

壹、摘要

百慕達乾草是國內餵飼乳牛常用的牧草，其纖維含量偏高，而且在瘤胃的分解緩慢，可能會限制對動物的養分供應。本論文研究的目的是在於探討乳牛瘤胃中添加以木聚糖酵素為主之外源纖維分解酵素，對百慕達乾草瘤胃原位 (*in situ*) 纖維分解率、酵素活性變化與發酵產物的影響。

試驗一評估瘤胃中添加不同劑量 (0、75 或 150 g) 之外源纖維分解酵素，對乳牛瘤胃酵素活性變化與百慕達乾草原位分解率之影響。結果顯示，添加酵素顯著提高餵飼後 1.5 小時與 4.5 小時之瘤胃木聚糖酵素 (xylanase) 活性，而且以添加 150 g 的效果最好；但是對羧甲基纖維素酵素 (carboxy-methyl cellulase, CMCase) 的活性沒有影響。添加酵素提高飼餵後 4.5 小時瘤胃原位中洗纖維 (neutral detergent fiber, NDF) 分解率，其他培養時間 (1.5、7.5 與 24 小時) 則沒有處理效應。酵素的添加對酸洗纖維 (acid detergent fiber, ADF) 分解率沒有影響，但顯著提高餵飼後 4.5 小時之半纖維素分解率，而以 150 g 組最高。SDS-PAGE 電泳圖顯示，外源酵素在瘤胃中可能會快速分解。

試驗二的目的在於探討外源纖維分解酵素與水溶性蛋白質的組合，對瘤胃酵素活性變化、百慕達乾草原位分解率與發酵作用之影響。在體外試驗 (*in vitro*) 方面，使用不同劑量 (0~0.1%) 外源酵素單獨

與瘤胃液共同培養，發現瘤胃液中的 CMCCase 與 xylanase 活性隨著培養時間的增加而逐漸分解。然而，當額外加入牛血清白蛋白或明膠共同培養時，瘤胃液中的酵素活性分解較為緩慢。藉由酵素動力學模式推算，在明膠使用劑量為 0.20 % 時，可以減緩酵素活性分解達 50 %。

在動物試驗方面，使用兩頭配備有瘤胃屜管的荷蘭種母牛，試驗處理分為牛隻餵飼時於瘤胃不添加（對照組）或添加 80 g 纖維分解酵素、160 g 明膠、80 g 酵素搭配 160 g 明膠，以及 160 g 酵素與 160 g 明膠均分為兩次（早上八時和中午十二時）添加。結果發現，試驗的處理降低餵飼後之瘤胃 pH 值，與提高氨、還原糖、蛋白質與非氨非蛋白質態氮濃度。瘤胃乙酸與總揮發性脂肪酸濃度也因為試驗處理而提高，其中以酵素與明膠同時添加的效果較單獨添加酵素為佳，而添加兩次酵素與明膠的處理，比添加一次的處理有較高的總揮發性脂肪酸濃度。酵素搭配明膠比單獨添加酵素，提高瘤胃 CMCCase、xylanase、與外切纖維素分解酵素（avicelase）活性，同時降低蛋白質分解酵素（proteinase）活性，其中以添加兩次酵素搭配明膠的處理效果最高。

另外，百慕達乾草的瘤胃原位分解率也有正面的處理效應，試驗處理提高餵飼後百慕達草在瘤胃中乾物質、NDF、ADF 與半纖維素分解率，其中效果以混合（酵素與明膠）添加的方式較單獨添加酵素，對改善乾物質、NDF、ADF 與半纖維素分解率的效果為優。由 SDS-PAGE 電

泳圖可看出，明膠有減緩外源酵素在瘤胃中的分解，而補充兩次明膠的效果更為明顯。

整體而言，本論文研究的結果顯示，外源纖維分解酵素在瘤胃中，可能是因為瘤胃中蛋白質分解酵素的作用，而快速分解，因而促進瘤胃纖維分解的效果無法持續長久。瘤胃中添加酵素搭配明膠，可以延長酵素在瘤胃中的活性，促進瘤胃纖維分解與發酵作用的效果更為明顯，可能是因為明膠與瘤胃中蛋白質分解酵素發生作用，減少外源纖維分解酵素被破壞。

關鍵詞：外源纖維分解酵素、百慕達乾草、酵素活性、原位分解率

貳、前言

芻料為反芻動物日糧中的主要成分，除了是動物的能量來源，也有維持瘤胃健康的功能。芻料中的纖維在瘤胃中分解緩慢，會限制反芻動物的自願採食量，因而影響到動物的表現 (Van Soest *et al.*, 1991)。纖維中的半纖維素會包覆纖維素 (Tovar *et al.*, 1997)，可能是芻料纖維在瘤胃分解緩慢的重要因素。

百慕達乾草 (*Cynodon dactylon*) 是國內飼餵乳牛與其他反芻動物常用的芻料，其蛋白質含量偏低，而纖維含量偏高 (NRC, 2001)。百慕達乾草中的纖維含有高比例的半纖維素 (Park *et al.*, 1995; Kouakou *et al.*, 1997; West *et al.*, 1997)，而先前的研究報告指出，百慕達乾草的纖維可能較其他牧草不易被瘤胃微生物分解 (Yang, 2002; Ogden *et al.*, 2005)。由於纖維中的半纖維素會包覆纖維素 (Tovar *et al.*, 1997)，推測在百慕達乾草為主的日糧中，添加外源性半纖維素木聚糖分解酵素，可以加速半纖維素的分解，進一步使牧草纖維中的纖維素暴露，因而促進纖維在瘤胃中的分解。

商業用外源纖維分解酵素通常是微生物發酵的產品 (Pendleton, 2000)，已經逐漸被嘗試應用在反芻動物的日糧當中。有些試驗研究發現外源纖維分解酵素可以促進芻料纖維在瘤胃中的分解 (Beauchemin *et al.*, 1999; Kung *et al.*, 2000; Pinos-Rodriguez *et al.*, 2002; Nowak *et al.*,

