

高温酸沉对大豆分离蛋白品质的影响

时玉强^{1,2}, 马 军¹, 李顺秀¹, 赵洪兵¹, 王兴煜¹, 郭增旺³

(1. 山东禹王生态食业有限公司, 山东 禹城 251200; 2. 克东禹王大豆蛋白食品有限公司, 黑龙江 齐齐哈尔 164800; 3. 东北农业大学 食品学院, 哈尔滨 150006)

摘要:为了拓宽大豆分离蛋白的应用范围,降低大豆分离蛋白中大豆异黄酮的含量,考察了高温酸沉对大豆分离蛋白品质的影响。分析了不同酸沉温度下,大豆分离蛋白中主要大豆异黄酮类物质含量的变化,大豆乳清中粗蛋白质含量及固形物含量的变化,大豆分离蛋白水合蓝光白度的变化,以及大豆分离蛋白凝胶值的变化。结果表明:酸沉温度从70℃升高到85℃,大豆异黄酮总量降低了43.84%,其中大豆苷、染料木苷含量分别降低了88.76%、83.95%,黄豆苷降到了检出限以下,而大豆苷元、染料木素含量分别提高了72.51%和143.47%,黄豆黄素的含量变化不显著;随酸沉温度升高,大豆乳清中的粗蛋白质含量和固形物含量不断降低,与酸沉温度70℃时相比,酸沉温度85℃时粗蛋白质含量降低了25.12%,固形物含量降低了6.34%;随酸沉温度升高,大豆分离蛋白的水合蓝光白度不断增加且增速不断提高,与酸沉温度70℃时相比,酸沉温度85℃时水合蓝光白度增加了26.83%;随酸沉温度升高,大豆分离蛋白的凝胶值不断降低,与酸沉温度70℃时相比,酸沉温度85℃时凝胶值降低了57.02%。综上,高温酸沉可有效控制大豆分离蛋白中大豆异黄酮的含量,提高大豆分离蛋白的水合蓝光白度和回收率,对开发低异黄酮含量的婴幼儿产品有积极意义。

关键词:大豆分离蛋白;高温酸沉;大豆异黄酮;大豆乳清;蓝光白度;凝胶值

中图分类号:TS229;TQ936.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)02-0047-05

Effect of high-temperature acid precipitation on the quality of soybean protein isolate

SHI Yuqiang^{1,2}, MA Jun¹, LI Shunxiu¹, ZHAO Hongbing¹,
WANG Xingyu¹, GUO Zengwang³

(1. Shandong Yuwang Ecological Food Industry Co., Ltd., Yucheng 251200, Shandong, China;
2. Kedong Yuwang Soy Protein Food Co., Ltd., Qiqihar 164800, Heilongjiang, China;
3. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150006, China)

Abstract: In order to broaden the application of soybean protein isolate (SPI) and reduce the content of soybean isoflavones in SPI, the effects of high-temperature acid precipitation on the quality of SPI were investigated. Under different acid precipitation temperatures, the changes of main soybean isoflavone content in SPI, the changes of the crude protein content and solid content in soybean whey, the changes of hydration blue brightness and gel value of SPI were analyzed. The results showed that the acid precipitation temperature increased from 70℃ to 85℃, the total amount of soybean isoflavones decreased by 43.84%, among which daidzin, genistin contents decreased by 88.76%, 83.95% respectively, and the content of glycitein dropped below the detection limit, whereas daidzein and genistein contents increased by 72.51%

and 143.47% respectively, and the content of glycitein had no significant difference. The crude protein content and solid content in soybean whey decreased continuously with the increase of acid precipitation temperature. Compared with 70℃, at the acid precipitation temperature 85℃, the crude

收稿日期:2022-11-11;修回日期:2023-10-28

基金项目:黑龙江省百千万重大工程科技重大专项支撑行动计划(2021ZX12B02);山东省重大科技创新工程(2022CXGC010603)

作者简介:时玉强(1982),男,正高级工程师,研究方向为植物蛋白工程(E-mail)slz7142940@163.com。

protein content in soybean whey decreased by 25.12%, and the solid content decreased by 6.34%. With the increase of acid precipitation temperature, the hydration blue brightness of SPI continued to increase and the growth rate continued to increase, and the hydration blue brightness increased by 26.83%, when the temperature increased from 70 °C to 85 °C. With the increase of acid precipitation temperature, the gel value of SPI decreased continuously, and it reduced by 57.02% when the acid precipitation temperature increased from 70 °C to 85 °C. In conclusion, the high-temperature acid precipitation process could effectively control the soybean isoflavones content in SPI, improve the hydration blue brightness and recovery capacity of SPI, which is of positive significance for the development of infant products with low soybean isoflavones content.

