

以外源性葡聚糖酶發酵麩皮取代部分玉米對 生長期肉豬生長與血液性狀之影響⁽¹⁾

劉芳爵⁽²⁾⁽⁴⁾ 林幼君⁽³⁾

收件日期：104 年 10 月 12 日；接受日期：105 年 3 月 25 日

摘 要

為提升此階段肉豬之飼糧麩皮的使用量，本試驗以酵母細胞表現外源性葡聚糖酶供進行麩皮的固態發酵用，並評估以未發酵或發酵麩皮取代部分玉米，對生長期肉豬之生長與血液性狀之影響。在外源性葡聚糖酶的表現量，酵母菌轉形株 No.9 與 10，分別具有 18 與 22 U/mL 之水解纖維素活性，水解麩皮產生的還原糖量亦比未發酵者增加 4.9 倍 (22.0 mg vs. 4.5 mg)。在動物飼養試驗，採用體重 30 kg LYD 雜交肉豬，共 30 頭公母各半分別飼養於個別欄舍。飼糧共五組，分別為以玉米—大豆粕為基礎飼糧作為對照組 (0% 麩皮)、分別以 5% 與 10% 未經及經發酵之麩皮取代等量玉米共 4 組試驗飼糧，飼養 4 週。動物飼養結果，以 5% 與 10% 麩皮或發酵麩皮等量取代玉米對生長期肉豬之生長性狀沒有顯著差異，但是在血液性狀方面，發酵麩皮組有較高的血漿尿素氮與較低總蛋白含量，但是兩者含量仍在豬隻正常血液生理值範圍內。因此，由前述結果顯示，以經外源性葡聚糖酶進行固態發酵麩皮或麩皮可取代生長期肉豬飼糧中 5 — 10% 之玉米，並不影響生長期肉豬之生長與血液性狀。

關鍵詞：麩皮、固態發酵、 β 葡聚糖酶。

緒 言

纖維的型態最常以非澱粉類多醣型式存在，植物細胞壁中之纖維素、半纖維素與果膠高達 90% 組成，由非澱粉類多醣組成 (Selvendran and Robertson, 1990)，剩餘一小部分則由聚果糖 (fructans)、葡甘露聚糖 (glucomannans)、半乳露聚糖 (galactomannans)、粘液質 (mucilages)、 β 葡聚糖 (β -glucans) 與膠質 (gums) 等組成。另外，木質素是一種高分子量聚合物，但不屬於多醣，無法被豬隻消化利用 (Grieshop *et al.*, 2001)。豬飼糧中纖維的消化率可以介於 0 — 97%，端賴如纖維的來源 (Bach Knudsen and Hansen, 1991)、處理過程 (Fadel *et al.*, 1989) 以及占飼糧之比例等因素 (Stanogias and Pearce, 1985; Goodlad and Mathers, 1991)。非澱粉類之多醣一部分可以於後腸進行發酵，產生揮發性脂肪酸 (volatile fatty acids) 如醋酸、丙酸與酪酸等，而這些揮發性脂肪酸可以快速吸收提供豬隻 5 — 28% 所需能量 (Imoto and Namioka, 1978; Rerat *et al.*, 1987)。

小麥麩皮之粗纖維含量高達 9.5% 以上，具有輕瀉性，慣常被使用於種母豬飼料中，肉豬飼糧的部分使用量較低。據游等 (1986) 試驗結果顯示，以 0、5、10、15 或 20% 麩皮取代玉米—大豆粕飼料，並以添加油脂與合成必須胺基酸，維持每日相同的營養濃度的攝取量，不影響豬隻日增重、日採食量與屠體性狀，但飼料效率會隨麩皮用量增加而變差。另外在一些文獻報告指出，飼糧纖維對豬隻胃腸道中之代謝生理功能具有助益，但是仍需注意纖維的類型與含量等影響因素 (Noblet and Le Goff, 2001; Wenk, 2001; Zijlstra *et al.*, 2010)。為了降低生長期肉豬日糧中纖維成分的負面影響，越來越多的研究重點，運用發酵處理獲取纖維的有利作用，例如，利用微生物在迴腸利用纖維合成某些胺基酸 (Zhu *et al.*, 2007)、發酵過程中產生的短鏈脂肪酸可供作能量的來源 (Anguita *et al.*, 2006)、經過發酵的纖維在腸道後半段具有益菌素 (prebiotic) 的作用與藉由產生短鏈脂肪酸促進腸道上皮細胞吸收營養的作用 (Smiricky-Tjardes *et al.*, 2003; Kien *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010; Reilly *et al.*, 2010; de Lange *et al.*, 2010)、中和結腸發酵後產生的毒害物質 (Cone *et al.*, 2005) 與產生的惡臭化合物 (Nahm, 2003; Bindelle *et al.*, 2008; Zervas and Zijlstra, 2002)、改

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2380 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(4) 通信作者，E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw。

