

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☐有 ☐無主張優先權
歐洲專利機構 1998年05月06日 98401101.5 ☐有 ☒無主張優先權

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：
食品工業發展研究所 2000年1月11日 CCRC 930030

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明領域

本發明是有關新穎的微生物及新穎的酵素混合物。此外，本發明是有關酵素混合物之組合物，彼之製劑及彼在飼料，食品及其他工業上之用法，包括紙業及織品業但不限於此。

發明背景

長久以來酵素即應用於各種不同的工業應用上。已知之實例如在烘培工業，酒類及果汁工業(其中酵素用於瓦解果膠以及 β -聚葡萄糖)，於織品工業(其中纖維素酶用來獲得柔軟及平滑之纖維質織品)，且同時也於動物飼料工業，但此非最後之應用。在此例子中，酵素係可改進植物源之消化能力。

此最後之用法使家畜可更有效率地消化飼料。飼料之價值可由FCR(飼料轉化率)來偵測，此為飼料消耗量對動物獲重之營養比率。對飼料而言，FCR降低表示對一定量飼料而言，動物更按比例地獲重，即動物可更有效率地利用飼料。

飼料組份(澱粉，脂質，蛋白質/胺基酸)不良的消化力是穀物為基準飼料的一個值得注意之特色，且特別是含有大量大麥或小麥含量者。在這些例子中，必需自其他來源及其他添加物，如胺基酸，中將飼料調和成含有較高之能量水平。這些酵素可增加納入飼料內之穀物之表觀可代謝之能量數值。

解決此問題的另一途徑是添加酵素添加物，纖維素酶， β -葡聚糖醇，木聚糖醇等，或酵素活性混合物至這些以穀物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明(2)

為基礎之飼料中。酵素添加物可有特異的用途，可水解 β -聚葡萄糖，或可水解阿拉伯木聚糖酶，其常見於穀物中(通常是大麥及小麥)。酵素的添加有不同的目的。可清楚地證明飼料酵素添加物之效力的一個優點是可降低物質在動物腸道內之黏度，此動物係接受含有適量酵素添加物之以穀物為基礎之飼料。較高的黏度有部份是歸因於見於大麥及小麥中之 β -聚葡萄糖及阿拉伯木聚糖酶。由酵素作用所致較低黏度，使營養組份在動物腸道中可更容易地吸收。另外的優點是可釋出為穀物細胞壁所截陷之營養物，減少其他耗費的飼料添加物之要求。整體而言結果是飼料的費用顯著地降低，具有如FCR所偵測之相似或有益作用。

由各種不同微生物所得之酵素製劑，已知可改進飼料之消化力。

若吾等考量酵素在動物飼料之用途之先前技藝，吾等可提及歐洲專利案No. 0.699.762，其中描述使用來自許旺酵母之植酸酶。此植酸酶是由將經選殖基因納入而由遺傳修飾有機體中獲得的，但在本發明中則避免此類型。

若吾等考量，WO 95/26398專利案，則可再次獲得經修飾之纖維素酶，其中將外來的DNA序列納入宿主細胞中，其可修飾原先胞株之本質，且宿主選自下列微生物：芽孢桿菌，鏈霉菌，釀酒酵母，裂殖酵母，曲霉。在本發明中吾等的目標是避免外來基因納入微生物中，此微生物為酵素之產製者。

在WO 96/05739專利案中，則是自不同微生物中獲得酵素

五、發明說明 (3)

之混合物(木聚糖酶，蛋白酶及視所需之 β -葡聚糖酶)。作者示出之實例(第5頁)中，酵素混合物中木聚糖酶活性對 β -葡聚糖酶活性之比例在1：5中。頃發現當在以穀物為基礎之飲食中將木聚糖酶以其最佳劑量水平或左右之水平納入時，具有 β -葡聚糖酶活性之酵素之共同存在，可增加飼料之FCR，此點當然是缺點。因此作者建議不可有 β -葡聚糖酶之存在，其建議木聚糖酶活性對 β -葡聚糖酶活性之最大比例是1：0-0.25。

在某些例子中，為了確使和飼料應用有關之所有酵素均存在，製劑通常製備自由一種以上微生物所得之製劑。在許多例子中，酵素製劑得自接受重組DNA技術之遺傳修飾之微生物。

吾等發現且發展出一種新穎的微生物，其屬於繩狀青霉，其含有酵素活性之混合物，且可成功地用來增加以穀物為基礎之動物飼料之消化能力。

發明要點

因此，本發明是有關由繩狀青霉衍生之新穎的微生物，以及培養此微生物之方法，及回收由此微生物產生之酵素。

因此，依據本發明，在此提出由此微生物所得之新穎酵素，及含彼之新穎組合物。

再者，依據本發明，在此提出改進穀物為基礎之動物飼料之消化力之方法。

本發明的另一主題是減少磷之排泄。

發明的詳細說明

五、發明說明 (5)

培養基中含有纖維素，穀物浸漬液，碳酸鈣及硫酸銨。

B. 醱酵過程

此新穎真菌由所貯置菌株之醱酵而產製，先在較好由下列組成之種子培養基中(按重計)：

- 穀物浸漬液 1%-4%
- 抗起泡劑 正好可避免泡沫
- 水 加至100%
- NaOH 足以調整pH至約pH 3.0-6.0再行滅菌培養基；

培育溫度：27°C - 36°C

產製培養基較好有以下組成：

- 穀物浸漬液 0-4.0%
- 成批及填加之纖維素 0.8-14%
- Ca 鹽， 0-0.8%
- 硫酸銨 0-1.0%
- 抗起泡劑 正好可避免泡沫
- 水 足以獲得100%
- NaOH 足以將pH調在pH 3.0-6.0，再行培養基之滅菌作用；
- H₂SO₄ 足以維持pH在約 3.0-6.0；
- 氨呈氣體或液體型式 足以維持pH在約 3.0-6.0；

培育溫度27°C - 36°C。

於醱酵時，醱酵槽中加入充份的水，將組份加至水中，並於適當攪動之容器內，攪拌30分鐘直到組份溶解為止。滅

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

五、發明說明(6)

菌係將醱酵槽密封，內容物升高至121℃。醱酵容器以種子醱酵基接種。

在醱酵過程中加入之主要碳源是纖維素，在各種不同纖維素來源中，吾等喜用 ARBOCEEL，SOLKAFLOC，CLAROCCELL，ALPHACELL，FIBRACELL，並有不同等級。

醱酵中之pH值較好予以控制，可加入硫酸，或其他的酸，及氣體或液體型式之氮，或另外的鹼。

於醱酵末了，以固體-液體分離移去固體粒子，如過濾，收集液相並予以濃縮，如在有機或無機膜上行超過濾作用。

這些酵素也可由重組DNA技術方法中製成，且因此可產製自重組體同質種類或異質種類。轉移編碼酵素之基因之宿主可選自真菌，細菌細胞或植物細胞。任何傳統技術均可用來將編碼重點酵素之基因嵌入宿主細胞中，如質體(整合與否)，噬菌體載體。

依據本發明，酵素可呈經分離之純酵素製劑，或為粗製製劑，如其中生長有繩狀青黴之培養基。

也可將這些酵素納入含有其他酵素之組合物中，其型式依組合物欲求之用途而定。所加入之酵素可選自如：纖維素酶，半纖維素酶，脂酶，蛋白酶，澱粉酶，酯酶。

C. <<酵素活性混合物>>之組合物

1. 液體組合物

於液體組合物方面，在加入抗菌劑後，偵測酵素濃度，再

五、發明說明 (7)

進行校正稀釋度以達產物張力。

液體溶液之較佳組合物如下，按重計：

-微生物產物，呈總有機固體粒子	4%-10%
-抗菌劑	0.005%-0.35%
較好	0.01%-0.25%
-山梨醇	20%-50%
-最後是抗凍劑	0%-40%
較好	15%-40%
-濃縮之經過濾醱酵肉汁	0.3-76%
-緩衝並調整pH 3-5	

