

幾丁質、幾丁聚醣的生產製造、 檢測與應用

陳榮輝 / 台灣海洋大學食品科學系

一、前言

幾丁質、幾丁聚醣是一種多功能、對環境友善的現代材料 (Zakaria *et al.*, 1995)，此等物質有生物相容性 (毒性低、不會產生抗體等)、生物活性 (降膽固醇、降血脂、降血壓、增加免疫功能)、成膜性、成膠性、在酸性溶液帶正電 (抗菌、吸附、止血) 等特性，因此可當做傷口敷料、貼布、手術縫合線、抗菌防臭布料、保健食品、減肥食品、固定化酵素擔體、化妝品，亦可做為果汁澄清劑、水果保鮮劑、廢水處理劑等。幾丁質、幾丁聚醣普遍應用在農業、醫藥、食品、化工、環保等領域，故全世界無論是已開發或開發中國家均對此等物質積極進行研究。有鑑於世界各國對幾丁質、幾丁聚醣的積極研究與開發利用，也基於蝦蟹甲殼類是台灣的重要漁業加工廢棄物，如不加以利用，很容易產生惡臭而造成環境污染。且蝦蟹加工廢棄物富含蛋白質、蝦紅素、幾丁質、鈣等有價值的成分，加以回收利用，可產生高附加價值之物質。幾丁質、幾丁聚醣原料的另一重要來源是生資 (biomass)，我國有很好的發酵工業，這些生資之利用除了可以解決廢棄物問題，減少對環境之衝擊，也可以達到資源永續利用、綠色台灣之理想。

「幾丁質、幾丁聚醣的生產製造、檢測與應用」之整合型計畫，前後二期計有六年，共五十個子計畫，承蒙國科會鼎力支持並補助新台幣參仟肆佰萬元，到目前為止之成果計有：發表研究報告九十二篇 (其中三十八篇發表在 *SCI* 刊物、二十一篇於非 *SCI* 刊

物、三十一篇國際與國內研討會會議紀錄)、二項專利案、一件技術轉移案、三項建教合作案，舉辦一次國際會議暨第三屆亞太幾丁質幾丁聚醣會議 (Third Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium)，共有來自十八個國家的國外八十餘人與國內近百人的學者、專家、廠商代表與會，為期三天，共發表九十篇論文，其中大會邀請論文十篇、口頭報告二十九篇、壁報式報告五十一篇，出版專書一本 (Chen and Chen, 1999a)。以下簡述本整合型計畫到目前為止之研究成果。

二、研究成果

(一) 生產製造技術方面

1. 原料儲存技術有關之研究成果

幾丁質、幾丁聚醣與幾丁寡醣之製備，可以利用目前台灣地區冷凍蝦加工之廢棄物，如未處理之蝦殼廢棄物，或脫水、細碎之蝦殼廢棄物。未處理之蝦殼廢棄物用酸液浸泡，可以儲存在室溫十天以上 (陳榮輝，民88)。

2. 用化學法製備幾丁質、幾丁聚醣與幾丁寡醣

以回應曲面法探討由蝦殼廢棄物製備幾丁質之最適條件，由幾丁質製備幾丁聚醣之最適條件，並探討製備過程中之反應動力現象。由省產大頭紅蝦殼廢棄物用化學法製備幾丁質與幾丁聚醣的最適條件分別為去碳酸鈣：常溫、約1.7N的鹽酸、9 ml酸液/g蝦殼粉；去蛋白質：約75°C、2.5N的氫氧化鈉溶液、流

動良好的鹼液用量；去乙醯反應：約 107°C 、60%的氫氧化鈉溶液，結果可用於回收蝦殼廢棄物中之有效物質，提高製造幾丁質之效率，並有助於控制所製造幾丁聚醣之特性 (Chang and Tsai, 1997; Chang *et al.*, 1997)。以鹽酸水解幾丁質或幾丁聚醣製備幾丁寡醣及運用 HPLC 分析寡醣之方法 (張克亮等, 民 89a)，若欲製備較高聚合度之寡醣，除提高酸液濃度外，亦須縮減反應時間，而高溫則容易生成較小之寡醣。製備較高分子量幾丁寡醣之最適化條件為在約 60°C 、以高濃度酸液進行約一小時的短時間作用。幾丁聚醣經鹽酸水解後可得到較多幾丁寡醣，但需約三小時之較長時間 (張克亮等, 民 89)。另外也探討由魷魚加工廢棄物之軟骨部分製備幾丁質和幾丁聚醣之方法，以及用氧化降解法製備幾丁寡醣之方法。(張克亮, 民 89; Chang *et al.*, 2001)。

3. 以蝦蟹殼廢棄物做為微生物碳源生產酵素

直接利用蝦蟹殼廢棄物做為微生物生產酵素之主要碳源，以市售之廉價蝦蟹殼粉 (shrimp and crab shell powder, SCSP) 為主要碳源，由新竹南寮漁港土壤篩選到一個耐鹼性之幾丁質酶生產菌 *Pseudomonas aeruginosa* K-187 (Wang *et al.*, 1995)。不僅蝦蟹殼粉，就連酸鹼處理過之蝦蟹殼粉或酸鹼廢液亦能被用來做為生產幾丁質酶之主要碳源 (Wang *et al.*, 1997a; Wang and Hwang, 1999)。以酸/鹼處理過之蝦蟹殼粉比未處理之蝦蟹殼粉更適用於用來做為 *P. aeruginosa* K-187 菌生產幾丁質酶之主要碳源。此菌所生產之兩種幾丁質酶經進一步分離純化結果，證明係為最先被發現源自微生物之雙機能幾丁質酶/溶菌酶 (bifunctional chitinases/lysozymes) (Wang and Chang, 1997; Wang *et al.*, 1997b; 王三郎, 民 88)。*P. aeruginosa* K-187 菌發酵蝦蟹殼所得之發酵液裡，除了含有具抗細菌效果之幾丁質酶之外，尚含對植物病原黴菌具抗菌效果之其他成分。此一抗黴菌成分經分離純化結果，證明係為分子量 66 kDa 之高分子複合醣類，並且將之命名為 pafungin (Wang and Yieh, 1999; Wang *et al.*, 1999a, 1999b)。

P. aeruginosa K-187 菌所生產幾丁質酶可共價鍵結於簡稱 (hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate) AS-L 的這種能隨 pH 值變化而改變可溶性的高分子聚合物上。酵素活性之固定化率可高達百分之九十九，

