I722358

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I722358 B**

(45)公告日： 中華民國 110 (2021) 年 03 月 21 日

(21)申請案號：107147914　(22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 12 月 28 日

(51)Int. Cl.：　*A23K10/18* *(2016.01)*　*A61K35/742* *(2015.01)*

A61P1/18 *(2006.01)*　*A61P31/12* *(2006.01)*

(30)優先權：2017/12/29　南韓　10-2017-0184265

2018/12/27　南韓　10-2018-0171279

(71)申請人：南韓商ＣＪ第一製糖股份有限公司 (南韓) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

南韓

(72)發明人：金智恩 KIM, JI EUN (KR)；韓知垠 HAN, JEE EUN (KR)；金星勳 KIM, SUNG HUN (KR)；禹諝衡 WOO, SEO HYUNG (KR)；殷鐘秀 EUN, JONGSU (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

WO　2012/105804A2　WO　2013/155468A2

WO　2017/147130A2

審查人員：李東秀

申請專利範圍項數：7 項　圖式數：6　共 44 頁

(54)名稱

包括枯草桿菌菌株作為活性成分之用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)或白斑綜合症(WSS)之飼料組成物

(57)摘要

本揭示內容涉及一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)或白斑綜合症(WSS)之飼料組成物，該飼料組成物包括枯草桿菌(KCCM11143P)菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質作為活性成分。該飼料組成物呈現出對引起蝦 AHPND 之腸炎弧菌之抗菌活性及對引起 WSS 之白斑綜合症病毒(WSSV)之抗病毒活性。

The present disclosure relates to a feed composition for preventing or treating acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) or white spot syndrome (WSS), comprising a Bacillus subtilis (KCCM11143P) strain, a culture medium thereof, a concentrate thereof, or a dry matter thereof as an active ingredient. The feed composition exhibits antibacterial activity against Vibrio parahaemolyticus causing shrimp AHPND and antiviral activity against white spot syndrome virus (WSSV) causing WSS.

I722358

公告本

【發明摘要】

【中文發明名稱】 包括枯草桿菌菌株作為活性成分之用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)或白斑綜合症(WSS)之飼料組成物

【英文發明名稱】 A FEED COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) OR WHITE SPOT SYNDROME (WSS), COMPRISING A *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN AS AN ACTIVE INGREDIENT

【中文】

本揭示內容涉及一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND) 或白斑綜合症(WSS)之飼料組成物，該飼料組成物包括枯草桿菌(KCCM11143P) 菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質作為活性成分。該飼 料組成物呈現出對引起蝦AHPND之腸炎弧菌之抗菌活性及對引起WSS之白斑綜合症病毒(WSSV)之抗病毒活性。

【英文】

The present disclosure relates to a feed composition for preventing or treating acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) or white spot syndrome (WSS), comprising a *Bacillus subtilis* (KCCM11143P) strain, a culture medium thereof, a concentrate thereof, or a dry matter thereof as an active ingredient. The feed composition exhibits antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* causing shrimp

AHPND and antiviral activity against white spot syndrome virus (WSSV) causing WSS.

【指定代表圖】　　無

本案圖式皆為實驗數據或影像，故本案無指定代表圖。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 包括枯草桿菌菌株作為活性成分之用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)或白斑綜合症(WSS)之飼料組成物

【英文發明名稱】 A FEED COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE (AHPND) OR WHITE SPOT SYNDROME (WSS), COMPRISING A *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN AS AN ACTIVE INGREDIENT

【技術領域】

【0001】 本揭示內容係關於一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)或白斑綜合症(WSS)之飼料組成物，係包括枯草桿菌(*Bacillus subtilus*)菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質作為活性成分。

【先前技術】

【0002】 早期死亡綜合症(early mortality syndrome，EMS)、急性肝胰臟壞死病(acute heptopancreatic necrosis disease，AHPND)和急性肝胰臟壞死綜合症(acute heptopancreatic necrosis syndrome，AHPNS)是養蝦業中迅速發展的疾病，腸炎弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是這些疾病的病原體；亦即，腸炎弧菌產生昆蟲毒素，在 6 小時內或一周內造成100%的致死率(Tran 等人 2013.Dis aquat Org 105:45-55)。昆蟲毒素係藉由存在於細菌的特定質粒中的特定基因(即，光桿菌昆蟲相關毒素；皮爾毒素)之表現而產生，並且易於移動，即它們具有移動性。在這方面，這些疾病比病毒性蝦病，例如白斑綜合症病毒(white spot syndrome

virus，WSSV)，桃拉綜合徵病毒(Taura syndrome virus，TSV)，傳染性肌肉壞死病毒(infectious myonecrosis virus，IMNV)等傳播得更快，最近已受到關注。AHPND 於 2009 年在中國開始，並在一年內在亞洲各國(如泰國、馬來西亞和越南)迅速蔓延，以及進一步在墨西哥發生並蔓延到其他中美洲國家，導致大多數蝦市場受損。南韓也因 2015 年至 2016 年的 AHPND 而遭受嚴重損害，目前正在進行研究以預防或控制該疾病。

【0003】 最近，由於消費者對安全產品的需求和連續養殖的生產策略，用於治療現有致病菌的治療劑受到與養殖相關規定的限制。因此，在蝦養殖中，不僅要考慮苗產品的質量和繁殖方法，還要考慮控制疾病的重要因素。

【0004】 同時，益生菌被定義為幫助腸中微生物平衡的微生物製劑或組分，並且具有與抗生素相反的詞源意義，抗生素是指抗菌物質。代表性地，益生菌的實例包括乳酸菌，例如乳桿菌屬和雙歧桿菌屬。此外，益生菌不具有針對人類和動物的毒性基因，也不產生致病物質，因此被歸類為 GRAS(generally regarded as safe，通常被認為是安全的)。因此，業經積極達成使用經證實具安全性之益生菌開發飼料添加劑。

【0005】 例如，韓國專利公開案第 10-2011-035554 號揭露了芽孢桿菌的新型 CMB L1 和乳桿菌屬的 CMB201 的混合菌株，使用該混合菌株之用於抗癌和增強免疫力之食物組成物和具有抗菌活性之微生物製劑。此外，韓國專利第 10-0977407 號揭露了一種用於動物之免疫增強劑和飼料添加劑，其係含有拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*)之裂解物(lysate)以增加嗜中性細胞(動物的主要吞噬細胞)的各種活性，並對由接種

之致病菌所引起的攻擊增強非特異性防禦。然而，使用益生菌的飼料添加劑的實際免疫活性不足，因此需要對使用益生菌而仍具有優異免疫活性的飼料添加劑進行研究。

【發明內容】

[技術問題]

【0006】 本案發明人已經進行了大量努力以開發補充益生菌(芽孢桿菌屬菌種)的蝦飼料，用於預防蝦 AHPND。結果，他們已證實當以補充了枯草桿菌之飼料組成物餵養蝦時，蝦對 AHPND 感染(由越南在 2013 年的受影響區域單離的菌株所引起；Tran 等人，2013 年)或 WSSV 感染的存活率得到改善，不僅增加蝦的成長速度和非特異性免疫力，而且水質也得到改善，可以生產高蛋白蝦，從而完成本揭示內容。

[技術方案]

【0007】 本揭示內容之一個目的係提供一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)之飼料組成物，係包括枯草桿菌菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質作為活性成分。

【0008】 本揭示內容之另一個目的係提供一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病之方法，包括對受試者投予飼料組成物。

【0009】 本揭示內容之又一個目的係提供一種用於預防或治療白斑綜合症(WSS)之飼料組成物，係包括枯草桿菌菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質作為活性成分。

【0010】 本揭示內容之又一個目的係提供一種用於預防或治療白斑綜合症之方法，包括將飼料組成物投予受試者。

[有利功效]

【0011】 本揭示內容的組成物，係包含枯草桿菌(KCCM11143P)菌株作為活性成分，具有對腸炎弧菌(其導致蝦養殖中產生問題之 AHPND)的抗菌活性，以及對引起 WSS 的白斑綜合症病毒之抗病毒活性，且具有提高蝦肝胰臟免疫力的作用，因此本揭示內容的組成物可用作蝦飼料組成物或飼料添加劑。

【圖式簡單說明】

【0012】 第 1 圖係顯示感染腸炎弧菌的蝦的存活率圖。

【0013】 第 2 圖係顯示蝦肝胰臟中 AHPND 含量的分析圖。

【0014】 第 3 圖係顯示蝦肝胰臟的病理特徵圖。

【0015】 第 4 圖係顯示蝦的成長率圖。第 4(a)至 4(e)圖分別顯示了最終體重、體重增加率、日成長率、飼料轉化率和存活率。

【0016】 第 5 圖係分析蝦的非特異性免疫圖。第 5(a)至 5(e)圖分別顯示了對巨噬細胞、酚氧化酶、抗蛋白酶、溶菌酶和超氧化物歧化酶的活性。

【0017】 第 6 圖係顯示在零水交換的育種水中水質分析結果的圖。

【實施方式】

【0018】 後文中，將詳細描述本揭示內容。同時，本文揭露的每個解釋和例示性具體實施例可以應用於其他解釋和例示性具體實施例。亦即，本文揭露的各種因素的所有組合都屬於本揭示內容的範疇。此外，本揭示內容的範疇不應受下文提供的具體揭示內容的限制。

【0019】 為了實現上述目的，本揭示內容的一個態樣提供了一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病(AHPND)之飼料組成物，包括枯草桿菌菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質作為活性成分。

【0020】 如本文所用，術語“枯草桿菌”係一種無毒並產生孢子之嗜氧菌。枯草桿菌廣泛分佈於自然界，諸如乾草、土壤、污水、空氣等。這種細菌廣泛用於工業，因為它產生可使乳凝結、澱粉糖化、脂肪和油分解之酶。細菌生長之最佳條件是 pH 為 7 至 8.5，溫度為 37°C 至 40°C。由於芽孢桿菌屬菌株的特性，該菌株不具有人和動物的毒性基因，是非致病性的，不產生致病物質，並且在體內表現出快速生長率。枯草桿菌在葡萄糖等存在下具有厭氧生態，內生孢子使芽孢桿菌在極端惡劣的環境(如高溫或低溫)中生存。

【0021】 在本揭示內容中，枯草桿菌可以係以登錄號 KCCM11143 寄存之菌株。

【0022】 在本揭示內容中，製備包含枯草桿菌(KCCM11143P)之飼料組成物。

【0023】 本揭示內容的組成物可包括細菌數為 1×10^4 CFU 至 1×10^{11}CFU/公克之總活性成分之枯草桿菌(KCCM11143P)。具體地，細菌數可以是 1×10^4 CFU/g 至 1×10^{10} CFU/g，更具體地，本揭示內容之組

