



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตอนุพันธ์คอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากแมงกะพรุนเพื่อใช้
ประโยชน์ในเวชสำอาง

Production of low molecular weight collagen derivative from
jellyfish for cosmeceutical applications

นายสามารถ สายอูต

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตอนุพันธ์คอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากแมงกะพรุนเพื่อใช้
ประโยชน์ในเวชสำอาง

Production of low molecular weight collagen derivative from
jellyfish for cosmeceutical applications

นายสามารถ สายอุต

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 45.8/2562 ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารที่สนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณนางสาวรัตน์ฟ้า พรหมดาและนางสาววิสนันท์ พลอยงาม ที่ช่วยเหลือการวิจัยให้บรรลุความสำเร็จ

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการออกซิเดชันไขมันในระบบอิมัลชัน โดยขั้นแรกศึกษาการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนดองที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยสกัดคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนดองด้วย NaHCO_3 และน้ำ ในอัตราส่วน 1:2 บดแล้วสกัดด้วยกรดอะซิติกในอัตราส่วน 1:1.5 (w/v) พบว่าได้ผลผลิตที่เป็นสารละลายร้อยละ 147.41 ซึ่งมีโปรตีนเท่ากับ 17 mg/ml ทำแห้งได้ผลผลิตร้อยละ 3.63 และนำสารละลายเจลาตินมาไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยใช้เอนไซม์ทริปซินที่ pH 7.8 อุณหภูมิ 50 °C และเอนไซม์อัลคาเลสที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 55 °C ใช้อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 และ 1:100 และนำมาวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิด α พบว่าการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตด้วยการใช้เอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 มีปริมาณกรดอะมิโนชนิด α สูงที่สุด และวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS พบว่าการใช้เอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ($\mu\text{Mole trolox equivalents/mg protein}$) ได้ดีที่สุด และการวิเคราะห์ร้อยละการละลายของโปรตีน และความไม่ชอบน้ำ พบว่าคอลลาเจน ไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 และ 1:100 มีความสามารถในการละลายน้ำ และค่า protein hydrophobicity เท่ากัน ขั้นตอนต่อมาจึงนำคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 ในระดับความเข้มข้น 0% 10% และ 20% มาวิเคราะห์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งออกซิเดชันในระบบไลโปโซม โดยติดตามการออกซิเดชันของระบบไลโปโซมด้วย วิธี conjugated diene วิธี peroxide value และวิธี TBARS พบว่าการเกิดออกซิเดชันเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น การวิเคราะห์ค่าสี L^* , a^* และ b^* พบว่าค่าสีลดลงในช่วงแรกและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ และการประยุกต์คอลลาเจนไฮโดรไลเสตน้ำหนักโมเลกุลต่ำในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางสามารถยับยั้งการออกซิเดชัน โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเสตเข้มข้นที่ 2% มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด

ABSTRACT

This research investigated the production of collagen hydrolysate from jellyfish that inhibits the oxidation of fat in the emulsion system. To production of collagen from jellyfish, dried jellyfish was extracted with NaHCO₃ and water with the ratio of 1:2 and acetic acid at a ratio of 1:1.5 (w/v). The result showed that collagen yield was 147.41 % with 17 mg/ml protein. The dried collagen yield was 3.63 %. To produce collagen hydrolysate, the sample was hydrolyzed with trypsin or alkalase (1:50 and 1:100 E/S) for 3 hr. at pH of 7.8 and 7.0, and temperature of 50 and 55°C, respectively. Collagen hydrolysate hydrolyzed by trypsin showed the highest α amino acid content and antioxidant activity. Collagen hydrolysate produced by trypsin and alkalase had no significantly different in hydrophobicity and protein solubility. Therefore, trypsin hydrolyzed collagen hydrolysate was chosen for further study. The collagen hydrolysate produced by trypsin was added in salad dressing at the concentration of 0 %, 10 % and 20 %, respectively. Lipid oxidation in salad dressing was determined by CD, PV and TBARS assays. The result showed that oxidation increased when storage time increased. Although L *, a * and b * values decreased with increasing duration of storage, after 2 weeks the color values tend to increase. Application of low molecular weight collagen hydrolyzate in emulsions used in cosmeceuticals can be used to inhibit oxidation. The 2% concentration of collagen hydrolyzate was the most effective against oxidation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
เนื้อเรื่อง	4
การทบทวนวรรณกรรม	4
คอลลาเจนและเจลาติน	4
สมบัติหน้าที่ของคอลลาเจนและเจลาติน	4
สมบัติทางชีวภาพของไฮโดรไลเสตและเปปไทด์	6
การประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชัน (Microemulsions) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง	7
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	
การสกัดคอลลาเจนจากแมงกะพรุน	9
การหาปริมาณโปรตีน	9
วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยเครื่อง electrophoresis	10
การผลิตคอลลาเจนน้ำหนักรโมเลกุลต่ำ	10
วิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระ	10

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
การเตรียมไมโครอิมัลชัน	11
การเตรียมไมโครอิมัลชันที่มีการเติมคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ	11
วิเคราะห์ปริมาณของ conjugated diene (CD)	11
วิเคราะห์ค่า peroxide (PV)	11
วิเคราะห์หาสาร thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)	12
การวิเคราะห์ทางสถิติ	12
ผลการวิจัยและวิจารณ์	13
การผลิตอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	13
ปริมาณร้อยละของผลผลิตเจลาตินจากแมงกะพรุน (%yield) และปริมาณโปรตีนของแมงกะพรุน	13
ปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน	13
กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน	15
ร้อยละการละลายของโปรตีนของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน	16
ความไม่ชอบน้ำ (protein hydrophobicity) ของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน	17
การใช้อนุพันธ์คอลลาเจนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแมงกะพรุนในการยับยั้งออกซิเดชันในระบบอิมัลชันเบื้องต้น	18
การติดตามการ oxidation ของระบบอิมัลชันด้วยค่า conjugated diene (CD)	18
ติดตามการ oxidation ของระบบไลโปโซมด้วยวิธี peroxide value	20
ติดตามการ oxidation ของระบบไลโปโซมด้วยวิธี TBARS	22
ติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของระบบไลโปโซม	23
ลักษณะทางประสาทสัมผัสของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	25
การประยุกต์คอลลาเจนไฮโดรไลเสตน้ำหนักโมเลกุลต่ำในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางเพื่อใช้ยับยั้งการออกซิเดชัน	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย	30
รายการอ้างอิง	31
ผลผลิต	40
รายงานการเงิน	41
ภาคผนวก	43
ประวัตินักวิจัยและคณะ	51

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ร้อยละการละลายของโปรตีนและค่า protein hydrophobicity (CBBG bound (μg)) ตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วย เอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน	18

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ตัวอย่างแมงกะพรุนทอง (ส่วนหนวด) ที่นำมาสกัดอนุพันธ์คอลลาเจน	13
2	ปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน	14
3	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (μ Mole trolox equivalents/mg protein) ของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน	16
4	ระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 1:50 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน	19
5	ค่า conjugated diene (CD) ในระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	20
6	ค่า peroxide value (PV) ในระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	21
7	ค่า TBARS ของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ สองวัน	23
8	การเปลี่ยนแปลงค่าสี L^* (A), a^* (B), b^* (C) และ ค่าความขาว (D) ของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ	24
9	ผลการเปรียบเทียบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ (A), ด้านสี (B), ด้านกลิ่น (C) และ ด้านความชอบโดยรวม (D) ของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่างกัน	26
10	การเปลี่ยนแปลงของค่า peroxide ในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเสต (CH) ที่ความเข้มข้น 0.5% 1% และ 2% เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	27
11	การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเสต (CH) ที่ความเข้มข้น 0.5% 1% และ 2% เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	29

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แมงกะพรุนเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังลำตัวโปร่งใสจัดอยู่ในกลุ่ม Scyphozoa ในประเทศไทยพบแมงกะพรุนหลายชนิดแต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งส่วนใหญ่แมงกะพรุนมักใช้ผลิตเป็นอาหาร อย่างไรก็ตามการจับแมงกะพรุนมีความผันผวนขึ้นอยู่กับการกระจายพันธุ์และปรากฏการณ์ในท้องทะเล ในจังหวัดชลบุรี เขตเมืองบางแสนปรากฏการณ์แมงกะพรุนที่เกยตื้นบนชายหาดอาจเป็นสิ่งที่พบเจอได้หากในช่วงปีได้มีการเติบโตของแมงกะพรุนมากผิดปกติ ซึ่งส่งผลกระทบต่อการท่องเที่ยวและเกิดความกังวลต่อการจัดการกับแมงกะพรุนเหล่านั้น อย่างไรก็ตามแมงกะพรุนเป็นแหล่งของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีแหล่งของคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแมงกะพรุนมาสกัดคอลลาเจนเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่นเพื่อเป็นการจัดการกับปัญหาดังกล่าวและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับแมงกะพรุน

โดยทั่วไปคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลักสำคัญของชั้นผิวหนังแท้และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยมีคอลลาเจนชนิด I และ III เป็นคอลลาเจนที่พบมากในผิวหนังชั้นไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) (Lam et al., 2014) โมเลกุลของคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเกลียวสายเปปไทด์สามสายพันกันที่เรียกว่า “collagen triple-helix” โครงสร้างแบบนี้มีความเสถียรมากเพราะมีพันธะไฮโดรเจนระหว่างภายในและระหว่างสาย ซึ่งร้อยเรียงเป็นลำดับซ้ำๆ กันอย่างต่อเนื่องในรูปของ gly-X-Y โดยมักพบ proline ที่ตำแหน่ง x และ hydroxyproline ที่ตำแหน่ง y เป็นส่วนใหญ่ (Gómez-Guillén et al., 2011) ด้วยเหตุนี้คอลลาเจนจึงเป็นที่นิยมใช้ในการแพทย์ความงามและเวชสำอาง โดยคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight: HMW) ช่วยสร้างความสมบูรณ์ของโครงสร้างชั้นผิวแท้ให้มีความหนาแน่นมากขึ้น และหน้าที่หลักของคอลลาเจนชนิดนี้คือการผลิตเซลล์ผิวใหม่อยู่ตลอดเวลาและผลัดกันขึ้นมาบนผิวของหนังกำพร้า (epidermis) ขณะที่คอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight: LMW) ช่วยเพิ่มความหนาแน่นและขนาดของเส้นใยคอลลาเจน นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการผลิตกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) และช่วยป้องกันรังสี UVA (Gómez-Guillén et al., 2011) ปัจจุบันมีการใช้คอลลาเจนในระบบนำส่งยาชนิดคอลลอยด์ (colloidal drug delivery systems) การผลิตฟองน้ำสำหรับแผลไหม้ (Vaneerdeweg et al., 1998) ระบบนำส่งโปรตีนในรูปแบบเม็ดเล็ก (Friess, 1998) และผลิตอนุภาคระดับนาโนในการนำส่งยีน (Lee, Singla, & Yugyung, 2001)

การนำคอลลาเจนไปใช้ในเวชสำอางนั้นมีข้อจำกัด เนื่องจากชั้นผิวหนังชั้นนอก (stratum corneum) ยอมให้อนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 10 นาโนเมตรซึมผ่าน (หรือขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 500 Da) ยิ่งไปกว่านั้นผิวหนังชั้นนี้มีลักษณะไม่ชอบน้ำ (lipophilic) ทำให้โมเลกุลที่ชอบน้ำอย่าง

คอลลาเจนและกรดไฮยาลูโรนิกที่นิยมใช้ในเวชสำอางซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญได้ผิวหนังไม่สามารถซึมผ่านได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในทางการแพทย์ความงามจึงมักนิยมฉีดสารดังกล่าวเข้าสู่เซลล์ผิวโดยตรงเพื่อฟื้นฟูชั้นคอลลาเจนที่สูญเสียไปและแก้ไขข้อบกพร่องของริ้วรอยบนใบหน้า (Li et al., 2005, Narins et al., 2010) แต่ด้วยเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าทางออกของปัญหานี้จึงอาจแก้ไขได้ด้วยเทคโนโลยีไมโครอิมัลชัน (microemulsions) ซึ่งใช้หลักการการจับคอลลาเจน (incorporated collagen) เข้าไปในตัวนำส่งระดับนาโน (nanocarrier) เพื่อปรับปรุงการขนส่งสารและการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ต่างๆ ผ่านระบบ microemulsion นี้ ซึ่งระบบคอลลอยด์นี้มีเสถียรภาพในเชิงอุณหพลศาสตร์ และขั้นตอนการสร้างระบบนี้ไม่ยุ่งยากมีเพียงน้ำมันและน้ำเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ขนาดของอนุภาคมีขนาดอยู่ในช่วง 10-100 นาโนเมตร โดยมีสารลดแรงตึงผิว (surfactants และ cosurfactants) ช่วยให้เกิดโครงสร้างเสถียรดังกล่าว (Paul & Moulik, 1998) นอกจากนี้ขนาดของคอลลาเจนต้องมีขนาดน้อยกว่า 500 Da ซึ่งการผลิตคอลลาเจนให้มีขนาดเล็กด้วยเทคโนโลยีที่เป็นมิตรมีทางเลือกเดียว คือ การย่อยคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ โดยทั่วไปเอนไซม์ที่ย่อยคอลลาเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพจัดอยู่ในกลุ่ม serine protease หรือ metalloprotease เช่น alcalase, flavourzyme และ trypsin เป็นต้น (Saiut et al., 2013) ในขณะเดียวกันคอลลาเจนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กยังให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Alemán et al., 2011; Lassoued et al., 2015)

