(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201036555 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：099106305 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 03 月 04 日
(51)Int. Cl.： *A23L1/305 (2006.01)* *A23L1/30 (2006.01)*
A23C9/152 (2006.01)
(30)優先權：2009/03/04 世界智慧財產權PCT/EP09/052551
組織
(71)申請人：耐斯泰克公司 (瑞士) NESTEC S. A. (CH)
瑞士
(72)發明人：史普倫格 諾伯特 SPRENGER, NORBERT (LI)；柏洛可 拉法葉 BERROCAL, RAFAEL (ES)；費雀 馬里 克萊兒 FICHOT, MARIE-CLAIRE (FR)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：0 共 17 頁

(54)名稱

寡糖成分

OLIGOSACCHARIDE INGREDIENT

(57)摘要

本發明係關於一種包括通式 R_nSac_m 之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分，其中 R 為胺基酸殘基，Sac 為選自包括 N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n 具有介於 1 至 10 之間之值，但其限制條件為若 n 之數值為 1，則 R 為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若 n 具有介於 2 至 10 之間之值，則該肽包含至少一個之蘇胺酸或絲胺酸殘基，m 具有介於 2 至 4 之間之值，且至少 20 莫耳%之成分為 N-乙醯基神經胺酸。

(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201036555 A1
(43)公開日： 中華民國 99 (2010) 年 10 月 16 日

(21)申請案號：099106305 (22)申請日： 中華民國 99 (2010) 年 03 月 04 日
(51)Int. Cl.： *A23L1/305 (2006.01)* *A23L1/30 (2006.01)*
A23C9/152 (2006.01)
(30)優先權：2009/03/04 世界智慧財產權PCT/EP09/052551
組織
(71)申請人：耐斯泰克公司 (瑞士) NESTEC S. A. (CH)
瑞士
(72)發明人：史普倫格 諾伯特 SPRENGER, NORBERT (LI)；柏洛可 拉法葉 BERROCAL, RAFAEL (ES)；費雀 馬里 克萊兒 FICHOT, MARIE-CLAIRE (FR)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：8 項 圖式數：0 共 17 頁

(54)名稱

寡糖成分

OLIGOSACCHARIDE INGREDIENT

(57)摘要

本發明係關於一種包括通式 R_nSac_m 之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分，其中 R 為胺基酸殘基，Sac 為選自包括 N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n 具有介於 1 至 10 之間之值，但其限制條件為若 n 之數值為 1，則 R 為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若 n 具有介於 2 至 10 之間之值，則該肽包含至少一個之蘇胺酸或絲胺酸殘基，m 具有介於 2 至 4 之間之值，且至少 20 莫耳%之成分為 N-乙醯基神經胺酸。

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種富含唾液酸之寡醣成分、包含該寡醣成分之食品及製造該寡醣成分之方法。

【先前技術】

吾們習知，人乳包含大量難消化寡醣。實際上，難消化寡醣代表母乳中第三大之固態成分(在乳糖及脂類後)，其在初乳中之濃度為12-15 g/l，及在成熟乳中之濃度為5-8 g/l。人乳寡醣極抗拒酶水解，表示該等寡醣可能顯示與其熱量值不相關之實質功能。

在過去的二十年間，人乳寡醣之化學結構已採用NMR光譜法及質譜法進行研究。各個單一寡醣係基於在葡萄糖、半乳糖、唾液酸(N-乙醯基神經胺酸)、岩藻糖及/或N-乙醯胺基葡萄糖之間利用許多種不同鍵結之組合，因此在人乳中形成極大數量之不同寡醣，目前已判別出超過130種結構。幾乎彼等所有在其還原端均具有一個乳糖部分，而唾液酸(當存在時)則佔在非還原端之末端位置。

尤其令人感興趣的為人乳中大量之唾液酸化寡醣。唾液酸為一種九碳糖，其為腦神經節苷脂之一種重要結構及功能成分。茲認為其在神經細胞傳輸、記憶形成及細胞對細胞之通訊中扮演基本作用。幼鼠之研究顯示，在早期增補唾液酸可改良營養佳及營養不良之動物之腦神經節苷脂唾液酸及學習能力，及該等改變可持續至成人期。

