

角蛋白酶應用於單胃動物飼料

撰文/石家興

引言

角蛋白酶 (keratinase) 的發現和利用，起源於筆者多年研究養雞場廢棄物的處理與利用，主要目標就是糞料，從實驗室到農場，筆者的研究室開發出高溫厭氧醱酵技術，有效轉化糞料為沼氣能源，並於近年開發新型專利技術 (Shih, 1987; 2012; 2015; patents pending, 2016)。在農場操作的過程中，筆者意外發現，脫落的羽毛完全消失於醱酵槽中，經過兩年的追尋，終於分離出一株特別的細菌，稱為 *Bacillus licheniformis* PWD-1，可以分解羽毛、生長於羽毛 (圖一) (Williams *et al.*, 1990)。接著，筆者研究室從 PWD-1 純化出一種水解羽毛的酵素 (Lin

et al., 1992)，因為羽毛的組成是角蛋白質 (keratin)，所以此酵素稱之為角蛋白酶，此酶的基因也終於分離定序成功 (Lin *et al.*, 1995)。角蛋白質結構緊密，不易被一般蛋白酶分解，因此 PWD-1 角蛋白酶有其特殊性；同時，它來自於高溫菌，因此具耐高溫之特性，有利於工業上的應用。在應用方面，筆者曾作三方面的探討，其一為改進羽毛粉處理與利用，羽毛經過高壓蒸煮後乾燥成為羽毛粉，可少量 (約 5%) 添加於飼料補充少量蛋白質，然而因為消化率偏低，價值不高，如果預混少量角蛋白酶，可提高飼料中羽毛粉之消化。此外，製造羽毛粉過程中，添加酶劑可以降低製程溫度和時間，節省能源成本。



a: *B. licheniformis* PWD-1 在試管中降解羽毛並繁衍生長。b: 電子顯微鏡下的PWD-1 細菌。
資料來源：Shih, 2012。

圖一 角蛋白酶產生菌 *Bacillus licheniformis* PWD-1

其二，角蛋白酶可降解普里昂蛋白 (prion protein)，有助防止狂牛症 (bovine spongiform encephalopathy/mad cow disease) 傳染 (Langeveld *et al.*, 2003)，因為狂牛症已得到控制，這方面的應用，便沒有繼續發展。其三，作為飼料添加物，角蛋白酶在單胃 (monogastric) 動物可提高蛋白質消化，因此，用於雞和豬飼料，可有效降低飼料成本 (Odetallah *et al.*, 2005)，由於飼用蛋白價格高，例如豆粕，代用品市場潛力廣大，筆者與其長子 Dr. Giles Shih 於 2000 年創辦百瑞國際生技 (BioResource International，簡稱 BRI)，走向角蛋白酶產業開發，目前該產品已進入世界市場。這篇報導重點，著重於角蛋白酶在飼料上的應用。

