

# 公 告 本

A4  
C4

申請日期	85 年 6 月 19 日
案 號	85107433
類 別	A61k 37/56

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書 480175 發 新 型		
一、發明 名稱	中 文	磷脂酶在動物飼料上的應用
	英 文	Application of phospholipases in animal feed
二、發明人 創作	姓 名	(1) 羅伯特·法蘭斯·普德克 Beudeker, Robert Franciscus (2) 阿里·凱斯 Kies, Arie Karst
	國 籍	(1) 荷蘭                      (2) 荷蘭 (1) 荷蘭登弘布威克立三十一號 Boomkwekerij 31, 2635 KC Den Hoorn, The Netherlands
	住、居所	(2) 荷蘭皮奈克福魯爾范多斯新格爾五十七號 Freule van Dorthsingel 57, 2642 AC Pijnacker, The Netherlands
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 吉斯特布勞凱斯有限公司 Gist-Brocades B.V.
	國 籍	(1) 荷蘭 (1) 荷蘭台夫特瓦德林茲街 1 號
	住、居所 (事務所)	Wateringseweg 1, PO-Box 1, 2600 MA Delft, The Netherlands
	代 表 人 姓 名	(1) 威廉·波爾 Boer, Willem Roelf DE

裝 訂 線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6  
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， 有 無主張優先權

歐洲  
歐洲

1995 年 5 月 15 日 95201266.4  
1995 年 8 月 9 日 95202442.0

無主張優先權  
無主張優先權

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 1 )

### 發明領域

本發明是有關在家畜飼料中應用酵素。

### 發明背景

在動物的胃腸道中分泌許多酵素以消化食物。這些酵素各自作用在部份胃腸道特殊環境之特異組份上。例如，胃蛋白酶，在胃的酸性環境中具活性，而其他的蛋白酶如胰凝乳蛋白酶及羧基肽酶在 pH 6 - 7 的小腸上半部份具有活性。此類酵素有許多在被活化前需有前驅體。如胃蛋白酶，僅在酸性環境中才自胃蛋白酶原形成。胰凝乳蛋白酶及羧基肽酶均以未活化型式分泌，且由蛋白酶胰蛋白酶所活化。

脂質的水解是個複雜的過程。動物飼料中大部份的脂質可呈三甘油酯型式應用。這些三甘油酯若非完全也是極難為小腸所吸收，且需降解成單，及二甘油酯，甘油及自由態脂肪酸。此轉化作用可由酵素脂酶所催化，其係由胰臟所分泌。此酵素在水及油之界面處活化。於食物消化時，在油水乳液中需有極小之油滴。乳化劑為一種界面活性劑，可將脂質分散在水相中。在胃腸道中最重要的乳化劑是膽汁。膽汁由肝分泌且可貯存於膽囊中。膽汁中含有膽酸及鹽類，膽固醇及磷脂類。小粒子—微團—由膽汁組份與（其餘的）三甘油酯產物之混合所形成。

這些微團可擴散至空腸上皮細胞，在此其內容物被釋出並吸收。在這些上皮細胞中，三甘油酯被重新組成。加

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

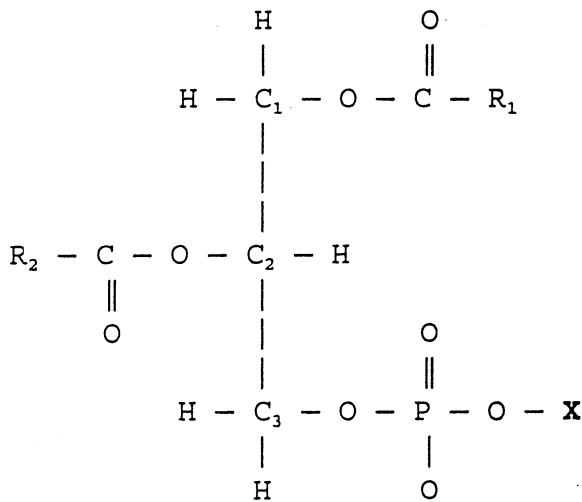
象

五、發明說明(2)

上膽固醇，膽固醇酯，磷脂及蛋白質，其可形成新的水溶性粒子，稱之為乳糜微膠粒。

磷脂，如卵磷脂可由磷脂 A 及 B 作用而酵素水解，其也由胰臟所分泌。

卵磷脂為極性及中性脂質之混合物，其中極性脂質之含量至少 60%。由於其疏水性／親水性特色，極性脂質（及因此之卵磷脂）可充作乳化劑。極性脂質包括（甘油）磷脂及糖脂。甘油磷脂之基本結構如下：



X = 膽素

乙醇胺

肌醇

絲胺酸

氫

甘油磷脂基本上由甘油部份與 C 1 - 及 C 2 位置上的脂肪酸組成。C 3 - 位置以磷酸脂化。此磷酸常以醇基連接，由此產生以下化合物：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明(3)

- 磷脂鹽基 — 乙醇胺 ( P E ; X = 乙醇胺 )
- 磷脂鹽基 — 膽鹼 ( P C ; X = 膽鹼 )
- 磷脂鹽基 — 弱胺酸 ( P S ; X = 弱胺酸 )
- 磷脂鹽基 — 肌醇 ( P I ; X = 肌醇 )
- 磷脂鹽基 — 酸 ( P A ; X = 氫 )