變尿液中的揮發性尿素與穩定糞便中的細菌蛋白等效果 (Bindelle *et al.*, 2009)。瘤胃之細菌類與真菌類微生物中，具有多種水解植物多醣之酵素，可以有效降解纖維素 (Williams and Orpin, 1987)。由於麩皮屬於含高量纖維的飼料原料，且其單價約為玉米的 2/3，若能提高其在豬隻飼糧的使用量，將可降低飼料成本與減少玉米的使用量。因此，本試驗利用酵母細胞表現外源性葡聚醣酶進行麩皮的固態發酵，並評估以發酵麩皮取代部分玉米對生長期肉豬生長與血液性狀的影響。

材料與方法

I. 葡聚醣酶 cDNA (*Fibrobacter succinogenes* 1, 3-1-4- β -D- glucanase gene, β -glucanase) 之選殖

試驗取 10 mL 瘤胃液經過濾後，利用商業化套組 (QIAamp DNA mini Kit, QIAGEN US)，並依照廠商所提供的操作步驟進行瘤胃液中微生物 DNA 的萃取，取得高品質的微生物 DNA。

選殖葡聚醣酶的編碼基因，利用 primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 設計葡聚醣酶專一性之引子對 (Forward primer: 5'-AGCTAATGCTGCTTGTGGTGG-3' 與 Reverse primer: 5'-GGATGGTCTAGCATTCTTACTAATTG-3') 後，以 94°C 2 分鐘、94°C 30 秒、60°C 30 秒、72°C 1 分鐘以及 72°C 7 分鐘等反應條件，進行 PCR 增幅 1.0 kb 之葡聚醣酶編碼基因，之後取 10 μ L 之 PCR 產物，進行 1.5% 瓊脂膠片電泳，以溴化乙錠染色，運用數位式影像分析每條量亮帶之相對亮度，並以此作為葡聚醣酶編碼基因定量用。當確認此 PCR 產物之大小與欲選殖基因相符時，即利用 T4 結合酶將其連結於 pGEM-T Easy 載體，再利用 42°C 45 秒進行熱衝擊 (heat shock)，將該載體送入勝任細胞 (DH5 α 菌株)，篩選培養基上呈白色菌落者，將其接種於 LB (Lysogeny broth) 液態培養基中，培養 18 小時後取 1.5 mL 菌液於微量離心管中，抽取質體 DNA 後委由基龍米克斯生物科技股份有限公司以 dideoxy chain termination method 進行核酸序列定序與利用 BLAST (basic local alignment search tool) 進行核酸序列比對。

II. 葡聚糖酶表現載體之構築

運用致突變引子對 (5'-GAATTCAGGCGATGAGCCCCTT-3' 與 5'-TCTAGACACGGGAGCCAGCC-3') 以 PCR 方法，反應條件為 94°C 2 分鐘、94°C 30 秒、65°C 30 秒、72°C 1 分鐘以及 72°C 進行 7 分鐘，增幅前後分別帶有 *EcoRI* 與 *XbaI* 限制酶之葡聚糖酶 DNA 序列，再將其轉形至勝任細胞，經 16 小時培養，萃取其質體 DNA，並利用限制酶酶切質體 DNA，然後回收 DNA，接續設計適宜之表現載體 (pGAPZ α A)，利用 T4 接合酶將其兩者接合，完成表現載體之構築。構築完成之載體，再利用 42°C 45 秒進行熱衝擊，將該載體送入大腸桿菌，並以 Zeocin 抗生素 (Invitrogen) 篩選具有轉染葡聚醣酶編碼基因表現載體之大腸桿菌菌株。

III. 葡聚醣酶之表現載體轉形至酵母菌細胞

再利用 *Pichia pastoris* GS115 菌株作為宿主細胞，將截切後之 pGAPZ α /pGlucanase 質體 DNA 以電穿孔 (electroporation) 方式送入 GS115 酵母菌宿主，並以 Zeocine 進行篩選嵌入葡聚醣酶表現載體高複製數 (copy number) 之酵母菌，並 YPD (yeast extract 1%、peptone 2% 與 glucose 2%) 培養液培養，離心取其上清液，並利用 15% 聚丙烯酰胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 分離不同分子量的蛋白質。運用抗體 Anti-HIS (C-term)-HRP (Invitrogen) 在稀釋倍率為 1:5,000 條件下，進行西方墨點法分析，藉以篩選具有高表現量葡聚醣酶之酵母菌轉形株。