而活化能則由原先游離酵素之 9.9 Kcal/g/mol 降為 5.96 Kcal/g/mol。最適反應 pH 及溫度則分別移至 pH 8 及 50°C 。於半衰期 (4°C) 方面，游離酵素為九天，而固定化之後則延長為十三天。經過十次批式之幾丁質水解反應後，固定化幾丁質酶仍持有原有 (反應前) 活性之百分之七十。此菌所生產幾丁質酶經固定化後，仍具有原先之抗菌 (溶菌酶) 活性 (Wang and Chio, 1997, 1998a, 1998b)。另外亦發現，此菌所生產之 pafungin 亦能被固定化於此種擔體，而且維持所具之抗菌活性。*P. aeruginosa* K-187 菌發酵蝦蟹殼廢棄物所得之發酵液裡，除了含有上述兩種具抗細菌活性的幾丁質酶，以及對於植物病原黴菌具有抗菌效果的 pafungin 之外，尚具能夠用來進行蝦蟹殼去蛋白質之用的蛋白質酶活性 (Wang *et al.*, 1999c)。利用此菌所生產之蛋白質酶，經由微生物發酵法進行蝦蟹殼去蛋白質實驗時發現，當以固態培養方式進行去蛋白質時，對於蝦蟹殼粉及天然蝦殼之去蛋白質率，分別為百分之六十八及百分之八十二。此結果比已往所發表利用 *Pseudomonas maltophilia* 之去蛋白質率還高 (Wang *et al.*, 1999c; Yang *et al.*, 2000)。另外，本研究亦篩選到能發酵蝦蟹殼廢棄物之數株細菌 *Bacillus* spp.，除了進行所生產蛋白質酶之分離純化及蝦蟹殼去蛋白質試驗之外 (Oh *et al.*, 2000)，亦針對所生產之幾丁質酶進行分離純化 (Wang and Hwang, 2001)。

4. 以微生物降解蝦殼生產幾丁質、幾丁聚醣及幾丁寡醣

大頭紅蝦、龍蝦及紅蟳的殼以化學法及生物法製取幾丁質。大頭紅蝦之幾丁質純度最高，化學法及生物法分別為 94.8 及 95.2% (乾重，未脫色)。化學法所得各幾丁質之 5% 氯化鋰/二甲基乙醯胺 (LiCl/DMAC) 溶解度，大頭紅蝦為 19.0%、紅蟳為 18.7%、龍蝦為 6.9%。用微生物可以水解蝦殼上的蛋白質而得到幾丁質，雖然其純度 (96%) 略低於以強鹼處理所得的幾丁質，但去聚合化及去乙醯化較緩和，所得之幾丁質較適於做生物醫材之原料。以 *Pseudomonas maltophilia* 1-1 或 *Candida parapsilosis* CCRC 20515 發酵去鈣後的蝦殼，可分離幾丁質 (92~95%)。其廢液可做為微生物培養基及有機液肥。自環境中分離出會產生幾丁質酶的細菌，包括 *Pseudomonas maltophilia* 1-1、

Cellulomonas flavigena NTOU 1、*Aeromonas caviae* D 1及*Alteromonas haloplanktis* K12。*P. maltophilia* 1-1以0.38 % (w/v) pH 8.39的 K_2HPO_4 為基礎培養基發酵三天，將去鈣的蝦殼中的蛋白質水解，而得到幾丁質含量達98% (乾重)的殘留物(陳幸臣與許嘉珍，民86)。

另外，也從土壤中分出一株*Flavobacterium* sp. 能將幾丁質的乙醯化程度由74 %降低為64 %。以生物法製取未脫色的幾丁質(乾重98.3，乙醯度為75.9%，分子量為 3.8×10^6)為原料，以*Amycolatopsis orientalis*的部分純化幾丁質酶加以水解以製取乙醯幾丁六糖，每毫升水溶液可得1.49毫克之N-乙醯幾丁六糖(GlcNAc)₆，即每克未脫色的大頭紅蝦幾丁質可獲得七十四毫克的(GlcNAc)₆。*C. flavigena*會產生N-乙醯葡萄糖胺酶及幾丁二糖酶(Chen *et al.*, 1997)。*A. caviae*會產生N-乙醯葡萄糖胺酶、幾丁二糖酶及幾丁三糖酶，而*A. haloplanktis*會產生N-乙醯葡萄糖胺酶及其他幾丁質酶。利用分子生物技術，以*A. caviae*的重組幾丁質酶(Lin *et al.*, 1997, 1999)生產N-乙醯幾丁寡糖(一糖至六糖)。以微生物水解水產廢棄物分離幾丁質時，發現能水解蝦殼蛋白質的微生物(如*P. maltophilia*及*Candida parapsilosis*)不能水解魷魚鞘之蛋白質。經由酵素水解及電子顯微鏡觀察，發現魷魚鞘外殼包裹一層膠原蛋白。

5. 水溶性幾丁聚醣之製備技術

(1)利用梅納反應或酵素轉醯基與果膠結合製備水溶性幾丁聚醣

幾丁聚醣可與葡萄糖等還原醣經梅納反應可得46%至28%水溶性幾丁聚醣，溶解度在0.32到1.0 g/dl之間，亦可經由果膠酯酶之轉醯基反應與果膠分子結合，可以改善幾丁聚醣之水溶性，但產率、溶解度均較上述反應低。

(2)以酵素法製備低分子量水溶性幾丁聚醣

幾丁聚醣(去乙醯度65%及80%)醋酸鹽溶液可利用商品胃蛋白酶及枯草菌血纖維蛋白酶粗製品快速水解，粗胃蛋白酶水解幾丁聚醣之最終產物主要為分子量30000左右之低分子量幾丁聚醣，而枯草菌血纖維蛋白酶水解幾丁聚醣之最終產物則為幾丁寡糖。兩種酵素水解幾丁聚醣之最適pH為2至4，粗胃蛋白酶之最適溫度為70至80°C，而粗枯草桿菌血

纖維蛋白酶之最適溫度為30至40°C。兩種商品蛋白酶經系列步驟純化可得到幾丁聚醣酵素(Chang *et al.*, 1999)。

枯草蛋白酶粗酵素製品可應用於降解幾丁聚醣，製備幾丁寡糖，所製備幾丁寡糖之組成為幾丁二糖至四糖以及若干較高聚合度之幾丁寡糖(廖玉滿等，民89)。市售鳳梨莖蛋白酶粗酵素製品可應用於降解幾丁聚醣，製備不同低分子量幾丁聚醣(黏度平均分子量108至2.1 KDa)。

(3)以物理及物化方法製備水溶性幾丁聚醣

以各種物理及物化方法包括剪力、超音波、剪力超音波合併、熱與尿素、熱/尿素與超音波五種方法處理可得水溶性幾丁聚醣(陳榮輝等，民87)。用物理及物化方法製備之水溶性幾丁聚醣，去乙醯程度、分子量可以控制外(Chen *et al.*, 1996a, 1996c, 1996d, 1998a)，分子量可高達九十萬道爾敦，操作簡單，不必使用強酸強鹼、有機溶劑，收率高，甚至可以此等方法得到幾丁寡糖。水溶性的幾丁聚醣之流體行為是非牛頓流體假塑性流體，其聚電解質性質在離子強度恆定為0.05 M，而溶液之pH由pH 4.0增加到pH 6.5，其表面黏度會隨pH值的增加而下降，表面黏度也會隨溶液之離子強度由0M氯化鈉增加至0.1M氯化鈉而急速下降，流體之剪力作用時間之效應在剪速率1000 1/s，作用時間三十分鐘之內並不顯著。

