

# 利用混合酸製備 N-乙醯幾丁寡醣之探討

駱錫能<sup>1\*</sup> 陳翠瑤<sup>2</sup> 邱群惠<sup>3</sup> 古遠丰<sup>3</sup> 曾欽盟<sup>3</sup> 黃家駿<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 國立宜蘭技術學院食品科學系教授

<sup>2</sup> 國立宜蘭技術學院食品科學系講師

<sup>3</sup> 國立宜蘭技術學院食品科學系

## 摘要

本研究主要探討以三氟醋酸和甲酸的混合液水解幾丁聚醣產生 N-乙醯幾丁寡醣的條件，同時評估其高效液相層析的分離條件及抑菌作用。利用高效液相層析儀可以在 38 min 內完整分析定量聚合度為 1-6 的 N-乙醯幾丁寡醣，滯留時間(retention time)的對數值與 N-乙醯幾丁寡醣的聚合度(DPs)呈線性正相關。在不同的溫度下以三氟醋酸和甲酸的 1:1 混合液水解幾丁聚醣的結果顯示，各溫度下水解反應的主要產物為幾丁五糖，隨著水解時間的延長 N-乙醯葡萄糖胺、幾丁五糖和總水解率(即聚合度 1-6 的幾丁寡醣總生成率)均會增加，但是在 80、90 和 100°C 水解 90、60 和 20 min 後幾丁五糖的含量明顯下降，太長的水解時間會導致幾丁五糖的降解;在 70°C 水解時無法產生幾丁六糖，水解 300 min 後可得 41.0%的總水解率，80°C 水解時僅有部分微量幾丁六糖，水解 120 min 之總水解率可達 38.3%，90°C 水解可產生較多量的幾丁六糖，水解 60 min 總水解率達 54.5%，並且產生 3.5%的幾丁六糖，100°C 水解時幾丁六糖含量則大幅減少，水解 20 min 可得 38.8%的總水解率，綜合觀之，提高溫度會縮短到達最高水解率的作用時間，但是超過 100°C 時總水解率和幾丁六糖並無法提高，可能高溫導致裂解所致，本實驗中的最佳水解條件應為 90°C 下水解 60 min。經抑菌環初步試驗，水解液對大腸桿菌和金黃葡萄球菌具有抑菌作用。

**關鍵詞:** 幾丁聚醣、N-乙醯幾丁寡醣、混合酸水解、高效液相層析、抑菌作用

## Approach with an Acid Mixture for Preparation of N-acetylchitooligosaccharides

Shyi-Neng Lou<sup>1\*</sup> Tsui-Yao Chen<sup>2</sup> Chun-Hui Chiu<sup>3</sup> Yuan-Feng Ku<sup>3</sup>  
Chin-Meng Tseng<sup>3</sup> and Chia-Chun Huang<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Professor of National Ilan Institute of Technology, Department of Food Science

<sup>2</sup>Instructor of National Ilan Institute of Technology, Department of Food Science

## Abstract

The purpose of this study was to investigate the optimal condition to prepare N-acetylchitooligosaccharides from chitosan by an acid mixture of trifluoroacetic acid and formic acid. In the meanwhile, analytic method based on HPLC and the effect of microbial inhibition were also studied. N-acetylchitooligosaccharides with DPs=1-6 could be differentiated by an established HPLC method within 38 min. The logarithm of the retention time correlated linearly with DPs of N-acetylchitooligosaccharides. Hydrolysis of chitosan by trifluoroacetic acid and formic acid (1/1:v/v) mixture were carried out at different temperatures for vary time duration. The data showed that the content of (GlcNAc)<sub>5</sub> dominated in any hydrolytic conditions. The yield of N-acetylglucosamine(GlcNAc)<sub>1</sub>, (GlcNAc)<sub>5</sub> and (GlcNAc)<sub>1-6</sub> increased for increasing hydrolytic time duration. However, the (GlcNAc)<sub>5</sub> level dramatically decreased after hydrolysis at 80、90 and 100°C for 90、60 and 20 min, respectively. These suggested that long time hydrolysis might lead to the loss of (GlcNAc)<sub>5</sub>. The yield of (GlcNAc)<sub>1-6</sub> was 41.0%, obtained at 70°C for 300 min, but no (GlcNAc)<sub>6</sub> occurred. 38.3% of total (GlcNAc)<sub>1-6</sub> was found at 80°C for 120 min with only minor amount of (GlcNAc)<sub>6</sub>. Hydrolyzing at 90°C for 60 min, 54.5% of (GlcNAc)<sub>1-6</sub>, the highest yield, was obtained, and the highest level of (GlcNAc)<sub>6</sub> was 3.5% among the processes. The yield of (GlcNAc)<sub>1-6</sub> was 38.8% obtained at 100°C for 20 min. The content of (GlcNAc)<sub>6</sub> was lower than that at 90°C. Collectively, these data indicated that an increasing hydrolysis temperature could cause a decreasing time duration, to which the highest yield of (GlcNAc)<sub>6</sub> was obtained. However, the fact that the yield of (GlcNAc)<sub>1-6</sub> and the amount of (GlcNAc)<sub>6</sub> hydrolyzed at 100°C could not be increased, presumably due to the high temperature effect on degradation of N-acetylchitooligosaccharides. We concluded that the optimal hydrolysis condition was at 90°C for 60 min in this study. A simple inhibition ring test was carried out to evaluate the microbial inhibition effect of the hydrolysis product. The results showed that the hydrolysis product at 90°C for 60 min could inhibit the growth of *E. coli* and *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** Chitosan, N-acetylchitooligosaccharides, hydrolysis by acid mixture, HPLC, Microbial Inhibition