2003 ; Sutton *et al.*, 2003), 但是也有的報告表示沒有效果 (Hristov *et al.*, 1998b ; Wang *et al.*, 2001)。造成效果變異的可能因素很多 (Beauchemin *et al.*, 2004a ; Beauchemin *et al.*, 2004b), 其中由於外源酵素是水溶性蛋白質, 在瘤胃當中會被微生物破壞而活性分解 (Hristov *et al.*, 1998a ; Morgavi *et al.*, 2001), 因此酵素在瘤胃中的穩定性是影響效果的重要因素。有很多因素會影響外源酵素在瘤胃中的穩定性 (Beauchemin *et al.*, 2004a)。Morgavi *et al.*, (2000b) 的體外試驗結果顯示, 添加水溶性蛋白質可以與瘤胃蛋白質分解酵素產生結合, 而具有保護外源酵素在瘤胃的穩定性。

本論文試驗首先評估添加不同劑量之外源纖維分解酵素, 對瘤胃中纖維分解酵素的活性變化, 以及百慕達乾草分解率的影響。其次, 探討添加外源纖維分解酵素搭配水溶性蛋白質, 對瘤胃發酵特性、酵素活性與百慕達乾草分解率的影響。

參、文獻檢討

一、植物纖維對反芻動物的重要性

植物纖維是地球上含量最多的碳水化合物，由於哺乳動物分泌的消化液中沒有分解纖維的酵素，故其利用性低。反芻動物能夠充分利用植物纖維，主要是仰賴瘤胃中微生物分解纖維的能力，微生物分解的產物可以被反芻動物用來從事各種生理功能。另外，植物纖維能夠刺激反芻作用，對纖維的分解、維持正常的瘤胃生理功能與動物的健康至為重要。瘤胃微生物發酵纖維的主要產物是揮發性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFA)，提供反芻動物的主要能量來源。乙酸是瘤胃中最多的 VFA，丙酸與丁酸次之 (Church, 1979)。

二、植物纖維之結構

植物纖維主要由纖維素 (cellulose)、半纖維素 (hemicellulose)、及木質素所構成，也可稱為木質纖維素 (lignocellulose)，通常以纖維素含量最多，半纖維素次之 (Singleton and Sainsburg, 1988)。植物的種類、成熟度及部位均會影響纖維素與半纖維素的含量 (Chesson and Forsberg, 1997)。

纖維素的結構組成主要是由 100 至 10,000 個葡萄糖單體以 β (1 \rightarrow 4) 糖苷鍵 (β -1,4-glucosidic bonds) 之鍵結方式，形成如圖 1 (a) 之直線聚合物。藉由分子間氫鍵的排列方式，可將纖維素分成結構鬆

散的非結晶區 (amorphous region) 及結構緊密的結晶區 (crystalline region) 圖 1 (b)。數條直鏈型的纖維素形成微束 (micelles)，微束再形成纖維細束 (microfibrils) (圖 2)。由於纖維素具有結晶構造，因此被纖維素分解酵素的水解過程較為緩慢，而非結晶區的部分則較容易被水解 (Beguin, 1974; 村尾 等, 1987)。

半纖維素係指除纖維素、果膠以外，構成植物纖維之其他多醣。半纖維素於構造及組成上皆較纖維素具為多樣性，大多數的半纖維素都是含有兩種以上不同單糖之異多醣 (heteropolysaccharides)，其成分包含木糖 (xylose)、阿拉伯糖 (arabinose)、甘露糖 (mannose) 等五碳糖 (pentose) 與甲基葡萄糖醛酸 (methylgluronic acid) 等 (Jefferies, 1994)。甘露糖聚合而形成甘露聚糖 (mannan)，木糖聚合而形成木聚糖 (xylan)，其中木聚糖為半纖維素之主要成份 (Wong *et al.*, 1988; Lee, 1999)。半纖維素是帶有支鏈的分子，會與纖維素結合，使植物纖維形成緊密的三度空間結構 (圖 3)。