抗菌劑選自下列產物如：山梨酸及鹽，苯甲酸及鹽，4-羥基苯甲酸甲酯及4-羥基苯甲酸正丙酯，延胡索酸、鹽及酯。鹽類如氯化鈉或氯化鉀也可使用。

最佳之抗凍劑為1,2-丙二醇，乙二醇，甘油。

2. 散劑組合物

於散劑製劑，所得之濃縮溶液最後在載劑存在下乾燥。在無載劑下乾燥濃縮溶液所得之散劑，可進一步與適合的載劑混合。

散劑型式較佳組合物如下：

-微生物產物，呈總有機固體粒子	16%-40%
-載劑	59%-83%
-其他乾燥之醱酵肉汁組份	1%

較佳之載劑選自：麵粉，澱粉，石膏，麥芽糊精，穀物固體，來自其他穀物處理之副產物，如玉米粗粒，小麥粗

五、發明說明(8)

粉，小麥麩，裸麥渣滓，礦物混合物。

D. 酵素特性

吾等自繩狀青霉產生一種新穎的酵素混合物。此酵素混合物含有新的酵素，如木聚糖酶， β 葡聚糖酶，纖維素酶及阿魏酸酯酶。

1. 步驟

酵素製劑之鑑定是分析纖維素酶，內向-1,3(4)- β -葡聚糖酶及內向-1,4- β -木聚糖酶活性。

1.1 DNS大麥 β -葡聚糖方法

內向-1,3(4)- β -葡聚糖酶活性之分析基礎在於大麥 β -葡聚糖， β -1,3(4)-葡聚糖，中糖苷鍵之酵素水解。反應產物， β -1,3(4)-葡聚糖寡糖，由還原價增加結果(呈葡萄糖)來決定。

含有1毫升1%(w/v)大麥 β -葡聚糖溶液於0.1M醋酸鈉緩衝溶液，pH 5.0之溶液；1毫升經稀釋的酵素溶液(含有0.02-0.06單位·毫升⁻¹)在50℃下培育10分鐘。加入2毫升DNS溶液以停止酵素反應(1%(w/v) 3,5-二硝基水楊酸，1.6%(w/v) 氫氧化鈉，30%(w/v) (+)-酒石酸鉀鈉於蒸餾水)。溶液混合，再置於煮沸的水浴中，最少95℃，歷5分鐘，再冷卻至25℃。在溶液中加入10毫升蒸餾水，再利用2公分徑長之小池於540毫微米波長下偵測吸光度。

結果經由與標準曲線比較而轉化成微莫耳還原糖(呈葡萄糖)，此標準曲線係針對2毫升0.00-0.04%(w/v)葡萄糖溶液，並以相當方式以DNS溶液處理之。

五、發明說明(9)

所觀察到的酵素反應吸光度再做非特異吸光度之校正，後者係在酵素溶液之前將DNS溶液加至混合物中。將一單位的內向-1,3(4)- β -葡聚糖酶活性定義為，在分析條件下可產生1微莫耳葡萄糖當量·分⁻¹所需之酵素量。

1.2. DNS CMC方法

纖維素酶活性分析基礎在於，羧基甲基纖維素(CMC)，一種- β -1,4-葡聚糖，中糖苷鍵之酵素水解作用。反應產物， β -1,4-葡聚糖寡糖，可由還原價增加結果決定(呈葡萄糖)。

含有1毫升1%(w/v) CMC溶液於0.1M醋酸鈉緩衝溶液，pH 5.0之溶液；1毫升經稀釋的酵素溶液(含有0.10-0.25單位·毫升⁻¹)在50°C下培育10分鐘。酵素反應由2毫升DNS溶液之加入便停止(1%(w/v) 3,5-二硝基水楊酸，1.6%(w/v)氫氧化鈉，30%(w/v) (+)-酒石酸鉀鈉於蒸餾水)。溶液混合，再置於沸水浴中，最少95°C，歷5分鐘，再冷卻至25°C。在溶液中加入10毫升蒸餾水，並利用2公分徑長小池於540毫微米波長下偵測吸光度。

經由與標準曲線比較，結果可轉化成微莫耳還原糖(呈葡萄糖)，此標準曲線由2毫升0.00-0.04%(w/v)葡萄糖溶液以DNS溶液以相當方式處理而得。

所觀察到的酵素反應吸光度進行非一特異吸光度之校正，係在酵素溶液前將DNS溶液加至混合物中。將一單位的纖維酶活性定義為，在分析條件下可產生1微莫耳葡萄糖當量·分⁻¹之酵素量。

1.3. DNS樺木木聚糖方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

五、發明說明 (10)

內向-1,4- β -木聚糖酶活性分析基礎在於樺木的木聚糖，一種 β -1,4-木聚糖，中木糖苷鍵之酵素水解。反應產物， β -1,4-木聚糖寡糖可由還原價增加來決定(呈木糖型式)。

含1毫升1%(w/v)樺木之木聚糖溶液於0.1M醋酸鈉緩衝溶液，pH 5.5之溶液；1毫升經稀釋的酵素溶液(含有0.03-0.10單位·毫升⁻¹之間)在50°C下培育10分鐘。酵素反應由加入2毫升DNS溶液使停止(1%(w/v)3,5-二硝基水楊酸，1.6%(w/v)氫氧化鈉，30%(w/v)(+)-酒石酸鉀鈉於蒸餾水)。溶液混合，再置於沸水浴中，最少95°C，歷5分鐘，再冷卻至25°C。在溶液中加入10毫升蒸餾水，再利用2公分徑長小池，於540毫微米下偵測吸光度。

由比較標準曲線，將結果轉化成微莫耳還原糖(呈木糖)，此標準曲線係以2毫升0.00-0.03%(w/v)木糖溶液以DNS溶液以相當方式處理而得。

所觀察到的酵素反應吸光度再作非-特異吸光度之校正，其係在酵素溶液前將DNS溶液加至混合物中而得。一單位的內向-1,4- β -木聚糖酶活性定義為，在分析條件下可產生1微莫耳木糖當量。分⁻¹之酵素量。

1.4.偶氮大麥 β -葡聚糖方法

內向-1,3(4)- β -葡聚糖酶活性分析基礎在於大麥 β -葡聚糖之酵素水解；其有一個經結合的發色團(偶氮一大麥 β -葡聚糖)。反應產物，寡聚物在乙醇沈澱係是可溶的，可由590毫微米吸光度之增加結果來決定。

含有0.5毫升偶氮大麥 β -葡聚糖受質(即可使用型式)及0.2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

五、發明說明 (11)

毫升酵素稀釋液(含有0.15-0.60單位·毫升⁻¹，於0.01M醋酸鈉緩衝溶液，pH 4.6)之溶液在30℃下確實培育20分鐘。加2.5毫升沈澱溶液(含有18.1克醋酸鈉及3.0克鋅混合於300毫升玻璃蒸餾水，pH值以鹽酸調至pH 5.0，內容物轉移至1升計量燒瓶，並以96% v/v乙醇使達其體積)以停止酵素反應。溶液混合，再於室溫下靜置10分鐘。溶液轉移至離心管，並在桌上型離心機上以1000克離心10分鐘。在590毫微米下以1公分玻璃小池偵測吸光度。

所觀察到的酵素反應吸光度作非特異吸光度之校正，其進行是在酵素溶液前將沈澱溶液加至混合物中。將一單位的內向-1,3(4)-β-葡聚糖酶活性定義為，在分析條件下，利用標準受質，可水解受質生成590毫微米下0.820單位吸光度之酵素量。

1.5. 偶氮橡樹木聚糖方法

內向-1,4-β-木聚糖酶活性分析基礎在於橡樹木聚糖之酵素水解，此糖有一個與之結合之發色團(偶氮-橡樹木聚糖)。反應產物，寡聚物在乙醇沈澱後是可溶的，可由590毫微米下吸光度之增加來決定。

含有0.5毫升偶氮-橡樹木聚糖受質(1.00克受質於40毫升蒸餾水，煮沸同時攪拌2分鐘，並在減溫下攪拌10分鐘，當溶液冷卻於20-25℃時，以蒸餾水使達到50毫升)及0.2毫升酵素溶液之溶液(含有0.15-0.60單位·毫升⁻¹於0.01M醋酸鈉緩衝溶液，pH 4.7)在30℃下確實培育10分鐘。酵素反應由加入2.0毫升乙醇96%便停止。溶液混合，並令其在室溫

五、發明說明 (12)

