

ผลของสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อน *Morus alba* L. ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

นางสาวสุภาวรัตน์ แสงเนตร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

EFFECT OF PHENOLIC-CONTAINING EXTRACTS FROM MULBERRY *Morus alba* L.
LEAVES ON PROPERTIES OF SOY PROTEIN ISOLATE FILM

Miss Suparat Sangnate

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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อน

Morus alba L. ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีน

ถั่วเหลืองสกัด

โดย

นางสาวสุภารัตน์ แสงเนตร

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวณิช

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวณิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. วาณี ชนเห็นชอบ)

สุภารัตน์ แสงเนตร : ผลของสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อน *Morus alba* L. ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด. (EFFECT OF PHENOLIC-CONTAINING EXTRACTS FROM MULBERRY *Morus alba* L. LEAVES ON PROPERTIES OF SOY PROTEIN ISOLATE FILM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ. ดร. ธนจันทร์ มหาวณิช, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย. 73 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อน ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ในการศึกษานี้แปรระดับการออกซิเดชันของสารสกัดน้ำ (water extract) จากใบหม่อนเป็น 3 ระดับ ได้แก่ สารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ (unoxidized extract, UNOX), สารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับต่ำ (mildly oxidized extract, MILD-OX) และสารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับสูง (highly oxidized extract, HIGH-OX) สารสกัด UNOX เตรียมจากใบหม่อนที่นำไปให้ความร้อนด้วยไอน้ำเพื่อยับยั้งกิจกรรมของออกซิไดซิงเอนไซม์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในใบหม่อน ส่วนสารสกัด MILD-OX เตรียมจากใบหม่อนสด และสารสกัด HIGH-OX เตรียมโดยนำสารสกัดน้ำจากใบหม่อนสดมาพ่นอากาศเป็นเวลา 60 นาที พบว่าผงสารสกัด UNOX, MILD-OX และ HIGH-OX ที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 75.3, 72.4 และ 59.2 mg gallic acid equivalent/g โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในการเตรียมตัวอย่างฟิล์มแปรความเข้มข้นของผงสารสกัดเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 5 และ 10% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด และใช้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมสารสกัดเป็นตัวอย่างควบคุม พบว่าความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยตัวอย่างฟิล์มมีความหนาอยู่ในช่วง 0.129-0.133 mm ในด้านสมบัติเชิงกล พบว่าการเติมสารสกัดมีผลอย่างยิ่งต่อความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) โดยฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX เพิ่มขึ้น 10%, MILD-OX เพิ่มขึ้น 2% และ HIGH-OX เพิ่มขึ้น 2% มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มเหล่านี้สามารถยืนยันได้จากการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบของแถบโปรตีนที่ติดตามโดยใช้ SDS-PAGE ซึ่งพบการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อน อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX ที่ระดับความเข้มข้นสูง (5 และ 10%) ส่งผลให้ฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดลดลง ในขณะที่การเติมสารสกัดไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break) อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) การเติมสารสกัดทำให้ความโปร่งแสงและค่าความสว่าง (L^*) ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีค่าลดลง ในขณะที่สีแดง ($+a^*$) และสีเหลือง ($+b^*$) มีค่าเพิ่มขึ้น ฟิล์มทุกตัวอย่างมีมุมสี (hue angle) ประมาณ 90° ซึ่งเป็นมุมสีของสีเหลือง ฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์ (MILD-OX และ HIGH-OX) มีความอิ่มตัวสี (chroma) สูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX และตัวอย่างควบคุม การเติมสารสกัดมีผลให้ค่ามุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม (contact angle) มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability) และความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) มีค่าลดลง ลักษณะภาคตัดขวางของฟิล์มที่ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงถึงโครงสร้างที่หนาแน่นมากขึ้นของฟิล์มที่เติมสารสกัด

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา..... 2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5372503923 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : PROTEIN FILM/SOY/PHENOLIC/PLANT EXTRACT/MULBERRY/PROTEIN CROSS-LINKING

SUPARAT SANGNATE : EFFECT OF PHENOLIC-CONTAINING EXTRACTS FROM MULBERRY *Morus alba* L. LEAVES ON PROPERTIES OF SOY PROTEIN ISOLATE FILM.
 ADVISOR : THANACHAN MAHAWANICH, Ph. D., CO-ADVISOR : ASST. PROF. KIATTISAK DUANGMAL, Ph. D., 73 pp.

This study aimed to investigate the effect of concentration and degree of oxidation of phenolic-containing mulberry leaf extract on properties of soy protein isolate film. Water extract of mulberry leaves at three different degrees of oxidation, namely unoxidized (UNOX), mildly oxidized (MILD-OX) and highly oxidized (HIGH-OX), were investigated in this study. UNOX extract was obtained by water extraction of heated mulberry leaves. Steaming was done to inactivate oxidizing enzymes indigenous to the leaves. MILD-OX extract was obtained from unheated leaves while HIGH-OX extract was obtained after 60-minute aeration of the unheated leaf extract. Total phenolic content of freeze-dried UNOX, MILD-OX and HIGH-OX extracts, expressed as gallic acid equivalent, were 75.3, 72.4 and 59.2 mg/g dry weight, respectively. To prepare the film samples, freeze-dried mulberry leaf extracts were added to the film-forming solution at three different levels (2, 5 and 10% by weight of soy protein isolate). Soy protein isolate film without added leaf extract was used as a control. It was revealed that concentration and degree of oxidation of the extract posed no significant effect on the film thickness ($p>0.05$). Thickness of the film samples was in the range of 0.129-0.133 mm. With regard to mechanical properties, extract incorporation was found to greatly affect tensile strength of soy protein film. The film samples with 10% UNOX, 2% MILD-OX and 2% HIGH-OX exhibited significantly higher tensile strength as compared to the control ($p\leq 0.05$). Protein cross-linking in those samples were confirmed by the changes in protein pattern as monitored using SDS-PAGE. A decrease in band intensity of lower molecular weight proteins was manifested in those samples incorporated with phenolic-containing leaf extract. However, at higher levels of MILD-OX and HIGH-OX addition (5 and 10%), the film samples exhibited lowered tensile strength. On the other hand, elongation at break was not affected by the extract incorporation ($p>0.05$). Addition of the leaf extract resulted in films with decreased transparency and lightness (L^*) whereas redness ($+a^*$) and yellowness ($+b^*$) in those samples became increasing. Hue angle of all film samples was approximately 90° which represents the yellow hue angle. The films with oxidized extract (MILD-OX and HIGH-OX) were higher in chroma as compared to the UNOX and the control films. The extract-containing films possessed higher contact angle plus lower water vapor permeability and water solubility. The scanning electron micrograph of the film cross section demonstrated denser structure in those extract-containing samples.

Department : Food Technology Student's Signature.....
 Field of Study : Food Technology Advisor's Signature
 Academic Year : 2012 Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้โดยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อคิด ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ซึ่งประกอบด้วยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พาสวดี ประทีปะเสน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีตา บรมพิชัยชาติกุล และรองศาสตราจารย์ ดร. วาณี ชนเห็นชอบ ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดน่าน ในการอนุเคราะห์ให้วัดถูปโอบหม่อน

ขอขอบพระคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในความอนุเคราะห์ การใช้เครื่องมือวัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. วาณี ชนเห็นชอบ และ คุณภัทรินทร์ ลีลาภวัฒน์ สำหรับคำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ สำหรับคำแนะนำเพื่อปรับปรุงโครงร่างวิทยานิพนธ์และความอนุเคราะห์การใช้ตู้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์

ขอขอบคุณพี่นลิน คุณนลินทิพย์ คงแก้ว สำหรับคำแนะนำและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนปริญญาโทภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดการวิจัยรวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย ญาติพี่น้องที่คอยให้ ความสนับสนุน ให้กำลังใจและดูแลห่วงใยเอาใจใส่ตลอดมา จนสามารถประสบความสำเร็จลุล่วงในการ ทำวิจัยครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	2
2.1 โปรตีนถั่วเหลือง.....	2
2.2 การเกิดเป็นฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลือง.....	2
2.3 สมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง.....	3
2.4 การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน.....	3
2.4.1 การผลิตเป็นฟิล์มเชิงประกอบ.....	3
2.4.2 วิธีทางกายภาพ.....	4
2.4.3 วิธีทางชีวเคมี (การใช้เอนไซม์).....	7
2.4.4 วิธีทางเคมี.....	8
2.5 ไบโหม่อน.....	15
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	17
3.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี.....	17
3.2 อุปกรณ์.....	17
3.3 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	18
3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากไบโหม่อนที่ออกซิไดส์ที่ระดับแตกต่างกัน.....	18
3.3.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกัน ของสารสกัดจากไบโหม่อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	20
3.3.2.1 ความหนา.....	23

	หน้า
3.3.2.2 สมบัติเชิงกล.....	23
3.3.2.3 รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์ม.....	23
3.3.2.4 ความโปร่งแสง.....	27
3.3.2.5 สี.....	27
3.3.2.6 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ.....	27
3.3.2.7 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	28
3.3.2.8 ความสามารถในการละลายน้ำ.....	28
3.3.2.7 ลักษณะภาคตัดขวาง.....	29
3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	29
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง.....	30
4.1 ปริมาณสารประกอบพีนอลิกทั้งหมดในผงสารสกัดจากใบหม่อน.....	30
4.2 ผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัด จากใบหม่อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	32
4.2.1 ความหนา.....	32
4.2.2 ความต้านทานแรงดึงขาด.....	33
4.2.3 การยืดตัวถึงจุดขาด.....	37
4.2.4 รูปแบบของแถบโปรตีน.....	39
4.2.5 ความโปร่งแสง.....	41
4.2.6 สี.....	43
4.2.7 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ.....	46
4.2.8 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	46
4.2.9 ความสามารถในการละลายน้ำ.....	48
4.2.10 ลักษณะภาคตัดขวาง.....	49
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	52
รายการอ้างอิง.....	54
ภาคผนวก.....	62
ภาคผนวก ก ลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์.....	63
ภาคผนวก ข กราฟเทียบมาตรฐานและรูปตัวอย่างฟิล์ม.....	64

ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง.....	67
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	73

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ปริมาณวัตถุบัพที่ใช้ในการเตรียมสารละลายฟิล์ม.....	21
4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผงสารสกัดจากใบหม่อนที่ออกซิไดส์ ที่ระดับแตกต่างกัน.....	31
4.2 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้น และระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	33
4.3 ค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับ ออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	44
4.4 มุมสีและความอิมิตัวสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความ เข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	45
ค.1 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	66
ค.2 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความ เข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	67
ค.3 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	68
ค.4 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	69
ค.5 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	70
ค.6 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อน ที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	71

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยา thiol-disulfide exchange ในโปรตีน.....	6
2.2 การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนและไทโรซีนโดยฟอร์มาลดีไฮด์ และการเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วยโดยฟอร์มาลดีไฮด์.....	9
2.3 การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วยโดยกลูทาราลดีไฮด์.....	9
2.4 การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วยโดยไกลออกซัล และไกลออกซัลสามารถเกิดปฏิกริยากับหน่วยย่อยอาร์จินีน.....	10
2.5 ปฏิกริยาของกรดพีนอลิกกับไซซังที่เป็นหมู่อะมิโนของพอลิเพปไทด์.....	14
3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากไบหม่อนที่ออกซีไดส์ที่ระดับแตกต่างกัน.....	19
3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	22
4.1 ออกซีเดชันของแคทีคอลไปเป็นออร์โธ-ควิโนน.....	32
4.2 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซีเดชันแตกต่างกัน.....	34
4.3 อันตรกิริยาเชื่อมข้ามภายในโครงสร้างฟิล์มโปรตีนในระบบที่ไม่มีสารประกอบพีนอลิก มีสารประกอบพีนอลิก และมีสารประกอบพีนอลิกที่ถูกออกซีไดส์.....	37
4.4 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซีเดชันแตกต่างกัน.....	38
4.5 รูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซีเดชันแตกต่างกัน.....	40
4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ เอ และบี.....	41
4.7 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซีเดชันแตกต่างกัน.....	42
4.8 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซีเดชันแตกต่างกัน.....	46
4.9 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซีเดชันแตกต่างกัน.....	47

รูปที่	หน้า
4.10 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจาก ไบโหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	49
4.11 ลักษณะภาคตัดขวางของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อน ที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน.....	51
ข.1 กราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu	64
ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry	66
ข.3 ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชัน แตกต่างกัน.....	67

บทที่ 1

บทนำ

แม้ว่าปัจจุบันทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคได้หันมาสนใจใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้เพิ่มมากขึ้น แต่สำหรับฟิล์มโปรตีนหลายชนิดยังไม่มี การนำมาใช้งานแพร่หลายนักเนื่องจากข้อจำกัดสำคัญในด้านสมบัติเชิงกล ในการปรับปรุงความแข็งแรงของฟิล์มโปรตีน วิธีที่นิยมใช้กันมากวิธีหนึ่งคือวิธีทางเคมี สารเคมีที่มักใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน ได้แก่ แอลดีไฮด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น ฟอรัมาลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล เนื่องจากแอลดีไฮด์สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนปฐมภูมิเกิดเป็นอันตรกิริยาเชื่อมข้ามภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Marquié และคณะ, 1997) อย่างไรก็ตามจากความกังวลในด้านความเป็นพิษและผลเสียต่อสุขภาพของแอลดีไฮด์ จึงมีความพยายามในการใช้สารเคมีอื่นที่มีความปลอดภัยสูงกว่า (Galietta และคณะ, 1998)

สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดเป็นองค์ประกอบของพืชตามธรรมชาติและสามารถทำให้เกิดอันตรกิริยาเชื่อมข้ามภายในโครงสร้างของโปรตีน (Strauss และ Gibson, 2004) ไบโหม่อนเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดพารา-คูมาริก กรดเบนโซอิก คาเทชิน กรดคลอโรเจนิก กรดวานิลลิก กรดไซรินจิก กรดซินาปิก กรดโพรโตคาเทอจิก กรดเพรูลิก กรดแกลลิก กรดแคฟเฟอิก กรดแคฟเฟอิลลควินิก รูทีน ไอโซเคอเวซิทิน เคอเวซิทิน เคมเฟอรอล แอสทรากาลิน และอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ (Katsube และคณะ, 2009; Wanyo, Siriamornpun และ Meeso, 2009; Naowaratwattana, De-Eknamkul และ De Mejia, 2010) ดังนั้นสารสกัดจากไบโหม่อนจึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน นอกจากความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกแล้ว สถานะออกซิเดชัน (state of oxidation) ที่แตกต่างกันยังอาจมีผลต่อความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกในการทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนด้วย (Rawel และคณะ, 2002) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัดจากไบโหม่อนต่อสมบัติเชิงกลและสมบัติด้านอื่นๆ ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 โปรตีนถั่วเหลือง

โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่มีปริมาณมากที่สุดในถั่วเหลืองทั้งเมล็ด (whole soybean) โดยมีปริมาณประมาณ 40.3% โดยน้ำหนักแห้ง (Wijeratne, 1993) องค์ประกอบหลักของโปรตีนถั่วเหลือง ได้แก่ ไกลซีนินและเบต้า-คอนไกลซีนิน ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดโกลบูลิน โปรตีนทั้งสองชนิดมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 51.0 และ 18.5% ของโปรตีนทั้งหมด ตามลำดับ (Murphy และ Resurreccion, 1984) โปรตีนถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) ครบถ้วน เช่นเดียวกับโปรตีนจากสัตว์ (Wijeratne, 1993) โปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่หลากหลาย เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม การเกิดเจล รวมถึงการเกิดเป็นฟิล์ม (Zayas, 1997; United Soybean Board, 2004)

