

# 生物技術於改善離乳仔豬脂肪利用率之應用性

撰文/劉芳爵

## 前言

目前台灣地區每頭母豬年生產離乳仔豬頭數約為 15 頭，遠低於歐美養豬先進國家之 23 頭仔豬，而且仔豬於保育期間之死亡率更高達 15-40%，嚴重影響我國養豬產業經營效益。研究仔豬胰臟消化酶的活性發展，發現離乳仔豬的胰脂肪酶 (lipase) 與胰輔脂肪酶 (colipase) 活性較同日齡未離乳者低，但是於 6 週齡時離乳與未離乳兩者的活性相似。現今國內仔豬飼養管理制度，常採用 4 週齡離乳，遂致仔豬於離乳後最初幾週期間，經由採食飼料攝取之能量，常不敷仔豬維持正常生長和免疫系統發展之所需。面對此一問題養豬業者常於飼料中將脂肪添加量提高，藉以讓離乳仔豬獲取較多之脂肪攝取量，雖然此法有些許增加離乳仔豬能量攝取之作用，但常因脂肪種類不同與仔豬腸道脂肪水解酵素活性不足，導致離乳仔豬對添加脂肪的吸收效果並不一致。仔豬腸道脂肪水解酵素，即為胰脂肪酶與胰輔脂肪酶，當在脂肪水解的過程中胰脂肪酶需要胰輔脂肪酶作為蛋白質輔助因子，將胰脂肪酶錨定 (anchor) 在脂肪小滴 (droplet) 的表面，俾供胰脂肪酶順利進行脂肪的水解作用。因此，胰脂肪酶和胰輔脂肪酶的活性高低，是為影響仔豬脂肪利用率的主要決定因素。另外，仔豬常於離乳初期發生所謂生長停滯現象，應是受腸道發育尚未完成以及消化酵素活性不足（如胰脂肪酶和胰輔脂肪酶等）所

致。是以，針對仔豬在離乳最初兩週胰脂肪酶和胰輔脂肪酶活性下降現象，運用酵母細胞表現之重組胰脂肪酶和胰輔脂肪酶蛋白質添加於飼料中，改善離乳仔豬之生長性能與脂肪利用率。

## 胰脂肪酶和胰輔脂肪酶之交互作用

養豬飼料中脂肪型態高於 90% 以上以三酸甘油酯 (TG) 形式存在，因此在消化吸收過程中，需先經胰脂肪酶的水解作用才能被吸收，在脂肪水解過程中需蛋白質輔助因子稱為胰輔脂肪酶，其具有將胰脂肪酶穩定於脂肪小滴表面進行水解作用。若以晶體構形而言，胰脂肪酶和胰輔脂肪酶的結合比率為 1:1，不過在試管試驗分析胰脂肪酶具有最大活性，兩者之結合比率為 1:2；至於在腸腔中兩者最適比率則尚需再予確定。在分析胰臟腺胞細胞 (acini)，得到胰輔脂肪酶 (C) 和胰脂肪酶 (L) 活性比率 (C/L) 為 0.60，但由培養胰臟腺胞細胞並用膽囊收縮素刺激活性比率則為 0.50，顯示胰脂肪酶活性高於胰輔脂肪酶，上述現象與 Palade (1975) 認為胰臟各種消化酶都是同時合成、分泌、儲存以及外泌作用之說法 (exocytotic expulsion)，並不相符。不過 (Vainio et al., 1983) 認為胰輔脂肪酶出現順序較胰脂肪酶晚，即是在膽鹽乳化脂肪時釋入胰輔脂肪酶，其說法認為消化酶原 (zymogen) 有兩個儲藏所 (reservoir)，供存放不同之酶原顆粒，也有兩個消化酶之酵素池 (pool)，消化酶原出現在製造酶原顆粒

的粗內質網中，酵素池則在細胞質中，兩者會因刺激程度的不同而成不平行的分泌。雖然腸道消化酵素活性並不一致，但是腸道之消化酶分泌量主要受內泌素（如 secretin 或膽囊收縮素）所調控。因此，欲提升脂肪利用率應特別注意胰脂肪酶和胰輔脂肪酶兩者之活性比率。

