

私立東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組碩士論文

Master Thesis of Food Technology Section

指導教授：蔡正宗 博士

Advisor : Tsun-Chung Tsai, Ph. D.

轉植酸? 基因之稻米添加於米漿粉飼料中對成長中大鼠之礦物質生
物可利用性之影響及不同市售品牌稻米之植酸比較

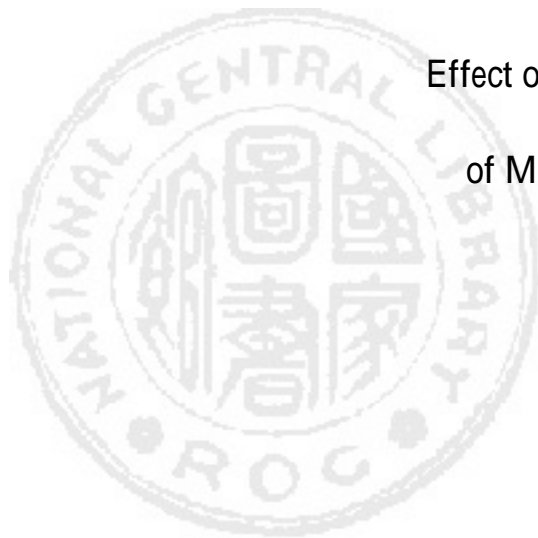
Effect of Phytase-Transgenic Rice Treated Rice milk Diets on Bioavailability
of Mineral in Growing Rats, and compared the content of phytate to the
different brands of rice on the market

研究生：李明展

Graduate Student : Ming-Jam Lee

中華民國九十七年一月

January, 2008



目錄

壹、中文摘要-----	1
英文摘要-----	3
貳、前言-----	5
參、文獻回顧-----	7
一、米-----	7
(一) 米的背景及種類介紹-----	7
(二) 米的營養及應用-----	8
二、花生-----	12
三、植酸-----	14
(一) 植酸背景介紹-----	14
(二) 植酸營養效應-----	14
(三) 植酸及其水解物之功用-----	18
四、植酸? -----	20
(一) 植酸? 的發展-----	20
(二) 植酸? 來源與作用機制-----	20
(三) 影響植酸? 活性之因子-----	23
(四) 植酸? 之應用-----	25

(五) 基因工程改良植酸?	27
肆、材料方法與步驟	31
一、實驗材料	31
二、實驗設備	32
三、化學藥品	32
四、實驗方法	33
(一) 水稻植酸? 之粗酵素	33
(二) 植酸酵素活性分析	34
(三) 植酸含量測定	36
(四) 發芽米製作	37
(五) 化學成分分析	37
(六) 動物實驗	39
(七) 礦物質分析	43
五、統計分析	46
伍、結果討論	48
一、不同市售稻米植酸含量比較	48
二、糙米在不同發芽時間之植酸? 活性	48
三、米漿粉中植酸、蛋白質與油脂組成以及飼料配置	51
四、動物生長實驗	51

五、 餵食米漿粉飼料對礦物質之生物可利用性-----	53
陸、 結論-----	60
柒、 參考文獻-----	62

圖目錄

表一、 稻米必需氨基酸(EAA)組成和WHO認定蛋白質氨基酸最佳配比模式(%)-10	10
表二、 穀類蛋白質之生物價、消化率、淨利用率及功效比值-----11	11
表三、 穀類、豆類及其製品與根莖植物、水果中植酸之含量-----16	16
表四、 植酸? 歷史-----21	21
表五、 不同來源之植酸? 特性-----22	22
表六、 生產植酸? 之微生物菌種-----29	29
表七、 米漿粉成分表-----42	42
表八、 不同礦物質之石墨原子吸收光譜溫度條件-----45	45
表九、 不同品牌之市售稻米植酸含量-----49	49
表十、 在米粉、花生粉和米漿粉中植酸、蛋白質和油脂的含量-----52	52
表十一、 植酸和植酸? 對於進食飼料量、體重和飼料轉換率的影響-----54	54
表十二、 植酸和植酸? 對鐵和鋅吸收的影響-----55	55
表十三、 植酸和植酸? 對鈣和磷吸收的影響-----56	56
表十四、 植酸和植酸? 對鎂吸收的影響-----57	57

表目錄

圖一、植酸之化學架構-----	15
圖二、植酸與蛋白質、金屬及澱粉之可能反應-----	19
圖三、植酸經植酸? 水解為肌醇及磷酸之水解圖-----	24
圖四、植物及黴菌所產之植酸? 降解植酸途徑-----	26
圖五 A、動物實驗大鼠飼養籠-----	41
圖五 B、糞尿分離不銹鋼墊盤-----	41
圖五 C、墊盤細部圖-----	41
圖六、糙米在不同發芽時間下植酸? 之活性-----	50

壹、中文摘要

植酸常被視為抗營養分子，在植物中為磷酸根儲存的主要形式；本研究使用含 E. coli 植酸? 基因 appA 的轉殖水稻中，將轉殖基因稻米粉加入飼料，探討其對礦物質吸收的影響。本實驗除了測量市面上不同品牌之糙米、胚芽米和白米之植酸以及糙米不同時間發芽之植酸? 活性，還有將轉基因米粉直接加入米漿粉中，混合之後餵食老鼠，觀察其重量變化，及礦物質生物可利用性。

市面上不同品牌之稻米會經磨成粉後，測其植酸含量；糙米發芽是將糙米浸水，溫水洗滌後，靜置暗處，於不同時間測量其植酸? 之變化；動物實驗部分分成四組，第一組為控制組，第二、三及四組於米漿粉飼料中加入一倍、兩倍及三倍可在 30 分鐘內將飼料中的植酸完全水解之轉基因米粉量。將飼料餵食 24 隻 wistar 大鼠，每組 6 隻，餵食 28 天，每天記錄攝食情況且收集糞便，每星期檢測動物重量和糞便重量。將飼料和收集來的糞便磨粉經溼式灰化後，用石墨原子吸收光譜分析飼料及糞便中的礦物質鈣、鋅、鐵及鎂的含量，用呈色法測量磷的含量。

結果發現糙米以中興牌之植酸較高，胚芽米是金墩牌之植酸較高，白米是台糖牌之植酸較高，糙米發芽所產生之植酸? 是隨著發芽時間而增加，動物實驗部分有添加轉基因米粉的組別，其鈣、鐵、鋅、磷及鎂生物可利用性皆有明顯的改善；其中鈣的吸收率最高，其次鋅、鐵及鎂。糞便中植酸降低率是添加 3 倍轉殖

基因米粉的效果較佳，約可降低 10% 的植酸殘留。

Abstract

Rice milk flavored with roasted peanut is a popular breakfast beverage to Chinese. Both rice and peanut contain phytate which is considered to be an anti-nutritional factor to the absorption of metals, protein and starch. A limited phytase, an enzyme specific for hydrolysis of phytate, has been reported to occur in the grain and oilseed. Including into food / feed a stable and high activity phytase will improve the absorption of nutrients, especially metal ions. In this study we will examine the phytate content of rice milk components, rice and peanut, and phytase activity during germination first. Then we will include a stable, high activity of phytase from transgenic rice to feed for mice to investigate its effect on the absorption of metals.

The contents of phytate in different brands of brown rice, embryonic rice and polished rice from market have been investigated. It was found that generally the content of phytate in rice is in following order: brown rice > embryonic rice >> polished rice for same brand. Phytate content in 100g of Sunhow rice were found to be 1.24, 1.23 and 0.07 g for brown rice, embryonic rice and polished rice, respectively. Phytase activity in germinated rice is increased with increase in germination duration. However, phytase activity of germinated regular rice (<1200U/kg) is much lower than that of the transgenic rice (30000-40000 U/kg).

Twenty four Wistars male divided into four groups. Control group was fed basal diet containing regular rice powder. In group 2, the calculated amount of transgenic rice required to hydrolyze total phytate in feed in 30 minutes was incorporated into basal diet to replaced partial regular rice. Double and triple transgenic rice were added into basal diet in group 2 and 3, respectively. Each group was fed for 4 weeks. The feed consumption and collected feces were recorded daily. The body weights were measured weekly. The diet and collected feces were dried, powdered and ashed for measurement of calcium, zinc, iron and magnesium content with graphite atomic absorption spectrophotometer and phosphorous content with colorimeter method.

No significant difference in weight gains and feed efficiency among groups were found. Apparent absorption of iron absorption was found to increase with the increasing addition of transgenic rice. Enhancing iron absorption is most profound at single addition of transgenic rice. On the contrary, double calculated transgenic rice addition exhibit most effective to enhance the absorption of zinc. Absorption of calcium were found to increase gradually with increase in the transgenic rice addition. Enhancing absorption of magnesium by transgenic rice addition was most effective among all metals examined. The phosphorus absorption exhibited to increase with increase in transgenic rice incorporation into regular rice and most profound at the single incorporation.

貳、前言

自古以來,稻米一直是國人的主食,並發展出了許多不同的食用方式,例如:米漿、米飯、粥、米糕等....。米類食品有非常均衡的營養,對於國人而言是最適合的主食。在米及米製品中含有一抗營養因子植酸(phytic acid),不同加工米(糙米、胚芽米及白米)有不同的植酸含量,而植酸是廣泛存在於植物體中之含磷化合物,種子中含有較多的植酸,具有能量的儲存以及防止脂肪氧化的功能(Empson et al., 1991)。在單胃動物的腸胃道中缺乏可以分解植酸的植酸?,或是活性太低,無法將植酸有效地分解,植酸會與蛋白質和澱粉結合而生成複合物,因而降低 α -amylase 的活性,使得蛋白質和澱粉的吸收率下降,而且植酸還會跟金屬離子嵌合形成具有穩定不溶性之錯合物,因此降低金屬生物利用率。目前如何降低食物中植酸的含量是重要的課題,現在有酵素性的方法(添加外源性酵素、浸泡發芽活化內質性的植酸?等..)及非酵素性(加熱、高壓等..)。大部分使用的都是非酵素性的方法,但是效果不明顯仍有植酸存在於食品中。最好的方法是使用添加外源性酵素去分解植酸,植酸?存在於植物、微生物及特定的動物組織中(反芻動物),以微生物生產植酸?最常見。微生物生產植酸?並沒有辦法應付市場需求而大量生產,所以學者們藉由基因工程改良發展去解決問題。本研究的目的除了測量市面販售的米所含的植酸含量及不同時間下糙米發芽之植酸?活性並探討利用轉 E.coli 植酸?基因 appA 的水稻(Oryza-sativa L. cv. Tainung 67),所得

高含量植酸? 的米粉餵食成長中的大鼠，觀察其對礦物質的生物可利用率的影響。期望此實驗結果能提供米類食品營養資訊及探討植酸? 在動物的消化系統中之運用性。



？、文獻回顧

一、米

(一) 米的背景及種類介紹：

稻米是多數國人數千年來賴以為生的物質，其影響已深入到倫理和精神的層面。因為米除了供應大多數國人的三餐外，在逢年過節中，有年糕、粽子、糕餅和各式粿類等應景米製品，過去無論人出生、成年、結婚、過壽甚至死亡，米食都在儀式中占了重要的角色，因為米食是最適合國人體質的主食，也與國人生活產生密不可分的關係。現今全世界有一半的人口食用稻米，主要在亞洲、歐洲南部和熱帶美洲及非洲部分地區，稻的總產量占世界糧食作物產量第三位。

稻成熟之後結穀，去穀去皮之後就成為了米。也就是今日大家在商場、市場看到的商品。米的種類也相當多種，而且不限於地區販售，因此在中國可能也會吃到泰國米，在日本也會吃到台灣米。

將米的種類以加工過程做簡單區分：

1. 糙米：稻穀去除稻殼後之稻米。營養價值較胚芽米和白米高，但浸水和煮食時間也較長。
2. 胚芽米：糙米加工去除糠層保留胚芽及胚乳，是糙米和白米的中間產物。

3. 白米：糙米加工去除糠層及胚芽，只留下胚乳，現代人最常吃的種類。

(二) 米的營養及應用：

大體而言，米的營養價值相當完整且均衡。含有碳水化合物、脂肪、蛋白質，並含有適量礦物質、維生素和纖維。米所含的營養以碳水化合物為主，是供給熱量的最大來源。

1. 蛋白質：由表一中發現米中蛋白質的氨基酸比例大部分高於世界衛生組織認定蛋白質最佳配比模式的，除了Lys (第一限制性氨基酸)，Thr (第二限制性氨基酸)和Try(第三限制性氨基酸) 略為欠缺；從表二可知，稻米蛋白質的營養價值同其它穀物蛋白質相比是較高的，這與它具有很高之穀蛋白含量有關(Barber et al, 1972 ; Johnson et al, 1974)。因為，同其它穀類相比，稻米之穀蛋白中含有較豐富的Lys(Takeda et al, 1970 ; Barber et al, 1972) , 稻米蛋白質比其它穀物蛋白質具有較好之氨基酸平衡(Johnson et al, 1974 ; 何,1985)，且稻米不含任何抑制動物生長之成分(Nishizawa et al, 1990)。

Hayakawa 等報告中蛋白質之淨蛋白質利用率(net protein utilization)由氨基酸的含量決定，由於稻米不同部位的Lys 含量不同，故稻米的不同部位其營養價值也必然不同。稻米外層蛋白質的營養價值最高，中層次之，粒心又略有增高(Hayakawa, 1985) 。聯合國世界衛生組織(1973)建議，對於一個高品性的蛋白質來說,它的必需氨基酸與總氨基酸的比值(EPT) 應該至少

是36.0%，而稻米之清蛋白(含硫蛋白質)、球蛋白、醇溶蛋白、穀蛋白以及總蛋白之EPT值分別是40.8%、38.0%、43.2%、38.4%和41.0% (Padhye et al, 1979)，表示稻米蛋白是優質蛋白質；儘管稻米蛋白質是優質蛋白質，但正如表一所示，稻米蛋白質中Lys、Thr之含量同WHO(World Health Organization)模式相比還欠佳，因此，可以透過對稻米強化這兩種氨基酸使稻米蛋白質之營養價值更顯著。

2. - 氨基丁酸(GABA)：是一種廣泛分佈於動植物界的非蛋白質類氨基酸，由穀氨酸經穀氨酸脫羧酸酵素催轉化而來，是存在於哺乳動物腦脊髓和外周組織中抑制性之神經傳遞物質。GABA 具有很重要的生理功能，有降低血壓；促使精神安定；促進腦部血流，增進腦活力，增強記憶；營養神經細胞，對神經元的增殖、分化以及自身受體的基因表達，神經相關蛋白的合成有一定的調節作用；增加生長激素分泌；健肝利腎；促進乙醇代謝、改善高脂血症、預防肥胖；抑制大腸癌；抑制垂體激素 LH 和 PRL 的分泌，促進精子的獲能，提升精子的體外能力；刺激胃酸、胃蛋白酶素的分泌，增加胃黏膜屏障機能；改善更年期綜合症等和消除體臭等功能。(許，2003)

