

การเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยใช้กรดฟีนอลิกและการบ่ม

นางสาวอัญชญา อินสวาสดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF SOY PROTEIN ISOLATE FILM USING PHENOLIC ACIDS AND CURING

Miss Anchana Insaward



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยใช้กรดฟีนอลิกและการบ่ม
โดย	นางสาวอัญชญา อินสวาสดี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.ธนจันท์ มหาวนิช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.ตรีช กวักเพ็ญอยู่)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.ธนจันท์ มหาวนิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรางคณา สมพงษ์)

ัญญา อินสวาสดี : การเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยใช้กรดฟีนอลิกและการบ่ม (PREPARATION OF SOY PROTEIN ISOLATE FILM USING PHENOLIC ACIDS AND CURING) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์, 116 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมกรดฟีนอลิกและการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยในขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาผลของชนิด สถานะออกซิเดชัน และความเข้มข้นของกรดฟีนอลิก แปรชนิดของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ กรดเฟรูลิก กรดแคฟเฟอิก กรดแกลลิก แปรสถานะออกซิเดชันเป็น 2 สถานะ ได้แก่ ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ และแปรความเข้มข้นเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าการเติมกรดฟีนอลิกทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงสุด รองลงมาได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกและกรดเฟรูลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ และโดยทั่วไปความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น การติดตามรูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ปริมาณ available lysine และซัลโฟไฮดริลทั้งหมด รวมทั้งการเกิดพันธะ C-N ยืนยันการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิก การเติมกรดฟีนอลิกทำให้ฟิล์มมีความโปร่งแสงและค่า L^* ลดลง ในขณะที่มีค่า a^* และ b^* รวมถึงความชื้นสัมพัทธ์ลดลง การเติมกรดฟีนอลิกทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นและความสามารถในการละลายน้ำลดลง แต่สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำอาจลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง สำหรับพฤติกรรมการดูดความชื้นของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% ที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าฟิล์มมีเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นแบบ type II และวอเตอร์แอกทิวิตีมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาด ($p > 0.05$) ในขั้นตอนที่สองเป็นการศึกษาผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% โดยแปรอุณหภูมิเป็น 25, 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส และแปรระยะเวลาการบ่มเป็น 5, 10 และ 15 ชั่วโมง พบว่าการบ่มด้วยความร้อนทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยฟิล์มมีค่าความต้านทานแรงดึงขาดสูงชันเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงชันซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.54 เมกะพาสคาล ซึ่งสูงกว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกและไม่บ่มด้วยความร้อนถึง 861% ในส่วนของการยืดตัวถึงจุดขาด พบว่าในช่วงอุณหภูมิการบ่ม 25-70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาด ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามการบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ฟิล์มที่ได้มีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำกว่าฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) รูปแบบของแถบโปรตีนที่ติดตามด้วย SDS-PAGE ยืนยันการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างที่บ่มด้วยความร้อน การบ่มความร้อนส่งผลให้ความโปร่งแสงและ L^* ลดลง และค่า a^* รวมทั้ง b^* เพิ่มขึ้น มุมสัมพัทธ์ลดลงและความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น โดยทั่วไปพบว่าการบ่มด้วยความร้อนมีผลค่อนข้างน้อยต่อสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ แต่ทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติชอบน้ำมากขึ้น นอกจากนี้ฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนทุกตัวอย่างมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่โดยทั่วไปพบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ สำหรับพฤติกรรมการดูดความชื้นของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าเมื่อวอเตอร์แอกทิวิตีเพิ่มขึ้น ความต้านทานแรงดึงขาดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าการยืดตัวถึงจุดขาดไม่เปลี่ยนแปลงตามวอเตอร์แอกทิวิตีที่เปลี่ยนแปลงไป

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ นิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5572174223 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: BIO-DEGRADABLE FILM / PROTEIN FILM / FERULIC ACID / CAFFEIC ACID / GALLIC ACID / INCUBATION

ANCHANA INSAWARD: PREPARATION OF SOY PROTEIN ISOLATE FILM USING PHENOLIC ACIDS AND CURING. ADVISOR: THANACHAN MAHAWANICH, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D., 116 pp.

This study aimed to explore the effect of phenolic acid addition and heat curing on properties of soy protein isolate film. In the first part of the study, the effect of type, oxidation state and concentration of phenolic acid on properties of soy protein film was investigated. Ferulic, caffeic, and gallic acid, either oxidized or unoxidized, were added to the film at 0.5, 1.0 and 1.5% by weight of soy protein isolate. Phenolic acid addition was found to pose a significant effect ($p \leq 0.05$) on tensile strength and elongation at break of the film. Gallic-containing films exhibited the highest tensile strength and elongation at break, followed by those added with caffeic and ferulic acid, respectively. Oxidized phenolic acids were shown to produce a film with higher tensile strength and elongation at break than their unoxidized counterparts. In addition, tensile strength and elongation at break were found to increase with increasing phenolic acid concentration. Protein pattern as monitored using SDS-PAGE, as well as available lysine and total sulfhydryl contents, and also a decrease in FTIR transmittance in the C-N stretching region reflected protein cross-linking in the phenolic-containing samples. Phenolic acid addition resulted in the film with decreasing transparency and L^* with a concomitant increase in a^* , b^* and chroma. Phenolic-containing films demonstrated increasing surface hydrophobicity and decreasing water solubility. Water vapor permeability either decreased or unchanged upon adding phenolic acid. Regarding to moisture sorption behavior at a constant temperature of 25 °C, the film containing 1.5% oxidized gallic acid demonstrated type II isotherm. Water activity was found to significantly affect tensile strength ($p \leq 0.05$) but posed no effect on elongation at break ($p > 0.05$). The second part of this research dealt with the investigation of the effect of heat curing on properties of the film added with either oxidized or unoxidized gallic acid at 1.5% level. Curing temperature was varied as 25, 50, 70 and 90 °C with 5, 10 and 15 hr curing time. Heat curing significantly affected tensile strength ($p \leq 0.05$) which was found to increase with increasing curing temperature and time. The film containing 1.5% oxidized gallic acid and cured at 90 °C for 15 hr demonstrated the highest tensile strength of 6.54 MPa which was 861% greater than that of the non-phenolic added, non-heat treated soy protein film. Curing temperature and time posed no effect on elongation at break in the 25-70 °C range ($p > 0.05$). However, 90 °C curing caused a reduction in elongation at break of the film. Protein pattern as monitored using SDS-PAGE affirmed protein cross-linking in the heat cured samples. The heat treated films exhibited a decrease in transparency and L^* with an increase in a^* and b^* . Decreasing hue angle and increasing chroma were observed in the heat cured films. In general, heat curing posed a minimal effect on water vapor permeability. However, it was demonstrated that the heat cured film exhibited an increase in surface hydrophilicity. All heat cured samples exhibited lower water solubility as compared to the control ($p \leq 0.05$). However, soluble solids content seemed to be unaffected by curing temperature and time. Pertaining to the moisture sorption behavior, the film with 1.5% oxidized gallic and cured at 70 °C for 10 hr exhibited decreasing tensile strength with increasing water activity. However, elongation at break was found to be unaffected by changing water activity.

Department: Food Technology

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยความกรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี
ยิ่งจากอาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
เกียรติศักดิ์ ดวงมัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการ
แก้ปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนดูแลเอาใจใส่และช่วยเหลือมาโดยตลอด รวมถึง
แก้ไขวิทยานิพนธ์และบทความวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์อันประกอบด้วย รอง
ศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ รองศาสตราจารย์ ดร. วราภรณ์ สมพงษ์ และ
อาจารย์ ดร. ดริษ กวักเพชुरย์ ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งคำแนะนำและข้อเสนอแนะต่าง ๆ อันเป็น
ประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ ที่ให้ความอนุเคราะห์
การใช้ตู้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์

ขอขอบพระคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความ
อนุเคราะห์การใช้เครื่องมือวัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร.
วาณี ชนเห็นชอบ และ คุณภัทรินทร์ ลีลาภวัฒน์ สำหรับคำแนะนำในการใช้เครื่องมือดังกล่าว

ขอขอบพระคุณ คุณสุภารัตน์ แสงเนตร และ คุณบุรฉัตร ศรีทองแท้ สำหรับคำแนะนำ
เกี่ยวกับการวิเคราะห์โปรตีน

ขอขอบคุณพี่ น้อง เพื่อนนิสิตภาควิชาเทคโนโลยีอาหารที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ
และกำลังใจมาโดยตลอด รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการ
อำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้องที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุน
ตลอดมาจนประสบความสำเร็จในการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 फिल्मย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (bio-degradable film).....	3
2.2 โพรตีนถั่วเหลือง.....	5
2.2.1 องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลือง.....	5
2.2.2 การเกิดเป็นฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลือง.....	9
2.3 การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน.....	10
2.3.1 วิธีทางเคมี.....	10
2.3.2 วิธีทางชีวเคมี.....	13
2.3.3 วิธีทางกายภาพ.....	16
2.3.3.1 การฉายรังสี.....	16
2.3.3.2 การบ่มด้วยความร้อน (heat curing).....	17
2.4 สารประกอบพีนอลิก.....	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	25
3.1 วัสดุดิบและสารเคมี.....	25
3.1.1 วัสดุดิบ.....	25

3.1.2 สารเคมี.....	25
3.2 อุปกรณ์.....	28
3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	29
3.3.1 การศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	29
3.3.1.1 ความหนา.....	32
3.3.1.2 สมบัติเชิงกล.....	34
3.3.1.3 รูปแบบของแถบโปรตีน.....	35
3.3.1.4 ปริมาณ available lysine.....	38
3.3.1.5 ปริมาณซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl content).....	39
3.3.1.6 พันธะคาร์บอน-ไนโตรเจน (C-N bond).....	39
3.3.1.7 ค่าสี.....	40
3.3.1.8 ความโปร่งแสง.....	40
3.3.1.9 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ.....	40
3.3.1.10 มุมสัมผัส (contact angle) ระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	41
3.3.1.11 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility).....	41
3.3.1.12 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง.....	42
3.3.1.13 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น (moisture sorption isotherm).....	42
3.3.2 การศึกษาผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ เติมกรดฟีนอลิก.....	43
3.3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	43
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	44
4.1 ผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	44
4.1.1 ความหนา.....	44

4.1.2 ความต้านทานแรงดึงขาด	46
4.1.3 การยืดตัวถึงจุดขาด	49
4.1.4 รูปแบบของแถบโปรตีน	50
4.1.5 ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮไดรลทั้งหมด.....	52
4.1.6 พันธะ C-N.....	55
4.1.7 ค่าสี.....	56
4.1.8 ความโปร่งแสง.....	59
4.1.9 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ.....	60
4.1.10 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	61
4.1.11 ความสามารถในการละลายน้ำ.....	64
4.1.12 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง.....	65
4.1.13 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น.....	66
4.2 ผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก	68
4.2.1 ความหนา.....	69
4.2.2 ความต้านทานแรงดึงขาด	70
4.2.3 การยืดตัวถึงจุดขาด	72
4.2.4 รูปแบบของแถบโปรตีน	74
4.2.5 ค่าสี.....	76
4.2.6 ความโปร่งแสง.....	80
4.2.7 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ.....	81
4.2.8 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	83
4.2.9 ความสามารถในการละลายน้ำ.....	84
4.2.10 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง.....	84

4.2.11 เส้นพฤติกรรมการดูความขึ้น.....	85
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	88
รายการอ้างอิง.....	91
ภาคผนวก.....	102
ภาคผนวก ก ข้อมูลเฉพาะของผลิตภัณฑ์.....	103
ภาคผนวก ข กราฟการทดลองและกราฟเทียบมาตรฐาน.....	104
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง.....	106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	116



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณและองค์ประกอบของส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองที่ละลายน้ำได้ซึ่งแยกโดยอัลตราเซนตริฟิวเกชัน (ultracentrifugation).....	5
ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับเตรียมสารละลายฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	33
ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE	37
ตารางที่ 4.1 ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแกลลิก (GA) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	54
ตารางที่ 4.2 ค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแกลลิก (GA) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด	57
ตารางที่ 4.3 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ มุมสัมผัส และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแกลลิก (GA) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	62
ตารางที่ 4.4 ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5%.....	68
ตารางที่ 4.5 ค่าสี L^* , a^* และ b^* ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ.....	78

ตารางที่ 4.6 มุมสี่และความเข้มสี่ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ..... 79

ตารางที่ 4.7 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ มุมสัมพัทธ์ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ..... 82

ตารางที่ 4.8 ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งนำไปทำให้อยู่ในสมดุลวอเตอร์แอททิวิตีต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 87

ตารางที่ ค.1 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุริก (FE) กรดเพรุริกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 106

ตารางที่ ค.2 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุริก (FE) กรดเพรุริกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 107

ตารางที่ ค.3 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุริก (FE) กรดเพรุริกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 108

ตารางที่ ค.4 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุริก (FE) กรดเพรุริกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 109

ตารางที่ ค.5 พฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% 110

ตารางที่ ค.6 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่
ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ 111

ตารางที่ ค.7 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และ
กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็น
ระยะเวลาต่างๆ..... 112

ตารางที่ ค.8 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และ
กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็น
ระยะเวลาต่างๆ..... 113

ตารางที่ ค.9 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และ
กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็น
ระยะเวลาต่างๆ..... 114

ตารางที่ ค.10 พฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรด
แกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีน และบ่มที่อุณหภูมิ 70
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง..... 115

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 โครงสร้างสามมิติ (ซ้าย) และแบบจำลอง (ขวา) ของโครงสร้างจตุรภูมิของไกลซีนิน.....	7
รูปที่ 2.2 โครงสร้างสามมิติ (ซ้าย) และแบบจำลอง (ขวา) ของโครงสร้างจตุรภูมิของเบตา-คอนไกลซีนิน.....	8
รูปที่ 2.3 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ.....	9
รูปที่ 2.4 การเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยฟอร์มัลดีไฮด์ (ก) ฟอร์มัลดีไฮด์เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน (ข) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับโปรตีนอีกสายหนึ่งเกิดเป็นพันธะเชื่อมข้ามเมทิลีน (methylene cross-link) ระหว่างสายโปรตีน และ (ค) การเชื่อมข้ามระหว่างโซ่ข้างของไลซีนกับอะตอมไนโตรเจนของพันธะเพปไทด์โดยฟอร์มัลดีไฮด์	11
รูปที่ 2.5 การเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยกลูทาราลดีไฮด์ (ก) มอนอเมอร์กลูทาราลดีไฮด์ (monomeric glutaraldehyde) (ข) กลูทาราลดีไฮด์เกิดพอลิเมอร์เชนซ์ภายใต้ภาวะที่เป็นต่าง และ (ค) พอลิเมอร์ของกลูทาราลดีไฮด์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับหมู่อะมิโนของโปรตีนทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายโปรตีน.....	12
รูปที่ 2.6 การเกิดพันธะเชื่อมข้ามไดไทโรซีนที่เร่งโดยเพอร์ออกซิเดสในขณะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์.....	14
รูปที่ 2.7 การเกิดพันธะไอโซเพปไทด์เอพซิลอน-(แกมมา-กลูตามิล)ไลซีน ที่เร่งโดยแทรนส์กลูตามิเนส	15
รูปที่ 2.8 (ก) ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไรออล-ไดซัลไฟด์ (ข) การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของพอลิเพปไทด์	17
รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของพอลิเพปไทด์กับกรดฟีนอลิก.....	20
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก	30

รูปที่ 4.1 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด..... 45

รูปที่ 4.2 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 46

รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของ (ก) กรดเพรูลิก (ข) กรดแคฟเฟอิก และ (ค) กรดแกลลิก..... 48

รูปที่ 4.4 การยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด..... 50

รูปที่ 4.5 รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) ฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% (FE) ฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (OX-FE) ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (CA) ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (OX-CA) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (GA) และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (OX-GA) รวมทั้งรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ (GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5%..... 52

รูปที่ 4.6 สเปกตรัม FTIR ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5 และ 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม..... 56

รูปที่ 4.7 ลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก ทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 and 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด..... 58

รูปที่ 4.8 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด 59

- รูปที่ 4.9 รูปร่างของหยดน้ำบนผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด..... 63
- รูปที่ 4.10 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5 และ 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ถ่ายที่กำลังขยาย 750 เท่า..... 65
- รูปที่ 4.11 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5%..... 67
- รูปที่ 4.12 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ..... 69
- รูปที่ 4.13 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ..... 71
- รูปที่ 4.14 การยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ 73
- รูปที่ 4.15 รูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 1) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ช่องที่ 2) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 3) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 4) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ช่องที่ 5) และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 6)..... 75
- รูปที่ 4.16 ลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ 77

รูปที่ 4.17 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ.....	80
รูปที่ 4.18 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ.....	83
รูปที่ 4.19 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ถ่ายที่กำลังขยาย 750 เท่า.....	85
รูปที่ 4.20 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีน และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง.....	86
รูปที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดพีนอลิกที่เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	104
รูปที่ ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry	105

บทที่ 1

บทนำ

ในระยะเวลาที่ผ่านมาพอลิเมอร์ฐานปิโตรเลียม (petroleum-based polymer) ได้รับความนิยมในการนำมาใช้ผลิตวัสดุบรรจุภัณฑ์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสมบัติเด่นทั้งด้านความแข็งแรง ความสามารถในการต้านทานการซึมผ่านของสารต่างๆ และลักษณะปรากฏ อย่างไรก็ตามจากปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมชั้นวิกฤติในปัจจุบัน ทั้งผู้บริโภคและผู้ผลิตต่างตระหนักถึงปัญหาที่เกี่ยวข้องกับการจัดการขยะที่ย่อยสลายได้ยากและหันมาให้ความสนใจกับวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้เพิ่มขึ้น (González et al., 2011) พอลิเมอร์ชีวภาพจากธรรมชาติ (naturally occurring biopolymer) หลายชนิดมีศักยภาพในการนำมาผลิตเป็นฟิล์มย่อยสลายได้ โปรตีนถั่วเหลืองเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีสมบัติในการเกิดเป็นฟิล์ม (Su et al., 2010) โดยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติเด่นในด้านการต้านทานการซึมผ่านของออกซิเจนและไขมัน อย่างไรก็ตามฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองยังคงมีข้อจำกัดสำคัญในด้านความแข็งแรงเชิงกลและการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำ (Kim et al., 2002; Chambi and Grosso, 2006) จากสาเหตุดังกล่าวส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองยังไม่แพร่หลายนัก

การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนสามารถทำได้โดยส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี อาทิเช่น การใช้สารเคมีเชื่อมข้าม และการใช้ความร้อน ที่ผ่านมาสสารเคมีที่นิยมใช้ ได้แก่ สารกลุ่มแอลดีไฮด์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการเชื่อมข้ามโปรตีน อย่างไรก็ตามได้มีการตระหนักถึงความเป็นพิษของแอลดีไฮด์ จึงมีความพยายามในการหาสารอื่นที่สามารถทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนแต่มีความปลอดภัยสูงกว่า สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้ (Strauss and Gibson, 2004; Hoque et al., 2011) โดยจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล รวมทั้งสถานะออกซิเดชัน

(state of oxidation) ของสารประกอบพีนอลิกส่งผลต่อความสามารถของสารประกอบดังกล่าวในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน (Rawel et al., 2002)

การบ่มสารละลายฟิล์มหรือแผ่นฟิล์มด้วยความร้อน (heat curing) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน โดยในภาวะที่เป็นต่าง ความร้อนจะช่วยเร่งให้เกิดการแลกเปลี่ยนไธออล-ไดซัลไฟด์ (thiol-disulfide exchange) ส่งผลให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายโปรตีนเพิ่มขึ้น (Jensen, 1959; Gennadios et al., 1996; Jangchud and Chinnan, 1999) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิด ความเข้มข้น และสถานะออกซิเดชันของกรดพีนอลิก รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มแผ่นฟิล์มต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีน ถั่วเหลืองสกัด



บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 พิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (bio-degradable film)

ฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ หมายถึง ฟิล์มที่สามารถเปลี่ยนแปลงสมบัติเนื่องจากปัจจัยแวดล้อมต่างๆ เช่น ภาวะที่เป็นกรด ภาวะที่เป็นด่าง ความชื้น ออกซิเจน และแสง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี และย่อยสลายทางชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่ก่อให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม (Ahmadi et al., 2012) จึงช่วยลดภาระในการจัดการขยะ ฟิล์มย่อยสลายได้ที่นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารมีสมบัติเชิงหน้าที่เช่นเดียวกับฟิล์มที่เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์โดยทั่วไป กล่าวคือ ควบคุมการซึมผ่านของไอน้ำ แก๊สออกซิเจน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ไขมัน รวมถึงสารที่เป็นส่วนประกอบของกลิ่นรสเพื่อคงลักษณะเดิมของผลิตภัณฑ์ไว้ (Ghanbarzadeh and Oromiehi, 2008) ฟิล์มย่อยสลายได้สามารถช่วยป้องกันหรือชะลอการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นกับผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น การเกิดออกซิเดชันของไขมัน และการเปลี่ยนแปลงของสี นอกจากนี้ยังอาจทำหน้าที่ให้ความคงตัว (integrity) แก่ผลิตภัณฑ์ (Ghanbarzadeh et al., 2007)

พอลิเมอร์ชีวภาพจากธรรมชาติ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีน หลายชนิดมีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นฟิล์มย่อยสลายได้ ในขณะที่ลิกนินมักไม่ใช้ผลิตเป็นฟิล์มโดยตรง แต่จะใช้เป็นสารเคลือบย่อยสลายได้ (bio-degradable coating) หรือใช้ร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์หรือโปรตีนในการผลิตฟิล์มประกอบ (composite film)

พอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจำนวนมาก พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟิล์มย่อยสลายได้ ได้แก่ เซลลูโลสและเซลลูโลสดัดแปร สตาร์ชและสตาร์ชดัดแปร ฟลาวัวร์ ไคโทซาน คาราจีแนน แอลจีแนนต กัมอะราบิก และเพกทิน (Mariniello et al., 2003; Dias et al., 2010; Kanatt et al., 2012; Harper et al.,

2013; Ma et al., 2013; Pelissari et al., 2013; Soazo et al., 2013) พอลิเมอร์พอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดสามารถชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด แต่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำที่ต่ำ (Yu et al., 2013) เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยหมู่เคมีที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic group) เป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตามฟิล์มชนิดนี้สามารถช่วยชะลอการสูญเสียความชื้นของอาหารได้เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลาที่จำกัด

สำหรับโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ประกอบด้วยอะมิโนต่างๆ จำนวนมาก จึงมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ฟิล์มโปรตีนมีสมบัติเด่นในด้านการต้านทานการซึมผ่านของไขมัน ออกซิเจนและแก๊สอื่นๆ รวมทั้งไอของสารอินทรีย์ อย่างไรก็ตามฟิล์มโปรตีนมีข้อจำกัดสำคัญในด้านการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำเช่นเดียวกับฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีนที่มีการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟิล์ม ได้แก่ โปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนถั่วลิสง ชีน (โปรตีนข้าวโพด) กลูเตน เวย์โปรตีนและเคซีน เจลาติน และโปรตีนไข่ขาว (Kunte et al., 1997; Lim et al., 1998; Rayner et al., 2000; Hernández-Muñoz et al., 2004a; Ghanbarzadeh and Oromiehi, 2008; Ma et al., 2013; Soazo et al., 2013)

ลิพิดเป็นกลุ่มของสารที่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ปีโตรเลียมอีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม แต่ละลายได้อย่างจำกัดในน้ำ ลิพิดมักนำมาใช้ในการผลิตสารเคลือบ เนื่องจากลิพิดมีขั้วต่ำจึงมีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของความชื้นได้ดี นอกจากนั้นยังใช้เพื่อป้องกันการเสียดสีของอาหารในระหว่างการขนส่ง และรวมถึงป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลบนผิวของผลไม้เพื่อยืดอายุหลังการเก็บเกี่ยว (Han and Aristippos, 2005) นอกจากนี้ใช้ในรูปสารเคลือบแล้ว ยังมีการใช้ลิพิดร่วมกับพอลิเมอร์ชีวภาพอื่น เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีน ในการผลิตฟิล์มประกอบ เพื่อปรับปรุงสมบัติการป้องกันการซึมผ่านของความชื้นของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์และฟิล์มโปรตีน ลิพิดที่นำมาใช้ในการผลิตฟิล์มและสารเคลือบ ได้แก่ น้ำมันและไขมันจากพืชและสัตว์ แวกซ์ แล็ก (lac) และน้ำมันหอมระเหย (Kamper and Fennema, 1984; Gontard et al., 1994; McHugh and Krochta,

1994; Shellhammer and Krochta, 1997; Yang and Paulson, 2000; Morillon et al., 2002; Peroval et al., 2002; Fernandez et al., 2006; Han et al., 2006; Perez-Mateos et al., 2007; Bourtoom and Chinnan, 2009; Monedero et al., 2009; Kokoszka et al., 2010; Wu et al., 2010; Zahedi et al., 2010)

2.2 โพรตีนถั่วเหลือง

2.2.1 องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 40% โดยน้ำหนักแห้ง (Wijeratne, 1993a) โดยมีโกลบูลินเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถแยกออกได้เป็น 4 ส่วนหลัก (fraction) ตามอัตราการตกตะกอน (sedimentation rate) ได้แก่ 2s, 7s, 11s และ 15s ส่วน 2s และ 7s ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ในขณะที่ส่วน 11s และ 15s ประกอบด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียว (Wijeratne, 1993b) ตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองส่วนต่างๆ

ตารางที่ 2.1 ปริมาณและองค์ประกอบของส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองที่ละลายน้ำได้ซึ่งแยกโดยอัลตราเซนตริฟิวเกชัน (ultracentrifugation)

ส่วน	ปริมาณ (%)	องค์ประกอบ	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)
2s	22	สารยับยั้งทริปซิน	8,000-21,500
		ไซโตโครม-ซี	12,000
7s	37	ฮีแมกกลูทีนิน	110,000
		ไลพอกซีจีเนส	102,000
		เบตา-แอมิเลส	61,000
		โกลบูลิน 7s	180,000-210,000
11s	31	โกลบูลิน 11s	350,000
15s	11	-	600,000

ที่มา: Wijeratne (1993b)

ส่วน 2s มีปริมาณประมาณ 22% ของโปรตีนถั่วเหลือง ประกอบด้วยสารยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) ไซโตโครม-ซี และโปรตีนไม่ทราบชนิด (unidentified protein) (Wijeratne, 1993b) สำหรับสารยับยั้งทริปซินมีผลทำให้ความสามารถในการย่อยของโปรตีน (protein digestibility) ของสัตว์ที่บริโภคถั่วเหลืองลดลง และก่อให้เกิดความชะงักงันของการเจริญเติบโต (growth depression) และการขยายขนาดของตับอ่อน (pancreas enlargement) อย่างไรก็ตามสารยับยั้งทริปซินสามารถถูกทำลายได้โดยความร้อน สำหรับถั่วเหลืองเมล็ดแห้ง การต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที เพียงพอที่จะทำลายสารยับยั้งทริปซิน ในขณะที่หากเป็นเมล็ดถั่วเหลืองที่แช่น้ำแล้ว การลวกในน้ำเดือดเพียง 5 นาทีก็เพียงพอที่จะทำลายสารยับยั้งทริปซิน (Weingartner, 1993)

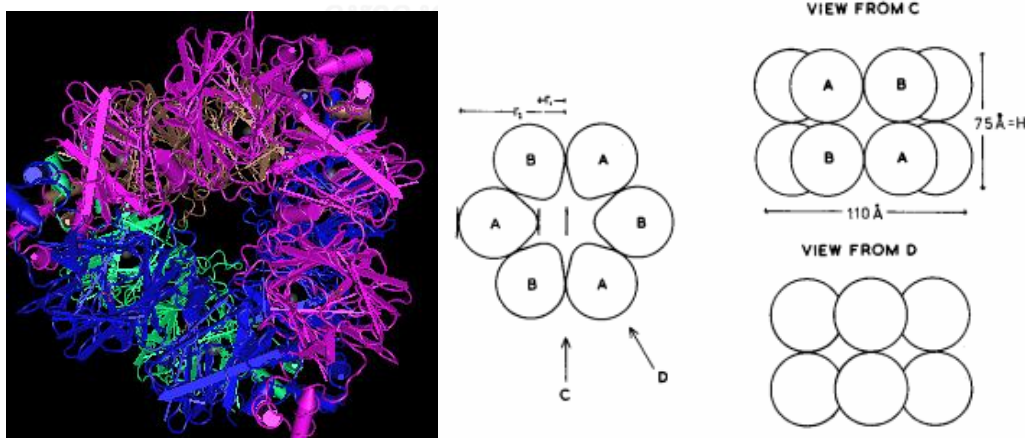
ส่วน 7s มีปริมาณประมาณ 37% ของโปรตีนถั่วเหลือง ประกอบด้วยฮีแมกกลูทีนิน (hemagglutinin) ไลพอกซีจีเนส เบตา-แอมิเลส และโกลบูลิน 7s (7s globulin) หรือเบตา-คอนไกลซินิน (β -conglycinin) (Wijeratne, 1993b) โกลบูลิน 7s นี้มีปริมาณประมาณ 50% ของโปรตีนส่วน 7s ทั้งหมด สำหรับฮีแมกกลูทีนินแม้จะเป็นพิษต่อสัตว์ แต่ก็สามารถถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อน (Weingartner, 1993)

ส่วน 11s ประกอบด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียว คือ โกลบูลิน 11s (11s globulin) หรือไกลซินิน (glycinin) มีปริมาณประมาณ 31% ของโปรตีนทั้งหมด และส่วน 15s เป็นพอลิเมอร์ของไกลซินิน (Wijeratne, 1993b)

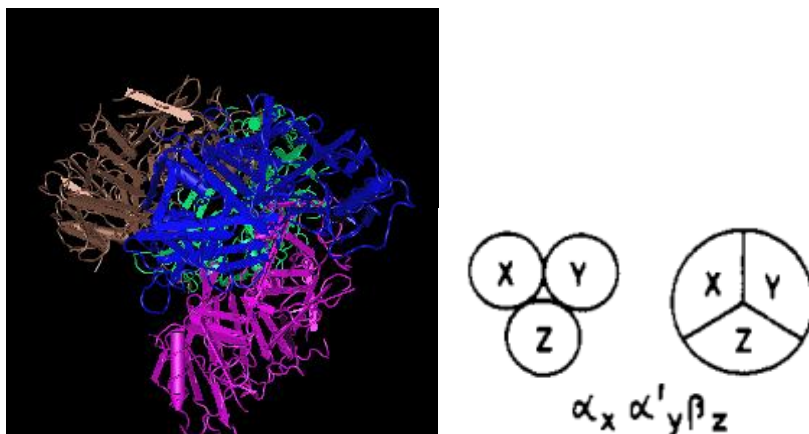
จะเห็นได้ว่าไกลซินินและเบตา-คอนไกลซินินเป็นโปรตีนหลักในถั่วเหลือง งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนถั่วเหลืองจึงมุ่งเน้นที่โปรตีนสองชนิดนี้ ทั้งไกลซินินและเบตา-คอนไกลซินินมีโครงสร้างถึงระดับจตุรภูมิ (quaternary structure) โดยไกลซินินเป็นโปรตีนในกลุ่มลิวจิน (legumin) ซึ่งได้แก่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 300-400 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยคู่ของสายโซ่พอลิเพปไทด์ชนิดกรด (acidic polypeptide chain) หรือสายโซ่เอ (A chain) และสายโซ่

