

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

以幾丁聚醣或幾丁聚醣和卵磷脂為乳化劑製備次亞麻油酸/
 β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液及其性質之研究

Preparation and Characterization of Linolenic acid/ β -carotene

Nano Droplet Emulsion Using Chitosan or Chitosan and
Lecithin as Emulsifiers

張萬宇

Wan-Yu Chang

指導教授：徐詮亮 博士

阮進惠 博士

Advisor: Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

Jin-Hewi Rwan, Ph. D.

中華民國一百零七年一月

Jan., 2018

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 張萬宇 君所提之論文

以幾丁聚醣或幾丁聚醣和卵磷脂為乳化劑製備

次亞麻油酸/ β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液及其性質之研究

Preparation and Characterization of Linolenic acid/ β -carotene


Nano droplet Emulsion Using Chitosan or Chitosan and

Lecithin as Emulsifiers

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



中華民國一零七年一月十五日

碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 張萬宇 君所提之論文

以幾丁聚醣或幾丁聚醣和卵磷脂為乳化劑製備

次亞麻油酸/ β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液及其性質之研究

Preparation and Characterization of Linolenic acid/ β -carotene Nano
droplet Emulsion Using Chitosan or Chitosan and Lecithin as
Emulsifiers

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

吳明昌

屏東科技大學食品科學系 教授

徐誌良

東海大學食品科學系 教授

阮運惠

東海大學食品科學系 副教授

指導教授：徐誌良

中華民國一零七年一月十五日

謝誌

在研修碩士學位期間，承蒙我的指導老師 阮進惠博士於研究上給予悉心指導及建議，使實驗與論文得以順利進行與完成。在撰寫論文期間，感謝恩師不厭其煩批閱及細心斧正，使我得以順利通過學位口試，師恩浩蕩，此生難忘，特以此文對恩師致上最深的謝意。

論文口試期間，承蒙國立屏東科技大學食品科學系 吳明昌博士及本研究所 徐詮亮博士，百忙中撥空審閱及詳加修正，並提供寶貴意見，使本論文內容更為周詳完善，在此深表由衷感謝。

在研究所期間，感謝系上所有教授和助教在專業領域上的知識傳授及協助，感謝本校化材系張有義教授慷慨借儀器及協助，使研究得以順利進行。

在此，感謝叔瑜助教在口試申請及口試期間給予協助，使口試得以順利進行；感謝文華、貫中、柏漢學長及怡臻學姐對我在實驗上的指導和關心，讓我了解許多實驗上的細節；感謝我的同窗好友秉叡、佑星、閔鴻、育豪、性樺、湘儀在實驗上互相討論學習，偶爾一起聚餐聊聊天，讓我研究所生活豐富有趣；感謝學弟妹佳純、琤綾、思瀚、仲雯、恆毅、鄩殷、育菁分享生活及遊戲上一些有趣的事，使我了解很多學校以外的知識；感謝紹華及他的室友(大廚)，在我修改論文期間，提供住宿；感謝芸禎的陪伴和鼓勵，我們一起旅遊、一起吃大餐、互相分享生活上的大小事，也幫助我修改論文上的錯誤，研究所期間得到太多人的幫助，無法一一詳列，在此一併致謝，謝謝你們的一路相挺。

最後，感謝我的爸爸、媽媽、弟弟們，在研究所期間給予我最大的包容、支持和鼓勵，讓我無後顧之憂順利完成學業。

張萬宇 謹致於
東海大學食品科學研究所
中華民國一〇七年一月

目錄

	頁數
目錄.....	I
圖目錄.....	V
表目錄.....	VII
中文摘要.....	VIII
英文摘要.....	X
壹、前言.....	1
貳、文獻整理.....	3
一、幾丁質與幾丁聚醣.....	3
(一) 幾丁質(chitin)與幾丁聚醣(chitosan)的發現.....	3
(二) 幾丁質(chitin)與幾丁聚醣(chitosan)之簡介.....	3
(三) 幾丁質與幾丁聚醣之結構及晶型架構.....	5
(四) 幾丁質與幾丁聚醣溶液特性.....	10
(五) 幾丁質與幾丁聚醣的製備.....	13
(六) 幾丁聚醣之物性分析.....	18
(七) 幾丁聚醣安全性與法規.....	22
(八) 幾丁質與幾丁聚醣之應用.....	23
二、次亞麻酸油(Linolenic acid, LNA).....	31
(一) 次亞麻油酸簡介.....	33
(二) 次亞麻油酸之生理作用.....	35
(三) 次亞麻油酸氧化.....	37
三、 β -胡蘿蔔素(β -Carotene).....	39
(一) β -胡蘿蔔素簡介.....	39
(二) β -胡蘿蔔素結構和基本性質.....	39
(三) β -胡蘿蔔素的醫療功效.....	41

(四) β -胡蘿蔔素在加工食品中的應用	41
四、幾丁聚醣之乳化性質	43
(一) 幾丁聚醣乳化包覆原理之探討	43
(二) 幾丁聚醣乳化相關研究	45
(三) 幾丁聚醣乳化安定作用	47
(四) 靜電層沉積法乳化研究	48
五、乳化	51
(一) 乳化之原理介紹	51
(二) 乳化劑	52
(三) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)值	54
(四) 乳化的方法與乳化液類型	56
(五) 影響乳化安定性的因素	59
(六) 乳化不安定型態	59
六、奈米科技發展	62
(一) 奈米科技	62
(二) 奈米科技在食品領域的發展	64
(三) 奈米乳滴乳化液原理及相關研究	67
參、材料與方法	70
一、實驗材料	70
(一) 原料	70
(二) 藥品	70
二、實驗儀器	71
三、實驗架構	72
(一) 第一部分：以幾丁聚醣為乳化劑進行乳化製備幾丁聚醣(CS)-次亞麻油酸 (LNA)- β -胡蘿蔔素(β -Carotene)奈米乳滴乳化液試驗(CS-LNA- β -Carotene nano droplet emulsion)	72

(二) 第二部分：以幾丁聚醣及卵磷脂共同乳化劑進行乳化製備幾丁聚醣-卵磷脂 (Le)-次亞麻油酸-β-胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液試驗(CS-Le-LNA-β-Carotene nano droplet emulsion).....	73
四、材料準備.....	74
(一)幾丁聚醣之製備.....	74
五、實驗方法.....	74
(一)以幾丁聚醣(chitosan, CS)為乳化劑製備次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)-β-胡蘿蔔 素(β-Carotene)奈米乳滴乳化液之試驗.....	74
(二)以幾丁聚醣(chitosan, CS)及卵磷脂(lecithin, Le)為合併乳化劑製備次亞麻油酸 (LNA)-β-胡蘿蔔素(β-Carotene)奈米乳滴乳化液之試驗.....	76
六、分析方法.....	77
(一) 幾丁聚醣去乙醯度之測定.....	77
(二) 乳化液乳滴大小(droplet size)及表面電位(zeta potential)之測定.....	78
(三)乳化液過氧化價(POV)之測定.....	78
(四) 統計分析.....	79
肆、結果與討論.....	80
一、幾丁聚醣之製備.....	80
二、以幾丁聚醣(chitosan, CS)為乳化劑製備次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)-β-胡蘿蔔 素(β-Carotene)奈米乳滴乳化液之特性(CS-LNA-β-Carotene nanodroplet emulsion).....	81
(一) 均質壓力(homogenizing pressure)、LNA-β-Carotene 濃度及均質循環次數 (homogenizing cycle number)對(CS-LNA-β-Carotene)乳化液中乳滴大小(droplet size)及 表面電位(zeta potential)之影響.....	81
(二)CS-LNA-β-Carotene 奈米乳滴乳化液之安定性.....	87
三、以幾丁聚醣(chitosan, CS)及卵磷脂(lecithin, Le)為共同乳化劑製備次亞麻油酸-β-胡蘿蔔 素(LNA-β-Carotene)奈米乳滴乳化液(CS-Le-LNA-β-Carotene nanodroplet emulsion)..	94
(一) LNA-β-Carotene 油量對 CS-Le-LNA-β-Carotene 乳化液乳滴大小(droplet size)、表 面電位(zeta potential)之影響.....	95
(二)CS-Le-LNA-β-Carotene 奈米乳滴乳化液之安定性.....	99
伍、結論.....	105

一、以 CS 為單獨乳化劑製備 CS-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液：..... 105

二、以 CS 及 Le 為合併乳化劑製備 CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液：..... 106

三、總結..... 106

陸、參考文獻..... 107



圖目錄

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之架構。.....	6
圖二、 α 型幾丁質之立體架構。.....	8
圖三、 β 型幾丁質之立體架構。.....	9
圖四、幾丁聚醣溶液於酸性或鹼性環境下之分子電荷、分散性及分子排列情形。	12
圖五、幾丁質與幾丁聚醣加工之簡單流程圖。.....	17
圖六、以穿透電子顯微鏡觀察幾丁聚醣對腸道上皮細胞之影響，(a) 為 Caco-2 細胞正常型態，(b) 為經由 0.1%幾丁聚醣處理 30 分鐘後之細胞和(c) 為將幾丁聚醣移除後，繼續培養 24 小時後之細胞。.....	30
圖七、Omega-3 不飽和脂肪酸之結構。.....	34
圖八、高度多元不飽和脂肪酸之合成路徑。.....	36
圖九、不飽和脂肪酸的氧化機制。.....	38
圖十、各種胡蘿蔔素結構。.....	40
圖十一、多層膜乳化液使用靜電層沉積法之圖示 (i) 為單層膜 (ii) 為雙層膜 (iii) 為多層膜.....	44
圖十二、具有雙層界面膜(lecithin-chitosan)之乳化液滴製備圖。.....	49
圖十三、乳化劑之形態及其種類 (a) 乳化劑基本結構示意圖 (b) 乳化劑種類。.....	53
圖十四、兩相乳化液 (a) 水中油滴型 (O/W) 或是 (b) 油中水滴型 (W/O)。多重相乳化液 (c) 以 W/O/W 型做說明。.....	58
圖十五、乳液的幾種不穩定現象示意圖。.....	61
圖十六、奈米遞送系統。.....	63
圖十七、奈米顆粒於腸道吸收之優勢。.....	63
圖十八、(a) 均質機和(b) 均質閥之構造。.....	68
圖十九、製備幾丁聚醣-次亞麻油酸/ β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液試驗架構。.....	72
圖二十、製備幾丁聚醣-卵磷脂-次亞麻油酸- β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液試驗架構。	73
圖二十一、乳化壓力、LNA- β -Carotene 油量及乳化循環次對乳化液滴大小之影響。	84
圖二十二、乳化壓力、LNA- β -Carotene 油量及乳化循環次對乳化液滴表面電位之影響。	86
圖二十三、CS-LNA- β -Carotene 乳化液於 25°C 下保存 28 天之乳滴粒徑變化。.....	91
圖二十四、CS-LNA- β -Carotene 乳化液及 LNA- β -Carotene 之 POV 變化情形。.....	93
圖二十五、CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液於 25°C 下保存 28 天之乳滴粒徑變化。	102

圖二十六、不同油量 LNA- β -Carotene 的 CS-Le-LNA- β -Carotene 及
CS-LNA- β -Carotene 乳化液之 POV 變化情形。..... 104



表目錄

表一、甲殼動物、節足動物、軟體動物、及真菌類之幾丁質含量。.....	4
表二、幾丁質三種晶型架構與特性。.....	7
表三、不同去乙酰程度幾丁聚醣之製備條件。.....	16
表四、幾丁質及幾丁聚醣常見之應用領域。.....	25
表五、必需脂肪酸和多元不飽和脂肪酸的主要食物來源。.....	32
表六、HLB 值與用途間的關係。.....	55
表七、CS-LNA- β -Carotene 乳化液於 25°C 下保存 28 天之分離情形。.....	89
表八、CS-LNA- β -Carotene 及 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液液滴粒徑之比較。.....	96
表九、CS-LNA- β -Carotene 及 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液表面電位之比較。.....	98
表十、CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液於 25°C 下保存 28 天之分離情形。.....	100



中文摘要

類胡蘿蔔素為一種天然色素，廣泛分佈於蔬果當中，提供人類飲食維生素 A 的來源。而 β -carotene 是擁有高維生素 A 的活性及抗氧化能力的類胡蘿蔔素之一，研究顯示 β -carotene 能防止癌症、心血管疾病、黃斑部病變等嚴重疾病發生，然而 β -carotene 難溶於水，且容易受到光、熱的破壞，使得難以應用於食品中。次亞麻油酸(Linolenic acid, LNA, ω -3)為人體必需脂肪酸，且容易受到熱、自由基的氧化，使得降低其營養功效。幾丁聚醣(chitosan)為一種多醣聚合物，其在酸性環境下帶正電，且與卵磷脂合併為乳化劑在加工上具有多種應用性，可作為食品乳化液之安定劑。故本研究以幾丁聚醣和卵磷脂為乳化劑製備次亞麻油酸/ β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液，並針對其安定性進行研究。

本研究將 0.5 % 的幾丁聚醣溶液作為水相，次亞麻油酸及 β -胡蘿蔔素依比例混合至不同濃度(500:1、1000:2、1500:3、2000:4、2500:5、3000:6 及 3500:7, w/w, mg)作為油相，利用高壓均質機在不同均質壓力(500、1000 及 1500 bar)及不同的循環次數(1 至 10 次)下，製備奈米乳滴乳化液，並選出較小乳滴及較高表面電位之乳化液條件(即 LNA/ β -carotene 濃度、乳化壓力及乳化循環次數)，另將上述最佳條件(1500:3、2000:4、2500:5 及 3000:6, w/w, mg LNA- β -carotene)分別與 0.375、0.5、0.625 及 0.75 g 卵磷脂(lecithin, Le)混和，進行初乳化後分別加入 CS 溶液，再行第二次初乳化，依最適均質壓力及乳化循環次數製備 CS-Le-LNA- β -carotene 奈米乳滴乳化液，探討其物理及化學性質，並於 25 °C 下儲存 28 天，測定其安定性。

結果顯示，隨著高壓均質的壓力、循環次數及油量增加，粒徑均有變小的趨勢，而循環次數對於表面電位沒有顯著的影響。在均質壓力 1500 bar、循環次數 10 passes、油量 1500:3、2000:4、2500:5、3000:6 (w/w)製備條件下其粒徑為 730 ~ 887 nm，可達奈米等級，電位為 +33 ~ +38 mV，POV 約為 5.8 ~ 7.0 meq/Kg。另將上述四種最佳條件與卵磷脂混和結果顯示粒徑為 700 ~ 856 nm，電位為 +42.3 ~ +45.2 mV，POV 僅為 2.0 ~ 3.5 meq/Kg，由此可見，CS 與 Le 合併作為乳化劑，製備雙層膜乳化液，能顯著增加乳化液之穩定性。

綜上所述，以幾丁聚醣或幾丁聚醣和卵磷脂為乳化劑製備次亞麻油酸/ β -胡蘿蔔素之奈米乳滴乳化液，可做為食品加工產業發展之基礎，用以保護相關食品避免營養物質氧化，延長食品之保存期限。

關鍵字：幾丁聚醣、胡蘿蔔素、奈米液滴、乳化安定性、過氧化價



Abstract

Carotenoids, a natural pigment widely distributed in fruits and vegetables, provide the source of vitamin A for human diet. β -carotene is one of the carotenoids with high activity and antioxidant capacity of vitamin A. Studies have shown that β -carotene can prevent some serious diseases such as cancer, cardiovascular disease and macular degeneration. However, β -carotene is hard to dissolve in water and be sensitive to heat and light, so it was difficult in application of food development. Linolenic acid (LNA, ω -3) is an essential fatty acid in human body, and it is easily oxidized by heat and free radicals, that causes a reduction in certain nutrients. Chitosan (CS) is a polysaccharide polymer that is positively charged in an acidic environment. With the combination of chitosan and lecithin as emulsifier, there are many applications in food processing that can be act as a food emulsifier and stabilizer. The aim of this study was to discussed with the emulsifying stability of linolenic acid / β -carotene nano droplet emulsion using chitosan or chitosan and lecithin as emulsifiers.

In the study, 0.5% chitosan solution was used as the aqueous phase, and different concentrations of linoleic acid / β -carotene (500:1, 1000:2, 1500:3, 2000:4, 2500:5, 3000:6 and 3500:7, *w/w, mg*) were used as the oil phase. To prepared the CS- LNA- β -carotene emulsion, the emulsions were passed through a high pressure homogenizer (APV) at different pressure (500, 1000 and 1500 *bar*) and recycled in different passes (1~10 *passes*). The emulsions were determined on the droplet size and electrical charge (zeta potential). Suitable emulsifying conditions, (i.e., LNA/ β -carotene

concentration, homogenizing pressure and recycling pass) that showed a small droplet and high zeta potential emulsions were applied to prepare the CS-LNA- β -carotene emulsions, then determined on the emulsion stability (i.e., oil-water separation, droplet size and peroxide value POV change) during 28 day storage at 25 °C. Such homogenizing conditions were also applied for emulsifying with dual emulsifiers. And the optimal conditions (1500:3, 2000:4, 2500:5 and 3000:6, w/w, mg LNA- β -carotene) were mixed with 0.375, 0.5, 0.625 and 0.75 g of lecithin (Le) into CS-Le-LNA- β -carotene nano droplet emulsions which were then determined on the droplet size, zeta potential and emulsion stability.

As result, a higher homogenizing pressure and more number of recycling pass gave smaller droplet size under LNA- β -carotene, but there are no significant effects in zeta potential of the emulsions. Emulsions prepared with homogenizing pressure of 1500 *bar*, recycling pass of 10 *passes* and oil content of 1500:3, 2000:4, 2500:5 and 3000:6 (w/w) got a smaller droplet and higher zeta potential. The droplet size was in a range of 730-887 *nm*, zeta potential within +33 ~ +38 *mV*, and POV was about 5.8 ~ 7.0 *meq/Kg*. The CS-Le-LNA- β -carotene nano droplet emulsions showed a droplet size in a range of 700 ~ 856 *nm*, zeta potential within +42.3 ~ +45.2 *mV*, and the POV was only 2.0 ~ 3.5 *meq/Kg*. Thus, under the same emulsified on conditions, CS-Le-LNA- β -carotene had smaller droplet size but higher zeta potential and more stable in the storage than that of the CS-LNA- β -carotene emulsion.

In conclusion, the preparation of linolenic acid / β -carotene nano droplet emulsion using chitosan or chitosan and lecithin as emulsifiers can

be used as the basis for the development of the food processing industry. In addition, it could protect food related products from the nutritional oxidative deterioration and also extend the shelf life of food.

Key words: chitosan, β -carotene, nano droplet, emulsifying stability, POV



壹、前言

幾丁聚醣(chitosan, CS)，大多從蝦、蟹殼或生物細胞壁取得，是第二大天然存在的生物聚合物(Jung, Chung, & Lee, 2006)結構為(poly- β (1-4)-2-deoxy-2-aminoglucose)，在食品工業中的商業應用受到很多關注(Shahidi, Arachchi, & Jeon, 1999)。幾丁聚醣具有 OH 和 NH_3 基為親水性質，及 COCH_3 為親油基故可當為乳化劑 (Agulló, Rodríguez, Ramos & Albertengo, 2003)。其乳化性質通常受分子量，去乙酰度及其濃度的影響。利用幾丁聚醣為乳化劑可使乳化液更為安定，這些安定機制包括：(1) 靜電排斥安定作用 (electrostatic repulsion stabilization)：利用乳化劑本身之電荷(正電或負電)來防止乳滴分子 (droplets) 間的聚集，這些乳化劑多半為低分子量者，如：lecithin、stearoyllactylate 等，其缺點為易受 pH 及電解質之影響(Macrae et al., 1993；DelBlanco et al., 1999)；(2) 立體阻礙安定作用(steric hindrance stabilization)：乳化劑利用本身大分子結構(macromolecular structure)阻礙這些 droplets 因聚集而使乳化液不穩定，這類屬於大分子之乳化劑，如：蛋白質、膠質(gums) (Napper, 1983;Tesch et al., 2002)，其缺點會遭受 pI(等電點)及 pKa(酸解離常數)影響使其變性而降低乳化效果；(3) 黏性安定作用(viscosifying stabilization)：利用具有高黏度特性之乳化劑使乳化液更為安定，這類乳化劑多半屬於非離子(non-ionic)，例如：mono and diglycerides (Macrae et al., 1993)。

食品系中之油脂分為飽和脂肪酸及不飽和脂肪酸，其中以 ω -3 型多元不飽和脂肪酸之二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)對於預防和治療心血管疾病、免疫反應失調以及促進胎兒時期腦神經之發育等方面扮演重要的角色。次亞麻油酸(Linolenic acid, LNA)主要來源為亞麻籽油及大豆油，身體無法自行合成，需靠外界食物獲得，為必需脂肪酸，文獻指出人體攝取次亞麻油酸能預防阿茲海默症，降低膽固醇、防止心血管疾病及皮膚炎，是維持神經發展及視覺功能重重要物質(Spector, 1999)。而 ω -3 及 ω -6 在儲存過程易氧化且人體吸收轉換效率差。

β -胡蘿蔔(β -Carotene)素是一種脂溶性化合物，常被利用於食品添加物中。在過去幾十年中，已經證明 β -胡蘿蔔素可有助於降低慢性疾病(如癌症，心血管疾病)，然而來自植物的 β -胡蘿蔔素生物利用度通常較差，吸收可能低於 10 % (Boileau, Moore & Erdman, 1999)，且 β -胡蘿蔔素由於其對氧、光和溫度的敏感而易於降解，將 β -胡蘿蔔素包覆在適當的運送載體中是保護 β -胡蘿蔔素免於降解的有用方法 (Salvia-Trujillo et al., 2013)。

Wei 和 Gao(2016)利用包覆技術(encapsulation technology)製備 CS- β -Carotene 奈米乳滴乳化液可減緩 β -胡蘿蔔素及油脂氧化速度。Julio 等人(2018)利用幾丁聚醣和卵磷脂(Lecithin, Le)為乳化劑包覆 ω -3 脂肪酸製備雙層膜乳化液，粒徑達奈米等級($< 1 \mu m$)、電位為 +47 mV，且在 4 °C 下避光儲存 50 天 POV 只有 3~6 meq/kg，表示乳化液非常安定。幾丁聚醣有良好之乳化能力，因此常被使用於乳化包覆油脂物質，可降低甚至阻止油脂氧化及改善異味等功能，且帶正電荷之幾丁聚醣易吸附於負電之腸黏膜細胞上，增加其吸收率。故本實驗利用高壓均質機以幾丁聚醣為乳化劑或幾丁聚醣和卵磷脂合併為乳化劑製備 CS-LNA- β -Carotene 單層乳化液以及 CS-Le-LNA- β -Carotene 雙層乳化液，期望乳化液之乳滴粒徑可達奈米等級，及有較高的表面電位，並有效抑制油脂及 β -胡蘿蔔素氧化，使乳化液安定不分層。

貳、文獻整理

一、幾丁質與幾丁聚醣

(一) 幾丁質(chitin)與幾丁聚醣(chitosan)的發現

在 1799 年，英國 Hachett 將蝦、蟹及龍蝦的外殼以酸處理後，發現產生泡沫，且之後又轉變成黃色膠狀軟骨物，此為幾丁質的第一次發現(賴，1979)；1811 年，法國植物學家 Braconnot 用稀釋鹼液加熱處理洋菇時，發現一種不溶於水的物質，將其稱為“fungine”，後來此物質經 X-ray 分析，發現其結晶型態與無脊椎動物中所抽出之幾丁質結晶類似(Ruiz-Herrera, 1978)；1823 年，法國 Odier 發現昆蟲表殼部分也有類似的物質，並命名為幾丁質(chitin)，此字源於希臘語，為包覆的物質之意；1859 年 Rouget 將幾丁質放入濃氫氧化鈉溶液中加熱處理後，發現產物可溶於有機酸(楊，2002)；1894 年 Hopper-Seyler 將此物質命名為幾丁聚醣(chitosan) (Muzzarelli, 1977)；在 1925 年，Children 證明它是一種含氮化合物(賴，1979)。

(二) 幾丁質(chitin)與幾丁聚醣(chitosan)之簡介

幾丁質(chitin)又名甲殼素、甲殼質，一般呈淡黃色至褐色的棉絮狀或絲狀固體，具有高度彈性及延展性，廣泛存在自然界中，為含量僅次纖維素的天然高分子聚合物，其中以海洋生物的生成量最多，主要出現在昆蟲與甲殼類動物之外骨骼及植物、藻類與真菌等的細胞壁中(表一) (Knorr, 1984)。與纖維素相同，幾丁質具有支持與保護生物體之功能(Allan and Hadiges, 1979)，其晶體結構間存在很多強固之氫鍵使幾丁質的物性及化性都十分安定。

幾丁聚醣為幾丁質經去乙醯化作用(deacetylation)之後所得的產物，其去乙醯程度差異多寡才稱為幾丁聚醣，各文獻說明不一，一般 70~90% 最為常見(劉，1994)。幾丁質加工性較差，常將幾丁質去乙醯而成幾丁聚醣，或以幾丁聚醣摻合其他高分子聚合體，增加其加工性及應用性。此外幾丁聚醣於酸性條件下帶有正電荷，此特性具有提升該物質的化學活性及各種生物活性(Tsai and Su, 1999)。

表一、甲殼動物、節足動物、軟體動物、及真菌類之幾丁質含量。

Table 1. Chitin content of selected crustacean, insects, molluscan organs, and fungi.

Type	Chitin content (%)	Type	Chitin content (%)
Crustacea		Insects (continued)	
Cancer (crab)	72.1 ^c	May beetle	16 ^b
Carcinus (crab)	0.4-3.3 ^a	Diptera (true fly)	54.8 ^c
	8.29 ^b	Pieris (sulfur butterfly)	64 ^c
	64.2 ^c	Grasshopper	2-4 ^a
Paralithodes (King crab)	35 ^b		20 ^c
Callinectes (blue crab)	14 ^a	Bombyx (silkworm)	44.2 ^c
Pleuroncodes (red crab)	1.3-1.8 ^b	Calleria (wax worm)	33.7 ^c
Crangon (shrimp)	5.8 ^b		
	69.1 ^c	Molluscan Organs	
Alaskan shrimp	28 ^d	Clamshell	6.1
Nephrops (lobster)	69.8 ^c	Oyster shell	3.6
	6.7 ^b	Squid, skeleton	41.0
Homarus (lobster)	60.8-77.0 ^c	Krill, deproteinized shell	40.2 ± 5.2
Lepas (barnacles)	58.3 ^c		
		Fungi	
Insects		<i>Aspergillus niger</i>	42.0 ^e
Periplaneta (cockroach)	2.0 ^b	<i>Penicillium notatum</i>	18.5 ^e
Blatella (cockroach)	18.4 ^c	<i>Penicillium chrysogenum</i>	20.1 ^e
	10 ^b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.9 ^e
	35 ^c	(bakers yeast)	44.5
Coloptera (beetle)	5-15 ^b	<i>Mucor rouxii</i>	19.0
	27-35 ^c	<i>Lactarius vellereus</i>	
		(Mushroom)	
Tenebrio (beetle)	2.1 ^a		
	4.9 ^b		
	31.3 ^c		

a: Wet bodyweight

b: Dry bodyweight

c: Organic weight of cuticle

d: Total dryweight of cuticle

e: Dryweight of the wall

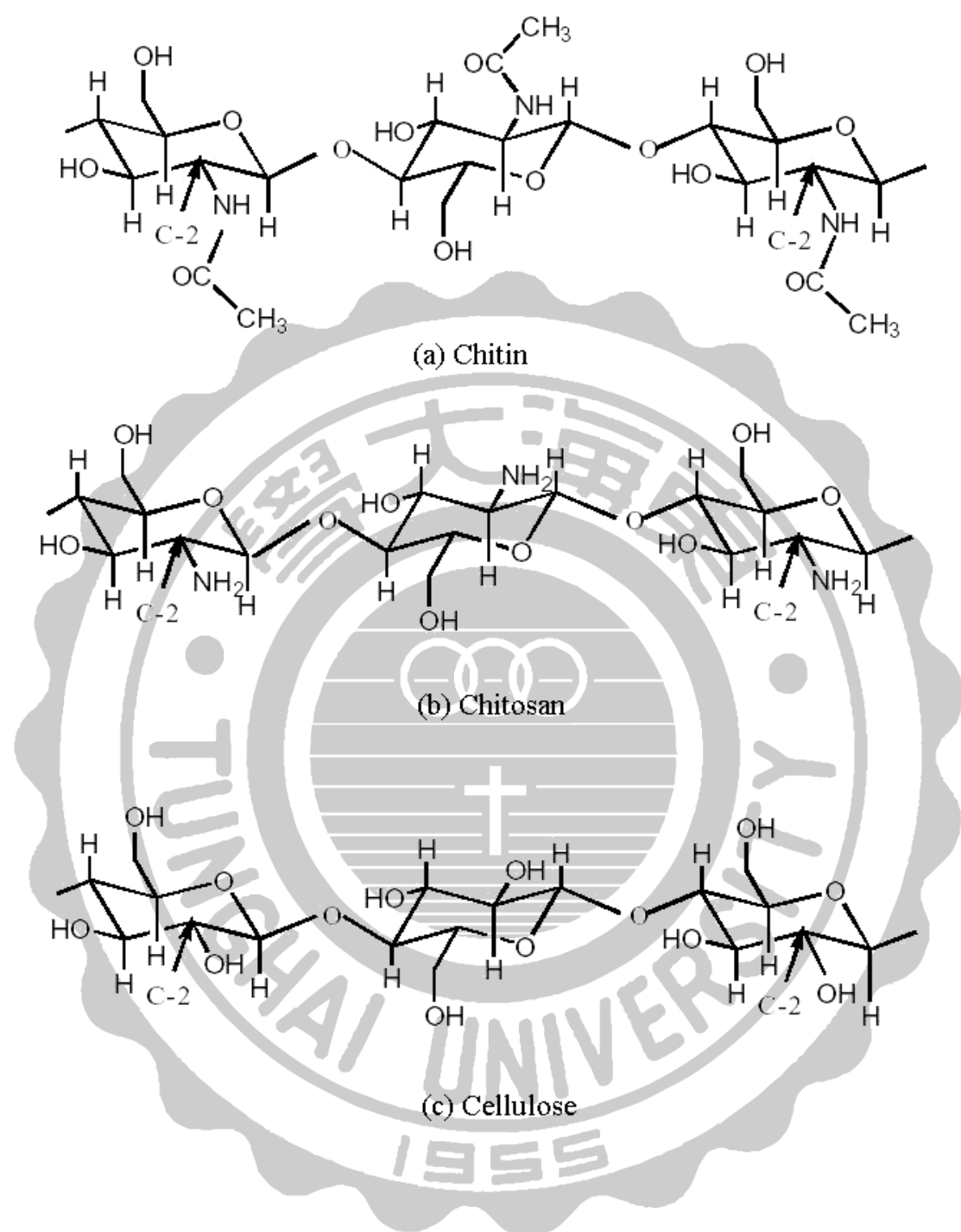
(Knorr, 1984)

(三) 幾丁質與幾丁聚醣之結構及晶型架構

幾丁質(chitin)為一種由 2000 ~ 3000 個 N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)以 β -1,4 糖苷鍵相互鍵結且類似纖維素(cellulose)的高分子聚合物(biopolymer)，與纖維素不同之處在於 C2 位置上所接官能基為乙醯胺基(-NHCOCH₃, acetylamino group)，而纖維素 C2 上則是氫氧基(-OH, hydroxyl group)(圖一)。

幾丁聚醣為幾丁質經高溫強鹼行乙醯化作用(deacetylation)，結構上大部分乙醯基被脫去，而使游離胺基裸露所得之產物。目前幾丁質與幾丁聚醣之去乙醯度差異並沒有明顯的定義將其劃分，Muzzarelli 和 Roberto 於 1985 年提出總氮量佔聚合物的百分之七(w/w)以上者為幾丁聚醣；另一說法則是在 1992 年 Aiba 提出以去乙醯程度超過 60 %且微溶於酸性溶液者稱為幾丁聚醣。幾丁聚醣幾乎無毒，又可被生物分解，且分子結構可變性大，包括聚合長度、聚合的鍵結方式等，通常可製成膠狀(gel)、纖維狀(fiber)、膠質狀(colloids)及薄膜狀(films)等，以供使用(Sabnis and Block, 2000)。

幾丁質經 X-ray 光譜分析後，其結晶型態及聚合方式依據三度空間的立體排列可分為 α 型、 β 型、 γ 型三種，其晶型特性見表二(Muzzarelli, 1977)，架構見圖二及圖三(Rinaudo, 2006)。而幾丁聚醣的幾何構型類似 α -chitin，屬斜方晶系。



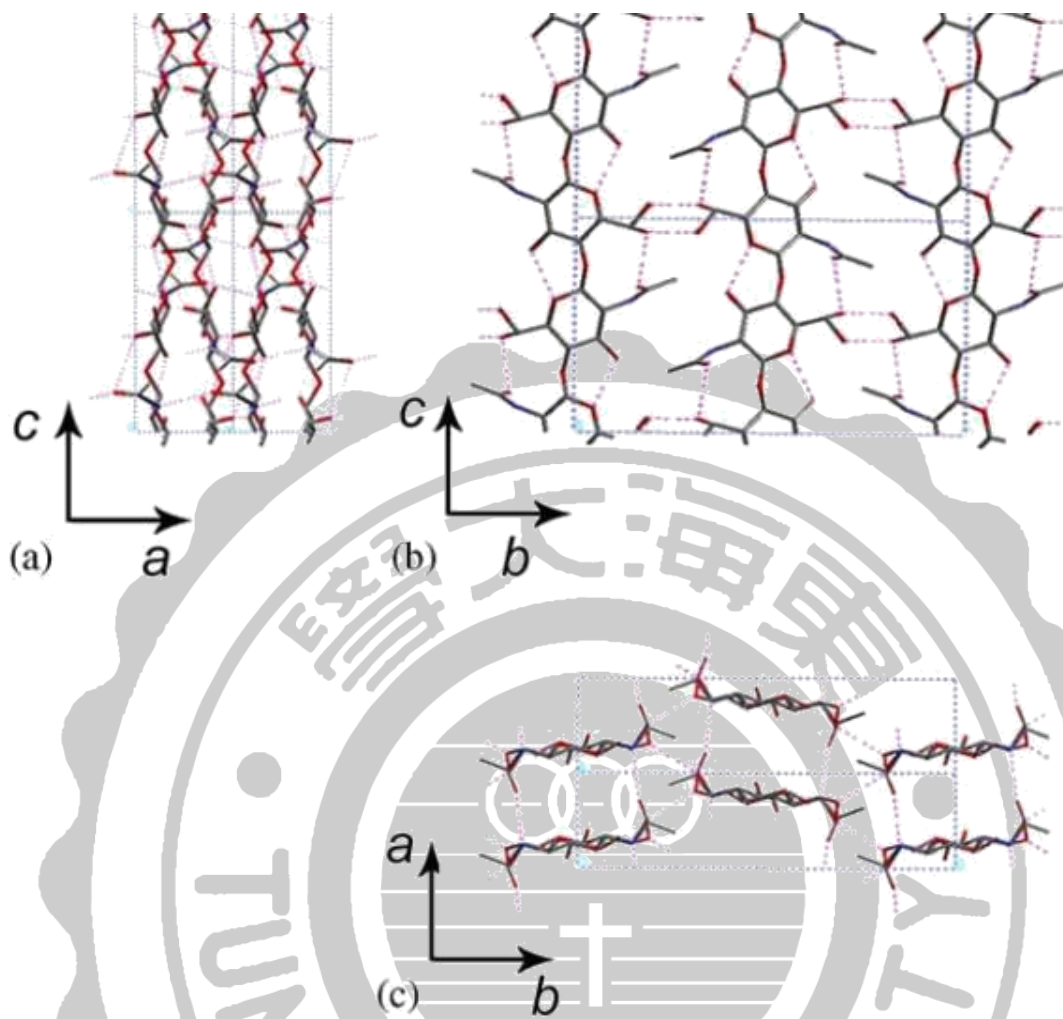
圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之架構。

Fig. 1. Structure of chitin, chitosan and cellulose (Knorr, 1984).

