



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารโพลีเมอร์ เอนไซม์ไลเปส และเกลือน้ำดี
ต่อการปลดปล่อยกรดไขมันโอเมก้า-3 จากอิมัลชัน
แบบผิวสัมผัสสองชั้นของน้ำมันปลาทูน่า

โดย

ดร. อุทัย กลิ่นเกษร

กันยายน 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารโพลีเมอร์ เอนไซม์ไลเปส และเกลือน้ำดี
ต่อการปลดปล่อยกรดไขมันโอเมก้า-3 จากอิมัลชัน
แบบผิวสัมผัสสองชั้นของน้ำมันปลาทูน่า

ดร. อุทัย กลิ่นเกษร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับงานวิจัยนี้ โดยภายใต้โครงการทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ รหัสโครงการ MRG4980084

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการศึกษาวิจัย

ขอขอบคุณ ดร. ปาริฉัตร หงสประภาส และ Prof. David Julian McClements นักวิจัยที่ปรึกษา สำหรับกำลังใจ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

อุทัย กลิ่นเกษร

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG4980084

ชื่อโครงการ: ผลของสารโพลีเมอร์ เอนไซม์ไลเปส และเกลือน้ำดี ต่อการปลดปล่อยกรดไขมันโอเมก้า-3 จากอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้นของน้ำมันปลาทูน่า

ชื่อนักวิจัย: ดร. อุทัย กลิ่นเกษร

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ

E-mail: fagiutk@ku.ac.th; utai.k@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: มิถุนายน 2549 ถึง กันยายน 2551

การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้น (0-0.3 wt%) และขนาดโมเลกุลของโคโคแซน (120 250 และ 342.5 kDa) เกลือน้ำดี และสารไบโอโพลีเมอร์ ต่อความคงตัวและการย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสของอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าในน้ำที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิติน โดยวัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ขนาดอนุภาคหยดน้ำมัน ความคงตัวต่อการเกิดชั้นครีม ปริมาณกรดไขมันอิสระ และกลูโคซามีนของอิมัลชันที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0 นาน 1 ชม.; พีเอช ~ 2.0 นาน 1 ชม.; พีเอช ~ 5.3 นาน 2 ชม.; พีเอช ~ 7.5 นาน 2 ชม.; 37°C) ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ไลเปส พบว่าค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิตินเปลี่ยนจากค่าลบ (≈ -29 mV) เป็นบวกเมื่อเติมโคโคแซนเข้มข้น 0-0.3 wt% โดยค่าเป็นบวกจะเพิ่มขึ้นและมีค่าคงที่ ($\approx +53$ mV) ที่โคโคแซนเข้มข้น ≥ 0.2 wt% หลังผ่านแบบจำลองการย่อยอาหาร ประจุบนผิวหยดน้ำมันที่ห่อหุ้มด้วยชั้นเลซิติน-โคโคแซน มีค่าเป็นลบที่ทุกความเข้มข้นและขนาดโมเลกุลที่ใช้ในการทดลองนี้ อิมัลชันที่หยดน้ำมันถูกห่อหุ้มด้วยชั้นเลซิติน-โคโคแซน เริ่มแรกมีความคงตัวต่อการรวมกันของหยดน้ำมัน แต่ไม่มีความคงตัวเลยเมื่อผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร ปริมาณกรดไขมันอิสระและกลูโคซามีนที่ปลดปล่อยจากอิมัลชันมีปริมาณสูงขึ้น และอนุภาคหยดน้ำมันเกิดการรวมกันเป็นอนุภาคที่ใหญ่ขึ้นมากสำหรับอิมัลชันที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารและเติมเอนไซม์ไลเปส (0.5-2 mg/ml) ส่วนการเติมเกลือน้ำดี (2.5-6.5 mM) และไบโอโพลีเมอร์ประจุลบ (เพคติน) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์อิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าที่ทำให้คงตัวด้วยชั้นเลซิติน-โคโคแซนของเอนไซม์ไลเปสได้ ผลการทดลองที่ได้ทำให้เข้าใจอิทธิพลของโคโคแซนต่อการไฮโดรไลส์ไขมันมากขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองแสดงว่าหยดน้ำมันปลาทูน่าที่ถูกห่อหุ้มด้วยชั้นเลซิติน-โคโคแซน สามารถถูกไฮโดรไลส์หรือย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไลเปสภายใต้สภาวะจำลองระบบย่อยอาหารของมนุษย์ ฉะนั้นระบบอิมัลชันที่มีโคโคแซนห่อหุ้มหยดน้ำมันน่าจะเป็นระบบนำส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารโภชนเภสัชกลุ่มไขมันได้

คำหลัก: โคโคแซน เลซิติน ไลเปส ความคงตัวของอิมัลชัน การย่อยไขมัน

Abstract

Project Code: MRG4980084

Project Title: Influence of biopolymer, lipase and bile salt on n-3 fatty acid released from emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes

Investigator: Utai Klinkesorn, Ph.D.
Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry
Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok
e-mail: fagiutk@ku.ac.th; utai.k@ku.ac.th

Project Period: June 2006 – September 2008

The influence of chitosan concentration (0-0.3 wt%) and molecular weight (120, 250 and 342.5 kDa), bile salt and biopolymer on the physical stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions was studied. The ζ -potential, droplet size, creaming stability, free fatty acids released, and glucosamine released was measured for the emulsions when they were subjected to an in vitro digestion model (pH~7.0, 1 h; pH~2.0, 1 h; pH~5.3, 2 h, pH~7.5, 2 h: 37°C) in the absence of pancreatic lipase. The ζ -potential of the oil droplets in lecithin-stabilized emulsions changed from negative ($\approx$ -29 mV) to positive when the chitosan concentration was increased from 0 to 0.3 wt%, reaching a relatively constant value ($\approx$ +53 mV) at $\geq$ 0.2 wt% chitosan. After passing through the in vitro digestion model, the ζ -potential of the lecithin-chitosan coated lipid droplets became negative for all chitosan concentrations and molecular weights used. The initial lecithin-chitosan coated droplets were stable to droplet aggregation, but they became highly unstable after being subjected to the digestion model. The amount of free fatty acid and glucosamine released per unit amount of emulsion was higher and there was much more extensive droplet aggregation in the emulsions when pancreatic lipase (0.5-2 mg/ml) was included in the digestion model. Addition of bile salt (2.5-6.5 mM) and anionic biopolymer (pectin) enhanced lipase digestibility of tuna oil emulsion stabilized by lecithin-chitosan membranes. These results may have important implications for understanding the influence of chitosan on lipid digestion, since they show that lecithin-chitosan coated tuna oil droplets can be degraded by lipase under simulated gastrointestinal conditions. Consequently, chitosan-coated lipid droplets may serve as useful carriers for the delivery of bioactive lipophilic nutraceuticals.

Keywords: chitosan; lecithin; lipase; emulsion stability; digestibility of fat

บทนำ

น้ำมันปลา เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 เช่น กรดไขมันอีพีเอ (EPA; Eicosapentaenoic acid; C20:5) และกรดไขมันดีเอชเอ (DHA; Docosahexaenoic acid; C22:6) กรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 นี้มีความสำคัญและมีประโยชน์ต่อร่างกาย สามารถป้องกันและรักษาโรคเกี่ยวกับระบบหมุนเวียนเลือด (Kris-Etherton et al., 2003; Uauy and Valenzuela, 2000) ป้องกันและลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม (Gonzalez et al., 1993) และ มะเร็งต่อมลูกหมาก (Norris et al., 1999; Terry et al., 2001) นอกจากนี้กรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 ยังมีความสำคัญต่อการพัฒนาระบบประสาทตา การพัฒนาสมอง (Jonsbo et al., 1995) รวมทั้งลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอัลไซเมอร์ด้วย เนื่องจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 มีประโยชน์ต่อร่างกายสูงดังกล่าวข้างต้น จึงมีความสนใจในการนำน้ำมันที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวโอเมก้า-3 อยู่สูง เช่น น้ำมันปลาทูน่า (Klinkesorn et al., 2004) มาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร ซึ่งจะทำให้อาหารที่บริโภคโดยทั่วไปในแต่ละวันมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากองค์ประกอบกรดไขมันในน้ำมันปลาทูน่าเป็นกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูง จึงทำให้เกิดออกซิเดชันได้ง่าย ซึ่งน้ำมันที่เกิดออกซิเดชันนั้นจะมีกลิ่นเหม็นหืน และไม่เป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภค นอกเหนือจากสารต้านออกซิเดชันแล้ว การใช้เทคนิคเ็นแคปซูลชัน (encapsulation) เพื่อชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันปลา ถือเป็นอีกหนึ่งวิธีที่กำลังได้รับความสนใจในภาคอุตสาหกรรม

ไคโตแซน (chitosan) เป็นสารประกอบไบโอโพลีเมอร์ที่กำลังได้รับความสนใจ สำหรับใช้ผลิตเ็นแคปซูลชันน้ำมันปลา (Klaypradit and Huang, 2008; Klinkesorn et al., 2005a; Peniche, et al., 2004) ไคโตแซน ได้จากการดัดแปรโมเลกุลไคติน (chitin) ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เปลือกของแมลง ปู หรือกุ้ง และกระดองของปลาหมึก โมเลกุลไคโตแซนมีกลูโคซามีน (glucosamine) เป็นองค์ประกอบหลัก และเป็นโพลีแซคคาไรด์ประจุบวก มีค่า pKa ประมาณ 6.3-7 (Schulz et al., 1998; Shahidi, Arachchi and Jeon, 1999) ไคโตแซนมีสมบัติเชิงหน้าที่หลากหลาย เช่น สมบัติการเป็นสารอิมัลซิฟายเออร์ สารต้านออกซิเดชัน สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเชื้อรา สารจับโลหะ และการลดปริมาณคลอเรสเตอรอล เป็นต้น (Kim and Thomas, 2007; Maezaki and Tsuji, 1993; No et al., 2007; Schulz et al., 1998; Seo, Mitsuhashi and Tanibe, 1992; Shahidi et al., 1999) อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์ของไคโตแซนในผลิตภัณฑ์อาหารยังมีข้อจำกัด เนื่องจากไคโตแซนไม่ละลายน้ำ และก่อให้เกิดพฤติกรรมที่ย่อยไคโตแซนในระบบทางเดินอาหารมนุษย์ยังไม่ชัดเจน

การย่อยไขมันในระบบทางเดินอาหารมนุษย์จะเกิดขึ้นในกระเพาะอาหาร แล้วเกิดต่อเนื่องไปยังลำไส้เล็ก ส่วนการดูดซึมไขมันจะเกิดขึ้นเฉพาะที่ลำไส้เล็กเท่านั้น (Mu and Hoy, 2004) โดยในกระเพาะอาหารไขมันจะอยู่ในรูปอิมัลชัน หลังจากนั้นจะเคลื่อนที่เข้าสู่ลำไส้เล็ก และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเพสในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salt) และโคไลเพส (colipase) ซึ่งผลิตและถูกปล่อยออกมาจากตับอ่อน (Brockman, 2000; Gurr and Harwood, 1991) อันตรกิริยาระหว่างเกลือน้ำดี

โคไลเปส และเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้กระบวนการย่อยไขมันเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ (Gurr and Harwood, 1991) นอกจากนั้นคุณลักษณะของหยดน้ำมัน องค์ประกอบ โครงสร้าง และสมบัติทางเคมีกายภาพของชั้นผิวสัมผัสรอบๆ หยดน้ำมัน ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่อาจจะส่งผลต่ออัตราการย่อยและดูดซึมไขมันด้วย ตัวอย่างเช่น ชั้นผิวสัมผัสรอบหยดน้ำมันอาจจะเป็นชั้นขวางกั้นเอนไซม์ไลเปสไม่ให้สัมผัสกับโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมัน (Armand et al., 1999)

การเตรียมอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้น (Two-layered emulsion) สามารถเตรียมได้โดยใช้วิธีเตรียมสองชั้นตอนดังนี้ ชั้นตอนแรกคือการเตรียมอิมัลชันปฐมภูมิ (primary emulsion) โดยการโฮโมจีไนซ์น้ำมันกับสารละลายอิมัลซิฟายเออร์ เช่น เลซิทีน โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) เป็นต้น ส่วนชั้นตอนที่สองเป็นการเตรียมอิมัลชันทุติยภูมิ (secondary emulsion) โดยการเจือจางอิมัลชันปฐมภูมิด้วยสารละลายไบโอโพลีเมอร์ที่มีประจุตรงกันข้ามกับประจุของอิมัลซิฟายเออร์ปฐมภูมิ เช่น โคลิเจน เป็นต้น หยดน้ำมันจะดูดซับโพลีเมอร์ที่มีประจุตรงข้ามกับประจุบนผิวหยดน้ำมัน ทำให้เกิดผิวสัมผัสสองชั้นรอบหยดน้ำมัน (Ogawa et al., 2003) ซึ่งอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้นนี้ จะมีความคงตัวต่อการให้ความร้อน การทำละลายหลังการแช่เยือกแข็ง และสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (Aoki et al., 2005; Ogawa et al., 2003) โดยเฉพาะอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้นของน้ำมันปลาทูน่า นอกจากมีความคงตัวต่อการแยกชั้นและรวมตัวกันของหยดน้ำมันที่สภาวะต่างๆ แล้ว ยังมีความคงตัวต่อการเกิดออกซิเดชันดีกว่าอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าผิวสัมผัสชั้นเดียวหรืออิมัลชันปฐมภูมิอีกด้วย (Klinkesorn et al., 2005) ระบบอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้นของน้ำมันปลาทูน่านี้ จึงน่าจะเป็นระบบลำเลียงน้ำมันปลาที่ดีสำหรับใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตาม การมีโคไลเจนอยู่รอบหยดน้ำมันอาจจะส่งผลต่อการย่อยและดูดซึมไขมันปลาในร่างกาย แม้ว่าจะสามารถชะลอหรือยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันปลาได้ แต่ถ้าไม่สามารถปลดปล่อยน้ำมันปลาหรือกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันปลา เพื่อการใช้ประโยชน์ของร่างกายได้แล้ว ก็ไม่สามารถเรียกได้ว่าเป็นระบบลำเลียงที่ดี ด้วยเหตุนี้การศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันปลาที่ถูกห่อหุ้มด้วยชั้นโคไลเจนจึงมีความสำคัญและเป็นเรื่องที่น่าสนใจ

น้ำมันที่ถูกห่อหุ้มด้วยโคไลเจน จะถูกปลดปล่อยออกมาได้ก็ต่อเมื่อชั้นโคไลเจนหลุดออกจากผิวหยดน้ำมัน หรือโคไลเจนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ งานวิจัยบางชิ้นรายงานว่าร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยสลายโคไลเจนได้ (Rodriguez and Albertengo, 2005) แต่ก็มีงานวิจัยหลายชิ้นที่รายงานความสามารถในการย่อยสลายโคไลเจนของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เซลลูเลส (cellulase) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เพคตินเนส (pectinase) โปรตีเนส (protease) และไลเปส (lipase) เป็นต้น (Pantaleone, Yalpani and Scollar, 1992; Shin, Lee and Lee, 2001) ตัวอย่างเช่น ผลการศึกษาการย่อยหรือไฮโดรไลส์โคไลเจนด้วยเอนไซม์ไลเปส (lipase) ที่เตรียมจากจุลินทรีย์พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถไฮโดรไลส์หรือย่อยโคไลเจนได้ โดยทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโคไลเจนจากเริ่มต้น 700 kDa ลดลงเหลือ 13 kDa และความหนืดลดลงเหลือเพียง 35% ของความหนืดเริ่มต้น (Muzzarelli et al., 1995) เช่นเดียวกับ การศึกษาการย่อยสลาย (degradation) โคไลเจนด้วยเอนไซม์ โดยการวัดความหนืดของสารละลายโคไลเจน พบว่าความหนืดของสารละลายโคไลเจนในบัฟเฟอร์ที่เติม 1% ของเอนไซม์ pancreatin (เอนไซม์ผสมของ lipase, amylase และ

protease) และ 0.14% ของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (porcin pancreatic lipase) ลดลงเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น นั่นคือเอนไซม์ pancreatin และ porcin pancreatic lipase สามารถทำให้โคโคแซนแตกสลายได้ (Zhang et al., 2002) และในปี 2004 Peniche และคณะ ศึกษาการย่อยสลายโคโคแซน และการปลดปล่อยน้ำมันตับปลาคอด ที่ห่อหุ้มอยู่ในแคปซูลของอัลจีเนตกับโคโคแซนโดยใช้เอนไซม์ไลเปสที่พีเอช 8 แล้วทำการวัดปริมาณกรดไขมัน และ glucosamine ที่ปลดปล่อยออกมา พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปส (427 U/L) ปริมาตร 1 ml เป็นเวลา 24 ชม. สามารถปลดปล่อยน้ำมันได้ 5% ของน้ำมันปลาทั้งหมด

ถึงแม้ว่างานวิจัยข้างต้นจะรายงานความสามารถในการย่อยสลายโคโคแซนของเอนไซม์ไลเปส แต่ก็ไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าที่มีชั้นโคโคแซนห่อหุ้มหดยดน้ำมันที่เตรียมแบบผิวสัมผัสสองชั้นนั้น จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้โดยไม่มีผลกระทบต่อกรดไขมันโอเมก้า-3 ที่ต้องการ ดังนั้นเพื่อเพิ่มความเข้าใจและเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สำคัญดังกล่าว ซึ่งถือว่าเป็นข้อมูลที่มีความจำเป็นและสำคัญยิ่งต่อการนำระบบอิมัลชันที่ใช้โคโคแซนเป็นสารให้ความคงตัวมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร จึงมีความสนใจและเห็นว่าจะมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาสมบัติของอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้นหลังผ่านสภาวะจำลองระบบย่อยอาหารของคน และความคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยรายงานว่า เอนไซม์ไลเปสจะทำงานได้ดีขึ้นในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salt) ร่วมด้วย (Lombardo, 2001) เกลือน้ำดี ซึ่งเป็นสารที่ตับสร้างขึ้นนี้จะทำให้ไขมันมีอนุภาคเล็กลง และสามารถทำปฏิกิริยากับไลเปสได้ง่ายขึ้น เนื่องจากความสามารถในการแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange) ที่ดีของโคโคแซน (Ebihara and Schneeman, 1989) จึงทำให้โคโคแซนสามารถเกิดอันตรกิริยากับเกลือน้ำดีได้ ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งอันตรกิริยาระหว่างเกลือน้ำดี และโคโคแซนนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิด้วย (Thongngam and McClements, 2005) สารประกอบที่เกิดจากอันตรกิริยาของโคโคแซนและเกลือน้ำดีดังกล่าว อาจจะส่งเสริมหรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในการย่อยโคโคแซน และปลดปล่อยน้ำมันปลาได้ จึงมีความสนใจศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ไลเปสร่วมกับเกลือน้ำดีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย หรือไฮโดรไลส์อิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้นด้วย

การเติมสารโพลีเมอร์ลงในอิมัลชันที่หดยดน้ำมันถูกห่อหุ้มด้วยเลซิทีน-โคโคแซนนั้น นอกจากส่งผลต่อโครงสร้างและสมบัติของอิมัลชันแล้ว (Ogawa et al., 2004) อาจจะมีผลต่อการย่อยและปลดปล่อยน้ำมันปลาในอิมัลชันด้วย ซึ่งกลไกที่อาจจะเป็นไปได้เช่น สารโพลีเมอร์ประจุลบที่เติมลงไปอาจจะมียอันตรกิริยากับโคโคแซน ทำให้โคโคแซนหลุดจากผิวสัมผัส เอนไซม์ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น และปลดปล่อยน้ำมันออกมาได้มากขึ้น เป็นต้น ดังนั้นเพื่อความเข้าใจและให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนจึงมีความสนใจศึกษาผลของสารโพลีเมอร์ เช่น เพคติน และมอลโตเด็คทรีน ต่อการย่อยและปลดปล่อยน้ำมันปลาทูน่าจากอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์อิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป และยังสามารถใช้ข้อมูลนี้เป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาอิมัลชันอื่นๆ ได้อีกด้วย

วิธีการทดลอง

วัสดุและสารเคมี

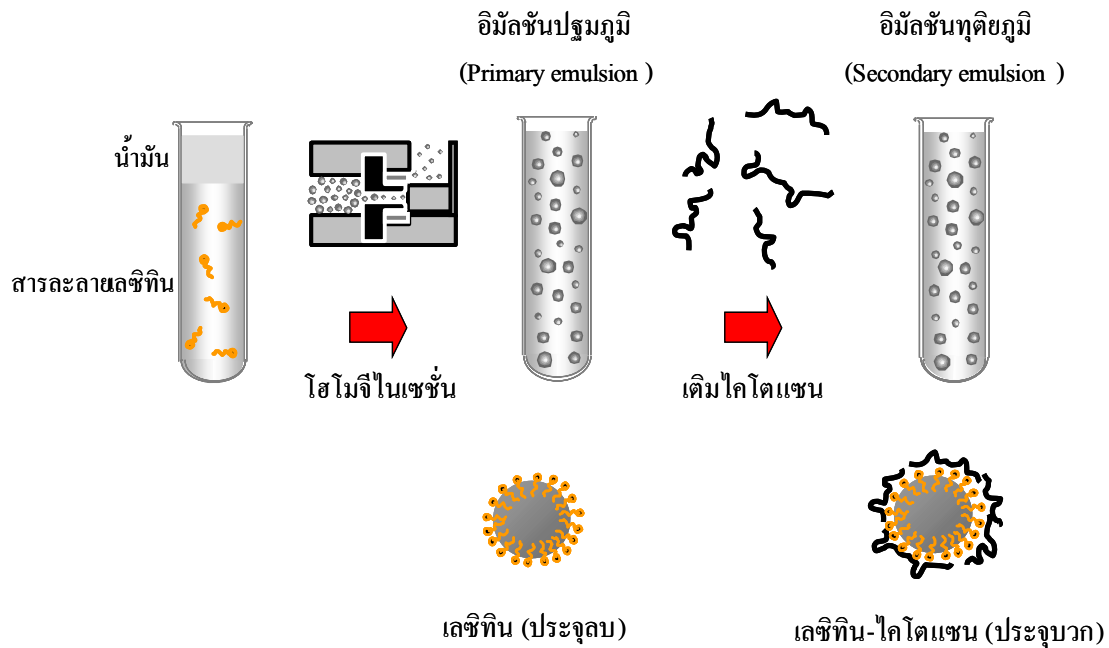
น้ำมันปลาทูน่าบริสุทธิ์ (fully refined tuna oil) ที่มีกรดอีพีเอร้อยละ 5.4 กรดดีเอชเอร้อยละ 26 ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากบริษัท ที.ซี. ยูเนียน โกลบอล จำกัด (มหาชน) (ประเทศไทย) สำหรับเลซิทีนชนิดเหลว (YELKIN@TS) ซื้อมาจากห้างหุ้นส่วนจำกัดแล็ปวัลเลย์ (ประเทศไทย) เพคติน เป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์จากบริษัท CPKelco A Huber Company (Lille Skensved, Denmark) และมอลโตเด็คทรีน จากบริษัท Siam Modified Starch Co., Ltd (ประเทศไทย) ส่วน โคโคโทแซนชนิดเกล็ดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ (120 250 และ 342.5 kDa) เอนไซม์ไลเปส (Porcine pancreas lipase type II) เกลื่อน้ำดี (Bile extract) โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นผลิตภัณฑ์จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO) สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์เป็นสารเคมี reagent grad หรือดีกว่านั้น และใช้น้ำกลั่นในการเตรียมสารละลายต่างๆ

การเตรียมสารละลาย

สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 100 mM พีเอช 3.0 เตรียมโดยการละลาย 2 mM โซเดียมอะซิเตตใน 98 mM สารละลายกรดอะซิติก แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 3.0 ส่วนสารละลายโคโคโทแซนที่ขนาดโมเลกุลต่างๆ เข้มข้น 1.5 wt% เตรียมโดยการละลายโคโคโทแซนชนิดเกล็ดในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 แล้วกวนทิ้งไว้ข้ามคืน เพื่อให้เกิดการละลายอย่างสมบูรณ์

การเตรียมอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้นน้ำมันปลาทูน่า

การเตรียมอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้น เตรียมได้โดยขั้นแรกทำการเตรียมอิมัลชันแบบผิวสัมผัสชั้นเดียวที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีน หรืออิมัลชันปฐมภูมิ (primary emulsion) ให้มีความเข้มข้นของน้ำมันปลาทูน่า 15 % และเลซิทีน 3 % โดยการผสมน้ำมันปลาทูน่ากับเลซิทีน กวนให้เลซิทีนละลายอย่างสมบูรณ์ในน้ำมัน แล้วเติมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ บันของผสมด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (Ultra-Turrax T25 basic, Ika-Werke GmbH & Co., Germany) ที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำของผสมไปผ่านเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ความดันสูง โดยใช้ความดันที่ 5000 psi (15 MR-8TA, APV-Gaulin Inc., Wilmington, MA, USA) ขั้นที่สอง นำอิมัลชันปฐมภูมิที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายโคโคโทแซนขนาดโมเลกุลต่างๆ ให้มีความเข้มข้น 0-0.3 % ทำการกวนอิมัลชันอย่างสม่ำเสมอเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอิมัลชันไปผ่านเครื่องย่อยสลายเซลล์ด้วยคลื่นเสียงพลังงานสูง (sonication) ที่ความถี่ 23 kHz นาน 20 นาที (Soniprep 150 MSE, Sanyo Gallenkamp PLC, UK) จะได้อิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้น หรืออิมัลชันทุติยภูมิ (secondary emulsion) ที่มีน้ำมันปลาทูน่า 5 % เลซิทีน 1 % และโคโคโทแซน 0-0.3 % (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเตรียมอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้น (Two-layered emulsion)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ogawa et al., 2003

แบบจำลองระบบย่อยอาหาร

แบบจำลองระบบย่อยอาหาร เป็นการเลียนแบบการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นจริงในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ ซึ่งดัดแปลงจากการศึกษาของ Beysseriat และคณะ (2006) โดยปรับพีเอชอิมัลชันปฐมภูมิ และทุติยภูมิที่เตรียมตามวิธีข้างต้น (พีเอช 3.0) ให้มีพีเอชเท่ากับ 7.0 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นปรับพีเอชต่ำลงมาให้เท่ากับ 2.0 แล้วบ่มอิมัลชันที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมเขย่านาน 1 ชม. ต่อจากนั้นปรับพีเอชของอิมัลชันให้สูงขึ้นเป็น 5.3 และเติมเอนไซม์ไลเปส (0.5-2.0 mg/ml) แล้วทำการบ่มพร้อมเขย่านาน 2 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากครบตามเวลาที่กำหนด ปรับพีเอชของอิมัลชันให้สูงขึ้นเท่ากับ 7.5 แล้วบ่มอิมัลชันต่อที่อุณหภูมิเดียวกัน เป็นเวลา 2 ชม. ซึ่งเป็นช่วงสิ้นสุดระบบจำลองการย่อยอาหาร

สำหรับการศึกษาผลของเกลื่อน้ำดี จะทำการเติมเกลื่อน้ำดีเข้มข้น 2.5-6.5 mM ร่วมกับเอนไซม์ไลเปส ในช่วงพีเอชเท่ากับ 5.3 ส่วนการศึกษาผลของไบโอโพลีเมอร์ จะทำการเติมโพลีเมอร์ (เพคติน และมอลโตเด็คทรีน) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1-0.5%) ลงในอิมัลชันทุติยภูมิก่อนผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร หลังสิ้นสุดกระบวนการย่อยแล้ว วิเคราะห์คุณลักษณะ และสมบัติของอิมัลชัน รวมทั้งตรวจวัดปริมาณกรดไขมันอิสระ และกลูโคซามีนในอิมัลชัน

การตรวจวัดขนาดอนุภาคหยดน้ำมัน

เจือจางตัวอย่างอิมัลชันด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 ให้มีความเข้มข้นน้ำมันประมาณ 0.05 % หลังจากนั้นดูดอิมัลชันใส่คิวเวต (cuvette) แล้วตรวจวัดขนาดอนุภาคเฉลี่ยของหยดน้ำมัน (Z-average diameter) ด้วยเครื่องวัดขนาดอนุภาคแบบ dynamic light scattering (Zetasizer Nano series-Zen 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)

การตรวจวัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน

เจือจางตัวอย่างอิมัลชันด้วยสารละลายอะซีเตตบัฟเฟอร์พีเอช 3.0 ให้มีความเข้มข้นน้ำมันประมาณ 0.05 % หลังจากนั้นดูดอิมัลชันใส่คิวเวต (cuvette) แล้วตรวจวัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ด้วยเครื่องวัดประจุบนผิวหยดน้ำมันแบบ dynamic light scattering (Zetasizer Nano series-Zen 3600, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)

การตรวจวัดความคงตัวต่อการเกิดชั้นครีม

ดูดอิมัลชันตัวอย่างปริมาตร 10 ml ใส่หลอดทดลอง แล้ววัดความสูงของอิมัลชันในหลอด (H_E) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตและวัดความสูงของชั้นครีมด้านบนหลอดทดลอง (H_C) รายงานความคงตัวต่อการแยกชั้นของอิมัลชันเป็นร้อยละของชั้นครีม (cream fraction) โดยคำนวณดังนี้

$$\text{Cream Fraction} = 100 \times (H_C/H_E)$$

การตรวจวัดปริมาณกรดไขมันอิสระ

ปริมาณกรดไขมันอิสระในอิมัลชันตรวจวัดด้วยวิธีการไตเตรต (Mun et al., 2006) โดยหยดสารละลายฟีนอลทาลีน (0.1%) ลงในพลาสติกที่มีอิมัลชันตัวอย่างปริมาตร 5 ml แล้วไตเตรตด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 0.01 N คำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระได้จากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณของสารละลาย NaOH และกรดสเตียริกอิสระเข้มข้น 0-1000 μmol

การตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีน

วิธีการตรวจวัดปริมาณกลูโคซามีนสำหรับการทดลองนี้ ดัดแปลงจากวิธีการของ Elson และ Morgan (1933) โดยดูดอิมัลชันตัวอย่างหลังจากผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารใส่หลอดพลาสติกขนาดเล็ก ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นดูดของเหลวส่วนใสใส่หลอดแก้วทดลอง และเติม 2 ml สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N ลงในหลอดทดลอง นำไปต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนนาน 4 ชม. แล้วทำให้เป็นกลางด้วย NaOH (3 N) จนมีพีเอชประมาณ 7.5 เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 10 ml แล้วดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 ml ใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ เติม 1 ml ของสารละลาย 2% อะซีดีลอะซิโตน ใน 0.5 N Na_2CO_3 แล้วผสมให้เข้ากัน ต้มสารละลายให้เดือดในอ่างน้ำร้อน เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทสารละลายทั้งหมดลงในพลาสติกขนาด 10 ml เติม 3 ml ของเอทานอล และ 1 ml ของสารละลาย Ehrlich's reagent พร้อมกวนผสม ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 ml ด้วยเอทานอล ตั้งตัวอย่างไว้นาน 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณความเข้มข้นของกลูโคซามีนได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลาย glucosamine chlorohydrate

การวิเคราะห์โครงสร้างของอิมัลชัน

โครงสร้างของอิมัลชันวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงส่องผ่าน (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์แบบสแกนด้วยแสงเลเซอร์ (confocal laser scanning microscope; CLSM)

สำหรับกล้องจุลทรรศน์แบบแสงส่องผ่าน (Axiolab[®], Carl Zeiss Pte Ltd., Germany) ทำการเขย่าอิมัลชันในหลอดตัวอย่างก่อนหยดลงบนสไลด์ แล้วปิดทับด้วยแผ่นกระจก สังเกตลักษณะโครงสร้างของอิมัลชันที่กำลังขยาย 40× ส่วนการวิเคราะห์โครงสร้างอิมัลชันด้วยเครื่อง CLSM (Axio Imager MI, Carl Zeiss Pte Ltd., Germany) ทำได้โดยดูอิมัลชันตัวอย่างปริมาตร 2 มล. ใส่หลอดทดลองแล้วเติมสารละลายสีย้อม Nile blue (ย้อมน้ำมัน) และ Rhodamin B (ย้อมโคโคไธแซน) เข้มข้นร้อยละ 0.01% ในเอทานอล ทำการผสมให้สีย้อมละลาย หยดตัวอย่างอิมัลชันที่ผสมสีย้อมลงบนกระจกสไลด์ สังเกตโครงสร้างของอิมัลชันที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร และใช้กำลังขยาย 100×

การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองโดยใช้ ANOVA (Analysis of Variance) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS (Version 10)

ผลการทดลองและวิจารณ์

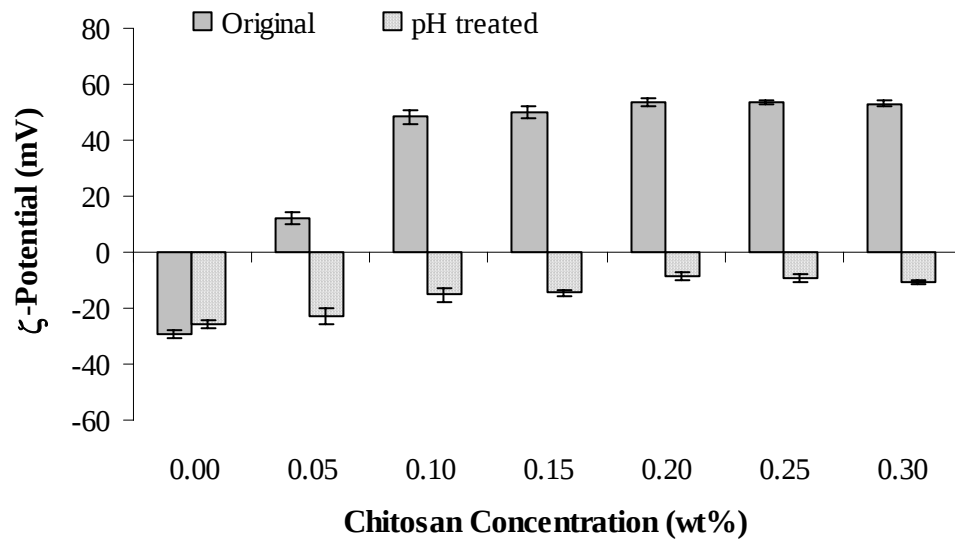
ผลของความเข้มข้นและขนาดโมเลกุลโคโคไธแซนต่อคุณลักษณะของอิมัลชัน

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้น (0.0-0.3%) และขนาดโมเลกุล (120 250 และ 342.5 kDa) ของโคโคไธแซน ต่อคุณลักษณะอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าในน้ำที่ใช้เลซิทีนเป็นอิมัลซิฟายเออร์ ก่อนและหลังผ่านการปรับเปลี่ยนพีเอชที่จำลองตามระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ซม.; พีเอช ~ 2.0, 1 ซม.; พีเอช ~ 5.3, 2 ซม. และพีเอช ~ 7.5, 1 ซม.: 37°C) โดยการวัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ขนาดอนุภาคหยดน้ำมัน ความคงตัวต่อการเกิดชั้นครีม ปริมาณกรดไขมันอิสระ และกลูโคซามีนในอิมัลชัน

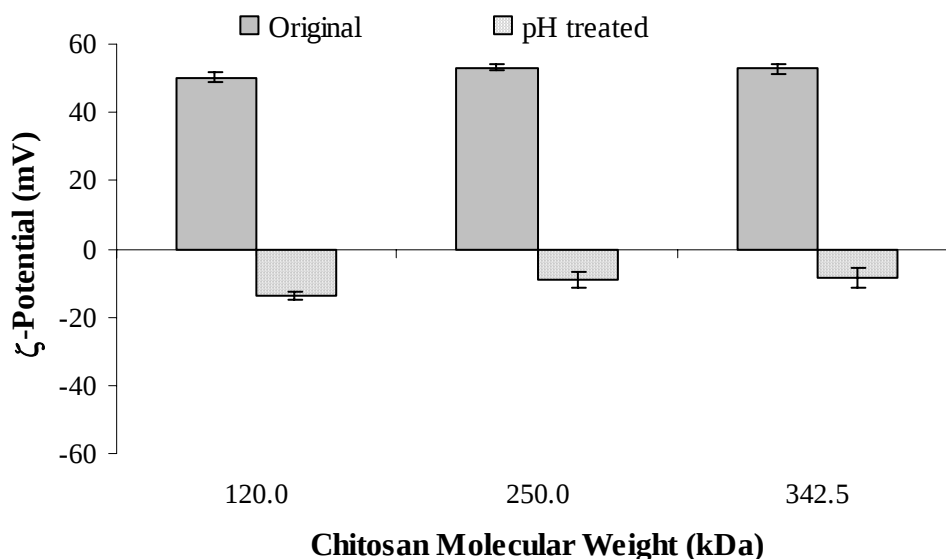
ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันที่ใช้เลซิทีนเป็นอิมัลซิฟายเออร์เปลี่ยนจากค่าลบ (≈ -29 mV) เป็นบวกเมื่อเติมโคโคไธแซน (250 kDa) ที่ทุกความเข้มข้นลงในอิมัลชัน (ภาพที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากโคโคไธแซนซึ่งมีประจุบวก (พีเอช 3.0) ถูกดูดซับที่ผิวสัมผัสของหยดน้ำมันในอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีนซึ่งมีประจุลบด้วยแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic attraction) โดยค่าประจุเป็นบวกมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโคโคไธแซนเพิ่มขึ้นจนมีค่าคงที่ที่โคโคไธแซนเข้มข้น 0.2% ($\approx +53$ mV) และค่าประจุของหยดน้ำมันจะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นโคโคไธแซนมากกว่า 0.2% โดยผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (Faldt et al., 1993; Ogawa et al., 2003) ส่วนขนาดโมเลกุลของโคโคไธแซนไม่มีผลต่อค่าประจุบนผิวของหยดน้ำมันในอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีนตามสภาวะการทดลองนี้ (ภาพที่ 3)

