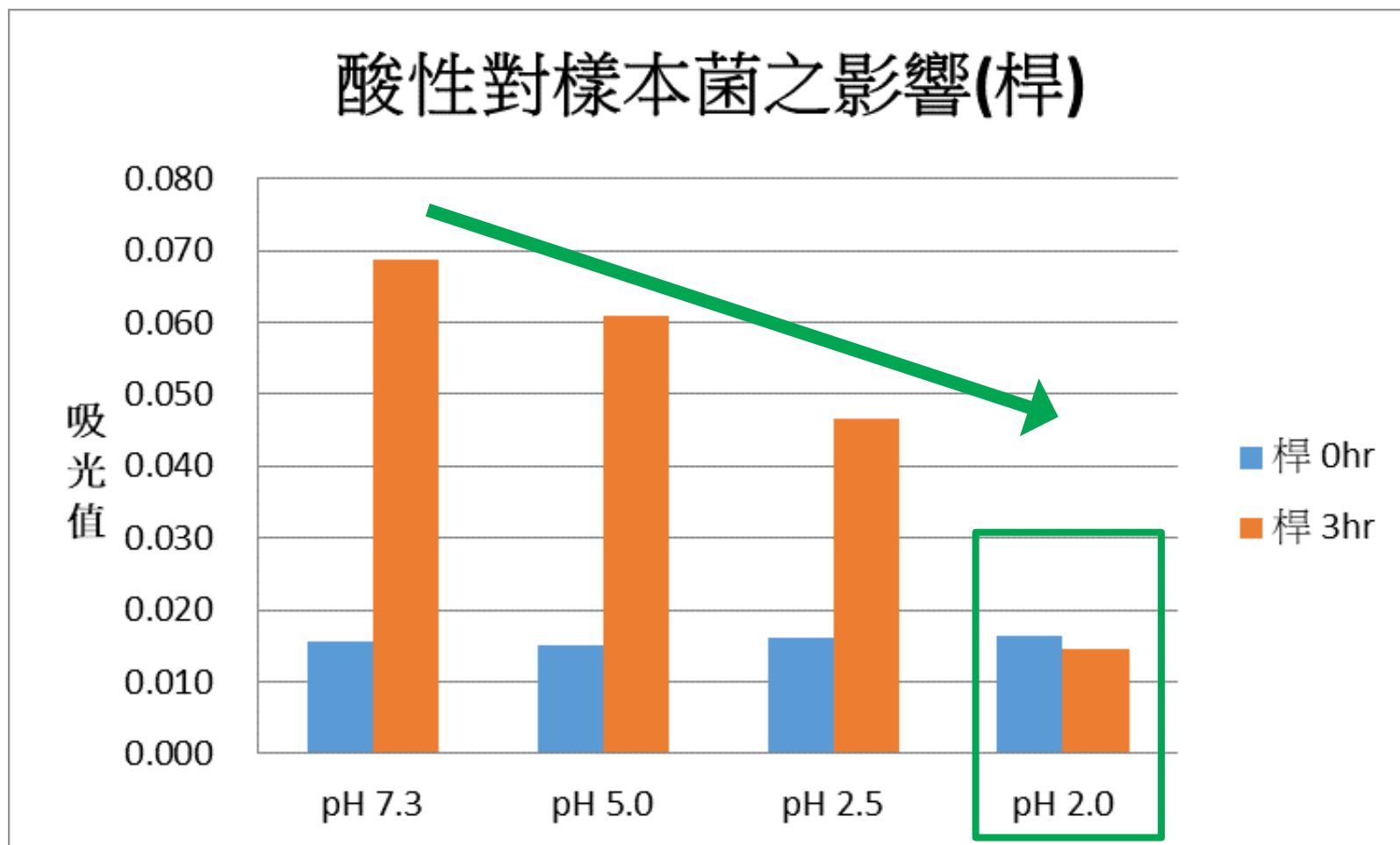


# 自竹葉便分離乳酸菌 在酸性環境下生長不佳



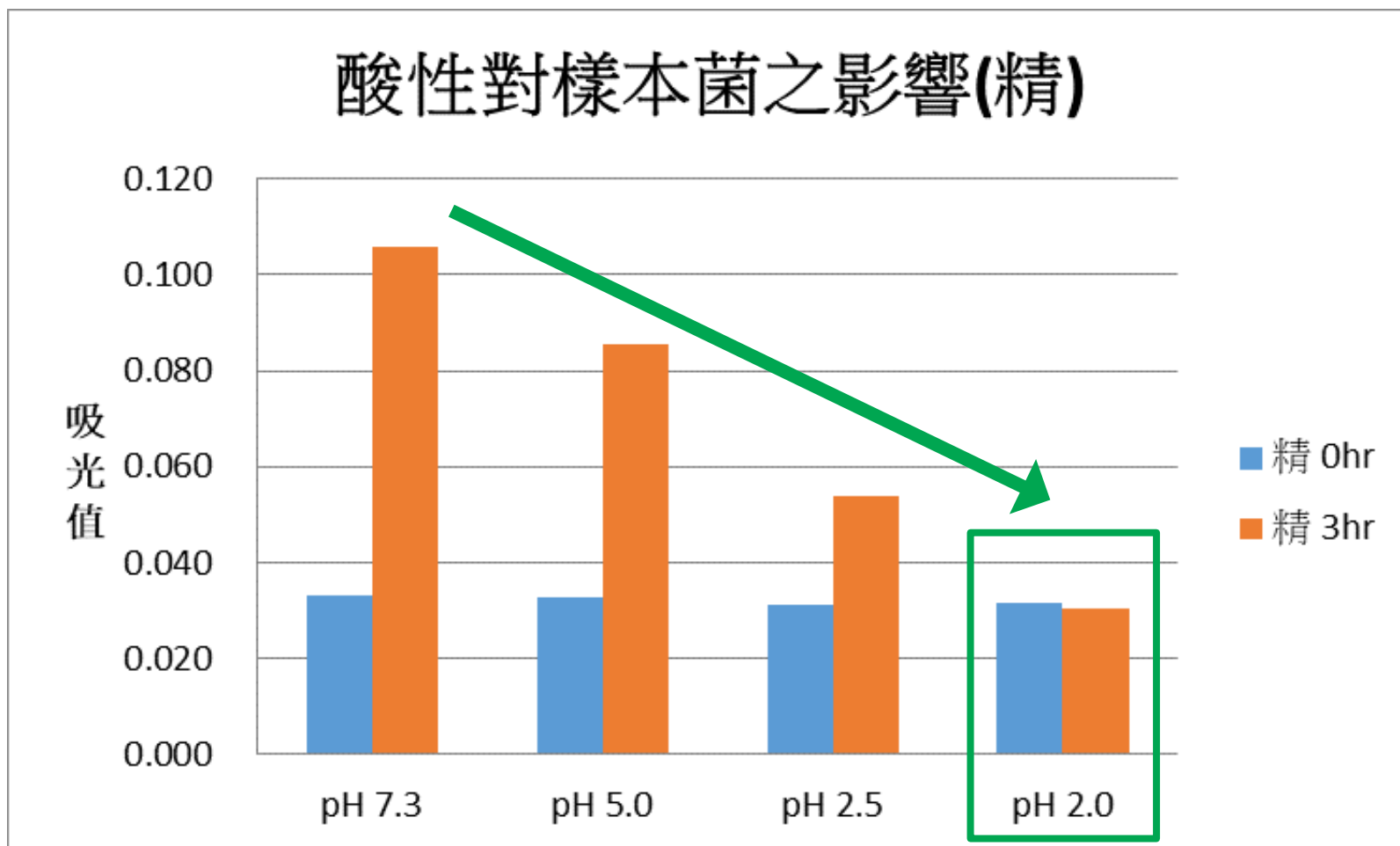
圖、由竹葉便(BL)所分離的乳酸菌分別在pH7.3-2.0環境下，培養3小時後的吸光值變化

