การเตรียมและการศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LUTEIN IN WHEY PROTEIN ISOLATE NANOPARTICLES

นฤมล สุประภากร

NARUMON SUPRAPAKORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรของบริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AI-M-053-315

การเตรียมและการศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนลูทีนใน เวย์โปรตีนไอโซเลต

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LUTEIN IN WHEY PROTEIN ISOLATE NANOPARTICLES

นฤมล สุประภากร

NARUMON SUPRAPAKORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรของปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AI-M-053-315

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LUTEIN IN WHEY PROTEIN ISOLATE NANOPARTICLES

NARUMON SUPRAPAKORN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2018

KMITL-2018-AI-M-053-315

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2018

FACULTTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเตรียมและการศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LUTEIN IN WHEY PROTEIN ISOLATE NANOPARTICLES

ชื่อนักศึกษา นางสาวนฤมล สุประภากร

รหัสประจำตัว 57608006

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.ปนัดดา นนทนำ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.ปนัดดา นนทนำ	ปนัดดา นนทนำ
ผศ.ดร.โสรยา เกิดพิบูลย์	
ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ	วิรามศรี ศรีพจนารถ
ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 26 กรกฎาคม 2561 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่...26...เดือน...กรกฎาคม...พ.ศ...2561...

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมและการศึกษาลักษณะของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต
ชื่อนักศึกษา	นางสาว นฤมล สุประภากร
รหัสประจำตัว	57608006
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.ปนัดดา นนทนำ

บทคัดย่อ

ลูทีนเป็นสารสำคัญในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่สะสมอยู่บริเวณจอประสาทตามนุษย์ การบริโภคลูทีนมีบทบาทช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมซึ่งสามารถนำไปสู่ภาวะการตาบอดได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการผลิตลูทีนให้มีขนาดอนุภาคนาโน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและดูดซึมลูทีนเข้าสู่ร่างกาย ทั้งในรูปแบบแห้งและรูปแบบอิมัลชันด้วยเทคนิคดีซอลเวชัน โดยจะมีการห่อหุ้มลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต เพื่อเพิ่มการปกป้องและทำส่งผลให้ลูทีนสามารถกระจายตัวในน้ำได้ โดยในการผลิตลูทีนในรูปแบบแห้งได้ทำการศึกษาผลของสภาวะการผลิต ได้แก่ ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (3, 7 และ 9) ปริมาณของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต (1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100) และปริมาตรเอทานอลที่เติมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (0.25,0.50 และ 0.75 เท่า) ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ขนาดอนุภาค การปลดปล่อยลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวของลูทีนเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ (5, 25 และ 40 องศาเซลเซียส) ผลจากการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนมีค่าสูงสุดร้อยละ91ที่สภาวะการผลิตที่ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตเท่ากับ 9 ปริมาณของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตเท่ากับ 2.50:100 และปริมาตรเอทานอลที่เติมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตเท่ากับ 0.50 เท่า ผลจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากสภาวะการผลิตนี้จะมีลักษณะเป็นอนุภาครูปร่างทรงกลมขนาดเล็กมาต่อกัน โดยขนาดอนุภาคของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่วัดได้จากเครื่องวัดการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์มีค่าประมาณ 198 นาโนเมตร ขนาดอนุภาคของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตมีแนวโน้มที่ใหญ่ขึ้นในสภาวะการผลิตที่ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเลตมีค่าลดลง ปริมาณของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ใช้และปริมาตรเอทานอลที่เติมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตมีค่าเพิ่มขึ้น ผลจากการศึกษาปริมาณการปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตในสภาวะจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลองพบว่าปริมาณการปลดปล่อยลูทีนมีความสัมพันธ์ขนาดอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ผลิตได้ โดยลูทีนมีแนวโน้มที่จะถูกปลดปล่อยออกจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตได้สูงขึ้นเมื่ออนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตมีขนาดเล็กลง โดยผลจากการศึกษาความคงตัวของลูทีนต่อสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่า ตัวอย่างที่มีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มที่สูงจะมีค่าความคงตัวที่สูง โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ลูทีนเกิดการเสื่อมสลายไปมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส ส่วนการทดลองการผลิตลูทีนในรูปแบบอิมัลชัน ได้ทำการศึกษาผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ (เลซิติน และทวีน 80) ร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตในการห่อหุ้มลูทีน ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน ขนาดอนุภาค การปลดปล่อยลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวของลูทีนเมื่อทำการเก็บรักษาโดยใช้อุณหภูมิการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน (4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส) ผลจากการทดลองพบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตจะทำให้ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนเพิ่มขึ้นโดยที่ขนาดอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตเพียงอย่างเดียวในการห่อหุ้มลูทีนโดยประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนมีค่าประมาณร้อยละ 87.14, 88.47 และ 91.36และขนาดอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มมีค่าประมาณ 203, 105 และ 143 นาโนเมตร เมื่อทำการห่อหุ้มลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตเพียงอย่างเดียว เวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับเลซิติน และเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับทวีน 80 ตามลำดับ ผลจากการศึกษาการปลดปล่อย ลูทีนออกจากตัวห่อหุ้มในสภาวะจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลองพบว่าลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับทวีน 80 มีค่าปริมาณการปลดปล่อยลูทีนที่สูงที่สุดและผลจากการศึกษาความคงตัวของลูทีนในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่าลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับเลซิตินมีความคงตัวมากที่สุดต่อทุกอุณหภูมิการเก็บรักษาเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Preparation and Characterization of Lutein in Whey protein Isolate Nanoparticles.
Student	Miss. Narumon Suprapakorn
Student ID.	57608006
Degree	Master of Science
Program	Food Science
Year	2018
Thesis Advisor	Dr. Panadda Nonthanum

ABTRACT

Lutein is a carotenoid that accumulates in human retina. Lutein can help reduce the risk of developing age-related macular degeneration which leads to blindness. In order to enhance digestion and absorption of lutein into the body, this research aimed to produce nanoparticles of lutein in both dry and emulsion forms using a desolvation method. Lutein would be encapsulated with whey protein isolate (WPI) to increase its protection and enable the dispersion in water. For the production of lutein nanoparticles in dry form, the effects of pH levels of WPI solution (3, 7 and 9), the ratio of lutein to WPI (1.25: 100, 2.50: 100, 3.75: 100 and 5.00: 100) and the amount of ethanol added to WPI solution (0.25, 0.50 and 0.75 times) on encapsulation efficiency (EE) of lutein, encapsulated lutein particle sizes, morphology, lutein in vitro digestion and the stability of lutein in different storage temperatures would be investigated. The results showed that EE of lutein was approximately 91% at the processing conditions of using the WPI solution at pH 9 with the ratio of lutein to WPI of 2.50:100 and the volume of ethanol added to the WPI solution was 0.50 times. The morphology of the lutein entrapped with WPI as examined by scanning electron microscope at this particular processing condition showed small spherical particles connected to each other. The average size of lutein in WPI particles as measured by dynamic light scattering was approximately 198 nm. The particle size tended to increase as the pH values of the WPI solution decreased, the amount of added ethanol to WPI solution and the ratio of lutein to WPI increased. The release of lutein simulated in vitro digestive system was correlated with lutein particle sizes. Lutein was likely to be released in a higher amount from the smaller encapsulated lutein particles. As for the stability of lutein upon storage at various temperatures, it was found that the samples

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with high EE showed high stability. Lutein samples kept at the temperature of 40°C would decay faster when compared to those stored at 25 and 4°C. For the experiments on the production of lutein nanoemulsion, the effects of addition of low molecular weight surfactants (lecithin and Tweed 80) to the high molecular weight emulsifier (WPI) on EE of lutein, particle sizes of encapsulated lutein, lutein in vitro digestion, and the stability of lutein in different storage temperatures would be studied. The results showed that the addition of low molecular weight surfactants into the system increased EE of lutein while decreased encapsulated lutein particle sizes. The EE of the lutein was approximately 87.14, 88.47 and 91.36% while the average particle size oflutein was approximately 203, 105 and 143 nm when encapsulated with only WPI, WPI combined with lecithin and WPI mixed with Tween 80, respectively. The results from in vitro study showed that lutein was released the most in simulated digestive system from the sample of lutein encapsulated with WPI mixed Tween 80. The results from stability tests revealed that lutein encapsulated with WPI mixed with lecithin was the most stable sample at all storage temperatures.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดีจากความกรุณาของ ดร. ปนัดดา นนทนำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษาข้อชี้แนะ และให้ความช่วยเหลือในหลายสิ่งหลายอย่างจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น ประธานสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.โสรยา เกิดพิบูลย์ และ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ ที่ให้ความกรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของงานวิจัย รวมทั้งตรวจสอบ และให้คำแนะนำด้วยดีตลอดมา

นอกจากนี้ยังขอขอบคุณความช่วยเหลือด้านเครื่องมือจากเจ้าหน้าที่วิทยาลัยนวัตกรรมการจัดการข้อมูล และศูนย์วิจัยร่วมภาครัฐและเอกชน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

นฤมล สุประภากร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา	1
1.2. วัตถุประสงค์งานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ลูทีน	4
2.1.1 ลูทีนในธรรมชาติ	5
2.1.2 การดูดซึมลูทีนเข้าสู่ร่างกาย	8
2.1.3 ความปลอดภัยของลูทีน	11
2.2 นาโนเทคโนโลยี	13
2.2.1 การห่อหุ้มสารทางด้านอาหาร	14
2.2.2 การผลิตอนุภาคนาโน	15
2.2.3 การห่อหุ้มสารโดยใช้วิธีการดีซอลเวชัน	16
2.2.4 สารที่ใช้ในการห่อหุ้มอนุภาคนาโน	18
2.3 การผลิตอนุภาคนาโนจากเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีการดีซอลเวชัน	19
2.3.1 โครงสร้างเวย์โปรตีนไอโซเลต	19
2.3.2 แรงพันธะในโครงสร้างเวย์โปรตีนไอโซเลต	20
2.2.3 การห่อหุ้มอนุภาคนาโนด้วยเบต้าแลคโตกลอบูลิน	22
2.2.4 ปัจจัยสำหรับการออกแบบการห่อหุ้มสารด้วยเบต้าแลคโตกลอบูลิน	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.5 สภาวะทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อการรวมตัวเป็นอนุภาคนาโน.. 29

2.4 การขนส่งสารสำคัญด้วยอนุภาคนาโนในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง..... 30

2.4.1 อัตราการดูดซึมของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก..... 30

2.4.2 การละลายและความคงตัวของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก..... 31

2.4.3 การดูดซึมสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกในระบบเซลล์ของลำไส้เล็ก..... 32

2.4.4 ระบบอนุภาคนาโนในการขนส่งสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก..... 34

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 35

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 38

3.1 วัตถุดิบ..... 38

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์..... 38

3.3 สารเคมี..... 39

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 40

บทที่ 4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล..... 47

4.1 การผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีดีซอลเวชันแบบผงแห้ง.. 47

4.1.1 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต..... 47

4.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต..... 55

4.1.3 ความคงตัวของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ..... 61

4.1.4 การปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตภายใต้สภาวะจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง..... 64

4.2 การผลิตอิมัลชันลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ..... 69

4.2.1 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ..... 69

4.2.2 ลักษณะของอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ..... 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.3 ความคงตัวของลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ..... 71

4.2.4 การปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำภายใต้สภาวะจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง..... 74

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 75

5.1 สรุปผลการทดลอง..... 75

5.2 ข้อเสนอแนะ..... 75

บรรณานุกรม..... 76

ภาคผนวก..... 92

ภาคผนวก ก การทดลองเบื้องต้น: การศึกษาสภาวะการผลิตอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลต..... 92

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์..... 100

ประวัติผู้เขียน..... 101

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณลูทีนที่ได้รับจากอาหารชนิดต่างๆ	5
2.2	สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของสารสกัดลูทีน	5
2.3	สมบัติและลักษณะของอนุภาคนาโน	12
2.4	ข้อดีและข้อจำกัดของวิธีการต่างๆที่ใช้ในการผลิตอนุภาคนาโน	16
2.5	องค์ประกอบและลักษณะของเวย์โปรตีนไอโซเลต	19
2.6	ข้อคำนึงในการเลือกใช้วัสดุห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	26
2.7	วิธีการผลิตอนุภาคนาโนในรูปแบบต่างๆที่ใช้เบต้าแลคโตกลอบูลินเป็นวัสดุห่อหุ้มสารสำคัญ	28
4.1	ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต	48
4.2	ผลการวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตในรูปแบบตาราง ANOVA	48
4.3	ขนาดอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตจากการวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์ (Dynamic light scattering)	58
4.4	ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า และค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของลูทีน.....	6
2.2	กลุ่มแคโรทีนอยด์ที่อยู่ในซีรั่มและเนื้อเยื่อมนุษย์.....	8
2.3	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของลูทีน.....	8
2.4	ลักษณะผลึกลูทีน.....	10
2.5	ช่วงขนาดของอนุภาคนาโน.....	10
2.6	หลักการสร้างอนุภาคนาโน.....	14
2.7	การห่อหุ้มสารโดยใช้วิธีการดีซอลเวชัน.....	15
2.8	วัสดุห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	18
2.9	โครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินที่ถูกเกาะด้วยคอเลสเตอรอล.....	24
2.10	รูปแบบการดูดซึมสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกเข้าสู่เซลล์รูปแบบต่างๆ.....	32
2.11	การดูดซึมอนุภาคนาโนเข้าสู่เซลล์ลำไส้เล็ก.....	34
4.1	กราฟวิเคราะห์ผลของปัจจัยหลักที่ใช้ในการผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีต่อค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต	49
4.2	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต.....	59
4.3	ภาพถ่ายสารละลายลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต.....	60
4.4	ปริมาณของลูทีนที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน...	63
4.5	ปริมาณลูทีนที่ถูกปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตในสภาวะการย่อยอาหารแบบจำลองในสภาวะปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก.....	66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.6	ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตในสภาวะการย่อยอาหารแบบจำลองในสภาวะลำไส้เล็ก…….....	68
4.7	ปริมาณของลูทีนที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคที่ห่อหุ้มด้วย เวย์โปรตีนไอโซเลต, เวย์โปรตีนไอโซเลต-ทวิน-80 และ เวย์โปรตีนไอโซเลต-เลซิติน หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน.....	73
4.8	ปริมาณลูทีนที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตในสภาวะจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง ที่ห่อหุ้มอนุภาคลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต, เวย์โปรตีนไอโซเลตกับทวิน-80 และ เวย์โปรตีนไอโซเลตกับเลซิติน.....	74
ก.1	ภาพถ่ายสารละลายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของเวย์โปรตีนไอโซเลตร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 และปริมาตรเอทานอลที่เติมลงไปในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับ (a) 0.25 เท่า (b) 0.50 เท่า (c) 0.75 เท่า.....	96
ก.2	ภาพถ่ายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ระดับความเข้มข้นของเวย์โปรตีนไอโซเลตร้อยละ 1 และปริมาตรเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับ (a) 0.25 เท่า (b) 0.50 เท่า (c) 0.75 เท่า.....	96
ก.3	ภาพถ่ายสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของร้อยละ 1 เมื่อมีการเติมเอทานอลที่เติมลงไปสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 0.25, 0.50 และ0.75 เท่า พีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ คือ (a) pH3 (b) pH 7 (c) pH 9.....	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

ก.4 ภาพถ่ายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ระดับความเข้มข้นของเวย์โปรตีนไอโซเลตร้อยละ 1 ปริมาตรเอทานอลที่เติมลงไปในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 0.50 เท่า ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต คือ (a) pH3 (b) pH 7 (c) pH 9..... 97

ก.5 ภาพถ่ายของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการดีซอลเวชัน เพื่อผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต (a) สารละลายลูทีนในเอทานอล (b) สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตในน้ำปราศจากไอออน (c) สารละลายลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ pH 9 เอทานอล 0.50 เท่า สัดส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100..... 99

ก.6 ภาพถ่ายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (a) สารละลายลูทีนในเอทานอล (b) สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตในน้ำปราศจากไอออน (c) สารละลายอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ pH 9 เอทานอล 0.50 เท่า สัดส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ5.00:100..... 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ลูทีนเป็นสารรงควัตถุสีเหลืองที่จัดอยู่ในกลุ่มของแคโรทีนอยด์ซึ่งพบในพืชผักตามธรรมชาติ ในปัจจุบันมีการแยกสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ออกมาได้มากกว่า 700 ชนิด (Britton *et al.,* 2004) แต่มีแค่เพียงลูทีนและซีแซนทีนเท่านั้นที่มีการสะสมอยู่บริเวณจอประสาทตาของมนุษย์ โดยทำหน้าที่กรองแสงสีฟ้าซึ่งมีพลังงานสูงที่สามารถไปทำลายจอประสาทตาได้ มีรายงานวิจัยพบว่าปริมาณลูทีนที่ร่างกายได้รับมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคทางสายตา โดยกลุ่มคนที่ได้รับลูทีนเข้าสู่ร่างกายจะมีระดับลูทีนในเลือดและในจอประสาทตาที่สูง มีการมองเห็นที่ชัดเจนและมีแนวโน้มของการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมที่สามารถนำไปสู่ภาวะตาบอดได้ในอัตราที่ต่ำลง เมื่อเทียบกับกลุ่มบุคคลที่ไม่ได้บริโภคลูทีน

ลูทีนเป็นสารที่จำเป็นจะต้องได้รับเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคเท่านั้น เนื่องจากลูทีนเป็นสารที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เอง (Fernandes, 1993) แหล่งอาหารที่มีลูทีนในปริมาณที่สูง มักเป็นผักใบสีเขียวเข้ม เช่น ผักคะน้า และผักโขม ซึ่งจะมีลูทีนอยู่ในปริมาณ 4.8-13.4 และ 6.5-13.0 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผักสด 100 กรัม ตามลำดับ โดยการบริโภคลูทีนวันละ 6 มิลลิกรัมต่อวันจะสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ประมาณร้อยละ 57 (Kopsell *et al.,* 2007) นั่นหมายถึงอาจจะต้องมีการบริโภคผักใบเขียวที่ประกอบด้วยสารลูทีนในวันละประมาณ 100-500 กรัม จึงจะเพียงพอต่อการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ รายงานการวิจัยของ USDA ที่จัดทำขึ้นในปี 2001 พบว่าชาวอเมริกันได้รับสารลูทีนจากการรับประทานอาหารเฉลี่ยประมาณ 1.7 มิลลิกรัมต่อวัน (National Institute of Medicine 2001; O'Neill *et al.,* 2001) ประชากรชาวยุโรปได้รับลูทีนจากการรับประทานอาหารโดยเฉลี่ยประมาณ 2.2 มิลลิกรัมต่อวัน ส่วนในประชากรไทยยังไม่มีรายงานถึงปริมาณการบริโภคสารลูทีน แต่ก็มีข้อมูลการศึกษาทางระบาดวิทยาของโรงพยาบาลรามาธิบดี จากสถิติผู้ป่วยนอกและผู้ป่วย 5 ปีย้อนหลัง (2551-2555) พบว่าประชากรผู้สูงอายุในกลุ่ม 65-75 ปี มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคความเสื่อมของดวงตา (Age-Related Macular Degeneration, AMD) สูงถึงประมาณร้อยละ 50 (พิทยา, 2555) จากงานวิจัยพบว่ากลุ่มคนที่เกิดโรคความเสื่อมของดวงตาจะมีระดับลูทีนในเลือดเฉลี่ยต่ำกว่าคนปกติถึงร้อยละ 30 (พงศธร, 2554) ดังนั้นเพื่อเพิ่มช่องทางในการรับสารลูทีนอย่างเพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย การผลิตผลิตภัณฑ์ลูทีนในรูปแบบอาหารเสริมจึงถือเป็นหนึ่งทางเลือกที่สำคัญ

ลูทีนเป็นสารที่มีสมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิคสูง มีความสามารถรวมตัวกันเป็นผลึกละลายได้ในน้ำมันที่อุณหภูมิห้อง แต่ละลายน้ำได้เพียงเล็กน้อย (Alves-Rodrigues and Shao, 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

) ซึ่งจะส่งผลให้มีการย่อยและดูดซึมสารลูทีนสู่เข้าสู่ร่างกายได้ในปริมาณจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการผลิตลูทีนให้มีขนาดอนุภาคนาโนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมลูทีนเข้าสู่ร่างกาย โดยผลิตภัณฑ์ที่จะทำการศึกษามีทั้งในรูปแบบแห้งและแบบอิมัลชัน และจะมีการห่อหุ้มลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต เพื่อช่วยให้ลูทีนสามารถกระจายตัวในน้ำและช่วยป้องกันไม่ให้ลูทีนถูกทำลายจากสภาวะแวดล้อมได้ง่ายอีกด้วย ในการผลิตอนุภาคนาโนจะเลือกใช้วิธีดีซอลเวชัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน อีกทั้งไม่ใช้ความร้อนหรือความดันในระดับที่สูงที่อาจจะไปส่งผลทำให้ลูทีนเสื่อมสลายในระหว่างการผลิต ทั้งนี้ลักษณะและขนาดของอนุภาคที่ได้จากกระบวนการจะขึ้นอยู่กับสภาวะการเตรียมและการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลของสภาวะการผลิต ได้แก่ ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีน ปริมาณเอทานอลที่เติมลงในระบบ และปริมาณลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่มีต่อลักษณะของอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ได้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์แบบแห้ง และศึกษาผลของการใช้สารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตในการห่อหุ้มลูทีน ที่มีต่อลักษณะของอนุภาคลูทีนที่ได้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์แบบอิมัลชัน โดยข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตลูทีนให้มีขนาดในระดับนาโนเมตรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของสภาวะการผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ขนาดอนุภาค ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง รวมถึงความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา ในการผลิตตัวอย่างแบบแห้ง

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตในการห่อหุ้มลูทีน ที่มีต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ขนาดอนุภาค การปลดปล่อยลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา ในการผลิตตัวอย่างแบบอิมัลชัน

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 การทดลองผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตแบบแห้ง ทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยสภาวะการผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ทำการศึกษาได้แก่ ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ (3, 7 และ 9) สัดส่วนปริมาณของสารลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 4 ระดับ (0.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100) และปริมาตรของเอทานอลที่เติมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ (0.25, 0.50 และ 0.75 เท่า) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำมาทำแห้งเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ขนาดอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวของลูทีนในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส

1.3.2 การทดลองผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตแบบอิมัลชัน ทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยสภาวะการผลิตอนุภาคลูทีนที่ทำการศึกษา ได้แก่ ผลของการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีมวลโมเลกุลต่ำร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตในการห่อหุ้มสารลูทีน ที่มีต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ขนาดอนุภาคที่เกิดขึ้น ปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวของลูทีนเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นแนวทางในการผลิตอนุภาคขนาดนาโนของสารลูทีน

1.4.2 สามารถประยุกต์ใช้อนุภาคนาโนที่ได้ ในการเพิ่มคุณค่าประโยชน์ของผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ

1.4.3 สามารถนำวิธีการไปประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้มสารไฮโดรโฟบิคชนิดอื่นๆ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลูทีน

ลูทีนเป็นหนึ่งในแคโรทีนอยด์กว่า 700 ชนิดที่พบในธรรมชาติ ลูทีนพบมากในผักใบเขียวเข้ม เช่น ผักโขม และผักคะน้า โดยปริมาณสารลูทีนในอาหารชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.1 ในมนุษย์ลูทีนจะสะสมอยู่ในบริเวณจอประสาทตา โดยลูทีนมีความสามารถในการกรองแสงสีฟ้าซึ่งเป็นคลื่นแสงที่มีพลังงานสูงที่จะสามารถทำลายจอประสาทตาได้ (Kritchevsky, 2000; Johnson, 2002) จึงทำให้ลูทีนเป็นที่รู้จักกันว่าเป็นสารที่มีความสำคัญต่อดวงตา ทั้งนี้ลูทีนต้องได้รับจากการบริโภคเท่านั้น เนื่องจากร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์สารนี้ขึ้นมาเองได้ โดยมีงานวิจัยศึกษาการบริโภคลูทีน พบว่าการรับประทานลูทีนที่มีอยู่ทั้งในอาหารและอาหารเสริม จะสามารถเพิ่มระดับปริมาณลูทีนในจอประสาทตาได้ (Johnson *et al.,* 2002) โดยการบริโภคลูทีนในปริมาณที่เพียงพอจะสามารถลดความเสี่ยงโรคจอประสาทตาเสื่อมในผู้สูงอายุได้ สำหรับปริมาณของลูทีนที่ควรได้รับต่อวัน เพื่อลดความสี่ยงต่อการเกิดโรคจอประสาทตาเสื่อมได้ร้อยละ 57 มีค่าอยู่ที่ 6 มิลลิกรัมต่อวัน (Kopsell *et al.,* 2007) ในส่วนของความปลอดภัย GRAS (generally recognized as safe) ได้ให้การรับรองถึงความปลอดภัยในการบริโภคลูทีนไว้อีกด้วย (Dagnelie *et al.,* 2000; Olmedilla *et al.,* 2003 ; Richer, 1999) การรับประทานลูทีนจากอาหารให้เพียงพอต่อวันในการลดระดับความเสี่ยงต่อโรคจอประสาทตาเสื่อมนั้นเป็นไปได้ยากในชีวิตประจำวัน แต่สามารถเพิ่มปริมาณลูทีนจากการรับประทานได้จากอาหารเสริม หรือใส่ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป ซึ่งเป็นรูปแบบที่สามารถเข้าถึงลูทีนได้ง่ายขึ้น โดยแหล่งลูทีนที่สกัดและนำมาใช้ในการผลิตอาหารเสริมมักมาจากดอกดาวเรือง Marigold flowers (*Tagetes erecta L*) ซึ่งลูทีนที่สกัดได้จะถูกนำไปใช้งานในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ทั้งในรูปแบบผงแห้ง หรือในแบบลูทีนละลายในน้ำมัน เนื่องจากพบว่าจะให้ประสิทธิภาพการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ดีกว่า โดยทางการค้ามักใช้อยู่ในรูปสารละลายน้ำมันต่างๆ อาทิเช่น น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันดอกคำฝอย เนื่องจากลูทีนไม่สามารถละลายน้ำได้ โดยสมบัติและลักษณะพื้นฐานของลูทีน แสดงดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณลูทีนที่ได้รับจากอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร	ปริมาณลูทีน (มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักสด 100 กรัม)
บรอคโคลี่ (Broccoli)	1.770
กะหล่ำปลี (Cabbage)	0.280
ผักโขม (Spinach)	14.400
กะหล่ำปลีเล็ก (Brussels sprouts)	1.340
ผักคะน้า (Kale)	14.200
มะม่วง (Mango)	1.012
มะละกอ (Papaya)	2.436
พริกไทย (Pepper)	2.067
มันฝรั่ง (Potato)	0.087
ฟักทอง (Pumpkin)	0.738

ที่มา: Industrial Organica (2012)

ตารางที่ 2.2 สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของสารสกัดลูทีน

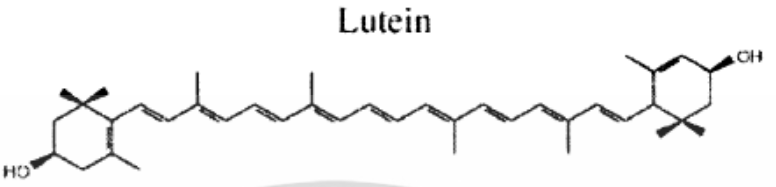
Property/Parameter	Lutein
Chemical names	Xanthophyll; 13, &-carotene-3,3-diol
Empirical formula	$C_{40}H_{56}O_2$
Molecular weight	568.88
Physical state	Crystalline
Melting point	177-178°C
Bulk density	0.35-0.40 g/mL
Solubility- water at 5°C	Insoluble

ที่มา: Alves-Rodrigues และ Shao (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 โครงสร้างลูทีน

โครงสร้างไฮโดรคาร์บอนสายยาว แกนโครงสร้างหลักมีคาร์บอน 40 อะตอม (C40 isoprenoid carbon skeletons) จึงทำให้ลูทีนไม่เสถียรในสภาวะที่มีออกซิเจน ความร้อน และแสง เนื่องจากมีโครงสร้างพื้นฐานของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ แสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของลูทีน

ที่มา: Alves-Rodrigues และ Shao (2004)

ลักษณะของหมู่ไฮดรอกซิลในลูทีน แสดงให้เห็นถึงลักษณะความแตกต่างจากแคโรทีนอยด์ชนิดอื่นๆในธรรมชาติ โดยจะมีหมู่ไฮดรอกซีสองตัวเกาะที่ด้านข้างโครงสร้างข้างละตัว (ภาพที่ 2.1) (Johnson, 2002; Winkler *et al.,* 1999) ลูทีนสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและปกป้องการเกิดอนุมูลอิสระจากแสงที่ทำให้เกิดความเสียหายจากอนุมูลอิสระ (Baroliand and Niyogi, 2000; Demmig-Adams *et al.,* 1996) แสงสีน้ำเงินเป็นแสงที่มีระดับพลังงานสูงต่อการมองเห็น และเป็นที่รู้จักกันดี ว่าเป็นรูปแบบแสงที่ชักนำก่อให้เกิดการออกซิเดชัน โดยปฏิกริยาการแตกตัวของอนุพันธ์ออกซิเจน (ROS) ลูทีนมีค่าการดูดแสงสูงสุดที่ช่วง 446 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงแสงที่มองเห็นได้ และยังมีความสามารถในการแยกแสงสีฟ้าออก และช่วยปกป้องพืชในกระบวนการสังเคราะห์แสง (ภาพที่ 2.2) อาจสังเกตได้ไม่ชัดในผักใบเขียวชนิดอื่น เนื่องจากมีคลอโรฟิลล์บดบังอยู่ โดยลักษณะลูทีนบริสุทธิ์จะเป็นผลึกสีส้มเหลือง (ภาพที่ 2.3)

ลูทีนสามารถพบได้มากมายในอาหารโดยพบมากที่สุดใน ผักใบเขียว เช่น ผักโขม ผักคะน้า ซึ่งมีลูทีนสูงถึง 12 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมของผักโขม และสูงมากถึง 40 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมของผักคะน้า อาหารที่มีสีเหลือง เช่น ข้าวโพด และไข่แดง ก็เป็นแหล่งอาหารอุดมไปด้วยลูทีนเช่นกัน (Sommerburg *et al.,*1998) ตาม USDA การบริโภคลูทีนเฉลี่ยต่อวันของชาวอเมริกันอยู่ในขณะนี้ประมาณ 1.7 มิลลิกรัมต่อวัน (National Institute of Medicine, 2001; O'Neill *et al.,* 2001) ข้อมูลล่าสุดของยุโรป แสดงให้เห็นว่าชาวยุโรปรับประทานลูทีนประมาณ 2.2 มิลลิกรัมต่อวัน (O'Neill *et al.,* 2001) โดยค่าเหล่านี้ต่ำกว่าระดับที่รับประทาน เพื่อลดความเสี่ยงจากโรคตา เช่น ต้อกระจก และโรค AMD (Brown *et al.,*1999; Chasan-Taber *et al.,* 1999; Seddon

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

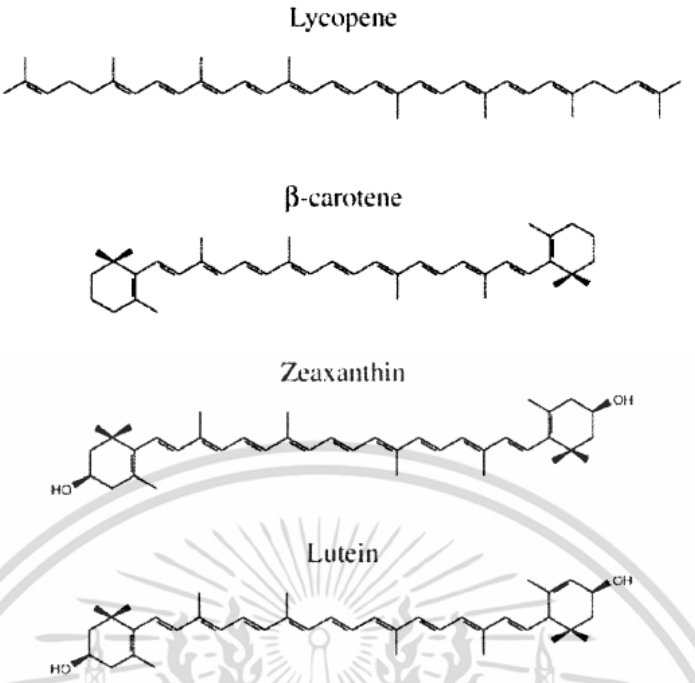
et al., 1994) ทำให้ต้องมีการเพิ่มขนาดการรับประทานลูทีน ทั้งในที่เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเครื่องดื่มก็มีการเติมลูทีนลงไปอีกด้วย

2.1.2 การดูดซึมลูทีนเข้าสู่ร่างกาย

แคโรทีนอยด์ วิตามินอีและวิตามินอื่นๆ ที่ละลายที่ในไขมันโมเลกุลจะสามารถถูกดูดซึมโดยเยื่อบุขนาดเล็กของลำไส้เล็กส่วนต้น (Chow, 2000; Noy,2000) ซึ่งไม่ใช่รูปแบบการแพร่แบบ active carriers หรือ transporter ในการดูดซึมแคโรทีนอยด์ในลำไส้เล็ก การดูดซึมแคโรทีนอยด์จะอาศัย hydrophobic cleavage by-products (สารที่ไม่ชอบน้ำ เช่น กรดไขมัน) ในการขนส่งผ่านเมือกของลำไส้เล็กได้ โดยจะมีการรวมตัวของสารเป็น chylomicrons และเข้าไปปล่อยสารในเส้นเลือดทาง inferior cava โดยแคโรทีนอยด์ส่วนมากจะไปรวมอยู่ที่ตับ ในรูปแบบ lipoproteins เพื่อนำมาปล่อยไหลเวียนเข้าสู่กระแสเลือด (Yeum and Russell, 2002)

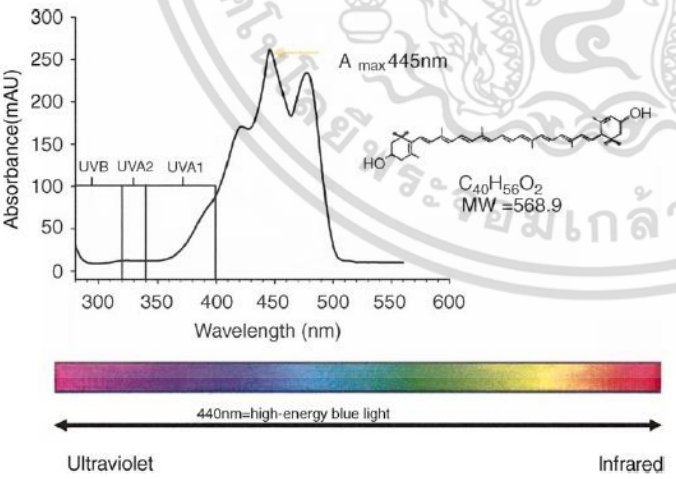
แม้ว่าจำนวนของข้อมูลการศึกษาในมนุษย์ของลูทีนในอาหารในเรื่องการดูดซึมพบว่าประสิทธิภาพการดูดซึมค่อนข้างยาก โดยมีข้อมูลหนึ่งที่ศึกษาระดับความเข้มข้นของลูทีนในรูปแบบของ chylomicron fraction เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และในซีรั่ม 16 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของแคโรทีนอยด์ในอาหารสูง จะลดประสิทธิภาพการดูดซับลูทีน และมีอีกงานวิจัยของ Jenkins และคณะ (2000) ได้มีการรายงานประสิทธิภาพการดูดซึมของลูทีนอยู่ในช่วงความเข้มข้น 28.7-43.1% ในหนู ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับการให้อาหาร นอกจากนี้ปัจจัยยังขึ้นอยู่กับการละลาย ค่าประจุในการเกิด micelles หรือ chylomicrons ในร่างกายมนุษย์หลักสำคัญที่ช่วยในการกระจายตัวของแคโรทีนอยด์ คือ ค่าความหนาแน่นของ lipoproteins ในเลือดที่ต่ำสุด (LDL) ค่าความหนาแน่นของ lipoproteins ในเลือดที่สูงสุด (HDL) ความแตกต่างไฮโดรคาร์บอนของแคโรทีนอยด์ นั้นก็เป็นปัจจัยสำคัญ โดยใน LDL จะมีขั้วมากกว่าทำให้อยู่ในรูป oxycarotenoids โดยลูทีนและซีแซนทีนพบได้ทั้งใน HDL และ LDL (Yeum and Russell, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 กลุ่มแคโรทีนอยด์ที่อยู่ในซีรั่มและเนื้อเยื่อมนุษย์ จากบนมาล่าง lycopene, β-carotene (hydrocarbons), zeaxanthin และ lutein (xanthophylls)