成物包括細菌數為 1×10^{8}CFU/g 至 1×10^{10}CFU/g 之枯草桿菌(KCCM111 43P)。

【0024】 為了本揭示內容之目的，飼料組成物中所含作為活性成分之枯草桿菌可僅包含枯草桿菌(KCCM11143P)。

【0025】 如本文所用，術語“急性肝胰臟壞死病(AHPND)”是指稱為早期死亡綜合症(EMS)或急性肝胰臟壞死綜合症(AHPNS)的疾病，並且統稱為在海洋牧場中停留(standing)30 天內由病原體引起的大規模死亡率。AHPND 係由腸炎弧菌引起的，腸炎弧菌是一種存在於海水中的致病菌，在白蝦中有大量感染，約佔韓國養殖蝦的 96%。由於在生命早期的高死亡率，它會對蝦造成傷害，但對人類無害。

【0026】 腸炎弧菌是屬於弧菌屬的革蘭氏陰性桿菌，其在人類中引起急性食物中毒和腸炎並引起魚的弧菌病。最近，腸炎弧菌已被確定為急性肝胰臟壞死病(AHPND)的致病菌，其導致蝦養殖業的大量死亡。

【0027】 本揭示內容之組成物可進一步包括短小芽孢桿菌(*Bacillus pumilus*)和地衣芽孢桿菌(*Bacillus licheniformis*)作為活性成分。短小芽孢桿菌可為以登錄號 KCCM11144P 寄存之菌株，而地衣芽孢桿菌可為以登錄號 KCCM11270P 寄存之菌株。

【0028】 如本文所用，術語“預防”是指藉由投予根據本揭示內容之包括枯草桿菌之組成物，而導致蝦 AHPND 症狀抑制或延遲的任何行為。

【0029】 如本文所用，術語“治療”是指藉由投予根據本揭示內容之包括枯草桿菌(KCCM11143P)之組成物，而導致蝦 AHPND 症狀減輕或完全恢復的任何作用。

【0030】 除了包含作為活性成分之上述菌株外，組成物還可包括可接受用於藥物、食品或飼料用途之已知的載體或添加劑。在本揭示內容中，作為對腸炎弧菌具有抗菌活性之包括枯草桿菌(KCCM11143P)的益生菌製劑，可以存在為了防止益生菌製劑的品質下降而添加之黏合劑、乳化劑、防腐劑等；並且飼料中可以添加用以增加益生菌製劑效率之胺基酸、維生素、酶、調味劑、非蛋白質氮化合物、矽酸鹽、緩衝劑、提取劑、寡聚醣等。另外，可以進一步包含飼料混合物等，但本揭示內容不限於此。

【0031】 在本揭示內容的一個具體實施例中，確認蝦餵食飼料組成物是否會增加對 AHPND 的免疫力並表現出疾病預防功效的結果，確認了與群組(對照組 1 和 2)(其中投予比較例 1(不包括益生菌)及比較例 2(包含市售益生菌(三種芽胞桿菌(枯草桿菌、短小芽孢桿菌和地衣芽孢桿菌)之混合製劑))相比，群組(BS 組 1 和 2)(其中投予包括本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)菌株之飼料組成物(實施例 1 和 2))可以增加蝦對腸炎弧菌感染的疾病抗性和顯著地降低蝦肝胰臟中 AHPND 的毒素量。

【0032】 在本揭示內容之另一個具體實施例中，分析包含上述菌株的飼料組成物的非特異性免疫力的結果，發現巨噬細胞(NBT)活性、穀胱甘肽過氧化物酶(GPx)活性、溶菌酶活性、苯酚氧化酶(PO)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性和抗蛋白酶活性明顯高於比較例有者。基於該結果，可以看出組成物可用於增加蝦的非特異性免疫反應或改善其免疫力。

【0033】 本揭示內容提供了一種蝦養殖用飼料添加劑，其係包括上述飼料組成物。

【0034】 在本揭示內容的飼料添加劑中，除了上述活性成分外，還可以加入於醫藥、食品或飼料用途可接受的已知載體或安定劑。必要時，可以添加各種營養素，諸如維生素、胺基酸和礦物質、抗氧化劑和其他添加劑，其形狀可以是便利於使用的，例如粉末、顆粒、丸和懸浮液。當供應根據本揭示內容之飼料添加劑時，飼料添加劑可以單獨供應或與飼料混合供給非反芻動物。

【0035】 另外，本揭示內容提供了一種蝦養殖用飼料，其包括上述飼料添加劑。

【0036】 本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)菌株係具有孢子形成能力的革蘭氏陽性菌，較佳以孢子形式配製，但不限於此。本揭示內容之飼料沒有特別限制，可以使用任何飼料如粉末飼料、固體飼料、濕丸飼料、乾燥丸飼料、擠壓機丸(EP)飼料和原料飼料。

【0037】 如上所述，芽孢桿菌屬形成內源孢子，因此對熱非常穩定。因此，本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)可以作為飼料添加劑形式單獨製備，然後與飼料混合，或者可以在準備飼料時直接添加到飼料。包含在本揭示內容之飼料中之枯草桿菌可以是液態或乾態，並且較佳為經乾燥之粉末形式。乾燥程序可以藉由空氣乾燥、自然乾燥、噴霧乾燥和冷凍乾燥而進行，但不限於此。本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)可以粉末形式混合，其量以飼料的重量為基準計，為 0.05 重量%至 10 重量%，較佳為 0.1 重量%至 1 重量%。此外，該飼料係用於水產養殖，並且除了本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)之外，可進一步包含能夠提高飼料保存性的傳統添加劑。

【0038】 為了實現上述目的，本揭示內容之另一態樣提供了一種用於預防或治療急性肝胰臟壞死病之方法，包括投予受試者本揭示內容之飼料組成物。

【0039】 本文中，本揭示內容之急性肝胰臟壞死病、預防和治療係如上所述。

【0040】 如本文所用，術語“受試者”可以指可以養殖之魚或甲殼類動物，並且具有急性肝胰臟壞死病或有發展急性肝胰臟壞死病之風險，根據目的可提及之受試者為蝦。

【0041】 進料較佳係以與傳統飼料相同的量和相同的餵食間隔供應。此外，致病菌是指在蝦養殖中藉由誘發 AHPND 而導致蝦的大量死亡的細菌，並且具體地可以指腸炎弧菌。

【0042】 養蝦業中之大規模死亡原因不僅包括腸炎弧菌，還包括各種病毒的感染和繁養殖水中氨的濃度。在蝦養殖中，繁養殖水中的氨由蝦糞、飼料廢棄物等蛋白質的代謝產物產生，並且隨著 pH 和水溫的增加而變化很大。高濃度的氨是蝦急性死亡的直接原因，導致大規模死亡；低濃度的氨可能導致蝦的成長以及攝食能力和免疫力的長期降低，從而導致各種疾病的發展。

【0043】 在本揭示內容的一個具體實施例中，採集並分析餵食本揭示內容之飼料組成物之蝦之繁養殖水，結果發現繁養殖水中的總氨濃度顯著低於對照組者，因此本揭示內容之枯草桿菌菌株(KCCM11143P)可以改善對蝦繁養殖水的水質。

【0044】 如上所述，本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)不僅可以增強蝦的疾病抗性，還可以抑制蝦肝胰臟中 AHPND 的毒素。因此，藉由使用該菌株，可以獲得預防引起疾病的腸炎弧菌的功效，從而可以更安全地養殖蝦。

【0045】 為了實現上述目的，本揭示內容之又一態樣提供了一種用於預防或治療白斑綜合症(WSS)之飼料組成物，包括枯草桿菌菌株；其培養物；其濃縮物；或其乾物質作為活性成分。

【0046】 本揭示內容之枯草桿菌、預防和治療之術語係如上所述。

【0047】 本揭示內容之組成物可包括細菌數為 1×10^4 CFU 至 1×10^{11} CFU /公克之總活性成分之枯草桿菌(KCCM11143P)。具體地，細菌計數可以是 1×10^4 CFU/g 至 1×10^{10}CFU/g，更具體地，本揭示內容之組成物包括細菌數為 1×10^8 CFU/g 至 1×10^{10} CFU/g 之枯草桿菌(KCCM11143P)。

【0048】 如本文所用，術語“白斑綜合症病毒(WSSV)”是指廣泛分佈於世界各地的病毒。因為 WSSV 在病毒粒子的末端具有尾狀附著物，並且具有類似於其中存在桿狀衣殼和包膜之蛋形桿菌的形式，所以它被稱為桿狀病毒或桿狀病毒形成之病毒；然而，最近，它已被重命名為白點病毒屬(whispovirus)，這是一種基因上新的病毒群組。該病毒的長度約為 275nm，直徑約為 120nm，由大小約為 290kb 的雙鏈 DNA 組成。

【0049】 除了含有作為活性成分的上述菌株外，組成物還可包括可用於醫藥、食品或飼料用途之已知載體或添加劑。在本揭示內容中，作為對白斑綜合症病毒具有抗病毒活性之包含枯草桿菌(KCCM11143P)之益生

菌製劑可以有為了防止益生菌製劑品質惡化之黏合劑、乳化劑、防腐劑等；並且飼料中可以添加用以增加益生菌製劑的效率之胺基酸、維生素、酶、調味劑、非蛋白質氮化合物、矽酸鹽、緩衝劑、提取劑、寡聚醣等。另外，可以進一步包含飼料混合物等，但本揭示內容不限於此。

【0050】 在本揭示內容之一個具體實施例中，確認飼料組成物是否會增加蝦對白斑綜合症病毒(WSSV)的免疫力並表現出疾病預防功效，結果證實了與群組(對照組 1)(投予比較例 1(不包括益生菌))相比，群組(BS 組 1)(投予包括本揭示內容之枯草桿菌(KC CM11143P)菌株之飼料組成物(實施例 1))可以增加蝦對白斑綜合症病毒(WSSV)感染的疾病抗性。

【0051】 在本揭示內容之另一個具體實施例中，確認白斑綜合症病毒(WSSV)和急性肝胰臟壞死病(AHPND)的複合感染是否會增加，以及當餵食蝦飼料組成物時是否表現出存活率增強功效，結果證實了與群組(對照組 1)(其中投予比較例 1(不包括益生菌))相比，群組(BS 組 1)(其中投予包括本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)菌株之飼料組成物(實施例 1))，可以增強蝦對 WSSV 和 AHPND 複合感染的疾病抗性。

【0052】 本揭示內容提供了一種蝦養殖用飼料添加劑，其係包括上述飼料組成物。

【0053】 在本揭示內容之飼料添加劑中，除了上述活性成分外，還可以加入於醫藥、食品或飼料用途可接受的已知載體或安定劑。必要時，可以添加各種營養素，諸如維生素、胺基酸和礦物質、抗氧化劑和其他添加劑，其形狀可以是便利於使用的，例如粉末、顆粒、丸和懸浮液。當供

