วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 41(3): 178-189

ไมโครเอนแคปซูเลชันสารสกัดเห็ดหลินจือสำหรับควบคุมการปลดปล่อยสารต้านอนุมูลอิสระในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารสัตว์ปีก

Microencapsulation of Lingzhi extract (*Ganoderma lucidum*) for Controlled Release of Antioxidants in Simulated Gastrointestinal Tract of Poultry

ปิยาพัชร เพ็ชรวัฒนาภา[1] ทองเลียน บัวจูม[1] บัวเรียม มณีวรรณ์[1]
อัมพร คำฟองเครือ[1] ปรีชา รัตนัง[2] และสุรีรัตน์ ถือแก้ว[1*]
Piyaphat Petwattanapha[1], Tonglian Buwjoom[1], Buaream Maneewan[1]
Amporn Khamfongkrua[1], Pricha Rattanang[2] and Sureerat Thuekeaw[1*]
[1]คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[2]คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290
[1]Faculty of Animal science and Technology, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290
[2]Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai, Thailand 50290
*Corresponding author: s.thuekeaw@gmail.com

Received: *September 09, 2023*
Revised: *February 29, 2024*
Accepted: *March 22, 2024*

Abstract

Lingzhi (*Ganoderma lucidum*) mushrooms have antioxidant property. They can be used as feed additives to improve the gut health of poultry. However, antioxidants have relatively low stability and limitations in intestinal targeted delivery. Microencapsulation is a technique to improve stability, bioavailability, and release of active ingredients at a target site. This experiment aimed to develop Lingzhi extract (LE) microcapsules, evaluate controlled release and their stability under simulated poultry digestive conditions. Sodium alginate (SA) was used as a wall material to fabricate SA microcapsule containing LE as a model animal feed additive. The encapsulation efficiency (%EE), swelling performance, the release efficiency as well as the antioxidant stability under simulated GI were examined. LE encapsulated in SA microcapsules had a good %EE (73.50±0.05%). Thermogravimetric analysis demonstrated that SA microcapsule improved its thermal stability. The swelling result indicated great performance of microcapsules (64.96±2.04% and 86.00±1.77% in gastric and intestinal stages, respectively), whereas SA displayed the cumulative release of LE in gastric stage (41.00±1.98%) and in intestinal stage (85.02±2.33%), respectively. Additionally, SA microcapsules retained antioxidant activity

under acids, bile, trypsin, including thermal conditions. In conclusion, the SA microcapsule could be considered as a promising driver of LE, drugs, and active compounds, etc. Consequently, LE/SA microcapsule can be used as a feed additive, and it has to be further investigated in *In Vivo*.

Keywords: controlled release, microcapsule, poultry, Lingzhi extract, antioxidant

บทคัดย่อ

เห็ดหลินจือมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถใช้เป็นสารเสริมพัฒนาสุขภาพทางเดินอาหารสัตว์ปีก อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระมีความคงตัวค่อนข้างต่ำ และมีข้อจำกัดในการนำส่งสู่ลำไส้ ไมโครเอนแคปซูเลชันเป็นเทคนิคเพื่อปรับปรุงความเสถียรชีวปริมาณสารออกฤทธิ์ และควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ที่บริเวณเป้าหมาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารสกัดเห็ดหลินจือไมโครแคปซูล ประเมินการปลดปล่อยสารและความเสถียร ภายใต้สภาวะเลียนแบบทางเดินอาหารสัตว์ปีก โซเดียมอัลจิเนตถูกใช้เป็นสารห่อหุ้มเพื่อสร้างอัลจิเนตไมโครแคปซูลที่บรรจุสารสกัดเห็ดหลินจือเป็นต้นแบบสารเสริมอาหารสัตว์ ทำการประเมินประสิทธิภาพการกักเก็บสาร ประสิทธิภาพการบวมตัว การปลดปล่อยสาร และความเสถียรของสารต้านอนุมูลอิสระ อัลจิเนตไมโครแคปซูลมีความสามารถกักเก็บสารสูง (73.50±0.05%) เทอร์โมกราวิเมตริกพิสูจน์ได้ว่าไมโครแคปซูลปรับปรุงเสถียรภาพทางความร้อน ผลการบวมตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพที่ดีของไมโครแคปซูล (64.96±2.04% and 86.00±1.77% ในกระเพาะและลำไส้ ตามลำดับ) ขณะที่ไมโครแคปซูลแสดงการปลดปล่อยสารสกัดเห็ดหลินจือในกระเพาะอาหาร (41.00±1.98%) และในลำไส้ (85.02±2.33%) นอกเหนือจากนี้อัลจิเนตไมโครแคปซูลรักษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ภายใต้สภาวะความทนทานต่อกรดน้ำดี ทริปซิน รวมถึงความร้อนได้ดี สรุปได้ว่าอัลจิเนตไมโครแคปซูลสามารถขับเคลื่อนประสิทธิภาพของสารสกัดเห็ดหลินจือ ยา และสารออกฤทธิ์อื่น ๆ ดังนั้นสารสกัดเห็ดหลินจือไมโครแคปซูลสามารถใช้เป็นสารเสริมอาหารสัตว์ และจะมีการศึกษาในสัตว์ทดลองต่อไป

คำสำคัญ: ควบคุมการปลดปล่อยสาร ไมโครแคปซูล สัตว์ปีก สารสกัดเห็ดหลินจือ สารต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ

การใช้สารเติมแต่งฟังก์ชันในอาหารสัตว์ (Functional feed additive) ถือว่าเป็นกลยุทธ์ที่สำคัญในการส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของทางเดินอาหารสัตว์และประสิทธิการผลิต เนื่องจากเป็นทางเลือกทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเร่งการเจริญเติบโต (Antibiotic as growth promoters: AGPs) และเป็นที่ทราบกันดีว่าเห็ดหลินจือ (*Ganoderma Lucidum*) มีสรรพคุณทางยาใช้รักษาโรค และบำรุงสุขภาพ เห็ดหลินจือมีสารออกฤทธิ์สำคัญหลายชนิดและจึงมีการนำมาใช้เป็นสารเสริมสุขภาพในมนุษย์อย่างแพร่หลายและเป็นที่ยอมรับทั่วโลก เห็ดหลินจือมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) เนื่องจากมีสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) เป็นองค์ประกอบอยู่สูง (Liu *et al*., 2020) ในการผลิตสัตว์ปีกโดยทั่วไปลำไส้เล็กเป็นเป้าหมายสำหรับการประเมินคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟีนอลิกทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (Free radicals) โดยการให้หมู่ฟีนอลิก OH ให้กับอนุมูลอิสระกลุ่ม Reactive oxygen species (ROS) ช่วยลดความเสียหายของเนื้อเยื่อและลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation) ในทางเดินอาหารสัตว์

อีกทั้งสามารถลดความเครียดจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidative stress) ส่งผลต่อการพัฒนาการทางสัณฐานวิทยาและการทำงานของลำไส้ (Zhao *et al*., 2017) อย่างไรก็ตามการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ยังคงมีข้อจำกัด เนื่องจากสารออกฤทธิ์ในเห็ดหลินจือมีความเสถียรต่ำ เมื่อผ่านสภาวะที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ผ่านการให้ความร้อนในการอัดเม็ดอาหารสัตว์ สภาวะการเก็บรักษา และการขนส่ง สภาวะเหล่านี้อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชั่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเคลื่อนที่ในทางเดินอาหาร สารออกฤทธิ์อาจถูกทำลายในสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร เอนไซม์ในตัวสัตว์ และการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในทางเดินอาหาร ก่อนที่จะถึงอวัยวะเป้าหมาย จากการข้อมูลข้างต้นการพัฒนาประสิทธิภาพของระบบนำส่งสาร (Delivery system) จึงมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นในการผลิตสัตว์ (Thuekeaw *et al*., 2021)

ไมโครเอนแคปซูลเลชั่น (Microencapsulation) คือ การห่อหุ้มสารสำคัญ (Core material) ด้วยสารห่อหุ้มหรือพอลิเมอร์ (Wall material) ก่อตัวเป็นไมโครแคปซูล (Microcapsule) หรือนาโนแคปซูล (Nanocapsule) ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันไป เทคนิคนี้สามารถเพิ่มความเสถียรของสารสำคัญภายใต้สภาวะที่ไม่พึงประสงค์ และควบคุมการปลดปล่อยในทางเดินอาหารสัตว์ การศึกษาก่อนหน้านี้มีการนำกระบวนไมโครเอนแคปซูลเลชั่นมาเพิ่มความคงตัวต่อการออกซิเดชั่นของน้ำมันสปอร์จากเห็ดหลินจือโดยการใช้กัมอารบิกและมอลโตเด็กซ์ตรินเป็นวัสดุห่อหุ้ม (Zhou *et al*., 2019) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสารสกัดจากเห็ดหลินจือไมโครแคปซูล และประเมินความสามารถในการปลดปล่อยสาร และคุณสมบัติความทนทานต่อความร้อน สภาวะจำลองในทางเดินอาหาร ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับสามารถสร้างมูลค่าให้เศษเหลือจากเห็ดหลินจือ และมีสารเสริมสุขภาพชนิดใหม่ที่เป็นทางเลือกสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพการสัตว์ปีก อีกทั้งมีต้นแบบไมโครแคปซูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเพิ่มประสิทธิภาพสารเสริมอื่น ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

การทดลองนี้ใช้สารสกัดเห็ดหลินจือ (Lingzhi Extract: LE) เป็นสารแกนกลาง และโซเดียมอัลจิเนต (Sodium Alginate: SA) เป็นสารห่อหุ้ม เห็ดหลินจือตกเกรดได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์พัฒนาเห็ดหลินจือและเห็ดสมุนไพรอินทรีย์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

การสกัดเห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือ (20 กรัม) สกัดด้วยทำละลายเอทานอล 60% (400 มล.) ใช้เครื่องกวนสารกวนให้เข้ากันนาน 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำตัวอย่างมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เพื่อแยกสารสกัด (LE) และกากหลังจากการสกัด (Lingzhi Residual Waste: LRW) นำสารสกัดไปแยกตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 50°ซ. เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างจำนวน 10 ซ้ำ จากนั้นเก็บสารสกัดเห็ดหลินจือใส่ในขวดเก็บตัวอย่างสีชาเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟินอลิกรวม และคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

การวิเคราะห์ปริมาณสารฟินอลิกรวม (Total phenolic content) โดยใช้สารละลาย Folin-Ciocalteu เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid) และวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl) ตามวิธีของ Brand-Williams *et al.* (1995) โดยเปรียบเทียบสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox stock solution) เตรียม

สารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ในเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดเห็ดหลินจือ (400 ไมโครมิลลิลิตร) ผสมกับสารละลาย DPPH (1,000 ไมโครมิลลิเมตร) เขย่าให้เข้ากันเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณความสามารถในยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ตามสมการ (1)

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = 100 \times \left(\frac{\text{Abs blank} - \text{Abs sample}}{\text{Abs blank}}\right) \quad (1)$$

โดยที่ Abs blank คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH และ Abs sample คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH + ตัวอย่าง

การเตรียมอัลจิเนตไมโครแคปซูลที่บรรจุสารสกัดเห็ดหลินจือ (LE/SA)

เตรียมสารละลายอัลจิเนตความเข้มข้น 5.0% (w/v) ผสมกับสารลดแรงตึงผิว (Tween 80) ผสมให้เข้ากันบนเครื่องกวนสารที่อุณหภูมิ 50°ซ. เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ในตู้เย็นข้ามคืน เพื่อให้เกิดการอิ่มตัวของพอลิเมอร์ นำสารละลายอัลจิเนต (SA) กับสารสกัดหลินจือ (LE) ในอัตราส่วน 1:5 (v/v) ผสมด้วยเครื่องฮอโมจีไนซ์ ทำให้อนุภาคของเหลวมีขนาดเล็กลงและเกิดการกระจายเป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ความเข้มข้น 1.0% (w/v) เพื่อใช้เป็นสารเชื่อมขวาง (Crosslinker) หยดสารละลายอัลจิเนต (SA) ลงใน $CaCl_2$ โดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จนก่อตัวเป็นอัลจิเนตไมโครแคปซูล เก็บตัวอย่าง LE/SA ล้างสารละลายส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคืออัลจิเนตไมโครแคปซูลที่บรรจุสารสกัดเห็ดหลินจือ (LE/SA) การเตรียมอัลจิเนตไมโครแคปซูลแสดงใน **Figure 1**

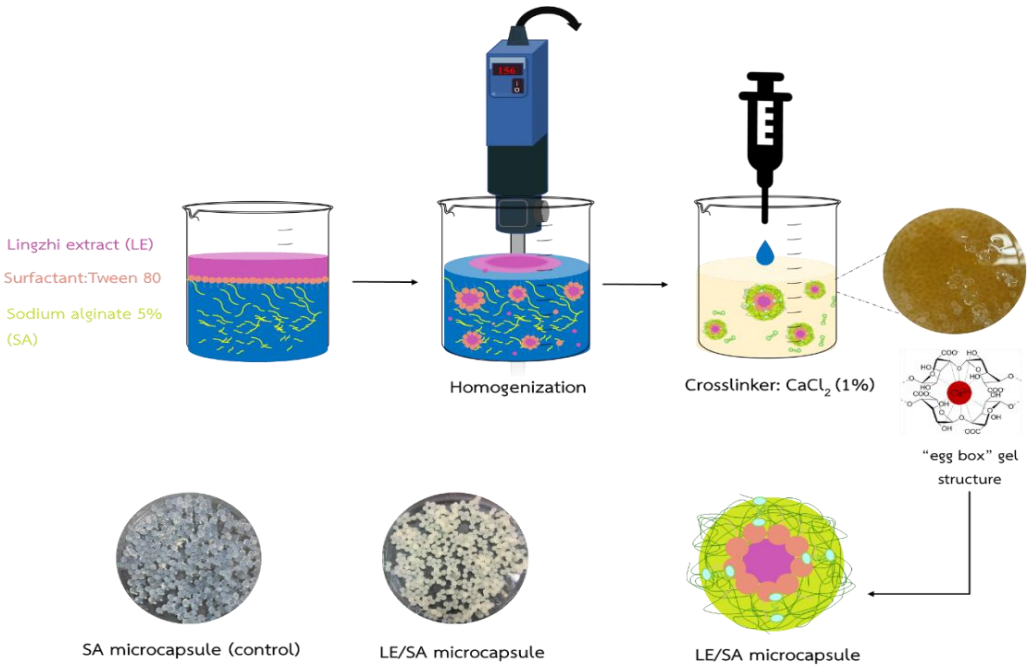

Figure 1 Schematic for step of preparation of LE/SA microcapsule

ความเสถียรทางความร้อน (Thermal stability) ของไมโครแคปซูล ด้วยเครื่อง Thermogravimetric analyzer (TGA)

ไมโครแคปซูลถูกนำมาศึกษาเสถียรภาพทางความร้อน โดยการวัดน้ำหนักตัวอย่างที่สูญเสียไปกับการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ ภายใต้บรรยากาศที่มีการควบคุมไนโตรเจน อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 30-700°ซ. อัตราการให้ความร้อน 10°ซ./นาที ผลลัพธ์แสดงเป็นกราฟการสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่าง โดยทั่วไป TGA ใช้ในงานวิจัยสำหรับวัสดุประเภทเซรามิก พอลิเมอร์ ยาง โลหะ หรือชีวมวล เครื่องสามารถปรับอุณหภูมิได้สูง ในงานทดลองนี้นำ TGA มาวิเคราะห์การย่อยสลายตัวของสารแกนกลางและวัสดุห่อหุ้มซึ่งมีอุณหภูมิที่สลายตัวแตกต่างกัน การปรับอุณหภูมิในช่วง 30-700°ซ. สามารถประเมินอุณหภูมิแต่ละช่วงของการย่อยสลายสารแกนกลางและวัสดุห่อหุ้ม

