

# ผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อคุณลักษณะทางกายภาพ ของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน

## Effects of Emulsifiers on Physical Properties of $\beta$ -Carotene Nanoemulsion

เกศินี ศรีรัตนโชติ, วรวรรณ พันพิพัฒน์ และมนัส ชัยจันทร์\*

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีและนวัตกรรมอาหาร สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

หมุดตอเล็บ นินิสอ

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านวิทยาการพลาสมาและคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า สำนักวิชาวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ตำบลไทยบุรี อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

Kesinee Srirattanachot, Worawan Panpipat and Manat Chaijan\*

Food Technology and Innovation Research Center of Excellence, Department of Agro-Industry,  
School of Agricultural Technology, Walailak University, Thaiburi, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80160

Mudtorlep Nisoa

Plasmas and Electromagnetic Wave Science Center of Excellence, School of Science,  
Walailak University, Thaiburi, Thasala, Nakhon Si Thammarat 80160

Received: May 2, 2019; Accepted: May 22, 2019

### บทคัดย่อ

การเตรียมเบต้าแคโรทีนให้มีอนุภาคในระดับนาโนสามารถช่วยในการปรับปรุงฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการนำไปใช้ประโยชน์ของเบต้าแคโรทีนได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อคุณลักษณะของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน โดยละลายเบต้าแคโรทีนร้อยละ 45 ในน้ำมันรำข้าวที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้แก๊สไนโตรเจน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมนาโนอิมัลชันโดยมีสัดส่วนของน้ำมัน (oil volume fraction) เท่ากับ 0.1 และเติมอิมัลซิไฟเออร์ชนิดที่แตกต่างกันร้อยละ 3 (Tween 80, Span 80, lecithin,  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg), whey protein isolate (WPI), lecithin + Tween 80, lecithin + WPI และ Tween 80 + Span 80) โดยเตรียมอิมัลชันด้วยอ่างอัลตราซาวด์เป็นเวลา 10 นาที ต่อด้วย probe sonicator ที่ 40 วัตต์ และแอมพลิฟายด์ร้อยละ 25 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวิเคราะห์ขนาดอนุภาค การกระจายตัว ค่าประจุบริเวณพื้นผิว ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ เสถียรภาพของอิมัลชันและโครงสร้างทางจุลภาคของนาโนอิมัลชัน จากการศึกษาพบว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมระหว่าง Tween 80 + Span 80 จะให้ขนาดอนุภาคเล็กที่สุด (263 นาโนเมตร) โดยอิมัลชันที่เตรียมจากอิมัลซิไฟเออร์ทุกชนิดมีค่าประจุบริเวณพื้นผิวดังกล่าว -30 mV บ่งชี้ถึงการมีเสถียรภาพสูงของอิมัลชันดังกล่าว

ในขณะที่อิมัลชันที่ใช้อิมัลซิไฟเออร์ชนิดโปรตีนแบบเดี่ยวจะมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และเสถียรภาพของอิมัลชันค่อนข้างสูง แต่การใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมจะทำให้อิมัลชันที่ได้มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์แบบเดี่ยว เมื่อพิจารณาจากค่า polydispersity index (PDI) และโครงสร้างทางจุลภาค ดังนั้นอิมัลซิไฟเออร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชันเพื่อใช้เป็นส่วนผสมฟังก์ชันในอาหาร คือ อิมัลซิไฟเออร์ผสมระหว่าง Tween 80 และ Span 80 เนื่องจากทำให้ขนาดอนุภาคของไขมันเล็กกว่า 500 นาโนเมตร

**คำสำคัญ :** เบต้าแคโรทีน; อิมัลซิไฟเออร์; นาโนอิมัลชัน; ลักษณะทางกายภาพ

## Abstract

Preparation of  $\beta$ -carotene in nanoemulsion is one of an effective means to improve  $\beta$ -carotene bioactivity and bioavailability. The aim of this study was to investigate the effect of emulsifier types on the physical properties of  $\beta$ -carotene nanoemulsion. To prepare the nanoemulsion,  $\beta$ -carotene was dissolved in rice bran oil (45% w/w) at 60°C under nitrogen gas for 1 h with oil volume fraction of 0.1. Different emulsifiers and their mixtures (3 %) were employed for nanoemulsion fabrication including Tween 80, Span 80, lecithin,  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg), whey protein isolate (WPI), lecithin+ Tween 80, lecithin+WPI and Tween 80+Span 80. Emulsion was prepared using a bath sonicator for 10 min followed by a probe sonicator (40 watt and 25 % amplitude) for 10 min. The median droplet size diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, emulsion activity index (EAI), emulsion stability index (ESI) and microstructure of corresponded emulsions were immediately analyzed. The smallest mean particle size diameter (263 nm) was observed in nanoemulsion made by Tween 80 mixed with Span 80. This mixed emulsifier rendered the nanoemulsion with the lowest PDI and distributed more uniform when observed with confocal scanning light microscopy. All emulsions showed the zeta potential lower than -30 mV indicating high stability of these emulsions. The EAI and ESI were higher in proteins-stabilized emulsions. From the results, the  $\beta$ -carotene nanoemulsion was successfully produced by the aid of Tween 80 mixed with Span 80 as an active emulsifier mixture, which exhibited the mean particle size diameter of less than 500 nm.

**Keywords:**  $\beta$ -carotene; emulsifier; nanoemulsion; physical property

## 1. คำนำ

แคโรทีนอยด์จัดเป็นสารสีธรรมชาติที่พบมากในพืชและสัตว์ แคโรทีนอยด์แสดงสมบัติในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต้านโรคมะเร็ง ต้านโรคหลอดเลือด ต้านโรคหัวใจ และต้านโรคจอประสาทตาเสื่อม เป็นต้น (Yuan *et al.*, 2008) โดยเบต้า

แคโรทีน ( $\beta$ -carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่พบมากที่สุดและใช้งานอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมและยา รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่าง ๆ เบต้าแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์วิตามินเอที่มีประสิทธิภาพสูง (high provitamin A activity) อย่างไรก็ตาม การใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์

อาหารของสารดังกล่าวมีข้อจำกัด เนื่องจากเบต้าแคโรทีนไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่จะละลายได้ดีในน้ำมันที่อุดมไขมันสูง ทำให้เป็นการยากที่จะเติมลงในอาหารส่วนใหญ่ซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง นอกจากนี้เบต้าแคโรทีนยังมีโครงสร้างเป็นผลึก ดังนั้นจึงทำให้ความสามารถในการนำไปใช้ประโยชน์ในร่างกายอยู่ในระดับต่ำ (poor bioavailability) (Ribeiro and Cruz, 2005) รวมทั้งเบต้าแคโรทีนมีความไวต่อการเกิดออกซิเดชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสัมผัสกับอนุมูลอิสระสูง แสงออกซิเจน สภาวะที่เป็นกรด และการมีโปรออกซิเดนต์ (prooxidant) (Boon *et al.*, 2010)

