

國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術系

碩士論文

Department of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

山羊乳寡糖改善小鼠腸內細菌菌相與免疫調節功能之評估

Evaluation of modification capability of
goat milk oligosaccharides on mouse
intestinal bacterial composition and immunity



Peng-Cheng Sun

指導教授：徐濟泰 博士

Advisor: Jih-Tay Hsu, Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

目錄

	頁次
誌謝	i
目錄	ii
表次	iii
壹、緒言	1
貳、中文摘要	3
參、英文摘要	4
肆、文獻檢討	6
伍、材料與方法	32
陸、結果與討論	36
柒、結論	45
捌、參考文獻	46
附錄	64



表次

	頁次
表 1. 餵飼寡醣對小鼠血液中血球數的影響	40
表 2. 餵飼寡醣對小鼠足蹠腫脹程度的影響	40
表 3. 餵飼寡醣對小鼠血液中免疫球蛋白 IgG 及 IgM 的影響	41
表 4. 餵飼寡醣八週後對小鼠脾臟細胞進行增生能力測定實驗結果	41
表 5. 餵飼寡醣八週後小鼠結腸絨毛中所測得之各菌菌數	42
表 6. 餵飼寡醣八週後小鼠結腸內容物中所測得之各菌菌數	42
表 7. 餵飼寡醣八週後小鼠盲腸絨毛中所測得之各菌菌數	43
表 8. 餵飼寡醣八週後小鼠盲腸內容物中所測得之各菌菌數	43
表 9. 餵飼寡醣八週後小鼠糞便中所測得之各菌菌數	44

壹、緒言

依民國九十三年度衛生署所公布的統計資料，國人在消化系統疾病的醫療費用支出達到 790.75 億元，僅次於呼吸系統疾病(衛生署，2004)；另外，癌症亦為多年來國人十大死因之首，而同年度的癌症前十大死亡原因中，也有半數是與消化系統有關，其中結腸直腸癌更是高居第三位(衛生署，2005)。所以，如何促進胃腸道的健康，實為當前重要的研究題目。

腸胃等消化器官主要功能是消化食物、吸收營養素及排遺。對整個消化系統來說，除了外來病原的侵襲外，工作壓力、心情緊張或是飲食習慣改變等等因素，都會影響消化系統表現其正常功能，進而妨礙食物消化和養份的吸收，甚至使胃腸道產生不適或疾病。

伴隨著近來大多數國人在飲食型態上的西化以及對精緻飲食攝取的增加，相對使膳食纖維的攝取普遍不足。有鑑於此，衛生署訂定之「國民飲食指標」中已鼓勵民眾應儘量食用其內含有較高膳食纖維的食物。又，民國八十八年八月三日公告施行的「健康食品管理法」中，也特別明定了「胃腸道功能改善評估辦法」。再者，於九十年公告的「市售包裝食品營養宣稱規範」，把膳食纖維列為可補充攝取的營養素，這些都顯示目前我國內已相當重視膳食纖維對健康的重要性。

現今各種訴求能夠改善消化道功能的食品在市場上日漸受到消費者重視，其中寡糖類的產品已經過一段時間的研究，也確知某些寡糖能夠影響腸道內菌相的生長，進而改善腸道功能。在歐、日等許多國家寡糖已被當成食品原料使用在各式的食品中。機能性寡糖在現今製造方式上有許多不同種類來源，目前是以植物提煉萃取和酵素產製法為大宗，以動物乳為來源者則相當少見。

本實驗嘗試採用山羊乳寡糖為對象，探討其應用在小鼠上面會對受試動物的腸內菌相與免疫能力產生何種影響。並且，配合國家的「健康食品管理法」的規定來進行試驗，供作山羊乳寡糖能否應用在人體健康上的參考。



貳、中文摘要

本試驗之目的在研究比較小鼠的日常飲食中添加山羊乳寡醣或半乳寡醣對其腸道菌相組成及免疫能力的影響。試驗中所使用的山羊乳寡醣是利用快速液態層析儀分離再濃縮後所得。本試驗使用 40 隻 4 週齡大的雄性 BALB/c 小鼠為受試對象，總飼養期間為兩個月。四個試驗組分別為 1) 對照組；2) 半乳寡醣組；3) 酸性山羊乳寡醣組與 4) 中性山羊乳寡醣組。三個寡醣處理組餵飼劑量均為每日 500 mg/ 每公斤體重。餵飼四週後，所有小鼠均進行遲發性過敏反應 (delayed-type hypersensitivity) 檢測。隨後，利用腹腔注射卵白蛋白來對小鼠進行特異性免疫反應測試，追蹤血漿中免疫球蛋白 G(IgG) 及免疫球蛋白 M(IgM) 的濃度變化。隨後，當飼養滿八週後，採集小鼠血液樣本進行特異性免疫反應測試及血液血球計數分析試驗。接著犧牲所有小鼠，解剖取得其腸道與脾臟。在腸道取 1) 結腸絨毛；2) 結腸內容物；3) 盲腸絨毛及 4) 盲腸內容物後再加上 5) 糞便，分別檢測其菌數。檢測的菌種為 1) *Bifidobacterium* spp.；2) *Lactobacillus* spp.；3) *Clostridium perfringens* 及 4) *Escherichia coli*。而脾臟則用以進行淋巴細胞增生能力的測試。本試驗結果顯示，在遲發性過敏反應上，三個寡醣處理組都較對照組有較小的腫脹程度。血液血球計數分析的結果，則呈現三寡醣處理組在單位血液量中的白血球、淋巴球與單核球三種細胞數目皆高於對照組。特異性免疫反應方面，半乳寡醣組與酸性山羊乳寡醣組的小鼠血漿中 IgG 及 IgM 濃度亦顯著較對照組為高。淋巴細胞增生能力上，半乳寡醣組與酸性山羊乳寡醣組有較對照組強的 T 淋巴球增生表現。最後，腸道菌數檢測的結果，半乳寡醣組與酸性山羊乳寡醣組相較於對照組，顯著的提昇腸道中 *Bifidobacterium* spp. 和 *Lactobacillus* spp. 的數目，並使 *E. coli* 下降，但在對照組與中性山羊乳寡醣組之間則較無差異。綜合上述結果，山羊乳寡醣在提昇小鼠免疫能力和增加腸道益菌數目上與半乳寡醣有類似的正面結果。

參、英文摘要

The purpose of this study was to investigate the effect of dietary supplementation of goat milk OS on intestinal bacterial composition and immunity of mice. The goat milk OS were isolated and concentrated by FPLC in NTU Animal Nutrition Lab. Forty male BALB/c mice of 4 weeks age were used in this study. They were randomly allocated to 4 treatments of 10 mice each treatment. The four treatments were:

(1)control, (2)galacto-oligosaccharides(GOS), (3)acidic goat milk

oligosaccharides(AOS) and (4)neutral goat milk oligosaccharides(NOS). After four weeks of OS feeding, all mice were subjected to the delayed-type hypersensitivity test.

After eight weeks, blood samples were collected for assay of the blood cells numbers, immunoglobulin G, immunoglobulin M and splenic lymphocyte proliferation, and

samples of the (1)colic content, (2)colic villus, (3)cecal content, (4)cecal villus and

(5)feces were taken for culturing count of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli*.

Results showed that all three OS treatments were higher in quantities of leukocytes, lymphocytes, and monocytes than the control group. In delayed-type hypersensitivity test, the swollen skin areas were smaller in the GOS, AOS, and NOS groups. Plasma IgG and IgM concentrations of mice in GOS or AOS group were significantly higher than those of control group. The lymphocyte proliferation competence in GOS and AOS

groups was higher for T cell proliferation. In the intestinal bacterial composition, the number of *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* increased significantly and *E. coli* decreased in the GOS and AOS groups, but there was not difference between NOS and control groups.

In conclusion, goat milk oligosaccharides have ameliorative effect on immunity and intestinal bacterial composition, which was similar to the effects of GOS.



肆、文獻檢討

益菌質 (prebiotics)

壹、益菌質的定義

益菌質定義為不具消化性的食物組成份，且可選擇性的刺激腸道中一種或數種益生菌的生長與活性，進而促進宿主健康。攝取益菌質可刺激定殖於特定腸道區域之菌群生長與增加代謝活性，顯著增加特定菌群而調整腸道菌相組成。

貳、益菌質的要件

符合對動物體有益的益菌質要件包含有(Fooks *et al.*, 1999)：

- (1) 在胃腸道的前半段不被分解或吸收。
- (2) 做為結腸內有益菌的選擇性受質，並可刺激其生長與代謝活性。
- (3) 能使腸道中的菌相組成形成對宿主健康較有益的狀態。
- (4) 能夠誘導產生對動物較有益的免疫系統反應。

所以，能夠被選擇性的利用與發酵是益菌質最主要的優點。因其僅能被某些特定菌株所利用，而其他的菌株則無法同樣的將其當成能量來源。故依此標準，有許多寡糖都是很好的益菌質。寡糖的特性計有(Macfarlane *et al.*, 1999; Sako *et al.*, 1999)：

- (1) 有數種寡糖其甜味與蔗糖相似，但甜度與熱量均較低，不會對人類的血糖與胰島素分泌造成影響，所以連糖尿病患者也都可食用。又，口腔中的細菌無法利用寡糖來產生酸性物質侵蝕牙齒，故不會引起蛀牙。
- (2) 某些寡糖在人體內能與膽鹽及膽酸結合，然後將其排出體外。所以攝取一

定量的寡醣會促進體內膽固醇在肝臟中產生膽酸，因而降低血中的膽固醇。

- (3) 攝取寡醣會增進動物對礦物質的吸收。
- (4) 寡醣能增進腸道內之益生菌群的生長。


目前的研究以證明諸如果寡醣(fructo-oligosaccharides)、異麥芽寡醣(isomalto-oligosaccharides)、異構乳糖(lactulose)、半乳寡醣(galacto-oligosaccharides)、木寡醣(xylo-oligosaccharides)與大豆寡醣(soybean-oligosaccharides)等均具有符合不被人體所消化吸收代謝，並可選擇性刺激益菌但不會促進 *Bacteroides* 等菌生長的特點而被歸屬為益菌質(Fooks *et al.*, 1999)。



寡醣的機能性

機能性寡醣(functional oligosaccharides)

隨著文明演進與生活水準提高，現代人飲食習慣已與過去大有改變。在平日攝取精緻飲食越來越多的同時，也因此的身體健康上造成越來越多負面的影響，許多像肥胖、高血壓、心血管疾病、骨質疏鬆、第二型糖尿病與數種消化道癌症等疾病均伴隨而生(Swennen *et al.*, 2006)。故要如何能在滿足飲食渴望卻又能夠保持身體正常生理功能就成為人們關心的議題，也使得近年來「機能性食品」或「健康食品」成為重要的研究項目。



今日食品工業上，不斷開發能改善及增進宿主動物身體健康的機能性食品或機能性食品元素是一種趨勢。對於機能性食品或機能性食品元素當前的定義為：在攝取後能夠產生正面提升宿主健康的影響或是下降宿主的慢性病發生率的物質(Ziemer and Gibson, 1998)。此研究初期，人們關注的對象是在提供維生素與礦物質方面；而現在，如何去運用像益生菌與益菌質等物質來對消化道微生物產生有益影響則成為主要方向(Gibson and McCartney, 1998; Ziemer and Gibson, 1998)。

不可消化性寡醣(non-digestible oligosaccharides, NDOs)是泛指不被人類唾液與其他消化液中所含酵素分解，但卻能夠被腸道中微生物代謝利用的醣類物質(Van Laere, 2000; Sako *et al.*, 1999)。大部份的不可消化性寡醣單體分子中包含有 3-10 個醣基單元(Voragen, 1998)，但也有像 lactulose 的雙醣類小分子物質與菊糖(inulin)等大分子物質被歸納在內(Conway, 2001)。在目前有許多不同方法能夠製造出對身體健康具機能性的 NDOs，而酵素產製法與由植物中萃煉得到則是現在主要的工業產製方式(Crittenden and Playne, 1996; Harris and Ferguson, 1999)。

機能性寡糖的對宿主產生的影響

由以往至今眾多對機能性寡糖所進行的研究中，雖然尚有些假設未能被完全證實，但也已經能夠從許多已知的實驗結果來確認機能性寡糖會對宿主健康能產生怎樣的影響，茲分述如下：

1. 減輕便秘

便秘是許多中、高年者會出現的困擾(Kaur and Gupta, 2002)。另外，在孕婦、減重者或日常生活作息紊亂等人(如長途旅行者)的身上也較易產生(Brandt, 2001)。已有研究指出若能適當的給予像果寡糖(fructooligosaccharides)等機能性寡糖後，就能因其會增加腸道中微生物生物質量、纖維性刺激結腸與能增加糞便保水性等性質來改善攝取者便秘的現象(Kaur and Gupta, 2002; Roberfroid, 1997)。

2. 增進礦物質吸收

研究發現在結腸中若有機能性寡糖加速微生物發酵因而產生較多量短鏈脂肪酸時，也會伴隨使得礦物質在其內的吸收與生物可利用率上升，尤其是對鈣與鎂。此外，對於停經的婦女或年長者，攝取機能性寡糖也會因此有防止骨質疏鬆和貧血的效用。而像半乳寡糖與 lactulose 等物有增進鈣吸收的效用，對更年期過後婦女及發育中的青少年更是重要(Teitelbaum and Walker, 2002)。

