

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 分解幾丁質生成還原醣 之最適碳源與氮源濃度探討

盧沛誼¹ 吳淑姿^{1,2} 余世宗^{3*}

¹大葉大學生物產業科技學系

²大葉大學餐旅管理學系

³大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*yust@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究從彰化縣大村鄉田間土壤取樣，篩選出幾丁質分解酵素之菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，探討菌株分解幾丁質之最適培養條件。以“一次一因子”法先探討不同碳源種類和濃度及氮源蛋白胨 (peptone) 濃度對菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 之幾丁質分解酶活性和還原醣生成量之影響，再以反應曲面法探討菌株分解幾丁質生成還原醣之最適培養條件。結果顯示，5% β -幾丁質培養之幾丁質分解酶活性最高為 1,572 U/L。4% β -幾丁質培養，具最高還原醣產量 15.4 g/L；以蛋白胨為氮源時，濃度為 0.5 g/L 之培養，幾丁質分解酶活性最高為 1,850 U/L，還原醣產量為 12.5 g/L。進行中心混成試驗，探討菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 生成還原醣之最適化培養條件。結果顯示， β -幾丁質含量與蛋白胨含量兩因子，對還原醣生成量達到顯著水準 ($p < 0.05$)，由反應曲面法獲得碳氮源最適培養組成為 4.42% β -幾丁質與 0.55 g/L 蛋白胨，預估最大還原醣產量 20.52 g/L。經由發酵培養驗證最適化條件，還原醣產量為 20.24 g/L，實驗值與預測值並無太大差異，表示此一回應模式能適切預測菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 生產還原醣之產量。

關鍵字: *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，幾丁質分解酶，還原醣，反應曲面法，最適培養條件

Optimal Concentrations of Carbon and Nitrogen in *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 for the Production of Reducing Sugars through Chitin Degradation

PEI-YI LU¹, SHWU-TZY WU^{1,2} and SHIH-TSUNG YU^{3*}

Department of Bioindustry Technology, Da-Yeh University¹

Department of Hospitality Management, Da-Yeh University²

Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University³

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua, 51591, Taiwan, R.O.C.

*yust@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

In this study, *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 obtained in Dacun, Changhua, Taiwan was screened for chitin degradation. This study explored the optimal cultivation conditions of *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 for the breakdown of chitin. The one-factor-at-a-time method was used to investigate the effect of different carbon sources and concentrations as well as peptone concentrations on chitinase activity and the production of reducing sugar. Response surface methodology was used to explore optimal cultivation conditions for the production of reducing sugars through chitin degradation. The results showed that the highest chitinase activity in 5% β -chitin culture was 1,572 U/L. The highest proportion of reducing sugar was 15.4 g/L in 4% β -chitin culture. When 0.5 g/L peptone was the nitrogen source, the highest chitinase activity and reducing-sugar proportion were 1,850 U/L and 12.5 g/L, respectively. Central composite design was used to investigate the optimal cultivation conditions for the production of reducing sugars by *Aeromonas veronii* DYU-Too 19. The concentrations of β -chitin and peptone were significantly related to the level of reducing-sugar production ($p < 0.05$). The optimal cultivation condition obtained by the response surface methodology was 4.42% β -chitin and 0.55 g/L peptone, which had the maximum reducing-sugar yield 20.52 g/L. The optimal cultivation conditions yielded 20.24 g/L reducing sugar. No significant difference was observed between the experimental and the predicted values. Therefore, this response model can accurately predict the yield of reducing sugar produced by *Aeromonas veronii* DYU-Too 19.

Keywords: *Aeromonas veronii* DYU-Too 19, Chitinase, Reducing sugar, Response surface methodology

一、前言

幾丁質為自然界存量僅次於纖維素之高分子醣類，是自然界中含量第二多的多醣聚合體，其化學結構與纖維素類似，為N-乙醯葡萄糖胺以 β -1,4鍵結之天然多醣，呈現纖維結晶之型態，外表為白色、堅硬、無彈性之含氮多醣，其與纖維素的結構差異在於第二碳上之羥基被乙醯基所取代，與纖維素一樣具有不溶於水之特性。存在於節肢動物之外骨骼，或真菌及酵母菌之細胞壁 [10, 12]，昆蟲與蝦、蟹的外骨骼。幾丁質具有生物可分解性、生理惰性、抗菌性、親水性及對蛋白質有吸附能力等特性，廣泛應用於醫藥與製藥技術上，如傷口的包紮材料 [19]、膠囊填充藥物。因為它的黏膜貼附性，也可應用在包覆膠體、粉末、薄膜等。農業上，轉殖基因於植物的幾丁質酶可以當生物性農藥，防禦植物病原體和農業害蟲，可以抵抗植物根腐病、幾丁質酶可以裂解真菌菌絲的細胞壁，達到抑制真菌菌絲生長能力 [5, 13, 16, 17]。

