

# *Aeromonas hydrophila* Too12 生產 *N*-乙醯幾丁寡醣之發酵 培養條件探討

顧振旗<sup>1</sup> 吳淑姿<sup>1,2</sup> 余世宗<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>大葉大學食品暨應用生物科技學系

<sup>2</sup>大葉大學餐旅管理學系

<sup>3</sup>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

探討不同培養條件（不同碳源、氮源、 $\alpha$ -幾丁質濃度、 $\beta$ -幾丁質濃度和通氣量）對菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12 生產 *N*-乙醯幾丁寡醣的影響。菌株培養於 2%  $\alpha$ -幾丁質與膠態幾丁質 72 h，水解產物以 *N*-乙醯幾丁三醣為主，分別為 0.48 與 0.47 g/L。菌株培養於 5%  $\alpha$ -幾丁質 144 h，水解產物 *N*-乙醯葡萄糖胺 2.85 g/L 與 *N*-乙醯幾丁三醣 2.42 g/L。培養於 4%  $\beta$ -幾丁質，生成水解產物含有 *N*-乙醯幾丁四醣 0.68 g/L。以蛋白朊、酵母抽出物及胰化蛋白為氮源之培養，其幾丁質分解酶活性、還原醣生成量及幾丁質水解產物相近。於高溶氧的批次發酵培養 96 h，*N*-乙醯幾丁三醣產量為 0.64 g/L。於低溶氧的批次發酵培養 72 h，*N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁三醣，分別有 1.26 與 1.1 g/L。不通氣的批次發酵培養 96 h，*N*-乙醯葡萄糖胺為 2.55 g/L。培養菌株之粗酵素液，經硫酸銨沉澱、透析、離子交換層析（DEAE-Sepharose CL-6B）和膠體過濾層析（Sephacryl S-100）純化步驟，收集具活性之波峰，利用活性染色分析，33 kDa 蛋白質於膠片上有明顯活性。酵素最適反應溫度與 pH 值分別為 40 °C 與 6.0。Hg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 及 Mn<sup>2+</sup> 金屬離子對幾丁質分解酶活性具抑制作用，EDTA 對幾丁質分解酶之活性具促進作用。

**關鍵詞：***N*-乙醯幾丁寡醣，*N*-乙醯幾丁三醣，幾丁質分解酶

## Study of the Cultivation Conditions of *Aeromonas hydrophila* Too12 for Producing *N*-acetylchitooligosaccharides

ZHEN-QI GU<sup>1</sup>, SHWU-TZY WU<sup>1,2</sup> and SHIH-TSUNG YU<sup>3\*</sup>

Department of Food Science and Biotechnology, Da-Yeh University<sup>1</sup>

Department of Hospitality Management, Da-Yeh University<sup>2</sup>

Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University<sup>3</sup>

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

\*yust@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

This study explored the effect of different cultivation conditions (different carbon sources, nitrogen sources,  $\alpha$ -chitin concentration,  $\beta$ -chitin concentrations, and ventilation) on the production of *N*-acetylchitooligosaccharides using the strain *Aeromonas hydrophila* Too12. The strains were cultivated in 2%  $\alpha$ -chitin and colloidal chitin for 72 h using *N*-acetyl chitosan triose hydrolysate at 0.48 and 0.47 g/L, respectively. The strain that was cultivated in 5%  $\alpha$ -chitin for 144 h and *N*-2.85 g/L acetylglucosamine and 2.42 g/L *N*-acetylchitotriose. Under cultivation in 4%  $\beta$ -chitin, the hydrolysate contained 0.68 g/L *N*-acetylchitotetraose. With the cultivation of peptone using yeast extract and pancreatic protein as nitrogen sources, the activity of chitin-decomposing enzyme, amount of reducing sugar, and amount of chitin hydrolysate were similar. After 96 h of fermentation in batches with high dissolved oxygen, the yield of *N*-acetylchitotriose was 0.64 g/L. After fermentation and cultivation in batches with low dissolved oxygen for 72 h, the yield of *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylchitotriose was 1.26 and 1.1 g/L, respectively. The nonaerated batch was fermented for 96 h, producing 2.55 g/L *N*-acetylglucosamine. The crude enzyme solution of the cultured strain was purified through ammonium sulfate precipitation, dialysis, ion exchange chromatography, and colloidal filtration chromatography. The active peaks were collected and analyzed using active staining; 3-kDa protein exhibited obvious activity on the film. The optimal reaction temperature and pH of the enzyme were 40°C and 6, respectively. The results revealed that  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , and  $Mn^{2+}$  metal ions have an inhibitory effect on chitin-degrading enzyme activity, whereas ethylenediaminetetraacetic acid can promote such activity.

**Key Words:** *N*-acetylchitooligosaccharides, *N*-acetylchitotriose, chitinase

## 一、前言

*N*-乙醯幾丁寡醣是由 *N*-乙醯葡萄糖胺構成的水溶性低分子醣類，可由幾丁質降解而得。幾丁質 (chitin) 是由 1,000-3,000 個 *N*-乙醯葡萄糖胺 (*N*-acetyl-*D*-glucosamine, GlcNAc) 單體以  $\beta$ -1,4-鍵結形成直鏈高分子多醣體，分子量約在  $10^5 \sim 10^7$  kDa，其中約每六個 *N*-乙醯葡萄糖胺分子會與一個胺基葡萄糖分子 (glucosamine, GlcN) 連結 [7]。幾丁質呈淡黃色至褐色之棉絮狀或絲狀固體，具有高彈性及延展性，是一種類似纖維素的直鏈聚合物，其蘊藏量是自然界中僅次於纖維素之多醣類 [10]。幾丁質廣泛存在水產無脊椎動物、昆蟲、藻類以及真菌等 [15]，估計全球每年的幾丁質產量約一千億噸，其中南極蝦、蝦蟹甲殼類及真菌類為商業生產的主要來源。

*N*-乙醯幾丁寡醣具有特殊生理活性，研究發現，*N*-乙醯幾丁寡醣具有增強免疫能力與抑制腫瘤細胞生長的功能 [8, 11, 13, 23]。對白血球具引誘劑 (attractant) 作用，提高多形核白血球的趨化性並刺激其活性氧的分泌，動物實驗證實注射 *N*-乙醯幾丁六醣能加強 BALB/c 小鼠對細菌 *Listeria monocytogenes* 的抵抗力 [17]。*N*-乙醯幾丁六醣能抑制小鼠

體內 Sacroma 180 及 Meth-A solid tumor 之生長 [18]，另外，於 B6 小鼠中，*N*-乙醯幾丁六醣也可以抑制 Lewis lung carcinoma 轉移 [19]。

*N*-乙醯幾丁寡醣的製備有化學法與生物法。化學法所需時間短成本低，因而被廣泛採用，其缺點為製備的寡醣聚合度難以控制、有衍生物及環境污染的問題。生物法是以微生物或酵素分解製備，污染性低、製程簡易及作用專一性高 [14, 21]。*N*-乙醯幾丁寡醣之製備目前大多利用化學法製備 *N*-乙醯幾丁寡醣。化學法是將幾丁質以強酸在高溫下水解產生葡萄糖胺，再以酸酐與葡萄糖胺作用，重新接上乙醯基而產生 *N*-乙醯葡萄糖胺。但由於葡萄糖胺上除了胺基之外，尚有許多一級醇或二級醇官能基也會與酸酐作用，其作用程度與所使用的溶劑、催化劑、反應溫度等因素有關，因此往往得不到單一的乙醯化產物，即發生 *N*-乙醯化也產生 *O*-乙醯化。化學法之優點是經濟、快速及方便；缺點是反應條件如強酸濃度、反應溫度與時間對寡醣聚合度較難控制，及有強酸等廢液污染問題。

近年來，水解幾丁質的酵素已陸續被開發，因此以酵素法製備 *N*-乙醯幾丁寡醣的研究也越來越多 [20]。酵素法較

化學法專一性高、操作簡單及污染性較低，是目前製備 *N*-乙醯幾丁寡醣頗具潛力的方法。除了幾丁質酶與幾丁聚醣酶外，還有多種非幾丁質分解酵素，例如：纖維素酶、半纖維素酶、蛋白質分解酶、脂質酶等皆可水解幾丁質。由於環保意識的訴求日漸受到重視，因此有越多學者進行酵素水解法的研究。酵素法之優點為作用性專一與不會造成酸廢液而破壞環境等，缺點是酵素價格昂貴而導致成本過高。

本研究是以 *Aeromonas hydrophila* Too12 為生產 *N*-乙醯幾丁寡醣之菌株，此菌株為革蘭氏陰性菌株，具觸酶、氧化酶及運動性，不會產生內生孢子，在好氧與厭氧環境皆可生長。探討不同碳源、不同氮源、 $\alpha$ -幾丁質濃度、 $\beta$ -幾丁質濃度和通氣量對菌株生產 *N*-乙醯幾丁寡醣產量之影響。並進行批次發酵培養，探討菌株生產 *N*-乙醯幾丁寡醣種類與生成量之最適條件及酵素純化與特性分析。