เนื่องจากประโยชน์การใช้งานที่หลากหลายของโปรตีนถั่วเหลือง จึงมีการนำถั่วเหลืองมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนหลายชนิดซึ่งมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันไป เช่น ซอยกริต (soy grits) (โปรตีน 50-54%) โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (soy protein concentrate) (โปรตีน 65-70%) และโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate) (โปรตีนไม่ต่ำกว่า 90%) สำหรับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดผลิตโดยนำถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกแล้วมาผ่านกระบวนการแยกโปรตีนออกจากส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตทั้งส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ จึงได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนสูง มีปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรตต่ำ มีสีและกลิ่นเฉพาะตัว (United Soybean Board, 2004)

2.2 การเกิดเป็นฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลือง

โปรตีนหลายชนิดมีสมบัติในการเกิดเป็นฟิล์ม รวมถึงโปรตีนถั่วเหลือง (Park และคณะ, 2002) สำหรับฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายฟิล์ม (film-forming solution) จะต้องให้ความร้อนสารละลายโปรตีนที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C เพื่อทำให้ให้ไกลซีนินและเบต้า-คอนไกลซีนินเกิดการเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน (partial denaturation) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสูญเสียโครงสร้างบางส่วนของโครงสร้างระดับทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ เกิดการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีน และมีหมู่ซัลไฟไฮไดรลและหมู่ไฮโดรโฟบิกซึ่งแต่เดิมอยู่ที่ตำแหน่งด้านในของโมเลกุลปรากฏขึ้นที่ด้านนอก ในระหว่างที่สารละลายฟิล์มแห้งตัวลง สายพอลิเพปไทด์จะเคลื่อนที่

เข้ามาใกล้กัน เกิดอันตรกิริยากันด้วยพันธะโคvalent และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และทำให้เกิดโครงสร้างของฟิล์มขึ้น (Anonymous, 1997)

2.3 สมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง

ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติด้านการป้องกันการซึมผ่านของแก๊ส ไอสารอินทรีย์ และน้ำมันอยู่ในเกณฑ์ดี แต่มีข้อจำกัดสำคัญในด้านสมบัติเชิงกลและการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ ทำให้การนำฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองไปใช้ประโยชน์ยังไม่กว้างขวางนัก ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีความแข็งแรงเชิงกลอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มพลาสติกโดยทั่วไป เช่น พอลิเอทิลีน พอลิพรอพิลีน และพอลิไวนิลิดีนคลอไรด์ (Krochta และ De Mulder-Johnston, 1997; Gennadios และคณะ, 1998) นอกจากนี้จากสมบัติความชอบน้ำของโปรตีนถั่วเหลือง อีกทั้งในกระบวนการผลิตฟิล์มยังมีการเติมพลาสติกไซเซอร์ที่มีสมบัติชอบน้ำ เช่น กลีเซอรอล จึงทำให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดี (Rhim และคณะ, 2000) Gennadios และคณะ (1998) รายงานว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength, TS) และการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break, EB) ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์มพอลิเมอร์สังเคราะห์ ในขณะที่มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (water vapor permeability, WVP) สูงกว่า โดยมีค่าสูงกว่าฟิล์มพอลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำ (low-density polyethylene) ถึง 4 เท่า

2.4 การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน

เนื่องจากความแข็งแรงเชิงกลที่ค่อนข้างต่ำเป็นข้อจำกัดสำคัญประการหนึ่งของฟิล์มโปรตีน ดังนั้นเพื่อเพิ่มศักยภาพในการนำฟิล์มโปรตีนมาใช้งานจึงมีความพยายามในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนซึ่งสามารถทำได้โดยเพิ่มการเชื่อมข้ามของโปรตีนในโครงสร้างฟิล์ม โดยส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาทางเคมีต่างๆ วิธีการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

2.4.1 การผลิตเป็นฟิล์มเชิงประกอบ (composite film)

ฟิล์มที่ผลิตจากพอลิเมอร์แต่ละชนิดต่างก็มีข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันออกไป การผลิตเป็นฟิล์มเชิงประกอบเป็นการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโดยอาศัยสมบัติที่ต้องการของพอลิเมอร์แต่ละชนิด นอกจากนี้ยังอาจเกิดผลเชิงเสริม (synergistic effect) ระหว่างพอลิเมอร์ต่าง

ชนิดที่ใช้ร่วมกัน พิล์มเชิงประกอบอาจเป็นฟิล์มที่ผลิตจากพอลิเมอร์ประเภทเดียวกัน (เช่น พิล์มโปรตีนเชิงประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองและเจลาติน พิล์มพอลิแซ็กคาไรด์เชิงประกอบของสตาร์ชข้าวและไคโทซาน) หรือผลิตจากพอลิเมอร์ต่างประเภทก็ได้ (เช่น พิล์มเชิงประกอบของสตาร์ชข้าวและโปรตีนข้าว พิล์มเชิงประกอบของไคโทซานและเวย์โปรตีน)

Rhim และคณะ (1999) ศึกษาสมบัติของฟิล์มเชิงประกอบจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนต โดยแปรปริมาณพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนตเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 5.0, 10.0, 15.0, 17.5 และ 20.0% โดยน้ำหนักของของแข็ง ผู้วิจัยรายงานว่า การเติมพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนตในช่วง 5.0-17.5% โดยน้ำหนักของของแข็ง ทำให้ฟิล์มที่ได้มีค่า TS เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยาที่เพิ่มขึ้นระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองและพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนต อย่างไรก็ตามเมื่อเติมพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนตในปริมาณ 20% โดยน้ำหนักของของแข็ง มีผลให้ฟิล์มที่ได้มีค่า TS ลดต่ำลง ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าปริมาณพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนตที่มากเกินไปอาจขัดขวางการเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่ไฮดรอกซีของพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนตกับหมู่อะมิโนของโปรตีน ส่วน EB พบว่ามีค่าลดต่ำลงเมื่อเติมพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนต ทั้งนี้ผู้วิจัยเสนอว่าเนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยาที่เพิ่มขึ้นระหว่างโปรตีนและพวอพิลีนไกลคอลแอลจีเนตเช่นเดียวกัน

Cao, Fu และ He (2007) ศึกษาสมบัติของฟิล์มเชิงประกอบจากโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและเจลาติน โดยแปรอัตราส่วนของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดต่อเจลาตินเป็น 6 อัตราส่วน ได้แก่ 10:0, 8:2, 6:4, 4:6, 2:8 และ 0:10 พบว่าเมื่ออัตราส่วนของเจลาตินเพิ่มขึ้น TS และ EB มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและเจลาตินที่เพิ่มขึ้น โดยเกิดเป็นพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและหมู่คาร์บอกซิลของเจลาติน นอกจากนี้ผู้วิจัยได้อธิบายเพิ่มเติมว่าการเกิดเป็นฟิล์มของเจลาตินเป็นผลเนื่องมาจากอันตรกิริยาไอออนิกระหว่างหมู่อะมิโนอิสระและหมู่คาร์บอกซิลอิสระของกรดอะมิโน ร่วมกับพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่สายข้างของกรดอะมิโน ทำให้ฟิล์มเจลาตินมีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มโปรตีนโดยทั่วไป

2.4.2 วิธีทางกายภาพ

การฉายรังสี (radiation) และการบ่มด้วยความร้อน (heat curing) เป็นวิธีทางกายภาพที่สามารถใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของฟิล์มโปรตีนได้

สำหรับการใช้รังสีเพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน Fujimori (1965) เสนอว่ากรดอะมิโนที่มีสายข้างอะโรมาติก ได้แก่ ไทโรซีน และเฟนิลอะลานีน สามารถดูดกลืนรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต และรังสีแกมมา ซึ่งสามารถเร่งให้เกิดอันตรกิริยาเชื่อมข้ามของโปรตีนได้

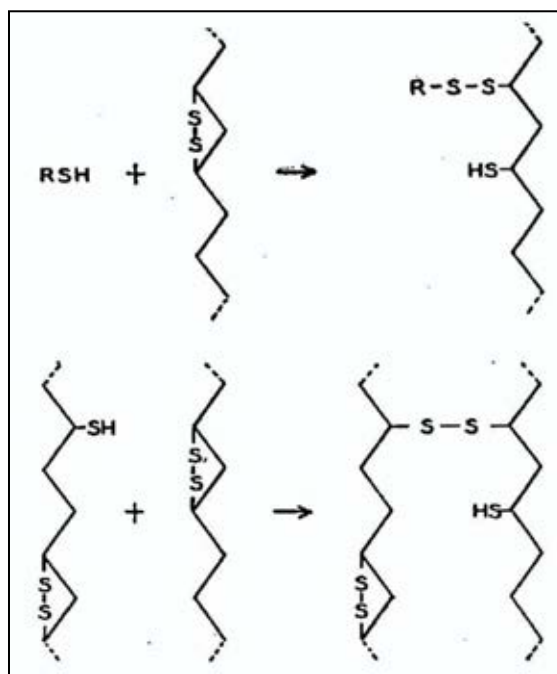
Gennadios และคณะ (1998) ศึกษาผลของการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยแปรปริมาณรังสีดูดกลืน (irradiation dosage) เป็น 6 ระดับ ได้แก่ 13.0, 25.9, 38.9, 51.8, 77.8 และ 103.7 J/m² พบว่าฟิล์มที่ผ่านการฉายรังสีมีค่า TS เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มควบคุม ในขณะที่ EB มีค่าลดลง ผู้วิจัยอธิบายว่าการเชื่อมข้ามของโปรตีนทำให้ฟิล์มมีโครงสร้างฟิล์มที่แข็งแรงมากขึ้น แต่มีความยืดหยุ่นลดลง

Lee, Lee และ Song (2005) ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาลงบนสารละลายฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดต่อสมบัติของฟิล์ม โดยแปรปริมาณรังสีดูดกลืนเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 4, 16, 32 และ 50 kGy จากการศึกษาแบบของแถบโปรตีนโดย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าการฉายรังสีแกมมาในปริมาณต่ำ (4 kGy) มีผลให้พอลิเพปไทด์มีการแตกออก (dissociation) เล็กน้อย ในขณะที่การฉายรังสีในปริมาณสูงกว่า 16 kGy ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน และส่งผลให้ TS ของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วน EB มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ปริมาณรังสีดูดกลืนเท่ากับ 50 kGy

สำหรับการบ่มด้วยความร้อน อาจทำได้โดยการบ่มสารละลายฟิล์มหรือบ่มแผ่นฟิล์ม โดย Park และคณะ (2002) เสนอว่าการบ่มโปรตีนด้วยความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ซิสเทอีน สามารถช่วยส่งเสริมให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้ โดยก่อนหน้านี้ Jensen (1959) เสนอว่าการให้ความร้อนแก่โปรตีนในภาวะที่เป็นด่างช่วยส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยา thiol-disulfide exchange (รูปที่ 2.1) ซึ่งสามารถเพิ่มการเชื่อมข้ามของโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์

Perez-Gago และ Krochta (2001) ศึกษาผลของการบ่มสารละลายฟิล์มด้วยความร้อนต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มเวย์โปรตีน แปรอุณหภูมิการบ่มสารละลายเวย์โปรตีนสกัด (whey protein isolate) เป็น 4 ระดับ ได้แก่ 70, 80, 90 และ 100 °C และแปรระยะเวลาการบ่มเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มสารละลายฟิล์มเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่ได้มีค่า TS, EB และยังมี modulus เพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่นฟิล์มที่ผลิตโดยบ่มสารละลายฟิล์มที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที มีค่า TS, EB และยังมี modulus เท่ากับ 3.4 MPa, 7%

และ 156 MPa ตามลำดับ ในขณะที่ฟิล์มที่ผลิตโดยบ่มสารละลายฟิล์มที่ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที มีค่าดังกล่าวเท่ากับ 8 MPa, 14% และ 342 MPa ตามลำดับ ผู้วิจัยอธิบายว่าสาเหตุที่ฟิล์มที่ผลิตโดยการบ่มสารละลายฟิล์มด้วยความร้อนในระดับต่ำมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นต่ำกว่าว่าเป็นผลเนื่องมาจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนเป็นอันตรกิริยาชนิดที่มีพลังงานพันธะต่ำ เช่น พันธะไฮโดรเจน ในขณะที่การบ่มสารละลายฟิล์มด้วยความร้อนในระดับที่สูงกว่าสามารถส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์และมีค่าพลังงานพันธะที่สูง ฟิล์มที่ได้จึงมีความแข็งแรงเชิงกลที่สูงกว่า



รูปที่ 2.1 ปฏิกริยา thiol-disulfide exchange ในโปรตีน (ที่มา: Jensen, 1959)

Hernández-Muñoz, Villalobos และ Chiralt (2004a) ศึกษาผลของบ่มแผ่นฟิล์มไกลอะดินและกลูเตนินด้วยความร้อน โดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 6 ระดับ ได้แก่ 40, 55, 70, 85, 95 และ 115 °C ระยะเวลาการบ่มเท่ากับ 24 ชั่วโมง และรายงานว่าการบ่มแผ่นฟิล์มด้วยความร้อนทำให้ TS ของฟิล์มไกลอะดินและกลูเตนินเพิ่มสูงขึ้น ในกรณีของฟิล์มไกลอะดินพบว่า TS มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 55-85 °C ส่วนฟิล์มกลูเตนินพบว่า TS มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 40-70 °C สำหรับฟิล์มโปรตีนทั้งสองชนิดพบว่า EB มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยเสนอว่าการเปลี่ยนแปลงสมบัติของฟิล์มที่เกิดขึ้นนี้เป็น

ผลมาจากการเกิดพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมข้ามในโครงสร้างของฟิล์มโปรตีนอันเนื่องมาจากความร้อน ซึ่งมีผลให้สายพอลิเมอร์เคลื่อนไหวได้ยากขึ้น ฟิล์มที่ได้จึงมีความแข็งแรงมากขึ้น ในขณะที่ความยืดหยุ่นมีค่าลดลง

2.4.3 วิธีทางชีวเคมี (การใช้เอนไซม์)

การใช้เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลโปรตีนเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน เอนไซม์ที่มีการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน ได้แก่ เพอร์ออกซิเดส และแทรนส์กลูตามิเนส

เพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) เร่งปฏิกิริยาที่เกิดกับโปรตีนในขณะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของหน่วยย่อยไทโรซีนของสายเพปไทด์ เกิดการรวมตัวกัน (condensation) ของวงอะโรมาติก ได้เป็นไคเมอร์ ไตรเมอร์ หรือเตตระเมอร์ ขึ้นอยู่กับความยาวของสายเพปไทด์และตำแหน่งของไทโรซีนในลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) (Michon และคณะ, 1997)

Stuchell และ Krochta (1994) ศึกษาการใช้เพอร์ออกซิเดสจากฮอร์สเรดิชเพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยเติมเพอร์ออกซิเดสในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1000 และเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 20 mM เพื่อเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ พบว่าการเติมเพอร์ออกซิเดสทำให้ฟิล์มที่ได้มีค่า Young's modulus เพิ่มขึ้น ในขณะที่ TS และ EB มีค่าลดลง ซึ่งผู้วิจัยอธิบายว่าแม้เพอร์ออกซิเดสจะช่วยเร่งการเชื่อมข้ามของโปรตีน แต่ก็มีผลทำให้เกิดการแตกสลาย (degradation) ของโปรตีนด้วย

แทรนส์กลูตามิเนส (EC 2.3.2.13) เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิลของแกมมา-คาร์บอกซีเอมิโดของหน่วยย่อยกลูตามีนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เอซิล (acyl donor) ไปยังหมู่อะมิโนปฐมภูมิหรือเอพิซิลอน-อะมิโนของหน่วยย่อยไลซีนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล (acyl donor) เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์เชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยทั้งสอง (Ha และ Luchi, 2003)