僅攜一個(而非一般的二個)脂肪酸殘基的甘油磷脂稱為溶血-磷脂。

卵磷脂在許多應用中作為乳化劑之用，包括食物及飼料。乳化劑為界面活性物質，其可使油液相分散在水相中。乳化劑在相同分子內具有親水及親脂基。親水基對親脂基之比例，已知為HLB值，為乳化劑特色之指示。

脂溶性疏水性乳化劑，具有0至少於10之HLB值，而水溶性化合物具有10以上及20間之HLB值。

如卵磷脂之乳化劑加至動物飼料中可達成使飼料的營養值改善，或使得在液態飼料例子中有更佳的分散。也已知可將溶血卵磷脂加至動物飼料中(由Kemin公司以Lysoforte®之商品名出售)，其有改善的乳化特性，使得可有更佳的營養價值(Pluimveehouderij 24:20-21, March 18, 1994)。

卵磷脂之乳化特性不僅可因將卵磷脂以乾比例納入而利用於家畜之產製上，也可應用於動物是給予含大量脂質之液態飼料例領域中。這些是牛主要的乳汁代替物，及小

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

## 五、發明說明(4)

豬之牝豬乳汁代用物。卵磷脂的功能是在即可製備之液態飼料中產生儘可能細緻的脂質分散相。細緻的分散相使動物對脂質有改善的消化力。此外，卵磷脂在將不溶性組份沈澱在液態飼料之時呈現有益的作用。

近年來，飼料工業開始使用由工業產生之酵素來補充在動物胃腸道產生之酵素。實例包括肌醇六磷脂酶， $\alpha$ -澱粉酶，蛋白酶，及各種植物細胞壁降解酵素。然而，在先前的技藝中並無一處描述將磷脂直接加至動物飼料中以促進動物之生長，因為動物本身已在小腸之上半部位分泌大量這些酵素。

在 EP - A - 0 6 1 9 0 7 9 中揭示特別是使用磷脂為顆粒劑之外層，而此中含有具生物活性之物質以納入反芻類之飼料中。外層可保護生物活性物質於瘤胃中，使得其接下來的消化及吸收可經由第四胃後之消化器官。EP - A 0 6 1 9 0 7 9 中進一步揭示視所需的磷脂酶也可納入保護性外層中以助其水解，然而，EP - A - 0 6 1 9 0 7 9 中並未揭示或建議磷脂酶可加至飼料中以促進生長，或改善飼料利用之效率。

GB - A - 2 2 6 7 0 3 3 是有關促進生長，然而，GB - A - 2 2 6 7 0 3 3 教示將含有磷脂卵磷脂加上鏈霉菌之套組加至秣草中。其中建議，鏈霉菌可在秣草之醱酵中產生磷脂酶 A 2。但此中該套組之使用受動物飼料之限制，即產製過程需包括一個醱酵階段，其係與由該鏈霉菌產生之磷脂相容。因此，為改善飼料利用率及

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明(5)

／或促進動物之生長，此中仍需有可廣泛應用，多方面且即可用之磷脂酶飼料添加物。

### 發明要點

本發明提出改善飼料利用率之過程，其中動物所餵食之飼料包括由飼料物質及即可用之磷脂酶添加物所組成之組成物。

本發明也提出促進動物生長之過程，其中動物所餵食之飼料包括由飼料物質及即可用之磷脂酶添加物所組成之組成物。

本發明進一步提出一種動物飼料組成物，其中含有飼料物質及即可使用之磷脂酶添加物。

此外本發明提出產生動物飼料之方法，此方法包括在微生物或導入外來基因之植物中重組產生磷脂酶，並將如此得到之磷脂酶與飼料物質混合。

### 詳細說明

本發明揭示動物飼料中，外加的及即可使用的磷脂酶之用法，以改善胃腸道中磷脂之乳化特性，由是改善飼料利用效率及／或促進動物生長。因此促進動物生長在此定義為促進生長是依時間變化之獲重（生長速率）及／或促進生長是依飼料效率（飼料轉換率）而言。

可應用於本發明的磷脂酶包括：磷脂酶 A 1（E C 3 . 1 . 1 . 3 2 ），磷脂酶 A 2，磷脂酶 B（溶血磷脂

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

象

## 五、發明說明(6)

酶)，磷脂酶 C 及磷脂酶 D。

特言之，本發明揭示應用其中加有磷脂酶 A 2 之飼料 (EC, 3.1.1.4)。磷脂酶 A 2 之產生可分離自豬之胰臟，可為胰島素產製中之副產物。另外，磷脂酶 A 2 可以重組體方式產生，係在微生物如乳酸克魯維酵母中表現異質基因而得。酵素利用發酵可自此微生物中獲得，並順流處理以回收酵素。

將磷脂酶外加至含卵磷脂動物飼料的另一個可能性是加含有導入外來基因植物物質之磷脂酶，較好是導入外來基因之種子，其中磷脂酶經由異質基因表現而合成。為獲得此，將編碼磷脂酶之基因選殖於植物表現載體內，並在適合的植物表現訊號控制之下，如組織特異的啟動子，如種子特異的啟動子。含有磷脂酶基因之表現載體接下來轉形至植物細胞內，再選擇經轉形之植物以再生成完整植物。如此得到的導入外來基因之植物可生長及回收，且含有異質磷脂酶之植物部位可包括在動物飼料中，可呈此型式或經過進一步處理才納入。異質的磷脂酶可含於導入外來植物之種子中，或其可含於其他植物物質中，如根，莖，葉，木材，花，樹皮及／或果實。