(二)分析測定技術方面

1. 去乙醯程度測定

(1)改良Niola等人(1993)之液相層析法

將離子交換層析管柱改為C8管柱，可使管柱購置成本降低至原來之四分之一，並且較易操作及維護；將水解方法改為真空水解法，可減少層析時所產生之雜峰(游士弘，民88)。

(2)改良目前IR法之缺點

由 A_{1655}/A_{3450} 之比值與核磁共振光譜法(nuclear magnetic resonance, NMR)所得之N-乙醯化程度之值做迴歸分析時，可得到一極佳之三次方程式($r = 0.9913$)以適用於低乙醯化程度之幾丁質產品(游士弘，民88)。

(3)建立以超臨界流體層析測定之新方法

經酸水解之樣品，再添加丁酸做為內標準品，利用超臨界流體層析定量水解液中之乙酸，即可求得去乙醯程度(游士弘，民88)。

2. 建立測定幾丁質類產品純度之方法

利用上述測定去乙醯程度之樣品，配合元素分析，可計算出樣品之純度(游士弘，民88)。

3. 幾丁寡醣分離、增加偵測靈敏度之方法

(1)建立以NH₂及C18分析管柱分離，半製備型管柱分離幾丁寡醣之方法。

(2)建立以氯化甲苯醯(benzoyl chloride)做衍生化以增加幾丁寡醣偵測靈敏度之方法(陳福智，民88)。

(三)應用技術方面

1. 在化工上之研究成果

陰離子型自由基物質可以快速將幾丁聚醣分子鏈裂解。譬如在70°C下，只要1.08克的過硫酸鉀就可以在五分鐘內，將幾丁聚醣醋酸水溶液的黏度降低至原先的五分之一(Hsu *et al.*, 2001；董崇民等，民89a)。幾丁聚醣可以做為陽離子型界面活性劑，大幅增進乳化聚合反應速率，同時本身也參與了聚合體的合成。也探討於幾丁聚醣存在下的乳化聚合反應動力及聚合體結構分析(Don *et al.*, 2001)。發現可以藉著不同種類的起始劑合成出不同結構的幾丁聚醣共聚合體。若是利用熱分解型起始劑，譬如過硫酸鉀，可以得到嵌段共聚合體；若是利用氧化還原型起始劑，譬如過渡金屬銻離子，則可以得到接枝共聚合體(徐世昌等，民88；董崇民等，民89b；董崇民等，民89c)。

合成出幾丁質/聚醋酸乙烯酯接枝共聚合體、幾丁聚醣/聚醋酸乙烯酯接枝共聚合體、幾丁聚醣/聚乙醇接枝共聚合體、幾丁聚醣/聚甲基丙烯酸甲酯嵌段共聚合體、幾丁聚醣/聚丙烯酸接枝共聚合體和幾丁聚醣/聚丙烯酸嵌段共聚合體(莊仲揚等，民90；董崇民等，民89d；董崇民等，民89e)。分別評估這些材料的生物分解性、生物相容性、血液適合性、金屬螯合性及吸水性等性質。幾丁聚醣果膠複合顆粒(composite particles)在pH 1.4之膨脹受Ca²⁺離子濃度影響，但在pH 7.4之溶液下則受幾丁聚醣與果膠溶液濃度的影響。蛋白質釋放量在pH 1.4之環境下很微量，但在pH 7.4，二十四小時後會釋放出大部分之蛋

白質，複合顆粒可應用在結腸(colon)釋放生物活性物質。探討幾丁聚醣在薄膜製備及蛋白質成分控制釋放藥物載體上之應用。其成果可應用在食品業製造可食性膜及製藥業開發新產品之參考(Chang *et al.*, 1999b; Chang and Lin, 2000)

2. 在農業應用之研究成果

*Cellulomonas flavigena*之幾丁質酶能抑制植物病原黴菌的生長(特別是立枯黴菌)，因不影響土壤中的自然細菌相，可做為植物有害真菌類的生物抑制劑。經由顯微鏡觀察發現，pafungin藉由造成黴菌菌絲膨脹，而對植物病原性黴菌 *Fusarium oxysporum* 及其他多株病原性黴菌具有抑制生長之效果，此種抑制植物病原黴菌感染之效果亦經苜蓿芽實驗獲得證實(Wang *et al.*, 1999a)。此外，亦於種植山藥之有機農場進行田間試驗結果，證實能夠有效防止青枯病之發生。亦篩選到能發酵蝦蟹殼廢棄物，生產植物病原真菌抗菌劑之數株細菌 *Bacillus* spp.作為生物農藥/肥料之田間試驗(Wang *et al.*, 2001)，進行抗菌、抗蟲害及促進作物生長之田間試驗。

蕪菁種子以幾丁聚醣處理後種植於田間，其根部所含幾丁質酶活性增加，以防衛性酵素活性之增加可能有助於抵抗入侵之病原菌。將β型幾丁質製成酸溶性與水溶性幾丁聚醣，利用於養殖污水的處理，探討對水質項目中，濁度、懸浮固體(suspended solids, SS)、化學需氧量(chemical oxygen demand, COD)、生化需氧量(biological oxygen demand, BOD)、氨態氮、亞硝酸態氮、魚病原菌(*Aeromonas* and *Pseudomonas*)的影響。以酸溶幾丁聚醣進行試驗時，對於改善濁度與懸浮固體的最佳劑量範圍極窄，約在5-10 ppm，並可達澄清目的。在化學需氧量與生化需氧量方面，因為其本身為有機物，所以處理後化學需氧量與生化需氧量反而增加。對氨態氮的影響，因為其本身具有胺基，所以添加會導致氨濃度的些微增加，但亞硝酸態氮卻普遍降低。對魚病原菌的影響，添加量在50 ppm以上者，其抑菌能力與去乙醯度成正比，添加量在50至10 ppm時，混凝沈澱除去者勝過去乙醯度的影響。水溶性幾丁聚醣的作用與酸溶性者類似，不過其澄清效果更佳。其他尚有因不使用醋酸為溶劑，所以有不曾提高化學需氧量與生化需氧量值、無魚腥味等優

點。因此，水溶性者較酸溶性者更適合於水質處理(陳詠文與李錦楓，民87)。

3. 在幾丁質酵素之研究成果

枯草菌粗酵素所含幾丁聚醣酶(chitosanase)已完成純化及性質測定。此酵素與其他微生物幾丁聚醣酶性質比較，具有較低之最適pH及活化能，催化反應速率快，所以甚具應用潛力。鳳梨莖蛋白酶粗酵素(stem bromelain)在食品工業上可做為肉類嫩化劑及啤酒製造之澄清劑，製品所含幾丁聚醣酶已完成純化及性質測定，為一兼具幾丁質酶活性之幾丁聚醣酶。此酵素製品尚可快速降解幾丁聚醣(chitosan)而應用於低分子量幾丁聚醣及幾丁寡糖(chitooligosaccharides)之製造。其降解幾丁聚醣之原因乃因含有幾丁聚醣酶(chitosanase)之作用而非蛋白酶本身之作用，此幾丁聚醣酶除可水解幾丁聚醣外，亦可水解乙二醇幾丁質，然水解幾丁聚醣活性大於水解幾丁質活性，對30-90%去乙酰度幾丁聚醣具有最大之水解速率，其生化性質如表一所示。此為首度證實鳳梨莖含有幾丁聚醣酶並探討其生化性質。至目前為止，有關植物幾丁聚醣酶之研究甚少，所以甚具學術價值。豬胃幾丁聚醣酶之新發現豬胃蛋白酶粗酵素製品(pepsin from porcine stomach mucosa)可快速降解幾丁聚醣，且可應用於製備低分子量幾丁聚醣，而以親和層析技術除去胃蛋白酶可獲得幾丁聚醣酶，首度證實動物消化道