母乳是值得推薦給所有嬰兒。然而，在某些情況下，母

乳餵養會因為醫學原因或母親不選擇母乳餵養而不適當或不成功。因應該等狀況而發展了幼兒配方乳品。然而，常用作市售幼兒配方商品基礎之牛乳具有含量遠低於人乳含量之唾液酸化寡醣。由於已更了解人乳之結構及其單個成分之功能，因此顯然更需要改良以牛乳為主之幼兒配方之唾液酸含量。

已知幾種唾液酸來源，包括：游離N-乙醯基神經胺酸、唾液基乳糖及其他唾液基化寡醣、含唾液酸之神經節苷脂、及肽酪蛋白糖巨肽。酪蛋白糖巨肽或CGMP為富含大型碳水化合物之親水性肽，其即為可藉由酶或酸處理，自κ酪蛋白裂解之C末端部分。在美國專利申請案第2005/0096295號中，提議可藉著包含具有經提高濃度之唾液酸之新穎CGMP成分來增加幼兒配方之唾液酸含量。比較天然存在之CGMP中之40至60 mg/g肽之唾液酸含量而言，該成分具有超過60 mg/g肽之唾液酸含量。其可經採用陰離子層析法分離製造，或經部分水解之後，接著採用陰離子層析法分離製造。

然而，仍需提供其他富含唾液酸之成分，可用於強化幼兒配方及其他營養組合物中此重要成份之含量。

【發明內容】

本發明係提供一種包括通式R_nSac_m之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分，其中R為胺基酸殘基，Sac為選自包括N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n具有介於1與10之間之值，但其限制條件為若n之數值為

1，則R為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若n具有介於2與10之間之值，則該肽包含至少一個之蘇胺酸或絲胺酸殘基，m具有介於2與4之間之值，繼而至少20莫耳%之成分為N-乙醯基神經胺酸。

該成分為富含唾液酸之新穎食品級成分，適用於添加至營養組合物(諸如幼兒配方)，以增加該組合物之唾液酸含量。

本發明進一步相關於一種製造一種包括通式R_nSac_m之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分之方法，其中R為胺基酸殘基，Sac為選自包括N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n具有介於1與10之間之值，但其限制條件為若n之數值為1，則R為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若n具有介於2與10之間之值，則該肽包含至少一個蘇胺酸或絲胺酸殘基，m具有介於2至4之間之值，且至少20莫耳%之成分為N-乙醯基神經胺酸，其包括如下步驟：藉由外切蛋白酶及內切蛋白酶水解酪蛋白糖巨肽，獲得游離胺基酸與鏈長介於2至10之間之肽之混合物，及將該經水解之混合物進行奈米過濾，以保留分子量介於1000至2000道爾頓之間之部分。

本發明亦關於一種包含上述寡醣成分之食品。該食品視需要可為一種幼兒食物或配方，但是該產品可供嬰兒、幼兒或成年人食用之任何食物或飲品。食用含如此寡醣成分之食品可改善唾液酸吸收進入腦神經節苷脂中，並因此改善相關之神經功能，諸如神經傳輸。

【實施方式】

在本說明書中，在閱讀並理解該闡述、實例及請求項時必需考慮以下詞語之定義。

「CGMP」：酪蛋白-糖巨肽，亦即藉由凝乳酶作用，自牛之κ酪蛋白裂解之糖巨肽。

「幼兒配方」：為計畫在出生後4至6個月期間提供幼兒完全營養及之後部分營養之食品。該術語包括起始配方及較大幼兒配方。

「唾液酸」：N-乙醯基神經胺酸。

本發明提供一種包括通式R_nSac_m之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分，其中R為胺基酸殘基，Sac為選自包括N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n具有介於1至10之間之數值，但其限制條件為若n之數值為1，則R為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若n具有介於2至10之間之值，則該肽包含至少一個蘇胺酸或絲胺酸殘基，m具有介於2至4之間之值，且至少20莫耳%成分為N-乙醯基神經胺酸；以及提供包含此等寡醣成分之幼兒或成人食品。

較佳而言，n具有介於1至3之間之值，及m具有3或4之值。

該成分包含至少20莫耳%之唾液酸，作為醣鏈結之一部份連接至蘇胺酸或絲胺酸之羥基。該唾液酸可構成該鏈之一部份或本身可為該鏈中一個單醣單元之一個取代基。因此，該寡醣成分可包含以下單醣類：