การบวมตัวของไมโครแคปซูล (Swelling ratio, %) และอัตราการปลดปล่อย (*In Vitro* cumulative release, %) สารออกฤทธิ์ในสภาวะเลียนแบบทางเดินอาหาร (Simulated Gastrointestinal Tract)

การประเมินอัตราการบวมตัว และการปลดปล่อยสารของไมโครแคปซูล ดัดแปลงจากวิธีของ Chitprasert and Sutaphanit (2014); Forssten *et al.* (2023) โดยทั่วไปการจำลองสภาวะทางเดินอาหารในหลอดทดลองของสัตว์กระเพาะเดี่ยว (สัตว์ปีกและสุกร) มีการศึกษา 2 ระยะ ระยะที่ 1 สภาวะจำลองในกระเพาะอาหาร (Simulated Gastric Fluid: SGF) และระยะที่ 2 สภาวะจำลองในลำไส้เล็ก (Simulated Intestinal Fluid; SIF) ที่อุณหภูมิที่ 39.5±0.5°ซ. (อุณหภูมิร่างกายสัตว์) โดยการปรับลดระยะเวลาการบ่ม และความเข้มข้นของเอนไซม์ให้เหมาะสมกับชนิดสัตว์

ในระยะที่ 1 ไมโครแคปซูล 2 กรัม บ่มใน SGF 100 มล. ตามด้วยการปรับ pH สารละลายเป็น 6.0, 5.0, 3.0 และ 2.0 ที่เวลา 5 นาที 30 นาที 120 นาที และ 180 นาที ตามลำดับ ที่ 39.5°ซ. ใน Thermostat water bath ในระยะที่ 2 การบ่มใน SIF นำไมโครแคปซูล และ SGF จากการบ่มระยะที่ 1 มาเติมด้วยสารละลายทริปซิน (Trypsin) น้ำดี (Bile) แพนครีเอตินจากตับอ่อน (Pancreatin) และ SIF ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 5.5 และ 7.0 ที่เวลา 220 และ 240 นาที ตามลำดับ หลังการบ่มแต่ละจุด ไมโครแคปซูลจะนำมากรองและชั่งน้ำหนัก ทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ จากนั้นนำมาคำนวณอัตราการบวมตัวของไมโครแคปซูลตามสมการ (2)

การบวมตัวของไมโครแคปซูล (Swelling of the microcapsule, %)

$$= \left(\frac{Ms - Md}{Md}\right) \times 100 \qquad (2)$$

โดยที่ Ms, และ Md คือ น้ำหนักของ LE/SA ที่บ่มในแต่ละจุด และน้ำหนักของ LE/SA ก่อนการบ่ม

การประเมินประสิทธิภาพการปลดปล่อยสารจากไมโครแคปซูล มีขั้นตอนเหมือนกับการวัดอัตราการบวมตัวของไมโครแคปซูลที่อธิบายไปก่อนหน้านี้ โดยการเก็บสารละลายที่ผ่านการบ่มแต่ละจุด มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 470 nm เพื่อนำมาคำนวณการปลดปล่อยสารจากไมโครแคปซูลตามสมการ (3)

อัตราการปลดปล่อยสะสม (Cumulative release, %)

$$= \sum_{t=0}^{t} \frac{M_t}{M_0} \qquad (3)$$

โดยที่ M_t คือ ปริมาณสะสมของ LE, M_0 คือ ปริมาณเริ่มต้นของ LE ที่ห่อหุ้มไว้ใน LE/SA

ความเสถียรของไมโครแคปซูล ภายใต้สภาวะความเป็นกรด เกลือน้ำดี เอนไซม์ทริปซิน และอุณหภูมิที่ 85°ซ.

ไมโครแคปซูลถูกนำไปบ่มในสภาวะกรด เกลือน้ำดี เอนไซม์ทริปซิน และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°ซ. เวลา 1 นาที ตามวิธีของ Thuekeaw *et al.* (2021) ตัวอย่างก่อนและหลังการบ่มนำมาวิเคราะห์

กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ทำการวิเคราะห์ 4 ซ้ำ จากนั้นคำนวณร้อยละการสูญเสียของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

วิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาความเสถียรสารของเห็ดหลินจือไมโครแคปซูลภายใต้สภาวะจำลองในทางเดินอาหาร โดยการเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ข้อมูลที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design; CRD และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองโดยวิธี Duncan's New Mutiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

ปริมาณสารฟินอลิกรวม และคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหลินจือ

จากการสกัดเห็ดหลินจือด้วยเอทานอล สารสกัดเห็ดหลินจือพบกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ สารประกอบฟินอลิกรวมในสารสกัดเห็ดหลินจือเท่ากับ 47.25±0.20 มก/ก ขณะที่ในกากหลังการสกัดเท่ากับ 15.25±0.23 มก/ก การทดสอบคุณสมบัติการต่อต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH assay (2,2-diphenyl-1-picryhydrazyl) โดยเปรียบเทียบสารมาตรฐาน พบว่าสกัดเห็ดหลินจือและกากหลังการสกัดมีความสามารถในการกำจัดอนูมูลอิสระเท่ากับ 85.06±1.45% และ 12.18±2.12% ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Total phenolic compound and DPPH radical scavenging of Lingzhi extract (LE)

Chemical composition and properties	LE	LRW	Units
Total phenolic compound	47.25±0.20	15.25±0.23	mg/g
DPPH radical scavenging	85.06±1.45	12.18%±2.12	%

