

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：楊芳鏘 博士

結合雞腿麈菌絲體培養與自溶作用
提升幾丁六醣產量之研究

研究生：莊翌晨 撰

中華民國一百年七月

Graduate Institute of Chemical and Materials Engineering

Tunghai University Master Thesis

Advisor : Fan-Chiang Yang, Ph.D.

Combining the cultivation & autolysis of *Coprinus cinereus* mycelia for production of chitohexaose

Graduate student : Yi-Chen Chuang

July,2011

中文摘要

幾丁寡醣除了可做為醫療用藥亦被證實可用於植物黴菌病害的防治，其中聚合度 6 左右之幾丁寡糖具有抗腫瘤提升免疫力之效果而受到重視，但因為價格高無法普及使用，因此全球產業界正積極研究幾丁寡醣製程的改善，期望提高產量與增加市場競爭性。

鬼傘屬真菌具有生長周期短且富含幾丁質酶特色。研究重點在於利用鬼傘屬真菌 (BCRC36099) 幾丁質酶降解菌絲體產生幾丁六醣產量之製程開發。實驗使用雞腿蘑液態培養第六天菌絲體做為系統分解原料，並利用菌體內酵素產生自溶現象。結果顯示經水解與均質破壞菌絲體後，發酵液中幾丁分解酵素活性由 0.58 U 提升至 1.14 U(97%)，還原醣量由 1100.93 mg/l 提升 1284.45 mg/l(17%)。本研究亦發現當還原醣濃度達 1300 mg/l 會抑制幾丁分解酵素之活性，為避免此現象之發生，透過添加緩衝液降低基質還原醣濃度來維持酵素活性。後期為避免產物二次降解而使用超過濾裝系統進行產物分離與酵素回收利用，結果得知使用 1 kDa 分離膜進行兩批次分離發效液，可將幾丁六醣寡醣量由 41.85 mg 提升至 87.28 mg (約 109%)，證明此系統有效提升幾丁六醣產量。

關鍵字：幾丁六醣、自溶作用、超過濾、雞腿蘑

Abstract

In recent years chitoglycosaccharides have been proved to possess many bioactive functions, and used as medical drugs or an anti-fungal agent for plant protection. Especially, hexamer is well-known for anticancer treatment. However, owing to high price, it could not be used universally. Therefore, how to develop a high efficiency process for the production of chitohexaose has become an urgent research program.

Coprinus cinereus (BCRC36099) has the main characteristics of short cultivation time and its carpophore with varied chitinase. The objective of this study was to enhance the activity of chitosanase in *Coprinus cinereus* mycelium for the enzymatic production of chitohexaose by mycelia auto-hydrolysis. The experimental results showed that after the treatment of mycelia destruction, chitinase activity increased from 0.58 U to 1.14 U (96%) and reducing sugar concentration rose from 1100.93 mg/l to 1284.55 mg/l (17%). However, it is interesting to note that when the reducing sugar concentration was higher than 1300 mg/l, chitinase activity could be inhibited. The problem could be partially solved by diluting the medium to maintain chitinase activity.

In order to avoid excessive hydrolysis, an ultra-filtration membrane reactor system was used for the separation of crude product and enzyme recovery. The results indicated that twice operation of batch filtration by 1kDa membrane could raise the level of chitohexaose

from 41.85 mg to 87.28 mg, in which the concentration had a 109% increase. The system was proved to enhance the production of chitohexaose efficiently by enzymatic hydrolysis of mycelia.

Key words: hexamer 、 autolysis 、 ultra-filtration 、 *Coprinus cinereus*

目錄

中文摘要	III
ABSTRACT	IV
目錄	VI
表目錄	VIII
圖目錄	IX
附錄表	XI
附錄圖	XI
第一章 緒論	1
1-1 前言	1
1-2 研究動機與目的	2
第二章 文獻回顧	3
2-1 幾丁質與幾丁質衍生物之介紹	3
2-2 幾丁質分解酵素介紹	7
2-3 幾丁寡醣之生產方法	12
2-4 幾丁寡醣製備研究近況	17
2-5 鬼傘屬雞腿蘑特性介紹	23
2-6 菌絲體自溶之成因	24

第三章 實驗材料與分析方法	27
3-1 菌株	27
3-2 實驗藥品	28
3-3 實驗儀器及設備	29
3-4 分析分法	31
3-5 實驗架構	36
3-6 實驗方法	38
3-8 菌絲體發酵液之最佳水解時間	40
3-9 使用超過濾對幾丁六醣產量之影響	41
3-10 雞腿蘑分解酵素與合成現象之探討	43
第四章 結果與討論	49
4-1 菌絲體培養最佳化條件	49
4-2 菌絲體發酵液之最佳水解條件探討	52
4-3 使用超過濾對幾丁六醣產量之影響	72
第五章 結論與未來展望	89
5-1 結論	89
5-2 未來展望	90
參考文獻	91

表目錄

表 2-1 幾丁質/幾丁聚醣的發展史 -----	4
表 2-2 N-乙醯幾丁寡糖及 N-乙醯葡萄糖胺之應用 -----	6
表 2-3 不同 N-乙醯幾丁寡糖生產方法之優缺點比較 -----	15
表 2-4 幾丁寡糖原料來源之優缺點比較 -----	17
表 3-1 實驗藥品 -----	28
表 3-2 實驗儀器設備 -----	29
表 3-3 雞腿蘑培養基成分 -----	39
表 4-1 雞腿蘑菌絲體酵素之特性分析 -----	63
表 4-2 雞腿蘑幾丁分解酵素比活性與生產幾丁六醣之產能與文獻之比較 ----	76
表 4-3 稀釋不同倍數濃縮端反應物對批次水解發酵液自溶影響 -----	78
表 4-4 5 kDa 透析膜批次分離 50%稀釋水解發酵液之幾丁六醣總量 -----	80
表 4-5 1 kDa 透析膜批次分離 50%稀釋之水解發酵液之幾丁六醣總量 -----	81
表 4-6 水解兩小時與四小時與 1 kDa 批次分離製程之幾丁六醣產量比較 ----	82
表 4-7 批次分離水解濃縮液對總反應醣之變化 -----	88

圖目錄

圖 2-1 幾丁質與纖維素之結構比較	3
圖 2-2 參與幾丁質代謝之幾丁質相關酵素	10
圖 2-3 絲狀真菌幾丁質代謝之相關酵素	11
圖 2-4 酵素法製備 N-乙酰幾丁寡糖與幾丁寡糖之路徑圖	16
圖 2-5 幾丁質與幾丁聚醣生產幾丁寡醣之路徑	18
圖 2-6 (a) <i>Penicillium chrysogenum</i> 菌體區段示意圖(b)菌體延伸分支液泡化自 體溶解及 Penicillin 生成機制	25
圖 2-7 真菌發生自體溶解之成因	26
圖 3-1 總實驗架構圖	37
圖 3-2 批次添加緩衝液水解流程圖	45
圖 3-3 單次分離發酵液對幾丁六醣產量之流程圖	45
圖 3-4 濃縮端反應物不同稀釋倍數對批次水解發酵液自溶之影響流程圖	46
圖 3-5 不同膜孔徑大小對批次分離水解發酵液自溶現象實驗流程圖	46
圖 3-6 抑制自溶現象之還原醣濃度探討	47
圖 3-7 探討合成現象為逆反應或合成酵素作用影響之流程圖	47
圖 3-8 合成作用之可能原因探討	48

圖 4-1 雞腿蘑培養 1~10 天生理活性的變化	50
圖 4-2 雞腿蘑發酵液還原糖 3~10 天變化	51
圖 4-3 菌絲體發酵液水解時間與特性變化	53
圖 4-4 重複添加緩衝液至菌絲體發酵液水解時間與特性變化	55
圖 4-5 抑制自溶現象之還原糖濃度探討	57
圖 4-6 發酵液醣量變化對合成作用之影響	59
圖 4-7 5 kDa 濃縮液醣量變化對合成作用之影響	60
圖 4-8 5 kDa 透析液醣量變化對合成作用之影響	61
圖 4-9 粗酵素之光譜分佈	64
圖 4-10 5kDa 濃縮端酵素之光譜分佈	65
圖 4-11 5 kDa 透析端酵素之光譜分佈	66
圖 4-12 5 kDa ~1 kDa 濃縮端酵素之光譜分佈	67
圖 4-13 1 kDa 透析端酵素之光譜分佈	68
圖 4-14 發酵液兩倍濃縮酵素之光譜分佈	70
圖 4-15 發酵液三倍濃縮酵素之光譜分佈	71
圖 4-16 兩小時水解液經超過率分離之醣量變化	73
圖 4-17 三小時水解液經超過率分離之醣量變化	74
圖 4-18 兩小時水解經超過率分離濃縮液與透析液之幾丁寡醣含量	75

圖 4- 19 批次分離水解濃縮液對多醣轉化率之影響 -----	85
圖 4- 20 批次分離水解濃縮液對幾丁六醣產量之影響 -----	86
圖 4- 21 批次分離水解濃縮液與水解發酵液對幾丁一至四醣產量之影響 -----	87

附錄表

附錄表 1. 1% Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution 配方 -----	98
---	----

附錄圖

附錄圖 1. N-乙醯葡萄糖胺還原醣濃度標準曲線 -----	98
附錄圖 2. 牛血清蛋白標準曲線 -----	99

第一章 緒論

1-1 前言

近年來隨著醫學發展的日新月異，醫學診斷及治療方法的不斷進步，國人之平均壽命已達 78 歲，但根據行政院衛生署所公佈之資料顯示，惡性腫瘤蟬連國人十大死因之首達二十九年之久，平均每四人中即有一人死於惡性腫瘤，其中尤以肝癌及肺癌為主要致死之癌症類別。因此，醫學界持續研究之目標為如何降低癌症之發生率、死亡率及提高癌症的治癒率。癌症的化學預防廣泛來說即為使用天然或人工合成之食品或藥品去降低癌症的發生率及減緩癌症的發展甚至於逆轉癌化的過程。流行病學研究指出飲食中的蔬菜與水果能有效的降低癌症的發生率(Steinmetz and Potter, 1991)。由於某些天然食物中含有特殊成分可有效提高癌症治癒率，且相較於化學合成藥品更具毒性低、安全性高、攝取也容易，因此廣為大眾所接受。

幾丁寡醣 (Chitosan oligosaccharides) 是時下熱門健康食品之一，其中幾丁寡糖聚合度 6 至 9 左右具有抗腫瘤提昇免疫力及減輕體重之效果，一般市售幾丁寡糖原料中聚合度 6 至 9 之幾丁寡糖含量都不超過 10%，聚合度 6 至 9 之幾丁寡糖含量 30% 以上之幾丁寡糖原料價值頗高，日本地區每公斤售價十八萬日幣，折合台幣約五萬元左右，此種幾丁寡糖可作為保健食品素材，常添加於巴西蘑菇和靈芝等強調免疫功能的保健食品內，以提高此等保健食品之免疫功能。

1-2研究動機與目的

目前生產幾丁寡糖的方法可分為化學法、物理法與酵素法，其中又以酵素法製備幾丁寡糖較溫和且具高度的專一性，也無化學法的廢液處理問題，對環境造成傷害較小，故為目前製備幾丁質水解物質的主要方法。為了提高產量，過去幾年研究人員把焦點放在非特定性商業酵素，特別是食品等級的酵素，以改善現有的生產方式。但市售之木瓜酵素、脂肪分解酵素及溶菌酵素等，水解效果不佳，寡糖之產量低，加上成本過高無法商業化生產，近年來轉向使用真菌或細菌做為酵素來源以降低幾丁寡糖生產之成本。

根據文獻指出利用 MTT assay 法篩選出的真菌幾丁寡糖在體外 (*in vitro*) 實驗方面，抑制人類肝癌細胞 (HepG2 cell) 生長效果最顯著，抑制能力約達 50 %，證實利用真菌所得幾丁寡糖對於降低國人癌症極有幫助(王，2004)。

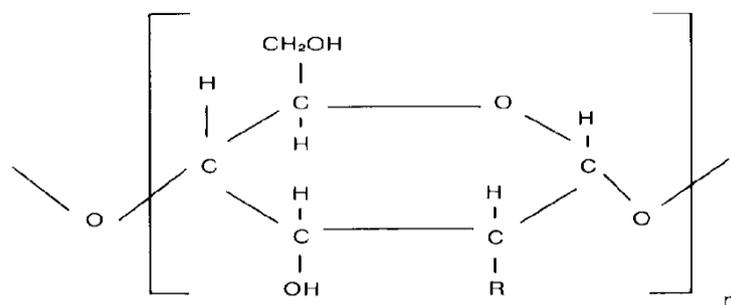
鬼傘屬真菌中的毛頭鬼傘(*Coprinus cinereus*)，俗稱雞腿蘑富含幾丁質酶，幾丁質酶除了可以產生幾丁寡糖外(製備藥劑用的幾丁寡糖和 N-乙醯葡萄糖胺)，也被證實可用於植物黴菌病害的防治(包括真菌原生質體的製備、植物抗真菌劑、病原真菌的控制、生物殺蟲劑)。本研究透過水解方式提升幾丁分解酵素能力，更進一步利用超過濾裝置將高價值之幾丁六糖與酵素反應物分離，以便增加多糖轉化為幾丁六糖之效能，本製備流程是期望透過重複利用酵素水解多糖，增加單一批次雞腿蘑菌絲體發酵液幾丁六糖之產量。

第二章 文獻回顧

2-1 幾丁質與幾丁質衍生物之介紹

2-1-1 幾丁質

幾丁質廣泛存在於自然界為含氮多醣類生物性高分子，主要的來源為蝦、蟹、昆蟲等甲殼類動物的外殼與軟體動物的器官（如烏賊軟骨），及真菌類的細胞壁等。其蘊藏量在地球上的天然高分子中占第二位，估計每年自然界生物的合成量可達 10^{11} 噸，僅次於纖維素(陳，2003)。幾丁質的化學結構類似纖維素的直鏈狀聚合物(圖 2-1)，約 1000~3000 個 N-乙醯葡萄糖胺的單元(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)，以 β -1,4 鍵結聚合而成。幾丁質是白色半透明物質，其物理及化學性質穩定，不溶於水及普通溶劑，只溶於某些操作條件下之濃鹽酸、硫酸、硝酸、磷酸、無水加酸等 (林與林，2002)。在應用方面，因具有可降解特性且無毒性、保濕性佳、對人體親和性排斥力低，多半使用於生產抗過敏、自菌防臭布料或做為醫療包紮繃帶及藥物載體(Marguerite, 2006)。



R-group 為 OH 其結構為纖維素，R-group 若為 NHCOCH_3 其結構為則為幾丁質

圖 2-1 幾丁質與纖維素之結構比較(吳與曾，1997)

2-1-2 幾丁質/幾丁聚醣的發展史

幾丁質及幾丁聚醣的發展已有很久的一段時間，由歷史發展(表 2-1)中可發現，1930 年開始幾丁質因具有類纖維素的成分受到注目，目前也仍被用來添加在纖維素中製備薄膜，隨著更深入的研究到了 1986 年後幾丁質的應用延伸到了醫療方面，至今科學家們仍致力於提升幾丁質衍生物的產量。

表 2-1 幾丁質/幾丁聚醣的發展史(紡織中心，2000)

年代	發生事項
1811	Braconnot 作者於蘑菇中加入稀鹼，發現甲殼素命名為「Fugine」
1823	Oider 作者於昆蟲表面硬角皮部份，也發現甲殼素，名為「Chitin」
1859	Rouge 作者將 Chitin 放入高濃度的 KOH 溶液中加熱，得到一種改質的甲殼素，命名為「Chitosan」。
1926	Kunike 作者，將 6~10% 之 Chitin 溶於冷硫酸中做為紡絲液，再以 wet-spinning method 抽 Chitin 纖維。
1930	合成纖維 polyamide, polyester 等被製造出來，相對地 Chitin 纖維的研究逐漸減少。
1980	Chitosan 置於醋酸液中，利用 wet-spinning method 抽製成 Chitosan 纖維。
1986	* 日本鳥取大學平野教授發表甲殼質寡醣降低血中膽固醇與 中性脂肪酯。 * 日本東北藥科大學鈴木教授發表甲殼素可以使免疫細胞活化，抑制癌細胞增殖。
1990	日本枋木縣纖維試驗場，將 Chitin 當作抗菌劑。
1996	台灣成立中華民國「Chitin-Chitosan 協會」。

2-1-3 幾丁質之衍生物

幾丁質製備的衍生物，包括幾丁聚醣、幾丁寡醣、葡萄糖胺與 N-乙醯葡萄糖胺也都發現具有許多特殊生理活性，如免疫調節、抗癌、關節修復等，因此幾丁質衍生物是有價值的研究。

幾丁聚醣(chitosan, poly[β -(1 \rightarrow 4)-2-amine-2-deoxy-D-glucopyranose])，一種白色帶淡黃色的粉末狀固體，是由葡萄糖胺單體以 β -1,4 鍵結聚合而成。

1894 年 Seyler 發現將幾丁質與氫氧化鉀在 180 $^{\circ}$ C 下混和熔解，經處理後得到乙醯化降低的產物，並命名為幾丁聚醣(Chitosan)，目前的作法是將幾丁質經去乙醯酵素或高溫和強鹼的共同作用下進行去乙醯化作用，去除部分或全部的乙醯基後，即為幾丁聚醣，另外由於幾丁聚醣上的胺基(-NH₂) 在酸性溶液下會呈 (-NH₃⁺)，使幾丁聚醣成為帶有正電的聚電解質，易溶於醋酸、乳酸、甲酸、蘋果酸等有機酸及如鹽酸、磷酸等無機酸中的特性，但不溶於中性或鹼性溶劑。

N-乙醯幾丁寡醣 (N-acetyl-chitooligosaccharides) 一般是指由 2-10 的 N-乙醯葡萄糖胺以 β -1,4 醣鍵鍵結所形成的低分子醣類；而幾丁寡醣 (chito-oligosaccharides) 則是由 2-10 個葡萄糖胺以 β -1,4 醣鍵鍵結所形成的。此兩種寡醣皆可由幾丁質或幾丁聚醣製備而得 (Aiba and Muraki, 1988)。這類寡醣最早是用來作為溶菌 (lysozyme) 的受質，以研究其作用的機制，近年來對於此類寡醣之研究已擴展至食品、醫學等方面，在此可顯示出幾丁質衍生物逐漸使用於民生用品中。

N-乙醯幾丁寡糖分子量小、溶解性好、易吸收，常應用於食品、醫療、農業及化妝品等領域，如增強免疫效果、抗微生物活性、促進脾臟抗體生成、抑制大腸桿菌的生長、抗癌活性和抑制腫瘤生長的功能等。N-乙醯葡萄糖胺為幾丁質的單糖產物，人體本身也會合成，可作為抗發炎藥物，用來治療關節炎及當成藥物之前驅物，而塗佈於皮膚表面可促進傷口癒合，也可當成外科手術之腹膜透析液(參考表 2-2)。

表 2-2 N-乙醯幾丁寡糖及 N-乙醯葡萄糖胺之應用

(Patil et al., 2000 ; Breborowicz et al., 1997 ; Tokoro et al., 1989)

	N-乙醯幾丁寡糖	N-乙醯葡萄糖胺(NAG)
食品	<ol style="list-style-type: none"> 由於具有抗菌及抗氧化，可抑制霉菌產生，加入食品中做為天然防腐劑。 具有甜味，可作為天然之食品添加劑。 	
醫療	<ol style="list-style-type: none"> 調節腸道微生物代謝，增加腸道內益菌生長。 增強免疫力或抑制腫瘤(癌細胞)的生長之藥品，以 DP 為 6 的寡糖，有最顯著的效果。 	<ol style="list-style-type: none"> 治療關節炎 抗發炎藥物 藥物前驅物 腹膜透析液 體表傷口修復
農業	活化植物細胞，促進生長，且具抑菌性	

2-2 幾丁質分解酵素介紹

自然界中，含有幾丁質之微生物(細菌、真菌)及動物幾乎含有幾丁質水解酵素，而一些不具有幾丁質之細菌或高等植物中，也有研究指出有幾丁質水解酵素的的存在，其中細菌產生之幾丁質水解酵素一般多屬誘導型，主要與營養寄生有關，真菌產生之幾丁質水解酵素一般多屬構成型，本身即存在於菌體內部，動物之幾丁質水解酵素為持續分泌而非誘導性酵素，而植物體內不含幾丁質在一般情況下幾丁質水解酵素在植物體內活性很小，只有在植物遭受病菌感染、侵襲或機械傷害，才會誘導出大量幾丁質水解酵素，以抵抗。

以下分別介紹六種與水解幾丁質代謝有關之酵素 (圖 2-2)

1. 幾丁質酶 (chitinase ; EC 3.2.1.14)

幾丁質酶依作用方式：可分為外切型幾丁質酶 (exo-chitinase)、內切型幾丁質酶 (endo-chitinase) 及任意型幾丁質酶 (random chitinase)。外切型幾丁質酶由非還原端逐步水解幾丁質 β -1,4 糖苷鍵，產生 N, N β -二乙醯幾丁二糖 (GlcNAc₂)；內切型幾丁質酶可水解幾丁質產生 N-乙醯幾丁寡糖 (GlcNAc_n, n = 2~10) (Abdel-Naby et al., 1992 ; Jeuniaux, 1961)。任意型幾丁質酶則可水解幾丁質產生 N-乙醯胺基葡萄糖 (GlcNAc) 及 GlcNAc_n(n = 2~10) (Mommsen, 1980)。

2. β -N-乙醯胺基葡萄糖苷酶 (β -N-acetylglucosaminidase, EC 3.2.1.30)

此酵素可水解 N, N-二乙醯胺基幾丁二醣或 N-乙醯胺基幾丁寡醣的非還原端之 β -1,4 醣苷鍵，產生 β -N-乙醯胺基葡萄糖。大多數 β -N-乙醯胺基葡萄糖苷酶對 N-乙醯胺基葡萄糖或 N-乙醯胺基半乳糖所連接配醣基之 β -1,4 醣苷鍵皆可水解，1992 年國際酵素命名委員會將其併入 β -N-乙醯胺基六碳糖苷酶 (β -N-acetylhexosaminidase ; EC3.2.1.52 / HexNAc' ase)。

3. 幾丁二糖酶 (chitobiase ; EC 3.2.1.29)

幾丁二糖酶可水解 GlcNAc₂ 而產生 GlcNAc，其作用方式與 β -NAHA 相似，因作用之基質範圍狹窄，1978 年國際酵素命名委員會已將其併入 β -NAGA，而 β -NAGA 則於 1992 年併入 β -NAHA。

4. 幾丁質去乙醯基酶 (chitin deacetylase ; EC 3.5.1.41)

幾丁質去乙醯基酶可水解幾丁質之乙醯基，使幾丁質形成幾丁聚醣(chitosan)。有些微生物如毛黴屬 (muco) 真菌可分泌此種酵素。

5. 幾丁聚醣酶 (chitosanase ; EC 3.2.1.132)

幾丁聚醣酶可水解 chitosan 及其衍生物而產生幾丁寡醣(GlcN_n, n=2~10)，但不易水解幾丁質，在醣類水解酵素家族中屬第 46 家族 (family46)，幾丁聚醣酶主要來自微生物，大部分微生物幾丁聚醣酶對 35~80% 去乙醯度之幾丁聚醣具有較高活性 (Seino et al., 1991 ; Fenton et al., 1981)，僅少數對 100% 去乙醯度之幾丁聚醣具有較高活性。

最近發現若干植物亦含有幾丁聚醣酶 (Dumas-Gaudot et al., 1992)，但有關植物幾丁聚醣酶之研究不多，其性質亦未完全瞭解。

6. 幾丁質合成酶 (chitin synthase ; EC 2.4.1.16)

幾丁質合成酶可催化UDP-GlcNAc 之 GlcNAc 轉移至經 GlcNAc 聚合物進行鏈延長，可形成長鏈之 GlcNAc 聚合物(幾丁質)，依其催化特性在國際酵素委員會分類之六大類酵素中屬轉移酶類酵素。

文獻指出幾丁質酶與 β -N-乙醯胺基葡萄糖苷酶兩者同時存在於真菌分解系統中且相互影響幾丁質的降解(Kramer and Koga, 1986)，加上早期科學家提出二進法系統理論(tandem binary system)來探討幾丁質酶與 β -N-乙醯胺基葡萄糖苷酶之間的協同作用，結果發現此系統將會涉及幾丁二醣的立體機構之改變與產生(Fukamizo and Kramer, 1985)，導致分解酵素受到葡萄糖與幾丁二醣的濃度而有抑制現象的發生(圖 2-3)，在真菌系統中若產物濃度不會抑制水解酵素的作用將會造成幾丁質完全被降解，為了維持正常的生理活性，可理解生物體會有這樣特殊的作用系統是不可避免的。