### 胰脂肪酶和胰輔脂肪酶之晶體結構、活化以及胺基酸序列

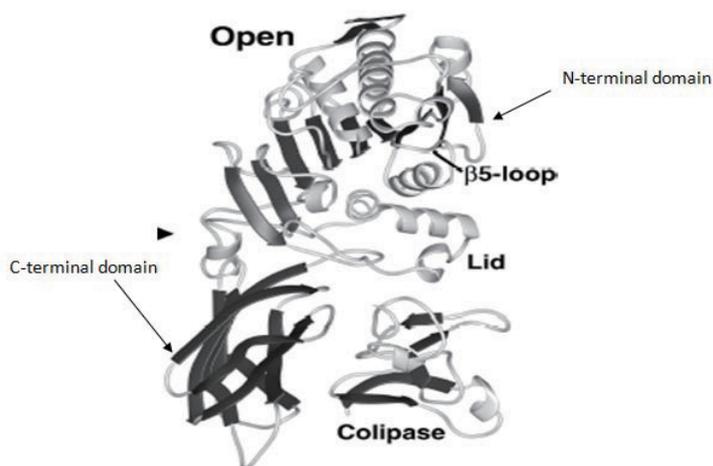
胰液中最初的胰輔脂肪酶稱為脫輔基胰輔脂肪酶 (apocolipase)，以 X-ray 繞射其結晶形態，發現其結構中有三個指形環 (finger-shaped loop)，分別位於胺基酸序列之 29-38、50-60 和 70-86，其第三個指形區域為胰脂肪酶與胰輔脂肪酶相互結合的位置，但第一和第二指形區域的功能尚未完全清楚。另外其結構中有 5 個雙硫橋 (disulfide bridges 分別位於 17-28、23-39、27-61、49-69 和 61-87)，功用為促使胰輔脂肪酶的核心呈緊密結構。另外在輔脂肪酶 N 端的 Arg<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup> 之間為胰蛋白酶敏感區 (trypsin-sensitive area)，當脫輔基胰輔脂肪酶被胰蛋白酶截切作用後，即形成胰輔脂肪酶，被胰蛋白酶切下之 5 個胺基酸的片段 (Val-Pro-Asp-Pro-Arg) 對膽囊收縮素 (cholecystokinin; CCK) 的分泌具有抑制作用，同時對胰臟消化酶的分泌亦有負回饋調節作用，此胜肽片段被稱作腸體制素 (enterostatin)。另外此腸體制素亦具有調節飽食感和脂肪採食量的作用，同時對胰輔脂肪酶合成和分泌有負回饋的作用。當彈性蛋白酶 (elastase) 截切胰輔脂肪酶胺基酸序列之 Ile<sup>79</sup>-Thr<sup>80</sup> 後，胰輔脂肪酶才具有活性。胰輔脂肪酶種類有兩型，分別為胰輔脂肪酶 I 和胰輔脂肪酶 II，前者佔有比率為 85%，它是由含有 95 個胺基酸序列組成，而後者約佔 15%，它是由 93 個胺基酸序列組成，兩者有 91 個胺基酸相同且活性相似，故一般以兩者之總和，表示胰輔脂肪酶之活性。

胰脂肪酶由 449 個胺基酸殘基組成，其分子量約為 50kD，催化位置 (active site) 是由 Ser<sup>153</sup>、

His<sup>264</sup> 和 Asp<sup>177</sup> 所組成，但在催化位置周圍有蓋子 (lid) 及環 (loop) 會影響胰脂肪酶與受質的作用。不過胰輔脂肪酶能於脂肪小滴表面形成水的界面 (waterface)，供胰脂肪酶的催化位置能順利與脂肪結合進行水解作用，同時保護胰脂肪酶不受膽鹽的干擾。胰脂肪酶 C 端的蛋白區域 (amino acids 337-449) 為胰輔脂肪酶之鏈接位置 (圖一)，當分離經胰凝乳蛋白酶水解作用之胰脂肪酶，仍然可得到與胰輔脂肪酶鏈接之胰脂肪酶 C 端酶片段。若用化學方法置換胰脂肪酶 C 端胺基酸序列上之離胺酸，則發現胰輔脂肪酶無法與胰脂肪酶鏈接，另外利用萃取豬輔脂肪酶交叉連接到馬的胰脂肪酶，亦確認在馬的胰脂肪酶胺基酸序列之 403-449 為與豬胰輔脂肪酶形成共價鍵之鏈接位置。因此，胰脂肪酶 C 端胺基酸序列區之正確性，將影響胰輔脂肪酶鏈接之效果。