## 二、材料與方法

本研究自苗栗外埔漁港採集土壤樣本，篩選出 *Aeromonas hydrophila* Too12 為生產 *N*-乙醯幾丁寡醣之菌株。使用之  $\alpha$ -幾丁質粉末購自誠麗股份有限公司。 $\beta$ -幾丁質粉末是粉碎後的烏賊軟骨，經酸鹼處理所得。

### (一) 膠態幾丁質之製備

取幾丁質粉末 5 g，加入 50 mL 12 N HCl 中，攪拌均勻 1 h，倒入 4 L 蒸餾水 (5~10°C) 中，除去上層液重新加入蒸餾水，直到上層液之 pH 值大於 3.5 後，離心儲存於 4°C 備用。膠態幾丁質中幾丁質含量的測定，取 2~3 g 膠態幾丁質於 80°C 烘箱中烘乾至恆重。計算公式為

$$\text{幾丁質}\% = (\text{烘乾後膠態幾丁質重量} / \text{膠態幾丁質重量}) \times 100\%$$

### (二) 培養基

CB (Chitin Broth) 培養基之組成為 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.07 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.05 g/L, Peptone 0.03 g/L, Yeast extract 0.03 g/L, Chitin 2 g/L。

### (三) 批次發酵槽培養

本研究以 5 L 之發酵槽進行批次發酵培養，工作體積為 3 L。發酵槽之起始轉速 250 rpm，空氣流率 1 vvm，於培養過程適時調整攪拌速率與空氣流率以維持培養基的溶氧量在飽和溶氧量的 20% 以上。利用 pH 自動監控儀監控培養過程之 pH，以 2 N 氫氧化鈉和 2 N 硫酸溶液調整培養基之 pH 於 7.0。於固定時間取樣 50 mL 進行幾丁質分

解酵素活性、還原醣量及 *N*-乙醯幾丁寡醣之分析。發酵培養過程中，培養基若有發泡情形，可藉由降低攪拌轉速與添加消泡劑來控制。

### (四) 還原醣含量之測定

發酵液以 2,015 g 離心 15 min 後，取 0.75 mL 上層液加入 0.75 mL 無菌水及 2 mL 呈色劑 (0.5 g/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>，溶於 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液)，置於沸水浴中 15 min，靜置冷卻 10 min，於 420 nm 下測其吸光值 (U-2000, Hitachi)，以 *N*-乙醯葡萄糖胺作為標準品 [3]。

### (五) 酵素活性分析

酵素活性測定主要使用還原醣測定法 [12]。取粗酵素液 0.2 mL 加入含有 1% 膠態幾丁質的 McIlvaine buffer (pH 7) 1 mL，混合均勻於 40°C 下反應 30 min，8,057 g 離心 10 min，取上清液 0.75 mL、蒸餾水 0.75 mL 及呈色劑 (0.5 g/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>，溶於 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液) 2 mL，於沸水浴反應 15 min，冷卻後以波長 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  $\mu$ mol 還原醣，即為 1 個酵素活性單位。

### (六) 蛋白質濃度測定

蛋白質濃度測定依據 Bradford [9] 方法，0.6 mL 的酵素液加入 2.4 mL 的 Coomassie blue dye，靜置 10 min，測其波長 595 nm 吸光值，對照牛血清蛋白 (bovine serum albumin) 的檢量線 (0~100  $\mu$ g/mL)，求得蛋白質濃度。

### (七) 幾丁質水解產物分析

發酵液以 6,000 rpm 離心 15 min，取 4 mL 上清液進行冷凍乾燥濃縮，加 0.5 mL 的去離子水復溶並離心去除不溶物，上清液以孔徑 0.2  $\mu$ m 水相過濾膜過濾，過濾液加入等量的乙腈稀釋液 (含 46% 乙腈的 0.016 N 硫酸)，離心，上清液由高效能液相層析儀 (HPLC, L-4500, Hitachi) 進行水解產物分析。分析管柱為 LiCrospher NH<sub>2</sub>-100 (5  $\mu$ m, 4×250 mm, Merck)，移動相為 乙腈/水 (70/30)，以 UV 偵測器偵測 (diode array detector L-4500, Hitachi)，波長為 205 nm。

### (八) 幾丁質酶之分離純化

將菌株大量發酵培養並測定幾丁質酶的活性變化，於酵素活性達最高時收集發酵液離心，上清液於 4°C 的下進行 0~80% 硫酸銨沉澱。將硫酸銨緩慢加入上清液，待溶解後，靜置 30 min 使蛋白質沉澱，以 3,580 g 離心 20 min，收集沉澱物，沉澱物復溶於 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7.8)，並於相同緩衝溶液中進行透析 48 h，脫除鹽類，透析完的粗蛋白

經離心去除不溶物，以陰離子交換層析分離純化蛋白質，使用DEAE-Sepharose CL-6B分離管柱（1.6 cm × 20 cm），以50 mM Tris-HCl（pH 7.4）緩衝溶液流析，流率為0.5 mL/min，每管收集3 mL濾液，於波長280 nm測其吸光值，以定量蛋白質濃度，並分析幾丁質酶的活性，收集具有酵素活性之蛋白質樣品，經由冷凍乾燥濃縮並復溶於含0.15 M NaCl的50 mM Tris-HCl（pH 7.8）緩衝溶液3 mL，以進行膠體過濾層析，管柱為Sephacryl S-100（1 cm × 100 cm），以含0.15 M NaCl的50 mM Tris-HCl（pH 7.4）緩衝溶液流析，流率為0.1 mL/min，每管收集3 mL，進行蛋白質定量（OD<sub>595</sub>）及活性分析（OD<sub>420</sub>）。

### （九）純化酵素特性分析

經由純化後所得之幾丁質分解酶，分別進行最適反應pH值與最適反應溫度、pH值與溫度穩定性、酵素動力學及金屬離子對酵素活性影響的測試。

#### 1. 最適反應 pH 值

取 0.2 mL 酵素液加入含 1% 膠態幾丁質 1 mL 緩衝液（McIlvaine buffer, pH 3~8, Tris-HCl, pH 7~10），於 40°C 下反應 30 min，分析其酵素活性。

#### 2. 最適反應溫度

取 0.2 mL 酵素液加入 1 mL McIlvaine buffer（含 1% 膠態幾丁質，pH 7.0），於不同溫度（10~80°C）下反應 30 min，分析其酵素活性。

#### 3. pH 值穩定性

取 0.1 mL 酵素液加入 0.1 mL 緩衝液（McIlvaine buffer, pH 3~8; Tris-HCl, pH 7~10），於 30°C 下作用 1 h，加入 1 mL McIlvaine buffer（含 1% 膠態幾丁質，pH 7.0），於 40°C 下反應 30 min，分析其酵素活性。

#### 4. 溫度穩定性

取 0.2 mL 酵素液，於不同溫度（10~80°C）下作用 1 h，加入 1 mL McIlvaine buffer（含 1% 膠態幾丁質，pH 7.0），於 40°C 下反應 30 min，分析其酵素活性。

#### 5. 金屬離子對酵素活性之影響

取 0.1 mL 酵素液加入 0.1 mL 10 mM 不同金屬離子溶液，於 30°C 下作用 1 h，加入 1 mL McIlvaine buffer（含 1% 膠態幾丁質，pH 7.0），於 40°C 下反應 30 min，分析其酵素活性。

#### 6. 酵素動力學

取 0.2 mL 酵素液加入 1 mL 分別含有 0.1、0.25、0.5、

0.75、1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 及 2.25% 膠態幾丁質之 McIlvaine buffer（pH 7.0），於 40°C 下反應 30 min，分析其酵素活性。

### （十）聚丙烯醯胺膠體電泳分析

蛋白質經由純化後，藉由十二烷基磺酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳（SDS-PAGE）分析蛋白質的純度與分子量 [16]，並以活性電泳染色法（zymogram）分析具有幾丁質酶活性的分子量 [5]。

## 三、結果與討論

*Aeromonas hydrophila* Too12 為自行篩選具分解幾丁質之菌株，經新竹食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心鑑定，屬革蘭氏陰性桿菌，具觸酶、氧化酶及運動性，好氧與厭氧環境下均會生長。進行 16S rRNA 基因部份序列分析，根據 API 鑑定系統分析，菌株屬 *Aeromonas hydrophila*，命名為 *Aeromonas hydrophila* Too12。

### （一）不同碳源培養

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於含有 2% (w/v) 之  $\alpha$ -幾丁質粉末、膠態幾丁質、 $\beta$ -幾丁質粉末、蝦殼粉末及幾丁聚醯之培養基，每 24 h 取樣並分析幾丁質分解酶活性、還原醣生成量及 N-乙醯幾丁寡醣種類與產量，探討不同碳源對 N-乙醯幾丁寡醣產量之影響。