3. 降低腸癌發生率

已知的機能性寡糖像果寡糖與半乳寡糖在最近的研究發現能夠抑止結腸癌的

轉變進程。可能的原因為增進腸道中益生菌與微生物發酵過程所產生的短鏈脂肪酸，從而下降了病原菌外也使得結腸癌致癌先驅物的產生減少(Johnson, 2004)。

4. 調節免疫功能

在機能性寡糖如何對黏膜免疫系統產生調解的機制方面目前尚未瞭解清楚的機制，但有三種假說被提出。首先，有人認為因為機能性寡糖能增進乳酸菌屬的生長，也因此使得增生多量的乳酸菌其細胞壁或細胞間質較能穿透腸道上皮細胞，而使消化道相關的淋巴系統被激活(Manning and Gibson, 2004)；第二種假說則是以發酵產生的短鏈脂肪酸為主，認為此物具有能影響免疫系統調節與抗發炎等特性(Kelly-Quagliana *et al.*, 2003)；第三種假說著眼於較多丁酸(butyrate)的產生，推論因此物存在於腸道中能夠下降腸道上皮細胞對麩醯胺(glutamine)等物的需求，使較多的此類「免疫營養」物質能夠被分配到身體其他的免疫系統細胞來利用(Jenkins *et al.*, 1999)。

5. 調節脂肪代謝


有些初步的研究資料表示機能性寡糖會對血液中的膽固醇與脂肪含量產生使其下降的影響。對於解釋此一現象在當前有三種假設性的機制。第一個是因為葡萄糖與胰島素濃度的改變，研究發現攝取機能性寡糖會使在進食後的血糖值高峰降低，造成葡萄糖與胰島素不能夠引發脂質合成酵素(lipogenic enzymes)產生作用(Roberfroid, 2000)。

羊乳的機能性

羊乳是一種營養豐富的食物。在本草綱目上提到羊乳為：「甘溫無毒，補寒冷虛乏、潤心肺、治消渴、療虛勞、益精氣、補肺腎氣和小腸氣」。所以在一般的消費者觀念中，至今也仍有許多人相信羊乳有諸如滋肺、健胃、利腸、養顏美容等等的特殊養生功能。然而，真正有利用現今科學方式下去解析有關羊乳的研究報告卻很少。以下是收集至目前羊乳功能的相關研究報告。

羊乳的機能性成分

1. 寡醣(Oligosaccharides)



人乳中，寡醣是乳組成成分含量第三高者，僅少於乳糖和脂肪(Kunz and Rudloff, 2002)。每公升人乳中約含 12-13g，初乳甚至可達 22~24g。隨著研究方法和分析儀器的進步，現今在人乳中已有近百種的寡糖被分離鑑定出來(Boehm and Stahl, 2003; Nakamura and Urashima, 2004)。當前的研究顯示，初生兒腸道內有較多雙叉桿菌屬(*Bifidoabcterium* spp.)益菌存在，其原因就是與能經由母乳獲得較多乳寡糖有關。而以母乳餵哺的嬰兒，其腸胃道遭受細菌或病毒的感染率或感染後的發病病徵嚴重程度，均顯著少於哺餵一般牛乳改製之代食品者(Newburg, 1996)。故現已公認人乳中大量的機能性寡醣即為母乳相較於其他農場經濟動物所分泌乳汁優異的原因。

在山羊乳中也已分離出數種寡糖。每公升山羊乳中約含 2-3 g 的寡醣，雖然在含量上仍不如人乳，但約達人乳含量的 20%。相較於牛乳中每升僅約含 0.1-0.3 g 的寡醣有數十倍的差距(Mehra and Kelly, 2006)。此外，山羊乳中的酸性寡醣帶有唾

液酸(sialic acid, n-acetylneuraminic acid)基，其結構似於腸道上皮細胞細胞膜，能誘使病原菌與其結合防止腸道受感染。而山羊乳寡糖中的乙醯葡萄糖胺(n-acetylglucosamine)成分也可促進雙叉桿菌屬益菌的生長。

2. 乳鐵蛋白(lactoferrin)


人乳中乳鐵蛋白每公升約含有 2-4 g。山羊乳僅含 135 mg/L，但比牛乳的 100 mg/L 略高(Steijns and Hooijdonk, 2000)。乳鐵蛋白是一種分子量為 77 KD 的醣蛋白，其組成元素亦含有唾液酸。每個乳鐵蛋白分子的能與兩分子鐵結合(Moore *et al.*, 1997)。人乳的乳鐵蛋白一般只有 6~8%含鐵，其他則是用來清除多餘的鐵而使細菌無法利用鐵生長，並藉此達到抑菌作用。在分子結構上，乳鐵蛋白有一端為帶正電端，能與細菌的 lipopolysaccharide(LPS)等結合，因而抑制 LPS 的致發炎作用(Crouch *et al.*, 1992)。乳鐵蛋白的分子特性使它尚具有多項生理機能，像在免疫上能活化自然殺手細胞與抗腫瘤(Brock, 1995)；在血液中能降低自由基形成和抑制血小板凝集(Britigan *et al.*, 1994)；在消化道則可促進腸黏膜細胞增生等(Nichols *et al.*, 1987)。

3. 上皮細胞生長因子(epidermal growth factor, EGF)

在人乳中能夠偵測到促進細胞生長活性的上皮細胞生長因子(EGF)。山羊乳中亦有類似物，牛乳中則較缺乏(Brown and Blakeley, 1983)。雖然在山羊乳中所分離出的類 EGF 與人類有些許差異，但的確能夠刺激小鼠乳腺上皮(mouse mammary epithelial, MME)細胞生長，故仍視為 EGF 分子群(吳 and Elsasser, 1995)。EGF 是分子量為 6 KD 的小分子蛋白，對酸及胰蛋白酶具相當程度的安定性。此種安定的特性使其能夠有更多機會與消化道上皮細胞作用，並促進其生長。除了胃腸道外，

對 EGF 有反應的體系尚有心、肝、腎、眼、乳腺、神經、皮膚與免疫系統等(Carpenter, 1980)。幼兒的消化道上皮細胞層通常尚未形成完整障壁，使得一些大分子蛋白質容易透過屏障，進入血流而造成過敏現象產生。山羊乳中的類 EGF 即可促進細胞生長活性，加速形成細胞障壁。當消化道上皮細胞因食物磨損、刺激或本身老化等因素受傷時，就會容易受到微生物感染或引發食物過敏。若能攝取山羊乳，除類 EGF 能加速上皮細胞修補外，其他的山羊乳營養份也能可幫助組織儘速恢復正常功能(吳 and Elsasser, 1995)。

4. 血小板活化因子乙醯水解酵素(i-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, PAF-AH)



血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)是一種磷脂質，為發炎或過敏反應的中介物。它是由受活化的白血球釋放出來，大多是引發傷害性的反應(Prescott *et al.*, 1990)。PAF 的有效臨界濃度極低，一旦產生作用時會引起血液中血小板凝集而造成血栓，並增加氣管收縮因而引起呼吸困難、胃底收縮等身體反應出現(Kirsch *et al.*, 1992)。此外，PAF 也是已知最強的致胃潰瘍物質，並會誘發其他白血球的過敏作用，像與內毒素、TNF- α 等物一起造成初生兒壞死性腸炎(necrotizing enterocolitis, NEC) (Imaizumi *et al.*, 1995)。目前研究已知人類的嬰兒餵哺母乳可防止 NEC (Minekawa *et al.*, 2004)。羊乳與人乳中含有 PAF-AH，可將 PAF 分解成不引發傷害性反應活性的 lysoPAF (曹等，2002)。在 PAF-AH 活性上，人乳與山羊乳類似，但牛乳則非常低。

雖說各種動物的乳汁應該就是最適合該動物的營養需要，但因人乳的取得困難和市場需要大宗數量的情況下，替代母乳的食品至今仍是被熱烈研究的題目。相較於傳統以牛乳為基礎，內含有較高量寡糖、乳鐵蛋白、類 EGF 與 PAF-AH 這四種機能性成分物質的山羊乳應該會是值得更進一步研究的對象。

乳寡醣

乳寡醣的區別

哺乳動物所分泌的乳汁除了主要提供給幼獸成長所需外，隨著人類文明的演進，由被馴化的畜隻所獲得的乳汁更成為人們良好的營養食物來源之一。現在，大規模的飼養經濟性泌乳家畜更成為許多國家的重要產業，也是世界上經濟活動重要的一環。而乳類的營養價值除了我們以往所熟知的熱量、蛋白質與乳脂外，有許多的研究發現乳中所含的寡醣也是值得研究的營養成份。

1. 人、山羊與乳牛的乳寡醣

目前除了少數環境特殊的地區外，乳牛與山羊的乳汁是人類較易取得能供給大量食用的重要食物來源，同時也衍生出各種運用和加工方式。而替代人乳來哺育人類的嬰幼兒一直是牛羊乳很重要運用方式之一。然而，現今的研究發現，決定人乳優於牛羊等畜隻乳汁的重要關鍵因素就是在於人乳內含有較多量且品質較好的乳寡醣，是使人乳具有較強益菌質與抗感染物特性的主要原因(Kunz *et al.*, 2000)。

經許多研究發現，動物的物種、個體間差異與泌乳期時序都會影響哺乳動物乳汁中的乳寡醣含量多寡。另外，綜合這些研究也發現，在牛或羊乳裏所含的寡醣不論在量與質上都與人乳有相當大的差距(Mehra and Kelly, 2006)。

2. 乳寡醣的分類


研究者進一步分析乳中所含的寡醣後將其依化學性質來主要分為兩大類：中性(neutral)與酸性(acidic)乳寡醣。分類的依據為：(1) 中性乳寡醣：組成結構的醣苷單元中不帶有任何電荷價數者；(2) 酸性乳寡醣：醣苷單元中最少有一個或更多個

像唾液酸 (sialic acid) 這樣帶有負電價的單元基(Gopal and Gill, 2000)。且因為研究用儀器與分析方式的日益進步，現今自人類與各經濟性畜隻的初乳或一般乳中已分離檢驗出近 200 種不同的中性與酸性乳寡糖，並且也清楚它們的化學結構(Boehm and Stahl, 2003; Nakamura and Urashima, 2004)。比如像人乳中的佔主要成份但在家畜乳汁中卻幾乎沒有的乳寡糖 fucosylated oligosaccharides(Finke, 2000)，各種動物也都擁有各自的獨特寡糖或組成單元基。而當前更深入的研究趨勢就是去瞭解各個寡糖或組成單元在動物體內會產生何種作用。



半乳寡糖(galacto-oligosaccharides)

半乳寡糖是乳糖經過 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)行半乳糖化作用(transgalactosylation)後所產生之寡糖(Aronson, 1952; Prenosil *et al.*, 1987; Yanahira *et al.*, 1995), 因而又可稱為反式半乳寡糖(trans-galacto-oligosaccharides)。半乳寡糖的結構一般為(galactose)_n- galactose-glucose, 其內鍵結的方式則會因不同來源的 β -半乳糖苷酶而產生差異。像來自*Aspergillus oryzae*與*Streptococcus thermophilus*之 β -半乳糖苷酶所生成的半乳寡糖其半乳糖苷鍵結就是以 β 1-6 鍵結為主(Matsumoto, 1990), 但來自*Bacillus circulans*與*Cryptococcus laurentii*的 β -半乳糖苷酶所合成的半乳寡糖, 其中的半乳糖間鍵結則是以 β 1-4 鍵結為主(Mozaffar *et al.*, 1984; Ozawa *et al.*, 1989)。



目前工業化生產半乳寡糖的做法, 多是先由乳清中純化出高濃度乳糖(lactose)來做基質, 而主要獲得的半乳寡糖產品則是以三糖為主(Matsumoto, 1990; Ishikawa *et al.*, 1995)。現市售之食用半乳寡糖產品大多為其內含有不同糖類混合的混合物質, 在嬰兒配方乳方面主要是模擬人類母乳中的乳寡糖功效; 在成人方面, 美、日等國的市售食用半乳寡糖產品中大多均含 55% 以上的半乳寡糖、20% 乳糖、20% 葡萄糖及少量半乳糖, 包裝方式則以液態與粉末兩種型式為主(Sako *et al.*, 1999)。另外, 在熱量方面, 半乳寡糖、果寡糖等較常見的寡糖其熱量約為 1.0 到 2.0 kcal/g(Cummings *et al.*, 1997; Roberfroid *et al.*, 1993), 僅有蔗糖的 30% 至 50%。半乳寡糖的另一優點為結構穩定, 有報告指出在室溫下半乳寡糖可以長期保存於酸性環境中, 其穩定性比果寡糖更佳(Voragen, 1998)。

在一般消化生理方面, 已有研究證實諸如人類唾液的 α -澱粉酶(α -amylase)、老鼠腸液、豬胰液與人工胃液等物均難消化分解半乳寡糖(Ohtsuka *et al.*, 1990);

Watanuki *et al.*,1996)。主因為上述之哺乳動物消化液及近似物中的酵素大多針對 α 形式的糖苷鍵結，對 β 形式構型較無法產生作用。

近來消費者對聲稱具有低卡路里與低甜度等優點的寡糖類機能性食品日益重視，需求亦顯著提升。直到目前，寡糖主要仍是以當作食品添加物為主(Sako *et al.*,1999)，但市面上也已有像台糖果寡糖等標榜其為健康食品而單獨販賣的產品出現。再加上半乳寡糖能在高溫與酸性環境中仍保持相當好的穩定性，故更是漸漸被廣泛地應用在各式食品加工上。目前半乳寡糖主要的應用範疇則是在製造發酵乳製品，這是因為有數種已知對人體健康有益的益生菌(probiotics)如雙叉桿菌等，已確知會因為半乳寡糖的存在而促進其在腸道中的定殖與生長(Ito *et al.*,1993；Tanaka *et al.*,1983)。因此，日、歐等地已有許多種類的發酵乳製品會在其內添加半乳寡糖。