化合物	莫耳%
N-乙醯基半乳糖胺(GalNAc)	10-25
半乳糖(Gal)	10-25
N-乙醯基神經胺酸(NeuAc)	50-20

該寡醣成分可包含15至50莫耳%絲胺酸及/或蘇胺酸之混合物。

該寡醣成分可包含以下醣基化胺基酸或肽：

NeuAc-α-2,3-Gal-β-1,3-(NeuAc-α-2,6-)-GalNAc-R_n

NeuAc-α-2,3-Gal-β-1,3-GalNAc-R_n

Gal-β-1,3-(NeuAc-α-2,6-)-GalNAc-R_n

Gal-β-1,3-GalNAc-R_n

本發明之該寡醣成分可藉由如下方法製造：藉由外切蛋白酶及內切蛋白酶水解CGMP，獲得游離胺基酸及鏈長介於2至10之間之肽之混合物，該經水解之混合物經過奈米過濾，以保留分子量介於1000至2000道爾頓之間之部份。

CGMP本身為製作乳酪之副產物，其利用凝乳酶處理全脂乳，使酪蛋白沈澱。在該製程中，CGMP係自κ酪蛋白裂解並殘留於含有乳清蛋白質之溶液中。該產品稱為甜乳清。該CGMP可藉由相關文獻中所習知之任一方法自該乳清蛋白質分離。一種合適之方法係在歐洲專利案第986312號中加以闡述。

可採用任何合適之酶組合進行水解。其中一種具有外切及內切蛋白酶活性之酶系統商品實例為由Novo Nordisk之Novozymes部門以Flavourzyme®銷售之產品。

水解處理之產物為游離胺基酸、醣基化蘇胺酸及絲胺酸、包含至少一個蘇胺酸或絲胺酸殘基之醣基化肽及未醣基化肽，該等肽之鏈長具有2至10個胺基酸殘基。經過奈米過濾分離該混合物，並保留分子量在1000至2000道爾頓範圍內之部分。該部分將包含本發明之寡醣成分。

本發明一個較佳態樣中，將上述寡醣成分併入食品中。在本發明之上下文中，術語「食品」應包括任何可食用之物質。因此，其可為計畫用於供人類食用之產品，特定言之，幼兒配方、較大幼兒配方、嬰兒食物(諸如幼兒穀片)及其類似物。特定言之，本發明之寡醣成份可併入幼兒配方、較大幼兒乳品、及脫水乳品或穀片混合物中。

該食品可根據產品種類利用相關文獻習知之任一合適方法製備，且在製程中適當階段，添加本發明寡醣成分至該產品中。例如，幼兒配方製法可將蛋白質來源、除了乳糖及脂肪來源外之任何碳水化合物，依合適比例一起混合。若需要，可添加乳化劑。可在該時間點添加維生素及礦物質，然而通常在後來添加，以避免熱降解。任何親脂性維生素、乳化劑及其類似物可先溶於脂肪來源中後再混合。然後，可將水(較佳為已經過逆滲透之水)混入，以得到液態混合物。

然後將該液態混合物進行熱處理，以減少細菌含量。例如，可快速加熱該液體混合物至約80℃至約110℃之溫度約5秒至約5分鐘。此舉可藉由蒸汽注入或藉由熱交換器(例如板式熱交換器)實現。

然後，例如藉由急驟冷卻，使該液態混合物冷卻至約60℃至約85℃。然後，使該液態混合物均質化，例如，分兩個階段，第一階段為約7 MPa至約40 MPa及第二階段為約2 MPa至約14 MPa。然後可進一步使該均質化混合物冷卻，以添加任何熱敏感組分，諸如維生素及礦物質。在此時間點時，可使該均質化混合物之pH及固形物含量進行合適之標準化。

將該均質化混合物轉移至合適之乾燥裝置，諸如噴霧乾燥器或冷凍乾燥機，繼而轉化成粉末。該粉末之含水量應小於約5重量%。

藉由乾燥混合法時，可直接添加，或若呈液體形式，則在上述混合階段添加本發明該寡醣成分至幼兒配方。咸了解，在兩種情況下，添加該成分時同時亦添加了一些胺基態氮，因此習此相關技藝之人士咸了解，必需調整該已添加該成分之幼兒配方或其他產品之蛋白質含量。幼兒配方可允許之蛋白質含量及胺基酸組分係在立法中規定，諸如1991年5月14日之歐洲委員會指令(European Commission Directive)91/321/EEC，且熟習此項相關技藝之人士很容易經由考慮藉由本發明成分所額外引入之胺基態氮及額外增加之蘇胺酸及絲胺酸含量，來調整該幼兒配方之蛋白質含量及胺基酸組分。

