

ผลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดต่อสมบัติเคมีกายภาพ และความคงตัวของน้ำมันปลาในไลโปโซม

Physicochemical Properties and Stability of Liposomal Fish Oils as Affected by Phospholipid Concentrations

จักรภัทร เอ่งล่อง, วันชัย วรวิวัฒน์เมธีกุล และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์*

ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

มารุจ ลิ้มปะวัตนะ

ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

แขวงบางหว้า เขตภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร 10160

Chakkapat Aenglong, Wanchai Worawattanamateekul and Wanwimol Klaypradit*

Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkhen Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Maruj Limpawattana

Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University,

Bang Wa, Phasi Charoen, Bangkok 10160

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของไลโปโซมที่กักเก็บน้ำมันปลาจากส่วนท้องปลาแซลมอน (*Oncorhynchus mykiss*) โดยไลโปโซมเตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ (ร้อยละ 2, 3 และ 4 น้ำหนักโดยปริมาตร) และลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีโซนิเคชัน ไลโปโซมที่เตรียมได้นำไปวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี ได้แก่ ขนาดอนุภาค ลักษณะโครงสร้างด้วยกล้องคอนโฟคอลเลเซอร์ ค่าสี ชนิด และปริมาณของกรดไขมัน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของค่าเพอร์ออกไซด์ (PV) ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBAR) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 °C ผลการทดลองพบว่าไลโปโซมที่เตรียมได้จากทุกระดับความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดมีขนาดอนุภาค โครงสร้าง ค่าสีรวมทั้งค่า PV และค่า TBAR ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายหลังการเตรียมไลโปโซมน้ำมันปลา พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดไขมันและมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว > กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน > กรดไขมันอิ่มตัว โดยมีสัดส่วนของกรดไขมันโอเมก้า 6 ต่อกรดไขมันโอเมก้า 3 เท่ากับ 1.13-1.90:1 ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีการแนะนำให้บริโภค

ดังนั้นการใช้ฟอสโฟลิพิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด (ร้อยละ 2 น้ำหนักโดยปริมาตร) จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคงสมบัติทางกายภาพเคมีของไลโปโซมน้ำมันปลา การศึกษานี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้น้ำมันปลารูปแบบไลโปโซมสำหรับอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

คำสำคัญ : ไลโปโซม; น้ำมันปลา; ปลาแซลมอน; ฟอสโฟลิพิด; ออกซิเดชัน

Abstract

The purpose of this study was aimed to investigate the effect of phospholipid concentrations on physicochemical properties of salmon fish oil, extracted from salmon belly (*Oncorhynchus mykiss*), encapsulated in liposome. Liposomes were prepared from three different concentrations of phospholipids (PC=70 %) at 2, 3 and 4 %w/v together with sonication was employed on particle size reduction. Encapsulated fish oil in liposome was determined for the physical characteristics including particle size, microstructure using laser confocal microscope, color and fatty acid profile. Oxidation was monitored during 4 weeks storage at 4 °C by measuring the peroxide value (PV) and thiobarbituric acid reactive substances (TBAR). The results showed that all liposomes prepared from different concentrations of phospholipid were not significantly different ($P > 0.05$) in size, microstructure, color as well as PV and TBAR. For fatty acid profile, it was found that types of fatty acid in fish oil were not significantly different after encapsulation. The sum of fatty acids showed monounsaturated fatty acids > polyunsaturated fatty acids > saturated fatty acids. The ratios of ω -6 : ω -3 were 1.13-1.90 : 1 which was acceptable based on recommended intake. Thus, the optimal concentration of phospholipid at 2 %w/v was sufficient to maintain the physicochemical properties of salmon fish oil. This study suggest a possible use of salmon fish oil in the liposome form for food industry.

Keywords: liposome; fish oil; salmon; phospholipid; oxidation

1. บทนำ

อุตสาหกรรมแปรรูปแซลมอนแช่เยือกแข็งเป็นส่วนหนึ่งของอุตสาหกรรมอาหารที่มีความสำคัญ จากรายงานปริมาณและมูลค่าการส่งออกสินค้าประมงตั้งแต่ พ.ศ. 2550 ถึง พ.ศ. 2559 ประเทศไทยมีการส่งปลาแซลมอนออกประมาณ 430,000 ตันซึ่งมีมูลค่าประมาณ 93,000 ล้านบาท [1] และมีแนวโน้มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี จากการศึกษาพบว่าในระหว่างกระบวนการผลิตปลาแซลมอนแช่แข็งจะเกิดส่วนเหลือประมาณ

ร้อยละ 40 โดยคิดเป็นส่วนทิ้งร้อยละ 10 ซึ่งในส่วนทิ้งมีปริมาณน้ำมันประมาณร้อยละ 30 [2] จากการสำรวจเบื้องต้นพบว่ายังไม่มีการผลิตน้ำมันปลาแซลมอนในเชิงการค้าจากเนื้อส่วนทิ้ง ดังนั้นการใช้เนื้อส่วนทิ้งปลาแซลมอนสำหรับผลิตน้ำมันปลาจึงเป็นที่น่าสนใจ ทั้งนี้ปัจจุบันน้ำมันปลานับว่าเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับความนิยมเป็นอันดับต้น ๆ เนื่องจากประโยชน์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในน้ำมันปลา ได้แก่ กรดไขมันโอเมก้า 3 หรือ