對健康的影響

1.改善腸道菌相

很多的研究指出，有數種腸道菌如 *Bifidobacterium*、*Bacteroides* 與 *Lactobacillus* 等能夠消化代謝半乳寡糖(Ishikawa *et al.*,1995；Ohtsuka *et al.*,1989；Tanaka *et al.*,1983)。而這些菌種中又以雙叉桿菌因為能產生較多種類的聚糖分解酵素來分解不同類型的糖苷鍵結，並且酵素活性亦比其他腸內菌如 *Escherichia coli*、*Lactobacillus* 及 *Streptococcus* 等為佳，故雙叉桿菌較其他腸內菌更能有效分解半乳寡糖(Tochikura *et al.*,1986)。

在人類母乳的寡糖中，半乳寡糖亦為組成成份之一。有實驗證實除了攝取母乳的嬰兒較喝配方乳者腸道中會擁有較多雙叉桿菌外(Yamashita and Kobata,

1974)，若在嬰兒配方乳中添加此類寡糖，也會產生促進嬰兒腸道內雙叉桿菌的生長並抑制其它病原菌增生的效果(Fanaro *et al.*, 2005)。同樣的在成人身上，也有許多研究結果顯示出若每日攝取半乳寡糖，對腸道中雙叉桿菌的增加及優勢化均有幫助(Beerens *et al.*, 1980；Bouhnik *et al.*, 1997；Stark and Lee, 1982；Tamai *et al.*, 1992；Welsh and May, 1979)。

2. 預防便秘

至今也有相當多的研究證實在攝取足量半乳寡糖後，能產生預防便秘的功效(Ito *et al.* 1990；Narimiya *et al.* 1996；Shimoyama *et al.* 1984)。以 1998 年 Teuri and Korpela 對 14 位平均年齡 79.6 歲並患有便秘的女性當做自願受試者的研究結果指出，每日攝取 9 克半乳寡糖的膳食兩週後，相較於控制組受試組的排便次數有明顯增加(Teuri and Korpela, 1998)。

而攝取半乳寡糖可改善便秘的原因，據至目前研究推論為在於增加了腸道內如乳酸(lactic acid)及琥珀酸(succinic acid)等短鏈有機酸，因此提高了腸道內的滲透壓而促進排便(Ishikawa *et al.*, 1995；Kikuchi *et al.*, 1997)。

3. 預防結腸癌

在目前已知能用來判斷結腸癌發生與否的重要因子中包含有糞便中的 pH 值、*p*-甲苯酚、吲哚(indole)與氨等物的含量或濃度。有研究指出由細菌所產生的酵素如 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)、 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase)和硝基還原酶(nitroreductase)等，會把導致結腸癌發生的誘癌物質先驅物(procarcinogen)轉成確能引發結腸癌的因子(carcinogen)(Rowland, 1988)。有很多實驗都已證實攝取半乳寡糖會有助於預防結腸癌的發生。在以小鼠為對象的動物實驗上，餵飼半乳寡糖或搭配添加 *B. breve* 四週後可觀察到乳酸桿菌與雙叉桿菌的數目顯著上升與 β -葡萄

糖醛酸酶、硝基還原酶等活性的下降(Rowland and Tanaka, 1993)。在數個以成年人為對象的實驗中，結果也顯示若受試者每日攝取 10 克到 15 克的半乳寡糖，其糞便中醋酸含量會明顯增加而使糞便 pH 值下降，並因此使 β -葡萄糖醛酸酶的活性降低(Ishikawa *et al.*, 1995；Ito *et al.*, 1993；van Dokkum *et al.*, 1999)。

4.增加腸道礦物質吸收

在以卵巢切除的老鼠做為研究對象的試驗中，發現在餵予半乳寡糖 20 天後，能夠增加其對鈣質的吸收並抑制骨質流失(Chonan *et al.*, 1995)。其原因應為半乳寡糖促進了老鼠腸內雙叉桿菌的生長，造成較多量短鏈脂肪酸與有機酸產生，使腸道的 pH 值下降而提高了鈣的溶解度，也因此使鈣的吸收上升。

5.降低腸道中氨含量

動物體內氨的來源之一為未被吸收的胺基酸再被腸道菌分解而來。主要會行此機制產生氨與吲哚的腸道菌屬為 *Bacteroides* 與 *Enterobacteriaceae* 兩者(Vince and Burrige, 1980)。在動物實驗上，飼予半乳寡糖的老鼠腸道內的胺基酸代謝衍生物如苯酚(phenol)的產生會有效的被抑制(Kawakami *et al.*, 2005)。以人類為對象的實驗中則發現每日攝取 10 g 的半乳寡糖三週，會因增進腸道中雙叉桿菌的增長而抑制 *Bacteroides* 與 *Enterobacteriaceae* 的繁殖，使受試者糞便中氨含量顯著下降(Tanaka *et al.*, 1983)。更有後續研究顯示除了氨含量外，像苯酚(phenol)、*p*-甲苯酚(*p*-cresol)與吲哚等胺基酸代謝衍生物也會降低(Tamai *et al.*, 1992)。

益生菌 (probiotics)

壹、益生菌定義

益生菌詞源起於希臘文的「生命 (for life)」之意。在近代研究上，此概念是在 1907 年由 Metchnikoff 所提出，而「益生菌(probiotics)」一字是於 1965 年的 Lilly 和 Stillwell 的研究發表中被首次使用，當時是意指：由微生物所分泌可促進其他微生物生長之物。主要是用來和抗生素(antibiotic)做區隔。其後人們對其定義仍有不同意見。直至 1992 年 Havenaar 等人為益生菌所下的定義為：「單一或多種活的微生物，可改善宿主腸內微生物組成相的特質，並對宿主健康有正面的效應」(Fooks and Gibson, 2002; Schrezenmeir and Vrese, 2001)才成為現今被較多人普遍認可的共識。聯合國農糧組織與聯合國世界衛生組織(FAO/WHO)於 2001 年也針對益生菌公布其所允許認可的條件：(1)需為活菌；(2)是經攝食由外界所得到，非腸胃原生菌；(3)需提供明確的保健功效證明。

雖說來自各方面對於益生菌的定義仍有些許分歧，但在 1999 年 Collins 和 Gibson 認為現今要能被命名為益生菌者，應要符合以下的要求：(1)對宿主有健康利益；(2)為大量並具活性的活菌；(3)不帶有毒性或致病性；(4)能夠存活在腸道中而且要仍具有代謝作用力；(5)經儲存後欲再使用時，要能維持相當好的活菌狀態；(6)在味覺和嗅覺上令攝取者有好感(good sensory properties)；(7)於宿主體內應可再被純化出相同菌種(Collins and Gibson, 1999)。

貳、益生菌種類

現今被研究認為具有益生菌性質的菌種非常多，並仍不斷有新的菌種被發現。但在已被用來商業化生產的益生菌種來說，主要能分為四類：(1)乳酸桿菌類、

(2)雙叉桿菌類、(3)其它乳酸菌類與(4)非乳酸菌類(Holzapel *et al.*, 1998)。

四類當中較重要且為人所熟知、應用較廣的就是乳酸桿菌類與雙叉桿菌類(Fooks and Gibson, 2002)，亦為本試驗檢測對象。

1. 乳酸桿菌屬(*Lactobacillus* spp.)：

為革蘭式陽性菌，兼性厭氧、不產芽孢。對觸酶反應與細胞色素酶呈陰性，不能還原硝酸鹽類物質。可代謝蛋白質與碳水化合物，並在代謝過程中產生大量的乳酸與其他如二乙醯和乙醛等具有風味的物質。又，乳酸桿菌能藉著產生像細菌素(bacteriocin)物質來抑制微生物生長或產生黏液素(mucin)去阻礙病原的黏附(Forestier *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 1999)。不同乳酸菌所產生的細菌素在特性和效力上可能會有不同，目前大致分為四類：(1)lantibiotics；(2)小分子的疏水性熱穩定肽；(3)大分子的熱不穩定蛋白質與(4)複合型 bacteriocin，本物可能是由蛋白質與脂質或碳水化合物結合而成(Fooks and Gibson, 2002)。

2. 雙叉桿菌屬(*Bifidobacterium* spp.)：

雙叉桿菌亦為革蘭式陽性菌。厭氧、不耐酸、無運動力且不形成芽孢。是具有多種形狀的桿菌。在許多哺乳動物新生兒時期的腸道中為初始最佔優勢的菌種(Kawase *et al.*, 1981)，但很快會隨著年齡的增長而逐漸減少。雙叉桿菌對體內生理效用有抑制病原菌，促進腸道菌群穩定 (Silva *et al.*, 1987)；合成維生素(Rasic and Kurmann, 1983)；維持腸道的完整性 (Salminen *et al.*, 1996)；抑制腫瘤與減少致癌物產生 (Hasen, 1985) 以及活化免疫系統 (Isolauri *et al.*, 2001) 等。本菌的減少也相對的代表腸道中其他常駐菌或害菌的增加。

參、益生菌在腸道的健康效應

益生菌對腸道的健康效應可歸為以下幾項：

1. 改善乳糖不耐症

在有些人或動物身上，除了肇因於腸道發炎而導致腸黏膜受損，影響了原有的消化吸收功能的因素外，主要是因為本身小腸黏膜的乳糖分解酶(β -galactosidase)不足，使其在攝取像乳製品等富含乳糖的飲食後會出現腹脹、腹痙攣、嘔吐或腹瀉等現象，此即為乳糖不耐症。因人種而異，乳糖不耐症的出現率在東方人上又較西方人為高(Vrese *et al.*, 2001)。乳酸桿菌屬、雙叉桿菌屬與鏈球菌屬均能在腸道細胞壁上幫助產生乳糖分解酶，這其中又以鏈球菌屬所產生的分解酶活性最高(Sanders *et al.*, 1996)。除了幫助產生乳糖分解酶外，也有研究發現益生菌尚能延緩胃的排空時間，使得乳糖分解酶有更多的時間去代謝乳糖(Vrese *et al.*, 2001)。故攝取益生菌會有效地減低宿主的乳糖不耐症表現。

2. 降低結腸與大腸癌發生率

很多的流行病學證據表示，正常的腸道菌相會影響一些如 β -葡萄糖醛酸糖酶(β -glucuronidase, GUS)、硝基還原酶(nitroreductase)與偶氮還原酶(azoreductase)的產生，從而抑制腫瘤細胞的生成速率(Gorbach, 1990)。另有研究結果表示發酵乳也能減少大腸癌的發生，研究者將其原因歸因於是益生菌在發酵過程中所產生的短鏈脂肪酸或是膽鹽等二級產物均會使得產生致癌酶的壞菌數目降低，並因此減少腸癌的發生(Kasper, 1998)。

3. 增加腸道的抗感染能力

諸如葡萄球菌或大腸桿菌等致病菌的突然增加，會導致許多腸道感染性疾病

的發生。而在腸道中若能保持一個益生菌佔優勢的局面，因其於代謝過程會產生一些短鏈脂肪酸使腸道維持在酸性環境，或藉由製造細菌素等物及競爭附著位置與營養等作用機制，來達到抑制致病菌生長的目的(Rolfe, 2000; Goldin, 1998)。故至今的臨床應用研究上，也已證實若讓某些腸道疾病患者攝取益生菌，可治療如腹瀉、腸道過敏與腸道感染等症狀(Furrie *et al.*, 2005; Rolfe, 2000)，進而協助患者儘早恢復健康。

4. 幫助維生素合成與碳水化合物的吸收

存在於腸道內的益生菌能夠合成維生素K(vitamin K)和大多數的維生素B群(B vitamins)。其中又以雙叉桿菌屬在幫助合成維生素B₂和B₆上的作用最為顯著(Ginsberg *et al.*, 2000; Gorbach, 1990)。故腸道中有較多益生菌存在時，宿主也不容易出現因缺乏維生素K和維生素B群所造成的病症。而在幫助碳水化合物吸收方面，因所有碳水化合物均是仰賴腸道黏膜層上的許多酵素如蔗糖-異麥芽糖酶(sucrase-isomaltase complex, SI complex)先將其水解成為單糖後再通過腸道黏膜將其吸收。但蔗糖-異麥芽糖酶卻是人類常缺乏的雙糖酶，當此酵素不足時，就會造成腸內的蔗糖消化不良進而使腸內其他細菌因此過度發酵產生氫氣堆積，導致動物體出現腹脹氣與腹瀉等症狀。有臨床研究使用酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)來治療八位腸內缺乏蔗糖-異麥芽糖酶的孩童，證實其可促進腸道中氫離子的排除，並改善這些孩童的症狀(Rolfe, 2000)。

5. 促進消化道的免疫作用

當抗原經口進入身體，消化道中的黏膜相關淋巴細胞即釋出細胞激素來刺激系統性與黏膜性免疫的活化(Perdigon *et al.*, 1995)。益生菌對宿主的影響即依此原