幾丁質水解所得之N-乙醯葡萄糖胺和N-乙醯幾丁寡醣，如幾丁二醣、幾丁三醣、幾丁四醣等，為水溶性低分

子的醣類，具有特殊的生理活性與抗菌能力、抑制腫瘤細胞活性、增強免疫力，以及抗氧化能力等 [7-9, 11, 15]，可用於醫學、食品、農業、廢水等相關領域。N-乙醯幾丁寡醣的製備，有化學法與酵素法。化學法所需時間短且成本低，因而被廣泛採用，其缺點為製備的寡醣聚合度難以控制，有衍生物及環境汙染的問題。酵素法是以微生物或酵素製備，汙染性低、製程簡易及專一性高 [6, 14]。

本研究的目的是篩選具幾丁質分解酵素菌株，利用“一次一因子”法進行培養，探討不同碳源種類和濃度、氮源蛋白胨（peptone）濃度之適宜培養條件，再利用反應曲面法探討菌株分解幾丁質之最適培養條件。

二、材料與方法標題

篩選具分解幾丁質以生成 N-乙醯幾丁寡醣之菌株，以“一次一因子”法探討不同碳源、不同碳源濃度及氮源蛋白胨（peptone）濃度對還原醣生成量之影響，並以反應曲面法探討菌株最適培養條件。

（一）培養基組成

CB (chitin broth) 為發酵培養基，用以誘導菌株產生幾丁質水解酶之培養基，其組成為 0.03% KH_2PO_4 、0.07% K_2HPO_4 、0.05% MgSO_4 、0.03% peptone、0.03% yeast extract、2.0% α -幾丁質。

(二) 膠態幾丁質之製備

取 α -幾丁質粉末 (g)：鹽酸 (mL, 12N) 比例為 1：10，充分混合並攪拌 1 h 後，再以大量冰水重複沉降數次，待上層液 pH 大於 6.5 後，以 6,000 rpm 離心 30 min，收集膠態幾丁質。取 3 ~ 4 g 膠態幾丁質於烘箱 100 °C 烘乾，換算膠態幾丁質含幾丁質量，後續以濕式膠態幾丁質為原料進行試驗，後續以濕式膠態幾丁質為原料進行試驗。

(三) 實驗菌株

實驗菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too19 篩選自彰化縣大村鄉山腳路田間土壤，經由膠態幾丁質培養基培養後，確認具有分解幾丁質之能力。

(四) 還原醣含量之測定

將培養之菌液以 4,500 rpm 離心 15 min 後，取 1.5 mL 上清液加入 2 mL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 呈色劑 (0.5 g 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶解於 1 L 之 0.5 M 的 Na_2CO_3 溶液中)，置於沸水浴 15 min，待冷卻，於 420 nm (U-2000, Hitachi, Tokyo) 下測其吸光值 [4]。以 N-乙醯葡萄糖胺為標準品。

(五) 幾丁質分解酶活性分析

將培養之菌液以 6,000 rpm 離心 15 min，取上清液 0.2 mL 加入含 0.1% 膠態幾丁質之 McIlvaine buffer (pH 7) 1 mL，在 40 °C 下反應 30 min 後，以 10,000 rpm 離心 10 min，取上清液 0.75 mL 加入蒸餾水 0.75 mL 及 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 呈色劑 2 mL，置於沸水浴中反應 15 min，待冷卻後，於波長 420 nm 測其吸光值。酵素活性單位 (U) 定義為酵素在 40 °C、pH 7 下，每分鐘分解膠態幾丁質生成 1 μmol 還原醣，即為 1 酵素活性單位。

(六) 菌株最適培養之實驗設計

本研究採用回應曲面法 (response surface methodology, RSM) 分析 [2]，根據“一次一因子”法之結果，探討不同 β -幾丁質濃度與不同蛋白胨濃度兩因子對菌株分解幾丁質之最適培養條件。中心混成實驗採用兩變因五階層因子設計，包含星點 (star points) 與中心點 (central points)，將實驗結果以多元迴歸法進行二階模式之理論契合，探討兩變因之互動關係。因子設計以正規水準 -d、-1、0、+1、+d 表示，兩變因之因子設計有 4 組試驗，外加星點 4 組及中心點 3 組共

計 11 組試驗。數據以統計軟體 STATISTICA 進行統計迴歸，利用變異數分析法 (analysis of variance) 檢驗回應曲面對於實驗數據的適切程度。

三、結果與討論

本研究利用“一次一因子”法進行培養，探討不同碳源種類和濃度、氮源蛋白胨 (peptone) 濃度之適宜培養條件，再利用反應曲面法探討菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too19 分解幾丁質之最適培養條件。

(一) 菌株 DYU-Too 19 之基本特性分析

菌株 DYU-Too19 是篩選自彰化縣大村鄉山腳路田間之土壤，經由膠態幾丁質培養基培養後，確認具有分解幾丁質之能力。此菌株屬革蘭氏陰性桿菌，好氧與厭氧環境下皆會生長。委託台北基龍米克斯生物科技公司進行菌種鑑定，以 NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool of the National Center for Biotechnology Information) 鑑定系統分析，此菌株與 *Aeromonas veronii* 相似度達到 98%，為 *Aeromonas* 屬，命名為 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19。

(二) 不同碳源培養

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 以 CB 培養基進行發酵培養，探討菌株對不同型態碳源 (α -幾丁質、 β -幾丁質和膠態幾丁質) 之幾丁質分解酶活性和還原醣生成量的影響。