此種磷脂酶添加物經了解表示磷脂酶，其並非主要飼料物質之天然組份，或並非以其天然濃度含於此，如磷脂酶與飼料物質分別加至飼料中，可單獨地或配合其他的飼料添加物，或者磷脂酶是飼料物質之一的完整部份，但在其中係以重組體 DNA 技術所產製的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

## 五、發明說明 ( 7 )

即可用的磷脂酶添加物在此定義為在動物飼料中並非於原位產生之添加物。即可用的磷脂酶添加物可直接加入動物飼料中，較好在與其他飼料組份混合後直接加入。即可用的磷脂酶添加物包括呈不活化原型之磷脂酶，但其可於 G I 道中活化，如經由蛋白水解處理修飾。

較佳的飼料含有磷脂，較好是卵磷脂，呈原料型式存在如全脂之大豆，全脂之油菜籽，大豆油，油菜籽油或其他任一種油籽或富含卵磷脂（除了外加之磷脂酶外）之油，其較好是（微生物產製的）豬磷脂酶 A 2。然而，飼料並不需含有磷脂，因為胰臟已可分泌磷脂。

在本發明另一方面，磷脂酶，較好是（微生物產生的）豬磷脂酶 A 2，包括在含有卵磷脂之乳汁替代物中，以用於年幼的動物。此可改善年幼動物對脂質之消化力。

又本發明另一方面是將磷脂酶包括在魚及甲殼類之食物中，以改善生長及飼料轉換率。

在以如磷脂酶 A 2 ( P L A 2 ) 之處理下，卵磷脂之 H L B 值可由 7 升至約 8 或 9，其可在卵磷脂之乳化特性上對磷脂酶 A 2 處理提供益處。

豬磷脂酶 A 2 在 p H 6 . 0 以下之試管內未呈現任何活性。單胃動物 G I 道內普遍的 p H 值在鳥之膝囊及胃內為 6 . 0 以下。

吾等對於磷脂酶 A 2 之添加並不預期有任何益處因為

:

a ) 由於在普遍的 p H 及酵素的 p H 依賴性間有失誤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

錄

## 五、發明說明( 8 )

之結果因此在鳥的膝囊及胃中添加磷脂酶並不預期有活性；及

b) 動物本身可在小腸上半段分泌大量的此種酵素，在此普遍的 pH 值與酵素之 pH 依賴性調和。

令人驚訝地，頃發現添加外來的豬磷脂酶 A 2，可在嫩雞中造成飼料轉換率顯著地改善。

除了單胃動物，磷脂酶 A 2 也可有益地應用於多胃動物中。例如，在高產量之乳牛早期泌乳中，令人感興趣的是在其食物中納入高水平的脂質，以部份補償大的負面能量平衡。由文獻中已知，乳牛 GI 道內脂肪酸之消化力，特別是以脂質之比例組成及來源呈函數關係而變化。頃發現脂肪酸之消化力在含有 500 克富含棕櫚酸 (C 16 : 0) 之飽和脂質食物的 87% 及含有 1000 克富含硬脂酸 (C 18 : 0) 之飽和脂質食物的 64% 間變化 (Weisbjerg et al., Acta Agric. Scand. Section A, Animal Sciences 42, p. 115-120, 1992)。

乳牛脂肪酸消化力上的變化大部份可由小腸中消化力之變化來解釋 (同上, p 114 - 120)。乳牛小腸中磷脂酶 A 2 之作用似乎是加強脂肪酸之消化力。

蛋白質如酵素磷脂酶 A 2 通常可在瘤胃中快速降解。因此，這些蛋白質應可以避免在瘤胃中降解之方式遞送至小腸。許多調和方法可為精藝者所應用，以保護酵素免於在瘤胃中被失去活性。

由加上磷脂酶，尤其是豬磷脂酶 A 2 至非反芻牛，頃

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明(9)

發現對脂質之消化力有顯著的改善。(實例4)

魚及甲殼類之食物中也常添加相當高濃度之磷脂類，以達到可接受之生長，健康及飼料轉換。依據本發明，磷脂類也可加至這些食物中，以進一步改善生長及飼料之轉換率。

又本發明進一步方面是添加磷脂酶及視所需之磷脂至動物飼料中，可減少昂貴磷脂組份之量，如維生素及／或著色劑。

磷脂酶添加至飼料內之濃度，可依磷脂之型式及濃度及標的動物而變化，通常每公斤磷脂在約1,000-5,000,000國際單位之間(IU，其定義見實例1)。較好每公斤磷脂內加約10,000-500,000IU。一般而言，動物飼料中每公斤含有約1-2克的磷脂。因此，每公斤飼料1-10,000IU，或較好10-1,000IU是適合的，然而最佳的範圍是每公斤約100-1,000IU。在不尋常的飼料磷脂含量例子中，可調整所添加之磷脂酶劑量。

於本發明一個較佳具體實例中，磷脂酶是利用重組體DNA技術所獲得的。磷脂酶之重組產製係在適合的宿主有機體中表現磷脂酶基因或cDNA，或者，將適合的內源基因行同源之過度表現。

本發明此中所述之特異具體實例是使用豬之磷脂酶A2，其係在乳酸克魯維酵母中行異質基因表現所產製的。然而，精藝者應了解，由其他來源所得之磷脂酶在本發

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 10 )

明中也可作用。此種磷脂酶可衍生自其他哺乳動物，如大鼠，老鼠，或人類，此中所有的磷脂酶 A 2 基因均為技藝中可應用的。另外，磷脂酶可衍生自哺乳動物以外的有機體，如微生物，或甚至是植物磷脂酶。