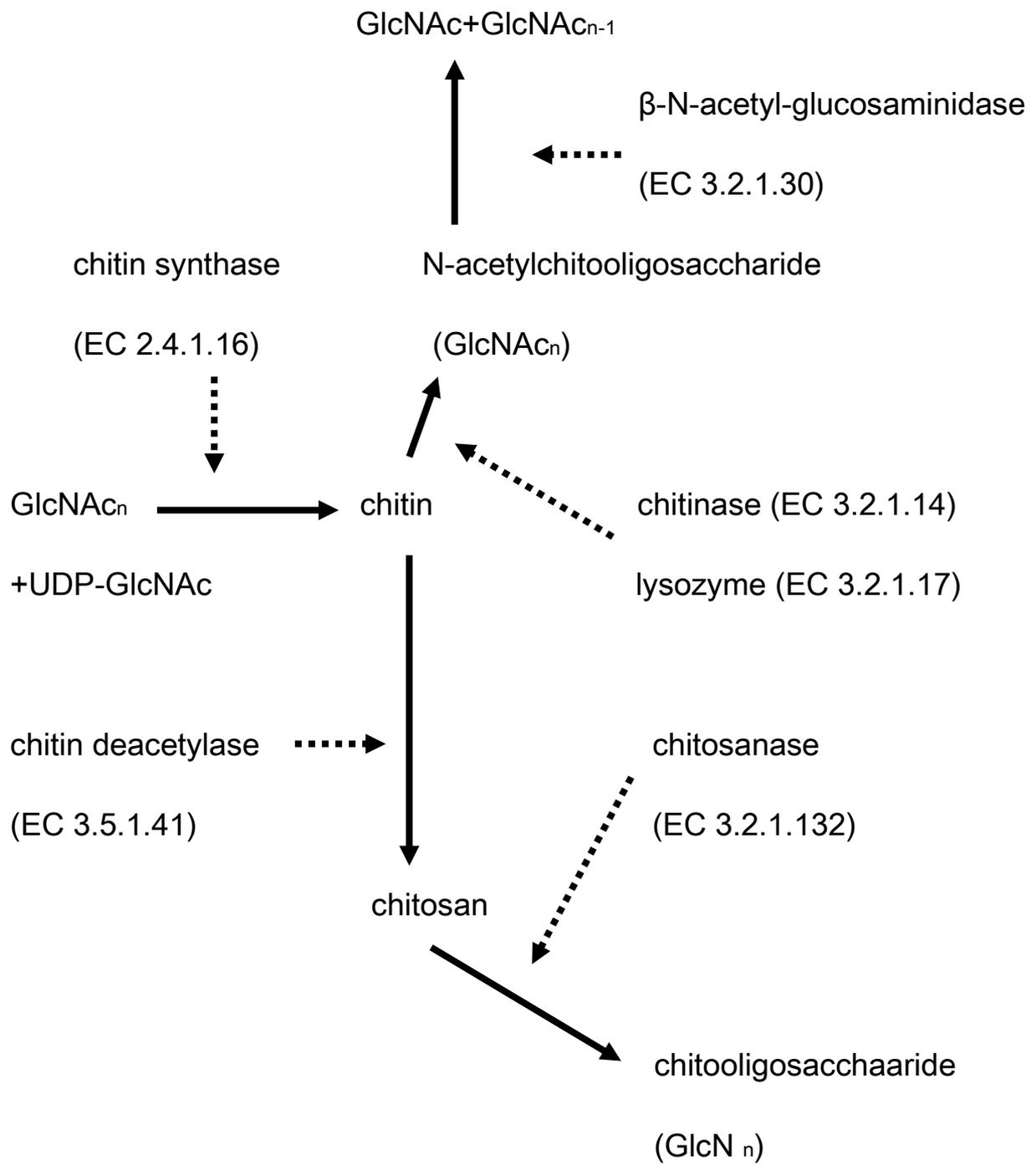


圖 2-2 參與幾丁質代謝之幾丁質相關酵素(Kramer and Kogo, 1986)

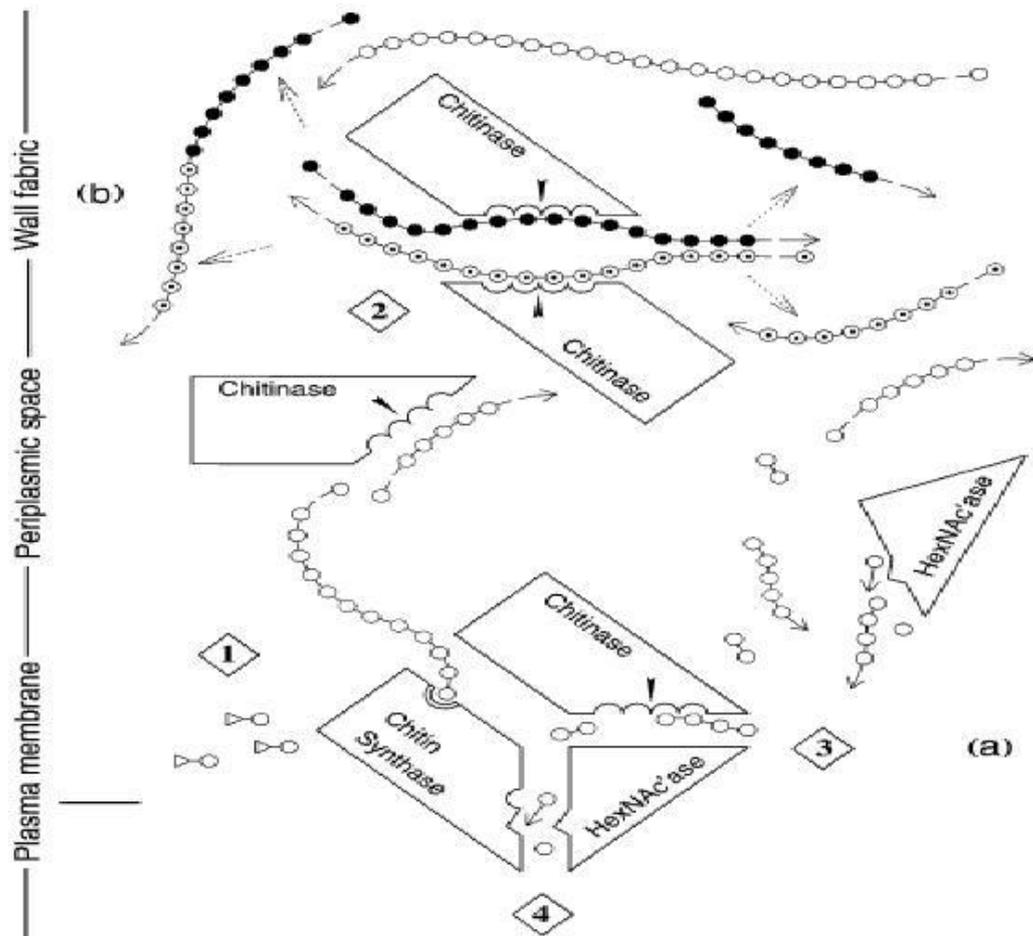


圖 2-3 絲狀真菌幾丁質代謝之相關酵素(Kramer and Kogo, 1986)

2-3 幾丁寡糖之生產方法

N-乙醯幾丁寡糖及幾丁寡糖之製備，約分成三大類：化學法、物理法及酵素法，利用三類型方法製備幾丁寡糖的優缺點可參考表 2-3。

2-3-1 化學法

在工業上目前多採用化學水解法製備幾丁寡糖，許多研究皆致力於改變反應條件以獲得較高產量之幾丁五、六、七糖。但因水解程度不易控制，較難獲得品質均一且聚合度較高具有生理活性之寡糖類。

1. 酸水解法

幾丁質、幾丁聚糖在 HCl、H₂SO₄ 和 HF 等作用下，產生劇烈水解得到幾丁寡糖。而工業化生產以 HCl 為主，所得到的寡糖主要為單糖和雙糖，4 糖以上的寡糖含量非常低，雖然操作簡單，但是較難得到高聚合度之寡糖(Jeon et al., 2000)。

2. 氧化法

使用酸溶解幾丁質後，加入 H₂O₂ 利用氧化作用進行水解之反應，再利用鹼中和產物，在 80°C 以上分離得到寡糖產物，反應溫度及 H₂O₂ 濃度，對產物聚合度有很大的影響。這種方法產率高、反應速度快且對環境污染較小，為較理想之化學水解法，但產物分子量較大，大多為 10 糖以上，5~8 糖產量較少(Chang et al., 2001)。

2-3-2 物理法

利用機械力或非機械力去破壞幾丁質的結構，降解得到衍生物。

1. 超音波法

幾丁質脫乙酰化後，溶於乙酸溶液中，在 60°C 條件下用超音波處理，發現幾丁聚醣黏度明顯下降，能得到低聚合度的寡醣產量仍低。雖然此方法能夠降低能耗，減小污染，節省原料但不適用於低聚合度的寡醣製備(王與秦，1989)。

2. 光降解法

輻射照射(紫外線、可見光和紅外線)可以降解幾丁聚醣(Anthony et al., 1996)，當輻射照射的波長小於 360 nm 時降解反應較明顯。

3. γ 射線法

在放射性射線照射下，使幾丁聚醣分子產生電離或激發等物理效應，進而導致分子鏈斷裂，可得到低聚合度幾丁寡醣，如增加放射劑量，可提高幾丁寡醣的產率，但會有放射線污染的問題(Choi et al., 2002)。

2-3-3 酵素法

酵素法所得之產物聚合度較高，反應速率快，又無環境污染問題，因而廣受重視。

1. 溶菌酵素(lysozyme；EC3.2.1.17)

溶菌酵素存在於蛋白、淚液及唾液中。主要水解微生物細胞壁、幾丁質和幾丁聚醣。利用溶菌酵素水解幾丁質，主要得到4糖以下的寡醣 (Aiba, 1992)。

2. 纖維素酵素(cellulose；EC3.2.1.4)

由於幾丁質的結構與纖維素相似，因此利用纖維素酵素水解幾丁聚醣，但纖維素酵素水解活性較低，水解所需時間長，產物平均分子量大且分佈較寬，無法進行商業化生產(Zhang et al., 1999)。

3. 幾丁質水解酵素(chitinase；EC.3.2.1.14)

自然界許多微生物、昆蟲、植物及動物組織中皆有幾丁質水解酵素的的存在。依國際生化及分子生物學會對酵素之分類(圖 2-4)，幾丁質水解酵素被歸類於糖類之水解酵素，依不同作用型態可分為：幾丁質水解酵素(chitinase；EC.3.2.1.14)，幾丁聚糖酵素(chitosynase； EC.3.2.1.132)， β -N-乙醯胺基六碳糖酵素(β -N-acetyl-hexosaminidase；EC3.2.1.52)，幾丁二糖酵素(N-diacetyl-chitobiohyhrolase；EC3.5.1.29)，幾丁質去乙醯基酵素(chitin deacetylase；EC.3.5.1.41)。

表 2-3 不同 N-乙醯幾丁寡糖生產方法之優缺點比較(馬鏞 等人，2007)

	優點	缺點
化學法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 設備簡易，生產流程簡單，成本較低。 2. 穩定性較佳。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 反應參數不易控制，分離純化困難，且產量偏低。 2. 需使用高溫、高壓，且水解程度不易控制。 3. 化學試劑容易造成設備腐蝕及嚴重的環境污染。 4. 可能產生有毒之副產物。
物理法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 操作簡單，可控性好。 2. 降解時間短。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 產物之分子量分布廣，選擇性較差，且難以得到低分子量之產物(4000 以下)。 2. 降解過程不易控制，導致原料之浪費，限制了物理法之應用。
酵素法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 反應條件溫和，不會產生有毒之副產物，且不會污染環境。 2. 水解過程及產物分子量易控制，且產率高。 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 酵素不易保存,容易失去活性。 2. 水解所需時間較長。 3. 酵素價格昂貴，成本過高，不利於工業化生產。

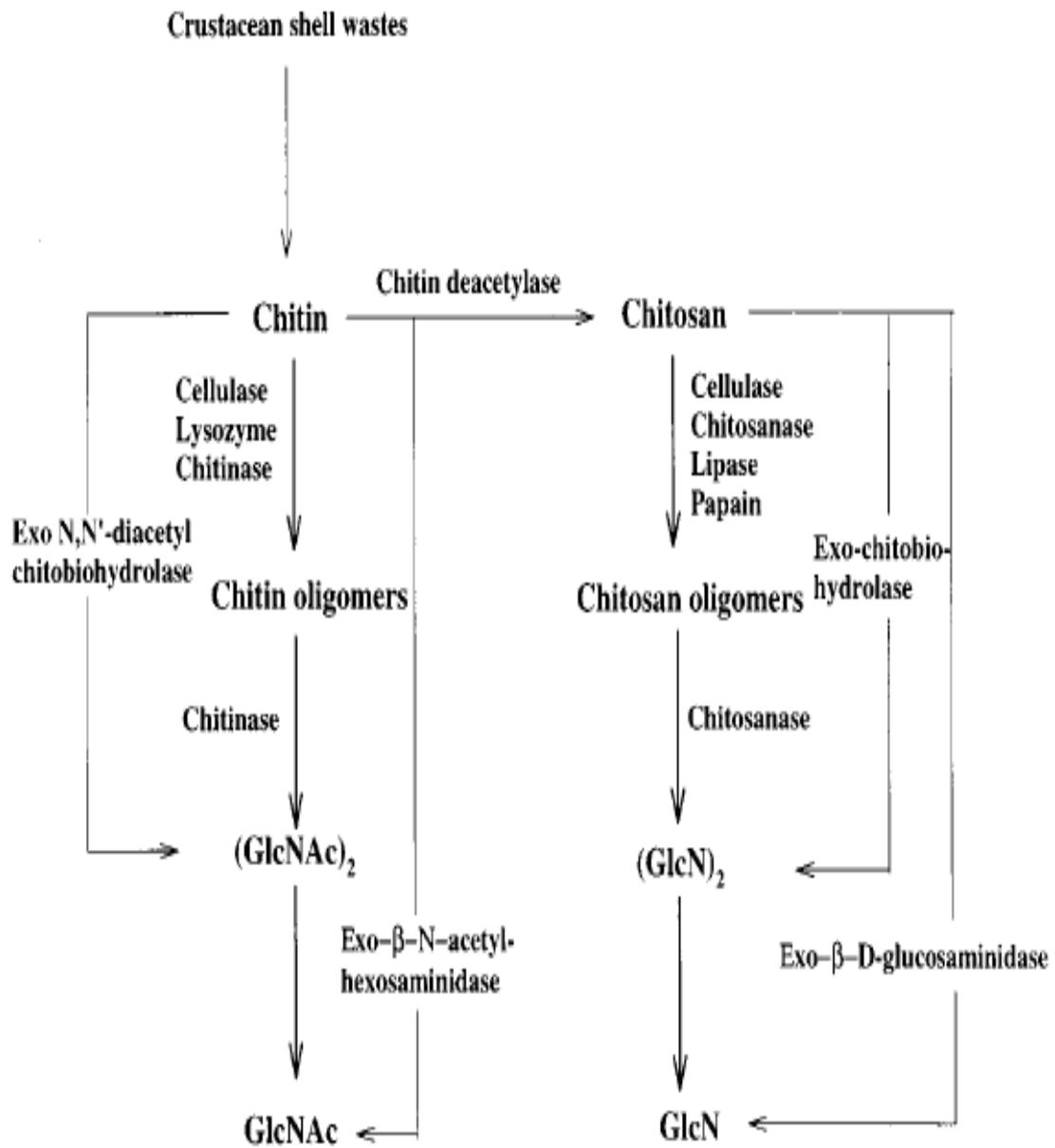


圖 2-4 酵素法製備 N-乙醯幾丁寡糖與幾丁寡糖之路徑圖(Jeon et al., 2000)

2-4 幾丁寡醣製備研究近況

生產幾丁寡醣原料一般可分為蝦蟹殼製備而成的幾丁質或真菌類細胞壁組成成分，兩種材料都廣泛的被運用在生產幾丁寡醣的製程當中(兩者比較可參考表 2-4)，但因近年來工業發展蓬勃，海洋生物倍受汙染，如重金屬汙染、輻射線汙染等問題，相較於這些問題發酵培養真菌較為安全，可經由精確的培養條件來避免此類危害人體的物質殘留，除此之外根據圖 2-5 可知真菌細胞壁組成為幾丁聚醣相較於使用幾丁質製成幾丁寡醣所需降解的步驟較少，可節省製備時間。

表 2-4 幾丁寡醣原料來源之優缺點比較

來源	真菌	蝦蟹殼
幾丁聚醣含量	高	低(多為幾丁質)
生產製程汙染	少	多
產品精製步驟	簡單	複雜
產量	可控制	受產地和季節性侷限
產品重金屬含量	不會受汙染	去除不易
品質	穩定	不穩

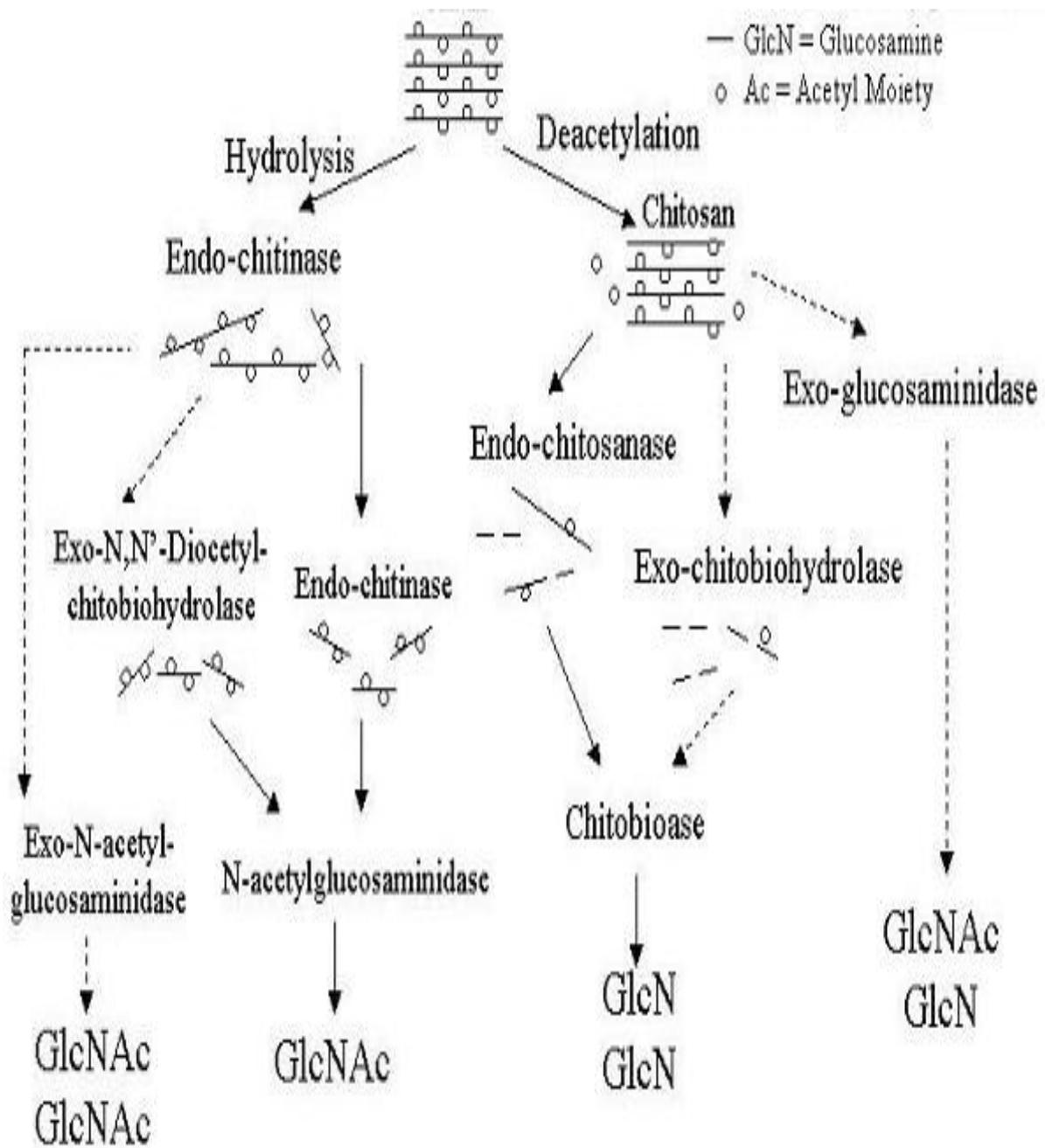


圖 2-5 幾丁質與幾丁聚糖生產幾丁寡糖之路徑(Davis and Eveleigh, 1984)

2-4-1 添加工業酵素促進幾丁分解酵素分解幾丁質

在酵素法方面，文獻指出除了幾丁質、幾丁聚醣外另有多種已經商業化大量生產成本較低之酵素可利用(Yalpani & Pantaleone, 1994)，如纖維素(cellulase)、半纖維素(hemicellulase)、蛋白質分解(protease)、脂肪分解(lipase)等，且水解效果不低於幾丁質酵素或幾丁聚醣酵素。其中脂肪分解酵素與木瓜酵素對幾丁聚醣水解能力不錯，可惜酵素成本較高，且需較長反應時間才可獲得較高之產率(Muzzarelli et al., 1995)。

國內亦有類似此種方式的研究(許, 2006)，利用可逆溶解型擔體—AS-L 為固定化材料，進行 *Bacillus cereus* TKU006 和 *B.subtilis* TKU007 所產酵素及鳳梨酵素和木瓜酵素之固定化。研究結果發現酵素固定化製程可能幫助酵素在面對不同保存溫度下，增加酵素對溫度的熱安定性；相對的，也有可能反倒是降低酵素對溫度的熱安定性，並不一定為加乘作用，因為不同的工業酵素以及不同來源的幾丁分解酵素都有各自適合的反應溫度。酵素水解反應之 pH 安定性試驗中，酵素的固定化可能造成酵素對 pH 的變化具有較穩定之活性，同時也有趨於不穩定的可能，因為酵素若具有兩種以上之酵素活性，彼此對於 pH 安定性也不必需考量，總結利用工業酵素搭配自產幾丁分解酵素其工業酵素與幾丁質分解酵素在操作條件上必須雙方面配合，要考量的條件較多，但若搭配得宜，配合上固定化則可打破破游離酵素水解活性較佳的迷思。

2-4-2 利用細菌生產幾丁分解酵素分解幾丁質(蝦蟹殼)

目前國外多半採用添加有機溶劑以降低水相中水含量，來達成改變反應方向的目的。如利用 glucoamylase 在水溶液及醚類中合成出二糖及五糖(Cantarella et al., 1994)。或添加硫酸銨以排除酵素表面之水分子，增加酵素內引力，利用溶菌酶以 N-乙醯幾丁四糖為基質做轉醣反應；發現 N-乙醯幾丁六糖之產率為 39.6%；再用 N-乙醯幾丁二糖為基質，添加 30 % 硫酸銨，結果以五糖及六糖之產量最高(Usui et al., 1990)。另外也有學者採用高基質濃度的方式來促使反應朝合成方向進行，如利用 β -galactosidase 進行半乳寡糖合成之研究，發現當起始乳糖之濃度越高時，寡糖轉化率也越高(Iwasaki et al., 1994)。

國內目前透過逆微胞的系統來進行幾丁寡糖的合成(Lin et al., 2009)，逆微胞(reverse micell)為一種以液-液兩相萃取進行分離純化蛋白質的方法，近年來，除了應用於不同之蛋白質分離之外，有越來越多的研究是利用其能穩定蛋白質的特性，使得分離出之蛋白質能在有機相中進行反應的特點來合成疏水性的物質。此研究細菌所產之幾丁質分解酵素利用丙酮沉澱酵素法純化蛋白質，挑選出最適生產幾丁六糖之酵素，再利用 E/S 的不同比例來探討最適生產的條件。實驗結果發現，透過酵素的純化後搭配連續式生產可有效提高幾丁六糖的產量，但在生產過程當中會有轉醣基的現象發生，初步推測可能原因為粗酵素中包含之水解酵素種類太過眾多，會對於合成出的寡糖再進行水解作用或其他作用，導致生產幾丁六糖的產能不穩定。

2-4-3 利用大豆類分離酵素分解幾丁質(蝦蟹殼)

文獻指出植物方面僅有部分植物具有幾丁酵素，如甜、韭菜和洋蔥根部 (Dumas-Gaudot et al., 1992)、胡瓜果實與某些品種植物之葉、種子和果實 (Ouakfaoui and Asselin, 1992 a and b)，橙癒合組織 (Osswald et al., 1993) 等，其中以大麥種子、大豆種子和胡瓜果實含有較高之幾丁聚醣酶活性，因此利用高等植物之種子生產幾丁酵素，在未來可能是另一種利於製備幾丁六醣的酵素。

國內目前有利用黑豆、豌豆等豆類提煉出幾丁分解酵素，透過各種純化酵素的方式，將豆類所提煉出的酵素歸類至內切或外切酵素並找出最適的反應條件，研究結果黑豆酵素主要生產物為單醣與四醣而豌豆酵素水解幾丁聚醣則可產生各種聚合度之幾丁寡糖，包括聚合度 6 和大於 6 之幾丁寡糖，有利於製備幾丁六醣之程序(張，2002)。

2-4-4 利用真菌類菌絲體自溶現象產幾丁寡糖

國內目前透過回應曲面法(RSM 法)回歸出一階和二階模式，從模式中觀察培養基各成分對酵素產率的影響，來找到最適化培養基，與蠟蚧輪枝菌(*Verticillium lecanii*)最適生產幾丁質酵素條件，在過去對幾丁質分解酵素的用途報導中，除了在生物防治上有良好的功能之外，在食品應用方面也可當作防腐劑來使用。另外在醫療方面，此酵素之水解產物六個單元體的幾丁寡糖，則具有抗腫瘤活性。但由於目前對於幾丁質分解酵素的擴大化生產的研究並不多見，故此研究是針對幾丁質分解酵素產量做探討，以期望能在最低的生產成本下，生產大量且高效能之生物製劑(高，2002)。

本研究亦利用此原理，透過雞腿蘑培養取得高濃度菌絲體做為反應原料，利用水解方式加強菌絲體的自溶現象，使得發酵液中的幾丁分解酵素活性提升提高樣品酵素含量，更進一步利用超過濾裝置將高價值之幾丁六糖與酵素反應物分離，以便增加多醣轉化為幾丁六糖之效能，此系統不但節省了酵素與分解原料兩部分的成本，更可提升單一批次發酵液生產幾丁六糖之效能。

2-5 鬼傘屬雞腿蘑特性介紹

2-5-1 鬼傘菌雞腿蘑簡介

鬼傘科在生物分類上，屬於真菌界，擔子菌亞門，層菌綱，傘菌目。鬼傘科主要的特色是生命週期短，成長為成熟的子實體後只會存活區區數天。全世界共有 7 屬 764 種，台灣有 6 屬 38 種。其中在全科約佔了一半的鬼傘屬(*Coprinus*，約 350 種)，子實體成熟後菌蓋會自溶呈墨汁狀，獨留一支細長的菌柄。鬼傘科鬼傘屬的成員多半無毒可食，其中的毛頭鬼傘(*Copriuns cinereus*)，俗稱雞腿蘑(圖 7)。而雞腿蘑通常生長在夏秋天，長在草地上聚生或散生，有高有低，高的可達十多公分。在中國，歐美地區都有分佈。它的英語俗名是「Shaggy mane mushroom」(張和周，2005)。