## 一、前言

幾丁質(chitin)經去乙酰化即可得幾丁聚醣(chitosan)，幾丁聚醣及其水解產物(如:N-乙酰幾丁六糖)具有多種生理活性功能，包括有增強免疫能力[1,2,3]，抗腫瘤[4,5]、降低膽固醇與血脂肪[6,7]和抗菌性[8,9]等，可利用為化妝品和健康食品等之天然素材[10]。但是幾丁聚醣在食品的應用仍有相當之限制，主要在於其分子量大，不溶於水，僅溶於部分有機酸中，且具高黏度及澀味[11]，因此如能製備成較低分子量之水溶性幾丁寡醣，將可有效的提高其利用價值，這也是許多研究的主要目標[10,12-18]。

幾丁寡醣的製備一般有酵素法、微生物法和化學法等三類[10]，酵素法一般選擇性高，不同生物來源的幾丁質酶有不同的水解特性，須經過長時的測試和純化後才可應用，且經濟成本高[16,18]，微生物法製備幾丁寡醣須考慮安全問題且作用時間較長[16]，化學法最常被應用的是鹽酸水解法，此法無選擇性，雖然處理後酸的分離和脫鹽較為困擾，但是其法操作較簡便經濟成本低，因而仍是應用最多的方法 [12-14]，其他的酸被應用的情形則較少。幾乎所有上述方法均相同地，只能產製較低聚合度(DPs<6)的幾丁寡醣。三氟醋酸和甲酸的 1:1 混合液被用來水解核酸物質的醣苷鍵(N-glycoside)已有良好的效果[19,20]，並且曾被應用於分解膳食纖維素的β-glucoside 鍵結，作為分析膳食纖維的方法已有報告[21]。三氟醋酸和甲酸的 1:1 混合液具有快速水解而且可利用減壓濃縮脫除作用後殘存酸溶液的優點，目前尚無應用於水解幾丁質或幾丁聚醣的研究，因此，本實驗嘗試以三氟醋酸和甲酸的混合液水解幾丁聚醣產

生幾丁寡醣，在不同的溫度和作用時間下分解幾丁聚醣，評估其幾丁寡醣的分布和產量，期能尋求最適的水解條件，同時改善 HPLC 的分析方法和初步評估所得水解液的抑菌作用，以提供將來加工利用的參考。

## 二、材料與方法

### (一)材料

以蝦蟹殼原料製備所得之幾丁聚醣獲取自海洋大學食品科學系，標準醣類有 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, (GlcNAc)<sub>1</sub>)，幾丁二糖 (N-acetylchitobiose, (GlcNAc)<sub>2</sub>)，幾丁三糖 (N-acetylchitotriose, (GlcNAc)<sub>3</sub>)，幾丁四糖 (N-acetylchitotetraose, (GlcNAc)<sub>4</sub>)，幾丁五糖 (N-acetylchitopentaose, (GlcNAc)<sub>5</sub>) 和幾丁六糖 (N-acetylchitohexaose, (GlcNAc)<sub>6</sub>) 等，均購自美國 Sigma 公司。三氟醋酸和甲酸為 Riedel-de haen GR 級試藥，氘甲烷等其他試藥為 Merck 公司 GR 級。