ที่มา: Alves-Rodrigues และ Shao (2004)



ภาพที่ 2.3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของลูทีนสูงสุดที่ 446 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงแสงสีฟ้าเป็นแสงที่มีค่าพลังงานสูงสุด

ที่มา: Alves-Rodrigues และ Shao (2004)

ภาพที่ 2.4 ลักษณะผลึกลูทีน

ที่มา: Alves-Rodrigues และ Shao (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูทีนไดเอสเทอร์ที่รวมตัวกับกรดไขมันซึ่งติดอยู่ทั้งสองด้านของลูทีน โดยลูทีนได้ถูกนำมาใช้ทดสอบในมนุษย์ พบว่าลูทีนในอาหารเสริมสามารถเพิ่มระดับลูทีนในซีรั่มได้ และ (Bone *et al.,* 2003) และได้นำมาปรับปรุงการให้ยาแก้ผู้ป่วยโรคตา (Olmedilla *et al.,* 2003; Richer *et al.,* 2002) โดยมีการศึกษาหนึ่งที่ได้มีการเปรียบเทียบการดูดซึมของลูทีนจากการรับประทานโดยตรง กับการรับประทานจากอาหาร Bowen และคณะ (2002) ได้สรุปไว้ว่าการทดสอบการดูดซึมลูทีนจากแหล่งทั้งสองไม่มีความแตกต่างกัน และ ไม่ทำให้เสียการดูดซึมของลูทีน

2.1.3 ความปลอดภัยของลูทีน

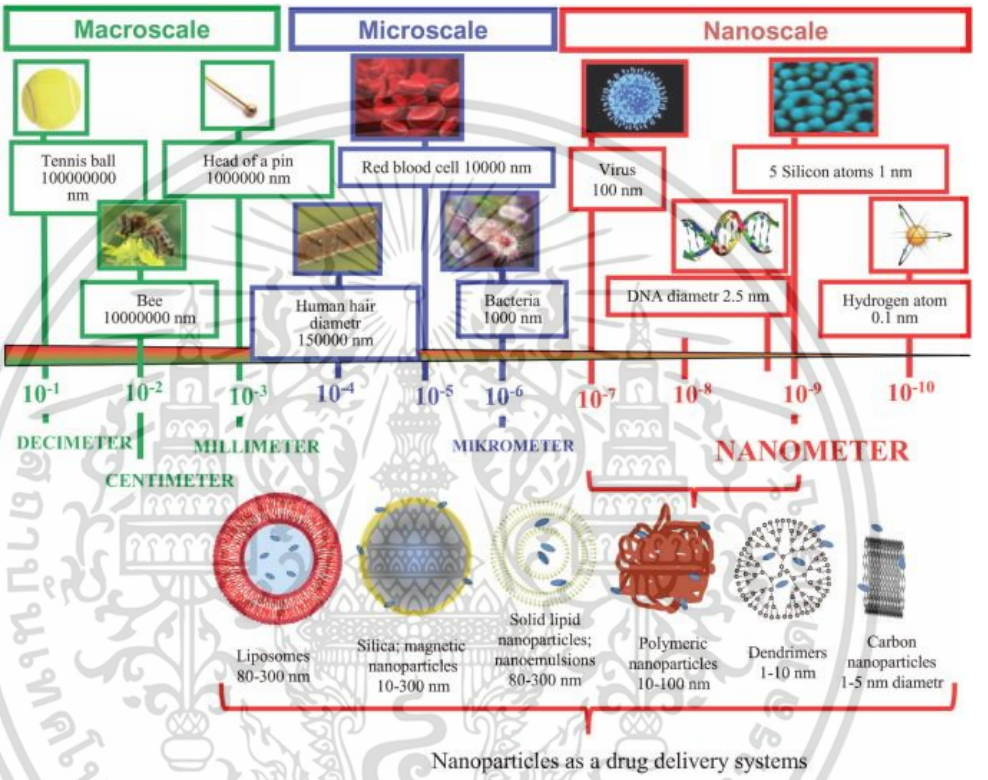
ผลจากการศึกษาการได้รับลูทีนเข้าสู่ร่างกายของกลุ่มประชากรตัวอย่างที่ได้รับลูทีนในปริมาณที่สูงถึง 20 มิลลิกรัมต่อวัน นานถึง 6 เดือน (Aleman *et al.,* 2001; Duncan *et al.,* 2002) แม้ในปริมาณ 30 มิลลิกรัมต่อวัน 5 เดือน (Landrum *et al.,* 1997) หรือ 40 มิลลิกรัมต่อวัน กว่า 2 เดือน ก็ไม่พบผลกระทบอันไม่พึงประสงค์หรือผลข้างเคียงร้ายแรงแต่อย่างใด (Dagnelie *et al.,* 2000) ทั้งนี้ผู้ที่บริโภคแคโรทีนอยด์ในระดับสูง เช่น ประชากรในหมู่เกาะฟิจิมีการบริโภคผักสีเขียวเกินกว่า 200 กรัมทุกวัน และเป็นปริมาณลูทีนเกือบ 25 กรัมที่บริโภคต่อวัน (LeMarchand *et al.,* 1995) จะพบอัตราการเกิดโรคมะเร็งปอดในอัตราที่น้อยกว่าประชากรอื่นๆ ในหมู่เกาะแปซิฟิกใต้ที่รับประทานอาหารที่ไม่หลากหลายและไม่อุดมด้วยผักและผลไม้นานาชนิด อย่างไรก็ตามการบริโภคลูทีนในปริมาณที่สูงอาจทำให้เกิดอาการตัวเหลือง (Carotenedermia) (Granadoet *et al.,* 1998 ; Olmedilla *et al.,* 1997) ซึ่งผลกระทบมาจากการบริโภคสารอาหารในกลุ่มแคโรทีนอยด์ที่มากเกินไป โดยไม่ได้เกิดแต่กับการบริโภคลูทีนในปริมาณที่สูงเพียงอย่างเดียว

2.2 นาโนเทคโนโลยี

นาโนเทคโนโลยี ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในสมัยอดีตมาจนถึงปัจจุบัน (Buzea, *et al.,* 2007) โดยได้มีการกำหนดคุณสมบัติของอนุภาคนาโนเอาไว้ว่าอย่างน้อยควรมีขนาดที่เล็กกว่า 1000 นาโนเมตร แต่มีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลหรืออะตอมเดียว อย่างไรก็ตามเกณฑ์ของขนาดจะแตกต่างกันไปตามประเภทและวัสดุนอกจากนี้อาจจะมีการกำหนดขนาดความต้องการที่มากขึ้นคือต้องไม่เกิน 100-200 นาโนเมตร (Reverchon and Adami, 2006; Weiss *et al.,* 2006) อนุภาคนาโนนั้น มีคุณสมบัติที่โดดเด่นอยู่สองประการ คือ มีขนาดเล็ก และ มีอัตราส่วนระหว่างผิวต่อปริมาตรที่สูง อนุภาคขนาดเล็กและมีอัตราส่วนระหว่างผิวต่อปริมาตร จะมีคุณสมบัติทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กายภาพและทางสรีรวิทยาที่แตกต่างกันจากอนุภาคขนาดใหญ่ เช่น การกระเจิงแสงที่ลดลง เสถียรภาพที่ดีขึ้น เนื่องจากอนุภาคขนาดใหญ่จะถูกตกตะกอนด้วยแรงโน้มถ่วง อัตราการแพร่กระจายได้เร็วขึ้น ความสามารถในการละลายสูงขึ้น และอัตราการแทรกซึมทางชีวภาพสูงขึ้น ซึ่งเหล่านี้ล้วนแต่เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของอนุภาคนาโน (Buzea *et al.,* 2007) ซึ่งแสดงไว้ดังตารางที่ 2.4



ภาพที่ 2.5 ช่วงขนาดของอนุภาคนาโน

ที่มา : Wilczewska และคณะ (2012)

นอกจากนี้อนุภาคขนาดนาโนยังมีอิทธิพลต่อระหว่างปฏิกิริยา เช่น การเกิดออกซิเดชัน หรือ การย่อยอาหาร คุณสมบัติเฉพาะของอนุภาคนาโนได้นำไปสู่ การใช้งานในหลากหลายอุตสาหกรรม (Reverchon *et al.,* 2007) ในส่วนของอุตสาหกรรมอาหาร อนุภาคนาโนมีความน่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความสามารถในการปรับลักษณะการปลดปล่อยสาร, เพิ่มชีวปริมาณการออกฤทธิ์ (bioavailability: การดูดซึมสารเข้าสู่ร่างกาย) และ เพิ่มความคงตัวของสารออกฤทธิ์ในอาหารและภายในร่างกายมนุษย์ (Weiss *et al.,* 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปแล้วเทคนิคที่ใช้ในการผลิตอนุภาคนาโน สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ 1.) วิธีการ top-down methods (อย่างเช่น การโฮโมจีไนซ์ และการบด) 2.) วิธีการ bottom-up methods (เช่น การทำอิมัลชัน และการเติมตัวทำละลายให้เกิดการตกตะกอน) สำหรับการเลือกการใช้งาน ควรเลือกให้เหมาะกับ การผลิตระดับเชิงพาณิชย์ ความปลอดภัยในการเป็นส่วนผสมทางอาหาร และการปรับใช้กระบวนการทางอุตสาหกรรมที่สะดวก โดยเทคนิคในการทดลองนี้เราใช้วิธีการ bottom-up methods การเติมตัวทำละลายให้เกิดการตกตะกอนซึ่งจะอธิบายในส่วนการผลิตอนุภาคนาโน (Shimomura and Sawadaishi, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 สมบัติและลักษณะของอนุภาคนาโน

คุณสมบัติ	คุณลักษณะ	อ้างอิง
ความคงตัว (Stability)	แรงโน้มถ่วง (Gravitational) : เกิดการเคลื่อนที่แบบคงที่ของ Brownian ทำให้อนุภาคนาโนมีเสถียรภาพ เมื่อเกิดแรงโน้มถ่วง การแยกชั้น (Separation) : การเกิดชั้นครีม (creaming) และการตกตะกอน (sedimentation) และน้ำที่ไหลออกจากภายในอนุภาค(drainage) สังเกตได้จากอนุภาคขนาดใหญ่เกิดการรวมตัวกัน การเกาะกลุ่มของอนุภาคที่ยังแขวนลอยได้ (Flocculation) : การเกิด flocculation จะสามารถป้องกันและ ช่วยให้อนุภาคยังคงกระจายตัว โดยไม่เกิดการแยกชั้น การรวมตัวกันของอนุภาค (Coalescence) : 1. ความหนาของฟิล์มสารลดแรงตึงผิวส่งผลต่อขนาดของอนุภาคที่เกิดขึ้น จะช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของฟิล์มระหว่างอนุภาค 2. อนุภาคขนาดเล็ก สามารถลดช่วงแรงดึงดูดระหว่างอนุภาคได้	Graves *et al.* (2005), Lee and McClements (2010), Peng *et al.* (2010)
พื้นที่ผิว (Large surface area)	1. ช่วยเพิ่มความสามารถไน การละลาย การดูดซึม และความสามารถในการเข้าถึงของสารออกฤทธิ์ได้หลายชนิดเช่น carotenoids, phytosterols และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (PUFA) 2. ช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดซึมของโปรตีนที่นำมาใช้เป็นนาโนแคปซูล เนื่องจากพื้นผิวที่เพิ่มขึ้นปฏิสัมพันธ์ของการขนส่งสารในรูปแบบอนุภาคนาโน (nanocarriers) สามารถทำการดูดซับผ่านผิวเยื่อบุผิวลำไส้เล็ก (epithelium)ได้โดยตรง และลดการเชื่อมต่อกันของสายพันธะเปปไทด์ได้ 3. ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มของสารที่มีลักษณะเป็นชอบไขมัน (lipophilic) และสามารถ การปล่อยควบคุมในบริเวณเฉพาะเจาะจงได้	Yuan *et al.* (2008), Qian *et al.* (2012)
โปร่งใส /, ความขุ่นต่ำ (Optical transparency/ low turbidity)	ขนาดของหยดน้ำมันอาจเล็กกว่าความยาวคลื่นของแสง ทำให้มีขนาดเล็กลง โปร่งใส เหมาะสำหรับการผสมสารออกฤทธิ์ลงในอาหาร โดยไม่เกิดความขุ่น	Lee and McClements (2010),Qian *et al.* (2012)
การไหล (Fluidity)	1. อาจเพิ่มการแพร่กระจายและปฏิสัมพันธ์กับเซลล์จากการบริโภคทางปาก 2. ที่ความเข้มข้นของน้ำมันที่เท่ากัน สามารถลดความหนืดของของเหลวได้	Sonneville-Aubrun *et al.* (2004)

2.2.1 การห่อหุ้มสารทางด้านอาหาร

การเพิ่มอายุการเก็บรักษา (shelf-life) ของสารอาหารที่มีความไวต่อสภาพแวดล้อม และการกำหนดแหล่งที่ปลดปล่อยสารอาหาร สามารถใช้วิธีการเอนแคปซูลเลชันมาพัฒนาในผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยมีการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในโภชนเภสัชภัณฑ์ และอาหารเสริม ได้แก่ การนำมาใช้เป็นตัวห่อหุ้มหรือเก็บกักสารอาหารหรือสารในอาหารชนิดต่างๆไว้ในอนุภาคนาโน (nanoencapsulation) เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ หรือส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ โดยประโยชน์ที่ได้อาจเป็นการเพิ่มคุณลักษณะที่ดีของผลิตภัณฑ์ หรือเป็นการเสริมหรือเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร (food fortification) รักษาความคงสภาพของสารที่ห่อหุ้มไว้ สามารถเก็บกักกลิ่น และสีของอาหาร ซึ่งอาจสูญเสียไประหว่างกระบวนการผลิตอาหารที่ผ่านการใช้พลังงาน หรือความร้อนสูง นอกจากนั้นยังใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยสารที่เก็บกักในอนุภาคได้ด้วย (Qian *et al.*, 2012)

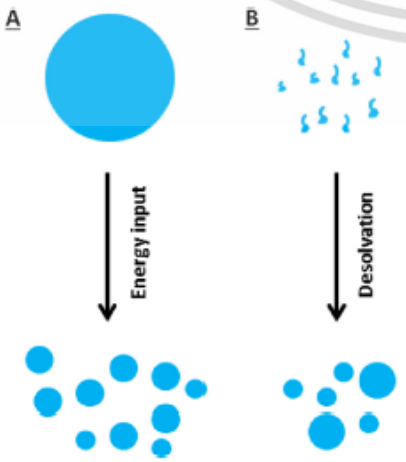
สารสำคัญที่นิยมเก็บกักไว้ภายในอนุภาคนาโนมักเป็นสารที่ละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลาย ตัวอย่าง เช่น วิตามินชนิดละลายในไขมัน และสารพฤกษเคมีต่างๆ การเก็บกักสารดังกล่าวไว้ในอนุภาคนาโนจะช่วยเพิ่มความคงตัว และการดูดซึมของสารนั้นเข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้ชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ของสารนั้นในร่างกายเพิ่มขึ้นด้วย ทั้งนี้หลังการเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานแล้ว อนุภาคนาโนจะแพร่ผ่านเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้เล็ก (enterocytes) โดยวิธีที่เรียกว่า transcellular หรือ transcytosis และอาจอาศัยตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์ในการผ่านเข้าสู่เซลล์ร่างกาย กระบวนการเพิ่มความ สามารถในการผ่านเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนาโน มีตัวอย่างการศึกษาที่นำอนุภาคนาโนมาประยุกต์ใช้ในโภชนเภสัชภัณฑ์ ได้แก่ อนุภาคนาโนของเคอร์คิวมิน (curcumin) เคอร์คิวมินเป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลที่สกัดจากเหง้าของขมิ้นชัน (Curcuma longa) และมีการละลายน้ำได้น้อย เคอร์คิวมินเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ได้แก่ เป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ต้านอักเสบ (antiinflammation) ต้านการเกิดมะเร็ง (anticar cinogenesis) อย่างไรก็ตาม เคอร์คิวมินมีการละลายในน้ำได้น้อยไม่คงตัวในสภาวะที่เป็นด่าง ทำให้ดูดซึมในร่างกาย และมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ที่ต่ำ นาโนเทคโนโลยีจึงถูกนำมาใช้ เพื่อโภชนเภสัชภัณฑ์ของเคอร์คิวมิน อนุภาคนาโนที่มีการศึกษาและใช้เพิ่มการละลายของเคอร์คิวมิน ได้แก่ นาโนอิมัลชัน ซึ่งประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (Tween 20) น้ำมันไตรกลีเซอไรด์ชนิดห่วงโซ่ปานกลาง (MCT, medium chain triglycerides) และน้ำ โดยการเตรียมจะใช้วิธีปั่นผสมสารทั้งหมดภายใต้แรงดันสูง (high pressure homogenization) ได้อนุภาคนาโนในขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นผ่านศูนย์กลาง 79.5 นาโนเมตร และเมื่อนำนาโนอิมัลชันไปทดสอบฤทธิ์ต้านอักเสบในสัตว์ทดลองพบว่ามีฤทธิ์ที่ดีกว่าอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ นอกจากนั้นยังมีการเก็บกักเคอร์คิวมินไว้ใน อนุภาคนาโนชนิดอื่นๆ ซึ่งช่วยทำให้เคอร์คิวมินมีความคงตัวมากขึ้น และป้องกันการถูกทำลายโดยการไฮโดรไลซีส (hydrolysis) ภายในร่างกายได้ ทำให้สารอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น และเพิ่มชีวปริมาณออกฤทธิ์ของสารตลอดจน ทำให้สารมีฤทธิ์ทางชีวภาพเพิ่มขึ้นด้วย เช่น ฤทธิ์ต้านมะเร็ง นอกจากเคอร์คิวมินแล้วยังมีการใช้อนุภาคนาโนในการกักเก็บสารอื่น ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) โดยอนุภาคนาโนเตรียมได้จากโซเดียมเคซีนเนท (sodium caseinate) และสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ ซึ่งพบว่าอนุภาคนาโนช่วยป้องกันการความไม่คงตัว จากการออกซิเดชันของเบต้าแคโรทีนที่ห่อหุ้มไว้ได้ นอกจากนั้นยังมีการเตรียมอนุภาคนาโนในรูปไมเซลล์ ของวิตามินดี (vitamin D2) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวคือโซเดียมเคซีนเนท และเตรียมโดยใช้วิธีปั่นผสมภายใต้ แรงดันสูง พบว่าสามารถเก็บกักวิตามินดีได้ในขนาดสูงและนำไปใช้เสริมในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Kontopidis *et al.*, 2014; Pihlanto-Leppala, 2000)

2.2.2 การผลิตอนุภาคนาโน

การสร้างอนุภาคนาโนปกติแล้วโดยพื้นฐานใช้สองหลักการ คือ กระบวนการ top-down และ กระบวนการ bottom-up (Shimomura and Sawadaishi 2001; Whitesides and Grzybowski, 2002) ในขั้นตอน top-down เป็นสร้างอนุภาคขนาดใหญ่ขึ้นมาก่อน จากนั้นทำการลดขนาดให้มีอนุภาคขนาดเล็กในระดับนาโน การลดขนาดสามารถทำโดยวิธีทางกลโดยการให้พลังงานเข้าไป ส่วนอีกกระบวนการคือ bottom-up จะสร้างอนุภาคนาโนจากการรวมตัวของโมเลกุลขนาดเล็ก โดยขึ้นกับค่าสัมพรรคภาพ (affinity) ภายในโมเลกุล (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.6 หลักการสร้างอนุภาคนาโน
(A) หลักการ top-down
(B) หลักการ bottom-up
ที่มา: (Li *et al.*, 2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างของการผลิตอนุภาคนาโนด้วยหลักการ top-down ได้แก่ นาโนอิมัลชัน วิธีการนี้จะใช้กระบวนการทางกลโดยให้พลังงานสูงเข้าไป เพื่อให้เกิดความรุนแรงระหว่างเฟสน้ำและน้ำมันจนทำให้เฟสน้ำมันเกิดการกระจายตัวเป็นหยดน้ำมันในเฟสน้ำ จึงเกิดเป็นอนุภาคนาโนไขมันเกิดขึ้น (Tadros *et al.,* 2004) ยกตัวอย่างเช่น Leong และคณะ (2012) ได้ศึกษาเตรียมอนุภาคนาโนอิมัลชันจากน้ำมันดอกทานตะวัน ได้อนุภาคเฉลี่ยขนาด 40 นาโนเมตร ซึ่งได้ใช้คลื่นอัตราซาวน์ร่วมกับโฮโมจิไนซ์ ทำให้เกิดแรงเฉือนสูงจนเกิดการแพร่เป็นอนุภาคนาโนอิมัลชัน

ในทางตรงกันข้าม วิธีการ bottom-up จะขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของโมเลกุล โดยหลักการคืออนุภาคขนาดเล็กจะรวมตัวเป็นอนุภาคขนาดใหญ่ (Chen *et al.,* 2006) ซึ่งหลักการของ bottom-up จะมีสามปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ คือ สภาวะของวิธีการ การรวมตัวของพอลิเมอร์ และการกระจายตัวของอนุภาคภายในสารละลาย ยกตัวอย่างวิธีการที่ใช้หลักการ bottom-up คือวิธีการดีซอลเวชัน (Desolvation) จะลดการละลายของโพลิเมอร์ที่นำมาเป็นวัสดุห่อหุ้ม โดยจะค่อยๆเติมตัวทำละลายจนเกิดการรวมตัวของอนุภาค (Coester *et al.,* 2000) ตัวอย่างงานวิจัยมีการใช้โปรตีนเซอีน (zein) ในการเอนแคปซูลเลตด้วยสารละลายเอทานอล (Zhong and Jin, 2009) วิธีการใช้สารเคมีที่ส่งผลต่อความสามารถในการรวมตัวกันเองของอนุภาคนาโน เป็นวิธีการที่ใช้อย่างกว้างขวาง ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์จากแรงระหว่างโมเลกุลในการสร้างอนุภาคนาโน โดยมีผลมาจากอัตราส่วนมวลภายในโมเลกุล สภาวะพีเอช อุณหภูมิ และสภาวะอื่น (Chen *et al.,* 2006; Grzelczak *et al.,* 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ข้อดีและข้อจำกัดของวิธีการต่างๆที่ใช้ในการผลิตอนุภาคนาโน

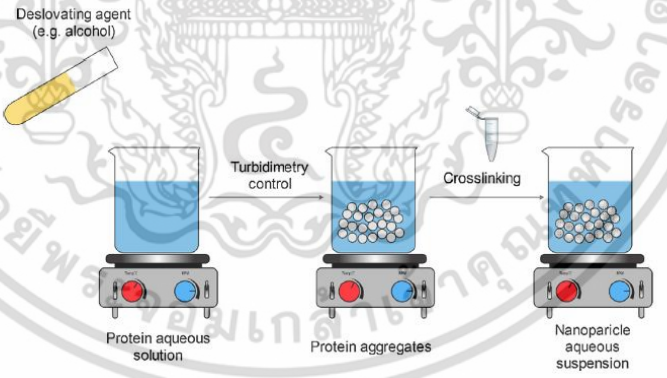
ลักษณะที่สำคัญ	วิธีการเอนแคปซูเลชันด้วยโปรตีน				
	ปรับพีเอชสารละลาย **pH cycling**	**ใช้ความร้อน** **Heat Treatment**	**สเปรยดรายย์** **Sparay technique**	**อิมัลชันร่วมกับการระเหย** **Emulsion evaporation**	**การแทนที่ด้วยตัวทำละลาย** **Solvent displacement**
ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการ	ปานกลาง	ปานกลาง-สูง	ปานกลาง-สูง	สั้น	ต่ำ-ปานกลาง
ตัวทำละลาย	ใช้บัฟเฟอร์มาก	ใช้บัฟเฟอร์มาก	ใช้บัฟเฟอร์/แอลกอฮอล์	ความเป็นพิษต่ำ	ความเป็นพิษต่ำ
พลังงานที่ใช้ในกระบวนการ	ต่ำ	ปานกลาง	ปานกลาง	ต่ำ	ปานกลาง
ความเข้มข้นพอลิเมอร์ที่นำมาห่อหุ้ม	ปานกลาง-สูง	ปานกลาง	ปานกลาง	ปริมาณที่ขนาดอนุภาคเข้าใกล้นาโน	ปานกลางสูง
การห่อหุ้มสารประกอบไฮโดรโฟบิค	ต่ำ-ปานกลาง	ต่ำ-ปานกลาง	ปานกลาง	สูง	สูงมาก
การห่อหุ้มสารประกอบไฮโดรฟิลิค	สูง	ปานกลาง-สูง	ปานกลาง	ปานกลาง	ปานกลาง
สารลดแรงตึงผิว	ไม่จำเป็น	ไม่จำเป็น	ไม่จำเป็น	จำเป็น	จำเป็น
ระยะเวลาที่ทำให้บริสุทธิ์	สั้น	สั้น	ปานกลาง	ปานกลาง	ปานกลาง
ข้อสังเกต:(สารที่นำมาห่อหุ้ม/ตัวห่อหุ้ม)	มักใช้กับโปรตีน	ไม่เหมาะกับสารไบโอแอคทีฟที่ไม่ทนความร้อน	มักใช้กับโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต	เหมาะกับสารไบโอแอคทีฟที่เป็นไฮโดรฟิลิคและไฮโดรโฟบิค	ข้อจำกัดในการเติมตัวทำละลาย

ที่มา: Sabliov และคณะ (2015)

2.2.3 การห่อหุ้มสารโดยใช้วิธีการดีซอลเวชัน

เทคนิคดีซอลเวชันอาศัยความสามารถในการรวมตัวกันระหว่างพอลิเมอร์ (เช่น โปรตีน หรือ พอลิแซคคาร์ไรด์) การเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคที่เกิดขึ้นมีผลมาจากสภาวะการกระตุ้นจากตัวทำละลาย โดยมีขั้นตอนเริ่มจากการละลายพอลิเมอร์ในตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งพอลิเมอร์จะเกิดการคลายสาย จากนั้นใส่ซอลเวติ้งเอเจนต์ เช่น ไอโซโพพานอล หรือ เอทานอล ลงไป (ในกรณีที่ตัวทำละลายพอลิเมอร์คือน้ำ) จากนั้นพอลิเมอร์ที่กระจายตัวอยู่จะเกิดการรวมตัวเชื่อมต่อ (cross linked) ระหว่างอนุภาค เนื่องจากตัวทำละลายที่เติมลงไปนั้นเกิดการสร้างพันธะกับน้ำแทนที่พอลิเมอร์ ซึ่งจะเป็นการเหนี่ยวนำพอลิเมอร์เกิดการรวมตัวกันเอง เมื่อถึงจุดเหมาะสมของสารจะเกิดลักษณะขุ่น และเกิดเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในรูปแบบอนุภาคนาโน (Grzelczak *et al.,* 2010; Yi *et al.,* 2006)

รูปแบบอนุภาคและขนาดของอนุภาคนาโนจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะการเตรียม เช่น ปริมาณพอลิเมอร์ ค่าพีเอช ความแข็งแรงไอออนิก ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุล(cross-linking) ความเร็วรอบการกวนขณะทำการดีซอลเวชัน ปริมาณดีซอลเวติ้งเอเจนต์ (desolvating agent) (Coester *et al.,* 2000)



ภาพที่ 2.7 การห่อหุ้มสารโดยใช้วิธีการดีซอลเวชัน (Desolvation process)

ที่มา: Thrhini และคณะ (2017)

2.2.4 สารที่ใช้ในการห่อหุ้มอนุภาคนาโน

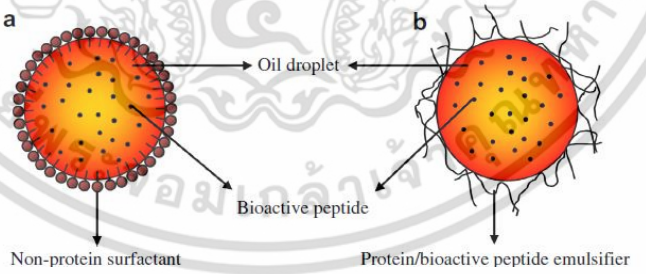
การนำสารที่นำมาใช้เป็นวัสดุหุ้มในการทำเอนแคปซูเลชัน วัสดุห่อหุ้มที่เลือกใช้จะมีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายของสารภายใน และความเสถียรของผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นสารที่จะนำมาห่อหุ้มต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ อาทิเช่น สภาวะที่ใช้ในขั้นตอนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนแคปซูเลต ตัวสารเคลือบที่ใช้ในการเอนแคปซูเลตจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารภายในโครงสร้างทางเคมี (chemical structure) ความมีขั้ว (polarity) ความสามารถในการระเหย (volatility) ปกป้องสารจากสภาวะแวดล้อม มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดความเสถียร และสามารถควบคุมการปลดปล่อย ภายใต้สภาวะและช่วงเวลาที่ต้องการ (Shahidi and Han, 1993)

สารที่เลือกใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มในกระบวนการเอนแคปซูเลชัน จะมีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายในสารละลาย และความเสถียรของผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นสารที่จะนำมาห่อหุ้มต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ อาทิเช่น สภาวะที่ใช้ในขั้นตอนการเอนแคปซูเลต ตัวสารเคลือบที่ใช้ในการเอนแคปซูเลตจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารสำคัญ สามารถปกป้องสารจากสภาวะแวดล้อม มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดความเสถียร และสามารถควบคุมการปลดปล่อยภายใต้สภาวะและช่วงเวลาที่ต้องการ (Shahidi and Han, 1993)

วัสดุหุ้มในการทำเอนแคปซูเลชันมักเป็นไบโอพอลิเมอร์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ถูกสร้างขึ้นและคัดแยกมากจากเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นวัสดุที่มีความปลอดภัยต่อการใช้งานในการนำมาเป็นวัสดุในการขนส่งสารทางเภสัชกรรม และการแพทย์ การใช้ไบโอพอลิเมอร์จะแบ่งเป็น 2 ชนิด (1) พอลิแซคคาไรด์ (เช่น ไคโตซาน ไฮยาลูโรนิค เดร็กเทรน เซลลูโลส พลูแลน คอนดรอยตินซัลเฟต อัลจิเนต) และ (2) โปรตีน (เช่น คอลลาเจน เจลาติน ไกลอะดิน อัลบูมิน เวย์โปรตีน) ทั้ง 2 กลุ่มมีลักษณะเป็นไฮโดรฟิลลิค เป็นสารชีวภาพที่เข้ากันได้ และเสื่อมสลายทางชีวภาพได้



ภาพที่ 2.8 วัสดุห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

(a) วัสดุห่อหุ้มที่ไม่ใช่โปรตีน (b) วัสดุห่อหุ้มที่เป็นโปรตีน

ที่มา: Adjonu และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3. การผลิตอนุภาคนาโนจากเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธการดีซอลเวชัน

2.3.1. โครงสร้างเวย์โปรตีน

เวย์โปรตีน เป็นผลพลอยได้จากการทำเนยแข็ง หลังจากแยกโปรตีนเคซีน และไขมัน นำมาผ่านกระบวนการทำให้แห้ง เพื่อให้ได้เป็นโปรตีนบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปผง โครงสร้างเวย์โปรตีนประกอบด้วย 4 โปรตีนหลัก คือ เบต้า-แลคโตกลอบูลิน (β-lactoglobulin), แอลฟ่า-แลคตาบูมิน (α-lactalbumin), เซรัมอะบูมิน (serum albumin) และ อิมมูโนกลอบูลิน (immunoglubins) ซึ่งมีสัดส่วนเป็น 50, 20, 10, และ 10 เปอร์เซ็นต์ของเวย์โปรตีนตามลำดับ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 162 ชนิด มีหมู่ไธออลอิสระหนึ่งหมู่ และมีสองพันธะไดซัลไฟต์ (Jovanovic *et al.,* 2007; Santos *et al.,* 2012) โดยโปรตีนเหล่านี้จะมีลักษณะเป็นโปรตีนก้อนกลม (globular protein) (ไวต่อการเสียสภาพจากความร้อน) ในโครงสร้างระดับทุติยภูมิและตติยภูมิประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งกรดอะมิโนที่แสดงสมบัติกรดและเบส (มีประจุ) และกรดอะมิโนที่แสดงลักษณะไฮโดรฟิลิคและไฮโดรโฟบิค (มีขั้วและไม่มีขั้ว) ซึ่งการกระจายตัวของกรดอะมิโนเหล่านี้จะทำให้เกิดความสมดุลภายในโครงสร้างโปรตีน (Smilowitz *et al.,* 2005) การพัฒนารูปแบบของการเกิดปฏิสัมพันธ์ของระหว่างโครงสร้างของโปรตีนกับโปรตีน (Protein–protein interactions) (ที่เกิดจากสารเคมีและทางกายภาพ) จะขึ้นอยู่กับรูปแบบการรวมตัว (aggregation mechanisms) และชนิดของโปรตีนที่เกิดการรวมตัว (types of protein aggregates) โดยการรวมตัวของโปรตีนกับโปรตีนจะส่งผลต่อระดับโครงสร้างทั้งลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ความสามารถในการรวมตัวกัน (binding capability) และการเกิดฟังก์ชันการทำงาน (functionality) ซึ่งจะส่งผลต่อขนาด และความคงตัวของอนุภาคนาโนที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบและลักษณะของเวย์โปรตีนไอโซเลต

เวย์โปรตีนไอโซเลต	มวลโมเลกุล (kDa)	ค่า pI	อุณหภูมิเสียสภาพ (เซลเซียส)	จำนวนกรดอะมิโน
ทั้งหมด	-	-	-	-
b-lactoglobulin	18.3	5.2	71.9	162
a-Lactalbumin	14.2	4.8	64.3	123
Immunoglobulins	150-900	5.5-6.8	-	-
Bovine serum Albumin	66.4	4.7-4.9	72.0-74.0	583
Proteose peptones	<12	3.3-3.7	-	-
Lactoferrin	80.0	8.0-8.5	70.0	700

ที่มา: Ramos และคณะ (2015)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 แรงพันธะในโครงสร้างเวย์โปรตีน

การควบคุมเสถียรภาพของโปรตีนเป็นสิ่งสำคัญในการออกแบบและควบคุมปฏิสัมพันธ์ของโมเลกุลทางชีววิทยาที่ซับซ้อน โดยเวย์โปรตีนสามารถมีปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลชนิดต่างๆ โดยจะสร้างแรงพันธะระหว่างโปรตีน ซึ่งจะอธิบายถึงแรงพันธะที่หลากหลายดังต่อไปนี้ (Bryant and McClements, 1998; Nicolai *et al.,* 2011; Edwards and Jameson, 2014) ได้แก่ แรงประจุทางไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interactions) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และพันธะไดซัลไฟล์(disulphide) การเกิดไฮเดรชั่น (hydration) และแรงจากไฮโดรโฟบิค (hydrophobic effects) โดยแรงเหล่านี้เป็นแรงที่กำหนดความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนในระดับชั้นตติยภูมิ ทั้งในโครงสร้างโปรตีนปกติหรือการเกิดปฏิสัมพันธ์กับโครงสร้างอื่นๆ (de la Fuente *et al.,* 2002; Nicolai *et al.,* 2011)

โดยปกติแล้วการรวมตัวโมเลกุลขนาดใหญ่อย่างเวย์โปรตีน ภายในโครงสร้างจะเกิดการรวมตัวจาก sulphydryl กับ disulphide ปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนพันธะนำไปสู่การก่อตัวของโมเลกุลเป็นพันธะไดซัลไฟล์ (ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์) (Sawyer, 1968; Shimada and Cheftel, 1989; Hoffmann and van Mil, 1997) อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ของเวย์โปรตีนภายในโครงสร้างก็มี เช่นกัน ทั้งพันธะไอออนิค (ionic), แรงอิเลคโตสแตติค (electrostatic), แรงแวนเดอร์วาลว (van der Waals) และ แรงไฮโดรโฟบิค (hydrophobic) ก็มีส่วนร่วมต่อบทบาทที่สำคัญการรวมของเวย์โปรตีน (de la Fuente *et al.,* 2002; Nicolai *et al.,* 2011)

2.3.2.1 แรงจากพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (Noncovalent bonds)

แรงจากพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ มักจะมีปฏิสัมพันธ์ที่ย้อนกลับได้และค่อนข้างอ่อนแอ แต่เมื่ออยู่ในระดับการรวมตัวที่เยอะขึ้น จะทำให้มีอิทธิพลต่อการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลโปรตีนได้ปัจจัยทางเคมีที่ส่งผลต่อแรงพันธะเหล่านี้ ได้แก่ ค่าพีเอชใกล้จุด isoelectric (pI) หรือความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้น (Hoffmann and van Mil, 1997; Karshikoff, 2006)

