

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

以幾丁聚醣和卵磷脂高壓均質製備次亞麻油酸-維生素E

單/雙層奈米乳滴乳化液之研究

Preparation and Characterization of Linolenic acid-Vitamin E
Nano droplet Emulsion Using Chitosan and Lecithin
as Emulsifiers by High Pressure Homogenization

李貫中

Kuan-Chung Li

指導教授：阮進惠 博士

Advisor: Jin-Hewi Rwan, Ph. D.

中華民國一百零四年一月

Jan., 2015

目錄

	頁數
中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
壹、前言.....	5
貳、文獻整理.....	9
一、幾丁質與幾丁聚醣.....	9
(一) 幾丁質(chitin).....	9
(二) 幾丁聚醣(chitosan).....	12
(三) 幾丁質與幾丁聚醣之結構.....	12
(四) 幾丁質與幾丁聚醣的晶型架構.....	15
(五) 幾丁質與幾丁聚醣溶液特性.....	19
(六) 幾丁質與幾丁聚醣的製備.....	21
(七) 幾丁聚醣之物性分析.....	26
(八) 幾丁聚醣安全性與法規.....	27
(九) 幾丁質與幾丁聚醣之應用.....	28
二、乳化.....	36
(一) 乳化之原理介紹.....	36
(二) 乳化劑.....	37
(三) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)值.....	39
(四) 乳化的方法與乳化液類型.....	42
(五) 影響乳化安定性的因素.....	45
(六) 乳化不安定型態.....	45
三、幾丁聚醣之乳化性質.....	48
(一) 幾丁聚醣乳化相關研究.....	51
(二) 幾丁聚醣乳化安定作用.....	50
(三) 靜電層沉積法之乳化.....	52
四、奈米科技發展.....	55
(一) 奈米科技簡介.....	55
(二) 奈米在食品之應用.....	57

(三) 奈米食品之安全研究與管理	60
(四) 奈米乳滴乳化液乳化原理及相關研究	62
五、次亞麻酸油(Linolenic acid, LNA)	66
(一) 次亞麻油酸簡介	68
(二) 次亞麻油酸之生理作用	70
(三) 次亞麻油酸氧化	72
六、維生素 E (Vitamin E, Vit. E)	74
(一) Vitamin E 簡介	74
(二) Vitamin E 結構	74
(三) Vitamin E 之體內吸收	76
(四) Vitamin E 的抗氧化功能	76
(五) Vitamin E 的抗氧化代謝與肝中代謝物	77
參、材料與方法	80
一、實驗材料	80
(一) 原料	80
(二) 藥品	80
二、實驗儀器	81
三、實驗架構	82
(一) 以幾丁聚醣(chitosan, CS)為乳化劑製備幾丁聚醣-次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)-維生素E(vitamin E, Vit. E)奈米乳滴乳化液之試驗	82
(二) 以幾丁聚醣(chitosan, CS)及卵磷脂(lecithin, Le)共同乳化劑進行乳化製備幾丁聚醣-次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)-維生素 E(vitamin E, Vit. E)奈米乳滴乳化液試驗	83
四、材料準備	84
(一) 幾丁聚醣之製備	84
五、實驗方法	84
(一) 以幾丁聚醣(chitosan, CS)為乳化劑製備次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)-維生素 E(vitamin e, Vit. E)奈米乳滴乳化液之試驗	84
(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)-維生素 E(Vit. E)奈米乳滴乳化液之試驗	86
六、分析方法	87

(一) 幾丁聚醣去乙醯度之測定	87
(二) 乳化液乳滴大小(droplet size)及表面電位(zeta potential)之測定	88
(三) 乳化液過氧化價(Peroxide value, POV)之測定	88
(四) 穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM)之照相觀察...	89
(五) 統計分析	89
肆、結果與討論.....	90
一、幾丁聚醣之製備	90
二、以幾丁聚醣(CS)為乳化劑製備次亞麻油酸(LNA)-維生素E(Vit. E)奈米乳滴乳 化液之特性.....	91
(一) 均質壓力(homogenizing pressure)、LNA-Vit. E 濃度及均質循環次數 (homogenizing cycle number)對(CS-LNA-Vit. E) 乳化液中乳滴大小(droplet size)及表面電位(zeta potential)之影響	91
(二) CS-LNA-Vit. E 奈米乳滴乳化液之安定性	97
三、以幾丁聚醣(CS)及卵磷脂(Le)為共同乳化劑 製備次亞麻油酸-維生素 E(LNA- Vit. E)奈米乳滴乳化液(CS- LNA-Vit. E nano droplet emulsion)	105
(一) LNA-Vit. E 油量對 CS-Le-LNA-Vit. E 乳化液乳滴大小(droplet size)、表面電 位(zeta potential)之影響	106
(二) CS-Le-LNA-Vit. E 奈米乳滴乳化液之安定性.....	111
四、穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察 CS-LNA-Vit. E 及 CS-Le-LNA-Vit. E 奈米乳 化液外觀型態.....	119
伍、結論.....	121
一、以 CS 為單獨乳化劑製備 CS-LNA-Vit. E 奈米乳滴乳化液	121
二、以 CS 及 Le 為合併乳化劑製備 CS-Le-LNA-Vit. E 奈米乳滴乳化液	121
三、總結	122
陸、參考文獻.....	123
柒、附錄.....	137

圖

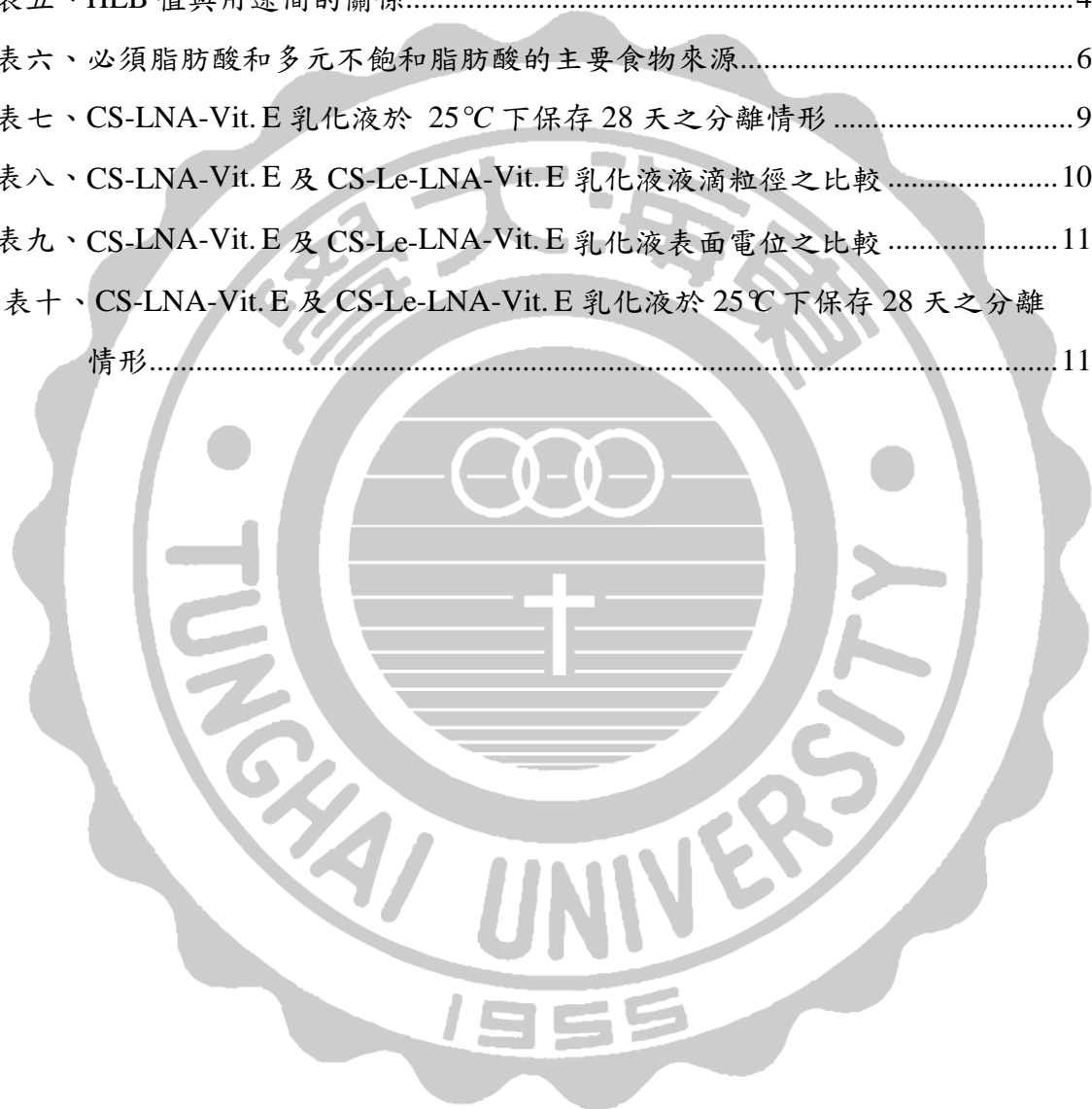
	頁數
圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之架構.....	14
圖二、 α 型幾丁質之立體架構	17
圖三、 β 型幾丁質之立體架構	18
圖四、幾丁聚醣溶液於酸性或鹼性環境下之分子電荷、分散性及分子排列情形...20	
圖五、幾丁質與幾丁聚醣加工之簡單流程圖.....	25
圖六、以穿透電子顯微鏡觀察幾丁聚醣對腸道上皮細胞之影響，(a) 為Caco-2 細胞正常型態，(b) 為經由0.1%幾丁聚醣處理30分鐘後之細胞和(c) 為將幾丁聚醣移除後，繼續培養24小時後之細胞.....	35
圖七、乳化劑之形態及其種類.....	38
圖八、兩相乳化液 (a) 水中油滴型 (O/W) 或是 (b) 油中水滴型 (W/O)。多重相乳化液(c) 以 W/O/W 型做說明.....	44
圖九、乳液的幾種不穩定現象示意圖.....	47
圖十、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.....	54
圖十一、具有雙層界面膜(lecithin-chitosan)之乳化液滴製備圖	54
圖十二、奈米遞送系統.....	56
圖十三、奈米顆粒於腸道吸收之優勢.....	56
圖十四、均質機 (a)和均質閥(b)之構造	64
圖十五、Omega-3 不飽和脂肪酸之結構.....	69
圖十六、高度多元不飽和脂肪酸之合成路徑.....	71
圖十七、不飽和脂肪酸的氧化機制.....	73
圖十八、Vitamin E 之八種異構體.....	75
圖十九、Vitamin E 與自由基反應時之代謝途徑及產物結構.....	78
圖二十、乳化壓力、LNA-Vit.E 油量及乳化循環次對乳化液滴大小之影響.....	94
圖二十一、乳化壓力、LNA-Vit.E 油量及乳化循環次對乳化液滴表面電位之影響.....	96
圖二十二、CS-LNA-Vit.E 乳化液於 25°C 下保存 28 天之乳滴粒徑變化	101

圖二十三、CS-LNA-Vit. E 乳化液及 LNA-Vit. E 之 POV 變化情形.....	104
圖二十四、CS-Le-LNA-Vit. E 乳化液於 25℃ 下保存 28 天之乳滴粒徑變化	115
圖二十五、不同油量 LNA-Vit. E 的 CS-Le-LNA-Vit. E 及 CS-LNA-Vit. E 乳化液之 POV 變化情形.....	118
圖二十六、CS-LNA-Vit. E (a)、CS-Le-LNA-Vit. E (b)儲存 28 天之 CS-LNA-Vit. E (c)乳化液之穿透式電子顯微鏡觀察	120



表

表一、甲殼動物、節足動物、軟體動物、及真菌類之幾丁質含量.....	11
表二、幾丁質三種晶型架構與特性.....	16
表三、不同去乙酰程度幾丁聚醣之製備條件.....	24
表四、幾丁質及幾丁聚醣常見之應用領域.....	30
表五、HLB 值與用途間的關係.....	41
表六、必須脂肪酸和多元不飽和脂肪酸的主要食物來源.....	67
表七、CS-LNA-Vit.E 乳化液於 25°C 下保存 28 天之分離情形	99
表八、CS-LNA-Vit.E 及 CS-Le-LNA-Vit.E 乳化液液滴粒徑之比較	108
表九、CS-LNA-Vit.E 及 CS-Le-LNA-Vit.E 乳化液表面電位之比較	110
表十、CS-LNA-Vit.E 及 CS-Le-LNA-Vit.E 乳化液於 25°C 下保存 28 天之分離情形.....	112



中文摘要

將幾丁聚醣(chitosan, CS, $\geq 85\%$ 去乙醯度)溶於0.1 M醋酸至0.5%濃度並調至pH 6.0。將次亞麻油酸(linolenic acid, LNA, ω -3)及維生素E (vitamin E, Vit. E) 依比例200:1(w/w)混合後溶於正己烷(hexane) 至不同濃度(1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5, w/w, mg)，並個別加入100 mL CS溶液LNA-Vit. E溶液，先以旋轉式均質機 (Polytron homogenizer) 進行粗乳化 (轉速13500 rpm, 2min，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至10次) 下乳化製成CS-LNA-Vit. E奈米乳滴乳化液，測定其液滴大小(droplet size)、表面電位(zeta potential)，然後選出能製備較小乳滴及高表面電位之乳化液之條件(即LNA/ Vit. E濃度、乳化壓力及乳化循環次數)，進行製備其奈米乳滴乳化液後，於25°C下儲存28天，並測定其安定性，包括乳滴大小、油水分離、表面電位及過氧化價(peroxide value, POV)變化。另外，將1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5, w/w mg LNA-Vit.E分別與0.25、0.375、0.5、0.562、0.625 g卵磷脂(lecithin, Le)混和，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-Vit. E奈米乳滴乳化液，並測定其乳滴大小、表面電位及儲存安定性。最後本實驗亦以穿透式電子顯微鏡(TEM)照相觀察比較 CS-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E乳化液之乳滴。

結果，在CS-LNA-Vit.E奈米乳滴乳化液方面:對1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25 (w/w) LNA-Vit. E而言，均質壓力愈大及乳化循環次數愈多，其乳滴愈小，但2500:12.5 mg LNA-Vit. E，則在高壓力下於一定乳化循環之後，會有粒徑不減反增之情形。表面電位方面，LNA-Vit. E量增加使表面電位上升，但均質壓力及乳化循環次數無顯著影響，約+33~36 mV間。

將1000:5-2500:12.5 (w/w)LNA-Vit.E，各別加入CS溶液後，分別於適合乳化壓力及循環次數下製出具有較小奈米乳滴和較高表面電位之五種乳化液，並測定其在25°C下儲存28天之安定性。其乳化液簡稱為：(1000:5 (w/w) LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes : A組乳化液)、(1500:7.5

(w/w)LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes : B 組 乳 化 液)、
(2000:10(w/w)LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes : C 組 乳 化 液)、
(2250:11.25(w/w) LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes : D 組 乳 化 液)和
(2500:12.5(w/w) LNA-Vit. E, 1500 bar, 9 passes : E 組 乳 化 液)。在油水分離方面，A、B和C組乳化液存放28天無分離現象；D組乳化液存放至20天呈現分離；E組乳化液於第12天存放則出現分離。在乳滴大小變化，A、B、C乳化液於存放期間乳滴漸漸變小(粒徑分別為，A:880 nm→667 nm ; B:941 nm→723 nm ; C:853 nm→754 nm)，D和E組乳化液乳滴均呈現變大現象。POV方面，將上述5種CS-LNA-Vit. E乳化液於50 °C保存0~9天，測POV之變化情形，發現，其POV均變大，最高在第五天，平均約在710-725 meq/Kg，但比未以CS乳化的純LNA- Vit. E脂肪酸較低(約820-860 meq /Kg)。

若將 1000:5-2500:12.5, (w/w) LNA-Vit. E 分別以 Le 及 CS 為合併乳化劑乳化為 CS-Le-LNA-Vit. E 奈米乳滴乳化液，測定其乳滴粒徑、表面電位、安定性及 POV。結果發現，其乳滴粒徑約 790-992 nm 及表面電位約+46 mV；乳化安定性方面，儲存 28 天未分離，乳滴粒徑漸漸變小，POV 上升緩慢且非常安定(200 meq/Kg)。由此可見，於相同條件下乳化的 CS-Le-LNA-Vit. E 及 CS-LNA-Vit. E 乳化液：前者乳滴粒徑粒徑雖略微增大，但表面電位較高(約+46mV)，且儲存期間安定性較佳。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。此外，透過 TEM 圖顯示單層膜及雙層膜之乳滴均為完整圓形或橢圓形。

關鍵字：幾丁聚醣、卵磷脂、奈米液滴、乳化安定性、過氧化價、穿透式電子顯微鏡

Abstract

Chitosan (CS, $\geq 85\%$ deacetylation) was dissolved in 0.1 M acetic acid at 0.5% concentration and adjusted to pH 6.0. Linolenic acid (LNA, ω -3) and vitamin E (Vit. E) were mixed at the ratio 1000:5, 1500:7.5, 2000:10, 2250:11.25 and 2500:12.5 (w/w,mg) in hexane before adding into 100 mL chitosan solution. These mixtures were pre-emulsified by a Polytron homogenizer (13,500 rpm, 2 min) before 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/Vit. E concentration, homogenizing pressure and recycling pass) showed a small droplet and high zeta potential emulsions were applied to prepare the CS-LNA-Vit. E emulsions that were then determined on the emulsion stability during (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 of chitosan and lecithin (Le) into CS-Le- LNA-Vit. E nano droplet emulsions which were then determined on the droplet size, Zeta potential and emulsion stability. Nano droplets of CS-LNA-Vit. E and CS-Le-LNA-Vit. E emulsions were also observed by transmission electron microscopy (TEM).

As result, on the CS-LNA-Vit. E emulsion : a higher homogenizing pressure and more number of recycling pass gave smaller droplet size under LNA-Vit. E conditions of 1000:5-2250:11.25 (w/w,mg) , but showed a larger droplet size at a conditions of 2500:12.5 (w/w,mg). Zeta potential of the emulsions increased as the LNA-Vit. E concentration increased but not affected by both the homogenizing pressure and more recycling pass (+33~36 mV). Emulsions that were carried out by the following conditions gave a comparison small droplet and high Zeta

potential : “A emulsion” (1000:5 w/w,mg LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes), ” B emulsion” (1500:7.5 w/w,mg LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes), “ C emulsion” (2000:10 w/w,mg LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes), “ D emulsion” (2250:11.25 w/w,mg LNA-Vit. E, 1500 bar, 10 passes), “ E emulsion” (2500:12.5 w/w,mg LNA-Vit. E, 1500 bar, 9 passes).These emulsions were determined on their stability. On the oil-water separation, A, B and C emulsions were stable during 28 day storage ; D emulsion showed separation at 20th day, and E emulsion showed separation at the 12th day. On the droplet-size change, A, B and C emulsions showed a decreasing during the storage (A:880 nm→667 nm ; B:941 nm→723 nm ; C:853 nm→754 nm), D and E emulsions showed a gradual larger during the storage. On the POV change, all emulsions gave a increasing POV , about 710-725 meq/Kg at the 5nd day storage at 50 °C while pure LNA-Vit. E showed about 820-860 meq /Kg.

The CS-Le-LNA- Vit. E nano droplet emulsions showed a droplet size in a range of 790-992 nm and zeta potential almost +46 mV. On the emulsion stability, they had no separation and showed a gradually decreasing in droplet size and more stable POV(200 meq/Kg) during the storage. Thus, under the same emulsified conditions, CS-Le-LNA- Vit. E had larger droplet size but higher Zeta potential and more stable in the storage than that of the CS-LNA- Vit. E emulsion . Both CS-Le-LNA- Vit. E droplets and CS-LNA- Vit. E droplets were spherical or oval shapes under TEM observation.

Key words : Chitosan, Lecithin, Emulsifying stability, Nano droplet, POV,
TEM

壹、前言

乳化劑 (emulsifier) 添加至食品後可顯著降低油水兩相表面張力，在經過均質 (homogenization) 後，使互不相溶的兩相(如水和油)能均勻分散形成穩定的乳化液。乳化劑除了利用本身親水基(hydrophilic group)及親油基 (hydrophobic or lipophilic group) 使油水互溶在一起外，另外有一些安定作用機制可使乳化液 (emulsion) 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、stearoyl lactylate 等，其缺點為易受 pH 及電解質之影響(Macrae et al., 1993;Del Blanco 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者(non-ionic)，例如:mono and diglycerides(Macrae et al.,

1993)。

自蝦、蟹殼或生物細胞壁取得之幾丁聚醣(poly- β (1-4)-2-deoxy-2-aminoglucose) 可溶於有機酸溶液，且具以下特點：(1) 有親油基 (-COCH₃ groups) 及親水基 (-NH₃⁺、-OH groups)，可作為乳化劑；(2) 具有多價陽離子(polycationic)，故有靜電排斥安定作用；(3) 為多醣類聚合物 (polymer)，故有立體阻礙安定作用；(4) 溶液呈現高黏性，故有黏性安定作用；(5) 因其 pK_a 值約 6.3，故於 pH 6.0 以下較不受食品 pH 值之影響；(6) 有抑菌作用 (吳，2003)；(7) 有保健功能，如降低人(動物)體內之膽固醇、三酸甘油酯、油脂吸收等 (吳，2003)。此外，幾丁聚醣(chitosan)因帶正電荷且有良好之乳化能力，故常被使用於乳化包覆油脂，減緩油脂氧化速度及改善異味等功能，帶正電荷之幾丁聚醣易吸附於帶負電之腸黏膜細胞上而延長腸道停留時間，助於被包覆物質(營養素、藥物等)易為吸收。綜合以上特性，幾丁聚醣不論是在食品、化妝品及藥劑上之應用具有相當的潛力，且優於以往在食品加工或化妝品上所用的乳化劑。

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要物質(Spector, 1999)。維生素 E 是一種脂溶性化合物，可防止不飽和脂肪酸氧化腐敗，故常被利用於乳霜和乳液中。其能與脂溶性物質互溶，經脂解(lipolysis)及乳化作用(emulsification)複合成微膠粒，進入小腸黏膜細胞內後，會形成乳糜微粒，經由外胞飲作用釋放到淋巴系統，再經由胸導管進入血液系統(陳，2002)。學者指出，維生素 E 大約 70 % 在肝臟中與葡萄糖醛酸結合，隨膽汁進入腸道，再經糞便排出，故其在人體中吸收率不高(何，2004)。但具維生素 E 具強抗氧化性，故當其進入人體吸收時易產生氧化作用，且在腸道中吸收率低。

然而次亞麻油酸因具有雙鍵的不飽和脂肪酸，維生素 E 吸收易產生氧化作用，兩種油在儲存過程中容易氧化且人體吸收轉換效率差，過去文獻指出利用包覆技術(encapsulation technology)可減緩油脂氧化速度。幾丁聚醣(chitosan)因帶正電荷且有良好之乳化能力，因此常被使用於乳化包覆油脂物質，降低或甚至可阻止油脂氧化及改善異味等功能，且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。

以往乳化液常以傳統旋轉式或壓力式均質機均質而成，但其乳化液滴之大小只能約 10 μm 或以上。若改以高壓均質處理，可得比傳統乳化後相對較小的乳滴，且其乳滴可達奈米級($<1 \mu\text{m}$)。奈米乳滴具有良好的分散和安定性，且營養方面更易被人體吸收利用。

本研究擬將粗幾丁質製成 $\geq 85\%$ 去乙醯度之幾丁聚醣作為乳化劑，以高壓均質方法製備幾丁聚醣-次亞麻油酸-維生素 E 奈米乳化液(nano-droplet emulsion)，探討其乳化性質，如乳化液滴粒徑、乳化安定性以及油 POV 等，同時提高奈米乳滴乳化液穩定性並延緩油脂氧化。另外以幾丁聚醣及卵磷脂(lecithin)為合併乳化劑將次亞麻油酸及維生素 E 乳化，並探討比較幾丁聚醣-次亞麻油酸-維生素 E 奈米乳化液及幾丁聚醣-卵磷脂-次亞麻油酸-維生素 E 奈米乳化液的上述性質及雙層乳化劑對乳化液氧化穩定之影響。

貳、文獻整理

一、幾丁質與幾丁聚醣

(一) 幾丁質 (chitin)

幾丁質(chitin)俗稱甲殼素、甲殼質、殼多醣、蟹殼素等，一般外觀呈現淡黃色的棉絮狀固體。最早被發現於1799年，由英國人 Hachett 將蝦、蟹及龍蝦外骨骼利用酸處理，發現產生泡沫及轉變成黃色膠狀軟骨物，當時未知其為何物質，但即為幾丁質的發現(賴，1979)。1811年，法國植物學Braconnot利用氫氧化鈉的稀溶液加熱處理菇類時，發現一種不溶於水的物質，其命名‘fungine’。1823年法國Odier於昆蟲堅硬的表殼中分離出類似物質，而將其命名為幾丁質(chitin)，希臘語意為“包裹物”。1859年Rouget 更進一步發現，將幾丁質置於高濃度氫氧化鈉溶液中加熱，發現其物質可溶於有機酸，稱之幾丁酸。直至1894年Hoppe-Seyler將此產物命名為「脫乙醯殼多醣」(幾丁聚醣，chitosan)(陳，1999)。

幾丁質廣泛存在於自然界，以海洋生物的生成量最多，其主要出現於昆蟲與甲殼類動物的外骨骼及植物、藻類與真菌類等的細胞壁中(表一)(Knorr, 1984)。自然界中幾丁質會與其他多醣或是蛋白質相互結合，在真菌的細胞壁中，會與其他多醣相結合；動物體內則是和蛋白質結合成醣蛋白(Carmen and Roland, 1997)。幾丁質具有支持與保護生物體的功能(Allan and Hadiges, 1979)。幾丁質其結晶構造間存在著許多強固的氫鍵，使其物化性質相當安定。