表二、幾丁質三種晶型架構與特性。

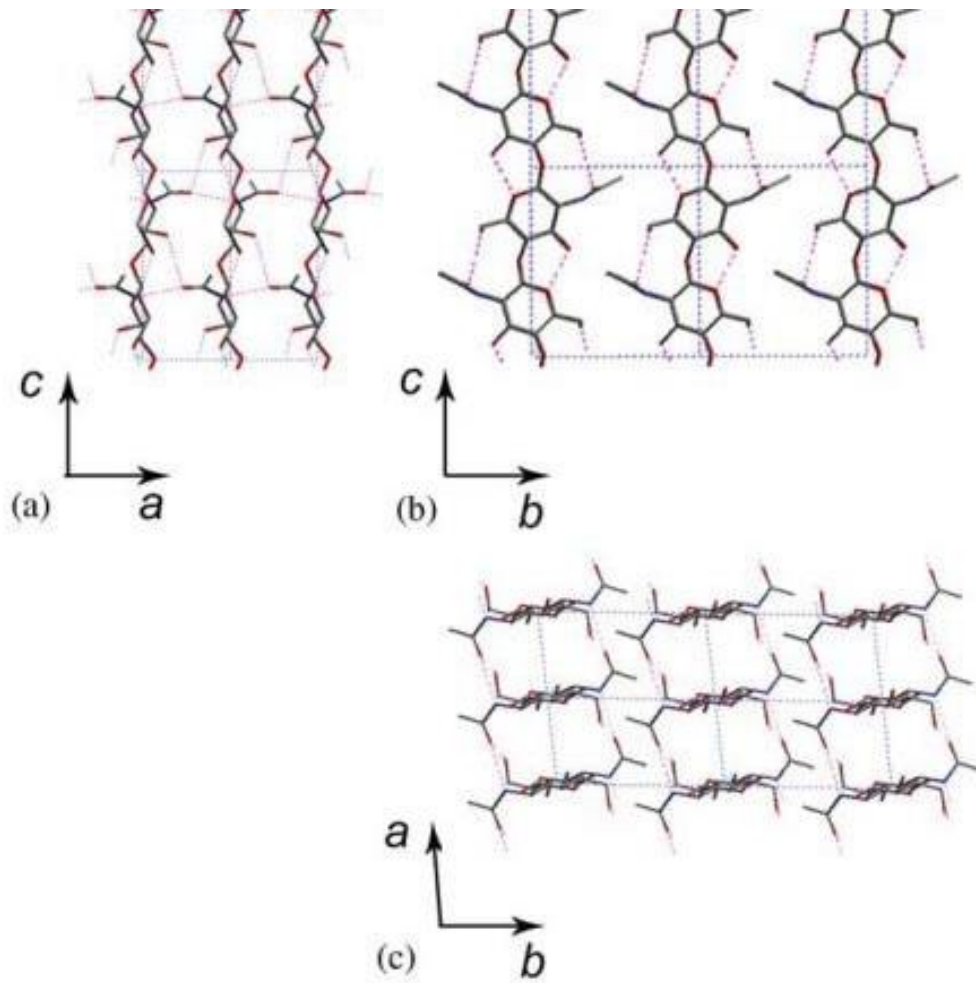
Table 2. Three crystal structures of chitin and their properties.

形式	α type	β type	γ type
晶系	斜方晶系 (rhombic system)	單斜晶系 (monoclinic system)	斜方晶系與 單斜晶系混合
架構	對稱的兩股雙螺旋呈現 反向平行 (anti-parallel)	對稱的兩股雙螺旋呈現 同向平行 (parallel)	每兩個平行長鏈就會 有一個反向平行長鏈
圖示	↓ ↑ ↓ ↑ ↓ ↑	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	↓ ↑ ↓ ↓ ↑ ↓
特性	構型緊密，質地堅硬	架構較鬆散，亦被幾丁質酶分解	架構緊密性介於 α 型與 β 型之間
存在	昆蟲、甲殼類動物	烏賊體類軟骨	藻類、真菌類



圖二、 α 型幾丁質之立體架構。

Fig. 2. Structure of α -chitin: (a) a -projection; (b) bc projection; (c) ab projection. The structure contains a statistical mixture of 2 conformations of the $-\text{CH}_2\text{OH}$ groups (Minke and Blackwell, 1978; Rinaudo, 2006)



圖三、 β 型幾丁質之立體架構。

Fig. 3. Structure of anhydrous β -chitin: (a) *ac* projection; (b) *bc* projection; (c) *ab* projection (Noishiki et al., 2004; Rinaudo, 2006)

(四)幾丁質與幾丁聚醣溶液特性

1.幾丁質

特性：

(1) 化學特性

幾丁質因具有許多乙醯基，容易產生分子內氫鍵，因此形成很強的微膠粒(micelle)結構，使其化學反應性低(Hackman, 1965)。

(2) 溶液特性

幾丁質不溶於一般溶劑中，僅微溶於強酸(硝酸、鹽酸、濃硫酸和無水甲酸)，且有降解(degradation)現象(Muzzarelli, 1977)。然而5%氯化鋰(LiCl)的二甲基乙醯胺(dimethylacet-amide)溶液則為幾丁質的良好溶劑(Austin, 1981)。

(3) 對掌旋光性(chiroptical)

當紅蝦(pink shrimp)中的幾丁質溶於5%氯化鋰的二甲基乙醯胺溶液時，在兩星期內旋光度會由 75° 轉為 -54° (Austin, 1981)。

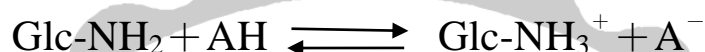
2.幾丁聚醣

幾丁聚醣通常是幾丁質在高溫下經濃鹼液的去乙醯作用所獲得的胺多醣類(aminopolysaccharide)。但是其去乙醯作用一般不是很均一，所以幾丁聚醣聚合物中常包含了葡萄糖胺分子(D-glucosamine)和N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl-D-glucosamine)分子，且此兩者的比例視去乙醯的條件和步驟而定。幾丁質與幾丁聚醣在去乙醯度方面並沒有明確界定，但有文獻指出當總氮量佔整個聚合物百分之七(w/w)以上時，則稱為幾丁聚醣(Muzzarelli, 1985)；而另外說法則是以去乙醯度大於60%且微溶於酸性溶液者稱為幾丁聚醣(Aiba, 1992)。

特性：

(1) 陽離子特性

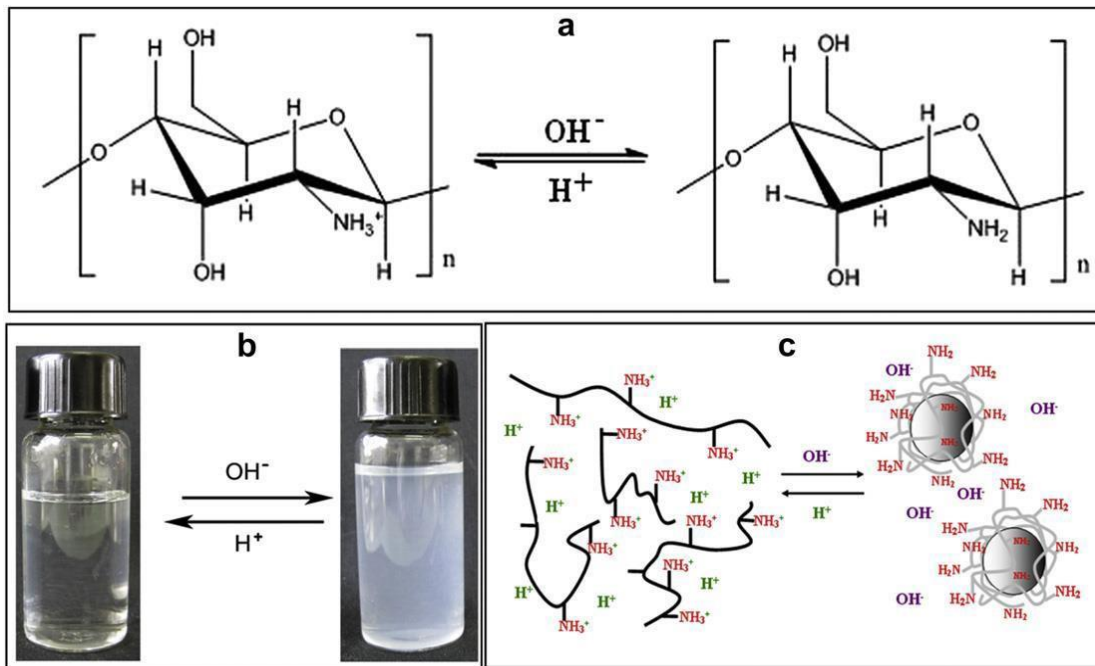
在酸性溶液環境下且小於其 pKa (pH~6.3)時，幾丁聚醣為一個帶有正電荷的聚合物，且其親水性受到其去乙醯程度多寡的影響(Rinaudo and Domard, 1988)。



(2) 溶液特性

幾丁聚醣可以溶於 1 %己二酸(adipic acid)、甲酸、醋酸、乳酸、丙酸、蘋果酸、琥珀酸，可是不溶於硫酸、中性及鹼性溶劑，這當中又以甲酸為最佳溶劑，從 0.2 %到 100 %的甲酸水溶液系統均可溶，而一般醋酸則是常被選擇作為幾丁聚醣溶液性質測定的標準溶液(Knorr, 1984)。雖然幾丁聚醣可以溶解在稀酸中，但是主要因素還是在於其本身的去乙醯度及溶液的 pH，有文獻指出去乙醯程度達 75 %以上的幾丁聚醣才能容易的溶解在較稀的有機酸中，而且當溶液的 pH 高於 5.5 時則溶解度明顯下降(Filar and Wirick, 1978)。

幾丁聚醣在酸性溶液下為帶正電的聚合物，且在溶液中會形成親水性蚯蚓狀(worm-like)分子(Kienzle-Sterzer and Rha, 1984)，其聚合物的流體性質取決於分子構形、氫鍵數目或是相鄰分子間的靜電斥力(Launay et al, 1986)。另外幾丁聚醣在溶液中的分子構形也會受到溶劑種類、pH、離子張度、溶質濃度等的影響(Gamzazad et al, 1981; Kienzle-Sterzer and Rha, 1984)。基於上述因素，幾丁聚醣溶液的黏度會受到本身分子離子化程度(正電荷數)的增加和溶液離子強度的減低而增加(Kienzle-Sterzer and Rha, 1984)；而當溶液中的離子強度及 pH 升高時，會導致幾丁聚醣鏈的分子內及分子間的靜電排斥情形減少，造成分子鏈更易結合在一起，使分子捲縮，黏度因此下降(Aiba et al, 1986);幾丁聚醣溶液於酸性或鹼性條件下，其分子電荷、分散性及分子糾結情況可參見圖四(Wei et al., 2012)。



圖四、幾丁聚醣溶液於酸性或鹼性環境下之分子電荷、分散性及分子排列情形。

Fig. 4. Chitosan solution in the case of the molecular charge under acidic or alkaline environment, dispersion and molecular arrangement (Wei et al., 2012).

(五)幾丁質與幾丁聚糖的製備

1.幾丁質製備

(1) 原料來源及成分

一般最容易取得的幾丁質來源為蝦、蟹的外殼，其主要組成份為：碳酸鈣、蛋白質、幾丁質、磷酸鈣、還原蝦紅素(astaxanthin)等(Hirano, 1989)。蝦蟹殼成分中以碳酸鈣含量最高，次高為幾丁質，蛋白質，粗脂肪含量則極低，因此要先去除蝦、蟹外殼中之碳酸鈣與蛋白質後才可得到幾丁質(王，1989)。

(2) 幾丁質製備過程

a. 去除礦物質

主要是去除蝦蟹外殼中的碳酸鈣，通常使用鹽酸與碳酸鈣溶液進行反應，使其產生二氧化碳和鈣化合物而去除，其中使用之 HCl 以蒸餾水沖洗完全即可(Stanley et al., 1975)。另外有文獻指出在使用鹽酸處理幾丁質時，可能因為處理時間過長或強酸濃度太高而發生分子降解(depolymerization)的情形(Austin et al., 1981)，所以為了降低分子降解的機率，可將強酸濃度降低，但此方法可能造成蝦蟹殼中的礦物質未完全被去除。

亦有文獻指出使用弱酸類取代鹽酸，如：亞硫酸、醋酸或金屬螯合劑 EDTA 等，可降低分子降解程度，其結果為 EDTA < 乙酸 < 亞硫酸 < 鹽酸(Brine and Austin, 1981)。上述方法雖有可減低分子降解程度的優點，但缺點是不易完全去除礦物質，但近年研究發現，使用過量 0.25 M 鹽酸於室溫下反應，其中幾丁質與鹽酸溶液比例為 1:40 時，為去除碳酸鈣之最佳條件(Percot et al., 2003)。

b. 去除蛋白質

蛋白質去除通常有兩種方法：化學法與酵素法(Bough et al., 1978; Knorr, 1984)，一般常用化學法來處理，因化學法是利用鹼液來處理，操作簡便，效果佳、成本低及處理時間短等優點，但有鹼液廢液處理問題。去除蛋白質過程可能產生幾丁質分子降解、去乙酰作用等問題，所以化學法使用兩段式鹼液處理：(1)以低濃度 0.5 N 氫氧化鈉過夜處理，去除大部份蛋白質及碳酸鈣；(2)再以高濃度 5 N 氫氧化鈉蒸氣浴方式加熱 3 小時，去除殘留之蛋白質(Stanley et al., 1975)。1982 年 Shimahara 等人提出利用蛋白質分解酶產生菌 *Pseudomonas maltophilia* 以發酵方式去除蛋白質，且未出現去乙酰作用。利用酵素法去除蛋白質具有低溫操作、對幾丁質分子降解程度小及去乙酰程度低等優點，但事實上蛋白質可能未完全去除，且作用時間長，所以此方法較少被使用。

3. 幾丁聚醣製備過程

製備幾丁聚醣時須將幾丁質進行去乙酰作用，其常用方法分別為：熱鹼液、酵素或微生物法處理。

a. 熱鹼液

是目前最常用之方法，顧名思義是將幾丁質放入高濃度之鹼液中，加熱進行去乙酰作用。去乙酰程度會受鹼液種類、濃度及用量、加熱溫度、鹼液作用時間以及幾丁聚醣本身分子量、結構差異等因素影響，中以鹼液作用反應時間做為幾丁聚醣去乙酰最重要因子 (Synowiecki and Al-Khateeb, 1977; Prashanth et al., 2002; Methacanon et al., 2003)。此方法具有反應時間短、去乙酰程度高及製備成本低等優點(徐, 2001; 柯, 2006)。表三為利用不同濃度之 NaOH 及反應時間來控制去乙酰度之高低。

b. 酵素法

利用幾丁質去乙醯酶(chitin deacetylase)去除結構上之乙醯基製得幾丁聚醣，雖然此方法並不會對幾丁聚醣分子造成降解，但由於使用成本高、作用時間長而且產率低，在製備去乙醯度 $>90\%$ 之幾丁聚醣較不容易，所以實用性低(劉，1994；陳等，1999；徐，2001)。

c. 微生物法

使用 *Aeromonas sp.* 中的幾丁質去乙醯生產菌以發酵方式生產幾丁聚醣，其優缺點與上述酵素法相似，所以較少被使用(陳等，1999；莊，2002)。

本實驗室使用熱鹼法製備幾丁聚醣，將取幾丁質 40~60 mesh 大小的粉末加入 57 % (w/v) NaOH 溶液(20 mL/g)，加熱 $102\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 並攪拌至不同時間取出，以蒸餾水洗去 NaOH 至 pH 中性，倒入鐵盤於 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱乾燥 8 小時以上，即得不同去乙醯度之幾丁聚醣(阮與沈，2006)。圖五為幾丁質與幾丁聚醣簡單加工流程。

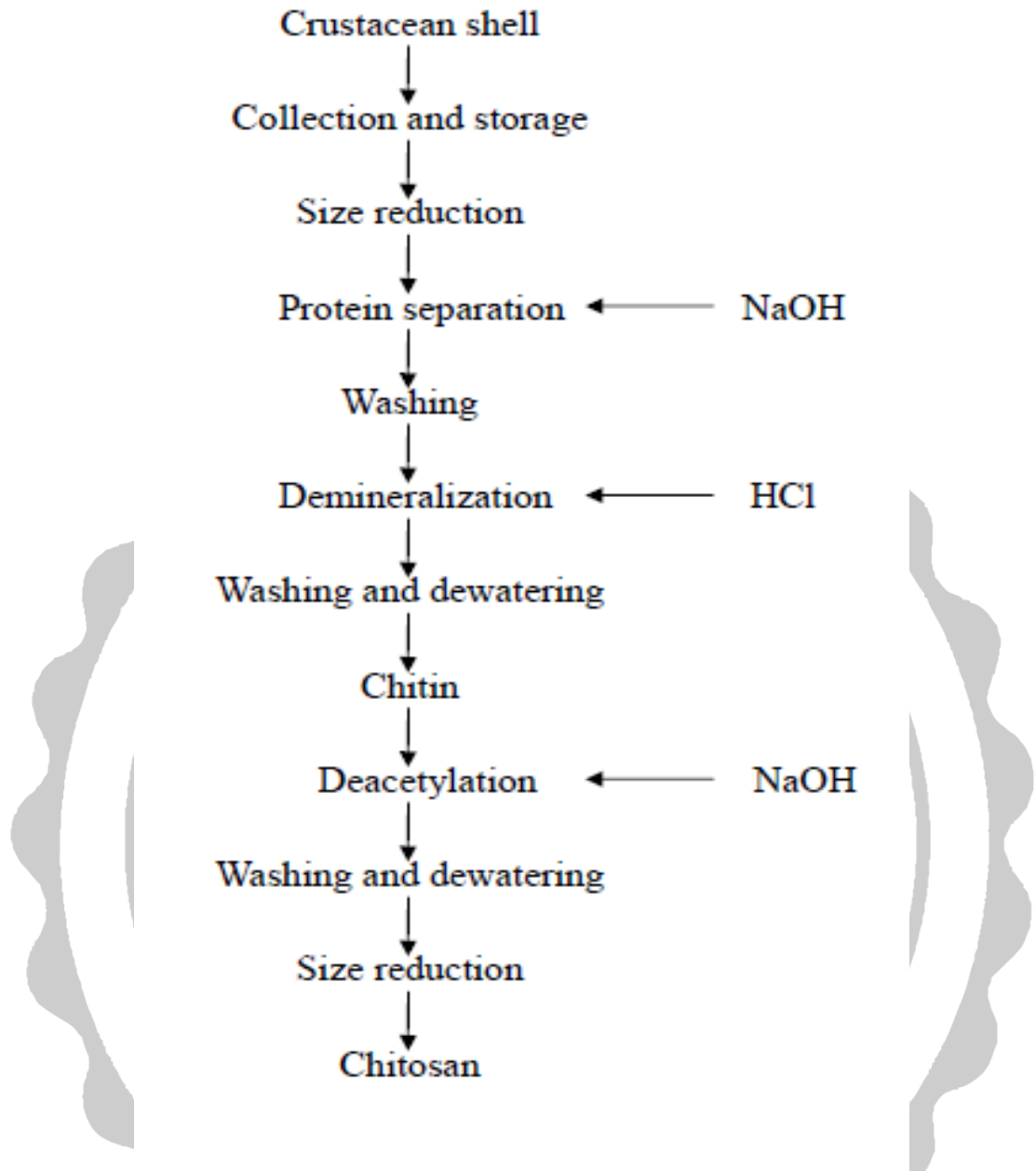
表三、不同去乙醯程度幾丁聚醣之製備條件。

Table 3. Conditions for preparing chitosan of different degrees of deacetylation.

Degree of deacetylation (DD) (%)	Treatment conditions
30-40	30% NaOH [*] , 6-8 hr
	40% NaOH, 0.5 hr
40-50	40% NaOH, 1.0 hr
60-70	50% NaOH, 0.5 hr
70-75	40% NaOH, 2.5 hr
	50% NaOH, 1.0 hr
	60% NaOH, 0.5 hr
75-80	40% NaOH, 4.0 hr
	60% NaOH, 1.0 hr
80-85	40% NaOH, 6.0 hr
	50% NaOH, 4.0 hr
	60% NaOH, 2.5 hr
85-90	50% NaOH, 8.0 hr
	60% NaOH, 4.0 hr

(李, 1988)

* NaOH solution/dry chitin (v/w) = 20
 Reaction temperature = 100 °C



圖五、幾丁質與幾丁聚醣加工之簡單流程圖。

Fig. 5. Simplified flow diagram of chitin and chitosan processing (Knorr, 1984).

(六) 幾丁聚醣之物性分析

1. 分子量測定

(1) 膠體過濾分析法

在管柱中填充一定孔徑的膠體，並以醋酸緩衝液作為其流動相，利用其不同分子大小在管柱內滯留的時間的不同，配合 RI 偵測器來偵測分子大小(Mima et al., 1983)。

(2) 黏度平均分子量

將幾丁聚醣溶解於 0.1 M 醋酸/0.2 M 氯化鈉溶液中，測量此溶液之極限黏度值(limiting viscosity number values, LVN; $[\eta]$)，再利用 Mark-Houwink 公式來計算出其平均分子量，但此法只適用去乙醯度在 60 %以上之幾丁聚醣(Maghani, 1988; Roberts, 1982)。

$$\text{Mark-Houwink equation : } [\eta] = K_m \cdot M^a$$

$$\text{其中 } K_m = 1.81 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}, a = 0.93$$

(3) 高效液相層析法

選擇 glass supports 作為固定相，其粒子大小為 37 ~ 74 μm (200 - 400 mesh)，孔徑大小及管柱長為：2500A (2ft.)、1500A (4ft.)、550A (6ft.)、250A (2ft.)、100A (2ft.)及 40A (2ft.)，並以 dextran 當標準品，配合 UV 和 RI 偵測器來偵測，移動相使用 2 %醋酸，流速為 1 mL/min，即可定出分子量分布的標準曲線(Wu and Bough, 1976)。

(4) 光散射法

利用聚合物分子量不同對不同角度入射光所散射的角度也不同的現象，將幾丁聚醣配製成不同濃度，以折射儀測定溶液折射率變化，再以光散射儀測定散射光子數目，作出 Zimmplots 以求出幾丁聚醣的平均分子量(Beri et al., 1993)。

2. 去乙醯度的測定

(1) 紅外光譜分析法

因為乙醯基在紅外光區有三個吸收波峰，分別為：amide I(1655 cm^{-1})、amide II(1550 cm^{-1})、amide III(1310 cm^{-1})，並利用乙醯基多寡會影響吸光值的原理，即可計算出幾丁聚糖的乙醯度。因此可以 amide II 配合 C-H bond 在 2878 cm^{-1} 之吸收波峰作為內標準，來計算 N-乙醯化程度(Sannan et al., 1978)。

N-乙醯化程度($\%$)= $98.03 - 34.68 \times (A_{1550}/A_{2878})$ 其中 A_{1550} 為 amide II 在 1550 cm^{-1} 的吸收值； A_{2878} 為 C-H bond 在 2878 cm^{-1} 的吸收值。

另外，也可利用 amide I 配合 O-H bond 在 3450 cm^{-1} 之吸收波峰作為內標準，來計算 N-乙醯化程度(Moore and Roberts, 1980)。

N-乙醯化程度($\%$)= $(A_{1655}/A_{3450}) \times (100/1.33)$ 其中 A_{1655} 為 amide I 在 1655 cm^{-1} 的吸收值； A_{3450} 為 O-H bond 在 3450 cm^{-1} 的吸收值。

(2) 紫外光光譜分析

利用 N-乙醯葡萄糖胺在紫外光 199 nm 時，其吸收光譜值的一次微分與其濃度之間所形成的一個正相關性質，以此來計算樣品的去乙醯程度，且此現象不會受到乙酸及葡萄糖胺的存在而影響。其方法為先做出 N-乙醯葡萄糖胺標準品的標準方程式，再將待測樣品的吸光值代入此方程式，即可得知去乙醯度。但此方法容易受到殘留蛋白質等其他因素的關係而影響準確性(Muzzarelli, 1985; Tan et al., 1998)。

$$\text{去乙醯程度}(\%) = 100 - (A \times 100) / [(W - 204A) / (161 + A)]$$

其中 A 為 N-乙醯葡萄糖胺之莫耳數； W 為樣品重(g)。

(3) 光譜分析法

利用光譜波長在 $200 \sim 250\text{ nm}$ 範圍時，N-乙醯葡萄糖胺在波長 211 nm 有吸收峰，而葡萄糖胺則沒有的現象，根據吸收峰的強度來推算幾丁質與幾丁聚糖的乙醯基含量(Domard, 1987)。

$$\text{乙醯基程度(\%)} = (161 \times H100) / [161 \times H + 203 \times (H100 - H)]$$

其中 H100 為完全去乙醯基的光譜吸收峰高度；H 為樣品去乙醯基的光譜吸收峰高度。

(4) 氣相層析法

將幾丁質或幾丁聚醣以 4 N 的鹽酸溶解，在 100 °C 下進行水解，除了使 β -1,4 醣鍵全部斷裂之外，也使乙醯葡萄糖胺上的乙醯基完全游離並以醋酸的形態存在於水解液中，接著以氣相層析法定量水解液中醋酸的含量，就可以得知乙醯葡萄糖胺之含量，然後以呈色法測定總葡萄糖胺的量，最後將乙醯葡萄糖胺量除以總葡萄糖胺量就可得知去乙醯程度 (Holan and Voyruba, 1980)。

(5) 高效液相層析法

用 12 N 的濃硫酸、草酸和丙酸混合液在高溫 155 °C 下水解待測樣品 1 小時，使幾丁聚醣上的乙醯基完全水解，並以醋酸的形態存在於水解液中。再經由 2 小時的冰浴，接著以 HPLC 定量醋酸，並以丙酸做為標準液，即可得知乙醯化程度。其所使用之管柱為陽離子交換樹脂(cation-exchange resin)管柱，移動相為 5 mM H₂SO₄，紫外光檢測器(UV detector)之波長為 210 nm (Niola et al., 1993)。

醋酸之質量(Mx)以下式計算：

$$M_x = K \times (A_x / A_{is}) \times M_{is}$$

其中 K 為 response factor；A_x 為醋酸的波峰面積；A_{is} 為丙酸的波峰面積；M_{is} 為丙酸標準品之質量(mg)。

$$N\text{-乙醯化程度(\%)} = [161X / (43 - 42X)] \times 100$$

其中 X 為樣品經由強酸水解後所得之質量與扣除殘留灰分量後樣品質量的比值；161 為葡萄糖胺單體的分子量；43 為乙醯基的式量。

(6) 酵素法

先將 0.5 g 的幾丁聚醣樣品溶解於 100 mL 的醋酸溶液(0.2 %) 中，再取 2 mL 上述溶液，分別以 5 單位的 exo- β -D-glucosamin-

idase, β -N-acetylhexosaminidase 及 chitosanase 在 40 °C 下水解 12 小時，接著利用 specific colorimetric 及 HPLC 分析葡萄糖胺與 N-乙醯葡萄糖胺的含量，並帶入下列公式計算幾丁聚醣的去乙醯程度(Nanjo, 1991)。

degree of deacetylation(%) = $100 \times \text{GlcN} / (\text{GlcN} + \text{GlcNAc})$ 其中
GlcN 為葡萄糖胺的濃度($\mu\text{mol/ml}$)；GlcNAc 為 N-乙醯葡萄糖胺的濃度($\mu\text{mol/ml}$)。

(7) 滴定法

以多陰離子試劑 P.V.S.K. (Potassium polyvinyl sulfate) 滴定待測溶液，並以 toluidine blue 為指示劑，當滴定達終點時，會由藍色轉變為紅紫色，再與標準品比對滴定量後就可以測得去乙醯度(Toei and Kohara, 1976)。

(8) 熱分析法

因幾丁質與幾丁聚醣所含的乙醯基數量不一樣，所以其分子之鍵結能亦不相同，故熱溶解時所需之能量也會不同，因此可以將幾丁質或幾丁聚醣樣品與標準品熱溶解後，相互比較其熱溶解所需之能量，以得知待測樣品之乙醯基的含量(Alonso et al., 1983)。

(9) 比色分析法

使用亞硝酸將葡萄糖胺的胺基去除後，再加入 MBTH (3-methyl-2-benzothiazolone hyarazone hydrochloride) 與三氯化鐵反應，接著測量葡萄糖胺在 650 nm 的吸光值，最後代入標準方程式即可求得樣品的去乙醯程度(Davis and Hayes, 1988)。

(10) 核磁共振光譜分析法

N-乙醯葡萄糖胺在核磁共振光譜分析中，其 N-乙醯基在 $\delta = 2.1 \text{ ppm/TMS}$ 時有吸收光譜，可以測量乙醯基含量。此法最好的地方是可使用在固體的樣品，因此沒有幾丁聚醣是否可以溶解的問題，但其缺點則是對於低乙醯基的樣品測定較不準確(Saito, 1987)。

(11) Nihydrin 呈色定量游離胺基法

分別配製一系列的幾丁聚醣待測樣品與葡萄糖胺之溶液 (20-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，將兩者分別與 Ninhydrin 試劑反應後，測量其在 OD₅₇₀ 下的吸光值，再以幾丁聚醣樣品濃度或葡萄糖胺濃度對 OD₅₇₀ 吸光值作圖，分別算出兩者的斜率，並把葡萄糖胺校正曲線的斜率當作 100，求得幾丁聚醣待測樣品校正的斜率數值，此數值即為待測樣品之去乙酰程度 (Curotto and Aros, 1993)。

(七)幾丁聚醣安全性與法規

1990 年科學家 Hirano 每天分別以每公斤體重添加 0.8 g 及 1.4 g 的幾丁聚醣餵食雞和兔子，在 239 天後並沒有發現不良症狀；另外以幾丁聚醣作為飼料中蛋白質的凝結促進劑，結果不會影響蛋白質的吸收率，也不會產生任何毒性 (Bough and Lands, 1977)。幾丁聚醣目前其已被廣泛利用在食品上，並通過許多安全認證，是公認無毒性且具高度生物相容性的聚合物。

1983 年：日本將幾丁聚醣列入食品添加劑 (Japanese Natural Additive List)。

1986 年：AAFCO (Association of American Feed Control Officials) 允許幾丁聚醣作為動物飼料，其含量以 0.1% 為限。

1989 年：日本將幾丁質及幾丁聚醣在 List of Food Additives other than Chemical Synthetics 列為合法的安定劑 (stabilizers) 及增稠劑 (thickeners)。

1991 年：美國食品藥物管理局 (USFDA, United States Food and Drug Administration) 允許幾丁聚醣添加於食品及飼料中，為一合法添加物。幾丁聚醣及其衍生物可用來當作食品加工蔬果的蛋白質沈澱劑。

2002 年：台灣行政院衛生署於「衛生署核發健康食品許可證一覽表」中，列出「金車甲殼素複方膠囊」為核可健康食品，其內容

物主要成分包含幾丁聚醣，且標示出其保健功效：(1)降低血中總膽固醇量；(2)可降低血中低密度脂蛋白膽固醇；(3)可減少動脈硬化之危險因子(台灣行政院衛生署)。可減少動脈硬化之危險因子(台灣行政院衛生署)。

(八)幾丁質與幾丁聚醣之應用

早期幾丁質與幾丁聚醣之應用主要在於廢水處理、螯合金屬離子和食品加工等方面(Knorr, 1982)。近年來更被廣泛應用在各個領域，如醫療保健、紡織工業、生化工業及生醫材料等，朝向具有較高價值的產品，參見表四。以下針對食品加工、食品保健及醫療藥學等方面進行介紹：

1. 食品加工之應用

幾丁聚醣在食品加工方面主要扮演乳化劑、穩定劑、增稠劑、凝絮劑及澄清劑的角色(徐，2006)。幾丁聚醣為優異且廣泛的抗菌效果，Roller 與 Covill 於 1999 年研究證明若在市售蘋果汁及實驗室自製蘋果汁培養液中添加微量幾丁聚醣，即可對多種真菌產生優異的抑制效果。

另外幾丁聚醣對於粒子、金屬離子具有吸附效果，且在酸性溶液中，幾丁聚醣變為帶正電之聚合物，利用此特性來吸附液態食品中部份的有機酸，減少食品中的酸度，亦可以澄清液態食品中濁度(阮與吳，1996；李等，1999；Roller and Covill, 1999；潘與黃，2005)。阮與吳(1996)使用顆粒大小 40 ~ 60 mesh，去乙醯程度約 90 %，濃度為 0.015 g/mL 的幾丁聚醣添加在葡萄柚汁中，發現果汁的總酸減少 52.6 %，其中的 citric acid、tartaric acid、L-malic acid、oxalic acid 及 ascorbic acid 之去除率分別為 56.6、41.2、38.8、36.8 及 6.5 %。

幾丁聚醣亦可做為可食用膜(edible films)對食品進行包覆，以延長食品儲存期，改善食品在新鮮、冷凍時的品質(Labuza, 1989；劉等，2004；劉等，2005)。一般利用二價金屬離子、負電荷多醣類(anionic

polysaccharides)或 polyelectrolytes 來與幾丁聚醣交叉鍵結形成堅固的幾丁聚醣膜(Dutkiewicz et al., 1992; Uragami et al., 1994)。幾丁聚醣膜具有堅韌、耐久、具彈性且不易撕裂等優點，此機械性質相當於許多中強度之聚合物(Butler et al., 1996)。Kittur 等人(1998)指出幾丁聚醣膜具有調節水分滲透性的性質，可延長許多新鮮製造或水活性高產品之儲存期。



表四、幾丁質及幾丁聚醣常見之應用領域。

Table 4. Application of chitin and chitosan.

