

## 捌、聲明事項

本案係符合專利法第二十條第一項  第一款但書或  第二款但書規定之期間，其日期為：\_\_\_\_\_

本案已向下列國家(地區)申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家(地區)；申請日期；申請案號 順序註記】

1. 美國                      2001年10月31日                      60/335,303
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家(地區)；日期；案號 順序註記】

1. 美國                      2001年10月31日                      60/335,303
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_
8. \_\_\_\_\_
9. \_\_\_\_\_
10. \_\_\_\_\_

主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

(1)

## 玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

相關申請案的前後參照

在 35 U.S.C § 119(e) 之下，本申請案優先於 2001 年 10 月 31 日申請之美國臨時申請案第 60/335,303 號。

發明範疇

本發明係關於改善飼糧之營養價值的方法，以及經過改善之飼糧。更特定而言，本發明係關於藉著餵飼與在酵母菌中表現之植酸酶混合的飼糧給動物，來改善包括肌醇六價磷酸酯之飼糧的營養價值的方法。

發明背景和概要

植酸酶是肌醇六價磷酸酯磷酸水解酶，其催化從植酸酯 (phytate)(肌醇六價磷酸酯) 中逐步移除無機正磷酸的作用。植酸酯是在植物飼料中，主要的磷酸酯儲存形式，包括穀類和豆科植物。因為諸如豬、禽類和人類之類的單胃動物，在其胃腸道中具有少量的植酸酶，故幾乎所有攝取的植酸磷酸酯均是不可消化的。因此，這些動物需要在其飲食中補充植酸酶或無機的磷酸酯。相反的，反芻動物在瘤胃中具有產生植酸酶的微生物，故這些動物不需要在其飲食中補充植酸酶。

在單胃動物中不能利用的植酸磷酸酯，產生其他的問題。不能利用的植酸磷酸酯被排泄到糞肥中，並污染環境。因此，在單胃動物中植酸酯相當完整地通過上胃腸道，在那裏其螯合必需的礦物質(例如鈣和鋅)，結合胺基酸和蛋白質，並抑制酵素活性。因此，在單胃動物的飲食中補充

(2)

植酸酶，不僅減少補充無機磷酸酯的需求，亦降低了由於植酸酯所引起的環境污染，減少植酸酯的反營養的影響，並增加了飼料的營養價值。

有兩類型的植酸酶，包括 3-植酸酶 (EC.3.1.3.8)，其在肌醇環的 1 和 3 位置處移除磷酸基團，以及 6-植酸酶 (EC.3.1.3.6)，其首先在環的 6-位置處釋放磷酸。植物通常含有 6-植酸酶，而大範圍的微生物，包括細菌、絲狀真菌和酵母菌則產生 3-植酸酶。已經選殖並定序得自兩個得自黑麴黴 (*Aspergillus niger*) 的植酸酶，phyA 和 phyB。已經在黑麴黴中表現 phyA，並可購買重組的酵素，用來補充動物飲食。

亦已經從土麴黴 (*Aspergillus terreus*)、嗜熱毀絲黴 (*Myceliophthora thermophila*)、煙麴黴 (*Aspergillus fumigatus*)、構巢麴黴 (*Emericella nidulans*)、嗜熱塔拉羅黴 (*Talaromyces thermophilus*)、大腸桿菌 (appA) 和玉蜀黍中，分離出植酸酶基因。此外，亦已經從芽胞桿菌屬 (*Bacillus* sp.)、腸桿菌屬 (*Enterobacter* sp.)、土生克雷伯氏菌 (*Klebsiella terrigena*) 和無花果麴黴 (*Aspergillus ficum*) 中分離並 / 或純化出植酸酶酵素。

植酸酶產製的高成本，已經限制了在畜產業中使用它來作為植酸酶補充劑的用途，這通常比就環境而言較不想要的無機磷補充更昂貴。可藉著提高產製效率並 / 或產製具有優良活性的酵素，來降低植酸酶的成本。

可使用酵母菌表現系統，有效率地產製酵素，一部分是因為酵母菌生長在單純且便宜的培養基中。此外，帶有適

(3)

當的信號序列，可將所表現之酵素分泌到培養基中，以便於分離和純化。在飼料業中亦接受某些酵母菌表現系統，因為其對於產製飼料產物而言是安全的，不像真菌表現系統，在一些情況下，例如對於人類的食品製造而言，可能是不安全的。

因此，本發明的一項觀點是藉著以酵母菌表現之植酸酶補充飼糧，其具有從飼糧之植酸酯中釋放磷酸的優異能力，來改善飼糧之營養價值的方法。本發明亦針對具有改善之營養價值的飼糧，其包括酵母菌表現的植酸酶。可有效率並便宜地產製植酸酶，因為本發明之酵母菌表現的植酸酶，適合在最少加工之飼料和食品業上的商業用途。

在一個具體實施例中，藉著增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性，提供改善由單胃動物消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯。該方法包括將該飼糧與低於1200單位的在酵母菌中表現之植酸酶/每公斤飼糧混合，來餵飼動物的步驟，其中該植酸酶為大腸桿菌-衍生之AppA2，且其中該得自植酸酯之磷酸的生物利用性，與藉著餵飼與相同單位在非-酵母菌之宿主細胞中表現之植酸酶混合的飼糧，所獲得之得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少2-倍。

在另一個具體實施例中，藉著餵飼動物包括肌醇六價磷酸酯的飼糧，提供降低單胃動物之飼料對增重比例的方法。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合，來餵飼動物的步驟，其中該植酸酶係選自由大腸桿菌-衍生

(4)

之 AppA2 和大腸桿菌-衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群，且其中降低了動物的飼料對增重比例。

在另一個具體實施例中，藉著增加動物的骨質量和礦物質內含量，改善由單胃動物消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合，來餵飼動物的步驟，其中該植酸酶係選自由大腸桿菌-衍生之 AppA2 和大腸桿菌-衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群，且其中增加了動物的骨質量和礦物質內含量。

在另一個具體實施例中，提供加在動物飼料中的飼料添加組合物。該飼料添加組合物包括酵母菌表現的植酸酶，和植酸酶的載劑，其中在飼料添加組合物中之植酸酶的濃度，比在終飼料混合物中的植酸酶濃度更高。

在另一個具體實施例中，提供飼糧。該飼糧包括上述的飼料添加組合物，其中在終飼料混合物中之植酸酶的濃度，低於 1200 單位植酸酶/公斤終飼料混合物。

在另一個具體實施例中，提供改善由單胃動物消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯。該方法包括將選自由大腸桿菌-衍生之 AppA2 和大腸桿菌-衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群的植酸酶噴霧乾燥，將該植酸酶與植酸酶之載劑，並可視需要與其他成分混合，產生用來補充飼糧之植酸酶的飼料添加組合物。將飼料添加組合物與飼糧混合，並餵飼動物補充有飼料添加組合物之飼糧的步驟。

(5)

在另一個具體實施例中，藉著增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性，提供改善由禽類消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯。該方法包括將該飼糧與低於1200單位的在酵母菌中表現之植酸酶/每公斤飼糧混合，來餵飼動物的步驟，其中該得自植酸酯之磷酸的生物利用性，與藉著將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合來餵飼非-禽類，所獲得之得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少1.5-倍。

在另一個具體實施例中，藉著餵飼禽類包括肌醇六價磷酸酯的飼糧，提供降低禽類之飼料對增重比例的方法。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合，來餵飼禽類的步驟，其中降低了動物的飼料對增重比例。

在另一個具體實施例中，藉著增加禽類的骨質量和礦物質內含量，改善由禽類消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合，來餵飼禽類的步驟，其中增加了禽類的骨質量和礦物質內含量。

在另一個具體實施例中，提供改善由禽類消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合，來餵飼禽類的步驟，其中增加了禽類的產蛋數目和產蛋的重量。

圖式簡單說明

圖1顯示 appA2 基因的核苷酸序列，及其推行的胺基酸序列。以小寫字母表示未轉譯的區域。加下標線的序列是用

(6)

來擴大 appA2 (Pf1:1-22和 K2:1468-1490)、 appA2 (E2:243-252和 K2:1468-1490)的引子。將可能的 N-糖基化作用位置加框。已經將 appA2的序列送至 Genebank 資料庫，登錄編號 250016。

圖 2 顯示 (圖 2A 和 B) 突變種 U 的推衍胺基酸序列。圖 2C 和 D 顯示突變種 U 的核苷酸序列。

圖 3 顯示在活體內，在餵飼補充有 Natuphos®、突變種 U、AppA 或 AppA2 之動物飼料的雞中，在生物可利用之磷酸上的增加百分比。

#### 發明詳細說明

本發明提供改善由動物消耗之飼糧的營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯，其為本發明之植酸酶酵素的受質。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現的植酸酶混合，來餵飼動物的步驟，其中增加了來自植酸酯之磷酸的生物利用性，降低了飼料對增重比例，增加動物的骨質量和礦物質內含量，或對禽類而言，額外地增加了蛋重量或產蛋的數目。該植酸酶可選自由大腸桿菌-衍生的 AppA2 和大腸桿菌衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群。在另一個具體實施例中，對禽類而言，植酸酶可以是任何的植酸酶，包括選自由大腸桿菌衍生的 AppA、大腸桿菌衍生的 AppA2，和大腸桿菌衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群的植酸酶。在一些具體實施例中，改善來自植酸酯之磷酸的生物利用性、飼料對增重比例，以及骨質量和礦物質內含量至少 2-倍，例如在禽類中，像是雞，係與在藉著餵飼與相同重量百分比之在非-酵母菌宿主

(7)

細胞中表現的植酸酶混合的飼糧，所獲得的營養價值之改善做比較。在豬中，與藉著餵飼與相同重量百分比之在非-酵母菌宿主細胞中表現的植酸酶混合之飼糧，所獲得的營養價值之改善相比較，亦增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性至少 1.5 倍。此外，與藉著將飼糧與酵母菌-表現之植酸酶混合來餵飼非-禽類，所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性，和骨質量與礦物質內含量相比較，藉著將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合來餵飼禽類，所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性，和骨質量與礦物質內含量，增加了至少 1.5 倍。

在本文中使用的"改善的營養價值"或"增加的營養價值"，意指在餵飼該飼糧之動物中，由增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性、降低飼料對增重比例、增加骨質量和礦物質內含量、增加得自植酸酯之肌醇的生物利用性、增加得自諸如鎂、錳、鈣、鐵和鋅之類礦物質之植酸鹽的生物利用性，或在餵飼該飼糧之禽類中，由增加蛋重量或產蛋數目(例如在首次或後續之產蛋循環的產蛋母雞)，所反映的在飼糧之營養價值上的改善。

在本文中使用的增加"得自植酸酯之磷酸的生物利用性"意指由增加增重或骨灰分重所反映之增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性。

在本文中使用的"非-酵母菌宿主細胞"一詞，包括真菌細胞。

在本文中使用的"植酸酶"一詞，意指能夠催化從肌醇六

(8)

價磷酸酯中移除無機磷酸之作用的酵素。

在本文中使用的"植酸酯"一詞，意指包括肌醇六價磷酸酯的組合物。

根據本發明，藉著將增重除以飼料攝取量，來計算飼料對增重比例。骨質量或礦物質含量的增加，則由在脛骨或腓骨之乾重上的增加，或由在灰分重上的增加來反映。

根據本發明，使用各種可表現以便產製植酸酶的植酸酶基因。可根據本發明所使用的代表性基因，為衍生自細菌、絲狀真菌、植物和酵母菌的植酸酶基因，像是衍生自大腸桿菌(大腸桿菌)的 appA (Gene Bank 登錄編號 M58708) 和 appA2 (Gene Bank 登錄編號 250016) 基因，以及衍生自黑麴黴的 phyA 和 phyB，或這些基因任何的指定位置突變種，其仍保留或具有改善的肌醇六價磷酸酯之磷酸水解酶活性。

植酸酶基因可獲自經過分離的微生物，像是細菌、真菌或酵母菌，其顯露出極高的植酸酶活性。如同下述，可從諸如大腸桿菌分離物中選殖 appA2 基因，且其為這類植酸酶基因的代表。

被表現的植酸酶基因，可以是異種的基因或是同種的基因。在本文中將異種基因定義為起源於與用來表現該基因之物種不同物種的基因。例如，在表現異種植酸酶基因的案例中，可在酵母菌物種中，像是酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 或巴斯德畢赤酵母菌 (*Pichia pastoris*) 中，表現衍生自大腸桿菌或其他細菌物種的植酸酶基因。在本文中，將同種的基因描述為基因起源於與用來表現該基因相同的

物種。在表現同種植酸酶基因的案例中，例如，可在相同的酵母菌物種中，表現衍生自酒酵母菌的植酸酶基因。

用來產製植酸酶，以便根據本發明使用的代表性基因，為 appA、appA2，以及 appA 或 appA2 的指定位置突變種。將取代、刪除和截短的植酸酶基因(其中所得的表現植酸酶或其片段，仍保留實質上與在本文中特別舉例說明之植酸酶相同的植酸酶活性)，視為代表性植酸酶基因的相等物，並亦在本發明的範圍內。

appA 基因係分離自大腸桿菌(參見美國專利第 6,451,572 號，以引用的方式併入本文中)。appA2 基因則分離自細菌菌落，其顯露出特別高的植酸酶活性，獲自雜交的 Hampshire-Yorkshire-Duroc 豬之結腸內容物(參見美國專利申請案第 09/540,149 號，以引用的方式併入本文中)。AppA2 蛋白質產物顯示在大約 2.5 到大約 3.5 之間的最適 pH 值。在圖 1 中出示 AppA2 的胺基酸和核苷酸序列(序列識別：1 號)。

已經分離出數個 appA 的指定位置突變種(參見 PCT 出版物第 WO 01/36607 A1 號(美國專利申請案第 60/166,179 號)，以引用的方式併入本文中)。設計這些突變種，提高 AppA 酵素的糖基化作用。突變種包括 A131N/V134N/D207N/S211N、C200N/D207N/S211N (突變種 U) 和 A131N/V134N/C200N/D207N/S211N (參見 Rodriguez 等人，Arch. of Biochem. and Biophys. 382:105-112 (2000)，以引用的方式併入本文中)。突變種 U 具有比 AppA 更高的專一親和力，且像 AppA2 一樣，具有在大約 2.5 到 3.5 之間的最適 pH 值。在突變種 U 中的

C200N突變，是在間隙區域，且C200與C210形成AppA中唯一的二硫鍵結。在圖2中出示突變種U的胺基酸(圖2A和B)和核苷酸序列(圖2C和D)(序列識別：2號)。

根據本發明，可使用熟諳此藝者已知的任何酵母菌表現系統，或其他的真核生物表現系統。例如，在美國專利申請案第09/104,769號(現在是美國專利第6,451,572號)、美國專利申請案第09/540,149號和美國專利申請案第60/166,179號(PCT出版物第WO 01/36607 A1號)中，描述了各種酵母菌表現系統，全部以引用的方式併入本文中。可使用這些酵母菌表現系統中的任一個。或者，可使用其他的真核生物表現系統，像是昆蟲細胞表現系統(例如Sf9細胞)、真菌細胞表現系統(例如木黴屬(*Trichoderma*))，或哺乳動物細胞表現系統。

可使用酵母菌表現系統，產製足量的植酸酶，由酵母菌細胞分泌，而得以便利地從培養基中分離和純化該植酸酶。分泌至培養基中的作用，係由信號肽控制(例如phyA信號肽或酵母菌 $\alpha$ -因子信號肽)，其能夠指揮所表現之植酸酶到酵母菌細胞外。其他適合促進從酵母菌細胞中分泌植酸酶的信號肽，為熟諳此藝者已知的。通常在分泌之後，從植酸酶中切開信號肽。

如果使用酵母菌表現系統，可使用任何適合表現植酸酶基因的酵母菌物種，包括諸如酵母菌屬(例如酒酵母菌)、克魯維爾酵母菌屬(*Kluyveromyces*)、有孢圓酵母(*Torulasporea*)、裂殖酵母菌屬(*Schizosaccharomyces*)之類的酵

母菌，以及諸如畢赤酵母菌屬(例如巴斯德畢赤酵母)、漢遜酵母菌屬(Hansenula)、球擬酵母菌屬(Torulopsis)、念珠菌屬(Candida)和卡文斯菌屬(Karwinskia)之類的甲基營養性酵母菌物種。在一個具體實施例中，在甲基營養性的巴斯德畢赤酵母菌中，表現植酸酶基因。甲基營養性的酵母菌能夠利用甲醇，作為唯一的碳來源，產製維持細胞功能所需的能量資源，並含有編碼利用甲醇所需之氧化酶的基因。

可使用熟諳此藝者已知的，並與酵母菌或其他真核生物細胞表現系統可相容的任何宿主-載體系統(例如，其中載體自動複製或整合到宿主基因組內的系統)。在一個具體實施例中，載體具有可插入DNA片段的核酸限制內切酶切開位置，以及用來選擇轉化物的遺傳標記。可在例如酵母菌中，將植酸酶基因以有功能的方式，與能夠指揮該植酸酶表現的啟動基因連接，且在一個具體實施例中，在架構中將植酸酶基因與轉錄促進元件接合，並具有終止轉錄的停止轉錄序列(例如HSP150停止轉錄序列)。啟動基因可以是組成的(例如3-磷酸-甘油酸激酶啟動基因或 $\alpha$ -因子啟動基因)，或可誘導的啟動基因(例如ADH2、GAL-1-10、GAL7、PHO5、T7或金屬硫肽啟動基因)。在美國專利申請案第09/104,769號(現在是美國專利第6,451,572號)、美國專利申請案第09/540,149號和美國專利申請案第60/166,179號(PCT出版物第WO 01/36607 A1號)中，描述了各種宿主-載體系統，全部以引用的方式併入本文中。

使用熟諳此藝者已知的程序，利用包括以可操作之方式

與酵母菌表現系統偶聯之植酸酶基因的基因-載體構築體，轉化酵母菌細胞。這類轉化作用草案，包括電穿透作用和原生質體轉化作用。

可藉著各種技術，使經過轉化的酵母菌細胞生長，包括在液體培養基中，或是在半-固體培養基上的分批或連續發酵作用。酵母菌細胞的培養基是此項技藝中已知的，且通常補充有碳來源(例如葡萄糖)。可使經過轉化的酵母菌細胞，在30°C、經過控制pH值的環境(pH值約為6)中需氧地生長，並將碳來源(例如葡萄糖)持續維持在預定含量下，已知其在指定的期間內，支持酵母菌生長至想要的密度。

可藉著傳統的技術，以經過純化之形式(例如至少大約60%純度，或至少大約70-80%純度)，產製在根據本發明之方法中使用的表現植酸酶之酵母菌。通常，植酸酶被分泌至酵母菌培養基中，並從培養基中收集之。為了從培養基中純化，例如，可使植酸酶接受硫酸銨沉澱作用，接著是DEAE-瓊脂糖管柱層析法。可使用其他熟諳此藝者已知的傳統技術，像是凝膠過濾、離子交換層析法、DEAE-瓊脂糖管柱層析法、親和力層析法、溶劑-溶劑萃取作用、超過濾作用和HPLC。或者，可能不需要純化步驟，因為植酸酶在培養基中，以如此高的濃度存在，使得植酸酶基本上在培養基中是純的(例如70-80%純的)。

在未將植酸酶分泌至培養基中的情況下，可藉著例如超音波振盪、加熱或化學處理，將酵母菌細胞溶解，並離心勻漿以便移除細胞碎屑。然後使上清液接受硫酸銨沉澱作

用，並按照需要進行額外的分級分離技術，像是凝膠過濾、離子交換層析法、DEAE-瓊脂糖管柱層析法、親和力層析法、溶劑-溶劑萃取作用、超過濾作用和HPLC，來純化植酸酶。應瞭解上述關於從培養基或從酵母菌細胞中純化植酸酶的純化方法，是非限制性的，且如果獲得實質上純的植酸酶需要這類技術的話，可使用任何熟諳此藝者已知的純化技術，來純化酵母菌-表現的植酸酶。

在一個具體實施例中，藉著將酵母菌培養物冷卻(例如至大約 $8^{\circ}\text{C}$ )，並使用諸如離心、微量過濾和旋轉真空過濾之類的技術，移除酵母菌細胞，從培養基中收集到的植酸酶不需進一步的純化步驟。可藉著像是例如超過濾作用和切向流過濾的技術，濃縮在不含細胞之培養基中的植酸酶。

可製備經過純化之植酸酶製品的各種調配物。可經由添加其他的蛋白質(例如明膠和脫脂奶粉)、化學製劑(例如甘油、聚乙二醇、EDTA、山梨酸鉀、苯甲酸鈉和還原劑和醛)、多醣類、單醣類、脂質(氫化植物油)、植酸鈉，及其他含有植酸酯的化合物，及其類似物，使植酸酶酵素穩定。亦可將植酸酶酵素懸浮液脫水(例如噴霧乾燥、轉鼓式乾燥，和冷凍乾燥)，並經由已知的方法調配成散劑、顆粒、藥丸、礦物塊、液體和凝膠。可使用膠凝劑，像是明膠、藻酸鹽、膠原蛋白、瓊脂、果膠和角叉菜膠。本發明亦延伸至飼料接種製品，包括冷凍乾燥的非病原性酵母菌，當餵飼動物該製品時，其可在動物的胃腸道中表現本發明之植酸酶。

在一個具體實施例中，藉著超過濾作用濃縮在不合細胞之培養基中的植酸酶，並噴霧乾燥該超過濾作用的殘留物。可直接將噴霧乾燥的散劑與飼糧摻合，或可將噴霧乾燥的散劑與載劑摻合，用來作為飼料添加組合物，補充飼糧的植酸酶。在一個具體實施例中，將在殘留物中的植酸酶與載劑及/或穩定劑一起-脫水。在另一個具體實施例中，將植酸酶與幫助噴霧乾燥之植酸酶與載劑黏附的成分一起噴霧乾燥，或者，可使植酸酶與載劑鬆散地結合。可使用飼料添加組合物(也就是植酸酶/載劑組合物，並可視需要含有其他成分)與飼糧摻合，達成植酸酶在飼糧中更均勻的分布。