Key words: soybean protein isolate; high-temperature acid precipitation; soybean isoflavones; soybean whey; blue brightness; gel value

大豆分离蛋白有着优越的食品加工性能,在食品行业应用广泛,同时大豆分离蛋白的营养保健功能也日益得到人们的认可^[1-3]。一直以来大豆被认为是主要的八种食物过敏原之一,但是2021年5月FAO/WHO食品过敏原风险评估特别联合专家磋商会报告指出,由于缺乏有关流行率、严重程度和/或效力的数据,或某些食物的地区消费情况的数据,委员会建议大豆不应被列为全球优先过敏原^[4]。Klemola等^[5]研究发现,80例牛乳过敏婴儿中,只有8例(10%)发生豆基配方奶粉过敏,因此大豆蛋白可以作为牛乳蛋白过敏患者的替代品,这极大地拓宽了大豆蛋白的应用领域,并提高了其使用量。食品工业生产的大豆分离蛋白是通过碱溶酸沉法提取的,其蛋白质含量不小于90.0%,此外还含有无机盐、大豆异黄酮、低聚糖等微量成分。大豆异黄酮是一类具有多种生物活性的天然植物雌激素,主要包括大豆苷元(Daidzein)、大豆苷(Daidzin)、染料木素(Genistein)、染料木苷(Genistin)、黄豆黄素(Glycitein)、黄豆黄苷(Glycitin)等。由于大豆异黄酮与雌激素分子结构相似,在体内激素水平不同的条件下既可表现为弱雌激素活性也可以表现为抗雌激素活性,具有雌激素水平调节器的作用^[6],但是大豆异黄酮的类雌性激素作用对婴幼儿的影响程度尚不清晰,因此豆基婴儿配方食品中异黄酮的安全性目前仍存在许多争议^[7]。为了降低大豆异黄酮对婴幼儿的影响程度,用于婴幼儿配方的大豆蛋白产品对大豆异黄酮含量提出了更高的要求。大豆异黄酮糖苷能被稀酸催化水解^[8],生成的苷元在酸沉时进入大豆分离蛋白产品中,但提高酸沉温度可促进大豆异黄酮的溶解^[9],有利于减少产品中大豆异黄酮的含量,另外,高温会提高大豆蛋白变性程度,进而影响大豆蛋白的回收率和凝胶特性。本文拟对酸沉后的料液进行加热处理,以研究高温酸沉对降

低大豆分离蛋白中大豆异黄酮含量的工业可行性,并且评估其对大豆分离蛋白品质的影响,以期控制大豆分离蛋白产品中大豆异黄酮含量提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

低温脱脂豆粕(粗蛋白质55.2%,粗脂肪0.3%,膳食纤维14.6%),山东禹王生态食业有限公司;浓硫酸,分析纯,烟台远东精细化工有限公司;氢氧化钠,分析纯,北京益利精细化学品有限公司;硫酸铜、丙酮,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;无水乙醚,分析纯,格里斯(天津)医药化学技术有限公司;95%乙醇,天津市津东天正化学试剂厂;重铬酸钾,分析纯,茂名市雄大化工有限公司;三羟甲基氨基甲烷,分析纯,河南比爱欧生物科技有限公司;2-(N-吗啉代)乙烷磺酸,分析纯,翌圣生物科技(上海)股份有限公司;冰醋酸、甲醇,色谱纯,南京化学试剂股份有限公司。