應根據本揭示內容之飼料添加劑時，該飼料添加劑可以單獨供應或與飼料混合供給非反芻動物。

【0054】 另外，本揭示內容提供了一種蝦養殖用飼料，其包含上述飼料添加劑。

【0055】 本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)菌株是具有孢子形成能力的革蘭氏陽性菌，較佳為以孢子形式配製，但不限限於此。本揭示內容之飼料沒有特別限制，但可以使用任何飼料如粉末飼料、固體飼料、濕飼丸進料、乾燥丸飼料、擠壓機丸(EP)飼料和原料飼料。

【0056】 如上所述，芽孢桿菌屬形成內源孢子，因此對熱非常穩定。因此，本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)可以作為飼料添加劑形式單獨製備，然後與飼料混合，或者可以在準備飼料時直接添加到飼料。包含在本揭示內容之飼料中之枯草桿菌可以是液態或乾態，並且較佳為乾粉末形式。乾燥過程可以藉由空氣乾燥、自然乾燥、噴霧乾燥和冷凍乾燥而進行，但不限於此。本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)可以粉末形式混合，其量以飼料之重量為基準計，為 0.05 重量%至 10 重量%，較佳為 0.1 重量%至 1 重量%。此外，該飼料用於水產養殖，並且除了本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)之外，還可以包括能夠提高飼料保存性的傳統添加劑。

【0057】 為了實現上述目的，本揭示內容之另一態樣提供了一種用於預防或治療白斑綜合症之方法，包括投予受試者本揭示內容之飼料組成物。

【0058】 本文中，本揭示內容之白斑綜合症、預防、治療和受試者之術語如上所述。

【0059】 蝦養殖的大規模死亡原因不僅包括腸炎弧菌，還包括各種病毒的感染。具體而言，病毒可以指白斑綜合症病毒(WSSV)。

【0060】 如上所述，本揭示內容之枯草桿菌(KCCM11143P)可以獲得增強對白斑綜合症病毒(WSSV)的抗性的功效，因此蝦可以更安全地養殖。

[進行本發明之較佳模式]

【0061】 後文中，將通過例示性具體實施例詳細描述本揭示內容。然而，這些例示性具體實施例僅用於說明目的，並不旨在限制本揭示內容的範疇。

製備例 1.具有抗菌活性之益生菌之選擇

【0062】 為了選擇對誘導蝦 AHPND 之腸炎弧菌具有抗菌活性的菌株，進行透明區測定。將 0.5％瓊脂(3mL)和 100μL 振盪培養物(2.0×10^9 CFU/mL)之致病菌混合，並接種在 TSA+培養基上以製備頂層瓊脂。將 12 種枯草桿菌菌株(彼等 CJ CheilJedang 所具者和商業菌株)各自為 10μL 量的培養物滴在經製備之頂層瓊脂上，在 30℃培養 18 小時，並且觀察存在/不存在透明區。一起評價市售枯草桿菌和複合噬菌體之抗菌活性。

【0063】 [表 1]

抗菌評估之目標	腸炎弧菌
枯草桿菌 1 (CJBS-01)	++++
枯草桿菌 2 (CJBS-02)	+
枯草桿菌 3 (CJBS-03)	-
枯草桿菌 4 (CJBS-04)	-
枯草桿菌 5 (CJBS-05)	+
枯草桿菌 6 (CJBS-06)	-
枯草桿菌 7 (CJBS-07)	-
枯草桿菌 8 (CJBS-08)	-
枯草桿菌 9 (CJBS-09)	+
枯草桿菌 10 (CJBS-10)	-
枯草桿菌 11 (CJBS-11)	-
枯草桿菌 12 (CJBS-12)	-
枯草桿菌 (商購，Company A, Korea)	+
複合噬菌體	-

++++：強活性，+：存在活性，-：無活性

【0064】 如上表 1 所示，枯草桿菌 1 微生物(CJBS-01)在體外對引起 AHPND 之腸炎弧菌顯示出最優異的抗菌作用。然而，儘管微生物在體外對特定病原體顯示出抗菌活性，觀察到的抗菌活性僅僅是體外效應，並不一定意味著動物攝入腸炎弧菌將能夠為動物提供免疫力或對特定病原體的預防作用。

【0065】 因此，在如下實驗中，檢驗了當餵給蝦枯草桿菌 1(CJBS-01)微生物時，是否可以導致蝦對 AHPND 疾病的免疫力和疾病預防效果的改善。此外，還檢驗了枯草桿菌 1(CJBS-01)是否對體重增加和消化率有影響。

【0066】 枯草桿菌 1(CJBS-01)係 2010 年 12 月 14 日寄存於韓國微生物培養中心(Korean Culture Center of Microorganisms，KCCM)的菌株，登錄號為 KCCM11143P。

製備例 2.用於蝦的含枯草桿菌的飼料組成物之製備

【0067】 製備含有製備例 1 中選擇之枯草桿菌 1(登錄號 KCCM11143P，後文稱“BS”)的飼料組成物。

【0068】 具體而言，將不含枯草桿菌之比較例 1、含有市售芽孢桿菌種(即，三種芽孢桿菌種(枯草芽孢桿菌、短小芽孢桿菌和地衣芽孢桿菌)之混合製劑)的比較例 2、含有 $10^{10}\times0.2$ CFU/g 之量之經選擇之枯草桿菌 1(BS)之實施例 1 以及含有 $10^{9}\times0.2$ CFU/g 之量之經選擇之 BS 之實施例 2 之組成物與魚油和水混合，並製成丸形式。比較例 1 和 2 以及實施例 1 和 2 之飼料組成物用乾燥器在 25℃乾燥約 24 小時，並儲存在-20℃直到後續實驗。

【0069】 [表 2]

成分 (%)	比較例 1	比較例 2	實施例 1	實施例 2
魚粉	40	40	40	40
SBM 44%南美洲	12.81	12.81	12.81	12.81
魷魚肝粉	10	10	10	10
麵粉	25.61	25.61	25.61	25.61
Amygluten 110	3	3	3	3
魚油 A/C	2	2	2	2
胺基酸	0.42	0.42	0.42	0.42
維生素/礦物質預混物	5.96	5.96	5.96	5.96
米糠	0.2	0.18	0.00	0.00
3 種芽孢桿菌種 (10^{10} x CFU/g)	0.00	0.2	0.00	0.00
BS (10^{10} x CFU/g)	0.00	0.00	0.2	0.00
BS (10^{9} x CFU/g)	0.00	0.00	0.00	0.2
化學組成物(%乾物質)				
水分	5.68	5.57	5.60	5.61
粗蛋白	47.3	47.4	47.4	47.4
粗脂質	7.31	7.47	7.49	7.48
粗灰分	6.01	6.18	6.12	6.10

【0070】

實驗例 1.飼料組成物對 AHPND 之預防功效之評估

1-1. 蝦之製備和成長速度之評估

【0071】 在總共 40 個水箱中，每個水箱準備 30 隻白蝦。所有實驗水箱都配備有空氣石以維持溶解氧，並且在整個實驗期間將水箱之溫度保持在 28℃至 32℃之範圍內。飼料以限制的供應量(魚體重之 4%至 12%)每天餵食 4 次。

【0072】 每 2 週測量一次蝦的重量。評估項與用以計算與成長率和餵食效率相關之公式如下：

【0073】

- 重量增加(%)=100 x (最終平均體重-初始平均體重)/平均體重
- 飼料轉化率(%)=重量增加量/進食量
- 每日比成長率(%天$^{-1}$)= 100×($\log_e$最終體重- $\log_e$初始體重) /天數

【0074】 對於實驗飼料之分配，進行完全隨機化之設計，並使用 SPSS Version 18.0 程式，所得之成長和分析的結果藉由單向 ANOVA 進行統計分析。在鄧氏多距檢定(Duncan's multiple range test)中比較了數據值的顯著差異($P<0.05$)。數據以平均值±SD 表示，而且百分比數據經計算為反正弦變換值並進行統計分析。

【0075】 [表 3]

	對照組 1	對照組 2	BS 組 1
IBW[1] (g)	0.51±0.01	0.51±0.01	0.51±0.01
FBW[2] (g)	3.49 ± 0.12^{bc}	3.80 ± 0.22^{ab}	3.86 ± 0.18^{a}
WG[3] (%)	592 ± 18.9^{c}	655 ± 39.3^{ab}	667 ± 31.9^{a}
SGR[4] (%)	6.04 ± 0.09^{b}	6.31 ± 0.16^{a}	6.37 ± 0.13^{a}
FCR[5]	1.30±0.26	1.28±0.09	1.19±0.12
殘存率 (%)	80.0±3.33	75.6±6.94	71.1±6.94

[1]IBW：初始體重

[2]FBW：最終體重

[3]WG：重量增加(%)= [(最終體重-初始體重)/初始體重] x 100

[4]SGR：每日比成長率(%天$^{-1}$)= [($\log_e$最終體重-$\log_e$初始體重) /天數] x 100

[5]FCR：飼料轉化率=餵食之乾飼料/濕重增加

【0076】 如表 3 所示，餵養試驗之結果，證實了與對照組 1 和對照組 2(提供比較例 1 和比較例 2 之各飼料組成物)相比，BS 組 1(提供實施例 1 之含製備例 1 中經選擇之枯草桿菌 1(BS)之飼料組成物)表現了顯著更高之成長率。另外，經證實與提供比較例 1 和比較例 2 之各飼料組成物之群組相比，實施例 1 之飼料組成物具有顯著更高的每日比成長率。

1-2. 腸炎弧菌對蝦 1 之攻擊試驗

【0077】 腸炎弧菌對蝦的攻擊試驗在總共兩次分開的試驗中進行。在弧菌菌株之情況下，使用 2013 年在越南單離之 AHPND 造成(EMS)之菌株進行試驗。攻擊試驗如下方式進行：餵食蝦實施例之飼料組成物兩

週，然後將相同重量(平均重量：2.32g)之蝦分成 4 個重複，每群組 96 隻蝦。使用 TSB^{+}培養基在 30℃，150rpm 培養細菌 24 小時，並將腸炎弧菌之懸浮液以每箱 3.1×10^{5} CFU/mL 之濃度浸潤。浸潤後，每小時確認蝦之存活和游泳狀態，並於 8 小時後，交換 95%的水。測試飼料係以限制的方式(魚體重的 10%至 12%)，每天分次給予劑量三次(於 8：30、13：30 和 18：30)，並觀察死亡率歷經 70 個小時。結果如下表 4 所示。

【0078】 [表 4]

處理	存活率 (%)
	試驗
對照組 1	50.0 ± 16.0
對照組 2	49.0 ± 23.2
BS 組 1	67.7 ± 28.9

【0079】 如上表 4 所示，與對照組 1 和對照組 2 相比，BS 組 1(提供含製備例 1 中經選擇之枯草桿菌 1(BS)之飼料組成物)在腸炎弧菌對蝦的攻擊試驗中表現出較高的存活率。