代表性的飼料添加組合物(也就是植酸酶/載劑組合物，並可視需要含有其他成分)可含有600單位植酸酶/克載劑至5000單位植酸酶/克載劑。這些植酸酶/載劑組合物可含有額外的成分。例如，可將該組合物調配成含有作為載劑的稻殼或小麥次級品(25-80重量%)、植酸酶(0.5至20重量%)、碳酸鈣(10-50重量%)和油類(1-3重量%)。或者，飼料添加組合物可包含植酸酶和載劑，但無額外的成分。可將該飼料添加組合物與飼料混合，獲得具有從大約50到大約2000單位植酸酶/公斤飼料的終飼料混合物。

因此，根據本發明，亦提供包括肌醇六價磷酸酯之來源、酵母菌表現之植酸酶和載劑的飼糧。此外，亦提供改善由單位動物消耗之飼糧之營養價值的方法，其中該飼糧包括肌醇六價磷酸酯，其中該方法包括將植酸酶噴霧乾燥，

包括選自由大腸桿菌-衍生之 AppA、大腸桿菌-衍生之 AppA2 和大腸桿菌-衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群的植酸酶，將植酸酶與載劑混合，並可視需要與其他成分混合，產生用來補充飼糧植酸酶的飼料添加組合物，並將該飼料添加組合物與飼糧混合，再餵食動物補充有該飼料添加組合物之飼糧的步驟。

在這些具體實施例中，載劑可以是任何此項技藝中已知的、用來製造飼料添加組合物的適當載劑，包括但不限於稻殼、小麥次級品、多醣(例如特殊澱粉)、單醣、礦物油、植物油脂、氫化的脂質、碳酸鈣、明膠、脫脂奶粉、植酸酯和其他含有植酸酯的化合物、基底混合物，及其類似物。基底混合物通常包括除了飼料摻合物(例如玉米粗粉和大豆粗粉)之外的最終飼料混合物的大多數成分，包括維生素和礦物質。在飼料添加組合物中使用的植酸酶，最好是大腸桿菌-衍生的 AppA、大腸桿菌-衍生的 AppA2 或大腸桿菌-衍生之 AppA 的指定位置突變種。

飼料添加組合物含有噴霧乾燥的植酸酶和載劑，並可視需要含有其他的成分，與終飼料混合物混合，獲得具有預定數目之植酸酶單位/公斤飼料(例如大約 50 至大約 2000 單位植酸酶/公斤飼料)的飼料。在與載劑摻合之前，先測定噴霧乾燥之植酸酶的植酸酶活性，以便判定欲與載劑摻合之脫水散劑的含量，以便獲得具有預定數目之植酸酶單位/公斤載劑的飼料添加組合物。然後將該含有植酸酶的載劑與終飼料混合物摻合，獲得具有預定數目之植酸酶單位

1/公斤飼料的終飼料混合物。因此，在飼料添加組合物中之植酸酶濃度，大於在終飼料混合物中的植酸酶濃度。

根據本發明的一個具體實施例，將飼糧與酵母菌表現之植酸酶混合，再餵食任何的單胃動物(也就是具有單一隔間之胃的動物)。可餵食與酵母菌表現之植酸酶混合之飼糧的單胃動物，包括農業動物，像是豬(例如閹豬(閹公豬)、新母豬(第一次配種之前的母豬)和任何其他類型的豬)、雞、火雞(雛雞(也就是孵化後前數週)和較老的動物)、鴨和孔雀，任何其他的禽類，海水或淡水的水生動物，被囚禁的動物(例如動物園的動物)，或家畜(例如狗和貓)。

農業上的單胃動物，通常餵食包括植物產物的動物飼料組合物，其含有植酸酯(例如玉米粗粉和大豆粗粉，含有植酸酯(例如肌醇六價磷酸酯))，作為主要的磷酸鹽儲存形式，並因此以植酸酶補充飼料是有利的。因此，可根據本發明補充植酸酶的飼糧，包括農業動物的飼料，像是豬飼料和禽飼料，以及任何的禽類，或海水或淡水水生物種的飼糧(例如魚飼料)。此外，可將含有與本發明之酵母菌表現之植酸酶混合的植酸酯之任何飼糧，像是早餐食品，給人類食用。

在餵飼單胃動物之動物飼料的案例中，根據本發明可使用任何此項技藝中已知的動物飼料摻合物，像是油菜籽粗粉、棉籽粗粉、大豆粗粉和玉米粗粉，但大豆粗粉和玉米粗粉是特佳的。以酵母菌表現之植酸酶補充動物飼料摻合物，但可視需要將其他的成分添加至動物飼料摻合物中。

動物飼料摻合物的任意成分包括糖類和複合的碳氫化合物，像是可溶於水和不可溶於水的單醣類、雙醣類和多醣類。可視需要加至飼料摻合物中的胺基酸成分，為精胺酸、組胺酸、異亮胺酸、亮胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、蘇胺酸、色胺酸、纈胺酸、酪胺酸乙基 HCl、丙胺酸、天冬胺酸、穀胺酸鈉、甘胺酸、脯胺酸、絲胺酸、半胱胺酸乙基 HCl 和類似物，及其鹽類。可視需要添加的維生素是硫胺素(維生素 B1) HCl、核黃素(維生素 B2)、吡哆醇(維生素 B6) HCl、菸鹼酸、菸鹼醯胺、肌醇、膽鹼鹽酸鹽、泛酸鈣、生物素、葉酸、抗壞血酸和維生素 A、B、K、D、E，及其類似物。亦可添加礦物質、蛋白質成分，包括獲自獸肉粗粉或魚粗粉的蛋白質、液態或粉末狀的蛋、魚可溶部分、乳清蛋白濃縮物、油類(例如大豆油)、玉米澱粉、鈣、無機磷酸鹽、硫酸銅、鹽和石灰石。可將任何此項技藝中已知的醫藥成分加至動物飼料摻合物中，像是抗生素。

飼料組合物亦可含有酵母菌表現之植酸酶以外的酵素。代表性的這類酵素為蛋白酶、纖維素酶、木聚糖酶和酸性磷酸酶。例如，僅藉著植酸酶並不能完成植酸酯之完全的脫磷酸作用，而加入酸性磷酸酶可導致額外的磷酸釋放。例如，可加入蛋白酶(例如胃蛋白酶)，切開酵母菌-表現的植酸酶，提高植酸酶的活性。這類以蛋白酶處理過的植酸酶，可顯露出提高的能力，增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性，降低飼料對增重比例，增加骨質量和礦物質內

含量，而對禽類而言，與完整的酵母菌表現之植酸酶相比較，增加了蛋重或產蛋數目。此外，亦可使用植酸酶的組合，像是可協同作用而增加得自植酸酯之磷酸之生物利用性的任何組合，或可使用植酸酶的蛋白水解片段，或蛋白水解片段的組合。關於這一點，可使用在酵母菌中表現的植酸酶基因，產生截短的產物，直接用在本發明的方法中。

亦可將抗氧化劑加至飼糧中，像是動物飼料組合物，預防用來補充飼糧之植酸酶蛋白質的氧化作用。可藉著將天然存在的抗氧化劑導入飼糧中，來防止氧化作用，像是β-胡蘿蔔素、維生素E、維生素C和生育酚，或合成的抗氧化劑，像是丁基化的羥基甲苯、丁基化的羥基茴香醚、第三-丁基氫醌、倍酸丙酯或乙氧奎(ethoxyquin)。亦可加入與抗氧化劑協同作用的化合物，像是抗壞血酸、檸檬酸和磷酸。以此方式併入之抗氧化劑的量，視諸如產物調配物、運送條件、包裝方法和想要的儲存壽命之類的需要而定。

根據本發明的一個方法，以足以增加飼糧之營養價值之含量的酵母菌表現之植酸酶，來補充諸如動物飼料之類的飼糧。例如，在一個具體實施例中，以低於2000單位(U)的在酵母菌中表現之植酸酶/公斤(Kg)飼糧，來補充飼糧。該含量的植酸酶相當於在1公斤飼糧中加入大約34毫克的植酸酶(大約.0034%重量/重量)。在另一個具體實施例中，以低於1500單位的在酵母菌中表現之植酸酶/公斤飼糧，來補充飼糧。該含量的植酸酶相當於在1公斤飼糧中加入大約26毫克的植酸酶(大約.0026%重量/重量)。在另一個具

體實施例中，以低於1200單位的在酵母菌中表現之植酸酶/公斤飼糧，來補充飼糧。該含量的植酸酶相當於在1公斤飼糧中加入大約17毫克的植酸酶(大約.0017%重量/重量)。在另一個具體實施例中，以大約50單位/公斤至大約1000單位/公斤的酵母菌表現之植酸酶(也就是大約0.7至大約14.3毫克/公斤，或大約.00007%至大約.0014%(重量/重量))補充飼糧，像是動物飼料組合物。在另一個具體實施例中，以大約50單位/公斤至大約700單位/公斤的酵母菌表現之植酸酶(也就是大約0.7至大約10毫克/公斤，或大約.00007%至大約.001%(重量/重量))補充飼糧。在另一個具體實施例中，以大約50單位/公斤至大約500單位/公斤的酵母菌表現之植酸酶(也就是大約0.7至大約7毫克/公斤，或大約.00007%至大約.007%(重量/重量))補充飼糧。在另一個具體實施例中，以大約50單位/公斤至大約200單位/公斤的酵母菌表現之植酸酶(也就是大約0.7至大約2.9毫克/公斤，或大約.00007%至大約.0003%(重量/重量))補充飼糧。應瞭解在這些具體實施例的每一個中，"公斤"意指飼糧的公斤，像是在動物飼料摻合物之案例中的終飼料組合物(也就是在組合物中作為終混合物的飼料)。此外，將一單位(U)的植酸酶活性定義為在37°C和5.5之pH值下，每分鐘從1.5毫莫耳/公升植酸鈉中產生1微莫耳無機磷所需的酵素含量。

可在餵飼動物飼糧之前，先將酵母菌表現之植酸酶與該飼糧混合，像是動物飼料(也就是作為終混合物的飼料組合物)，或可將植酸酶與飼糧一起餵給動物，不需先混合

。例如，可將植酸酶直接加至未經處理、製成丸狀，或另行加工的飼糧中，像是動物飼料，或可與飼糧分開提供植酸酶，例如礦物質塊、藥丸、凝膠調配物、液體調配物，或放在飲水中。根據本發明，餵飼動物與植酸酶"混合"之飼糧，意指餵飼與植酸酶混合的飼糧，或分別餵飼飼糧和植酸酶，不需先混合。

酵母菌表現的植酸酶可以是未包膠的，或是包膠的形式，用來餵飼動物或與動物飼料摻合物混合。包膠作用使植酸酶免於在被動物攝食之前分解及/或氧化(也就是說，包膠作用增加了蛋白質的穩定性)，並提供脫水產物，較容易餵飼動物，或較容易與例如動物飼料摻合物混合。可以該方式保護酵母菌表現的植酸酶，例如藉著以此項技藝中已知為有效包膠劑的其他蛋白質或任何其他的物質塗覆植酸酶，像是聚合物、蠟、脂肪，和氫化的植物油。例如，可使用此項技藝-承認的技術，像是 $\text{Na}^{2+}$ -藻酸鹽包膠技術來包膠植酸酶，其中以 $\text{Na}^{2+}$ -藻酸鹽塗覆植酸酶，接著轉變為 $\text{Ca}^{2+}$ -藻酸鹽，在 $\text{Ca}^{2+}$ 離子的存在下進行包膠。或者，可藉著此項技藝-承認的技術，像是造粒(prilling)(也就是將融化液體霧化，並冷卻小滴，形成小珠)，來包膠植酸酶。例如，可在氫化的棉籽薄片，或氫化的大豆油中，將植酸酶造粒，產生脫水的產物。可以完全未包膠的形式、完全包膠的形式，或未包膠和包膠植酸酶之混合物的形式使用植酸酶，將其加至飼糧中，像是動物飼料組合物，或直接餵飼動物，不需先與飼糧混合。可簡單地處理任何

根據本發明之方法所使用的植酸酶。

根據本發明之方法，含有植酸酶之飼糧可在飼糧中口服投與動物，像是動物飼料，或放在礦物塊或飲水中，但亦可使用任何熟諳此藝者已知的其他有效的投藥方法(例如藥丸形式)。可在有效增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性、降低飼料對增重比例，或增加動物之骨質量和礦物質含量的期間，將含有酵母菌表現之植酸酶的飼糧投與動物。例如，在將飼料組合物餵飼單胃動物的案例中，可在動物的一生中，每天餵飼動物含有酵母菌表現之植酸酶的飼料組合物。或者，可餵飼動物含有植酸酶的飼料組合物較短的期間。餵飼動物含有植酸酶之飼糧的期間並沒有限制，並應瞭解可使用任何判定藉著投與含有植酸酶之飼糧，將有效提高動物營養的期間。

#### 實例 1

##### 動物飼料摻合物組成

雞和豬的動物飼料摻合物之組成如下(也就是無植酸酶的飼料組成)：

表 1. 在雞和豬測定中所使用的動物飼料之組成

成分	雞測定	豬測定
玉米澱粉	至 100.0	至 100.0
玉米	50.89	61.35
大豆粗粉，脫殼的	39.69	31.19
大豆油	5.00	3.00
石灰石，磨碎的	1.67	1.06
鹽	0.40	--
雞維生素混合物	0.20	--
豬維生素混合物	--	0.20
雞微量礦物質混合物	0.15	--
豬微量維生素混合物	--	0.35
膽鹼鹽酸鹽 (60%)	0.20	--
豬抗生素預混物 (CSP)	--	0.50
桿菌肽預混物	0.05	--
硫酸銅	--	0.08
L-離胺酸 HCl，飼料級	--	0.17
DL-甲硫胺酸，飼料級	0.20	0.05

## 實例 2

植酸酶製備

在生長培養基中，利用以 AOX1-appA、pGAP-appA2 或 AOX1-突變種 U 轉化的巴斯德畢赤酵母菌 X33，接種酵母菌播種培養物。使播種培養物在 30°C 下生長大約 24 小時，直到 OD<sub>600</sub> 達到大約 50 為止。然後使用該播種培養物來接種含有

無菌之 FM-22 生長培養基 (含有 5% 葡萄糖) 的發酵器 (分批製程)。在 FM-22 生長培養基中，將 24-小時的播種培養物稀釋成大約 1:25 到大約 1:50。在發酵器中，在 30°C 並將 pH 值控制在 6.0 (使用  $\text{NH}_2\text{OH}$ ) 之下，以需氧的方式培養酵母菌培養物，並持續餵食葡萄糖，直到培養物達到大約 400 之  $\text{OD}_{600}$  為止 (大約 36 小時)。

欲從培養基中收集植酸酶，將酵母菌培養物迅速地冷卻至 8°C。藉著離心並藉著微量過濾，從培養基中分離細胞。在培養基中的植酸酶為 70-80% 純的，並如下準備用來與載劑摻合，作為飼料添加物。

藉著超過濾作用 (10,000 分子量之排阻限制)，濃縮含有經分泌之植酸酶的不含細胞之培養基。將超過濾的殘留物 (7-5% 固體) 移至無菌的容器中，進行噴霧乾燥。使用此項技藝中已知的標準技術將殘留物噴霧乾燥，並收集所得的粉末 (4-6% 濕度)。

進行該粉末的微量生物學測試，並測定該粉末的植酸酶活性。使用該粉末的植酸酶活性 (植酸酶活性 / 毫克粉末之單位)，來判定與小麥次級品 (也就是載劑) 摻合之脫水粉末的含量，以便獲得具有預定數目之植酸酶單位 / 克載劑的植酸酶 / 載劑混合物。將脫水的植酸酶粉末與小麥次級品混合，並包裝在防水的容器中。再按照需要將含有植酸酶之小麥次級品與動物飼料摻合物混合，獲得具有預定數目之植酸酶單位 / 公斤飼料的終飼料混合物 (大約 400 至大約 1000 單位 / 公斤)。

## 實例 3

飼料添加組合物

下列的組合物是代表性的飼料添加組合物，可將其與動物飼料摻合物混合，像是在實例 1 中描述的動物飼料摻合物，獲得終飼料混合物，具有例如大約 50 單位植酸酶 / 公斤終飼料混合物，至大約 2000 單位植酸酶 / 公斤飼料。下述的飼料添加組合物並非限制性的，並應瞭解可使用判定可有效提高動物飼料之營養價值的任何含有植酸酶之飼料添加組合物。出示含有 600 單位植酸酶 / 克飼料添加組合物，或 5000 單位植酸酶 / 克飼料添加組合物的代表性飼料添加組合物。

	600 植酸酶單位 / 克 (重量 %)	5000 植酸酶單位 / 克 (重量 %)
稻殼	82.64	76.35
碳酸鈣	15.00	15.00
油	1.5	1.5
酵素	0.86	7.15

	600 植酸酶單位 / 克 (重量 %)	5000 植酸酶單位 / 克 (重量 %)
小麥次級品	82.64	76.35
碳酸鈣	15.00	15.00
油	1.5	1.5
酵素	0.86	7.15

實例 4餵飼草案

使用在 Biehl 等人 (J. Nutr. 125:2407-2416 (1995)) 中描述的草案，來餵飼雞。簡言之，以得自 New Hampshire 公雞和 Columbian 母雞之雜交種的公和母雞，來進行測定，並在控制環境，具有 24 小時螢光燈具的實驗室中進行。從孵化後第 0 天至第 7 天，按照上文在實例 1 中的描述，餵食雞含有 23% 粗蛋白、添加甲硫胺酸之玉米-大豆粗粉的基礎飲食。在第 8 天時，將雞稱重，在翅膀上綁上束帶，並隨機分派至實驗處理組。使每個圍欄 3 或 4 隻雞的 5 個圍欄，分別接受長達 13-天實驗餵飼期間的飲食處理，而雞隻具有 80-100 克的平均原始體重。

經過 13-天的餵飼期間，將雞限制在恆溫控制的不鏽鋼雞組架中，亦使用不鏽鋼餵食器和飲水器。採用這些步驟以避免來自環境的礦物質污染。在整個餵飼期間，自由地獲得飲食和經過蒸餾的去離子水。

在開始每項測定之前，先使豬禁食 12 小時，餵食實驗飲食 23 天，並在完成每項測定之後禁食 12 小時。每個處理組使用 10 隻豬，並在測定開始時，豬平均大約 8-120 公斤。將豬飼養在個別的圍欄中，其含有不鏽鋼的餵食器、不鏽鋼的飲水器，和通電的圓柱狀圍牆。

將在每個處理組中所有的雞，和每個處理組中 5 隻中間體重的豬安樂死，以便進行測試。測量增重，並收穫脛骨(雞)或腓骨(豬)，進行骨灰分分析，反映骨質量和礦物質

內含量。

#### 實例 5

##### 測量無機磷酸和生物可利用的磷酸

根據在 Biehl 等人中描述的 AOAC (1984)，以比色法定量在用來產生標準曲線之飼料試樣中的總磷酸。以磷酸單鉀 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 作為標準物。藉著測量在補充有  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (X-軸) 之基礎飼料中的無機磷酸含量，並判定餵食補充各種含量  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  之基礎飼料的動物之脛骨灰分重量 (毫克) 或增重 (克) (Y-軸)，產生標準曲線。然後藉著將這些動物的脛骨灰分重和增重，與標準曲線相比較，針對餵食補充有植酸酶之基礎飼料的動物，判定得自植酸酯之磷酸的生物利用性。

#### 實例 6

##### 骨灰分分析

在每個實驗結束時，將雞和豬安樂死，並分別從雞或豬中定量地移出右邊脛骨或腓骨。藉著平行圍欄集合骨頭，並在移除黏附的組織之後，在  $100^\circ\text{C}$  下乾燥 24 小時，再稱重。在稱重之後，在隔燄爐中，在  $600^\circ\text{C}$  下 24 小時，將骨頭乾燒成灰。以乾骨重量的百分比來表示灰分重量，亦為每個骨頭的灰分重。

#### 實例 7

##### 在酵母菌中的植酸酶表現

根據本發明，可在酵母菌中表現任何的植酸酶基因，並可根據熟諳此藝者已知的方法，使用任何的酵母菌表現系統。針對代表性的植酸酶基因，像是大腸桿菌衍生的  $\text{appA}$

和 AppA2 基因，並針對大腸桿菌衍生之 AppA 的指定位置突變種，在美國專利申請案第 09/104,769 號 (現在是美國專利第 6,451,572 號)、美國專利申請案第 09/540,149 號和美國專利申請案第 60/166,179 號 (PCT 出版物第 WO 01/36607 A1 號) 中，描述了酵母菌表現系統，全部以引用的方式併入本文中。以下簡單地說明用來表現 AppA 和 AppA2 酵素，以及 AppA 之指定位置突變種的代表性酵母菌表現系統。