Kjeltec 8200 凯氏定氮仪,丹麦 FOSS 公司;AL204-2C 电子天平,梅特勒-托利多有限公司;LHS-150-A 恒温培养箱、HWS-26 恒温水浴锅,上海一恒科学仪器有限公司;Vortex1 旋涡振荡器,广州仪科实验室技术有限公司;ColorTouch PC 白度仪,美国 Technidyne 公司;UltiMate 3000 液相色谱仪,赛默飞世尔科技公司;FDU-2110 真空冷冻干燥机,东京理化器械株式会社;R-210 旋转蒸发器,瑞士步琪(Buchi)实验室仪器公司;HT-100C 恒温摇床,上海赫田科学仪器有限公司;Allegra V-15R 冷冻型高速台式离心机,贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司;MDF-U392VHI 超低温保存箱,冰山松洋生物科技(大连)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白的提取

低温脱脂豆粕→加水(水料比8:1,45 °C)→调

pH(10 g/100 mL 氢氧化钠溶液, pH 7.3 ~ 7.4) → 搅拌萃取(120 r/min, 30 min) → 离心分离(4 500 r/min, 10 min) → 取上清液(豆乳) → 调 pH (pH 4.5 ~ 4.6) → 加热(75 ~ 85 °C, 30 min, 高温酸沉) → 离心分离(5 000 r/min, 10 min) → 沉淀 → 中和(pH 7.3 ~ 7.5) → 高温瞬时杀菌(121 °C, 5 s) → 喷雾干燥 → 大豆分离蛋白。

1.2.2 理化指标检测

大豆异黄酮含量的测定, 参照文献[10]的方法; 含水量的测定, 参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》; 固形物含量测定, 参照 SB/T 10326—1999《无盐固形物测定法》; 粗蛋白质含量测定, 参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》; 凝胶值测定, 参照文献[11]的方法; 水合蓝光白度的测定: 将(250.0 ± 0.1 g) 蒸馏水加入食品调理机中并调整转速为 500 r/min, 将(50.00 ± 0.01) g 大豆分离蛋白加入调理机搅打 30 s, 使用药匙清理调理机壁上黏附的蛋白, 再次运行调理机搅打 2 min, 使用白度仪进行水合蓝光白度检测。

1.2.3 数据处理

所有实验至少进行 3 次, 利用 SPSS 16.0 软件对数据进行 ANOVA 差异显著性分析, $p < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 高温酸沉对大豆分离蛋白中大豆异黄酮含量的影响

根据是否与糖基结合, 大豆异黄酮可分为游离苷元型和结合糖苷型, 其中结合糖苷型含量在 95% 以上^[12]。基于常规的生产设备对温度的耐受能力及使用寿命考虑, 酸沉加热的最高温度为 85 °C。按照 1.2.1 方法, 考察酸沉温度对大豆分离蛋白中大豆异黄酮含量的影响, 结果如表 1 所示。

表 1 酸沉温度对大豆分离蛋白中大豆异黄酮含量的影响

项目	不同酸沉温度下的含量/(mg/kg)			
	70 °C	75 °C	80 °C	85 °C
大豆苷元	211.0 ^a	216.0 ^b	243.5 ^c	364.0 ^d
大豆苷	546.5 ^d	477.5 ^c	259.5 ^b	61.4 ^a
染料木素	256.5 ^a	262.5 ^b	467.0 ^c	624.5 ^d
染料木苷	1 100.0 ^d	1 000.0 ^c	738.0 ^b	176.5 ^a
黄豆黄素	26.2 ^a	26.4 ^a	28.5 ^a	26.2 ^a
黄豆黄苷	99.0 ^d	87.5 ^c	33.3 ^b	ND ^a
合计	2 239.2 ^d	2 069.9 ^c	1 769.8 ^b	1 257.6 ^a

注: ND 表示小于检出限(L) 10 mg/kg, 计算时其含量以 0.5L 计; 同行不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著。下同