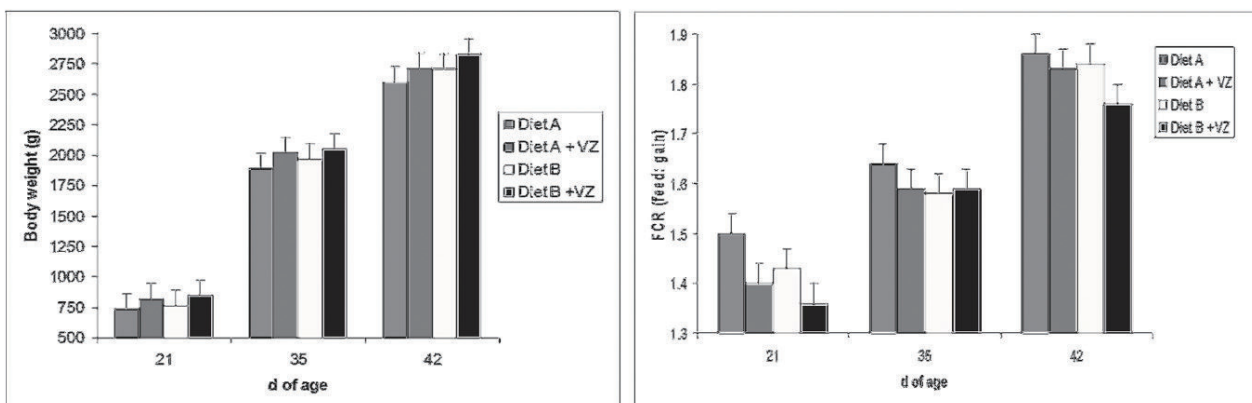
角蛋白酶生產

菌種的分離和培養，以及角蛋白酶的生產和純化，起初都在實驗室內完成，規模很小，產量只有數十毫克，不可能進行應用方面的研究。其後裝設了一套 150 公升的中型醱酵設備，得以試驗擴大生產的方法 (Wang and Shih, 1999)，從此可以生產角蛋白酶達數百公克，並可提供數百隻動物試驗，甚至到數千隻雞的農場試驗 (Odetallah *et al.*, 2003; 2005)。自從 BRI 成立，酶劑委外生產，便可提供大型企業

農場試用 (Wang *et al.*, 2006)，目前，產品已進入國際市場，工業化生產基地在臺灣，總經銷是全球性的美國公司，BRI 的角色是保持研發能力，開發新技術、新產品。這種國際策略聯盟方式，可供產業界參考。

應用於雞飼料

2001 年，筆者研究室有一次發現到有趣的結果，實驗原來目的是試探該酵素的毒性，是否妨礙小雞生長。當我們將小量 (<0.1%) 角蛋白酶加入幼雞飼料，經過三星期飼養，發現飼料含酶的處理組小雞長得較大，而且飼料轉換率較好。當時我們不明究理，便很仔細地重複三次實驗，仍得到相同的結果，乃思索到，此酶劑可能促進了蛋白質在動物體內的消化率，因此同樣的飼料，使用酶促使其消化較好，體重自然較高。為了証實我們的假說，在農場設計了 2X2 四千隻肉雞的實驗，配製了含高、低蛋白兩組飼料，分添加酶、或不添加酶，飼養 42 天達市場年齡。結果發現，成長最好的是高蛋白 / 添加酶之處理組，最差的是低蛋白 / 不添加酶之組別，其他兩組相等居中 (圖二) (Odetallah *et al.*, 2005)。後續研究，也確定角蛋白酶提高蛋白質消化，以及胺基酸利用率 (Wang *et al.*, 2008)，不但理論得到証



左圖為體重，右圖為飼料轉換率；Diet A: 低蛋白飼料，Diet B: 高蛋白飼料，VZ: 角蛋白酶。
資料來源：Shih, 2012。

圖二 添加角蛋白酶(VZ)對於42天肉雞成長的效果

實，也可實際應用於產業。

如今，世界上已有許多公司和農場，接受這項產品。一般的飼料，大約有 10-15% 的粗蛋白質難以消化，添加角蛋白酶可提高其消化利用。換個說法，添加酶大約可替代 10% 飼料蛋白，因此，為每噸飼料大約可節省 20-30 元美金（視市場豆粕價格而定），對於豆粕以外非傳統性的蛋白源，譬如棉子粕替代 50% 豆粕，添加酶可達相同的營養效果 (Wang *et al.*, 2008)。飼料中若含羽毛粉，添加角蛋白酶，也有一定的效果。而在生產羽毛粉的製程中，角蛋白酶有助提升其消化率，但因製程各有不同，效果不一，尚待進一步改進或標準化。

應用於豬飼料

近年來，中國農業大學飼料工業中心完成了一系列的研究，觀察角蛋白酶對斷奶幼豬的影響 (Wang *et al.*, 2011a,b)。首先，他們確定在試管中該酶劑可降解大豆球蛋白 (glycinin) 和 beta-conglycinin，這兩種蛋白質占大豆蛋白的 30-40%，有礙幼豬腸道發育及免疫力。因此，角蛋白酶除了單純的酶解作用，也可能在其他方面，有助小豬育成。對於角蛋白酶對幼豬的影響，農大團隊做了全

面性的研究。首先，在不同的飼料蛋白量，測試酶添加對動物成長、營養利用、腸道發育、腸道化學及微生物之影響，確認角蛋白酶有助幼豬成長、腸道健康、減少腹瀉、提高營養料利用率。進一步，在添加飼料角蛋白酶之下，利用小豬迴腸接管手術，直接測量二十種胺基酸個別的迴腸消化率，結果顯示，除了蛋白質總體消化提高之外，另有十二種胺基酸的消化率明顯提高，十二種之中有十種是必需胺基酸 (essential amino acids)。綜合以上結果，斷奶幼豬飼料添加角蛋白酶，可降解有害蛋白，同時也確實提升胺基酸消化率，因此有助腸道健康，加強免疫反應，增加體重。