在酒酵母菌中表現 appA 基因

將在酒酵母菌中表現的 appA 基因，與 phyA 基因 (得自黑麴黴的植酸酶基因) 的信號肽連接。該 appA 基因獲自 ATCC，並使用 pappA1 表現載體 (Ostanin 等人, J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992))，將該基因 (1.3 kb) 轉化到大腸桿菌品系 BL21(87441 號) 內。欲製備 appA-phyA 信號肽構築體，使用聚合酶連鎖反應 (PCR)。合成兩個引子，且 5' 引子為 80 個鹼基對長，並含有 phyA 信號肽序列、KpnI 限制酵素切開位置，和與模板互補的序列，如下：5' GGG GTA CCA TGG GCG TCT CTG CTG TTC TAC TTC CTT TGT ATC TCC TGT CTG GAG TCA CCT CCG GAC AGA GTG AGC CGG AG 3' (序列識別：3 號)。3' 引子為 24 個鹼基對長，並含有 EcoRI 位置，以及與模板互補的序列，如下：5' GGG AAT TCA TTA CAA ACT GCA GGC 3' (序列識別：4 號)。執行在 95°C 下變性 1 分鐘，在 58°C 下黏接 1 分鐘，和在 72°C 下鏈延伸 1 分鐘之 25 次循環的 PCR 反應。

藉著 PCR 擴大 1.3 kb 之片段，並以 KpnI 和 EcoRI 消化，連接到在酒酵母菌中表現的載體 pYES2 內。藉著乙酸鋰法，將

pYES2-appA-phyA 信號肽構築體轉化至酵母菌 (INVSci, Invitrogen, San Diego, CA) 內。

將經過選擇的轉化物接種在 YEPD 培養基內，並在達到  $OD_{600}=2$  之後，以半乳糖誘導表現。在誘導之後 15-20 小時收穫細胞。從培養物上清液中分離 AppA 植酸酶酵素，並為主要出現的蛋白質，排除了對於冗長純化作用的需求。在巴斯德畢赤酵母菌中表現 appA 或 appA2 基因

appA。PCR 反應的模板如同上述。PCR 反應所使用的 5' 引子如下：5' GGA ATT CCA GAG TGA GCC GGA 3' (序列識別：5 號)。3' 引子如下：5' GGG GTA CCT TAC AAA CTG CAC G 3' (序列識別：6 號)。擴大反應包括在  $94^{\circ}\text{C}$  下 (3 分鐘) 的 1 次循環，在  $94^{\circ}\text{C}$  下 (0.8 分鐘) 的 30 次循環，在  $54^{\circ}\text{C}$  下 (1 分鐘) 的 30 次循環，在  $72^{\circ}\text{C}$  下 (2 分鐘) 的 30 次循環，和在  $72^{\circ}\text{C}$  下 (10 分鐘) 的 1 次循環。首先將產物插入 pGEM T-easy 載體 (Promega) 內，並使用大腸桿菌品系 TOP10F' 作為擴大該構築體的宿主。然後在 EcoRI 位置，將該構築體插入酵母菌表現載體 pPicZ $\alpha$  (Invitrogen) 內，並再度使用大腸桿菌品系 TOP10F' 作為擴大該構築體的宿主。

藉著電穿透作用，將含有 appA 的 PicZ $\alpha$  載體轉化到巴斯德畢赤酵母菌品系 X33 內。將經過轉化的細胞平鋪在 YPD-辛歐西 (Zeocin) 瓊脂培養基內，並在帶有甘油的最低營養要求培養基 (BMGY) 中培養陽性的菌落 24 小時。當達到 5 之  $OD_{600}$  時，離心細胞，並為了誘導再懸浮於 0.5% 甲醇培養基 (BMMY) 中。每 24 小時加入甲醇 (100%)，以便維持 0.5-1% 之

濃度。在誘導之後192小時，收穫細胞，並藉著硫酸銨沉澱法和DEAE-瓊脂糖管柱層析法，純化AppA蛋白質。

appA2。appA2基因分離自(參見美國專利申請案第09/540,179號)展現出特別高植酸酶活性的細菌菌落，獲自雜交Hampshire-Yorkshire-Duroc豬的結腸內容物。欲分離展現出高植酸酶活性的細菌菌落，以厭氧的瘤胃液葡萄糖培養基稀釋結腸內容物試樣，劇烈地攪動3分鐘，再連續稀釋。在37°C下，在含有不可溶之植酸鈣的經過修改之瘤胃液-葡萄糖-纖維二糖-瓊脂培養基上，培養經過稀釋的試樣3天。使用植酸鈉作為受質，測定具有澄清帶之菌落的植酸酶活性。將確認產生最高植酸酶活性的菌落，是為大腸桿菌品系。因此，使用如同上述關於在巴斯德畢赤酵母菌中表現appA的引子(序列識別：5和6號)，分離appA2基因。按照上文關於在巴斯德畢赤酵母菌中表現appA的描述，將appA2基因選殖到PIcZ $\alpha$ 載體內，並以PIcZ $\alpha$ -appA2構築體轉化巴斯德畢赤酵母菌品系X33。按照上文關於AppA的描述表現AppA2酵素，並從酵母菌培養基上清液中收集AppA2蛋白質。

#### AppA指定位置突變種

按照在美國專利申請案第06/166,179號(PCT出版物第WO 01/36607 A1號)中的描述，製備appA的指定位置突變種，將其以引用的方式併入本文中。簡言之，使用巨引子(megaprimer)的指定位置突變生成法(Seraphin, B.等人, Nucleic Acids Res. 24:3276-77 (1996)；Smith, A.M.等人，

Biotechniques 22:438-39 (1997)，以引用的方式併入本文中)，  
，建構大腸桿菌 appA 突變種。

突變生成作用的模板獲自 ATCC，並使用 pappA1 表現載體 (Ostanin 等人, J. Biol. Chem., 267:22830-36 (1992))，將基因 (1.3 kb) 轉化到大腸桿菌品系 BL21 (87441 號) 內。按照上文關於在巴斯德畢赤酵母菌中表現 appA 的描述，使用上文在巴斯德畢赤酵母菌中表現 appA 所使用的引子 (序列識別：5 和 6 號)，來擴大模板。擴大反應包括在 94°C 下 (3 分鐘) 的 1 次循環，在 94°C 下 (0.5 分鐘) 的 30 次循環，在 54°C 下 (1 分鐘) 的 30 次循環，在 72°C 下 (1.5 分鐘) 的 30 次循環，和在 72°C 下 (10 分鐘) 的 1 次循環。

按照上述進行突變生成 PCR 反應，使用下列的引子：

5'CTGGGTATGGTTGGTTATATTACAGTCAGGT3' A131N

(序列識別：7 號) V134N

5'CAAACCTTGAACCTTAAACGTGAG3' C200N

(序列識別：8 號)

5'CCTGCGTTAAGTTACAGCTTTCATTCTGTTT3' D207N

(序列識別：9 號) S211N

致突變的 PCR 反應，併入適當的引子，製造出 appA 的 A131N/V134N/D207N/S211N、C200N/D207N/S211N (突變種 U) 和 A131N/V134N/C200N/D207N/S211N 突變種。按照上述進行第一個致突變的 PCR 反應 (100 微升)，使用 4 微升完整的 appA PCR 反應混合物，以及上文列舉之經過適當修改的引子。將所有的巨引子 PCR 產物溶解於 1.5% 低熔點的瓊脂糖凝膠

中。切下預期的片段，並利用 GENE CLEAN II 套組洗脫。按照上述設定最後的致突變 PCR 反應 (100 微升)，使用 4 微升 appA PCR 產物和各種濃度之經過純化的巨引子 (50 毫微克至 4 微克)，視其尺寸而定。將 5 個熱循環設定為在 94°C 下 1 分鐘和在 70°C 下 2 分鐘。當在 70°C 下時，加入 1 微莫耳的前進引子和 2 單位 AmpliTaq DNA 聚合酶，並溫和地與反應混合物混合，再繼續在 94°C 下 1 分鐘和在 70°C 下 1.5 分鐘之 25 次循環的熱循環。

按照上文關於 appA2 基因的描述，在巴斯德畢赤酵母菌中表現編碼指定位置突變種的基因。按照上文關於 AppA 的描述，表現蛋白質產物，並藉著硫酸銨沉澱法和 DEAE-瓊脂糖層析法，從酵母菌培養物上清液中純化指定位置突變種。

### 實例 8

#### 以酵母菌表現之植酸酶餵飼雞，在活體內的影響

欲評估其作為動物飼料補充劑的可能性，將酵母菌表現之植酸酶 AppA 和 AppA2 脫水，並加在上文在實例 1 中描述的動物飼料摻合物 (23% 粗蛋白) 中，使用小麥次級品作為載劑。按照上文在實例 4 中的描述，將補充有植酸酶的飼料組合物餵給雞 (每個圍欄 4 隻雞；平均開始體重為 97 克)。處理組包括構成標準曲線之各種含量的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，500 單位/公斤的 Natuphos®，一種在真菌黑麴黴中表現的市售 (Gist-Brocades) 植酸酶，500 單位/公斤在巴斯德畢赤酵母菌或在大腸桿菌中表現的 AppA，以及各種含量的 AppA2/p (在巴

(32)

斯德畢赤酵母菌中表現的 AppA2，使用組成的 pGAP 啟動基因來進行基因表現)，如下：

處理組：

1. 基礎飲食 (0.10% P, 0.75% Ca)
2. 與 1 相同 +0.05% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
3. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
4. 與 1 相同 +0.15% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
5. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA (酵母菌)
6. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA (大腸桿菌)
7. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA2/p
8. 與 1 相同 +1000 單位 / 公斤 AppA2/p
9. 與 1 相同 +1500 單位 / 公斤 AppA2/p
10. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Natuphos®

針對各種處理組，判定增重、飼料攝取、飼料對增重的比例、乾脛骨重、脛骨灰分重量、按乾脛骨重百分比計的脛骨灰分重量，以及以脛骨灰分重量和增重兩者為基礎之生物可利用的磷酸百分比。下文表現的結果係按 5 個圍欄 (R1、R2、R3、R4 和 R5) 各 4 隻雞的平均值計，亦計算 5 個圍欄的平均值 (在表中以 "平均值" 標示)。在表中將處理組標示為 T1-T10，且 "g/c/d" 代表按克 / 雞 / 天計的增重或飼料攝取。

## 增重(克/雞)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	185	282	315	321	314	284	334	352	334	269
R2	219	286	315	336	317	322	315	326	348	274
R3	234	277	327	335	321	312	318	321	342	267
R4	234	291	309	311	316	308	326	342	333	276
R5	223	278	303	332	316	268	313	336	361	294
平均值	219 <sup>g</sup>	283 <sup>ef</sup>	314 <sup>cd</sup>	327 <sup>bc</sup>	317 <sup>c</sup>	299 <sup>de</sup>	321 <sup>bc</sup>	335 <sup>ab</sup>	344 <sup>a</sup>	276 <sup>f</sup>
g/c/d	16.8	21.8	24.2	25.2	24.4	23.0	24.7	25.8	26.5	21.2

集合的 SEM=6

LSD=16

## 13天的飼料攝取(克/雞)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	303	392	434	434	426	389	450	474	465	397
R2	330	462	448	454	429	430	425	449	472	396
R3	336	391	445	458	446	425	428	445	464	397
R4	350	416	432	424	432	420	441	464	449	386
R5	335	388	421	467	425	389	453	461	483	420
平均值	331 <sup>f</sup>	410 <sup>e</sup>	436 <sup>c</sup>	447 <sup>abc</sup>	432 <sup>cd</sup>	411 <sup>de</sup>	439 <sup>bc</sup>	459 <sup>ab</sup>	467 <sup>a</sup>	399 <sup>e</sup>
g/c/d	25.5	31.5	33.5	34.4	33.2	31.6	33.8	35.3	35.9	30.7

集合的 SEM=7

LSD=21

## 增重 / 飼料 (克 / 公斤)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	611	718	726	740	738	729	742	742	720	678
R2	665	618	703	741	738	749	741	727	738	692
R3	696	708	736	730	719	736	743	722	736	671
R4	668	700	715	733	731	733	738	738	743	715
R5	665	717	721	710	742	688	691	730	749	710
平均值	661 <sup>c</sup>	692 <sup>b</sup>	720 <sup>a</sup>	731 <sup>a</sup>	734 <sup>a</sup>	727 <sup>a</sup>	731 <sup>a</sup>	732 <sup>a</sup>	737 <sup>a</sup>	691 <sup>b</sup>

集合的 SEM=10

LSD=28

## 乾脛骨重 (毫克 / 雞)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	659	804	883	981	892	787	914	1059	1106	757
R2	655	769	891	977	907	918	873	997	1083	759
R3	713	751	878	1008	901	820	905	964	1065	726
R4	740	742	931	925	823	809	923	1083	1096	729
R5	714	714	866	942	841	809	931	1036	1132	764
平均值	698 <sup>g</sup>	756 <sup>f</sup>	890 <sup>d</sup>	967 <sup>c</sup>	873 <sup>de</sup>	829 <sup>e</sup>	909 <sup>d</sup>	1028 <sup>b</sup>	1096 <sup>a</sup>	747 <sup>f</sup>

集合的 SEM=16

LSD=45

## 脛骨灰分(毫克/雞)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	232	307	406	492	434	345	439	590	617	278
R2	215	315	415	507	445	435	420	546	600	305
R3	259	300	406	520	435	382	451	523	604	284
R4	237	297	442	462	392	372	454	590	616	267
R5	242	277	396	471	432	373	471	548	642	316
平均值	237 <sup>h</sup>	299 <sup>g</sup>	413 <sup>e</sup>	490 <sup>c</sup>	428 <sup>de</sup>	381 <sup>f</sup>	447 <sup>d</sup>	559 <sup>b</sup>	616 <sup>a</sup>	290 <sup>g</sup>

集合的 SEM=10

LSD=28

## 補充的 P 攝取(克)

	T1	T2	T3	T4
R1	0	0.196	0.434	0.651
R2	0	0.231	0.448	0.680
R3	0	0.196	0.445	0.687
R4	0	0.208	0.432	0.636
R5	0	0.194	0.421	0.701
平均值	0 <sup>d</sup>	0.205 <sup>c</sup>	0.436 <sup>b</sup>	0.671 <sup>a</sup>

集合的 SEM=0.007

LSD=0.022

## 脛骨灰分 (%)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	35.15	38.22	46.03	50.12	48.64	43.78	47.98	55.64	55.79	36.78
R2	32.86	40.92	46.53	51.86	49.06	47.31	48.07	54.69	55.35	40.15
R3	36.30	39.96	46.22	51.61	48.31	46.62	49.85	54.23	56.69	39.14
R4	32.01	40.02	47.47	49.96	47.70	45.96	49.19	54.44	56.23	36.68
R5	33.45	38.82	45.74	49.95	51.40	46.11	50.54	52.86	56.71	41.32
平均值	33.95 <sup>g</sup>	39.59 <sup>f</sup>	46.40 <sup>e</sup>	50.70 <sup>e</sup>	49.02 <sup>d</sup>	45.96 <sup>e</sup>	49.13 <sup>cd</sup>	54.37 <sup>b</sup>	56.15 <sup>a</sup>	38.81 <sup>f</sup>

集合的 SEM=0.57

LSD=1.62

磷等價評估脛骨灰分重量

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>標準曲線： Y=脛骨灰分(毫克)

X=補充或相等的 P攝取(克)

$$Y=232.0+389.9X$$

$$r^2=0.97$$

針對 500單位/公斤的植酸酶活性

(使用脛骨灰分處理平均值的實例計算)

生物可利用的P%

AppA(酵母菌)： (428-232.0)/389.9=0.503克P 得自432克FI= 0.116%

AppA(大腸桿菌)： (381-232.0)/389.9=0.382克P 得自411克FI= 0.093%

AppA2/p： (447-232.0)/389.9=0.551克P 得自439克FI= 0.126%

Natuphos®： (290-232.0)/389.9=0.149克P 得自399克FI= 0.037%

\*\*得自 ANOVA的結果(對每個圍欄4隻鳥進行計算；處理的說明在前頁)

## 生物可利用的 P (%)

	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	0.122	0.075	0.118	0.194	0.212	0.030
R2	0.127	0.121	0.113	0.179	0.200	0.047
R3	0.117	0.091	0.131	0.168	0.206	0.034
R4	0.095	0.085	0.129	0.198	0.219	0.023
R5	0.121	0.093	0.135	0.176	0.218	0.051
平均值	0.116 <sup>c</sup>	0.093 <sup>d</sup>	0.125 <sup>c</sup>	0.183 <sup>b</sup>	0.211 <sup>a</sup>	0.037 <sup>e</sup>

集合的 SEM=0.005

LSD=0.016

對比顯著性 (P-值)

AppA (酵母菌)對 AppA (大腸桿菌)	0.006
AppA2/p線性的	0.001
AppA2/p二次的	0.039

增重

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>標準曲線： Y=增重(克)

X=補充的 P攝取(克)

$$Y=234.1+157.2X$$

$$r^2=0.84$$

得自 ANOVA 的結果 (對每個圍欄 4 隻鳥進行計算；處理的說明在前頁)

## 生物可利用的 P (%)

	T5	T6	T7	T8	T9	T10
R1	0.119	0.082	0.141	0.158	0.137	0.056
R2	0.123	0.130	0.121	0.130	0.154	0.064
R3	0.124	0.117	0.125	0.124	0.148	0.053
R4	0.121	0.112	0.133	0.148	0.140	0.069
R5	0.123	0.055	0.111	0.141	0.167	0.091
平均值	0.122 <sup>b</sup>	0.099 <sup>d</sup>	0.126 <sup>b</sup>	0.140 <sup>ab</sup>	0.149 <sup>a</sup>	0.067 <sup>d</sup>

集合的 SEM=0.007

LSD=0.021

對比

顯著性 (P-值)

AppA (酵母菌) 對 AppA (大腸桿菌)

0.038

AppA2/p 線性的

0.036

AppA2/p 二次的

0.768

以逐漸增加含量的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  補充動物飼料摻合物，導致增重和脛骨灰分的線性 ( $p < .001$ ) 增加。以 Natuphos® 補充動物飼料摻合物，導致增重、脛骨灰分和生物可利用之磷酸 % 的線性增加 ( $p < .001$ )。在改善每個在活體內進行測試的反應上，包括飼料對增重之比例、脛骨重，以及生物可利用的磷酸 %，500 單位 / 公斤的酵母菌表現之酵素 (AppA 和 AppA2/p)，均比大腸桿菌表現的 AppA 或 Natuphos® 更有效。事實上，依據是否使用脛骨灰分重量或增重來計算生物可利用的磷酸 %，AppA 和 AppA2/p 在增加生物可利用之磷酸

的層面上，比 Natuphos® 更有效 2-6 倍。

### 實例 9

#### 以酵母菌表現之植酸酶餵飼雞，在活體內的影響

按照在實例 8 中描述的程序，除了雞具有 91 克的平均開始體重，並使用如下的處理組之外：

#### 處理組：

1. 基礎飲食 (0.10% P, 0.75% Ca)
2. 與 1 相同 +0.05% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
3. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
4. 與 1 相同 +300 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
5. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
6. 與 1 相同 +700 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
7. 與 1 相同 +900 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
8. 與 1 相同 +1100 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
9. 與 1 相同 +1300 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
10. 與 1 相同 +1500 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶
11. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Ronozyme® 植酸酶
12. 與 1 相同 +300 單位 / 公斤 突變種 U 植酸酶
13. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 突變種 U 植酸酶
14. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA 植酸酶
15. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA2 植酸酶

Ronozyme® (Roche) 植酸酶是在真菌中表現的植酸酶。突變種 U 是上述的 AppA 之指定位置突變種。按照在實例 8 中的描述來標示表。測量在實例 8 中描述之補充植酸酶的活體內影響，且結果如下：

增重 (克 / 雞)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
R1	287	295	318	269	295	271	301	305	304	317	256	324	340	319	343
R2	271	291	342	288	297	282	313	295	323	327	231	289	349	325	342
R3	268	302	326	286	278	267	298	309	308	327	274	332	337	348	336
R4	256	282	317	255	304	280	294	295	289	310	287	310	338	324	330
R5	215	279	310	292	270	290	302	270	295	306	284	316	329	319	331
平均值	259	290	323	278	289	278	302	295	304	317	266	314	339	327	336
g/c/d	18.5	20.7	23.1	19.9	20.6	19.9	21.6	21.1	21.7	22.6	19.0	22.4	24.2	23.4	24.0

集合的 SEM=6

LSD=18

飼料攝取 (克 / 雞)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
R1	463	450	489	428	450	435	466	479	445	489	422	500	487	483	503
R2	424	439	565	443	427	454	470	469	490	489	394	459	518	459	519
R3	425	446	526	444	417	425	444	480	483	485	427	522	496	520	535
R4	406	437	472	398	450	437	462	442	425	505	439	478	499	496	491
R5	381	443	478	421	423	438	447	423	455	452	437	463	496	476	519
平均值	420	443	506	427	433	438	458	459	460	484	424	484	499	487	513
g/c/d	30.0	31.6	36.1	30.5	30.9	31.3	32.7	32.8	32.9	34.6	30.3	34.6	35.6	34.8	36.6

集合的 SEM=10

LSD=27

增重 / 飼料 (克 / 公斤)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15
R1	620	656	650	627	655	623	645	636	683	648	605	648	699	661	681
R2	639	662	606	651	696	621	665	629	659	668	587	629	672	709	659
R3	630	677	619	644	666	628	671	644	637	673	641	635	680	669	629
R4	631	645	671	641	675	642	636	668	679	614	654	649	678	652	671
R5	564	630	649	694	639	662	675	639	648	678	649	683	663	669	638
平均值	617	654	639	651	666	635	658	643	661	656	627	649	678	672	656

集合的 SEM=10

LSD=28

乾 脛 胃 重 (毫 克 / 雞)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	970	1010	1146	952	1028	1011	1007	995	1027	1131	---	1150	1169	1160	1234
R2	920	1029	1175	974	937	1047	1013	993	1077	1077	828	995	1251	1130	1209
R3	1038	872	1147	981	932	917	1049	1072	1030	1137	1029	1151	1238	1178	1215
R4	890	944	1125	957	1008	964	1073	1005	961	1100	919	1116	1273	1177	1128
R5	882	970	1078	954	976	1004	961	963	1065	1101	937	1046	1172	1141	1145
平均值	940	965	1134	964	976	989	1021	1006	1032	1109	928	1092	1221	1157	1186