### (二)實驗方法

#### 1.HPLC 層析方法

參考張等[14]的方法並作部分修飾，製備含有六種幾丁寡醣的混合標準溶液，分別為濃度 2000 ppm 的 (GlcNAc)<sub>n</sub>，n = 1-6，以下列兩種層析管柱進行分析，層析管柱一 (Column 1) 為 LiChrospher 100 NH<sub>2</sub>，5 μm，4.6 × 250 mm (Merck, Germany)，層析管柱二 (Column 2) 為 Hypersil APS2，5 μm，4.6 × 250 mm (Thermohypersil, UK)。其他分析條件如下：

HPLC 採用 Shimadzu LC-10 AT Pump Gradient system

移動相: 氘甲烷:水 = 75:25

流 速: 1.0 mL/min

檢測器: Shimadzu M6A Photodiodearray, UV=205 nm

注射量: 20 μL

#### 2.不同溫度與時間下混合酸溶液水解幾丁聚醣

參考 Lou[19,20]水解嘌呤物質的方法並作部分的修飾，精稱 0.1 g 幾丁聚醣細末於有蓋螺旋試管中，加入三氟醋酸:甲酸:水 = 5:5:1 (v/v/v) 的混合酸溶液 3mL，經混合均勻後，分別置於 70、80、90 和 100°C 的恆溫水槽中，依照不同溫度條件分別加熱作用 10、20、30、60、90、100、120、180、240 或 300 分鐘不等，水解液倒入 250 mL 圓底燒瓶中，於減壓濃縮機 50°C 下濃縮至乾，再加入少許去離子水，重複減壓濃縮步驟三次，到完全無酸味為止，在加入 5 mL 去離子水於超音波震盪器震盪 3 min，溶出已水解產生的幾丁寡醣，經 0.2 μm 的 cellulose acetate 過濾膜過濾後，以前述 HPLC 分析方法分析水解液中幾丁寡醣的分布及其含量。由檢液所得的波峰面積與標準試劑所得的波峰面積比值，換算出幾丁寡醣的含量。

#### 3.抑菌環試驗

取大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 和金黃葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 菌液於洋菜培養基 (nutrient broth agar) 作傾注平板，再貼上直徑 4 mm 的 Whatman 1 號濾紙，濾紙事先用 90°C 作用 30 min 的水解液和 90°C 作用 60 min 的水解液浸潤後貼於含菌的平板培養基上，在 37°C 下培養 24 hr 後量測抑菌環直徑大小，作為抑菌效果的判定指標，另外以去離子水取代水解液作為對照組。

## 三、結果與討論

### (一) 幾丁寡醣的 HPLC 分析

圖一為 N-乙醯葡萄糖胺和幾丁二糖至六糖等六種標準試劑的 HPLC 層析圖，六種幾丁寡醣在 38 min 內可以完全被分離，其析出順序依序為乙醯葡萄糖胺、幾丁二糖、幾丁三糖、幾丁四糖、幾丁五糖和幾丁六糖，顯然其滯留時間會隨著幾丁寡醣聚合度(degree of polymerizations, DPs)的增加而增加，而且分析波峰滯留時間的對數值和其聚合度大小恰成直線關係式(圖二)，使用 LiChrospher 100 NH<sub>2</sub> (column 1)和 Hpersil APS2(column 2) 兩種管柱皆有相似的直線關係，以 LiChrospher 100 NH<sub>2</sub> 分析時幾丁六糖的析出時間約需 40.2 min，其直線式為  $\log(\text{retention time}) = 0.1795(\text{DPs}) + 0.5077$ ，相關係數  $r = 0.9975$ ，張等[14]也有相似的研究結果，並提出可利用外插法來預估或判定幾丁七糖至幾丁十糖的析出時間。不過本實驗分析時發現管柱會持續的變化，其分析容量因子(capacity factor)逐漸下降，因而造成各幾丁寡醣滯留時間的減少，此現象 Ohtakara and Mitsutomi [22]也有相同的發現，顯示此一直線關係式並不穩定，在分析的定性判定或是預估造成諸多困擾。因此實驗測試以 Hypersil APS2 進行分析，幾丁六糖的析出時間約為 36.1 min，較以 LiChrospher 100 NH<sub>2</sub> 管柱的析出時間稍快，其直線式為  $\log(\text{retention time}) = 0.1738(\text{DPs}) + 0.4953$ ，相關係數  $r = 0.9969$ ，此分析方法較為穩定，並無滯留時間減小的現象，因此實驗以此法進行分析探討幾丁寡醣的變化，分析圖中(GlcNAc)<sub>1-6</sub> 的容量因子依序分別為 1.15、1.99、3.32、5.51、9.07 和 14.73，一般容量因子界於 1-5 之間最為恰當，其中幾丁五、六糖的容量因子較大分析效能稍差，仍可進一步的研究改善。

