

## 壹、中文摘要

將粗幾丁質以 2N HCl 及 2N NaOH 溶液依序除去碳酸鈣及蛋白質製成幾丁質(chitin)，再以濃鹼液(57%，w/v)於高溫下加熱至不同時間以去除乙醯基(acetyl group)，可得 20~30、40~50、60~70 及 80~90 %去乙醯度之幾丁聚醣(chitosan)。進而研究討論於不同去乙醯度之幾丁聚醣、使用濃度(0.5、1.0、1.5 及 2.0 %)及 pH (3.0、4.0、5.0 及 6.0)下乳化對其乳化能力及乳化安定性之影響。乳化安定性之測試項目包括：乳化液經 5°C、室溫、60°C，30 min、100°C，30 min 及 121°C，30 min 處理後存放兩星期；凍結-解凍循環(freeze-thawing cycle)共 5 次；及黏度、乳滴大小分布。在食品應用方面，將上述不同去乙醯度之幾丁聚醣取代蛋黃製備法式沙拉醬，並比較這些沙拉醬與傳統沙拉醬的官能評估、黏度、安定性及菌的生長問題。

結果發現，在乳化能力方面，80~90 %去乙醯度幾丁聚醣之乳化能力最高，20~30 %去乙醯度者最低，而 40~50 %及 60~70 %去乙醯度者介在上述兩組中間。幾丁聚醣濃度越高其乳化能力越低，而幾丁聚醣溶液之 pH 偏於 6.0 時有較高之乳化能力。

在乳化安定性方面，20~30 %去乙醯度者於 pH 3.0 及 pH 4.0，濃度 1.0 %以上乳化，其乳化液經 5°C 至 121°C 處理後存放兩星期均無分層現象，若於 pH 5.0 下乳化則需濃度 1.5 %以上，而於 pH 6.0 下則需提高濃度至 2.0 %。40~50 %去乙醯度者，以濃度 1.0 %，pH 3.0 及 pH 4.0 下乳化，於 100°C 之內處理後存放尚為安定，但 121°C 處理即馬上分層，其於 pH 5.0 及 pH 6.0 乳化，除以 100°C 內處理後存放均為安定外，並於 121°C 處理後可存放 3 天方產生分層。60~70 %去乙醯度者，於 pH 3.0 及 pH 4.0，濃度為 2.0 %下乳化，其乳化液於 100°C 內處理後存放均為安定，121°C 處理則不

宜，於 pH 5.0，濃度 2.0 % 或於 pH 6.0 濃度 1.0 % 以上乳化並於 121 °C 內處理後存放兩星期均未分層。此外，80~90 % 去乙醯度者更適合偏 pH 6.0 下乳化，其濃度只要 1.0 % 以上，121 °C 內處理後存放均不分層。

在凍結-解凍循環安定性方面，20~30 % 去乙醯度組幾乎於每次循環都會有些許油分離情形；40~50 % 去乙醯度組表現最差；60~70 % 去乙醯度組，使用濃度為 2.0 % 方為安定；而 80~90 % 去乙醯度組表現最為安定，其濃度 1.5 % 以上，凍結-解凍循環 5 次均無分層。在乳化液之黏度方面，對不同去乙醯度者於適合濃度及 pH 下乳化，其乳化液較安定者黏度較黏。乳化液之乳滴大小分布情形亦隨著乳化安定性越佳其乳滴直徑 0.02 cm 內之數量亦越多。此外，幾丁聚醣乳化型態為 w/o/w (water-in-oil-in-water)。

此外，在沙拉醬應用方面，由官評結果得知，除了 40~50% 去乙醯度組及各組呈現澀味為缺點外，其餘去乙醯度組的口感、風味、顏色似乎均略優於傳統組，其總接受性與傳統組為不明顯差異。此外，幾丁聚醣乳化液均比傳統者較安定(不分層)，且雜菌不易生長。

## 貳、英文摘要

### ABSTRACT

Crude chitin was treated with 2N HCl and 2N NaOH solution to remove calcium carbonate and protein, respectively, to produce chitin. Chitin was treated with concentrated alkali solution (57%, w/v) under high temperature and different intervals to cleave acetyl group and became 20~30、40~50、60~70 and 80~90 % deacetylated chitosans. Emulsifying capacities and stabilities of the chitosans were determined at different deacetylation degree chitosan、concentrations (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 %) and pHs (3.0, 4.0, 5.0, and 6.0). The treated items of emulsion stability include: Treating emulsions at 5°C and storing at 5°C for 2 weeks; treating emulsions at room temperature; 60°C, 30 min; 100°C, 30 min; and 121°C, 30 min, and storing at room temperature for 2 weeks; freeze-thawing cycle 5 times; viscosity test and emulsions droplet distribution. To food application, French salad dressing was done by replacing egg yolk with the deacetylated chitosans. The products were compared on the sensory evaluation, viscosity, stability, and microbial growth. Traditional salad dressing was also done as a control.

As result, in the aspect of emulsion capacity, 80~90 % deacetylated chitosan had a highest value, 20~30 % deacetylated chitosan presented lowest, where 40~50 % and 60~70 % deacetylated chitosans were between the 80~90 % and 20~30 % samples. The higher the chitosan concentration, the lower the emulsifying capacity. Chitosan solutions slanted toward pH 6.0 had a higher emulsion capacity.

In the aspect of emulsion stability, 20~30 % deacetylated chitosan was emulsified at pH 3.0 and pH 4.0, and a concentration above 1.0 %, then appeared no separation after treating at temperature from 5°C to 121°C and storing during 2 weeks. But the emulsion was carried at pH 5.0, or at pH 6.0, a concentration must be above 1.5 %, or at 2.0 %, respectively to keep the stability. For 40~50 % deacetylated chitosan, it was emulsified at a concentration of 1.0 %, pH 3.0 or pH 4.0 then treated at temperatures within 100°C, gave a stable emulsion, but its emulsion immediately separated as treated at 121°C. When it was emulsified at pH 5.0 or pH 6.0, the emulsion separated for 3 days after treating at 121°C. For 60~70 % deacetylated chitosan, its emulsions were all stable at concentration 2.0 %, pH 3.0 or pH 4.0 after treating within 100°C, but separated as treated at 121°C. If the emulsion was carried out at a concentration of 2.0 % and pH 5.0, or at a concentration above 1.0 %, and pH 6.0, then treated within 121°C and stored during 2 weeks, gave no separation. And for 80~90 % deacetylated chitosan, it was emulsified at a concentration above 1.0 % and pH 6.0, then treated within 121°C, gave a stable emulsion during storing 2 weeks.

On the freeze-thawing resistance, the emulsion of 20~30 % deacetylated chitosan had some oil leak at every cycle; that of 40~50 % deacetylated chitosan appeared more badly; 60~70 % deacetylated one was stable at a concentration of 2.0 % while 80~90 % deacetylated one was the most stable at a concentration above 1.5 % in 5 freeze-thawing cycles. Most of stable emulsions those were carried out under suitable concentration and pH value, gave a high viscosity and high percentage of small droplet size (less than 0.02cm)

distribution. The chitosan emulsion were water-in-oil-in-water type.

Salad dressings those were prepared from 20~30 %, 60~70 %, and 80~90 % deacetylated chitosans appeared better mouth-feel, flavor, and color than that of traditional one, and gave a similar score of total acceptability as the latter although they had some astringent taste. Chitosan salad dressings also showed more stable, and less microbial growth than traditional one.

## 參、前言

食品中油和水經均質(homogenization)後雖暫時能混合一起，但之後漸漸地分離(separation)。若具有親水基(hydrophilic group)及親油基(hydrophobic group)之乳化劑，其於均質時可降低油及水滴(droplets)之表面張力(surface tension)，使兩者的droplets易相溶一起成為不易分離之乳化液。若在食品系統中為w/o(water-in-oil) food system 如：margarine、peanut dressing、chocolate coating...等，則可利用HLB(Hydrophile Lipophile Balance value)小於6的乳化劑，而食品系統中若是o/w(oil-in-water) food system 如：salad dressing、mayonnaise、ice cream、whipped topping...等，則利用HLB大於8的乳化劑。

當乳化劑應用至食品或化妝品...等時，主要為使食品中油和水於均質混合後不易分層(即安定)。乳化劑除了利用其親水基及親油基使水和油在一起外，尚有一些安定作用機制使其乳化液更為安定。這些機制依乳化劑之種類，大致分為：

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

乳化劑當吸附(adsorption)在油和水滴間之表面時，其利用帶負電(anionic)或正電(cationic)互相推斥使這些droplets不易聚集(coalescence)而分離。這些乳化劑多半為低分子量者，如：lecithin、stearoyl lactylate等，其缺點為受pH及電解質之影響(Macrae et al, 1993；Del Blanco et al, 1999)。

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

大分子之乳化劑，如：蛋白質、膠質(gums)...等，當附著在油和水滴間表面上，其利用巨大結構(macromolecular structure)阻礙這些droplets因聚集而分離(March and

Napper, 1977; Napper, 1983; Tesch et al, 2002)。

—黏性安定作用(viscosifying stabilization)：

乳化劑利用其具有高黏度特性使乳化液更為安定。這類乳化劑多半屬於非離子者(non-ionic)，例如：mono and diglycerides、diacetyltartaric esters of mono-diglycerides...等 (Macrae et al, 1993; Rodriguez et al, 2002)。

有些研究指出，蛋白質具有親水基及親油基故可當為食品之乳化劑，且因其帶靜電及為大分子聚合物故有靜電排斥、立體阻礙及黏性安定作用，使食品乳化後很安定，但其缺點為受熱變性(thermal denaturation)、等電點 (pI) 及多價離子等之作用(阮，1984；阮及張，1984；阮及張，1996；Van Nieuwenhuyzen and Szuhaj, 1998；El-Adawy, 2000)。有研究將澱粉修飾為 octenyl-succinate starch 後可當為食品之乳化劑，且其兼具立體阻礙及黏性安定作用，故使食品乳化後更安定 (Tesch et al, 2002)。

自貝殼或生物細胞壁，以酸及鹼溶液依序除去碳酸鈣及蛋白質製成幾丁質(chitin, poly- $\beta(1-4)$ -N-acetyl-D-glucosamine)，再以濃鹼 $>45\%$  (w/w)於高溫下加熱至不同時間以去除乙酰基(acetyl group)，可得到不同去乙酰度之幾丁聚醣(chitosan of different deacetylation degrees, poly- $\beta(1-4)$ -2-deoxy-2-aminoglucose)。幾丁聚醣可溶於有機酸溶液，並有以下特點：

—有親油基(-COCH<sub>3</sub> groups)及親水基(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>、-OH groups)，可為乳化劑。

—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) 並呈現高黏性，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 約 6.3)。
- 不受熱影響。
- 有抑菌作用(阮等，1997)
- 有保健功能，如降低人(動物)體內之膽固醇、三酸甘油脂、油脂吸收及體重...等(吳，2003)。

因此，幾丁聚醣理論上具有潛力且優於以往在食品加工或化妝品(cosmetic)上所用的乳化劑。

本研究擬將粗幾丁質製備為不同去乙醯度幾丁聚醣後，測定比較其乳化性質(即乳化能力及乳化安定性)，研究探討影響其乳化性質之因素如：幾丁聚醣之去乙醯度和濃度及 pH，於冷藏、室溫保存、高溫加熱殺菌及凍結-解凍循環(freeze-thawing cycle) 處理後之安定性。最後選出幾丁聚醣及適合乳化條件製備沙拉醬(salad dressing)，並探討其安定性及官能評估(sensory evaluation)。

## 肆、文獻整理

### 一、幾丁質及幾丁聚醣

#### (一) 幾丁質與幾丁聚醣的發現

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

#### (二) 幾丁質、幾丁聚醣簡介

幾丁質(chitin)為一種由 2,000 ~ 3,000 個 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetyl-D-glucosamine) 以  $\beta$ -1,4 糖 鍵互相結合且類似纖維素(cellulose)的生物聚合物(biopolymer)，不同的地方是將 C<sub>2</sub> 上的 (-OH, hydroxyl group) 用 (-NHCOCH<sub>3</sub>, acetylamino group) 所取代，其在自然界中的含量僅次於纖維素。幾丁質分布的範圍非常廣泛，如：海洋無脊椎動物的外骨骼、昆蟲外殼、真菌和酵母菌細胞壁... 等(表一)。而結構式中含有 N-乙醯葡萄糖胺及葡萄糖胺(D-glucosamine)分子，且與蛋白質、色素及碳酸鈣

表一、甲殼動物、節肢動物、軟體動物、及真菌類之幾丁質含量。

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

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

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)

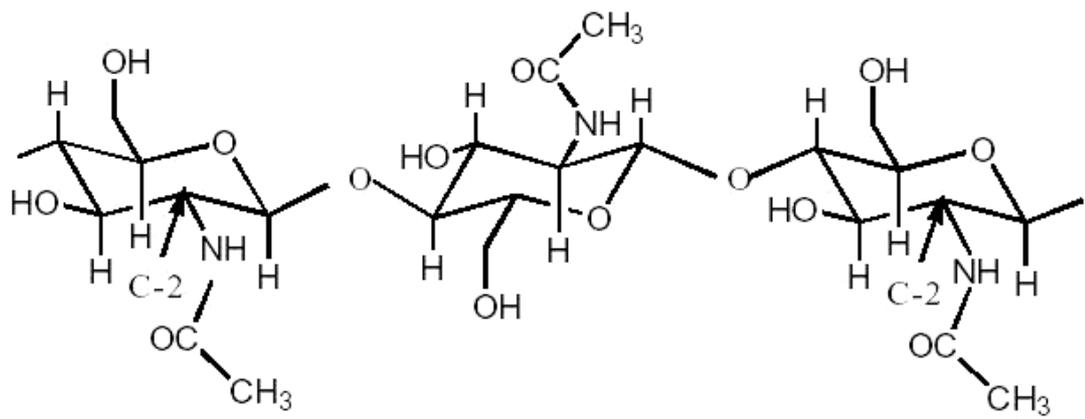
相互結合在一起，幾丁質結構式如圖一，(Austin et al.，1981；Knorr，1984；Stanley et al.，1975)。

幾丁聚醣為幾丁質經去乙酰作用(deacetylation) 之後所得到的產物，且幾丁聚醣、幾丁質及其衍生物均為無毒。目前，幾丁聚醣一年的產量約 600 噸，應用很廣，可用於農業、醫藥、醫療、化妝品及食品方面... 等，且其中 90 %用於廢水之污泥處理，作為凝結劑。其他用途包括：染色增強相片與印刷之鮮豔度；凝膠-保水劑和醫療用原料；治癌劑-免疫強化物質；膜-逆滲透膜、超過濾膜、離子交換膜；抗菌劑-抑制微生物繁殖等(宮尾，1995)。

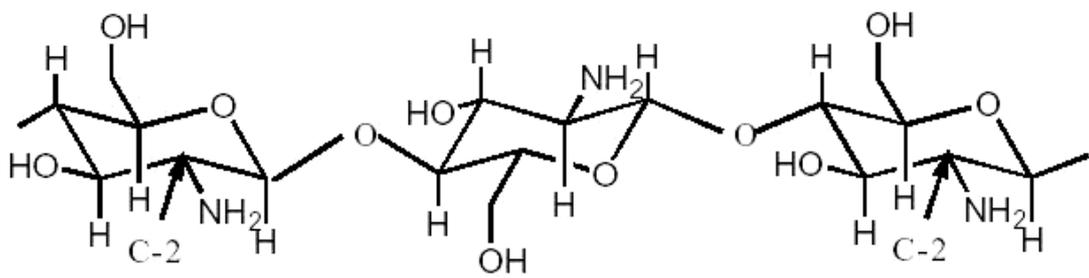
### (三) 幾丁質、幾丁聚醣的結構及特性

#### 1. 幾丁質

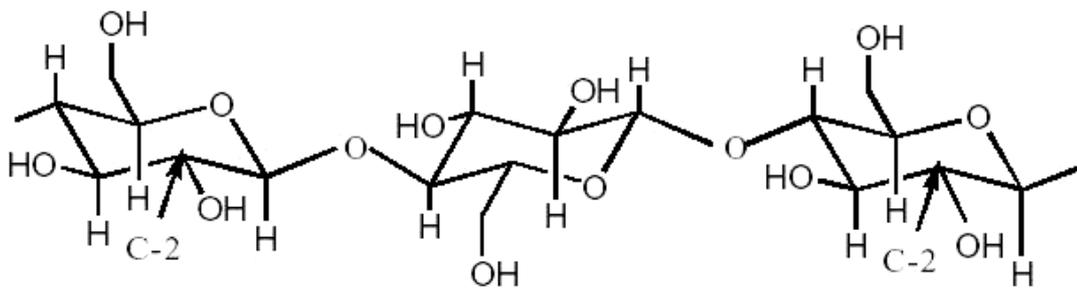
幾丁質經由 X-ray 光譜分析後，依照其結晶型態，可以分為  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三種不同類型的晶型，結構如圖二及圖三所示。其中  $\alpha$  型為斜方晶系(rhombic system)，其對稱的兩股雙螺旋是呈現反向平行(anti-parallel)，構型緻密、質地堅硬，大多存在昆蟲、甲殼類動物中，是自然界當中最普遍且最穩定的； $\beta$  型為單斜晶系(monoclinic syatem)，其雙股螺旋呈平行排列(parallel)，結構較鬆散，常存在烏賊軟骨當中； $\gamma$  型則是上述兩種晶型的混合，其結構為每兩個平行長鏈中會有一個反向平行長鏈，在藻類或真菌類中存在的即為此型式(Muzzarelli，1977)。此三種不同的類型在沸騰的 5 %氫氧化鉀或是氫氧化鈉中都很穩定，但是在 6N 的鹽酸中  $\beta$  型及  $\gamma$  型都會轉變成  $\alpha$  型(Blackwell，1988)。



(a) Chitin



(b) Chitosan

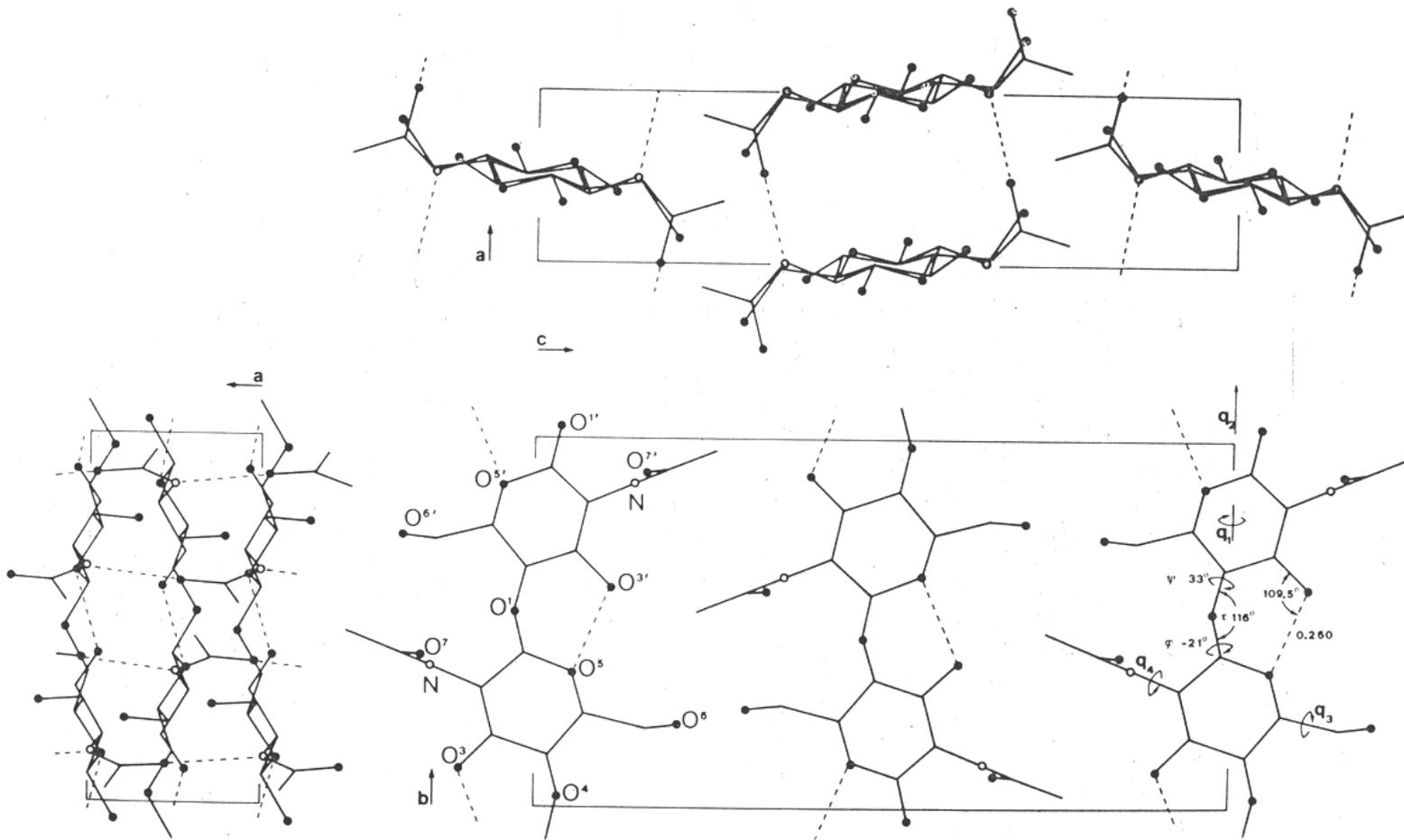


(c) Cellulose

圖一、幾丁質、幾丁聚醣及纖維素之結構。

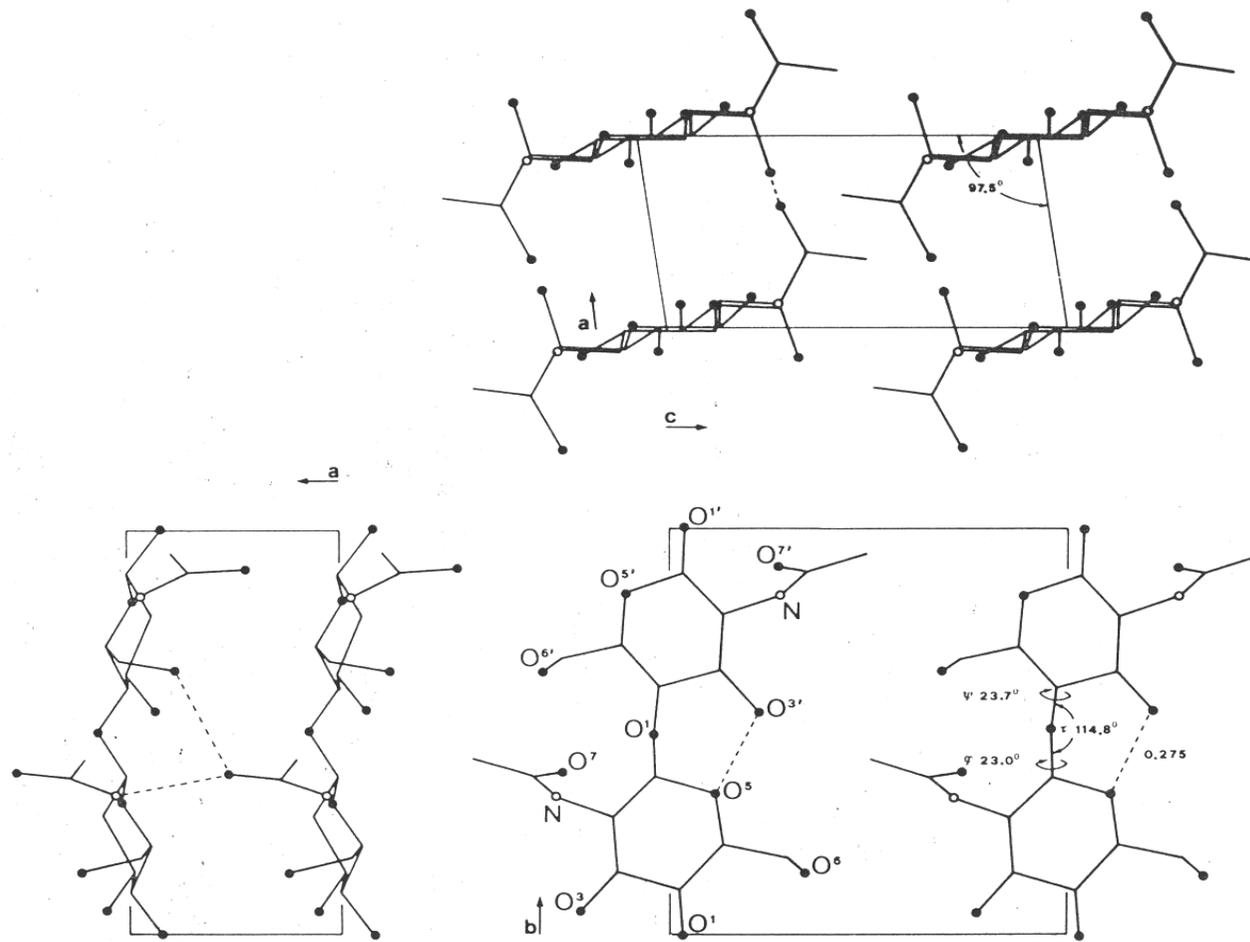
Figure 1. Structure of chitin, chitosan, and cellulose.