Tang และ Jiang (2007) ศึกษาผลของแทรนส์กลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนต่างๆ ได้แก่ โปรตีนถั่วเหลืองสกัด โซเดียมเคซีนต เวย์โปรตีนเข้มข้น (whey protein concentrate) เจลาติน กลูเต็น และโปรตีนถั่วลิสงสกัด (peanut protein isolate) โดยเติมแทรนส์กลูตามิเนสเข้มข้น 8 หน่วย/g โปรตีน พบว่าการเติมแทรนส์กลูตามิเนสทำให้ TS ของฟิล์ม

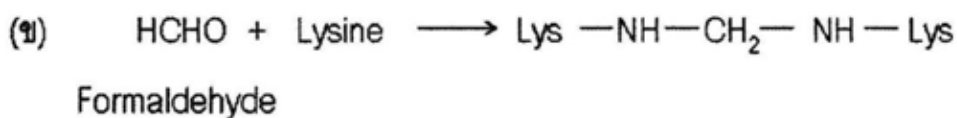
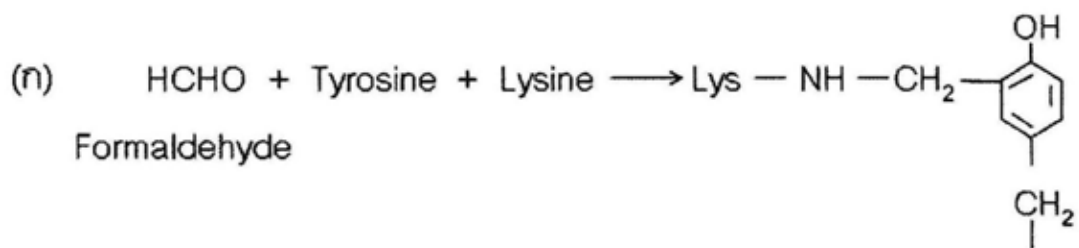
โปรตีนทุกชนิด (ยกเว้นฟิล์มเวย์โปรตีนเข้มข้น) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเพิ่มขึ้นในช่วง 13-33% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างฟิล์มโปรตีนชนิดเดียวกันที่ไม่เติมเอนไซม์ จากการศึกษาแบบของแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีความเข้มลดลงในตัวอย่างฟิล์มที่เติมเอนไซม์ ซึ่งเป็นผลจากการเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยการทำงานของแทรนส์กลูตามิเนสเกิดเป็นโครงสร้างที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น สำหรับ EB พบว่าการเติมแทรนส์กลูตามิเนสทำให้ EB เพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่างยกเว้นฟิล์มกลูเต็น ซึ่งผู้วิจัยให้เหตุผลว่าอาจเนื่องมาจากโครงสร้างตามธรรมชาติที่ต่างกันของโปรตีนแต่ละชนิด

2.4.4 วิธีทางเคมี

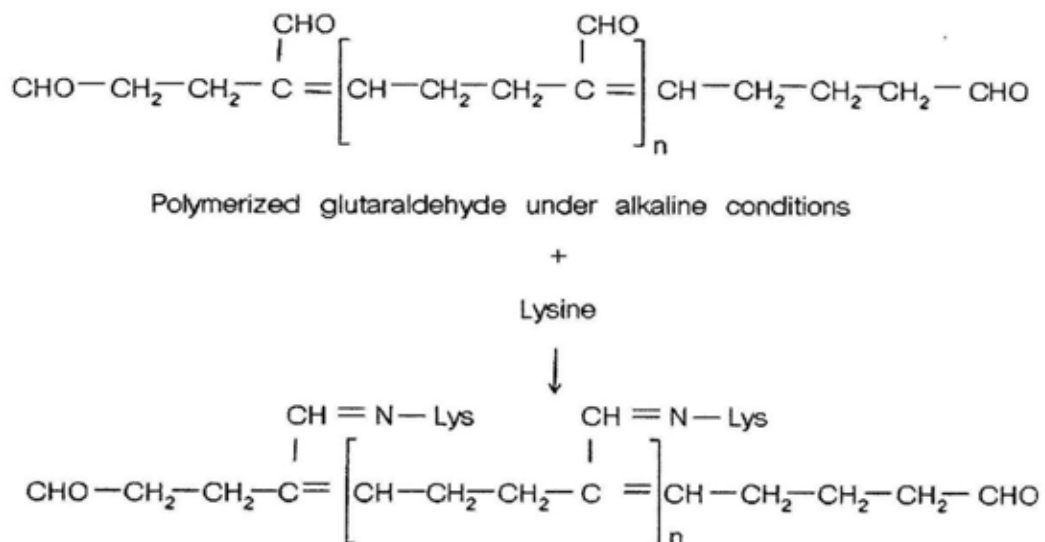
แต่เดิมสารเคมีที่นิยมนำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน ได้แก่ แอลดีไฮด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น ฟอรัมาลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล เนื่องจากแอลดีไฮด์สามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนปฐมภูมิเกิดเป็นอันตรกิริยาเชื่อมข้ามภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Marquié และคณะ, 1997)

Marquié (2001) ศึกษาการเชื่อมข้ามโปรตีนเมล็ดฝ้ายด้วยฟอรัมาลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล รายงานว่าหน่วยย่อยกรดอะมิโนที่มีบทบาทในกลไกการเชื่อมข้ามโปรตีนโดยฟอรัมาลดีไฮด์ ได้แก่ ไลซีนและไทโรซีน โดยฟอรัมาลดีไฮด์อาจเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนและไทโรซีน (รูปที่ 2.2ก) หรือระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วย (รูปที่ 2.2ข) ส่วนกลูทาราลดีไฮด์เชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วย (รูปที่ 2.3) เช่นเดียวกับกับไกลออกซัลที่เชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วย (รูปที่ 2.4ก) ทั้งนี้แม้ว่าไกลออกซัลจะสามารถเกิดปฏิกิริยากับหน่วยย่อยอาร์จินีนได้ แต่ไม่ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างเป็นแบบวง (cyclized product) (รูปที่ 2.4ข)

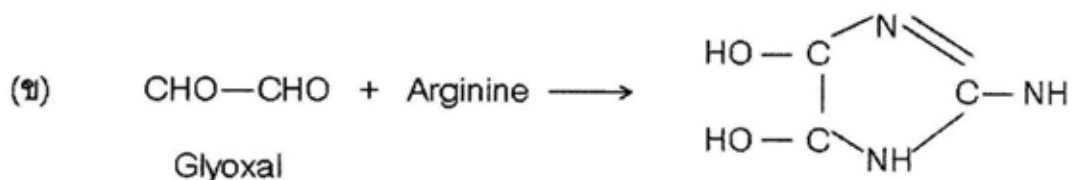
Hernández-Muñoz, Villalobos และ Chiralt (2004b) ศึกษาผลของการใช้แอลดีไฮด์ต่อสมบัติของฟิล์มกลูเตนิน แอลดีไฮด์ที่ศึกษา ได้แก่ ฟอรัมาลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล แปรความเข้มข้นของแอลดีไฮด์เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 4 และ 8% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มี TS สูงขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมแอลดีไฮด์ โดยฟิล์มที่เติมฟอรัมาลดีไฮด์มี TS สูงสุด รองลงมาได้แก่ฟิล์มที่เติมกลูทาราลดีไฮด์และฟิล์มที่เติมไกลออกซัล ส่วน EB ของฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมแอลดีไฮด์



รูปที่ 2.2 (ก) การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนและไทโรซีนโดยฟอร์มัลดีไฮด์ และ (ข) การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วยโดยฟอร์มัลดีไฮด์ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Marquié, 2001)



รูปที่ 2.3 การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วยโดยกลูทาราลดีไฮด์ (ที่มา: ดัดแปลงจาก Marquié, 2001; Migneault และคณะ, 2004)



รูปที่ 2.4 (ก) การเชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยไลซีนสองหน่วยโดยไกลออกซัล ในขณะที่ (ข) ไกลออกซัลสามารถเกิดปฏิกิริยากับหน่วยย่อยอาร์จินีน แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างเป็นแบบวง จึงไม่ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน (ที่มา: ดัดแปลงจาก Marquié, 2001)

Carvalho และ Grosso (2004) ศึกษาผลของการเติมฟอร์มัลดีไฮด์ (8.8 mmol/สารละลายฟิล์ม 100 ml) และไกลออกซัล (26.5 mmol/สารละลายฟิล์ม 100 ml) ต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มเจลาติน พบว่าการเติมฟอร์มัลดีไฮด์ช่วยปรับปรุง TS ของฟิล์มเจลาติน ในขณะที่การเติมไกลออกซัลไม่มีผลต่อ TS ของฟิล์ม โดยฟิล์มที่เติมฟอร์มัลดีไฮด์ ไกลออกซัล และฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมแอลดีไฮด์มี TS เท่ากับ 23.10, 14.97 และ 15.12 MPa ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานว่าการเติมฟอร์มัลดีไฮด์และไกลออกซัลไม่มีผลต่อ EB ของฟิล์มเจลาตินอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

แม้ว่าแอลดีไฮด์จะมีประสิทธิภาพสูงในการเชื่อมข้ามโปรตีนและมีผลปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน อย่างไรก็ตามมีรายงานที่เกี่ยวกับความเป็นพิษและผลเสียต่อสุขภาพของแอลดีไฮด์ เช่น การมีบทบาทในการเป็นแฮพเทน (hapten)¹ ความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคมะเร็ง ความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคตับ ความเป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (teratogenicity) ความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคเบาหวานและภาวะความดันโลหิตสูง ความเสี่ยง

¹ แฮพเทนคือสารที่ตัวมันเองไม่สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองแบบจำเพาะแต่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีและสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นจึงอาจมีความเกี่ยวข้องกับโรคภูมิไวเกิน (allergic hypersensitivity diseases) ภาวะภูมิแพ้ของระบบทางเดินหายใจ (respiratory allergy) และภาวะการแพ้ยาชนิดอิดิโอซิงครติก (idiosyncratic drug reaction)

ในการก่อให้เกิดโรคความเสื่อมทางระบบประสาท (neurodegenerative diseases) และโรคที่สัมพันธ์กับความชรา (aging-associated diseases) (O'Brien, Siraki และ Shangari, 2005) นักวิจัยจึงหันมาให้ความสนใจในการใช้สารเคมีอื่นที่มีความปลอดภัยมากกว่า (Cao และ คณะ, 2007)

สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดพบได้ตามธรรมชาติ โดยเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิในพืช (plant secondary metabolite) (Van Sumere, 1989) สำหรับบทบาทในพืช สารประกอบฟีนอลิกมีหน้าที่ในกระบวนการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ การป้องกันต้นพืชจากสัตว์กินพืช (antifeedant) และการป้องกันโรค (antipathogen) นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกบางกลุ่มยังมีบทบาทในด้านสีของพืช รวมทั้งมีบทบาทในการจำแนกชนิดพืชของสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตแบบซิมไบโอซิสกับพืชนั้นๆ (Shahidi และ Naczka, 1995) ส่วนสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสัตว์เป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่มาจากพืช (Shahidi และ Naczka, 1995) สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างทางเคมีที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติกซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีเป็นหมู่แทนที่ตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไป สารประกอบฟีนอลิกส่วนใหญ่ที่พบในพืชอยู่ในกลุ่มกรดฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ ลิกแนน สทิลบิน คูมาริน และแทนนิน (Shahidi และ Naczka, 1995)

สารประกอบฟีนอลิกรวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนได้ Loomis และ Battaile (1966) เสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนได้ 2 รูปแบบ คือ สารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนโดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นชนิดผันกลับได้ (reversible complex formation) หรืออีกกลไกหนึ่งคือสารประกอบฟีนอลิกเมื่อถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนนสามารถจับกับโปรตีนโดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นชนิดผันกลับไม่ได้ (irreversible complex formation) ในเวลาต่อมา Asano, Shinagawa และ Hashimoto (1982) ศึกษาการเกิดตะกอนความขุ่น (haze) ในเบียร์และรายงานว่าอันตรกิริยาที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก อย่างไรก็ตาม Siebert, Troukhanova และ Lynn (1996) รายงานว่าพันธะไฮโดรเจนไม่ได้มีบทบาทสำคัญมากเท่ากับอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีน ในแง่ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก Rutkowski และคณะ (1977) เสนอว่าผลิตภัณฑ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้งแบบอาศัยเอนไซม์และแบบไม่อาศัยเอนไซม์สามารถเกิดอันตรกิริยา

ได้ดีกับหมู่เอพซัลลอน-อะมิโนของไลซีนและหมู่เมทิลไฮโอ ($\text{CH}_3\text{-S-}$) ของเมไทโอนีน การเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารประกอบฟีนอลิกและโปรตีนหรือเอนไซม์อาจไม่เป็นที่ต้องการในเชิงโภชนาการเนื่องจากทำให้ร่างกายนำโปรตีนไปใช้งานไม่ได้หรือมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Shahidi และ Naczki, 1995) อย่างไรก็ตามบทบาทของสารประกอบฟีนอลิกในการเป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีน (protein cross-linker) อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงความแข็งแรงของโครงสร้างโปรตีน เช่น ฟิล์มหรือเจลโปรตีนได้ (Strauss และ Gibson, 2004)

Rawel และคณะ (2002) ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างกรดฟีนอลิก (กรดคลอโรเจนิก กรดแคเฟอิก และกรดแกลลิก) ฟลาโวน และฟลาโวนอยด์ (เอพิจเนน เคมเฟอรอล ควอเซทิน และไมริเซทิน) กับไกลซินินและสารยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) ในถั่วเหลือง ติดตามการเกิดอันตรกิริยาโดยวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ปริมาณไลซีน ปริมาณทริปโตเฟน และปริมาณหมู่ไฮดรอกซิล พบว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดสามารถเกิดอันตรกิริยากับหมู่ต่างๆ ของโปรตีนได้แตกต่างกันไป แต่โดยรวมแล้วพบว่าเคมเฟอรอล ควอเซทิน และไมริเซทินสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนถั่วเหลืองได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตามในแง่บทบาทของสารประกอบฟีนอลิกในการทำหน้าที่เป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีนถั่วเหลือง พบว่ากรดแคเฟอิกและควอเซทินทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนถั่วเหลืองได้สูงสุด นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีสถานะออกซิเดชันต่างกัน อาจมีความสามารถในการเชื่อมข้ามโปรตีนที่ต่างกัน โดยความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกหนึ่งๆ ที่จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถของสารนั้นในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน

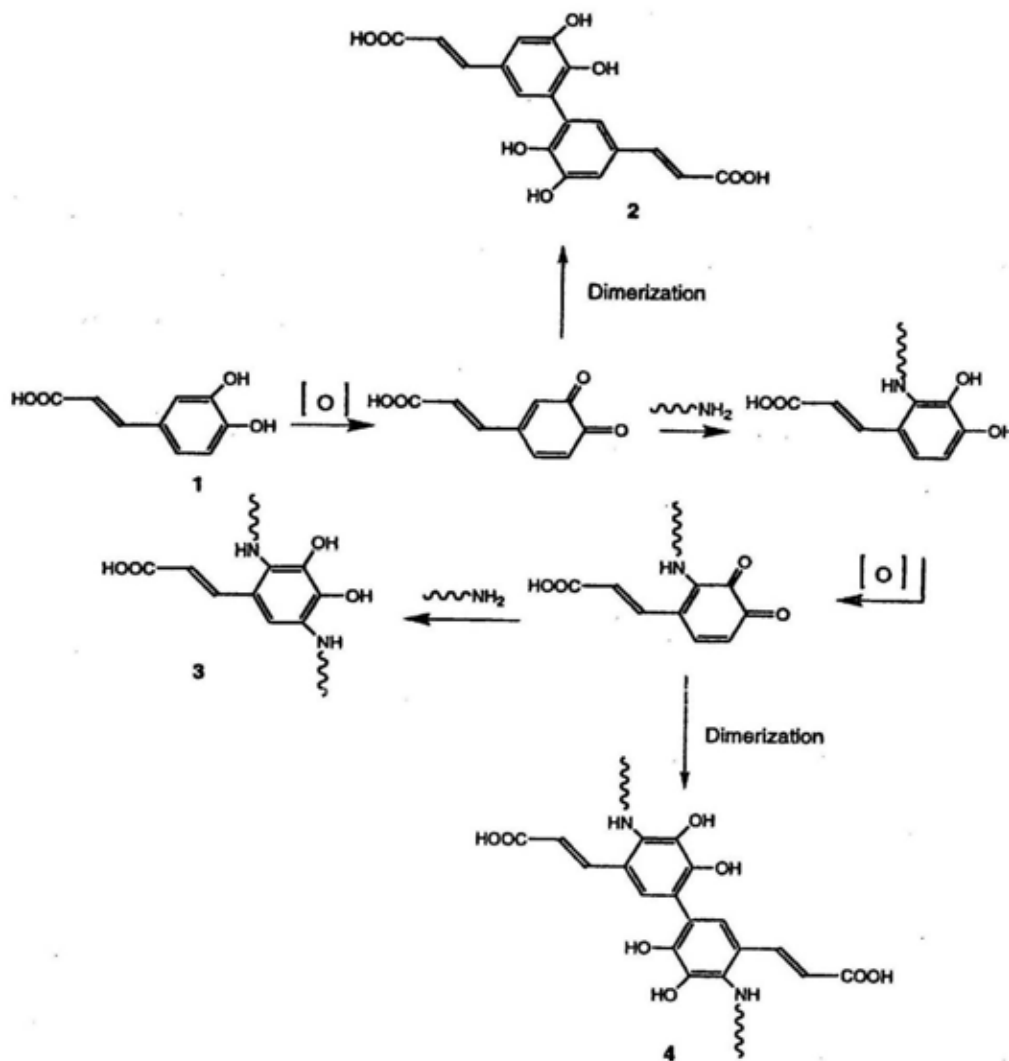
Strauss และ Gibson (2004) ศึกษาการใช้สารประกอบฟีนอลิกทั้งที่เป็นสารบริสุทธิ์ (รูทีน กรดแคเฟอิก และกรดเฟรูลิก) และสารสกัดฟีนอลิกจากพืช (น้ำกาแฟและน้ำองุ่น) ในการเชื่อมข้ามในระบบเจลของเจลาตินและโคอะเซอร์เวตของเจลาตินและเพกติน พบว่าเจลาตินที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีความแข็งเกร็ง (rigidity) และความแน่นของโครงร่างตาข่ายของโมเลกุลพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ในขณะที่มีอัตราส่วนการพองตัว (swelling ratio) และปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลง ในขณะที่โคอะเซอร์เวตของเจลาตินและเพกตินที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติความไม่ชอบน้ำและความเสถียรต่อความร้อนเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยได้แนะนำว่าสารสกัดจากพืช เช่น น้ำกาแฟและน้ำองุ่น มีสารประกอบฟีนอลิกในความเข้มข้นที่สูงพอจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องนำมาแยกสารให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ผู้วิจัยได้อธิบายกลไกการเชื่อมข้ามโปรตีนโดยสารประกอบฟีนอลิกดังรูปที่ 2.5 โดยสารประกอบฟีนอลิก (หมายเลข 1

ในรูปที่ 2.5) สามารถถูกออกซิไดส์ไปเป็นออร์โธ-ควิโนน ซึ่งปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้อาจเกิดจาก เอนไซม์ในเนื้อเยื่อของพืชหรือโดยโมเลกุลออกซิเจน ออร์โธ-ควิโนนที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดปฏิกิริยา ไดเมอไรเซชันได้เป็นไดเมอร์ (หมายเลข 2 ในรูปที่ 2.5) ซึ่งทำให้เกิดการรวมตัวกันของ สารประกอบฟีนอลิกแต่ไม่เกิดการเชื่อมข้ามโปรตีนขึ้น หรือในอีกทางหนึ่งออร์โธ-ควิโนนอาจทำ ปฏิกิริยากับโซ่ข้าง (side chain) ที่เป็นหมู่อะมิโนหรือซัลไฟไฮดริลของพอลิเพปไทด์ เกิดเป็นพันธะ โควาเลนต์ชนิด C-N หรือ C-S กับวงฟีนอลิก ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้สามารถถูกออกซิไดส์ต่อไปและทำ ปฏิกิริยากับโซ่ข้างของพอลิเพปไทด์อีกสายหนึ่งทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายพอลิเพปไทด์ (หมายเลข 3 ในรูปที่ 2.5) อีกกลไกหนึ่งนี้อาจเกิดขึ้นคือควิโนนที่จับอยู่กับพอลิเพปไทด์สายหนึ่ง แล้วอาจเกิดไดเมอไรเซชันและทำให้เกิดการเชื่อมข้ามพอลิเพปไทด์สองสายเข้าด้วยกัน (หมายเลข 4 ในรูปที่ 2.5)

Ou และคณะ (2005) ศึกษาผลของการเติมกรดเพอรูลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีน ถั่วเหลืองสกัด โดยแปรความเข้มข้นของกรดเพอรูลิกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 50, 100, 150 และ 200 mg/สารละลายฟิล์ม 100 g พบว่าความเข้มข้นของกรดเพอรูลิกเท่ากับ 100 mg/สารละลายฟิล์ม 100 g เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งทำให้ฟิล์มมี TS และ EB สูง ในขณะที่ WVP มีค่าต่ำ

Nuthong, Benjakul และ Prodpan (2009) ศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติ ของฟิล์มพลาสมาโปรตีนจากสุกร (porcine plasma protein) กรดฟีนอลิกที่ศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพอรูลิก แปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 2 และ 3% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าเมื่อเติมกรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพอรูลิก เข้มข้น 3% โดยน้ำหนักของโปรตีน ฟิล์มที่ได้มี TS เพิ่มขึ้น 123.3, 194.3 และ 19.5% ตามลำดับ และ EB เพิ่มขึ้น 71.1, 86.3 และ 10.2% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมกรด ฟีนอลิก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาผลของการฟั่นออกซิเจน (oxygenation) ลงในสารละลายฟิล์มที่ เติมกรดแคฟเฟอิก 3% โดยน้ำหนักของโปรตีน โดยแปรระดับการฟั่นออกซิเจนเป็น 2 ระดับ คือ ไม่ ฟั่นออกซิเจนและฟั่นออกซิเจนลงในสารละลายฟิล์มเป็นเวลา 30 นาที พบว่าฟิล์มที่ผลิตโดยฟั่น ออกซิเจนลงในสารละลายฟิล์มมี TS เพิ่มขึ้น ในขณะที่ EB มีค่าลดลง ตัวอย่างเช่นสารละลาย ฟิล์มที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 10 ซึ่งไม่ฟั่นและฟั่นออกซิเจนมี TS เท่ากับ 3.52 และ 3.71 MPa ตามลำดับ และมี EB เท่ากับ 126.39 และ 93.27% ตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยอธิบายว่าภาวะที่ เป็นต่างทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการคลายตัว (unfolding) และมีหมู่หน้าที่ที่สามารถเกิดการเชื่อม

ข้ามปรากฏออกมามากขึ้น ในขณะที่การฟ่นออกซิเจนส่งผลให้กรดแคฟเฟอิกบางส่วนถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนนซึ่งเป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีนที่มีประสิทธิภาพ



รูปที่ 2.5 ปฏิกิริยาของกรดฟีนอลิกกับไซซังที่เป็นหมู่อะมิโนของพอลิเพปไทด์ (ที่มา: Strauss และ Gibson, 2004)

นอกจากในระบบของฟิล์มแล้ว ยังมีการนำสารประกอบฟีนอลิกมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของระบบอื่นที่เกี่ยวข้องกับระดับการเชื่อมข้ามของโปรตีน ตัวอย่างเช่น Balange และ Benjakul (2009) ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์ (oxidized phenolic compound) ต่อสมบัติของเจลซูริมิปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) สารประกอบฟีนอลิกที่ใช้ในการศึกษามี 4 ชนิด ได้แก่ กรดเฟรูลิก กรดแทนนิก คาเทชิน และกรดแคฟเฟอิก สำหรับ

สารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์เตรียมโดยเตรียมสารละลายของสารประกอบฟีนอลิกเข้มข้น 1% แล้วนำไปฟั่นออกซิเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 40 °C ในการศึกษาี้แปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์ที่เติมลงในซูริมิเป็น 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมกรดเพอริกที่ถูกออกซิไดส์เข้มข้น 0.20% กรดแทนนิกที่ถูกออกซิไดส์เข้มข้น 0.05% กรดแคฟเฟอิกที่ถูกออกซิไดส์เข้มข้น 0.15% หรือคาเทชินที่ถูกออกซิไดส์เข้มข้น 0.05% มีผลให้ค่าแรงเจาะทะลุ (breaking force) และระยะทางก่อนเจาะทะลุ (deformation) ของเจลซูริมิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเจลซูริมิที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์

Yan และคณะ (2011) ศึกษาผลของการเติมกรดแกลลิกและรูทีนต่อสมบัติของเจลเจลาตินจากหนังปลาวอลลายพอลล็อก (*Theragra chalcogramma*) โดยแปรความเข้มข้นของกรดแกลลิกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 10, 20, 30 และ 40 mg/g เจลาติน และแปรความเข้มข้นของรูทีนเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 2, 4, 6 และ 8 mg/g เจลาติน พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดแกลลิกเพิ่มขึ้นความแข็งแรงของเจล (gel strength) มีค่าเพิ่มสูงขึ้นจนถึงความเข้มข้นของกรดแกลลิกเท่ากับ 20 mg/g เจลาติน แต่ที่ความเข้มข้นของกรดแกลลิกสูงกว่า 20 mg/g เจลาติน ความแข็งแรงของเจลมีค่าลดต่ำลง สำหรับรูทีนพบว่าความแข็งแรงของเจลมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของรูทีนเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของรูทีนเท่ากับ 8 mg/g เจลาติน เจลที่ได้มีค่าความแข็งแรงสูงสุด

2.5 ไบหม่อน

จากข้อมูลการปลูกหม่อน (*Morus alba* L.) ปี พ. ศ. 2551/2552 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกหม่อน 106,106 ไร่ (กรมหม่อนไหม, 2554) การปลูกหม่อนในไทยมีวัตถุประสงค์เพื่อการเลี้ยงหนอนไหมเป็นหลัก การนำส่วนของต้นหม่อนมาบริโภคในแง่การเป็นอาหารมนุษย์ยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด อย่างไรก็ตามในวัฒนธรรมอื่นๆ ได้มีการนำผลและใบหม่อนมาใช้ในเชิงอาหารและเภสัช ซึ่งมีรายงานว่าผลและใบหม่อนประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิกชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและต้านการก่อมะเร็ง

Katsube และคณะ (2009) วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบหม่อนที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยให้เอทานอลเข้มข้น 60% เป็นตัวสกัด พบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่พบในปริมาณสูงในตัวอย่างใบหม่อน ได้แก่ กรดคลอโรเจนิก (988 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง)

เควอเซทิน 3-(6-มาโลนิลกลูโคไซด์) (538 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง) รูทีน (331 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง) เคมเฟอรอล 3-(6-มาโลนิลกลูโคไซด์) (192 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง) ไอโซเควอเซทิน (90 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง) และแอสทรากาลิน (43 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานว่ไบหม่อนที่อบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C มีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกใกล้เคียงกับไบหม่อนที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

Wanyo และคณะ (2009) รายงานว่สารประกอบฟีนอลิกหลักในชาไบหม่อน ได้แก่ กรดพารา-คูมาริก นอกจากนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลิกอื่นๆ ได้แก่ กรดเบนโซอิก คาเทชิน กรดคลอโรเจนิก กรดวานิลลิก กรดไซรินจิก กรดซินาปิก กรดโพรโตคาเทชูลิก กรดเฟรูลิก กรดแกลลิก และกรดแคฟเฟอิก

Naowaratwattana และคณะ (2010) รายงานว่รูทีน ไอโซเควอเซทิน อนุพันธ์ชนิดต่างๆ ของเคมเฟอรอล และเควอเซทินไกลโคไซด์ เป็นสารหลักที่ได้จากการสกัดไบหม่อนด้วยเมทานอลหรือบิวทานอล ส่วนการสกัดไบหม่อนด้วยน้ำร้อนได้กรดคลอโรเจนิกและอนุพันธ์ของกรดแคฟฟีโอลลิคควินิกเป็นสารประกอบฟีนอลิกหลัก

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุดิบและสารเคมี

โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (บริษัท ไมท์ดี อินเทอร์เน็ตเนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ) (ภาคผนวก ก.1)

ไบหม่อนสด (ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ, น่าน)

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

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

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

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

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

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

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

Glycerol (Ajax Finechem, New South Wales, Australia)

Glycine, AR grade (USB Corporation, Cleveland, OH)

2-mercaptoethanol, AR grade (Loba Chemie, Mumbai, India)

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

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

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

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

3.2 อุปกรณ์

Color meter system, Chroma meter CR-400 series (Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan)

Contact angle measuring instrument, model OCA15EC (DataPhysics Instruments, Filderstadt, Germany)

Food blender, model EM-11 (Thai City Electric, Bangkok, Thailand)

Freeze dryer, model SuperModulyo-230 (Thermo Scientific, Asheville, NC)

Gel electrophoresis system, model miniVE (Hofer, Holliston, MA)

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

Laboratory hot air oven, model 600 (Mettler, Schwabach, Germany)

Laboratory hot air oven, Beschickung-Loading, model 300 (Mettler, Schwabach, Germany)

Laboratory shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ)

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

Shaking water bath, model SW23 (JulaboLabortechnik, Seelbach, Germany)

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

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

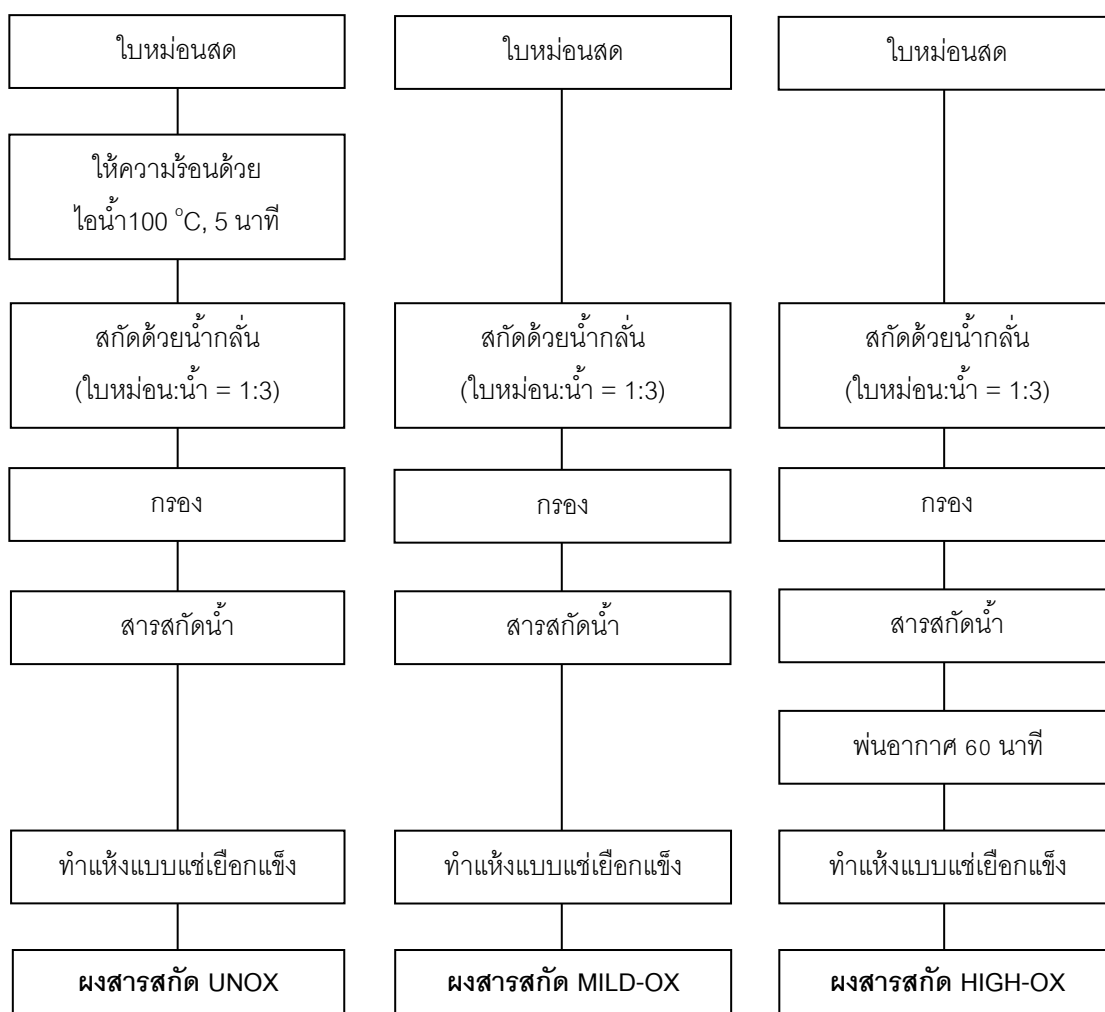
UV/Vis spectrophotometer, model V-530 (Jasco, Easton, MD)