菌株以含 2% 之 α -幾丁質、 β -幾丁質及膠態幾丁質之培養基培養，氮源為 0.3 g/L yeast extract 及 0.3 g/L 蛋白胨，培養於 30 °C。每 24 h 取樣一次，測定其酵素活性及還原醣生成量。

以 2% β -幾丁質為碳源培養 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，具有最高酵素活性，如圖 1 (a) 所示，隨培養時間增加而上升，在 120 h 酵素活性達到最高為 827 U/L。在相同條件下培養，*Aeromonas veronii* DYU-Too 19 之幾丁質分解酶活性比 *Aeromonas* sp. DYU-Too 13 高 (125 U/L) [1]。以 α -幾丁質及膠態幾丁質為碳源時，酵素活性亦隨著培養時間增加而上升，在 120 h 時酵素活性分別為 246 U/L 與 137 U/L。

以不同碳源培養菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 之還原醣生成量之變化，如圖 1 (b) 所示。以不同碳源培養，還原醣量均隨著培養時間增加而上升。 α -幾丁質培養於培養 144 h 還原醣量達到最高 1.9 g/L； β -幾丁質培養於 120 h 還原醣量為 7.9 g/L，與 *Aeromonas* sp. DYU-Too 13 和 *Bacillus*

sp. DYU-Too 17 之還原醣生成量相近 [1, 3]；膠態幾丁質培養培養 144 h 時，還原醣量達到最高，為 1.7 g/L。實驗結果顯示，以 β -幾丁質為碳源時，菌株具有較高之幾丁質分解酶活性和還原醣生成量，主要與 β -幾丁質結構較為鬆散有關， β -幾丁質的結構較 α -幾丁質鬆散，當以 β -幾丁質為碳源時，菌株可快速分解，因而酵素活性及還原醣量快速增加 [4, 18]。 α -幾丁質經由鹽酸處理過所得之膠態幾丁質，結構變得較蓬鬆，但仍維持 α -幾丁質結構，菌株 *Aeromonas veronii*

DYU-Too 19 仍無法有效分解。

(三) 不同碳源濃度

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 以 1~5% 之 α 、 β 及膠態幾丁質做為碳源培養，氮源為 0.3 g/L yeast extract 與 0.3 g/L 蛋白胨，培養於 30 °C。每 24 h 取樣一次，量測其酵素活性及還原醣生成量，探討菌株對不同濃度之幾丁質分解能力。

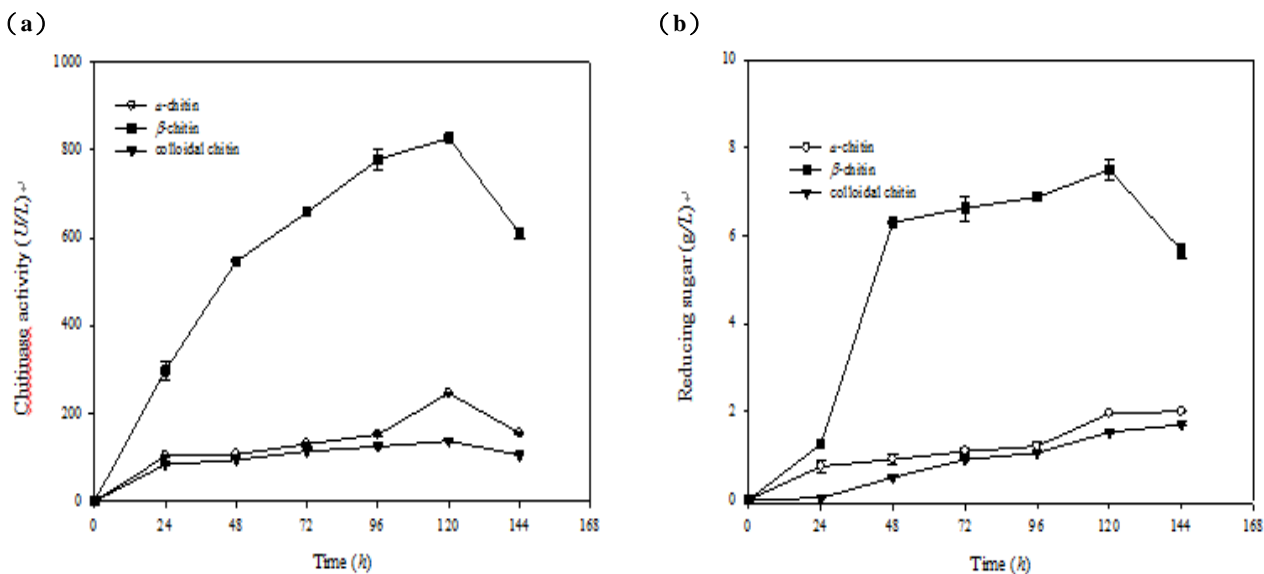


圖 1. 不同碳源培養 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，(a) 幾丁質分解酶活性；(b) 還原醣生成量