#### 1. 幾丁質分解酶活性

以不同碳源培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之幾丁質分解酶活性、還原醣生成量、N-乙醯幾丁寡醣種類與含量，圖 1。圖 1 (a) 為幾丁質分解酶活性變化，不同幾丁質培養之幾丁質分解酶活性隨培養時間增加而增加。 $\alpha$ -幾丁質粉末培養於 0~96 h，最高可達 371 U/L。 $\beta$ -幾丁質粉末培養於 0~72 h，最高可達 467 U/L。膠態幾丁質培養於 0~48 h，最高可達 151 U/L。蝦殼粉末與幾丁聚醯之培養，不具幾丁質分解酶活性。 $\beta$ -幾丁質結構較  $\alpha$ -幾丁質鬆散柔軟，較易被分解，因此幾丁質分解酶達到最高活性相對較快。膠態幾丁質是  $\alpha$ -幾丁質粉末經酸水解的產物，幾丁質分解酶並無較高活性，此結果與 Young and Carroad [22] 培養 *Serratia marcescens* 相似。

#### 2. 還原醣生成量

以不同碳源培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之還原醣生成量，圖 1 (b)。 $\alpha$ -幾丁質之培養，還原醣生成量隨培養時間增加而增加，培養於第 144 h 達 9.1 g/L。 $\beta$ -幾丁質粉末

與膠態幾丁質之培養，培養於 0~24 h，還原醣生成量快速增加，分別達 5.8 與 6.5 g/L。幾丁聚醣之培養，還原醣生成量僅 0.6 g/L。蝦殼粉末培養，無還原醣生成。*Aeromonas hydrophila* Too12 與 *Aeromonas hydrophila* Too11 [2] 於  $\alpha$ -幾丁質粉末培養，最高還原醣生成量分別為 9.13 和 8.52 g/L。*Aeromonas hydrophila* Too12 還原醣生成量較 *Aeromonas hydrophila* Too11 稍高。

### 3. 幾丁質水解產物

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於  $\alpha$ -幾丁質、 $\beta$ -幾丁質與膠態幾丁質，生成水解產物，圖 1 (c)。以  $\alpha$ -幾丁質與膠態幾丁質培養 72 h，水解產物以 *N*-乙醯幾丁三醣為主，分別達 0.48 與 0.47 g/L。 $\alpha$ -幾丁質之培養，*N*-乙醯幾丁寡醣的種類較單純。 $\beta$ -幾丁質培養 24 h，*N*-乙醯幾丁三醣 0.3 g/L，培養 96 h，*N*-乙醯葡萄糖胺達 0.45 g/L。*Aeromonas hydrophila* Too12 於  $\alpha$ -幾丁質與膠態幾丁質之培養，*N*-乙醯幾丁三醣產量較高，培養於  $\beta$ -幾丁質，生產 *N*-乙醯幾丁三醣所需時間較短，此結果與張 [2] 之研究類似。

### (二) 不同氮源培養

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於不同氮源，添加量為 0.06 g/L，包括有機氮源之酵母抽出物、蛋白胨及胰化蛋白及無機氮源之氯化銨。每 24 h 取樣，測其幾丁質分解酶、還原醣生成量及 *N*-乙醯幾丁寡醣種類與產量，以探討不同氮源對 *N*-乙醯幾丁寡醣產量之影響。

#### 1. 幾丁質分解酶活性

以不同氮源培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之幾丁質分解酶活性的變化，圖 2 (a)。不同氮源包括蛋白胨與酵母抽出物混合物、蛋白胨、酵母抽出物、胰化蛋白及氯化銨，培養 72h，幾丁質分解酶活性最高，分別為 447、521、364、483 及 490 U/L。

#### 2. 還原醣生成量

以不同氮源培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之還原醣生成量變化，圖 2 (b)。以蛋白胨與酵母抽出物混合、蛋白胨、酵母抽出物、胰化蛋白及氯化銨為氮源，培養於第 96h，還原醣生成量皆達到最高，分別為 4.78、5.42、4.59、3.88 及 3.83 g/L。

#### 3. 幾丁質水解產物

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於不同氮源之水解產物，圖 2 (c)。水解產物以 *N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁三醣為主，以蛋白胨與酵母抽出物混合、蛋白胨、酵母抽出

物、胰化蛋白及氯化銨為氮源，培養 72 h，*N*-乙醯葡萄糖胺產量分別為 0.05、0.09、0.11、0.05 及 0.05 g/L，*N*-乙醯幾丁三醣產量分別為 0.33、0.37、0.36、0.34 及 0.03 g/L。

