

ผลของน้ำมันจระเข้ต่อการมีชีวิตรอด ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังมนุษย์
และการประยุกต์ใช้เป็นอาหารปลานิล

Effect of Crocodile Oil on Human Keratinocyte Cell Line Viability
Antioxidant Activity and Its Application as Tilapia Fish Feed

เมธัส เงินจันทร์¹ ยามาระตี จัยสิน² ชีระวัฒน์ รัตนพจน์³ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน³ และดวงพร อมรเลิศพิศาล^{1,3*}

Metas Ngernjan¹, Yamaratee Jaisin², Teerawat Rattanaphot³, Kriangsak Mengumphan³
and Doungporn Amornlerdpisan^{1,3*}

¹คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

²คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

¹Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

²Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand 10110

³Center of Excellence in Agricultural Innovation for Graduate Entrepreneur, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290

*Corresponding author: doungpornfishtech@gmail.com

Received: September 04, 2021

Revised: October 06, 2022

Accepted: November 03, 2022

Abstract

Crocodile fat, a by-product of community enterprise farms, was extracted in from of oil. Crocodile oil (CO) was investigated for its ability to enhance cell viability and antioxidant activity on human keratinocyte line (HaCaT cell) and its ability to increase growth performance of tilapia when used as supplement. From the results, the unsaturated fatty acid content of crocodile oil was 71.26 g/100 g, composing of omega 3, 6, and 9 fatty acids at the amounts of 1.67, 24.53, and 39.71 g/100 g, respectively. In the study on HaCaT cells, when CO was dissolved in tween 20, the concentrations of 0.125 and 0.25% showed no cytotoxicity and also enhanced cell viability. Additionally, CO possessed antioxidant activity via reduction of NO production induced by UVB irradiation. Furthermore, CO was fed to tilapia for over 4 months, and the results on growth performance demonstrated that 4% CO could be used as an ingredient in fish feed. However, need more pharmacological research on CO is needed before it can be used commercially.

Keywords: crocodile oil, cell viability, antioxidant activity, fish feed, growth performance

บทคัดย่อ

ไขมันจระเข้จากฟาร์มวิสาหกิจชุมชนถูกนำมาสกัดเป็นน้ำมัน นำน้ำมันจระเข้ไปทดสอบความมีชีวิตรอดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังของมนุษย์ (Human keratinocyte line; HaCaT cell) และประเมินการเจริญเติบโตของปลานิลที่ได้รับน้ำมันจระเข้ จากผลการศึกษาพบว่า น้ำมันจระเข้มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว 71.26 กรัม/100 กรัม และมีสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า 3, 6 และ 9 เท่ากับ 1.67, 24.53 และ 39.71 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ การศึกษาใน HaCaT cell พบว่าน้ำมันจระเข้ที่ละลายใน Tween 20 ในขนาด 0.125 และ 0.25% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วยเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยรังสียูวีบี (UVB) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยลดการสร้างอนุมูล NO ที่ถูกกระตุ้นด้วย UVB ในเซลล์เพาะเลี้ยงได้ จากนั้นน้ำมันจระเข้ถูกไปประยุกต์ใช้ในอาหารเลี้ยงปลานิลเป็นเวลา 4 เดือน พบว่าน้ำมันจระเข้ระดับ 4% สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปลา และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของปลานิลได้ อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทางเภสัชวิทยาของน้ำมันจระเข้เพื่อการใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ: น้ำมันจระเข้ การมีชีวิตรอดของเซลล์ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาหารปลา ประสิทธิภาพการเติบโต

คำนำ

อุตสาหกรรมขายหนังและเนื้อจระเข้ในประเทศไทยได้รับความนิยมอย่างต่อเนื่อง และพบว่ามีเศษเหลือจากการแล่เนื้อและหนังเป็นไขมันประมาณ 10% ของน้ำหนักตัว ซึ่งไม่ถูกนำไปใช้ประโยชน์ กลุ่มวิสาหกิจชุมชนทั้งในภาคใต้ ภาคกลาง และภาคเหนือหลายแห่งมีอาชีพเลี้ยงจระเข้ในบ่อดินเพื่อจำหน่ายเป็นเนื้อ หนัง

และเลือด ส่งให้กับบริษัทเอกชนด้านอุตสาหกรรมการแปรรูปจระเข้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อจระเข้แช่แข็ง การแปรรูปหนังจระเข้เป็นของใช้ เช่น กระเป๋า เสื้อผ้า และการนำเลือดจระเข้ไปทำแท่งบรรจุในรูปแบบแคปซูล (Chaeychomsri *et al.*, 2009) ทำให้กลุ่มวิสาหกิจเหล่านี้มีไขมันซึ่งเป็นเศษเหลือจากการจำหน่ายจำนวนมาก เดิมเคยเก็บไขมันแช่แข็งไว้รอการจำหน่ายเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งไม่ได้ราคาและเสียค่าใช้จ่ายในการเช่าห้องเย็น จึงต้องกำจัดทิ้งโดยการฝังกลบทำให้ประสบปัญหาต่อการจัดการด้านสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก

ในทางการแพทย์แผนโบราณมีการใช้น้ำมันจระเข้มานานหลายศตวรรษและมีบทความวิจัยมากมายที่พิสูจน์ได้ว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาโรคต่าง ๆ ตั้งแต่โรคผิวหนังไปจนถึงมะเร็ง ตัวอย่างเช่น ในแอฟริกาตามหลักฐานมีการรับรองน้ำมันจระเข้ใช้รักษาโรคต่าง ๆ เช่น ผื่นที่ผิวหนัง และส่งเสริมการสมานแผลได้ดีและมีประสิทธิภาพ (Shim-Prydon and Camacho-Barreto, 2007) ในส่วนน้ำมันจระเข้ น้ำจืดสายพันธุ์ *Crocodylus siamensis* มีการใช้เป็นยาแผนโบราณเพื่อส่งเสริมการรักษาบาดแผลในภาคใต้ของจีนมาเป็นเวลานาน เนื่องจากมีผลการรักษาได้ดี มีรายงานวิจัยพบว่า น้ำมันจระเข้มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและแก้ปวด จึงมีการนำไปผสมในครีมทาแผลไหม้ (Burn wound) ที่เกิดจากความร้อน (Li *et al.*, 2017) และมีการศึกษานำเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของจระเข้พันธุ์ *Crocodylus palustris* และซีรัมไปทดสอบ พบว่าสามารถต้านเชื้ออะมีบา และต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Siddiqui *et al.*, 2017)

กรดไขมันโอเมก้า 9 เป็นกรดไขมันที่มีฤทธิ์ชีวภาพที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่วิจัยพบว่า น้ำมันสกัดจากไขมันจระเข้ น้ำจืดมีกรดไขมันโอเมก้า 9 ปริมาณ 40.93 กรัม/100 กรัม และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในเซลล์มาโครฟาจชนิด RAW 264.7 พบว่ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยไปมีผลลดการหลั่งสารก่ออักเสบหรือ Cytokines ชนิด Interleukin-6,

Cyclooxygenase-2, Prostaglandin E2, Nitric oxide และ Nuclear factor kappa B นอกจากนี้ยังมีผลเพิ่ม การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในระดับอื่นอีกด้วย (Ngernjan *et al.*, 2022) มีรายงานการวิจัยพบว่า น้ำมัน ที่สกัดจากจระเข้สายพันธุ์ *C. niloticus* มีองค์ประกอบ หลักของกรดไขมัน 3 ชนิด คือ Oleic, Palmitic และ Linoleic acid โดยกรดไขมัน Palmitic เป็นกรดไขมัน อิ่มตัว ส่วนกรด Oleic เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว 9 ซึ่งพบ ปริมาณสูงในน้ำมัน และกรด Linoleic เป็นกรดไขมัน โอเมก้า 6 และมีฤทธิ์ชีวภาพในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia* และ *Candida albicans* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Buthelez *et al.*, 2012) ส่วนน้ำมันจากจระเข้ชนิด *C. siamensis* มีฤทธิ์ในการรักษาแผลไหม้โดยกระตุ้นการ สร้างผิวหนังใหม่และลดการอักเสบของแผลได้ (Li *et al.*, 2017)

จากฤทธิ์ชีวภาพที่กล่าวมาจึงมีความเป็นไปได้ใน การนำเอาไขมันจระเข้ที่มีจำนวนมากจากอุตสาหกรรม การเลี้ยงจระเข้มาเพิ่มมูลค่าเป็นส่วนประกอบใน อาหาร โดยในการศึกษาครั้งนี้จะนำไปประยุกต์ใช้เป็น ส่วนผสมสำคัญหรือสารประกอบเชิงหน้าที่ (Functional ingredient) ในอาหารสัตว์น้ำ ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ น้ำมันปลาเป็นส่วนประกอบสำคัญในการผลิตอาหาร สัตว์น้ำของผู้ผลิตสัตว์น้ำทั่วโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามการเพิ่มขึ้นของประชากรและการเติบโตทาง เศรษฐกิจอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิต น้ำมันปลาจากปลาที่จับได้จากทะเลมีแนวโน้มลดลง ดังนั้นที่วิจัยจึงเห็นโอกาสทางการตลาดและมีแนวคิด นำน้ำมันจระเข้มาเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในอุตสาหกรรม อาหารสัตว์น้ำและสัตว์อื่น ๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดน้ำมันจระเข้

เก็บรวบรวมไขมันจระเข้มาจัดจากกลุ่มวิสาหกิจ ชุมชนบ้านทราย ตำบลทุ่งหวัง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยนำไขมันมาล้างน้ำประปาจนสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้ว นำไปบดด้วยเครื่องบดจนละเอียด แล้วนำไขมัน บดละเอียดไปนึ่งที่อุณหภูมิ 95-100°C. นาน 30 นาที กรองน้ำมันผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกกากจะได้ไขมันดิบ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบ/นาที ที่ 20°C. เป็นเวลา 10 นาที จะได้ไขมันใสอยู่ ส่วนบนหรือเรียกว่า น้ำมันจระเข้ โดยแบ่งส่วนหนึ่งไป วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมัน ที่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่ และเก็บน้ำมันจระเข้ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทดลอง ต่อไป

การเตรียมสารละลายน้ำมันจระเข้เพื่อทดสอบในเซลล์

นำน้ำมันจระเข้ความเข้มข้น 100% มาละลาย Tween 20 (Polysorbate 20) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่ใช้ ผสมเพื่อทำให้น้ำกับน้ำมันเข้ากัน โดยเตรียมที่อัตราส่วน ปริมาตร 1:1 จากนั้น ทำการละลายสารละลายน้ำมัน จระเข้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ในหลอดทดลองปลอดเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร (มล.) ทำการเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าส่ายยี่ห้อ Vortex Mixer GENIE 2 ตามด้วยการทิ้งไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 2-8°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไม่เกิดการ แยกชั้นระหว่างน้ำมันกับน้ำ ดังนั้นที่ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ของสารละลายน้ำมันจระเข้ จึงเป็นความ เข้มข้นสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สามารถนำมาศึกษา ต่อในการทดลองถัดไป

การเพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการและการฉายรังสียูวีไปที่เซลล์

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด Keratinocytes; HaCaT cells ซึ่งจากบริษัท Cell Lines Service ประเทศเยอรมันในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ซึ่งประกอบด้วย 10% Fetal bovine serum, Penicillin 25 มก./มล., Streptomycin 25 ยูนิต/มล., Sodium pyruvate 1 มิลลิโมลาร์ (mM), Nonessential amino acid 1 mM และ L-glutamine 4 mM ใน Plastic flasks เลี้ยงเซลล์ในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C. และ 5% CO₂ (Jaisin *et al.*, 2020)

ในการศึกษานี้ทำการแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ประกอบด้วย 1) กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมที่ไม่ใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ 2) กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับการฉายรังสียูวีเพียงอย่างเดียว เพื่อกระตุ้นให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระ NO และทำให้เซลล์ตาย 3) กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใส่น้ำมันจะเข้ความเข้มข้น 0.125% ตามด้วยการฉายรังสียูวี 4) กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใส่น้ำมันจะเข้ความเข้มข้น 0.25% ตามด้วยการฉายรังสียูวี และ 5) กลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใส่น้ำมันจะเข้ความเข้มข้น 0.25% เพียงอย่างเดียว เพื่อประเมินการเกิดพิษต่อเซลล์

สำหรับการฉายรังสียูวีไปที่เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells ขั้นตอนแรก ทำการใส่น้ำมันจะเข้ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells ตามด้วยการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่ฉีด 5% ของ CO₂ และอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย 1X Phosphate buffer saline (PBS) เป็นจำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยการใส่ 1X PBS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร (μL) เพื่อให้เคลือบผิวเซลล์ชั้นบน ทำการฉายรังสียูวีไปที่เซลล์แบบครั้งเดียวที่ความเข้มข้น 40 มิลลิจูล/ตร.ซม. (mJ/cm²) ด้วยเครื่องฉายรังสียูวียี่ห้อ UV BIO-

LINK®, Vilber Lourmat ประเทศฝรั่งเศส ตามด้วยการใส่อาหารเลี้ยงเซลล์อย่างช้าๆ ลงไปใน PBS ทำการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงต่อในตู้ CO₂ incubator ที่ฉีด 5% ของ CO₂ และอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การวัดการอยู่รอดชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี Resazurin cell viability assay

การศึกษานี้ป้องกันการตายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells จากการฉายรังสียูวี (Jaisin *et al.*, 2020) โดยใช้ Resazurin cell viability assay kit ยี่ห้อ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา ขั้นตอนนี้ ทำการเพาะเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 well plate จำนวน 2.5×10^5 เซลล์ต่อหลุม บ่มในตู้บ่มเซลล์ที่มี CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการใส่น้ำมันจะเข้ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells ตามด้วยการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการฉายรังสียูวีแบบครั้งเดียวไปที่เซลล์ที่ความเข้มข้น 40 mJ/cm² ตามขั้นตอนที่ระบุก่อนหน้านี้ หลังจากการฉายรังสียูวีไปที่เซลล์เพาะเลี้ยงและทำการบ่มเซลล์ต่อในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเติมสารละลาย Resazurin ปริมาตร 20 μL ต่อหลุม แล้วทำการบ่มต่อเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยหลักการสีของสาร Resazurin เมื่อถูกเปลี่ยนโดย Mitochondrial reductase ที่อยู่ในเซลล์ที่มีชีวิต จะเปลี่ยนเป็นสีชมพูของสี Rezorufin ซึ่งเป็นสาร Fluorescent ที่สามารถวัดปริมาณแสง Fluorescence ที่เกิดขึ้นได้ ที่ค่า Excitation 530 nm และ Emission ที่ 590 nm โดยใช้เครื่อง Automated microplate reader ยี่ห้อ Bio-Tek Instrument, Winooski ประเทศสหรัฐอเมริกา จากนั้นทำการแปลผลร้อยละการอยู่รอดชีวิตของเซลล์ (% Cell viability) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

Percentage of cell viability

$$= (F_{\text{treatment}} - F_{\text{blank}}) / (F_{\text{control}} - F_{\text{blank}}) \times 100\%$$

โดย F = Fluorescence

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ Nitric oxide (NO)

ด้วยวิธี Griess assay

Nitric oxide (NO) เป็นอนุมูลอิสระ ที่มีคุณสมบัติเป็นสารสื่อกลางการอักเสบ ที่เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells สามารถสร้างขึ้นมาได้จากการฉายรังสียูวีไปที่เซลล์หลังจากเกิดปฏิกิริยา Autoxidation ของ NO ในสารละลายที่มี Oxygen จะได้ผลผลิตที่เสถียร คือ Nitrite ที่สามารถตรวจวัดได้โดย Griess reagent