含有幾丁聚醣酶(Chang *et al.*, 1998, 1999a, 2000; 廖玉滿等，民89)。

4. 水溶性幾丁聚醣的應用

利用機械力量破壞幾丁聚醣的結晶區，可以製備不同分子量、不同去乙酰度的水溶性幾丁聚醣，以便應用在食品(Chen and Chang, 2001)、化妝品(Chen and Heh, 1999, 2000a, 2000b)、醫療藥品。

在化妝品的應用成果上，則研究以不同克數、不同分子量之水溶性幾丁聚醣取代濕潤面膜之成膜劑、活力滋養霜之界面活性劑、防曬乳液之增稠劑及螯合劑的效果，在敏感性測試之結果上，三種產品皆無紅腫現象產生，且隨著水溶性幾丁聚醣濃度的增加，三種產品之表面黏度亦明顯上升。保濕效果則隨著水溶性幾丁聚醣分子量增加而增加，濕潤面膜之成膜時間較短。活力滋養霜之維生素E釋放速率則無明顯差異，防曬乳液之SPF值可達16以上(Chen and Heh, 1999, 2000a, 2000b)。使用含微脂粒之活力滋潤霜不會有紅腫現象產生。塗抹後四十分鐘皮膚pH值回升至正常的pH值。含微脂粒活力滋潤霜較不含微脂粒活力滋潤霜對皮膚保水性之效果明顯來得好，塗抹後四週對皮膚之彈性值皆有增加之情形。添加水溶性幾丁聚醣在多重乳化W/O/W型乳液的內部相或外部相中，所製得之乳液對皮膚之保水力均較標準配方高，有持久性之保溼效果；當添加水溶性幾丁聚醣於W/O/W外部相時，塗抹後、前四十分鐘之保溼效果與水溶性幾丁聚醣之分子量成正比。添加水溶性幾丁聚醣在多重乳化W/O/W型乳液的內部相或外部相中，皮膚pH值下降較控制組(添加三仙膠)輕微，推測是因為水溶性幾丁聚醣之胺基在酸性溶液中質子化，減少游離之氫離子、使乳液之pH值上升，所以皮膚pH值下降較小。添加水溶性幾丁聚醣之微脂粒較不添加水溶性幾丁聚醣微脂粒之安定性好(Chen *et al.*, 2001a)。添加水溶性幾丁聚醣可以增加W/O/W型多重乳化之形成率，且形成率隨所添加之水溶性幾丁聚醣之分子量成正比。

5. 在食品加工上的應用成果

食品保鮮上應用抗菌性幾丁質類產品方面，微生物處理法及化學製備法所得幾丁質類產品之抑菌作用並無明顯不同。由蝦殼製備去乙酰度50%、75%與

表一 鳳梨莖幾丁聚醣酶之生化性質

分子量(kDa)	31.4(gel filtration), 29.5(SDS-PAGE)
最適pH	3(chitosan), 4(EGC), 4(4-MU-(GlcNAc) ₃)
最適溫度(°C)	50(chitosan), 60(EGC), 50(4-MU-(GlcNAc) ₃)
麥氏常數(K _m)(%)	0.088(chitosan), 0.020(EGC)
最大反應速率(V _m /mg) ($\mu\text{mole GlcNAc}/\text{min}/\text{mg}$)	4.00(chitosan), 2.67(EGC)
基質專一性	chitosan, EGC
抑制物	Hg ²⁺ , PHMB, NBS
等電點(pI)	5.7
幾丁聚醣水解產物	低分子量幾丁聚醣及幾丁寡糖

EGC: Ethylene glycol chitin, 4-MU-(GlcNAc): 4-methylumbelliferyl N, N', N'-triacetyl-- β -chitotrioside, PHMB: *p*-hydroxymercibenzoic acid.

NBS: N-bromosuccinimide.

95%之幾丁聚醣，探討其抗菌活性，顯示抗菌活性隨去乙醯度增加而增大，95%去乙醯度幾丁聚醣對常見十二株病原菌及腐敗菌之最低殺菌濃度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 為50至200 ppm，生魚片若先浸泡於去乙醯度95%幾丁聚醣溶液一小時，取出，置於冰箱貯存，貯存期限可增加至少三天以上 (Tsai *et al.*, 2001; Tsai and Su, 1999a)。且幾丁聚醣，對細菌抑菌能力與菌株革蘭氏反應無關，比較蝦殼經不同處理而得之幾丁聚醣抗菌活性，探討影響其抗菌活性之因子，包括(1)幾丁聚醣之去乙醯度與分子量，以及添加方式，以及(2)環境因子如溫度、pH、鹽種類與鹽含量，以及(3)菌體本身因子(菌齡)對幾丁聚醣抗菌活性之影響，而與菌體表面陰電性有關 (Tsai and Su, 1999b)。菌齡、作用溫度及pH值，以及環境中鹽種類及含量，均影響其抑菌能力，尤其鹽類可能因與幾丁聚醣形成錯合物而降低其對菌體之作用效果 (Tsai and Su, 1999a)。幾丁聚醣對 *E. coli* 之抑菌作用機制，可能是由於幾丁聚醣上帶正電荷之 $-NH_3^+$ 與陰電性菌體表面結合，進而導致菌體表面穿孔，細胞內容物，如蛋白質及葡萄糖等流出死亡 (Tsai *et al.*, 1997)。間接驗證幾丁聚醣之抗菌機制。

合成磺酸幾丁聚醣 (sulfonated chitosan, SC) 及磺酸苯幾丁聚醣 (sulfobenzoyl chitosan, SBC) 對十二株常見食品病原菌及腐敗菌均有良好的抑菌作用 (Chen *et al.*, 1999b, 1999c)。此等衍生物取代程度會影響產品溶解度與抗菌活性，有其最適宜之取代程度。硫含量在2.5%至5.3%時，抑菌能力最好，且水溶解度高，應用在牡蠣保鮮上，可延長其在4°C保存期限至少七天以上 (Tsai *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998a, 1999b, 1999c)。利用市售較廉價工業級酵素，包括纖維素酶 (cellulase)、脂肪酶 (lipase)、半纖維素酶 (hemicellulase) 及果膠酶 (pectinase)，製備抗菌性水溶幾丁寡醣，此幾丁寡醣混合物具有很強抗菌活性，其活性為幾丁聚醣之二至三百倍 (依菌種而異)。將此寡醣應用在4°C貯存的生乳，可抑制或降低其內病菌與腐敗菌生長，使生乳在4°C經十二天貯存，菌數仍維持在 10^5 cfu/ml以下 (Tsai *et al.*, 2000)，所得寡醣中聚合度 (DP) ≥ 5 者之百分比為42.6%。添加不同濃度、不同種類的幾丁質類物質到阿拉斯加鱈魚漿中，發現添加