類似地，用於產製本發明所使用之磷脂酶之微生物，並不需限制於乳酸克魯維酵母。除了乳酸克魯維酵母，已在大腸桿菌，釀酒酵母及黑曲霉中報告豬磷脂酶 A 2 基因成功的異質表現。(總覽可見 Swinkeles et al. 1993, Antonie van Leeuwenhoek 64, 187-201)。因此預期本發明磷脂酶可在各樣微生物中獲得成功的(異質)表現。基於此目的，較佳的微生物為芽孢桿菌及大腸桿菌屬，酵母屬，克魯維酵母屬，漢遜酵母屬，畢赤酵母屬，Yarrowia 屬，假絲酵母屬或曲霉屬，鐮孢及木霉屬等有菌絲之真菌。

關於磷脂酶在導入外來基因之植物物質中表現之方法，較好在種子中，可參見國際申請案 WO 91 / 14772，其已列為此中參考，且其中揭示酵素於植物中(異質)表現之一般方法，包括酵素之種子一特表現方法。

精藝者應了解，磷脂酶呈導入外來基因之植物物質型式般加入，如含有磷脂酶呈導入外來基因之種子，需將植物物質處理修飾以使酵素可被利用，或至少是改善其利用率。此種處理修飾技術包括各種輾磨及磨擦技術，或熱機械處理如延展或擴大。

本發明在秣草之醱酵中並不限於使用可產生磷脂酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 11 )

A 2 之鏈霉菌，其特別是提供以下優點：

- 可包括任何的磷脂酶。如此可使用內源於動物之磷脂酶，其中欲應用酵素，其有助於自調控當局獲得產物許可。

- 此進一步可選出最適合充作飼料添加物使用之磷脂酶。

- 可排除為於原位產生酵素而醱酵飼料之必要。因而可精確地控制飼料中磷脂酶添加物之量，此在某些應用中使磷脂酶濃度達最佳範圍之觀點下十分重要（見實例 3）。

- 此在調和酵素添加物及含彼之飼料上極具彈性。

- 添加哺乳動物之磷脂酶 A 2，對於生長促進有意外的高度作用。

生長增重，飼料攝取量及飼料轉換率之實驗結果予以統計分析。測試組各組數據之間的差異顯著性係根據最低顯著性偏差測試（Least Significance Difference test; Snedecor & Cochran, 1980）分析其偏差。利用電腦程式 SPSS/PC, 5.0 版（Norusius, 1992）計算偏差值之分析結果。所有顯著性之統計係根據或然率  $P < 0.05$ 。

乳替代品中使用磷脂酶 A 2 之試驗結果，係採用學生 t - 試驗法予以成對方式統計分析。

本說明書提供之實例僅供說明之用，不欲在任一方面限制本發明之範圍。

實例 1

於乳酸克魯維酵母（*Kluyveromyces lactis*）中表現豬磷脂酶 A<sub>2</sub>（PLA<sub>2</sub>）

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 12 )

編碼豬磷脂酶 A<sub>2</sub> 蛋白質之基因，其本質及分子選殖在先前已詳述於 Geus et al. (Nucl. Acid Res. 15, 3743-3759, 1987) 及 van den Bergh et al. (Eur. J. Biochem 170, 241-246, 1987)。

以這些充份鑑定的純系之一，p C B 0 8 T，其含有完整的 P L A<sub>2</sub> c D N A 序列及克魯維酵母特異之遺傳控制要件，吾等構築表現匣 p K L A P L A - 1 1，以在乳酸克魯維酵母中獲得豬 P L A<sub>2</sub> 之表現。關於 P L A<sub>2</sub> c D N A 序列及乳酸克魯維酵母調控要件之序列，均可在公開之資料庫中獲得，精藝者可得到構築表現匣以在乳酸克魯維酵母中表現 P L A<sub>2</sub> 所需的所有物質。

所有標準的分子選殖技術，如核酸之分離及純化，核酸之電泳，酵素修飾，核酸之解離及／或擴大，大腸桿菌之轉形等，吾等均依文獻所述進行 ( Sambrook et al. ( 1989) "Molecular Cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York; Innis et al. (eds.) (1990) 及 "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego)。寡一去氧核苷酸之合成及 D N A 序列分析，可在 Applied Biosystems 3 8 0 B D N A 合成儀及 3 7 3 A D N A 定序儀上，依廠商供應之使用者手冊分別進行。

為促進 p K L A P L A - 1 1 之構築，第一個適合的兩側限制位置經聚合酶鏈反應 ( P C R ) 引入成熟的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

88-128

A<sup>-</sup>  
B<sup>-</sup>

五、發明說明 ( 13 )

P L A c D N A 序列之界線。在 5 ' - 界線，就在前一及成熟的 P L A <sub>2</sub> 蛋白質解離位置處，有一個 S m a I 位置，在 3 ' - 界線，就在停止密碼子之下游，同時引入 X h o I 及 K p n I 限制位置。為進行此，於是合成二個寡核苷酸：

寡聚物 1

成熟的 P L A <sub>2</sub>

S m a I

寡聚物 2

、 停止密碼子 P L A <sub>2</sub>

進行 P C R 擴大作用，以寡聚物 1 及 2 為引子，p C B 0 8 T 為模板。所得的經擴大的 4 0 0 b p P L A c D N A 片段，以 S m a I 及 K p n I 水解再嵌入適合大小的 p T Z 1 8 R 內，利用分子選殖進行。生成的載體命名為 p P L A - 1。此經修飾的 P L A c D N A 片段完全定序以確實 P C R 擴大反應，及所引入之鄰接的限制位置。