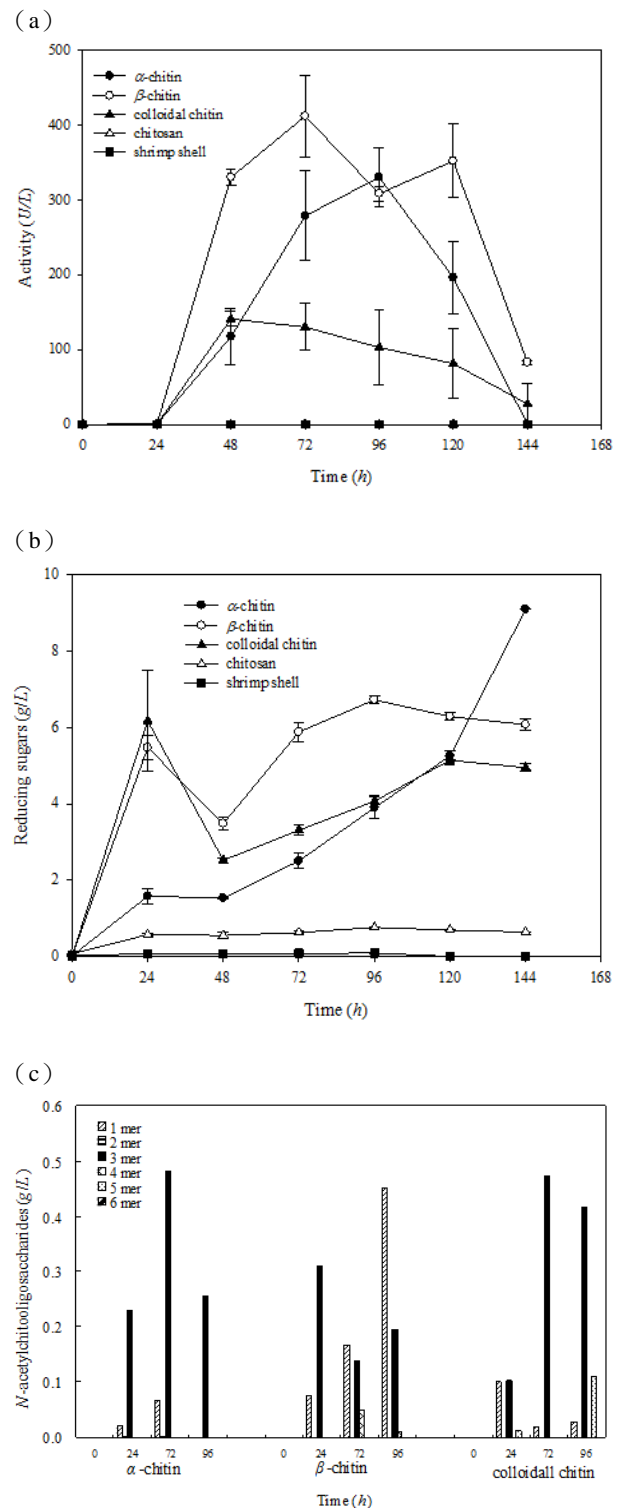


圖1. 不同碳源培養菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12

(a) 幾丁質分解酵素活性、(b) 還原醣生成量、(c) *N*-乙醯幾丁寡醣

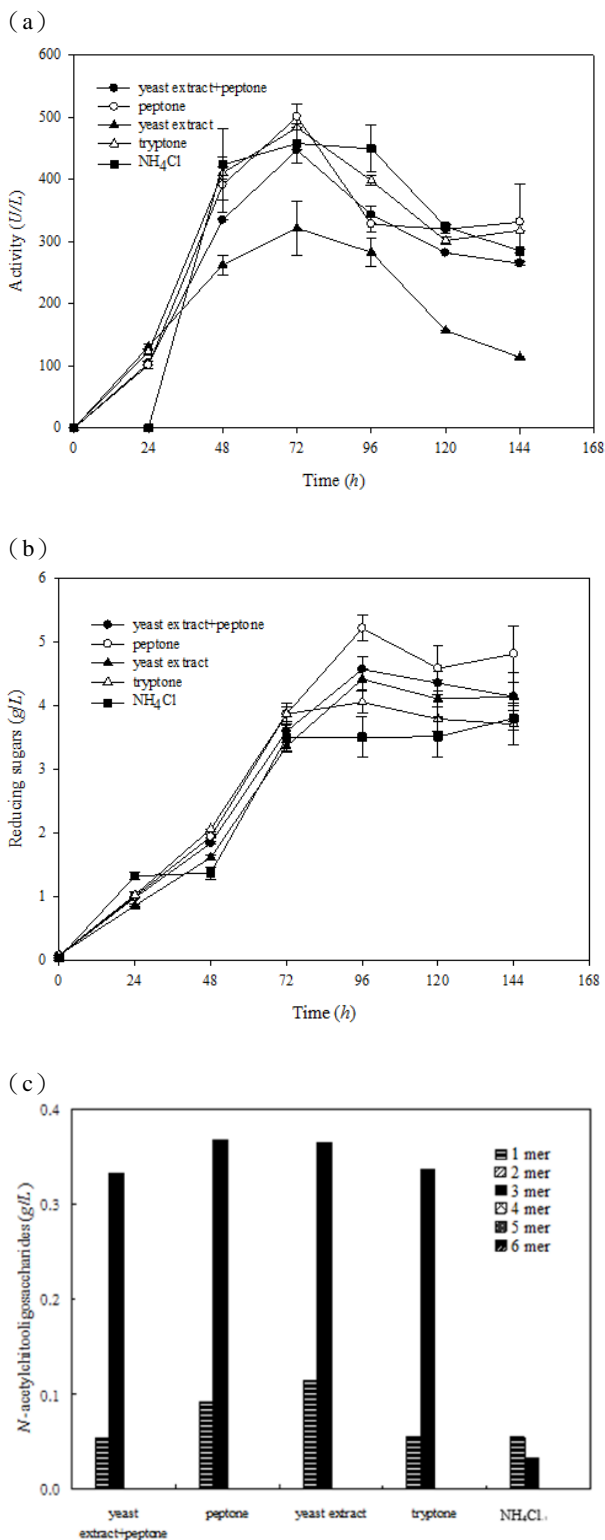


圖2. 不同氮源培養菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12

(a) 幾丁質分解酵素活性、(b) 還原醣生成量、  
(c) *N*-乙醯幾丁寡醣

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於不同氮源，除氯化銨培養之 *N*-乙醯幾丁三醣產量較低，以蛋白胨、酵母抽出

物及胰化蛋白為氮源之培養，其幾丁質分解酶活性、還原醣生成量及幾丁質水解產物相近，後續將以蛋白胨與酵母抽出物混合為氮源進行培養。

### (三) 不同濃度 $\alpha$ -幾丁質培養

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於含 1~6% (w/v)  $\alpha$ -幾丁質，每隔 24 h 取樣並分析發酵液之幾丁質分解酶活性、還原醣生成量及 *N*-乙醯幾丁寡醣種類與含量。

#### 1. 幾丁質分解酶活性

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於 1~6%  $\alpha$ -幾丁質之幾丁質分解酶活性變化，圖 3 (a)。培養於 1~2%  $\alpha$ -幾丁質 48 h 達最高，而後趨於減緩，最高幾丁質分解酶之活性，分別為 333 與 563 U/L。培養於 3%  $\alpha$ -幾丁質 96~120 h，幾丁質分解酶活性快速上升，培養 120 h，幾丁質分解酶活性最高為 1128 U/L。培養於 4%  $\alpha$ -幾丁質 96~120 h，幾丁質分解酶活性快速上升，培養 144 h，幾丁質分解酶活性最高為 782 U/L。培養於 5%  $\alpha$ -幾丁質 96~120 h，幾丁質分解酶活性快速上升，培養 144 h，幾丁質分解酶活性最高為 1103 U/L。培養於 6%  $\alpha$ -幾丁質 96~120 h，幾丁質分解酶活性快速上升，培養 120 h，幾丁質分解酶活性可達到最高為 1539 U/L。實驗結果顯示，*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於較高濃度  $\alpha$ -幾丁質，誘導出幾丁質分解酶活性較高。

#### 2. 還原醣生成量

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於 1~6%  $\alpha$ -幾丁質之還原醣生成量變化於圖 3 (b)。培養於 1%  $\alpha$ -幾丁質 72 h，最高還原醣生成量為 0.71 g/L。培養於 2~3%  $\alpha$ -幾丁質 96 h，最高還原醣生成量，分別為 5.12 與 7.17 g/L。培養於 4~6%  $\alpha$ -幾丁質 144 h，最高還原醣生成量分別為 10.57、13.6 及 13.99 g/L。

#### 3. 幾丁質水解產物

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於 1~6%  $\alpha$ -幾丁質之 *N*-乙醯幾丁寡醣變化於圖 4，水解產物以 *N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁三醣為主。培養 96 h，圖 4 (a)，*N*-乙醯葡萄糖胺產量分別為 0.13、0.5、0.04、0.08、0.41 及 0.06 g/L，*N*-乙醯幾丁三醣產量分別為 0.40、0.51、0.52、0.72、0.87 及 1.22 g/L。培養 120 h，圖 4 (b)，*N*-乙醯葡萄糖胺產量分別為 0.8、1.5、1、0.19、0.18 及 1.12 g/L，培養於 1~2%  $\alpha$ -幾丁質，無 *N*-乙醯幾丁三醣產生，培養於 3~6%  $\alpha$ -幾丁質，*N*-乙醯幾丁三醣產生分別為 0.16、1.12、0.86 及 1.96 g/L。培養 144 h，圖 4 (c)，*N*-乙醯葡萄糖胺產量分別為 0.73、1.58、

2.45、2.25、2.85 及 1.3 g/L，培養於 3~6%  $\alpha$ -幾丁質，*N*-乙酰幾丁三醣產量分別為 0.08、0.36、2.42 及 2.37 g/L。以較高濃度  $\alpha$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12，產生 *N*-乙酰幾丁三醣較高。

#### (四) 不同濃度 $\beta$ -幾丁質培養

將 *Aeromonas hydrophila* Too12 培養於含 1~6% (w/v)  $\beta$ -幾丁質粉末之基礎培養基，每隔 24 h 取樣並分析發酵液之幾丁質分解酶、還原醣生成量及 *N*-乙酰幾丁寡醣種類與含量，以瞭解此菌株對不同濃度之  $\beta$ -幾丁質粉末的利用程度。

##### 1. 幾丁質分解酶之活性

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於 1~6%  $\beta$ -幾丁質之幾丁質分解酶活性變化，圖 5 (a)。培養於 1%  $\beta$ -幾丁質 24 h，幾丁質分解酶活性為 182 U/L，而後，幾丁質分解酶活性趨於減緩。培養於 2%  $\beta$ -幾丁質 72 h，幾丁質分解酶活性最

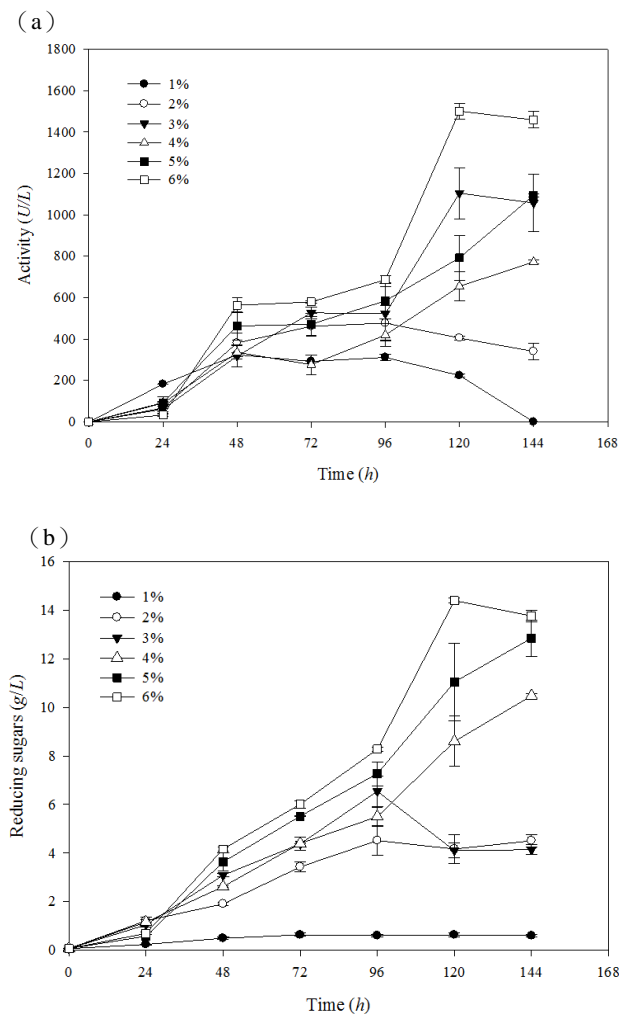


圖 3. 不同濃度  $\alpha$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12  
(a) 幾丁質分解酵素活性、(b) 還原醣生成量