2-5-2 雞腿蘑的自溶

雞腿蘑子實體的成熟過程分為幼蕾期、棒狀期、梭形期、卵形期和成熟自溶期。而其自溶現象是最受到重視，亦為本研究選用此菌株的原因。鬼傘屬菇類自溶的發生與此菌株的菌蓋為圓錐形不利於孢子的散發有關，此菌株孢子成熟時由菌蓋邊緣往中央逐漸成熟，當菌蓋開始自溶後，墨水般的孢子液便可以順著菌蓋邊緣落下，一旦沾到附近停留的昆蟲，就能藉機將孢子傳播出去(張和周，2005)。而早期 Kues 與 Bush 也分別提出成熟菌蓋的自溶是因幾丁質酶造成細胞壁解體的，幾丁質酶存在於開始衰老的真菌菌褶的液泡中使之產生自溶，且也會作用於菌柄或有生長力的菌絲體(Bush, 1974)。

2-6 菌絲體自溶之成因

Paul 經由影像分析及分化染色的結合研究，對 penicillin 生產菌 *P. chrydogenum* 定義出 4 個菌絲區段(圖 2-6)，A₀ 區是菌絲活性的尖端，是菌絲生長的地方；A₁ 區是非生長區，富含細胞質成份，此區可讓新的生長尖端從這分枝，當成長到一定長度時，隔膜就會在尖端後方形成，經過這個程序，老的尖端菌室又變成非生長的 A₁ 區，因此菌絲淨擴張生長為形成 A₁ 區；非生長菌絲小液泡 A₂ 區和衰退及代謝失活 A₃ 區。Paul 指出 penicillin 生產最主要的區段是非生長的 A₁ 區，而在菌絲活性尖端 A₀ 區及菌絲液泡 A₂ 區的 penicillin 生產並不顯著。而自體溶解也常發生在重大液泡 A₃ 區，此區因為酵素的反應或機械力作用而破碎(Paul, 1996)。

真菌的自體溶解(Autolysis)是細胞的自我毀滅現象(cellular self-destruction)，是菌絲老化時釋放出本身組織內的酵素降解細胞。在正常情況下，溶酶體的膜是十分穩定的，不會對細胞自身造成傷害。當細胞受到嚴重損傷，如胞器與細胞壁的空洞化而被打破，則造成溶酶體破裂，使細胞受溶酶體酶降解。高度液泡化和衰退區的菌絲中，發現蛋白質水解酵素活性會提升以降解蛋白質、細胞多醣體及細胞質內物質轉化成胺基酸和能量來源，這類菌絲生長稱為 cryptic growth(White et al., 2002)。

影響真菌發生自體溶解的原因可分為內在和外在一種因素(圖 2-7)，內在是真菌的老化等本身的生長代謝，外在因素是受到營養源的限制或物理應力的影響(White et al., 2002)。

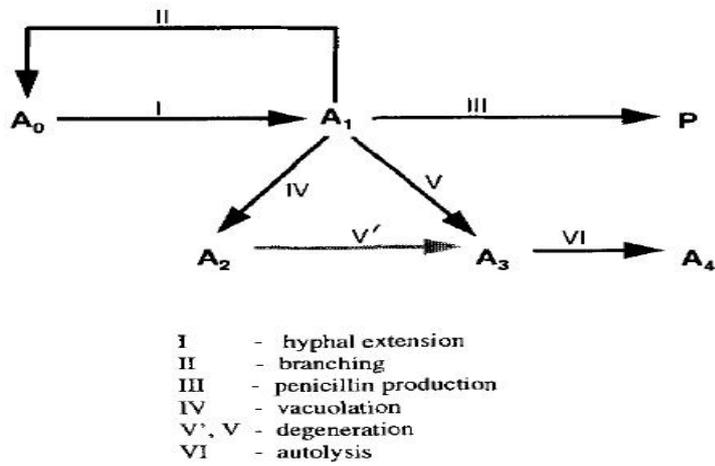
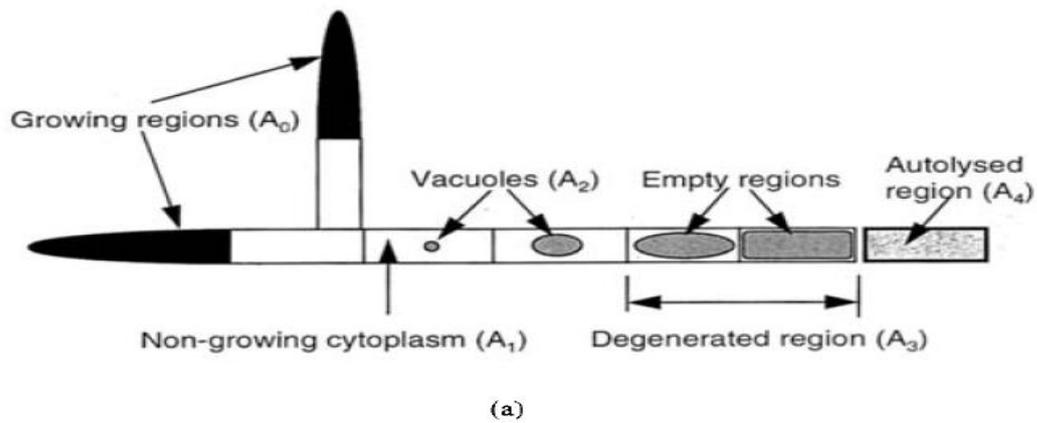


圖 2- 6 (a) *Penicillium chrysogenum* 菌體區段示意圖 (b) 菌體延伸分支液泡
 化自體溶解及 Penicillin 生成機制 (Paul, 1996)

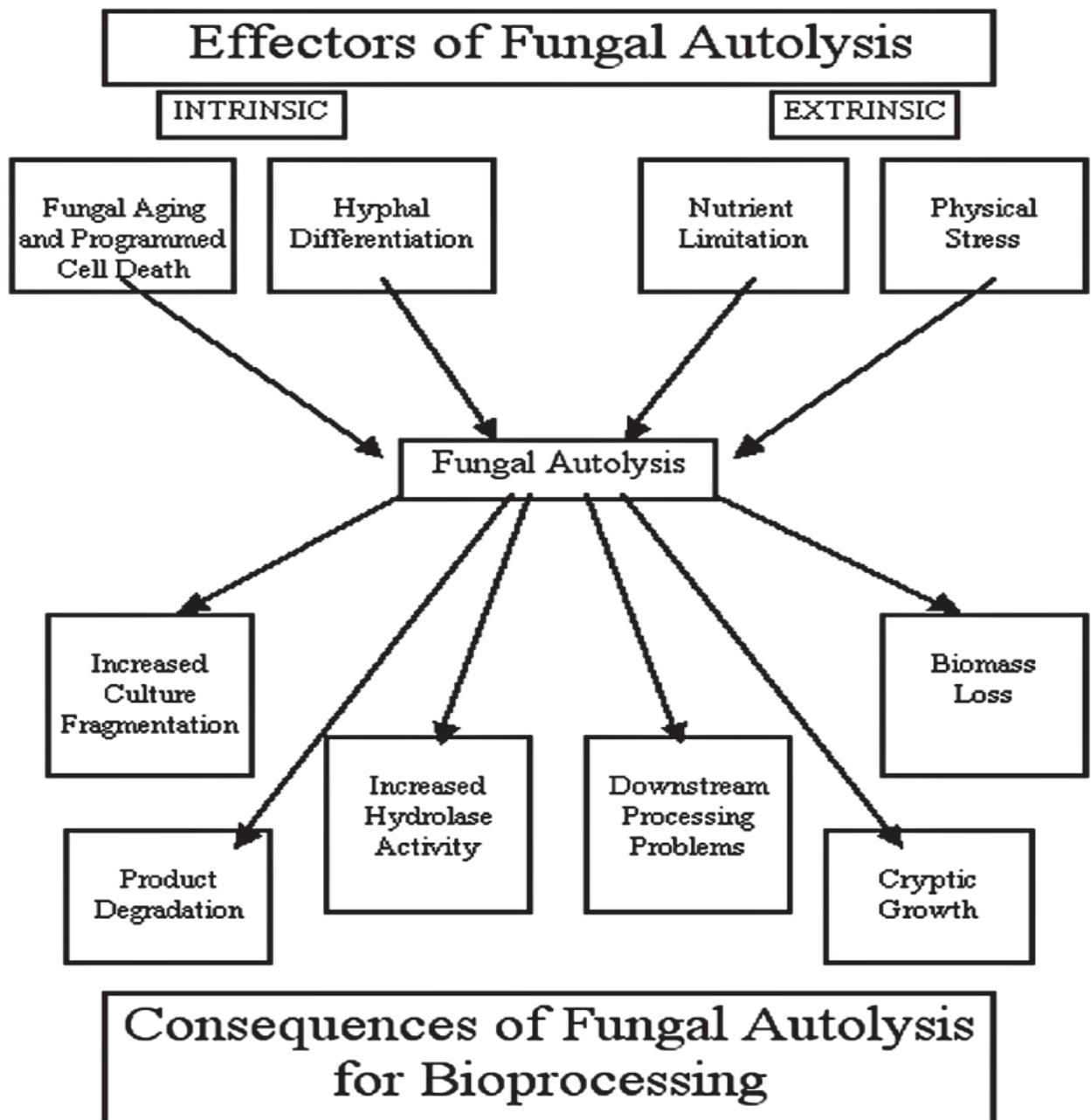


圖 2-7 真菌發生自體溶解之成因(White et al., 2002)

第三章 實驗材料與分析方法

3-1 菌株

本實驗所採用之菌株購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，*Copriuns cinereus*，俗稱雞腿磨，編號 BCRC36099。菌株以生物資源保存及研究中心所提供的 POTATO DEXTROSE AGAR (Diced potatoes 200.0 g、Glucose 20.0 g、Agar15.0 g、Distilled water1.0 L)作為斜面培養基，在 25°C 活化生長，並置於 4°C 冰箱中保存備用。

3-2 實驗藥品

本實驗藥品如表 3-1 所示

表 3-1 實驗藥品

藥品名稱	廠牌
Glucose	ROQUETTE
Difco™ Potato Dextro Agar	BD
Bacto™ Yeast extract	BD
NH ₄ H ₂ PO ₄	SHOWA
MgSO ₄	SHOWA
CH ₃ COONa	SHOWA
KH ₂ PO ₄	聯工
K ₂ HPO ₄	聯工
NaOH	聯工
Potassiumsodium(+)-tartrate tetrahydrate	SHOWA
Dinitrosalic acid	ACROS
Phenol	SHOWA
Na ₂ SO ₄	聯工

3-3 實驗儀器及設備

本實驗所使用的儀器與設備如表 3-2 所示

表 3-2 實驗儀器設備

儀器設備名稱	廠牌	型號
無菌操作台	LIAN SHEN	JW-4N
均質機	Osterixer	
高壓滅菌釜	HUXLEY	HL-340
熱風循環烘箱	RISEN	RHD-452
迴轉式振盪培養箱	KS	OSI-500
往復式恆溫振盪水浴器	KS	SB302
低溫冷藏櫃	KS	Kcc-3
電子天平	Sartorius	BP190S
電磁加熱攪拌機	C-MAG HS7	德國 IKA
微電腦蒸餾水製造機	SANYO	WSCO44.MH3.4
超純水製造機	MILLIPORE	
高速離心機	HITACHI	05P-21
高速冷凍離心機	HETTICH	Universal-32R

儀器設備名稱	廠牌	型號
UV-可視光譜儀	HITACHI	U-2001
桌上型 pH/°C/mV 酸鹼度計	EUTECH	PH510
葡萄糖分析儀	YSI	2300 stat
試管振盪器	Vortex	德國 IKA
冷凍乾燥機	CT-110	丹麥 HETO
切向流濃縮純化透析系統	millipore	
膠體管柱	GE Healthcare	Sephacryl S-100
蛋白質分析儀	GE Healthcare	
分割收集器	GE Healthcare	

3-4 分析分法

3-4-1 菌體乾重測定

將搖瓶培養後的發酵液以抽氣過濾裝置分離，濾紙連同菌絲體烘乾至恆重，扣除濾紙重即為菌體乾重。

3-4-2 葡萄糖濃度測定

將濾液等倍稀釋，經過離心機離心取上清液，用 YSI 2300 stat glucose 測定。

3-4-3 HPLC 分析

1. 將 10 ml 發酵液，冷凍乾燥
2. 將乾燥粉末以 0.5 ml 二次去離子水復溶
3. 將樣品以離心機 8000 rpm 離心 5 分鐘
4. 復溶樣品，以 0.22 μ m 過濾膜分離
5. 將樣品置入 HPLC 分析樣品槽

HPLC 條件：移動相：乙晴/水= 75/25，流速：1.0 ml/min、注射量 20 μ L，UV 波長 205nm

3-4-4 超過濾分離

1. 發酵液利用過濾網分離，將菌絲體去除
2. 將樣品置入分離槽，利用 5 kDa/1 kDa 分離膜分離
3. 進口壓力 20 psi、出口壓力 10 psi
4. 分離體積到原始體積的一半，濃縮為原始兩倍

3-4-5 幾丁質分解酶活性測定(Wirth and Wolf ,1990)

酵素活性定義：酵素在 45°C 下反應 30 分鐘，產生 1.0 μmol 的 N-乙醯葡萄糖胺時的酵素活性為 1U。(1Unit=1 $\mu\text{mol}/30 \text{ min ml}$)。

1. 取 1.0 mL 膨脹過的幾丁質(10 mg/mL 在 pH 5.5 的檸檬酸鹽磷酸緩衝液)及 1.0 mL 酵素樣品(發酵液)，在恆溫水槽 45°C 下振盪反應 30 分鐘，離心取上清液。
2. 將上清液以 DNS 法測量還原醣濃度。

膠態幾丁質(colloidal chitin)製備方法：

1. 在抽氣櫃內取 10-15 g 的 chitin 粉末(Sigma C-7170) 溶於 200-300 mL 的 12 N HCl，40°C 隔水加熱作用 15~20 分鐘。上述 chitin 分解液以 5 L 二次去離子水稀釋後於 4°C 靜置隔夜。
2. 隔天倒掉上層液，重覆加二次去離子水與靜置到除上清液的步驟，使 pH 值變高最後調整至 pH 7，8000 rpm 離心去除上清液，多次離心濃縮後，最後以真空乾燥法求得膠態幾丁質的濃度，取定量(1mL)上述回溶均勻的液體以離心濃縮的方式去除液體後，秤取乾燥前後的重量即可求得膠態幾丁質的濃度%(w/v)。

3-4-6 DNS 還原糖測定(Gail ,1959)

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 試劑之反應是利用 DNS 具還原力的特性，因此碳水化合物只要具有游離或游離趨勢之醛或酮基，即能在鹼性溶液下有還原的能力而進行以下反應，配方參考附錄表 1。

Reduction

3,5-dinitrosalicylic acid (yellow) → 3-amino-5-nitrosalicylic acid(orange-red)

N-乙醯葡萄糖標準曲線：

1. 取 5 支試管分別加入 1.0 ml N-乙醯葡萄糖標準溶液及 1.0 ml DNS 呈色劑。
2. 於 100°C 恆溫水浴加熱 10 分鐘後，在室溫下靜置降溫。
3. 加入 1 ml 40% Potassium sodium tartrate solution ，測 530 nm 波長之吸光值。

樣品之還原糖定量：

1. 將樣品溶液經過適當稀釋，使還原糖含量落在校正曲線範圍內，依上述方法，測定 530 nm 吸光值。
2. 由吸光值對照校正曲線，換算樣品之還原糖含量。

(回歸曲線： $y=0.0032x-0.3163$ ，附錄圖 1)

3-4-7 測定合成現象對還原糖量之影響

1. 取 1.0 ml 濃度為 1300 mg/l 的 N-乙基葡萄糖胺溶液與 1ml 酵素樣品(發酵液)
2. 在恆溫水槽 45°C 下振盪反應 30 分鐘與 60 分鐘，離心機 5000 rpm 離心 10 分鐘。
3. 以 DNS 法測量水解前、後，還原糖濃度之改變量。

3-4-8 蛋白質含量測定(Bradford,1976)

標準品配製：小牛血清白蛋白加入 10 ml 二次去離子至標準品瓶中，混合均勻，待標準品粉末完全溶解後，即完成濃度 2.8 mg/ml 的配製。

蛋白質標準曲線(bradford)：

1. 將染色劑(dye reagent)利用二次水作 5 倍稀釋
2. 準備 5-8 管的蛋白質標準品序列稀釋液，加入 100 ul 標準品或待測樣品至試管中
3. 再加入 5 ml 經稀釋的染色劑，混合均勻，可使用混合器(Mixer)
4. 室溫下反應 5 分鐘後(吸光值會隨時間增加，不可超過 1 小時，建議盡快進行後續實驗)，再次混合均勻後，利用分光光度計測量 595 nm 之吸光值

樣品之蛋白質定量：

1. 將樣品溶液經過適當稀釋，使蛋白質含量落在校正曲線範圍內，依上述方法，測定 595nm 吸光值
2. 由吸光值對照校正曲線，換算樣品之蛋白質含量。

(回歸曲線： $y=0.9942x+0.0607$ ，附錄圖 2)

3-4-9 AKTA prime 蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離之分析條件

1. AKTA prime 蛋白質分析儀操作條件：

吸收波長 280 nm、流速 0.5 ml/min、沖提液 0.025 M 醋酸緩衝液

2. 膠體管柱條件：管柱填充物 Sephacryl S-100 & 16/60、操作壓力 0.35 MPa
3. 樣品條件：樣品濃度 0.01 M、分析體積 0.5 ml

3-4-10 移除率與質量守恆(分析方法與名詞定義)

1. 將批次超過濾分離樣品，各取 1 ml 添加 72% 濃硫酸 3 ml
2. 置入恆溫水槽 25⁰C 震盪反應 30 min，以高溫滅菌釜滅菌兩次
3. 取出後冷卻至室溫滴定至 pH 7，做為 DNS 分析樣品
4. 利用 DNS 分析結果求得各批次分離反應物與生成物之單醣含量與移除率

◇ 移除率(translate rate)定義：生成物所含單醣量/反應物所含單醣量

◇ 質量守恆(mass balance)定義：將各階段移除率相加所得

◇ Run1 質量守恆：水解兩小時發酵液所含單醣量/Run1 UF 透析液所含單醣量

◇ Run2 質量守恆：(Run1 UF 濃縮液所含單醣量/ Run2 UF 透析液所含單醣量)+

Run1 質量守恆結果

◇ Run3 質量守恆：(Run2 UF 濃縮液所含單醣量/ Run3 UF 透析液所含單醣量)+

Run2 質量守恆結果

3-5 實驗架構

本研究目的為利用雞腿蘑之特殊自溶現象，即可生產幾丁六醣。由於菌絲體自溶現象可提供幾丁分解酵素與幾丁質原料，相對一般製程需購買工業酵素或添加幾丁質原料相比，所需反應成本較低。根據 White 所提，真菌自溶現象受到內在因素與外在因素影響 (White et al.,2002)，調控內外因素可對自溶狀況做控制。本研究利用上述兩種提升真菌自溶現象的變因，設計水解與菌絲體均質研究以加速菌體自溶現象，其中水解條件之選擇參考陳啟倫學長之研究結果得知雞腿蘑在 pH 6 與 50°C 下自體溶解度最大(陳，2006)。但過度劇烈的自溶作用可能會導致幾丁六醣二次水解，為了避免此狀況的發生，並將酵素可回收使用，因此在製程中搭配超過濾分離裝置之使用，根據 Jeon & Kim 研究指出利用超過濾移除菌體降解後的寡糖可提高產物回收率，且反應槽中將保留幾丁分解酵素(Jeon et al., 2000 a and b)，又根據 Kao 指出利用稀釋樣品可提升幾丁分解酵素的產量(Kao et al.,2006)所以在超過濾分離中又以反應槽反應物濃度、超過濾分離使用次數與透析膜孔徑大小，此三項探討來進行提升幾丁六醣製程之最佳條件選擇。

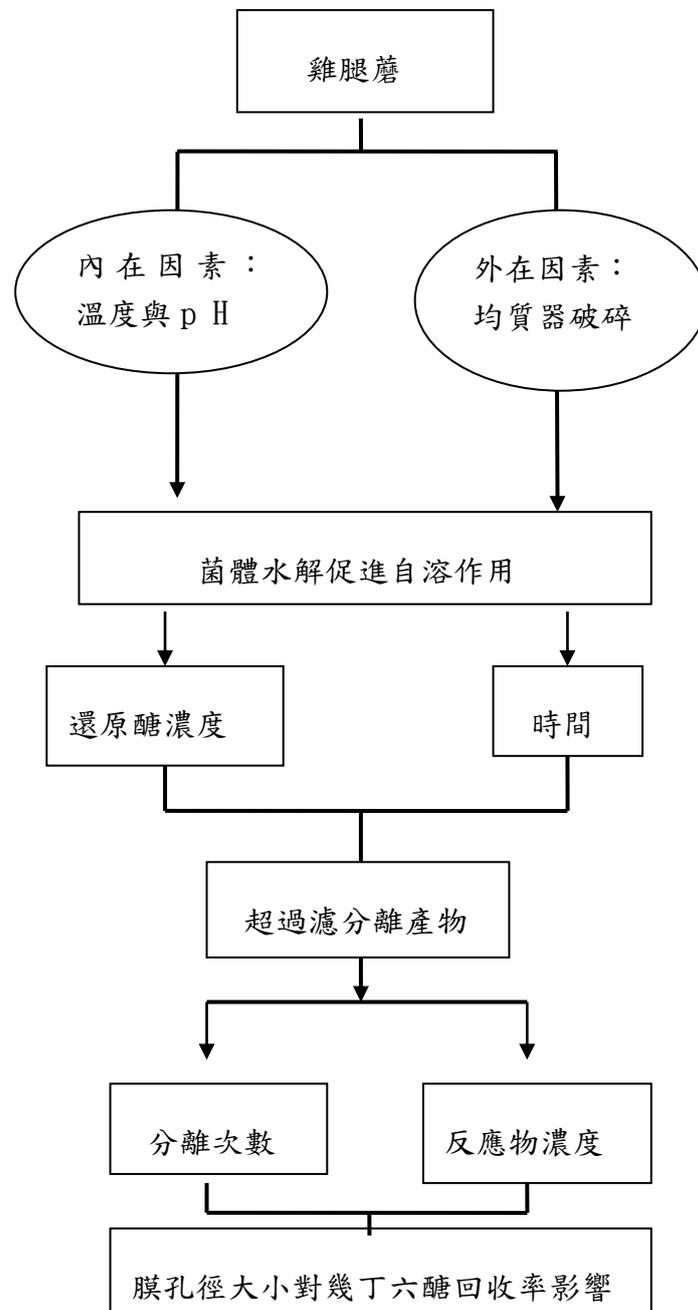


圖 3-1 總實驗架構圖

3-6 實驗方法

3-6-1 菌種斜面試管培養

1. 以生物資源保存及研究中心提供的 Potato Dextrose Agar 39 g/L 為培養基，加熱攪伴使之均均溶解。
2. 利用白金鉤取自生物資源保存及研究中心所購得之雞腿菇，接於配製好的斜面上，再以矽膠塞緊試管，即完成。
3. 於 25°C 下活化菌絲，培養完成後放置 4°C 下保存備用。

3-6-2 培養皿培養

1. 以 Potato Dextrose Agar 39 g/L 為培養基，加熱攪伴使之均均溶解。
2. 冷卻後，拿自製的切割器，用酒精燒至通紅，在切取已長好的雞腿蘑培養皿。在拿白金鉤用酒精燒紅，重覆幾次，在刮取菌絲，接種於新配置好的空白培養皿上。
4. 於 25°C 下活化菌絲，培養完成後放置 4°C 下保存備用。

3-6-3 種菌的製備

1. 在三角錐形瓶中加入 100 ml 的基礎液態培養基成份如表 3-3

表 3-3 雞腿蘑培養基成分

藥品名稱	組成比例(%)	藥品名稱	組成比例(%)
Glucose	40.0 g (4%)	MgSO ₄	0.5 g (0.05%)
Yeast extract	10.0 g (1%)	KH ₂ PO ₄	0.5 g (0.05%)
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.34 g (0.134%)	K ₂ HPO ₄	0.5 g (0.05%)

2. 放入滅菌釜(121°C, 1.2 kg/cm²) 滅菌 20 分鐘。
3. 冷卻後, 以白金鉤燒至通紅鉤取菌體, 需要四個單位菌體於三角錐形瓶內。
4. 最後將三角錐形瓶放置於 30°C, 轉速 150 rpm 的振盪培養箱內, 培養七天。

3-7 雞腿蘑菌絲體培養實驗

目的：找出雞腿蘑菌絲體酵素活性最高的培養天數

1. 利用 250 ml 三角瓶配置 10 瓶培養基(成分如表表 3-3), 每瓶 100 ml 培養基。
2. 置入殺菌釜中殺菌, 冷卻後將菌體均質液取出 5% 移入三角瓶培養液中。
3. 放入菌體培養箱(迴旋振盪)中, 以 25°C、150 rpm 培養。
4. 隔天開始每日取一瓶測定 pH、菌重、還原糖及幾丁質酶活性。

3-8 菌絲體發酵液之最佳水解時間

3-8-1 水解時間對發酵液自溶之影響

目的：利用外在環境的變因，加速菌絲體自溶現象的反應，以提高還原糖與酵素活性

1. 依據 3-7 實驗步驟，第六天菌絲體發酵液，均值 10 秒，每 100 ml 加入 CH_3COOH 0.58 ml、 CH_3COONa 0.82 g，調整 pH 6。
2. 將上述樣品置入恆溫水槽 50°C ，水解 0、1、2、3、4、5 小時。
3. 將水解後的樣品取出 15 ml 發酵液以 6000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液 5 ml 進行冷凍乾燥做為 HPLC 分析樣品，另外取 6 ml 進行還原糖量分析與酵素活性測定。