## (二)不同水解條件對幾丁寡醣產量的影響

### 1. 70°C水解不同時間

表一為 70°C 下幾丁聚醣水解 100 – 300 min 之幾丁寡醣含量分布，乙醯葡萄糖胺的產量隨水解時間的延長而增加，幾丁二、三和四糖的含量變化則較不規則，幾丁五糖的含量也是明顯的隨水解時間的延長而升高，在 240 min 後大致維持在每 100 g 可產生 16 g，而幾丁六糖則均未檢出，總水解率在 180 min 前維持在 16-19%，在 240 min 時達 28.8%，而在 300 min 後達最高的水解率 41.0%。這些結果顯示，在 70°C 下水解時間愈久，其總水解率大致會愈高，其主要產物為幾丁五糖，但是並無法產生幾丁六糖，這種僅產生較小分子幾丁寡醣的現象可能是酸無法進入幾丁聚醣的主要鏈中作用所致，或許是與其結晶的架構有關[13,14]。而 N-乙醯葡萄糖胺的含量一直上升，推測其除了來自較大分子的水解外，其他已產生的幾丁寡醣也有部分被水解，因此造成變化較不規則的現象。

### 2. 80°C水解不同時間

在 80°C 下分別水解幾丁聚醣 30、60、90 和 120 min 後，結果與在 70°C 下水解相似，N-乙醯葡萄糖胺的含量與水解時間成正比(表二)，但是在 120 min 即可得 10.3 g N-乙醯葡萄糖胺，約為 70°C 水解 240 min 時的兩倍，幾丁二、三和四糖的含量也有相同的變化，幾丁五糖隨水解時間的增長而增加至 90 min 後，在 120 min 時又下降，幾丁六糖在水解過程中於 30 和 90 min 時有微量被發現，總水解率隨時間的延長而增加，從 30 min 的 15.1 % 提高到 120 min 的 38.3%。整體而言，提高水解溫度，可有效縮短水解時間，主要水解產物仍為幾丁五糖，且可能促進幾丁六糖的產生，但是當水解時間過長超過 90 min 時，可能導致幾丁五糖的持續降解，同時小於幾丁五糖的其他醣類均有明顯的增加，此時主要產物變成 N-乙醯葡萄糖胺，顯示欲獲得較大分子的幾丁寡醣可能以高溫短時間的水解較為有利，陳等[16]在鹽酸水解幾丁質的研究中也有相似的結果，或許是高溫影響幾丁質的構形促進酸的作用所致。

### 3. 90°C水解不同時間

提高水解溫度達 90°C 針對幾丁聚醣水解 10、20、30、60 和 90 min 後觀察其產生幾丁寡醣的變化(表三)，發現 N-乙醯葡萄糖胺和幾丁二、三和四糖的含量均隨時間而升高，同樣時間均比 80°C 時高出許多倍，幾丁五糖的含量變化與在 80°C 時相似，先上升於水解超過 60min 時再下降，總水解率變化與幾丁五糖類似，由 10 min 的 21.8% 上升到 60 min 的 54.5%，再下降為 90 min 的 52.5%，幾丁六糖含量明顯高於 70°C 和 80°C 的水解產物，約界於 2.0-3.5 g 間，以在水解 60 和 90 min 時為最高。在 90°C 下水解，顯然因為溫度的效應因而可以產製幾丁六糖產物，但是其影響效應並不大，故而產率並不高，相同地，在 60 min 水解時間內幾丁五糖仍為主要產物，水解 90 min 時主要產物轉變為 N-乙醯葡萄糖胺，顯示降解幾丁五糖的轉折時間隨溫度的升高而縮短。綜合觀之，在 90°C 下水解 60 min 可得 54.5%