ขั้นตอนนี้ ทำการเพาะเซลล์ในงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 well plate จำนวน 2.5×10^6 เซลล์ต่อหลุม บ่มเซลล์ในตู้ CO₂ incubator ที่ฉีด 5% ของ CO₂ และอุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการใส่สารละลายน้ำมันจระเข้ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ที่ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells ตามด้วยการบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงในตู้ CO₂ incubator ที่อุณหภูมิ 37°C. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการฉายรังสียูวีแบบครั้งเดียวไปที่เซลล์ที่ความเข้มข้น 40 mJ/cm² ตามขั้นตอนที่ระบุก่อนหน้านี้ หลังจากทำการบ่มเซลล์ต่อในตู้ CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 100 μ L จากงานเพาะเลี้ยงชนิด 6 Well plate ใส่ลงใน 96 Well plate โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ตามด้วยการใส่สารละลาย 1% Sulfanilamide ปริมาตร 50 μ L และสารละลาย 0.1% Naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) ในน้ำปริมาตร 50 μ L จากนั้นปล่อยให้สารทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยการวัดค่า Absorbance ที่ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm โดยใช้เครื่อง Automated microplate reader ยี่ห้อ Bio-Tek Instrument, Winooski ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับปริมาณ Nitrite ที่เกิดขึ้น คำนวณได้สมการกราฟเส้นตรง

ของสารมาตรฐาน Sodium nitrite (NANO2) ที่นำมาทดสอบพร้อมกัน (Jaisin *et al.*, 2020)

ศึกษาการเจริญเติบโตของปลานิลในบ่อซีเมนต์

เตรียมปลานิลขนาดน้ำหนัก 20 กรัม แบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 20 ตัว เตรียมอาหารเม็ดลอย 3 สูตร ผสมน้ำมันจระเข้ที่ระดับ 2 และ 4% อาหารปลานิลเตรียมจากปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด ปลาขี้ขาว และน้ำมันจระเข้ 2 และ 4 กรัม ในอาหารปลา 100 กรัม โดยมีการคำนวณให้ทุกสูตรมีปริมาณโปรตีน 30% เท่ากัน และมีกลุ่มควบคุมที่ไม่มีส่วนผสมของน้ำมันจระเข้ ให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 08.00 น. และ 18.00 น. อัตราส่วนการให้อาหาร 3% ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 เดือน ในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.2x1.2x1 เมตร ต่อกลุ่มการทดลอง เริ่มเดือนเมษายน ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2563 บันทึกผลการทดลองโดยชั่งน้ำหนักเพื่อประเมินน้ำหนักตัว (Body weight: BW) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight gain: WG) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily growth: ADG) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion rate: FCR) ของปลานิล ทุก ๆ 1 เดือน ทำการตรวจวัดประสิทธิภาพการเติบโต โดยคำนวณค่าต่าง ๆ ดังนี้

$$WG = \text{น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}$$

$$ADG = \frac{\text{น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเมื่อเริ่มทดลอง}}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$$

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ให้}}{\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น}}$$

ในการทดลองครั้งนี้ได้ดำเนินการตามหลักการปฏิบัติที่ดีต่อสัตว์ทดลอง โดยการเลือกลูกพันธุ์ปลานิลที่มาจากฟาร์มมาตรฐานของคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ใช้จำนวนปลาน้อยที่สุดที่สามารถสรุปผลได้ถูกต้อง มีสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม รวมทั้งมีผู้ปฏิบัติงานที่มีความชำนาญ และเชี่ยวชาญด้านสุขภาพปลา ติดตามการเจริญเติบโตตลอดการเลี้ยง 4 เดือน โดยไม่มีการทำกรูณาต

สถิติที่ใช้ในการทดลอง

ข้อมูลแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean $\pm$ S.E.M.) การศึกษาในเซลล์และในปลานิล ข้อมูลถูกเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบภายหลังจากการวิเคราะห์ (Post hoc test) โดยใช้ Tukey Honestly Significant Difference เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่ม ที่ค่า $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

ชนิดและปริมาณกรดไขมันของน้ำมันจระเข้ (CO)

การสกัดน้ำมันจระเข้พบว่า จากไขมันจระเข้ น้ำจืด 100 กรัม สามารถสกัดแยกเป็นน้ำมันจระเข้สีเหลืองอ่อนใส มีกลิ่นเฉพาะตัว สกัดได้น้ำมัน 36-38 มล. พบองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดเด่น คือ กรดไขมัน Oleic ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวหรือโอเมก้า 9 ในสัดส่วน 39.71 ± 0.80 กรัม/100 กรัม และเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากถึง 71.26 ± 0.56 กรัม/100 กรัม โดยผลแสดงใน

Table 1

Table 1 Fatty acid composition of freshwater crocodile oil (*Crocodylus siemensis*)

Fatty acid	Amount in crocodile oil (g/100 g)
Butyric acid (C4:0)	ND
Caproic acid (C6:0)	ND
Caprylic acid (C8:0)	ND
Capric acid (C10:0)	ND
Undecanoic acid (C11:0)	ND
Lauric acid (C12:0)	0.28 ± 0.21
Tridecanoic acid (C13:0)	ND
Myristic acid (C14:0)	0.46 ± 0.03
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.08 ± 0.00
Palmitic acid (C16:0)	21.61 ± 0.62
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.14 ± 0.01
Stearic acid (C18:0)	5.56 ± 0.20
Arachidic acid (C20:0)	0.11 ± 0.00
Heneicosanoic acid (C21:0)	0.03 ± 0.00
Behenic acid (C22:0)	0.05 ± 0.01
Tricosanoic acid (C23:0)	0.91 ± 0.06
Lignoceric acid (C24:0)	0.02 ± 0.00
Saturated fatty acid	28.74 ± 0.56

Table 1 (Continued)