由表 1 可以看出, 随着酸沉温度的升高, 大豆分离蛋白中 3 种大豆异黄酮糖苷(大豆苷、染料木苷和黄豆黄苷)含量都呈显著下降趋势, 而大豆苷元和染料木素含量呈显著增加趋势, 黄豆黄素含量无明显变化, 总异黄酮含量显著下降。从酸沉加热后大豆异黄酮糖苷和苷元此消彼长的趋势推断, 酸沉加热加快了糖苷的水解速度。酸沉温度由 70 °C 升高至 80 °C, 大豆苷含量由 546.5 mg/kg 迅速降低到 259.5 mg/kg, 降低了 52.52%, 大豆苷元含量由 211.0 mg/kg 升高到 243.5 mg/kg, 提高了 15.40%, 大豆苷的降低幅度远大于大豆苷元的增长幅度, 说明高温酸沉对大豆苷的降低主要是通过稀酸热条件提高其水溶性所致; 酸沉温度由 80 °C 升高至 85 °C, 大豆苷(相对分子质量 416.30)减少量折合生成的大豆苷元(相对分子质量 254.24)的量为 121.0 mg/kg, 而大豆苷元增加的量为 120.5 mg/kg, 两者的差异不显著($p > 0.05$), 据此推断在此过程中稀酸热效应增加的溶解度趋于平稳, 两者含量之和的降低主要是由于糖苷水解所致。酸沉温度由 70 °C 提高至 75 °C, 染料木苷含量由 1 100.0 mg/kg 降低到 1 000.0 mg/kg, 降低了 9.09%, 染料木素含量由 256.5 mg/kg 升高到 262.5 mg/kg, 提高了 2.34%, 染料木苷的降低幅度远大于染料木素的增长幅度, 说明高温酸沉对染料木苷的降低是稀酸热条件下提高了其水溶性所致; 酸沉温度由 75 °C 升高至 80 °C, 染料木苷含量降低了 26.20%, 而染料木素含量增加了 77.90%, 染料木苷水解生成染料木素的降低幅度低于染料木素的增长幅度, 可能是大豆苷元氧化转化为染料木素所致; 酸沉温度由 80 °C 升高至 85 °C, 染料木苷含量降低了 76.08%, 而染料木素含量增加了 33.73%, 染料木苷的降低幅度再次远大于染料木素的增长幅度, 说明在此过程中染料木苷稀酸热溶性增加幅度大于其稀酸水解幅度。酸沉温度由 70 °C 升高至 85 °C, 黄豆黄苷含量持续下降, 由 99.0 mg/kg 下降至检出限以下, 下降趋势显著, 而黄豆黄素的含量变化不显著, 这可能是因为黄豆黄苷水解为黄豆黄素的量和温度提高造成的黄豆黄素溶解度提高的程度相当, 水解产生的黄豆黄素溶于水, 在酸沉分离时进入了乳清中。酸沉温度由 70 °C 升高到 85 °C, 大豆异黄酮总量降低了 43.84%, 其中大豆苷、染料木苷含量分别降低了 88.76%、83.95%, 黄豆黄苷降至检出限以下, 而大豆苷元、染料木素含量分别提高了 72.51% 和 143.47%, 黄豆黄素含量无明显变化。总体来看, 高温酸沉可有效降低大豆分离蛋白中大豆异黄酮含量, 有利于降低大豆分离蛋白潜

在的不确定性,更利于其应用于婴幼儿产品中。目前尚未有国家标准规定婴幼儿产品中大豆异黄酮的含量,但是一些大型的国际跨国婴幼儿食品生产商已经开始关注低大豆异黄酮的大豆分离蛋白产品。

2.2 高温酸沉对大豆乳清中粗蛋白质含量的影响

大豆乳清的主要成分是大豆低聚糖、可溶性盐和大豆乳清蛋白^[13]。高温酸沉可以使部分大豆乳清蛋白变性,在酸沉后的离心分离过程中作为沉淀从乳清中分离出来,从而降低大豆乳清中的粗蛋白质含量,有利于提高产品得率。对高温酸沉离心分离后的大豆乳清中粗蛋白质含量和固形物含量进行检测,结果如表2所示。

表2 酸沉温度对大豆乳清中粗蛋白质含量和固形物含量的影响

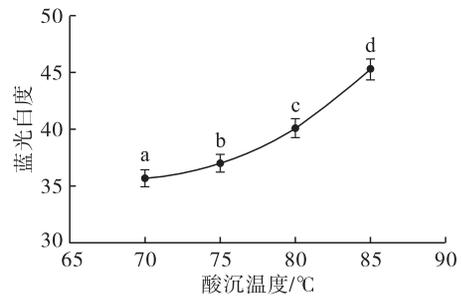
项目	不同酸沉温度下的含量/%			
	70℃	75℃	80℃	85℃
粗蛋白质	21.5 ^a	19.7 ^b	19.5 ^b	16.1 ^c
固形物	2.05 ^a	2.00 ^b	2.00 ^b	1.92 ^c