理。以乳酸桿菌來說，所引發的免疫反應主要也是賴於其細胞壁所造成刺激巨噬細胞的活化(Tannock, 1997)。因乳酸桿菌屬於格蘭氏陽性菌，細胞壁主要成份是肽聚糖，被分解後產生的胞壁肽(muramyl peptide)在被身體吸收後能引發上述反應(Hoijer *et al.*, 1995)。雙叉桿菌能提升的免疫作用更多，包括淋巴、巨噬細胞的活化與抗體的產生(So *et al.*, 1999)。已發表的研究報告中，用乳酸桿菌發酵乳餵飼小鼠後能觀察到腹膜巨噬細胞與腸道黏膜淋巴組織 B 細胞數量增加(Chantal *et al.*, 2001)。更進一步以人為研究對象，結果也顯示將乳酸桿菌添加於低脂牛乳後持續飲用三週，受試者的周邊血液多形核細胞與單核球的活性都會提升。



免疫系統

壹、先天性免疫(innate immunity)

先天性免疫一般又稱為非特異性免疫，主要可分為結構性、生理性、吞噬性與發炎性等四種屏蔽，它為動物提供了免疫的第一道防線，茲分述如下(Roitt 1984; Roitt *et al.*, 1993; Kuby, 1994)：

1. 結構性屏蔽(anatomic barriers)

結構性屏蔽為一般動物身體抵抗舉凡外源性病毒、細菌或寄生蟲等病原的初級防線。包涵了皮膚、呼吸道與消化道黏膜等部位均屬之。在皮膚方面，完整的皮膚除了可提供物理性上的入侵抵禦外，皮下皮脂腺所分泌含有脂肪酸與乳酸的皮脂，也會使皮膚保持在一個較低酸鹼值的狀態，從而能夠抑制許多細菌的孳生。

而呼吸道與消化道黏膜等部位在正常狀態下均會分泌黏液，因而可黏附捕抓外來的微小有機物質，並且再藉由這些部位上的纖毛組織的同步運動而排除掉在腔道內被黏液包裹住的微細外源性異物。

2. 生理性屏蔽(physiologic barriers)

動物體的生理性屏蔽包括了體溫、溶菌酶(lysozyme)和體內特定酸鹼值等等。很多動物體在保持其正常體溫狀態下即可抑制一些病原的生長，進而免除某些疾病的感染。而溶菌酶則會藉由溶解細菌細胞壁的方式來阻礙細菌在動物體內的增生，防止體組織受到無法控制的感染。體內特定酸鹼值的例子像胃酸，藉由其創造的低 pH 值環境來抑制大部份的微生物生長。

3. 吞噬性屏蔽(phagocytic barriers)

吞噬性屏蔽可分為胞飲作用(pinocytosis)與吞噬作用(phagocytosis)兩種類型的免疫反應。一般不具有特殊功能的體細胞，在其細胞膜上產生凹陷後再將微細物質分子攝入的方式即為胞飲作用。而像血液中單核球細胞、嗜中性球細胞與組織巨噬細胞等具特定功能的免疫細胞，在其表面接觸高分子物質或異物時，會伸出突觸將其包圍後攝進細胞內的行為則稱做吞噬作用。胞飲作用與吞噬作用兩者亦可合稱為細胞攝粒作用(endocytosis)。

4. 發炎性屏蔽(inflammatory barriers)

當身體組織受傷或是遭到感染時大多會伴隨產生發炎反應(inflammatory responses)的現象。此現象是肇因於當組織遭感染或受傷時，會引發血管擴張、通透性增加，且促使體液和吞噬細胞等經微血管進入組織中，而讓組織出現腫脹的狀況。吞噬細胞會在發炎區域累積，進行吞噬和分泌溶菌酶等動作。在此同時，鄰近的正常細胞大多也會受到傷害的影響。死亡的吞噬與組織細胞、遭溶菌酶分解後的產物和體液等混合便形成膿。在發炎反應結束後，待病原與壞死細胞均被清除，細胞即可進行再生，並使體組織行修補動作。

貳、適應性免疫系統(adaptive immune system)

適應性免疫反應亦稱做特異性免疫反應。它是泛指動物體在被不同的外源性物質刺激後，會因而產生相應的適應性免疫作用。此種免疫具可辨識並有選擇性消滅外來物的性質，且有抗原特異性(specificity)、多樣性(diversity)、記憶性(memory)與自我/非自我辨識能力(self/non-self recognition)等特點。適應性免疫與前述先天性免疫有很大的關聯，活化專一性免疫反應和噬菌細胞的非專一性免疫反應也息息相關，在動物體內要此兩者彼此配合才能保障該生物體具有完善的免疫防禦機制。適應性免疫一般可被分為細胞免疫(cell-mediated immune)與體液免疫(humoral

immune)兩類型(Roitt 1984; Roitt *et al.*,1993; Kuby, 1994)。

與適應性免疫反應相關的細胞包含有淋巴球與抗原呈現細胞(anti-presenting cell, APC)兩種。淋巴球又分為T淋巴球與B淋巴球。T淋巴球於胸腺中成熟，可分為毒殺型CD8⁺T細胞(T cytotoxic cell, Tc cell)與輔助型CD4⁺T細胞(T helper cell, Th cell)。毒殺型T細胞是針對被病毒感染或自體變異的細胞以及其他的外源性物質進行毒殺作用。而輔助型T細胞則又被分為Th1 與Th2 兩種亞型，其主要功能在於分泌細胞激素來參與細胞及體液免疫反應。B淋巴球於骨髓中成熟，在其表面會呈現許多抗原接受體。一般而言成熟的B淋巴球在動物體內僅存活數天，但若遇到抗原的刺激時則會使B細胞進行分化並產生分裂，進一步形成漿細胞(plasma cell)、記憶性B細胞(memory B cell)或功能性B細胞(effector B cell)。漿細胞的主要功用在能製造抗體，這些被製出的抗體就是體液免疫作用的主要分子；當B細胞分化成記憶性B細胞後它的生命週期變得相當長，可存在生物體內數年甚至數十年。抗原呈現細胞則包括B細胞、巨噬細胞與樹突狀細胞(dendritic cells)，而三者中最具效力者為樹突狀細胞。抗原呈現細胞多利用吞噬作用把抗原攝入，經溶菌酶等物作用分解成小分子肽後，呈現於細胞膜表面的 class II MHC複合分子上，再經由Th細胞辨識後，產生細胞激素來調節細胞免疫和體液免疫反應。

參、免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)

存在於B細胞膜上的抗原結合蛋白即為免疫球蛋白，通稱為抗體(antibody)。在抗原進入生物體內並經抗原呈現細胞來啟動一連串的活化T細胞與B細胞作用後，最後就會使得某些B細胞分化成漿細胞來產生免疫球蛋白。這些被分泌出來的免疫球蛋白會在動物體內的循環系統中隨體液週轉運行，並成為體液免疫的重要作用來源與調節者。免疫球蛋白是利用抗原與抗體之間的專一性結合性質來除

去外來抗原。另外，依現今的研究，將免疫球蛋白主要分為 IgG、IgM、IgA、IgE 與 IgD 五類型(壽，1979; Roitt *et al.*, 1993; Kuby, 1994)。

1. 免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)

IgG是存在於血清中最大量的免疫球蛋白，約佔全部免疫球蛋白的 80%。IgG 有四種亞型，主要是依據 γ 重鏈序列的不同而區分為IgG₁、IgG₂、IgG₃與IgG₄。其中IgG₁、IgG₃與IgG₄可穿過胎盤至胎兒體內，是新生兒最早擁有的抗體，也因此在胎兒的發育保護佔了重要位置。又，IgG₁、IgG₂與IgG₃可以活化補體系統，且四種亞型的IgG都會與巨噬細胞的F_c受體結合，而傳導調理作用。四種IgG的特性和功能都不同。在正常成人血清中，70%的IgG是IgG₁，IgG₂佔 20%，IgG₃和IgG₄則分別佔 6%和 4%。不過此比例在個體遭受感染或出現發炎等病理狀態下則會有所不同。

2. 免疫球蛋白 M(immunoglobulin M, IgM)

IgM 是對抗原的初級反應所產生的第一種免疫球蛋白，也是胎兒第一個會自體製造的免疫球蛋白。其佔所有血清免疫球蛋白的 5-10%。IgM 是經由漿細胞以五聚體(pentamer)分泌，在其結構上有 10 個抗原結合處，這也因而讓 IgM 較血清中其他的免疫球蛋白擁有較高的有效力價。舉例來說，當 IgM 與病毒粒子或紅血球等多維形狀物質結合時，結合效力會比 IgG 高出 100-1000 倍。但是因為 IgM 分子較大，故滲透性較差，也因而其在細胞組織液中的濃度較低。

3. 免疫球蛋白 A(immunoglobulin A, IgA)

IgA 佔所有血清免疫球蛋白的比例為 10-15%，其主要存在於動物的各種體分泌液(乳汁、淚液或唾液等等)之中及呼吸道、消化道與生殖泌尿道的黏膜上。IgA 通常以單體型態存在，但研究發現也有二聚體(dimer)、三聚體(trimer)甚或四聚體

(tetramer)的形式。IgA 的分泌是經由黏膜內皮細胞的受器—轉介內噬作用 (receptor-mediated endocytosis)來進行，其對支氣管黏膜細胞的防禦功能影響非常大，因為它可以和病毒及細菌的表面抗原結構，藉此避免病原附著在黏膜細胞上。此外，動物的初乳中所含有 IgA 對新生兒出生後數週到數月的健康亦有重要影響。

4. 免疫球蛋白 E(immunoglobulin E, IgE)

在五種類的血清免疫球蛋白中 IgE 是含量最少的一種，其濃度約為 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 。但其存在及功能性卻相當重要，因與多數的過敏反應有關。IgE可與嗜鹼性球(basophils)及肥大細胞(mast cell)兩者的表面Fc受體結合，經此結合後的IgE若再和抗原(過敏原，allergen)交叉連結，將致使嗜鹼性球與肥大細胞產生去顆粒作用 (degranulation)，釋出大量化學媒介物，因而引發過度免疫反應，造成過敏現象出現。但在正常狀態下，IgE所誘發的局部肥大細胞去顆粒作用所釋出的化學媒介物也會造成不同細胞聚集，而此作用對動物體對抗外來寄生蟲的防禦上扮演重要角色。

5. 免疫球蛋白 D(immunoglobulin D, IgD)

IgD 在血清免疫球蛋白中含量約為 30 $\mu\text{g/ml}$ ，至今的研究尚未清楚其詳細的生理與免疫功能。但已知 IgD 與 IgM 是 B 細胞表面最多的膜連結免疫球蛋白，故一般推測 IgD 或與 B 細胞分化至漿細胞的流程有關。

肆、吞噬細胞

與發炎反應有關的免疫細胞大多具有吞噬活性，而此種類的細胞也因此被稱為發炎細胞(inflammatory cell)，主要包括了顆粒細胞與巨噬細胞。此類細胞平時大多處於休止狀態，而要激活其啟動吞噬作用的途徑為以下二種：一是當細菌入侵

時，其細胞壁上脂多醣成份會經抗原呈現細胞作用而活化輔助型 T 細胞，並產生細胞激素因而刺激吞噬細胞進行吞噬作用；二是當細菌等抗原被調理素包裹後，會很快地與吞噬細胞細胞膜上的接受器結合，促使吞噬作用發生(Roitt *et al.*, 1993; Kuby, 1994)。顆粒細胞依其細胞質染色特性和細胞型態可分為：嗜伊紅細胞(eosinophils)、嗜中性白血球(neutrophils)與嗜鹼性球(basophils)三者，其中的嗜伊紅細胞和嗜中性白血球具吞噬性。在體內血液循環的白血球中，嗜中性白血球佔 50-70%，嗜伊紅細胞僅佔 1-3%。另外，嗜中性白血球也是在發炎反應中最早到達感染部位的淋巴細胞。嗜中性白血球由骨髓生成，一般會在體內血液循環約 7-10 個小時；當有組織受到感染時，轉移到受感染部位後會有將近 3 天的壽命。其作用的機制是當與外來物接觸時，利用細胞膜上的接受器辨認出外來物後再將其吞噬，且以產生如白三烯素(leukotrienes)、prostaglandins 等含氧物質或超氧化物(superoxides)、過氧化氫(hydrogen peroxide)等物來消滅外來異物(Novak *et al.*, 2001)。



伍、自然殺手細胞

自然殺手細胞亦來自骨髓，但是它們是一群無法表現 T 或 B 細胞的胞膜分子與抗原接合受器，缺乏免疫專一性和記憶性的細胞，統稱為 null cells，被歸類在不屬於 T 或 B 細胞的第三類細胞。在免疫反應作用中，本類細胞與非特異性免疫有關。自然殺手細胞佔人體周邊血液淋巴球的 5-10%，是一種不具吞噬能力而內含顆粒的大顆粒淋巴細胞(large granular lymphocytes, LGLs)。主要作用是對受病毒感染或已癌變的細胞進行毒殺。其作用機制雖與毒殺型 T 細胞相仿，但因自然殺手細胞不具有 T 細胞接受器，故無法辨識抗原。但自然殺手細胞會辨識病毒感染細胞與癌變或腫瘤細胞的表面醣蛋白分子。其作用的機制是當與目標細胞接觸後，將會釋出穿孔素顆粒到標的上藉以產生破壞作用，引發目標細胞的細胞凋亡