高為 454 U/L，培養 72 h 後，幾丁質分解酶活性趨於平緩。培養於 3~6%  $\beta$ -幾丁質 120 h，幾丁質分解酶活性可達到最

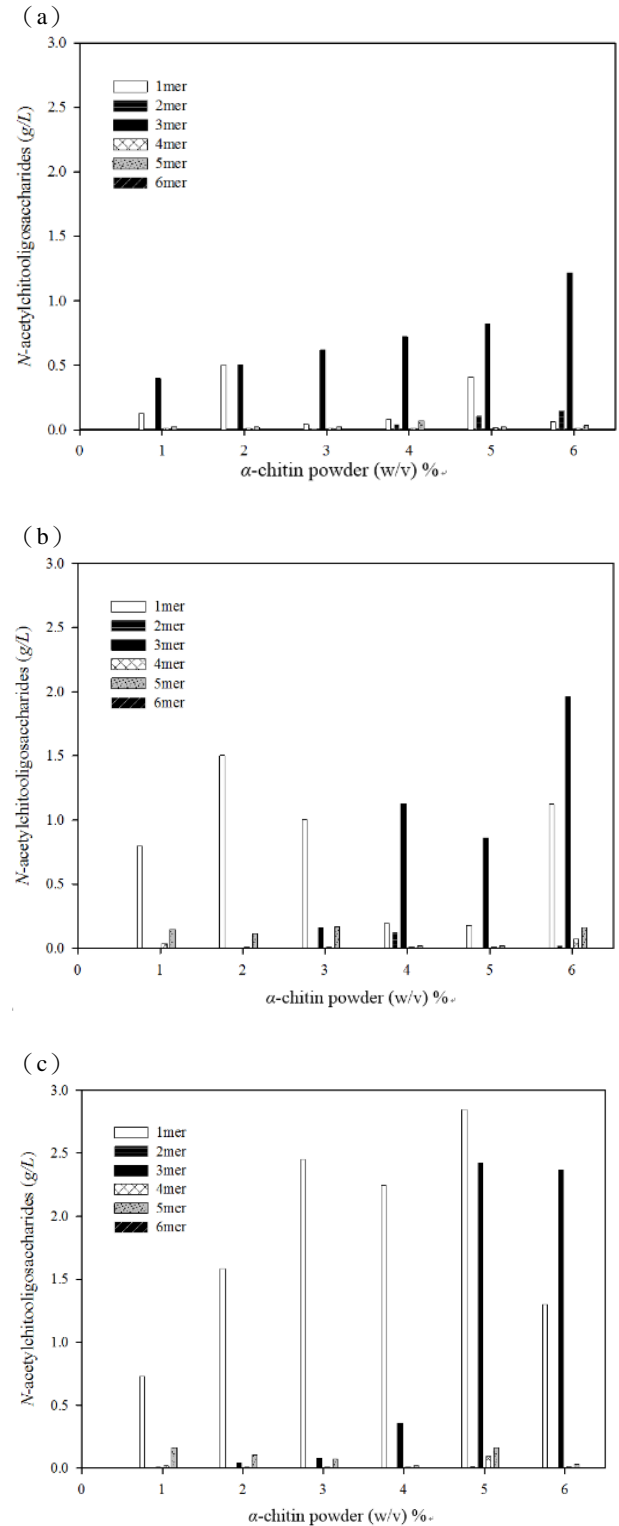


圖 4. 不同濃度  $\alpha$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之 *N*-乙酰幾丁寡醣變化，(a) 培養 96 h、(b) 培養 120h、(c) 培養 144 h

高，分別為 773、999、1156 及 1526 U/L，培養 120 h 後，幾丁質分解酶活性趨於減緩。以較高濃度  $\beta$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12，所誘導出幾丁質分解酶活性較高。

## 2. 還原醣生成量

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於 1~6%  $\beta$ -幾丁質還原醣生成量變化，圖 5 (b)。培養於 1~2%  $\beta$ -幾丁質 72 h，最高量的還原醣，分別為 2.87 與 8.38 g/L。培養於 3~4%  $\beta$ -幾丁質 72 h，可獲得最高還原醣生成量，分別為 13.16 與 18.58 g/L，培養 72 h 後，還原醣量趨於減緩。培養於含 5~6%  $\beta$ -幾丁質 96 h，可獲得最高還原醣生成量，分別為 22.21 與 25.08 g/L，培養 96 h 後，還原醣生成量趨於減緩。

以較高濃度  $\beta$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12，所獲得還原醣生成量較高， $\beta$ -幾丁質培養的還原醣生成量明顯高於  $\alpha$ -幾丁質培養。

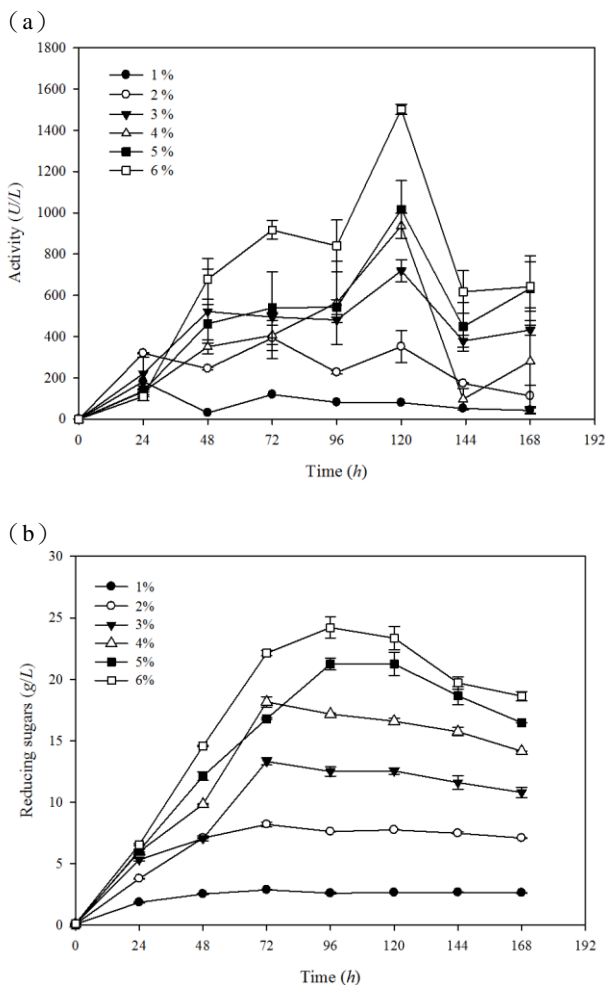


圖 5. 不同濃度  $\beta$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12

(a) 幾丁質分解酵素活性 (b) 還原醣生成量

## 3. 幾丁質水解產物

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於 4~6%  $\beta$ -幾丁質 48 h，以 *N*-乙醯幾丁二醣與 *N*-乙醯幾丁三醣為主，圖 6 (a)，*N*-乙醯幾丁二醣產量分別為 0.21、0.15 及 0.14 g/L，*N*-乙醯幾丁三醣產量分別為 0.51、0.46 及 0.45 g/L。菌株於 3~6%  $\beta$ -幾丁質培養 72 h 之水解產物，圖 6 (b)，*N*-乙醯葡萄糖胺產量分別為 0.18、0.12、0.08 及 0.05 g/L，*N*-乙醯幾丁三醣產量分別為 0.20、0.15、0.11 及 0.38 g/L，*N*-乙醯幾丁四醣產量分別為 0.45、0.30、0.27 及 0.02 g/L，培養於 5~6%  $\beta$ -幾丁質，生成水解產物有 *N*-乙醯幾丁二醣，產量分別為 0.37 與 0.26 g/L。菌株培養於 3~6%  $\beta$ -幾丁質 96 h，圖 6 (c)，*N*-乙醯葡萄糖胺產量分別為 0.31、0.39、0.08 及 0.07 g/L，*N*-乙醯幾丁二醣產量分別為 0.1、0.25、0.34 及 0.42 g/L，*N*-乙醯幾丁三醣產量分別為 0.65、0.54、0.5 及 0.64 g/L，培養於 4%  $\beta$ -幾丁質，生成水解產物含有 *N*-乙醯幾丁四醣 0.68 g/L。

$\beta$ -幾丁質結構較鬆散，幾丁質分解酶活性和還原醣生成量皆高於  $\alpha$ -幾丁質的培養。實驗結果顯示，菌株培養於高濃度  $\alpha$ -幾丁質比培養於高濃度  $\beta$ -幾丁質產生 *N*-乙醯幾丁寡醣種類較少，且 *N*-乙醯幾丁三醣生成量較高，後續實驗以  $\alpha$ -幾丁質為碳源培養。