水溶性幾丁聚醣及酸溶性幾丁聚醣皆有提高煉製品的膠強度及曲折度之效果，其中又以水溶性幾丁聚醣的效果最佳，而添加幾丁質者效果較差，尤其對曲折度，會導致成品更易折裂。但在保水方面，則無明顯差異，皆會隨幾丁質類物質添加量的增加而略上升，添加沒有脫色之幾丁質類物質，消費者在彈性方面之接受性不錯，但顏色之接受性較差。

6. 幾丁寡醣做健康食品的成分之評估

(1) 膳食幾丁聚醣對大白鼠脂質代謝與糖代謝之影響

幾丁聚醣會降低餐後三酸甘油酯濃度，並降低非常低密度脂蛋白濃度 (very low density lipoprotein, VLDL) 及改變其組成，提升高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 之濃度。幾丁聚醣會減少飲食脂質的吸收，增加糞便脂質的排泄。大白鼠短時間 (二至四星期) 攝取幾丁聚醣後會降低血漿總膽固醇50%左右，低密度脂蛋白-及非常低密度脂蛋白-膽固醇的濃度，且沒有明顯的副作用，顯示膳食幾丁聚醣有降低血脂質，改善脂質代謝的功能 (Chiang and Chen, 1999a, 1999b)。然而大白鼠長時間 (八至十星期) 攝食幾丁聚醣後血漿總膽固醇濃度不但不會下降 (江孟燦與陳敏俐，民88)，而且會造成大、小腸長度的增加，盲腸pH值的上升，糞便黏液素酶 (mucinase) 及 β -醣醣酸酶 (β -glucuronidase) 活性的改變，顯示長時間攝食幾丁聚醣會影響腸道生理，值得注意。利用Stroptozotocin所引起的糖尿病大白鼠為實驗動物，發現攝食幾丁聚醣對罹患糖尿病且併發高脂血症的大白鼠，有明顯降低血漿總膽固醇濃度的效果。幾丁聚醣雖然不會影響糖尿病大白鼠的血糖濃度及耐糖能力，但是幾丁聚醣會明顯降低肝醣的含量。幾丁聚醣具有降低第二類型糖尿病合併高膽固醇血症之糖尿病病人血漿總膽固醇及低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 膽固醇濃度 (Tai *et al.*, 2000)。

雖然幾丁聚醣會明顯降低正常大白鼠的血漿果糖胺 (Fructosamine) 濃度 (Chiang and Chen, 1999a, 1999b)，但是幾丁聚醣對糖尿病大白鼠卻沒有明顯的影響。薏仁添加幾丁聚醣後會明顯降低糖尿病大白鼠的果糖胺 (Fructosamine) 濃度，顯示幾丁聚醣及薏仁在糖代謝的調節上可能扮演重要角色。不同黏度、相同去乙醯度之幾丁聚醣對血膽固醇濃度沒有明顯的影

響，但黏度較高之幾丁聚醣會有較低的肝臟游離及酯化型膽固醇含量 (Chiang *et al.*, 2000)。幾丁聚醣會降低血漿中肝功能指標鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 之活性。幾丁質對血漿及肝臟脂質沒有明顯的影響。攝食幾丁聚醣會增加肝內抗氧化酵素活性及脂質過氧化物濃度，促進肝臟脂質過氧化作用，幾丁聚醣會減少肝臟脂質的堆積，特別是膽固醇酯及三酸甘油酯的堆積，幾丁聚醣會影響肝臟醣類代謝酵素六碳醣激酶 (hexokinase)，降低血液果糖胺濃度。顯示幾丁聚醣可能會影響糖代謝。攝取過多的幾丁聚醣 (7%) 會造成脂肪動員，並降低生長。大鼠血糖濃度，而菊糖的添加則有降低盲腸 pH 及提升短鏈脂肪酸濃度的作用。

(2) 膳食幾丁聚醣對大白鼠生理影響之研究成果

腸內病菌 *Clostridium perfringens* 及腸內益菌乳桿菌 (*Lactobacillus*) 與雙叉桿菌 (*Bifidobacterium*) 等十四株腸內細菌之體外試驗顯示腸內病菌 *Clostridium perfringens* 對幾丁聚醣敏感，易被殺死，乳桿菌 (*Lactobacillus*)，則隨菌種不同敏感性不同，雙叉桿菌 (*Bifidobacterium*) 則普遍對幾丁聚醣有抗性。動物餵食試驗顯示動物攝食去乙醯度 50%、75% 與 95% 幾丁聚醣，並未顯著影響其腸內菌相，此乃腸道 pH 值偏微鹼性，降低幾丁聚醣之抗菌性及以粉末狀幾丁聚醣攝食，分子未展開而降低抗菌活性。動物餵食幾丁聚醣四週後，小腸腸壁絨毛並不受影響，但盲腸腸壁黏膜產生脫落，且此受損程度隨去乙醯度增加而增大。但若繼續攝食幾丁聚醣八週，盲腸腸壁受損已恢復與控制組相同。(Tsai and Hwang, 2001a, 2001b)。由市售廉價工業級酵素製備具免疫增強活性之幾丁寡醣產物。由體外組織細胞測試及動物注射顯示，其可促進抗體分泌及淋巴細胞增生。由動物注射結果顯示其效果比 N-乙醯幾丁六醣標準品還好。由動物餵食結果顯示此種幾丁寡醣具備類似乳果寡醣功能，而有利腸內益菌。

此外，幾丁寡醣並不影響動物腸壁組織，但攝食幾丁寡醣之動物體重明顯低於控制組。依動物實驗發現 N-乙醯幾丁寡醣會使攝食動物降低血膽固醇，並提高白血球之數目。經試管試驗，發現 N-乙醯葡萄糖胺能為易脆擬桿菌 (*Bacteroides fragilis*) 及乳酸球菌利用為

碳源；但雙叉桿菌則不能；而產氣莢膜梭菌則能有效利用 N-乙醯幾丁二糖為碳源。分離的 *Cellulomonas flavigena* NT01 將未去乙醯基處理的幾丁質水解為含有游離胺基酸、核苷酸及其相關物質低於 7 mg/ 100 ml 的水溶液，但尚有 N-乙醯幾丁二糖 39 mg/ 100 ml 及兩種未被確定的寡醣各 122 及 106 mg/ 100 ml。以此水溶液或蒸餾水為飲料，並均以固體飼料 (purina chow) 飼養大白鼠四週，發現飲用幾丁質水解液的試驗組動物血液中的白血球數目高於飲用蒸餾水的對照組 ($p < 0.05$)；但試驗組與對照組的總血膽固醇量相似。觀察飼養動物盲腸 (ceca) 中內容物的菌相，發現試驗組動物的分歧桿菌屬 (*Bifidobacterium*) 菌數比對照組的為高，但一種機緣性病原菌 *Bacteroides fragilis* 在試驗動物中 (占全部菌相分布的百分之三十) 超過對照組動物甚多 ($p < 0.05$)。因此以幾丁寡醣或乙醯幾丁寡醣為健康食品的成分，在臨床上尚需小心 (Chen and Chen, 1999b)。