(apoptosis) (Roitt *et al.*,1993)。

陸、細胞激素

細胞激素是動物體內免疫細胞與其相關細胞經誘導性刺激反應而分泌出來的物質，主要是由巨噬細胞與輔助型T細胞所產生。本物大多為一群小分子量的蛋白質，在特定區域產生調節作用。細胞激素的功能一般而言是當做細胞間的訊息傳遞物，當其與目標細胞的專一性接受器結合後，會引發特殊生物活性。由巨噬細胞所分泌的細胞激素主要有IL-1、IL-6、TNF- α ，因為這三種物質已知是在發炎反應中導致紅、腫、熱、痛的作用物，故亦被稱做促發炎細胞激素(Umetsu *et al.*,2003)。而輔助型T細胞產生的細胞激素在Th1 與Th2 兩種亞型上是有差異的。Th1 細胞主要分泌IL-2 與TNF- γ ；目前已知IL-2 是刺激T細胞增生的主要因子，而TNF- γ 的作用則是活化毒殺型T細胞、巨噬細胞與自然殺手細胞，且抑制Th2 細胞作用、抑制B細胞分化；另外，IL-2 與TNF- γ 會促使B細胞產生IgG_{2a}，並抑制IgG₁與IgE的產生。Th2 細胞主要分泌IL-4、IL-5 與IL-10 等細胞激素，作用為：IL-4 會促使T細胞活化並分化成Th2 細胞，並刺激B細胞活化，誘導血液中的抗體轉變為IgG₁與IgE，促使肥大細胞成長，抑制巨噬細胞的活化和Th1 細胞的增生(Guidos *et al.*,1987)。

伍、材料與方法

(一) 試驗設計

試驗目的：

小鼠的日常飲食中添加(1)山羊乳寡糖；(2)半乳寡糖後對其腸道菌相組成及免疫能力的影響。

試驗設計：

採完全隨機設計(CRD)方式進行。

試驗地點：

國立台灣大學動物科學技術學系



試驗動物：

總共使用 40 隻四週齡大的雄性 BALB/c 小鼠，隨機分成四處理組，每組 10 隻小鼠。

試驗分組：

本試驗組分四個處理組，分別為：(1)對照組；(2)半乳寡糖組；(3)酸性山羊乳寡糖組與(4)中性山羊乳寡糖組。除對照組僅管餵予清水外，每組每日分別以管餵方式給予約 500 mg/kg 體重的半乳寡糖、酸性山羊乳寡糖與中性山羊乳寡糖。本試

驗用量主要參考 Daddaoua *et al.* (2006)使用之劑量。

寡醣：

本試驗使用之寡醣來源有二：(1)半乳寡醣(galactooligosaccharides，環泰企業股份有限公司，台灣)；(2) 酸性山羊乳寡醣與中性山羊乳寡醣，於實驗室利用 FPLC 分離取得。

試驗程序：

40 隻四週齡小鼠購入後先經三日之適應期飼養，再開始對其進行每日管餵動作。待餵飼四週後，所有小鼠均進行遲發性過敏反應 (delayed-type hypersensitivity) 檢測。而後，進行特異性免疫反應測試，利用腹腔注射卵白蛋白及佛氏完全佐劑 (Complete Freund's Adjuvant) 致敏，再於兩週後每週以佛氏不完全佐劑 (Incomplete Freund's adjuvant, IFA) 行追加致敏並採集血液樣本，藉此追蹤觀察小鼠血漿中免疫球蛋白 IgG 及 IgM 的濃度變化。

飼養滿八週後，小鼠先再次採集血液樣本來測試其特異性免疫反應與進行血液血球計數分析。接著使用灌注二氧化碳安樂死的方法犧牲所有小鼠，解剖取得腸道與脾臟。在腸道方面進行腸道菌數的試驗，分別取以下的部位：(1)結腸絨毛；(2)結腸內容物；(3)盲腸絨毛及(4)盲腸內容物後，再加上(5)糞便來檢測此五個位置的菌數。受檢測的菌種為(1)*Bifidobacterium* spp.；(2)*Lactobacillus* spp.；(3)*Clostridium perfringens* 與(4) *Escherichia coli* 四種。而小鼠的脾臟是於取得後進行淋巴細胞增生能力的測試。

樣品收集：

1. 血液樣品：

均以頰靜脈採血方式取得小鼠血液。每次採集血量約為 0.5-1.0 毫升，用以進行血液血球計數分析與檢測小鼠血漿中免疫球蛋白 IgG 及 IgM 的濃度。

2. 腸道組織與內容物：

用外科手術方式將已犧牲之小鼠剖腹，取得其腸道。之後以無菌器具刮取定量欲採集的各部位腸內膜組織，並移入準備好內含緩衝液的系列稀釋瓶中，進行後續的系列稀釋程序與細菌培養試驗。

3. 脾臟樣品：

在以外科手術方式將小鼠剖腹同時取得其脾臟，移置含 RPMI-1640 培養基內打散並進行離心，收集細胞層，以進行脾臟淋巴細胞增生能力的測試。



4. 測定項目與分析方法：

(1) 血液血球計數分析

使用scil Vet abc動物專用血球分析儀(scil animal care company, German)進行分析。

(2) 遲發型過敏反應(delayed-type hypersensitivity)

藉由注射卵白蛋白致敏劑(DNP-OA)於受試小鼠足蹠內，觀察其於 24 小時後因產生遲發型過敏反應所導致的足蹠腫脹程度來做為評估指標。詳細步驟參考 Shishikura *et al.* (2006)的方法進行。

(3) 血漿 IgG 及 IgM 濃度測定

利用酵素連結免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)測定，詳細步驟參考 Tsai 與 Yu 之方法來進行(Tsai and Yu, 1997)。

(4) 脾臟淋巴細胞增生能力測定

將收集到的細胞調整濃度為 1×10^6 cells/mL，再使用 ConA 及 LPS 進行刺激，並以 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 法測定其增生指數(proliferation index, PI)。詳細步驟參考 Hansen *et al.* (1989) 所使用之測定方法。

(5) 腸道與糞便之微生物組成試驗

利用選擇性培養基來進行測定。培養包括四個由腸道所取得部份與糞便中的(1) 雙叉桿菌屬；(2) 乳酸菌屬；(3) 產氣莢膜梭狀芽孢桿菌與(4) 大腸桿菌四菌種。詳細步驟參考林 (2007) 之方法進行。



(二) 統計分析

試驗所有資料使用 SAS 套裝統計軟體進行變方分析上是以一般線性模式 GLM 程序進行。顯著性差異是進一步以 S-N-K 法 (Student-Newman-Keuls test) 進行均值比較。S-N-K 法起源為 Tukey 測驗，其特色為對不同 group size，會採用不同之臨界值。故當二平均值之 group size 較小時，對應的差值臨界值也會較小。相較於 Tukey 測驗而言，此法能有較多之均值比較具有顯著差異。

陸、結果與討論

1. 血液血球計數分析

在小鼠的日常飲食中添加寡醣類物質在對其血液中所含血球數目的影響在紅血球上各組間無顯著差異，但白血球、淋巴球與單核球數目在三個寡醣處理組均有較高於對照組的情況。詳細結果見表 1。就此結果而言，本試驗中添加半乳寡醣或山羊乳寡醣於小鼠飼糧內似乎能夠有效提高小鼠體內單核球、淋巴球與白血球等具特定功能的免疫細胞數量。但 Kelly-Quagliana 等人同樣以小鼠為對象，於其飼糧中添加果寡醣(oligofructose)及菊糖(inulin)所進行的試驗所觀察到的寡醣處理組白血球數量則是下降的現象，但因其對照組為纖維素，與本試驗所用之空白處理不同；且其寡醣種類與劑量上都與本實驗不同，故其作用可能有所差異 (Kelly-Quagliana *et al.*, 2002)。另有研究者是以狗為對象進行餵予可發酵寡醣的實驗，則觀察到在白血球數目上升的反應(Swanson *et al.*, 2002a,b; Grieshop *et al.*, 2004; Middelbos *et al.*, 2007a.)。

2. 遲發型過敏反應

遲發型過敏反應是泛指反應時間超過 12 小時以上的過敏反應。此類過敏反應雖藉由 T 細胞(在小鼠體內則是 Th1 細胞)轉移，但其卻是與細胞媒介有關，而非體液性免疫。故本反應與 T 細胞免疫有關，但反應強弱與 T 細胞多寡則並不一定有很大的關連性。能夠產生遲發型過敏反應的 T 細胞，必需要經由特定的抗原所致敏，並且因此召喚聚集其他免疫細胞到達反應部位而進一步產生過敏反應的表徵。另外，遲發型過敏反應的發生時間皆在於接觸抗原 72 小時之內。本反應在操作上一般可分類為兩種：(1)令抗原直接與皮膚接觸與 (2)將抗原注射入皮下，然後再依據受試動物的局部表皮腫脹厚度或其他像是皮膚與過敏原接觸點上產生濕疹

性反應等因實驗處理所造成的免疫反應的強弱度來作為評估標準。

本試驗是藉由注射卵白蛋白致敏劑 (DNP-OA)於受試小鼠足蹠內，觀察其於 24 小時後因產生遲發型過敏反應所導致的足蹠腫脹程度來做為評估指標，用以測試餵飼寡糖四週後對小鼠會產生何種效果。實驗結果為先於左後肢進行足蹠注射，此後，待 96 小時再行觀察時四組小鼠的足蹠腫脹程度與未注射時的初始厚度來比較均已無任何差異性，表示經此注射 4 天後小鼠已自動消腫。同時，四組間的足蹠平均厚度數值也無差異。而後，改在右後肢再行足蹠注射。初始時四組間的足蹠平均厚度仍無差異；但於 24 小時後測量右後肢足蹠腫脹厚度則發現四組的足蹠均有明顯腫脹產生，而在實驗的三個寡糖處理組小鼠所測得的足蹠平均厚度增加則小於未餵飼寡糖的對照組。詳細結果見表 2。此一結果表示，於飼糧中添加半乳寡糖或山羊乳寡糖，可能會使小鼠體內如足蹠腫脹現象等與遲發型過敏症有關的免疫表現能力有所降低。

3. 血漿 IgG 及 IgM 濃度測定


本試驗利用酵素連結免疫吸附法測定小鼠血漿中的免疫球蛋白 IgG 及 IgM 濃度，結果顯示半乳寡糖組與酸性山羊乳寡糖組的血漿中 IgG 濃度有較對照組顯著增加，在 IgM 上亦然。詳細結果見表 4。此結果顯示，於小鼠的日常添加半乳寡糖組與酸性山羊乳寡糖可能能夠提昇小鼠的免疫反應能力。此現象與其他用可發酵寡糖飼予狗後所得到的有些相似(Swanson *et al.*, 2002a,b; Grieshop *et al.*, 2004; Middelbos *et al.*, 2007a.)。

4. 脾臟淋巴細胞增生能力測定

在脾臟淋巴細胞增生能力測定上本試驗的作法是取得小鼠脾臟淋巴細胞後分

別以 LPS 及 ConA 進行刺激，觀察其增生指數(PI)。脾臟淋巴球增生能力是偵測免疫功能的重要指標，因為在細胞性的免疫反應中，除了單核球巨噬細胞外，淋巴細胞也佔很重要的角色。在 1994 年 Stephen 與 Maetin 的研究指出，腸道中的淋巴細胞會活化免疫系統，促使淋巴細胞分化成熟，並進而藉由轉移至其他淋巴結或胸腺而影響全身的免疫反應(Stephen and Maetin, 1994)。詳細結果見表 5。本實驗結果顯示，當持續餵飼小鼠寡糖到第 8 週飼養結束時，由三個有添加寡糖處理組小鼠中所取得的脾臟淋巴細胞均會在被刺激源 ConA 所誘導產生的增生指數上有所增加，但在 LPS 刺激下則無顯著差異。就本結果而言，或可代表本試驗所給予小鼠之寡糖均有提升其脾臟淋巴中 T 細胞在數量上的增生活性；但在 LPS 所刺激的 B 淋巴細胞方面，寡糖處理組與對照組間則無差異。

5. 腸道與糞便之微生物組成試驗



本實驗是利用選擇性培養基來測定由腸道上四個不同部位：(1)結腸絨毛；(2)結腸內容物；(3)盲腸絨毛及(4)盲腸內容物與(5)糞便等五位置來檢測包括以下四個(1)雙叉桿菌屬；(2)乳酸菌屬；(3)產氣莢膜梭狀芽孢桿菌與(4)大腸桿菌菌種的菌數。各菌種選擇性培養基的配置法是參考林 (2007)的方法，與衛生署在「健康食品調整腸胃功能評估方法」所建議的有所不同。在菌相試驗上，選取這五個受測部位，是歸因於人類以結腸為腸道的主要發酵位置，故選取；而小鼠等齧齒類動物是以盲腸為主要發酵位置，所以該部位亦選取；最後，測試糞便則是想觀察由此取得的菌相是否會與上述部位出現差異，其結果或許可當做日後進行類似實驗的參考。