Lingzhi extract (LE) and (Lingzhi residual waste; LRW)

สารสกัดเห็ดหลินจือไมโครแคปซูล และประสิทธิภาพการกักเก็บสาร

จากขั้นแรกของการเตรียมไมโครแคปซูล การฮอโมจีไนชั่นทำให้อนุภาคของสารสกัดและสารละลายอัลจิเนต มีขนาดเล็กลงและเกิดการกระจายเป็นเนื้อเดียวกัน รวมเป็นอิมัลชัน (Emulsion) ไม่แยกชั้น คงตัว ด้วยการลดแรงตึงผิวของเหลวทั้งสองส่วน โดยการเติมสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ก่อนนำไปก่อตัวเป็นไมโครแคปซูลด้วยการเชื่อมพันธะระหว่างอัลจิเนตและแคลเซียมไอออน ขั้นตอนนี้เกิดไอโอนิกเจเลชั่น (Ionic gelation) การเชื่อมพันธะระหว่างอัลจิเนตและแคลเซียมไอออน เพื่อสร้างโครงสร้าง "Egg box" เจล ทำให้เกิดเครือข่ายที่ซับซ้อนของพอลิเมอร์ จนก่อตัวเป็นไมโครแคปซูล (LE-SA microcapsule) LE-SA มีความสามารถในการกักเก็บสารออกฤทธิ์ (%EE) 73.50±0.05% และมีปริมาณสารออกฤทธิ์ในไมโครแคปซูล (%LE content) 69.99±2.93%

ความเสถียรทางความร้อนด้วยเครื่องเทอร์โมกราวิเมตริก

เพื่อพิสูจน์ว่าโครงสร้างของ SA สามารถเพิ่มความเสถียรทางความร้อนของ LE จึงมีการศึกษาเสถียรภาพทางความร้อน โดยการวัดน้ำหนักตัวอย่างที่สูญเสียไป (Weight loss) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ภายใต้บรรยากาศที่มีการควบคุมไนโตรเจน ผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักต่ออุณหภูมิ พบว่าการสูญเสียน้ำหนักของ LE เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การสูญเสียน้ำหนักเท่ากับ 94.95% ช่วงอุณหภูมิที่ 30.18-80.94°ซ.

สามารถระบุได้ว่าเป็นการระเหยของน้ำ และเอทานอล เห็นได้ชัดว่าสารสกัดเห็ดหลินจือมีเสถียรภาพทางความร้อนต่ำ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงถึง 80°ซ. ซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิอัดเม็ดอาหารสัตว์ Figure 2 (กราฟ A) การสูญเสียน้ำหนัก SA มีการสูญเสียน้ำหนักครั้งแรก 12.49% ในช่วงอุณหภูมิ 30.18-176.69°ซ. การสูญเสียน้ำหนักในครั้งที่ 1 และ 2 เท่ากับ 39.26% และ 9.40% ในขั้นตอนสุดท้าย SA มีปริมาณเถ้า (Char yield) เหลืออยู่ประมาณ 30% ซึ่งเป็นปริมาณปกติของโพลีแซคคาไรด์ Figure 2 (กราฟ B) LE-SA มีการสูญเสียน้ำหนักในขั้นตอนแรกอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30.18-150.12°ซ. เท่ากับ 9.381% อุณหภูมิสูงสุดในการย่อยสลายคือ 74.11°ซ. สามารถระบุได้ว่าเป็นการระเหยของน้ำและสารสกัดเห็ดหลินจือบางส่วน ขั้นตอนที่ 2 และ 3 เกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 150.12-253.31°ซ. การสูญเสียน้ำหนักเท่ากับ 7.85% และ 13.70% ตามลำดับ ระบุได้ว่าเริ่มเกิดการสลายของโครงสร้างอัลจิเนต ขั้นตอนที่ 4 มีการสูญเสียน้ำหนักมากที่สุดเท่ากับ 22.65% อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 253.31-398.38°ซ. ซึ่งเป็นการสลายของโครงสร้างอัลจิเนต ปริมาณเถ้าเหลืออยู่เท่ากับ 34.65% Figure 2 (กราฟ C)

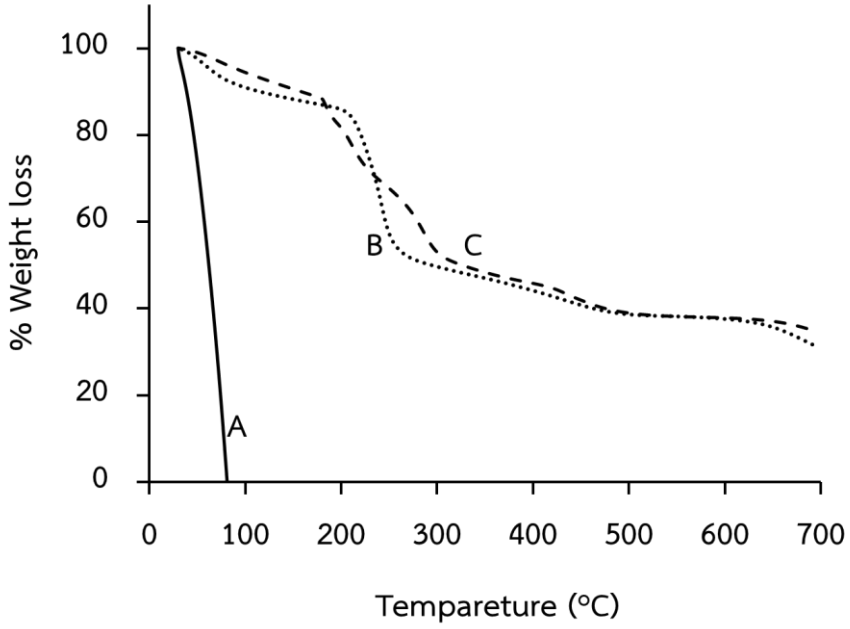

Figure 2 TGA thermograms of (A) LE, (B) SA and (C) LE/SA

อัตราบวมตัวและการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ในสภาวะจำลองทางเดินอาหารสัตว์