由於幾丁質加工性差，將其去乙酰而成幾丁聚醣，而增加其加工性及應用性，已知應用領域相當廣泛，在農業方面，可作為植物產生抗菌物質之誘發劑、種子包覆劑、提高產量、增加原產品採收品質。在海產廢棄物中，幾丁聚醣原料來自生物資源(蝦、蟹殼等漁業加工廢棄物，其中以甲殼類蝦蟹殼的幾丁質含量最高)，善加利用自然的寶貴資源，除了減少環境污染的問題，並產生高附加價值之物質。



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 ontent (%)
Crustacea		Insects (continued)	
Cancer (crab)		May beetle	
Carcinus (crab)	72.1 ^c	Diptera (true fly)	16 ^b
	0.4-3.3 ^a	Pieris (sulfur butterfly)	54.8 ^c
	8.29 ^b	Grasshopper	64 ^c
	64.2 ^c		2-4 ^a
	35 ^b		20 ^c
Paralithodes (King crab)	14 ^a	Bombyx (silkworm)	44.2 ^c
Callinectes (blue crab)	1.3-1.8 ^b	Calleria (wax worm)	33.7 ^c
Pleuroncodes (red crab)			
Crangon (shrimp)			
Alaskan shrimp	5.8 ^b		
Nephrops (lobster)	69.1 ^c		
Homarus (lobster)	28 ^d		
Lepas (barnacles)	69.8 ^c	Molluscan Organs	
Insects	6.7 ^b	Clamshell Oyster shell	6.1
Periplaneta (cockroach)	60.8-77.0 ^c	Squid,skeletapen	3.6
Blatella (cockroach)		Krill,deproteinized shell	41.0
	58.3 ^c		40.2 ± 5.2
		Fungi <i>Aspergillus niger</i>	
Colcoptera (beetle)		<i>Penicillium notatum</i>	
Tenebrio (beetle)		<i>Penicillium chrysogenium</i>	

a: Wet body weight

b: Dry body weight

c: Organic weight of cuticle

d: Total dry weight of cuticle

e: Dry weight of the wall

(Knorr, 1984)

(二) 幾丁聚醣

1859年 Rouget 將幾丁質以濃氫氧化鈉加熱去除乙醯基(-COCH₃) 後，發現其可溶於有機酸，在1894年Hoppe-Seyler將此物質命名為「脫乙醯殼多醣」(幾丁聚醣，chitosan)。1925年Children證明其為一含氮化合物(賴，1979)。幾丁聚醣為幾丁質經去乙醯化作用(deacetylation)之後所得到之產物，其去乙醯基程度範圍由65%至95%不等，一般以70%~90%最為常見(劉，1944)。

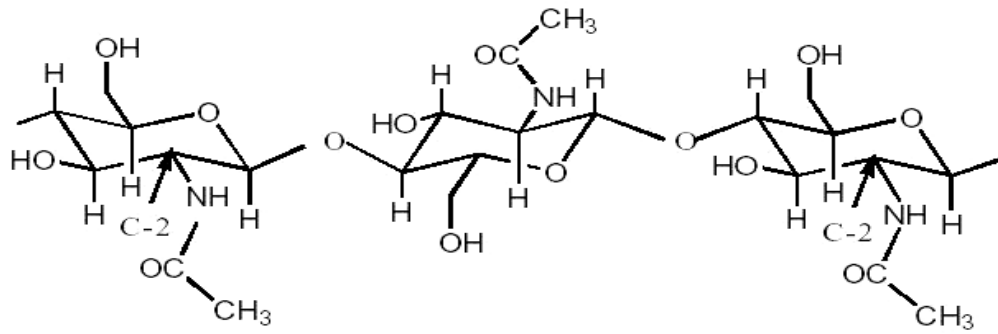
(三) 幾丁質與幾丁聚醣之結構

幾丁質(chitin)為2000~3000個N-乙醯葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine)及少數單體葡萄糖胺(glucosamine)以 β -1,4糖苷鍵鍵結形成直鏈狀多醣類聚合物，分子架構為「(1,4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucan」，構造類似纖維素的生物性高分子，而與纖維素不同的地方在於 C-2 位置上所接的是胺基(-NH₂) 或乙醯基(-NHCOCH₃, acetylamino group)，而纖維素在 C-2 位置上接的是氫氧基 (-OH, hydroxyl group) (圖一)。

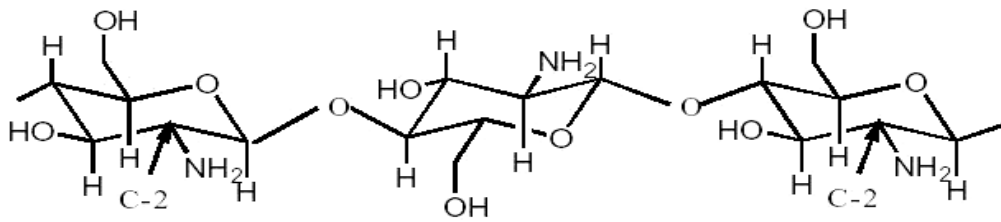
幾丁質經由高溫及濃鹼處理進行去乙醯化作用(deacetylation)，除去部份乙醯基而使游離胺基(-NH₂)裸露出來，得到的產物即為幾丁

聚醣，分子架構為「poly[β -(1 \rightarrow 4) -2-amine-2-deoxy-D-glucopyranose] 」(Knorr, 1984)。幾丁質與幾丁聚醣之去乙醯程度差異，並沒有明顯的定義，但是在Muzzarelli和Rocchetti (1985)認為總氮量佔聚合物的百分之七(w/w)以上者為幾丁聚醣。Aiba (1992)以去乙醯程度超過60%而微溶於酸性溶劑者稱為幾丁聚醣。

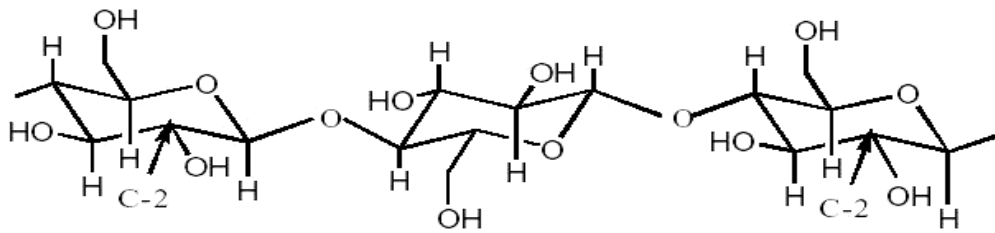




(a) Chitin



(b) Chitosan



(c) Cellulose

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之架構。

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

(四) 幾丁質與幾丁聚醣的晶型架構

幾丁質經 X-ray 光譜分析後，依其結晶型態主要可分成 α -chitin、 β -chitin 及 γ -chitin 三種結晶型，其晶型特性如表二 (Muzzarelli, 1977，架構如圖二及圖三 (Rinaudo, 2006)。幾丁聚醣的幾何構型類似 α -chitin，為斜方晶系。

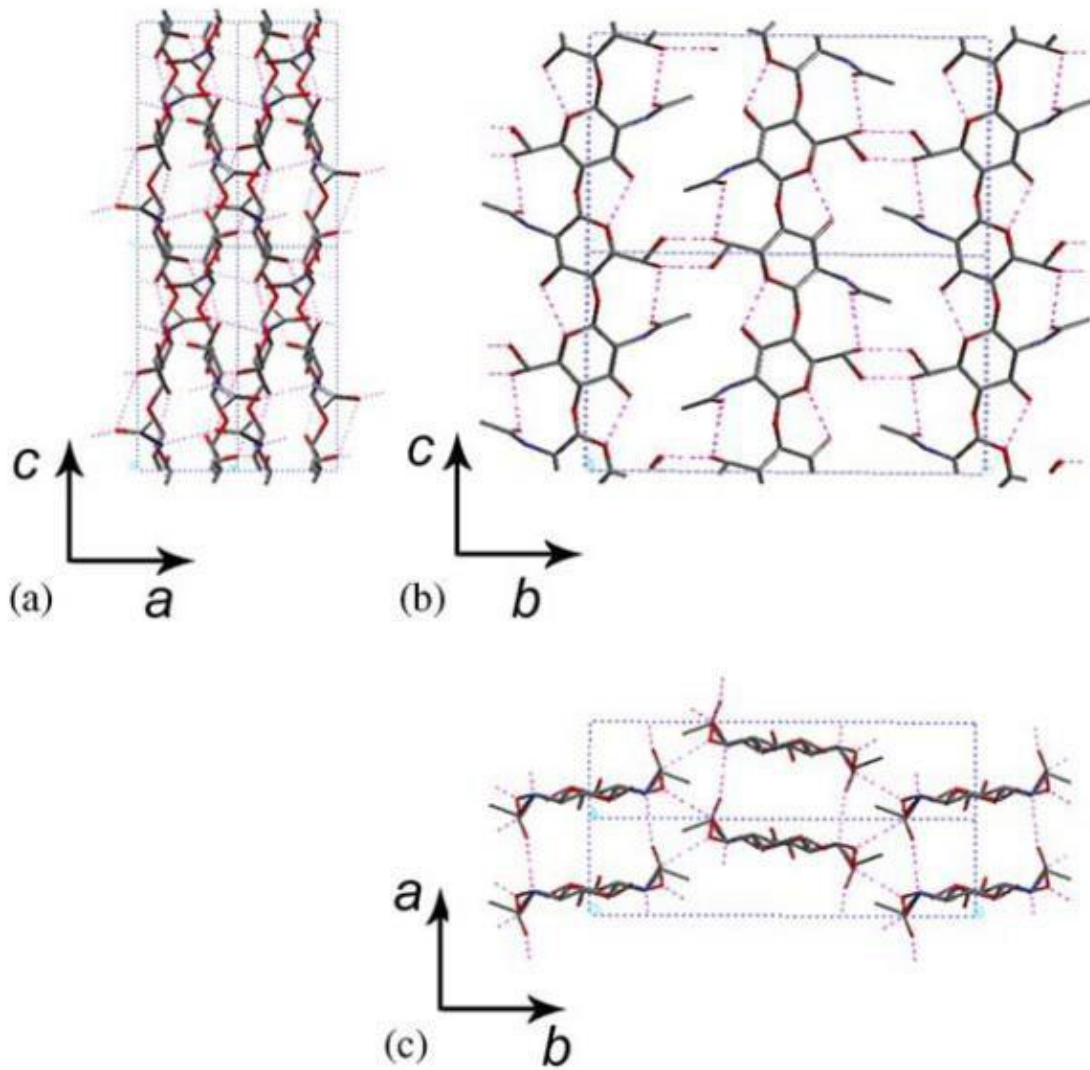


表二、幾丁質三種晶型架構與特性。

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

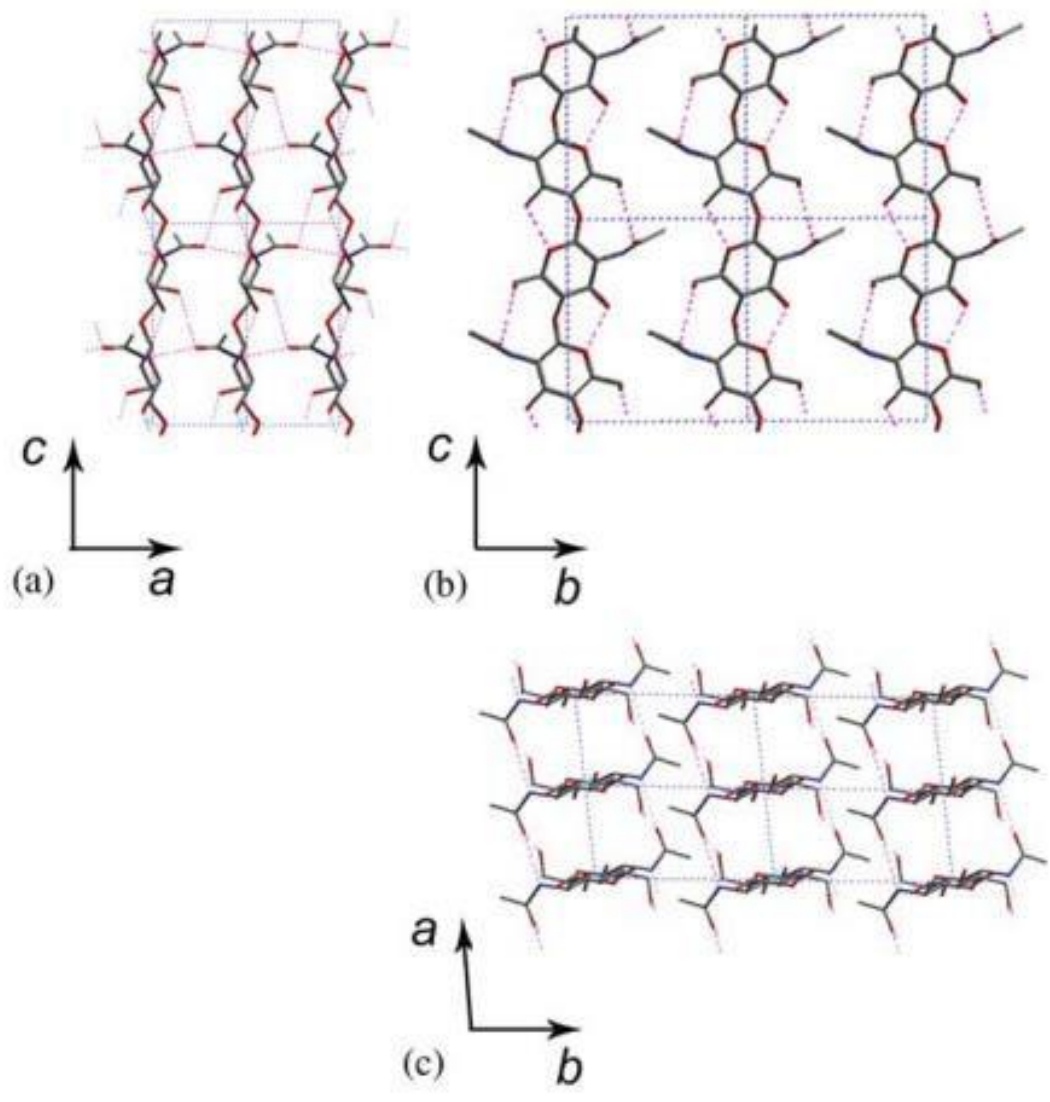
形式	α type	β type	γ type
晶系	斜方晶系 (rhombic system)	單斜晶系 (monoclinic system)	斜方晶系與 單斜晶系混合
架構	對稱的兩股雙螺旋呈現 反向平行 (anti-parallel)	對稱的兩股雙螺旋呈現 同向平行 (parallel)	每兩個平行長鏈就會 有一個反向平行長鏈
圖示	↓ ↑ ↓ ↑ ↓ ↑	↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	↓ ↑ ↓ ↓ ↑ ↓
特性	構型緊密，質地堅硬	架構較鬆散，亦被幾丁質酶分解	架構緊密性介於 α 型與 β 型之間
存在	昆蟲、甲殼類動物	烏賊體類軟骨	藻類、真菌類

(Muzzarelli *et al*, 1977 ; 賴, 1979 ; Blackwell, 1988)



圖二、 α 型幾丁質之立體架構。

Figure 2. Structure of α -chitin: (a) ac 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。

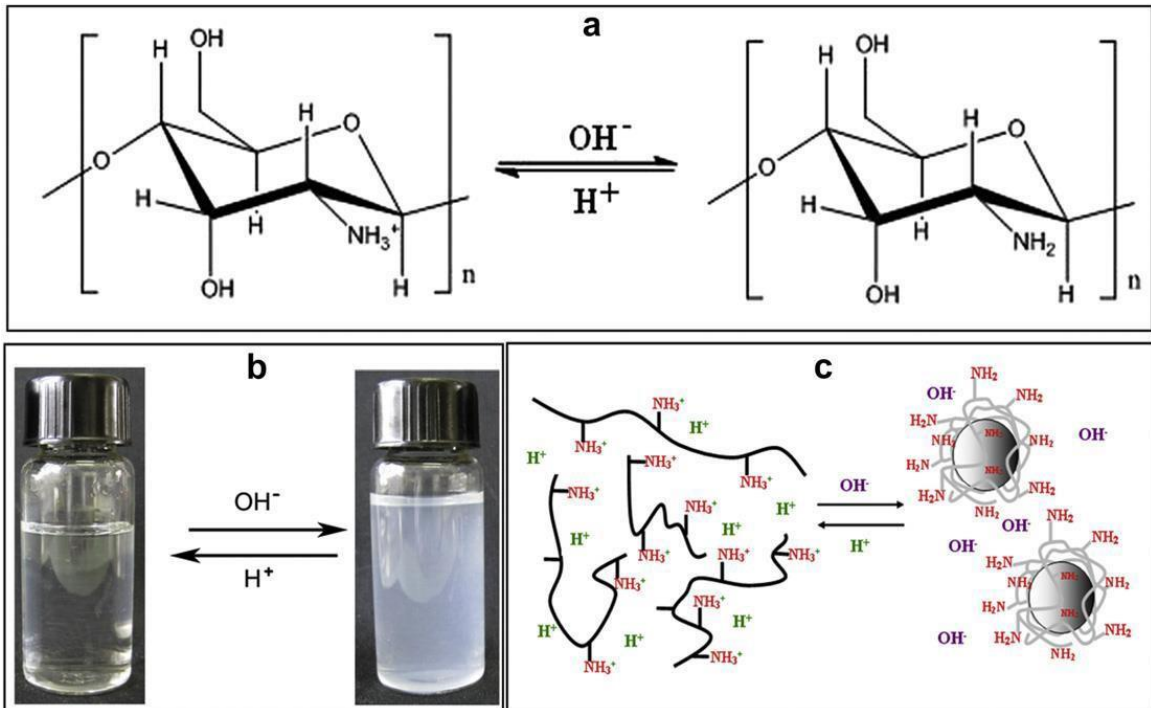
Figure 3. Structure of anhydrous β -chitin: (a) ac projection; (b) bc projection; (c) ab projection (Noishiki *et al.*, 2004 ; Rinaudo, 2006).

(五) 幾丁質與幾丁聚醣溶液特性

幾丁質對溶劑的抗性大，不溶於一般無機酸或有機酸，且也不溶於鹼液中，只溶於強無機酸，如：硝酸、鹽酸、濃硫酸和無水甲酸，因幾丁質的乙醯胺基易產生分子內、間氫鍵，形成強的微粒結構(Somorin, 1982)。含有5%氯化鋰(LiCl)的二甲基乙醯胺(dimethylacetamide)溶液則為幾丁質的良好溶劑(Austin, 1981; 陳等, 1999)。幾丁質具有強吸濕性，保濕效果相當良好，並具有吸附重金屬離子的功能，分子在自然狀態下不易斷裂、變性，具有相當良好的機械強度。

幾丁聚醣可溶於酸性或弱酸性溶液中，包括有機酸或無機酸，例如1%己二酸(adipic acid)、甲酸、醋酸、磷酸、乳酸、丙酸、蘋果酸、琥珀酸，但不溶於硫酸、中性及鹼性的溶劑。幾丁聚醣可溶解於稀酸中，但其溶解度取決於幾丁聚醣之去乙醯程度及本身的pH值。Filar 和 Wirick (1978) 文獻指出去乙醯程度達75%以上的幾丁聚醣，才易溶於較稀的有機酸中，而當溶液的pH值高於5.5，其溶解度明顯下降因強於其pKa (pH~6.3)。當中以醋酸為最佳溶劑，能夠溶解近50%的幾丁聚醣，所以常被選用作為幾丁聚醣溶液性質測定的標準溶液(Knorr, 1984)

在酸性環境下之幾丁聚醣為多價正電荷聚合物，在溶液中會形成親水性蚯蚓狀(worm-like)分子，其聚合物流體性質取決於分子構形、氫鍵數目或相鄰分子間之靜電斥力(Launay et al., 1986)。幾丁聚醣溶液溶於酸性環境會形成黏狀的非牛頓(non-Newtonian)溶液，其黏度受到本身離子化程度(正電荷數)的增加而使黏度增加。若溶液pH值升高，會導致幾丁聚醣分子內及分子間之靜電排斥情形減低，亦即 $\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2$ ，造成分子鏈更易糾結在一起，使分子捲縮造成黏度下降情形(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).

(六) 幾丁質與幾丁聚醣的製備

1. 幾丁質製備

(1) 原料來源及成分

一般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，再使用之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)，所以為了降低分子的降解，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。

另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，但缺點是不容易完全去除礦物質，但近年研究發現，使用過量0.25M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

蛋白質去除有兩種方法：化學法與酵素法 (Bough et al., 1978 ; Knorr, 1984)，一般常使用化學法來處理，因化學法利用鹼液來處理，操作過程簡便，效果佳、成本低及處理時間短等優點，但會有鹼液廢液處理問題。去除蛋白質過程中可能產生幾丁質分子降解、去乙醯作用等問題，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，且未出現去乙醯作用。利用酵素法去除蛋白質具有以下優點：低溫操作、對幾丁質分子降解程度小及去乙醯程度低等，但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醯作用，其常用方法分別為：熱鹼液、酵素或微生物法處理。

a. 熱鹼液

是目前最常使用之方法，將幾丁質放入高濃度之鹼液中，加熱進行去乙醯作用。去乙醯程度會受鹼液種類、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，其中以鹼液作用反應時間做為幾丁聚醣去乙醯最重要關鍵因子 (Synowiecki and Al-Khateeb, 1977 ; Prashanth et al., 2002 ; Methacanon et al., 2003)。此方法具有反應時間短、去乙醯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醯度之高低。

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，將幾丁質粉末加入 57% (w/v) NaOH 溶液 (20 mL/g)，加熱 $102 \pm 2^\circ\text{C}$ 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°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)。圖六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。

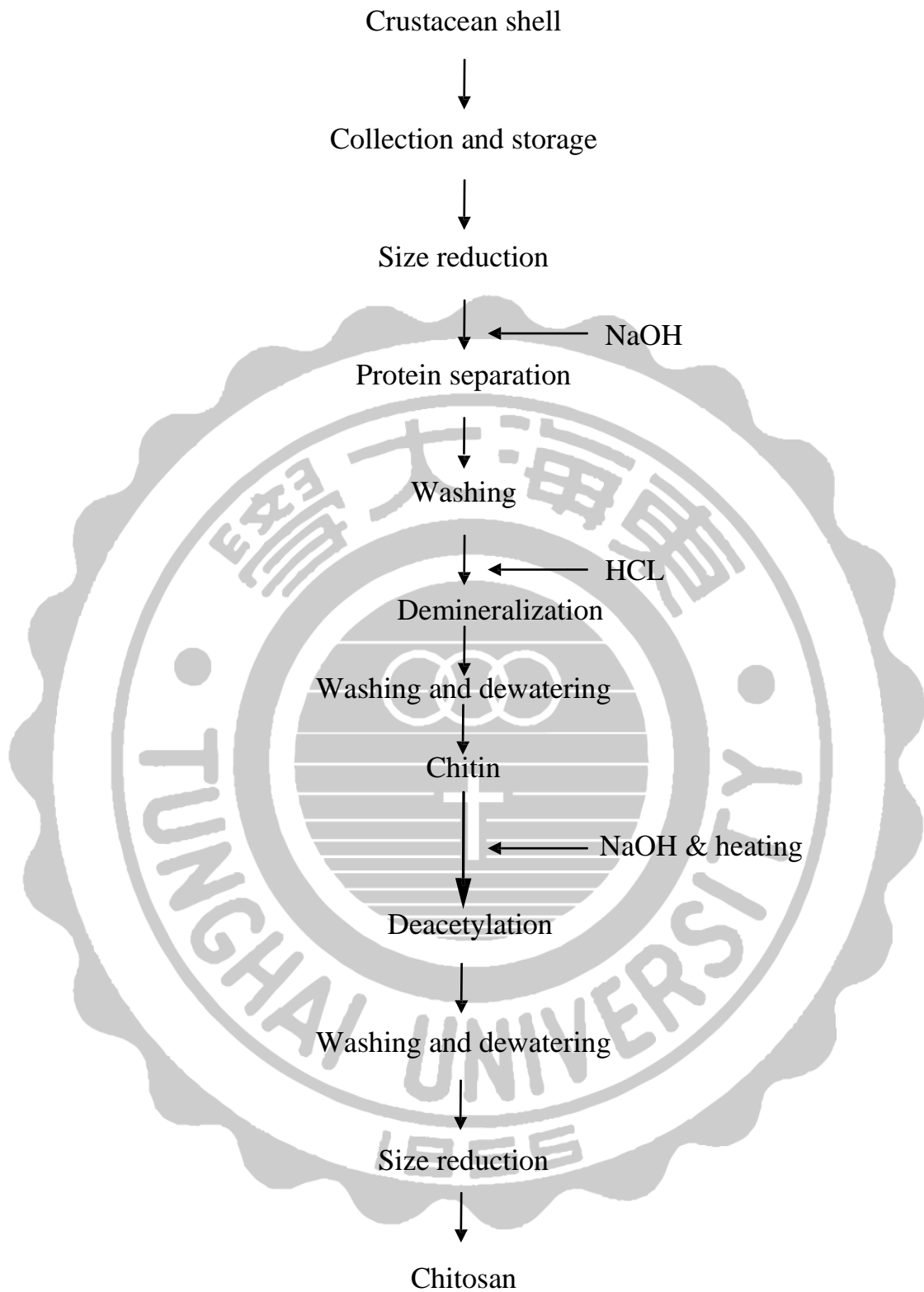
Table 3. Conditions for preparing chitosan of different degrees of deacetylation.