แรงอิเลคโตสแตติค (Electrostatic interactions) มีผลมาจากค่าพีเอช และความแข็งแรงของไอออนิกของสารละลายที่ล้อมรอบอนุภาคโปรตีน จะส่งผลต่อการรักษาความคงตัวของโปรตีนก้อนกลม (globular proteins) (Kinsella and Whitehead, 1989) การปรับค่า pH ให้เป็น pI และ / หรือเพิ่มไอออน ขนาดและช่วงของการเกิดปฏิสัมพันธ์จะลดลงเกิดจากการไปลด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าอิเล็กโตรไลต์จากแรงอิเล็คโตสแตติค ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากโมเลกุลอิเล็กตรอนที่ล้อมรอบอะตอมกลาง (Counter ions) (Kitabatake *et al.,* 2001)

พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bonds) ถึงจะมีผลต่อการรวมของเวย์โปรตีนที่เกิดขึ้น แต่ก็ไม่ได้เป็นแรงที่สำคัญในการกำหนดรูปแบบการรวมตัวกันของโปรตีนก้อนกลม (globular proteins) (Croguennec *et al.,* 2004) โดยพบว่าการใช้ความร้อนหรือความดัน อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนห่วงโซ่เปปไทด์กางออก เกิดการแสดงส่วนไฮโดรโฟบิคออกมา หรือ เกิดการแสดงส่วนพันธะไฮโดรเจนที่นำไปสู่การรวมตัวของโมเลกุลโปรตีนได้

ปฏิสัมพันธ์ภายในโครงสร้างระหว่างโมเลกุลไฮโดรโฟบิค (Intermolecular hydrophobic interactions) ปฏิสัมพันธ์ภายในโครงสร้างระหว่างโมเลกุลไฮโดรโฟบิค มีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลิน ถึงแม้ว้าโครงสร้างเบต้า-แลคโตกลอบูลิน โดยปกติพื้นผิวโมเลกุลจะมีลักษณะเป็นไฮโดรฟิลลิก(ชอบน้ำ) แต่ภายในโครงสร้างยังมีหมู่อะมิโนที่ไม่มีขั้วอยู่มาก จะเกิดการเข้าจับกันเองได้ของโครงสร้างโปรตีน (Nicolai *et al.,* 2011) เมื่อมีการเติมตัวทำละลาย หรือมีการให้ความร้อน ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญในการรวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีน

ปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (Hydration interactions) ช่วยป้องกันโมเลกุลโปรตีนเกิดการรวมตัวกันเอง ทำให้เกิดแรงผลักกันระหว่างโมเลกุล ช่วงระยะทางการเกิดแรงผลักภายในโมเลกุลโปรตีนที่มากขึ้นจะเกิดจากระดับไฮเดรชั่นที่สูงขึ้น (Edwards and Jameson, 2014)

ปฏิสัมพันธ์ภายในโครงสร้างระหว่างโมเลกุลสเตอริค (Steric interactions) จะเกิดการรวมตัวของสารละลายโปรตีน 2 รูปแบบด้วยกัน คือจะเกิดการผลักกันมากระหว่างโมเลกุลของอะตอม หรือ โมเลกุลเกิดการแยกตัวกันเล็กน้อยจากการซ้อนทับของโมเลกุลอิเล็กตรอน ซึ่งการซ้อนทับนี้ สามารถใช้ดูแนวโน้มขนาดและรูปร่างการรวมตัวกันของโมเลกุลโปรตีนได้ (Edwards and Jameson, 2014)

ปฏิสัมพันธ์ภายในโครงสร้างระหว่างโมเลกุลด้วยแรงแวนเดอวาลล์ (Van der Waals interactions) แรงแวนเดอวาลล์จะมีผลต่อการดึงดูดโมเลกุลโปรตีนให้เกิดการรวมตัวกัน (การคลายสายหรือไม่คลายสายของโครงสร้างโปรตีน) แต่ก็มีบทบาทเพียงเล็กน้อยต่อการรวมตัวของอนุภาคโปรตีน อย่างไรก็ตามหากโมเลกุลโปรตีนมีขนาดใหญ่เพียงพอในการเป็นอนุภาคคอลอยด์ได้ และการผสมไบโอพอลิเมอร์อื่นกับโมเลกุลโปรตีนแล้วทำให้เกิดความคงตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของที่เพิ่มขึ้น นั้นจะเกิดจากแรงแวนเดอวาลล์ (Bryant and McClements,1998 ; Nicolai *et al.,* 2011)

2.3.2.2 แรงจากพันธะโควาเลนต์ (Covalent bonds)

เป็นที่รู้จักกันดีอยู่แล้วว่าความคงตัวของโครงสร้างโปรตีนเกิดจากพันธะไดซัลไฟล์(disulphide bonds) โดยการไปลดค่าเอนโทรปีจะทำให้เกิดการเสียสภาพโปรตีน การทำพันธะระหว่าง หมู่ซัลไฮดริล และหมู่ซัลไฟต์ จะเกิดการเชื่อมต่อจากพันธะไดซัลไฟล์ (จะอยู่ในบริเวณ b-Lg และ a-La) มีผลต่อการรวมตัว(aggregation processes) ของโมเลกุลโปรตีน (Shimada and Cheftel,1989)

2.3.3 การห่อหุ้มอนุภาคนาโนด้วยเบต้าแลคโตกลอบูลิน

เบต้าแลคโตกลอบูลิน (Beta-lactoglobulin) เป็นองค์ประกอบหลักของเวย์โปรตีน และสามารถใช้ในการขนส่งสารอาหารต่างๆ โดยเบต้าแลคโตกลอบูลินสามารถต้านทานการย่อยจากสภาวะในกระเพาะอาหาร โดยวิธีการจะนำเบต้าแลคโคกลอบูลินมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้สามารถห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ การห่อหุ้มและคุณสมบัติของเบต้าแลคโตกลอบูลิน จะมีความสัมพันธ์มาจากลักษณะโครงสร้างของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีการใช้เบต้าแลคโตกลอบูลินอย่างเดียวหรือรวมเบต้าแลคโตกลอบูลินกับพอลิเมอร์อื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการขนส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

โดยทั่วไปแล้วประสิทธิผลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ มีความสามารถในการดูดซึมต่ำ ซึ่งเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความรุนแรงในช่วงการแปรรูปอาหาร (ความร้อน ออกซิเจน แสง ฯลฯ) ความไม่แน่นอนในระบบทางเดินอาหารทางเดินอาหาร (GI) (ค่า pH, เอนไซม์, สารอาหารอื่นๆ) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จะใช้วิธีการเอนแคปซูเลชันด้วยวิธีการต่าง เพื่อปกป้องและขนส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้ถึงเป้าหมาย วัตถุประสงค์หลักของการเอนแคปซูเลชันของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อ (1) ป้องกันสารความสำคัญที่มีความไม่เสถียรหรือสามารถสูญสลายได้ง่ายจากสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น การเปลี่ยนแปลงสภาวะทางเคมี (ออกซิเจน, กรด, ฯลฯ) และแสง (2) การควบคุม bioaccessibility และการดูดซึมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ห่อหุ้ม (3) ขนส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไปยังเป้าหมาย โดยเฉพาะภายในสิ่งมีชีวิต โดยรูปแบบและระบบการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อปกป้อง สารโพลีฟีนอล, สารสกัดจากสมุนไพรสารอาหารวิตามิน(วิตามิน, เกลือแร่, น้ำมันปลา, เปปไทด์, ฯลฯ) และโปรไบโอติก /จุลินทรีย์ (แลคโต, bifidobacteria) ในระบบอาหาร

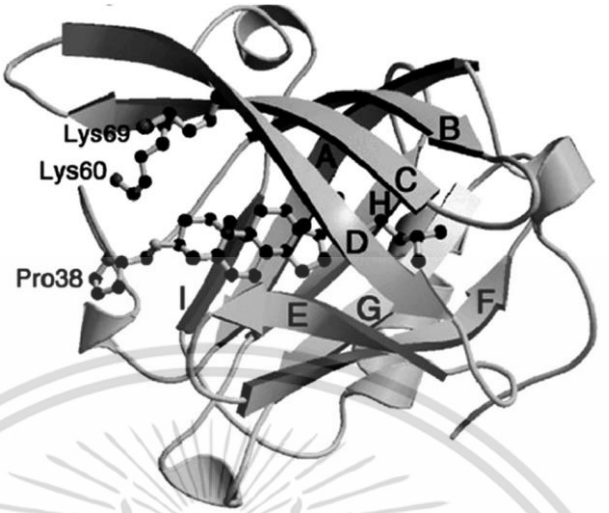
ในบรรดาวัสดุที่นำมาศึกษาใช้เป็นวัสดุในการเอนแคปซูลเลชัน โปรตีนมความน่าสนใจอย่างกว้างขวาง โดยโปรตีนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีลักษณะเป็น amphiphilic ซึ่งมีความสามารถในการทำปฏิสัมพันธ์ทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและตัวทำละลาย นอกจากนี้ความเป็นธรรมชาติของโปรตีนแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษต่ำและสามารถย่อยสลายทางชีวภาพที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ โดยเฉพาะคุณสมบัติการทำงานของโปรตีนทั้งเป็นอิมัลซิไฟเออร์ มีคุณสมบัติการก่อเจล มีความยืดหยุ่น มีคุณลักษณะที่หลากหลาย ซึ่งเหมาะสมสำหรับการใช้งานในรูปแบบที่แตกต่างกัน เบต้าแลคโตกลอบูลินเป็นเวย์โปรตีนที่สำคัญในนมวัว ซึ่งมีข้อดีหลายอย่าง เช่น มีบริเวณเกาะกับสารอาหารธรรมชาติ เพิ่มความสามารถละลายน้ำได้ และความต้านทานต่อการย่อยในระบบกระเพาะอาหาร ซึ่งทั้งหมดนี้ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถเพิ่มการดูดซึมสารอาหารได้

มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในโครงสร้างและทางเคมีกายภาพของเบต้าแลคโตกลอบูลิน โดยเบต้าแลคโตกลอบูลินจัดอยู่ในกลุ่มของ lipocalin ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ในการขนส่งสารอาหารเข้าสู่ร่างกาย และมีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิค มีการรายงานว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถเกาะกับเบต้าแลคโตกลอบูลินได้ ซึ่งเคยมีการศึกษาทั้งใน เรตินอล วิตามินดี กรดไขมัน สารประกอบฟีนอลิค และคอลเลสเตอรอล โดยจะเกาะอยู่สองบริเวณ ดังในภาพที่2.8 ด้วยแรงทางพันธะ ทั้งพันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟบิค และแรงแวนเดอร์วาลล์

ประโยชน์ของโปรตีนเป็นที่นำมาเป็นวัสดุห่อหุ้มมีประสิทธิภาพมากกว่าพอลิแซกคาร์ไรด์ และโพลิเมอร์สังเคราะห์ โดยหน้าที่การทำงานของโครงสร้างโปรตีนมีดังนี้ โครงสร้างมีความยืดหยุ่น (ซึ่งหมายถึงความสามารถในการเอนแคปซูลเลชันสารในรูปแบบต่างๆ) สามารถทำงานครอบคลุมหมู่ฟังก์ชันได้หลายกลุ่ม (ซึ่งแสดงให้เห็นการทำปฏิสัมพันธ์ทางเคมีที่เข้ากันง่ายกับสารชนิดต่างๆ) มีลักษณะเป็น amphiphilic จากธรรมชาติ (ซึ่งบ่งบอกถึงการมีปฏิสัมพันธ์ในการเก็บกักสาร) และการย่อยสลายทางชีวภาพ มีการเทียบความเป็นไฮโดรโฟบิคกับโปรตีนชนิดอื่นๆ เช่น เซอีน (zein) และ กลูเตน พบว่าเบต้าแลคโตกลอบูลินมีความสามารถในการละลายของในช่วง พีเอช และ ionic strengths ที่กว้างกว่า และถ้าหากกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(53.4% อัตราส่วนโมล) ก็ไม่อาจห่อหุ้มออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นไฮโดรโฟบิคให้มีประสิทธิภาพสูงได้



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินที่ถูกเกาะด้วยคอเลสเตอรอล

ที่มา: Teng และคณะ (2015)

นอกจากนี้เบต้าแลคโตกลอบูลิน มีสองคุณสมบัติที่สำคัญ หนึ่งคือสามารถต้านทานกับน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจากเอนไซม์เปปซิน (pepsin) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่สามารถย่อยโปรตีนได้ โดยเอนไซม์เปปซินมีลักษณะการทำงานที่สำคัญ 3 ส่วน คือ 1) เปปซินจะย่อยโปรตีนส่วนพันธะเปปไทด์บริเวณโปรตีนไฮโดรโฟบิค อย่างไรก็ตามสภาวะการย่อยบริเวณพันธะเปปไทด์ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของสภาพขั้ว และประจุของกรดอะมิโน 2) พบว่าหากเบต้าแลคโตกลอบูลินมีโปรตีนสายเบต้า (B-sheet) มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ จะลดความสามารถในการย่อยกับเอนไซม์เปปซินได้ โดนจะลดการเข้าจับกันสับเสตรด 3) มีบริเวณพันธะไดซัลไฟด์สองตำแหน่ง (Cys82–Cys176 และ Cys122–Cys135/137) ที่ถูกเอนไซม์ย่อยให้เกิดการคลายสายส่งผลต่อความคงตัวต่อสายโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลิน และคุณสมบัติที่สองเบต้าแลคโตกลอบูลินจะถูกย่อยอย่างช้าๆด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ในลำไส้เล็ก จากทั้งสองคุณสมบัติในระบบการย่อยอาหาร ทำให้เบต้าแลคโตกลอบูลินเป็นที่น่าสนใจในการนำมาเป็นวัสดุในการเอนแคปซูเลชันสำหรับควบคุมการปลดปล่อยของสารอาหาร (nutraceuticals labile) หรือยาในระบบทางเดินอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 ปัจจัยสำหรับการออกแบบการห่อหุ้มสารด้วยเบต้าแลคโตกลอบูลิน

มีหลากหลายปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยปัจจัยเหล่านี้มีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องร่วมกันในการสร้างเมทริกซ์ในการห่อหุ้มสาร ซึ่งปัจจัยนั้น ได้แก่ ลักษณะของสารสำคัญที่นำมาห่อหุ้ม(พื้นผิวของสารสำคัญ) และสภาวะการผลิตอนุภาคนาโน (คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ) จะมีผลต่อการทำปฏิสัมพันธ์ซึ่งสรุปดังตารางที่ 2.6

ความสามารถในการห่อหุ้มสาร (Loading capacity) มีผลมาจากอัตราส่วนน้ำหนัก (โมลาร์) ระหว่างสารที่ถูกเก็บกักและวัสดุห่อหุ้มส่งผลต่อการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างเมทริกซ์ของสารประกอบกับวัสดุห่อหุ้ม โดยวัสดุห่อหุ้มมีแนวโน้มที่จะดึงดูดประจุตรงข้ามด้วยแรงอิเลคโทรสแตติก แรงไฮโดรโฟบิค รวมตัวเป็นเมทริกซ์ในการห่อหุ้มสาร นอกจากนี้ยังมีค่าพารามิเตอร์จากสภาวะแวดล้อม เช่นค่า pH, ความแข็งแรงของอิออน และอุณหภูมิ ก็มีผลกระทบต่อชนิดและขนาดของแรงในการเกิดปฏิสัมพันธ์กันของโครงสร้างเมทริกซ์ ดังนั้นเพื่อให้เกิดความสามารถในการห่อหุ้มสาร ที่เหมาะสมสำหรับออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ต้องคำนึงถึงการเลือกวัสดุห่อหุ้มให้เหมาะสมและเพียงพอต่อการเกิดเมทริกซ์ร่วมกับสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม

ความคงตัวในการกระจายตัวเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมของสารอาหาร โดยมีผลมาจากแรงดึงดูด และแรงผลักของปฏิสัมพันธ์ในการขนส่งสารอาหาร โดยแรงพันธะที่เกี่ยวข้องที่เกิดแรงดึงดูดกันระหว่างอนุภาค ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอวาลล์ แรงไฮโดรโฟบิค และแรงดึงดูดอิเล็กโทรสแตติก และพันธะที่เกิดแรงผลักกันระหว่างอนุภาค แรงผลักอิเล็กโทรสแตติก และหมู่สเตอริค นอกจากนี้ยังมีบริเวณที่แสดงลักษณะความเป็นไฮโดรโฟบิค (เช่น หมู่อะโรมาติกของกรดอะมิโน) บริเวณที่แสดงลักษณะความเป็นไฮโดรฟิลิค (เช่น หมู่ –OH และ $–NH_2$) เป็นส่วนสำคัญในการความคุมความเป็นไฮโดรโฟบิคหรือการทำพันธะไฮโดรเจนของโครงสร้างโปรตีน ประจุที่พื้นผิวอนุภาคโปรตีนมีบทบาทที่สำคัญแรงผลัก และแรงดึงดูดบนพื้นผิวอนุภาค โดยค่าพารามิเตอร์ที่ใช้วัดความคงตัวของอนุภาคคือ ค่าศักย์ซีต้า (zeta potentials) ควรมีค่ามากกว่า 30 มิลลิโวตต์ และน้อยกว่า 30 มิลลิโวตต์ แสดงถึงความคงตัวของอนุภาคที่กระจายตัว ซึ่งเกิดจากแรงผลักอิเลกโทรแตติกระหว่างอนุภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 ข้อคำนึงในการเลือกใช้วัสดุห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

คุณสมบัติ	ลักษณะรายละเอียด	ปัจจัยที่มีผล
ความสามารถในการห่อหุ้มสาร (Loading capacity)	น้ำหนัก (โมลาร์) อัตราส่วนระหว่างสารที่ถูกเก็บกักและ วัสดุห่อหุ้ม แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการห่อหุ้ม	แรงพันธะของปฏิสัมพันธ์ระหว่างการเกิดเมทริกซ์ของสารประกอบกับวัสดุห่อหุ้ม (แรงอิเลคโทสแตติก แรงไฮโดรโฟบิค พันธะไฮโดรเจน แรงแวนเดอวาลส์ , ฯลฯ)
ความคงตัวและการกระจายตัว (Dispersion stability)	ความคงตัวกับการตกตะกอน ก่อให้เกิดความสามารถในการละลายและดูดซึมในการเก็บกักสาร	แรงประจุไฟฟ้า แรงไฮโดรฟิลิค และหมู่สเตอริค (steric) บนพื้นผิวอนุภาค
การควบคุมการปลดปล่อยสาร (Controlled release)	เวลาในการปลดปล่อยสาร การสัมผัสกับสิ่งเร้าบางอย่าง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการขนส่งสาร	พอลิเมอร์หรือหมู่ฟังก์ชันที่เหมาะสมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมบางอย่าง (เช่น pH หรือ เอนไซม์)
พอลิเมอร์ที่สามารถยึดเกาะเซลล์ mucus (Mucoadhesion)	การยึดติดกับเยื่อบุในทางเดินอาหารทางเดิน ก่อให้เกิดการดูดซึมของสารที่ถูกกักเก็บไว้ได้	ประจุบวกบนพื้นผิวอนุภาค; ปนิมาณพันธะไฮโดรเจนที่มากจะรวมกลุ่มกัน (เช่น หมู่ไฮดรอกซิล)
ระยะเวลาที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร (Prolonged circulation)	การยืดระยะเวลาที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ลดการสูญเสียของการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	หมู่ Steric หรือ พอลิเมอร์ที่คล้ายคลึงธรรมชาติ (biomimetic polymers) เกาะอยู่บนพื้นผิวอนุภาค
การดูดซึมเข้าสู่เซลล์ (Cellular uptake)	การขนส่งสารในระดับเซลล์ ขั้นตอนที่ดีที่สุดสำหรับการขนส่งสาร	ลดขนาดของระบบการจัดส่งนั้น จากประจุบวกบนพื้นผิวอนุภาค การมีค่าไฮโดรโฟบิคบนพื้นผิวสูง

ที่มา: Teng และคณะ (2015)

ต่อมาเป็นคุณสมบัติควบคุมการปลดปล่อยสาร ในตำแหน่งหรือระยะเวลาที่ต้องการ โดยปกติแล้วเมทริกซ์ของสารอาหารมีผลต่อระดับการควบคุมการปลดปล่อยสาร เช่น วัสดุที่นำมาห่อหุ้มอาจจะถูกย่อยได้โดยง่ายจากกรดและเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร เป็นผลให้สารอาหารที่ถูกกักเก็บอาจสูญสลายไปจากการเจอสภาวะกรดรุนแรงจากกระเพาอาหาร ดังนั้นวัสดุห่อหุ้มที่เหมาะสมสำหรับห่อหุ้มสารอาหาร ควรรักษาสามารถป้องกันและกักเก็บสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากการรั่วไหลในสภาวะกระเพาะอาหาร จนกว่าจะถึงลำไส้เล็ก และอวัยวะที่สำคัญสำหรับการดูดซึมสารอาหาร โดยสารอาหารที่ห่อหุ้มควรจะปล่อยออกมาในช่วงนี้การบริโภคสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะถูกดูดซึมเข้าสู่การไหลเวียนของระบบในลำไส้เล็ก mucin เป็นประจุลบไกลโคโปรตีนที่ล้อมรอบเซลล์ลำไส้เล็กเป็นชั้นเหมือนเจลและทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะในการดูดซึมสารอาหาร ระหว่างวัสดุห่อหุ้มและเมือก mucoadhesion จึงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการดูดซึม

ระบบที่มีเบต้าแลคโตกลอบูลินห่อหุ้ม การเลือกวัสดุห่อหุ้มที่เหมาะสมและเทคนิคการห่อหุ้มเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการรวมตัวและการขนส่งสารไปยังเป้าหมาย ข้อดีของเบต้าแลคโตกลอบูลินที่นำมาใช้ สรุปเกี่ยวกับวิธีการผลิตอนุภาคจากเบต้าแลคโตกลอบูลิน ในตารางที่ 2.6 การผลิตอนุภาคนาโน การเกิดโมเลกุลเชิงซ้อน ซึ่งเกิดจากการรวมกันของบริเวณลิแกนด์ของโปรตีนอนุภาคนาโนเกิดการจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนและการรวมตัวกันของโมเลกุลออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เมื่อเทียบกับโมเลกุลเชิงซ้อนอนุภาคนาโนจะแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง (100-200 นาโนเมตร) และ ความสามารถในการห่อหุ้มสารจะสูงมาก โดยงานวิจัย Maux และ คณะ 2016 ได้เอนแคปซูเลชันกรดไขมัน linoleate เกิดการแสดงบริเวณไฮโดรโฟบิคจากโครงสร้างเปบไทด์ในเบต้าแลคโตกลอบูลินในการฟอร์มอนุภาค ซึ่งการคลายสายส่งผลต่อประสิทธิภาพการรวมตัวของอนุภาคนาโนเบต้าแลคโตกลอบูลินในการขนส่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นไฮโดรโฟบิค โดยโครงสร้างอนุภาคนาโนที่เกิดจากโปรตีน จะสามารถป้องกันการย่อยสลายได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับระบบอื่นๆ เมื่อเทียบกับ polysaccharides ซึ่งมีอนุภาคขนาดใหญ่ เปรียบเทียบเบต้าแลคโตกลอบูลินที่มีขนาดทที่เล็ก และมีความหยืดหยุ่นมากกว่า สามารถรวมมาก เกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคทรงกลมอย่างรวดเร็ว ทำให้อนุภาคมีขนาดเล็กลงและมีประสิทธิภาพการกักเก็บมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 วิธีการผลิตอนุภาคนาโนในรูปแบบต่างๆที่ใช้เบต้าแลคโตกลอบูลินเป็นวัสดุห่อหุ้มสารสำคัญ

ระบบการขนส่ง	วิธีการเตรียมอนุภาค	ขนาดอนุภาค	สารที่ถูกนำมาห่อหุ้ม	ข้อดี	ข้อเสีย
Molecular complex	การผสมและการบ่ม	อนุภาคนาโนหลายขนาด	ฟีนอล กรดโฟลิค และกรดไขมัน	ขั้นตอนง่ายๆที่ไม่มีสารเคมีที่เป็นพิษ ต้านทานน้ำย่อยจากBLG ขนาดเล็กมีความโปร่งใส	ประสิทธิภาพการกักเก็บต่ำ เกิดการเปลี่ยนแปลงได้งานจากสภาวะแวดล้อม
Nanoparticles	ดีซอลเวชัน, ความร้อนและแรงดันสูงโฮโมจีไนซ์	50–200 nm	เคอคูมิน ฟีนอล กรดไขมัน อัลฟ่า-โทโคเฟอรอล	โครงสร้างขนาดเล็ก สามารถขนส่งสารได้ทั้ง lipo- และ hydro- philic	มีอินทรีย์ตัวทำละลาย (desolvation); ประจุบนพื้นผิวต่ำ การสลายตัวในระบบทางเดินอาหาร
Nanoemulsion	โฮโมจีไนซ์	50–200 nm	เบต้าแคโรทีน เคอคูมิน	ผลิตภัณฑ์โปร่งใส ขนส่งสาร lipophilic ได้	ลักษณะเทอร์โมไดนามิกที่ไม่เสถียร ไม่สามารถใช้กับสารประกอบที่มีขั้วได้ เกิดความไม่คงตัว การเจือจาง, การอบแห้ง, และสารลดแรงตึงผิวในระบบทางเดินอาหาร
Gel	ตัวทำละลายอินทรีย์หรือชักนำด้วยแรงไอออนิก	โครงร่างโปรตีน	อัลฟ่า-โทโคเฟอรอล ไอออนเหล็ก	มีประสิทธิภาการกักเก็บสูง	เกิดเป็นช่องขนาดใหญ่ การป้องกันที่ไม่ดี เกิดลักษณะที่บวมน้ำ

ที่มา: Teng และคณะ (2015)

2.3.5 สภาวะทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อรวมตัวเป็นอนุภาคนาโน

มีการศึกษาถึงกลไกการสร้างเวย์โปรตีนในการรวมตัวเป็นอนุภาคนาโน โดยใช้การรวมตัวในรูปแบบ bottom up จนเกิดเป็นอนุภาคได้ในขนาด 40 นาโนเมตร อนุภาคนาโนจากเวย์โปรตีนที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลมาจากค่าพารามิเตอร์ของกระบวนการสร้างอนุภาคนาโน (Leclerc *et al.,* 2005) ผลของอนุภาคจะเกิดการรวมตัวจากปริมาณแคลเซียมไอออนต่ำกับอุณหภูมิของสารละลายเวย์โปรตีนที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่ทำให้เบต้ากาแลคโตบูลินเสียสภาพ ผลการทดลองได้วัดขนาดค่าศักย์ซีต้าอยู่ที่ -25 มิลลิโวลต์ ซึ่งการมีประจุที่พื้นผิวสูงมีความสัมพันธ์ต่อการกระจายตัว และความคงตัวในการเก็บรักษา โดยพบว่าการรวมตัวของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีน เกิดจากแรงพันธะต่างๆ ทั้งพันธะโควาเลนต์ พันธะไฮโดรเจน แรงไฮโดรโฟรบิคจากภายในโครงสร้าง และแรงแวนเดอรวาลล์ การทดลองได้มีการตรวจติดตามผลของการสร้างพันธะในโครงสร้างโปรตีน โดยการเติม $CaCl_2$ (เพื่อศึกษาแรงจากอิเลคโตสแตติค) เติมยูเรีย (เพื่อศึกษาความไม่คงตัวของโครงสร้างโปรตีนจากแรงของพันธะไฮโดรเจน) เติม SDS (เพื่อบล็อกการเกิดพันธะกับหมู่ไฮโดรโฟบิค) และเติม 2-mecaptoethanol (เพื่อป้องกันการเกิดพันธะไดซัลไฟล์) จากตรวจติดตามการฟอร์มตัวของอนุภาคจากค่าความขุ่นที่ 480 นาโนเมตร จากผลการศึกษากลไกการรวมตัวกันของเบต้ากาแลคโตบูลินมาจากการเติมแคลเซียม หรือการเกิดพันธะไดซัลไฟล์จากการสังเกตการณ์ดังกล่าวกลไกส่วนใหญ่ที่นำไปสู่การก่อตัวของ nanoaggregates เกิดจากแรงอิเล็กโตรสแตติกระหว่างโปรตีนและแคลเซียม ส่วนแรงไฮโดรโฟรบิคมีผลต่อการรวมตัวระหว่างสายโครงสร้างโปรตีน ส่วนพันธะไดซัลไฟด์มีผลต่อการรวมตัวของโปรตีนภายในโครงสร้างโปรตีนเอง นอกจากปัจจัยทางเคมีและทางกายภาพของการทดลองนี้แล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการรวมตัวของอนุภาคเวย์โปรตีนอีก (Chen *et al.,* 2006)

ผลของพีเอช การกระจายตัวของประจุบนพื้นผิวโครงสร้างโปรตีนมักขึ้นอยู่กับพีเอช ซึ่งพีเอชเป็นค่าพารามิเตอร์ที่ส่งผลต่อทั้งระดับการคลายสายภายในโมเลกุลโปรตีน และส่งผลต่อการรวมตัวกันของโปรตีน-โปรตีนภายในโมเลกุล ดังนั้นค่าพีเอชกับแรงไฮโดรโฟบิคเป็นตัวแปรสำคัญ ต่ออัตราการรวมโปรตีนและความคงตัวของอนุภาคนาโน (Bryant and McClements,1998; Ramos *et al.,* 2012) โดยการรวมตัวของอนุภาคโปรตีนต้องมีการรักษาสมดุลระหว่างค่าพีเอชและความแรงของไอออนในสารละลายเวย์โปรตีน โดยการรวมตัวภายในโครงสร้างจะเกิดจากแรงอิเล็คโตสแตติค ที่สภาวะไอออนิคต่ำ ค่าพีเองควรจะมีค่างห่างจาก pI เพราะ pH อยู่ในช่วงของค่า pI จะเร่งอัตราการตกตะกอนเพิ่มมากขึ้น จนสมารถเกิดเป็นลักษณะขุ่นหรือเป็นพลาก์เจลขนาดใหญ่แทน

ผลของปริมาณเอทานอล ปริมาณเอทานอลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วของโครงสร้างโปรตีน(dielectric costant) ซึ่งจะมีผลต่อ แรงไฮโดรโฟบิคภายในโครงสร้างโปรตีน พันธะไฮโดรเจน โดยการเติมแอลกอฮอล์ลงไปจะลดความเป็นขั้วของตำแหน่งโครงสร้างโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริเวณพันธะไฮโดรเจน และโครงสร้างอัลฟ่า-ฮีลิค ทำให้เกิดการแสดงลักษณะไฮโดรโฟบิคที่สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันภายในโครงสร้างโปรตีน

ผลของความเข้มข้นเวย์โปรตีน เวย์โปรตีนที่เพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของโปรตีนมักจะก่อให้เกิด (1) การรวมตัวที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีโอกาสเพิ่มขึ้นของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีน และ (2) การตกตะกอนเนื่องจากความสามารถในการละลาย ผลกระทบที่สำคัญในการรวมโปรตีนโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อเสียสภาพโปรตีนจากความร้อนเปรียบเทียบกับความเข้มข้นสูงของโปรตีน แนวโน้มของโปรตีนที่ความเข้มข้นสูงจะเกิดการรวมจะสูงกว่า (Wehbi *et al.,* 2005)

2.4. การขนส่งสารสำคัญด้วยอนุภาคนาโนในสภาวะทางเดินอาหารจำลอง

ระบบนำส่งอนุภาคนาโนเป็นระบบที่ใช้ nanocarriers ในการห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และขนส่งสารประกอบเหล่านี้ เพื่อเพิ่มการดูดซึมในทางเดินอาหารระบบที่ใช้ในระบบชีวภาพของร่างกาย (active endocytosis) (Schneider *et al.,* 2006) ปัจจุบันสารพฤกษเคมีจะแนะนำในแง่ของสุขประโยชน์ แต่มีอุปสรรคในการดูดซึมต่ำ จึงได้นำการขนส่งสารในรูปแบบอนุภาคนาโนมาเป็นระบบการขนส่งสารสารพฤกษเคมีโดยจะเน้นในส่วน คุณสมบัติที่เป็นเอกลักษณ์ เพื่อเพิ่มการดูดซึมสารสารพฤกษเคมีในทางเดินอาหาร

2.4.1 อัตราการดูดซึมของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก

แม้ว่าสารในกลุ่มสารพฤกษเคมีมีผลดีสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งได้รับการยืนยันจากหลายงานการศึกษาแต่อัตราการดูดซึมที่ต่ำ และข้อจำกัดของการดูดซึมสารของสารพฤกษเคมีก็ยังได้รับการรายงานจำนวนมากเช่นกัน ซึ่งส่วนใหญ่สารธรรมชาติมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ เสถียรภาพทางเดินอาหารไม่ดี, การแพร่กระจายของสารพฤกษเคมีในระบบทางเดินอาหารที่ต่ำ มีผลต่อการดูดซึมสารเข้าสู่ร่างกายได้น้อย

2.4.2 ความสามารถในการละลายและความคงตัวของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก

สามารถในการละลายและความคงตัวต่ำของไฟโตเคมิคัลส่งผลต่อการดูดซึมในระบบทางเดินอาหารที่ต่ำตามไปด้วย การละลายของไฟโตเคมิคัลที่เป็นสารประกอบฟีนอลิก เกิดจากค่า affinity ของสารที่ทำกับโมเลกุลของน้ำ ร่วมกับน้ำหนักมวลโมเลกุลก็มีบทบาทสำคัญต่ออัตราการละลาย โดยถ้าหากสารมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้นอัตราการละลายจะต่ำในน้ำ (Gao and

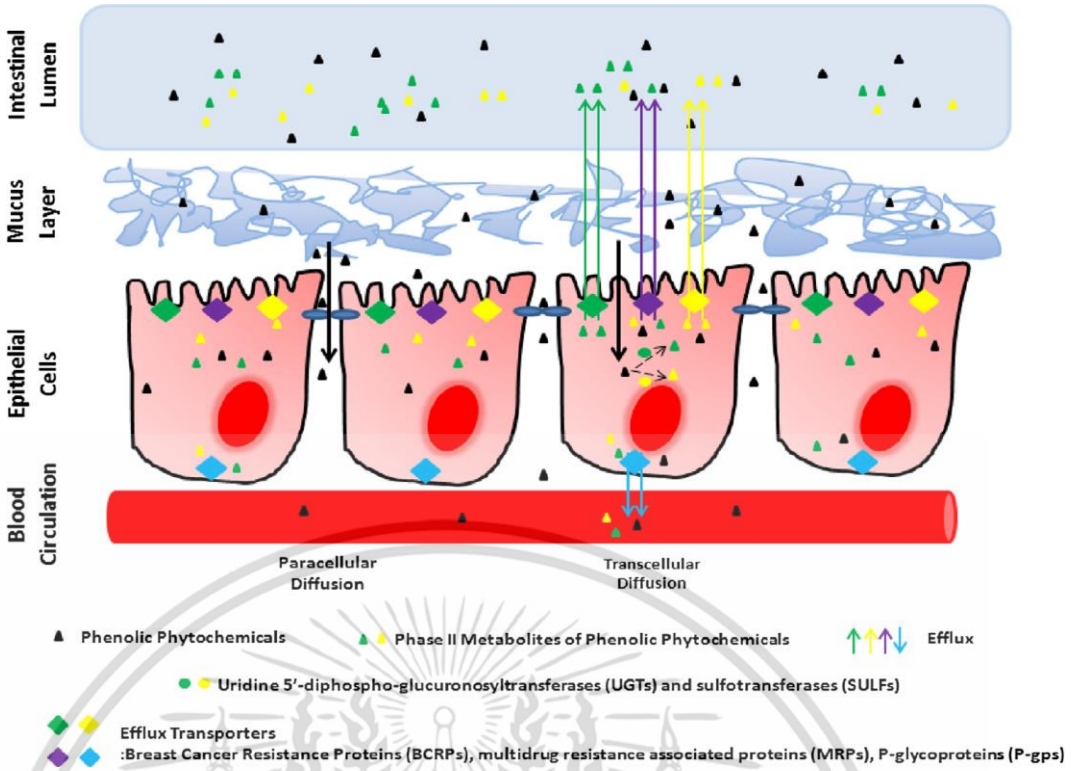
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hu, 2010) ยกตัวอย่างเช่น โปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidins) มีการสังเคราะห์จาก (+) - catechin และ (-) - epicatechin ขนาดของโพลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ มากเมื่อเทียบกับ oligmers และโมโนเมอร์นี้ การที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ทำให้เกิดการละลายของโพลิเมอร์ proanthocyanidin ที่ต่ำมาก และนำไปสู่การดูดซึมที่ต่ำ (Ou *et al.* 2012; Zhang, *et al.* 2004).ยิ่งไปกว่านั้นสภาพความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันในทางเดินอาหาร ยังอาจทำให้เกิดย่อยสลายของสารพฤกษเคมีได้ ยกตัวอย่างเช่น epigallocatechin gallate (EGCG) ไม่คงตัวต่อความเป็นกรด (<1.5) ในกระเพาะอาหาร และสภาพแวดล้อมที่มีค่า pH เป็นกลางในลำไส้เล็กและ ซึ่งทำให้การย่อยเกิดกระบวนการสลายเป็นลำดับแรกๆ(first-order reaction) (Onoue *et al.* 2011; Zhu *et al.* 1997) ส่วน แอนโทไซยานินมีการรายงานว่า จะถูกย่อยสลายในอย่างรวดเร็วในลำไส้เล็กที่มีค่า pH เป็นกลาง (McGhie and Walton, 2007)