อิมัลซิไฟเออร์เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวประสานให้อนุภาคของของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายซึ่งกันและกันรวมกันได้ โดยไม่เกิดการแยกชั้น ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic part) และส่วนที่ไม่มีขั้วหรือส่วนที่ชอบน้ำมัน (lipophilic part) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้อิมัลซิไฟเออร์มีสมบัติที่เข้ากันได้กับน้ำและน้ำมันในระดับหนึ่งและเรียงตัวอยู่ที่รอยต่อของน้ำมันและน้ำ โดยหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาน้ำและส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาน้ำมัน การจัดเรียงตัวบริเวณรอยต่อของอิมัลซิไฟเออร์จะช่วยทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัวได้โดยช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างทั้งสองเฟสหรือส่งเสริมการกระจายตัวของอนุภาคเม็ดไขมันในเฟสต่อเนื่องได้อย่างสม่ำเสมอ เพิ่มความยืดหยุ่นแก่พื้นผิว (surface elasticity) เพิ่มแรงผลึกเนื่องจากประจุ (กรณีของอิมัลซิไฟเออร์ประเภทที่มีประจุ) และยังสามารถเพิ่มความหนืดแก่พื้นผิว (surface viscosity) ของอิมัลชันได้อีกด้วย (Schramn *et al.*, 2003) ดังนั้นอิมัลซิไฟเออร์จึงมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างระบบอิมัลชันที่มีความเสถียร

การห่อหุ้มในระดับนาโน (nanoencapsulation) สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ ของอาหารได้ รวมทั้งสามารถใช้เป็นระบบเพื่อการ

ลำเลียงสารเข้าไปยังอวัยวะเป้าหมาย โดยระบบการพาสาร์ที่เป็นส่วนผสมฟังก์ชัน (functional ingredient) ด้วยการทำให้เป็น nanocapsule มีบทบาทที่สำคัญหลายประการ โดยบทบาทแรกคือทำหน้าที่ในการเป็นตัวพาสาร์เหล่านี้ไปยังเซลล์เป้าหมาย บทบาทที่ 2 คือ ทำหน้าที่ปกป้องสารที่มีประโยชน์เหล่านี้จากการแตกสลายด้วยปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมี เช่น ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งการปกป้องนี้จะเกิดขึ้นในช่วงของการแปรรูปอาหาร การเก็บรักษาอาหารและการใช้ประโยชน์อาหาร ส่งผลให้สามารถพาสาร์ส่วนผสมฟังก์ชันเหล่านี้ไปยังเซลล์เป้าหมายได้ และบทบาทที่ 3 คือ ทำหน้าที่ควบคุมการปลดปล่อยสารเหล่านี้ในอัตราที่กำหนด (Weiss *et al.*, 2006) นาโนอิมัลชันถือว่าเป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการห่อหุ้มระดับนาโน ซึ่งมีความน่าสนใจและสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวพาสาร์ที่เป็นส่วนผสมต่าง ๆ ได้ การใช้นาโนอิมัลชันเป็นระบบการลำเลียงสารจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการใช้ประโยชน์ของร่างกาย โดยสารประกอบที่มีประโยชน์จะถูกห่อหุ้มในหยดน้ำมัน ดังนั้นนาโนอิมัลชันส่วนใหญ่จะใช้ในการห่อหุ้มหรือลำเลียงสารที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ สารอาหาร กลิ่นรส สารสี และสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น เนื่องจากขนาดอนุภาคของเฟสกระจายของนาโนอิมัลชันอยู่ประมาณ 100-500 นาโนเมตร ดังนั้นผลที่จะทำให้เกิดการแยกตัวของอิมัลชันหากตั้งทิ้งไว้จะน้อยลง (Weiss *et al.*, 2006)

การห่อหุ้มเบต้าแคโรทีนในนาโนอิมัลชันจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายและการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพของสารดังกล่าว โดยนิยมใช้การห่อหุ้มในระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion) จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ ความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ แรงเฉือน รอบของการปั่นผสม และสัดส่วนของเฟสไขมันมีผลอย่างยิ่งต่อคุณลักษณะ

ทางกายภาพ (Tan and Nakajima, 2005) โดยเฉพาะอย่างยิ่งขนาดอนุภาคและเสถียรภาพของนาโนอิมัลชัน โดยอิมัลซิไฟเออร์มีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งต่อคุณลักษณะดังกล่าว ด้วยเหตุนี้งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ประเภทโปรตีนและไขมันในรูปแบบเดี่ยวหรือผสม ต่อคุณลักษณะทางกายภาพของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน ซึ่งมีการศึกษาในประเด็นดังกล่าวค่อนข้างน้อย

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 สารเคมี

เบต้าแคโรทีน ( $C_{40}H_{56}$ ), น้ำมันรำข้าว, Tween 80, Span 80, lecithin,  $\beta$ -lactoglobulin, whey protein isolate, โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ( $NaC_{12}H_{25}SO_4$ ), น้ำกลั่น, Nile red ( $C_{20}H_{18}N_2O_2$ ), เอทานอล ( $C_2H_5OH$ )

### 2.2 การเตรียมเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน

เตรียมเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil in water emulsion, O/W) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kaur และคณะ (2016) โดยผสมเบต้าแคโรทีนร้อยละ 45 ลงในน้ำมันรำข้าว แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชัน เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเบต้าแคโรทีนเกิดการละลายได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเตรียมเฟสน้ำ โดยละลายอิมัลซิไฟเออร์แต่ละชนิดร้อยละ 3 ในน้ำหรือน้ำมันที่ผ่านการให้ความร้อนเบื้องต้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ต้องให้เกิดการละลายของอิมัลซิไฟเออร์อย่างสมบูรณ์) โดยอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้ ได้แก่ Tween 80 (ละลายในเฟสน้ำ) Span 80 (ละลายในเฟสน้ำมัน) lecithin (ละลายในเฟสน้ำมัน)  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) (ละลายในเฟสน้ำ) whey protein isolate (WPI) (ละลายในเฟสน้ำ) lecithin

(ร้อยละ 1 ในเฟสน้ำมัน) ร่วมกับ Tween 80 (ร้อยละ 2 ในเฟสน้ำ) lecithin (ร้อยละ 1 ในเฟสน้ำมัน) ร่วมกับ WPI (ร้อยละ 2 ในเฟสน้ำ) และ Tween 80 (ร้อยละ 1 ในเฟสน้ำ) ร่วมกับ Span 80 (ร้อยละ 2 ในเฟสน้ำ) ซึ่งอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้ทั้งหมดจัดเป็น GRAS (generally recognized as safe) มีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