# 自竹桿便分離乳酸菌 在酸性環境下生長不佳



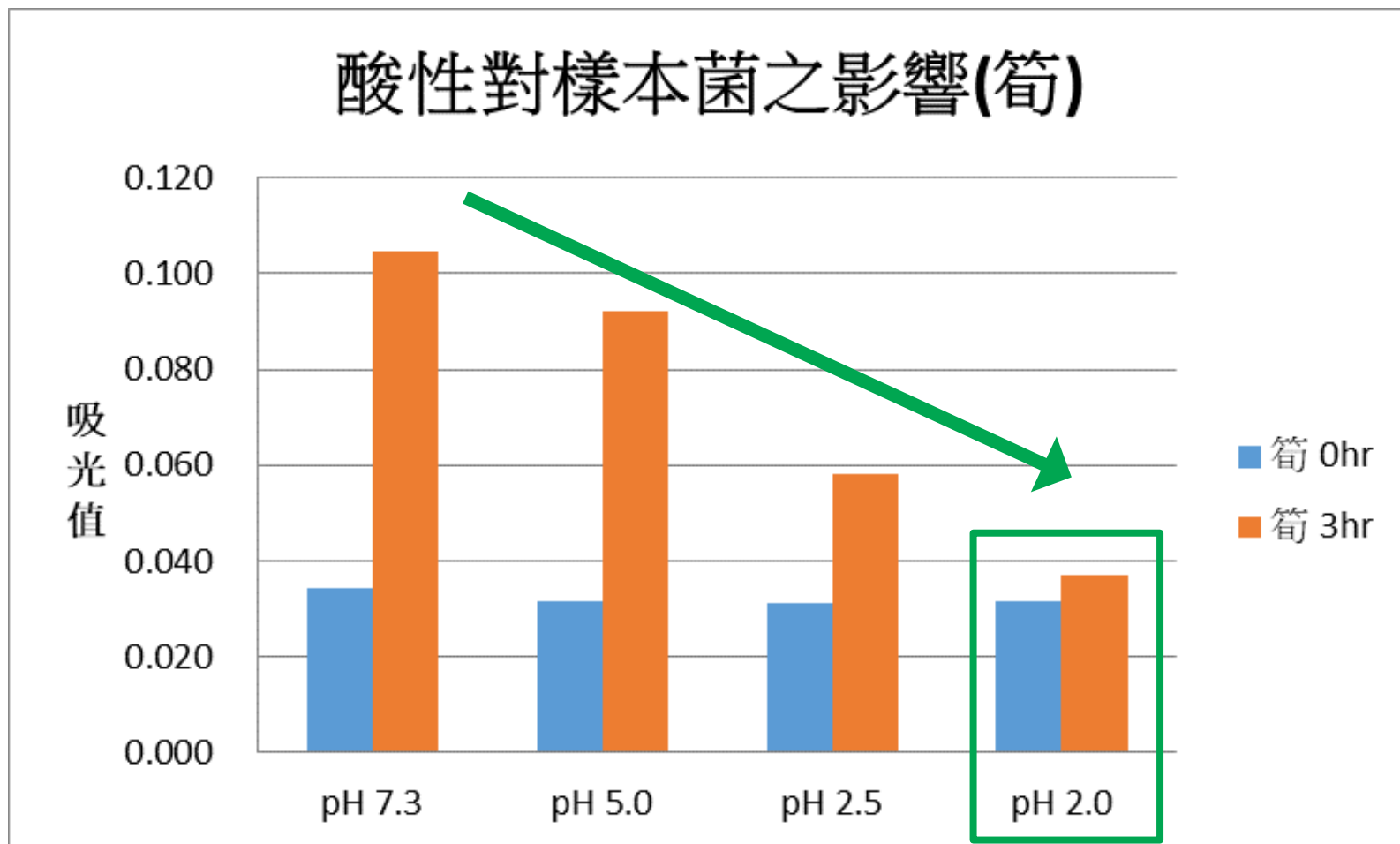
圖、由竹桿便所分離的乳酸菌分別在pH7.3-2.0環境下，  
培養3小時後的吸光值變化