的水解率，其幾丁五糖和六糖的含量也最高。

#### 4. 100°C下水解不同時間

在 100°C 下水解幾丁聚醣 10、20、30 和 90 min 的結果如表四，N-乙醯葡萄糖胺的含量明顯隨時間而增加，幾丁二、三和四糖的含量較低，且變化較無規律性，幾丁五糖的含量由 10 min 的 10.0 g 升高到 20 min 的 16.7 g，隨後持續下降到 60 min 的 3.9 g，幾丁六糖的含量僅有 0.5 g 以下，總水解率的變化與幾丁五糖相同，呈先上升再下降的趨勢。相同地，幾丁五糖降解時間縮短為 30 min，水解 20 min 以內主要產物為幾丁五糖，超過 30 min 後主要產物轉為 N-乙醯葡萄糖胺，顯示幾丁五糖在 100°C 下水解 30 min 即會大量降解，主要降解為 N-乙醯葡萄糖胺，溫度效應雖可促進幾丁六糖的產生，但是可能由於 100°C 的條件下溫度過高，致使幾丁六糖也部分降解，因而其含量較 90°C 水解低，觀察總水解率發現，水解 10 和 20 min 後其水解率達 26.4% 和 38.8%，皆比 90°C 同時間水解率稍高，但是已經不像 70°C-90°C 之間，溫度升高其水解率倍數增加的現象，顯然在 100°C 的高溫下水解幾丁聚醣除了幾丁五糖溶液降解外，N-乙醯葡萄糖胺也有破壞減少的現象產生，這種情形在延長水解時間到 30 min 以上更為明顯，水解率更比 90°C 同時間水解率低，可能在高溫及強酸的條件下，N-乙醯葡萄糖胺經過連續的脫水裂解產生呋喃醛(furfural)或羧甲基呋喃醛(hydroxyl methyl furfural)，因而造成含量降低[23]。超過 100°C 的高溫水解顯然較不適合幾丁寡醣的製備。

綜合上述，以三氟醋酸和甲酸混合液在 90°C 下作用 60 min 水解幾丁聚醣可得最高的水解率，且其幾丁五糖和六糖的含量高，超過 100°C 水解率反而下降，低於 80°C 水解需要較長時間以提高水解率，但是並無法產生幾丁六糖的產物。

### (三)抑菌作用

為初步了解幾丁聚醣水解液的抑菌效果，使用在 90°C 下作用 30 min 和 60 min 的幾丁聚醣水解液對大腸桿菌(*E. coli*) 和金黃葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作抑菌環試驗，結果顯示，水解 30 min 的產物對 *E. coli* 和 *Staphylococcus aureus* 的抑菌環分別達 15.6±5.4 mm 和 13.2±4.3 mm，水解 60 min 的產物則分別為 15.3±2.2 mm 和 13.2±4.6 mm，水解液不論是對 G(-)的大腸桿菌或是對 G(+)的金黃葡萄球菌均有明顯的抑制作用，阮等[17]也有相似的研究結果，研究報告指出，幾丁聚醣帶有多價正電荷，會與細菌表面的負電荷作用導致細胞壁的通透性改變，細胞內的蛋白質、酵素或核苷酸等可能外洩因而死滅[24]。初步確認此條件下的水解產物具有應用於加工產品抑菌作用的潛力，惟仍有待進一步的深入研究評估。

## 四、結論

幾丁寡醣可以 HPLC 分離定量，其滯留時間的對數值和寡醣的聚合度呈現一次線性關係，可用為預測寡醣的滯留時間協助定性鑑定。幾丁聚醣的最適水解條件為 90°C 水解 60 min，此時總水解率和幾丁五、六糖的含量最高，此水解液具抑菌作用，或可為加工進一步利用之。

## 五、謝誌

本研究承蒙行政院國家科學委員會補助經費，計劃編號: NSC 90-2815-C-197-007-B，特申謝忱。本系黃俊儒和林世斌老師協助樣品取得和提供寶貴意見，謹此一並申謝。