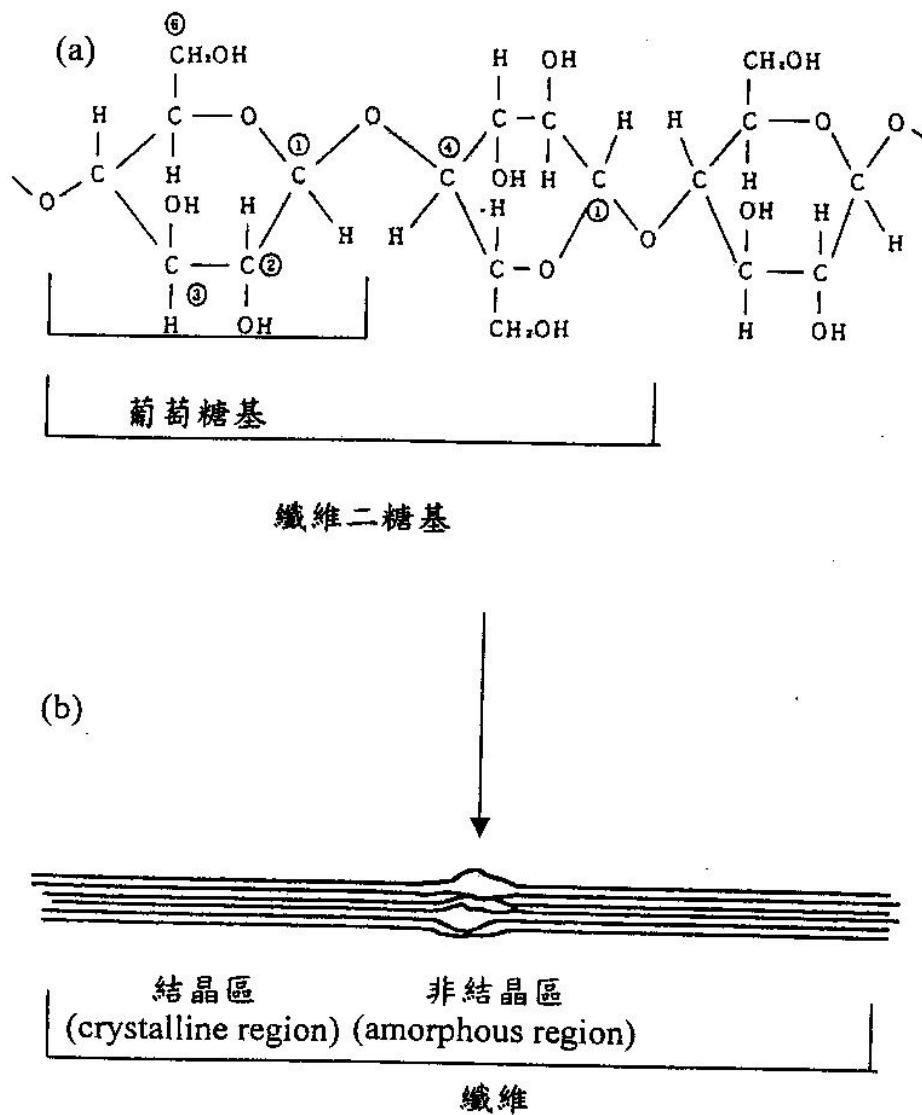


圖 1. 纖維素之結構。(a) 纖維素分子之化學結構 (b) 基本纖維中纖維素分子之構造。(Beguin, 1974)

Fig. 1. Structure of cellulose. (a) Chemical structure of cellulose molecule. (b) Organization of cellulose molecules in elementary fibrils. (Beguin, 1974)

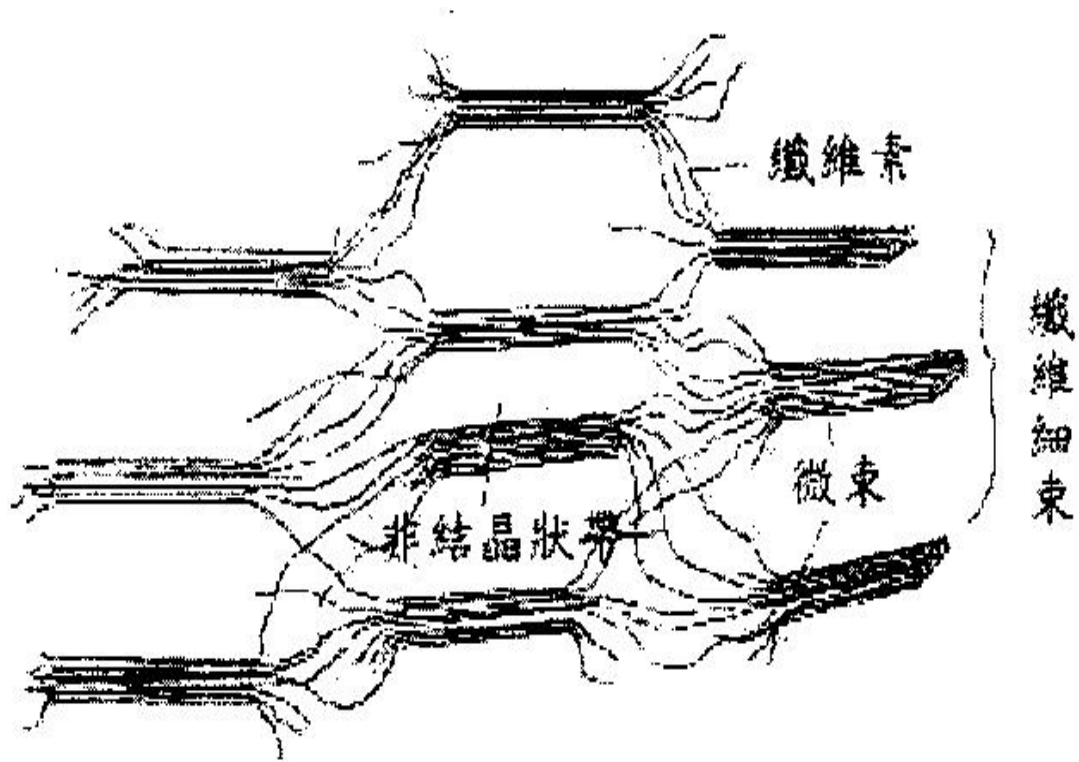


圖 2. 植物細胞壁纖維束示意圖 (蔡, 1994)。

Fig. 2. The structure of macrofibrils in plant cell wall. (蔡, 1994)