為了在 P L A <sub>2</sub> 前原訊號序列之 5 ' - 邊界引入一個 S a a I I 限制位置及最佳的酵母轉譯起始序列，於是合成二個互補的合成寡核苷酸。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製



## 五、發明說明 ( 15 )

al. (1984)EMBO J. 3, 3317-3322) , 後者由釀酒酵母 A D H 1 啓動子所驅動 ( Bennetzen and Hall (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025) 。在 L A C 4 啓動子的獨特 S s t II 位置上, p G B H S A - 2 0 含有大腸桿菌載體 p T Z 1 9 R , 其用於在大腸桿菌中之擴大作用。在乳酸克魯維酵母轉形之前, 大腸桿菌 p T Z 1 9 R 序列以 S s t II 水解移出自 p G B H S A - 2 0 , 再行瓊脂糖凝膠電泳純化。將在 L A C 4 啓動子 S s t II 位置上線化之 p G B H S A - 2 0 轉形至乳酸克魯維酵母內, 可造成經由同源重組之整合至基因體 L A C 4 啓動子內。

爲於乳酸克魯維酵母內表現豬 P L A <sub>2</sub> , prepro P L A <sub>2</sub> 序列適當地融合至 p G B H S A - 2 0 中的乳酸克魯維酵母啓動子序列。因此 p G B H S A - 2 0 以 S a  $\lambda$  I 及 X h o I 水解, 且 H S A c D N A 序列經由分子選殖替代 p K L A P L A - 5 中之 S a  $\lambda$  I - X h o I D N A 片段。如上述, p K L A P L A - 5 之 S a  $\lambda$  I - X h o I D N A 片段含有 prepro P L A <sub>2</sub> 編碼序列。用於 P L A <sub>2</sub> 之最終表現載體命名爲 p K L A P L A - 1 1 。

以吾等已發表之專利案 E P - A 0 6 3 5 5 7 4 所述之步驟可產生酵母轉形細胞, 此以 Ito H. et al. 之方法爲基礎 ( J. Bacteriol. 153 , 163-168, 1983) 。 p K L A P L A - 1 1 以 S s t II 水解在 L A C 4 啓動子中線化。 p T Z 1 9 r 序列經由在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明（16）

瓊脂糖凝膠中分級分離及純化而移出。此 DNA 片段取 15 微克轉移至乳酸克魯維酵母株 CBS 2360 及 CBS 683 中，並在 30 °C 下培育 3 天後可得二菌株之 G418 - 抗性集落。

先選出各宿主株有限數目的轉形細胞，以測試培養基中活性的豬 PLA<sub>2</sub> 之表現。轉形細胞接種於乳酸克魯維酵母培養基中，其中含有：1% (w/v) 酵母浸膏；2% (w/v) 蛋白胨；2% (w/v) 葡萄糖及 50 微克 / 毫升 G418。在 30 °C 下經過 3 天之生長後，收集上清液並由下述的蛋黃活性分析來測試活性 PLA<sub>2</sub> 之存在與否，在此樣品並先以胰蛋白酶處理。為將不具活性的酶原（由乳酸克魯維酵母轉形細胞所產生）活性成為具活性者，成熟的 PLA<sub>2</sub>，肽原的解離是必要的。

所有的轉形細胞似乎都可產生具活性之豬 PLA<sub>2</sub>，範圍由 5 至 40 單位 / 毫升。

1 單位 (IU) 定義為在標準條件下：蛋黃受質 (0.4% 磷脂)，pH 8，40 °C，6 mM Ca<sup>+2</sup>，每分鐘產生 1 微莫耳自由態脂肪酸所需之酵素量。

實例 2穩定酵素製劑之產製

乳酸克魯維酵母之肉汁接受盤式過濾，繼以超過濾。超過濾液以 0.3% 胰蛋白質在 pH 8.0 下處理，並有 10 mM CaCl<sub>2</sub> 之存在歷 2.5 小時，如此造成

## 五、發明說明 ( 17 )

酶原 t 肽之移去以活化酵素。

加入作為保藏劑之苯甲酸及山梨酸，pH 4.0，留下之胰蛋白酶活性再於 70°C 下滅活 30 分鐘。最終的產物呈微棕色，且含有 10,000 IU / 毫升之活性。

進一步純化及貯於低溫下可進一步改善此製劑之穩定性。在 4°C 下貯存 1 個月後，並未觀察到酵素活性有何喪失。

### 實例 3

#### 在動物飼料中應用磷脂酶 A<sub>2</sub>

以嫩雞進行試驗以測試磷脂酶 A<sub>2</sub> 之效力。公的嫩雞 (Ross) 保持在標準食物下 1 至 5 天。在第 5 天，自此群中選出動物分配在各欄內。考量動物之體重及其變化。每欄內之平均重量及其偏差是相同的。每欄有 15 隻動物。每欄放在人工加熱，通風及照明之雞舍內。各欄之地板空間為 0.98 平方米，並為有鐵網之地板。雞舍每天照光 24 小時。在實驗期間，逐漸減弱光度。溫度由第一週的 28°C 逐漸減低至最後一週的 23°C。在實驗期間雞舍的濕度為約 60%。動物利用噴灑方法在分別是 1 至 14 天大時接種疫苗以拮抗新城雞瘟。實驗持續 33 天，包括 5 天的試驗前期及 28 天的實驗期。