พอลิเพปไทด์ชนิดเบส (basic polypeptide chain) หรือสายโซ่บี (B chain) จำนวน 6 คู่ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (SS) ในรูปแบบ A-SS-B โดยสายโซ่เอมีน้ำหนักประมาณ 34-44 กิโลดาลตัน และสายโซ่บีมีน้ำหนักประมาณ 20 กิโลดาลตัน พันธะไดซัลไฟด์นี้สามารถถูกทำลายได้โดยความร้อน หรือสารที่รีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide reductant) เช่น เบตา-เมอร์แคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol) (Ly et al., 1998; Liu, 1999)

สำหรับเบตา-คอนไกลูซินินเป็นโปรตีนในกลุ่มวิซิลิน (vicilin) ซึ่งได้แก่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 150-250 กิโลดาลตัน เบตา-คอนไกลูซินินเป็นไตรเมอร์และ/หรือเฮกซะเมอร์ในสารละลาย และอาจปรากฏในทั้งสองรูปแบบในเมล็ดถั่วเหลือง โปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วย โดยสองในสามหน่วยเป็นเพปไทด์ที่มีลักษณะคล้ายกัน เรียกหน่วยย่อยแอลฟาและแอลฟา-ไพรม์ ซึ่งมีน้ำหนัก 58 และ 57 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ส่วนอีกหน่วยย่อยเป็นไกลโคซิเลเตดเพปไทด์ (glycosylated peptide) ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตประมาณ 5% เรียกว่าหน่วยย่อยเบตา มีน้ำหนัก 42 กิโลดาลตัน (Ly et al., 1998; Liu, 1999) รูปที่ 2.1 และ 2.2 แสดงโครงสร้างจตุรภูมิของไกลูซินินและเบตา-คอนไกลูซินิน ตามลำดับ



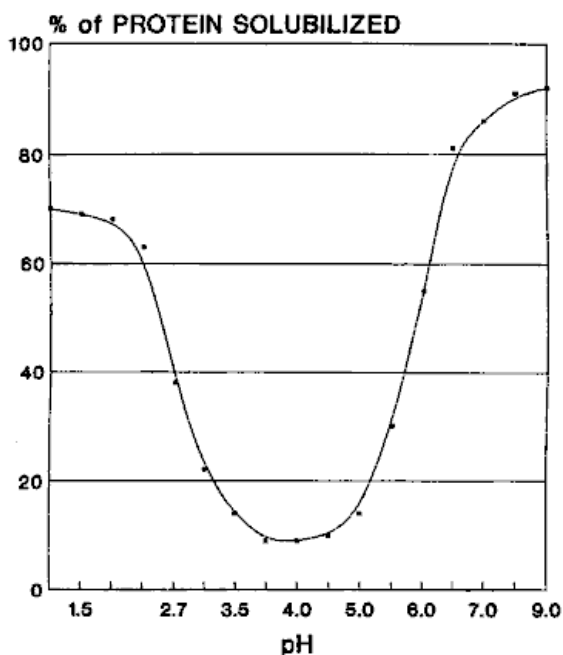
รูปที่ 2.1 โครงสร้างสามมิติ (ซ้าย) และแบบจำลอง (ขวา) ของโครงสร้างจตุรภูมิของไกลูซินิน
ที่มา: Badley et al. (1975); NCBI (2014b)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างสามมิติ (ซ้าย) และแบบจำลอง (ขวา) ของโครงสร้างจตุรภูมิของเบตา-คอนไกลซินิน

ที่มา: Thanh and Shibasaki (1978); NCBI (2014a)

เช่นเดียวกับโปรตีนอื่นๆ ค่าความเป็นกรดต่างมีผลสำคัญต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลือง โดยโปรตีนถั่วเหลืองมีจุดไอโซอิเล็กทริกอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.2-4.6 (Wijeratne, 1993b) ซึ่งที่จุดไอโซอิเล็กทริกนี้โปรตีนจะมีความสามารถในการละลายต่ำที่สุด (รูปที่ 2.3) ที่ค่าความเป็นกรดต่างสูงขึ้น ความสามารถในการละลายจะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 9 โปรตีนอาจเกิดการเสียสภาพได้ (Wijeratne, 1993b) ส่วนที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก โปรตีนถั่วเหลืองสามารถละลายได้มากขึ้น และที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำมาก โปรตีนอาจเกิดการเสียสภาพได้เช่นกัน



รูปที่ 2.3 ความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองที่ค่าความเป็นกรดต่างๆ
ที่มา: Berk (1992)

2.2.2 การเกิดเป็นฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลือง

โปรตีนถั่วเหลืองมีความสามารถในการเกิดเป็นฟิล์ม ฟองเต้าหู้ (yuba) เป็นตัวอย่างหนึ่งของฟิล์มบริโภคนได้จากโปรตีนถั่วเหลือง โดยฟองเต้าหู้มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักและมีเม็ดไขมันขนาดเล็ก (เล็กกว่า 0.5 ไมโครเมตร) กระจายอยู่ในเมทริกซ์ของโปรตีน (Okamoto, 1978) โครงสร้างของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนที่เร่งโดยความร้อน โดยพันธะไดซัลไฟด์ พันธะไฮโดรเจน และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก เป็นอันตรกิริยาหลักที่ทำให้เกิดโครงสร้างของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง (Liu, 1999) การให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนถั่วเหลืองจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพบางส่วน (partially denatured) เกิดคลายตัวของโปรตีน ทำให้หมู่ซัลไฟไฮดริลและหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ซึ่งเดิมอยู่ด้านในของโครงสร้างสามมิติปรากฏขึ้นที่ด้านนอกและเกิดอันตรกิริยาได้ นอกจากอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนแล้ว โปรตีนในเมทริกซ์ของฟิล์มยังสามารถเกิดอันตรกิริยากับสารอื่นในระบบ เช่นในระบบที่มีแคลเซียม อาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่

คาร์บอกซิลที่แตกตัว (-COO^-) ของโปรตีนกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เกิดเป็น electrostatic-metal ion bridge ($\text{-COO}^- - \text{Ca}^{2+} - \text{OOC}^-$)

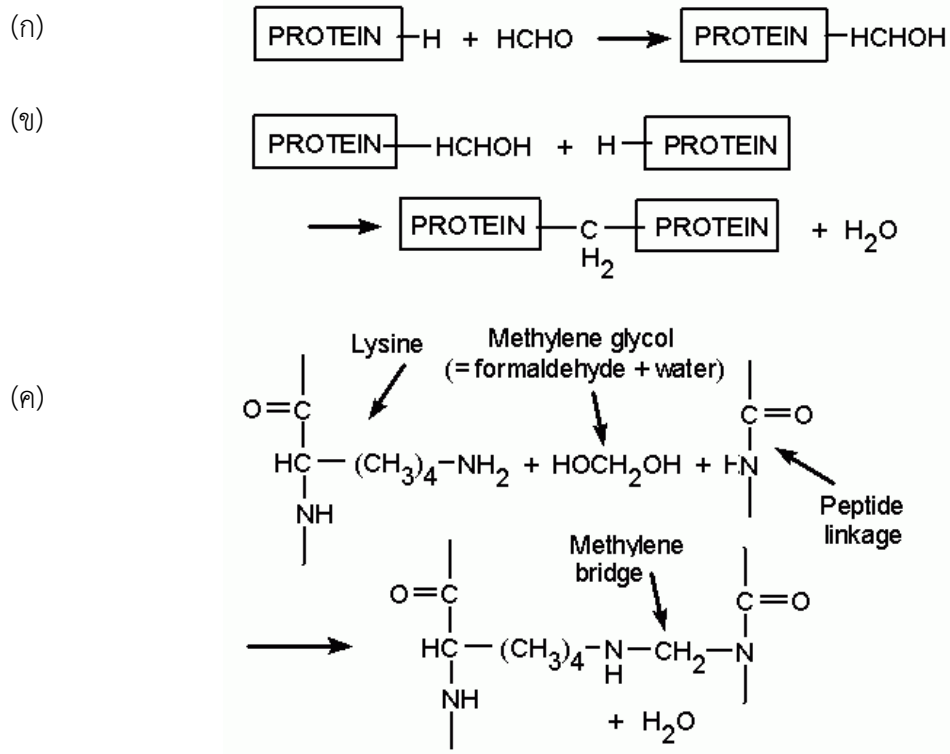
2.3 การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน

ฟิล์มโปรตีนโดยทั่วไปรวมถึงฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีข้อจำกัดสำคัญในด้านสมบัติเชิงกล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มพลาสติก ซึ่งเป็นสาเหตุให้ฟิล์มโปรตีนยังไม่มีการใช้งานแพร่หลายนัก จึงได้มีความพยายามในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนโดยการส่งเสริมการเชื่อมข้ามของโปรตีนด้วยเทคนิคต่างๆ ดังนี้

2.3.1 วิธีทางเคมี

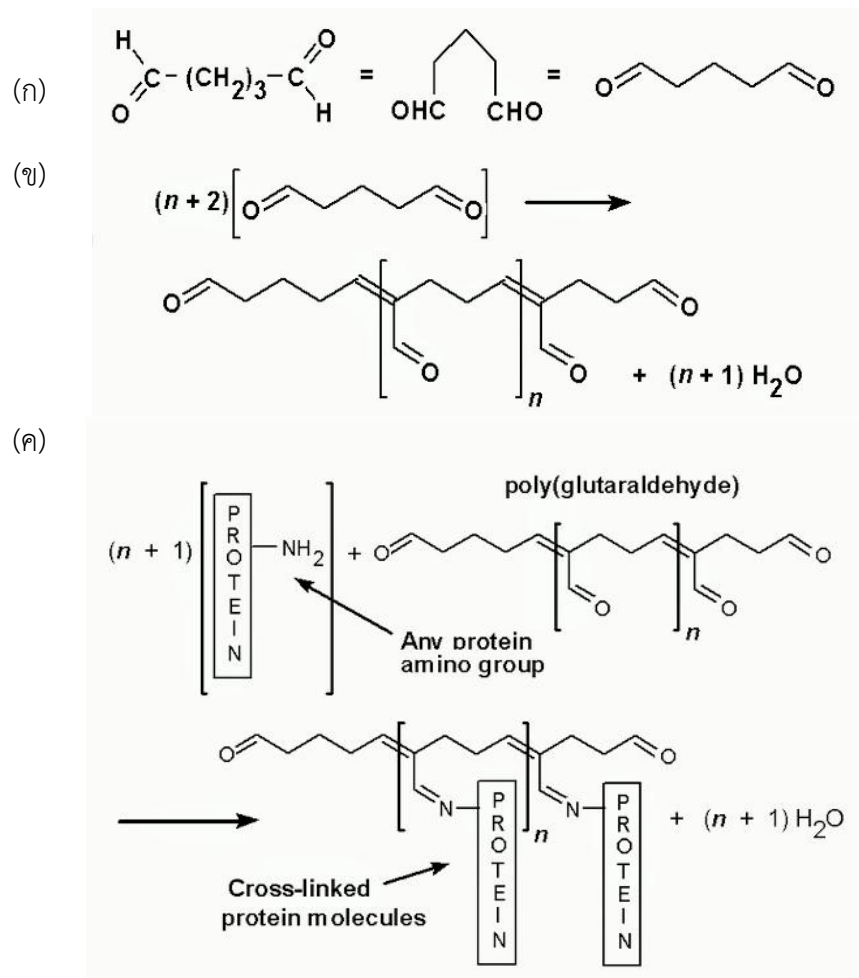
สารเคมีหลายชนิดสามารถเชื่อมข้ามโปรตีน ที่ผ่านมาสารเคมีที่นิยมใช้ในการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน ได้แก่ แอลดีไฮด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น ฟอรัมาลดีไฮด์ และ กลูทาราลดีไฮด์ เนื่องจากแอลดีไฮด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนปฐมภูมิและหมู่ซัลฟ์ไฮดริล เกิดเป็นพันธะเชื่อมข้ามภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Feeney et al., 1975) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนกับฟอรัมาลดีไฮด์และกลูทาราลดีไฮด์ แสดงดังรูปที่ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ

(Orliac et al., 2002) ศึกษาผลของการเติมแอลดีไฮด์ ได้แก่ ฟอรัมาลดีไฮด์ ไกลออกซัล (glyoxal) และกลูทาราลดีไฮด์ ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนสกัดจากเมล็ดทานตะวัน (sunflower protein isolate) โดยแปรความเข้มข้นของแอลดีไฮด์เป็น 1-6% โดยน้ำหนักของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่าในช่วงความเข้มข้นของแอลดีไฮด์เท่ากับ 1.5-3% ฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) สูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมแอลดีไฮด์ โดยฟิล์มที่เติมกลูทาราลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมฟอรัมาลดีไฮด์และไกลออกซัล ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของแอลดีไฮด์สูงกว่า 3% ตัวอย่างฟิล์มกลับมีความต้านทานแรงดึงขาดลดลง ผู้วิจัยอธิบายว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ แอลดีไฮด์สามารถเชื่อมข้ามโปรตีนได้ แต่เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น แอลดีไฮด์จะรวมตัวกันเองทำให้การเชื่อมข้ามโปรตีนลดลง



รูปที่ 2.4 การเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยฟอร์มาลดีไฮด์ (ก) ฟอร์มาลดีไฮด์เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน (ข) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับโปรตีนอีกสายหนึ่งเกิดเป็นพันธะเชื่อมข้ามเมทิลีน (methylene cross-link) ระหว่างสายโปรตีน และ (ค) การเชื่อมข้ามระหว่างโซ่ข้างของไลซีนกับอะตอมไนโตรเจนของพันธะเพปไทด์โดยฟอร์มาลดีไฮด์

ที่มา: Kiernan (2000)



รูปที่ 2.5 การเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยกลูทาราลดีไฮด์ (ก) มอนอเมอร์กลูทาราลดีไฮด์ (monomeric glutaraldehyde) (ข) กลูทาราลดีไฮด์เกิดพอลิเมอร์เชนภายใต้ภาวะที่เป็นต่าง และ (ค) พอลิเมอร์ของกลูทาราลดีไฮด์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับหมู่อะมิโนของโปรตีนทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายโปรตีน

ที่มา: Kiernan (2000)

Hernández-Muñoz et al. (2004a) ศึกษาผลของแอลดีไฮด์ต่อสมบัติของฟิล์มกลูเตนิน แอลดีไฮด์ที่ศึกษา ได้แก่ ฟอรัมาลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล แปรความเข้มข้นของแอลดีไฮด์เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 4 และ 8% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมแอลดีไฮด์ โดยฟิล์มที่เติม

พอร์มาลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกลูทาราลดีไฮด์และไกลออกซัล ตามลำดับ ส่วนการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break) และสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability) พบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีการยืดตัวถึงจุดขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยฟิล์มที่เติมพอร์มาลดีไฮด์มีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ กลูทาราลดีไฮด์และไกลออกซัล ตามลำดับ สำหรับสภาพให้ซึมผ่านของไอน้ำพบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์ทั้งสามชนิดมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ซึ่งมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม

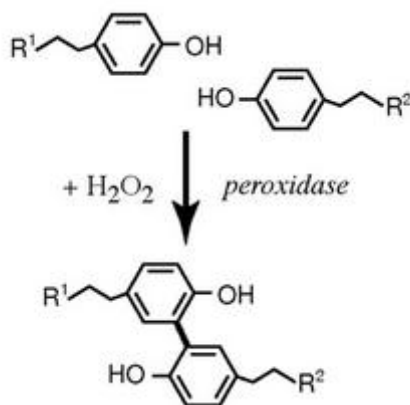
แม้ว่าแอลดีไฮด์จะมีประสิทธิภาพสูงในการทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีน แต่มีความกังวลเกี่ยวกับความเป็นพิษของแอลดีไฮด์ (Galietta et al., 1998) O'Brien et al. (2005) รายงานว่าแอลดีไฮด์อาจมีความสัมพันธ์กับภาวะภูมิไวเกิน (allergic hypersensitivity) ความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง โรคตับ โรคเบาหวาน ภาวะความดันโลหิตสูง โรคความเสื่อมทางระบบประสาท (neurodegenerative disease) โรคที่สัมพันธ์กับความชรา (aging-associated disease) และอาจเป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (teratogenicity) จึงมีความสนใจในการใช้สารเคมีอื่นที่มีความปลอดภัยสูงกว่า เช่น สารประกอบฟีนอลิก ในการเป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีน ดังจะกล่าวถึงรายละเอียดต่อไปในหัวข้อ 2.4

2.3.2 วิธีทางชีวเคมี

เอนไซม์บางชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลของโปรตีน ตัวอย่างของเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน ได้แก่ เพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) และทรานส์กลูตามิเนส (EC 2.3.2.13)

เพอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของหน่วยย่อยไทโรซีนของโปรตีนในขณะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เกิดการรวมตัวกัน (condensation)

ได้เป็นพันธะเชื่อมข้ามไดไทโรซีน (dityrosine cross-link) ระหว่างสายโปรตีน (Michon et al., 1997) (รูปที่ 2.6)

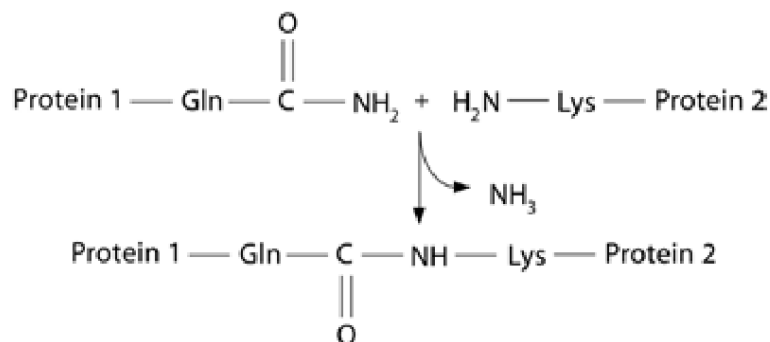


รูปที่ 2.6 การเกิดพันธะเชื่อมข้ามไดไทโรซีนที่เร่งโดยเพอร์ออกซิเดสในขณะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ที่มา: Wong and Wessel (2008)

Stuchell and Krochta (1994) ใช้เพอร์ออกซิเดสปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1000 พร้อมทั้งเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าฟิล์มที่เติมเพอร์ออกซิเดสมีค่ายังก์มอดูลัสเพิ่มขึ้น ในขณะที่มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์

แทรนส์กลูตามิเนส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มแทรนส์เฟอเรส เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิลของแกมมา-คาร์บอกซีเอมิโดของหน่วยย่อยกลูตามีนไปยังหมู่อะมิโนปฐมภูมิหรือเอพซิลอน-อะมิโนของหน่วยย่อยไลซีนเกิดเป็นพันธะไอโซเพปไทด์เอพซิลอน-(แกมมา-กลูตามิล)ไลซีน [ϵ -(γ -glutamyl)lysine isopeptide bond] เชื่อมข้ามระหว่างสายโปรตีน (Ha and Luchi, 2003) (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 การเกิดพันธะไอโซเพปไทด์เอพซิลอน-(แกมมา-กลูตามิล)ไลซีน ที่เร่งโดยแทรนส์กลูตามิเนส
ที่มา: Wittaya (2012)

Mariniello et al. (2003) ศึกษาผลของการเติมแทรนส์กลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์มเชิงประกอบจากเพกทินและพลาว์ธั่วเหลือง พบว่าฟิล์มที่เติมแทรนส์กลูตามิเนสมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้น ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมเอนไซม์ทำให้ฟิล์มที่ได้มีโครงสร้างของพื้นผิวของฟิล์มเรียบเนียนมากขึ้น

Jiang et al. (2007) ศึกษาผลของการเติมแทรนส์กลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง โดยเติมแทรนส์กลูตามิเนสเข้มข้น 4-60 หน่วย/กรัมโปรตีน พบว่าการเติมเอนไซม์เข้มข้น 4-10 หน่วย/กรัมโปรตีน มีผลทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงกว่า 20 หน่วย/กรัมโปรตีน พบว่าฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดลดลง ในด้านการยืดตัวถึงจุดขาดพบว่า มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จากการวัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม พบว่ามุมสัมผัสมีค่ามากขึ้น ซึ่งแสดงว่าพื้นผิวของฟิล์มมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

Su et al. (2007) ศึกษาผลของการเติมแทรนส์กลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์ม 3 ชนิด ได้แก่ ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ฟิล์มประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและพลาว์ธั่วเหลือง และฟิล์มประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและเวย์โปรตีน โดยแปรความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น

0-20 หน่วย/กรัม พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มมีค่าสูงขึ้น

2.3.3 วิธีทางกายภาพ

2.3.3.1 การฉายรังสี

การฉายรังสีเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน เนื่องจากสามารถกระตุ้นทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโนและทำให้เกิดการรวมตัวกัน (Galiotta et al., 1998) โดย Fujimori (1965) เสนอว่ากรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างชนิดแอมโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน และเฟนิลอะลานีน สามารถดูดกลืนรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต และรังสีแกมมาได้

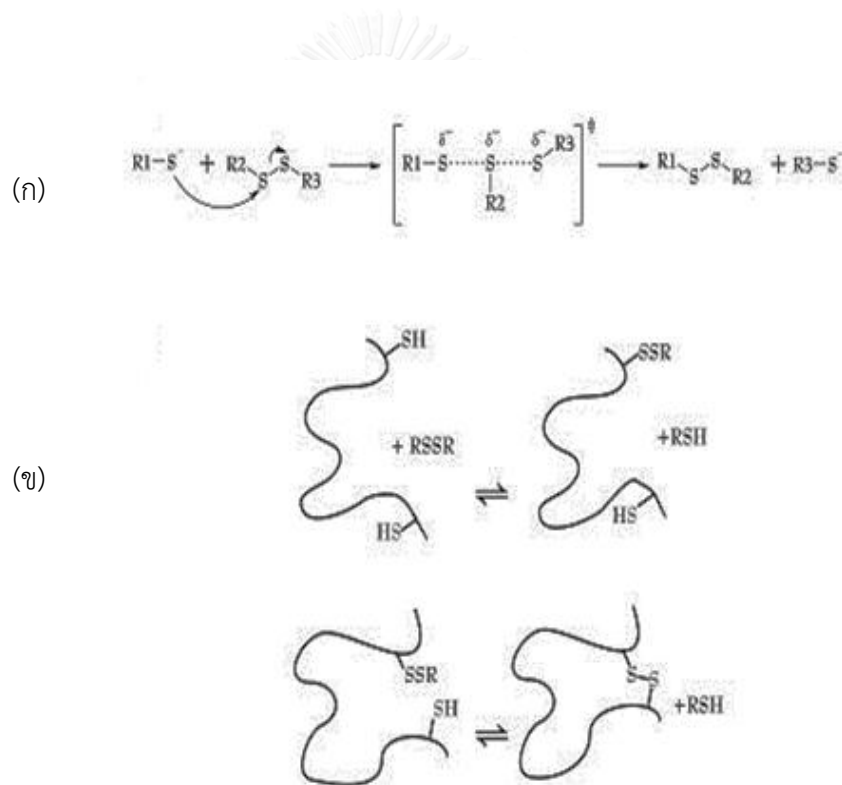
Ressouany et al. (2000) รายงานว่าฟิล์มเคซีนเนตที่ฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีดูดกลืน 64 กิโลเกรย์ มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ผ่านการฉายรังสี

Salmoral et al. (2000) ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเขียวสกัด พลาเวร์ถั่วเขียว โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และพลาเวร์ถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาณรังสีดูดกลืน 50 กิโลเกรย์ พบว่าฟิล์มทั้งสี่ชนิดมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงขึ้น ในขณะที่มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลง

Sabato et al. (2005) ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนจากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยแปรปริมาณรังสีดูดกลืนเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 25, 50, 100, 150 และ 200 กิโลเกรย์ พบว่าฟิล์มที่ฉายรังสีมีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ฉายรังสี และการใช้ปริมาณรังสีดูดกลืน 100 กิโลเกรย์ส่งผลให้ฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงที่สุด อย่างไรก็ตามพบว่าการฉายรังสีไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์ม ($p > 0.05$) ผู้วิจัยอธิบายว่ารังสีชนิดไอออไนซิง (ionizing radiation) เช่น รังสีแกมมาสามารถส่งเสริมการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้

2.3.3.2 การบ่มด้วยความร้อน (heat curing)

การบ่มแผ่นฟิล์ม (dry film) หรือสารละลายฟิล์ม (film-forming solution) ด้วยความร้อนเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีรายงานว่าสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโพรตีนได้ (Gennadios et al., 1996; Jangchud and Chinnan, 1999) โดยการให้ความร้อนในภาวะที่เป็นต่างสามารถส่งเสริมปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจน-ไดซัลไฟด์ ส่งผลให้เกิดการเชื่อมข้ามของโพรตีน (Jensen, 1959) ซึ่งจะช่วยให้เกิดเป็นโครงสร้างของฟิล์มที่แข็งแรงมากขึ้น รูปที่ 2.8 แสดงปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจน-ไดซัลไฟด์ และการเชื่อมข้ามของโพรตีน



รูปที่ 2.8 (ก) ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจน-ไดซัลไฟด์ (ข) การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของพอลิเพปไทด์ ที่มา: Ágoston et al. (2005)

Gennadios et al. (1996) ศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มโพรตีนถั่วเหลือง สกัดที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลา

ในการบ่มเพิ่มสูงขึ้น พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้น ในขณะที่การยึดตัวถึงจุดขาด สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ และความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) มีค่าลดลง

Jangchud and Chinnan (1999) ศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มโปรตีนถั่วลิสงเข้มข้น (peanut protein concentrate) ที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มสูงขึ้น พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำและสภาพให้ซึมผ่านได้ของออกซิเจน (oxygen permeability) มีค่าลดลง

Kim et al. (2002) ศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่ความดัน 101.3, 81.32 และ 61.32 กิโลพาสคาล พบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น พิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่การยึดตัวถึงจุดขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มด้วยความร้อน และเมื่อความดันลดลง พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่การยึดตัวถึงจุดขาด ความสามารถในการละลายน้ำ และสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลง นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิในการบ่ม โดยแปรอุณหภูมิเป็น 2 ระดับ ได้แก่ 80 และ 90 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา 2-24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพิ่มสูงขึ้น พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้น ในขณะที่การยึดตัวถึงจุดขาด สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ และความสามารถในการละลายน้ำ มีค่าลดลง

Hernández-Muñoz et al. (2004b) ศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มกลูเตนินด้วยความร้อน โดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 6 ระดับ ได้แก่ 40, 55, 70, 85, 95 และ 115 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มสูงขึ้น พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น แต่มีการยึดตัวถึงจุดขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลง

2.4 สารประกอบฟีนอลิก

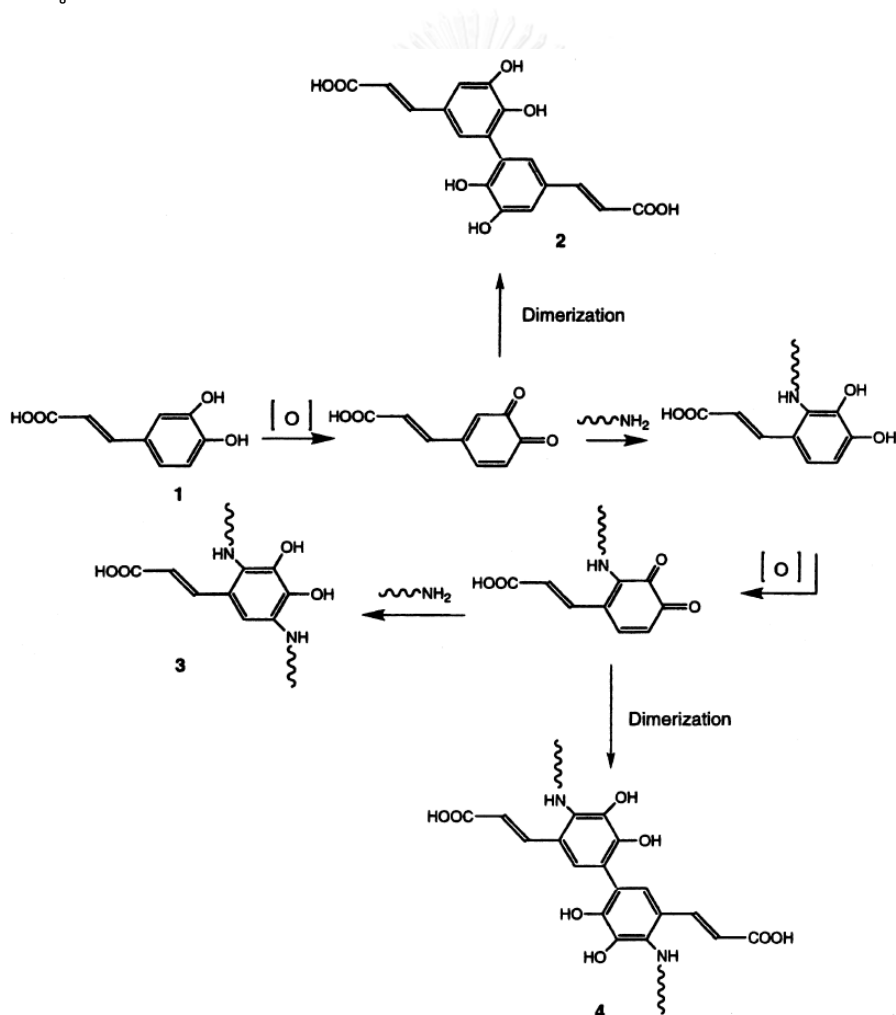
สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดพบตามธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช โดยสารดังกล่าวเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอไลซึมตามธรรมชาติของพืช สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยวงแอรโรมาติกและมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อยหนึ่งหมู่ (Balange and Benjakul, 2009) นอกจากนี้ยังรวมถึงอนุพันธ์ของสารดังกล่าว โดยมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่างๆ ที่ในตำแหน่งออร์โธ (ortho) เมตา (meta) หรือพารา (para) (O'Connell and Fox, 2001)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นกลุ่มขนาดใหญ่ประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ ตั้งแต่กลุ่มที่มีโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างซับซ้อนเป็นโมเลกุลพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ เช่น ลิกนิน สารประกอบฟีนอลิกอาจจำแนกประเภทได้ตามจำนวนวงฟีนอลิก ได้แก่ (1) มอนอไซคลิกฟีนอล (monocyclic phenol) ที่มีวงฟีนอลิกเพียง 1 วง ได้แก่ ฟีนอล แคทีคอล (catechol) ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) และพารา-ไฮดรอกซีซินนามิกแอซิด (*p*-hydroxycinnamic acid) (2) ไดไซคลิกฟีนอล (dicyclic phenol) ประกอบด้วยวงฟีนอลิก 2 วง ได้แก่ ฟลาโวนอยด์ และกรดเอลลาจิก (ellagic acid) และ (3) พอลิไซคลิกฟีนอลหรือพอลิฟีนอล (polycyclic phenol or polyphenol) ประกอบด้วยวงฟีนอลิกมากกว่า 2 วง ได้แก่ ลิกนิน และธีอะฟลาบิน (theaflavin) สารประกอบฟีนอลิกในพืชสามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้ โดยการเกิดปฏิกิริยาขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้าง นอกจากนี้ตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลยังอาจมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกกับสารอื่นด้วย (Rawel et al., 2002; Arcan and Yemenicioglu, 2011)

สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่เคมีต่างๆ ของโปรตีนได้ และบางชนิดสามารถทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้ (Rawel et al., 2002) โดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะ

โควาลেন্ট (Strauss and Gibson, 2004; Hoque et al., 2011) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์แล้วยังสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้ด้วย (Balage and Benjakul, 2009; Prodpran et al., 2012)

สารประกอบฟีนอลิกที่มีสถานะออกซิเดชันต่างกันอาจมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้แตกต่างกัน Rawel et al. (2002) เสนอว่าความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนขึ้นอยู่กับความสามารถของสารนั้นที่จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นสารประกอบควิโนน รูปที่ 2.9 แสดงกลไกการเชื่อมข้ามโปรตีนโดยสารประกอบฟีนอลิก



รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของพอลิเพปไทด์กับกรดฟีนอลิก

ที่มา: Strauss and Gibson (2004)

จากรูปที่ 2.9 กรดฟีนอลิก (1) สามารถถูกออกซิไดส์ไปเป็นสารประกอบควิโนน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเป็นได้ทั้งแบบอาศัยเอนไซม์หรือไม่อาศัยเอนไซม์ ควิโนนที่เกิดขึ้นอาจเกิดไดเมอไรเซชันได้เป็นไดเมอร์ของควิโนน (2) ปฏิกิริยาไดเมอไรเซชันนี้ทำให้เกิดการรวมตัวของควิโนนโดยไม่เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน ในอีกทางหนึ่งควิโนนสามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่อะมิโนหรือหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของโปรตีนได้ (ในรูปที่ 2.9 แสดงในรูปหมู่อะมิโน) เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ชนิด C-N (ในกรณีที่เกิดอันตรกิริยากับหมู่อะมิโน) หรือ C-S (ในกรณีที่เกิดอันตรกิริยากับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล) พร้อมทั้งได้เป็นไฮโดรควิโนนกลับมา (regeneration of hydroquinone) ไฮโดรควิโนนที่เกิดขึ้นนี้สามารถถูกออกซิไดส์และเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนหรือหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของโปรตีนได้อีก ผลที่ได้คือการเชื่อมข้ามโปรตีนโดยสารประกอบฟีนอลิก (3) และในอีกทางหนึ่งควิโนนที่เกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนหรือหมู่ซัลฟ์ไฮดริลแล้วสามารถเกิดไดเมอไรเซชันทำให้เกิดการเชื่อมข้ามโปรตีนสองสายเข้าด้วยกัน (4)

ได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิกมากมาย Fox (2001) ศึกษาปฏิกิริยาของแคทีคิน (catechin) กับโปรตีนนม พบว่าการเกิดปฏิกิริยาทำให้เกิด อันตรกิริยาหลัก ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก โดยหมู่ไฮดรอกซิลของแคทีคินสามารถเกิดอันตรกิริยากับ β -CN ของโพรตีน

Rawel et al. (2002) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์กับโปรตีนถั่วเหลือง 2 ชนิด ได้แก่ ไกลซินิน และสารยับยั้งทริปซิน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณทริปโตเฟน ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ปริมาณไลซีน และปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริล นอกจากนี้ยังใช้เทคนิคสเปกโทรโฟโตเมทรีในการติดตามการถูกจับของสารประกอบฟีนอลิกโดยโปรตีน และใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลามิดเจลอิลเล็กโทรโฟเรซิส (SDS-PAGE) ในการติดตามการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน พบว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดเกิดปฏิกิริยากับหมู่ต่างๆ ของโปรตีนได้ดีมากน้อยแตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น เควอเซทิน (quercetin) และไมริเซทิน (myricetin) เกิดปฏิกิริยาได้ดีกับทริปโตเฟน หมู่อะมิโน ไลซีน และหมู่ซัลฟ์ไฮดริล นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเชื่อม

ข้ามของโปรตีนถั่วเหลือง ในขณะที่เอพิเจนิน (apigenin) เกิดปฏิกิริยาได้กับหมู่แอลฟา-อะมิโนและหมู่ซัลฟ์ไฮดริล แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับทริปโตแฟนและหมู่เอพซิลอน-อะมิโนของไลซีน นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนถั่วเหลือง

Ou et al. (2005) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกรดเพรูลิกและค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายฟิล์มต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด แปรความเข้มข้นของกรดเพรูลิกเป็น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/100 กรัม และแปรค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายฟิล์มเป็น 8 และ 9 พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมกรดเพรูลิก โดยภาวะที่ให้ฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด (2.6 เมกะพาสคาล) คือ การเติมกรดเพรูลิกเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/100 กรัม และค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายฟิล์มเท่ากับ 9 ผู้วิจัยอธิบายว่ากรดเพรูลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้และทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน ฟิล์มจึงมีโครงสร้างที่แข็งแรงมากขึ้น

Balange and Benjakul (2009) ศึกษาผลของชนิดของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และแคทีคิน ต่อสมบัติของเจลซูริมิปลาแมคเคอเรล (*Rastrelliger kanagurta*) แปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในช่วง 0.05-0.25% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมกรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และแคทีคิน ที่ออกซิไดส์ ปริมาณ 0.4, 0.5, 0.5 และ 0.1% ส่งผลให้ค่าแรงที่ทำให้เจลแตกออก (breaking force) เพิ่มขึ้น 45.0, 115.0, 46.1 และ 70.3% ตามลำดับ โดยความแข็งแรงของเจลที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการเชื่อมข้ามโปรตีนโดยสารประกอบฟีนอลิก

Salgado et al. (2010) ผลิตฟิล์มย่อยสลายได้จากโปรตีนเมล็ดทานตะวันสกัดที่เตรียมโดยวิธีแตกต่างกัน โดยโปรตีนเมล็ดทานตะวันสกัดที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในช่วง 1.82-2.51% พบว่าตัวอย่างฟิล์มจากโปรตีนเมล็ดทานตะวันสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกแตกต่างกันไม่มี

ความแตกต่างกันในด้านสมบัติเชิงกลและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าฟิล์มที่เตรียมจากโปรตีนเมล็ดทานตะวันสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่ามีความชุ่มสูงกว่า

Arcan and Yemenicioglu (2011) ศึกษาผลของการเติมกรดฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ต่อสมบัติของฟิล์มขึ้น กรดฟีนอลิกที่ศึกษาได้แก่ กรดแกลลิก พารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิด (*p*-hydroxybenzoic acid) และกรดเพรูลิก ฟลาโวนอยด์ที่ศึกษาได้แก่ แคลทีคิน ฟลาโวน (flavone) และเคอเซทิน โดยแปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเป็น 0.75, 1.5, 2.25, 3.0, 4.5 และ 6.0 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตรของแผ่นฟิล์ม พบว่าการเติมกรดแกลลิก แคลทีคิน กรดเพรูลิก และพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิดเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ตารางเซนติเมตรของแผ่นฟิล์ม สามารถช่วยปรับปรุงความยืดหยุ่นของฟิล์มขึ้นได้ ส่วนการเติมฟลาโวนและเคอเซทินไม่มีผลต่อความยืดหยุ่นของฟิล์ม การเติมกรดเพรูลิกและพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิดทำให้ฟิล์มดูดน้ำได้มากและฟิล์มมีลักษณะบวมพองและสูญเสียโครงสร้างเมื่อนำไปแช่ในน้ำกลั่น ในทางตรงกันข้ามฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกและแคลทีคินยังคงรักษาลักษณะโครงสร้างของฟิล์มไว้ได้ดีเมื่อนำไปแช่ในน้ำกลั่น สำหรับสมบัติด้านการต้านออกซิเดชันพบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกและฟิล์มที่เติมแคลทีคินมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเท่ากับ 21.0 และ 86.2 ไมโครโมลโทร็อกซ์/ตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และ *Campylobacter jejuni* อย่างไรก็ตามฟิล์มที่เติมแคลทีคินไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้

Prodpran et al. (2012) ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก แคลทีคิน กรดเพรูลิก และกรดแทนนิก ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่มีการยืดตัวถึงจุดขาดลดลง นอกจากนี้ผู้วิจัยรายงานว่ากรดแทนนิกมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเชื่อมข้ามโปรตีน ซึ่งเห็นได้จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่

ลดลงมากที่สุดและการลดลงของความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) ที่ติดตามโดย SDS-PAGE โดยพบว่าระดับการเชื่อมข้ามของโปรตีนเพิ่มขึ้นสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น

Xiong et al. (2012) ศึกษาผลของการเติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (oxidized caffeic acid) ต่อสมบัติของฟิล์มเวียโปรตีน โดยแปรความเข้มข้นของกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เป็น 2 และ 4% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ช่วยส่งเสริมการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยพันธะไดซัลไฟด์และพันธะโควาเลนต์อื่นๆ ซึ่งทำให้ฟิล์มมีเสถียรภาพต่อความร้อนเพิ่มขึ้น การเติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ทำให้ฟิล์มมีความโปร่งแสงและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์

Friesen et al. (2014) ศึกษาผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิก 2 ชนิดคือ รุทีน (rutin) และอีพิแคทีคิน (epicatechin) เข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง ได้แก่ สมบัติเชิงกล ความทึบแสง และสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ พบว่าฟิล์มที่เติมรุทีนและฟิล์มที่เติมอีพิแคทีคินมีความต้านทานแรงดึงขาดเท่ากับ 35.1 และ 22.1 เมกะพาสคาล ตามลำดับ สูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีความต้านทานแรงดึงขาดเท่ากับ 9.3 เมกะพาสคาล สำหรับสมบัติด้านการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำ พบว่าตัวอย่างควบคุมมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำเท่ากับ 1.7 กรัม มิลลิเมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง กิโลพาสคาล ในขณะที่ฟิล์มที่เติมรุทีนและฟิล์มที่เติมอีพิแคทีคินมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำเท่ากับ 1.2 และ 2.3 กรัม มิลลิเมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง กิโลพาสคาล ตามลำดับ ในด้านความทึบแสงพบว่าฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลิกทั้งสองชนิดความทึบแสงเพิ่มขึ้น

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัสดุดิบ

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (ปริมาณโปรตีน 92.0% โดยฐานเปียก) (บริษัท ไมท์ดี อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ)

3.1.2 สารเคมี

2-mercaptoethanol, AR grade (Merck, Billerica, MA)

5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Acetic acid, glacial, AR grade (QRëCTM, Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

Acrylamide gel, 40% solution, AR grade (Pharmacia, Uppsala, Sweden)

Ammonium persulfate, AR grade (USB, Cleveland, OH)

Bovine serum albumin, AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Bromophenol blue, AR grade (USB, Cleveland, OH)

Caffeic acid, AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Coomassie brilliant blue R-250, AR grade (Fluka, Buchs, Switzerland)

Copper (II) sulfate, AR grade (Univar, Seven Hills, Australia)

Ethanol, 95%, AR grade (Carlo Erba Reagenti, Ronado, Italy)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Ferulic acid, AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, AR grade (Carlo Erba Reagenti, Ronado, Italy)

Gallic acid, AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Glycerol (Ajax Finechem, New South Wales, Australia)

Glycine, AR grade (USB, Cleveland, OH)

Hydrochloric acid, AR grade (QRëCTM, Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

Hydrogen peroxide, 30%, AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Lithium chloride, AR grade (Ajax Finechem, New South Wales, Australia)

Magnesium chloride hexahydrate, QRëC™, AR grade (Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

Magnesium nitrate hexahydrate, QRëC™, AR grade (Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), AR grade (USB, Cleveland, OH)

Potassium acetate, AR grade (Ajax Finechem, New South Wales, Australia)

Potassium carbonate, QRëC™, AR grade (Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

Potassium chloride, AR grade (VWR International, Poole, England)

Potassium iodide, AR grade (Ajax Finechem, New South Wales, Australia)

Potassium nitrate, QRëC™, AR grade (Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

Potassium tartrate, AR grade (Univar, Seven Hills, Australia)

Protein molecular weight marker, AR grade (Sigma, Munich, Germany)

Sodium bicarbonate, AR grade (Univar, Seven Hills, Australia)

Sodium carbonate anhydrous, AR grade (Univar, Seven Hills, Australia)

Sodium deoxycholate, AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Sodium dodecyl sulfate (SDS), AR grade (USB, Cleveland, OH)

Sodium hydroxide, anhydrous, AR grade (QRëCTM, Quality Reagent Chemical, Pulau Pinang, Malaysia)

Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Tris-(hydroxymethyl-methylamine), AR grade (Fisher Scientific, Leicestershire, UK)

Urea, AR grade (Univar, Seven Hills, Australia)

3.2 อุปกรณ์

Chroma meter, model CR-400 (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan)

Contact angle measuring instrument, model OCA15EC (Data Physics Instrument, Filderstadt, Germany)

Digital thickness gauge, model 7301 (Mitutoyo, Tokyo, Japan)

Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), model Spectrum One (Perkin Elmer, Waltham, MA)

Gel electrophoresis system, model miniVE (Hoefer, Holiston, MA)

Homogenizer, model X10/25 (Ystral, Ballrechten-Dottingen, Germany)

Laboratory hot air oven, model 5200 (Kubota, Fujioka, Japan)

Laboratory shaker, model INNOVA 2050 (New Brunswick Scientific, Edison, NJ)

Refrigerated microcentrifuge, model 22R (Hettich, Buckinghamshire, England)

Scanning electron microscope, model JSM-5410LV (JEOL, Tokyo, Japan)

UV/Vis spectrophotometer, model V-530 (Jasco, Easton, MD)

Ultrasonic bath (model 136H, Fisher Scientific, Schwerte, Germany)

Universal materials testing machine, model 5565 (Instron, Norwood, MA)

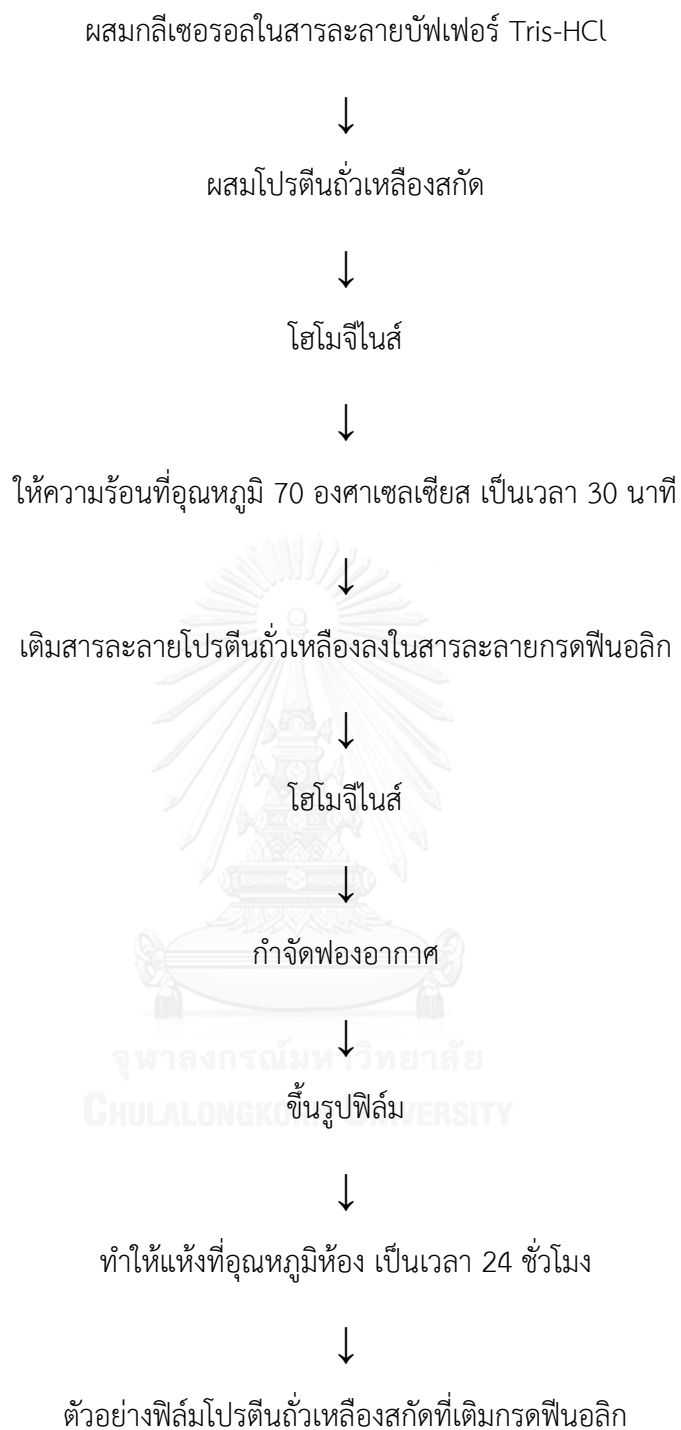
Water bath, model SW23 (Julabolabortechnik, Seelbach, Germany)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของชนิด สถานะออกซิเดชัน และความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด แปรชนิดของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก แปรสถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกเป็น 2 สถานะ ได้แก่ ไม่ออกซิไดส์ และออกซิไดส์ และแปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยใช้รหัสตัวอย่างดังต่อไปนี้ ตัวอย่างที่เติมกรดเพรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์ (FE) ตัวอย่างที่เติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) ตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์ (CA) ตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) ตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ (GA) และตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) กำหนดให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกเป็นตัวอย่างควบคุม (control) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทดลอง 3 ซ้ำ

เตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Jiang et al. (2007) (รูปที่ 3.1) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีกลีเซอรอลเข้มข้น 55% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเป็นพลาสติกไซเซอร์ (ปริมาณส่วนผสมสำหรับเตรียมตัวอย่างฟิล์มแสดงดังตารางที่ 3.1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ homogenizer (รุ่น X10/25, Ystral, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 22,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายฟิล์มไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก

สำหรับสารละลายกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ เตรียมโดยชั่งกรดฟีนอลิกในปริมาณที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0) ที่อุณหภูมิห้อง

สำหรับสารละลายกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ ในขั้นตอนแรกเป็นการติดตามการเกิดออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกเพื่อกำหนดระยะเวลาที่ต้องใช้ในการออกซิไดส์กรดฟีนอลิก เตรียมสารละลายกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ou et al. (2005) ชั่งกรดฟีนอลิกในปริมาณที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0) ที่อุณหภูมิห้อง เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/สารละลาย 100 กรัม ติดตามการเกิดออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่กรดฟีนอลิกแต่ละชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (321, 327 และ 220 นาโนเมตร สำหรับกรดเพรูลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก ตามลำดับ) ผลการติดตามการเกิดออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกพบว่ากรดฟีนอลิกทุกชนิดถูกออกซิไดส์จนสมบูรณ์ในเวลา 2-3 นาที (ภาคผนวกที่ ข.1) ในการเตรียมสารละลายกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์สำหรับเตรียมตัวอย่างฟิล์ม จึงทำโดยชั่งกรดฟีนอลิกในปริมาณที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0) ที่อุณหภูมิห้อง เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/สารละลาย 100 กรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทั้งนี้เพื่อให้แน่ใจว่ากรดฟีนอลิกได้ถูกออกซิไดส์อย่างสมบูรณ์แล้ว จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เท่ากับ 9 เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ส่วนเกิน (Ou et al., 2005)

จากนั้นนำส่วนของสารละลายโปรตีนกลัวเหลืองสกัดที่ให้ความร้อนและทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้องเติมลงในสารละลายกรดฟีนอลิกที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ homogenizer (รุ่น X10/25, Ystral, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 22,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วกำจัดฟองอากาศโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก (รุ่น 136H, Fisher

Scientific, Schwerte, Germany) เป็นเวลา 10 นาที ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยปิเปตสารละลายฟิล์ม ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บรรจุลงในแม่พิมพ์อะคริลิกขนาด 15 เซนติเมตร x 15 เซนติเมตร ทำให้แห้งที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลอกแผ่นฟิล์มออก แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้นที่ ความชื้นสัมพัทธ์ 50% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาวิเคราะห์สมบัติดัง ข้อที่ 3.3.1.1-3.3.1.12 และคัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุด ขาดสูงมาศึกษาสมบัติเชิงกล และพฤติกรรมการดูดความชื้นที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตีดังข้อที่ 3.3.1.2 และ 3.3.1.13 ตามลำดับ

3.3.1.1 ความหนา

ตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 3 เซนติเมตร x 10 เซนติเมตร วัดความหนาด้วย เครื่อง digital thickness gauge (รุ่น 7301, Mitutoyo, Tokyo, Japan) สุ่มวัดความหนาของ ตัวอย่างชิ้นละ 15 จุด นับเป็น 1 ซ้ำ

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับเตรียมสารละลายย้อมโปรตีนด้วยเกลือสกัด

ส่วนผสม		ตัวอย่าง				
ตัวอย่าง	ตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์	ตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์	ตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์	ตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์	ตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์	
ควบคุม	(% โดยน้ำหนักของโปรตีนด้วยเกลือ)	(% โดยน้ำหนักของโปรตีนด้วยเกลือ)	(% โดยน้ำหนักของโปรตีนด้วยเกลือ)	(% โดยน้ำหนักของโปรตีนด้วยเกลือ)	(% โดยน้ำหนักของโปรตีนด้วยเกลือ)	
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	
โปรตีนด้วยเกลือสกัด (กรัม)	5	5	5	5	5	
สารละลายย้อมฟลูออโรส ส่วนที่ 1* (กรัม)	80	80	80	80	80	
กลีเซอรอล (กรัม)	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	
กรดฟีนอลิก (กรัม)	0	0.025	0.050	0.075	0.075	
สารละลายย้อมฟลูออโรส ส่วนที่ 2** (กรัม)	12.25	12.225	12.200	12.175	11.895	
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (กรัม)	0	0	0	0	0.33	

* สารละลายย้อมฟลูออโรส Tris-HCl ส่วนที่ใช้ละลายโปรตีนด้วยเกลือสกัด

** สารละลายย้อมฟลูออโรส Tris-HCl ส่วนที่ใช้ละลายกรดฟีนอลิก

3.3.1.2 สมบัติเชิงกล

วัดความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของตัวอย่างฟิล์มโดยใช้เครื่อง universal materials testing machine (รุ่น 5565, Instron, Norwood, MA) ซึ่งติดตั้งด้วย load cell ขนาด 5 กิโลกรัม ใช้หัววัด pneumatic side-action grips ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 3 เซนติเมตร x 10 เซนติเมตร ติดตั้งลงบนส่วนยึดจับ (grip) ทั้งสองด้าน กำหนดระยะห่างของส่วนยึดจับเท่ากับ 30 มิลลิเมตร ดึงตัวอย่างฟิล์มด้วยความเร็ว 5.0 มิลลิเมตร/วินาที จนกระทั่งแผ่นฟิล์มขาดออกจากกัน ได้ผลการวัดในรูปของแรงที่ใช้ในการดึงขึ้นตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (หน่วยเป็นกรัม-แรง) และระยะทางที่สามารถดึงขึ้นตัวอย่างให้ยืดออกมาได้มากที่สุดก่อนที่จะขาดออกจากกัน (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) คำนวณการต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดโดยใช้สมการที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ

$$\text{ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)} = [F \times 0.009807 \times 10^{-6}] / w d \quad (3.1)$$

เมื่อ F คือ แรงที่ใช้ในการดึงขึ้นตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (กรัม-แรง)

w คือ ความกว้างของชิ้นตัวอย่าง (เมตร)

d คือ ความหนาของชิ้นตัวอย่าง (เมตร)

$$\text{การยืดตัวถึงจุดขาด (\%)} = L_f \times 100 / L_i \quad (3.2)$$

เมื่อ L_f คือ ระยะทางที่สามารถดึงขึ้นตัวอย่างให้ยืดออกมาได้มากที่สุดก่อนที่จะขาดออกจากกัน (มิลลิเมตร)

L_i คือ ความยาวของชิ้นตัวอย่างระหว่างส่วนยึดจับก่อนดึง (มิลลิเมตร)

3.3.1.3 รูปแบบของแถบโปรตีน

ศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE โดยดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) เปรียบเทียบรูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกและฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิก

การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีน

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนโดยตัดตัวอย่างฟิล์มเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งมา 0.3 กรัม บรรจุลงใน sample buffer (ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์, sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้น 10%, glycerol เข้มข้น 20%, 2-mercaptoethanol เข้มข้น 3.1% และ bromophenol blue เข้มข้น 1%) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ใน Eppendorf tube ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ 31,154g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วย refrigerated micro-centrifuge (รุ่น 22R, Hettich, Buckinghamshire, England) ที่ติดตั้งด้วย high speed angle rotor (รุ่น A1195-A, Hettich, Buckinghamshire, England) เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีน ยกเว้นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ไม่มีส่วนประกอบของ bromophenol blue วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี modified Lowry (Peterson, 1983) เตรียมกราฟเทียบมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานของซีรัมอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin, BSA) โดยชั่ง BSA ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตรต่างๆ แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตร

ให้เป็น 1 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติม sodium deoxycholate เข้มข้น 0.15% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย trichloroacetic acid เข้มข้น 72% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงแยกที่ 31,154g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กำจัดส่วนใส นำตะกอนที่ได้มาเติม Reagent A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Reagent A ประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วนผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยสารละลายส่วนแรกประกอบด้วย sodium deoxycholate เข้มข้น 0.8 นอร์มัล และ SDS เข้มข้น 10% สารละลายส่วนที่สองคือ สารละลาย copper tartrate/carbonate (CTC) ซึ่งประกอบด้วย copper sulfate เข้มข้น 0.1%, potassium tartrate เข้มข้น 0.2% และ sodium carbonate เข้มข้น 10%) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม Reagent B ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (Reagent B ประกอบด้วย Folin-Ciocalteu's phenol reagent และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบล็ก

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มด้วยทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน แต่ใช้สารละลายตัวอย่างแทนการใช้สารละลาย BSA เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟเทียบมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณโปรตีนของตัวอย่างฟิล์ม

การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีน

ตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE เริ่มจากเตรียมเจลโดยล้างแผ่นกระจกสำหรับหล่อเจลด้วยน้ำสะอาด จากนั้นชะด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้วเซ็ดด้วยเอทานอล โดยประกอบแผ่นกระจกด้านที่มีรอยเว้าเข้าด้านในของตัวเครื่อง gel electrophoresis system (รุ่น miniVE, Hoefer, Holiston, MA) วางแผ่น spacer ที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร คั่นไว้ที่ขอบทั้งสองด้าน ประกบอีกแผ่นเข้าหากัน จากนั้นติดตั้งเข้ากับตัวเครื่อง ปิดเตา สารละลาย separating gel เข้มข้น 10% เติมลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิด

ฟองอากาศ จนสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบบนของแผ่นกระจกที่มีรอยเว้าประมาณ 1.5 เซนติเมตร หยด
 บิวทานอลทับบริเวณผิวหน้า separating gel ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณ
 ของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม separating gel และ stacking gel

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

สารเคมี	Separating gel	Stacking gel
Acrylamide stock solution เข้มข้น 30%	6.7 มิลลิลิตร	0.99 มิลลิลิตร
Separating gel buffer เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่าง 8.8)	5 มิลลิลิตร	-
Stacking gel buffer เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่าง 6.8)	-	1.86 มิลลิลิตร
Sodium dodecyl sulfate เข้มข้น 10%	200 ไมโครลิตร	74.25 ไมโครลิตร
Ammonium persulfate เข้มข้น 10%	100 ไมโครลิตร	37.57 ไมโครลิตร
TEMED	6.7 ไมโครลิตร	3.71 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	8 มิลลิลิตร	4.56 มิลลิลิตร

*สำหรับเตรียมเป็นแผ่นเจลหนา 1 มิลลิเมตร จำนวน 2 แผ่น

เมื่อ separating gel เซ็ตตัวแล้ว เทบิวทานอลออก ชะด้วยน้ำ
 กลั่น 3 ครั้ง จากนั้นเปิดสารละลาย stacking gel เข้มข้น 4% (ตารางที่ 3.2) เติมลงในช่องว่าง
 ระหว่างแผ่นของกระจกจนถึงขอบกระจก จากนั้นเสียบ comb ลงบนช่องด้านบน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา
 ประมาณ 1 ชั่วโมงจนกระทั่ง stacking gel เซ็ตตัว จากนั้นถอด comb ออกจะเกิดช่องว่างสำหรับ
 บรรจุตัวอย่าง เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber และช่องระหว่างแผ่นเจลจน
 สารละลายท่วมแผ่นเจล จากนั้นเปิดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight
 marker) และสารละลายตัวอย่างที่มีโปรตีนปริมาณ 7 ไมโครกรัม บรรจุลงในช่องของแผ่นเจล ช่องละ
 1 ตัวอย่าง และต่อ gel electrophoresis system เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เติม electrophoresis

buffer ลงใน chamber (electrophoresis buffer เตรียมโดยผสม Tris เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 9.06 กรัม, glycine เข้มข้น 1.5% ปริมาณ 43.2 กรัม, SDS เข้มข้น 1% ปริมาณ 3 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 3000 มิลลิลิตร) กำหนดกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 40 มิลลิแอมแปร์ เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าจนกระทั่งสังเกตเห็นแถบโปรตีนเคลื่อนลงมาถึงระยะประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากขอบล่างของแผ่นเจลจึงปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ถอดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า แล้วแกะเจลออกจากกระจก นำแผ่นเจลมาแช่ใน staining solution เป็นเวลา 20 นาที (staining solution ประกอบด้วย Coomassie blue R-250 ปริมาณ 1 กรัม, ethanol เข้มข้น 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร, glacial acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปแช่ใน destaining solution จนแถบโปรตีนปรากฏขึ้น (destaining solution ประกอบด้วย ethanol เข้มข้น 95% ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, glacial acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น ปริมาตร 650 มิลลิลิตร) เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น