表一、稻米必需氨基酸(EAA)組成和世界衛生組織認定蛋白質氨基酸最佳配比模式(%)

Table 1. The composition of the essential amino acid in rice, and WHO think the best model that is the proportion of protein and amino acid

EAA	稻米蛋白質		WHO 模式
	糙米 (n = 12)	大米 (n = 60)	
Cys	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.2	
Met	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3	3.5
Lys	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.2	5.6
Ile	4.1 ± 0.1	4.1 ± 0.2	4.0
Leu	8.2 ± 0.3	8.2 ± 0.3	7.0
Phe	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.2	
Tyr	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.3	6.0
Thr	3.5 ± 0.2	3.5 ± 0.2	4.0
Try	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.0
Val	5.8 ± 0.4	5.8 ± 0.3	5.0

資料來源(Kennedy et al, 1981)

表二、穀類蛋白質之生物價、消化率、淨利用率及功效比值

Table 2. A ratio of the biological Value, digestive rate, NUU and efficiency of Corn protein

品种	BV 生物价 ^a	CD 消化率 ^a	NPU 淨利用率 ^a	PER 功效比值 ^b
稻米	77	94	72	1.50
小麦	67	91	61	0.65
小米	57	85	48	
玉米	59 ^c	90 ^c	51 ^c	0.85
高粱	56	90	50	0.69
大麦	64	90	58	1.66

資料來源 a(周等人,1986)

b(食品生物化學,1985)

c(劉,1991)

PS.

$$BV = \frac{\text{保留氮量}}{\text{吸收氮量}} \times 100$$

$$\text{消化係數 (CD)} = \frac{\text{氮攝取量} - (\text{糞便氮量} - \text{無蛋白質飲食時之糞便氮量})}{\text{氮攝取量}} \times 100$$

$$NPU = \frac{\text{保留氮量}}{\text{氮攝取量}} \times 100$$

$$\text{功效比值} = \text{PER (Protein Efficiency Ratio)} = \frac{\text{體重增加克數}}{\text{蛋白質攝取克數}}$$

二、花生

花生是豆科植物(Fabaceae 或 Leguminosae)花生(Arachis hypogaea L.)的種子，它是花落以後，花莖鑽入泥土而結果，所以稱「落花生」；由於它營養價值高，吃了延年益壽，故又被稱為「長壽果」，而台灣人則習慣稱它為「土豆」。是世界重要雜糧作物之一，為一種油用與食用的豆類作物。

落花生被利用最大的部份為莢果，可提供八種人體所需的胺基酸及不飽和脂肪酸、卵磷脂、膽鹼、胡蘿蔔素、粗纖維等，落花生所含的脂肪尤其豐富，含有 12 種以上的脂肪酸，其中含量較高者為油酸、亞麻油酸及棕櫚酸。油酸及亞麻油酸為不飽和脂肪酸，兩者合計約占總含油量的 80%，其他約 10 種的脂肪酸的含量約在 0.02%及 3.59%之間；且含膽鹼、卵磷脂等，具降低血液膽固醇，預防動脈血管硬化、心臟病、高血壓、腦溢血的產生，防止膽固醇在血管沈澱、堆積而引起動脈硬化等，亦可促進人體新陳代謝、增強記憶力及神經系統的作用，達益智、抗衰老、延壽之目的。落花生蛋白質含量為 25 ~ 30%，至少含有 16 種游離形態的胺基酸，主要以精胺酸、天門冬胺酸及麩胺酸等人體必需胺基酸為主。花生及其製品含不飽和脂肪酸、植物固醇、白藜蘆醇、維生素 C 和 E、葉酸等植物活性物質，對促進健康、預防疾病十分有益。

對脾胃的保健作用，花生性味甘平，據<<本草綱目>>記載：“花生悅脾和胃，潤肺化痰，滋養補氣，清咽止癢”。明朝藍茂所著<<滇南本草>>記載：<<藥性考>>記載：“本品炒熟食用胃醒脾滑腸潤燥”(萬,2003)。花生適用於治療營養不良、

脾胃失調和腸燥便秘等症狀，民間俗稱“生花生健胃、煮花生潤肺、炒花生保肝”，與古人論述相一致。

預防心血管疾病方面，現代藥理研究和臨床實驗證明，花生具有降血壓、降低膽固醇等多方面作用。花生含有不飽和脂肪，可預防心臟病、降低血液內膽固醇含量，有動脈硬化、冠狀心臟病以及高血壓的病人食用(周,2003)。花生中還含有豐富的維生素 E，可使血小板沉積在血管壁的數量降低，保持血管柔軟，血管不易硬化，降低心臟病的機率。花生的有效成分具有延緩人體細胞衰老、加強腦細胞發育、保護血管、防止硬化及增強記憶力等作用；據 Kris-Etherton 教授研究，食用花生油及花生製品者患心血管疾病之機率減少 21%(Penny M., 1990)，還有美國科學家在花生中發現了大量之白藜蘆醇，花生根中白藜蘆醇含量是葡萄酒之 10 至百倍(? ,1996)。白藜蘆醇是一種具有廣泛保健功能之成分，主要有降脂、消炎、抑癌和治療冠狀心臟病等作用，特別對抗腫瘤疾病有顯著效果被譽為“100 種最熱門有效抗衰老物質”之一(周,2003)。

其他功效方面，花生含有一般雜糧少有之膽鹼、卵磷脂，具有促進人體新陳代謝，增強記憶力等作用，可益智、抗衰老等，美國衛生機構建議中老年人多吃花生製品，目的是預防老年性癡呆。現代醫學研究證實，花生能紓解血友病患者之出血症狀，具有抗纖維蛋白溶解、促進骨髓製造血小板及調整凝血因子缺陷等作用，還有一些出血性疾病都有較好之止血作用，中國方面還用花生紅衣研製了抗血友病藥劑。(周,2003)

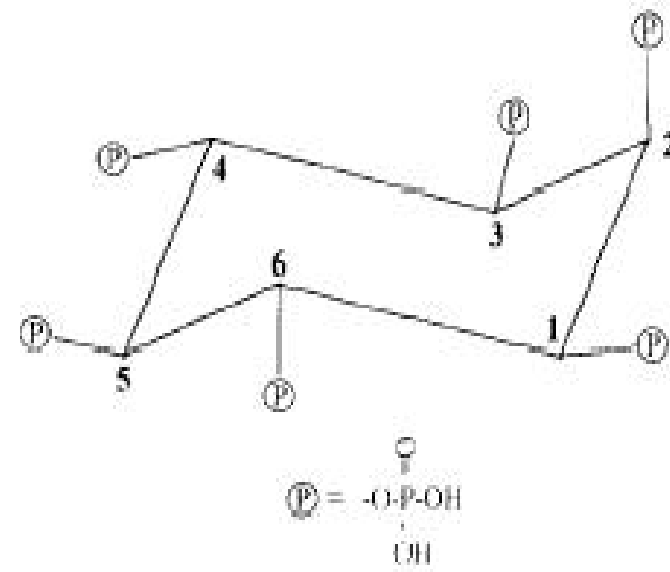
三、植酸

(一) 植酸背景及架構介紹

植酸(phytic acid)，為環類肌醇與六個磷酸根離子所組成之環類化合物，學名為肌醇六磷酸(myoinositol 1,2,3,4,5,6-hexakisdihydrogenphosphate) (圖一)，經由分離植物種子發現，直到1903年由Possternak等學人確定植酸的存在(Posternak, 1903)。植酸廣泛地存在於自然界中，各種植物之植酸含量如表三所示。植物通常以鈣-鎂-鉀鹽之混何形式(phytin)存於種子中，植酸所儲存的位置依植物種類而不同，如玉米儲存於胚芽(O' Dell et al., 1972)，小麥於糊粉層，而米在穀皮層(Tanaka et al., 1974)。

(二) 植酸營養效應

單胃動物如人、狗、雞中消化道內因缺乏植酸? (Taylor, 1965; Nelson, 1967; Cromwell, 1991)，且植酸易與陽離子之礦物元素，例如鈣、鋅、鐵及鎂等形成不易溶解之植酸鹽，進而影響礦物質之利用率；植酸之存在亦影響蛋白質與胺基酸之利用率(Rutherford et al., 2002)，因磷酸根與蛋白質或胺基酸之胺基及羧基結合，形成植酸-蛋白質或植酸-蛋白質-礦物質複合物(圖二)，而降低蛋白質或礦物質之利用率(Thompson, 1993)，常被視為抗營養分子，單胃動物所排出的糞便在環境中微生物將植酸分解產生大量無機磷，而污染水源，促使水中藻類繁殖速度增加，進而引發優養化問題。



圖一、植酸之化學架構。(Liu et al., 1998)

Fig1. Molecular structure of phytic acid

表三、穀類、豆類及其製品與根莖植物、水果中植酸之含量

Table 3. Phytate content of cereals, cereal products, beans, bean products, tuber and fruits

Classification		phytate(%)	References
Cereal	wheat	0.39-1.35	Lolas,1976
	Barley	0.38-1.16	Kikunaga,1985
	Corn	0.75-2.22	Harland,1979
	Rice	0.17	Mameesh,1993
	Oat	0.42-1.16	Frolich,1988
Cereal product	wheat breads	0.28	Graf,1982
	Corn chips	0.24-0.66	Harland,1987
	Biscuit	0.11-1.05	Ceruti,1984
Bean	Soybeans	1.0-2.22	Cilliers,1986
	Peas	0.22-1.22	Welch,1974
	Peanuts	1.05-1.76	Harland,1979
	kidney beans	0.89-1.57	Yoon,1983
	Green gram	0.59-1.10	Davies,1986
Bean product	Soymilk	0.05-0.11	Anno,1985
	Tofu	1.46-2.9	Kasim,1998
	Peant flour	1.5-1.94	Harland,1986
Tubers	Potato	0.01-0.18	Wolters,1993
	Sweer potato	0.07-0.32	Ravindran,1994
	Sugar beet	0.01	Kasim,1998
Fruit	Strawberry	0.13	Wolters,1993
	Mango raw/ripe	0.14	Ferguson,1988

(Food phytates , 2001)

植酸於營養方面之問題：

1. 澱粉之消化及吸收：植酸能與澱粉結合，影響其溶解度、功能性、消化率及吸收性。Thompson 等學人於體外試驗發現，含有植酸之條件下，人體唾液所含之 α -澱粉酶對小麥澱粉之消化率經過5小時後反應減少60%(Thompson et al., 1984)；且 Kunckles 等學人之體外實驗，在 pH4.15 唾液中 α -澱粉酶於可溶性馬鈴薯澱粉會因植酸與其水解物之存在分別降低 8.5%和 78.3%，且其濃度越高其抑制效果相對提升(Kunckles et al., 1987)；此外植酸會與澱粉產生鍵結，降低澱粉的消化吸收(Carnovale et al., 1988)。

2. 蛋白質之消化及吸收：植酸對蛋白質之抑制性受到 pH 值強烈影響，最大抑制效應在 pH 2~3 之間，且隨著 pH 值上升抑制性有下降之趨勢；在 pH4.5~5.0 時幾乎無抑制性(Vaintraub and Bulmage,1991)。在無陽離子存在之酸性環境下，植酸可與蛋白質之鹼性殘基鍵結，形成大量蛋白質沉澱發生，進而影響蛋白質之溶解性及功能性，在陽離子存在之鹼性環境下，則會形成蛋白質-金屬-植酸之不溶複合物(Okubo et al., 1976)。

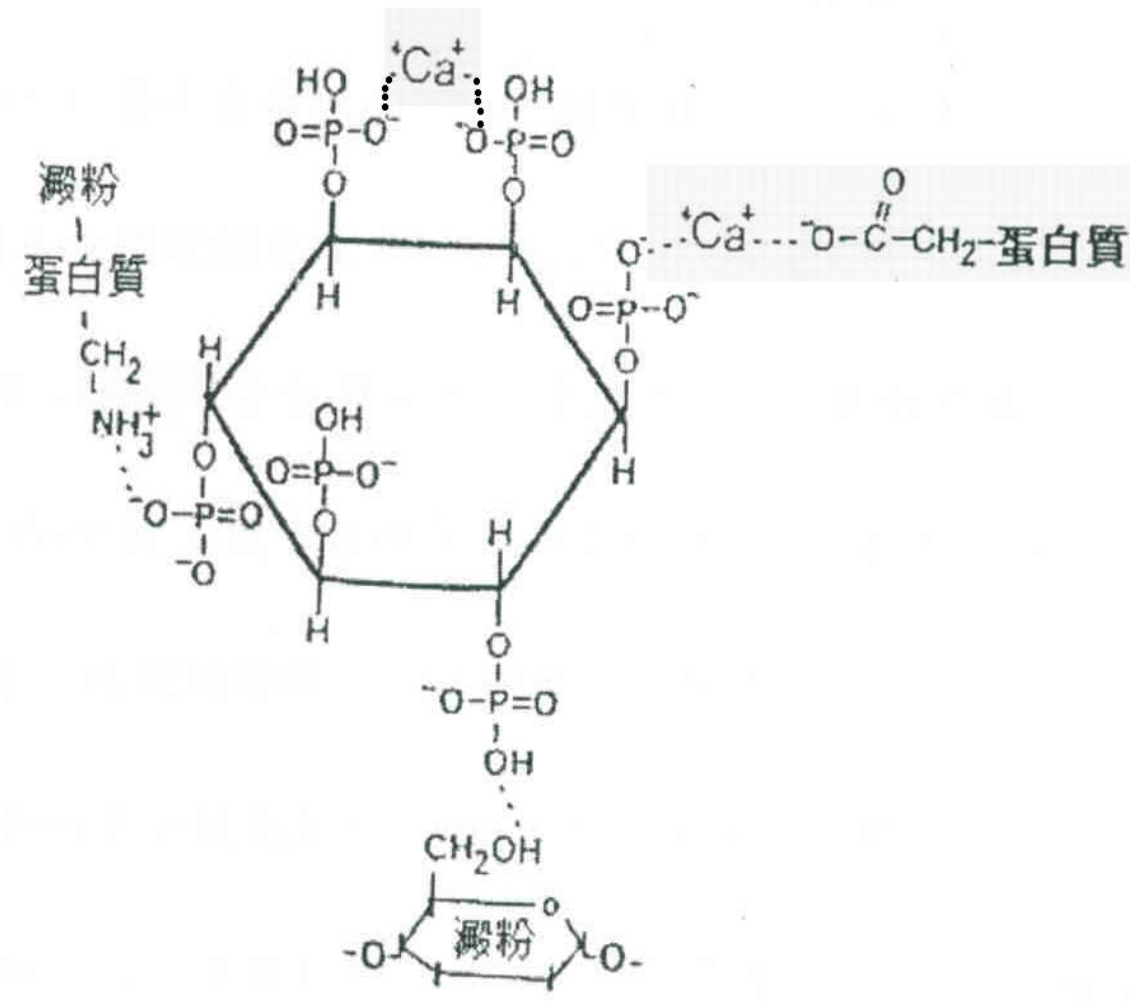
3. 金屬離子之生物利用率：植酸在食品中帶有六個強解離性及六個弱解離性質子，具很強的負電荷，因此極易與正電荷之物質如金屬離子形成安定之複合物，其鍵結強度因金屬離子與環境不同而異。植酸解離常數為 1.1-12.0，因此，對於腸道之生理環境下，易整合帶正二及正三價之金屬離子，如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Fe^{3+} 及 Cu^{2+} 等形成穩定不溶之錯合物，即為植酸鹽(phytates) (Wodiznski and Ullah,