(Knorr, 1984)



圖二、 $\alpha$ 型幾丁質之立體結構。

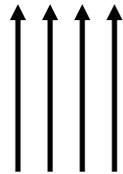
Figure 2. The stereo conformation of  $\alpha$ -chitin. (Muzzarelli, 1977)



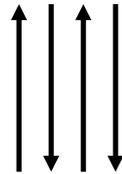
圖三、 $\beta$ 型幾丁質之立體結構。

Figure 3. The stereo conformation of  $\beta$ -chitin. (Muzzarelli, 1977)

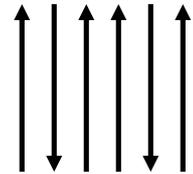
$\alpha$  型：



$\beta$  型：



$\gamma$  型：



特性：

### (1) 化學特性

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

### (2) 溶液特性

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

### (3) 對掌旋光性(chiroptical)

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

## 2. 幾丁聚醣

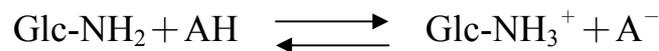
幾丁聚醣通常是幾丁質在高溫下經濃鹼液的去乙醯作用所獲得的胺多醣類(aminopolysaccharide)。但是其去乙醯作用

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

特性：

### (1) 陽離子特性

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



### (2) 溶液特性

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

幾丁聚醣在酸性溶液下為帶正電的聚合物，且在溶液中會形成親水性蚯蚓狀(worm-like)分子(Kienzle-Sterzer and Rha, 1978)。

1984)，其聚合物的流體性質取決於分子構形、氫鍵數目或是相鄰分子間的靜電斥力(Launay et al, 1986)。另外幾丁聚醣在溶液中的分子構形也會受到溶劑種類、pH、離子張度、溶質濃度等的影響(Gamzazad et al, 1981; Kienzle-Sterzer and Rha, 1985)。基於上述因素，幾丁聚醣溶液的黏度會受到本身分子離子化程度(正電荷數) 的增加和溶液離子強度的減低而增加(Kienzle-Sterzer and Rha, 1984)；而當溶液中的離子強度及 pH 升高時，會導致幾丁聚醣鏈的分子內及分子間的靜電排斥情形減少，造成分子鏈更易結合在一起，使分子捲縮，黏度因此下降(Aiba et al, 1986)。

#### (四) 幾丁質、幾丁聚醣的製備

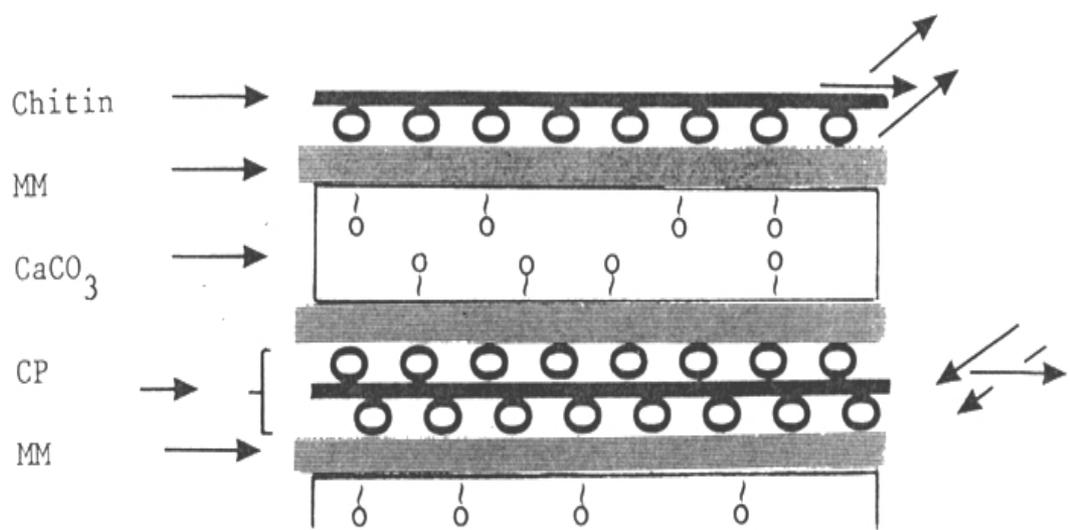
##### 1. 蟹殼之成分

蝦、蟹外殼的主要成份為碳酸鈣、蛋白質及幾丁質等，其結構模型如圖四(Poulicek, 1985)。一般去內臟蟹殼固形物當中含量最高的為碳酸鈣，其次是幾丁質，第三為蛋白質，而粗脂肪含量則很少(王, 1989)。因此必須先將蝦、蟹外殼中之碳酸鈣及蛋白質去除才能得到幾丁質。

##### 2. 幾丁質製備

###### (1) 去除碳酸鈣

由於蝦蟹殼中的碳酸鈣為主要成分，因此在製備幾丁質時一般使用鹽酸與蝦蟹殼中的碳酸鈣來反應，使其產生二氧化碳而除去(Stanely et al, 1975; Ignacio, 1982)。另外在使用鹽酸處理時，可能會因為濃度過高的酸或是處理時間過長而引起分子降解的情形出現，所以亦有文獻指出使用較弱的酸類來取代



圖四、軟體動物外殼有機結構模型的描繪圖。

Figure 4. Schematic interpretation of the structure of the organic matrix in mollusk shells. MM : mineralization matrix. CP : carrier protein. (Poulicek et al., 1985)

鹽酸，如：亞硫酸、醋酸或是金屬螯合劑 EDTA 來去除碳酸鈣 (Brine and Austin, 1981)。有研究指出去除蝦中碳酸鈣的方式為使用過量的 0.25M 鹽酸在室溫下反應，其中幾丁質與鹽酸溶液比例 1:40 為最好條件(Percot, 2003)。

## (2) 去除蛋白質

蛋白質去除有鹼液法與酵素法兩種 (Bough, 1978; Brine and Austin, 1981; Knorr, 1984)，一般較常使用鹼液法來處理。去除蛋白質時為了降低去乙醯反應發生，所以便使用二段式鹼液處理，首先以 0.5N 氫氧化鈉反應過夜，以去除大量蛋白質，接著去除碳酸鈣，最後再以 5 N 氫氧化鈉蒸氣浴加熱 3 小時，用意為去除殘留的蛋白質 (Stanely et al, 1975)。也有研究使用 1 M 的氫氧化鈉在高溫 70°C 下與蝦殼反應 24 小時，其分子量及乙醯度不受影響(Percot, 2003)。

## 3. 幾丁聚醣製備

### (1) 鹼液法

在製備幾丁聚醣時，首要則是將幾丁質做去乙醯的處理，可參考表二，而去乙醯時會有許多因素影響其去乙醯程度及分子量的變化，其相關因素整理如下：

#### \* 鹼液濃度

一般做去乙醯反應時經常被使用的鹼液是氫氧化鈉，其濃度大約 30~60 % (w/v) 之間，隨著鹼液濃度升高，去乙醯的程度也就隨著升高(李, 1988)。

#### \* 鹼液使用量

理論上來說鹼液體積越大所達到的去乙醯效果也越好，因此有研究提到鹼液體積至少要為幾丁質重量的十倍以上，這樣

表二、不同去乙酰程度幾丁聚醣之製備條件。

Table 2. Conditions for preparing chitosan of different degrees of deacetylation.

Degree of deacetylation (DD)(%)	Treatment conditions needed
30-40	30%NaOH*, 6-8hr 40%NaOH, 0.5hr
40-50	40%NaOH, 1hr
60-70	50%NaOH, 0.5hr
70-75	40%NaOH, 2.5hr 50%NaOH, 1hr 60%NaOH, 0.5hr
75-80	40%NaOH, 4hr 60%NaOH, 1hr
80-85	40%NaOH, 6hr 50%NaOH, 4hr 60%NaOH, 2.5hr
85-90	50%NaOH, 8hr 60%NaOH, 4hr

(李，1988)

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

才能使反應時整體溶液維持良好的流動性，反應均勻(Johnson and Peniston, 1982)。

#### \* 處理溫度及時間

在低溫低濃度時，可在短時間內去除少量的乙醯基，如再延長時間反應，則其去乙醯程度不會再有進一步變化；相反的在高溫高濃度時，隨著反應時間增加，去乙醯程度也越高，但當到達 95 % 以上之後也就不容易再上升，且過長的加熱時間往往會造成分子降解的情形(Mima, 1983)，這是值得注意的。

#### \* 周圍環境的影響

反應如果處在氮氣中時，則所得到的幾丁聚醣分子量和黏度都會比在空氣中時大，其原因可能為空氣中的氧氣造成幾丁聚醣分子的裂解，導致分子量及黏度下降 (Bough, 1978)。或者利用抽真空的方式，也可以減低幾丁質在做去乙醯時的降解反應(Johnson and Peniston, 1982)。

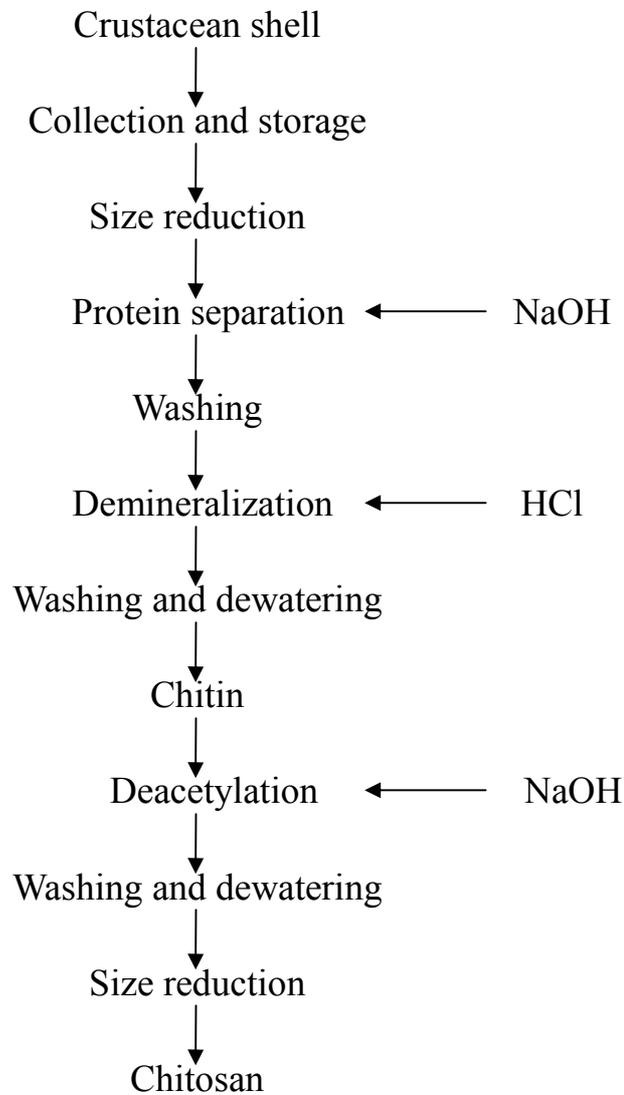
#### \* 幾丁質顆粒大小

若幾丁質的顆粒較大的話，會使得去乙醯時需要較長的時間才能使顆粒膨潤，因而降低去乙醯的速率，同時也造成分子量較低和黏度下降的情形(Bough, 1978)。

幾丁質及幾丁聚醣製備流程主要步驟，如圖五所示。

## (2) 酵素法

利用幾丁質去乙醯酵素( chitin deacetylase )將幾丁質上的乙醯基去除，作用位置為乙醯葡萄糖胺 (glucose-NH-COCH<sub>3</sub>) 上面的N-C鍵結上，但是此方式的成本較高，且在製作去乙醯度大於 90 %的幾丁聚醣較不容易(劉, 1994)。



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)

#### 4. 完全去乙醯幾丁聚醣之製備

將幾丁質以 47% 之鹼液在充氮氣的環境下，以 100°C 加熱 1 小時或 60°C 加熱 2 小時之後(並不會使其分子降解)，接著以 80°C 的水清洗至中性(此時去乙醯度 ≤ 80%)，之後將此半成品以 1.5~2.0% 的濃度溶解於 2% 之醋酸水溶液中，並通過細孔擠壓成絲狀物進入 1.0 N 的鹼液中，再進一步的做去乙醯處理，重複上述步驟兩次以上可得到完全去乙醯之幾丁聚醣 (Mima et al., 1983)。

#### (五) 幾丁質與幾丁聚醣純度之測定

幾丁類物質產品的純度計算方式，一般是以幾丁質或幾丁聚醣總重量佔樣品乾重的百分比為參考依據。以往有文獻指出純的幾丁質樣品是不含有任何蛋白質殘留物的(Galat, 1979)，另外也有另一種說法是依據其幾丁質樣品當中所殘留蛋白質及灰份來測定 (Pinelli, 1998)。在測定幾丁質類的產品的純度時，可分析待測樣品中碳、氫、氮等三種元素的質量百分比並配合 N-乙醯化程度的方法來測定(游, 1997)，方法如下：

##### 1. 以碳元素含量計算

$$\text{純度(\%)} = [(203 \times A + 161 \times B) / W] \times 100$$

$$\begin{cases} A/B = Y/(100 - Y) \\ 8A + 6B = C \end{cases}$$

$$C = W \times Fc / 12.01$$

其中 203 為 N-乙醯葡萄糖胺單體的分子量；161 為葡萄糖胺單

體的分子量；W 為待測樣品的乾重(g)；A 為 N-乙醯葡萄糖胺莫耳數；B 為葡萄糖胺莫耳數。Y 為利用 NMR 測得之 N-乙醯化程度(%)；C 為待測樣品含碳的莫耳數。Fc 為待測樣品中碳所佔之質量比。

## 2. 以氮元素含量計算

$$\text{純度(\%)} = (203 \times N \times Y + 161 \times N \times Z) / W$$

$$N = W \times F_n / 14.01$$

$$Z = 100 - Y$$

其中 N 為待測樣品中含氮的莫耳數；Fn 為待測樣品中氮所佔之質量比。

## (六) 理化性質的分析

### 1. 分子量的測定

#### (1) 膠體過濾分析法

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

#### (2) 黏度平均分子量

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

1988 ; Roberts , 1982) 。

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

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

### (3) 高效液相層析法

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

### (4)光散射法

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

## 2. 去乙醯度的測定

### (1) 紅外光譜分析法

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

$$\text{N-乙醯化程度(\%)} = 98.03 - 34.68 \times (A_{1550}/A_{2878})$$

其中 $A_{1550}$ 為amide II在 $1550\text{cm}^{-1}$ 的吸收值； $A_{2878}$ 為C-H bond在 $2878\text{cm}^{-1}$ 的吸收值。

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

$$\text{N-乙醯化程度(\%)} = (A_{1655}/A_{3450}) \times (100/1.33)$$

其中 $A_{1655}$ 為amide I在 $1655\text{cm}^{-1}$ 的吸收值； $A_{3450}$ 為O-H bond在 $3450\text{cm}^{-1}$ 的吸收值。

## (2) 紫外光光譜分析

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

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

其中 A 為 N-乙醯葡萄糖胺之莫耳數；W 為樣品重(g)。

## (3) 光譜分析法

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

$$\text{乙醯基程度(\%)} = (161 \times H_{100}) / [161 \times H + 203 \times (H_{100} - H)]$$

其中 $H_{100}$ 為完全去乙醯基的光譜吸收峰高度； $H$ 為樣品去乙醯基的光譜吸收峰高度。

#### (4) 氣相層析法

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

#### (5) 高效液相層析法

用 12N 的濃硫酸、草酸和丙酸混合液在高溫 155°C 下水解待測樣品 1 小時，使幾丁聚醣上的乙醯基完全水解，並以醋酸的形態存在於水解液中。再經由 2 小時的冰浴，接著以 HPLC 定量醋酸，並以丙酸做為標準液，即可得知乙醯化程度。其所使用之管柱為陽離子交換樹脂(cation-exchange resin)管柱，移動相為 5 mM  $H_2SO_4$ ，紫外光檢測器(UV detector)之波長為 210 nm (Niola et al, 1993)。

醋酸之質量( $M_x$ )以下式計算：

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

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

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

其中  $X$  為樣品經由強酸水解後所得之質量與扣除殘留灰

分量後樣品質量的比值；161 為葡萄糖胺單體的分子量；  
43 為乙醯基的式量。

#### (6) 酵素法

先將 0.5g 的幾丁聚醣樣品溶解於 100ml 的醋酸溶液(0.2 %) 中，再取 2ml 上述溶液，分別以 5 單位的 *exo*- $\beta$ -D-glucosaminidase， $\beta$ -N-acetylhexosaminidase 及 chitosanase 在 40°C 下水解 12 小時，接著利用 specific colormetric 及 HPLC 分析葡萄糖胺與 N-乙醯葡萄糖胺的含量，並帶入下列公式計算幾丁聚醣的去乙醯程度(Nanjo，1991)。

$$\text{degree of deacetylation(\%)} = 100 \times \text{GlcN} / (\text{GlcN} + \text{GlcNAc})$$

其中 GlcN 為葡萄糖胺的濃度( $\mu\text{mol/ml}$ )；GlcNAc 為 N-乙醯葡萄糖胺的濃度( $\mu\text{mol/ml}$ )。

#### (7) 滴定法

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

#### (8) 熱分析法

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

### (9) 比色分析法

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

### (10) 核磁共振光譜分析法

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

### (11) Ninhydrin 呈色定量游離胺基法

分別配製一系列的幾丁聚醣待測樣品與葡萄糖胺之溶液 (20-100  $\mu\text{g/ml}$ )，將兩者分別與Ninhydrin試劑反應後，測量其在OD<sub>570</sub>下的吸光值，再以幾丁聚醣樣品濃度或葡萄糖胺濃度對OD<sub>570</sub>吸光值作圖，分別算出兩者的斜率，並把葡萄糖胺校正曲線的斜率當作 100，求得幾丁聚醣待測樣品校正的斜率數值，此數值即為待測樣品之去乙醯程度 (Curotto and Aros, 1993; Mitsukawa et al, 1971)。

## (七) 幾丁質與幾丁聚醣之安全性與法規

每天分別以每公斤體重添加 0.8 g 及 1.4 g 的幾丁聚醣至動物飼料當中，餵食雞和兔子，在 239 天後並沒有發現不良症狀(Hirano, 1990)；若以幾丁聚醣作為飼料中蛋白質的凝結促進劑，則不會影響蛋白質的吸收率，也不會產生任何毒性(Bough

and Lands, 1977); 另外, 也有研究指出每天餵食老鼠每公斤體重 18g 以上的幾丁聚醣才會對老鼠產生傷害 (Arai, 1968), 由以上可知適量餵食時幾丁聚醣對動物是安全的, 不會造成傷害。

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: 日本將幾丁質以及幾丁聚醣於 List of Food Additives other than Chemical Synthetics, 列為合法的安定劑 (stabilizers) 與增稠劑 (thickeners)。

另外, 台灣行政院衛生署在“衛生署核發健康食品許可證一覽表”中於民國 91 年 12 月 12 日核可“金車甲殼素複方膠囊”列為健康食品, 其內容物主要成份包含了幾丁聚醣並標示其保健功效: (1) 降低血中總膽固醇; (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(台灣行政院衛生署網頁)。

## (八) 幾丁質與幾丁聚醣之應用

### 1. 食品工業上之應用

#### (1) 幾丁質、幾丁聚醣和其衍生物的抗菌性

因為葡萄糖胺單體的C<sub>2</sub>上的胺基在pH為 6.0 以下時呈現正電荷, 使幾丁聚醣水溶性較佳, 比幾丁質有更好的抗菌活性

(Chen et al., 1998)。幾丁質、幾丁聚醣和其衍生物的抗菌機制仍尚不清楚，但是有許多的機制已經被證實，一般認為的機制為幾丁聚醣的正電荷與微生物細胞膜表面之負電荷作用，造成蛋白類物質及其他細胞內組成份流失(林，1995；Papineau，1991；Sudharshan，1992；Fang，1994；Chen，1998；Young，1982)。幾丁聚醣也可作為螯合劑(chelating agent)，可以選擇性結合微量金屬而抑制毒素生成和微生物的生長(Cuero，1991)。另外，幾丁類物質也可活化一些宿主的防禦系統(El Ghaouth et al.，1992)，能與水結合而抑制各種酵素的作用(Young，1982)。

另外也有利用不同水解程度之幾丁聚醣(0%、5%、10%、20%、30%)來做 G+ 與 G- 菌抑菌之研究，結果以 5% 水解程度者抑菌效果較佳，其次為 0、10、20 及 30% 水解程度者，這些幾丁聚醣產品之添加濃度越高其抑菌性越好，其中 0 或 5% 水解程度者，在添加濃度達 50 ~ 250 ppm 時可達完全抑菌效果，其餘水解物之抑菌濃度因菌種而異，自 50 ~ 300 ppm 不等。此外，幾丁聚醣產品對 G+ 菌之抑菌效果較 G- 菌為佳(阮等，1997)。

## (2) 幾丁質與幾丁聚醣在食用膜工業的應用

利用可食用膜(edible films)包覆，以延長食品儲存期，改善食品在新鮮、冷凍時的品質，已經被研究 (Kester，1986；Labuza，1989)，且可食用膜的生物分解性及對環境之有利是其被研究的主因(Hoagland，1996；Kittur，1998)。這些包覆層/膜在食品方面是提供其生理、形態、生化特性改變的必要方式(Kittur，1998)。雖然高密度的聚乙烯膜是食品常用的包材，但因為其在儲存時會消耗氧、凝聚水而有促進真菌生長的缺點(Risse，1987；El Ghaouth，1992；Miller，1983)。幾丁質與幾丁聚醣由於具有成膜特性 (Knorr，1986；Muzzarelli，1986)，

並已成功運用為食品包材。利用 N,O-carboxymethylchitin 膜在加拿大和美國已經有成功長期保存水果的例子。而一般利用 glutaraldehyde、二價金屬離子、polyelectrolytes 或負電荷多醣類(anionic polysaccharides)來與幾丁聚醣交叉鍵結形成堅固的幾丁聚醣膜(Uragami, 1994; Dutkiewicz, 1992)。幾丁聚醣膜是堅韌、耐久、具彈性且不易撕裂，此機械性質相當於許多中強度之聚合物(Butler, 1996)。Kittur 等人指出幾丁聚醣膜具有調節水分滲透性的價值，可延長許多新鮮製造或水活性高產品之儲存期。

### (3) 幾丁聚醣在果汁澄清和脫酸的應用

通常果汁在澄清時都會添加一些澄清劑，包含了 gelatin、bentonite、silica sol、tannins、potassium caseinate 和 polyvinyl pyrrolidone 等(Simpson, 1994; Spagna, 1996)。幾丁聚醣鹽類，帶有強的正電荷，為有效的澄清劑，也可以控制果汁中的酸度(Imeri, 1988)。且無論是否有添加果膠酵素，幾丁聚醣對葡萄柚汁而言為一個好的澄清劑，對蘋果汁的去混濁方面也有高度效果(陳, 1995; Soto-Perlata, 1989)。

若使用顆粒大小 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，此時果汁的總酸減少 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% (阮與吳, 1996)。

先將粗梅汁以顆粒大小為 40~60 mesh 之幾丁聚醣脫酸至不同脫酸率(0~80%) 後，加入不同濃度之幾丁聚醣溶液或不同水解度之幾丁聚醣溶液進行澄清。此外，將粗梅汁及酵素處理梅汁分別以幾丁聚醣脫酸至 50% 後進行澄清，並比較二者

澄清效果以及各種成分變化。結果發現，在澄清效果方面，粗梅汁於脫酸至 40~60%，只在 5°C 下放置 2 小時後離心即可達到良好之澄清效果。粗梅汁及酵素處理之梅汁於脫酸澄清前，其濁度分別 88.5 及 49.2 NTU(nephelometric turbidity unit)，脫酸澄清後降至 2.3 及 3.5 NTU (阮與林，1999)。

#### (4) 幾丁質與幾丁聚醣在食品營養的影響

1983 年，美國 FDA (USFDA, United States Food and Drug Administration) 通過幾丁聚醣作為食品添加物 (Knorr, 1986)。其在食品系統中的許多影響均與其食用纖維和機能性部分有關。在某些國家，幾丁聚醣也使用在增強食品品質方面，其中日本就因為幾丁聚醣的降膽固醇作用，而將其添加於餅乾、馬鈴薯片和麵條中(Hirano, 1989)。幾丁聚醣在上腸胃道的非消化性、高黏度、聚合物性質、高水結合能力和在下腸胃道的低水結合能力，是決定其為具有降低膽固醇潛力的膳食纖維主因(Muzzarelli, 1996、1997)。由於幾丁聚醣在低 pH 時能形成離子鍵，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)。上述大部分所結合的脂質在人體都隨後被排泄掉，主因為結合的三酸甘油脂 (triacylglycerols) 能避免被脂解 (lipase) 水解，促進膽固醇、固醇類(sterols)、三酸甘油脂的排出(Muzzarelli, 1997; Zacour, 1992)。因為在肝臟中所產生的膽酸是從血液中的膽固醇循環而來，而幾丁聚醣在腸胃道中能與膽酸結合形成微胞 (micelles) 而排出體外，所以能降低血液當中的膽固醇濃度。另外大量的腸道微生物能產生幾丁質，分解上述微胞，使膽酸與固醇類以游離形式釋放至排泄物當中而不會被吸收(Hirano, 1995)。

另有研究將大於 85% 去乙醯度之幾丁聚醣水解至不同程度(0、10、20 及 30%)，分別添加至基礎飼料、加重油脂飼料、

加重膽固醇飼料及加重油脂和膽固醇飼料至不同濃度 2、4、6 及 8% 餵養老鼠，結果發現，在基礎飼料組老鼠肝臟及血清中脂溶性維生素 A 和 E 含量下降，其中以添加 10% 水解度之幾丁聚醣下降比較少，水溶性維生素 B1 未受影響，膽固醇和三酸甘油酯含量均下降，其中以添加 0% 水解度者(即幾丁聚醣)下降較多；而排泄物中鈣、鎂和鐵含量均增加，其中又以添加 10% 水解度者礦物質之排泄量較少；油脂和蛋白質之吸收率均下降，前者以添加 10% 水解度者下降較多，而後者以 0% 水解度者下降較多；在體重增加方面，均有明顯緩和作用，其中以添加 0% 水解度者影響最大。這些幾丁聚醣產品之使用量愈高對上述項目影響之程度愈高。在加重油脂飼料方面，添加幾丁聚醣產品對上述各項影響有類似趨勢，但加重油脂使各組老鼠肝臟及血清中維生素 E、膽固醇和三酸甘油酯含量普遍增加、排泄物中鎂含量減少而鐵含量增加，及體重增加。而加重膽固醇飼料和加重油脂和膽固醇飼料與加重油脂飼料之情況相似(吳，2003)。

#### (5) 食品加工廢棄物和廢水中的固型物回收

一般在食品加工廠所排放出的廢水中，經常含有豐富的有機質，使得具有很高的 COD (chemical oxygen demand) 或 BOD (biochemical oxygen demand) 以及高固型物含量(No, 1989)。而利用親和性作用的概念，由食品加工廢液中分離固型物是很吸引人的，因為它不僅達到起初純化的目的且又降低後續樣品處理的體積(Senstad, 1989)。幾丁聚醣的部分正電荷可以當作有效的聚正電荷凝結劑來處理廢水，尤其能有效去除廢水中的蛋白類，且所凝結之副產物可以提供作為動物飼料蛋白質的來源(Bough, 1975, 1976)。幾丁聚醣降低食品加工廢水中固形物程度，如表三所示。

表三、幾丁聚醣在降低食品加工廢棄物中固形物的影響。

Table 3. Effect of chiosan on reduction of solid materials from food processing wastes.