應用領域	用途
醫療領域	抗癌藥物 膠囊型藥物之原料 外科手術所用之縫合線人工皮膚各種 醫學器材之抗菌材料或鍍膜抗凝血劑 促傷口癒合之藥劑
化工領域	化妝品及保濕性乳劑洗髮精及各式洗 潔劑具抗菌及防臭功能的紡織物加工 品顏料之助染劑及褪染劑人造纖維、染 料等化工材料之原料
生物科技領域	固定化酵素如 lactase 及 amylase 固定細胞膜 薄膜層析法(TLC)之材料蛋白質之純化 或分離微生物生長之抑制劑離子交換 樹脂之材料
農業領域	作為生物性農藥作為飼料添加劑餵食 家禽及水產動物種子保存
食品加工及食品化學領域	作為防腐劑吸附色素(如紅色四號) 飲 料之澄清劑、去酸劑強化食品香氣 中藥煎液之去金屬離子劑

(接上頁)

保健食品領域

減少脂肪吸收，降低肥胖症、脂血症降
血壓及膽固醇

吸附體內微量重金屬增強人體免疫力
及增強抗體調節生理機能

環保領域

飲用水及工業廢水之吸附劑廢水處理
之混凝劑吸附廢重金屬及特定之污染
物螯合廢水中之重金屬離子處理污泥
回收加工廢水中蛋白質吸附殺蟲劑及
多氯聯苯(PCBs) 吸附染料

其他

隱形眼鏡之材料擴音器震動膜材料樂
器材料之覆蓋劑，具美化音質之效紙力
增強劑
逆滲透膜改良之香菸紙捲其他薄膜結
構之替代品

(江，1998；李，1988；Shahidi et al., 1999；陳，2005)

2. 食品保健之應用

1983 年美國 FDA (USFDA, United States Food and Drug Administration) 通過幾丁聚醣作為食品添加物(Knorr, 1986)。(呂等, 2001)研究證實幾丁聚醣對於膽固醇(cholesterol)及脂肪具有強吸附性能, 因此亦被用為肥胖及其併發症的預防及治療。在低 pH 時, 由於幾丁聚醣能形成離子鍵, 在體外實驗時顯示其能與各種陰離子結合, 如膽酸和游離脂肪酸(Muzzarelli, 1997), 而在人體胃至腸道方面, 因幾丁聚醣無法被人體消化吸收利用, 同時又與膽汁酸、脂肪及膽固醇等結合成絮凝物或較大顆粒的膠體, 並把油脂類物質包覆於其中, 阻礙消化酵素對脂肪的吸收和作用, 而上述大部分所結合的脂質都隨後被排泄掉(Kanauchi et al., 1995; Muzzarelli, 1997)。在腸胃道中, 膽固醇與幾丁聚醣形成微細胞(micelles)而在上腸道中減少膽固醇的吸收並循環 cholic acid 至肝臟進而降低血膽固醇之含量; 膽汁酸被幾丁聚醣包覆, 亦會減少油脂的乳化作用, 導致脂質消化率的降低(Vahouny et al., 1983; 劉等, 2005), 達到減肥的效果。

另外有研究指出使用膠態幾丁聚醣加入高脂飼料中餵養老鼠, 結果發現, 膠態幾丁聚醣濃度愈高, 老鼠糞便中所含有的脂質、礦物質及蛋白質含量會愈高, 而體重增加率及肝臟和血漿中膽固醇與三酸甘油酯含量會愈低(蔡, 2004; 吳, 2003)。幾丁質及幾丁聚醣不會被人體所消化和吸收, 因此可視為動物性膳食纖維(Knorr et al., 1985; 張, 2002)。

3. 醫療藥學之應用

幾丁聚醣除了上述的降低膽固醇功用外, 還可以活化生物體內的殺手細胞(killer cell)、抑制腫瘤細胞的生長、抗潰瘍、抗病毒及做抗癌藥物使用(Suzuki et al., 1986; 戶倉, 1990; Kurita et al., 1998; Nishimura et al., 1998; Mitra et al., 2001; Qin et al., 2001; Qin et al., 2003; 曹等, 2005), 亦具有使細菌不易附著、具抗菌活性、可被生物分解、組織相

容性佳、對人體不具刺激性等特性，因此亦被開發於生醫材料之用(Naoji et al., 2000)，例如可作為手術縫合線、膠囊、人工皮膚及抗菌面膜等物品之材料(Shahabeddin et al., 1990; Chung et al., 1994; 陳, 2000)。

於藥學上，幾丁聚醣有良好的生物分解性生物相容性及生物相容性(馬等, 2002)。幾丁聚醣於常溫乾燥環境下為穩定之固態物質，因此常被用作藥劑之膠囊、包覆膜等，並應用於控制藥劑釋放之微膠囊(microcapsule)上(何等, 2002; 趙等, 2004)。文獻指出一些不易被消化吸收的藥物如 tenolol 與幾丁聚醣混合後，經實驗證明幾丁聚醣可提升腸道細胞 Caco-2 吸收 atenolol，其吸收度率達 10 ~ 15 倍(Schipper et al., 1999)。

4. 幾丁聚醣有助於物質在腸道吸收之因素

有學者推測關於幾丁聚醣提升物質在腸道的吸收，主要和兩種作用有關：(1)生物附著性(2)可有效黏附在黏膜上，短暫打開細胞內之緊密連接(tight junctions)通道提高物質進入等特性(Artursson et al., 1994)。

a. 幾丁聚醣具生物黏著性

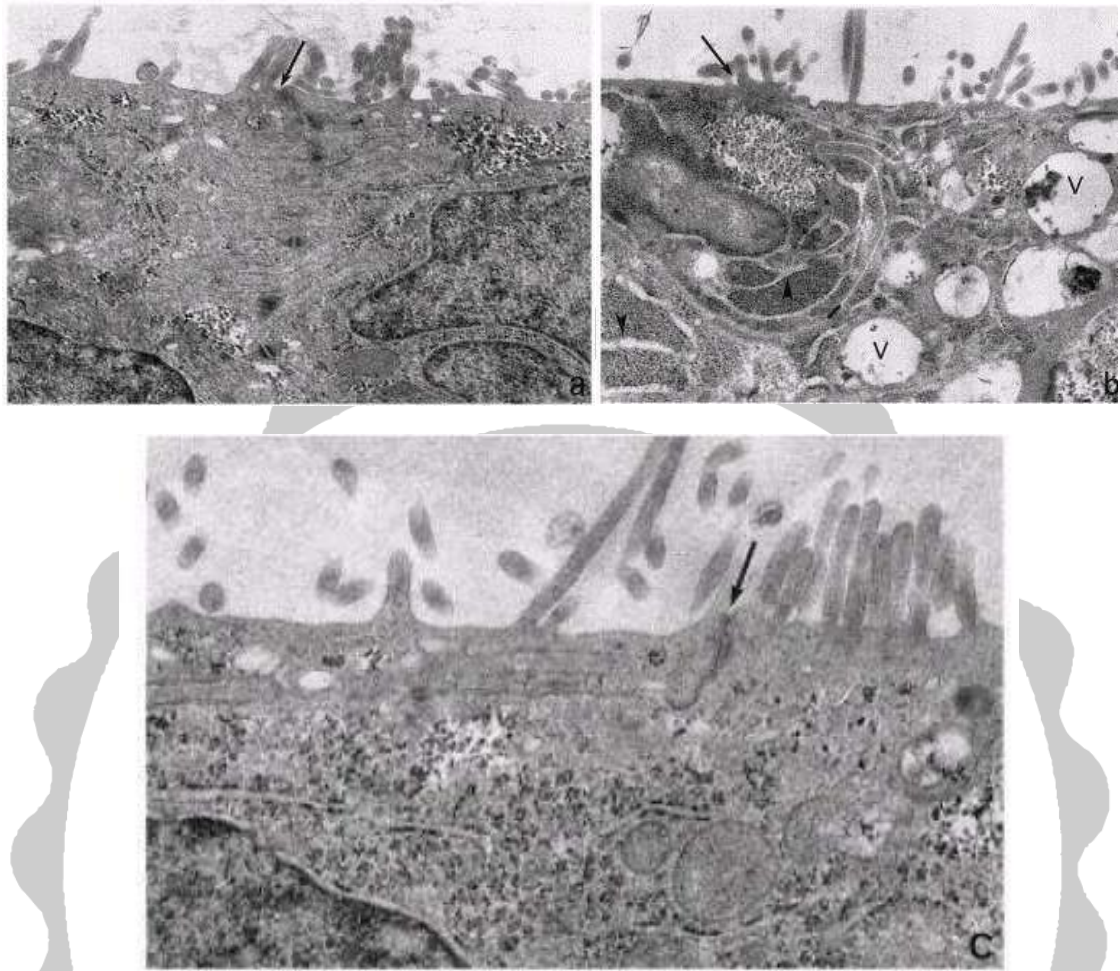
幾丁聚醣在酸性環境下帶有高度正電荷，幾丁聚醣分子會與帶負電之黏膜細胞產生靜電吸引作用力而黏附於細胞表面，此特性歸因於幾丁聚醣有：

- (1)強的氫鍵鍵結基團如 - OH 及 - COOH (Schipper et al., 1997)；
- (2)高度電荷(Dodane et al., 1999)；
- (3)高度分子量(Schipper et al., 1996; Kotze et al., 1998)；
- (4)長鏈具有良好的伸展性(He et al., 1998)；
- (5)表面能量特性可支持幾丁聚醣滲透至黏膜(Lueßen et al., 1994)。

b. 幾丁聚醣具可逆性地調控腸道上皮細胞之緊密連接(tight junction) 開合之能力

緊密連接是一種封閉連接，主要存在內皮細胞間和上皮細胞，如消化道上皮、膀胱上皮、腦毛細管內皮以及睪丸支持細胞之間等。文獻指出幾丁聚醣之衍生物具有促進胜肽類藥物在腸道內釋放及吸收的效果(Kotze et al., 1998)，其原因為幾丁聚醣衍生物具有可短暫調控腸道上皮細胞間的緊密連接開合的功能，讓藥物或營養物質順利通過腸道進入血液中被吸收。

Dodane 等人(1999)指出幾丁聚醣因帶有正電荷，能夠黏附在負電腸道上皮細胞上，與調控緊密連接開合的蛋白產生作用，暫時打開通道使藥物或營養物質進入。研究以穿透式電子顯微鏡觀察幾丁聚醣對腸黏膜上細胞緊密連接通道之影響(圖六)。作者以兩種方式處理後觀察細胞：1.將細胞以 0.1 % chitosan 處理 30 分鐘之後觀察；2.將細胞做回復處理，將培養液中的幾丁聚醣移除，繼續培養 24 小時，觀察細胞結構。圖六之(a)圖指出細胞具有連續的頂端膜、正常微絨毛(\)及緊密的緊密連接結構；(b)圖為以方式一處理後，發現細胞出現許多大的細胞內空泡(V)及腫脹的網狀結構(▲)，在(\)位置也可觀察到微絨毛經由幾丁聚醣處理後呈不規則的排列；(c)圖為方式二處理後觀察發現細胞結構可恢復到未處理前相似。由上述結果證實幾丁聚醣能夠可逆性調控上皮細胞之細胞間和細胞內路徑，來增加物質的滲透性。



圖六、以穿透電子顯微鏡觀察幾丁聚醣對腸道上皮細胞之影響，(a) 為 Caco-2 細胞正常型態，(b) 為經由 0.1%幾丁聚醣處理 30 分鐘後之細胞和(c) 為將幾丁聚醣移除後，繼續培養 24 小時後之細胞。

Fig. 6. Transmission electron micrographs of (a) Caco-2 cells before or (b) after 30 min of 0.1 % chitosan treatment and (c) 24h recovery following 0.1% chitosan treatment. $\times 30,000$ (Dodane et al., 1999).

二、次亞麻酸油(Linolenic acid, LNA)

脂肪酸是組成脂質的基本成分，一般很少單獨存在，常與甘油結合或以其他衍生物的形態存在。脂肪酸由碳鏈及 carboxyl group 所構成，在自然界中脂肪酸多為偶數個碳原子，可依據其碳鏈長度可分類為短鏈(2 至 6 個碳原子)、中鏈(含 8 至 12 個碳原子)及長鏈(含 14 個以上的碳原子)。且碳鏈上之雙鍵數目主要決定此脂肪酸的類型：
(a)碳鏈上不含雙鍵者為飽和脂肪酸，如硬脂酸(stearic acid, C18:0)。
(b)碳鏈含一個雙鍵者為單元不飽和脂肪酸，如油酸(oilic acid, C18:1n-9)。
(c)若於碳鏈上含有兩個或兩個以上雙鍵者為多不飽和脂肪酸。其中碳鏈長為 18 ~ 22 個碳原子且為直鏈脂肪酸的多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fattyacid, PUFA)，會因其結構特點及在人體內代謝的相互轉化方式不同，主可分成 omega-3 及 omega-6 fatty acids 兩個系列。由於人體無法藉由酵素作用將雙鍵加入在 ω -3 及 ω -6 的位子合成(De Caterina, 2011)，必須藉由食物中才能獲得脂肪酸，見表五，故稱為必須脂肪酸(Essential fatty acids)。

表五、必需脂肪酸和多元不飽和脂肪酸的主要食物來源。

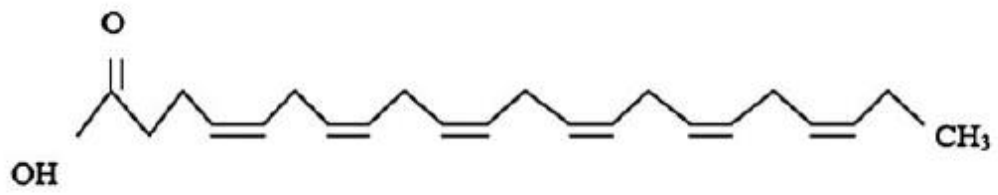
Table 5. Dietary sources of selected EFAs/PUFAs.

Product	LA	ALA	AA	EPA+DHA
<i>n</i> – 6 FA rich foods				
Corn oil	50000	900		
Cotton seed oil	47800	1000		
Peanut oil	23900			
Soybean oil	53400	7600		
Sunflower oil	60200	500		
Safflower oil	74000	470		
Margarine	17600	1900		
Lard	8600	1000	1070	
Chicken egg	3800	220		
Bacon	6080	250	250	
Ham	2480	160	130	
Soya bean	8650	1000		
Maize	1630	40		
Almond	9860	260		
Brazil nut	24900			
Peanut	13900	530		
Walnut	34100	6800	590	
<i>n</i> – 3 FA rich foods				
Canola oil	19100	8600		
Linseed oil	13400	55300		
Herring	150	61.66	36.66	1700
Salmon	440	550	300	1200
Trout	74		30	500
Tuna	260	270	280	400
Cod	4	2	3	300
<p>^a Data reported as mg/100 g.</p> <p>^b Data elaborated from [16,36].</p> <p>^c Content of <i>n</i> – 6, <i>n</i> – 3 FAs may slightly vary according to species, sources and analytical methods.</p>				

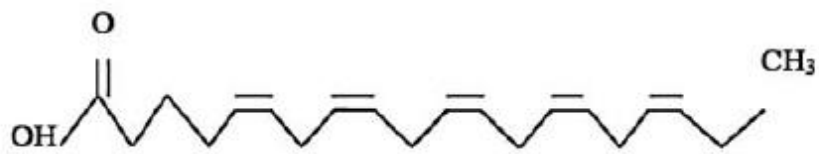
(De Caterina, 2011)

(一)次亞麻油酸簡介

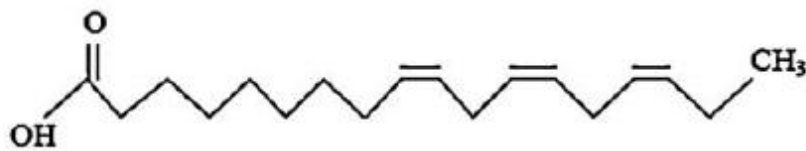
由 18 個碳原子所構成且具有 3 個雙鍵($18:3\Delta^{9c,12c,15c}$), 為 ω -3 脂肪酸, 亞麻籽油、大麻籽油及大豆油為其主要來源, 亦存在於海洋魚類中。攝取次亞麻油酸的優點為:(1)預防老人失智、預防阿茲海默症 (2)降低膽固醇、防止心血管疾病, 如:預防心律不整、抗血栓、減緩動脈粥狀硬化 (3)藉由與細胞膜之嵌合, 進一步穩定細胞膜及減少發炎介質生成, 有效延緩發炎反應。當缺乏次亞麻油酸時, 會出現皮膚炎等症狀, 研究指出, ω -3 脂肪酸是維持神經發展及視覺功能的重要物質, 因此確定次亞麻油酸對人體的重要性。Omega-3 不飽和脂肪酸有三種主要的脂肪酸:富含於植物的次亞麻油酸以及大量存在海洋生物的 eicosa pentaenoic acid (EPA)和 docosa hexaenoic acid (DHA), 參見圖七。其中與次亞麻油酸同族之二十二碳六烯酸 (docosa hexaenoic acid, 22:6, DHA)是組織中含量最豐富之 ω -3 脂肪酸, 在大腦及視網膜中濃度最高 (Spector, 1999)。有學者認為其 DHA 具有影響三種磷脂質結構及代謝之能力, phosphatidylserine、phosphatidylethanolamine 及 eanolamineplasmalogens 結構中 DHA 為所佔比例較高的脂肪酸, 因此間接改變細胞膜的流動性及通透性(Yorek et al., 1984)。神經系統中星狀細胞將次亞麻油酸變換成 DHA 並供給至神經元(Moore et al., 1991)。研究指出將 ω -3 脂肪酸含量降低, ω -6 脂肪酸之花生四烯酸和二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, 22:5)濃度會增加以取代 ω -3 脂肪酸的生理作用, 但即時濃度明顯增加, 神經系統中的二十二碳五烯酸存在各類脂質的濃度僅為正常生理狀態下 DHA 的 50% (Zhang et al., 1998)。因此有學者推論 DHA 對於神經系統功能的影響是無法被其他脂肪酸所替代的, 所以當次亞麻油酸缺乏時, 才會出現神經功能異常或遲緩等現象(Spector, 1999)。



Docosahexanoic Acid (DHA) – 22:6n-3



Eicosapentaenoic Acid (EPA) – 20:5n-3



Alpha-Linolenic Acid (ALA) – 18:3n-3

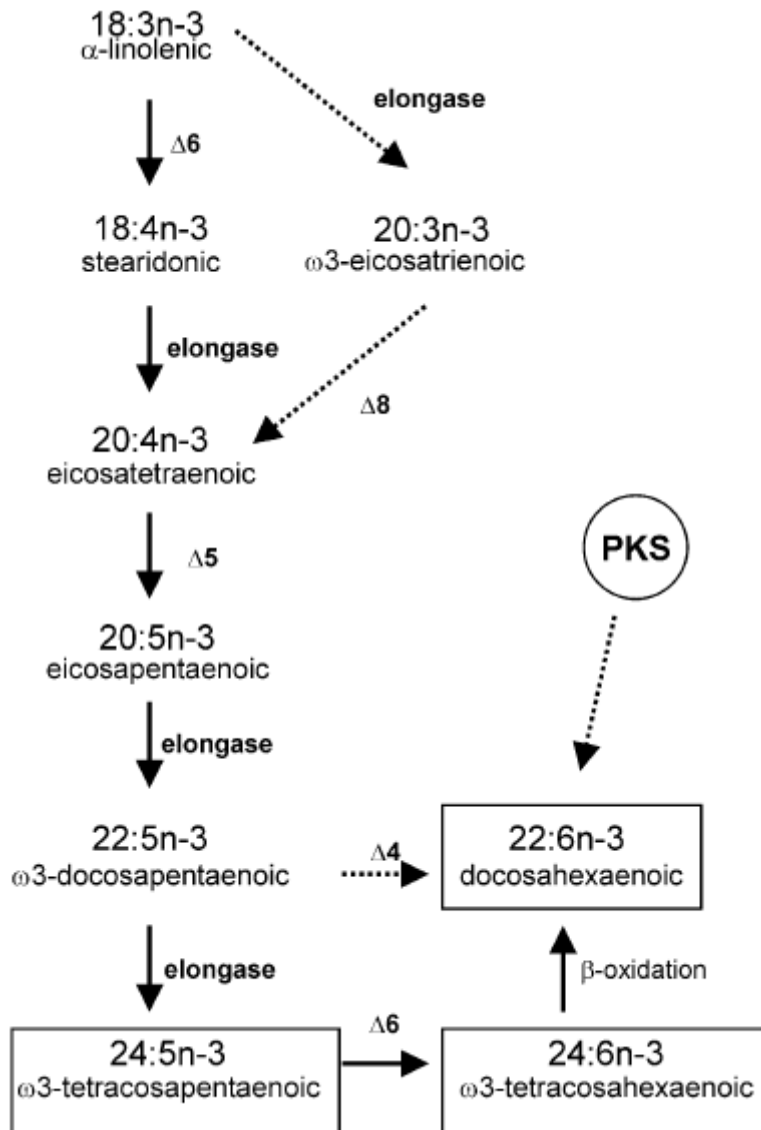
圖七. Omega-3 不飽和脂肪酸之結構。

Fig. 7. Nomenclature of omega-3 fatty acids. (McManus et al., 2011)

(二)次亞麻油酸之生理作用

由於身體無法自行合成 ω -3和 ω -6PUFA，如次亞麻油酸(LNA; 18:3, ω -3)，需靠外界食物才能獲得，因被稱為必須脂肪酸(Roberts, 1990)。重要的是，其在體內代謝轉化或者特定食物中攝入的幾種多元不飽和脂肪酸在人體生理中產生重要的作用，與人體心血管疾病的控制，例如：可顯著影響脂蛋白代謝，從而改變心血管疾病的危險性；減少血小板凝聚功能，避免動脈血栓形成；影響動脈粥狀硬化細胞免疫反應及炎性反應、免疫調節、細胞生長以及抗癌作用等相關作用。其可經由兩種去飽合酶(Δ^5 與 Δ^6)及加長酶作用，展延(elongation)成二十碳多元不飽和脂肪酸，如二十碳五烯酸(EPA; 20:5, ω -3)及二十二碳六烯酸(DHA; 22:6, ω -3)等(Schlemmer et al., 1999)，人體轉換系統如圖八。 ω -3PUFA最後轉變為(DHA; 22:6, ω -3)儲存在各種人體組織中，例如：眼、腦神經及細胞壁等，具有抗前列腺和白烯三素的作用。通常嬰兒和老年人的 Δ^6 脫氫酶的活性不足，對成年人來說，如果飲酒過度、胰島素分泌不足、高膽固醇及高血脂等。都會導致 Δ^6 去飽合酶的活性不足，從而影響不飽和脂肪酸的合成，因此必須從外源補充 ω -3不飽和脂肪酸。

文獻指出花生四烯酸及 DHA 其兩者對於大腦發育及功能發展有重要的影響(Maclean et al., 2005)。研究顯示多元不飽和脂肪酸對於大腦的功能有明顯的影響，如修飾膜的流動性，控制膜結合酶的活性、離子通道活性以及神經系統信號傳遞和活性等(Robinson et al., 1996)；在視網膜發育方面 ω -3脂肪酸之DHA為重要角色，尤其是光感受器的突觸及外段部分 DHA 影響更是明顯，因 DHA 可通過血液視網膜屏障(bloodretinabARRIER)使視網膜細胞柔軟，進而刺激感光感細胞，活化視網膜，使訊息快速傳遞到大腦，進而提升視力(Marszalek et al., 2005)。此外，血小板的總次亞麻油酸(LNA; 18:3, ω -3)、EPA(20:5, ω -3)以及DHA(22:6, ω -3)與血漿甘油三酯、磷脂、脂肪組織中的脂肪酸濃度呈顯著相關性。

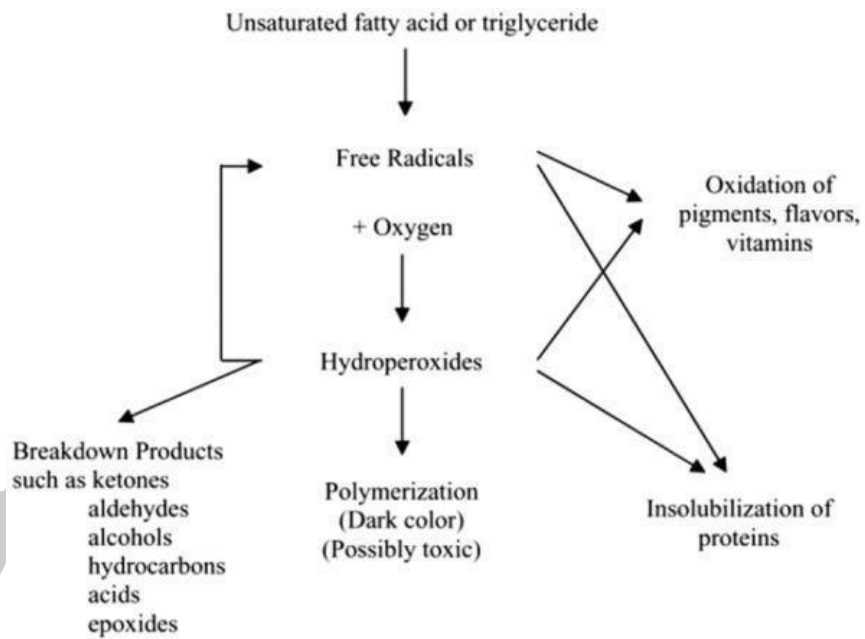


圖八、高度多元不飽和脂肪酸之合成路徑。

Fig. 8. Metabolic pathways of long-chain PUFAs. (Leonard et al., 2004)

(三) 次亞麻油酸氧化

次亞麻油酸其結構因具有雙鍵，故在儲存時容易發生氧化情形，如圖九，而脂肪酸隨著不飽和程度的增加其氧化速率隨之加快。根據研究指出，含有 ω -3 脂肪酸之魚油容易與氧氣產生作用而氧化 進而降低其功效性，故以幾丁聚醣及卵磷脂利用靜電層沉積法將魚油包覆於中，因正負電相吸形成穩定的靜電膜，使油滴穩定並可減緩氧化的速度，其效果比單獨只有包覆卵磷脂膜來的更顯著(Klinkesorn et al., 2005)；另 有學者利用幾丁聚醣、修飾澱粉及葡萄糖之混合物包覆魚油粉末改善魚油之氧化穩定，製備兩種比例 [chitosan:glucose:Hi-Cap:oil =1:1:2.7:2 (15 %:15 %:40 %:30 %)及 1:1:1:2 (20 %:20 %:20 %:40 %)] 且 pH 各別為 4.9 及 6 的乳化液，再利用噴霧乾燥製成魚油粉末保存，結果顯示 pH6 之魚油粉末其氧化穩定比 pH4.9 之魚油粉末好，可得之 pH6 之魚油粉末包覆性比 pH4.9 好且經 chitosan - OSA-starch 包覆之魚油有助於減緩魚油氧化速度(Shen et al., 2010)。



圖九、不飽和脂肪酸的氧化機制。

Fig. 9. Oxidative mechanisms of unsaturated fatty acid.
(Sakdapipanich and Rojruthai, 2012)

三、 β -胡蘿蔔素(β -Carotene)

(一) β -胡蘿蔔素簡介

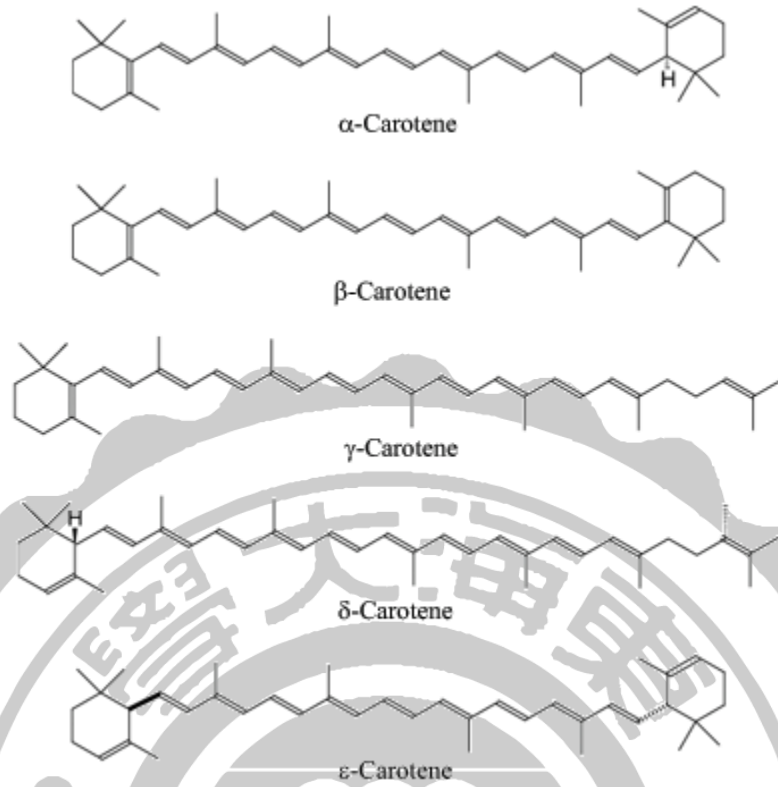
β -胡蘿蔔素是存在於許多蔬果中的一種類胡蘿蔔素(carotenoids)，其分佈十分廣泛，且多存在於植物的葉、花、根中，屬於脂溶性物質。

作為天然色素和抗氧化劑， β -胡蘿蔔素是常見的食物成分，在食品工業中起著重要的作用。各種研究已經確定了 β -胡蘿蔔素的許多潛在健康益處，例如防止癌症，黃斑變性，心臟病和作為維生素 A 的前驅物等(Shao, 2017)。

(二) β -胡蘿蔔素結構和基本性質

胡蘿蔔素(carotene)類有多種異構體，是含有 40 個碳的多烯四萜，由異戊二烯經頭尾或尾尾相連而構成，有 α -胡蘿蔔素、 β -胡蘿蔔素、 γ -胡蘿蔔素等(參見圖十)，其差異在於末端環狀基上的雙鍵位置；在多種異構體中， β -胡蘿蔔素分佈最廣、含量最多，也最具有轉化成維他命 A 的物質特性。

胡蘿蔔素類為典型的脂溶性色素，易溶於石油醚、乙醚而難溶於乙醇。如無氧化條件，在酸、光、熱作用下，除可能發生幾何異構化外，顏色變化不大。如遇氧化條件，易受氧化和光化學氧化形成加氧產物或進一步分解為更小的分子；在受強熱時可分解為多種揮發性小分子化合物，從而改變顏色和風味。



圖十、各種胡蘿蔔素結構。

Fig. 10. Chemical structure of carotene series. (陳，2000)

(三) β -胡蘿蔔素的醫療功效

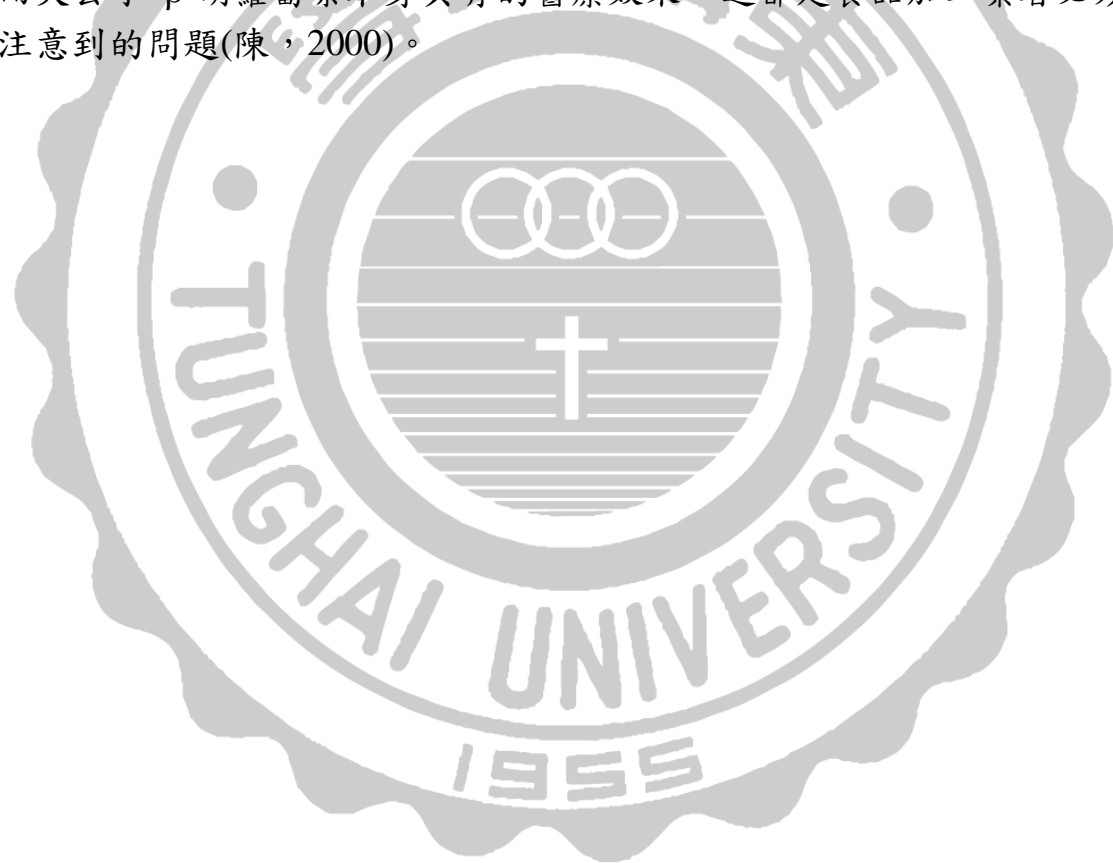
目前有關於 β -胡蘿蔔素於臨床醫學方面的研究報告非常多，由於 β -胡蘿蔔素於人體內有部分可被轉換成維生素 A。因此有些學者相信某些醫療上的效果是來自維生素 A，而不是 β -胡蘿蔔素本身。不過最近幾年的研究報告顯示出一些不具有維生素 A 活性的類胡蘿蔔素亦具有相同的醫療效果， β -胡蘿蔔素可抑制神經母細胞瘤轉移(Lim et al., 2014)，加上飲食中的 β -胡蘿蔔素在人體內僅約有六分之一會被轉換成維生素 A，這些證據都足以說明某些醫療上的效果是來自 β -胡蘿蔔素本身。(陳，2000)現就 β -胡蘿蔔素的醫療效果分述如下：(1) β -胡蘿蔔素具有治療光過敏性皮膚病及皮膚癌的效果，此種效果在臨床上的表現非常顯著；(2) β -胡蘿蔔素可能具有增加生物體免疫能力的效果；(3) β -胡蘿蔔素具有防癌的效果，此種效果主要來自於 β -胡蘿蔔素本身的抗氧化作用。此外，亦有醫學研究報告指出 β -胡蘿蔔素在人體內的抗氧化作用，與維生素 E 具有互補的作用，可是並沒有相乘的效果；(4) β -胡蘿蔔素可能具有治療肺癌或其他癌症的效果，此種效果必須經醫學界更進一步證明；(5) β -胡蘿蔔素可能具有抗老化的效果，此種效果與維生素 E 的抗老化作用類似；(6) β -胡蘿蔔素能具有治療心臟血管疾病的效果。

