

# Galacto-oligosaccharides 成分的分離及 化學性質之探討<sup>(1)</sup>

黃建榕<sup>(2)</sup>

收件日期：90 年 8 月 20 日；接受日期：90 年 10 月 2 日

## 摘 要

本試驗之目的在於探討 Galacto-oligosaccharides 成分中之四醣類之最適生成條件、化學構造及重要機能性等，以做為將來應用於乳製品或食品方面之參考。研究結果顯示：將乳糖濃度調為 20%，反應溫度及酵素濃度分別提高為 40℃ 及 8 ONPG/ml 時，在反應 4.5 小時左右，可得較高量之二種四醣類，經分離純化後，以 <sup>13</sup>C-NMR 鑑定其化學構造分別為 0-β-D-galactopyranosyl-(1→3)-0-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-0-β-D-lactose (G<sub>1</sub>) 及 0-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-0-β-D-galactopyranosyl-(1→6)-0-β-D-lactose (G<sub>2</sub>)。且此二種四醣類對熱之安定性高，在 100℃ 之溫度下，反應 5 小時，只有少量被分解，在 37℃ 人工胃液內反應五小時，G<sub>1</sub> 及 G<sub>2</sub> 分別僅有 16 及 13.7% 左右被分解。在乳酸菌增殖能力方面，G<sub>1</sub> 及 G<sub>2</sub> 對 *S. thermophilus* 增殖性能不佳，但對 *Lactobacillus* 屬之二菌株及所有供試之雙叉乳桿菌均有良好之增殖效果。

關鍵詞：半乳寡醣類、四醣類、分離、化學性質。

## 緒 言

寡醣類的機能性自被發現以來，已有數種問市（細谷等，1984；荒谷等，1981）。Greenberg *et al.* (1983) 及出家等 (1982) 分別使用不同來源之β-半乳糖苷酶來進行寡醣類的生合成。本研究以前曾採用源自 *Aspergillus oryzae* 之β-半乳糖苷酶，將乳中之乳糖生合成 galacto-oligosaccharides，並已確認其中二種三醣類的化學構造分別為 3-0-β-D-galactosyl-lactose 及 6-0-β-D-galactosyl-lactose（黃，1992）。不過，由實驗資料顯示，所生合成的 galacto-oligosaccharides 內，尚含數種四醣或五醣類。日高 (1985) 指出，最具增殖腸內雙叉乳桿菌 (*bifidobacteria*) 數目之醣類為三醣或四醣類，筆者最近的研究也顯示出上述二種三醣類具有增殖雙叉乳桿菌的功能（未發表）。鑑此，為了明瞭所生合成之四或五醣類的機能性，有必要針對其化

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1086 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所畜產加工系。

學構造、製造條件及增殖雙叉乳桿菌之能力，做更進一步的探討，以做為將來應用於乳製品或食品方面之參考。

## 材料與方法

- I. 寡醣類之生成條件之探討：參考 Huber *et al.* (1976) 之方法，進行各項條件（反應溫度、時間、基質濃度及酵素濃度等）之測試，尋求四醣或五醣類之最佳生成條件。
- II. 寡醣類之單離及精製：參考黃 (1992) 法行之。添加蒸餾水於約 200 g 之活性炭中，充分脫氣後，充填於管徑為 8×55 cm 之玻璃管柱內。將反應溶液注入其內，使其內含之醣分子吸著於活性碳中，而後以水、5、10、15 及 30% 酒精溶液為溶媒，順次將反應生成物溶出。生成物以薄層層析法（黃，1992）檢查之。
- III. 化學構造之鑑定：參考 Bradbury and Jenkins (1984) 及黃 (1989) 之法，將分離精製後之試料溶於 D<sub>2</sub>O 在 25 MHz 之條件下，以 <sup>13</sup>C-NMR (BURKER AMX 400 FT-NMR) 分析之。
- IV. 人工胃液內安定性試驗：參考沖等 (1992) 法，添加 1% 試樣於人工胃液 (0.08 N HCl, 0.2 % NaCl) 內，於 37°C 下以 Thin Layer Chromatography (TLC) 及 Gas Chromatography (GC) (黃，1989) 觀察其經時變化。
- V. 熱安定性試驗：添加試樣 10% 於 pH 7 之 0.1 M Mcl Ivaine 緩衝液內，加熱至 100°C 後，以 TLC 及 GC (黃，1989) 觀察其經時變化。
- VI. 乳酸菌增殖效果鑑定：參考 Okazaki *et al.* (1990) 之法，添加分離精製之試樣 0.5% 於 PYF 培養基 (pH 7.2, 2 ml) 後，接種各活化後之乳酸菌液 0.03 ml，在 37°C 及厭氣或好氣狀態下，培養 96 小時，以 pH 值作為判定基準。