Fatty acid	Amount in crocodile oil (g/100 g)
Myristoleic acid (C14:1)	0.09± 0.01
cis-10-Pentadecenoic acid (C15:1n10)	ND
Palmitoleic acid (C16:1n7)	4.31 ± 0.09
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1n10)	0.07 ± 0.00
trans-9-Elaidic acid (C18:1n9t)	0.19 ± 0.02
cis-9-Oleic acid (C18:1n9c)	39.62 ± 0.79
cis-11-Eicosenoic acid (C20:1n 11)	0.37 ± 0.04
Erucic acid (C22:1n9)	0.04 ± 0.01
Nervonic acid (C24:1n9)	0.05 ± 0.00
Monounsaturated fatty acid	44.73 ± 0.87
trans-Linolelaidic acid (C18:2n6t)	ND
cis-9,12-Linoleic acid (C18:2n6)	24.07 ± 1.54
gamma-Linolenic acid (C18:3n6)	0.21 ± 0.03
alpha-Linolenic acid (C18:3n3)	1.19 ± 0.12
cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)	0.21 ± 0.07
cis-8, 11, 14-Eicosatrienoic acid (C20:3n6)	0.26 ± 0.03
cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	0.20 ± 0.17
Arachidonic acid (C20:4n6)	ND
cis-13, 16-Docosadienoic acid (C22:2)	0.03 ± 0.02
cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)	0.21 ± 0.17
4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	0.12 ± 0.03
Polyunsaturated fatty acid	26.53 ± 1.41
Unsaturated fatty acid	71.26 ± 0.56

Table 1 (Continued)

Fatty acid	Amount in crocodile oil (g/100 g)
Tran fat	0.19±0.02
Omega 3	1.67±0.17
Omega 6	24.53±1.59
Omega 9	39.71±0.80

Values are expressed as mean $\pm$ S.E.M (n=3), ND = not detected

ผลของ CO ต่อการอยู่รอดชีวิตของเซลล์ Keratinocyte จากการฉายรังสียูวี

จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับการฉายรังสียูวีเพียงครั้งเดียว มีร้อยละการอยู่รอดชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เท่ากับ 56.33 ± 1.3 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม แต่กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ CO ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ก่อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการฉายรังสียูวีเพียงครั้งเดียว แล้วนำไป

บ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่าเซลล์มีร้อยละการอยู่รอดชีวิตเพิ่มมากขึ้นเท่ากับ 96.90 ± 6.92 และ $100.8 \pm 5.50\%$ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเพียงรังสียูวีเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้กลุ่มเซลล์ที่ได้รับเพียง CO ความเข้มข้น 0.25% พบว่าไม่มีผลทำให้เซลล์ตาย บ่งชี้ว่า CO ความเข้มข้นสูงสุดที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ไม่เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells (Figure 1)

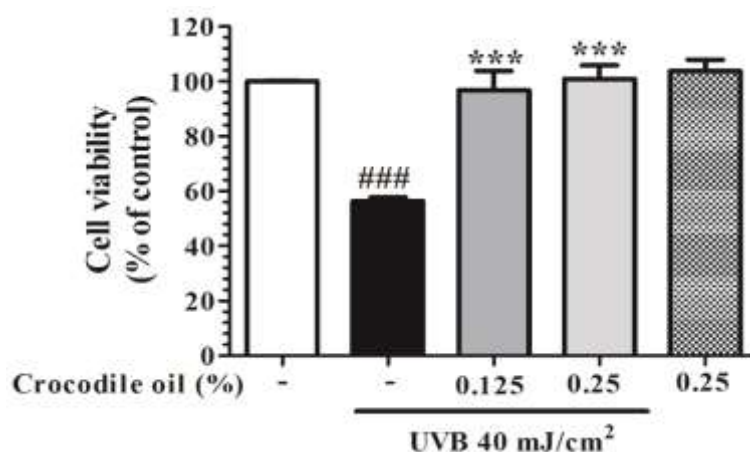


Figure 1 Photo-protective effect of the crocodile oil on keratinocyte cell viability

Mean values were significant different compared with the control group at $^{###}p < 0.001$ and $^{***}p < 0.001$ when compared with UVB-irradiated group

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO ของ CO ต่อเซลล์ HaCaT cells จากการฉายรังสียูวีบี

จาก Figure 2 แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ได้รับการฉายรังสียูวีบี มีปริมาณ Nitrite เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ $90.16 \pm 2.53 \mu\text{M}$ บ่งชี้ได้ว่า ในขณะที่กลุ่มเซลล์ที่ได้รับ CO ความเข้มข้น 0.125 และ 0.25% ก่อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการฉายรังสียูวีบีเพียงครั้งเดียว แล้วนำไปบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณ Nitrite ลดลง เท่ากับ 76.30 ± 5.31 และ $65.59 \pm 191 \mu\text{M}$ ตามลำดับ

บ่งชี้ได้ว่า CO มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ NO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Keratinocytes จากการฉายรังสียูวีบีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับรังสียูวีบีเพียงอย่างเดียว สำหรับกลุ่มเซลล์ที่ได้รับ CO ความเข้มข้น 0.25% เพียงอย่างเดียว พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ Nitrite เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า CO ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระ NO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HaCaT cells

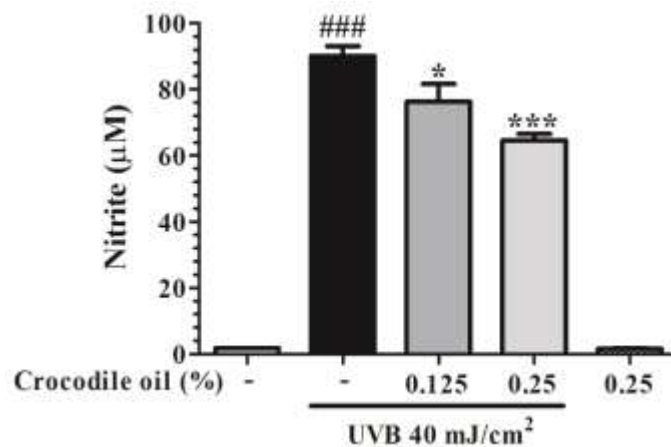


Figure 2 Effects of crocodile oil on NO production in UVB-irradiated keratinocyte cells.