从表2可以看出,随着酸沉温度的升高,大豆乳清中的固形物含量和粗蛋白质含量不断降低。酸沉温度由70℃升高到75℃时,大豆乳清中粗蛋白质含量降低了1.8个百分点,固形物含量降低了0.05个百分点,降幅达2.44%,这是因为在此期间大豆胰蛋白酶抑制剂和 β -淀粉酶热变性导致的,这与大豆胰蛋白酶抑制剂热变性温度72.8℃^[14], β -淀粉酶70℃以上一般会变性失活^[15]的研究结论一致;酸沉温度由75℃升高到80℃时,大豆乳清中粗蛋白质含量和固形物含量没有显著变化;酸沉温度由80℃升高到85℃时,大豆乳清中粗蛋白质含量降低了3.4个百分点,固形物含量降低了0.08个百分点,降幅达4.00%,这是因为在此期间脂肪氧化酶变性聚集,脂肪氧化酶占大豆种子蛋白质含量的2%,当温度超过80℃时开始变性^[16]所致。受设备承受能力的影响,本文实验梯度只做到85℃。酸沉温度在85℃时,大豆乳清中固形物含量降低到1.92%,与70℃相比只下降了6.34%,这主要是因为大豆凝集素的等电点在5.8左右^[17],在pH为4.5时,其在大豆乳清中溶解度较高,另外,大豆凝集素的热变性温度为89.4℃^[18],其含量高达大豆蛋白质总量的10%左右^[19],故大部分大豆凝集素残留在了乳清中,同时由于设备离心力的局限性,部分变性后的蛋白没有被离心去除。整体看,酸沉温度由70℃升高到85℃,大豆乳清中粗蛋白质含量降低了25.12%,固形物含量降低了6.34%,说明高温酸沉有利于大

豆蛋白的回收。

2.3 高温酸沉对大豆分离蛋白水合蓝光白度的影响

酸沉温度对大豆分离蛋白水合蓝光白度的影响如图1所示。



注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。下同

图1 酸沉温度对大豆分离蛋白水合蓝光白度的影响

由图1可以看出,随着酸沉温度的升高,大豆分离蛋白的水合蓝光白度不断增加且增速不断提高,与70℃时相比,85℃时大豆分离蛋白的水合蓝光白度增加幅度达到26.83%。这主要是因为大豆异黄酮为黄色^[9],大豆分离蛋白中大豆异黄酮含量的降低,导致其水合蓝光白度持续增长,同时随着温度的升高,大豆中含有一些热敏性色素被破坏也是其水合蓝光白度增加的原因之一^[20-21]。

2.4 高温酸沉对大豆分离蛋白凝胶值的影响

酸沉温度对大豆分离蛋白凝胶值的影响如图2所示。

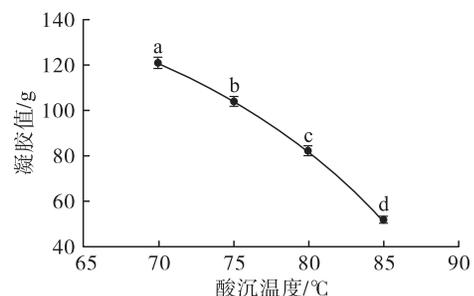


图2 酸沉温度对大豆分离蛋白凝胶值的影响

由图2可以看出,随着酸沉温度的升高,大豆分离蛋白的凝胶值不断降低,由酸沉温度70℃时的121 g降低到酸沉温度80℃时的52 g,降低了57.02%。这是因为随着酸沉温度的升高,蛋白质的变性加快,大豆分离蛋白中变性蛋白的比例不断增加,导致其凝胶值不断下降。

3 结论

提高酸沉温度,有利于降低大豆分离蛋白中大豆异黄酮的总量,提高大豆蛋白的回收率,降低大豆乳清的处理难度,改善大豆分离蛋白的水合颜色,但会降低大豆分离蛋白的凝胶性。高温酸沉虽然降低