ดังนั้น การนำแมงกะพรุนมาผลิตคอลลาเจนน้ำหนักรโมเลกุลต่ำจึงเป็นความท้าทาย เพื่อประยุกต์กับเวชสำอางให้ได้สูตรที่สามารถนำคอลลาเจนน้ำหนักรโมเลกุลต่ำเข้าไปในระบบไมโครอิมัลชันให้มากที่สุดและได้ตัวนำส่งระดับนาโนที่สามารถซึมผ่านผิวหนังชั้น stratum corneum ได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1 ผลิตคอลลาเจนน้ำหนักรโมเลกุลต่ำจากแมงกะพรุนเพื่อประโยชน์ในเวชสำอางระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในไขมัน

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ผิวหนังชั้นนอกสุด หรือ stratum corneum มีลักษณะเป็นเซลล์แบนๆ เรียงกันขนานกับผิว เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งจะหลุดลอกออกเป็นขี้ไคล (desquamation process) ผิวหนังชั้นนี้จึงต้องอาศัยการซึมผ่านสารต่างๆ โดยการแพร่ (diffusion) เท่านั้น นอกจากนี้อนุภาคสารที่สามารถซึมผ่านได้นั้นต้องมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 10 นาโนเมตร หรือมีน้ำหนักรโมเลกุลน้อยกว่า 500 Da และผิวหนัง stratum corneum ยังมีสมบัติไม่ชอบน้ำทำให้สารที่ซึมผ่านต้องมีลักษณะเป็นสารกลุ่ม lipophilic และมีประจุบวก ดังนั้นอนุภาคสารขนาดเล็กที่ไม่ชอบน้ำจึงมีความสำคัญต่อการซึมผ่านผิวหนังชั้นนี้ ขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนสามารถลดลงได้ด้วยการไฮโดรไรซ์ด้วยเอนไซม์ซึ่งเอนไซม์ที่

มีประสิทธิภาพในการย่อยได้แก่ alcalase และ trypsin วิธีนี้เป็นกระบวนการที่ไม่มีการใช้สารเคมีรุนแรง เหมาะสมกับการประยุกต์ในเวชสำอาง นอกจากนี้การใช้ระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันมีเหมาะสมกับการใช้กับผิวชั้นนอก โดยทั่วไประบบไมโครอิมัลชันสามารถสร้างอนุภาคที่มีขนาด 10-100 นาโนเมตร ซึ่งมีสารลดแรงตึงผิวช่วยสร้างโครงสร้างแบบ micelle ที่มี hydrogel จากคอลลาเจนภายใน โครงสร้างดังกล่าวจะนำส่งสารภายใน micelle เข้าสู่ผิวหนัง ชั้น stratum corneum ได้ในที่สุด ดังนั้นสัดส่วนของสูตรเวชสำอางที่ใช้สารต่างๆ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อให้ได้สูตรผสมเวชสำอางระบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันที่ได้ขนาดอนุภาคที่เหมาะสมเพื่อประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวที่ดีที่สุด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากแมงกะพรุนเตรียมด้วยเอนไซม์ alcalase และ trypsin เพื่อให้ได้สายเปปไทด์ที่ขนาดสั้นลงหรือใกล้เคียงขนาดน้ำหนักโมเลกุล 500 Da และนำคอลลาเจนที่ได้ไปใช้ผลิตเวชสำอางที่มีระบบนำส่งแบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในไขมันที่มีสูตรให้มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังชั้น stratum corneum ให้มากที่สุด ดังนั้นประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับคือ

- 1 สร้างองค์ความรู้และนวัตกรรมใหม่ในการผลิตคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากแมงกะพรุน
- 2 ประโยชน์ในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับแมงกะพรุน
- 3 ประโยชน์ด้านการพัฒนาการเวชสำอางที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

เนื้อเรื่อง

การทบทวนวรรณกรรม

คอลลาเจนและเจลาติน

เจลาติน (gelatin) เป็นอนุพันธ์โปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ โดยได้จากการย่อยบางส่วนของคอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนแบบเส้นใย (fibrous protein) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกระดูก กระดูกอ่อน และหนัง นอกจากนี้แหล่งวัตถุดิบ อายุของสัตว์ และประเภทของคอลลาเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณสมบัติของเจลาติน (Johnston-Banks, 1990) ปัจจุบันคอลลาเจนแบ่งชนิดที่แตกต่างกันได้ถึง 27 ชนิด คอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวางซึ่งเป็นคอลลาเจนจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เจลาตินประกอบไปด้วยคาร์บอนร้อยละ 50.5 ไฮโดรเจนร้อยละ 6.8 ไนโตรเจนร้อยละ 17 และออกซิเจนร้อยละ 25.2 (Smith, 1921) เจลาตินมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 15 ถึง 300 กิโลดาลตัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและวิธีการในการผลิต โครงสร้างปฐมภูมิของคอลลาเจนและเจลาตินจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันถึง 18 ชนิด โดยคอลลาเจนจัดเป็นโปรตีนจากสัตว์ที่ประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกันถึง 18 ชนิด โดย hydroxyproline และ hydroxylysine รวมถึงปริมาณ Immino acid ทั้งหมดในปริมาณสูง กรดอะมิโนใน เจลาตินจะมีลักษณะไม่แตกต่างจากกรดอะมิโนที่พบในคอลลาเจนต้นแบบ โดยจะมีลักษณะการจัดเรียงตัวแบบ Gly-X-Y แบบนี้ไปอย่างต่อเนื่อง โดยที่ตำแหน่ง X ส่วนใหญ่จะเป็น โพรลีน และที่ตำแหน่ง Y จะเป็น hydroxyproline คอลลาเจนและเจลาตินมีกรดอะมิโนที่สำคัญ เช่น ไกลซีน ไฮดรอกซีไลซีน และไฮดรอกซีโพรลีน และ อนุพันธ์ของทรिปีโทฟาน ในส่วนตำแหน่งที่อยู่ระหว่างปลายสาย N- และ C-terminal เรียกว่า telopeptides ซึ่งไม่ได้จัดตัวในรูปแบบโครงสร้างเกลียวสามสาย เนื่องจากโมเลกุลของ telopeptides ประกอบด้วยโมเลกุลที่จับกันด้วยพันธะโควาเลนต์ทั้งแบบภายในและภายนอกระหว่างโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนไลซีนและ hydroxylysine (Hyl) พันธะเหล่านี้จับอะตอมหรือไอออนเข้าด้วยกันกลายเป็นโมเลกุล เจลาตินประกอบไปด้วยโปรตีนที่มีสายโซ่แบบ สายแอลฟา α -chains (one polymer/single chain) สายเบต้า β -chains (two α -chains covalently crosslinked) และสาย แกมมา γ -chains (three covalently crosslinked α -chains) (Papon et al., 2007)

สมบัติหน้าที่ของคอลลาเจนและเจลาติน

นอกจากคุณสมบัติพื้นฐานของการ hydration แล้ว (เช่น การละลาย และการพองตัวในน้ำ) สมบัติหน้าที่ที่สำคัญที่สุดของคอลลาเจนและเจลาตินสามารถแบ่งออกได้สองกลุ่ม คือ 1) สมบัติที่เกี่ยวข้องกับการช่วยให้เกิดเจล เช่น การเกิดเจล (gel formation) ความมีเนื้อสัมผัส (texturizing) ความคงตัว (thickening) และความสามารถในการจับน้ำและน้ำมัน และ 2) ความสามารถในการทำให้เกิดเจล

เช่น การพองตัว การละลาย สำหรับการนำเอาเจลาตินมาประยุกต์ใช้นั้นสมบัติที่สำคัญของเจลาตินคือ ความสามารถในการเกิดเจล และความแข็งแรงของเจล ความหนืด และการหลอมเหลว คุณสมบัติเหล่านี้มีผลมาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย และการกระจายของน้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน เวลาการเกิดเจล อุณหภูมิการเกิดเจล ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณเกลือ มีการศึกษาสมบัติของอาหารที่มีการประยุกต์ใช้เจลาตินปลากันอย่างแพร่หลาย (Choi & Regenstein 2000; Norland 1990; Osborne et al., 1990) นอกจากนี้ การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างเจลาตินจากแหล่งต่างกันต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินก็มีการศึกษา เช่น Leuenberger (1991) ได้ทำการเปรียบเทียบสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านต่าง ๆ ระหว่างเจลาตินปลาและเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้สมบัติเชิงหน้าและเคมีกายภาพของเจลาตินปลาในด้านอื่น ๆ ยังมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น สมบัติทางด้านกรไล (Badii & Howell 2006; Gilsenan & Ross-Murphy 2000; Gudmundsson 2002; Haug et al., 2004; Jamilah & Harvinder 2002; Muyonga et al., 2004; Zhou & Regenstein 2007) สมบัติในการเกิดฟอง (Avena-Bustillos et al., 2006; Jongjareonrak et al., 2006; Zhang et al., 2007) เป็นต้น ซึ่งสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินและความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ

เจลาตินเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดซึ่งได้รับความนิยมและเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมภาพถ่าย ทั้งนี้สืบเนื่องจากสมบัติที่โดดเด่นของเจลาตินสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำเจลาตินมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ขนมขบเคี้ยว ผลิตภัณฑ์ไขมันต่ำ ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยในแต่ละผลิตภัณฑ์ต้องการสมบัติที่แตกต่างกันซึ่งมีอยู่ในเจลาติน มีการใช้เจลาตินในผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นเจลหรือใช้เพื่อเพิ่มลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยพบว่าเจลาตินสามารถลดปัญหาการไหลเอิ้มของน้ำออกจากตัวผลิตภัณฑ์ในผลิตภัณฑ์เจลขึ้นรูปบางชนิดได้ เจลาตินที่สามารถเกิดเจลในอุณหภูมิต่ำ สามารถใช้กับอาหารได้อย่างหลากหลาย ตัวอย่างเช่น สารเก็บกักกลิ่น และเก็บกักตามินซี ซึ่งไวต่อการเสื่อมเสีย ในอุตสาหกรรมยาใช้เจลาตินสำหรับเป็นตัวนำส่งยา การผ่าตัด การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ การสมานแผล และการนำเจลาตินมาใช้เป็นแคปซูลยาทั้งชนิดอ่อนและชนิดแข็ง เป็นต้น เนื่องจากเจลาตินมีแคลอรีต่ำดังนั้นจึงมักจะถูกแนะนำให้ใช้เป็นส่วนประกอบอาหารเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้กับผู้บริโภคโดยเฉพาะในผู้บริโภคที่ต้องการสร้างกล้ามเนื้อให้กับร่างกาย นอกจากนี้เจลาตินยังถูกใช้เป็นส่วนประกอบอาหารเพื่อทดแทนปริมาณคาร์โบไฮเดรตในสูตรอาหารควบคุมสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานอีกด้วย (Huang et al., 2014)

สมบัติทางชีวภาพของไฮโดรไลเซตและเปปไทด์

โปรตีนที่เราบริโภคอยู่ทุกวันเป็นแหล่งของเปปไทด์ทางชีวภาพซึ่งอยู่ในรูป inactive ในลำดับโปรตีนต้นกำเนิดแต่สามารถทำหน้าที่ได้เมื่อผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหาร การแปรรูปอาหารและการหมัก ทุกครั้งที่มีการปลดปล่อย เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานในระบบร่างกายและส่วนต่างๆ ในร่างกาย คอลลาเจนและเจลาตินจึงได้มีการให้ความสนใจว่าเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อส่งเสริมสุขภาพในเชิงโภชนาการและการประยุกต์ใช้ในเภสัชกรรมปกติแล้วคอลลาเจนและเจลาตินไฮโดรไลเซตมักผลิตจากแหล่งของหนังวัว หนังหมู ซึ่งมีข้อจำกัดในการบริโภคว่าด้วยข้อจำกัดของโรคหัวใจและการบริโภคในบางศาสนาทำให้เกิดการหาแหล่งคอลลาเจนและเจลาตินใหม่ ซึ่งแหล่งคอลลาเจนและเจลาตินจากสัตว์น้ำเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีและเป็นที่ยอมรับในหลายศาสนาและมีความปลอดภัยกว่าการใช้วัตถุดิบจากหนังหมู หรือ วัว จึงทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาแหล่งไฮโดรไลเซตและเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากสัตว์น้ำมากขึ้น (Cheng et al., 2008; Cheng et al., 2009) ซึ่งแหล่งคอลลาเจนเหล่านี้ได้มาจากส่วนหนัง หัว กระดูก เกล็ดปลาที่แปรรูปแล้ว มากไปกว่านั้นการแยกเปปไทด์ที่มีกิจกรรมทางชีวภาพที่มีความสำคัญมักจะรายงานมาจากแหล่งของสัตว์ทะเล เช่น ปลาทะเล แมงกะพรุน ปลิงทะเล (Qian et al., 2008; Wang et al., 2010; Zhuang et al., 2010; Zhao et al., 2009; Zhuang et al., 2009)

เปปไทด์หรือไฮโดรไลเซตจากคอลลาเจนและเจลาตินผลิตจากการย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ทางการค้าต่างๆ ได้นำมาใช้ในการผลิตเปปไทด์ซึ่งได้แก่ trypsin, chymotrypsin, pepsin, alcalase, properase E, pronase, collagenase, bromelain และ papain (Kim et al., 2001b; Lin and Li, 2006; Mendis et al., 2005a; Yang et al., 2008) นอกจากนี้การใช้เอนไซม์จากไส้ปลาก็นิยมนำมาศึกษาเพื่อผลิตไฮโดรไลเซต (Jung et al., 2005; Phanturat et al., 2010) เอนไซม์โปรติเอสมีความจำเพาะต่อการย่อยโปรตีนต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีน องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ รวมถึงลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ด้วย และนั่นนำไปสู่การทำงานเชิงหน้าที่ของเปปไทด์ที่ได้ (Wu et al., 2003) เอนไซม์ Alcalase เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่นิยมกันมากในงานวิจัยหลายๆ เรื่อง เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์นี้เป็นที่นิยมเนื่องจากการย่อยโปรตีนให้ระดับการย่อยที่สูงและไม่มีความจำเป็นว่าจะเลือกย่อยโปรตีนชนิดไหน นอกจากนี้ยังใช้เวลาที่สั้นภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง (Benkajul & Morrissey, 1997) เอนไซม์นี้ได้นำไปใช้ในการย่อยหนังปลา Alaska Pollack, ปลาหมึก squid *Todarodes pacificus* และปลาหมึก giant squid เพื่อผลิตเป็นไฮโดรไลเซตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่สูงอีกด้วย (Giménez et al., 2009; Nam et al., 2008)

ขนาดเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นปัจจัยที่มีสำคัญในแง่ของการทำหน้าที่เชิงชีวภาพ เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ต่างๆ การใช้

ระบบ ultrafiltration membrane จะสามารถช่วยให้ได้กลุ่มของเปปไทด์ที่ต้องการนั้นแคบลง เช่น ได้ขนาดโมเลกุลที่ต้องการและมีฤทธิ์เฉพาะที่ต้องการ ซึ่งมักจะขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีนที่ใช้เริ่มต้น (Picot et al., 2010) นี่เป็นระบบที่จะมีบทบาทมากขึ้นในการผลิตเปปไทด์ในอนาคต ซึ่ง ณ ตอนนี้มี การศึกษาการแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากคอลลาเจนแล้วมากมาย (Alemán et al., 2011b; Hai-Lun et al., 2006; Hernández-Ledesma et al., 2004; Hernández-Ledesma et al., 2005; Mendis et al., 2005a; Saiga et al., 2008; Zhao et al., 2007)

การศึกษาทั้งหมดเกี่ยวกับเปปไทด์ที่ผลิตจากคอลลาเจนมักสนใจในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์ ACE เปปไทด์ส่วนใหญ่เหล่านั้นมักอยู่ในรูปของ Gly-Pro-Hyp ซึ่งการมี องค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเพาะมีบทบาทต่อการมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Kim & Mendis, 2006) นอกจากนี้เปปไทด์สามารถใช้ทำหน้าที่ในการต้านจุลลินทรีย์ จับกับโลหะ ลดผลของไขมัน และมีผลดี ต่อสุขภาพผิว รวมถึงข้อต่อในร่างกาย (Gómez-Guillén et al., 2010; Hou et al., 2009; Moskowitz, 2000; Zhang et al., 2010)

บางการศึกษาเป็นการยืนยันกิจกรรมทางชีวภาพในระบบ in vivo รวมถึงการทดลองใน สัตว์ทดลอง นอกจากนี้การศึกษาในมนุษย์เองก็ให้ผลในทางบวก ซึ่งการบริโภคเปปไทด์จากแหล่ง คอลลาเจนส่งผลต่อการส่งเสริมการทำงานในข้อต่อต่างๆ ในร่างกาย เนื่องจากความสามารถของเปป ไทด์ที่ได้จากคอลลาเจนและเจลาตินนี้ทำให้เป็นที่นิยมผลิตในอุตสาหกรรมยาเพื่อทำเป็นอาหารเสริม (Zuckley et al., 2004) เปปไทด์จากหนังปลาสามารถลดการดูดซึมไขมันได้เมื่อทดลองในหนู (Saito et al., 2009) ไฮโดรไลสเสตจากกระดูกไก่สามารถลดการผลิต proinflammatory cytokine ในหนู ทดลองได้ (Zhang et al., 2010) นอกจากนี้โรคข้อต่อกระดูกในสุนัขและโรคกระดูกพรุนในหนู สามารถเยียวยาได้ด้วยการบริโภคคอลลาเจนไฮโดรไลสเสตจากหนังหมู (Beynen et al., 2010; Han et al., 2009; Watanabe-Kamiyama et al., 2010) ในทางกลับกันการบริโภคเจลาตินไฮโดรไลสเส ตจากหนังวัวไม่มีผลต่อโครงสร้างกระดูกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (Cúneo et al., 2010) และ เร็วๆ นี้ เปปไทด์บางอย่างจากแหล่งทะเลสามารถช่วยป้องกันการทำลาย DNA ผิวจากแสงรังสี UV ได้ (Hou et al., 2009; Zhuang et al., 2009)

การประยุกต์ใช้ไมโครอิมัลชัน (Microemulsions) ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

เครื่องสำอางจะมีประสิทธิภาพดี นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณสารออกฤทธิ์สำคัญ ที่เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางเองแล้ว ยังขึ้นอยู่กับความสามารถที่สารออกฤทธิ์สำคัญดังกล่าว จะแทรกหรือซึมไปยังอวัยวะเป้าหมายได้มากน้อยเพียงใด เทคนิคไมโครอิมัลชัน (microemulsions, ME) เป็นเทคนิคที่ทำให้ขนาดของอนุภาคมีขนาดในช่วง 10-140 นาโนเมตร ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มี ลักษณะโปร่งใส มีความหนืดต่ำ และมีความคงตัวทางเทอร์โมไดนามิก (thermodynamic stability) ไมโครอิมัลชันมีองค์ประกอบ 3 องค์ประกอบ คือ เฟสของน้ำ (aqueous phase) เฟสของน้ำมัน (oil

phase) และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) และอาจมีสารเสริม (cosurfactant) ในสัดส่วนที่เหมาะสม ทำให้เฟสทั้งสองซึ่งปกติเป็นเฟสที่ไม่สามารถเข้ากันได้ สามารถอยู่รวมกันแบบคอลลอยด์ (colloidal system) ที่คงตัว (Anton & Vandamme, 2011; Donnelly & Singh, 2015) ทั้งนี้สามารถแบ่งไมโครอิมัลชันเป็นหลายประเภท ขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบ สัดส่วนขององค์ประกอบเหล่านั้น และการจัดเรียงตัวของโมเลกุล ได้แก่ ไมโครอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ (oil-in-water) O/W ที่มีอนุภาคของน้ำมันกระจายตัวอยู่ในเฟสของน้ำ ไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil, W/O) ที่อนุภาคของน้ำกระจายตัวอยู่ในเฟสของน้ำมัน และระบบต่อเนื่องแบบคู่ (bicontinuous systems) ที่มีเฟสของน้ำและน้ำมันพันกันโดยมีสารลดแรงตึงผิวที่มีลักษณะเป็นแผ่นยึกระหว่างเฟส

ปัจจุบันนิยมใช้ไมโครอิมัลชันในเครื่องสำอางหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว บำรุงเส้นผม เป็นต้น เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ใส ไม่ทิ้งคราบขาวไว้บนผิวหรือเส้นผม มีสมบัติในการเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิวหรือเส้นผมได้ มีความสามารถในการละลายที่ดี ทำให้มีการกระจายตัวของสารออกฤทธิ์สม่ำเสมอ มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานโดยไม่เกิดการแยกชั้น เนื่องจากเทคนิคไมโครอิมัลชันสามารถทำให้สารออกฤทธิ์สำคัญที่อาจมีความเป็นขั้วต่างกันสามารถอยู่รวมกันเป็นเนื้อเดียวกันได้ นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังเป็นวิธีที่ทำให้สามารถใส่สารออกฤทธิ์สำคัญลงในส่วนผสมได้มากกว่าวิธีอื่น ๆ (high bioactive compound loading) รวมทั้งมีขั้นตอนการเตรียมที่ไม่ยุ่งยากเพียงแค่ผสมส่วนผสมให้เข้ากันในสัดส่วนที่เหมาะสม และสามารถขยายขนาดของกระบวนการผลิตให้สามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ (Adnan et al., 2008; Azouaoui et al., 2017; A. Kumar, Kushwaha, & Sharmar, 2014; ประภาพร บุญมี, กฤติยา ศรีสุวรรณวิเชียร, & ณัฐธิดา ภัคพัตต์, 2553) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ด้วยขนาดอนุภาคที่เล็กระดับนาโนเมตร และการมีสัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตร (surface area-to-volume ratio) มาก ทำให้ไมโครอิมัลชันสามารถซึมเข้าสู่ผิวได้ดีกว่าการใช้ครีมหรือเจลที่เตรียมโดยวิธีปกติ (B. Kumar, Jain, & Prajapati, 2011; Malakar, Sen, Nayak, & Sen, 2011; Thacharodi & Panduranga Rao, 1994) โดยไมโครอิมัลชันจะเข้าทำลายโครงสร้างที่เป็นไขมัน บนชั้นผิวหนังที่ป้องกันไม่ให้สารเข้า-ออก หรือทำให้สารสำคัญดังกล่าวสามารถละลายไปกับผิวหนังได้มากขึ้นได้ (Hathout, Mansour, Mortada, Geneidi, & Guy, 2010; Lopes, 2014)

ทั้งนี้ปัจจัยหลายปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการซึมเข้าสู่ผิวของไมโครอิมัลชัน เช่น ชนิดของไมโครอิมัลชัน ชนิด ปริมาณ และความสามารถในการละลายของสารออกฤทธิ์สำคัญ ชนิด และสัดส่วนของสารลดแรงตึงผิว หรือสารเสริมต่อสารออกฤทธิ์สำคัญดังกล่าว ขนาดของไมโครอิมัลชัน ลักษณะโครงสร้างของสารตัวพาที่เป็นไขมันซึ่งมีผลต่อความสามารถในการเลือกผ่านของเซลล์ผิวหนัง รวมถึงลักษณะเฉพาะของเป้าหมายที่เราต้องการใช้ผลิตภัณฑ์เหล่านั้น เช่น ผิวหน้า หรือผิวกาย เป็นต้น (Boonme, Boonthongchuay, Amnuait, & Wongpoowarak, 2013; Förster,

Von Rybinski, & Wadle, 1995; Friedman, Schwarz, & Weisspapir, 1995; Lopes, 2014; Shim et al., 2010; Thevenin, Grossiord, & Poelman, 1996) การเลือกชนิดของไมโครอิมัลชันส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้งาน หรือสารออกฤทธิ์สำคัญ เป็นสำคัญ เช่น ไมโครอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ นิยมใช้สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์กันแดด เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถกันน้ำได้ ทำให้ผิวไม่แห้ง ไม่คันหื่นทำให้สามารถชะโลมผิวได้ง่ายไม่เหนอะหนะ หรือสามารถนำมาผลิตสารให้ความชุ่มชื้นกับผิวที่มีความเป็นขี้ดที่อยู่ในเฟสที่เป็นน้ำมัน ซึ่งจะค่อย ๆ ถูกปล่อยออกมาในเฟสของน้ำที่อยู่ด้านนอกเป็นระยะ ๆ อย่างต่อเนื่องเพื่อให้ความชุ่มชื้นกับผิว ส่วนไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันนิยมใช้สำหรับป้องกันองค์ประกอบที่ละลายในน้ำได้ เช่น โปรตีน เปปไทด์ จากกระบวนการเมแทบอลิซึม หรือจากการสัมผัสอนุมูลอิสระที่สูงที่อาจเป็นจำเป็นในกระบวนการผลิต แต่มีผลทำให้สารดังกล่าวเกิดการเสื่อมสภาพได้ หรือใช้สำหรับการผลิตสารให้ความชุ่มชื้นกับผิวเช่นกัน แต่ไม่ทิ้งสารตกค้างบนผิว โดยสารที่นิยมใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในไมโครอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมัน คือ แอลกอฮอล์สายยาวที่มีคาร์บอน 12-18 อะตอม หรืออัลคิลแอลกอฮอล์ (alkyl alcohol ที่มีคาร์บอน 1-3 อะตอม โดยขนาดของอนุภาคจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.001-0.2 ไมโครเมตร (Adnan et al., 2008)

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดคอลลาเจนจากแมงกะพรุน

นำแมงกะพรุน แช่ในสารละลาย NaOH (0.2 M) ในอัตราส่วนหนึ่งปลา 1 ส่วน สารละลาย NaOH 10 ส่วน (w/v) แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำการกวนด้วยเครื่อง overhead stirrer เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในระหว่างการแช่แมงกะพรุนทำการเปลี่ยนถ่ายสารละลาย NaOH ทุก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำแมงกะพรุนที่ได้แช่ในน้ำโดยปล่อยให้ น้ำไหลผ่านตัวอย่างตลอดจนกว่าค่า pH ของน้ำที่แช่ตัวอย่างมีค่าเป็นกลาง หลังจากนั้นนำแมงกะพรุนที่ได้ไปสกัดอนุพันธ์คอลลาเจน โดยใช้อัตราหนึ่งตัวอย่างต่อน้ำ 1 ต่อ 10 (w/v) โดยมีสารละลายสกัดคือ acetic acid เข้มข้น 0.05 M ทำการสกัดในถังที่มีการกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังการสกัดนำสารละลายส่วนใสมากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น ก่อนนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งแช่เยือกแข็งด้วยเครื่อง Scanvac Model Coolsafe 55 freeze dryer (Coolsafe, Lynge, Denmark) จะได้คอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ผงเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนวัดได้โดยใช้การทดสอบ Biuret ตามวิธีการของ Robinson and Hodgen (1940)

วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยเครื่อง electrophoresis

รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำวิเคราะห์โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE (Laemmli, 1970) นำตัวอย่าง (1 กรัม) ละลายในสารละลาย SDS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 10 ml และให้ความร้อนแล้วที่ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารละลายโปรตีนส่วนใส (supernatants) นำส่วน supernatant ผสมกับ บัฟเฟอร์ (สารละลาย 0.5 M Tris-HCl ที่มี pH 6.8 โดยมีความเข้มข้นร้อยละ 4 (w/v) ของสาร SDS มีกลีเซอรอลร้อยละ 20 (v/v) และสาร β -mercaptoethanol ร้อยละ 10 (v/v) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำส่วนผสมที่ได้ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นโปรตีน 15 ไมโครกรัม โหลกลงในช่องว่างบนแผ่นเจล ซึ่งประกอบด้วยส่วนเจลทดสอบและเจลส่วนบนที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ร้อยละ 7.5 (v/v) และร้อยละ 4 (v/v) ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 15 mA ต่อ 1 แผ่นเจล ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad Laboratories, Inc., Richmond, CA., USA) หลังจากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie blue R-250 ร้อยละ 0.1 (w/v) ที่ละลายในสารละลาย methanol ร้อยละ 15 (v/v) และกรด acetic ร้อยละ 5 (v/v) เป็นเวลา 1 คืน ก่อนล้างสารย้อมด้วยสารละลาย methanol ร้อยละ 30 ที่มีกรด acetic acid ร้อยละ 10 จนได้แผ่นเจลที่มีพื้นหลังใส