結語

從發現高溫沼氣的優異性，到羽毛降解，飼料酶的產業化，筆者幸運，一路走來，充滿驚喜。若有所得，卻是事後才看明白，那就是科技路是一條雙行道，理論與實踐，互動互補，相得益彰。

AgBIO

石家興 美國North Carolina State University 榮譽教授
美國BioResource International, Inc. 創辦人
資深顧問
美國Holistic Farming, Inc. 創辦人 總經理

參考文獻

1. BioResource International, From www.briworldwide.com
2. Langeveld, J.P.M., Wang, J.J., Shih, G.C., Bossers, A., Garssen, J. and Shih, J.C.H. (2003) *Enzymatic inactivation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep*. J. Inf. Dis. 188:1782-1789.
3. Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S. and Shih, J.C.H. (1992) *Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading Bacillus licheniformis*. Appl. Environ. Microbiol. 58:3271-3275.
4. Lin, X., Kelemen, D.W., Miller, E.S. and Shih, J.C.H. (1995) *Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of Bacillus licheniformis PWD-1*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1469-1474.
5. Odetallah, N.H., Wang, J.J., Garlich, J.D. and Shih, J.C.H. (2003) *Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks*. Poult. Sci. 82:664-670.
6. Odetallah, N.H., Wang, J.J., Garlich, J.D. and Shih, J.C.H. (2005) *Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance*. Poult. Sci. 84:858-864.
7. Shih, J. C. H. (1987) *From Anaerobic Digestion to Holistic Farming*. (ed.) Bioenvironmental System, Vol. II (CRC Press, Boca Raton, Florida) 1-16.

參考文獻

8. Shih, J.C.H., (2012) *From biogas energy, feed enzyme to new agriculture*. World Poultry Science Journal 68:409-416. Erratum: 68:803-806.
9. Shih, J.C.H. and Wang, J.J. (2006) *Keratinase technology: from feather degradation and feed additive, to prion destruction*. CAB Reviews: Perspect. Agri., Vet. Sci. Nutri. Natur. Resourc. 1, No. 42, 1-6. Available online: <http://www.cababstractsplus.org/cabreviews>
10. Shih, J.C.H., (2015) *Development of anaerobic digestion of animal waste: from laboratory, research and commercial farms to a value-added new product*, pp. 339-352 in *Anaerobic Biotechnology* "H.P. Fang and T. Zhang (Eds.)", Imperial College Press, UK, 2015.
11. Wang, D., Piao, X.S., Zeng, Z.K., Lu, T., Zhang, Q., Li, P.F., Xue, L.F. and Kim, S.W. (2011a) *Effects of keratinase on performance, nutrient utilization, intestinal morphology, intestinal ecology and inflammatory response of weaned piglets fed diets with different levels of crude protein*. Asian-Aust. J. Anima. Sci. 24:1718-1728.
12. Wang, D., Zeng, Z.K., Piao, X.S., Li, P.F., Xue, L.F., Zhang, Q., Han, X., Zhang, H.Y., Dong, B., Kim, S.W. (2011b) *Effect of keratinase supplementation of corn-soybean meal based diets on apparent ileal amino acid digestibility in growing pigs and serum amino acids, cytokines, immunoglobulin levels and loin muscle area in nursery pigs*. Archives Anim. Nutri. 65:290-302.
13. Wang, H.Y., Guo, Y.M. and Shih, J.C.H. (2008) *Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention, and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals*. Animal Feed Sci. Technol. 140:376-384.
14. Wang, J.J. and Shih, J.C.H. (1999) *Fermentation production of keratinase from Bacillus licheniformis PWD-1 and recombinant B. subtilis FDB-29*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 22:608-616.
15. Wang, J.J., Garlich, J.D. and Shih, J.C.H. (2006) *Beneficial effects of Versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broiler chickens*. J. Appl. Poult. Res. 15:544-550.
16. Williams, C.M., Richter, C.S., MacKenzie, Jr., M. and Shih, J.C.H. (1990) *Isolation, Identification, and Characterization of a feather-degrading bacterium*. Appl. Environ. Microbiol. 56:1509-1515.