1996)，而且會干擾腸道對陽離子之吸收，因而在營養方面降低了重要礦物質之生物利用率(Graf, 1983)，進而導致動物體內礦物質之攝取不足(Lonnerdahl et al., 1989)，造成生長遲緩或是骨骼易變等問題；為了讓飼養動物生長更好，必須增加額外之礦物質，造成成本增加。

(三) 植酸及其水解物之功用

植酸在種子休眠和萌芽的過程中扮演重要角色，可作為儲存磷酸根、高能磷酸根及陽離子(Pawar and Ingle, 1988)和細胞壁前驅物質之用(Graf, 1983)。此外，植酸亦能防止種子於儲藏期間遭受氧化作用傷害(Graf and Empson, 1987)，對於種子儲存有一定效果，而且當種子發芽時，胚乳中植酸會被內生性植酸[?]分解成無機磷酸鹽形式，可供植物生長所需(Eskin and Wiebe, 1983 ; Wodzinski and Ullah,1996)。

由於植酸及其水解物具有干擾澱粉消化性之特性，可用於製成低熱量食品及血糖反應器(Wodzinski and Ullah, 1996)，亦可當作抗氧化劑，使其不形成自由基而避免脂質過氧化，且可預防罹患心血管疾病之危險；還有植酸之金屬螯合能力可用於一些果汁或是葡萄酒的除鐵劑，罐頭的防腐銹劑及魚罐頭的防腥、防變色等；植酸經過植酸[?]作用或是體內代謝而脫磷酸化對於癌症有抑制與治療的效果，如大腸癌、結腸癌還有直腸癌等(Reddy,1999 ; Koba et al, 2003)。



圖二、植酸與蛋白質、金屬及澱粉之可能反應(Thompson, 1993)
 Fig. 2. Possible interactions of phytic acid with protein, minerals, and starch

四、植酸?

(一) 植酸? 的發展(表四)

1907 年由 Suzuki 等學者從米麩中萃取出植酸? , Dox 與 Gdden(1911)發現 aspergilli 具有產植酸? 之能力後,一直到 1962 年 International Minerals and Chemicals 公司最先開發出商業化之植酸? 產品; 1968 年 Shieh 與 Ware 學者從土壤中篩選許多株微生物, 發現 A. niger NRRL 3135 具有高植酸? 活性, 1969 年 Shieh 又提出 A. niger NRRL 3135 之植酸? 部份純化定性, 後來 1988 年 Ullah 將 A. niger NRRL 植酸? 純化並訂出 phyA 部分胺基酸序列, 在 1996 年美國 FDA 核准由 GRAS 菌株所生產之植酸? 可添加於食品中, 現在有許多國家包括我國在內許可植酸? 添加於飼料中。

(二) 植酸? 來源與作用機制

從 1907 年 Suzuki 等人發現植酸? 以來, 許多人陸續在植物、動物及微生物中發現植酸? 之存在(表五)(Liu et al., 1998), 植物中以穀類、豆類等含量居多, 植物性植酸? 最適作用溫度約為 46-60 , 最適 pH 範圍為 4.8-8.0 之間; 動物性來源是以大多脊椎之紅血球與血漿及部分哺乳動物之小腸中, 最適 pH 約在中性(Liu et al., 1998); 微生物性來源最為廣泛, 由真菌所產生之胞外酵素, 最適 pH 作用約為 4.5-5.5, 細菌性植酸? , 除了 Bacillus subtilis 及 Enterobaceter 外, 其他皆為胞內酵素, 最適作用 pH 在 4.5-7.5 之間。動物性植酸? 來源少, 取得不易且費時,

表四、植酸? 歷史

Table 4. The history of phytase

1903	Posternak-Describes phytic acid
1907	Suzuky et al.-Describes and extract rice bran phytase.
1911	Dox and Golden-Demonstrate phytase in aspergilli.
1913	Plimmer and Anderson-Identify organic phosphorus compounds in plant material.
1914	Anderson-Determines the structure of phytic acid.
1959	Casida-Lists 20 soil fungi that have phytase activity.
1962-1971	International minerals and Chemical initiates first commercial attempt to develop phytase as a product.
1967	Ware and Shieh-Patent acid phytase.
1968	Shieh and Ware-Screen over 2000 isolates for phytase activity. Isolate <i>Aspergillus niger</i> NRRL3135 syn <i>A. ficuum</i> produces <i>phyA</i> and <i>phyB</i> at the highest yeild ever reported in a nongenetically modified strain.
1968	Nelson <i>et al.</i> -Feed phytase-treated soybean meal and document that hydrolyzed phytin is assimilated efficiently by broilers.
1969	Shieh <i>et al.</i> -Partial purification characterization and regulation of <i>A. niger</i> NRRL 3135 phytase.
1971	Nelson <i>et al.</i> -Direct feeding of supplemental <i>A. niger</i> NRRL 3135 phytase to broilers in experimental and practicaldiets is titered.
1984	Southern Regional Research Center Agricultural Research Service, Untited States Department of Agriculture begin basic studies on phytase.
1987	Alko Ltd. (Finland)(Pan labs) initiates project to commercialize phytase.
1987	Gist-Brocades(Netherlands) initiates project to commercialize phytase.
1988	Ullah-Purified, characterized, and determined the partial amino acid sequence of <i>A. niger</i> NRRL 3135 <i>phyA</i> .
1990	Simons et al.-Demonstration of efficacy of phytase in broilers and pigs.
1991	Van Gorcom et al.-Application for patent on the overproduction of <i>phyA</i> by cloned strains of <i>A. niger</i> NRRL3135 and <i>A. niger</i> CBS 513.88 that has a glucoamylase promoter and in which synthesis is not controlled by levels of P. Extracellular yeild of <i>phyA</i> increased by 50-fold.
1992	Ecological benefits of the use of phytase to abate phosphorus excretion by monogastric animals.
1993	Ehrlich <i>et al.</i> -Cloned and sequenced the gene for <i>A. niger</i> NRRL 3135 <i>phy B</i> .
1993	Piddington <i>et al.</i> -Cloned and sequenced phytase from <i>A. niger</i> var. awarmori.
1993	Pen <i>et al.</i> -Expression of fungal phytase <i>phy A</i> in tobacco.
1994	Ullah et al.-Cloned and sequenced the gene of <i>A. niger</i> NRRL 3135 metallo pH 6.0 acid phosphatse.
1994	Beudeker and Pen-Expression of fungal phytase <i>phy A</i> in canola(<i>Brassica napus</i>).

(Wodiznski and Ullah, 1996)

表五、不同來源之植酸? 特性

Table 5. General characteristics of phytase from various sources.

Classification	Source	Molecular weight	Optimal Temperature	Optimal pH
		(kDa)	(°C)	[pI]
Bacteria	<i>B. subtilis</i>	36-38	60	6.0-6.5[6.25]
	<i>E. coli</i>	42	55	4.5
	<i>Enterobater</i>	-	50	7.0-7.5
	<i>K. aerogenes</i>	10-13,700	60-70	4.5, 5.2[3.7]
	<i>Pseudomonas</i>	-	-	5.5
Fungi	<i>A. ficuum</i>	85-100	55-60	4-6[4.5]
	<i>A. niger</i>	200	53	5.5
	<i>A. terreus</i>	214	70	4.5
	<i>A. oryzae</i>	120-140	50	5.5[4.5]
	<i>R. oligosporus</i>	-	55	4.5
Yeast	<i>S. castellii</i>	490	77	4.4
	Baker's yeast	-	45	4.6
Plant	Canola seed	-	50	5.2
	<i>Cucurbita maxima</i>	66.5	48	4.8
	<i>Lilum longiflorum</i>	88	55	8
	Maize	76	55	4.8
	Mung bean	160	57	7.5
	Soybean	60	55	4.5-4.8[5.5]
	Spelt	68	45	6
	Wheat bran	47	55	5.0-5.6, 7.0
Animal tissue (intestinal ucosa)	Human	-	-	5
	Chicken	-	-	5
	Calf	-	-	5
	Rat	70-90	-	5

(Liu *et al.*, 1998)

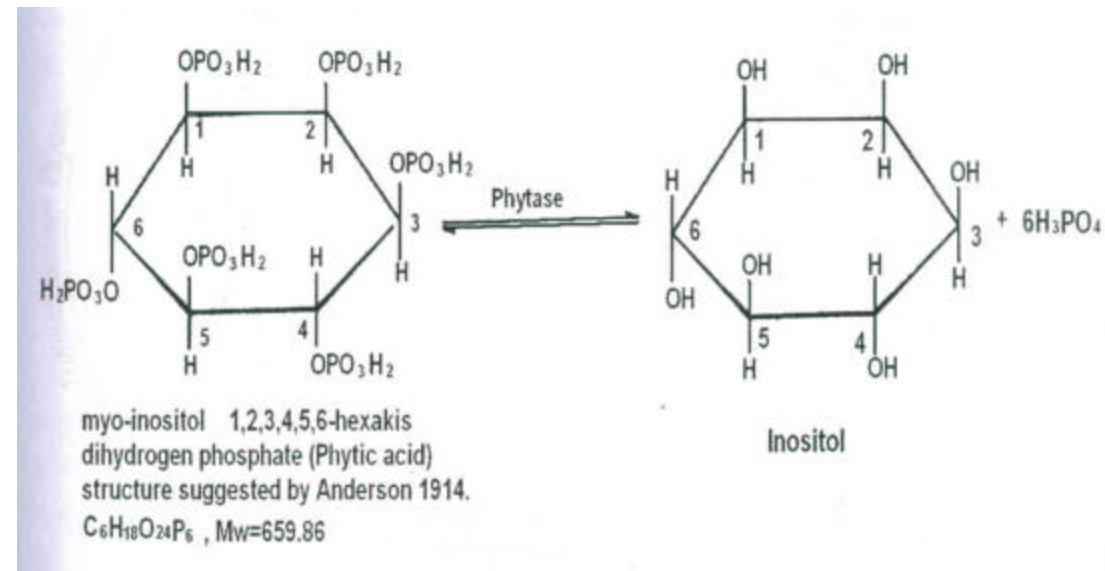
一般都是以微生物來生產植酸[?]，不過細菌性植酸[?]多為胞內酵素(Liu et al., 1998)，會造成回收不易，而且其最適作用 pH 值不適合用於食品添加物中，因此，商業上都以真菌性植酸[?]為主，易量產、回收容易及活性高，耐受較廣泛之 pH 值及溫度，不被消化道中蛋白[?]降解等優點；現在常見真菌性植酸[?]以 *A. niger* NRRL 3135 最具潛力(Shieh and Ware, 1968)，因其菌株活性為 6.8 μ mol/ml/min，而常被研究和探討(Nair et al., 1991)。

根據國際生化組織於 1979 年將植酸[?]分為 2 種類型：肌醇六磷酸 3-磷酸水解[?]，即 3-phytase(E.C. 3.1.3.8)，作用植酸時，會從肌醇的第三碳位開始水解磷酸根；肌醇六磷酸 6-磷酸水解[?]，即 6-phytase(E.C. 3.1.3.26)是由第六碳位水解磷酸根(Wodzinski and Ullah,1996)；微生物所產之植酸[?]多為 3-phytase，大多植物產之植酸[?]多為 6-phytase，第二碳位磷酸根因立體障礙而不易水解(圖四)。

(三) 影響植酸[?]活性之因子

植酸[?]之活性易受溫度 pH 值及不同金屬離子影響(Kim et al. 1998)，如 Ca^{2+} 能提高玉米所含 *B.subtillus* 所產植酸[?]之活性(Segueilha et al., 1992)，而 Zn^{2+} 則會抑制 *A. ficuum*，*B. subtillus*，*Enterobacter* 及 *S. castellii* 等微生物生產之植酸[?]活性 (Ullah, 1988; Powar and Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992; Laboure et al., 1993; Yoon et al., 1996)。Jongbloed 等學者研究指出植酸[?]主要作用部位在禽類之嗉囊及腺胃；豬隻則在胃及十二指腸前端(Jongbloed et al. 1992)。小腸後段因腸

道 pH 改變



圖三、植酸經植酸? 水解為肌醇及磷酸之水解圖

Figure 3. Scheme of dephosphorylation of phytic acid hydrolysis of phytic acid to