3.3.1.4 ปริมาณ available lysine

วิเคราะห์ปริมาณ available lysine โดยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Habeeb, 1966) ทำโดยนำตัวอย่างฟิล์มมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0) ที่ประกอบด้วย KCl เข้มข้น 0.6 โมลาร์, urea เข้มข้น 8 โมลาร์, SDS เข้มข้น 2% และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของส่วนใสโปรตีนโดยวิธี modified Lowry (Peterson, 1983) แล้วจึงปรับปริมาณโปรตีนให้เป็น 1.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ เช่นเดียวกับข้างต้น ปิเปตสารละลายโปรตีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย NaHCO_3 เข้มข้น 4% (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.5) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร โดยแปลงค่าที่ใช้เตรียมโดยวิธี

เดียวกันกับตัวอย่างโปรตีน แต่ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายโปรตีน คำนวณปริมาณ available lysine โดยใช้ extinction coefficient เท่ากับ 1.4×10^4 โมลาร์⁻¹ เซนติเมตร⁻¹ (Habeeb, 1966)

3.3.1.5 ปริมาณซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl content)

วิเคราะห์ปริมาณซัลไฟไฮดริลทั้งหมดโดยวิธี 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Yongsawatdigul and Park, 2002) เตรียมสารละลายโปรตีนโดยวิธีในข้อ 3.3.1.4 ปิเปตสารละลายโปรตีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย urea เข้มข้น 8 โมลาร์, SDS เข้มข้น 2% และ EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ แล้วผสมกับสารละลาย DTNB เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร โดยแปลงค่าที่ใช้เตรียมโดยวิธีเดียวกันกับตัวอย่างโปรตีน แต่ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายโปรตีน คำนวณปริมาณซัลไฟไฮดริลทั้งหมดโดยใช้ extinction coefficient เท่ากับ $13,600$ โมลาร์⁻¹ เซนติเมตร⁻¹ (Yongsawatdigul and Park, 2002)

3.3.1.6 พันธะคาร์บอน-ไนโตรเจน (C-N bond)

ติดตามการเกิดพันธะ C-N โดยใช้ Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) (รุ่น Spectrum One, Perkin Elmer, Waltham, MA) โดยวัดร้อยละของแสงส่องผ่าน (%transmittance) ในช่วงเลขคลื่น (wavenumber) ประมาณ 1100 เซนติเมตร⁻¹ ซึ่งเป็น C-N stretching region (Klein, 2012) ทั้งนี้ไม่สามารถติดตามการเกิดพันธะคาร์บอน-ซัลเฟอร์ (C-S bond) ด้วยเทคนิค FTIR ได้ เนื่องจากธรรมชาติของพันธะ C-S ที่ให้สัญญาณที่ต่ำ (weak signal) ในสเปกตรัม FTIR (Hampton and Demoin, 2010)

3.3.1.7 ค่าสี

วัดค่า L^* , a^* และ b^* ในระบบ CIELAB โดยใช้ chroma meter (รุ่น CR-400, Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan) ภายใต้แหล่งกำเนิดแสง D65 มุมมอง 10 องศา โดยสุ่มวัดสีของตัวอย่างชิ้นละ 5 จุด นับเป็น 1 ซ้ำ และคำนวณมุมสี (hue angle) และความเข้มสี (chroma) ตามสมการที่ 3.3 และ 3.4

$$\text{มุมสี} = \arctan (b^*/a^*) \quad (3.3)$$

$$\text{ความเข้มสี} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (3.4)$$

3.3.1.8 ความโปร่งแสง

ติดตามการเปลี่ยนแปลงของความโปร่งแสงของตัวอย่างฟิล์มโดยดัดแปลงจากวิธีของ Tang et al. (2005) โดยความโปร่งแสงแสดงในรูปร้อยละของแสงส่องผ่านที่วัดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วย UV/Vis spectrophotometer (รุ่น V-530, Jasco, Easton, MD) โดยตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 1 เซนติเมตร x 4 เซนติเมตร ติดตั้งแผ่นฟิล์มลงบนพื้นผิวด้านในของด้านที่แสงส่องผ่านด้านหนึ่งของคิวเวตต์ โดยใช้คิวเวตต์เปล่าบรรจุลงใน reference cell (ใช้อากาศเป็นแบล็ก) กำหนดให้แบล็กมีร้อยละของแสงส่องผ่านกับ 100

3.3.1.9 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน ASTM (1999) นำซิลิกาที่อบแห้งแล้วปริมาณ 20 กรัม บรรจุลงในขวดแก้วทรงกระบอก ทากรีสบริเวณปากขวด จากนั้นนำตัวอย่างฟิล์มขนาด 6 เซนติเมตร x 6 เซนติเมตร วางปิดปากขวด รััดด้วยยางวงแหวน แล้วพันทับด้วยพาราฟิล์ม นำขวดที่ติดตั้งตัวอย่างฟิล์มแล้วไปแช่น้ำหนักเริ่มต้น จากนั้นนำไปบรรจุไว้ในภาชนะปิดสนิทที่อ้อมตัวด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของขวดทดสอบทุก 2 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำโดยใช้สมการที่ 3.5

$$\text{สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ} = W d/A t (P_2 - P_1) \quad (3.5)$$

- เมื่อ W คือ น้ำหนักของขวดทดสอบ (กรัม)
- d คือ ความหนาของแผ่นฟิล์ม (เมตร)
- A คือ พื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์มที่ไอน้ำผ่านได้ (ตารางเมตร)
- t คือ เวลาที่น้ำหนักของขวดทดสอบคงที่ (ชั่วโมง)
- $P_2 - P_1$ คือ ความแตกต่างของความดันไอน้ำระหว่างสองด้านของแผ่นฟิล์ม (พาสคาล)

3.3.1.10 มุมสัมผัส (contact angle) ระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม

วัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโดยใช้ contact angle measuring instrument (รุ่น OCA15CE, Data Physics Instruments, Filderstadt, Germany) โดยตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 2 เซนติเมตร x 5 เซนติเมตร จากนั้นนำไปวางบนแท่นวางตัวอย่าง หยดน้ำกลั่น 4 ไมโครลิตร บนผิวหน้าของแผ่นฟิล์ม แล้ววัดมุมของหยดน้ำบนผิวหน้าแผ่นฟิล์ม วัดตัวอย่างละ 3 ซีน นับเป็น 1 ซ้ำ

3.3.1.11 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility)

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำตามวิธีของ Perez-Gago and Krochta (2001) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 2 เซนติเมตร x 2 เซนติเมตร นำตัวอย่างฟิล์มไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (รุ่น 5200, Kubota, Fujioka, Japan) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างฟิล์มมาชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างฟิล์ม บรรจุตัวอย่างฟิล์มที่ชั่งน้ำหนักแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องเขย่า (รุ่น INNOVA 2050, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว ชะด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำกระดาษกรองและสิ่งที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้

เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก เมื่อหักน้ำหนักกระดาษกรองออกแล้วได้เป็นน้ำหนักของตัวอย่างฟิล์มหลังอบ คำนวณความสามารถในการละลายน้ำโดยใช้สมการที่ 3.6

$$\text{ความสามารถในการละลายน้ำ} = (W_i - W_f) \times 100/W_i \quad (3.6)$$

เมื่อ W_i คือ น้ำหนักตัวอย่างฟิล์มเริ่มต้น (กรัม)

W_f คือ น้ำหนักของตัวอย่างฟิล์มหลังอบ (กรัม)

3.3.1.12 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง

ศึกษาลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รุ่น JSM-5410LV, JEOL, Tokyo, Japan) ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 5 เซนติเมตร x 5 เซนติเมตร เก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่มีซิลิกาเจลเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เตรียมตัวอย่างโดยนำชิ้นฟิล์มแช่ลงในไนโตรเจนเหลวให้ฟิล์มแข็งตัวและหักตัวอย่างฟิล์ม ทิ้งให้ตัวอย่างฟิล์มอ่อนตัวลง ตัดตั้งตัวอย่างบนแท่งทองเหลืองที่มีลักษณะเป็นร่องตั้งฉากกับพื้นผิวสำหรับตัดตั้งตัวอย่าง นำไปฉายด้วยทองและศึกษาลักษณะภาคตัดขวางที่กำลังขยาย 750 เท่า

3.3.1.13 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น (moisture sorption isotherm)

ศึกษาพฤติกรรมการดูดความชื้นของตัวอย่างฟิล์ม โดยคัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดสูงมาศึกษา นำตัวอย่างฟิล์มมาเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทที่บรรจุสารละลายเกลืออิ่มตัวที่มีผลึกเกลือเหลืออยู่ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ ได้แก่ 11, 22, 33, 43, 53, 69, 84 และ 94% ที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้อยู่ในสมดุลของไอน้ำ (ภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ดังกล่าวควบคุมโดยใช้สารละลายอิ่มตัวของ LiCl, CH₃COOK, MgCl₂, K₂CO₃, Mg(NO₃)₂, KI, KCl และ KNO₃ ตามลำดับ) นำตัวอย่างฟิล์มมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2000) โดยชั่งตัวอย่างฟิล์มประมาณ 5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน บรรจุลงในจานอลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำตัวอย่างเข้าอบในตู้อบ

ลมร้อน (รุ่น 5200, Kubota, Fujioka, Japan) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก คำนวณปริมาณความชื้นเป็นร้อยละโดยฐานเปียก นำข้อมูลของปริมาณความชื้นที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตีมาสร้างเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น

สำหรับการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตีทำเช่นเดียวกับหัวข้อ

3.3.1.2

3.3.2 การศึกษาผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก

ในการศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มด้วยความร้อนนี้ ทำโดยคัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงที่สุดจากข้อ 3.3.1 รวมทั้งคู่ของตัวอย่างฟิล์มดังกล่าวที่เติมกรดฟีนอลิกที่มีสถานะออกซิเดชันต่างกัน กล่าวคือจะได้คู่ของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกชนิดหนึ่งที่มีออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นหนึ่ง แปรอุณหภูมิการบ่มแผ่นฟิล์มเป็น 4 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (25), 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส โดยใช้ตู้อบลมร้อน (รุ่น 5200, Kubota, Fujioka, Japan) และแปรระยะเวลาการบ่มเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 5, 10 และ 15 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมกรดฟีนอลิก วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์สมบัติของตัวอย่างฟิล์มตามหัวข้อ 3.3.1.1-3.3.1.3 และ 3.3.1.7-3.1.1.13

หมายเหตุ ไม่สามารถติดตามการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (S-S bond) โดยใช้เทคนิค FTIR ได้เนื่องจาก S-S bond stretching ไม่ปรากฏสัญญาณในสเปกตรัมของ FTIR (Hampton and Demoin, 2010)

3.3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

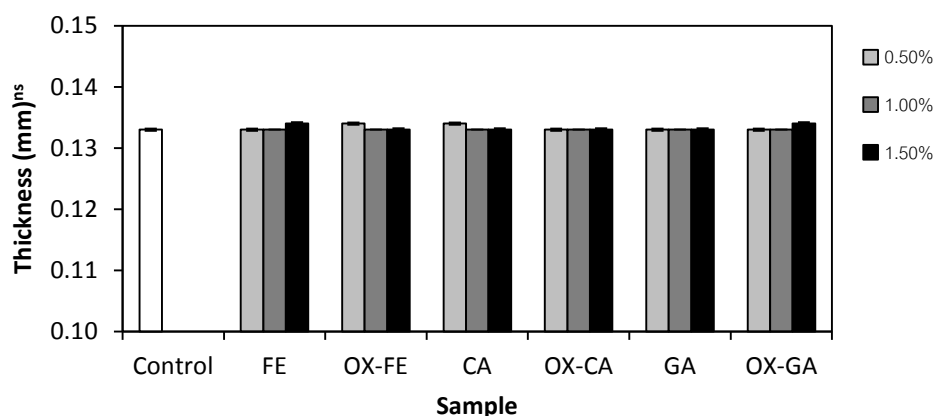
4.1 ผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

สำหรับการศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ในงานวิจัยนี้ได้แปรชนิดของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ กรดเพรูริก กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก แปรสถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกเป็น 2 สถานะ ได้แก่ ไม่ออกซิไดส์ และออกซิไดส์ และแปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยใช้รหัสตัวอย่างดังต่อไปนี้ ตัวอย่างที่เติมกรดเพรูริกที่ไม่ออกซิไดส์ (FE) ตัวอย่างที่เติมกรดเพรูริกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) ตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์ (CA) ตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) ตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ (GA) และตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) กำหนดให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกเป็นตัวอย่างควบคุม (control) ผลการวิเคราะห์สมบัติของตัวอย่างฟิล์มมีดังนี้

4.1.1 ความหนา

ความหนาของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกแสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างมีความหนาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.132-0.134 มิลลิเมตร ความหนาเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อสมบัติด้านอื่นๆ ของฟิล์ม เช่น สมบัติเชิงกล ความโปร่งแสง และสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ ดังนั้นสำหรับงานวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่า สมบัติที่แตกต่างกันของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดไม่ได้เป็นผลมาจากความหนา Mahmoud and Savello. (1992) และ Galus et al. (2012) เสนอว่าปัจจัยที่มีผลต่อความหนาของฟิล์ม ได้แก่ ปริมาณของแข็ง และภาวะที่ใช้ในการผลิตฟิล์ม เนื่องจากตัวอย่างฟิล์มที่ผลิตในงานวิจัยนี้มีปริมาณ

ของแข็งที่ใกล้เคียงกันและใช้ภาวะในการผลิตที่เหมือนกัน ความหนาของตัวอย่างฟิล์มจึงมีค่าไม่แตกต่างกัน

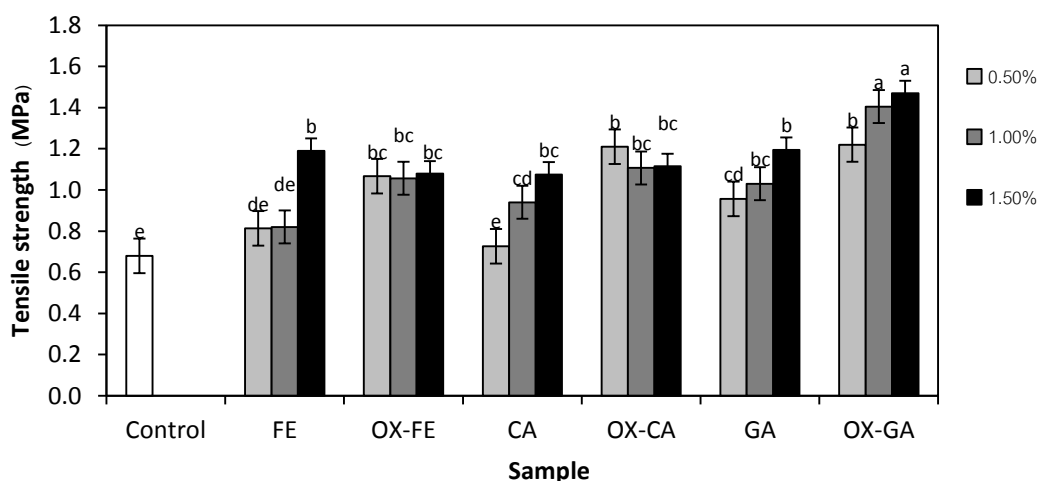


รูปที่ 4.1 ความหนาของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโพรตีนถั่วเหลืองสกัด

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ González et al. (2011) ซึ่งศึกษาผลของการเติมเจนิพิน (genipin) ซึ่งเป็นสารเชื่อมข้ามโพรตีนต่อสมบัติของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยแปรความเข้มข้นของเจนิพินในช่วง 0-10% โดยน้ำหนักของโพรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมเจนิพินมีความหนาไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเจนิพิน และความเข้มข้นของเจนิพินไม่มีผลต่อความหนาของตัวอย่างฟิล์ม ($p > 0.05$) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nuthong et al. (2009) ซึ่งศึกษาผลของการเติมกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มจากโพรตีนพลาสมาสุกร (porcine plasma protein) กรดฟีนอลิกที่ศึกษา ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดแทนนิก ซึ่งแปรความเข้มข้นในช่วง 1-3% โดยน้ำหนักของโพรตีน พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีความหนาอยู่ในช่วง 0.067-0.072 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.1.2 ความต้านทานแรงดึงขาด

รูปที่ 4.2 แสดงความต้านทานแรงดึงขาดของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก พบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกทุกตัวอย่างมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ยกเว้นตัวอย่างที่เติมกรดเพอรูลิกเข้มข้น 0.5 และ 1.0% และตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ซึ่งแม้จะมีความหนาสูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)



รูปที่ 4.2 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพอรูลิก (FE) กรดเพอรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

สำหรับตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ (FE, CA และ GA) โดยทั่วไปพบว่าความต้านทานแรงดึงขาดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกที่เท่ากัน พบว่าชนิดของกรดฟีนอลิกไม่มีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาดมากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่เติมกรดเพอรูลิกและกรดแคฟเฟอิก ซึ่งพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ความเข้มข้นเท่ากัน มีความต้านทานแรงดึงขาดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

สำหรับการเติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์ โดยทั่วไปพบว่าฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกชนิดเดียวกันที่ไม่ออกซิไดส์ใน ความเข้มข้นที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์และฟิล์มที่เติม กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์มีความต้านทานแรงดึงขาดที่ใกล้เคียงกัน ต่างจากฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ ออกซิไดส์ที่มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยตัวอย่างที่มี ความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ซึ่งมีความ ต้านทานแรงดึงขาดเท่ากับ 1.47 เมกะพาสคาล อย่างไรก็ตามพบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.0 และ 1.5% มีความต้านทานแรงดึงขาดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

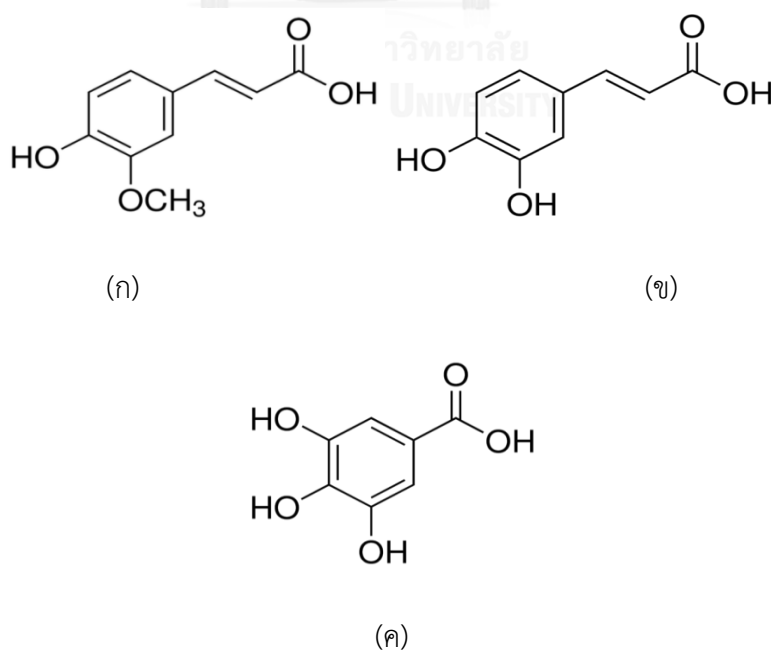
ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการรายงานของ Prodpran et al. (2012) ซึ่ง ศึกษาผลของการเติมสารประกอบพีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน สารประกอบพีนอลิกที่ศึกษา ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก กรดเพรูลิก กรดแทนนิก และแคทีคิน แปรความ เข้มข้นเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 3 และ 5% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของ สารประกอบพีนอลิกเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงาน ว่ากรดแทนนิกมีประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับปรุงความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์ม

นอกจากระบบของฟิล์มแล้ว การเชื่อมข้ามของโปรตีนยังส่งผลต่อสมบัติของระบบที่ เป็นฐานโปรตีน (protein-based system) อื่นๆ เช่น เจลโปรตีน ตัวอย่างของการศึกษาผลของการ เติมสารประกอบพีนอลิกต่อสมบัติของเจลโปรตีน ได้แก่ งานวิจัยของ Balange and Benjakul (2009) ที่ศึกษาผลของสารประกอบพีนอลิกที่ออกซิไดส์ต่อสมบัติของเจลซูริมิปลาแมคเคอเรล สารประกอบพีนอลิกที่ศึกษา ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และแคทีคิน แปรความ เข้มข้นของสารประกอบพีนอลิกที่ออกซิไดส์ในช่วง 0.05-0.25% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าแรงที่ ทำให้เจลแตกออก (breaking force) มีค่าสูงสุดเมื่อเติมกรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และ แคทีคินที่ออกซิไดส์ ในปริมาณ 0.4, 0.5, 0.5 และ 0.1% ตามลำดับ โดยตัวอย่างดังกล่าวมีค่าแรงที่

ทำให้เจลดอกเพิ่มขึ้น 45.0, 115.0, 46.1 และ 70.3% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

Rawel et al. (2002) เสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและการทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยเสนอว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความว่องไวของสารประกอบฟีนอลิกในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน ได้แก่ จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิล รวมทั้งความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกที่จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนน โดยผู้วิจัยรายงานว่าความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น และการมีหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' ทำให้สารประกอบฟีนอลิกเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้ดี (เช่นในกรณีของเคอเวซิทินและไมริเซทิน)

สำหรับงานวิจัยนี้การที่กรดแกลลิกมีความสามารถในการปรับปรุงความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดสูงกว่ากรดแคฟเฟอิกและกรดเฟรูลิก อาจเนื่องมาจากการที่กรดแกลลิกมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลสูงกว่ากรดแคฟเฟอิกและกรดเฟรูลิก โดยกรดแกลลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเฟรูลิก มีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลเท่ากับ 3, 2 และ 1 หมู่ ตามลำดับ (รูปที่ 4.3)



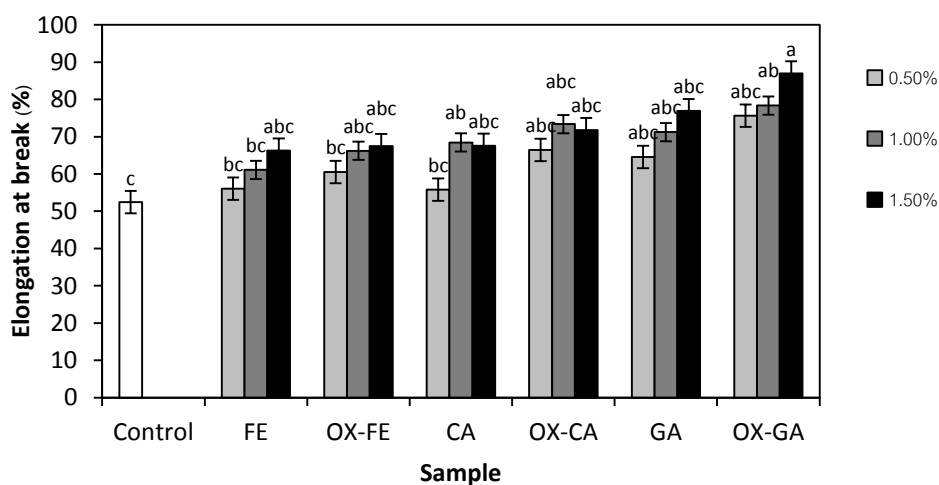
รูปที่ 4.3 โครงสร้างทางเคมีของ (ก) กรดเฟรูลิก (ข) กรดแคฟเฟอิก และ (ค) กรดแกลลิก

นอกจากนี้การที่กรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความสามารถในการปรับปรุงความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่ากรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์เนื่องมาจากเมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกออกซิไดส์จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของสารประกอบควิโนน ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนและหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีน เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ชนิด C-N และ C-S และทำให้เกิดการเชื่อมข้ามภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของโปรตีนได้ (Strauss and Gibson, 2004) และเพื่อเป็นการยืนยันการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง ในงานวิจัยนี้จึงติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE (หัวข้อ 4.1.4) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณของ available lysine และหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด (หัวข้อ 4.1.5) และติดตามการเกิดพันธะ C-N โดยเทคนิค FTIR (หัวข้อ 4.1.6) ทั้งนี้สำหรับการเกิดพันธะ C-S ไม่สามารถติดตามโดยใช้เทคนิค FTIR ได้ เนื่องจากธรรมชาติของพันธะ C-S ที่จะให้สัญญาณที่ต่ำในสเปกตรัม FTIR (Hampton and Demoin, 2010)

4.1.3 การยึดตัวถึงจุดขาด

รูปที่ 4.4 แสดงการยึดตัวถึงจุดขาดของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก แม้ว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีการยึดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่พบว่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ยกเว้นตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.0 และ 1.5% นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน สถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกไม่มีผลต่อการยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด Guilbert et al. (1995) เสนอว่าความต้านทานแรงดึงขาดขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ ในขณะที่การยึดตัวถึงจุดขาดไม่ได้ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ แต่หากขึ้นอยู่กับระยะระหว่างหมู่ที่เกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลพอลิเมอร์ ดังนั้นการที่กรดฟีนอลิกมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาด แต่มีผลค่อนข้างน้อยต่อการยึดตัวถึงจุดขาด อาจเนื่องมาจากการเกิดพันธะเชื่อมข้ามทำให้ความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลทำให้ระยะระหว่างหมู่ที่เกิดอันตรกิริยาเกิดการเปลี่ยนแปลง

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ou et al. (2005) ที่ศึกษาผลของกรดเพรูลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง โดยแปรความเข้มข้นของกรดเพรูลิกเป็น 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/100 กรัม พบว่าความเข้มข้นที่ต่างกันของกรดเพรูลิกไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง



รูปที่ 4.4 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.1.4 รูปแบบของแถบโปรตีน

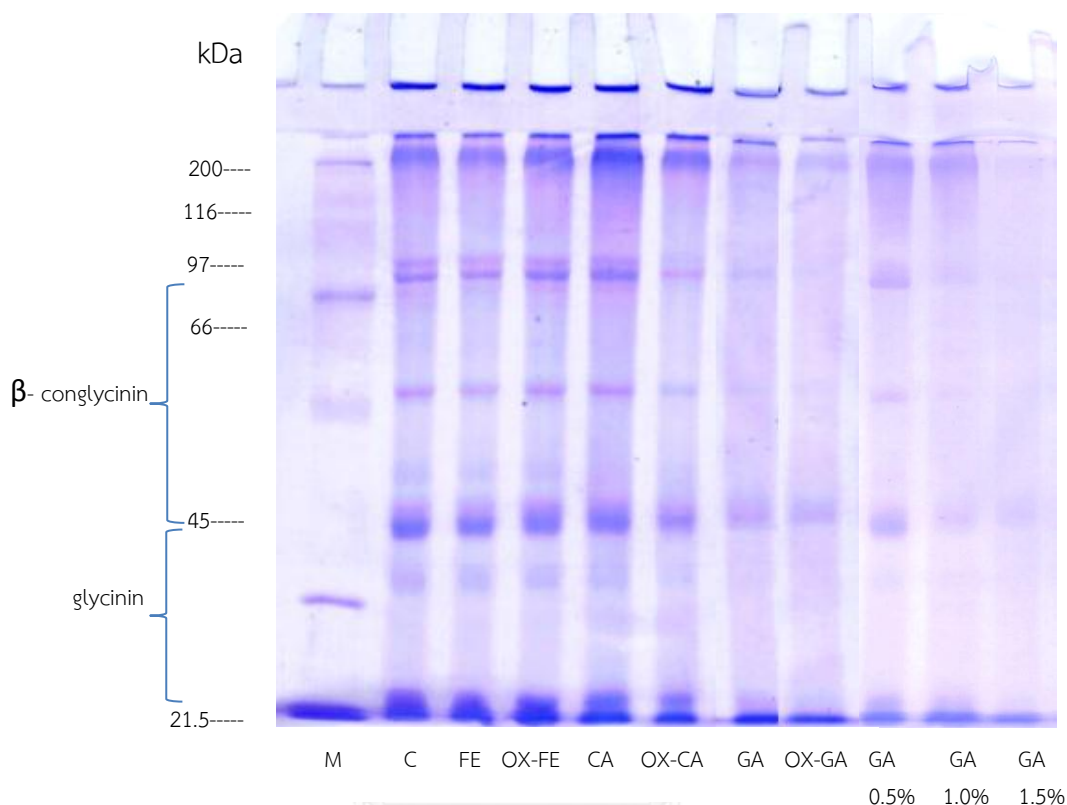
เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ เมื่อเติมกรดฟีนอลิกในฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ในงานวิจัยนี้จึงศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE โดยตัวอย่างฟิล์มที่คัดเลือกมาศึกษา ได้แก่ ตัวอย่างควบคุม ฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% ฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% นอกจากนี้ยัง

เปรียบเทียบรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% รูปที่ 4.5 แสดงรูปแบบของแถบโปรตีนที่ศึกษาด้วย SDS-PAGE

โปรตีนไกลซีนินของถั่วเหลืองประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ชนิด คือ หน่วยย่อยชนิดกรด (acidic subunit) และหน่วยย่อยชนิดเบส (basic subunit) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 36 และ 24 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Ly et al., 1998; Liu, 1999) ส่วนเบตา-คอนไกลซีนินประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ชนิด ได้แก่ α' , α และ β ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 84, 66 และ 45 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Tang et al., 2006) จากรูปที่ 4.5 พบว่าฟิล์มที่กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% มีความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 24-84 กิโลดาลตัน ลดลง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 24-84 กิโลดาลตัน มีความเข้มลดลงเมื่อปริมาณกรดแกลลิกเพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุล ซึ่งส่งผลให้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหายไป (Rawel et al., 2002)

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prodpran et al. (2012) ซึ่งศึกษาผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน สารประกอบฟีนอลิกที่ศึกษา ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก กรดเพรูลิก กรดแทนนิก และแคทีคิน แปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 3 และ 5% วิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนโดยติดตามความเข้มของแถบไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) ซึ่งเป็นโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์หลักในกล้ามเนื้อ พบว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกมีผลให้ความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 24-84 กิโลดาลตันลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิก โดยเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ความเข้มของแถบโปรตีนลดต่ำลง ผู้วิจัยอธิบายว่า

สารประกอบพีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน โดยในงานวิจัยดังกล่าวพบว่าตัวอย่างที่เติมกรดเพรูลิกมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนลดลงน้อยที่สุด



รูปที่ 4.5 รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) ฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (FE) ฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (OX-FE) ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (CA) ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (OX-CA) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (GA) และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% (OX-GA) รวมทั้งรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ (GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5%

4.1.5 ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมด

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าตัวอย่างควบคุมมีปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมด

เท่ากับ 544.76×10^{-6} และ 13.38×10^{-6} โมล/กรัมโปรตีน ตามลำดับ ตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกมีปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกรดฟีนอลิกทั้งสามชนิด พบว่าตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกมีปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ ตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกและกรดเพรูลิก ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสถานะออกซิเดชันที่ต่างกัน พบว่าตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดต่ำกว่าตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ และปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น Rawel et al. (2002) และ Strauss and Gibson (2004) เสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนและหมู่ซัลไฟไฮดริลของโปรตีนได้ และทำให้เกิดพันธะเชื่อมข้ามชนิด C-N และ C-S ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดที่ลดลงนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากหมู่เคมีทั้งสองชนิดเข้าร่วมในปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Rawel et al. (2002) ซึ่งศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีนถั่วเหลือง พบว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแกลลิก กรดแคฟเฟอิก กรดคลอโรเจนิก ฟลาวาน เอพิเจนิน เคมเพอรอล เควเซทิน และไมริเซทิน ทำให้ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดของสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา (reactivity) กับโปรตีนแตกต่างกันไป เช่นเดียวกับ Prodpran et al. (2012) ที่รายงานว่าสารประกอบฟีนอลิก (กรดแคฟเฟอิก กรดเพรูลิก กรดแทนนิก และแคทีคิน) ในฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานทำให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลง โดยฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงมากที่สุด

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเฟรูลิก (FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแกลลิก (GA) กรดเฟรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

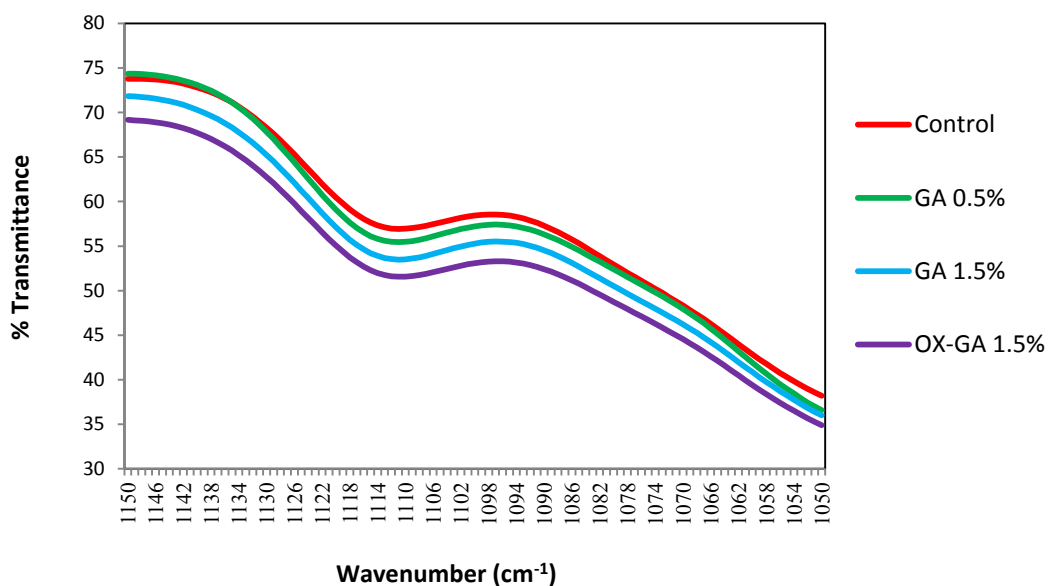
ตัวอย่าง	Available lysine ($\times 10^{-6}$ โมล/กรัมโปรตีน)	ซัลไฟไฮดริลทั้งหมด ($\times 10^{-6}$ โมล/กรัมโปรตีน)
Control	544.76 \pm 6.06 ^a	13.38 \pm 0.21 ^a
FE 0.5%	502.38 \pm 16.84 ^a	13.09 \pm 1.46 ^{ab}
FE 1.0%	453.33 \pm 17.51 ^b	12.65 \pm 2.08 ^{abc}
FE 1.5%	416.19 \pm 20.20 ^{bcd}	12.21 \pm 0.21 ^{abcd}
CA 0.5%	447.14 \pm 13.47 ^b	11.76 \pm 0.83 ^{abcd}
CA 1.0%	428.57 \pm 14.82 ^{bc}	10.88 \pm 1.25 ^{abcd}
CA 1.5%	411.43 \pm 1.35 ^{bcde}	9.56 \pm 1.87 ^{bcdef}
GA 0.5%	394.76 \pm 29.63 ^{cdef}	9.71 \pm 1.66 ^{bcdef}
GA 1.0%	372.62 \pm 36.13 ^{fg}	7.06 \pm 2.91 ^{efgh}
GA 1.5%	365.00 \pm 9.09 ^{defg}	5.88 \pm 2.08 ^{gh}
OX-FE 0.5%	389.05 \pm 30.98 ^{cdef}	10.88 \pm 2.08 ^{abcd}
OX-FE 1.0%	361.91 \pm 11.45 ^{efg}	10.59 \pm 0.42 ^{abcdef}
OX-FE 1.5%	350.95 \pm 12.12 ^{fg}	9.26 \pm 0.21 ^{cdef}
OX-CA 0.5%	354.76 \pm 26.26 ^{fg}	9.12 \pm 1.66 ^{cdef}
OX-CA 1.0%	343.33 \pm 35.02 ^{fg}	6.91 \pm 1.87 ^{fgh}
OX-CA 1.5%	348.10 \pm 28.28 ^{fg}	6.91 \pm 0.21 ^{fgh}
OX-GA 0.5%	333.81 \pm 29.63 ^{gh}	8.82 \pm 2.08 ^{defgh}
OX-GA 1.0%	331.67 \pm 5.72 ^{gh}	5.29 \pm 0.83 ^h
OX-GA 1.5%	290.48 \pm 5.39 ^h	5.29 \pm 0.42 ^h

ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.1.6 พันธะ C-N

เพื่อยืนยันการเกิดพันธะเชื่อมข้าม C-N ในตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิก ในงานวิจัยนี้ จึงใช้เทคนิค FTIR ติดตามการเปลี่ยนแปลงของร้อยละของแสงส่องผ่านในช่วง C-N stretching region ซึ่งอยู่ในช่วงเลขคลื่นประมาณ 1100 เซนติเมตร⁻¹ (Klein, 2012) โดยคัดเลือกตัวอย่างควบคุม ฟิ์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5% ฟิ์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิ์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% มาเพื่อศึกษาเปรียบเทียบ (รูปที่ 4.6) พบว่าในช่วง C-N stretching region ฟิ์มที่เติมกรดแกลลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์มีร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม โดยเมื่อความเข้มข้นของกรดแกลลิกเพิ่มขึ้นร้อยละของแสงส่องผ่านมีค่าลดลง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างฟิ์มที่เติมกรดแกลลิกที่มีสถานะออกซิเดชันต่างกัน พบว่าตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์มีร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ ผลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่ากรดฟีนอลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์สามารถส่งเสริมให้เกิดพันธะ C-N ในฟิ์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดได้



รูปที่ 4.6 สเปกตรัม FTIR ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5 และ 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

4.1.7 ค่าสี

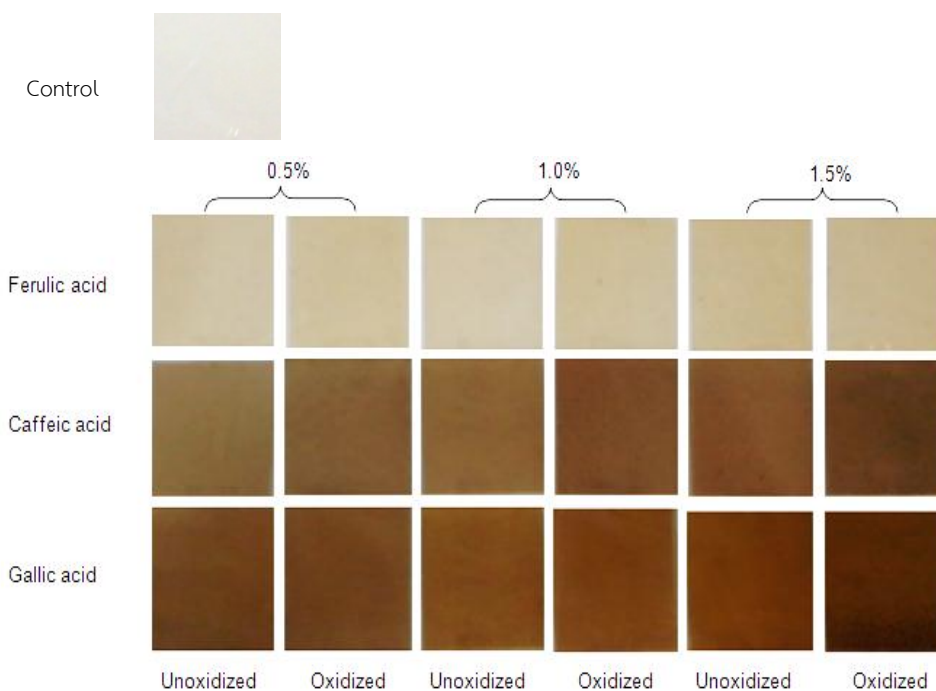
ค่าสีในระบบ CIELAB ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดฟีนอลิกแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าตัวอย่างควบคุมมีค่า L^* เท่ากับ 86.78 ซึ่งมีค่าสูงที่สุดของตัวอย่างทั้งหมดที่ศึกษา ค่า L^* มีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเท่ากัน ตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกมีค่า L^* ต่ำที่สุด ตามด้วยตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกและกรดเพรูลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีค่า L^* ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกชนิดเดียวกันที่ไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน การลดลงของค่า L^* นี้ สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของค่า a^* และค่า b^* และจากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีสีน้ำตาลที่เข้มข้น (รูปที่ 4.7) มุมสีของฟิล์มทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 70-88 องศา (ตารางที่ 4.2) ซึ่งเป็นค่าของมุมสีสัมแดงจนถึงสีเหลือง (McGuire, 1992) อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มสีของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์

ตารางที่ 4.2 ค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุคลิก (FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแกลลิก (GA) กรดเพรุคลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตัวอย่าง	ค่าสี			มุมสี (องศา)	ความเข้มสี
	L^*	a^*	b^*		
Control	86.78 ± 0.37 ^a	-1.29 ± 0.07 ^{ijkl}	16.86 ± 0.76 ^k	85.36 ± 0.08 ^c	16.67 ± 0.13 ^l
FE 0.5%	86.34 ± 0.47 ^{ab}	-1.48 ± 0.80 ^l	16.93 ± 1.50 ^k	86.85 ± 0.64 ^b	16.69 ± 0.31 ^l
FE 1.0%	86.13 ± 0.47 ^{ab}	-0.93 ± 0.08 ^{ijkl}	18.15 ± 1.21 ^{jk}	87.34 ± 0.24 ^b	17.71 ± 0.15 ^l
FE 1.5%	85.09 ± 0.58 ^b	-0.55 ± 0.03 ^{jk}	21.57 ± 1.34 ^h	88.54 ± 0.13 ^a	21.21 ± 1.11 ^j
CA 0.5%	80.67 ± 0.47 ^d	3.60 ± 0.24 ⁱ	22.60 ± 0.69 ^h	80.47 ± 0.43 ^e	22.95 ± 0.60 ⁱ
CA 1.0%	75.20 ± 0.47 ^e	4.50 ± 0.58 ^h	25.35 ± 0.75 ^{fg}	79.29 ± 0.19 ^f	26.32 ± 0.42 ^g
CA 1.5%	72.73 ± 0.58 ^f	6.79 ± 1.90 ^f	27.22 ± 5.38 ^e	79.29 ± 0.19 ^f	26.32 ± 0.42 ^g
GA 0.5%	71.24 ± 0.47 ^{fg}	9.11 ± 0.94 ^d	39.01 ± 2.48 ^c	77.09 ± 0.57 ^h	39.01 ± 1.91 ^e
GA 1.0%	62.35 ± 0.47 ^h	10.97 ± 0.66 ^c	41.56 ± 1.73 ^b	75.52 ± 0.67 ⁱ	44.12 ± 0.29 ^c
GA 1.5%	54.31 ± 0.47 ⁱ	16.51 ± 1.30 ^a	43.35 ± 0.49 ^a	70.16 ± 1.73 ^j	48.00 ± 1.46 ^a
OX-FE 0.5%	85.50 ± 0.47 ^{ab}	-0.92 ± 0.05 ^{ijkl}	19.85 ± 0.39 ⁱ	87.47 ± 0.08 ^b	19.64 ± 0.18 ^k
OX-FE 1.0%	85.71 ± 0.58 ^{ab}	-1.03 ± 0.22 ^{ijkl}	19.06 ± 2.11 ^{ij}	87.10 ± 0.53 ^b	19.21 ± 1.56 ^j
OX-FE 1.5%	82.40 ± 0.58 ^c	-0.47 ± 0.39 ^j	24.94 ± 0.88 ^g	88.47 ± 0.31 ^a	24.84 ± 0.94 ^h
OX-CA 0.5%	74.97 ± 0.47 ^e	5.69 ± 1.35 ^g	27.59 ± 2.36 ^e	79.69 ± 0.81 ^f	26.47 ± 1.77 ^g
OX-CA 1.0%	72.34 ± 0.47 ^f	6.44 ± 0.87 ^f	26.58 ± 2.19 ^{ef}	77.03 ± 0.84 ^h	25.69 ± 0.39 ^{gh}
OX-CA 1.5%	70.39 ± 0.47 ^e	7.54 ± 1.73 ^e	32.34 ± 4.62 ^d	77.03 ± 0.84 ^h	26.27 ± 1.50 ^g
OX-GA 0.5%	71.67 ± 0.47 ^g	4.38 ± 0.51 ^h	32.63 ± 1.32 ^d	82.28 ± 0.49 ^d	33.74 ± 0.94 ^f
OX-GA 1.0%	62.31 ± 0.47 ⁱ	8.90 ± 0.58 ^d	41.62 ± 0.24 ^b	77.95 ± 0.17 ^g	42.75 ± 0.24 ^d
OX-GA 1.5%	53.43 ± 0.47 ⁱ	15.12 ± 2.09 ^b	44.55 ± 1.50 ^a	70.16 ± 1.73 ^j	46.36 ± 0.23 ^b

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



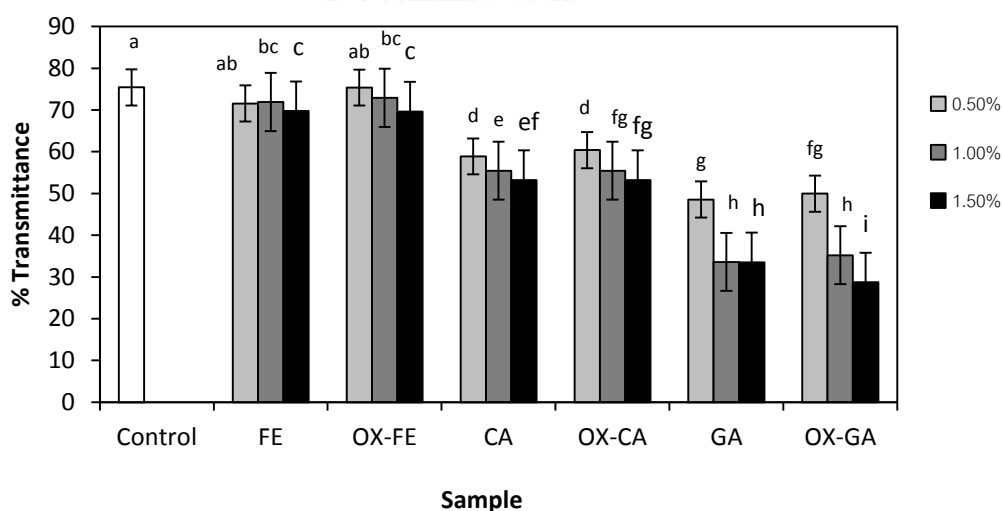
รูปที่ 4.7 ลักษณะปรากฏของฟิล์มโพรพีนไทลีนที่เคลือบด้วยสารเติมกรดเฟอร์ริก กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก ทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 and 1.5% โดยน้ำหนักของโพรพีนไทลีน

Pierpoint (1969) อธิบายว่าสีของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิก และเพปไทด์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเพปไทด์ และค่าความเป็นกรดต่าง นอกจากนี้ควิโนนที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกยังสามารถเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันได้เป็นสารโมเลกุลใหญ่ที่มีสี

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prodpran et al. (2012) ซึ่งพบว่าฟิล์มโพรพีนไทลีนที่ไม่โอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีค่าสีเหลืองและสีแดงเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความสว่างมีค่าลดลง นอกจากนี้ Balange (2009) ยังรายงานว่าเจลซูริมิปลาแมคเคอเรลมีความขาวลดลงเมื่อเติมกรดเฟอร์ริกที่ออกซิไดส์

4.1.8 ความโปร่งแสง

รูปที่ 4.8 แสดงความโปร่งแสงของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกในรูป ร้อยละของแสงส่องผ่าน ตัวอย่างควบคุมมีร้อยละของแสงส่องผ่านเท่ากับ 75.41 การเติมกรดฟีนอลิก ทำให้ฟิล์มมีความโปร่งแสงลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ ออกซิไดส์ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% มีความโปร่งแสงต่ำที่สุด โดยมีร้อยละของ แสงส่องผ่านเท่ากับ 28.73 ความโปร่งแสงที่ลดลงนี้อาจเป็นผลเนื่องจากสีของควิโนนที่เกิด พอลิเมโรเซชัน (Pierpoint, 1969) ผลิตภัณฑ์ที่มีสีของปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและ โปรตีน (Pierpoint, 1969) และการเพิ่มขึ้นของอันตรกิริยาระหว่างโปรตีน (Tang et al., 2005; González et al., 2011)



รูปที่ 4.8 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และ กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Gómez-Estaca et al. (2009) ซึ่งพบว่าการเติม สารสกัดจากโบริจ (borage) ทำให้ฟิล์มเจลาตินจากหนังปลาตาเดียว (sole) มีความทึบแสงเพิ่มขึ้น

ในขณะที่ Prodpran et al. (2012) รายงานว่าฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานมีค่าแสงส่องผ่านลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดแคฟเฟอิก แคทีคิน กรดเพรูลิก และกรดแทนนิก เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Salgado et al. (2010) ศึกษาการผลิตฟิล์มจากโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิกตามธรรมชาติในปริมาณ 1.82-2.51% และพบว่าฟิล์มที่ผลิตจากโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่ามีความชุ่มมากกว่า ความสามารถในการป้องกันแสงของฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกนี้อาจมีประโยชน์สำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีความไวต่อแสง

4.1.9 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

ตารางที่ 4.3 แสดงสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก จากการทดลองพบว่าสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์มีค่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ในขณะที่สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์และกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์มีแนวโน้มลดลงจนถึงความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเท่ากับ 1.0% แต่เมื่อเติมกรดแคฟเฟอิกที่ไม่ออกซิไดส์หรือกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำกลับมีค่าเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง ในขณะที่การเติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ โดยทั่วไปพบว่าสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น การเติมสารประกอบฟีนอลิกอาจทำให้เกิดปรากฏการณ์สองอย่างที่ส่งผลตรงข้ามกันต่อสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ โดยสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดอันตรกิริยาชนิดต่างๆ กับโปรตีน เช่น พันธะไฮโดรเจน และพันธะโควาเลนต์ ทำให้โครงร่างตาข่ายของโปรตีนมีปริมาตรอิสระ (free volume) ลดลง ไอน้ำจึงเคลื่อนที่ผ่านเมทริกซ์ของฟิล์มในอัตราที่ช้าลง (Cisneros-Zevallos and Krochta, 2002; González et al., 2011) ในขณะเดียวกัน สารประกอบฟีนอลิกอาจทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีน (protein aggregation) ซึ่งทำให้เมทริกซ์ของฟิล์มมีความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogeneous) ซึ่งทำให้ไอน้ำเคลื่อนที่ผ่านไปได้เร็วขึ้น (Prodpran et al., 2012)

Ou et al. (2005) ศึกษาผลของกรดเพอรูลิกต่อสมบัติของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลือง พบว่าการเติมกรดเพอรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 50-150 มิลลิกรัม/100 กรัม ไม่มีผลต่อสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์ม อย่างไรก็ตามการเติมกรดเพอรูลิกที่ออกซิไดส์เพียง 50 มิลลิกรัม/100 กรัม ก็เพียงพอที่จะทำให้สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ Siripatrawan and Harte (2010) รายงานว่าการเติมสารสกัดจากชาเขียวในปริมาณ 2-20% ในฟิล์มไคโทซาน ทำให้สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลงเมื่อปริมาณสารสกัดจากชาเขียวเพิ่มสูงขึ้น

4.1.10 มุมสัมผักระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม

มุมสัมผักระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มแสดงสมบัติความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของผิวฟิล์ม หากผิวฟิล์มชอบน้ำ หยดน้ำจะสามารถแผ่ขยาย (spread) บนผิวฟิล์มได้ ทำให้มุมสัมผัสมีค่าต่ำ ในทางกลับกันหากผิวฟิล์มไม่ชอบน้ำ หยดน้ำจะไม่แผ่ขยายบนผิวฟิล์ม ทำให้มุมสัมผัสมีค่าสูง มุมสัมผัสของตัวอย่างฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดพีนอลิก แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.9 โดยทั่วไปพบว่าฟิล์มที่เติมกรดเพอรูลิกและกรดแคฟเฟอิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ในปริมาณ 0.5 และ 1.0% มีค่ามุมสัมผัสใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม แต่การเติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ในปริมาณ 1.5% และการเติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ในปริมาณ 0.5, 1.0 และ 1.5% ส่งผลให้มุมสัมผัสมีค่าเพิ่มขึ้น แสดงว่าผิวฟิล์มมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น

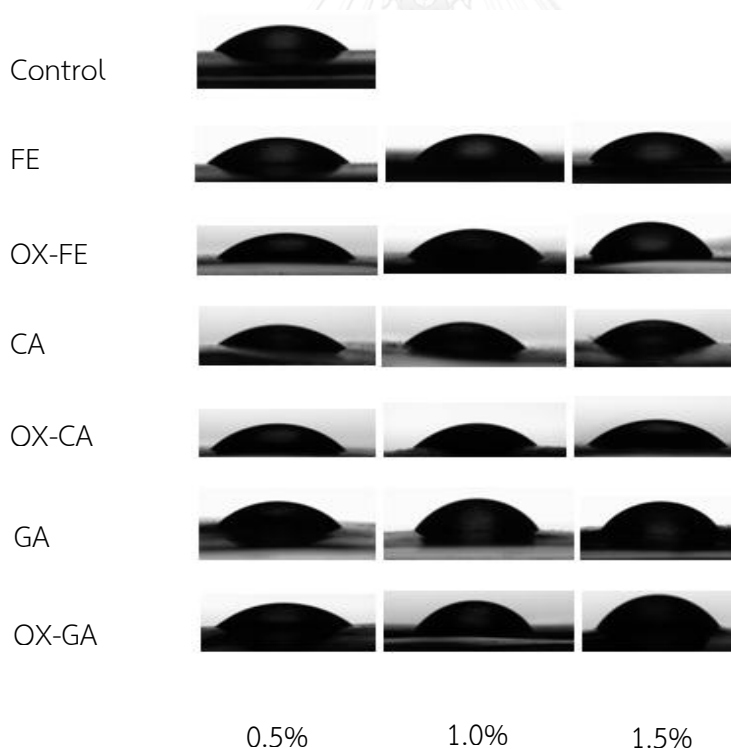
ตารางที่ 4.3 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ มุมสัมผัส และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ของฟิล์มโปรตีน ถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุติก (FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแกลลิก (GA) กรดเพรุติกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตัวอย่าง	สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (กรัม เมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง พาสคาล)	มุมสัมผัส (องศา)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (%)
Control	0.76 ± 0.06 ^a	37.20 ± 1.80 ^{efg}	69.46 ± 2.75 ^a
FE 0.5%	0.69 ± 0.06 ^{abcde}	44.01 ± 4.32 ^{bcdefg}	50.41 ± 4.19 ^{bcd}
FE 1.0%	0.72 ± 0.04 ^{abc}	52.88 ± 3.50 ^{bcdefg}	45.60 ± 2.81 ^{bcdefg}
FE 1.5%	0.75 ± 0.07 ^{ab}	52.54 ± 3.77 ^{bc}	40.85 ± 5.43 ^{defgh}
CA 0.5%	0.71 ± 0.06 ^{abcd}	46.66 ± 4.76 ^{bcde}	51.73 ± 4.68 ^{bc}
CA 1.0%	0.60 ± 0.10 ^e	42.68 ± 1.66 ^{cdefg}	50.61 ± 5.45 ^{bc}
CA 1.5%	0.63 ± 0.07 ^{de}	55.28 ± 2.55 ^{ab}	54.17 ± 7.96 ^b
GA 0.5%	0.65 ± 0.10 ^{cde}	35.20 ± 4.69 ^{fgh}	47.93 ± 2.66 ^{bcde}
GA 1.0%	0.67 ± 0.11 ^{bcde}	47.95 ± 3.11 ^{bcde}	47.06 ± 6.30 ^{bcdef}
GA 1.5%	0.73 ± 0.07 ^{abc}	47.63 ± 1.87 ^{bcde}	42.93 ± 5.36 ^{cdefg}
OX-FE 0.5%	0.61 ± 0.10 ^e	25.56 ± 0.50 ^h	45.88 ± 5.29 ^{bcdefg}
OX-FE 1.0%	0.62 ± 0.07 ^{de}	33.35 ± 1.60 ^{gh}	44.64 ± 5.24 ^{bcdefg}
OX-FE 1.5%	0.77 ± 0.04 ^a	37.67 ± 3.66 ^{defg}	44.56 ± 7.11 ^{bcdefg}
OX-CA 0.5%	0.76 ± 0.05 ^a	44.36 ± 8.65 ^{bcdef}	40.69 ± 7.09 ^{efgh}
OX-CA 1.0%	0.74 ± 0.08 ^{abc}	47.52 ± 5.76 ^{bcde}	37.63 ± 3.74 ^{fgh}
OX-CA 1.5%	0.62 ± 0.07 ^{de}	48.66 ± 7.82 ^{bcd}	39.12 ± 2.71 ^{efgh}
OX-GA 0.5%	0.71 ± 0.09 ^{abcd}	48.81 ± 5.61 ^{bcd}	40.30 ± 3.92 ^{efgh}
OX-GA 1.0%	0.66 ± 0.12 ^{cde}	55.36 ± 5.85 ^{ab}	36.95 ± 2.03 ^{gh}
OX-GA 1.5%	0.61 ± 0.13 ^e	65.28 ± 3.52 ^a	33.38 ± 4.55 ^h

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สาเหตุที่ผิวฟิล์มมีสมบัติไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากการที่กรดฟีนอลิกเกิดปฏิกิริยากับหมู่เอมีโนและหมู่ซัลไฟไฮไดรลของโปรตีนถั่วเหลือง ทำให้หมู่ดังกล่าวซึ่งมีสมบัติชอบน้ำเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ลดลง (Ou et al., 2005) ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Orliac et al. (2002) ซึ่งรายงานว่า การเติมแทนนินทำให้มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดมีค่าเท่ากับ 51.2 องศา ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่มีมุมสัมผัสเท่ากับ 17.9 องศา ในทำนองเดียวกัน Strauss and Gibson (2004) ประเมินสมบัติความไม่ชอบน้ำของโคแอเซอร์เวต (coacervate) จากเจลาตินที่เติมสารประกอบฟีนอลิก โดยเติม Sudan III ซึ่งเป็น hydrophobic dye ลงในสารแขวนลอยของโคแอเซอร์เวต พบว่าโคแอเซอร์เวตที่เติมสารประกอบ ฟีนอลิกสามารถดูดซับ Sudan III ได้ดี ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมแทบจะไม่มี การดูดซับ Sudan III เลย



รูปที่ 4.9 รูปร่างของหยดน้ำบนผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพอรูลิก (FE) กรดเพอรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และ กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.1.11 ความสามารถในการละลายน้ำ

ความสามารถในการละลายน้ำได้ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดฟีนอลิกแสดงในรูปปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดดังตารางที่ 4.3 พบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกทุกตัวอย่างมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำที่สุด โดยมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้เพียง 33.38% ซึ่งมีค่าเพียงประมาณครึ่งหนึ่งของตัวอย่างควบคุม (69.46%) การที่ฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกละลายน้ำได้น้อยลงนี้อาจเนื่องมาจากการที่กรดฟีนอลิกเกิดปฏิกิริยาได้กับหมู่มีซัลของโปรตีน ทำให้ปริมาณของหมู่ที่ชอบน้ำลดลง ประกอบกับการเชื่อมข้ามทำให้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลที่เพิ่มขึ้น โปรตีนจึงมีความสามารถในการละลายน้ำที่ลดลง (Rhim et al., 2000; Hoque et al., 2011)

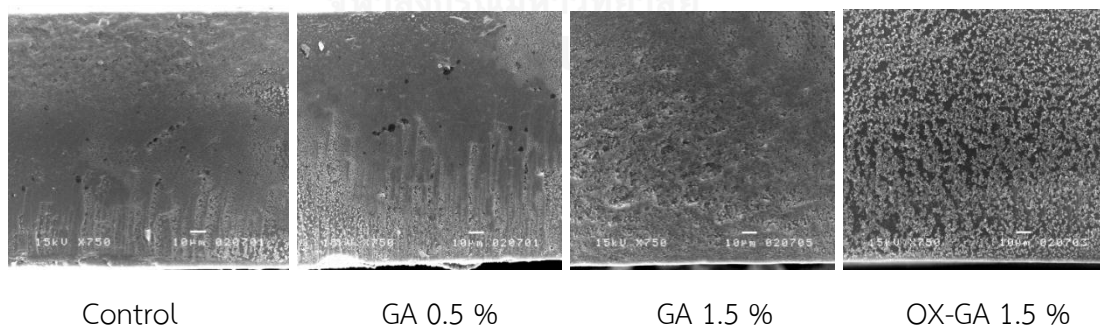
Hoque et al. (2011) ศึกษาสมบัติการละลายของฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองลายเสือ (*Sepia pharaonis*) ที่เติมสารสกัดจากอบเชย โป๊ยกั๊ก และกานพลูที่ออกซิไดส์ และพบว่าฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

González et al. (2011) ศึกษาผลของเงินพินต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง โดยแปรความเข้มข้นเงินพินในช่วง 0.1-10% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมเงินพินเพียง 0.1% ก็มีผลทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลง และการเติมเงินพินในปริมาณ 1% ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลงถึง 45% จากตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานว่าการเติมเงินพินในปริมาณมากกว่า 1% ไม่มีผลทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.1.12 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง

รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดฟีนอลิก โดยคัดเลือกตัวอย่างควบคุม ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5% ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% มาเพื่อศึกษาเปรียบเทียบ พบว่าตัวอย่างควบคุมมีลักษณะโครงสร้างที่ค่อนข้างเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) เช่นเดียวกับฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5% อย่างไรก็ตามเมื่อเติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% จะสังเกตเห็นการรวมตัวของโปรตีนมากขึ้น และเมื่อเติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ฟิล์มที่ได้มีการรวมตัวของโปรตีนอย่างมากและมีความหนาแน่นมากซึ่งเกิดจากการเชื่อมข้ามของโปรตีน (Haslam, 1989)

ก่อนหน้านี้ Nuthong et al. (2009) รายงานว่าฟิล์มโพรตีนพลาสติกจากสุกรที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 3% มีลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางที่มีการรวมตัวของโปรตีนมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

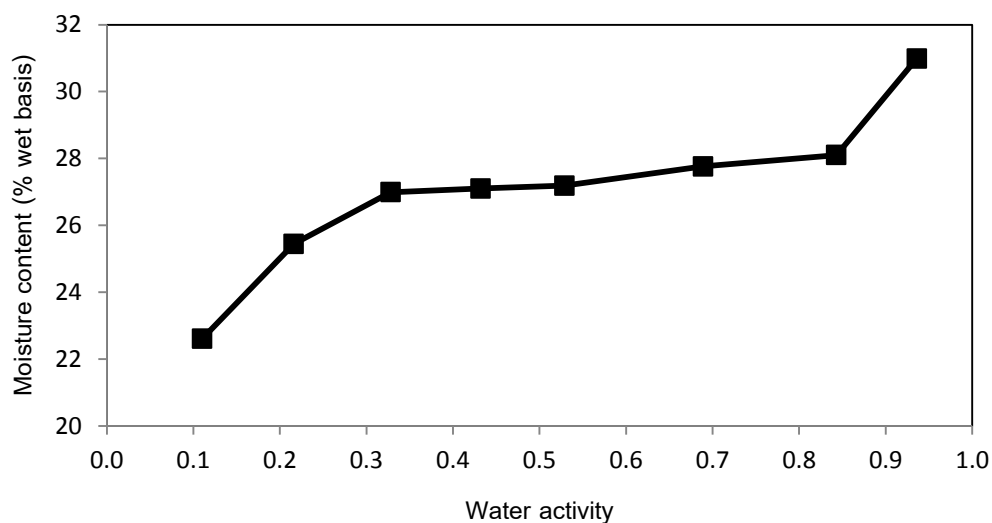


รูปที่ 4.10 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 0.5 และ 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ถ่ายที่ กำลังขยาย 750 เท่า

4.1.13 เส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้น

ในการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น (หัวข้อ 4.1.1-4.1.12) สมบัติต่างๆ ที่รายงานเป็นค่าสำหรับตัวอย่างฟิล์มที่มีวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.50 โดยในการทดลองได้นำตัวอย่างฟิล์มไปทำให้อยู่ในสมดุลกับบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 50% ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ในการนำฟิล์มไปใช้งานกับผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจมีค่าวอเตอร์แอกทิวิตีที่แตกต่างกันไป ฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองซึ่งมีสมบัติชอบน้ำสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าวอเตอร์แอกทิวิตีได้เนื่องจากการถ่ายเทของความชื้น (moisture migration) ระหว่างผลิตภัณฑ์กับฟิล์ม ซึ่งจะส่งผลต่อสมบัติต่างๆ ของฟิล์มได้ ในขั้นตอนนี้จึงคัดเลือกฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงสุด ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% มาทำให้อยู่ในสมดุลกับบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 11-94% (หรือวอเตอร์แอกทิวิตีตั้งแต่ 0.11-0.94) ที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส เพื่อติดตามพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้น รวมทั้งวิเคราะห์สมบัติเชิงกลของฟิล์มที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตี

รูปที่ 4.11 แสดงเส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นของฟิล์มที่เติมกรดกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และตารางที่ 4.4 แสดงความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีต่างๆ พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีเส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นแบบ type II ตามการจำแนกของ Brunauer et al. (1940) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปตัวเอส (sigmoid isotherm) (รูปที่ 4.11) ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างฟิล์มเป็นระบบที่ประกอบด้วยสารทั้งที่เป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ (โพรตีน) และตัวถูกละลายที่มีโมเลกุลเล็ก (กลีเซอรอลและกรดกลลิก) โดยในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.11-0.33 ปริมาณความชื้นมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อวอเตอร์แอกทิวิตีเพิ่มขึ้น และอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณความชื้นเริ่มต่ำลงในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.33-0.84 แต่เมื่อวอเตอร์แอกทิวิตีสูงกว่า 0.84 ปริมาณความชื้นกลับมาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้ง



รูปที่ 4.11 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิก ที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5%

สำหรับสมบัติเชิงกล (ตารางที่ 4.4) พบว่าอวอเตอร์แอกทिवิตีมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยความต้านทานแรงดึงขาดมีค่าลดลงเมื่ออวอเตอร์แอกทिवิตีเพิ่มขึ้น ในทำนองเดียวกันการยืดตัวถึงจุดขาดก็มีแนวโน้มลดลงเมื่ออวอเตอร์แอกทिवิตีเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าการยืดตัวถึงจุดขาดของทุกตัวอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จากการทดลองนี้จะเป็นได้ว่าการนำฟิล์มดังกล่าวไปใช้งานกับผลิตภัณฑ์ที่มีอวอเตอร์แอกทिवิตีแตกต่างกันไปจึงต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงกลที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย

ตารางที่ 4.4 ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์
เข้มข้น 1.5%

วอเตอร์แอกทिवิตี	ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)	การยืดตัวถึงจุดขาด (%) ^{ns}
0.11	3.05 ± 0.11 ^a	110.26 ± 0.72
0.22	3.04 ± 0.11 ^a	109.89 ± 1.39
0.33	1.95 ± 0.12 ^b	109.09 ± 11.62
0.43	1.59 ± 0.08 ^c	101.68 ± 2.19
0.53	1.23 ± 0.06 ^d	100.48 ± 2.07
0.69	1.19 ± 0.11 ^d	100.27 ± 5.99
0.84	0.82 ± 0.08 ^e	97.21 ± 10.62
0.94	0.89 ± 0.14 ^e	83.69 ± 25.52*

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

*ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมีค่าสูงเนื่องจากตัวอย่างฟิล์มมีการดูดความชื้น ทำให้สมบัติเชิงกลมีความแปร
ผันในช่วงกว้าง

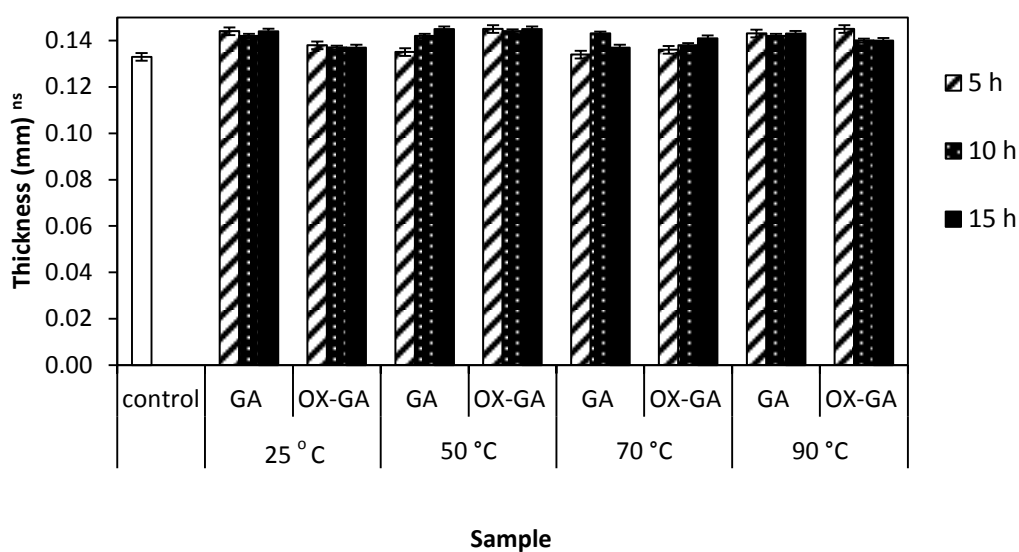
4.2 ผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก

ในการศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มด้วยความร้อนนี้ ทำโดยคัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความ
ต้านทานแรงดึงขาดสูงสุดจากข้อ 4.1 รวมทั้งคู่ของตัวอย่างฟิล์มดังกล่าวที่เติมกรดฟีนอลิกที่มี
สถานะออกซิเดชันต่างกัน โดยจากข้อ 4.1 พบว่าตัวอย่างที่มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด คือ ฟิล์ม
ที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ดังนั้นตัวอย่างที่นำมาศึกษาในการทดลองนี้ ได้แก่ ฟิล์มที่
เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% แปร
อุณหภูมิการบ่มแผ่นฟิล์มเป็น 4 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (25), 50, 70 และ 90 องศาเซลเซียส

และแปรรยะเวลาการบ่มเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 5, 10 และ 15 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิก ผลการวิเคราะห์สมบัติของตัวอย่างฟิล์มมีดังนี้

4.2.1 ความหนา

รูปที่ 4.12 แสดงความหนาของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังนั้นสำหรับงานวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่า สมบัติที่แตกต่างกันของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดไม่ได้เป็นผลมาจากความหนา



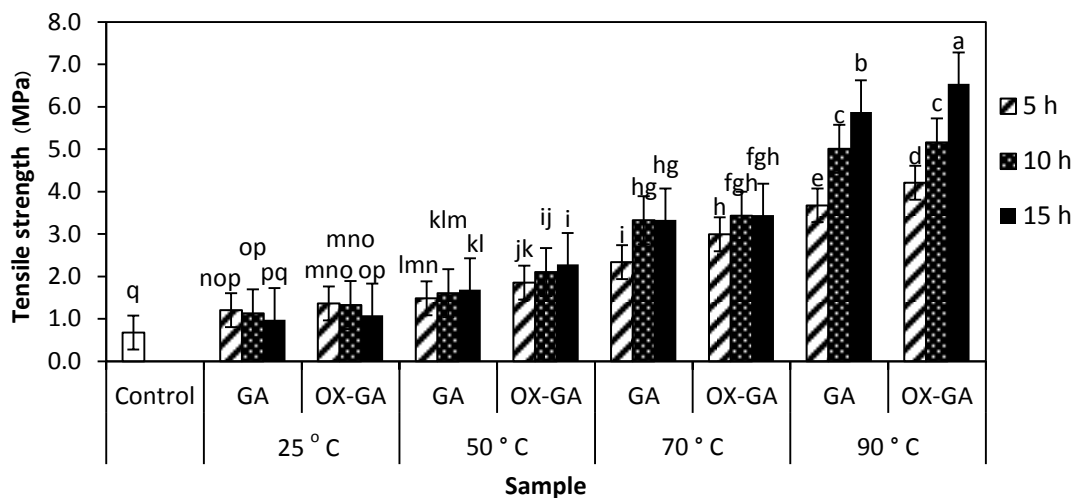
รูปที่ 4.12 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Kim et al. (2002) ซึ่งศึกษาผลของการบ่มฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และยังสอดคล้องกับ Hoque et al. (2010) ที่

ศึกษาผลของการบ่มฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองที่อุณหภูมิ 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และพบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างรวมทั้งตัวอย่างควบคุมที่ไม่บ่มด้วยความร้อนมีความหนาอยู่ในช่วง 0.037-0.041 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

4.2.2 ความต้านทานแรงดึงขาด

ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.13 พบว่าอุณหภูมิการบ่มมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาดอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) โดยเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความต้านทานแรงดึงขาดมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ระยะเวลาการบ่มไม่มีผลมากนักต่อความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิต่ำ (25 และ 50 องศาเซลเซียส) แต่สำหรับฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ 90 องศาเซลเซียส พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้น ($p\leq 0.05$) และโดยทั่วไปพบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์ โดยฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 6.54 เมกะพาสคาล ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกและไม่บ่มด้วยความร้อน) ถึง 861%



รูปที่ 4.13 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Kim et al. (2002) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง โดยบ่มตัวอย่างฟิล์มที่อุณหภูมิ 60, 72.5 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 72.5 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิ 60 และ 72.5 องศาเซลเซียสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ในทำนองเดียวกัน Gennadios et al. (1996) ศึกษาการบ่มฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่อุณหภูมิ 80 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดที่สูงขึ้น นอกจากนี้ Hernández-Muñoz et al. (2004b) ศึกษาผลของการบ่มฟิล์มไกลอะดินและกลูเตนินจากข้าวสาลี โดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 40, 55, 70, 85, 95 และ 115 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าฟิล์มโปรตีนข้าวสาลีทั้งสองชนิดมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้น

การที่การบ่มด้วยความร้อนสามารถปรับปรุงความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนนี้ เนื่องมาจากการให้ความร้อนโพรตีนในภาวะที่เป็นต่างสามารถส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮดรอเจน-ไดซัลไฟด์ (Jensen, 1959) Fernandes and Ramos (2004) เสนอว่าปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮดรอเจน-ไดซัลไฟด์ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 4 ปฏิกิริยา ดังสมการเคมีที่ 4.1-4.4



ซึ่งสามารถเขียนเป็นปฏิกิริยาโดยรวมได้ดังสมการเคมีที่ (4.5)

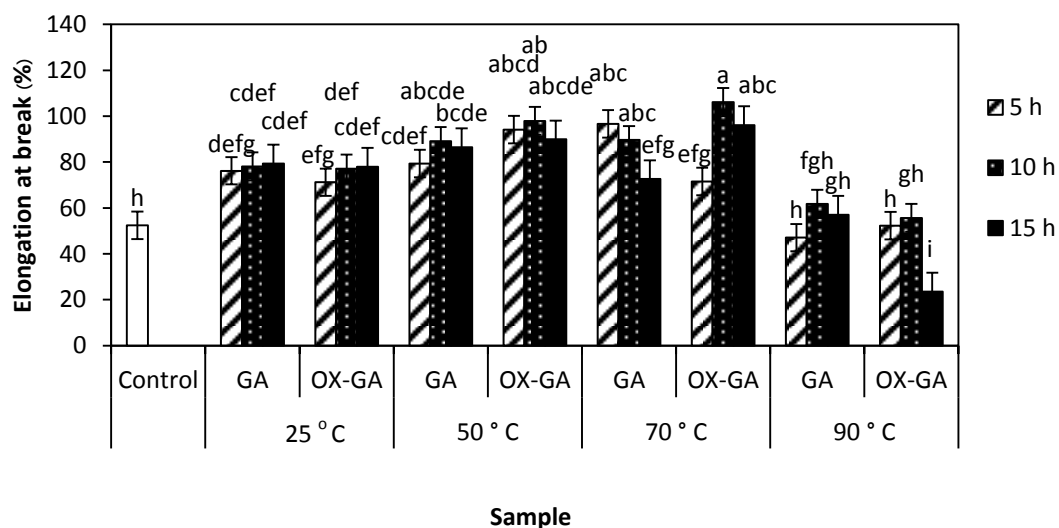


พันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นทำให้โครงร่างแหของโพรตีนมีความแข็งแรงมากขึ้น เนื่องจากพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่แข็งแรง โดยมีค่าพลังงานที่ต้องการในการทำให้พันธะแตกออก (bond dissociation energy) สูงถึง 60 กิโลแคลอรี/โมล ซึ่งสูงกว่าค่าพลังงานที่ต้องการในการทำให้พันธะแตกออกของพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ที่เกิดพันธะไฮโดรเจนได้ของโพรตีน (1-3 กิโลแคลอรี/โมล) (Cremlyn, 1996; Berg et al., 2002)

4.2.3 การยึดตัวถึงจุดขาด

การยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.14 พบว่าในช่วงอุณหภูมิการบ่ม 25-70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อการยึดตัวถึงจุดขาดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามการบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ฟิล์มที่ได้มีการยึดตัวถึงจุดขาดต่ำกว่าฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำมาก โดยมีค่าเพียง 23.51%



รูปที่ 4.14 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Gennadios et al. (1996) ซึ่งศึกษาการบ่มฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่อุณหภูมิ 80 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-24 ชั่วโมง พบว่าการบ่มด้วยความร้อนส่งผลให้ฟิล์มมีการยืดตัวถึงจุดขาดลดลง โดยตัวอย่างควบคุมที่ไม่บ่มด้วยความร้อนมีการยืดตัวถึงจุดขาดเท่ากับ 111.9% ในขณะที่ฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิ 80 และ 95 องศาเซลเซียสมีการยืดตัวถึงจุดขาดประมาณ 30 และ 25% ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกัน Hernández-Muñoz et al. (2004b) รายงานว่าการบ่มฟิล์มไกลอะดินและกลูเตนินจากข้าวสาลีที่อุณหภูมิ 95 และ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ฟิล์มมีการยืดตัวถึงจุดขาดลดลง 90 และ 94% ตามลำดับเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม การที่ฟิล์มมีการยืดตัวถึงจุดขาดลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานานนี้ อาจเนื่องมาจากการเกิดพันธะ

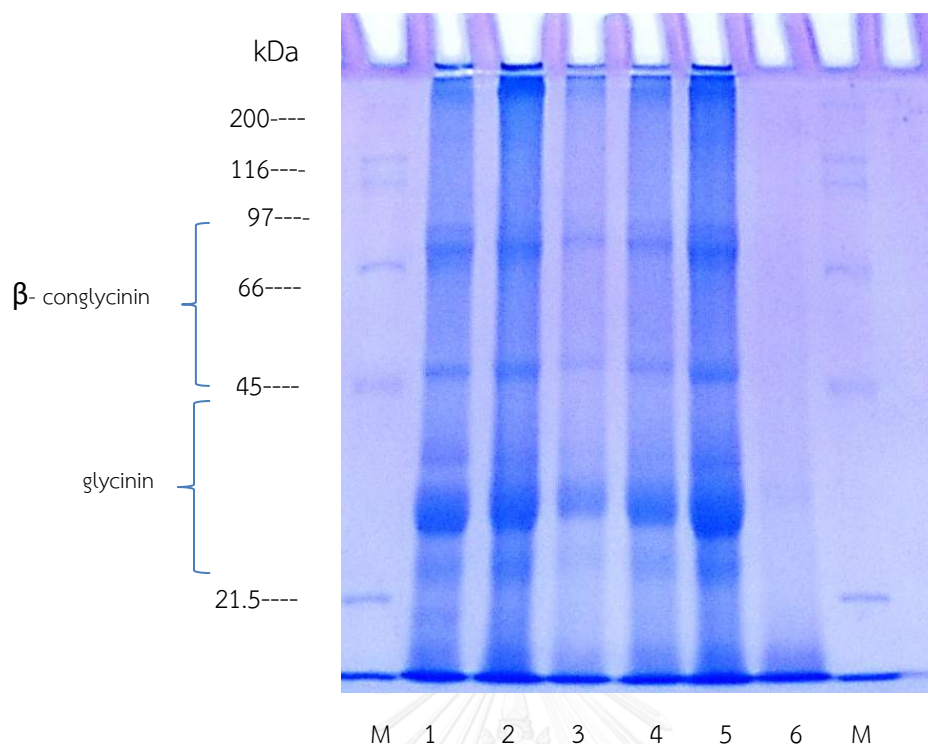
ไดซัลไฟด์ ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์มีความยาวพันธะ (bond length) ประมาณ 205 พิโคเมตร ซึ่งสั้นกว่าพันธะไฮโดรเจนซึ่งมีความยาวประมาณ 300 พิโคเมตร (Iozzi et al., 2011) จึงทำให้ระยะระหว่างหมู่ที่เกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลพอลิเมอร์มีค่าลดลง

4.2.4 รูปแบบของแถบโปรตีน

รูปที่ 4.15 แสดงรูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 และ 15 ชั่วโมง

จากรูปที่ 4.15 พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 6) มีความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 24-84 กิโลดาลตัน ลดลงมากที่สุด การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเนื่องมาจากโปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุล ซึ่งส่งผลให้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหายไป (Rawel et al., 2002) อย่างไรก็ตามการที่ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเนื่องจากโปรตีนเหล่านี้ถูกเหวี่ยงแยกออกไปในขั้นตอนการเตรียมสารละลายโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ช่องที่ 5) ซึ่งยังคงปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งให้เห็นว่าระยะเวลาการบ่มมีผลต่อการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน

เมื่อเปรียบเทียบฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 6) กับฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 4) พบว่าช่องที่ 4 ยังปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่องที่ 6 ซึ่งแสดงว่าสถานะออกซิเดชันของกรดแกลลิกมีผลต่อการเชื่อมข้ามของโปรตีนแม้จะใช้ภาวะในการบ่มที่เหมือนกัน



รูปที่ 4.15 รูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 1) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ช่องที่ 2) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 3) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 4) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ช่องที่ 5) และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 3) ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (ช่องที่ 2) และฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์และบ่มที่

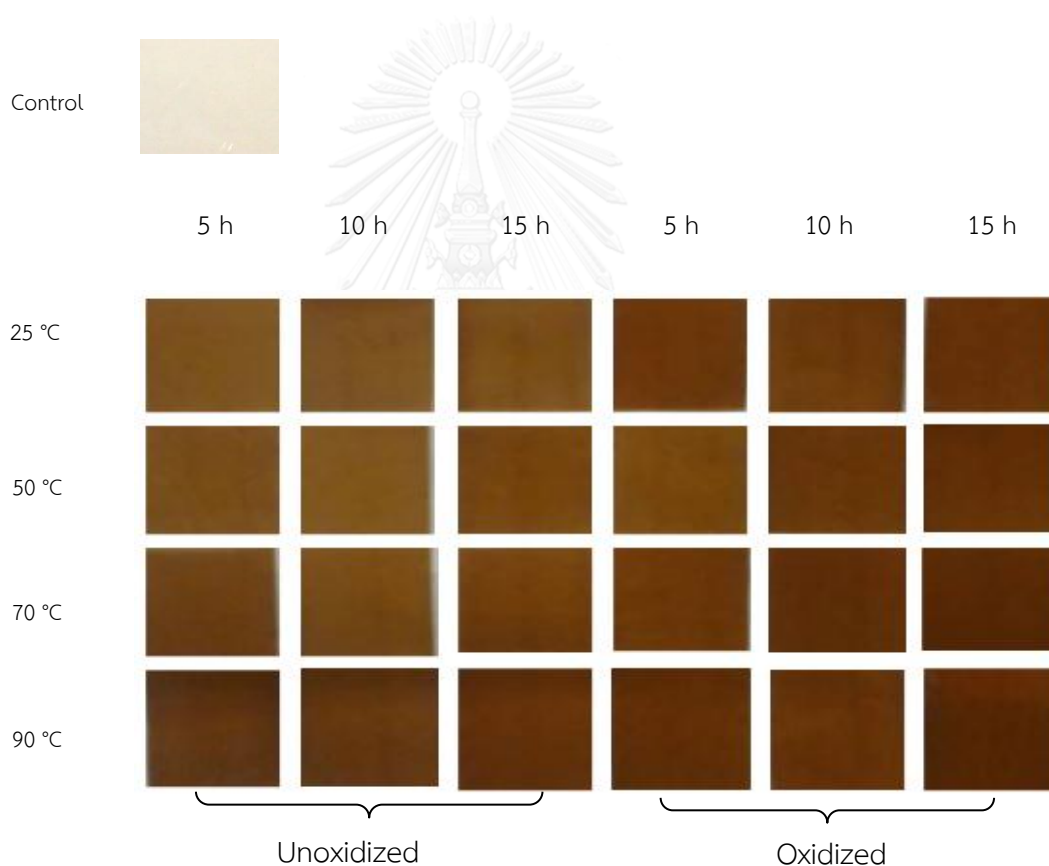
อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ช่องที่ 1) พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกับตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

ในด้านผลของอุณหภูมิการบ่ม พบว่าฟิล์มบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (ช่องที่ 4, 5 และ 6) มีความเข้มของแถบโปรตีนต่ำกว่าฟิล์มบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ช่องที่ 1, 2 และ 3) แสดงว่าอุณหภูมิการบ่มมีผลต่อการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน

4.2.5 คำสี

ตารางที่ 4.5 และ 4.6 แสดงค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่าฟิล์มมีค่า L^* ลดลง ในขณะที่มีค่า a^* และ b^* เพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.5) ส่วนมุมสีของฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนมีค่าอยู่ในช่วง 65-80 องศา (ตารางที่ 4.6) ซึ่งเป็นค่าของมุมสีส้มแดงจนถึงสีเหลือง (McGuire, 1992) โดยมุมสีมีค่าเข้าใกล้มุมของสีแดงมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น (มุมสีของสีแดงและเหลืองเท่ากับ 0 และ 90 องศา ตามลำดับ) สำหรับความเข้มสี พบว่าฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนมีค่าความเข้มสีสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และความเข้มสีมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น โดยความร้อนสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและโปรตีนซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบที่มีสี (Pierpoint, 1969) รูปที่ 4.16 แสดงลักษณะปรากฏของตัวอย่างฟิล์ม ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Jangchud and Chinnan (1999) ซึ่งรายงานว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่บ่มที่อุณหภูมิ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส มีสีเหลืองมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเพิ่มขึ้น

Kim et al. (2002) ศึกษาการบ่มฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 60, 72.5 และ 85 องศาเซลเซียส และพบว่าตัวอย่างฟิล์มมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้น โดยตัวอย่างฟิล์มมีค่า b^* เท่ากับ 14.90, 17.67 และ 21.00 ตามลำดับ ส่วน Hernández-Muñoz et al. (2004b) ศึกษาการบ่มฟิล์มไกลอะดินและกลูเตนินจากข้าวสาลี โดยแปรอุณหภูมิเป็น 40, 55, 70, 85, 95 และ 115 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส ทำให้ฟิล์มมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย และเมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มเพิ่มเป็น 115 องศาเซลเซียส ฟิล์มที่ได้มีสีเข้มขึ้นมาก



รูปที่ 4.16 ลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.5 ค่าสี L^* , a^* และ b^* ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		ค่าสี		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	L^*	a^*	b^*
Control			75.41 ± 0.77 ^a	-1.29 ± 0.78 ^m	16.857 ± 0.28 ⁱ
GA 1.5%	25	5	70.66 ± 1.30 ^b	6.28 ± 0.60 ^{kl}	31.597 ± 0.36 ^{hi}
GA 1.5%		10	70.45 ± 0.92 ^b	5.91 ± 0.37 ^l	30.067 ± 0.36 ^h
GA 1.5%		15	68.30 ± 2.72 ^c	7.05 ± 1.27 ^{kl}	35.678 ± 0.36 ^h
OX-GA 1.5%		5	53.74 ± 2.30 ^{ijk}	13.25 ± 1.24 ^{fgh}	40.922 ± 0.36 ^{cde}
OX-GA 1.5%		10	53.11 ± 3.48 ^{ijk}	13.63 ± 1.55 ^{defgh}	40.916 ± 0.36 ^{cde}
OX-GA 1.5%		15	54.20 ± 2.18 ^{ghij}	14.29 ± 1.02 ^{defg}	42.831 ± 0.36 ^{ab}
GA 1.5%	50	5	67.16 ± 3.08 ^c	8.30 ± 1.52 ^{jkl}	36.854 ± 0.37 ^{fg}
GA 1.5%		10	66.69 ± 1.46 ^c	8.71 ± 0.73 ^{jkl}	35.909 ± 0.37 ^{gh}
GA 1.5%		15	64.89 ± 1.62 ^d	9.24 ± 1.02 ^{ijk}	37.545 ± 0.34 ^{de}
OX-GA 1.5%		5	61.34 ± 3.46 ^e	10.86 ± 1.70 ^{ij}	40.755 ± 0.37 ^{de}
OX-GA 1.5%		10	56.47 ± 2.06 ^f	13.19 ± 1.27 ^{fgh}	43.207 ± 0.36 ^a
OX-GA 1.5%		15	52.66 ± 2.72 ^{ijk}	14.98 ± 1.17 ^{defg}	40.710 ± 0.36 ^{de}
GA 1.5%	70	5	60.29 ± 1.64 ^e	11.99 ± 0.97 ^{ghi}	41.273 ± 0.36 ^{cde}
GA 1.5%		10	57.26 ± 2.78 ^f	13.75 ± 1.46 ^{defgh}	40.752 ± 0.36 ^{de}
GA 1.5%		15	54.42 ± 1.99 ^{ghi}	15.33 ± 1.00 ^{cdefg}	41.023 ± 0.37 ^{cde}
OX-GA 1.5%		5	55.70 ± 2.83 ^{fg}	14.21 ± 1.17 ^{defg}	41.649 ± 0.36 ^{cd}
OX-GA 1.5%		10	53.40 ± 2.38 ^{ijk}	27.95 ± 1.46 ^a	40.448 ± 0.37 ^e
OX-GA 1.5%		15	52.42 ± 2.97 ^{jkl}	16.62 ± 2.85 ^{bcde}	40.326 ± 0.37 ^e
GA 1.5%	90	5	55.46 ± 2.23 ^{fgh}	16.24 ± 2.96 ^{bcdef}	40.131 ± 0.36 ^e
GA 1.5%		10	54.03 ± 2.12 ^{ghij}	16.60 ± 1.19 ^{bcde}	40.647 ± 0.36 ^{de}
GA 1.5%		15	52.08 ± 1.40 ^{kl}	17.57 ± 0.79 ^{bc}	41.131 ± 0.36 ^{cde}
OX-GA 1.5%		5	60.09 ± 1.30 ^e	13.53 ± 0.80 ^{efgh}	40.676 ± 0.36 ^{de}
OX-GA 1.5%		10	54.58 ± 2.63 ^{ghi}	16.86 ± 1.41 ^{bcd}	41.946 ± 0.33 ^{bc}
OX-GA 1.5%		15	50.68 ± 1.75 ^l	18.87 ± 0.78 ^b	41.266 ± 0.38 ^{cde}

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 4.6 มุมสี่และความเข้มสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