(四) β -胡蘿蔔素在加工食品中的應用

β -胡蘿蔔素的食品非常廣泛,烘焙食品例如蛋糕、麵包、甜甜圈，麵食類如麵條，嬰兒食品例如奶粉、麥粉，乳製品例如冰淇淋、牛奶、乾酪、優酪乳、奶油，油脂類如烤酥油，糖果類例如牛奶糖，以及蛋黃、沙拉醬、布丁、甜點、果汁、馬鈴薯薄片、爆玉米花、碳酸飲料等。不過最好避免添加到高酸性的食品中，因為 β -胡蘿蔔素於酸性條件亦會呈不穩定的狀態，有可能因為經過長時間的貯藏導致活性及顏色改變，進而喪失了原有食品的特性。

幾年前，市面上充斥著添加 β -胡蘿蔔素的飲料及加工食品如麥粉、奶粉等。早期 β -胡蘿蔔素於食品工業的應用主要是當做著色劑來使用，最近幾年則因為消費者健康意識抬頭，加上 β -胡蘿蔔素在臨床

上的醫療效果，使得廠商可以藉者添加 β -胡蘿蔔素至某些食品中，以達到推廣產品的目的。當然就 β -胡蘿蔔素本身的醫療效果而言，是有必要添加到各種食品中，可是由於 β -胡蘿蔔素本身的不安定性，例如光照或加熱都有可能導致 β -胡蘿蔔素無法達到預期的醫療效果，這也是食品製造廠或消費者所必須注意到的一個問題。就 β -胡蘿蔔素的純度而言，廠商若能添加具有 100 %純度的 β -胡蘿蔔素至食品中，對消費者而言是有莫大的好處。可是此種添加方式通常也會增加廠商生產的成本。此外，廠商亦必須注意到 β -胡蘿蔔素在食品加工及貯藏中的安定性，例如食品殺菌時的使手條件，貯藏時使用的包裝材料、溫度及光照條件。因為食品在到達消費者手中時，通常都會已經貯藏一段時間，而這段期間是否有可能導致 β -胡蘿蔔素本身的氧化或裂解，進而失去了 β -胡蘿蔔素本身具有的醫療效果，這都是食品加工業者必須注意到的問題(陳，2000)。



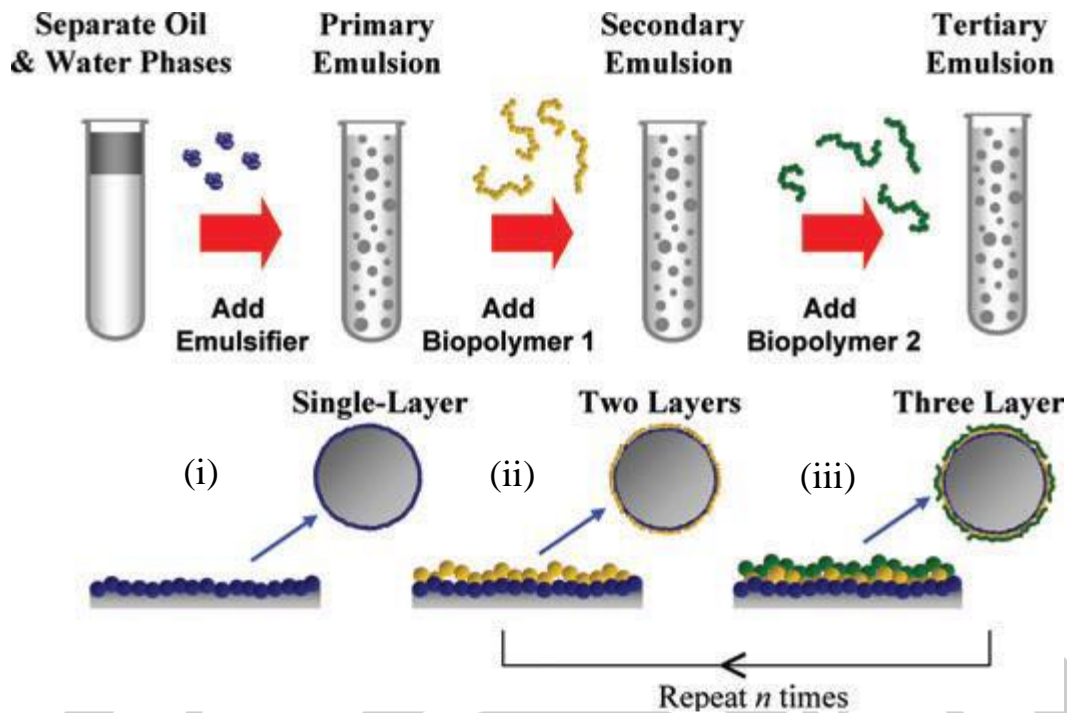
四、幾丁聚醣之乳化性質

(一) 幾丁聚醣乳化包覆原理之探討

1. 靜電沈積法

靜電層沉積法係指將不相容的兩液體(如：水和油)加入一帶電乳化劑，經乳化後其帶電乳化劑吸附於乳滴表面形成帶電單層膜乳化液，而後加入相對電荷之乳化劑進行乳化作用，其第二種乳化劑會因正負電荷相吸行靜電作用而附著於單層帶電乳滴表面，形成雙層膜乳化液。另外可再添加相對電荷乳化劑形成多層膜乳化液，這種層層堆積的方式就稱為靜電層沉積法(electrostatic layer-by-layer (LbL) deposition technique)，參見圖十一。Magdassi 等人(1997)研究發現，單獨使用一種乳化劑進行乳化是不能形成安定的乳化物，所以作者將迷迭香精油先與卵磷脂溶液乳化，形成外表帶負電的乳滴，再加入帶正電之幾丁聚醣溶液，形成不溶之幾丁聚醣—卵磷脂複合物，當 pH 調至 3.5，幾丁聚醣便會沈澱在油滴周圍，形成微膠囊。此方法製備出之乳化物具有較佳之儲藏安定性。Ogawa 等人(2004)亦是使用兩個步驟製備含雙層膜的脂質乳化液。首先將玉米油和卵磷脂溶液乳化，形成表面為陰離子之乳化油滴，接著再加入帶正電的幾丁聚醣溶液，因為靜電吸引力的關係而可形成表面帶正電的雙層膜液滴。

Kaasgaard 及 Keller 於 2010 年研究將負電乳化劑 citrem 與正電乳化劑 chitosan 對揮發性油性風味香芹酮(R-carvone)進行乳化作用，藉由靜電層沉積法將兩種乳化劑包覆於香芹酮表面形成雙層膜乳化液，結果可增加香芹酮於儲存時香味保留度。



圖十一、多層膜乳化液使用靜電層沉積法之圖示 (i) 為單層膜 (ii) 為雙層膜 (iii) 為多層膜

Fig. 11. Multilayer emulsions can be produced by a multistep procedure (electrostatic layer-by-layer (LbL) deposition technique): (i) primary emulsion; (ii) secondary emulsion; (iii) multilayer emulsions. (McClements, 2010)

2. 乳化—凝膠化法

Bustos 等人(2003)以乳化—凝膠化法(emulsification - ionotropic gelation method)製備幾丁聚醣包覆磷蝦油之微膠囊。磷蝦油具有 30 % 以上的 EPA、DHA 以及 200 ~ 400 ppm 左右的蝦紅素，這些成分很容易因氧化而裂解，故藉由幾丁聚醣之包覆，增加其氧化安定性，以使用於水產動物的飼育或人類的營養補充。

3. 多重乳化/交聯法

多重乳化/交聯法是以多重乳化合併使用戊二醛當交聯劑之方法進行乳化包覆作用 (multiple emulsion / solvent evaporation)。Higuera-Ciapara (2004) 將幾丁聚醣先與蝦紅素進行第一次乳化形成 O/W 乳化液，再加入至礦物油中行第二次乳化形成 O/W/O 乳化液，加入戊二醛進行交聯作用製得幾丁聚醣包覆蝦紅素之微膠囊。使用 3 % 之幾丁聚醣溶液所製備出的微膠囊黏度較大，其粒徑約為 5 μm ~50 μm 。且發現儲藏於 25、35 和 45 $^{\circ}\text{C}$ ，經過 8 星期後，微膠囊內的蝦紅素之含量約為 18 mg/g 左右與原本之含量 (20.68 mg/g) 比較，並未有明顯下降的情形。

(二) 幾丁聚醣乳化相關研究

Schulz 等人於 1998 年研究將幾丁質加入 41 % NaOH (w/w) 中並加熱 136 $^{\circ}\text{C}$ ，經過 1 小時處理後，製備成幾丁聚醣，並將其為乳化劑進行乳化方面的研究；確認高去乙醯度的幾丁聚醣具有良好的親水性，而低去乙醯度的幾丁聚醣則有良好的疏水性；此幾丁聚醣適合 O/W 的食品系統中，而且此樣品並不是單純只有固定去乙醯度的幾丁聚醣，系有少量低去乙醯者混合其中。較低去乙醯之幾丁聚醣會先形成 W/O 乳化液，再與高去乙醯度之幾丁聚醣形成 W/O/W 的乳化液。因此，學者認為此幾丁聚醣形成的乳化液形態為 W/O/W (water-in-oil-in-water)，研究中亦以光學顯微鏡照加以證明。同時也可以由幾丁聚醣和添加油量的比例來控制乳化液滴的大小(直徑為 6 ~ 12 μm)。

Rodriguez 等人(2002)研究將 75 ~ 95 %去乙醯度程度之幾丁聚醣分別溶於 0.1 M HCl (即類似胃酸環境)中製成 0.2、1.0 及 2.0 % (w/v) 之濃度，隨後加入 sunflower oil 至不同比例，並進行均質乳化。結果發現 oil/chitosan solution 之比例為 20/80 時，其乳化液置於室溫下 1 hr 呈現安定且無分離現象。這些乳化液具有安定且乳滴(emulsion droplet)較小及一致性(unimodal)的特性。

阮與沈(2006)及阮等人(2008)則利用五種去乙醯度(0 ~ 10、20 ~ 30、40 ~ 50、60 ~ 70 及 80 ~ 90 %)之幾丁聚醣，分別配置成不同添加濃度(0.5、1.0、1.5、2.0 %)及不同 pH 值(pH 3 至 pH 6)，利用旋轉式均質機製備幾丁聚醣乳化液，探討幾丁聚醣的乳化能力，發現 80~90%之高去乙醯幾丁聚醣且濃度為 0.5 %時，溶液 pH 環境接近其 pKa (pH ~ 6.3)時會有較好的乳化能力，但幾丁聚醣添加量增加時會使溶液黏度上升，此可能會造成其乳化能力的下降。在乳化安定性方面，將樣品分別以不同溫度 (5、25、60、100、121 °C) 處理後放置，結果 60 ~ 70、80 ~ 90 %去乙醯度組比其他組別在較高添加濃度以及 pH 6.0 左右有較高安定性。另外在凍結—解凍循環安定性實驗方面，樣品經過 5 次的凍結—解凍循環後，去乙醯度 60 ~ 70 %組且添加量為 2.0 %時，可以使乳化液安定無分離；而去乙醯度 80 ~ 90 %組在 1.5 %添加量時則擁有最好的安定性，乳化液滴直徑約 0.02 cm。

張於 2010 年研究選擇去乙醯程度 80~90 %之幾丁聚醣溶於 0.1 M 醋酸中製成 1.5 %濃度且將溶液 pH 調製 6.0，加入沙拉油製成不同比例 (10、30、50、70、90 及 120 mL/100 mL chitosan solution)，先以一般旋轉式均質機粗乳化再放入高壓均質機進行高壓乳化(壓力：500、1000、1500 及 1800 bar，1~7 passes)得奈米乳化液。結果發現油量/幾丁聚醣溶液比例較低、乳化壓力愈高及乳化循環次數愈多，則乳化液之液滴粒徑有愈小及儲存安定性愈佳之趨勢；在溫度處理及凍結—解凍對乳化液性質之影響方面，則選出下列乳化條件可製備出奈米液滴及良好儲存安定性之各組乳化液：A 組：1500 bar, 30 mL oil/100 mL chitosan solution, 3 passes; B 組：1500 bar, 50 mL oil/100 mL chitosan solution, 7 passes; C 組：1500 bar, 70 mL oil/100 mL chitosan solution, 7 passes; D 組：1500 bar, 90 mL oil/100 mL chitosan solution, 6 passes 及 E 組：1500 bar, 120 mL oil/100 mL chitosan solution, 7 passes。溫度處理方面，5 組乳化

液經較高溫度處理後，其有黏度下降、液滴粒徑稍微變大現象，但粒徑仍保持奈米等級且可保存 26 天以上無分離現象。於凍結—解凍安定性方面，上述 5 組乳化液於 5 次凍結—解凍後，均維持安定（即油及水未分離），其中 A、B 及 C 組之液滴仍為奈米狀態。

(三) 幾丁聚醣乳化安定作用

乳化劑會利用本身親水基及親油基使油水穩定共存外，尚有一些安定作用機制使其乳化液更為安定在食品以及化妝品領域中，而乳化劑為一相當重要的添加劑，主要目的為使食品中油和水於均質混合後不易分層(即安定)，不同類型的乳化液具有不同的安定特性，初略分為以下三類：

1. 黏性安定作用 (viscosifying stabilization)：

黏性安定作用為乳化劑最常見的安定作用，這些乳化劑都能產生高黏度特性，阻礙油滴或水滴聚集而使乳化液產生分離，通常這類乳化劑大多屬於非離子(non-ionic)乳化劑，如：monoglycerides 和 diglycerides 等(Macrae et al., 1993)。

2. 靜電推斥安定作用 (electrostatic repulsion stabilization)：

通常此類乳化劑大多為低分子量者，如：lecithin 和 stearyl lactylate 等，其特定就是利用乳化劑在乳化作用時吸附在油滴和水滴間的表面時，利用其本身帶有的正電(cationic)或負電荷(anionic)互相推斥使乳化液滴不易因為聚集而產生分離。但此類乳化劑通常都易受到 pH 值及電解質的影響(Macrae et al., 1993; Del Blanco et al., 1999)。

3. 立體阻礙安定作用 (steric hindrance stabilization)：

大分子之乳化劑，如：蛋白質和膠質(gums)等，當此類乳化劑附著在油或水滴間表面上時，會因本身的巨大結構(macromolecular structure)進而可以阻礙這些油或水滴因聚集而使乳化液分離(Napper, 1983; Tesch, 2002)。

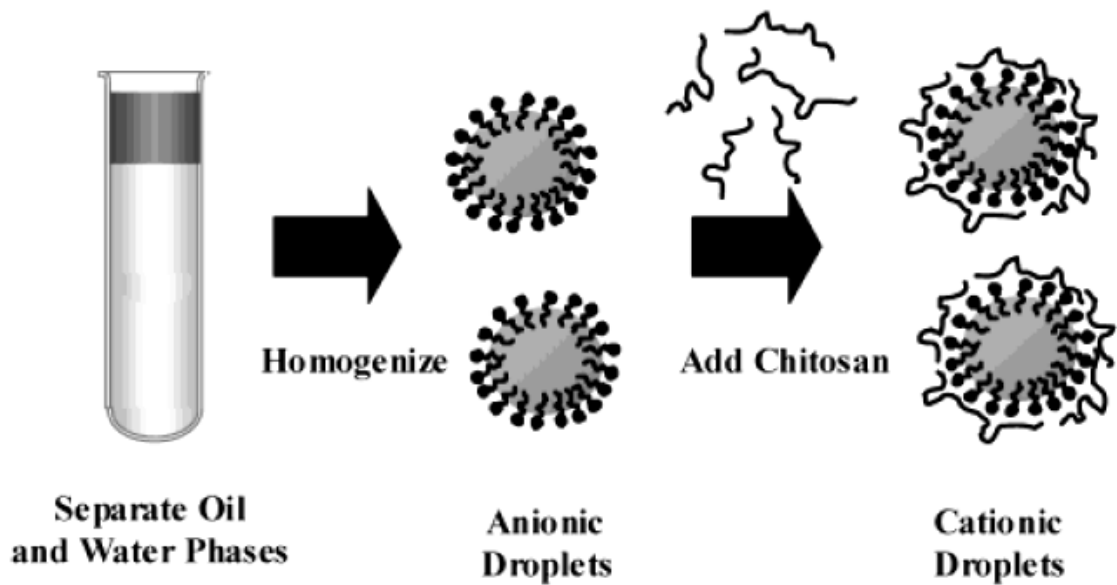
阮 (1984)；Van 及 Szuhaj (1998)；El-Adawy (2000)研究指出蛋白質亦具有親水基及親油基故可當為食品之乳化劑，且因其帶靜電及為大分子聚合物及會產生高黏度，故同時具有靜電推斥、立體阻礙及黏性安定作用，使食品乳化後很安定，但其缺點為受熱變性(thermal denaturation)、等電點(pI)及多價離子等之影響。

以幾丁聚醣為乳化劑時，其有立體阻礙安定作用(聚合物)、黏性安定作用(溶於有機酸呈現高黏性)、靜電推斥安定作用(為多價陽離子)、熱安定作用(為耐熱者)、於 pH 6.0 以內不受 pH 值影響(其 pKa 為 6.3)。此外，幾丁聚醣具有抑菌作用、保健功能等。

(四) 靜電層沉積法乳化研究

有許多文獻指出，幾丁聚醣-卵磷脂雙層膜已廣泛應用於油脂及油性風味等物質，可改善其油脂穩定度、氧化程度及延長保存期限等相關保存條件。

Ogawa 等學者(2003)將玉米油和卵磷脂溶液先行均質，形成表面為陰離子之乳化油滴，再加入帶正電之幾丁聚醣溶液，行乳化作用後會因正負電荷靜電吸引力的關係而可形成外表帶正電的雙層膜液滴，參見圖十二，結果顯示卵磷脂-幾丁聚醣雙層膜可改善玉米油乳化液之穩定度。



圖十二、具有雙層界面膜(lecithin-chitosan)之乳化液滴製備圖。

Fig. 12. Two-stage mechanism for producing emulsion droplets coated by a two-layer interfacial membrane (lecithin-chitosan). (Ogawa et al., 2003)

亦有文獻指出將卵磷脂及幾丁聚醣以靜電層沉積法包覆金槍魚油製成乳化液，探討雙層膜對乳化液之氧化影響。結果發現卵磷脂-幾丁聚醣雙層膜可有效改善金槍魚乳化液的氧化情形，且效果比只包覆單一乳化劑(卵磷脂)之乳化液來的好，故兩種乳化劑包覆乳化液可明顯改善油脂氧化程度(Klinkesorn et al., 2005)。

Shaw 等學者(2007)則是研究利用卵磷脂及幾丁聚醣包覆鮭魚油製成雙層膜乳化液後進行噴霧乾燥，探討雙層膜改善魚油成分中 ω -3 不飽和脂肪酸之氧化情形，實驗中將單層膜(lecithin)乳化粉末及雙層膜(lecithin-chitosan)乳化粉末放置在 37 °C 下儲存，結果為單層乳化粉末在儲存四天及六天時其產生之脂質過氧化物及二次氧化物丙醛含量到達最大值，而雙層膜乳化粉末則是要儲存 10 天及 11 天含量才到達最大值，由上得知雙層膜(lecithin-chitosan)包覆魚油可改善魚油中 ω -3 不飽和脂肪酸氧化情形，且在這篇研究最後作者提到微膠囊化之多層膜乳化液系統可被使用作為功能性食品中 ω -3 不飽和脂肪酸的一個傳遞系統。

Klinkesorn 及 McClements (2009)研究在卵磷脂-鮭魚油乳化液中添加不同濃度和不同分子量之幾丁聚醣製備雙層膜乳化液，結果顯示添加 0.1 % (w/v)濃度幾丁聚糖可維持乳化液儲存穩定性，且於消化試驗中幾丁聚醣能被分解而釋放油脂，但幾丁聚醣分子量對於其在腸胃道中的分解沒有顯著影響。Kaasgaard 及 Keller (2010)研究將帶負電乳化劑 citrem 與帶正電乳化劑 chitosan 對揮發性油性香芹酮(R-carvone)進行乳化作用，藉由靜電層沉積法包覆兩種乳化劑於香芹酮表面形成雙層膜乳化液，結果顯示可增加香芹酮於儲存時香味保留度。

五、乳化

(一) 乳化之原理介紹

將兩種不能互溶的液體(或氣體與液體)中之一種以 0.2-50 μm 的細微粒分散於他種液體(或氣體)中時，此現象稱之為乳化(emulsification)，經過乳化後所形成之白色分散液稱為乳化液(emulsion)。而能使兩不相溶液體乳化且穩定的第三成分就稱為乳化劑(emulsifier)(柯，2006)。

以熱力學的角度來看，當兩種不互溶的液體在同一容器且處於上下分層的穩定狀態時，則兩者交界的界面會最小，因此對於整個系統來說，此時的整體自由能最小，也就是最安定的狀態；但若施以外力於此系統中，如機械力攪拌，則會使兩不相溶液體間界面面積增加，整體的自由能也增加，便導致整個系統的不穩定(吳，1979；蔡，1979)。從以下的方程式可以簡單看出界面張力與自由能變化的關係(Das and Kinsella, 1990)：

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T\Delta S$$

其中 ΔG 為自由能變化量； γ 為油水界面張力(interfacial tension)； ΔA 為界面面積變化量； T 為絕對溫度； ΔS 為油滴(或水滴)之熵(entropy)變化量。

從以上方程式可以看出，當兩不相溶液受到強烈外力作用，會使 ΔA 快速的增加，造成 $\Delta A > T\Delta S$ ，因此 ΔG 為正值，表示此系統正處於不穩定的狀態，為了使系統走向穩定的狀態，故會趨向自由能較低的形態，最後又會回到兩不相溶、上下分層的情況，此時界面面積為最小。其他乳化液影響安定性的因素還有粒徑分佈、連續相黏度、各相的體積比與密度差異等。

為了要維持整個系統能持續的呈現不穩定狀態，則必須額外添加能降低界面張力的乳化劑或安定劑來維持乳化液的穩定性。乳化作用所形成的乳化液中以小液滴(droplets)狀態分佈的液體稱為分散相(dispersed phase)，而在這些小液滴周圍的液體部分則稱為連續相

(continuous phase)。

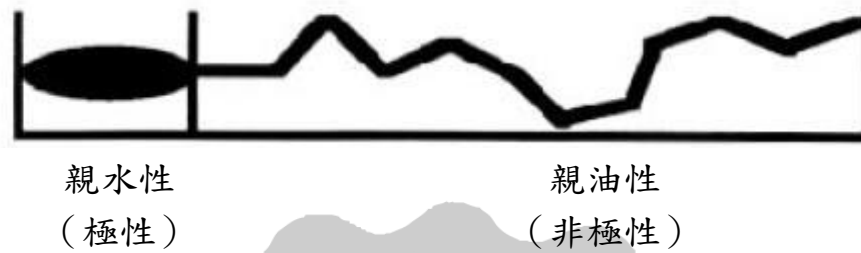
食品中有三種最常見的兩相(two-phase)分散系：a. 固體與液體的膠溶體，如：乳清；b. 液體與液體的乳化液，如：沙拉醬；c. 液體與氣體所組成的泡沫，如：啤酒等。

(二) 乳化劑

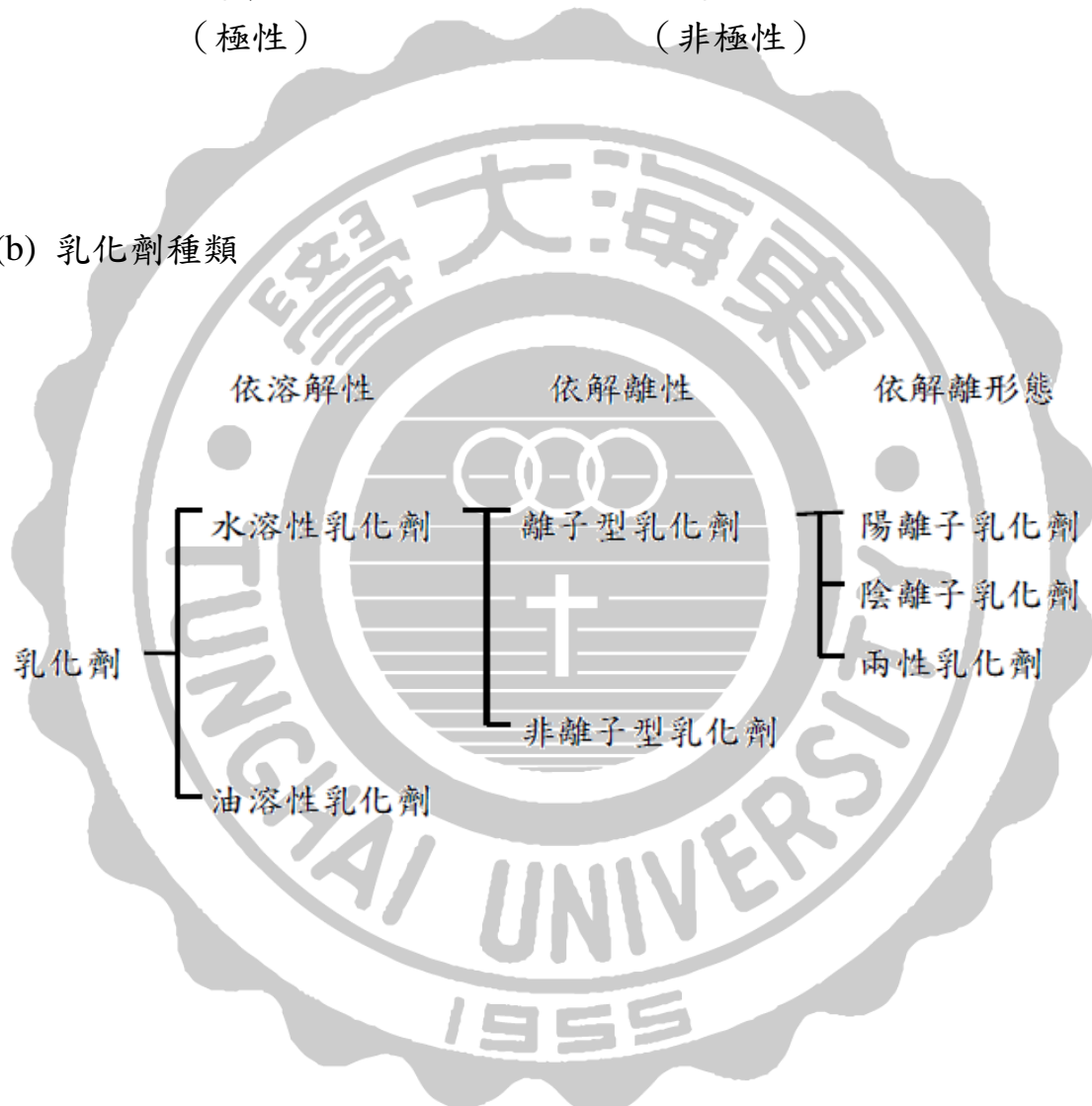
乳化劑是很常見的食品添加劑，舉凡麵包、蛋糕、冰淇淋等，都需要乳化劑。乳化劑是一種界面活性劑，它同時具有「親水端」跟「親油端」，可以把本來不互溶的油跟水形成穩定的混合液。因此，當食品製作過程需要將油與水均勻混合在一起的時候，就可以加入乳化劑。

乳化劑有相當多的種類，但其基本構造大致都相同，分子上同時具有親水(hydrophilic)的極性基及疏水(hydrophobic)的非極性親油基，其中圓形部分代表具有極性的親水基頭端，尾鏈部分則代表非極性的疏水基(親油基)，如圖十三所示。因為乳化劑分子上的親水基與親油基的含量比值不相同，其結構也有所差異，故乳化劑又可分為水溶性以及油溶性兩種類型。水溶性乳化劑又依分子是否可在水中解離可分為離子性與非離子性(nonionic)，而離子性界面活性劑可再分為陽離子(cationic)、陰離子(anionic)及兩性(amphoteric) (趙，1991；王，1993)。

(a) 乳化劑基本結構示意圖



(b) 乳化劑種類



圖十三、乳化劑之形態及其種類 (a) 乳化劑基本結構示意圖 (b) 乳化劑種類。

Fig. 13. The form and the kinds of emulsifiers. (a) The form of emulsifiers (b) The kinds of emulsifiers(趙，1991；王，1993)

(三) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)值

因乳化劑分子中的親水基與親油基之重量百分比不相同，其比值即所謂的「親水性－親油性平衡 (Hydrophile－Lipophile Balance)」，簡稱為 HLB。HLB 值越小代表乳化性的親油性越好，值越高則代表親水性越好。目前常用的 HLB 值計算方法為美國 Atlas Power 公司之工程師 W. C. Griffin 所提出，其發明目的在於標明乳化劑在乳化試驗時之適用性。其最大值約為 40，最小則為 1。其公式如下(趙，1995)：

$$\begin{aligned} \text{HLB} &= (\text{親水基分子量} / \text{乳化劑分子量}) \times (100 / 5) \\ &= (\text{親水基分子量} / (\text{親油基重量} + \text{親水基重量})) \times (100 / 5) \\ &= \text{親水基重量比} \times 20 \\ &= \text{親水基重量比} \times 100 / 5 \\ &= \text{親水基重量} \% / 5 \end{aligned}$$

在其定義中，沒有親水基之烷類 HLB=0，而全部由親水基所構成的 polyethylene glycol 之 HLB=20，離子性乳化劑也可適用此公式計算 HLB 值，陰離子性乳化劑之 HLB 更高達 40。因非離子性乳化劑的親水基親水性不大，故其 HLB 值介於 0~20 之間，但由於非離子乳化劑的化學結構不同，故以多元醇的脂肪酸酯類型之乳化劑作為介紹，其 HLB 值之計算方式如下：

$$\text{HLB} = 20 \times (1 - S / A)$$

$$\text{其 } 0 \leq \text{HLB} \leq 20$$

S：酯的皂化價

A：脂肪酸之中和價

除此之外，Griffin 整理當時具有標準 HLB 值的界面活性劑之數據做數據組合，找出各種油類最佳乳化之乳化劑混和比，其以下列公式計算混和後乳化劑之 HLB 值：

$$HLB_0 = ((W_A \times HLB_A) + (W_B \times HLB_B)) / (W_A + W_B)$$

W_A ：乳化劑 A 之重量%

W_B ：乳化劑 B 之重量%

HLB_A ：乳化劑 A 之 HLB 值

HLB_B ：乳化劑 B 之 HLB 值

HLB_0 ：該油最佳乳化時之 HLB 值

HLB 值常為極重要的指標，由表六可看出 HLB 值與用途間的對應關係。

表六、HLB 值與用途間的關係。

Table 6. Relation between HLB value and application.

HLB 值	用途
1.5 ~ 3	消泡作用
3.5 ~ 6	乳化作用 (W/O 型)
7 ~ 9	濕潤作用
10 ~ 18	乳化作用 (O/W 型)
13 ~ 15	洗淨作用
15 ~ 18	可溶化作用

(趙，1991)

(四) 乳化的方法與乳化液類型 (趙, 1991)

常見的乳化方法為機械分散法，其可分為幾個類型：

1. 界面震動破壞型：將界面由緩和至激烈的振動

- (1) 斷續震盪法：分成數次之振盪效果，其震動的強度不斷變化，效果優於連續振盪。
- (2) 磨碎法：利用膠體磨碎機 (colloid mill)，將兩種要進行乳化的液體放入 1,000 ~ 20,000 rpm 的滾輪，使液體於滾輪約 0.001 吋之空隙通過，而達乳化效果。
- (3) 超音波乳化法：利用超音波振盪兩液體間的界面，使液體進行混合而達到良好乳化效果。

2. 流體切斷分散型：與噴霧器(atomizer)的原理相同，只是將氣體載劑改為液體。利用在出口將液體以小液滴的方式噴出來達到乳化目的。

- (1) 攪拌法：使用高轉速機械攪拌，使液體流動造成分散相分散於連續相中，達乳化效果。
- (2) 噴射法：使用乳化機均質機(homogenizer)，將液體在高壓下從小孔隙中擠出，而得到乳化狀態。
- (3) 高壓均質法：利用高壓幫浦將流體加壓至特定壓力，並經由高壓管路輸送至均質閥或噴嘴，過程產生剪切力、衝擊力等將流體進行乳化分散作用，而得良好之乳化效果(張, 2007)。

乳化液一般可區分為水中油滴型(oil-in-water, O/W)及油中水滴型(water-in-oil, W/O)兩種，此兩種為兩相乳化液(two-phase emulsions)；在食品中屬於 O/W 型的有牛奶、貢丸、沙拉醬及冰淇淋等，屬 W/O 型的有奶油(butter)、酥油及乳酪等。除了上述兩種類型外，另外還有多相乳化液(multiple emulsions)，形式為 W/O/W 或 O/W/O 兩種，如圖十四所示的 W/O/W 以及 O/W/O 兩種形式(Friberg and Larsson, 1997)。另外在檢驗一個乳化物樣品是屬於哪一類型時，可以由下列幾種方式判斷(趙，1991)：

1. 色素法

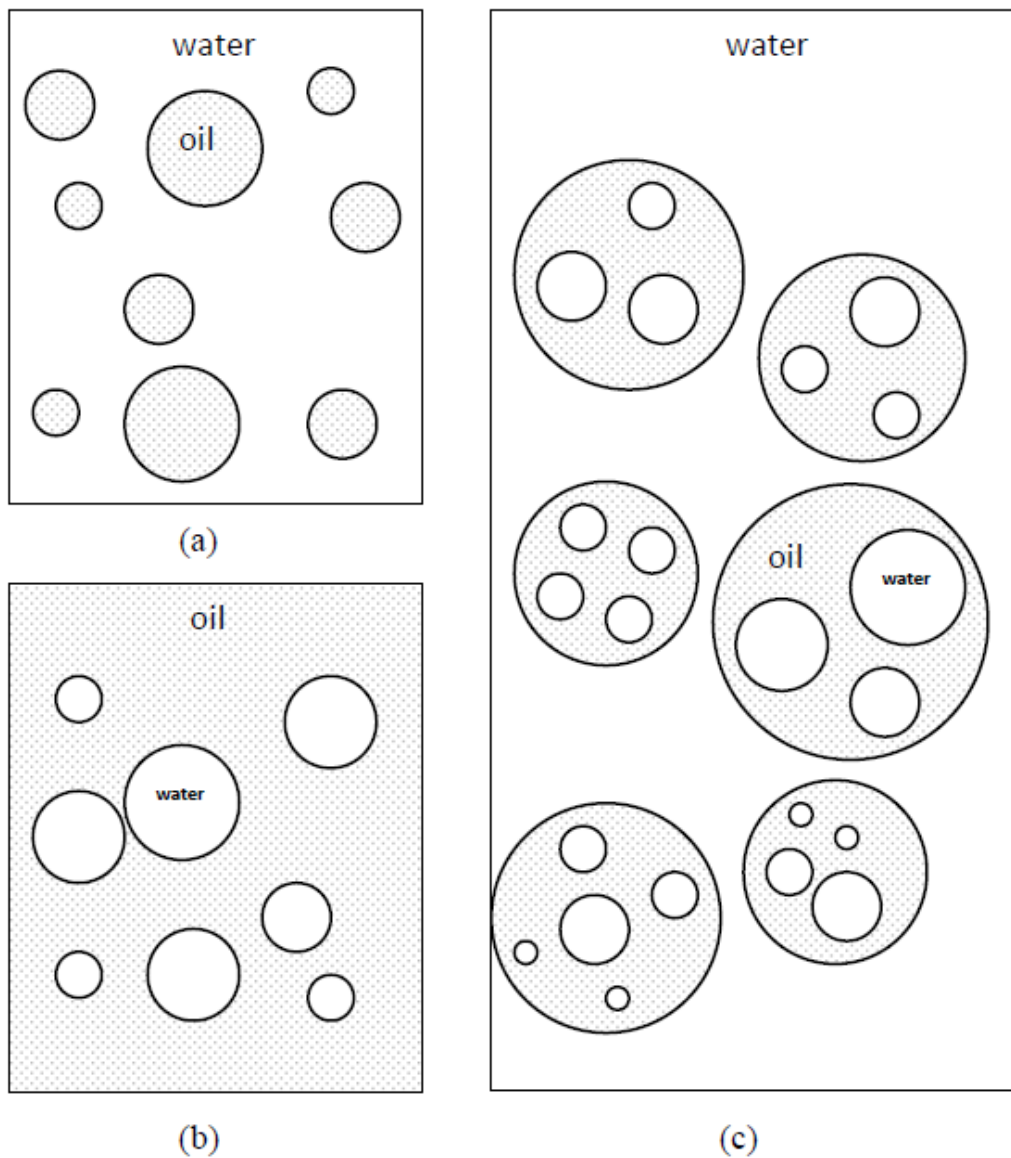
將油溶性色素放入乳化液中，若色素能溶解分散於其中，則為 W/O 型之乳化液；反之則為 O/W 型乳化液，另外亦可利用水溶性色素放入乳化液，若色素能溶解分散在其中，則為 O/W 型乳化液，反之則為 W/O 型乳化液。

2. 稀釋法

O/W 型乳化液放入水中時能夠被水稀釋，但放入油中時會呈現為乳化液滴；若為 W/O 型乳化液，放入油中會有被稀釋之效果，但若放入水中則形成乳化液滴。

3. 導電度法

因為水的導電度遠大於油，故測量乳化液導電度時，O/W 型乳化液之導電度會比 W/O 型乳化液大上數百倍。



圖十四、兩相乳化液 (a) 水中油滴型 (O/W) 或是 (b) 油中水滴型 (W/O)。多重相乳化液 (c) 以 W/O/W 型做說明。

Fig. 14. A two phase emulsion (a) may consist of oil droplets in water (O/W) or (b) water droplets in oil (W/O). A multiple emulsion, (c) water in oil in water (W/O/W) (Friberg and Larsson, 1997 ; 沈, 2004).