# 自精料便分離乳酸菌 在酸性環境下生長不佳



圖、由精料便所分離的乳酸菌分別在pH7.3-2.0環境下，  
培養3小時後的吸光值變化

# 自竹筍便分離乳酸菌 在酸性環境下生長不佳

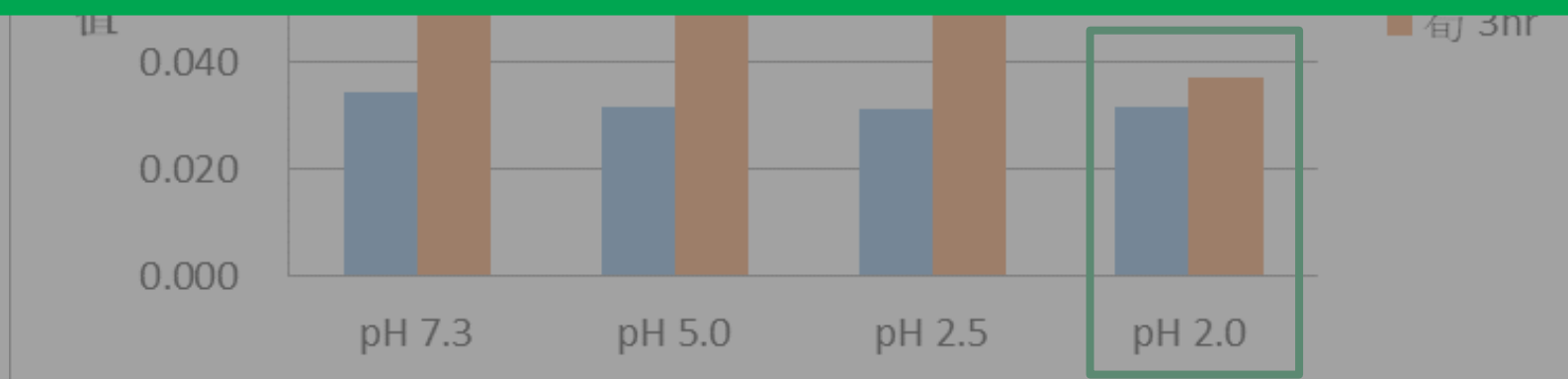


圖、由竹筍便所分離的乳酸菌分別在pH7.3-2.0環境下，培養3小時後的吸光值變化

# 自竹筍便分離乳酸菌 在酸性環境下生長不佳

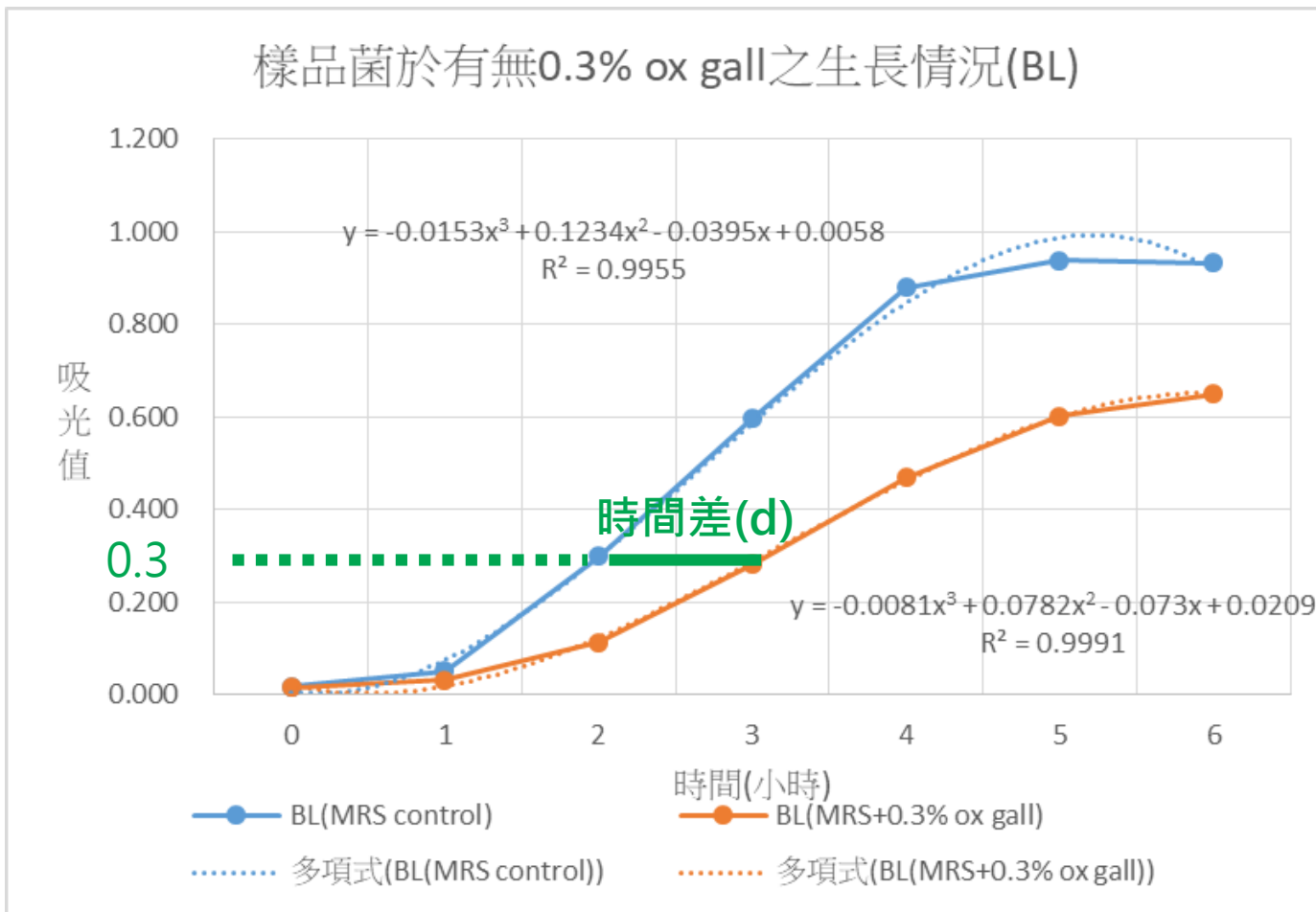
酸性對樣本菌之影響(筍)

結果顯示四種糞便來源之乳酸菌，於酸性環境下生長情況皆不佳，且於pH 值為2時  
乳酸菌幾乎無法生長。



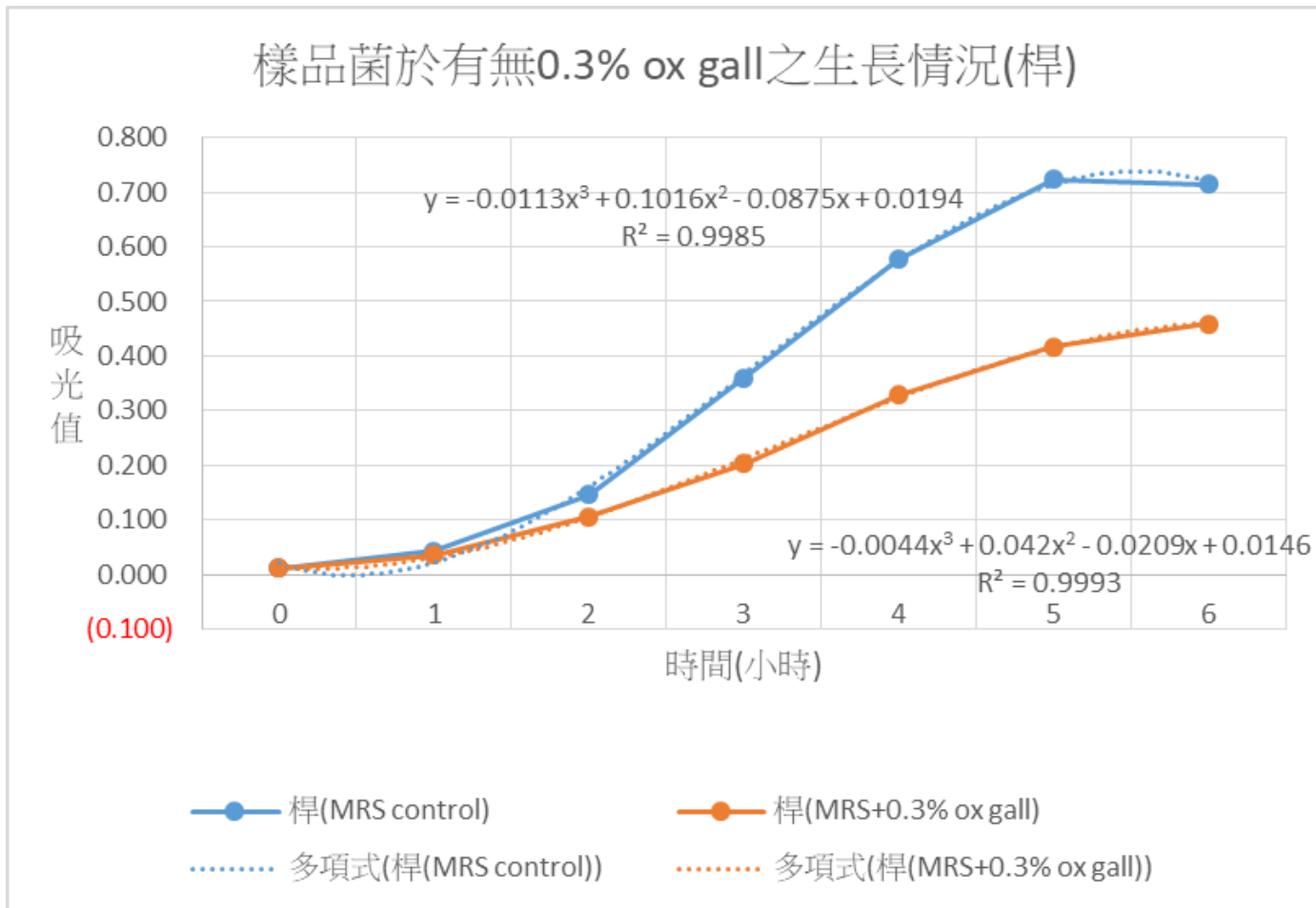
圖、由竹筍便所分離的乳酸菌分別在pH7.3-2.0環境下，  
培養3小時後的吸光值變化