เตรียม O/W นาโนอิมัลชันด้วยการผสมเฟสน้ำและน้ำมันในอัตราส่วน 9:1 (w/w) โดยการนำเฟสน้ำบรรจุในหลอดทดลองแล้วจึงนำไปวางในอ่างอัลตราโซนิก จากนั้นค่อย ๆ เติมเฟสของน้ำมันลงไปจนหมด อัลตราซาวด์ต่อในอ่างอัลตราโซนิกเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้เกิดไมโครอิมัลชัน จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปเตรียมให้เป็นนาโนอิมัลชันโดยใช้ probe sonicator ที่ 40 วัตต์ แอมพลิจูดร้อยละ 25 เป็นเวลา 10 นาที โดยอิมัลชันสุดท้ายจะมีความเข้มข้นของเบต้าแคโรทีนร้อยละ 0.45 (w/w) นำนาโนอิมัลชันที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ขนาดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายตัวของอนุภาค ค่าซีต้าโพเทนเชียล (zeta-potential) ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ เสถียรภาพของอิมัลชัน และโครงสร้างทางจุลภาคของนาโนอิมัลชัน

### 2.3 การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเฉลี่ย (mean particle size)

วิเคราะห์ขนาดอนุภาคเฉลี่ยและการกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชันตาม วิธีของ Sotomayor-Gerding และคณะ (2016) โดยใช้เทคนิค dynamic light scattering (DLS) ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)

### 2.4 การวิเคราะห์ค่าซีต้าโพเทนเชียล (zeta-potential)

ซีต้าโพเทนเชียลเป็นการวัดความต่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวของอนุภาค โดยวัดการเคลื่อนที่ทางอิเล็กโทรโฟรีติก (electrophoretic

mobility) ด้วยเครื่อง Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) โดยวัดที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) หลังจากเจือจางอิมัลชันอัตราส่วน 1:100 (อิมัลชัน: น้ำกลั่น)

**2.5 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ (emulsion activity index, EAI) และการวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชัน (emulsion stability index, ESI)**

วิเคราะห์ความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันและเสถียรภาพของอิมัลชันตามวิธีของ Pearce และ Kinsella (1978) โดยบีบटनाโนอิมัลชันที่เตรียมได้ในเวลา 0 และ 15 นาที หลังจากการโฮโมจีไนส์ มาเจือจาง 500 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมโตนเดซิลซัลเฟตร้อยละ 0.1 แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร คำนวณค่าความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชันและเสถียรภาพของอิมัลชันดังสูตร

$EAI (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A \times DF) \div (l \cdot C)$   
โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร; DF = dilution factor; l = path length ของคิวเวท (m); C = ความเข้มข้นของอิมัลชันไฟเออร์ (g/m<sup>3</sup>)

$$SSD (min) = \frac{\Delta 0}{\Delta t} \times \Delta t$$

โดยที่ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร;  $\Delta A = A_0 - A_{15}$ ;  $\Delta t = 15$  นาที

**2.6 โครงสร้างทางจุลภาคของนาโนอิมัลชัน**

นำนาโนอิมัลชันมาข้อมด้วย Nile red (ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในเอทานอล) และเตรียมสไลด์โดยการเจือจางนาโนอิมัลชัน 50 เท่าด้วยน้ำกลั่น จากนั้นบีบटनाโนอิมัลชัน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับ Nile red ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วบ่มนาน 5 นาที บีบตัวอย่างอิมัลชันที่บ่มใส่ในสไลด์ประมาณ 10-20 ไมโครลิตร แล้วปิดด้วย

กระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูภายใต้กล้อง CLSM (confocal laser scanning microscope) ยี่ห้อ LEICA รุ่น SP5 II โดยใช้ excitation ที่ 543 นาโนเมตร และ emission ที่ 600 นาโนเมตร กำลังขยายภาพที่ 1100x

**2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยทดลองชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลด้วยตาราง ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Steel and Torrie, 1980) และวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS, 22.0 for windows, SPSS Inc., Chicago, IL)

**3. ผลการวิจัยและวิจารณ์**

**3.1 ผลของชนิดของอิมัลชันไฟเออร์ต่อคุณลักษณะของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน**

การสร้างระบบอิมัลชันที่มีความคงตัวนั้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของอิมัลชันไฟเออร์ ซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างเฟสน้ำและน้ำมัน โดยอิมัลชันไฟเออร์จะเข้าไปห่อหุ้มอนุภาคขนาดเล็ก ๆ ของเฟสกระจาย ช่วยป้องกันการกลับเข้ามารวมตัวและการเกาะกลุ่มกันของอนุภาคของเฟสกระจาย และยังช่วยให้ขนาดอนุภาคของน้ำมันเล็กลงและมีความสม่ำเสมอมากขึ้น (นิศรา, 2554) โดยทั่วไปการใช้อิมัลชันไฟเออร์ผสมจะทำให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคเล็ก (Dickinson, 1989)

การทดลองนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบอิมัลชันไฟเออร์ 2 กลุ่ม คือ อนุพันธ์ของโปรตีนและไขมัน รวมถึงพิจารณาสัดส่วนระหว่างส่วนที่ชอบน้ำกับส่วนที่ชอบน้ำมัน (hydrophilic and lipophilic balance, HLB) ของอิมัลชันไฟเออร์ เพื่อคัดเลือกอิมัลชันไฟเออร์ที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเบต้าแคโร

ทีนนาอิมัลชัน จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าการใช้ซีไฟเออร์ที่ร้อยละ 3 จะเหมาะสมที่สุดสำหรับการสร้างนาโนอิมัลชัน เมื่อทดสอบผลของชนิดของอิมัลซีไฟเออร์ต่อคุณลักษณะทางกายภาพของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน พบว่าขนาดอนุภาคของนาโนอิมัลชันที่เล็กที่สุดพบในตัวอย่างที่มีการใช้อิมัลซีไฟเออร์ผสมระหว่าง Tween 80 และ Span 80 (263.3 นาโนเมตร) รองลงมา คือ การใช้เลซิทีน, Tween 80, เลซิทีน + เวย์โปรตีน, เลซิทีน + Tween 80, Span 80, เวย์โปรตีน และ  $\beta$ -lactoglobulin ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 โดยการเลือกผสมอิมัลซีไฟเออร์ระหว่าง Tween 80 และ Span 80 ซึ่งเป็นชนิดที่ละลายได้ดีในน้ำและน้ำมัน ตามลำดับ โดยมีค่า HLB เท่ากับ 8 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นอิมัลซีไฟเออร์ในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (O/W emulsion) (นิธิยา, 2549) มีรายงานผลที่คล้ายกันของ ภักธรวรรณ (2552) โดยการใช้อิมัลซีไฟเออร์ผสมที่มีค่า HLB อยู่ในช่วง 8-15 ในการผลิตอิมัลชันของน้ำมันกานพลู พบว่าการใช้ Span 20 ร่วมกับ Tween 20 จะทำให้ได้ขนาดอนุภาคของน้ำมันเฉลี่ย (0.563 ไมโครเมตร) ซึ่งเล็กกว่าการใช้ Tween 20 เป็นอิมัลซีไฟเออร์เพียงอย่างเดียว และยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงขนาดอนุภาคเฉลี่ยของน้ำมันตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องนาน 30 วัน