## 結果與討論

本試驗以前曾於反應溫度為 37°C、乳糖濃度 30% 及 3 ONPG units/ml 酵素濃度條件下，在反應 7 小時得到最大寡醣生成量，約佔全糖量之 25.3% 左右（黃，1992）。且所合成寡醣中，三、四及五醣分別約佔寡醣量之 80、12 及 8% 左右（表 1）。其中二種三醣類的化學構造已經確認（黃，1992）。但由於四及五醣類的生成量較少，因此，本試驗針對反應條件再作檢討。表 1 為在各反應條件下，寡醣類生成量達 25~27% 時，三、四及五醣類在總寡醣量中所佔之比例。在反應溫度及乳糖濃度分別為 37°C 及 30% 時，增加酵素濃度雖能縮短反應時間，可是三、四及五醣類的比例並無明顯變化。但是，如果將反應溫度及乳糖濃度分別調整為 40°C 及 20% 時，可看出寡醣類中之三及四醣含量有明顯之變化。出家等 (1982) 指出在寡醣類合成反應中，應在提高酵素及基質濃度的前提下，尋求適當的反應條件，在本試驗之第 2 組，其基質及酵素濃度均為最

高，且寡醣類之生成效率也甚良好，但因為三及四醣類的含量比例無明顯變化，所以本試驗採用寡醣生成量中，三醣及四醣含量比例變化最大之第 4 組的反應條件為試驗條件（表 1）。

表 1. 在不同反應條件下被源自 *A. oryzae* 之  $\beta$ -半乳糖苷酶所生成寡醣類之比較

Table 1. Comparison on the production of galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *A. oryzae* under various reaction conditions

Treatment	Temperature (°C)	Substrate (%)	Enzyme (ONPG units/ml)	Reaction* time (h)	Oligo- (% of total sugar)	Tri- (% of total oligo-)	Tetra- (% of total oligo-)	Penta- (% of total oligo-)
1	37	30	3	7.0	25.3	80	12	8
2	37	30	8	3.0	27.1	84	10	6
3	40	20	3	9.5	25.2	72	18	10
4	40	20	8	4.5	26.5	65	27	8

\* When reacted at 25~27% yield of oligosaccharides.

表 2.  $G_1$  及  $G_2$  分子內還原碳原子上之碳-13 核磁共振化學位移

Table 2.  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts<sup>a</sup> of the anomeric carbons<sup>b</sup> for  $G_1$  and  $G_2$

Oligosaccharide	C-1***	C-1**	C-1*	C-1	
				$\alpha$	$\beta$
$G_1$	106.72	105.64	105.32	94.54	98.65
$G_2$	106.40	106.78	105.39	94.59	98.72

<sup>a</sup> : Chemical shifts (ppm) from TSP-d4.

<sup>b</sup> : Unprimed numbers refer to reducing residue, primed numbers to next residue, etc.