อัตราการบวมตัวและการปลดปล่อยสารแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ระยะที่ 1 ของเหลวในกระเพาะอาหาร (Gastric fluid, pH 2-3.5) และระยะที่ 2 ของเหลวในลำไส้ (Intestinal fluid, pH 5.0-7.0) ที่อุณหภูมิที่ 39.5°ซ. อัตราการบวมตัวของไมโครแคปซูลเมื่อบ่มในของเหลวในกระเพาะอาหาร พบว่ามีอัตราการบวมตัวที่ 64.96±2.04% และ 86.00±1.77% ในของเหลวในลำไส้ ตามลำดับ (**Figure 3A**) การปลดปล่อยสารในทางเดินอาหาร พบว่าไมโครแคปซูลสามารถปลดปล่อย LE สะสม เท่ากับ 41.00±1.98% และ 85.02±2.33% ในกระเพาะอาหารและลำไส้ ตามลำดับ **(Figure 3B)**

ความทนทานของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหลินจือที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต ไมโครแคปซูล (LE/SA) ภายใต้สภาวะความเป็นกรด เกลือน้ำดี เอนไซม์ทริปซิน และอุณหภูมิอัดเม็ดอาหารสัตว์

ความทนทานของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหลินจือที่ถูกห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต ไมโครแคปซูลแสดงใน **Figure 4** กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเริ่มต้นของ LE/SA เท่ากับ 85.94±1.55% เมื่อบ่มในสภาวะกรด เอนไซม์ทริปซิน และอุณหภูมิอัดเม็ด พบว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระลดลง 2.33-2.77% ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้น อย่างไรก็ตามการบ่มในเกลือน้ำดีไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ($P>0.05$)

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารประกอบฟินอลิกเป็นสารที่มีความเป็นขั้ว จึงสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น เอทานอล สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งอนุมูลอิสระโดยการให้อิเล็กตรอน สามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ และไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ สารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น กลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมีทั้งโมเลกุลที่มีขั้ว (Hydroxyl group; OH) และไม่มีขั้ว (Alkyl group) (Ribeiro *et al*., 2015) ส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในสารสกัดเห็ดหลินจือ >80% ในขณะที่กากเห็ดหลินจือหลังการสกัดยังคงมีปริมาณสารฟินอลิก และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณสารฟินอลิกรวมและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีทิศทางเดียวกัน สารสกัดนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอาหารสัตว์

ไมโครแคปซูลมีประโยชน์ต่อระบบการนำส่งสารสำคัญเข้าสู่ร่างกายสัตว์ โดยเกิดความเสียหายน้อยที่สุดก่อนถึงอวัยวะเป้าหมาย จากการเตรียมไมโครแคปซูลการใช้อัลจิเนต ที่มีโครงสร้างรุพรุนมีความสามารถในการจับกับสารประกอบฟีนอลิก (Polyphenolics biopolymer interaction) อีกทั้งอัลจิเนตที่อยู่ในรูปโซเดียมอัลจิเนตมีคุณสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic property) ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ไปยังส่วนท้ายของทางเดินอาหารได้ดี (Gawad and Fellner, 2019) จากกระบวนการเห็นได้ชัดว่าไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสูง ใช้อุณหภูมิต่ำในการผลิต และลดการสูญเสียคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ เมื่อเทียบกับการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 200-250°ซ. (Araujo-Diaz *et al*., 2017)

จากการพิสูจน์ว่าโครงสร้างของ SA สามารถเพิ่มความเสถียรทางความร้อนของ LE การสูญเสียน้ำหนักเห็นได้ว่า SA เป็นพอลิเมอร์ที่มีความทนทานต่อความร้อนได้สูง (Keawchaoon and Yoksan, 2011) มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสารคำสัญ อีกทั้งการใช้ $CaCl_2$ เป็นสารเชื่อมขวางทำให้เกิดเจลแบบไอออนิก (Ionic gelation) กับโครงสร้างของอัลจิเนต (Cao *et al*., 2022) ดังนั้นโครงสร้าง SA-$CaCl_2$ สามารถเพิ่มเสถียรทางความร้อน และรักษาสารสกัดเห็ดหลินจือในช่วงอุณหภูมิที่ 85 °ซ.