實驗食物自由供給至動物。水也自由取用。

飼料在低溫下成團塊 (溫度保持在 65°C 下)，直徑為 3 毫米。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

## 五、發明說明 ( 18 )

實驗包括以下的處理：

- a ) 玉米 / 小麥 / 大豆食物 ( 陰性對照組 )
- b ) 玉米 / 小麥 / 大豆食物 + 1 0 0 I U / 公斤
- c ) 玉米 / 小麥 / 大豆食物 + 5 0 0 I U / 公斤

各種處理法均重覆 6 次 ( 每種處理法共 9 0 隻雞 ) 。  
測度獲重及飼料之轉換率。所使用飼料之組成示於表 1 中。

表 1 嫩雞實驗中玉米 / 小麥 / 大豆食物之物成

組成	含量 ( % )
玉米	2 5 . 0
小麥	1 5 . 0
豆油	3 . 5
動物脂	2 . 0
樹薯粉	1 1 . 6 8
豆粉 ( 5 0 % 粗製蛋白質 )	1 9 . 4 5
全脂烘焙的大豆	1 0 . 0
魚粉	1 . 0
肉粉桶槽渣滓，油含量高	4 . 0
豆類	5 . 0
維生素 / 礦物質預混物	1 . 0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( )

19

石灰石	0 . 8 2
磷酸鈣	1 . 0 0
鹽類 ( N a C l )	0 . 3 0
D L - 甲硫胺酸	<u>0 . 2 5</u>
	1 0 0 . 0 0
ME 嫩雞 ( M J / 公斤 )	12.55
粗製蛋白質 ( % )	22.1
粗製脂質 ( % )	9.6
賴胺酸 ( 可運用的 ) ( % )	1.23(1.04)
甲硫胺酸 + 賴胺酸 ( 可運用的 ) ( % )	0.91(0.79)

酵素加至此食物中，係先與載劑混合。

結果示於表 2 中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

## 五、發明說明 ( 20 )

表 2 玉米 / 小麥 / 大豆食物中磷脂酶 A<sub>2</sub> 對於 5 至 33 天  
大嫩雞生長及飼料轉換率上之影響

	飼料之攝取 (克)	生長(克)	飼料轉換率
基礎食物	2613 ± 67	1445 ± 38	1.81 ± 0.028
食物 + 100 IU /公斤	2569 ± 67	1458 ± 38	1.76 ± 0.028
食物 + 500 IU /公斤	2526 ± 67	1472 ± 38	1.72 ± 0.028

\* 最低顯著性偏差 ( LSD 於 P = 0 . 0 5 )

至於第二個實驗，基本上和第一個相同，其中以表 3 所示之小麥 / 裸麥 / 大豆食物為基礎食物。

實驗處理包括以下處理：

- a ) 小麥 / 裸麥 / 大豆食物 ( 陰性對照組 )
- b ) 小麥 / 裸麥 / 大豆食物 + 1 0 0 I U / 公斤
- c ) 小麥 / 裸麥 / 大豆食物 + 5 0 0 I U / 公斤
- d ) 小麥 / 裸麥 / 大豆食物 + 1 0 0 0 I U / 公斤

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ( 21 )

所有其他的變數如上文玉米 / 小麥 / 大豆實驗中所述。

表 3 嫩雞實驗中小麥 / 裸麥 / 大豆食物之組成

組成	含量 ( % )
小麥	4 0 . 0
裸麥	1 0 . 0
豆油	1 . 0
動物脂	6 . 0
樹薯粉	4 . 2 8
大豆粉 ( 4 5 . 4 % 粗製蛋白質 )	2 2 . 0
全脂烘焙的大豆	1 0 . 0
肉粉桶槽渣滓 ( 5 8 % 粗製蛋白質 )	3 . 0
維生素 / 礦物質預混物	1 . 0
石灰石	0 . 9 4
磷酸鈣	1 . 2 0
鹽類 ( N a C l )	0 . 2 6
L - 賴胺酸 H C l	0 . 1 1
D L - 甲硫胺酸	0 . 2 1
	<hr/>
	1 0 0 . 0 0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 五、發明說明 ( 22 )

M E 嫩 雞 ( M J / 公 斤 )	11.9
粗 製 蛋 白 質 ( % )	21.4
粗 製 脂 質 ( % )	10.5
賴 胺 酸 ( 可 運 用 的 ) ( % )	1.23(1.05)
甲 硫 胺 酸 + 半 胱 胺 酸 ( 可 運 用 的 )	0.90(0.77)

酵 素 加 至 此 食 物 中 係 先 與 載 劑 混 合 。

結 果 示 於 表 4 中 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

公告本

A<sup>-</sup>  
B<sup>-</sup>

88年(月)28日 修正

五、發明說明 (23)

表 4 在玉米 / 裸麥 / 大豆食物中磷脂酶 A<sub>2</sub> 對於 5 至 33 天大嫩雞生長及飼料轉換率上之影響

	飼料之攝取 (克)	生長(克)	飼料轉換率
基礎食物	2752 ± 64	1556 ± 41	1.77 ± 0.026
食物 + 100 IU /公斤	2747 ± 64	1568 ± 41	1.75 ± 0.026
食物 + 500 IU /公斤	2733 ± 64	1586 ± 41	1.72 ± 0.026
食物 + 1000 IU/公斤	2724 ± 64	1572 ± 41	1.73 ± 0.026