3-8-2 重複添加緩衝液至水解發酵對特性之影響(圖 3-4)

目的：在水解時稀釋發酵液，避免合成現象的發生，以維持酵素活性值與增加還原糖

1. 依據 3-7 實驗步驟，第六天菌絲體發酵液，均值 10 秒，每 100 ml 加入 CH_3COOH 0.58 ml、 CH_3COONa 0.82 g，調整 pH 6。
2. 各樣品置入恆溫水槽 50°C ，每水解一小時添加緩衝液 10v/v 進入搖瓶中，進行重複饋料式水解，水解 0、1、2、3、4、5 小時。
3. 將水解後的樣品取出 20 ml 發酵液離心，取上清液冷凍乾燥做為 HPLC 分析樣品，另外取 6 ml 進行還原糖量分析與酵素活性測定。

3-9 使用超過濾對幾丁六糖產量之影響

3-9-1 單次分離發酵液對幾丁六糖產量之影響(圖 3-5)

目的：將幾丁六糖與分解酵素分離，避免目標產物二次降解。

1. 依據 3-7 實驗步驟，第六天菌絲體發酵液，均值 10 秒，每 100 ml 加入 CH_3COOH 0.58 ml、 CH_3COONa 0.82 g，調整 pH 6。
2. 2 小時水解發酵液離心，取澄清液濃縮過濾，直到工作體積濃縮至 50% 的體積量。
3. 將透析液取 20 ml，10 ml 進行冷凍乾燥做為 HPLC 分析樣品，取 6 ml 進行還原糖量測定與酵素活性測定。

3-9-2 濃縮端反應物不同稀釋倍數對批次水解發酵液自溶之影響(圖 3-6)

目的：將幾丁六糖與分解酵素分離，稀釋樣品避免分解酵素活性下降。

1. 依據 3-9-1 實驗前 2 步驟
2. 經超過濾裝置後之產物分為濃縮液與透析液兩部分，組別如下
 - (A) 將濃縮液稀釋 30%，重新水解兩小時後，再次以超過濾裝置分離。
 - (B) 將濃縮液稀釋 50%，重新水解兩小時後，再次以超過濾裝置分離。
3. 兩組各批次稀釋水解分離之透析液樣品 1 ml 進行還原糖量測定。

3-9-3 不同膜孔徑大小對批次分離水解發酵液自溶現象之影響

(圖 3-7)

目的：將幾丁六醣與分解酵素分離，透過不同孔徑大小的膜來討論分解酵素影響。

1. 依據 3-7 實驗步驟，培養至第六天之菌絲體發酵液，每 100 ml 加入 CH_3COOH 0.58 ml、 CH_3COONa 0.82 g，調整 pH 6。
2. 將 2 小時水解後產物過濾後取澄清液，置入超過濾裝置。
3. 分別透過兩種不同孔系度之透析膜(5 kDa/1 kDa)來分離樣品。
4. 將濃縮液濃度稀釋一半，重新水解兩小時後，再至入超過濾裝置分離。
5. 重複步驟 3-5，3 次。
6. 將各批次透析液取出冷凍乾燥做為 HPLC 分析樣品，另外測定還原醣量。

3-9-4 不同批次分離水解濃縮液次數對多醣轉化率與幾丁六醣

產量影響

目的：討論此製成的經濟效應與最佳使用次數。

1. 依據 3-9-3 實驗步驟。
2. 將各批次濃縮液與透析液取出 1 ml 添加 3 ml 72% 硫酸液，於 25°C 水槽震盪 30 分鐘後，高溫滅菌兩次，待冷卻後調整至 pH 7。
3. 將上一步驟處理後之樣品以 DNS 法分析還原醣量。

3-10 雞腿蘑分解酵素與合成現象之探討

3-10-1 抑制自溶現象之還原醣濃度探討 (圖 3-8)

目的：找出抑制雞腿蘑分解酵素活性之還原醣濃度。

1. 第六天發酵液分為三瓶，分為 a 組不添加 N-乙醯葡萄糖胺，b 組添加 0.15 g N-乙醯葡萄糖胺，c 組添加 0.30 g N-乙醯葡萄糖胺，各組以 DNS 法測量起始還原醣量。
2. 將 a、b、c 組樣品置入 50°C 水槽水解，在水解 1 小時取樣以 DNS 分析。
3. 比較隨水解時間的變化其還原醣量的增減，有無還原醣極限濃度的存在。

3-10-2 合成現象之可能原因探討(圖 3-9)

目的：利用不同分子量區段之樣品液討論合成現象是屬於逆反應或為合成酵素之作用。

1. 將發酵液以 5 kDa 膜分離，得三組樣品，分為 a 組發酵液，b 組 5 kDa 濃縮液，c 組 5 kDa 透析液，添加等量 N-乙醯葡萄糖胺，測量起始還原醣量。
2. 將 a、b、c 組樣品置入 50°C 水槽水解，在水解 30 min、180 min，取樣以 DNS 分析。
3. 比較隨水解時間的變化各樣品還原醣量的增減，以及各樣品之還原醣極限濃度值。

3-10-3 不同分子量發酵液所得之酵素與蛋白質分佈試驗(圖 3-10)

目的：透過不同分子量區間樣品酵素純化，找出合成酵素與分解酵素分離之膜孔徑。

1. 第六天發酵液至入超過濾以 5 kDa/1 kDa 透析膜至工作體積為 50% 濃縮。
2. 將各透析膜分離所得之濃縮端與透析端發酵液，以及澄清發酵液，以 80 v/v 丙酮進行蛋白質沉澱，離心取沉澱物，冷凍乾燥沉澱物，即可取得各樣品之酵素粉。
3. 將酵素粉以 0.2 M 醋酸緩衝液復溶，配製成 0.01 g/ml 之樣品。
4. 使用 AKTA prime 進行蛋白質分析並測定蛋白質濃度與酵素活性。

3-10-4 合成酵素存在之驗證實驗

目的：透過酵素純化證明本研究合成現象屬於分解酵素之影響。

1. 將第六天發酵液透過 5 kDa 透析膜分離，a 組樣品工作體積為 180 ml 濃縮至 90 ml(發酵液兩倍濃縮)、b 組樣品工作體積為 270 ml 濃縮至 90 ml(發酵液三倍濃縮)。
2. 將上述兩組樣品添加 80 v/v 丙酮使蛋白質沉澱，離心取沉澱物並冷乾取得酵素粉。
3. 將兩組酵素粉以 0.2 M 醋酸緩衝液復溶，配製為 0.01 g/ml 的樣品，使用 AKTA prime 分析儀進行蛋白質濃度分析。

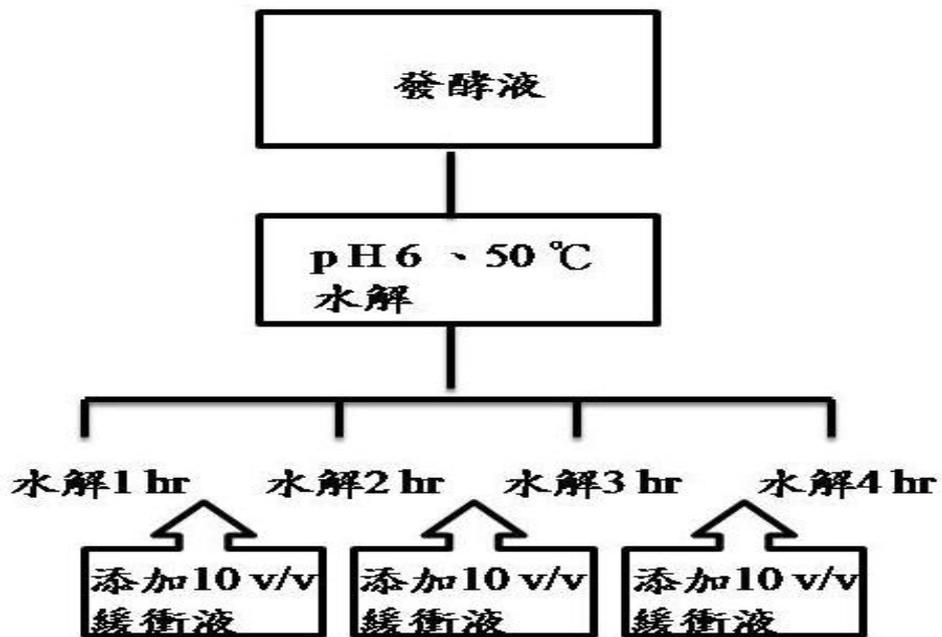


圖 3-2 批次添加緩衝液水解流程圖

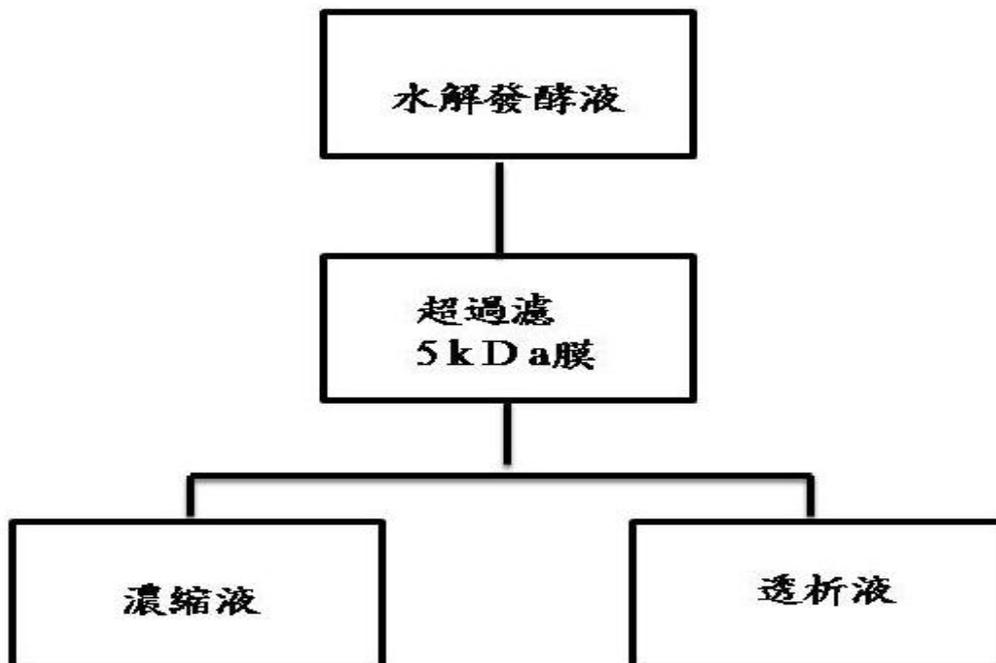


圖 3-3 單次分離發酵液對幾丁六糖產量之流程圖

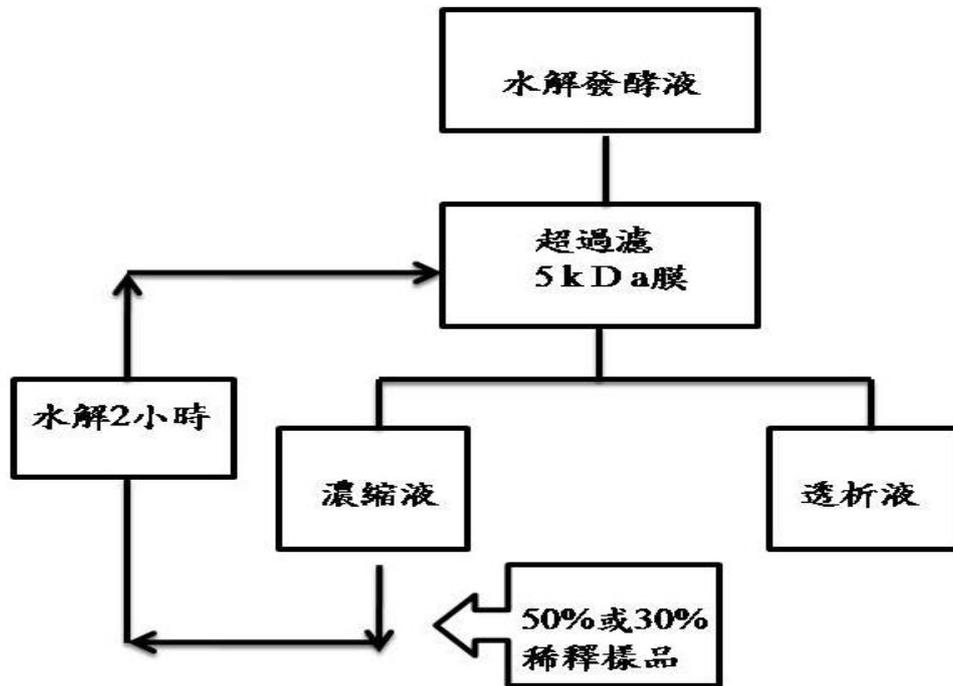


圖 3-4 濃縮端反應物不同稀釋倍數對批次水解發酵液自溶之影響流程圖

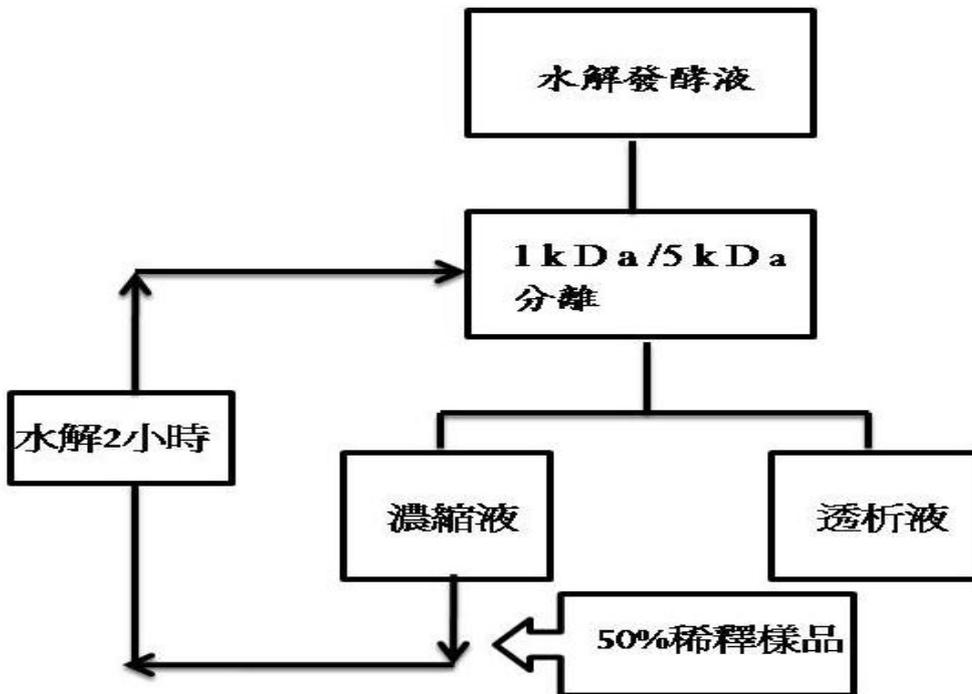


圖 3-5 不同膜孔徑大小對批次分離水解發酵液自溶現象實驗流程圖

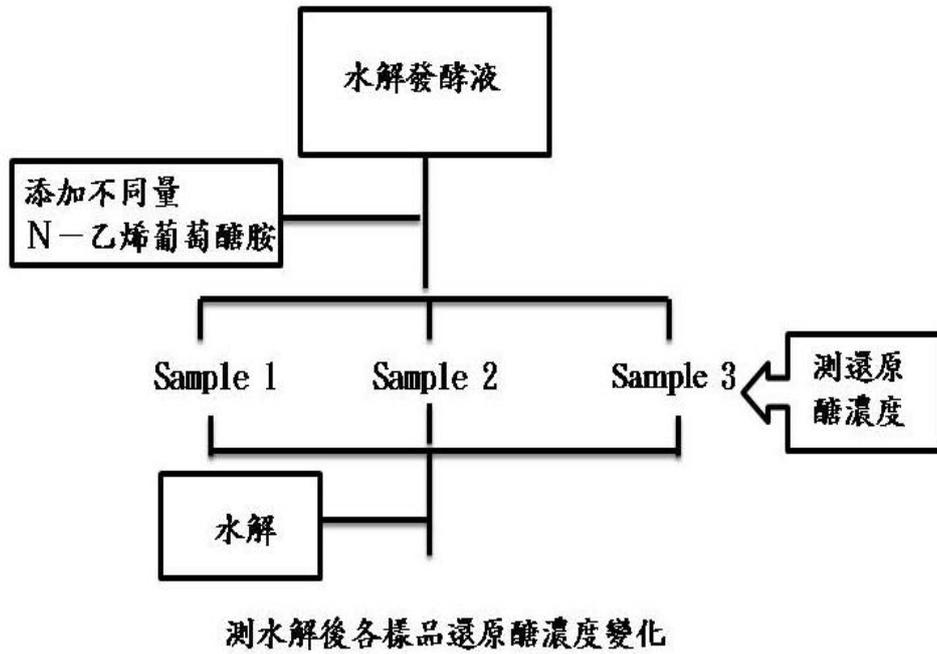


圖 3-6 抑制自溶現象之還原糖濃度探討

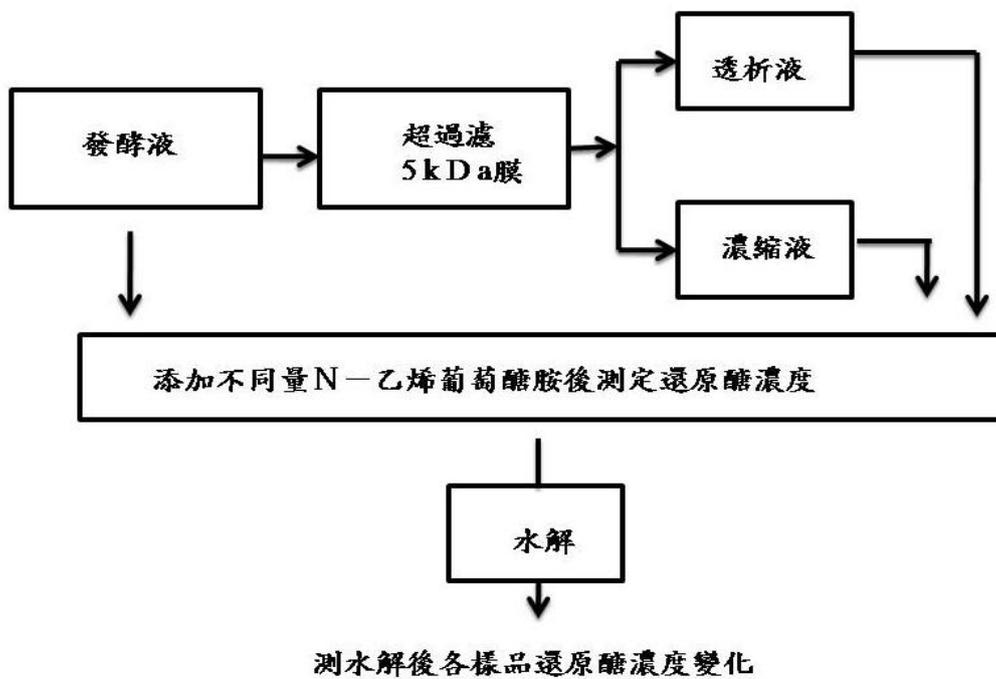


圖 3-7 探討合成現象為逆反應或合成酵素作用影響之流程圖

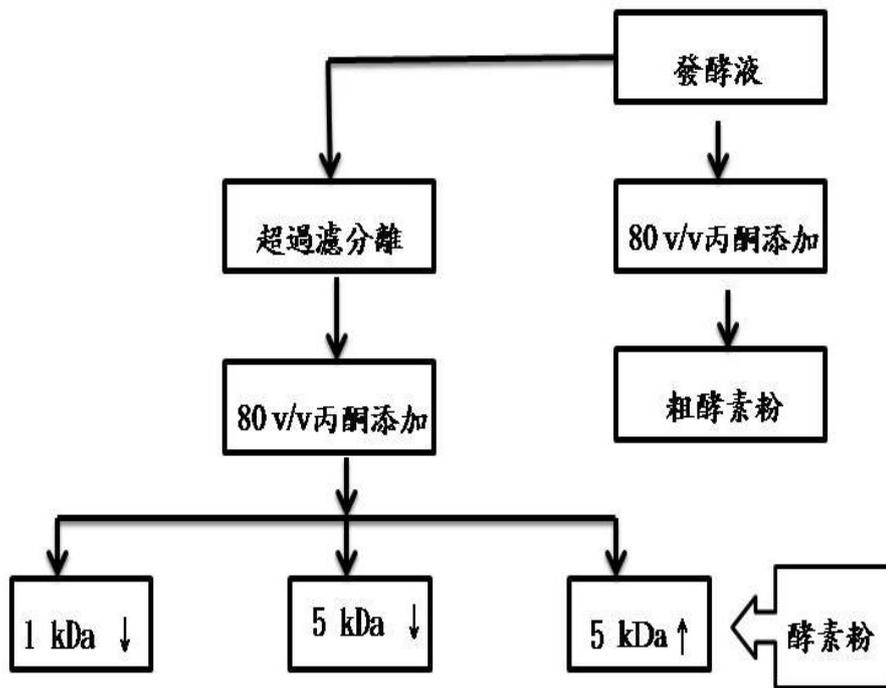


圖 3-8 合成作用之可能原因探討

第四章 結果與討論

4-1 菌絲體培養最佳化條件

4-1-1 雞腿麴菌絲體培養實驗

本研究利用葡萄糖為碳源，進行 10 天搖瓶液態培養雞腿麴菌絲體 (圖 4-1)。生理活性探討中，發現菌絲體由初始 5.28 g 成長到第六天 12.86 g，之後菌重持平直到第八天菌重又持續增加，第十天菌重已達 16.43 g，顯示出系統中持續有碳源提供菌絲體生長利用。但由葡萄糖分析結果，發現葡萄糖濃度會因為菌體的生長代謝而隨著時間遞減，並且在第三天後就測不出葡萄糖濃度，表示培養基所提供之碳源在第三天已消耗殆盡。根據文獻得知真菌做為幾丁質提供物時，經酵素分解後會形成 N-乙醯葡萄糖胺，為 DNS 分析方法主要測得的還原醣量。因此推斷培養三天後，菌體生長所使用的碳源來源不為葡萄糖，應該為 N-乙醯葡萄糖胺(還原醣)。根據圖 4-2 也可發現還原醣量在第三天到第十天逐漸下降，對照菌重的變化，可確定當系統所提供之碳源消耗殆盡時，老化菌絲體將會自體溶解釋出碳源提供健康菌絲體代謝利用，才會導致菌重持續上升，而這種高濃度菌絲體會導致所需的碳源增加，進而促使幾丁質分解酵素分解老化菌絲體的效果更為明顯，因此在第六天得到最高酵素活性 0.58 U。