# 自竹葉便分離乳酸菌 在膽鹽環境下生長受到抑制



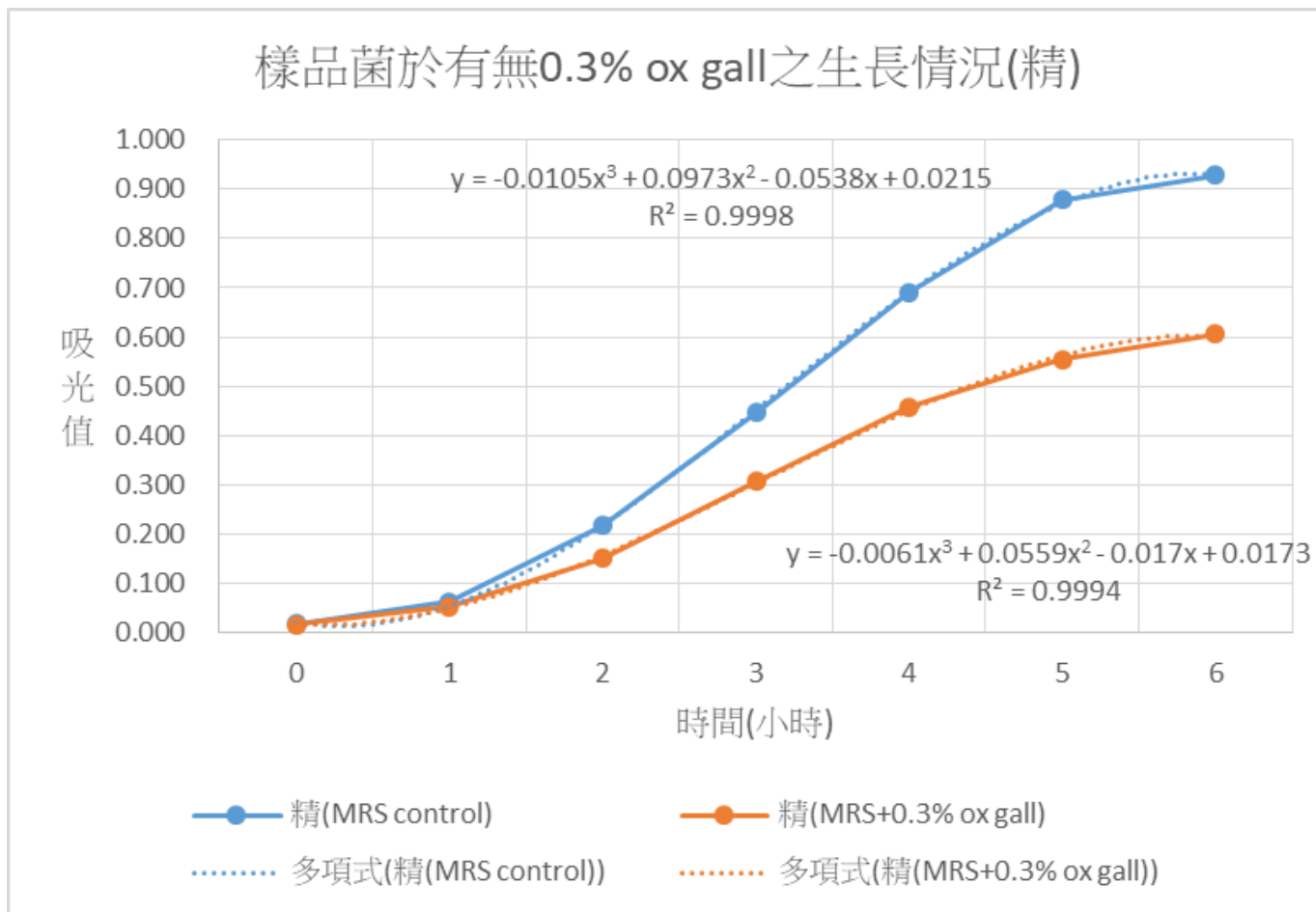
圖、由竹葉便所分離的乳酸菌在0.3% ox gall中，培養6小時的吸光值變化

# 自竹桿便分離乳酸菌 在膽鹽環境下生長受到抑制



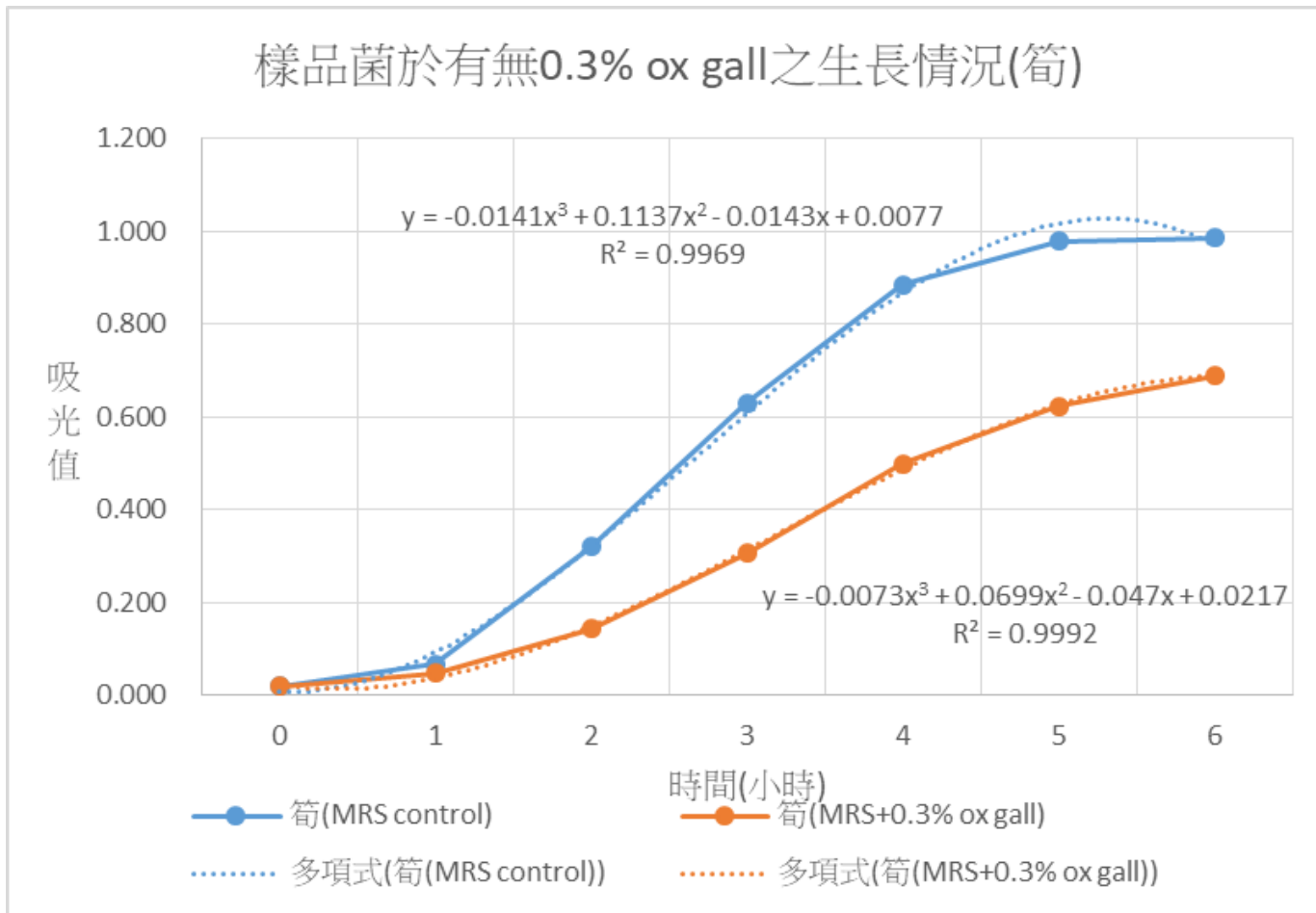
圖、由竹桿便所分離的乳酸菌在0.3% ox gall中，培養6小時的吸光值變化

# 自精料便分離乳酸菌 在膽鹽環境下生長受到抑制



圖、由精料便所分離的乳酸菌在0.3% ox gall中，培養6小時的吸光值變化

# 自竹筍便分離乳酸菌 在膽鹽環境下生長受到抑制



圖、由竹筍便所分離的乳酸菌在0.3% ox gall中，培養6小時的吸光值變化

# 不同來源乳酸菌對膽鹽之耐受性

透過計算實驗組和控制組吸光值

上升到0.3(到達log phase)需要的時間差(d) (單位：分鐘)

- $d \leq 15$  為能抵抗 (resistant)