\* 最低顯著性偏差 (LSD 於 P = 0.05)

如表 4 所示，在此特殊的嫩雞食物中有最佳的磷脂酶濃度範圍，即每公斤飼料大於約 100 IU 及少於約 1000 IU。對於其他系統可能存在不同的最佳範圍，此可例常的實驗來決定。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ( 24 )

實例 4

於乳替代品中磷脂酶 A<sub>2</sub> 之應用

利用各 5 隻公的 Friesian Dutch Holstein-Friesian 牛共三組來進行實驗。

在實驗前期，餵以商品化之乳替代品。14 天後，動物分組以接受三種處理法，考慮體重及其變化。動物保持在個別的欄內。廠內自然照光；通風並保持在約 18 °C 下。

在 14 天中使動物適應其食物。接下來定量收集其糞便歷相繼的 5 天，且每天 24 小時。牛在實驗前加上牛具。將糞便收集在連接於牛具上之塑膠袋內。一天一次將糞便稱重，匯集再貯於 -20 °C 下。分析前，糞便充份混合再取樣。

動物依據其體重依循餵食流程個別餵養。使用之乳替代品具以下組成：

	%
脫脂奶粉	58.5
脂質	19.8
乳糖	17.6
澱粉，維生素，礦物質	4.1
ME	4450 仟卡 / 公斤
粗製蛋白質 ( N = 6.25 )	21.5 %
粗製脂質	19.5 %

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ( 25 )

在餵養前，乳替代品粉末混以水，再於約 40 °C 溫度下餵養。

依據處理，脂質含有 18 % 牛脂，椰子油或豬脂。卵磷脂以脂質含量的 10 % 濃度加入。

豬磷脂酶 A<sub>2</sub> 以每公斤乳替代品 500 IU 之終濃度加至食物中。可偵測脂質之消化力。結果以表 5 示之。

表 5：接受 18 % 脂質（於食物中）及 1.8 % 卵磷脂（脂質含量之 10 %）之非反芻牛，其磷脂酶 A<sub>2</sub> 處理對於各種脂質消化力上之影響。磷脂酶 A<sub>2</sub> 依實例 2 所示製備，且以每公斤乳替代品 500 IU 之終濃度加至食物中

	無磷脂酶 A <sub>2</sub>	有磷脂酶 A <sub>2</sub>
牛脂	70.0%	73.1%
椰子脂	95.6%	96.2%
豬脂	79.4%	84.3%

\* P < 0.05

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

## 五、發明說明 ( 26 )

## 序列表

## ( 1 ) 一般資料

## ( i ) 申請人

( A ) 名稱 : Gist-brocades B.V.

( B ) 街 : Wateringseweg 1

( C ) 市 : Delft

( E ) 國 : 荷蘭

( F ) 郵遞區號 : ( Z I P ) : 2 6 1 1 X T

( G ) 電話 : + 3 1 - 1 5 - 2 7 9 9 1 1 1

( H ) 傳真 : + 3 1 - 1 5 - 2 7 9 3 9 5 7

( ii ) 標題 : 磷脂酶在動物飼料上的應用

( iii ) 序列數目 : 4

( iv ) 電腦可讀型式 :

( A ) 媒體型式 : 套裝軟體

( B ) 電腦 : I B M P C 可相容

( C ) 操作系統 : P C - D O S / M S - D O S

( D ) 軟體 : PatentIN Release #1.0, Version  
#1.30 (EPO)

## ( 2 ) S E Q I D N O : 1 資料

## ( i ) 序列特色

( A ) 長度 : 3 0 鹼基對

( B ) 型式 : 核酸

( C ) 股性 : 單股

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 ( )

27

( D ) 拓撲學 : 線型

( ii ) 分子型式 : D N A ( 基因體 )

( iii ) 假設 : 無

( iv ) 抗意識股 : 無

( ix ) 序列說明 : S E Q I D N O : 1

TGTCATGCCC GGGCATTATG GCAGTTTCGT

30

( 2 ) S E Q I D N O : 2 資料

( i ) 序列特色

( A ) 長度 : 3 9 鹼基對

( B ) 型式 : 核酸

( C ) 股性 : 單股

( D ) 拓撲學 : 線型

( ii ) 分子型式 : D N A ( 基因體 )

( iii ) 假設 : 無

( iv ) 抗意識股 : 無

( ix ) 序列說明 : S E Q I D N O : 2

AGTCCTCGGT ACCTCGAGTC AGCAGTACTT CTTGGTGTC 39

( 2 ) S E Q I D N O : 3 資料

( i ) 序列特色

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 ( 28 )

- ( B ) 型式：核酸
- ( C ) 股性：線型
- ( D ) 拓撲學：線型
- ( ii ) 分子型式：DNA ( 基因體 )
- ( iii ) 假設：無
- ( iv ) 抗意識股：無
- ( ix ) 序列說明：SEQ ID NO : 3

TCGACAAAAA TGAAATTCCT CGTGTTGGCT GTTCTGCTCA  
 CAGTGGGCGC TGCCCAGGAA GGCATCAGCT CAA 73

( 2 ) SEQ ID NO : 4 資料

- ( i ) 序列特色
  - ( A ) 長度：69 鹼基對
  - ( B ) 型式：核酸
  - ( C ) 股性：單股
  - ( D ) 拓撲學：線型
- ( ii ) 分子型式：DNA ( 基因體 )
- ( iii ) 假設：無
- ( iv ) 抗意識股：有
- ( ix ) 序列描述：SEQ ID NO : 4