廢棄物種類	幾丁聚醣含量(mg/l discharge)	降低懸浮固型物(%)
肉品加工	30	89
小蝦加工	10	98
小龍蝦加工	150	97
乾酪乳清	2.5-15	82-97
	10-16	74
家禽加工	30	88
蛋加工	100-200	70-90
小麥芽膠	20	70
蔬菜加工	10	84-90
水果加工	2	94

(Shahidi et al., 1999)

## (6) 幾丁聚醣與幾丁質在純化水的應用

由於重金屬與殺蟲劑對健康和生態上關聯的認知，及其經由食物鏈而在體內累積的情形，使得工業廢水的處理受到要求 (Jeuniaux, 1986; Knorr, 1991)。而傳統移除工業廢水當中金屬的方法一般是效率差且昂貴的，尤其當金屬含量低時效率更差 (Deans, 1992; Volesky, 1987)。螯合離子交換 (chelation ion exchange) 是從廢水中回收金屬的一種技術，且商業化、對環境安全的生物聚合物必須能使金屬離子濃度降至 ppb (parts per billion) 層級，此類聚合物須有數種官能基 (functional groups)，如 基 (hydroxyl) 與胺基 (amino)，以增進對金屬的吸收力 (Deans, 1992)。幾丁質與幾丁聚醣可與金屬形成複合物的能力在日本已經被用在純化水方面 (Simpson, 1994)。

美國的環境保護署 (USEPA, United States Environmental Protection Agency) 也證實了可使用幾丁聚醣 (10 mg/l) 應用在純化飲用水上 (Knorr, 1984)。由於幾丁聚醣之 OH 間可與二價以上之礦物質及金屬離子產生螯合，以及在其 pKa 以上時，幾丁聚醣釋放較多的胺基 ( $\text{NH}_3^+$  轉變成  $\text{NH}_2$ )，使其有較多與金屬離子形成複合物而解決水中金屬之污染 (Tirmizi, 1996)。而幾丁聚醣衍生物 N-carboxymethylchitosan 能有效去除飲用水中的鉛、Cd (cadmium) 等重金屬 (Muzzarelli et al., 1989)，另外，也有報告指出幾丁聚醣能移除污染溪水中 PCB (polychlorinated biphenyls)，且其效果比使用活性碳來的好 (Thome and Daele, 1986)。

表四、幾丁質、幾丁聚醣及其衍生物在食品工業上的應用。

Table 4. Food applications of chitin, chitosan, and their derivatives in the food industry.

應用領域	範例
抗菌物質	細菌 真菌 測量農產原料之黴菌污染
可食用膜工業	食品與周圍環境間控制水分傳遞 控制抗菌物質之釋放 控制抗氧化物之釋放 控制養分、香氣與藥劑之釋放 降低氧分壓 控制呼吸率 控制溫度 控制水果之褐變 還原滲透膜
添加物	水果與飲料之澄清與去酸 天然香氣之擴散 組織性(Texture)控制劑 乳化劑 模擬食品 增稠劑與穩定劑 色素穩定作用
營養品質	膳食纖維 降低膽固醇之影響 畜產與魚類飼料添加物 降低脂肪之吸收 生產單細胞蛋白質 抗胃炎劑 嬰兒食品成分

(接上頁)

食品加工廢棄物回收固形物	親和性絨毛作用(Affinity flocculation)
	凝膠分餾法(Fractionation of agar)
純化水	回收金屬離子、殺蟲劑、酚及 PCB's 脫色
其他	酵素固定化
	營養素膠囊
	色層分析
	分析試劑

---

---

(Shahidi et al., 1999)

表五、幾丁質及幾丁聚醣之應用。

Table 5. Application of chitin and chitosan.

應 用 型 態	用 途
廢水處理 chitin/chitosan	降低廢水中 Hg、Pb、Zn、Cu 等重金屬
chitosan-glucan	吸附廢水中 Hg、Pb、Zn、Cr、Co、Ni、Cu 等重金屬
chitosan	螯合 Fe、Co、Ni、Cu 等金屬 處理蔬菜罐頭廢水 處理家禽肉加工廢水 處理蛋加工廢水 處理乳清加工廢液 處理各種食品加工廢水(如:洋菇殺菁水...等) 處理魚漿廢水 處理污泥
chitin	回收番茄加工廢水中蛋白質
生化方面 chitin	固定酵素(如:glucose isomerase, lactase, amylase, invertase, 5'-phosphodiesterase) 分離 trypsin 及 chymotrypsin
chitosan	純化 lysozyme 固定 $\alpha$ -chymotrypsin 及 phosphatase TLC 材料
Deaminated chitin	純化 lysozyme
benzyl chitosan	陰離子交換樹脂

(接上頁)

食品方面

chitin

熱分解產生 pyrazines，可加強食品香氣

chitin/chitosan

吸附紅色四號色素

chitosan

當作防腐劑、增稠劑等食品添加物

醫藥方面

chitin/chitosan

外科手術縫合線、抗凝血劑、膠囊材料、療傷藥

其他

chitosan

逆滲透膜

紙力增強劑

膜之代用品

隱形眼鏡

chitin/chitosan

人造纖維工業

chitin

改良香煙捲紙

---

(李，1988；林，1992)

## 2. 醫藥方面之應用

幾丁聚醣除了上述的降低膽固醇功用外，還可以活化生物體內的殺手細胞 (killer cell)，抑制腫瘤細胞的生長 (Suzuki et al, 1986; 戶倉清一, 1990)，亦可將幾丁質與幾丁聚醣硫酸化，當成抗凝血劑，醫療材料方面，因具有低抗原性優點，可做人造皮膚、外科手術縫合線(Hirano, 1985)，另外還可以當藥物的包覆膠囊材料，用來控制藥物釋放的速率(Knorr, 1984)。

## 3. 生化方面

幾丁質因為有OH基與NH<sub>2</sub>基，所以其親水性與化學反應性極佳，適合作為酵素固定及親合性吸附擔體，其中固定酵素可以使用戊二醛 (glutaraldehyde) 作為偶合劑，分別與幾丁質和酵素分子的胺基形成Schiff's base，因此就可以將酵素固定在幾丁質上面 (Stanley et al, 1975)；另外也可以利用酵素上的COOH 基與幾丁質NH<sub>2</sub>基因吸附作用形成共價鍵，使酵素固定在幾丁質上，用來作親合性吸附劑，並利用親合性層析法分離酵素、抗體及激素等物質，達到分離純化效果(蘇等, 1981；張等, 1986)。

## 4. 其它

幾丁聚醣可以應用於膜的代用物、護髮劑、化妝品及隱形眼鏡(方, 1990)；若添加至人造纖維中，可改善化學毛織品的皺縮及增加衣服的韌性，也可增加紙張強度(山口, 1986)，且幾丁類聚合物也可做為耐鹼性逆滲透膜(Yang and Zall, 1984)。

## 二、乳化

### (一) 乳化之形成原理

從熱力學方面來看，通常兩不互溶的液體如：油與水同置於一容器中時會在中間出現一層油水界面，而此時界面面積最小，整體自由能最小，故所呈現狀態最安定；如果經由外來的機械力攪拌後，油水互相混合使兩液體間界面面積增加時，會導致整體自由能也隨著增加，形成一種不穩定狀態(吳，1979；蔡，1979)。我們可以由以下方程式得知：

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

其中 $\Delta G$ 為自由能變化量； $\gamma$ 為油水界面張力(interfacial tension)； $\Delta A$ 為界面面積變化量； $T$ 為絕對溫度； $\Delta S$ 為油滴(或水滴)之 (entropy)變化量(Das and Kinsella，1990)。

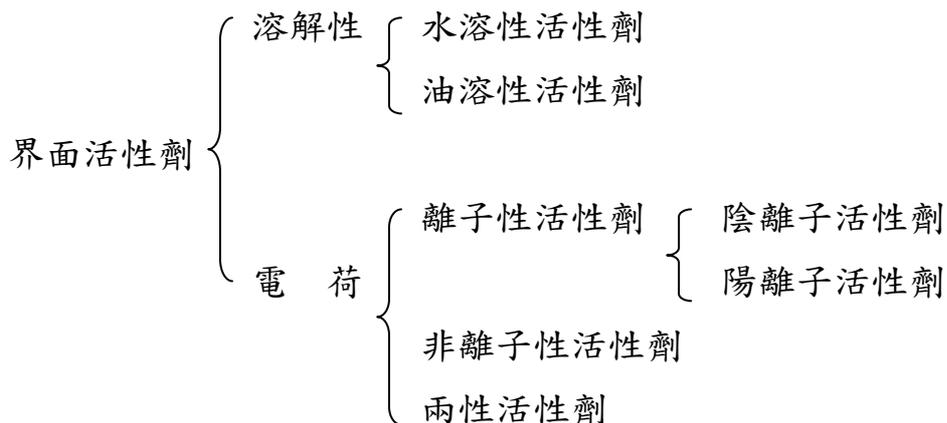
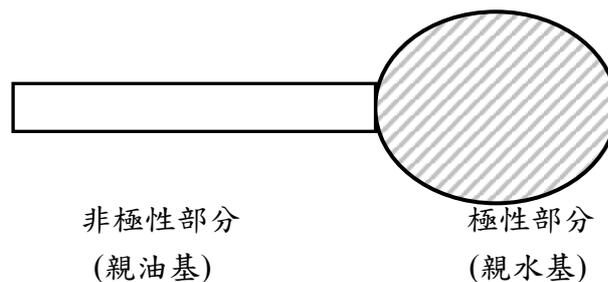
由於乳化後界面面積會比原來增加 100 倍以上，造成 $\Delta A$ 數值非常大，通常 $\Delta A \gg T\Delta S$ ，使得 $\Delta G$ 為正值，因此會讓乳化物處於不穩定狀態，為了要趨向穩定狀態，乳化物自然會往自由能較低處走，所以最後兩不互溶之液體會各自聚集在一起，減少界面面積而成為原始最安定的油水分離狀態。

如果要將此種不穩定現象持續下去，則必須再另外添加乳化劑或安定劑來維持乳化液的穩定性。所以乳化定義為：將二種或二種以上互不相溶的液體藉由乳化劑(emulsifiers)或安定劑(stabilizers)和外力作用後，使其中一種液體以液滴狀(droplets)分散在另一種液體中，並產生某程度上的安定性，此種現象稱為乳化(emulsification) (Dickinson and Stainsby，1982)。由乳化作用所形成的乳化物(emulsions)，其中呈現小滴狀分布的液體稱為分散相(dispersed phase)，而在小滴狀液體周

圍的液體部分則稱為連續相(continuous phase)。

## (二) 乳化劑之簡介

乳化劑為界面活性劑之一種，其分子具有非極性的親油基(lipophilic group)與極性的親水基(hydrophilic group)兩部分，依照溶解性可分為油溶性與水溶性兩類型。由結構又可再分為離子性、非離子性及兩性界面活性劑；離子性界面活性劑視其極性基之電荷又再區分為陰離子性及陽離子性兩種。而乳化劑的主要作用是用來減少分散相與連續相之間的界面張力(surface tension)，使乳化物能穩定存在，防止乳化物分層。(趙，1991)。



### \* 陰離子性界面活性劑

在此類活性劑當中較常見的化學簡式為 $\text{RCOOM}$ ，其中M可以是Na、K、Ca的鹼金屬鹽或是有機胺鹽，R為烷基，形成

$\text{RCOO}^-\text{Na}^+$  的形式，例如普通肥皂；另外也有高級醇的硫酸酯鹽( $\text{ROSO}_3^-\text{Na}^+$ )或是烷磺酸鹽( $\text{RSO}_3^-\text{Na}^+$ )等。

\* 陽離子性界面活性劑

典型的陽離子性活性劑有一級胺鹽( $\text{R-NH}_2\text{H}^+\text{Cl}^-$ )、四級胺鹽( $[\text{R-N-R}'\text{R}''\text{R}''']^+\text{X}^-$ )和三烷基苯甲胺鹽。

\* 非離子性界面活性劑

此類有縮合型及酯型，縮合型包含了環氧乙烷和 diethanol amine( $\text{RCON}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ )，酯型則有聚甘油脂肪酸酯等

\* 兩性界面活性劑

兩性界面活性劑的構造與胺基酸很相似，也就是分子中含有胺基和酸基兩種正負離子，在酸性溶液中，胺基會與酸作用而有水溶性；而在鹼性溶液中時，酸基會與鹼中和溶解，其中一例為 N, N-二烷基胺基烯 酸鹽( $\text{R}'\text{R}''\text{N}^+(\text{CH}_2)_n\text{COO}^-$ )。

### (三) HLB (Hydrophile Lipophile Balance) 值

由於乳化劑都具有親水基及親油基兩個部分，若親水部份強度比親油部份強，則整個分子為水溶性不溶於油；相反的，若親油部份強度比親水部份強，則整個分子為油溶性而不溶於水。因此為了辨別乳化劑的親水親油性，便有 HLB(Hydrophile Lipophile Balance) 值的出現，其表示法是使用數字，數字越大表示乳化劑的親水性也就越好，數字越小表示親油性越好，現今所使用的 HLB 值最大者約 40，最小者為 1，乳化劑 HLB 值的計算方式有很多種，可依照不同性質區分如下：(趙，1991；王，1993)。

1. W. C. Griffin 所訂的基本計算方式：

$$\text{HLB} = (\text{親水基分子量} / \text{界面活性劑分子量}) \times (100/5)$$

$$\begin{aligned}
&= (\text{親水基重量} / \text{疏水基重量} + \text{親水基重量}) \times (100/5) \\
&= \text{親水基重量比} \times 20 \\
&= \text{親水基重量} \% \times (1/5)
\end{aligned}$$

其基本定義為沒有親水基的烷類 HLB 為 0；全部由親水基所構成的 polyethylene glycol 其 HLB 為 20，因為非離子性界面活性劑其親水基親水性不大，最大為 20，所以非離子性界面活性劑其 HLB 值介於 0~20 之間。而上式也可以用來計算離子性界面活性劑 HLB，其中陰離子性的 HLB 可達到 40。

由於非離子性界面活性劑的化學構造不同，所以有不同的計算方式，就不同化學結構可分為下列方式計算：

(1) 多元醇的脂肪酸酯

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

其中 S 為酯的皂化價；A 為脂肪酸的中和價。

(2) 多元醇的環氧乙烷縮合物

$$HLB = (E + P) / 5$$

其中 E 為環氧乙烷重量百分率；P 為多元醇重量百分率。

(3) 單元醇環氧乙烷縮合物

$$HLB = E / 5$$

其中 E 為環氧乙烷重量百分率

## 2. 川上計算方式

用此方式計算其 HLB 值的範圍不受到 0~20 之間的限制，其適用範圍為  $-\infty \sim +\infty$ 。

(1) 非離子性界面活性劑

$$HLB = 7 + 11.7 \log(M_w/M_o)$$

其中  $M_w$  為親水部份的分子量； $M_o$  為親油部份的分子量。

## (2) 離子性界面活性劑

$$HLB = 7 + 4.05 \log(1/c.m.c.)$$

其中 c.m.c.(critical micelle concentration) 為界面活性劑微胞生成濃度(mole/L)。

## 3. Davis 計算法

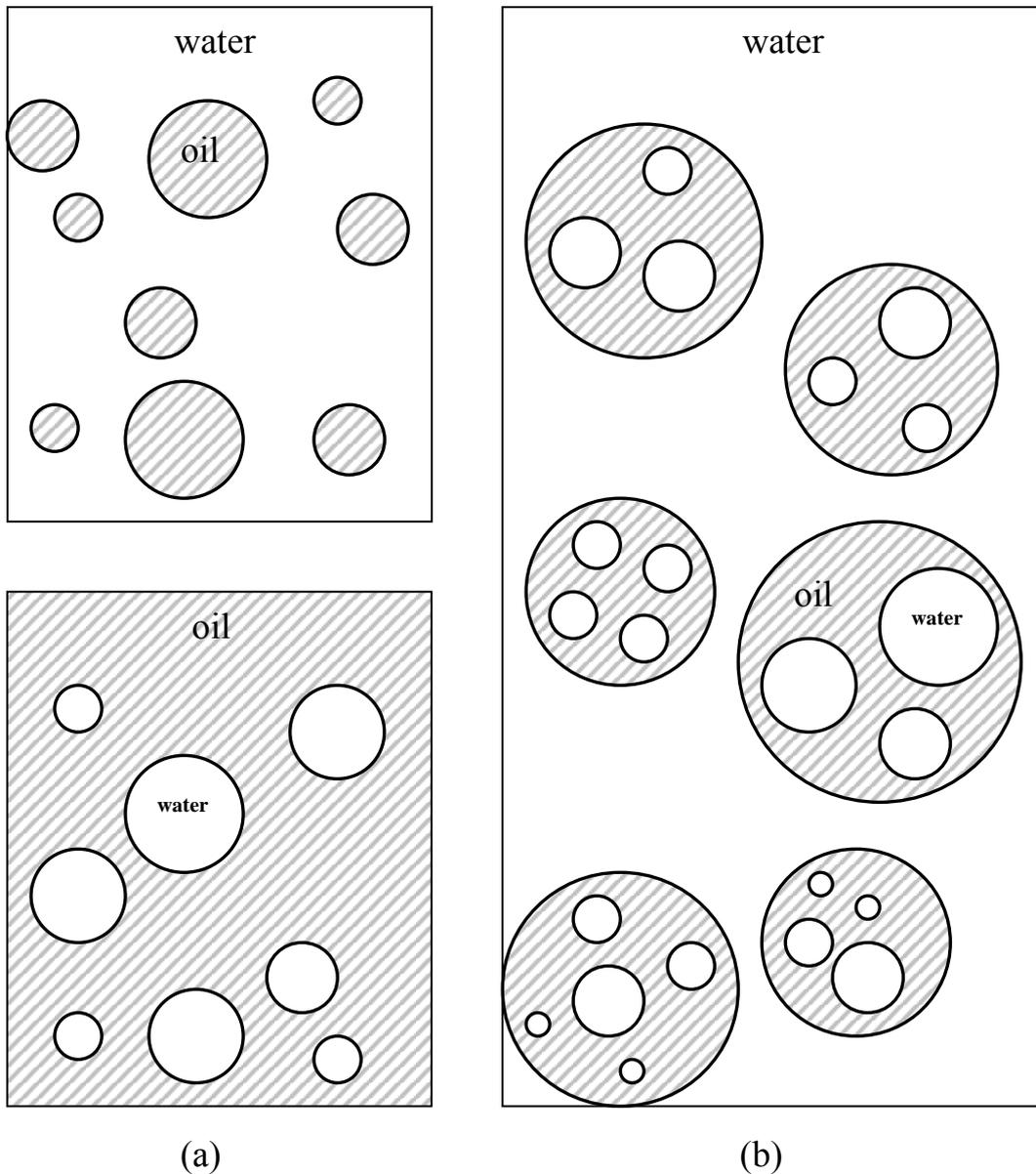
$$HLB = 7 + \Sigma(\text{親水基的基數}) - n \Sigma(\text{CH}_2\text{基的基數})$$

其中  $n$  為分子中  $\text{CH}_2$  基的數目。

## (四) 乳化物之類型

乳化液一般可區分為水中油滴型(oil-in-water, o/w)及油中水滴型(water-in-oil, w/o)兩種，此兩種為兩相乳化液(two-phase emulsions)，在食品應用方面 o/w 型為蛋黃醬(mayonnaise)、沙拉醬(salad dressing)、冰淇淋(ice cream)...等；而 w/o 型為奶油(butter)、烤酥油...等。在乳化液生產過程中，對乳化劑具有較好溶解度的液體將成為連續相，換句話說，當乳化劑的 HLB 值為 3.5-6 或是油溶性時，可以用來生產 w/o 型乳液，表示水滴為分散相，油為連續相；當乳化劑 HLB 值為 8-18 或是水溶性時，則可以用來生產 o/w 型乳液，表示油滴為分散相，水為連續相(陳，1996)，除了上述兩種類型外，還有多重相乳化液(multiple emulsions)，形式為 w/o/w 或 o/w/o 兩種，如圖六所示(Friberg and Larsson，1997)。

在檢驗一個乳化物樣品是屬於哪一類型時，可以由下列幾種方式判斷(趙，1991)：



圖六、兩相乳化液(a)水中油滴型(o/w，上)或是油中水滴型(w/o，下)。多重相乳化液(b)以 w/o/w 型做說明。

Figure 6. A two phase emulsion (a) may consist of oil droplets in water (o/w, top) or water droplets in oil (w/o, bottom). A multiple emulsion, (b) water-in-oil-in-water (w/o/w). (Friberg and Larsson, 1997)

### 1. 色素法

將油性色素放入乳化液中，若色素能溶解分散在其中，則為 w/o 型之乳化液；反之，無法溶解分散時，則為 o/w 型乳化液，或者利用水溶性色素放入乳化液時，若色素能溶解分散在其中，則為 o/w 型乳化液，反之，則為 w/o 型之乳化液。

### 2. 稀釋法

將乳化液放入水中時，能夠被水稀釋，但放入油中時所呈現為乳化液滴，則為 o/w 型乳化液；反之則為 w/o 類型。

### 3. 導電度法

因為水的導電度比油大，所以測量乳化液導電度時，o/w 型乳化液其導電度會比 w/o 型乳化液大很多。

一般不論哪一種類型的乳化液，其外觀給人的視覺均為乳白色，此乃因乳化液中分散相與連續相具有不同折射率，而乳化粒子大小是介於 100~1 $\mu$ m 之間，1 $\mu$ m 以下則稱為溶化現象，乳化顆粒大小與外觀如表六(王，1993；陳，1996)。

表六、乳化顆粒大小與外觀。

Table 6. Emulsion droplet sizes and appearance

乳化顆粒大小( $\mu$ m)	外觀
> 1	乳白色
0.1~ 1	青白色
0.05 ~ 0.1	半透明灰色
< 0.05	透明

## (五) 沙拉醬與蛋黃醬簡介

沙拉醬(salad dressing)和蛋黃醬(mayonnaise)為東西方日常見之食品，是一種半固體的 o/w 乳化物，其主要成份包含了油、醋、水和蛋黃，而鹽、香料、甜味劑和食品調味料也可以適量添加在蛋黃醬當中用來增加風味。蛋黃的成分包含了脂蛋白(lipoprotein)、卵磷脂(lecithin)和磷脂類(phosphatides)，這些物質提供蛋黃的乳化能力(emulsifying capacity)，且在美國蛋黃已經被當成乳化劑使用在蛋黃醬上(Krog et al., 1985)。在西班牙法令中，蛋黃醬和清淡醬汁等被規定為半固體的乳化物，利用油、全蛋或蛋黃、醋和檸檬汁等製作而成，另外再加上其他的佐料，且規範蛋黃醬的油含量最少要 65%，蛋則需要 5%，高量的油主要是提供蛋黃醬的黏度(Pons et al., 1994)。沙拉醬依照類型又可分為(Macrae et al., 1993)：

### 1. Oil and vinegar dressing：

屬於暫時性乳化液(temporary emulsions)，激烈攪拌可使溶液均勻乳化，然而不久混合成份又分開。例如：義大利沙拉醬(Italian salad dressing)、法式沙拉醬(French salad dressing)等。