(五) 影響乳化安定性的因素

當乳化不安定時，乳化液粒子間會互相結合，而造成油或水的分離，嚴重時會造成乳化液完全分離為上下兩層，影響乳化安定性的因素有很多，一般常考慮的因素大略如下(刈米，2003)：

1. 乳化系統的黏度油相與水相間之比重差。
2. 乳化系統的黏度。
3. 乳化粒子的大小。
4. 乳化系統保存的環境與條件，如：溫度及時間等。
5. 乳化系統粒子間之距離和其界面電位(包含系統之 pH 值)。
6. 乳化劑的添加濃度。
7. 乳化劑種類的選擇。

(六) 乳化不安定型態

乳液在熱力學上不穩定的現象(Walstra, 1983)如圖十五所示，分別為：聚結(coalescence)、分層(creaming 或 sedimentation)、凝絮(flocculation)和相分離(breaking)。每個過程皆代表不同的情況，但在某些情況下它們可能是相關連的，例如乳液完全破乳以前可能會發生凝絮、聚結和分層，或是分層與相分離同時發生。

1. 聚結(coalescence)

兩個以上的分散相液滴直接接觸才可能會發生，凝絮物的液滴發生凝聚現象，其中的小液滴的液膜被破壞，形變成較大的液滴，這種過程稱為聚結。聚結是不可逆的過程，會導致液滴數目的減少和乳液的完全被破壞，油水分離，進而改變液滴大小分佈。因此聚結前須行凝絮的作用，聚結則是乳液被破壞的直接原因，聚結得速率決定乳液得穩定度。

2. 分層(creaming)

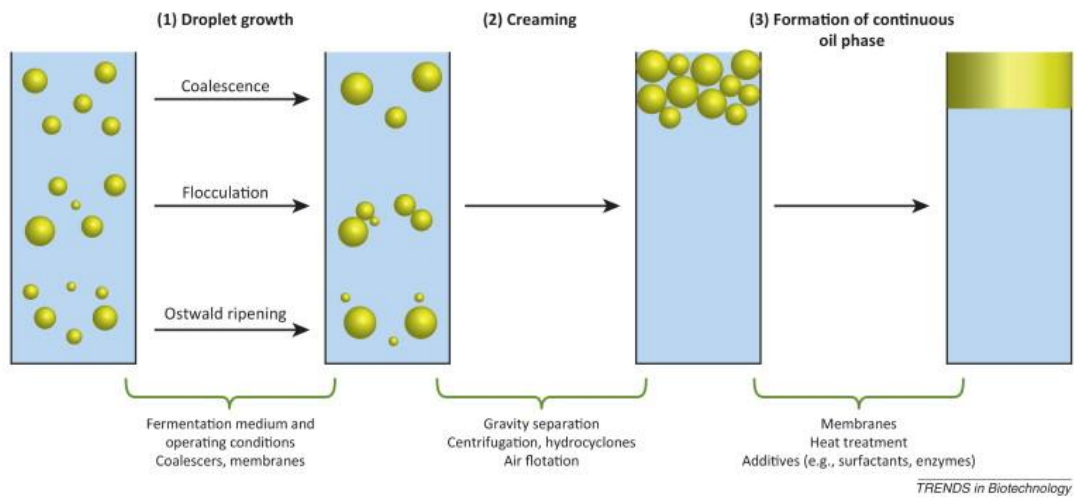
若乳化不良，靜置一段時間後，由於水相和油相密度不同，在重力的作用下液珠將上浮或下沉，在乳液中形成液滴濃度梯度，這種過程稱為分層。雖然分層使得乳液的均勻性遭到破壞，但乳液並未真正遭到破壞。液滴密集地排列在整個體系的上層或下層，分成兩層，一層中分散相比原來多；而另一層以連續相為主，分散相的濃度較低。一般情況下，分層過程中的液滴大小和分佈不變，只是建立了平衡液滴濃度梯度。由於重力作用所引起的分層，其沉降速度與內外相的密度差、外相的黏度及液滴大小有關。分層作用的起因是外力場的作用，除重力外，還有靜電力和離心力。

3. 凝絮(flocculation)

一種乳液中分散相的液滴聚集，也就是液滴之間的吸引力(凡得瓦爾力)引起的，這種作用力往往較弱，所以凝絮過程是可逆過程，可以藉由機械力的攪拌使得凝絮物再分散。

4. 相分離(breaking)

乳液是熱力學不穩定狀態，最終平衡即是油水分離，這是必然的結果。乳析與相分離可以同時發生，但乳液的相分離必須經過凝絮及聚合過程。



圖十五、乳液的幾種不穩定現象示意圖。

Fig. 15. Food emulsions may become unstable through a variety physical mechanisms, including creaming, sedimentation, flocculation, coalescence, and phase inversion. (Heeres, 2014)

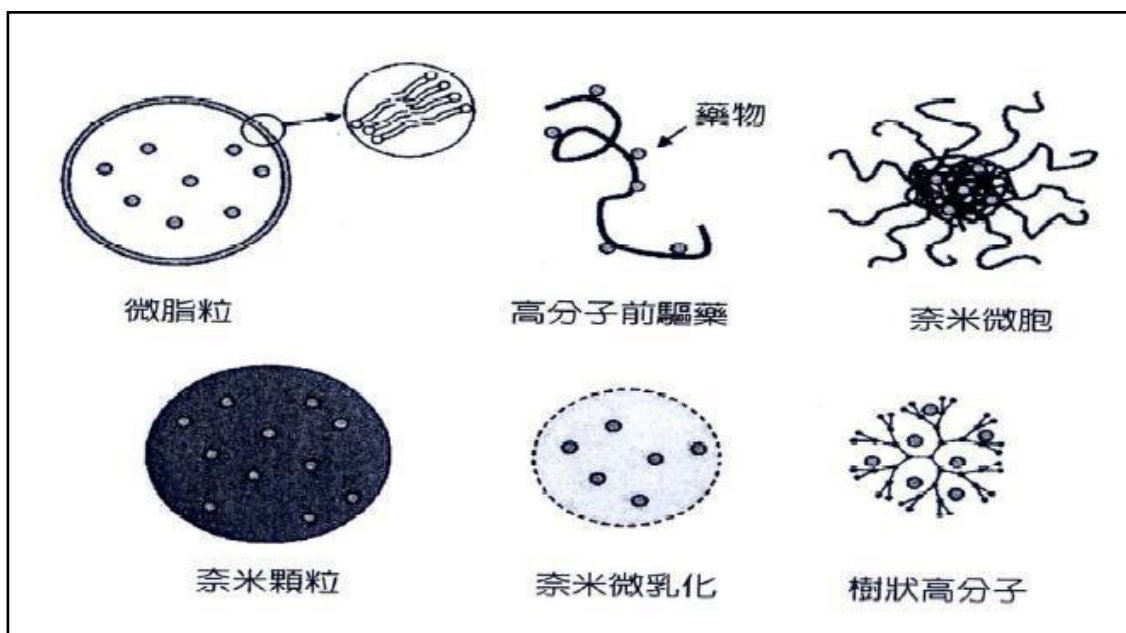
六、奈米科技發展

(一) 奈米科技

奈米是一種長度單位，1 奈米為百萬分之一公釐；也就是十億分之一公尺 (10^{-9} 公尺)，是 10 個氫原子並排起來的長度。一般所謂的奈米等級是泛指 1~100 nm 之間，也有較廣的定義為 100 ~ 1000 nm 之間。奈米材料因具有特殊的表面、體積與量子效應這三種基本特性(孫等，2006)，可能會表現出新的特性與功效，因此奈米技術的目標是利用奈米結構所具有的特性開發具有特定功能的產品。所以奈米技術所涉及的研究內容十分廣泛，至今已發展衍生出奈米生物學、奈米電子學、奈米材料學及奈米化學等不同專業學門。奈米技術在農業及食品的研究與應用亦備受矚目，並發展出專有名詞—農業食品奈米技術(agrifood nanotechnology)，包括奈米包裝、奈米保鮮、奈米粉碎及奈米傳遞系統等技術研究與產品開發(孫等，2006)。奈米技術發展快速已成 21 世紀之新興科技，利用其特性未來可望賦予一般傳統原料創造出更高附加價值之新穎性產品。

奈米科技(nanotechnology)亦即以成熟的技術或能力操控奈米材料並應用在產業界，又或是探討奈米尺度下所出現展新物理、化學等特性的科學技術。奈米科技的範疇相當廣泛，涵蓋了物理、化學、生物、醫學、材料、電子學、力學及加工等領域。

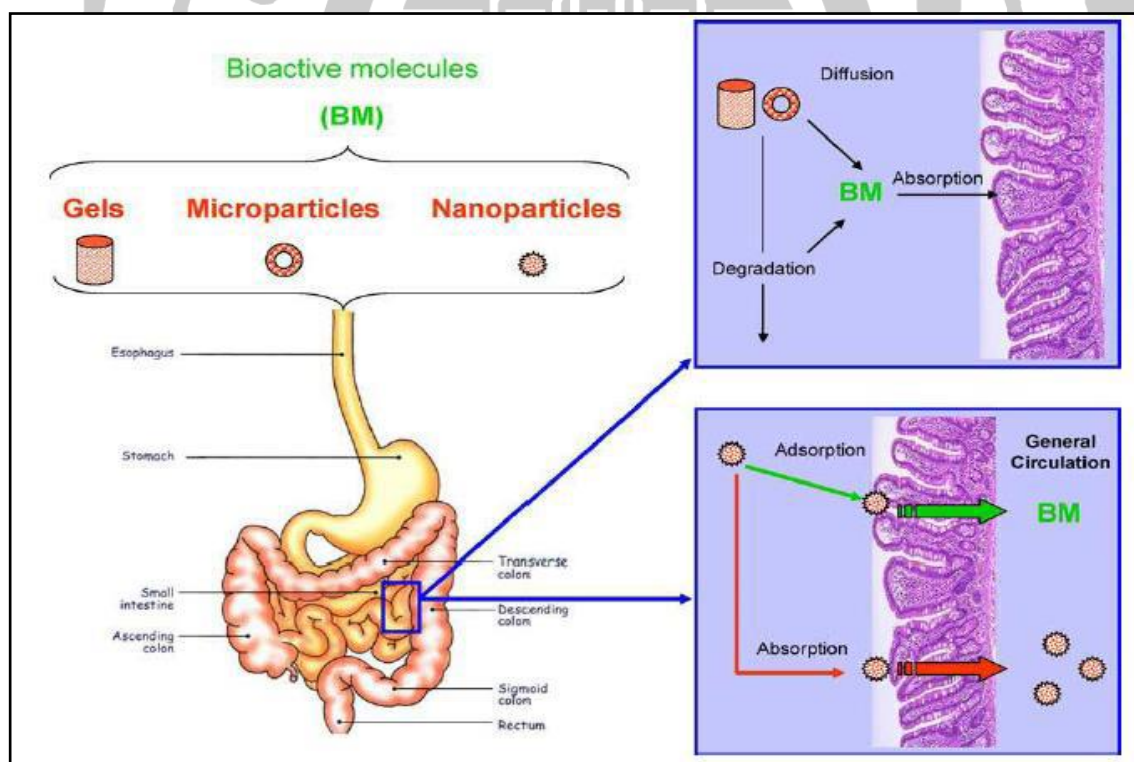
關於奈米遞送系統形態可見圖十六，文獻指出奈米顆粒比微米顆粒($> 1 \mu m$)更容易通過腸道上皮細胞(Desai et al., 1996)，當粒徑大於 $1 \mu m$ 之顆粒無法直接通過生物屏障，而當顆粒大小介於 100 ~ 1000 nm 時，則可改善營養物質之生體利用率(bioavailability) (Acosta, 2009)，當顆粒愈小，其生體利用率愈高。食品經奈米技術處理除了降低分子粒徑大小，也可延長在胃腸道之排空時間，藉此提高與腸道細胞接觸的機會或是直接被細胞吸收(圖十七)，因而提高吸收與利用效率(Chen et al., 2006; Chau et al., 2007)。



圖十六、奈米遞送系統。

Fig. 16. Nano delivery system.

(梁，2007)



圖十七、奈米顆粒於腸道吸收之優勢。

Fig. 17. Schematic representation of different absorption mechanisms of bioactive molecules. (Chen et al., 2006)

(二) 奈米科技在食品領域的發展

在食品方面，奈米技術已成功應用於製程開發、營養物質遞送、安全與檢測上，將食品原料經過微膜、微膠囊、微乳液、微脂粒、微球等各種奈米技術處理後，可改變原先性質創造更好之性能，增加食品之應用。

▲ 奈米科技在食品領域有下列幾項： (陳，2014)

1. 食品成分奈米化以改善品質或增加營養機能
2. 改善食品加工製程或擴展利用性
3. 利用奈米顆粒殺(抗)菌並增加食品儲存性
4. 新的包裝材料和物料的再利用
5. 重組食品與合成食品
6. 食品衛生與安全
7. 奈米食品安全性及管理

a. 食品加工方面

(1) 提高食品溶解度:

經過奈米化的食品原料，因食品粒徑變小，比表面積增加，而提高食品原料之溶解度，趙與田(2006)研究發現經過奈米化之維生素，可使粒徑介於20 ~ 25 nm，能夠改善維生素之水溶性、分散性、吸收率，明顯提高維生素的有效性及穩定性;純植物固醇難溶於水或脂肪，經奈米技術處理後容易溶解於水或油相，達到易於加工之目的(Guan et al., 2006)在奈米傳遞系統方面，可在奈米顆粒內部空間填裝不易溶解於水溶劑之營養物質或非極性之物質，如油脂、脂肪酸、維生素、植物固醇、類胡蘿蔔素等，使之形成容易稀釋於水相系統、奈米大小的微膠囊顆粒，提高這些物質的溶解度(Chen et al., 2006)。

(2)改善感官品質

將澱粉經奈米處理後具有類似脂肪的細膩口感、爽滑，故奈米澱粉可以替代脂肪類成分製造低脂食品(Zhu et al., 2006)；酒類產品經奈米技術處理後可以去除酒中之醛類、甲醇類並且可以增加酒類產品之香氣(趙與田，2006)。

(3)延長保存期限

因奈米包覆作用，能夠使裝載於核心部分之營養物質做有效隔離，達到保護作用(Chen et al., 2006)；文獻指出經奈米遞送系統之微脂體包覆維生素E可比一般傳統之維生素E具有較佳的耐熱及耐紫外線之效果，可延長維生素E保存期限(Chen et al., 2006)；Hatanaka等人(2007)年發表研究出平均粒徑為60 nm之輔酶Q10奈米乳劑，奈米輔酶Q10比一般市售之輔酶Q10晶粒或液劑更不易被氧化和紫外線破壞，增加其保存性。

b.保健食品方面

研究證明，食品經過奈米化處理後，會使營養物質在體內產生不同於常態食品的分布及運轉方面，能表現更高的生物活性，因此具有以下特性：

(1)提高吸收率

降低粒徑有助於提高營養物質在腸胃道之吸收率，以及身體組織之滲透、傳輸與吸收(Chen et al., 2006; Medina et al., 2007)；微量金屬鈣、鋅、鐵等和一些保健中草藥經奈米化後，能夠提高其在人體之吸收率及利用率並增加體內的生物活性與功效(Chau et al., 2007; Li et al., 2006)。

(2)提高生體利用率(bioavailability)

利用奈米包覆技術，包覆極性或非極性分子，如大分子的蛋白質、不易被吸收之維生素或營養素，使其易溶於，提高生體利用率。(Chen et al., 2006; Rohner et al., 2007)

(3)增進保健功效

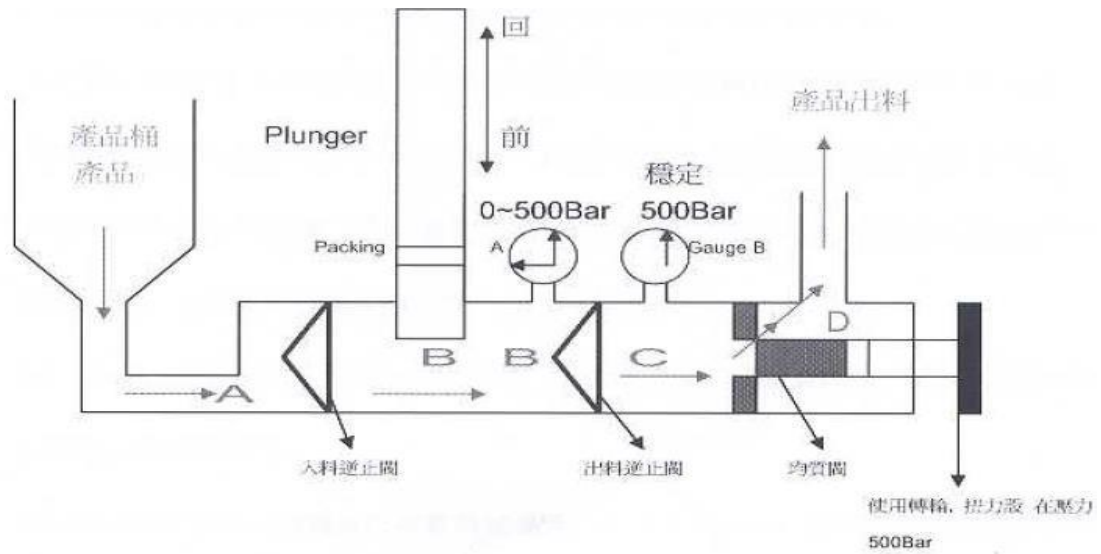
利用奈米包覆技術包覆營養物質，可使營養物質不受胃酸、腸道溫度、pH 值變化和酵素作用等影響而降低其功效，並藉由奈米載體的特性，營養物質能迅速靠近腸道而被吸收，延長營養物質在腸道的滯留時間，有效發揮其生理功效與提高生體利用率(Chen et al., 2006)。香菇多醣具有活化免疫系統、抗腫瘤的效果，但其分子量大且易聚集，故影響其口服吸收效果及生體利用率，而研究經奈米化處理之香菇多醣溶液及香菇萃取物連續餵食 ICR 小鼠荷瘤 10 天，結果發現奈米化之香菇多醣比一般香菇多醣具明顯降腫瘤之功效(Suga et al., 2003)。

(三) 奈米乳滴乳化液原理及相關研究

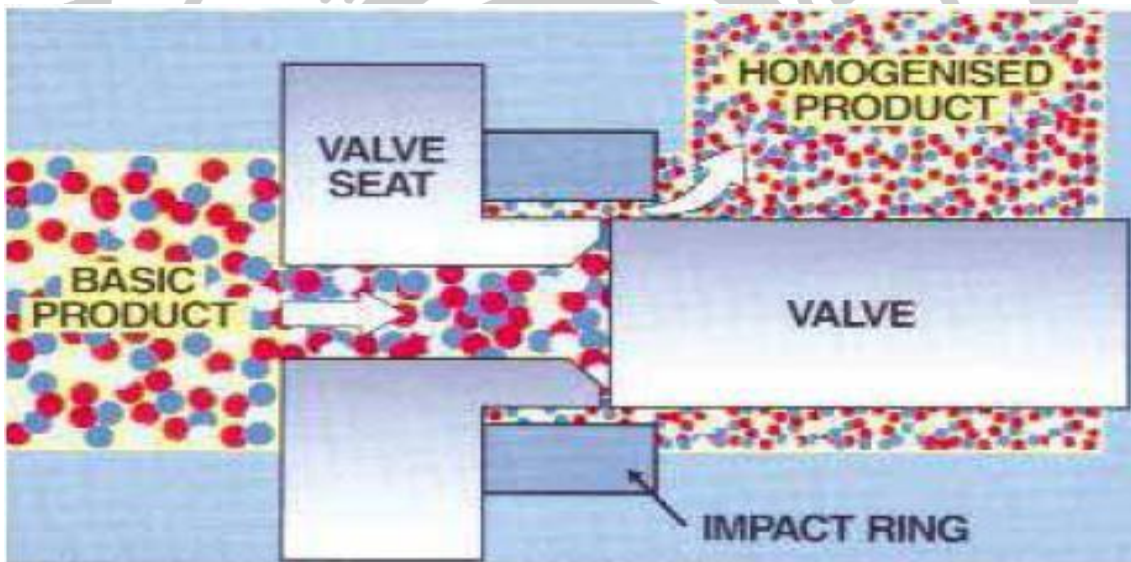
均質技術於 1900 年由 Auguste Gaulin 發表於巴黎世界博覽會，最早設計之高壓均質設備為由一束毛細管抵住均質閥凹陷，藉由均質閥對彈簧壓縮之帶動作用，使牛乳經毛細管對抗均質閥之壓力(200 ~ 300 atm)作用而達到乳化效果(張，2007)。雖然均質技術早用於穩定食品之乳化系統，但直到 1970 年作用機制才逐漸被瞭解，且早期均質設備壓力不超過 500 bar，後來高壓技術的成熟，設備的操作壓力逐漸提昇，現已有超過 1000 bar 的高壓力，因而利用此原理的裝置稱為高壓均質設備(Paquin, 1999)。高壓均質裝置運作原理係利用一高壓幫浦將混合液體加壓至特定壓力，利用高壓管路將液體輸送至均質閥，均質閥內截面積縮減，高壓混合液轉換為高速混合液，利用高速流體產生的衝擊力(impact)、剪切力(shear)、氣穴(cavitation) 及壓降(pressuredrop)等效應，進行粉體微細化分散、油水相混合液乳化和細胞體破碎等應用 (Phipps, 1971; Kleing and Middelberg, 1996; Paquin, 1999)。均質機和均質閥構造參見圖十八。

Jafari 等人於 2007 年研究利用各種乳化技術將檸檬精油 (D-Limonene)、修飾澱粉及麥芽糊精進行乳化，再利用噴霧乾燥進行微膠囊化，結果發現經由高壓均質器乳化之乳化液其粒徑為奈米級，粒徑結果為 Microfluidizer (高壓均質) < Ultrasound (超音波) < Silverson (攪拌均質) < IKAmixer (一般傳統均質)。但均質壓力大於 40 ~ 60 MPa，1 ~ 2 cycles，容易發生過度作用(over-processing)使粒徑聚集而變大。Jafari 等人另於 2008 年研究利用前一研究之各種乳化技術:傳統式均質機 (IKA mixer 或 Silverson)和高壓處理(microfluidizer, 20 MPa, 1 cycle)或超音波均質機(ultrasound, 24 kHz, 20 sec)將魚油、麥芽糊精(maltodextrin, 30%)及修飾澱粉(Hi-Cap)或乳清蛋白(WPC)進行乳化作用，再利用噴霧技術將乳化液進行微膠囊化，研究結果證實 Microfluidizer(高壓均質機) 乳化效率最佳且微膠囊包覆效果亦最好，即顆粒粒徑愈小，微膠囊效果愈好。

(a)



(b)



圖十八、(a) 均質機和(b) 均質閥之構造。

Fig. 18. The structure of (a) high pressure homogenizer and (b) homogenize valve (APV-Gaulinhighpressure homogenizer).

周 (2013) 將次亞麻油酸 (linolenic acid, LNA, ω -3) 及亞麻油酸 (linoleic acid, LA, ω -6) 混和溶液加入幾丁聚醣 (chitosan, CS)，以旋轉式均質機 (Polytron homogenizer) 先行初乳化 (13,500 rpm, 2 min)，再以高壓均質機 (APV homogenizer) 於不同均質壓力 (500、1000 及 1500 bar) 及不同乳化循環次數 (1-5 次) 下乳化製成 CS-LNA-LA 奈米乳滴乳化液，並測定其乳滴大小 (droplet size) 及表面電位 (zeta potential)。結果，在適當均質壓力及循環次數下，能製出粒徑為奈米級之乳滴，而部分安定性較差的乳化液，於初乳化時先加入卵磷脂 (lecithin, Le) 行第一次初乳化，再加入幾丁聚醣行第二次初乳化，最後在相同均質壓力及循環次數下行高壓均質，在雙層乳化劑的包覆下，即能改善乳化液之安定性。

Lanciotti 等人 (2007) 以 100 MPa 將牛奶和羊奶進行高壓均質 (100 MPa) 後所製得之乳酪，其生物胺 (biogenic amine) 與熱處理 (65 °C, 3 min) 相比含量較低。Kheadr 等人 (2000) 將全脂牛奶以高壓 (200 MPa, 5 cycles) 進行處理後製得之乳酪，在物性方面能使酪蛋白膠粒 (casein micellar) 和脂肪球 (fat globule sizes) 變小，進而使其硬度 (firmness)、破碎力 (fracturability) 和彈性 (elasticity) 等有較好表現。2009 年墨西哥學者 Chanes 等人研究柳橙汁經高壓均質 (100 MPa / 250 MPa, 5 cycles) 處理後發現，果汁中之嗜溫菌及酵母菌含量檢測分別小於 8.7×10^2 和 1.85×10^3 CFU/mL。

高壓均質器由於均質閥或噴嘴等特殊設計，其對流體產生之渦流 (cavitation)、剪切力 (shear)、紊流 (turbulence)、衝擊力 (impact) 及壓力差 (pressure drop) 等效應，可廣泛應用至食品、化妝品、醫藥及生技等產業上，進行產品的分散、細化、細胞破碎及機能性的改質等應用，尤其在奈米科技產業的帶動下，高壓均質機的基本功能 (如：破碎、分散、乳化等) 具備未來發展潛力。

奈米乳化目前在研究上已經有被廣泛地應用，它的理論和應用發展極為迅速，由於它的粒徑小、低黏度、光學透明或半透明狀溶液，呈現動力學穩定系統。與傳統乳狀液相比，具有相當的優勢。

參、材料與方法

一、實驗材料

(一) 原料

粗幾丁質 (crude chitin, 由蟹殼製備而取得)：高雄應化公司，台灣。

次亞麻油酸 (linolenic acid)：MP Biomedicals，美國。

β -胡蘿蔔素 (β -Carotene)：SIGMA，美國

(二) 藥品

1. 幾丁聚醣去乙醯測定：

Potassium polyvinyl sulfate solution(P.V.S.K)：和光純藥，日本。

Toluidine blue：SIGMA，美國。

2. 乳化液製備

氫氧化鈉(sodiumhydroxide)：聯工化學廠股份有限公司，台灣。

95% 正己烷(n-hexane, HPLC級)：J.T.Baker，美國。

醋酸(acetic acid, 17N)：聯工化學廠股份有限公司，台灣。

大豆磷脂膽鹼(L- α -phosphatdylcholine, 試藥級)：SIGMA，美國。

卵磷脂(lecithin, 食品級)：振芳食品公司提供，台灣。

卵磷脂(lecithin, 試藥級)：東京化學株式會社，日本。

4. 過氧化價試驗：

碘化鉀(potassium iodide, KI)：島久藥品株式會社，日本。

醋酸(acetic acid, 17N)：聯工化學廠股份有限公司，台灣。

三氯甲烷(chloroform)：J.T.Baker，美國。

硫代硫酸鈉(sodimn thiosulfate)：科成化學股份有限公司，台灣。

澱粉(starch)：SIGMA，美國。

碘酸鉀(potassium iodide, KIO₃)：J.T.Baker，美國。

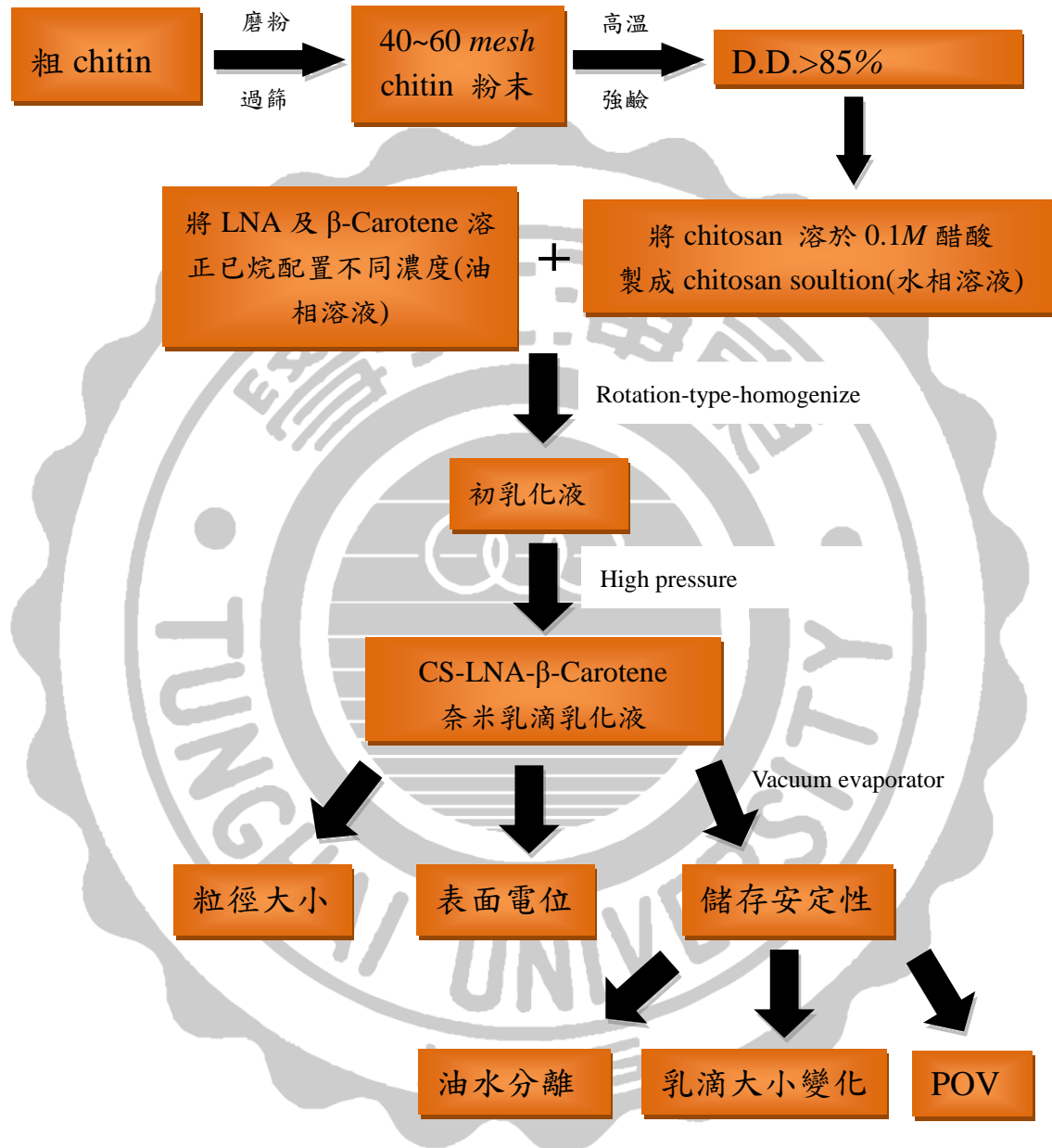
硫酸(sulfuric acid)：聯工化學廠股份有限公司，台灣。

二、實驗儀器

- 1.磨粉機：1hp型，群策電機工業股份有限公司，台灣。
- 2.旋轉式均質機：T25 basic IKA Labortechnik，IKA 公司，德國。
- 3.電磁式過篩機：OCTAGON^{DIDITAL} 2000型，Endecotts公司，英國。
- 4.分析篩網：Tyler 標準規格篩網，Endecotts 公司，英國。
- 5.pHmeter：SP701型，Suntex公司，台灣。
- 6.高壓均質機 (high pressure homogenizer)：APV-2000型，APVSPX 公司，德國。
- 8.雷射奈米粒徑及界面電位分析儀：Zetasizer 3000HS型，Malvern 公司，英國。
- 9.冷卻水循環裝置：CA-1110型，EYELA公司，日本。
- 10.真空幫浦旋轉式減壓濃縮機：R-114型，Buchi公司，德國

三、實驗架構

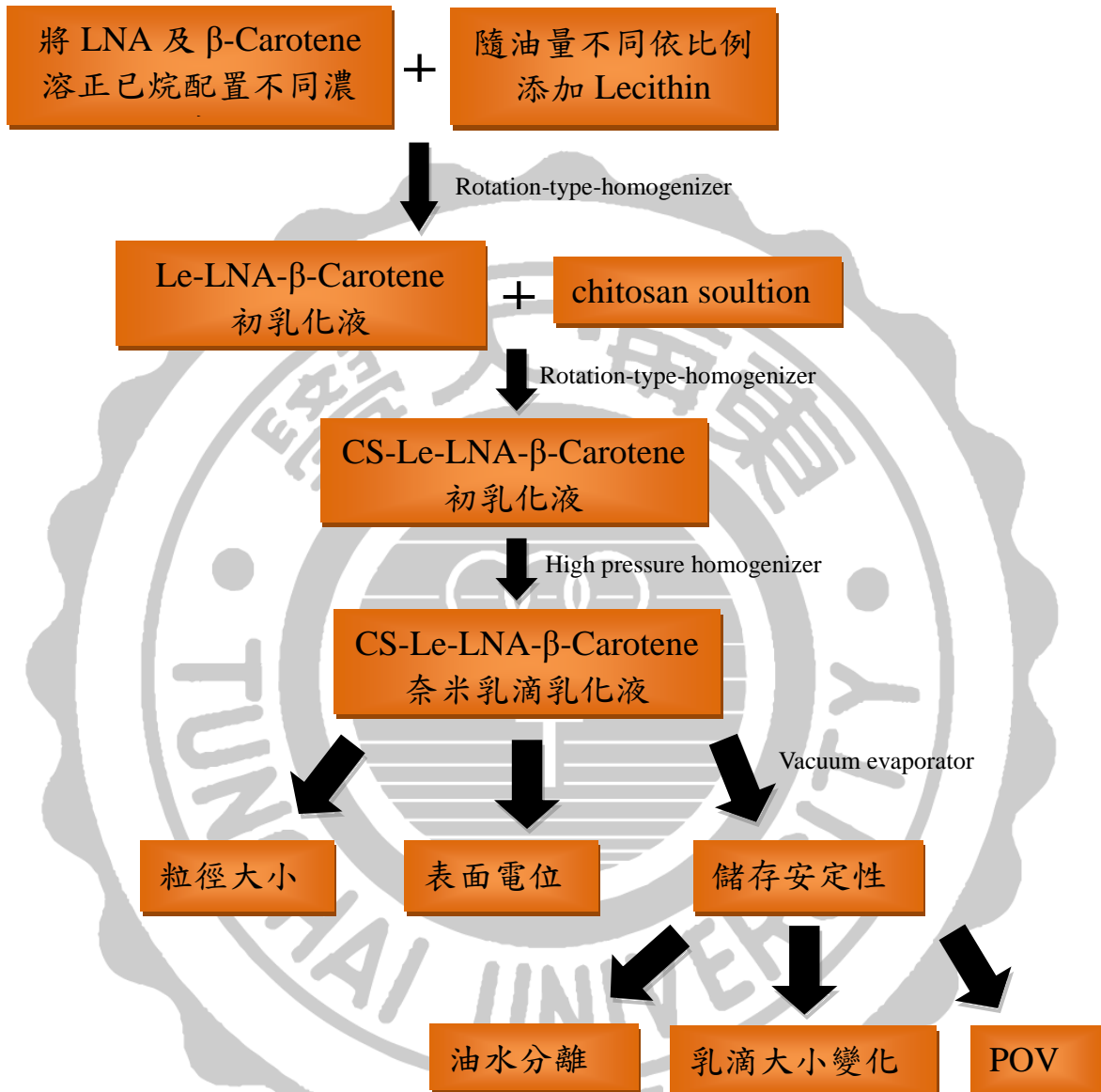
(一) 第一部分：以幾丁聚醣為乳化劑進行乳化製備幾丁聚醣 (CS)-次亞麻油酸(LNA)- β -胡蘿蔔素(β -Carotene)奈米乳滴乳化液試驗(CS-LNA- β -Carotene nano droplet emulsion)



圖十九、製備幾丁聚醣-次亞麻油酸/ β -胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液試驗架構。

Fig. 19. The conceptual framework of preparation of chitosan-linolenic acid/ β -carotene nano droplet emulsion.