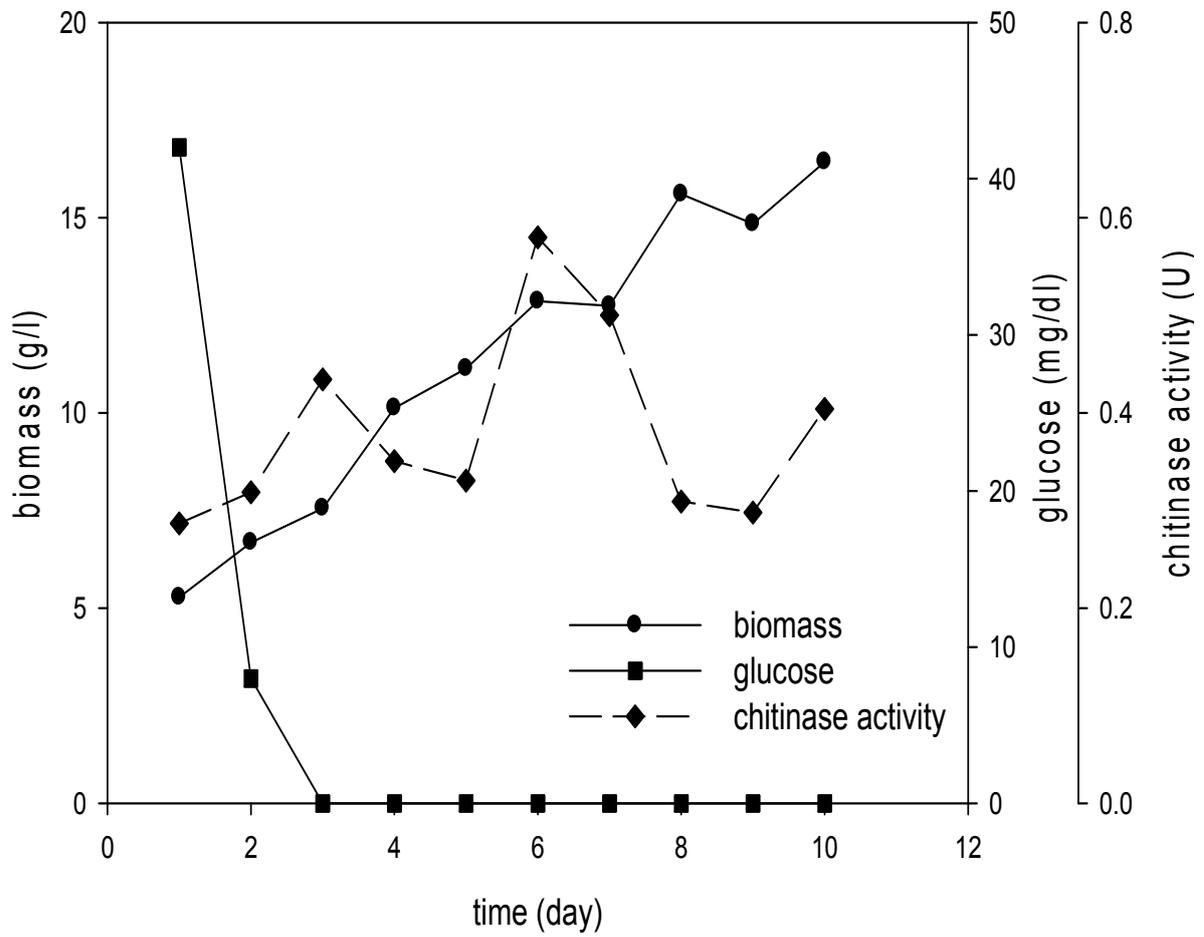


圖 4-1 雞腿蘑培養 1~10 天生理活性的變化

培養條件：液態培養基如表表 3-3、接菌量 5%、25°C、120 rpm、pH 7

實驗方法：菌體乾重測定、葡萄糖濃度測定、幾丁質分解酶活性分測定

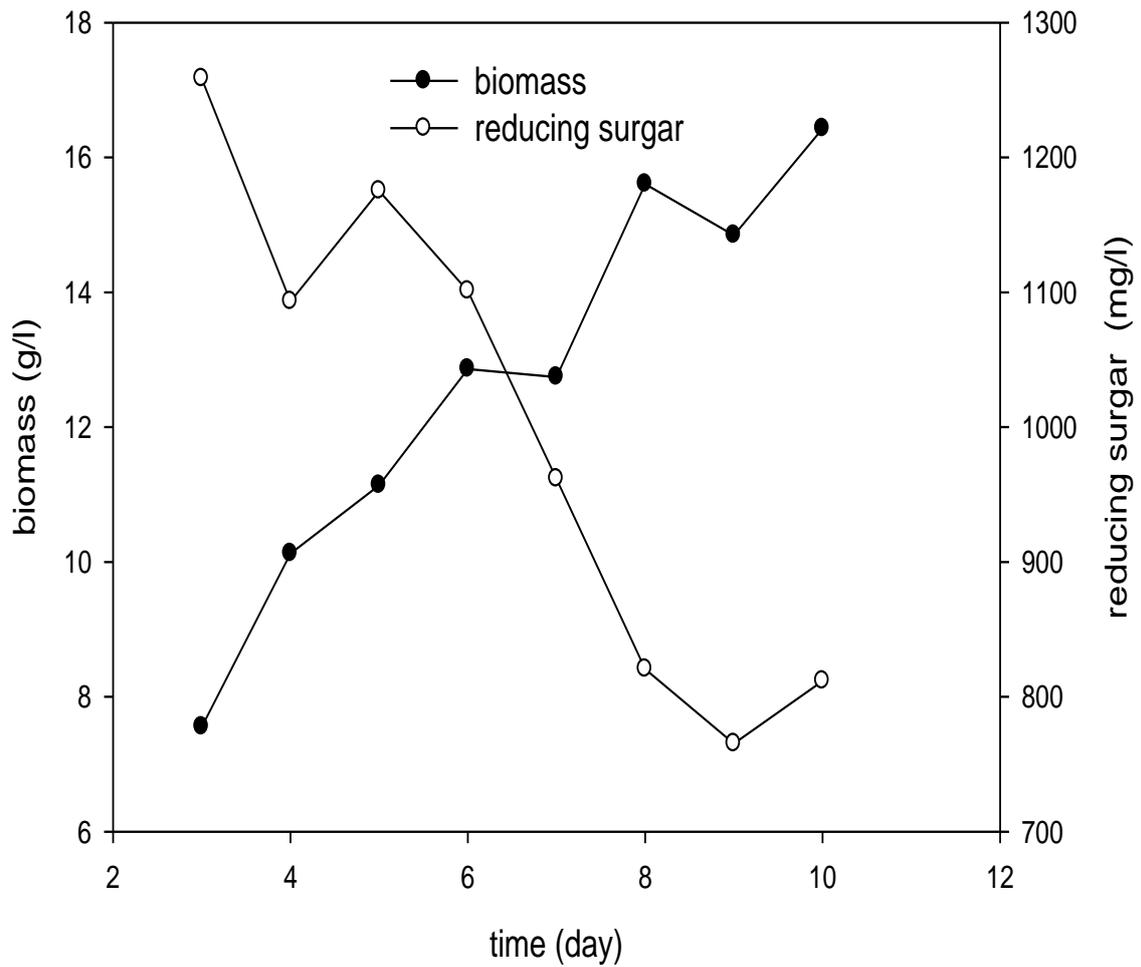


圖 4-2 雞腿蘑發酵液還原糖 3~10 天變化

培養條件：液態培養基如表表 3-3、接菌量 5%、25°C、120 rpm、pH 7

實驗方法：DNS 還原糖分析

4-2 菌絲體發酵液之最佳水解條件探討

4-2-1 水解時間對發酵液自溶之影響

利用 White 所提影響真菌發生自體溶解的原因 (White et al., 2002)，本研究藉此來促進菌絲體自溶，期望分解現象更為顯著。水解條件選自陳學長研究結果，水解溫度 50°C、pH 6，可提升雞腿蘑分解酵素的效能，藉此加速本研究提升幾丁六糖產量與縮短製程的時間。

由圖 4-3 可知發酵液經水解後，還原糖量由 1100.93 mg/l 上升至 1310.92 mg/l(提升 15%)，酵素活性則有較明顯的變化由原始的活性 0.58 U 提升至 1.14 U，活性增加為原始 2 倍，可證實利用內在與外在因素的改變可迫使菌絲體釋放更多的幾丁質酵素來分解幾丁質，有利提升整體酵素活性與還原糖量。

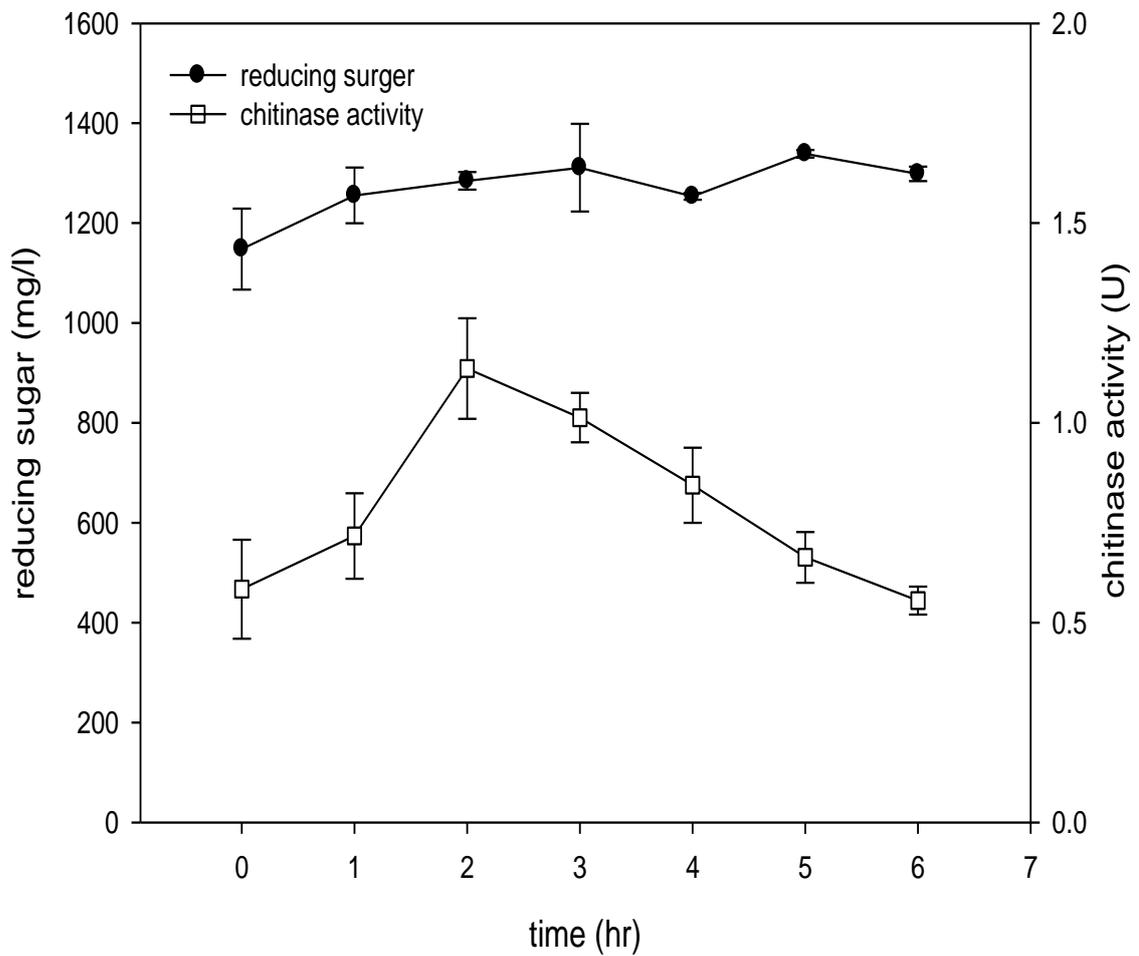


圖 4-3 菌絲體發酵液水解時間與特性變化

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、水解溫度 50°C、pH 6

實驗方法：DNS 還原糖分析、幾丁質分解酶活性分測定

4-2-2 重複添加緩衝液至水解發酵對特性之影響

根據 Chen 的重複饋料式實驗，提出添加新的基質進入發酵液中，使得 N-乙醯葡萄糖胺的濃度降低後，可減緩分解酵素被抑制的現象並使酵素活性恢復(Chen et al., 1995)。根據上述理論本研究設計，將發酵液透過緩衝液稀釋並持續水解，結果發現(圖 4-4)此水解法所產生的還原醣量與原先水解系統所產生之最大值還原醣量(1310.92 mg/l)相比僅略升 4%，推測是因為發酵液經稀釋後雖酵素活性不受到抑制但因為反應物的濃度降低使得反應速率下降，加上取樣的時間過短無法看出還原醣增加的趨勢。酵素活性方面與原先水解系統水解三小時酵素活性(1.03 U)相比，提升了 48%，與初始第六天發酵液所含酵素活性(0.58 U)相比，則提升了 163%，證實還原醣濃度過高，酵素活性會受到抑制。後期研究根據此實驗結果的發現，確定當發酵液中還原醣濃度降低，可提升整體酵素活性值，因此後續又設計利用稀釋水解發酵液提高或維持酵素活性之研究。

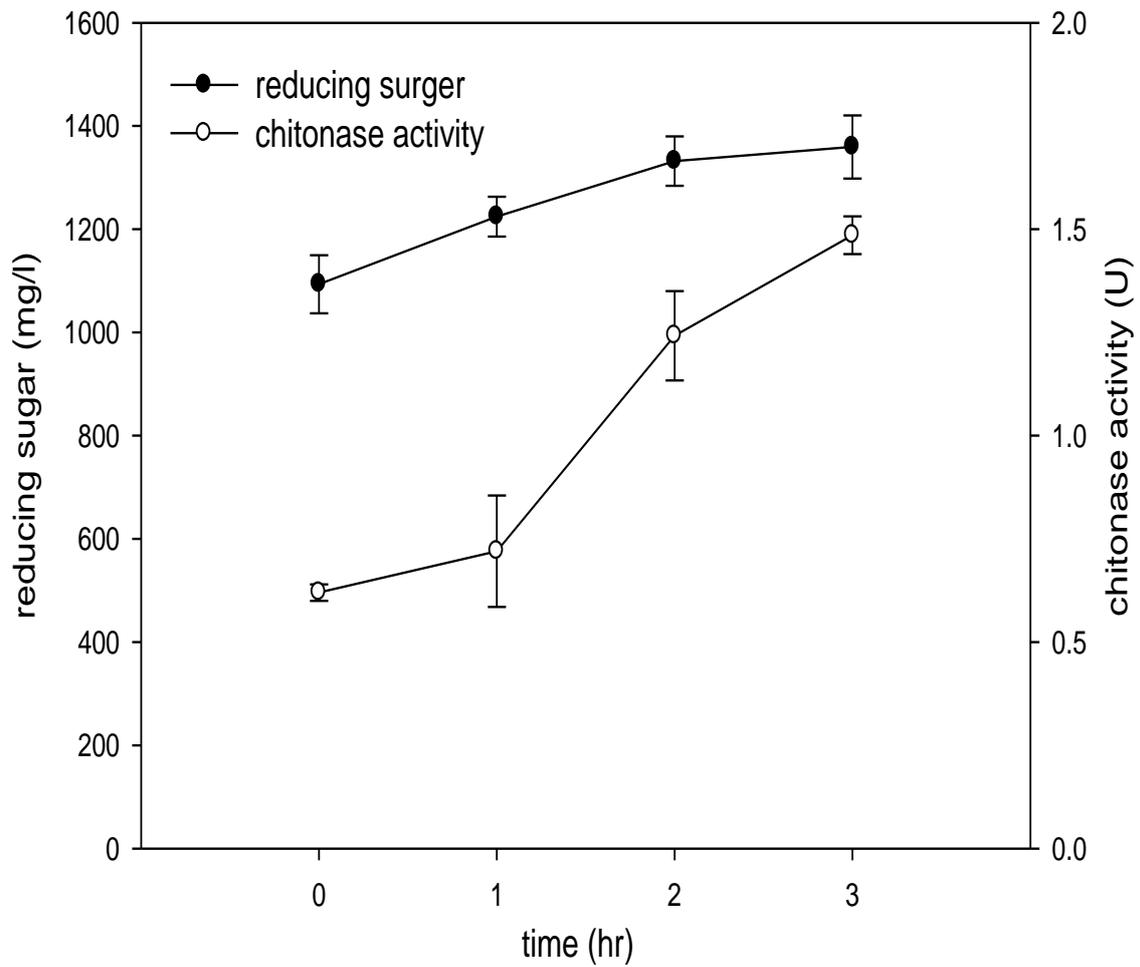


圖 4-4 重複添加緩衝液至菌絲體發酵液水解時間與特性變化

實驗條件：第六天發酵液、溫度 50°C、pH 6、均質 10 秒、水解一小時後

添加 10v/v 緩衝液

實驗方法：DNS 還原糖分析、幾丁質分解酶活性分測定

4-2-3 抑制自溶現象之還原醣濃度探討

Chen 研究結果提出當發酵液中 N-乙醯葡萄糖胺的濃度達到 2000 mg/l 會降低幾丁質分解酵素能力 10 % (Chen et al., 1995)，本實驗利用此論點，探討還原醣濃度對雞腿蘑分解酵素活性的影響。依據先前實驗發現，圖 4-3 還原醣變化在水解三小時後，達動態平衡，推測是因為酵素活性受還原醣濃度抑制而降低分解能力。藉由設計利用添加 N-乙醯葡萄糖胺提高發酵液還原醣含量，比較不同初始還原醣量的發酵液經水解一小時還原醣量的變化，來證實實驗的假說。結果發現，當菌絲體發酵液中所含還原醣濃度高於 1300 mg/l 左右時，會降低幾丁質分解酵素能力。亦證實圖 4-3 水解 2~3 小時酵素活性下降原因，應該受到發酵液還原醣濃度過高導致分解酵素活性表現不明顯。

另外圖 4-3 中，發現另一項獨特的現象，由酵素活性分析結果顯示，在水解 3 小時後，酵素活性降低但仍存在分解效能，但還原醣量卻無明顯變化，其增加量不成比例，推測反應中應有合成作用之影響，此部分探討在下一部份實驗，進行討論。

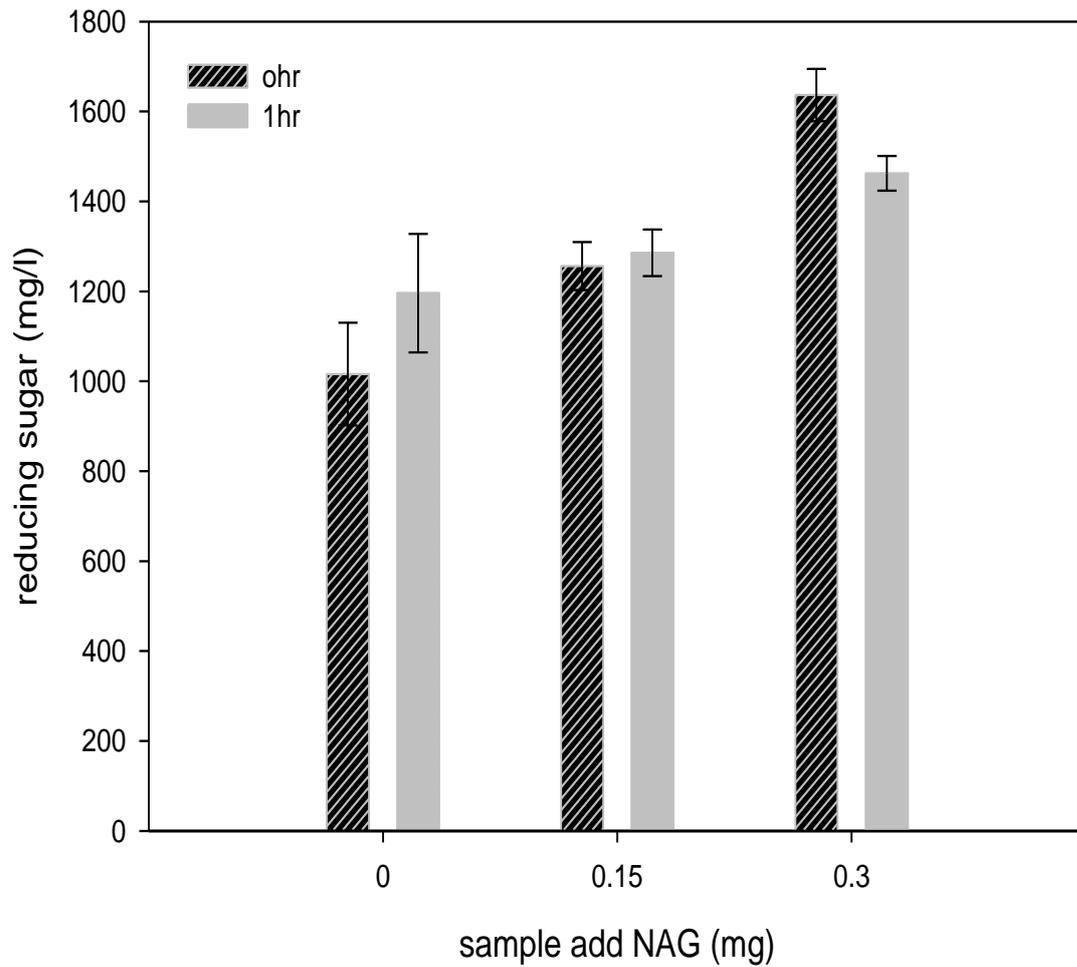


圖 4-5 抑制自溶現象之還原醣濃度探討

實驗條件：第六天發酵液添加 N-乙醯葡萄糖胺、水解溫度 50°C、

pH 6、測量水解前與後還原醣量

實驗方法：DNS 還原醣分析、合成現象測定

4-2-4 合成現象之可能原因探討

承接上述研究中的發現，探討為何發酵液中，仍有酵素活性之存在，但還原醣量卻不增反減之現象。根據文獻得知，絲狀真菌生長型態中，為了維持正常生理活性，在生長系統中含有分解酵素與合成酵素。菌體老化時會透過幾丁質分解酵素溶解細胞壁，提供新生菌絲體生長，當菌體過度的自體破壞，引發不正常生理活性表現，菌體則會透過合成酵素補修細胞壁，兩種酵素相互協調。

本實驗主要是還原醣量合成現象之成因，設計利用超過濾分離，將發酵液做分子量的劃分，相互比較是否仍有合成現象變化，以確立此現象為水解逆反應或合成酵素之作用。研究結果發現圖 4-6 初始還原醣量經添加 N-乙醯葡萄糖胺後，其還原醣量提升 1200 mg/l，置入水解 30 分鐘後還原醣量已達 1300 mg/l，為了觀察合成現象之變化量，將水解時間延長至水解三小時，發現還原醣量由 1300 mg/l 降至 1260 mg/l。發現圖 4-7 在還原醣達抑制濃度後，還原醣下降量較為顯著，得知利用 5 kDa 透析膜處理樣品後，濃縮端之合成酵素濃度提高會提升還原醣合成效果，確定幾丁合成酵素分子量大於 5 kDa。圖 4-8 顯示出超過濾裝置可以將幾丁質合成酵素保留在 5kDa 濃縮端，因此透析端部分不會出現合成現象，當樣品改為 1 kDa 透析液時研究結果與圖 4-8 相同，換而言之，分子量小於 5 kDa 之樣品不再有還原醣極限濃度引起合成現象之發生。