### 2. Emulsified dressings：

屬於永久性乳化液(permanent emulsion)：含有乳化劑之濃稠液，其穩定性佳，混合成份不易分開者。例如：蛋黃醬。

### 3. Cooked salad dressings：

乳化液中含有澱粉增稠劑(starch thickener)，其外觀與蛋黃醬相似，但是其油含量 FDA 規定不可超過 30%，蛋的含量要在 4% 以下。

## (六) 幾丁聚醣之乳化性質

Knorr(1982)研究結果：

研究比較幾丁質、幾丁聚醣、微結晶幾丁質(microcrystalline chitin) (即將幾丁質加入 $H_3PO_4$ 及 2-propanol作用使其膨脹並以Waring Blendor高速攪拌利用剪切力降解其分子後冷凍乾燥之產物)、微結晶纖維素(microcrystalline cellulose)之吸水性吸油性。結果發現，在吸水性方面介於 230-440 % (w/w)之間，其中chitosan > chitin > microcrystalline chitin > microcrystalline cellulose；在吸油性方面介於 170-315 % (w/w)之間，其中chitin > microcrystalline cellulose > microcrystalline chitin > chitosan。另外，取 microcrystalline chitin、microcrystalline cellulose 及 lauryl sulfate的乳化能力(emulsion capacity, mL oil/g)及乳化安定性 (emulsion stability)。在乳化能力方面， lauryl sulfate > microcrystalline chitin > microcrystalline cellulose，在乳化安定性方面，於使用濃度低於 0.52 g /mL water時：lauryl sulfate > microcrystalline chitin > microcrystalline cellulose，但至濃度 0.8 g /mL water以上三者則相同，這些乳化液置於 85°C，15 min無分離現象。

Schulz 等人(1998)研究結果：

研究幾丁聚醣 (去乙醯度 89 %) 之乳化性質，結果發現，此幾丁聚醣適合 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。這些低去乙醯度者先將油包住水(w/o)，然後由高去乙醯者將水包住 w/o 而成為 w/o/w (即 water-in-oil-water) 乳化液。因此，學者認為此幾丁聚醣為 w/o/w 型乳化物，研究中亦以光學顯微鏡照相加以證明。若將幾丁聚醣溶於醋酸至 1 %濃度，加入 sunflower oil 使

chitosan/sunflower oil 為 0.16 (w/w)後，乳化，其乳化液置於室溫下 2 個月並無分離現象。但若添加 anionic emulsifier，如：sodium dodecyl sulfate (SDS)至上述 chitosan/sunflower oil 之混合液，乳化後，發現帶正電之幾丁聚醣會與帶負電之 SDS 產生結合作用而沉澱使乳化液產生分層。

Del Blanco 等人(1999)研究結果：

自蝦殼製備去乙酰度 73 至 94 %之幾丁聚醣後，分別溶於 1%醋酸，加入 sunflower oil (20g sunflower oil/80g 1 % chitosan solution)並乳化。結果發現，去乙酰度 81 至 88 %者的乳化液經過 6 次凍結-解凍循環(freeze-thawing cycle)或是 100°C 加熱時仍為安定。

Kanauchi 等人(1995)研究結果：

研究發現幾丁聚醣粉可溶於胃液中並可乳化胃中之脂質進而防止腸內脂質水解 (intestine lipase)水解吸收。

Rodriguez 等人(2002)研究結果：

將去乙酰度 75 至 95 %的幾丁聚醣分別溶於 0.1M HCl (即類似胃酸環境) 至 0.2、1.0 及 2.0 % (w/v) 之濃度，然後加入 sunflower oil 至不同比例，並且均質乳化。發現於 oil /chitosan solution 之比例為 20/80 時，其乳化液置於室溫下 1hr 後無分離現象。這些乳化液更為安定且乳滴 (emulsion droplet) 較小及一致性(unimodal)。

Van 及 Szuhaj(1998)；El-Adawy(2000)；阮(1984，1996)研究指出：

蛋白質具有親水基及親油基故可當為食品之乳化劑，且因其帶靜電及為大分子聚合物故有靜電推斥、立體阻礙及黏性安定作用，使食品乳化後很安定，但其缺點為受熱變性(thermal denaturation)、等電點(pI)及多價離子等之作用。

Tesch(2002)研究結果：

將澱粉修飾為 octenyl-succinate starch 後可當為食品之乳化劑，且其兼具立體阻礙及黏性安定作用，故使食品乳化後更安定。

乳化劑當應用至食品或化妝品等時，主要為使食品中油和水於均質混合後不易分層(即安定)。乳化劑除了利用其親水基及親油基使水和油在一起外，尚有一些安定作用機制使其乳液更為安定。這些機制依靠乳化劑之種類，大致分為：

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

乳化劑當吸附(adsorption)在油和水滴間之表面時，其利用帶負電(anionic)或正電(cationic)互相推斥使這些 droplets 不易聚集 (coalescence) 產生分離。這些乳化劑多半屬於低分子量者，如：lecithin、stearoyl lactylate 等，其缺點為受 pH 及電解質之影響(Macrae，1993；Del Blanco，1999)。

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

大分子之乳化劑，如：蛋白質、膠質(gums)...等，當附著在油和水滴間表面上，利用巨大結構(macromolecular structure)

阻礙這些 droplets 因聚集而分離 (March and Napper, 1977 ; Napper, 1983 ; Tesch, 2002)。

(3) 黏性安定作用(viscositying stabilization)：

乳化劑利用其具有高黏度特性使乳化液更為安定。這類乳化劑多半屬於非離子者(non-ionic)，如：mono and diglycerides、diacetyltartaric esters of mono-diglycerides...等(Macrae, 1993 ; Rodriguez, 2002)。

而幾丁聚醣：

- \* 有親油基(-COCH<sub>3</sub> groups)及親水基(-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>、-OH groups)，可為乳化劑。
- \* 為多價陽離子(polycationic)，故有靜電推斥安定作用。
- \* 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)並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 約 6.3)。
- \* 不受熱影響。

因此，幾丁聚醣理論上具有潛力且優於以往在食品加工或化妝品(cosmetic)上所用的乳化劑。

## 伍、材料與方法

### 一、實驗材料

#### (一) 粗幾丁質原料：

購自台灣高雄應化企業公司，由蟹殼加工而得之粗幾丁質，其外觀為片狀( $\alpha$ -type)。

#### (二) 大豆沙拉油：

市售統一大豆沙拉油，置於室內陰涼乾燥處存放備用。

#### (三) 實驗所需藥品：

NaOH 和 HCl 購自聯工化學廠股份有限公司；potassium polyvinyl sulfate solution (P. V. S.-K), acetic acid 購自和光純藥工業；toluidine blue 購自 Sigma 公司；糖(精製細砂)購自台糖公司、鹽(高級精鹽)購自台鹽公司；PCA(plate-count-agar) 購自 Merck 公司。

## 二、實驗之儀器設備

- (1) 磨粉機：SW-1 型，祥泰精機股份有限公司，臺灣。
- (2) 電磁式搖篩機：OCTAGON<sup>DIGITAL</sup> 2000 型，Endecotts 公司，英國。
- (3) 分析篩網：Tyler 標準規格篩網，Endecotts 公司，英國。
- (4) 板式加熱攪拌器(Stirrer/Hot Plate)：Corning 公司，美國。
- (5) 烘箱：ULM500 型，Mettler 公司，德國。

- (6) 電子式天平：B120S 和 B410 型，Sartorius 公司，德國。
- (7) pH meter：SP701 型，Suntex 公司，臺灣。
- (8) 均質機：POLYTRON PT3000 型，Kinematica AG，美國。
- (9) 黏度計：DV-II+型，Brookfield 公司，美國。
- (10) 顯微鏡：BH-2 型，Olympus 公司，日本。
- (11) 數位相機：Canon G2，Canon 公司，日本。

### 三、實驗材料之製備

#### (一) 幾丁質(chitin)

將購得之粗幾丁質以粉碎機磨碎後，再經由 40 ~ 60 mesh Tyler標準規格之篩網過篩，所得之粗幾丁質粉末大小介於 0.25 ~ 0.42 mm之間，接著加入 2N HCl溶液(20mL/g dry chitin)攪拌至無CO<sub>2</sub>氣泡產生，除去液體，再以蒸餾水洗去殘餘 HCl後烘乾(80°C，6hr)，再以 2N NaOH溶液(20mL/g dry chitin)，於 100 °C下加熱攪拌一小時，除去液體，最後使用蒸餾水洗去殘留之 NaOH，放入烘箱乾燥，即得實驗用之幾丁質(阮，1995)。

#### (二) 不同去乙醯度之幾丁聚醣(chitosan)

將上述所得之幾丁質加入 57 % (w/v) NaOH 溶液中(20mL /g dry chitin) 並加熱 100°C攪拌至不同時間，時間一到，立刻利用大量蒸餾水洗去 NaOH 至 pH 中性為止，接著放入烘箱乾燥(80°C，6hr)，乾燥完成後，測定其去乙醯度。

## 四、實驗方法

### (一) 幾丁聚醣產品乳化能力(emulsifying capacity) 之測定

此試驗進行幾丁聚醣之去乙醯度、濃度以及 pH 對乳化能力之影響(Sathe and Salunkhe, 1981)：

將 0~10、20~30、40~50、60~70 及 80~90 %去乙醯度之幾丁聚醣分別置於 250mL 燒杯中，加入 30mL 0.1M 醋酸溶液配製不同濃度 (0.5、1.0、1.5 及 2.0 %)，在室溫下攪拌溶解 2 小時以上，並個別以 0.1N CH<sub>3</sub>COOH 或 0.1N NaOH 調至不同 pH 值 (3.0、4.0、5.0、6.0)，且此燒杯有裝置三用電表電極，然後一邊緩慢加油(3mL / interval)，一邊以均質機均質(9500rpm)至導電度突減並紀錄此時所加油量(mL oil/100mL chitosan solution)。

### (二) 幾丁聚醣產品乳化安定性(emulsifying stability) 之測定

上述乳化能力之測定所添加最高之油量，其乳化液中油及水均產生分離。欲得到較安定之乳化液，吾人所使用油量均較測定乳化能力時所添加油量為少，通常以乳化液達到最高黏度所添加油量為準(阮，1984)。此試驗首先進行各乳化液於導電度突減前確實之添加油量以達到最高之黏度，然後以此為準製備各種乳化液後於不同溫度下處理，以及施行凍結-解凍循環(freeze- thawing cycle)，並觀察其安定性。

## 1. 油量添加量對乳化液黏度影響之測定

將 0~10、20~30、40~50、60~70 及 80~90 % 去乙醯度之幾丁聚醣置於 250mL 燒杯中，加入 30mL 0.1M 醋酸溶液配製不同濃度(0.5、1.0、1.5、2.0 %)且攪拌溶解 2 小時以上，並以 0.1N  $\text{CH}_3\text{COOH}$  或 0.1 N  $\text{NaOH}$  調至不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0)，分別慢慢添加油並均質，其加油量與導電度突減所添加油量之比例分別為 50、60、70、80 及 90 %，靜置 1 小時後測定乳化物之黏度。

## 2. 處理溫度、幾丁聚醣之去乙醯度和濃度、pH 對乳化液安定性影響之測定

將 0~10、20~30、40~50、60~70 及 80~90 % 去乙醯度之幾丁聚醣分別置於 250 mL 燒杯中，加入 30mL 0.1M 醋酸溶液配至不同濃度(0.5、1.0、1.5、2.0 %)，攪拌溶解 2 小時以上並以 0.1N  $\text{HCl}$  或 0.1N  $\text{NaOH}$  調至不同 pH(3.0、4.0、5.0、6.0)，以同上方方法均質及加油 (導電度突減前最佳油量)，然後各取 30 mL 乳化液置於試管內，分別於 5°C(即冷藏溫度)及 25°C下(即室溫) 存放，及於 60°C 加熱 30 min (Pasteurization) 或 100°C 加熱 30min (即一般以 boiling water 殺菌) 或 121°C 加熱 30min (即 autoclaving) 後，放置在室溫 1 小時待所有樣品溫度相同後測定比較乳化液之黏度改變情形。測量完畢後除了冷藏組繼續儲存在 5°C 下二星期外，其餘組別在室溫下存放二星期，存放期間觀察乳滴大小之分布 (droplet size distribution) 及有否凝集 (coalescence) 現象發生，同時以肉眼觀察有否分離。

### 3. 凍結-解凍循環對乳化液安定性影響之測定

選擇上述存放二星期實驗中較安定之幾丁聚醣乳化液樣品，依前述乳化液之條件製備其乳化液後，各取 30mL 於試管中進行循環凍結-解凍(freeze-thawing cycle) 5 次(二重複)，其凍結溫度為  $-13^{\circ}\text{C}$ ，解凍溫度為  $25^{\circ}\text{C}$  (室溫)，其時間各約 1hr。每次循環凍結-解凍利用滴管吸取所分離之油，並紀錄其所分離之油量，且觀察其有否凝集及分離現象。

## (三) 食品應用

選出使乳化液最為安定之組合(即幾丁聚醣之去乙醯度、濃度及 pH)製備似沙拉醬產品後進行黏度、官能評估、安定性及生菌數之測定。亦依傳統方法製備為對照組。

### 1. 法式沙拉醬之配方

參考 Macrae (1993) 等方法並稍修改其成份如下：

Ingredient	Traditional process	Here-in process
Soybean oil	40.0 %	40.0 %
Vinegar	17.0 %	17.0 %
Water	36.1 %	36.1 %
Sugar	6.0 %	6.0 %
Salt	0.3 %	0.3 %
Egg yolk (dry weight)	0.6 %	-----
Chitosan	-----	0.6 %
	100.0 %	100.0 %

## 2. 製備方法

傳統做法為將蛋黃原料與醋、水相混合溶解後加入糖、鹽調味，並攪拌均勻，並預先加些許油均質乳化，然後再一邊加油，一邊均質(9500rpm，30 min)，完成後即為沙拉醬。在幾丁聚醣產品方面，則先取部分水分別與糖及鹽混合溶解成糖水及鹽水後，再另外將乾燥的幾丁聚醣與醋、剩餘之水攪拌溶解，等待幾丁聚醣溶解後加入上述糖水，然後一邊加油並一邊均質(9500rpm，30 min)，最後所完成之乳化物再加入鹽水調味，即為含幾丁聚醣之沙拉醬產品。若想再增加沙拉醬之額外風味，則可以選擇性加入其它特殊風味調味料。

## 3. 官能評估

官能評估採用喜好測驗法(nine point Scale)，總共分為9分，其中最喜歡者為9分，最不喜歡者為1分。評定幾丁聚醣產品或傳統沙拉醬時，請16位東海大學食品科學所研究生品評，項目為口感、風味、顏色、澀味及整體接受性。

## 4. 產品安定試驗

挑選適合當幾丁聚醣沙拉醬之產品，分別於5°C及室溫下保存，保存期間取樣測定總生菌數及觀察有否分層。

## (四) 分析方法

### 1. 幾丁聚醣去乙醯度之測定

取20mg待測樣品加入0.1M醋酸10mL，在室溫下攪拌約

1 小時後，以蒸餾水稀釋 5 倍，取 5mL 加入一滴指示劑(toluidine blue indicator)，以 N / 400 potassium polyvinyl sulfate solution (P. V. S.-K) 滴定至變紅紫色，另外再取標準樣品依同樣方法滴定，比較滴定量後計算待測樣品之去乙醯度(Toei and Kohara，1976)。

## 2. 黏度測定

以 Brookfield viscometer (model DV-II+) 測定幾丁聚醣產品乳化液之黏度，所使用之 Spindle 為 S61 至 S64。

## 3. 乳滴大小分布

利用 optical microscope 觀察，紀錄乳化液中乳滴具有之直徑，同時照相其分布及有否凝集現象，乳滴直徑計算方式：利用接目測微尺直接觀察乳滴直徑，首先將觀測範圍區分為四等分，隨機取其中一區域計算乳滴大小，之後計算其直徑大小出現次數所占百分比(Rodriguez，2002)。

## 4. o/w、w/o、o/w/o 及 w/o/w 型乳化液觀察及測定

將乳化液 5mL 放入 100mL 水中攪拌後觀察，若能夠被水稀釋，則判斷為 o/w 型乳化液，反之若放入 100mL 油中時呈現乳化液滴狀，此時則為 w/o 類型。另外，亦以顯微鏡進一步觀察其為 o/w/o 或是 w/o/w，若在乳化液滴中，其內部水相還有液滴存在則為 o/w/o 型態，反之在乳化液滴中，其內部油相還有水滴存在則為 w/o/w 類型。

## 5. 生菌數之檢驗

參考 CNS10890 食品微生物之檢驗-生菌數及黴菌之檢驗。

### (1) 培養基之準備：

取 22.5 g PCA (Plate count agar) 溶於 1000 mL 蒸餾水中，加熱溶解後，分裝於血清瓶中，經 121°C 滅菌 15 min。

### (2) 無菌稀釋液(生理食鹽水)之準備：

取 8.5 g 氯化鈉溶於 1000 mL 蒸餾水中，加熱溶解後，分裝 9mL 於試管中，經 121°C 滅菌 15 min。

### (3) 生菌數檢驗方法：

檢驗生菌數前先使樣品充分均勻混合，之後將各稀釋倍數之檢液，均勻混合，再分別取 1 mL 注入培養皿中(每一稀釋檢液做二重複)，並倒入約 45°C 之培養基，使稀釋液與檢液混合均勻。待培養基凝固後，倒置培養 37°C，72hr 後，選取 25 ~ 250 個菌落之兩個培養皿來計數，其生菌數之表示方式為取平均值 (CFU/mL)。

## 6. 統計分析

試驗結果之數據，採用 SAS 套裝軟體，進行全隨機設計 (completely randomized design) 並以變異分析 (ANOVA) 及 Duncan's new multiple Range test 比較樣品間差異顯著性， $p < 0.05$  為有顯著差異。

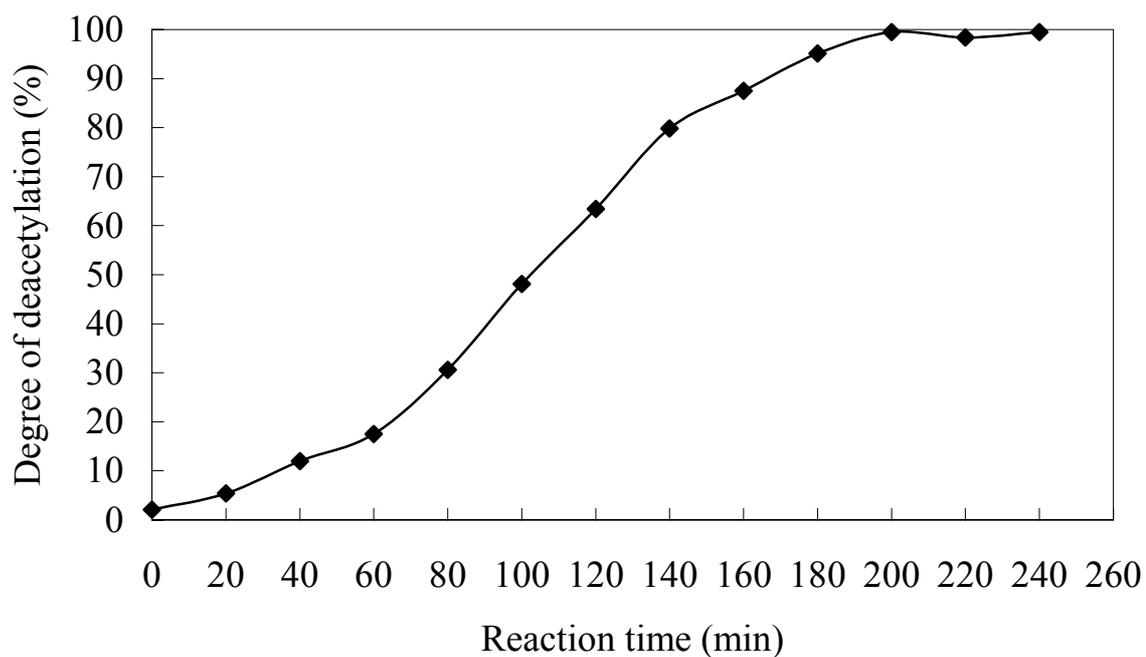
## 陸、結果與討論

### 一、幾丁質之製備

將購自高雄應化企業公司之粗幾丁質( $\alpha$ -type)，經粉碎機磨碎並過篩後，取顆粒大小介於 40~60 mesh 的小顆粒，取上述粗幾丁質加入 2N HCl (20mL/g dry chitin) 處理並接續以 2N NaOH (20mL/g dry chitin) 在 100°C 下反應，可以去除粗幾丁質中剩餘之碳酸鈣及蛋白質，乾燥後得到較純之幾丁質，其外觀是略為黃白色、質地堅硬且無異味之細小顆粒。而使用 40~60 mesh 大小之原因是避免顆粒太大，在去蛋白質、碳酸鈣及後續去乙醯反應時反應不完全，另外顆粒太小則容易在使用大量蒸餾水清洗時流失。

### 二、不同去乙醯度幾丁聚醣之製備

幾丁質經由強鹼液在高溫下作用後，會使得幾丁質上的乙醯基 (acetyl group) 被去除掉，因而裸露出胺基 ( $\text{NH}_2$ )，此時產物則稱為幾丁聚醣，一般去乙醯程度越高的幾丁聚醣其裸露的胺基則越多。由於幾丁聚醣去乙醯度多寡主要會受到溫度、反應時間、鹼液濃度、鹼液用量、周圍環境…等影響，所以不同條件下所製備的幾丁聚醣其去乙醯程度也會不一樣，本實驗所使用之條件為將 57% NaOH (w/v) 溶液 1000mL 預先放在不鏽鋼容器中加熱至 100°C，接著馬上放入上述之幾丁質 (20mL NaOH solution/g dry chitin)，在普通大氣下反應，溫度保持在 100°C，沒有加鍋蓋，且適時添加蒸餾水補充蒸發之水分維持 NaOH 溶液體積之恆定，避免濃度改變影響去乙醯反應，接著待反應時間一到馬上取出幾丁聚醣，用大量蒸餾水沖洗至中性並烘乾，結果可參考圖七。



圖七、反應時間對幾丁質去乙醯度之影響。

Figure 7. Effect of reaction time on the degree of deacetylation of chitin.