Inositol and phosphoric acid by phytase

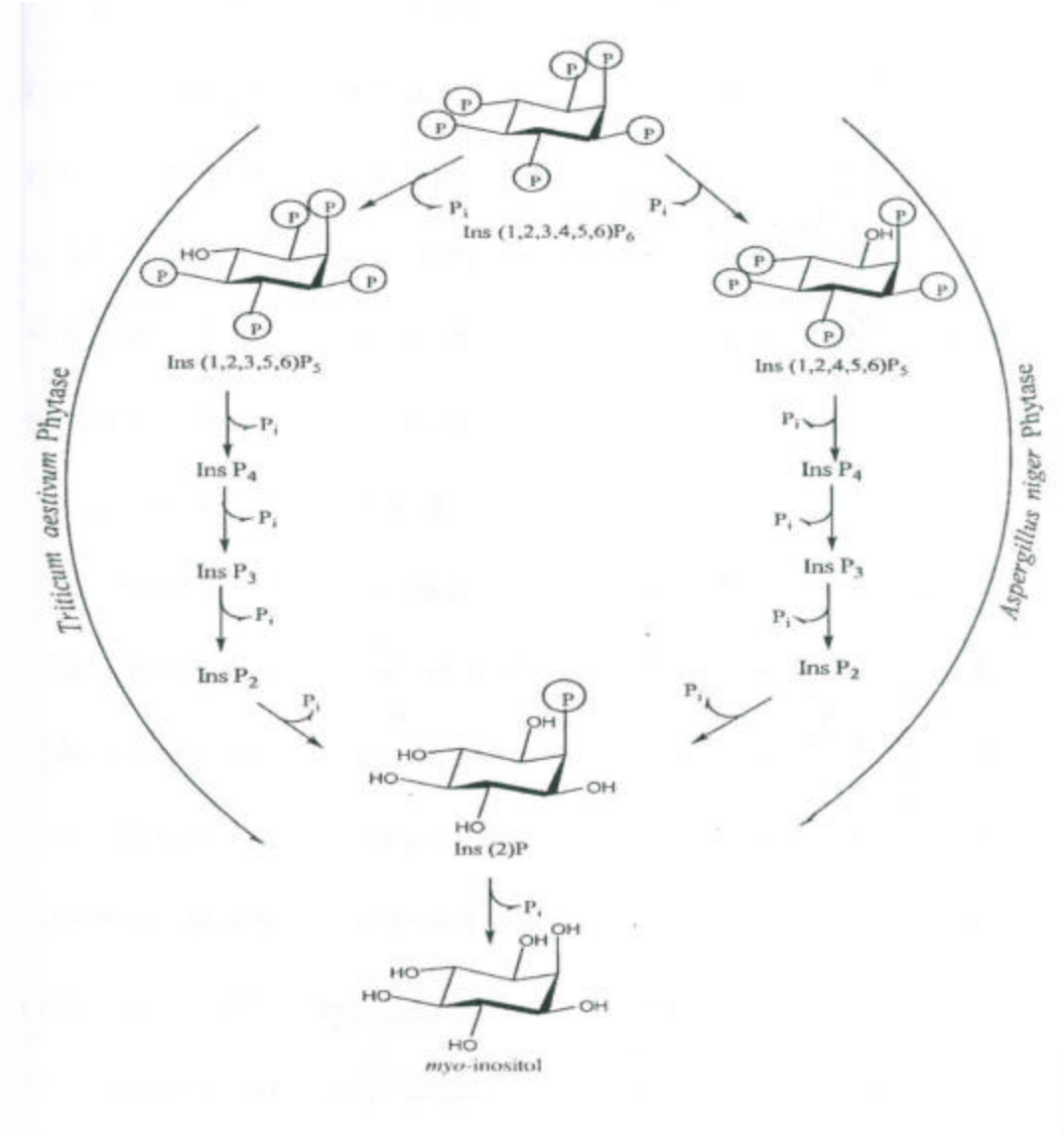
或受內源性蛋白水解酵素水解，而使其活性喪失(Schlemmer et al., 2001)。因此，熱穩定性高，同時於不同pH值仍維持活性及抵抗消化道蛋白水解酵素，為生產植酸酶必須考慮之因子。

(四) 植酸酶之應用

1. 配合禽畜飼料之添加物

由於單胃動物缺乏內源性植酸酶，所以植酸磷利用率很低；植酸酶添加劑加入飼料後，在畜禽消化道內被激活並水解植酸或是植酸鹽，釋放出磷，減少了無機磷之添加量，提高了磷之利用率(Simons et al., 1990)。研究表明添加植酸酶可提高豬仔對磷吸收、增加腳掌切力和骨灰分。在生長豬和肥育豬低磷飼料中添加植酸酶可增加骨骼強度和重量(Cromwell et al., 1995)，改善經濟效益。在蛋雞(查等, 1998)、種雞(張等, 1997)、肉雞(胥等, 1998; 樓等, 1998; Yi et al., 1996)、豬(徐等, 1998; 熊等, 2000; Lei et al., 1998)飼料中添加適量之植酸酶可替代部分甚至全部無機磷。張若寒學者在產蛋高峰期飼料中添加 400-500FTU/kg 植酸酶可替代 70%無機磷且效果最佳(張, 2000)。

豬雞消化道缺乏植酸酶，使得植酸磷之消化率很低，因此大部分的磷都隨糞便排出體外(王等, 1998)，導致環境污染；添加植酸酶將有利於減少其糞尿中的無機磷之排出(張等, 1997)。Cromwell 等研究指出，玉米、豆粕為主的豬飼料中添加



圖四、植物及黴菌所產之植酸？降解植酸途徑

Figure 4. Predominant pathways for the hydrolysis of phytate by plant and fungal phytases.

加植酸? , 豬糞中磷之排泄量減少了 34~54%(Cromwell , 1991) , 因此添加植酸? 可降低額外無機磷之需求, 又可降低糞尿中磷之排出量, 進而減少污染發生。

植酸通過與蛋白質和礦物質形成植酸鹽和蛋白質錯合物而干擾這些營養物質吸收, 植酸? 可以水解植酸消除其抗營養特性, 提高單胃動物對澱粉、蛋白質和礦物質吸收率且植酸? 之作用與飼料中胺基酸充足與否和蛋白質來源有關; 植酸? 可以通過提高蛋白質之消化率及提高胺基酸被吸收之利用率而增加豆粕之蛋白質利用率(王等,1998), 張若寒學者等人指出添加植酸? 不僅增加了磷的代謝和利用, 而且使其他礦物質吸收率也提高(張,1995 ; 劉,1998)。

2. 去除豆製品及穀類製品之植酸

黃豆粉水溶液中混合 *A. niger* NRRL 3135 之植酸? , 經 24 小時作用後, 可水解 85% 植酸, 添加在玉米粉溶液中, 可水解 70% 植酸(Han and Wiferd,1988); 現代生活素質提升對於自然健康飲食越趨重視, 全穀類食品消耗逐漸增加, 不過通常加工後都還會殘留少量植酸, 若要去除麵團中植酸可用高安全性、高活性、嗜微酸性及熱穩定性之植酸? (Nayini and Markakis,1983)。

(五) 基因工程改良植酸?

Verdoes 等人於 1995 年提出利用基因工程改良菌株, 應考量之問題: 基因套數與酵素產量關係; 轉形株中基因表現控制; 轉形株之酵素穩定性、活性及基質

專一性；醱化程度與活性關係；酵素生產之誘導及基因表現時間；轉殖寄主之安全性考量等問題(Verdoes et al., 1995)。目前飼料工業上主要藉基因工程，並利用微生物或植物作為生物反應器，生產外源性植酸[?]；其中以真菌為主要菌株(表六)；*A. fumigatus* 能產生熱穩定型植酸[?]，在 100 °C 下加熱 20 分鐘以上，僅減少 10%之活性，90 °C 下加熱 120 分鐘還具有 70%活性。利用 PCR 方法大量複製，構築於一個具有 *A. niger* 之 glucoamylase promoter、*A. nidulans* 之 tryptophan C terminator 及來自 *Neurospora crassa* 之篩選標誌 orotidine-5' - phosphate decarboxylase 基因之表現載體中，轉殖於 *A. niger* 中，其產生之重組酵素仍保有原酵素之熱穩定特性，廣泛之 pH 值下(pH2.5-8)仍具有高活性(Pasamontes et al., 1997)。

商業方面，已利用 Fungi 來生產植酸[?] 有 *A. niger* 及 *A. ficuum* 兩株，其活性大約 100U/mg protein，熱穩定，但是為酸性酵素 pH 值在 2.5 與 5，大於 pH 5.5 以上便失去活性，不適合做為食品添加物(Howson and Davis, 1983)，但是植酸[?] 之廣大需求，因此相關產品之開發深具潛力。

利用植物種子作為轉殖株，其安全性較高、運輸方便、熱穩定性高及保存期限長等優點，所以科學家利用穀類及豆類作為植酸[?] 基因轉形宿主開發量產酵素。中研院由余等學者，於 2003 年分別將 *Escherichia coli* 植酸[?] 基因 appA 及動物瘤胃中分離出之微生物 *Selenomas ruminantium* 之植酸[?] 基因 SrPf6 轉殖至水稻(*Oryza-sativa L. cv. Tainung 67*)基因中，以 α -amylase 基因(Amy8)為 promoter，轉殖後其植酸[?] SrPf6 與 appA 其最適 pH 分別為 3.0-5.5 與 2.0-6.0，

而活性為 2500 與 6000 U/kg rice。近年來，轉殖基因稻米再以 *E. coli* 植酸? 基因

表六.生產植酸? 之微生物菌種

Table 6. Micro-organisms for the production of microbial phytase

Micro-organism	Expressed in
Bacteria	
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>B. subtilis</i>
<i>Enterobacter</i> sp.	-
Yeasts	
<i>Arwula adenivorans</i>	-
<i>Hansenula polymorpha</i>	-
Fungi	
<i>A. carbonarius</i>	-
<i>A. niger</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>A. niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Peniophora lycii</i>
<i>A. oryzae</i>	
<i>A. fumigatus</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>A. ficuum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>A. ficuum</i>	<i>A. niger</i>

(Pandey *et al.*, 2001.)

appA 與另一修飾之 α -amylase 基因作為 promoter 表現, 發現活性可達 50,000 U/kg rice, 轉植酸? 水稻的植酸? 具熱穩定性, 儲存方便, 耐酸鹼環境。經動物實驗及安全性評估後可望作為良好之植酸? 來源(Hong et al., 2003)。

肆、材料方法與步驟

一、實驗材料

(一) 轉殖植酸[?]基因米粉

由中央研究院成功將 E.coli. phytase 基因(appA)轉殖到稻米上，並由國際基因公司承接專利，其植酸[?]具有高活性(30000~40000U/kg 米粉)。原料是將稻米去殼後，以液態氮冷凍乾燥後研磨成粉末，保存於 4℃ 下。

(二) 米漿粉原料

生的蓬萊米粉：購自和美食品原料，嘉義縣中埔鄉。

炒過花生粉：同上。

(三) 市售的稻米

1. 中興糙米、蓬萊胚芽米、台糖有機糙米、有機白米、山水牌糙米、山水越光米、三好牌糙米、胚芽精米及白米—購自於台糖量販店(台中港路分店)
2. 金墩牌養生纖維胚芽米、白米—購自於愛買量販店(台中港路分店)

(四) 樣品製備

1. 米漿粉：將生的蓬萊米粉及市售花生粉，以 2 : 1 的比例混合配製而成。
2. 米粉：將市售稻米用高速磨粉機磨製而成(40mesh)

(五) L(+)- ascorbic acid 及 Sodium hydroxide 購自 Riedel- de Haen , GR 級

(Germany)

(六) 粗蛋白所用的硫酸，鹽酸購自台灣聯工，試藥級

(七) 正己烷，購自 Sigma , GR 級(Germany)

(八) 石墨原子吸收光譜儀用藥：

1. Atomic absorption 級 nitric acid 及 sulfuric acid 購自於 Ferak Berlin

GmbH (Germany)

2. KH_2PO_4 , 及各礦物質的標準品 Ca、Fe 及 Mg standard solution (皆是

1000ppm , 溶於 5% HNO_3) 購自 J. T. Baker(USA)

3. Zn standard solution(1000ppm , 溶於 5% HNO_3) 購自 Merck , GR 級

4. P standard solution(1000ppm , 溶於 5% HNO_3) 購自林純製藥，試藥一

級(Japan)

(九) 動物飼料配方 Casein , corn starch , sucrose , cellulose , mineral mix

(AIN -93G) , vitamin mix(AIN -93-VX) 及 methionine 購自 ICN(USA)

四、實驗方法

(一) 水稻植酸? 之粗酵素液萃取(Vasilios et al., 2003)

材料：

Na -acetate buffer - 先取一定量的 1M 醋酸鈉溶液，利用 1M 的醋酸溶

液調整 pH 值至 5.0，此為 10 倍儲存液，使用時稀
釋 10 倍。

1 M 醋酸鈉溶液：秤取醋酸鈉 82 克溶於 900ml 去離子水中定量至 1L。

1 M 醋酸溶液：取 30ml 醋酸加入 470ml 去離子水中，體積為 500ml。

方法：在 4℃ 下以 4 倍體積 0.1M pH 5.0 之 Acetate buffer，萃取轉基因米粉
之植酸？ 2 小時。其他樣品的植酸？ 粗萃取液作法相同，比較和一
般的市售稻米差異和測定不同時間米發芽的植酸？ 活性變化。

(二) 植酸酵素活性分析(Shimizu, 1992)

材料：

1. A 液：3% Ammonium molybdate(w/v%)溶於 5% H₂SO₄(避光，4℃ 下
可儲存兩週)

B 液：5.4% Ferrous sulfate 溶液(w/v%)(避光，4℃ 下可儲存兩週)

呈色劑 - A 液和 B 液以 4：1 的比例均勻混合即為呈色劑，需要新
鮮配製。

2 基質溶液 - 1.5mM sodium phytate 溶於 0.1M Na- acetate buffer(新鮮
配製)。

3. 5% TCA 溶液 - 5% Trichloroacetic acid(w/v%)

4. 標準曲線溶液 - 1.0-7.0 mM KM₂PO₄ 溶液。

原理：

植酸酵素與基質於 pH5, 37 °C 下進行反應。之後利用 ammonium molybdate 與磷形成 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3 \cdot 6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，再以 Ferrous sulfate 還原成藍色，在波長 700nm 處測其吸光值。

方法：將 1.5ml 的酵素粗萃取液離心 (4 °C, 13000rpm)，取上清液

進行適當稀釋，並先將基質溶液在 37 °C 下預熱 5 分鐘，之後

取 75 μl 稀釋過的酵素粗萃取液加入 300 μl 預熱過的基質溶液

，放入水浴槽，在 37 °C 下反應 15 分鐘，反應完成加入 5%TCA

溶液中止反應，最後加入 375 μl 之呈色劑，在波長 700nm 處

測吸光值。

酵素活性單位定義(1U)：在 37 °C, pH5.0 環境下，植酸? 水解植酸每

分鐘可產生 1 μmole 無機磷產物定義為一個酵素

活性單位(one unit)。

活性單位計算方法：

1. 將空白組歸零，做出標準曲線，把樣品代入標準曲線計算出無機磷

產物的莫耳濃度(mM)。

2. 每公斤樣品產生植酸? 活性(U/kg)計算公式：

產物莫耳濃度(mM)/反應時間(15min) \times 稀釋倍數 = 活性單位(U)

活性單位(U) \times 萃取體積(mL)/樣品萃取克數 \times 1000 = 每公斤活性單位

(三) 植酸含量測定(Wheeler, et al., 1971)

材料：

1. 3% Trichloroacetic acid
2. FeCl_3 溶液 - 每毫升 3%TCA 中含有 2 毫克的 ferric chloride
3. 1.5N NaOH
4. 3.2N HNO_3
5. 1.5M Potassium thiocyanate
6. 標準曲線溶液 - 0.4~2.0 mM $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$