การผลิตคอลลาเจนน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ

นำคอลลาเจนจำนวน 4 g ละลายในน้ำกลั่น ก่อนปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 M หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 50 ml และได้ปริมาณโปรตีนให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 2 ซึ่งหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry method (Lowry et al., 1951) เริ่มปฏิบัติการย่อยโดยเติมเอนไซม์ alcalase และ trypsin ในปริมาณ 1 ต่อ 50 ส่วน (เอนไซม์ต่อสารตั้งต้น) หลังจากย่อยคอลลาเจนเป็นเวลา 12 ชั่วโมงทำการหยุดปฏิบัติการด้วยการต้มที่น้ำเดือด อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (model W350, Memmert, Schwabach, Germany) เมื่อตัวอย่างเย็นลงนำสารละลายที่ได้หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 × g เป็นเวลา 10 นาที ณ อุณหภูมิ 25 °C เก็บส่วนใสและสารละลายไปทำแห้งแช่เยือกแข็งจนในที่สุดได้เป็นผงคอลลาเจนน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ นำผงคอลลาเจนน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ ที่ได้ใส่ถุงพลาสติกปิดให้แน่นและเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C

วิเคราะห์ความเข้มข้นโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระ

ความเข้มข้นโปรตีนในตัวอย่างคอลลาเจนน้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ วิเคราะห์โดยวิธี Folin phenol reagent (Lowry et al., 1951) ใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน สำหรับความเข้มข้นกรดอะมิโนอิสระวิเคราะห์โดยวิธี ninhydrin method (Moore & Stein, 1957) ใช้ glycine

เป็นสารมาตรฐาน ซึ่งทำการวัดค่าทั้งหมดด้วยวิธีการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Shimadzu UV mini-1240 spectrophotometer

การเตรียมไมโครอิมัลชัน

เตรียมไมโครอิมัลชันด้วยการผสมน้ำมัน ต่างๆ ซึ่ง isopropyl myristate จำนวน 40 กรัม และเติมสารลดแรงตึงผิว sorbitane monooleate (S80) ต่อ Tween80 (poly-oxyethylene sorbitan monooleate, T80) ในอัตราส่วนต่างกัน 2:1 (น้ำหนัก) จำนวน 40 กรัม และสารลดแรงตึงผิวรวม ได้แก่ propylene glycol ต่อ ethanol ในอัตราส่วนคงที่ 1:1 (น้ำหนัก) จำนวน 10 กรัม คนให้เข้ากัน หลังจากนั้นหยดน้ำบริสุทธิ์ลงในสารละลายส่วนน้ำมันดังกล่าวขณะมีการกวนอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องกวนด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที จนกว่าระบบไมโครอิมัลชันจะขุ่นเล็กน้อย ทำการบันทึกปริมาณน้ำที่ใช้ (15 กรัม) ก่อนทำการหยดน้ำใหม่ซ้ำอีกครั้งจนกว่าโดยให้ได้ปริมาณหยดสุดท้ายใกล้เคียงกับที่บันทึกแต่สารละลายยังไม่เกิดความขุ่น ตัวอย่างแต่ละตัวจะตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนการวิเคราะห์ผลต่างๆ

การเตรียมไมโครอิมัลชันที่มีการเติมคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

จากการเตรียมไมโครอิมัลชันในข้อ 12.3 ทำการเลือกส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้เกิดระบบอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ก่อนผสมน้ำบริสุทธิ์ที่มีคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2%

ศึกษาการป้องกันของคอลลาเจนเปปไทด์ในระบบอิมัลชัน

นำสารละลายอิมัลชันที่เตรียมได้มาทำปฏิกิริยา กับสารละลาย cupric acetate (0.15 μM) จำนวนอย่างละ 50 μl ผสม และเขย่าตลอดเวลาด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Germany) ที่ 37 °C ในภาวะไม่มีแสง การทดลองนี้เปรียบเทียบกับตัวอย่างกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์คือ Trolox ที่ความเข้มข้น 100 ppm ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่า conjugated diene ค่า peroxide value และค่า TBARS

วิเคราะห์ปริมาณของ conjugated diene (CD)

ปริมาณของ conjugated diene วิเคราะห์โดยวิธีของ Frankel et al. (1997) นำตัวอย่าง Liposome (0.1 ml) ละลายในสารละลาย methanol (5.0 ml) ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 234 nm ด้วยเครื่อง UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)

วิเคราะห์ค่า peroxide (PV)

ค่า PV วิเคราะห์โดยวิธีของ Wu et al. (2003) นำสารละลาย liposome จำนวน 50 μl ผสมกับสารละลาย ethanol เข้มข้นร้อยละ 75 จำนวน 2.35 ml ตามด้วยสารละลาย ammonium thiocyanate ร้อยละ 30 จำนวน 50 μl สุดท้ายเติมสารละลาย ferrous chloride เข้มข้น 20 mM ที่ละลายในสารละลาย HCl เข้มข้นร้อยละ 35 จำนวน 50 μl หลังจากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ทั้ง

ไว้ 3 นาทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ cumene hydroperoxide เป็นสารมาตรฐาน และรายงานข้อมูลในรูปของ g cumene hydroperoxide/l liposome

วิเคราะห์หาสาร thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

การวิเคราะห์ค่า TBARS ทำตามวิธีของ Lee and Hendricks (1997) โดยนำตัวอย่าง Liposome จำนวน 0.5 ml ผสมกับสารละลาย TBARS (0.375% thiobarbituric acid, 15% TCA และ 0.25 M HCl) จำนวน 2.5 ml เมื่อส่วนผสมตัวอย่างเข้ากันดีแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนี้สีชมพูในสารละลายเริ่มเปลี่ยนสี หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นด้วยการแช่น้ำแข็ง ก่อนนำตัวอย่างเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 × g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 nm ด้วยเครื่อง UV-1601 spectrophotometer สำหรับการเปรียบเทียบสารมาตรฐานใช้ malondialdehyde (MDA) เป็นสารมาตรฐาน และรายงานข้อมูลในรูปของ as g MDA/l liposome

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละปัจจัยที่ศึกษา วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยที่ศึกษาด้วย Duncan's Multiple Range Test วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อประมวลผลทางสถิติ SPSS (SPSS 10.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การผลิตอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตคอลลาเจนน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากแมงกะพรุนเตรียมด้วย เอนไซม์ alcalase และ trypsin เพื่อให้ได้สายเปปไทด์ที่ขนาดสั้นลงหรือใกล้เคียงขนาดน้ำหนักโมเลกุล 500 Da และนำคอลลาเจนที่ได้ไปใช้ผลิตเวชสำอางที่มีระบบนำส่งแบบไมโครอิมัลชันชนิดน้ำ ในไขมันที่มีสูตรให้มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านผิวหนังชั้น stratum corneum ให้มากที่สุด โดยวัสดุที่สำคัญในการวิจัยครั้งนี้คือแมงกะพรุนดองเกลือ (ดังภาพที่ 1) ซึ่งนำมาสกัดคอลลาเจนเพื่อใช้เตรียมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแมงกะพรุนดอง (ส่วนหนวด) ที่นำมาสกัดอนุพันธ์คอลลาเจน

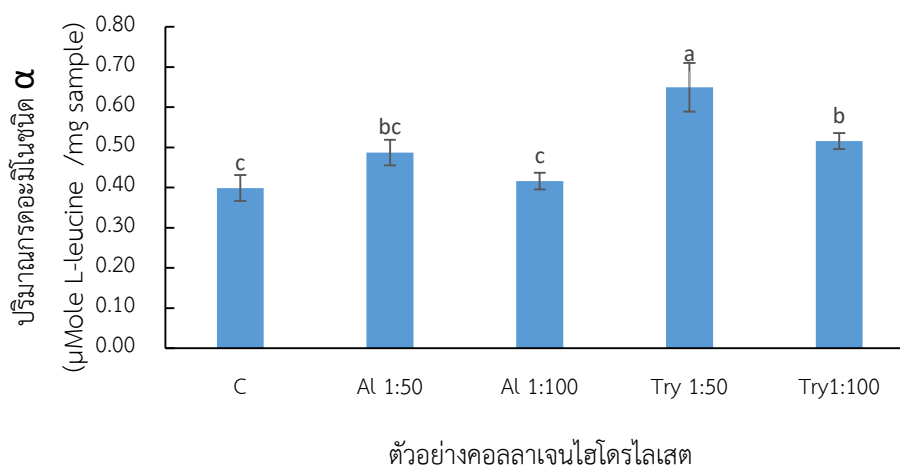
1.1 ปริมาณร้อยละของผลผลิตเจลาตินจากแมงกะพรุน (%yield) และปริมาณโปรตีนของแมงกะพรุน

จากการสกัดคอลลาเจนจากแมงกะพรุน โดยนำมาสกัดด้วย 0.5 M กรดอะซิติก พบว่าได้ปริมาณของผลผลิตสารสกัดในรูปของสารละลายร้อยละ 147.41 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนจากการทดสอบด้วยวิธี Biuret เท่ากับ 17 mg/ml หากทำแห้งจะได้สารสกัดในรูปของแข็งมีผลผลิตร้อยละ 3.63

1.2 ปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (1:50 และ 1:100 ตามลำดับ) ต่างกันโดยใช้ L-leucine เป็นสารมาตรฐาน (แสดงดังภาพที่ 4-2) พบว่าการใช้เอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 (Try 1:50) มีปริมาณกรดอะมิโนชนิด α

สูงที่สุด เนื่องจากเอนไซม์ทริปซินย่อยโปรตีนโดยตัดพันธะเปปไทด์ทำให้มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง α มากขึ้น บ่งบอกถึงความสามารถของทริปซินในการย่อยโปรตีน ซึ่งการที่มีปริมาณกรดอะมิโนชนิด α มากแสดงว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยมีความสามารถในการย่อยได้ดี และเมื่อปริมาณเอนไซม์มากจึงมีโอกาสดับกับสับสเตรทได้มากขึ้นส่งผลให้มีการย่อยที่มากขึ้น เอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease) สามารถตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ที่สั้นลง และเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะการตัดสายยาวของโพลีเปปไทด์แบบเอนโดเปปติเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูงเนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้



ภาพที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน (C คือ เจลาตินที่ไม่ได้ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน, AL 1:50 คือ เจลาตินที่ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50, AL 1:100 คือ เจลาตินที่ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:100, Try 1:100 คือ เจลาตินที่ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ ต่อสารตั้งต้น 1:100, Try 1:100 คือ เจลาตินที่ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:100)

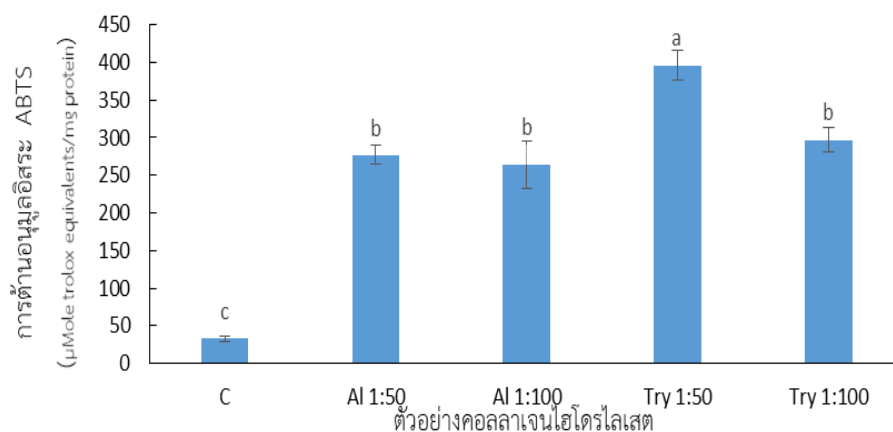
เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ ทริปซินและอัลคาเลสที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นเท่ากันพบว่าตัวอย่างที่ย่อยด้วยทริปซินมีปริมาณอะมิโนชนิด α ได้มากกว่า บ่งชี้ถึงความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นอย่างจำเพาะซึ่งเอนไซม์ทริปซินมีจำเพาะต่อการย่อยโปรตีน ที่ตำแหน่งที่พบกรดอะมิโน กรดอะมิโนไลซีนหรืออาร์จินีนมาก โดยเฉพาะคอลลาเจนจากแมงกะพรุนมีกรดอะมิโน

อาร์จินีนมาก จึงสามารถย่อยโปรตีนสายใหญ่ให้สั้นลงได้ดี ดังนั้นเอนไซม์ทริปซินจึงเหมาะสมสำหรับใช้ย่อย คอลลาเจนเพื่อให้ได้โปรตีนสายสั้น และระดับการย่อยยังส่งผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากการไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสเป็นการใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงและสามารถกำหนดขอบเขตของการไฮโดรไลซ์ได้ ซึ่งสามารถปรับปรุงสมบัติของโปรตีนให้อยู่ในรูปของเพปไทด์ใช้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ และมีสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น การเกิดโฟมและการเกิดอิมัลชัน อย่างไรก็ตามสมบัติเชิงหน้าที่ขึ้นกับแหล่งของโปรตีนตั้งต้น และสมบัติที่เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือ และชนิดของเอนไซม์ซึ่งส่งผลต่อระดับการไฮโดรไลซิส (degree of hydrolysis) ขนาดของเพปไทด์ (molecular weight) องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) และการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน (amino acid sequence)