$G_1$  : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

$G_2$  : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

圖 1 為反應溶液之薄層分析圖，由此圖所示，四醣類可能有 2 種（ $G_1$  及  $G_2$ ），因此首先使用活性炭層析法，以水、5、10、15 及 30% 之酒精溶液順次將反應產物溶出，在 30% 酒精溶出液內，將  $G_1$  及  $G_2$  分別分離、精製出。 $G_1$  及  $G_2$  經酸水解反應後均得半乳糖及葡萄糖分子，且其含量比率約為 3:1。顯示此二種醣類可能為三分子之半乳糖及一分子之葡萄糖所結合成之四醣類。以  $^{13}\text{C}$ -FTNMR 加以分析，所得各 anomeric carbons 之化學位移（chemical shift）如表 2 所示。除了 C-1 外，其他三個 anomeric carbons 均在 105.32-106.72 ppm 範圍內產生共振現象，因此可推斷醣分子內之半乳糖分子之還原基 C-1\*\*\*、C-1\*\* 及 C-1\* 以  $\beta$ -鍵結合於非還原位置（Bradbury and Jenkins, 1984），且依據黃（1989）及 Bradbury & Jenkins（1984）之資料來研判這幾個特殊之 anomeric carbons 之化學位移，可推算出 106.72、105.64 ppm 及 106.40、106.78 ppm 分別為二個乳糖分子連續以  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) 及  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)、 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) 之形式鍵結於其他醣分子之化學位移。而 94.54、98.65 及 94.59、98.72 ppm（即 C-1 之化學位移）明顯為葡萄糖分子還原基上之化學位移，因此， $G_1$  及  $G_2$  之最末端分子應為葡萄糖分子。綜合以上分析結果，本試驗所生合成之四醣類  $G_1$  及  $G_2$  之化學構造應為  $G_1$  : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose 及  $G_2$  : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose（圖 2）。而圖 1.  $G_1$  及  $G_2$  之下方所呈現的黑點可能為四醣以上之寡醣類，因量極微，萃取困難，所以本次不針對其加以探討。

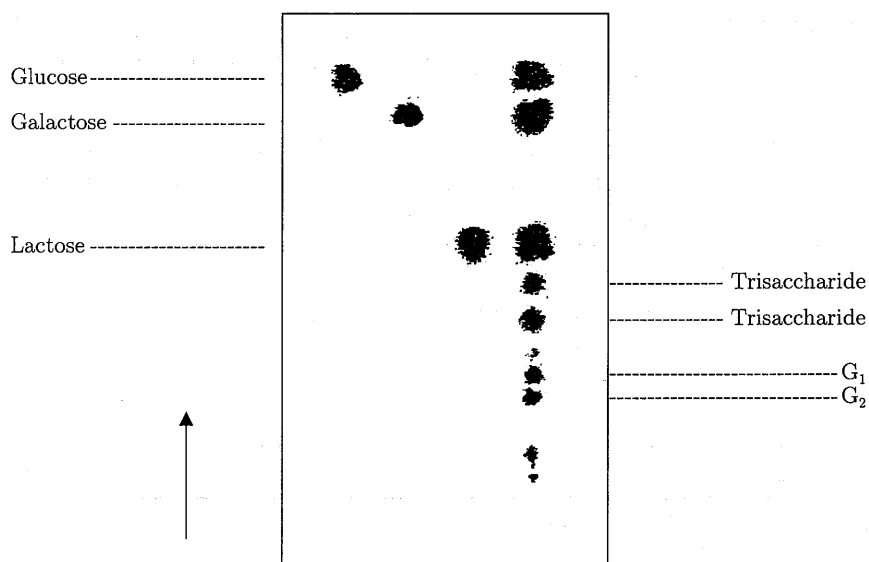


圖 1. 源自 *A. oryzae* 之  $\beta$ -半乳糖苷酶 (8 ONPG units/ml) 在乳糖轉移反應系中，於 40°C 下反應 4.5 小時之轉移生成物的 TLC。

展開溶媒：乙酸乙酯：醋酸：水 = 2 : 1 : 1；檢出液：5% 硫酸-甲醇溶液。

Fig. 1. TLC of the transgalactosylation products of lactose system by *A. oryzae*  $\beta$ -galactosidase (8 ONPG units/ml) at 40°C for 4.5 hrs.

Developing solvent : ethyl acetate-acetic acid-water = 2 : 1 : 1.

Detecting reagent : 5% sulfuric acid-methanol.

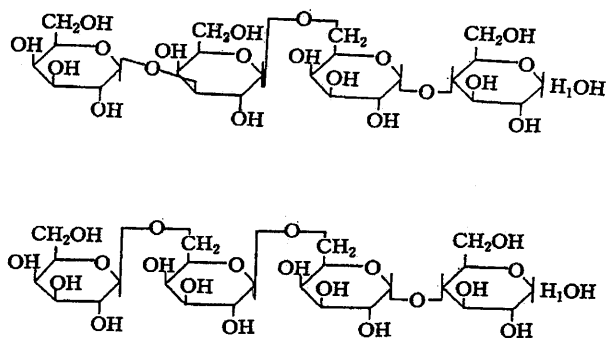


圖 2.  $G_1$  及  $G_2$  之化學構造。

Fig. 2. The chemical structures of  $G_1$  and  $G_2$ .