2.4.3 การดูดซึมสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกในระบบเซลล์ของลำไส้เล็ก

บนเซลล์พื้นผิวของเยื่อบุผิวขนาดเล็กลำไส้ไม่มีเซลล์รับสารที่เฉพาะเจาะจง (epithelial cells receptors) ในการขนส่ง phenolicสารพฤกษเคมีเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นกลไกสำหรับ phenolicสารพฤกษเคมีในการขนส่งข้ามเยื่อบุผิวเป็นไปตามหลักในการดูดซึมในรูปแบบการแพร่แบบต่างๆทั้ง passive diffusion, paracellular และ transcellular diffusions หลังจากการดูดซึม phenolicสารพฤกษเคมีผ่านกระบวนการ active efflux สาร phenolicสารพฤกษเคมีจะถูกดูดซึมเข้าสู่ลูเมน(lumen) ก่อนเข้าสู่กระแสเลือด (ภาพที่ 2.8) ยกตัวอย่างงานวิจัยของ Murota *et al.* (2002) ได้ทดลองการดูดซึมของ genistein, daidzein และ glucoside conjugates การศึกษาการซึมผ่านพบว่า aglycones (โมเลกุลที่ถูกไฮโดรไลซิสจาก glucoside) จะถูกดูดซึมได้ง่ายขึ้น เมื่อเทียบกับการดูดซึมของ conjugates Pro-anthocyanidins ศึกษาการดูดซึมเปิดเผยว่า Pro-anthocyanidin dimers และ Trimers สามารถถูกดูดซึมได้ทั่วเซลล์ monolayer อย่างไรก็ตามโพลิเมอร์ที่มีระดับขนาดใหญ่ จะสามารถขนส่งผ่าน Caco-2 monolayer ได้ยากเพราะน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ (Ou *et al.* 2012; Stephanie *et al.,* 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 รูปแบบการดูดซึมสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกเข้าสู่เซลล์รูปแบบต่างๆ

ที่มา: Li และคณะ (2015)

2.4.4 ระบบอนุภาคนาโนในการขนส่งสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก

อนุภาคนาโนสามารถห่อหุ้มสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกโดยใช้พันธะไฮโดรเจนและแรงไฮโดรโฟบิค ซึ่งสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายของสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกอนุภาคนาโนสามารถป้องกันการสลายตัวของสารพฤกษเคมีระบบทางเดินอาหาร ที่สำคัญอนุภาคนาโน สามารถนำมาถูกดูดซึมโดยตรงขึ้นผ่านเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้เล็กได้ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมสารพฤกษเคมีได้

2.4.4.1 อนุภาคนาโนช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของ สารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิก

การสร้างอนุภาคนาโน โครงสร้างภายในอนุภาคจะเป็นสารในกลุ่มไฮโดรโฟบิค และบนผิวของอนุภาคจะกระจายตัวด้วยกลุ่มสารที่มีขั้ว (Li and Gu, 2014) ดังนั้นอนุภาคนาโน สามารถคงความเสถียรในระบบการกระจายตัวได้ จากการผลักกันระหว่างอนุภาคและการเกิดไฮเดรชั่นของอนุภาคนาโน สารพฤกษเคมีสามารถสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์บริเวณไฮโดรโฟบิคกับอนุภาคนาโนด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงไฮโดรโฟบิค พื้นผิวที่จะมีประจุและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดคุณสมบัติ hydration ที่เหมาะสมทำให้สารพฤกษเคมีที่ห่อหุ้มอยู่ในอนุภาคนาโน เกิดสภาวะที่เสถียร สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของสารพฤกษเคมีได้ ยกตัวอย่างเช่น procyanidin ถูกห่อหุ้มด้วย zein อนุภาคนาโนที่ใช้วิธีดีซอลเวชัน และ procyanidinezein ที่เกิดขึ้นอนุภาคนาโน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการละลายน้ำของ procyanidin ได้ อนุภาคนาโน Poly (lacticco-glycolic acid) (PLGA), อนุภาคนาโนไคโตซานและอนุภาคนาโนโปรตีนทั้งหมดถูกรายงานว่าการห่อหุ้มเคอคูมินไปเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำได้ (Anand *et al.,* 2010)

2.4.4.2 อนุภาคนาโนป้องกัน phenolicสารพฤกษเคมีกับการย่อยสลายในระบบทางเดินอาหาร

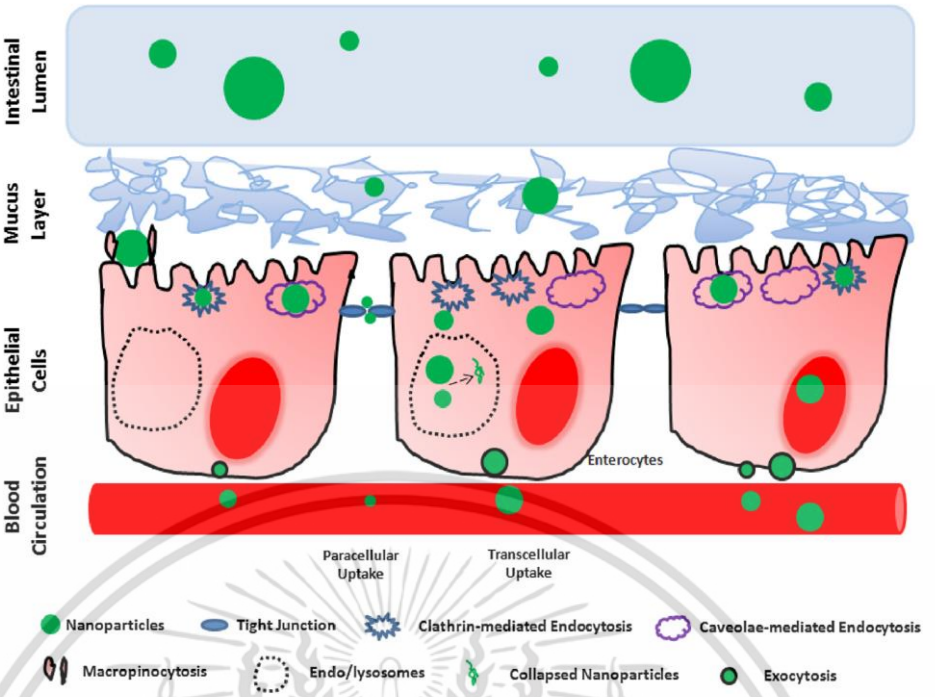
สารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในทั้งสภาพเป็นกรดและเป็นกลางต่ำ (Zhu *et al.,* 1997) แต่หลังจากที่ห่อหุ้มเป็นอนุภาคระดับนาโนความคงตัวของ EGCG ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง (pH 1.2) สูงเป็น 2 เท่า ของ EGCG อิสระ (Onoue *et al.,* 2011) แสดงให้เห็นว่า EGCG มีความคงตัวสูงมากจากการหุ่อหุ้มด้วยเซรั่มอัลบูมินโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรเจนและปฏิสัมพันธ์กับหมู่ไฮโดรโฟบิค โดยกลุ่ม sulfhydryl ในเซรั่มอัลบูมินโปรตีน ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันการย่อยสลายสาร EGCG

2.4.4.3 อนุภาคนาโนช่วยเพิ่มการดูดซึมสารสารพฤกษเคมีกลุ่มฟีนอลิกในเซลล์เยื่อ endocytotic ผ่านการดูดซึมของเซลล์

มีงานวิจัยพบว่าอนุภาคนาโน สามารถดูดซึมผ่านเข้าเยื่อบุผิวของลำไส้เล็กขนส่งด้วยวิธีการ paracellular หรือ transcellular pathway การขนส่งเพิ่มการดูดซึม ห่อหุ้ม phenolic สารพฤกษเคมีในทางเดินอาหาร (ภาพที่ 2.9)

Clathrin-mediated endocytosis เป็นการห่อหุ้มโปรตีน ฮอร์โมน สารเมตาบอไลท์ต่างๆ เข้าสู้เซลล์ผ่านรีเซฟเตอร์ด้วยการห่อหุ้มด้วยโปรตีน โดยเรียกโปรตีนชนิดนี้ว่าแคลทริน (Clathrin) ซึ่งขนาดอนุภาคที่สามารถดูดซึมได้คือประมาณ 120 นาโนเมตร (Ogunkoya *et al.,* 2009) นอกจากนี้มีงานวิจัยอื่นพบว่าหากมีขนาดอนุภาคนาโนเฉลี่ยเล็กกว่า 200 นาโนเมตรจะสามารถรักษาความคงตัวของโปรตีนแคลทริน (Clathrin) ในการดูดซึมสารเข้าสู่เซลล์ได้ (Ehrlich *et al.,* 2004).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.11 การดูดซึมอนุภาคนาโนเข้าสู่เซลล์ลำไส้เล็ก

ที่มา: Li และคณะ (2015)

2.4.4.4 ผลกระทบของพีเอช ไอออน และเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร ต่อเสถียรภาพอนุภาคนาโน

อนุภาคนาโนหลังจากที่เข้าระบบทางเดินอาหารจะเจอกับสภาวะค่า pH ที่แตกต่างกัน จำนวนไอออนที่เพิ่มมากขึ้น และชนิดเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารที่แตกต่างกัน อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนได้ สำหรับขนส่ง สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พีเอชที่มีบทบาทสำคัญที่จะส่งผลกระทบต่อความคงตัวของอนุภาคนาโนในระบบทางเดินอาหาร

ปริมาณของไอออนที่มีอยู่ในระบบทางเดินอาหารส่งผลต่อสมดุลของพีเอช (เช่น กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไบคาร์บอเนต ฯลฯ), การส่งสัญญาณ (เช่นโซเดียมและโพแทสเซียม) การขนส่งสารอาหาร และ การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เพื่อดำเนินกระบวนการย่อยอาหาร ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้จะส่งผลต่อปฏิสัมพันธ์ระหว่างอนุภาคนาโนและไอออน ทำให้เกิดแรงจากไอออนิคที่เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเพิ่มขนาดอนุภาคนาโน จากความสามารถในการละลายน้ำลดลง (Bootz *et al.,* 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคนาโนสามารถถูกย่อยจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร Luo et al ได้รายงานว่า การกักเก็บโทโคฟีรอล (tocopherol) ในอนุภาคนาโนโปรตีนเซอีน (zein) โทโคฟีรอล ออกมาอย่างต่อเนื่อง จากสภาวะจำลองของเหลวในกระเพาะอาหารด้วยเอนไซม์เปปซิน และไอนไซม์ในลำไส้เล็กแพนครีเอติน (Luo *et al.,* 2011) Li และคณะ (2011) ได้ศึกษาความคงตัวของของวิตามินดี3 จากการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารที่ประกอบด้วยเอนไซม์ การสแกนอิเล็กตรอนกล้องจุลทรรศน์ พบว่าขนาดอนุภาคนาโนเพิ่มขึ้นจาก 200 เป็น 500 นาโนเมตร ในจำลองของเหลวในกระเพาะอาหารหลังผ่านไป 0.5 ชั่วโมง และเกิดการรวมตัวของอนุภาคนาโนในลำไส้หลังจากผ่านไป 6 ชั่วโมง (Li *et al.,* 2011)

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิธีการเตรียมอนุภาคนาโนจากเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีการดีซอลเวชั่น มีงานวิจัยของ Gunasekaran *et al.,*(2006) ทำการศึกษาผลของระดับพีเอชของสารละลายเวยโปรตีนไอโซเลต ที่มีผลต่อค่า zeta-potential และศึกษาแนวโน้มของขนาดอนุภาคนาโน ในการทดลองได้สังเกตแนวโน้มค่า zeta-potential ของ β-lactoglobulin จากการผลิตอนุภาคนาโนจากเวย์โปรตีนคอนเซนเตรดด้วยวิธีการดีซอลเวชัน โดยใช้อะซิโตนเป็นดีซอลเวติ้งเอเจนต์ ในการทดลองได้ศึกษาระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตก่อนการดีซอลเวชัน จาก 3.5 - 9.0 พบว่าค่า zeta-potential มีแนวโน้มลดลงจาก +20 ถึง -40 โดยค่า zeta-potential ของอนุภาคที่จะสามารถแขวนลอยด์คงตัวอยู่ในสารละลายจะอยู่ในช่วง +30 ถึง -30 การที่พีเอชเพิ่มขึ้นและทำให้แนวโน้มค่า zeta-potential ลดลง มีผลมาจากการแลกเปลี่ยนประจุที่พื้นผิว และค่า surface hydrophobicity การทดสอบศึกษาแนวโน้มของ zeta-potential พบว่าที่ pH 9 มีค่า zeta-potential ต่ำสุดที่ -40 โดยคาดการณ์ว่าที่ pH 9 โมเลกุลจะมีการเปลี่ยนแปลงประจุลบที่พื้นผิวอนุภาคของ β-lactoglobulin มากที่สุด ในการทดสอบถัดมาจึงได้ทดสอบสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ pH 9 ร่วมกับนำมาให้ความร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนเข้าสู่กระบวนการดีซอลเวชัน พบว่าขนาดของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลต 50±4 นาโนเมตร(ปริมาณ 80 %)

ในส่วนถัดมาส่วนสำคัญคือการใช้เทคนิคดีซอลเวชันในการสร้างอนุภาคนาโน ที่ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า ดีซอลเวติ้งเอเจน (Desolvating agent) ในการให้เกิดการแตกตัวของประจุของพอลิเมอร์ ทำให้เกิดการเข้าจับโครงสร้างของโครงสร้างไฮโดรโฟบิคที่มีประจุแตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันด้วยแรงทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) ภายในโมเลกุลพอลิเมอร์เกิดเป็น coacervative wall ซึ่งปริมาณดีซอลเวติ้งเอเจนที่เติมลงไปจะส่งผลต่อการรวมตัวและขนาดของอนุภาคนาโน

โดยมีงานวิจัยที่ศึกษาปริมาณการเติมดีซอลเวติ้งเอเจนด้วยวิธีการดีซอลเวชัน หลายงาน อาทิเช่น งานของ Arroyo-Maya *et al.,* 2014 ได้ศึกษาการเตรียมอนุภาคนาโนจาก α-Lactalbumin (เป็นโปรตีนที่ประกอบอยู่ในเวย์โปรตีนประมาณ 20 - 22 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเตรียมด้วยวิธีการดีซอลเวชัน ทำการศึกษาโครงสร้างและความคงตัวในการรวมตัวของอนุภาคโปรตีน โดยใช้สารละลาย α-Lactalbumin ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 9 โดยใช้อะซิโตนปริมาณ 4 เท่าต่อสารลายเวย์โปรตีนเป็นดีซอลเวติ้งเอเจน ร่วมกับการเติมสารละลายกลูตารัลดิไฮด์ (Glutaraldehyde) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองพบว่า วิธีการสามารถสร้างอนุภาคนาโนทรงกลมได้ ซึ่งมีขนาด 100 – 160 นาโนเมตร เกิดจากการเชื่อมต่อกันของ α-Lactalbumin กับ glutaraldehyde จากการเติมอะซิโตน (80% v/v) ลงไป ซึ่งพบว่าอะซิโตนมีส่วนทำให้โครงสร้างโปรตีนเสียหายระดับทุติยภูมิ จนทำให้โครงสร้างพอลิเปปไทด์ของ α-Lactalbumin เกิดการรวมตัวแบบ B-stand และรวมตัวเป็นพอลิเมอรริคของ glutaraldehyde ทำให้สามารถอธิบายถึงการพบโครงสร้างโปรตีนสายสั้นในอนุภาคนาโน ซึ่งมีความคงตัวมาจากพันธะโควาเลนต์ของโปรตอนจากหมู่คาร์บอกซิล

งานวิจัยของ Gulseren *et al.,* 2012 ได้ทำการศึกษาผลของระดับปริมาณเอทานอล ที่มีผลต่อสภาวะความคงตัวของอนุภาคนาโน จากการผลิตอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีการดีซอลเวชันโดยใช้เอทานอล เป็นดีซอลเวติ้งเอเจนต์ โดยพบว่าการใช้ปริมาณเอทานอล 3- 4 เท่าของสารละลายเวย์โปรตีน 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 9 แล้วปรับพีเอชการเก็บรักษามาที่ pH 3 เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง อนุภาคยังมีความคงตัวอยู่ โดยสังเกตจากความเปลี่ยนแปลงจากการเพิ่มขนาดอนุภาคที่น้อยกว่าการใช้ปริมาณเอทานอล 1-2 เท่า ซึ่งเกิดจากโครงสร้างของเบต้ากาแลคโตบูลิน (b-lactoglobulin) เมื่อเพิ่มปริมาณเอทานอลมากขึ้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยไปลดค่าไดอิเล็กทริต (dielectric constant) จนเกิดการแสดงส่วนของ α-helix เพิ่มขึ้นทำให้อนุภาคคงตัวได้มากขึ้น ขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ยเมื่อใช้เอทานอล 3- 4 เท่ามีขนาด 30 นาโนเมตร

เมื่อมีการพัฒนาในส่วนของเปลือกห่อหุ้มของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตแล้วได้มีการนำมาประยุกต์ในการกักเก็บสารสำคัญชนิดต่างๆ จึงได้มีการศึกษาอัตราส่วนปริมาณสารสำคัญต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต โดยงานวิจัยของ Gulseren และคณะ (2012) มีการศึกษาปริมาณของเอทานอล (1-3 เท่า)ร่วมกับปริมาณไอออนเหล็กที่ใช้ (ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมล)ในกระบวนการดีซอลเวชัน จากการผลิตอนุภาคนาโนของไอออนเหล็กในเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดีซอลเวชัน โดยใช้สภาวะที่ pH 9 และใช้เอทานอลเป็นดีซอลเวติ้งเอเจนต์ พบว่าปริมาณเอทานอลมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ในการเอนแคปซูลเลชันไอออนเหล็ก (เข้มข้น 5 มิลลิโมล) หากมีการเพิ่มปริมาณเอทานอลอยู่ในช่วง 2-3 เท่าของสารละลายเวย์โปรตีน จะมีเปอร์เซ็นต์ในการเอนแคปซูลเลชันถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่หากใช้ปริมาณเอทานอลจำนวน 1 เท่า เปอร์เซ็นต์ในการเอนแคปซูลเลชันจะอยู่ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีสาเหตุมาจากการจำนวนไอออนเหล็กจะสูงมากในช่วงที่ยังไม่ได้ทำการดีซอลเวชัน และเมื่อละลายเวย์โปรตีนไว้ร่วมกับอนุภาคไอออนเหล็กก็ไม่เกิดการรวมตัวกัน แต่หากมีการเพิ่มปริมาณเอทานอลขึ้นจะทำให้ไอออนเหล็กลดลง ร่วมกับการลดลดค่าไดอิเล็กทริตของโปรตีนลง จึงมีประสิทธิภาพในการเอนแคปซูลเลชันมากขึ้น

นอกจากนี้ยังมีในส่วนงานวิจัยของ Bagheri และคณะ (2013) ทำการการผลิตอนุภาคนาโนของสารสกัดอิทผลัมในเวย์โปรตีนไอโซเลต ได้ศึกษาปริมาณสารสกัดอินทผลัมที่ใส่ลงไปในกระบวนการดีซอลเวชัน โดยกำหนดปริมาณเอทานอลคงที่ 3 เท่า pH 9 และ อัตราส่วนสารสกัดอินทผลัม:เวย์โปรตีน (core:matrix-from) 1:15 และ 1:20 การที่อัตราส่วน 1:15 มีแนวโน้มให้จำนวนอนุภาคที่ได้ (Particle Yield) และประสิทธิภาพการเอนแคปซูลเลชันที่ต่ำกว่า เนื่องจากหากมีปริมาณสารสกัดอินทผลัมที่มากเกินไป จะส่งผลให้การเชื่อมต่อระหว่างอนุภาคโปรตีนด้วยกันหรือ ระหว่างอนุภาคโปรตีนกันสารฟีนอลลิคมีแรงที่อ่อนลง การเพิ่มสารสกัดที่มากเกินไป อาจเป็นการเพิ่มปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 สารสกัดลูทีนจากดอกดาวเรืองในน้ำมันดอกคำฝอย ความเข้มข้นลูทีนร้อยละ 20 (Lutein in safflower oil, 20 %) บริษัท FloraGLO

3.1.2 เวย์โปรตีนไอโซเลต มีโปรตีนร้อยละ 92.79 (Whey protein isolate (WPI) with 92% protein) (Mullins9030) consisting of 92.79% protein, 1.5% fat, 4.7% moisture and 2.8% ash จาก บริษัท Mullins Whey (Wisconsin, USA)

3.1.3 เลซิติน (L-α-Phosphatidylcholine from dried egg yolk, 40%) บริษัท Sigma aldrich

3.1.4 Tween 80 (Food grade) บริษัท Merck

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน	EVO HD Carl Zeiss, France
3.2.2 เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า	IKA รุ่น RW 20 digital, Germany
3.2.3 เครื่องเซนตริฟิวส์	Eppendorf รุ่น 5804R, Germany
3.2.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	N-Biotek รุ่น NB-205 VL, Korea
3.2.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น CPA3245, Germany
3.2.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Inolab PH level1, Germany
3.2.7 เครื่องพีเอชแบบต่อเนื่อง	Metrohm รุ่น Riverview, USA
3.2.8 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Shimadzu รุ่น UV-1601 , Japan
3.2.9 เครื่องวัดการกระจายตัวของขนาดอนุภาค	NanoPlusTM 3 Particulate , UK).
3.2.10 ตู้อบสุญญากาศ (Vacuum Oven)	Heraeus, Germany.
3.2.11 ไมโครปิเปต (Micropipette)	Sartorius รุ่น Proline, Germany
3.2.12 อ่างอัลตร้าโซนิก (Ultrasonic bath)	Bosstech รุ่น HBV120S, Germany
3.2.13 เครื่องแก้ว	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

3.3.1 Ammonium nitrate	Merk, Germany
3.3.2 Ethanol 95%	Merk, Germany
3.3.3 Ethanol 99.9%	Merk, Germany
3.3.4 Lactic acid sodium salt	Merk, Germany
3.3.5 Chloroform	RCI Labscan, Ireland
3.3.6 Phosphoric acid	RCI Labscan, Ireland
3.3.7 Potassium dihydrogen phosphate	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.8 Potassium phosphate	Merk, Germany
3.3.9 Potassium chloride	Merk, Germany
3.3.10 Potassium citrate	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.11 Sodium chloride	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.12 Sodium citrate	Merk, Germany
3.3.13 Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.14 Hydrochloric acid 37%	RCI Labscan, Ireland
3.3.15 Urea	Merk, Germany
3.3.16 Porcine gastric Mucin	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.17 Uric acid sodium salt	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.18 Pancreatin from porcine pancreas	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.19 Pepsin Enzyme	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.20 Deionized water	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 วิธีการสร้างอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตแบบแห้ง

3.4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

การทดลองจะทำการศึกษาสภาวะการผลิต 3 ปัจจัย ได้แก่ ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ (3, 7และ 9) ปริมาตรเอทานอล 3 ระดับ (0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าของปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต) และปริมาณสารสกัดลูทีนต่อปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลต 4 ระดับ (1.25, 2.50, 3.75 และ 5.00 มิลลิกรัมของสารลูทีนต่อ 100 กรัมของเวย์โปรตีนไอโซเลต) ที่มีต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ขนาดอนุภาค ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ วางแผนการทดลองหาประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตแบบแฟคทอเรียล จากนั้นเลือกตัวอย่างที่มีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มที่สูงมาศึกษาขนาดอนุภาค ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การปลดปล่อยสารลูทีนโดย*จำลอง*ระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำผลข้อมูลไปเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติต่อไป

การเตรียมสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต

เตรียมสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/w) โดยใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตในปริมาณ 5 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 495 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างบนเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างเก็บเข้าตู้เย็นไว้ 1 คืน เพื่อให้เกิดการไฮเดรตน้ำที่สมบูรณ์ จากนั้นนำสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เตรียมไว้ มาปรับค่าพีเอช (pH) เป็น 3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือเป็น 7 หรือ 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

การเตรียมสารละลายลูทีน

เตรียมสารละลายลูทีน โดยนำสารสกัดลูทีนไปละลายในเอทานอล 4 ระดับ คือ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัม ลงในเอทานอลแอนไฮดรัสที่มีปริมาตร 5, 10, 15 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนผสมของสารละลายลูทีนในเอทานอลแอนไฮดรัสที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปโซนิเคท (Sonicate) สารละลายด้วยเครื่องโซนิเคท (Sonicator) ที่ 37 kHz 15 นาที เพื่อให้ลูทีนละลายในเอทานอลเป็นเนื้อเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอนุภาคนาโนด้วยวิธีการดีซอลเวชัน

นำสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เตรียมไว้ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปกวนบนเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที แล้วจึงทำการหยดสารละลายลูทีนในเอทานอลที่เตรียมไว้ มาหยดลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตอย่างช้าๆ โดยใช้อัตราการหยด 1 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อให้มีความเข้มข้นของสารลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต และปริมาตรเอทานอลในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตตามสัดส่วนจำนวนที่ต้องการ จากนั้นทำการดูดตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ลงบนถาดฟอยล์ แล้วนำตัวอย่างไปอบไล่ความชื้นด้วยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จนตัวอย่างแห้ง จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ได้ลงในถุงฟอยล์ปิดสนิทในตู้ดูดความชื้นเพื่อรอทำการตรวจสอบต่อไป

3.4.1.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ตัวอย่างในการทดลองการสร้างอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตแบบแห้ง แบ่งเป็น 5 ส่วน ดังนี้

1.) ศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน

2.) ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน

3.) ตรวจสอบขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงแสง

4.) ตรวจสอบความการปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหาร

5.) ตรวจสอบความคงตัวของสารลูทีนในการเก็บรักษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

3.4.2 วิธีการสร้างอนุภาคนาโนลูทีนแบบอิมัลชัน

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

การทดลองจะทำการศึกษาผลของการสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ทวีน 80 และ เลซิติน) ร่วมกับเวย์โปรตีนซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุล ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน ขนาดอนุภาคที่เกิดขึ้น การปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง และความคงตัวในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำผลข้อมูลไปเปรียบเทียบค่าความแตกต่างทางสถิติต่อไป

การเตรียมสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต

เตรียมสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 % (w/w) ในน้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับค่าพีเอช (pH) ของสารละลายเป็น 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล และกวนที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาที และเก็บไว้ตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง แล้วกรองสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตผ่านแผ่นกรอง *Whatman* No.1 (Whatman, Germany)

การเตรียมสาระลายทวีน 80 และสารละลายเลซิติน

เตรียมสารละลายทวีน 80 (Tween-80) หรือ เลซิติน (lecithin) ความเข้มข้นร้อยละ 0. 1 (w/w) ในน้ำปราศจากไอออน และทำการกวนสารละลายที่ 500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

การเตรียมสารละลายลูทีน

เตรียมสารละลายลูทีนความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในเอทานอล จากนั้นทำการโซนิเคท (Sonicate) สารละลายด้วยเครื่องโซนิเคท (Sonicator) ที่ 37 kHz เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียมนาโนอิมัลชันด้วยวิธีดีซอลเวชัน

นำสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เตรียมไว้ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไปกวนบนเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที แล้วจึงการหยดสารละลายทวีน 80 หรือเลซิติน ในปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำการหยดสารละลายลูทีนในเอทานอลที่เตรียมไว้ มาหยดลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (20 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการหยด 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งได้ตัวอย่างลูทีนที่มีการห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต, เวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับทวีน 80 และ เวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับเลซิติน ตามลำดับ โดยอัตราส่วนของทวีน 80 และเลซิตินที่ใช้ต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตจะเท่ากับ 1:1 จากนั้นทำการระเหยเอทานอลออกจากส่วนผสมโดยใช้เครื่องการระเหยแบบสูญญากาศ ที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 580 psi

3.4.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ตัวอย่างในการทดลองการสร้างอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตแบบแห้ง แบ่งเป็น 4 ส่วน ดังนี้

1.) ศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน

2.) ตรวจสอบขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต

3.) ตรวจสอบความการปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหาร

4.) ตรวจสอบความคงตัวของสารลูทีนในการเก็บรักษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

3.4.3 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.2.3.1 การศึกษาประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน

สำหรับตัวอย่างแห้ง จะทำการวิเคราะห์ปริมาณสกัดลูทีนอิสระ ทำโดยนำตัวอย่างแห้งมา 0.5 กรัม มากระจายตัวในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการกวนตัวอย่างด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า 30 นาที จากนั้นนำส่วนใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 446 นาโนเมตร (ปรับปรุงวิธีการจาก: Ravanan and Rao, 2010) แล้วเทียบหาปริมาณลูทีนอิสระของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารมาตรฐานลูทีนเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยในการทำกราฟมาตรฐานจะใช้ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานลูทีนเป็น 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วนำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 446 นาโนเมตร

ทำการคำนวณหาปริมาณสารสกัดลูทีนอิสระที่ปลดปล่อยออก แล้วนำค่าที่ได้มาใช้ในการคำนวณประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน ด้วยสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (ร้อยละ)} = \frac{(\text{ลูทีนทั้งหมดของตัวอย่าง} - \text{ลูทีนอิสระ}) \times 100}{\text{ลูทีนทั้งหมดของตัวอย่าง}}$$

สำหรับตัวอย่างอิมัลชัน จะทำการวิเคราะห์ปริมาณสกัดลูทีนอิสระ ทำโดยนำตัวอย่างอิมัลชันมา 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนใสที่ได้มามาสกัดเอาลูทีนออกด้วยตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม แล้วจึงนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร จากนั้นทำการเทียบหาปริมาณลูทีนอิสระของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารมาตรฐานลูทีนที่ละลายในคลอโรฟอร์มเป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วจึงทำการคำนวณหาประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนจากสูตรคำนวณข้างต้น

3.4.3.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

นำตัวอย่างแห้งไปทำการเคลือบด้วยทอง จากนั้นนำไปตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทำการส่องกราด

3.4.3.3 การวัดขนาดอนุภาค

นำตัวอย่างไปทำการวัดขนาดโดยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบพลวัต ด้วยเครื่อง Particle size analyzer ที่อุณหภูมิการวัด 25 องศาเซลเซียส ลำแสงเลเซอร์ 657 นาโนเมตร มุมตกกระทบ 90 องศา วัดสามครั้ง คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยขนาดต่อปริมาตร
(ปรับปรุงวิธีการจาก: Li *et al.,* 2013: Bagheri *et al*., 2013: Gulseren *et al.,* 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.4 การปลดปล่อยสารลูทีนโดยจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง

การศึกษาการปลดปล่อยสารลูทีนออกจากตัวห่อหุ้มด้วยการจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง จะทำโดยมีการจำลองให้ตัวอย่างถูกส่งผ่านสภาวะจำลองทางเดินอาหาร ซึ่งประกอบด้วยปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก (Lopez-Pena *et al.,* 2016) วิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการ

การทดลองทำโดยเตรียมตัวอย่างสารละลาย 20 มิลลิลิตร หรือ ตัวอย่างผงแห้ง 3.0 ± 0.5 มิลลิกรัม ในสารละลายน้ำปราศจากไอออน 20 มิลลิลิตร (ตัวอย่างทั้งหมดมีความเข้มข้น 0.15 mg/ ml) ทำการกวนตัวอย่างด้วยอัตราเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที

สภาวะการย่อยด้วยน้ำลาย Simulated saliva fluid (SSF) มีส่วนประกอบของ mucin และเกลือต่างๆ (Sarkar *et al.*,, 2009) (ดูรายละเอียดสูตรในภาคผนวก ค) นำมาผสมกับสารละลายตัวอย่างในข้างต้นอัตราส่วน 1:1 (v/v) ปรับพีเอชของสารผสมด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้น 0.5โมลาร์ ให้เป็น pH 6.8 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าส่วนผสมอย่างต่อเนื่องที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที

สภาวะการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร Simulated gastric fluid (SGF) ทำโดยเตรียมเอนไซม์เปปซิน (pepsin) ปริมาณ 3.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้น 0.03 โมลาร์ ปรับพีเอช เป็น 1.2 เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โดยใช้กรดไฮโดรคลอริค (HCl) จากนั้นทำการผสมเข้ากับสารละลายตัวอย่างข้างต้นในอัตราส่วน 1:1 ทำการปรับพีเอชของส่วนผสมเป็น 2.5 จากนั้นทำการเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง

สภาวะการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก Simulated intestinal fluid (SIF) ทำโดยเตรียมเอนไซม์เพนครีเอติน (pancreatin) ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) (6.7 กรัม/ลิตร) ปรับพีเอช ให้เป็น 7.0 ด้วยสาระละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จากนั้นสารละลายตัวอย่างมาผสมลงในสภาวะ SGF ในอัตราส่วน 1:1 หลังจากกระบวนการสิ้นสุดระยะเวลา 5 ชั่วโมง ทำการปรับพีเอชของตัวอย่างเป็น 2.5 เพื่อหยุดปฏิกิริยา โดยระหว่างการทำปฏิกิริยาต้องมีการเขย่าส่วนผสมในอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยจะทำการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioaccessibility) และ ค่าการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid)

ในการเก็บตัวเพื่อให้เอนไซม์หยุดปฏิกิริยาทำการเก็บตัวอย่างในกล่องน้ำแข็งก่อนการตรวจ Bioaccesibility และ Free Fatty Acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.) ค่าการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioaccessibility)

การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า Bioaccessibility โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ชั่วโมง ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยง 18,000 rpm เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นทำการดูดตัวอย่างส่วนใสมาในปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาผสมให้เข้ากับคลอโรฟอร์มที่มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ 1400 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการดูดตัวอย่างในส่วนชั้นคลอโรฟอร์มไปตรวจความเข้มข้นของสารลูทีนที่ความยาวคลื่น 452 นาโมเมตร จากจากนั้นทำการเทียบหาปริมาณลูทีนอิสระของตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานที่ใช้สารมาตรฐานลูทีนที่ละลายในคลอโรฟอร์มเป็นตัวเปรียบเทียบ แล้วจึงคำนวณหาค่าการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioaccessibility) ด้วยสมการ

$$\text{Bioaccessibility (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของลูทีนที่ปลดปล่อยออกมา}}{\text{ความเข้มข้นของลูทีนเริ่มต้น}} \times 100$$

โดย ความเข้มข้นของลูทีนที่ปลดปล่อยออกมา และ ความเข้มข้นของลูทีนเริ่มต้น เป็นค่าความเข้มข้นของลูทีนในชั้นไมเซลล์ที่ได้จากการวัดค่าและค่าความเข้มข้นของลูทีนในระบบน้ำย่อยที่ได้จากทางทฤษฎี ตามลำดับ

2.) ค่าการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid)

หลังจากเข้าสู่สภาวะจำลองการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ในลำไส้เล็กของระบบทางเดินอาหารในหลอดทดลอง จะมีการนำตัวอย่างมาทำการปรับพีเอชให้เป็น 7 โดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ที่มีความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ ด้วยเครื่อง pH-stat (Metrohm USA Inc. , Riverview, FL) ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปจะแปรผันตรงกับที่ปริมาณของกรดไขมันอิสระ (FFA) ที่เพิ่มขึ้นซึ่งจะถูกบันทึกไว้ทุกๆ 30 นาที โดยเปอร์เซ็นต์ของ FFAs ที่ปลดปล่อยออกมาจะถูกคำนวณจากปริมาตรของสารละลายด่างที่นำมาทำให้ตัวอย่างมีค่าพีเอชที่เป็นกลาง

ทำการคำนวณปริมาณกรดไขมันอิสระโดยใช้สมการต่อไปนี้

$$\%FFA = \frac{100 \times V_{NaOH} \times m_{NaOH} \times M_{lipid}}{W_{lipid}}$$

โดยที่ V_{NaOH} คือ ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ หน่วยเป็นลิตร

m_{NaOH} คือ ความเข้มข้นหน่วย molarity (M) ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

M_{lipid} คือ น้ำหนักโมเลกุลของน้ำมันดอกคำฝอย (470.691 g/mol)