DHA (docosahexaenoic acid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์ประสาทและยังช่วยบำรุงสายตา ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับวัยเรียนและวัยทำงานและกรดไขมันโอโคเซเพนตะอีโนอิกหรือ EPA (eicosapentaenoic acid) ซึ่งมีส่วนช่วยลดระดับไขมันที่ไม่ดี (low density lipoprotein, LDL) คอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหัวใจและหลอดเลือด [24] อย่างไรก็ตาม น้ำมันปลาที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในสัดส่วนที่สูงจึงทำให้เสื่อมคุณภาพได้ง่ายด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) [3] จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มความคงตัวให้กับน้ำมันปลาด้วยวิธีการต่าง ๆ อาทิ García-Moreno และคณะ [4] ได้ศึกษาการกักเก็บน้ำมันปลาด้วยระบบอิมัลชันโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นอิมัลซิไฟเออร์ Kumar และคณะ [5] ศึกษาการกักเก็บน้ำปลาด้วยวิธีทำผงแห้งโดยใช้ไคโตซานเป็นสารห่อหุ้ม และ Wu และคณะ [6] ศึกษาการกักเก็บน้ำมันปลาด้วยแอลจินेट อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่ศึกษาการกักเก็บน้ำมันปลาด้วยเทคโนโลยีไลโปโซมยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย ซึ่งไลโปโซม คือ อนุภาคเล็กที่ภายในบรรจุสารที่ต้องการจะกักเก็บ โดยสร้างขึ้นจากฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ซึ่งเป็นสารประเภทไขมันที่มีสมบัติคล้ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ในสิ่งมีชีวิต ทำให้องค์ประกอบของไลโปโซมมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค [7] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของไลโปโซมน้ำมันปลา

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัตถุดิบ

2.1.1 ท้องปลาแชลมอน (*Oncorhynchus mykiss*) จากบริษัท ไทยยูเนียน โพรเซ่น โปรดักส์ จำกัด

(มหาชน) จังหวัดสมุทรสาคร

2.1.2 ฟอสโฟลิพิดซึ่งมีปริมาณฟอสฟาติดีลโคลีนร้อยละ 75 (PC 75 %) (Lipoid, Germany)

2.2 วิธีการ

2.2.1 การเตรียมน้ำมันปลาจากส่วนท้องปลาแชลมอน

(1) การสกัดน้ำมันปลาดิบ

วิธีการสกัดน้ำมันปลาดิบได้ดัดแปลงจากวิธีของ Klaypradit และคณะ [2] โดยนำท้องปลาแชลมอนแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปนึ่งด้วยตู้นึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 15 นาที จึงใช้เครื่องบีบอัดด้วยระบบไฮดรอลิก บีบของเหลวออกจากท้องปลา จากนั้นนำส่วนของเหลวไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกส่วนของน้ำมันปลาดิบออกจากของเหลวอื่น ๆ ดูดน้ำมันปลาดิบซึ่งอยู่ส่วนบนเพื่อนำเข้าสู่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

(2) การทำน้ำมันปลาดิบให้บริสุทธิ์

นำน้ำมันปลาดิบที่สกัดได้จากข้อ (1) ไปผ่านกระบวนการกำจัดยางตะกอนซึ่งได้ดัดแปลงจากวิธีของ Klaypradit และคณะ [2] โดยนำน้ำมันปลาดิบไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมกรดซิตริกเข้มข้นร้อยละ 0.3 ในอัตราส่วนน้ำมันปลาดิบ 99 ส่วนต่อกรดซิตริก 1 ส่วน (ร้อยละโดยน้ำหนัก) แล้วนำไปกวนด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดเอาน้ำมันปลาซึ่งอยู่ส่วนบนเพื่อใช้เป็นส่วนผสมในการเตรียมไลโปโซมน้ำมันปลาต่อไป

2.2.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดสำหรับเตรียมไลโปโซมน้ำมันปลาแชลมอน

การเตรียมไลโปโซมได้ดัดแปลง จากวิธี

ของ Mutalik และคณะ [22] ทำโดยละลายฟอสโฟลิพิดในอัตราส่วนร้อยละ 2, 3 และ 4 (ร้อยละน้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 25 มล. จากนั้นจึงเติมน้ำมันปลาปริมาณ 1 กรัม เมื่อส่วนผสมทั้งหมดละลายเข้ากันดีจึงนำไปประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยระบบสุญญากาศ เมื่อระเหยเอทานอลออกจนหมด จึงเติมน้ำกลั่นเพื่อทำให้เกิดไลโปโซม เทส่วนผสมลงในขวดสีชาพร้อมกับพ่นก๊าซไนโตรเจนแล้วนำขวดส่วนผสมไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Memmert WNB14, Germany) ที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปลดขนาดด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นความถี่สูง (ELMA transonic T 780/H, Germany) ที่ความถี่ 50 kHz เป็นเวลา 30 นาที นำไลโปโซมที่เตรียมได้บรรจุลงในถุงออลูมิเนียมฟอยล์ซีลปิดปากถุงให้สนิทและเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 °C