【0080】 另外，如第 1 圖所示，在上述兩個試驗中通常觀察到，在浸潤腸炎弧菌後，蝦的運動變慢並且停在水箱底部而沒有游泳活動，並且飼料攝食也不活躍。在浸潤後 8 小時，蝦的快速死亡開始發生，並且 BS 組 1 的存活率顯示出比對照組 1 或對照組 2 的存活率高至少 17%。

1-3. 腸炎弧菌對蝦 2 之攻擊試驗

【0081】 腸炎弧菌對蝦的攻擊試驗係進行一次。在弧菌菌株之情況下，使用 2013 年在越南單離之 AHPND 誘發(EMS)之菌株進行試驗。攻

擊試驗如下方式進行：餵食蝦實施例之飼料組成物兩週，然後將相同重量(平均重量：2.30g)之蝦分成 4 個重複，每群組 96 隻蝦。細菌係使用 TSB$^+$培養基在 30℃，150rpm 培養 24 小時，並浸潤腸炎弧菌之懸浮液每箱為 6.3×10^5 CFU 之濃度。浸潤後，每小時確認蝦之存活和游泳狀態，並於 8 小時後，交換 95%的水。測試飼料係以限制的方式(魚體重的 10%至 12%)，每天分次給予劑量三次(於 8：30、13：30 和 18：30)，並觀察死亡率歷經 70 個小時。結果如下表 5 所示。

【0082】 [表 5]

處理	存活率 (%)
	試驗
對照組 1	0.00±0.00
BS 組 1	8.93±10.7
BS 組 2	6.90±5.45

【0083】 如表 5 所示，在腸炎弧菌對蝦的攻擊試驗中，BS 組 1 和 2(提供包括選自製備例 1 之枯草桿菌之實施例 1 和 2 之飼料組成物)顯示出高於對照組 1(提供比較例 1 的飼料組成物)之存活率。

1-4. 樣本採集方法和組織病理學分析方法

【0084】 在起始(感染前)、中間時間(感染)和腸炎弧菌對蝦的攻擊試驗結束時的每個時間點，從各群組隨機選擇兩隻蝦並提取其肝胰臟。將部分提取的肝胰臟儲存在乙醇(100%)中以用於定量實時 PCR (qPCR)分析，而另一部分在戴維森氏固定劑(Davidson's fixative)中固定 24 小時，然後儲存在乙醇(70%)中以用於組織病理學分析。

【0085】 更具體地，組織病理學分析係藉由以下方法進行。

【0086】 為了盡量減少提取的肝胰臟組織的損傷，在每個水箱取樣後立即使用 1 mL 注射器將戴維森氏固定劑注入蝦的肝胰臟中，並提取肝胰臟。然後，將各個提取的肝胰臟在 1.5mL 含有戴維森氏固定劑的微量離心管中固定 24 小時，儲存在乙醇(70%)中，並用於分析。完成固定時，將器官修剪至約 2mm 至約 3mm 的厚度，以適用於製備組織樣本並插入盒中，並將該等組織處理 13 小時。將這些組織薄切成約 4μm 的厚度，用刷子採集所得樣本，附著於每個載玻片上但無任何皺褶，在空氣中放置約 5 分鐘，然後進行 H&E 染色。完成染色後，使用相差顯微鏡(BX50，Olympus)，以顯微鏡(TCapture，Tucen Photonics)用專業程式在 200×放大率下拍照。然後，對採樣之肝胰臟中存在的 AHPND 毒素的量進行 qPCR 分析。

【0087】 結果如第 2 圖所示，其中較低的 Ct 值表示較高量的毒素。

【0088】 在攻擊試驗前的時間點(即，第 0 小時)取樣的肝胰臟中，在所有群組中未檢測到 AHPND 毒素，而在攻擊試驗的 10 小時時間點(即，第 10 小時；當死亡受試者的數量最高時)取樣之肝胰臟中，在所有樣本中檢測到 AHPND 毒素。然而，與對照組 1 和對照組 2 相比，BS 組 1(提供根據本揭示內容之含枯草桿菌之飼料組成物)顯示出顯著更高的 Ct 值，以及在攻擊試驗之 24 小時時間點採樣之肝胰臟中，在 BS 組 1 中偵測到最低水平的 AHPND 毒素。此外，在攻擊測試的終止時間點(即，第 193 小時)，在 BS 組 1 和對照組 2 中未檢測到 AHPND 毒素。

【0089】 另外，肝胰臟的組織病理學分析結果顯示在第 3 圖中。

【0090】 在攻擊試驗前的時間點(即，第 0 小時)取樣的肝胰臟中，在所有群組中觀察到異常組織。在 10 小時時間點取樣的肝胰臟中，顯示對照組 1 中的損傷水平最嚴重，並且在 BS 組 1 和對照組 2 中觀察到組織壞死的進展。在 24 小時時間點取樣的肝胰臟中，觀察到發炎，而不是由 AHPND 毒素引起的組織壞死。在攻擊試驗之終止時間點(即，第 193 小時)採樣的肝胰臟中，由於在對照組 1 中之第 37 小時時間點發生 100%死亡而不可能進行取樣，在 BS 組 1 和對照組 2 中則觀察到一些發炎細胞。

【0091】 從以上結果可以看出，證實了根據本揭示內容之含有枯草桿菌之飼料組成物不僅可以改善蝦對腸炎弧菌感染的疾病抗性，還可以顯著降低蝦肝胰臟細胞中 AHPND 毒素的含量。

實驗例 2. 根據枯草桿菌濃度之蝦生長率和免疫力之評估

【0092】 考慮到製備例 2 中的結果，製備含有各種濃度的製備例 1 中經選擇之枯草桿菌(KCCM11143P，後文中稱為“BS”)之飼料組成物(實施例 1 和 3)。結果如下表 6 所示。

【0093】 [表 6]

成分 (%)	比較例 1	比較例 2	實驗例 1	實驗例 3
魚粉	40	40	40	40
SBM 44%南美洲	12.81	12.81	12.81	12.81
魷魚肝粉	10	10	10	10
麵粉	25.61	25.61	25.61	25.61
Amygluten 110	3	3	3	3
魚油 A/C	2	2	2	2
胺基酸	0.42	0.42	0.42	0.42
維生素/礦物質預混物	5.96	5.96	5.96	5.96
米糠	0.2	0.18	0.00	0.00
3 種芽孢桿菌種 (10^{10} x CFU/g)	0.00	0.2	0.00	0.00
BS (10^{10} x CFU/g)	0.00	0.00	0.2	0.1
化學組成物 (%，乾物質)				
水分	5.59	5.80	5.78	5.71
粗蛋白	47.3	48.6	49.2	48.9
粗脂質	7.74	7.71	7.73	7.70
粗灰分	6.12	6.12	6.20	6.10

【0094】 表 6 中各群組之組成物係藉由加入魚油和水，將其混合且製備成丸形式。將表 6 中各群組之組成物用乾燥器在 25℃乾燥約 24 小時，並在-20℃儲存直到後續實驗。

2-1. 蝦之製備和成長速度之評估

【0095】 在總共 28 個水箱中，每個水箱準備 30 隻白蝦。所有實驗水箱都配備有空氣石以維持溶解氧，並且在整個實驗期間水箱的溫度保持在 28℃至 32℃的範圍內。飼料係以限定供應量(6%至 12%的魚重，初始體重：0.14g)每天餵食 4 次，持續 8 週。

【0096】 每 2 週測量一次蝦的重量。評估項目和用以計算與成長率和飼料效率相關之公式如下：

- 重量增加(%)=100×(最終平均體重-初始平均體重)/平均體重
- 飼料轉化率(%)=重量增加量/進食量
- 每日比成長率(%天$^{-1}$)= 100×($\log_e$ 最終體重-$\log_e$ 初始體重) /天數

【0097】 結果如下表 7 所示。

【0098】 [表 7]

	對照組 1	對照組 2	BS 組 1	BS 組 3
IBW[1] (g)	0.14±0.00	0.14±0.00	0.14±0.00	0.14±0.00
FBW[2] (g)	10.2±0.69^b	11.3±0.45^a	11.9±0.43^a	11.5±0.60^a
WG[3] (%)	7029±506^b	7969±413^a	8381±356^a	8085±464^a
SGR[4] (%)	7.62±0.13^b	7.84±0.09^a	7.93±0.07^a	7.86±0.10^a
FCR[5]	1.53±0.04^c	1.21±0.09^{ab}	1.11±0.22^a	1.13±0.12^a
存活率(%)	90.7±6.11	92.0±4.00	84.0±17.4	88.0±8.00

* ($P < 0.05$)

[1]IBW：初始體重

[2]FBW：最終體重

[3]WG：重量增加(%)=[(最終體重-初始體重)/初始體重] x 100

第 107147914 號專利申請案
109 年 11 月 3 日修正替換頁

[4]SGR：每日比成長率(%天$^{-1}$)= [($\log_e$最終體重-$\log_e$初始體重) /天數] x 100

[5]FCR：飼料轉化率=餵食之乾飼料/濕重增加

【0099】 如表 7 和第 4 圖所示，餵食 8 週之所有蝦群組與餵食前相比，成長率增加超過 7,000%。特別地，BS 組 1 之最終平均體重和 BS 組 3 之最終平均體重分別大於對照組的最終平均體重 15.7%和 16.7%。另外，關於每日特定生長率，BS 組 1 和 BS 組 3 與對照組 1 相比，分別顯示 3.4%和 4.1%之增加值。與對照組 1 之餵食效率相比，BS 組 1 和 BS 組 3 之餵食效率分別提高了 27.5%和 26.1%。然而，所有群組中蝦的存活率沒有顯著差異。

2-2. 樣本採集

【0100】 每 2 週對測試蝦稱重，並且在測量前 18 小時將所有測試蝦禁食以減少蝦的壓力。

【0101】 在測量最終重量後，從各水箱隨機選擇 7 隻蝦並在冰水中麻醉，並且使用經 Alsever 氏溶液處理之注射器採集血淋巴。採集之血淋巴用於分析硝基藍四氮唑(nitroblue tetrazolium，NBT)活性，並且使用離心(800g，10 分鐘，4℃)分離血清之樣本分析非特異性免疫。

【0102】 關於採集用於消化率分析之蝦糞，在餵食 30 分鐘後，藉由虹吸和水交換而清潔水槽中剩餘之飼料和雜質，並且此後 3 小時，使用虹吸管採集排泄的糞便。將採集之樣本用蒸餾水洗滌，通過濾紙過濾，並在-40℃之低溫冷凍機中儲存，直到用作分析樣本。

2-3. 統計分析

【0103】 對於實驗飼料之分布，進行完全隨機化之設計，並使用 SPSS Version 18.0 程式，成長和分析之結果藉由單向 ANOVA 進行統計分析。在鄧氏多距檢定中比較了數據值的顯著差異(P <0.05)。數據以平均值±SD 表示，而且百分比數據經計算為反正弦變換值並進行統計分析。