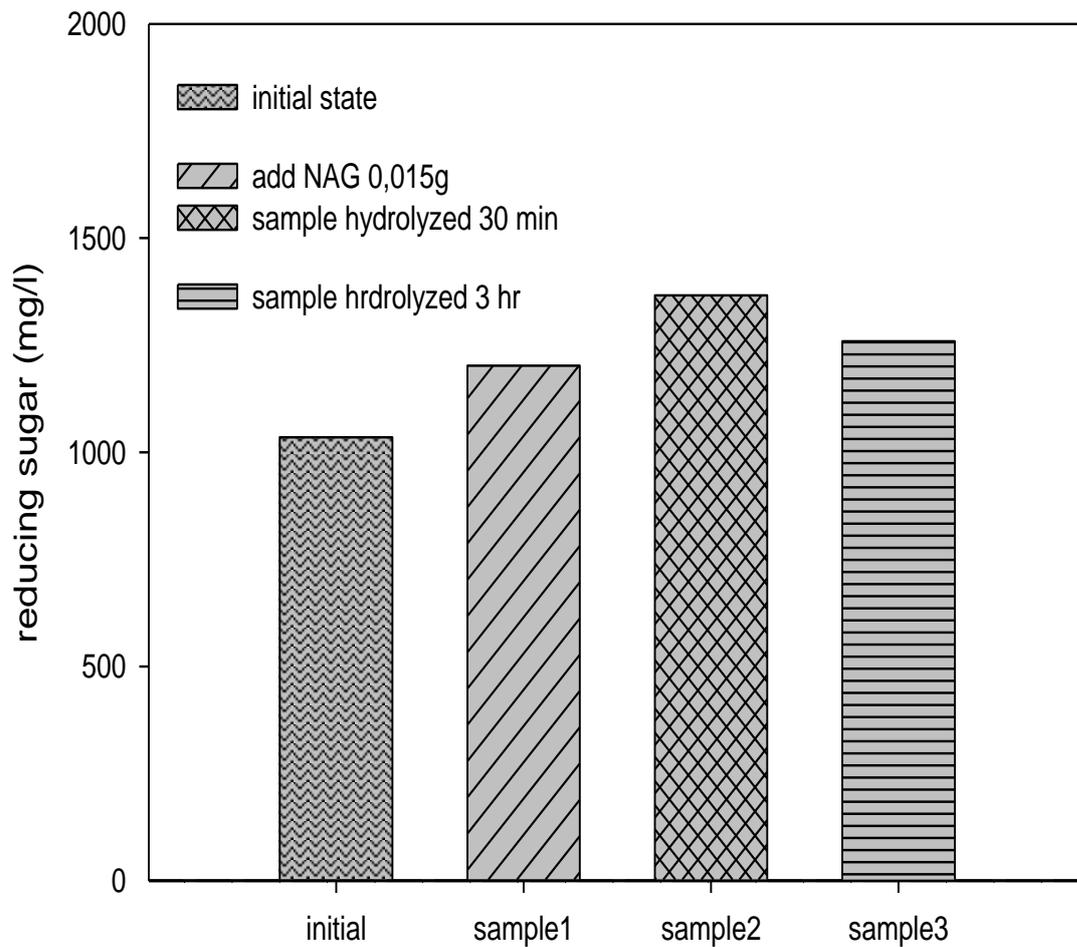


圖 4-6 發酵液醣量變化對合成作用之影響

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、水解溫度 50°C、pH 6

實驗方法：DNS 還原醣分析、合成現象測定

Sample 1：第六天澄清發酵液

Sample 2：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g

Sample 3：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g，水解 30 分鐘

Sample 4：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g，水解 3 小時

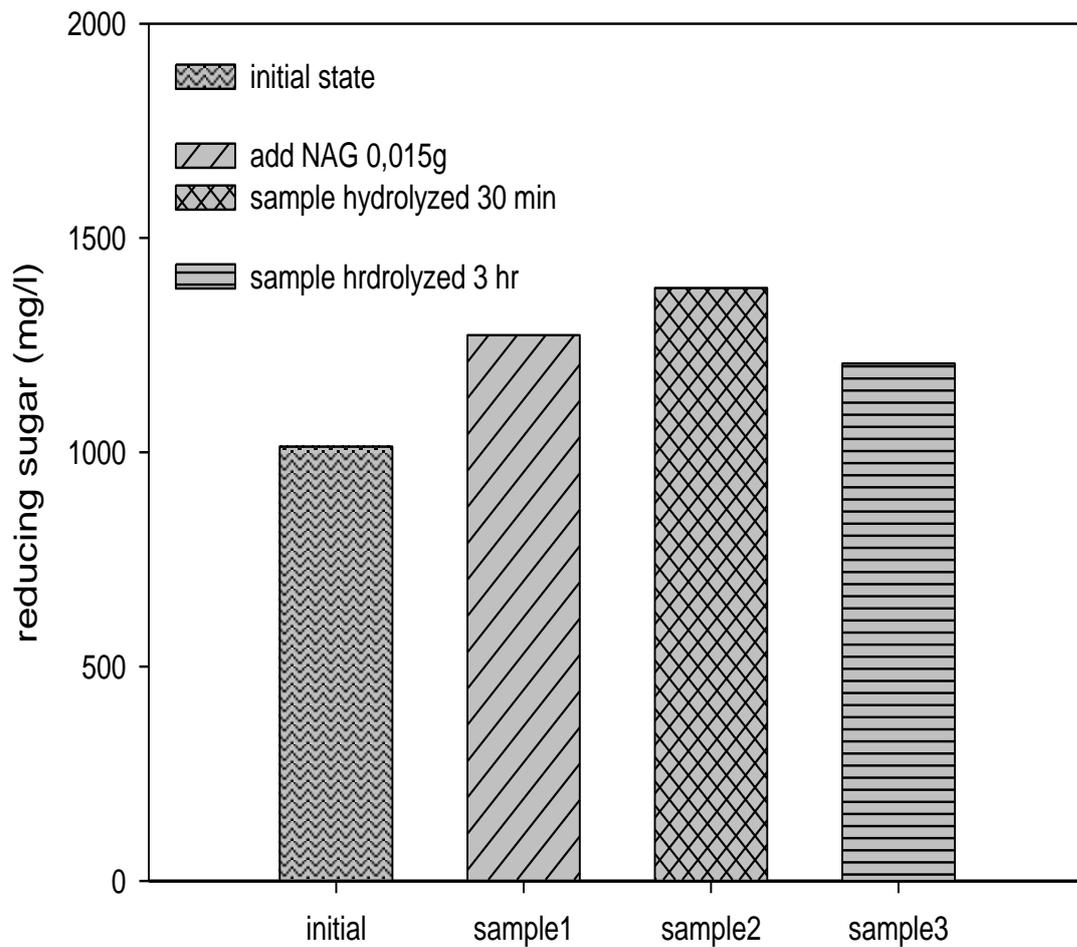


圖 4- 75 kDa 濃縮液醣量變化對合成作用之影響

實驗條件： 5 kDa 過濾膜濃縮液、水解溫度 50°C、pH 6

實驗方法：DNS 還原醣分析、合成現象測定、超過濾分離

Sample 1：第六天澄清發酵液

Sample 2：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g

Sample 3：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g，水解 30 分鐘

Sample 4：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g，水解 3 小時

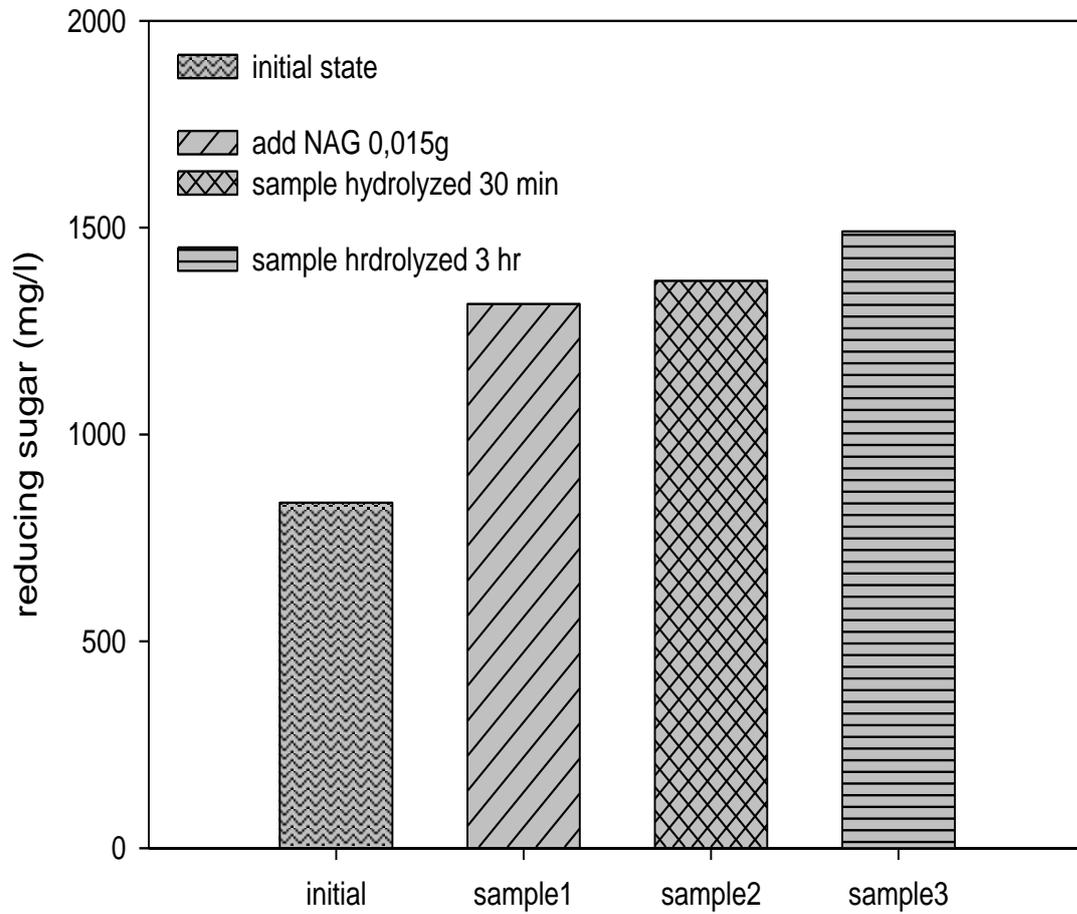


圖 4- 8 5 kDa 透析液醣量變化對合成作用之影響

實驗條件：5 kDa 過濾膜透析液、水解溫度 50°C、pH 6

實驗方法：DNS 還原醣分析、合成現象測定、超過濾分離

Sample 1：第六天澄清發酵液

Sample 2：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g

Sample 3：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g，水解 30 分鐘

Sample 4：第六天澄清發酵液添加 NAG 0.015 g，水解 3 小時

4-2-5 不同分子量發酵液所得之酵素與蛋白質分佈試驗

根據上述研究發現幾丁分解酵素分佈廣泛，各分子量區間樣品皆有分解酵素之效果，為了更加了解雞腿蘑分解酵素主要分佈區間，因此設計利用不同膜孔徑大小分出 5 kDa 濃縮液、5 kDa 透析液、5 kDa~1 kDa 濃縮液、1 kDa 透析液，經丙酮 80 v/v 與冷乾處理後，測定各樣品酵素活性與蛋白質含量，比較各區段之比活性值(表 4-1)，結果發現幾丁分解酵素在 5 kDa~1 kDa 分子量區間有最高值，相較於原始的發酵液增高 3.7 倍。

另外比較圖 4-9 與 4-10 可發現發酵液經濃縮後 fraction 4 吸收光值會增加，應為合成酵素被濃縮之結果，而 fraction13-16 吸收光值會下降，應為分解酵素被分離至透析端。當樣品分子量低於 5 kDa 時 fraction 4 吸光值消失，但 fraction13-16 吸收光值仍保留，並且高於 5 kDa 濃縮端之吸光值(圖 4-11)。由圖 4-12 與圖 4-13 比較發現，5 kDa~1 kDa 濃縮液 fraction13-16 吸光值遠大於 1 kDa 透析液之吸光值，判定幾丁分解酵素多半被保留於 1 kDa 以上，與表 4-1 比活性結果相符。

fraction 數值定義：分劃收集器管數的代號，在圖上屬於紅色的區段

表 4-1 雞腿麈菌絲體酵素之特性分析

分析樣品	總酵素活性 (U)	蛋白質濃度 (mg)	比活性 (U/mg)
發酵液	58.00	15.52	3.74
粗酵素	10.43	1.34	7.80
UF 5 kDa 濃縮液	8.65	1.98	4.38
UF5 kDa 透析液	6.77	0.57	11.97
UF5 ~1 kDa 濃縮液	11.10	0.63	17.56
UF 1 kDa 透析液	9.14	0.55	16.75

實驗條件：發酵液利用超過濾過濾膜 5 kDa/1kDa 分離

實驗方法：蛋白質含量測定、蛋白質丙酮沉澱法、超過濾分離

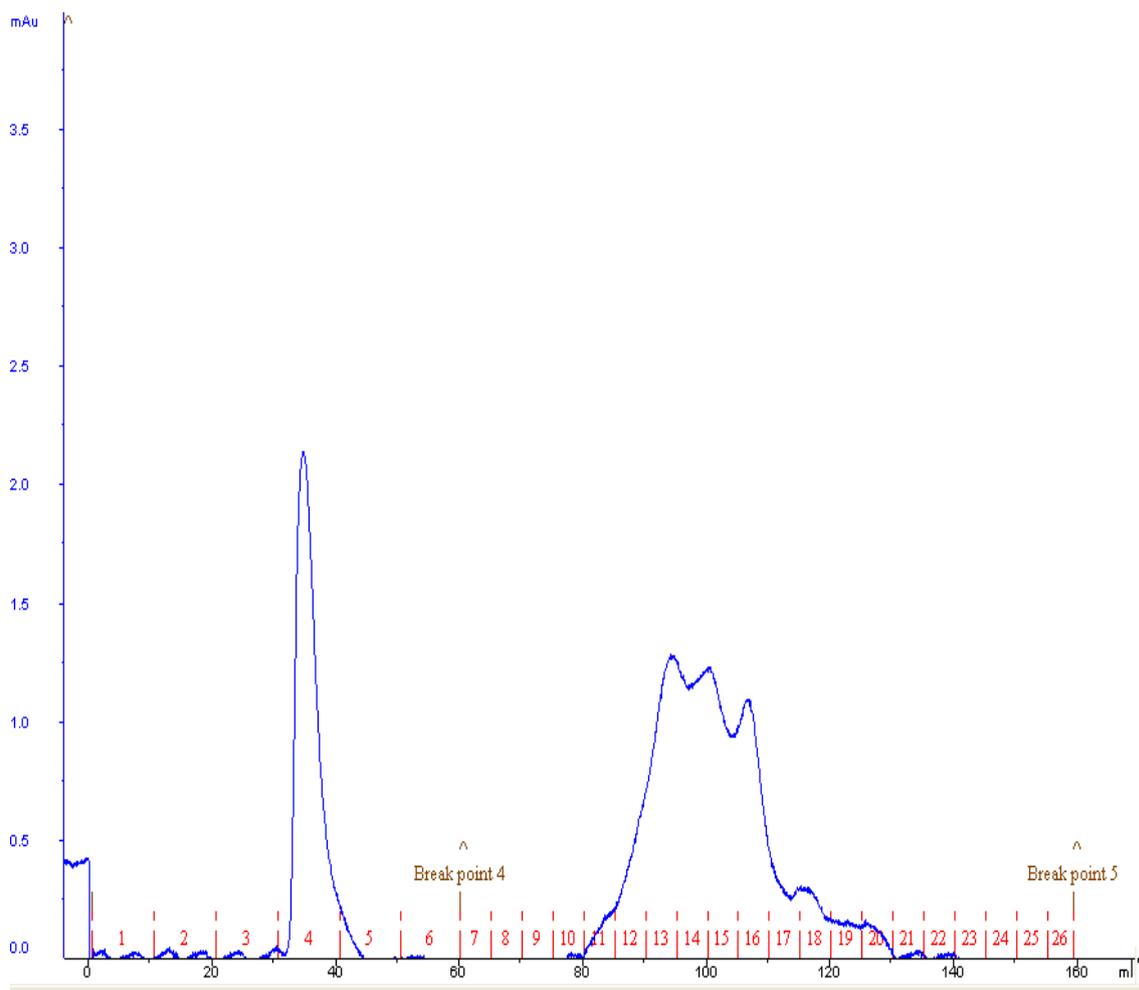


圖 4-9 粗酵素之光譜分佈

實驗條件：發酵液酵素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離

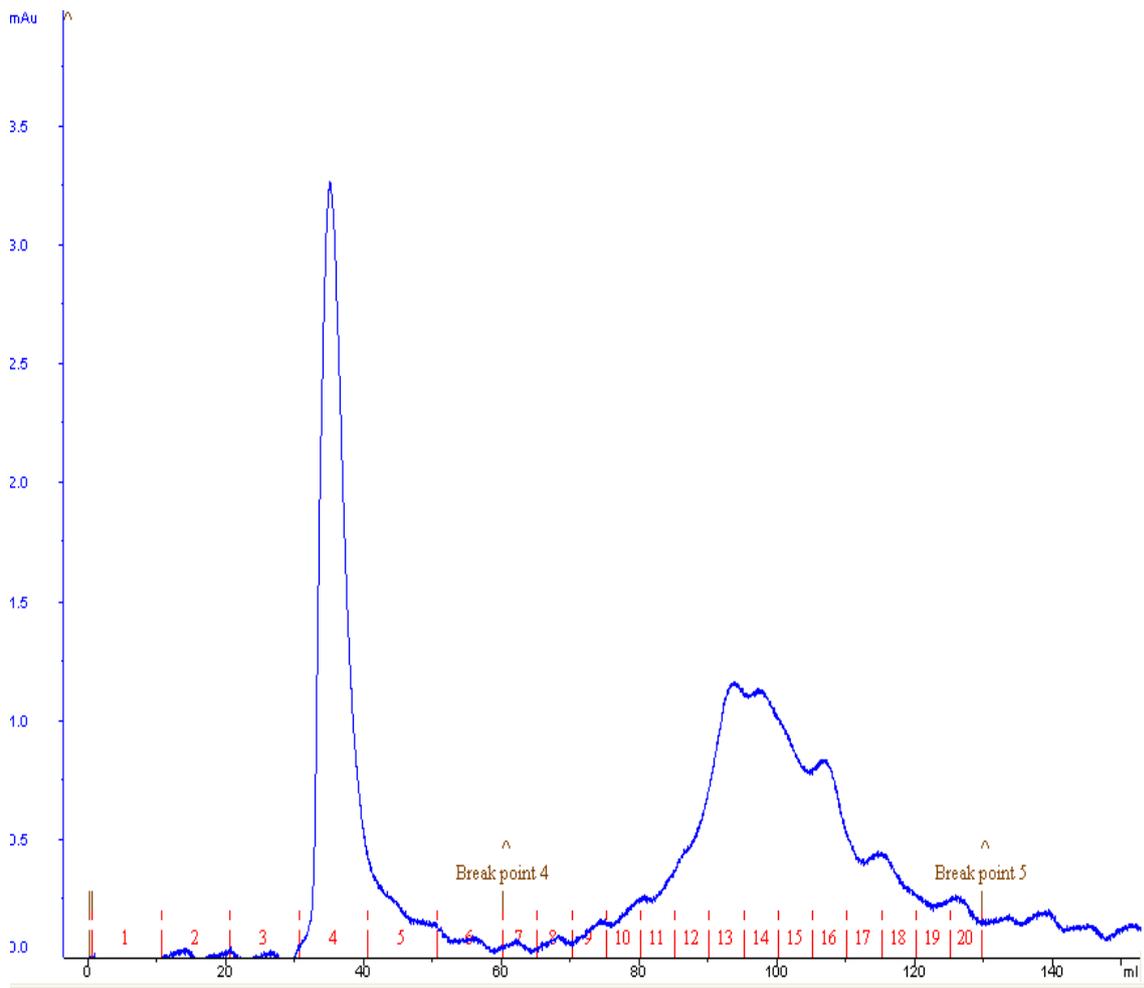


圖 4- 10 5kDa 濃縮端酵素之光譜分佈

實驗條件：5kDa 濃縮端酵素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離、

超過濾分離

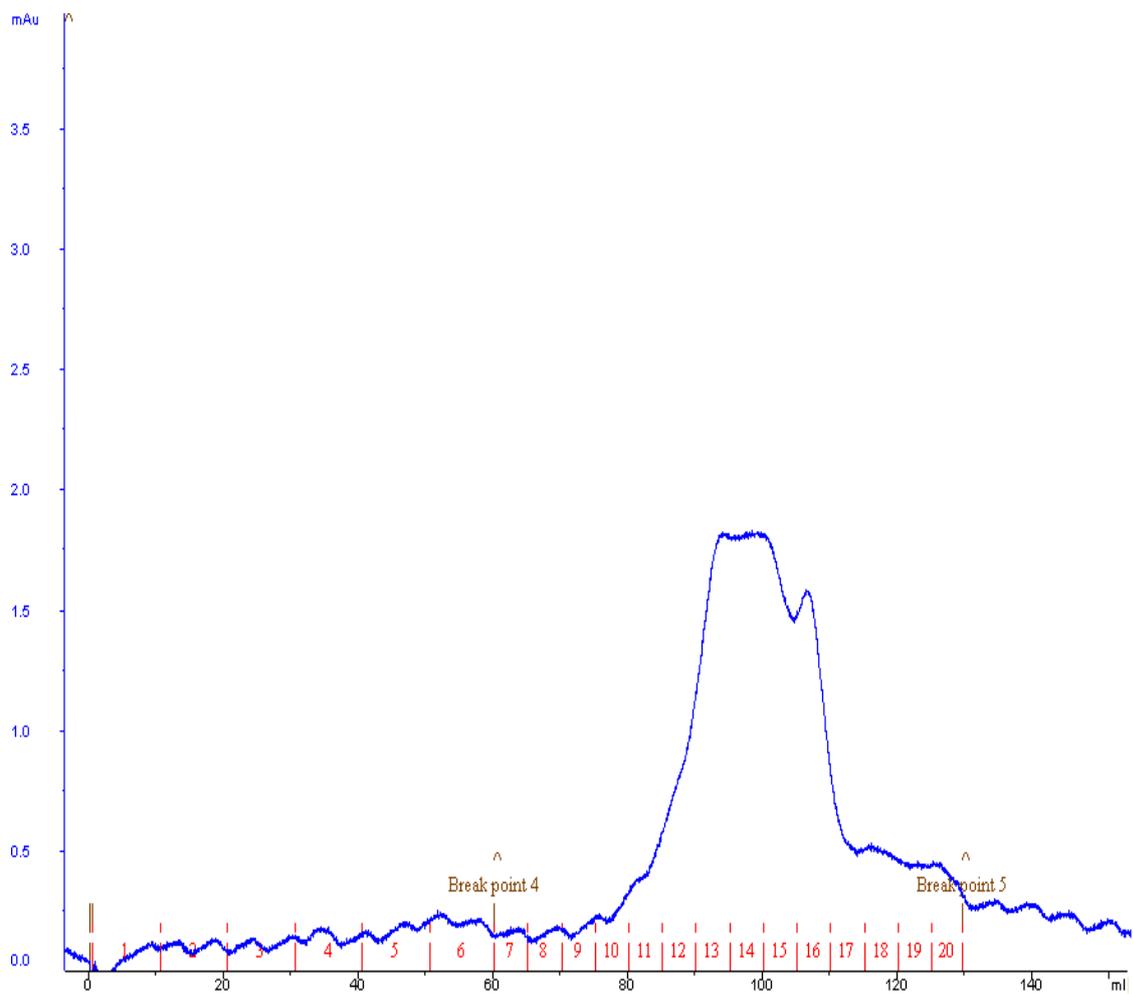


圖 4- 11 5 kDa 透析端毒素之光譜分佈

實驗條件：5kDa 透析端毒素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離、

超過濾分離

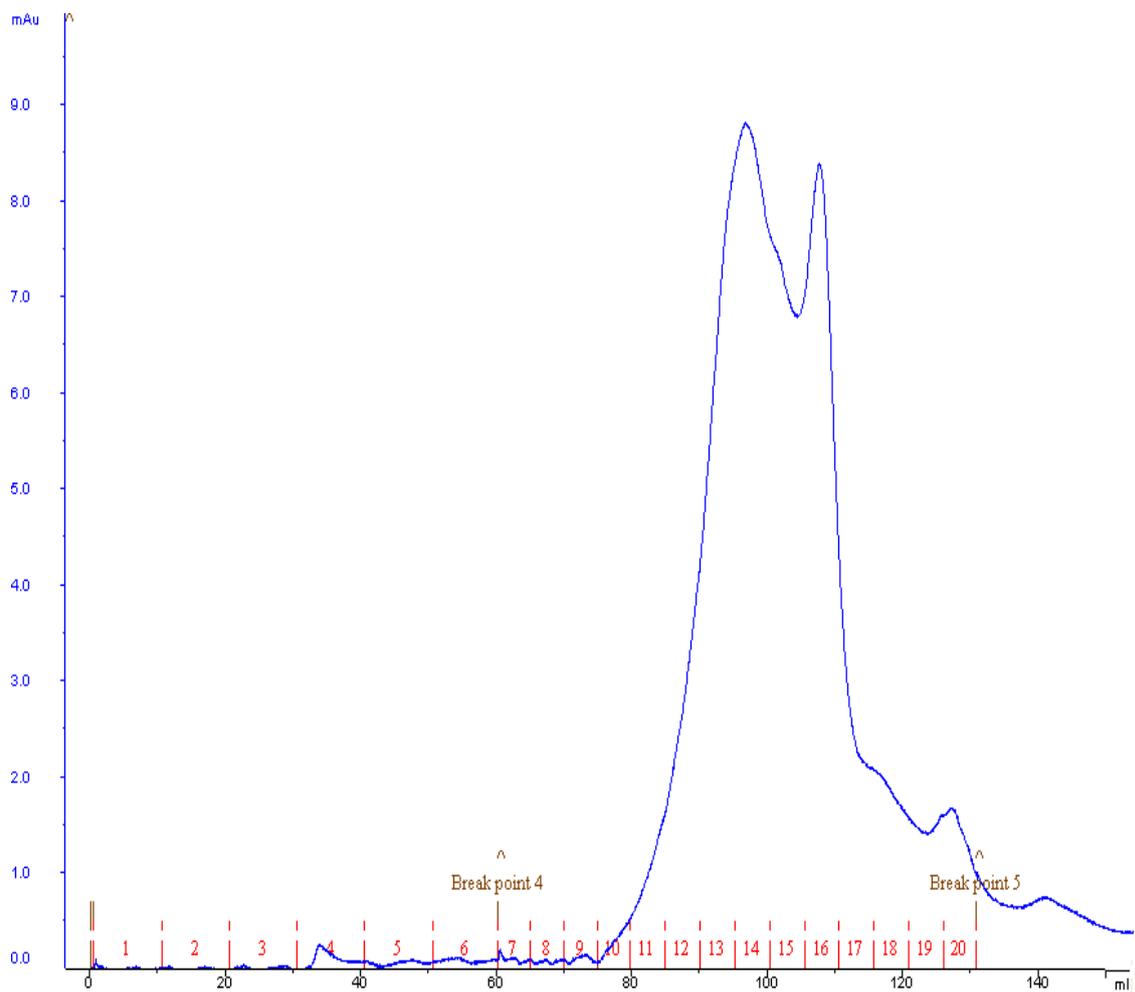


圖 4- 12 5 kDa ~1 kDa 濃縮端酵素之光譜分佈

實驗條件：5 kDa ~1 kDa 濃縮端酵素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離、

超過濾分離

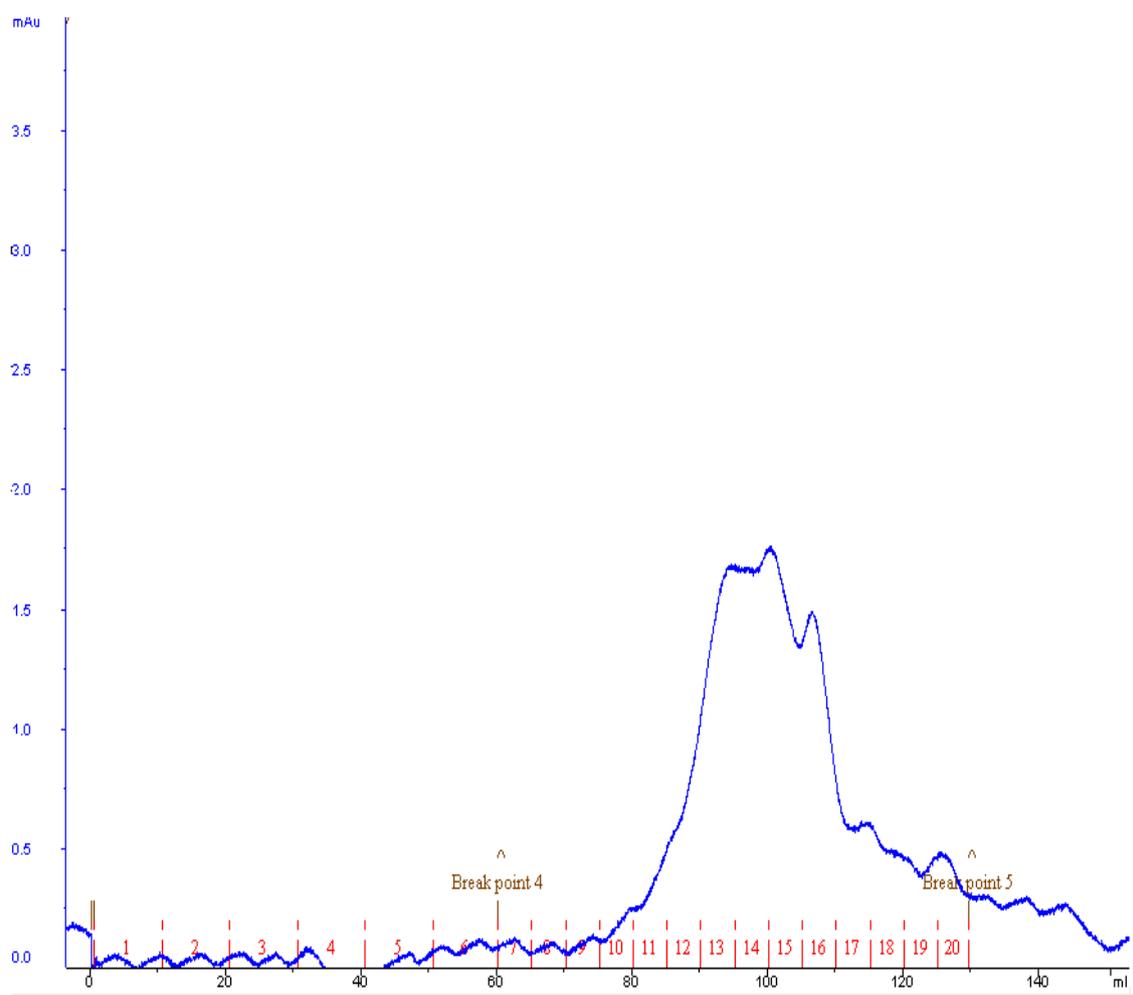


圖 4- 13 1 kDa 透析端酵素之光譜分佈

實驗條件：1 kDa 透析端酵素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離、

超過濾分離

4-2-6 合成酵素存在之驗證實驗

根據 4-2-5 實驗結果推測 fraction 4 可能為合成酵素，為了更進一步確認合成酵素被保留在 5 kDa 透析膜之濃縮端，此研究透過發酵液兩倍濃縮(圖 4-14)與三倍濃縮(圖 4-15)所得酵素之分析結果來比較 fraction 4 吸收光值，因為蛋白質分析儀於吸光值 280 nm 可偵測蛋白質量，如果 fraction 4 為合成酵素，那麼濃縮倍數越高，在濃縮端部分所偵測到的吸光值應該會提升。研究結果顯示圖 4-14 fraction 4 吸光值為 5；圖 4-15 fraction 4 吸光值為 9，與推論相符，藉此證實合成酵素可被 5 kDa 分離膜保留在反應槽內，而 fraction 13-16 吸收光值則隨著濃縮比例增加而減少，驗證本研究若要重複利用幾丁分解酵素降解多醣來提高幾丁六醣產量，應搭配 1 kDa 分離膜會有較好的效果，此論點與表 4-1 幾丁分解酵素比活性結果相符。