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。

Figure 5. Simplified flow diagram of chitin and chitosan processing

(Knorr, 1984)

(七)幾丁聚醣之物性分析

1. 分子量測定

不同分子量之幾丁聚醣有不同特性及其應用範圍，常見分析幾丁聚醣分子量方法分別有：膠體過濾分析法(Mima et al., 1983)、黏度平均分子量(Maghami and Roberts, 1988; Roberts and Domszy, 1982)、高效液相層析法(Wu and Bough, 1976)及光散射法(Beri et al., 1993)。

本實驗室採用膠體過濾層析法測定幾丁聚醣分子量，方法為在管柱中填充一定孔徑的膠體，並以醋酸緩衝液作為流動相，利用其不同分子大小在管柱內滯留時間的不同，大分子會先跑出滯留時間短，小分子則較慢跑出滯留時間長，配合折射率偵測器(refractive index detector, RI)來偵測分子量大小(Mima et al., 1983)。

2. 去乙醯度測定

幾丁質與幾丁聚醣最大不同處在於去乙醯度，一般幾丁聚醣去乙醯度介於65~99%之間，其中以70~90%最為常見。去乙醯度愈高，結構上之胺基愈多，在酸性環境下所帶正電荷也愈多，因此能吸附較多小分子或陰離子等物質，本實驗採用去乙醯度大於85%之幾丁聚醣。一般常用測定去乙醯度方法有：紅外線光譜分析法、紫外光光譜分析(Muzzarelli and Rocchetti, 1985; Tan et al., 1998)、光譜分析法(Domard, 1987)、氣相層析法(Holan and Voyruba, 1980)、高效液相層析法(Niola et al., 1993)、酵素法(Nanjo, 1991)、滴定法(Toei and Kohara, 1976)、熱分析法(Alonso et al., 1983)、比色分析法(Davies and Hayes, 1988)等。

本實驗使用滴定法測定幾丁聚醣去乙醯度，其方法為利用多陰離子試劑 P.V.S.K.(Potassium polyvinyl sulfate) 滴定待測溶液，並以 toluidine blue 作為指示劑，當待測溶液由藍色變為紅紫色時，即達滴定終點並記錄試劑滴定量，再與標準品比對滴定量則可測得去乙醯度 (Toei and Kohara, 1976)。

(八)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 0.8g 及 1.4g 的幾丁聚醣餵食雞和兔子，在 239 天後發現並沒有產生不良症狀；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)。目前，幾丁聚醣已被廣泛利用於食品上，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)。

(九)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，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)。幾丁聚醣為具有廣泛的抗菌效果，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極佳的抑制效果。

另外幾丁聚醣對於粒子、金屬離子具有吸附效果，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，能延長食品儲存期，並改善食品在新鮮、冷凍時的品質 (Labuza, 1989; 劉等, 2004; 劉等, 2005)。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	<p>抗癌藥物</p> <p>膠囊型藥物之原料</p> <p>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</p> <p>促傷口癒合之藥劑</p>
化工領域	<p>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</p>
生物科技領域	<p>固定化酵素如lactase 及amylase</p> <p>固定細胞膜</p> <p>薄膜層析法 (TLC)之材料</p> <p>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</p>
農業領域	<p>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</p>
食品加工及食品化學領域	<p>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</p> <p>中藥煎液之去金屬離子劑</p>

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

(接上頁)

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
及特定之汙染物 整合廢水中之
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

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

2. 食品保健之應用

1983，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)。在2001年呂等學者研究證實幾丁聚醣對於膽固醇(cholesterol)及脂肪具有強吸附性功能，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, 1996)，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，而將大部分所結合的脂質隨後被排泄掉(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) 減少上腸道中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。

此外也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，當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越高，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

幾丁聚醣除了降低膽固醇功用外，還能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; 戶倉清一, 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，因此也被開發於生

醫材料之用(Naojiet al., 2000),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(micro capsule)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

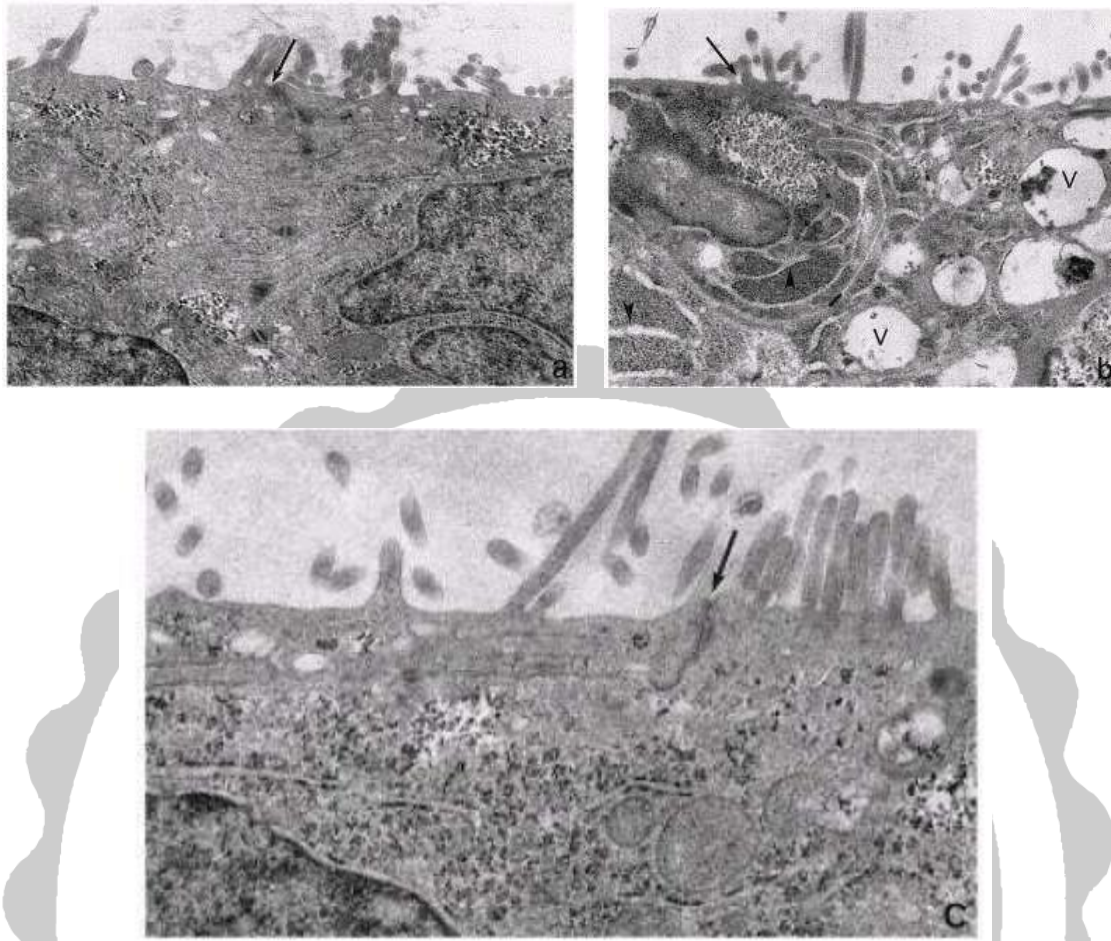
幾丁聚醣在酸性環境下帶有高度正電荷,其分子會與帶負電之黏膜細胞產生靜電吸引作用力而黏附於細胞表面,此特性歸因於幾丁聚醣有下列特性:

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

二、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 $0.2-50 \mu m$ 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，當兩不互溶的液體放置在同一容器時，當處於上下分層的穩定狀態，則兩者交界的界面會最小，對於整個系統而言，此時的整體自由能(Gibbs free energy) 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積增加，使得整體的自由能也增加，便造成整個系統的不穩定(吳，1979；蔡，1979)。從以下的方程式中，我們可以得知界面張力與自由能變化的關係 (Das and Kinsella, 1990)：

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

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。

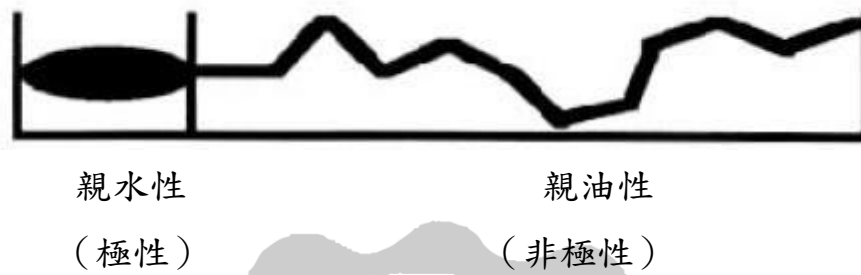
為了要維持整個系統能持續的呈現不穩定狀態，則必須另外再添加能降低界面張力的乳化劑或安定劑來維持乳化液的安定性。乳化作用所形成的乳化液中以小液滴(droplets)狀態分佈的液體稱為分散相(dispersed phase)，而在這些小液滴周圍的液體部分則稱為連續相(continuous phase)。

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。

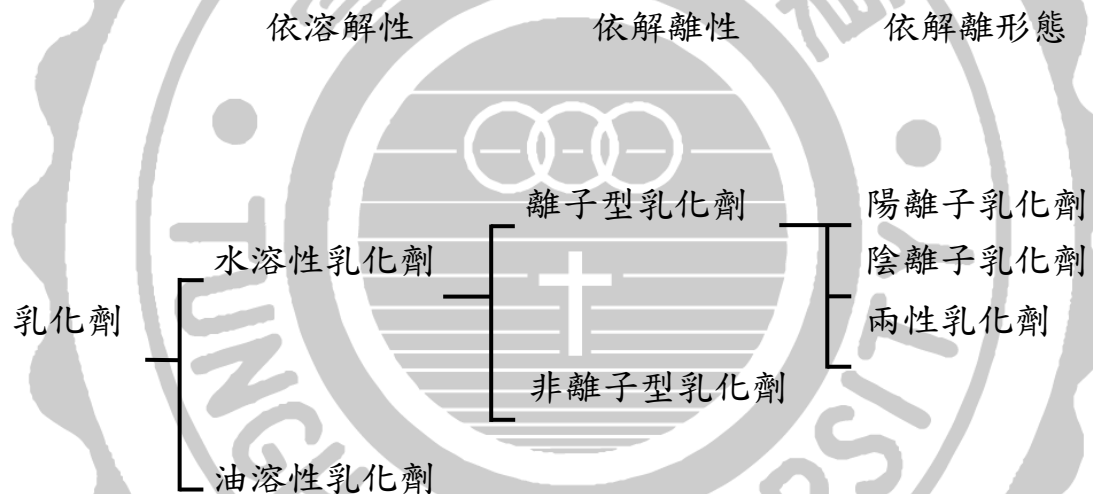
(二) 乳化劑(趙，1991；王，1993)

乳化劑有許多的種類，但基本構造大致都相同，分子上同時具有親水(hydrophilic)的極性親水基及疏水(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)，如圖七所示。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)。

(A) 乳化劑基本結構示意圖



(B) 乳化劑種類



圖七、乳化劑之形態及其種類。

Fig. 7. The form and the kinds of emulsifiers. (A)The form of emulsifiers
(B)The kinds of emulsifiers

(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Griffin所提出,其最大值約為40,最小則為1。其公式如下(趙,1955)

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

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:

非離子性乳化劑的 HLB 值介於 0~20 之間,由於非離子乳化劑的化學結構不同,多元醇的脂肪酸酯類型之乳化劑作為介紹其算其HLB

值之計算方式。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：

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

S：酯的皂化價

A：脂肪酸之中和價

除此之外，Griffin利用具有標準HLB值的界面活性劑做多種組合，並且針對所需乳化分散系之HLB值做乳化實驗，即可得簡單加減之混合HLB值計算法：

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

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，由表五可看出HLB值與用途間的對應關係。

表五、HLB值與用途間的關係。

Table5. 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

(歐靜枝, 1990)

(四) 乳化的方法與乳化液類型(趙，1991)

一般的乳化方法為機械分散法，其可分為以下幾個類型：

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1000~20,000 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。

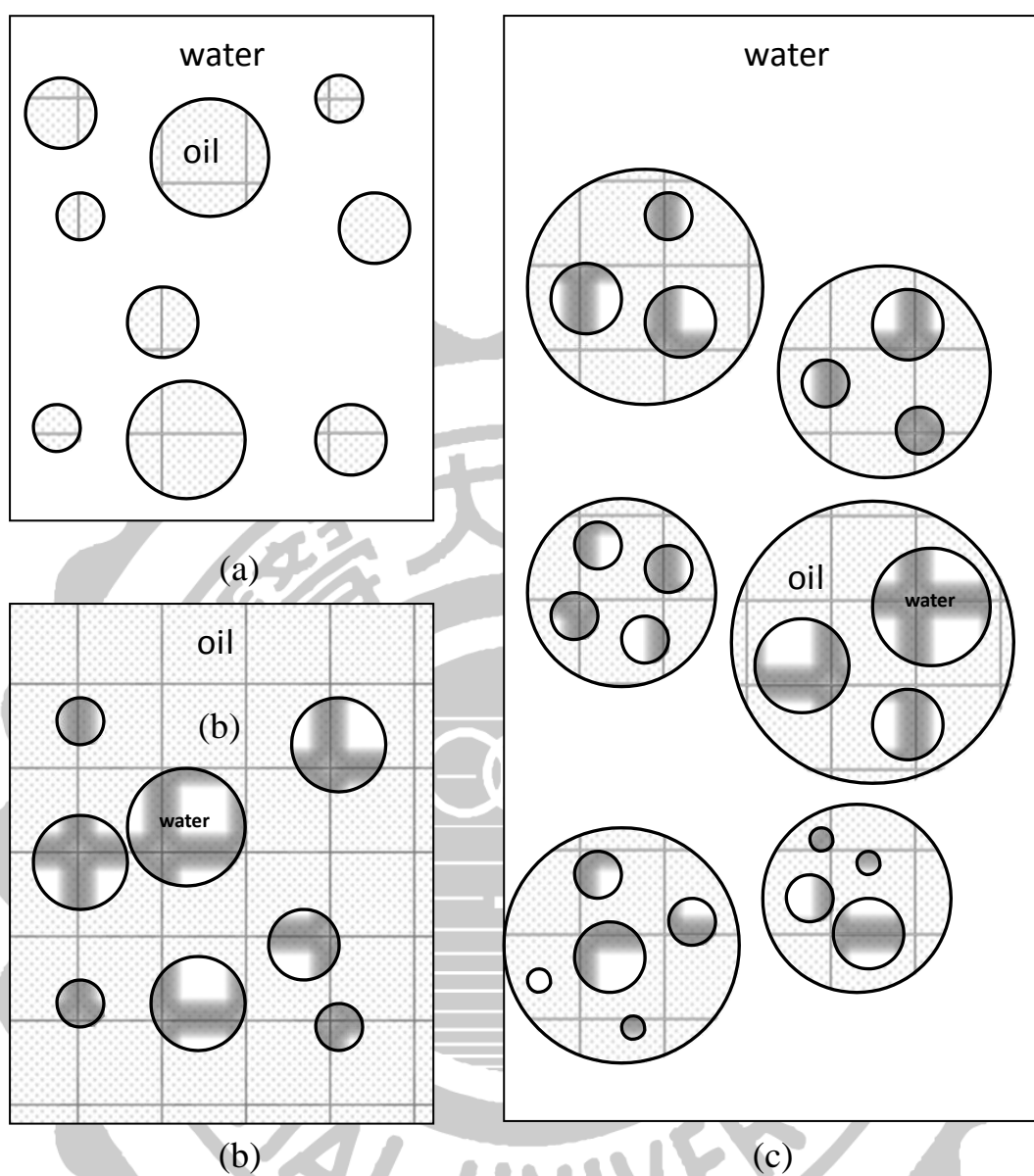
(1) 攪拌法：使用高轉速機械攪拌，使液體流動造成分散相分散於連續相中，達乳化效果。

(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，過程中產生剪切力、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型的有貢丸、牛奶、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，如圖八所示的w/o/w以及o/w/o兩種形式(Friberg and Larsson, 1997)。





圖八、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。

Figure 8. 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

乳化不安定時，乳化液粒子間會相互結合，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如下：(刈米，2003)

1. 乳化粒子的大小。
2. 乳化系統的黏度。
3. 乳化系統的黏度油相與水相間之比重差。
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) 如圖九所示，分別為：凝絮 (flocculation)、聚結 (coalescence)、分層(creaming或sedimentation)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. 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。

2. 聚結(coalescence)

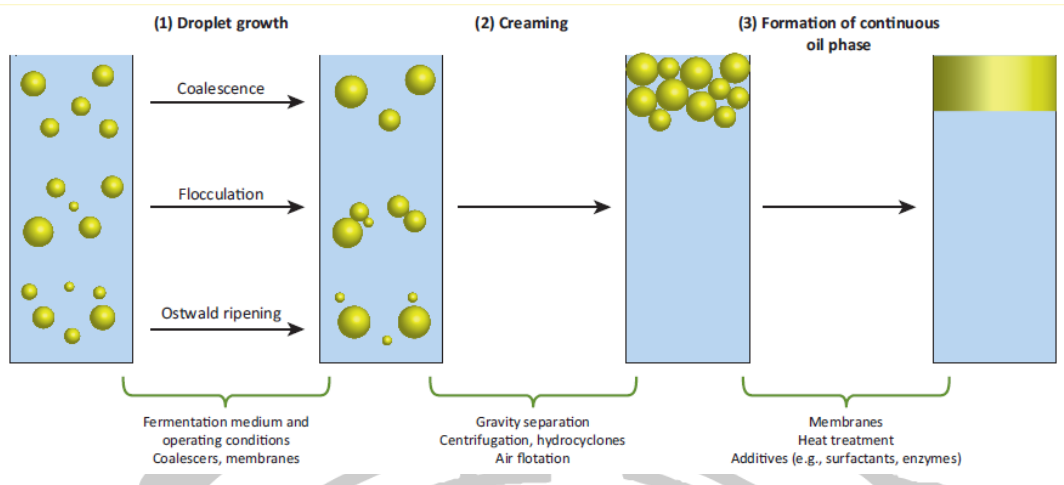
兩個以上的分散相液滴直接接觸才可能會發生，凝絮物的液滴發生凝聚現象，其中的小液滴的液膜被破壞，形變成較大的液滴，這種過程稱為聚結。聚結是不可逆的過程，會導致液滴數目的減少和乳液的完全被破壞，油水分離，進而改變液滴大小分佈。因此聚結前須行凝絮的作用，聚結則是乳液被破壞的直接原因，聚結得速率決定乳液得穩定度。

3. 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。

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。



圖九、乳液的幾種不穩定現象示意圖。

Figure 9. Food emulsions may become unstable through a variety physical mechanisms, including creaming, sedimentation, flocculation, coalescence, and phase inversion (Ajan, 2014).

三、幾丁聚醣之乳化性質

(一) 幾丁聚醣乳化相關研究

Schulz等人(1998)將幾丁質加入強鹼NaOH加熱得89%去乙醯度之幾丁聚醣，並作為乳化劑進行乳化，發現幾丁聚醣適合o/w food system，且此樣品中並不是純的只有89%去乙醯者，尚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的形態乳化液。顧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)，研究中以光學顯微鏡照相加以證明。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 mm)。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。

Rodriguez等人(2002)將75~95 %去乙醯度之幾丁聚醣分別溶於0.1 M HCl (模擬胃酸環境)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，進行均質乳化。結果發現oil/chitosan solution之比例為20/80時，將乳化液置於室溫下1hr，乳化液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(2008)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，可能會造成其乳化能力的下降。乳化安定性方面，將樣品分別以不同溫度(5、25、60、100、121°C)處理後靜置，結果發現60~70、80~90%去乙醯度組別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%組添加量為2.0%時，可使乳化液安定無分離；而去乙醯度80~90%組在1.5%添加量時則擁有最佳的安定性，乳化液滴直徑約0.02 *cm*。

張(2010)研究選擇去乙醯程度80~90%之幾丁聚醣溶於0.1M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)，先以旋轉式均質機進行粗乳化後，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保存26天以上無分離現象。於凍結-解凍安定性方面，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。

(二) 幾丁聚醣乳化安定作用

在食品領域中，乳化劑為重要的添加劑，主要目的為使食品中油和水於均質混合後不易產生分層現象(即安定)。乳化劑本身除了利用本身親水基及親油基使油水穩定共存外，也具有安定作用機制使乳化液更加安定，不同類型的乳化液具有不同的安定特性，大概分為以下三類：

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

乳化劑大多為低分子量者，如 lecithin 和 stearyl lactylate 等，其利用乳化劑在乳化作用時吸附在油滴和水滴間的表面時，利用本身帶有的正電(cationic)或負電荷 (anionic) 互相推斥使得乳化液滴不易因為聚集而產生油水分離。但此類乳化劑易受到 pH 值及電解質的影響(Macrae et al., 1993；Del Blanco et al., 1999)。

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

主要為大分子之乳化劑，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) 進而阻礙油滴或水滴因聚集而使乳化液分離 (Napper, 1983；Tesch, 2002)。此外，蛋白質易受等電點(pI)、熱及電解質等(阮，1984；Van 及 Szuhaj, 1998；El-Adawy, 2000) 作用而嚴重影響其乳性。

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

非離子(non-ionic)乳化劑，如： monoglycerides 和 diglycerides 等 (Macrae et al., 1993)，這類乳化劑能產生高黏度特性，阻礙油滴或水

滴聚集而使乳化液產生分離，這是乳化劑最常見的安定作用。

而幾丁聚醣作為乳化劑也與蛋白質相同能同時具有靜電排斥作用、立體阻礙作用以及黏性安定作用，但其特性更為安定，其因具有以下優點：

- 有親油基 (-COCH₃ groups) 及親水基 (-NH₃⁺、-OH groups)。
- 為多價陽離子 (polycationic)，故有靜電排斥安定作用。
- 為聚合物 (polymer)，故有立體阻礙安定作用。
- 溶於有機酸 (如：lactic acid、ascorbic acid、acetic acid...等) 時呈現高黏性故有黏性安定作用。
- 於pH 6.0以內不受食品pH值之影響(其pKa 6.3)。
- 不受響熱影響。
- 具抑菌作用。
- 具保健功能(降低膽固醇、三酸甘油脂、吸附油脂...等)

綜合以上特性，幾丁聚醣不論是在食品、化妝品及藥劑在其乳化上的應用都具有極佳的潛力，並優於以往在食品加工或化妝品(cosmetic)上所使用之乳化劑。

(三) 靜電層沈積法之乳化

1. 靜電層沈積法原理

靜電層沉積法之乳化，是將不相容的兩液體(如：水和油)加入一帶電乳化劑，經乳化後其帶電乳化劑會吸附於乳滴表面而形成帶電單層膜乳化液，隨後加入一帶相反電荷之乳化劑進行乳化作用，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，此外可再添加不同相對電荷乳化劑形成多層膜乳化液，這種層層堆積的方式稱為靜電層沉積法 (electrostatic layer-by-layer (LbL) deposition technique)，參見圖十。

2. 幾丁聚醣-卵磷脂之靜電層沉積法乳化研究

卵磷脂(lecithin)是生物體中細胞膜之主要成分，廣泛分佈於自然界之動、植物中，因價格較合成之乳化劑或界面活性劑低，因此在食品工業上被廣泛的應用。卵磷脂(lecithin)屬於一種混合物，除了當做乳化劑外亦可作為安定劑、抗氧化劑、抗黏劑、濕潤劑、分散劑和脫膜劑等使用，而在一般工業上之使用特性為界面活性作用和防止氧化作用等。其會因結構中磷脂種類不同使卵磷脂帶不同電荷(正電、負電或不帶電)，因本實驗將卵磷脂與幾丁聚醣以靜電層沉積法進行包覆，故使用帶負電荷之卵磷脂作為負電乳化劑。

Magdassi等人(1997)單獨使用一種乳化劑進行乳化，發現不能形成安定的乳化物，後來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，此方法製備出之乳化物具有較佳之儲藏安定性。Ogawa等人(2003)將玉米油和卵磷脂溶液先進行均質乳化，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

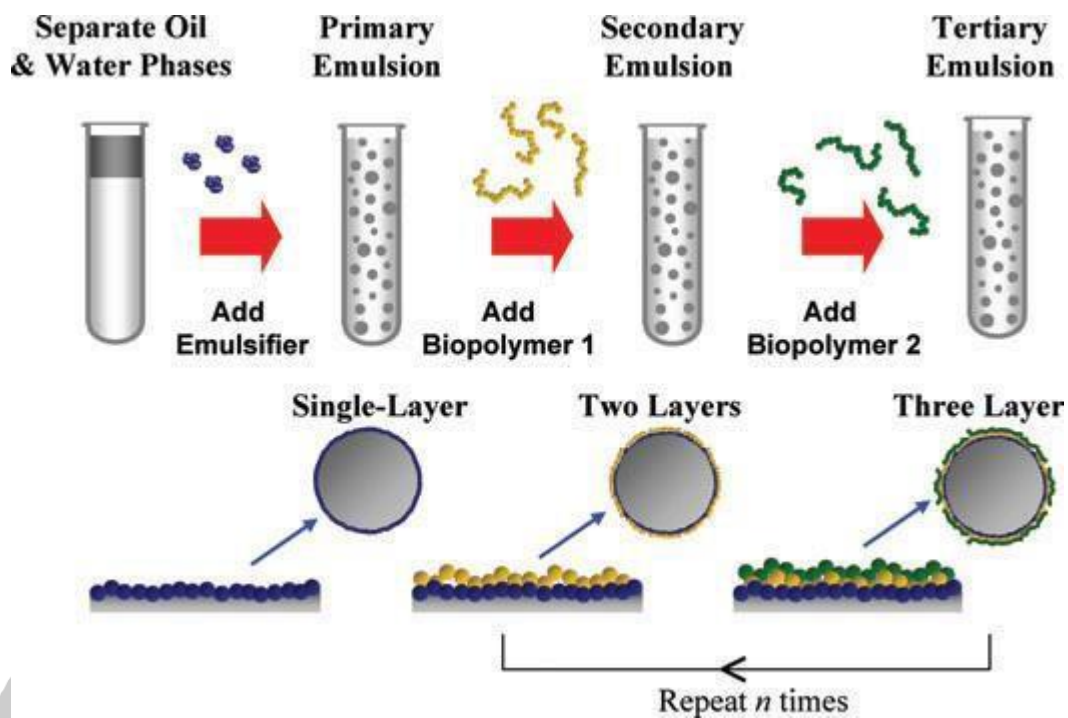
靜電吸引力的關係而可形成外表帶正電的雙層膜液滴，參見圖十一，結果顯示卵磷脂-幾丁聚醣雙層膜可改善玉米油乳化液之穩定度。