### 營養因素對胰脂肪酶和胰輔脂肪酶基因表現之調控

消化酶的活性隨飼糧脂肪 (受質) 含量的提高而增加。Malika 等人 (1980) 認為增加 6 倍脂肪含量約可增加豬胰脂肪酶 1.8 倍活性，但提高蛋白質



胰脂肪酶可分為2個蛋白區域，分別為N端功能區域（第1至336胺基酸序列之間）與C端功能區域（第337-449胺基酸序列之間）。

圖一 胰脂肪酶與胰輔脂肪酶之結構圖

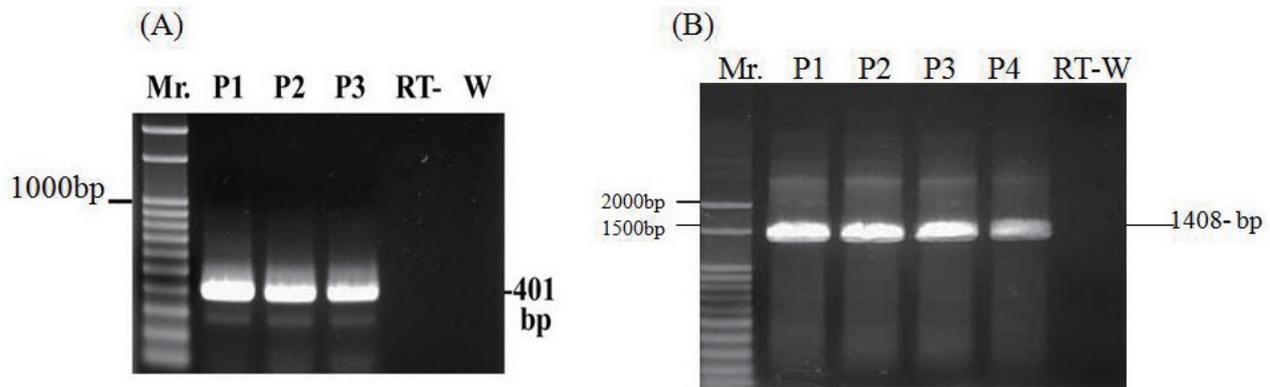
的攝取量對胰脂肪酶活性並沒有作用。離乳仔豬飼糧中常添加脂肪供作能量來源，由脂肪產生之能量為碳水化合物的 2.25 倍，因此一般畜禽飼料均含有適量之脂肪，以滿足動物對必需脂肪酸與能量之需求，但剛離乳仔豬對於能量的攝取，至少須經兩週的適應期後，才能經由採食飼料得到與離乳前（母豬乳汁中得到）相似之能量攝取量，而且要增加離乳仔豬脂肪的利用率，需有足量的胰脂肪酶，才能有效提高離乳仔豬脂肪的利用率。胰輔脂肪酶因有促進胰脂肪酶結合至脂肪小滴的表面，對脂肪的水解作用有輔助作用，因此提高胰輔脂肪酶活性亦有促進胰脂肪酶的水解作用。Wicker 等人 (1988) 與 Rausch 等人 (1985) 等研究指出，提高脂肪可增加胰脂肪酶和胰輔脂肪酶之 mRNA 含量，顯示增加脂肪可以調控胰脂肪酶和胰輔脂肪酶的轉錄速率，同時有促進腸道內分泌素的分泌作用，例如小腸內分泌素 (secretin)。不過 Brannon (1990) 卻認為在大鼠之十二指腸灌注含 20% 脂肪的溶液，可以增加胰脂肪酶 mRNA 的表現量，但是不影響小腸內分泌素分泌量。

在脂肪酸型態對胰臟消化酵素分泌之效應，脂肪酸碳鏈需達 9 個或 9 個碳數以上，始具有刺激狗胰臟分泌外分泌素和釋放 CCK 的作用，顯示脂肪

型態亦會影響胰臟消化酵素之分泌作用。另外離乳過程會造成仔豬脂肪酶與輔脂肪酶活性以及脂肪利用率下降現象，因此為增加離乳初期仔豬脂肪的利用率，作者於過去幾年從事豬隻營養試驗時，確認植物性脂肪促進胰脂肪酶活性作用較動物性脂肪高，在胰輔脂肪酶活性雖有類似現象，但並未達顯著水準。因此認為胰脂肪酶活性高低，受脂肪含量高低與型態之影響，至於胰輔脂肪酶活性除受脂肪因素影響外，可能受其他因素的調控作用。