2.2.3 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมีของไลโปโซมน้ำมันปลา

(1) การวิเคราะห์ขนาดอนุภาค

การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคทำโดยเจือจางไลโปโซมด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นร้อยละ 15±3 จากนั้นจึงนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ขนาดอนุภาค (dynamic light scattering) (Malvern Mastersizer 2000, UK) อนุภาคที่วิเคราะห์ได้ มีหน่วยเป็นไมโครเมตร (µm)

(2) การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา

ทำโดยย้อมไลโปโซมด้วยสีย้อมไนล์เรด (nile red) โดยใช้อัตราส่วนไลโปโซมต่อสีย้อมเท่ากับ 1:0.1 (ปริมาตรโดยปริมาตร) จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เลเซอร์คอนโฟคอล (laser confocal microscope) (Olympus Fluoview FV3000, Japan) โดยกำหนดช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการในการกระตุ้น (excitation wavelength) เท่ากับ 552 นาโนเมตร

และความยาวคลื่นแสงที่ต้องการวัด (emission wavelength) เท่ากับ 636 นาโนเมตร

(3) การวิเคราะห์ค่าสี

ดำเนินการโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ค่าสี (Minolta CM-3500d, Japan) ในระบบ CIE LAB โดยเทียบค่าความสว่าง/ความมืด (L*) ค่าสีแดง/สีเขียว (a*) ค่าสีเหลือง/สีน้ำเงิน (b*) และค่าความแตกต่างของสีทั้งหมด (ΔE) โดยเปรียบเทียบกับแผ่นขาวมาตรฐาน (standard white plate) ค่า ΔE สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad (1)$$

(4) การวิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์

การวิเคราะห์ค่าเพอร์ออกไซด์ดำเนินการตามวิธีของ American Oil Chemists' Society [8] method Cd 8b-90 ทำโดยนำไลโปโซม 10 กรัม ไปหมუნเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนบนปริมาณ 5 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่แล้วจึงเติมกรดอะซิติก-ไอโซออกเทน อัตราส่วน 3:2 ปริมาตร 50 มล. เขย่าเป็นเวลา 1 นาที จนส่วนผสมละลายเข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอดัดอิมตัว ปริมาตร 0.5 มล. แล้วเขย่าส่วนผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มล. เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปไทเตรตกับโซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยค่าเพอร์ออกไซด์คำนวณได้จากสมการ (2)

$$PV \text{ (meq O}_2\text{/ Kg sample) = } \frac{N \times (V_{\text{Sam}} - V_{\text{Blank}}) \times 1000}{W_{\text{Sam}}} \quad (2)$$

โดยที่ N = ความเข้มข้นของโซเดียมไทโอซัลเฟต (โมลาร์), V_{Blank} = ปริมาณของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเตรต Blank (มล.), V_{Sam} = ปริมาณของโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ไทเตรตตัวอย่าง (มล.), W_{sam} = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

(5) การวิเคราะห์ค่า thiobarbituric acid reactive substance (TBAR)

การวิเคราะห์ค่า TBAR ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Karnjanapratum และคณะ [9] ทำโดยนำไลโปโซม 10 กรัมไปหมวนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นดูดส่วนบนปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในหลอดทดลองแล้วจึงเติม TBA reagent (ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ปริมาณ 15 กรัม และกรดไทโอบาบิทริก (thiobarbituric acid) ปริมาณ 0.375 กรัมกับสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.25 โมลาร์) ปริมาตร 2.5 มล. แล้วนำส่วนผสมไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายไปหมวนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000g ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยค่า TBAR สามารถคำนวณได้จากสมการเส้นตรงของกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของสารมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde) โดยมีหน่วยความเข้มข้นเป็นมิลลิกรัมของสารมาลอนไดแอลดีไฮด์ต่อลิตรตัวอย่าง (mg malondialdehyde/L)

(6) การวิเคราะห์กรดไขมัน

การเตรียมอนุพันธ์กรดไขมันดำเนินการตามวิธีของ Association of Official Analytical Chemists [10] method 991.39 จากนั้นวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดไขมันด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ซึ่งได้ดัดแปลงจากวิธีของ Intharapongnuwat [11] ดำเนินการโดยฉีดอนุพันธ์กรดไขมันปริมาณ 1 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง GC (Agilent 7890A, USA) โดยใช้คอลัมน์ชนิด DB-WAX (30 m x 250 µm) ความหนาของสารเคลือบ 0.25 ไมโครเมตร ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาโดยมีอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที สำหรับอุณหภูมิของ injection,

oven และ detector เท่ากับ 240 °C และใช้ระบบการตรวจจับสัญญาณแบบ frame ionization detector สำหรับการระบุชนิดกรดไขมันทำได้โดยเทียบ retention time กับ retention time ของ FAME standard menhaden oil (Sigma, USA) โดยใช้ C23:0 Methyl tricosanoate (Sigma, USA) เป็น internal standard สำหรับร้อยละของกรดไขมันทั้งหมดคำนวณตามวิธีของ Association of Official Analytical Chemists [10] method 991.39