IV. 還原糖測定方法

以葡萄糖和雙硝基水楊酸 (3,5- dinitro-salicylic acid, DNS) 作呈色反應，並利用分光光度計進行葡萄糖之定量分析 (Miller, 1959)。試驗以此法測定纖維素基質在分解酵素作用後，單位時間所產生的還原糖量，表示葡聚醣酶之活性高低。在葡萄糖檢量線製備，分別從 10 mg/mL 葡萄糖溶液中取 0、0.1、0.5、1、1.5、2 及 2.5 mL 入 10 mL 定量瓶，各 10 mL 定量瓶以磷酸鈉緩衝液 (sodium phosphate buffer) 定量至 10 mL，即成 0 (試劑空白組)、0.1、0.5、1、1.5、2.0 及 2.5 mg /mL 葡萄糖溶液。以不同濃度葡萄糖標準品之濃度 (為 x 軸) 對其波長 540 nm 下吸光值扣除試劑空白組吸光值後之差值 (為 y 軸) 作圖，求出迴歸曲線之方程式。

進行酵母菌轉形株菌數之麩皮小量固態發酵試驗，分別接種 1×10^6 cfu/kg 或 1×10^8 cfu/kg 菌數於裝有 20 g 麩皮之 50 mL 已滅菌塑膠管中，將水分含量調整於 40 – 45% 之間，將其至於 30°C 培養 48 小時，並以 60 rpm/min 持續轉動。發酵麩皮還原糖含量的分析，首先將前述兩種發酵麩皮各取 1 g 置於沸水浴中，反應 5 分鐘後置入冰水浴中冷卻，加入 5 mL 二次水混合均勻，室溫下離心去除懸浮物後以 3,000 rpm 離心 20 分鐘後，以分光光度計於波長 540 nm 下測定各組吸光值，利用葡萄糖檢量線計算出還原糖的含量。同時，以濾紙 No.4 作為纖維素的基質，加入以 YPD 培養液培養 72 小時後之 No. 9 或 10 酵母菌轉形株發酵液各 0.5 mL，分析此兩株轉形株

分解纖維素之酵素活性，並將 1 U 活性定義為在 39°C 下每分鐘生成 1 µg 還原糖。

V. 比較未經與經葡聚糖酶固態發酵麩皮之生長長期肉豬飼效試驗

發酵麩皮之製作過程，首先以 7 L 小型發酵槽培養酵母菌株約 36 小時後，取 1 mL 發酵液以血球計數器分析菌株的濃度，當濃度高於 5×10^9 cfu/L，取 2 公升菌液接種於放置 200 kg 麩皮之固態發酵槽（菌數相當於 1×10^8 cfu/kg），並以 30°C 恆溫連續培養 48 小時，過程中需控制水分於 40 – 45% 之間，並以 60 rpm/min 持續攪拌，最後再將發酵後之麩皮至於大烘箱中進行乾燥，使水分含量降低至 10%，在乾燥完成後。避免酵母菌轉形株發生污染的疑慮，再以 YPD agar 培養基確認發酵麩皮中，並無存活之酵母菌株。在動物飼效試驗，採用體重 30 kg 之 LYD 雜交肉豬，共 30 頭公母各半分別飼養於個別欄舍。試驗飼糧共有五種，分別為玉米—大豆粕為基礎飼糧作為對照組 (0% 麩皮)、以麩皮及經發酵麩皮 5 或 10% 取代等量玉米共 4 組試驗組飼糧 (如表 1)，進行 4 週。試驗期間。採任食並充分供應清潔飲水，每 2 週秤重一次，並紀錄飼料採量，供進行分析生長性狀，並於試驗結束日，採集血液樣品供分析血液性狀。

VI. 統計分析

試驗相關之數值以 SAS (2004) 電腦套裝軟體進行統計分析，並以一般線性模式程序 (general linear model, GLM) 進行變方分析，以最小均方演算法 (least square means, LSM) 分析各處理組間之顯著差異，當 P 值小於 0.05 時表差異顯著。

表 1. 生長長期肉豬試驗用飼糧之組成分

Table 1. Composition of experimental diets for grower pigs

Items	Control diet	Wheat bran		Fermentated wheat bran	
	0%	5%	10%	5%	10%
Ingredients, %					
Corn, yellow	73.27	68.27	63.77	68.27	63.77
Soybean meal, 44%	19.0	19	19	19	19
Wheat bran	0	5	10	5	10
Fish meal, 61.2%	3	3	3	3	3
Dicalcium phosphate	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
Limestone, pulverized	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Salt, iodized	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Vitamin premix ^a	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Mineral premix ^b	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Molasses, cane	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Choline-chloride, 50%	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Total	100	100	100	100	100
Analyzed values					
Crude protein, %	16.10	16.42	16.74	16.51	16.95
Lysine, %	0.88	0.89	0.91	0.91	0.90
Calcium, %	0.80	0.82	0.84	0.82	0.85
Phosphorus, %	0.60	0.62	0.66	0.64	0.67

^a Vitamin premix provided the following vitamins per kg of diet: vitamin A, 8,000 IU; vitamin D₃, 800 IU; vitamin E, 30 IU; vitamin K₃, 1.0 mg; thiamin, 2.0 mg; riboflavin, 5.0 mg; vitamin B₁₂, 25 µg; Ca-pantothenate, 12 mg; niacin, 18 mg; folic acid, 0.4 mg; biotin, 0.06 mg and choline, 120 mg.