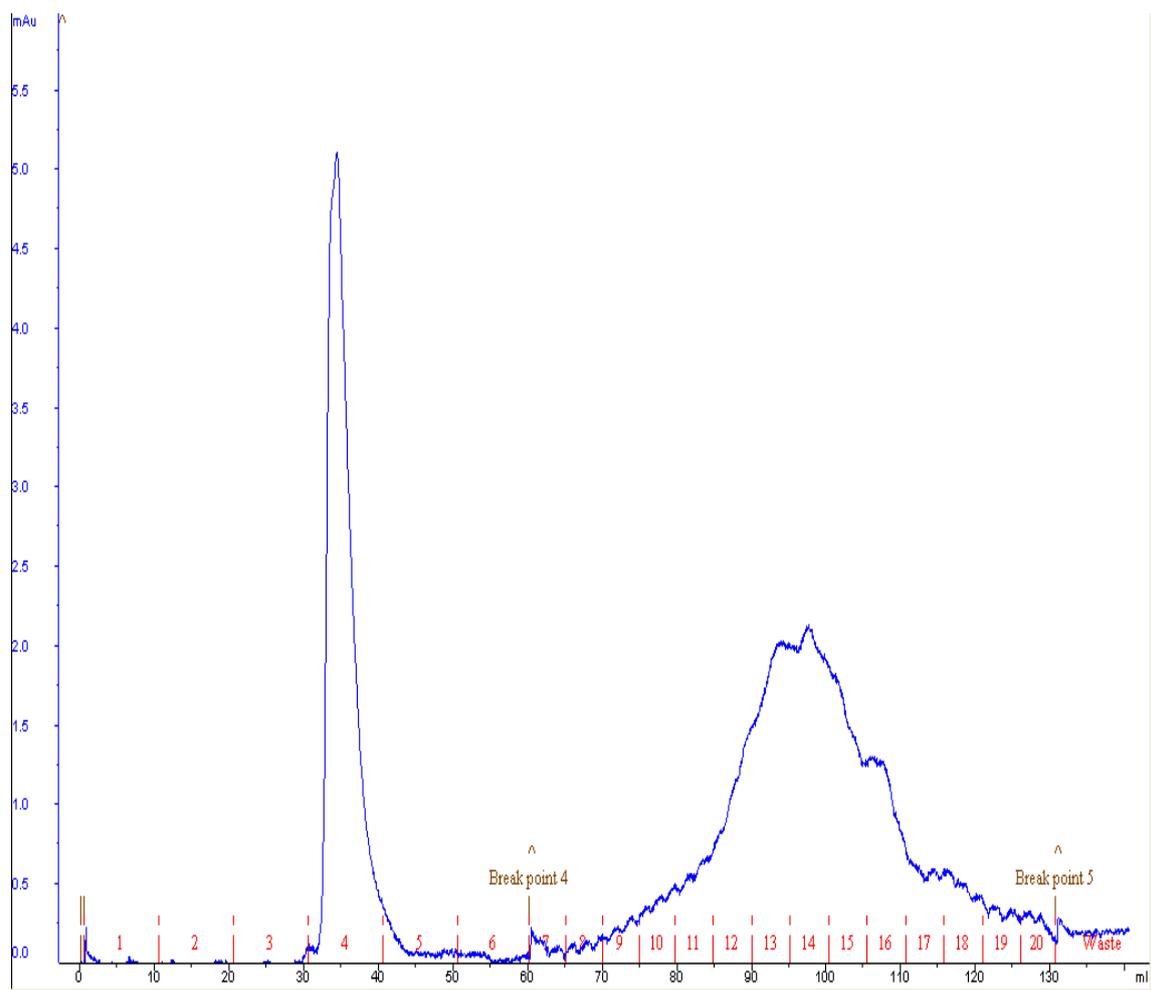


圖 4-14 發酵液兩倍濃縮酵素之光譜分佈

實驗條件：發酵液兩倍濃縮酵素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離、

超過濾分離

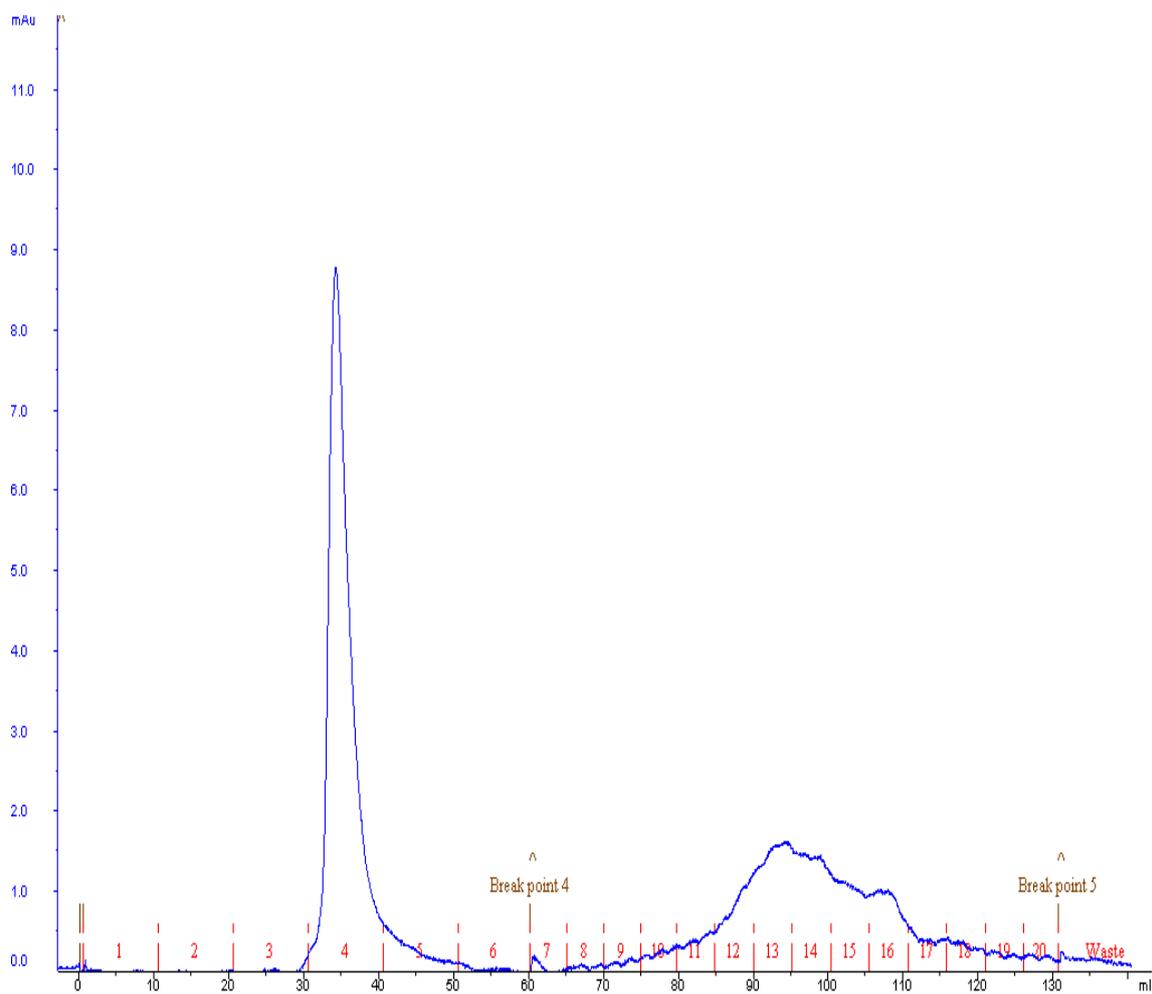


圖 4- 15 發酵液三倍濃縮酵素之光譜分佈

實驗條件：發酵液三倍濃縮酵素、樣品濃度 0.01M、吸收波長 280 nm

實驗方法：蛋白質丙酮沉澱法、蛋白質吸收光譜與膠體管柱分離、

超過濾分離

4-3 使用超過濾對幾丁六糖產量之影響

4-3-1 單次分離發酵液對幾丁六糖產量之影響

由先前之研究發現當還原醣濃度過高時，會有合成現象之發生，但水解樣品過程中，水解兩小時與三小時所得還原醣量差異不大，為了確定最佳水解時間，本實驗利用超過濾裝置分別分離水解兩小時與三小時發酵液，結果顯示水解兩小時發酵液濃縮端與透析端之醣量濃度合，符合質量守恆(圖 4-16)，此時並未出現還原醣減少的狀況，而水解三小時發酵液濃縮端與透析端之醣量濃度和，不符合質量守恆(圖 4-17)，並出現還原醣減少的狀況，推測是三小時之水解發酵液中還原醣量達極限濃度。酵素活性比較中可

知水解兩小時分解效能較高，但過高的分解速率會提升整體還原醣量，無法提供長期分解效能生產幾丁六糖，而依據先前研究結果得知欲避開合成現象的發生可透過添加緩衝液稀釋樣品還原醣量，來維持幾丁分解酵素效能，因此後續設計批次添加緩衝液來維持酵素活性，期望可提高幾丁六糖之產量。

另外 HPLC 分析顯示水解兩小時與未水解前之發酵液比較幾丁六糖的濃度由 0.23 mg/l 提升至 0.42 mg/l，而水解兩小時發酵液經過過濾膜(5 kDa)分離後，能提升幾丁六糖的濃度至 0.63 mg/l (圖 4-18)，結果確定利用超過濾分離樣品可提升幾丁六糖量，雖然與 Lin 研究結果相比僅達八成含量(Lin et al.,2009)，但本系統是利用自體酵素與自溶現象生產幾丁六糖，在酵素未純化下，節省生產成本，顯示出此系統是有潛力的開發。

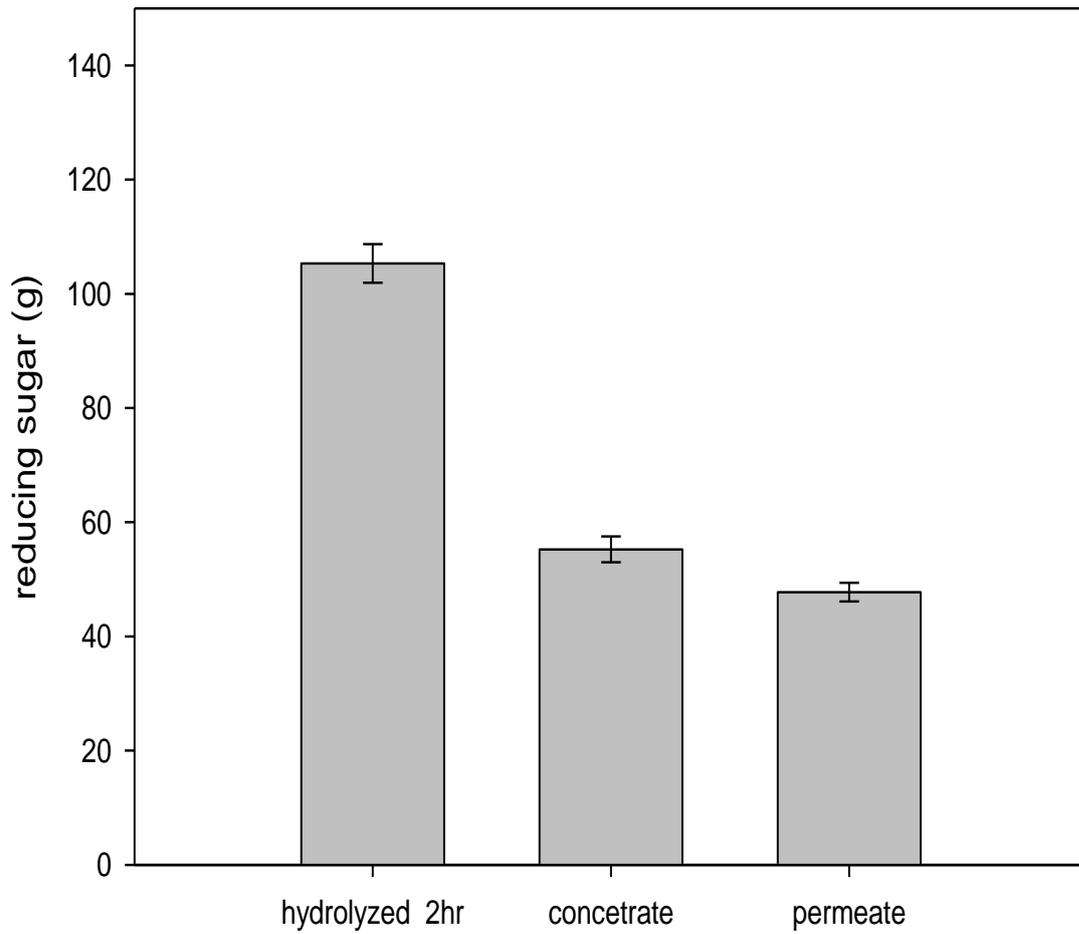


圖 4- 16 兩小時水解液經超過率分離之醣量變化

實驗條件：兩小時水解液、水解溫度 50°C、pH 6、5 kDa 過濾膜

實驗方法：幾丁質分解酶活性分測定、DNS 還原醣分析、超過濾分離

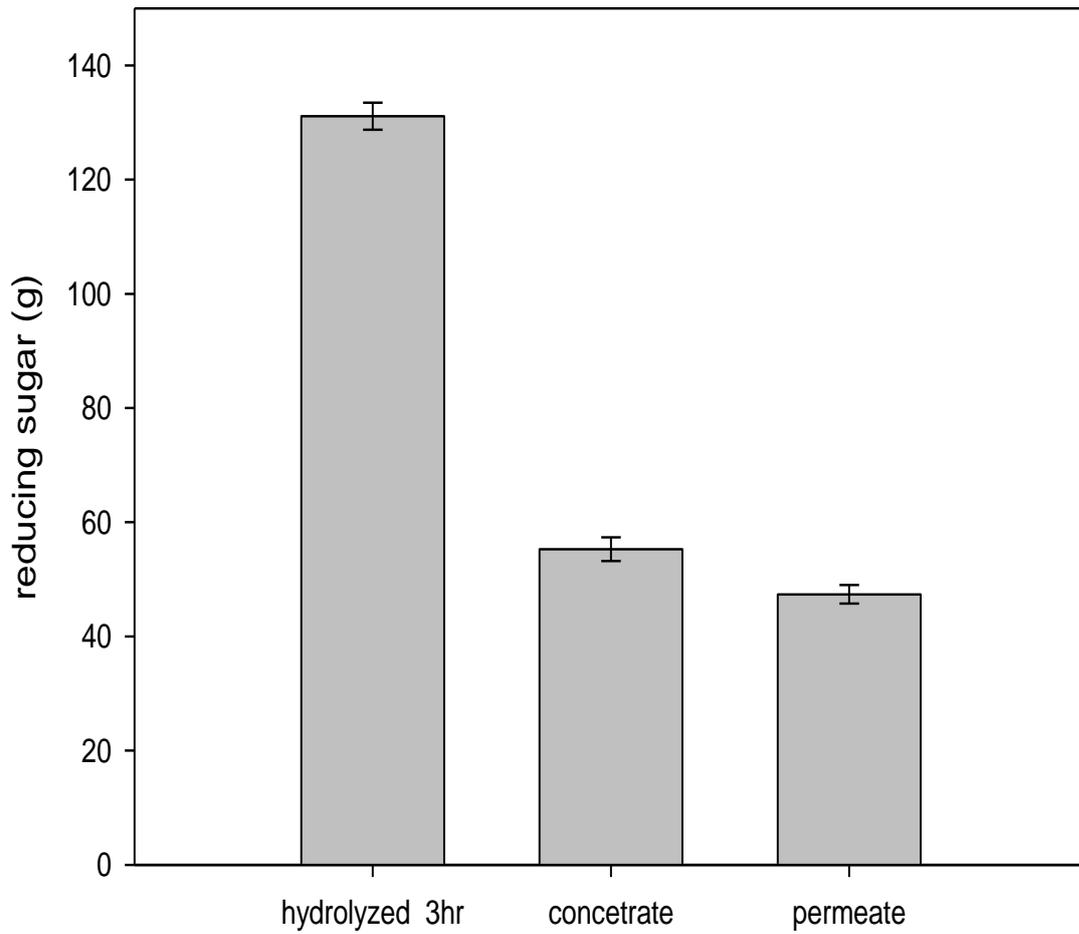


圖 4- 17 三小時水解液經超過率分離之醣量變化

實驗條件：三小時水解液、水解溫度 50°C、pH 6、5 kDa 過濾膜

實驗方法：幾丁質分解酶活性分測定、DNS 還原醣分析、超過濾分離

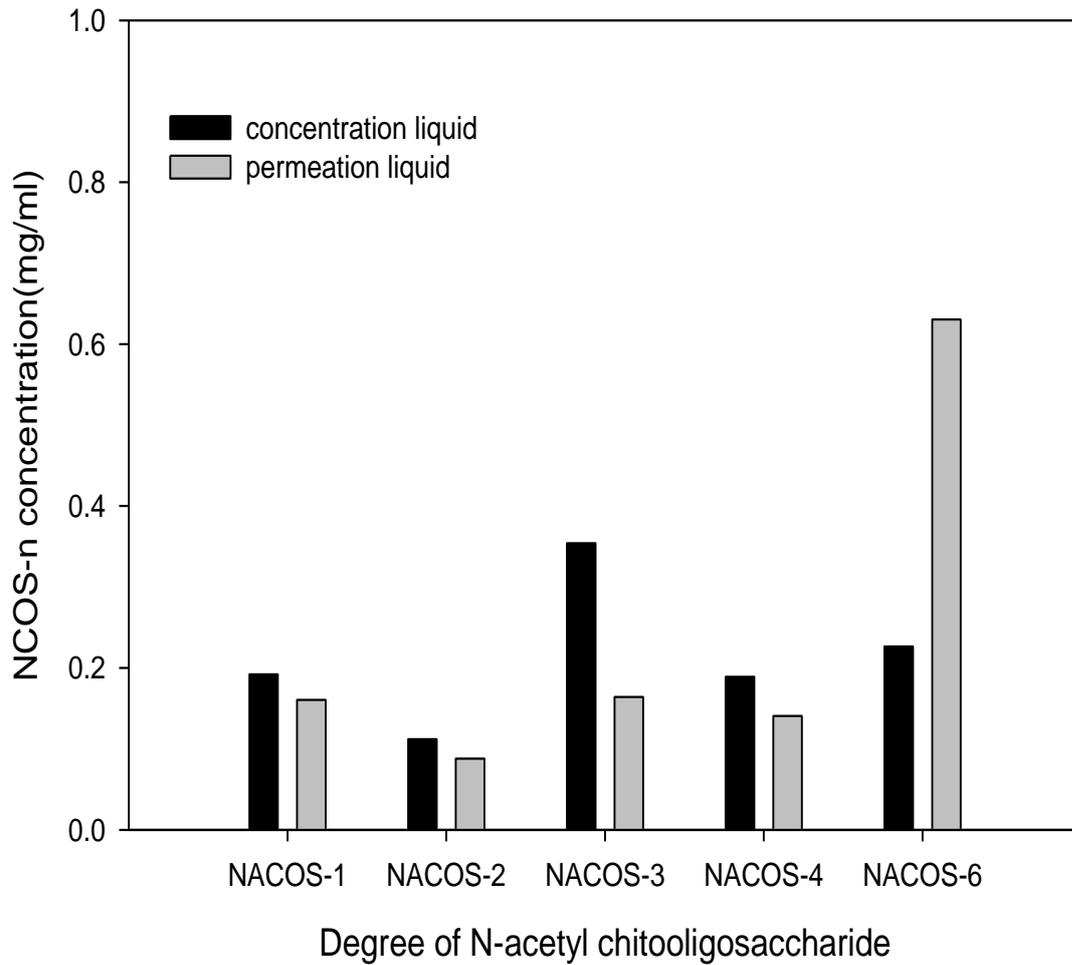


圖 4-18 兩小時水解經超過濾率分離濃縮液與透析液之幾丁寡糖含量

實驗條件：兩小時水解液、水解溫度 50°C、pH 6、5 kDa 過濾膜

實驗方法：HPLC 分析、超過濾分離

表 4-2 雞腿蘑幾丁分解酵素比活性與生產幾丁六醣之產能與文獻之比較

樣品	<i>B. cercus</i> NTU-FC-4 CBCIII enzyme (Lin et al.,2009)	兩小時水解發酵液 之透析液
比活性	129.94 U/mg	4.01 U/mg
幾丁六醣濃度	0.80 mg/ml	0.63 mg/ml

4-3-2 稀釋不同倍數濃縮端反應物對批次水解發酵液自溶影響

上述研究結果已確定稀釋樣品可提升幾丁分解酵素之效能，但無法確定多少稀釋倍數為較佳反應物濃度，因此本實驗探討反應槽樣品稀釋 30%(A 組) 與 50%(B 組)後還原醣增加量之比較。研究結果知，A 組 Run1 還原醣濃度原始為 1006.17 mg/l 經 30% 稀釋後濃度降為 704.32 mg/l，但經水解兩小時並超過濾分離透析後還原醣量為 848.45 mg/l，僅提升 144.14 mg/l(提升 20%)。而 B 組還原醣原始為 1068.61 mg/l 經 50% 稀釋後濃度降為 534.30 mg/l，但經水解兩小時後並超過濾分離透析後還原醣量為 702.13 mg/l，增加 182.83 mg/l(提升 34%)，到 Run 3 時 50% 稀釋反應物會比 30% 稀釋反應物的還原醣量高，更可確定 50% 稀釋反應物為較佳操作條件，可提升幾丁分解酵素的能(表 4-3)，故選擇 50% 稀釋反應物做為後續操作條件。

表 4-3 稀釋不同倍數濃縮端反應物對批次水解發酵液自溶影響

過濾次數	Run1	Run2	Run3
還原糖量			
A 組(30%)	1006.17 mg/l	848.45 mg/l	404.73 mg/l
B 組(50%)	1068.61 mg/l	702.13 mg/l	414.41 mg/l

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、水解兩小時、水解溫度 50°C、

pH 6、5 kDa 過濾膜

實驗方法：DNS 還原糖分析、超過濾分離

4-3-3 不同膜孔徑大小對批次分離水解發酵液自溶現象之影響

由上述研究中，已知最佳水解時間與反應物稀釋最佳倍數，因此在此階段探討不同膜孔徑度對幾丁六糖產量之影響。實驗結果發現 5 kDa 透析膜分離次數比較中，分離一次與分離兩次所得總幾丁六糖含量由 31.52 mg/50 ml 提升至 58.79 mg/50 ml(表 4-4)，而 1 kDa 透析膜分離次數比較中發現，分離一次與分離兩次所得總幾丁六糖含量由 35.19 mg/50 ml 提升至 87.82 mg/50 ml(表 4-5)。比較批次添加緩衝液系統與水解系統，5kDa 透析膜分離所得總幾丁六糖含量 58.79 mg/l 與單純水解兩小時幾丁六糖含量 41.85 mg/l(提高 41%)，若透析膜改為 1 kDa，實驗方式與工作體積皆與 5 kDa 相同，則總幾丁六糖含量為 87.28 mg/l(提高 109%)，單是透析膜孔隙度改變就提高 28.49 mg/l 幾丁六糖量，為單純水兩小時之幾丁六糖含量的 0.68 倍。

由先前研究得知，幾丁分解酵素雖然分子量小會穿透 5 kDa 與 1 kDa 之透析膜，但 1 kDa 之透析膜濃縮液所含之幾丁分解酵素量多於 5 kDa 透析膜濃縮液，因此二次水解後 1 kDa 更能有效的分解多糖產生幾丁六糖，與表 4-1 比活性最高值區間相符。另外 1 kDa 透析膜分離所生產之幾丁六糖量 87.28 mg/l 比發酵液水解四小時所產生之幾丁六糖含量 52.03 mg/l 相比提升 68%，表示此套系統有利於提升幾丁六糖之含量(表 4-6)。

表 4- 4 5 kDa 透析膜批次分離 50%稀釋水解發酵液之幾丁六糖總量

樣品	NACOS-6 總量 (mg)
透析液(1)	31.52 mg
濃縮液(2)	11.21 mg
透析液(2)	16.06mg
三種樣品總和量	58.79mg

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、水解兩小時、水解溫度 50°C、

pH 6、5 kDa 過濾膜

實驗方法：HPLC 分析、超過濾分離

表 4- 5 1 kDa 透析膜批次分離 50%稀釋之水解發酵液之幾丁六糖總量

樣品	NACOS-6 總量 (mg)
透析液(1)	35.19 mg
濃縮液(2)	20.72mg
透析液(2)	31.37 mg
三種樣品總和量	87.28 mg

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、水解兩小時、水解溫度 50°C、

pH 6、1kDa 過濾膜

實驗方法：HPLC 分析、超過濾分離

表 4-6 水解兩小時與四小時與 1 kDa 批次分離製程之幾丁六醣產量比較

樣品	NACOS-6 總量 (mg)
兩小時水解液	41.85mg
四小時水解液	52.03 mg
1 kDa 稀釋 50% 之水解發酵液兩批次分離	87.28 mg