(7) การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษานี้ได้วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ผลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดที่ใช้เป็นสารหุ้มต่อกระบวนการกักเก็บน้ำมันปลา

3.1.1 ขนาดอนุภาค

ขนาดอนุภาคของไลโปโซมน้ำมันปลาซึ่งเตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 1 ไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.01-1.27 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Chan และคณะ [12] ที่ได้ศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บ bovine serum albumin โดยใช้ไลโปโซมซึ่งพบว่าไลโปโซมที่เตรียมมีขนาดอนุภาคเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.8-1.3 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไลโปโซมที่

เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 มีขนาดอนุภาคเล็กที่สุด ตามด้วยไลโปโซมที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 4 ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดมีอิทธิพลต่อขนาดของไลโปโซมที่เตรียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Soema และคณะ [13] ซึ่งรายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดจะมีผลต่อจำนวนโมเลกุลของฟอสโฟลิพิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังไลโปโซมจึงเป็นผลทำให้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นฟอสโฟลิพิด ไลโปโซมจึงมีขนาดเพิ่มขึ้น

Table 1 Color and size of liposomes prepared from different concentration of phospholipid

| Phospholipid (%w/v) | Size (D4,3) (μm) | L* | a* | b* | ΔE |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 (salmon fish oil) | - | 86.56 \pm 0.60 ^a | 28.09 \pm 0.44 ^a | 56.12 \pm 0.45 ^a | 64.12 \pm 0.45 ^a |
| 2 | 1.01 \pm 0.02 ^b | 79.30 \pm 0.26 ^b | 10.51 \pm 0.95 ^b | 21.15 \pm 0.77 ^b | 31.43 \pm 0.47 ^b |
| 3 | 1.2 \pm 0.04 ^a | 79.56 \pm 0.70 ^b | 10.29 \pm 0.74 ^b | 21.06 \pm 0.56 ^b | 31.16 \pm 0.81 ^b |
| 4 | 1.27 \pm 0.04 ^a | 79.93 \pm 0.55 ^b | 10.05 \pm 0.26 ^c | 20.19 \pm 0.72 ^c | 30.28 \pm 0.63 ^c |

Data are expressed as mean \pm SD (n=3), Different letters within the same column denote significant differences ($P < 0.05$).

3.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้แสดงดังรูปที่ 1 ผลการทดลองพบว่าไลโปโซมที่เตรียมได้ไม่มีการแยกชั้นและไม่มีย้ำมันปลาอิสระลอยอยู่บนผิวหน้าซึ่ง Li และคณะ [14] กล่าวว่าฟอสโฟลิพิดมีสมบัติเป็นแอมฟิฟิลิก (amphiphilic) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขั้วหรือหมู่ฟอสเฟตและส่วนที่ไม่มีขั้วหรือกรดไขมันด้วยเหตุนี้ไลโปโซมจึงสามารถแขวนลอยและกระจายอยู่ในน้ำได้ สำหรับลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาค (microstructure) แสดงดังรูปที่ 2 โดยไลโปโซมที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นทรงกลมกระจายกันโดยทั่ว สำหรับอนุภาคทรงกลมที่ปรากฏเป็นสีแดงแสดงถึงโมเลกุลของน้ำมันปลาซึ่งจับอยู่กับโมเลกุลของสีย้อมไนล์เรดโดยโมเลกุลของสีย้อมจะวาแสง (fluorescence) สีแดง เมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นแสงความถี่ 552 นาโนเมตร [23] จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างไลโปโซมสามารถกักเก็บ

น้ำมันปลาไว้ใน ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ O'Dwyer และคณะ [15] ซึ่งใช้สีย้อมไนล์เรดตรวจสอบการคงอยู่ของน้ำมันในโครงสร้างระดับจุลภาคของอิมัลชันซึ่งมีน้ำมันปลาเป็นส่วนผสม โดยพบว่าบริเวณที่ติดสีแดงจะเป็นส่วนของน้ำมันซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยากับสีย้อม

3.1.3 ค่าสี

ค่าสีของน้ำมันปลาผสมอนที่ไม่ถูกกักเก็บและค่าสีของไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 1) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยค่า L*, a*, b* และ ΔE ของน้ำมันปลามีค่าสูงกว่าไลโปโซมน้ำมันปลาในทุกตัวอย่าง ในขณะที่ค่า L* ของไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่ามีค่า L* ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ค่า a*, b* และ ΔE มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



Figure 1 (a) Salmon fish oil, (b) Liposome made from phospholipid 2 % w/v, (c) Liposome made from phospholipid 3 % w/v, and (d) Liposome made from phospholipid 4 % w/v