^b Mineral premix provided the following minerals per kg of diet: Cu, 10 mg; Fe, 100 mg; Zn, 100 mg; Mn, 10 mg and Se, 0.1 mg.

結果與討論

I. 葡聚糖酶 cDNA 之選殖與表現載體之構築

試驗採集瘤胃開窗荷蘭牛之瘤胃液 10 mL，萃取瘤胃微生物 DNA，並以葡聚糖酶專一性之引子對，進行 PCR 增幅 1.0 kbp 之葡聚糖酶編碼基因 (如圖 1)，接續將此 PCR 產物黏合於 pGEM-T Easy 載體上，再轉形於 DH5 α 之勝任細胞中，並置於 LB 培養液中於 37°C 培養箱培養 18 小時後，抽出質體 DNA 進行核酸序列定序。接續將此核苷酸定序資料運用 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站提供之核苷酸-核苷酸-BLAST 比對序列。結果顯示選殖之 cDNA 產物與葡聚糖酶 100% 相似度 (Accession number: M33676.1)。

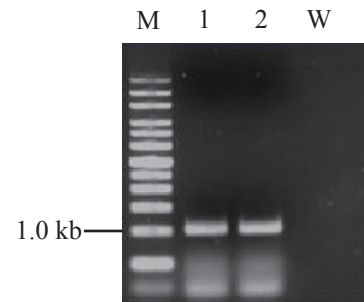


圖 1. 葡聚糖酶基因選殖。

Fig. 1. The PCR product of beta-glucanase
M represented 1-kb DNA marker.
Lane 1 and 2 represented *beta*-glucanase DNA.
W represented negative control.

II. 葡聚糖酶表現載體之構築與分析

接續利用帶有 *Eco*RI 與 *Xba*I 限制酶切位之重組引子對，運用 PCR 方法選殖 966-bp 之葡聚糖酶編碼基因，運用熱衝擊方法將其轉形於 DH5 α 之勝任細胞中，置於 LB 培養液利用 37°C 培養箱培養 18 小時，抽出質體 DNA 進行 *Eco*R I 與 *Xba* I 限制酶截切後，利用 T4 接合酶接合於酵母菌載體 (pGAPZ α A)，同時將該質體 (pGAPZ α A-pPepsin)，依照 Lee *et al.* (2005) 方法轉形至 DH5 α 中，經低鹽濃度之 LB broth 培養液培養 37°C 後，再離心收集菌體並抽出 pGAPZ α A-pGlucanase 質體，確定葡聚糖酶完整之編碼基因嵌入此載體。接續選用酵母菌之 GS115 菌株作為寄主細胞 (Waterham *et al.*, 1997; Jungoh *et al.*, 2007)，將 pGAPZ α A-pGlucanase 質體以電穿孔方式轉形於 GS115 酵母菌寄主，並以 Zeocine 篩選具有高複製套數之葡聚糖酶表現載體之酵母菌轉形株 (如圖 2)。

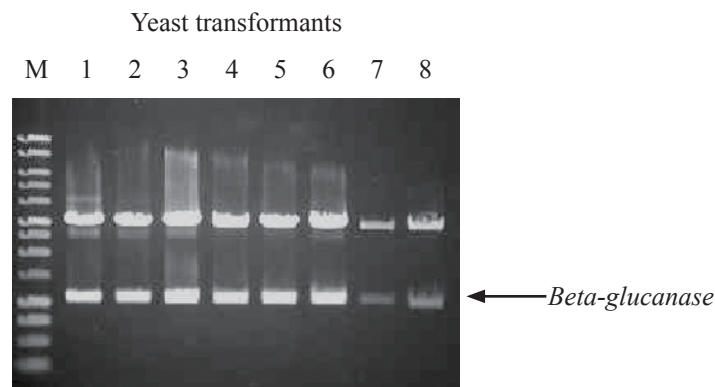


圖 2. 分析酵母菌轉形株之 pGAPZ α A-pGlucanase 表現載體 DNA 含量。

Fig. 2. Analysis of DNA level of pGAPZ α A-pGlucanase expression vector from yeast transformants.
M represented 1-kb DNA marker.
Yeast transformants No.1-8 represented had integrated pGAPZ α A- pGlucanase expression vector.