Reaction temperature: 100°C

NaOH solution/dry chitin (v/w)=20

由圖中之結果可得知，隨著反應時間的增加其去乙醯度也隨著增加，0 min 時為幾丁質所測得之去乙醯度(約 2.1%)，而在反應時間 60 min 前去乙醯度上升速度較 60 min 後緩慢，其原因推測是 60 min 前幾丁質結晶正慢慢吸水膨潤，鹼液較難接觸晶體內之乙醯基(acetyl group)，只能與晶體外面之乙醯基反應，故去乙醯速度較慢；60 min 之後幾丁質已經完全膨潤，因此鹼液較易深入晶體內部結構與幾丁質內部乙醯基反應，其去乙醯程度上升較快。在 200 min 時，幾丁聚醣的去乙醯度就已經達到 99.5%，此後繼續加熱反應，則去乙醯度就沒有再上升現象。

### 三、幾丁聚醣之乳化能力

使用顆粒大小為 40~60 mesh，不同去乙醯度幾丁聚醣，將其溶解在濃度 0.1M 的 30mL 醋酸溶液中，調整不同濃度與不同 pH，一邊加油一邊攪勻直到導電度突減時所加入的油量 (mL oil/100mL chitosan solution) 為乳化能力。

#### (一) 幾丁聚醣之去乙醯度對乳化能力之影響

將去乙醯度 0~10% 者(即幾丁質)配製不同濃度放入 30mL 醋酸溶液中，攪拌 2 小時以上無法溶解，且無膨潤現象，其顆粒仍是原來黃白色固體並直接沉澱至燒杯底部，上半部為白色細小幾丁質懸浮物，沒有溶解現象。大部分均為結晶體，乙醯基及胺基並未露出，故無論在任何 pH 及濃度下皆無乳化能力。

由圖八可看出，幾丁聚醣去乙醯度越高其乳化能力越佳，雖然高去乙醯度者的乙醯基較低去乙醯度者為少，理論上後者之乳化能力比較高，但因其溶解度欠佳，許多乙醯基仍在其結

構內使然。

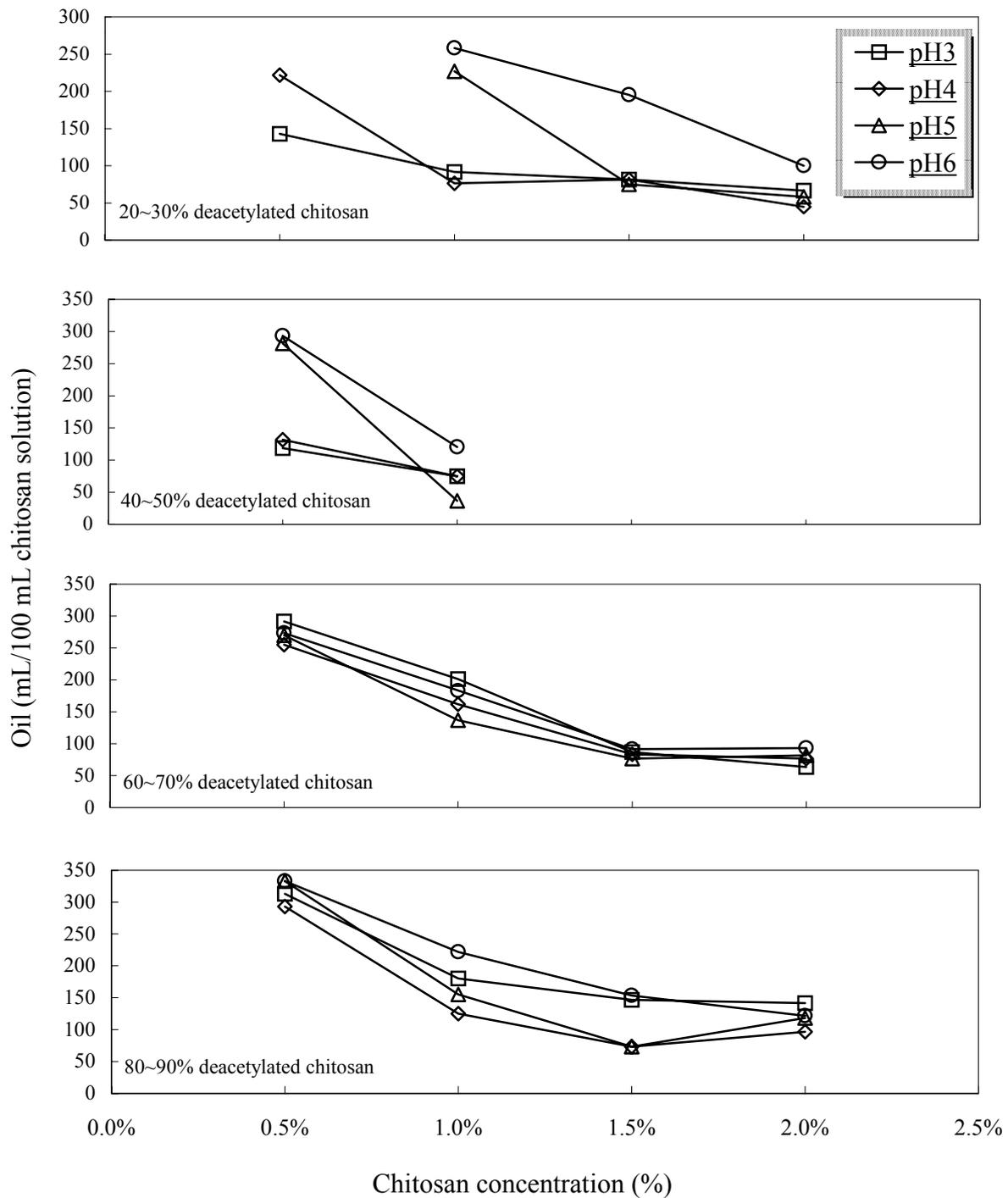
## (二) 幾丁聚醣之濃度對乳化能力之影響

圖八顯示，隨著幾丁聚醣溶液濃度增加，其乳化能力會有下降趨勢。原因可能是隨著幾丁聚醣溶液濃度增加，幾丁聚醣分子與分子之間相對距離越來越接近，因此在均質乳化的過程中，油的分子較難順利與幾丁聚醣之乙醯基產生交互作用而影響至其乳化能力。

## (三) pH 對幾丁聚醣乳化能力之影響

由圖八亦可看出，對去乙醯度 20~30 % 者而言，其濃度 1.0 % 以上，在相同濃度下，幾丁聚醣溶液 pH 接近幾丁聚醣 pKa (6.3) 時其乳化能力較佳，而隨著 pH 越低其乳化能力亦降低。原因可能是 pH 接近 pKa 時， $\text{COCH}_3$  親油能力較  $\text{NH}_3^+$  ( $\text{NH}_3^+$  變成  $\text{NH}_2$ ) 多，故乳化能力較好，pH 越低時，由於  $\text{COCH}_3$  數量不變，但  $\text{NH}_3^+$  變多，親水亦變大，故乳化能力降低。此外，該幾丁聚醣之濃度為 0.5 % 在 pH 5.0 及 6.0 時呈現無乳化能力，此可能為其濃度本來少且 pH 接近 pKa 時其產生沉澱所致。去乙醯度 40~50 % 者，於 pH 接近 pKa 時，其乳化能力亦較佳，而 pH 較低時其乳化能力便降低，推測原因與上面類似。但濃度 1.5 % 以上時其溶液為膠狀，流動性極低 (燒杯倒置時溶液仍不會流動)。此溶液難於攪拌、調 pH 或進行乳化，故僅做其 0.5 % 及 1.0 % 濃度之乳化性質。在去乙醯度 60~70 % 和 80~90 % 者方面，除了在去乙醯度 60~70 %，濃度為 1.0 % 及去乙醯度 80~90 %，濃度為 1.0 %、1.5 % 時，乳化能力有因 pH 不同而出現些微差距外，其餘不同 pH 對乳化力之影響並不是很大，但是在此兩組中，整體而言在 pH 6.0 時其乳化能力與其它 pH 比較時

是有較高之趨勢。



圖八、幾丁聚醣之去乙醯度和濃度及 pH 對乳化能力之影響。

Figure 8. Effects of deacetylation degree and concentration of chitosan and pH on the emulsifying capacity.

## 四、幾丁聚醣之乳化安定性

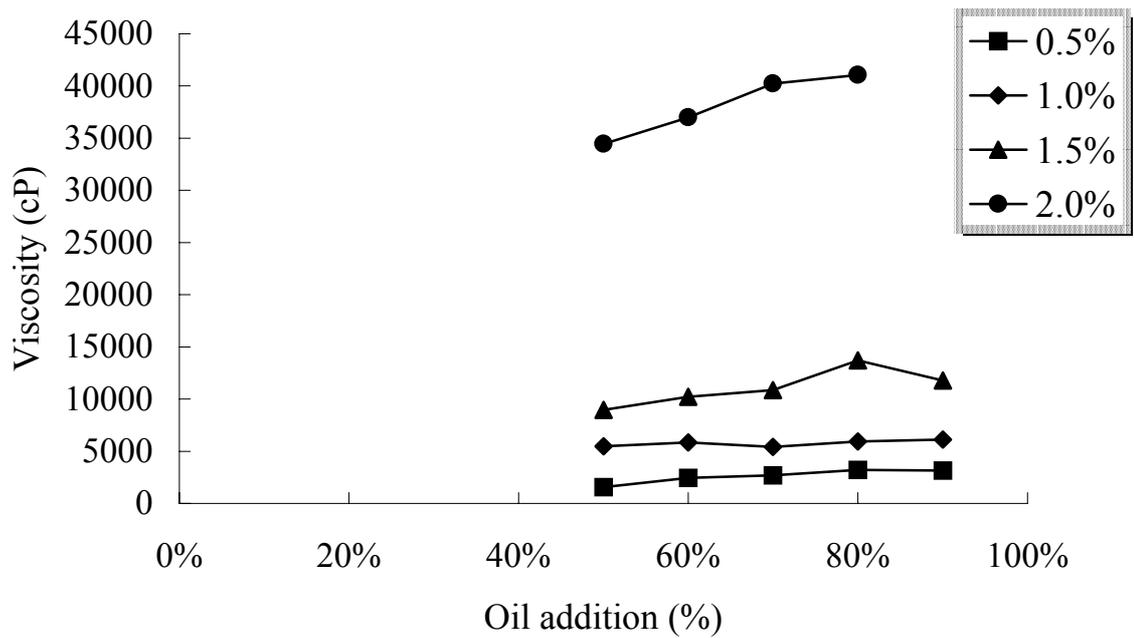
### (一) 油量之選擇

取不同去乙醯度之幾丁聚醣，加入 30mL 的醋酸溶液且配製不同濃度，並以 $\text{CH}_3\text{COOH}$ 或 $\text{NaOH}$ 調整幾丁聚醣溶液至不同 pH，接著一邊慢慢添加油一邊均質，其加油量為導電度突減時所加油量之比例，分別為 50、60、70、80 及 90%，完成後測定其乳化液之黏度，選擇具黏度最大之比例。結果發現，在各種乳化樣品中，當添加至導電度突減時油量的 80% 時，其黏度均為較高的，乳化液之黏度越高則越為安定(阮，1984)。比如去乙醯 60~70% 者為例，分別以不同濃度在 pH 6.0 以下進行乳化，乳化時分別加入油量為導電度突減時所加油量之比例，為 50、60、70、80 及 90%，發現，其黏度均在加油量約 80% 時為較高的(圖九)。因此推斷此時乳化物是較穩定的，其中在 2.0% 時，添加 90% 油會造成乳化失敗，推斷可能是接近其乳化能力極限，且加上均質時間比測定乳化能力實驗的時間長，所以導致乳化物不安定。在其它去乙醯度方面，也有相同之現象。因此，後續之實驗中，均以此為依據乳化之。

### (二) 處理溫度、幾丁聚醣之去乙醯度和濃度、pH

#### 對乳化液安定性之影響

將去乙醯度 20~30、40~50、60~70 及 80~90% 之幾丁聚醣，加入 30 mL 醋酸溶液至不同濃度 (0.5%、1.0%、1.5% 及 2.0%)、不同 pH (3.0、4.0、5.0 及 6.0)，邊均質邊加油(導電度突減時 80% 油量，此時乳化液黏度及安定性最佳)，完成後分別置於 5°C (冷藏溫度) 及 25°C 下 (即室溫) 存放，及 60°C 加熱



圖九、導電度突減前所加入油之比例對乳化液黏度之影響。

Figure 9. Effect of added oil percentage on the viscosity of the emulsion before sudden decreasing of conduct electricity. (60~70 % deacetylated chitosan, pH 6.0)

30 min (Pasteurization) 或 100°C 加熱 30 min (即一般以 boiling water 殺菌) 或 121°C 加熱 30 min (即 autoclaving) 後測定其黏度及觀察分離現象。

### 1. 20~30 % 去乙醯度幾丁聚糖乳化液之黏度及安定性

表七，所示不同處理溫度對去乙醯度 20~30 % 幾丁聚糖乳化液黏度之影響。隨著處理溫度越高其乳化液之黏度越低，甚至有分離現象，即越不安定。於相同處理溫度及 pH 下，增加其濃度則有明顯提高其乳化液之安定性，比如在 pH 3.0 其濃度 0.5 % 在 5°C、RT (室溫) 及 60°C 處理下，其乳化液黏度分別為 4,720、4,266 及 3,740 cP，若濃度增加至 2.0 % 時，則黏度提高至 22,740、19,440 及 17,093 cP，而在 100°C 及 121°C 處理時，自產生分離現象變為很安定之乳化液，其黏度分別為 12,346 及 10,906 cP。於相同處理溫度及濃度下，若幾丁聚糖溶液之 pH 不同則乳化液之安定性所遭受影響之程度亦不同。大致上於 pH 較低下其乳化液之安定性較佳，比如，在 pH 3.0 及 pH 4.0，所用 1.0 % 幾丁聚糖之乳化液，無論何種處理溫度均不會產生分離，但於 pH 5.0，濃度 1.0 %，處理溫度 60°C 以上即產生分離；於 pH 6.0，濃度 1.5 %，處理溫度 121°C 亦會分離。

整體而言，20~30 % 去乙醯度者，乳化液之黏度及安定性隨著處理溫度之升高而下降，pH 越高亦使其安定性越差，但其濃度之增加可助於其黏度及乳化安定性之增加。其原因可能為乳化液經由高溫處理時，液滴之間有些已經發生凝集現象使得液滴變大，最後導致黏度下降；在濃度方面可能因為濃度低故不夠對應油水界面所生成之界面面積，造成所形成之液滴大小有限，不能再變小(此時油水界面面積變大)；低 pH 時，親油

基與親水基數量較平衡，所形成之乳化液滴較小，在pH 6.0時，雖然乳化能力較好，但是親油基與親水基數量較不平衡( $\text{NH}_3^+$ 變成 $\text{NH}_2$ )，使得乳化液滴較大而使黏度下降。

若將上述乳化液，除在 $5^\circ\text{C}$ 處理後仍置放在 $5^\circ\text{C}$ 下兩星期外，其他自不同溫度處理後均於室溫下( $\sim 25^\circ\text{C}$ )置放兩星期，期間觀察分離情形。由表八得知，存放兩星期乳化液不分離包括下列樣品：於pH 3.0及pH 4.0，分別濃度0.5%以上，乳化後於 $5^\circ\text{C}$ 下存放者；於pH 3.0及pH 4.0，分別濃度1.0%以上乳化後於室溫下及 $60^\circ\text{C}$ ，30 min處理者；於pH 3.0及pH 4.0，分別濃度1.0%以上乳化後於 $100^\circ\text{C}$ ，30 min及 $121^\circ\text{C}$ ，30 min處理者。於pH 5.0及pH 6.0，分別濃度1.0%以上乳化後於 $5^\circ\text{C}$ 下存放者；於pH 5.0，濃度1.5%以上乳化後於室溫、 $60^\circ\text{C}$ ，30 min、 $100^\circ\text{C}$ ，30 min及 $121^\circ\text{C}$ ，30 min處理者；於pH 6.0，濃度1.0%以上乳化後於室溫及 $60^\circ\text{C}$ ，30 min處理者；於pH 6.0，濃度1.5%以上乳化後於 $100^\circ\text{C}$ ，30 min處理者；及於pH 6.0，濃度2.0%乳化後於 $121^\circ\text{C}$ ，30 min處理者。由此可見，20~30%去乙醯者在pH 3.0及pH 4.0下，濃度1.0%以上乳化並於不同溫度下處理( $5^\circ\text{C}$ 至 $121^\circ\text{C}$ )後存放兩星期均未發生分離，而於pH 5.0及pH 6.0則需配合更高幾丁聚糖之濃度方能安定。

## 2. 40~50%去乙醯度幾丁聚糖乳化液之黏度及安定性

表九，所示不同處理溫度對去乙醯度40~50%幾丁聚糖乳化液安定性之影響。處理溫度越高使其乳化液之黏度越低，甚至產生分離。此幾丁聚糖因溶於0.1M醋酸中時黏度非常黏，難於攪拌、調pH及進行乳化操作，故只做0.5及1.0%之濃度。在兩種濃度中，濃度高者其乳化液之安定性較佳。相同處理溫

度及濃度，以 pH 3.0 者乳化液之黏度較佳，但在 121°C 處理其乳化液會產生分離。但值得注意的是於 pH 6.0，濃度 1.0 % 者，雖處理溫度偏高使其乳化液之黏度偏低，但均未分離。而與 20~30 % 去乙醯度者相比，在相同濃度及 pH 下乳化並以相同溫度處理，40~50 % 去乙醯度者乳化液之黏度較高許多，唯一是於 pH 3.0 下乳化及 121°C 處理時，前者不會分離而後者則會。此不同應由於後者溶液之黏度本身非常黏而影響至乳化性質所致。

若將上述乳化液，除在 5°C 處理後仍置放在 5°C 下兩星期外，其他不同溫度處理後均於室溫下 (~25°C) 置放兩星期，期間觀察其分離現象。由表十得知，存放兩星期乳化液不分離包括下列樣品：於 pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0 及 pH 6.0，分別濃度 0.5 % 及 1.0 % 乳化後於 5°C 下存放者；於 pH 3.0、pH 4.0 及 pH 5.0，分別濃度 1.0 % 乳化後於室溫及 60°C，30 min 處理者；於 pH 3.0 及 pH 5.0 分別濃度 1.0 % 乳化後於 100°C，30 min 處理者；於 pH 6.0，分別濃度 0.5 % 及 1.0 % 乳化後於室溫及 60°C，30 min 處理者，以及於 pH 6.0，濃度 1.0 % 乳化後於 100°C，30 min 處理者。但值得注意的是於濃度 1.0 %，pH 3.0 及 pH 4.0 下乳化後在 121°C，30 min 處理，其乳化液馬上分層，但於同濃度，pH 5.0 及 pH 6.0 下乳化後在 121°C，30 min 處理，其乳化液存放 3 天才分層，故可知 40~50 % 去乙醯度者於 pH 偏 5.0 下乳化稍較安定。整體而言，40~50 % 去乙醯者因溶於醋酸後其黏度非常黏稠而對其乳化能力及安定性有不良影響。

### 3. 60~70 %及 80~90 %去乙醯度幾丁聚糖乳化液之黏度及安定性

表十一及表十三分別所示處理溫度、幾丁聚糖濃度及 pH 對 60~70 %及 80~90 %去乙醯幾丁聚糖乳化液黏度及安定性之影響。在處理溫度及幾丁聚糖濃度影響方面，與上述的 20~30 %及 40~50 %去乙醯度者類似，即處理溫度較高及濃度較低時其乳化液之黏度較低，甚至產生分離。除了二者，使用濃度 1.0 %以上及處理溫度 60°C 以下，在 pH 3.0~5.0 均未分離現象，更值得注意的是於其濃度 1.0 %以上及 pH 6.0 時，其處理溫度均未使其分離，尤其濃度 2.0 %者非常安定。兩者相比則以後者更佳。

將上述之 60~70 %去乙醯度之幾丁聚糖各種乳化液於相同上述條件處理及存放並觀察分離情形。由表十二得知，存放兩星期乳化液不分離包括下列樣品：於 pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0 及 pH 6.0，分別濃度 0.5 %~2.0 %乳化後於 5°C 下存放者；於 pH 4.0 及 pH 5.0，分別濃度 1.5 %及 2.0 %乳化後於 60°C，30 min 處理者；於 pH 3.0、pH 4.0 及 pH 5.0，分別濃度 2.0 %乳化後於 100°C，30 min 處理者；於 pH 5.0 及濃度 2.0 %乳化後於 121°C，30 min 處理者；於 pH 6.0，分別濃度 0.5 %~2.0 %乳化後並分別於室溫及 60°C，30 min 處理者；於 pH 6.0，分別濃度 1.0 %~2.0 %乳化後並分別於 100°C，30 min 處理者。由此結果可見，60~70 %去乙醯度者 pH 偏於 6.0 只要配合濃度 1.0 %以上乳化，其乳化液在 121°C 之內處理均為安定。此顯然於 20~30 %及 40~50 %去乙醯者不同。

此外，80~90 %去乙醯度幾丁聚糖之各種乳化液於相同上

述條件處理及存放，其分別情形與 60~70 %去乙醯者類似，即 pH 偏於 6.0，配合濃度 1.0 %以上乳化，其乳化非常安定，有一點不同的是 80~90 %去乙醯度者比 60~70 %去乙醯度者更為不適合於酸性 pH 下乳化，如表十四所示。

綜合以上之結果可看出，處理溫度越高及所使用幾丁聚醣之濃度越低，對 20~30、40~50、60~70 及 80~90 %去乙醯度幾丁聚醣乳化液之黏度有越降低之趨勢，甚至產生分離現象。其中，以 20~30 及 40~50 %去乙醯度者之乳化液，於 pH 偏於 3.0 較為安定，而 60~70 及 80~90 %去乙醯度者之乳化液在 pH 偏於 6.0 時則較為安定。

前人研究有關幾丁聚醣之乳化性質不多而不夠系統，Del Blanco (1999) 研究討論不同去乙醯度僅自 73 至 95 %於 pH 3.05(即幾丁聚醣溶於 1 %醋酸溶液之 pH)之乳化能力及安定性，發現對 81 及 88 %去乙醯度幾丁聚醣溶液(溶於 1 % (v/v) 醋酸中，濃度為 1 % (w/v) )80g，加入 sunflower oil 20g 乳化，其乳化液很安定，若將此乳化液加熱至 100°C 並未分離。

表七、處理溫度、20~30 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液黏度之影響。

Table 7. Effects of treatment temperature, 20~30 % deacetylated chitosan concentration and pH on the emulsion viscosity.

Temp	pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		4720	9740	14280	22740	4046	4660	5840	6220
R.T.		4266	9786	13766	19440	3453	4700	5513	4220
60°C		3740	6646	10786	17093	2720	3586	4446	3320
100°C		Sp	4273	8073	12346	Sp	3106	3946	2653
121°C		Sp	2700	5553	10906	Sp	2313	2733	2820

Temp	pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		Nd	4020	4580	9360	Nd	3340	4600	5320
R.T.		Nd	3900	4113	7460	Nd	2766	4020	5353
60°C		Nd	Sp	3660	7173	Nd	1980	3426	5086
100°C		Nd	Sp	3000	5306	Nd	Sp	3406	5086
121°C		Nd	Sp	3013	4966	Nd	Sp	Sp	2480

Number, viscosity (cP) ; Sp, separation ; Nd, not determined ; repeat 3 times.

表八、處理溫度、20~30 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液存放兩星期間安定性之影響。

Table 8. Effects of treatment temperature, 20~30 % deacetylated chitosan concentration, and pH on the stability of emulsions stored during 2 weeks.

Temp	pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		O	O	O	O	O	O	O	O
R.T.		7	O	O	O	2	O	O	O
60°C		7	O	O	O	2	O	O	O
100°C		X	O	O	O	X	O	O	O
121°C		X	O	O	O	X	O	O	O

Temp	pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		/	O	O	O	/	O	O	O
R.T.		/	2	O	O	/	O	O	O
60°C		/	X	O	O	/	O	O	O
100°C		/	X	O	O	/	X	O	O
121°C		/	X	O	O	/	X	X	O

O, no separation during 2 weeks ; number, separation in number of days ; X, separation happened right after treatment temperature.

表九、處理溫度、40~50 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液黏度之影響。

Table 9. Effects of treatment temperature, 40~50 % deacetylated chitosan concentration and pH on the emulsion viscosity.

Temp	pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		9460	18353	Nd	Nd	9486	10293	Nd	Nd
R.T.		8426	16606	Nd	Nd	7326	8720	Nd	Nd
60°C		5333	10560	Nd	Nd	2966	4626	Nd	Nd
100°C		Sp	5513	Nd	Nd	Sp	3233	Nd	Nd
121°C		Sp	Sp	Nd	Nd	Sp	Sp	Nd	Nd

Temp	pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		5446	8946	Nd	Nd	5340	8586	Nd	Nd
R.T.		4246	6560	Nd	Nd	4500	6980	Nd	Nd
60°C		Sp	7606	Nd	Nd	3293	7200	Nd	Nd
100°C		Sp	3526	Nd	Nd	Sp	4346	Nd	Nd
121°C		Sp	Sp	Nd	Nd	Sp	3260	Nd	Nd

Number, viscosity (cP) ; Sp, separation ; Nd, not determined ; repeat 3 times.

表十、處理溫度、40~50 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液存放兩星期間安定性之影響。

Table 10. Effects of treatment temperature, 40~50 % deacetylated chitosan concentration, and pH on the stability of emulsions stored during 2 weeks.

Temp	pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		O	O	/	/	O	O	/	/
R.T.		12	O	/	/	2	O	/	/
60°C		6	O	/	/	2	O	/	/
100°C		X	O	/	/	X	2	/	/
121°C		X	X	/	/	X	X	/	/

Temp	pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		O	O	/	/	O	O	/	/
R.T.		9	O	/	/	O	O	/	/
60°C		X	O	/	/	O	O	/	/
100°C		X	O	/	/	X	O	/	/
121°C		X	3	/	/	X	3	/	/

O, no separation during 2 weeks ; number, separation in number of days ; X, separation happened right after treatment temperature.

表十一、處理溫度、60~70 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液黏度之影響。

Table 11. Effects of treatment temperature, 60~70 % deacetylated chitosan concentration and pH on the emulsion viscosity.

Temp Conc.	pH	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		5066	8033	9113	13273	4746	5340	8546	12586
R.T.		4486	7213	7540	9980	3333	3680	6660	10413
60°C		3646	4926	5160	8866	Sp	3586	6486	7746
100°C		Sp	Sp	Sp	7700	Sp	Sp	Sp	4426
121°C		Sp	Sp	Sp	4540	Sp	Sp	Sp	Sp

Temp Conc.	pH	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		4013	7906	9473	42050	6333	11240	16160	44666
R.T.		3613	5580	9006	37450	5446	9740	15473	40116
60°C		Sp	2346	7873	28900	3280	8940	13446	42216
100°C		Sp	Sp	Sp	8640	Sp	4380	10693	14806
121°C		Sp	Sp	Sp	5806	Sp	3400	4040	11493

Number, viscosity (cP) ; Sp, separation ; repeat 3 times.

表十二、處理溫度、60~70 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液存放兩星期間安定性之影響。

Table 12. Effects of treatment temperature, 60~70 % deacetylated chitosan concentration, and pH on the stability of emulsions stored during 2 weeks.

Temp	pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		O	O	O	O	O	O	O	O
R.T.		1	3	O	O	1	3	O	O
60°C		1	2	14	O	X	1	O	O
100°C		X	X	X	O	X	X	X	O
121°C		X	X	X	5	X	X	X	X

Temp	pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		O	O	O	O	O	O	O	O
R.T.		2	3	O	O	O	O	O	O
60°C		X	1	O	O	O	O	O	O
100°C		X	X	X	O	X	O	O	O
121°C		X	X	X	O	X	O	O	O

O, no separation during 2 weeks ; number, separation in number of days ; X, separation happened right after treatment temperature.

表十三、處理溫度、80~90 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液黏度之影響。

Table 13. Effects of treatment temperature, 80~90 % deacetylated chitosan concentration and pH on the emulsion viscosity.

Temp \ pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C	6753	8820	13850	16850	4933	5713	10460	17750
R.T.	5433	6133	12240	13460	2926	2953	8513	14100
60°C	Sp	4286	4866	6373	Sp	2833	5993	13700
100°C	Sp	Sp	Sp	2260	Sp	Sp	Sp	Sp
121°C	Sp	Sp	Sp	2473	Sp	Sp	Sp	Sp

Temp \ pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C	1746	7613	11266	42466	8233	13086	34983	154066
R.T.	1566	6280	10253	39300	7146	12066	33700	148400
60°C	Sp	3013	8280	11566	5420	8953	32600	47500
100°C	Sp	Sp	Sp	5666	Sp	5106	10526	32566
121°C	Sp	Sp	Sp	Sp	Sp	2540	6606	35050

Number, viscosity (cP) ; Sp, separation ; repeat 3 times.