在實驗結果上，得到在餵予半乳寡糖與酸性山羊乳寡糖兩個處理組與對照組比較之下，於雙叉桿菌屬及乳酸菌桿屬數目上會有顯著的提昇，且在大腸桿菌顯

著下降。但另一個處理的中性山羊乳寡糖組與對照組之間的差異較小，大多未能達到顯著水準。各部位測得之菌數詳細結果見表 5-9。另外較為值得注意的是在產氣莢膜梭狀芽孢桿菌方面，相較於對照組，本試驗所得到的結果發現寡糖處理組並不能夠有效的令此一害菌的指標菌數目下降，而是保持同樣的水準。此一產氣莢膜梭狀芽孢桿菌菌數持平的現象，對照其他以人或動物為實驗對象餵予寡糖後所得到的結果相似(Guigoz *et al.*, 2002; Middelbos *et al.*, 2007b)，但卻與過去另一些以寡糖做體外培養研究所得能下降產氣莢膜梭狀芽孢桿菌數目的結果不同(Mitsuoka, 1982; Okazaki *et al.*, 1990)。推測可能的原因為本實驗進行期間在小鼠腸道中的雙叉桿菌與乳酸菌等益菌增生程度尚未能達到抑制產氣莢膜梭狀芽孢桿菌繁殖的程度。但梭狀芽孢桿菌的存在對宿主來說並非全然有害，以預防結腸與直腸癌而論，有研究認為寡糖發酵後所產生的短鏈脂肪酸中的丁酸(butyric acid)有抑制大腸黏膜細胞增生的作用(Bartram *et al.*, 1993; McIntyre *et al.*, 1993; Velazquez *et al.*, 1996)，而在腸內能將寡糖發酵為丁酸的就是梭狀芽孢桿菌屬與真桿菌屬(*Eubacterium*)。並且，在本試驗所使用的小鼠整體飼養時間中，各方面健康表現均無出現諸如下痢等負面影響。綜合整體的菌種結果數值，在五個不同受測部位上都有相近的表現，可知本實驗所使用的半乳寡糖與酸性山羊乳寡糖，在此一份量下經 8 週的給予後確能顯著提昇於小鼠腸道中益菌的指標菌種菌數。最後，由於自各受測部位所得到之結果有相當高的一致性，故未來進行類似實驗時或可僅用較易採集且不需犧牲動物的糞便來進行試驗，且其結果也能代表上述其它受測腸道部位的菌相表現。

表 1. 餵飼寡醣對小鼠血液中血球數的影響

Table 1. Effect of feeding oligosaccharides on blood cells counts of mice

TYPE	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
RBC	11.49 ± 1.33	12.08 ± 1.78	12.43 ± 1.90	12.35 ± 2.12
WBC	14.55 ± 3.91 ^A	18.53 ± 2.61 ^B	17.22 ± 1.76 ^B	16.06 ± 1.46 ^{AB}
#LYM	7.7 ± 1.85 ^A	11.03 ± 1.82 ^B	11.19 ± 1.53 ^B	10.90 ± 1.56 ^B
#MON	0.87 ± 0.27 ^A	1.31 ± 0.22 ^B	1.17 ± 0.19 ^B	1.14 ± 0.28 ^B

Data represented by means ± standard error.

^{A, B} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

各項目單位： RBC 10⁶/mm³

#LYM 淋巴球絕對數目 (mm³)

WBC 10³/mm³

#MON 單核球絕對數目 (mm³)



表 2. 餵飼寡醣對小鼠足蹠腫脹程度的影響

Table 2. Effect of feeding oligosaccharides on the swollen skin areas (mm²) of mice

TYPE	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
Swollen skin areas	673 ± 153 ^B	499 ± 81 ^A	472 ± 94 ^A	539 ± 71 ^A

Data represented by means ± standard error.

^{A, B} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

表 3. 餵飼寡醣對小鼠血液中免疫球蛋白 IgG 及 IgM 的影響

Table 3. The plasma IgG(mg/ml) and IgM(μ g/ml) concentration of mice after oligosaccharides supplement in water

	Control	GOS	AOS	NOS
2wk				
IgG	5.23 \pm 0.34	5.41 \pm 0.17	5.57 \pm 0.26	4.90 \pm 0.64
IgM	498 \pm 22	537 \pm 36	510 \pm 13	460 \pm 13
3wk				
IgG	6.33 \pm 0.79	7.70 \pm 0.98	7.05 \pm 0.52	6.40 \pm 0.48
IgM	622 \pm 29	773 \pm 70	660 \pm 38	552 \pm 28
4wk				
IgG	8.52 \pm 0.81^A	11.08 \pm 1.12^C	9.55 \pm 0.66^B	8.40 \pm 0.72^A
IgM	793 \pm 77^A	1184 \pm 101^C	966 \pm 91^B	752 \pm 62^A

Data represented by means \pm standard error.

^{A, B, C} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).



表 4. 餵飼寡醣八週後對小鼠脾臟細胞進行增生能力測定實驗結果

Table 4. The lymphocyte proliferation reaction in spleen of mice after feeding OS for 8 weeks

	Control	GOS	AOS	NOS
8wk				
PI				
ConA	1.55 \pm 0.25^A	7.60 \pm 0.33^C	4.47 \pm 0.23^B	2.30 \pm 0.2^{AB}
LPS	1.22 \pm 0.31	1.20 \pm 0.38	1.10 \pm 0.11	1.16 \pm 0.19

Data represented by means \pm standard error.

^{A, B, C} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

PI(Proliferation index)= mitogen stimulated lymphocyte/ none mitogen stimulated lymphocyte.

ConA(concanavalin), LPS(lipopolysaccharide).

表 5. 餵飼寡醣八週後小鼠結腸絨毛中所測得之各菌菌數

Table 5. Effect of oligosaccharides on bacteria counts in the colic villus of mice

Bacterial species	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
	log CFU/g colic villus			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.16 ± 0.45 ^B	8.87 ± 0.85 ^A	8.37 ± 0.6 ^A	7.33 ± 0.16 ^B
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.58 ± 0.44 ^B	9.79 ± 0.45 ^A	9.53 ± 0.47 ^A	9.03 ± 0.4 ^B
<i>Clostridium</i> spp.	7.35 ± 0.61 ^B	7.58 ± 0.51 ^A	7.17 ± 0.49 ^B	7.25 ± 0.44 ^B
<i>E.coli</i>	6.07 ± 0.45 ^A	5.55 ± 0.41 ^B	5.82 ± 0.45 ^B	5.83 ± 0.6 ^{AB}

Data represented by means ± standard error.

^{A, B} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

表 6. 餵飼寡醣八週後小鼠結腸內容物中所測得之各菌菌數

Table 6. Effect of oligosaccharides on bacteria counts in the colic contents of mice

Bacterial species	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
	log CFU/g colic contents			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.31 ± 0.43 ^B	8.65 ± 0.76 ^A	8.32 ± 0.6 ^A	7.55 ± 0.23 ^B
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.69 ± 0.63 ^B	9.53 ± 0.47 ^A	9.64 ± 0.45 ^A	8.83 ± 0.56 ^B
<i>Clostridium</i> spp.	7.52 ± 0.61	7.87 ± 0.37	7.43 ± 0.46	7.39 ± 0.47
<i>E.coli</i>	6.09 ± 0.36 ^A	5.43 ± 0.41 ^B	5.56 ± 0.46 ^B	5.48 ± 0.38 ^B

Data represented by means ± standard error.

^{A, B} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

表 7. 餵飼寡醣八週後小鼠盲腸絨毛中所測得之各菌菌數

Table 8. Effect of oligosaccharides on bacteria counts in the cecal villus of mice

Bacterial species	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
	log CFU/g cecal villus			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.12 ± 0.42 ^D	10.22 ± 0.49 ^A	9.75 ± 0.61 ^B	8.73 ± 0.32 ^C
<i>Lactobacillus</i> spp.	9.33 ± 0.26 ^C	11.2 ± 0.47 ^A	10.57 ± 0.63 ^B	9.39 ± 0.62 ^C
<i>Clostridium</i> spp.	7.87 ± 0.73	8.06 ± 0.19	8.14 ± 0.29	7.58 ± 0.74
<i>E.coli</i>	5.35 ± 0.55 ^A	4.57 ± 0.72 ^B	4.73 ± 0.37 ^B	5.03 ± 0.42 ^A

Data represented by means ± standard error.

A, B, C, D Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

表 8. 餵飼寡醣八週後小鼠盲腸內容物中所測得之各菌菌數

Table 9. Effect of oligosaccharides on bacteria counts in the cecal contents of mice

Bacterial species	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
	log CFU/g cecal contents			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.32 ± 0.52 ^B	10.41 ± 0.71 ^A	9.92 ± 0.78 ^A	8.55 ± 0.17 ^B
<i>Lactobacillus</i> spp.	9.02 ± 0.48 ^C	11.22 ± 0.43 ^A	10.52 ± 0.43 ^B	9.11 ± 0.39 ^C
<i>Clostridium</i> spp.	7.76 ± 0.59 ^{AB}	8.17 ± 0.31 ^A	7.72 ± 0.37 ^{AB}	7.42 ± 0.58 ^B
<i>E.coli</i>	5.22 ± 0.33 ^A	4.03 ± 0.37 ^C	4.77 ± 0.48 ^B	5.26 ± 0.45 ^A

Data represented by means ± standard error.

A, B, C Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).

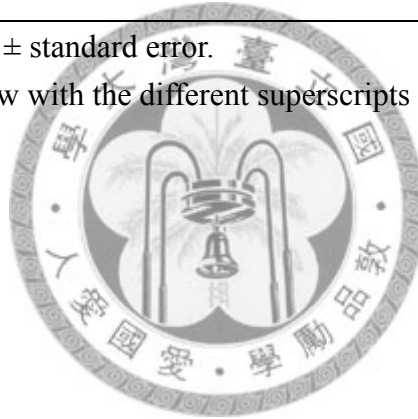
表 9. 餵飼寡醣八週後小鼠糞便中所測得之各菌菌數

Table 9. Effect of oligosaccharides on bacteria counts in the feces of mice

Bacterial species	Group			
	Control	GOS	AOS	NOS
	log CFU/g feces			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8.05 ± 0.53 ^B	9.75 ± 0.74 ^A	9.82 ± 0.46 ^A	8.51 ± 0.3 ^B
<i>Lactobacillus</i> spp.	8.59 ± 0.69 ^B	9.95 ± 0.44 ^A	9.62 ± 0.38 ^A	8.97 ± 0.57 ^B
<i>Clostridium</i> spp.	7.56 ± 0.58	7.75 ± 0.4	7.66 ± 0.54	7.52 ± 0.57
<i>E.coli</i>	5.07 ± 0.26 ^A	4.28 ± 0.41 ^B	4.87 ± 0.52 ^A	5.21 ± 0.39 ^A

Data represented by means ± standard error.

^{A, B, C} Means of the same row with the different superscripts were significantly different (P < 0.05).



柒、結論

1. 在小鼠的日常飲食中添加寡糖類物質可提高其血液中所含的白血球、淋巴球與單核球數目，對提升的非特異性免疫能力有幫助。
2. 半乳寡糖與酸性山羊乳寡糖處理組血漿中的IgG與IgM濃度有較對照組顯著增加。表示日糧中添加半乳寡糖與酸性山羊乳寡糖應能增進小鼠的免疫反應能力。
3. 三個有添加寡糖處理組小鼠的脾臟淋巴細胞被刺激源 ConA 所誘導而產生的增生指數均有增加，但在 LPS 刺激下則不顯著。此代表寡糖均有提升小鼠脾臟淋巴中 T 細胞的增生活性；在 B 淋巴細胞上則無差異。
4. 觀察五個不同受測部位的四菌種結果數值後可知以本實驗所用的份量來添加半乳寡糖與酸性山羊乳寡糖到小鼠飼糧中，經過 8 週後能夠顯著的提昇小鼠腸道中雙叉桿菌屬與乳酸菌屬的益菌數目，並在大腸桿菌上呈顯著下降。
5. 綜合以上結果，在小鼠的日常飲食中添加山羊乳寡糖與半乳寡糖後，對小鼠的免疫能力提昇與改善腸內細菌菌相都有正面的效果。

捌、參考文獻

行政院衛生署，1999。健康食品安全及功效評估方法-健康食品調整腸胃功能評估方法。

行政院衛生署。2001。市售包裝食品營養宣稱規範。

行政院衛生署。2004。中華民國 93 年國民醫療保健支出統計。

行政院衛生署。2005。中華民國 94 年全民健康保險醫療統計年報。

吳輔祐 and Elsasser, T. H.。1995。羊乳促進細胞生長活性之研究。中國農業化學會誌 33: 326-332。



曹博宏、吳輔祐、徐濟泰。2002。影響羊乳血小板活化因子乙醯水解酵素(PAF-AH)活性之研究。中畜會誌 31: 215。

壽廉。1979。人體免疫球蛋白。中華醫誌 26：1-11。

Aronson, M. 1952. Transgalactosidation during lactose hydrolysis. Arch Biochem Biophys 39:370-378.

Bartram, H. P., W. Scheppach, H. Schmid, A. Hofmann, G. Dusel, F. Richter, A. Richter, and H. Kasper. 1993. Proliferation of human colonic mucosa as an intermediate biomarker of carcinogenesis: effects of butyrate, deoxycholate, calcium, ammonia, and pH. Cancer Res. 53: 3283-3288.

Beerens, H., C. Romond and C. Neut. 1980. Influence of breast-feeding on the bifid flora of newborn intestine. *Am. J. Clin. Nutr.* 33:2434-2439.

Boehm, G., and B. Stahl. 2003. Oligosaccharides. In T. Mattila and M.Saarela Eds., *Functional Dairy Products*. pp. 203–243. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited.

Bouhnik, Y., B. Flourie, L. D'Agay-Abensour, P. Pochart, G. Gramet, M. Durand and J. C. Rambaud. 1997. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. *J. Nutr.* 127:444-448.

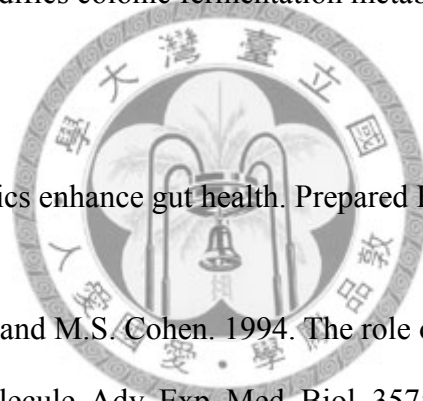
Brandt, L.A. 2001. Prebiotics enhance gut health. *Prepared Foods*. 170: 7–10.