3.3 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมสารสกัดจากใบหม่อนที่ออกซิไดส์ที่ระดับแตกต่างกัน

วัตถุดิบใบหม่อนสดได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จังหวัดน่าน เมื่อเก็บจากต้นแล้วบรรจุลงกล่องกระดาษลูกฟูกและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการภายในวันที่เก็บเพื่อนำมาเตรียมสารสกัด

เตรียมสารสกัดจากใบหม่อนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Naczki และคณะ (2011) โดยในงานวิจัยนี้ได้แปรระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อนเป็น 3 ระดับ ได้แก่ สารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ (unoxidized extract, UNOX) สารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับต่ำ (mildly-oxidized extract, MILD-OX) และสารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับสูง (highly-oxidized extract, HIGH-OX) ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากไบหม่อนที่ออกซิไดส์ที่ระดับแตกต่างกัน

สำหรับสารสกัด UNOX เตรียมจากไบหม่อนสดที่นำไปให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไบหม่อนที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วมาสกัดโดยใช้น้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ใช้อัตราส่วนของไบหม่อนต่อน้ำเท่ากับ 1:3 โดยน้ำหนัก บดผสมไบหม่อนกับน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องบดผสมอาหาร (Sharp, รุ่น EM-11, กรุงเทพมหานคร) เป็นเวลา 1 นาที นำสิ่งที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง และนำสารสกัดน้ำ (water extract) ที่ได้มาทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (รุ่น SuperModulyo-230, Thermo Scientific, Asheville, NC) บรรจุผงสารสกัดที่ได้แบบสุญญากาศพร้อมกับซองบรรจุสารดูดความชื้นและซองบรรจุสารดูดออกซิเจนลงในถุงอลูมิเนียมพอลิเอทิลีน ปิดผนึกด้วยความร้อน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เพื่อนำมาศึกษาต่อไป

สำหรับสารสกัด MILD-OX เตรียมจากใบหม่อนสดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน โดยใช้ขั้นตอนการสกัด การทำแห้ง การบรรจุ และการเก็บรักษาเช่นเดียวกับสารสกัด UNOX ตามที่กล่าวด้านบน

สำหรับสารสกัด HIGH-OX เตรียมจากใบหม่อนสด โดยใช้ขั้นตอนการสกัดเช่นเดียวกับสารสกัด MILD-OX ตามที่กล่าวด้านบน เมื่อได้สารสกัดน้ำจากใบหม่อนสดแล้ว นำสารสกัดน้ำที่ได้มาพ่นอากาศที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นจึงนำสารสกัดที่ได้ไปทำแห้ง บรรจุ และเก็บรักษาเช่นเดียวกับสารสกัด UNOX และ MILD-OX ตามที่กล่าวด้านบน

นำผงสารสกัดทั้ง 3 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic content) ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ตามวิธีของ Waterhouse (2005) โดยซึ่งตัวอย่างผงสารสกัด 0.25 g ละลายในน้ำกลั่น 50 ml นำสารละลายตัวอย่าง 100 μ l ผสมกับน้ำกลั่น 7 ml จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 8 นาที และเติมสารละลาย sodium carbonate ปริมาตร 1500 μ l ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 10 ml ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm ใช้กรดแกลลิกในการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน รายงานปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในรูป mg gallic acid equivalent/g โดยน้ำหนักแห้ง

3.3.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัดจากใบหม่อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

การศึกษาในขั้นตอนนี้แปรระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อนเป็น 3 ระดับ ได้แก่ UNOX, MILD-OX และ HIGH-OX และแปรความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 5 และ 10% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

เตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Jiang และคณะ (2007) เตรียมสารละลายฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก ปริมาณของวัตถุดิบที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดแสดงดังตารางที่ 3.1

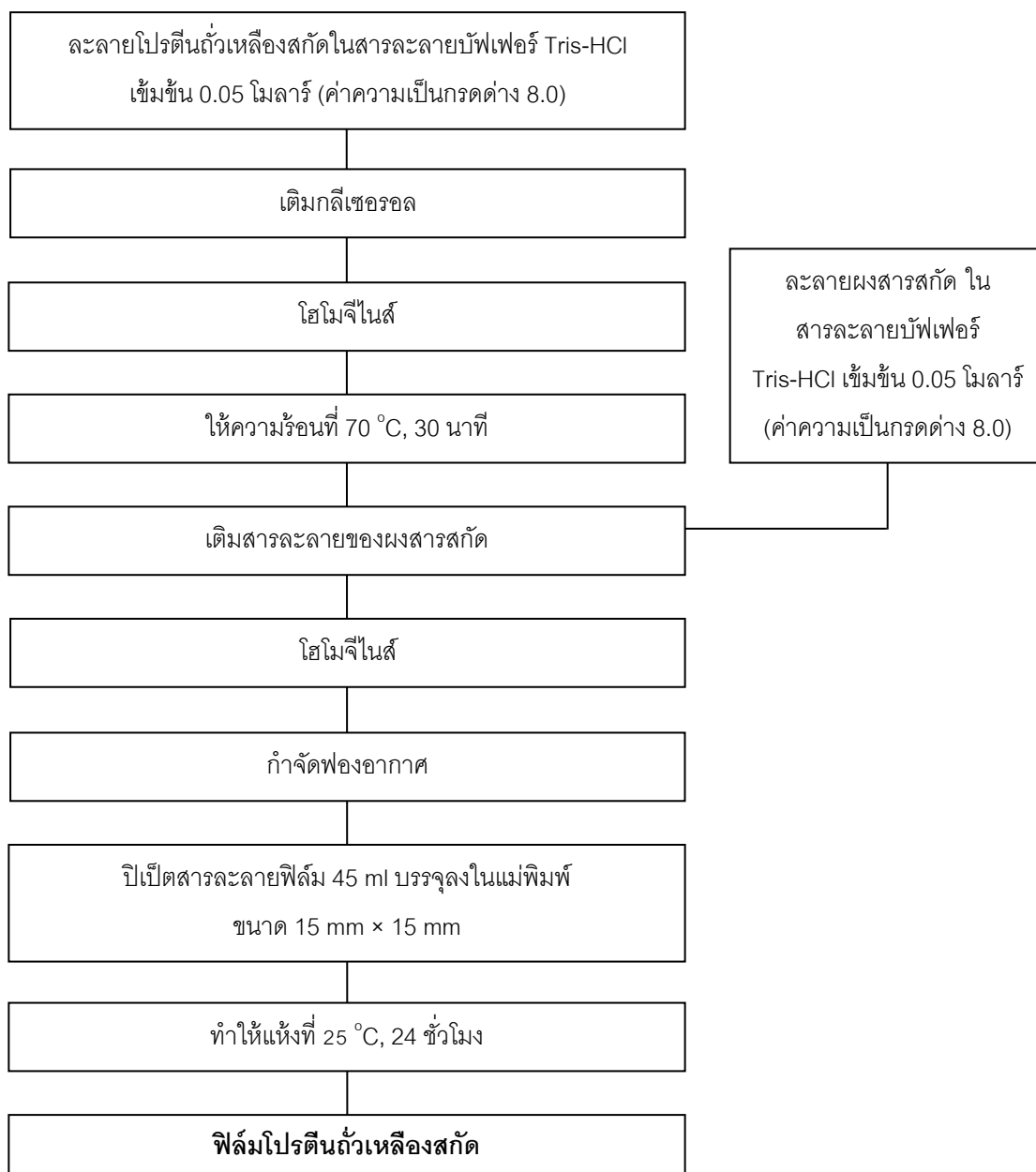
ตารางที่ 3.1 ปริมาณวัตถุดิบ (g) ที่ใช้ในการเตรียมสารละลายฟิล์ม 100 g

วัตถุดิบ	ความเข้มข้นของสารสกัดในตัวอย่าง ฟิล์ม (% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่ว เหลืองสกัด)			หมายเหตุ
	2	5	10	
<i>ส่วนของสารละลายโปรตีน</i>				
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด	5.0	5.0	5.0	
สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl*	80	80	80	ใช้เพื่อละลายโปรตีน ถั่วเหลืองสกัด
กลีเซอรอล	2.75	2.75	2.75	เท่ากับ 55% โดย น้ำหนักของโปรตีนถั่ว เหลืองสกัด
<i>ส่วนของสารละลายผงสารสกัด</i>				
ผงสารสกัด	0.10	0.25	0.50	
สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl*	12.15	12.00	11.75	ใช้เพื่อละลายผงสาร สกัด

*ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0

สำหรับการเตรียมตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (รูปที่ 3.2) ขั้นตอนแรกเตรียมสารละลายโปรตีนโดยนำโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0) ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เติมกลีเซอรอล นำสารละลายมาโฮโมจีไนส์โดยใช้ Ystral homogenizer (รุ่น X10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) แล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น SW23, JulaboLabortechnik, Seelbach, Germany) ที่ 70 °C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเตรียมสารละลายของผงสารสกัด โดยนำผงสารสกัดจากใบหม่อนที่เตรียมในข้อ 3.3.1 มาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0) ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) แล้วเติมลงในสารละลายโปรตีน นำสารละลายฟิล์มที่ได้มาโฮโมจีไนส์อีกครั้งด้วย Ystral homogenizer (รุ่น X10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) แล้วกำจัดฟองอากาศโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก (รุ่น 136H, Fisher Scientific, Schwerte, Germany)

สำหรับการขึ้นรูปฟิล์ม ปิเป็ตสารละลายฟิล์มปริมาตร 45 ml บรรจุลงในแม่พิมพ์ อะคริลิกรูปทรงสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 15 mm × 15 mm ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งบนพื้นระนาบที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลอกแผ่นฟิล์มออกและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิคงที่ 25 °C และความชื้นสัมพัทธ์คงที่ 50% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์สมบัติดังต่อไปนี้ เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

3.3.2.1 ความหนา

ตัดตัวอย่างฟิล์มเป็นรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 30 mm × 150 mm วัดความหนาของฟิล์มโดยใช้ไมโครมิเตอร์ (รุ่น 7301, Mitutoyo, Tokyo, Japan) วัดความหนาขึ้นละ 15 จุดนับเป็น 1 ซ้ำ

3.3.2.2 สมบัติเชิงกล

วิเคราะห์สมบัติเชิงกลด้านแรงดึง (tensile test) โดยใช้เครื่อง Instron® universal materials testing machine (รุ่น 5565, Instron, Norwood, MA) ซึ่งติดตั้งด้วย load cell ขนาด 5 kg ใช้หัววัด pneumatic side-action grips ซึ่งมีลักษณะเป็นส่วนยึดจับ 2 ชิ้นติดตั้งในตำแหน่งตรงกันแนวตั้ง ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 30 mm × 100 mm ติดตั้งลงบนส่วนยึดจับทั้งสองด้าน กำหนดระยะห่างของส่วนยึดจับเท่ากับ 50 mm ดึงตัวอย่างฟิล์มด้วยความเร็ว 5.0 mm/วินาทีจนกระทั่งขาดออกจากกัน ได้ผลการวัดในรูปของแรงที่ใช้ในการดึงขึ้นตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (หน่วยเป็น g force) และระยะทางที่สามารถดึงขึ้นตัวอย่างให้ยืดออกไปได้มากที่สุด ก่อนที่จะขาดออกจากกัน (หน่วยเป็น mm) คำนวณ TS และ EB โดยใช้สูตรที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ วัดตัวอย่างละ 6 ชิ้น นับเป็น 1 ซ้ำ

$$TS(MPa) = \frac{\text{แรงที่ใช้ในการดึงตัวอย่างให้ขาด (gforce)} \times 0.009807 \times 10^{-6}}{\text{ความกว้างของตัวอย่าง (m)} \times \text{ความหนาของตัวอย่าง (m)}} \quad (3.1)$$

$$EB(\%) = \frac{\text{ระยะการยืดของตัวอย่าง (mm)}}{\text{ความยาวเดิมของตัวอย่าง (mm)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.2.3 รูปแบบของแถบโปรตีน (protein pattern) ของตัวอย่างฟิล์ม

วิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนโดยใช้วิธี SDS-PAGE ศึกษาในตัวอย่างฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดและตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด

การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนโดยดัดแปลงจากวิธีของ Tang และ Jiang (2007) ตัดชิ้นตัวอย่างฟิล์มให้ละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่าง

ฟิล์ม 0.3 g ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์² ปริมาตร 4 ml ซึ่งบรรจุอยู่ใน Eppendorf tube ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปเหวี่ยงแยกที่ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนดังรายละเอียดด้านบน หากแต่สารละลายบัฟเฟอร์³ ที่ใช้ไม่มีส่วนประกอบของ bromophenol blue

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี modified Lowry โดยดัดแปลงจากวิธีของ Peterson (1983) ในขั้นแรกเตรียมกราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานซีรัมอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin, BSA) ซึ่ง BSA ปริมาตร 10 mg ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ปิดสารละลาย BSA ปริมาตรต่างๆ ผสมกับน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ml โดยให้ความเข้มข้นของ BSA อยู่ในช่วง 5-100 µg/ml เติมสารละลาย sodium deoxycholate เข้มข้น 0.15% ปริมาตร 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย trichloroacetic acid เข้มข้น 72% ปริมาตร 0.1 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยงแยกที่ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที กำจัดส่วนใส นำส่วนตะกอนที่ได้มาเติม Reagent A⁴ ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่

² สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์, SDS เข้มข้น 10%, 2-mercaptoethanol เข้มข้น 3.1%, glycerol เข้มข้น 20% และ bromophenol blue เข้มข้น 1%

³ สารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์, SDS เข้มข้น 10%, 2-mercaptoethanol เข้มข้น 3.1% และ glycerol เข้มข้น 20%

⁴ Reagent A ประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วนผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยสารละลายส่วนแรกประกอบด้วย sodium deoxycholate เข้มข้น 0.8 นอร์มัล และ SDS เข้มข้น 10% และสารละลายส่วนที่สองคือสารละลาย copper tartrate carbonate (CTC) ซึ่งประกอบด้วย copper sulfate เข้มข้น 0.1%, potassium tartrate เข้มข้น 0.2% และ sodium carbonate เข้มข้น 10%

อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Reagent B⁵ ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 30 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบลคกิ้ง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มใช้วิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน แต่ใช้สารละลายตัวอย่างแทนสารละลาย BSA และใช้น้ำกลั่นเป็นแบลคกิ้ง คำนวณปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิล์ม

การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีน

ตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE โดยดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) ในขั้นแรกเตรียมเจลโดยล้างแผ่นกระจกสำหรับหล่อเจลด้วยน้ำสะอาด จากนั้นชะอีกครั้งด้วยน้ำปราศจากอิออน (deionized water) แล้วเช็ดด้วยเอทานอล วางแผ่นกระจกที่มีรอยเว้าเข้าด้านในของตัวเครื่อง Hoefer gel electrophoresis system (รุ่น miniVE, Hoefer, Holliston, MA) วางแผ่นพลาสติก (spacer) ที่มีความหนา 1 mm คั่นไว้ที่ขอบทั้งสองด้าน ประกบแผ่นกระจกอีกแผ่นเข้าหากัน จากนั้นประกอบแผ่นกระจกเข้ากับตัวเครื่อง ปิดเปิดสารละลาย separating gel เข้มข้น 10%⁶ เติมลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกอย่างช้าๆ ด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จนกระทั่งสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบบนของแผ่นกระจกที่มีรอยเว้าประมาณ 1.5 cm หยดสารละลายบิวทานอลปิดทับหน้า separating gel ตั้งทิ้งไว้บนพื้นระนาบเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมงจนกระทั่งเจลเซตตัว

⁵ Reagent B ประกอบด้วย Folin-Ciocalteu's phenol reagent และน้ำกลั่น ผสมกันในอัตราส่วน 1:5

⁶ สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลาย separating gel เข้มข้น 10% ประกอบด้วย acrylamide stock solution เข้มข้น 30% ปริมาตร 6.7 ml, separating gel buffer เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.8) ปริมาตร 5 ml, sodium dodecyl sulfate เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.2 ml, ammonium persulfate เข้มข้น 10% ปริมาตร 100 µl, TEMED ปริมาตร 6.7 µl และน้ำกลั่น ปริมาตร 8 ml โดยสามารถใช้เตรียมเป็นแผ่นเจลหนา 1 mm จำนวน 2 แผ่น

เทสสารละลายบิวทานอลที่อยู่บนผิวหน้าเจลออก แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นบีบเทสสารละลาย stacking gel เข้มข้น 4%⁷ ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกอย่างช้าๆ ด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ จนกระทั่งสารละลายสูงถึงขอบบนของกระจก จากนั้นสอด comb ลงในช่องระหว่างแผ่นกระจก ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งเจลชั้นบนเซตตัว

เมื่อเจลเซตตัวแล้ว ถอด comb ออกซึ่งจะเกิดเป็นช่องสำหรับบรรจุตัวอย่าง ต่อชุด gel electrophoresis system เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Amersham Bioscience, San Francisco, CA) บีบเทสสารละลายตัวอย่างที่มีโปรตีนปริมาณ 20 µg และสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight marker) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) ลงในช่องด้านบนของ stacking gel ช่องละ 1 ตัวอย่าง เติม electrophoresis buffer⁸ ลงใน chamber และระหว่างแผ่นกระจกจนสารละลายท่วมแผ่นเจล กำหนดกระแสไฟฟ้า 40 mA ต่อแผ่นเจล 2 แผ่น เปิดกระแสไฟฟ้าจนสังเกตเห็นแถบโปรตีนเคลื่อนที่ลงมาจนถึงระยะประมาณ 1 cm จากขอบล่างของแผ่นเจลจึงปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ถอดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าออก แล้วนำแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจก นำแผ่นเจลที่ได้มาแช่ใน staining solution⁹ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย

⁷ สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลาย stacking gel เข้มข้น 4% ประกอบด้วย acrylamide stock solution เข้มข้น 30% ปริมาณ 0.99 ml, stacking gel buffer เข้มข้น 1.5 โมลาร์ (ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.8) ปริมาณ 1.86 ml, sodium dodecyl sulfate เข้มข้น 10% ปริมาณ 74.25 µl, ammonium persulfate เข้มข้น 10% ปริมาณ 37.57 µl, TEMED ปริมาณ 3.71 µl และน้ำกลั่น ปริมาณ 4.56 ml โดยสามารถใช้เตรียมเป็นแผ่นเจลหนา 1 mm จำนวน 2 แผ่น

⁸ สารเคมีสำหรับเตรียม electrophoresis buffer ประกอบด้วย Tris เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 9.06 g, glycine เข้มข้น 15% ปริมาณ 43.2 g, sodium dodecyl sulfate เข้มข้น 1% ปริมาณ 3 g และน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 3,000 ml

⁹ สารเคมีสำหรับเตรียม staining solution ประกอบด้วย Coomassie blue R-250 ปริมาณ 1 g, ethanol เข้มข้น 95% ปริมาณ 500 ml, glacial acetic acid ปริมาณ 100 ml และน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 1,000 ml

น้ำกลั่น จากนั้นจึงนำไปแช่ใน destaining solution¹⁰ จนแถบโปรตีนปรากฏขึ้น นำแผ่นเจลออกมาล้างด้วยน้ำกลั่น

3.3.2.4 ความโปร่งแสง

วัดความโปร่งแสงของตัวอย่างฟิล์มโดยดัดแปลงจากวิธีของ Tang และคณะ (2005) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาดพอดีกับด้านที่แสงส่องผ่านของคิวเวร์ตต์แก้ว ติดตั้งแผ่นฟิล์มลงบนพื้นผิวด้านในของคิวเวร์ตต์ แล้วนำไปวัดค่าร้อยละของแสงส่องผ่าน (%transmittance) ที่ความยาวคลื่น 500 nm โดยใช้ UV/Vis spectrophotometer (รุ่น V-530, Jasco, Easton, MD) ใช้คิวเวร์ตต์เปล่า (คิวเวร์ตต์ที่มีอากาศภายใน) เป็นแบล็ก กำหนดให้ค่าแสงส่องผ่านของแบล็กมีค่าเท่ากับ 100%

3.3.2.5 สี

วัดค่า L^* , a^* และ b^* ของตัวอย่างฟิล์มในระบบ CIELAB โดยใช้ chroma meter (รุ่น CR-400, Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan) ใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 วัดค่าสีของตัวอย่างชิ้นละ 5 จุดนับเป็น 1 ซ้ำ คำนวณมุมสี (hue angle) และความอิ่มตัวสี (chroma) โดยใช้สูตรที่ 3.3 และ 3.4

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

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

3.3.2.6 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

วิเคราะห์ WVP ของตัวอย่างฟิล์มตามวิธีมาตรฐาน ASTM E96-95 (ASTM, 1999) ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 6 cm × 6 cm โดยปราศจากรอยขีดข่วน รอยพับ และรูรั่วที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า บรรจุซิลิกาเจลที่อบแห้งแล้วปริมาณ 20 g ลงในขวดแก้วสำหรับทดสอบ ทาสีลิโคนกรีสบริเวณปากขวดให้ทั่ว วางตัวอย่างฟิล์มลงบนปากขวด ซึ่งให้ตั้งและรัดให้แน่นด้วยพาราฟิล์ม บันทึกน้ำหนักขวดที่ติดตั้งฟิล์มแล้ว จากนั้นนำขวดตัวอย่างไปบรรจุไว้ใน

¹⁰ สารเคมีสำหรับเตรียม destaining solution ประกอบด้วย ethanol เข้มข้น 95% ปริมาณ 250 ml, glacial acetic acid ปริมาณ 100 ml และน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรทั้งหมดให้เป็น 1,000 ml

เฝ้าติดตามความชื้นที่บรรจุน้ำกลั่นไว้ภายใน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) บันทึกน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงไปตามเวลาจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นคำนวณ WVP ตามสูตรที่ 3.5

$$WVP = \frac{WL}{At(P_2 - P_1)} \quad (3.5)$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง (g)

L คือ ความหนาของฟิล์ม (mm)

A คือ พื้นที่หน้าตัดของฟิล์ม (m²)

t คือ เวลาที่ใช้ในการทดสอบ (h)

(P₂-P₁) คือ ความแตกต่างของความดันไอน้ำที่ด้านทั้งสองของฟิล์ม (Pa)

3.3.2.7 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม (contact angle)

วิเคราะห์มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโดยใช้ contact angle measuring instrument (รุ่น OCA15CE, DataPhysics Instruments, Filderstadt, Germany) โดยตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 5 cm × 2 cm นำแผ่นฟิล์มวางบนแท่นวางตัวอย่าง หยดน้ำกลั่น 4 µl บนผิวหน้าของตัวอย่างฟิล์ม วัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม วัดตัวอย่างละ 3 ซึ้นนับเป็น 1 ซึ้า

3.3.2.8 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility)

วิเคราะห์ตามวิธีของ Jangchud และ Chinnan (1999) ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 2 cm × 2 cm นำแผ่นฟิล์มตัวอย่างไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก บรรจุแผ่นฟิล์มในหลอดทดลองขนาด 50 ml เติมน้ำกลั่น 20 ml นำหลอดตัวอย่างไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 4 ที่อบแห้งแล้ว ล้างตัวอย่างบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น 10 ml แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก วัดตัวอย่างละ 3 ซึ้นนับเป็น 1 ซึ้า คำนวณความสามารถในการละลายน้ำโดยใช้สูตรที่ 3.6

$$\text{Water solubility (\%)} = \frac{(w_i - w_f)}{w_i} \times 100 \quad (3.6)$$

เมื่อ W_i คือ น้ำหนักเริ่มต้นของฟิล์ม (g)
 W_f คือ น้ำหนักสุดท้ายของฟิล์ม (g)

3.3.2.9 ลักษณะภาคตัดขวาง

ศึกษาลักษณะภาคตัดขวางของตัวอย่างฟิล์ม โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, รุ่น JSM-5410LV, JEOL, Tokyo, Japan) ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 5 cm × 5 cm เก็บไว้ในโถดูดความชื้นที่มีซิลิกาเจลเป็นเวลา 7 วัน ในการศึกษาลักษณะภาคตัดขวางของฟิล์มใช้แท่งทองเหลืองสำหรับวางตัวอย่างซึ่งมีลักษณะเป็นร่องตั้งฉากกับพื้นผิวสำหรับติดตัวอย่าง นำตัวอย่างฟิล์มแช่ลงในไนโตรเจนเหลวให้ฟิล์มแข็งตัว แล้วหักตัวอย่างฟิล์ม ทิ้งตัวอย่างฟิล์มให้อ่อนตัวลง ติดเทปกาวยสองหน้าแบบบางลงบนแท่งทองเหลืองบริเวณที่เป็นร่องที่ตั้งฉาก แล้วติดตัวอย่างฟิล์มให้ด้านที่ถูกหักวางตั้งฉากกับแท่งทองเหลือง นำตัวอย่างไปฉายด้วยทอง แล้วศึกษาลักษณะภาคตัดขวางของตัวอย่างฟิล์มโดยใช้กำลังขยาย 750 เท่า

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1957)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผงสารสกัดจากใบหม่อน

ในงานวิจัยนี้ได้แปรระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อนเป็น 3 ระดับ ได้แก่ สารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ (unoxidized extract, UNOX) สารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับต่ำ (mildly-oxidized extract, MILD-OX) และสารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับสูง (highly-oxidized extract, HIGH-OX)

สำหรับสารสกัด UNOX เตรียมจากใบหม่อนสดที่นำไปให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อยับยั้งออกซิเดชันซึ่งเอนไซม์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในใบหม่อนซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก Appel (1993) รายงานว่ามีเอนไซม์ในพืชหลายกลุ่มที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ โมโนฟีนอล โมโนออกซีจีเนสหรือไทโรซิเนส (EC 1.14.18.1) ออร์โธ-ไดฟีนอลออกซิเดสหรือแคทีคอลออกซิเดส (EC 1.10.3.1) พารา-ไดฟีนอลออกซิเดสหรือแลกเคส (EC 1.10.3.1) และเพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7)

สำหรับสารสกัด MILD-OX เตรียมจากใบหม่อนสดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ในขั้นตอนการสกัดซึ่งมีการบดใบหม่อนส่งผลให้เซลล์ถูกทำลาย สารต่างๆ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกและเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งอยู่ตามธรรมชาติในเนื้อเยื่อพืชจะถูกปลดปล่อยออกมา และเอนไซม์สามารถเข้าออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกได้ (Pierpoint, 1969) ส่วนสารสกัด HIGH-OX นั้นเตรียมจากใบหม่อนสด โดยใช้ขั้นตอนการสกัดเช่นเดียวกับสารสกัด MILD-OX โดยเมื่อได้สารสกัดน้ำจากใบหม่อนสดแล้ว นำสารสกัดน้ำที่ได้มาพ่นอากาศที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 60 นาที ความเข้มข้นของออกซิเจนรวมทั้งพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารสกัดกับอากาศที่เพิ่มขึ้นจึงสามารถเพิ่มอัตราของปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Sikwese, 2005) สำหรับสารสกัดน้ำทุกตัวอย่างนำมาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเนื่องจากเป็นวิธีการทำแห้งสารสกัดที่สามารถรักษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกไว้ได้มากที่สุดวิธีหนึ่ง (Katsube และคณะ, 2009)

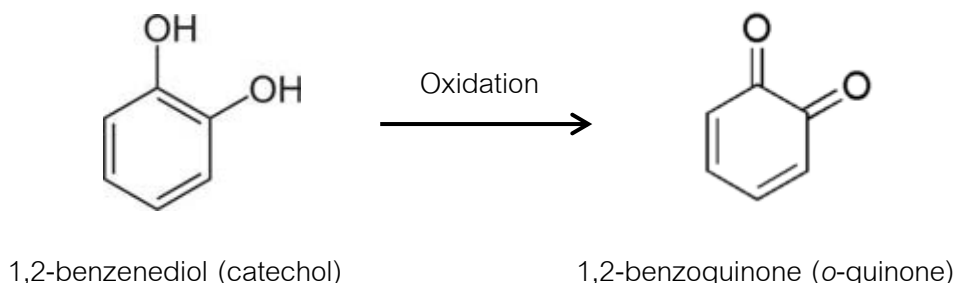
ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผงสารสกัดจากใบหม่อนที่ออกซิไดส์ที่ระดับแตกต่างกัน พบว่าเมื่อระดับออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้น ผงสารสกัดจากใบหม่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีหมู่แทนที่ ได้แก่ หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งเป็นหมู่ที่ให้อิเล็กตรอน (electron donating group) สารประกอบฟีนอลิกจึงถูกออกซิไดส์ได้โดยออกซิโดซึ่งเอเจนต์ต่างๆ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นควิโนน (ไซโคลเฮกซาไดอินไดโอน) (Brown และคณะ, 2012) ตัวอย่างเช่น 1,2-เบนซีนไดออกอล (แคทีคอล) สามารถถูกออกซิไดส์ได้เป็น 1,2-เบนโซควิโนน (ออร์โธ-ควิโนน) (รูปที่ 4.1) ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoque, Benjakul และ Prodpran (2011) ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผงสารสกัดจากเครื่องเทศก่อนและหลังออกซิเดชัน พบว่าผงสารสกัดจากอบเชยกานพลู และโป๊ยกั๊ก มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดก่อนออกซิเดชันเท่ากับ 138.1, 125.0 และ 34.8 mg gallic acid equivalent/g ผงสารสกัด ตามลำดับ และมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดหลังออกซิเดชันเท่ากับ 49.5, 52.2 และ 11.9 mg gallic acid equivalent/g ผงสารสกัด ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในผงสารสกัดจากใบหม่อนที่ออกซิไดส์ที่ระดับแตกต่างกัน

ตัวอย่างผงสารสกัด	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg gallic acid equivalent/g โดยน้ำหนักแห้ง)
UNOX	75.3 ^a ± 0.336
MILD-OX	72.4 ^b ± 0.336
HIGH-OX	59.2 ^c ± 0.767

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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



รูปที่ 4.1 ออกซิเดชันของแคทีคอลไปเป็นออร์โธ-ควิโนน

4.2 ผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัดจากใบหม่อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