(二) 第二部分:以幾丁聚醣及卵磷脂共同乳化劑進行乳化製備
 幾丁聚醣-卵磷脂(Le)-次亞麻油酸-β-胡蘿蔔素奈米乳滴乳
 化液試驗(CS-Le-LNA-β-Carotene nano droplet emulsion)



圖二十、製備幾丁聚醣-卵磷脂-次亞麻油酸-β-胡蘿蔔素奈米乳滴乳化液
 試驗架構。

Fig. 20. The conceptual framework of preparation of
 chitosan-lecithin-linolenic acid/ β-carotene nano droplet emulsion.

四、材料準備

(一)幾丁聚醣之製備

參考沈於2004年的實驗方法，將購得之粗幾丁質先以磨粉機磨碎後，過篩並取得40 ~ 60 mesh幾丁質粉末，加入57 % (w/v)NaOH溶液(g chitin /20 mL NaOH)中，於104±2 °C下加熱攪拌130 min進行去乙醯作用，接著以大量蒸餾水沖洗殘留之氫氧化鈉至中性為止，乾燥(80 °C、8小時)，測定其去乙醯度(Toei and Kohara, 1976)，並取≥85 %去乙醯度之幾丁聚醣備用。

五、實驗方法

(一)以幾丁聚醣(chitosan, CS)為乳化劑製備次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)-β-胡蘿蔔素(β-Carotene)奈米乳滴乳化液之試驗(參見圖十九)

1.CS-LNA-β-Carotene初乳化液之製備

取≥85 %之0.5 g chitosan溶於100 mL 0.1 M酸溶液製成0.5 % (w/v) chitosan solution，並使用0.1 N CH₃COOH或0.1 N NaOH調整pH值至6.0。將LNA-β-Carotene (500:1 mg)定量溶於至20 mL正己烷製備成500:1、1000:2、1500:3、2000:4、2500:5、3000:6、3500:7 mg之油相溶液。之後使用旋轉式高速均質機於冰浴上均質(13,500 rpm, 2 min)，同時個別加入20 mL LNA-β-Carotene (500:1、1000:2、1500:3、2000:4、2500:5、3000:6、3500:7 mg)於100 mL chitosan solution，進行初乳化，製成七種不同比例油量/幾丁聚醣溶液之初乳化液。

2.CS-LNA-β-Carotene 奈米乳滴乳化液之製備及LNA-β-Carotene油量、乳化壓力和乳化循環次數對乳滴大小及表面電位影響之試驗

將製得之七種不同油量之初乳化液放入高壓均質機，分別以不同壓力(500, 1000及1500 bar)進行高壓乳化，其乳化循環次數為1至10

次，高壓乳化溫度為5 °C，製得之奈米乳滴乳化液後，以減壓濃縮除去正己烷CS-LNA-β-Carotene奈米乳滴乳化液後，測定其乳滴粒徑大小及表面電位。

3.CS-LNA-β-Carotene奈米乳滴乳化液之安定性試驗

在上述七種油量中選擇四種能製出較小之乳滴及較高表面電位乳化液之條件，進行製備CS-LNA-β-Carotene奈米乳滴乳化液，並測定其乳化液之安定性，包含油水分離現象、乳滴大小變化及過氧化價POV變化之情形。

四種奈米乳滴乳化液製備條件如下：

1500:3 mg(1500 bar,10 passes) CS-LNA-β-Carotene之奈米乳滴乳化液

2000:4 mg(1500 bar,10 passes) CS-LNA-β-Carotene之奈米乳滴乳化液

2500:5 mg(1500 bar,10 passes) CS-LNA-β-Carotene之奈米乳滴乳化液

3000:6 mg(1500 bar,10 passes) CS-LNA-β-Carotene之奈米乳滴乳化液

(a) 油水分離安定性試驗

各取上述條件之乳化液40 mL於50 mL塑膠離心管中，置於25 °C烘箱中，並包覆鋁箔紙避光，儲存28天觀察其油水分離情形。

(b) 乳化液滴大小之變化試驗

將上述條件乳化液置於25 °C烘箱中保存28天，並包覆鋁箔紙避光，每隔四天測其粒徑大小。

(c) 過氧化價POV 試驗

取上述條件之CS-LNA-β-Carotene奈米乳滴乳化液於塑膠離心管，置於50 °C烘箱中儲存9天，並包覆鋁箔紙避光，每天取樣測定其POV值。

(二)以幾丁聚醣(chitosan, CS)及卵磷脂(lecithin, Le)為合併乳化劑製備次亞麻油酸(LNA)- β -胡蘿蔔素(β -Carotene)奈米乳滴乳化液之試驗(參見圖二十)

1.CS-Le-LNA- β -Carotene初乳化液之製備

取 $\geq 85\%$ 之 0.5 g chitosan 溶於 50 mL 0.1 M 醋酸溶液製成 chitosan solution，並調整 pH 值至 6.0。將 LNA- β -Carotene (1500:3、2000:4、2500:5、3000:6 mg, w/w) 之重量比例分別與 (0.375、0.5、0.625、0.75 g) 卵磷脂溶少許正己烷作混合，再加入 0.1 M 醋酸溶液 50 mL，先以旋轉式高速均質機將上述四種油量的 Le-LNA- β -Carotene 的混合液進行第一次初乳化 (13,500 rpm, 2 min) 後，並個別加入上述 50 mL 幾丁聚醣溶液，溶液以同上方法進行第二次初乳化，並得四種不同油量之 CS-Le-LNA- β -Carotene 初乳化液。

2.CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液製備及 LNA- β -Carotene 油量對乳滴大小及表面電位之影響

將上述四種 CS-Le-LNA- β -Carotene 初乳化液放入高壓均質機，分別以先前試驗出最佳的乳化條件(製出較小乳滴及較高表面電位)，於 5 °C 下進行高壓乳化，製成奈米乳滴乳化液，經減壓濃縮去除正己烷後，測定其乳滴粒徑與表面電位。

四種奈米乳滴乳化液製備條件如下:

1500:3 mg (1500 bar, 10 passes) CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液

2000:4 mg (1500 bar, 10 passes) CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液

2500:5 mg (1500 bar, 10 passes) CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液

3000:6 mg (1500 bar, 10 passes) CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液

3.CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液之安定性試驗

將上述四種油量 (1500:3、2000:4、2500:5、3000:6 mg) 之 CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液進行測定其安定性，包括油水分離現象、乳

滴大小變化及過氧化價POV變化之情形。

(a) 油水分離安定性試驗

各取上述條件之乳化液50 mL塑膠離心管中，置於25 °C烘箱中，並包覆鋁箔紙避光，儲存28天觀察其油水分離情形。

(b) 乳化液滴大小之變化試驗

將上述條件乳化液置於25 °C烘箱中保存28天，並包覆鋁箔紙避光，每隔四天測其粒徑大小。

(c) 過氧化價POV試驗

取上述條件乳化液於塑膠離心管，置於50 °C烘箱中儲存9天，並包覆鋁箔紙避光，每天取樣測定其POV值。

六、分析方法

(一) 幾丁聚醣去乙醯度之測定

參考Toei與Kohara(1976)方法，精稱0.02 g 幾丁聚醣樣品及標準品並記錄其重量。將樣品及標準品溶於10 mL 之0.1 M 醋酸溶液中，並置於室溫下攪拌一小時待其溶解，再以蒸餾水定量至50 mL 且混合均勻。取5 mL 樣品及標準品溶液於125 mL 三角錐形瓶中，加入0.05 mL toluidine blue 指示劑後，以N/400 potassium polyvinyl sulfate solution(P.V.S.K)進行滴定，滴定時需邊滴邊搖晃錐形瓶，當滴定至溶液由藍色變成紫紅色時，此為其滴定終點，利用標準品滴定量與重量和樣品之重量及滴定量做計算即可得知去乙醯度。

(二) 乳化液乳滴大小(droplet size)及表面電位(zeta potential)之測定

使用雷射光散射法粒徑及界面電位分析儀(Zetasizer 3000HS, Malvern, UK)測定奈米乳滴大小及表面電位。CS-LNA- β -Carotene及CS-Le-LNA- β -Carotene奈米乳化液測其粒徑時需考慮到透光率及分散性的問題，所以無法直接使用原乳化液去測定，需將樣品以濾紙過濾之去離子水稀釋至適當倍數後才可測定其奈米粒徑；測定表面電位亦需將乳化液稀釋後才可測定表面電位。所有樣品皆測定3次以上，求其平均值。

(三) 乳化液過氧化價(POV)之測定

將各種乳化液依He等人(2017)檢驗方法及過氧化價CNS 3650 N 6085，中國國家標準之方法修飾進行過氧化價POV氧化試驗。即各秤取5 g 之乳化液250 mL 三角錐行瓶中，加50 ml 冰醋酸與三氯甲烷混合液 (v/v = 3 : 2；冰醋酸：三氯甲烷)，搖動使其溶解(持續搖動1 min)，再加入0.5 mL 飽和碘化鉀溶液(持續搖動1 min)，加入30 mL 去離子水，用0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 標準溶液滴定至呈淡黃色時，加入0.5 %澱粉指示劑1 mL，繼續滴定到藍色沉澱物剛消失為止，記錄0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液所消耗之體積。依下面公式算出樣品之POV氧化值，所有樣品皆測定3次以上，求其平均值。另外配製未包覆CS及CS-Le之乳化液，置於50 °C烘箱儲存0 ~ 9天，每天依上述實驗方法進行POV氧化試驗，此試驗目的在於探討包覆單、雙層以及未包覆乳化劑之LNA- β -Carotene對POV氧化試驗之影響。

$$\text{過氧化價(meq/kg)} = \frac{S \times 0.01 \times F}{W} \times 1000$$

S = 滴定所消耗的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液毫升數。

W = 樣品重(公克)

F = 0.01 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液之力價

● 0.01 N 硫代硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 標準溶液之力價測定

1. 精確稱取碘酸鉀約0.02 g，倒入三角錐形瓶中。

2. 加25 mL 水及0.5 mL 飽和碘化鉀溶液，再加入5 ml 2 N H₂SO₄ 溶液，置於陰暗處3分鐘後，加水稀釋至100 mL。
3. 立即以0.01 N Na₂S₂O₃溶液滴定剛產生之碘，直到碘之顏色快要消失時（由深黃變成淺黃色），加入0.5 %澱粉指示劑1 mL，此時溶液有藍黑色之沉澱物。繼續滴定至藍黑色消失，即為終點，記錄反應前後所消耗之硫代硫酸鈉溶液體積。

$$N = \frac{\text{KIO}_3 \text{ 之稱取量}(g)}{214/6} \times \frac{1000}{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ 溶液滴定數}}$$

$$F = N/0.01$$

(四) 統計分析

本實驗數據皆以平均±標準誤差均值(means±standard error of the mean, means±SEM)表示。實驗結果分析之數據採用SAS 9.4 套裝軟體，進行完全隨機設計(completely randomized design)，以及變異分析(ANOVA)和Duncan's Multiple Range Test比較樣品間差異顯著性，當機率值小於0.05時(p<0.05)表示各組別於統計分析上有顯著差異，並使用SigmaPlot 12.0 (Systat software, USA)軟體進行作圖。

肆、結果與討論

一、幾丁聚醣之製備

幾丁聚醣經高溫強鹼處理後，會使其結構上之乙醯基(-COCH₃, acetylgroup)被脫去，進而使胺基(-NH₂, aminogroup)露出即為幾丁聚醣。參考沈(2004)實驗方法，欲製備出 $\geq 85\%$ 去乙醯度之幾丁聚醣，其條件為：將幾丁質(40 ~ 60 mesh)置於 $104\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 之 57% NaOH 溶液(w/v)(20 mL NaOH/g chitosan)中加熱攪拌 120 min，結果可得 $\geq 85\%$ 去乙醯度之幾丁聚醣。

幾丁聚醣去乙醯度是決定幾丁聚醣應用之功能性之一大因素，在藥物或營養物質傳遞吸收方面，高去乙醯度之幾丁聚醣可溶解於稀有機酸中，如：己二酸、甲酸、醋酸等，並呈現高度陽離子(ploycations)之特性，可以提高對陰離子腸黏膜細胞之吸附力以及可暫時打開腸黏膜上之緊密連接通道(tight junctions)，促進藥物、營養物質等之腸道吸收率(Huang et al., 2004; Lin et al., 2005)。而在幾丁聚醣乳化方面，根據阮與沈(2006)及阮等人(2008)探討幾丁聚醣乳化能力之研究，發現以去乙醯度 80 ~ 90 %之幾丁聚醣為乳化劑溶於 0.1 M 醋酸溶液中，製成濃度 0.5 %幾丁聚醣溶液為水相，加入大豆油進行乳化，可得良好乳化液。因此本文採用高去乙醯度($\geq 85\%$)之幾丁聚醣進行後續之研究。

二、以幾丁聚醣(chitosan, CS)為乳化劑製備次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)- β -胡蘿蔔素(β -Carotene)奈米乳滴乳化液之特性(CS-LNA- β -Carotene nanodroplet emulsion)

(一) 均質壓力(homogenizing pressure)、LNA- β -Carotene 濃度及均質循環次數(homogenizing cycle number)對(CS-LNA- β -Carotene)乳化液中乳滴大小(droplet size)及表面電位(zeta potential)之影響

將幾丁聚醣溶於 100 mL 0.1M 醋酸溶液中，配置成 0.5 % 濃度之幾丁聚醣溶液，並用 0.1 N NaOH 調整至 pH6.0，慢慢加入次亞麻油酸和 β -胡蘿蔔素至幾丁聚醣溶液，其(LNA: β -Carotene)比例分別為 500:1、1000:2、1500:3、2000:4、2500:5、3000:6 及 3500:7 mg / 20 mL，先以旋轉式均質機製備初乳化液。接著，將初乳化液經高壓均質機乳化，分別於 500、1000 及 1500 bar 壓力下乳化，每組乳化液於每個壓力下進行 1 至 10 乳化循環次數，然後測定其乳化液滴大小及表面電位。

1. 乳化液之液滴大小

(1) 乳化均質壓力之影響

圖十九表示均質壓力對乳化液液滴大小之影響。整體來說，當均質壓力愈大，製備出來之乳滴愈小。由於乳化壓力之增加，其油和水相互相之衝擊力(impact)、剪切力(shear)、氣穴作用(cavitation)及壓降(pressure drop)等亦隨之增加，而使乳化液滴變小。

Floury 等人(2000)研究以蛋白質為乳化劑，分別以 20、150 及 300 MPa 之均質壓力乳化油脂，油量為 10 及 50 %(w.w.b., mass ratio)，結果在 150 MPa 壓力下製備出的粒徑比 20 MPa 製備出來之乳滴粒徑小，因在較大壓力使油水相互衝擊產生之氣穴、破散及剪切等作用力較大。與本研究結果相似。

(2) LNA- β -Carotene 油量之影響

由圖十九亦可看出次亞麻油酸- β -胡蘿蔔素 (LNA- β -Carotene) 油量對乳化液液滴大小之影響。整體而言，LNA- β -Carotene 油量的增加，粒徑有變小的趨勢，原因為在低油量時(500:1、1000:2 mg)液滴與液滴間彼此碰撞機會較少使粒徑較大，而較高的油量(3000:6、3500:7 mg)會與乳化劑和連續相碰撞機會多使乳滴均勻分散其中因而粒徑較小，至於在中間的油量(1500:3 ~ 2500:5 mg)乳化液需要較高均質壓力(1500 bar)才能使液滴粒徑差異較明顯，而較低均質壓力只有小幅度的差異。

周(2013)以乳化壓力 500、1000 及 1500 bar 對 2 ~ 10 % 的次亞麻油酸-亞麻油酸(LNA-LA)油溶液(乳化劑為幾丁聚醣)進行乳化，脂肪酸濃度自 2 % 增加至 8 % 時，其乳滴有變小之趨勢，與本實驗有類似的結果。有些文獻指出，Floury 等人(2000)研究以高壓均質 150 及 300 MPa 壓力處理，10 及 50 % 油量比例之乳化液，發現 50 % 油量比例者之乳滴比 10 % 者較大。張於 2010 年研究將大豆油及幾丁聚醣溶液配成不同濃度 10 至 120 mL oil/100 mL chitosan solution，並以高壓均質乳化，發現油量比例之增加會使乳滴隨之變大。上述研究顯示，與本實驗有不同，推測原因為使用的油脂不同，而乳化液製備出來的結果不同。

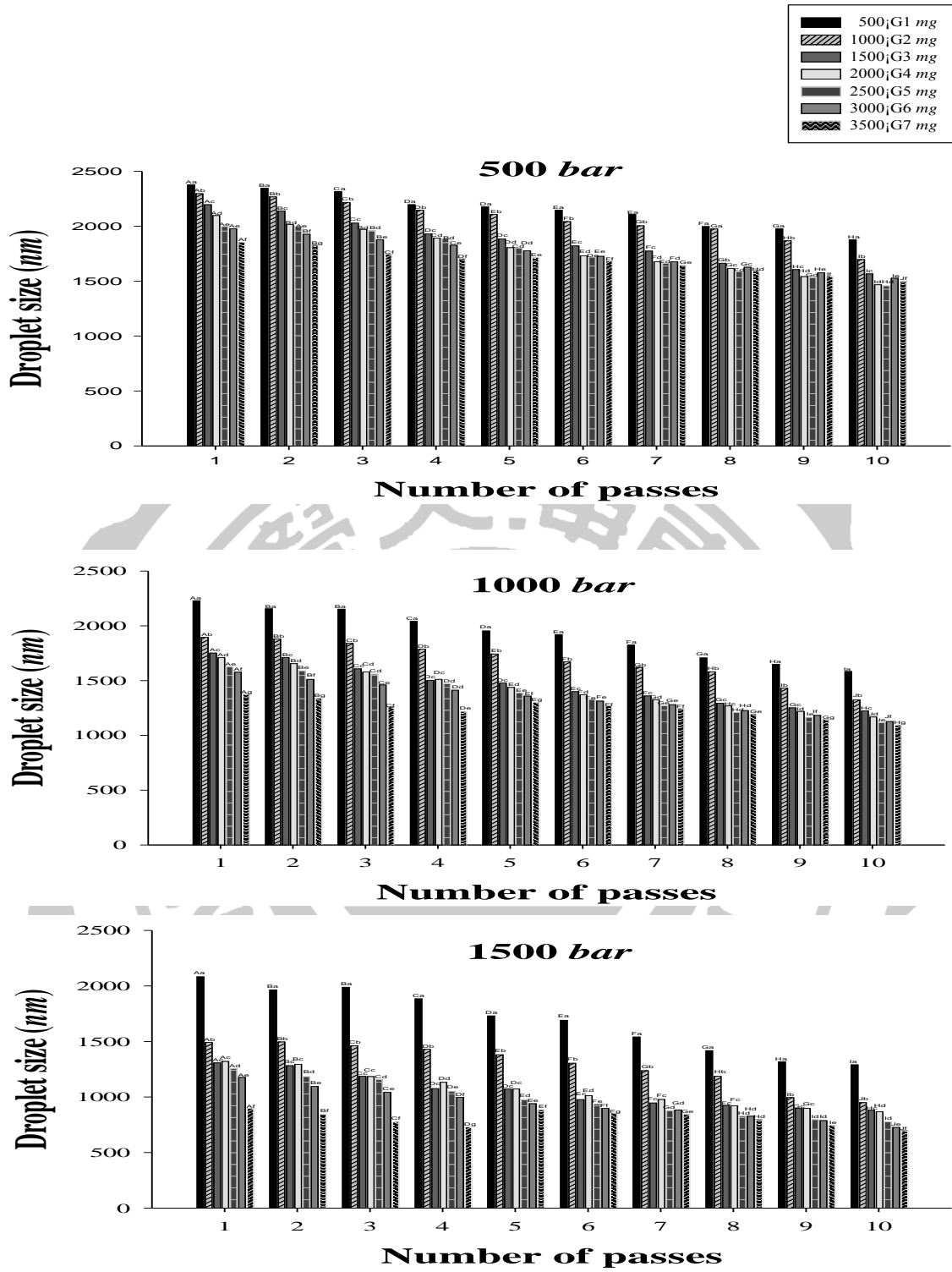
(3) 乳化循環次數之因素

由圖十九可看出，整體而言，無論乳化壓力大小或油量高低，乳化循環次數增加會使乳滴變小。無論製備之乳化壓力大小，乳化循環次數增加會使乳滴變小，且隨均質壓力增加，粒徑變小的幅度也會增加。值得注意的是，500 bar 及 1000 bar 壓力下乳化，在 6 passes 的循環次數後液滴小幅下降，而在 1500 bar 壓力下到 3 passes 的循環次數後液滴才小幅下降，表示越高壓的處理會在越少的循環次數下使乳化液達均質完全的狀態。另外壓力 1500 bar 及油量 3500:7 mg 在 5 passes 處理時粒徑上升後又有下降的趨勢，可能原因為高油量乳滴被打散後又聚集而造成的現象。

周(2013)於 1500 bar 乳化壓力下，在使用 2 ~ 6 %LNA-LA 時乳化循環 2 次後，乳滴粒徑幾乎不變且均為奈米級，較高油濃度乳化液方面(油脂濃度 10 %)，循環次數愈高則會使乳滴粒徑變大。李(2016)將 8 及 10 mL 南瓜仔油(PSO)於 1000 及 1500 bar 下進行高壓乳化，乳化液滴在一定循環次數(1000 bar 於 6 passes 以上，1500 bar 於 5 passes 以上)後會使得粒徑增加。而本實驗則將次亞麻油酸- β -胡蘿蔔素溶於正己烷中才與幾丁聚醣溶液進行乳化，樣品性質不同故實驗結果亦有所不同。

Schulz(2000)以羥丙基甲基纖維(hydroxypropyl methylcellulose)為乳化劑進行高壓(90 MPa)乳化，循環次數為 1 至 5 次後，乳化液滴會跟著循環次數的上升變小。Floury(2000)研究顯示，乳化液經過第二次循環次數時能使乳化液滴混合更加均勻(與第一次相比較)，而使得乳化液滴大小變小。與本研究結果相似。





圖二十一、乳化壓力、LNA-β-Carotene 油量及乳化循環次對乳化液滴大小之影響。

Fig. 21. Effect of homogenizing pressure LNA-β-Carotene concentration and pass number on the droplet size of CS-LNA-β-Carotene emulsions.

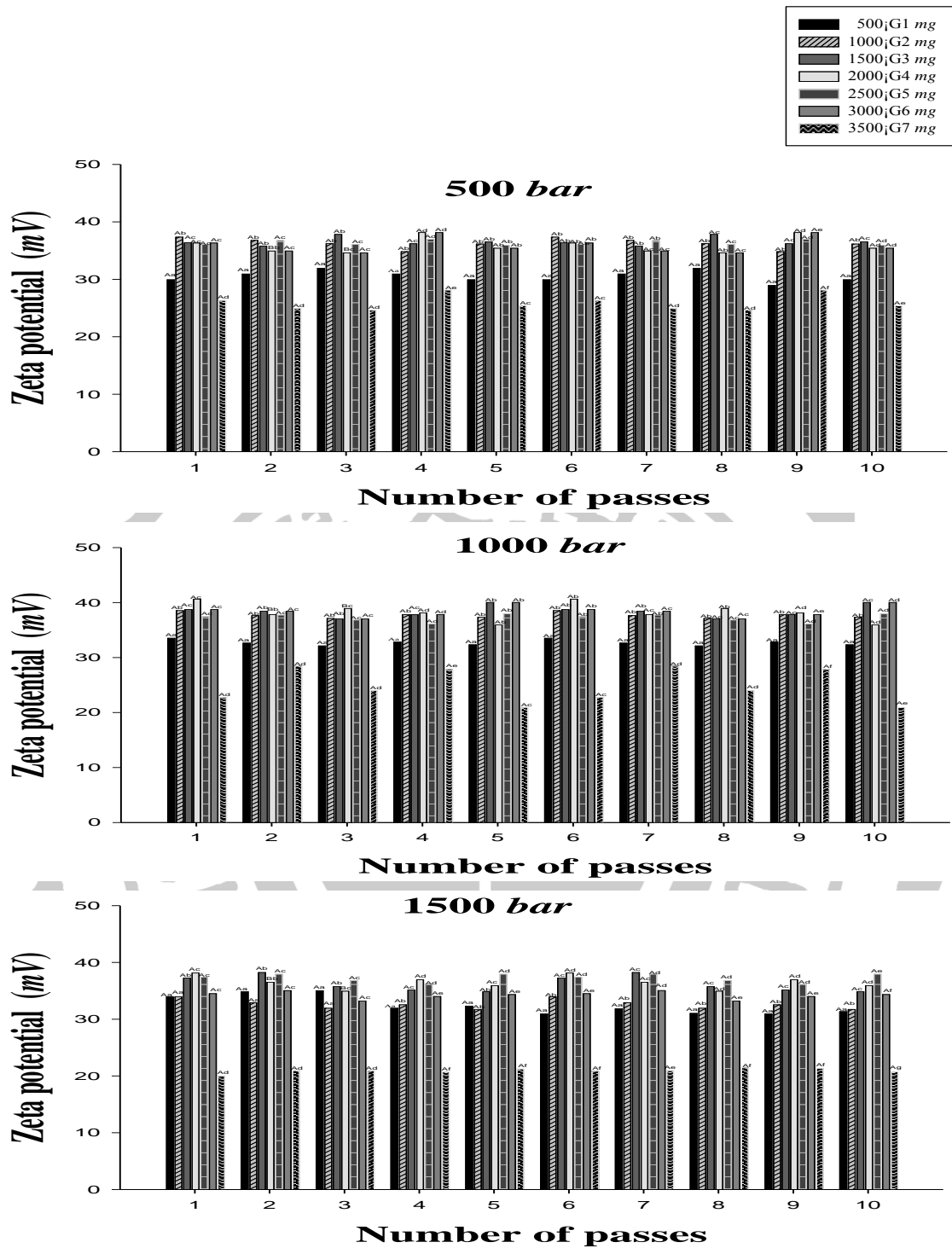
A-J mean with pass number different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

a-g mean with LNA-β-Carotene concentration different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

2. 乳化液乳滴之表面電位

由圖二十可看出乳化壓力、LNA- β -Carotene 油量及乳化循環次數對乳化液乳滴表面電位之影響。其中乳化壓力及乳化循環因素無顯著影響，而由量之影響方面對 500:1、1000:2、1500:3、2000:4、2500:5 及 3000:6 mg LNA- β -Carotene 油量來說，在 500-1500 bar 及 1-10 次循環次數下乳化，其乳滴表面電位約在 +30 ~ +40 mV 間。而油量上升時液滴表面電位也隨之上升。而在高油量為 3500:7 mg LNA- β -Carotene 時，其表面電位較低，均在 +20 ~ +27 mV 間，其原因可能為在高油量下乳化，雖然油量較高乳化時油水碰撞機會較多，但因過多的油會蓋住乳滴表面附著之帶正電幾丁聚醣較少，使表面電位亦較低，也可能在此條件下製成之乳滴有聚集現象，使乳滴表面之表面電位被覆蓋住而無法被偵測到，故電位較低。

周(2013)將 2 ~ 10 % LNA-LA 濃度油溶液，在 500-1500 bar 及 1-5 次循環次數下乳化，其乳滴表面電位約在 +40 ~ +51 mV 間。周採用之油脂為純脂肪酸，其中不含卵磷脂，故與本實驗油量增加會使表面電位增加之結果相同。



圖二十二、乳化壓力、LNA-β-Carotene 油量及乳化循環次對乳化液滴表面電位之影響。

Fig. 22. Effect of homogenizing pressure, LNA-β-Carotene concentration and pass number on the zeta potential of CS-LNA-β-Carotene emulsions.

A-J mean with pass number different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

a-g mean with LNA-β-Carotene concentration different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

(二)CS-LNA-β-Carotene 奈米乳滴乳化液之安定性

將四種油量之 LNA-β-Carotene 經適合之乳化壓力及循環次數乳化製得奈米乳滴較小的 CS-LNA-β-Carotene 乳化液(如下)，並於儲存期間進行觀察其油水分離情形、乳滴大小變化及過氧化價 POV 變化以了解其安定性。

*四種 CS-LNA-β-Carotene 乳化液之製備條件為：

- (1) 1500:3 mg LNA-β-Carotene 1500 bar, 10 passes (887.3 nm, 34.9 mV)
- (2) 2000:4 mg LNA-β-Carotene 1500 bar, 10 passes (871.9 nm, 36.0 mV)
- (3) 2500:5 mg LNA-β-Carotene 1500 bar, 10 passes (780.6 nm, 38.0 mV)
- (4) 3000:6 mg LNA-β-Carotene 1500 bar, 10 passes (730.1 nm, 34.5 mV)

1. 乳化液油水之分離情形

表七所示上述四種乳化液於 25 °C 下儲存 28 天之油水分離情形。由表七得知，乳化液於保存 28 天內皆未分層，由結果可以得知，單純以幾丁聚醣為乳化劑，經由高壓處理後能使乳液不易分層。

張於 2010 年研究將 1.5 %幾丁聚醣與大豆油以六種油量/幾丁聚醣溶液比例進行高壓乳化，乳化壓力為 500、1000、1500 及 1800 bar，乳化循環次數為 1 至 7 次，製成之奈米乳滴乳化液進行各乳化液之乳化安定保存性，在最高壓力 1800 bar 均質壓力下乳化 10、30 及 50 mL 大豆油，乳化液可儲存 4 週無分層現象。其油量 70 ~ 120 mL 時隨油量增加循環次數方可提升乳化液穩定性，達到使儲存 4 週無分層。整體結果而言，乳化壓力較高，循環次數較多均有助於乳化液不易分層。

張(2010)研究之結果與本實驗結果相同。周(2013)將五種不同濃度(2、4、6、8、10%)之 LNA-LA 與 0.5% 幾丁聚醣進行高壓乳化，乳化循環次數為 1 至 5 次，製得奈米乳滴化液後，於 25 °C 下儲存 20 天觀察油水分離情況，發現，在低油量 2、4% LNA-LA 之保存可達 20 天內未分層，而 8 及 10% 之 LNA-LA 乳化液只能保存 8 天不分層。由此結果可看出，LNA-LA 濃度 $\geq 6\%$ 時，雖在適合乳化壓力及乳化循環次數下乳化可得較小的奈米乳滴之乳化液，但可能因油濃度較高，所以製出乳滴之密度亦較密集，彼此易接近結合較大之乳滴而易於分離。



表七、CS-LNA- β -Carotene 乳化液於 25 °C 下保存 28 天之分離情形。

Table 7. Separation of CS-LNA- β -Carotene emulsion during 28 day storage at 25°C.