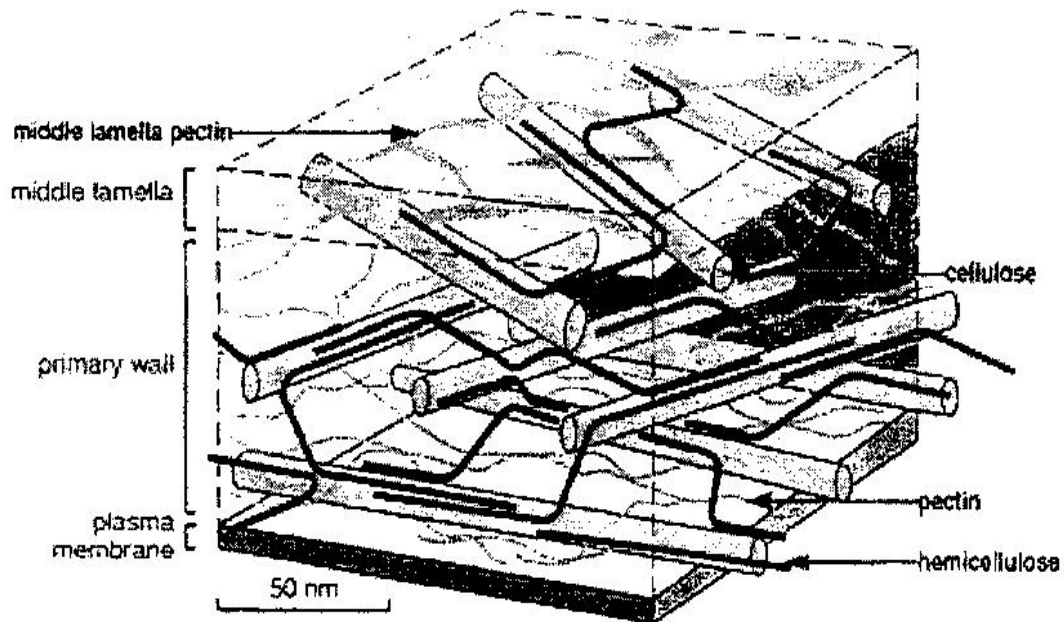


圖 3. 植物細胞壁立體結構圖。

Fig. 3. The dimensional structural diagram of plant cell wall.

Source : IPPA (International Pectin Producers Association), 2001.

三、纖維在瘤胃中的分解過程

纖維在瘤胃中的分解首先經過纖維的水合作用，再經過微生物所分泌酵素進行作用，微生物所分泌的纖維分解酵素以纖維素酵素與半纖維素酵素為主，其類別與作用機制如下：

(一) 纖維素分解酵素之種類與作用機制

1. 纖維素分解酵素之種類

纖維素分解酵素為一種複合形酵素，主要功能則是將纖維素 β -1,4 糖苷鍵之鍵結水解成可溶性之葡萄糖，此酵素系統一般區分為三大類：

(1) endo-1,4- β -D-glucanase

為纖維素內切型酵素，又可稱為 endo- β -1,4glucano-hydrolase、endocellulase、或 CMCCase (EC3.3.1.4)。人工受質為羧甲基纖維素 (carboxymethyl cellulose，簡稱 CMC)、不定型的纖維素 (amorphous H_3PO_4 -swollen cellulose) 或纖維寡糖 (cello-oligosaccharides)。此酵素的主要作用在於以非特異性的方式分解受質之 β -1,4 糖苷鍵，釋出更多之還原端，其水解產物為由兩個或三個葡萄糖所組成的聚合物，如纖維二糖 (cellobiose)。

(2) exo-1,4- β -D-glucanase

為纖維素外切型酵素，又稱 exo- β -1,4-glucosidase、exo-glucanase、avicelase 與 cellobiohydrolase (EC3.3.1.9.1)。人工受質為水解纖維素 (hydrocellulose) 或 dyed avicel。此酵素則由纖維素結晶區之非還原末端開始，以纖維二糖 (cellobiose) 為一個單位來進行水解。

(3) β -glucosidase

為 β -葡萄糖苷酶，又稱 β -D-glucoside glucohydrolase、cellulbiase (EC3.2.1.21)。受質為 cellobiose、salicin、cello-oligosaccharides 或 o- or p-nitrophenyl- β -D-glucosides。此酵素能切除上述兩種酵素作用所產生的纖維寡糖及纖維二糖進行水解，產生為單一葡萄糖分子 (Wang *et al.*, 1989)。

2. 纖維素分解酵素之作用機制

由於纖維素結構緊密，欲將其水解則需要各種酵素的參與。第一個步驟就是酵素必需先吸附在纖維素上，再進行水解 (Kim *et al.*, 1995)。早期的科學家 (Bisaria and Ghose, 1981) 提出纖維分解酵素的作用機制，提出了 C1-Cx 及 Modified C1 假說如圖 4；即纖維素分解酵素的 endoglucanase (Cx) 以非特異的方式先作用於排列鬆散之非結晶區 (amorphous region)，將長鏈分子產生新的末端 (如圖 a 步驟)，接著再由纖維外切型酵素 (cellobiohydrolase, C1) 從非還原端開始作用，以兩個葡萄糖為單位，水解出纖維二糖 (如圖 b 步驟)，並重複連續的水解反應 (如圖 c 步驟)，最後由 β -葡萄糖苷酶將 cellobiose 或 cello-oligosaccharides 水解成葡萄糖 (如圖 d 步驟)。由於內切酵素為參與分解酵素的首要步驟，因此可能是纖維分解的限制因子。