Klinkesorn學者等人(2005)年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，此時之界面電位(zeta potential)為 -51 ± 2 mV。之後再加入幾丁聚醣水溶液而形成二次乳化物，界面電位為 $+57\pm 2$ mV。此靜電層沈積法製造之卵磷脂—幾丁聚醣雙層膜，能穩定魚油乳化物，且具有熱加工、冷凍—解凍循環處理及凍乾處理上之安定性。

於同年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鮭魚油乳化液的氧化情形，且效果比只包覆單一乳化劑(卵磷脂)之乳化液來的好，故以兩種乳化劑包覆油脂可明顯改善油脂氧化程度(Klinkesorn et al., 2005)。Shaw學者等人(2007)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，結果為單層乳化對於改善氧化能力有限，而雙層膜包覆魚油可有效改善魚油中 ω -3不飽和脂肪酸氧化情形。

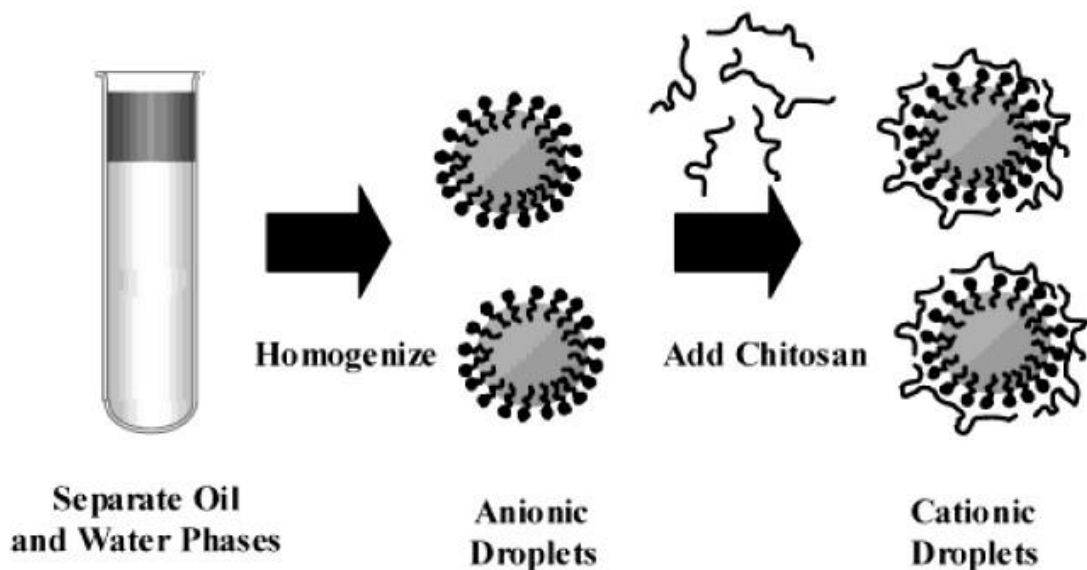
Klinkesorn及McClements (2009)研究在卵磷脂-鮭魚油乳化液中添加不同濃度和不同分子量之幾丁聚醣製備雙層膜乳化液，結果顯示添加0.1% (w/v)濃度幾丁聚糖可維持乳化液儲存穩定性，且於消化試驗中幾丁聚醣能被分解而釋放油脂，但幾丁聚醣分子量對於其在腸胃道中的分解沒有顯著影響。Kaasgaard及Keller (2010)研究將帶負電乳化劑citrem與帶正電乳化劑chitosan對揮發性油性香芹酮(R-carvone)進行乳化作用，藉由靜電層沉積法包覆兩種乳化劑於香芹酮表面形成雙層膜乳化液，結果顯示可增加香芹酮於儲存時香味保留度。

由以上文獻可得知，幾丁聚醣-卵磷脂雙層膜可應用於油脂及油性風味等物質，可改善其油脂乳化液穩定度、氧化程度及延長保存期限，且幾丁聚醣能在腸胃道中分解釋出包覆物質，使人體得以吸收。



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

Fig. 10. Multilayer emulsions : (i) primary emulsion; (ii) secondary emulsion; (iii) multilayer emulsions. (McClements, 2010)



(Ogawa et al., 2003)

圖十一、具有雙層界面膜(lecithin-chitosan)之乳化液滴製備圖。

Fig. 11. Two-stage mechanism for producing emulsion droplets coated by a two-layer interfacial membrane (lecithin-chitosan).

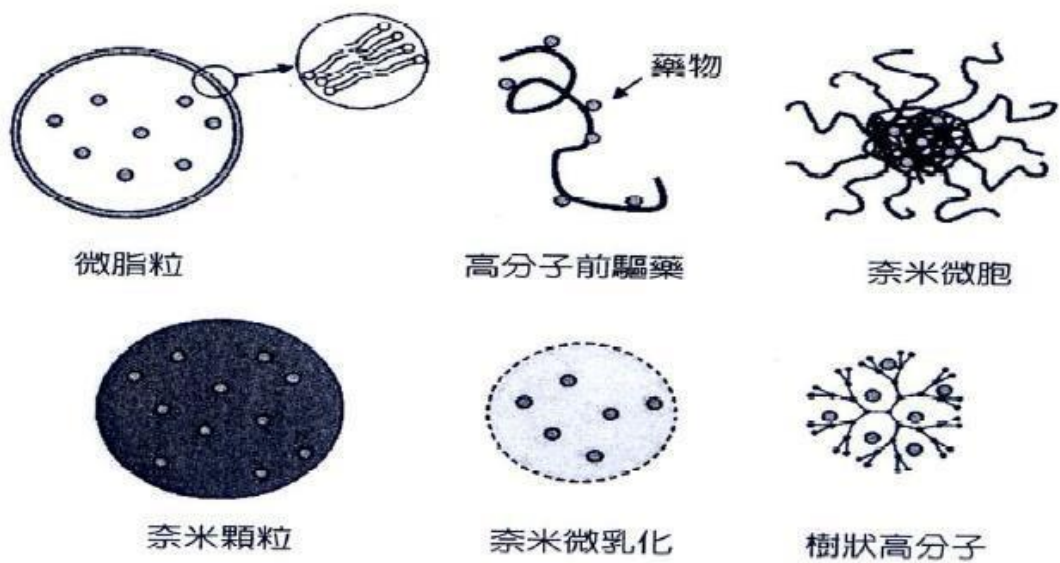
四、奈米科技發展

(一) 奈米科技簡介

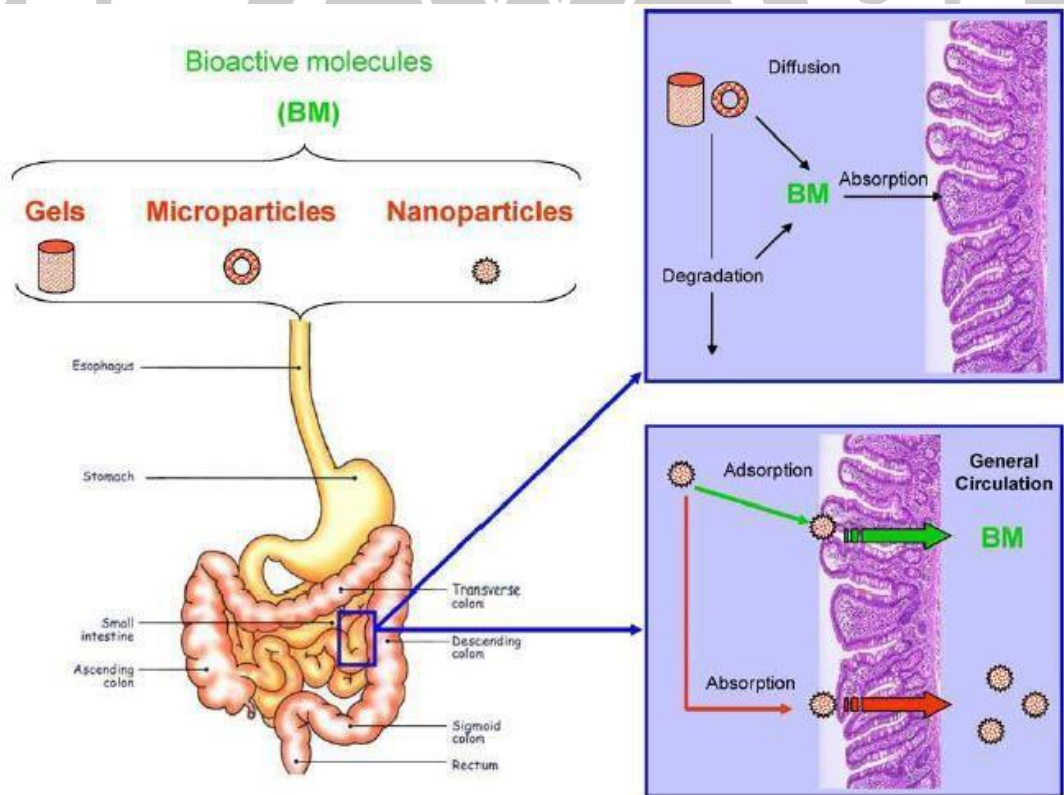
奈米是一個全新的研究領域，奈米顆粒通常可利用化學或機械方法製造，利用機械方式製備出之奈米顆粒大小通常介於100~1000 nm之間；若以化學法則可製備出更小的顆粒，大小約為10~100 nm (Acosta, 2009)。

在藥學領域，認為粒子大小小於1 μm (即1000 nm)可定義為“奈米顆粒”(Kipp, 2004)，因此本文認定奈米顆粒泛指尺寸大小介於數奈米至數百奈米之顆粒。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)，利用奈米結構具有的特性開發具有特定功能的產品。奈米技術所涉內容十分廣泛，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。

關於奈米遞送系統形態可見圖十二，文獻指出奈米顆粒比微米顆粒(> 1 μm)更容易通過腸道上皮細胞 (Desai et al., 1996)，當粒徑大於1 μm 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(圖十三)，因而提高吸收與利用效率 (Chen et al., 2006；Chau et al., 2007)。



圖十二、奈米遞送系統。
 Fig. 12. Nano delivery system. (梁, 2007)



圖十三、奈米顆粒於腸道吸收之優勢。
 Fig.13. Schematic representation of different absorption mechanisms of bioactive molecules. (Chen et al., 2006)

(二) 奈米在食品之應用

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，將食品原料經過微膠囊、微膜、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。

1. 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，強化有效成分之功用，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，故奈米澱粉可以取代部分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具有較佳的耐高溫及耐紫外線之效果，使之不易分解即可延長維生素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。

2. 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，包覆對人體有利之營養物質，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出物連續餵食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) 奈米食品之安全研究與管理

1. 國際間對於奈米安全的重視

2004年：歐盟推動「奈米安全計畫」(Nanosafe)檢視奈米產品本身、處理過程與產業界應用奈米顆粒時在健康上的疑慮(Thomas et al.,2005)。

2004年：英國皇家學會與皇家工程學院建議英國政府成立專門研究奈米生物環境效應與安全性的研究中心(Lu et al., 2004)。

2004年：我國政府於「挑戰2008國家發展重點計畫」將奈米技術列為重點發展技術，並由經濟部、國科會、環保署等跨部會成立「奈米標章委員會」並建立奈米標章驗證體系，用以審查奈米產品的功能性及安全性。

2. 奈米食品的安全性疑慮與評估

奈米食品依照美國國際生命科學研究院(International life science institute, ILSI)的規定，所使用之食材原料必須符合人類長期食用的原則，且證明有易於人體健康，並含豐富營養素，對人體不產生毒害等(劉等，2005)。

食品經奈米化處理後使分子粒徑變小，食品成分吸收能夠明顯提高，因其可自由穿透細胞天然屏障，使得分子於體內代謝途徑異於平常，但奈米技術可能造成分子結構改變或性質變異等，可能導致生物體功能機制紊亂或引起生物毒性，有安全上之疑慮(孫等，2006)。

目前研究者普遍認為食品經奈米化後應被當作是新的物質，且其所包覆的材料應為高生物相容性的生物材料，每種奈米食品應分別進行毒性檢測評估(包括半致死量急性毒性、最大耐受劑量、與常規物質毒性比較等)，生理化學特性研究(體內消化-吸收-代謝-分佈-排泄等)，奈米顆粒對人體反應、體外細胞培養免疫反應測試等，另外也必須檢測奈米食品成分結構、作用機制與添加量等(Sweet and Strohm,2006)。

目前有研究指出可以利用一些相關化學修飾降低生物毒性，如：改變奈米微粒表面電荷、對奈米微粒功能基團做化學修飾或改變親水/疏水性等，來調控其生物毒理機制，以降低或是消除毒性。



(四) 奈米乳滴乳化液乳化原理及相關研究

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 (pressure drop)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十四。

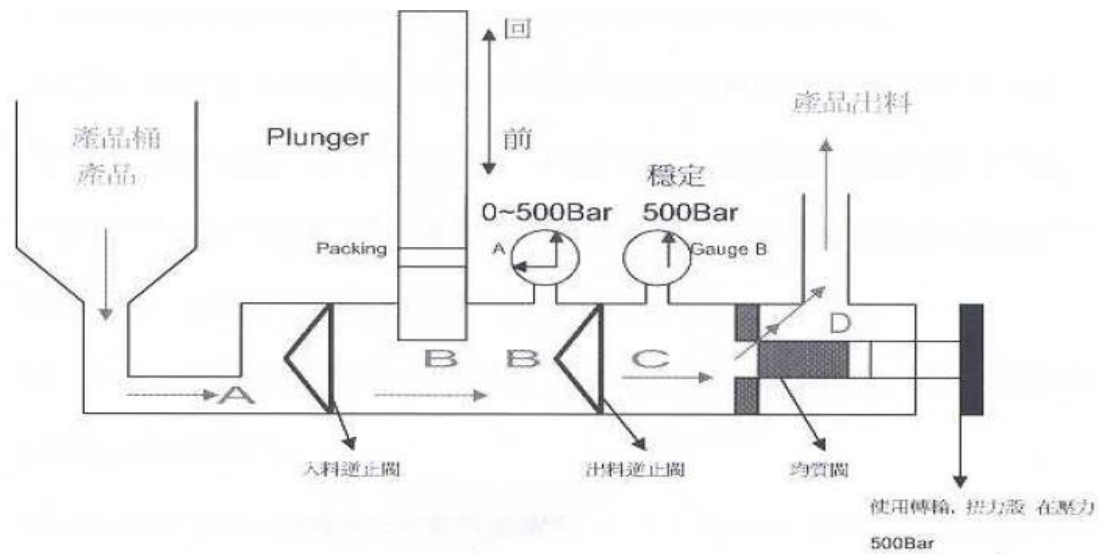
Floury等人(2000)使用高壓均質機將10及50% (油/水重量比)油量比例之乳化液，在150 MPa 壓力下進行乳化，因油和水相互之衝擊力、剪切力和氣穴等作用，使得乳化液滴變小，並能達到奈米級的乳化液滴，且可修飾乳化液之流變性質。

Jafar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) < IKA mixer (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。Jafar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

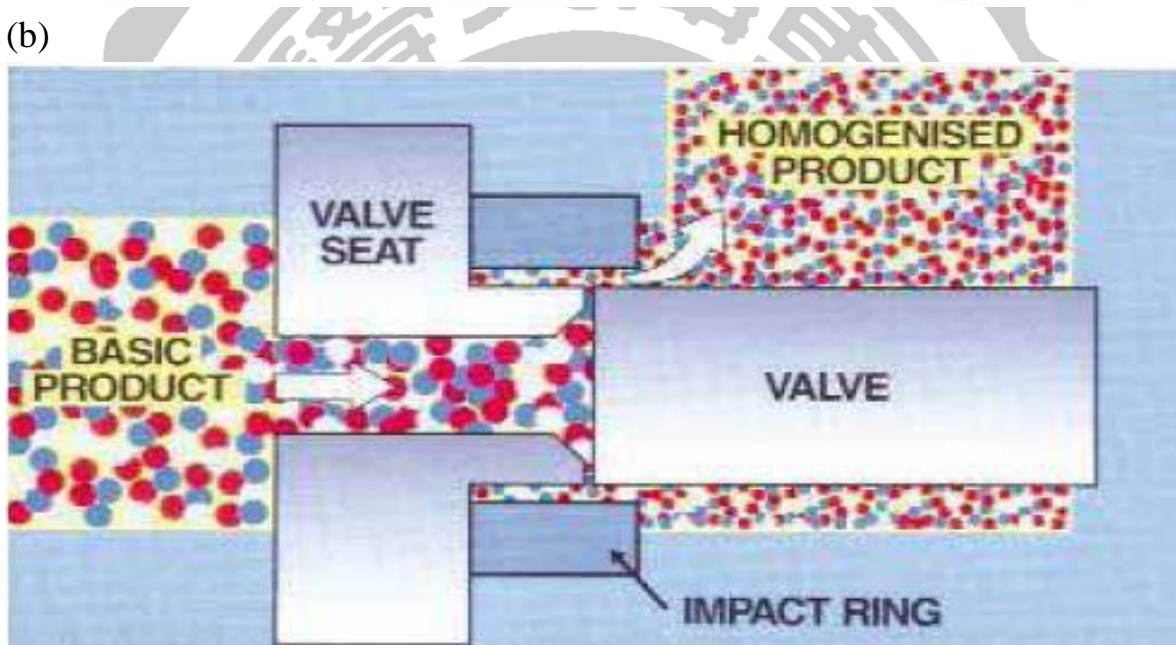
(IKA mixer或Silverson)和高壓處理(microfluidizer, 20MPa, 1 cycle)或超音波均質機(ultrasound, 24 kHz, 20 sec)將魚油、麥芽糊精(maltodextrin, 30%)及修飾澱粉(Hi-Cap)或乳清蛋白(WPC)進行乳化作用，再利用噴霧技術將乳化液進行微膠囊化，研究結果證實Microfluidizer(高壓均質機)乳化效率最佳且微膠囊包覆效果亦最好，即顆粒粒徑愈小，微膠囊效果愈好。



(a)



(b)



圖十四、均質機 (a)和均質閥(b)之構造。

Figure 14. The structure of high pressure homogenizer (a) and homogenize valve (b).(APV-Gaulin high pressure 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。

五、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 fatty acid, 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，見表六，故稱為必須脂肪酸(essential fatty acids)。

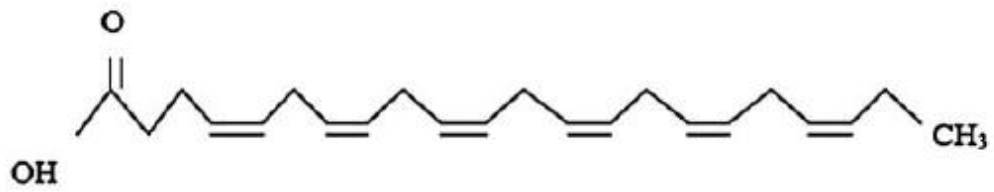
表六、必需脂肪酸和多元不飽和脂肪酸的主要食物來源

Table 6. Dietary sources of selected EFAs/PUFAs.

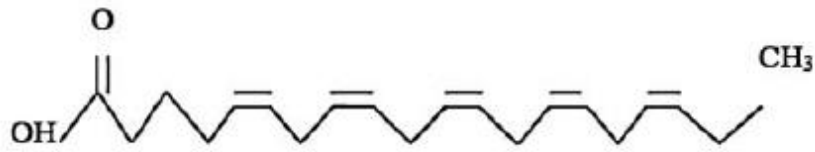
Product	LA	ALA	AA	EPA+DHA
<i>n</i> – 6 FA rich foods				
Corn oil	50000	900		
Cotton seed oil	47800	1000		
Peanut oil	23900			
Soybean oil	53400	7600		
Sunflower oil	60200	500		
Safflower oil	74000	470		
Margarine	17600	1900		
Lard	8600	1000	1070	
Chicken egg	3800	220		
Bacon	6080	250	250	
Ham	2480	160	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>				

(一) 次亞麻油酸簡介

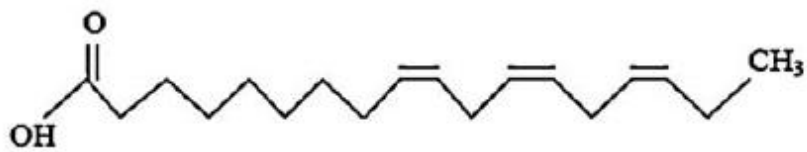
由 18 個碳原子所構成且具有 3 個雙鍵($18:3\Delta^{9c,12c,15c}$)，為 ω -3 脂肪酸，亞麻籽油、大麻籽油及大豆油為其主要來源，亦存在於海洋魚類中。攝取次亞麻油酸的優點為：(1)預防老人失智、預防阿茲海默症 (2)降低膽固醇、防止心血管疾病，如：預防心律不整、抗血栓、減緩動脈粥狀硬化 (3)藉由與細胞膜之嵌合，進一步穩定細胞膜及減少發炎介質生成，有效延緩發炎反應。當缺乏次亞麻油酸時，會出現皮膚炎等症狀，研究指出， ω -3 脂肪酸是維持神經發展及視覺功能的重要物質，因此確定次亞麻油酸對人體的重要性。Omega-3 不飽和脂肪酸有三種主要的脂肪酸：富含於植物的次亞麻油酸以及大量存在海洋生物的 eicosa pentaenoic acid (EPA) 和 docosahexaenoic acid (DHA)，參見圖十五。其中與次亞麻油酸同族之二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic 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)。



Docosahexaenoic Acid (DHA) – 22:6n-3



Eicosapentaenoic Acid (EPA) – 20:5n-3



Alpha-Linolenic Acid (ALA) – 18:3n-3

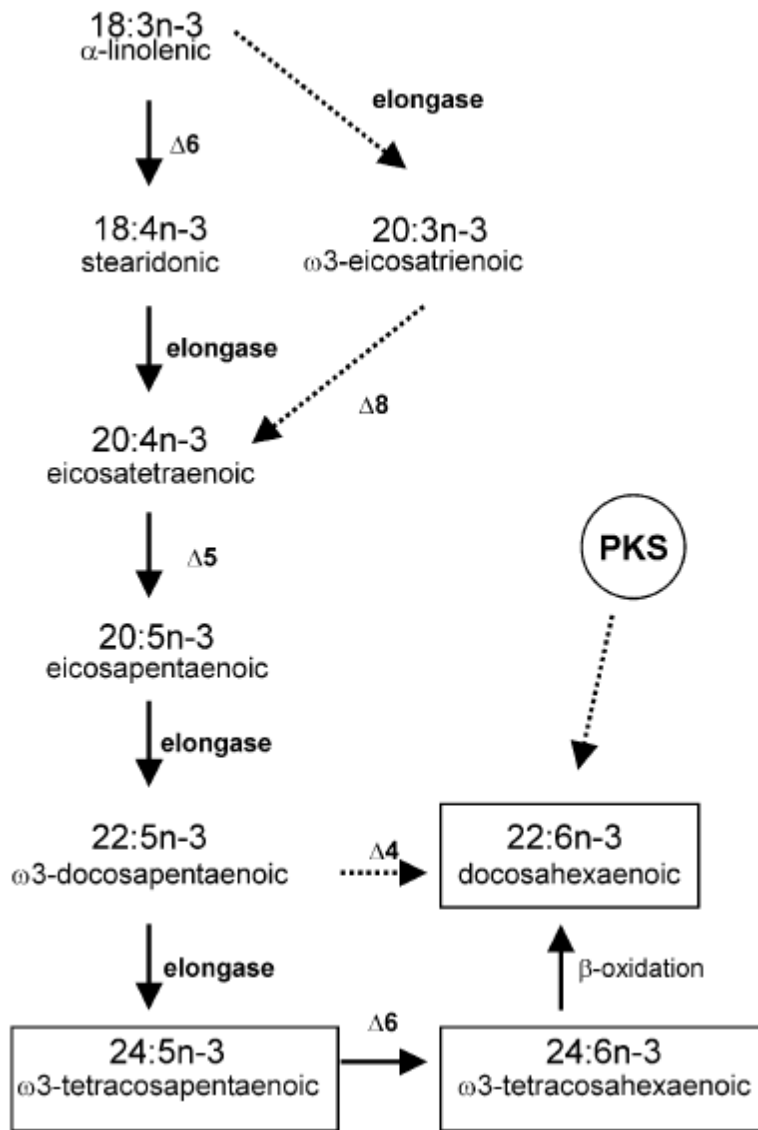
圖十五.Omega-3 不飽和脂肪酸之結構

Fig.15. 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 -6 PUFA，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)，人體轉換系統如圖十六。 ω -3 PUFA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(blood retina barrier)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。

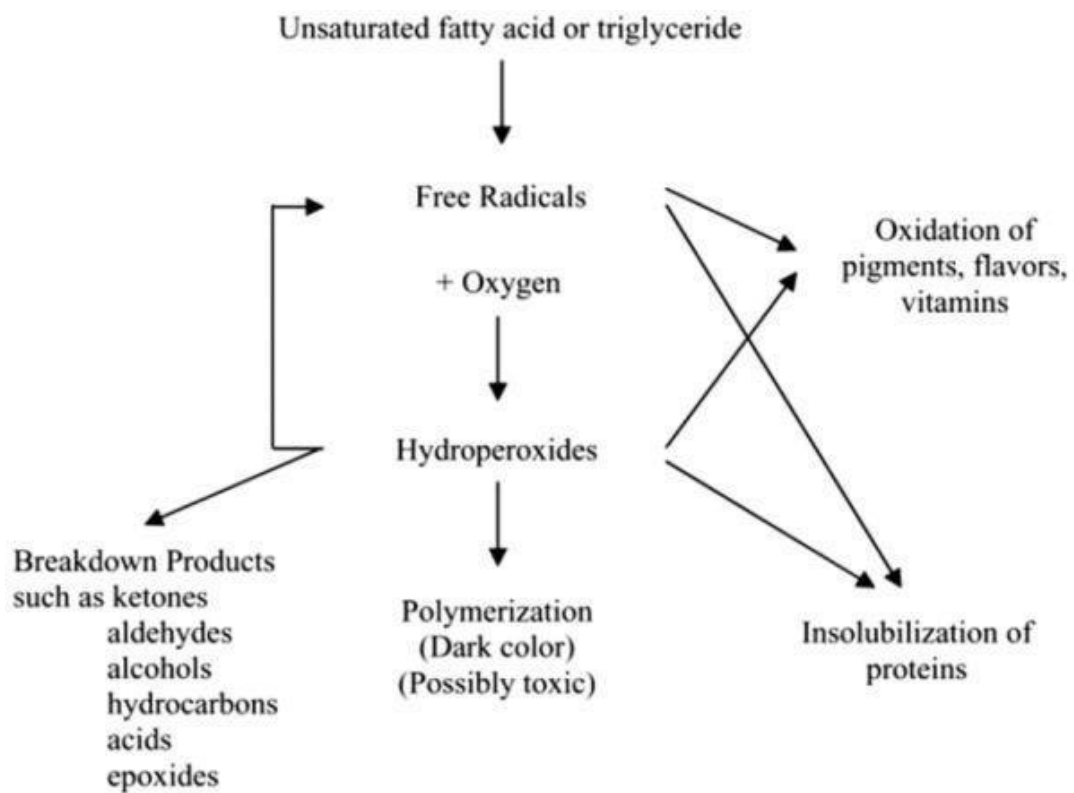


圖十六、高度多元不飽和脂肪酸之合成路徑

Fig 16. 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，如圖十七，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pH 6之魚油粉末其氧化穩定比pH 4.9之魚油粉末好，可得之pH 6之魚油粉末包覆性比pH 4.9好且經chitosan-OA-starch包覆之魚油有助於減緩魚油氧化速度 (Shen et al., 2010)。



圖十七、不飽和脂肪酸的氧化機制

Fig.17. Oxidative mechanisms of unsaturated fatty acid.