## (五) 批次發酵培養

*Aeromonas hydrophila* Too12 為好氧與厭氧環境下均會生長，探討不同溶氧量培養對菌株生產 *N*-乙醯幾丁寡醣之影響。培養於含 2%  $\alpha$ -幾丁質 5 L 發酵槽（工作體積 3 L），培養溫度 30°C，轉速 250 rpm，培養過程溶氧量分別調控為 50% 以上（高溶氧）、10% 以下（低溶氧）及不通氣。每隔 12 h 取樣，分析發酵液中幾丁質分解酶活性、還原醣生成量和 *N*-乙醯幾丁寡醣種類與含量。

### 1. 幾丁質分解酶之活性

不同溶氧量培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之幾丁質分解酶活性之變化，圖 7 (a)。高溶氧下培養，培養 60 h 最高為 576 U/L，而後幾丁質分解酶活性降低。低溶氧下培養，培養 24 h，幾丁質分解酶活性為 358 U/L，培養 36 h 後，幾丁質分解酶活性緩慢增加，培養 108 h 幾丁質分解酶活性最高為 452 U/L。於不通氣下培養，幾丁質分解酶活性低，最高僅有 34 U/L。高溶氧下培養 *Aeromonas hydrophila* Too12，幾丁質分解酶活性較高，此結果與謝 [6] 之研究相似。

### 2. 還原醣生成量



以不同溶氧量培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之還原醣生成量，圖 7(b)。高溶氧下培養 24 h，還原醣為 1.15 g/L，

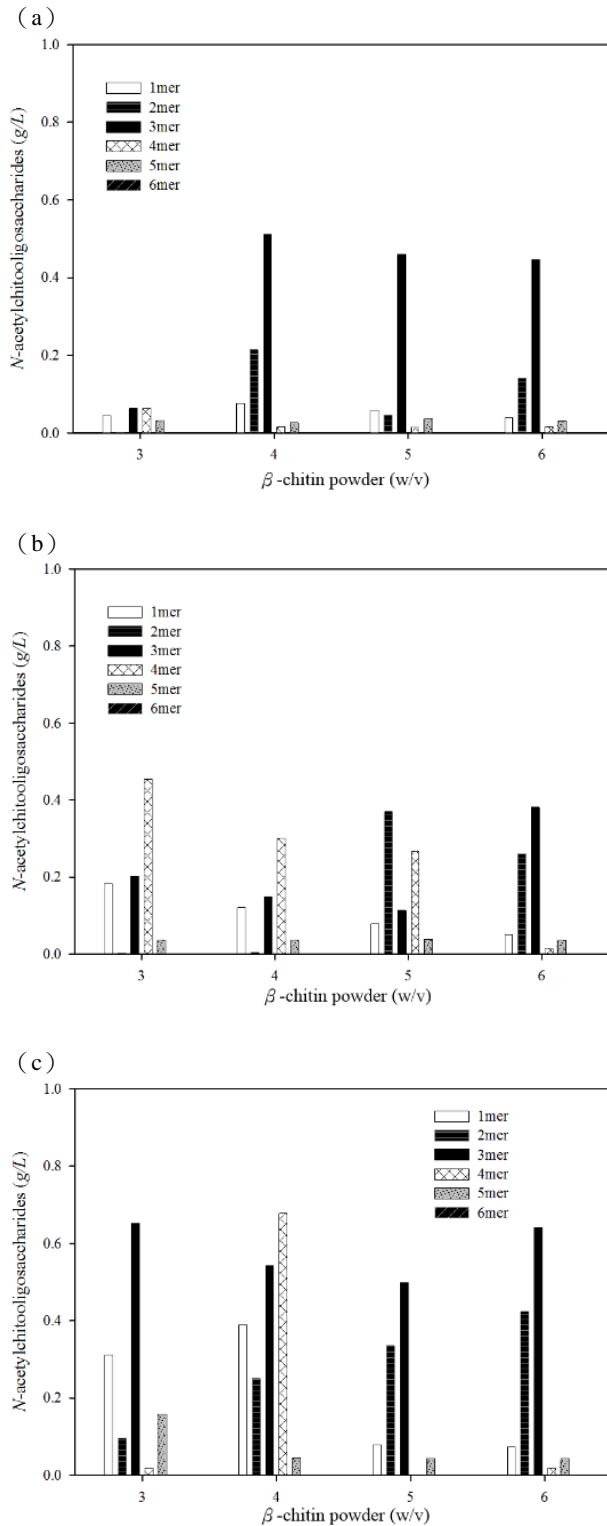


圖6. 不同濃度 $\beta$ -幾丁質培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之 *N*-乙醯幾丁寡醣變化，(a) 培養48 h、(b) 培養72 h、(c) 培養96 h

低溶氧下培養 24~36 h，還原醣快速增加，培養於 36 h 為 3.82 g/L，培養 144 h 最高為 4.93 g/L，於不通氣下培養 120 h 為 1.93 g/L。

高溶氧與低溶氧下培養，皆可使菌株正常生長，與不同溶氧下培養比較 [6]，本研究還原醣生成量較高。還原醣增加會導致培養基的 pH 值下降，延遲菌體生長，此結果與培養 DYU-Too7 類似[4]。

### 3. 幾丁質水解產物

高溶氧下培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 之幾丁質水解產物，圖 8 (a)，培養 96 h，*N*-乙醯幾丁三醣產量為 0.64 g/L，培養 120 h，*N*-乙醯葡萄糖胺產量為 2.14 g/L。低溶氧下培養之幾丁質水解產物變化，圖 8 (b)，培養 72 h，*N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁三醣產量分別為 1.26 與 1.1 g/L。

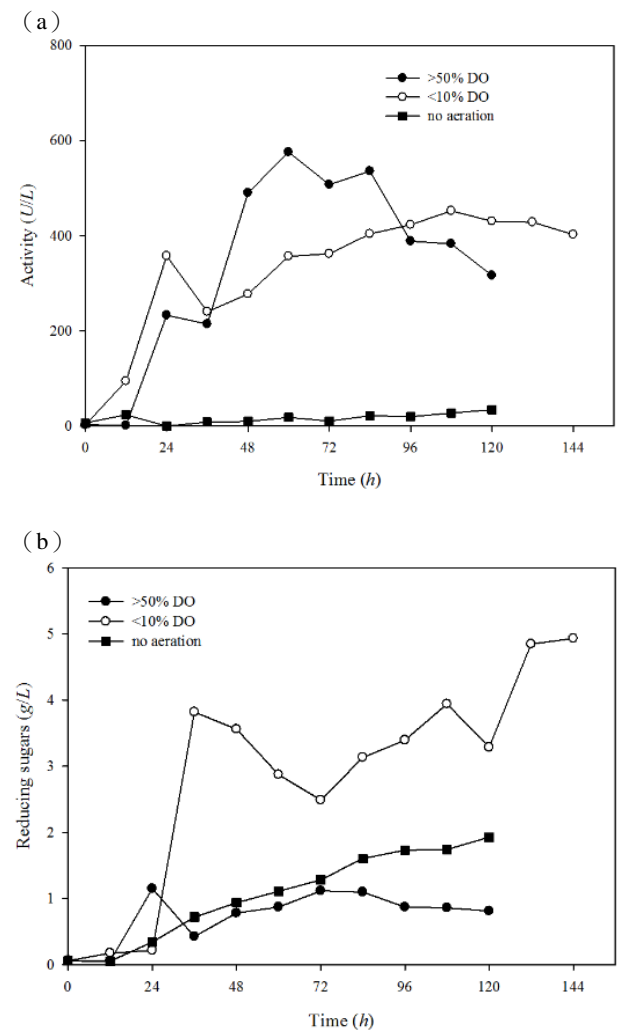


圖7. 不同溶氧量培養菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12 (a) 幾丁質分解酶活性、(b) 還原醣生成量