表十四、處理溫度、80~90 %去乙酰度幾丁聚醣之濃度及 pH 對乳化液存放兩星期間安定性之影響。

Table 14. Effects of treatment temperature, 80~90 % deacetylated chitosan concentration, and pH on the stability of emulsions stored during 2 weeks.

Temp	pH Conc.	pH 3.0				pH 4.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		O	O	O	O	13	O	O	O
R.T.		3	3	3	6	3	3	5	6
60°C		X	1	1	4	X	3	4	4
100°C		X	X	X	1	X	X	X	X
121°C		X	X	X	1	X	X	X	X

Temp	pH Conc.	pH 5.0				pH 6.0			
		0.5%	1.0%	1.5%	2.0%	0.5%	1.0%	1.5%	2.0%
5°C		2	O	O	O	O	O	O	O
R.T.		2	3	O	O	O	O	O	O
60°C		X	2	O	O	O	O	O	O
100°C		X	X	X	O	X	O	O	O
121°C		X	X	X	X	X	O	O	O

O, no separation during 2 weeks ; number, separation in number of days ; X, separation happened right after treatment temperature.

### (三) 幾丁聚醣乳化液滴之大小分布

#### 1. 20~30 %去乙醯度幾丁聚醣乳化液滴大小之分布

如圖十所示，20~30 %去乙醯度幾丁聚醣在若干條件下乳化，其乳滴大小分布情形。其中，由圖(A)可見於濃度 2.0 %分別在不同 pH 下乳化，pH 偏低(3.0 及 4.0)時，其乳滴直徑大部分都集中在 0.02cm 內，在 pH 5.0 時，其乳滴直徑多半在 0.03cm 內，而在 pH 6.0 則直徑均落在 0.03~0.08cm 內。乳滴直徑越小的乳化液，其安定性越佳，此顯示 20~30 %去乙醯度者較適合於 pH 偏低下乳化。圖(B)則顯示於 pH 3.0，幾丁聚醣濃度越高之下乳化時，其乳滴直徑落在 0.02cm 內越多，即乳化安定性越好。此外，以顯微鏡觀察於 2.0 %濃度，分別在 pH 3.0 及 pH 6.0 下乳化之乳化液，前者之乳滴均為小且分配均勻，而後者乳滴大部分為大且大小之分配不均(圖(C))。

此觀察更證明 20~30 %去乙醯度之幾丁聚醣適合在酸性 pH 下乳化，而濃度越高其乳化液越安定。

#### 2. 40~50 %去乙醯度幾丁聚醣乳化液滴大小之分布

圖十一所示，40~50 %去乙醯度幾丁聚醣在若干條件下乳化，其乳滴大小分布情形。其中，由圖(A)可見於濃度 1.0 %分別在不同 pH 下乳化，pH 5.0 及 pH 6.0 者其乳滴多半在 0.02cm 內，而 pH 3.0 及 pH 4.0 者其直徑 0.02cm 內之乳滴數量已明顯減少。圖(B)則顯示於 pH 5.0，濃度較高下乳化時，其乳滴直徑落在 0.02cm 內較多，即乳化安定性較佳。此外，以顯微鏡觀察於 1.0 %，濃度分別在 pH 4.0 及 5.0 下乳化之乳化液，前者乳滴較大，而大小分布不均，而後者之乳滴均為小且分布均勻(圖(C))。

此便證明為何此去乙醯度幾丁聚醣於接近 pH 6 比酸性下乳化較稍安定。

### 3. 60~70 %去乙醯度幾丁聚醣乳化液滴大小之分布

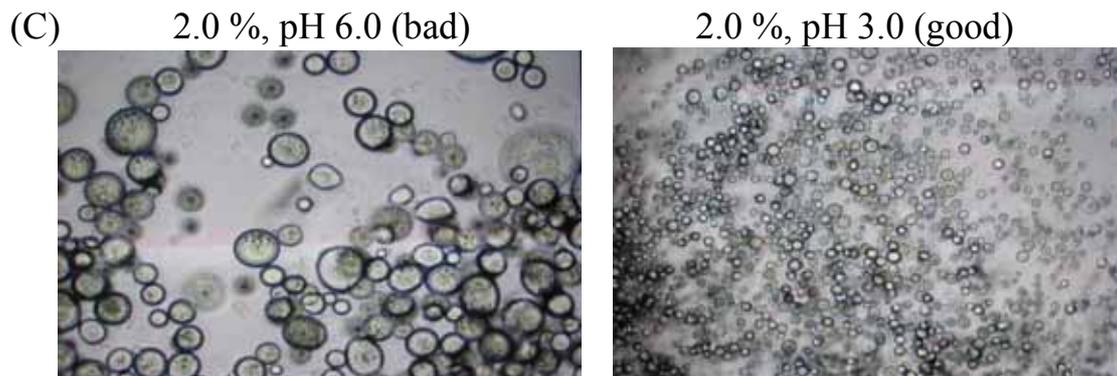
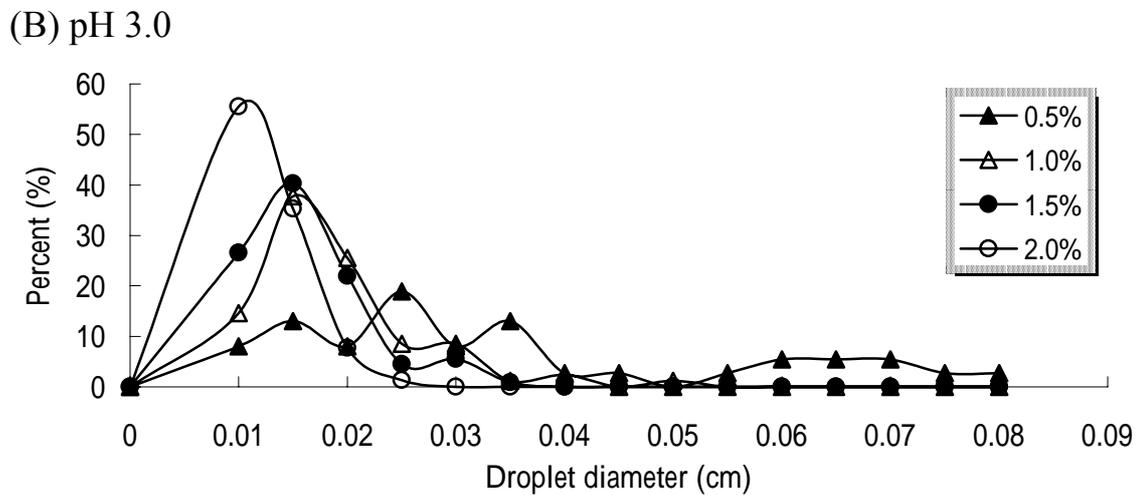
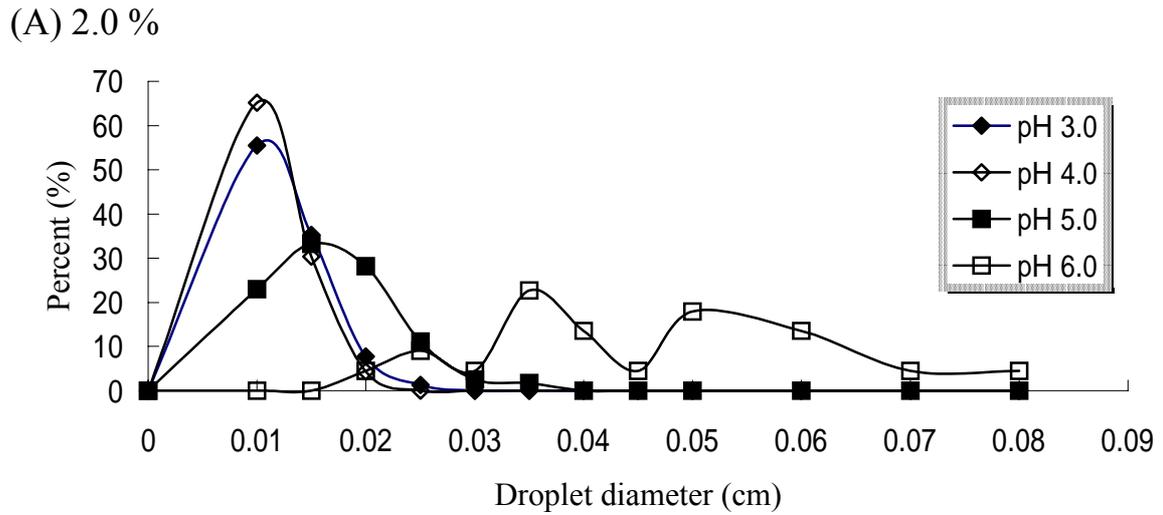
圖十二所示 60~70 %去乙醯度幾丁聚醣在若干條件下乳化，其乳滴大小分布情形。其中，由圖(A)可見於濃度 1.5 %分別在不同 pH 下乳化時，pH 5.0 及 pH 6.0 者乳滴直徑 0.02cm 內之數量多於 pH 3.0 及 pH 4.0 者。圖(B)則顯示於 pH 6.0 而濃度越高下乳化時，其乳滴直徑落在 0.02cm 內之數量越多。此外，以顯微鏡觀察於 1.5 %濃度分別在 pH 3.0 及 pH 6.0 下乳化之乳化液，後者乳滴為小及分布均勻，而前者乳滴較大及大小乳滴分布不均(圖(C))。

由此觀察可說明 60~70 %去乙醯度者於 pH 偏於 6.0 及濃度較高時乳化液較為安定。

### 4. 80~90 %去乙醯度幾丁聚醣乳化液滴大小之分布

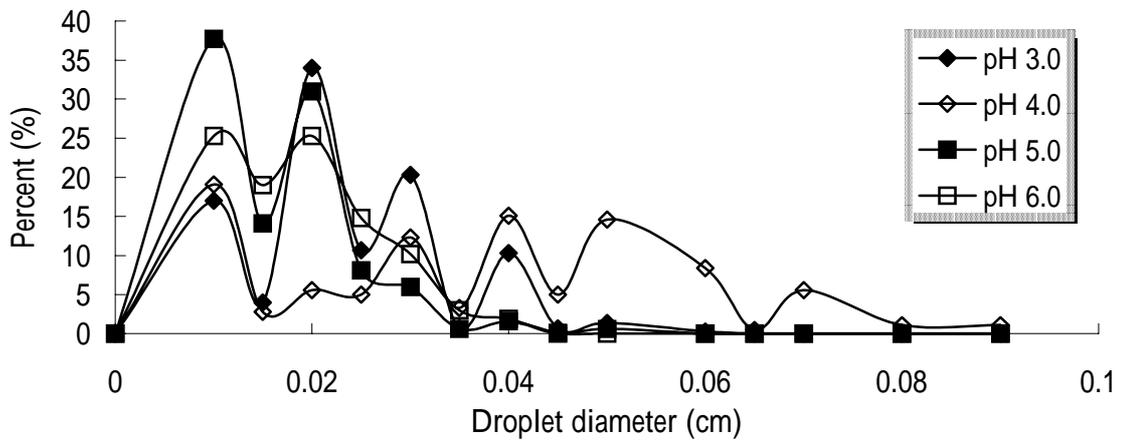
圖十三所示 80~90 %去乙醯度幾丁聚醣在若干條件下乳化，其乳滴大小分布情形。其中，由圖(A)可見於濃度 1.5 %分別在不同 pH 下乳化時，pH 5.0 及 pH 6.0 者乳滴直徑 0.02cm 內之數量亦多於 pH 3.0 及 pH 4.0 者。圖(B)則顯示於 pH 6.0 而濃度越高下乳化時其乳滴直徑落在 0.02cm 內之數量越多。此外，以顯微鏡觀察於 1.5 %濃度分別在 pH 3.0 及 pH 6.0 下乳化之乳化液，後者乳滴為小及分布均勻，而前者乳滴較大(圖(C))。

由此可見，80~90 %去乙醯度者於 pH 偏於 6.0 及濃度較高時乳化液較為安定。

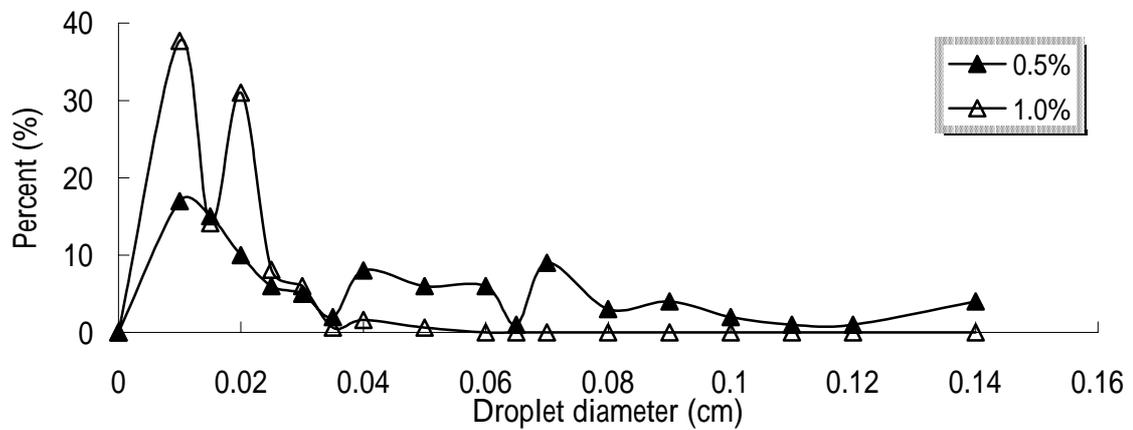


圖十、去乙酰度 20~30 % 幾丁聚醣乳化液滴之大小分布情形。  
 Figure 10. Droplet size distribution of 20~30 % deacetylated chitosan emulsions. (A) 2.0% concentration at different pHs ; (B) pH 3.0 at different concentrations ; (C) photograph (100x) of emulsions having concentration at 2.0% and pH at 3.0 and 6.0.

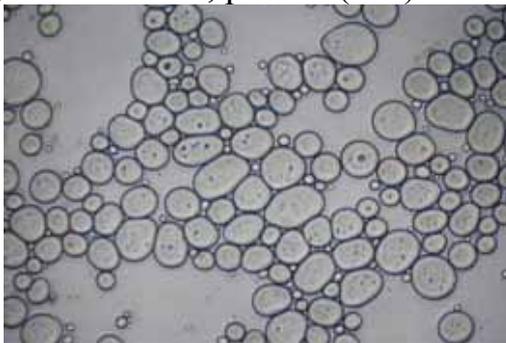
(A) 1.0 %



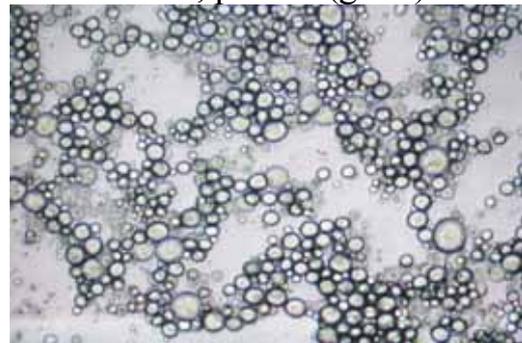
(B) pH 5.0



(C) 1.0 %, pH 4.0 (bad)

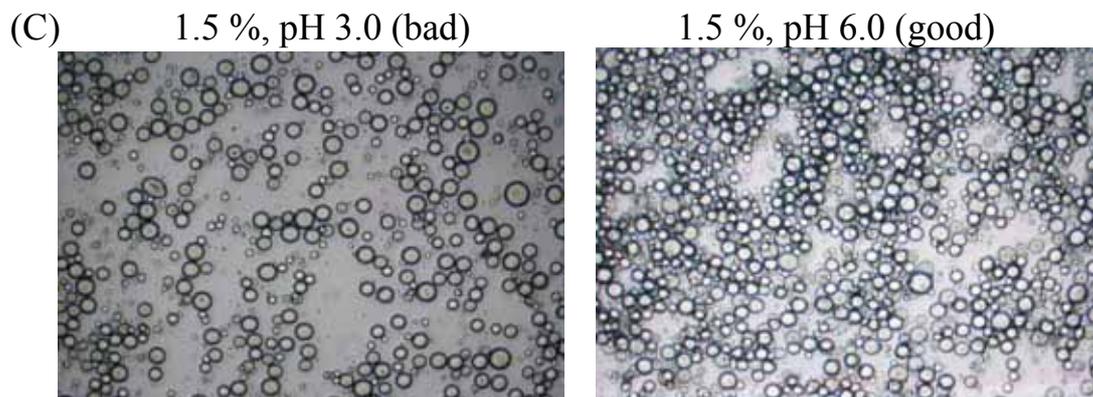
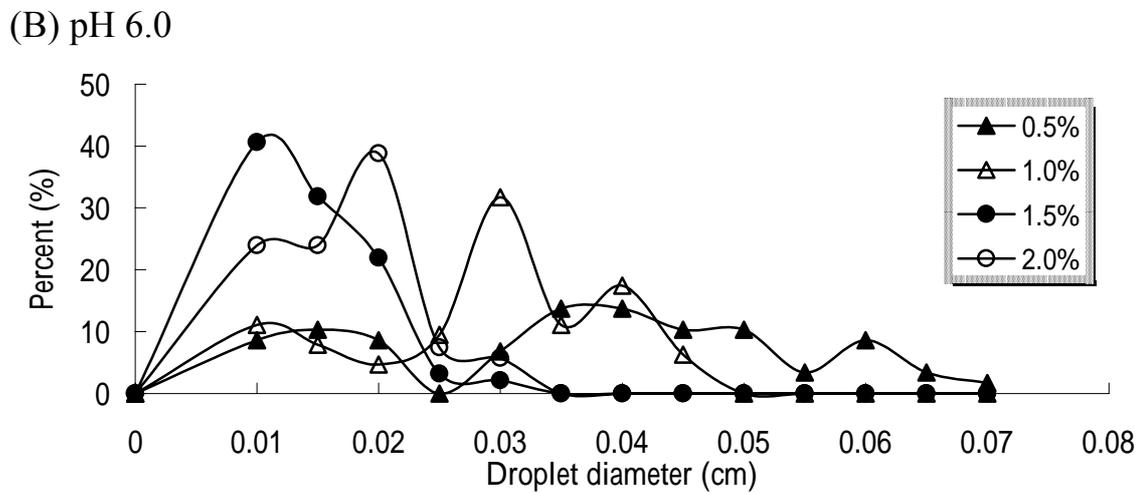
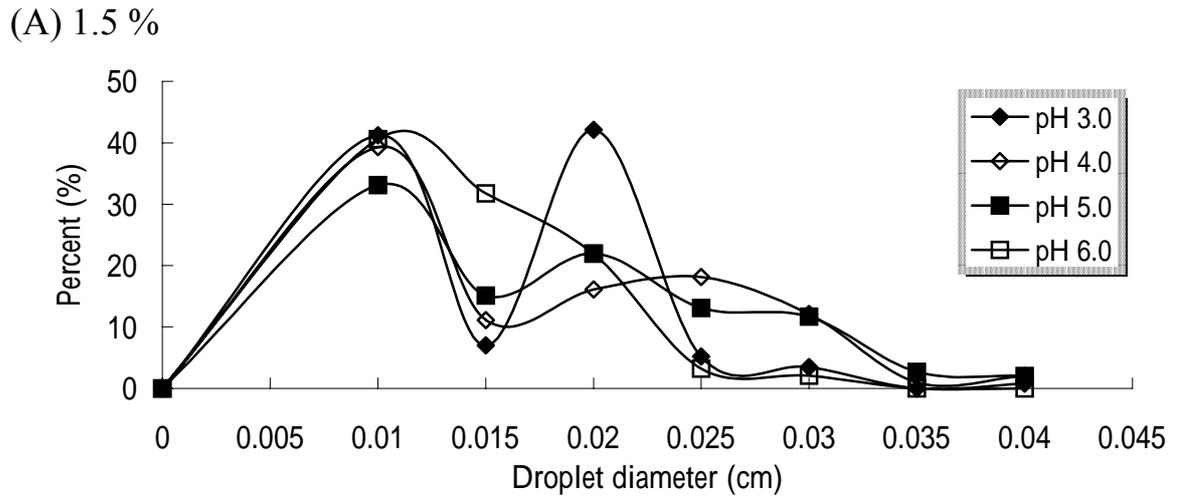


1.0 %, pH 5.0 (good)



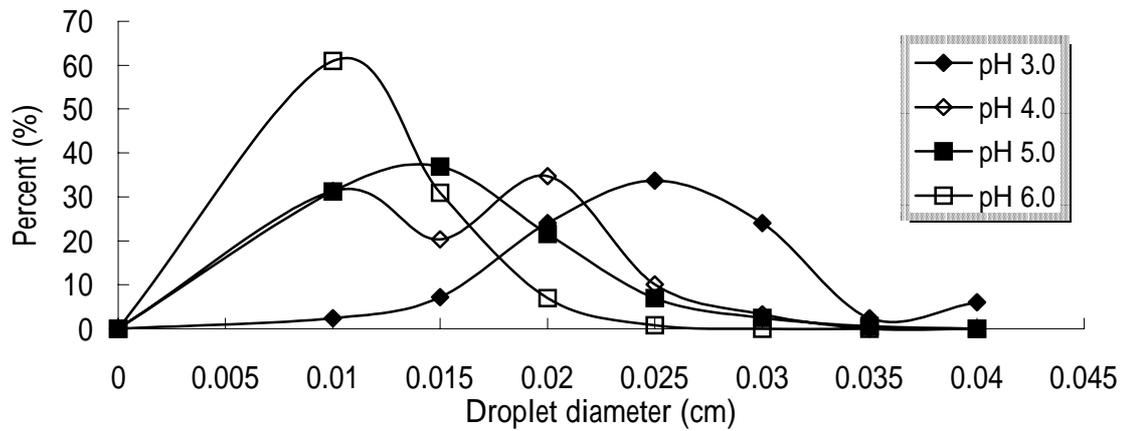
圖十一、去乙酰度 40~50 % 幾丁聚醣乳化液滴之大小分布情形。

Figure 11. Droplet size distribution of 40~50 % deacetylated chitosan emulsions. (A) 1.0 % concentration at different pHs ; (B) pH 5.0 at different concentrations ; (C) photograph (100x) of emulsions having concentration at 1.0 % and pH at 4.0 and 6.0.

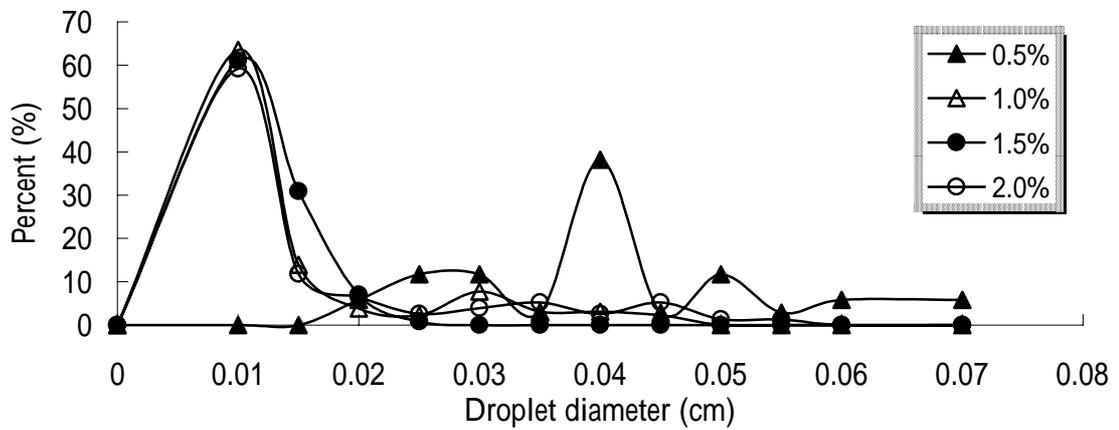


圖十二、去乙醯度 60~70 % 幾丁聚醣乳化液滴之大小分布情形。  
 Figure 12. Droplet size distribution of 60~70 % deacetylated chitosan emulsions. (A) 1.5 % concentration at different pHs ; (B) pH 6.0 at different concentrations ; (C) photographs (100x) of emulsions having concentration at 1.5 % and pH at 3.0 and 6.0.

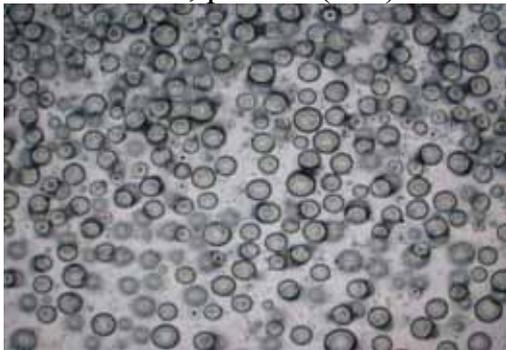
(A) 1.5 %



(B) pH 6.0



(C) 1.5 %, pH 3.0 (bad)



1.5 %, pH 6.0 (good)



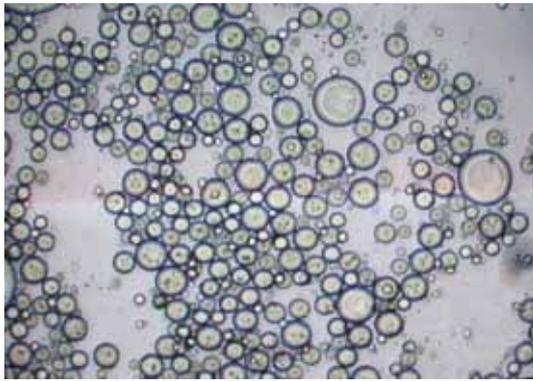
圖十三、去乙酰度 80~90 % 幾丁聚醣乳化液滴之大小分布情形。

Figure 13. Droplet size distribution of 60~70 % deacetylated chitosan emulsions. (A) 1.5 % concentration at different pHs ; (B) pH 6.0 at different concentrations ; (C) photographs (100x) of emulsions having concentration at 1.5 % and pH at 3.0 and 6.0.