集合的 SEM=22

LSD=61

補充的 P 攝取 (克)

	1	2	3
R1	0	0.225	0.489
R2	0	0.220	0.565
R3	0	0.223	0.526
R4	0	0.219	0.472
R5	0	0.222	0.478
平均值	0 <sup>a</sup>	0.222 <sup>b</sup>	0.506 <sup>a</sup>

脛胃灰分 (毫克/雞)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	284	333	437	279	303	305	328	324	340	369	---	401	428	453	457
R2	270	318	447	298	290	336	336	325	383	363	226	355	481	441	470
R3	291	271	398	302	278	263	326	357	345	403	293	410	479	420	455
R4	234	305	398	281	314	297	341	317	324	364	264	406	500	447	413
R5	243	327	388	287	279	309	302	305	352	368	279	354	447	424	443
平均值	264	311	414	289	293	302	327	326	349	373	266	385	467	437	448

集合的 SEM=10

LSD=28

脛胃灰分 (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	29.30	32.94	38.15	29.25	29.48	30.18	32.55	32.54	33.10	32.60	---	34.90	36.63	39.07	37.06
R2	29.29	30.97	38.03	30.61	30.99	32.06	33.21	32.73	35.51	33.67	27.33	35.66	38.48	39.04	38.89
R3	28.03	31.08	34.70	30.81	29.79	28.71	31.12	33.26	33.45	35.49	28.50	35.63	38.73	35.63	37.48
R4	26.30	32.33	35.34	29.35	31.17	30.80	31.73	31.55	33.71	33.11	28.74	36.38	39.29	38.00	36.63
R5	27.52	33.76	35.98	30.13	28.60	30.81	31.44	31.67	33.09	33.41	29.77	33.81	38.14	37.18	38.70
平均值	28.09	32.21	36.44	30.03	30.00	30.51	32.01	32.35	33.77	33.65	28.58	35.28	38.25	37.78	37.75

集合的 SEM=0.49

LSD=1.39

## 磷等價評估

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  標準曲線： $Y = \text{脛骨灰分 (毫克)}$

$X = \text{補充或相等的 P 攝取 (克)}$

$$Y = 257.1 + 299.0X$$

$$r^2 = 0.88$$

針對 500 單位 / 公斤的植酸酶活性

(使用脛骨灰分處理平均值的實例計算)

生物可利用的 P%

Natuphos®： $(293 - 257.1) / 299.0 = 0.120$  克 P 得自 433 克 FI = 0.030%

Ronozyme®： $(266 - 257.1) / 299.0 = 0.030$  克 P 得自 424 克 FI = 0.007%

突變種 U： $(467 - 257.1) / 299.0 = 0.702$  克 P 得自 499 克 FI = 0.141%

AppA： $(437 - 257.1) / 299.0 = 0.602$  克 P 得自 487 克 FI = 0.124%

AppA2： $(448 - 257.1) / 299.0 = 0.638$  克 P 得自 513 克 FI = 0.124%

得自 ANOVA 的結果 (對每個圍欄 4 隻鳥進行計算；處理的說明在前頁)

## 生物可利用的 P (%)

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
R1	0.017	0.034	0.037	0.051	0.047	0.062	0.076	—	0.097	0.117	0.136	0.133
R2	0.031	0.026	0.058	0.057	0.049	0.086	0.072	-0.026	0.071	0.145	0.134	0.137
R3	0.034	0.017	0.005	0.052	0.069	0.061	0.101	0.028	0.098	0.150	0.105	0.124
R4	0.020	0.043	0.030	0.060	0.045	0.053	0.071	0.006	0.104	0.163	0.128	0.106
R5	0.024	0.018	0.040	0.034	0.038	0.071	0.082	0.017	0.070	0.128	0.117	0.120
平均值	0.025	0.027	0.034	0.051	0.050	0.066	0.080	0.006	0.088	0.140	0.124	0.124

集合的 SEM = 0.006

LSD = 0.018

對比	顯著性(P-值)
對Natuphos®的直線反應(處理組5(trt) 4-10)	0.001
對Natuphos®的二次反應	0.208
500單位/公斤Natuphos® (trt 5)對500單位/公斤	
酵母菌表現之植酸酶(trt 13-15)	0.001
500單位/公斤Natuphos® (trt 5)對500單位/公斤	
Ronozyme® (trt 11)	0.031
500單位/公斤Ronozyme® (trt 11)對500單	
位/公斤酵母菌表現之植酸酶(trt 13-15)	0.001
300單位/公斤突變種U (trt 12)對500單位/公斤突變種U (trt 13)	0.001
500單位/公斤突變種U (trt 12)對500單位/公斤AppA (trt 14)	0.074
500單位/公斤突變種U (trt 12)對500單位/公斤AppA2 (trt 15)	0.074

多重線性回歸： Y=脛骨灰分(毫克)

X=植酸酶攝取(單位)

$$Y=263.462+0.144 (\text{Natuphos®})+0.014 (\text{Ronozyme®})+0.823 (\text{突變種 U})+0.711 (\text{AppA})+0.718 (\text{AppA2})$$

$R^2=0.93$

相對的植酸酶活性	比例% 相當於500單位/公斤Natuphos®
Ronozyme®：	$(0.014/0.144)^*100=10$ 50
突變種U：	$(0.823/0.144)^*100=572$ 2860
AppA：	$(0.711/0.144)^*100=494$ 2470
AppA2：	$(0.718/0.144)^*100=499$ 2495

在500單位/公斤下，酵母菌表現之酵素(突變種U，AppA

和 AppA2), 在改善進行測試的活體內反應方面, 比 Natuphos® 或 Ronozyme® (兩個酵素均在真菌表現系統中表現) 更有效。例如突變種 U、AppA 和 AppA2, 在釋放磷酸方面, 比 Natuphos® 更有效 4 倍 (參見圖 3)。

### 實例 10

#### 以酵母菌表現之植酸酶餵飼豬, 在活體內的影響

按照在實例 8 中描述的程序, 除了以補充有植酸酶的飼料組合物餵飼豬 (平均開始體重為 10 公斤), 處理組如下:

處理組:

- 1) 基礎飲食 (0.75 P; 0.60% Ca)
- 2) 與 1 相同 +0.05% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
- 3) 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
- 4) 與 1 相同 +0.15% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
- 5) 與 1 相同 +400 單位/公斤得自 Natuphos® 的植酸酶
- 6) 與 1 相同 +400 單位/公斤得自突變種 U 植酸酶的植酸酶
- 7) 與 1 相同 +400 單位/公斤 AppA 植酸酶
- 8) 與 1 相同 +400 單位/公斤 AppA2 植酸酶

針對各種處理組, 判定增重、飼料對增重的比例、脛骨灰分重量、按乾脛骨重百分比計的脛骨灰分重量, 以及以脛骨灰分重量為基礎之生物可利用的磷酸百分比。結果如下:

表 3. 豬測定<sup>a</sup>

處理組	腓骨組成				
	增重 克/天	增重: 飼料 克/公斤	灰分 %	灰分, 毫克	生物可 利用的, % <sup>b</sup>
基礎飲食	369	533	29.31	666	
與1相同+0.05%得自KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 的P	435	576	32.83	766	
與1相同+0.10%得自KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 的P	446	618	36.62	972	
與1相同+0.15%得自KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 的P	509	660	36.57	1123	
與1相同+400單位/公斤Natuphos®植酸酶	460	605	34.37	889	0.081
與1相同+400單位/公斤突變種U植酸酶	458	645	35.45	961	0.116
與1相同+400單位/公斤AppA植酸酶	458	606	35.97	1035	0.136
與1相同+400單位/公斤AppA2植酸酶	443	583	34.96	968	0.108
對比	顯著性 (P-值)				
Natuphos® (處理組 (trt)5)對酵母菌表現之植酸酶 (trt 6-8)	NS	NS	NS	0.05	0.048
突變種 U (trt 6)AppA對 (trt 7)和AppA2 (trt 8)	0.10	0.10	NS	0.001	0.239

<sup>a</sup> 數據為在23天的期間內，每個處理組10隻個別飼養的豬重複的平均值；平均開始體重為8.4±0.2公斤

<sup>b</sup> 生物可利用之P%計算，為評估以KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>標準曲線(處理組1-4)為基礎的P等價。以KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>標準曲線為基礎的計算，其中Y=脛骨灰分(毫克)且X=補充或相等的P攝取(克)：

$$Y = 664.49 + 15.29X \quad (r^2 = 0.87)$$

在 400 單位 / 公斤下，酵母菌表現之酵素 (突變種 U, AppA 和 AppA2)，在改善進行測試的反應方面，比 Natuphos® (在真菌中表現) 更有效。

### 實例 11

#### 酵母菌表現之植酸酶，在雞中的活體內影響

按照在實例 8 中描述的程序，除了雞具有 83 克的平均開始體重以外，且處理組如下：

處理組：

1. 基礎飲食 (0.10% P ; 0.75% Ca)
2. 與 1 相同 +0.05% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
3. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
4. 與 1 相同 +0.15% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 P
5. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶 (第 1 批)
6. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶 (第 2 批)
7. 與 1 相同 +1000 單位 / 公斤 Natuphos® 植酸酶 (第 2 批)
8. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Ronozyme® 植酸酶 (第 1 批)
9. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 Ronozyme® 植酸酶 (第 2 批)
10. 與 1 相同 +1000 單位 / 公斤 Ronozyme® 植酸酶 (第 2 批)
11. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 突變種 U 植酸酶
12. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA 植酸酶
13. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA2 植酸酶
14. 與 1 相同 +500 單位 / 公斤 AppA2+新穎啟動基因的植酸酶 (AppA2/p)

表如同在實例 8 中的標示。測量在實例 8 中描述之植酸酶補充的活體內影響，且結果如下：

增 重 ( 克 / 雞 )

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
R1	152	252	295	299	215	235	241	223	256	254	325	308	322	314
R2	199	238	290	332	206	210	256	237	212	243	312	316	309	306
R3	163	257	297	347	235	254	250	215	218	246	324	309	313	335
R4	176	262	288	330	242	250	288	228	195	223	329	318	310	317
R5	190	257	295	356	193	230	288	218	214	259	306	307	314	317
平均值	176	253	293	333	218	236	265	224	219	245	319	312	314	318
g/c/d	12.6	18.1	20.9	23.8	15.6	16.9	18.9	16.0	15.6	17.5	22.8	22.3	22.4	22.7

集 合 的 SEM=7  
LSD=19

飼 料 攝 取 ( 克 / 雞 )

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
R1	279	373	431	424	347	386	352	359	284	321	435	429	447	424
R2	335	352	407	441	333	340	375	363	325	368	395	441	427	465
R3	291	374	419	472	369	400	381	330	348	367	439	459	440	472
R4	292	386	400	457	366	370	405	358	328	356	451	473	421	441
R5	344	374	427	483	341	370	450	336	344	394	425	420	449	445
平均值	308	372	417	455	351	373	393	349	326	361	429	444	437	449
g/c/d	22.0	26.6	29.8	32.5	25.1	26.6	28.1	24.9	23.3	25.8	30.6	31.7	31.2	32.1

集 合 的 SEM=10  
LSD=28

增重 / 飼料 (克 / 公斤)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
R1	544	674	684	705	618	608	684	621	676	793	747	718	719	742
R2	593	676	713	752	617	616	682	653	651	659	790	716	722	657
R3	558	686	709	736	636	635	656	650	626	671	737	673	713	708
R4	601	680	720	723	662	677	711	637	594	627	729	673	737	719
R5	551	685	690	737	565	622	641	649	624	658	721	732	700	712
平均值	569	680	703	731	620	632	675	642	634	682	745	702	718	708

集合的 SEM=13  
LSD=37

乾脛胃重 (毫克 / 雞)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	671	886	1048	1002	919	840	912	825	891	831	1117	1041	1057	1091
R2	815	---	1003	1298	752	765	906	865	756	916	1113	1152	1041	1070
R3	730	884	1036	1296	849	942	937	864	849	816	1154	1017	1130	1220
R4	698	911	931	1232	802	901	918	837	807	872	1163	1165	1047	1078
R5	773	929	1037	1266	793	845	867	768	825	962	1044	1054	1130	1140
平均值	737	903	1011	1219	823	859	908	832	826	879	1118	1086	1081	1120

集合的 SEM=27  
LSD=77

補充的 P 攝取 (克)

	1	2	3	4
R1	0	0.187	0.431	0.636
R2	0	0.176	0.407	0.661
R3	0	0.187	0.419	0.708
R4	0	0.193	0.400	0.685
R5	0	0.187	0.427	0.724
平均值	0 <sup>d</sup>	0.186 <sup>c</sup>	0.417 <sup>b</sup>	0.683 <sup>a</sup>

脛胃灰分 (毫克/雞)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	174	255	381	367	254	230	246	239	253	224	415	385	404	411
R2	197	279	343	483	199	198	244	242	200	249	395	425	357	353
R3	185	279	361	486	238	261	276	230	228	231	410	370	389	454
R4	175	287	315	459	220	262	282	222	210	244	416	455	371	396
R5	183	261	335	481	211	229	264	202	222	262	383	380	406	431
平均值	183	272	347	455	224	236	262	227	223	242	404	403	385	409

集合的 SEM=12

LSD=32

脛胃灰分 (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	25.88	28.82	36.31	36.67	27.60	27.39	26.91	29.01	28.42	26.99	37.15	37.03	38.24	37.64
R2	24.20	—	34.21	37.18	26.51	25.89	26.86	27.97	26.44	27.16	35.49	36.90	34.33	32.98
R3	25.43	31.61	34.87	37.53	28.06	27.75	29.52	26.65	26.85	28.35	35.54	36.34	34.40	37.22
R4	25.04	31.53	33.85	37.22	27.42	29.15	30.73	26.46	26.03	27.97	35.76	39.09	35.43	36.71
R5	23.72	28.11	32.27	38.02	26.61	27.17	30.41	26.26	26.88	27.22	36.67	36.02	35.99	37.80
平均值	24.85	30.02	34.30	37.32	27.24	27.47	28.89	27.27	26.92	27.54	36.12	37.08	35.68	36.47

集合的 SEM=0.57

LSD=1.61

磷等價評估

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>標準曲線：Y=脛骨灰分(毫克)

X=補充或相等的P攝取(克)

$$Y=187.9+393.4X$$

$$r^2=0.95$$

針對500單位/公斤的植酸酶活性

(使用脛骨灰分處理平均值的實例計算)

生物可利用的P%

Natuphos® 1：(224-187.9)/393.4=0.092克P 得自351克FI= 0.026%

Natuphos® 2：(236-187.9)/393.4=0.122克P 得自373克FI= 0.033%

Ronozyme® 1：(227-187.9)/393.4=0.099克P 得自349克FI= 0.028%

Ronozyme® 2：(223-187.9)/393.4=0.089克P 得自326克FI= 0.027%

突變種U：(404-187.9)/393.4=0.549克P 得自429克FI= 0.128%

AppA：(403-187.9)/393.4=0.547克P 得自444克FI= 0.123%

AppA2：(385-187.9)/393.4=0.501克P 得自437克FI= 0.115%

AppA2/p：(409-187.9)/393.4=0.562克P 得自449克FI= 0.125%

得自ANOVA的結果(對每個圍欄4隻鳥進行計算；處理的說明在前頁)

生物可利用的P(%)

	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
R1	0.048	0.028	0.042	0.036	0.058	0.029	0.133	0.117	0.123	0.138
R2	0.008	0.008	0.038	0.038	0.009	0.042	0.133	0.137	0.101	0.090
R3	0.035	0.047	0.059	0.032	0.029	0.030	0.129	0.101	0.116	0.143
R4	0.022	0.051	0.059	0.024	0.017	0.040	0.129	0.144	0.111	0.120
R5	0.017	0.028	0.043	0.011	0.025	0.048	0.117	0.116	0.123	0.139
平均值	0.026 <sup>c</sup>	0.032 <sup>bc</sup>	0.048 <sup>b</sup>	0.028 <sup>c</sup>	0.028 <sup>c</sup>	0.038 <sup>bc</sup>	0.128 <sup>a</sup>	0.123 <sup>a</sup>	0.115 <sup>a</sup>	0.125 <sup>a</sup>

集合的SEM=0.006

LSD=0.018

500單位/公斤下，酵母菌表現之酵素(突變種U、AppA、AppA2和AppA2/p)，在改善進行測試的反應方面，包括增重、飼料對增重之比例、骨質量和礦物質內含量，以及生物可利用之磷酸%，比Natuphos®或Ronozyme®更有效。酵母菌表現之酵素，在增加生物可利用之磷酸的層面上，比真菌表現的酵素更有效大約4倍。

### 實例 12

#### 以酵母菌表現之植酸酶餵飼換羽後的產蛋母

#### 雞，在活體內的影響

按照在實例8中描述的程序，除了測試換羽後的產蛋母雞，並判定蛋產量和蛋重量以外，且處理組和基礎飲食如下：

處理組：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食(0.10% Pa； 3.8% Ca； 17% CP)
2. 與1相同 +0.10%得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與1相同 +150單位/公斤 r-AppA2植酸酶
4. 與1相同 +300單位/公斤 r-AppA2植酸酶
5. 與1相同 +10,000單位/公斤 r-AppA2植酸酶

基礎飲食：成份	%
玉米	63.65
大豆粗粉，脫殼的	25.65
石灰石，磨碎的	9.80
鹽	0.40
礦物質預混物	0.20
維生素預混物	0.15
DL-甲硫胺酸，飼料級	01.0
膽鹼鹽酸鹽	0.05

\*\*註解：處理組 1 在 4 週後中斷，因為蛋產量低於 50%

按照在實例 8 中的描述標示下列的表，並測量一些與在實例 8 中描述的相同的反應。結果顯示 AppA2 在換羽後的產蛋母雞中，增加了蛋產量和蛋重量。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食 (0.10% Pa; 3.8% Ca; 17% CP)
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +150 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +300 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +10,000 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶

開始體重(克；12隻母雞的平均值)

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	1699	1792	1682	1790	1707
R2	1785	1698	1734	1855	1694
R3	1690	1665	1775	1724	1824
R4	1688	1745	1739	1823	1760
平均值	1716	1725	1733	1798	1746

集合的SEM=26

LSD=78

4週體重(克；12隻母雞的平均值)

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	1566	1802	1763	1769	1748
R2	1558	1734	1816	1860	1723
R3	1633	1707	1744	1769	1850
R4	1615	1749	1762	1827	1757
平均值	1593	1748	1771	1806	1770

集合的SEM=21

LSD=64

12週體重(克；12隻母雞的平均值)

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	--	1876	1831	1792	1781
R2	--	1791	1775	1856	1791
R3	--	1800	1765	1806	1933
R4	--	1853	1814	1876	1815
平均值	--	1830	1796	1833	1830

集合的SEM=24

LSD=74

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食 (0.10% Pa; 3.8% Ca; 17% CP)
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +150 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +300 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +10,000 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶

飼料攝取 (克 / 母雞 / 天)<sup>1</sup>

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	89	118	122	115	116
R2	92	125	114	122	119
R3	89	117	118	116	124
R4	94	123	119	115	123
平均值	91 <sup>b</sup>	121 <sup>a</sup>	118 <sup>a</sup>	117 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>

集合的 SEM=2

LSD=5

<sup>1</sup>平均值為母雞的平均每日飼料攝取，對處理組 1 而言是前 4-週的期間，而對於處理組 2-5 而言是全部 12 週的期間。

蛋重量 (克)<sup>1</sup>

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	57.5	64.0	65.4	65.7	64.5
R2	63.5	64.7	64.3	66.0	65.5
R3	60.3	64.3	64.6	64.8	65.6
R4	62.8	63.3	62.2	65.3	63.7
平均值	61.0 <sup>b</sup>	64.1 <sup>a</sup>	64.1 <sup>a</sup>	65.5 <sup>a</sup>	64.8 <sup>a</sup>

集合的 SEM=0.7

LSD=2.2

<sup>1</sup>平均值為母雞的平均蛋重量，對處理組 1 而言是前 4-週的期間，而對於處理組 2-5 而言是全部 12 週的期間。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食 (0.10% Pa; 3.8% Ca; 17% CP)
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +150 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +300 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +10,000 單位 / 公斤 r-AppA2 植酸酶

每週的蛋產量 (%)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D1	75.3	55.7	36.0	22.9	--	--	--	--	--	--	--	--
D2	88.4	90.8	88.1	87.8	88.4	85.4	86.0	81.8	80.4	79.8	80.7	78.3
D3	84.5	85.1	83.3	85.1	83.3	82.1	83.6	79.2	77.4	77.4	79.5	76.5
D4	86.6	86.3	83.9	82.4	82.1	84.5	81.5	77.4	78.0	74.7	73.8	72.0
D5	82.4	83.3	83.6	84.8	80.7	81.3	82.7	78.6	80.1	78.9	76.8	72.6
SEM	3.0	3.2	3.4	3.5	3.3	3.2	3.2	4.1	3.4	4.5	3.5	3.9

蛋產量 (%)<sup>1</sup>

	T1	T2	T3	T4	T5
R1	44.6	86.5	73.0	81.0	80.7
R2	60.1	85.7	78.1	81.7	74.7
R3	43.2	87.2	84.3	83.9	87.8
R4	42.0	80.9	90.8	74.6	85.3
平均值	47.5	85.1	81.6	80.3	82.1
最小二乘方平均值 <sup>2</sup>	53.8 <sup>b</sup>	81.2 <sup>a</sup>	80.7 <sup>a</sup>	77.8 <sup>a</sup>	82.9 <sup>a</sup>