1.3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน

จากการวิเคราะห์ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (1:50 และ 1:100 ตามลำดับ) แตกต่างกัน โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน เพื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าการใช้เอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 (Try 1:50) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS (แสดงดังภาพที่ 4-3) เนื่องจากเอนไซม์ทริปซินเป็นที่มียับยั้งหลักในการย่อยโปรตีนและเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน lysine และ arginine ที่ด้านคาร์บอกซิลของพันธะเพปไทด์ ซึ่งในตัวอย่างแมงกะพรุนประกอบด้วย กรดอะมิโน arginine และ hydroxy lysine เป็นองค์ประกอบหลัก จึงทำให้การใช้เอนไซม์ทริปซินในการไฮโดรไลซ์มีประสิทธิภาพสูงสุด และจากความเข้มข้นของทริปซินในปริมาณสูงจึงทำให้ย่อยอนุพันธ์คอลลาเจนได้ในปริมาณที่มากซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haslaniza et al. (2010) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์โบรมีเลนเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นเช่นกันเนื่องจากโปรตีนบางส่วนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้ได้ กรดอะมิโนและเพปไทด์สายสั้นๆ เกิดขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เพิ่มขึ้น และ งานวิจัยของ Nattha et al. (2554) ได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์ทริปซินในการผลิตโปรตีน ไฮโดรไลเสตโดยพบว่าการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ระดับความเข้มข้น 24 % (v/w) และระยะเวลาการย่อยสลาย 10 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงสุด ดังนั้นจึงทำให้มีผลต่อการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้สูง เพราะการใช้เอนไซม์ทริปซินสามารถย่อยโปรตีนจากแมงกะพรุนได้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งกรดอะมิโน cysteine และ proline ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์แมงกะพรุนนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้ในการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 1:50 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด มีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ

โปรตีนไฮโดรไลสได้จากพืช โดยใช้เอนไซม์ โปรติเอสหลายชนิด เช่น โปรตีนไฮโดรไลสได้จากกากปาล์ม ด้วย alcalase, chymotrypsin, papain, pepsin, trypsin, Flavourzyme® และ bromelain พบว่าระดับการไฮโดรไลซ์มีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลส โดยประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้นเมื่อระดับการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น เช่น โปรตีนไฮโดรไลสแล้วลิสงไฮโดรไลซ์ด้วย alcalase มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น เมื่อระดับการไฮโดรไลซ์สูงขึ้น ยังมีการศึกษาผลของขนาดของเพปไทด์ต่อประสิทธิภาพในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยที่เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กจะมีการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ขนาดใหญ่ จากการศึกษาของ Sarmadi และ Ismail (2010) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสได้จาก African yam bean ไฮโดรไลซิส ด้วย เอนไซม์อัลคาเลสจะได้เพปไทด์มีขนาดเล็ก มีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระโดยการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของ สารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ferric reducing power และการดักจับอนุมูลอิสระ hydroxyl และ DPPH สูงกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่



ภาพที่ 3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ($\mu\text{Mole trolox equivalents/mg protein}$) ของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน

1.4 ร้อยละการละลายของโปรตีนของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน

จากการวิเคราะห์ผลของความสามารถในการละลายของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน (แสดงดังตารางที่ 4-1) อนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (1:50 และ 1:100 ตามลำดับ) พบว่าตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีเท่ากัน โดยการละลายของโปรตีนขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์คอลลาเจนประกอบไปด้วยเพปไทด์สายสั้น ที่มีกรดอะมิโน hydrophilic ซึ่งมีความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ เนื่องจากขนาดของโมเลกุลจะเล็กลงเมื่อเทียบ

กับโปรตีนที่มีโครงสร้างเชิงซ้อน และการแตกตัวของอะมิโนและหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน จะช่วยเพิ่ม hydrophilicity ทำให้มีความสามารถในการละลายที่สูง โดยทั่วไปการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นหรือมีขนาดโมเลกุลเล็กจะส่งผลให้โปรตีนมี ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี ในขณะที่โปรตีนที่ไม่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์จะมีขนาดใหญ่มีความสามารถในการกระจาย ตัวในน้ำได้ต่ำ โมเลกุลโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์จะเกิดการคลายตัวเอกรดอะมิโนที่ชอบน้ำ (hydrophilic amino acid) ออกมาได้มาก ส่งผลให้พื้นผิวของโมเลกุลโปรตีนแสดงความมีขั้วได้มากขึ้นโปรตีนจึงมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้ดี เมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นต่อค่าการละลายของโปรตีน พบว่าเมื่ออัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นสูงขึ้น มีค่าการละลายของโปรตีนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อาจเนื่องจากการไฮโดรไลซ์เจลาตินด้วยเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิดส่งเสริมให้มีโครงสร้างของเปปไทด์ที่มีความเป็นขั้วมากขึ้นทำให้เปปไทด์จับกับน้ำได้ดี สอดคล้องกับวิจัยของ Quaglia และ Urban (1987) ที่ได้ศึกษาการย่อยสลายเนื้อปลาชาร์ดินด้วยเอนไซม์ Alcalase และ Paspain พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อมีการย่อยสูงขึ้น เนื่องจากโปรตีนถูกย่อยสลายทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และจำนวนของหมู่ที่มีขั้วเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหมู่ที่มีขั้วเหล่านี้สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำได้ดีทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการละลายที่ดีขึ้น

1.5 ความไม่ชอบน้ำ (protein hydrophobicity) ของตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน

จากการวิเคราะห์ผล protein hydrophobicity ของอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน (แสดงดังตารางที่ 4-2) อนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (1:50 และ 1:100 ตามลำดับ) พบว่าอนุพันธ์คอลลาเจนมีค่า protein hydrophobicity (CBBG bound (μg)) เท่ากัน (แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)) โดยปกติค่า protein hydrophobicity บ่งบอกถึงความไม่ชอบน้ำของโปรตีน ซึ่งเป็นค่าที่มีบทบาทสำคัญในการกำหนดโครงสร้างและคุณสมบัติของโปรตีน จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่าง Al 1:50, Al 1:100, Try 1:50 และ Try 1:100 มีค่า protein hydrophobicity สูงกว่าเจลาตินที่ไม่ได้ทำการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน (C) เนื่องจากในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในสายพอลิเพป โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาไขมัน แต่การไฮโดรไลซ์โปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพียงบางส่วนทำให้โปรตีนเผยด้าน hydrophobic group ออกสู่ภายนอกโครงสร้างของโปรตีนได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า

เพิ่มสูงขึ้นและนำไปสู่การปรับปรุงสมบัติการละลายของโปรตีนและการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์
ยังส่งผลต่อค่าไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity)

ตารางที่ 1 ร้อยละการละลายของโปรตีนและค่า protein hydrophobicity (CBBG bound (μg))
ตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ทริปซิน

สิ่งทดลอง	protein solubility ^{ns} (%)	CBBG bound (μg)
C	76 \pm 13.4	17.58 \pm 0.8 ^b
Al 1:50	86 \pm 3.05	24.14 \pm 0.1 ^a
Al 1:100	84 \pm 5.19	24.08 \pm 0.2 ^a
Try 1:50	87 \pm 10.90	24.08 \pm 0.3 ^a
Try 1:100	88 \pm 4.25	24.03 \pm 0.1 ^a

ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ns หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

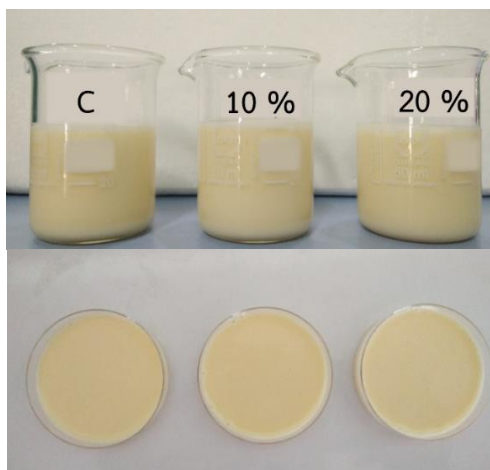
2 การใช้อนุพันธ์คอลลาเจนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากแมงกะพรุนในการยับยั้งออกซิเดชันในระบบอิมัลชันเบื้องต้น

จากการศึกษาจึงได้คัดเลือกตัวอย่างอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระพบว่า แมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทริปซินที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:50 (Try 1:50) มีความเหมาะสม เนื่องจากออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด มีการละลายของโปรตีนที่ดี รวมทั้งมีค่า protein hydrophobicity ที่มากจึงเหมาะสมในการใช้ทดสอบการออกซิเดชันไขมันในระบบอิมัลชัน

2.1 การติดตามการ oxidation ของระบบอิมัลชันด้วยค่า conjugated diene (CD)

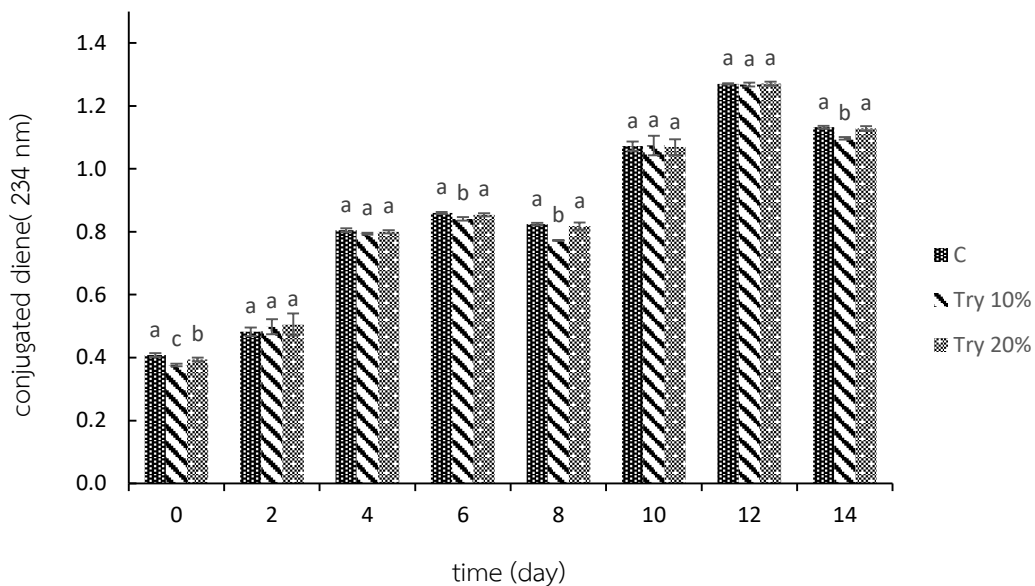
จากการวิเคราะห์ผล ค่า conjugated diene (CD) ของระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ สองวัน พบว่าค่า CD มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาเก็บรักษาซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงชัดเจนในช่วงแรก ของระยะเวลาการเก็บรักษา ค่า CD ใช้ศึกษาปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันต่างๆ รวมทั้งการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein; LDL) การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง UV บ่งบอกถึงการเกิดผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (primary oxidation products) ในไขมันและน้ำมัน (Antolovich et al., 2002) โดยอัตราเร็วการเกิดปฏิกิริยาจะเกิดเร็วมากขึ้นเมื่อมีพันธะคู่ของกรดไขมันมากทำให้ไขมันไม่อิ่มตัวเท่านั้นที่จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ในตำแหน่งที่เป็น

พันธะคู่แบบคอนจูเกตจะเกิดปฏิกิริยาได้เร็วกว่าพันธะคู่ที่ไม่เป็นคอนจูเกต ในช่วง 8 วันแรกของการเก็บรักษา ค่า CD ของตัวอย่างที่เติม Trypsin 1.0% (Try 1.0%) มีแนวโน้มมีค่าน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (C) และตัวอย่างที่เติม Trypsin 2.0% (Try 20%) (แสดงดังภาพที่ 4-6) เนื่องจากตัวอย่างที่เติม Try 1.0% สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้



ภาพที่ 4 ระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 1:50 ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (c คือระบบอิมัลชันที่ไม่มีการเติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุน, 1.0% คือระบบอิมัลชันที่มีการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลสได้จากแมงกะพรุน 1.0% และ 2.0% คือ ระบบอิมัลชันที่มีการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลสได้จากแมงกะพรุน 20%)

สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับโดยตรงจากอาหาร กลไกป้องกันอนุมูลอิสระกลไกของสารที่เข้าทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิด ROS ได้แก่ วิตามินซี (ascorbate), เบต้าแคโรทีน (β -carotene), ยูบิควิโนน (ubiquinone), อัลบูมิน (albumin), กรดยูริก (uric acid), บิลิรูบิน (bilirubin), หมู่ซัลไฟไฮไดรล (sulfhydryl groups), กรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ซึ่งมีอยู่ในโปรตีนของสัตว์ ซึ่งกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ที่พบมากในการสกัดแมงกะพรุนอาจทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจึงสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ เนื่องจากซิสเทอีน และเมทไธโอเนอีน มีหมู่ซัลเฟอร์ (thiol) อยู่ในโครงสร้างของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้ โดยซัลเฟอร์ในโครงสร้างของซิสเทอีนและเมทไธโอเนอีนนั้นมีค่าอิเล็กโตรเนกาติวิตี (electronegativity) ต่ำ ทำให้กรดอะมิโนทั้งสองชนิดนี้สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ง่าย