III. 篩選外源性葡聚糖酶高表現量之酵母菌轉形株

分析酵母菌轉形株 No.1 – 12 之 mRNA 轉錄本表現量，其中 No.8 – 12 等 4 株表現量較高 (如圖 3)。接續將此上述 4 株轉形株接種於 YPD 培養液中，經 72 小時發酵後取上清液進行 SDS-PAGE 與西方墨點法分析 (圖 4 與 5) 顯示，No.9 與 10 之酵母菌轉形株表現較高外源性葡聚糖酶 (分子量 33 kDa)。另外，以濾紙片 No.4 為基質分析，前述兩株酵母菌轉形株水解纖維素活性，分別為 18 與 22 U/mL，可供運用於進行麩皮的固態發酵。

IV. 比較未經與經葡聚糖酶水解麩皮之動物飼效試驗

選取 No.9 酵母菌轉形株分別添加 1×10^6 與 1×10^8 cfu/kg 兩種菌數於 20 g 麩皮中進行小量發酵，並以 DNS 方法分析，麩皮 (菌數 0) 與接種前述兩種菌數之發酵麩皮，每 1 g 分別有 4.5、14 以及 22 mg 之還原糖 (如表 2)。由此結果顯示，No.9 酵母菌轉形株具有水解麩皮纖維素的能力，同時水解纖維素的能力隨接種菌數增加而增加。

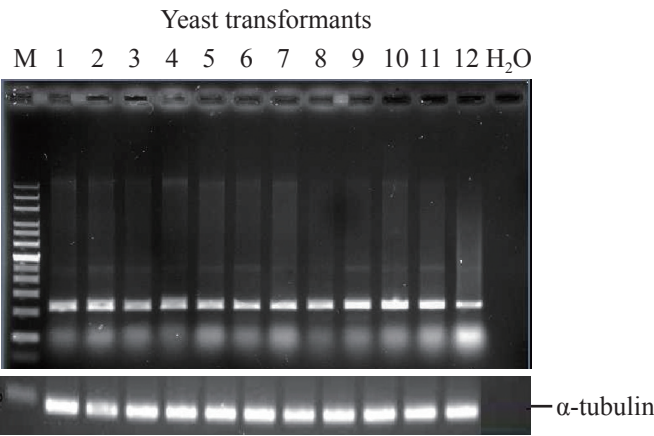


圖 3. 酵母菌轉形株轉錄 Glucanase mRNA 的含量。
Fig. 3. The level of Glucanase mRNA transcribed from yeast transformants
M noted protein marker.
No.1-12 were yeast transformants respectively.

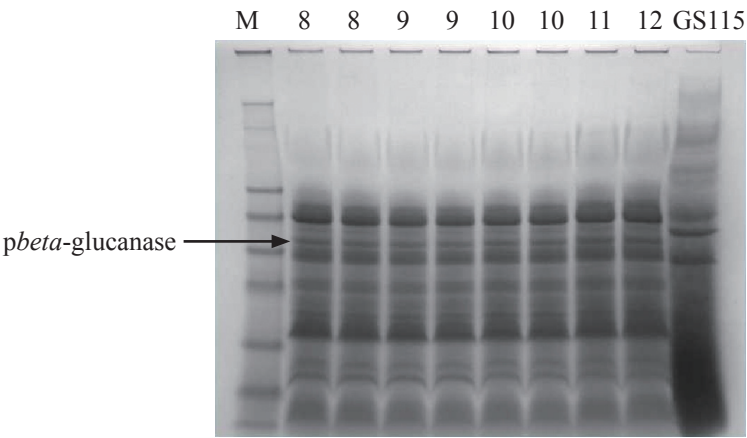


圖 4. 以 SDS-PAGE 分析外源性葡聚糖酶的表現量。
Fig. 4. Exogenous beta-glucanase secreted levels of assay by SDS-PAGE
GS115 served as negative control (only contained empty vector).

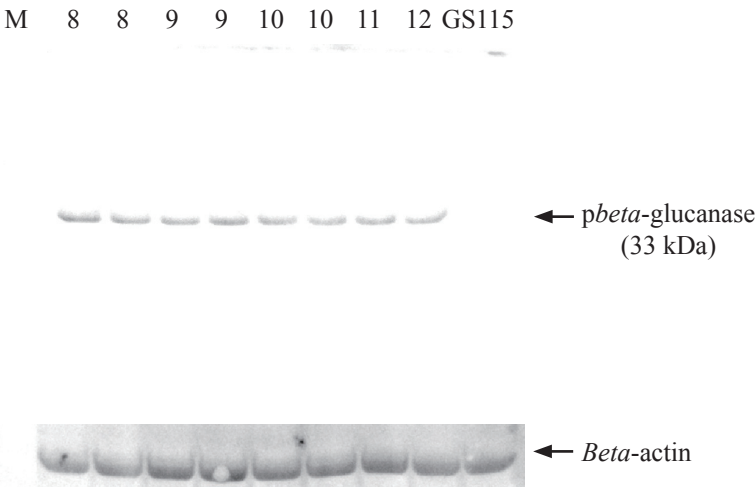


圖 5. 以西方墨點法分析酵母菌轉形株葡聚糖酶的表現量。
Fig. 5. Yeast transformants secrete capacity of assay by western blot
GS115 served as negative control.
Beta-actin served as internal control.
M represented protein marker (3.0-191 kDa).