โดยทั่วไปอิมัลซีไฟเออร์เป็นกลุ่มของสารประกอบที่ภายในโมเลกุลมีทั้งส่วนที่มีขั้วหรือชอบน้ำและส่วนที่ไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำ เมื่ออยู่ในระบบอิมัลชันแล้ว อิมัลซีไฟเออร์จะถูกดูดซับอยู่บริเวณรอยต่อ (interface) ระหว่างน้ำกับน้ำมัน โดยอิมัลซีไฟเออร์จะเป็นตัวกั้นกลางระหว่างน้ำกับน้ำมัน แล้วจัดเรียงตัวหันส่วนที่มีขั้วไปในด้านของน้ำและส่วนที่ไม่มีขั้วไปยังด้านของน้ำมัน จึงช่วยลดแรงดึงผิวสัมผัสระหว่างกัน และยังเป็นเสมือนเยื่อหุ้มที่มีความยืดหยุ่น (viscoelastic film) ล้อมรอบอนุภาคของน้ำมัน จึงขัดขวางไม่ให้อนุภาคของ

น้ำมันรวมตัวกัน หรือเกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน ทำให้ระบบอิมัลชันมีความคงตัวมากขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นว่าการใช้อิมัลซีไฟเออร์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่น เช่น Tween 80, Span 80 หรืออนุพันธ์ของไขมันขนาดเล็ก เช่น เลซิทีน จะส่งผลให้ขนาดอนุภาคของน้ำมันที่ได้มีขนาดเล็ก มีความเสถียร และยิ่งช่วยให้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสร่วมได้เร็วกว่าและมีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้อิมัลซีไฟเออร์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น  $\beta$ -lactoglobulin และเวย์โปรตีน โดยทั่วไปอิมัลซีไฟเออร์กุ่ม Tween มักใช้ร่วมกับอิมัลซีไฟเออร์ในกลุ่ม Span เพื่อรักษาความคงตัวของอิมัลชันและเป็นตัวช่วยในการกระจายตัวที่ดี (Dziejak, 1988) มีการศึกษาสมบัติในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ของ Tween 20 และเลซิทีน พบว่าการใช้ Tween 20 และเลซิทีน จะให้ขนาดอนุภาคเฉลี่ยของไขมันอยู่ที่ 0.11 ไมโครเมตร และ 0.13 ไมโครเมตรตามลำดับ และเมื่อประเมินเสถียรภาพของอิมัลชันด้วยสายตาในระหว่างการเก็บรักษาอิมัลชันที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่มีการแยกเฟสที่สามารถมองเห็นได้ (Pan *et al.*, 2013)

อิมัลซีไฟเออร์ประเภทโปรตีนโดยทั่วไปมีโครงสร้างขนาดใหญ่และมีประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ต่ำกว่าอิมัลซีไฟเออร์ในกลุ่มที่มีโครงสร้างขนาดเล็ก Ali และคณะ (2016) ศึกษาสมบัติในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ของ  $\beta$ -lactoglobulin พบว่าความเข้มข้นของ  $\beta$ -lactoglobulin และพารามิเตอร์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต (ความดันและจำนวนรอบ) มีผลต่อขนาดอนุภาคของนาโนอิมัลชัน โดยนาโนอิมัลชันที่เตรียมด้วย  $\beta$ -lactoglobulin (1 wt%) และ Miglyol 812 (5 wt%) มีขนาดอนุภาคค่อนข้างเล็กประมาณ 200 นาโนเมตร เมื่อใช้ความดัน 100 MPa เป็นเวลา 4 รอบ โดยขนาดอนุภาคจะลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนรอบในการโฮโมจิไนส์ และอนุภาคจะมีขนาดใหญ่กว่า 400 นาโนเมตร เมื่อทำ

การโฮโมจิไนส์เพียงครั้งเดียว อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพสำหรับการทำให้เกิดอิมัลชันของ  $\beta$ -lactoglobulin จะลดลงเมื่อความดันที่ใช้เพิ่มขึ้น (200-300 MPa) เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติอย่างรุนแรงเมื่อได้รับความร้อนหรือแรงเฉือนในระดับสูง ส่งผลให้เกิดการเกาะกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการตกตะกอนในที่สุด ทำให้ประสิทธิภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนลดลง (McClements, 1999) นอกจากนี้  $\beta$ -lactoglobulin และเวย์โปรตีนยังมีโครงสร้างเป็นก้อนกลมและเสถียรโครงสร้างด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้เกิดการเปิดตัวของโครงสร้างและการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมันเกิดขึ้นได้ยาก จึงมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่ำ ส่งผลต่อเนื้อให้อนุภาคน้ำมันขนาดเล็กเกิดการรวมตัวกันก่อนที่โปรตีนจะเคลื่อนที่ไปห่อหุ้มอนุภาคของน้ำมันไว้ ดังนั้นขนาดอนุภาคของน้ำมันจึงมีขนาดใหญ่เมื่อใช้โปรตีนดังกล่าวเป็นอิมัลซิไฟเออร์

Calligaris และคณะ (2018) ศึกษาผลของอิมัลซิไฟเออร์ชนิด Tween 80 และเวย์โปรตีนต่อคุณลักษณะของนาโนอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่กำลังสูงร่วมกับการโฮโมจิไนส์ที่ความดันสูง พบว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เพียงอย่างเดียวจะส่งผลให้ขนาดอนุภาคของอิมัลชันที่ใช้ Tween 80 เป็นอิมัลซิไฟเออร์มีขนาดใหญ่ คือ 498 นาโนเมตร และการใช้เวย์โปรตีนในการเตรียมอิมัลชันทำให้เกิดการแยกชั้นจนไม่สามารถวิเคราะห์ผล ในขณะที่การโฮโมจิไนส์จะให้ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเมื่อใช้ Tween 80 และเวย์โปรตีนเป็นอิมัลซิไฟเออร์เท่ากับ 363 นาโนเมตร และ 389 นาโนเมตร ตามลำดับ และเมื่อใช้คลื่นอัลตราซาวด์ร่วมกันกับการโฮโมจิไนส์ จะทำให้ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเล็กกว่าการใช้วิธีใดวิธีหนึ่งเดียว ๆ เมื่อเพิ่มเวลาและพลังงานในการเตรียม

จะยิ่งทำให้ขนาดอนุภาคของอิมัลชันเล็กลงเมื่อพิจารณาผลของขนาดอนุภาคเฉลี่ยแล้ว ทำให้สรุปได้ว่าการใช้  $\beta$ -lactoglobulin และเวย์โปรตีน ไม่สามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในการผลิตเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชันในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากทำให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ในระดับไมโครเมตร

เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของอนุภาคอิมัลชัน ซึ่งพิจารณาจากค่า polydispersity index (PDI) พบว่านาโนอิมัลชันที่ใช้  $\beta$ -lactoglobulin และเวย์โปรตีนเป็นอิมัลซิไฟเออร์จะให้ขนาดอนุภาคใหญ่ที่สุดและมีค่าการกระจายตัวของอนุภาคสูงที่สุด ( $p \leq 0.05$ ) ดังตารางที่ 1 ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวมีโครงสร้างขนาดใหญ่และมีการจัดเรียงตัวเป็นก้อนกลมซึ่งมีความเสถียรสูง ส่งผลให้เกิดการแผ่ตัวและเคลื่อนที่ไปยังรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมันได้ช้า จึงทำให้อนุภาคน้ำมันบางส่วนเกิดการรวมตัวกันจนมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นก่อนที่จะเกิดการจัดเรียงตัวรอบ ๆ อนุภาคน้ำมัน ส่งผลต่อเนื้อให้อิมัลชันที่ได้มีขนาดอนุภาคเฉลี่ยค่อนข้างใหญ่และมีการกระจายตัวของอนุภาคของเฟสกระจายไม่สม่ำเสมอ การศึกษาของ López-Castejón และคณะ (2019) เกี่ยวกับคุณลักษณะของอิมัลชันพรีไบโอติกที่เสถียรด้วยอินนูลินและ  $\beta$ -lactoglobulin พบว่าอิมัลชันที่ใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ชนิด  $\beta$ -lactoglobulin เพียงอย่างเดียวจะเกิดการรวมกันของอนุภาคเฟสกระจายที่บริเวณพื้นผิว ในขณะที่อิมัลชันที่ใช้อินนูลินร่วมกับ  $\beta$ -lactoglobulin จะไม่เกิดการแยกตัว เนื่องจากการมีอยู่ของอินนูลินจะเปลี่ยนแปลงการดูดซับของ  $\beta$ -lactoglobulin ในสารผสม โดยทำให้กิจกรรมบนพื้นผิวของโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่การใช้อิมัลซิไฟเออร์ร่วมระหว่าง Tween 80 และ Span 80 จะให้ค่าการกระจายตัวของอนุภาคน้อยที่สุด เนื่องจากการใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมข้างต้นจะทำให้มีอิมัลชันที่ได้มีขนาดเล็กและมีความสม่ำเสมอ กล่าวคือ มีขนาดอนุภาคที่ใกล้เคียง

กัน ซึ่งส่งผลต่อเนื่องให้อิมัลชันมีความคงตัวสูงกว่า การใช้อิมัลซิไฟเออร์แบบเดี่ยว ๆ ทั้งนี้เนื่องจากในระบบที่มีการใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมจะทำให้เกิดการเคลื่อนที่และดูดซับอิมัลซิไฟเออร์ที่บริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมันได้อย่างรวดเร็ว ทำให้อนุภาคของน้ำมันที่มีขนาดเล็กถูกห่อหุ้มด้วยอิมัลซิไฟเออร์ได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน ประกอบกับการใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมจะทำให้มีค่า HLB ที่เหมาะสม จึงส่งเสริมการจัดเรียงตัวของสารดังกล่าวที่บริเวณรอยต่อ ทำให้การกระจายตัวของอนุภาคของเฟสกระจายค่อนข้างสม่ำเสมอ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Lv และคณะ (2014) ที่ศึกษาสมบัติทางกายภาพของอิมัลชันที่มีการใช้ Span 80 และ Tween 80 เป็นอิมัลซิไฟเออร์ พบว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์ร่วมระหว่าง Span 80 และ Tween 80 ทำให้ความเสถียรของอิมัลชันเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้ Tween 80 เพียงอย่างเดียว โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Span 80 ส่งผลให้อิมัลชันมีขนาดเล็กและกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจาก Span 80 มีการดูดซับมากขึ้นในบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมัน สำหรับผลของการใช้ Tween 80, Span 80 และเลซิทิน

แบบเดี่ยวนั้น พบว่าจะทำให้อนุภาคของเฟสกระจายมีขนาดใหญ่ ซึ่งส่งผลต่อการกระจายตัวของนาโนอิมัลชัน โดย Tween 80 จัดเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ละลายได้ดีในน้ำและทำให้อิมัลชันมีเสถียรภาพสูง และจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับอิมัลซิไฟเออร์ที่ละลายได้ดีในไขมัน กรณีของ Span 80 ซึ่งเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่มีค่า HLB ต่ำ ซึ่งเหมาะสำหรับการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (W/O emulsion) เช่นเดียวกับกับเลซิทินที่นิยมใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน เนื่องจากเป็นไขมันประเภทฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ทำให้อนุภาคที่ได้มีขนาดใหญ่ ซึ่งส่งผลต่อการกระจายของอนุภาค โดยอนุภาคของเฟสกระจายมีแนวโน้มในการรวมตัวกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ (coalescence) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ต่ำหรือสูงเกินไป เนื่องจากจะไปทำให้สารลดแรงตึงผิวมีค่า surface activity ต่ำ ส่งผลให้สารลดแรงตึงผิวไม่เกาะที่ผิวอนุภาคของเฟสกระจาย จึงไม่สามารถป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคได้

ตารางที่ 1 ผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อขนาดอนุภาคเฉลี่ย การกระจายตัว และค่าซีต้าโพเทนเชียลของเบต้าแคโรทีนอิมัลชัน/นาโนอิมัลชัน

Emulsifiers	Z-average (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta-potential (mV)
Tween 80	524.3±1.9 <sup>f</sup>	0.600±0.059 <sup>b</sup>	-37.2±0.3 <sup>a</sup>
Span 80	674.4±2.6 <sup>c</sup>	0.659±0.004 <sup>a</sup>	-75.1±1.7 <sup>f</sup>
Lecithin	503.2±2.3 <sup>g</sup>	0.651±0.005 <sup>ab</sup>	-88.9±2.4 <sup>g</sup>
β-lactoglobulin (β-Lg)	3064.0±1.0 <sup>a</sup>	0.676±0.012 <sup>a</sup>	-63.3±2.3 <sup>d</sup>
Whey protein isolate (WPI)	1551.3±4.0 <sup>b</sup>	0.666±0.004 <sup>a</sup>	-52.4±1.5 <sup>b</sup>
Lecthin + Tween 80	574.2±1.7 <sup>d</sup>	0.542±0.012 <sup>c</sup>	-67.6±0.9 <sup>e</sup>
Lecthin + WPI	533.4±3.2 <sup>e</sup>	0.610±0.032 <sup>b</sup>	-55.4±2.0 <sup>c</sup>
Tween 80 + Span 80	263.3±1.2 <sup>h</sup>	0.341±0.004 <sup>d</sup>	-56.5±1.7 <sup>c</sup>