Mean values were significant different compared with the control group at ^{###} $p < 0.001$, ^{*} $p < 0.05$ and ^{***} $p < 0.001$ when compared with UVB-irradiated group.

ผลของ CO ต่อการเจริญเติบโตของปลานิลในบ่อซีเมนต์

จากผลวิจัยข้างต้นพบว่าน้ำมันจระเข้มีผลต่อการมีชีวิตรอด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซลล์เพาะเลี้ยงผิวหนังมนุษย์ จึงนำมาประยุกต์ใช้เป็น Functional ingredient ในอาหารปลา เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสัตว์น้ำทดแทนการใช้ไขมันปลา และทดสอบผลการเจริญเติบโตและความปลอดภัยในสัตว์ทดลองจากการเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารสูตร CO 2 และ 4% เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าปลานิลกลุ่มที่ให้อาหารสูตร CO 4% มีน้ำหนักตัวในเดือนกรกฎาคม (เดือนที่ 3) สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีน้ำหนัก

เท่ากับ 222.5 ± 34.15 กรัม และน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในเดือนสิงหาคม (เดือนที่ 4) เท่ากับ 333.4 ± 37.81 กรัม ซึ่งสูงกว่าปลานิลที่ให้อาหารกลุ่มควบคุม และกลุ่ม CO 2% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของ ปลานิลกลุ่มให้อาหารสูตร CO 4% เท่ากับ 303.00 ± 30.83 กรัม และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน เท่ากับ 10.10 ± 1.03 กรัม มีค่าต่างจากกลุ่มควบคุม และกลุ่มอาหารสูตร CO 2% อย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 4 ของการเลี้ยงเท่านั้น โดยที่อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่แตกต่างกัน และไม่พบการตายของปลานิลในทุกกลุ่มการทดลองตลอดการเลี้ยง (Figure 3)

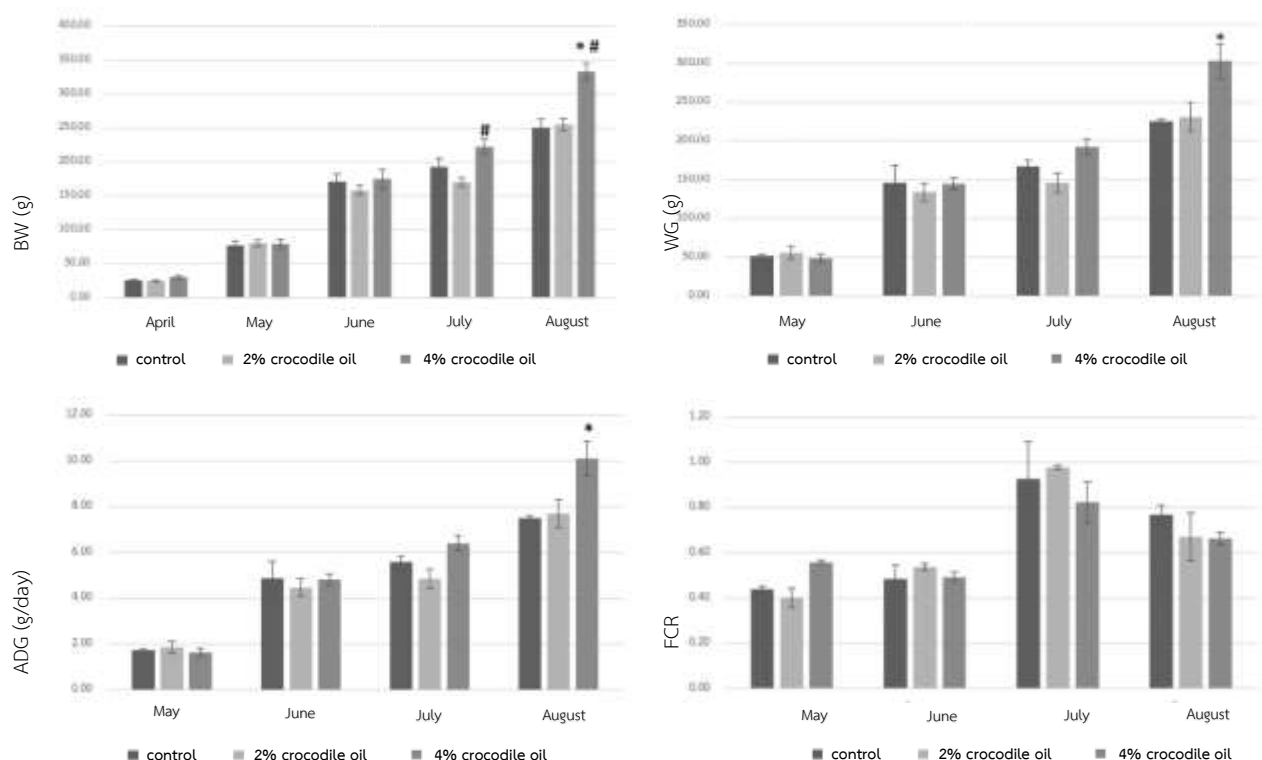


Figure 3 Effect of crocodile oil supplement in fish feed on growth performance of tilapia for 4 months (April-August, 2020) Mean values were significant different compared with the control group at * $p < 0.05$ and # $p < 0.05$ when compared with 2% CO and 4% CO group.