Conditions for emulsification	Separation time (<i>day</i>)
1500:3 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	O
2000:4 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	O
2500:5 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	O
3000:6 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	O

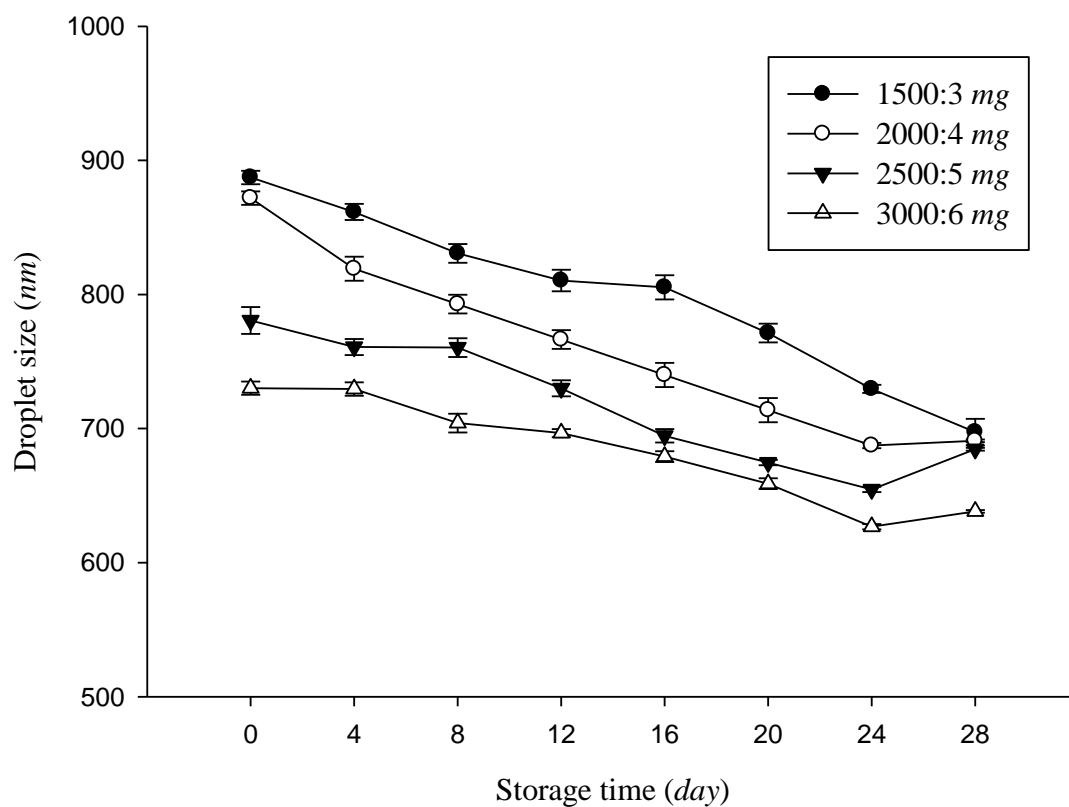
O: no separation during 28 days

Number: separation in number of days (duplicate test)

2. 乳化液乳滴大小之變化

將上述四種乳化液於 25 °C 下儲存 28 天，每四天測一次粒徑，結果如圖二十一所示。可以發現所有油量之乳化液，乳滴隨著儲存天數增加而變小而後漸漸趨緩。此現象由於剛製好之乳化液其乳滴尚未穩定而產生聚集現象，但乳滴表面帶有正電荷的幾丁聚醣，彼此相互排斥而後散開變小。但在 24~28 天保存則粒徑有小幅上升，因奈米乳滴較於保存時靠近而結合為大乳滴。顯然，以幾丁聚醣為乳化劑並利用高壓均質機將乳化可達到奈米級乳滴且可保存 28 天仍為安定。

周(2013)以幾丁聚醣為乳化劑，將次亞麻油酸(LNA)及亞麻油酸(LA)混和之脂肪酸溶液以高壓乳化方式製成單層膜奈米乳化液，結果發現，2 及 4 %LNA-LA 乳化液，於儲存期間粒徑先上升後下降，此現象由於其乳滴為奈米級，且密度低，加上乳滴表面帶正電，彼此產生排斥，故剛製好之乳化液其乳滴尚未穩定有些聚集現象，而後則散開而粒徑變小。6、8 及 10 %LNA-LA 乳化液，因其油濃度較高使其乳滴較多較密，於保存時易靠近而結合為大乳滴，故分別在保存第 17 及 8 天時乳化液呈現分離。Ogawa 等人(2003)研究以卵磷脂為乳化劑，將玉米油以高壓乳化方式(5000 *psi*, 1 *pass*)製成單層膜奈米乳化液，結果發現乳化液在保存 22 至 28 天時，乳化液滴粒徑有明顯上升現象。前人研究與本實驗分別在油脂或乳化劑使用上的不同，而相同地方皆為經高壓均質製成奈米乳化液，且在部分條件下製備之乳化液於保存多天後乳滴粒徑有聚集現象。故只經由單一乳化劑包覆之乳化液，其保存安定性較不慎理想。



圖二十三、CS-LNA- β -Carotene 乳化液於 25 °C 下保存 28 天之乳滴粒徑變化。

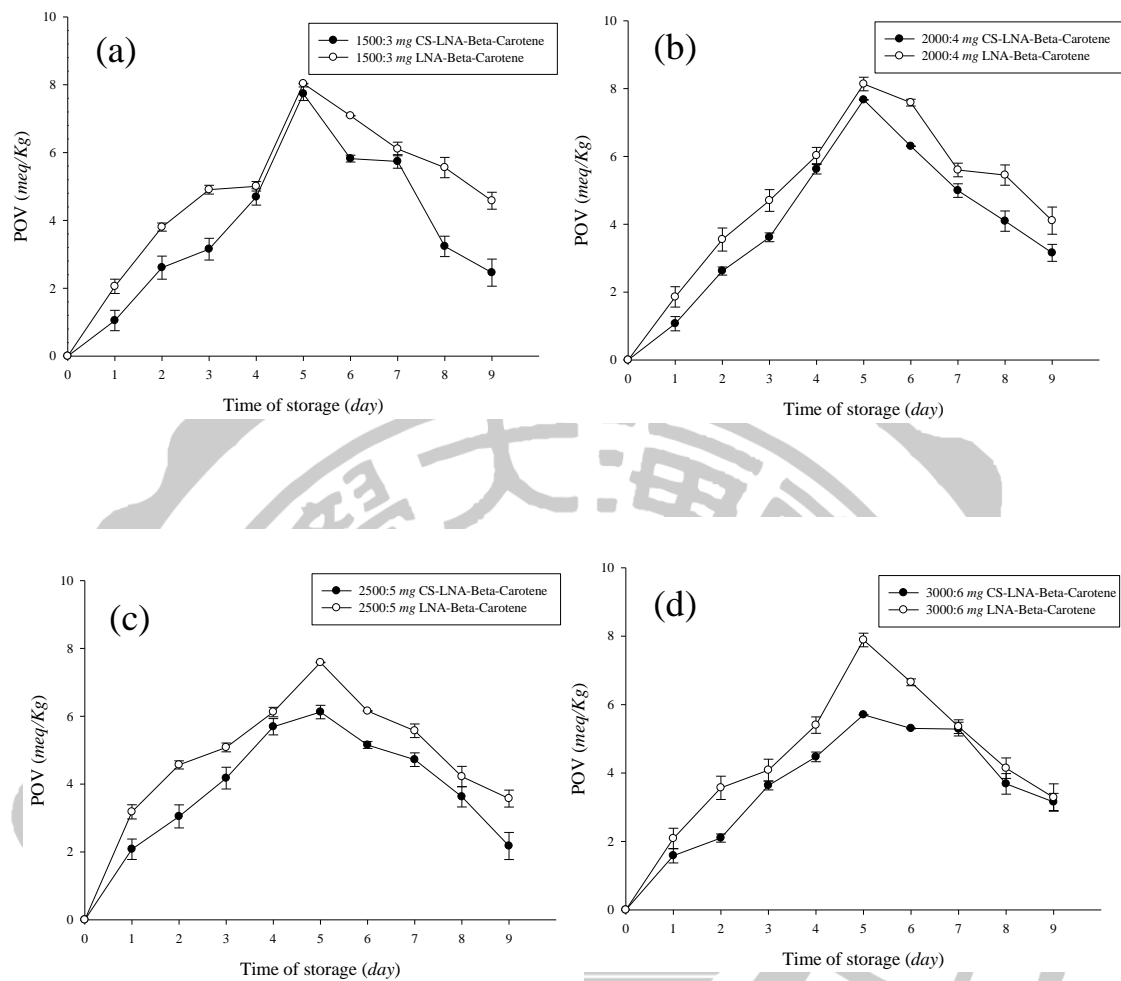
Fig. 23. Change of emulsion droplet size of CS- LNA- β -Carotene emulsion during 28 day storage at 25°C.

3. 乳化液於儲存期間過氧化價 POV 之變化

圖二十二 a、b、c、d 所示，上述四種不同油量之 CS-LNA- β -Carotene 乳化液以及單純 LNA- β -Carotene 的乳化液於 50 °C 保存期間(0~9 天)的 POV 變化情形。純的 LNA- β -Carotene 於第 5 天時 POV 達到最大值約 7.58 ~ 8.14 meq/Kg，而後這些樣品 POV 均開始下降，而 CS-LNA- β -Carotene 乳化液則也是在第 5 天 POV 達最大值約 5.70 ~ 7.66 meq/Kg，而後開始下降，可見以幾丁聚醣乳化油脂稍微有減緩油脂氧化的效果，均比未乳化包覆油脂的 POV 來得低。原因為單一乳劑包覆油滴表層較薄對於油脂的保護有限。另一原因為在高壓均質時，乳化液升溫且接觸大量空氣，幾丁聚醣無法充分避免氧化，故使保護效果較差。POV 會下降的原因在於 POV 只測量油脂氧化產生的初級氧化產物(過氧化物)，而隨著儲存時間增加，過氧化物會裂解成其他物質，故圖(a)~(d)後期測出之 POV 值下降現象是因過氧化物裂解所致。

李(2015)以幾丁聚醣作為乳化劑對次亞麻油酸-維他命 E (LNA-Vit.E)油脂進行乳化後測其 POV，發現純 LNA-Vit.E 於第 4 天時 POV 達到最大值，而 CS-LNA-Vit.E 乳化液則在第 5 天 POV 達最大值。周(2013)以幾丁聚醣作為乳化劑，對次亞麻油酸(LNA)及亞麻油酸(LA)混和之脂肪酸溶液(2 ~ 10 %)進行乳化後測其 POV，發現其 POV 較純 LNA-LA 之 POV 低，結果顯示以幾丁聚醣為乳化劑能保護 LNA-LA 且可以減緩脂肪酸氧化速度。Klinkesorn 等人(2005)研究將金槍魚油以卵磷脂經高轉速均質機製備成初乳化液後，再經由超音波震盪(20 kHz, 2 min)製成單層膜之乳化液，然後將乳化液放在 37 °C 下並測量其氫過氧化物的生成量，結果顯示，其乳化液之氫過氧化物產生量在第 9 天達最大量，但隨後氫過氧化物分解成二級氧化產物而下降。與本實驗相似。

由此可知，幾丁聚醣為乳化劑進行乳化包覆於 LNA- β -Carotene 表面時，可避免與氧氣直接接觸，進而降低油脂的氧化作用，但其效果並不理想。本實驗另以卵磷脂及幾丁聚醣共同為乳化劑，將 LNA- β -Carotene 乳化，並探討其乳化液之安定性是否更佳。



圖二十四、CS-LNA- β -Carotene 乳化液及 LNA- β -Carotene 之 POV 變化情形。

Fig. 24. POV change of CS-LNA- β -Carotene emulsions and pure LNA- β -Carotene.
(Storage time and temperature: 0-9 days and 50°C)

三、以幾丁聚醣(chitosan, CS)及卵磷脂(lecithin, Le)為共同乳化劑製備次亞麻油酸- β -胡蘿蔔素(LNA- β -Carotene)奈米乳滴乳化液(CS-Le-LNA- β -Carotene nanodroplet emulsion)

參考三篇文獻之油水相之比例(Ogawa et al., 2003, 1:4(v/v); Klinkesorn et al., 2006, 1:3(v/v)及Sorensen et al., 2008, 1:2(v/v))及使用不同廠牌之卵磷脂〔食品級卵磷脂、試藥級卵磷脂(TCI)及試藥級卵磷脂(SIGMA)來測試以何種作為乳化劑乳化可得較安定之乳化液，結果以試藥級卵磷脂(TCI)之Le較佳。故此部分以CS及TCI之Le為共同乳化劑將LNA- β -Carotene乳化製成CS-Le-LNA- β -Carotene奈米乳滴乳化液並探討其性質。

將1500:3、2000:4、2500:5及3000:6之LNA- β -Carotene分別與0.375、0.5、0.625及0.75 g 卵磷脂(lecithin, Le)混合，加入50 mL 0.1 M醋酸溶液後利用旋轉式均質機先將Le與LNA- β -Carotene進行第一次初乳化(13,500 rpm, 2 min)，製得5種濃度之Le-LNA- β -Carotene乳化液後，加入幾丁聚醣溶液(50 mL Le-LNA- β -Carotene emulsion/50 mL chitosan solution)進行第二次初乳化(13,500 rpm, 2 min)，再以高壓均質機製成奈米乳化液，選擇能製備出粒徑較小乳滴、表面正電位較高及較為安定之條件。

上述五種乳化液之乳化條件如下：

- (1) 0.375 g:1500:3 mg Le-LNA- β -Carotene 1500 bar, 10 passes
- (2) 0.5 g:2000:4 mg Le-LNA- β -Carotene 1500 bar, 10 passes
- (3) 0.625 g:2500:5 mg Le-LNA- β -Carotene 1500 bar, 10 passes
- (4) 0.75 g:3000:6 mg Le-LNA- β -Carotene 1500 bar, 10 passes

製備成奈米乳滴乳化液後測定乳滴大小、表面電位及乳化安定性。其中安定性部分包括於保存期間油水分離情形，乳滴大小和過氧化價POV之變化。

(一) LNA- β -Carotene 油量對 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液乳滴大小(droplet size)、表面電位(zeta potential)之影響

1. 乳化液乳滴之大小

表八所示，CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液乳滴大小受 LNA- β -Carotene 油量之影響及與 CS-LNA- β -Carotene 乳化液乳滴大小之比較。LNA- β -Carotene 油量對 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液乳滴大小之影響方面，油量愈多則乳滴粒徑有變小的趨勢(1500:3、3000:6 mg 粒徑大小分別為 856.3 及 700.2 nm)，原因為油量的增加使油水碰撞機會較大使乳滴均勻分散其中，且加入卵磷脂後，使得乳化效果更好，粒徑比只使用幾丁聚醣當做乳化劑所製成的乳滴更小。

周(2012)以高壓均質方式製備單層膜乳化液(chitosan 為乳化劑)及雙層膜乳化液(chitosan 及 lecithin 為乳化劑)，比較其儲存期間之粒徑，發現雙層膜乳化液滴之粒徑較小，可能原因為其乳化效果較佳，相同油量時，能形成較多且較小的乳滴，此與本實驗之結果相同。但 Klinkesorn 等人(2009)研究將金槍魚油先以帶負電乳化劑 Tween80 經高轉速均質機製成初乳化液，再經高壓均質製成單層膜乳化液，最後添加不同濃度之幾丁聚醣做為第二層乳化劑與單層膜乳化液混合製成雙層膜乳化液，在粒徑方面，加入幾丁聚醣會使乳滴粒徑上升，且隨著添加幾丁聚醣量增加會使粒徑變更大，但能改善乳化液的儲存安定性。李(2016)將南瓜籽油(Pumpkin Seed Oil)先加入卵磷脂後，隨著添加不同的油量，乳化劑(卵磷脂)依比例增加，並以旋轉式均質機出乳化後，加入幾丁聚醣溶液(第二種乳化劑)，經高壓均質機乳化製備成雙層膜乳化液，結果發現 CS-PSO 乳化液粒徑較相同 CS-Le-PSO 油量為高，且油量愈多則乳滴粒徑愈大，此部分與本實驗之結果不相似。原因可能為本實驗添加乳化劑的量，隨著油量增加而增加，CS-Le 結合更加緊密，故製備出粒徑較小。

表八、CS-LNA- β -Carotene 及 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液液滴粒徑之比較。

Table 8. Comparison of droplet size between CS-LNA- β -Carotene and CS-Le-LNA- β -Carotene emulsions.

Conditions for emulsification	Emulsion type	
	CS-LNA- β -Carotene	CS-Le-LNA- β -Carotene
	Droplet size (nm)	
1500:3 g (1500bar, 10 passes)	887.3 ^{Aa}	856.3 ^{Ab}
2000:4 g (1500bar, 10 passes)	871.9 ^{Ba}	841.9 ^{Bb}
2500:5 g (1500bar, 10 passes)	780.6 ^{Ba}	750.6 ^{Cb}
3000:6 g (1500bar, 10 passes)	733.1 ^{Ca}	700.2 ^{Db}

*A-D mean in the same column (LNA- β -Carotene concentration) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

*a-b mean in the same row (type of emulsion) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2. 乳化液之表面電位

表九所示，當 LNA- β -Carotene 僅加入 lecithin 為乳化劑時，以旋轉式均質機(13,500 rpm, 2 min)行初乳化為 Le-LNA- β -Carotene 初乳化液，其表面電位約為-39.4 ~ -41.5 mV，此由於 lecithin 離子化磷酸鹽基的 ionized phosphate group 帶負電之故。測定 Le-LNA- β -Carotene 乳化液滴表面電位，目的在於探討 lecithin 是否包覆於乳滴表面，使乳滴表面呈現負電狀態，再與帶正電之幾丁聚醣以靜電層沉積法進行包覆，形成雙層膜乳化液。若只以 CS 為乳化劑時，乳滴電位約在+34.4 ~ +38 mV。若併用 CS 及 Le 為 2 種乳化劑，則乳滴電位在+42.3 ~ +45.2 mV，此原因為利用正負電相吸(靜電層積法)，帶正電的 CS 能完整包覆在帶負電的 Le 外，故乳滴表面帶正電。

Chuah 等人(2009)將大豆油與 lecithin 乳化後，加入不同濃度之幾丁聚醣再混合乳化，發現 lecithin 乳化液中電位由-84 mV 上升至+60 mV 左右，因幾丁聚醣之正電荷與卵磷脂之負電荷相消並轉為正電位，隨著幾丁聚醣之濃度愈高則電位呈現+mV 愈高。Klinkeson 及 McClements (2009)將 tuna oil 與 lecithin 乳化後加入不同濃度之幾丁聚醣再乳化同樣發現上述之結果，若單只以 lecithin 為乳化劑，其乳化液表面電位約-30 mV，而加入幾丁聚醣時隨即相消負電位而轉為正電位，約+55 ~ +60 mV。Gudipati 等人(2010)將魚油與 citrem (citric acidcenterofmone anddizlyceride)為乳化劑製成乳化液，其乳化液電位約-50 mV，而後加入不同濃度之幾丁聚醣再乳化，亦發現上述之結果，表面電位約為+56 mV。周(2013)以 chitosan 及 lecithin 為合併乳化劑製備雙層膜乳化液，在製備過程中測定僅以 lecithin 為乳化劑製備初乳化液時之表面電位，結果顯示，單以 lecithin 為乳化劑時，表面電位約為-38 ~ -40 mV，而併用 chitosan 及 lecithin 為乳化劑時，表面電位約為+50 ~ +51 mV，表示 chitosan 以靜電層積法包覆在 lecithin 之外，形成雙層膜乳滴，本實驗與上述前人研究之結果相似。

表九、CS-LNA- β -Carotene 及 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液表面電位之比較。

Table 9. Comparison of electrical charge (ζ -potential) between CS-LNA- β -Carotene and CS-Le-LNA- β -Carotene emulsions

Conditions for emulsification	Emulsion type		
	Le-LNA- β -Carotene	CS-LNA- β -Carotene	CS-Le-LNA- β -Carotene
ζ potential (mV)			
1500:3 mg	-39.4 ^A	+34.9 ^{Ab}	+45.2 ^{Aa}
2000:4 mg	-40.2 ^A	+36.0 ^{Bb}	+43.4 ^{Aa}
2500:5 mg	-41.5 ^A	+38.0 ^{Cb}	+42.9 ^{Ba}
3000:6 mg	-40.8 ^A	+34.4 ^{Db}	+42.3 ^{Ba}

*A-D mean in the same column (LNA- β -Carotene concentration) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

*a-b mean in the same row (type of emulsion) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

(二)CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液之安定性

1. 乳化液油水之分離情形

表十所示，CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液在 25 °C 下保存 28 天，其油水分離之情形。對照表七得知，若只以幾丁聚醣為乳化劑乳化為單層膜包覆乳滴，乳化液皆無分層產生，表示幾丁聚醣具有良好的乳化作用，但是乳化液的顏色在第 4 天卻明顯由亮黃色變為淺黃色(添加 β -胡蘿蔔素的著色效果)，甚至第 8 天後乳化液接近乳白色，代表 β -胡蘿蔔素被氧化，單層乳化劑保護油脂氧化效果有限。但以 Le 和 CS 為合併乳化劑，乳化液儲存至 28 天仍維持安定不分層，且乳化液顏色只轉為淺黃色，代表雙層乳化劑保護油脂氧化效果良好。此因幾丁聚醣與卵磷脂會在油滴表面因正負電相吸形成雙層膜將乳滴(內為 Le 層，外為 CS 層)完整將 LNA- β -Carotene 包覆於其中，加上外層 CS 帶正電使乳滴彼此產生排斥作用，可大大減少乳滴間之聚集合保護油脂氧化，改善乳化液之安定性。

Ogawa 等人(2003)研究將玉米油(oil)分別加入卵磷脂(Le)及卵磷脂和幾丁聚醣(CS)製成 Le-oil 乳化液及 CS-Le-oil 乳化液後，置於室溫下保存，發現前者可保存 22 至 28 天，之後油水分離，而後者保存 3 個月以上仍為安定。本實驗結果與前人研究結果類似，雙層膜乳化液之安定性比單層膜乳化液良好。由前人研究及本實驗證實，雙層膜包覆於乳滴表面可明顯改善乳化液之穩定性。Klinkesorn 等人(2005)研究將鮭魚油與卵磷脂溶液均質，經超音波震盪後形成一次乳化物，再加入幾丁聚醣水溶液而形成二次乳化物，此卵磷脂—幾丁聚醣雙層膜可提高魚油乳化液之安定性，且此乳化液經熱加工、冷凍—解凍循環處理及凍乾處理油水較不易分離。周(2013)分別以 chitosan 為乳化劑，或 chitosan 和 lecithin 為合併乳化劑，將次亞麻油酸及亞麻油酸混和之脂肪酸溶液乳化，製成單層膜及雙層膜及雙層膜乳滴乳化液，發現在高油量下(6、8 及 10 %)雙層膜乳化液於儲存期間皆無油水分離產生，而單層膜乳化液於儲存時則有油水分離現象產生。

表十、CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液於 25 °C 下保存 28 天之分離情形。

Table 10. Separation of CS-Le-LNA- β -Carotene emulsions during 28 day storage at 25°C.

Conditions for emulsification	Separation time (<i>day</i>)
0.375 g:1500:3 mg (1500 bar, 10 passes)	O
0.5 g:2000:4 mg (1500 bar, 10 passes)	O
0.625 g:2500:5 mg (1500 bar, 10 passes)	O
0.75 g:3000:6 mg (1500 bar, 10 passes)	O

O: no separation during 28 days

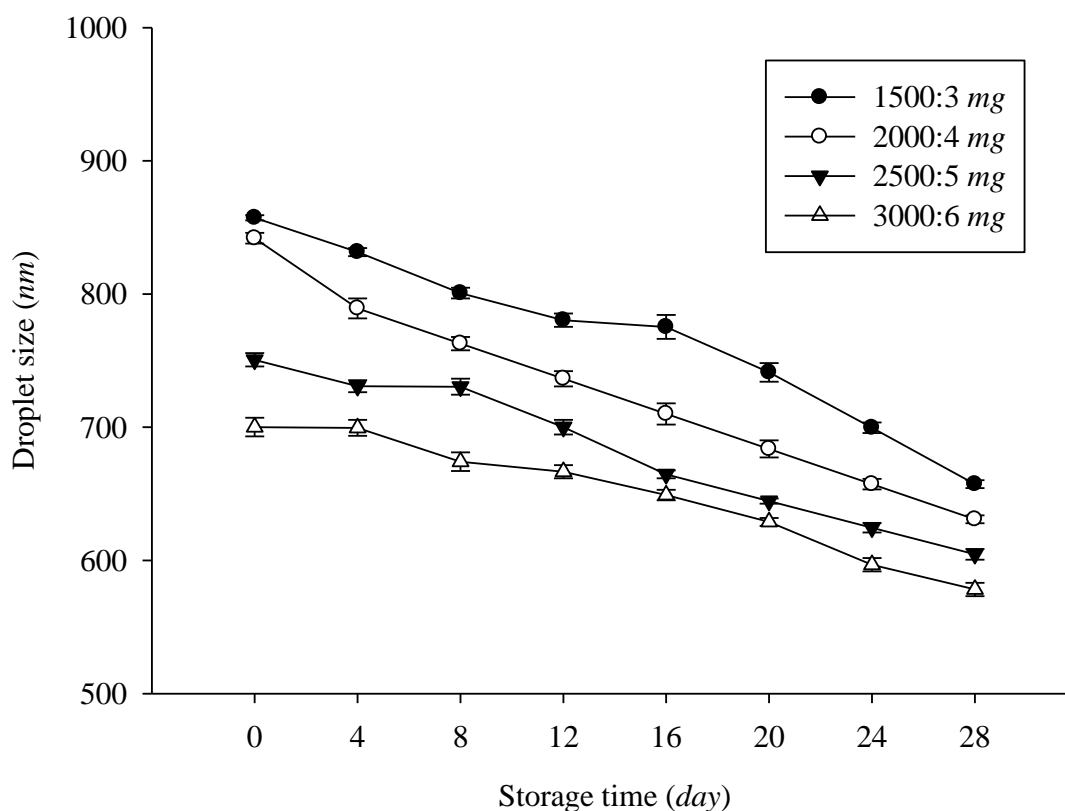
Number: separation in number of days (duplicate test)

2. 乳化液乳滴大小之變化

圖二十三所示為 1500:3、2000:4、2500:5 及 3000:6 mg LNA- β -Carotene 油量之 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液於 25 °C 下保存 28 天其乳滴粒徑變化情形。此圖可得知油量，四種 LNA- β -Carotene 濃度之 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液乳滴粒徑隨著保存天數的增加而有變小的現象，推測因剛製出之奈米乳滴尚未安定，其乳滴間彼此有聚集的情形，但隨後表面帶正電之乳滴間產生靜電排斥力作用而慢慢分開，使粒徑變小，並在儲存期間乳滴並未產生聚集現象，故於 28 天保存其乳化液仍為安定。

周(2013)利用卵磷脂(Le)及幾丁聚醣(CS)作為兩種乳化劑，製備成 6、8 及 10 % LNA-LA 濃度的兩種 CS-Le-LNA-LA 及 CS-LNA-LA 奈米乳化液，發現只有單層的乳化劑(CS)，於 20 天保存下，其乳滴粒徑隨著保存天數增加而變大，分別於 17 及 8 天油水呈現分離，反之 CS-Le-LNA-LA 乳化液乳滴粒徑隨著保存天數增加而有變小的現象，並在 20 天保存下乳化液仍為安定。Ogawa 等人(2003)研究將卵磷脂及玉米油以高壓乳化方式(5000 *psi*, 1 *pass*)製成一次奈米乳化液(*lecithin-oil*)，再加入幾丁聚醣溶液製成二次奈米乳化液(*chitosan-lecithin-oil*)，並探討兩種乳化液在室溫保存下其乳化液滴粒徑變化情形。結果顯示，只有包覆卵磷脂之乳化液在保存 22 至 28 天時，乳化液滴粒徑才有明顯上升現象，約從 1.5 μm 上升至 7 μm ，而包覆幾丁聚醣和卵磷脂之乳化液則可以安定保存超過 3 個月以上，粒徑穩定且不變大(維持 0.9 μm 左右)，由結果得知一次乳化液(*lecithin-oil*)經由幾丁聚醣包覆後，可明顯改善乳化液之安定性。Panya 等人(2010)研究將脂質體(*liposome*)與卵磷脂(*lecithin*)以高壓均質(9000 *psi*, 3 *passes*)均質成 *lecithin-liposomes*，加入幾丁聚醣(*chitosan*)再經攪拌機(700 *rpm*, 2 *min*)攪拌成最後幾丁聚醣-卵磷脂-脂質體溶液，探討脂質體在保存期間粒徑變化情形。發現經卵磷脂及幾丁聚醣包覆之脂質體於 55 °C 保存 5 天時，粒徑有稍變大，但保存至 14 天時，粒徑有變小現象(最後粒徑約為 200 *nm*)。而只以卵磷脂包覆之脂質體其粒徑隨著保存天數增加而變大(87.8 \rightarrow 150 *nm*)。雖幾丁聚醣-卵磷脂-脂質體溶液之粒徑較卵磷脂-脂質體溶液大，但在安定性部分前者結果較後者佳。

上述研究結果與本研究結果相似，皆是包覆兩層乳化劑之乳化液其乳化液安定性較包覆單層乳化劑好，乳化液經由靜電層層積法包覆後其乳化安定性可明顯被改善。



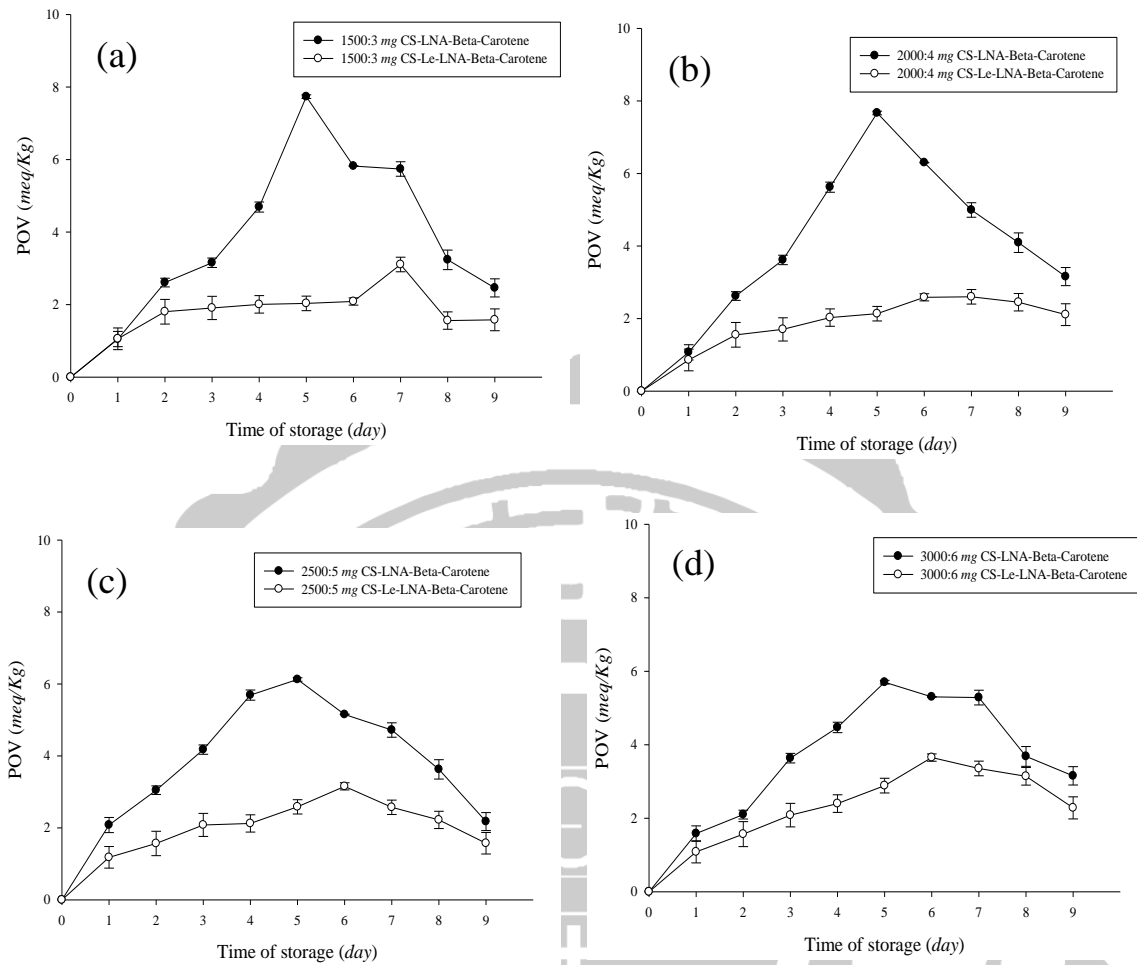
圖二十五、CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液於 25 °C 下保存 28 天之乳滴粒徑變化。

Fig. 25. Change of emulsion droplet size of CS-Le-LNA- β -Carotene emulsions during 28 days storage at 25 °C.