### 構築胰脂肪酶與胰輔脂肪酶之表現載體與其生物活性分析

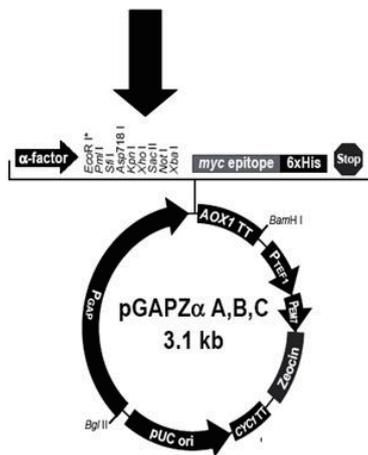
首先萃取豬胰臟總 RNA，其後再純化 poly (A+) mRNA，並利用逆轉錄酶合成第一股 cDNA，運用專一性引子對分別增幅胰脂肪酶與胰輔脂肪酶 cDNA (圖二)，以及致突變引子對 (mutagenic primer set) 增幅重組胰脂肪酶與胰輔脂肪酶之編碼基因，並將其接合於 *P. pastoris* 酵母菌表現載體 (圖三)，再以電穿孔方法將此兩種表現載體轉形至酵母菌之染色體，以及選取複製套數高之酵母菌轉形株，接種於發酵液後產生重組胰脂肪酶與胰輔脂肪酶，其後再經過濾菌體、濃縮發酵液、冷凍乾燥以及滴定法分析其生物活性等。在生物活性分析結



(A) Mr.表100-bpDNA標記；亮帶P1至P3為胰輔脂肪酶之cDNA；RT-W表負對照組。  
 (B) Mr.表100-bpDNA標記；亮帶P1至P4為胰脂肪酶之cDNA；RT-W表負對照組。

圖二 胰輔脂肪酶與胰脂肪酶cDNA之PCR 產物

## 重組胰脂肪酶與胰輔脂肪酶之編碼基因



圖三 *P. pastoris* 酵母菌表現型質體之序列圖

果，每 1 公升發酵液中含有胰脂肪酶與胰輔脂肪酶之生物活性均高於 1,000,000U，可供作離乳仔豬之飼料添加物用。

## 添加重組胰輔脂肪酶對離乳仔豬生長性能與脂肪消化率之效應

添加重組胰輔脂肪酶對離乳仔豬之效果評估，試驗以餵飼不含重組胰輔脂肪酶發酵物作為對照組，結果顯示離乳仔豬餵飼添加 5,000 U/kg 之重組胰輔脂肪，在離乳後第 8 天時，仔豬體重變化在試驗組與對照組之間沒有差異性，但是在離乳後第 15 天、22 與 28 天時，試驗組之體重顯著高於對照組如表一所示。在仔豬日增重方面，在離乳後第一週期間，添加組比對照組改善約 60% 之日增重，但是仍未達顯著水準。離乳後第 2 週期間，添加組之日增重則顯著高於對照組，但是於離乳後第 3 與 4 週期間，兩組間差異不顯著。在脂肪消化率之測定，利用分析血液中 TG 濃度作為測定因子，血液樣品採集時間點，分別為離乳當日、第 7 天與第 28 天，血液樣品採自於全部之試驗動物，結果顯示在離乳第 7 天，添加組與對照組之血液 TG 濃度沒有顯著

差異，但是在離乳後第 28 天血液中 TG 濃度添加組顯著高於對照組（表二），此結果顯示，離乳仔豬餵飼添加 5,000 U/kg 之重組胰輔脂肪酶，具有改善離乳仔豬脂肪消化率之效果。

## 添加重組脂肪酶對離乳仔豬生長性能與脂肪消化率之效應

離乳仔豬餵飼重組胰脂肪酶之效果評估，試驗仍以不含重組胰脂肪酶發酵物作為對照組。試驗結果如表三所示，在仔豬之日增重、飼料採食量與

表一 添加重組胰輔脂肪酶對離乳仔豬生長性能之效應 (n=8)