集合的 SME=2.1

<sup>1</sup> 平均值為母雞的平均蛋產量，對處理組 1 而言是前 4-週的期間，而對於處理組 2-5 而言是全部 12 週的期間。

<sup>2</sup> 因為在第一週中蛋產量上的變化(上文)，使用共變數分析分析整體的蛋產量，以最小二乘方平均值顯示共變數的影響。

## 實例 13

以酵母菌表現之植酸酶餵飼肥育豬，在活體內的影響

按照在實例 8 中描述的程序，除了測試肥育豬(新女豬和閹豬)以外，且基礎飲食和處理組如下：

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +250FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +500FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +1,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
6. 與 1 相同 +10,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶

基礎飲食：

成分	重量範圍 (公斤)	
	50-80	80-120
玉米澱粉	至 100	至 100
玉米	78.42	83.85
大豆粗粉，脫殼的	18.08	12.65
石灰石，磨碎的	1.06	1.07
磷酸二鈣	0.16	--
微量礦物質預混物	0.35	0.35
維生素預混物	0.10	0.10
L-離胺酸 HCl，飼料級	0.16	0.11
L-蘇胺酸，飼料級	0.02	--
抗生素預混物	0.75	0.75
經過計算之組成 (NRC, 1998)		
粗蛋白 %	15.1	13.0
離胺酸，總計 %	0.88	0.69
鈣 %	0.50	0.45
磷，總計 %	0.38	0.32
磷，估計為生物可利用的 %	0.09	0.05
ME，千卡/公斤	3293	3295

按照在實例 8 中的描述標示下列的表，並測量一些在實例 8 中描述的反應。顯示增重/飼料比例而非飼料/增重比例。

結果顯示 AppA2 在增加骨質量和礦物質內含量，以及在改善增重/飼料比例方面，像磷酸一樣地有效。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +250FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +500FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +1,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
6. 與 1 相同 +10,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶

開始豬重(公斤)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	52.2	52.8	53.0	51.8	52.0	51.8	51.2	50.8	52.2	52.2	51.3	52.4
R2	51.0	51.1	51.7	50.3	51.6	50.4	49.6	49.6	50.3	50.0	50.4	50.8
R3	48.2	49.6	49.8	49.6	50.1	49.2	48.1	49.6	47.9	47.1	48.8	48.4
R4	46.4	46.5	46.5	46.9	47.4	47.9	45.9	45.4	44.3	46.6	46.5	45.7
R5	52.0	44.1	51.0	52.4	46.4	50.7	43.4	43.9	44.0	43.1	44.1	44.0
平均值	50.0	48.8	50.4	50.2	49.5	50.0	47.6	47.9	47.7	47.8	48.2	48.3

集合的 SEM=0.4

## 階段 - 轉變豬重 (公斤)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	78.8	83.0	85.0	76.0	79.6	79.2	79.7	80.1	88.6	84.1	83.1	89.6
R2	76.8	80.6	86.9	79.9	82.2	83.8	80.0	83.5	87.7	84.5	87.3	83.5
R3	73.7	79.8	77.1	79.1	79.0	75.9	77.1	77.6	81.3	79.9	82.6	82.4
R4	82.3	82.5	79.2	79.1	84.4	84.5	74.7	78.1	73.9	84.6	78.9	79.1
R5	84.5	78.5	84.7	83.2	85.3	85.2	83.3	80.5	84.4	87.2	81.7	82.5
平均值	79.2	80.9	82.6	79.5	82.1	81.7	78.9	79.9	83.2	83.4	82.7	83.4

集合的 SEM=0.8

## 最終的豬重 (公斤)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	111.3	121.2	121.9	115.9	112.9	111.1	105.9	109.5	119.9	116.1	105.4	130.1
R2	111.5	119.6	132.7	111.9	121.3	116.3	105.4	115.8	118.6	115.3	123.3	112.5
R3	115.9	126.4	117.1	119.9	114.0	120.7	104.9	107.9	123.6	125.2	127.1	130.8
R4	116.6	117.9	110.0	110.0	119.7	122.1	120.2	121.6	117.9	127.7	109.3	123.0
R5	118.3	111.6	122.3	114.2	123.0	117.1	115.2	110.4	119.2	135.1	119.1	117.1
平均值	114.7	119.3	120.8	114.4	118.2	117.5	110.3	113.0	119.8	123.9	116.8	122.7

集合的 SEM=3.0 (性別 x 飲食,  $P < 0.10$ )。

對比：性別 x Pi (2) 對植酸酶 (3-6),  $P < 0.05$ 。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +250FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +500FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +1,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
6. 與 1 相同 +10,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶

增重，開始 - 轉變 (克 / 天)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	1024	1163	1233	931	1061	1055	816	836	1040	911	909	1063
R2	993	1135	1353	1140	1178	1283	867	966	1068	986	1055	936
R3	979	1162	1048	1131	1109	1028	829	801	955	935	965	971
R4	1025	1028	936	921	1057	1046	822	936	847	1001	925	952
R5	931	983	963	881	1109	984	950	870	962	1048	895	918
平均值	990	1094	1107	1001	1103	1079	857	882	974	976	950	968

集合的 SEM=24

對比：閹豬 (Ba) 對新母豬 (Gi)， $P < 0.01$ ；1 對 2-6， $P < 0.01$ 。

## 增重，轉變 - 最終 (克 / 天)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	832	979	945	1023	855	818	706	794	844	865	604	1095
R2	890	1000	1174	822	1001	833	688	874	835	830	974	784
R3	919	1013	870	889	762	974	545	593	829	888	871	949
R4	927	971	832	833	954	1015	893	854	861	904	596	862
R5	912	895	1018	836	1020	864	531	499	581	798	624	577
平均值	896	972	968	881	918	901	673	723	790	857	734	853

集合的 SEM=37

對比：Ba對Gi， $P<0.05$ 。

## 增重，整體的 (克 / 天)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	909	1053	1060	986	937	913	760	814	940	887	752	1079
R2	931	1054	1246	949	1072	1013	775	919	948	906	1013	858
R3	941	1066	934	976	888	993	660	678	880	907	910	958
R4	975	1006	882	876	1004	1030	864	887	855	944	730	898
R5	922	938	992	858	1063	922	703	652	738	901	735	717
平均值	935	1023	1023	929	993	974	752	790	872	909	828	902

集合的 SEM=38 (性別 x 飲食， $P<0.10$ )

對比：性別 x Pi (2)對植酸酶(3-6)， $P<0.05$ 。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +250FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +500FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +1,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
6. 與 1 相同 +10,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶

飼料攝取，開始 - 轉變 (克 / 天)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	2670	2733	2947	2271	2516	2448	2152	2029	2437	2074	2211	2579
R2	2541	2564	2940	2590	2484	2899	2425	2068	2543	2326	2363	1979
R3	2277	2499	2338	2385	2601	2066	2134	2020	2388	2168	2207	2093
R4	2371	2370	2311	2206	2457	2077	2104	2230	1919	2139	2260	2215
R5	2665	2312	2603	2308	2696	2366	2008	1289	2396	2237	1494	1866
平均值	2505	2496	2628	2352	2551	2371	2165	1927	2337	2189	2107	2146

集合的 SEM=67

對比：Ba對Gi， $P < 0.01$ 。

## 飼料攝取，轉變 - 最終 (克 / 天)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	3181	3427	3559	3270	2962	2918	2443	2615	2890	2651	2094	3739
R2	2922	3039	3833	3011	3141	3147	2481	2652	2936	2796	3316	2565
R3	3087	3330	2847	2877	2904	2686	2241	2110	2849	2692	2820	2952
R4	2978	2945	2872	2646	3104	2876	2935	2946	2373	2685	2481	2836
R5	3244	2958	3549	3106	3517	3008	2307	1747	2728	2947	2224	2385
平均值	3082	3140	3332	2982	3126	2926	2482	2414	2755	2754	2587	2895

集合的 SEM=105

對比：Ba對Gi， $P<0.01$ 。

## 飼料攝取，整體的 (克 / 天)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	2977	3149	3314	2870	2784	2726	2302	2330	2670	2370	2151	3175
R2	2770	2849	3476	2842	2878	3048	2454	2368	2745	2568	2853	2280
R3	2794	3030	2663	2699	2794	2462	2197	2073	2661	2479	2571	2603
R4	2683	2632	2599	2432	2790	2488	2597	2655	2188	2463	2391	2583
R5	2963	2644	3089	2718	3118	2696	2184	1559	2591	2654	1993	2171
平均值	2837	2861	3028	2712	2873	2684	2347	2197	2571	2507	2378	2562

集合的 SEM=81

對比：Ba對Gi， $P<0.01$ 。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與1相同+0.10%得自 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 的Pi
3. 與1相同+250FTU/公斤 r-AppA2植酸酶
4. 與1相同+500FTU/公斤 r-AppA2植酸酶
5. 與1相同+1,000FTU/公斤 r-AppA2植酸酶
6. 與1相同+10,000FTU/公斤 r-AppA2植酸酶

增重/飼料，開始-轉變(克/公斤)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	383	425	418	410	421	431	379	412	427	439	411	412
R2	391	443	460	440	474	442	357	467	420	424	447	473
R3	430	465	448	474	427	498	388	396	400	431	437	464
R4	432	434	405	418	430	504	390	420	441	468	409	430
R5	349	425	370	382	411	416	473	675	402	469	599	492
平均值	397	438	420	425	433	458	397	474	418	446	461	454

集合的 SEM=12

對比：1對2-6， $P<0.01$ ；3對4-6， $P<0.10$ 。

## 增重 / 飼料，轉變 - 最終 (克 / 公斤)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	262	286	265	313	289	281	289	304	292	326	289	293
R2	305	329	306	273	319	265	277	329	285	297	294	306
R3	298	304	307	309	262	363	243	281	291	330	309	321
R4	311	329	290	315	307	353	304	290	363	337	240	304
R5	281	303	287	269	290	287	230	285	213	271	281	242
平均值	291	310	291	296	293	310	269	298	289	312	283	293

集合的 SEM=8

## 增重 / 飼料，整體的 (克 / 公斤)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	305	334	320	344	337	335	330	349	352	374	350	340
R2	336	370	358	334	372	332	316	388	345	353	355	376
R3	337	352	351	362	318	403	301	327	331	366	354	368
R4	363	381	339	361	360	414	333	334	391	383	305	348
R5	311	355	321	316	341	342	322	418	285	340	382	330
平均值	331	358	338	343	346	365	320	363	341	363	349	352

集合的 SEM=8

對比：1對2-6， $P < 0.01$ 。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與 1 相同 +0.10% 得自  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的 Pi
3. 與 1 相同 +250FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
4. 與 1 相同 +500FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
5. 與 1 相同 +1,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶
6. 與 1 相同 +10,000FTU/公斤 r-AppA2 植酸酶

腓骨乾重(克)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	8.18	10.90	11.45	12.11	10.08	12.08	7.54	10.95	9.92	9.42	9.87	11.29
R2	8.84	11.74	8.66	10.98	11.21	11.66	7.96	8.81	9.33	11.41	10.70	12.73
R3	8.54	11.29	9.81	11.90	10.10	12.77	8.62	10.25	9.94	10.50	11.86	12.46
R4	9.82	10.69	9.06	10.22	11.05	12.40	8.26	11.61	9.67	10.92	10.91	10.49
R5	7.88	8.88	10.33	10.51	12.01	11.26	7.68	9.51	11.16	11.48	10.10	11.44
平均值	8.65	10.70	9.86	11.14	10.89	12.03	8.01	10.23	10.00	10.75	10.69	11.68

集合的 SEM=0.27

對比：1對2-6， $P<0.01$ ；3對4-6， $P<0.01$ 。

腓骨灰分重量(克)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	4.37	6.32	6.34	6.90	6.03	6.94	4.06	6.42	5.21	5.33	5.61	6.78
R2	4.26	7.05	5.12	6.49	6.24	6.80	4.36	5.18	5.51	6.25	6.21	7.16
R3	4.51	6.54	5.78	7.17	5.81	7.49	4.35	5.91	6.11	5.79	6.93	7.23
R4	5.34	6.35	5.19	5.90	6.73	7.33	4.28	7.13	5.66	6.35	6.56	6.22
R5	4.37	5.22	6.02	6.34	7.06	6.64	3.91	5.64	7.02	6.25	5.88	6.93
平均值	4.57	6.30	5.69	6.56	6.37	7.04	4.19	6.06	5.90	5.99	6.24	6.86

集合的 SEM=0.17

對比：Ba對Gi， $P<0.1$ ；1對2-6， $P<0.01$ ；3對4-6， $P<0.01$ ；4對5-6， $P<0.01$ ；5對6， $P<0.01$ 。

腓骨灰分百分比(%)

R	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	53.42	57.98	55.37	56.98	59.82	57.45	53.85	58.63	52.52	56.58	56.84	60.05
R2	48.19	60.05	59.12	59.11	55.66	58.32	54.77	58.80	59.06	54.78	58.04	56.25
R3	52.81	57.93	58.92	60.25	57.52	58.65	50.46	57.66	61.47	55.14	58.43	58.03
R4	54.38	59.40	57.28	57.73	60.90	59.11	51.82	61.41	58.53	58.15	60.13	59.29
R5	55.46	58.78	58.28	60.32	58.78	58.97	50.91	59.31	62.90	54.44	58.22	60.58
平均值	52.85	58.83	57.79	58.88	58.54	58.50	52.36	59.16	58.90	55.82	58.33	58.84

集合的 SEM=0.65

對比：1對2-6， $P<0.01$ 。

處理：

1. P-不充分的玉米-大豆粗粉基礎飲食
2. 與1相同+0.10%得自 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 的Pi
3. 與1相同+250FTU/公斤 r-AppA2植酸酶
4. 與1相同+500FTU/公斤 r-AppA2植酸酶
5. 與1相同+1,000FTU/公斤 r-AppA2植酸酶
6. 與1相同+10,000FTU/公斤 r-AppA2植酸酶

聽骨乾重(克)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	11.42	14.03	15.84	15.36	14.43	13.85	11.77	15.90	16.00	15.48	12.65	15.05
R2	11.89	14.52	13.27	14.26	13.73	15.06	11.66	13.74	14.14	14.19	13.75	14.87
R3	14.01	14.45	13.20	13.99	14.91	17.43	10.52	12.20	11.95	16.31	17.53	17.13
R4	12.25	14.38	12.54	15.99	15.26	17.01	11.68	13.49	13.16	14.20	12.77	14.23
R5	12.55	13.03	14.30	14.36	17.79	14.29	11.26	12.76	12.47	16.93	12.78	13.10
平均值	12.42	14.14	13.83	14.79	15.22	15.53	11.38	13.62	13.54	15.42	13.90	14.88

集合的SEM=0.44

對比：1對2-6， $P < 0.01$ ；3對4-6， $P < 0.05$ 。

蹄骨灰分重量(克)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	5.28	6.59	7.97	6.93	6.74	6.86	4.74	7.21	6.72	7.09	6.07	7.50
R2	6.81	7.10	5.94	6.74	6.32	7.44	4.84	6.28	6.40	6.55	6.71	7.07
R3	4.82	6.95	6.41	6.77	6.72	7.88	4.82	5.59	6.67	6.99	8.13	8.11
R4	4.83	6.81	6.26	7.73	7.88	7.48	4.86	7.27	5.92	7.15	6.97	7.13
R5	5.20	5.75	7.22	6.99	8.33	7.14	5.24	6.61	6.65	7.07	6.04	6.55
平均值	5.39	6.64	6.76	7.03	7.20	7.36	4.90	6.59	6.47	6.97	6.78	7.27

集合的 SEM=0.18

對比：1對2-6， $P<0.01$ ；3對4-6， $P<0.05$ 。

蹄骨灰分百分比(%)

	閹豬						新母豬					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
R1	46.25	46.99	50.31	45.15	46.75	49.56	40.22	45.37	42.01	45.80	47.96	49.84
R2	39.90	48.90	44.75	47.16	46.02	49.39	41.50	45.72	45.27	46.18	48.80	47.55
R3	34.38	48.12	48.59	48.36	45.09	45.18	45.84	45.78	55.84	42.87	46.39	47.35
R4	39.44	47.27	49.89	48.35	51.65	43.98	41.63	53.93	44.97	50.32	54.59	50.11
R5	41.44	43.26	50.50	48.69	46.81	49.95	46.50	51.82	53.33	41.74	47.28	50.00
平均值	40.28	46.91	48.81	47.54	47.26	47.61	43.14	48.52	48.28	45.38	49.00	48.97

集合的 SEM=1.05

對比：1對2-6， $P<0.01$ 。

## 實例 14

以酵母菌表現之植酸酶餵飼豬，在活體內的影響

按照在實例 8 中描述的程序，除了處理組如下：

28-天的期間

1. 基礎 -.08% 可利用之磷
2. 基礎 +.05 磷，獲自磷酸單鈉
3. 基礎 +.10 磷，獲自磷酸單鈉
4. 基礎 +.15 磷，獲自磷酸單鈉
5. 基礎 +250 FTU/公斤實驗的植酸酶產物
6. 基礎 +500 FTU/公斤實驗的植酸酶產物
7. 基礎 +1,000 FTU/公斤實驗的植酸酶產物
8. 基礎 +2,000 FTU/公斤實驗的植酸酶產物
9. 基礎 +Natuphos® 500 FTU/公斤

在下表中出示該結果。結果顯示 AppA2 增加了骨質量和礦物質內含量，並像磷酸一樣改善了增重/飼料比例。

植酸酶補充對豬生長效率和骨骼灰分的影響<sup>a</sup>

添加 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}^{\text{h}}$	0.00	0.05	0.10	0.15	250	500	1,000	2,000	500 BASF	S.E.
植酸酶單位/克 <sup>c</sup>										
每日增重，公斤 <sup>ij</sup>	0.35 <sup>g</sup>	0.39 <sup>fg</sup>	0.46 <sup>de</sup>	0.49 <sup>d</sup>	0.38 <sup>g</sup>	0.42 <sup>el</sup>	0.47 <sup>d</sup>	0.49 <sup>d</sup>	0.42 <sup>l</sup>	0.01
每日飼料，公斤 <sup>ij</sup>	0.75 <sup>f</sup>	0.75 <sup>f</sup>	0.81 <sup>def</sup>	0.85 <sup>d</sup>	0.77 <sup>ef</sup>	0.79 <sup>def</sup>	0.83 <sup>def</sup>	0.85 <sup>d</sup>	0.85 <sup>de</sup>	0.07
增重：飼料 <sup>ijk</sup>	0.48 <sup>f</sup>	0.53 <sup>de</sup>	0.57 <sup>d</sup>	0.58 <sup>d</sup>	0.50 <sup>ef</sup>	0.54 <sup>de</sup>	0.57 <sup>d</sup>	0.57 <sup>d</sup>	0.49 <sup>ef</sup>	0.02
腓骨灰分，克 <sup>ij</sup>	0.57 <sup>f</sup>	0.65 <sup>gh</sup>	0.77 <sup>f</sup>	0.88 <sup>c</sup>	0.59 <sup>h</sup>	0.72 <sup>f</sup>	0.85 <sup>e</sup>	0.97 <sup>d</sup>	0.70 <sup>fg</sup>	0.03
腓骨灰分，% <sup>ij</sup>	34.6 <sup>h</sup>	36.0 <sup>gh</sup>	37.8 <sup>g</sup>	41.5 <sup>de</sup>	33.9 <sup>h</sup>	38.2 <sup>fg</sup>	40.4 <sup>ef</sup>	42.6 <sup>d</sup>	38.5 <sup>f</sup>	0.84
可和利的 P% <sup>l</sup>	18.43 <sup>g</sup>	----	----	----	22.56 <sup>g</sup>	38.31 <sup>f</sup>	53.56 <sup>e</sup>	66.71 <sup>d</sup>	34.47 <sup>f</sup>	4.07
aP 攝取，克/天 <sup>ijl</sup>	0.58 <sup>g</sup>	0.92 <sup>g</sup>	1.45 <sup>f</sup>	1.92 <sup>c</sup>	0.68 <sup>g</sup>	1.22 <sup>f</sup>	1.81 <sup>e</sup>	2.31 <sup>d</sup>	1.17 <sup>f</sup>	0.13
補充的 aP 攝取，克/天 <sup>ijm</sup>	0.02 <sup>h</sup>	0.34 <sup>gh</sup>	0.84 <sup>f</sup>	1.27 <sup>c</sup>	0.12 <sup>h</sup>	0.62 <sup>fg</sup>	1.17 <sup>e</sup>	1.64 <sup>d</sup>	0.57 <sup>fg</sup>	0.13

<sup>a</sup>為了完成數據，每個圍欄 2 隻豬重覆 6 次；針對骨骼數據，每個圍欄 2 隻豬重覆 6 次，除了添加植酸酶至 500 單位/克

的處理組之外，其具有5次重覆。

<sup>b</sup>在基礎飲食中加入得自磷酸單鈉 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) 的 P。

<sup>c</sup>在基礎飲食中加入補充的植酸酶。

<sup>defgh</sup>在行列中的平均值沒有共同的肩上數字差異 ( $P < 0.05$ )。

<sup>i</sup>加入得自磷酸單鈉之 P 的線性影響 ( $P < 0.001$ )。

<sup>j</sup>補充之植酸酶的線性影響 ( $P < 0.001$ )。

<sup>k</sup>UF植酸酶對 BASF植酸酶 ( $P < 0.07$ )。

<sup>l</sup>假定在玉米、大豆粗粉和磷酸單鈉中的 P 分別為 11.25，且 100% 是可利用的。

<sup>m</sup>假定在磷酸單鈉中的 P 是 100% 可利用的。

#### 實例 15

##### 以酵母菌表現之植酸酶餵飼雞和豬，在活體內的影響

在下表中概述的研究程序，按照在實例 8 中的描述。在每個表中顯示處理組，並在下表中顯示基礎飲食組成 (參見下一頁)。結果顯示 AppA2 (ECP) 在改善增重/飼料比例，以及增加骨質量和礦物質內含量方面，是像磷酸一樣有效的。結果亦顯示 AppA2 在增加生物可利用之磷酸上，比 Natuphos® 和 Ronozyme® 更有效。此外，結果尚顯示 AppA2 在產蛋母雞中，像磷酸一樣有效地增加了蛋重量和蛋產量。