了大豆异黄酮总量,但是增加了游离态苷元的含量,因此需要评估大豆异黄酮总量减少与苷元型大豆异黄酮含量增加产生的综合效应。另外,高温酸沉带来的蛋白凝胶性降低,在一定程度上限制了大豆分离蛋白的应用,但在颜色上有较大的优势,可以有针对性地开发下游产品,拓宽大豆分离蛋白的应用领域。高温酸沉对大豆分离蛋白的一级结构、二级结构、三级结构及四级结构的影响,需要后期进行系统的研究,由此产生的对大豆分离蛋白乳化性、起泡性、成膜性的影响也有待进一步深入研究,以促进大豆蛋白产业的持续发展。

参考文献:

- [1] GUO X, SUN X, ZHANG Y, et al. Effect of soy protein hydrolysates incorporation on dough rheology, protein characteristic, noodle quality, and their correlations[J]. *J Food Sci*, 2022, 87(8): 3419–3432.
- [2] WEI Z, ZHOU N, ZOU L, et al. Soy protein alleviates malnutrition in weaning rats by regulating gut microbiota composition and serum metabolites [J/OL]. *Front Nutr*, 2021, 8: 774203[2022–11–11]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.774203>.
- [3] KOZACZEK M, BOTTJE W, ALBATAINEH D, et al. Effects of short- and long-term soy protein feeding on hepatic cytochrome P450 expression in obese nonalcoholic fatty liver disease rat model[J/OL]. *Front Nutr*, 2021, 8: 699620[2022–11–11]. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.699620>.
- [4] Ad hoc joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of food allergens Part 2: Review and establish threshold levels in foods of the priority allergens[R/OL]. (2021–08–20)[2022–11–11]. <https://www.fao.org/3/cb6388en/cb6388en.pdf>.
- [5] KLEMOLA T, VANTO T, JUNTUNEN – BACKMAN K, et al. Allergy to soy formula and to extensively hydrolyzed whey formula in infants with cow's milk allergy: A prospective, randomized study with a follow-up to the age of 2 years[J]. *J Pediatr*, 2002, 140(2): 219–224.
- [6] 肖硕, 王培玉, 张玉梅. 大豆异黄酮与乳腺癌关系研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(5): 530–531.
- [7] 万洋灵, 吕莹, 陶然, 等. 豆基婴儿配方食品中异黄酮的安全性[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(2): 200–208.
- [8] 韩锋, 翟桂香. 大豆异黄酮及其水解研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2004, 12(5): 35–36.
- [9] SINGH N. Process for producing a high solubility, low viscosity, isoflavone-enriched soy protein isolate and the products thereof: US7306821[P]. 2007–12–11.
- [10] HSIEH H C, KAO T H, CHEN B H. A fast HPLC method for analysis of isoflavones in soybean[J]. *J Liq Chromat Rel Technol*, 2004, 27(2): 315–324.
- [11] 时玉强, 鲁绪强, 马军, 等. 湿法粉碎豆粕对大豆分离蛋白生产的影响[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5): 45–47.
- [12] 郭咪咪, 杨茜, 段章群. 纤维素酶催化大豆异黄酮的水解[J]. *中国油脂*, 2023, 48(3): 110–115, 139.
- [13] 关艳艳. 大豆乳清废水中 β -淀粉酶的分离纯化、性质及应用研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
- [14] 梁雪华. 大豆胰蛋白酶抑制剂提取及酶法失活技术研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
- [15] 刘亚伟. 淀粉基食品添加剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [16] 冯笑笑. 豆浆关键挥发性异味成分的形成机制及加工工艺对豆浆风味影响的研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2021.
- [17] 李兴飞. 大豆乳清蛋白与多糖的复合作用以及蛋白质组分的选择性提取[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2017.
- [18] 郑志雄, 杨晓泉. 大豆乳清蛋白的热变性和热聚集的研究[J]. *食品工业科技*, 2009, 30(5): 100–102.
- [19] 王利民, 秦贵信, 胡海霞, 等. 大豆凝集素的分子结构及其抗营养作用研究进展[J]. *吉林农业科学*, 2006, 31(6): 44–47.
- [20] PIERCE E C, LAFAYETTE P R, ORTEGA M A, et al. Ketocarotenoid production in soybean seeds through metabolic engineering [J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138196[2022–11–14]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138196>.
- [21] TAGUCHI Y, ONO F, TANAKA M. Preparation of microcapsules containing β -carotene with thermo sensitive curdlan by utilizing reverse dispersion [J]. *Pharmaceutics*, 2013, 5(4): 609–620.