หลังจากผ่านการปรับเปลี่ยนพีเอชตามระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ซม. $\rightarrow$ พีเอช ~ 2.0, 1 ซม. $\rightarrow$ พีเอช ~ 5.3, 2 ซม. $\rightarrow$ พีเอช ~ 7.5, 1 ซม. ที่ 37 °C) ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีนไม่แตกต่างกับอิมัลชันเริ่มต้น ($p < 0.05$) ตรงกันข้ามกับอิมัลชันที่เติมโคโคไธแซนที่ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันเปลี่ยนเป็นลบที่ทุกความเข้มข้น และขนาดโมเลกุลของ

ไคโตแซนหลังผ่านการปรับเปลี่ยนพีเอช (ภาพที่ 2 และ 3) ทั้งนี้เนื่องจากค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันเริ่มต้นทำการตรวจวัดที่พีเอช 3.0 ซึ่งไคโตแซนมีประจุบวก ส่วนอิมัลชันหลังผ่านการปรับพีเอชนั้นตรวจวัดที่พีเอช 7.5 ซึ่งไคโตแซนไม่ได้มีประจุเป็นบวก แต่อย่างไรก็ตาม ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันที่ห่อหุ้มด้วยเลซิทีน-ไคโตแซน มีค่าเป็นลบน้อยกว่าค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันที่ห่อหุ้มด้วยเลซิทีนเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงว่าไคโตแซนบางส่วนยังถูกดูดซับอยู่ที่ผิวของหยดน้ำมัน

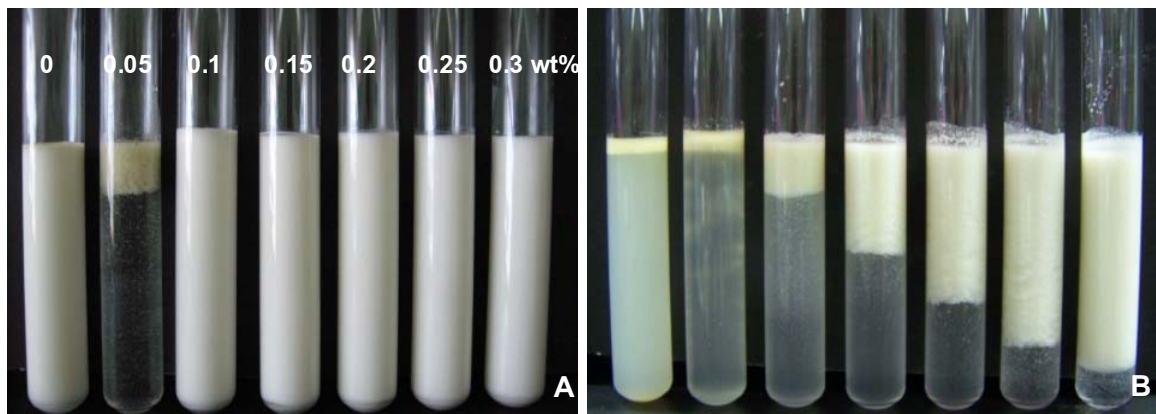


ภาพที่ 2 ผลของความเข้มข้นไคโตแซนต่อค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ในอิมัลชันน้ำมันปลาที่ช่วยให้คงตัวด้วยเลซิทีน ก่อนและหลังการปรับเปลี่ยนพีเอช (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C)



ภาพที่ 3 ผลขนาดโมเลกุลไคโตแซนต่อค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ในอิมัลชันน้ำมันปลาที่ช่วยให้คงตัวด้วยเลซิทีน ก่อนและหลังการปรับเปลี่ยนพีเอช (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C)

การศึกษาผลของความเข้มข้นโคโตแซนต่อขนาดหยดน้ำมันในอิมัลชันน้ำมันปลาที่ช่วยให้คงตัวด้วยเลซิทีน อิมัลชันน้ำมันปลาที่หยดน้ำมันถูกห่อหุ้มด้วยเลซิทีน-โคโตแซน มีความคงตัวต่อการรวมกันของหยดน้ำมัน ยกเว้นที่โคโตแซนเข้มข้น 0.05% อิมัลชันจะไม่คงตัวเกิดการแยกชั้นครีม (ภาพที่ 4) และเกิด aggregation ของหยดน้ำมัน ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 5 และ 6b) เนื่องจากที่ความเข้มข้นของโคโตแซนดังกล่าวประจุบวกของโคโตแซนจะพอดีกับประจุลบบนผิวของหยดน้ำมัน ทำให้ประจุบนผิวหยดน้ำมันถูกทำให้เป็นกลาง (Ogawa et al., 2003) มีค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันประมาณ +10 mV (ภาพที่ 2) ซึ่งมีแรงผลักระหว่างหยดน้ำมันไม่เพียงพอต่อการป้องกันการเคลื่อนที่มารวมตัวกันแล้วเกิดการแยกชั้นครีม หรือ flocculation ได้ โดยค่าประจุที่ผิวหยดน้ำมันต้องมีค่ามากกว่า ± 30 mV จึงจะทำให้อิมัลชันที่ได้มีความคงตัว ส่วนขนาดโมเลกุลของโคโตแซนที่ต่างกัน ไม่มีผลต่อขนาดอนุภาคหยดน้ำมันในอิมัลชันเริ่มต้น ($p < 0.05$) โดยอิมัลชันมีขนาดหยดน้ำมันประมาณ 0.6-0.7 ไมโครเมตร ที่ทุกขนาดโมเลกุลของโคโตแซน

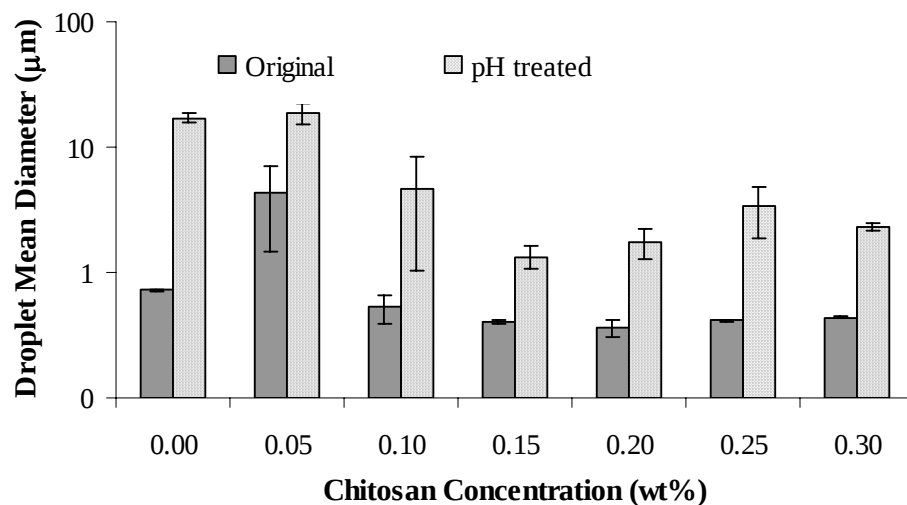


ภาพที่ 4 ผลของความเข้มข้นโคโตแซนต่อการเกิดชั้นครีมของอิมัลชันน้ำมันปลาที่ช่วยให้คงตัวด้วยเลซิทีน ก่อน (A) และหลัง (B) การปรับเปลี่ยนพีเอช

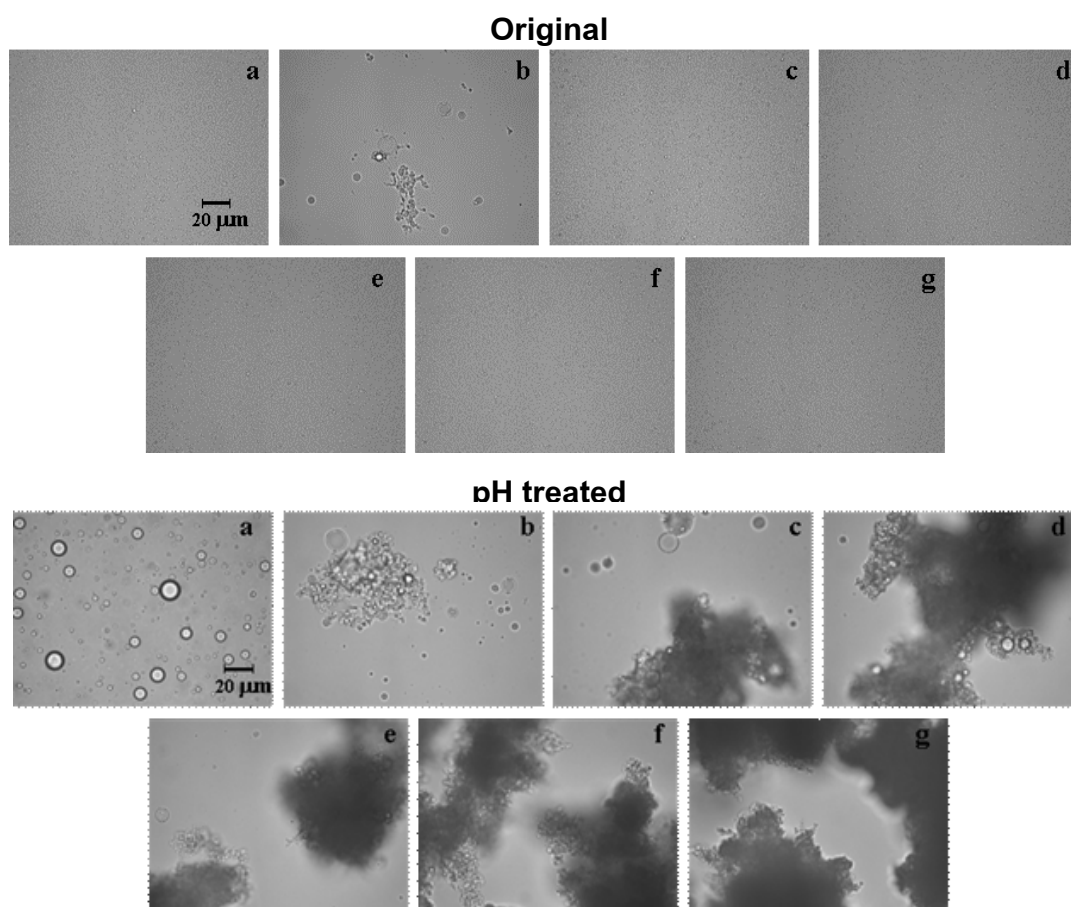
หลังผ่านการปรับเปลี่ยนพีเอช พบว่าอิมัลชันไม่มีความคงตัวเกิดการแยกชั้น (ภาพที่ 4) หยดน้ำมันมีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 5) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับลักษณะโครงสร้างของอิมัลชันที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 6) การเปลี่ยนแปลงพีเอชทำให้อิมัลชันปลาที่ช่วยให้คงตัวด้วยเลซิทีนไม่มีความคงตัวต่อการแยกชั้น และการรวมตัวของหยดน้ำมันโดยหยดน้ำมันมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับอิมัลชันเริ่มต้น (ภาพที่ 6a) การเติมโคโตแซนลงในอิมัลชันน้ำมันปลาก็ให้ผลเช่นเดียวกับอิมัลชันเริ่มต้นคือไม่มีความคงตัวต่อการแยกชั้น เกิด aggregation ของโคโตแซน และเกิดการรวมตัวของหยดน้ำมันที่ทุกความเข้มข้น