## 六、參考文獻

1. Suzuki, S., Okawa, Y., Okura, Y., Hashimoto, K. and Suzuki, M. (1982) Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan. In "Chitin and Chitosan" Proceeding of the Second International Conference on Chitin and Chitosan, eds. Hirano, S. and Tokura, S. Sapporo, Japan. P.210. Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori Univ., Tottori, Japan.
2. Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1984) Protecting effect of chitin and chitosan. On experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.* 28: 903-912.
3. 許美芳 (1996), 「N-乙酰幾丁六醣之免疫效果」, 食品工業, 第二十八卷, 第十期, 第 38-44 頁。
4. Suzuki, K., Midami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1986) Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.* 151: 403-408.
5. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1988) Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 784-790.
6. Maezki, Y., Tsuji, K., Nakagawa, Y., Kawai, Y., Akimoto, M., Tsugita, T., Takekawa, W., Terada, A., Hara, H. and Mitsuoka, T. (1993) Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult males. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1439-1444.
7. Miura, T., Usami, M., Tsuura, Y., Ishida, H. and Seino, Y. (1995) Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 1623-1625.
8. Tsai, G. J., Wu, Z. Y. and Su, W. H. (2000) Antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J. Food Prot.* 63: 747-752.
9. 蔡政芳、林文源、李錦楓 (1993), 「不同去乙酰度幾丁聚醣的抑菌作用及其澀味」, 中華生質能源學會會誌, 第十二卷, 第二期, 第 74-88 頁。
10. 陳榮輝 (2001), 「幾丁質、幾丁聚醣的生產製造、檢測與應用」, 科學發展月刊, 第二十九卷, 第十期, 第 776-787 頁。
11. 陳美惠、莊淑惠、吳志律 (1999) 「幾丁聚醣的物化特性」, 食品工業, 第三十一卷, 第十期, 第 1-6 頁。
12. Capon, B. and Foster, R. L. (1970) The preparation of chitin oligosaccharide. *J. Chem. Soc.* 6: 1654-1655.
13. Rupley, J. A. (1964) The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 83: 245-255.
14. Chang, B. K. L., Lee, J. and Fu, W. R. (2000) HPLC analysis of N-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *J. Food Drug Anal.* 8: 75-83.
15. Cheng, C. Y. and Li, Y. K. (2000) An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 32: 197-203.
16. 陳坤上、黃珮芬、陳聰松、陳幸臣 (1996), 「幾丁寡醣製備條件之探討」, 食品科學, 第二十三卷, 第六期, 第 874-883 頁。
17. 阮進惠、林翰良、羅淑珍 (1997), 「幾丁聚醣水解物之連續式生產及其抑菌作用」, 食品科學, 第三十五卷, 第六期, 第 596-611 頁。
18. 廖玉滿、李蘇珍、江翠蓮、張珍田 (2000), 「豬胃及枯草菌蛋白酶粗製品水解幾丁聚醣之研究」, 農化與食科, 第三十八卷, 第三期, 第 239-247 頁。
19. Lou, S. N. and Montag, A. (1994) Change in the nucleostatus of mushrooms during storage and thermal processing. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 90: 278-284.
20. Lou, S. N., Lin, C. D. and Rainer, B. (2001) Changes in purine content of *Tilapia mossambica* during storage, heating and drying. *Food Sci. Agric. Chem.* 3: 23-29.
21. Kuehn, Th. and Steinhart, H. (1989) Kurzzeit-Druckhydrolyse zur monomerenbestimmung von Nahrungsfaser. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188: 7-10.

- 22.Ohtakara, A. and Mitsutomi, M. (1988) Analysis of chitooligosaccharides and reduced chitooligosaccharides by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 161: 453-457.
- 23.Belitz, H. D. and Grosch, W. (1999) *Food Chemistry*, pp. 252-254. Springer-Verlag, New York, U. S. A.
- 24.Sudarshen, N. R., Hoover, D. G. and Knorr, D. (1992) Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 6: 257-272.

91年09月10日投稿

91年09月26日接受

表一 幾丁聚醣在 70°C 下以混合酸水解不同時間後各幾丁寡醣的含量分布

Table 1. Distribution of various N-acetylchitooligosahharides produced from chitosan hydrolyzed by a mixed acid solution during different time duration at 70°C

(g/100g chitosan)

Time of hydrolyzation (min)	(GlcNAc) <sub>1</sub> <sup>a</sup>	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	Total <sup>b</sup>
100	1.3 <sup>c</sup>	6.0	3.5	4.0	4.2	- <sup>d</sup>	19.0
120	2.3	1.1	5.1	4.1	5.6	-	18.2
180	3.3	1.4	2.0	1.5	8.3	-	16.5
240	5.2	2.4	2.6	2.6	16.0	-	28.8
300	13.0	3.9	4.4	3.4	16.3	-	41.0

<sup>a</sup> (GlcNAc)<sub>1</sub>: N-acetylglucosamine, (GlcNAc)<sub>2</sub>:N-acetylchitobiose, (GlcNAc)<sub>3</sub>: N-acetylchitotriose, (GlcNAc)<sub>4</sub>: N-acetylchitotetraose, (GlcNAc)<sub>5</sub>: N-acetylchitopentaose, (GlcNAc)<sub>6</sub>: N-acetylchitohexaose

<sup>b</sup> Sum of (GlcNAc)<sub>1-6</sub>

<sup>c</sup> Mean value of duplicate.