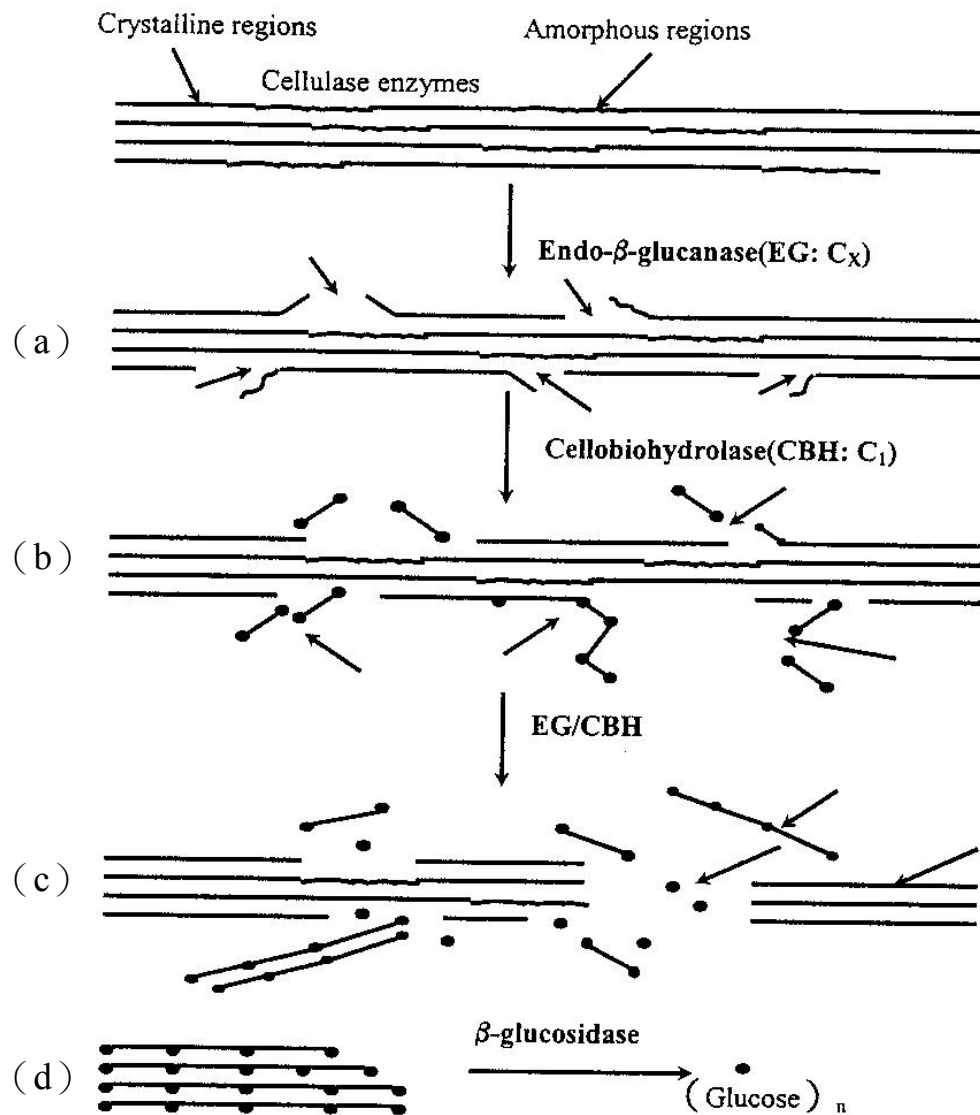


圖 4. 纖維素分解酵素協同作用模式示意圖(Bisaria and Ghose, 1981)。

Fig. 4. Schematic representation of synergistic action of enzymes in cellulolysis. (Bisaria and Ghose, 1981)

(二) 半纖維素木聚糖酵素之種類與作用機制

半纖維素分解酵素含有木聚糖酵素、甘露糖酵素 (mannanase) 與阿拉伯糖酵素 (arabinase) 等，其中以木聚糖酵素為主。

1. 木聚糖酵素之種類

木聚糖的結構複雜，因此參與分解的酵素由多種不同類型的酵素群所組成。可分為降解主鏈與支鏈兩大類 (Coughlan and Hazlewood, 1993)。

(1) 作用於木聚糖主鏈之酵素

a. endo- β -1,4-xylanase (EC 3.2.1.8)

為內切型的木聚糖酵素，其人工受質為 oat spelt xylan、brichwood xylan 或 barley husk xylan。此酵素作用於木聚糖主鏈內側的 β -1,4 糖苷鍵結處，因而造成聚合度下降，同時釋出低木聚糖 (Dekker and Richards, 1976)。

b. exo- β -1,4-xylanase

為外切型的木聚糖酵素，主要作用於主鏈上之非還原端，釋放出木糖。

c. β -1,4-xylosidase (EC 3.2.1.37)

又名 xylobiase，其主要受質為木二糖或低聚木糖 (Wong *et al.*, 1988)。由非還原端水解釋出木糖，對分解長鏈的木聚糖效果差。

(2) 作用於木聚糖支鏈之酵素

a. arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55)

受質為有支鏈有阿拉伯糖取代基的木寡糖 (arabinose-substituted xylo-oligosaccharides)。此酵素可催化阿拉伯糖取代基之 α -1,2、 α -1,3 或 α -1,5 鍵結斷裂，釋出阿拉伯糖 (Poutanen, 1988)。

b. α -glucuronidase (EC 3.2.1.1)

作用於含有 4-O-methylglucuronose 為取代基之木寡糖。可切斷 glucuronoxylan 上 glucuronic acid 與木糖之間的 α -1,2 鍵結，且僅對聚合度大於 2 的低木聚糖具有活性 (Smith and Forsberg., 1991)。

c. acetylxylan esterase (EC 3.2.1.6)

作用於木聚糖主鏈上與乙醯基鍵結之處及一些人工基質如 p-nitrophenyl acetate，可降解產生醋酸 (McCrae *et al.*, 1994)。

d. phenolic acid esterases

水解受質中帶有酚類等芳香族支鏈之木聚糖或低木聚糖，釋出 ferulic 或 p-coumaric acid 等物 (Christov and Prior, 1993)。

2. 半纖維素木聚糖分解酵素作用模式

由於木聚糖的結構複雜，因此需要不同類型的酵素參與分解，而分解木聚糖主要酵素為內切型與外切型的木聚糖酵素，前者主要作用在非還原端部位進行分解產生木聚雙糖或木寡糖，後者在還原端的部位以兩個木糖為一個單位進行水解產生木聚雙糖，而木寡糖與木聚雙糖再經由 β -1,4-xylosidase 分解產生木糖。其他分解木聚糖支鏈之酵素如 arabinofuranosidase、 α -glucuronidase、acetylxylan esterase 與 phenolic acid esterases，分別在不同位置作用產生不同的產物。其木聚糖主鏈之酵素及支鏈之酵素的作用模式如圖 5。