7. 幾丁質類產品之食用安全性及降解重金屬銅毒害之作用

以老鼠為實驗動物，各餵食 0 至 10% 含量之幾丁質、低去乙醯度之幾丁聚醣 (去乙醯度 75%)、高去乙醯度之幾丁聚醣 (92%) 和葡萄糖胺等八週，經檢測老鼠之成長、飼料轉換效率、血液學如紅血球數、白血球數、血比容等和生化學指標如天冬胺酸轉胺酶 (aspartate transaminase)、丙胺酸轉胺酶 (alanine transaminase)、血尿素氮、血漿鐵和肌酸酐 (creatinine) 等十數項指標，綜合各項指標結果，發現幾丁質類產品之食用安全性限量為幾丁質 10%，低去乙醯度幾丁聚醣 5%，高去乙醯度幾丁聚醣 2.5%，葡萄糖胺 1.0%。其中 10% 之低去乙醯度幾丁聚醣經老鼠長期食後，其血液中之血比容和血紅素會下降，血漿鐵之濃度亦會下降，而 5% 以上之高去乙醯度幾丁聚醣則除血比容、血紅素和血漿鐵會下降外，肝腎功能指標亦會受影響而上升。葡萄糖胺則 1.0% 以上時，會使老鼠之血漿鐵和肌酸酐 (creatinine) 下降。另外比較低去乙醯度和高去乙醯度之幾丁聚醣對銅在老鼠毒性作用之影響，發現低去乙醯度之幾丁聚醣稍具有舒解銅毒性之作用，但高去乙醯度之幾丁聚醣則不具舒解毒銅毒性之作用，反而會增加銅之毒性作用 (Hwang *et al.*,

廠、健康食品業者參考利用。雖然本整合計畫執行成果值得肯定，也獲得國外學者認同而得以舉辦第三屆亞太幾丁質幾丁聚醣會議，但對幾丁質類物質中，產值最高的醫療有關研究之投入尚不夠，這方面之研發尚待積極投入。幾丁質類物質衍生物之研發可以改善現有材料性質，這方面也待強化。幾丁質類物質之水膠 (hydrogel) 亦有許多種型與用途值得開發利用 (Chen *et al.*, 1999, 2000b, 2001b)。有關幾丁質類物質與重金金屬吸附之基礎研究，國內也待進一步提升。

參考文獻

- 王三郎 (民 88) 新穎幾丁質酶及其製法，日本專利特許第 3002140 號。
- 江孟燦、陳敏俐 (民 88) 膳食幾丁聚醣對大白鼠脂質代謝的影響，*中國農業化學會誌*，**37**，20-31，台灣。
- 徐世昌、董崇民、邱文英 (民 88) 聚甲基丙烯酸甲酯／幾丁聚醣乳膠顆粒之合成及力研究，第廿二屆高分子研討會論文集，頁 229-230，新竹，台灣。
- 莊仲揚、董崇民、邱文英 (民 90) 幾丁聚醣／丙烯酸共聚合體膨潤行為之研究，第廿四屆高分子研討會論文集，頁 437-438，台北，台灣。
- 陳幸臣、許嘉珍 (民 86) 以微生物分解蝦殼製取幾丁質與其部份去乙酰化，*中國農業化學會誌*，**35(3)**，342-353。
- 陳詠文、李錦楓 (民 87) 以幾丁聚醣處理水產養殖池水的效益，*食品科學*，**25(5)**，626-637。
- 陳福智 (民 88) 幾丁寡醣之高效率液相層析分離葡萄糖糖基甲醯化之探討，國立台灣海洋大學食品科學碩士學位論文。
- 陳榮輝 (民 84) 水產甲殼廢棄物開發高經濟價值之幾丁質材料研究報告，*科學發展月刊*，**27(4)**: 413-421。
- 陳榮輝、徐珠璽、張展榮 (民 87) 水溶性幾丁聚醣的製造方法，中華民國專利申請中。
- 游士弘 (民 88) 幾丁質與幾丁聚糖之 N - 乙酰化程度及純度測定測定方法之探討，國立台灣海洋大學水產食品科學碩士學位論文。
- 張克亮 (民 89) 魷魚加工廢棄物之回收與利用研究，八十八年度食品科技研發成果發表會—水產加工，頁 105-109，食品工業發展研究所。
- 張克亮、李宗洋、傅文榮 (民 89) HPLC Analysis of N-acetylchito-oligosaccharides during the Acid Hydrolysis of Chitin. *藥物食品分析*，**8(2)**, 75-83。
- 董崇文、江志鈞、洪聖原 (民 89a) 以過氧化物裂解幾丁聚醣之研究，*明志技術學院學報*，**32**，123-128。
- 董崇民、邱文英、陳韻如、金家鳳、莊仲揚 (民 89b) 幾丁質與醋酸乙烯酯之接枝共聚合體的研究，第廿三屆高分子研討會論文集，頁 537-538，高雄，台灣。
- 董崇民、邱文英、金家鳳 (民 89c) 幾丁聚醣共聚合體的合成及其應用，2000 年臺灣幾丁質生物科技研討會論文集，頁 34-38，台北，台灣。
- 董崇民、廖建棠、鄭敬賢 (民 89d) 幾丁聚醣圓珠吸附銅離子之研究，*明志技術學院學報*，**32**，117-122。
- 董崇民、曾盛晃、陳良牧 (民 89e) 不同去乙酰度幾丁聚醣之製備與測定，*明志技術學院學報*，**32**，129-134。
- 廖玉滿、李蘇珍、江翠蓮、張珍田 (民 89) 豬胃及枯草菌蛋白酶粗製品水解幾丁聚醣之研究，*台灣農業化學及食品科學會誌*，**38**，239-247。
- Chang, C. T., F. P. Young, M. H. Chang and H. Y. Sung (1998) Purification and properties of β -N-acetylhexosaminidase from cabbage. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 371-380.
- Chang, C. T., Y. M. Liao and S. J. Li (1999a) Preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 233-238., Rita advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Chang, C. T., S. T. Cheng, R. J. Shiau, H. C. Lin, L. L. Chien and H. Y. Sung (2000) Purification and properties of chitinase from radish roots, *Food Sci. Agric. Chem.*, **2**, 07-114.
- Chang, K. L. B., J. Lin and J. Lee (1999b) Physical and chemical properties of chitosan membrane. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 261-266., Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Chang, K. L. B. and G. Tsai (1997) Response surface optimization and kinetics of isolating chitin from pink shrimp (*Solenocera melanthero*) shell waste. *J. Agric. Food Chem.*, **45(5)**, 1900-1904.
- Chang, K. L. B., G. Tsai, J. Lee and W. R. Fu (1997) Heterogenous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.*, **303(3)**, 327-332.
- Chang, K. L. B., J. Lin and J. Lee (1998) Optimizing the preparation of N-acetylchito-oligosaccharides by mild acid hydrolysis with RSM. *J. Agric. food Chem.* (in press)
- Chang, K. L. B. and J. Lin (2000) Swelling behavior and release of protein from chitosan-pectin composite particles. *Carbohydr. Polym.*, **43**, 163-169.
- Chang, K. L. B., J. Lin and J. Lee (2001) Optimizing the