原理：植酸與鐵離子形成不溶性錯合物，分離後以強鹼溶出鐵，以利用呈色法測鐵含量，利用 Fe : P 之 molar ratio 為 4 : 6 算出植酸含量。

方法：取適量樣品(5-30 mg 植酸含量)置於 125ml 三角錐形瓶中，加入 25 ml，3%TCA 溶液，室溫下振盪萃取 30 分鐘，離心後，取上清液 5ml，放入 15ml 的耐熱離心管，加入 2ml FeCl_3 溶液，放入沸水浴加熱 45 分鐘，使 Fe^{3+} 複合物完全沉澱，放冷後，離心 (4000rpm，15min) 去除上清液，用 10-15ml 3% TCA 洗滌沉澱，放入沸水浴 5-10 分鐘，重複洗滌和沸水浴 5-10 分鐘兩次後，最後用去離子水洗滌沉澱同上步驟加熱離心。沉澱分散於少量去離子水，加入 1.5ml NaOH 溶液和去離子水至 15ml，放入

沸水中加熱 30 分鐘以沉澱 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ，用濾紙過濾，把濾紙(含沉澱物)放物 20ml 硝酸溶液中，加熱至紅色的沉澱物消失，除去濾紙，以去離子水定量至 50ml。取 250 μl 澄清液加入 3.75ml 去離子水和 1ml KSCN 定量至 5ml 後，在波長 480nm 測其吸光值

(四) 發芽糙米製作(郭，2005)

方法：將有機糙米用水清洗，浸泡於燒杯中約 3 小時，再以 42 溫水洗滌後將溫水倒乾，放置於暗處，再覆蓋經溫水浸潤擰乾之紗布或毛巾置於燒杯內，在不同時間取樣測量植酸? 之變化。

(五) 化學成分分析：

1. 水分測定：將磨碎待測樣品放入已乾燥至恆溫之稱量瓶中，置入烘箱中，於 135 放置 3 小時後，放冷 30 分鐘，第一次稱量，再將稱量瓶移入烘箱中，乾燥 1-2 小時，放冷後，第二次稱量，直至恆量為止。(CNS5033，N6114)

計算方式：

$$\text{水份(\%)} = (b-c) / (b-a) * 100$$

a：稱量瓶重(g)

b：稱量瓶+樣品重(g)

c : 稱量瓶+樣品乾燥至恆量之重量(g)

2. 粗脂肪測定 : Soxhlet method(CNS5036 , N6117)

原理 : 利用 Soxhlet Apparatus , 藉由有機溶劑(乙醚或是正己烷)加熱
冷凝經迴流八小時 , 可達到完全萃取 , 將有機溶劑去除後 ,
可得到粗脂肪萃取物。

方法 : 精秤 2-10 克的樣品放入圓筒濾紙 , 其上輕塞適量脫脂棉以防
樣品在萃取時流失 , 先將樣品於 100~105 烘箱乾燥 2 小時 ,
取出冷卻後 , 放入索氏萃取管中 , 加入約 1/2~2/3 燒瓶容量之
有機溶劑(乙醚或是正己烷) , 置於加熱器上加熱至 60~70 ,
迴流萃取至少 8 小時後 , 取出圓筒濾紙 , 將燒瓶置於 80 水
浴中使有機溶劑蒸發至乾 , 再把燒瓶放於烘箱 100 中乾燥 1
小時 , 移入乾燥皿中冷卻 , 稱重至恆量。

計算方式 :

$$\text{粗脂肪}(\%) = \frac{W_0 - W}{S} \times 100$$

W : 放有沸石燒瓶重量(g)

W0 : 萃取乾燥後粗脂肪與有沸石燒瓶重量(g)

S : 樣品重量(g)

3. 粗蛋白質測定 : Kjeldahl method(AOCS,1989)

原理 : 利用 H₂SO₄ 分解有機物質形成(NH₄)₂SO₄ , 與 NaOH 蒸餾出

NH₃，以 H₃BO₃ 接收 NH₃，最後用 HCl 滴定出 NH₄ 的量，

含氮係數 6.25 計算出蛋白質含量。

方法：稱取適量樣品放入分解管，加入 10ml H₂SO₄ 與沸石(防突沸)，

在抽氣櫥裡用分解爐進行高溫分解(400℃，2 小時)，冷卻後

加一定量去離子水稀釋，放入半自動凱式氮蒸餾裝置中，用

4% H₃BO₃ 接受 NH₃，滴入酚酞指示劑，再用 0.1N HCl 滴定。

計算方式：

$$\text{蛋白質含量(\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 14}{\text{Sample(g)} \times 1000} \times F \times 100$$

V₁：滴定待測樣品消耗鹽酸標準溶液體積

V₂：空白組消耗鹽酸標準溶液體積

C：鹽酸標準溶液濃度

14：氮原子量

F：含氮係數

4. 灰分測定：樣品稱重 2-5 克放入坩鍋，用高溫灰化爐於 500℃ 下灰化

樣品，灰化 3-5 小時，確定灰化完全，取出坩鍋至乾燥

皿中冷卻，之後稱出坩鍋增加重量，即為灰分重。

5. 粗碳水化合物測定：將總重扣除上述 4 種測定(水分、粗蛋白質、粗

脂肪及灰分)，即為粗碳水化合物重量。

(六) 動物實驗

1. 實驗動物：3 週大剛斷奶之 Wistar 公鼠，購自臺大醫學院動物實驗中心，台北市。
2. 環境條件：飼養在溫度 22 - 24 ，12 小時日夜週期通風良好之動物房中，個別分籠飼養 28 天，用壓克力籠，其底部放置不銹鋼墊盤(圖五)，上層網架跟壓克力籠底部一樣大，間距長 7.5 公分，寬 1.2 公分，可讓糞便順利掉到下層，下層跟上層網架間格 2 公分，使大鼠不易吃到糞便，下層間距長寬各 0.3 公分，利於實驗中收集完整之糞便。
3. 飼料：餵食含米漿粉之飼料混合物(表七)。分為四組，第一組為控制組，其餘三組為實驗組；實驗中第二、第三及第四組分別加入 1 倍、2 倍及 3 倍可將飼料中之植酸於 30 分鐘內完全水解之轉基因米粉。
4. 動物飼養：將動物先於飼養環境下適應一星期後開始進行實驗，一共 28 天，隨機分組(一組控制組，三組實驗組)，每組 6 隻。餵食實驗飼料之前，在第 0 天測量第一次體重後，開始紀錄每日攝食量以及收集糞便，將收集之糞便，按編號密封包裝儲存於 0 以下之環境防止

圖五 A、動物實驗大鼠飼養籠

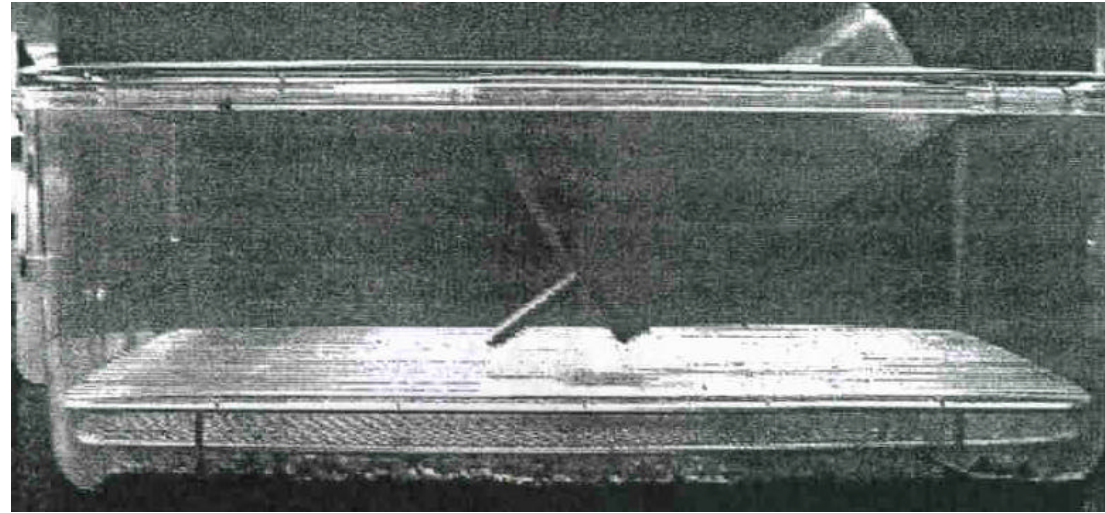


圖 5B、糞尿分離不銹鋼墊盤(約 44*23 cm , 上層間距 7.5*1.2 cm)

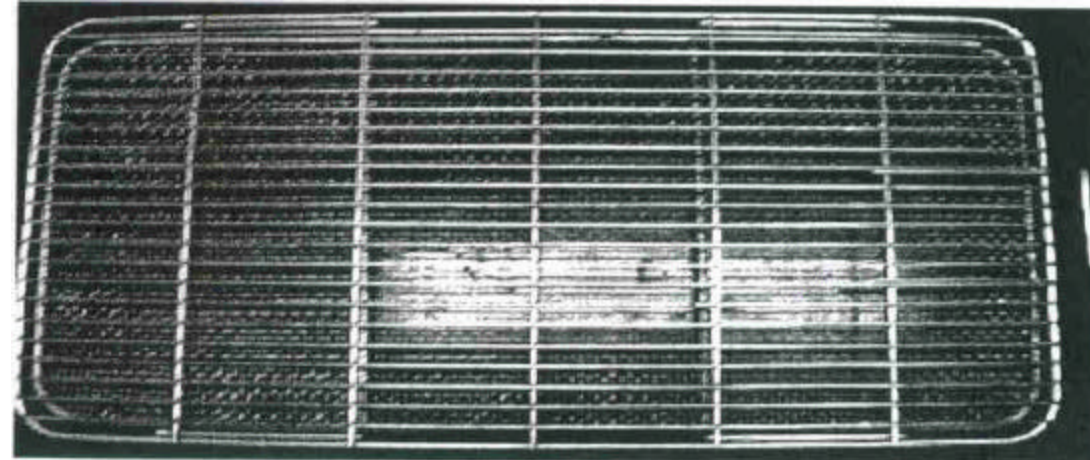


圖 5C、墊盤細部圖(上下間距 2 cm , 下層間距 0.3*0.3cm)

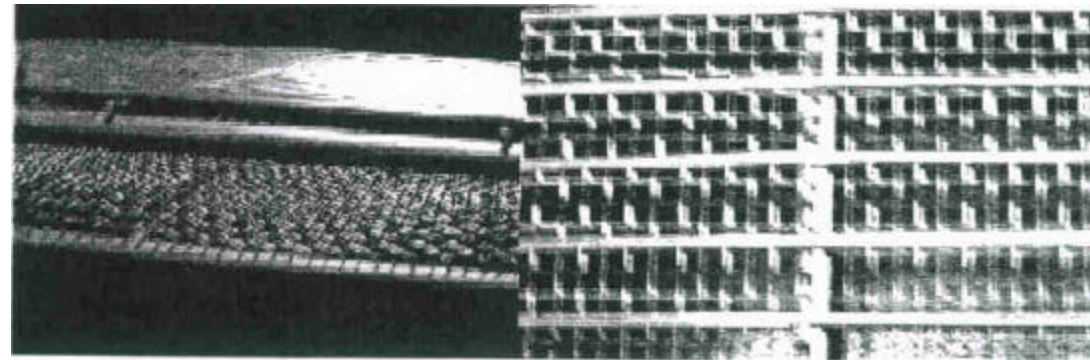


Figure 5A.The cage for raising Wistar rats.

B.Stainless steel plate to separate feces and urine

C. Close up of steel plate

表七、米漿粉成分表

Table 7、Composition of rice milk powder diets in growing rats

Ingredient	Control	Treatment		
	Diet	Diet	Diet	Diet
transgene rice powder	-	23	45	68
Rice powder	85	63	40	17
Peanut powder	171	171	171	171
casein	150	150	150	150
cornstarch	341	341	341	341
Sucrose	100	100	100	100
Cellulose	30	30	30	30
Mineral Premix ¹	100	100	100	100
Vitamin Premix ²	20	20	20	20
Methionine	3	3	3	3

單位：g / kg

1.Mineral mix : Calcium carbonate35.7%,monopotassium phosphate19.6%,potassium citrate monohydrate 7.078%, sodium chloride 7.4%, potassium sulfate 4.66%, magnesium oxide 2.4%, ferric citrate 0.606% ,zinc carbonate 0.165%,manganese carbonate 0.063%,copper carbonate 0.03%, potassium iodate 0.001% sodium selenate,anhydrous 0.001%, ammonium molybdate 0.000795%, sodium metasilicat.9H₂O 0.145%, chromium potassium sulfate .12H₂O 0.0275%, lithium chloride 0.00174% , boric acid 0.008%, sodium fluoride 0.006%, nickel carbonate 0.003%, ammonium vanadate 0.0006%, powdered sugar 22.1%.

2.Vitamin min(gm/kg):Nico acid 3.00,D-calcium pantothenate 1.60,pyridoxine HCL 0.70, thiamin HCL 0.60 , folic acid 0.2 , D-biotin 0.02 ,vitamin B₁₂2.50 , Alpha tocopherol powder (250U/gm) 30.00 , vitamin A Polmitate(250000U/gm)1.6 ,vitamin D₃(400000U/gm)0.25,phyllloquinone 0.075, powered sucrose 959.655

微生物生長或樣品變質，每週測量記錄動物體重，每

2 天將墊料更換以維持飼養環境之清潔。

5.生物指數(Biological Index)：

$$(1) \text{吸收量(absorption)} = \text{Intake} - \text{Feces}$$

$$(2) \text{吸收率(\% of intake)} = \frac{\text{Absorption}}{\text{Intake}} \times 100\%$$

$$(3) \text{飼料轉換率(Feed efficiency)} = \frac{\text{Weight increase}}{\text{Intake}}$$

$$(4) \text{糞便殘留率(Retention, \%)} = \frac{\text{Feces}}{\text{Intake}} \times 100\%$$

Feces：糞便量，Intake：攝食量

(七)礦物質分析：

1. 樣品處理：將收集之糞便置於烘箱中 105 烘乾至恆重後，用刀口瓶磨粉。

2. 濕式灰化：秤取飼料以及磨好的糞便粉末 0.2 克於樣品瓶中，加入 0.6 ml H_2SO_4 及 1ml HNO_3 ，置於 Hot plate 上加熱至無暗橘色煙霧產生，溶液呈現澄清狀即為灰化完成，用去離子水定量至 10ml。

3. 石墨原子吸收光譜：

標準曲線溶液： $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ - 1- 6 ppm

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - 1- 5 ppm

$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ - 0.05-0.3 ppm

$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ - 1-5 ppm

原理：原子化是利用石墨爐，經過乾燥 灰化 原子化加熱過程，使用中空陰極管輻射通過原子化樣品，基態原子吸光而成激發態，殘留之光在經過分光器分取選擇之光，並由光電倍增管裝置加以測量。

方法：將經過濕式灰化完定量的樣品液為原液，取 1ml，離心取上清液，依照各金屬所測得標準曲線範圍濃度內，將樣品系列稀釋至各標準曲線範圍中，取適量(2-5 μl)注入石墨管，根據不同礦物質的溫度條件(表八)測定鈣、鐵、鋅及鎂，算出濃度含量。