\*ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันที่อยู่ในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



ค่าซีต้าโพเทนเชียล (zeta-potential) คือค่าประจุบริเวณพื้นผิวอนุภาค ซึ่งขนาดของซีต้าโพเทนเชียลแสดงให้เห็นถึงเสถียรภาพของระบบคอลลอยด์ โดยทั่วไปหากค่าซีต้าโพเทนเชียลมากกว่า +30 และต่ำกว่า -30 mV จะทำให้ระบบคอลลอยด์มีเสถียรภาพที่ดี (Wongsagonsup *et al.*, 2005) จากการทดลองพบว่าเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน/อิมัลชันทั้งหมดมีค่าซีต้าโพเทนเชียลอยู่ระหว่าง -37 และ -89 mV (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่านาโนอิมัลชัน/อิมัลชันที่ผลิตขึ้นทั้งหมดค่อนข้างมีเสถียรภาพดี ทั้งนี้ยังมีความเป็นลบที่บริเวณพื้นผิวมากจะส่งเสริมแรงผลักระหว่างประจุชนิดเดียวกันให้มากขึ้น ทำให้เบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน/อิมัลชันมีโอกาสที่จะรวมกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ได้ลดลง ผลที่คล้ายกันรายงานโดย Tabilo-Munizaga และคณะ (2019) โดยศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของนาโนอิมัลชันจากถั่วเลนทิล (*lentil*) พบว่าที่จำนวนครั้งของการโฮโมจิไนส์มากขึ้น ส่งผลให้ค่าซีต้าโพเทนเชียลของอิมัลชันมากกว่า -30 mV แสดงให้เห็นถึงระบบอิมัลชันที่มีความเสถียร ซึ่งจะช่วยป้องกันการรวมตัวกันของอนุภาคน้ำมัน ดังนั้นแรงผลักระหว่างไฟฟ้าสถิตจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการรวมตัวของอนุภาคไขมันได้ ในกรณีของอนุภาคของเฟสกระจายในอิมัลชันที่ไม่เสถียรส่วนใหญ่มักจะเกิดจากแรงแวนเดอร์วาลส์ที่มีอยู่ในระบบในช่วงเวลาสั้น ๆ ซึ่งควบคุมประจุไฟฟ้าบริเวณพื้นผิว จึงอาจส่งผลให้อนุภาคเกิดการจับตัวรวมกันในสารละลาย (Anandharamakrishnan, 2014) เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าซีต้าโพเทนเชียลของนาโนอิมัลชัน/อิมัลชันทุกชนิดมีค่าเป็นลบ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสมบัติทางประจุของอิมัลซีไฟเออร์ โดยการใช้เลซิทินจะทำให้ค่าซีต้าโพเทนเชียลมีความเป็นลบสูงสุด รองลงมา คือ การใช้ Span 80, เลซิทิน + Tween 80,  $\beta$ -lactoglobulin, Tween 80 + Span 80, เลซิทิน + เวย์โปรตีน, เวย์โปรตีน และ

Tween 80 ตามลำดับ

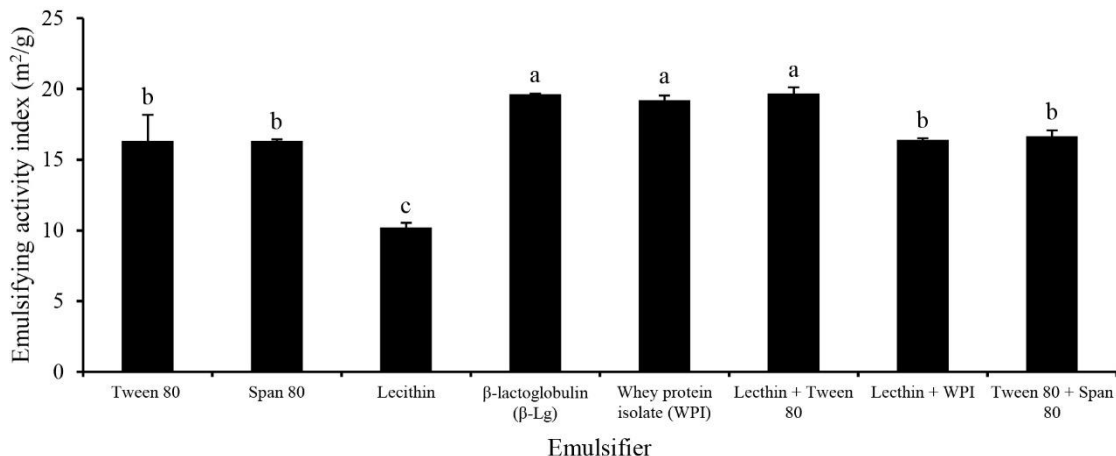
การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ พบว่าอิมัลซีไฟเออร์ประเภทโปรตีนจะให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์สูงที่สุด ( $p \leq 0.05$ ) ดังรูปที่ 1 โดยความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์นั้นเกี่ยวข้องกับความสามารถในการดูดซับที่รอยต่อระหว่างน้ำมันและน้ำ ทำให้เกิดฟิล์มที่มีความเสถียร (Pearce and Kinsella, 1978) อย่างไรก็ตาม สมบัติดังกล่าวอาจไม่เกี่ยวข้องกับความสามารถของอิมัลชัน มีการศึกษาอิทธิพลของไฮโดรคอลลอยด์ (เพคตินและกัวกัม) ต่อการแยกเฟสและสมบัติการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ของโปรตีนเวย์พบว่าอิมัลชันที่เตรียมจากโปรตีนเวย์ร่วมกับเพคตินหรือกัวกัมมีความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์ที่เพิ่มขึ้น โดยความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์และความเสถียรของอิมัลชันนั้นจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของไฮโดรคอลลอยด์ที่ใช้ (Ercelebi and Ibanog, 2007) อย่างไรก็ตาม การใช้โปรตีนเป็นอิมัลซีไฟเออร์อาจมีผลต่อเสถียรภาพของอิมัลชันในระยะยาว เนื่องมาจากการเสียสภาพธรรมชาติเมื่อโปรตีนได้รับความร้อนหรือแรงเฉือนสูง ทำให้เกิดการจับกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดการแยกชั้นของอิมัลชันในที่สุด (Mc Clements, 1999)

นอกจากนี้ความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์อาจขึ้นกับเทคนิคและระยะเวลาในการเตรียมอิมัลชัน โดย Sui และคณะ (2017) ศึกษาผลของการใช้อัลตราโซนิกในระบบอิมัลชันที่เสถียรด้วยโปรตีนถั่วเหลืองและเลซิทินต่อสมบัติการเป็นอิมัลซีไฟเออร์และความเสถียรของอิมัลชัน พบว่าอิมัลชันที่ใช้อัลตราโซนิกที่ 150 วัตต์ นาน 24 นาที จะให้ค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซีไฟเออร์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ 300 และ 450 วัตต์ โดยใช้อัลตราโซนิกกำลังวัตต์สูงและเวลานานจะลดความเสถียรของอิมัลชันและลดความสามารถในการ