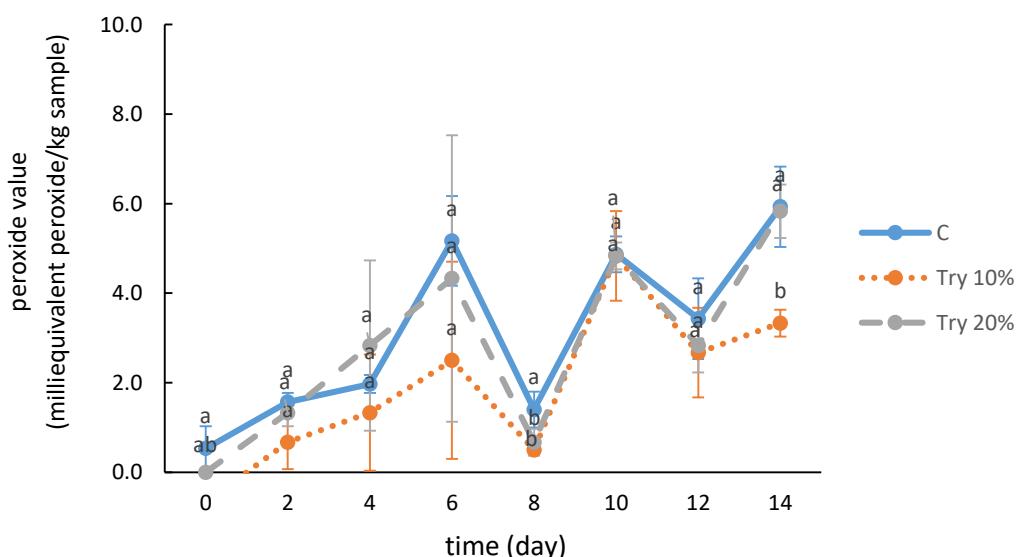


ภาพที่ 5 ค่า conjugated diene (CD) ในระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนใน ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2.2 ติดตามการ oxidation ของระบบไลโปโซมด้วยวิธี peroxide value

จากการวิเคราะห์ผล ค่า peroxide value (PV) ของระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ สองวัน พบว่าค่า peroxide value (PV) ของตัวอย่าง Control (C), Trypsin 10% (Try 10%) และ Trypsin 20% (Try 20%) (แสดงดังภาพที่ 4-7) เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการสะสมของปริมาณสารเปอร์ออกไซด์สูงขึ้น ระบบอิมัลชันมีปริมาณสารเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้นจากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 6 หลังจากนั้นปริมาณสารเปอร์ออกไซด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างไม่คงที่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากสารประกอบออกไซด์เป็นสารที่ไม่เสถียรจึงมีการเปลี่ยนเป็น Secondary oxidation product (Gordon, 2001) การวัดค่า peroxide value (PV) เป็นดัชนีบ่งชี้ขึ้นเริ่มต้นสำหรับตรวจวัดผลิตภัณฑ์ของการเกิดออกซิเดชันในไขมัน ซึ่งเป็นสารปฐมภูมิ (primary product) ของปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นสารทุติยภูมิ (secondary product) ที่ไม่เสถียรและเกิดเป็นสารอนุมูลอิสระได้ ค่า peroxide value (PV) เป็นค่าที่ใช้ในการวัดอัตราการเกิดปฏิกิริยา lipid oxidation ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นหืน (rancidity) อีกทั้งเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของน้ำมันและไขมันรวมทั้งอาหารที่มีไขมันสูง โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันชนิดนี้จำเพาะกับกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวซึ่งทำให้คุณภาพของระบบอิมัลชันลดลง เป็นสาเหตุให้มีกลิ่น ตัวอย่าง Control (C) มีปริมาณสารเปอร์ออกไซด์สูงสุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจน Trypsin 2.0% (Try 2.0%) และ Trypsin 1.0% (Try 1.0%) ตามลำดับ เนื่องจากอนุพันธ์คอลลาเจน

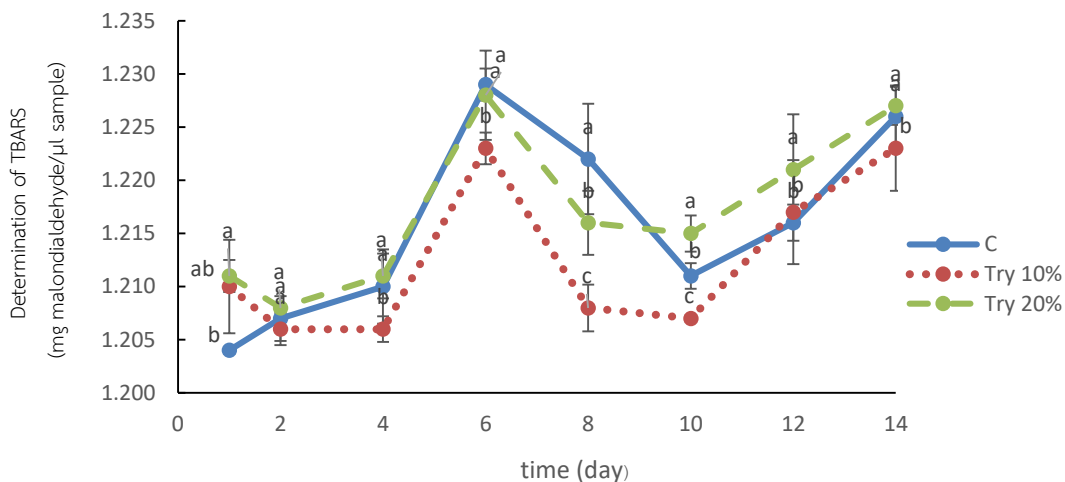
จากแมงกะพรุนที่เติมเข้าไปนั้นมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันและสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhuang et al. (2009) ที่พบว่าคอลลาเจนเปปไทด์จากแมงกะพรุน (*Rhopilemo esculentum*) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในระบบอิมัลชันของกรดไขมันลิโนเลอิก อีกทั้งยังป้องกัน peroxide value เนื่องจากมีสมบัติการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันมีผลทำให้เกิดการเสื่อมเสีย เช่น สี กลิ่น รสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตเซตเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบธรรมชาติ อาจทำหน้าที่เป็นสารจับโลหะที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากงานวิจัยของ Dong et al. (2007) ได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาเกล็ดเงิน (*Hypophthalmichthys molitrix*) โดยใช้ เอนไซม์ Alcalase และ Flavourzyme ในการย่อย พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเสต ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase และ Flavourzyme มีความสามารถในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ดีกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันจากธรรมชาติ คือ G-tocopherol, carnocine และดีกว่าสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ BHT นอกจากนี้ยังมีปัจจัยสำคัญที่เกี่วข้องในการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันคือ ขนาดของเพปไทด์ อัตราส่วนของกรดอะมิโนอิสระ และชนิดของกรดอะมิโนที่พบ ในการศึกษาวิจัยอีกมากพบว่าน้ำหนักของโมเลกุลขนาดเล็กส่งผลต่อการเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่ดี ทั้งยังเกี่ยวข้องกับค่า DH ถ้ามีค่ามากจะส่งผลถึงน้ำหนักของโมเลกุลให้มีขนาดเล็กลง



ภาพที่ 6 ค่า peroxide value (PV) ในระบบอิมัลชันที่เติมอนุพันธ์คอลลาเจนจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2.3 ติดตามการ oxidation ของระบบไลโปโซมด้วยวิธี TBARS

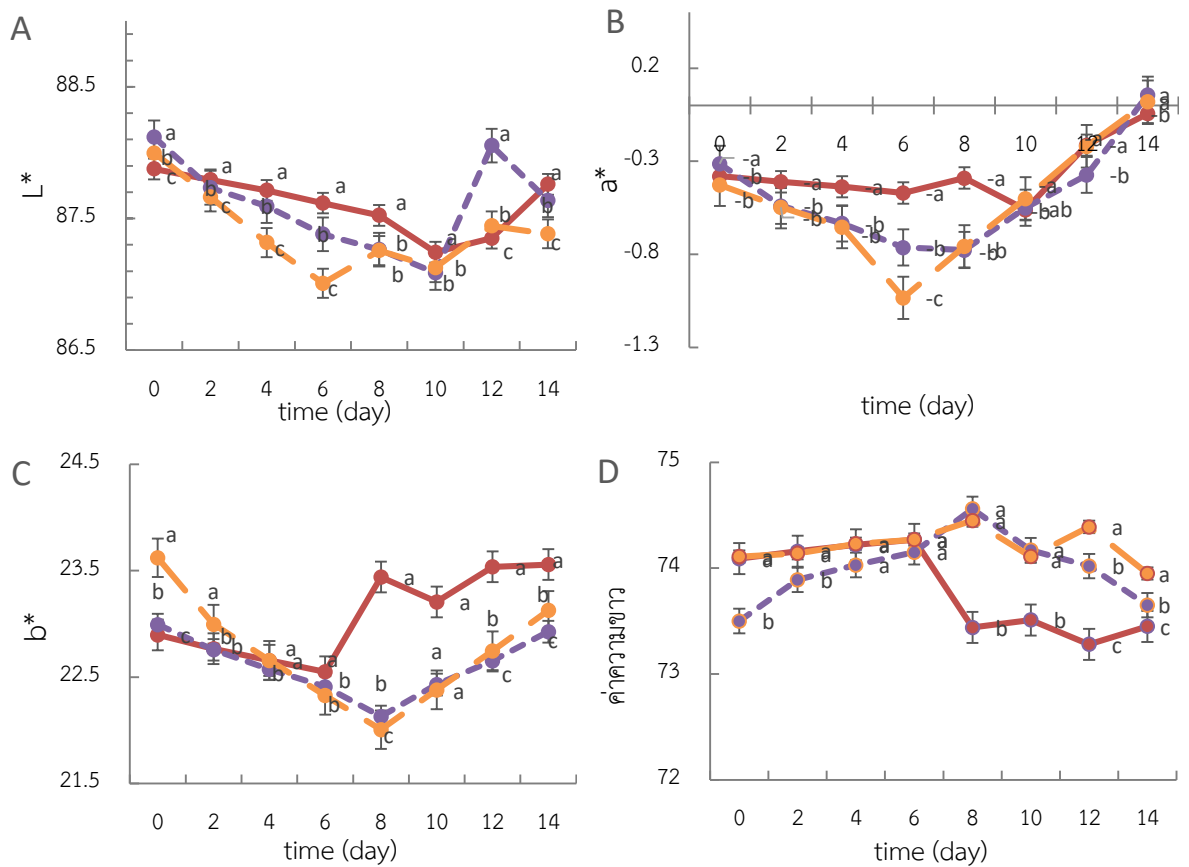
จากการวิเคราะห์ผล ค่า TBARS ของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ สองวันพบว่าค่า TBARS ของตัวอย่างควบคุม (C), Trypsin 10% (Try 10%) และ Trypsin 20% (Try 20%) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ถึงวันที่ 6 และมีแนวโน้มลดลงจากวันที่ 6 ถึงวันที่ 10 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกในระยะเวลาการเก็บรักษา (แสดงดังภาพที่ 4-8) การวัดค่า TBARS เป็นการทดสอบการเกิดผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันอย่าง malondialdehyde (MDA) ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์จากน้ำมันที่ถูกออกซิไดส์ ระหว่างการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน สาร MDA ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากแตกตัวของกรดไขมันถูกพบมากขึ้น ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Shahidi et al., 1991) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า TBARS ของตัวอย่าง Try 20% มีแนวโน้มที่จะมีค่าต่ำกว่าตัวอย่าง C และตัวอย่าง Try 10% เนื่องจากความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนไฮโดรไลเสต และเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนทำให้การเกิดออกซิเดชันของไขมันลดลง (lipid oxidation) ซึ่งเพิ่มความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนในกิ่งก้านของกรดอะมิโนในกลุ่มอะซิดิก (acidic amino acid) และเบสิก (basic amino acid) จึงช่วยกำจัดตัวเร่งการเกิดออกซิเดชัน (Saiga et al., 2003) และระดับการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีปริมาณกรดอะมิโน proline, glycine และ arginine เพิ่มมากขึ้นช่วยยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้มากกว่าตัวอย่าง C ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล (2556) ที่กล่าวว่าเปปไทด์จากเจลาตินของในหนังหมึก (Jumbo squid skin gelatin) ที่มีกรดอะมิโน arginine, proline, serine, glycine, lysine และ alanine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและน้ำมันที่สูงและมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ α -tocopherol ที่ได้จากธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการจับกับอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชัน (OH^\bullet , R^\bullet , RO^\bullet และ ROO^\bullet) ได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด (Mendis et al., 2005)



ภาพที่ 7 ค่า TBARS ของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ สองวัน

2.4 ติดตามการเปลี่ยนแปลงสีของระบบไลโปโซม

การวิเคราะห์ค่าสี L^* , a^* และ b^* ของตัวอย่างระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ระดับ โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุกๆ สองวัน (แสดงดังภาพที่ 4-9) จากการวิเคราะห์การแปรปรวนทางสถิติพบว่าค่า L^* ของตัวอย่างระบบไลโปโซมชุดควบคุม มีค่ามากที่สุดในช่วงวันที่ 2-10 ขณะที่วันที่ 12 ตัวอย่างระบบไลโปโซมที่เติม Trypsin 20% (Try 20%) มีค่า L^* มากที่สุด ($p < 0.05$) ลักษณะสีของระบบไลโปโซมทุกตัวอย่างมีสีเหลือง-ขาวขุ่น จากการวัดค่าสี (L^* a^* b^*) พบว่าค่า L^* (ค่าความสว่าง) และ ค่าสีเขียว (a^*) จะมีแนวโน้มลดลงในระยะเวลาการเก็บรักษาในช่วงแรกจนถึงวันที่ 10 ของการเก็บรักษาและจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 4 วันสุดท้ายของการทดสอบ และค่าสีเหลือง (b^*) จะมีแนวโน้มลดลงในระยะเวลาการเก็บรักษาในช่วงแรกจนถึงวันที่ 8 ของการเก็บรักษาและจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วง 6 วันสุดท้ายของการทดสอบ ในขณะที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอาจเป็นเพราะหยดน้ำมันบางส่วนเกิด flocculation ทำให้หยดน้ำมันมาเกาะกลุ่มรวมตัวใหญ่ขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตอนเริ่มต้นเป็นผลให้ลำแสงสามารถกระเจิงลดค่า L^* จึงลดลง (McClements, 2005) และลักษณะปรากฏมันวาวของน้ำมันมีสีขาวออกเหลืองมาจากสีของน้ำมันพืชซึ่งมี แคโรทีนอยด์เป็นรงควัตถุ และในไข่แดงที่เป็นส่วนผสมของระบบไลโปโซมมีสีเช่น สีเหลือง ส้ม แดง เกิดจากอาหารที่สัตว์กินเป็นแหล่งของ ลูทีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) ซึ่งเป็นรงควัตถุในกลุ่ม แคโรทีนอยด์ (carotenoids) ที่เป็นส่วนประกอบของเรตินาในจอตา และมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่เติมลงไปในระบบไลโปโซม มีสีเหลือง-เขียวจึงอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า b^* และค่า a^*