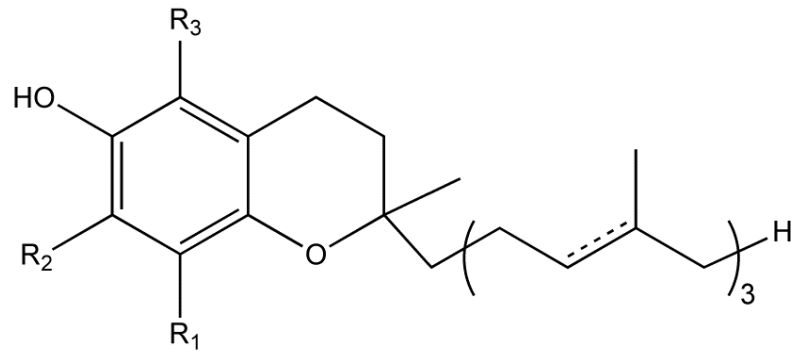
六、維生素 E (Vitamin E, Vit. E)

(一) Vitamin E 簡介

維生素E為動物體必需脂溶性維生素之一，為脂溶性化合物，其為淡黃色透明黏稠油狀物，不溶於水但溶於乙醇、氯仿或丙酮，在無氧的環境下對酸、鹼或熱非常穩定，在有光、熱、不飽和脂肪酸或金屬離子時變得不穩定且容易被周圍的氧氣所氧化。許多研究多注重維生素E抗氧化的功能，其為自然界抗氧化劑的重要一員，其能防止脂肪化合物、維他命A及維他命C的氧化，並且可以加強維他命A的活性，也具有延緩細胞氧化，進而減緩細胞老化。

(二) Vitamin E 結構

維生素 E 是具有生理活性的脂溶性化合物，其構造包含 chromanol ring 和三個 isoprenoid unit 所組成的 phytyl chain。大致可以分為生育醇 (tocopherol, TOH) 和生育三烯醇 (tocotrienol) 兩類，兩者之間最大的差異在 phytyl side chain 的結構不同，tocopherol 具有飽和的 phytyl side chain，而 tocotrienol 的 phytyl side chain 則具有三個雙鍵。此外，依 chromanol ring 上 5,7,8 上甲基的有無，可細分為 α 、 β 、 γ 、 δ 四種類型，所以 Vit.E 總共有八種異構化合物 (isoforms)，見圖十八，其中以 α -的生物活性最高。



α -tocopherol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$
 α -tocotrienol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$

γ -tocopherol, $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{H}$
 γ -tocotrienol, $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$ $R_3 = \text{H}$

β -tocopherol, $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$
 β -tocotrienol, $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$

δ -tocopherol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$
 δ -tocotrienol, $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

圖十八、Vitamin E 之八種異構體

Fig.18. Eight vitamers of vitamin E(Lester Packer,1992)

(三) Vitamin E 之體內吸收

維生素E為脂溶性維生素，故在生物體內需靠特殊的運輸系統運輸(transport system)，吸收途徑與脂肪大致相同，維生素E會先與食物中的脂溶性物質互溶，經脂解(lipolysis)及乳化作用(emulsification)複合成微膠粒，在小腸黏膜細胞外以被動擴散運輸之方式吸收，進入小腸黏膜細胞內後，會形成乳糜微粒，經由外胞飲作用釋放到淋巴系統，再經由胸導管進入血液系統(陳，2002)。維生素E大約70%在肝臟中與葡萄糖醛酸結合，隨膽汁進入腸道，再經糞便排出，故其在人體中吸收率不高，吸收率大概為15~45% (何，2004)。

(四) Vitamin E 的抗氧化功能

Vitamin E 被認為是重要的天然抗氧化劑，廣泛應用於食品、化妝品和乳液中(Constantinides et al,2006)。其因具有清除自由基(free radicals)的能力可以與脂質共存，避免不飽和脂肪酸的氧化，也可保護細胞膜的抗氧化作用。體內細胞和組織在行使許多生化功能的過程中易產生自由基，例如粒線體和內質網中的電子傳遞系統產生大量的自由基(Anderson et al., 1987)，需要 Vit.E 的保護避免組織受傷而影響生理功能。相對當不飽和脂肪攝取量增多時，對維生素 E 所需的量也隨之增多。Vit.E 可以中和過氧化自由基 (ROO·)，使之變成 ROOH，Vit.E 則變成二價體生育醇(tocopherol dimers)或是對苯三酮(quinone)，結束 ROO· 的自由基連鎖反應，有效地抑制脂類過氧化作用，亦能保護膜磷脂中的不飽和脂肪酸，穩定細胞膜結構，維持膜的正常功能(Lester Packer,1992)。由前人研究結果，Vit.E 在許多體內或體外實驗，被認為可以廣泛對抗體內產生的氧化傷害，對動物細胞有不同程度的保護作用(McCay et al., 1985)。

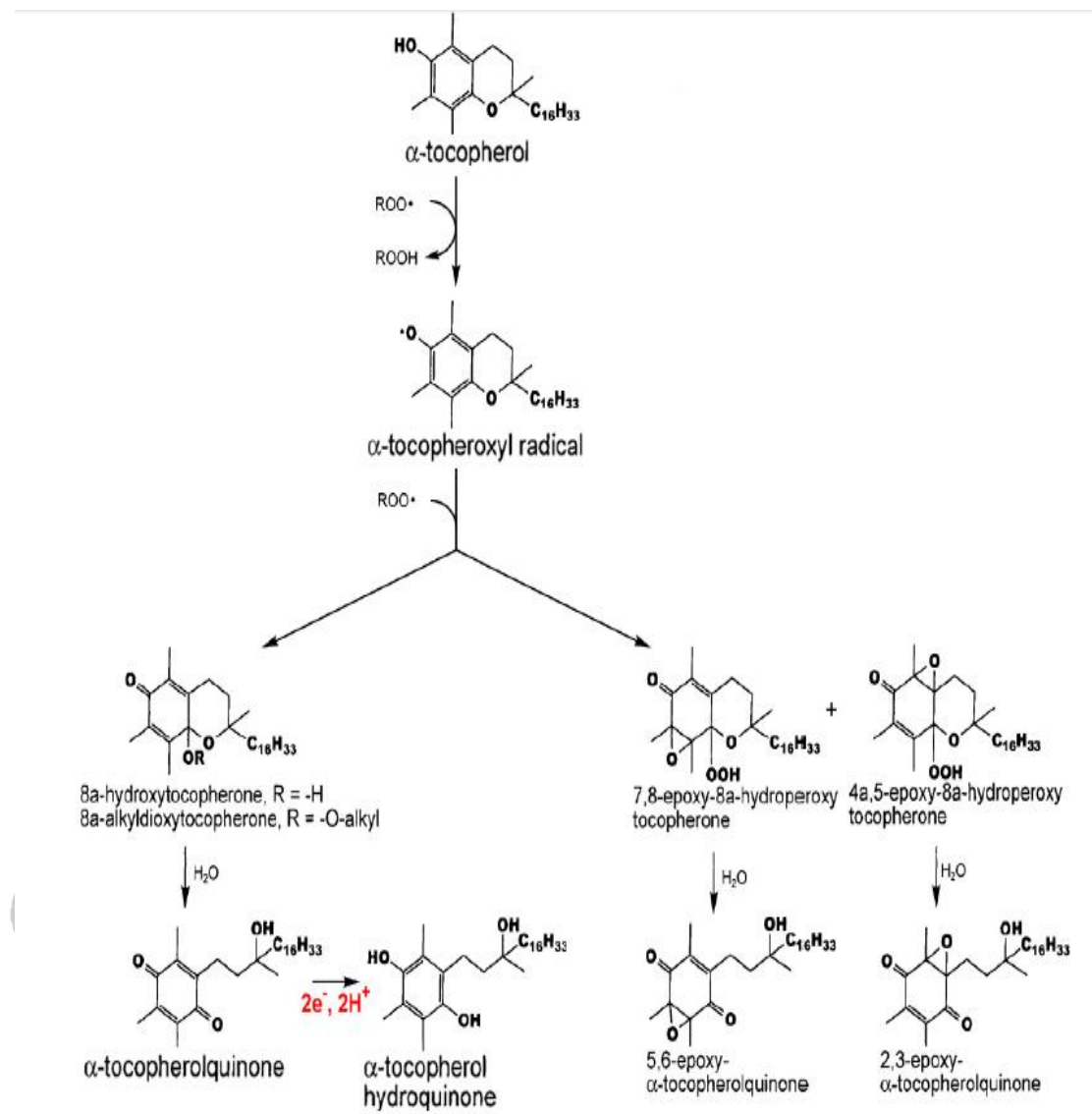
(五) Vitamin E 的抗氧化代謝與肝中代謝物

由於 Vit. E 具有較佳抗氧化的功能，已知 α -tocopherol(TOH)其抗氧化功能的過程：



第一個反應式中的 $\text{ROO}\cdot$ 為導致 TOH 氧化的自由基，與之產生反應過，TOH 會先被氧化成穩定的代謝物 α -tocopheroxyl radical ($\text{TO}\cdot$)，此反應式可逆的。不過一但 α -tocopheroxyl radical 再與其他的自由基反應，便會氧化反應生成其他的代謝物。有關於 Vit. E 與自由基反應代謝途徑和產物，可見圖十九。





圖十九、Vitamin E 與自由基反應時之代謝途徑及產物結構

Fig.19. α -Tocopherol and its oxidation products in peroxy radical scavenging reaction.(Liebler et al., 1996)

由以上文獻結果可知，次亞麻油酸不僅營養豐富，也對特定疾病有治療效果，是對人體相當有益的油脂，維生素E又有良好的抗氧化力，能保護不飽和脂肪酸的氧化，故本實驗選用次亞麻油酸作為樣品油脂，以幾丁聚醣或幾丁聚醣及卵磷脂作為乳化劑，透過高壓均質機製備次亞麻油酸-維生素E奈米乳滴乳化液，探討乳化液之性質。



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。

維生素E (vitamin e): 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(sodium hydroxide): 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, 17 N): 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, 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:

鐵粉(iron reduced, AR): Ferak Berlin GmbH, 德國。

30%過氧化氫溶液(hydrogen peroxide): 昭和化學株式會社, 日本。

三氯甲烷(chloroform): J.T.Baker, 美國。

硫氰酸胺(ammoniumthiocyanat): Merck, 德國。

甲醇(methyl alcohol, HPLC級): Mallinckrodt Chemical, 美國。

氯化亞鐵(ferrous chloride tetrahydrate, 試藥級): J.T.Baker, 美國。

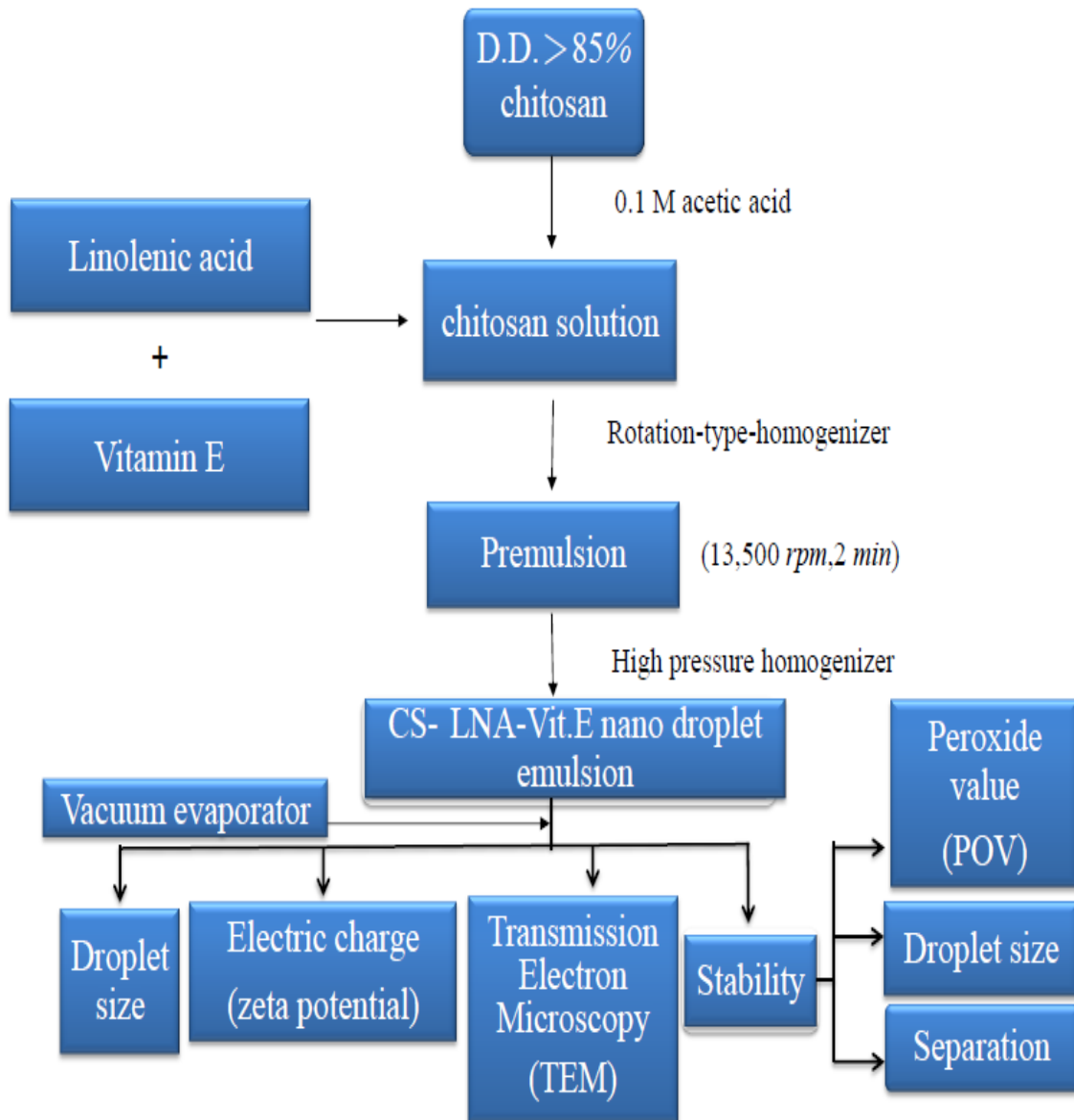
鹽酸(hydrochloric acid): 聯工化學廠股份有限公司, 台灣。

二、實驗儀器

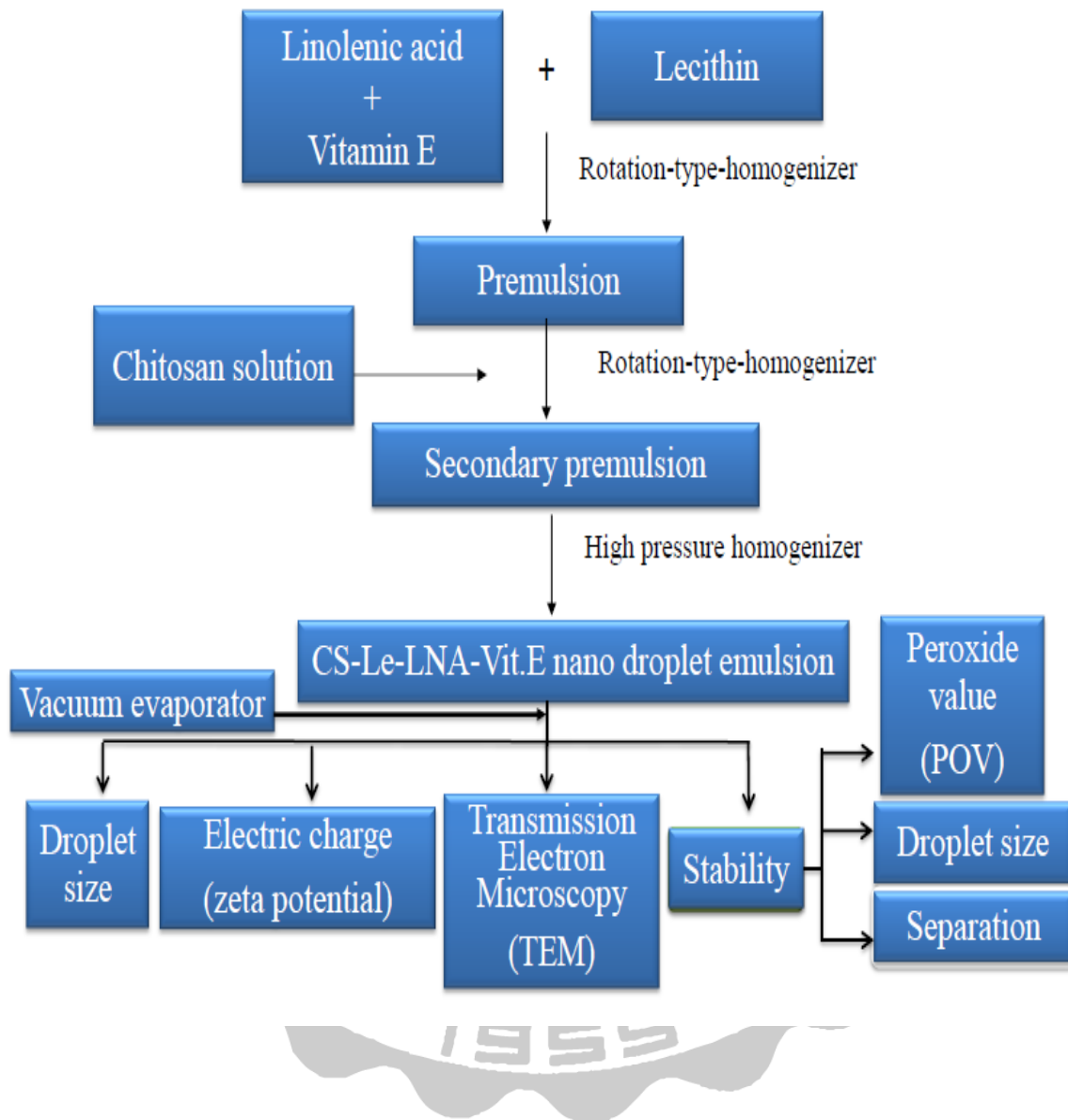
1. 磨粉機：1hp型，群策電機工業股份有限公司，台灣。
2. 旋轉式均質機：T25 basic IKA Labortechnik, IKA 公司，德國。
3. 電磁式過篩機:OCTAGON DIDITAL 2000型，Endecotts公司,英國。
4. 分析篩網：Tyler 標準規格篩網，Endecotts 公司，英國。
5. pH meter：SP701型，Suntex 公司，台灣。
6. 黏度計：DV-II+型，Brookfield 公司，美國。
7. 高壓均質機 (high pressure homogenizer)：APV-2000型，APV SPX 公司，德國。
8. 雷射奈米粒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
11. 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope)：JEM 1400 型，JEOL 公司，日本。

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-次亞麻油酸-維生素E奈米乳滴乳化液試驗 (CS-LNA-Vit. E 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-次亞麻油酸-維生素E奈米乳滴乳化液
(CS-Le-LNA-Vit. E nano droplet emulsion)試驗



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40~60 mesh之幾丁質粉末，加入57% (w/v) NaOH溶液(g chitin /20 mL NaOH)中，於 $104 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 $\geq 85\%$ 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)-維生素E(vitamin e, Vit. E)奈米乳滴乳化液之試驗

1. CS-LNA-Vit. E初乳化液之製備

取 $\geq 85\%$ 之0.5g chitosan溶於100mL 0.1M酸溶液製成0.5%(w/v) chitosan solution，並使用 0.1 N CH_3COOH 或0.1 N NaOH調整pH值至6.0。將LNA-Vit. E(200:1)溶於20mL正己烷製備成1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25、2500:12.5 mg 之油相溶液，之後使用旋轉式均質機於冰浴上均質 (13,500 rpm, 2 min)，同時個別加入20mL LNA-Vit. E (1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25、2500:12.5 mg)於100 mL chitosan solution，進行初乳化，製成五種不同比例油量/幾丁聚醣溶液之初乳化液。

2. CS-LNA-Vit. E奈米乳滴乳化液之製備及LNA-Vit. E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

將製得之五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℃，製得之奈米乳滴乳化液後，以減壓濃縮除去正己烷CS-LNA-Vit. E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-Vit. E奈米乳滴乳化液之安定性試驗

在上述五種油量中個別選擇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-Vit. E 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。

五種奈米乳滴乳化液製備條件如下：

1000: 5 mg (1500 bar, 10 passes) CS-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

1500: 7.5 mg (1500 bar, 10 passes) CS-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

2000: 10 mg (1000 bar, 10 passes) CS-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

2250: 11.25 mg (1500 bar, 10 passes) CS-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

2500: 12.5 mg (1500 bar, 9 passes) CS-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

(a) 油水分離安定性試驗

各取乳化液40 mL於塑膠離心管中，置於25℃下儲存28天觀察其油水分離情形。

(b) 乳化液滴大小之變化試驗

將上述五種乳化液置於25℃保存28天，並每隔四天測其粒徑大小。

(c) 過氧化價POV 試驗

取CS-LNA-Vit. E奈米乳滴乳化液於塑膠離心管，置於50℃烘箱中儲存9天，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)-維生素E(Vit. E)奈米乳滴乳
化液之試驗

1. CS-Le-LNA-Vit. E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-Vit. E (1000:5、1500:7.5、
2000:10、2250:11.25、2500:12.5 w/w,mg) 之重量比例分別與 0.25、0.375、
0.5、0.562、0.625 mg 卵磷脂(lecithin)溶少許正己烷作混合，再加入 0.1 M
醋酸溶液 50 mL，先以旋轉式均質機將上述 5 種油量的Le-LNA-Vit. E
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5種不同
油量之 CS- Le-LNA-Vit. E初乳化液。

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

將上述 5 種 CS-Le-LNA-Vit. E 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，即製出較小乳滴者，於5℃ 下進
行高壓乳化，製成奈米乳化液，經減壓濃縮去除正己烷後，測定其乳
滴粒徑與表面電位。

五種奈米乳滴乳化液製備條件如下：

1000:5 mg (1500 bar, 10 passes) CS-Le- LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

1500:7.5 mg 1500 bar, 10 passes) CS-Le- LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

2000:10 mg (1000 bar, 10 passes) CS-Le- LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

2250:11.25 mg (1500 bar, 10 passes) CS-Le-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

2500:12.5 mg (1500 bar, 9 passes) CS-Le- LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液

3. CS-Le-LNA-Vit. E奈米乳滴乳化液之安定性試驗

將上述 5 種油量(1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25、2500:12.5 mg)之CS-Le-LNA-Vit. E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