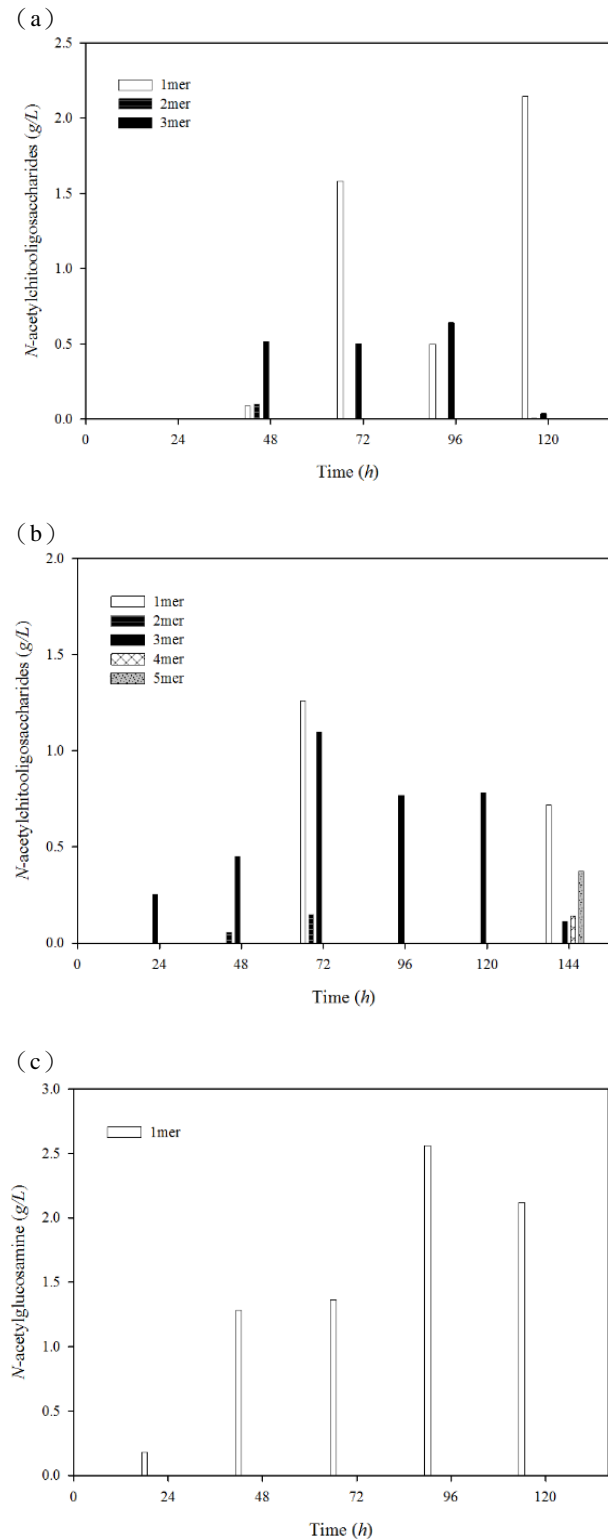


圖 8. 不同溶氧量培養菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12 之幾丁寡醣種類與含量, (a) 高溶氧量、(b) 低溶氧量、(c) 不通氣

於不通氣下培養之幾丁質水解產物變化, 圖 8 (c), 培養 96 h, *N*-乙醯葡萄糖胺產量為 2.56 g/L。培養於高溶氧與低溶氧

下, 幾丁質水解產物以 *N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁三醣為主, 且 *N*-乙醯幾丁三醣產量較高。於不通氣下培養, 幾丁質水解產物以 *N*-乙醯葡萄糖胺為主, 不通氣下培養, 無法誘導菌株合成 *N*-乙醯幾丁三醣酵素。

#### (六) 幾丁質分解酶

以低溶氧量培養 *Aeromonas hydrophila* Too12, 生成之 *N*-乙醯幾丁三醣含量較高, 利用低溶氧量培養, 探討酵素種類並進行分離純化和特性分析。

##### 1. 幾丁質分解酶分離純化

*Aeromonas hydrophila* Too12 培養於含 2%  $\alpha$ -幾丁質 5 L 發酵槽 (工作體積 3 L), 培養 48 h 得粗酵素液, 經硫酸銨沉澱、透析、離子交換層析 (DEAE-Sepharose CL-6B) 和膠體過濾層析 (Sephacryl S-100), 幾丁質分解酶活性 1164 U/L, 以具最高活性之酵素樣品進行电泳活性染色分析, 蛋白質主要有 60、33 及 23 kDa, 活性染色分析, 在 33 kDa 蛋白質於膠片上有明顯活性。

##### 2. 幾丁質分解酶特性

幾丁質分解酶之特性分析包括最適反應溫度、溫度穩定性、最適反應 pH 值、pH 穩定性、酵素動力學和金屬離子對酵素活性之影響。

##### (1) 最適反應溫度

幾丁質分解酶加入受質, 於不同溫度 (10~80°C) 反應, 經酵素活性測定後, 圖 9 (a)。幾丁質分解酶最適反應溫度為 40°C, 於 10~30°C 相對活性為 20%, 於 50°C 下相對活性為 80%, 超過 60°C 相對活性為 45%, 幾丁質分解酶對於溫度極為敏感。

##### (2) 溫度穩定性

幾丁質分解酶置於不同溫度 (10~80°C) 反應 1 h, 加入受質, 於 40°C 下反應 30 min, 經酵素活性測定後, 圖 9 (a)。幾丁質分解酶於 10~30°C 可維持 95% 以上之相對活性, 於 40°C, 相對活性為 35%, 溫度 50°C 以上, 活性喪失 97%。

##### (3) 最適反應 pH 值

幾丁質分解酶置於不同 pH 值 (3~10) 之受質, 於最適溫度 40°C 反應, 經酵素活性測定, 圖 9 (b)。酵素之最適反應 pH 值為 6.0, pH 值 4 時, 相對活性為 33%, 當 pH 值高於 6 時, 相對活性則降低, 於 pH 10 相對活性為 72%。

##### (4) pH 穩定性

幾丁質分解酶在不同 pH 值 (pH 3~10) 30°C 反應 1 h,

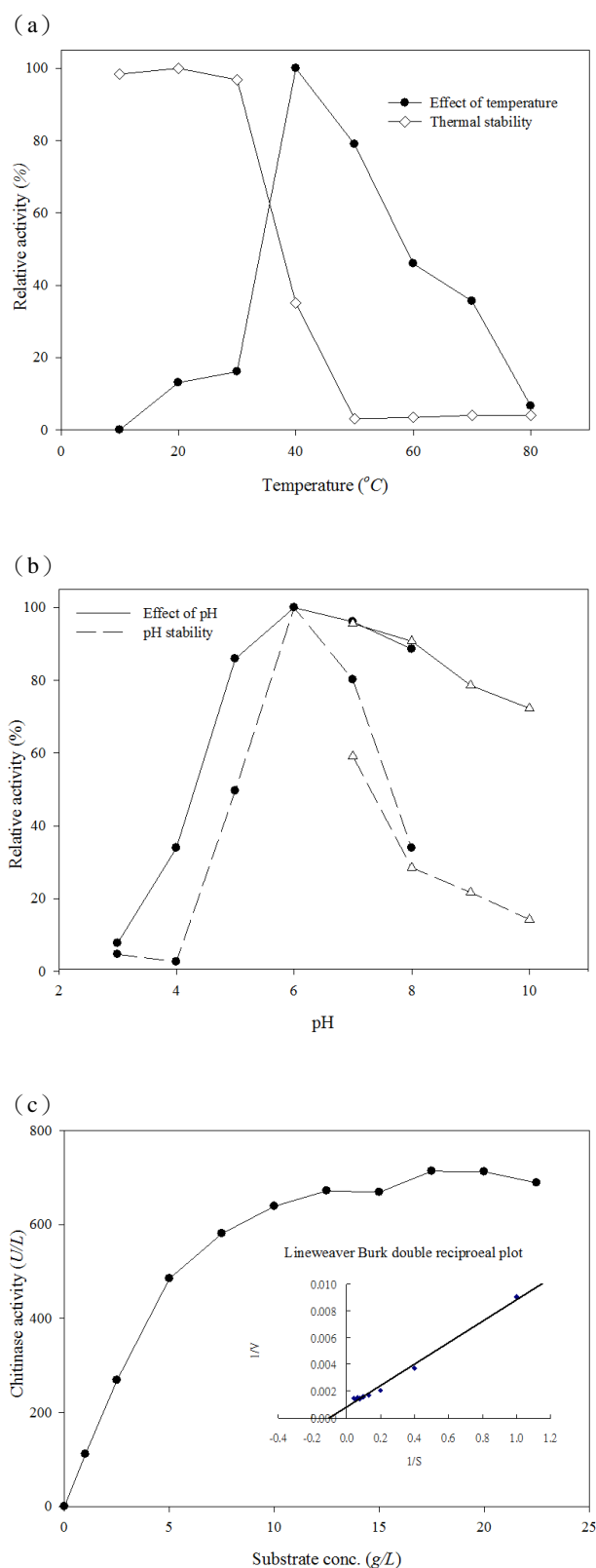


圖 9. *Aeromonas hydrophila* Too12 之幾丁質分解酶特性分析

(a) 反應溫度、(b) pH；(●)：McIlvaine buffer (pH 3-8)、(△)：Tris-HCl buffer (pH7-10)、(c) 酵素動力

與受質 40°C 下反應，經酵素活性測定，圖 9 (b)。於 pH 值 6 時，具有最高之 pH 穩定性。幾丁質分解酶於 pH 3 與 4 時，相對活性為 2%，pH 5 時，相對活性為 50%，當 pH 值高於 6 時，隨 pH 值上升，相對活性降低，於 pH 10 相對活性為 14%。