在動物飼效試驗方面，在日增重、採食量與飼料效率，各飼糧間沒有顯著差異 (如表 3)，此結果與游等 (1987) 報告結論相似。不過在比較麩皮與經發酵麩皮組結果顯示，在豬隻生長性狀 (日增重、飼料採食量與飼料效率) 麩皮組有略低的現象，此現象可能因發酵麩皮還原醣含量高於麩皮 (如表 2)，有助於提升生長期肉豬的生長表現。

表 2. 酵母菌轉形株接種菌數對麩皮還原醣產生量之影響

Table 2. The impact of the number of inoculated yeast transformants on the product of reducing glucose from wheat bran

	The number of inoculated yeast transformants		
	0	1×10^6 cfu/kg	1×10^8 cfu/kg
Reducing glucose, mg	4.5	14	22

表 3. 以 5 或 10% 之麩皮與發酵麩皮取代等量玉米對生長期肉豬生長性狀之效應

Table 3. The effects of 5 or 10% of wheat bran and fermented wheat bran substituted the same amount of yellow corn in diets on growth performance of grower pig

Items	Control diet	Wheat bran		Fermentated wheat bran	
	0%	5%	10%	5%	10%
Total of trial	6	6	6	6	6
ADG, kg/d	$0.77 \pm 0.19^*$	0.74 ± 0.28	0.69 ± 0.19	0.76 ± 0.18	0.74 ± 0.12
ADFI, kg/d	1.85 ± 0.58	2.16 ± 0.64	1.97 ± 0.51	1.89 ± 0.59	1.86 ± 0.50
FE (feed/gain)	2.40 ± 0.42	2.81 ± 0.98	2.86 ± 0.99	2.49 ± 0.43	2.51 ± 0.38

* The meaning of value is mean \pm SD.

在血液性狀方面，對照組的血液總蛋白含量顯著高於以發酵麩皮取代玉米組 (5 和 10%)，但是在發酵麩皮兩組間，則沒有顯著差異 (如表 4)。豬隻血液總蛋白含量，主要由球蛋白和白蛋白組成，兩者分別為免疫狀態與肝功能的重要指標，當出現肝臟損害的情況下，白蛋白和總蛋白都會減少 (Plank *et al.*, 2008)，不過在本試驗以發酵麩皮取代玉米組血液總蛋白含量雖然顯著低於對照組 (6.11 vs. 5.96 vs. 6.59 g/dL)，但其分析含量值與一般豬隻正常血液總蛋白含量 3.5 – 6.0 g/dL 比較，兩者間數值相近 (Radostitis *et al.*, 2000)，顯示此發酵麩皮並不會影響生長期肉豬之免疫與肝臟功能。在血漿尿素氮 (BUN) 含量，以 10% 發酵麩皮取代玉米組顯著高於對照組與麩皮組，而對照組與麩皮組三組間沒有差異，但是各組血液的 BUN 分析數值，均介於正常值 7 – 18 mg/dL 之間 (Kaneco, 1989)，顯示各處理組間並無異常現象。至於發酵麩皮組 BUN 偏高的原因，可能因以等量麩皮取代玉米時，麩皮蛋白質含量 15% 高於玉米 7% (如表 1)，亦可能因麩皮在外源性葡聚醣酶的水解過程中產生胺基態氮，生長期肉豬對其利用率較低，導致豬隻血漿尿素氮的含量較高 (Bindelle *et al.*, 2009)。另外，在肌酸酐含量各組間則沒有差異。

表 4. 以 5 或 10% 之麩皮與發酵麩皮取代等量玉米對生長期肉豬血液性狀之效應

Table 4. The effects of 5 or 10% of wheat bran and fermented wheat bran substituted the same amount of yellow corn in diets on blood traits of grower pig

Items	Control diet	Wheat bran		Fermentated wheat bran	
	0%	5%	10%	5%	10%
Total of trial	6	6	6	6	6
ADG, kg/d	$6.59 \pm 0.44^{*a}$	6.25 ± 0.28^{abc}	6.49 ± 0.39^{ab}	6.11 ± 0.33^{bc}	5.96 ± 0.33^c
ADFI, kg/d	12.53 ± 3.05^b	12.65 ± 1.79^b	12.18 ± 3.69^b	14.76 ± 2.25^{ab}	15.10 ± 3.12^a
FE (feed/gain)	1.43 ± 0.10	1.43 ± 0.18	1.33 ± 0.25	1.40 ± 0.31	1.40 ± 0.17

* The meaning of value is mean \pm SD.

^{a, b, c} Means in the same row with different superscripts differed significantly ($P < 0.05$).