上述結果顯示，使用同一來源之酵素，適度的改變反應條件後，可能獲得不同比例之寡醣種類或量。Huber *et al.* (1976) 的研究也得類似結果。前次及本次之試驗結果顯示出 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)鍵結及 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)鍵結在寡醣生成反應中優先形成，尤其是 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)鍵結，即使酵素來源不同，也會顯現出此種特異性。Asp *et al.* (1980) 及黃 (1989) 之研究也得相同結論。本反應所生成之寡醣類(三及四醣)在分子還元末端為乳糖分子，顯示 *A. oryzae* 來源之 $\beta$ -半乳糖苷酶所具有之特異性，此為與源自 *Kluyveromyces lactis* (Asp *et al.*, 1980)、*S. thermophilus* (Greenberg and Mahoney, 1983) 及其他來源酵素不盡相同之處。

表 3 表示  $G_1$  及  $G_2$  在 100°C 時之熱安定性，在 100°C 時，反應 5 小時後， $G_1$  及  $G_2$  只有少量被分解，顯示其熱安定性頗高。表 4 則為在人工胃液內之經時變化情形。在反應 5 小時後， $G_1$  及  $G_2$  之分解量分別約為 16 及 13.7% 左右，遠低於 stachyose 及 raffinose 在同樣反應狀況下之分解量(沖等，1992)。這種差異可能由於醣分子末端若為酮基時，在食品加工階段或低酸度加熱狀態下，易產生化學反應所致。在乳酸菌增殖性能方面，二株 *S. thermophilus* 對  $G_1$  及  $G_2$  之發酵性能雖不甚佳，但其他二株 *Lactobacillus* 屬乳酸菌及所有供試之雙叉乳桿菌對  $G_1$  及  $G_2$  之發酵性均甚良好，增殖效果顯著(表 5)，顯示  $G_1$  及  $G_2$  確實為雙叉乳桿菌及乳酸菌之良好增殖物質。

表 3.  $G_1$  及  $G_2$  在 100°C 下之熱安定性

Table 3. Heat stability of  $G_1$  and  $G_2$  at 100°C for 5 hours

Oligosaccharide	Reaction time (hrs)			
	0	1	3	5
	Remaining %			
$G_1$	100	100	100	95.2
$G_2$	100	100	100	97.1

$G_1$ : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

$G_2$ : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

表 4.  $G_1$  及  $G_2$  在 37°C 之人工胃液內之安定性

Table 4. Stability of  $G_1$  and  $G_2$  in artificial gastric juice at 37°C for 5 hours

Oligosaccharide	Reaction time (hrs)			
	0	1	3	5
	Remaining %			
$G_1$	100	98.5	88.5	84.0
$G_2$	100	97.8	89.7	86.3

$G_1$ : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

$G_2$ : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

表 5. 各種乳酸菌對  $G_1$  及  $G_2$  之利用性Table 5. Utilization of  $G_1$  and  $G_2$  by various lactic acid bacteria

Strain	Saccharide				
	Glc	Gal	Lac	$G_1$	$G_2$
<i>B. longum</i> CCRC 11847	++	++	++	++	++
14634	++	++	++	++	++
14664	++	++	++	++	++
14605	++	++	++	++	++
<i>B. breve</i> CCRC 11846	++	++	++	++	++
14632	++	++	++	++	++
<i>B. bifidum</i> CCRC 14146	++	++	++	++	++
11844	++	++	++	++	++
<i>L. bulgaricus</i> CCRC 14009	++	++	++	+	+
<i>L. acidophilus</i> CCRC 14072	++	++	++	++	++
<i>S. thermophilus</i> CCRC 14085	++	++	++	—	±
14086	++	++	++	—	—

Glc : Glucose Gal : Galactose Lac : Lactose

 $G_1$  : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose. $G_2$  : 0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)-0- $\beta$ -D-lactose.

