บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ไข่แดง อิมัลซิฟายเออร์ และน้ำมันถั่วเหลือง ไข่แดงได้จากไข่ไก่ซีพีเกรด AAAA ของบริษัท วีฟู้ดโภคภัณฑ์ จำกัด โดยการแยกเอาไข่ขาวออก มีลักษณะเป็นของเหลวค่อนข้างข้นสีเหลืองส้ม มีโปรตีนคุณภาพสูงและมีฟอสโฟลิปิดในปริมาณมาก (Cook และ Briggs, 1990 ; Powrie และ Nakai, 1990) แต่ในขณะเดียวกันก็มีคอเลสเทอรอลอยู่ในปริมาณมากเช่นกัน (Labier และ Leclereq, 1994) ในการทดลองสนใจศึกษาวิธีการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในไข่แดงโดยใช้น้ำมันพืชและอิมัลซิฟายเออร์เนื่องจากน้ำมันพืชและอิมัลซิฟายเออร์เป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและมีความปลอดภัยต่อการบริโภค นอกจากนั้นยังสนใจศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในไข่แดงที่เปลี่ยนแปลงไป น้ำมันพืชที่เลือกใช้ในการทดลองคือน้ำมันถั่วเหลือง เนื่องจากเป็นน้ำมันพืชที่มีการผลิตมากและสามารถหาได้ง่ายในประเทศ รวมทั้งมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก (Shukla, 1994) น้ำมันถั่วเหลืองนี้ได้จากการผลิตของบริษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน) มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีเหลืองอ่อน มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid) ได้แก่ Linoleic acid และ Linolenic acid เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก และอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด คือ GMO SMO และ LC เนื่องจากอิมัลซิฟายเออร์ทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและมีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Charalambous, 1989 ; Knightly, 1992) นอกจากนั้นในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงต้องทำลายโครงสร้างอิมัลชันในไข่แดงก่อน ซึ่ง GMO SMO และ LC เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ละลายได้ดีในน้ำมัน (lipophilic emulsifiers) ที่มีค่า HLB ต่ำ โดยมีค่า 3.7 4.3 และ 4.0 ตามลำดับ (Pomeranz, 1985) ซึ่งจะลดความตึงผิวของน้ำมันได้ดี อิมัลซิฟายเออร์ชนิดนี้จัดเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ช่วยในการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (Sherman, 1968; Pomeranz, 1985) เมื่อเติมลงไปในไข่แดงซึ่งเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Romanoff และ Romanoff, 1949 ; Pomeranz, 1991) จะทำให้เสถียรภาพของระบบอิมัลชันในไข่แดงเสียไป (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2534) ทำให้การสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงทำได้ดีขึ้น

1. <u>ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของไข่แดง</u>

ไข่แดงที่ใช้เป็นวัตถุดิบในงานวิจัยนี้ได้จากไข่ไก่ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่แดง (ตารางที่ 4.1) พบว่ามีความชื้นร้อยละ 49.76 โปรตีน ไขมัน ร้อยละ 31.29 63.63 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ และมีคอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิปิดอยู่ 2480.57 และ 17220.68 mg/100g โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากงานวิจัยของ Anton และ Gandemer (1997) ซึ่งวิเคราะห์

ปริมาณโปรตีน ไขมัน ในไข่แดงได้ร้อยละ 33.2 63.4 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีคอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิปิดอยู่ 2600 และ 17700 mg/100g โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ จะเห็นได้ว่าไข่แดงมีปริมาณโปรตีนและฟอสโฟลิปิดค่อนข้างสูง แต่ในขณะเดียวกันก็มีคอเลสเทอรอลอยู่ในปริมาณสูงเช่นกัน ส่วนไขมันก็มีอยู่ในปริมาณสูงเนื่องจากไขมันทั้งหมดในไข่ไก่จะอยู่ในส่วนของไข่แดงเท่านั้น ไข่แดงที่ใช้ในการทดลองมีค่าความสว่าง (L) ค่าสีแดง (a) และค่าสีเหลือง (b) เป็น 38.27 48.78 และ 8.41 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีค่าสีแดงเป็นบวกมากแสดงว่ามีสีค่อนไปทางสีแดงมาก สีของไข่แดงจึงมีสีส้มเข้มเนื่องจากไข่แดงมีรงควัตถุจำพวก Xanthophyll ซึ่งให้สีส้มอยู่ โดยมี Lutein และ Zeaxanthin เป็น Xanthophyll หลักในไข่แดงและมี Cryptoxanthin และ Carotene อีกเล็กน้อย (Penfield และ Campbell , 1990) และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในไข่แดง (ตารางที่ 4.2) พบว่าไข่แดงที่ได้ประกอบด้วย Myristic acid (C14:0) 0.35% Palmitic acid (C16:0) 27.69% Palmitoleic acid (C16:1) 2.05% Stearic acid (C18:0) 7.45% Oleic acid (C18:1) 39.94% Linoleic acid (C18:2) 17.93% Linolenic acid (C18:3) 0.40% Arachidonic acid (C20:4) 1.78% Docosahexaenoic acid (C22:6) 1.27% จะเห็นได้ว่า Palmitic acid และ Oleic acid เป็นกรดไขมันที่มีอยู่มากในไข่แดง สัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัว มีค่าประมาณ 0.60 แสดงว่าไข่แดงมีกรดไขมันอิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าประกอบด้วย Palmitic acid (C16:0) 12.01% Stearic acid (C18:0) 3.80% Oleic acid (C18:1) 21.42% Linoleic acid (C18:2) 53.72% Linolenic acid (C18:3) 7.78% จะเห็นได้ว่า Linoleic acid และ Oleic acid เป็นกรดไขมันที่มีอยู่มากในน้ำมันถั่วเหลือง

2.ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่แดง

จากการทดลองพบว่าไข่แดงที่ใช้ในการทดลองมีค่า emulsifying capacity และอุณหภูมิในการเกิด coagulation เป็น 36.5 ml oil emulsified/gm of egg yolk และ 68.67 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากค่า emulsifying capacity ของไข่แดง จะพบว่าไข่แดงมีสมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ดี เนื่องจากมีเลซิตินซึ่งเป็นฟอสโฟลิปิดที่มีสมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก (79%) (Wells และ Belyavin, 1985 ; Zayas, 1997) นอกจากนั้น LDL ซึ่งเป็น lipoprotein ที่มีอยู่มากในไข่แดงก็มีสมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์เช่นกัน (Zayas, 1997) ดังนั้นจากปริมาณเลซิตินและ LDL ที่มีอยู่มากในไข่แดงจึงทำให้ไข่แดงมีสมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ดี นอกจากนั้นไข่แดงยังมีอุณหภูมิในการเกิด coagulation ค่อนข้างสูง เนื่องจากไข่แดงเป็นระบบอิมัลชันที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 2 ใน 3 ส่วน (Romanoff และ Romanoff, 1949 ; Pomeranz, 1991) ปริมาณไขมันที่มีอยู่มากในไข่แดงจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงสภาพทางเคมีกายภาพของไข่แดงเกิดที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง เมื่อให้ความร้อนแก่ไข่แดง

จะทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการยืดตัว (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538) และเกิดการคลายตัว ทำให้ส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วที่อยู่ด้านในโมเลกุลหันออกมาด้านนอกของโมเลกุลมากขึ้น ทำให้โปรตีนมีความเป็น hydrophobicity มากขึ้น (Zayas, 1997) และมีการลดลงของกรดอะมิโนที่มีขั้วที่สามารถจับกับน้ำได้เป็นผลให้โปรตีนจับกับน้ำได้น้อยลง การละลายจึงลดลง (Kinsella, 1976 ; Rakosky, 1989 ; Pomeranz, 1991) นอกจากนั้นอาจจะเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วของโปรตีนทำให้สารละลายเปลี่ยนสภาพเป็นเจลซึ่งเจลที่เกิดจาก coagulation จะเป็นเจลที่สานตัวกันไม่เป็นระเบียบมากนัก(Pomeranz,1991) แต่เนื่องจากไข่แดงมีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ค่อนข้างมาก ประกอบกับมีเลซิตินซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์อยู่ในปริมาณมาก เลซิตินจะช่วยในการรวมตัวของน้ำกับน้ำมันในระบบ ดังนั้นจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของไข่แดงเกิดที่อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง

3. <u>ศึกษา pH ชนิดและปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง</u>

จากการศึกษา pH ชนิด และปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง ตามวิธีสกัดดังรูป 3.1 โดยแปร pH เป็น 2 ค่า คือ 4.5 และ 9.0 แปรชนิดของอิมัลซิฟายเออร์เป็น 3 ชนิด คือ GMO SMO และ LC และแปรปริมาณอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองเป็น 3 ระดับ คือ 8% 10% และ 12% ประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากปริมาณคอเลสเทอรอลและปริมาณฟอสโฟลิปิดของผลิตภัณฑ์ เมื่อนำอิมัลชันไปปั่นแยกจะทำให้อิมัลชันเสียสภาพเกิดการแยกชั้นขึ้น พบว่าเมื่อนำตัวอย่างอิมัลชันที่มี pH 4.5 และ 9.0 ไปปั่นแยก จะได้ชั้นตัวอย่าง 4 ชั้น ซึ่งการแยกชั้นนี้เกิดจากความแตกต่างของความหนาแน่นขององค์ประกอบแต่ละส่วนในอิมัลชันที่เตรียม โดยน้ำมันซึ่งมีความหนาแน่นน้อยที่สุดจะแยกอยู่ชั้นบนสุด รองลงไปเป็นชั้นเจล ชั้นของเหลว และของแข็ง ซึ่งมีความหนาแน่นมากที่สุดจึงอยู่ชั้นล่างสุด ยกเว้นตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้ SMO และ LC ที่ pH 9.0 จะได้ชั้นตัวอย่างหลังการปั่นแยกเพียง 3 ชั้น คือ ชั้นน้ำมัน ชั้นเจล และชั้นของเหลว โดยไม่มีชั้นของแข็ง ซึ่งปริมาณของชั้นตัวอย่างแต่ละชั้นจะแตกต่างกันไป เมื่อใช้อิมัลซิฟายเออร์ต่างชนิดกันและปริมาณที่ใช้ต่างกัน โดยเมื่อปริมาณอิมัลซิฟายเออร์ที่ใช้มากขึ้น ปริมาณของชั้นของเหลวและของแข็งซึ่งเป็นส่วนชั้นผลิตภัณฑ์จะลดลงทุกตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ทั้งสามชนิดที่ pH 4.5 ในขณะที่ไม่ค่อยมีความแตกต่างของปริมาณชั้นผลิตภัณฑ์ที่เตรียมโดยใช้อิมัลซิฟายเออร์ทั้งสามชนิดที่ pH 9.0 ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปรับ pH ของไข่แดงจะทำให้เกิดการเสียเสถียรภาพโครงสร้างของอิมัลชันในไข่แดงและเกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆ ในไข่แดง (Bracco และ Viret, 1982) โดยเมื่อปรับ pH ของไข่แดงที่เจือด้วยน้ำเป็น 4.5 จะทำให้เกิดการแยกส่วนของ granule ทำให้เกิดการปลดปล่อย Phosvitin และ Lipoproteins สู่วัฏภาคน้ำ (aqueous phase) (Causeret, Matringe และ Lorient,1991) นอกจากนั้น Lipovitellin ถูกprotonate (Taborsky, 1974; Vogel, 1983) ทำให้ประจุของ Lipovitellin ลดลง ซึ่งจะเสริมการเกิดการกระทำต่อ

กัน (interaction) ระหว่างโปรตีน (Kiosseoglou และ Sherman, 1983) ทำให้เกิด dimerization ของ Lipovitellin (Burley และ Cook, 1962 ; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) เกิดการตกตะกอนได้ง่ายเมื่อนำไปปั่นแยก ประกอบกับโมเลกุลของ Phosvitin ซึ่งมี amino acid residues อยู่เป็นจำนวนมาก โดยครึ่งหนึ่งเป็น phosphoserines และอีกครึ่งหนึ่งของส่วนที่เหลือประกอบด้วย acidic amino acids เป็นจำนวนมาก (Taborsky, 1974) ในขณะที่มี basic amino acidsอยู่น้อยกว่าจึงทำให้โมเลกุลของ Phosvitin มีประจุเป็นลบ (Vogel, 1983) เมื่อปรับ pH เป็น 4.5 จะถูก protonate ทำให้มีประจุรวมน้อยลงจึงเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้น้อยลงการละลายจึงลดลง ดังนั้นเมื่อนำอิมัลชันที่เตรียมที่ pH 4.5 โดยใช้ GMO SMO หรือ LC ไปปั่นแยก จะได้ชั้นตัวอย่าง 4 ชั้น คือ ชั้นน้ำมัน ชั้นเจล ชั้นของเหลวและชั้นของแข็ง ส่วนอิมัลชันที่เตรียมที่ pH 9.0 โดยใช้ GMO เมื่อนำไปปั่นแยกจะได้ชั้นตัวอย่าง 4 ชั้น คือ ชั้นน้ำมัน ชั้นเจล ชั้นของเหลว และชั้นของแข็ง ในขณะที่อิมัลชันที่เตรียมที่ pH 9.0 โดยใช้ SMO หรือ LC จะได้ชั้นตัวอย่าง 3 ชั้น คือ ชั้นน้ำมัน ชั้นเจล และชั้นของเหลว ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปรับ pH ของไข่แดงที่เจือด้วยน้ำเป็น 9.0 โปรตีนจะถูก deprotonate ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของประจุลบ (Causeret, Matringe และ Lorient, 1991) และจะเกิดการเสียเสถียรภาพของ granule ทำให้เกิดการปลดปล่อย Phosvitin และ Lipoproteinsสู่วัฏภาคน้ำ นอกจากนั้นจะเกิดแยกตัวของ Lipovitellins เป็นmonomeric units (Burley และ Cook , 1962 ; Kamet , Lawrence , Hart และ Yoell , 1973) และเนื่องจาก Phosvitin ถูก deprotonate ทำให้ประจุลบของ Phosvitin มากขึ้น (Vogel, 1983) ประกอบกับที่ pH 9.0 เลซิตินมีประจุเป็นลบ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการผลักกันเนื่องจากแรงทางประจุระหว่างโมเลกุลโปรตีน ส่งผลให้ไม่เกิดการรวมตัวกันและตกตะกอนในขั้นตอนการปั่นแยก ชั้นตัวอย่างที่ได้จึงไม่มีชั้นตะกอนของแข็งเช่นเดียวกับตัวอย่างอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ SMO แต่ SMO เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่มีประจุ (nonionic emulsifier) ดังนั้นผลการแยกชั้นของตัวอย่างอิมัลชันหลังการปั่นแยกจึงไม่ใช่ผลของแรงทางประจุระหว่างโมเลกุลโปรตีน โดยการแยกชั้นนี้อาจเนื่องมาจากอนุภาคไขมันในอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ SMO ที่ pH 9.0 มีขนาดเล็กและชั้นฟิล์มที่เกิดจากการใช้ SMO จะช่วยไม่ให้อนุภาคเข้ามาใกล้กันจนเกิดการรวมตัวกัน ประกอบกับพันธะระหว่าง SMO กับ Lipovitellins ที่จับกันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนอาจเป็นพันธะที่แข็งแรง ดังนั้นหลังการปั่นแยกจึงไม่เกิดการแยกตัวของ SMO กับ Lipovitellins ในสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะอยู่ในส่วนของชั้นที่เป็นเจลหลังการปั่นแยก ส่งผลให้ไม่เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนทำให้จำนวนชั้นของตัวอย่างที่ได้มีเพียง 3 ชั้น ในขณะที่ตัวอย่างอิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ GMO จะได้ชั้นตัวอย่าง 4 ชั้น หลังการปั่นแยก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก GMO อาจมีผลทำให้อนุภาคของโปรตีนเข้ามาใกล้กันมากกว่า ดังนั้นจึงเกิดการรวมตัวกันเป็นอนุภาคที่มีขนาดใหญ่มากขึ้นและตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดหลังการปั่นแยก