ความไม่คงตัวต่อการรวมกันของหยดน้ำมันหลังการปรับเปลี่ยนพีเอชของอิมัลชันเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ อิมัลชันปฐมภูมิที่ไม่คงตัวอาจจะเนื่องจากเลซิทีนที่ผิวสัมผัสถูกแทนที่ด้วยสารประกอบที่เกิดจากการย่อยไขมัน เช่น กรดไขมันอิสระ โมโน- หรือไดกลีเซอไรด์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการทำให้อิมัลชันคงตัวต่ำ นอกจากนั้น การเพิ่มขึ้นของความแรงไอออน (ionic strength) จากการเติมกรดและด่างลงในอิมัลชันเพื่อปรับพีเอช อาจลดแรงผลักระหว่างอนุภาค

หยดน้ำมันทำให้หยดน้ำมันมีโอกาสรวมตัวกันมากขึ้น ส่วนความไม่คงตัวของอิมัลชันทุติยภูมิ เนื่องจากที่พีเอชเป็นกลางนั้นโคโตะแซนละลายได้น้อยลง และอาจจะตกตะกอนแยกออกมา



ภาพที่ 5 ผลของความเข้มข้นโคโตะแซนต่อขนาดอนุภาคหยดน้ำมันในอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีน ก่อนและหลังการปรับเปลี่ยนพีเอช (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C)

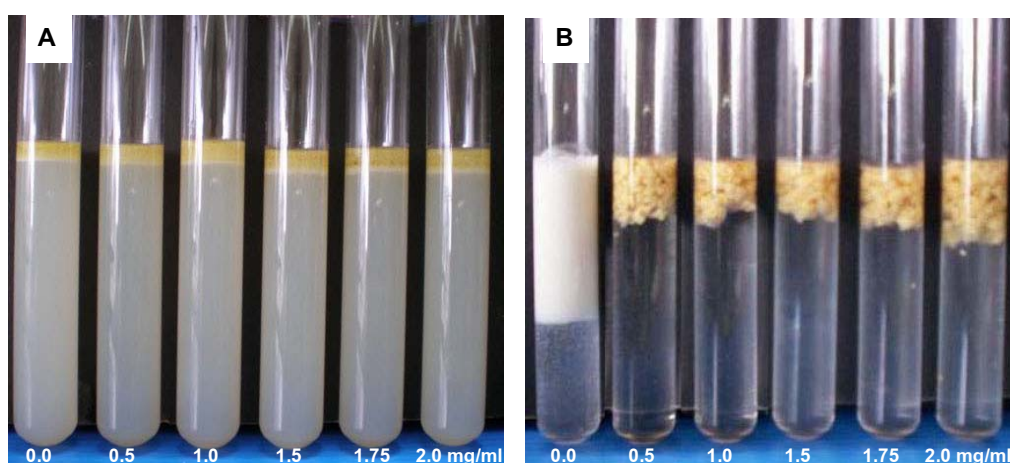


ภาพที่ 6 ผลของความเข้มข้นโคโตะแซน (a=0, b=0.05, c=0.1, d=0.15, e=0.2, f=0.25, g=0.3 %) ต่อโครงสร้างอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีน ก่อนและหลังการปรับพีเอช

ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ไลเปส

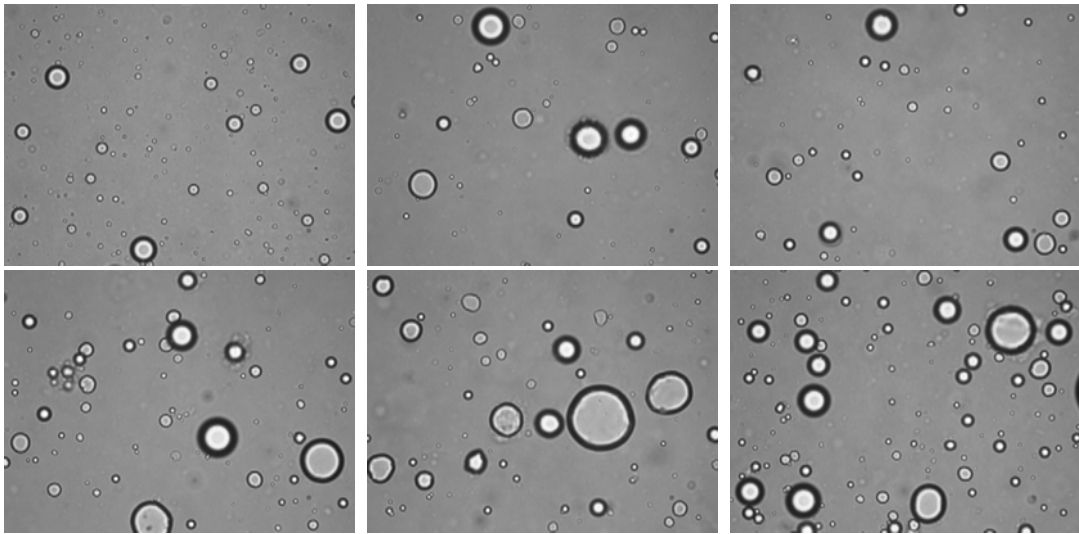
การศึกษาผลของเอนไซม์ไลเปสต่อความคงตัวและการปลดปล่อยกรดไขมันจากอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้น ซึ่งเตรียมอิมัลชันโดยใช้โคโคธแซน (โมเลกุลขนาด 250 kDa) ที่ความเข้มข้น 0.2% แล้วนำอิมัลชันไปผ่านการปรับเปลี่ยนพีเอชที่จำลองตามระบบย่อยอาหารในสถานะที่มีเอนไซม์ไลเปส โดยเติมเอนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้น 0.5-2.0 mg/ml ในช่วงพีเอช 5.3 ของแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37 °C) วัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ขนาดอนุภาคหยดน้ำมัน (droplet size) ความคงตัวต่อการเกิดชั้นครีม (creaming) รวมถึงการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ และกลูโคซามีนในอิมัลชัน

อิมัลชันที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารที่มีเอนไซม์ไลเปสจะไม่มี ความคงตัว เกิด aggregation ของโคโคธแซน และการรวมตัวกันของหยดน้ำมัน ทำให้เกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจนระหว่างส่วนครีม และของเหลว (ภาพที่ 7) สำหรับอิมัลชันปฐมภูมิ จะเกิดชั้นน้ำมันแยกอยู่ด้านบนของอิมัลชัน (oiling off) ส่วนในอิมัลชันทุติยภูมิชั้นครีมที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกับอิมัลชันที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารโดยไม่มีเอนไซม์ไลเปส คือในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์ ชั้นครีมจะหนาและเป็นสีขาวขุ่น (ภาพที่ 4) แต่ในสถานะที่มีเอนไซม์ ชั้นครีมจะบางกว่าและมีลักษณะครีมที่จับกันเป็นก้อนสีน้ำตาล (ภาพที่ 7) เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของอิมัลชันด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า ขนาดหยดน้ำมันในอิมัลชันปฐมภูมิมิมีขนาดใหญ่ขึ้นมาก เนื่องจากเกิดการรวมตัวกันของหยดน้ำมัน ส่วนอิมัลชันทุติยภูมิที่ผ่านแบบจำลองโดยไม่เติมเอนไซม์ไลเปส จะสังเกตลักษณะการเกิด aggregation ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่เมื่อเติมเอนไซม์ไลเปส โคโคธแซนและหยดน้ำมันเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จึงมีเฉพาะส่วนของเหลวเท่านั้นที่นำมาวิเคราะห์ ซึ่งพบว่าส่วนของเหลวนี้มีหยดน้ำมันอยู่ค่อนข้างน้อย แสดงว่าหยดน้ำมันรวมอยู่ในชั้นครีมด้านบน (ภาพที่ 8) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ไม่สามารถวัดขนาดหยดน้ำมันที่แน่นอนได้

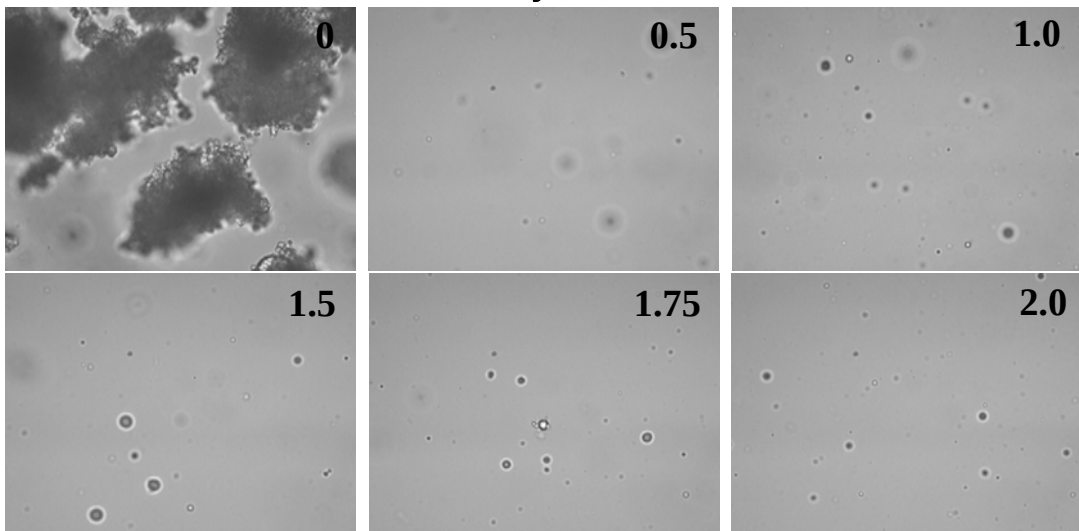


ภาพที่ 7 อิมัลชันปฐมภูมิ (A) และทุติยภูมิ (B) ของน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสถานะที่มีเอนไซม์ไลเปส 0.5-2.0 mg/ml

Primary emulsion



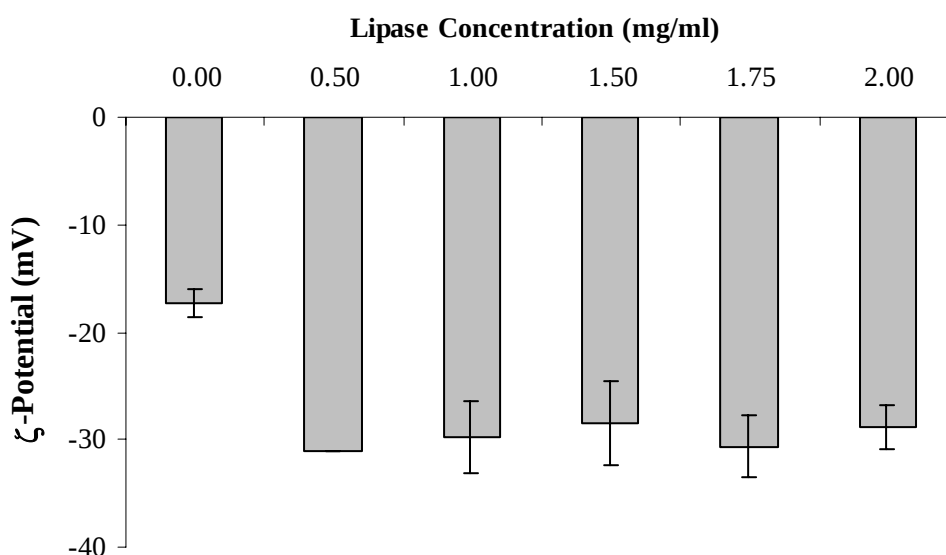
Secondary emulsion



ภาพที่ 8 ลักษณะโครงสร้างอิมัลชันปลูมภูมิ และทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสถานะที่มีเอนไซม์ไลเปส 0.5-2.0 mg/ml

ทั้งนี้ความไม่คงตัวของอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารในสถานะที่มีเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นเนื่องจากหลายสาเหตุ สำหรับอิมัลชันปลูมภูมินั้น โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ แล้วรวมตัวกัน (coalescence) จากหยดน้ำมันขนาดเล็กกลายเป็นหยดน้ำมันขนาดใหญ่ ดังภาพที่ 8 นอกจากนี้ การไฮโดรไลส์โมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ ได- และโมโนกลีเซอไรด์ ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ประสิทธิภาพไม่ดี ไปแทนที่เลซิทีนที่ผิวสัมผัสจึงทำให้อิมัลชันไม่คงตัว รวมทั้งการเพิ่มความแรงไอออนจากการปรับพีเอชระหว่างผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร ทำให้แรงผลักระหว่างหยดน้ำมันในอิมัลชันลดลง หยดน้ำมันจึงเข้า