4.2.1 ความหนา

ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างมีความหนาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีความหนาอยู่ในช่วง 0.129-0.133 mm แสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดจากใบหม่อนไม่มีผลต่อความหนาของตัวอย่างฟิล์ม ดังนั้นในงานวิจัยนี้หากจะมีความแตกต่างในสมบัติด้านใดๆ ของตัวอย่างฟิล์ม จึงไม่น่าจะเป็นผลมาจากความหนาของตัวอย่างฟิล์ม

ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nuthong และคณะ (2009) ซึ่งศึกษาการเติมกรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเฟรูลิก ในฟิล์มพลาสติกโปรตีนจากสุกร พบว่าการเติมกรดฟีนอลิกไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์ม เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Arcan และ Yemenicioğlu (2011) ที่ศึกษาสมบัติของฟิล์มขึ้นที่เติมกรดฟีนอลิก (ได้แก่ กรดแกลลิก กรดพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิก และกรดเฟรูลิก) และฟลาโวนอยด์ (ได้แก่ คาเทชิน ฟลาโวน และเคอเซทิน) พบว่าตัวอย่างฟิล์มควบคุมและฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีความหนาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 4.2 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	ความหนา (mm) ^{ns}
Control	0	0.129 ± 0.005
UNOX	2	0.130 ± 0.002
	5	0.131 ± 0.003
	10	0.130 ± 0.004
MILD-OX	2	0.131 ± 0.009
	5	0.133 ± 0.003
	10	0.132 ± 0.003
HIGH-OX	2	0.130 ± 0.002
	5	0.133 ± 0.008
	10	0.132 ± 0.005

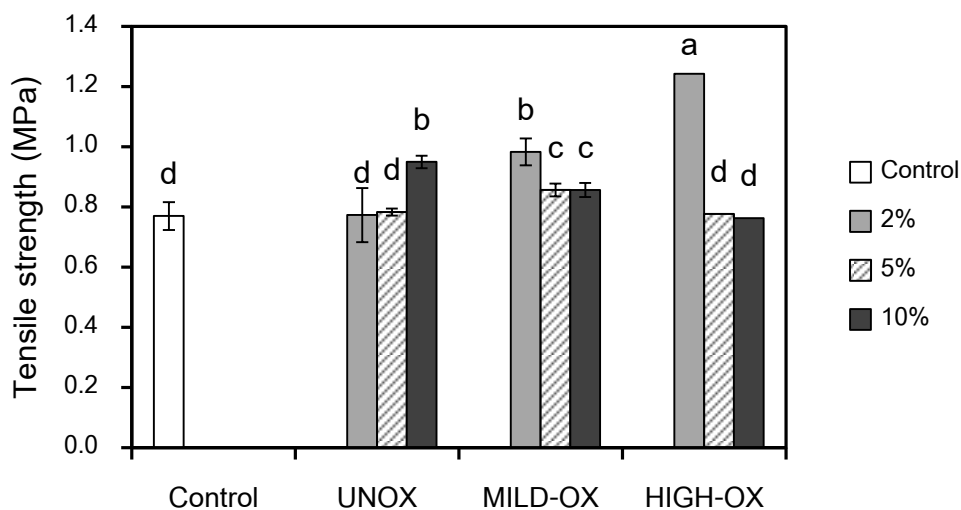
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

4.2.2 ความต้านทานแรงดึงขาด

TS คือความเครียดที่เกิดขึ้นในขณะที่ดึงที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของแผ่นฟิล์มที่มีความกว้างคงที่จนแผ่นฟิล์มนั้นขาด รูปที่ 4.2 แสดง TS ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน ตัวอย่างฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมีค่า TS เท่ากับ 0.77 MPa เมื่อเติมสารสกัด UNOX เข้มข้น 2 และ 5% พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่ได้มีค่า TS ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด UNOX เป็น 10% ตัวอย่างฟิล์มที่ได้มีค่า TS เท่ากับ 0.95 MPa ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) สำหรับการเติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX เข้มข้น 2% พบว่าสามารถปรับปรุงค่า TS ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดได้ โดยฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX เข้มข้น 2% มีค่า TS สูงกว่าตัวอย่างฟิล์มควบคุม 27.7 และ 61.4% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการเติมสารสกัด MILD-OX และ

HIGH-OX ที่ความเข้มข้นสูง (5 และ 10%) มีผลให้ฟิล์มมีค่า TS ลดต่ำลง ตัวอย่างเช่นฟิล์มที่เติม MILD-OX และ HIGH-OX เข้มข้น 10% มีค่า TS เท่ากับ 0.86 และ 0.76 MPa ตามลำดับ



รูปที่ 4.2 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Prodpran, Benjakul และ Phatcharat (2012) ซึ่งศึกษาผลของสารประกอบพีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มจากโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน โดยสารประกอบพีนอลิกที่ศึกษาได้แก่ กรดแคฟเฟอิก คาเทชิน กรดเฟรุสิก และกรดแทนนิก แปรความเข้มข้นของสารประกอบพีนอลิกเป็น 1, 3 และ 5% ของปริมาณโปรตีน ผู้วิจัยรายงานว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบพีนอลิกเพิ่มสูงขึ้น ฟิล์มที่ได้ยังมีค่า Young's modulus และ TS ที่สูงขึ้น ในขณะที่ Hoque และคณะ (2011) ศึกษาผลของการเติมสารสกัดจากเครื่องเทศต่อ TS ของฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองและฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองที่ไฮโดรไลส์บางส่วน (partially hydrolyzed gelatin) โดยในการศึกษานี้ใช้สารสกัดจากอบเชย กานพลู และโป๊ยกั๊ก รวมทั้งสารสกัดจากเครื่องเทศดังกล่าวที่ถูกออกซิไดส์ โดยรวมพบว่าการเติมสารสกัดจากเครื่องเทศทำให้ฟิล์มมี TS สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และการเติมสารสกัดที่ถูกออกซิไดส์ทำให้ฟิล์มมี TS สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ไม่ถูกออกซิไดส์

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อสมบัติของระบบเจลซึ่งเป็นระบบที่อาศัยอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนทำให้เกิดเป็นโครงสร้างร่างแหที่มีความแข็งแรง ซึ่งเป็นระบบที่ใกล้เคียงกับระบบของฟิล์ม โดย Balange และ Benjakul (2009) ศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกลอกซีไดส์ต่อสมบัติของเจลซูริมิปลาตาหวาน สารประกอบฟีนอลิกที่ใช้ในการศึกษามี 4 ชนิด ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแทนนิก คาเทชิน และกรดแควเฟอิก สำหรับสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกลอกซีไดส์เตรียมโดยเตรียมสารละลายของสารประกอบฟีนอลิกเข้มข้น 1% แล้วนำไปพ่นออกซิเจนที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในการศึกษาที่แปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกลอกซีไดส์ที่เติมลงในซูริมิเป็น 6 ระดับ ได้แก่ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 และ 0.25% โดยนำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมกรดเพรูลิกที่ถูกลอกซีไดส์เข้มข้น 0.20% กรดแทนนิกที่ถูกลอกซีไดส์เข้มข้น 0.05% กรดแควเฟอิกที่ถูกลอกซีไดส์เข้มข้น 0.15% หรือคาเทชินที่ถูกลอกซีไดส์เข้มข้น 0.05% มีผลให้ค่าแรงเจาะทะลุของเจลซูริมิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเจลซูริมิที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกลอกซีไดส์ อย่างไรก็ตามเมื่อเติมกรดเพรูลิกที่ถูกลอกซีไดส์มากกว่า 0.20% กรดแทนนิกที่ถูกลอกซีไดส์มากกว่า 0.05% กรดแควเฟอิกที่ถูกลอกซีไดส์มากกว่า 0.15% หรือคาเทชินที่ถูกลอกซีไดส์มากกว่า 0.05% มีผลให้ค่าแรงเจาะทะลุของเจลซูริมิลดลง ทั้งนี้ผู้วิจัยให้เหตุผลว่าเนื่องมาจากการรวมตัวกันเองของสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูงๆ

Freitas และ Mateus (2001) เสนอว่าความแข็งแรงของฟิล์มโปรตีนที่เติมสารประกอบฟีนอลิกเป็นผลมาจากทั้งอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนและอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังเสนอว่าสาเหตุที่ความแข็งแรงของฟิล์มโปรตีนมีค่าลดลงเมื่อเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูงเป็นผลมาจากการรวมตัวกันเองของสารประกอบฟีนอลิก

สำหรับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนกับโปรตีน Oakenfull, Pearce และ Burley (1997) อธิบายว่าอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนที่ทำให้เกิดโครงสร้างที่เสถียรของเจลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลัก ได้แก่ อันตรกิริยาชนิดไอออน-โควาเลนต์และพันธะโควาเลนต์ อันตรกิริยาชนิดไอออน-โควาเลนต์ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน (ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาระหว่างหมู่ -OH หรือ -NH) อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาระหว่างหมู่ -CH₃) แรงทางไฟฟ้าที่เกิดจากการดึงดูดของหมู่ที่มีขั้วต่างกัน (electrostatic interaction) เช่น แรงทางไฟฟ้าที่เกิดจากการดึงดูดของเกลือ (electrostatic salt link) (ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาระหว่างหมู่ -COO⁻ และ

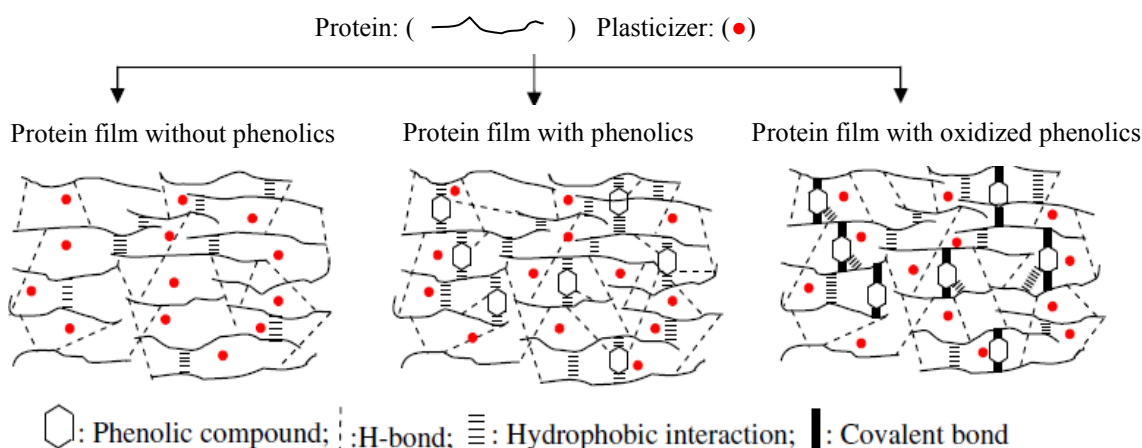
$-NH_3^+$) และแรงทางไฟฟ้าที่เกิดจากการดึงดูดของอิลอนโลหะ (electrostatic metal ion bridge) (ตัวอย่างเช่น อันตรกิริยาระหว่างหมู่ $-COO^-$ และ Ca^{2+}) ส่วนตัวอย่างพันธะโควาเลนต์ ได้แก่ พันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-) และพันธะแกมมา-กลูตามิล ($-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2-$)

สำหรับระบบที่มีสารประกอบฟีนอลิกและโปรตีน Asano และคณะ (1982) อธิบายว่าอันตรกิริยาที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก อย่างไรก็ตามในเวลาต่อมา Siebert และคณะ (1996) รายงานว่าพันธะไฮโดรเจนไม่ได้มีบทบาทสำคัญมากเท่ากับอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกในการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีน

ในแง่ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก Rutkowski และคณะ (1977) เสนอว่าผลิตภัณฑ์ของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชันทั้งแบบอาศัยเอนไซม์และแบบไม่อาศัยเอนไซม์สามารถเกิดอันตรกิริยาได้ดีกับหมู่เอพซิลอน-อะมิโนของไลซีนและหมู่เมทิลไฮโอ (-S-CH₃) ของเมไทโอนีน ในขณะที่ Rawel และคณะ (2002) เสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีสถานะออกซิเดชันต่างกัน อาจมีความสามารถในการเชื่อมข้ามโปรตีนที่ต่างกัน โดยความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกหนึ่งๆ ที่จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนนเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถของสารนั้นในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน

ชนิดของอันตรกิริยาที่มีผลให้เกิดการเชื่อมข้ามในระบบของฟิล์มโปรตีนจึงสามารถสรุปได้ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่ง Hoque และคณะ (2011) อธิบายว่าในระบบของฟิล์มโปรตีนที่ไม่มีสารประกอบฟีนอลิก โมเลกุลโปรตีนจะสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ในขณะที่ในระบบของฟิล์มโปรตีนที่มีสารประกอบฟีนอลิก นอกจากอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างโปรตีนกับโปรตีนแล้ว ยังสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างโปรตีนและสารประกอบฟีนอลิกได้อีกด้วย ส่วนในระบบของฟิล์มโปรตีนที่เติมสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์ ซึ่งการเกิดออกซิเดชันทำให้สารประกอบฟีนอลิกเปลี่ยนไปเป็นควิโนนที่มีความว่องไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน (Pierpoint, 1969) และควิโนนที่เกิดขึ้นนี้สามารถเกิดอันตรกิริยาได้กับโซ่ข้างที่เป็นหมู่อะมิโนหรือซัลไฟไฮดริลของพอลิเพปไทด์ เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ชนิด C-N หรือ C-S กับวงฟีนอลิกขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถถูกออกซิไดส์ต่อไปและทำปฏิกิริยากับโซ่ข้างของพอลิเพปไทด์อีกสายหนึ่งทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายพอลิเพปไทด์ขึ้น (Strauss และ Gibson, 2004) การเชื่อมข้ามที่เกิดขึ้นนี้มีความ

แข็งแรงมากเนื่องมาจากค่าพลังงานพันธะของพันธะโควาเลนต์ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอันตรกิริยาชนิดแวนเดอร์วาลส์ (Oakenfull และคณะ, 1997) พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นนี้ ร่วมกับอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนและอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิกที่กล่าวมาข้างต้น จึงส่งผลให้โครงสร้างโปรตีนที่เกิดขึ้นมีความแข็งแรงมาก

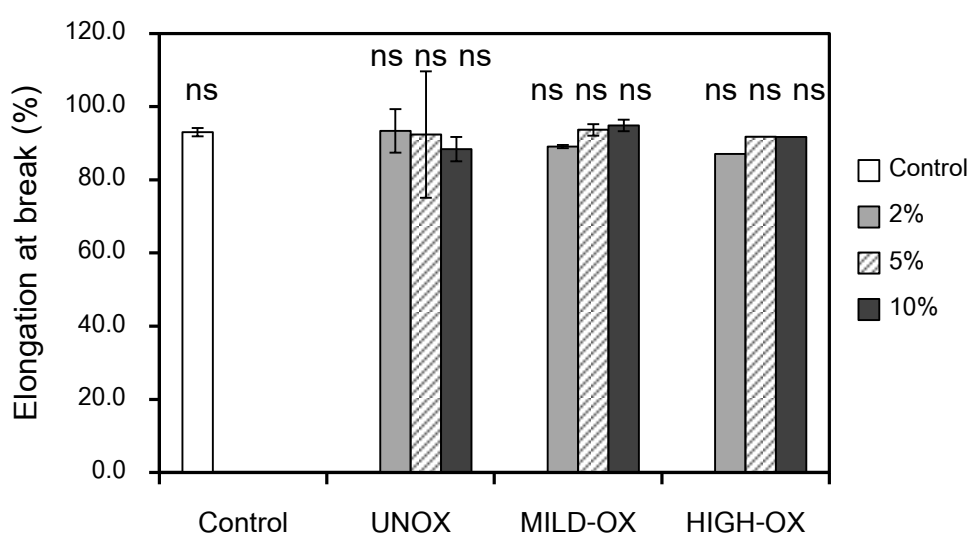


รูปที่ 4.3 อันตรกิริยาเชื่อมข้ามภายในโครงสร้างฟิล์มโปรตีนในระบบที่ไม่มีสารประกอบฟีนอลิก (ซ้าย) มีสารประกอบฟีนอลิก (กลาง) และมีสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์ (ขวา) (ดัดแปลงจาก Hoque และคณะ, 2011)