++ : pH&lt;5.0 ; + : pH 5.01~5.5 ; ± : pH 5.51~6.0 ; — : pH&gt;6.01.

## 結 論

$G_1$  及  $G_2$  除具有良好的之熱安定性及耐酸性外，並對雙叉乳桿菌有良好之增殖效果，所以使用此類寡醣類於各式乳製品或食品中，將可有效地提高產品之營養價值。不過  $G_1$  及  $G_2$  對 *Streptococcus* 屬乳酸菌之增殖效果不甚顯著，往後將進一步研製具有更佳機能特性之新式寡醣類，以符合未來多樣化乳品及食品之需求。

## 參考文獻

- 黃建榕。1989。Isoraffinose の發現とその利用に関する研究。日本東北大學畜産利用學博士論文。
- 黃建榕。1992。A. *oryzae*  $\beta$ -galactosidase 於乳糖水解過程寡醣類之生合成。畜産研究 25(2) : 171~179。
- 日高秀昌。1985。腸内フローラの栄養における役割。微生物 1(4) : 32~40。
- 出家榮記、天谷三枝子、野尻かおる、五十嵐清一郎。1982。ガラクトシルラクトースの育児用調製乳粉への利用に関する研究（第一報） $\beta$ -ガラクトシダーゼによるオリゴ糖の調製。雪印乳業技術研究所報告 78 : 19~26。

- 沖 裕治、橋本 香、松本貴至、久保田昭正、江本三男、小橋恭一。1992。大豆オリゴ糖を原料とした食酢の製造およびヒト腸内フローラに及ぼす影響。日本農化會誌 66(4) : 727~732。
- 荒谷真平、竹内光春。1981。カップリングシユガと虫歯。pp. 95~128, 光琳, 東京, 日本。
- 細谷憲政、福場博保。1984。轉移糖と榮養。pp. 12~58, 第一出版社, 東京, 日本。
- Asp, N. G., A. Burvall, A. Dahlqvist, P. Hallgren and A. Lundblad. 1980. Oligosaccharide formation during hydrolysis of lactose with *saccharomyces lactis* lactase (MAXILACT) : PART. 2 : Oligosaccharide structures. Food Chem. 5 : 147~159。
- Bradbury, J. H. and G. A. Jenkins. 1984. Determination of the structures of trisaccharides by  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. Carbohydr. Res. 126 : 125~156。
- Greenberg, N. A. and R. R. Mahoney. 1983. Formation of oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. Food Chem. 10 : 195~204。
- Huber, R. E., G. Kurz and K. Wallenfels. 1976. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of  $\beta$ -galactosidase (*E. coli*) on lactose. Biochem. 15(9) : 1994~2001。
- Okazaki, M., S. Fujikawa and N. Matsumoto. 1990. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. Bifidobacteria Microflora 9(2) : 77~86。

# Studies on the Isolation and Property of Galacto-oligosaccharides<sup>(1)</sup>

Chien-Jung Huang<sup>(2)</sup>

Received Aug. 20, 2001 ; Accepted Oct. 2, 2001

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the optimal synthesis conditions, chemical structures and functional properties of tetrasaccharides, which belong to galacto-oligosaccharides, for the future utilization in dairy or food industries. The results were summarized as follows: Two tetrasaccharides had occurred when lactose concentration was 20%, reaction temperature and enzyme concentration were 40°C and 8 ONPG/ml, respectively. When identified with <sup>13</sup>C-FTNMR, they were found to be 3-O- $\beta$ -D-galactosyl-6-O- $\beta$ -D-galactosyl-lactose (G<sub>1</sub>) and 6-O- $\beta$ -D-galactosyl-6-O- $\beta$ -D-galactosyl-lactose (G<sub>2</sub>). G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> had high heat stability at 100°C for 5 hrs, and also only 16 and 13.7% were disintegrated in artificial gastric juice at 37°C for 5 hrs, respectively. The proliferation effects of lactic acid bacteria with G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> were all good for bifidobacteria and lactobacilli except streptococci.

Key words : Galacto-oligosaccharides, Tetrasaccharides, Isolation, Chemical property.

---

(1) Contribution No. 1086 from Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Dept. of Animal Products Processing, COA-TLRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.