- $15 < d \leq 40$  為耐受性 (tolerant)
- $40 < d < 60$  為低度耐受性 (weakly tolerant)
- $d \geq 60$  為敏感 (sensitive)

(Chateau *et al.*, 1994; Hyronimus *et al.*, 2000)

表、大貓熊不同糞便來源乳酸菌在膽鹽環境中之耐受性

乳酸菌來源	時間差(d)	對膽鹽耐受性
竹葉便	65.4	敏感(sensitive)
竹桿便	69.6	敏感(sensitive)
竹筍便	62.4	敏感(sensitive)
精料便	38.4	耐受性(tolerant)

# 不同來源乳酸菌對膽鹽之耐受性

透過計算實驗組和控制組吸光值

上升到0.3(到達log phase)需要的時間差(d) (單位：分鐘)

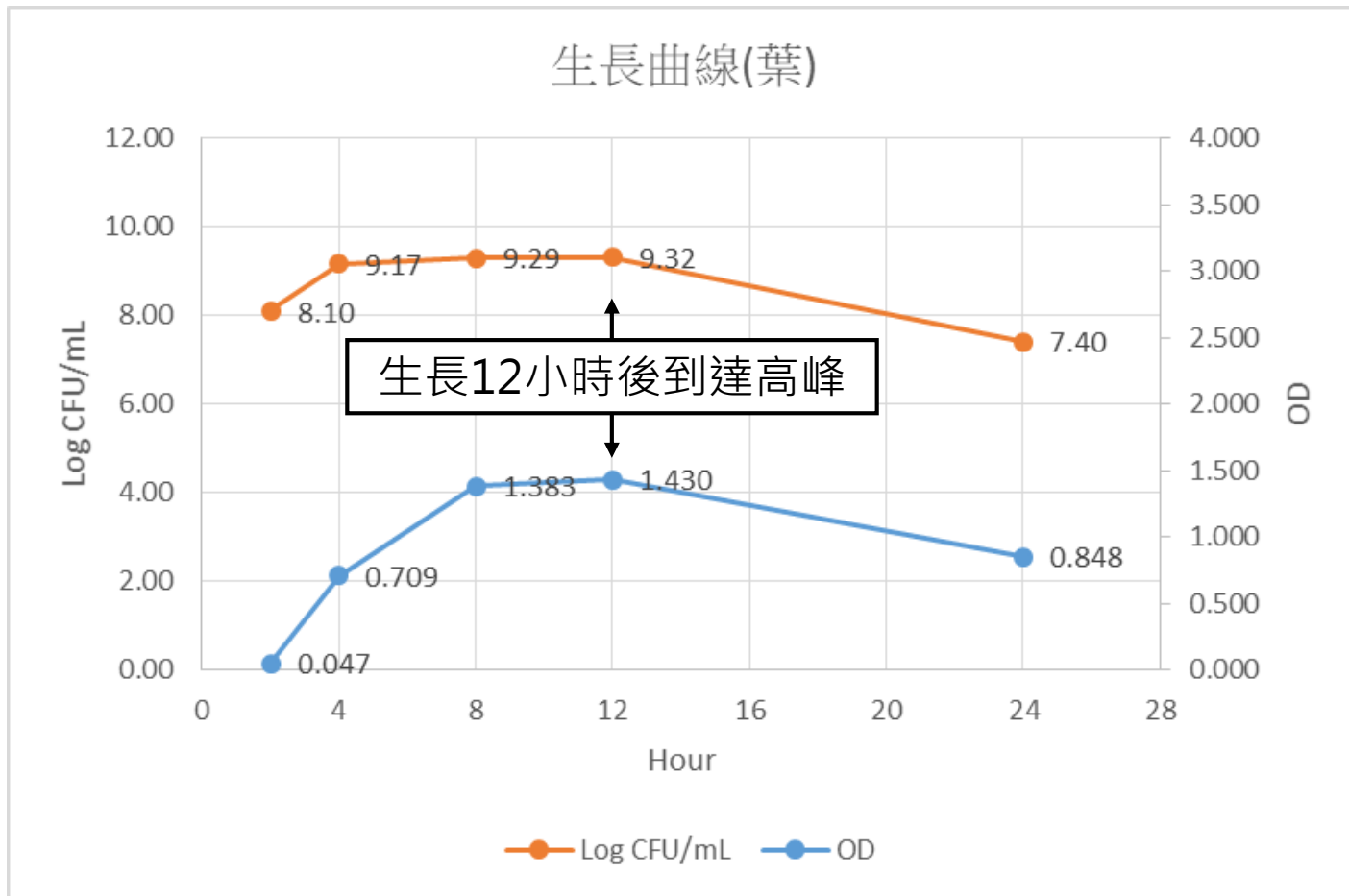
□  $d \leq 15$  為能抵抗 (resistant)