結 論

運用葡聚醣酶編碼基因 (966 bp) 轉形至酵母菌宿主細胞，表現外源性葡聚醣酶具有水解纖維素的作用，其中酵母菌轉形株 No. 9 與 10 表現之外源性葡聚醣酶，分別具有 18 與 22 U/ml 之水解纖維素活性，且當接種菌數達 1×10^8 cfu/kg 時，發酵麩皮還原糖產生量高於麩皮 4.9 倍 (22 mg vs. 4.5 mg)。綜合前述結果顯示，以 5% 與 10% 發酵麩皮或麩皮等量取代飼糧中之玉米，並不影響生長長期肉豬之生長與血液性狀。

參考文獻

- 游義德、顏宏達、陳賜鈺。1987。麩皮用量對豬隻生長與屠體性能之影響。中華農學會報 137：72-80。
- Anguita, M., N. Canibe, J. F. Perez and B. B. Jensen. 2006. Influence of the amount of dietary fibre on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: Use of cannulated pigs and *in vitro* fermentation. J. Anim. Sci. 84: 2766-2778.
- Bach Knudsen, K. E. and I. Hansen. 1991. Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 1. Digestibility and bulking properties of polysaccharides and other major constituents. Brit. J. Nutr. 65: 217-232.
- Bindelle, J., A. Buldgen, J. C. B. Wavreille and P. Leterme. 2007. Effect of inoculum and pepsin-pancreatin hydrolysis on fibre fermentation measured by the gas production technique in pigs. Anim. Feed Sci. Tech. 132: 111-122.
- Bindelle, J., A. Buldgen, M. Delacollette, J. Wavreille, R. Agneesens, J. P. Destain and P. Leterme. 2009. Influence of source and concentrations of DF on *in vivo* nitrogen excretion pathways in pigs as reflected by *in vitro* fermentation and nitrogen incorporation by faecal bacteria. J. Anim. Sci. 87: 583-593.
- Cone, J. W., A. W. Jongbloed, A. H. V. Gelder and L. D. Lange. 2005. Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. Anim. Feed Sci. Tech. 124: 463-472.
- De Lange, C. F. M., J. Pluske, J. Gong and C. M. Nyachoti. 2010. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. Livest. Sci. 134: 124-134.
- Fadel, J. G., R. K. Newman, C. W. Newman and H. Graham 1989. Effects of baking hullless barley on the digestibility of dietary components as measured at the ileum and in the feces in pigs. J. Nutr. 119: 722-726.
- Goodlad, J. S. and J. C. Mathers. 1991. Digestion by pigs of non-starch polysaccharides in wheat and raw peas (*Pisum sativum*) fed in mixed diets. Brit. J. Nutr. 65: 259-270.
- Grieshop, C. M., D. E. Reece and G. C. Fahey. 2001. Nonstarch polysaccharides and oligosaccharides in swine nutrition. In swine nutrition. 2nd edition. Edited by Lewis, A. J., L. L. Southern and F. L. Boca Raton, CRC Press, p. 107-130.
- Imoto, S. and S. Namioka. 1978. VFA production in the pig large intestine. J. Anim. Sci. 47: 467-478.
- Jungoh, A., J. Hong, H. Lee, M. Park, E. Lee, C. Kim, E. Choi, J. Jung and H. Lee. 2007. Translation elongation factor 1- α gene from *Pichia pastoris*: molecular cloning, sequence and use of its promoter. App. Genet. Mol. Biotech. 74(3): 601-608.
- Kaneco, J. J. 1989. Clinical biochemistry of domestic animals. pp. 269-270, 4th eds., Academic Press. San Diego, California.
- Kien, C. L., R. Blauwiel, J. Y. Bunn, T. L. Jetton, W. L. Frankel and J. J. Holst. 2007. Cecal infusion of butyrate increases intestinal cell proliferation in piglets. J. Nutr. 137: 916-922.
- Lee, C., T. Williams, D. Wong and G. Robertson. 2005. An episomal vector for screening mutant gene libraries in *Pichia pastoris*. Plasmid. 54: 80-85.
- Martins, C., M. Pinho, M. M. Lordelo, L. F. Cunha, J. Carvalho and J. P. B. Freire. 2010. Effect of brewer's grain on intestinal microbial activity and mucosa morphology of weaned piglets. Livest. Sci. 133: 132-134.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31(3): 426-428.
- Nahm, K. H. 2003. Influences of fermentable carbohydrates on shifting nitrogen excretion and reducing ammonia emission of pigs. Crit. Rev. Env. Sci. Tec. 33 (2): 165-186.
- Noblet, J. and L. G. Goff. 2001. Effect of dietary fibre on the energy value of feeds for pigs. Anim. Feed Sci. Tech. 90: 35-52.
- Plank, L. D., E. J. Gane, S. Peng, C. Muthu, S. Mathur, L. Gillanders, K. McIlroy, A. J. Donaghy and J. L. McCall. 2008. Nocturnal nutritional supplementation improves total body protein status of patients with liver cirrhosis: a randomized 12-month trial. Hepatology 48(2): 557-566.