3.1 ศึกษา pH และปริมาณ GMO ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเมื่อใช้ GMO พบว่าที่ pH 4.5 ที่ระดับการใช้ GMO 8% และ 10% จะได้ผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่มีปริมาณคอเลสเทอรอลต่ำกว่าที่ pH 9.0 โดยเมื่อปริมาณ GMO ที่ใช้เพิ่มขึ้น ปริมาณคอเลสเทอรอลในชั้นผลิตภัณฑ์จะน้อยลง ($P \leq 0.05$) แต่เมื่อปริมาณ GMO เพิ่มขึ้นเป็น 12% พบว่าที่ pH 4.5 ปริมาณคอเลสเทอรอลในชั้นผลิตภัณฑ์จะมากกว่าที่ระดับการใช้ GMO 10% ($P \leq 0.05$) ในขณะที่ pH 9.0 ปริมาณคอเลสเทอรอลในชั้นผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างจากที่ระดับการใช้ GMO 10% ($P > 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณ GMO ที่ใช้เพิ่มขึ้น จะทำให้ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชันเล็กลง (Chen และ Dickinson, 1998) เนื่องจากมีปริมาณ GMO ที่จะไปเกิดเป็นชั้นฟิล์มล้อมรอบหยดน้ำมันมากขึ้น ทำให้เกิดอนุภาคหยดน้ำมันขนาดเล็กจำนวนมาก ส่งผลให้ความหนืดของตัวอย่างอิมัลชันที่เตรียมมากขึ้น ทำให้ขั้นตอนในการกวนตัวอย่างทำได้ไม่ดี ดังนั้นหยดน้ำมันในตัวอย่างอิมัลชันจึงกระจายตัวได้ไม่ทั่วถึง ผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากการใช้ GMO 12% จึงมีปริมาณคอเลสเทอรอลมากกว่าผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากการใช้ GMO 10%

จากขั้นตอนการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงที่แสดงดังรูปที่ 3.1 เมื่อนำไข่แดงมาเจือน้ำเพื่อลดความหนืดของไข่แดง และช่วยในการทำลายโครงสร้างอิมัลชันในไข่แดง (Awad และ Smith, 1996) โดยในการทดลองใช้อัตราส่วนไข่แดงต่อน้ำ 1: 1 โดยน้ำหนัก ซึ่งที่อัตราส่วนนี้จะช่วยลดความหนืดของไข่แดง ทำให้ขั้นตอนการกวนผสมหลังจากเติมน้ำมันพืชและอิมัลซิฟายเออร์ทำได้ดีขึ้น ในขณะที่ Conte และคณะ (1992) ศึกษาการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง โดยใช้น้ำมันพืชและ monoglyceride จะเจือไข่แดงด้วยน้ำ 50% ของน้ำหนักไข่แดง หรือใช้อัตราส่วนของไข่แดงต่อน้ำ 1: 0.5 ซึ่งความหนืดของอิมัลชันที่เตรียมยังค่อนข้างสูง ทำให้ขั้นตอนการกวนตัวอย่างทำได้ไม่ดี ดังนั้นในการทดลองจึงใช้อัตราส่วนไข่แดงต่อน้ำ 1: 1 โดยน้ำหนัก ที่ pH เริ่มต้นของไข่แดง (6.03) องค์ประกอบต่างๆ ของ granule ซึ่งได้แก่ Lipovitellins Phosvitin และ LDL จะอยู่รวมกันเป็น insoluble particles ที่เชื่อมกันด้วย Phosphocalcic bridges ซึ่งเป็นพันธะที่แข็งแรงระหว่าง Phosvitin และ Lipoproteins (Chang, Powrie และ Fennema, 1977 ; Causeret, Matringe และ Lorient, 1991) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง pH จะทำให้เกิดทำลายโครงสร้างของ Phosphocalcic bridges ที่เชื่อม Phosvitin กับ Lipoproteins ทำให้เกิดการแยกตัว (dissociation) ของ granule (Causeret , Martringe และ Lorient , 1991)

เมื่อปรับpH ของไข่แดงที่เจือด้วยน้ำเป็น 4.5 จะทำให้เกิดการลดลงของ phosphate monoester residues เกิด ionization ของหมู่คาร์บอกซิลและมีการเพิ่มขึ้นของแรงผลัก (repulsive forces) ระหว่างประจุบวก (NH_3^+) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการเสียโครงสร้างของสะพานอิออน (ionic bridges) (Causeret, Matringe และ Lorient,1991) ทำให้เกิดการปลดปล่อย Phosvitin และ Lipoproteins สู่วัฏภาคน้ำ เป็นการเพิ่มการละลายของ granule โมเลกุลของ Phosvitin ซึ่งมี amino acid residues อยู่เป็นจำนวนมาก โดยครึ่งหนึ่งเป็น phosphoserines และอีกครึ่งหนึ่งของส่วนที่เหลือประกอบด้วย acidic amino