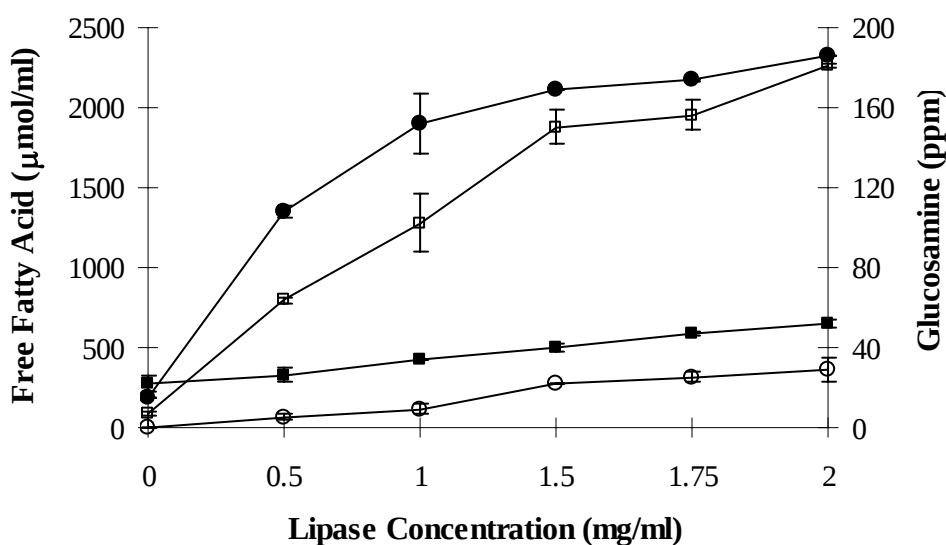
มาใกล้กันและรวมตัวกันเป็นหยดน้ำมันขนาดใหญ่ขึ้นในที่สุด ส่วนความไม่คงตัวของอิมัลชันทุติยภูมิ โดยเฉพาะการเกิดก้อนครีมนั้น อาจเกิดขึ้นเนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างโคโคแซนที่มีประจุบวก กับประจุลบบนโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปส (Damodara, 1996; Hedin et al., 2005) ความสามารถในการทำให้อิมัลชันคงตัวจึงลดลง หยดน้ำมันจึงเคลื่อนที่มารวมตัวกันและมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งอิมัลชันทุติยภูมิ (เลซิทิน-โคโคแซน) หลังจากผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารในสภาวะที่มีไลเปส ความเข้มข้นต่าง ๆ (0.5-2.0 mg/ml) มีค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันเป็นลบที่ทุกความเข้มข้นของเอนไซม์ เนื่องจากโคโคแซนสูญเสียสมบัติการเป็นโพลีเมอร์ประจุบวกเมื่อเข้าสู่สภาวะเป็นกลางที่พีเอช 7.5 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า pKa ของโคโคแซน (pKa ~ 6.5) และค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันที่ผ่านระบบย่อยอาหารในสภาวะที่มีไลเปสมีค่าเป็นลบมากกว่าสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ ซึ่งเป็นการสนับสนุนผลที่ว่าโคโคแซนเกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ไลเปส (ภาพที่ 9)



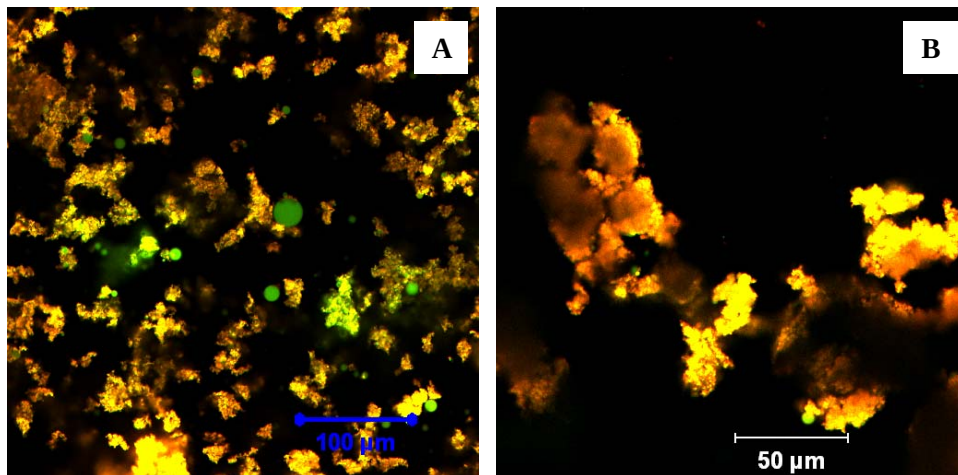
ภาพที่ 9 ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันปฐมภูมิและทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 0.5-2.0 mg/ml

ปริมาณกรดไขมันอิสระในอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่า มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเติมเอนไซม์ โดยค่าจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 10) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระแสดงว่าโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมันปลาทูน่าที่ห่อหุ้มด้วยโคโคแซน ถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ไลเปส ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานการไฮโดรไลส์น้ำมันตับปลาค็อดที่ห่อหุ้มด้วยโคโคแซนโดยเอนไซม์ไลเปส (Peniche et al., 2004) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดไขมันอิสระที่ปลดปล่อยจากอิมัลชันทุติยภูมิ ยังมีค่าน้อยกว่าจากอิมัลชันปฐมภูมิ ทั้งนี้เนื่องจากชั้นโคโคแซนรอบหยดน้ำมันหรือการเกิดกลุ่มก้อนของโคโคแซนขัดขวางไม่ให้เอนไซม์สัมผัสกับหยดน้ำมัน หรือโคโคแซนมีอันตรกิริยากับไลเปสตรงตำแหน่ง active site ทำให้เอนไซม์มี

ประสิทธิภาพลดลง (Damodaran, 1996; Hedin et al., 2005) หรือกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นอาจไปจับกับ ไคโตแซนทำให้วิเคราะห์ได้น้อยลง ซึ่งผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันอิสระ จะสอดคล้องกับปริมาณกลูโคซามีนในอิมัลชัน (ภาพที่ 10) โดยปริมาณกลูโคซามีนในอิมัลชันจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองแสดงว่าน้ำมันปลาที่เตรียมอยู่ในรูปอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้น (เลซิทีน-ไคโตแซน) ถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ไลเปส และปลดปล่อยออกมาได้หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร นั่นคือระบบอิมัลชันแบบผิวสัมผัสสองชั้นสามารถใช้เป็นระบบลำเลียงกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้ โดยสามารถปลดปล่อยกรดไขมันดังกล่าวได้บางส่วนสำหรับแบบจำลองระบบย่อยอาหารในการทดลองนี้ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์โครงสร้างของอิมัลชันหลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารทั้งในสถานะที่มีและไม่มีเอนไซม์ไลเปสด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแกนด้วยแสงเลเซอร์ (ภาพที่ 11) อิมัลชันที่ผ่านแบบจำลองในสถานะที่ไม่มีเอนไซม์ไลเปส (ภาพที่ 11A) อิมัลชันไม่มีความคงตัว ไคโตแซนเกิด aggregation (สีส้ม) และหยดน้ำมันจะแยกออกมาเป็นอิสระ (สีเขียว) เมื่อเติมเอนไซม์ไลเปส (ภาพที่ 11B) จะเห็นว่าไคโตแซนเกิด aggregation มากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องจากเกิดอันตรกิริยากับเอนไซม์ไลเปส และไม่พบหยดน้ำมันอิสระเหลืออยู่ จึงสันนิษฐานได้ว่าหยดน้ำมันถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ไลเปส ดังอธิบายข้างต้น



ภาพที่ 10 ปริมาณกรดไขมันอิสระ (ทึบ) และกลูโคซามีน (โปร่ง) ในอิมัลชันปฐมภูมิ (วงกลม) และทุติยภูมิ (สี่เหลี่ยม) ของน้ำมันปลาที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสถานะที่มีเอนไซม์ไลเปส 0.5-2.0 mg/ml



ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml

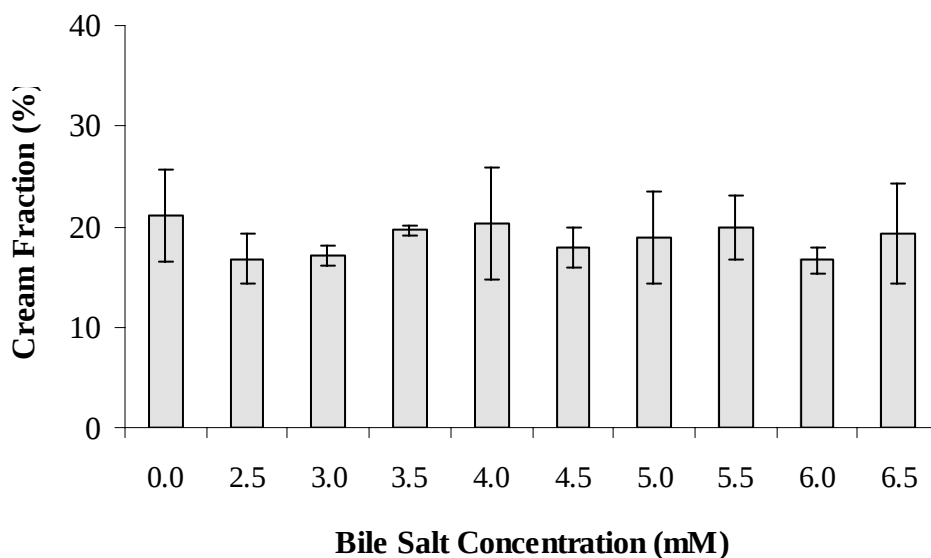
ผลของเกลือน้ำดี

การทดลองนี้ เป็นการศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ไลเปสร่วมกับเกลือน้ำดี (2.5-6.5 mM) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการไฮโดรไลส์อิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้น ซึ่งเตรียมอิมัลชันโดยใช้โคโคแซน (โมเลกุลขนาด 250 kDa) เข้มข้น 0.2% แล้วนำอิมัลชันไปผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปสความเข้มข้น 2.0 mg/ml (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลือน้ำดี, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37 °C) แล้ววัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ปริมาณกรดไขมันอิสระ และกลูโคซามีนในอิมัลชัน

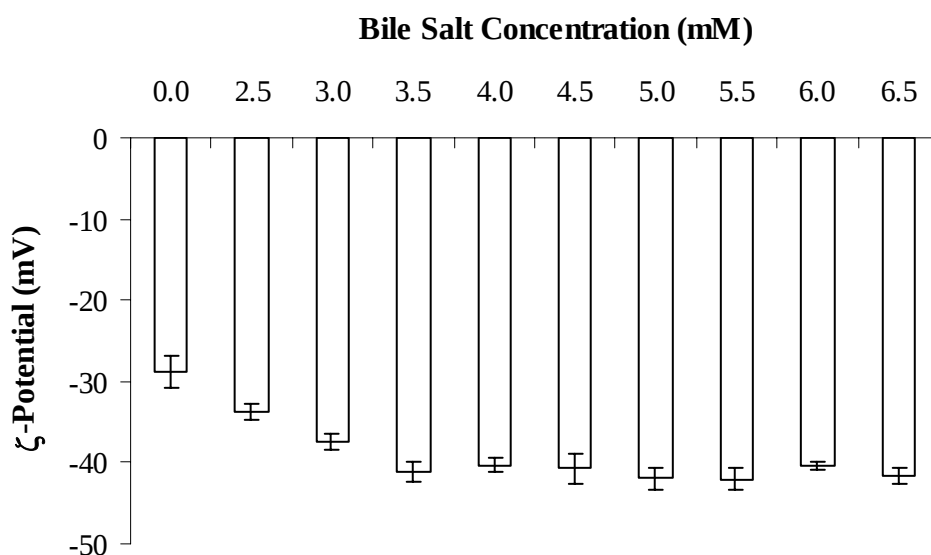
ลักษณะของอิมัลชันหลังผ่านแบบจำลองอิมัลชันที่เติมเกลือน้ำดีไม่แตกต่างกับอิมัลชันที่ผ่านแบบจำลองในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปสเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 7B) ซึ่งจะเกิดชั้นครีมที่จับกันเป็นก้อนสีน้ำตาลอยู่ด้านบน แยกจากชั้นของเหลวด้านล่างของหลอดทดลอง โดยชั้นครีมมีความหนาประมาณ 17-21% ของความหนาอิมัลชันทั้งหมด ซึ่งความหนาของชั้นครีมในอิมัลชันหลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทุกความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (ภาพที่ 12)

ประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเพิ่มขึ้น จนกระทั่งมีค่าค่อนข้างคงที่ (≈ -42 mV) ที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดีเท่ากับ 3.5 mM (ภาพที่ 13) การเพิ่มขึ้นของประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันหลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารในสภาวะที่มีไล

เฟส และเกลื่อน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ นั้น แสดงว่าเกลื่อน้ำดีถูกดูดซับบนผิวหยดน้ำมันที่ห่อหุ้มด้วยเลซิทีน-โคโคแซน (Ebihara and Schneeman, 1989; Thongngam and McClements, 2005)

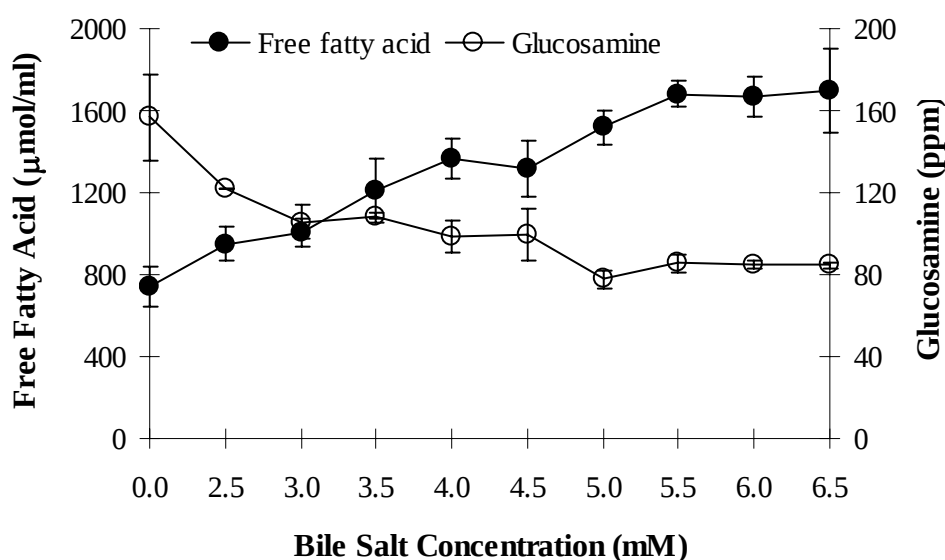


ภาพที่ 12 ความหนาชั้นครีมของอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลื่อน้ำดี, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลื่อน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 13 ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูน่า หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลื่อน้ำดี, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลื่อน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยในอิมัลชันมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีเพิ่มขึ้น (2.5-6.5 mM) แสดงว่าการเติมเกลือน้ำดีสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์น้ำมันในอิมัลชันของเอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งจากรายงานผลการวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่า เกลือน้ำดีจะดึงกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นออกจากผิวสัมผัส ด้วยการละลายกรดไขมันในโครงสร้างไมเซล สำหรับปริมาณกลูโคซามีนในอิมัลชันน้ำมันปลาที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร พบว่ากลูโคซามีนมีค่าลดลงเมื่อเกลือน้ำดีมีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 14) ซึ่งตรงกันข้ามกับผลปริมาณกรดไขมันอิสระ ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเกลือน้ำดีเกิดอันตรกิริยากับโคโคแซนทำให้ไลเปสไฮโดรไลส์โคโคแซนได้ยาก ปริมาณกลูโคซามีนที่เกิดขึ้นจึงมีค่าลดลง

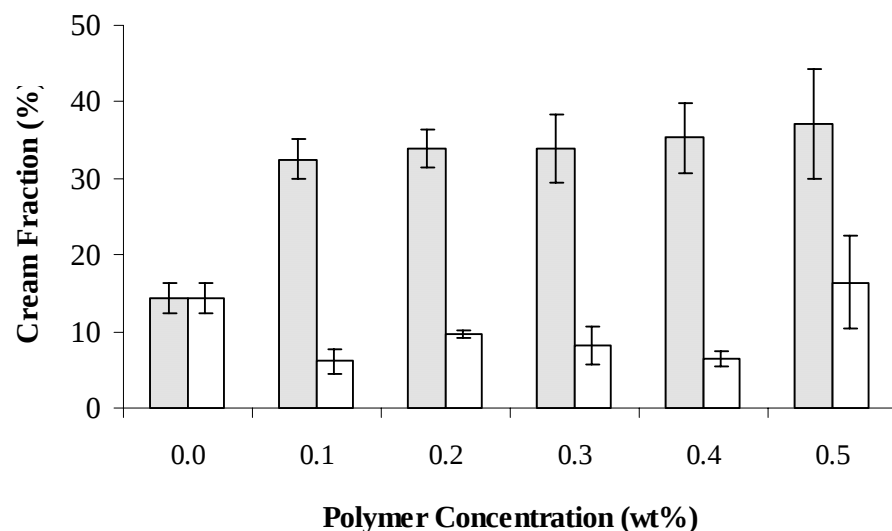


ภาพที่ 14 ปริมาณกรดไขมันอิสระและกลูโคซามีนในอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลือน้ำดีความเข้มข้นต่างๆ

ผลของไบโอโพลีเมอร์

สารประกอบไบโอโพลีเมอร์มักจะถูกเติมลงในอิมัลชันเพื่อทำหน้าที่เป็นสารให้ความคงตัว โดยสารโพลีเมอร์ที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรต ด้วยเหตุนี้จึงศึกษาผลของสารไบโอโพลีเมอร์ (เพคตินและมอลโตเด็คตริน) ต่อสมบัติและการถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ไลเปสของอิมัลชันน้ำมันปลาที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลือน้ำดี 5.5 mM (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลือน้ำดี, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37 °C) แล้ววัดค่าประจุบนผิวหยดน้ำมัน (ζ -potential) ปริมาณกรดไขมันอิสระ และกลูโคซามีนในอิมัลชัน

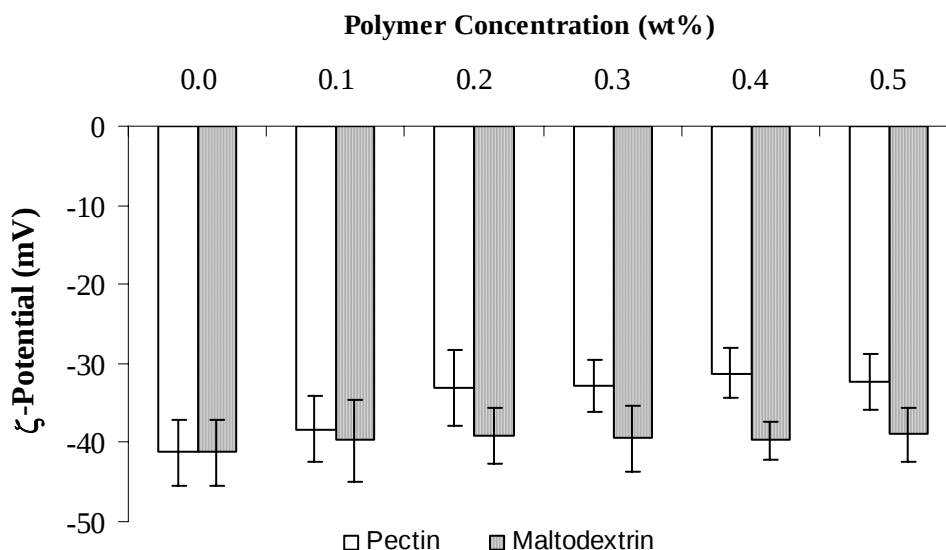
การเติมสารโพลีเมอร์ลงในอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่ามีผลต่อความหนาชั้นครีมของอิมัลชันหลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (ภาพที่ 15) โดยการเติมมอลโตเด็คทรีนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5% จะทำให้ความหนาชั้นครีมลดลง ส่วนการเติมเพคตินที่ทุกความเข้มข้น ทำให้อิมัลชันเกิดชั้นครีมหนาขึ้น การเติมมอลโตเด็คทรีนลงในอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่า ไม่ส่งผลต่อค่าประจุบนผิวของหยดน้ำมัน (ภาพที่ 16) ในอิมัลชันหลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่มีรายงานมาก่อน (Klinkesorn et al., 2005b) เนื่องจากมอลโตเด็คทรีนเป็นโพลีเมอร์ที่ไม่มีประจุ จึงไม่เกิดอันตรกิริยากับสารประกอบอื่นที่บริเวณผิวสัมผัสของหยดน้ำมันในอิมัลชัน ตรงกันข้ามกับการเติมเพคตินที่มีผลทำให้ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพคติน (ภาพที่ 16) อาจจะเป็นเนื่องจากอันตรกิริยาระหว่างเพคตินกับกรดไกลโคดีออกซีโคลิค (glycodeoxycholic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเกลื่อน้ำดีที่ใช้สำหรับการทดลองนี้ (Dongowski, 1997; Hoagland and Pfeffer, 1987) อย่างไรก็ตาม ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันที่เติมเพคติน จะมีค่าเป็นลบสูงกว่าอิมัลชันเริ่มต้น (เลซิทีน-โคโคเตแซน) ที่ผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหารในสถานะที่ไม่มีเกลื่อน้ำดี (ภาพที่ 12) ซึ่งแสดงว่าเพคตินบางส่วนยังถูกดูดซับที่ผิวสัมผัสของหยดน้ำมันที่ห่อหุ้มด้วยเลซิทีน-โคโคเตแซน (Ogawa et al., 2004)



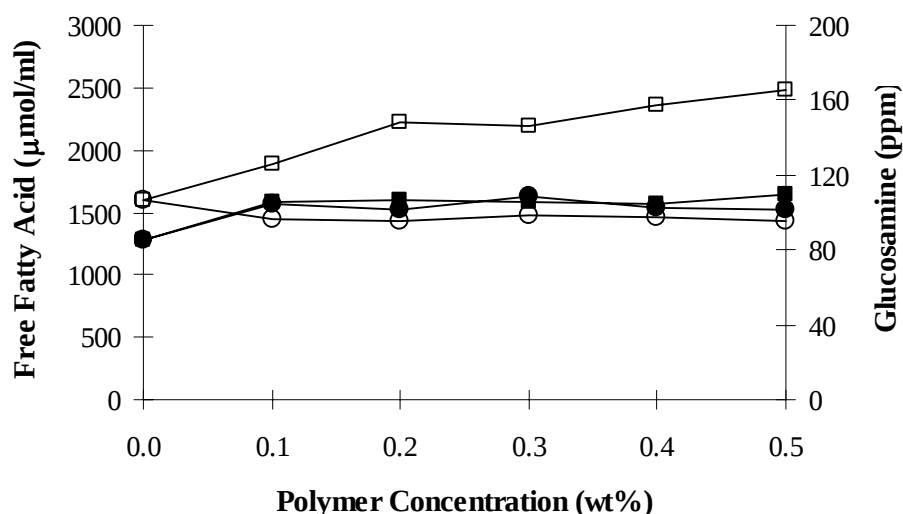
ภาพที่ 15 ความหนาชั้นครีมของอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูน่าที่เติมโพลีเมอร์ความเข้มข้นต่างๆ หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ซม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ซม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลื่อน้ำดี, 2 ซม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ซม. ที่ 37°C) ในสถานะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลื่อน้ำดี 5.5 mM

การเติมเพคตินซึ่งเป็นโพลีเมอร์ประจุลบลงในอิมัลชันน้ำมันปลาทูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้น ส่งผลให้ปริมาณกรดไขมันอิสระในอิมัลชันที่ถูกปลดปล่อยออกมามีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 17) และมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดไขมันอิสระในอิมัลชันปฐมภูมิหรือผิวสัมผัสชั้นเดียว (ภาพที่ 10) ส่วนปริมาณกลูโคซามีนมีค่าค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของเพคติน ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าโคโคเตแซนในอิมัลชันที่มีการเติมเพคตินไม่ถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ไลเปส ปริมาณกรดไขมัน

อิสระในอิมัลชันที่เพิ่มมากขึ้นน่าจะเนื่องมาจากไคโตแซนจับกับเพคติน แล้วหลุดจากผิวสัมผัสของหยดน้ำมัน ทำให้เอนไซม์ไลเปสสัมผัสกับหยดน้ำมันได้โดยตรงเช่นเดียวกับในอิมัลชันปฏุมูมิ (Mun et al., 2006) การเติมโพลีเมอร์ลงในอิมัลชันน้ำมันปลาทูลูน่าแบบผิวสัมผัสสองชั้น อาจจะมีผลหรือไม่มีผลต่อการไฮโดรไลส์น้ำมันโดยเอนไซม์ไลเปส ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของโพลีเมอร์