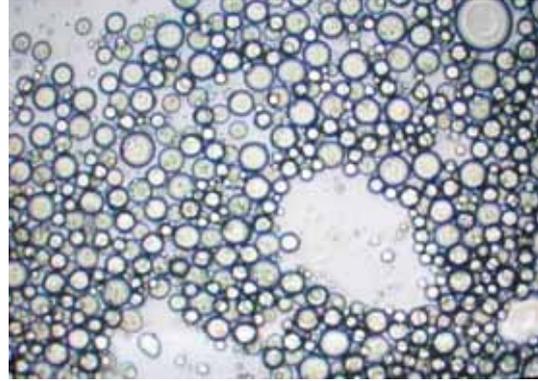
#### (四) 處理溫度對幾丁聚醣乳化液滴之影響

將不同去乙醯度之幾丁聚醣，利用醋酸溶解，調整不同濃度、不同 pH，加油均質，完成後分別置於 5°C(冰箱)、室溫(25°C)、60°C 或 100°C 或 121°C 各處理 30min，之後取乳化液用顯微鏡觀察，其中去乙醯度 80~90%幾丁聚醣，pH6.0，濃度 1.5% 之結果如圖十四，乳化液外觀如圖十五。

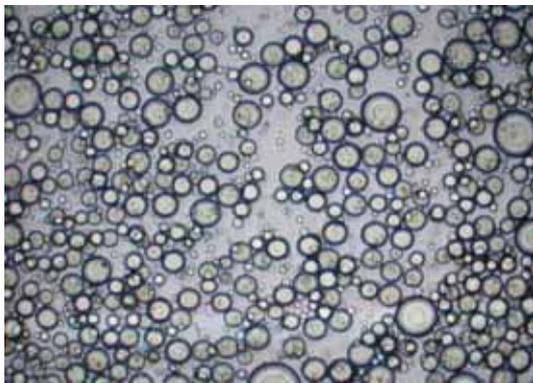
在圖十四中，可從顯微鏡下觀察到去乙醯度 80~90%幾丁聚醣在不同溫度下的情形，其乳化液滴的大小與分布在 60°C 以內幾乎沒有變化，在 100°C 液滴有些微變大，而在 121°C 時則乳化液滴有些已經聚集在一起，其餘液滴大小則是變化不大。此結果得知不同溫度的處理對於以去乙醯度 80~90 %幾丁聚醣，濃度 1.5 %及 pH 6.0 下乳化，其乳化液滴大小在 100°C 以內溫度的影響甚小，但其黏度由先前結果可知有隨溫度上升而下降的情形，此表示幾丁聚醣乳化液雖自外觀上較無法看其變化，但的確仍受溫度之影響。圖十五中，在 100°C 以上加熱處理組中，雖不見油水分離狀態，但是由於高熱使得乳化液沸騰，所以在外觀上會造成乳化液中有因加熱起泡沫的空洞出現。



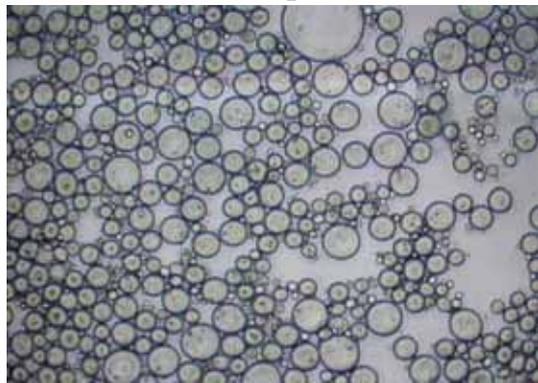
5°C



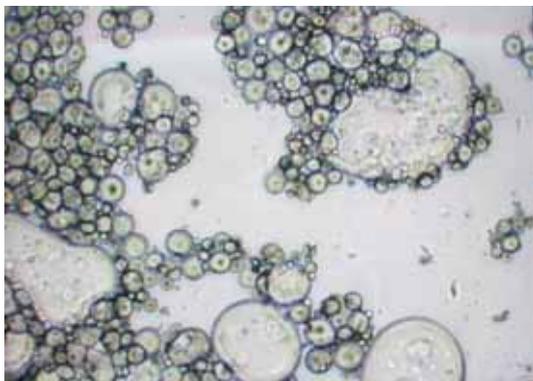
room temperature



60



100



121

圖十四、去乙酰度 80~90% 幾丁聚醣(pH 6.0, 1.5%) 乳化液滴在不同溫度下大小分布情形。

Figure 14. Emulsion droplet size distribution of 80~90% deacetylated chitosan (pH 6.0, 1.5 %) at different temperature (100x).



5

R.T.

60

100

121

圖十五、不同溫度下乳化液外觀。

Figure 15. Appearance of emulsions at different temperature (Degree of deacetylation (DD)80~90%, concentration 1.5%, pH 6.0).

## (五) 循環凍結-解凍(freeze-thawing cycle)對乳化物安定性之影響

由上述不同處理溫度試驗中所呈現最安定之乳化液，依其乳化條件製備乳化液後進行循環凍結 ( $-13^{\circ}\text{C}$ )-解凍 ( $25^{\circ}\text{C}$ ) (freeze-thawing cycle) 5 次，並紀錄每次所分離之油量。這些乳化液之乳化條件分別如下：

去乙醯度 20~30 %者，濃度 1.5 及 2.0 %，每個濃度分別在 pH 3.0 及 pH 4.0 下乳化，共 4 樣品；去乙醯度 40~50 %者，濃度 1.0 %，pH 6.0，一個樣品；去乙醯度 60~70 %者，濃度 1.5 及 2.0 %均在 pH 6.0 下乳化，共 2 樣品；及去乙醯度 80~90 %者，濃度 1.5 及 2.0 %均在 pH 6.0 下乳化，共 2 樣品。總共九種乳化液。

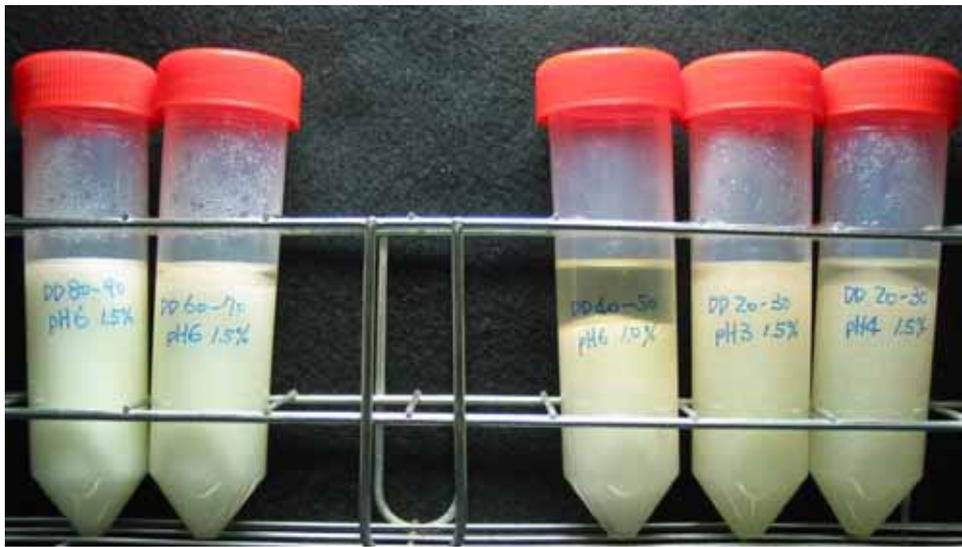
由表十五及圖十六得知，去乙醯度越高的幾丁聚醣乳化液，其抵抗循環凍結解凍的能力亦越好。其中，去乙醯度 20~30 %幾丁聚醣之乳化液幾乎每一次循環都會有些許油分離情形。在去乙醯度 40~50 %幾丁聚醣之乳化液方面，其穩定度則是最差的，所分離之油也是最多的。去乙醯度 60~70 %幾丁聚醣之乳化液，除了在濃度 1.5 %時有些許油分離外，當濃度添加至 2.0 % 時則沒有發現分層現象。去乙醯度 80~90 %組則是最穩定的，在 5 次凍結-解凍循環後沒有發現分層。另外，雖然去乙醯度 80~90 %幾丁聚醣之乳化液在外觀上沒有出現分層，但是由顯微鏡下觀察其乳化液滴時，可發現隨著凍結-解凍循環次數增加，其乳化液滴也有隨著變大的現象(圖十七)。

從相同去乙醯度觀察時，添加濃度較高者其每次所分離之油量較少，顯示幾丁聚醣濃度的增加能夠使乳化液抵抗循環凍結解凍，防止油的分離。引起油從幾丁聚醣乳化液分層之原因

表十五、循環凍結-解凍對幾丁聚醣乳化物安定性之影響。

Table 15. Effect of freeze-thawing cycle on the stability of chitosan emulsions.

Degree of deacetylation (%)	pH / Conc.(%)	Oil separation (mL)					
		Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Cycle 4	Cycle 5	Total
20~30	pH3 / 1.5 %	0.75	1	0.5	0.15	0.15	2.55
	pH3 / 2.0 %	0	0	0.3	0.4	1	1.7
20~30	pH4 / 1.5 %	1.1	1.1	4.1	1.4	1.55	9.15
	pH4 / 2.0 %	0	0.25	0.95	0.6	1.05	2.85
40~50	pH6 / 1.0 %	12.5	1.2	1.15	0.65	0.55	16.05
60~70	pH6 / 1.5 %	0	0.2	0.35	0.2	0.3	1.05
	pH6 / 2.0 %	0	0	0	0	0	0
80~90	pH6 / 1.5 %	0	0	0	0	0	0
	pH6 / 2.0 %	0	0	0	0	0	0



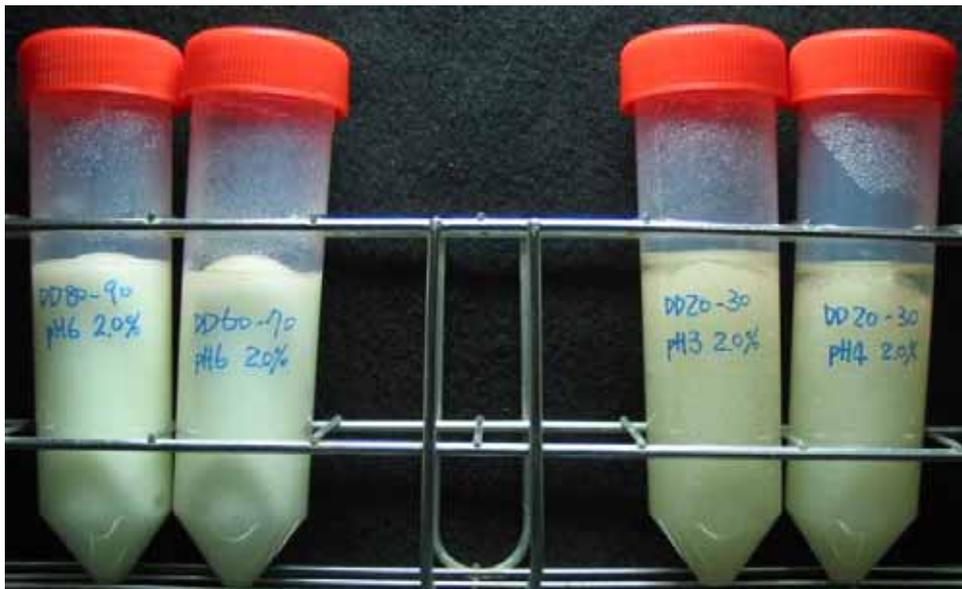
DD80~90  
1.5 %, pH6.0

DD60~70  
1.5 %, pH6.0

DD40~50  
1.0 %, pH6.0

DD20~30  
1.5 %, pH3.0

DD20~30  
1.5 %, pH4.0



DD89~90  
2.0 %, pH6.0

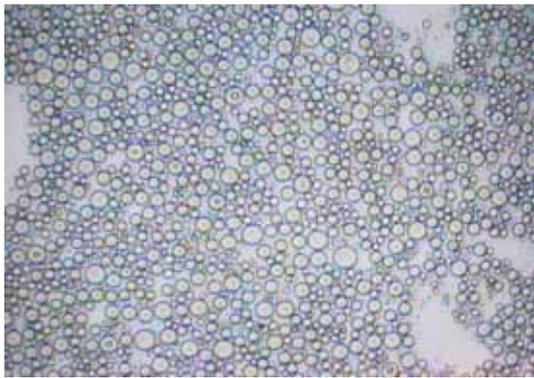
DD60~70  
2.0 %, pH6.0

DD20~30  
2.0 %, pH3.0

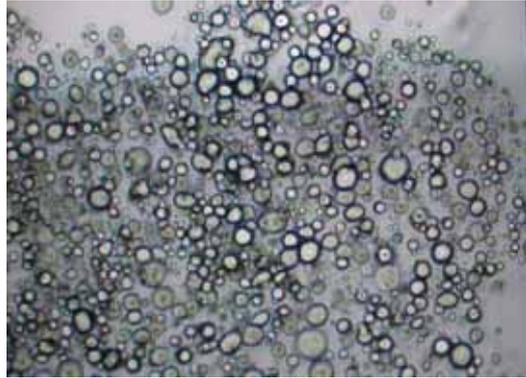
DD20~30  
2.0 %, pH4.0

圖十六、凍結-解凍循環 5 次後乳化液外觀。

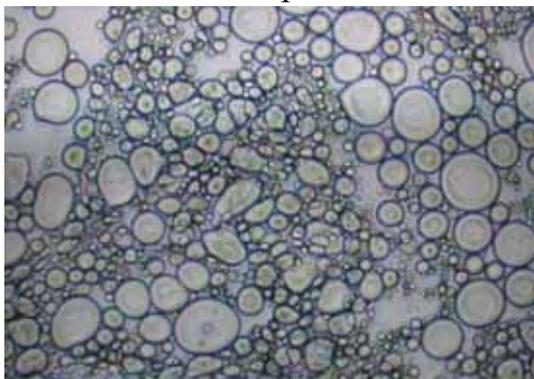
Figure 16. Appearance of emulsions after 5 freeze-thawing cycles.



room temperature



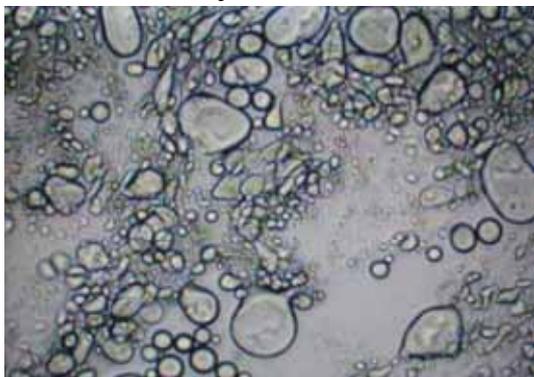
cycle 1



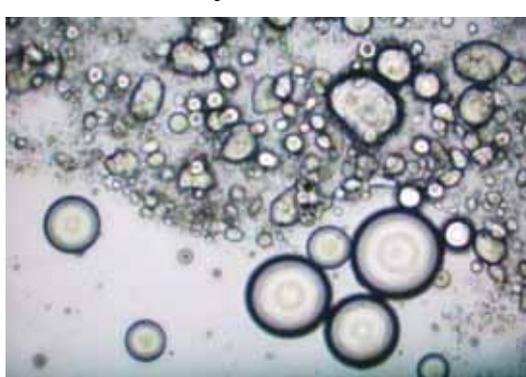
cycle 2



cycle 3



cycle 4



cycle 5

圖十七、凍結-解凍循環 5 次後乳滴大小分布圖。

Figure 17. Droplet size distribution after 5 freeze-thawing cycles.

(100x) (DD80~90 %, concentration 1.5 %, pH 6.0)

可能由於凍結時，水分子結合在一起形成冰晶，使得幾丁聚醣親水基部分無法再與水維持結合狀態，降低油水界面張力，所以當解凍時，水分子重新回到液體狀態後沒有再次均質乳化，導致乳化液滴無法繼續維持，最後液滴慢慢變大而分層。在未分層之組別中，雖然在外觀上沒有油分離，但是其乳化液滴從外觀上已經直接察覺慢慢變大，顯示其安定性也是下降了。幾丁聚醣濃度的增加可能也是藉由其分子與分子間立體空間障礙，減少大量水分子低溫時凍結在一起，故解凍後油水分離較少。

## 五、o/w、w/o、o/w/o 及 w/o/w 型乳化液觀察

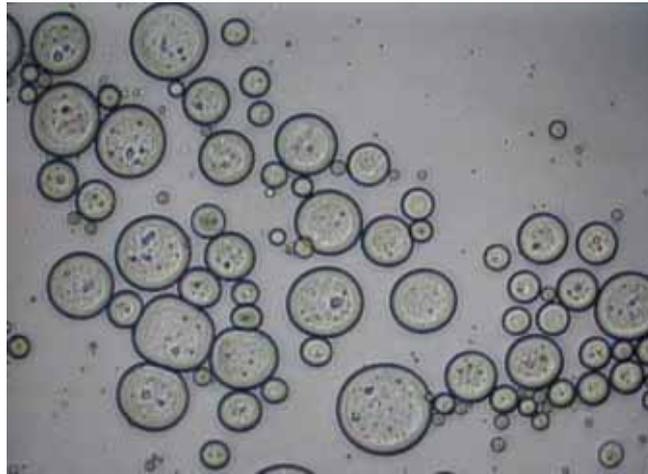
由圖十八中可以藉由稀釋法得知，幾丁聚醣乳化液放入水中時，能夠被水稀釋，但放入油中時所呈現為乳化液滴狀，此時判斷為 o/w 型乳化液。另外，在圖十九中，進一步由顯微鏡下觀察得知，在乳化液滴中，其內部油相還有液滴存在，所以可以判斷為 w/o/w 類型。此結果與 Schulz 學者(1998)所研究之結果相同，其中說明了幾丁聚醣之 HLB 值大約為 36.7，故水溶性極高；另外，在高去乙醯度幾丁聚醣樣品中會包含了大量高去乙醯度及少數低去乙醯度的幾丁聚醣，所以為數種不同 HLB 值之混合，在高去乙醯度部份會形成 o/w，而低去乙醯度者(HLB 值較低)會使水進入油中，又因為高去乙醯度者相對數量較低去乙醯度者高，所以水則成為連續相，導致最後幾丁聚醣形成 w/o/w 型乳化液。



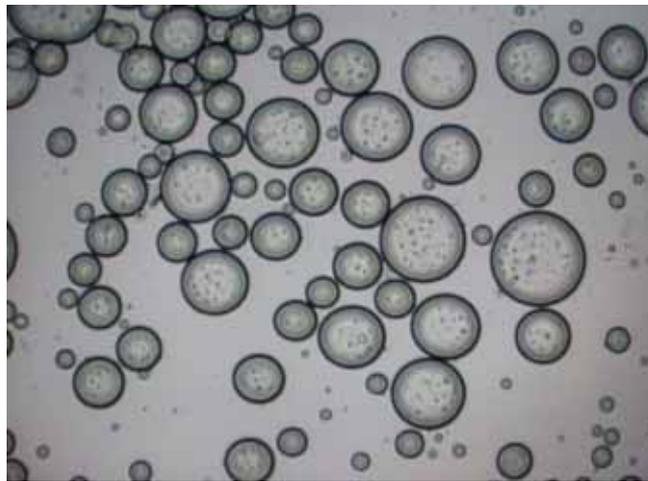
圖十八、幾丁聚醣乳化液之類型測試。

Figure 18. Type of chitosan emulsion.

(DD 80~90 %, 1.0 %, pH 4.0).



(A)



(B)

圖十九、w/o/w 型乳化液。

Figure 19. w/o/w emulsion.

A. Emulsion of 60~70 % deacetylated chitosan, concentration 0.5 % and pH 3.0. (100x)

B. Emulsion of 80~90 % deacetylated chitosan, concentration 0.5 % and pH 3.0. (100x)

## 六、相關食品應用：沙拉醬

傳統沙拉醬以蛋黃為沙拉醬之乳化劑(lecithin)，本實驗以 20~30、40~50、60~70 及 80~90 % 去乙醯度之幾丁聚醣，分別取代蛋黃製備法式沙拉醬，其用量為 0.6 % (即相當所用蛋黃之乾重)，此用量亦為醋及水總量的 1.13 % (w/v)。製畢後置於室溫約 1 小時，並進行測定及比較各種沙拉醬之黏度、官能評估及生菌數。

### (一) 黏度

表十六所示傳統配方沙拉醬及由不同去乙醯度幾丁聚醣取代蛋黃之沙拉醬的黏度。由此表可見，傳統式沙拉醬之黏度遠低於添加幾丁聚醣之沙拉醬。而在各種不同去乙醯度之添加者中，以 60~70 % 及 80~90 % 去乙醯度者之黏度最高，次者為 20~30 % 去乙醯度者，而 40~50 % 去乙醯度者最低。傳統式沙拉醬並未添加澱粉以提高沙拉醬之黏度和安定性，故當靜置一段時間，約 2 小時後其乳化液會分層，待食用時再均質之。而由幾丁聚醣取代蛋黃製備之沙拉醬中，除了 40~50 % 去乙醯度產品之乳化不安定外，其餘之黏度均遠高於傳統式且其乳化液非常安定，儲放 14 天均無分層。

### (二) 官能評估

本試驗邀請 16 位東海大學食品科學所研究生來品評上述各種沙拉醬，品評項目包括：口感(Mouthfeel)、風味(Flavor)、顏色(Color)、澀味(Astringency)及總接受度(Total acceptability)5 種，分數採 9 分制，分數越高其評估越佳，其結果如表十七。

在口感方面，去乙醯度 40~50 % 組最差，且有顯著差異，可能是因為其乳化的能力不好，使得已經開始產生油水分離情

表十六、傳統沙拉醬與幾丁聚醣沙拉醬黏度之比較。

Table 16. Viscosity of traditional salad dressing and chitosan salad dressing.

	Type of salad dressing				
	Traditional salad dressing	Chitosan salad dressing			
		20~30 <sup>*</sup>	40~50	60~70	80~90
Viscosity (cP)	113.9	5,263.3	3,086	7,560	7,420

\* : Degree of deacetylation (%)

表十七、傳統沙拉醬與不同去乙酰度幾丁聚醣沙拉醬產品之官能評估結果。

Table 17. Sensory evaluation on traditional salad dressing and different degree of deacetylation chitosan salad dressing.