TTGAGCTGAT GCCTTCCTGG GCAGCGCCCA CTGTGAGCAG  
 AACAGCCAAC ACGAGGAATT TCATTTTGG 69

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

## 四、中文發明摘要(發明之名稱：

## 磷脂酶在動物飼料上的應用)

本發明揭示一種改善飼料利用率效率及／或促進動物生長之方法，其中動物餵食的飼料含有包括飼料物質及即可用磷脂酶添加物之組成物。較好該組成物也含有至少一種磷脂。該組成物可用來改善脂質的消化能力及可促進動物的生長。磷脂較好是卵磷脂，且較佳的磷脂酶是哺乳動物的磷脂酶 A 2。於一個較佳具體實例中，磷脂酶由重組體 DNA 技術產生，以於適當的宿主中如微生物或導入外來基因植物中以表現酵素。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

## 英文發明摘要(發明之名稱： Application of phospholipases in animal feed )

The present invention discloses a process for improving the efficiency of feed utilization and/or for promoting the growth of animals in which an animal is fed a diet which comprises a composition comprising feed substance and a ready for use phospholipase additive. Preferably said composition also comprises at least one phospholipid. Said compositions are used to improve fat digestibility and to promote growth of the animal. The phospholipid is preferably lecithin and the preferred phospholipase is a mammalian phospholipase A2. In a preferred embodiment the phospholipase is produced using recombinant DNA technology to express the enzyme in a suitable host such as a microorganism or a transgenic plant.

## 六、申請專利範圍

附件一 A：

第 85107433 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 91 年 1 月修正

1 . 一種改善飼料利用效率之方法，其中動物餵食的食物包括由飼料物質及即可用之磷脂酶添加物組成之組成物。

2 . 一種促進動物生長之方法，其中動物餵食的食物包括由飼料物質及即可用之磷脂酶添加物組成之組成物。

3 . 一種可改善飼料利用效率之動物飼料組成物，其中包括飼料物質及即可使用磷脂酶添加物。

4 . 一種促進生長之動物飼料組成物，其中包括飼料物質及即可用之磷脂酶添加物。

5 . 如申請專利範圍第 3 項之組成物，其中包括有磷脂。

6 . 如申請專利範圍第 4 項之組成物，其中包括有磷脂。

7 . 如申請專利範圍第 5 項之組成物，其中磷脂包括卵磷脂。

8 . 如申請專利範圍第 6 項之組成物，其中磷脂包括卵磷脂。

9 . 如申請專利範圍第 3 至 8 項中任一項之組成物，其中磷脂酶得自哺乳動物，植物及微生物。

10 . 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中磷脂酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 六、申請專利範圍

是哺乳動物磷脂酶 A 2，選自下列包括牛，豬，鼠科，大鼠及人類磷脂酶 A 2。

1 1 . 如申請專利範圍第 1 至 8 項及 1 0 項中任一項之組成物，其中磷脂酶由重組體 D N A 在宿主有機體中表現而得。

1 2 . 如申請專利範圍第 9 項之組成物，其中磷脂酶由重組體 D N A 在宿主有機體中表現而得。

1 3 . 如申請專利範圍第 1 1 項之組成物，其中宿主有機體是微生物選自下列包括細菌，酵母及有菌絲之真菌。

1 4 . 如申請專利範圍第 1 2 項之組成物，其中宿主有機體是微生物選自下列包括：細菌，酵母及有菌絲的真菌。

1 5 . 如申請專利範圍第 1 3 項之組成物，其中微生物是選自下列各屬，包括：芽孢桿菌，大腸桿菌，酵母屬，克魯維酵母，漢遜酵母，畢赤酵母，Yarrowia，假絲酵母，曲霉，木霉，青霉，毛霉，鐮孢及腐質霉。

1 6 . 如申請專利範圍第 1 4 項之組成物，其中微生物是選自下列各屬，包括：芽孢桿菌，大腸桿菌，酵母屬，克魯維酵母，漢遜酵母，畢赤酵母，Yarrowia，假絲酵母，曲霉，木霉，青霉，毛霉，鐮孢及腐質霉。

1 7 . 如申請專利範圍第 1 5 項之組成物，其中微生物是大腸桿菌，釀酒酵母，乳酸克魯維酵母或黑曲霉。

1 8 . 如申請專利範圍第 1 6 項之組成物，其中微生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

## 六、申請專利範圍

物是大腸桿菌，釀酒酵母，乳酸克魯維酵母或黑曲霉。

19. 如申請專利範圍第5至8項中任一項之組成物，其中每公斤磷脂含有由1,000至5,000,000國際單位之磷脂酶。

20. 如申請專利範圍第5至8項中任一項之組成物，其中磷脂酶添加物含量在每公斤飼料100至1000國際單位範圍中。

21. 如申請專利範圍第3至8項中任一項之組成物，其用以餵養非反芻之動物。

22. 如申請專利範圍第3至8項中任一項之組成物，其用以餵養非反芻之小牛。

23. 一種產製如申請專利範圍第3至22項中任一項動物飼料組成物之方法，此方法包括將磷脂酶與飼料物質混合。

24. 一種產製如申請專利範圍第5至22項中任一項動物飼料組成物之方法，此方法包括將磷脂酶與飼料物質及至少一種磷脂混合。

25. 如申請專利範圍第23項之方法，其中的磷脂酶係重組地產製的。

26. 如申請專利範圍第24項之方法，其中磷脂酶係重組地產製的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