#### (5) 酵素動力學

幾丁質分解酶加入不同基質濃度 (1~22.5 g/L 膠態幾丁質) 之受質，於 40°C 下反應，經酵素活性測定，圖 9 (c)。幾丁質分解酶於基質濃度 1~7.5 g/L 下為一級反應，酵素反應速率與基質濃度成正比，10~22.5 g/L 基質濃度下為零級反應，反應速率不受基質濃度改變影響。利用 Lineweaver-Burk 雙倒數作圖法，以 1/S (S, 受質濃度) 與 1/v (v, 反應速率) 作圖求出  $K_m$  (Michaelis constant) 與  $V_{max}$  (maximal velocity)，分別為 4 g/L 與 714 U/L，DYU-Too11 幾丁質分解酶 [1]  $K_m$  與  $V_{max}$  分別為 2.3 g/L 與 303 U/L。*Aeromonas hydrophila* Too12 幾丁質分解酶之  $K_m$  較大，酵素與受質間的親和力較小，最大反應速率 ( $V_{max}$ ) 為 DYU-Too11 幾丁質分解酶 2 倍。

#### (6) 金屬離子對酵素活性之影響

幾丁質分解酶與 10 mM 不同金屬離子 ( $Ag^+$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Zn^{2+}$  及  $Na_2EDTA$ ) 於 30°C 反應 1 h，加入受質於 40°C 下反應，量測其酵素活性，表 1。 $Hg^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  及  $Mn^{2+}$  金屬離子對幾丁質分解酶活性抑制較大，其相對殘餘活性低於 40%。 $Ca^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $K^+$ 、 $Na^+$  及  $Mg^{2+}$  對幾丁質分解酶之相對殘餘活性分別為 72%、66%、92%、72% 及 71%，對幾丁質分解酶活性抑制較弱。EDTA 對幾丁質分解酶活性具促進作用 181%，與菌株 DYU-Too7 之結果相似 [4]。

表 1. 金屬離子和 EDTA 對菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12 幾丁質分解酶活性之影響

Ion (10 mM)	Residual activity (%)
None	100
$Ag^+$	75
$Ba^{2+}$	66
$Ca^{2+}$	72
EDTA	181
$Hg^+$	14
$K^+$	92
$Mg^{2+}$	71
$Mn^+$	39
$Na^+$	72
$Zn^{2+}$	16

#### 四、結論

本研究自苗栗外埔漁港採集土壤樣本，篩選出具有生產幾丁質酶之菌株 *Aeromonas hydrophila* Too12，以此為試驗菌株，探討不同碳源、氮源、 $\alpha$ -幾丁質濃度及  $\beta$ -幾丁質濃度，對菌株生合成幾丁質分解酶活性、還原糖生成量及 *N*-乙醯幾丁寡醣生成之影響。

以不同碳源（蝦殼粉末、 $\alpha$ -幾丁質、 $\beta$ -幾丁質、膠態幾丁質及幾丁聚醣）培養，結果顯示，以  $\alpha$ -幾丁質與膠態幾丁質為碳源具較高的 *N*-乙醯幾丁三醣產量；以  $\alpha$ -幾丁質為碳源，生產 *N*-乙醯幾丁寡醣種類較單一；以  $\beta$ -幾丁質為碳源其 *N*-乙醯葡萄糖胺生成量較以  $\alpha$ -幾丁質為碳源者大，可達 0.45 g/L。

以不同濃度  $\alpha$ -幾丁質或  $\beta$ -幾丁質培養，發現以 5%  $\alpha$ -幾丁質培養，其生成 *N*-乙醯葡萄糖胺與 *N*-乙醯幾丁三醣，可達最高，分別為 2.84 與 2.42 g/L，且相較於不同濃度  $\beta$ -幾丁質培養，其 *N*-乙醯幾丁寡醣種類較單一，且 *N*-乙醯幾丁三醣產量也較高。

以高溶氧量培養菌株，菌體生成量較高，所需時間較短，但生合成 *N*-乙醯幾丁三醣的量並無較高，反而以較低溶氧量下培養菌株，生合成 *N*-乙醯幾丁三醣的量較高，可達 1.1 g/L，若在培養過程中不通氣，菌株生合成以 *N*-乙醯葡萄糖胺為主，可達 2.56 g/L，由此可知，於不同溶氧量下，可誘導菌株生成不同幾丁質分解酶。

以低溶氧量培養 *Aeromonas hydrophila* Too12 於發酵槽中，探討幾丁質分解酶之特性。菌株培養於 48 h 後所得之粗酵素液，經硫酸銨沉澱、透析、DEAE-Sepharose CL-6B 及 Sephacryl S-100 純化步驟後，收集具活性之波峰。最適反應溫度與 pH 值為 40°C 與 6.0。Hg<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup> 及 Mn<sup>2+</sup> 金屬離子對幾丁質分解酶活性抑制較大，EDTA 作用對幾丁質分解酶之活性有促進作用。

#### 參考文獻

- 林玲慧 (民 94)，生產 *N*-乙醯幾丁寡醣菌株之篩選與幾丁質酶之分離純化，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
- 張鄧廷 (民 95)，利用 *Aeromonas hydrophila* Too11 生產 *N*-乙醯葡萄糖胺之培養條件探討，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
- 連德昇 (民 91)，以本土菌株分解幾丁質生產 *N*-乙醯幾丁寡醣之研究，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
- 連德昇 (民 96)，幾丁質分解酵素之生產與其基因選殖，大葉大學生物產業科技學系博士論文。
- 陳錦坤、許清輝、李錦榆、林忠亮、方炳勳、黃冬梨、吳奇生 (民 90)，在電泳片上直接分析 chitinase 活性的新方法，明志技術學院 90 學年度技術與教學研討會，台北。
- 謝伊金 (民 96)，*N*-乙醯幾丁寡醣生產菌之篩選與幾丁質分解酶之特性分析，大葉大學生物產業科技學系碩士論文。
- Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle, and J. P. Zikakis (1981) Chitin: New facets of research. *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 315-326.
- Behera, H. T., A. K. Upadhyay, V. Raina and L. Ray (2019) Optimization of media components for the production of N-acetylchitooligosaccharide from chitin by *Streptomyces chilikensis* through Taguchi experimental design. *Journal of Microbiological Methods*, 159, 194-199.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Cody, R. M. (1989) Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. *Current Microbiology*, 19, 201-205.
- Hao, W. T., K. C. Li and P. C. Li (2021) Review: Advances in preparation of chitooligosaccharides with heterogeneous sequences and their bioactivity. *Carbohydrate Polymers*, 252, 117206.
- Imoto, T. and K. Yagishita (1971) A simple activity measurement of lysozyme. *Agricultural and Biological chemistry*, 35(7), 1154-1156.
- Jafari, H., K. V. Bernaerts, G. Dodi and A. Shavandi (2020) Chitooligosaccharides for wound healing biomaterials engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 117, 111266.
- Mukherjee, S., P. K. Behera and J. Madhuprakash (2020) Efficient conversion of crystalline chitin to *N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose by the enzyme cocktail produced by *Paenibacillus* sp. LS1. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116889.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977) Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by

- Amycolatopsis* sp. CsO-2. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(6), 617-620.
16. Righetti, P. G., E. Gianazza, C. Gelfi and M. Chiari (1990) In: *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. B. D. Hames and D. Richwood (Eds.), 149-216, Oxford University Press, New York.
17. Tokoro, A., M. Kobayashi, N. Tatewaki, K. Suzuki, Y. Okawa, T. Mikami, S. Suzuki and M. Suzuki (1989) Protective effect of *N*-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiology and Immunology*, 33(4), 357-367.
18. Tokoro, A., N. Tatewaki, K. Suzuki, T. Mikami, S. Suzuki and M. Suzuki (1988) Growth-inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(2), 784-790.
19. Tsukada, K., T. Matsumoto, K. Aizawa, A. Tokoro, R. Naruse, S. Suzuki and M. Suzuki (1990) Antimetastatic and growth-inhibitory effects of *N*-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Journal Cancer Research*, 81(3), 259-265.
20. Yahiaoui, M., H. Laribi-Habchi, K. Bouacem, K. L. Asmani, S. Mechri, M. Harir, H. Bendif, R. A. Fertas and B. Jaouadi (2019) Purification and biochemical characterization of a new organic solvent tolerant chitinase from *Paenibacillus timonensis* strain LK-DZ15 isolated from the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria. *Carbohydrate Research*, 483, 107747.
21. Yan, Q. and S. S. Fong (2018) Cloning and characterization of a chitinase from *Thermobifida fusca* reveals Tfu\_0580 as a thermostable and acidic endochitinase, *Biotechnology Reports*, 19, e00274.
22. 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(1), 142-144.
23. Zhai, X. C., C. N. Li, D. F. Ren, J. Wang, C. Ma and A.M. Abd El-Aty (2021) The impact of chitooligosaccharides and their derivatives on the in vitro and in vivo antitumor activity: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 266, 118-132.

收件：110.07.05 修正：110.08.25 接受：110.10.27