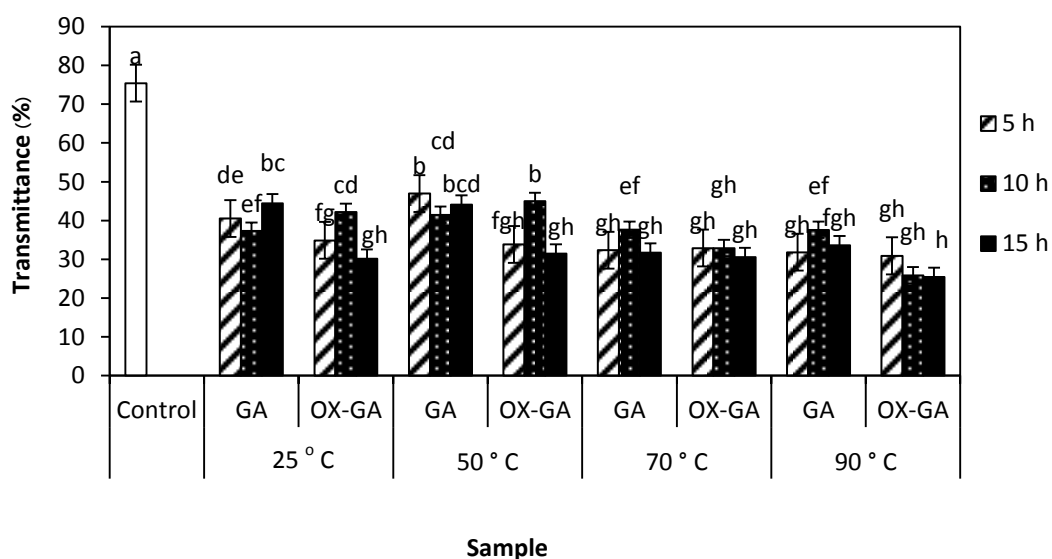
ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		ค่าสี	
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	มุมสี่ (องศา)	ความเข้มสี
Control			85.36 ± 0.07 ^a	16.66 ± 0.12 ⁿ
GA 1.5%	25	5	77.44 ± 0.59 ^{de}	31.72 ± 0.33 ^l
GA 1.5%		10	76.68 ± 0.46 ^{ef}	30.55 ± 0.40 ^m
GA 1.5%		15	76.21 ± 0.47 ^f	35.18 ± 1.42 ^k
OX-GA 1.5%		5	73.98 ± 0.55 ^f	42.28 ± 0.78 ^h
OX-GA 1.5%		10	73.38 ± 1.07 ^f	43.81 ± 0.50 ^{def}
OX-GA 1.5%		15	69.64 ± 1.09 ^{ij}	44.80 ± 0.66 ^{bc}
GA 1.5%	50	5	79.24 ± 0.30 ^b	38.83 ± 1.13 ⁱ
GA 1.5%		10	79.02 ± 0.24 ^{bc}	37.51 ± 1.00 ^j
GA 1.5%		15	78.09 ± 0.67 ^{cd}	39.45 ± 0.57 ⁱ
OX-GA 1.5%		5	70.57 ± 1.24 ⁱ	42.88 ± 0.60 ^{gh}
OX-GA 1.5%		10	71.26 ± 1.65 ^{gh}	45.74 ± 0.23 ^a
OX-GA 1.5%		15	71.11 ± 0.93 ^{gh}	43.49 ± 0.35 ^{efg}
GA 1.5%	70	5	73.22 ± 0.63 ^g	43.54 ± 0.71 ^{efg}
GA 1.5%		10	72.15 ± 1.28 ^g	42.90 ± 0.58 ^{gh}
GA 1.5%		15	69.03 ± 1.65 ^{jk}	43.87 ± 0.42 ^{def}
OX-GA 1.5%		5	71.32 ± 0.56 ^{gh}	44.27 ± 0.52 ^{cde}
OX-GA 1.5%		10	69.47 ± 2.02 ^j	43.60 ± 1.84 ^{efg}
OX-GA 1.5%		15	69.24 ± 0.88 ^{jk}	43.17 ± 1.26 ^{fg}
GA 1.5%	90	5	68.34 ± 1.12 ^{kl}	43.21 ± 0.25 ^{fg}
GA 1.5%		10	67.97 ± 0.35 ^l	44.15 ± 0.45 ^{cde}
GA 1.5%		15	66.09 ± 0.67 ^m	44.54 ± 0.20 ^{cd}
OX-GA 1.5%		5	71.83 ± 0.55 ^g	43.05 ± 0.56 ^{fgh}
OX-GA 1.5%		10	68.23 ± 0.96 ^{kl}	45.35 ± 0.46 ^{ab}
OX-GA 1.5%		15	65.49 ± 0.91 ^m	45.40 ± 0.44 ^{ab}

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.2.6 ความโปร่งแสง

รูปที่ 4.17 แสดงความโปร่งแสงของฟิล์มในรูปร้อยละของแสงส่องผ่าน พบว่า อุณหภูมิการบ่มมีผลต่อความโปร่งแสง โดยฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส มีร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าฟิล์มที่บ่มที่ 25 และ 50 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปพบว่าฟิล์มที่บ่มที่อุณหภูมิเท่ากันเป็นระยะเวลาต่างๆ มีความโปร่งแสงใกล้เคียงกัน จากงานวิจัยนี้พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีความโปร่งแสงต่ำที่สุดโดยมีร้อยละของแสงส่องผ่านเพียง 25.44 การที่การบ่มด้วยความร้อนทำให้ฟิล์มมีความโปร่งแสงลดลงอาจเนื่องมาจากความร้อนสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาระหว่าง สารประกอบฟีนอลิกและโปรตีนซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารประกอบที่มีสี (Pierpoint, 1969) รวมทั้ง อาจช่วยเร่งการรวมตัวกันของโปรตีนจึงทำให้ความสามารถในการส่องผ่านของแสงลดต่ำลง (Tang et al., 2005; Denavi et al., 2009; González et al., 2011)



รูปที่ 4.17 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และ กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Garcia and Sobral (2005) ที่ศึกษาการบ่มฟิล์มโปรตีน ไมโอไฟบริลลาร์และฟิล์มโปรตีนซาร์โคพลาสซึมจากปลาในสกุล Tilapia โดยบ่มที่อุณหภูมิ 45 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้น ฟิล์มที่ได้มีสีเข้มขึ้นและมีความทึบแสงมากขึ้น

4.2.7 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

ตารางที่ 4.7 แสดงสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รวมทั้งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำอยู่ประมาณ 0.7 กรัม เมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง พาสคาล ส่วนฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส รวมทั้งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงเล็กน้อยโดยมีค่าประมาณ 0.6 กรัม เมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง พาสคาล แต่ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส รวมทั้งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสกลับมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำเพิ่มเป็น 0.7 กรัม เมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง พาสคาล อีกครั้งหนึ่ง

การที่ความร้อนช่วยเร่งให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนเกิดเป็นโครงร่างตาข่ายที่มีความหนาแน่นมากขึ้นจึงสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติในการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำได้ (Gennadios et al., 1996) อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีน ส่งผลให้ฟิล์มมีโครงสร้างไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ไอน้ำจึงซึมผ่านได้ง่ายขึ้น

Ali et al. (1997) ศึกษาการบ่มฟิล์มกลูเตน โดยแปรอุณหภูมิที่บ่มเป็น 65, 80 และ 95 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ฟิล์มทุกตัวอย่างมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 4.7 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ มุมสัมผัส และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ของฟิล์มโพรตีน ถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

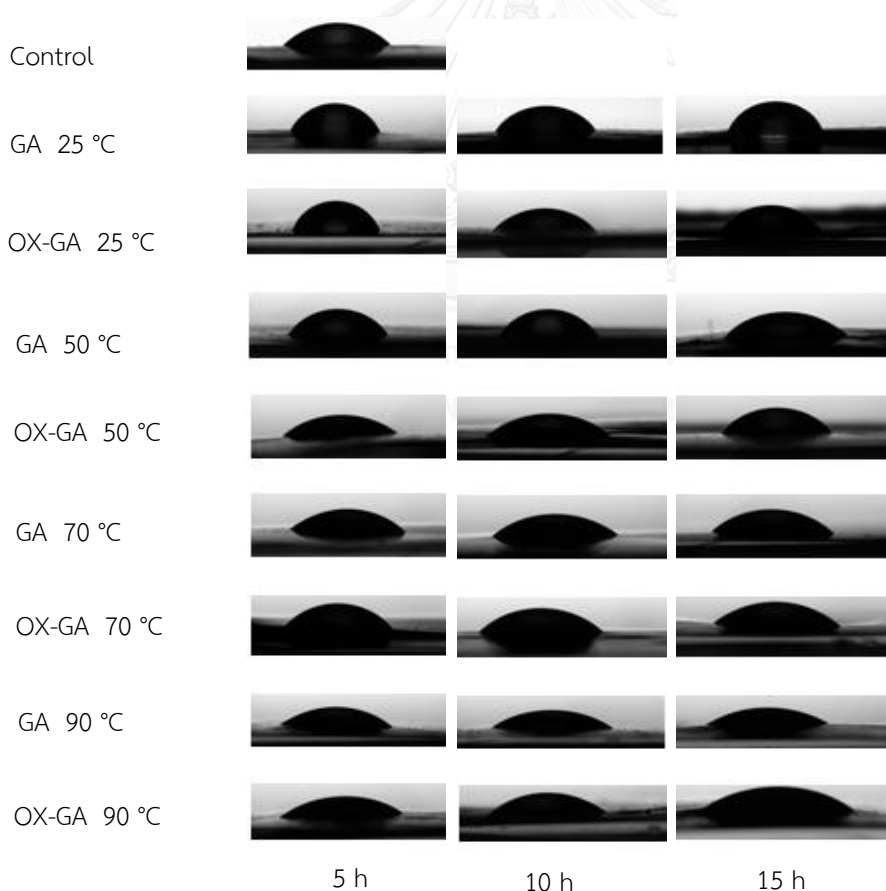
ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		สภาพให้ซึมผ่าน ได้ของไอน้ำ (กรัม เมตร/ตาราง เมตร ชั่วโมง พาสคาล)	มุมสัมผัส (องศา)	ปริมาณของแข็ง ที่ละลายได้ (%)
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)			
Control			0.74 ± 0.07 ^{abcde}	37.20 ± 1.80 ^{efg}	69.46 ± 2.75 ^a
GA 1.5%	25	5	0.73 ± 0.11 ^{abcdgf}	62.48 ± 3.45 ^{ab}	38.57 ± 5.04 ^{def}
GA 1.5%		10	0.74 ± 0.12 ^{abcdef}	59.84 ± 7.81 ^b	41.94 ± 2.48 ^{de}
GA 1.5%		15	0.70 ± 0.05 ^{bcdefg}	68.78 ± 1.74 ^a	35.31 ± 2.51 ^{def}
OX-GA 1.5%		5	0.74 ± 0.05 ^{abcdef}	69.94 ± 1.23 ^a	33.70 ± 3.90 ^{def}
OX-GA 1.5%		10	0.71 ± 0.04 ^{bcdefg}	68.39 ± 7.39 ^a	29.21 ± 6.38 ^{ef}
OX-GA 1.5%		15	0.77 ± 0.10 ^{abcd}	66.15 ± 3.10 ^{ab}	28.46 ± 0.29 ^f
GA 1.5%	50	5	0.70 ± 0.08 ^{bcdefg}	42.54 ± 2.18 ^{cdefg}	45.97 ± 5.70 ^{cd}
GA 1.5%		10	0.80 ± 0.19 ^{ab}	49.79 ± 3.21 ^c	42.72 ± 3.13 ^d
GA 1.5%		15	0.69 ± 0.08 ^{cdefgh}	44.06 ± 2.06 ^{cde}	40.73 ± 1.21 ^{def}
OX-GA 1.5%		5	0.63 ± 0.07 ^{fghi}	40.16 ± 3.44 ^{defgh}	41.74 ± 1.43 ^{de}
OX-GA 1.5%		10	0.57 ± 0.07 ^{ij}	40.94 ± 0.31 ^{defgh}	39.09 ± 5.46 ^{def}
OX-GA 1.5%		15	0.66 ± 0.02 ^{efghi}	43.43 ± 7.27 ^{cdef}	33.82 ± 3.50 ^{def}
GA 1.5%	70	5	0.52 ± 0.02 ^j	35.40 ± 2.26 ^{fgh}	39.17 ± 2.57 ^{def}
GA 1.5%		10	0.67 ± 0.04 ^{defghi}	36.13 ± 2.14 ^{efgh}	41.54 ± 1.45 ^{def}
GA 1.5%		15	0.62 ± 0.08 ^{ghi}	40.85 ± 4.27 ^{defgh}	39.31 ± 4.42 ^{def}
OX-GA 1.5%		5	0.60 ± 0.04 ^{hij}	38.65 ± 4.92 ^{efgh}	36.23 ± 4.13 ^{def}
OX-GA 1.5%		10	0.74 ± 0.05 ^{abcdef}	39.21 ± 2.25 ^{efgh}	45.67 ± 1.39 ^{cd}
OX-GA 1.5%		15	0.72 ± 0.09 ^{abcdefg}	41.24 ± 0.52 ^{defgh}	42.66 ± 4.79 ^d
GA 1.5%	90	5	0.82 ± 0.14 ^a	25.36 ± 0.59 ⁱ	43.47 ± 2.54 ^{bc}
GA 1.5%		10	0.78 ± 0.06 ^{abc}	35.09 ± 2.75 ^{gh}	42.51 ± 1.08 ^d
GA 1.5%		15	0.77 ± 0.16 ^{abcd}	33.91 ± 3.03 ^h	56.10 ± 1.37 ^{bc}
OX-GA 1.5%		5	0.80 ± 0.07 ^{ab}	37.37 ± 0.26 ^{efgh}	36.69 ± 1.41 ^{def}
OX-GA 1.5%		10	0.78 ± 0.10 ^{abc}	40.79 ± 2.86 ^{defgh}	59.27 ± 2.76 ^b
OX-GA 1.5%		15	0.79 ± 0.08 ^{abc}	47.41 ± 4.77 ^{cd}	45.66 ± 1.65 ^{cd}

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.2.8 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม

มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์และบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.18 โดยทั่วไปพบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มสูงขึ้น มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มมีค่าลดลง แสดงถึงสมบัติความชอบน้ำที่เพิ่มขึ้น Tang et al. (2009) ศึกษาการบ่มฟิล์มโปรตีนที่สกัดจากพืชในสกุล Phaseolus 3 ชนิดคือ ถั่วแดง (red bean) ถั่วแดงหลวง (kidney bean) และถั่วเขียว (mung bean) พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทำให้มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มของฟิล์มดังกล่าวมีค่าลดลงจาก 92.3, 87.3 และ 90.3 องศา เป็น 64.5, 55.2 และ 58.7 องศา ตามลำดับ



รูปที่ 4.18 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

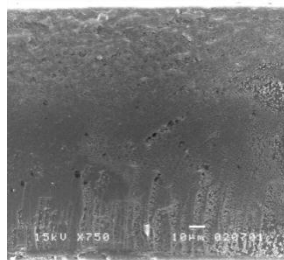
4.2.9 ความสามารถในการละลายน้ำ

ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์และบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.7 ฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนทุกตัวอย่างมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่โดยทั่วไปพบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ($p > 0.05$) ยกเว้นการใช้อุณหภูมิที่สูงและ/หรือระยะเวลาการบ่มที่นาน เช่น การบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 หรือ 15 ชั่วโมง เนื่องจากความร้อนที่สูงมากอาจทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน ไม่เกิดเป็นโครงร่างตาข่ายที่สม่ำเสมอ ฟิล์มจึงละลายน้ำได้มากขึ้น (Hernández-Muñoz et al., 2004b)

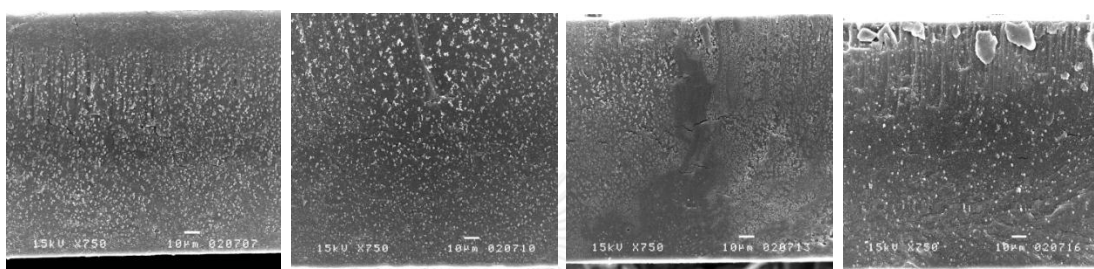
ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Hernández-Muñoz et al. (2004b) ที่พบว่าการบ่มฟิล์มกลูเตนที่อุณหภูมิ 40, 55, 70, 85, 95 และ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายของฟิล์ม

4.2.10 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง

ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แสดงดังรูปที่ 4.19 พบว่าฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนมีลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางที่มีการรวมตัวกันของโปรตีนและมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส Wang et al. (2013) ศึกษาการบ่มฟิล์มเวย์โปรตีนที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส และรายงานว่าความร้อนทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนทำให้เกิดเป็นโครงสร้างขนาดใหญ่และทำให้โครงสร้างภาคตัดขวางมีลักษณะที่หนาแน่นมากขึ้น



Control



GA 70 °C

OX-GA 70 °C

GA 90 °C

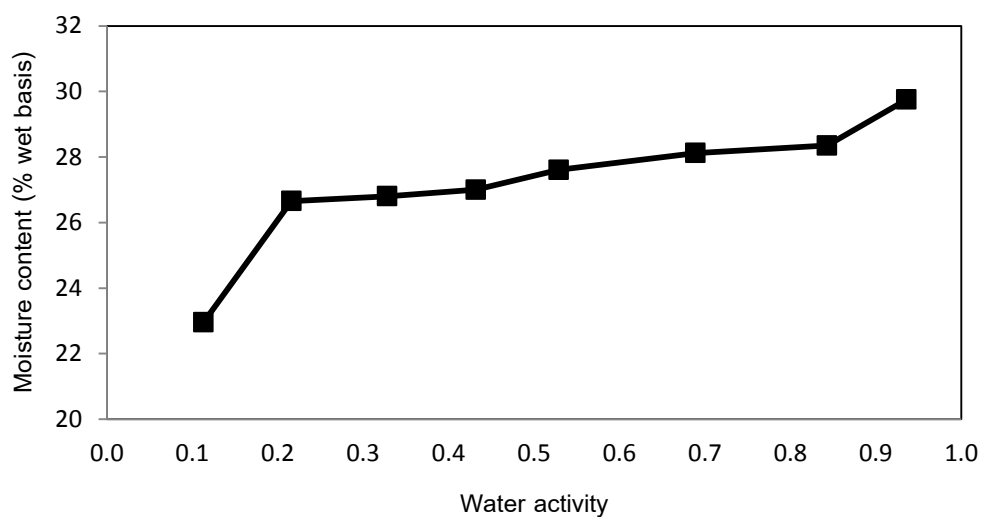
OX-GA 90 °C

รูปที่ 4.19 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ถ่ายที่กำลังขยาย 750 เท่า

4.2.11 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น

รูปที่ 4.20 แสดงเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง สาเหตุที่คัดเลือกตัวอย่างดังกล่าวมาศึกษาพฤติกรรมการดูดความชื้น เนื่องจากตัวอย่างดังกล่าวมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดที่สูง ตารางที่ 4.8 แสดงความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตี พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นแบบ type II ตามการจำแนกของ Brunauer et al. (1940) ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปตัวเอส (รูปที่ 4.20) สำหรับสมบัติเชิงกล (ตารางที่ 4.8) พบว่าเมื่อวอเตอร์แอกทิวิตีเพิ่มขึ้น ความต้านทานแรงดึงขาดมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในด้านการยืดตัวถึงจุดขาดแม้จะมีแนวโน้มลดลงเมื่อ

วอเตอร์แอกทิวิตีเพิ่มขึ้น แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) สำหรับตัวอย่างที่มีวอเตอร์แอกทิวิตีต่างกัน ดังนั้นการนำฟิล์มดังกล่าวไปใช้งานกับผลิตภัณฑ์ที่มีวอเตอร์แอกทิวิตีแตกต่างกันไปจึงต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงกลที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย



รูปที่ 4.20 เส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีน และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.8 ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์
เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ซึ่งนำไปทำให้อยู่ในสมดุ
วอเตอร์แอกทิวิตีต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

วอเตอร์แอกทิวิตี	ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)	การยืดตัวถึงจุดขาด (%) ^{ns}
0.11	3.77 ± 0.33 ^a	110.64 ± 2.21
0.22	3.61 ± 0.26 ^a	110.08 ± 0.37
0.33	2.44 ± 0.12 ^b	100.56 ± 10.34
0.43	2.21 ± 0.13 ^b	100.48 ± 3.71
0.53	2.01 ± 0.01 ^{bc}	99.38 ± 2.42
0.69	1.59 ± 0.26 ^{cd}	98.71 ± 0.92
0.84	1.60 ± 0.04 ^{cd}	98.08 ± 15.80
0.94	1.37 ± 0.33 ^d	97.26 ± 6.49

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่ากรดฟีนอลิกสามารถใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด การเติมกรดเพรูลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก ทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ มีผลให้ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น โดยกรดแกลลิกมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กรดแคฟเฟอิก และกรดเพรูลิก ตามลำดับ โดยกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลสูงกว่ากรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ และโดยทั่วไปความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 1.47 เมกะพาสคาล และ 86.98% ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิก) 116 และ 66% ตามลำดับ ความสามารถในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของกรดฟีนอลิกนี้เป็นผลมาจากการที่กรดฟีนอลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์สามารถทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีน ซึ่งยืนยันจากการติดตามรูปแบบของแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE การวิเคราะห์ปริมาณ available lysine และซัลไฟไฮดริลทั้งหมด รวมทั้งการติดตามการเกิดพันธะ C-N โดยใช้ FTIR

อย่างไรก็ตามการเติมกรดฟีนอลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์มีผลสำคัญต่อสมบัติเชิงแสง (optical property) ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมี L^* และความโปร่งแสงลดลง ในขณะที่มีค่า a^* ค่า b^* และความเข้มสีมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีสีน้ำตาลชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นสูง

โดยทั่วไปพบว่า การเติมกรดฟีนอลิกทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นและ ความสามารถในการละลายน้ำลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกออกซิไดส์ สำหรับ สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ พบว่าการเติมกรดฟีนอลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์อาจทำให้ฟิล์ม มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงหรือไม่เปลี่ยนแปลง

สำหรับพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียสของฟิล์มที่เติมกรด แกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นแบบ type II โดยวอเตอร์แอกทिवิตีของฟิล์มมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาด แต่ไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาด ดังนั้นการนำฟิล์มดังกล่าวไปใช้งานกับผลิตภัณฑ์ที่มีวอเตอร์แอกทिवิตีแตกต่างกันไปจึงต้องคำนึงถึง สมบัติเชิงกลที่อาจเปลี่ยนแปลงไปด้วย

สำหรับการศึกษาผลของการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติม กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% พบว่าการบ่มด้วยความร้อนทำให้ความ ต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 6.54 เมกะพาสคาล ซึ่งสูงกว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกและไม่บ่ม ด้วยความร้อนถึง 861% ในส่วนของการยืดตัวถึงจุดขาด พบว่าในช่วงอุณหภูมิการบ่ม 25-70 องศา เซลเซียส อุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามการบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ฟิล์มที่ได้มีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำกว่าฟิล์ม ที่บ่มที่อุณหภูมิต่ำอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 1.5% และบ่มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีการยืดตัวถึงจุดขาดที่ต่ำมากโดยมี ค่าเพียง 23.51% สาเหตุที่การบ่มด้วยความร้อนสามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนได้เป็น ผลมาจากการให้ความร้อนในภาวะที่เป็นต่างสามารถส่งเสริมให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน ซึ่ง ยืนยันจากการติดตามรูปแบบของแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE

การบ่มด้วยความร้อนทำให้ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ เข้มข้น 15% มีค่า L^* และความโปร่งแสงลดลง ในขณะที่มีค่า a^* และ b^* เพิ่มขึ้น มุมสีมีค่าเข้าใกล้มุมของสีแดงมากขึ้นและความเข้มสีมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนมีสีน้ำตาลเข้มขึ้น

โดยทั่วไปพบว่า การบ่มด้วยความร้อนมีผลค่อนข้างน้อยต่อสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ แต่ทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติชอบน้ำมากขึ้น นอกจากนี้ฟิล์มที่บ่มด้วยความร้อนทุกตัวอย่างมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่โดยทั่วไปพบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อปริมาณของแข็งที่ละลายได้

สำหรับเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าเมื่อวอเตอร์แอกทิวิตีเพิ่มขึ้น ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่า การยืดตัวถึงจุดขาดไม่เปลี่ยนแปลงตามวอเตอร์แอกทิวิตีที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นเมื่อนำฟิล์มดังกล่าวไปใช้งานกับผลิตภัณฑ์ที่มีวอเตอร์แอกทิวิตีแตกต่างกันไปจึงต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงกลที่อาจเปลี่ยนแปลงไปด้วย

รายการอ้างอิง

- Ágoston, V., M. Cemazar, L. Kaján, and S. Pongor. 2005. Graph-representation of oxidative folding pathways. *BMC Bioinformatics* 6: 1-7.
- Ahmadi, R., A. Kalbasi-Ashtari, A. Oromiehie, M.-S. Yarmand, and F. Jahandideh. 2012. Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk). *Journal of Food Engineering* 109: 745-751.
- Ali, Y., V. M. Ghorpade, and M. A. Hanna. 1997. Properties of thermally-treated wheat gluten films. *Industrial Crops and Products* 6: 177-184.
- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*, 17th ed. The Association of Analytical Chemists, Washington, D. C.
- Arcan, I., and A. Yemenicioglu. 2011. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. *Food Research International* 44: 550-556.
- ASTM. 1999. *Annual Book of ASTM Standards*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Badley, R. A., D. Atkinson, H. Hauser, D. Oldani, J. P. Green, and J. M. Stubbs. 1975. The structure, physical and chemical properties of the soy bean protein glycinin. *Biochimica et Biophysica Acta* 412: 214-228.
- Balange, A. K. 2009. Enhancement of Gel Strength of Surimi Using Oxidized Phenolic Compounds. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University, Songkla, Thailand.
- Balange, A. K., and S. Benjakul. 2009. Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *LWT - Food Science and Technology* 42: 1059-1064.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*, 5th ed. W. H. Freeman and Company. Marcel Dekker, New York, NY.
- Berk, Z. 1992. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. *FAO Agricultural Bulletin* 97.

- Bourtoom, T., and M. S. Chinnan. 2009. Improvement of water barrier property of rice starch-chitosan composite film incorporated with lipids. *Food Science and Technology International*. 15: 149-158.
- Brunauer, S., L. S. Deming, W. E. Deming, and E. Teller. 1940. On a theory of Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society* 62: 1723-1732.
- Chambi, H., and C. Grosso. 2006. Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International* 39: 458-466.
- Cisneros-Zevallos, L., and J. M. Krochta. 2002. Internal modified atmospheres of coated fresh fruits and vegetables: understanding relative humidity effects. *Journal of Food Science* 67: 1990-1995.
- Cremlyn, R. J. 1996. *An Introduction to Organosulfur Chemistry*. Wiley Hoboken, NJ.
- Denavi, G., D. R. Tapia-Blácido, M. C. Añón, P. J. A. Sobral, A. N. Mauri, and F. C. Menegalli. 2009. Effects of drying conditions on some physical properties of soy protein film. *Journal of Food Engineering* 90: 341-349.
- Dias, A. B., C. M. O. Müller, F. D. S. Larotonda, and J. B. Laurindo. 2010. Biodegradable film based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science* 51: 213-219.
- Feeney, R., E. , G. Blankenhorn, and B. D. H. 1975. Carbonyl-amine reactions in protein chemistry. *Advances in Protein Chemistry* 29: 135-203.
- Fernandes, P., and M. Ramos. 2004. Theoretical insights into the mechanism for thiol/disulfide exchange. *Chemistry* 10: 257-266.
- Fernandez, L., E. D. de Apodaca, M. Cebrian, M. C. Villaran, and J. I. Mate. 2006. Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of whey protein isolate edible films. *European Food Research and Technology* 224: 415-420.
- Fox, P. F. 2001. Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology* 54: 41-55.
- Friesen, K., C. Chang, and M. Nickerson. 2014. Incorporation of phenolic, compounds rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chemistry* 172: 18-23.

- Fujimori, E. 1965. Ultraviolet light-induced changes in collagen macromolecules. *Biopolymers* 3: 115-119.
- Galiotta, G., L. D. Gioia, S. Guilbert, and B. Cuq. 1998. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Dairy Science* 81: 3123-3130.
- Galus, S., H. Mathieu, A. Lenart, and F. Debeaufort. 2012. Effect of modified starch or maltodextrin incorporation on the barrier and mechanical properties, moisture sensitivity and appearance of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16: 148-154.
- Garcia, F. T., and P. J. A. Sobral. 2005. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of Tilapia. *LWT- Food Science and Technology* 38: 280-296.
- Gennadios, A., V. M. Ghorpade, C. L. Weller, and M. A. Hanna. 1996. Heat curing of soy protein films. *Biological Systems Engineering* 39: 575-579.
- Ghanbarzadeh, B., M. Musavi, A. R. Oromiehie, K. Rezayi, E. R. Rad, and J. Milanib. 2007. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT - Food Science and Technology* 40: 1191-1197.
- Ghanbarzadeh, B., and A. R. Oromiehi. 2008. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules* 43: 209-215.
- Gómez-Estaca, J., B. Giménez, P. Montero, and M. C. Gómez-Guillén. 2009. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. *Journal of Food Engineering* 92: 78-85.
- Gontard, N., Duchez, C., J. L. Cuq, and S. Guilbert. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*. 29: 39-50.

- González, A., M. C. Strumia, and C. I. Alvarez Igarzabal. 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering* 106: 331-338.
- Guilbert, S., N. Gontard, and B. Cuq. 1995. Technology and application of edible protective films. *Packaging Technology and Science* 8: 339-346.
- Ha, C. R., and I. Luchi. 2003. Transglutamiase. In: J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen and D. W. S. Wong (eds.) *Handbook of Food Enzymology*. p 367-655. Marcel Dekker, New York, NY.
- Habeeb, A. F. S. A. 1966. Determination of free amino groups in protein by trinitrobenzenesulphonic acid. *Analytical Biochemistry* 14: 328-336.
- Hampton, C., and D. Demoin. 2010. Vibrational spectroscopy tutorial: sulfur and phosphorus. *Organic spectroscopy* [online]. Retrieved from: http://faculty.missouri.edu/~glaserr/8160f8110/A8103_Silver.pdf. [2014, October 9].
- Han, J. H., and G. Aristippos. 2005. Lipid based edible film and coating: a review. In: J. H. Han (ed.) *Innovations in Food Packaging*. p 239-262. Elsevier Science, New York, NY.
- Han, J. H., G. H. Seo, I. M. Park, G. N. Kim, and D. S. Lee. 2006. Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. *Journal of Food Science* 71: E290-E296.
- Harper, B. A., S. Barbut, L. T. Lim, and M. F. Marcone. 2013. Characterization of 'wet' alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. *Food Research International* 52: 452-459.
- Haslam, E. 1989. Vegetable tannins revisited. In: J. D. Phillipson, D. C. Ayres and H. Baxter (eds.) *Plant Polyphenols*. Cambridge University, Cambridge, UK.
- Hernández-Muñoz, P., R. Villalobos, and A. Chiralt. 2004a. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids* 18: 403-411.
- Hernández-Muñoz, P., R. Villalobos, and A. Chiralt. 2004b. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. *Food Hydrocolloids* 18: 647-654.