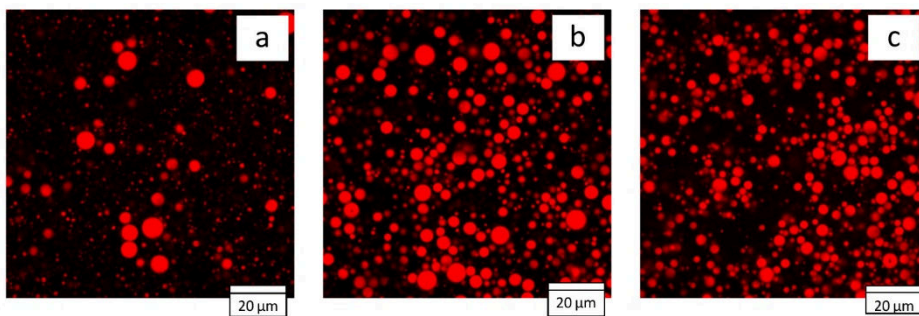


Figure 2 Laser confocal microscope images of liposomes (magnification: 100x): (a) Liposome made from phospholipid 2 % w/v, (b) Liposome made from phospholipid 3 % w/v, and (c) Liposome made from phospholipid 4 % w/v

ตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าที่วันเริ่มต้น ค่า PV ของน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บและไลโปโซมน้ำมันปลาอยู่ในช่วงที่มีการแนะนำไว้ คือ ไม่เกิน 10 meqO₂/kg [18] แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บมีค่า PV สูงกว่าไลโปโซม

($P < 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าน้ำมันปลาที่ถูกกักเก็บไว้ในไลโปโซมได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้ค่าสีแดงลดลงโดยที่สีที่ปรากฏภายนอกเป็นสีของฟอสโฟลิพิดที่ห่อหุ้มน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพของไลโปโซมน้ำมันปลา (รูปที่ 1) โดยจากข้อมูลของ Weiss และคณะ [16] ได้สนับสนุนว่าค่าสีจะขึ้นอยู่กับสีของส่วนผสมในไลโปโซมเช่นเดียวกับการศึกษาของ Toniazzo และคณะ [17] ซึ่งรายงานว่ามีสีของส่วนผสมมีอิทธิพลต่อค่าสีของไลโปโซมเช่นกัน

3.2 ค่าปฏิกิริยาออกซิเดชันของของไลโปโซมน้ำมันปลา

3.2.1 ค่าเพอร์ออกไซด์ (PV)

ค่า PV เป็นค่าดัชนีบ่งชี้ปริมาณของไฮโดรเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นต้นของน้ำมัน ไขมัน (primary oxidation) สำหรับค่า PV ของน้ำมันปลาและไลโปโซมน้ำมันปลาแสดงดัง

น้ำมันปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่า PV ของไลโปโซมน้ำมันปลาในทุกตัวอย่างมีค่า PV ต่ำกว่าค่า PV ของน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บ โดยค่า PV ของไลโปโซมน้ำมันปลาเพิ่มขึ้นจากวันเริ่มต้นร้อยละ

22.52-26.88 และค่า PV ของไลโปโซมเพิ่มขึ้นซ้ำกว่า น้ำมันปลาประมาณ 4 เท่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดในทุกระดับความเข้มข้นสามารถช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นต้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sebaaly และคณะ [19] ที่ศึกษาการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันกานพลูโดยใช้ไลโปโซม พบว่าไลโปโซมสามารถชะลอการเสื่อมเสียเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันในน้ำมันกานพลูได้เมื่อเทียบกับน้ำมันกานพลูที่ไม่ถูกกักเก็บด้วยไลโปโซม และยังพบว่าความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า PV ในระหว่างเก็บรักษาแต่ค่า PV ที่เกิดขึ้นระหว่างเก็บรักษานั้นเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autoxidation) ซึ่งเป็นไปอย่างช้า ๆ

3.2.2 Thiobarbituric acid reactive substance (TBAR)

ค่า TBAR เป็นค่าบ่งชี้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขั้นที่ 2 (secondary oxidation) ของน้ำมัน ไขมันซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไฮโดรเพอร์ออกไซด์ไปเป็นสารที่หักลื่นหื่นซึ่งอยู่ในกลุ่มของแอลดีไฮด์ [3] สำหรับค่า TBAR ของน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บและไลโปโซมน้ำมันปลาแสดงดังตารางที่ 2 จากผลการทดลองพบว่าที่วันเริ่มต้นค่า TBAR ของน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บมีค่าแตกต่างกับค่า