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการวิจัยนี้ใช้รังสียูวีบีกระตุ้นเซลล์ให้เกิด Oxidative stress จากการสร้าง NO ไปทำลายเซลล์ HaCaT cells (Wu *et al.*, 2010) โดยปริมาณของ NO ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์จะทำให้เกิดปฏิกิริยาถูกใช้ของอนุมูลอิสระในร่างกาย และกระตุ้นการสังเคราะห์ไฮโดรโคโรนต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อและเซลล์ (Turnage *et al.*, 2002) ผลการวิจัยพบว่า น้ำมันจระเข้ที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันโอเลอิก 9 ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมัน Oleic เป็นหลัก ที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.25% ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และน้ำมันจระเข้ยังช่วยเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วยรังสียูวีบี และยังมีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ NO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด

Keratinocyte จากการถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีบีได้ ซึ่งสอดคล้องกับการงานวิจัยของ Salucci *et al.* (2017) ที่พบว่าน้ำมันมะกอกมีองค์ประกอบหลัก คือ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวกลุ่มโอเลอิก 9 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและช่วยป้องกันการตายของเซลล์ (Apoptosis) ในเซลล์ HaCaT cells ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสียูวีบีได้ดี

อนุมูลอิสระ (Free radical) เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจน ซึ่งเกิดตลอดเวลา เช่น การหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรียเพื่อสร้างพลังงาน อย่างไรก็ตามร่างกายมีการป้องกันภาวะการสะสมของสารอนุมูลอิสระด้วยการสร้างเอนไซม์เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระให้อยู่ในปริมาณที่สมดุล หรืออาจบริโภคกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากอาหาร เมื่อเซลล์เกิดการบาดเจ็บและการอักเสบจะทำให้เกิดภาวะที่เซลล์และ

ร่างกายถูกออกซิไดส์จนเกินสมดุล (Oxidative stress) ส่งผลให้เกิดการเสื่อมของเซลล์และเกิดการทำลายเนื้อเยื่อต่าง ๆ อนุมูลอิสระกลุ่มที่ไวต่อการทำปฏิกิริยา คือ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น Superoxide anion, Hydroxyl radical, Peroxyl radical และ Nitric oxide (NO) เป็นต้น ซึ่งอนุมูลอิสระกลุ่มนี้มีผลต่อการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคหลอดเลือดและหัวใจ โรคเบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น เนื่องจากน้ำมันจระเข้จัดเป็นอาหารใหม่สำหรับมนุษย์ หรือ Novel food เพราะยังไม่มีรายงานการบริโภคมาก่อนมากกว่า 15 ปี ทีมวิจัยจึงมีแนวคิดในการนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารสัตว์น้ำก่อน เนื่องจากการศึกษาวิจัยด้านความปลอดภัยในหนูขาวและในมนุษย์ต้องใช้เวลาและงบประมาณในการดำเนินการสูง

ผลจากการนำน้ำมันจระเข้ผสมในอาหารปลาพบว่า ปลานิลมีการเจริญเติบโตดีตลอดการเลี้ยง 4 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rattanaphot *et al.* (2018) ที่นำน้ำมันปลาน้ำจืดซึ่งสกัดจากเศษเหลือการแปรรูปปลาหมักน้ำจืดกลุ่มปลาสาวย โดยพบมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว 62.30 กรัม/100 กรัม และมีกรดไขมันโอเมก้า 9 ชนิด Oleic ในปริมาณ 44.57 กรัม/100 กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำมันจระเข้ในการศึกษาครั้งนี้ที่มีกรด Oleic และ 39.62 ± 0.79 กรัม/100 กรัม และให้ผลเพิ่มการเจริญเติบโตในปลาได้ดีเช่นกัน จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่า กรดไขมัน Oleic หรือกรดไขมันโอเมก้า 9 ในน้ำมันจระเข้ เป็น Functional ingredient ที่ออกฤทธิ์ชีวภาพ (Buthelez *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017) ทั้งนี้ผลอาจมาจากการที่ในการต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยป้องกันเซลล์ถูกทำลาย และฤทธิ์ด้านการอักเสบโดยไปมีผลลดการหลั่งสารก่ออักเสบและเพิ่มการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในระดับยีน (Ngernjan *et al.*, 2022) จึงทำให้ปลาสุขภาพแข็งแรงและเจริญเติบโตดี

ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์น้ำมีความต้องการน้ำมันปลามาใช้ส่งเสริมสุขภาพสัตว์น้ำอย่างมาก และหลายบริษัทมีความต้องการจัดหาวัตถุดิบอื่นมาทดแทนน้ำมันปลาเพื่อการผลิตอาหารสัตว์น้ำ เช่น บริษัทไทยยู