acids เป็นจำนวนมาก (Taborsky , 1974) ในขณะที่มี basic amino acids อยู่น้อยกว่าจึงทำให้โมเลกุลของ Phosvitin มีประจุเป็นลบ (Vogel, 1983) ที่ pH ปกติของไข่แดง phosphoserine residues จะอยู่ในรูป dianionic เมื่อปรับ pH เป็น 4.5 จะถูก protonate ทำให้มีประจุรวมน้อยลง (Taborsky, 1974; Vogel, 1983) ในขณะที่ประจุของ Lipovitellin ลดลงซึ่งจะเสริมการเกิดการกระทำต่อกันระหว่างโปรตีน (Kiosseoglou และ Sherman, 1983) ทำให้เกิด dimerization ของ Lipovitellin (Burley และ Cook, 1962; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) และเกิดการเสียเสถียรภาพของ LDL ส่วนของพลาสมาซึ่งประกอบด้วย Livetin และ LDL ก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน โดยโปรตีน Livetin จะถูก protonate และ LDL จะเกิดการเสียเสถียรภาพ ดังนั้นเมื่อปรับ pH เป็น 4.5 จะทำให้โครงสร้างขององค์ประกอบต่างๆ ในไข่แดงเปลี่ยนแปลงไปและทำให้โครงสร้างอิมัลชันในไข่แดงเสียไป โดยไฮโดรเจนอิออนจากกรดจะไปทำลายเสถียรภาพโครงสร้างไมเซลของ LDL (Evans, Bauer และ Flegal, 1974) เมื่อ LDL แพร่มาถึงผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน (oil-water interface) จะเกิดการเสียสภาพโครงสร้างของชั้นล้อมรอบเดี่ยวที่ล้อมรอบโครงสร้างไมเซลของ LDL เกิดการแยกส่วนขององค์ประกอบต่างๆ ในโครงสร้างของ LDL ทำให้เกิดการดูดซับของคอเลสเทอรอลที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน (Mine, 1998)

ในการเกิดอิมัลชันนั้นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) จะทำหน้าที่ในการช่วยให้เกิดอิมัลชัน โดยทำให้มีการลดลงของแรงตึงระหว่างผิวสัมผัส (interfacial tension) และสารลดแรงตึงผิวเหล่านี้จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสเกิดเป็นชั้นฟิล์มล้อมรอบหยดน้ำมัน ฟิล์มนี้จะทำหน้าที่เป็นชั้นป้องกันไม่ให้เกิดการรวมตัวกันของหยดน้ำมัน (droplet coalescence) (Schuster และ Adams, 1984) ซึ่งจะเกิดแรงกระทำที่แข็งแรงระหว่างส่วน hydrophilic ของอิมัลซิฟายเออร์และวัฏภาคน้ำ ทำให้มีการลดลงอย่างมากของแรงตึงระหว่างผิวของน้ำทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ โดยสารลดแรงตึงผิวจะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันในระบบอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำมี 2 ชนิด คือ โปรตีนและสารลดแรงตึงผิวโมเลกุลเล็กหรืออิมัลซิฟายเออร์นั่นเอง โดยโปรตีนในระบบประกอบด้วย Phosvitin ซึ่งเป็น hydrophilic protein เนื่องจากมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก (Itoh, Kubo และ Adachi, 1986 ; Causeret , Martringe และ Lorient , 1991) ในขณะที่ Lipovitellin และ LDL เป็น hydrophobic protein (Halling, 1981; Parker ,1987) ดังนั้น Lipovitellin และ LDL ซึ่งมีความเป็น hydrophobic มากกว่า Phosvitin จึงเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ดีกว่า แต่เนื่องจากที่ pH 4.5 Lipovitellin เกิด dimerization จึงเกิดการคลายตัว (unfolding) ของโมเลกุลได้ไม่ดีทำให้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ไม่ดี (Burley และ Cook, 1962) ดังนั้น LDL จึงเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มากกว่า Lipovitellin ทำให้คอเลสเทอรอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากการเสียสภาพโครงสร้างของ LDL เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มาก ส่วนของ Lipovitellin ที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจะจับกับโมเลกุลของอิมัลซิฟายเออร์ในวัฏภาคน้ำ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนกับอิมัลซิฟายเออร์ (Dickinson และ Woskett, 1989)

เมื่อใช้ GMO เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในระบบ จะเกิดการแข่งขันระหว่าง GMO กับโปรตีนในการที่จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน โดยจะเกิดการดูดซับของ LDL Lipovitellin และ GMO ที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ส่วนของ Lipovitellin ที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจะจับกับโมเลกุลของ GMO ในวัฏภาคน้ำ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Lipovitellin กับ GMO ส่วน GMOอิสระที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจะจับที่ด้านบนของโมเลกุลโปรตีนที่ดูดซับอยู่ที่ผิวสัมผัส (Dickinson และ Woskett , 1989) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ SMO กับ Lipovitellin ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้โครงสร้างของ Lipovitellin เปลี่ยนไป (Bee, Richmond และ Mingins, 1989) นอกจากนั้นโปรตีนบางส่วนจะถูกแทนที่ด้วย GMO ทำให้เกิดช่องว่างที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันมากขึ้นส่งผลให้เกิดการดูดซับของ LDL ได้มากขึ้น ส่วน GMO อิสระที่อยู่ในวัฏภาคน้ำจะจับตัวกันเกิดเป็นไมเซลทำให้ความหนืดของอิมัลชันมากขึ้น เป็นผลให้ไม่เกิดการรวมตัวกันของหยดน้ำมันเล็กๆ ทำให้เสถียรภาพของอิมัลชันดี เมื่อปริมาณ GMO ที่ใช้เพิ่มขึ้นจาก 8% เป็น 10% ทำให้มี GMO ที่จะมาแข่งขันกับโปรตีนในการที่จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันมากขึ้น และทำให้มี GMO อิสระที่จะมาจับกับโปรตีนมากขึ้นด้วย ดังนั้นปริมาณคอเลสเทอรอลในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จึงน้อยลง แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ GMO เป็น12% ปริมาณคอเลสเทอรอลในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะมากขึ้น เนื่องจากความหนืดของอิมัลชันเพิ่มขึ้น ทำให้ในขั้นตอนการกวนเกิดการกระจายของหยดน้ำมันได้ไม่ทั่วถึง และเมื่อปริมาณ GMO เพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณฟอสโฟลิปิดจะลดลงเนื่องจากขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันจะเล็กลง (Chen และ Dickinson, 1998) ทำให้มีพื้นที่ผิวในการดูดซับมากขึ้น นอกจากนั้น GMO จะจับกับ Lipovitellin มากขึ้น ทำให้โปรตีน Phosvitin ซึ่งมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก (Itoh , Kubo และ Adachi , 1986 ; Causeret , Matringe และ Lorient , 1991) เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มากขึ้น ดังนั้นปริมาณฟอสฟอรัสที่ติดไปกับน้ำมันจึงมากขึ้น ทำให้ปริมาณฟอสโฟลิปิดลดลง

เมื่อปรับ pH ของไข่แดงที่เจือด้วยน้ำเป็น 9.0 โปรตีนจะถูก deprotonate ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของประจุลบ (COO^-) เหนี่ยวนำให้เกิดแรงผลักทางประจุไฟฟ้า (electrostatic repulsion) เป็นผลให้เกิดการเสียโครงสร้างของ granule เนื่องจากเกิดการทำลาย phosphocalcic bridge (Causeret, Matringe และ Lorient, 1991) เกิดการปลดปล่อย Phosvitin และ Lipoproteins สู่วัฏภาคน้ำ นอกจากนั้นจะเกิดแยกตัวของ Lipovitellins เป็นหน่วยเดี่ยว (monomeric units) (Burley และ Cook, 1962 ; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) ดังนั้นที่ pH 9.0 Lipovitellins ซึ่งอยู่เป็น monomer จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มากกว่าที่ pH 4.5 ทำให้ LDL เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสได้น้อยลง ดังนั้นปริมาณคอเลสเทอรอลในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จึงมากกว่าที่ pH 4.5 และเนื่องจาก Phosvitin ถูก deprotonate ทำให้ประจุลบของ Phosvitin มากขึ้น ดังนั้นจึงเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้น้อยกว่าที่ pH 4.5 ปริมาณฟอสโฟลิปิดในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จึงมากกว่าที่ pH 4.5 และปริมาณ

ฟอสโฟลิปิดในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะน้อยลงเมื่อปริมาณ GMO ที่ใช้มากขึ้น ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณ GMO ที่ใช้มากขึ้นจะส่งผลให้ขนาดของหยดน้ำมันในอิมัลชันมีขนาดเล็กลง ทำให้พื้นที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้น Phosvitin จึงเกิดการดูดซับที่หยดน้ำมันได้มากขึ้น นอกจากนี้จากการทดลองพบว่า yield ของชั้นของแข็งและของเหลวซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ pH 4.5 และ 9.0 จะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่จะมีปริมาณของชั้นของแข็งและของเหลวต่างกัน โดยปริมาณชั้นของแข็งที่ pH 4.5 จะมากกว่าปริมาณชั้นของแข็งที่ pH 9.0 ในขณะที่ปริมาณชั้นของเหลวจะน้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากที่ pH 4.5 Lipovitellin จะอยู่เป็น dimer (Burley และ Cook, 1962 ; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) ดังนั้นเมื่อนำไปปั่นแยกจึงตกตะกอนแยกเป็นชั้นของแข็งได้มากกว่าที่ pH 9.0 ซึ่ง Lipovitellin จะอยู่เป็น monomer (Burley และ Cook, 1962 ; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) เมื่อนำไปปั่นแยกจึงตกตะกอนแยกเป็นชั้นของแข็งได้น้อยกว่า

3.2 ศึกษา pH และปริมาณ SMO ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

เมื่อปรับ pH ของไข่แดงเป็น 4.5 และ 9.0 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆ ในไข่แดงเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในข้อ 3.1 เมื่อใช้ SMO เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในระบบ SMO จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ตรงส่วนที่เป็นช่องว่างที่เหลือจากการดูดซับของโมเลกุลโปรตีนเกิดเป็นชั้นฟิล์มผสมระหว่าง SMO และโปรตีน (Bergenstahl, 1995) ที่ pH 4.5 Lipovitellin อยู่เป็น dimer (Burley และ Cook, 1962) จึงทำให้เกิดการคลายตัวที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ไม่ดี ส่งผลให้ Lipovitellin เกิดการดูดซับที่ช่องว่างที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ไม่ดีจึงเกิดเป็นชั้นฟิล์มที่หนา (Mine, 1998) ทำให้ SMO เข้าไปแทรกที่ช่องว่างที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ไม่ดี ประกอบกับ SMO เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Lipovitellin ได้น้อย ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Lipovitellin และเกิดการถอนตัว (desorption) จากผิวสัมผัส แล้วเกิดการแทนที่ด้วย SMO น้อย เป็นผลให้ LDL ถูกดูดซับได้น้อย ในขณะที่ pH 9.0 นั้น Lipovitellin อยู่เป็น monomer (Burley และ Cook, 1962; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) จึงทำให้เกิดการคลายตัวของโมเลกุลที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ดีทำให้ชั้นฟิล์มที่เกิดขึ้นบาง (Mine, 1998) ส่งผลให้ SMO เกิดการดูดซับที่ช่องว่างที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มาก SMO จะเข้าไปแทรกที่ช่องว่างที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้ดีและSMO จะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ Lipovitellin ได้มาก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Lipovitellin และเกิดการถอนตัวของ Lipovitellin จากผิวสัมผัสได้มากทำให้เกิดช่องว่างที่ผิวสัมผัสมากขึ้น เป็นผลให้ LDL เกิดการดูดซับได้มากขึ้น ดังนั้นปริมาณคอเลสเทอรอลในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากการใช้ SMO ที่ pH 9.0 จึงน้อยกว่าที่ pH 4.5 ส่วนปริมาณฟอสโฟลิปิดในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ pH 9.0 จะมากกว่าที่ pH 4.5 เนื่องจากที่ pH 9.0 Phosvitin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก (Itoh, Kubo และ Adachi, 1986 ; Causeret , Matringe และ Lorient , 1991) ถูก deprotonate ทำให้ประจุลบของ

Phosvitin มากขึ้น (Taborsky, 1974; Vogel, 1983) จึงเกิดการดูดซับที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณฟอสฟอรัสลดลง เมื่อปริมาณฟอสฟอรัสลดลงจึงเป็นผลให้ปริมาณฟอสโฟลิปิดในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงน้อยลงด้วย นอกจากนี้ yield ของชั้นของแข็งและของเหลวซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมที่ pH 4.5 จะมีค่าใกล้เคียงกับ yield ของชั้นของเหลว ซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมที่ pH 9.0 โดยที่ pH 4.5 ปริมาณของชั้นของแข็งมีค่าใกล้เคียงกันที่ทุกระดับการใช้ SMO ในขณะที่ปริมาณชั้นของเหลวจะลดลง เมื่อปริมาณ SMO ที่ใช้มากขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้ SMO มากขึ้นจะทำให้มี SMO อิสระที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันมากขึ้น ซึ่ง SMO อิสระนี้จะละลายอยู่ในส่วนของวัฏภาคต่อเนื่อง ส่งผลให้ความหนืดของอิมัลชันที่เตรียมมากขึ้น (Chow และ Ho, 1996) ทำให้อิมัลชันมีเสถียรภาพมากขึ้น ดังนั้นเมื่อนำไปปั่นแยกจึงทำให้อิมัลชันที่เตรียมโดยใช้ SMO ในปริมาณที่น้อยกว่าเกิดการแยกชั้นได้ดีกว่าและมีส่วนของเหลวที่ติดไปกับชั้นเจลน้อยกว่า