TBAR ของไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นค่า TBAR ของไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดร้อยละ 2 ที่มีความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าค่า TBAR ของน้ำมันปลามีค่าสูงกว่าไลโปโซมน้ำมันปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับอิทธิพลของความเข้มข้นฟอสโฟลิพิดพบว่าที่วันเริ่มต้นไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้มีค่า TBAR ประมาณ 1.52-2.09 มิลลิกรัม ของสารมาลอนไดแอลดีไฮด์ต่อลิตรตัวอย่าง และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าไลโปโซมน้ำมันปลาที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดเข้มข้นร้อยละ 4 มีค่า TBAR ต่ำกว่าไลโปโซมที่เตรียมได้จากฟอสโฟลิพิดเข้มข้นร้อยละ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดจะแปรผกผันกับค่า TBAR โดย Cui และคณะ [20] กล่าวว่าฟอสโฟลิพิดมีสมบัติจับกับโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ส่วนของฟอสเฟต นอกจากนี้ฟอสโฟลิพิดยังสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ในปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยการให้อิเล็กตรอนแก่ไฮโดรเพอร์ออกไซด์ ค่า TBAR จึงเกิดขึ้นได้เพียงเล็กน้อย

Table 2 Peroxide value (PV) and thiobarbituric acid reactive substances (TBAR) of liposomes prepared from different concentration of phospholipid

| Phospholipid (%w/v) | PV (meq O ₂ /kg) | | TBAR (mg Malondialdehyde/L) | |
|---------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------|
| | 0 week | 4 weeks | 0 week | 4 weeks |
| 0 (salmon fish oil) | 6.67±0.67 ^c | 23.45±0.36 ^a | 2.36±0.21 ^a | 6.02±0.62 ^a |
| 2 | 8.89±0.38 ^b | 13.32±0.40 ^b | 2.09±0.07 ^{ab} | 4.51±0.27 ^b |
| 3 | 8.72±0.37 ^b | 13.23±0.35 ^b | 1.78±0.19 ^{bc} | 4.42±0.29 ^b |
| 4 | 9.7±0.19 ^a | 13.48±0.70 ^b | 1.52±0.14 ^c | 3.84±0.49 ^c |

Data are expressed as mean ± SD (n=3), Different letters within the same column denote significant differences ($P < 0.05$)

Table 3 Fatty acid composition (%) of salmon fish oil and liposomal salmon fish oil.

| Fatty acids | Salmon fish oil | liposomal salmon fish oil | | |
|-------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | 2 % Phospholipid | 3 % Phospholipid | 4 % Phospholipid |
| C14:0 | 2.56±0.04 ^a | 2.05±0.14 ^b | 2.16±0.14 ^b | 2.08±0.15 ^b |
| C16:0 | 12.44±0.31 ^a | 12.55±0.23 ^a | 13.19±0.23 ^b | 13.43±0.23 ^b |
| C16:1n7 | 3.91±0.16 ^a | 3.74±0.11 ^a | 3.51±0.25 ^a | 3.50±0.21 ^a |
| C16:2n4 | 0.42±0.11 ^a | 0.13±0.05 ^b | 0.14±0.06 ^b | 0.25±0.03 ^b |
| C16:3n4 | 0.48±0.18 ^a | 0.37±0.34 ^b | 0.28±0.17 ^c | 0.15±0.05 ^d |
| C18:0 | 3.88±0.32 ^a | 3.45±0.36 ^a | 3.57±0.24 ^a | 3.43±0.26 ^a |
| C18:1n9 | 34.54±0.30 ^a | 32.14±0.33 ^b | 32.56±0.1 ^b | 32.40±0.29 ^b |
| C18:1n7 | 4.31±0.36 ^a | 4.22±0.22 ^a | 4.63±0.26 ^a | 4.18±0.23 ^a |
| C18:2n6 | 16.24±0.23 ^c | 20.02±0.09 ^b | 21.22±0.21 ^b | 23.48±0.22 ^a |
| C18:3n4 | 0.19±0.02 ^b | 0.37±0.05 ^a | 0.34±0.03 ^a | 0.13±0.02 ^c |
| C18:3n3 | 0.24±0.03 ^c | 0.31±0.03 ^a | 0.30±0.04 ^a | 0.21±0.02 ^c |
| C18:4n3 | 4.47±0.13 ^b | 6.40±0.12 ^a | 6.20±0.12 ^a | 6.25±0.10 ^a |
| C20:1n9 | 1.78±0.05 ^a | 0.96±0.12 ^b | 1.04±0.10 ^b | 0.99±0.03 ^b |
| C20:4n6 | 0.38±0.03 ^b | 0.71±0.08 ^a | 0.57±0.08 ^a | 0.64±0.07 ^a |
| C20:4n3 | 0.64±0.07 ^a | 0.60±0.03 ^a | 0.50±0.08 ^{ab} | 0.47±0.05 ^b |
| C20:5n3 | 3.44±0.12 ^a | 3.28±0.18 ^a | 2.74±0.09 ^b | 2.33±0.26 ^b |
| C22:5n3 | 1.55±0.07 ^a | 1.36±0.07 ^a | 0.85±0.10 ^b | 0.84±0.08 ^b |
| C22:6n3 | 4.08±0.21 ^a | 3.81±0.18 ^a | 3.10±0.20 ^b | 2.62±0.08 ^c |
| Other | 5.30±0.20 ^a | 3.69±0.19 ^b | 3.57±0.14 ^b | 3.29±0.18 ^b |
| ΣSFA | 18.88±0.67 ^a | 18.06±0.73 ^a | 18.91±0.61 ^a | 18.94±0.64 ^a |
| ΣMUFA | 44.54±0.87 ^a | 41.05±0.78 ^b | 41.74±0.71 ^b | 41.07±0.76 ^b |
| ΣPUFA | 32.19±1 ^b | 37.43±1.22 ^a | 36.41±1.18 ^a | 37.38±0.98 ^a |
| Σn-3 | 14.41±0.42 ^a | 15.77±0.43 ^a | 13.69±0.63 ^{ab} | 12.71±0.59 ^b |
| Σn-6 | 16.63±0.26 ^c | 20.73±0.17 ^b | 21.79±0.29 ^{ab} | 24.12±0.29 ^a |
| Σn-6:n-3 | 1.15:1 | 1.13:1 | 1.59:1 | 1.90:1 |