下靜置10分鐘。溶液轉移至離心管，並在1000克下離心10分鐘(於桌上型離心機上進行)。

利用1公分玻璃小池，在590毫微米下偵測吸光度。

所觀察到的酵素反應吸光度進行非特異吸光度之校正，為進行此是在酵素溶液之前將乙醇96%加至混合物中。一單位的內向-1,4- β -木聚糖酶活性定義為，在分析條件下，利用標準受質，可水解受質生成590毫微米下1.23單位吸光度之酵素量。

1.6. 黏度測定之小麥阿拉伯木聚糖方法

內向-1,4- β -木聚糖酶活性的另一個分析基礎在於標準小麥阿拉伯木聚糖溶液之酵素水解，活性由隨著時間相對黏度減少來決定。

含有1毫升1%(w/v)小麥阿拉伯木聚糖溶液於0.1M醋酸鈉緩衝溶液，pH 5.5之溶液；3毫升蒸餾水及1毫升稀酵素溶液(含有0.01-0.06單位·毫升⁻¹)注入Haake微量黏度計中(利用金球校正至0.1-2.0毫帕)，再以每30秒偵測球滴時間($T_{\text{試驗}}$) (按毫秒計歷一定之滴徑)在30°C下歷15-20分鐘。對水偵測平均球滴時間(5毫升蒸餾水)($T_{\text{水}}$ 及 $T_{\text{受質}}$)，且受質(1毫升的1%(w/v)小麥阿拉伯木聚糖溶液於0.1M醋酸鈉緩衝溶液，pH 5.5及4毫升蒸餾水)對照組以相當方式偵測。對 $T_{\text{試驗}}$ 各值估算相對流動性(F_r)，如下：

$$F_r = \frac{T_{\text{受質}} - T_{\text{水}}}{T_{\text{試驗}} - T_{\text{水}}}$$

五、發明說明 (14)

2. 結果

2.1. 最佳 pH 值

2.1.1. 內向-1,3(4)- β -木聚糖酶

在 50℃ 之標準條件下，利用 DNS 大麥 β -木聚糖方法進行來自繩狀青霉之內向-1,3(4)- β -木聚糖酶之分析。在 pH 3.0 及 pH 7.0 之間偵測酵素活性。酵素活性之最佳 pH 值是 pH 4.0-5.0。

pH	活性	
	(單位 · 毫升 ⁻¹)	(%)
3	96	42
4	225	98
5	229	100
6	150	66
7	45	20

2.1.2. 內向-1,4 β -木聚糖酶

在 50℃ 下利用 DNS 樺木之木聚糖方法進行標準條件下來自繩狀青霉內向-1,4 β -木聚糖酶之分析。

由二種不同的木聚糖酶，木聚糖酶 G 及木聚糖酶 F 之存在，判斷最大活性之二峰。此二酵素之存在特別令人感興趣，因吾等在酸性 pH (pH 3) 有最大活性，其為鷄砂囊中的 pH 值，而另一者在 pH 4.0-5.0 有最大活性。

2.2. 最佳溫度

2.2.1. 內向-1,3(4)- β -木聚糖

來自繩狀青霉之內向-1,3(4)- β -木聚糖，其分析係在 pH 5.0 之標準條件下(此酵素之最佳 pH 值)，並利用 DNS 大麥 β -

五、發明說明 (15)

木聚糖方法。酵素活性在30℃-70℃間偵測。最佳溫度在50-60℃之間，而在60℃下可測得最大活性。詳細結果，以表列示出對溫度之型式示出。

溫度	活性	
	(單位·毫升 ⁻¹)	(%)
30	73	32
40	160	70
50	229	100
60	320	140
70	220	96

2.2.2. 內向1,4β-木聚糖酶

在pH 3.0標準條件下，利用DNS樺木木聚糖方法，進行繩狀青霉之內向1,4β-木聚糖酶之分析。

溫度 (°C)	活性(pH 5.5)		溫度 (°C)	活性(pH 3.0)	
	單位·毫升 ⁻¹	(%)		單位·毫升 ⁻¹	(%)
20	273	24	20		
30	465	41	30		
40	904	80	40		
50	1134	100	50	2708	100
60	576	51	60	3556	131
60	792	70	70	1461	54
70	746	66	75	963	36
70	755	67	80	545	20
75	814	72	85	340	13
80	676	60	90	251	9
85	192	17			
90	84	7			

五、發明說明 (16)

所測及之各活性，以對製劑之主活性比例報告，所得結果示於表A。

由繩狀青霉產生之酵素，具有高水平的內向-1,3(4)- β -木聚糖酶及纖維素酶活性。此外，其特徵尚有高水平的內向-1,4- β -木聚糖酶活性(內向-1,3(4)- β -木聚糖酶活性之41%)，不同分析方法對此二活性所觀察到的內向-1,3(4)- β -木聚糖酶：內向-1,4- β -木聚糖酶活性有相似比例(偶氮，DNS及黏度計量方法)。

廣效的半木纖維溶解酵素，是由微生物所得之酵素製劑特有的。

表A：對相關化學上純模式受質之活性

用於試驗中之方法	以繩狀青酶所得之結果
A=內向-1,3(4)- β -葡聚糖酶 (偶氮-大麥 β -葡聚糖方法)	1 +/-
B=內向-1,4- β -木聚糖酶 (偶氮-燕麥木聚糖方法)	0.700 +/-
C=纖維素酶(DNS CMC方法)	2.623
D=內向-1,3(4)- β -木聚糖酶 (DNS大麥 β -葡聚糖方法)	1.842
E=內向-1,4- β -木聚糖酶 (DNS樺木木聚糖方法)	0.664
F=內向-1,3(4)- β -葡萄糖酶 (黏度計定之大麥 β -葡聚糖方法)	3.571
G=內向-1,4- β -木聚糖酶 (黏度計定之小麥阿拉伯木聚糖方法)	1.593

五、發明說明 (17)

E. 實例

實例 1：評估由繩狀青霉所產生之酵素製劑，對於混合的小麥-大麥食物於Broilers之能量值(AME_N)之作用

此例目的是證明酵素(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹) 在表觀可代謝能量上之作用，以含有50%小麥及22%大麥之食物氮平衡(AME_N)校正之。

在對照組及酵素製劑上(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)利用歐洲參考方法(Bourdillon et al., 1990)進行實驗，在18及21天大之動物中自由餵食並收集全部排泄物。

a. 材料及方法

雞隻：品種及飼育條件

數天大的雄的Ross嫩雞飼養在集合式成排雞舍中直到12天大。其給標準的起頭食物。在第12天，對雞隻稱重，且每隻處理組平均分佈至10個個別的雞舍中，再給予實驗性飲食，歷一段適應期(最少5天)。

應用標準的溫度及濕度程式。照光程式保持固定的23小時亮光及1小時黑暗直到實驗完了。

飼養：雞隻接受起頭食物至12天大，再予以實驗飼料。

實驗用食物

飼料含有50%小麥及22%大麥(表1.1)。酵素製劑散布在20公斤碎屑上。以黏度計量方法偵測飼料中酵素之回收率(Sabatier and Fish 1996)。

五、發明說明（18）

可代謝能量之偵測

依據以下步驟在D 18開始平衡：

D 17，鷄禁食一夜；

D 18，稱重，清潔收集盤；

D 19，收集糞便並冷凍；

D 20，收集糞便並冷凍，一夜禁食；

D 21，收集糞便並冷凍，鷄稱重並再餵食。

糞便再冷凍乾燥並輾磨如飼料（1毫米Retsch輾磨機）。在IKA C5000隔熱熱量計上偵測飼料及排泄物之總體能量。也決定蛋白質（ $N \times 6.25$ ，Kjeldahl方法Z130）及脂質（方法Z160）含量。利用獲重中18%蛋白質來校正氮平衡。

b. 結果及討論

對氮平衡（ AME_N ）校正之表觀可代謝能量

動物技術操作及可代謝能量示於表1.2。在各處理間之動物技術操作並無差異。

在生長之嫩鷄方面，酵素製劑對50 %小麥及22 %大麥一為基礎食物之 AME_N ，可改進達6.2 %（+204仟卡/公斤DM（乾重））。再者，在能量可消化力上的變異性，由80降至62仟卡·公斤DM。

此高度改進證明，由繩狀青霉所產生的二種活性（木聚糖酶及 β -葡聚糖酶）水解小麥及大麥可溶性非澱粉多醣之重點所在。

五、發明說明 (19)