(1) 鋅：離心後糞便上清液稀釋 20 倍，飼料上清液稀釋 2 倍，測量波長為 213.9nm。

(2) 鐵：離心後糞便上清液稀釋 5 倍，飼料上清液稀釋 2 倍，測量波長為 248.3nm。

(3) 鈣：離心後的糞便上清液稀釋 450 倍，飼料上清液稀釋 300 倍，待測溶液中加入少許 0.1% LaCl_3 以防止磷酸根的

表八、不同礦物質之石墨原子吸收光譜溫度條件

Table8. Temperature program of Ca, Fe, Zn and Mg

Tempertaure program	Ca		Fe		Zn		Mg	
		sec		sec		sec		sec
Dry	80-120	20	80-120	20	80-120	20	80-120	20
Ash	120-400	40	120-400	30	120-400	10	120-400	30
	400-600	50	400-600	20	400-600	30	400-500	10
	600-600	20	600-600	30	600-600	30	500-500	30
Atomization	2700	10	2700	10	2100	10	2000	10
Clean	2800	3	2800	3	2800	3	2400	3

Condition :

Cuvette Graphite Tube
 Carrier gas 200 ml/min N₂
 30 ml/min Ar

干擾，測量波長 422.7nm。

(4) 鎂：離心後糞便上清液稀釋 450 倍，飼料上清液稀釋 300 倍，

待測溶液中加入 0.1% LaCl_3 以防止干擾物的影響，測量

波長為 285.2nm。

4. 無機磷測定(Chen et al., 1956)

材料：

A 液：0.42% ammonium molybdate (溶於 1 N H_2SO_4)

B 液：10% ascorbic acid

呈色劑= 6A+1B 混合均勻即為呈色劑，新鮮配置，避光

標準溶液配置：1- 4 ppm P standard solution

原理：利用 ammonium molybdate 與磷形成 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_3 \cdot 6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

再以 ascorbic acid 還原成藍色，測量波長 820nm。

方法：將灰化定量的糞便原液和飼料原液離心後，取上清液，且糞

便上清液稀釋 300 倍，飼料上清液 60 倍。取 300 μl 稀釋液

，加入 700 μl 呈色劑，放入水浴槽中，於 45 °C 下反應 20 分

鐘，取出立即測量在波長 820nm 之吸光值，算出濃度。

五、統計分析：

實驗數據以平均值 \pm 標準偏(mean \pm standard deviation)差表示，並採取統計

軟體 PC-SAS 進行完全隨機設計，以變異分析比較組間差異顯著性， $p < 0.05$ 視

為具顯著差異。

伍、結果與討論

一、不同市售稻米植酸含量比較

比較不同市售稻米之植酸含量(表九)，可以作為自製米漿的參考。糙米部份，以中興糙米植酸含量較高約 1.36%，其次是台糖、山水，最低為三好糙米為 1.24%；胚芽米部分，金墩胚芽米植酸含量較高約 1.44%，其次為中興胚芽米，最低為三好胚芽米為 1.23%；白米部分，以台糖白米植酸含量較高約 0.09%，其次為三好白米，最低為山水白米約 0.05%，所以不同牌子間之比較，植酸含量差異與其工廠要求之稻米規格和其稻米來源有關；由於植酸大多存在稻米之穀殼及米糠層上，就稻米之加工程度可知道糙米、胚芽米和白米之植酸含量差異，與表中三好牌之三種米植酸含量比是糙米 > 胚芽米 > 白米之結果相符合。

二、糙米在不同發芽時間之植酸? 活性

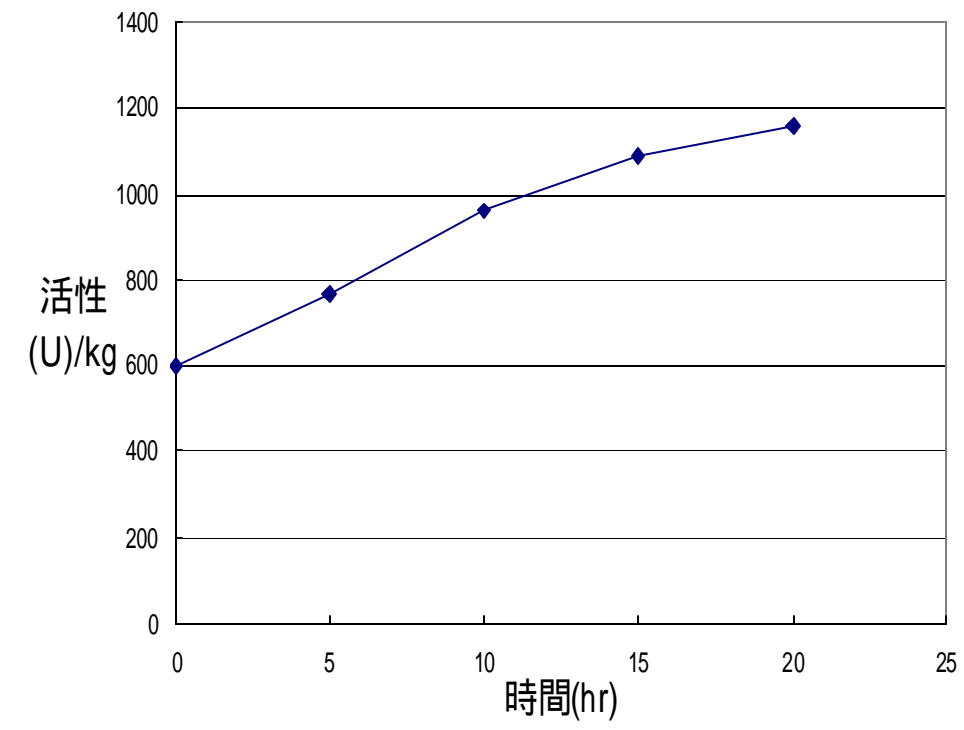
發芽糙米隨著時間植酸? 活性會增加，如穀類及豆類發芽，會活化植酸? 而分解植酸，增加無機磷的含量，使植物可以利用於生長(Long,1961;Belavady and Banerjee, 1953)，且植酸減少，種皮就比較容易被外界影響而軟化，使胚芽容易伸出，由圖之結果與理論相同。

表九、不同品牌之市售稻米植酸含量

Table 9、Phytic acid content of the different brand of rice on the market

植酸重/100g 米粉	三好	金墩	山水	台糖	中興
糙米(g/100g)	1.24 ±0.03	- - -	1.27 ±0.03	1.28 ±0.06	1.36 ±0.16
胚芽米(g/100g)	1.23 ±0.067	1.44 ±0.034	- - -	- - -	1.35 ±0.043
白米(mg/100g)	73.72 ±6.87	53.29 ±7.97	47.52 ±1.59	86.2 ±5.18	- - -

Ps.產品來自於台中的愛買及台糖量販店



圖六、糙米在不同發芽時間下植酸酶之活性

Figure 6、Phytase activity measured during different time of germination

三、米漿粉中植酸、蛋白質與油脂組成以及飼料配置

一般米漿製程是用蓬萊米煮出黏稠米水，之後加入一定比例的炒芝麻或是炒花生粉來增加風味，由於製作的過程太冗長，因此採取直接取一定比例之生米粉及花生粉來進行實驗飼料之配製。本實驗 100 克米漿粉含有植酸 250 毫克。米漿粉中提供粗蛋白含量為 14.12%，粗脂肪為 27.51%，植酸為 0.25%。

配製動物飼料之前，先確定米漿粉中植酸含量後，根據動物實驗中大鼠之營養需求訂定飼料配方(Rimbach et al.,1995)，在表十中已知米漿粉中植酸含量(0.25mg/g)及蛋白質與油脂組成，加入 85 克生米粉，以及 171 克之花生粉，添加轉基因米粉取代米漿粉中之生米粉，提供一倍、兩倍及三倍轉基因米粉含量可在 30 分鐘內分解米漿粉之植酸，且花生粉所含之粗脂肪量已達標準飼料之粗脂肪比例，因此不加入大豆油，不足蛋白質及碳水化合物以酪蛋白及玉米澱粉補足，動物飼料中蛋白質含量約 18%，此結果與 Lina 和 Hiroo(2003)及 Rimbach(1995)等人飼養成長中大鼠，其動物飼料蛋白質皆為 20%之設計相近。在確定飼料中成分後，再進行動物飼養。

四、動物生長實驗

三週大的 Wistar 大鼠，在飼養條件下適應一週後，進行實驗 28 天。在實驗前先測量起始體重，第 0 天平均重量為 116 克，餵食飼料 28 天後平均重量為 29

表十、在米粉、花生粉和米漿粉中植酸、蛋白質和油脂的含量

Table 10、 The content of phytate, protein and oil in rice powder, peanut powder and rice milk powder

	rice	peanut	Rice milk powder
	%		
phytate	0.19	0.28	0.25
protein	24.5	8.93	14.12
oil	2.05	40.24	27.51

克，飼料平均攝食量為 542 克。因為動物個體間差異大，無法從體重增加量及攝食量來判斷動物間差異，所以必須用飼料轉換率(Feed efficiency)來比較個體間差異，平均飼料轉換率為 0.33%，個體間飼料轉換率並無顯著差異(表十一)，各組老鼠對飼料之吸收力相當，在此情形下才能衡量比較礦物質吸收率是否可採信。

五、餵食米漿粉飼料對礦物質之生物可利用性

1. 鐵：每日攝取量約在 1.75-2.10 毫克，每日吸收量以第四組最好，比控制組多 0.38 毫克，在每日吸收率，隨著加入轉基因米粉越多，依序遞增，有顯著差異，第二組增加了約 10%，第三組增加約 11%，第四組增加約 15%(表十二)。
2. 鋅：每日攝取量約為 1.25-1.30 毫克，對照組(第二、三和四組)皆大於控制(第一組)，在吸收率方面，加入的轉基因米粉越多，則有上升的現象，有顯著差異，第二組增加約 5%，第三組增加約 14%，第四組增加約 16%(表十二)。
3. 鈣：四組之每日攝取量 540-590 毫克之間，每日吸收量以第四組為最好，比控制組多 62 毫克；隨著加入的轉基因米粉越多，其吸收率越高，有顯著的差異，第二組增加約 1.5%，第三組增加約 2%，第四組增加約 7%(表十三)。
4. 磷：由於老鼠個體間有差異性的存在，在四組間每日吸收量大約為 65-75 毫

表十一、植酸和植酸酶對於進食飼料量、體重和飼料轉換率的影響

Table 11、3.Effect of phytate and phytase on food intake, body weight and growth rate

Diet	feed intake (g)	Body weight(g)		Weight Increase(g)	Growth rate (gain/intake)
		day0	day28		
1	547.4 ±3.2 ^a	117.22 ±5.04 ^a	302.64 ±5.88 ^a	183.38 ±1.35 ^a	0.34 ±0.02 ^a
2	562.02 ±1.8 ^a	122.4 ±1.78 ^a	301.07 ±3.06 ^a	178.67 ±2.68 ^a	0.32 ±0.04 ^a
3	535.26 ±79.4 ^a	117.2 ±8.41 ^a	285.36 ±39.36 ^a	171.65 ±24.08 ^a	0.32 ±0.03 ^a
4	525.7 ±7.99 ^a	108.7 ±4.22 ^a	281.54 ±37.08 ^a	179.23 ±1.15 ^a	0.33 ±0.01 ^a

Each value is the mean ±standard deviation (n=6)

^{a-b} Mean in the same column with different superscripts are significantly different (P<0.05)

表十二、植酸和植酸酶對鐵和鋅吸收的影響：

Table 12、Effect of phytate and phytase on apparent absorption of iron and zinc

Mineral	Diet	fecal	Feed intake	absorption	% of intake
Fe	1*	0.99 ±0.18 ^a	1.78 ±0.26 ^a	0.78 ±0.09 ^b	44.31 ±3.05 ^c
	2	0.95 ±0.09 ^a	2.09 ±0.36 ^a	1.14 ±0.28 ^a	54.21 ±4.49 ^{bc}
	3	0.83 ±0.14 ^a	1.85 ±0.3 ^a	1.02 ±0.17 ^{ab}	55.2 ±2.22 ^b
	4	0.78 ±0.13 ^a	1.93 ±0.29 ^a	1.16 ±0.18 ^a	59.87 ±2.72 ^a
Zn	1*	0.64 ±0.1 ^a	1.27 ±0.19 ^a	0.63 ±0.1 ^a	49.55 ±2.39 ^d
	2	0.57 ±0.06 ^{ab}	1.26 ±0.19 ^a	0.69 ±0.13 ^a	54.43 ±2.79 ^c
	3	0.46 ±0.06 ^{bc}	1.29 ±0.22 ^a	0.83 ±0.17 ^{ab}	63.91 ±2.79 ^b
	4	0.44 ±0.08 ^c	1.27 ±0.19 ^a	0.83 ±0.12 ^b	65.52 ±2.37 ^a

* 1 為未加入轉基因米粉，2.3.4 是加入一倍、兩倍和三倍的轉基因米粉量

% of intake = absorption / intake

Each value is the mean ±standard deviation (n=6)

^{a-b} Mean in the same column with different superscripts are significantly different

(P<0.05)

表十三、植酸和植酸酶對鈣和磷吸收的影響：

Table 13、Effect of phytate and phytase on apparent absorption of calcium and phosphorus

Mineral	Diet	fecal	Feed intake	absorption	% of Intake
Ca	1*	130.21 ± 20.02 ^a	567.86 ± 73.94 ^a	437.65 ± 59.34 ^a	77.04 ± 2.24 ^c
	2	125.81 ± 19.85 ^a	590.87 ± 86.01 ^a	465.06 ± 70.89 ^a	78.67 ± 1.94 ^{bc}
	3	112.67 ± 19.36 ^{ab}	542.6 ± 82.03 ^a	429.93 ± 69.24 ^a	79.06 ± 2.47 ^b
	4	92.06 ± 13.63 ^b	590.35 ± 87.58 ^a	498.3 ± 76.94 ^a	84.35 ± 1.38 ^a
P	1*	59.53 ± 9.56 ^a	66.33 ± 9.86 ^b	6.81 ± 2.31 ^b	10.32 ± 3.17 ^c
	2	60.57 ± 10.8 ^a	72.74 ± 13.05 ^a	12.17 ± 3.66 ^a	16.71 ± 3.45 ^{bc}
	3	54.84 ± 6.25 ^b	68.16 ± 10.42 ^{ab}	13.32 ± 4.17 ^a	19.21 ± 3.29 ^{ab}
	4	55.99 ± 12.13 ^b	70.97 ± 12.42 ^a	14.98 ± 2.58 ^a	21.51 ± 4.79 ^a

* 1 為未加入轉基因米粉，2,3,4 是加入一倍、兩倍和三倍的轉基因米粉量

% of intake = absorption / intake

Each value is the mean ± standard deviation (n=6)