取上述乳化液於塑膠離心管中，置於25℃下儲存28天，並觀察其油水分離情形。

(b) 乳化液滴大小之變化試驗

將上述乳化液置於25℃保存28天並每隔四天測其粒徑大小。

(c) 過氧化價POV試驗

取上述之乳化液於塑膠離心管中置於50℃烘箱中儲存9天，並每天取樣測定其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 sulfite solution(P.V.S.K)進行滴定，滴定时需邊滴邊搖晃錐形瓶，當滴定至溶液由藍色變成紅紫色時，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-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E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International IDF Standards(1991)及陳 (2005)之方法修飾進行過氧化價 POV氧化試驗。該方法原理為油脂在前期氧化反應產生之初級氧化產物--氫過氧化物，此物質可在酸性條件下將 Fe^{2+} 氧化成 Fe^{3+} ， Fe^{3+} 再與硫氰酸鹽反應生成紅色的硫氰酸鐵複合物，採用分光光度法進行比色定量。即各取 1.2 mL之乳化液於 15 mL 塑膠離心管中置於 50°C 烘箱中儲存 0~9 天，每天取100 μ L 乳化液，加入 0.1 mL 30%硫氰酸胺溶液以及 0.1 mL 0.02 M 氯化亞鐵溶液，再加入 4.7 mL 氯仿/甲醇(7:3,v/v) 混合溶液，震盪使其混合均勻，隨即靜置 5 min，以分光光度計測其 500 nm吸光值；依文獻上之標準品配置方法檢測標準品於 500 nm下之吸光值繪製標準曲線並計算標準曲線斜率(見附圖一)，依下面公式算出樣品之 POV氧化值。空白試驗為將 100 μ L 乳化液替換成 100 μ L 0.1 M 醋酸溶液，以上述實驗方法進行空白試驗。另外配製未包覆 CS 及CS-Le 之樣品，秤取與乳化液中 LNA-Vit.E同重量之脂肪酸放入 tube 中，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-Vit.E對POV氧化試驗之影響。

$$POV = \frac{(A - A_0) \times m}{55.84 \times m_0 \times 2}$$

A = 樣品吸光值 A₀ = blank 吸光值
m = 標準曲線斜率
m₀ = 油脂重

(四) 穿透式電子顯微鏡 (transmission electron microscope, TEM)之照相觀察

本研究奈米乳滴乳化液之型態於台灣大學之貴儀中心以穿透式電子顯微鏡(TEM)進行拍攝觀察，依化學系 陳俊顯博士及技術員簡佳盈 小姐所教之方法進行樣品製備。

將CS-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E乳化液取一小滴滴於parafilm 上，再放入有支持膜且表層鍍有碳膜之銅網，附著時間持續10秒鐘，時間終止使用鑷子輕夾銅網邊緣至濾紙上吸取銅網表面多餘液體，再加入負染劑磷鎢酸(Phosphotungstic acid,PTA)進行負染色，時間持續 5~10 秒，時間一到即輕夾邊緣放上濾紙吸取多餘染劑，再夾入盒中並放置防潮櫃5 min以上，待銅網表面完全乾燥時即可進行TEM觀察。

(五) 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 10.0(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, acetyl group) 被脫去，進而使胺基 (-NH₂, amino group) 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 $104\pm 2^\circ\text{C}$ 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(polyocations)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(Hung 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0.1M 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)-維生素E(vitamin E, Vit. E)奈米乳滴乳化液之特性(CS-LNA-Vit. E nano droplet emulsion)

(一) 均質壓力(homogenizing pressure)、LNA-Vit. E濃度及均質循環次數(homogenizing cycle number)對(CS-LNA-Vit. E) 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 0.1 M 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pH 6.0，慢慢加入次亞麻油酸和維生素E至幾丁聚醣溶液，其(LNA:Vit. E)比例分別為 1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5mg / 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

圖二十表示均質壓力對乳化液液滴大小之影響。整體而言，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。但在 2250:11.25及 2500:12.5 mg LNA-Vit. E 油量較高時，增加均質壓力能使液滴粒徑下降之程度有限。

Floury等人(2000)研究以乳化劑為蛋白質，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。但在300 MPa 壓力下，乳滴粒徑並無繼續下降。與本研究2250:11.25及2500:12.5 mg LNA-Vit. E者之結果相似。

(2) LNA-Vit. E油量之影響

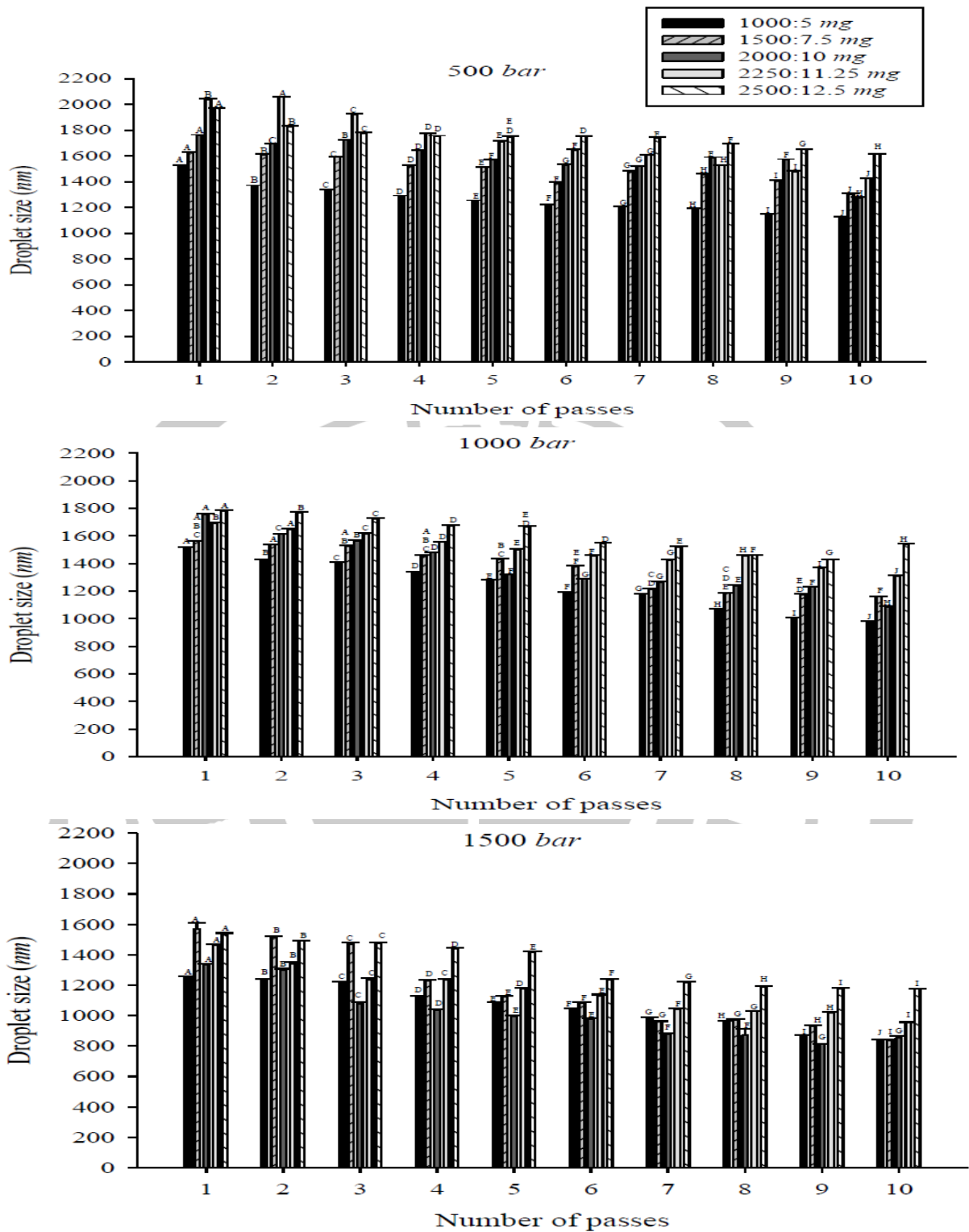
由圖二十亦可看出次亞麻油酸-維生素E(LNA-Vit. E)油量對乳化液液滴大小之影響。結果發現，以於第一次乳化循環次數為例，LNA-Vit.E油量越低(1000:5~2000:10 mg)之CS-LNA-Vit. E乳化液需要較高均質壓力(1500 bar)才能使液滴粒徑大幅下降，此時因乳化液較稀而能形成的液滴相對較少，在均質時液滴與液滴間彼此碰撞機會較少使粒徑無法進一步降低。在高油量(2250:11.25及2500:12.5 mg)之CS-LNA-Vit. E乳化液則在較小均質壓力下即可降低粒徑，可能由於乳化液中之乳滴數量較多，乳滴間互相碰撞機會亦增加，使得乳滴隨之變小。特別的是，高油量之CS-LNA-Vit. E 乳化液在高壓力下於一定乳化循環次數後，則粒徑不減反增之情形。比如，油量為2500:12.5 mg 之CS-LNA- Vit. E 乳化液，在均質壓力為1000 bar下均質八次循環後，乳滴粒徑隨均質次數增加而變大，其可能原因為兩點：第一點，乳滴數量增加太密集，均質時乳滴相互碰撞受阻礙，乳滴會聚集，故其乳滴增大；第二點，因幾丁聚醣包覆較多油脂，故液滴粒徑增加。

文獻指出，Floury等人(2000)研究以高壓均質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，油量比例較高情況下，以高壓均質乳化，其乳滴均增大與本實驗有類似之結果。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，但增加至10%反而有變大現象。本研究僅於2000:10 mg 油量，均質壓力在1000及1500 bar時，會產生油量增加但乳滴粒徑減小之結果。

(3) 乳化循環次數之因素

由圖二十可看出，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。1000:5、1500:7.5、2000:10及2250:11.25 mg 油量之CS-LNA-Vit. E乳化液，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，2500:12.5 mg LNA-Vit. E於1000及1500 bar下乳化，乳化液滴在一定循環次數 (1000 bar於8 *passes*以上，1500 bar於9 *passes*以上)後會使粒徑增加，此現象可能原因為高油量下進行高壓乳化，並超過一定循環次數後，使乳滴數量多且過於聚集，又因高油量乳化液滴表面電位較低(圖二十一)，無法提供充分的靜電斥力使液滴分散而造成粒徑上升。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。Schulz (2000)以羥丙基甲基纖維(hydroxypropylmethylcellulose)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。

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。



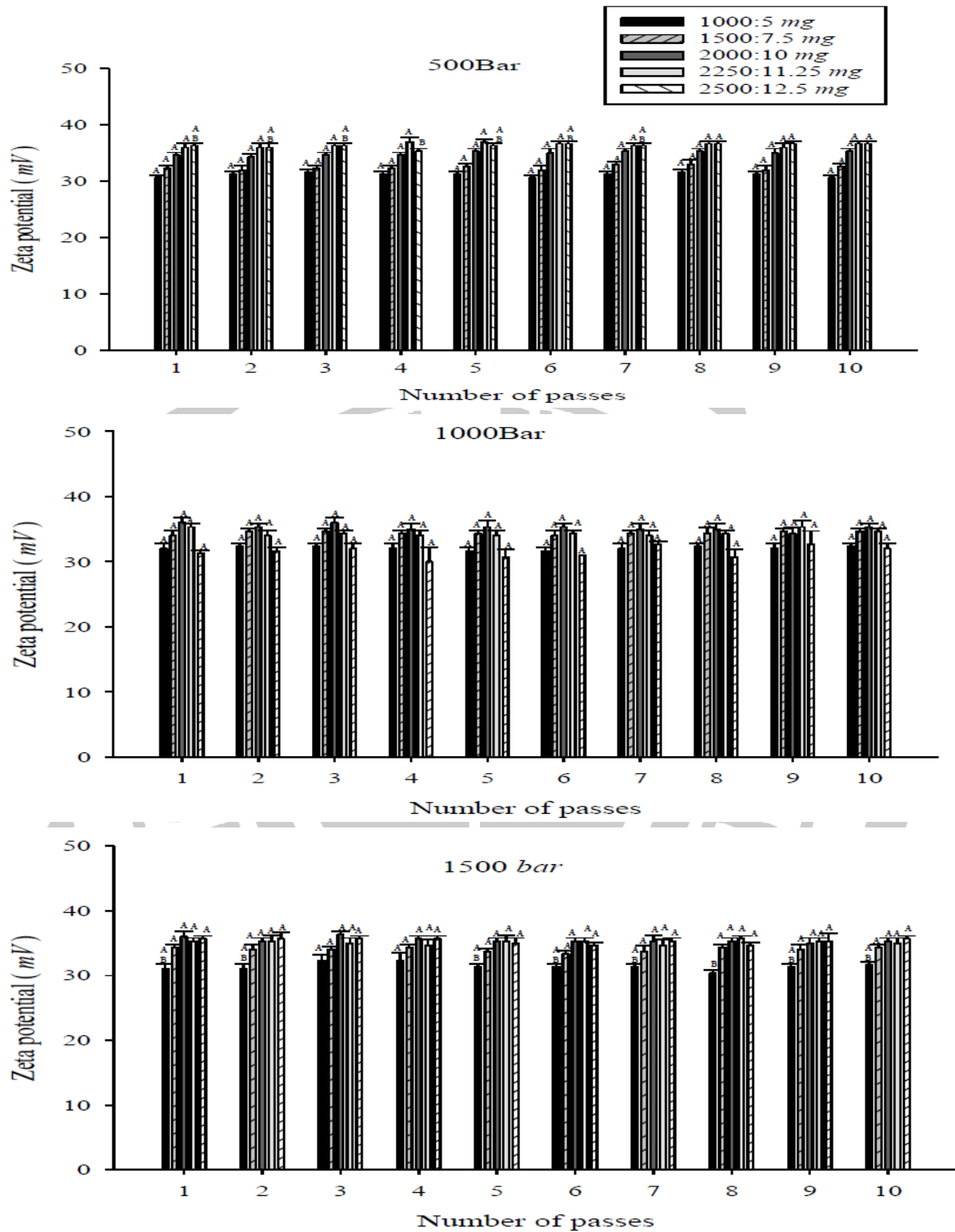
圖二十、乳化壓力、LNA-Vit. E油量及乳化循環次對乳化液滴大小之影響。

Fig. 20. Effect of homogenizing pressure and LNA-Vit. E concentration and pass number on the droplet size of CS-LNA-Vit. E emulsions. A-J mean with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

2. 乳化液乳滴之表面電位

由圖二十一可看出乳化壓力、LNA-Vit. E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 LNA-Vit. E油量越高則使乳化液滴表面電位上升。對1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5 mg LNA-Vit. E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+33~+36 mV間。而油量上升時液滴表面電位也隨之上升。值得注意的是，在乳化壓力為1000 bar，在2500:12.5 mg LNA-Vit. E 油量在相同條件下乳化，其乳滴表面電位則降至約+5~+6mV 間，其可能因乳化循環次數增，使原本穩定之乳滴被破壞，而使乳滴表面電位減少。在1000:5 mg LNA-Vit. E油量時，其表面電位較低，均在+30~+32 mV 間，其原因可能為在低油量下乳化，油量較少乳化時油水碰撞機會較低，乳滴表面附著之帶正電幾丁聚醣較少，故測出之表面電位亦較低；也可能在此條件下製成之乳滴較大，乳滴間產生聚集現象，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。



圖二十一、乳化壓力、LNA-Vit. E油量及乳化循環次對乳化液滴表面電位之影響。

Fig. 21. Effect of homogenizing pressure, LNA-Vit. E concentration and pass number on the zeta potential of CS-LNA-Vit. E emulsions. A-J mean with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

(二) CS-LNA-Vit. E奈米乳滴乳化液之安定性

將五種油量之LNA-Vit. E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-Vit. E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。

*五種 CS-LNA-Vit. E乳化液之製備條件為:

- (1) 1000:5 mg LNA-Vit.E1500 bar, 10 passes (833.67 nm)
- (2) 1500:7.5 mg LNA-Vit.E1500 bar, 10 passes (837.2 nm)
- (3) 2000:10 mg LNA-Vit.E 1500 bar, 10 passes (853.3 nm)
- (4) 2250:11.25 mg LNA-Vit.E1500 bar, 10 passes (953.7 nm)
- (5) 2500:12.5 mg LNA-Vit.E 1500 bar, 9 passes (1176.4 nm)

1. 乳化液油水之分離情形

表七所示上述五種乳化液於25℃下儲存28天之油水分離情形。由表七得知，1000:5、1500:7.5及2000:10 mg CS- LNA-Vit. E之乳化液於保存28天內未分層，2250:11.25 mg LNA-Vit. E者在保存第20天出現油水分離，而2500:12.5 mg LNA-Vit. E者保存至12天時即有油水分離情形。由結果可以得知，當油量為2250:11.25及2500:12.5 mg CS-LNA-Vit. E乳化液可能因油量較高，經高壓均質製出的乳滴彼此較聚集，儲存時易接近結合成較大之乳滴而最終分層，降低存儲安定性。此外，另一可能原因為幾丁聚醣量不足以完整的包覆於2250:11.25及2500:12.5 mg LNA-Vit. E，或是能包覆在LNA-Vit. E外之幾丁聚糖膜較薄，於儲存期間容易破壞。

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之安定性。張研究之結果與本實驗結果稍有不同，主要原因在於油脂本身性質不同所影響，張使用精製大豆油與幾丁聚醣溶液進行乳化，而本實驗則將次亞麻油酸-維生素E溶於正己烷中才與幾丁聚醣溶液進行乳化，油本身性質不同故實驗結果亦有所不同。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℃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，此結果與本研究結果相似。

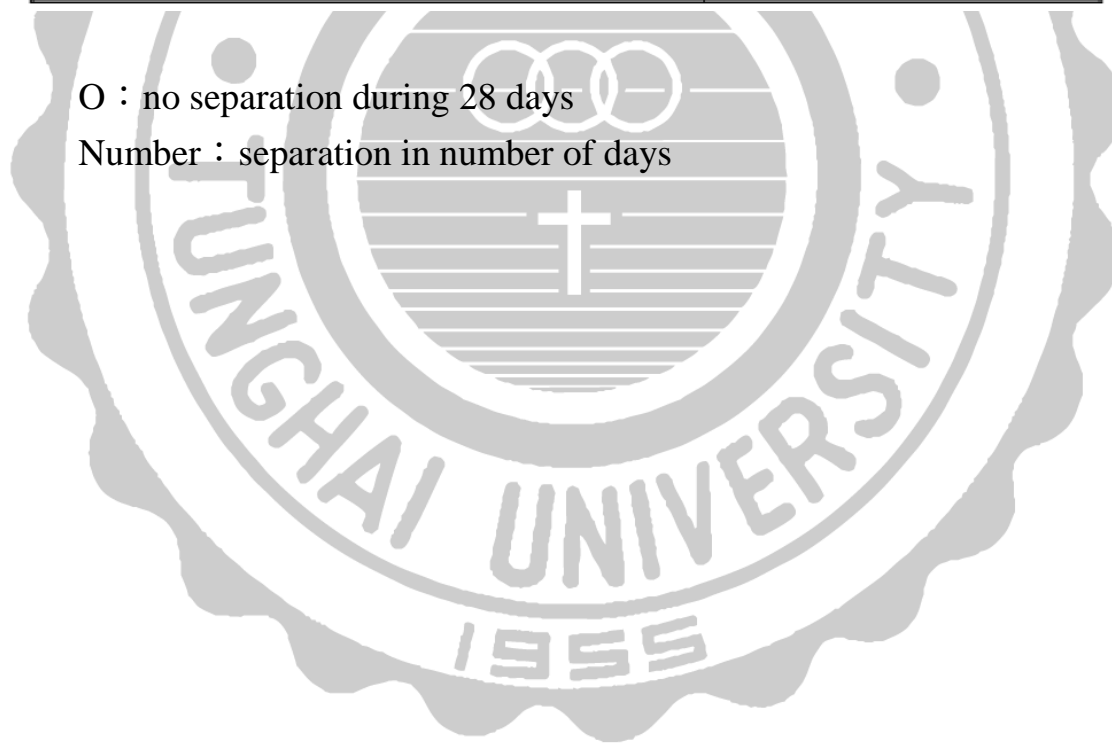
表七、CS-LNA-Vit. E 乳化液於 25°C下保存28天之分離情形。

Table 7. Separation of CS-LNA-Vit. E emulsion during 28 days storage at 25°C.

Conditions for emulsification	Separation time (<i>day</i>)
1000:5 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	0
1500:7.5 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	0
2000:10 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	0
2250:11.25 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 10 <i>passes</i>)	20
2500:12.5 <i>mg</i> (1500 <i>bar</i> , 9 <i>passes</i>)	12

O : no separation during 28 days

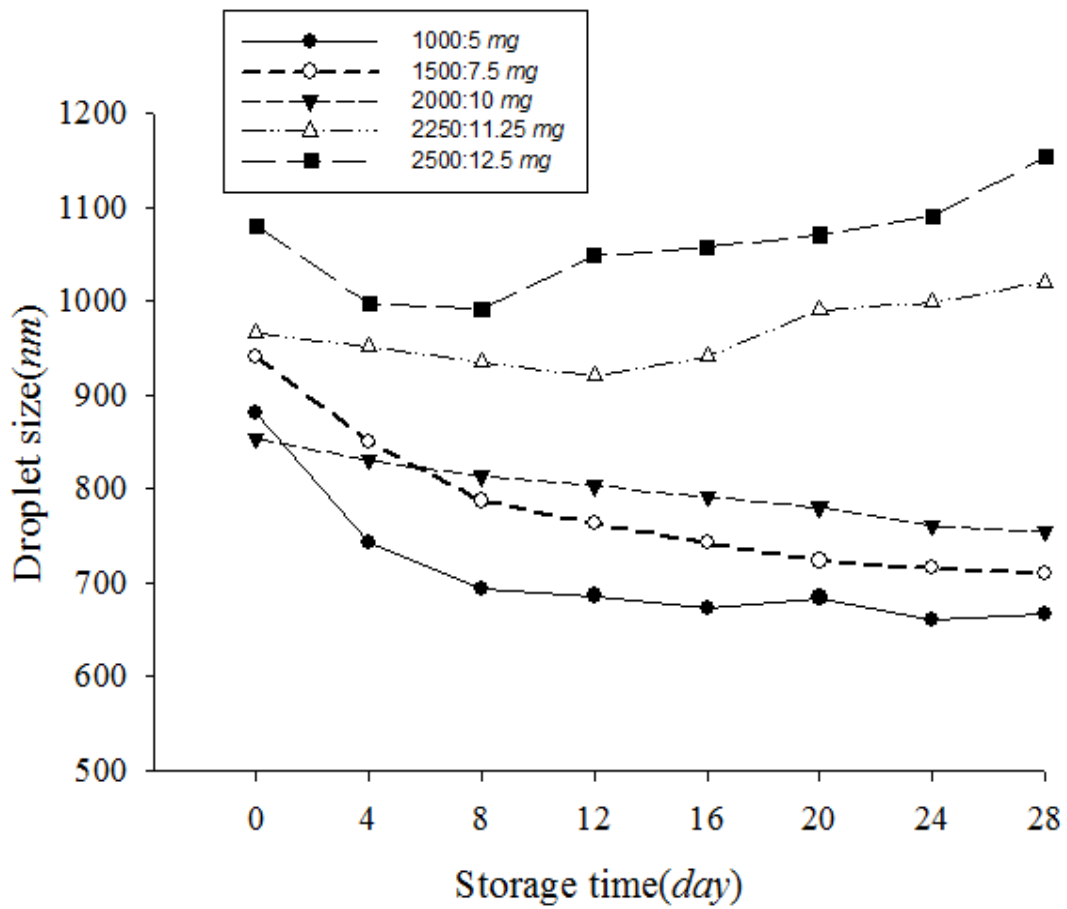
Number : separation in number of days



2. 乳化液乳滴大小之變化

將上述五種乳化液於25℃下儲存28天，每四天測一次粒徑，結果如圖二十二所示。可以發現1000:5、1500:7.5及2000:10 mg CS-LNA-Vit. E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。另外在2250:11.25及2500:12.5 mg CS-LNA-Vit. E乳化液，因高油量奈米乳滴較多且較密集，於保存時易靠近而結合為大乳滴，保存時分別在第12及20天粒徑些上升，產生油水分離現象。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，但在高油量時，其保存安定性並不理想，故之後本實驗以幾丁聚醣及卵磷脂合併為乳化劑以改善其安定性。

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，其保存安定性較不謹慎理想。



圖二十二、CS-LNA-Vit. E 乳化液於 25°C 下保存 28 天之乳滴粒徑變化。

Fig. 22. Change of emulsion droplet size of CS-LNA-Vit. E emulsion during 28 days storage at 25°C.