表 1.1：實驗食物之主要組份及分析的特性

組合物 (%)		
小麥	50	
大麥	22	
Canola 粉	8	
家禽用粉	5	
大豆粉	5	
肉粉	5	
脂質	3	
維生素/礦物質	2	
特性 (%)	對照組	酵素
DM	89.7	89.6
粗製蛋白質	20.8	20.7
脂質	5.4	5.6

表 1.2 由繩狀青霉產生之酵素製劑，對接受 50 % 小麥及 22 % 大麥一為基礎食物之嫩雞之生長性能及表觀可代謝能量上之作用

	對照組 n=10	酵素 n=10
食物整體能量(仟卡/公斤 DM)	4609	4651
獲重(克)	156 ± 19.8	154 ± 22.3
攝入之飼料(克/天)	104 ± 15.8	99.7 ± 10.1
FCR(克/克)	1.99 ± 0.11	1.95 ± 0.17
糞便 DM (%)	34.7 ± 3.7	35.6 ± 8.3
AME _N (仟卡/公斤 DM)	3252 ± 80	± 3456 ± 62
AME _N (仟卡/公斤)	2913 ^a ± 71.9	3095 ^b ± 55

五、發明說明 (20)

實例 2：由繩狀青霉產生之酵素製劑對於餵以小麥之嫩雞之飼料消化力之作用

進行試驗以決定由繩狀青霉所產生之酵素製劑(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹，及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)，對餵以含有54 %小麥之食物之嫩雞其表觀可代謝能量(AME)，蛋白質及脂質消化力之作用。也檢視與輾磨之交互作用。

(1)對照組 1(54 %輾磨過之小麥)

(2)對照組 1+酵素製劑(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹，及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)

(3)對照組 2(30 %完全之小麥，24 %輾磨過之小麥)

(4)對照組 2+酵素製劑(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹，及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)

依歐洲參考方法進行(自由餵養，且由18至21天收集全部之排泄物)(Bourdillon et al., 1990)。

a. 材料及方法

雞隻：品種及餵養條件

數天大的Ross雄雞餵養在成排雞舍中到12天大。其再轉移至個別的雞舍中以消化平衡。應用標準溫度及濕度程式。照光程式為23小時亮光及1小時黑暗，直到8天大。再改變成15.5小時亮光及8.5小時黑暗，此乃因在同一建築物中進行生蛋雞試驗。

飼養：雞接受標準的起頭食物達12天，再給予實驗性食物。

五、發明說明 (21)

實驗性食物

實驗食物含有 54 % 小麥。特性示於表 2.1。食物組成示於表 2.2。

表觀可代謝能量之偵測

依以下步驟在第 17 天開始平衡：

D 17，鷄禁食一夜；

D 18，鷄稱重，清潔收集盤；

D 19，收集糞便並冷凍；

D 20，收集糞便並冷凍，一夜禁食；

D 21，收集糞便並冷凍，鷄稱重並再餵食。

之後冷凍乾燥糞便，且如飼料般輾磨 (1 毫米，Retsch 輾磨機)。在 IKA C5000 隔熱熱量計上偵測飼料及排泄物之總體能量。也決定蛋白質 ($N \times 6.25$ ，Kjeldahl 方法 Z130) 及脂質 (方法 Z160) 含量。

胺基酸概圖也以 HPLC 進行 (飼料採用 Z100 方法，糞便採用 Z080 方法)。也利用 AFNOR 方法 (NFV 18-106) 偵測飼料及排泄物之磷含量。

b. 結果及討論

表觀可代謝能量 (AME)

生長性能及可代謝能量數據示於表 2.3。進行三天之性能偵測 (獲重，飼料之攝取) 在各治療間並無差異。含有 54 % 輾磨過之小麥之對照食物之 AME 是 3173 仟卡/公斤。而含有相同小麥總量，但其中 30 % 是完全穀粒，之飲食，其可代謝能量與理論值比較下增加 100 仟卡/公斤。再者，所偵測之

五、發明說明 (22)

不同準則之標準偏差，其間之變異性因完全小麥也有所減低。

由繩狀青霉產生之酵素(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)，其對54 %小麥為基礎之食物之可代謝能量值可加強+3.4 % (122仟卡/公斤DM)，此對所有的小麥均輾磨而言，而若30 %小麥包括在完全穀粒內時則增加+2.7 % (101仟卡/公斤DM)。

營養品之表觀消化力(脂質，蛋白質及胺基酸)

當所有小麥輾磨，則繩狀青霉酵素製劑之表觀脂質及蛋白質消化力分別增加7及2.7 %。當一部份的小麥是完整穀粒時，增加力減低至分別為：+3及+0.6 %，此乃因整體性加強營養品之消化力。確實，含有完整小麥之對照食物，其營養品消化力和僅含輾磨之小麥但添加有酵素製劑之實驗性食物是相似的。

酵素製劑對表觀胺基酸消化力之作用示於表2.4。酵素製劑之改進，當所有的小麥均為輾磨過的小麥時平均可達+2.9 %，而完全穀粒時為1.1 %，證實在表觀蛋白質消化力上之作用。

表觀磷之滯留及磷的排泄

在表觀磷滯留上之酵素製劑作用示於表2.5。以酵素製劑，表觀磷滯留可顯著增加達：+8.0 %。此增加較其他營養物上所觀察到的均強(依準則而定由+2.9至3.5 %：AME，蛋白質，脂質，胺基酸)。因此此種增加可能來自經改進之營養物消化力(木聚糖酶及 β -葡聚糖酶之直接作用)但

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

也可能來自小麥植酸酶之更佳作用。當水解非澱粉多醣時，木聚糖酶及 β -葡聚糖酶較內源小麥植酸酶更易接近植酸。

對磷的比較佳消化利用率可減低磷之排泄：- 8 %，當以每公斤獲重之磷克數表示。

表 2.1：小麥特性(%)

%	小麥
乾重	86.2
粗製蛋白質	10.87
脂質	1.65
β -葡聚糖	0.77
戊聚糖	6.8
相對黏度	pH=4.5 : 1.34
(毫帕)	pH=1.5 : 1.29

表 2.2：實驗食物之組合物及特性

食物	輾磨的小麥	完整的小麥
組合物(%)		
輾磨的小麥	53.84	23.84
完整小麥	0	30.0
動物脂質	3.52	3.52
大豆粉 48	18.26	18.26
肉 & 骨粉	5.64	5.64
碗豆	7.0	7.0
完整油菜籽	10.0	10.0
維生素/礦物質	1.74	1.74

五、發明說明 (24)

特性 (%)		
ME (仟卡/公斤)	3 1 7 3	3 . 1 8 8
蛋白質	2 0 . 6	2 0 . 5
脂質	9 . 6	9 . 6
賴胺酸	1 . 0 5	1 . 0 4
甲硫胺酸	0 . 4 5	0 . 4 5
Met + Cys	0 . 8 5	0 . 8 5
鈣	0 . 9 0	0 . 9 0
可運用之 P	0 . 3 5	0 . 3 5

表 2.3 : 酵素製劑 (β -葡聚糖酶活性: 100單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性: 1100單位·公斤⁻¹) 在成長中之嫩鷄中, 對於以小麥為基礎之食物 (54 % 經磨過之小麥或 24 % 磨過的 + 30 % 完整小麥) AME 之作用

食物	1	2	3	4
	輾磨過的小麥	輾磨過的小麥+酵素	完全小麥	完全小麥+酵素
獲重(克)	172±11.8	170±13.1	167±8.9	165±12.0
飼料之攝入(克)	282±20.5	272±17.2	274±15.5	267±14.0
每天攝入之飼料(克/天)	94±6.8	91±5.7	91±5.2	89±4.7
FCR ³ (克/克)	1.64±0.05	1.60±0.06	1.64±0.05	1.63±0.09
表觀蛋白質消化力(%)	83.8±1.08 ^a	85.9±1.14 ^b	86.5±0.77 ^{bc}	87.0±0.80 ^c
表觀脂質消化力(%)	82.2±2.5 ^a	88.0±2.1 ^{bc}	86.6±2.45 ^b	89.2±1.25 ^c
AME(仟卡/公斤DM)	3577±76 ^a	3699±85 ^b	3678±35 ^b	3779±34 ^c
(卡/公斤)	3194±67	3303±76	3284±31	3375±31