^{a-b} Mean in the same column with different superscripts are significantly different

(P<0.05)

表十四、植酸和植酸酶對鎂吸收的影響

Table 14、Effect of phytate and phytase on apparent absorption of magnesium

Mg	fecal	Feed intake	absorption	% of intake
	mg/day			
1*	8.09 ± 1.13 ^a	12.34 ± 1.64 ^a	4.25 ± 0.63 ^b	34.44 ± 2.17 ^d
2*	7.55 ± 0.99 ^a	13.77 ± 1.62 ^a	6.22 ± 0.94 ^a	45.16 ± 3.58 ^c
3*	5.72 ± 0.54 ^b	12.49 ± 1.85 ^a	6.77 ± 1.42 ^a	53.8 ± 4.31 ^b
4*	5.71 ± 1.33 ^b	12.91 ± 1.91 ^a	7.19 ± 1.05 ^a	55.95 ± 5.83 ^a

* 1 為未加入轉基因米粉，2,3,4 是加入一倍、兩倍和三倍的轉基因米粉量

feed efficiency = absorption / intake

Each value is the mean ± standard deviation (n=6)

^{a-b} Mean in the same column with different superscripts are significantly different

(P<0.05)

克，發現每日吸收量是以第四組(加入三倍轉基因米粉)效果最好，約為 15 毫克；第二組(加入一倍轉基因米粉)、第三組(加入二倍轉基因米粉和第四組皆大於控制組(未加入轉基因米粉)，在吸收率方面，依序遞增 $1 < 2 < 3 < 4$ (表十三)，第二組增加約 6%，第三組增加約 9%，第四組增加約 11%。

5. 鎂：每日攝取量為 12-14 毫克，四組之間沒有顯著差異，每日吸收量，第二、第三和第四組沒有顯著差異，皆大於控制組，以第四組吸收量最高，隨著加入轉基因米粉量增加而有上升的趨勢(表十四)，在攝時吸收率，則是 $1 < 2 < 3 < 4$ ，第二組增加約 11%，第三組增加約 19%，第四組增加約 21%，有顯著差異。

討論：

在不同礦物質之間無法用每日吸收量來做比較，所以用吸收率來當做比較之依據。在所有測量之礦物質中，以鈣(84%)最好，其次鋅(65%)及鐵(59%)，其他礦物質也都有隨著轉基因米粉添加量增加而吸收率有顯著增加；動物實驗方面，張等人指出飼料添加植酸? 不僅增強磷之利用，而且使其他礦物質之吸收率提高(張,1995; 劉,1998)，在人體實驗方面，Sandberg 等人將麥麩經 *A.niger* 所產之植酸? 處理後進行人體實驗，發現可以提高 11.8%鐵之吸收率(Sanberget al.,1996)，還有 Weaver 等人曾以 24 位婦女進行人體實驗，攝食以 phytase 處理之 Pionto bean，結果可以提高 8.7%鈣之吸收率(Weaver C. M. et al., 1974)。由此可知，經過植酸?

處理後，皆可有效提高礦物質之吸收率與本實驗相符合。

此實驗中添加轉基因米粉與沒有添加轉基因米粉之組別，在生長情況方面並無顯著差別，表示添加轉基因米粉不會影響其正常生長情況，但是在礦物質吸收方面，添加轉基因米粉之組別，皆有顯著改善；由此發現，將 *E. coli* 之植酸酶基因 *appA* 轉至水稻中，可耐胃之酸性環境，也對腸胃道之環境有耐受性。有文獻指出，*E. coli* 所產生之植酸酶之優點，除具有較高之比活性(3165U/ mg protein)外，在動物腸胃中對其活性影響較小，且耐酸程度至 pH2.0 仍具活性(Igbasan et al., 2000)。Rodriguez 等人比較不同蛋白質對 *E. coli*、*A. fumigatus* 及 *A. niger* 之影響，發現 *E. coli* 植酸酶活性不會受胃蛋白酶 (pepsin) 影響，但會被胰蛋白酶 (trypsin) 破壞而失去活性(Rodriguez et al., 1999 ; Rodriguez et al., 2000)。不過由本實驗結果發現，*E. coli* 植酸酶基因(*appA*)經轉殖入水稻後仍保持原有特性，可在消化過程中水解植酸，進而增加礦物質之生物利用率。

陸、結論

一般去除植酸方法有加熱(蒸煮)、浸泡、酸處理或是高壓下去除部分植酸，但效果有限。穀類大都含有較高含量之植酸，在市面上面所販售不同種類之稻米，由於加工方式不同，所含之植酸含量也不同，糙米含量最高，是因其含有大部分之種皮及米糠，而白米因加工後只剩下胚乳，所以植酸含量最低；在營養成分是糙米最高，但是因其植酸含量高，讓糙米發芽可產生植酸？減少部分植酸，增加礦物質之吸收率；長期食用高植酸之食品，會引響蛋白質、礦物質及其他營養素之吸收。本實驗使用中央研究院開發之轉植酸？基因水稻，將其應用於食品米漿粉中，餵食成長中大鼠進行動物實驗。

轉 E.coli 之植酸？基因 appA 至水稻中，稻米本身就具有長期儲存之特性，所以轉基因稻米於好的保存環境下，其酵素活性能長期穩定維持在高活性(30,000- 40,000U/kg 米粉)。添加轉基因稻米於米漿粉飼料中，皆可有效增加動物對礦物質之生物可利用率，此結果表示轉基因稻米對於腸胃消化道之環境具有耐受性，可有效將植酸水解。

直接添加 3 倍可於 30 分鐘內完全水解飼料中植酸之轉基因米粉對礦物質吸收效果較好，其次為添加 2 倍之轉基因米粉，而添加 1 倍之轉基因米粉即對植酸具有水解之能力，能夠增加礦物質之生物可利用性，表示添加轉基因米粉量提高，其效果亦隨之增加。

植酸? 在飼料上之應用非常普及, 而且也有相關之產品, 但是於食品方面應用很少, 希望轉基因稻米經田間試驗及安全評估後, 可以應用於植酸含量較高之穀類及豆類等食品中, 藉此改善食品營養品質, 增加蛋白質和澱粉之消化吸收以及礦物質之生物可利用率。

柒、參考文獻

中國國家標準(CNS) , 1984。食品中水份之檢驗方法。經濟部中央標準局
印。總號 5033 , 類號 N6114

中國國家標準(CNS) , 1984。食品中粗灰份之檢驗方法。經濟部中央標準
局印。總號 5034 , 類號 N6115

中國國家標準(CNS) , 1984。食品中粗脂肪之檢驗方法。經濟部中央標準
局印。總號 5036 , 類號 N6117

天津輕工業學院,無錫輕工業學院合? . 食品生物化學.輕工業出版社,1985 ,346

王紅寧,黃勇,陳惠等。甲酸和植酸? 在豬飼料中的應用。國外畜牧學飼料,
1998 (5):11

何照范, 1985. 糧食籽粒品質及分析技術. 農業出版社, ,11

周世英,鍾麗玉. 糧食學與糧食化學. 中國商業出版社, 1986 ,592 – 596

周瑞寶, 2003.花生加工技術.北京:化學工業出版社,13 :227-265

查常林,劉進,1998 .不同水平植酸? 在產蛋雞飼料中應用效果的分析.飼料工業,
(1):28-29

胥傳來,趙玉蓮,1998 .植酸? 在肉雞飼料中的應用研究.糧食與飼料工業, (5) : 23-25

徐建雄,崔立,俞沛初,等, 1998.玉米-豆粕型日糧添加植酸? 對生長豬生產性能與
糞中磷含量的影響.飼料研究,(7):28-29

張若寒,1995.植酸? 對商品豬磷代謝、生長性能及周圍環境的影響.國外畜
牧學-豬與禽,75(8):979-990

張若寒,張萱, 1997 .植酸? 對種雞生產性能及種蛋孵化性能影響的研究.中國畜牧
雜誌, (5):5-9

許建軍, 江波, 許時嬰. - 氨基丁酸(GABA) 一种新型的功能食品因子. 食品
工業科技, 2003

郭同慶, 高雄區農業改良場農藝作物研究室, 2005.。生鮮發芽米 DIY。

行政院農業委員會高雄區農業改良場新聞稿 第 94010 號

萬舒波, 2003.中國花生栽培學。上海:化學工業出版社,; 1-7

熊國平,王淑雲,王小顏等, 2000.植酸? 替代無機磷飼餵肉豬試驗報告.江西畜牧獸

醫雜誌,(3):8-9

劉志皋. 食品營養學. 輕工業出版社,1991 ,298

劉曉輝,1998.植酸對蛋白質和礦物質利用率的影響.中國飼料,(15):12

樓洪興,吳建良,許松等, 1998. 植酸? 替代日糧中磷酸氫鈣對肉雞飼養效應的研

究.糧食與飼料工業,(8):34-35

? 永紅, 許實波, 1996 .白藜蘆醇藥理作用研究進展.國外醫藥植物分冊,11: 155-157

Anno, T., Nakanishi, K., Matsuno, R., and kamikubo, T. 1985. Enzymatic elimination of

phytate in soybean milk. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi 32:174-180

AOCS, 1989. Official method and recommended practices of the American oil chemists' society (4th ed.) Champaign, IL:AOCS

Barber S. , 1972. Milled rice and changes during aging. In " Rice :chemistry and technology " Houston D F , ed. ,ST, Paul ,MN:AACC ,215 – 263

Belavady, B., and Banerjee, S. 1953. Studies on the effect of germination on the phosphorus values of some common Indian pulses. Food Res. 18, 223.

Carnovale, E., Lugaro, E. and Lombardi-Boccia, G. 1988. Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. Cereal Chem. 65:114-117

Chen, P.S., Toribara, Jr. T.Y., and Warner, H. 1956. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Anal. Chem. 28:1756.

Cromwell GI., Coffey RD., Monegue HJ., et al., 1995,. Efficacy of low-activity , microbialphytase in improving the bioavailability of phosphorus in corn - soybean meal diets for pigs 【J】 .Journal of animal science . 73(2):449-456

Cromwell, G. L. 1991. Phytase appears to reduce phosphorus in feed, manure. Feedstuffs.

63:14-16

Davies, N. T. and Warrington, S., 1986. The phytic acid, mineral, trace element, protein,

and moisture content of UK Asian immigrant food . Human Nutr. Appl. Nutr. 40A:

49-59. Eskin, N. A. M., and S. Wiebe. 1983. Changes in phytase activity and phytate

during germination of two fababean cultivars. J. Food Sci. 48: 270-271

Ferguson, E. L., Gibson, R. S., Thompson, L. U., Ounpuu, S., and Berry, M. 1988. Phytate,

zinc, and calcium contents of 30 East African foods and their calculated phytate: Zn,

Ca: phytate, and $[Ca] [phytate] / [Zn]$ molar ratio. J. Food Comp. Anal. 1:316-325

Graf, E. 1983. Application of phytic acid. J. Am. Oil Chem. Soc. 60: 1861-1867

Graf, E. and K. L. Empson. 1987. Phytic acid a natural antioxidant. J. Biol. Chem. 262:

11647-11450

Han, Y. W., and Wilfred, A. G. 1988. Phytate hydrolysis in soybean and cottonseed meals

Aspergillus ficuum phytase. J. Agric. Food Chem. 36:259-262

Hanland, B. F., and Oberleas, D. 1986. Anion-exchange method for determination of phytate on foods: Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69 : 667-670

Harland, B.F., and Prosky, L.1979.Development of dietary fiber values for foods. Cereal Foods World, 24:390-394

Hayakawa S ,Suzuki H ,and Suzuki T. , 1987. Radial distribution of amino acids in the milled rice kernel. J . Agric. Food Chem, 35(4) :607 – 610

Hayakawa S ,Suzuki H. and Suzuki T.,1985. Report of the national institute ,47 :113 – 117

Hong C-Y, Cheng K-J, Tseng T-H, Wang C-S, Liu L-F and Yu S-M. 2003. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. Transgene Research PC 1237:1-11

Howson, S. J., and Davis, R. P. 1983. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. Enzyme Microb. Technol. 5:377-382

Ifbasn, F. A., Manner, K. Miksch, G. Borriss, R. Farouk, A. and Simon, O. 2000.

Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins. Arch Tierernahr 53:353-73

Johnson V A and Lay C L. ,1974. Genetic improvement of plant protein. J . Agric. Food

Chem ,22 :558 – 566

Jongbloed, A. W., Mroz, Z, and P. A. Kemme. 1992. The effect of 68 supplementary

Aspergillus niger phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus, and phytic acid in different sections of the alimentary tract. J. Anim. Sci., 70: 1159-1168.

Kasim, A. B., and Edwards, H. M. 1998. The analysis of inositol phosphate forms in feed

ingredients. J Sci. Food Agric. 76: 1-9.

Kennedy B M,1981. Nutritional qualities of rice endosperm. In “ Rice production and

utilization ” . AVI. , 2 :439



Kikunaga, S., Takahashi, M., and Huzisige, H. 1985. Accurate and simple measurement of phytic acid contents in cereal grains. *Plant Cell Physiol.* 26:1323-1330

Kim, Y. O., H. K. Kim, K. S. Bae, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DSII. *Enzyme Micro. Technol.* 22: 1-7.

Koba, K., Liu, J. W. E., Bobik, Mills, Jr. Sugano, D. E. M. and Huang, Y.S. 2003. Effect of phytate in soy protein on the serum and liver cholesterol levels and liver fatty acid profile in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:15-22

Kunckles, B. E., and A. A. Betschart. 1987. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on α -amylase digestion of starch. *J. Food Sci.* 52: 719-721

Laboure, A. M., J. Gagnon, and A. M. Lescure. 1993. Purification and characterisation of a phytase (myo-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zeamays*) seedings during germination. *Biochem. J.* 295: 413-419.

Lei XG., Han YM.,Stahl CH. Et al. , 1998. Development of a new phytase and its effect on dietary phosphorus and iron bioavailabilities to pigs.Proceedings.,(60):166-168

Liu B. L., Rafiq A., Tzeng Y., and Rob A. 1998. The induction and characterization of phytase and beyond-Evidence for unusually small active enzyme peptides. Enzy. Microbiol. Technol. 22:415-424

Lolas, G. M., Palamids, N., and Markakis, P. 1976.The phytic acid , total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans, and wheats. Cereal Chem. 53:867-871

Lina, Y. and Hiroo, S. 2003. Some polysaccharides improve zinc bioavailability in rats fed a phytic acid – containing diet. Nutr. Res. 23:343-355

Long, C. 1961.Phytase. In Biochemists ' Handbood, " p 259.

Lonnerdahl, B., A. S. Sandberg, B. M. Sandstrom, and C. Kunz. 1989. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. J. Nutr. 119:211-214

Mameesh, M.S., and Tomar, M. 1993. Phytate content of some popular Kuwaiti food.