表 1. 飲食的組成% (作為飼料基礎)

成分	肥育豬測定				
	雞測定	幼豬 測定	50-80 公斤	80-12 0公斤	產蛋母 雞測定
玉米澱粉	至100	至100	至100	至100	-
玉米	50.89	60.85	78.42	83.85	63.65
大豆粗粉，脫殼的	39.69	31.19	18.08	12.65	25.65
大豆油	5.00	3.00	-	-	-
石灰石，磨碎的	1.67	1.06	1.06	1.07	9.80
鹽	0.40	-	-	-	0.40
磷酸二鈣	-	-	0.16	-	-
微量礦物質預混物	0.15 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.20 <sup>a</sup>
維生素預混物	0.20 <sup>c</sup>	0.20 <sup>d</sup>	0.10 <sup>d</sup>	0.10 <sup>d</sup>	0.15 <sup>c</sup>
膽鹼鹽酸鹽(60%)	0.20	-	-	-	0.05
抗生素預混物	0.05 <sup>e</sup>	1.00 <sup>f</sup>	0.75 <sup>g</sup>	0.75 <sup>g</sup>	-
硫酸銅	-	0.08	-	-	-
L-離胺酸HCl，飼料級	-	0.17	0.16	0.11	-
L-蘇胺酸，飼料級	-	-	0.02	-	-
DL-甲硫胺酸，飼料級	0.20	0.05	-	-	0.10
化學組成					
粗蛋白% <sup>h</sup>	22.6	20.8	15.1	13.0	17.0
總共的磷% <sup>h</sup>	0.42	0.35	0.38	0.32	0.34
可利用的磷% <sup>i</sup>	0.10	0.075	0.09	0.05	0.07
鈣% <sup>i</sup>	0.75	0.60	0.50	0.45	3.8
ME，千卡/公斤 <sup>j</sup>	3123	3387	3293	3295	2758

- <sup>a</sup> 每公斤完全飲食補充下列的：Fe，75毫克 ( $\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$ )；Zn，100毫克 ( $\text{ZnO}$ )；Mn，75毫克 ( $\text{MnO}$ )；Cu，8毫克 ( $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ )；I，0.35毫克 ( $\text{CaI}_2$ )；Se，0.3毫克 ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )；NaCl，3克。
- <sup>b</sup> 每公斤完全飲食補充下列的：Fe，90毫克 ( $\text{FeSO}_4\text{H}_2\text{O}$ )；Zn，100毫克 ( $\text{ZnO}$ )；Mn，20毫克 ( $\text{MnO}$ )；Cu，8毫克 ( $\text{CuSO}_4\text{H}_2\text{O}$ )；I，0.35毫克 ( $\text{CaI}_2$ )；Se，0.3毫克 ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ )；NaCl，3克。
- <sup>c</sup> 每公斤完全飲食補充下列的：視黃基乙酸酯，1,514微克；膽鈣化甾醇，25微克；DL- $\alpha$ -生育乙酸酯，11毫克；甲基萘醌亞硫酸氫鈉複合物，2.3毫克；菸酸，22毫克；D-Ca-泛酸，10毫克；核黃素，4.4毫克；維生素B<sub>12</sub>，11微克。
- <sup>d</sup> 每公斤完全飲食補充下列的：視黃基乙酸酯，2,273微克；膽鈣化甾醇，16.5微克；DL- $\alpha$ -生育乙酸酯，88毫克；甲基萘醌，4.4毫克(甲基萘醌亞硫酸氫鈉複合物)；菸酸，33毫克；D-Ca-泛酸，24.2毫克；核黃素，8.8毫克；維生素B<sub>12</sub>，35微克；膽鹼鹽酸鹽，319毫克。
- <sup>e</sup> 每公斤完全飼料提供50毫克桿菌肽。
- <sup>f</sup> 每公斤完全飼料提供55毫克美卡多士(mecadox)。
- <sup>g</sup> 每公斤完全飼料提供38毫克羅沙腫(roxarsone)。
- <sup>h</sup> 分析(AOAC, 1999)。
- <sup>i</sup> 計算(NRC, 1994; NRC, 1998)。

表 2. 在受到兩種不同植酸酶酵素影響的雞中，評估相對的磷生物利用性(雞測定 1)<sup>a</sup>

飲食	增重 ，克	增重/飼料 ，克/公斤	脛骨灰分 %	毫克	生物可利 用的P%
1. 基礎飲食	259 <sup>e</sup>	617 <sup>d</sup>	28.1 <sup>f</sup>	264 <sup>f</sup>	-
2. 與1相同 + 0.05% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	290 <sup>d</sup>	654 <sup>c</sup>	32.2 <sup>d</sup>	311 <sup>e</sup>	-
3. 與1相同 + 0.10% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	323 <sup>c</sup>	639 <sup>cd</sup>	36.4 <sup>c</sup>	414 <sup>d</sup>	-
4. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Natuphos®	289 <sup>d</sup>	666 <sup>c</sup>	30.0 <sup>c</sup>	293 <sup>c</sup>	0.027 <sup>d</sup>
5. 與1相同 + 500 FTU/公斤 ECP	336 <sup>e</sup>	656 <sup>c</sup>	37.8 <sup>c</sup>	448 <sup>c</sup>	0.124 <sup>c</sup>
集合的SEM	6	10	0.5	10	0.006

<sup>a</sup> 值為 5 個圍欄各 4 隻公雞，在孵化後 8 至 22 天的期間內，餵飼實驗飲食的平均值；平均開始體重為 91 克。

<sup>b</sup> 為補充之 P 攝取(克)的函數，飲食 1 至 3 之脛骨灰分(毫克)的線性回歸是  $Y = 257.1 \pm 9.8 + 299.0 \pm 30.7X$  ( $r^2 = 0.88$ )。藉著從標準曲線來計算相等的生物可利用之 P 攝取(克)，除以飼料攝取(克)，再乘以 100，判定飲食 4 和 5 的生物可利用之 P 濃度(相等的 P 產量)。

<sup>cdef</sup> 在欄位內具有不同之肩上數字的平均值是有差異的， $P < 0.05$ 。

表 3. 在餵飼不同之植酸酶酵素的雞中，相對的磷生物利用性(雞測定 2)<sup>a</sup>

飲食	增重 ，克	增重/飼料 ，克/公斤	脛骨灰分		生物可利 用的P%
			%	毫克	
1. 基礎飲食	176 <sup>k</sup>	569 <sup>k</sup>	24.9 <sup>k</sup>	183 <sup>k</sup>	-
2. 與1相同 + 0.05% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	253 <sup>hi</sup>	680 <sup>h</sup>	30.0 <sup>h</sup>	272 <sup>h</sup>	-
3. 與1相同 + 0.10% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	293 <sup>g</sup>	703 <sup>fgh</sup>	34.3 <sup>g</sup>	347 <sup>g</sup>	-
4. 與1相同 + 0.15% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	333 <sup>f</sup>	731 <sup>ef</sup>	37.3 <sup>e</sup>	455 <sup>e</sup>	-
5. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Natuphos <sup>®c</sup>	218 <sup>j</sup>	620 <sup>j</sup>	27.2 <sup>j</sup>	224 <sup>j</sup>	0.026 <sup>g</sup>
6. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Natuphos <sup>®d</sup>	236 <sup>ij</sup>	632 <sup>j</sup>	27.5 <sup>ij</sup>	236 <sup>ij</sup>	0.032 <sup>fg</sup>
7. 與1相同 + 1,000 FTU/公斤 Natuphos <sup>®d</sup>	265 <sup>i</sup>	675 <sup>gh</sup>	28.9 <sup>hi</sup>	262 <sup>hi</sup>	0.048 <sup>f</sup>
8. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Ronozyme <sup>®</sup>	219 <sup>j</sup>	634 <sup>j</sup>	26.9 <sup>j</sup>	223 <sup>j</sup>	0.028 <sup>g</sup>
9. 與1相同 + 1,000 FTU/公斤 Ronozyme <sup>®</sup>	245 <sup>i</sup>	682 <sup>gh</sup>	27.5 <sup>ij</sup>	242 <sup>hij</sup>	0.038 <sup>fg</sup>
10. 與1相同 + 500 FTU/公斤 ECP	318 <sup>ef</sup>	708 <sup>fgh</sup>	36.5 <sup>ef</sup>	409 <sup>f</sup>	0.125 <sup>e</sup>
集合的SEM	7	10	0.6	12	0.006

<sup>a</sup> 值為 5 個圍欄各 4 隻公雞，在孵化後 8 至 22 天的期間內，餵飼實驗飲食的平均值；平均開始體重為 83 克。

<sup>b</sup> 為補充之 P 攝取(克)的函數，飲食 1 至 4 之脛骨灰分(毫克)的線性回歸是  $Y = 187.9 \pm 8.7 + 393.4 \pm 21.2X$  ( $r^2 = 0.95$ )；藉著從標準曲線來計算相等的生物可利用之 P 攝取(克)，除以圍欄的飼料攝取(克)，再乘以 100，判定飲食 4-11 的生物可利用之 P 濃度(相等的 P 產量)。

<sup>c</sup> 酵素係得自與雞測定 1 所使用的相同的一批。

<sup>d</sup> 酵素係得自與雞測定 1 所使用的不同的一批。

<sup>efghijk</sup> 在欄位內具有不同之肩上數字的平均值是有差異的， $P < 0.05$ 。

表 4. 在雞中，活性含量對大腸桿菌植酸酶之磷-釋放效率的影響 (雞測定 3)<sup>a</sup>

飲食	增重 ，克	增重/飼料 ，克/公斤	脛骨灰分	生物可利用的P% <sup>b</sup>
			毫克	
1. 基礎飲食	219 <sup>h</sup>	661 <sup>c</sup>	237 <sup>i</sup>	-
2. 與1相同 + 0.05% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	283 <sup>fg</sup>	692 <sup>d</sup>	299 <sup>h</sup>	-
3. 與1相同 + 0.10% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	314 <sup>c</sup>	720 <sup>c</sup>	413 <sup>g</sup>	-
4. 與1相同 + 0.15% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	327 <sup>dc</sup>	731 <sup>c</sup>	490 <sup>e</sup>	-
5. 與1相同 + 500 FTU/公斤 ECP	321 <sup>dc</sup>	731 <sup>c</sup>	447 <sup>f</sup>	0.125 <sup>c</sup>
6. 與1相同 + 1,000 FTU/公斤 ECP	335 <sup>cd</sup>	732 <sup>c</sup>	559 <sup>f</sup>	0.183 <sup>d</sup>
7. 與1相同 + 1,500 FTU/公斤 ECP	344 <sup>c</sup>	737 <sup>c</sup>	616 <sup>c</sup>	0.211 <sup>c</sup>
8. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Natuphos®	276 <sup>g</sup>	691 <sup>d</sup>	290 <sup>h</sup>	0.037 <sup>f</sup>
集合的SEM	6	10	12	0.005

<sup>a</sup> 值為 5 個圍欄各 4 隻公雞，在孵化後 8 至 22 天的期間內，餵飼實驗飲食的平均值；平均開始體重為 97 克。

<sup>b</sup> 為補充之 P 攝取 (克) 的函數，飲食 1 至 4 之脛骨灰分 (毫克) 的線性回歸是  $Y = 232.0 \pm 6.9 + 389.9 \pm 16.7X$  ( $r^2 = 0.97$ )；藉著從標準曲線來計算相等的生物可利用之 P 攝取 (克)，除以圍欄的飼料攝取 (克) 再乘以 100，判定飲食 5 至 8 的生物可利用之 P 濃度 (相等的 P 產量)。

<sup>cdefghi</sup> 在欄位內具有不同之肩上數字的平均值是有差異的， $P < 0.05$ 。

表 5. 混合 3-和 6-植酸酶，在餵食玉米-大豆粗粉飲食的雞中，對於 Pi-釋放並未產生協同的效果 (雞測定 4)<sup>a</sup>

飲食	增重 ，克	增重/飼料 ，克/公斤	脛骨灰分		生物可利 用的P%
			%	毫克	
1. 基礎飲食	137 <sup>g</sup>	610 <sup>g</sup>	25.4 <sup>g</sup>	134 <sup>h</sup>	-
2. 與1相同 + 0.05% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	191 <sup>ef</sup>	678 <sup>dc</sup>	29.0 <sup>f</sup>	198 <sup>fg</sup>	-
3. 與1相同 + 0.10% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	225 <sup>d</sup>	712 <sup>d</sup>	32.8 <sup>e</sup>	253 <sup>e</sup>	-
4. 與1相同 + 0.15% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	276 <sup>c</sup>	762 <sup>c</sup>	36.3 <sup>d</sup>	339 <sup>d</sup>	-
5. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Natuphos®	192 <sup>ef</sup>	624 <sup>fg</sup>	28.0 <sup>f</sup>	187 <sup>g</sup>	0.041 <sup>g</sup>
6. 與1相同 + 500 FTU/公斤 Ronozyme®	182 <sup>f</sup>	655 <sup>cf</sup>	27.7 <sup>f</sup>	188 <sup>g</sup>	0.047 <sup>fg</sup>
7. 與1相同 + 500 FTU/公斤 ECP	272 <sup>c</sup>	760 <sup>c</sup>	37.0 <sup>d</sup>	343 <sup>d</sup>	0.153 <sup>d</sup>
8. 與5 + 6相同	211 <sup>de</sup>	693 <sup>de</sup>	28.3 <sup>f</sup>	212 <sup>fg</sup>	0.064 <sup>ef</sup>
9. 與5 + 7相同	282 <sup>c</sup>	763 <sup>c</sup>	37.8 <sup>d</sup>	360 <sup>d</sup>	0.162 <sup>d</sup>
10. 與1相同 + 1,000 FTU/公斤 Natuphos®	217 <sup>d</sup>	703 <sup>d</sup>	29.0 <sup>f</sup>	217 <sup>f</sup>	0.067 <sup>c</sup>
11. 與1相同 + 1,000 FTU/公斤 Ronozyme®	201 <sup>def</sup>	666 <sup>ef</sup>	27.9 <sup>f</sup>	194 <sup>fg</sup>	0.050 <sup>efg</sup>
12. 與1相同 + 1,000 FTU/公斤 ECP	292 <sup>c</sup>	758 <sup>c</sup>	41.1 <sup>c</sup>	433 <sup>c</sup>	0.206 <sup>c</sup>
集合的SEM	9	15	0.6	10	0.007

<sup>a</sup>值為 5 個圍欄各 4 隻公雞，在孵化後 8 至 22 天的期間內，餵飼實驗飲食的平均值；平均開始體重為 68 克。

<sup>b</sup>為補充之 P 攝取 (克) 的函數，飲食 1 至 4 之脛骨灰分 (毫克) 的線性回歸是  $Y = 138.6 \pm 4.9 + 371.3 \pm 14.7X$  ( $r^2 = 0.97$ )；藉著從標準曲線來計算相等的生物可利用之 P 攝取 (克)，除以圍欄的飼料攝取 (克)，再乘以 100，判定飲食 5 至 8 的生物可利用之 P 濃度 (相等的 P 產量)。

<sup>cdefg</sup>在欄位內具有不同之肩數字之平均值是有差異的， $P < 0.05$ 。

表 7. 從 1-4 週，大腸桿菌植酸酶對產蛋母雞之效率的影響<sup>a</sup>

飲食	開始的母雞 體重，克	4週母雞 體重，克	飼料攝取 ，克/天	蛋產 量% <sup>b</sup>	蛋重 量，克
1. P-不充分的基礎飲食	1716	1593	90	54.0	61.0
2. 與1相同 + 0.10% Pi	1725	1748	122	84.8	64.2
3. 與1相同 + 150 FTU/公斤ECP	1733	1771	119	83.7	63.8
4. 與1相同 + 300 FTU/公斤ECP	1798	1806	119	82.3	65.4
5. 與1相同 + 10,000 FTU/公斤ECP	1746	1770	123	85.9	65.1
集合的SEM	26	21 <sup>c</sup>	2 <sup>c</sup>	1.6 <sup>c</sup>	0.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 數據為在研究期間的前4週，12隻母雞4次重覆的平均值。

<sup>b</sup> 使用共變數分析分析蛋產量(%)；以最小二乘方平均值提供數據。

<sup>c</sup> 飲食 1 對 飲食 2-5， $P < 0.01$ 。

表 8. 5-12 週，大腸桿菌植酸酶對產蛋母雞之效率的影響<sup>a</sup>

飲食	4週母雞 體重，克	飼料攝 取，克/天	蛋產 量% <sup>b</sup>	蛋重 量，克
2. 與1相同 + 0.10% Pi	1830	120	80.5	64.0
3. 與1相同 + 150 FTU/公斤ECP	1796	118	80.6	64.1
4. 與1相同 + 300 FTU/公斤ECP	1833	116	77.2	65.5
5. 與1相同 + 10,000 FTU/公斤ECP	1830	120	81.2	64.8
集合的SEM	24	2	2.5	0.5 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 數據為在研究期間的 5 至 12 週，12 隻母雞 4 次重覆的平均值。從研究中移除飲食 1，因為不佳的蛋產量。

<sup>b</sup> 使用共變數分析分析蛋產量(%)；以最小二乘方平均值提供數據。

<sup>c</sup> 飲食 3 對 飲食 4 和 5， $P < 0.01$ 。

表 9. 1-12週，大腸桿菌植酸酶對產蛋母雞之效率的影響<sup>a</sup>

飲食	母雞重量			飼料攝取 ，克/天	蛋產 量，% <sup>b</sup>	蛋重 量，克
	開始	4-週	12-週			
1. P-不充分的基礎飲食	1716	1593	-	90	53.8	61.0
2. 與1相同 + 0.10% PI	1725	1748	1830	121	81.2	64.1
3. 與1相同 + 150 FTU/公斤ECP	1733	1771	1796	118	80.7	64.1
4. 與1相同 + 300 FTU/公斤ECP	1798	1806	1833	117	77.8	65.5
5. 與1相同 + 10,000 FTU/公斤ECP	1746	1770	1830	121	82.9	64.8
集合的SEM	26	21 <sup>c</sup>	24	2 <sup>c</sup>	2.1 <sup>c</sup>	0.7 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> 據為 12 隻母雞 4 次重覆的平均值。對飲食 1 而言，數據為前 4 週的平均值，但對飲食 2-5 而言，為總共 12 週。

<sup>b</sup> 用共變數分析分析蛋產量 (%)；以最小二乘方平均值提供數據。

<sup>c</sup> 飲食 1 對飲食 2-5， $P < 0.01$ 。

表 10. 餵飼不同植酸酶酵素的幼豬中，磷的相對生物利用性 (豬測定 1)

飲食	增重 ，克	增重/飼料 ，克/公斤	脛骨灰分		生物可利 用的P%
			%	毫克	
1. 基礎飲食	369 <sup>f</sup>	533 <sup>f</sup>	29.3 <sup>g</sup>	666 <sup>i</sup>	-
2. 與1相同 + 0.05% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	435 <sup>e</sup>	576 <sup>ef</sup>	32.8 <sup>f</sup>	766 <sup>hi</sup>	-
3. 與1相同 + 0.10% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	476 <sup>de</sup>	618 <sup>de</sup>	36.6 <sup>d</sup>	972 <sup>ef</sup>	-
4. 與1相同 + 0.15% P <sub>i</sub> (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	509 <sup>d</sup>	660 <sup>d</sup>	36.6 <sup>d</sup>	1123 <sup>d</sup>	-
5. 與1相同 + 400 FTU/公斤 Natuphos®	460 <sup>c</sup>	605 <sup>de</sup>	34.4 <sup>def</sup>	889 <sup>fg</sup>	0.081 <sup>dc</sup>
6. 與1相同 + 400 FTU/公斤 Ronozyme®	445 <sup>e</sup>	565 <sup>ef</sup>	33.5 <sup>ef</sup>	805 <sup>gh</sup>	0.043 <sup>f</sup>
7. 與1相同 + 400 FTU/公斤 ECP	443 <sup>e</sup>	583 <sup>ef</sup>	35.0 <sup>def</sup>	968 <sup>ef</sup>	0.108 <sup>d</sup>
集合的SEM	17	21	0.8	38	0.016

<sup>a</sup> 數據為在 23 天的餵飼期間內，10 隻各別餵飼之豬的平均值；平均開始體重為 8.4 公斤。

<sup>b</sup> 數據為在 23 天餵飼期間結束時，從中間-體重區中選出 5 隻各別餵飼之豬的平均值。

<sup>c</sup> 為補充之 P 攝取 (克) 的函數，飲食 1 至 4 之脛骨灰分 (毫克) 的線性回歸是  $Y = 664.5 \pm 25.5 + 15.3 \pm 1.4X$  ( $r^2 = 0.87$ )；藉著從標準曲線來計算相等的生物可利用之 P 攝取 (克)，除以豬的飼料攝取 (克)，再乘以 100，判定飲食 5 至 7 的生物可利用之 P 濃度 (相等的 P 產量)。