เพื่อให้แน่ใจว่ามีการปล่อยสารเสริมที่ตำแหน่งเป้าหมายในทางเดินอาหาร การศึกษาการบวมตัวของไมโครแคปซูลและการปลดปล่อยจากสารสะสมจากไมโครแคปซูล จึงมีการดำเนินการโดยทำการจำลองสภาวะของกระเพาะอาหารและลำไส้ในหลอดทดลอง โดยมีการปรับ pH ระยะเวลาการบ่ม รวมถึงความเข้มข้มของเอนไซม์ให้ใกล้เคียงกับทางเดินอาหารสัตว์ปีก การบวมตัวของไมโครแคปซูลแสดงให้เห็นถึงการตอบสนองของ SA ในทางเดินอาหาร กลไกการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ของไมโครแคปซูลในสภาวะจำลองทางเดินอาหารสัตว์สามารถอธิบายได้ว่าระหว่างการบ่มใน SGF ที่สภาวะกรด SA มีความทนทานต่อการย่อยสลายจากกรด และหมู่คาร์บอกซิเลตของอัลจิเนต (Carboxylate groups) ยังคงรักษา LE ภายใต้การแปรผันของค่า pH อีกทั้งยังทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร ในขณะเดียวกันของเหลวในทางเดินอาหารสามารถซึมผ่านเข้าไปใน SA เกิดการดูดซับน้ำ เนื่องจากโครงสร้างมีลักษณะเป็นรูพรุนตามธรรมชาติ และเกิดการบวมตัวของไมโครแคปซูลในสภาวะเป็นกลางใน SIF โครงสร้างของ SA เริ่มละลายที่ pH>5 เนื่องจากการโปรโตเนชั่น (Protonation) ของกลุ่มไอออนิกคาร์บอกซิเลต (Ionic carboxylate group) และทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนไอออนระหว่างแคลเซียมไอออนบนโครงสร้างไมโครแคปซูล และฟอสเฟตไอออนใน SIF ทำให้เกิดการแพร่กระจายของ LE จากโครงสร้างไมโครแคปซูล อย่างไรก็ตามปัจจัยการควบคุมการปลดปล่อยสารขึ้นอยู่กับชนิดและคุณลักษณะของสารห่อหุ้ม ความเข้มข้นของสารเชื่อมขวาง สภาพแวดล้อมของเหลวในทางเดินอาหาร (pH และอุณหภูมิ) ปฏิสัมพันธ์กับสารประกอบทางชีวภาพหรือการตอบสนองทางชีวภาพ และเวลาบ่ม (Kleemann *et al.* 2020) ความเสถียรของไมโครแคปซูลภายใต้สภาวะทางเดินอาหารต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างไมโครแคปซูลที่มีอัลจิเนตองค์ประกอบสามารถรักษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของ LE ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อสัมผัสกับความร้อนที่อุณหภูมิ 85°ซ. เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ ในการศึกษาต่อไปไมโครแคปซูลจะถูกนำไปประเมินความเสถียรภายใต้สภาวะการเก็บรักษา (Storage stability) และการประเมินประสิทธิภาพการผลิตสัตว์ปีก

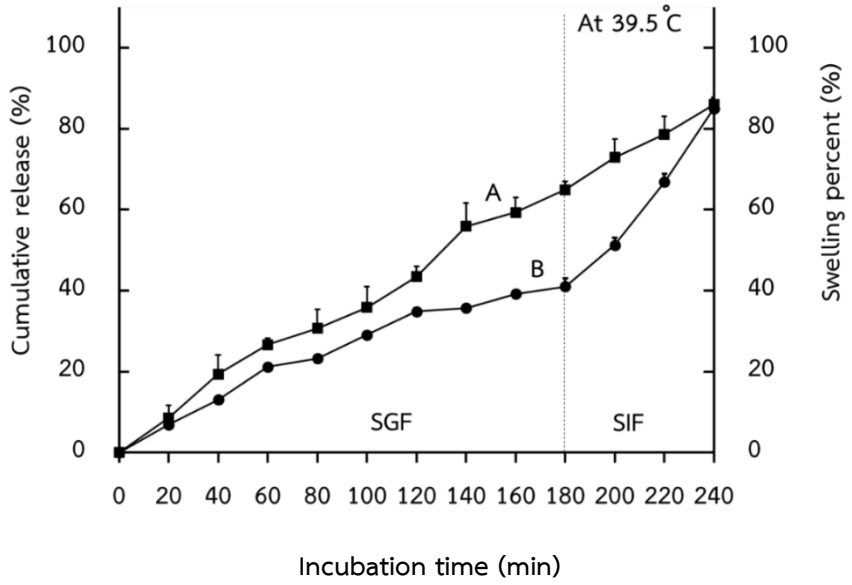

Figure 3 Swelling percent (A) and cumulative release (B) of LE/SA in SGF and SIF at 39.5±0.5°C. Simulated gastric fluid; SGF; Simulated intestinal fluid; SIF

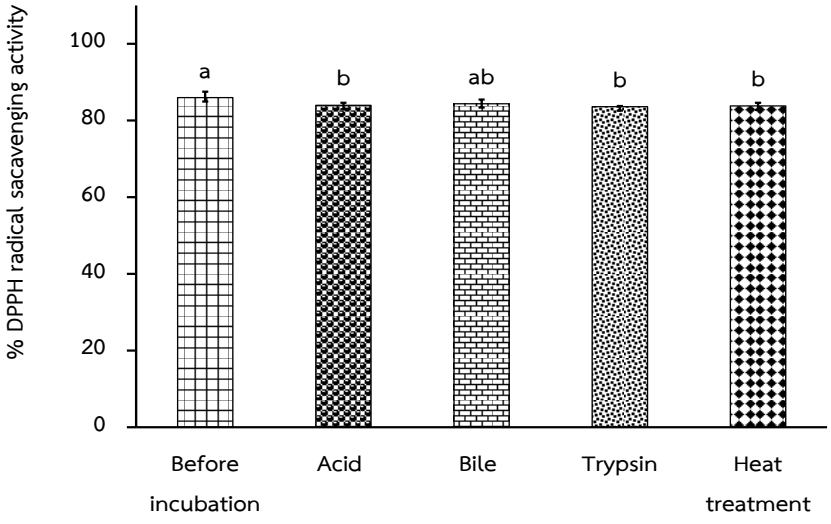

Figure 4 Antioxidation ability of LE/SA under acid tolerance, bile tolerance, trypsin tolerance, and thermal treatment as evaluated by DPPH radical scavenging. $^{a-b}$ superscript for significant differences ($P<0.05$)