ภาพที่ 16 ค่าประจุบนผิวหยดน้ำมันในอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูลูน่าที่เติมโพลีเมอร์ความเข้มข้นต่างๆ หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลื่อน้ำดี, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลื่อน้ำดี 5.5 mM



ภาพที่ 17 ปริมาณกรดไขมันอิสระ (โปร่ง) และกลูโคซามีน (ทีบ) ในอิมัลชันทุติยภูมิของน้ำมันปลาทูลูน่าที่เติมเพคติน (สี่เหลี่ยม) และมอลโตเด็คทรีน (วงกลม) ความเข้มข้น 0-0.5% หลังผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร (พีเอช ~ 7.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 2.0, 1 ชม. → พีเอช ~ 5.3 + เอนไซม์ไลเปส + เกลื่อน้ำดี, 2 ชม. → พีเอช ~ 7.5, 1 ชม. ที่ 37°C) ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส 2.0 mg/ml และเกลื่อน้ำดี 5.5 mM

สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ

ผลการวิจัยจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า ไคโตแซนที่ห่อหุ้มหยดน้ำมันในอิมัลชันน้ำมันปลา ทุณาแบบผิวสัมผัสสองชั้น มีผลต่อความคงตัว และความสามารถในการย่อยของอิมัลชัน หลังผ่านแบบจำลองระบบการย่อยอาหารของมนุษย์ในสภาวะที่มีเอนไซม์ไลเปส โดยปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดจากการไฮโดรไลส์น้ำมัน มีปริมาณลดลงเมื่อความเข้มข้นของไคโตแซนเพิ่มขึ้น แต่ไม่ขึ้นกับขนาดโมเลกุลของไคโตแซน ตรงกันข้ามกับปริมาณกลูโคซามีนในอิมัลชันที่เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นและขนาดโมเลกุลของไคโตแซนเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณกรดไขมันอิสระที่ลดลงเมื่อเติมไคโตแซนนั้น อาจจะเนื่องจากการเกิดชั้นไคโตแซนรอบหยดน้ำมันป้องกันการไฮโดรไลส์น้ำมันโดยไลเปส หรือไคโตแซนเกิดอันตรกิริยากับไลเปสทำให้ประสิทธิภาพของไลเปสลดลง หรือกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นอาจจะจับกับไคโตแซนทำให้ตรวจวัดได้น้อยลง ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถไฮโดรไลส์ไคโตแซนแล้วปลดปล่อยกลูโคซามีนออกมา

การเติมเกลือน้ำดีและเพคตินลงในแบบจำลองระบบย่อยอาหารช่วยเสริมประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปส การเติมเกลือน้ำดีทำให้ปริมาณกรดไขมันอิสระในอิมัลชันเพิ่มขึ้น แต่เกลือน้ำดีสามารถเกิดอันตรกิริยากับไคโตแซนได้ ทำให้ปริมาณ กลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือน้ำดีเพิ่มขึ้น ส่วนการเติมเพคตินซึ่งเป็นไบโอโพลิเมอร์ประจุลบ ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมาในอิมัลชันเพิ่มขึ้นเมื่อเติมเพคตินมากขึ้น แต่ปริมาณกลูโคซามีนในอิมัลชันไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าไคโตแซนไม่ถูกไฮโดรไลส์ด้วยเอนไซม์ เนื่องจากเพคตินเกิดอันตรกิริยากับไคโตแซนเมื่อผ่านแบบจำลองระบบย่อยอาหาร ทำให้ไคโตแซนหลุดออกจากผิวสัมผัส ไลเปสสามารถไฮโดรไลส์น้ำมันได้โดยตรงไม่ต้องไฮโดรไลส์ชั้นไคโตแซน

ผลการทดลองทั้งหมดที่ได้จากงานวิจัยนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำเทคนิคเอ็นแคปซูลชั้นที่ใช้ไคโตแซนเป็นสารห่อหุ้มหยดน้ำมันมาใช้ประโยชน์ เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียและใช้เป็นระบบลำเลียงน้ำมันปลา หรือกรดไขมันโอเมก้า-3 ซึ่งอิมัลชันของน้ำมันปลาทุณาที่ทำให้คงตัวด้วยเลซิทีน-ไคโตแซนสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของน้ำมันระหว่างการเก็บรักษาได้ ขณะเดียวกันก็สามารถปลดปล่อยกรดไขมันโอเมก้า-3 ได้หลังจากบริโภคอิมัลชันดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องผลการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ว่าสารห่อหุ้มหยดน้ำมันด้วยไคโตแซนไม่ส่งผลต่อการดูดซึมไขมันของสัตว์ (Park et al., 2007)

อย่างไรก็ตาม การย่อยหรือไฮโดรไลส์น้ำมันที่อยู่ในรูปอิมัลชันยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปส ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับไคโตแซน ไลดพสกับไคโตแซน-เลซิทีน และไลเปสกับเลซิทีนในเฟสต่อเนื่องของระบบอิมัลชัน หรือผลของความแรงไอออน (ionic strength) ในอิมัลชันต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เป็นต้น ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจและควรศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เสริมความเข้าใจการไฮโดรไลส์อิมัลชันน้ำมันปลาทุณาแบบผิวสัมผัสสองชั้นที่มีไคโตแซนเป็นองค์ประกอบให้เข้าใจดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Aoki, T., E.A. Decker and D.J. McClements. 2005. Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique. *Food Hydrocolloids*, 19: 209-220.
- Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., & Lairon, D. 1999. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 1096-1106.
- Beysseriat, M., Decker, E. A. & McClements, D. J. 2006. Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an in vitro human digestion model. *Food Hydrocolloids*, 20, 800-809.
- Brockman, H. L. 2000. Kinetic behavior of the pancreatic lipase-colipase-lipid system. *Biochimie*, 82, 987-995.
- Damodaran, S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In O.R. Fennema (Ed.), *Food Chemistry* (pp. 323-325). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dongowski, G. 1997. Effect of pH on the in vitro interactions between bile acids and pectin. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 205: 185–192.
- Ebihara, K and Schneeman, B. O. 1989. Interaction of bile acids, phospholipids, cholesterol and triglyceride with dietary fibers in the small intestine of rats. *The Journal of Nutrition*, 119: 1100-1106.
- Elson, L. A., & Morgan, W. T. J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochemistry Journal*, 27, 1824–1828.
- Faldt, P., Bergenstahl, B., & Claesson, P. M. 1993. Stabilization by chitosan of soybean oil emulsions coated with phospholipid and glycocholic acid. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 71, 187-195.
- Gonzalez, M. J., R.A Schemmel, L.J. Dugan, J.T. Gray and C.W. Welsch. 1993. Dietary fish oil inhibits human breast carcinoma growth: A function of increased lipid peroxidation. *Lipids*. 28: 827-832.
- Gurr, M. I., & Harwood, J. L. 1991. *Lipid Biochemistry: An Introduction*. London: Chapman & Hall.
- Harris, W. S. 2004. Fish oil supplementation: evidence for health benefits. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 71, 209-221.

- Hedin, E. M. K., Hoyrup, P., Patkar, S. A., Vind, J., Svendsen, A., & Hult, K. 2005. Implications of surface charge and curvature for the binding orientation of *Thermomyces lanuginosus* lipase on negatively charged or zwitterionic phospholipid vesicles as studied by ESR spectroscopy. *Biochemistry*, 44, 16658-16671.
- Heinzelmann, K., Franke, K., Velasco, J., & Marquez-Ruiz, G. 2000. Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage. *European Food Research and Technology*, 211, 234-239.
- Hoagland, P. D. and Pfeffer, P. E. 1987. Cobinding of bile acids to carrot fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35: 316-319
- Kagami, Y., Sugimura, S., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., & Matsumura, Y. 2003. Oxidative stability, structure, and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68, 2248-2255.
- Kim, K. W., & Thomas, R. L. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101, 308-313.
- Klaypradit, W., & Huang, Y.-W. 2008. Fish oil encapsulation with chitosan using ultrasonic atomizer. *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1133-1139.
- Klinkesorn, U., H-Kittikun, A., Chinachoti, P. & Sophanodora, P. 2004. Chemical transesterification of tuna oil to enriched omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chemistry*, 87, 415-421.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. 2005a. Stability of spray-dried tuna oil emulsions encapsulated with two-layered interfacial membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8365-8371.
- Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E. A., & McClements, D. J. 2005b. Encapsulation of emulsified tuna oil in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. *Food Hydrocolloids*, 19, 1044-1053.
- Kris-Etherton, P.M., W.S. Harris and L.J. Appel. 2003. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: New recommendations from the american heart association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 151-152.
- Jonsbo, F., M.H. Jorgensen and K.F. Michaelsen. 1995. Importance of n-3 and n-6 fatty acids for visual function and development in newborn infants. *Ugeskrift Laeger.* 157: 1987-1991.

- Lin, C.-C., Lin, S.-Y., & Hwang, L. S. 1995. Microencapsulation of squid oil with hydrophilic macromolecules for oxidative and thermal stabilization. *Journal of Food Science*, 60, 36-39.
- Maezaki, Y., & Tsuji, K. 1993. Hypocholesterolemic effect of chitosan in adult mouse. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57, 1439-1442.
- Mu, H., & Hoy, C.-E. 2004. The digestion of dietary triacylglycerols. *Progress in Lipid Research*, 43, 105-133.
- Mun, S., Decker, E. A., Park, Y., Weiss, J., & McClements, D. J. 2006. Influence of interfacial composition on in Vitro digestibility of emulsified lipids: potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. *Food Biophysics*, 1, 21-29.
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Ku, Z. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72, R87-R100.
- Norrish, A. E., C.M. Skeaff, G.L.B. Arribas, S.J. Sharpe and R.T. Jackson. 1999. Prostate cancer risk and consumption of fish oils: A dietary biomarker-based case-control study. *Brit. J. Cancer*. 81: 1238-1242.
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. 2003. Production and characterization of O/W emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2806-2812.
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. 2004. Production and characterization of O/W emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan-pectin multilayered membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3595-3600.
- Pantaleone, D., Yalpani, M., & Scollar, M. 1992. Susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis. In C. J. Brine, P. A. Sandford, & J. P. Zikakis (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan* (pp. 292-303). London: Elsevier Applied Science.
- Park, G. Y., Mun, S., Park, Y., Rhee, S., Decker, E. A., Weiss, J., McClements, D. J. & Park, Y. 2007. Influence of encapsulation of emulsified lipids with chitosan on their in vivo digestibility. *Food Chemistry*, 104, 761-767.
- Peniche, C., Howland, I., Carrillo, O., Zaldivar, C., & Arguelles-Monal, W. 2004. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules. *Food Hydrocolloids*, 18, 865-871.
- Rodriguez, M. S., & Albertengo, L. E. 2005. Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 2057-2062.

- Schulz, P. C., Rodriguez, M. S., Del Blanco, L. F., Pistonesi, M., & Agullo, E. 1998. Emulsification properties of chitosan. *Colloid and Polymer Science*, 276, 1159-1165.
- Seo, H., Mitsuhashi, K., & Tanibe, H. 1992. Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan. In C. J. Brine, P.A. Sandford, & J.P. Zikakis (Eds.), *Advances in Chitin and Chitosan* (pp. 34-40). London: Elsevier Applied Science.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y.-J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37-51.
- Shin, S. S., Lee, Y. C. & Lee, C. 2001. The degradation of chitosan with the aid of lipase from *Rhizopus japonicus* for the production of soluble chitosan. *Journal of Food Biochemistry*, 25, 307-321.
- Terry, P., P. Lichtenstein, M. Feychting, A. Ahlbom and A. Wolk. 2001. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *Lancet*. 357: 1764-1766.
- Uauy, R., & Valenzuela, A. 2000. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition*, 16, 680-684.
- Wickham, M., Garrood, M., Leney, J., Wilson, P. D. G., & Fillery-Travis, A. 1998. Modification of a phospholipid stabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity. *Journal of Lipid Research*, 39, 623-632.

Out put

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Klinkesoren, U and McClements, D. J. 2008. Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin stabilized tuna oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* (Submitted).

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เชิงวิชาการ: การเรียนการสอนรายวิชาเทคโนโลยีของไขมันและน้ำมันบริโภค (052482) และรายวิชาลิพิดในอาหาร (052513)