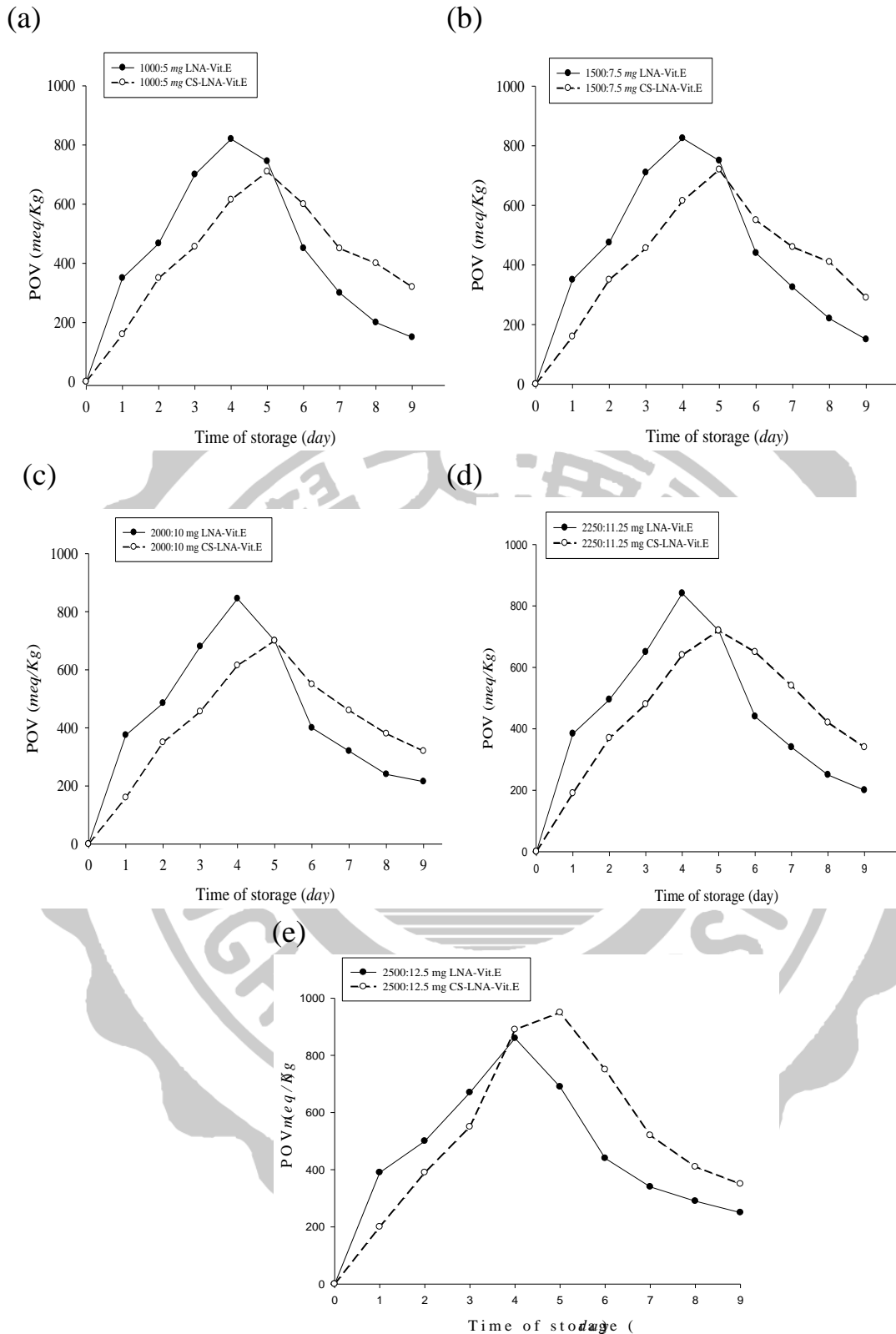
3. 乳化液於儲存期間過氧化價POV之變化

圖二十三所示，將上述五種不同油量之CS-LNA-Vit. E乳化液以及單純LNA-Vit. E於50°C保存期間(0~9天)其POV之變化情形做比較。圖二十三(a)~(d)為1000:5~2250:11.25 mg之純LNA-Vit. E及1000:5~2250:11.25 mg之CS-LNA-Vit. E乳化液，純LNA-Vit. E於第4天時POV達到最大值約820~860 meq/Kg 之間，而後這些樣品POV均開始下降，而CS-LNA-Vit. E乳化液則在第5天POV達最大值約710~725 meq/Kg，而後開始下降，可見以幾丁聚醣乳化油脂有減緩油脂氧化的效果。(e)為2500:12.5 mg之純LNA-Vit. E及2500:12.5 mg CS-LNA-Vit. E之乳化液，純LNA-Vit. E及在第4天時POV達到最大值約860 meq/Kg，而後POV開始下降，而CS-LNA-Vit. E乳化液則在第5天POV達最大值約950 meq/Kg，而後開始下降，可以發現，此時經過乳化之CS-LNA-Vit. E氧化程度反而高於未乳化純LNA-Vit. E，其原因可能為幾丁聚醣無法完整包覆避免油脂氧化，而使油脂暴露於空氣中，加速過氧化物的產生，可參見表七，在油量2500:12.5 mg CS-LNA-Vit. E之乳化液，保存至12天時即產生油水分離情形，乳化效果較不佳。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)~(e)後期測出之POV值下降現象是因過氧化物裂解所致。

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, 2min)製成單層膜之乳化液，然後將乳化液放在37°C下並測量其氫过氧化物的生成量，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。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。與本實驗不同的是，LNA-Vit.E油濃度較高時，因乳化效果不佳，幾丁聚醣無法充分避免氧化，且在高壓均質時，乳化液升溫且接觸大量空氣，故氧化更劇。由此可知，幾丁聚醣包覆於1000:5~2250:11.25 mg LNA-Vit. E表面時，可避免與氧氣直接接觸，進而降低油脂的氧化作用，故使用幾丁聚醣做乳化劑可在油滴表面形成

保護層並有助於減緩脂肪酸之氧化速度。但油脂量較高(2500:12.5 mg)時，則無法有效減緩油脂氧化，故後續以卵磷脂及幾丁聚醣共同為乳化劑將 LNA-Vit. E 乳化，並探討其乳化液之安定性是否有改善。





圖二十三、CS-LNA-Vit. E 乳化液及 LNA-Vit. E 之 POV 變化情形。
 Fig. 23. POV change of CS-LNA-Vit. E emulsions and pure LNA-Vit. E.
 (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-維生素 E(LNA-Vit. E)奈米乳滴乳化液(CS- LNA-Vit. E nano droplet 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-Vit.E乳化製成 CS-Le-LNA-Vit.E奈米乳滴乳化液並探討其性質。

將1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5 之LNA-Vit. E 分別與0.25,0.375,0.5,0.562及0.625 g卵磷脂(lecithin, Le)混合，加入50 mL 0.1M醋酸溶液後利用旋轉式均質機先將Le與LNA-Vit. E進行第一次初乳化(13,500 rpm, 2 min)，製得5種濃度之Le- LNA-Vit. E乳化液後，加入幾丁聚醣溶液(50 mL Le-LNA-VIT. E 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) 1000:5 mg LNA-Vit. E 1500 bar, 10 passes
- (2) 1500:7.5 mg LNA-Vit. E 1500 bar, 10 passes
- (3) 2000:10 mg LNA-Vit. E 1500 bar, 10 passes
- (4) 2250:11.25mg LNA-Vit. E 1500 bar, 10 passes
- (5) 2500:12.5mg LNA-Vit. E 1500 bar, 9 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-Vit. E油量對CS-Le-LNA-Vit. E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-Vit. E乳化液乳滴大小受LNA-Vit. E油量之影響及與CS-LNA-Vit. E乳化液乳滴大小之比較。LNA-Vit. E油量對CS-Le-LNA-Vit. E乳化液乳滴大小之影響方面，油量愈多則乳滴粒徑愈大(2000:10、2250:11.25、2500:12.5mg 粒徑大小分別為869.5、991.6及1136.9 nm)，此因為乳化劑中包覆較多油脂。CS-Le-LNA-Vit. E乳化液粒徑較相同油量CS-LNA-Vit. E為高，此可能由於添加兩種乳化劑(CS及Le)，且Le的使用量隨油量的增加而增加，因此包覆在油脂外的CS-Le膜較厚，故製備出粒徑較大之乳化液滴。此外，使用2500:12.5mg LNA-Vit. E之CS-Le-LNA-Vit. E乳化液滴粒徑為1136.9 nm，雖略為超出奈米範圍，但在儲存安定性試驗中粒徑下降至奈米乳滴範圍內(890nm)，見圖二十四。

Klinkesorn等人(2009)研究將金槍魚油先以帶負電乳化劑Tween 80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。但周(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，此與本實驗之結果不同，原因可能為本實驗添加乳化劑的量，隨著油量增加而增加，包覆在油脂外的CS-Le膜較厚，故製備出粒徑較大。

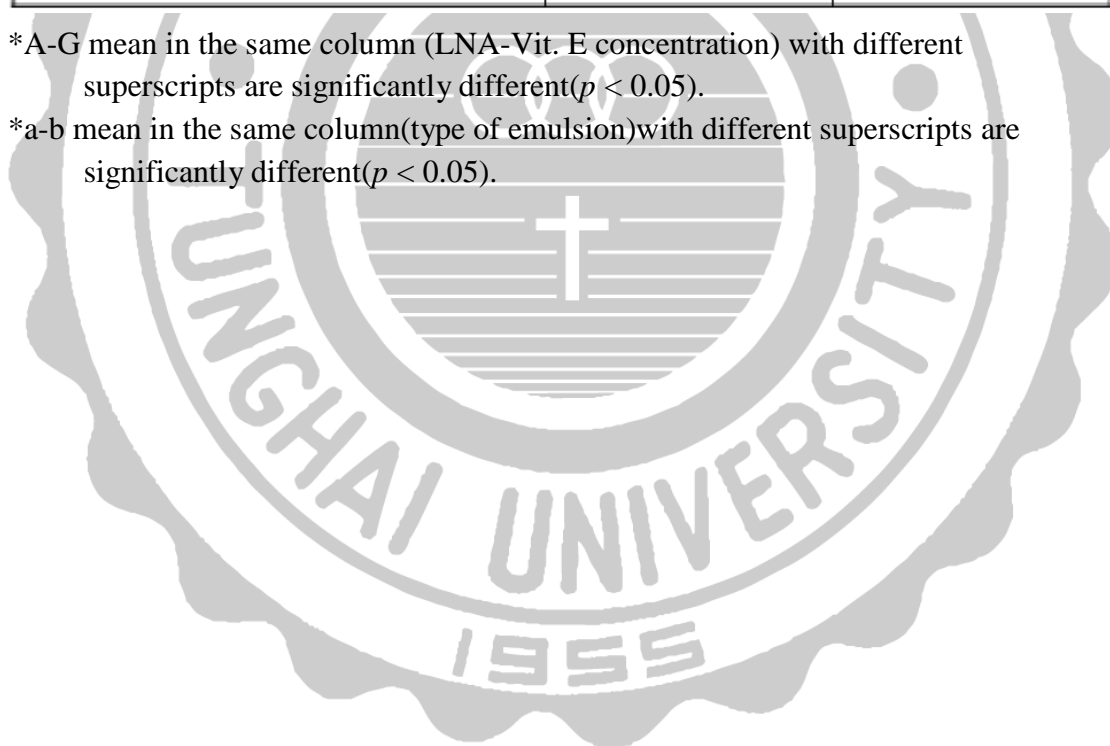


表八、CS-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E乳化液液滴粒徑之比較。
 Table 8. Comparison of droplet size between CS-LNA-Vit. E and CS-Le-LNA-Vit. E emulsions.

Conditions for emulsification	Emulsion type	
	CS-LNA-Vit.E	CS-Le-LNA-Vit.E
	droplet size (nm)	
1000:5 mg (1500 bar, 10 passes)	833.6±8.17 ^{Da}	798.3±5.26 ^{Ea}
1500:7.5 mg (1500 bar, 10 passes)	837.2 ±5.55 ^{Da}	817.6±4.27 ^{Da}
2000:10 mg (1500 bar, 10 passes)	853.3±7.76 ^{Cb}	869.5 ±2.96 ^{Ca}
2250:11.25 mg (1500 bar, 10 passes)	953.7±4.08 ^{Bb}	991.6 ±7.31 ^{Ba}
2500:12.5 mg (1500 bar, 9 passes)	1176.4 ±2.45 ^{Ab}	1136.9± 8.43 ^{Aa}

*A-G mean in the same column (LNA-Vit. E concentration) with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

*a-b mean in the same column (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-Vit. E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-Vit. E初乳化液，其表面電位約為-42~-42.7mV，由於lecithin離子化磷酸鹽基的ionized phosphate group帶負電之故，測定Le-LNA-Vit. E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+31~+35 mV。若併用CS及Le為2種乳化劑，則乳滴電位在+45~46 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。Gutipati等人(2010)將魚油與citrem (citric acid center of mone and dizlyceride)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-Vit. E及CS-Le- LNA-Vit. E乳化液表面電位之比較。

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

Conditions for emulsification	Emulsion type		
	Le-LNA-Vit.E	CS-LNA-Vit.E	CS-Le-LNA-Vit.E
	ζ potential(<i>mV</i>)		
1000:5 mg (1500 bar, 10 passes)	-42.0 ^A	+31.7 ^{Bb}	+46.7 ^{Aa}
1500:7.5 mg(1500 bar, 10 passes)	-42.4 ^A	+34.3 ^{Ab}	+45.3 ^{Aa}
2000:10mg (1500 bar, 10 passes)	-42.2 ^A	+35.4 ^{Ab}	+46.2 ^{Aa}
2250:11.25 mg(1500 bar, 10 passes)	-42.4 ^A	+35.0 ^{Ab}	+45.7 ^{Aa}
2500:12.5 mg (1500 bar, 9 passes)	-42.7 ^A	+35.7 ^{Ab}	+46.1 ^{Aa}

*A-B mean in the same column (LNA-Vit. E concentration) with different superscripts are significantly different($p < 0.05$).

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

(二) CS-Le-LNA-Vit. E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-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E乳化液在 25℃下保存28天，其油水分離之情形。由此表得知，若只以幾丁聚醣為乳化劑乳化為單層膜包覆乳滴，則油量為 1000:5、1500:7.5及2000:10 mg LNA-Vit. E之乳化液無分層產生，但油量為2250:11.25及2500:12.5 mg LNA-Vit. E之乳化液，分別在放置20及12天時出現油水分離現象。但若以Le和CS為合併乳化劑，則可延長兩種LNA-Vit. E油量乳化液至28天仍維持安定。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-Vit. E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，改善乳化液之安定性。

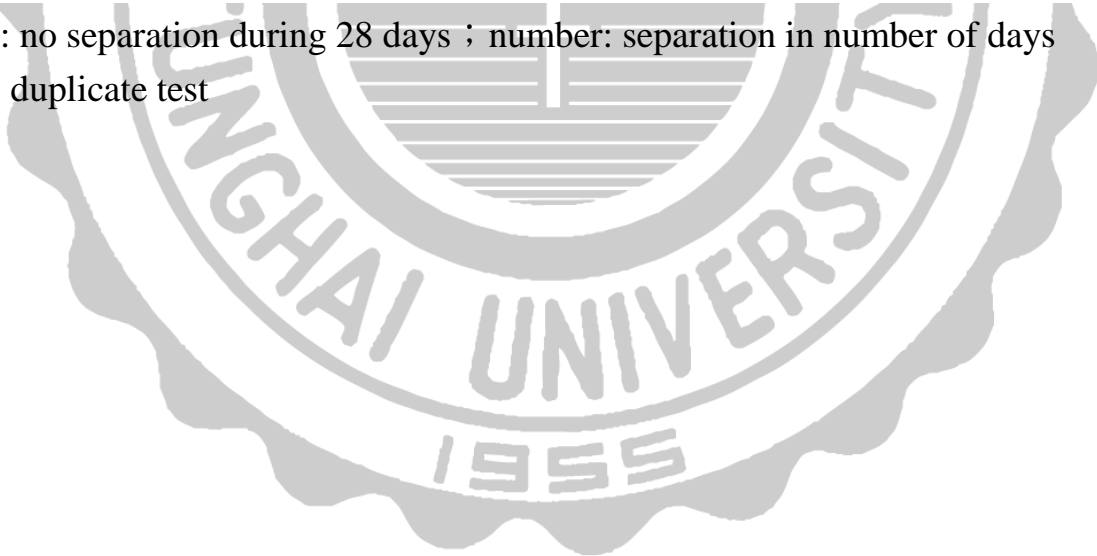
周(2013)分別以 chitosan為乳化劑，或 chitosan和 lecithin為合併乳化劑，將次亞麻油酸及亞麻油酸混和之脂肪酸溶液乳化，製成單層膜及雙層膜及雙層膜乳滴乳化液，發現在高油量下(6、8及10%)雙層膜乳化液於儲存期間皆無油水分離產生，而單層膜乳化液於儲存時則有油水分離現象產生。Klinkesorn等人(2005)研究將鮭魚油與卵磷脂溶液均質，經超音波震盪後形成一次乳化物，再加入幾丁聚醣水溶液而形成二次乳化物，此卵磷脂—幾丁聚醣雙層膜可提高魚油乳化液之安定性，且此乳化液經熱加工、冷凍—解凍循環處理及凍乾處理油水較不易分離。Ogawa等人(2003)研究將玉米油(oil)分別加入卵磷脂(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。

表十、CS- LNA-Vit. E 及 CS-Le- LNA-Vit. E 乳化液於 25℃ 下保存 28 天之分離情形。

Table10. Separation of CS-LNA-Vit. E and CS-Le-LNA-Vit. E emulsions during 28 days storage at 25 °C.

Conditions for emulsification	Emulsion type	
	CS-LNA-Vit.E	CS-Le-LNA- Vit.E
	Separation time (day)	
1000:5 mg (1500 bar, 10 passes)	O	O
1500:7.5 mg (1500 bar, 10 passes)	O	O
2000:10 mg (1500 bar, 10 passes)	O	O
2250:11.25 mg (1500 bar, 10passes)	20	O
2500:12.5mg (1500 bar, 9passes)	12	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

圖二十四所示為1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5 mg LNA-Vit.E油量之CS-Le-LNA-Vit. E乳化液於25℃下保存28天其乳滴粒徑變化情形。此圖可得知油量，五種LNA-Vit. E濃度之CS-Le-LNA-Vit. E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。

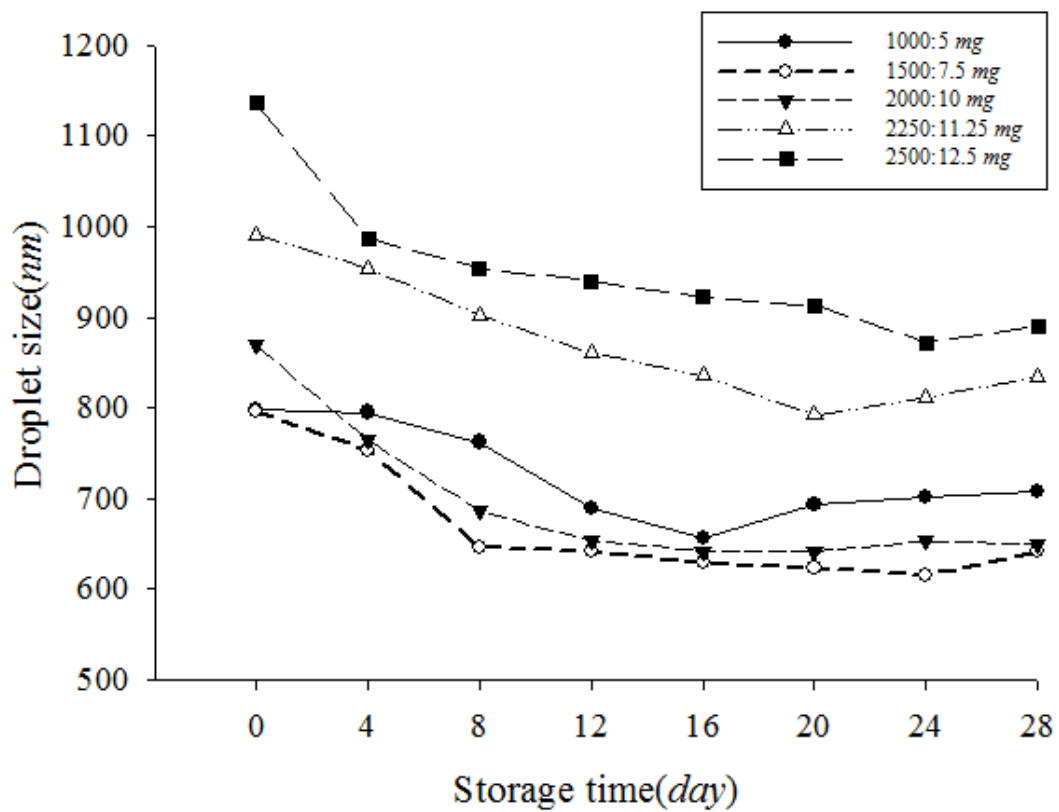
Ogawa等人(2003)研究將卵磷脂及玉米油以高壓乳化方式(5000 psi, 1 pass)製成一次奈米乳化液(lecithin-oil)，再加入幾丁聚醣溶液製成二次奈米乳化液(chitosan-lecithin-oil)，並探討兩種乳化液在室溫保存下其乳化液滴粒徑變化情形。結果顯示，只有包覆卵磷脂之乳化液在保存22至28天時，乳化液滴粒徑才有明顯上升現象，約從1.5 μm 上升至7 μm ，而包覆幾丁聚醣和卵磷脂之乳化液則可以安定保存超過3個月以上，粒徑穩定且不變大(維持0.9 μm 左右)，由結果得知一次乳化液(lecithin-oil)經由幾丁聚醣包覆後，可明顯改善乳化液之安定性。

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℃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→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。

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。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。





圖二十四、CS-Le-LNA-Vit.E乳化液於25°C下保存28天之乳滴粒徑變化。

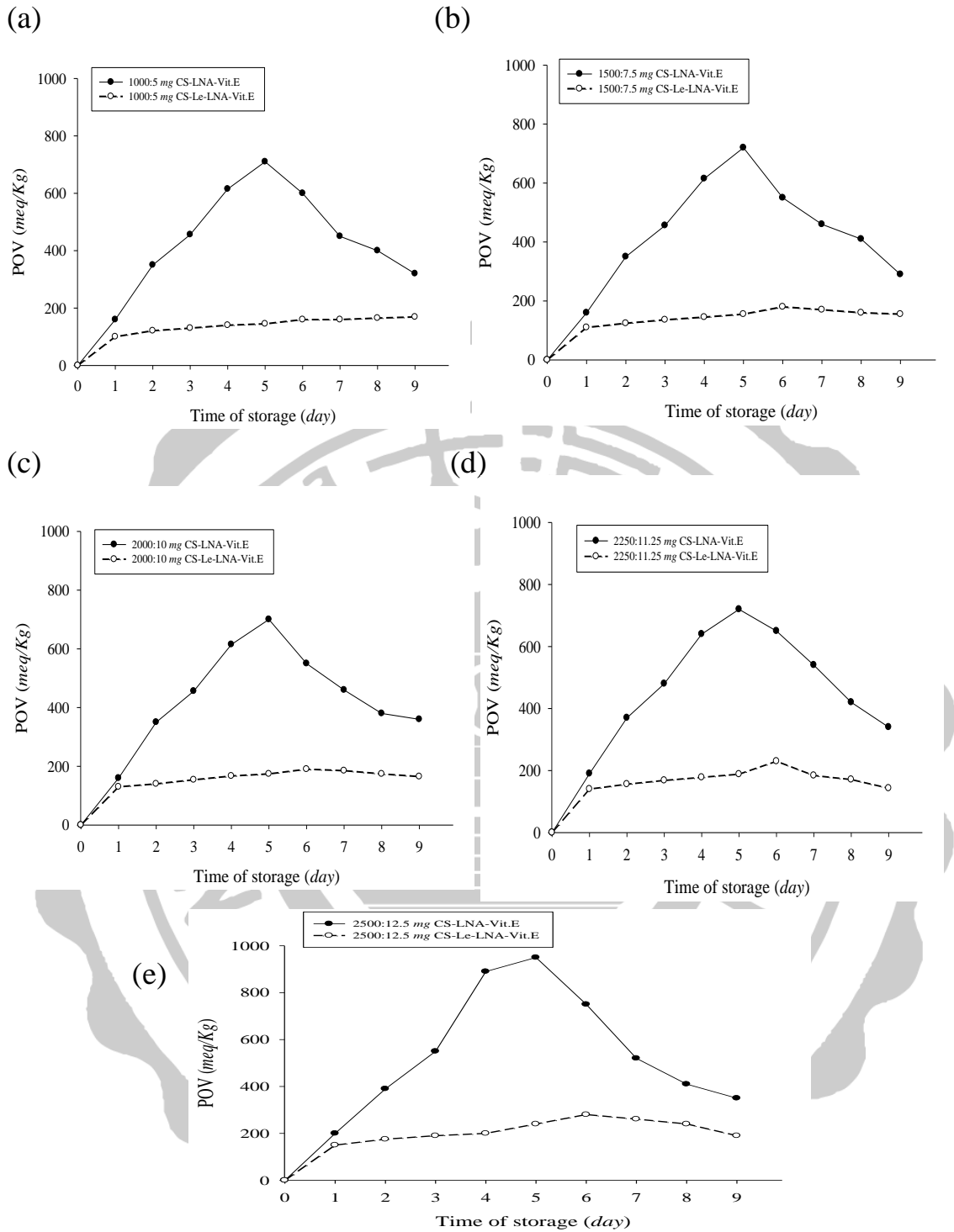
Fig. 24. Change of emulsion droplet size of CS-Le-LNA-Vit.E emulsions during 28 days storage at 25 °C.