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดเห็ดหลินจือมีสารประกอบฟินอลิกเป็นองค์ประกอบร่วมกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ >80% กระบวนไมโครเอนแคปซูลเลชันโดยใช้อัลจิเนต เป็นวัสดุห่อหุ้มสามารถก่อตัวเป็นอัลจิเนต ไมโครแคปซูล (LE-SA) ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บกักสารออกฤทธิ์ >70% และโครงสร้าง SA-$CaCl_2$ สามารถเพิ่มเสถียรทางความร้อนของสารสกัดเห็ดหลินจือ อัลจิเนต ไมโครแคปซูลสามารถรักษาสารสกัดเห็ดหลินจือผ่านสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร และควบคุมการปลดปล่อยสารในลำไส้ >85% ภายใต้ระบบทางเดินอาหารจำลองของสัตว์ปีก เมื่อพิจารณาความทนทานของโครงสร้างไมโครแคปซูล SA สามารถรักษาคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดเห็ดหลินจือ ภายใต้สภาวะความเป็นกรด เกลือน้ำดี เอนไซม์ทริปซิน และอุณหภูมิ 85°ซ. ดังนั้นไมโครเอนแคปซูลเลชันสามารถนำไปใช้ลดความสูญเสียของสารเสริมต่าง ๆ เมื่อสัมผัสกับความร้อนได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2566 (มจ.1-66-02-008) จากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม ผ่านสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์พัฒนาเห็ดหลินจือและเห็ดสมุนไพรอินทรีย์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการสนับสนุนเห็ดหลินจืออินทรีย์ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับความอนุเคราะห์สถานที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Araujo-Diaz, S.B., C. Leyva-Porras, P. Aguirre-Banuelos, C. Alvarez-Salas and Z. Saavedra-Leos. 2017. Evaluation of the physical properties and conservation of the antioxidants content, employing inulin and maltodextrin in the spray drying of blueberry juice. **Carbohydrate Polymers** 167: 317-325.

Brand-Williams, W., M.-E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology** 28(1): 25-30.

Cao, Y., Z. Chen, L. Sun, Y. Lin, Y. Yang, X. Cui and C. Wang. 2022. Herb polysaccharide-based drug delivery system: fabrication, properties, and applications for immunotherapy. **Pharmaceutics** 14(8): 1703-1736.

Chitprasert, P. and P. Sutaphanit. 2014. Holy basil (*Ocimum sanctum* Linn.) essential oil delivery to swine gastrointestinal tract using gelatin microcapsules coated with aluminum carboxymethyl cellulose and beeswax. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 62(52): 12641-12648.

Forssten, S.D., W. Morovic and P. Nurminen. 2023. An *in vitro* model of the chicken gastrointestinal tract with special emphasis to the cecal microbiota. **Poultry Science** 102(6): 1-11.

Gawad, R. and V. Fellner. 2019. Evaluation of glycerol encapsulated with alginate and alginate-chitosan polymers in gut environment and its resistance to rumen microbial degradation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences** 32(1): 72-81.

Keawchaoon, L. and R. Yoksan. 2011. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids Surf. B Biointerfaces** 84(1): 163-171.

Kleemann, C., R. Schuster, E. Rosenecker I. Selmer, I. Smirnova and U. Kulozik. 2020. *In-vitro*-digestion and swelling kinetics of whey protein, egg white protein and sodium caseinate aerogels. **Food Hydrocolloids** 101: 1-9.

Liu, T., J. Zhou, W. Li, X. Rong, Y. Gao, L. Zhao, Y. Fan, J. Zhang, C. Ji and Q. Ma. 2020. Effects of sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on growth performance, antioxidant function and immune response of broilers. **Animal Nutrition** 6(1): 39-46.

Ribeiro, A., G. Ruphuy, J.C. Lopes, M.M. Dias, L. Barros, F. Barreiro and I.C. Ferreira. 2015. Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. **Food Chemistry** 188(2015): 612-618.

Thuekeaw, S., K. Angkanaporn, S. Chirachanchai and C. Nuengjamnong. 2021. Dual pH responsive via double–layered microencapsulation for controlled release of active ingredients in simulated gastrointestinal tract: a model case of chitosan-alginate microcapsules containing basil oil (*Ocimum basilicum* Linn.). **Polymer Degradation and Stability** 191(2021): 1-8.

Zhao, P., X. Piao, L. Pan, Z. Zeng, Q. Li, X. Xu and H. Wang. 2017. Forsythia suspensa extract attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in rats via promoting antioxidant defense mechanisms. **Animal Science Journal** 88(6): 873-881.

Zhou, D., F. Zhou, J. Ma and F. Ge. 2019. Microcapsulation of *Ganoderma Lucidum* spores oil: evaluation of its fatty acids composition and enhancement of oxidative stability. **Industrial Crops and Products** 131: 1-7.