<sup>d</sup> Not detected

表二 幾丁聚醣在 80°C 下以混合酸水解不同時間後各幾丁寡醣的含量分布

Table 2. Distribution of various N-acetylchitooligosahharides produced from chitosan hydrolyzed by a mixed acid solution during different time duration at 80°C

(g/100g chitosan)

Time of hydrolyzation (min)	(GlcNAc) <sub>1</sub> <sup>a</sup>	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	Total <sup>b</sup>
30	2.2 <sup>c</sup>	1.2	1.8	1.6	7.0	1.3	15.1
60	4.3	2.3	3.2	2.7	10.3	- <sup>d</sup>	22.8
90	7.4	4.6	6.4	3.4	10.6	1.0	33.4
120	10.3	7.0	6.8	5.9	8.3	-	38.3

<sup>a</sup> (GlcNAc)<sub>1</sub>: N-acetylglucosamine, (GlcNAc)<sub>2</sub>:N-acetylchitobiose, (GlcNAc)<sub>3</sub>: N-acetylchitotriose, (GlcNAc)<sub>4</sub>: N-acetylchitotetraose, (GlcNAc)<sub>5</sub>: N-acetylchitopentaose, (GlcNAc)<sub>6</sub>: N-acetylchitohexaose

<sup>b</sup> Sum of (GlcNAc)<sub>1-6</sub>

<sup>c</sup> Mean value of duplicate.

<sup>d</sup> Not detected



表三 幾丁聚醣在 90°C 下以混合酸水解不同時間後各幾丁寡醣的含量分布

Table 3. Distribution of various N-acetylchitooligosahharides produced from chitosan hydrolyzed by a mixed acid solution during different time duration at 90°C

(g/100g chitosan)

Time of hydrolyzation (min)	(GlcNAc) <sub>1</sub> <sup>a</sup>	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	Total <sup>b</sup>
10	2.7 <sup>c</sup>	2.2	2.3	2.3	12.3	2.0	21.8
20	5.2	3.5	3.6	3.0	15.9	3.0	34.2
30	8.3	4.9	4.6	3.2	23.8	2.0	46.8
60	10.5	6.8	6.6	3.8	23.3	3.5	54.5
90	14.0	7.7	6.9	4.4	16.1	3.4	52.5

<sup>a</sup> (GlcNAc)<sub>1</sub>: N-acetylglucosamine, (GlcNAc)<sub>2</sub>:N-acetylchitobiose, (GlcNAc)<sub>3</sub>: N-acetylchitotriose, (GlcNAc)<sub>4</sub>: N-acetylchitotetraose, (GlcNAc)<sub>5</sub>: N-acetylchitopentaose, (GlcNAc)<sub>6</sub>: N-acetylchitohexaose

<sup>b</sup> Sum of (GlcNAc)<sub>1-6</sub>

<sup>c</sup> Mean value of duplicate.

表四 幾丁聚醣在 100°C 下以混合酸水解不同時間後各幾丁寡醣的含量分布

Table 4. Distribution of various N-acetylchitooligosahharides produced from chitosan hydrolyzed by a mixed acid solution during different time duration at 100°C

(g/100g chitosan)

Time of hydrolyzation (min)	(GlcNAc) <sub>1</sub> <sup>a</sup>	(GlcNAc) <sub>2</sub>	(GlcNAc) <sub>3</sub>	(GlcNAc) <sub>4</sub>	(GlcNAc) <sub>5</sub>	(GlcNAc) <sub>6</sub>	Total <sup>b</sup>
10	6.9 <sup>c</sup>	4.7	2.7	1.9	10.0	0.2	26.4
20	10.0	4.0	3.7	3.9	16.7	0.5	38.8
30	15.3	7.2	2.7	1.2	6.1	0.3	32.5
60	20.5	5.7	2.3	1.0	3.9	0.2	33.6

<sup>a</sup> (GlcNAc)<sub>1</sub>: N-acetylglucosamine, (GlcNAc)<sub>2</sub>:N-acetylchitobiose, (GlcNAc)<sub>3</sub>: N-acetylchitotriose, (GlcNAc)<sub>4</sub>: N-acetylchitotetraose, (GlcNAc)<sub>5</sub>: N-acetylchitopentaose, (GlcNAc)<sub>6</sub>: N-acetylchitohexaose