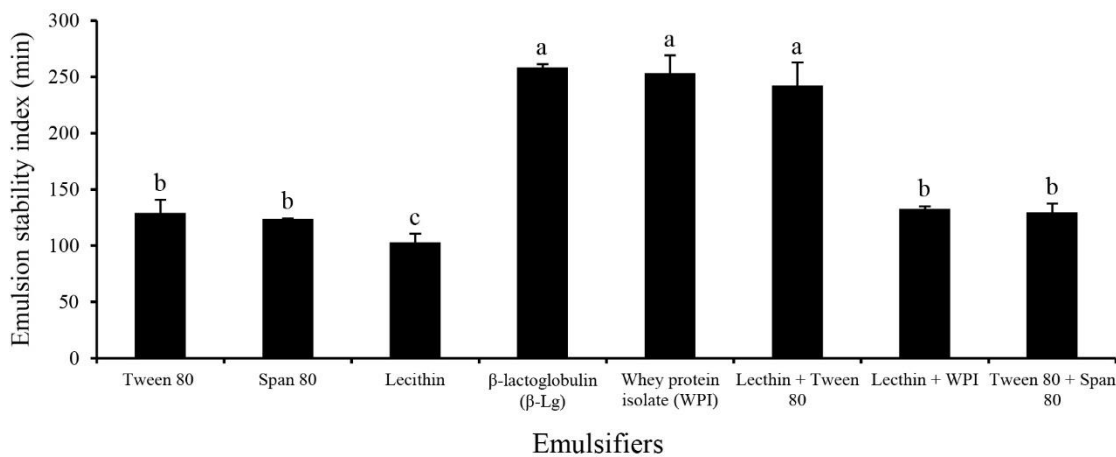
เป็นอิมัลซิไฟเออร์ เนื่องจากเกิดความร้อนขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมอิมัลชัน จึงทำให้อนุภาคน้ำมันเกิดการรวมตัวและแยกชั้น

เมื่อพิจารณาผลของอิมัลซิไฟเออร์ต่อความคงตัวของอิมัลชัน พบว่าอิมัลซิไฟเออร์ประเภทโปรตีนจะให้อิมัลชันที่มีเสถียรภาพสูงที่สุด (รูปที่ 2) ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนมีขนาดอนุภาคที่ใหญ่

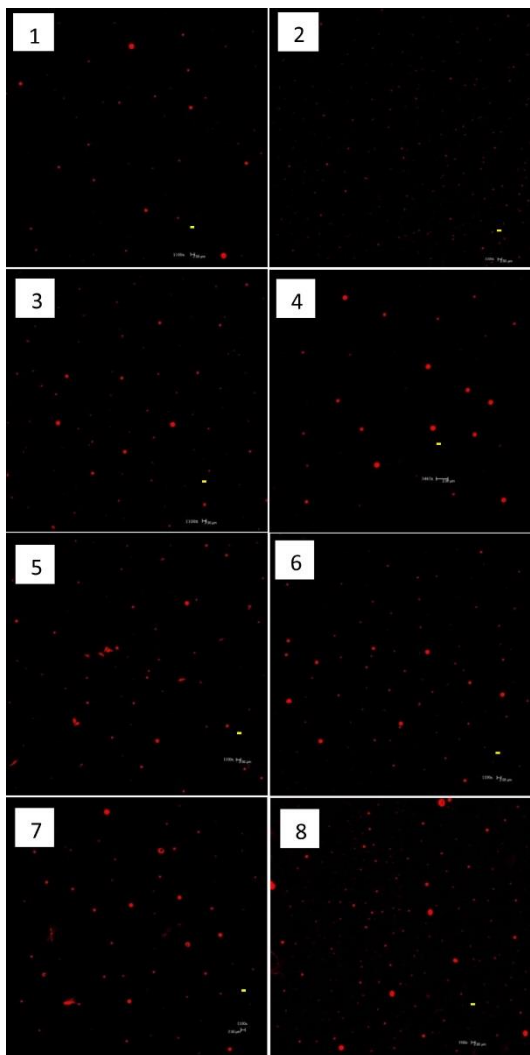
แม้จะมีความสามารถในการแผ่ตัว การเคลื่อนที่ และการจัดเรียงตัวที่รอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมันได้ต่ำกว่าอิมัลซิไฟเออร์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก แต่จะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวเป็นฟิล์มโปรตีนที่มีความหนา จึงป้องกันการรวมตัวของอนุภาคไขมันได้เป็นอย่างดี โดยโปรตีนจะเกิดการดูดซับบริเวณพื้นผิวของอนุภาคไขมันและเกิด repulsive interaction จาก



รูปที่ 1 ผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแท่งข้อมูลแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 2 ผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อเสถียรภาพของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน แสดงข้อมูลในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแท่งข้อมูลแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 3 โครงสร้างระดับจุลภาคของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชันที่เตรียมโดยอิมัลซิไฟเออร์ชนิดที่แตกต่างกัน (\*1: Tween 80 ร้อยละ 3, 2: Span 80 ร้อยละ 3, 3: Lecithin ร้อยละ 3, 4:  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -Lg) ร้อยละ 3, 5: whey protein isolate (WPI) ร้อยละ 3, 6: Lecithin ร้อยละ 1 + Tween 80 ร้อยละ 2, 7: Lecithin ร้อยละ 1 + WPI ร้อยละ 2, 8: Tween 80 ร้อยละ 1 + Span 80 ร้อยละ 2; \*\*กำลังขยายภาพที่ 1100x; เส้นตรงสีเหลืองในภาพแสดงขนาด 20.0  $\mu$ m)

electrostatic repulsion และ steric hindrance เป็นต้น จึงช่วยป้องกันการรวมกันของอนุภาคไขมัน (McClements, 2004) ทำให้อนุภาคไขมันสามารถกระจายตัวอยู่ได้อย่างมีเสถียรภาพ มีการศึกษาเสถียรภาพของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยใช้อิมัลซิไฟเออร์ที่เป็นโปรตีนตามธรรมชาติ ได้แก่ WPI, อัลบูมิน และ  $\beta$ -Lg เพื่อปรับปรุงเสถียรภาพและสมบัติทางเคมีของอิมัลชัน พบว่าอิมัลซิไฟเออร์ที่ใช้ทั้งหมดจะช่วยให้อิมัลชันมีความคงตัวได้ในระยะเวลาหนึ่ง โดยสาเหตุของความไม่คงตัวนั้นเนื่องจากโปรตีนไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะรักษาเสถียรภาพของอิมัลชันไว้ได้ รวมไปถึงพีเอชและความร้อนที่ใช้ในระหว่างการเตรียมอิมัลชันมีผลต่อการเสถียรภาพธรรมชาติของโปรตีน (McClements, 2004)