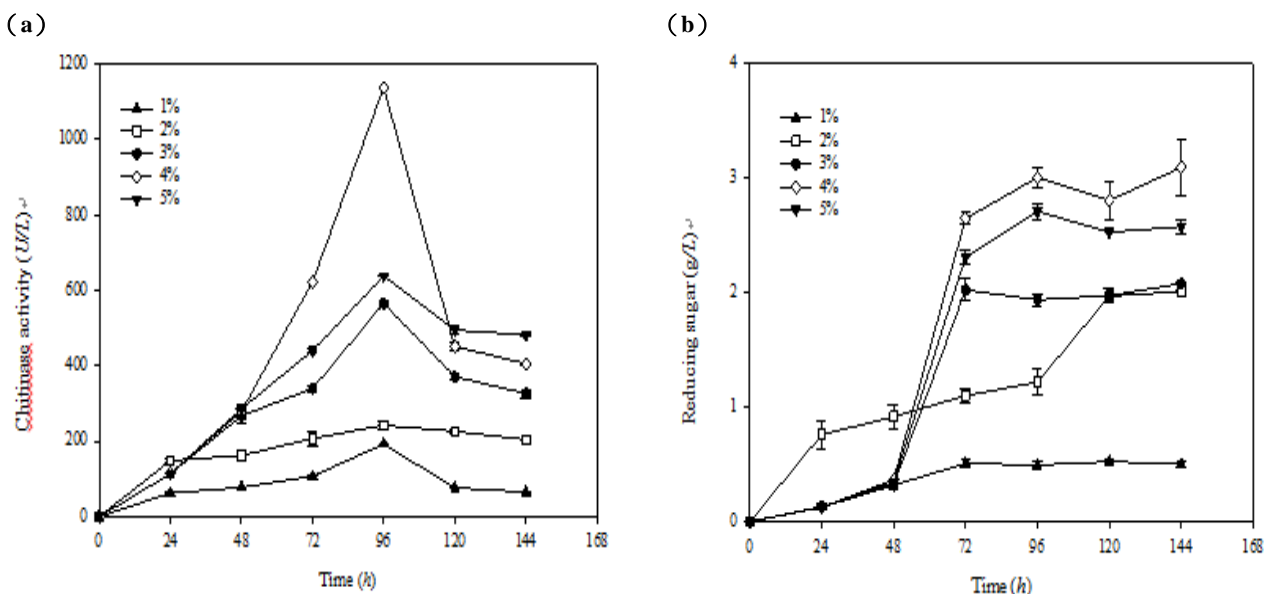


圖 2. 不同 α -幾丁質濃度培養 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，(a) 幾丁質分解酶活性；(b) 還原醣生成量

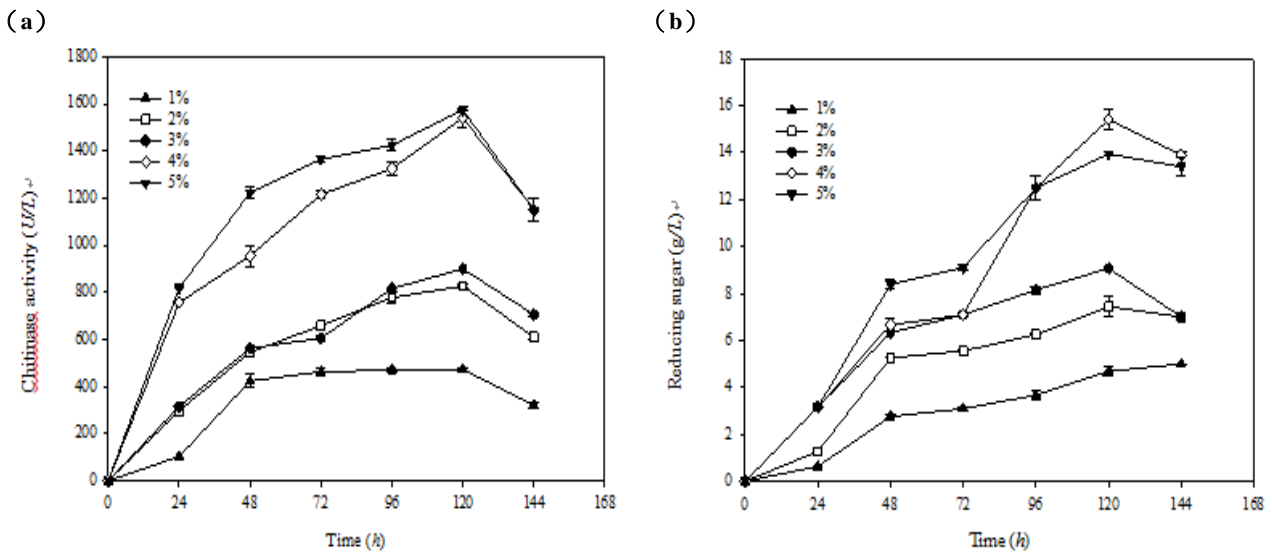


圖 3. 不同 β -幾丁質濃度培養 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，(a) 幾丁質分解酶活性；(b) 還原醣生成量