3. 乳化液於儲存期間過氧化價 POV 之變化

圖二十四所示，CS-LNA- β -Carotene 及 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液在 50 °C 下保存 9 天內 POV 氧化之變化。由圖可以得知，對 1500:3、2000:4、2500:5 及 3000:6 mg LNA- β -Carotene 以 Le 及 CS 為合併乳化劑製備 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化，在 50 °C 置放 9 天，其 POV 上升較為緩慢且非常安定，最高值約為 3.65 meq/Kg。在相同條件下製備的 CS-LNA- β -Carotene 乳化液，其 POV 最高達約在 7.73 meq/Kg。此顯示，以 CS 及 Le 為合併乳化劑使 CS-Le-LNA- β -Carotene 乳化液被氧化機會降低許多。此原因為 CS 及 Le 於乳化時形成雙層膜包覆 LNA- β -Carotene，減少了氧氣接觸所致。

Klinkesorn 等人(2005)將卵磷脂與金槍魚油以旋轉式均質機製成單層膜粗乳化液，再以超音波震盪(20 kHz, 2 min)製成最後卵磷脂-魚油乳化液，後續加入幾丁聚醣以超音波震盪(20 kHz, 2 min)製成雙層膜乳化液，探討單及雙層膜對乳化液氧化穩定之影響。結果經由幾丁聚醣和卵磷脂包覆之魚油乳化液在氫過氧化物測定方面，明顯較卵磷脂單層膜魚油乳化液好，雙層膜魚油乳化液之氫過氧化物含量一直維持低量穩定狀態，而單層膜乳化液於保存期間較不穩定，所以測定氫過氧化物量有明顯上升現象，故結果指出雙層膜包覆魚油確實可改善油之氧化速並增加乳化液之穩定度。周(2013)分別以 chitosan 為乳化劑，或 chitosan 和 lecithin 為合併乳化劑，將次亞麻油酸及亞麻油酸混和之脂肪酸溶液乳化，製成單層膜及雙層膜及雙層膜乳滴乳化液，結果顯示雙層膜乳化液之 POV 相對較低。結果與本研究相同，雙層膜之製備使用 chitosan 和 lecithin 為合併乳化劑，於氧化試驗中可降低正價鐵離子靠近，亦有雙層膜的保護可避免與氧氣直接接觸而使 POV 大大降低。因此，改變乳化液滴的界面膜是有效控制脂質氧化的方法，本研究與前人研究有類似之結果。



圖二十六、不同油量 LNA- β -Carotene 的 CS-Le-LNA- β -Carotene 及 CS-LNA- β -Carotene 乳化液之 POV 變化情形。

Fig. 26. POV changes of CS-Le-LNA- β -Carotene and CS-LNA- β -Carotene emulsions at different LNA- β -Carotene concentrations. (storage time and temperature: 0-9 day and 50°C)

伍、結論

將次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)及 β -胡蘿蔔素(β -Carotene)分別以幾丁聚醣(CS)為單獨乳化劑及以幾丁聚醣和卵磷脂(Le)合併為乳化劑，經初乳化後以高壓均質乳化並探討次亞麻油酸- β -胡蘿蔔素油量、均質壓力(500-1500 bar)及乳化循環次數(1-10 passes)對這些乳化液之乳滴大小、電位及安定性影響，得到以下具體結果：

一、以 CS 為單獨乳化劑製備 CS-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液：

- (一) 乳化液乳滴隨著 LNA- β -Carotene 油量增加，均質壓力愈大，乳化循環次數愈多，其粒徑愈小，但隨壓力變大和循環次數增多而有下降趨緩現象(表示乳化液均質完全)。
- (二) 乳化液之電位較不受均質壓力及乳化循環次數之影響，但受油量影響，油量越多，乳化液滴表面電位越高，但在 3500:7 mg LNA- β -Carotene 油量，電位下降至+20 ~ +26 mV。
- (三) 乳化安定性方面，其在 25 °C 下儲存 28 天未分層，乳滴粒徑 650 ~ 730 nm 及 POV 達最大值約 5.70 ~ 7.66 meq/Kg 比純 LNA- β -Carotene POV 低，顯示 CS 具有減緩油脂氧化之效果。

二、以 CS 及 Le 為合併乳化劑製備 CS-Le-LNA- β -Carotene 奈米乳滴乳化液：

- (一) 乳化液之乳滴粒徑比 CS-LNA- β -Carotene 乳化液之乳滴平均小約 30 nm，較小粒徑可使乳化液不易分層。
- (二) 表面電位較 CS-LNA- β -Carotene 高(約+43.5 mV)，油量、均質壓力及循環次數皆無顯著影響。
- (三) 乳化液滴儲存安定性較 CS-LNA- β -Carotene 佳，儲存 28 天內皆無產生分層，其乳滴變小。POV 非常安定也低於 CS-LNA- β -Carotene 乳化液。

三、總結

由結論可得知，以 CS 和 Le 為合併乳化劑將 LNA- β -Carotene 高壓乳化製成奈米乳滴之乳化液，粒徑可達到奈米等級，電位高達+45 mV，並於 25 °C 下，保存 28 天不分層，另可抑制高油量的 CS-LNA- β -Carotene 乳化液過氧化價的數值，改善其不穩定之情形。在未來研究，可進一步探討其體內和體外之吸收效率實驗。

陸、參考文獻

- 刈米孝夫 原著，王鳳英 編譯 (2003)。界面活性劑的原理與應用。高立圖書有限公司出版。
- 戶倉清一 (1990)。キトサソの基礎と應用。防菌防黴。23(7): 421。
- 王綺芬 (1989)。蟹殼幾丁質產品理化性質測定及製備方法之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。
- 王鳳英編譯 (1993)。界面活性劑的原理與應用。高立圖書有限公司。
- 江晃榮 (1998)。生物高分子(幾丁質、膠原蛋白)產業現況與展望。財團法人生物技術開發中心，1-99。
- 何東保、石毅、梁紅波及詹東風 (2002)。殼聚糖—海藻酸鈉協同相互作用及其凝膠化的研究。武漢大學學報(理學版)，48: 193-196。
- 吳俊毅 (2003)。以超臨界二氧化碳萃取海豹油之研究。國立成功大學化學研究所碩士論文。臺南，臺灣。
- 吳適 (1979)。乳化劑在食品工業上的應用。食品工業，11: 28-32。
- 呂朋、李八方及夏蘭 (2001)。殼聚糖在醫藥保健中的應用。中國海洋藥物，20: 30-34。
- 李貫中 (2015)。以幾丁聚糖或幾丁聚糖和卵磷脂為乳化劑製備次亞麻油酸/維生素E奈米乳滴乳化液及其性質之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 李凱琳 (2016)。以幾丁聚糖或幾丁聚糖和卵磷脂為乳化劑製備南瓜籽油奈米乳滴乳化液及其性質之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 李勳宜 (1988)。草蝦幾丁聚糖之製備及其應用研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。臺北，臺灣。
- 李續娥、張文學及劉心潔 (1999)。湯劑煎煮法的研究進展。西北藥學雜誌，14: 34。
- 沈家弘 (2004)。不同去乙酰度幾丁聚糖乳化性質之比較及其應用於沙拉醬之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 阮進惠 (1984)。脫色豬血血球蛋白之加熱修飾及其在食品上之應用。東海學報，25: 1013-1027。
- 阮進惠、沈家弘及閻立平 (2008)。加熱及凍結-解凍處理對幾丁聚糖乳化液安定性之影響。台灣農業化學與食品科學，46: 111-117。
- 阮進惠及吳貞誼 (1996)。利用幾丁聚糖脫酸葡萄柚汁。食品科學，23: 509。
- 阮進惠及沈家弘 (2006)。不同去乙酰度幾丁聚糖乳化性質之比較及其應用與沙拉醬之研究。台灣農業化學與食品科學，44: 41-53。

- 周書平 (2013)。以幾丁聚醣或幾丁聚醣和卵磷脂為乳化劑製備次亞麻油酸/亞麻油酸奈米乳滴乳化液及其性質之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 柯建邦 (2006)。不同去乙醯度膠態幾丁聚醣乳化性質之比較及其應用於冰淇淋之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 孫勇、李華佳、辛志宏及胡秋輝 (2006)。納米食品的活性與安全性研究。食品科學，27: 936。
- 徐世昌 (2001)。生物性高分子幾丁質與幾丁聚醣之介紹與應用。化工資訊，2: 36-45。
- 徐春 (2006)。殼聚糖在白葡萄酒澄清中的應用研究。中國釀造，1: 21-23。
- 馬小軍、王一力、包德才、付穎麗、薛偉明、雄鷹、劉袖洞及于煒婷 (2002)。海藻酸鈉/殼聚糖微膠囊生物相容性的研究。自然科學進展，12: 845-847。
- 張湘文 (2007)。高壓均質技術在食品工業上的應用。食品工業，39(8): 16-24。
- 張雅敏 (2002)。黑豆種子幾丁質酶之純化與性質研究。靜宜大學食品營養學研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 張慧文 (2010)。以高壓均質製備幾丁聚醣奈米乳滴乳化液及其性質之研究。私立東海大學食品科學系研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 曹晶、孫淑愛及盧鳳琦 (2005)。殼聚糖生物降解性與組織相容性。中國公共衛生，21: 1411。
- 梁祥發 (2007)。奈米藥物傳輸技術在藥物發展上。化工技術，11: 124-138。
- 莊仲揚 (2002)。幾丁聚醣於生醫產業上的應用。化工資訊，4: 46-50。
- 陳心怡 (2005)。雞蛋繫帶酵素水解物之抗氧化機制及在O/W系統中抗氧化能力之表現。國立嘉義大學食品科學系研究所碩士論文。嘉義，臺灣。
- 陳炳輝 (2000)。類胡蘿蔔素的特性與應用。科學發展月刊，28(8): 599-604。
- 陳美惠、莊淑惠及吳志律 (1999)。幾丁聚醣的物化特性。食品工業月刊，31: 1-6。
- 陳健祺 (2000)。幾丁類物質在生醫材料上的應用。食品工業，32: 9-17。
- 陳輝煌 主編 (2014)。食品奈米科技—基礎與應用。新文京開發出版，第二版。
- 趙成萍及田野 (2006)。納米級維生素的研究。飼料工業，27: 62。
- 趙承琛 (1995)。界面科學基礎。復文書局，第十五版。
- 趙承琛 編著 (1991)。界面基礎科學（原名：界面化學）。復文書局出版。
- 劉高強、劉衛星、魏美才及孫虹 (2005)。甲蟲甲殼素/殼聚糖的研究及其開發前景。西北林學院學報，20: 143-146。
- 劉高強、魏美才及王曉玲 (2004)。松毛蟲資源開發及其資源化管理的初步設想。西北林學院學報，19: 119-120。
- 劉彩雲、周圍、華陽、甘伯中及李維強 (2005)。納米技術在食品工業中的應用。食品工業科技，26: 185。
- 劉曉非、胡運華、耿崑崙、姚康德及張萬起 (2005)。殼聚糖及其衍生物應用於肥胖治療的研究進展。功能高分子學報，18: 715-720。

- 劉瓊淑 (1994)。幾丁質，幾丁聚醣及其相關酵素之特性與應用。食品工業，26: 26-36。
- 潘育方及黃丹瑩 (2005)。殼聚糖去除藥水煎液中重金屬的初探。化工時刊，19: 27-28。
- 蔡雅兆 (2004)。膠態幾丁聚醣及幾丁聚醣對小白鼠體重、營養素排出及膽固醇和三酸甘油酯含量之比較。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。臺中，臺灣。
- 蔡義宏 (1979)。乳化原理。應用界面化學，2: 13-19。
- 賴淑琪 (1979)。水產廢棄物蝦、蟹外殼之高度利用。食品工業，11: 23-28。
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, 14: 3-15.
- Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., and Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience.*, 3(10): 521-530.
- Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int. J. Biol. Macromol.*, 14: 225-228.
- Aiba, S., Fujiwara, Y., Hideshima, T., Hwang, C., Kakizaki, M., Izume, M., Minoura, N., Rha, C. K., Shojij, T., Sinskey, A. J., and Tsutsumi A. (1986). Filmogenic properties of chitin/chitosan. In: *Chitin in Nature and Technology*. Plenum Press, New York.
- Allan, C. R. and Hadiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.*, 3: 285-287.
- Alonso, I. G., Peniche-Covas, C., and Nieto, J. M. (1983). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan by thermal analysis. *J. Thermal Analysis.*, 28: 189-193.
- Artursson, P., Lindmark, T., Davis, S. S., and Illum, L. (1994). Effect of chitosan on permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.*, 11: 1358-1361.
- Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E., and Zikakis, J. P. (1981). Chitin: New facets of research. *Science*, 212: 749-753.
- Beri, R. G., Walker, J., Reese, E. T., and Rollings, J. E. (1993). Characterization of chitosans via coupled size-exclusion chromatography and multiple-angle laser light-scattering technique. *Carbohydrate*, 238: 11-26.
- Boileau, T. W., Moore, A. C. and Erdman, J. W. Jr. (1999). Carotenoids and vitamin A, in *Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health* (ed. A. M. Papas), *CRC Press*, Florida, USA, 133-158.
- Bough, W. A. and Landes, D. R. (1977). Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. *J. DairySci.*, 59: 1874.

- Bough, W. A., Salter, W. L., Wu, A. C. M. and Perkins, B. E. (1978). Influence of manufacturing variables on the characteristics and effectiveness of chitosan products. II. Coagulation of activated sludge suspensions, *Biotechnol. Bioeng.*, 20: 1931.
- Brine, C. J. and Austin, P. R. (1981). Chitin variability with species and method of preparation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 69: 283-286.
- Bustos, R., Díaz, G., Romo, C., Romo, L., and Yáñez, K. (2003). Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae. *J. Food Eng.*, 56: 289-293.
- Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. N., and Wiles, J. L. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *J. Food Sci.*, 61: 953-961.
- Chau, C. F., Wu, S. H., and Yen, G. C. (2007). The development of regulations for food nanotechnology. *Trends Food Sci. Tech.*, 18: 269-280.
- Chen, H., Weiss, J., and Shahidi, F. (2006). Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technol.*, 60: 30.
- Chen, L., Remondetto, G. E., and Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 17: 272-283.
- Chuah, A. M., Kuroiwa, T., Kobayashi, I., and Nakajima, M. (2009). Effect of chitosan on the stability and properties of modified lecithin stabilized oil-in-water monodisperse emulsion prepared by microchannel emulsification. *Food Hydrocolloid.*, 23: 600-610.
- Chung, L. Y., Schmidt, R. J., Hamlyn, P. F., Sagar, B. F., Andrew, A. M., and Turner, T. D. (1994). Biocompatibility of potential wound management products: fungal mycelia as a source of chitin/chitosan and their effect on the proliferation of human F1000 fibroblasts in culture. *J. Biomed. Mater. Res.*, 28: 463-469.
- Curotto, E. and Aros, F. (1993). Quantitative determination on chitosan and the percentage of free amino groups. *Anal Biochem.*, 211: 240-241.
- Das, K. P. and Kinsella, J. E. (1990). Stability of food emulsions: physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers. *Adv. Food Nutr. Res.*, 34: 82-201.
- Davis, D. H. and Hayes, E. R. (1988). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. *Methods Enzymol.*, 161: 442-446.
- De Caterina, R. (2011). n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med.*, 364(25): 2439-2450.
- Del Blanco, L. F., Rodriguez, M. S. Schulz, P. C., and Agullo, E. (1999). Influence of the deacetylation degree on chitosan emulsification properties. *Colloid Polym. Sci.*, 277: 1087-1092.

- Desai, M. P., Labhassetwar, V., Amidon, G. L., and Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles effect of particle size. *Pharm.Res.*, 13: 1838-1845.
- Dodane, V., Khan, M. A., and Merwin, J. R. (1999). Effect of chitosan on epithelial permeability and structure. *Int. J. Pharm.*, 182: 21-32.
- Domard, A. (1987). Determination of N-acetyl content in chitosan samples by C. D.measurements. *Int. J. Biol. Macromol.*, 9: 333-336.
- Dutkiewicz, J., Tuora, M., Judkiewicz, L., and Ciszewski, R. (1992). New forms of chitosan polyelectrolyte complexes. In: advances in chitin and chitosan. *Elsevier Applied Science*, London and New York. 496.
- El-Adawy, T. A. (2000). Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chem.*, 70: 83-91.
- Filar, L. F. and Wirick, M. G. (1978). Bulk and solution properties of chitosan. In :Proceedings of the 1st Int. *Conf. on chitin/chitosan*. 169-181
- Floury, J., Desrumaux, A., and Lardières, J. (2000). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 1: 127-134.
- Friberg, S. E. and Larsson, K. (1997). *Food emulsions*. New York.
- Gamzazad, A. I., Sklyar, A. M., Pavlova, S. S. A., and Rogozhin, S. V. (1981). On the viscosity properties of chitosan solutions. *Polym Sci.* 23: 665-666.
- Guan, R. F., Qian, B., Ye, X. Q., and Hao, Y. B. (2006). Recent study of nanotechnology in food science. *Food Sci.*, 27: 270.
- Gudipati, V., Sandra, S., McClements, D. J. and Decker, E. A. (2010). Oxidative stability and in vitro digestibility of fish oil-in-water emulsions containing multilayered membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 58 : 8093-8099.
- Hackman, R. H. and Goldberg, M. (1965). Studies on chitin.VI. The nature of α and β -chitins. *Aust. J. Biol. Sci.*, 18: 935-946.
- Hatanaka, J., Kimura, Y., Lai, F. Z., Onoue, S., and Yamada, S. (2007). Physicochemical and pharmacokinetic characterization of water-soluble Coenzyme Q₁₀ formulations. *Int. J. Phar.*, 363: 112-117.
- He, P., Davis, S. S. and Illum, L. (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int. J. Pharm.*, 166 : 75-88.
- He, Z., Zeng, W., Zhu, X., Zhao, H., Lu, Y., and Lu, Z. (2017). Influence of surfactin on physical and oxidative stability of microemulsions with docosahexaenoic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 151: 232-239.
- Heeres, A. S., Picone, C. S., van der Wielen, L. A., Cunha, R. L., and Cuellar, M. C. (2014). Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. *Trends Biotechnol.*, 32(4): 221-229.

- Higuera-Ciapara, I., Argüelles-Monal, W., Felix-Valenzuela, L., and Goycoolea, F. M. (2004). Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydr. Polym.*, 56: 41-45.
- Hirano, S. (1989). Production and application of chitin and chitosan in Japan. In: Chitin and Chitosan. *Elsevier Applied Science*, 37-43.
- Hirano, S., Hakura, C., Seino, H., Akiyama, Y., Nonaka, I., Kanbara, N., and Kawakami, T. (1990). Chitosan as an ingredient of domestic animal feed. *J. agric. Food Chem.*, 38: 1214-1217.
- Holan, Z. and Voyruba, J. (1980). New method of chitin determination based on deacetylation and gas-liquid chromatographic assay of liberated acetic acid. *J. Chromatography.*, 190: 67-76.
- Huang, M., Khor, E. and Lim, L. Y. (2004). Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm. Res.*, 21 : 344-353.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., Bhandari, B. and He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Res. Int.*, 41(2) : 172-183.
- Jafari, S. M., He, Y. and Bhandari, B. (2007). Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J. Food Eng.*, 82 : 478-488.
- Kaasgaard, T. and Keller, D. (2010). Chitosan coating improves retention and redispersibility of freeze-dried flavor oil emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 2446-2454.
- Julio, L. M., Copado C. N., Diehl B. W. K., Ixtaina V. Y., and Tomás M. C. (2018). Chia bilayer emulsions with modified sunflower lecithins and chitosan as delivery systems of omega-3 fatty acids. *LWT.*, 89: 581-590.
- Jung, B. O., Chung, S. J., and Lee, S. B. (2006). Preparation and characterization of eugenol-grafted chitosan hydrogels and their antioxidant activities. *Journal of Applied Polymer Science.*, 99: 3500-3506.
- Kaasgaard, T. and Keller, D. (2010). Chitosan coating improves retention and redispersibility of freeze-dried flavor oil emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 2446-2454.
- Kanauchi, O., Deuchi, K., Imasato, Y., Shizukuishi, M. and Kobayashi, E. (1995). Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 59: 786-790.
- Kheadr, E. E., J.C. Vuilleumard, S. A., and Deeb, E. I. (2000). Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *Food Sci.*, 35: 483-495.
- Kienzle-Sterzer, C. and Rha, C. K. (1984). Solution properties of chitosan : Chitin conformation. In: Chitin, Chitosan and Related Enzymes. *Academic Press*, London.
- Kittur, F. S., Kumar, K. R. and Tharanathan, R. N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *Z Lebensm. Unters Forsch. A.*, 206: 44-47.

- Kleing, A. R., and Middelberg, A. P. J. (1996). The correlation of cell disruption with homogenizer valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. *Chem. Eng. Sci.*, 51: 5103-5110.
- Klinkesorn, U. and McClements, J. D. (2009). Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. *Food Chem.*, 114: 1308-1315.
- Klinkesorn, U., Chinachoti, P., Decker, A. E., and McClements, J. D. (2005). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloid.*, 19: 1044-1053.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, A. E., and McClements, J. D. (2006). Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Res. Int.*, 39: 449-457.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, J. D., and Decker, A. E. (2005). Increasing the oxidative stability of liquid and dried tuna oil-water-emulsions with layer-by-layer deposition technology. *J. agric. Food chem.*, 53: 4561-4566.
- Knorr, D. (1982). Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, 47: 593-595.
- Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food-a challenge for food research and development. *Food Technol.*, 38: 85-97.
- Knorr, D. (1986). Nutritional quality, food processing, and biotechnology aspects of chitin and chitosan: A review. *Proc. Biochem.*, 6: 90-92.
- Knorr, D., Wampler, J. P., and Teutonico, R. A. (1985). Formation of prazine by chitin pyrolysis. *J. Food Technol.*, 50: 1762-1763.
- Kotze, A. F., Luessen, H. L., de Leeuw, B. J., de Boer, A. G., Verhoef, J. C., and Junginger, H. E. (1998). Comparison of the effect of different chitosan salts and N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). *J. Control Rel.*, 51: 35-46.
- Kurita, K., Shimada, K., Nishiyama, Y., Shimojoh, M., and Nishimura, S. I. (1998). Nonnatural branched polysaccharides: synthesis and properties of chitin and chitosan having alpha-mannoside branches. *Macromolecules*, 31: 4764-4769.
- Labuza, T. P. and Breene, W. M. (1989). Applications of "active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. *J. Food Proc. Preserv.*, 13: 1-69.

- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Guerzoni, M. E., Suzzi, G., Belletti, N., and Gardini, F. (2007). Effects of milk high pressure homogenization on biogenic amine accumulation during ripening of ovine and bovine Italian cheeses. *Food Chem.*, 104: 693-701.
- Launay, B., Doublier, L. L. and Cuverilier, G. (1986). Flow properties of aqueous solution and dispersions of polysaccharides. In: Function properties of food macromolecules. Mitchell, J. R., and Ledward, D. A., *Elsevier applied Sci.*, Publishers. 12-19.
- Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H., and Huang, Y. S. (2004). Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res.*, 43(1): 36-54.
- Li, H. J., Xin, Z. H., and Hu, Q. H. (2006). Advance in food nanotechnology and nanofood. *Food Sci.*, 27: 271.
- Lim, J. Y., Kim, Y. S., Kim, K. M., Min, S. J., and Kim Y. (2014). β -carotene inhibits neuroblastomatumorigenesis by regulating cell differentiation and cancer cell stemness. *BiochemBiophys Res Commun.*, 450(4): 1475-1480.
- Lin, Y., Tang, J., Chen, X., and Xin, H. (2005). A templating route to nanoporous chitosan materials. *Carbohydr. Res.*, 340: 2816-2820.
- Liu, Y., Tang, J., Chen, X., and Xin, J. H. (2005). Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbon*, 43: 3178-3180.
- Lu, L., Ma, M., Zhang, Y., Tang, M., and Gu, N. (2004). Development of study on biosafety of nanomaterials. *J. South Univ.*, 34: 711.
- Lueßen, H. L., Lehr, C. M., Rentel, C. O., Noach, A. B. J., de Boer, A. G., Verhoef, J. C., and Junginger, H. E. (1994). Bioadhesive polymers for the peroral delivery of peptide drugs. *J. Control Rel.*, 29: 329-338.
- Maclean, C. H., Newberry, S. J., Mojica, W. A., Issa, A., Khanna, P., Lim, Y. W., Morton, S. C., Suttorp, M., Tu, W., Hilton, L. G., Garland, R. H., Traina, S. B., and Shekelle, P.G. (2005). Effects of omega-3 fatty acids on cancer, *Evid. Rep. Technol. Assess.*, 113: 1-4.
- Macrae, R., Robinson, R. K., and Sadler, M. J. (1993). Encyclopaedia of food science food technology and nutrition. *Academic press*, New York.
- Magdassi, S., Bach, U., and Mumeuoglu, K. Y. (1997). Formation of positively charged microcapsules based on chitosan-lecithin interactions. *J. Microencapsul.*, 14: 189-195.
- Maghami, G. and Roberts, A. F. (1988). Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Die Makromolekul. Chem.*, 189: 195-200.
- Marszalek, J. R. and Lodish, H. F. (2005). Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 633-657.

- McClements, J. D. (2010). Design of nano-laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components. *J. Food Sci.*, 75: 30-42.
- McManus, A., Merga, M., and Newton, W. (2011). Omega-3 fatty acids. What consumers need to know. *Appetite.*, 57(1): 80-83.
- Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., and Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.*, 150: 552-558.
- Methacanon, P., Prasitsilp, M., Pothsree, T., and Pattaraarchachai, J. (2003). Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Polym.*, 52: 119-123.
- Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., and Yoshikawa, S. (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *J. Appl. Polym. Sci.*, 28: 1909-1917.
- Minke, R. and Blackwell, J. (1978). The structure of α -chitin. *J. Mol. Biol.*, 120: 67-81.
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C., and Maitra, A. N. (2001). Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control. Release.*, 74: 317-323.
- Moore, S. A., Yoder, E., Murphy, S., Dutton, G. R., and Spector, A. A. (1991). Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 n-3) and arachidonic acid (20:4 n-6). *J. Neurochem.*, 56: 518-524.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. Oxford: Pergamon, 220-228.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977). In: "Chitin". Muzzarelli, R. A. A. Eds, *Pergamon Press. Oxford.*, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt.
- Muzzarelli, R. A. A. (1997). Chitosan as dietary food additives. In: Applications of Chitin and Chitosan. Goosen, M. F. A. (Ed), *Technomic. Lancaster, PA, UK.* 115-127.
- Muzzarelli, R. A. A. and Roberto, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.*, 5: 461-472.
- Nanjo, F., Katsumi, R., and Sakai, K. (1991). Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Anal. Biochem.*, 193: 164-167.
- Naoji, K., Nobuhide, T., Takayuki, S., and Kaori, T. (2000). A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.*, 324: 268-274 .
- Napper, D. H. (1983). Polymeric stabilization of colloidal dispersions. *Academic Press.* New York.
- Niola, F., Basora, N., Chornet, E., and Vidal, P. F. (1993). A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin-chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. *Carbohydr. Res.*, 238: 1-9.

- Nishimura, S. I., Kai, H., Shinada, K., Yoshida, T., Tokura, S., Kurita, K., Nakashima, H., Yamamoto, N., and Uryu, T. (1998). Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydr. Res.*, 306: 427-733.
- Noishiki, N., Kuga, S., Wada, M., Hori, K., and Nishiyama, Y. (2004). Guest selectivity in complexation of β -chitin. *Macromolecules*, 37: 6839-6842.
- Ogawa, S., Decker, E. A., and McClements, J. D. (2003). Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2806-2812.
- Ogawa, S., Decker, E. A., and McClements, J. D. (2004). Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 3595-3600.
- Panya, A., Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., Weiss, J., McClements, D. J., and Decker, E. A. (2010). Effects of chitosan and rosmarinate esters on the physical and oxidative stability of liposomes. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 5679-5684.
- Paquin, P. (1999). Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Int. Dairy J.*, 9: 329-335.
- Percot, A., Viton, C., and Domard, A. (2003). Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromol.*, 4: 12-18.
- Phipps, L. W. (1971). Mechanism of oil droplet fragmentation in high homogenizers. *Nature*, 233: 617-619.
- Prashanth, H. K. V., Kitture, F. S., and Tharanathan, R. N. (2002). Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydr. Polym.*, 50: 27-33.
- Qin, C. Q., Du, Y. M., Xiao, L., Li, Z., and Gao, X. H. (2001). Enzymatic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, 31: 111-117.
- Qin, C. Q., Zhou, B., Zeng, L. T. Z., Zhang, H., Liu, Y., Du, Y. M., and Xiao, L. (2003). The physicochemical properties and antitumor activity of cellulase-treated chitosan. *Food Chem.*, 84: 107-115.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31: 603-632.
- Rinaudo, M. and Domard, A. (1988). Solution properties of chitosan. *Proceedings from the 4th international Conference on chitin and chitosan held in trondheim.*, 71-86.
- Roberts, G. A. F. and Domszy, J. A. (1982). Determination of viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 4: 373-377.
- Roberts, L. (1990). Omega-3 fatty acids in health and disease. Chapter 16: 309-323.

- Robinson, M. B. and Dowd, L. A. (1996). Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv Pharmacol.*, 37: 69-115.
- Rodriguez, M. S., Albertengo, L. A. and Agullo, E. (2002). Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 48: 271-276.
- Rohner, F., Ernst, F. O., Arnold, M., Hilbe, M., Biebinger, R., Ehrensperger, F., Pratsinis, k. E., Langhans, W., Hurrell, R. F., and Zimmermann, M. B. (2007). Synthesis, characterization, and bioavailability in rats of ferric phosphate nanoparticles. *J. Nutr.*, 137: 614-619.
- Roller, S. and Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 67-77.
- Ruiz-Herrera, J. (1978). The distribution and quantitative importance of chitin in fungi. In: Chitin and chitosan Proceedings of the First International Conference on Chitin and Chitosan Muzzarelli.
- Sabnis, S. and Block, L. H. (2000). Chitosan as an enabling excipient for drug delivery systems I. Molecular modifications. *J. Membrane Sci.*, 142: 13-26.
- Saito, H., Tabeta, R., and Ogawa, K. (1987). High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts. *American Chemical Society.*, 20(10): 2424-2430.
- Sakdapipanich, J. T. and Rojruthai, P. (2012). Molecular structure of natural rubber and its characteristics based on recent evidence, biotechnology - molecular studies and novel applications for improved quality of human life. *Prof. Reda Sammour (Ed.)*, 213-238.
- Salvia-Trujillo L., Qian C., Martín-Belloso O., and McClements D. J. (2013). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chem.*, 141 (2): 1472-1480.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K., and Iwakura, Y. (1978). Studies on chitin. 7. IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer.*, 19(4): 458-459.
- Schipper, N. G. M., Olsson, S., Hoogstraate, J. A., de Boer, A. G., Varum, K. M., and Artursson, P. (1997). Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 2: Mechanism of absorption enhancement. *Pharm. Res.*, 14: 923-929.
- Schipper, N. G. M., Varum, K. M., and Artursson, P. (1996). Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human epithelial (Caco-2) cells. *Pharm. Re.*, 13: 1686-1692.

- Schipper, N. G., Varum, K. M., Stenberg, P., Ocklind, G., Lennernäs, H., and Artursson, P. (1999). Chitosans as absorption enhancers of poorly absorbable drugs. 3: Influence of mucus on absorption enhancement. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 8: 335-343.
- Schlemmer, C. K., Coetzer, H., Claassen, N. and Kruger, M. C. (1999). Estrogen and essential fatty acid supplementation corrects bone loss due to ovariectomy in the female Sprague Dawley rat. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 61: 381-390.
- Schulz, M. B. and Daniels, R. (2000). Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as emulsifier for submicron emulsions influence of molecular weight and substitution type on the droplet size after high-pressure homogenization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 49: 231-236.
- Schulz, P. C., Rodriguez, M. S., and Del Blanco, L. F. (1998). Emulsification properties of chitosan. *Colloid Polym Sci.*, 276: 1159-1165.
- Shahabeddin, L., Berthod, F., Damour, O., and Collombel, C. (1990). Characterization of skin reconstructed on a chitosan-cross-linked collagen-glycosaminoglycan matrix. *Skin Pharmacol.*, 3: 107-114.
- Shahidi, F., Vidana-Arachchi, J. K., and Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends Food Sci. Technol.*, 10: 37-51
- Shao, P., Qiu, Q., Xiao, J., Zhu, Y., and Sun, P. (2017). Chemical Stability and in vitro release properties of β -carotene in emulsions stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 102: 225-231.
- Shaw, L. A., McClements, D. J., and Decker, E. A. (2007). Spray-dried multilayered emulsions as a delivery method for ω -3 fatty acids into food systems. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 3112-3119.
- Shen, Z., Augustin, M. A., Sanguansri, L., and Cheng, L. J. (2010). Oxidative stability of microencapsulated fish oil powders stabilized by blends of chitosan, modified starch, and glucose. *J. Agric. Food Chem.*, 58: 4487-4493.
- Shimahara, K., Ohkouchi, K., and Ikeda, M. (1982). A new isolation method of crustacean chitin using a proteolytic bacterium *Pseudomonas maltophilia*. In: Chitin and Chitosan, Proceedings of second international Conference on Chitin and Chitosan. *The Japanese Society of Chitin and Chitosan*, 10-14.
- Sorensen, Sørensen, Ann-Dorit, M., Anne-Mette, H., Becker, E. M., Skibsted, Leif, H., Bergenståhl, B., Nilsson, L., and Jacobsen, C. (2008). Interactions between iron, phenolic compounds, emulsifiers, and pH in omega-3-enriched oil-in-Water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 1740-1750.
- Spector, A. A. (1999). Essentiality of fatty acids. *Lipids*, 34: 1-3.

- Stanley, W. L., Watters, G. G., Chan, B., and Mercer, J. M. (1975). Lactase and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde. *Biotechnol. Bioeng.*, 17: 315-326.
- Suga, K., Yuan, Y., Ogasawara, N., Okada, M., and Matsunaga, N. (2003). Localization of breast sentinel lymph nodes by MR lymphography with a conventional gadolinium contrast agent. Preliminary observations in dogs and humans. *Acta Radiol.*, 44(1): 35-42.
- Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S., and Suzuki, M. (1986) Effect of N-acetyl-chitooligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, 30: 777.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N. A. A. Q. (1997). Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem.*, 60: 605-610.
- Tan, S. C., Khor, E., Tan, T. K., and Wong, S. M. (1998). The degree of deacetylation of chitosan : advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta.*, 45: 713-719.
- Tesch, S., Gerhends, Ch., and Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsion by OSA starches. *J. Food Eng.*, 54: 167-174.
- Toei, K. and Kohara, T. (1976). A conductometric method for colloid titrations. *Anal. Chim. Acta*, 83: 59-65.
- Tsai, G. J. and Su, W. H. (1999). Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 62: 239-243.
- Uragami, T., Matsuda, T., Okuno, H., and Miyata, T. (1994). Structure of chemically ModiRed chitosan membranes and their characteristics of permeation and separation of aqueous ethanol solutions. *J. Membrane Sci.*, 88: 243-251.
- Vahouny, G. V., Satchithanandam, S., Cassidy, M. M., Lightfoot, F. B., and Furda, I. (1983). Comparative effect of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 38: 278-284.
- Van Nieuwenhuyzen, W. and Szuhaj, B. F. (1998). Effects of lecithin and proteins on the stability of emulsions. *Fett-Lipid.*, 100: 282-291.
- Walstra, P. (1983). *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Dekker, New York.
- Wei, Z. and Gao, Y. (2016). Physicochemical properties of β -carotene bilayer emulsions coated by milk proteins and chitosan-EGCG conjugates. *Food Hydrocolloids.*, 52: 590-599.
- Wei, Z., Wang, C., Zou, S., Liu, H., and Tong, Z. (2012). Chitosan nanoparticles as particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules. *Polymer*, 53: 1229-1235.
- Wu, A. C. M. and Bough, W. A. (1976). Determination of molecular weight distribution of chitosan by HPLC. *J. Chromatogr.*, 128: 87-92.

- Yorek, M. A., Bohnker, R. R., Dudley, D. T., and Spector, A. A. (1984). Comparative utilization of n-3 polyunsaturated fatty acids by cultured human retinoblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 795: 277-285.
- Zhang, H., Hamilton, J. H., Salem, N. Jr., and Kim, H. Y. (1998). n-3 Fatty acid deficiency in the rat pineal gland: effects on phospholipid molecular species composition and endogeneous levels of melatonin and lipoxygenase products. *J. Lipid Res.*, 39: 1397-1403.
- Zhu, J., Wang, Y. B., and Zhang, S. P. (2006). Preparation and development of nanofood. *Food Sci. Technol.*, 11: 25.