**結果指出僅精料便純化之乳酸菌，對膽鹽較有耐受性，其他三種糞便來源之乳酸菌皆對膽鹽較敏感。**

乳酸菌來源	時間差(d)	對膽鹽耐受性
竹葉便	65.4	敏感(sensitive)
竹桿便	69.6	敏感(sensitive)
竹筍便	62.4	敏感(sensitive)
精料便	38.4	耐受性(tolerant)

# 檢測自竹葉便分離乳酸菌

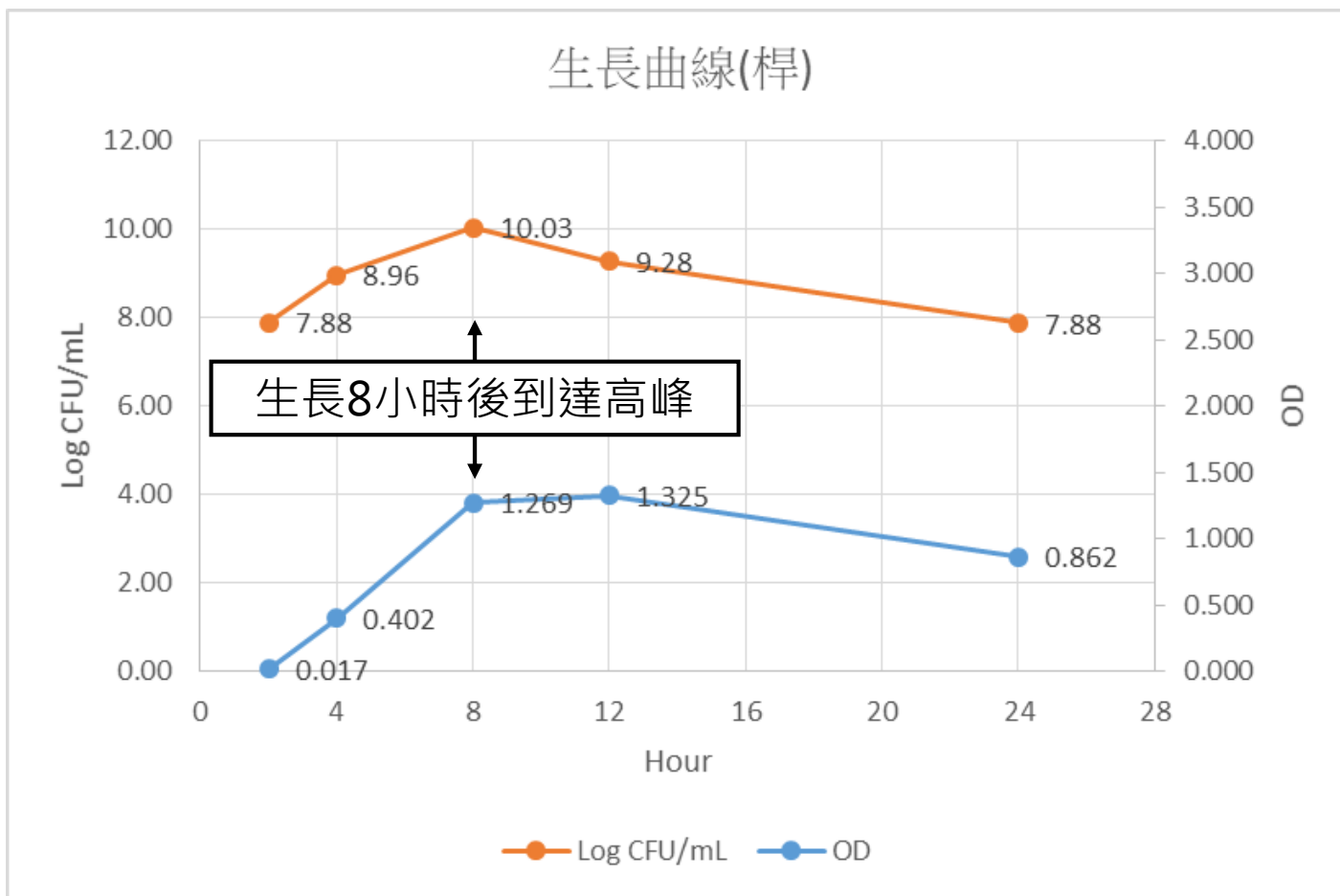
## 在大量培養時最適培養時間與吸光值



圖、由竹葉便分離的乳酸菌，以一公升培養基培養時的生長曲線與吸光值

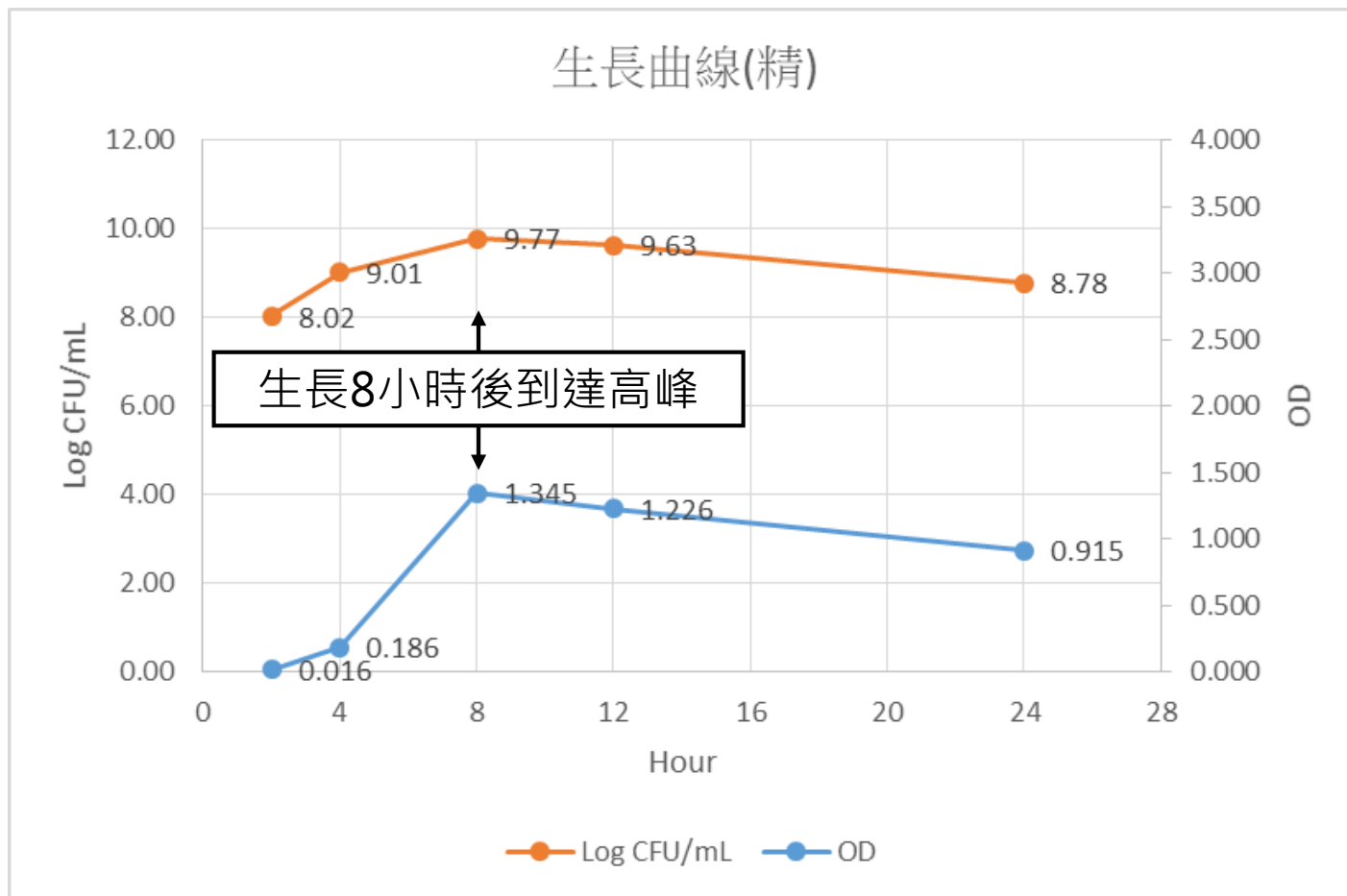
# 檢測自竹桿便分離乳酸菌

## 在大量培養時最適培養時間與吸光值



圖、由竹桿便分離的乳酸菌，以一公升培養基培養時的生長曲線與吸光值

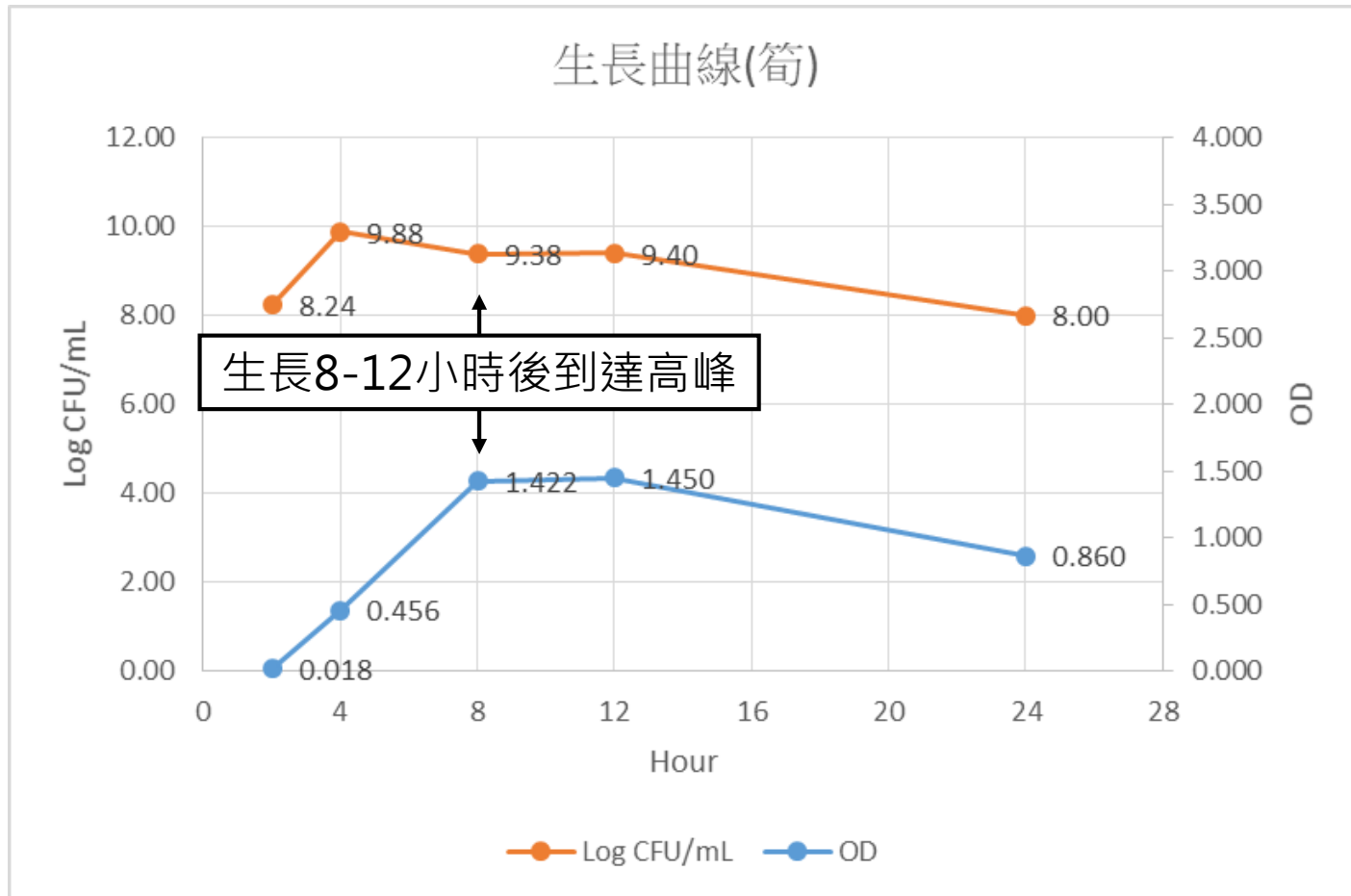