Cereal Chem. 70:502

Nair, V. C., Laflamme, J., and Duvnjak, Z. 1991. Production of phytase by *Aspergillus*

ficuum and reduction of phytic acid content in Canola meal. J. Sci. Food Agric.

54 :355-365

Nayini, N. R., and Markakis, P. 1983. Effect of fermentation time on the inositol

phosphates of bread. J. Food Sci. 48: 262-263

Nelson, T. S. 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry-a review. Poultry Sci.

46: 862-871

Nishizawa N ,Kurosawa N ,Kan M,et al. , 1990. Protein quality of high - yielding rice

and its improvement by supplementation of Lysine and Threonine. Agric.Biol. Chem.,

54(2):399 - 406

O ' Dell, B. L., de Boland A. R., and Koirtyohann, S. R. 1972. Distribution of phytate and

nutritionally important elements among the morphological components of cereal

grains. J. Agri. Food Chem. 20:718-721

Okubo, K., D. Myers, and G. A. Iacobucci. 1976. Binding of phytic acid to glycinin.

Cereal Chem. 53:513-524

Padhye V Wand Salunkhe D K,1979. Extraction and characterization of rice proteins.

Cereal Chem ,56(5) :389 – 395

Pandey, A., G. Szakacs, C. R. Socol, J. A. Rodriguez-Leon, and V. T. Socol. 2001.

Production, purification and properties of microbial phytases. Bios. Technol. 77:

203-214.

Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M. and van Loon, A. P. G. M. 1997. Gene

cloning , purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus

Aspergillus fumigatus. Appl. Envir. Microbio . 63 (5)1696-1700

Pawar, V. D., and U. M. Ingle. 1988. Investigations on phytateprotein-mineral complexes

in whey fractions of moth bean(*Phaseolus aconitifolius* Jacq) flour. J. Food Sci.

Technol. 25:190

Penny M. Kris-Etherton, Thomas A person, et al. ,1990. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentration. Am J Ntt, ,70: 1009-1015.

Posternak, S. 1903. Sur un nouveau principe phosphor-organique d ' origine vegetale la phytine. Compt. Rend. Soc. Biol. 55:1190-119

Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of phytase - specific phosphatase from Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 151: 1102-1108.

Ravindran, V., Ravindran, G., and Sivalogan, S. 1994. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin . Food Chem. 50:133-136

Reddy, B. S. 1999. Role of dietary fiber in colon cancer: an overview. Am. J. Med. 106:16S-19S;discussion 50S-51S.

Rimbach, G., Pallauf, J., Brandt, K., and Most, E. 1995. Effect of phytic acid and microbial phytase on Cd accumulation, Zn status, and apparent absorption of Ca, P, Mg , Zn, Cu, and Mn in growing rats. Ann Nutr. Metab. 39: 361-370

- Rodriguez, E., Mullaney, E. J., and Lei, X. G. 2000. Expression of the *Asperillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Bilchem. Biophys. Res. Commun* 268:373-8
- Rodriguez, E., Porres, J. Han, M. Y., and Lei, X. G. 1999. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase(r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase to trypsin and pepsin in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 365:262-7
- Rutherford, S. M., T. K. Chung, and P. J. Moughan. 2002. The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. *Br. Poultry. Sci.* 44: 598-606
- Sanberg, Ann-Sofie; Hulthen, Lena Rossander; Tuerk, Maria. 1996. Dietary *Aspergillus niger* phytase temperatures on selected nutrients and antinutrients of mung bean. *Food.Chem.* 34(2):111-20
- Schlemmer, U., K. D. Jany, A. Berk, E. Schulz, and G. Rechkemmer, 2001. Degradation of phytate in gut of pigs pathway of gastrointestinal inositol phosphate hydrolysis and

enzymes involved. Arch Tierernahr. 55: 255-80.

Segueilha, L., C. Lambrechts, H. Boze, G. Moulin, and P. Galzy. 1992. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. J. Ferment. Bioeng. 74: 7-11.

Shieh, T., and Ware, J. H. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. Appl. Microbiol. 16(9): 1348-1351

Shimizu, M. 1992. Purification and characterisation of phytase form *Bacillus subtilis* (natto)N-77. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56: 126-1269

Shridhar K. Sathe. ,N. Rukma Reddy, 2001. Food phytates , CRC Press. 29-32

Simons PCM., Versteegh HAJ., Jongbloed AW., et al., 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs 【J】 .The British Journal of nutrition , 64(2) :525-540

Takeda M, Namba Y and Nunokawa Y. ,1970. Heterogeneity of rice glutelin. Agric. Biochem , (Tokyo) ,34 :473

Tanaka, K., Yoshida, T., and Kasai, Z. 1974. Radioautographic demonstration of the accumulation site of phytic acid in rice and wheat grain. *Plant Cell Physiol.* 15:147-151

Taylor, T. G. 1965. The availability of the calcium and phosphorus of plant materials for animals. *Proc. Nutr. Soc.* 24: 105-112.

Thomposon, L. U., and J. H. Yoon. 1984. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *J. Food Sci.* 49: 1228-1229

Thompson, L. U. 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. *Food Res. Int.* 26: 131-149.

Ullah, A. H. J. 1988. *Aspergillus ficuum* phytase: Partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterisation. *Prep. Biochem.* 18: 459-47

Vaintraub, I. A., and V. P. Bulmaga, 1991. Determination of phytate on the in vitro activity of digestive proteinase. *J. Agr. Food Chem.* 39:859-861

Vasilios, M.E.A. and James, D. R. 2003. Isolation and characterization of phytase from dormant *Corylus avellana* seeds. *Phytochemistry* 64:689-699.

Verdouse, J. C., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. M. J. J. 1995. Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotech.* 43:195-205

Weaver, C. M., House, W. A., and Allaway, W. H. 1974. Availability of zinc from pea seeds to rats. *J. Nutr.* 104:733-740

Wheeler, E. L., and Ferrel, R.E. 1971. A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions . *American Association of Cereal Chemistry* 48:312-320.

Wodzinski, R. J. and Cowan, J. C.(Ed.).1975.Phytase. *Phytase advances in Applied Microbiol.* 42:263-302

Wodzinski, R. J., and Ulah, A. H. J. 1996. Phytase. *Phytase advances in Applied Microbiol.*42:263-302

Wolter, M. G. E., Diepenmat, H. B., Hermus, R. J. J., and Voragen, A. G. J. 1993. Relation between in vitro availability of minerals and food composition: A mathematical model. *J. Food Sci.* 58:1349-1355.

Yi Z., Kornegay ET., Ravindran V., et al., 1996. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculation of phosphorus equivalency values for phytase. *Poultry science*, 75(2):240-249

Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee, and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 449-454.

附 錄

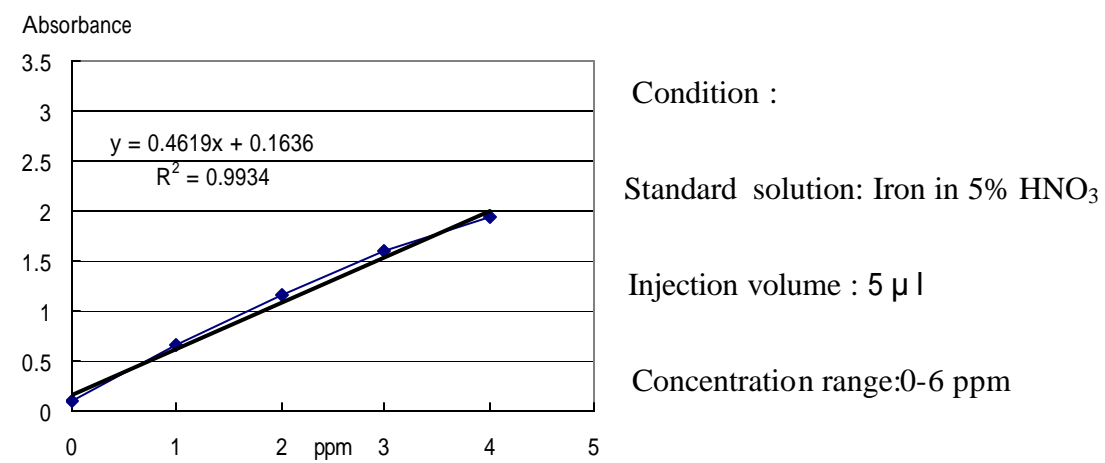


Figure 1. Fe standard curve

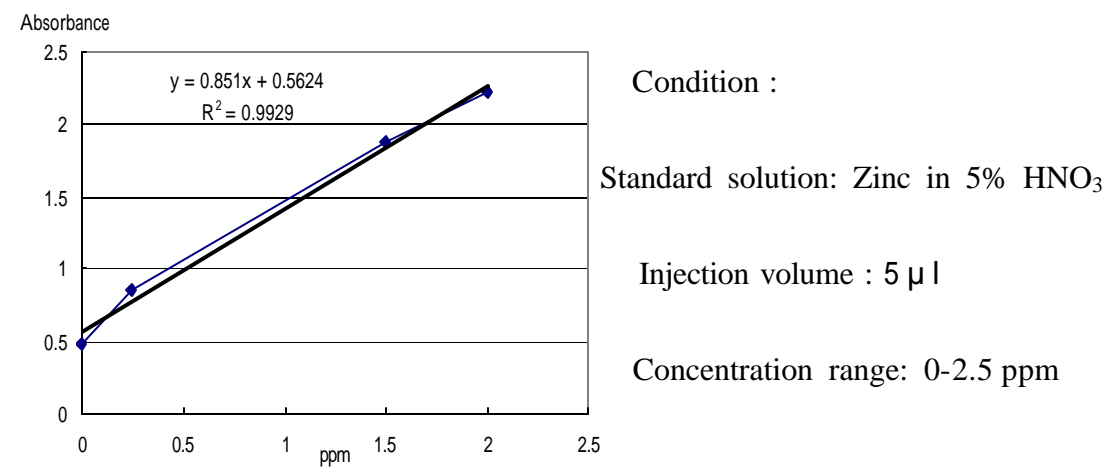


Figure 2. Zn standard curve

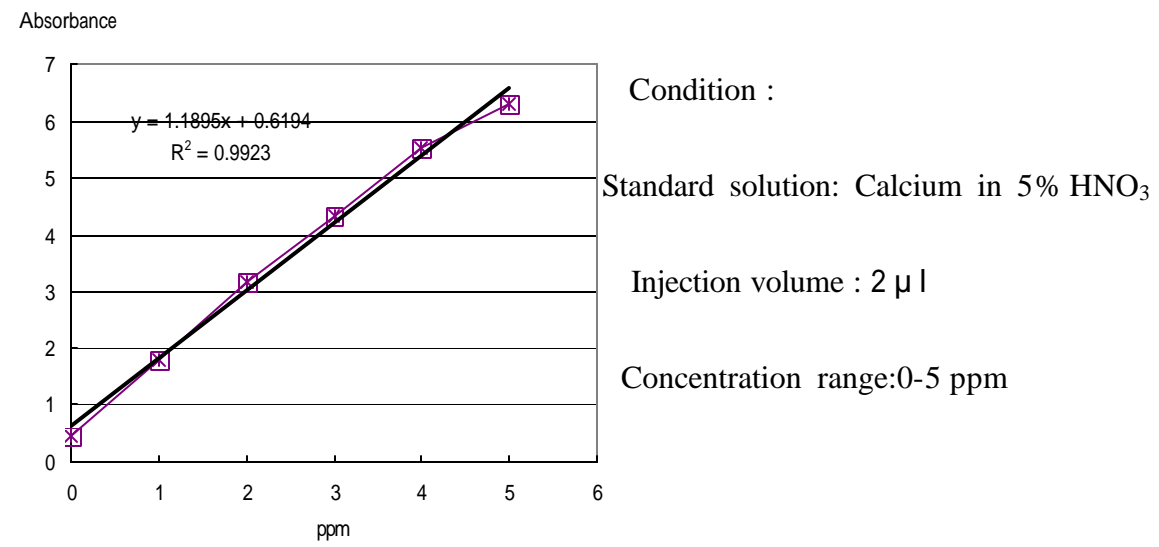


Figure 3. Ca standard curve

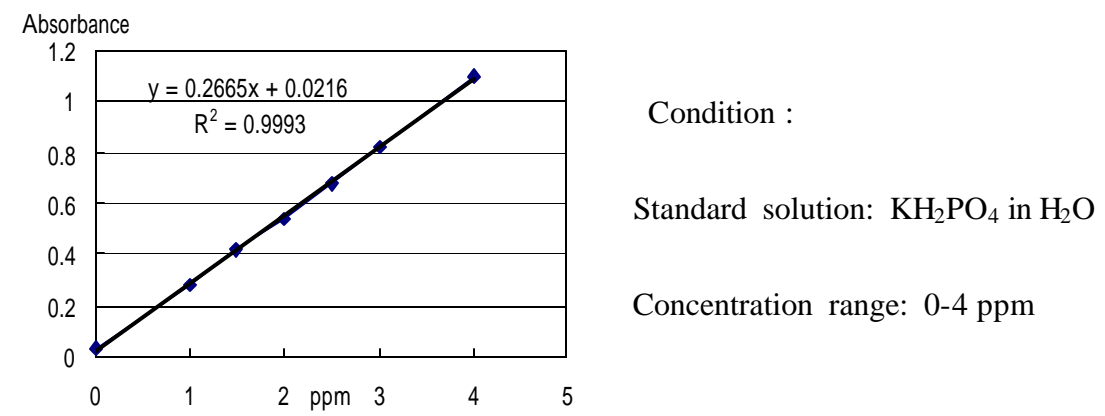
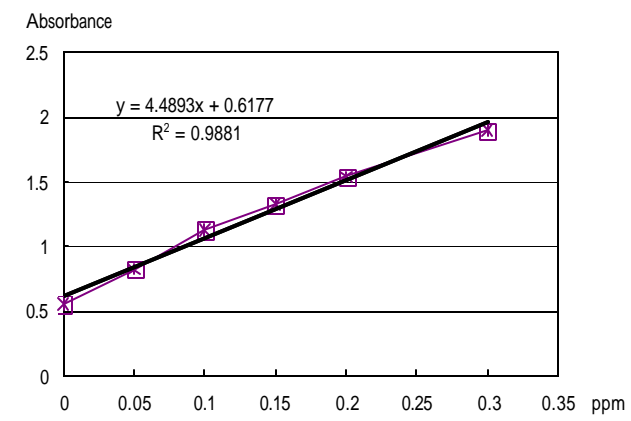


Figure 4. P standard curve



Condition :

Standard solution: Magnesium in 5 % HNO₃

Injection volume : 2 μl

Concentration range : 0-0.3

Figure 5. Mg standard curve