- preparation of N-acetyl-chito-oligosaccharides by mild acid hydrolysis with RSM. *J. Agric. food Chem.* (in press).
- Chen R. H. (1999) Manipulation and application of chain flexibility of chitosan. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 39-46, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Chen, R. H. (2000) Progress and Perspective of Chitin and chitosan science and industry in Asia. In: *Proceedings of 8th International Chitin Chitosan Conference*. Sept. 21-23, 2000, Yamaguchi, Japan.
- Chen R. H., J. Huang and Y. Chiang (1999a) Effects of various methods and chitosans used on pH stability and thermal properties of hydrogel prepared. In: *Advances in Chitin*.
- Chen, C. S., J. C. Su and G. J. Tsai (1999b) Antimicrobial effect and physical properties of sulfonated chitosan. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen, eds., pp. 273-277, Rita Advertising Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
- Chen, C. S., J. C. Su and G. J. Tsai (1999c) Antimicrobial effect and physical properties of sulfobenzoyl chitosan. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen, eds., pp. 278-282, Rita Advertising Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
- Chen, r. H., J. R. Chang and J. S. Shyur (1998c) Effect of shear conditions and storage in acidic solution on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *J. Fish Soc. Taiwan*, **25**(3), 219-229.
- Chen R. H., H. D. Hua and J. R. Huang (1998b) Effect of N-acetylation on the acidic solution stability and permeability of membranes prepared from different chain flexibility chitosans. *J. Fish Soc. Taiwan*, **25**(4), 303-311.
- Chen, R. H. and H. C. Chen (1999a) *Advances in Chitin Science Volume III*, Rita Advertsing Co., Ltd., Taipei, Taiwan.
- Chen, S. H. and H. C. Chen (1999b) Effect of oral administration of *Cellulomonas flavigena* NTOU1-degraded chitin hydrolysate of physiological changes in rat. *Food Sci. Agric. Che.*, **1**(3), 186-193.
- Chen, R. H. and J. S. Chen (2000) Changes of polydispersity and limiting molecular weight of ultrasonic treated chitosan. In: *Advances in Chitin Science Volume IV*. Eds. Peter, M. G., A. Domard and R. A. A. Muzzarelli, Universitat Potsdam, Germany, pp. 361-366.
- Chen, H. C., M. F. Hsu and S. T. Jiang (1997) Purification and characterization of an exo-N, N'-diacetylchitobiohydrolase-like enzyme from *Cellulomonas flavigena* NTOU 1. *Enzymes Microb. Technol.*, **20**(3), 191-197.
- Chen, R. H. and H. D. Hua (1996a) Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membranes. *Carbohydr. Polym.*, **29**, 353-358.
- Chen, R. H. and H. D. Hua (1996b) Effect of N-acetylation on the acidic solution stability, thermal and mechanical properties of membranes prepared from different chain flexibility chitosans. *J. Appl. Polym. Sci.*, **61**, 749-754.
- Chen, R. H. and H. D. Hua (1996c) Effect of chain flexibilities of chitosans on the physical and permeability properties of the ultrafiltration membranes prepared. In: *Advances in Chitin Science Vol. I*. Ed. by Domard, a., Jeuniaux, C., Muzzarelli, R. and roberts, G. Jacques Ander publisher, Lyon, France, pp 346-354.
- Chen, R. H., J. R. Chang and J. S. Shyur (1996a) Effect of ultrasonic conditions and storage in acidic solution on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan. *Carbohydr. Res.*, **299**, 287-294.
- Chen, R. H., J. S. Shyur and J. R. Chang (1996c) Effect of ultrasonic-heating and heating only on changes of intrinsic viscosity, degree of deacetylation, and maximum melting point temperature of treated chitosan in acetic acid solution containing 4M urea. In: *Advances in Chitin Science Vol. II*. Ed. by Domard, A., Roberts, G. A. F., and Varum, K. M. Jacques Ander Publisher, Lyon, France, pp. 437-444.
- Chen, R. H., J. S. Shyur and J. R. Chang (1996d) The effects of ultrasonic-heating and heating only on the changes of intrinsic viscosity, degree of deacetylation, and maximum melting point temperature of treated chitosan in acidic solution. In: *Chitin and Chitosan Enviromental Friendly and Versatile Biomaterial*. Ed. by Stevens, W. F., Rao, M. S. and Chandkrachang, S. AIT, Thailand, pp. 90-97.
- Chen, R. H., M. L. Tsaih and W. C. Lin (1996b) Effects of chain flexibility of chitosan molecules on the preparation, physical, and release characteristics of the prepared capsule. *Carbohydr. Polym.*, **31**, 141-148.
- Chen, R. H. and M. L. Tsaih (1997) Effect of preparation method, characteristics of chitosan on the mechanical and release properties of the prepared capsule. *J. Appl. Polym. Sci.*, **66**, 161-169.