2-4. 共同成分之分析

【0104】 根據 AOAC(2005)方法分析糞便及測試飼料之共同成分；藉由大氣壓力加熱乾燥法(125℃，3 小時)而得到水分含量(Kejltec system 2300，Sweden)；藉由直接焚燒法(550℃，4 小時)而得到到粗灰粉；藉由自動化粗蛋白質分析儀(Kejltec system 2300，Sweden)而得到粗蛋白質；藉由 Folch 等人之方法(1957 年)而得到粗脂質。結果如下表 8 所示。

【0105】 [表 8]

	對照組 1	對照組 2	BS 組 1	BS 組 3
乾物質	24.9±0.35	24.5±0.10	23.7±0.39	23.7±0.35
粗灰分	12.9±2.34	12.8±0.12	12.3±0.33	14.5±0.22
粗蛋白	76.5 ± 3.46^{b}	82.0 ± 1.67^{a}	84.3 ± 2.85^{a}	83.9 ± 2.31^{a}
粗脂質	5.37±0.96	5.45±1.15	5.09±0.28	5.26±1.05

($*P < 0.05$)

【0106】 如表 8 所示，關於粗灰分和粗脂質的含量，各群組之間沒有顯著差異。然而，與對照組 1 和對照組 3 之粗蛋白相比，BS 組 3 中之粗蛋白的含量顯著更高。亦即，證實了當提供根據本揭示內容之飼料組成物給蝦時，蝦之蛋白質含量可以增加。

2-5. 與非特異性免疫有關之分析

2-5-1. 硝基藍四氮唑(NBT)活性之分析

【0107】 將 Zhang 等人之分析方法(2013 年)用於測定呼吸爆發期間嗜中性細胞產生之氧化自由基的量。

【0108】 具體而言，首先，將血淋巴(50μL)與 200μL 之 Hank 氏平衡鹽溶液(HBSS)混合，並使其在 25℃反應。30 分鐘後，於其中加入 100 μL 酵母聚醣(0.1%Hank 溶液)，並在 37℃反應 2 小時。每次以 100μL 的量於其中加入 NBT 溶液(0.3%)，並在 37℃反應 2 小時。於其中加入 100 %甲醇(600μL)，並將混合物以 6,500rpm 之速率離心 10 分鐘。將上清液丟棄，用 70%甲醇(100μL)洗滌沉澱物 3 次，並乾燥 5 分鐘。然後，於其中加入 2M KOH(700μL)和 DMSO(800μL)，並在 620 nm 測量所得物之吸光度。

2-5-2. 穀胱甘肽過氧化物酶(GPx)活性之分析

【0109】 以 GPx 試劑盒(Biovision, Inc.，California)分析血清中之 GPx 活性。

【0110】 具體地，使用混合過氧化物基質(ROOH)、穀胱甘肽還原酶(GSSG-R)和還原 b-菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)之反應混合物作為氫過氧化異丙苯。首先，將血淋巴樣本(50μL)加入微量儀(microplater)中，並向其中加入反應混合物(40μL)使反應。然後，向其中加入氫過氧化異丙苯(10μL)，5 分鐘後，在 340nm 測量所得物之吸光度。GPx 活性係以 nmol/min/mL 計算。

2-5-3. 溶菌酶活性分析

【0111】 溶菌酶活性係根據 Swain 等人(2007 年)之方法而分析。

【0112】 具體地，溶菌酶係參與非特異性(先天性)免疫反應之抗菌酶，係以非特異性之方式對各種細菌表現出抗菌活性而不是以特定方式針對特定細菌的酶。

【0113】 對致病菌之抗菌機制係水解肽聚糖(其為細菌細胞壁之組成部分)之 β-1,4-醣苷鍵之抗菌作用，從而破壞細菌細胞壁。溶菌酶對革蘭氏陽性細菌特別有效。基於這種機制，溶菌酶活性被廣泛用於分析以測量蝦(包括魚)中之非特異性免疫反應。當將免疫刺激劑(例如抗壞血酸、β-葡聚糖、益生菌等)加到蝦飼料中時，可以證實蝦之血淋巴和組織中之溶菌酶活性增加，而且這些結果被解釋為增加非特異性免疫反應或改善魚類(蝦)之免疫力。

2-5-4. 酚氧化酶(PO)活性之分析

【0114】 基於 Hernandez-Lopez 等人之方法(1996)而分析酚氧化酶(PO)活性。

【0115】 具體地，酚氧化酶係在甲殼類動物之防禦機制中具有重要作用之酶，其在血液細胞中以原酚氧化酶之形式存在並由原酚氧化酶活化系統活化。活化之酚氧化酶產生調理素，其促進血液細胞之吞噬作用和對外來抗原之包覆作用，並參與血液凝固反應。因此，血淋巴內之酚氧化酶活性係用於作為蝦之先天免疫力之重要指標。

2-5-5. 超氧化物歧化酶(SOD)活性之分析

【0116】 使用 SOD 測定試劑盒(Sigma-Aldrich，19160，St.Louis，USA)分析 SOD 活性。

【0117】 具體地，將自由基偵測劑(20μL)添加到 96 孔板中，並且將各個血液樣本(20μL)加到每個孔中。然後，向其中加入黃嘌呤氧化酶(20μL)，並反應 20 分鐘。使用 Microplate Reader(Thermo)在 450nm 測量所得物的吸光度。

2-5-6. 抗蛋白酶活性之分析

【0118】 血淋巴內之抗蛋白酶活性係使用 Ellis 之分析方法(1990)而分析。

【0119】 具體地，將血淋巴(20μL)和標準胰蛋白酶溶液(20μL；來自豬胰臟的 II-S 型，Sigma-Aldrich，A2765，St.Louis，USA)混合，並在 22℃培養 10 分鐘。向其中加入磷酸鹽緩衝液(200μL；0.1M，pH7.0)和偶氮酪蛋白(2%)(250μL；Sigma-Aldrich)，在 22℃培養 1 小時，並再度向其中加入三氯乙酸(500μL；10%)(TCA)，在 22℃培養 30 分鐘。將培養液離心(6000g，5 分鐘)，將所得物(100μL)接種到 96 孔板中，在其中加入 1N NaOH(100μL)，使用 Microplate Reader 於 430 nm 測定所得物的吸光度。

【0120】 將進行非特異性免疫分析之實驗例 2-5-1 至 2-5-6 之結果示於下表 9 中。

【0121】 [表 9]

	對照組 1	對照組 2	BS 組 1	BS 組 3
NBT[1]	1.65 ± 0.15^{c}	1.72 ± 0.08^{bc}	1.85 ± 0.03^{ab}	1.79 ± 0.13^{ab}
PO[2]	0.213 ± 0.008^{b}	0.249 ± 0.031^{a}	0.254 ± 0.015^{a}	0.249 ± 0.009^{a}
抗蛋白酶[3]	31.6 ± 2.4^{b}	35.8 ± 0.3^{a}	36.6 ± 1.8^{a}	36.1 ± 3.4^{a}
溶菌酶[4]	6.40 ± 1.04^{b}	8.57 ± 0.50^{a}	8.43 ± 0.98^{a}	8.08 ± 1.26^{ab}
SOD[5]	67.3 ± 4.6^{b}	73.1 ± 3.3^{ab}	74.8 ± 4.6^{ab}	72.8 ± 7.7^{ab}
GPx[6]	28.5 ± 1.9^{d}	32.7 ± 2.4^{c}	36.4 ± 1.7^{abc}	36.7 ± 2.3^{a}

($*P < 0.05$)

[1] 硝基藍四氮唑；吞噬活性(吸光度)

[2] 酚氧化酶活性(吸光度)

[3] 抗蛋白酶(抑制%)

[4] 溶菌酶活性(μgmL^{-1})

[5] 超氧化物歧化酶(抑制%)

[6] 穀胱甘肽過氧化物酶($mU\ mL^{-1}$)

【0122】 如表 9 和第 5 圖所示，關於 NBT 活性和 PO 活性，與對照相 1 和對照組 2 相比，所有 BS 組 1 和 BS 組 3 顯示出顯著更高的值；特別是，在 PO 活性之情況下，BS 組 1 顯示出比對照組 1 高出 26.8%之值。關於抗蛋白酶活性，與對照組 1 和對照組 2 相比，所有 BS 組 1 和 BS 組 3 顯示出顯著更高的值；特別是，BS 組 1 顯示出較對照組 1 高出 15.8%之值。關於溶菌酶活性和 SOD 活性，與對照組 1 相比，所有 BS 組 1 和 BS 組 3 顯示出顯著更高的溶菌酶活性和 SOD 活性。關於 GPx 活性，與對照組 1 和對照組 2 相比，所有 BS 組 1 和 BS 組 3 顯示出顯著更

高的值；特別是，與 BS 組 1 和 BS 組 3 顯示較對照組 1 分別高出 27.7% 和 28.8%之值。

2-6. 水質分析與零水交換實驗

【0123】 在餵食實驗的 8 週期間，每 5 天從每個水箱採集培養水樣本。從每箱中的相同位置採集樣本，並測量溶解氧(DO)、鹽度、pH 和氨($NH4^+$)濃度。藉由 Thermo Scientific Orion Star A216 Benchtop Meter(Thermo Scientific)而測量 DO，且藉由 Master Refractometer(ATAGO)測量鹽度。藉由 Seven Compact(METTLER TOLEDO)測量 pH，並且藉由根據 Verdouw 等人之方法(1978 年)分析 NH_4^+之濃度。

【0124】 將 12 隻平均重量為 2.87(±0.08)g 之白蝦(中南美白對蝦)用零換水方法隨機放入每個 96L 水槽中，總共 14 個水槽。每個試驗組有兩個重複，並且每天四次(在 08：30、12：00、15：30 和 19:00)以分次劑量對蝦投予 10%體重之測試飼料。根據 Verdouw 等人(1978)，每天採集一次水樣本，測量水樣本中之總氨濃度 10 天。結果如表 10 所示。

【0125】 [表 10]

	DO mgL^{-1}	pH	NH_4+ mgL^{-1}
平均值	6.85	7.10	0.102
最大值	7.21	6.78	0.154
最小值	6.39	6.48	0.035

【0126】 如表 10 和第 6 圖所示，有趣的是，從第 7 天開始，所有試驗組開始顯示出比對照組更低的總氨濃度，並且在第 10 天，所有試驗組顯示出比對照組顯著更低的氨濃度。