โครงสร้างระดับจุลภาคของเบต้าแคโรทีนอิมัลชัน/นาโนอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้อิมัลซิไฟเออร์ที่แตกต่างกัน (รูปที่ 3) จากการทดลองพบว่าการกระจายตัวของอนุภาคไขมันในอิมัลชันที่ใช้อิมัลซิไฟเออร์ผสมระหว่าง Tween 80 และ Span 80 มีความสม่ำเสมอ ในขณะที่อิมัลชันที่มีการใช้อิมัลซิไฟเออร์ชนิดเดียวจะมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอ กล่าวคือ มีอนุภาคไขมันหลายขนาดและมีระยะห่างของแต่ละอนุภาคค่อนข้างมาก เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์ประเภทโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง  $\beta$ -Lg จะทำให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคไขมันที่ใหญ่และมีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ซึ่งสอดคล้องกับผลของขนาดอนุภาคเฉลี่ย (ตารางที่ 1)

#### 4. สรุป

การศึกษาผลของชนิดของอิมัลซิไฟเออร์ต่อคุณลักษณะทางกายภาพของเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน พบว่าอิมัลซิไฟเออร์ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชันเมื่อพิจารณาจาก

ขนาดอนุภาคไขมัน ซึ่งต้องมีขนาดเล็กกว่า 500 นาโนเมตร มีการกระจายตัวที่สม่ำเสมอ มีความเสถียรสูง และมีค่าซีต้าโพเทนเชียลที่เหมาะสม คือ อิมัลซิไฟเออร์ผสมระหว่าง Tween 80 และ Span 80 ความเข้มข้นร้อยละ 3 ซึ่งให้คุณลักษณะทางกายภาพโดยรวมที่ดีกว่าการใช้อิมัลซิไฟเออร์ชนิดเดียว ๆ อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้อิมัลซิไฟเออร์เพื่อให้ได้คุณลักษณะของอิมัลชันที่จะต้องคำนึงชนิดของอิมัลชันที่ต้องการ ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงประสบความสำเร็จในการผลิตเบต้าแคโรทีนนาโนอิมัลชัน เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายและการใช้ประโยชน์ทางชีวภาพของเบต้าแคโรทีนสำหรับใช้เป็นส่วนผสมฟังก์ชันในอาหาร

## 5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนโครงการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ในการทำวิจัยครั้งนี้

## 6. รายการอ้างอิง

- นิธิยา รัตนานนท์, 2549, เคมีอาหาร, พิมพ์ครั้งที่ 2, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ, 487 น.
- นิศรา สะเจริญ, 2554, การเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนในการแปรรูปและความคงตัวต่อความเย็นในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์กะทิสเตอริไรส์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.
- ภัทรวรรณ หมกทอง, 2552, ผลของตัวกระทำอิมัลชันผสมต่อเสถียรภาพและประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Ali, A., Mekhlou, G., Huang, N. and Agnely, F., 2016,  $\beta$ -lactoglobulin stabilized nanemulsions – Formulation and process factors

affecting droplet size and nanoemulsion stability, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 500: 291-304.

- Anandharamakrishnan, C., 2014, *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*, Springer, New York.
- Boon, C.S., McClements, D.J., Weiss, J. and Decker, E.A., 2010, Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50: 515-532.
- Calligaris, S., Plazzotta, S., Valoppi, F. and Anese, M., 2018, Combined high-power ultrasound and high-pressure homogenization nanoemulsification: The effect of energy density, oil content and emulsifier type and content, *Food Res. Int.* 107: 700-707.
- Dickinson, E., 1989, Food colloids – An overview, *Colloids Surf.* 42: 191-204.
- Dziedzic, J. D., 1988, Microencapsulation and encapsulation ingredients, *Food Technol.* 42: 136-151.
- Ercelebi, E.A. and Ibanog, E., 2007, Influence of hydrocolloids on phase separation and emulsion properties of whey protein isolate, *J. Food Eng.* 80: 454-459.
- Kaur, K., Kumar, R. and Mehta, S.K., 2016, Formulation of saponin stabilized nano emulsion by ultrasonic method and its role to protect the degradation of quercetin from UV light, *Ultrason. Sonochem.* 31: 29-38.
- López-Castejón, M.L., Bengoechea, C., Espinosa, S. and Carrera, C., 2019, Characterization of prebiotic emulsions stabilized by inulin and  $\beta$ -lactoglobulin, *Food Hydrocoll.* 87: 382-393.

- Lv, G., Wang, F., Cai, W. and Zhang, X., 2014, Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions, *Colloids Surf. A* 447: 8-13.
- McClements, D. J. , 1999, *Food Emulsions. Principles, Practices and Techniques*, 4th Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida.
- McClements, D. J. , 2004, Protein- stabilized emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 9: 305-313.
- Pan, Y., Tikekar, R. V. and Nitin, N., 2013, Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 450: 129-137.
- Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. , 1978, Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique, *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-723.
- Ribeiro, H.S. and Cruz, R.C.D. , 2005, Biliquid foams containing carotenoids. *Eng. Life Sci.* 5: 84-88.
- Schramm, L.L., Stasiuk, E.N. and Marangoni, D.G., 2003, *Surfactants and their applications*, *Annu. Rep. Prog. Chem.* 99: 3-48.
- Sotomayor-Gerding, D., Oomah, B.D., Acevedo, F., Morales, E., Bustamante, M., Shene, C. and Rubilar, M. , 2016, High carotenoid bioaccessibility through linseed oil nano emulsions with enhanced physical and oxidative stability, *Food Chem.* 199:463-470.
- Sui, X. , Bi, S. , Qi, B. , Wang, Z. , Zhang, M. , Li, Y. and Jiang, L. , 2017, Food hydrocolloids impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability, *Food Hydrocoll.* 63: 727-734.
- Tabilo- Munizaga, G. , Villalobos- Carvajal, R. , Herrera-Lavados, C. , Moreno-Osorio, L. , Jarpa-Parra, M. and Pérez-Won, M., 2019, Physicochemical properties of high-pressure treated lentil protein- based nanoemulsions, *LWT Food Sci. Technol.* 101: 590-598.
- Tan, C.P. and Nakajima, M. , 2005,  $\beta$ -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chem.* , 92: 661-671.
- Weiss, J., Takhistov, P. and McClements, D.J., 2006, Functional materials in food nano technology, *J. Food Sci.* 71: 107-116.
- Wongsagonsup, R., Shobsngob, S., Oonkhanond, B. and Varavinit, S. , 2005, Zeta potential and pasting properties of phosphorylated or cross-linked rice starches, *Starch Starke*, 57: 32-37.
- Yuan, Y. , Gao, Y. , Zhao, J. and Mao, L. , 2008, Characterization and stability evaluation of  $\beta$ - carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res. Int.* 41: 61-68.