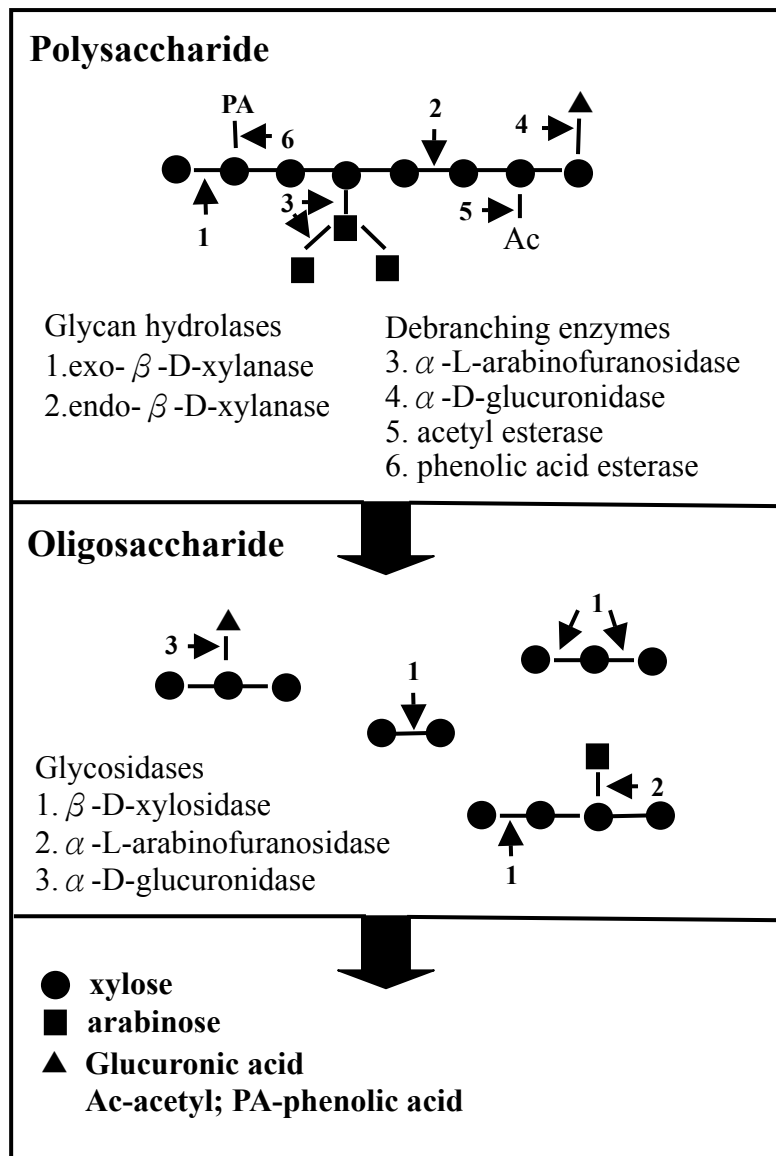


圖 5. 木聚糖分解酵素協同作用模式示意圖 (Chesson, 1993)。

Fig. 5. Schematic representation of synergistic action of enzymes in xylanase lysis. (Chesson, 1993)

四、纖維的組成分對瘤胃纖維分解的影響

植物纖維組成的差異主要受到植物種類、成熟度與結構型態的影響。豆科牧草的纖維通常比禾本科牧草不易被瘤胃微生物消化。楊等 (1999) 指出，百慕達草的半纖維素含量高於苜蓿草 (38 vs. 11 %)，但木質素含量低於苜蓿草 (6 vs. 10 %)，此外百慕達草的試管中洗纖維 (neutral detergent fiber, NDF) 消化率較苜蓿草低。另外，Tovar *et al.* (1997) 指出，普通玉米與褐色變種玉米 NDF 含量相似，由於變種玉米的半纖維素比普通玉米少，所以變種玉米在瘤胃中的中洗纖維消化率較普通玉米高。Wang *et al.* (2001) 的體外試驗 (*in vitro*)，發現青割苜蓿乾草 (chopped alfalfa hay) 的 NDF 含量比滾壓的大麥粒 (rolled barley) 高 (53 vs 27 %)，但是青割苜蓿草的瘤胃體外 NDF 分解率比滾壓大麥粒低 (24 vs 50 %)，推測苜蓿草的 NDF 分解率較低可能也是和半纖維素的含量有關。Mandebvu *et al.* (1999) 發現，百慕達草的半纖維素含量在三週的成熟度較兩週的高，但是體外乾物質分解率較兩週的差。顯示比較成熟的植物其纖維比較難消化，可能也是與半纖維素含量較高有關。

這些先前的研究結果顯示，半纖維素的含量會影響植物纖維的分解。可能是因為半纖維素包裹在纖維素聚集而成的纖維絲外圍 (圖 3)，而阻礙了纖維素的進一步分解。

五、外源纖維分解酵素對促進瘤胃纖維分解之影響因素

(一) 外源纖維分解酵素的種類

外源纖維分解酵素 (exogenous fibrolytic enzymes) 是經由微生物於體外培養發酵產生 (Considine and Coughlan, 1989)。Feng *et al.* (1996) 研究指出，使用兩種商業型纖維分解酵素 (alphazyme 和 grasszyme)，發現 alphazyme 可提高瘤胃 CMCCase (carboxy-methyl cellulase) 的活性與扁雀稗乾草 (smooth bromegrass) 之體外 NDF 分解率的作用；而添加 grasszyme 並未產生影響。若以混合的方式 (alphazyme : grasszyme = 1 : 1) 添加，則可提高瘤胃 CMCCase 的活性與扁雀稗乾草之體外乾物質或 NDF 的分解率。Hristov *et al.* (2000) 的報告也指出，經由 Angus 女牛瘤胃廔管添加纖維分解酵素 (xylanase : CMCCase = 10 : 1) 可提高瘤胃內 CMCCase 與 xylanase 的活性，使得日糧在瘤胃原位 (*in situ*) 乾物質分解率提高。但是，Hristov *et al.* (1998b) 使用配備有瘤胃廔管的 Angus 女牛，噴灑纖維分解酵素 (xylanase : CMCCase = 4 : 1) 在 TMR (total mixed ration) 上 (1 L/ton)，發現並未對瘤胃原位乾物質分解率產生影響，原因是因為酵素的添加未使瘤胃的 CMCCase 與 xylanase 活性提高所致。Morgavi *et al.* (2000b) 使用三種商業型纖維分解酵素 (*Irpex lacteus*, *Aspergillus niger* 與 *Trichoderma viride*) 與瘤胃液共同培養，發現 *A. niger* 提高瘤胃 CMCCase 與 xylanase 的活性作用較 *I. lacteus* 與 *T. viride* 為