嬰兒或幼兒之食品或配方中之寡醣成分之最終濃度可為乾物重計之0.2-4.0重量%，較佳為0.5-2.0重量%。然而，該等含量不應視為限制值，而應配合目標族群，例如基於

該嬰兒或幼兒之重量及年齡或健康狀況計算。較佳為在每次餵養時，將包含本發明寡醣成分之配方或餵養物餵予嬰兒。

儘管最好特別針對幼兒或嬰兒營養補充食品，但是沒有特別針對目標，或針對成人群體之食品可能亦有利。例如，可將本發明寡醣成分併入保健營養產品及用於老年人之營養產品中。該等食品可特別包括乳品、優酪乳、凝乳、乳酪、發酵乳、以乳品為主之發酵飲料、冰淇淋、穀類發酵產品、或以乳品為主之產品。除本發明寡醣成分之外，諸如幼兒配方之食品可再包括另外添加之一種或多種其他寡醣。

本發明現欲經由引用以下實例說明。

實例1

含根據本發明寡醣成分之幼兒配方之組合物實例如下。

營養素	每100 kcal	每升
能量(kcal)	100	670
蛋白質(g)	1.83	12.3
脂肪(g)	5.3	35.7
亞油酸(g)	0.79	5.3
α-亞麻酸(mg)	101	675
乳糖(g)	11.2	74.7
OS成分(g)	0.15	1.0
礦物質(g)	0.37	2.5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430

Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (μg)	8	50
Se (μg)	2	13
維生素A (μg RE)	105	700
維生素D (μg)	1.5	10
維生素E (mg TE)	0.8	5.4
維生素K1 (μg)	8	54
維生素C (mg)	10	67
維生素B1 (mg)	0.07	0.47
維生素B2 (mg)	0.15	1.0
菸鹼酸(mg)	1	6.7
維生素B6 (mg)	0.075	0.50
葉酸(μg)	9	60
泛酸(mg)	0.45	3
維生素B12 (μg)	0.3	2
生物素(μg)	2.2	15
膽鹼(mg)	10	67
Fe (mg)	1.2	8
I (μg)	15	100
Cu (mg)	0.06	0.4
Zn (mg)	0.75	5

實例2

使50 g酪蛋白糖巨肽(Biopure GMP, Davisco, USA)以10%(w/v)之形式溶於500 ml去離子水中。於40℃下，使該溶液在溫和攪拌下加熱30分鐘，然後在1.2巴之饋進壓力而無留滯壓力下，通過具有Pellicon 1000 Da濾筒(0.1 m^2)之實驗室規模之切向流過濾系統(Millipore, USA)進行再循環。

然後，可依每50 g蛋白質3500 LAPU(胺基肽酶單元)添

加來自稻曲黴(Aspergillus oryzae)之胺基肽酶(每克含1000個胺基肽酶單元之Flavourzyme 1000L (LAPU/g), Novozymes, DK)。在約1小時之後，利用3巴饋進壓力增加留滯壓力至3巴，開始進行透析。在5小時之後，停止透析，收集滯留物。使在該製程期間所收集之該滯留物及7個滲透物凍乾。然後，測定各個部分之乾物質(DM)及唾液酸含量。在溫和酸水解後，採用DMB(1,2-二胺基-4,5-亞甲基二氧基苯二鹽酸鹽)法標記，在裝備有Shodex C18逆向管柱及採用標準NeuAc作為外標校準物之螢光檢測器之HPLC上進行分析，測定唾液酸含量。表1顯示起始物質、滲透物及滯留物中之質量平衡及唾液酸含量。

表1

	質量(g)	NeuAc (DM%)	產率(%)	濃縮度
起始物質	50	7.5	**100**	**1.00**
滲透物1	4.32	0.2	**8.64**	**0.03**
滲透物2	3.1	0.2	**6.2**	**0.02**
滲透物3	6.1	0.3	**12.2**	**0.04**
滲透物4	4.29	1.4	**8.58**	**0.18**
滲透物5	3.56	0.8	**7.12**	**0.10**
滲透物6	2.8	0.4	**5.6**	**0.05**
滲透物7	2.94	0.3	**5.88**	**0.04**
滯留物	22.6	14.4	**45.2**	**1.92**