W_{lipid} คือ น้ำหนักของน้ำมันในระบบการย่อยอาหารเป็นหน่วยกรัม

(ปรับปรุงวิธีการจาก: Liang, *et al.,* 2012; Mun *et al.,* 2016; Yi *et al.* 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3.5 การตรวจสอบความคงตัวของสารลูทีนในการเก็บรักษาภายใต้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาสภาวะการเก็บรักษาต่ออัตราการกักเก็บลูทีนในอนุภาคนาโนเก็บรักษาตัวอย่างในที่มืดที่แตกต่างกัน 3 อุณหภูมิ คือ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน โดยหลังทำการเก็บรักษา ตัวอย่างจะถูกนำมาตรวจสอบปริมาณลูทีนที่หลงเหลือในตัวอย่าง ด้วยการปลดปล่อยลูทีนออกจากตัวห่อหุ้ม โดยนำตัวอย่างอิมัลชันมาปริมาณ 10 มิลลิลิตร หรือเตรียมตัวอย่างแห้งชั่งมา 1.5± 0.5 มิลลิกรัม ที่กระจายตัวในน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร มาผสมลงในสารละลาย Phosphate-buffered saline ที่มีความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ดูรายละเอียดสูตรในภาคผนวก ค) ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมส่วนผสมลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้มาสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม (อัตราส่วน 1:1) นำตัวอย่างที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 452 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณประสิทธิภาพการปลดปล่อย (Releasing effiency) ลูทีนตามสมการ

$$\text{ประสิทธิภาพการปลดปล่อย (\%RE)} = \frac{\text{ปริมาณลูทีนที่ถูกปลดปล่อย}}{\text{ปริมาณลูทีนเริ่มต้น}} \times 100$$

การคำนวณหาประสิทธิภาพการปลดปล่อยของอนุภาค คำนวณจากความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนที่เป็นส่วนใสจากสารละลายที่ปลดปล่อยออกมาจากอัตราการกักเก็บลูทีนในอนุภาคนาโนต่อความเข้มข้นของสารสกัดลูทีนทั้งหมดที่เติมในกระบวนการดีซอลเวชัน มาทำการวัดค่าความเข้มข้นของลูทีน

(ปรับปรุงวิธีการจาก: Mun *et al.,* 2016; Sotomayor-Gerding *et al.,* 2016; Yi *et al.,* 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีดีซอลเวชันแบบผงแห้ง

4.1.1 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

การวิเคราะห์หาค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ได้จากการปรับสภาวะการผลิต 3 ปัจจัย ได้แก่ 1,) ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (3, 7 และ 9) 2) สัดส่วนปริมาณของสารลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต (1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100 (มิลลิกรัม:มิลลิกรัม) และ 3) ปริมาตรของเอทานอลที่ใช้เป็น 0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าของปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต) พบว่าค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 47.61 - 91.78 (ตารางที่ 4.1) เมื่อนำค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย Three Way ANOVA พบว่าทุกปัจจัยการผลิต ได้แก่ ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต สัดส่วนปริมาณของสารลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต และปริมาตรของเอทานอลที่ใช้ต่อปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต มีผลทำให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และทั้ง 3 ปัจจัยต่างมีอิทธิพลร่วมระหว่างกัน (Interaction) โดยเมื่อนำค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต มาวิเคราะห์แนวโน้มอิทธิพลของแต่ละปัจจัย โดยใช้การวิเคราะห์ Main Effect ทำให้สามารถสรุปอิทธิพลของแต่ละปัจจัยได้ชัดเจนขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

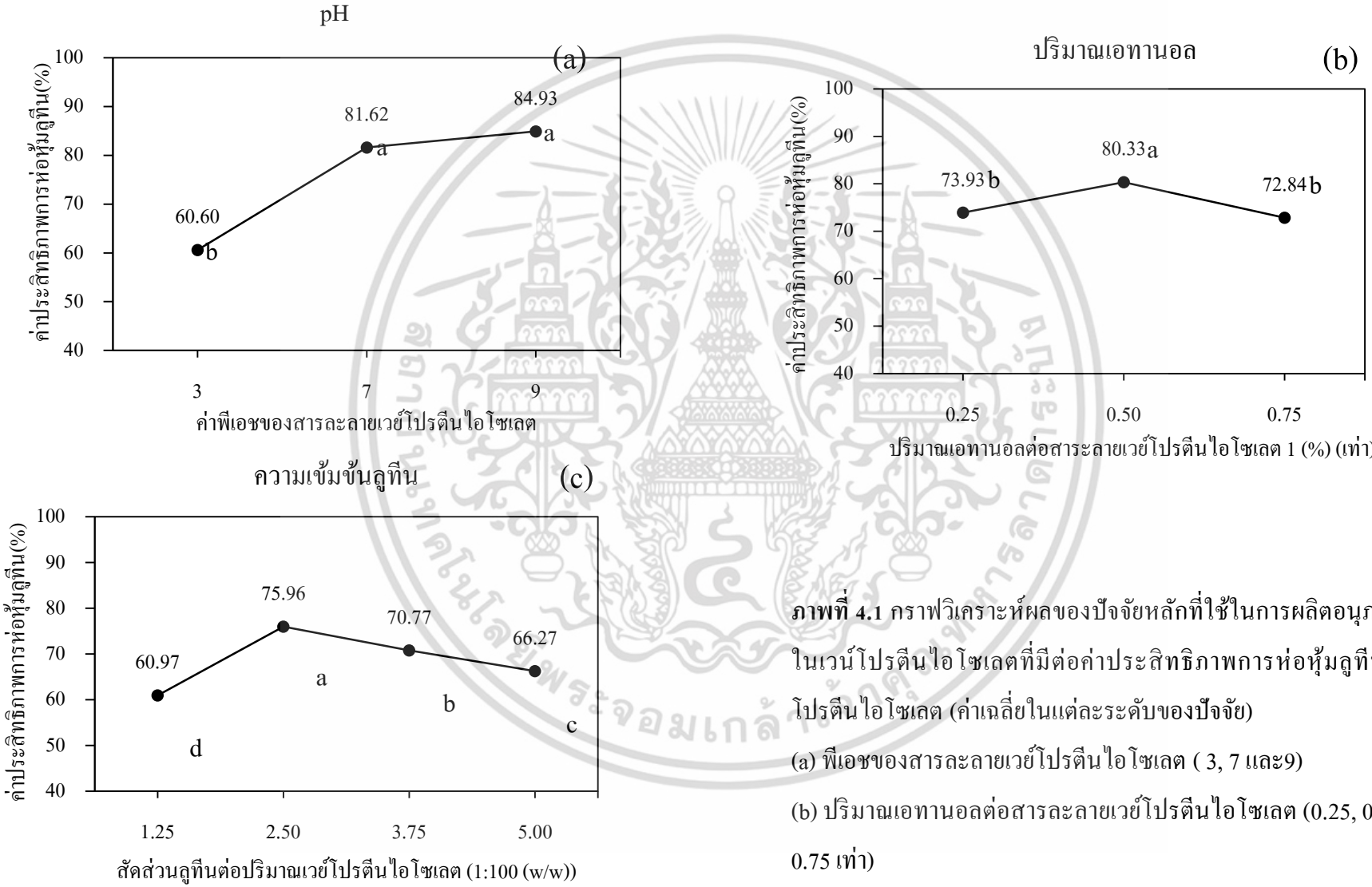
ระดับ pH ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต	ปริมาตรของเอทานอล (เท่าของปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต)	ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต (ร้อยละ)			
		สัดส่วนปริมาณของสารลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต			
		1.250:100	2.50:100	3.75:100	5.00:100
3	0.25	51.71±1.08	65.65±2.56	63.82±1.44	62.03±0.44
	0.50	67.82±1.79	72.25±0.46	68.11±0.79	67.09±1.23
	0.75	54.52±0.89	56.68±0.31	49.83±1.62	47.63±1.34
7	0.25	80.10±0.31	79.26±1.25	77.59±0.34	76.33±0.25
	0.50	86.62±0.68	88.51±0.76	83.14±1.35	81.59±0.78
	0.75	81.71±1.98	84.73±1.16	80.76±1.46	79.08±1.06
9	0.25	83.25±0.70	85.31±0.44	82.24±0.81	79.87±0.34
	0.50	87.10±1.45	91.78±2.36	85.33±0.58	84.70±0.16
	0.75	84.72±1.52	85.44±1.18	84.73±1.62	84.33±0.22

ตารางที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตในรูปแบบตาราง ANOVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14897.075[a]	35	425.631	302.428	.000
Intercept	627877.576	1	627877.576	4.461E5	.000
pH	11883.020	2	5941.510	4.222E3	.000
Ethanol	1388.907	2	694.453	493.438	.000
Lutein	371.116	3	123.705	87.898	.000
pH * Ethanol	1070.346	4	267.586	190.131	.000
pH * Lutein	30.907	6	5.151	3.660	.003
Ethanol * Lutein	54.293	6	9.049	6.430	.000
pH * Ethanol * Lutein	98.487	12	8.207	5.832	.000
Error	101.331	72	1.407		
Total	642875.982	108			
Corrected Total	14998.406	107			

a. R Squared = .993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 กราฟวิเคราะห์ผลของปัจจัยหลักที่ใช้ในการผลิตอนุภาคลูทีนในเวน์โปรตีนไอโซเลตที่มีต่อค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต (ค่าเฉลี่ยในแต่ละระดับของปัจจัย)

(a) พีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (3, 7 และ9)

(b) ปริมาณเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (0.25, 0.50 และ 0.75 เท่า)

(c) สัดส่วนปริมาณลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต (1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100)

4.1.1.1 ผลของระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

ระดับพีเอช (pH) ส่งผลโดยตรงต่อโครงสร้างของโปรตีน ซึ่งจะไปมีผลต่อการรวมตัวและการห่อหุ้มลูทีนโดยโปรตีน ผลจากการทดลองที่แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตของผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้จากการสภาวะการผลิตโดยใช้สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีระดับ pH 3 7 และ 9 มีค่าอยู่ในช่วง 47.63 – 72.25, 76.33 – 88.51 และ 79.87 – 91.78 ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาผลค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตของแต่ละระดับปัจจัยจากกราฟ Main Effect (ภาพที่ 4.1 (a)) พบว่า เมื่อระดับพีเอช (pH) ของสารละลายโปรตีนไอโซเลตมีค่าสูงขึ้น ค่าเฉลี่ยของประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตมีแนวโน้มที่สูงขึ้น โดยการเตรียมสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับ pH 3, 7 และ 9 จะทำให้ได้ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนอยู่ที่ร้อยละ 60.60, 81.62 และ 84.93 ตามลำดับ ผลจากการทดลองทำให้สามารถสรุปแนวโน้มผลของ pH ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตได้ โดยที่ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตจะมีค่าสูงที่สุด เมื่อทำการเตรียมผลิตภัณฑ์โดยใช้สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีค่าที่ pH 9 รองลงมาคือการเตรียมโดยใช้ pH ที่ระดับ 7 และ 3 ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2013) ที่ได้ศึกษาอิทธิพลของระดับพีเอช (pH 3–pH 10) ที่ส่งผลต่อการรวมตัวระหว่างเบต้าแลคโตกลอบูลิน (องค์ประกอบหลักในเวย์โปรตีน) กับสารบีซิน (Bixin) ซึ่งเป็นสารแคโรทีนอยด์จากดอกคำแสดที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิคสูง พบว่าสารละลายเบต้าแลคโตกลอบูลิน ที่ได้จากการเตรียมโดยใช้ pH 10 สามารถเข้าจับกับสารบีซินที่มีความเข้มข้นที่สูงที่สุดได้ และได้อธิบายผลของพีเอชที่มีต่อโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลิน ไว้ว่าจากการที่พีเอชของสารละลายเบต้าแลคโตกลอบูลินสูงขึ้น จะไปส่งผลให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีนในระดับที่สูงขึ้น ทำให้โปรตีนเผยส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิคออกมาเพิ่มมากขึ้น (แรงไฮโดรโฟบิคภายในโครงสร้างเวย์โปรตีนมาจากกรดอะมิโนไทโรซีนและทริปโตเฟน ซึ่งมีลักษณะเป็นกรดอะมิโนที่มีลักษณะไฮโดรโฟบิคเพราะมีหมู่อะโรมาติก ซึ่งมักอยู่บริเวณตำแหน่ง alpha-helix และบริเวณพื้นผิวของ beta-barrel ซึ่งเป็นบริเวณพื้นที่ของเบต้าแลคโตกลอบูลินที่ใช้ในการเข้าจับกับสารชนิดอื่นที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิค) อาจทำให้มีบริเวณพื้นที่เข้าจับกับสารที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิคได้มากยิ่งขึ้น ส่งผลต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิคที่เพิ่มมากขึ้น

การคลายสายของโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลิน มีผลมาจากระดับ pH ของระบบที่ห่างจากค่า Isoelectric point (pI) ของโปรตีน จะไปส่งผลทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดแรงผลักทางไฟฟ้า (electrostatic repulsion) ภายในสายโครงสร้างโปรตีน โดย pH จะไปส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับประจุที่ล้อมรอบของกรดอะมิโนของเวย์โปรตีนไอโซเลต โดยพบว่าที่ pH 3 โครงสร้างประจุโดยรวมจะเป็นบวกผลักกันมาก เหมือนใน pH 9 ที่มีประจุโดยรวมจะเป็นลบผลักกันมาก (Li and McClements, 2013) ซึ่งอาจส่งผลต่อระดับการคลายสายของเบต้าแลคโตกลอบูลินที่สูง แต่เนื่องจากโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินมีความทนต่อการเสียสภาพของโครงสร้างโปรตีนในสภาวะกรด (pH 3) แต่สามารถเสียสภาพและคลายโครงสร้างโปรตีนได้ง่ายในสภาวะด่าง (pH 9) ที่อุณหภูมิห้อง (McKenzie and Sawyer, 1967) ซึ่งอธิบายความแตกต่างของ pH 3 และ pH 9 ได้จากการทดลองของ Monahan และคณะ (1995) ที่ตรวจสอบหาอุณหภูมิความร้อนที่ทำให้โครงสร้างเบต้ากาแลคโตบูลินเสียสภาพจาก DSC ที่ pH 3.0, 6.0, 9.0 และ 10.0 พบว่าที่ pH 3 ต้องใช้อุณหภูมิสูงสุด แสดงให้เห็นถึงความต้านทานต่อการเสียสภาพโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินในสภาวะ pH กรดได้สูงสุด ซึ่งส่งผลต่อการเสียสภาพโปรตีนทำให้เกิดระดับการคลายสายโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินใน pH 3 ที่ต่ำกว่า (บริเวณพันธะไดซัลไฟล์ที่มีความคงตัวสูง จึงเกิดการคลายสายโครงสร้างโปรตีนต่ำ แสดงบริเวณไฮโดรโฟรบิคได้น้อย) ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เตรียมในสภาวะ pH ระดับ 3 มีค่าต่ำ

Monahan และคณะ (1995) ได้อธิบายไว้ว่าที่ pH 9 โครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินจะเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเกิดจากการถูกดึงโปรตอน (deprotonation) ออกจากบริเวณหมู่ซัลไฮดริลของโครงสร้างโปรตีน ทำให้สามารถเกิดการคลายสายของโครงสร้างโปรตีนในบริเวณพันธะไดซัลไฟต์ของ pH 9 มีระดับที่สูง โดย Dufour, Genot and Haertlé (1994) พบว่าโครงสร้างของเบต้าแลคโตกลอบูลิน ที่ระดับด่าง (pH 8) จะแสดงกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ที่มีลักษณะเป็นไฮโดรโฟบิคเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และเป็นช่วงที่สายโครงสร้างโปรตีนเกิดการคลายสายมากกว่า 80 % ขึ้นไป ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนด้วยเวย์โปรตีนมีค่าสูงในสภาวะที่เป็นด่าง (pH 7 และ pH 9) ซึ่งให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนส่วนใหญ่สูงมากกว่าร้อยละ 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.1.2 ผลของปริมาตรเอทานอลที่เติมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

เอทานอลที่เติมลงไปในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต จะส่งผลให้สภาพการละลายของโมเลกุลเวย์โปรตีนไอโซเลตในตัวทำละลายเปลี่ยนไป ซึ่งปริมาตรของเอทานอลที่แตกต่างกันน่าจะมีผลไปกระตุ้นการรวมตัวของโปรตีนและสารสำคัญในระดับที่แตกต่างกันไป ซึ่งจะส่งผลกระทบไปยังค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ผลการทดลองจากตารางที่ 4.1 พบว่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตของผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้จากการสภาวะการผลิต ที่มีการเติมเอทานอลลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตในปริมาตร 0.25, 0.5 และ 0.75 เท่า มีค่าอยู่ในช่วง 51.71 – 85.31, 67.09 – 91.78 และ 47.63 – 85.44 ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาผลค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตของแต่ละระดับในปัจจัยจากกราฟ Main Effect (ภาพที่ 4.1 (b)) พบว่า การเติมเอทานอลในปริมาตร 0.50 เท่าของสารละลายโปรตีนไอโซเลตจะทำให้ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตมีค่าสูงที่สุดอยู่ที่ร้อยละ 80.33 โดยการเติมเอทานอลในปริมาตรที่น้อยลงมาที่ระดับ 0.25 เท่า และการเติมเอทานอลในปริมาตรที่เพิ่มมากขึ้นที่ระดับ 0.75 เท่า จะส่งผลให้ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตมีค่าต่ำลงมาอยู่ที่ร้อยละ 79.93 และ 72.84 ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองของ Gulseren และคณะ (2012) ที่ได้ทำการศึกษาการเอนแคปซูลเลทอนุภาคไอออนเหล็กในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 (w/w) ด้วยวิธีการดีซอลเวชัน ซึ่งในการทดลองได้มีทดสอบผลของการเติมเอทานอลในปริมาตรที่แตกต่างกัน (0 – 4 เท่า) ลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต) ต่อค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มไอออนเหล็กในเวย์โปรตีน ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเติมเอทานอลในปริมาณ 3 เท่า จะให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มไอออนเหล็กในเวย์โปรตีนมากกว่าการเติมเอทานอลในปริมาณ 4 เท่า ทั้งนี้จุดสมดุลในการใช้ปริมาณเอทานอลจะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของโปรตีน และแรงของภายในโครงสร้าง

Mousavi *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลของปริมาณเอทานอล (ร้อยละ 0 – 50) ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงบริเวณพื้นที่เข้าจับ (Ligand binding) ของเรตินอลกับโปรตีนเบต้าแลคโตกลอบูลิน ซึ่งจากการตรวจสอบด้วย Fluorescence measurements พบว่าปริมาณเอทานอลที่ส่งผลให้เกิดปฏิสัมพันธ์ในการเข้าจับของเรตินอลกับเบต้าแลคโตกลอบูลินที่สูงที่สุด คือปริมาณเอทานอลร้อยละ 20 โดยการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ยกตัวอย่างเช่น เอทานอล ที่มีลักษณะเป็นแอมฟิโปรติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(amphiprotic solvent) ที่สามารถทำพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้จะทำให้เกิดการดึงน้ำจากโครงสร้างโปรตีน ทำให้โครงสร้างโปรตีนต้องมีการรักษาสมดุลด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงไฮโดรโฟบิคภายในโครงสร้าง ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงแรงอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic charges) และสภาพขั้ว (dipolar moments) บนโมเลกุลโปรตีน ทำให้โครงสร้างโปรตีนที่ถูกดึงน้ำออก ทำให้เกิดการเผยส่วนของไฮโดรโฟบิคที่อยู่ภายในโครงสร้างโปรตีนออกมา (Futterman and Heller, 1972) เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของเรตินอลกับเบต้าแลคโตกลอบูลิน (Mousavi *et al.,* 2008) โดยในการทดลองของ Mousavi และคณะ(2008) พบว่าการเติมเอทานอลในปริมาณร้อยละ 40 จะพบการปล่อยเรตินอลออกมาสูงมาก และทริปโตเฟน (ส่วนไฮโดรบิค) ก็ไม่ปรากฏในโครงสร้างของโปรตีน

4.1.1.3 ผลของอัตราส่วนปริมาณลูทีนต่อปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

จากตารางที่ 4.1 พบว่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตของผลิตภัณฑ์แห้งที่ได้จากการสภาวะการผลิตที่ใช้อัตราส่วนปริมาณลูทีนต่อปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลตที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100 (มิลลิกรัม:มิลลิกรัม) มีค่าอยู่ในช่วง 51.71 – 87.10, 56.68 – 91.78, 49.83 – 85.33 และ 47.63 – 84.70 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากกราฟวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (ภาพที่ 4.1 (c)) พบว่าผลค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตของสภาวะการผลิตที่ใช้อัตราส่วนปริมาณลูทีนต่อปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ 1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100 (มิลลิกรัม:มิลลิกรัม) มีค่า 60.97, 75.97, 70.77 และ 66.27 ตามลำดับ โดยพบว่าอัตราส่วนความเข้มข้นของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ให้ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสูงที่สุด อยู่ที่ความเข้มข้นของลูทีนต่อปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลตระดับ 0.25:100 โดยเมื่อลดหรือเพิ่มความเข้มข้นที่มากเกินไป จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการเอนแคปซูเลชันมีค่าลดลง ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Bagheri และคณะ (2013) ที่ได้ทำการศึกษาการเอนแคปซูลเลทสารสกัดอินทผลัมในเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยกระบวนการดีซอลเวชัน และมีการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสารสกัดอินทผลัมกับโปรตีนที่ใช้ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัด ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดจะมีค่าที่สูง เมื่อสัดส่วนของเวย์โปรตีนไอโซเลตและสารสกัดอินทผลัมมีค่าเท่ากับ 1:20 แต่ประสิทธิภาพการห่อหุ้มจะลงต่ำลงเมื่อสัดส่วนความเข้มข้นของสารสกัดอินทผลัมมีค่าเพิ่มขึ้น และในงานวิจัยของ Guo และคณะ (2017) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตอนุภาคนาโนของคาเฟอีนในเบต้าแลคโตกลอบูลิน โดยได้ค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสิทธิภาพการห่อหุ้มคาเฟอีนสูงสุดอยู่ที่ร้อยละ 13.54 ด้วยอัตราส่วนโมลของคาเฟอีนต่อเบต้าแลคโตกลอบูลินที่ 50:1 ซึ่งเป็นค่าระดับกลางที่ใช้ในการทดลอง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคาเฟอีนกลับจะทำให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มคาเฟอีนลดลงเช่นเดียวกัน โดยงานวิจัยของ Zou และคณะ (2012) การโหลดสารสกัดภายในมากเกินไป อาจทำให้ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลเลชันลดลง อย่างไรก็ตามหากอัตราส่วนสารสำคัญต่อเวย์โปรตีนมีปริมาณน้อยเกินไป อาจจะเกิด over loading ของโปรตีน ซึ่งจะส่งเสริมให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนกันเองมากกว่าที่จะมารวมตัวกันเป็นอนุภาคเอนแคปซูลเลชัน

สรุปผลการทดลอง ผลของสภาวะการผลิตต่างๆ ต่อค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต พบว่าค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ค่าสูงสุดที่สภาวะการผลิต pH 9 มี ที่สัดส่วนปริมาณของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ 2.50:100 และการเติมเอทานอลในปริมาตร 0.50 เท่า ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ซึ่งเป็นสภาวะที่ดีที่สุดของแต่ละกระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

ขนาดของอนุภาคและลักษณะทางกายภาพจะมีส่งต่อการขนส่งและการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างลูทีน ผลจากการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์แห้งของเวย์โปรตีนไอโซเลตในการกักเก็บลูทีน โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงดังภาพที่ 4.2 โดยมีภาพถ่ายสารละลายของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตจากสภาวะการผลิตต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.3 และขนาดของอนุภาค แสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งผลของแต่ละปัจจัยการผลิตที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของอนุภาคที่เกิดขึ้น มีดังนี้

4.2.2.1 ผลของพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

จากภาพถ่ายของอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพที่ 4.2 (a)) พบว่า อนุภาคที่เกิดขึ้นจากการสภาวะการผลิตที่ใช้สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ pH 9 มีขนาดเล็กมากที่สุด ลักษณะของอนุภาคมีลักษณะเป็นทรงกลมมีขนาดค่อนข้างเล็กสม่ำเสมอ เรียงต่อกัน ซึ่งเป็น pH ที่มีค่าห่างจากค่า pI ของเวย์โปรตีนมากที่สุด และพบอนุภาคที่มีขนาดใหญ่มากขึ้น ที่ pH 7 และ pH 3 โดยอนุภาคที่ได้จากการผลิตด้วย pH 7 มีลักษณะที่ค่อนข้างเล็กกว่าและเป็นทรงกลมมากกว่า เมื่อเทียบกับอนุภาคที่ได้จาก pH 3 และเมื่อเปรียบเทียบขนาดอนุภาคที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Particle sizer พบว่าอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เตรียมได้จากสารละลายเวย์โปรตีนที่ระดับ pH 3, 7 และ 9 มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยเป็น 548.7, 432.2 และ 198.2 นาโนเมตร ตามลำดับ

การปรับค่า pH ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต จะส่งผลต่อขนาดอนุภาคและลักษณะทางกายภาพของโปรตีนได้ เนื่องจากการปรับค่า pH จะสามารถทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุ ซึ่งอาจส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนเกิดแรงดึงดูดกัน (electrostatic attraction) หรือเกิดการผลักกัน (electrostatic repulsion) ได้ ซึ่งการรวมตัวโมเลกุลของเวย์โปรตีนโดยการปรับพีเอชเป็นตัวแปรสำคัญในการควบคุมขนาดหรือการรวมตัวของโมเลกุลเวย์โปรตีนในขณะดีซอลเวชัน โดยเวย์โปรตีนมีค่า Isoelectric point (pI) อยู่ที่ประมาณ 5.1 ซึ่งถ้าหากมี pH ของระบบมีค่าเข้าใกล้ค่า pI จะทำให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและโปรตีน ทำให้เพิ่มการรวมตัวของอนุภาค ในทางกลับกัน หากมี pH ของระบบมีค่าห่างจากค่า pI โปรตีนและตัวทำละลายจะเกิดปฏิสัมพันธ์เพิ่มขึ้น และลดการรวมตัวของโปรตีน (Giroux *et al.,* 2010) ซึ่งลักษณะที่เกิดสามารถส่งผลต่อขนาดที่เกิดขึ้นหลังจากเติมตัวทำละลายอินทรีย์อย่างเอทานอลได้

ในการทดลองของ Uversky และคณะ (1997) ได้ศึกษาการใช้อัลตร้าโซนิเคตในการทำให้เวย์โปรตีนไอโซเลต(0.15%) เสียสภาพจากเวย์โปรตีนไอโซเลตที่พีเอช (7.0 ถึง 10.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับปริมาณเอทานอล (50 ถึง 85.5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าที่สภาวะที่มีปริมาณโปรตีนเสียสภาพสูงสุดอยู่ที่พีเอช 7.5 ร่วมกับเอทานอลที่ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยผลของพีเอช จะเกิดการการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเบต้ากลอบูลิน ที่เรียกว่า Tanford transition (เป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบริเวณหมู่ไทออล บริเวณ EF-loop จะเกิดวงปิดของหมู่ไฮโดรโฟบิคเมื่อค่าพีเอชต่ำกว่า 7 และเปิดออกเมื่อมีค่าพีเอชสูงกว่า 7) เกิดการคลายตัวของโปรตีนสองกลุ่ม (protein dimer) และเกิดการคลายสายแสดงหมู่คาร์บอกซิลออกมา ซึ่งเมื่อพีเอชเพิ่มมากขึ้นจะลดระดับการรวมตัวของโปรตีน

มีการทดลองของ Ju and Kilara (1998) ทำการทดลองการรวมตัวของสารละลายเวย์โปรตีนความเข้มข้นร้อยละ 18 ที่ pH 3 ถึง 7 เมื่อตรวจสอบการรวมตัวของขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Dynamic light scattering พบว่าที่ pH 7 ขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ที่ 8 นาโนเมตร แต่เมื่อระดับพีเอชต่ำลง โปรตีนมีการรวมตัวกันมากขึ้นจนมีขนาด 2.645 ไมโครเมตร ที่ pH 5.2 แต่พอเมื่อระดับพีเอช เริ่มลดลงจาก 5.2 ถึง 4.0 ค่าเฉลี่ยอนุภาคเริ่มมีขนาดลดลง

ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนเริ่มต้นก่อนการดีซอลเวชันนั้นมีลักษณะการรวมตัวของโครงสร้างที่มากน้อยแตกต่างกันไปตามการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ซึ่งเมื่อหลังจากเติมเอทานอล(สารดีซอลเวติ้งเอเจนต์) ก็จะมีผลต่อระดับการรวมตัว ซึ่งมีผลต่อขนาดอนุภาคเวย์โปรตีนที่เกิดขึ้น

4.2.1.2 ผลของปริมาตรเอทานอลที่เติมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของผลิตภัณฑ์แห้งลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ได้จากเตรียมในสภาวะการผลิตที่ใช้ปริมาตรเอทานอลที่ต่างกัน ได้แก่ 0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าต่อปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แสดงดังภาพที่ 4.2 (b) ซึ่งพบว่าขนาดอนุภาคแห้งลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต จะขนาดใหญ่มากขึ้นเมื่อระดับปริมาณเอทานอลที่ใช้มีค่าเพิ่มมากขึ้น แต่ที่น่าสนใจมากคือการรวมตัวของอนุภาคนาโนโปรตีนใน ระดับปริมาณเอทานอล 0.50 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต มีลักษณะของอนุภาคที่มีรูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกลมที่มีขนาดสม่ำเสมอ ซึ่งอาจเป็นจุดสมดุลของปริมาณเอทานอลที่ใช้ในการเอนแคปซูลเลทลูทีน

ซึ่งในการทดลองของ Uversky *et al.,* 1997 ได้ศึกษาการใช้อัลตร้าโซนิเคตในการทำให้เวย์โปรตีนเสียสภาพจากเวย์โปรตีนไอโซเลตที่พีเอช (7.5 ถึง 10) ร่วมกับปริมาณเอทานอล (50 ถึง 85.5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าที่สภาวะที่มีปริมาณโปรตีนเสียสภาพสูงสุดอยู่ที่พีเอช 7.5 ร่วมกับเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทานอลที่ 55 เปอร์เซ็นต์ โดยผลของเอทานอล จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเบต้าแลคโตกลอบูลินตรวจสอบด้วยเครื่อง fluorescence techniques พบว่าโครงสร้างเกิดการเปลี่ยนแปลงค่า dielectric constant โดยสารละลายจะไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนจากสภาวะปกติ (native state) เป็นสภาวะกลาง (intermediate state) ที่เรียกว่าลักษณะ molten globule (ก่อนสภาวะการเสียสภาพโปรตีน) โดยช่วงแรกผลของการเพิ่มปริมาณเอทานอลจะทำให้กลอบูลาร์โปรตีนของเบต้าแลคโตกลอบูลินเสียสภาพ โดยแอลกอฮอล์จะมีผลไปเพิ่มแรงของพันธะไฮโดรเจนภายในโครงสร้างโปรตีนและลดแรงไฮโดรโฟบิคของภายในโมเลกุลโปรตีน มีผลทำให้โปรตีนเกิดการคลายสายออกมา ทำให้เกิดการสร้างพันธะช่วงสั้นๆเกิดเป็นโครงสร้างอัลฟ่าฮีลิค แต่หากมีการเติมเอทานอลมากขึ้น จะมีผลต่อโครงสร้างอัลฟ่าฮีลิคซึ่งไม่ค่อยคงตัวเกิดการรวมตัวมากขึ้นเปลี่ยนแปลงเป็นโครงสร้างเบต้าชีส ซึ่งส่งผลให้เกิดการรวมตัวของโครงสร้างโปรตีนเพิ่มมากขึ้น (Hirota,1999)

โดยผลการทดลองนี้ มีแนวโน้มที่ไปในทิศทางเดียวกับผลการทดลองของ Gülserene*t et al*. (2012) ซึ่งทำการเตรียมอนุภาคนาโนเวย์โปรตีน (5%w/w) โดยมีการใช้เอทานอล 50% ในปริมาณ 0 – 5 เท่า เพื่อช่วยในการรวมตัวของโปรตีน ผลจากการทดลอง พบว่า ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่ใช้มีค่ามากขึ้น เนื่องจากการเติมแอลกอฮอล์จะไปลดสภาพขั้วของโครงสร้างโปรตีน เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันของโมเลกุล (Dufour and Haertle, 1993)

4.2.1.3 ผลของอัตราส่วนปริมาณลูทีนต่อปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต

อัตราส่วนของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ใช้จะมีผลต่อลักษณะและขนาดอนุภาคที่ได้ เมื่อพิจารณาภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่มีอัตราส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต เป็น 1.25:100 2.50:100 3.75:100 และ 5.00:100 (มิลลิกรัม:มิลลิกรัม) (ภาพที่ 4.2 (c)) พบว่าเมื่ออัตราส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต มีค่าเพิ่มมากขึ้น อนุภาคที่ได้มีแนวโน้มที่ใหญ่ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวัดขนาดอนุภาคที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง Particle sizer ที่พบว่าขนาดอนุภาคของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่อัตราส่วน 1.25:100 2.50:100 3.75:100 และ 5.00:100 มีค่าเป็น 186.3, 198.2, 346.8 และ 957.1 ตามลำดับ ทั้งนี้จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของตัวอย่างที่เตรียมจากอัตราส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตเป็น 1.25:100 และ 2.50:100 จะพบลักษณะการรวมตัวของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีความสม่ำเสมอ แต่หากมีการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

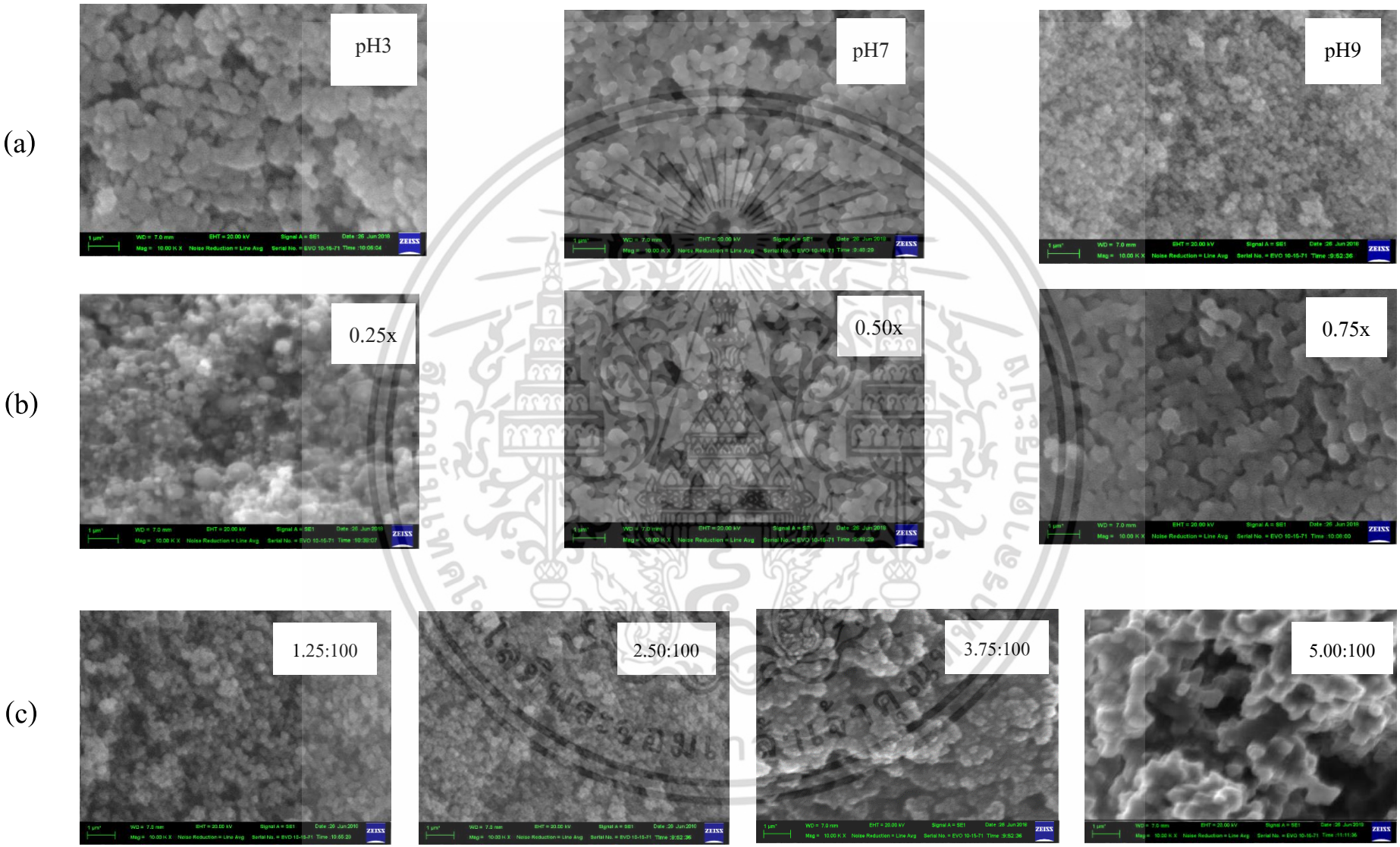
ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายลูทีนมากเกินไป จะพบลักษณะการรวมตัวของอนุภาคที่ไม่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม

การปรับปริมาณความเข้มข้นของสารต่างๆทั้งเอทานอล เวย์โปรตีน และลูทีน ล้วนแต่เป็นการควบคุมสมดุลของ hydrophilic –hydrophobic บนพื้นผิวโมเลกุลในการมารวมตัวกันเองและรวมตัวระหว่างเวย์โปรตีนกับลูทีนเกิดเป็นอนุภาคขึ้นมา ซึ่งการรวมตัวจะส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพและขนาดอนุภาคของผลิตภัณฑ์ โดยลูทีนที่มีความเข้มข้นสูงจะเกิดการรวมตัวเป็นอนุภาคขนาดใหญ่

ตารางที่ 4.3 ขนาดอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตจากการวัดขนาดอนุภาคด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงแบบไดนามิกส์ (Dynamic light scattering)

ทรีตเมนต์ของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง			ขนาดอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต (นาโนเมตร)
ระดับ pH ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต	ปริมาตรของเอทานอล (เท่าของปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต)	สัดส่วนปริมาณลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต	
3	0.50	2.50:100	548.7±4.32
7	0.50	2.50:100	432.2±1.64
9	0.50	2.50:100	198.2±1.52
7	0.25	2.50:100	246.3±3.97
7	0.50	2.50:100	432.2±1.64
7	0.75	2.50:100	852.4±6.94
9	0.50	1.25:100	186.3±2.65
9	0.50	2.50:100	198.2±1.52
9	0.50	3.75:100	346.8±4.22
9	0.50	5.00:100	957.1±6.81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

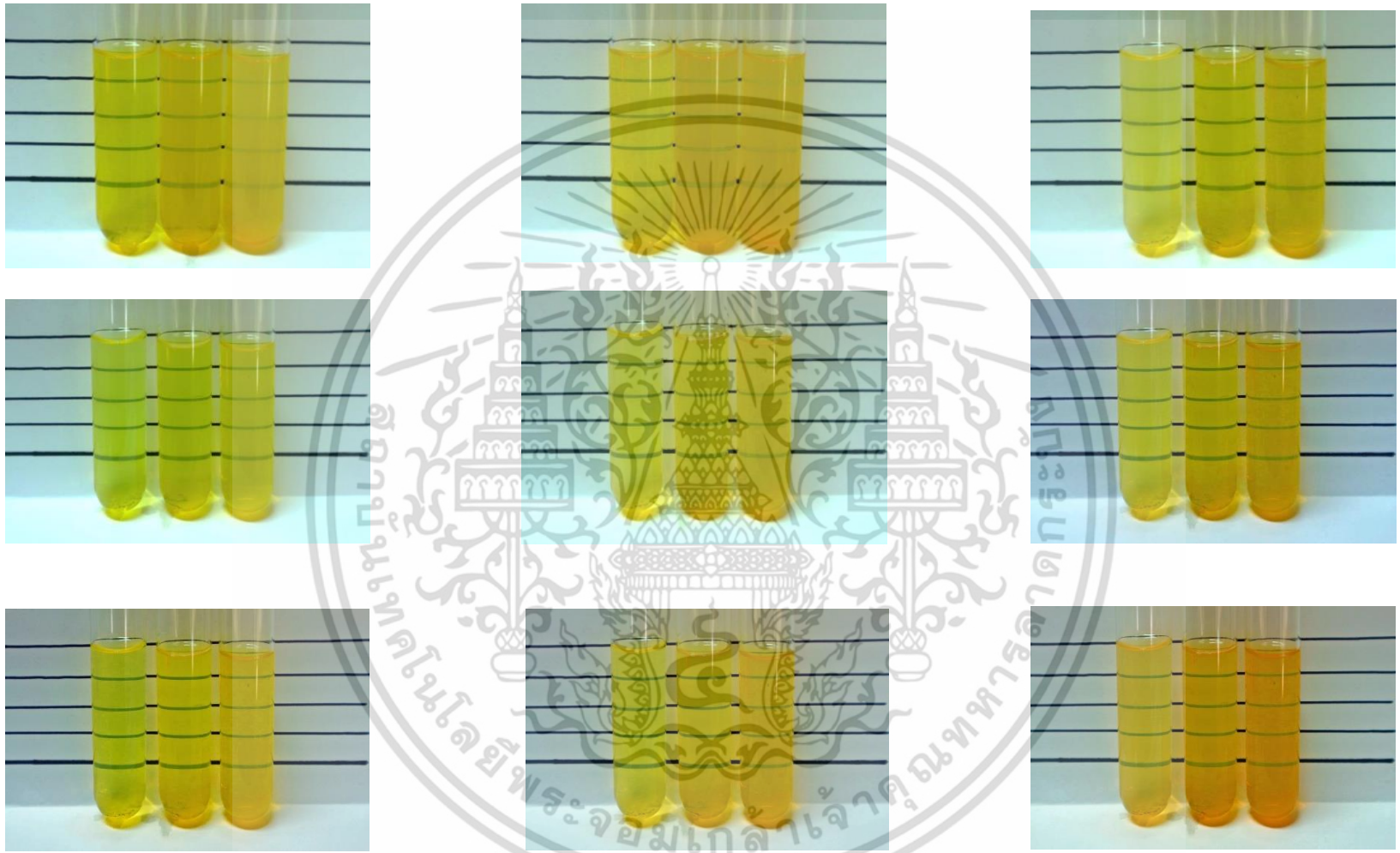


ภาพที่ 4.2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (a) pH 3 7 และ 9 ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (b) ปริมาณเอทานอล 0.25 0.50 และ 0.75 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (c) สัดส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 1.25:100 2.50 :100 3.75:100 และ 5.00:100

(a)

(b)

(c)



ภาพที่ 4.3 ภาพถ่ายสารละลายอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (a) pH 3 7 และ 9 ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (b) ปริมาณเอทานอล 0.25 0.50 และ 0.75 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (c) สัดส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 1.25:100 2.50 :100 และ 5.00:100

4.1.3 ความคงตัวของลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิและเก็บรักษาจะเป็นประโยชน์ในด้านการตรวจสอบอิทธิพลของอุณหภูมิที่ส่งผลต่อความเสถียรที่ทางเคมีและกายภาพของลูทีน การทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิของอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตใน (รูปแบบผงแห้ง) ทำการจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (4 25 และ 40 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน จากการสังเกตโดยภาพรวมพบว่าที่ 40 องศาเซลเซียส มีความคงตัวของความเข้มข้นลูทีนในอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตลดลงมากที่สุด และผลของการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสามารถเก็บรักษาความเข้มข้นของลูทีนไว้ได้สูงสุด ถึงแม้ว่าจะมีการเสื่อมสลายไปบ้าง แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการป้องกันการเสื่อมสลายของลูทีนจากสภาวะแวดล้อม

4.1.3.1 ผลของพีเอชที่มีผลต่อการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนลูทีนใต้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

ผลจากการศึกษาสภาวะพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ต่างกันได้แก่ 3 7 และ 9 ที่มีผลต่อความสามารถในการเก็บรักษาลูทีนในอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลต พบว่าในแต่ละพีเอช การเก็บรักษาลูทีนของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตทั้ง 3 อุณหภูมิ กัน (4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส) มีแนวโน้มความสามารถในการเก็บรักษาในแต่ละอุณหภูมิที่คล้ายคลึงกันคือเมื่อเวลาผ่านไปความเข้มข้นของลูทีนก็จะลดลงบางส่วน แต่จะสามารถเห็นผลความแตกต่างชัดเจนหลังจากทำการเก็บรักษา 15 วัน โดยพบว่าที่ pH 9 ในการเก็บรักษาลูทีนของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตทั้ง 3 อุณหภูมิ มีแนวโน้มสามารถการเก็บรักษาลูทีนไว้ในอนุภาคได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งจากผลการทดลองการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนที่ระดับ pH 9 รูปร่างลักษณะของอนุภาคเป็นโปรตีนก้อนกลมสม่ำเสมอ มีขนาดเล็ก รวมถึงผลของประสิทธิภาพการกักเก็บสารที่สูงมากกว่าพีเอชอื่นๆ จึงอาจส่งผลทำให้มีแนวโน้มความสามารถในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่สูงตามไปด้วย

4.1.3.2 ผลของปริมาณเอทานอลที่มีผลต่อการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนลูทีนใต้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

ผลจากการศึกษาการเติมเอทานอลในปริมาตรที่ต่างกัน ได้แก่ 0.25 0.50 และ 0.75 เท่าของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ต่อความสามารถในการเก็บรักษาลูทีนในเวย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

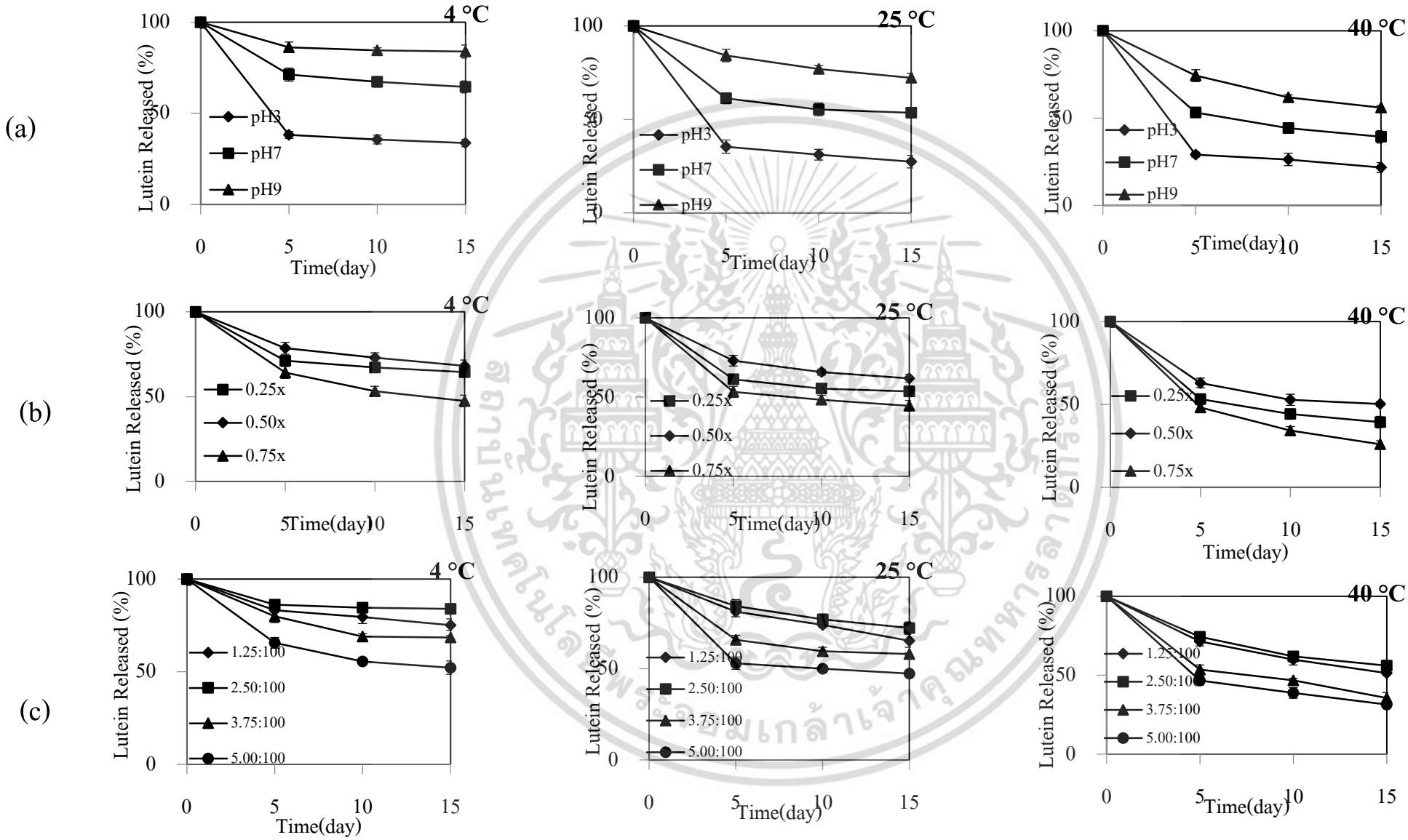
โปรตีนไอโซเลต พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ทำการเก็บรักษาลูทีนของอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต ได้สูงสุดทั้ง 3 อุณหภูมิ กัน (4 25 และ 40 องศาเซลเซียส) หลังจากทำการเก็บรักษา 15 วัน คือ ที่ปริมาณเอทานอล 0.75 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ซึ่งมีแนวโน้มสามารถการเก็บรักษาลูทีนไว้ในอนุภาคต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลของปริมาณเอทานอลที่เหมาะสมที่สร้างชั้นโปรตีนล้อมรอบที่หนาเพียงพอในการเก็บรักษาลูทีนไว้ในอนุภาคได้นานกว่าเอทานอลที่ปริมาณอื่น

4.1.3.3 ผลของความเข้มข้นลูทีนที่มีผลต่อการเก็บรักษาของอนุภาคนาโนลูทีนใต้สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

ผลจากการศึกษาความเข้มข้นของของลูทีต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต (1.25:100 2.50 :100 3.75:100 และ 5.00:100) ที่มีต่อความคงตัวของลูทีนระหว่างการเก็บรักษา พบว่า เมื่อสังเกตที่อัตราส่วนลูทีนต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ 5.00:100 กลับมีประสิทธิภาพการเก็บรักษาที่ต่ำสุด อาจเนื่องจากประสิทธิภาพการกักเก็บลูทีนที่น้อย ร่วมกับการโหลดสารสกัดลูทีนภายในมากเกินไป ที่นอกจากจะส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการเอนแคปซูลเลชันลดลง ก็ยังส่งผลต่อการเก็บรักษาอีกด้วย

ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abbasi และคณะ (2014) การผลิตอนุภาคนาโนอิมัลชันของวิตามิน D3 โดยในการผลิตมีการศึกษาผลของความเข้มข้นที่แตกต่างกันของวิตามิน D3 ถูกเติมเข้าไปในตัวอย่างก่อนการสร้างอนุภาคนาโน หลังจากเก็บรักษาไป 7 วัน พบว่าปริมาณวิตามิน D3 ของอนุภาคที่มีการเติมวิตามิน D3 ในปริมาณ 280 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะมีค่าความเข้มข้นของวิตามินที่ลดลงในระหว่างการเก็บรักษาแค่เพียงร้อยละ 12 – 17 ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการเติมวิตามิน D3 ในปริมาณ 560 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะพบว่าความเข้มข้นของวิตามินจะลดลงมากถึงร้อยละ 20 – 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4. ปริมาณของลูทีนที่เหลืออยู่ในอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 25 และ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน (a) pH 3 7 และ 9 ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (b) ปริมาณเอทานอล 0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต แถว (c) สัดส่วนลูทีน 1.25:100, 2.50 :100, 3.75:100 และ 5.00:100 มิลลิกรัมต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต

4.1.4 การปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตภายใต้สภาวะจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง

การย่อยสลายสารประกอบทางชีวภาพที่ห่อหุ้มในระบบทางเดินอาหารเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนและมีผลกระทบต่อการปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งการศึกษาบทบาทสำคัญในการดูดซึม และการกระจายตัวของสาร ที่มีผลต่อความสามารถในการดูดซึม จะทำการทดลองใน 2 ส่วน คือ การตรวจสอบประสิทธิภาพในการดูดซึมสารประกอบชีวภาพ (Bioaccessibility) และการตรวจสอบการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระออกจากอนุภาค (Free Fatty Acid Release) เพื่อศึกษาความคงตัวของการเอนแคปซูลเลชันลูทีน ในอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตในระบบทางเดินอาหาร

4.1.4.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพในการดูดซึมสารประกอบชีวภาพ (Bioaccessibility)

การตรวจสอบได้จำลองสภาวะทางเดินอาหารที่อนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตที่จะเดินทางผ่าน ได้แก่ ระบบการย่อยอาหาร 3 ส่วน คือ ระบบการย่อยบริเวณปาก ระบบการย่อยในกระเพาะอาหาร และระบบการย่อยในลำไส้เล็ก ซึ่งการทดสอบจะใช้เอนไซม์และการปรับสภาวะพีเอชในการจำลองระบบทางเดินอาหาร โดยในการทดลองจะวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยปริมาณลูทีนจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต และจะมีการเปรียบเทียบค่าที่ได้กับตัวแปรควบคุมซึ่งเป็นลูทีนอิสระในปริมาณเท่ากัน

ผลจากการผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต จาก 3 ปัจจัย คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต ได้แก่ 1.25:100 2.50 :100 3.75:100 และ 5.00:100 ปริมาตรเอทานอล 0.25 0.50 และ 0.75 เท่าของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต และสภาวะพีเอชของสารละลายในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับ 3 7 และ 9 ในการทดสอบการปลดปล่อยลูทีนจากการจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง พบว่าอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตมีความคงตัวมากในสภาวะการย่อยด้วยน้ำลาย (mucin) ไม่เกิดการปลดปล่อยลูทีนออกจากอนุภาค แสดงให้เห็นถึงความคงตัวของอนุภาค ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับในการทดสอบอิมัลชัน B-lactoglubulin ในสภาวะการย่อยด้วยน้ำลายที่อธิบายถึงระดับของการเติม mucin ต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ในระบบการย่อยในปาก ทำให้เกิดการผลักกันของประจุลบของ biopolymers จากแรงแวนเดอร์วาล์ว ทำให้เกิดความคงตัวของอนุภาคในการทดสอบสภาวะการย่อยด้วยน้ำลาย (Singh *et al.,* 2003) ต่อมาในส่วนของกระเพาะอาหาร พบว่าลูทีนในอยู่ในอนุภาค

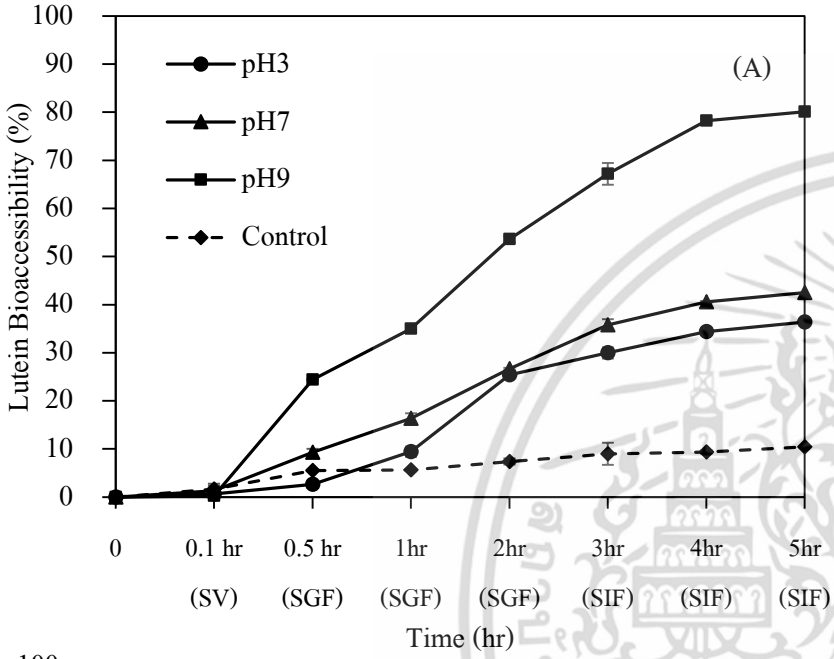
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

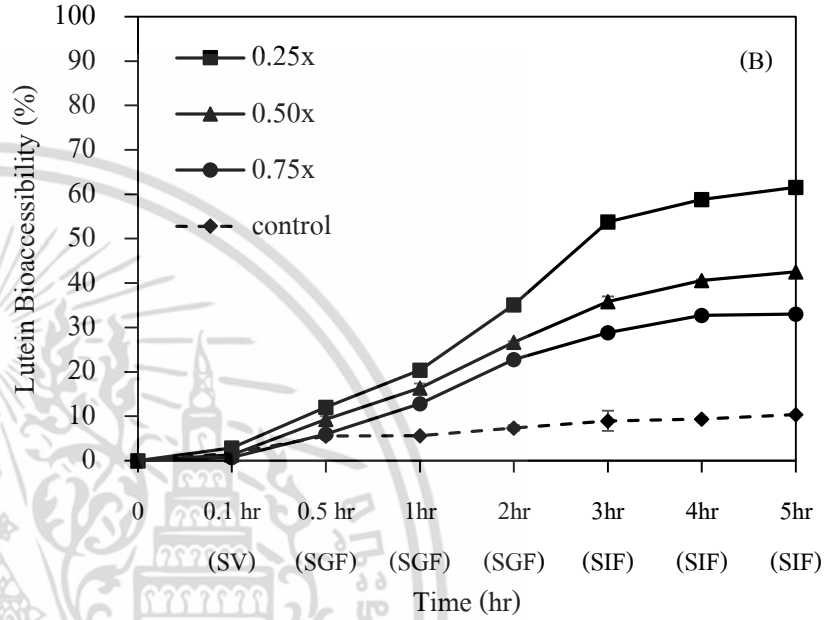
นาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตยังค่อนข้างมีความคงตัวโดยจะมีการปลดปล่อยลูทีนออกมาจากอนุภาคประมาณร้อยละ 50 ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการเอนแคปซูเลชันลูทีนไว้ในอนุภาคนาโนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต บางส่วนสามารถทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์เปปซินได้ ซึ่งได้มีงานวิจัยหลายชิ้นที่ได้อธิบายถึงความสามารถในความคงทนของ b-lactoglobulin การย่อยของเอนไซม์เปปซิน แต่เมื่อโปรตีนเจอสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร อาจทำให้โปรตีนเสียสภาพบางส่วนเกิดการปล่อยลูทีนออกมาจากอนุภาคบางส่วน และส่วนสุดท้าย คือการจำลองรูปแบบการย่อยในสภาวะลำไส้เล็ก ความไม่คงของตัวอย่างเริ่มเห็นได้ชัด สังเกตได้จากปริมาณลูทีนที่ออกมามากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ผลเกิดจากเบต้าแลคโตกลอบูลินไม่คงตัวต่อเอนไซม์แพนครีเอติน ซึ่งสอดคล้องกับวัตถุประสงค์การศึกษาที่ต้องการให้มีการให้เกิดการปลดปล่อยลูทีนส่วนใหญ่ในการย่อยที่สภาวะลำไส้เล็ก

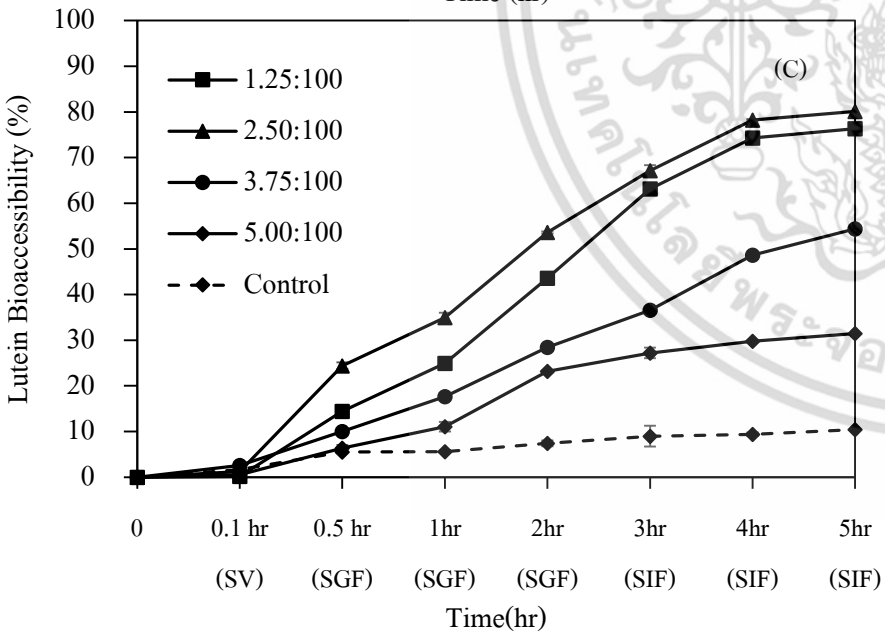
จากผลการทดลองพบว่าแนวโน้มของสภาวะการย่อยของทุกตัวอย่างมีความใกล้เคียงกันมาก อาจเป็นผลเนื่องมาจากในการทดลองใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตเป็นวัสดุห่อหุ้มอนุภาคนาโนเพียงชนิดเดียว แต่เมื่อนำค่าผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่แต่ละระดับพีเอชมาวิเคราะห์ พบว่าที่ pH 3 7 และ 9 ให้ผลการทดสอบ Bioaccessibility เท่ากับร้อยละ 36.39, 55.64 และ 80.10 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5)โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าที่ pH 9 ให้ค่า Bioaccessibility สูงสุด เมื่อผ่านไป 5 ชั่วโมง ในส่วนของปริมาณการเติมเอทานอลลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตเป็น 0.25 0.50 และ 0.75 เท่า ให้ผลการทดสอบ Bioaccessibility เท่ากับร้อยละ 61.58 42.50 และ 33.05 ส่วนผลการวิเคราะห์อัตราความเข้มข้นของลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ระดับ 1.25:100 2.50 :100 3.75:100 และ 5.00:100 พบว่าค่า Bioaccessibility มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 77.36 80.1 54.36 และ 28.44

โดยจากผลการทดลองพบแนวโน้มของอนุภาคที่มีขนาดเล็กหรือมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรในระดับที่สูง จะมีการปลดปล่อยสารลูทีนออกมาได้ดีกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายคลึงกับการทดลองของ Sotomayor-Gerding *et al.*, (2016) ได้ศึกษาค่า Bioaccessibility จากนาโนอิมัลชันของกลุ่มแคโรทีนนอยด์ (แอสต้าแซนทีน และ ไลโคพีน) พบว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันไลโคพีนขนาดช่วงประมาณ 100-200 นาโนเมตร ให้ค่า Bioaccessibility สูงกว่าอนุภาคขนาดช่วงขนาดกลางและขนาดใหญ่ประมาณ 300-500 และ 800-5000 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้







ภาพที่ 4.5. ปริมาณลูทีนที่ถูกปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตในสภาวะการย่อยอาหารแบบจำลองในสภาวะปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก 5 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)

(A) สภาวะพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ pH 3 7 และ 9 สัดส่วนลูทีน 2.50:100 และระดับเอทานอล 0.50 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต

(B) สภาวะปริมาณเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ 0.25 0.50 และ 0.75 เท่าที่สภาวะพีเอช pH 7 สัดส่วนลูทีน 2.50:100

(C) สัดส่วนลูทีนต่อน้ำหนักเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ 1.25:100, 2.50:100 3.75:100 และ 5.00:100 มิลลิกรัม (w:w) ที่ pH 9 และปริมาณเอทานอล 0.50 เท่า

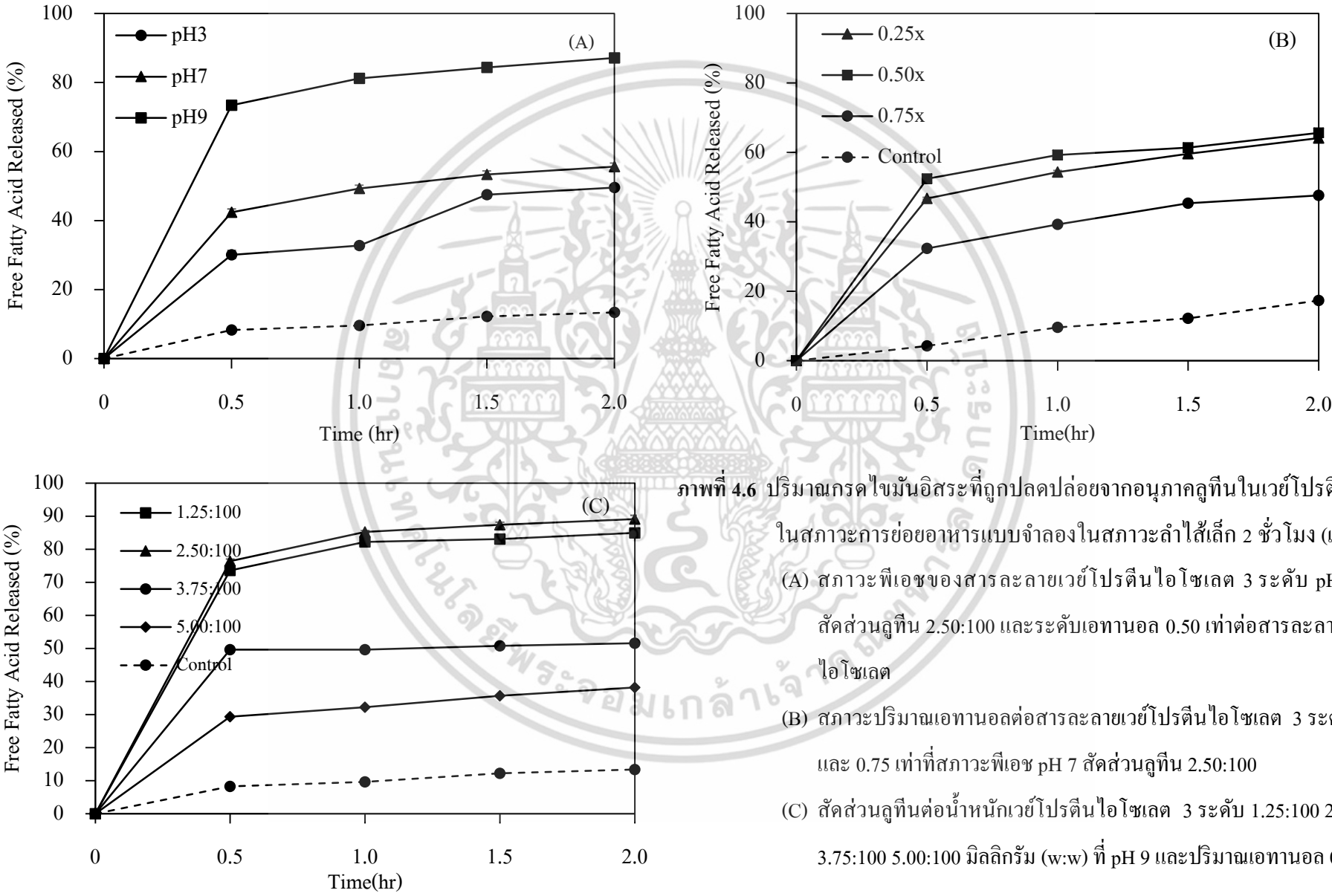
4.1.4.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพอัตราการย่อยกรดไขมันอิสระ (Free Fatty Acid)

ในการทดลองได้ทำการตรวจสอบผลการย่อยจนเกิดกรดไขมันอิสระในช่วงสภาวะจำลองลำไส้เล็กด้วยวิธี pH-stat ซึ่งมักใช้ในการตรวจสอบการย่อยกรดไขมันอิสระในอนุภาคนาโนที่สร้างจากกลุ่มโปรตีนหรือกลุ่มพอลีแซคคาร์ไรด์ (Salvia - Trujillo *et al.,* 2013)

ผลการทดลองเส้นแนวโน้มอัตราการย่อยกรดไขมันอิสระ (FFA release) ที่แต่ละระดับพีเอชมาวิเคราะห์ พบว่าที่ pH 3 7 และ 9 ให้ผลการทดสอบ FFA release เท่ากับร้อยละ 49.54, 55.64 และ 87.12 โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)โดยพบว่าที่ pH 9 ให้ค่า FFA release สูงสุด เมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง ซึ่งอาจเกิดจากขนาดอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ pH 9 ที่มีขนาดเล็กกว่า pH 7 และ pH 3 ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกริยาของเอนไซม์แพนครีเอติน ทำให้เกิดการย่อยไขมันและมีการปล่อย FFA ออกมาในปริมาณที่สูง ซึ่งพบผลการทดลองในทำนองเดียวกันนี้ เมื่อทดสอบการปลดปล่อย FFA จากตัวอย่างที่ใช้เอทานอลเป็นปริมาตร 0.25 , 0.50 และ 0.75 เท่าในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ซึ่งให้ผล FFA release เท่ากับร้อยละ 64.12, 55.64 และ 47.81 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6) โดยการเติมเอทานอลในปริมาณที่มากขึ้นจะส่งทำให้อนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนที่ได้มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่งผลให้มีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่มีค่าลดลง เป็นการลดพื้นที่ในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งส่งผลทำให้ค่า FFA ของตัวอย่างที่ได้จากสภาวะการเตรียมโดยใช้เอทานอลในปริมาณที่สูง ที่ค่า FFA release ที่ต่ำ

จากการทดลองให้ผลแนวโน้มการทดลองคล้ายกับ Troncoso และคณะ (2012) ที่ได้ทดสอบค่า FFA release จากนาโนอิมัลชันน้ำมันข้าวโพดที่ห่อหุ้มด้วยเบต้าแลคโตกลอบูลินและมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อย่างเฮกเซนในการลดขนาดอนุภาค โดยพบว่าอนุภาคนาโนอิมัลชันน้ำมันข้าวโพดที่มีขนาดเล็กสุดที่ 48 นาโนเมตร สามารถให้ค่า FFA release สูงสุดมากกว่าร้อยละ 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ปริมาณกรดไขมันอิสระที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ในสภาวะการย่อยอาหารแบบจำลองในสภาวะลำไส้เล็ก 2 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)

(A) สภาวะพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ pH 3 7 และ 9 สัดส่วนลูทีน 2.50:100 และระดับเอทานอล 0.50 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต

(B) สภาวะปริมาณเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ 0.25 0.50 และ 0.75 เท่าที่สภาวะพีเอช pH 7 สัดส่วนลูทีน 2.50:100

(C) สัดส่วนลูทีนต่อน้ำหนักเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ 1.25:100 2.50:100 และ 3.75:100 5.00:100 มิลลิกรัม (w:w) ที่ pH 9 และปริมาณเอทานอล 0.50 เท่า

4.2 การผลิตอิมัลชันลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ

ในการทดลองจะมีการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ได้แก่ทวีน 80 (Tween-80) หรือเลซิติน (Lecithin) ร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลต (Whey protein isolate: WPI) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในระบบอิมัลชัน และเพื่อเพิ่มความคงตัวของขนาดอนุภาคนาโนลูทีนในระหว่างการเก็บรักษา

4.2.1 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ

การผลิตอนุภาคลูทีนนาโนที่ห่อหุ้มด้วย เวย์โปรตีนไอโซเลต (WPI), เวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับทวีน 80 (WPI-Tween 80) และ เวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับเลซิติน (WPI-lecithin) อาศัยหลักการใช้ของอิมัลซิไฟเออร์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กสามารถดูดซับบนและสร้างพื้นผิวอนุภาคได้อย่างรวดเร็วกว่าโมเลกุลโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ในระหว่างการทำอิมัลชัน (Jafari *et al.,* 2007; McClements, 1999) ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสำคัญ โดยผลจากการทดลอง พบว่าการห่อหุ้มลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตเพียงอย่างเดียว (only WPI) มีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มอยู่ที่ประมาณร้อยละ 87.14 (ตารางที่ 4.5) และการใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีมวลโมเลกุลต่ำร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลต ได้แก่ WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin จะให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนอยู่ที่ร้อยละ 91.36 และ 88.47 ตามลำดับ โดยค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Sari และคณะ (2013) ซึ่งพบว่าสามารถใช้ WPC-Tween 80 ในการห่อหุ้มอนุภาคนาโนอิมัลชันเคอคูมินที่ทำให้มีประสิทธิภาพการห่อหุ้มเคอคูมินมากกว่าร้อยละ 90 เนื่องจาก Tween-80 สามารถทำ anionic complex กับโปรตีนที่มีประจุบวกซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการเก็บของนาโนอิมัลชันที่สูงขึ้น

การผลิตอนุภาคลูทีนที่ห่อหุ้มด้วย WPI-Tween-80 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บได้สูง เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่โมเลกุลต่ำอย่าง Tween-80 มีความสามารถลดแรงตึงผิวได้สูง เข้าดูดซับบนพื้นผิวอนุภาคได้อย่างรวดเร็ว เพราะมีพฤติกรรมการดูดซับแบบแข่งขันบนอินเตอร์เฟส (interface) ถึงแม้ว่าโปรตีนจะมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว แต่จะน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ แต่โปรตีนนอกเหนือจะลดแรงตึงผิวบน interfacial ยังสามารถสร้างฟิล์ม viscoelastic รอบหยดอนุภาค ซึ่งเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุล non-covalent และ covalent disulphide เกิดการ cross-linking ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวโมเลกุลต่ำไม่สามารถสร้างฟิล์มที่มีความยืดหยุ่นได้ ดังนั้นควรมีการใช้สารลดแรงตึงผิวทั้งโมเลกุลสูงและโมเลกุลต่ำเพิ่มประสิทธิภาพการกักเก็บมากยิ่งขึ้น (Courthaudon *et al.,*1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2. ลักษณะของอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ

4.2.2.1. ผลของการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมกับเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อขนาดอนุภาคลูทีน

ผลจากการศึกษาขนาดของอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยสารลดแรงตึงผิวที่มีมวลโมเลกุลต่ำร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลต พบว่าอนุภาคลูทีนที่ห่อหุ้มด้วย WPI, WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin มีขนาดหยด 203.5 ± 22.51, 143.0 ± 12.40 และ 105.3 ± 18.82 นาโนเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) โดยค่า PDI ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงการกระจายตัวของอนุภาคลูทีนในระบบอิมัลชัน มีค่าน้อยกว่า 0.30 ซึ่งค่า PDI ที่ต่ำนี้ จะแสดงถึงความคงตัวของอนุภาคนาโนในการเก็บรักษาที่มาก

การเติมสารลดแรงตึงผิวมีมวลโมเลกุลต่ำอย่าง Lecithin และ Tween-80 เข้าสู่ระบบจะส่งผลให้ขนาดอนุภาคนาโนลูทีนมีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสารลดแรงตึงผิวขนาดเล็กนี้จะสามารถเคลื่อนไปดูดซับที่ผิวและล้อมรอบลูทีนไว้ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งจะป้องกันการเข้ามารวมตัวกันของลูทีน อีกทั้งเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำมีขนาดเล็ก ส่งผลให้ขนาดอนุภาคลูทีนที่ล้อมรอบด้วยสารลดแรงตึงผิวร่วมที่ได้มีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ WPI ในระบบเพียงอย่างเดียว

งานวิจัยของ Mantovani และคณะ (2013) รายงานว่าส่วนผสมของ WPI และ lechithin จะเกิดโครงสร้างเมทริกซ์ที่ซับซ้อนกว่าสารลดแรงตึงผิวตัวอื่นๆ เพราะมีองค์ประกอบหลักเป็นฟอสโฟลิปิด (phospholipids) โดยมีปัจจัยระดับโมเลกุลคือโครงสร้างส่วนหัวของเลซิติน (เช่น โคลีนกับเอธานอลซามีน) และ โซ่กรดไขมัน (เช่น palmitoyl กับ dioleyl) ทำให้สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลไขมันมากกว่า Tween-80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่สุด จึงสามารถลดแรงตึงผิวอย่างรวดเร็วในขณะผลิตอนุภาคนาโน เกิดการดูดซับแบบแข่งขันกับโมเลกุลโปรตีน ส่งผลให้ปริมาณเวย์โปรตีนบนอินเตอร์เฟสลดลง สามารถทำให้ได้อนุภาคนาโนที่มีขนาดเล็กกว่าการใช้โปรตีนเพียงอย่างเดียว

4.2.2.2 ผลของการใช้สารลดแรงตึงผิวร่วมกับเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อค่าศักย์ซีต้าของอนุภาคลูทีนนาโนอิมัลชัน

ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวอนุภาค สามารถใช้ในอธิบายความคงตัวในการกระจายตัวของอนุภาคนาโนอิมัลชันได้ ซึ่งศักย์ซีต้าในอนุภาคแขวนลอยที่เสถียรจะมีค่าอยู่ในช่วงมากกว่า +30 มิลลิโวลต์ หรือ น้อยกว่า -30 มิลลิโวลต์ (Clogston and Patri, 2011) ค่าศักย์ซีต้ามีผลต่อลักษณะประจุของพื้นผิวของอนุภาคนาโน โดยหากมีค่าสัมบูรณ์สูงจะนำไปสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แรงผลักดันที่มากขึ้นระหว่างอนุภาค ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มความคงตัวทางกายภาพของอนุภาคนาโนได้

จากการทดลองพบว่าค่าศักย์ซีต้าของค่าอนุภาคนาโนลูทีน WPI, WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin มีค่าเท่ากับ -34.92, -26.91และ -49.09 มิลลิโวลต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4.5) การใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตเพียงอย่างเดียวแสดงให้เห็นถึงศักย์ซีต้าที่เป็นลบ เนื่องจาก WPI มีประจุลบที่พีเอช (pH) กลาง และจากการเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีมวลโมเลกุลต่ำอย่างเลซิตินและทวีน 80 ส่งผลให้ค่าศักย์ซีต้าอนุภาคนาโนลูทีนเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยค่าศักย์ซีต้าใน lecithin เป็นลบสูง เป็นผลมาจากกลุ่มฟอสเฟตของเลซิติน นอกจากนี้พบว่าเลซิติน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการคลายสายของโครงสร้างโปรตีนจนแสดงประจุลบบริเวณพื้นผิวของโปรตีนจึงทำให้มีค่าศักย์ซีต้าอนุภาคนาโนลูทีนมีค่าลบที่สูงขึ้น ในขณะที่การใช้ทวิน คจจะมีหมู่โมเลกุล hydrophilic (polyoxyethylene) ที่มีขนาดใหญ่ที่ใช้ดูดซับพื้นผิวอนุภาคจึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์ซีต้าโดยหลักๆ จากการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตเพียงอย่างเดียว (Klang and Valenta, 2011)

ตารางที่ 4.4 ขนาดอนุภาค ค่าการกระจายตัวอนุภาค ค่าศักย์ซีต้า และค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีนเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ

ตัวอย่าง	ขนาดอนุภาค (nm)	PDI (a.u.)	Zeta Potentail (mV)	EE(%)
WPI	203.5±22.51c	0.243	-34.92±0.26b	87.141±0.29c
WPI-Tween-80	143.0±12.40b	0.234	-26.91±0.31c	91.361±0.20a
WPI- lecithin	105.3±18.82a	0.284	-49.09±0.17a	88.471±0.20b

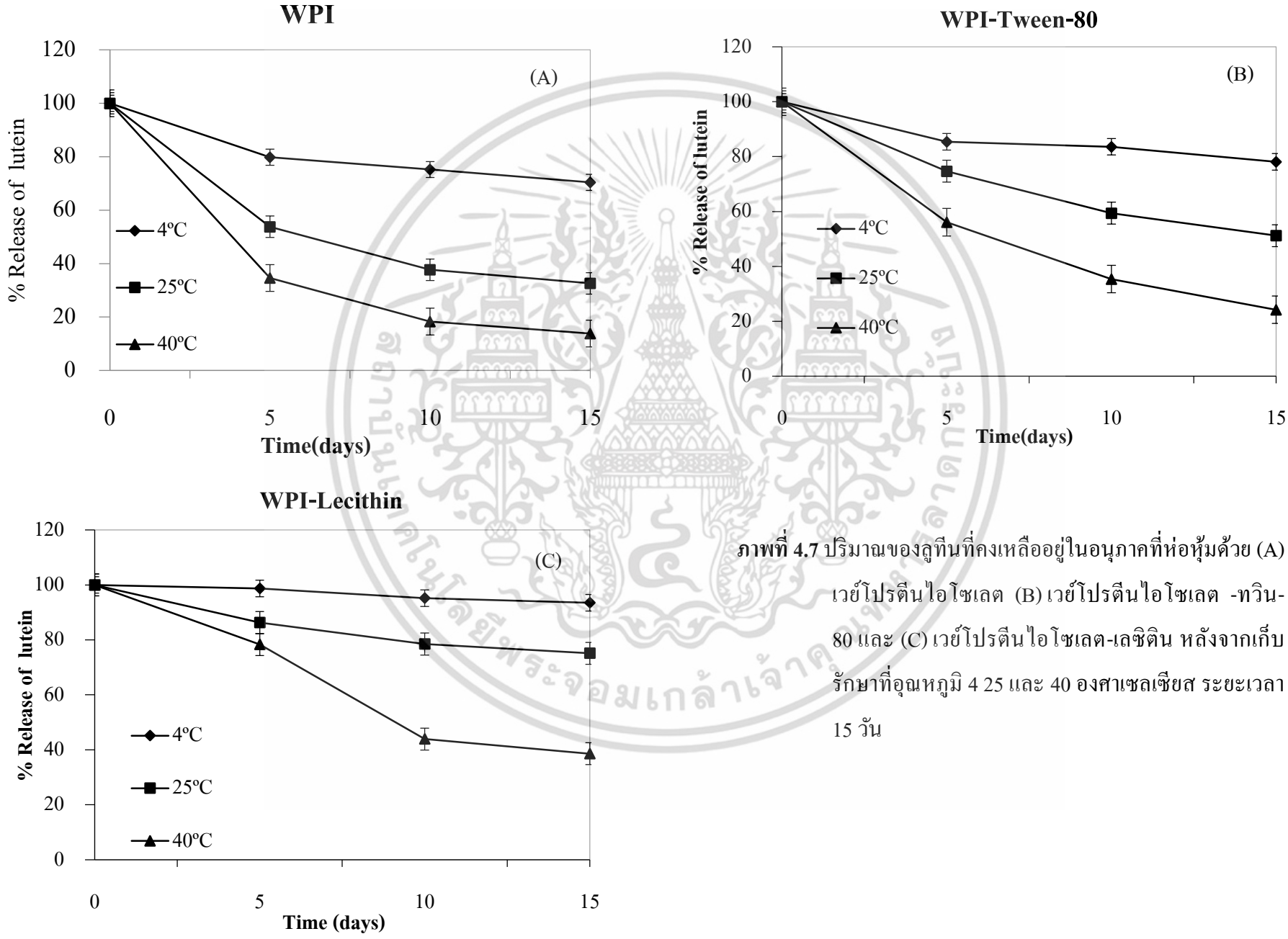
4.2 3 ความคงตัวของลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

ผลจากการศึกษาความคงตัวของการเก็บรักษาอนุภาคนาโนลูทีนที่ห่อหุ้มด้วย WPI, WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5, 10, 15 วัน พบว่าทุกสภาวะการห่อหุ้มอนุภาคนาโนลูทีนด้วย WPI, WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin มีการสลายตัวมากขึ้น เมื่อทำการเก็บรักษาอิมัลชันในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยเมื่อสังเกตแนวโน้มการสลายตัวของลูทีนที่ห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต (WPI) เพียงอย่างเดียว เมื่อเก็บไว้ที่ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน พบว่าปริมาณการสลายตัวของลูทีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 29.6 , 67.4 และ 86.2 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของการเติมสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำในการห่อหุ้มลูทีน ทั้ง WPI-lecithin และ WPI-Tween-80 พบแนวโน้มการสลายตัวของลูทีนต่อระยะเวลาการเก็บรักษาที่คล้ายคลึงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต (WPI) เพียงอย่างเดียว พบว่าลูทีนเกิดการสลายตัวเร็วที่สุดในทุกอุณหภูมิการเก็บรักษา ยกตัวอย่างเช่น ที่ 25 องศาเซลเซียส การสลายตัวของลูทีนที่ห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต (WPI) เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 15 วันพบว่าเกิดการสลายตัวประมาณร้อยละ 67.4 ในขณะที่ WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin จะมีการลดลงของลูทีนในปริมาณที่ต่ำกว่า คิดเป็นประมาณร้อยละ 48.8 % และ 24.9% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) ทั้งนี้พบว่า WPI-lecithin ให้ความเสถียรในการเก็บรักษาลูทีนที่สูงกว่า WPI-Tween-80 อาจเนื่องมาจากการที่โครงสร้างของ WPI ร่วมกับ lechithin เกิดเป็นเมทริกซ์ที่ซับซ้อนกว่าสารลดแรงตึงผิวตัวอื่นๆ (Mantovani *et al.,* 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

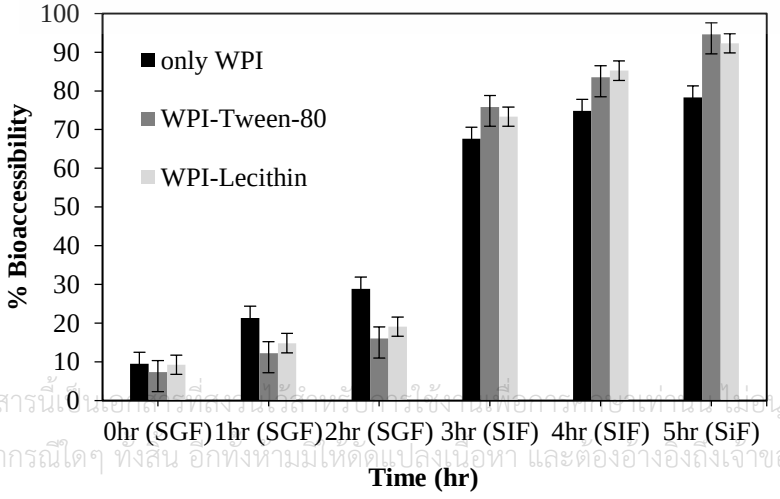


ภาพที่ 4.7 ปริมาณของลูทีนที่คงเหลืออยู่ในอนุภาคที่ห่อหุ้มด้วย (A) เวย์โปรตีนไอโซเลต (B) เวย์โปรตีนไอโซเลต -ทวิน-80 และ (C) เวย์โปรตีนไอโซเลต-เลซิติน หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 25 และ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 วัน

4.2.4. การปลดปล่อยลูทีนจากอนุภาคลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลตร่วมกับสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำภายใต้สภาวะจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง

ผลการตรวจสอบการปลดปล่อยลูทีนภายใต้สภาวะจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลอง ของอนุภาคนาโนลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วย WPI, WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin พบว่าหลังจากผ่านการย่อยอาหารภายใต้สภาวะการย่อยอาหารแบบจำลองในกระเพาะอาหาร นาน 2 ชั่วโมง ลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วย WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin ถูกปลดปล่อยออกมาน้อยกว่าร้อยละ 20 ในขณะที่ลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต (WPI) เพียงอย่างเดียว มีการปลดปล่อยลูทีนออกมาประมาณร้อยละ 30 (ภาพที่ 4.8) ความต้านทานการย่อยของนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) ต่อการย่อยของเอนไซม์เปปซิน (pepsin) ในน้ำในกระเพาะอาหาร เกิดจากความต้านทานของเบต้าแลคตาโกบูลิน (beta-lactoglobulin) ต่อการย่อยอาหารของเปปซิน เนื่องจากเบต้าแลคตาโกบูลินมีความสามารถทนต่อการสลายตัวต่อเอนไซม์ของกระเพาะอาหารได้ (Fu *et al.,* 2002) โดยเวย์โปรตีนไอโซเลตมีส่วนประกอบของเบต้าแลคตาโกบูลินถึงร้อยละ 65

หลังจากผ่านไป 5 ชั่วโมง ภายใต้การย่อยอาหารแบบจำลองในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก การปลดปล่อยลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต (WPI) เพียงอย่างเดียว มีค่าประมาณร้อยละ 75 (รูปที่ 4.8) โดยที่ปริมาณการปลดปล่อยลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วย WPI-Tween-80 และ WPI-lecithin มีค่าสูงถึงประมาณร้อยละ 94.6 และ 92.3 ตามลำดับ โดยงานวิจัย Sarkar และคณะ (2010) ได้อธิบายถึงลักษณะของเบต้าแลคตาโกบูลินเมื่อผ่านสภาวะการย่อยจากลำไส้เล็กจะถูกย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งจะส่งผลให้ลูทีนถูกปลดปล่อยออกมา และเนื่องจากอนุภาคของลูทีนที่ถูกห่อหุ้มด้วย WPI-lecithin และ WPI-Tween-80 มีขนาดอนุภาคที่เล็กส่งผลให้มีพื้นที่ผิวมาก ทำให้สามารถส่งเสริมการเข้าทำงานของเอนไซม์ ทำให้มีแนวโน้มการปลดปล่อยที่สูงขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจาก WPI-lecithin มีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า จึงเกิดการปลดปล่อยลูทีนออกมาได้น้อยกว่า WPI-Tween-80 เมื่อใช้ระยะเวลาการย่อยที่เท่ากัน



ภาพที่ 4.8 ปริมาณลูทีนที่ถูกปลดปล่อยจากอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตในสภาวะจำลองการย่อยอาหารในหลอดทดลอง ที่ห่อหุ้มอนุภาคลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต, เวย์โปรตีนไอโซเลตกับทวิน-80 และ เวย์โปรตีนไอโซเลตกับเลซิติน(เปอร์เซ็นต์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ผลจากการศึกษาการห่อหุ้มลูทีนด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต พบว่า สภาวะที่ใช้การผลิตโดยการเตรียมสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับพีเอช 9 มีการเติมเอทานอลลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตในปริมาตร 0.75 เท่า และมีอัตราส่วนระหว่างลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลตอยู่ที่ 2.50:100 สามารถผลิตอนุภาคลูทีนได้ประมาณ 198 นาโนเมตร โดยมีค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลตสูงถึงกว่าร้อยละ 90 และมีการปลดปล่อยสารลูทีนในการจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลองได้มากกว่าร้อยละ 80

5.1.2 ผลจากการผลิตนาโนอิมัลของลูทีน พบว่า การใช้สารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ ทั้งทวีน 80 และเลซิติน ร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลต จะส่งผลให้ค่าประสิทธิภาพการห่อหุ้มลูทีน การเก็บรักษาลูทีน รวมถึงการปลดปล่อยสารลูทีนในการจำลองระบบการย่อยอาหารในหลอดทดลองสูงกว่าการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตเป็นตัวห่อหุ้มแต่เพียงอย่างเดียว โดยที่ขนาดอนุภาคนาโนอิมัลของลูทีนที่ได้จากการสารลดแรงตึงผิวมวลโมเลกุลต่ำ (ทวีน 80 และเลซิติน) ร่วมกับการใช้เวย์โปรตีนไอโซเลตจะมีขนาดอนุภาคนาโนที่เล็กกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

การเพิ่มเสถียรภาพของอนุภาคนาโนของลูทีน อาจจะสามารถทำได้ด้วยการเติมสารต้านออกซิเดชันลงลูทีนที่ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

พงศธร สังข์เผือก. 2554. **สารสกัดแคโรทีนอยด์ในดวงตา: ลูทีนและซีแซนทีน**. สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

พิทยา ภมรเวชวรรณ. 2555. **โรคตาที่พบบ่อยในผู้สูงอายุ.** คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

Aberkane, L., Jasniewski, J., Gaiani, C., Hussain, R., Scher, J. and Sanchez, C. 2012. "Structuration mechanism of B-lactoglobulin Eacacia gum assemblies in presence of quercetin." **J. Food hyd.** 29: 9-20.

Abbasi, A., Djomeh, Z.E., Mousavi, M.A.E. and Davoodi, D. 2014. "Stability of vitamin D3 encapsulated in nanoparticles of whey protein isolate." **Food Chem**. 143: 379–383

Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., and Agboola, S. "Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities **J Food Eng.** 122: 15-27

Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., Rautalahti, M., Pietinen, P., Heinonen, O.P., 1996. "Effects of supplemental betacarotene, cigarette smoking, and alcohol consumption on serum carotenoids in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study." **J. Clinic Nutrition.** 66: 336-372.

Aleman, T.S., Duncan, J.L., Bieber, M.L., de Castro, E., Marks, D., Gardner, L.M., Steinberg, J.D., Cideciyan, A.V., Maguire, M.G. and Jacobson, S.G. 2001. "Macular pigment and lutein supplementation in retinitis pigmentosa and usher syndrome" **Invest. Ophthalmol.** 42: 1873-1881.

Allah Mousavi, S.H., Chobert, M.J. Bordbar, A.K. and Haertl, T. 2008. "Ethanol Effect on the Structure of B-Lactoglobulin B and Its Ligand Binding" **J. Agric. Food Chem.** 56: 8680-8684

Alves-Rodrigues, A. and Shao, A. 2004. "The science behind lutein." **Toxicol Letter.** 150: 57–83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anand, P., Nair, H. B., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Yadav, V. R. and Tekmal, R. R. 2010. "Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo." **Int J Pharm.** 79(3): 330-338.

Arts, I. C. W., Van de Putte, B. and Hollman, P. C. H. 2000. "Catechin contents of (BLG) nanoparticles. Journal of Microencapsulation." **Food Chem**. 108: 1122-1132.

Augustin, M. A. and Sanguansri, L. 2008. "Encapsulation of bioactives." **Food materials science Principles and practice.** New York: Springer. pp 601.

Bagheri, L., Madadlou, A., Yarmand, M. and Mousavi. M.E. 2013. "Nanoencapsulation of date palm pit extract in whey protein particles generated via desolvation method. **Food Res Int**. 51: 866-871.

Baroli, I. and Niyogi, K., 2000. "Molecular genetics of xanthophyll dependent photoprotection in green algae and plants." **Philos. Trans. R. Soc. Load B. Biol. Sci.** 355: 1385-1394.

Bengoechea, C., Peinado, I., and McClements, D. J. 2011. "Formation of protein nanoparticles by controlled heat treatment of lactoferrin: factors affecting particle characteristics." **J. Food hyd.** 25: 1354-1360.

Bernstein, P.S., Zhao, D.Y., Wintch, S.W., Ermakov, I.V., McClane, R.W. and Gellermann W. 2002. "Resonance Raman measurement of macular carotenoids in normal subjects and in age-related macular degeneration patients." **Invest. Ophthalmology.** 109: 1780-1787.

Bhattacharyya, S., Datta, S., Mallick, B., Dhar, P. and Ghosh, S. 2010. "Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian marigold flower (*Tagetes patula L.)* extracts." **J. Agric. Food Chem.** 58(14): 8259-8264.

Bilati, U., Allémann, E. and Doelker, E. 2005. "Development of a nanoprecipitation by two step desolvation a new preparation method surface modifications and cell uptake" **Int J Pharm.** 17(2): 187-193.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Birkhauser, V., Chew, B. P. and Park, J. S. 2004. "Carotenoid action on the immune response." **J. Nutr**. 134: 257-261.

Bone, R.A., Landrum, J.T., Guerra, L.H. and Ruiz, C.A. 2003. "Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in humans." **J. Nutr**. 133: 992-998.

Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D. and Kreuter, J. 2004. "Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles." **Int J Pharm.** 57(2): 369-375.

Bowen, P.E., Herbat-Espinosa, S.M., Hussain, E.A. and Stacewicz-Sapuntzakis, M. 2002. "Esterification does not impair lutein bioavalaibility in humans." **J. Nutr.** 132: 3668-3673.

Breithaupt, D.E., Bamedi, A. and Wirt, U. 2002. "Carotenol fatty acid esters: easy substrates for digestive enzymes." **Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.** 132: 721–728.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander H. 2004. **Carotenoids Handbook.** Boston, Berlin: Basel pp.408

Brown, L., Rimm, E.B., Seddon, J.M., Giovannucci, E.L., Chasan-Taber, L., Spiegelman, D., Willett, W.C. and Hankinson, S.E. 1999. "A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men." **A.J. Clinic Nutrition**. 6: 517-524.

Bryant, C.M. and McClements, D.J. 1998. "Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey." **Trend Food Sci. Tech**. 9: 143-151.

Buzea, C., Pacheco, I.I. and Robbie, K. 2007. "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity." **Bio. Interphases**. 2: 170-182.

Changdong Z., Hui C., Pengfei J., Yijing Y. and Jing H., 2014. "Preparation of lutein-loaded particles for improving solubility and stability by Polyvinylpyrrolidone (PVP) as an emulsion-stabilizer." **Food Chem.** 156: 123–128

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chasan-Taber, L., Willett, W.C., Seddon, J.M., Stampfer, M.J., Rosner, B., Colditz, G.A., Speizer, F.E. and Hankinson, S.E. 1999. "A prospective study of carotenoid and Vitamin A intakes and risk of cataract extraction in US women." **AJ. Clinic Nutrition**. 70: 509-516.

Chen, L., Remondetto, G.E. and Subirade, M. 2006. "Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems". **Trends Food Sci Technol.** 17(5): 272-283.

Chen, T. Yamaguchi, H. Takamura, and T.M. Atoba. 2010. "Novel technology for the self-assembled catechin/gelatin nanoparticles and their characterization." **J. Agric. Food Chem.** 58(11): 6728-6734.

Chow, C.K. 2000. **Vitamin E. Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition.** Philedelphia: W.B. Saunders Company. pp 584–596.

Chuacharoen, T. and Sabliov, C.M. 2016. "Stability and controlled release of lutein loaded in zein nanoparticleswith and without lecithin and pluronic F127 surfactants." **Trends Food Sci Technol.** 503: 11-18.

Coester, C.J., Langer, K., Von Briesen, H. and Kreuter, J., 2000. "Gelatin nanoparticles a combination of beta carotene and Vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease." **N. England. J. Medical.** 334: 1150–1155.

Croguennec, T., O'Kennedy, B.T. and Mehra, R. 2004. "Heat-induced denaturation/aggregation of beta-lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed." **Int. Dairy J.** 14: 399-409.

Dagnelie, G., Zorge, I.S. and McDonald, T.M. 2000. "Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the Internet." **Optometry**. 71: 14-16.

de la Fuente, M.A., Singh, H. and Hemar, Y. 2002. "Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins." **Trend Food Sci. Tech.** 13: 262-274.

Demmig-Adams, B., Gilmore, A.M. and Adams W.W. 1996. "Carotenoids: in vivo function of carotenoids in higher plants." **FASEB J.** 10: 403-412.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Desfougeres, Y., Croguennec, T., Lechevalier, V., Bouhallab, S. and Nau, F. 2010. "Charge and size drive spontaneous self-assembly of oppositely charged globular proteins into microspheres." **J. Phy ChemB.** 114: 4138-4144.

Duncan, I.L., Aleman, T.S., Gardner, L.M., De Castro, E., Marks, D., Emmons, I.M., Bieber, M.L., Steinberg, I.D., Bennett,I., Stone, E.M., MacDonald, I.M., Cideciyan, A.V., Maguire,M.G. and Jacobson, S.G. 2002. "Macular pigment and lutein supplementation in choroideremia." **Exp. Eye Res.** 74: 371-381.

Edwards, P.J.B. and Jameson, G.B. 2014. Chapter 7 - Structure and stability of whey proteins. **In Milk Proteins**. 2nd ed. pp. 201–242.

Elzoghby, A. O., El-Fotoh, W. S. and Elgindy, N. A. 2011. "Casein based formulations as promising controlled release drug delivery systems." **J. Cont Re**. 153: 206-216.

Esmaili, M., Ghaffari, S. M., Moosavi-Movahedi, Z., Atri, M. S., Sharifizadeh, A., Farhadi, M., et al. 2011. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. **LWT e Food Sci Tech.** 44: 2166-2172.

Eye Disease Case–Control Study Group, E., 1993. "Antioxidantstatus and neovascular age-related macular degeneration" **Arch. Ophthalmol.** 111: 104-109.

Fu, T.J., Abbott, U.R. and Hatzos, C.J. 2002. **"**Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid-a comparative study." **Agric Food Chem.** 50(24): 54-60.

Gao, S., and Hu, M. 2010. Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 10, 550-567.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I. and Mulligan, C. N. 1999. "Encapsulation in the food industry: a review." **Int J Food Sci Nutr.** 50: 213- 224.

Giroux, H. J., Houde, J. and Britten, M. 2010. "Preparation of nanoparticles from denatured whey protein by pH-cycling treatment." **J. Food hyd.** 24: 341-346.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Granado, F., Olmedilla, B., Gil-Martinez, E. and Blanco, I. 1998. “Lutein ester in serum after lutein supplementation in human subjects.” **Int J Food Sci Nutr.** 80: 445–449.

Graves, S., Meleson, K., Wilking, J., Lin, M. and Mason, T., 2005. “Structure of concentrated nanoemulsions.” **Phys Chem Chem Phys**. 122-134.

Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E. M. and Liz-Marzan, L. M. 2010. “Directed selfassembly of nanoparticles.” **ACS Nano.** 4(7): 3591-3605.

Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E.M. and Liz-Marzn, L. M. 2010. “Directed self assembly of nanoparticles.” **ACS Nano**. 4(7): 3591-3605.

Gulseren, I., Fang, Y. and Corredig, M. 2012. “Whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol: characterization thermal stability and interfacial behavior.” **J. Food hyd.** 29: 258-264.

Gunasekaran, S., Ko, S. and Xiao, L. 2007. “Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications.” **J Food Eng.** 83: 31-40.

Heidebach, T., Forst, P. and Kulozik, U. 2009. “Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins.” **J. Food hyd.** 23: 1670-1677.

Hennekens, C.H., Buring, I.E., Manson, I.E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N.R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J.M., Ridker, P.M., Willet, W. and Peto, R. 1996. “Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and car-diovascular disease.” **Int J Food Sci Nutr.** 334: 1145-1149.

Hoffmann, M.A.M. and van Mil, P.J.J.M. 1997. “Heat-induced aggregation of B-lactoglobulin: Role of the free thiol group and disulfide bonds.” **J. Agric. Food Chem.** 45: 2942-2948.

Holick, C.N., Michaud, D.S., Stolzenberg-Solomon, R., Mayne, S.T., Pietinen, P., Taylor, P.R., Virtamo, J. and Albanes, D. 2002. “Dietary carotenoids, serum beta carotene, and retinol and risk of lung cancer in the alpha-tocopherol, beta-carotene cohort study.” **Int J Food Sci Nutr.** 156: 536-547.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ibrahim G., Yuan F. and Milena C. 2012. "Zinc incorporation capacity of whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol." **Food Chem.** 135: 770-774.

Industrial Organica 2011. GRAS Notification for lutein and zeaxanthin preparation (Lutemax 2020TM). **OmniActive Health Technologies Ltd.** 14-16.

Jenkins, M.Y., Mitchell, G.V. and Grundel, E. 2000. "Natural tocopherols in a dietary supplement of lutein affect tissue distribution of tocopherols in young rats." **Nutr. Cancer.** 37: 207-214.

Jiande W., Mengxuan S., Wei Li., Luhai Z., Ze W., Xinzhong Y.,Willem and Yuan L. 2015. "Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking" **J. Food hyd**. 127: 96-104.

Johnson, E.J., Hammond, B.R., Yeum, K.J., Qin, J., Wang, X.D., Castaneda, C., Snodderly, D.M. and Rusell, R.M. 2000. "Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density." **Int J Food Sci Nutr.** 71: 1555-1562.

Jovanovic, S., Barac, M., Macej, O., Vucic, T. and Lacnjevac, C. 2007. "SDS-PAGE Analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments" **Sensors** 7:371-383.

Ju, Z.Y. and Kilara, A.1998. "Gelation of pH-Aggregated Whey Protein Isolate Solution Induced

Khachik, F., Spangler, C.J. and Smith, J.C. 1997. "Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum." **Anal. Chem.** 69: 1873-1881.

Kitabatake, N., Wada, R. and Fujita, Y. 2001. "Reversible conformational change in beta-lactoglobulin A modified with N-ethylmaleimide and resistance to molecular aggregation on heating." **J. Agric. Food Chem.** 49: 4011-4018.

Klang, V. and Valenta, C. 2011. "Zeta potential measurement. Lecithin-based nanoemulsions." **J Drug Deliv Sci Technol.** 21(1): 55-76.

Ko, S. and Gunasekaran, S. 2006. "Preparation of sub 100 nm betalactoglobulin controlled delivery applications." **J Food Eng.** 83: 31-40.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kontopidis, G., Holt C and Sawyer, L. 2004. “Invited Review: B-Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function.” **J. Dairy Sci.** 87: 785-796.

Kontopidis, G., Holt, C. and Sawyer, L. 2004. “Beta-lactoglobulin:binding properties, structure, and function.” **J Dairy Sci**. 87: 785-796.

Kopsell, D.A., Curran-Celentano, J. and Wenzel, A.J. 2007. “Genetic variability for lutein concentrations in leafy vegetable crops can influence serum carotenoid levels and macular pigment optical density in human subjects.” **ISHS Acta Horticulture**. 841: II International Symposium on Human Health Effects of Fruits and Vegetables.

Kotake-Nara and Nagao A. 2011. “Absorption and metabolism of xanthophylls in Marine Drugs.” **Int J Food Sci Nutr.** 9(6):1024-1037.

Krinsky, N.I. 2002. “Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls.” **Int J Food Sci Nutr.** 132: 540-542.

Kritchevsky, S.B., Bush, A.J., Pahor, M. and Gross, M.D. 2000. “Serum carotenoids and markers of inflammation in nonsmokers.” **Int J Food Sci Nutr.** 152: 1065-1070.

Landrum, J.T., Bone, R.A., Jos, H., Kilburn, M.D., Moore, L.L. and Sprague, K.E. 1997. “A 1 year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement.” **Exp. Eye Res.** 65: 57-62.

Le Marchand, L., Hankin, J.H., Kolonel, L.N., Beecher, G.R., Wilkens, L.R. and Zhao, L.P. 1993. “Intake of specific carotenoidsand lung cancer risk. Cancer Epidemiol.” **Biomarkers Prev.** 2:183-187.

Le Marchand, L., Harkin, J.H., Bach, F., Kolonel, L.N., Wilkens, L.R., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P.E., Beecher, G.R., Laudon, F. and Baque, P. 1995. “An ecological study of diet and lung cancer in the South Pacific.” **Int. J. Cancer** 63: 18-23.

Le Maux, S., Giblin, L., Croguennec, T., Bouhallab, S. and Brodkorb, A. 2012. “Beta-lactoglobulin as a molecular carrier of linoleate: characterization and effects on intestinal epithelial cells in vitro.” **J. Agric. Food Chem.** 60: 9476-9483.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lee, S. and McClements, D., 2010. "Fabrication of protein-stabilised nanoemulsions using a combined homogenisation and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach." **J. Food hyd.** 24 (6): 560-569.

Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E. and Ashokkumar, M. 2009. "Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification." **Ultrasonics Sonochemistry.** 16(6): 721-727.

Li, B., Du, W., Jin, J. and Du, Q. 2012. "Preservation of epigallocatechin-3-gallate antioxidant properties loaded in heat treated beta-lactoglobulin nanoparticles." **Food Chem.** 126: 821-826.

Li, Y., McClement, D.J. 2013. "Influence of non-ionic surfactant on electrostatic complexation of protein-coated oil droplets and ionic biopolymers (alginate and chitosan)". **J. Food hyd.** 33, (2): 368-375.

Li, Z., and Gu, L. 2011. "Effects of mass ratio, pH, temperature, and reaction time on method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles." **Cancer Lett.** 114: 179-181.

Li, Z., Jiang, H., Xu, C and Gu, L. 2015. "A review: Using nanoparticles to enhance absorption and bioavailability of phenolic phytochemicals." **J. Food hyd.** 43: 153- 164.

Li, Z., Pan, Q., Jin, Z., Mu, L. and Duan, C. 2011. "Comparison on phenolic compounds in Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China." **Food Chem.** 125(1): 77-83.

Li, Z., Percival, S.S., Bonard, S. and Gu, L. 2011. "Fabrication of nanoparticles using partially purified pomegranate ellagitannins and gelatin and their apoptotic effects." **Int J Food Sci Nutr.** 55(7):1096-1103.

Liang, L., Leung Sok Line, V., Remondetto, G. E. and Subirade, M. 2010. "In vitro release of a-tocopherol from emulsion-loaded blactoglobulin gels." **Int Dairy J.** 20: 176-181.

Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A. and Subirade, M., 2008. "Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications." **Biomacromolecules.** 9: 50-56.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Liang, L., Wu, X., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zou, Y., Mao, G. and Yang, L., 2012. "In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea Roxb.*) following simulated gastro-intestinal digestion." **Food Res Int**. 46(1): 76-82.

Lopez-Rubio, A. and Lagaron, J. M. 2012. "Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives." **Inno F Sci & Emer.Tech.** 13: 200-206.

Luo, Y., Zhang, B., Whent, M., Yu, L. and Wang, Q. 2011. "Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of a-tocopherol, and its in vitro controlled release study." **Trends Food Sci Technol.** 85(2):145-152.

Mantovani, R.A., Cavallieri, Â.L., Netto, F.M. and Cunha, R.L. 2013. "Stability and in vitro digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins." **Food Funct.** 4(9):1322-1331.

Martin, A. H. and de Jong, G. A. 2012. "Enhancing the in vitro Fe2 bio-accessibility using ascorbate and cold-set whey protein gel particles." **Dairy Sci & Tech**. 92: 133-149.

Matalanis, A., Decker, E. A. and McClements, D. J. 2012. Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. **Food Chem.** 132: 766-772.

Maux, S.L., Giblin, L., Croguennec, T., Bouhallab S. and Brodkorb, A. 2012. "B-Lactoglobulin as a Molecular Carrier of Linoleate: Characterization and Effects on Intestinal Epithelial Cells in Vitro" **J. Agric. Food Chem.** 60: 9476-9483.

Mckenzie, H.A. and Sawyer, W.H. 1967. "Effect of pH on β-Lactoglobulins." **Int J Food Sci Nutr.** 214, 1101-1104.

Monahan, F.J., German, J.B. and Kinsellat, J.E. 1995. **"**Effect of pH and Temperature on Protein Unfolding and Thiol/Disulfide Interchange Reactions during Heat-Induced Gelation of Whey Proteins." **J. Agric. Food Chem.** 43: 46-52.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mun, S., Parka, S., Kima, Y.O. and McClement. D.J. 2016. “Influence of methylcellulose on attributes of β-carotene fortifiedstarch-basedfilled hydrogels: Optical, rheological, structural digestibility, and bioaccessibility properties.” **Int J Food Sci Nutr.** 87: 18-24.

National Institute of Medicine, 2001. DRI’s for Vit A, Vit As, B, Cr, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Ni, Si, V, and Zn. **National Institute of Medicine**. Washington DC.

Nicolai, T., Britten, M. and Schmitt, C. 2011. “B-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications.” **J. Food hyd.** 25: 1945-1962.