高。Morgavi *et al.* (2001) 比較四種不同廠牌酵素與瘤胃液共同培養，雖然都來自相同的微生物 (*T. longibrachiatum*)，但對瘤胃CMCase與xylanase的活性則有不同的影響。因此，不同酵素產品對瘤胃的酵素活性有不同程度的影響。

(二) 應用的方式

Beauchemin *et al.* (1999) 使用配備有瘤胃屢管荷蘭種泌乳牛，將纖維分解酵素噴灑在以大麥 (barley) 或去殼大麥 (hull-less barley) 為主的日糧 (45 % of diet) 當中，發現添加酵素可以促進去殼大麥日糧的瘤胃原位NDF分解率。Wang *et al.* (2001) 試驗將纖維分解酵素噴灑在大麥粒後，與瘤胃液共同培養48小時，酵素的添加有提高大麥粒在瘤胃的乾物質分解率與xylanase的活性，但是對NDF分解率則沒有影響。另外，發現纖維分解細菌 (cellulolytic bacteria) 有增加的趨勢。Sutton *et al.* (2003) 將外源纖維分解酵素分別噴灑在TMR、日糧中的精料、或直接經由屢管置於荷蘭種乳牛瘤胃中，發現直接經由屢管添加的方式使瘤胃NDF消化率高於應用在TMR中，但是與應用在精料的方式相比則沒有顯著差異。Pinos-Rodriguez *et al.* (2002) 使用配備有瘤胃屢管的綿羊，將酵素直接經由屢管添加，發現酵素應用在以苜蓿草或黑麥草為主的日糧，可提高瘤胃原位乾物質、NDF、酸洗纖維 (acid detergent fiber, ADF) 與半纖維素分解率。Nowak *et al.* (2003)

則是使用兩頭配備含有瘤胃屢管 Jersey 的女牛，將纖維分解酵素（xylanase : CMCase= 2.5 : 1）混入精料，再以 TMR 方式餵飼牛隻，發現酵素的添加可提高麥桿（wheat straw）在瘤胃原位乾物質、NDF 與 ADF 的分解率。Feng *et al.* (1996) 使用配備瘤胃屢管的荷蘭種閹公牛，將酵素噴灑在新鮮的扁雀稗草、凋萎的扁雀稗草與扁雀稗乾草，發現三者瘤胃乾物質與 NDF 分解率並沒有受到影響，但是應用在新鮮的扁雀稗草與凋萎的扁雀稗草則有提高瘤胃 CMCase 活性的作用。因此，提高纖維分解酵素的結果可能視日糧的種類不同而異。

Kung *et al.* (2000) 將外源纖維分解酵素（分別稀釋為 5 倍與 2 倍的濃度）直接噴灑在日糧的芻料當中，並與瘤胃液共同培養，發現稀釋 2 倍的濃度比對照組顯著降低 48 小時的體外 NDF 分解率，但是與稀釋 5 倍相比則沒有顯著差異。Hristov *et al.* (2000) 的試驗是將不同濃度（0、100、200 與 400 g/day）的酵素經由 Angus 女牛的屢管添加，發現原位乾物質消化率隨著酵素用量的增加而呈現一次與二次的增加，而瘤胃 CMCase 與 xylanase 活性則呈現線性的增加。Yang *et al.* (1999) 使用配備含有瘤胃屢管的荷蘭種泌乳牛，在苜蓿乾草中噴灑不同濃度（0、1 或 2 g / kg）的酵素，發現在培養 3 至 24 小時的瘤胃原位乾物質與 CP 分解率，以每公斤應用 2 g 酵素的結果最好。因此，酵素的適當添加量也因日糧的組成成分而異。

六、外源纖維分解酵素在瘤胃中的穩定性

早期推測外源酵素在瘤胃中易受到蛋白質分解酵素的作用而失去活性 (Cheeson, 1994 ; Graham and Balnave, 1995)。Morgavi *et al.* (2000b) 先將外源纖維分解酵素 (*T. viride*) 與瘤胃液於體外共同培養，發現瘤胃 β -glucosidase 的活性隨著培養時間的增加，其活性逐漸分解。但是與非水溶性蛋白質 (玉米蛋白, maize zein) 或不同水溶性蛋白質 (大豆球蛋白, soybean globulin ; 牛血清白蛋白, bovine serum albumin) 於瘤胃液共同培養，發現添加牛血清白蛋白可延長外源纖維分解酵素對瘤胃 β -glucosidase 活性的半衰期 (從 0.5 小時增加到 3.0 小時)。牛血清白蛋白較不易被瘤胃蛋白質分解酵素分解，所以可以和蛋白質分解酵素結合較久 (Wallace, 1983 ; Broderick *et al.*, 1991)，而使用水溶性大豆球蛋白在瘤胃當中容易被分解破壞 (Aufrere *et al.*, 1994)，所以無法和蛋白質分解酵素長時間結合，導致保護效果較差，非水溶性玉米蛋白雖然不易被瘤胃蛋白質分解酵素破壞，但是可能因為水溶性差，所以無法充分與蛋白質分解酵素結合，因此由試驗結果得知，特定種類的水溶性蛋白質可能具有保護外源酵素被瘤胃蛋白質分解酵素破壞的作用。