<sup>defghi</sup> 在欄位內具有不同之肩上數字的平均值是有差異的， $P < 0.05$ 。

表 11. 大腸桿菌植酸酶對肥育豬的生長效率之  
影響 (豬測定 2)<sup>a</sup>

反應變數	飲食處理						集合的 SEM
	P-不充分的基礎 飲食	與1相同+ 0.10% Pi	與1相同+ 250 FTU/ 公斤ECP	與1相同+ 500 FTU/ 公斤ECP	與1相同+ 1,000 FTU/ 公斤ECP	與1相同+ 10,000 FTU/ 公斤ECP	
每日的增重，克 <sup>b</sup>							
閹豬	935	1023	1023	929	993	974	
新母豬	752	790	872	909	828	902	
平均值	844	907	947	919	910	938	38
每日的飼料，克 <sup>c</sup>							
閹豬	2837	2861	3028	2712	2873	2684	
新母豬	2347	2197	2571	2507	2378	2562	
平均值	2592	2529	2800	2610	2625	2623	81
增重/飼料，克/公斤 <sup>d</sup>							
閹豬	331	358	338	343	346	365	
新母豬	320	363	341	363	349	352	
平均值	325	361	339	353	347	359	9

<sup>a</sup> 數據為從體重 48.9 至 117.6 公斤，餵飼實驗飲食之每種性別 5 隻，各別餵飼之豬的平均值。

<sup>b</sup> 性別 x 飲食的交互作用。P < 0.10；性別 x Pi 對補充植酸酶之飲食，P < 0.05

<sup>c</sup> 閹豬對新母豬，P < 0.01。

<sup>d</sup> P-不充分的對補充 Pi 和植酸酶的飲食，P < 0.01。

表 12. 大腸桿菌植酸酶對肥育豬的骨骼特徵  
之影響 (豬測定 2)

反應變數	飲食處理					
	P-不充分的 基礎飲食	與1相同+ 0.10% Pi	與1相同+ 250 FTU/公 斤ECP	與1相同+ 500 FTU/公 斤ECP	與1相同+ 1,000 FTU/ 公斤ECP	與1相同+ 10,000 FTU/ 公斤ECP
腓骨灰分, %克 <sup>b</sup>						
閹豬	52.9	58.8	57.8	58.9	58.5	58.5
新母豬	52.4	59.2	58.9	55.8	58.3	58.8
平均值	52.6	59.0	58.3	57.3	58.4	58.7
腓骨灰分, 克 <sup>bcdef</sup>						
閹豬	4.57	6.30	5.69	6.56	6.37	7.04
新母豬	4.19	6.06	5.90	5.99	6.24	6.86
平均值	4.38	6.18	5.80	6.28	6.31	6.95
蹠骨灰分, % <sup>b</sup>						
閹豬	40.3	46.9	48.8	47.5	47.3	47.6
新母豬	43.1	48.5	48.3	45.4	49.0	49.0
平均值	41.7	47.7	48.5	46.5	48.1	48.3
蹠骨灰分, 克 <sup>bd</sup>						
閹豬	5.4	6.6	6.8	7.0	7.2	7.4
新母豬	4.9	6.6	6.5	7.0	6.8	7.3
平均值	5.1	6.6	6.6	7.0	7.0	7.3

<sup>a</sup> 數據為從體重 48.9 至 117.6 公斤，餵飼實驗飲食之每種性別 5 隻，各別餵飼之豬的平均值。

<sup>b</sup> P-不充分的對補充 Pi 和植酸酶的飲食， $P < 0.01$ 。

<sup>c</sup> 閹豬對新母豬， $P < 0.10$ 。

<sup>d</sup> 250 單位/公斤對較高的植酸酶活性含量， $P < 0.01$ 。

<sup>e</sup> 500 單位/公斤對 1,000 和 10,000 單位/公斤植酸酶， $P < 0.10$ 。

<sup>f</sup> 1,000 單位/公斤對 10,000 單位/公斤植酸酶， $P < 0.01$ 。

## 肆、中文發明摘要

本發明係描述藉著餵飼與在酵母菌中表現之植酸酶混合的飼糧，來改善飼糧之營養價值的方法，該飼糧包括肌醇六價磷酸酯(hexakisphosphate)的來源。該方法包括將飼糧與在酵母菌中表現之植酸酶混合，來餵飼動物的步驟，其中該植酸酶可選自由 AppA1、AppA2，和 AppA 的指定位置突變種所組成之群。本發明亦能夠降低飼料對增重的比例，並增加動物的骨質量和礦物質內含量。亦描述包括 AppA2 或 AppA 之指定位置突變種的飼糧和飼料添加物。

## 伍、英文發明摘要

A method is described for improving the nutritional value of a foodstuff comprising a source of *myo*-inositol hexakisphosphate by feeding the foodstuff in combination with a phytase expressed in yeast. The method comprises the step of feeding the animal the foodstuff in combination with a phytase expressed in yeast wherein the phytase can be selected from the group consisting of AppA1, AppA2 and a site-directed mutant of AppA. The invention also enables reduction of the feed to weight gain ratio and an increase bone mass and mineral content of an animal. A foodstuff and a feed additive comprising AppA2 or a site-directed mutant of AppA are also described.

公告本

拾壹、圖式

		Pfl →																				
1	taadgacgaaaca	ATG	TGG	TAT	TTC	CTT	TGG	TTC	GTC	GGC	ATT	TTG	TTG	ATG	TGT	TCG	CTC	63				
1		M	W	Y	F	L	W	F	V	G	I	L	L	M	C	S	L	16				
64	TCC	ACC	CTT	GTG	TTG	GTA	TGG	CTG	GAC	CCG	CGA	TTG	AAA	AGT	TAAcgaa	cgtaagcctgatccgg	128					
17	S	T	L	V	L	V	W	L	D	P	R	L	K	S	*		31					
129	cgcattagcgtc	gatcaggcaataat	atcggatatca	aagcggaaac	atc	atg	aaa	gcg	atc	tta	atc	201										
1						M	K	A	I	L	I	6										
		E2 →																				
202	CCA	TTT	TTA	TCT	CTT	TTG	ATT	CCG	TTA	ACC	CCG	CRA	TCT	GCA	TTC	GCT	CAG	AGT	GAG	CCG	261	
7	P	F	L	S	L	L	I	P	L	T	P	Q	S	A	F	A	Q	S	E	P	26	
262	GAG	CTG	AAG	CTG	GAA	AGT	GTG	GTG	ATT	GTC	AGC	CGT	CAT	GGT	GTG	CGT	GCC	CCA	ACC	AAG	321	
27	E	L	K	L	E	S	V	V	I	V	S	R	H	G	V	R	A	P	T	K	46	
322	GCC	ACG	CAA	CTG	ATG	CAG	GAT	GTC	ACC	CCA	GAC	GCA	TGG	CCA	ACC	TGG	CCG	GTA	AAA	CTG	381	
47	A	T	Q	L	M	Q	D	V	T	P	D	A	W	P	T	W	P	V	K	L	66	
382	GGT	TGG	CTG	ACA	CCA	CGC	GGT	GGT	GAG	CTA	ATC	GCC	TAT	CTC	GGA	CAT	TAC	CAA	CGC	CAG	441	
67	G	W	L	T	P	R	G	G	E	L	I	A	Y	L	G	H	Y	Q	R	Q	86	
442	CGT	CTG	GTG	GCC	GAC	GGA	TTG	CTG	GCG	AAA	AAG	GGC	TGC	CCG	CAG	CCT	GGT	CAG	GTC	GCG	501	
87	R	L	V	A	D	G	L	L	A	K	K	G	C	P	Q	P	G	Q	V	A	106	
502	ATT	ATT	GCT	GAT	GTC	GAC	GAG	CGT	ACC	CGT	AAA	ACA	GGC	GAA	GCC	TTC	GCC	GCC	GGG	CTG	561	
107	I	I	A	D	V	D	E	R	T	R	K	T	G	E	A	F	A	A	G	L	126	
562	GCA	CCT	GAC	TGT	GCA	ATA	ACC	GTA	CAT	ACC	CAG	GCA	GAT	ACG	TCC	AGT	CCC	GAT	CCG	TTA	621	
127	A	P	D	C	A	I	T	V	H	T	Q	A	D	T	S	S	D	P	L	146		
622	TTT	AAT	CCT	CTA	AAA	ACT	GGC	GTT	TGC	CAA	CTG	GAT	AAC	GCG	AAC	GTG	ACT	GAC	GCG	ATC	681	
147	F	N	P	L	K	T	G	V	C	Q	L	D	N	A	Q	V	T	D	A	I	166	
682	CTC	AGC	AGG	GCA	GGA	GGG	TCA	ATT	GCT	GAC	TTT	ACC	GGG	CAT	CGG	CAA	ACG	GCG	TTT	CGC	741	
167	L	S	R	A	G	G	S	I	A	D	F	T	G	H	R	Q	T	A	F	R	186	
742	GAA	CTG	GAA	CGG	GTG	CTT	AAT	TTT	TCC	CAA	TTA	AAC	TTG	TGC	CIT	AAC	CGT	GAG	AAA	CAG	801	
187	E	L	E	R	V	L	N	F	S	Q	L	N	L	C	L	N	R	E	K	Q	206	
802	GAC	GAA	AGC	TGT	TCA	TTA	ACG	CAG	GCA	TTA	CCA	TCC	GAA	CTC	AAG	GTG	AGC	GCC	GAC	AAT	861	
207	D	E	S	C	S	L	T	Q	A	L	P	S	E	L	K	V	S	A	D	Q	226	
862	GTT	TCA	TTA	ACC	GGT	GCG	GTA	AGC	CTC	GCA	TCA	ATG	CTG	ACG	GAA	ATA	TTT	CTC	CTG	CAA	921	
227	V	S	L	T	G	A	V	S	L	A	S	M	L	T	E	I	F	L	L	Q	246	
922	CAA	GCA	CAG	GGA	ATG	CCG	GAG	CCG	GGG	TGG	GGA	AGG	ATC	ACT	GAT	TCA	CAC	CAG	TGG	AAC	981	
247	Q	A	Q	G	M	P	E	P	G	W	G	R	I	T	D	S	H	Q	W	N	266	
982	ACC	TTG	CTA	AGT	TTG	CAT	AAC	GCG	CAA	TTT	TAT	TTA	CTA	CAA	CGC	ACG	CCA	GAG	GTT	GCC	1041	
267	T	L	L	S	L	H	N	A	Q	F	Y	L	L	Q	R	T	P	E	V	A	286	
1042	CGC	AGT	CGC	GCC	ACC	CCG	TTA	TTG	GAT	TTG	ATC	ATG	GCA	GCG	TTG	ACG	CCC	CAT	CCA	CCG	1101	
287	R	S	R	A	T	P	L	L	D	L	I	H	A	A	L	T	P	H	P	P	306	
1102	CAA	AAA	CAG	GCG	TAT	GGT	GTG	ACA	TTA	CCC	ACT	TCA	GTG	CTG	TTT	ATT	GCC	GGA	CAC	GAT	1161	
307	Q	K	Q	A	Y	G	V	T	L	P	T	S	V	L	F	I	A	G	H	D	326	
1162	ACT	AAT	CTG	GCA	AAT	CTC	GGC	GGC	GCA	CTG	GAG	CTC	AAC	TGG	ACG	CTT	CCA	GGT	CAG	CCG	1221	
327	T	N	L	A	N	L	G	G	A	L	E	L	Q	W	T	L	P	G	Q	P	346	
1222	GAT	AAC	ACG	CCG	CCA	GGT	GGT	GAA	CTG	GTG	TTT	GAA	CGC	TGG	CGT	CCG	CTA	AGC	GAT	AAC	1281	
347	D	N	T	P	P	G	G	E	L	V	F	E	R	W	R	R	L	S	D	N	366	
1282	AGC	CAG	TGG	ATT	CAG	GTT	TGC	CTG	GTC	TTC	CAG	ACT	TTA	CAG	CAG	ATG	CGT	GAT	AAA	ACG	1341	
367	S	Q	W	I	Q	V	S	L	V	F	Q	T	L	Q	Q	M	R	D	K	T	386	
1342	CCG	CTA	TCA	TTA	AAT	ACG	CCG	CCC	GGA	GAG	GTG	AAA	CTG	ACC	CTG	GCA	GGA	TGT	GAA	GAG	1401	
387	P	L	S	L	N	T	P	P	G	E	V	K	L	T	L	A	G	C	E	E	406	
1402	CGA	AAT	GCG	CAG	GGC	ATG	TGT	TGC	TTG	GCC	GGT	TTT	ACG	CAA	ATC	GTG	AAT	GAA	GCG	CGC	1461	
407	R	N	A	Q	G	M	C	S	L	A	G	F	T	Q	I	V	N	E	A	R	426	
		← E2																				
1462	ATA	CCG	GCG	TGC	AGT	TTG	TAA	TGGTACCCC	1491													
427	I	P	A	C	S	L	*		433													

圖 1

序列識別 1 號

	Met	Lys	Ala	Ile	Leu	Ile	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro	Leu	Thr
	1				5					10					15	
15	Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser
				20					25					30		
	Val	Val	Ile	Val	Ser	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr
			35					40					45			
20	Gln	Leu	Met	Gln	Asp	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val
		50					55					60				
	Lys	Leu	Gly	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu
25	65					70					75					80
	Gly	His	Tyr	Gln	Arg	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
					85					90					95	
30	Lys	Gly	Cys	Pro	Gln	Pro	Gly	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Asp
				100					105					110		
	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Pro
			115					120					125			
35	Asp	Cys	Ala	Ile	Thr	Val	His	Thr	Gln	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp
			130				135					140				
	Pro	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala
40	145					150					155					160
	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp
				165						170					175	
45	Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu
				180					185					190		
	Asn	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	Leu	Asn	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asn	Glu
50			195					200					205			

圖 2A

序列識別 2 號

	Ser	Cys	Asn	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu	Lys	Val	Ser	Ala
	210					215						220				
5	Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr
	225					230					235					240
	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp
						245				250					255	
10	Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His
				260					265						270	
	Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
15	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His
	290						295					300				
	Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu
20	305					310					315					320
	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu
				325						330					335	
25	Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly
				340					345					350		
	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln
30	355							360					365			
	Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp
	370							375					380			
	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr
35	385					390					395					400
	Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala
				405						410						415
40	Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu
				420					425					430		

圖 2B

序列識別 2 號

1 taa gga gca gaa aca ATG TGG TAT TTA CTT TGG TTC GTC GGC ATT  
 10 46 TTG TTG ATG TGT TCG CTC TCC ACC CTT GTG TTG GTA TGG CTG GAC  
 91 CCG CGA TTG AAA AGT T aac gaa cgt agg cct gat gcg gcg cat  
 134 tag cat cgc atc agg caa tca ata atg tca gat atg aaa agc gga  
 15 179 aac ata tcg ATG AAA GCG ATC TTA ATC CCA TTT TTA TCT CTT CTG  
 224 AIT CCG TTA ACC CCG CAA TCT GCA TTC GCT CAG AGT GAG CCG GAG  
 20 269 CTG AAG CTG GAA AGT GTG GTG AIT GTC AGC CGT CAT GGT GTG CGT  
 314 GCC CCA ACC AAG GCC ACG CAA CTG ATG CAG GAT GTC ACC CCA GAC  
 359 GCA TGG CCA ACC TGG CCG GTA AAA CTG GGT TGG CTG ACA CCA CGC  
 25 404 GGT GGT GAG CTA ATC GCC TAT CTC GGA CAT TAC CAA CGC CAG CGT  
 449 CTG GTG GCC GAC GGA TTG CTG GCG AAA AAG GGC TGC CCG CAG CCT  
 30 494 GGT CAG GTC GCG AIT AIT GTC GAT GTC GAC GAG CGT ACC CGT AAA  
 539 ACA GGC GAA GCC TTC GCC GCC GGG CTG GCA CCT GAC TGT GCA ATA  
 584 ACC GTA CAT ACC CAG GCA GAT ACG TCC AGT CCC GAT CCG TTA TTT  
 35 629 AIT CCT CTA AAA ACT GGC GTT TGC CAA CTG GAT AAC GCG AAC GTG  
 674 ACT GAC GCG ATC CTC AGC AGG GCA GGA GGG TCA AIT GCT GAC TTT  
 40 719 ACC GGG CAT CGG CAA ACG GCG TTT CCG GAA CTG GAA CCG GTG CTT  
 764 AAT TTT CCG CAA TCA AAC TTG AAC CTT AAA CGT GAG AAA CAG AAT  
 809 GAA AGC TGT AAC TTA ACG CAG GCA TTA CCA TCG GAA CTC AAG GTG  
 45 854 AGC GCC GAC AAT GTT TCA TTA ACC GGT GCG GTA AGC CTC GCA TCA  
 899 ATG CTG ACG GAA ATA TTT CTC CTG CAA CAA GCA CAG GGA ATG CCG  
 50 944 GAG CCG GGG TGG GGA AGG ATC ACT GAT TCA CAC CAG TGG AAC ACC  
 989 TTG CTA AGT TTG CAT AAC GCG CAA TTT TAT TTA CTA CAA CGC ACG

圖 2C

序列識別 2 號

1034 CCA GAG GTT GCC CGC AGT CGC GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC  
 5 1079 AAG ACA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CCG CAA AAA CAG GCG TAT GGT  
 1124 GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTG CTG TTT ATT GCC GGA CAC GAT ACT  
 1169 AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG ACG CTT  
 10 1214 CCA GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT  
 1259 GAA CGC TGG CGT CGG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT  
 1304 TCG CTG GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG  
 15 1349 CTA TCA TTA AAT ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA  
 1394 GGA TGT GAA GAG CGA AAT GCG CAG GGC ATG TGT TCG TTG GCC GGT  
 20 1439 TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCG CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG  
 1484 TAA

圖 2D

序列識別 2 號

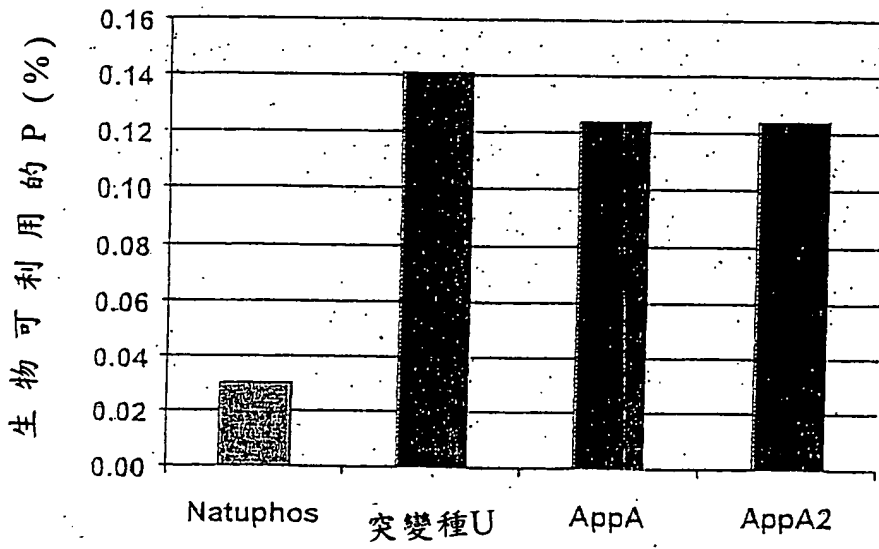


圖 3

陸、(一)、本案指定代表圖為：第 3 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

公告本

94年6月20日 修正  
補充(頁)

## 發明專利說明書

中文說明書替換頁(94年4月)

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※申請案號：091132256

※IPC分類：

A23L1/20, 1/00, C12N 9/16, 1/20, 1/50, 1/500,  
C07H 21/04, C07K 1/00, A23K 1/25, 1/8, 1/165※申請日期：91.10.7

## 壹、發明名稱

(中文) 含有植酸酶之動物食品及方法(英文) PHYTASE-CONTAINING ANIMAL FOOD AND METHOD貳、申請人(共2人)申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)姓名或名稱：(中文) 美商菲泰克斯公司(英文) PHYTEX, LLC.住居所或營業所地址：(中文) 美國緬因州波特蘭市莫頓街10號(英文) 10 MOULTON STREET, PORTLAND,  
MAINE 04101, U.S.A.國籍：(中文) 美國(英文) U.S.A.代表人：(中文) 約翰 寇貝特(英文) CORBETT, JOHN申請人 2姓名或名稱：(中文) 美商康乃爾研究基金股份有限公司(英文) CORNELL RESEARCH FOUNDATION, INC.住居所或營業所地址：(中文) 美國紐約州艾莎卡市索伍德街20號(英文) 20 THORNWOOD DRIVE, SUITE 105,  
ITHACA, NEW YORK 14850, U.S.A.國籍：(中文) 美國(英文) U.S.A.代表人：(中文) 理查 S 卡恩(英文) CAHOON, RICHARD S.

第 091132256 號專利申請案  
中文說明書替換頁(94年4月)

94年6月20日修(更)正替換頁

參、發明人(共 4 人)

發明人 1 (如發明人超過一人, 請填說明書發明人續頁)

姓名: (中文) 道格拉斯 M. 偉伯

(英文) DOUGLAS M. WEBEL

住居所地址: (中文) 美國印第安那州西菲爾德市葛拉希克諾爾大道18035號

(英文) 18035 GRASSY KNOLL DRIVE, WESTFIELD, IN  
46074, U.S.A.

國籍: (中文) 美國

(英文) U.S.A.

發明人 2

姓名: (中文) 當勞 E. 歐爾 二世

(英文) DONALD E. ORR JR.

住居所地址: (中文) 美國印第安那州諾貝爾斯維爾市丘伯蘭路15318號

(英文) 15318 CUMBERLAND ROAD, NOBLESVILLE, IN  
46060, U.S.A.

國籍: (中文) 美國

(英文) U.S.A.

發明人 3

姓名: (中文) 法蘭克 E. 盧奇 二世

(英文) FRANK E. RUCH JR.

住居所地址: (中文) 美國緬因州法蒙斯市弗賽路159號

(英文) 159 FORESIDE ROAD, FALMOUTH, MAINE 04105,  
U.S.A.