- Radostitis, O. M., C. C. Gay., D. C. Blood and K. W. Hinchcliff. 2000. Veterinary Medicine, Textbook of the diseases of cattle, sheep pigs, goats and horses. 9th edn. W. B. Saunders Company Ltd., London, pp. 1282.
- Reilly, P., T. Sweeney, A. G. Smith, K. M. Pierce, D. A. Gahan, J. J. Callan and J. V. O'Doherty. 2010. The effects of cereal-derived β -glucans and enzyme supplementation on intestinal microbiota, nutrient digestibility and mineral metabolism in pigs. *Livest. Sci.* 133: 144-147.
- Rérat, A., M. Fiszlewicz, A. Giusi and P. Vaugelade. 1987. Influence of meal frequency on postprandial variations in the production and absorption of volatile fatty acids in the digestive tract of conscious pigs. *J. Anim. Sci.* 64: 448-456.
- SAS Institute. 2004. SAS/STAT Guide for personal computer. Version 9.01. SAS Inst. Inc., Cary, NC. USA.
- Selvendran, R. R. and J. A. Robertson. 1990. The chemistry of dietary fibre: a holistic view of the cell wall matrix. In dietary fibre: chemical and biological aspects. *Roy. Soci. Chem.* 83: 27-43.
- Smiricky-Tjardes, M. R., C. M. Grieshop, E. A. Flickinger, L. L. Bauer and G. C. Fahey. 2003. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and faecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81: 2535-2545.
- Stanogias, G. and G. R. Pearce. 1985. The digestion of fibre by pigs. 3. Effects of the amount and type of fibre on physical characteristics of segments of the gastrointestinal tract. *Brit. J. Nutr.* 53: 537-548.
- Waterham, H. R., M. E. Digan, P. J. Koutz, S. V. Lair and V. Cregg. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-genase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* 186: 37-44.
- Wenk, C. 2001. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Anim. Feed Sci. Tech.* 90: 21-33.
- Williams, A. G. and C. G. Orpin. 1987. Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate, grown on a range of carbohydrates. *Can. J. Microbiol.* 33(5): 427-434.
- Zervas, S. and R. T. Zijlstra. 2002. Effects of dietary protein and fermentable fibre on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs. *J. Anim. Sci.* 80: 3247-3256.
- Zhu, C. L., M. Rademacher and C. F. M de Lange. 2007. Intake of fermentable fibre and body protein deposition in pigs fed methionine or tryptophan limiting diets. *Eur. Ass. Anim. Prod.* 12: 553-554.
- Zijlstra, R. T., A. Owusu-Asiedu and P. H. Simmins. 2010. Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs. *Livest. Sci.* 134: 255-257.

The substitution effects of fermented wheat bran through solid-state fermentation by exogenous *beta*-glucanase for part of yellow corn on growth performance and blood traits of grower pigs ⁽¹⁾

Fang-Chueh Liu ⁽²⁾⁽⁴⁾ and Yu-Chun Lin ⁽³⁾

Received: Oct. 12, 2015; Accepted: Mar. 25, 2016

Abstract

This study was to apply DNA recombination technology to construct and screen yeast transformants and to secrete exogenous *beta*-glucanase for solid-state fermentation of wheat bran. After that, assessment of the impact on growth performance and blood traits through part of the yellow corn in diet replaced with fermented wheat bran or wheat bran for grower pig. In the exogenous *beta*-glucanase of test results showed that yeast transformants No.9 and 10, respectively possessed 18 and 22 U/mL of hydrolysis of cellulose activity and the hydrolysis of wheat bran to produce reducing glucose content would increase 4.9 - fold compared to wheat bran (22.0 mg vs. 4.5 mg). Experimental animals weighing 30 kg LYD hybrid hogs adopted 30 heads half-male and half-female, and housed in individual pen. Dietary arrangement had five groups, corn- soybean meal as based diet was the control group (0% wheat bran) and 5% or 10% with and without fermentation process of wheat bran to substitute 5% or 10% of the same amount of corn in 4 kinds of experimental diets group during the four weeks of trial period. Animal feeding trials, 5% and 10% yellow corn in diet replaced with the equal amount of wheat bran or fermented wheat bran to raise grower pigs were no significant difference in growth performance, but in the blood traits, fed with containing fermented wheat bran group had a higher level of plasma urea nitrogen and a lower level of total protein content, but both of them were still in the normal physiological value. Thus, the previous results revealed that both of fermented wheat bran through solid-state fermentation process by exogenous *beta*-glucanase and wheat bran could replace 5-10% of the yellow corn didn't impact growth performance and blood traits of grower pigs.

Key words: Wheat bran, Solid-state fermentation, Beta-glucanase.

(1) Contribution of No. 2380 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Animal Products Processing Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(4) Corresponding author, E-mail: fcliu@mail.tlri.gov.tw.