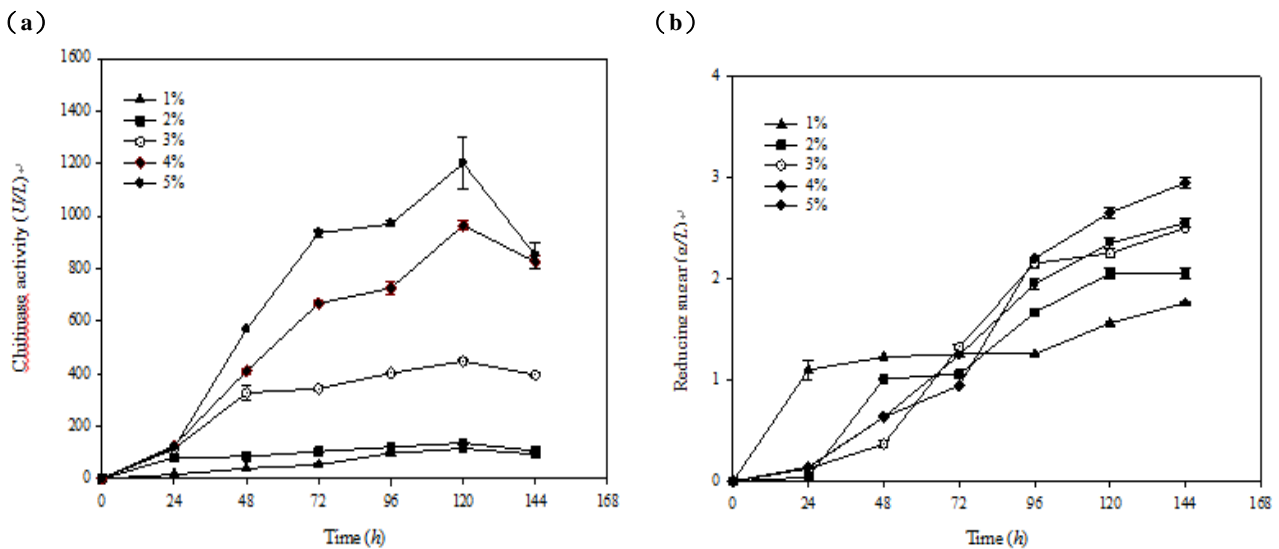


圖 4. 不同膠態幾丁質濃度培養 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，(a) 幾丁質分解酶活性；(b) 還原醣生成量

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 培養於含 1~5% α -幾丁質培養基，幾丁質分解酶活性變化，如圖 2 (a) 所示。其酵素活性快速上升，以 4% α -幾丁質之培養，於培養 96 h，活性達到最高約 1138 U/L。還原醣生成量變化如圖 2 (b) 所示。2~4% α -幾丁質之培養，其還原醣量皆隨時間增加而上升，4% α -幾丁質之培養在 144 h 時之還原醣量為 3.08 g/L。實驗以批次方式培養菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 分解 α -幾丁質，在發酵過程培養基中某些成分消耗殆盡，限制微生物生長降低幾丁質分解酵素 (chitinase) 的分泌，培養過程微生物分泌胞外物質亦會影響微生物生長及幾丁質分解酵素的分泌，此外微生物分泌之幾丁質分解酵素其

活性亦會隨培養條件變化而衰退。

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 培養於含 1~5% β -幾丁質，幾丁質分解酶活性變化，如圖 3 (a) 所示。隨 β -幾丁質培養濃度增加，幾丁質分解酶活性增加，於培養 120 h，5% β -幾丁質培養之幾丁質分解酶活性最高為 1572 U/L。

還原醣生成量如圖 3 (b) 所示。其還原醣量生成量隨培養時間增加而增加，4% β -幾丁質之培養 120 h 時，有最高之還原醣量為 15.4 g/L。

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 培養於含 1~5% 膠態幾丁質培養基，幾丁質分解酶活性變化，如圖 4 (a) 所

示。5% 膠態幾丁質培養於 120 h 時，活性達到最高 1,200 U/L，之後逐漸降低。還原醣生成量變化如圖 4 (b) 所示。其還原醣量皆隨培養時間增加而上升，4% 膠態幾丁質之培養 144 h 時，有最高之還原醣量，約為 2.9 g/L。

實驗結果顯示，*Aeromonas veronii* DYU-Too 19 以 β -幾丁質為碳源時，菌株具有較高之幾丁質分解酶活性 1,572 U/L 和還原醣生成量 15.4 g/L。 β -幾丁質除結構較鬆散，酵素較易接近分解外，以 β -幾丁質為碳源時，分泌多種幾丁質酶，有助於分解 β -幾丁質[8]。

(四) 不同蛋白胨濃度

菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too19 以 0.1、0.3、0.5、0.7 及 0.9 g/L 之蛋白胨為氮源培養，碳源為 4% β -chitin，於 30 °C 培養，每 24 h 取樣一次，量測其酵素活性和還原醣生成量，探討不同濃度之蛋白胨對菌株生成還原醣之影響。菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 培養於五種不同濃度蛋白胨，幾丁質分解酶活性變化，如圖 5 (a) 所示。培養於五種不同濃度蛋白胨時，其酵素活性皆在 120 h 時達到最高，以添加 0.5 g/L 蛋白胨時具最高活性 1,850 U/L。還原醣生成量，如圖 5 (b) 所示。其還原醣量皆隨時間增加而上升，

蛋白胨添加為濃度 0.5g/L 具最高還原醣量為 12.5g/L。*Aeromonas veronii* DYU-Too 19 之幾丁質分解酶活性及還原醣生成量均比 *Aeromonas hydrophila* 為佳 [4]。