Data are expressed as mean % ± SD (n=3), Different letters within the same row denote significant differences ($P < 0.05$), ΣSFA = sum of saturated fatty acid, ΣMUFA = sum of monounsaturated fatty acid, ΣPUFA = sum of polyunsaturated fatty acid, Σn-3 = sum of omega-3 fatty acid, Σn-6 = sum of omega-6 fatty acid, Σn-3/n-6 = ratio of omega-3 fatty acid to omega-6 fatty acid

3.3 องค์ประกอบของกรดไขมัน

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปลา จากผลการศึกษาพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดของกรดไขมันภายหลังการกักเก็บด้วยไลโปโซมและมีปริมาณ MUFA > PUFA > SFA เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของกรดไขมันกับน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บพบว่าสัดส่วนของ SFA ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่สัดส่วนของ PUFA มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากฟอสโฟลิพิดที่ใช้เป็นสารห่อหุ้มมีปริมาณ PUFA สูง ในขณะที่สัดส่วนของ MUFA มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดพบว่าไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณของกรดไขมันกลุ่ม SFA แต่มีอิทธิพลต่อปริมาณของกรดไขมันกลุ่ม MUFA และ PUFA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเมื่อความเข้มข้นของฟอสโฟลิพิดเพิ่มขึ้น ปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 จะเพิ่มขึ้นด้วย เนื่องจากฟอสโฟลิพิดที่เป็นสารห่อหุ้มมีสัดส่วนของกรดไขมันกลุ่มกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม สัดส่วนปริมาณของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ต่อกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ในไลโปโซมน้ำมันปลานั้นอยู่ในช่วงที่แนะนำคือ 1:1 ถึง 1:4 ซึ่งสัดส่วนของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ต่อกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ในน้ำมัน ไขมันนั้นเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อระบบหัวใจและหมุนเวียนโลหิต รวมทั้งการสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็น [21]

4. สรุป

การเตรียมไลโปโซมน้ำมันปลาโดยใช้ฟอสโฟลิพิดที่ทุกระดับความเข้มข้น (2-4 ร้อยละน้ำหนักโดยปริมาตร) สามารถเพิ่มความคงตัวให้แก่ไขมันปลาได้โดยผลทางกายภาพ ได้แก่ ขนาดอนุภาค ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และค่าสี พบว่าไม่แตกต่างกัน สำหรับค่า

คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ค่า PV และค่า TBAR ภายหลังการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าไลโปโซมน้ำมันปลาในทุกตัวอย่างมีค่า PV และค่า TBAR ต่ำกว่าน้ำมันปลาที่ไม่ถูกกักเก็บ และเมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายหลังการกักเก็บด้วยไลโปโซมพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของชนิดของกรดไขมันและไลโปโซมที่เตรียมได้มีปริมาณ MUFA > PUFA > SFA ทั้งยังมีสัดส่วนของกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 ต่อกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 เป็นไปตามเกณฑ์ที่มีการแนะนำ ดังนั้นการใช้ฟอสโฟลิพิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือความเข้มข้นร้อยละ 2 (ร้อยละน้ำหนักโดยปริมาตร) จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมและเพียงพอต่อการเพิ่มความคงตัวให้แก่ไขมันปลา งานวิจัยนี้จึงสามารถเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้น้ำมันปลารูปแบบไลโปโซมเพื่อเป็นทางเลือกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทูสนับสนุนการวิจัยจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบคุณบริษัท สเปซเมต จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์การวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์เลเซอร์คอนโฟคอล

6. รายการอ้างอิง

- [1] กองประมงต่างประเทศ, 2559, รายงานปริมาณและมูลค่าการนำเข้าสินค้าประมงทั้งหมดของไทย, แหล่งที่มา : http://www.fisheries.go.th/foreign/fisher2/index.php?option=com_goods&view=imports&layout=search&Itemid=140, 18 กุมภาพันธ์ 2560.
- [2] Klaypradit, W., Worawattanamateekul, W., Taksima, T. and Intharapongnuwat, W., 2014, Characterization of refined oils from