Item	Added recombinant colipase level		P-value
	0	5,000 U/kg	
<b>Body weight gain</b>			
Day 1 post-weaning, kg	7.37 ± 0.16	7.28 ± 0.09	0.86
Day 8 post-weaning, kg	8.06 ± 0.23	8.49 ± 0.38	0.50
Day 15 post-weaning, kg	10.59 ± 0.39	11.84 ± 0.70	0.02
Day 22 post-weaning, kg	14.32 ± 0.59	15.84 ± 0.95	0.005
Day 28 post-weaning, kg	18.54 ± 0.92	20.19 ± 1.47	0.003
<b>From 1 to 7 postweaning day</b>			
ADG, kg <sup>1</sup>	0.10 ± 0.03	0.16 ± 0.05	0.198
ADFI, kg <sup>2</sup>	0.16 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.581
Feed/gain weight	1.67 ± 0.28	1.34 ± 0.22	0.152
<b>From 8 to 14 postweaning day</b>			
ADG, kg	0.36 ± 0.04	0.49 ± 0.07	0.011
ADFI, kg	0.71 ± 0.06	0.82 ± 0.09	0.216
Feed/gain weight	1.97 ± 0.19	1.68 ± 0.11	0.193
<b>From 15 to 21 postweaning day</b>			
ADG, kg	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.08	0.203
ADFI, kg	1.00 ± 0.05	1.11 ± 0.16	0.261
Feed/gain weight	1.89 ± 0.08	1.89 ± 0.42	0.992
<b>From 22 to 28 postweaning day</b>			
ADG, kg	0.60 ± 0.06	0.65 ± 0.12	0.285
ADFI, kg	1.24 ± 0.18	1.30 ± 0.22	0.486
Feed/gain weight	2.05 ± 0.12	2.06 ± 0.61	0.942

<sup>1</sup>ADG is abbreviated from average daily gain.

<sup>2</sup>ADFI is abbreviated from average daily feed intake.

表二 添加重組胰輔脂肪酶對離乳仔豬血液之三酸甘油酯濃度之效應

(n=32)

Item	Triglyceride concentration; mg/dL		MSE <sup>c</sup>	P-value
	w/o colipase <sup>a</sup>	w/ colipase <sup>b</sup> (5,000 U/kg)		
1 <sup>st</sup> day of postweaning	15.71	12.82	1.72	0.49
7 <sup>th</sup> day of postweaning	7.59	11.98	0.91	0.21
28 <sup>th</sup> day of postweaning	16.37	32.50	2.95	<0.0001

<sup>a</sup>Added native yeast culture without (w/o) recombinant colipase protein in the diet as a control group.

<sup>b</sup>Added transformant yeast culture with (w/) recombinant colipase protein in the diet (5,000 U/kg of body weight) as a test group.

<sup>c</sup>MSE is the abbreviation of mean standard error.

表三 添加重組胰脂肪酶對離乳仔豬生長性能之效應

Items	Level of adding recombinant lipase, units/kg			MSE
	0	5,000	10,000	
From weaning day to 6 weeks of postweaning				
ADG	0.39 <sup>a</sup>	0.50 <sup>b</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.002
ADFI	0.73 <sup>a</sup>	0.83 <sup>b</sup>	0.85 <sup>b</sup>	0.008
FE	1.89 <sup>b</sup>	1.67 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	0.015

<sup>a,b</sup> Within the same rows with the different superscripts represent significantly different (P<0.05). ADG is the abbreviation of average daily gain; ADFI is the abbreviation of average daily feed intake. MSE is the abbreviation of mean standard error.

表四 添加重組胰脂肪酶對離乳仔豬血液三酸甘油酯濃度之效應

Blood trait	Level of adding recombinant lipase, units/kg			MSE
	0	5,000	10,000	
Triglyceride, mg/dL				
7 d postweaning	19.8 <sup>a</sup>	25.3 <sup>ab</sup>	30.9 <sup>b</sup>	2.0
14 d ostweaning	24.3 <sup>a</sup>	44.5 <sup>ab</sup>	48.3 <sup>b</sup>	3.5
BUN, mg/dL				
7 d ostweaning	13.4	13.0	15.7	0.8
14 d postweaning	12.3	13.0	14.6	0.6

<sup>a,b</sup> Within the same rows with the different superscripts represent significantly