3.3 ศึกษา pH และปริมาณ LC ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

เมื่อปรับ pH ของไข่แดงเป็น 4.5 และ 9.0 จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆ ในไข่แดงเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในข้อ 3.1 เมื่อใช้ LC เป็นอิมัลซิฟายเออร์ในระบบ LC จะเกิดการแข่งขันกับโปรตีนในการที่จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน โดยในช่วงแรกโปรตีนจะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันก่อน จากนั้น LC จะมาไล่โปรตีนที่ดูดซับที่ผิวสัมผัสออกไป (Christie, 1991) เนื่องจาก LC เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่มีประจุ (amphoteric emulsifier) (Stauffer, 1992) ดังนั้นเมื่อ pH เปลี่ยนจะทำให้ประจุบนโมเลกุลของ LC เปลี่ยนไปด้วย โดยที่ pH ต่ำกว่า 7 LC จะมีประจุเป็นบวก ในขณะที่ pH สูงกว่า 7 LC จะมีประจุเป็นลบ (Christie, 1991) ดังนั้นที่ pH 4.5 ซึ่ง LC มีประจุเป็นบวกจะทำให้เกิดการเสียเสถียรภาพของชั้นล้อมรอบเดี่ยวของ LDL ได้มากกว่าที่ pH 9.0 และประจุบวกของ LC จะทำให้เกิดการถอนตัวของ Lipovitellin จากผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มากกว่า (Dickinson, Euston และ Woskett , 1990) ทำให้ LDL เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มากขึ้น LC ที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน ส่วนหนึ่งจะจับกับโปรตีนในวัฏภาคน้ำ อีกส่วนจะจับตัวกันเกิดเป็น bilayer (Courthaudon และ Dickinson, 1991) ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของอิมัลชันและป้องกันไม่ให้เกิดการรวมตัวกันของหยดน้ำมัน ดังนั้นปริมาณคอเลสเทอรอลในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากการใช้ LC ที่ pH 4.5 จึงน้อยกว่าที่ pH 9.0 ส่วนปริมาณฟอสโฟลิปิดในผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ pH 9.0 จะมากกว่าที่ pH 4.5 เนื่องจาก Phosvitin ถูก deprotonate (Causeret, Matringe และ Lorient, 1991) ทำให้ประจุลบของ Phosvitin มากขึ้น ดังนั้นจึงเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้น้อยกว่าที่ pH 4.5 และเมื่อปริมาณ LC ที่ใช้เพิ่มขึ้นปริมาณฟอสโฟลิปิดในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะมากขึ้นทั้งนี้เนื่องจาก LC บางส่วนที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจะจับกับโปรตีน Phosvitin รวมอยู่ในส่วนชั้นของผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้หลังการปั่นแยก นอกจากนั้นอิมัลชันที่เตรียมที่ pH 4.5 จะได้

yield ของชั้นของแข็งและของเหลว ซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงมากกว่า yield ของชั้นของเหลว ซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมที่ pH 9.0 ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ pH 9.0 Lipovitellin จะอยู่เป็น monomer (Burley และ Cook, 1962 ; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) ทำให้ Lipovitellin ละลายได้ดี ดังนั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมที่ pH 9.0 จึงมีแต่ชั้นของเหลวไม่มีชั้นของแข็ง เมื่อนำไปปั่นแยกจึงทำให้ส่วนของเหลวติดไปกับชั้นเจลมากกว่าชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมที่ pH 4.5 ซึ่งมีทั้งชั้นของแข็งและของเหลว

3.4 <u>ศึกษา pH ชนิด และปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง</u>

จากการศึกษา pH ชนิด และปริมาณของอิมัลซิฟายเออร์ในน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง ตามวิธีสกัดดังรูป 3.1 พบว่าเมื่อใช้ GMO 10% ที่ pH 4.5 SMO 10% ที่ pH 9.0 และ LC 8% ที่ pH 4.5 ผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะมีปริมาณคอเลสเทอรอลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยที่แต่ละภาวะของการใช้อิมัลซิฟายเออร์แต่ละชนิดจะมีผลในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งกลไกในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดงของอิมัลซิฟายเออร์ทั้งสามชนิดได้กล่าวไว้แล้วในข้างต้น ในขณะที่จะมีความแตกต่างของปริมาณฟอสโฟลิปิดของผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้ โดยผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากการใช้ LC จะมีปริมาณฟอสโฟลิปิดมากกว่าผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จากการใช้ SMO และ GMO เนื่องจาก LC บางส่วนที่ใช้เป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่ไม่ได้เกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจะจับกับโปรตีน Phosvitin รวมอยู่ในส่วนชั้นของผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้หลังการปั่นแยก นอกจากนั้น yield ของผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมโดยใช้ LC จะมากกว่าผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่เตรียมโดยใช้ GMO และ SMO ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ LC 8% ที่ pH 4.5 เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4. <u>ศึกษาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง</u>

จากการเลือกใช้ภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดคอเลสเทอรอลจากไข่แดงจากข้อ 3.4 มาใช้ศึกษาหาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง พบว่าเมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เพิ่มขึ้น ปริมาณชั้นของแข็งและของเหลวซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงและชั้นเจลจะลดลง ในขณะที่ชั้นน้ำมันจะเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เพิ่มขึ้นจะทำให้ได้อิมัลชันที่มีเสถียรภาพดีขึ้น เนื่องจากเกิดหยดน้ำมันขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งในการทดลองใช้อิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณมากและปริมาณที่ใช้มากพอที่จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้เพียงพอ เกิดเป็นชั้นฟิล์มล้อมรอบหยดน้ำมัน ดังนั้นเมื่อเสถียรภาพของอิมัลชันดีขึ้นจึงทำให้การแยกชั้นหลังการปั่นแยกเกิดได้ไม่ดี ส่งผลให้ปริมาณของชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้น้อยลง ในขณะที่ปริมาณชั้นน้ำมันจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากปริมาณน้ำมันที่ใช้มากขึ้น เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้ พบว่าปริมาณคอเลสเทอรอล ฟอสโฟลิปิด โปรตีน

คาร์โบไฮเดรต และเถ้าในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะลดลง ($P<0.05$) ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างของปริมาณไขมัน ($P>0.05$) โดยเมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เพิ่มขึ้นจาก 2 เท่าเป็น 3 เท่า ปริมาณคอเลสเทอรอลและฟอสโฟลิปิดในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะน้อยลง ทั้งนี้เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันจะทำให้ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชันเล็กลง (Chen และ Dickinson , 1998) เนื่องจากปริมาณของน้ำมันที่ใช้มากขึ้น ทำให้เกิดหยดน้ำมันขนาดเล็กจำนวนมาก เนื่องจากในการทดลองใช้อิมัลซิฟายเออร์ในปริมาณมาก ซึ่งปริมาณที่ใช้มากพอที่จะเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้เพียงพอ เกิดเป็นชั้นฟิล์มล้อมรอบหยดน้ำมัน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับคอเลสเทอรอลจาก LDL แต่เมื่อปริมาณน้ำมันที่ใช้เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ปริมาณคอเลสเทอรอลในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้ไม่แตกต่างจากเมื่อใช้ปริมาณน้ำมัน 3 เท่า ($P>0.05$) เนื่องจากเมื่อปริมาณน้ำมันที่ใช้เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า จะทำให้ได้อิมัลชันที่มีขนาดของหยดน้ำมันเล็กลง มีผลทำให้ความหนืดของอิมัลชันมากขึ้น (Chow และ Ho, 1996) ส่งผลให้ในขั้นตอนการกวนตัวอย่างทำได้ไม่ดี ทำให้หยดน้ำมันกระจายตัวในอิมัลชันได้ไม่ดีและเมื่อขนาดของหยดน้ำมันเล็กลง ส่งผลให้พื้นที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้น ทำให้ฟอสโฟลิปิดเกิดการดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันได้มากขึ้น ดังนั้นเมื่อปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นปริมาณฟอสโฟลิปิดในชั้นผลิตภัณฑ์จึงน้อยลง ($P\leq0.05$) และพบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และเถ้า ($P>0.05$) เมื่อปริมาณน้ำมันเพิ่มขึ้นจาก 2 เท่า เป็น 3 เท่าของน้ำหนักไข่แดง แต่เมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เพิ่มเป็น 4 เท่า พบว่าปริมาณฟอสโฟลิปิด โปรตีน เถ้า และคาร์โบไฮเดรตจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นขนาดของหยดน้ำมันเล็กลง (Chow และ Ho, 1996) ส่งผลให้พื้นที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้น ที่ pH4.5 โปรตีนจะถูก protonate ทำให้มีประจุสุทธิลดลง (Taborsky, 1974; Vogel, 1983) ดังนั้นโปรตีนจึงเกิดการดูดซับที่ผิวของหยดน้ำมันได้มากขึ้น เมื่อพื้นที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้นปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับที่ผิวของหยดน้ำมันก็มากขึ้นทำให้ปริมาณโปรตีนในชั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้น้อยลง นอกจากนั้นปริมาณคาร์โบไฮเดรตก็น้อยลงด้วย ทั้งนี้เนื่องจากคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในไข่แดงจะจับกับอยู่โปรตีน (Alais และ Linden, 1991 ; Powrie และ Nakai, 1990) ดังนั้นเมื่อปริมาณโปรตีนลดลงจึงทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลงด้วย และปริมาณฟอสโฟลิปิดในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้น้อยลง เนื่องจากเมื่อพื้นที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้นโปรตีน Phosvitin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณมาก (Itoh , Kubo และ Adachi , 1986 ; Causeret , Martringe และ Lorient , 1991) จะเกิดการดูดซับที่ผิวของหยดน้ำมันมากขึ้นจึงส่งผลให้ปริมาณเถ้าในชั้นผลิตภัณฑ์น้อยลงด้วย นอกจากนี้เมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เพิ่มมากขึ้น พบว่า yield ของชั้นของแข็งและของเหลวซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์จะลดลง เนื่องจากเมื่อปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้มากขึ้นจะทำให้เกิดหยดน้ำมันขนาดเล็กจำนวนมาก ทำให้ความหนืดของอิมัลชันมากขึ้น (Chow และ Ho, 1996) ดังนั้นอิมัลชันที่เตรียมจึงมีเสถียรภาพมาก ส่งผลให้เมื่อนำไปปั่นแยกเกิดการแยกชั้นของอิมัลชันได้ไม่ดี