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่าสี L* (A), a* (B), b* (C) และ ค่าความขาว (D) ของระบบไลโบโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงทุก ๆ 2 วัน ตลอดระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ (—●— คือ C, —●— คือ Try 10% และ —●— คือ Try 20%)

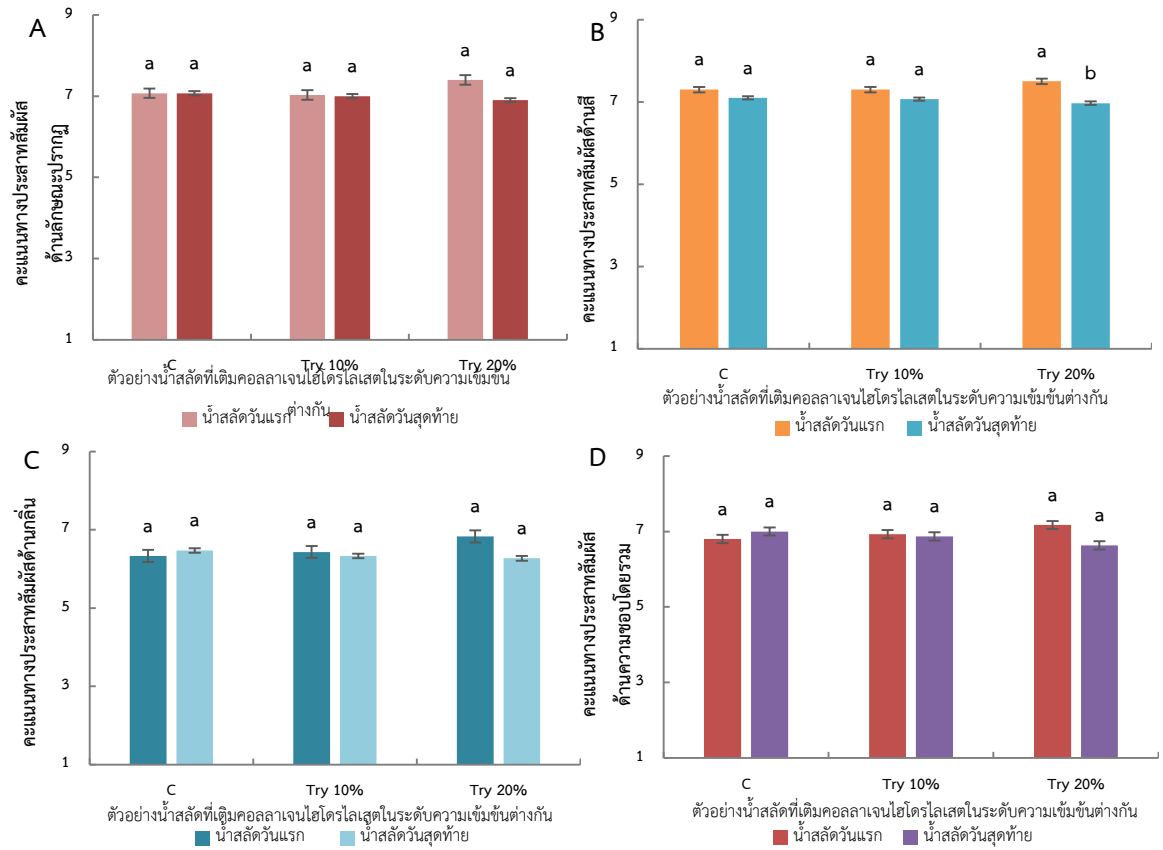
Santipanichwong and Supphantharika (2007) ที่ได้ศึกษาความเสถียรของค่าสี (CIE L*, a*, b*) เมื่อเติมแคโรทีนอยด์และลูเทออินในมายองเนสชนิดไขมันเต็มและมายองเนสชนิดลดไขมันพบว่ามายองเนสทุกตัว อย่างมีค่า b* ลดลง และเมื่อเก็บรักษามายองเนสชนิดไขมันเต็มเป็นเวลา 2 เดือน ค่า L* มีค่าลดลง เนื่องจากเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ส่งผลให้ขนาดของอนุภาคน้ำมันในมายองเนสมีขนาดใหญ่อขึ้น และทำให้ประสิทธิภาพในการกระเจิงแสงของหยดน้ำมันน้อยลง ทำให้ค่าความขาวที่ได้ของตัวอย่างทั้ง 3 ระดับมีแนวโน้มของค่าความขาวที่ได้ไม่แตกต่างกัน และการเปลี่ยนแปลงของสีระบบไลโบโซมอาจเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) กับกรดอะมิโน โปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ โดยมีความร้อน ความชื้น

และระยะเวลา เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจึงเป็นผลทำให้ ค่า a^* มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากระยะเวลาในการเก็บรักษาระบบไลโปโซมที่อุณหภูมิประมาณ 30 °C เป็นเวลานานถึง 2 สัปดาห์ จึงเป็นผลก่อให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้

2.5 ลักษณะทางประสาทสัมผัสของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลสเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

จากการประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลสเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยกลุ่มผู้ทดสอบทั้งหมด 30 คน ด้วยวิธีการให้คะแนนแบบ 9-point Hedonic scale ประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นและความชอบโดยรวม (โดยไม่มีกรชิม) โดยทำการเปรียบเทียบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสวันแรกและวันสุดท้าย พบว่า คะแนนทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น และความชอบโดยรวมของตัวอย่าง Control (C) , Trypsin 10% (Try 10%) และ Trypsin 20% (Try 20%) (แสดงดังภาพที่ 4-10A, 4-10C, 4-10D) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และคะแนนทางประสาทสัมผัสด้านสี ตัวอย่าง Trypsin 20% (Try 20%) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq 0.05$) ผู้ทดสอบสามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีระบบไลโปโซมที่เติม Try 20% โดยมีการเปรียบเทียบระหว่างวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บรักษาโดยในวันแรกมีคะแนนทางด้านประสาทสัมผัสด้านสีดีกว่าวันสุดท้าย ซึ่งอาจเกิดการออกซิเดชันทำให้ค่าสีมีค่าเปลี่ยนไป การเติมคอลลาเจนไฮโดรไลสเสตที่ความเข้มข้นสูง อาจทำให้ระบบไลโปโซมมีสีเข้มได้ เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล อาจเกิดจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันและสามารถเกิดโปรออกซิแดนซ์ได้ เมื่อใส่มากเกินไปสารดังกล่าวจะแปรตัวเองเป็นอนุมูลอิสระไปกระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชันได้ดี และสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลได้เร็วขึ้น ดังนั้นการเติมสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีความจำเป็นที่ต้องหาปริมาณที่เหมาะสมที่จะเติมลงไปผลิตภัณ์ระบบไลโปโซม ลักษณะของระบบไลโปโซมเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion, W/O) มีน้ำเป็นวัฏภาคภายในและน้ำมันเป็นวัฏภาคภายนอก มีไข่แดงทำหน้าที่เป็น อิมัลซิไฟเออร์ (พันธิพา จันทวัฒน์, 2542) และเป็น Least protein Complex ชนิดหนึ่งจะทำให้เกิดการเกาะยึดอยู่ตัว (Stablizing Agent) ทำให้ส่วนผสมรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียวกัน (สุวรรณ เกษตรสุวรรณ, 2539) ระบบไลโปโซม มีน้ำส้มสายชูและน้ำเชื่อมจะช่วยทำหน้าที่เป็น preservative ช่วยในการการยืดอายุการเก็บรักษาระบบไลโปโซม ระบบไลโปโซมจะเกิดการเสถียรภาพเมื่ออิมัลชันถูกทำลาย หรือเกิดจากน้ำมันมีกลิ่นหืนเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ (นิธิยา รัตนาพนนท์, 2548) น้ำมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่ทำให้ระบบไลโปโซมข้นหนืดและยังช่วยให้มีความรู้สึกในปากสั้นขึ้นและดีขึ้นการเติมสารที่เป็นกรดและ

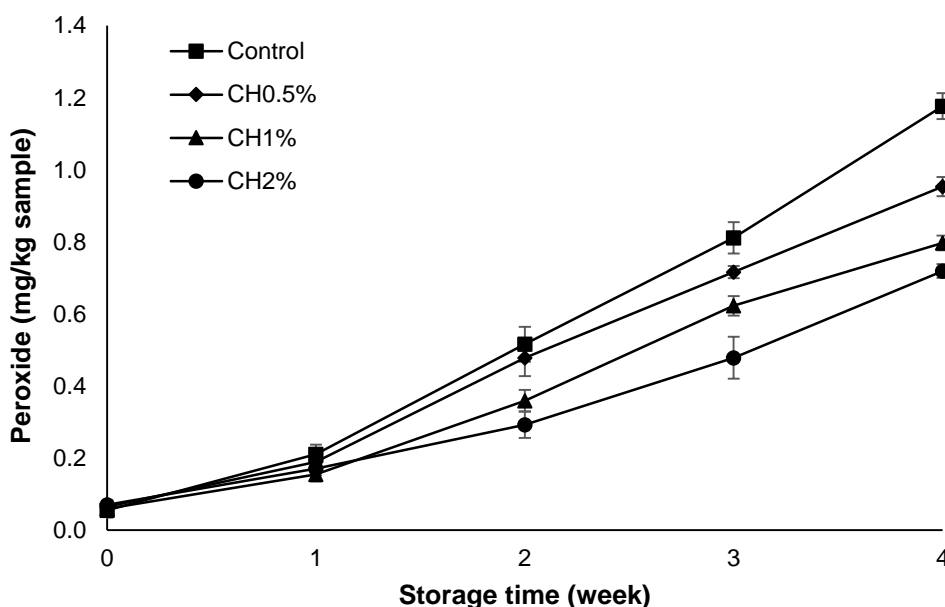
เครื่องเทศ เพื่อช่วยกลบกลิ่นที่ไม่ดี แต่ถ้าน้ำมันเริ่มหืนแล้วสารที่เติมลงไปจะยิ่งช่วยเสริมให้กลิ่นผิดปกติกมากยิ่งขึ้น (Thomas, 1975)



ภาพที่ 9 ผลการเปรียบเทียบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ (A), ด้านสี (B), ด้านกลิ่น (C) และ ด้านความชอบโดยรวม (D) ของระบบไลโปโซมที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนในระดับความเข้มข้นต่างกัน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของวันแรกและวันสุดท้าย ตลอดระยะเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C ภายใต้สภาวะไม่มีอากาศ

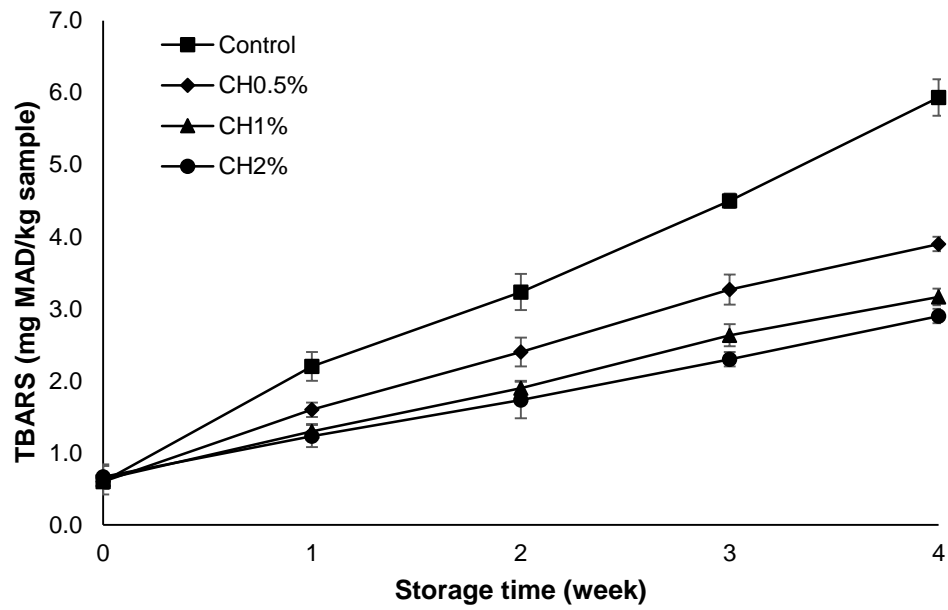
การประยุกต์คอลลาเจนไฮโดรไลเสตน้ำหนักโมเลกุลต่ำในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางเพื่อใช้ยับยั้งการออกซิเดชัน