肆、試驗部分

試驗一：商用纖維分解酵素添加量對乳牛瘤胃酵素活性變化、酵素消失與百慕達乾草原位分解率的影響

摘要

本試驗之目的在探討添加商業用纖維分解酵素對瘤胃中纖維分解酵素活性、pH 值、氨濃度以及百慕達乾草（含高量半纖維素）原位分解率的影響。使用兩頭配備有瘤胃屢管荷蘭種母牛，試驗處理分別為餵飼時於瘤胃中添加 0（對照組）、75 或 150 g 商用酵素。結果發現，瘤胃的 pH 值、氨濃度與瘤胃 CMCase 活性並未受到試驗處理影響。添加酵素顯著提高餵食後 1.5 小時與 4.5 小時之瘤胃 xylanase 的活性，其中以添加 150 g 效果最大，而在 7.5 小時的培養時間則沒有影響。添加酵素有提高餵飼後 4.5 小時之瘤胃原位 NDF 分解率，其他培養時間（7.5 小時與 24 小時）則沒有影響。酵素的添加對 ADF 分解率沒有影響，但顯著提高餵飼後 4.5 小時之半纖維素分解率，而以 150 g 組最高。試驗結果顯示，添加以木聚糖酵素為主之商用酵素，可以提高餵飼後早期之瘤胃 xylanase 活性與百慕達乾草半纖維素之分解。由 SDS-PAGE 電泳圖顯示，酵素在瘤胃中可能快速分解，因此促進瘤胃纖維消化的效果無法持續長久。

關鍵語：纖維分解酵素、百慕達乾草、原位分解率。

一、前言

纖維分解酵素逐漸被應用在反芻動物的日糧中，先前的研究結果顯示 (Feng *et al.*, 1996)，添加以 xylanase 活性為主的外源纖維分解酵素可提高扁雀稗草的瘤胃原位乾物質分解率。Pinos-Rodriguez *et al.* (2002) 使用配備有瘤胃廔管的綿羊，將酵素直接經由瘤胃廔管添加，發現酵素應用在苜蓿草或黑麥草為主的日糧，可提高瘤胃原位乾物質、NDF、ADF 與半纖維素分解率。

百慕達乾草(*Cynodon dactylon*) 是國內常用的芻料，其纖維含量高且在瘤胃的消化率低。百慕達乾草的纖維較其他牧草不易被瘤胃微生物分解 (Yang, 2002; Ogden *et al.*, 2005)，可能是因為含有高比例的半纖維素 (Park *et al.*, 1995; Kouakou *et al.*, 1997; West *et al.*, 1997)。由於纖維中的半纖維素會包覆纖維素 (Tovar *et al.*, 1997)，在百慕達乾草為主的日糧中，添加外源性半纖維素木聚糖分解酵素，可能加速半纖維素的分解，進一步使牧草纖維中的纖維素暴露，因而促進纖維在瘤胃中的分解。本試驗主要乃探討瘤胃添加不同劑量之商用型纖維分解酵素對瘤胃中 pH 值、氨濃度、酵素 (CMCase 與 xylanase) 活性與百慕達草乾物質、NDF 與 ADF 原位分解率的影響。

二、材料與方法

(一) 試驗動物與飼養管理

使用兩頭配備有瘤胃廔管之荷蘭種母牛進行試驗，年齡約 4 - 5 歲。將牛隻個別飼養於水泥地面欄舍，並固定於每天早上 8:00 及下午 18:00 分別餵給百慕達乾草 (bermudagrass hay) 4 kg 及商業精料 0.5 kg，並提供礦物鹽磚與飲水任食。日糧組成如表 1。

(二) 試驗處理與樣品收集

試驗處理為牛隻餵飼前經由牛隻廔管不添加或添加 75 或 150 g 商業型纖維分解酵素 (Natugrain Blend G, 艾立生物股份有限公司，中埔鄉，嘉義縣，台灣)，其酵素產品[木聚糖酵素：CMCase (46:1)] 的化學組成如表 1。試驗採完全逢機區集試驗設計，每個處理為期十天，包括七天的恢復期與三天的試驗期。試驗期間每日收集乾草與精料，於 4°C 冷藏保存，留待日後分析。

瘤胃採樣連續進行三天，每天於早上餵飼前 (0 小時) 及餵飼後 1.5、4.5 及 7.5 小時各採取瘤胃樣品一次。採集的部位為背囊區與腹囊區；背囊區的部分，以手直接經由廔管伸入瘤胃背囊前、中、後三個部分下約 15 cm 處，稍加攪拌後，直接抓取瘤胃內容物，以四層紗布過濾並收集濾液。腹囊區的部分，以 200 mL 採集瓶，直接經廔管伸入腹囊底部，稍加攪拌後，採集約 100 mL，同樣以四層紗布過濾並採集，隨即以酸鹼測定儀 (Microcomputer pH-Vision Model 6007, JENCO, 台灣) 測定其 pH 值，之後取瘤胃液 30 mL 置於 50 mL 塑膠收集瓶的離心管，以 $10,750 \times g$ 遠心分離 15 分鐘，取上層液 15 mL 於 50 mL 收集瓶並保存於 -20°C，供日後分析。

另外，根據 De Boer *et al.* (1987) 的方法，稱取 5 g 百慕達乾草樣品，

表1. 百慕達乾草、精料、日糧與外源酵素之化學組成

Table 1. Chemical composition of bermudagrass hay, concentrate, diet and exogenous enzyme in diets

Item	Hay	Concentrate ¹	Diet	Enzyme ²
Dry matter (DM), %	91.2	89.4	91.0	90.0
Organic matter, % DM	93.6	93.5	93.6	99.0
Crude protein, % DM	6.92	12.8	7.57	63.1
Neutral detergent fiber, % DM	74.3	30.8	69.4	10.3
Acid detergent fiber, % DM	36.0	12.4	33.4	0.70
Hemicellulose, % DM	38.2	18.5	36.0	9.60

¹Contained 53.0% ground corn, 17.7% soybean meal, 11.5% wheat bran, 16.2% alfalfa meal, 0.40% limestone, 0.40% dicalcium phosphate, 0.40% salt, 0.20% trace mineral salt, and 0.20% vitamin premix, on a fresh basis.

²Exogenous enzyme.