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、水解兩與四小時、水解溫度 50°C、

pH 6、1kDa 過濾膜

實驗方法：HPLC 分析、超過濾分離

4-3-4 批次分離水解濃縮液對多醣轉化率與幾丁六醣產量影響

由先前研究得知，批式分離水解濃縮液有利提升幾丁六醣總產量，但無法得知此系統最適工作次數，因此在本實驗中進行三個批次分離工作系統，並透過分析各批次之樣品中，討論反應物(濃縮端減少量)與生成物(透析端生成量)的變化量(圖 4-19)，移除率實驗結果顯示反應物(多醣)轉變成為生成物(幾丁寡醣)的移除率在各批次差不多，得知反應環境雖然被多次稀釋，導致在後續階段雖有寡醣產生，但寡糖濃度產生量不斷在下降，但幾丁分解酵素仍保有酵素活性。又由質量守恆結果得知，1 kDa 分離膜不會造成醣的損失也不會轉換為其他物質，且在批次分離三遍後仍有反應物存在於濃縮端。又根據 HPLC 分析各批次之樣品(圖 4-20)，發現在第三個批次中幾丁六醣已不存在，推測反應時間過久導致幾丁六醣已轉變為更低聚合度之寡糖，因此若要利用此系統提升幾丁六醣的產量(圖 4-20)，僅能提供一次饋料(run 2)水解，進行到第二次饋料(run 3)水解時，多半的產物分佈在幾丁二到四醣(圖 4-21)，其中幾丁二醣與三醣含量持續增加，但幾丁一醣與四醣變化值不大。

HPLC 分析各寡糖含量並換算為總單糖量，依序為 3090 mg/l、3645 mg/l、2060 mg/l，因為超過濾分離原理是依據膜壓差，將小於膜孔徑之樣品透析分離，此原理與透析膜相似，因此膜的兩端所含之透析糖量組成比例應相差不大，而根據表 4-7 顯示出在第三次實驗中反應端之淨反應糖量為 5940 mg/l，與反應後產物之單糖量相差不遠，顯示出系統中反應端糖量大多為低聚合度寡糖，再次水解會導至幾丁六糖被二次降解，形成幾丁二糖與三糖。因此本研究所用生產幾丁六糖之製程最適工作次數為兩次，若想持續使用此製程，應修改在 run3 添加水解兩小時發酵液或膠態幾丁質提供系統反應物。

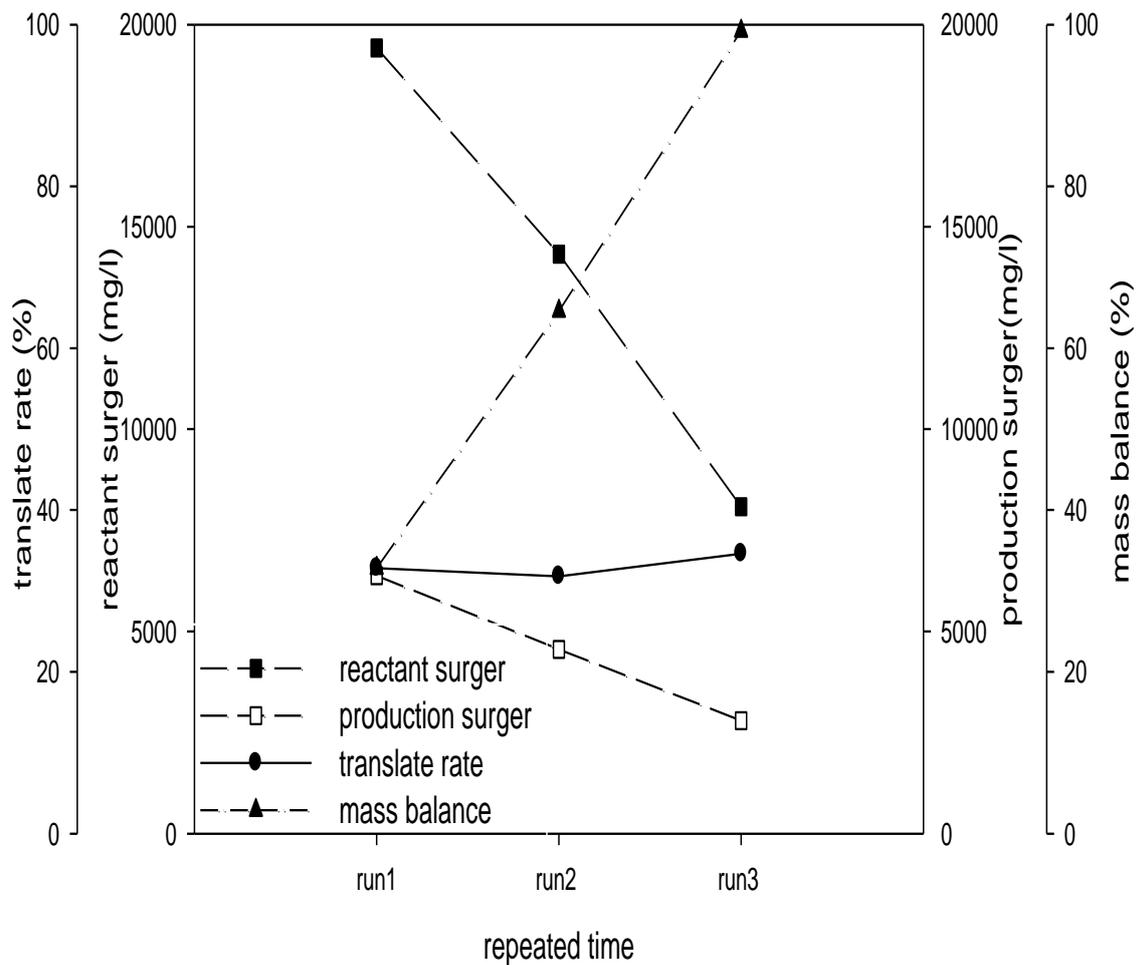


圖 4-19 批次分離水解濃縮液對多醣轉化率之影響

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、批次水解兩小時、水解溫度 50°C、
pH 6、1kDa 過濾膜

實驗方法：移除率與質量守恆分析、DNS 還原醣分析、超過濾分離

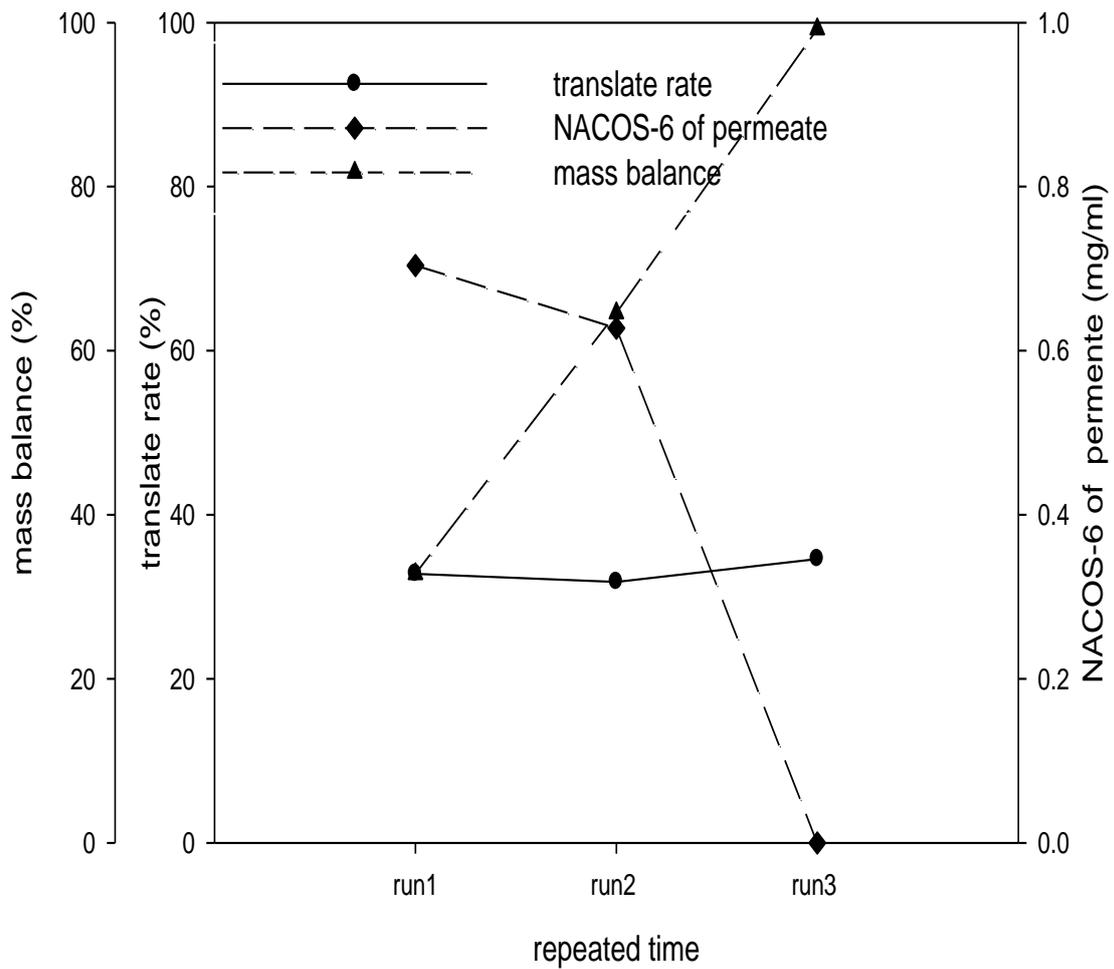


圖 4-20 批次分離水解濃縮液對幾丁六糖產量之影響

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、批次水解兩小時、水解溫度 50°C、
pH 6、1kDa 過濾膜

實驗方法：移除率與質量守恆分析、HPLC 分析、超過濾分離

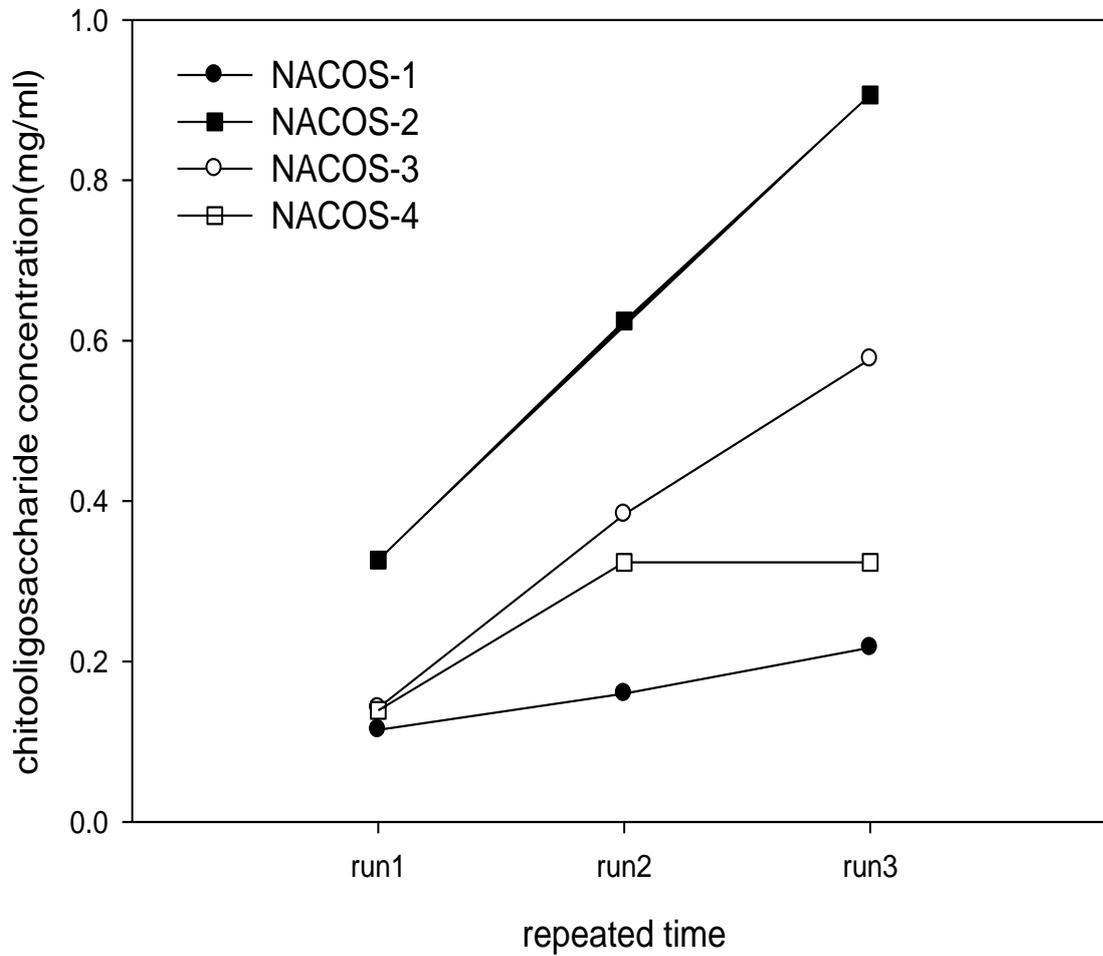


圖 4-21 批次分離水解濃縮液與水解發酵液對幾丁一至四糖產量之影響

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、批次水解兩小時、水解溫度 50°C、
pH 6、1kDa 過濾膜

實驗方法：移除率與質量守恆分析、HPLC 分析、超過濾分離

表 4-7 批次分離水解濃縮液對總反應糖之變化

	反應物單糖總量	HPLC 分析結果單糖含量	淨反應物單糖量
Run1	19400 mg/l	3090 mg/l	16310 mg/l
Run2	14300 mg/l	3645 mg/l	10655 mg/l
Run3	8000 mg/l	2060 mg/l	5940 mg/l

實驗條件：第六天發酵液、均質 10 秒、批次水解兩小時、水解溫度 50°C、

pH 6、1kDa 過濾膜

實驗方法：HPLC 分析、超過濾分離

第五章 結論與未來展望

5-1 結論

Coprinus cinereus，經液態培養在第六天得到較高酵素活性值 0.58 U，以此做為生產幾丁六醣反應系統中的分解原料，並利用水解與均質方式加強菌絲體的自溶現象提供反應系統中分解菌絲體之幾丁分解酵素，研究結果顯示發酵液經水解後幾丁分解酵素活性提高至原始 2 倍，研究證實雞腿麴菌絲體可以藉由內、外在因素(水解、均質)的改變促使酵素活性的提升效果。

當系統還原醣濃度達 1300 mg/l 會抑制幾丁分解酵素效能，此時會出現合成酵素之作用，將系統中的還原醣聚合，但幾丁合成酵素經超過濾分離分析結果顯示可保留於 5 kDa 濃縮端，而幾丁分解酵素在 5 kDa~1 kDa 濃縮端比活性值最高。

對半稀釋反應物重複水解並利用超過濾 1 kDa 膜分離總幾丁六醣量由水解兩小時 41.85 mg 提升至 87.28mg，增加 109%，研究結果證明此系統有效提升幾丁六醣產量。

5-2 未來展望

本研究主要針對幾丁六醣製程開發，對雞腿蘑所含酵素種類與反應機制探討不多，期望後續研究可著重於酵素純化與動力學探討，以利提升幾丁六醣產量。另外在本研究所開發之幾丁六醣製程部分，發現單一批次發酵液產能有提升，且酵素活性並未消失但反應端的聚醣多半被降解為低聚合度寡醣，期望可討論添加不同反應物至系統中，對後續幾丁六醣產量之影響或拉長製程之水解時間以便幾丁分解酵素之生成。最後因為幾丁六醣為目前抗癌藥品之成分之一，因此希望研究可延伸至細胞培養實驗，找出各類惡性腫瘤之抑制效果，並探討其機制。

参考文献

Aiba S.,(1992). Studies on Chitosan: Lysozymic Hydrolysis of Partially N-acetylated Chitosans, International Journal of Biological Macromolecules 4 : 225- 228.

Aiba S. and Muraki E.,(1999) Preparation of Higher N-Acetylchitooligosaccharides in High Yields. In Advance in Chitin Science, Rita Advertising Company Limited : 89-96.

Anthoy L. A., Ayako T. and Takahiro k., (1996). Spectral sensitivity of chitosan photodegradation , Journal of applied Polymer Science 52: 1465-1476.

Bradford, (1976).A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72 : 248-254.

Breborowicz A., Tobis K. W., Kuzlan M., Kupsz J., Korybalska K. and Polubinska A., (1997). N-Acetylglucosamine: a new osmotic solute in peritoneal dialysis solutions, Perit Dial Internal 17 : 80-83.

Bush D., (1974). Autolysis of *Coprinus comatus* sporophore. Experimental : 984-985.

Cantarella L. Z., Nikolov L. P. and Reilly J., (1994). Disaccharide production by glucoamylase in aqueous ether mixtures. *Enzyme Microbiology technology* 16 : 383-387.

Chang K., Tai M. C. and Cheng F. H. (2001). Kinetics and products of the degradation of chitosan by hydrogen peroxide , *Journal Agricultural Food Chemistry* 10 : 4845 - 4851.

Chen J. P. and Lee M. S., (1995). Enhanced production of *Serratia marcescens* chitinase in PEG/dextran aqueous two-phase systems, *Enzyme and Microbiology Technology* 17 : 1021-1027.

Choi W. S., Ahn K. J., Lee D. W., Byun M. W. and Park H. J. , (2002). Preparation of chitosan oligomers by irradiation, *Polymer Degradation and Stability* 78 :533-538.

Davis B. and Eveleigh D. E., (1984). Chitosanases: occurrence, production and immobilization. In *Chitin, Chitosan and Related Enzymes* : 161-179

Dumas-Gaudot, Grenier J., Furlan V. and Asselin A. E., (1992). chitosanase and β -1, 3 glucanase activities in *Allium* and *Pisum* roots colonized by *Glomus* species , *Plant Science* 84 : 17-24.

Fukamizo T. and Kramer K. J., (1985). Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect moulting fluid , *Insect Biochem* 15 : 141 - 145.

Gail L., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.

Analytical Chemistry 3 : 426–428.

Jeon Y. J. and Kim S. K., (2000 a). Production of chitooligosacchases using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. Carbohydrate Polymers 41 : 133-141.

Jeon Y. J. and Kim S. K., (2000b). Continuous production of chitooligosacchases using a dual reactor system. Process Biochemistry 35 : 623-632.

Jeon Y. J., Shahidi F. and Kim S. K. , (2000). Preparation of chitin and chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods, Food Reviews Internal 16 : 159-176.

Kramer K. J. and Koga D. , (1986). Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation : 851 – 877.

Kao P. M., Huang S. C., Chang Y. C. and Liu Y. C., (2007). Development of continuous chitinase production process in a membrane bioreactor by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. Process Biochemistry 42 : 606-611.

Lin Y. W., Hsiao Y. C. and Chiang B. H., (2009). Production of high degree polymerized chitooligosaccharides in a membrane reactor using purified chitosanase from *Bacillus cereus*. Food Research International 42 : 1355-1361.

Marguerite R., (2006). Chitin and chitosan: Properties and application, Programe Polymer Science 31 : 603-632.

Mommsen P. T., (1980). Chitinase and β -N-acetylglucosaminidase from the digestive fluid of the spider , *Cupiennius salei*., Biochem. Biophys , Acta Polymerica 612 : 361-372.

Muzzarelli R. (1977). Enzymatic synthesis of chitin and chitosan, Occurrence of chitin, In Chitin. Pregamon Press : 5-17

Osswald W. F., Shapiro J. P., McDonald R. E., Niedz R. P. and Mayer, R. T. (1993) Some citrus chitinases also possess chitosanase activities, Cellular and Molecular Life Sciences 49 : 888-892.

Ouakfaoui S. E. and Asselin A. (1992a) Diversity of chitosanase activity in cucumber. Plant Science 85 : 33-41.

Ouakfaoui S. E. and Asselin A., (1992b) Multiple forms of chitosanase activities, Pregamon Press Phytochemistry 31 : 1513-1518.

Patil R.S., Ghormade V. and Deshpande M.V., (2000). Chitinolytic enzymes : an exploration, Enzyme Microbiology Technology 26 : 473-483.

Paul G. C. and Thomas C. R., (1996). A structured model for hyphal differentiation and Penicillin production using *Penicillium chrysogenum*, *Biotechnology and Bioengineering* 51 : 558-572.

Steinmetz K. A. and Potter J. D., (1991). Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms, *Cancer Causes and Control* 2 : 325-357.

Tokoro A., Kobayashi M. and Tatewaki N., (1989). Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice, *Microbiology Immunologic* 33 : 357-368.

Usui T, Matsui H. and Lsohe K. (1990). Enzymic synthesis of useful chitooligosaccharides utilizing transglycation by chitolytic enzyme in a buffer containing ammonium sulfate. *Carbohydrate Polymers Research* 203 : 65-68.

White S., Berry, D. R., McNeil B. and McIntyre M., (2002). The autolysis of industrial filamentous fungi, *Critical Reviews in Biotechnology* 22 : 1-14.

Wirth S. J. and Wolf G. A., (1990). Dye-labeled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *Journal of Microbiological Methods* 12 : 197-205.

Yalpani M. and Pantaleone O., (1994). An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Polymers Researc* 256 : 159-175.

Zhang H., Du Y., Yu X. and Mitsutomi M., (1999). Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme , *Carbohydrate Polymers Research* 3 : 257-260.

王偉，秦汶.(1989). 脫乙酰基甲殼素的超聲波降解。化學通報 9， 41-44。

王應然.(2004).真菌幾丁寡糖之抑癌潛能評估與機轉之探討.國立成功大學環境醫學研究所碩士論文。

吳豐智，曾如玲.(1997).神奇的物質幾丁質與幾丁聚醣.化工技術.第五卷 7， 196-201。

林佳妘，林睿哲.(2005).幾丁質與幾丁聚醣於生醫材料之應用與特性.化工技術.第 10 卷 3， 228-237。

李詩鵬、蘇蕾.(2000). 雞腿菇多糖的提取及其免疫活性抗腫瘤活性的研究， 中國商辦工業 1， 44-45。

馬榮村.(1999). 10-氧-反-烯酸(ODA)對食藥用菇類菌絲生長之影響,國立中興大學食品科學系碩士論文。

馬鎬，吳元華，趙秀香.(2007). 殼寡糖的制備、分離分析方法及在農業上的應用，

現代農藥 6，20-22。

張淑芬.(2001). 食藥用菇類搖瓶液體培養條件之探討，食品工業，第 33 卷(7)，56-60。

張東柱，周文能.(2005).野菇入門.遠流出版社。

張雅敏.(2002). 黑豆種子幾丁質之純化與性質研究.私立靜宜大學食品營養學系碩士論文。

陳澄河.(2003). 蝦蟹殼傳奇，科學發展 369 期，62-67。

陳啟倫.(2006).Coprinus cinereus 真菌菌絲體自溶現象之探討.私立東海大學化學工程研究所碩士論文。

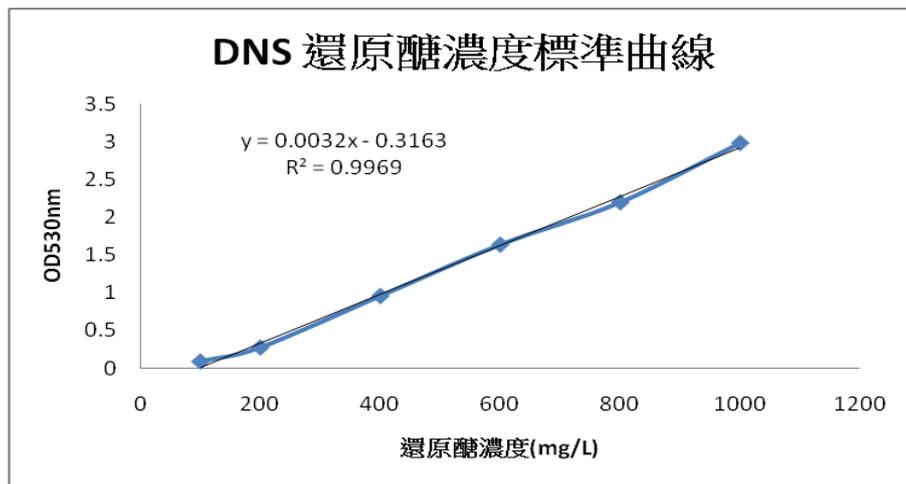
許智強.(2006). 利用可逆溶解型擔體於*Bacillus* sp.所生產幾丁質酶及蛋白酶之固定化研究.私立大葉大學生物產業科技學系碩士班。

高博敏.(2002). 蠟蚧輪枝菌液態發酵生產幾丁質分解酵素之研究.朝陽科技大學應用化學系碩士論文。

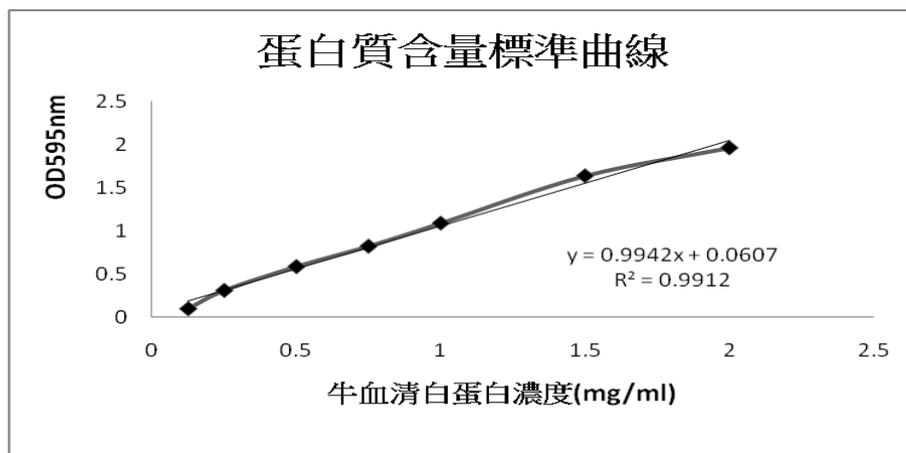
附錄

附錄表 1. 1% Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution 配方

藥品	克數
Dinitrosalicylic acid	10 g
Phenal	2 g
Sodium sulfite	0.5 g
Sodium hydroxide	10 g
water	1 L



附錄圖 1. N-乙醯葡萄糖胺還原糖濃度標準曲線



附錄圖 2.牛血清蛋白標準曲線