3. 乳化液於儲存期間過氧化價POV之變化

圖二十五所示，CS-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E乳化液在 50℃ 下保存9天內POV氧化之變化。由圖可以得知，對1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25及2500:12.5 mg LNA-Vit. E以Le及CS為合併乳化劑製備CS-Le-LNA-Vit. E乳化，在50℃置放9天，其POV上升較為緩慢且非常安定，最高值約為280 meq/Kg。在相同條件下製備的CS-LNA-Vit. E乳化液，1000:5、1500:7.5、2000:10、2250:11.25 mg其 POV最高達約在725 meq/Kg，2500:12.5 mg 其POV最高約在860 meq/Kg。此顯示，以CS及Le為合併乳化劑使CS-Le-LNA-Vit. E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-Vit. E，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。Gudipati等人(2010)研究將金槍魚油經三種乳化劑citrem、chitosan及sodium alginat，分別製備成citrem-oil、citrem-chitosan-oil及 citrem-chitosan-sodium alginate-oil三種乳化液並測量比較其POV。結果指出，citrem-chitosan-oil乳化液在POV試驗中效果較其他兩種好，而將3種乳化劑 citrem、chitosan及 alginate合併使用理論上可使乳化液更穩定，但三層膜乳化液表面電位為負電(-24.8±1.2 mV)，作者指出乳化脂質試驗的主要機制為鐵能促進過氧化物進一步分解產生自由基，此自由基再氧化不飽和脂肪酸，鐵離子與过氧化物的交互作用，對於脂質養化速率有顯著的影響。雙層膜乳化液表面帶正電(+56.27±4.5 mV)，因靜電斥力可降低正價鐵離子靠近與油滴反應，且油滴經雙層乳化劑保護可避免與氧氣直接接觸，故使其POV較低。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。





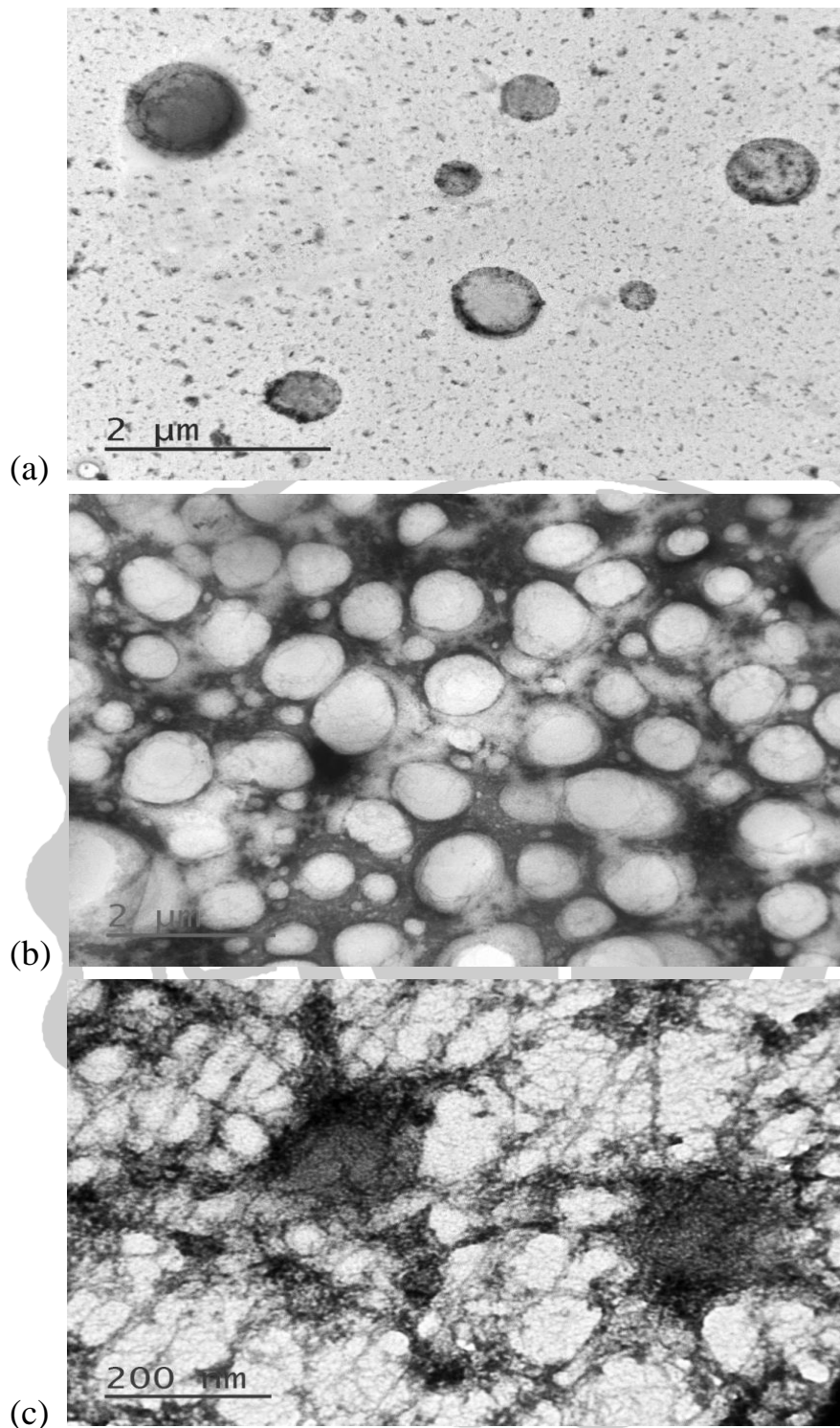
圖二十五、不同油量LNA-Vit. E的CS-Le-LNA-Vit. E及CS-LNA-Vit. E乳
化液之POV變化情形。

Fig. 25. POV changes of CS-Le-LNA-Vit. E and CS-LNA-Vit. E emulsions
at different LNA-Vit. E concentrations (storage time and
temperature: 0-9 days and 50 °C) .

四、穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察

CS-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E奈米乳 滴乳化液外觀型態

將1500:7.5mg LNA-Vit. E分別加入CS以及CS和Le合併乳化劑製成CS-LNA-Vit. E及CS-Le-LNA-Vit. E之奈米乳滴乳化液，並以穿透式電子顯微鏡(TEM)照片觀察如圖二十六(a)及(b)。首先，在圖(a)中可見奈米乳滴之粒徑介於300~800 nm之間且乳滴分散良好。圖(b)粒徑約介於400~900 nm之間，乳滴能包覆更多的油量，可以看出乳滴聚集的很緊密，但看不出有乳滴被破壞情形發生。因奈米乳滴是經由高壓均質機製備，所以製出乳滴大小並不一定相同，而奈米乳滴呈現圓至橢圓球型。文獻指出外型成球型之物質可更易通透腸之細胞膜而易於吸收(陳, 2004)。此結果略小於以粒徑分析儀(Zetasizer 3000 HS)所測定出之奈米乳滴粒徑，原因是樣品在照TEM前有經過乾燥處理所致。圖(c)為儲存28天後產生油水分離現象之CS-LNA-Vit. E乳化液，可以發現之前完整較大之乳滴已被破壞。以圖(c)跟圖(a)(b)相比，可以明顯看出乳化液滴是否安定。



圖二十六、儲存一天CS-LNA-Vit. E (a)、CS-Le-LNA-Vit. E (b)乳化液及儲存28天CS-LNA-Vit. E (c)乳化液之穿透式電子顯微鏡觀察。

Fig. 26. TEM of CS- LNA-Vit. E (a) and CS- LNA-Vit. E (b) emulsions of one day storage and CS- LNA-Vit. E (c) emulsion of 28 days storage.

伍、結論

將次亞麻油酸(linolenic acid, LNA)及維生素E(vitamin E, Vit. E)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-維生素E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-Vit. E奈米乳滴 乳化液：

- (一)對1000:5、1500:7.5、2000:10 mg LNA-Vit. E油量而言，均質壓力愈大，乳化循環次數愈多，其乳滴粒徑愈小，但對2250:11.25 mg LNA-Vit. E油量，乳滴粒徑隨壓力變大和循環次數增多而有下降趨緩現象，在高油量2500:12.5 mg LNA-Vit. E，乳滴粒徑在壓力1000 bar隨著循環次數增多而粒徑有變大現象。
- (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。
- (三)次亞麻油酸-維生素E油量為1000:5、1500:7.5、2000:10 mg 之乳化液在儲存時較為安定。但在油量及2250:11.25及2500:12.5 mg之乳化液分別在儲存20及12天時產生分層，在2500:12.5 mg 高油量時，POV也較純LNA-Vit. E高。

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

- (一) CS-Le-LNA-Vit. E乳化液之乳滴粒徑比CS-LNA-Vit. E乳化液之乳滴大出約20-40 nm，但在油量2250:11.25 mg 一開始超出奈米範圍一些，但在儲存安定下粒徑下降至奈米範圍內，故乳化液滴粒徑皆仍在奈米範圍中。
- (二) 表面電位較CS-LNA-Vit. E高(約+46 mV)，油量、均質壓力及循環次數皆無顯著影響。
- (三) 2250:11.25及2500:12.5 mg CS-Le-LNA-Vit. E乳化液滴儲存安定性較CS-LNA-Vit. E佳，儲存28天內皆無產生分層。POV非常安定也低於CS-LNA-Vit. E乳化液。

三、總結

由結論可得知，以CS和Le為合併乳化劑將LNA-Vit. E高壓乳化可製成奈米乳滴之乳化液，並在保存期間更為安定，可改善高油量的CS-LNA-Vit. E乳化液不穩定之情形。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

- 七田真 (2000)。腦內食品卵磷脂。國際村出版。臺北，臺灣。147-164。
- 戶田清一 (1990)。キトサソの基礎と應用。防菌防黴。23(7):421。
- 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
- 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。
- 王麗璇 (2007)。幾丁聚醣—精油微膠囊之製備及其對轉糖鏈球菌之抗菌活性。國立臺灣海洋大學食品科學系碩士論文。
- 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，p. 1-99。
- 呂朋、李八方及夏蘭 (2001)。殼聚醣在醫藥保健中的應用。中國海洋藥物，20：30-34。
- 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。
- 何孟濤(2004)。維他命E TPGS 1000於老鼠體內之動態及其對細胞色素3A藥物代謝之影響。國立成功大學臨床藥學研。
- 吳適 (1979)。乳化劑在食品工業上的應用。食品工業，11:28-32。
- 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。
- 李勳宜 (1988)。草蝦幾丁聚醣之製備及其應用研究。國立台灣大學食品科學系碩士論文。
- 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。
- 李凱琳 (2014)。以幾丁聚醣或幾丁聚醣及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。
- 沈家弘 (2004)。不同去乙醯度幾丁聚醣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。
- 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。
- 阮進惠及吳貞誼 (1996)。利用幾丁聚醣脫酸葡萄柚汁。食品科學，23:509。
- 阮進惠及林芬年 (1999)。利用幾丁聚醣脫酸澄清梅汁。中農化誌，37:403。
- 阮進惠及沈家弘 (2006)。不同去乙醯度幾丁聚醣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。

- 阮進惠、沈家弘及閻立平 (2008)。加熱及凍結-解凍處理對幾丁聚醣乳化液安定性之影響。台灣農業化學與食品科學，46:111-117。
- 余輝及陳潔 (2007)。可見光光度法測定乳狀液過氧化值的研究。食品科學，28(11):401-404。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 孫慧芬 (1993)。卵磷脂之特性與應用。食品工業，25:22-25。
- 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。
- 孫百秀 (2010)。分離大豆蛋白質水解物奈米顆粒之製備及特性之研究。私立東海大學食品科學研究所食品科技組碩士論文。
- 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。
- 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。
- 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。
- 張湘文 (2008)。微細化技術在食品工業上之發展與應用。食品工業月刊，40(11):5-15。
- 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。
- 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。
- 陳嘉芬 (2004)。細胞生物學。藝軒圖書出版社，p.88。
- 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。

- 陳慶隆 (2005)。幾丁聚醣對廢水中含氯有機物與染料吸附之研究。朝陽科技大學環境工程與管理研究所碩士論文。
- 黃健政、李欣格、莊雅雯、黃瓊慧及張譽穎 (2005)。油/水乳化系統中多酚化合物對兩價鐵離子的螯合作用與抗氧化能力的表現。國立嘉義大學食品科學系專題研究計畫。
- 趙承琛 編著 (1991)。界面基礎科學 (原名：界面化學)。復文書局出版。
- 趙承琛 (1995)。界面科學基礎。復文書局，第十五版。
- 趙武奇、殷湧光、梁歧及閔海洋 (2004)。殼聚糖—海藻酸鈉緩釋製備紅景天苷微膠囊。食品與發酵工業，30: 66-69。
- 趙成萍及田野 (2006)。納米級維生素的研究。飼料工業，27: 62。
- 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。
- 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。
- 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。
- 蔡義宏 (1979)。乳化原理。應用界面化學，2: 13-19。
- 廖家鼎 (2010)。奈米食品的分析檢測技術。食品工業月刊，42(11): 47-61。
- 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。
- 謝馥如 (2007)。奈米食品的安全性與生體利用率。食品工業月刊，39(8): 35-45。
- 謝馥如 (2008)。奈米技術在食品工業之應用。食品工業月刊，40(11): 60-68。
- 糜福龍 (2007)。幾丁聚醣化學改質再生醫材料的應用。化工技術，11: 182-195。
- 歐靜枝 (1990)。乳化溶化技術實務。復漢出版社，台灣台南。
- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.*, 14: 3-15.
- Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially -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., Shojj, T., Sinskey, A. J. and Tsutsumi A. (1986). Filmogenic properties of chitin/chitosan. In: Chitin in Nature and Technology. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., and Gooday, G. M. (Eds), 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.
- Arterburn, L. M., Hall, E. H. and Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 83 : 1467S–1476S.
- 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.
- Arjan.S.H., Carolina S.F.P, Rosiane L.C.(2014). Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation.*Biotechnology*, pages 221-229.
- Aruoma.(1990).Ubiquinol-10 is an Effective Lipid-Soluble Antioxidant at Physiological Concentrations. *Medical Sciences*, 87: 4879-4883.
- 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.
- Blackwell, J. (1988). Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Meth. Enzymol.*, 16 : 435-442.
- Bough, W. A. and Landes, D. R. (1977). Recovery and nutritional evaluation of proteinaceous solids separated from whey by coagulation with chitosan. *J. Dairy Sci.* 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., D íz, 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.
- Connor WE. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr*; 71(suppl): 171S-5S
- 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.
- David, G. S., Fred, J. E., Liping, W., Jane, J-Y, Tong, W. and George, I. (2007). Oil and Tocopherol Content and Composition of Pumpkin Seed Oil in 12 Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 55 : 4005-4013.
- Davis, D. H. and Hayes, E. R. (1988). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. *Methods Enzymol.*, 161 : 442-446.
- 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., Labhsetwar, V., Amidon, G. L. and Levy, R. J. (1996). Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles effect of particle size. *Pharm. Res.*, 13 : 1838–1845.
- De Caterina R. (2011). n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 364: 2439-50.
- Djordjevic, D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, D. J. and Decker, E. A. (2007). Chemical and physical stability of citral and limonene in sodium dodecyl Sulfate-chitosan and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 55 : 3585-3591.
- 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.
- Dudley, D. T., Macfarland, D. E. and Spector, A. A. (1987). Depletion of arachidonic acid from GH3 cells. *Biochem. J.*, 246 : 669-680.
- Dutkiewicz, J., Tuora, M., Judkiewicz, L. and Ciszewski, R. (1992). New forms of chitosan polyelectrolyte complexes. In: advances in chitin and chitosan. brine, C. J., Sanford, P. A., Zikakis, J. P. (Eds), Elsevier Applied Science, London and New York. p.496.

- El-Adawy, T. A. (2000). Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. *Food Chem.*, 70: 83-91.
- Elfiky, S.A., Elelaimy, I.A., Hassan, A.M., Ibrahim, H.M. and R.I. Elsayad, R.I. (2012). Protective effect of pumpkin seed oil against genotoxicity induced by zathioprine. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 65 : 289-298
- Filar, L. F. and Wirick, M. G. (1978). Bulk and solution properties of chitosan. In : Proceedings of the 1st Int. Conf. on chitin/chitosan. Muzzarelli. R. A. A. and Pariser, E. R. (Eds.).
- Fasswtt RG, Gobe GC, Peake JM, et al.(2010).Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Treatment of Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*; 56: 728-742.
- 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.
- Goyens, P. L. L., Spilker, M. E., Zock, P. L., Katan, M. B. and Mensink R. P. (2006). Conversion of α -linolenic acid in humans is influenced by the absolute amounts of α -linolenic acid and linoleic acid in the diet and not by their ratio. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84 : 44 –53.
- 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.
- 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.*, 10 : 1016.
- 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.
- HANA, A., AMAL, A., ABD, E. and HEKMA, A, ABD, EL, L. (1997). Efficacy of simvastatin and pumpkin-seed oil in the management of dietary-induced hypercholesterolemia. *Pharmacological Research*, 35 : 5
- 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. Skjak-Braek, G., Anthonsen, T., Sandford, P. Eds., *Elsevier Applied Science*, London, UK. p.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.

- 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.
- International IDF Standards (1991) International Dairy Federation, IDF- Square Vergote 41, Brussels, Belgium, sec. 74A:1991.
- 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.
- 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.
- John G. Scandalios.(1992).Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems, United States of America, Cold Spring Harbor Laboratory.
- 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.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ.(2003). Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: New Recommendations From the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23: 151-152.
- Kardinaal, A. F. M., Aro, A., Kark, J. D., Riemersma, R. A., Veer, P., Gomez-Aracena, J., Kohlmeier, L., Ringstad, J., Martin, B. C., Mazaev, V. P., Delgado-Rodriguze, M., Thamm, M., Huttunen, J. K., Martin-Moreno, J. M. and Kok, F. J. (1995). Association between β -Carotene and acute myocardial infarction depends on polyunsaturated fatty acid Status. *Arterioscl.Throm. Vas. Biol.*, 15 : 726-732.
- Kienzle-Sterzer, C. and Rha, C. K. (1984). Solution properties of chitosan : Chitin conformation. In : Chitin, Chitosan and Related Enzymes. Zikakis, J. P. (Eds.), *Academic Press*, Landon.
- Kittur, F. S., Kumar, K. R. and Tharanathan, R. N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *Z Lebensm. Unters Forsch. A.*, 206 : 44.
- 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., Chinachoti, P., Decker, A. E., McClements, J. D. and Sophanodora, P. (2005). Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes a prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloid.*, 19:1044-1053.

- 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. and McClements, J. D. (2010). Impact of lipase, bile salts, and polysaccharides on properties and digestibility of tuna oil multilayer emulsions stabilized by lecithin–chitosan. *Food Biophys.*, 5 :73–81.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Couverlier, G. (1986). Flow properties of aqueous solution and dispersions of polysaccharides. In: Function properties of food macromolecules.
- Lester, P., Jurgen, F. (1992). Vitamin E in health and disease.
- Li, H-J., Xin, Z-H. and Hu, Q-H. (2006). Advance in food nanotechnology and nanofood. *Food Sci.*, 27 : 271.
- 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.
- 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.
- Lu, L., Ma, M., Zhang, Y., Tang, M. and Gu, N. (2004). Development of study on biosafety of nanomaterials. *J. South Univ.*, 34 : 711.
- 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 Mumcuoglu, 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.
- Makni, M., Fetoui, H., Gargouri, N. K., Garoui, El.M., Jaber, H., Makni, J., Boudawara, T. and Zeghal, N. (2008) Hypolipidemic and hepatoprotective effects of flax and pumpkin seed mixture rich in ω -3 and ω -6 fatty acids in hypercholesterolemic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 3714-3720.
- McClements, J. D. (2010). Design of nano-laminated coatings to control bioavailability of lipophilic food components. *J. Food Sci.*, 75 : 1.
- McManus A, Merga M, Newton M. (2011). Omega-3 fatty acids. What consumers need to know. *Appetite*; 57: 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.
- Michael, M., Vieno, P., Anna, M, L., Tanja, K. and Gerhard, S. (2004). Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 1: non-volatile compounds). *Food Chemistry*, 84 : 359-365
- 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.
- Mirjana, A., John, V. C., Agniezka, T. and Roland, V. (2010). Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 112:

- Mitchell, J. R., and Ledward, D. A., *Elsevier applied Sci.*, Publishers. p.12-19.
- 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). In: "Chitin". Muzzarelli, R. A. A. Eds, *Pergamon Press. Oxford.*, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt. Muzzarelli, R. A. A. (1977). Chitin. Oxford: Pergamon, 220–228.
- 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.* p.115.
- 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.
- McCord JM, Fridovich I.(1969).Superoxide dismutase, An enzymic function for erythrocyte (hemo cuprein). *J B C*,244: 6049-6055.
- 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. New York : Academic Press.
- 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 : 6839–42.
- 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.
- Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, et al.(2011).Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome:Effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res*;50:372-387.
- 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.
- Ramsden, C. E., Ringel, A., Feldstein, A. E., Taha, A. Y., MacIntosh, B. A., Hibbeln, J. R., Majchrzak-Hong, S. F., Faurot, K. R., Rapoport, S. I., Cheon, Y., Chung, Y-M., Berk, M. and Mann, J. D. (2012). Lowering dietary linoleic acid reduces bioactive oxidized linoleic acid metabolites in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 87 (4-5) : 135-141.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31 : 603-632.
- Roberts, G. A. F. and Domszy, J. A. (1982). Determination of viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 4 : 373-377.
- Roberts, Lees. (1990). Omega-3 fatty acids in health and disease. Chapter 16 :309-323.
- Rodriguez, M. S., Albertengo, L. A. and Agullo, E. (2002). Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 48 : 271.
- 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, R. A. A., and Pariser, E. R. Eds. MIT Sea

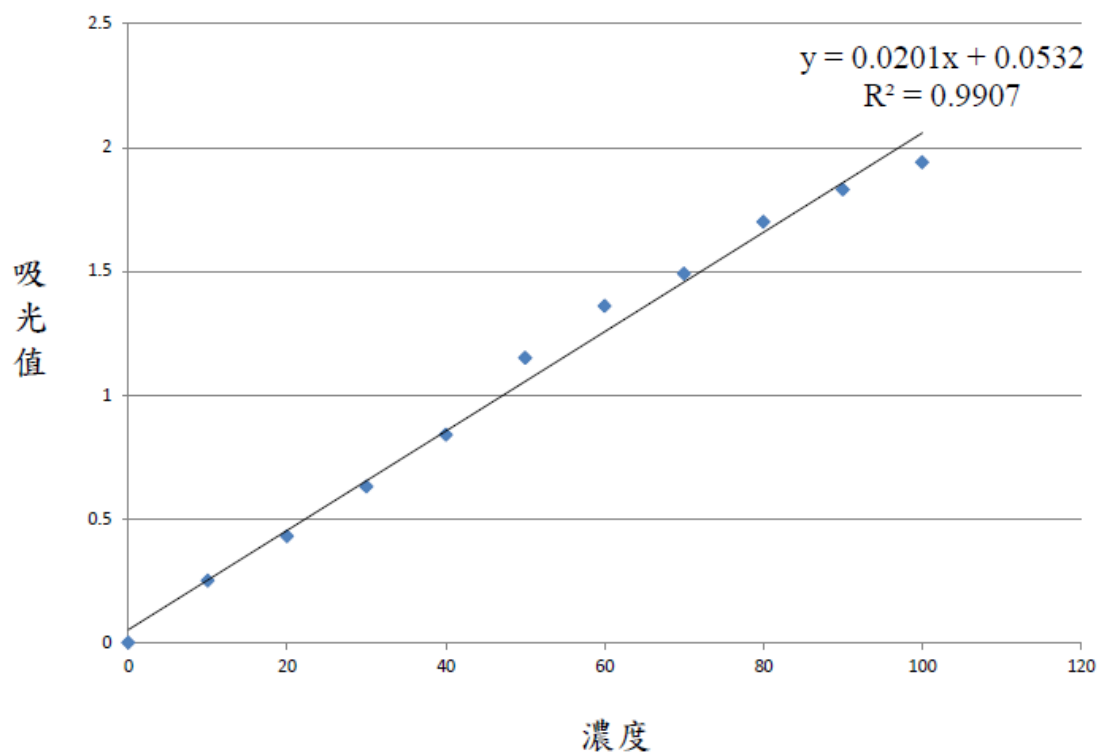
Grant Program, Cambridge, Mass.

- 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.
- 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.)*, p.213-238.
- 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. Res.*, 13:1686-92.
- 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 : 335-43.
- 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.
- 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
- Shantha, N. C. and Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Shantha and Decker: Journal of AOAC international*, 77 : 2.
- 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. Ed. by Hirano, S. and Tokura, S. Eds. *The Japanese Society of Chitin and Chitosan*, p.10-14.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56 : 365–379.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am Coll. Nutr.*, 21(6) : 495-505.
- Simopoulos, A. P. and Cleland, L. G. (2003). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio: the scientific evidence. *World Rev. Nutr. Diet.*, Basel, Karger, 92 : 1-22.
- Simopoulos, A. P., Leaf, A. and Salem, Jr. N. (1999). Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *Ann. Nutr. Metab.*, 43 : 127-130.
- 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 : S1-S3.
- Spiteller, G. (1998). Linoleic acid peroxidation-the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein and its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids*, 95 : 105-162.
- 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.
- 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.
- Sweet, L. and Strohm, B. (2006). Nanotechnology-life-cycle risk management. *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 12 : 528.
- 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.
- Thomas, K., Aguar, P., Kawasaki, H., Morris, J., Nakanishi, J. and Savage, N. (2005). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VIII: International efforts to develop risk-based safety evaluations for nanomaterials. *Toxicol. Sci.*, 92 : 23.
- 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.
- Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M. and Miyazawa, T. (2004). Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis*, 25 (8) : 1417--1425
- 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.
- 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.
- 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.
- Welti-Chanes, J., Ochoa-Velasco, C. E. and Guerrero-Beltrán, J.A . (2009). High-pressure homogenization of orange juice to inactivate pectinmethylesterase. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10 (4) : 457–462.
- Wu, A. C. M. and Bough, W. A. (1976). Determination of molecular weight distribution of chitosan by HPLC. *J. Chromatogr.*, 128 : 87–92.
- Yang, X., Tian, H., Ho, Ch. and Huang, Q. (2012). Stability of citral in emulsions coated with cationic biopolymer layers. *J. Agric. Food Chem.*, 60 : 402–409.
- 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 endogenous 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.

柒、附錄



附圖一、 Fe^{3+} 之標準曲線圖

Appendix 1. Standard curve of Fe^{3+}