1 : 變異性之單向分析, 食物作用, n=47; a,b : 數值下有相同的字角字母其差異不會在 $p < 0.05$ 。

五、發明說明 (25)

2：變異性之二向分析，n=47(小麥：54 %磨過的或24 %磨過的+30 %完整的；enz：有或無0.2升/t木聚糖)。

3：FCR：飼料轉化率(克飼料：克獲重)

表2.4：酵素製劑對於生長中之嫩鷄，其52 %小麥為基礎食物中胺基酸之表觀消化力之作用(每次處理之混合排泄物樣品)

	經輾磨的小麥		經輾磨+完全的小麥	
	Témoin	酵素製劑	Témoin	酵素製劑
氮	83.4	85.3	86.4	87.1
ASP	78.6	80.9	82.1	82.7
THR	74.2	75.3	78.0	79.9
SER	79.5	82.1	83.0	83.3
GLU	87.9	89.6	80.7	91.4
PRO	84.8	87.1	87.7	88.7
GLY	77.1	79.9	80.7	82.0
ALA	74.6	76.9	78.2	80.1
VAL	78.6	80.8	81.8	83.0
ILE	80.6	83.0	84.0	85.0
LEU	82.1	84.3	85.3	86.4
TYR	80.9	85.0	83.7	84.4
PHE	83.7	85.9	87.1	87.6
LYS	80.6	83.1	83.9	84.8
HIS	81.7	84.9	85.0	86.0
ARG	84.9	87.6	88.1	89.0
CYS	70.8	72.8	76.5	77.0
MET	87.2	88.5	88.5	89.4
TRP	79.5	82.7	83.3	84.7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂：線

五、發明說明 (26)

表 2.5：酵素製劑對於生長中之嫩鷄(n=12)於磷(P)排泄及磷表觀滯留上之作用，其以小麥為基礎之食物(54%磨碎之小麥)

食物	1	2	酵素作用
	小麥	小麥-酵素製劑	
			P
表觀的P滯留(%)	37.9±3.0	40.5±2.8	0.047
排泄之P(克/鳥/3天)	1.24±0.13	1.14±0.1	0.071
P之排泄(克/公斤獲重)	7.2±0.5	6.7±0.5	0.034

實例 3：評估酵素製劑對於生長中之火鷄以小麥為基礎食物之 AME_N

此分析之目的是決定由繩狀青霉來之酵素製劑(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)對於以小麥為基礎之食物表觀可代謝能量(AME)之作用，依以下實驗設計進行：

(1)對照組；

(2)EP 1：酵素製劑(β -葡聚糖酶活性：100單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性：1100單位·公斤⁻¹)；

(3)EP 2：酵素製劑(β -葡聚糖酶之活性：150單位·公斤⁻¹及木聚糖酶活性：1650單位·公斤⁻¹)；

利用歐洲參考方法(Bourdillon et al., 1990)自由餵食並在33及37天間收集總排泄物。

a.材料及方法

鷄：品種及飼養條件

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (27)

數天大的雄BUT9火雞飼養在集合式成排雞舍中，直到20天大。其再轉移至個別的雞舍中，經過至少7天之適應期以達消化力平衡。

應用標準的溫度及濕度。照光程式保持固定的23小時亮光及1小時黑暗，歷前2週，再減少至15小時亮光及9小時黑暗，直到試驗結束。

飼養：雞接受標準的完全起頭食物，由數天大至21天，再給予實驗性飼料。

實驗性食物

飼料中含有47 %小麥及33 %大豆粉(表3.1)。酵素噴灑在20公斤之對照組食物團塊上。

可代謝能量之偵測

在D21，雞予以稱重，每種處理法再平均分佈在10個個別的雞舍中，並給予實驗性食物。

依據以下步驟於D 33開始平衡：

D 32，雞禁食一夜；

D 33，雞稱重，清潔收集盤；

D 34及D 35，收集糞便並冷凍乾燥之；

D 36，收集糞便並冷凍，禁食一夜；

D 37，收集糞便並冷凍乾燥，雞予以稱重並再餵食。

糞便再冷凍乾燥，並如飼料般輾磨(1毫米，Retsch輾磨機)。在IKA C5000隔熱熱量計上偵測飼料及排泄物之整體能量。考量體重之獲重(克)及其氮含量(21 %粗製蛋白質)以N平衡校正AME。

糞便再如飼料般冷凍乾燥及輾磨(1毫米，Retsch輾磨機)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (28)

再於 IKA C5000 隔熱熱量計上偵測飼料及排泄物之整體能量。蛋白質也予以決定 ($N \times 6.25$, Kjeldahl 方法 Z130 於飼料, 及 Z135 於糞便), 且以 HPLC 決定出胺基酸概圖 (方法 Z100 於飼料及 Z080 於糞便)。

b. 結果及討論

表觀的可代謝能量 (AME)

動物技術性能及可代謝能量示於表 3.2。在平衡中於各處理法之間對於生長性能並無顯著差異。

在飼養火雞之中, 酵素製劑改進小麥為基礎食物之 AME_N 於 EP 1 及 EP 2 分別為 2.2 及 5.4 %。

所觀察的高度改進情形說明, 含於酵素製劑中的二種活性 (木聚糖酶及 β -葡聚糖酶) 對水解小麥非澱粉多醣上之重點, 可改善此穀物在飼養火雞中之能量值。

表 3.1 : 實驗性食物之主要組份及所分析之特性

組合物 (%)			
小麥	47.55		
擠出之大豆	5.00		
大豆粉	33.00		
肉粉	6.00		
脂質	4.00		
磷酸二鈣	2.30		
$CaCO_3$	0.85		
維生素/礦物質	1.30		
特性 (%)	對照組	EP 1	EP 2
DM	89.0	89.1	88.9
粗製蛋白質	26.3	26.1	26.3
脂質	6.4		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明 (29)

表 3.2：酵素製劑對於生長中之火鷄，其以小麥為基礎之食物之氮平衡(AME_N)為校正之表觀可代謝能量之作用

	對照組 n=12	EP 1 n=12	EP 2 n=12	或 然 率 ¹	劑量 作用
總體能量(仟卡/公斤MD)	4659	4680	4654		
體重獲重(克)	341±23	338±36	337.5±57	NS	NS
攝入之飼料(克/天)	111±5.9	107±6.3	103±12.1	NS	NS
飼料轉化率(克/克)	1.63±0.09	1.60±0.12	1.59±0.17	NS	NS
糞便DM(%)	26.1±5.5	26.5±2.2	25.9±4.8	NS	NS
AME _N (仟克/公斤DM) ²	3025±86	3092±56	3191±34	0.037	0.061
AME _N (仟卡/公斤) ²	2700±77	2753±50	2840±30	0.037	0.061

¹ 變異性之單方分析：酵素作用：n=60，a,b：表示不繼之以相同字母有顯著差異在p<0.05；劑量作用：0，0.2，0.3 l/t。

² 平均值±SEM

實例 4：評估由繩狀青霉產生之酵素製劑對於成長中之豬隻以小麥為基礎之完全飼料食物之效率

目的是評估以小麥為基礎之食物添加酵素，對成長中之豬隻小腸內能量消化之作用。酵素製劑正常水平活性，於木聚糖酶是1100單位·公斤⁻¹，且於β-葡聚糖酶是100單位·公斤⁻¹。

a. 材料及方法

動物

五、發明說明 (30)

依 Latin 平方設計測試處理法，其中有三種食物及三個時期，且每次食物期有二隻豬。

實驗用食物

以品質不佳之小麥並平衡以其他典型飼料組份為基礎之食物，餵食給 6 隻成長中之豬隻(見表 4.1.)。所餵養之食物：

1. 未添加(基礎型式)；
2. 添加型(1)：加有酵素製劑在 $1 \times$ 水平(β -葡聚糖酶：100 單位·公斤⁻¹，及木聚糖酶活性：1100 單位·公斤⁻¹)；
3. 添加型(2)：加有酵素製劑在 $2 \times$ 水平(β -葡聚糖酶：200 單位·公斤⁻¹，及木聚糖酶活性：2200 單位·公斤⁻¹)；