飼料利用效率，以添加 5,000 U/kg 重組胰脂肪酶組，在離乳第 1 至 6 週期間，均顯著高於對照組 (P<0.05)。但是添加 5,000 U/kg 與 10,000 U/kg 之重組胰脂肪酶組，兩者間差異不顯著。由上述仔豬之生長結果，顯示離乳仔豬在飼糧添加 5,000 U/kg 之重組胰脂肪酶，具有改善離乳仔豬生長性能之效果。餵飼重組胰脂肪酶對離乳仔豬脂肪消化率之效應，利用分析血液中 TG 濃度顯示，在離乳後第 7 天與 14 天，血液中 TG 濃度均以添加 10,000 U/kg 重組胰脂肪酶顯著高於對照組 (表四)，此結果指出，餵飼 10,000 U/kg 之重組胰脂肪酶具有改善離乳後 1-2 週期間離乳仔豬之脂肪利用率。在血液尿素氮 (BUN) 濃度分析，在離乳第 7 天與第 14 天，添加組與對照組間均沒有顯著差異，此現象顯示，飼料中添加重組胰脂肪酶並不影響離乳仔豬對飼料中蛋白質之利用率。

### 重組胰輔脂肪酶與胰脂肪酶在畜牧產業之應用

由上述試驗資料顯示，在飼糧中添加重組豬胰輔脂肪酶與胰脂肪酶是一種相當有效，可以改善脂肪消化率，以及強化離乳仔豬之生長性能。直接餵飼由酵母菌培養產生重組胰輔脂肪酶與胰脂肪酶於離乳仔豬是相當方便和安全之使用方法，而且添加過程中不會對仔豬造成緊迫傷害。因

此建議添加由酵母菌釋泌之富含重組胰輔脂肪酶與重組胰脂肪酶，以提升離乳仔豬生長性能和脂肪消化率，大量生產此重組胰輔脂肪酶與重組胰脂肪酶可供作飼料添加物，使用於養豬事業提升我國養豬產業之市場競爭力。

## 結論

仔豬常於離乳初期發生所謂生長停滯現象，除疫病干擾之外，主要原因為腸道發育未完成以及消化酵素分泌不足，運用酵母細胞表現之重組胰脂肪

酶和胰輔脂肪酶蛋白質添加於飼料中，試驗顯示，具有改善離乳仔豬生長性能與脂肪利用率之效果。因此，運用酵母細胞釋泌消化酵素，藉以改善離乳仔豬之生長性能與率成率，應是一項甚具潛力且可行方法。

AgBIO

劉芳爵 行政院農業委員會畜產試驗所 營養組 副研究員

## 參考文獻

1. Brannon, P. M. (1990) *Primary cultures of pancreatic acinar cells*. In: Thompson, J. C., ed. *Gastrointestinal endocrinology: receptors and post-receptor mechanisms*. San Diego, CA: Academic Press pp. 199 - 209.
2. Liu, C. F., A. L. Hsu, H. L. Chen, C M. Chen. (2008) *Production of recombinant porcine colipase secreted by pichia pastoris and its application to improve dietary fat digestion and growth performance of postweaning piglets*. *Biotechnol. Prog.* 24:1333-1341.
3. Liu, C. F., C. M. Chen. (2007) *The effect of dietary addition of the recombinant colipase on growth performance and fat utilization of TLRI Black piglets 2 wks postweaning*. *J. Taiwan Livestock Research* 40(3): 169-175.
4. Malika, O., S. Bertrand , G. G. Anikn, and A. Genevieve. (1980) *Differential regulation of lipase and colipase in the pancreas by dietary fat and protein*. *J. Nutr.*110:2302-2309.
5. Palade, G. (1975) *Intracellular aspects of the process of protein synthesis*. *Science* 189 (4200):347-358.
6. Rausch, U., P. Vasiloudes, K. Rudiger, and H. F. Kern. (1985) *In-vivo stimulation of rat pancreatic acinar cells by infusion of secretin. II. Changes in individual rates of enzyme and isoenzyme biosynthesis*. *Cell Tissue Res.* 242(3):641-644.
7. Vainio, H., K. Linnainmaa, M. Kahonen, J. Nickels, E. Hietanen, J. Marniemi, and P. Peltonen. (1983) *Hypolipidemia and peroxisome proliferation induced by phenoxyacetic acid herbicides in rats*. *Biochem. Pharmacol.* 32:2775-2779.
8. Wicker, C., G. A. Scheele, and A. Puigserver. (1985) *Pancreatic adaptation to dietary lipids is mediated by changes in lipase mRNA*. *Biochimie.* 70(9):1277-1283.