- Chen, R. H. and M. L. Tsaih (1998) Effect of temperature on the intrinsic viscosity and on the conformation of chitosans in dilute HCl solution. *Int. J. Biol Macromol.*, **23**, 135-141.
- Chen, R. H. and R. S. Heh (1999) Sun protection and skin hydration effects and physico-chemical properties of sun screen lotion containing water-soluble chitosans. *J. Appl. Cosmetics*, **17**(2), 56-71.
- Chen, R. H. and R. S. Heh (2000a) Film formation time and skin hydration effects and physico-chemical properties of moisture masks containing different water-soluble chitosans. *J. Cosmet. Sci.*, **51**, 1-13.
- Chen, R. H. and R. S. Heh (2000b) Vitamin E release ratio and skin hydration effects and physico-chemical properties of vital moisture creams containing water-soluble chitosans. *Int. J. Cosmetics Sci.*, **22**, 349-360.
- Chen, R. H., J. R. Huang and Y. J. Chiang (2000b) Effects of using various production methods and different molecular weight of chitosans on gel strength and release characteristics of prepared hydrogels. In: *Proceedings of 8th International Chitin Chitosan Conference*. Sept. 21-23, 2000, Yamaguchi, Japan.
- Chen R. H., J. Huang and Y. Chiang (2001b) Effects of using different degrees of deacetylation and production methods on gel strength and release characteristics of chitosan hydrogel. In: *Proceedings of 3rd Int. Symposium on Chitin Enzymology*.
- Chen, R. H. and M. L. Tsaih (2000) Effect of urea concentration on the conformation of chitosan and on the shift of break point of Mark-Houwink equation. *J. Appl. Polym. Sci.*, **75**, 452-457.
- Chen, R. H. and C. S. Liu (2001) Effect of recovery method and condition on the characteristics of regenerated chitosan. *J. Applied Polym. Sci.*, (in press).
- Chen, R. H., H. P. Win and H. J. Fang (2001a) Vesicle size, size distribution, stability, and rheological properties of liposomes coated with water-soluble chitosans of different molecular weights and concentrations. *J. Liposome Res.* (in press)
- Chen, S., W. Y. Liao and G. J. Tsai (1998a) Antibacterial effect of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and its application to oyster preservation. *J. Food Prot.*, **61**, 1124-1128.
- Chiang, M. T. and M. L. Chen (1999a) Effect of dietary chitosan on glucose metabolism in rats. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 345-349, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Chiang, M. T. and M. L. Chen (1999b) Effect of dietary chitosan on plasma lipoprotein cholesterol levels in rats. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 350-355, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Chiang, M. T., H. T. Yao and H. C. Chen (2000) Effect of dietary chitosan with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**(5), 965-971.
- Don, T. M., S. C. Hsu, W. Y. Chiu (2001) Structures and thermal properties of chitosan-modified Poly(methyl methacrylate). *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **39**(10), 1646-1655.
- Hsu, S. C., T. M. Don and W. Y. Chiu (2001) Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate, *Polymer Degradation and Stability*. (accepted)
- Hwang, D. F., M. Y. Lin and C. Y. Chung (1999) Evaluation of food safety for chitin and chitosan. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 356-361, Rita Advertising CO., LTD, Taipei.
- Lin, C. S., H. C. Chen and F. P. Lin (1997) Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*. *Enzyme Microb. Technol.*, **21**, 472-478.
- Lin, F. P., H. C. Chen and C. S. Lin (1999) Site-directed mutagenesis of Asp313, Glu315, and Asp391 residues in chitinase of *Aeromonas caviae*. *IUBMB Life.*, **48**, 199-204.
- Oh, Y. S., I. L. Shih, Y.-M. Tzeng and S. L. Wang (2000) Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 3-10.
- Tai, T. S., W. H. Sheu, W. J. Lee, H. T. Yao and M. T. Chiang (2000) Effect of chitosan on the plasma lipoprotein concentration in subjects having type II diabetes with hypercholesterolemia. *Diabetes Care*, **23**, 1703-1704.
- Tsai, G. J. and W. H. Su (1999a) Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, **62**, 239-243.
- Tsai, G. J. and W. H. Su (1999b) Extrinsic factors on the antibacterial activity of chitosan. pp. 323-327. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 233-238, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Tsai, G. J., W. Y. Liao and C. S. Chen (1997) Antimicrobial activities of shrimp chitosan and chitosan derivatives and their application on food preservation. In: *Advances in Chitin Science Vol. II*. Ed. by Domard, A., Roberts, G. A. F., and Varum, K. M. Jacques Ander Publisher, Lyon, France, pp. 744-750.

- Tsai, G. J., Z. Y. Wu and W. H. Su (2000) Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J. Food Prot.*, **63**, 747-752.
- Tsai, G. J., W. H. Su and H. C. Chen (2001) Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and application to fish preservation. *Fisheries Sci.* (submitted).
- Tsai, G. J. and S. P. Hwang (2001a) Effects of shrimp chitosan on the intestinal epithelia tissue. *Proceedings of 3rd Int. Symposium on Chitin Enzymology.*
- Tsai, G. J. and S. P. Hwang (2001b) Effects of shrimp chitosan on the intestinal bacteria. *Proceedings of 3rd Int. Symposium on Chitin Enzymology.*
- Tsaih, M. L. and R. H. Chen (1997) Effect of molecular weight and urea on the conformation of chitosan molecules in dilute solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*, **20**, 233-240.
- Tsaih, M. L. and R. H. Chen (1999a) Molecular weight determination of 83% degree of deacetylation chitosan with non-Gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. *J. Appl. Polym. Sci.*, **71**, 1905-1913.
- Tsaih, M. L. and R. H. Chen (1999b) Effect of ionic strength and pH on diffusion coefficients and conformation of chitosan molecules in solution. *J. Appl. Polym. Sci.*, **73**, 2041-2050.
- Wang, S. L., M. C. Lu and W. T. Chang (1995) Production of chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Proceeding of the National Science Council. ROC (life Science)*, **19(2)**, 105-112.
- Wang, S. L. and W. T. Chang (1997) Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab powder medium. *Applied and Environmental Microbiology*, **63(2)**, 380-386.
- Wang, S. L. and S. H. Chio (1998a) Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 629-633.
- Wang, S. L. and S. H. Chio (1998b) Reversible immobilization of chitinase via coupling to reversibly-soluble polymer. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 634-640.
- Wang, S. L., S. H. Chio and W. T. Chang (1997a) Production of chitinase from shellfish waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Proceeding of the National Science Council, ROC (life Science)*, **21(2)**, 71-78.
- Wang, S. L., C. S. Pai and S. T. Shieh (1997b) Production, purification and character-ization of the hen egg-white lysozyme inhibitor from *Enterobacter cloacae* M-1002. *J. Chinese Chem. Soc.* **44(5)**, 349-355.
- Wang, S. L., T. C. Yieh and I. L. Shih (1999a) Production of antifungal compound by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 142-148.
- Wang, S. L., T. C. Yieh and I. L. Shih (1999b) Purification and characterization of a new compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, **25**, 439-446.
- Wang, S. L., J. C. Yieh, C. H. Wang, I. L. shih, L. P. Lin, Y. C. Lin and Y. C. Li (1999c) Purification and characterization of a new antifungal compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. In: *Advances in Chitin Science Vol III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 436-442, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Wang, S. L. and J. R. Hwang (1999) Microbial reclamation of shellfish waste for the production of chitinase. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 186-189, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Wang, S. L. and J. R. Hwang (2001) Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. *Enzyme and Microbial Technology*. (accepted)
- Wang, S. L. and J. C. Yieh (1999) Microbial reclamation of shellfish waste for the production of antifungal compound. In: *Advances in Chitin Science Vol. III*, R. H. Chen and H. C. Chen Eds. pp. 439-442, Rita Advertising CO., LTD, Taipei, Taiwan, R.O.C.
- Wang, S. L., I. L. Shih, T. W. Liang and W. T. Chang (2001) Purification and characterization of two antifungal chitinases extracellularly produced by *Bacillus subtilis* V656 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology*. (revised)
- Yang, J. K., I. L. Shih, Y. M. Tzeng and S. L. Wang (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 406-413.
- Zakaria, M. B., W. M. W. Muda and M. P. Abdullah (1995) Chitin and Chitosan the Versatile Environmentally Friendly Modern Materials. Penerbit University Kebansaan Malagsia.

(收稿日期：90年7月19日；接受刊登：90年8月9日)