將酵素製劑以玉米澱粉稀釋可達到食物之正確給予，其之後形成預混物，再依所適當地加至食物中。

樣品的收集

依據標準步驟，在 RPNA 實驗室中每週收集 48 小時之迴腸液。再取迴腸液樣品及受試食物分析能量，利用 Sanders 的球型熱量計以決定可消化之能量。取一份樣品貯存，以於必要時再進一步分析。

統計分析

自迴腸液之球式熱量計，飼料及飼料攝入結果，估計粗製能量之消化力。變異性分析由消化力估計中進行。

表 4.1.：基礎食物之組份及營養說明

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (31)

組份	納入之百分率
小麥	60.0
大麥	9.7
豌豆	11.4
魚粉	5.0
向日葵粉(30)	10.0
賴胺酸	0.15
礦物質及纖維素	3.75
總計	100.0
營養物	
蛋白質	14.9
乾團	84.9
可消化能量(仟卡/公斤)	3150
纖維	5.1
可消化之賴胺酸	0.8

b. 結果及討論

在食物中添加木聚糖酶可增加能量消化力至少6%。此顯示，酵素可增加原料物質細胞壁之瓦解(特別是小麥)，並釋出小腸中額外之能量。

表4.2：酵素製劑添加於以小麥為基礎之食物，其對餵給生長中之豬隻之飼料能量消化力上之作用

	未添加之處理	添加組(1)	添加組(2)	p值
平均(%)	70.1	74.5	75.6	<0.001
能量消化力	0.80	0.49	0.45	
改進%		6.27	7.87	

實例5：由繩狀青霉產生之酵素製劑，在反芻動物稻草，玉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (32)

米秣草，乾草及牧草食物性能上之作用。

HFT試驗(Hohenheimer Futterwertesten, Menke et al., 1979, 1988)是一種試管內培育試驗，可用以偵測原料物質之降解，其係經由經緩衝之瘤胃液中這些食物發酵所產生之氣體體積。

a. 材料及方法

200毫克乾燥且經過輾磨的物質，與10毫升瘤胃液加上20毫升緩衝溶液共培育於注射器內，在受控培育箱中(39℃)緩和於旋轉器上攪動。所產生之氣體體積在24小時記錄。以空白組(無受質)，標準的乾草對照組及標準濃縮對照組(可產生已知量淨氣體體積)來校正結果，並估計在24小時內產生之氣體淨體積。利用在24小時內產生之氣體體積估計受質之能量值及OMD(有機質消化力)，其中並利用Menke et al. 推出之預測方程式(1988)。

在2隻已斷奶牛中收集瘤胃液，瘤胃插管並在a.m.8及pm 7時以由6公斤乾草及2公斤濃縮物組成之比例(75/25比例)餵食。所收集之瘤胃液是在早上餵食前收集的。過濾瘤胃液以避免營養分子通過且維持在嚴格無菌條件下。

此試驗目的是測試酵素製劑之作用，係於HFT培育前15小時應用在糧草上。

酵素製劑之預處理：酵素溶液噴灑在鋪有稻草，玉米秣草，乾草及牧草之地板上。噴灑經了解是將1毫升酵素製劑噴灑在2公斤糧草乾團上。邊緣處之糧草(約10公分)予以除去以改進樣品之均質性。處理後，以水混合糧草，並於噴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (33)

灑後留置在室溫下15小時。酵素製劑經一系列接觸且每次處理重覆6次，15小時後進行HFT培育。

b. 結果及討論

24小時後所產生之淨氣體體積示於表5.1，係有關稻草，玉米秣草，乾草及牧草。

纖維素酶經由預處理再施加至稻草上可生成相對於對照組有18 %淨氣體體積之改進。於玉米秣草方面，此改進達8 %，乾草達9.5 %，牧草達9 %

OMD示於表5.2，是在預處理前及後施於不同的糧草上。

OM消化力相對於對照組，於稻草，玉米秣草，乾草及牧草方面各有改進：8.5 %於稻草，5 %玉米秣草，5.4 %乾草及5 %牧草。

以酵素製劑對糧草預處理15小時(稻草，玉米秣草，乾草，牧草)可改進瘤胃受質培育之強度及受質之OM消化力。

表5.1：在24小時時淨氣體體積之產製

原料	處理	淨氣體體積 (在24小時時)	統計意義
稻草	對照組	25	S(p<0.05)
	纖維素酶	29.5	
玉米秣草	對照組	53.7	S(p<0.05)
	纖維素酶	57.8	
乾草	對照組	39.5	(p<0.08)
	纖維素酶	43.1	
牧草	對照組	43.7	(p<0.08)
	纖維素酶	47.7	

五、發明說明 (34)

表 5.2 : OMD

原料	處理	OMD	σ	統計意義
稻草	對照組	47.0	0.67	S(p<0.05)
	纖維素酶	51.0	2.37	
玉米秣草	對照組	70.7	0.91	S(p<0.05)
	纖維素酶	74.2	2.19	
乾草	對照組	59.7	0.77	(p<0.08)
	纖維素酶	62.9	3.27	
牧草	對照組	70.5	0.72	(p<0.08)
	纖維素酶	74.0	3.46	

實例 6：由繩狀青霉產生之酵素製劑對餵以小麥或大麥之生蛋雞性能之作用

此實驗目的是來評估所添加之酵素製劑對於生蛋雞產製變數之作用，此生蛋雞餵以小麥或大麥為基礎之食物。

a. 材料及方法

實驗設計：4種處理×8次重覆×5個雞舍×3隻雞

- 處理；
1. 對照組 1：60%小麥
 2. 對照組 1+酵素製劑
 3. 對照組 2：60%大麥
 4. 對照組 2+酵素製劑

動物，圈養及處理

在 480 隻 Hy-Line 種棕色母雞上進行試驗。各次重覆中以 5 隻母雞進行，有共同之秣槽，即各 15 隻雞有 32 種重覆。

分佈在二間相同雞舍中，重覆組有計劃之光照及通風。光

五、發明說明 (35)

照由每天14小時亮光開始，由17週大到達之母雞開始，每週增長光照時間30分鐘，直到每天17小時之最多亮光期為止。

在實驗之初母雞為22週大，並持續至前5個月之孵蛋期。

食物及餵養

在此有二種實驗性食物，以60 %小麥(食物1)及60 %大麥(食物2)為基礎並加上10 %向日葵粉。其組合物示於表6.1。穀物特性示於表6.2。

對照組

化學分析：

飼料樣品

分析乾團，粗製蛋白質，粗製脂質及灰分進行實驗性飼料之品質管制。在研碎飼料中決定木聚糖酶活性(T-1，T-2)及 β -葡聚糖酶活性(T-3，T4)。

偵測

每四週記錄飼料之消耗及飼料效率。母雞在實驗之初及末了均稱重。在各四週的5個時期中，每天記錄蛋產量，蛋重量及不潔及失敗蛋之比例。每天檢查及記錄死亡率，包括死因在內。

b. 結果及討論

性能試驗

於試驗中所得之產製變數示於表6.3-6.5。在前二週中(由22-30)及在整個實驗中，不潔蛋之百分比為處理方式而在統計上有所影響($P>0.005$)。以不加酵素之小麥食物餵食動物會產生較多的不潔蛋。統計上有意義之差異在於孵蛋率($P>0.05$)及蛋重量($P>0.005$)，由第二期至實驗末了。餵以大

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝
訂
線

五、發明說明 (36)

麥之動物呈現較高之孵蛋率，且較小麥食物者有更重之蛋量。酵素製劑似乎可增加這些變數，但非在有意義的0.05或然率水平。

在所有的實驗期中，T-3及T-4處理期之動物攝取飼料(大麥食物)較餵以小麥食物動物之消耗為高，此乃二種食物能量水平所致(大麥食物調和成2600仟卡/公斤能量，而小麥食物含2800仟卡/公斤)。考慮此二型食物之不同能量值及動物對飼料的消耗，在整個期間所有動物呈現相同的每天能量消耗狀況。

在第一期中實驗性食物之飼料效率(以克飼料/克蛋表示)很高，此乃因為在此時期母雞之孵蛋率低之故。在第二期，小麥處理組之飼料效率優於以大麥處理組所得的；但在第三期，當可記錄到最高之孵蛋百分率時，此二型式食物均呈現相似之效率。由34週至實驗末了，大麥食物較小麥組有更佳之飼料效率。酵素似乎可改進飼料效率($P>0.05$)。在整個期間， β -木聚糖酶可改進大麥食物之飼料效率($P=0.066$)。