國籍: (中文) 美國

(英文) U.S.A.

發明人 4

姓名: (中文) 賴鑫恩

(英文) LEI, XINGEN

住居所地址: (中文) 美國紐約州伊塔卡市西雷辛頓大道114號

(英文) 114 LEXINGTON DRIVE W., ITACA, NEW YORK,  
U.S.A.

國籍: (中文) 美國

(英文) U.S.A.

第 091132256 號專利申請案  
中文序列表替換本(99 年 7 月)

99. 7. 29  
年 月 日修(更)正本

序列表

<110> 美商菲泰克斯公司  
美商康乃爾研究基金股份有限公司

<120> 含植酸酶之動物食品及方法

<140> 第 091132256 號專利申請案

<141> 中華民國 91 年 10 月 31 日

<150> US 60/335303

<151> 2001-10-31

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1489

<212> DNA

<213> 大腸桿菌

<220>

<221> 引子結合

<222> (1)..(22)

<223>

<220>

<221> 引子結合

<222> (1468)..(1489)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(108)

<223>

<220>

<221> CDS

<222> (182)..(1480)

<223>

<400> 1

taaggagcag aaaca atg tgg tat ttc ctt tgg ttc gtc ggc att ttg ttg	51
Met Trp Tyr Phe Leu Trp Phe Val Gly Ile Leu Leu	
1 5 10	
atg tgt tcg ctc tcc acc ctt gtg ttg gta tgg ctg gac ccg cga ttg	99
Met Cys Ser Leu Ser Thr Leu Val Leu Val Trp Leu Asp Pro Arg Leu	
15 20 25	
aaa agt taa cgaacgtaag cctgatccgg cgcattagcg tcgatcaggc	148
Lys Ser	
30	
aataatatcg gatatcaaag cggaacata tcg atg aaa gcg atc tta atc cca	202
Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro	
35	
ttt tta tct ctt ttg att ccg tta acc ccg caa tct gca ttc gct cag	250
Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln	
40 45 50	
agt gag ccg gag ctg aag ctg gaa agt gtg gtg att gtc agc cgt cat	298
Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His	
55 60 65	
ggt gtg cgt gcc cca acc aag gcc acg caa ctg atg cag gat gtc acc	346
Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr	
70 75 80 85	
cca gac gca tgg cca acc tgg ccg gta aaa ctg ggt tgg ctg aca cca	394
Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro	
90 95 100	
cgc ggt ggt gag cta atc gcc tat ctc gga cat tac caa cgc cag cgt	442
Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg	
105 110 115	
ctg gtg gcc gac gga ttg ctg gcg aaa aag ggc tgc ccg cag cct ggt	490
Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Pro Gly	
120 125 130	
cag gtc gcg att att gct gat gtc gac gag cgt acc cgt aaa aca ggc	538
Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly	
135 140 145	

gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg gca cct gac tgt gca ata acc gta cat	586
Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His	
150 155 160 165	
acc cag gca gat acg tcc agt ccc gat ccg tta ttt aat cct cta aaa	634
Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys	
170 175 180	
act ggc gtt tgc caa ctg gat aac gcg aac gtg act gac gcg atc ctc	682
Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu	
185 190 195	
agc agg gca gga ggg tca att gct gac ttt acc ggg cat cgg caa acg	730
Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr	
200 205 210	
gcg ttt cgc gaa ctg gaa cgg gtg ctt aat ttt tcc caa tta aac ttg	778
Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Ser Gln Leu Asn Leu	
215 220 225	
tgc ctt aac cgt gag aaa cag gac gaa agc tgt tca tta acg cag gca	826
Cys Leu Asn Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala	
230 235 240 245	
tta cca tcg gaa ctc aag gtg agc gcc gac aat gtt tca tta acc ggt	874
Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly	
250 255 260	
gcg gta agc ctc gca tca atg ctg acg gaa ata ttt ctc ctg caa caa	922
Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln	
265 270 275	
gca cag gga atg ccg gag ccg ggg tgg gga agg atc act gat tca cac	970
Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His	
280 285 290	
cag tgg aac acc ttg cta agt ttg cat aac gcg caa ttt tat tta cta	1018
Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu	
295 300 305	
caa cgc acg cca gag gtt gcc cgc agt cgc gcc acc ccg tta ttg gat	1066
Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp	
310 315 320 325	
ttg atc atg gca gcg ttg acg ccc cat cca ccg caa aaa cag gcg tat	1114
Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr	
330 335 340	
ggt gtg aca tta ccc act tca gtg ctg ttt att gcc gga cac gat act	1162
Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr	
345 350 355	
aat ctg gca aat ctc ggc ggc gca ctg gag ctc aac tgg acg ctt cca	1210
Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro	
360 365 370	
ggt cag ccg gat aac acg ccg cca ggt ggt gaa ctg gtg ttt gaa cgc	1258

Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	
375						380					385					
tgg	cgt	cgg	cta	agc	gat	aac	agc	cag	tgg	att	cag	ggt	tgc	ctg	gtc	1306
Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	
390					395					400					405	
ttc	cag	act	tta	cag	cag	atg	cgt	gat	aaa	acg	ccg	cta	tca	tta	aat	1354
Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	
				410					415					420		
acg	ccg	ccc	gga	gag	gtg	aaa	ctg	acc	ctg	gca	gga	tgt	gaa	gag	cga	1402
Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	
			425					430					435			
aat	gcg	cag	ggc	atg	tgt	tgc	ttg	gcc	ggt	ttt	acg	caa	atc	gtg	aat	1450
Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala	Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	
		440					445						450			
gaa	gcg	cgc	ata	ccg	gcg	tgc	agt	ttg	taa	tggtacccc						1489
Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu								
	455					460										

<210>	2															
<211>	1486															
<212>	DNA															
<213>	大腸桿菌															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(188)..(1483)															
<223>																
<400>	10															
taaggagcag	aaacaatgtg	gtatttactt	tggttcgctcg	gcattttggt	gatgtgttcg	60										
ctctccacc	ttgtgttgg	atggctggac	ccgcgattga	aaagttaacg	aacgtaggcc	120										
tgatgcggcg	cattagcatc	gcatcaggca	atcaataatg	tcagatatga	aaagcggaaa	180										
catatcg	atg	aaa	gcg	atc	tta	atc	cca	ttt	tta	tct	ctt	ctg	att	ccg	229	
	Met	Lys	Ala	Ile	Leu	Ile	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro		
	1				5					10						
tta	acc	ccg	caa	tct	gca	ttc	gct	cag	agt	gag	ccg	gag	ctg	aag	ctg	277
Leu	Thr	Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	

15	20	25	30	
gaa agt gtg gtg att gtc agc cgt cat ggt gtg cgt gcc cca acc aag				325
Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys	35	40	45	
gcc acg caa ctg atg cag gat gtc acc cca gac gca tgg cca acc tgg				373
Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp	50	55	60	
ccg gta aaa ctg ggt tgg ctg aca cca cgc ggt ggt gag cta atc gcc				421
Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala	65	70	75	
tat ctc gga cat tac caa cgc cag cgt ctg gtg gcc gac gga ttg ctg				469
Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu	80	85	90	
gcg aaa aag ggc tgc ccg cag cct ggt cag gtc gcg att att gtc gat				517
Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Pro Gly Gln Val Ala Ile Ile Val Asp	95	100	105	110
gtc gac gag cgt acc cgt aaa aca ggc gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg				565
Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu	115	120	125	
gca cct gac tgt gca ata acc gta cat acc cag gca gat acg tcc agt				613
Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser	130	135	140	
ccc gat ccg tta ttt att cct cta aaa act ggc gtt tgc caa ctg gat				661
Pro Asp Pro Leu Phe Ile Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp	145	150	155	
aac gcg aac gtg act gac gcg atc ctc agc agg gca gga ggg tca att				709
Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile	160	165	170	
gct gac ttt acc ggg cat cgg caa acg gcg ttt cgc gaa ctg gaa cgg				757
Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg	175	180	185	190
gtg ctt aat ttt ccg caa tca aac ttg aac ctt aaa cgt gag aaa cag				805
Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Asn Leu Lys Arg Glu Lys Gln	195	200	205	
aat gaa agc tgt aac tta acg cag gca tta cca tcg gaa ctc aag gtg				853
Asn Glu Ser Cys Asn Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val	210	215	220	
agc gcc gac aat gtt tca tta acc ggt gcg gta agc ctc gca tca atg				901
Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met	225	230	235	
ctg acg gaa ata ttt ctc ctg caa caa gca cag gga atg ccg gag ccg				949
Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro	240	245	250	

ggg tgg gga agg atc act gat tca cac cag tgg aac acc ttg cta agt 997  
 Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser  
 255 260 265 270

ttg cat aac gcg caa ttt tat tta cta caa cgc acg cca gag gtt gcc 1045  
 Leu His Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala  
 275 280 285

cgc agt cgc gcc acc ccg tta ttg gat ttg atc aag aca gcg ttg acg 1093  
 Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr  
 290 295 300

ccc cat cca ccg caa aaa cag gcg tat ggt gtg aca tta ccc act tca 1141  
 Pro His Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser  
 305 310 315

gtg ctg ttt att gcc gga cac gat act aat ctg gca aat ctc ggc ggc 1189  
 Val Leu Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly  
 320 325 330

gca ctg gag ctc aac tgg acg ctt cca ggt cag ccg gat aac acg ccg 1237  
 Ala Leu Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro  
 335 340 345 350

cca ggt ggt gaa ctg gtg ttt gaa cgc tgg cgt cgg cta agc gat aac 1285  
 Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn  
 355 360 365

agc cag tgg att cag gtt tcg ctg gtc ttc cag act tta cag cag atg 1333  
 Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met  
 370 375 380

cgt gat aaa acg ccg cta tca tta aat acg ccg ccc gga gag gtg aaa 1381  
 Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys  
 385 390 395

ctg acc ctg gca gga tgt gaa gag cga aat gcg cag ggc atg tgt tcg 1429  
 Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser  
 400 405 410

ttg gcc ggt ttt acg caa atc gtg aat gaa gcg cgc ata ccg gcg tgc 1477  
 Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys  
 415 420 425 430

agt ttg taa 1486  
 Ser Leu

<210> 3

<211> 80

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 基因之引子。

<400> 3

ggggtaccat gggcgtctct gctgttctac ttcctttgta tctcctgtct ggagtcacct 60

ccggacagag tgagccggag 80

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 基因之引子。

<400> 4

gggaattcat tacaaactgc aggc 24

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 基因之引子。

<400> 5

ggaattccag agtgagccgg a 21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 基因之引子。

<400> 6

ggggtacctt acaaactgca cg

22

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 突變生成 PCR 擴大之引子。

<400> 7

ctgggtatgg ttggttatat tacagtcagg t

31

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 突變生成 PCR 擴大之引子。

<400> 8

caaacttgaa ccttaaactg gag

23

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於擴大 appA 突變生成 PCR 擴大之引子。

<400> 9

cctgCGTtaa gttacagctt tcattctggt t

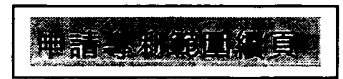
31

## 拾、申請專利範圍

1. 一種藉著增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性以改善單胃動物食用之食物之營養價值的方法，其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括以食物及每公斤食物約 50 至約 1200 單位的在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶餵食動物的步驟，

其中該得自植酸酯之磷酸的生物利用性與以食物及相同單位之在非酵母菌宿主細胞中表現的植酸酶餵食動物所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少 2 倍。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該動物為禽類。
3. 根據申請專利範圍第 2 項之方法，其中該禽類係選自由雞、火雞、鴨和雉所組成之群。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該動物為豬類。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該動物為海水或淡水的水生動物。
6. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該動物為家畜。
7. 根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中該家畜為犬類。
8. 根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中該家畜為貓類。



9. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該動物為人類。
10. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中該食物為豬飼料。
11. 根據申請專利範圍第3項之方法，其中該食物為禽飼料。
12. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該酵母菌係選自由酒酵母菌、畢赤酵母菌、克魯維爾酵母菌、漢遜酵母菌和念珠菌所組成之群。
13. 根據申請專利範圍第12項之方法，其中該酵母菌為釀酒酵母菌。
14. 根據申請專利範圍第12項之方法，其中該酵母菌為巴德畢赤酵母菌。
15. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約1000單位的在酵母菌中表現之植酸酶食物餵食動物。
16. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約700單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
17. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約500單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
18. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約200單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。

19. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該植酸酶在低於大約4之pH值時，具有最佳活性。
20. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中利用蛋白酶切開在酵母菌中表現的植酸酶，提高該植酸酶的效能，與完整的酵母菌表現之植酸酶相比較，增加了得自植酸酯之磷酸的生物利用性。
21. 一種藉著餵食動物食物以降低單胃動物之食物對增重比例的方法，其中該食物包括含有肌醇-六價磷酸酯，該方法包括以食物及約50至約1200單位的在酵母菌中表現之大腸桿菌6-植酸酶餵食動物的步驟，其中降低了動物的食物對增重比例。
22. 根據申請專利範圍第21項之方法，該動物為禽類。
23. 根據申請專利範圍第22項之方法，其中該禽類係選自由雞、火雞、鴨和雉所組成之群。
24. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該動物為豬。
25. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該動物為海水或淡水的水生動物。
26. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該動物為家畜。
27. 根據申請專利範圍第26項之方法，其中該家畜為犬類。
28. 根據申請專利範圍第26項之方法，其中該家畜為貓類。
29. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該動物為人類。

30. 根據申請專利範圍第24項之方法，其中該食物為豬飼料。
31. 根據申請專利範圍第23項之方法，其中該食物為禽飼料。
32. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該酵母菌係選自由酒酵母菌、畢赤酵母菌、克魯維爾酵母菌、漢遜酵母菌和念珠菌所組成之群。
33. 根據申請專利範圍第32項之方法，其中該酵母菌為釀酒酵母菌。
34. 根據申請專利範圍第32項之方法，其中該酵母菌為巴斯德畢赤酵母菌。
35. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約1000單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
36. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約700單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
37. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約500單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
38. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50至大約200單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
39. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中該植酸酶具有在序列識別：2號中所定義的胺基酸序列。

40. 根據申請專利範圍第39項之方法，其中該植酸酶與野外型 AppA 之差異為至少一個胺基酸取代，其瓦解了位置 100 和 210 處之半胱胺酸殘基之間形成的二硫鍵。
41. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中該植酸酶在低於大約 4 之 pH 值時，具有最佳活性。
42. 根據申請專利範圍第 21 項之方法，其中利用蛋白酶切開在酵母菌中表現的植酸酶，提高該植酸酶的效能，與完整的酵母菌表現之植酸酶相比較，降低了動物的食物對增重比例。
43. 一種藉著增加動物的骨質量和礦物質內含量以改善由單胃動物食用之食物之營養價值的方法，其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括以食物及每公斤食物約 50 至約 1200 單位的在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶餵食動物的步驟，  
其中該動物的骨質量和礦物質內含量與以食物及相同單位之在非酵母菌宿主細胞中表現的植酸酶餵食動物所獲得的骨質量和礦物質內含量相比較，增加至少 2 倍。
44. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，該動物為禽類。
45. 根據申請專利範圍第 44 項之方法，其中該禽類係選自由雞、火雞、鴨和雉所組成之群。
46. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中該動物為豬。
47. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中該動物為海水或淡水的水生動物。
48. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中該動物為家

- 畜。
49. 根據申請專利範圍第48項之方法，其中該家畜為犬類。
50. 根據申請專利範圍第48項之方法，其中該家畜為貓類。
51. 根據申請專利範圍第43項之方法，其中該動物為人類。
52. 根據申請專利範圍第46項之方法，其中該食物為豬飼料。
53. 根據申請專利範圍第45項之方法，其中該食物為禽飼料。
54. 根據申請專利範圍第43項之方法，其中該酵母菌係選自由酒酵母菌、畢赤酵母菌、克魯維爾酵母菌、漢遜酵母菌和念珠菌所組成之群。
55. 根據申請專利範圍第54項之方法，其中該酵母菌為釀酒酵母菌。
56. 根據申請專利範圍第54項之方法，其中該酵母菌為巴斯德畢赤酵母菌。
57. 根據申請專利範圍第43項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50到大約1000單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
58. 根據申請專利範圍第43項之方法，其中以食物及每公斤食物大約50到大約700單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
59. 根據申請專利範圍第43項之方法，其中以食物及每公

- 斤食物大約 50 到大約 500 單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
60. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中以食物及每公斤食物大約 50 到大約 200 單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
61. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中該植酸酶具有在序列識別 2 號中所定義的胺基酸序列。
62. 根據申請專利範圍第 61 項之方法，其中該植酸酶與野外型 AppA 之差異為至少一個胺基酸取代，其瓦解了在位置 100 和 210 處之半胱胺酸殘基之間形成的二硫鍵。
63. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中該植酸酶在低於大約 4 之 pH 值時，具有最佳活性。
64. 根據申請專利範圍第 43 項之方法，其中利用蛋白酶切開在酵母菌中表現的植酸酶，提高該植酸酶的效能，與完整的酵母菌表現之植酸酶相比較，增加了動物的骨質量和礦物質內含量。
65. 一種用於加至動物食物中的食物添加組合物，其包括酵母菌表現之大腸桿菌 6-植酸酶和植酸酶的載劑，其中在食物添加組合物中的植酸酶濃度，比在終食物混合物中的植酸酶濃度更高，其中終食物混合物中植酸酶之量為每公斤食物約 50 至約 1200 單位植酸酶，且其中該載劑係選自由稻殼、小麥次級品、植物油脂、氫化的脂質、多醣、單醣、礦物油、碳酸鈣、明膠、奶粉、肌醇六價磷酸酯和其他含有植酸酯的化合物所組成之群。

66. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該植酸酶係經噴霧乾燥。
67. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該植酸酶係選自由大腸桿菌衍生之 AppA2 和大腸桿菌衍生之 AppA 的指定位置突變種所組成之群。
68. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該終食物混合物包括每公斤終食物混合物大約 50 至大約 1000 單位之在酵母菌中表現的植酸酶。
69. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該終食物混合物包括每公斤終食物混合物大約 50 至大約 700 單位之在酵母菌中表現的植酸酶。
70. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該終食物混合物包括每公斤終食物混合物大約 50 至大約 500 單位之在酵母菌中表現的植酸酶。
71. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該終食物混合物包括每公斤終食物混合物大約 50 至大約 200 單位之在酵母菌中表現的植酸酶。
72. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中該終食物混合物尚包括 0.1% 或更少的外源添加的無機磷酸。
73. 根據申請專利範圍第 65 項之食物添加組合物，其中與含有相同單位之在非酵母菌宿主細胞中表現之植酸酶的食物之營養價值相比較，該食物具有增加的營養價值。
74. 一種改善由單胃動物食用之食物之營養價值的方法，

其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括下列步驟：

將大腸桿菌 6-植酸酶噴霧乾燥；

將該植酸酶與植酸酶之載劑混合，並可視需要與其他成分混合，產生以植酸酶來補充食物的食物添加組合物；

將食物添加組合物與食物混合；及

以補充食物添加組合物的食物餵食動物，其中該食物中補充每公斤食物約 50 至約 1200 單位之植酸酶，且其中對動物的得自植酸酯之磷酸的生物利用性，與以餵食食物及相同單位之在非酵母菌宿主細胞中表現之植酸酶所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少 2 倍。

75. 一種藉著增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性以改善由禽類食用之食物之營養價值的方法，其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括以食物及每公斤食物約 50 至約 1200 單位之在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶食物餵食禽類的步驟，其中該得自植酸酯之磷酸的生物利用性與以食物及在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶餵食非禽類動物所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少 1.5 倍。
76. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中該禽類係選自由雞、火雞、鴨和雉所組成之群。
77. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中該食物為禽飼料。

78. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中該酵母菌係選自由酒酵母菌、畢赤酵母菌、克魯維爾酵母菌、漢遜酵母菌和念珠菌所組成之群。
79. 一種藉著增加得自植酸酯之磷酸的生物利用性以改善由禽類食用之食物之營養價值的方法，其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括將食物及每公斤食物約 50 至約 2000 單位之在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶食物餵食禽類的步驟，其中該得自植酸酯之磷酸的生物利用性與以食物及在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶餵食非禽類動物所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少 1.5 倍。
80. 根據申請專利範圍第 79 項之方法，其中以食物及每公斤食物 1500 單位或更少的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
81. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中該植酸酶在低於大約 4 之 pH 值時，具有最佳活性。
82. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中以食物及每公斤食物大約 50 至大約 1000 單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
83. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中以食物及每公斤食物大約 50 至大約 700 單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
84. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中以食物及每公斤食物大約 50 至大約 500 單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。

85. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中以食物及每公斤食物大約 50 至大約 200 單位的在酵母菌中表現之植酸酶餵食動物。
86. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中利用蛋白酶切開在酵母菌中表現的植酸酶，提高該植酸酶的效能，與完整的酵母菌表現之植酸酶相比較，增加了得自植酸酯之磷酸的生物利用性。
87. 根據申請專利範圍第 75 項之方法，其中藉著餵食與在酵母菌中表現之植酸酶組合的食物，所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性，與以餵食及相同單位之在非酵母菌宿主細胞中表現之植酸酶所獲得的得自植酸酯之磷酸的生物利用性相比較，增加至少 2 倍。
88. 一種藉著餵食禽類食物以降低禽類之食物對增重比例的方法，其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括以食物及約 50 至約 1200 單位的在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶餵食禽類的步驟，其中降低了動物的食物對增重比例。
89. 一種改善由禽類食用之食物之營養價值的方法，其中該食物包括肌醇六價磷酸酯，該方法包括以食物及約 50 至約 1200 單位的在酵母菌中表現之大腸桿菌 6-植酸酶餵食禽類的步驟，其中增加了該禽類的產蛋數目和產蛋重量。