(五) 幾丁質分解效率之最適培養

以“一次一因子”法結果為依據，利用反應曲面法探討菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too19 分解幾丁質之最適培養條件。”一次一因子”法結果得知，以 4% β -幾丁質為碳源及 0.5g/L 蛋白胨為氮源時，可獲得較高之幾丁質分解效率及還原醣產率。本研究以 β -幾丁質 (X_1) 與蛋白胨濃度 (X_2) 二因子，探討對菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 生合成還原醣產率之影響。

1. 實驗設計

實驗設計以含 4% β -幾丁質與 0.5 g/L 蛋白胨為培養原點，進行五階層因子設計，二因子之各水準 (level) 與相對濃度列於表 1。兩變因五階層因子設計共有 4 組試驗，外加星點 4 組及中心點 3 組共計 11 組試驗。在第一組至第四組為因子設計實驗，而第五組至第八組為星點，第九組至第十一組為中心點之三重複實驗，如表 2 所示。

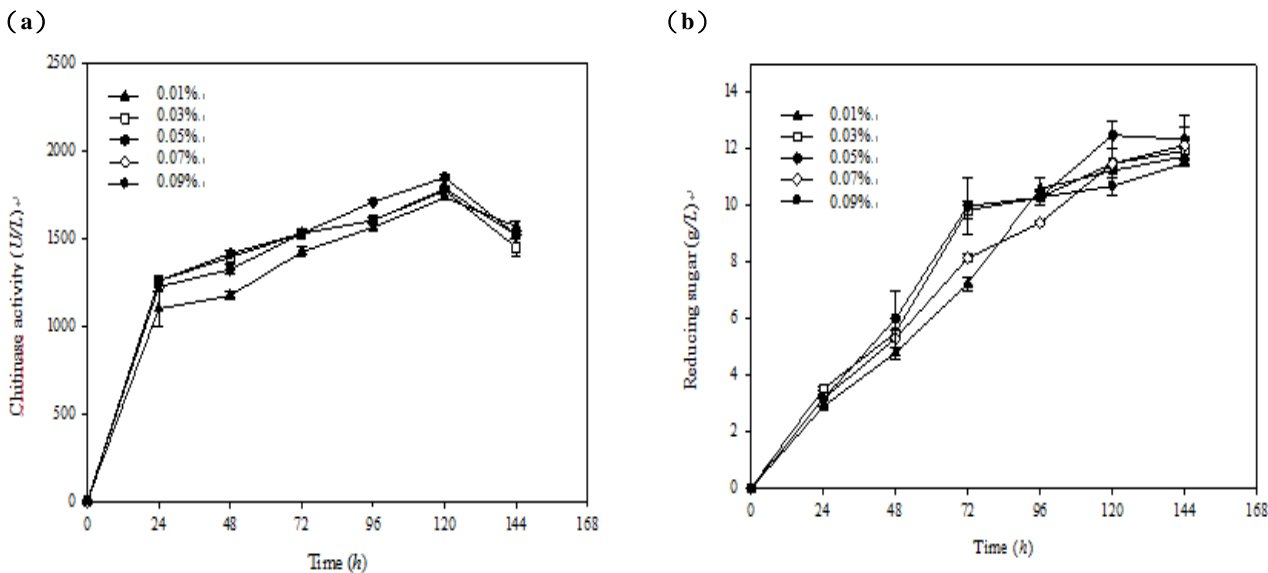


圖 5. 不同蛋白胨濃度培養 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19，(a) 幾丁質分解酶活性；(b) 還原醣生成量

表 1. 中心混成設計實驗之控制因子

Factors	Symbols	Coded Levels				
		-d	-1	0	+1	+d
β -Chitin (%)	X_1	2.60	3.00	4.00	5.00	5.40
Peptone (g/L)	X_2	0.29	0.35	0.50	0.65	0.71

表 2. 中心混成試驗之結果

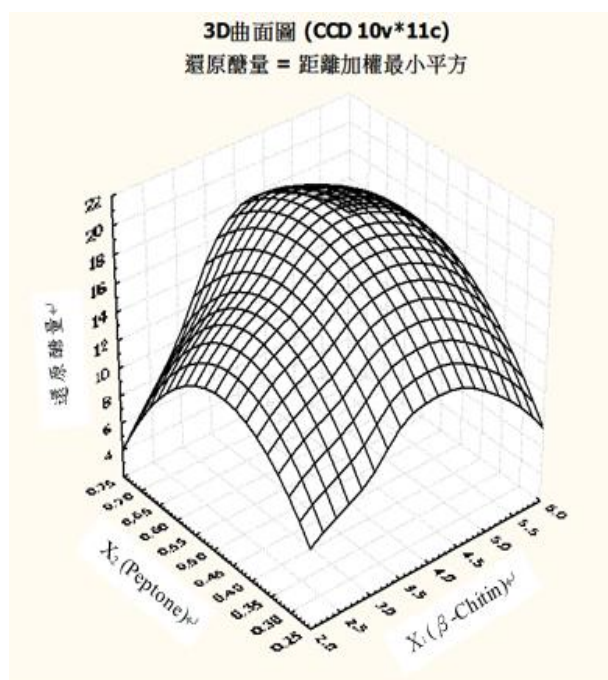
Trial	β -Chitin		Peptone		Reducing sugars (g/L)
	Coded Levels	Actual value (%)	Coded Levels	Actual value (g/L)	
1	-1	3	-1	0.35	14.56
2	+1	5	-1	0.35	16.22
3	-1	3	+1	0.65	14.37
4	+1	5	+1	0.65	19.00
5	-d*	2.6	0	0.50	16.18
6	+d	5.4	0	0.50	18.45
7	0	4	-d	0.29	15.31
8	0	4	+d	0.71	18.46
9(C)	0	4	0	0.50	20.18
10(C)	0	4	0	0.50	19.61
11(C)	0	4	0	0.50	20.54