Britigan, B.E., J.S. Serody and M.S. Cohen. 1994. The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357: 143-156.

Brock, J. 1995. Lactoferrin: a multifunctional immunoregulatory protein? *Immunol. Today* 16: 417-419.

Brown, K. D. and D. M. Blakeley. 1983. Cell growth-promoting activity in mammary secretions of the goat, cow and sheep. *Br Vet J.* 139: 68–78.

Carpenter, G. 1980. Epidermal growth factor is a major growth-promoting agent in human milk. *Science* 210: 198–199.



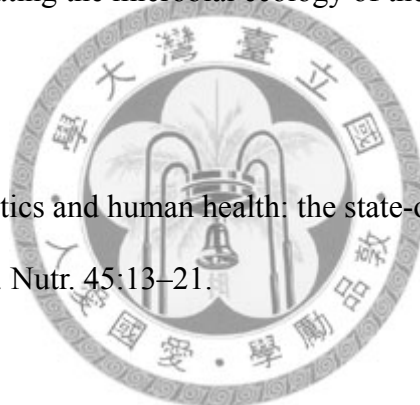
Chantal, M., C. V. Juan, M. Marcela, R. Mirtha and P. Gabriela. 2001.

Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. J. of Dairy Res. 68: 601-609.

Chonan, O., K. Matsumoto and M. Watanuki. 1995. Effect of galacto-oligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. Biosci. Biotech. Biochem. 59:236-239.

Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr. 69: 1052-1057.

Conway, P. L. 2001. Prebiotics and human health: the state-of-the-art and future perspectives. Scand. J. Nutr. 45:13-21.



Crittenden, R.G., and M. J. Playne. 1996. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends Food Sci. Technol. 7(11):353-361.

Crouch, S.P.M., K.J. Slater and J. Fletcher. 1992. Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. Blood 80: 235-240.

Cummings, J.H., M. B. Roberfroid, H. Anderson, C. Barth, A. Ferro-Luzzi, Y. Ghos, M. Gibney, K. Hermons, W. P. T. James, O. Korver, D. Lairon, G. Pascal and A. G. S. Voragen. 1997. A new look at dietary carbohydrate: Chemistry, physiology and health. Eur. J. Clin. Nutr. 51:417-423.

Daddaoua, A., V. Puerta, P. Requena, A. Martínez-Férez, E. Guadix, F. S. de Medina, A. Zarzuelo, M. D. Suárez, J. J. Boza. and O. Martínez-Augustin. 2006. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* 136: 672-676.

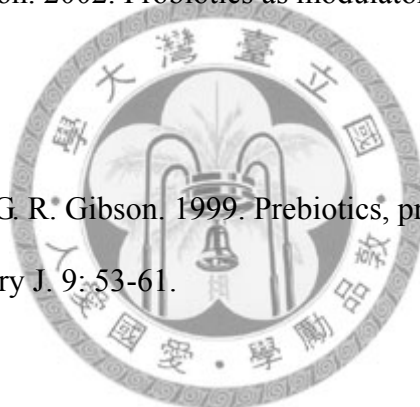
Fanaro, S., G. Boehm, J. Garssen, J. Knol, F. Mosca, B. Stahl and V. Vigi. 2005. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: A review. *Acta Paediatrica* 94:22-26.

Fooks, L. J. and G. R. Gibson. 2002. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88: 39-49.

Fooks, L. J., R. Fuller and G. R. Gibson. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy J.* 9: 53-61.

Forestier, C., C. D. Champs, C. Vatoux and B. Joly. 2001. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res. Microbiol.* 152: 167-173.

Furrie, E., S. Macfarlane, A. Kennedy, J. H. Cummings, S. V. Walsh, D. A. O'neil and G. T. Macfarlane. 2005. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut.* 54: 242-249.



- Gibson, G. R. and A. L. McCartney. 1998. Modification of the gut flora by dietary means. *Biochem. Soc. T.* 26: 222–228.
- Ginsberg, D. I., C. Drapeau and G. S. Jensen. 2000. Probiotic bacteria and the immune system. *JANA.* 3: 44-50.
- Goldin, B. R. 1998. Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* 80(2): 203-207.
- Gopal, P. K. and H. S. Gill. 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Bri. J. Nutr.* 84(Sup. 1): S69–74.
- Gorbach, S. L. 1990. Lactic acid bacteria and human health. *Ann. Med.* 22: 37-41.
- Griehop, C. M., E. A. Flikinger, K. J. Bruce, A. R. Patil, G. L. Czarnecki-Maulden and G. C. Fahey, Jr. 2004. Gastrointestinal and immunological responses of senior dogs to chicory and mannan-oligosaccharides. *Arch. Anim. Nutr.* 58: 483-493
- Guidos, C., A.A. Sinha and K.C. Lee. 1987. Functional differences and complementation between dendritic cells and macrophages in T-cell activation. *Immunol.* 61: 269-276.
- Guigoz, Y., F. Rochat, G. Perruisseau-Carrier, I. Rochat and E. J. Schiffrin. 2002. Effect of oligosaccharide on the faecal flora and nonspecific immune system in elderly people. *Nut. Res.* 22: 13-25.

Hansen, M. B., S. E. Nielson and K. Berg. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* 119: 302-310.

Harris, P. J. and L. R. Ferguson. 1999. Dietary fibers may protect or enhance carcinogenesis. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ.* 443: 95–110.

Hasen, R. 1985. Bifidobacteria have come to Denmark to stay. *N. Eur. Dairy. J.* 51: 79-83.

Hoijer, M. A., M. J. Melief, C. G. Helden-Meeuwsen, F. Eulerink and M. P. Hazenberg. 1995. Detection of muramic acid in a carbohydrate fraction of human spleen. *Infect. & Immun.* 63(5): 1652-1657.

Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. H. Huis In't Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Inter. J. Food Micro.* 41: 85-101.

Imaizumi, T., D. M. Stafforini, Y. Yamada, T. M. McIntyre, S. M. Prescott and G. A. Zimmerman. 1995. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J. Intern Med.* 238: 5-20.

Ishikawa, F., H. Takayama, K. Matsumoto, M. Ito, O. Chonan, Y. Deguchi, H. Kikuchi-Hayakawa and M. Watanuki. 1995. Effects of β 1-4 linked galacto-oligosaccharides on human fecal microflora. *Bifidus.* 9:5-18.

Isolauri, E., P. V. Kirjavainen and S. Salminen. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 50(Suppl): 54-59.

Ito, M., K. Matsumoto, M. Kimura, N. Onodera and T. Yajima. 1993. Influence of galactooligosaccharides on the human fecal microflora. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 39: 635-640.

Ito, M., Y. Deguchi, A. Miyamori, K. Matsumoto, H. Kimkuchi, K. Matsumoto, Y. Kobayashi, T. Yajima and T. Kan. 1990. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microb. Ecol. Health Dis.* 3:285-292.

Jenkins, D. J. A., C. W. C. Kendall and V. Vuksan. 1999. Inulin, oligofructose and intestinal function. *J. Nutr.* 129:1431S-1433S (Suppl. S).

Johnson, I. T. 2004. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. *Mutation Res.* 551:9-28.

Kasper, H. 1998. Protection against gastrointestinal diseases- present facts and future developments. *Inter. J. Food Micro.* 41: 127-31.

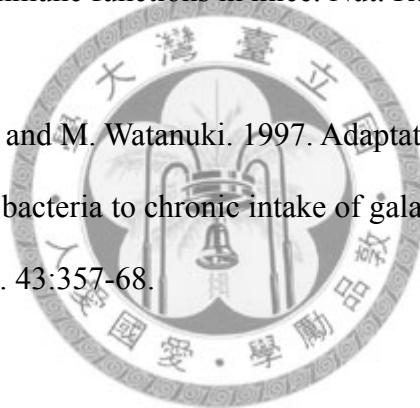
Kaur, N. and A. Gupta. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J. Biosci.* 27(7):703-714.

Kawakami, K., I. Makino, T. Asahara, I. Kato and M. Onoue. 2005. Dietary galacto-oligosaccharides mixture can suppress serum phenol and p-cresol levels in rats fed tyrosine diet. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 51:182-186.

Kawase, K., T. Suzuki, I. Kiyosawa, S. Okonogi, T. Kawashima and M. Kuboyama. 1981. Effects of composition of infant's formulas on the intestinal microflora of infants. *Bifidobacteria Microflora* 2: 25-31.

Kelly-Quagliana, K. A., P. D. Nelson and R. K. Buddington. 2003. Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nut. Res.* 23: 257-267.

Kikuchi, H. H., M. Kimura and M. Watanuki. 1997. Adaptation of rate of organic acid production of hindgut bacteria to chronic intake of galactooligosaccharide in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43:357-68.



Kirsch, C.M., J. J. Brokaw, D. M. Prow and G. W. White. 1992. Mechanism of platelet-activating factor –induced vascular leakage in the rat trachea. *Exp. Lung Res.* 18:447-459.

Kuby, J. 1994. *Immunology*. 2nd ed. W. H. Freeman Co., New York.

Kunz, C., and S. Rudloff. 2002. Health benefits of milk-derived carbohydrates. *Bulletin of the International Dairy Federation.* 375: 72–79.

Lilly, D. M. and R. H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.

Macfarlane, G. T. and J. H. Cummings. 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *Br. Med. J.* 318: 999-1003

Mack, D. R., S. Michail, S. Wei, L. Mcdougall and M. A. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* 276: G941-G950.

Manning, T. S. and G. R. Gibson. 2004. Prebiotics. *Best Practice Res. Clin. Gastroenterol.* 18(2):287–298.

Matsumoto, K. 1990. Characterization and utilization of β -galactosidase from lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Jap. J. Dairy Food Sci.* 39: 239-248.

McIntyre, A., P. R. Gibson and G. P. Young. 1993. Butyrate production from dietary fiber and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut.* 34: 386-391.

Mehra, R. and P. Kelly. 2006. Milk oligosaccharides : Structural and technological aspects. *International Dairy Journal.* 16: 1334-1340.

- Middelbos, I. S., M. R. Godoy, N. D. Fastinger and G. C. Fahey, Jr. 2007a. A dose-response evaluation of spray-dried yeast cell wall supplementation of diets fed to adult dogs: Effects on nutrient digestibility, immune indices, and fecal microbial populations. *J. Anim. Sci.* 85: 3022-3032.
- Middelbos, I. S., N. D. Fastinger and G. C. Fahey, Jr. 2007b. Evaluation of fermentable oligosaccharids in diets fed to dogs in comparison to fiber standard. *J. Anim. Sci.* 85: 3033-3044.
- Minekawa, R., T. Takeda, M. Sakata, M. Hayashi, A. Isobe, T. Yamamoto, K. Tasaka and Y. Murata. 2004. Human breast milk suppresses the transcriptional regulation of IL-1 β -induced NF- κ B signaling in human intestinal cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:1404-1411.
- Mitsuoka, T. 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobact. Microflora.* 1: 3-24.
- Moore, S.A., B.F. Anderson, C.R. Groom, M. Haridas and E.N. Baker. 1997. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 274: 222-236.
- Mozaffar, Z., K. Nakanishi, R. Matsuno and T. Kamikuro. 1984. Purification and properties of β -galactosidase from *Bacillus circulans*. *Agric. Bio. Chem.* 48: 3053-3061.

- Nakamura, T. and T. Urashima. 2004. The milk oligosaccharides of domestic farm animals. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 16: 135-142.
- Narimiya, M., K. Yokoi, N. Tajima, O. Sakai, Y. Ikeda and H. Takayama. 1996. The effect of β 1-4 galactooligosaccharides on fecal flora in non insulin dependent diabetic patients with constipation. *Jap. J. Clin. Nutr.* 18:44-50.
- Newburg, D. S. 1996. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 1: 271-83.
- Nichols, B.L., K.S. McKee, J.F. Henry and M. Putman, 1987. Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.* 21: 563-567.
- Ohtsuka, K., K. Tsuji, Y. Nakagawa, H. Ueda, O. Ozawa, T. Uchida and T. Mitsuoka. 1989. Effects of 4'-galactosyllactose (O-beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-O-beta-D-galactopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranose) in rat. *J Nutr. Sci. Vitaminol* 36: 265-276.
- Ohtsuka, K., A. Tanoh, O. Ozawa, T. Kanematsu, T. Uchida and R. Shinke. 1990. Purification and properties of a β -galactosidase with high galactosyl transfer activity from *Cryptococcus laurentii*. *J. Ferment Bioeng.* 70:301-307.
- Okazaki, M., S. Fujikawa and N. Matsumoto. 1990. Effect of xylooligosaccharide on the growth of *Bifidobacteria*. *Bifidobact. Microflora*. 9: 77-86.

- Ozawa, O., K. Ohtsuka and R. Uchida. 1989. Production of 4'-galactosyllactose by mixed cells of *Cryptococcus laurentii* and baker's yeast. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 36:898-902.
- Perdigon, G., S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero and N. Gobbato. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 78: 1597-1606.
- Prenosil, J.E., E. Stuker, J. R. Bourne. 1987. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose: Part I: State of art. *Biotechnol Bioeng* 30:1019-1025.
- Prescott, S.M., G. A. Zimmermann and T. M. McIntyre. 1990. Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 265: 17381-17384.
- Quan, S. and S. G. Harsharnjit. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20TM) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol. Medical Microbio.* 34: 59-64.
- Rasic, J. L. and J. A. Kurmann. 1983. Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. *Experientia. Suppl.* 39: 1-295.
- Roberfroid, M.B. 1997. Health benefits of non-digestible oligosaccharides. In: Kritchevsky and Bonfield. *Dietary fiber in health and disease*. New York, Plenum Press. pp: 211-219.