การประยุกต์คอลลาเจนไฮโดรไลเสตน้ำหนักโมเลกุลต่ำในระบบอิมัลชันที่เตรียมโดย isopropyl myristate ที่ใช้สารลดแรงตึงผิว S80 ต่อ T80 ในอัตราส่วนต่างกัน 2:1 และมีสารลดแรงตึงผิวร่วม ได้แก่ propylene glycol ต่อ ethanol ในอัตราส่วนคงที่ 1:1 และเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ความเข้มข้น 0.5% 1% และ 2% พบว่า การเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสต 2% มีปริมาณสารที่เกิดจากการออกซิเดชันน้อยที่สุด เมื่อเพิ่มคอลลาเจนไฮโดรไลเสตมากขึ้นชะลอการเกิดการออกซิเดชันในอิมัลชันได้ ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสต การเพิ่มขึ้นของค่า peroxide ลดลง โดยทั่วไปฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์อาจได้รับอิทธิพลจากลำดับกรดอะมิโน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีอยู่ และระดับของการย่อยไฮโดรไลซ์ รวมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ (Chang et al., 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่แข็งแกร่งกว่าเมื่อเทียบกับไฮโดรไลเสตที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (Je et al., 2007) จากการศึกษาของ Thomas et al. (2014) รายงานว่าการเตรียมไมโครอิมัลชันเสริมสารต้านอนุมูลอิสระจาก α -tocopherol ร่วมกับ lipoic acid ส่งเสริมการรักษาผิวหนังจากการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเนื้อเยื่อซึ่งมีศักยภาพในการป้องกันของการสลายตัวของยาที่เสริมร่วม



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของค่า peroxide ในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเสต (CH) ที่ความเข้มข้น 0.5% 1% และ 2% เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

การเปลี่ยนแปลงของ TBARS ของอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางระหว่างเก็บไว้นาน 4 สัปดาห์ (ภาพที่ 11) พบว่าค่า TBARS หลังจากสัปดาห์ที่ 3 เริ่มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะในตัวอย่างควบคุม การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสตในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางมีค่า TBARS น้อยกว่า ซึ่งแสดงถึงความสามารถของคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ชะลอการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันของไขมันหุติยภูมิ อิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางที่มีคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ 1% และ 2% มี TBARS ต่ำกว่าระบบที่เติมด้วยไฮโดรไลเสตที่ระดับ 0.5% อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ความเข้มข้นของคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่สูงขึ้นสามารถชะลอการก่อตัวของผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันหุติยภูมิได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลิตภัณฑ์ของการเกิดออกซิเดชันเป็นการเทียบปริมาณ malonaldehyde และผลิตภัณฑ์คาร์บอนสายสั้นอื่น ๆ ของ lipid oxidation ไม่คงที่และถูกย่อยสลายไปเป็นแอลกอฮอล์และกรดอินทรีย์ การลดลงของค่า TBARS เมื่อมีการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตมีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเสตมีส่วนในการรับอนุมูลอิสระ การศึกษาของ Dávalos et al. (2004) รายงานว่ากรดอะมิโนเดี่ยวๆ เช่น Trp, Tyr และ Met แสดงการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กรดอะมิโน Cys, His และ Phe ส่วนกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามยังมีเปปไทด์อีกหลายชนิดที่ไม่ปรากฏกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ให้ proton แต่สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ เปปไทด์ที่ได้จากคอลลาเจนและเจลาตินมักมีกรดอะมิโน Gly ตรงตำแหน่ง C-terminus และมีรูปแบบลำดับกรดอะมิโนของ Gly-Pro-Hyp ซ้ำๆ กัน กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์จากคอลลาเจนและเจลาตินยังมีความเชื่อมโยงเกี่ยวกับจำนวนกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) ซึ่งทำให้เปปไทด์ดังกล่าวสามารถละลายได้ในไขมันและเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งการเกิด oxidation



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางเสริมคอลลาเจนไฮโดรไลเสต (CH) ที่ความเข้มข้น 0.5% 1% และ 2% เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

การผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการไฮโดรไลซ์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ pH 7.8 อุณหภูมิ 50 °C ที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อตัวอย่าง 1:50 มีปริมาณกรดอะมิโนชนิด α และมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากที่สุด คอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีและไม่มีความแตกต่างกันของค่า protein hydrophobicity คอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากแมงกะพรุนสามารถยับยั้งการออกซิเดชันไขมันในระบบอิมัลชันของระบบไลโปโซมได้ การเปลี่ยนแปลงสีของระบบไลโปโซมหลังการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลเสตมีค่าสี L^* และ a^* ที่มีแนวโน้มลดลง การประยุกต์คอลลาเจนไฮโดรไลเสตน้ำหนักโมเลกุลต่ำในอิมัลชันที่ใช้ในเวชสำอางสามารถใช้ยับยั้งการออกซิเดชัน โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเสตเข้มข้นที่ 2% มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันมากที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- ประภาพร บุญมี, กฤติยา ศรีสุวรรณวิเชียร, & ณัฐธิดา ภัคพยัต. (2553). ไมโครอิมัลชันทางเครื่องสำอางสำหรับเส้นผม. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, 5(2), 185-192
- Adnan, A., Mohammad, R., Farhan, J. A., Zeenat, I. K., Roop, K. K., Mohammed, A., & Sushama, T. (2008). Emerging Role of Microemulsions in Cosmetics. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 2(3), 275-289.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT e Food Science and Technology*, 44, 407-413.
- Anton, N., & Vandamme, T. F. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 978-985.
- Anzai, H., Kajiwara, N., Seryou, A., Kono, T., Yamaguchi, Y., Yoshiyama, S., et al. (1997). Abstracts of the 51st annual meeting of Japanese Society of Nutrition and Food Science, p. 86.
- Azouaoui, A., Tran, C., Gueniche, A. G., Cassin, G., Laboureau, J., & Jouy, C. (2017). 052 Microemulsion: A new-type of formulation dedicated to skin anti-aging products. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(10, Supplement 2), S201.
- Badii, F., & Howell, N. K. (2006). Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20, 630-640.
- Benjakul, S. Morrissey, M.T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 3423–3430
- Beynen, A. C., van Geene, H.W., Grim, H. V., Jacobs, P., & van der Vlerk, T. (2010). Oral administration of gelatin hydrolysate reduces clinical signs of canine osteoarthritis in a double blind, placebo-controlled trial. *American Journal of Animal and Veterinary Science*, 5(2), 95-99.
- Binsan, W. Benjakul, S. Visessanguan, W. Roytrakul, S. Tanaka, M. Kishimura H. (2008). Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106, pp. 185–193

- Boonme, P., Boonthongchuay, C., Amnuakit, T., & Wongpoowarak, W. (2013). Effects of components on and predictive modeling of microemulsion phase behavior in nonionic systems. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), 001-006.
- Chang C.-Y., Wu K.-C., Chiang S.-H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chem.* 100: 1537–1543.
- Chelh, I. Gatellier, P. Santé-Lhoutellier V. (2006). Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci*, 74, pp. 681–683.
- Cheng, F. Y., Liu, Y. T., Wan, T. C., Lin, L. C., & Sakata, R. (2008). The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. *Animal Science Journal*, 79, 122-128.
- Cheng, F. Y., Wan, T. C., Liu, Y. T., Chen, C. M., Lin, L. C., & Sakata, R. (2009). Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. *Animal Science Journal*, 80, 91-97.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrate and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.
- Chockalingam A. (2008). World hypertension day and global awareness. *Canadian Journal of Cardiology*, 24, pp. 441–444.
- Cúneo, F., Costa-Paiva, L., Pinto-Neto, A. M., Morais, S. S., & Amaya-Farfan, J. (2010). Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density. *Maturitas*, 65, 253-257.
- Donnelly, R. F., & Singh, T. R. R. (2015). *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intra-dermal Drug Delivery*: Wiley.
- Eriksson, U. Danilczyk, U. Penninger J.M. (2002). Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes *Current Biology*, 12. 745–752.

- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39, 1195-1200.
- Faria, M., da Costa, E. L., Gontijo, J. A. R., & Netto, F. M. (2008). Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 560-567
- Förster, T., Von Rybinski, W., & Wadle, A. (1995). Influence of microemulsion phases on the preparation of fine-disperse emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 58(2), 119-149.
- Friedman, D. I., Schwarz, J. S., & Weisspapier, M. (1995). Submicron Emulsion Vehicle for Enhanced Transdermal Delivery of Steroidal and Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(3), 324-329.
- Gilsenan, P. M., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Rheological characterizations of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14, 191-195.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for the development of active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 3-16.
- Hai-Lun, H., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., & Bai-Cheng, Z. (2006). Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from proteasehydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12, 726-733.
- Hathout, R. M., Mansour, S., Mortada, N. D., Geneidi, A. S., & Guy, R. H. (2010). Uptake of Microemulsion Components into the Stratum Corneum and Their Molecular Effects on Skin Barrier Function. *Molecular Pharmaceutics*, 7 (4), 1266-1273.

- Haug, I. J., Draget, K. I., & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 203-213.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography A*, 1049(1e2), 107-114.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Hong, P. K., Gottardi, D., Ndagijimana, M., Betti, M. (2014). Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity. *Food Chemistry*. 142, 285–293.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*, 135, 4, 3039-3048
- Jamilah, B., & Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77, 81-84.
- Je J.-Y., Qian Z.-J., Byun H.-G., Kim S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 42: 840–846.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Ben R. Salem, S.-B., Mehiri, M., Hajji, M., Nasri, M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A2 6 . *Process Biochemistry*, 49, 6, 963-972
- Johnston-Banks, F. A. (1990). Gelatin. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 233-289). London: Elsevier Applied Science Publishers.

- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2006). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3), 475-484.
- Jung, W. K., Park, P. J., Byun, H. G., Moon, S. H., & Kim, S. K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91, 333-340.
- Kim, S. E., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts: a review. *Food Research International*, 39, 383-393.
- Kumar, A., Kushwaha, V., & Sharmar, P. K. (2014). Pharmaceutical Microemulsion: Formulation, Characterization and Drug deliveries across skin. *International Journal of Drug Development and Research*, 6(1), 1-21.
- Kumar, B., Jain, S. K., & Prajapati, S. K. (2011). Effect of Penetration Enhancer DMSO on In-Vitro Skin Permeation of Acyclovir Transdermal Microemulsion Formulation. *International Journal of Drug Delivery*, 3(1), 83-94.
- Lin, L., & Li, B. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2290-2295.
- Lopes, L. B. (2014). Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. *Pharmaceutics*, 6(1), 52-77.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, pp. 267-275.
- Malakar, J., Sen, S. O., Nayak, A. K., & Sen, K. K. (2011). Development and Evaluation of Microemulsions for Transdermal Delivery of Insulin. *ISRN Pharmaceutics*, 2011, 7.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., & Kim, S. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Moore, S. Stein W.H. (1957). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J Biol Chem*, 211, pp. 907-913.

- Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 30(2), 87-89.
- Nam, K. A., You, S. G., & Kim, S. M. (2008). Molecular and physical characteristics of squid (*Toradores pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 73(4), 249-255.
- Nikoo, M., Benjakul, S., Xu, X. (2015). Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry*.181: 295–303.
- Norland, R. E. (1990). Fish gelatin. In M. N. Voight, & J. K. Botta (Eds.), *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability* (pp. 325e333). Lancaster: Technomic Publishing Co.
- Ondetti, M. A., Rubin, B., & Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196, 441-443.
- Patchett, A. A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, et al.. (1980). *Nature*, 298, 280-283.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1), 86-97.
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandajon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., et al. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1819-1826.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana shaw*. *Bioresource Technology*, 99, 1690-1698.
- Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., & Suzuki, H. (2009). Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10477-10482.

- Shim, J., Kim, M. J., Kim, H.-K., Kim, D.-H., Oh, S. G., Ko, S. Y., . . . Kim, J.-W. (2010). Morphological effect of lipid carriers on permeation of lidocaine hydrochloride through lipid membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 388(1), 251-256.
- Skrbic, R. Ijic R. 2009. Seven decades of angiotensin (1939–2009) *Peptides*, 30. 1945–1950
- Thacharodi, D., & Panduranga Rao, K. (1994). Transdermal absorption of nifedipine from microemulsions of lipophilic skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 111(3), 235-240.
- Thevenin, M. A., Grossiord, J. L., & Poelman, M. C. (1996). Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: Assessment of bicontinuous structures. *International Journal of Pharmaceutics*, 137(2), 177-186.
- Thiansilakul, Y. Benjakul, S. Shahidi. F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 31, pp. 266–287.
- Thomas, S. Vieira, C. S. Hass, M. A. & Lopes, L. B. (2014). Stability, cutaneous delivery and antioxidant potential of a lipoic acid and α -tocopherol co-drug incorporated in microemulsions. *J Pharm Sci.* 103(8): 2530–2538.
- Wang, J., Wang, Y., Tang, Q., Wang, Y., Chang, Y., Zhao, Q., et al. (2010). Antioxidant activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Ocean University of China*, 9(1), 94-98.
- Watanabe-Kamiyama, M., Muneshige, S., Shin, K., Yasuki, T., Hideyuki, S., Fumiki, M., et al. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 835-841.
- Weng, W. Tang, L. Wang, B. Chen, J. Su, W. Osako, K. Tanaka, M. (2014). Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 11, 342–351.

- Wettasinghe, M. Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70, pp. 17–26
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957.
- Yang, H., Wang, Y., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2008). Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*, 22, 1541-1550.
- Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., et al. (2009). Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: a new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 2001-2007.
- Zhao, Q., Xue, C. H., Li, Z. J., Tang, Q. J., Wang, Y. M., & Wang, J. F. (2009). Neuroprotective effects of gelatin hydrolysates from *Stichopus japonicus* on hydrogen peroxide-induced PC12 cell damage. In *Proceedings of 2009 International conference of natural product and traditional medicine*, Vols. 1 and 2. 393-397.
- Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42, 1586-1591.
- Zhuang, Y. L., Sun, L. P., Zhao, X., Hou, H., & Li, B. F. (2010). Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity in vitro. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 222-228.
- Zhuang, Y., Hou, H., Zhao, X., Zhang, Z., & Li, B. (2009). Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *Journal of Food Science*, 74(6), H183-H188.
- Zuckley, L., Angelopoulou, K., Carpenter, M. S. S., Meredith, B. A., Kline, G., Rowinski, M., et al. (2004). Collagen hydrolysate improves joint function in adults with

mild symptoms of osteoarthritis of the knee. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(5), S153-S154