Noy, N. 2000. Vitamin A. In: Stipanuk. **Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition.** W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, pp. 599-618.

O’Neill, M.E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Van den Berg, H., Hininger, I., Rousell, A.M., Chopra, M., Southon, S. and Thurnham, D.I., 2001. “A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five country comparative study.” **Int J Food Sci Nutr.** 85: 499-507.

Ogunkoya, Y., Nickel, B., Gay, V. and Murray, S. 2009. “Using quantum dots to visualize clathrin associations.” **Biotechnic & Histochemistry,** 84(3): 109-115.

Ou, K., Percival, S.S., Zou, T., Khoo, C. and Gu, L. 2012. “Transport of Cranberry a-type procyanidin dimers, trimers, and tetramers across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells.” **J. Agric. Food Chem.** 60(6), 1390-1396.

Peng, L.C., Liu, C.H., Kwan, C.C. and Huang, K.F., 2010. “Optimisation of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants.” **Trends Food Sci Technol.** 370(3): 136-142.

Pihlanto-Leppala, A. 2000, “Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides.” **Trends Food Sci. Technol.** 11: 347-356.

Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H. and McClements, D.J., 2012. “Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on b-carotene bioaccessibility.” **Food Chem**. 135(3): 1440-447.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Qv, X.Y., Zeng, Z.P. and Jiang, J.G. 2011. “Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability” **J.foodhyd.** 25: 1596-1603

Ramos, O. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E. and Malcata, F. X. (2012). Edible films and coatings from whey proteins: a review on formulation, and on mechanical and bioactive properties. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 52:533–552.

Ramos, O.L., Ricardo, N., Martins, P.A., Rodrigues, R., Fucinos, C., Teixeira, J.A., Pastrana, L.F., Malcata, X. and António A. 2015. “Vicente Design of whey protein nanostructures for incorporation and release of nutraceutical compounds in food.” **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 2015 1549-1558

Ranganathan, A., Keelara, V. and Vallikannan, B. 2013. “Promising interaction between nanoencapsulated lutein with low molecular weight chitosan: Characterization and bioavailability of lutein in vitro and in vivo.” **Food Chem.** 141: 327-337

Relkin, P. and Shukat, R. 2012. “Food protein aggregates as vitaminmatrix carriers: impact of processing conditions.” **Food Chem.** 134: 2141-2148.

Rodrigues, A. and Shao. A. 2004. “The science behind lutein.” **Toxic Letters**. 150: 57-83

Roodenburg, A.J., Leenen, R., van het Hof, K.H., Weststrate, J.A. and Tijburg, L.B. 2000. “Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha- carotene, betacarotene, and Vitamin E in humans (see comments).” **Am. J. Clin. Nutr**. 71: 1187-1193.

Sabliov, Cr., Chen, Hr. and Yada, Ri. 2015. “Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients.” **Wiley-Blackwell**. 280-282

Santos, M.J., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L.R. 2012. “Fractionation of the major whey proteins and isolation of B-Lactoglobulin variants by anion exchange chromatography.” **Sep. Purif. Technol.** 90: 133-139.

Sarkar, A., Horne, D.S. and Singh, H., 2010. “Interactions of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions with bile salts in a simulated upper intestinal model.” **J. Foodhyd**. 24(2): 142-151.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sawyer, W.H. 1968. “Heat denaturation of bovine b-lactoglobulins and relevance of disulfide aggregation.” **J. Dairy Sci.** 51: 323-329.

Scalbert, A. and Williamson, G. 2000. “Dietary intake and bioavailability of polyphenols.” **J Nutr.** 130: 2073-2085.

Seddon, J.M., Ajani, U.A., Sperduto, F.L.D., Hiller, R., Blair, N.,Burton, T.C., Farber, M.D., Gragoudas, E.S., Haller, J. and Miller, D.T. 1994. “Dietary carotenoids, Vitamins A C and E and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group.” **Jam.** 272: 1413–1420.

Serrano-Cruz, M. R., Villanueva-Carvajal, A., Rosales, E. J. M., Davila, J. F. R. and Dominguez-Lopez, A. 2013. “Controlled release and antioxidant activity of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin.” **LWT Food Science and Technology.** 50: 554-561.

Shahidi, F. and Han, X. Q. 1993. “Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.” **Inno F Sci & Emer.Tech.** 33: 501-547.

Shahidi, F. and Han, X.Q. 1993. “Encapsulation of food ingredients, Encapsulation of food ingredients.” **J. Agric. Food Chem.** 33(6): 501-547.

Shimada, K. and Cheftel, J.C. 1989. “Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate.” **J. Agric. Food Chem.** 37:161-168.

Shimomura, M. and Sawadaishi, T. 2001. Bottom-up strategy of materials fabrication: a new trend in nanotechnology of soft materials. **J Food Eng.** 6(1): 11-16.

Shpigelman, A., Israeli, G. and Livney, Y. D. 2010. “Thermally-induced protein polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG.” **J. Foodhyd.** 24: 735-743.

Smilowitz, J.T., Dillard, C.J. and German, J.B. 2005. “Milk beyond essential nutrients: The metabolic food.” **Aust. J. Dairy Technol.** 60:77-83.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sneharani, A. H., Karakkat, J. V., Singh, S. A. and Rao, A. G., 2010. “Interaction of curcumin with beta-lactoglobulin-stability, spectroscopic analysis, and molecular modeling of the complex.” **J.Agri Food Chem**. 58: 11130-11139.

Sommerburg, O., Keunen, J.E., Bird, A.C. and van Kuijk, F.J. 1998. “Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes.” **Br. J. Ophthalmol.** 82: 907-910.

Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J.T. and L’Alloret, F., 2004. “Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products.” **J Food Eng.** 108: 145-149.

Sotomayor-Gerding, D., Oomah, B. D., Acevedo, F., Morales, E. Bustamante, M., Shene, C. and Rubilar, M. 2016. “High carotenoid bioaccessibility through linseed oil nanoemulsions with enhanced physical and oxidative stability.” **Food Chem.** 199: 463–470.

Stephanie, D., Isabelle, M., Jean-Francois, H., Daniel, T. and Augustin, S. 2001. “Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells.” **Int J Pharm.** 3(6): 957-967.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. and Solans, C. 2004. “Formation and stability of nano-emulsions. Advances in Colloid and Interface Science.” **Food Chem.** 108-119

Tarhini, M., Greige-Gerges, H. and Elaissaria, A. 2017. “Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules.” **Inter Journal of Pharmaceutics.** 522: 172-197.

Tavel, L., Moreau, C., Bouhallab, S., Li-Chan, E. C. Y. and Guichard, E., 2010. “Interactions between aroma compounds and blactoglobulin in the heat-induced molten globule state.” **Food Chem.** 119:1550-1556.

Teng, Z., Xu, R. and Wang, Q. 2015. “Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals” **RSC Adv.** 306-311.

Troncoso, E., Aguilera, J.M. and McClement, D.J. 2012.“Influence of particle size on the in vitro digestibility of protein-coated lipid nanoparticles.” **J Colloid Interface Sci.** 382 110-116.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Uversky, V.N. 1997. “Diversity of compact forms of denatured globular proteins.” **Protein Pept. Lett.** 4: 355-367.

Velikov, K. P. and Pelan, E. 2008. “Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals.” **Soft Matter**. 4: 1964-1980.

Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., and Langer, K. 2000. “Desolvation process and surface characteristics of protein nanoparticles.” **Int J Pharm.** 194: 91-102.

Weiss, J., Takhistov, P. and McClements, J. 2006. Functional Materials in Food Nanotechnology. **J. Agric. Food Chem.** 71(9): 107-116.

Whitesides, G. M. and Grzybowski, B. 2002. “Self-assembly at all scales. Science.” 295(5564), 2418-2421.

Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K. and Markiewicz, K.H. 2012. “Nanoparticles as drug delivery systems.” **Pharmacol Rep.** 64(5):1020-1037.

Winkler, B.S., Boulton, M.E., Gottsch, J.D. and Sternberg, P. 1999. “Oxidative damage and age-related macular degeneration.” **Mol.Vis.** 5:26-32.

Wolf, G. 2002. “The effect of low and high doses of beta-carotene and exposure to cigarette smoke on the lungs of ferrets.” **Int J Food Sci Nutr.** 60: 88-90.

Yang, Y. and McClements, D.J., 2013. “Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant.” **J. Food hyd.** 30 (2): 712-20.

Yeum, K.J. and Russell, R.M. 2002. “Carotenoid bioavailability and bioconversion”. **Annu. Rev. Nutr.** 22, 483-504.

Yi, K., Cheng, G. and Xing, F., 2006. “Gelatin/tannin complex nanospheres via molecular assembly.” **J. Agric. Food Chem.** 101(5): 3125-3130

Zhang, L., Zheng, Y., Chow, M.S.S. and Zuo, Z. 2004. “Investigation of intestinal absorption and disposition of green tea catechins by Caco-2 monolayer model.” **Int J Pharm.** 287(12): 1-12.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang, Y., Wright, E. and Zhong Q. 2013. “Effects of pH on the Molecular Binding between β-Lactoglobulin and Bixin.” **J. Agric. Food Chem.** 61:947-954.

Zhong, Q., and Jin, M. 2009. “Zein nanoparticles produced by liquideliquid dispersion.” **J. Food hyd.** 23(8): 2380-2387.

Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. and Chen, Z.Y. 1997. “Stability of green tea catechins.” **J. Agric. Food Chem.** 45(12): 4624-4628.

Zimet, P., Rosenberg, D. and Livney, Y.D. 2001. “Re-assembled casein micelles and casein nanoparticles as nano-vehicles for u-3 polyunsaturated fatty acids.” **J. Food hyd.** 25: 1270-1276.

Zorilla, R., Liang, L., Remondetto, G. and Subirade, M. 2011. “Interaction of epigallocatechin-3-gallate with b-lactoglobulin: molecular characterization and biological implication.” **Dairy Sci Technol.** 91: 629-644.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การศึกษาสภาวะเบื้องต้น: การผลิตอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต

ก.1 ผลของความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนที่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต

กระบวนการดีซอลเวชันเป็นวิธีการที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ เหนี่ยวนำโปรตีนให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนเกิดการรวมตัวกันเองของโปรตีน ซึ่งระดับความเข้มข้นสารละลายโปรตีนจะส่งผลต่อระดับการรวมตัวของอนุภาคและขนาดอนุภาคที่เกิดขึ้น (Jun *et al.*, 2011)

การทดลองหาสภาวะที่มีผลต่อขนาด และลักษณะทางกายภาพของอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เกิดขึ้น โดยได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ร่วมกับอัตราส่วนของปริมาตรเอทานอลต่อปริมาตรเอทานอลที่ใช้ในระดับ 0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าต่อปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (ที่สภาวะ pH 7) เป็นปัจจัยที่ใช้ศึกษาผลของลักษณะทางกายภาพของอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เกิดขึ้น

เมื่อสังเกตลักษณะของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ผ่านวิธีการดีซอลเวชันมา พบว่าระดับความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เพิ่มขึ้น (0.5, 1, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w)) ส่งผลให้ลักษณะของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตมีความขุ่นมากยิ่งขึ้น อาจเกิดจากปริมาณเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มากขึ้น จนทำให้อนุภาคเกิดการรวมตัวกันเองมากขึ้นจนเป็นอนุภาคขนาดใหญ่

และเมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าต่อปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต คงที่สภาวะ pH 7) พบว่าความเข้มข้นสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่สามารถเกิดลักษณะโปร่งใสในทุกระดับของปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น คือเวย์โปรตีนไอโซเลตความเข้ม 1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้คาดการณ์ว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นช่วงความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เหมาะสมในการเกิดอนุภาคระดับนาโนเมตร เนื่องจากการเกิดลักษณะที่โปร่งใสนี้มีความคล้ายคลึงกับลักษณะที่โปร่งใสที่เกิดขึ้นในระบบคอลลอยด์ของสารละลายอนุภาคนาโน ซึ่งมีขนาดอนุภาคเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 100-500 นาโนเมตร (Aboofazeli, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 ผลของอัตราส่วนของปริมาตรเอทานอลที่มีต่อขนาดอนุภาคของเวย์โปรตีนไอโซเลต

การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเป็นดีซอลเวติ้งเอเจนต์ (Desolvating agent) ในกระบวนการดีซอลเวชันถือเป็นหลักการสำคัญในการลดความสามารถในการละลาย และทำให้เกิดการรวมตัวกันเองของอนุภาคนาโน ในการทดลองได้ใช้เอทานอลเป็นสารดีซอลเวตที่เติมลงไปในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต (Li *et al.,* 2015) โดยระดับปริมาตรเอทานอลจะส่งผลต่อระดับการรวมตัวของอนุภาคและขนาดอนุภาคที่เกิดขึ้น

การทดลองจึงได้ศึกษาอัตราส่วนปริมาตรเอทานอลที่ 0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าต่อปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ร่วมกับระดับความเข้มข้นของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ 0.5, 1, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) เปอร์เซ็นต์ (w/w) (คงที่สภาวะ pH 7) ซึ่งได้ศึกษาผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคที่เกิดขึ้น

พบว่าปริมาณเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีนที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดลักษณะของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ขุ่นมากยิ่งขึ้น โดยเริ่มจากที่ปริมาตรเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีน 0.25 และ 0.50 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีน (ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) สามารถแสดงลักษณะที่โปร่งใสได้ แต่ถ้าหากมีการเพิ่มปริมาณของเอทานอลมากถึง 0.75 เท่าต่อปริมาตรสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต พบว่าสารละลายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตมีลักษณะขุ่นขึ้น แต่ถ้าหากเติมเอทานอลปริมาณมากถึง 1 เท่า สารละลายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตจะเกิดการตกตะกอน อาจเกิดจากการเติมตัวทำละลายเอทานอลในขั้นตอนดีซอลเวชันไปมากเกินไป ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน และเกิดการจับกันเองของโครงสร้างโปรตีนโดยส่วนใหญ่ (Gülseren, *et al.,* 2012)

ซึ่งจากการทดลองนี้จะพบว่าปริมาณเอทานอล และเวย์โปรตีนไอโซเลตที่พอเหมาะสามารถส่งเสริมให้อนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต เกิดการรวมตัวของโครงสร้างโปรตีนในระดับอนุภาคนาโน และความสามารถในความคงตัวในรูปแบบคอลลอยด์ โดยไม่เกิดการตกตะกอนได้นั้น จะอาศัยหลักการทำให้โครงสร้างของเวย์โปรตีนไอโซเลตเสียสภาพบางส่วน ระดับปริมาณของเอทานอลที่มากน้อยแตกต่างกันจะทำให้เกิดลักษณะการรวมตัวกันของอนุภาค 2 รูปแบบ รูปแบบที่หนึ่ง คือถ้าเมื่อเติมเอทานอลในระดับที่พอเหมาะจะทำให้เกิดสภาพขั้วที่สมดุลของโครงสร้างโปรตีนในการเกาะกับน้ำและเอทานอล สามารถแสดงสมบัติของการซึมซับเวย์โปรตีนไอโซเลตไว้บนพื้นผิวของอนุภาค จากการที่โปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีสองขั้ว (zwitterion) ทำให้โปรตีนสามารถเกิดรวมตัวกันเอง และมีสภาพประจุภายนอกที่เกิดการผลักกันทำให้สามารถต่อต้านการรวมตัวระหว่างอนุภาคกันเอง (re-coalescent) ทำให้อนุภาคสามารถคงตัวในสารละลาย สังเกตเห็นได้จากความโปร่งใสของสารละลาย ไม่ตกตะกอนจากการเสียสภาพของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Arroyo-Maya *et al.,* 2014: Zaman *et al.,* 2014) แต่ถ้าหากมีการเติมปริมาณเอทานอลในระดับที่มากเกินไปจะทำให้สภาพขั้วของโปรตีนไม่เกิดความสมดุล ปริมาณเอทานอลที่มากเกินไปจะไปแย่งจับกับน้ำ ทำให้โปรตีนเปลี่ยนแปลงสภาพขั้วมาจับกับโปรตีนกันเองมากไป จนทำให้เกิดการรวมกลุ่มของอนุภาคใหญ่มากจนเกิดการตกตะกอน (Yoshikawa *et al.,* 2012)

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ระดับปริมาตรเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีน 0.25, 0.50 และ 0.75 เท่าต่อสารละลายเวย์โปรตีน (1% w/w) (คงที่สภาวะ pH 7) ศึกษาผลการทดลองต่อลักษณะรูปร่างการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาแสดงให้เห็นถึงลักษณะการจัดเรียงตัวของอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เกิดขึ้น

ซึ่งพบว่าปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ลักษณะอนุภาคเวย์โปรตีนจะเกิดรวมตัวกันเองมากขึ้น โดยสังเกตได้จากที่ระดับเอทานอลจาก 25-75 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับปริมาณเอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ จะเกิดลักษณะการจับตัวที่เป็นกลุ่มก้อนมีขนาดที่ใหญ่ที่สุดอย่างชัดเจน จนสามารถเกิดการรวมตัวเป็นกลุ่มของอนุภาคได้

ทำให้สามารถอธิบายผลของปริมาณเอทานอลที่มากขึ้นส่งผลต่อขนาดอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เกิดขึ้นได้จากระดับปริมาณเอทานอลที่แตกต่างของ จะส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของสายโครงสร้างทุติยภูมิของเวย์โปรตีนไอโซเลต การตัวกันของโมเลกุลโปรตีน เป็นตัวการที่สำคัญต่อลักษณะการรวมตัวและขนาดอนุภาคที่เกิดขึ้น (Gülseren *et al.,* 2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3. ผลของสภาวะพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่มีต่อขนาดอนุภาคของเวย์โปรตีนไอโซเลต

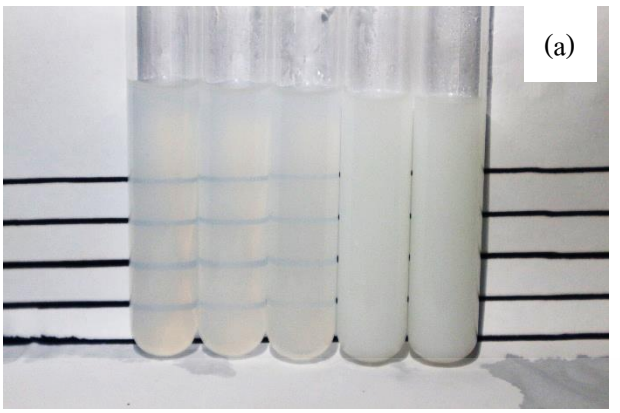
สภาวะพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตสามารถส่งผลต่อการรวมตัวของอนุภาคได้เช่นเดียวกัน ซึ่งระดับพีเอชที่แตกต่างกันจะทำให้เกิดแรงผลักของประจุบวก-ลบของระหว่างอนุภาคโปรตีนในการคลายสายโครงสร้างโปรตีนของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต นำไปสู่ระดับการรวมตัวของอนุภาคโปรตีนที่แตกต่างกันทำให้ได้ขนาดอนุภาคนาโนที่แตกต่างกัน (Bagheri *et al.,* 2014: Jun *et al.,* 2011)

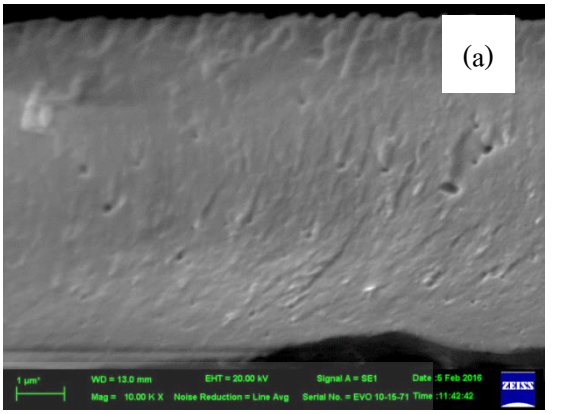
จึงได้ศึกษาหาสภาวะพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่มีผลต่อคุณลักษณะอนุภาคนาโนจากเวย์โปรตีนไอโซเลต โดยใช้พีเอช 3 7 และ 9 ในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต

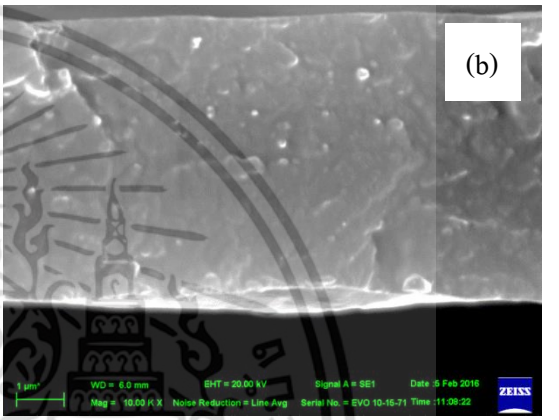
จากการทดลองได้แสดงให้เห็นถึงลักษณะของสารละลายอนุภาคโปรตีนที่ถูกเตรียมจากการปรับพีเอช (3, 7 และ 9) ของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต(1% w/w) พบว่าสารละลายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตที่เกิดขึ้นทั้ง 3 พีเอช มีลักษณะโปร่งแสง (translucent)

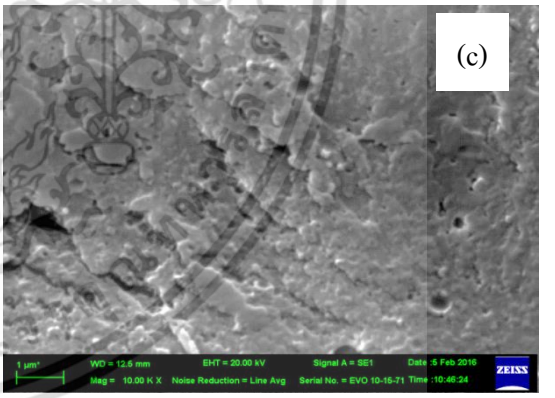
แต่เมื่อสังเกตภาพถ่ายจากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ผ่านการทำแห้งด้วยระบบสูญญากาศ ลักษณะภาพถ่ายอนุภาคของ pH7 และ pH9 มีความสามารถในการรวมตัวเป็นกลุ่มของอนุภาคโปรตีนได้ เนื่องจากภายใต้สภาวะด่างมีค่าพีเอชที่ห่างจากจุดไอโซอิเล็กทริกของเวย์โปรตีนมาก ส่งผลให้ค่าแรงผลักทางไฟฟ้า (electrostatic repulsion) ที่เป็นแรงดึงดูด (attraction force; VA) เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเกิดจากแรงวัลเดอร์วาลและแปรผันตรงต่อขนาดการรวมกลุ่มของโปรตีน (Gülseren *et al.,*2012) แตกต่างจาก pH 3 มีที่การรวมกลุ่มของเวย์โปรตีนไอโซเลต เกิดลักษณะที่เป็นพื้นผิวราบเรียบ คล้ายคลึงกับในการทดลองของ Davidov-Pardo *et al.,* (2016) ได้ศึกษาการผลิตนาโนอิมัลชัลลูทีนจากโปรตีนเคซีน ซึ่งได้อธิบายไว้ว่าโครงสร้างโปรตีนบางส่วนอาจเกิดการเสียสภาพก่อนการรวมตัวของอนุภาคโปรตีน ที่ pH 3 เช่นกัน ซึ่งเกิดจากการปรับค่าพีเอชจากสภาวะกลางมาสู่กรดต้องผ่านจุดไอโซอิเล็กทริกของเวย์โปรตีนไอโซเลต จากการทดลองทำให้สามารถอธิบายได้ถึงผลของระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตต่อการรวมตัวของอนุภาคนาโนเวย์โปรตีนไอโซเลตที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





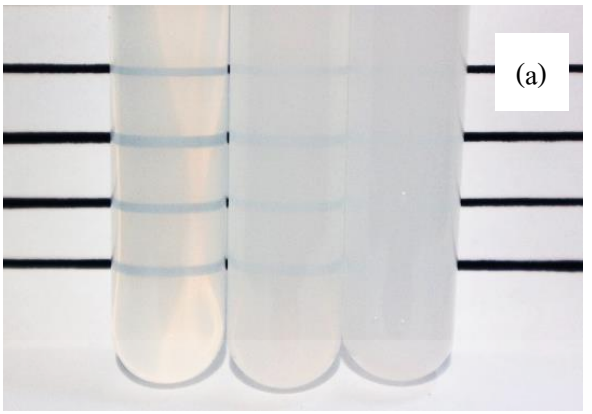




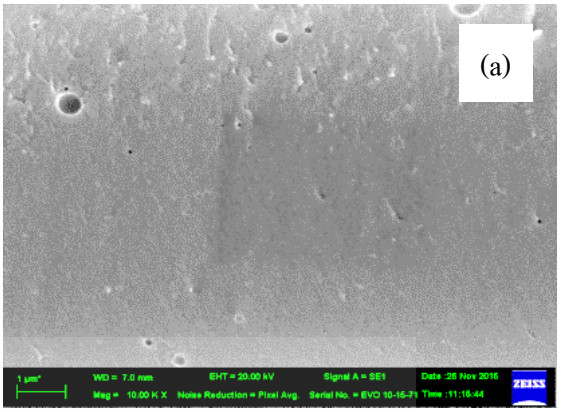
ภาพที่ ก.1 ภาพถ่ายสารละลายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของเวย์โปรตีนไอโซเลตร้อยละ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 5.0 และปริมาตรเอทานอลที่เติมลงไปในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับ (a) 0.25 เท่า (b) 0.50 เท่า (c) 0.75 เท่า

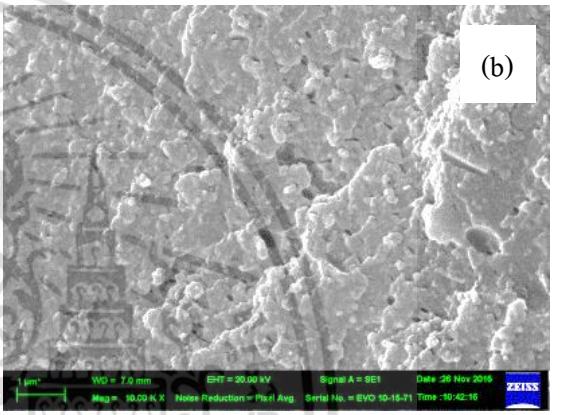
ภาพที่ ก.2 ภาพถ่ายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ระดับความเข้มข้นของเวย์โปรตีนไอโซเลตร้อยละ 1 และปริมาตรเอทานอลต่อสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตที่ระดับ (a) 0.25 เท่า (b) 0.50 เท่า (c) 0.75 เท่า

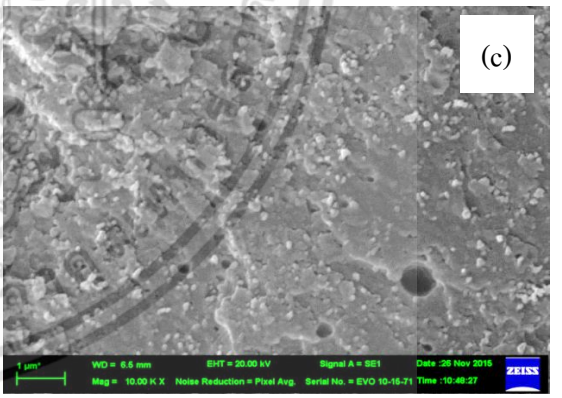
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก.3 ภาพถ่ายสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของร้อยละ 1 เมื่อมีการเติมเอทานอลที่เติมลงไปสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 0.25, 0.50 และ0.75 เท่า พีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 3 ระดับ คือ (a) pH3 (b) pH 7 (c) pH 9







ภาพที่ ก.4 ภาพถ่ายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ระดับความเข้มข้นของเวย์โปรตีนไอโซเลตร้อยละ 1 ปริมาตรเอทานอลที่เติมลงไปในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต 0.50 เท่า ระดับพีเอชของสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต คือ (a) pH3 (b) pH 7 (c) pH 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4 การศึกษาสภาวะการผลิตอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตในการกักเก็บลูทีน

ก.4.1 การตรวจสอบลักษณะการรวมตัวของอนุภาคนาโนลูทีนที่ห่อหุ้มเวย์โปรตีนไอโซเลต

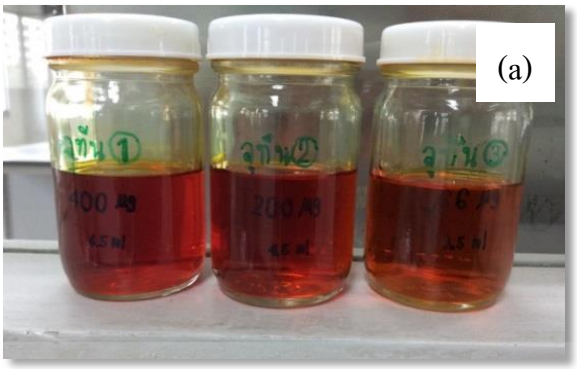
จากการทดลองได้แสดงลักษณะทางกายภาพ และสัณฐานวิทยาของลักษณะของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอนแคปซูเลชันลูทีนจากอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลต โดยตัวอย่างได้ศึกษาทั้งลักษณะลูทีนเพียงอย่างเดียว อนุภาคสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลต และอนุภาคเอนแคปซูเลชันลูทีนจากอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีการดีซอลเวชัน เพื่อศึกษารูปร่างลักษณะ ของการเติม-ไม่เติม ลูทีนในการเอนแคปซูเลชันด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่เปลี่ยนแปลงไป

จากการทดลองพบว่าลักษณะของสารละลายลูทีนเพียงอย่างเดียวจะมีลักษณะเป็นรวมตัวเป็นหยดอนุภาคขนาดใหญ่ โดยปกติแล้วลูทีนจะมีลักษณะรวมตัวเป็นเกล็ดผลึกขนาดเล็ก แต่ด้วยตัวลูทีนมีความเป็นไฮโดรโฟบิคสูง ก่อนการนำมาใช้ในกระบวนการเอนแคปซูเลชันลูทีนจะอยู่ในรูปของสารละลายในน้ำมัน ดังนั้นเมื่อนำสารละลายลูทีนในน้ำมันมาละลายในเอทานอลแล้วนำไประเหยที่สภาวะสูญญากาศ จึงทำให้เกิดเป็นหยดอนุภาคลูทีนในน้ำมันเกิดขึ้น

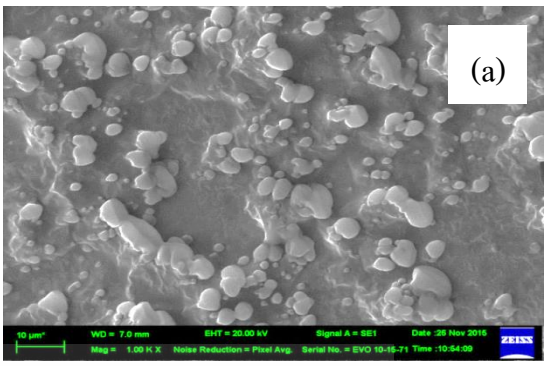
ในส่วนต่อมาเปรียบเทียบการเติม-ไม่เติม ลูทีนจากการเอนแคปซูเลชันด้วยเวย์โปรตีนไอโซเลต แสดงให้เห็นว่าลักษณะอนุภาคเป็นก้อนกลม และใหญ่มากขึ้นหลังมีการเติมลูทีนลงไป คล้ายคลึงกับสภาวะการทดลองการเอนแคปซูเลชันสารสกัดฟีนอลลิคจากอินทผลัม ที่มีลักษณะอนุภาคก้อนใหญ่และเกาะตัวรวมกลุ่มกันแน่นมากขึ้น (Bagheri *et al.,* 2014)

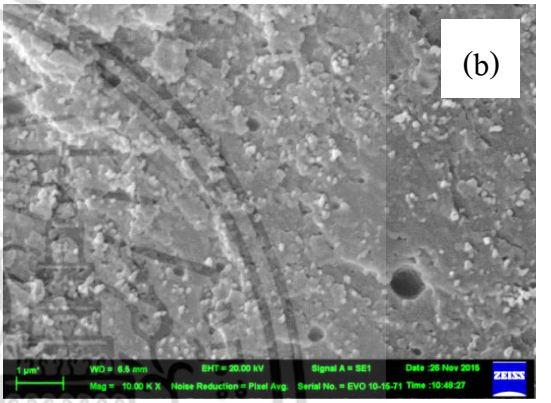
วิธีการดีซอลเวชันปัจจัยสำคัญของวิธีการ คือการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อย่างเอทานอลเติมลงไปเพื่อให้เกิดการคลายสายโครงสร้างโปรตีนของเวย์โปรตีนไอโซเลต ร่วมกับในการทดลองนี้ต้องใช้เอทานอลในการละลายลูทีน โดยการคลายโครงสร้างโปรตีนเกิดจากการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ระดับโครงสร้างทุติยภูมิแสดงส่วนของไฮโดรโฟบิคมากขึ้น ทำให้เกิดความสามารถในการเข้าจับกันของลูทีนบนบริเวณของโครงสร้างโปรตีนได้ มีงานวิจัยที่ทำการทดลองเอนแคปซูเลชันเคอคูมิน (curcumin) ตัวเคอคูมินจะเข้าไปเกาะในบริเวณ non-specific (ส่วนของไฮโดรโฟบิค) ของโครงสร้างโปรตีน β-lactoglobulin (Sneharani *et al.,* 2010)

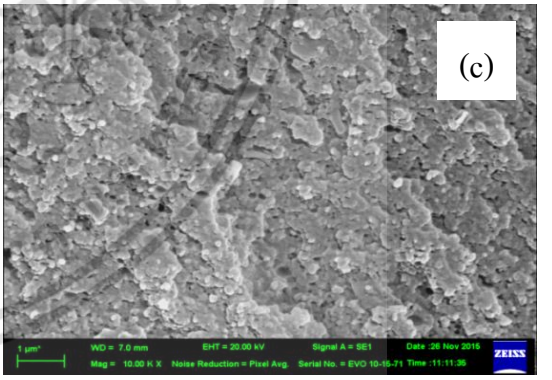
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ก.5 ภาพถ่ายของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการดีซอลเวชัน เพื่อผลิตอนุภาคลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต (a) สารละลายลูทีนในเอทานอล (b) สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตในน้ำปราศจากไอออน (c) สารละลายลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ pH 9 เอทานอล 0.50 เท่า สัดส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ 5.00:100







ภาพที่ ก.6 ภาพถ่ายอนุภาคเวย์โปรตีนไอโซเลตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (a) สารละลายลูทีนในเอทานอล (b) สารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลตในน้ำปราศจากไอออน (c) สารละลายอนุภาคนาโนลูทีนในเวย์โปรตีนไอโซเลต ที่ pH 9 เอทานอล 0.50 เท่า สัดส่วนลูทีนต่อเวย์โปรตีนไอโซเลต 1.25:100, 2.50:100, 3.75:100 และ5.00:100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

ข.1 การเตรียมสารละลาย 0.05 M phosphate buffer saline เตรียม stock solution

1.) สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

2.) สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

3.) ผสมสารละลาย A 39 มิลลิลิตร และสารละลาย B 61 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ระดับ pH 7 แล้วเติมน้ำให้เป็น 400 มิลลิลิตร (ควรตรวจสอบด้วย pH meter ก่อนนำไปใช้)

ข.2 สูตรน้ำลายเทียม saliva digestion สัดส่วนปริมาณสูตร (g/L)

Sodium chloride (NaCl)	1.594	กรัม
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	0.328	กรัม
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	0.636	กรัม
Potassium chloride (KCl)	0.202	กรัม
Potassium citrate ($K_3C_6H_5O_7.H_2O$)	0.308	กรัม
Uric acid sodium salt ($C_5H_3N4O_3Na$)	0.021	กรัม
Urea (H_2NCONH_2)	0.198	กรัม
Lactic acid sodium salt ($C_3H_5O_3Na$)	0.146	กรัม
Porcine gastric Mucin	15.00	กรัม
Water (H_2O) เติมน้ำให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวนฤมล สุประภากร
วันเกิด	14 มีนาคม พ.ศ. 2535
ที่อยู่	45/2 ม.4 ต.เปร็ง อ.บางบ่อ จ.สมุทรปราการ 10560
ประวัติการศึกษา	**พ.ศ.2556** จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์ศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง **พ.ศ.2557** ศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
การนำเสนอผลงาน	-เรื่อง Nanoemulsion of Lutein Stability by Whey Protein Isolate Blended with Low-Molecular Weight Emulsifiers งานประชุม วิชาการงาน Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017) ครั้งที่ 19 “Innovative Food Science and Technology for Mankind: Empowering Research for Health and Aging Society วันที่ 15 - 17 มิถุนายน 2560 -เรื่อง Effect of pH and the Amount of Added Ethanol on Whey Protein Isolate Aggregation งานประชุม วิชาการงาน Food Innovation Asia Conference 2018 (FIAC 2018) ครั้งที่ 20 “Creative Food for Future and Sustainability” วันที่ 14 - 16 มิถุนายน 2561

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้