2-7. 消化率分析

2-7-1. 指示劑(Cr_2O_3)分析

【0127】 根據 Divakaran 等人之方法(2002)分析測試飼料和粉末中之氧化鉻含量。

【0128】 具體地，將測試飼料和粉末樣本在灰化爐(550℃)中灰化 4 小時，並將獲得的樣本用於分析。首先，為了將氧化鉻氧化成單鉻酸鹽形式，稱量 5mg 至 10mg 粉末樣本並轉移到玻璃試管中。將 4mL 高氯酸試劑($HClO_4$)加到含有樣本的玻璃試管中。該試劑係藉由將 200mL 硝酸與 100mL 蒸餾水混合，冷卻混合物，然後向其中混合 200mL 之 70%高氯酸而製備。將含有樣本和高氯酸試劑之玻璃試管置於加熱板中，在 300℃加熱 15 分鐘，然後冷卻至室溫。將預處理之樣本轉移到 50mL 玻璃燒瓶中，並用三重蒸餾之水定量至 25mL。此後，使用分光光度計(Beckman DU-730)在 350nm 測量吸光度。使用如樣本分析中預處理之標準溶液準備之標準公式，利用測量之吸光度計算樣本的氧化鉻含量。

2-7-2. 乾物質和蛋白質消化率之分析

【0129】 藉由以下方法而計算測試飼料之乾物質和蛋白質消化率：

【0130】 乾物質之 ADC(%)=100-100 x (飲食中之%Cr_2O_3 /糞便中之%Cr_2O_3)；

【0131】 蛋白質之 ADC(%)=100-100 × (飲食中之%Cr_2O_3 /糞便中之%Cr_2O_3)×(糞便中之%蛋白質/飲食中之%蛋白質)

【0132】 在飼養實驗結束時進行的消化率分析的結果顯示在表 11 中。

【0133】 [表 11]

	對照組	3 種芽孢桿菌種	$BS10^{10}$x0.2	$BS10^{10}$x0.1
ADCd (%)[1]	85.6±0.7^{c}	87.4±0.6^{ab}	86.9±0.5^{b}	87.9±0.4^{a}
ADCp (%)[2]	93.5±0.3^{b}	95.0±0.2^{a}	94.8±0.2^{a}	95.2±0.2^{a}

數值係三重複群組之平均值，並以平均值±SD 表示。同一列中具有不同上標之值為顯著不同(P <0.05)。

[1] 乾物質之表觀消化率係數

[2] 蛋白質之表觀消化率係數

【0134】 如表 11 所示，與對照組相比，所有測試組顯示出顯著更高的乾物質消化率和蛋白質消化率。

實驗例 3. 飼料組成物對 WSSV 的預防效果之評估

【0135】 為了確認包括枯草桿菌的飼料組成物的抗病毒活性，進行攻擊試驗以使蝦受到白斑綜合症病毒的攻擊。在白斑綜合症病毒的情況下，從 WSSV 感染的白腿蝦(Litopenaues vannamei)中單離的病毒係在 2017 年從家養農場獲得者並用於測試。攻擊試驗如下進行：將實施例的飼料組成物給予蝦 6 週，然後將具有相同重量(平均重量：6.25g)的蝦，每組 96 隻蝦，4 個重複。病毒的接種濃度為 4.1×10^{5} 拷貝(copies)/μL，

並且使用注射器以 100μL 病毒肌內接種每隻蝦。每隻蝦的最終接種濃度為 4.1×10^7 拷貝/μL。

【0136】 接種後，確認蝦的死亡及其游泳狀態。測試飼料每天三次(8：30、13：30 和 18:30)以限制的方式(魚體重之 10%至 12%)分次給予，並觀察死亡率 125 個小時，結果如下表 12 所示。

【0137】 [表 12]

處理	存活率 (%)
	試驗
對照組 1	23.21±3.57
BS 組 1	25.00±18.0

【0138】 如表 12 所示，在用於對蝦的白斑綜合症病毒的攻擊試驗中，BS 組 1(提供實施例 2 之包括枯草桿菌之飼料組成物)顯示存活率高於對照組 1(投予比較例 1 之飼料組成物)之存活率。

實驗例 4. 飼料組成物對 WSSV 和 AHPND 共感染之預防效果之評價

【0139】 為了確認包括枯草桿菌的飼料組成物的抗病毒活性而進行了攻擊試驗，使蝦受到腸炎弧菌和白斑綜合症病毒的攻擊。在弧菌菌株的情況下，使用 2013 年從越南分離的 AHPND(EMS)誘發之菌株進行測試。在白斑綜合症病毒的情況下，從感染 WSSV 的白蝦(*Litopenaues vannamei*)中單離的病毒係在 2017 年從家養農場獲得者並用於測試。攻擊試驗如下進行：將實施例的飼料組成物給予蝦 6 週，然後將具有相同重量(平均重量：4.52g)的蝦，每組 96 隻蝦，4 個重複。病毒的接種濃度為

8.3×10³ 拷貝/μL，使用注射器以 50μL 病毒肌內接種各蝦。每隻蝦的最終接種濃度為 4.1×10⁴ 拷貝/μL。病毒接種後兩天，用弧菌菌株感染蝦。

【0140】 使用 TSB⁺培養基在 30℃，150rpm 培養細菌 24 小時，並將腸炎弧菌的懸浮液以每箱 1.3×10⁵ CFU/mL 的濃度浸潤。浸泡後，每小時確認蝦的死亡及其游泳狀態。試驗飼料每天三次(8：30、13：30 和 18:30)以限制的方式(魚體重的 10%至 12%)分次給予，觀察死亡率 7 天。結果如下表 13 所示。

【0141】 [表 13]

處理	存活率 (%)
	試驗
對照組 1	51.8±13.5
BS 組 1	62.50±14.7

【0142】 如表 13 所示，在蝦的腸炎弧菌和白斑綜合症病毒的攻擊試驗中，BS 組 1(提供實施例 1 之包含枯草桿菌之飼料組成物)之存活率高於對照組 1(提供比較例 1 之飼料組成物)之存活率。

【0143】 基於上述實施例，根據本發明內容之包括枯草桿菌之飼料組成物可以增進白蝦的生長、飼料效率、消化率、培養水質和非特異性免疫。此外，預期本揭示內容能夠生產高蛋白之白蝦，從而可以提高蝦的適銷性。

【符號說明】

無。

【生物材料寄存】

【0144】

[寄存號]

寄存機構：韓國微生物培養中心(國際寄存機構)

登錄號：KCCM11143P

寄存日期：20101214

登錄號：KCCM11144P

寄存日期：20101214

登錄號：KCCM11270P

寄存日期：20120322

公告本

第 107147914 號專利申請案
109 年 11 月 3 日修正替換頁

【發明申請專利範圍】

【第1項】 一種以登錄號 KCCM11143P 寄存之枯草桿菌菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質之用途，其係用以製備用於預防或治療蝦急性肝胰臟壞死病之藥物。

【第2項】 如申請專利範圍第 1 項所述之用途，其中該枯草桿菌具有菌數為 1×10^4 至 1×10^{11}CFU/公克。

【第3項】 一種包括(i)以登錄號 KCCM11143P 寄存之枯草桿菌菌株、短小芽孢桿菌及/或地衣芽孢桿菌、(ii)其培養物、(iii)其濃縮物或(iv)其乾物質之組成物之用途，其係用以製備用於預防或治療蝦急性肝胰臟壞死病之藥物。

【第4項】 一種以登錄號 KCCM11143P 寄存之枯草桿菌菌株、其培養物、其濃縮物或其乾物質之用途，其係用以製備用於預防或治療白斑綜合症之藥物。

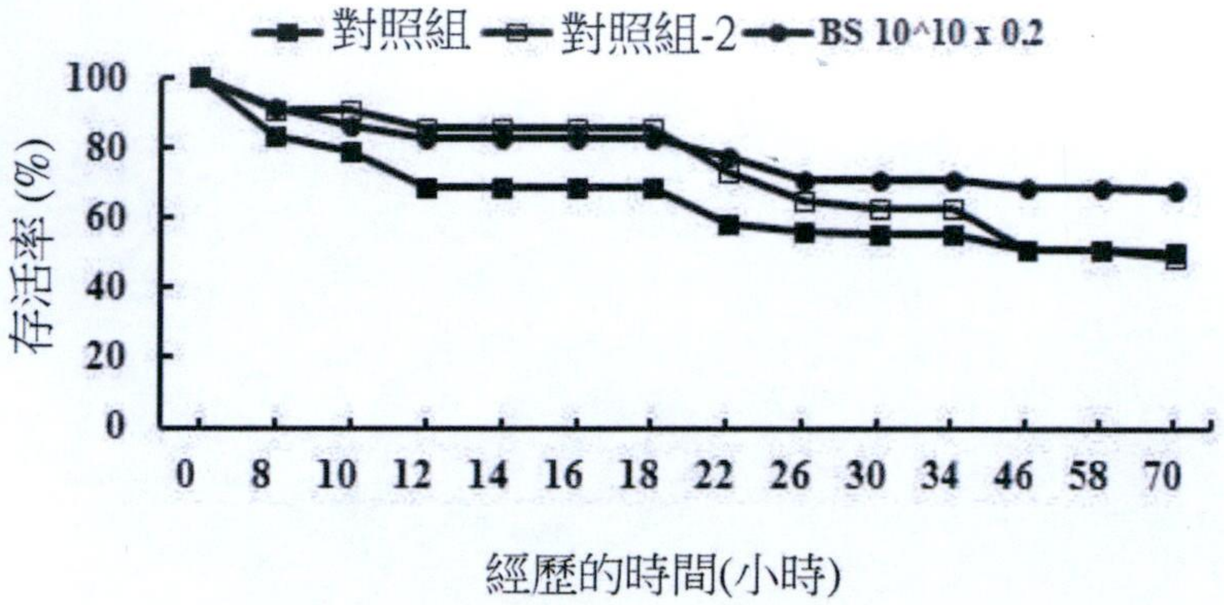
【第5項】 如申請專利範圍第 4 項所述之用途，其中該白斑綜合症係由白斑綜合症病毒引起。