- Hoque, M. S., S. Benjakul, and T. Prodpran. 2010. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering* 96: 66-73.
- Hoque, M. S., S. Benjakul, and T. Prodpran. 2011. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids* 25: 1085-1097.
- Iozzi, M. F., T. Helgaker, and E. Uggerud. 2011. Influence of external force on properties and reactivity of disulfide bonds. *Journal of Physical Chemistry* 115: 2308-2315.
- Jangchud, A., and M. S. Chinnan. 1999. Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *LWT- Food Science and Technology* 32: 89-94.
- Jensen, E. V. 1959. Thiol-disulfide interchange. *Science* 130: 1319-1323.
- Jiang, Y., C.-H. Tang, Q.-B. Wen, L. Li, and X.-Q. Yang. 2007. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8: 218-225.
- Kamper, S. L., and O. R. Fennema. 1984. Water vapor permeability of an edible fatty acid bilayer films. *Journal of Food Science* 49: 1482-1485.
- Kanatt, S. R., M. S. Rao, S. P. Chawla, and A. Sharma. 2012. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids* 29: 290-297.
- Kiernan, J. A. 2000. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today*: 8-12.
- Kim, K. M., C. L. Weller, M. A. Hanna, and A. Gennadios. 2002. Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *LWT - Food Science and Technology* 35: 140-145.
- Klein, D. R. 2012. *Organic Chemistry as a Second Language*. John Wiley Sons, Hoboken, NJ.
- Kokoszka, S., F. Debeaufort, A. Lenart, and A. Voilley. 2010. Liquid and water vapor transfer through whey protein/lipid emulsion films. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1673-1680.
- Kunte, L. A., A. Gennadios, S. L. Cuppet, M. A. Hanna, and C. L. Weller. 1997. Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry* 74: 115-118.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lim, L.-T., Y. Mine, and M. A. Tung. 1998. Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4022-4029.
- Liu, K. S. 1999. *Soybeans: Chemistry*. Aspen Publishers, New York, NY.
- Ly, Y. T. P., L. A. Johnson, and J. Jane. 1998. Soy protein as biopolymer. In: D. L. Kaplan (ed.) *Biopolymers from Renewable Resources*, p 144-176. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Ma, W., C.-H. Tang, X.-Q. Yang, and S.-W. Yin. 2013. Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate–chitosan composite films at acidic pH. *Food Hydrocolloids* 31: 237-247.
- Mahmoud, R., and P. Savello. 1992. Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein film. *Journal of Dairy Science* 75: 942-946.
- Mariniello, L., P. Di Pierro, C. Esposito, A. Sorrentino, P. Masi, and R. Porta. 2003. Preparation and mechanical properties of edible pectin–soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology* 102: 191-198.
- McGuire, R. G. 1992. Reporting of objective color measurements. *Hortscience* 27: 1254-1255.
- McHugh, T. H., and J. M. Krochta. 1994. Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71: 307-312.
- Michon, T., M. Chenu, N. Kellershon, M. Desmadril, and J. Guequen. 1997. Horseradish peroxidase oxidation of tyrosine-containing peptides and their subsequent polymerization: a kinetic study. *Biochemistry* 36: 8504-8513.
- Monedero, F. M., M. J. Fabra, P. Talens, and A. Chiralt. 2009. Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering* 91: 509-515.

- Morillon, V., Debeaufort, F., G. Blond, Capelle, M. , and A. Voilley. 2002. Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42: 67-89.
- NCBI. 2014a. Crystal structure of basic 7s globulin from soybean [online]. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=3AUP>. [2014, September 18].
- NCBI. 2014b. Crystal structure of soybean 11s globulin: glycinin a3b4 homohexamer [online]. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=1od5>. [2014, September 18].
- Nuthong, P., S. Benjakul, and T. Prodpran. 2009. Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. *Food Hydrocolloids* 23: 736-741.
- O'Connell, J. E., and P. F. Fox. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products. *International Dairy Journal* 11: 103-120.
- O'Brien, P. J., A. G. Siraki, and N. Shangari. 2005. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology* 35: 209-662.
- Okamoto, S. 1978. Factors affecting protein film formation. *Cereals Food World* 23: 256-262.
- Orliac, O., A. Rouilly, F. Silvestre, and L. Rigal. 2002. Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. *Polymer* 43: 5417-5425.
- Ou, S., Y. Wang, S. Tang, C. Huang, and M. G. Jackson. 2005. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering* 70: 205-210.
- Pelissari, F. M., M. M. Andrade-Mahecha, P. J. A. Sobral, and F. C. Megegalli. 2013. Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids* 30: 681-690.

- Perez-Gago, M. B., and J. M. Krochta. 2001. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Food Engineering and Physical Properties* 66: 705-710.
- Perez-Mateos, M., P. Montero, and M. C. Gomez-Guillen. 2007. Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids* 25: 53-61.
- Peroval, C., F. Debeaufort, D. Despre, and A. Voilley. 2002. Edible arabinoxylan-based films, effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3977-3983.
- Peterson, G. L. 1983. Determination of total protein. *Methods in Enzymology* 91: 95-119.
- Pierpoint, W. S. 1969. *o*-Quinones formed in plant extracts their reaction with bovine serum albumin. *Biochemical Journal* 112: 619-629.
- Prodpran, T., S. Benjakul, and S. Phatcharat. 2012. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. *International Journal of Biological Macromolecule* 51: 774-782.
- Rawel, H. M., D. Czajka, S. Rohn, and J. Kroll. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecule* 30: 137-150.
- Rayner, M., V. Ciolfi, B. Maves, P. Stedman, and G. Mittal. 2000. Development and application of soy-protein films to reduce fat intake in deep-fried foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 777-782.
- Ressouany, M., C. Vachon, and M. Lacroix. 2000. Microbial resistance of caseinate films crosslinked by gamma irradiation. *Journal of Dairy Research* 67: 119-124.
- Rhim, J., A. Gennadios, A. Handa, C. L. Weller, and M. A. Hanna. 2000. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4937-4941.
- Sabato, S. F., N. Nakamurakare, and P. J. Sobral. 2005. Effect of ionizing radiation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein biofilms. *International symposium on utilization of acellerators* 37: 115-123.

- Salgado, P. R., S. E. Molina Ortiz, S. Petruccelli, and A. N. Mauri. 2010. Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids* 24: 525-533.
- Salmoral, E. M., M. E. Gonzalez, M. P. Mariscal, and L. F. Medina. 2000. Comparison of chickpea and soy protein isolate and whole flour as biodegradable plastics. *Industrial Crops and Products* 11: 227-236.
- Shellhammer, T. H., and J. M. Krochta. 1997. Whey protein emulsion films performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science* 66: 390-394.
- Siripatrawan, U., and B. R. Harte. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids* 24: 770-775.
- Soazo, M., L. M. Pérez, A. C. Rubiolo, and R. A. Verdini. 2013. Effect of freezing on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocolloids* 31: 256-263.
- Strauss, G., and S. M. Gibson. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids* 18: 81-89.
- Stuchell, Y. M., and J. M. Krochta. 1994. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science* 59: 1332-1337.
- Su, G., H. Cai, C. Zhou, and Z. Wang. 2007. Formation of edible soybean and soybean-complex protein films by a cross-linking treatment with a new streptomyces transglutaminase. *Food Technology and Biotechnology* 45: 381-388.
- Su, J.-F., X.-Y. Yuan, Z. Huang, and W.-L. Xia. 2010. Properties stability and biodegradation behaviors of soy protein isolate/poly(vinyl alcohol) blend films. *Polymer Degradation and Stability* 95: 1226-1237.
- Tang, C.-H., Y. Jiang, Q.-B. Wen, and X.-Q. Yang. 2005. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology* 120: 296-307.

- Tang, C.-H., H. Wu, Z. Chen, and X.-Q. Yang. 2006. Formation and properties of glycinin-rich and bata-conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. *Food Research International* 39: 87-97.
- Tang, C.-H., M.-L. Xiao, Z. Chen, X.-Q. Yang, and S.-W. Yin. 2009. Properties of cast films of vicilin-rich protein isolates from *Phaseolus* legumes: influence of heat curing. *LWT - Food Science and Technology* 42: 1659-1666.
- Thanh, V. H., and K. Shibasaki. 1978. Major proteins of soybean seeds: subunit structure of β -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 692-695.
- Wang, Y., Y. L. Xiong, G. K. Rentfrow, and M. C. Newman. 2013. Oxidation promotes cross-linking but impairs film-forming properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering* 115: 11-19.
- Weingartner, K. E. 1993. Nutrition of soybeans. In: † K.Tanteeratarm (ed.) *Soybean Processing for Food Uses*. p 23-28. International Soybean Program, Urbana, IL.
- Wijeratne, W. B. 1993a. Composition of soybean. In: † K. Tanteeratarm (ed.) *Soybean Processing for Food Uses*. p 9-17. International Soybean Program, Urbana, IL.
- Wijeratne, W. B. 1993b. Functional properties of soy proteins in food systems. In: † K. Tanteeratarm (ed.) *Soybean Processing for Food Uses*. p 29-42. International Soybean Program, Urbana, IL.
- Wittaya, T. 2012. Protein-Based Edible Films: Characteristics and Improvement of Properties, Structure and Function. [online]. Retrieved from: <http://www.intechopen.com/books/structure-and-function-of-food-engineering/protein-based-edible-films-characteristics-and-improvement-of-properties>. [2014, October 15].
- Wong, J. L., and G. M.-. Wessel. 2008. Free-radical crosslinking of specific proteins alters the function of the egg extracellular matrix at fertilization. *Development* 135: 431-440.
- Wu, K., Y. Wang, and I. Zhitomirsky. 2010. Electrophoretic deposition of TiO_2 and composite TiO_2 - MnO_2 films using benzoic acid and phenolic molecules as charging additives. *Journal of Colloid and Interface Science* 352: 371-378.

- Xiong, Y.-L., Y.-S. Wang, and J. Chen. 2012. Oxidized caffeic acid cross-linked whey protein films: thermal properties, light transmittance, water barrier properties and in vitro digestibility. *Food Science* 33: 133-137.
- Yang, L., and A. T. Paulson. 2000. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International* 33: 571-578.
- Yongsawatdigul, J., and J. W. Park. 2002. Biochemical and conformation changes of actomyosin from Threadfin bream stored in ice. *Journal of Food Science* 67: 985-990.
- Yu, S.-H., H.-Y. Hsieh, J.-C. Pang, D.-W. Tang, C.-M. Shih, M.-L. Tsai, Y.-C. Tsai, and F.-L. Mic. 2013. Active films from water-soluble chitosan/cellulose composites incorporating releasable caffeic acid for inhibition of lipid oxidation in fish oil emulsions. *Food Hydrocolloids* 32 9-19.
- Zahedi, Y., B. Ghanbarzadeh, and N. Sedaghat. 2010. Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering* 100: 102-108.

ภาคผนวก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ข้อมูลเฉพาะของผลิตภัณฑ์

ก.1 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ผลิตภัณฑ์ของ: บริษัท ไมท์ตี้ อินเทอร์เน็ตเนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ

ข้อมูลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์:

ความชื้น	5.36%
โปรตีน	92.0%
ค่าความเป็นกรดต่าง	7.01
Sieve test (ผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมโครเมตร)	ไม่ต่ำกว่า 90%

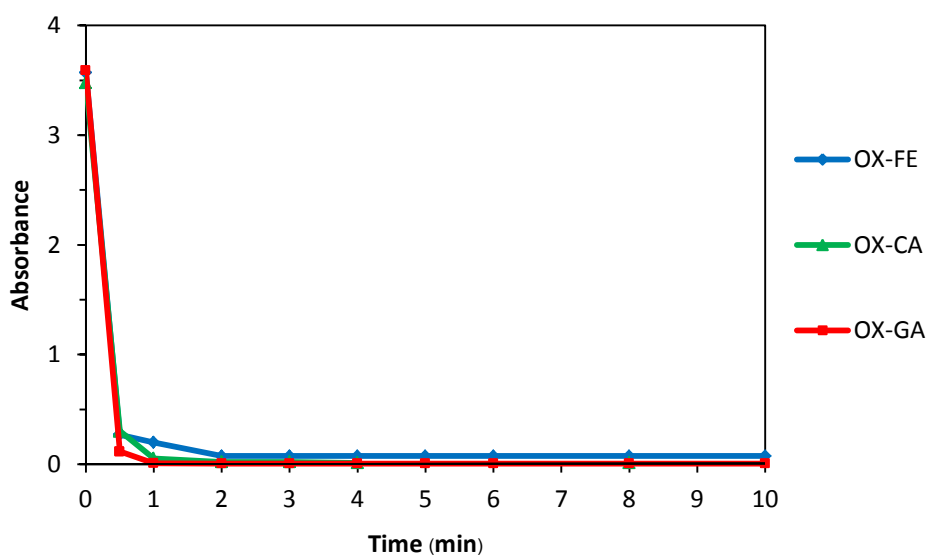
ข้อมูลวิเคราะห์จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์:

Standard plate count	<100 CFU/g
<i>Salmonella</i>	Negative
<i>Escherichia coli</i>	Negative

ภาคผนวก ข

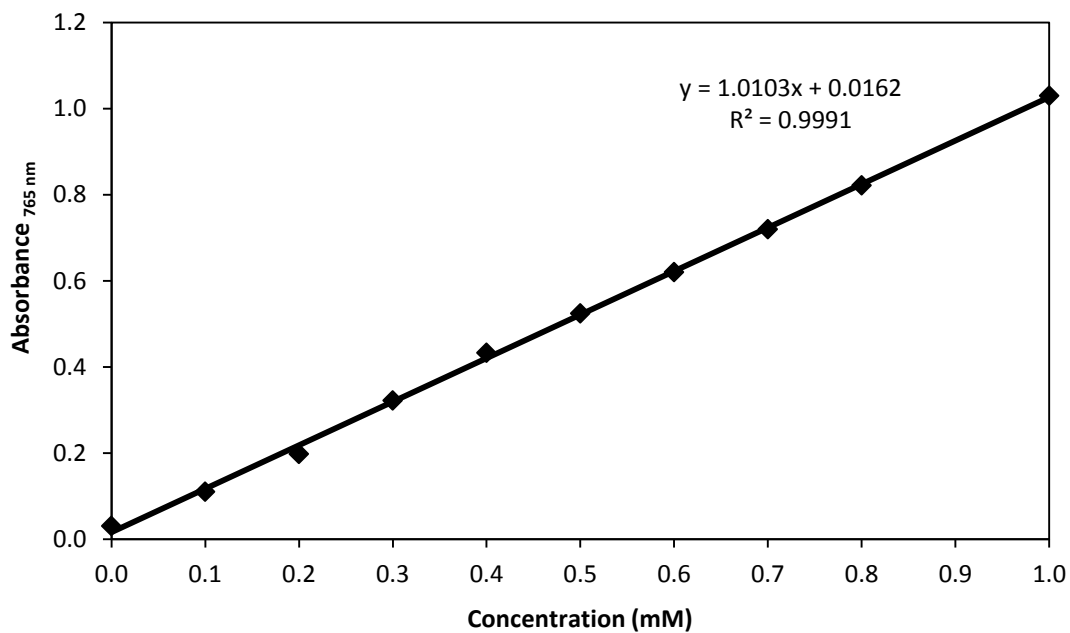
กราฟการทดลองและกราฟเทียบมาตรฐาน

ข.1 การติดตามการเกิดออกซิเดชันของกรดฟีนอลิก



รูปที่ ข.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดฟีนอลิกที่เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry



รูปที่ ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry



ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ค.1 ความหนาของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูติก (FE) กรดเพรูติกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโพรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตัวอย่าง	ความหนา (มิลลิเมตร) ^{ns}
Control	0.133 ± 0.002
FE 0.5%	0.133 ± 0.002
FE 1.0%	0.133 ± 0.002
FE 1.5%	0.134 ± 0.001
CA 0.5%	0.133 ± 0.002
CA 1.0%	0.133 ± 0.002
CA 1.5%	0.132 ± 0.002
GA 0.5%	0.134 ± 0.002
GA 1.0%	0.133 ± 0.002
GA 1.5%	0.133 ± 0.001
OX-FE 0.5%	0.133 ± 0.002
OX-FE 1.0%	0.133 ± 0.002
OX-FE 1.5%	0.133 ± 0.002
OX-CA 0.5%	0.133 ± 0.002
OX-CA 1.0%	0.133 ± 0.002
OX-CA 1.5%	0.133 ± 0.002
OX-GA 0.5%	0.133 ± 0.002
OX-GA 1.0%	0.133 ± 0.001
OX-GA 1.5%	0.134 ± 0.001

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ ค.2 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโพรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตัวอย่าง	ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)
Control	0.68 ± 0.05 ^e
FE 0.5%	0.81 ± 0.05 ^{de}
FE 1.0%	0.82 ± 0.05 ^{de}
FE 1.5%	1.19 ± 0.67 ^b
CA 0.5%	0.73 ± 0.05 ^e
CA 1.0%	0.94 ± 0.05 ^{cd}
CA 1.5%	1.08 ± 0.07 ^{bc}
GA 0.5%	0.96 ± 0.05 ^{cd}
GA 1.0%	1.03 ± 0.05 ^{bc}
GA 1.5%	1.19 ± 0.07 ^b
OX-FE 0.5%	1.07 ± 0.05 ^{bc}
OX-FE 1.0%	1.06 ± 0.05 ^{bc}
OX-FE 1.5%	1.08 ± 0.07 ^{bc}
OX-CA 0.5%	1.21 ± 0.05 ^b
OX-CA 1.0%	1.11 ± 0.05 ^{bc}
OX-CA 1.5%	1.12 ± 0.07 ^{bc}
OX-GA 0.5%	1.22 ± 0.05 ^b
OX-GA 1.0%	1.41 ± 0.07 ^a
OX-GA 1.5%	1.47 ± 0.05 ^a

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.3 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรุสิก (FE) กรดเพรุสิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และ กรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตัวอย่าง	การยืดตัวถึงจุดขาด (%)
Control	52.42 ± 5.16 ^c
FE 0.5%	56.03 ± 6.97 ^{bc}
FE 1.0%	61.08 ± 7.61 ^{bc}
FE 1.5%	66.26 ± 3.04 ^{abc}
CA 0.5%	55.80 ± 3.86 ^{bc}
CA 1.0%	68.44 ± 5.56 ^{abc}
CA 1.5%	67.53 ± 8.69 ^{abc}
GA 0.5%	64.55 ± 0.71 ^{abc}
GA 1.0%	71.21 ± 3.41 ^{abc}
GA 1.5%	76.88 ± 8.60 ^{abc}
OX-FE 0.5%	60.52 ± 8.46 ^{bc}
OX-FE 1.0%	66.22 ± 5.99 ^{abc}
OX-FE 1.5%	67.49 ± 4.42 ^{abc}
OX-CA 0.5%	66.47 ± 5.01 ^{abc}
OX-CA 1.0%	73.38 ± 7.92 ^{abc}
OX-CA 1.5%	71.74 ± 7.86 ^{abc}
OX-GA 0.5%	75.63 ± 8.02 ^{abc}
OX-GA 1.0%	78.36 ± 5.43 ^{ab}
OX-GA 1.5%	86.98 ± 7.01 ^a

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.4 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก (FE) กรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ (OX-FE) กรดแคฟเฟอิก (CA) กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ (OX-CA) กรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ตัวอย่าง	ร้อยละของแสงส่องผ่าน
Control	75.41 ± 0.33 ^a
FE 0.5%	71.66 ± 1.55 ^{ab}
FE 1.0%	71.92 ± 2.67 ^{bc}
FE 1.5%	69.76 ± 3.54 ^c
CA 0.5%	58.87 ± 1.33 ^d
CA 1.0%	55.46 ± 1.38 ^e
CA 1.5%	53.23 ± 2.89 ^{ef}
GA 0.5%	48.56 ± 5.59 ^g
GA 1.0%	33.60 ± 1.63 ^h
GA 1.5%	33.52 ± 6.19 ^h
OX-FE 0.5%	75.38 ± 1.44 ^{ab}
OX-FE 1.0%	72.06 ± 5.60 ^{bc}
OX-FE 1.5%	69.64 ± 3.65 ^c
OX-CA 0.5%	61.59 ± 3.79 ^d
OX-CA 1.0%	51.83 ± 3.44 ^{fg}
OX-CA 1.5%	50.29 ± 4.92 ^{fg}
OX-GA 0.5%	49.97 ± 3.04 ^{fg}
OX-GA 1.0%	34.29 ± 2.33 ^h
OX-GA 1.5%	28.73 ± 5.91 ⁱ

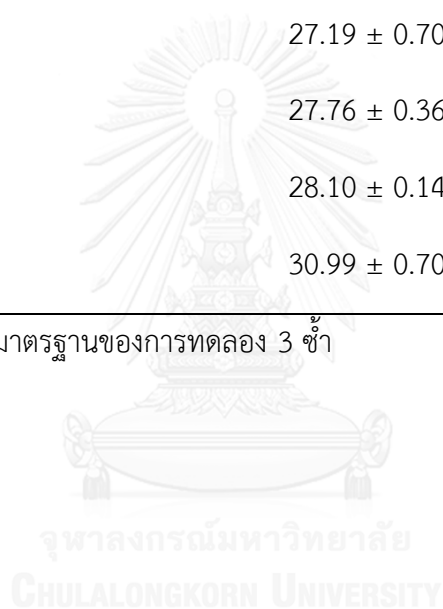
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.5 พฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5%

วอเตอร์แอกทิวิตี	ปริมาณความชื้น (% โดยฐานเปียก)
0.11	22.61 ± 0.93
0.22	25.44 ± 0.72
0.33	26.99 ± 0.82
0.43	27.10 ± 0.50
0.53	27.19 ± 0.70
0.69	27.76 ± 0.36
0.84	28.10 ± 0.14
0.94	30.99 ± 0.70

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ



ตารางที่ ค.6 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		ความหนา (มิลลิเมตร) ^{ns}
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	
Control			0.133 ± 0.001
GA 1.5%	25	5	0.144 ± 0.013
GA 1.5%		10	0.142 ± 0.018
GA 1.5%		15	0.144 ± 0.011
OX-GA 1.5%		5	0.138 ± 0.009
OX-GA 1.5%		10	0.137 ± 0.011
OX-GA 1.5%		15	0.137 ± 0.016
GA 1.5%	50	5	0.135 ± 0.001
GA 1.5%		10	0.142 ± 0.007
GA 1.5%		15	0.145 ± 0.019
OX-GA 1.5%		5	0.145 ± 0.003
OX-GA 1.5%		10	0.144 ± 0.014
OX-GA 1.5%		15	0.145 ± 0.017
GA 1.5%	70	5	0.134 ± 0.011
GA 1.5%		10	0.143 ± 0.013
GA 1.5%		15	0.137 ± 0.002
OX-GA 1.5%		5	0.136 ± 0.014
OX-GA 1.5%		10	0.138 ± 0.013
OX-GA 1.5%		15	0.141 ± 0.011
GA 1.5%	90	5	0.143 ± 0.019
GA 1.5%		10	0.142 ± 0.011
GA 1.5%		15	0.143 ± 0.015
OX-GA 1.5%		5	0.145 ± 0.014
OX-GA 1.5%		10	0.140 ± 0.024
OX-GA 1.5%		15	0.140 ± 0.024

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ ค.7 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	
Control			0.68 ± 0.05 ^q
GA 1.5%	25	5	1.21 ± 0.07 ^{nop}
GA 1.5%		10	1.13 ± 0.07 ^{op}
GA 1.5%		15	0.98 ± 0.06 ^{pq}
OX-GA 1.5%		5	1.37 ± 0.18 ^{mno}
OX-GA 1.5%		10	1.33 ± 0.07 ^{mno}
OX-GA 1.5%		15	1.09 ± 0.12 ^{op}
GA 1.5%	50	5	1.49 ± 0.14 ^{lmn}
GA 1.5%		10	1.61 ± 0.05 ^{klm}
GA 1.5%		15	1.69 ± 0.07 ^{kl}
OX-GA 1.5%		5	1.85 ± 0.11 ^{jk}
OX-GA 1.5%		10	2.11 ± 0.24 ^{ij}
OX-GA 1.5%		15	2.29 ± 0.09 ⁱ
GA 1.5%	70	5	2.34 ± 0.13 ⁱ
GA 1.5%		10	3.33 ± 0.40 ^{gh}
GA 1.5%		15	3.33 ± 0.26 ^{gh}
OX-GA 1.5%		5	2.99 ± 0.32 ^h
OX-GA 1.5%		10	3.43 ± 0.31 ^{fgh}
OX-GA 1.5%		15	3.45 ± 0.20 ^{fgh}
GA 1.5%	90	5	3.67 ± 0.44 ^e
GA 1.5%		10	5.01 ± 0.40 ^c
GA 1.5%		15	5.88 ± 0.40 ^b
OX-GA 1.5%		5	4.21 ± 0.49 ^d
OX-GA 1.5%		10	5.16 ± 0.84 ^c
OX-GA 1.5%		15	6.54 ± 0.97 ^a

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ ค.8 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		การยืดตัวถึงจุดขาด (%)
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	
Control			52.42 ± 15.16 ^h
GA 1.5%	25	5	76.17 ± 1.07 ^{def}
GA 1.5%		10	78.10 ± 7.21 ^{cdef}
GA 1.5%		15	79.31 ± 6.23 ^{cdef}
OX-GA 1.5%		5	71.19 ± 8.38 ^{efg}
OX-GA 1.5%		10	77.09 ± 5.38 ^{def}
OX-GA 1.5%		15	77.93 ± 8.13 ^{cdef}
GA 1.5%	50	5	79.35 ± 4.94 ^{cdef}
GA 1.5%		10	89.15 ± 6.45 ^{abcde}
GA 1.5%		15	86.45 ± 2.94 ^{bcde}
OX-GA 1.5%		5	94.11 ± 6.45 ^{abcd}
OX-GA 1.5%		10	97.95 ± 2.21 ^{ab}
OX-GA 1.5%		15	89.89 ± 4.93 ^{abcde}
GA 1.5%	70	5	96.67 ± 1.72 ^{abc}
GA 1.5%		10	89.61 ± 3.00 ^{abcde}
GA 1.5%		15	72.58 ± 6.23 ^{efg}
OX-GA 1.5%		5	71.51 ± 3.52 ^{efg}
OX-GA 1.5%		10	106.45 ± 6.66 ^a
OX-GA 1.5%		15	96.12 ± 3.24 ^{abc}
GA 1.5%	90	5	47.06 ± 3.90 ^h
GA 1.5%		10	61.84 ± 7.51 ^{fgh}
GA 1.5%		15	57.04 ± 7.34 ^{gh}
OX-GA 1.5%		5	52.25 ± 3.09 ^h
OX-GA 1.5%		10	55.65 ± 2.74 ^{gh}
OX-GA 1.5%		15	23.51 ± 2.62 ⁱ

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ค.9 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก (GA) และกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์ (OX-GA) เข้มข้น 1.5% ซึ่งบ่มด้วยความร้อนเป็นระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ภาวะการบ่ม		ร้อยละของแสงส่องผ่าน
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	
Control			75.41 ± 0.33 ^a
GA 1.5%	25	5	40.53 ± 4.39 ^{de}
GA 1.5%		10	37.33 ± 1.53 ^{ef}
GA 1.5%		15	44.42 ± 4.30 ^{bc}
OX-GA 1.5%		5	34.86 ± 2.01 ^{fg}
OX-GA 1.5%		10	42.20 ± 2.41 ^{bcd}
OX-GA 1.5%		15	30.11 ± 3.09 ^{bc}
GA 1.5%	50	5	46.98 ± 4.28 ^b
GA 1.5%		10	41.49 ± 5.84 ^{cd}
GA 1.5%		15	44.13 ± 5.27 ^{bcd}
OX-GA 1.5%		5	33.82 ± 2.46 ^{fgh}
OX-GA 1.5%		10	45.01 ± 5.68 ^b
OX-GA 1.5%		15	31.46 ± 2.44 ^{gh}
GA 1.5%	70	5	32.36 ± 1.29 ^{gh}
GA 1.5%		10	37.63 ± 1.67 ^{ef}
GA 1.5%		15	31.73 ± 5.01 ^{gh}
OX-GA 1.5%		5	32.88 ± 4.06 ^{gh}
OX-GA 1.5%		10	32.88 ± 4.14 ^{gh}
OX-GA 1.5%		15	30.56 ± 4.54 ^{gh}
GA 1.5%	90	5	31.81 ± 1.18 ^{gh}
GA 1.5%		10	37.61 ± 2.19 ^{ef}
GA 1.5%		15	33.61 ± 1.82 ^{fgh}
OX-GA 1.5%		5	30.89 ± 2.57 ^{gh}
OX-GA 1.5%		10	25.89 ± 2.82 ⁱ
OX-GA 1.5%		15	25.44 ± 2.94 ⁱ

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c,... ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ ค.10 พฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.5% โดยน้ำหนักของโปรตีน และบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

วอเตอร์แอกทิวิตี	ปริมาณความชื้น (% โดยฐานเปียก)
0.11	22.96 ± 2.15
0.22	26.65 ± 1.14
0.33	26.80 ± 1.03
0.43	27.00 ± 3.55
0.53	27.61 ± 0.93
0.69	28.12 ± 2.03
0.84	28.35 ± 1.06
0.94	29.75 ± 1.05

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอัญชญา อินสวาสดี เกิดเมื่อวันที่ 13 มีนาคม พ.ศ. 2532 ที่จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะ เทคโนโลยีชีวภาพ จากมหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555

นางสาวอัญชญา อินสวาสดี ได้นำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในหัวข้อ Mechanical strength, optical properties and solubility of soy protein film as affected by phenolic acid addition ในการประชุมวิชาการ the 1st Joint ACS AGFD-ACS ICST Symposium on Agricultural and Food Chemistry ณ โรงแรมมณเฑียร ริเวอร์ไซด์ กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 4-5 มีนาคม พ.ศ. 2557 และหัวข้อ Effects of heat curing on properties of soy protein film incorporated with gallic acid ในการประชุมวิชาการพืชเขตร้อนและกิ่งร้อน ครั้งที่ 8 ณ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 21-22 กรกฎาคม พ.ศ. 2557

ผลงานตีพิมพ์และรางวัล

Insaward, A., Duangmal, K. and Mahawanich, T. Mechanical, optical, and barrier properties of soy protein film as affected by phenolic acid addition. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Article ASAP. DOI: 10.1021/jf504016m. Publication date (Web): October 27, 2014.

Insaward, A., Duangmal, K. and Mahawanich, T. Effects of heat curing on properties of soy protein film incorporated with gallic acid. Agricultural Science Journal Vol. 45 No. 2 (Suppl.) May-August 2014 (in print).

รางวัลการเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ดีเด่น ด้านอาหาร การประชุมวิชาการพืชเขตร้อน และกิ่งร้อน ครั้งที่ 8