เนียน ฟีดมิลล์ จำกัด เพื่อเพิ่มผลผลิตและการเจริญเติบโต ส่วนในสัตว์เลี้ยงเพื่อสร้างภูมิคุ้มกันและส่งเสริมสุขภาพ น้ำมันจระเข้จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์น้ำและสัตว์อื่น ๆ ที่จะนำมาใช้เป็นสารประกอบเชิงหน้าที่ทดแทนน้ำมันปลา โดยจากผลการวิจัยสูตรอาหารปลานิลที่มีน้ำมันจระเข้ 4% ให้ผลดีต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ส่วนการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด Keratinocytes น้ำมันจระเข้ที่ละลายใน Tween 20 ในขนาดมากที่สุด คือ 0.25% ไม่ทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ชนิด HaCaT และทำให้ทราบฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันจระเข้ต่อการต้านอนุมูลชนิด NO ซึ่งไม่ใช่ขนาดที่จะเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองชนิดอื่น เช่น ปลา หรือหนู อย่างไรก็ตาม ทีมวิจัยได้ทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) พบว่าน้ำมันจระเข้ขนาด 5 กรัม/กก ไม่พบความเป็นพิษ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Praduptong *et al.* (2018) ที่ทดสอบ Acute toxicity ของน้ำมันจระเข้ที่ขนาด 300 และ 2,000 มก./กก. ที่ให้ทางปากครั้งเดียว จากนั้นสังเกตอาการเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบความเป็นพิษและการตายในหนูขาว จากผลการทดลองดังกล่าวทีมวิจัยจึงได้ดำเนินการทดสอบผลการให้น้ำมันจระเข้ในหนูที่เป็นเบาหวานเพื่อประเมินฤทธิ์และความปลอดภัยต่อไป

สรุปผลการวิจัย

ก๊อมน้ำมันจระเข้ที่เป็นเศษเหลือจากการแปรรูประดับอุตสาหกรรมถูกนำมาเพิ่มมูลค่าเป็นน้ำมันจระเข้ พบองค์ประกอบหลักเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะกรดไขมันโอเมก้า 9 ซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ และมีฤทธิ์ชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยป้องกันเซลล์ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระชนิดไนโตรออกไซด์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสี UVB สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็น Functional ingredient ในอาหารปลาสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ และเป็นข้อมูลในการนำไปศึกษาเชิงลึกทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาในหนูต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ทีมวิจัยขอขอบคุณสำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยระดับปริญญาเอกภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) รหัสโครงการ PHD62I0008 ร่วมกับบริษัท ออล อะเบาท์ เอ็กแทรกท์ จำกัด ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางการเกษตรสำหรับบัณฑิตผู้ประกอบการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และคณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับการสนับสนุนด้านสถานที่และอุปกรณ์ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Buthelezi, S., C. Southway, U. Govinden, J. Bodenstein and K. du Toit. 2012. An investigation of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of crocodile oil. **Journal of Ethnopharmacology** 143(1): 325-330.
- Chaeychomsri, W., S. Chaeychomsri, J. Siruntawineti, D. Hengsawadi and Y. Cuptapun. 2009. Freeze-dried crocodile blood production as food supplement. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 108(S1): S22.
- Jaisin, Y., P. Ratanachamnong, O. Wongsawatkul, A. Watthammawut, K. Malaniyom and S. Natewong. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCaT keratinocyte cells. **Life Science** 263: 1-9.
- Li, H.L., Y.T. Deng, Z.R. Zhang, Q.R. Fu, Y.H. Zheng, X.M. Cao, J. Nie, L.W. Fu, L.P. Chen, Y.X. Xiong, D.Y. Shen and Q.X. Chen. 2017. Evaluation of effectiveness in a novel wound healing ointment-crocodile oil burn ointment. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines** 14(1): 62-72.
- Ngernjan, M., A. Ontawong, N. Lailerd, K. Mengamphan, S. Sarapirom, and D. Amornlerdpison. 2022. Crocodile oil modulates inflammation and immune responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Molecules** 27(12): 3784. DOI: 10.3390/molecules27123784.
- Praduptong A., J. Siruntawineti, S. Chaeychomsri, P. Srimangkornkaew and W. Chaeychomsri. 2018. Acute oral toxicity testing of siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) oil in wistar rats. **Bioscience Discovery** 9(3): 409-15.
- Rattanaphot, T., K. Mengumphan, S. Tongsir, C. Srimaroeng and D. Amornlerdpison. 2018. Enhancement of oxidative defence and growth performance of Nile tilapia by omega-9-rich freshwater fish oil. **Maejo International Journal of Science and Technology** 12(1): 79-88.

- Salucci, S., S. Burattini, F. Buontempo, A.M. Martelli, E. Falcieri and M. Battistelli. 2017. Protective effect of different antioxidant agents in UVB-irradiated keratinocytes. **European Journal of Histochemistry** 61(3): 2784 [Online]. Available <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2784> (November 11, 2021).
- Shim-Prydon, G. and H. Camacho-Barreto. 2007. **New Animal Products: New Uses and Markets for By-products and Co-products of Crocodile, Emu, Goat, Kangaroo and Rabbit**. 65 p. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, March 2007 RIRDC Publication no. 06/117. Deakin West: Rural Industries Research and Development Corporation.
- Siddiqui, R., S. Jeyamogan, S.M. Ali, F. Abbas, K.A. Sagathevan and N.A. Khan. 2017. Crocodiles and alligators: antiamoebic and antitumor compounds of crocodiles. **Experimental Parasitology** 183: 194-200.
- Turnage, R.H., F. Nwariaku, J. Murphy, C. Schulman, K. Wright and H. Yin. 2002. Mechanisms of pulmonary microvascular dysfunction during severe burn injury. **World Journal of Surgery** 26(7): 848.
- Wu, S., L. Wang, A.M. Jacoby, K. Jasinski, R. Kubant and T. Malinski. 2010. Ultraviolet B light-induced nitric oxide/peroxynitrite imbalance in keratinocytes-implications for apoptosis and necrosis. **Photochemistry and Photobiology** 86(2): 389-396.