<sup>b</sup> Sum of (GlcNAc)<sub>1-6</sub>

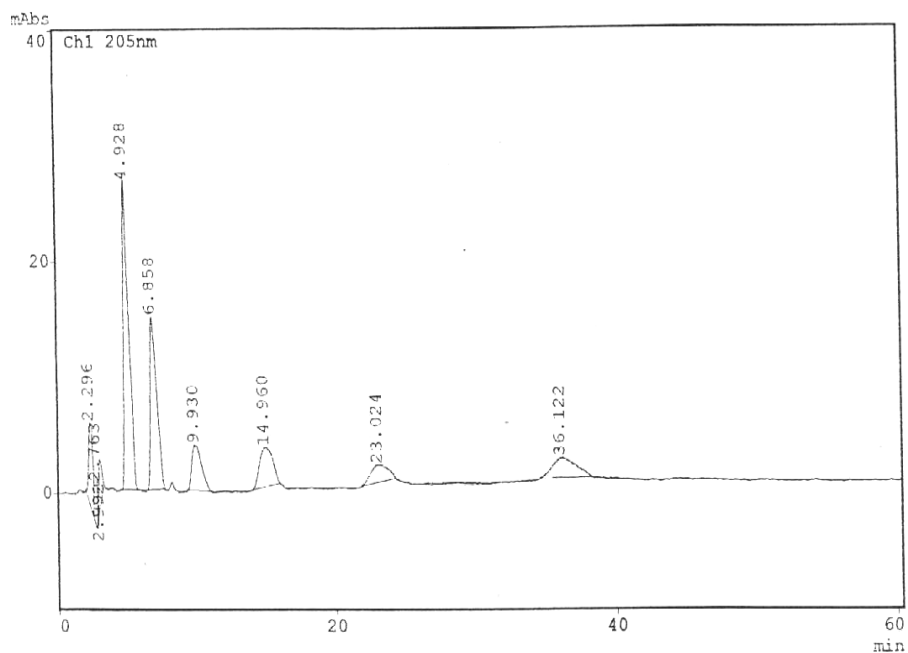
<sup>c</sup> Mean value of duplicate.

表五 以 90°C 作用 30 和 60 分鐘的水解液對大腸桿菌和金黃葡萄球菌的抑菌效果

Table 5. The inhibition effect of hydrolyse products by 30 and 60 min hydrolysis at 90°C on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*

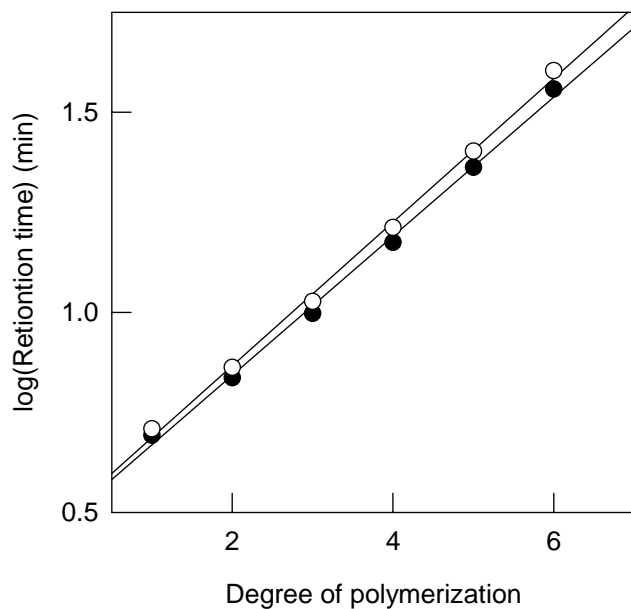
Sample	Diameter of inhibition ring (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Control	4.0±0.0 <sup>a</sup>	4.0±0.0
Hydrolyse product at 90°C for 30 min	15.6±5.4	13.2±4.3
Hydrolyse product at 90°C for 60 min	15.3±2.2	13.2±4.6

<sup>a</sup> mean value±S.D. of three determinations



圖一、六種標準幾丁寡糖混合物的 HPLC 層析圖

Fig. 1. HPLC elution profiles of a mixture standards from (GlcNAc)<sub>1-6</sub>. (Retention time (min) for (GlcNAc)<sub>1</sub>: 4.928 , (GlcNAc)<sub>2</sub>: 6.858 , (GlcNAc)<sub>3</sub>: 9.930 , (GlcNAc)<sub>4</sub>: 14.950 , (GlcNAc)<sub>5</sub>: 23.024 , (GlcNAc)<sub>6</sub>: 36.122)



圖二、滯留時間和幾丁寡醣聚合度的半對數回歸曲線圖

Fig. 2. Regression linear between logarithmic retention time and the degrees of polymerization of N-acetyl-oligosaccharides (column 1:Lichrospher, column 2:hypersil)