Roberfroid, M.B. 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1682S–1687S (Suppl. S).

Roberfroid, M.B., G. R. Gibson and N. Delzenne. 1993. Biochemistry of oilgofructose, a non-digestible fructo-oligosaccharide: An approach to estimate its caloric value *Nutr. Rev.* 51:137-146.

Roitt, I. 1984. *Essential Immunology*. 5th ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

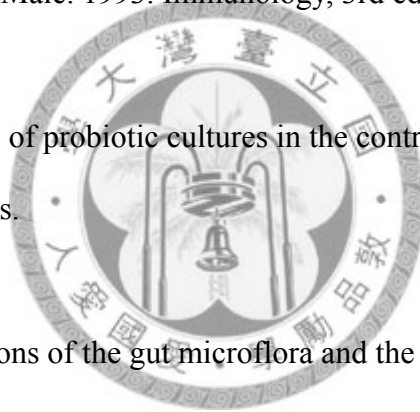
Roitt, I., J. Brostoff and D. Male. 1993. *Immunology*, 3rd ed. Mosby-Year Book Europe, Inc., England.

Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130: 396s-402s.

Rowland, I. 1988. Interactions of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicol Pathol.* 16:147-153.

Rowland, I. and R. Tanaka. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human fecal microflora. *J. Appl. Bacteriol.* 74:667-674.

Sako, T., K. Matsumoto and R. Tanaka. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 9: 69-80



Sanders, M. E., D. C. Walker, K. M. Walker, K. Aoyama and T. R. Klaenhammer. 1996
Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.* 79:
943-55.

Schrezenmeir, J. and M. Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching
a definition. *Am. J. Clin Nutr.* 73: 361-364.

Shishikura, T., K. Shito, M. Uchida and T. Inaba. 2006. A late cutaneous response in
actively sensitized rats: a new method for evaluating the efficacy of antiallergic
drugs. *J. Pharmacol Sci.* 101: 350-355.

Shimoyama, T., S. Hori, S. Tamura, M. Yamamura, M. Tanaka and K. Yamazaki. 1984
Microflora of patients with stool abnormality. *Bifidobacteria Microflora* 3:35-42.

Silva, M., N. V. Jacobus, C. Deneke, and S. L. Gorbach. 1987. Antimicrobial substance
from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1231-1233.

So, Y. P., E. J. Geun, T. K. Young, K. J. Hoo and U. Zeynep. 1999. Potentiation of
hydrogen peroxide, nitric oxide, and cytokine production in RAW 264.7
macrophage cells exposed to human and commercial isolates of *Bifidobacterium*.
Int. J. of Food Microbiol. 46: 231-241.

Stark, P. L. and A. Lee. 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed
and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* 15:189-203.

Steijns, J. M. and A.C.M. Hooijdonk. 2000. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br. J. Nutr.* 1: 11-17.

Stephen, P. J. and E. Maetin. 1994. Human gastrointestinal mucosal T cells. In: *Handbook of Mucosal Immunology*. pp: 275-285. Academic Press, London.

Swanson, K. S., C. M. Grieshop, E. A. Flickinger, L. L. Bauer, H. P. Healy, K. A. Dawson, N. R. Merchen and G. C. Fahey, Jr. 2002a. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dog. *J. Nutr.* 132: 980-989.

Swanson, K. S., C. M. Grieshop, E. A. Flickinger, H. P. Healy, K. A. Dawson, N. R. Merchen and G. C. Fahey, Jr. 2002b. Effects of supplemental fructooligosaccharides plus mannanoligosaccharides on immune function and ileal and fecal microbial populations in adult dogs. *Arch. Anim. Nutr.* 56: 309-318.

Swennen, K., C. M. Courtin and J. A. Delcour. 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Food Sci. Nutr.* 46: 459-471.

Tamai, S., K. Ohtsuka, O. Ozawa and T. Uchida. 1992. Effect of a small amount of galactooligosaccharides on fecal Bifidobacterium. *J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci.* 45:456-460.

- Tanaka, R., H. Takayama, M. Morotomi, T. Kuroshima, S. Ueyama, K. Matsumoto, A. Kuroda and M. Mutai. 1983. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*. 2:17-24.
- Tannock, G. W. 1997. Probiotic properties of lactic acid bacteria: plenty of scope for fundamental R and D. *Tibtech*. 6: 270-274.
- Teitelbaum, J.E., and W. A. Walker. 2002. Nutritional impact of pre-and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annu. Rev. Nutr.* 22:107–138.
- Teuri, U. and R. Korpela. 1998. Galacto-oligosaccharides relieve constipation in elderly people. *Ann. Nutr. Metab.* 42: 319-327.
- Teuri, U., R. Korpela, M. Saxelin, L. Montonen and S. Salminen. 1998. Increased fecal frequency and gastrointestinal symptoms following ingestion of galacto-oligosaccharide-containing yogurt. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 44:465-471.
- Tochikura, T., K. Sakai, T. Fujiyoshi, T. Tachiki and H. Kumagai. 1986. p-Nitrophenyl glucoside-hydrolyzing activities in bifidobacteria and characterization of β -d-galactosidase of *Bifidobacterium longum*. *Agric. Biol. Chem.* 50:2279-2286.
- Tsai, G. J. and S. C. Yu. 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. *J. Food Prot.* 60: 978-984.

- Umetsu, D.T., O. Akbari and R.H. Dekruyff. 2003. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 480-487.
- van Dokkum, W., B. Wezendonk, T. S. Srikumar and E. G. H. M. van den Heuvel. 1999. Effect of non digestible oligosaccharides on large-bowel functions, blood lipid concentrations and glucose absorption in young healthy male subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53:1-7.
- Velazquez, O. C., H. M. Lederer and J. L. Rombeau. 1996. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig. Dis. Sci.* 41: 729-739.
- Vince, A. and S. M. Burridge. 1980. Ammonia production by intestinal bacteria: The effects of lactose, lactulose and glucose. *J. Med. Microbiol.* 13:177-191.
- Voragen, A. G. J. 1998. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci. Technol.* 9:328-335.
- Vrese, M., A. Stegelmann, B. Richter, S. Fenselau, C. Lauem and J. Schrezenmeir. 2001. Probiotics- compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin Nutr.* 73: 421-429.
- Watanuki, M., Y. Wada and K. Matsumoto. 1996. Digestibility and physiological heat of combustions of β 1-4 and β 1-6 galacto-oligosaccharides in vitro. *Annu. Rep. Yakult Central Institute Microbiol Res.* 16:1-12.

Welsh, J. K. and J. T. May. 1979. Anti-infective properties of breast milk. *J. Pediatr.* 94:1-9.

Yamashita, K. and A. Kobata. 1974. Oligosaccharides of human milk. Isolation and characterization of a new trisaccharide 6'-galactosyllactose. *Arch. Biochem. Biophys.* 1:39-44.

Yanahira, S., T. Kobayashi, T. Suguri, M. Nakakoshi, S. Miura, H. Ishikawa and I. Nakajima. 1995. Formation of oligosaccharides from lactose by *Bacillus circulans* β -galactosidase. *Bio. Biotech Biochem* 59:1021-1026.

Ziemer, C. J. and G. R. Gibson. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8:473-479.



附錄

由羊乳中取得乳寡糖的步驟 (Prason *et al.*, 1997)

1. 取未均質的新鮮乳樣樣品 5ml，並加等量的水於 50 ml Falcon 離心管中。
2. 以 $4000 \times g$ 、 4°C 的條件離心 45 分。
3. 小心避開上層懸浮脂肪與下層固形物。將澄清的水溶液吸取出來。
4. 視其體積添加酒精(95%~99%均可)，使之成為酒精濃度 66.7%的溶液(約為 10 ml 溶液 + 20 ml 酒精)。並於 4°C 下隔夜。
5. 以 $4000 \times g$ 、 4°C 的條件離心 15 分。
6. 把澄清的水溶液吸取出來。移入另外已秤好重量的 50 ml Falcon 離心管中。
7. 送入凍乾機內進行凍乾。
8. 凍乾完畢，秤重。看得到多少量的初級產物。
(至此步驟得到粗略的 MOS 乳寡糖與乳糖)
9. 凍乾所得的產物加入現配的 5 ml NaBH_4 溶液 (濃度為 10 mg/ml)。
10. 振盪攪拌均勻，於室溫環境下隔夜。
11. 用 1M 的醋酸滴入，至有氫氣產生(約 5~6 滴)。
12. 將溶液利用 FPLC 來分離，使用 SP column。
13. 含有樣品的管柱用 1 ml 水分注洗 3 次，之後再用氮氣吹乾。
14. 加入甲醇 0.5 ml，在氮氣環境下使其揮發，重覆 3 次。
(至此步驟後開始分離 AOS 酸性乳寡糖與 NOS 中性乳寡糖)
15. 得到的乳寡糖粉末溶於 5 ml 水中，再用 FPLC 來分離，此次使用 Q column。
16. 收集洗液，凍乾後稱重即可得 AOS。
17. 再用 0.5M pyridinium acetate 溶液 30ml 洗管柱，收集洗液後凍乾得到 NOS。

腸道微生物檢測

1. 檢測對象：BALB/c 小鼠。
2. 採樣方式：小鼠先用CO₂安樂死，再剖腹取得其腸道。部位為盲腸與結腸，先綁起後再剪下秤重。
3. 取下後，將備好並已秤重之“無菌藥勺”刮取腸內內容物與腸道黏膜組織，並秤重定量。後移入備好厭氧稀釋液的系列稀釋瓶中。

4. 系列稀釋使用厭氧稀釋液。

5. 檢測項目：(結、盲腸與糞便均是)

益菌：*Bifidobacterium spp* & *Lactobacillus spp*

培養基：I. *Bifidobacterium spp* 使用

成分：Reinforced clostridial agar

(BBL Microbiology systems, Cockeysville, MD) 51 g

Nalidixic acid 20 mg

Polymyxin B sulfate 8.5 mg

Kanamycin sulfate 50 mg

Indoacetic acid (sodium salts) 25 mg

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride 25 mg

Distilled water 1 L



II. *Lactobacillus spp* 使用培養基

Lactobacillus MRS agar (Difco)	55 g
water	1 L

害菌：*Clostridium perfringens*

培養基：使用 Reinforced Clostridial medium(OXOID)	38 g
water	1 L

腸道常駐菌：*E. coli*

培養基：MacConkey agar(Difco)	50 g
water	1 L

厭氧稀釋液：(每 100 mL)

Gelatin	0.2 g
Distilled water	50 mL
Salt solution*	50 mL
Resazurin solution (25 mg/100 mL H ₂ O)	0.4 mL



混合各成分，煮沸 5-10 分鐘，冷卻後加入 0.05 g cysteine-HCl，於厭氧操作箱中分裝，再以 121°C 滅菌 15 分鐘。若液體呈粉紅色時不能使用。

*Salt solution (250 mL)：

MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
MnSO ₄ · 2H ₂ O	0.4 g
NaCl	0.5 g
Distilled water	250 mL

小鼠脾臟淋巴細胞增生分析

1. 檢測對象：雄性 BALB/c 小鼠。
2. 採樣方式：小鼠先用 CO₂ 安樂死，再剖腹取得其脾臟。後移入備好的 3 ml RPMI-1640 培養基後用無菌玻棒打散組織。
3. 將懸浮於培養基的細胞進行密度離心，條件為 400 × g，20 分鐘。
4. 調整細胞濃度為 1 × 10⁶ cells/ml。
5. 分別將細胞加入含有空白、5 μg/ml LPS 及 2.5 μg/ml ConA 的 96 孔培養盤中。
6. 移入 37°C、5% CO₂ 培養 48 小時。
7. 用 MTT 法，在 570 nm 吸光值下測量其增生情形並計算細胞增生活性。



製備 DNP-OA 步驟 (Taylor *et al.*, 1979)

1. 取 1 g 的卵蛋白 + 500 mg 的 K₂CO₃，於 25°C 環境下溶於 50 ml 的水中，移入避光的容器內(如咖啡色瓶)。
2. 再於其內加入 500 mg 的 DNB sulphinate 鈉鹽。攪拌 4 小時。
3. 離心。條件為 2500 × g、15 min。目的在去除微量沉澱。
4. 取上清液。於 4°C 環境下用 2 公升水透析 48 小時。所得之透析液用避光容器儲存於 -20°C 備用。

小鼠血液抗體含量分析

1. 檢測對象：雄性 BALB/c 小鼠。
2. 採樣方式：以小鼠頰靜脈採血收集約 0.5 至 1 ml 的血液。
3. 取 0.5 ml 血液置入 96 孔微滴定盤中，然後加入稀釋 1000 倍的 goat anti-mouse IgG 與 100 μ L 的 goat anti-mouse IgM 中。在 4 $^{\circ}$ C 下靜置過夜。
4. 加入 300 μ L 的 PBS-BSA，於室溫反應 2 小時，清洗。
5. 加入 100 μ L 的測試血清樣品與抗體標準品，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時，清洗。
6. 再加入稀釋 2000 倍 peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG 與 IgM，同樣於 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時，清洗。
7. 加入酵素基質溶液 ABTS，再於 37 $^{\circ}$ C 下反應 15 分鐘。最後於每個 well 加入 100 μ L 的 oxalic acid 來終止反應。
8. 檢測在 410 nm 下所得之吸光值。