*d=1.414

No. 9 (C), 10 (C) 及 11 (C)表示中心點重覆三次

表 3. 反應曲面模式之變異數分析表

Parameter	Sum of Squares (SS)	Degrees of Freedom (df)	Mean Square (MS)	F ratio	P-value
X_1	11.3185	1	11.3185	14.1362	0.0132*
X_1^2	15.6621	1	15.6621	19.5611	0.0069**
X_2	6.1868	1	6.1868	7.7270	0.0389*
X_2^2	19.9976	1	19.9976	24.9759	0.0041**
X_1X_2	2.2052	1	2.2052	2.7542	0.1579
Error	4.0033	5	0.8000		
Total SS	51.5544	10			

** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ X_1 : β -chitin powder X_2 : peptone圖 6. β -幾丁質與蛋白胨濃度對還原醣產量影響之反應曲面圖

2. 實驗結果

利用中心混成試驗得到兩因子濃度對於還原醣生成量之結果，列於表 2。以還原醣生成量 (Y) 當作應變數對兩因子 (β -幾丁質 (X_1)、蛋白胨 (X_2)) 進行複迴歸，其二次迴歸方程式為

$$Y = -25.9080 + 12.2251 X_1 - 1.6881 X_1^2 + 70.8686 X_2 - 84.7764 X_2^2 + 4.9500 X_1 X_2$$

以中心混成試驗實驗結果做變異數分析，如表 3。變異數分析結果， β -幾丁質含量 (X_1) 因子與蛋白胨含量 (X_2) 因子達到顯著水準 ($p < 0.05$)， β -幾丁質粉末含量 (X_1^2) 與蛋白胨 (X_2^2) 的二次項顯著水準達 $p < 0.01$ ，而 β -幾丁質與蛋白胨二因子之交互作用 (X_1X_2) 並無達到顯著水準。

利用二次迴歸方程式來描述兩因子與還原醣之產量的關係，繪製反應曲面，如圖 6 所示。圖中發現 β -幾丁質含量與蛋白胨濃度越接近中心點，還原醣產量越高。經統計軟體分析，最適培養條件為 4.42% β -幾丁質與 0.55 g/L 蛋白胨，

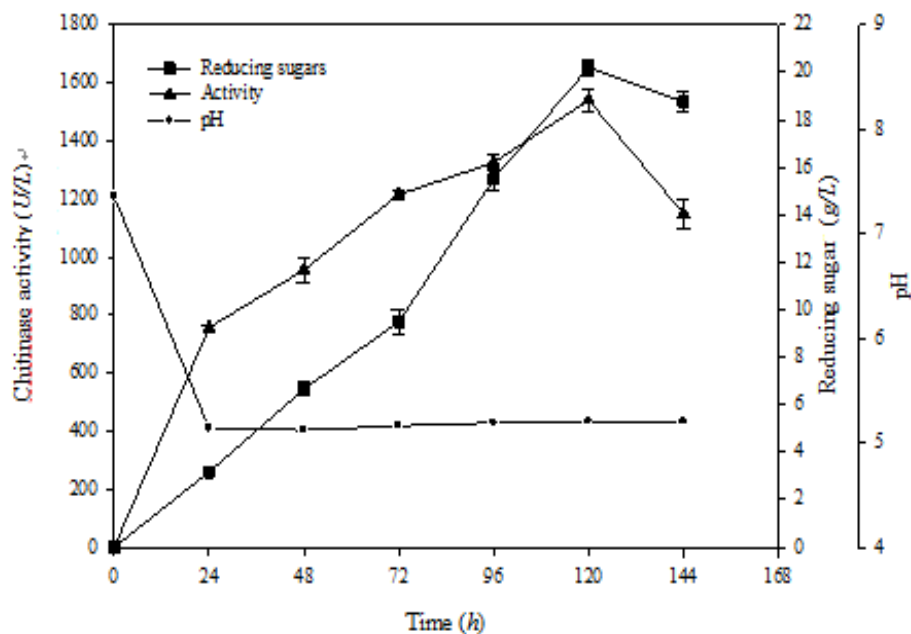


圖 7 菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 於最適條件培養

可預估得到最大還原醣產量，為 20.52 g/L。為證明實驗設計之結果，再次進行最適培養條件試驗，實驗結果如圖 7 所示。還原醣產量為 20.24 g/L，與預測值並無太大差異，表示此一回應模式能適切預估菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 之實驗結果。發酵過程培養基中某些成分消耗殆盡及微生物分泌胞外物質，限制微生物生長降低幾丁質分解酵素的分泌，幾丁質分解酵素活性隨培養條件變化而衰退，以上種種複雜因素交錯影響培養液中酵素活性，因而酵素活性和還原醣濃度在第 120h 達到最高點，而後下降。