表6.4示出，添加有酵素製劑之小麥，餵予生蛋雞後傾向可呈現較高之孵蛋率(+1.5絕對點)，較高之平均蛋重(+0.37克)及較低之飼料轉化率(-2.7%)，此乃與未添加組比較而言。

表6.5示出酵素製劑加至大麥再餵予生蛋雞，可改進孵蛋率(+4%)，平均蛋重(+0.7%)及飼料轉化率(-5.7%)，此與對照的大麥食物比較而言。

五、發明說明 (37)

表 6.1：實驗性孵蛋食物之組合物

組份	小麥食物	大麥食物
小麥	60.171	-
大麥	-	59.033
動物及植物油脂(30%亞麻油酸)	4.0	4.0
脫全脂之大豆	11.412	10.399
大豆粉，48%	3.443	5.705
向日葵粉，29%	10.0	10.0
DL-甲硫胺酸	0.091	0.101
L-賴胺酸HCl	0.111	-
碳酸鈣	8.595	8.546
磷酸鈣	1.478	1.517
鹽類	0.30	0.30
礦物質及維生素預混物*	0.40	0.40
所估計之營養值		
可代謝能量(仟卡/公斤)	2800	2600
粗製蛋白質	16.0	16.41
粗製脂質	7.48	7.21
賴胺酸	0.75	0.76
甲硫胺酸	0.35	0.35
甲硫胺酸+半胱胺酸	0.67	0.69
鈣	3.70	3.70
無機磷	0.40	0.40
鈉/氯化物	0.16/0.27	0.15/0.29

*)一公斤飼料含有：維生素A 8000UI；維生素D3：1600UI；
 維生素E：5毫克；維生素K3：2毫克；維生素B1：1.5毫
 克；維生素B2：4毫克；維生素B6：3毫克；維生素B12：
 11.8微克；葉酸：0.35毫克；生物素：150微克；泛酸鈣：
 10毫克；菸鹼酸：20毫克；Mn：30毫克；Zn：50毫克；I：0.3

五、發明說明 (38)

毫克；Fe：50毫克；Cu：6毫克；Se：0.1毫克，艾脫希昆：125毫克。

表 6.2：穀物之分析組合物

變數	百分率	
	小麥(970556)	大麥(970287)
水汽	10.65	9.79
灰份	1.57	2.11
粗製脂質	1.76	1.98
粗製纖維	2.43	4.61
粗製蛋白質	10.65	10.55
黏度(pH 1.5，予以失活，cps計)	0.78	2.31
總β-木聚糖(% DM)	0.66	3.57
不溶性β-木聚糖(% DM)	0.50	1.56
總戊聚糖	4.91	8.75
可溶性戊聚糖	0.51	0.39

表 6.3：22-42週之產製變數(完全實驗策略)

處理	孵蛋率% ¹	不潔蛋%	失敗蛋(%)	蛋重(克)	飼料攝入(克)	飼料效率(升)	動物獲重(克)	死亡率(%)
T-1	75.6b	7.9a	0.8	62.29b	101.5b	2.158	219.8	1.7
T-2	77.1b	6.6ab	1.1	62.66b	101.5b	2.100	222.6	0.8
T-3	78.0ab	5.3b	1.0	63.76a	109.4a	2.203	231.8	2.5
T-4	81.2a	6.6ab	1.0	64.22a	110.0a	2.111	227.7	5.0
	1.3	0.4	0.2	0.4	1.5	0.028	16.8	1.4
處理作用(P)	0.0402	0.0039	0.7796	0.0036	0.0003	0.0659	0.9586	0.2645

1. 與遺傳上完美母雞之比較(數值由母雞供應者給予)數值為15隻母雞8次重覆之平均值。在行列中，平均值後不同之字角表示有意義之不同($P < 0.05$)

五、發明說明 (39)

表 6.4：木聚糖酶對以小麥為飼料之生蛋雞孵蛋性能上之作用(以絕對值計¹及與對照組比較下之百分率計²)

週數	孵蛋率(%) ¹	蛋重(克) ¹	飼料轉化率	
			1	2
22-26	+ 1.0	- 0.3	+ 0.067	- 1.9 %
26-30	+ 1.1	+ 0.7	- 0.098	- 4.7
30-34	+ 1.4	+ 0.8	- 0.039	- 2.0
34-38	+ 2.1	+ 0.6	- 0.039	- 2.0
38-42	+ 2.3	- 0.5	- 0.042	- 2.2
整體計	+ 1.5 + 2.0 %	+ 0.37 + 0.6 %	- 0.058	- 2.7 %

³ 計 22-42 週期表 6.5：酵素製劑對以大麥及飼料之生蛋雞孵蛋性能上之作用(以絕對值計¹及與對照組比較下之百分率計²)

週數	孵蛋率(%) ¹	蛋重(克) ¹	飼料轉化率	
			1	2
22-26	+ 3.7	+ 1.0	- 0.381	- 9.0 %
26-30	+ 3.0	+ 0.5	- 0.137	- 6.3
30-34	+ 1.9	+ 0.5	- 0.015	- 0.8
34-38	+ 3.3	+ 0.6	- 0.067	- 3.5
38-42	+ 0.9	+ 0.3	- 0.082	- 4.2
整體計	+ 3.2 + 4 %	+ 0.46 + 0.7 %	- 0.092	- 5.7 %

³ 計 22-42 週期

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

參考書目

Bourdillon A., Carré B., Conan L., Duperray J., Franscesch M., Fuentes M., Huyghebaert G., Jansen W.M.M.A., Leclercq B., Lessire M., McNab J., Rigoni M., Wiseman J., 1990. European reference method for the in vivo determination of metabolizable energy with adult cockerels: reproductibility, effect of age, comparison with predicted values. British Poultry Science 31, 567-576.

Sabatier A.M., Fish N.M. 1996. Method of analysis for feed enzymes: methodological problems ? Journal of Applied Poultry Research 5, 408-413.

Barrier-Guillot B., Métayer J.P., Bouvarell., Castaing J., Picard M., Zwick J.L. 1997. Proceedings of the XIth European Symposium on Poultry Nutrition, WPSA, Aug 24-28th Faaborg, Denmark, 237-239.

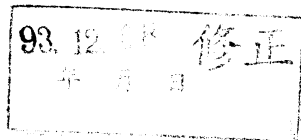
Svihus B., Herstad O., Newman C.W., Newman R.K. 1997. British Poultry Science 38, 524-529.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線



I230736

申請日期	89. 1. 14.
案 號	089100538
類 別	C1-N 9/16 - 9/4

A4

C4

中文說明書替換頁(93年12月)

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 新 型 名 稱	中 文	新穎酵素，其製備及用途及包含彼等之混合物及組合物
	英 文	"NEW ENZYMES, THE PREPARATION AND USE THEREOF AND MIXTURES AND COMPOSITIONS CONTAINING THEM"
二、發明 創 作 人	姓 名	1.紗巴迪亞 亞利恩 2.費許 尼微利 馬爾夏爾 3.海格 尼格爾 帕特森
	國 籍	1.法國 2.3.英國
	住、居所	1.法國巴黎市寇羅林耶路74號 2.英國史塔克波特郡布蘭霍爾市巒斯達爾路7號 3.英國修德斯菲爾德郡馬斯頓布畢恩路39號
三、申請人	姓 名 (名 稱)	法商艾迪賓歐法國公司 ADISSEO FRANCE S.A.S.
	國 籍	法國
	住、居所 (事務所)	法國安東尼市艾力斯泰布萊恩路42號 42 AVENUE ARISTIDE BRIAND, ANTONY, FRANCE
	代 表 人 名 姓	傑哈德 沃夫 WOLFF, GERARD

裝

訂

線

五、發明說明(4)

A. 新菌株繩狀青霉

繩狀青霉(*Penicillium funiculosum*)此新菌株，以編號IMI 378536在布達佩斯條約下之公認的國際貯置權威(1977)貯於國際霉菌研究所(IMI)，Bakeham Lane, Englefield Green, Egham, Surrey, TW 20 9TY, UK。該菌株另於2000年1月11日寄存於中華民國食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute (FIRDI)，中華民國新竹市食品路331號，寄存編號為CCRC 930030。