【第6項】 如申請專利範圍第 5 項所述之用途，其中該枯草桿菌具有細菌數為 1×10^4 至 1×10^{11}CFU/公克之活性成分。

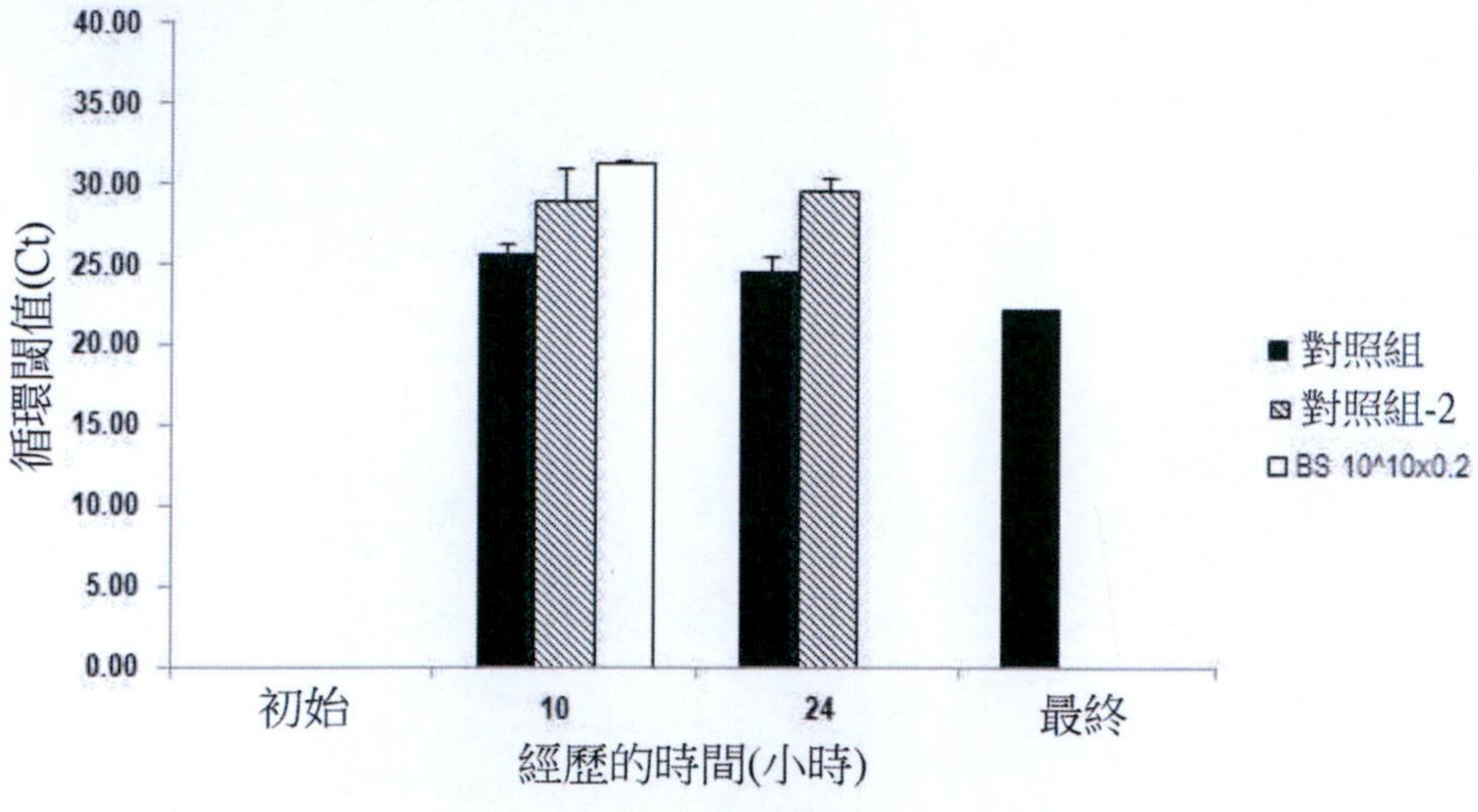
【第7項】 一種包括(i)以登錄號 KCCM11143P 寄存之枯草桿菌菌株、短小芽孢桿菌及/或地衣芽孢桿菌、(ii)其培養物、(iii)其濃縮物或(iv)其乾物質之組成物之用途，其係用以製備用於預防或治療白斑綜合症之藥物。