Type of salad dressing	Traditional process	Chitosan replacing process			
		20~30*	40~50	60~70	80~90
Mouthfeel	5.2 <sup>ab</sup>	5.6 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>	6.2 <sup>a</sup>	6.3 <sup>a</sup>
Flavor	4.9 <sup>ab</sup>	5.3 <sup>ab</sup>	4.4 <sup>b</sup>	5.7 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>
Color	6.6 <sup>ab</sup>	6.2 <sup>b</sup>	3.8 <sup>c</sup>	7.0 <sup>ab</sup>	7.4 <sup>a</sup>
Astringency	5.7 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup>	4.2 <sup>b</sup>	4.4 <sup>b</sup>
Total acceptability	5.4 <sup>a</sup>	5.1 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>	4.9 <sup>a</sup>	5.4 <sup>a</sup>

Duncan's multiple Range test,  $p < 0.05$

\* : degree of deacetylation (%)

形，因此試嘗時口感不好，其他不同去乙醯度幾丁聚醣樣品則彼此間沒有差異，但與傳統組相較似乎好一些，此可能由於前者之黏度較高之故。在風味方面，去乙醯度 80~90 % 組最好，評估人員感覺其甜味及香味較其他組佳；除了去乙醯度 40~50 % 組因為開始分層導致風味較不好外，其餘的幾丁聚醣組樣品並沒有顯著差異，而傳統沙拉醬則介在中間。顏色方面，去乙醯度 40~50 % 較無法被接受，原因與上述理由一樣，而去乙醯度 80~90 % 組與 20~30 % 組則有顯著差異，其中去乙醯度 80~90 % 組顏色較白，去乙醯度 20~30 % 組顏色略淡黃，至於傳統沙拉醬、去乙醯度 60~70 % 組之間則沒有差異性，是介於去乙醯度 80~90 % 組與 20~30 % 組之間。澀味方面，在幾丁聚醣組中普遍的接受性都不高，此乃由於幾丁聚醣本身在酸性溶液下會使  $\text{NH}_2$  轉變成  $\text{NH}_3^+$ ，讓人嚐起來感覺有澀味，傳統沙拉醬則接受度較高，與幾丁聚醣組相比較下有顯著差異。

最後在總接受度方面，除了去乙醯度 40~50 % 組總接受度很差外，傳統沙拉醬與其他去乙醯度幾丁聚醣組接受度一樣，沒有顯著差異。在此次官能評估中，受試者大多覺得若幾丁聚醣之澀味能夠去除，則將其做為新產品實行之可能性將大大提高。由於澀味之來源為幾丁聚醣其上面的  $\text{NH}_3^+$ ，故在去除澀味方面，若能利用一些蛋白質或是帶有負電之多醣類... 等添加，便可能與幾丁聚醣上面之  $\text{NH}_3^+$  結合而降低其澀味。

### (三) 生菌數之檢驗

將傳統沙拉醬與去乙醯度 80~90% 幾丁聚醣沙拉醬製備完後，將其分別置放在 5°C 及 25°C (室溫) 下，儲存期間測定其總生菌數。由表十八可看出，第一天至第三天生菌數無論在何種溫度下儲存皆為 TFTC，第七天於 5°C 儲存時，傳統及幾丁聚醣樣品中總生菌數分別為  $6.4 \times 10^3$  及  $5.65 \times 10^2$ ，但於 25°C 下儲放

二者均為TFTC。而至第十四天時，二者於5°C或25°C儲放則均為TFTC。上述結果推測，在低溫時微生物適應環境時間較室溫下為長，所以在第七天時，低溫儲存組開始有微生物生長，而室溫時因為溫度適合微生物生長，因此其生長快速造成生長周期較短，可能集中在四至六天，另外養分迅速被用完，造成微生物死亡。所以可以解釋在第七天時為什麼5°C時有菌生長，而25°C時則不生長的原因。另外，幾丁聚醣沙拉醬在5°C時之生菌數明顯比傳統低，顯示幾丁聚醣除有乳化作用外並兼具有抑菌能力。在第一天至第三天沒有菌生長之原因推測可能是菌還在適應環境階段，為停滯期 (lag phase)，所以並沒有出現生長情形，第七天可看出細菌在適應後開始生長的現象，最後在第十四天時均為TFTC之原因可能養分已用完而無法生長。

Jumaa (2001)將去乙醯度92%的幾丁聚醣製備成乳化液，並加入菌種 *Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*、*Candida albicans* 及 *Aspergillus niger* 的菌液，其中細菌在0、2、7及28天測定其生長情形，酵母菌及黴菌在0、14及28天測定其生長情形，結果含0.5%濃度之92%去乙醯度幾丁聚醣的乳化液，在培養期間對上述菌種都有抑制效果，第28時幾乎沒有任何菌種生長。

表十八、傳統沙拉醬與去乙酰度 80~90% 幾丁聚醣沙拉醬在儲藏期間之總生菌數。

Table 18. Total aerobic count of traditional salad dressing and 80~90% deacetylated chitosan salad dressing during storage.

Sample	Temp.	Storage (day)				
		1	2	3	7	14
Traditional	5°C	<2.5×10 <sup>1</sup> *	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	6.4×10 <sup>3</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>
	25°C	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>
DD80~90%	5°C	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	5.65×10 <sup>2</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>
	25°C	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>	<2.5×10 <sup>1</sup>

\* : CFU/mL, Colony Forming Unit/mL

<2.5×10<sup>1</sup>, Too Few To Count (TFTC)

>2.5×10<sup>2</sup>, Too Numerous To Count (TNTC)

## 柒、結論

由以上試驗結果可知幾丁聚醣確實具有優良之乳化性質，不同去乙醯度者於酸性 pH 下其乳化性質不同，這些性質總結如下：

### 一、在乳化能力方面

不同去乙醯度幾丁聚醣，在添加濃度為 0.5 % 時，其乳化能力的高低是以去乙醯度在 80~90 % 為最高，最低為去乙醯度 20~30 % 者，而去乙醯度 40~50 % 及 60~70 % 組則介在上述兩組中間。而幾丁聚醣溶液之 pH 若接近其 pKa 時則有較佳之乳化能力，且隨著幾丁聚醣之濃度增加其乳化能力有下降現象。

### 二、在乳化安定性方面

#### (一) 在不同溫度處理對幾丁聚醣乳化液安定性之影響方面

當使用去乙醯度 20~30 % 之幾丁聚醣做乳化時，在較低 pH，幾丁聚醣乳化液較安定且黏度也較高，相反的，於 pH 偏 6.0 時其乳化安定性有明顯遭受影響，需提高幾丁聚醣之濃度才能維持其安定。40~50 % 去乙醯度者，因其溶液本身黏度非常黏稠，因而影響至其乳化安定性，不過，當 pH 偏於 6.0 時其乳化安定性較偏酸性之 pH 稍好。60~70 % 及 80~90 % 去乙醯度者，於較高濃度及較接近 pH 6.0 進行乳化時，其乳化液較更為安定。

## (二) 在幾丁聚醣乳化液抵抗循環凍結解凍的能力方面

去乙醯度 20~30 % 幾丁聚醣乳化液幾乎在每一次循環都會有些許油分離情形。去乙醯度 40~50 % 組，其穩定度則是最差的，所分離之油也是最多的。去乙醯度 60~70 % 組，除了在低濃度時有些許油分離外，當濃度添加至 2.0% 時則沒有發現分層現象，顯示幾丁聚醣濃度的增加能夠使乳化液抵抗循環凍結解凍，防止油的分離。而去乙醯度 80~90 % 組使用濃度 1.5 % 以上則是最穩定的，在 5 次循環凍結-解凍後沒有發現分層。

## 三、幾丁聚醣乳化液滴之大小分布情形方面

不同去乙醯度幾丁聚醣乳化液滴大小會隨著濃度增加其液滴越小且較集中，因此穩定性佳；高去乙醯度幾丁聚醣在較高 pH 時( $<$ 幾丁聚醣 pKa) 乳化液滴大小分布集中，而低去乙醯度者則在較低 pH 時其乳化液滴較小較集中。

## 四、幾丁聚醣乳化液在顯微鏡下觀察方面

在顯微鏡下幾丁聚醣乳化液觀察及測試後之結果，發現幾丁聚醣為 w/o/w 型式的乳化液。

## 五、在沙拉醬應用方面

在沙拉醬上應用時，由官評結果得知，除了去乙醯度組及各組呈現澀味為缺點外，其餘去乙醯度組的口感、風味、顏色似乎均略優於傳統組，其總接受性與傳統組為不明顯差異。此

外，幾丁聚醣乳化液均比傳統者較安定(不分層)，且雜菌不易生長。

## 六、未來之展望方面

本次實驗為將不同去乙醯度幾丁聚醣做乳化，並探討其在不同 pH 及不同濃度下之乳化能力、乳化安定性...等，期望對幾丁聚醣的乳化性質能有一個全面性通盤了解，而不是只針對某部分去乙醯度來做討論，如此其應用範圍才會廣泛，以便將來不管是在食品上應用也好，或是在其他領域如：醫藥、生化、化學...等之應用上都有其參考價值。

但是在此實驗中，低去乙醯度者仍有溶解性或是分散性不佳之現象。因此，低去乙醯度幾丁聚醣可試利用濃 HCl 將其作成膠態幾丁聚醣(colloidal chitosan)，使得原本不易打開的晶體變得膨潤呈現開啟狀態，晶體內部之乙醯基及少部分胺基因此而有更多地顯露出，如此便可以提高其溶解度不佳之問題。另外，對於高去乙醯度者之澀味問題，則可試利用帶負電之多醣類或蛋白質與幾丁聚醣上面之  $\text{NH}_3^+$  相互結合，藉此方式去除澀味。至於其效果如何，則有待進一步之研究與探討。

## 捌、參考文獻

方紹威(1990)。幾丁質及幾丁聚醣在廢水處理、生化、食品和醫藥上之研究發展現況。藥物食品檢驗局調查研究年報。8:20。

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。

吳貞誼(1995)。以幾丁聚醣自葡萄柚汁脫酸、澄清及抗菌之研究。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。

阮進惠、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、林翰良、羅淑珍(1997)。幾丁聚醣水解物之連續式生產及其抑菌作用。中農化誌。35:596。

吳玟秀(2003)。不同水解度之幾丁聚醣對老鼠營養質之吸收、肝臟和血清膽固醇和三酸甘油脂之含量及體重之影響。私立東海大學碩士論文。

阮進惠、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、張文翰(1996)。以加熱和果膠修飾豬血血球蛋白及其功能性質。食品科學。23:215。

阮進惠、張為憲(1984)。豬血血漿與血球蛋白質之分離回收及其功能性質。食品科學。11:178。

阮進惠、張為憲(1995)。利用不同去乙醯度之幾丁聚醣固定澱粉葡萄糖化。中農化誌。33:732。

吳適(1979)。乳化劑在食品工業上的應用。食品工業 11:28。

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技研究所碩士論文。

林芬年(1997)。以幾丁聚醣脫酸澄清梅汁之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。

林俊煌(1992)。不同去乙醯程度之幾丁聚醣的流變性質與鏈柔軟度；膜之物理特性的關係。國立海洋大學水產食品科學研究所碩士論文。

林翰良(1995)。以固定化幾丁聚醣 生產幾丁聚醣水解物及其抑菌之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。

陳俊豪(2003)。利用幾丁聚醣水解物為凝固劑製備中式豆腐以升級產品及降低廢水污染之研究。私立東海大學食品科學研究所碩士論文。

陳崇賢(1996)。乳液概論。介面科學會誌 19:1。

陳懿慧(1995)。幾丁聚醣應用於葡萄柚汁澄清之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

張珍田、任瑞芝、宋賢一、蘇仲卿(1986)。利用親合層析法純化雞蛋白溶菌之研究。中農化誌。24:272。

張炳揚(2001)。食品體系中乳化安定性之控制。食品工業 33:42。

張蕙苓(2000)。鳳梨酵素粗製品水解幾丁聚醣之研究。私立靜宜大學食品營養系碩士論文。

游士弘(1997)。幾丁質與幾丁聚醣之N-乙醯化程度及純度測定方法之探討，國立台灣海洋大學水產食品科學系碩士論文。

黃德琳(2000)。黴菌中幾丁聚醣酵素之篩選、純化與性質的研究。國立交通大學應用化學系碩士論文。

楊萃渚(2002)。水溶性幾丁聚醣單、雙醣衍生物之合成與其一些理化與功能特性之探討。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

趙承琛編著(1991)。界面科學基礎(原名：界面化學)。復文書局。

蔡義宏(1979)。乳化原理。應用界面化學 2:13。

劉曉君(2001)。幾丁質類產品純度分析方法之建立。國立海洋大學食品科學系碩士論文。

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。

賴淑琪(1979)。水產廢棄物蝦、蟹外殼之高度利用。食品工業。11:23。

蘇仲卿、張珍田、莊榮輝(1981)。利用親合層析法分離豬胰臟蛋白質水解酵素 trypsin 和 chymotrypsin 之中間規模試驗。中農化誌。19:218。

山口壽(1986)。食品、醫藥品分野 應用擴 、 。食品開發。

戶倉清一(1990)。 , 免疫賦活能 制御。食品工業。10:37

宮尾茂雄(1995)。 基礎 應用。防菌防黴。23(7):421。

Aiba, S., Fujiwara, Y., Hideshima, T., Kakizaki, M., Izume, N., Shojij, T., Tsutsumi, A., Hwang, C., Rha, C. K., and Sinskey, A. J. (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. p.389.

Aiba, S. (1992). Studies on chitosan:IV. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. Int. J. Biol. Macromol. 14:225.

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.

Arai, K., Minumari, K., and Fujita, T. (1968) On the toxicity of chitosan. Bull, Tokai. Reg. Fich. Lab. 56:889.

Austin, P. R., Brine, C. J., Castle, J. E., and Zikakis, J. P. (1981). Chitin:New facets of research. Science 212:749.

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. Res.* 238:11.

Blackwell, J. (1988). Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Methods in enzymology.* 16:435.

Bough, W. A. (1975). Reduction of suspended solids in vegetable canning waste Effluents by coagulation with chitosan. *J. Food Sci.* 40:297.

Bough, W. A. (1976). Chitosan-a polymer from seafood waste, for use in treatment of food processing wastes and activated sludge. *Proc. Biochem.* 11:13.

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, *Biotechnology and bioengineering.* 20:1931.

Brine, C. J., and Austin, P. R. (1981) Chitin variability with species and method of preparation. *Biochem. Physiol.* 68:283.

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.

Chen, C., Liao, W., and Tsai, G. (1998). Antibacterial effects of N-Sulfonated and N-Sulfobenzoyl Chitosan and Application to Oyster Preservation. *J. Food Protection.* 61:1124.

Cuero, R. G., Osuji, G., and Washington, A. (1991). N-Carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: Role of zinc. *Biotechnology Letters.* 13:441.

Curotto, E., and Aros, F. (1993). Quantitative determination of chitosan and the percentage of free amine groups. *Anal. Biochem.* 211:240.

Das, K. P., and Kinsella, J. E. (1990). Stability of food emulsions. *Advance in*

Food Nutrition Research. 34:81.

Davis, D. H., and Hayes, E. R. (1988). Determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. *Method in Enzymology*. 161: 442.

Deans, J. R., and Dixon, B. G. (1992). Bioabsorbents for waste-water treatment. In: *Advances in Chitin and Chitosan*. Brine, C. J., Sandford, P. A., Zikakis, J. P. (Eds), Elsevier Applied Science, London and New York. p.648.

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.

Dickinson, E., and Stainsby, G. (1982) *Colloids in foods*. Applied Science, London.

Domard, A. (1987). Determination of N-acetyl content in chitosan samples by C.D. measurements. *Int. J. Biol. Macromol.* 9:333.

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 mungbean protein isolate. *Food Chem.* 70 : 83.

El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A., and Benhamou, N. (1992). Antifungal activity of chitosan on Post-Harvest pathogens: Induction of morphological and cytological alterations an *Rhizopus Stolonifer*. *Mycol. Res.* 96:769.

El Ghaouth, A., Ponnampalam, R., Castaigne, F., and Arul, J. (1992). Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *Hortscience* 27: 1016.

Fang, S. W., Li, C. F., and Shih, D. Y. C. (1994). Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar candied kumquat. *J. Food Protection.* 56:136.

- Filar, L. F., and Wirick, M. G. (1978). Bulk and solution properties of chitosan. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Conference on chitin and chitosan. Muzzarelli, R. A. A., and Pariser, E. R. (Eds). p.169.
- Friberg, S. E., and Larsson, K. (1997). Food emulsions. New York. p.2.
- Galat, A. (1979). Conformation and ultrastructural organization of chitin isolated from crayfish *Astacus astacus*. Bulletin of the Academie Polonaise des Sciences.27:987.
- Gamzazade, A. I., Sklyar, A. M., Pavlova, S. S. A., and Rogozhin, S. V. (1981). On the viscosity properties of chitosan solutions. Polym. Sci. U. S. S. R. 23:665.
- Hackman, R. H., and Goldberg. M. (1965). Studies on chitin. VI. The nature of  $\alpha$  and  $\beta$  - chitins. Aust. J. Biol. Sci. 18:935.
- Hirano, S., Tanaka, Y., Hasegawa, M., Tobetto, K., and Nruaoka, A. (1985) Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors. Carbohydrate Reasearch. 137:205.
- 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.51.
- 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.
- Hirano, S., and Akiyama, Y. (1995). Absence of hypocholesterolaemic action of chitosan in high serum-cholesterol rabbits. J. Sci. Food Agric. 69:91.
- Hoagland, P. D., and Parris, N. (1996). Chitosan/Pectin laminated films. J. Agric. Food Chem 44:1915.
- 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.

- Ignacio, G. C., Robert, A. F., and Paula. C. (1982). Bioconversion of shellfish chitin wastes: Waste pretreatment, Enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.* 47:901.
- Imeri, A. G., and Knorr, D. (1988). Effect of chitosan on yield and compositional data of carrot and apple juice. *J. Food Sci.* 53:1707.
- Jeuniaux, C. (1986). Chitosan as a tool for the purification of waters. In: *Chitin in Nature and Technology*. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., Gooday, G. W. (Eds), Plenum Press, New York, USA. p. 551.
- Johnson, E., and Peniston, Q. P. (1982). Utilization of shellfish waste for chitin and chitosan production. In: *Chemistry and Biochemistry of marine food products*. Martin, R. E., Flick, G. J., Hebard, C. E., and Ward, D. R. (Eds)
- Jumaa, M., Furkert, F.H., and Muller, B. M. (2002). A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *European J. Pharm. Biopharm.* 53:115.
- 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. *Biosc. Biotech. Biochem.* 59 : 786.
- Kester, J. J., and Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: A Review. *Food Technol.* 40: 47.
- Kienzle-Sterzer, C., and Rha, C. K. (1984). Solution properties of chitosan: Chain conformation. In: *Chitin, Chitosan and related enzymes*. Zikakis, J. P. (Eds), Academic Press, London. p.383.
- Kienzle-Sterzer, C., and Rha, C. K. (1985). Flow behavior of a cation Biopolymer: chitosan. *Polym. Bull.* 13:1.
- Kittur, F. S., Kumar, K. R., and Tharanathan, R. N. (1998). Functional packaging properties of chitosan films. *Z Lebensm. Unters Forsch. A.* 206: 44.
- Knorr, D. (1982). Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* 47:593.

Knorr, D. (1984). Use of chitinous polymers in food-a challenge for food research and development. *Food Technol.* 38:85.

Knorr, D. (1986). Nutritional quality, food processing, and biotechnology aspects of chitin and chitosan: A Review. *Proc. Biochem.* 6:90.

Knorr, D. (1991). Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management. *Food Technol* 45:114.

Krog, N. J., Riisom, T. H., and Larsson, K. (1985). Application in the food industry: 1 Chap. 1. In: *Encyclopaedia of emulsion technology*. Becher, P. (Ed), New York:Decker. p.321.

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.

Launay, B., Doublier, L. L., and Cuverilier, G. (1986). Flow properties of aqueous solution and dispersions of polysaccharides. In: *Function properties of food macromolecules*. Mitchell, J. R., and Ledward, D. A., (Eds), Elsevier applied Sci. Publishers. p.1.

Macrae, R., Robinson, R. K., and Sadler, M. J. (1993). *Encyclopaedia of food science food technology and nutrition*. Academic press, New York. p.1443,1577.

March, G. C., and Napper, D. H.(1977).The thermodynamic limit of the flocculation stability of sterical stabilized emulsion. *J. Colloid Int. Sci.* 61 : 383.

Miller, W. R., Spalding, D. H., and Risse, L. A. (1983). Decay,firmness and color development of florida bell pepper dipped in chlorine and imazalil and film-wrapped. *Proc. Fla.State Hort. Soc.* 96:347.

Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., and Yoshikawa, S. (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *J. Applied Polymer Sci.*28:1909.

Mitsukawa, H., Shimizu, O., and Nishi, H. (1971). Colorimetric determination of  $\alpha$ -amino nitrogen in urine and plasma with ninhydrin reaction. *Agr. Biol. Chem.*

35:272.

Moore, G. K., and Roberts, G. A. F. (1980). Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 2:115.

Muzzarelli, R. A. A. (1977). In: *Chitin*. Muzzarelli, R. A. A. (Ed). Pergamon Press, Oxford. New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt. p.5.

Muzzarelli, R. A. A., and Rocchetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydr. Polymers.* 5: 461.

Muzzarelli, R. A. A. (1986). Filmogenic properties of chitin/chitosan. In: *Chitin in Nature and Technology*. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., Gooday, G.W. (Eds), Plenum Press, New York, USA. p.389.

Muzzarelli, R. A. A., Weckx, M., and Fillipini, O. (1989). Removal of trace metal ions from industrial waters, unclear effluents and drinking water, with the aid of cross-linked N-carboxymethylchitosan. *Carbohydr. Polym.* 11:293.

Muzzarelli, R. A. A. (1996). Chitosan-based dietary foods. *Carbohydr. Polym.* 29:309.

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.

Nanjo, F., Katsumi, R., and Sakai, K. (1991). Enzymatic method for determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Anal. Biochem.* 193:164.

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.

No, H. K., and Meyers, S. P. (1989). *CrawRsh chitosan as a coagulant in recovery*

of organic compounds from seafood processing streams. *J. Agric. Food Chem.* 37:580.

Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., and Farkas, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnol.* 5:45.

Percot, A., Viton, C., and Domard, A. (2003) Optimization from shrimp shells. *Biomacromol.* 4:12.

Pinelli, S. A., Toledo, G. A. R., Esquerre, B. I. R., Luviano, S. A. R., and Higuera, C. I. (1998). Methods for extracting chitin from shrimp shell waste. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion.* 48(1):58.

Pons, M., Galotto, M. J., and Subirats, S. (1994). Light mayonnaise. Comparison of the steady rheological characterization of normal food. *Hydrocolloids.* 8:389.

Poulicek, M., Voss-Foucart, M. F., and Jeuniaux, C. (1985). Chitinoproteic complexes and mineralization in mollusk skeletal structures. In: *Chitin in Nature and Technology*. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., Gooday, G. W. (Eds), Plenum Press, New York and London. p.7.

Rinaudo, M., and Domard, A. (1988). Solution properties of chitosan. In: *Chitin and Chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and application*. Skjak-braek, G., Anthonsen, T., and Sandford, P. (Eds), Elsevier Applied Science, London and New York. p.71.

Risse, L. A., Chun, D., Mc Donald, R. E., and Miller, W. R. (1987). Volatile production and decay during storage of cucumber waxed, imazlil-treated, and film-wrapped. *Hortscience* 22:274.

Roberts, G. A. F., and Domszy, J. G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 4:374.

Rodriguez, M. S., Albertengo, L. A., and Agullo, E. (2001). Emulsification capacity of chitosan at different pH. In: *Chitin and Chitosan in Life Science*. Urugami T., Kurita K., and Fukamizo T. (Eds). Kodansha scientific ltd. P.113.

- Rodriguez, M. S., Albertengo, L. A., and Agullo, E. (2002). Emulsification capacity of chitosan. *Carbohydr. Polym.* 48 : 271.
- 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. p.11.
- Saito, M., Tabeta, R., and Ogawa, K. (1987). High-resolution solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR study of chitosan and its salts with acid : conformation characterization of polymorph and helical structures as viewed from the conformation-dependent  $^{13}\text{C}$  chemical shifts. *Macromolecules.* 20:2424.
- Sannan, T., Kurita, K., Ogura, K., and Iwakura, Y. (1978). Studies on chitin: I.R. Spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer.* 19:458.
- Sathe, S. K., and Salunkhe, D. E. (1981). Functional properties of the great Northern-bean protein: emulsion, Foaming, viscosity, and gelation properties. *J. Food. Sci.* 46:71.
- Schulz, P. C., Rodriguez, M. S., Del Blanco, L. F., Pistonesi, M., and Agullo, E. (1998). Emulsification properties of chitosan. *Colloid Polym. Sci.* 276:1159.
- Senstad, C. and Mattiasson, B. (1989). A nity-precipitation using chitosan as ligand carrier. *Biotechnol. Bioeng.* 33:216.
- Shahidi, F., Vidana Arachchi, J. K., and Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosan. *Trends in Food Sci. & Technol.* 10:37.
- Simpson, B. K., Gagne, N., and Simpson, M. V. (1994). Bioprocessing of chitin and chitosan. In: *Fisheries Processing: Biotechnological Applications.* Martin, A. M. (Ed), Chapman and Hall, London, UK. p.155.
- Soto-Perlata, N. V., Muller, H., and Knorr, D. (1989). Effect of chitosan treatments on the clarity and color of apple juice. *J. Food Sci.* 54:495.
- Spagna, G., Pifferi, P.G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G., and Palmonari, R. (1996). The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on

chitin and chitosan. *Food Res. Intern.* 29:241.

Stanley, W. L., Watters, G. G., Chan, B., and Mercer, J. M. (1975). Lactase and other enzymes bound to chitin with glutaraldehyde. *Biotech. Bioeng.* 17:315.

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.

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.

Tesch, S., Gerhends, Ch., and Schubert, H. (2002). Stabilization of emulsion by OSA starches. *J. Food Eng.* 54 : 167.

Thome, J. P., and Daele, Y. V. (1986). Adsorption of polychlorinated biphenyls (PCB) on chitosan and application to decontamination of polluted stream waters. In: *Chitin in Nature and Technology*. Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., Gooday, G. W. (Eds), Plenum Press, New York, USA. p.551.

Tirmizi, S. A., Iqbal, J., and Isa, M. (1996). Collection of metal ions present in water samples of different sites of pakistan using biopolymer chitosan. *J. Chem. Soc. Pakistan.* 18:312.

Toei, K., and Kohara, T. (1976). A conductometric method for colloid titrations. *Analytica Chimica Acta.* 83:59.

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.

Van Nieuwenhuyzen, W., and Szuhaj, B. F. (1998). Effects of lecithin and proteins on the stability of emulsions. *Fet/Lipid* 100. 7 : 282.

Volesky, B. (1987). Biosorbents for metal recovery. *Trends Biotechnol.* 5:96.

Wu, A. C. M., and Bough, W. A. (1976). Determination of molecular-weight

distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*. 128:87.

Yang, T, and Zall, R. R. (1984). Chitosan membranes for reverse osmosis application. *J. Food Sci.* 49:91.

Young, D. H., Kohle, H., and Kauss, H. (1982). Effect of chitosan on membrane permeability of suspension cultured glycine max and phaseolus vulgaris cells. *Plant Physiol.* 70:1449.

Zacour, A. C, Silva, M. E, Cecon, P. R., Bumbirra, E. A., and Vieira, E. C. (1992). Effect of dietary chitin on cholesterol absorption and metabolism in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38:309.