# 檢測自精料便分離乳酸菌 在大量培養時最適培養時間與吸光值



圖、由精料便分離的乳酸菌，以一公升培養基培養時的生長曲線與吸光值

# 檢測自竹筍便分離乳酸菌

## 在大量培養時最適培養時間與吸光值

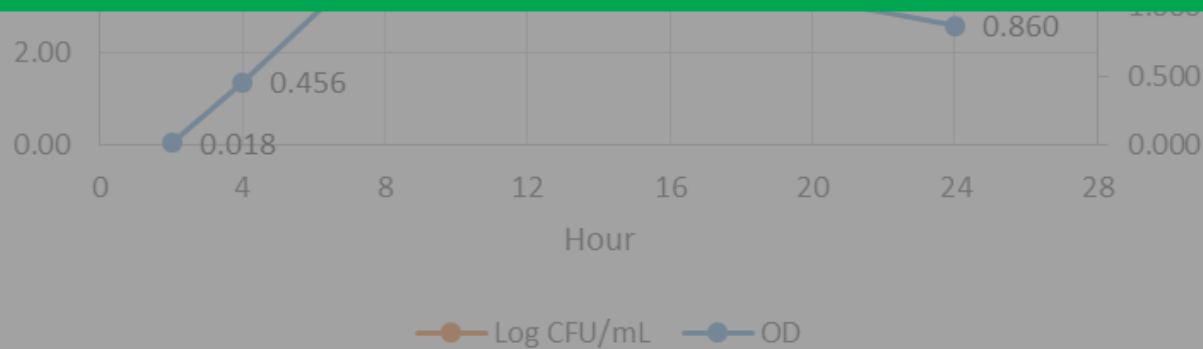


圖、由竹筍便分離的乳酸菌，以一公升培養基培養時的生長曲線與吸光值

# 檢測自竹筍便分離乳酸菌 在大量培養時最適培養時間與吸光值

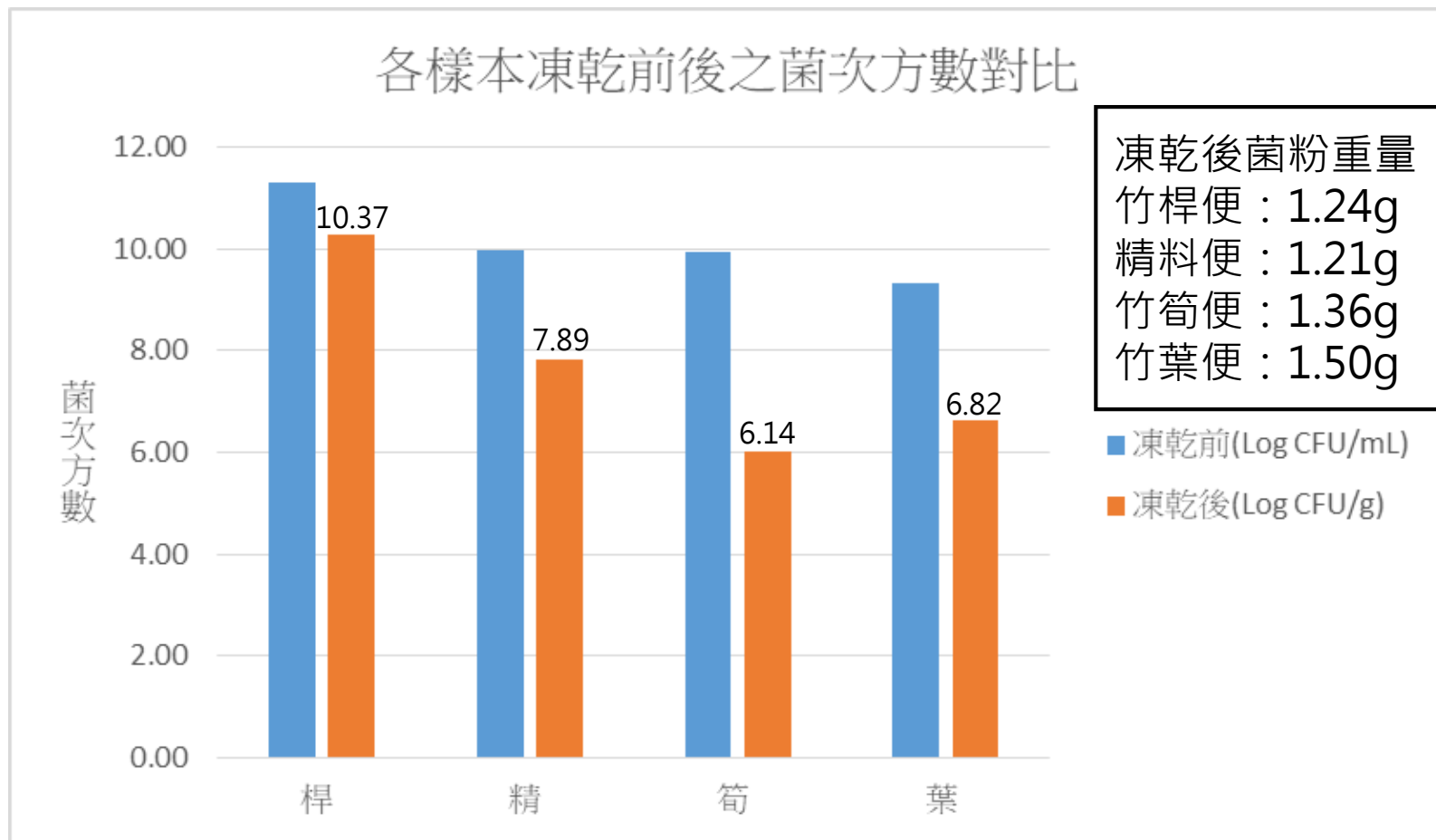
生長曲線(筍)

以一公升模式培養時，最佳收菌時機點，  
為培養時間8到12小時且吸光值(OD600)  
達到1.3左右。



圖、由竹筍便分離的乳酸菌，以一公升培養基培養時的生長曲線與吸光值

# 試驗乳酸菌大量培養凍乾後菌數變化



圖、本試驗由不同糞便來源所分離之乳酸菌，在冷凍乾燥成粉末前後菌次方數之變化



團團可能因幼年時期未建立良好之腸道菌相，於過去飼養紀錄中，每年常在食物轉換期出現排便異常之紀錄