5.ศึกษาความดันในการโฮโมจีไนซ์ที่เหมาะสมในการสกัดคอเลสเทอรอลออกจากไข่แดง

จากการแปรความดันในการโฮโมจีไนซ์ตัวอย่างอิมัลชันที่เตรียม โดยการแปรความดันเป็น 3 ค่าคือ 1000 , 2000 และ 3000 psi พบว่าเมื่อความดันในการโฮโมจีไนซ์เพิ่มขึ้น ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชันจะเล็กลง ($P \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มความดันในการโฮโมจีไนซ์จาก 1000 psi เป็น 2000 psi พบว่าปริมาณคอเลสเทอรอล ฟอสโฟลิปิด โปรตีน ไขมัน และเถ้าในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จะลดลง ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเพิ่มความดันในการโฮโมจีไนซ์ จะทำให้ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชันจะเล็กลง (Farrall, 1973) ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของหยดน้ำมันเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ LDL ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเป็น hydrophobic มากที่สุด (Zayas, 1997) เกิดการดูดซับที่หยดน้ำมันได้มากขึ้น และเกิดการเสียโครงสร้างของ LDL ทำให้คอเลสเทอรอลที่อยู่ภายใน LDL ถูกปลดปล่อยออกมา (Mine, 1998) จึงเกิดการดูดซับที่หยดน้ำมันได้มาก ปริมาณคอเลสเทอรอลในชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้จึงลดลง ในขณะที่ Phosvitin และ Livetin ซึ่งมีความเป็น hydrophilic มากกว่า (Itoh, Kubo และ Adachi, 1986 ; Causeret, Martringe และ Lorient,. 1991) จะเกิดการดูดซับที่หยดน้ำมันได้น้อยกว่าจึงมีเหลืออยู่ในชั้นผลิตภัณฑ์มากกว่า แต่เนื่องจากเมื่อเพิ่มความดันในการโฮโมจีไนซ์จะทำให้ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันในอิมัลชันจะเล็กลง (Farrall, 1973) จึงทำให้โปรตีนและฟอสโฟลิปิดเกิดการดูดซับที่หยดน้ำมันได้มากขึ้น และเนื่องจากที่ pH 4.5 โปรตีนถูก protonate ทำให้มีประจุสุทธิน้อยลงและฟอสโฟลิปิดจะมีประจุเป็นบวก (Christie, 1991) จึงทำให้เกิดแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับฟอสโฟลิปิดมากขึ้น ดังนั้นเมื่อโปรตีนลดลงจึงส่งผลให้ปริมาณฟอสโฟลิปิดซึ่งมีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบลดลงด้วย และเมื่อปริมาณฟอสฟอรัสลดลงจึงทำให้ปริมาณเถ้าในชั้นผลิตภัณฑ์ลดลงด้วย ไข่แดงที่ได้มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงประมาณ 74% ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Conte และคณะ (1992) ที่ทดลองเจือไข่แดงด้วยน้ำกลั่น 50% ของน้ำหนักไข่แดง แล้วเติมน้ำมันพืชที่มีmonoglyceride 8-10% ลงไปกวนให้เข้ากัน นำไปโฮโมจีไนซ์ที่ 500 psi จากนั้นนำไปปั่นแยกชั้น พบว่าชั้นผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้มีปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงประมาณ 80% ซึ่งความดันในการโฮโมจีไนซ์ที่ใช้ในช่วงไม่เกิน 3000 psi ยังคงให้ผลิตภัณฑ์เป็นที่ยอมรับ ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ความดันในการโฮโมจีไนซ์เป็น 1000, 2000 และ 3000 psi เนื่องจากเมื่อใช้ความดันในการโฮโมจีไนซ์มากขึ้นจะให้ผลในการสกัดคอเลสเทอรอลที่ดี แต่อิมัลชันที่เตรียมจะมีเสถียรภาพมากทำให้การแยกชั้นของอิมัลชันในขั้นตอนการปั่นแยกทำได้ยาก ดังนั้นจึงเลือกแปรความดันเพียง 3000 psi นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความดันในการโฮโมจิไนซ์ พบว่า yield ของชั้นของแข็งและของเหลวซึ่งเป็นชั้นผลิตภัณฑ์จะลดลง เนื่องจากเมื่อความดันที่ใช้ในการโฮโมจิไนซ์เพิ่มขึ้นจะทำให้ขนาดอนุภาคของหยดน้ำมันเล็กลง (Farrall, 1973) ส่งผลให้ความหนืดของอิมัลชันมากขึ้น (Chow และ Ho, 1996) ดังนั้นอิมัลชันที่เตรียมจึงมีเสถียรภาพมาก เมื่อนำไปปั่นแยกจึงเกิดการแยกชั้นของอิมัลชันได้ไม่ดี โดยชั้นของอิมัลชันที่ได้หลังการปั่นแยกจะมีส่วนของชั้นเจลอยู่ในปริมาณมาก ในขณะที่มีชั้นของแข็งและของเหลวอยู่น้อย จึงส่งผลให้ yield ของผลิตภัณฑ์ไข่แดงที่ได้ต่ำ