- atlantic salmon belly as affected by degumming, Kasetsart Univ. Fish. Res. Bull. TH 38: 1-14.
- [3] Akoh, C.C. and Min, D.B., 2008, Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, 3rd Ed., Taylor & Francis, 1028 p.
- [4] Garcia-Moreno, P.J., Guadix, A., Guadix, E.M. and Jacobsen, C., 2016, Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates, Food Chem. 203: 124-135.
- [5] Kumar, L.R.G., Chatterjee, N.S., Tejpal, C.S., Vishnu, K.V., Anas, K.K., Asha, K.K., Anandan, R. and Mathew, S., 2017, Evaluation of chitosan as a wall material for microencapsulation of squalene by spray drying: Characterization and oxidative stability studies, Int. J. Biol. Macromol. 104: 1986-1995.
- [6] Wu, Q., Zhang, T., Xue, Y., Xue, C. and Wang, Y., 2017, Preparation of alginate core-shell beads with different m/g ratios to improve the stability of fish oil, LWT-Food Sci. Tech. 80: 304-310.
- [7] New, R.R.C., 1990, Liposomes: A practical approach, IRL Press, UK, 301 p.
- [8] American Oil Chemists' Society, 2003, AOCS official method cd 8 b-9 0 , Reapproved 2003, Peroxide value, acetic acid, isooctane method, AOCS, Champaign, Ill., USA.
- [9] Karnjanapratum, S. and Benjakul, S., 2015, Antioxidative gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin as affected by prior autolysis, Int. Aquat. Res. 7: 101-114.
- [10] Association of Official Analytical Chemists, 2000, AOAC official method 991.39, Fatty acids in encapsulated fish oils and fish, AOAC, Gaithersburg, Maryland, USA.
- [11] Intharapongnuwat, W., 2014, Characterization of Refined Oil from Atlantic Salmon Belly as Affected by Degumming and Enrichment of Refined Salmon Oil with Capric Acid by Enzymatic Acidolysis, Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 171 p.
- [12] Chan, Y.H., Chen, B.H., Chiu, C.P. and Lu, Y.F., 2004, The influence of phytosterols on the encapsulation efficiency of cholesterol liposomes, Int. J. Food Sci. Tech. 39: 985-995.
- [13] Soema, P.C., Willems, G.J., Jiskoot, W., Amorij, J.P. and Kersten, G.F., 2015, Predicting the influence of liposomal lipid composition on liposome size, zeta potential and liposome-induced dendritic cell maturation using a design of experiments approach, Eur. J. Pharm. Biopharmaceut. 94: 427-435.
- [14] Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X. and Deng, Y., 2015, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, Asian J. Pharm. Sci. 10: 81-98.
- [15] O'Dwyer, S.P., O'Beirne, D., Ní Eidhin, D., Hannon, J.A. and O'Kennedy, B.T., 2013, Oxidative stability of tuna fat spreads

- (o/w/o emulsions) using conventional lipid oxidation methods, spme-gc/ms and sensory analysis, *Eur. Food Res. Technol.* 237: 385-398.
- [16] Weiss, J. and McClements, D.J., 2001, Color changes in hydrocarbon oil-in-water emulsions caused by ostwald ripening, *J. Agric. Food Chem.* 49: 4372-4377.
- [17] Toniazzo, T., Berbel, I.F., Cho, S., Fávoro-Trindade, C.S., Moraes, I.C.F. and Pinho, S.C., 2014, β -carotene-loaded liposome dispersions stabilized with xanthan and guar gums: Physico-chemical stability and feasibility of application in yogurt, *LWT-Food Sci. Tech.* 59: 1265-1273.
- [18] Annamalai, J., Dushyant, C.K. and Gudipati, V., 2015, Oxidative stability of microencapsulated fish oil during refrigerated storage, *J. Food Proc. Preserv.* 39: 1944-1955.
- [19] Sebaaly, C., Jraj, A., Fessi, H., Charcosset, C. and Greige-Gerges, H., 2015, Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes, *Food Chem.* 178: 52-62.
- [20] Cui, L. and Decker, E.A., 2016, Phospholipids in foods: Prooxidants or antioxidants?, *J. Sci. Food Agric.* 96: 18-31.
- [21] Simopoulos, A.P., 2002, The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids, *Biomed Pharmacother* 56: 365-379.
- [22] Mutalik, S., Salian, S.R., Avadhani, K., Menon, J., Joshi, H., Hegde, A.R., Kumar, P., Kalthur, G. and Adiga, S.K., 2014, Liposome encapsulated soy lecithin and cholesterol can efficiently replace chicken egg yolk in human semen cryopreservation medium, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60: 183-188.
- [23] Rumin, J., Bonnefond, H., Saint-Jean, B., Rouxel, C., Sciandra, A., Bernard, O., Cadoret, J.P. and Bougaran, G., 2015, The use of fluorescent nile red and bodipy for lipid measurement in microalgae, *Biotechnol. Biofuels* 8: 42.
- [24] Liu, Z.H., Yip, P.K., Adams, L., Davies, M., Lee, J.W., Michael, G.J., Priestley, J.V. and Michael-Titus, A.T., 2015, A single bolus of docosahexaenoic acid promotes neuroplastic changes in the innervation of spinal cord interneurons and motor neurons and improves functional recovery after spinal cord injury, *J. Neurosci.* 35: 12733-12752.