【發明圖式】

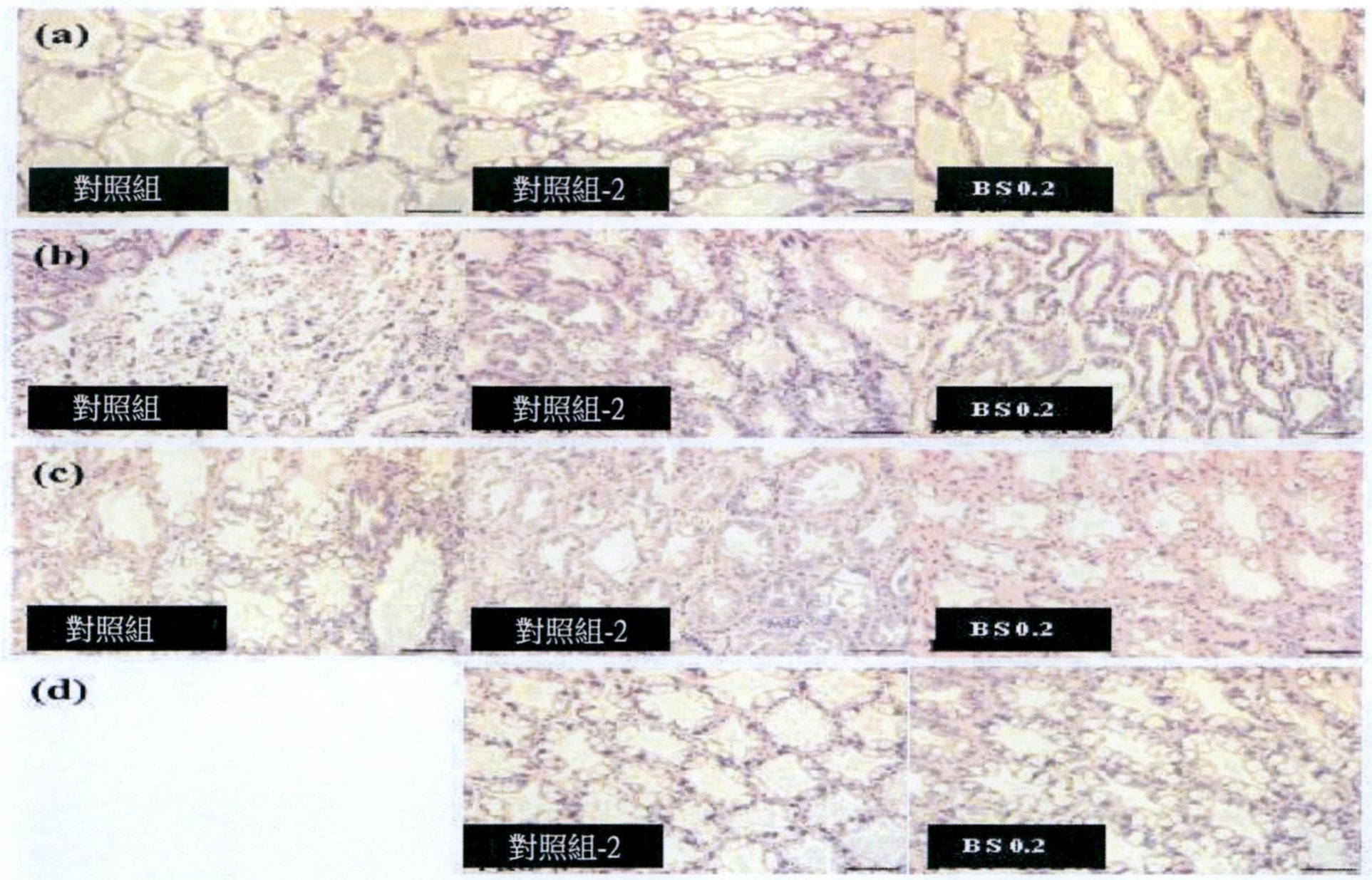
公告本



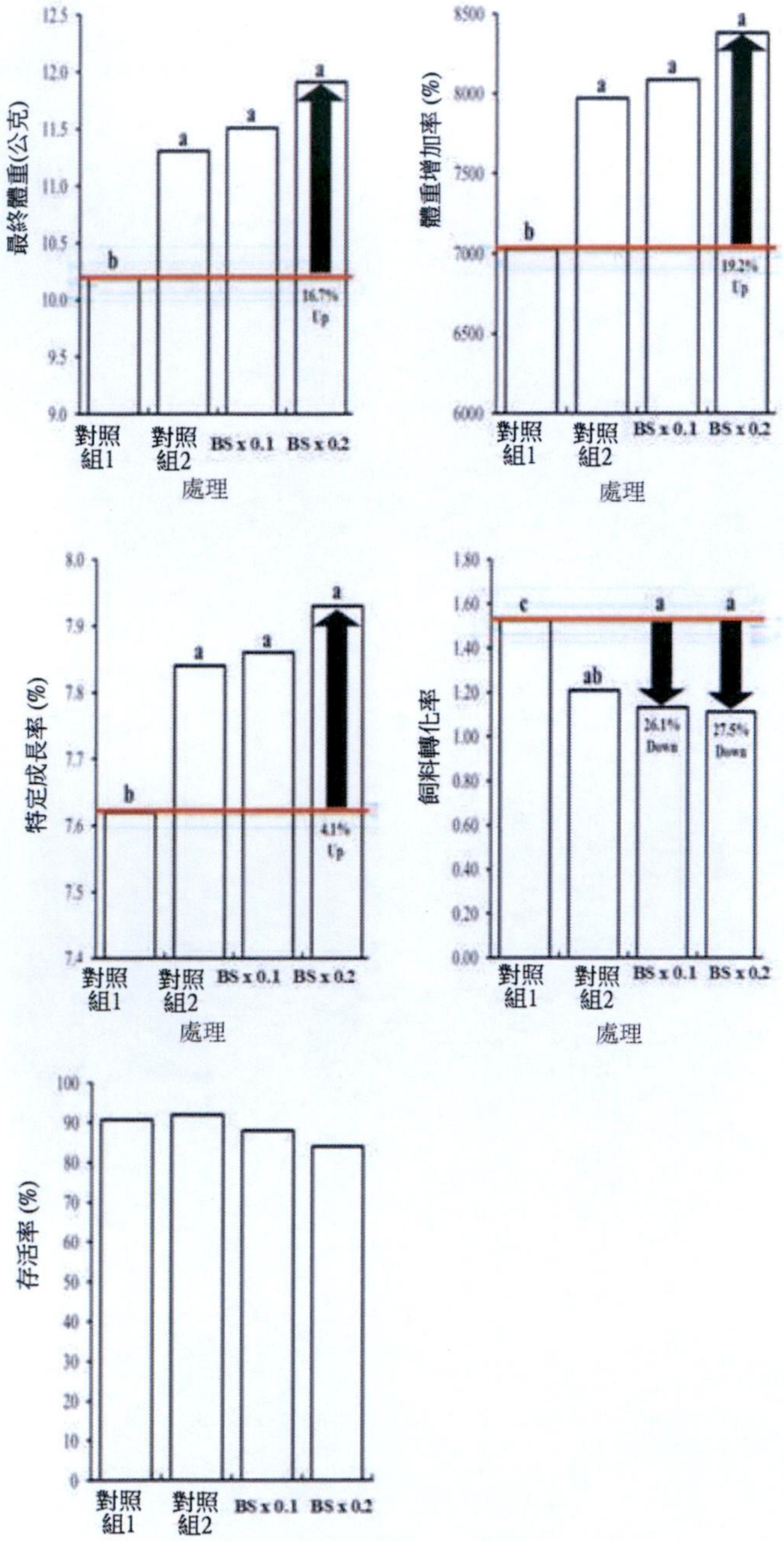
【第1圖】



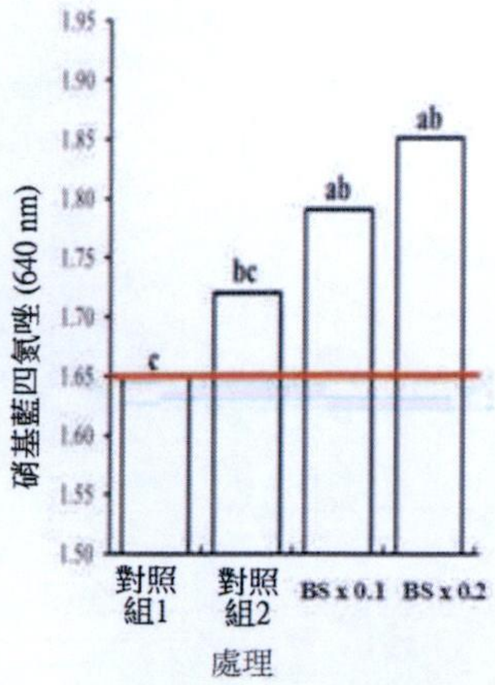
【第2圖】

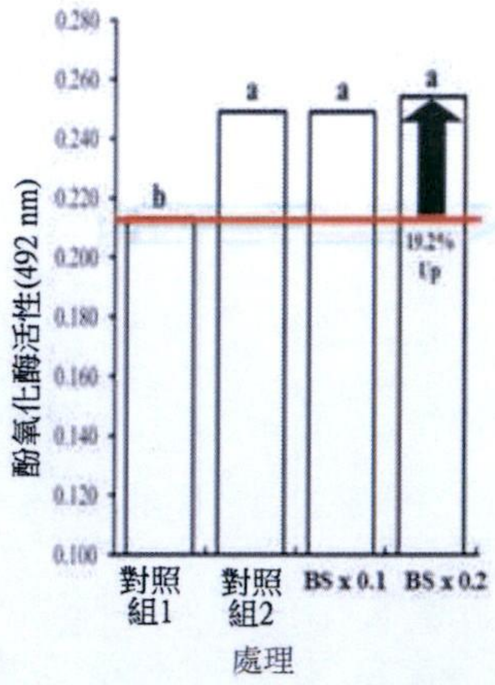


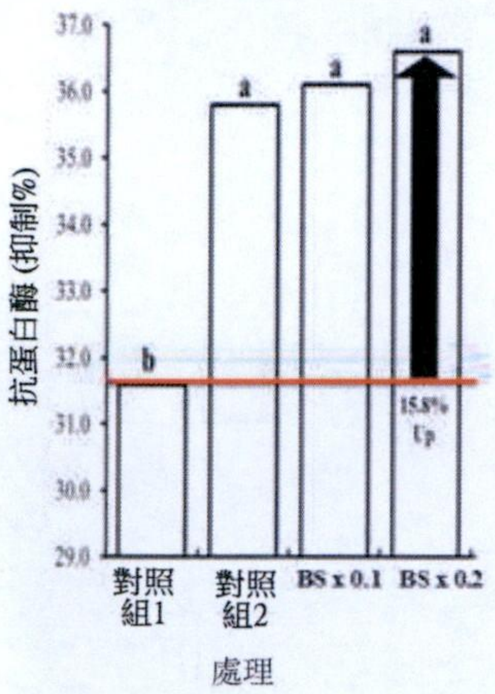
【第3圖】

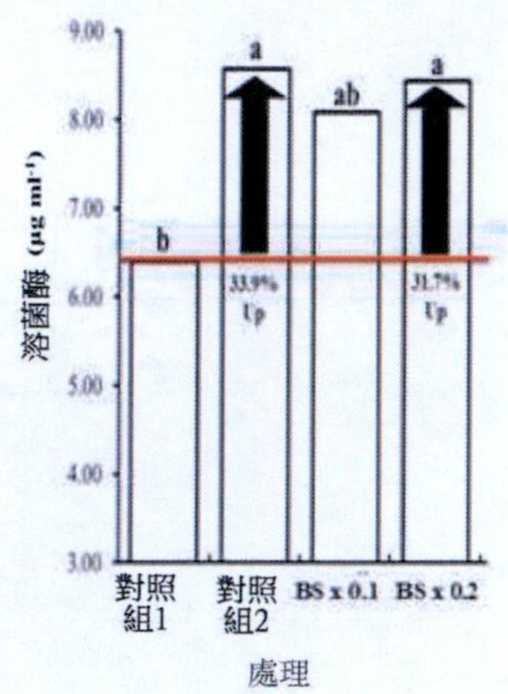

最終體重(公克)
12.5
12.0
11.5
11.0
10.5
10.0
9.5
9.0
a
a
b
a
16.7%
Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理
體重增加率 (%)
8500
8000
7500
7000
6500
6000
a
a
b
a
19.2%
Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理
特定成長率 (%)
8.0
7.9
7.8
7.7
7.6
7.5
7.4
a
a
b
a
4.1%
Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理
飼料轉化率
1.80
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
c
ab
a
a
26.1%
Down
27.5%
Down
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理
存活率 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2

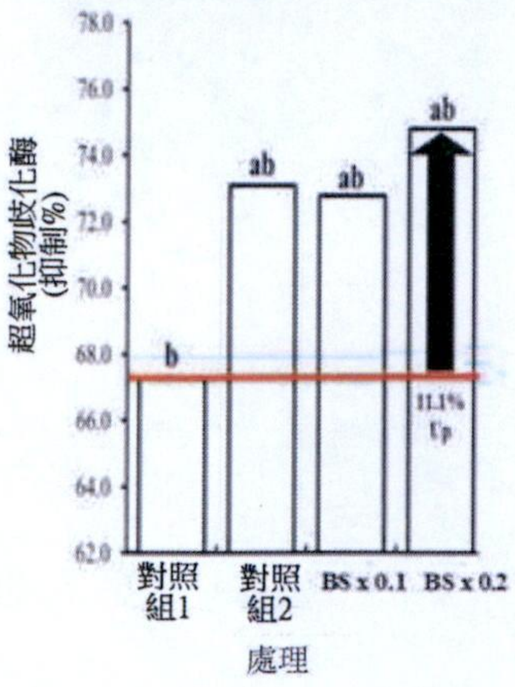
【第4圖】


硝基藍四氮唑 (640 nm)
1.95
1.90
1.85
1.80
1.75
1.70
1.65
1.60
1.55
1.50
c
bc
ab
ab
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理

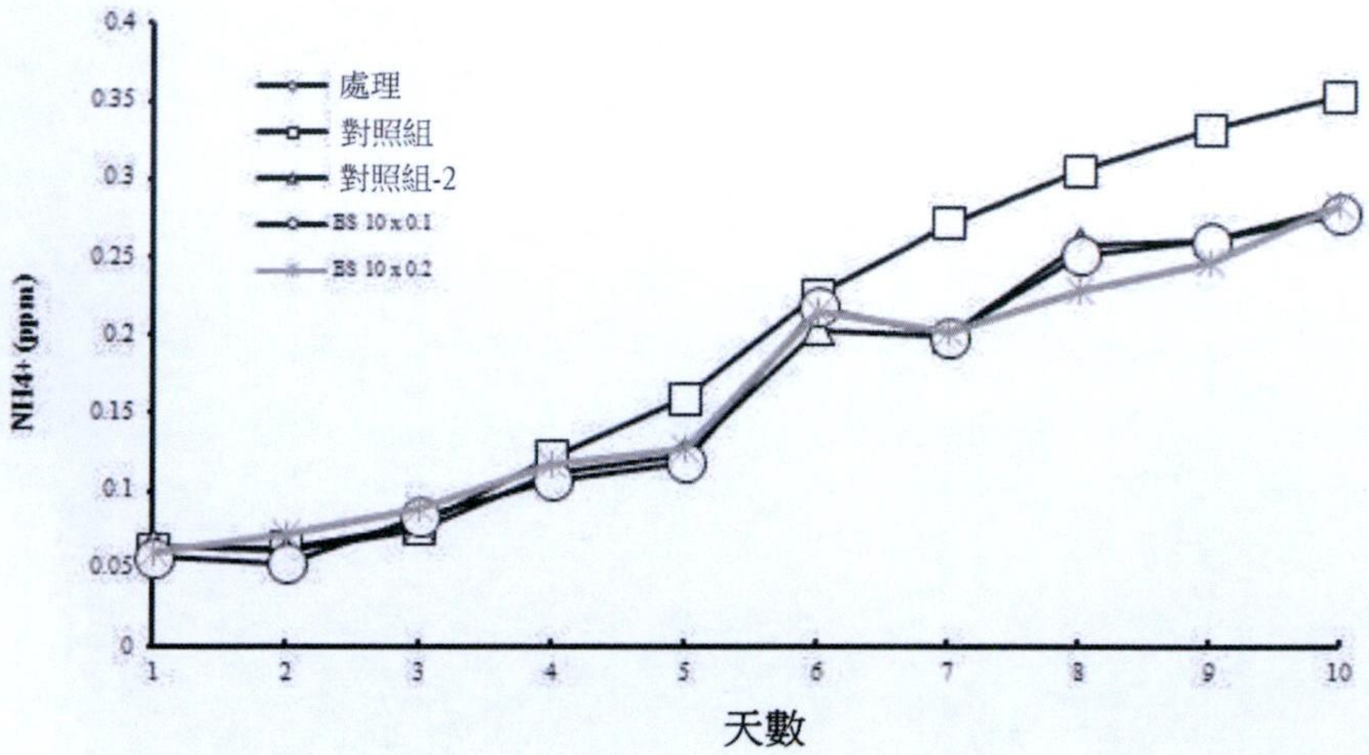

酚氧化酶活性(492 nm)
0.280
0.260
0.240
0.220
0.200
0.180
0.160
0.140
0.120
0.100
b
a
a
a
19.2% Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理


抗蛋白酶 (抑制%)
37.0
36.0
35.0
34.0
33.0
32.0
31.0
30.0
29.0
b
a
a
a
15.8% Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理


溶菌酶 (μg ml⁻¹)
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
b
a
ab
a
33.9% Up
31.7% Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理


超氧化物歧化酶 (抑制%)
78.0
76.0
74.0
72.0
70.0
68.0
66.0
64.0
62.0
b
ab
ab
ab
11.1% Up
對照組1
對照組2
BS x 0.1
BS x 0.2
處理

【第5圖】


處理
對照組
對照組-2
BS 10x0.1
BS 10x0.2
NH4+ (ppm)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
天數

【第6圖】