6.วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลง

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลง (ตารางที่ 4.22) พบว่ามีความชื้นร้อยละ 55.76 โปรตีน ไขมัน ร้อยละ 72.03 21.47 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีปริมาณคอเลสเทอรอล และฟอสโฟลิปิดอยู่ 650.90 และ 9969.94 mg/100g โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ มีค่าความสว่าง (L) ค่าสี (a) และค่าสี (b) เป็น 66.27 -4.93 13.45 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าไข่แดงที่ได้มีความชื้นมากกว่าความชื้นของไข่แดงเริ่มต้น (49.76%) เนื่องจากในขั้นตอนการลดปริมาณคอเลสเทอรอลจะมีการปรับ pH ของไข่แดงเป็น 4.5 ทำให้โปรตีนถูก protonate มีประจุบวกมากขึ้น (Taborsky, 1974; Vogel, 1983) นอกจากนั้นไข่แดงยังมี acidic amino acids อยู่เป็นจำนวนมาก (Vogel, 1983) ซึ่ง acidic amino acids เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวก จึงสามารถสร้างพันธะกับออกซิเจนของน้ำได้ (Zayas, 1997) ดังนั้นไข่แดงที่ได้จึงมีความชื้นมากขึ้น นอกจากนั้นไข่แดงที่ได้จะมีค่าความสว่างมากขึ้น แสดงว่าไข่แดงที่ได้มีสีอ่อนลง ส่วนค่าสีแดง (a) เป็นลบ แสดงว่ามีสีค่อนไปทางสีเขียวเล็กน้อย สีของไข่แดงที่ได้จึงมีสีเหลืองอ่อนมากค่อนไปทางสีขาวเหลือง เนื่องจากรงควัตถุจำพวก Xanthophyll ซึ่งให้สีส้มที่มีอยู่ในไข่แดง (Penfield และ Campbell, 1990) ละลายไปกับน้ำมันพืชที่ใช้ในการทดลองและจำนวนอนุภาคของหยดน้ำมันมีมาก จึงเกิดการสะท้อนแสงมากทำให้มีสีขาวมากขึ้น (Brennan, Butters, Cowell และ Lilley, 1990) และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลง พบว่าไข่แดงที่ได้ประกอบด้วย Myristic acid (C14:0) 0.32% Palmitic acid (C16:0) 24.59% Palmitoleic acid (C16:1) 0.87% Stearic acid (C18:0) 7.78% Oleic acid (C18:1) 25.17% Linoleic acid (C18:2) 34.90 Linolenic acid (C18:3) 3.42% Arachidonic acid (C20:4)1.58% Docosahexaenoic acid (C22:6) 1.24% จะเห็นได้ว่าไข่แดงที่ได้มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่เปลี่ยนแปลงไป โดยมีสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณ 0.51 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าไข่แดงเริ่มต้น เนื่องจากไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลงจะมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะ (Linoleic acid และ Linolenic acid) เพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณ Linoleic acid และ Linolenic acid ที่เพิ่มขึ้นนี้มาจากน้ำมันถั่วเหลืองบางส่วนที่ถูก emulsified เข้าไปในไข่แดง โดยกรดไขมันที่มีอยู่มากในไข่แดงที่ได้คือ Linoleic acid และ Oleic acid ซึ่งปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะที่เพิ่มขึ้นจะเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคมากขึ้น เนื่องจากการบริโภคกรดไขมันอิ่มตัวจะเพิ่มการสังเคราะห์คอเลสเทอรอลในร่างกาย ในขณะที่กรดไขมันไม่อิ่มตัวหลายพันธะจะช่วยลดระดับ serum cholesterol ในร่างกาย (Lawson, 1995) นอกจากนั้นจะเห็นว่าไข่แดงที่ได้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ไขมันลดลง เนื่องจาก LDL และไขมันบางส่วนถูกแยกออกไปกับชั้นน้ำมันหลังการปั่นแยก ดังนั้นไข่แดงที่ได้จึงมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นและมีไขมันลดลง ปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงประมาณ 74% ดังนั้นเมื่อปริมาณคอเลสเทอรอลลดลงจึงเป็นการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดตีบตัน (Atherosclerosis) (American Heart Association, 1993) และโรคเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดหัวใจ (Coronary heart disease) (Hegsted, 1993)

7. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลง

จากการทดลองพบว่าไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลงมีค่า emulsifying capacity 20.27 ml oil emulsified / gm of egg yolk ซึ่งมีค่าน้อยกว่าไข่แดงสด ทั้งนี้เนื่องจากฟอสโฟลิปิด LDL และ free cholesterol ในไข่แดงซึ่งเป็นสารที่ให้สมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ (Zayas, 1997) มีปริมาณลดลงบางส่วนของฟอสโฟลิปิดและ LDL ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำมัน จะสูญเสียไปกับชั้นน้ำมันและชั้นเจลพร้อมกับคอเลสเทอรอลที่ถูกแยกชั้นออกไปหลังปั่นแยกชั้นผลิตภัณฑ์ ซึ่งชั้นเจลจะประกอบด้วยไขมันเป็นส่วนใหญ่โดยมีน้ำมันซึ่งเป็นไตรกลีเซอไรด์เป็นองค์ประกอบหลักและมีฟอสโฟลิปิด คอเลสเทอรอล และ LDL เป็นองค์ประกอบรองลงไป รวมทั้งมีโปรตีนบางส่วนรวมอยู่ด้วย นอกจากนั้นในขั้นตอนการลดปริมาณคอเลสเทอรอลซึ่งมีการปรับ pH ของไข่แดงเป็น 4.5 จะทำให้ LDLเสียสภาพ เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ LDL (Burley และ Cook, 1962 ; Kamet, Lawrence, Hart และ Yoell, 1973) ซึ่งมีผลทำให้สมบัติในการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ของ LDL เสียไปด้วย อุณหภูมิในการเกิด coagulation ของไข่แดงที่ได้คือ 64.83 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าต่ำกว่าไข่แดงสดเช่นกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไข่แดงที่ลดปริมาณคอเลสเทอรอลลงมีปริมาณไขมันต่ำกว่าไข่แดงสด จึงทำให้เสถียรภาพต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้อยลง ส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงสภาพทางเคมีกายภาพของไข่แดงเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่าของไข่แดงสด เมื่อให้ความร้อนแก่ไข่แดงจะทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการยืดตัว (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2538) และเกิดการคลายตัว ทำให้ส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วที่อยู่ด้านในโมเลกุลหันออกมาด้านนอกของโมเลกุลมากขึ้น ทำให้โปรตีนมีความเป็น hydrophobicity มากขึ้น (Zayas, 1997) และมีการลดลงของกรดอะมิโนที่มีขั้วที่สามารถจับกับน้ำได้เป็นผลให้โปรตีนจับกับน้ำได้น้อยลง การละลายจึงลดลง (Kinsella, 1976 ; Rakosky, 1989 ; Pomeranz, 1991) นอกจากนั้นอาจจะเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วของโปรตีน ทำให้สารละลายเปลี่ยนสภาพเป็นเจลซึ่งเจลที่เกิดจากcoagulation จะเป็นเจลที่สานตัวกันไม่เป็นระเบียบมากนัก (Pomeranz, 1991) แต่เนื่องจากไข่แดงที่ได้มีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ค่อนข้างน้อย ประกอบกับมีเลซิตินซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์อยู่ในปริมาณน้อย ทำให้การรวมตัวของน้ำกับน้ำมันในระบบเกิดได้ไม่ค่อยดี ดังนั้นจึงทำให้การเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของไข่แดงที่ได้เกิดที่อุณหภูมิที่ต่ำกว่าของไข่แดงสด