四、結論

本研究以自行篩選之 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 為實驗菌株，以“一次一因子”法探討不同碳源種類和濃度、蛋白胨濃度對還原醣生成量影響，並利用中心混成試驗，探討菌株還原醣產率之最適培養條件。

一次一因子實驗結果得知，以不同碳源 (α -幾丁質、 β -幾丁質及膠態幾丁質) 培養，菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 培養於 4% β -幾丁質時，還原醣量達最高 15.4 g/L。以不同蛋白胨濃度 (0.1、0.3、0.5、0.7 及 0.9 g/L) 培養，生合成最高還原醣量，以 0.5 g/L 蛋白胨培養時，還原醣產量較高 12.5 g/L。菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19

於 4% β -幾丁質、0.5 g/L 蛋白胨，其還原醣產量較高，利用此條件進行中心混成試驗。

中心混成試驗結果顯示，培養基之 β -幾丁質含量與蛋白胨含量對還原醣產量有顯著影響，經統計軟體分析，最適培養條件為 4.42% β -幾丁質與 0.55 g/L 蛋白胨，可預估最大還原醣產量，為 20.52 g/L。以分析所得之最適培養條件進行實驗，實驗結果還原醣產量為 20.24 g/L，此結果與回應曲面模式預測值比較並無太大差異，表示此一回應模式能適切預測菌株 *Aeromonas veronii* DYU-Too 19 生產還原醣之產量。

參考文獻

1. 林玠伯 (民 98)，以 *Aeromonas* sp. DYU-Too12 生產 N-乙醯幾丁寡醣及其幾丁質酶之特性分析，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
2. 洪哲穎、陳國誠 (民 81)，回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用，化工專論，39(2)，3-18。
3. 張育祥 (民 100)，菌株 *Bacillus* sp. DYU-Too17 生產 N-乙醯幾丁寡醣之最適培養條件，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
4. 顧振旗 (民 97)，發酵培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 生產 N-乙醯幾丁寡醣之培養條件探討，大葉大學生物產

業科技學系碩士論文。

5. Dahiya, N., R. Tewari and G. S. Hoondal (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 773-782.
6. Hamed, I., F. Ozogu, and J. M. Regenstein (2016) Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40-50.
7. Hayes, M., B. Carney, J. Slater and W. Bruck (2008a) Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan - Part A: extraction methods. *Biotechnology Journal*, 3, 871-877.
8. Hayes, M., B. Carney, J. Slater and W. Bruck (2008b) Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: chitin and chitosan - Part B: Applications. *Biotechnology Journal*, 3, 878-889.
9. Horn, S. J., A. Sorbotten, B. Synstad, P. Sikorski, M. Sorlie, K. M. Varum and V. G. Eijsink (2006) Endo/exo mechanism and processivity of family 18 chitinases produced by *Serratia marcescens*. *FEBS Journal*, 273, 491-503.
10. Kumar, A., D. Kumar, N. George, P. Sharma and N. Gupta (2018) A process for complete biodegradation of shrimp waste by a novel marine isolate *Paenibacillus* sp. AD with simultaneous production of chitinase and chitin oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 263-272.
11. Kumar, M., A. Brar, V. Vivekanand and N. Pareek (2017) Production of chitinase from thermophilic *Humicola grisea* and its application in production of bioactive chitooligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, Part B, 1641-1647.
12. Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* 31, 603-632.
13. Shehata, A. N., A. A. Abd El Aty, D. A. Darwish, W. A. Abdel Wahab and F. A. Mostafa (2018) Purification, physicochemical and thermodynamic studies of antifungal chitinase with production of bioactive chitosan-oligosaccharide from newly isolated *Aspergillus griseoaurantiacus* KX010988. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, Part A, 990-999.
14. Song, Y. S., D. J. Seo, W. T. Ju, Y. S. Lee and W. J. Jung (2015) Enzymatic properties of chitinase-producing antagonistic bacterium *Paenibacillus chitinolyticus* with various substrates. *Microbial Pathogenesis*, 89, 195-200.
15. Songsiriritthigul, C., S. Lapboonrueng, P. Pechsrichuang, P. Pesatcha and M. Yamabhai (2010) Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresource Technology*, 101, 4096-4103.
16. Subbanna, A. R. N. S., H. Rajasekhara, J. Stanley, K. K. Mishra and A. Pattanayak (2018) Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. *Soil Biology and Biochemistry*, 116, 52-66.
17. Tsujibo, H., T. Kubota, M. Yamamoto, K. Miyamoto and Y. Inamori (2003) Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardioopsis prasina* OPC-131. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 894-900.
18. Young, M. E. and P. A. Carroad (1981) Dependence of extracellular chitinase activity of *Serratia marcescens* QMB1466 on continuous culture dilution rate. *Canadian Journal of Microbiology*, 27, 142-144.
19. Yusof, N. L., A. Wee, L. Y. Lim and E. Khor (2003) Flexible chitin films as potential wound-dressing materials: wound model studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A, 224-232.

收件：107.06.09 修正：107.09.18 接受：107.11.07