滯留物中之半乳糖及N-乙醯基半乳糖胺之含量係在酸水解之後，採用裝備有Dionex CarboPac PA1分析柱之HPAEC及脈衝電流分析法監測儀測定。簡單地說，先將滯留物溶於水中，繼而添加三氟乙酸至2M之最終濃度。使該溶液

於100℃下加熱3小時，在氮氣流條件下乾燥，然後利用水再溶解。在通過22 μm之微粒過濾器過濾之後，分析該樣本。利用作為外標校準物之標準半乳糖及半乳糖胺(N-乙醯基半乳糖胺在酸處理期間變成半乳糖胺)進行定量。在利用6 N HCl進行酸水解後，藉由HPLC定量蘇胺酸。

最終乾燥之滯留物產物包含29.6重量%之$(NeuAc)_{2-3}$-Gal-GalNAc-Thr及類似結構之NeuAc-α-2,3-Gal-β-1,3-(NeuAc-α-2,6-)-GalNAc-蘇胺酸/具有30莫耳%唾液酸、15莫耳%半乳糖、13莫耳%N-乙醯基半乳糖胺及42莫耳%蘇胺酸之肽。

201036555

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：99106305

※ 申請日：99.3.4　　※IPC 分類：~~C07K~~; A23L

A23L 1/305 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23C 9/152 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

寡醣成分

OLIGOSACCHARIDE INGREDIENT

二、中文發明摘要：

本發明係關於一種包括通式R_nSac_m之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分，其中R為胺基酸殘基，Sac為選自包括N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n具有介於1至10之間之值，但其限制條件為若n之數值為1，則R為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若n具有介於2至10之間之值，則該肽包含至少一個之蘇胺酸或絲胺酸殘基，m具有介於2至4之間之值，且至少20莫耳%之成分為N-乙醯基神經胺酸。

三、英文發明摘要：

An oligosaccharide ingredient comprising glycosylated amino acids and peptides of the general formula R_nSac_m where R is an amino acid residue, Sac is a monosaccharide selected from the group comprising N-acetyl-neuraminic acid, N-acetyl galactosamine and galactose, n has a value between 1 and 10 with the proviso that if n has the value 1 R is a threonine residue or a serine residue and if n has a value between 2 and 10 the peptide contains at least one threonine or serine residue, m has a value between 2 and 4 and at least 20 mol% of the ingredient is N-acetyl-neuraminic acid.

七、申請專利範圍：

1. 一種包括通式R_nSac_m之醣基化胺基酸及肽之寡醣成分，其中R為胺基酸殘基，Sac為選自包括N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺及半乳糖之群之單醣類，n具有介於1至10之間之值，但其限制條件為若n之數值為1，則R為一個蘇胺酸殘基或一個絲胺酸殘基，及若n具有介於2至10之間之值，則該肽包含至少一個蘇胺酸或絲胺酸殘基，m具有介於2至4之間之值，且至少20莫耳%成分為N-乙醯基神經胺酸。
2. 如請求項1中所述之寡醣成分，其包含10至25莫耳%之N-乙醯基半乳糖胺、10至25莫耳%之半乳糖、20至50莫耳%之N-乙醯基神經胺酸及15至50莫耳%之蘇胺酸或絲胺酸或其混合物。
3. 如請求項1或2中所述之寡醣成分，其中n具有介於1至3之間之值。
4. 如上述請求項中任一項所述之寡醣成分，其中m具有2或3之值。
5. 一種食品，其包括如請求項1至4中任一項所述之寡醣成分。
6. 如請求項5中所述之食品，其為一種幼兒配方。
7. 如請求項5或6中所述之食品，其包含0.2至4.0重量%之該寡醣成分。
8. 一種製造如請求項1至4中任一項所述之寡醣成分之方法，其包括如下步驟：藉由外切蛋白酶及內切蛋白酶水

解酪蛋白糖巨肽，獲得游離胺基酸及鏈長介於2至10之間之肽之混合物，及將該水解混合物經過奈米過濾，保留分子量介於1000至2000道爾頓之間之部分。

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)