本發明也包括IMI 378537之突變株，通常這些突變株可產生一種以上本發明具功能之酵素，其與由真菌IMI 378536所得之酵素相同，或相似。

起源

新菌株於孢子經過UV及 β -照射成功處理後，得自繩狀青霉IMI 134756，其中包括在篩選培養基中篩選。利用外來DNA或RNA之納入，以重組體DNA技術並未獲得遺傳之修飾作用。

鑑定及定型

繩狀青霉IMI 378536經由在Czapek Dox瓊脂上以25°C培養而鑑定。集落鑑定及微量外形學為繩狀青霉特有的。微生物被鑑知為繩狀青霉，已在國際黴菌研究所中被證實，Bakeham Lane, Englefield Green, Egham, Surrey, TW20 9TY, UK。生長呈堅固的基礎感，需氧生長，繩狀或束狀菌絲，菌絲組織呈白色，受質基底為紅色，邊緣是反面變蒼白，但漸向中心漸呈紅色，且可變成深紅色，此青霉是典型的，有短的分生孢子大多始自菌絲索，二輪生的，針狀的分生形成細胞，分生孢子是橢圓形且平滑的。

用於產製本發明酵素製劑之微生物係在需氧條件下生長，

I230736

第 89100538 號專利申請案

中文說明書修正頁(90 年 2 月)

90 > 26 修正
年 月 日

A5

B5

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 新穎酵素，其製備及用途及包含彼等之混合物)
及組合物

本發明是有關新穎的繩狀青霉 (*Penicillium funiculosum*)，
由彼中所得之新穎酵素及酵素混合物，以及酵素在改進動物
飼料消化能力之用法。

英文發明摘要 (發明之名稱： "NEW ENZYMES , THE PREPARATION AND USE)
THEREOF AND MIXTURES AND COMPOSITIONS
CONTAINING THEM"

The present invention relates to a novel fungal strain of *Penicillium funiculosum*, to
new enzymes and enzyme mixtures obtained from it, and to the use of the enzymes in
improving the digestibility of animal feedstuffs.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

六、申請專利範圍

1. 一種真菌菌株，其係為繩狀青霉 CCRC 930030 (Penicillium funiculosum CCRC 930030) (IMI 378536)。
2. 一種木聚糖酶，其可得自如申請專利範圍第1項之真菌菌株，其中該酵素在pH約3.0處有最適宜的木聚糖酶活性。
3. 一種木聚糖酶，其可得自如申請專利範圍第1項之真菌菌株，其中該酵素在pH由4.0至5.0時有最適宜的木聚糖酶活性。
4. 一種 β -葡聚糖酶，其可得自如申請專利範圍第1項之真菌菌株。
5. 一種阿魏酸酯酶，其可得自如申請專利範圍第1項之真菌菌株。
6. 一種酵素混合物，其包含一或多種可得自如申請專利範圍第1項之真菌菌株之酵素。
7. 根據申請專利範圍第6項之酵素混合物，其包含如申請專利範圍第2及3項之木聚糖酶及如申請專利範圍第4項之 β -葡聚糖酶。
8. 根據申請專利範圍第7項之酵素混合物，其進一步包含纖維素酶。
9. 一種醱酵母真菌菌株之方法，該此如申請專利範圍第1項之氮及無機鹽來源中醱酵該菌株。
10. 一種製備如申請專利範圍第2至5項中任一項義之酵素之方法，此方法包含培養如申請專利範圍第1項之真菌菌株及自培養基中回收酵素。
11. 一種製備如申請專利範圍第6項之酵素混合物之方法，此

六、申請專利範圍

方法包含培養如申請專利範圍第1項之真菌菌株及自培養基中回收該混合物。

12. 一種醱酵受質之方法，此方法包含將如申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素，或如申請專利範圍第6項之酵素混合物，或如申請專利範圍第1項之真菌菌株，與受質在可令醱酵發生之條件下接觸。
13. 根據申請專利範圍第12項之方法，其中的受質是動物飼料或其組份。
14. 一種適於添加至動物飼料中之製劑，此製劑包含如申請專利範圍第1至2項中任一項之酵素，或如申請專利範圍第6項之酵素混合物。
15. 一種呈液體型式之組合物，其包含有：
 - 得自 如申請專利範圍第1項之真菌菌 4%-10%
株之微生物產物，呈總有機固體型式
 - 抗菌劑 0.005%-0.35%
 - 山梨醇 20%-50%
 - 抗凍劑 0%-40%
 - 濃縮且濾過之得自 如申請專利範圍 0.3-76%
第1項之真菌菌株之醱酵液
 - 經緩衝並調整至pH 3-5
16. 根據申請專利範圍第15項之組合物，其中的抗菌劑選自山梨酸及鹽類，苯甲酸及鹽類，4-羥基苯甲酸甲酯4-羥基苯甲酸正丙酯，延胡索酸，鹽類及酯類，氯化鈉及氯化鉀。

六、申請專利範圍

17. 根據申請專利範圍第15或16項之組合物，其中的抗凍劑選自1,2-丙二醇，乙二醇及甘醇。
18. 一種呈粉末型式之組合物，其包含
 - 得自 如申請專利範圍第1項之真菌菌株之微生物產物，呈總有機固體粒子型式
 - 載劑 59%-83%
 - 其他經乾燥之得自 如申請專利範圍第1項之真菌菌株之醱酵液組份 1%
19. 根據申請專利範圍第18項之組合物，其中的載劑選自小麥粉，澱粉，石膏，麥芽糖糊精，玉米固體及來自穀物加工中之副產物如玉米粗粒，小麥粗粉，小麥麩，裸麥渣滓。
20. 根據申請專利範圍第15或16項之組合物，其中該微生物產物含有一或多種如申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素，或如申請專利範圍第6項中之酵素混合物。
21. 根據申請專利範圍第20項之組合物，其中的微生物產物選自由申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素及如申請專利範圍第6項之酵素混合物所組成之產物。
22. 如申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素，其係用於餵養農場動物，如家禽，豬隻及反芻動物。
23. 如申請專利範圍第6項之酵素混合物，其係用於餵養農場動物，如家禽，豬隻及反芻動物。
24. 如申請專利範圍第14項之製劑，其係用於餵養農場動

六、申請專利範圍

- 物，如家禽，豬隻及反芻動物。
25. 如申請專利範圍第15或16項之組合物，其係用於飼養農場動物，如家禽，豬隻及反芻動物。
26. 如申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素，其係用於改進穀物(如小麥，大麥，裸麥，小麥粒，燕麥或瑞爾(rile))消化力；油籽如大豆，向日葵或油菜籽；或穀物副產物，如小麥麩。
27. 如申請專利範圍第6項之酵素混合物，其係用於改進穀物(如小麥，大麥，裸麥，小麥粒，燕麥或瑞爾(rile))消化力；油籽如大豆，向日葵或油菜籽；或穀物副產物，如小麥麩。
28. 如申請專利範圍第14項之酵素製劑，其係用於改進穀物(如小麥，大麥，裸麥，小麥粒，燕麥或瑞爾(rile))消化力；油籽如大豆，向日葵或油菜籽；或穀物副產物，如小麥麩。
29. 如申請專利範圍第15或16項之組合物，其係用於改進穀物(如小麥，大麥，裸麥，小麥粒，燕麥或瑞爾(rile))消化力；油籽如大豆，向日葵或油菜籽；或穀物副產物，如小麥麩。
30. 如申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素，其係用於減少磷排泄。
31. 如申請專利範圍第6項之酵素混合物，其係用於減少磷排泄。
32. 如申請專利範圍第14項之製劑，其係用於減少磷排泄。

六、申請專利範圍

33. 如申請專利範圍第15或16項之組合物，其係用於減少磷排泄。
34. 如申請專利範圍第2至5項中任一項之酵素，其係用於增加磷消化性利用。
35. 如申請專利範圍第6項之酵素混合物，其係用於增加磷消化性利用。
36. 如申請專利範圍第14項之製劑，其係用於增加磷消化性利用。
37. 如申請專利範圍第15或16項之組合物，其係用於增加磷消化性利用。

裝

訂