自本園腸胃道菌相相對較穩定的大貓熊，篩選純化**大貓熊腸道乳酸菌粉末**以供利用

體外試驗

1. 對酸性環境和膽鹽較敏感
2. 在未來應用上可能需以膠囊保護

建立大量培養流程  
並凍乾菌粉

1. 培養時間8到12小時
2. 吸光值(OD600)達到1.3

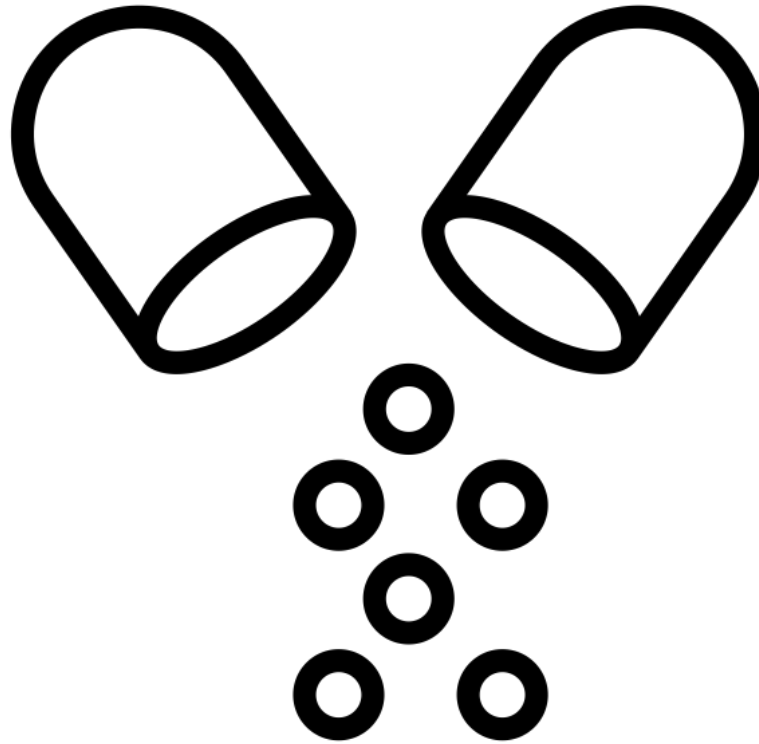
未來方向：確認純化乳酸菌之種類，以評估生物安全性



感謝聆聽



# Attribution



Created by rivercon  
from Noun Project



團團可能因幼年時期未建立良好之腸道菌相，於過去飼養紀錄中，每年常在食物轉換期出現排便異常之紀錄

自本園腸胃道菌相相對較穩定的大貓熊，篩選純化**大貓熊腸道乳酸菌粉末**以供利用

### 體外試驗

1. 耐酸性試驗：於酸性環境生長不佳
2. 耐膽鹽試驗：對膽鹽較敏感  
(僅一種較有耐受性)

### 建立大量培養流程 並凍乾菌粉

1. 培養時間8到12小時
2. 吸光值(OD600)達到1.3