4.2.3 การยืดตัวถึงจุดขาด

EB คือร้อยละของระยะทางที่ฟิล์มยืดตัวออกด้วยแรงดึงจนขาดต่อความยาวเดิม รูปที่ 4.4 แสดง EB ของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน พบว่าความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดไม่มีผลต่อ EB ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Balange และ Benjakul (2009) ที่รายงานว่า การเติมกรดเพอรูลิกไม่มีผลต่อระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลซูริมิจากปลาตาหวาน ในขณะที่ Hoque และคณะ (2011) ศึกษาผลของการเติมสารสกัดจากเครื่องเทศต่อ EB ของฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองและฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองที่ไฮโดรไลส์บางส่วน โดยในการศึกษานี้ใช้สารสกัดจากอบเชย กานพลู และไยบกี้ รวมทั้งสารสกัดจากเครื่องเทศดังกล่าวที่ถูกออกซิไดส์ โดยรวมพบว่าการเติมสารสกัดและสารสกัดที่ถูก

ออกซิไดส์ไม่มีผลต่อ EB ของฟิล์มทั้งสองชนิด Guilbert (1986) เสนอว่า EB ขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างหมู่เคมีที่เกิดอันตรกิริยาภายในโมเลกุลพอลิเมอร์ โดยไม่ขึ้นกับความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ จากผลการวิจัยในหัวข้อ 4.2.2 และ 4.2.3 จึงอนุมานได้ว่าการเติมสารประกอบฟีนอลิกและสารประกอบฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์สามารถช่วยให้เกิดอันตรกิริยาของโปรตีนในฟิล์มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อระยะห่างระหว่างหมู่เคมีที่เกิดอันตรกิริยาภายในโครงสร้างของโปรตีน



รูปที่ 4.4 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่ามีการรายงานผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิกต่อ EB ของฟิล์มโปรตีนที่แตกต่างกันไป เช่น Nuthong และคณะ (2009) รายงานว่าการเติมกรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเฟรูลิก ทำให้ฟิล์มพลาสติกโปรตีนจากสุกรมี่ค่า EB เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมกรดฟีนอลิก แต่เมื่อเติมกรดฟีนอลิกที่ถูกออกซิไดส์ ฟิล์มโปรตีนที่ได้กลับมีค่า EB ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมกรดฟีนอลิก ส่วน Arcan และ Yemenicioğlu (2011) รายงานว่าฟิล์มขึ้นมี EB เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของคาเทชินและกรดแกลลิกเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ Prodpran และคณะ (2012) รายงานว่า EB ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานมีค่าลดลงเมื่อเติมกรดแคฟเฟอิก คาเทชิน กรดเฟรูลิก และกรดแทนนิก

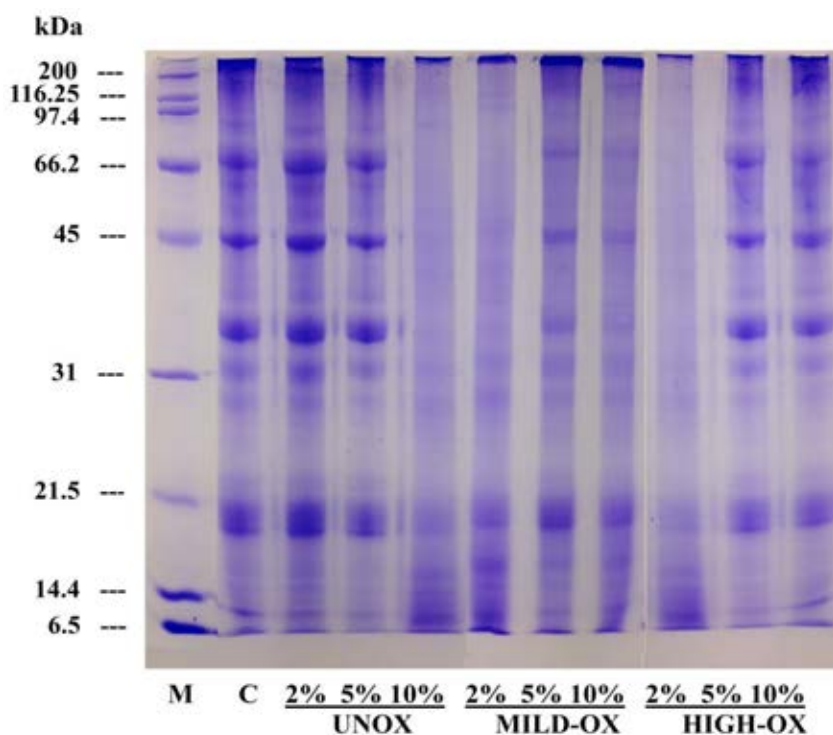
4.2.4 รูปแบบของแถบโปรตีน

รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ศึกษาโดย SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 4.5 พบว่าการเติมสารสกัดจากใบหม่อนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแถบโปรตีน สำหรับตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดเข้มข้น 2 และ 5% มีความเข้มของแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม แต่ตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX เข้มข้น 10% มีความเข้มของแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำลดลงอย่างชัดเจน และปรากฏเป็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200 kDa ที่ด้านบนของเจล ผลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่าเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไปเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นและยังสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่า TS ของฟิล์ม ที่พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX เข้มข้น 2 และ 5% มีค่า TS ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัด UNOX เป็น 10% ตัวอย่างฟิล์มที่ได้มีค่า TS สูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$) (หัวข้อ 4.2.2)

สำหรับตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดเข้มข้น 2% มีความเข้มของแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และปรากฏเป็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 200 kDa ที่ด้านบนของเจล ในขณะที่ตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX เข้มข้น 5 และ 10% มีความเข้มของแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่า TS ของฟิล์ม ที่พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX เข้มข้น 2% มีค่า TS สูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 5 หรือ 10% ตัวอย่างฟิล์มที่ได้กลับมีค่า TS ลดต่ำลง (หัวข้อ 4.2.2) ซึ่ง de Freitas และ Mateus (2001) เสนอว่าความเข้มข้นที่สูงมีผลให้สารประกอบฟีนอลิกเกิดการรวมตัวกันเองและเกิด อันตรกิริยากับโปรตีนได้ลดลง

ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบฟีนอลิกมีศักยภาพในการทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน และความสามารถในการเชื่อมข้ามดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนน อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูงๆ ควิโนนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกอาจเกิดปฏิกิริยาไดเมอไรเซชันได้เป็นไดเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดการ

รวมตัวกันของสารประกอบฟีนอลิกแต่ไม่เกิดการเชื่อมข้ามโปรตีนขึ้น (Strauss และ Gibson, 2004)



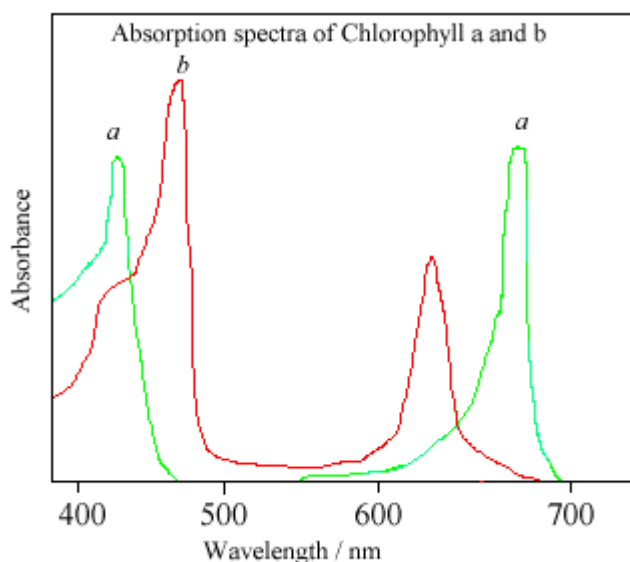
รูปที่ 4.5 รูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหมอนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน M คือ โปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight marker) C คือ ตัวอย่างฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด UNOX คือ ตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ MILD-OX คือ ตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับต่ำ และ HIGH-OX คือ ตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับสูง

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Balange และ Benjakul (2009) ซึ่งศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างฟลาโวนอยด์กับโปรตีนถั่วเหลือง จากการศึกษาโดยใช้ SDS-PAGE พบว่ามีการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Prodpran และคณะ (2012) ที่ศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน และรายงานการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลต่ำในตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลิกเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิก

4.2.5 ความโปร่งแสง

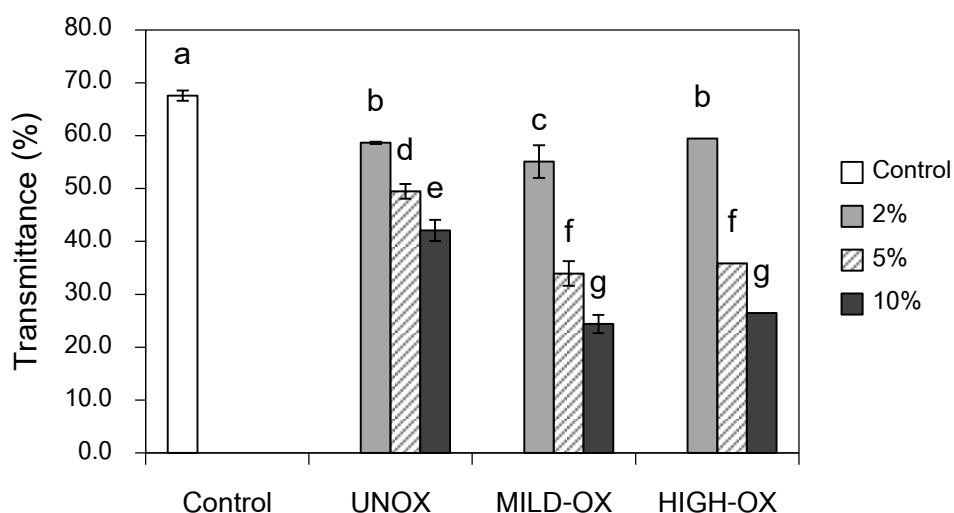
ในงานวิจัยนี้วัดความโปร่งแสงของตัวอย่างฟิล์มในรูปของร้อยละของแสงส่องผ่านที่ความยาวคลื่น 500 nm ทั้งนี้เพื่อจำกัดผลของการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ซึ่งเป็นรงควัตถุหลักในใบหม่อน เนื่องจากในช่วงความยาวคลื่นดังกล่าวซึ่งเป็นช่วงของแสงสีเขียว คลอโรฟิลล์ เอ และบี มีการดูดกลืนแสงต่ำที่สุด (Comar และ Zscheile, 1942; May, 2012) (รูปที่ 4.6)



รูปที่ 4.6 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ เอ และบี (ที่มา: May, 2012)

รูปที่ 4.7 แสดงผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อนที่มีต่อค่าร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าการเติมสารสกัดจากใบหม่อนมีผลต่อความโปร่งแสงของฟิล์ม โดยฟิล์มที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนทุกตัวอย่างมีค่าร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากใบหม่อนเพิ่มขึ้น ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มมีค่าลดต่ำลง โดยฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX เข้มข้น 10% มีความโปร่งแสงต่ำที่สุด โดยมีค่าร้อยละของแสงส่องผ่านเท่ากับ 24.40 และ 26.46 ตามลำดับ ความโปร่งแสงที่ลดลงนี้อาจเนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยา

ระหว่างโปรตีนกับโปรตีนหรือโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิกทำให้เกิดการเชื่อมข้ามหรือการรวมตัวกันของโปรตีนเป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ขึ้น



รูปที่ 4.7 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

สำหรับอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนที่มีผลให้ความโปร่งแสงของฟิล์มลดลง Tang และคณะ (2005) ศึกษาผลของการเติมแทนนัสกลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและรายงานว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมแทนนัสกลูตามิเนสมีความโปร่งแสงลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมเอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องมาจากเกิดการเชื่อมข้ามหรือการรวมตัวกัน (aggregation) ของโปรตีนอันเนื่องมาจากการเร่งของแทนนัสกลูตามิเนส ในทำนองเดียวกัน Yi และคณะ (2006) รายงานว่าฟิล์มเจลาตินปลาที่เติมแทนนัสกลูตามิเนสมีความทึบแสง (opacity) สูงกว่าฟิล์มที่ไม่เติมเอนไซม์ และ González และคณะ (2011) ศึกษาความทึบแสงฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมเจนิฟินซึ่งเป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีน และรายงานว่าตัวอย่างฟิล์มมีความทึบแสงเพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเจนิฟินเพิ่มขึ้น

ส่วนในด้านผลของสารประกอบฟีนอลิก สารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดอันตรกิริยาและทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้ตามรายละเอียดที่กล่าวในหัวข้อ 4.2.2

Prodpran และคณะ (2012) รายงานว่าการเติมกรดแคฟเฟอิก คาเทชิน กรดเฟรูลิก และกรดแทนนิก เข้มข้น 1, 3 และ 5% ในฟิล์มจากโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานส่งผลต่อความโปร่งแสงของฟิล์ม โดยฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีความโปร่งแสงต่ำกว่าฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นสูงมีผลให้ความโปร่งแสงของฟิล์มลดลงมากที่สุด

4.2.6 สี

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าสีในระบบ CIELAB ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน พบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดทุกตัวอย่างมีความสว่าง (L^*) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มควบคุม ในขณะที่ค่าสีแดง ($+a^*$) และค่าสีเหลือง ($+b^*$) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัด เมื่อพิจารณาระหว่างฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ (UNOX) และฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์ (MILD-OX และ HIGH-OX) พบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX มีค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีแดง (a^*) ต่ำกว่า ในขณะที่ค่าสีเหลือง (b^*) มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX สำหรับมุมสีและความอิมิตัวสีของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด (ตารางที่ 4.4) พบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างมีมุมสีใกล้เคียงกันโดยมีค่าประมาณ 90° ซึ่งเป็นมุมสีของสีเหลือง (Handprint Media, 2001) อย่างไรก็ตามพบว่าการเติมสารสกัดจากใบหม่อนมีผลต่อค่าความอิมิตัวสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนมีความอิมิตัวสีสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์ (MILD-OX และ HIGH-OX) มีความอิมิตัวสีสูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงสีของสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดขึ้นได้ใน 2 ขั้นตอน คือ ในขั้นตอนการเตรียมสารสกัดและขั้นตอนการเตรียมฟิล์ม โดยในขั้นตอนการเตรียมสารสกัดที่ออกซิไดส์ (MILD-OX และ HIGH-OX) สารประกอบฟีนอลิกถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนน และควิโนนเหล่านี้สามารถเกิดพอลิเมอร์เชนต่อไปได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และมีสีน้ำตาล (Pierpoint, 1969) ส่วนในขั้นตอนการเตรียมฟิล์มควิโนนสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนและอาจได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารที่มีสี Pierpoint (1969) ศึกษาการเกิดอันตรกิริยา

ระหว่างออร์โธ-ควิโนนของกรดคลอโรเจนิกและออร์โธ-ควิโนนของกรดแคฟเฟอิกกับกรดอะมิโนและเพปไทด์ และรายงานว่าออร์โธ-ควิโนนสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนได้ โดยกรดอะมิโนส่วนใหญ่ยกเว้นไลซีนและซิสเทอีนสามารถเกิดปฏิกิริยากับออร์โธ-ควิโนนที่หมู่แอลฟา-อะมิโน ส่วนไลซีนเกิดปฏิกิริยากับออร์โธ-ควิโนนที่ตำแหน่งเอพซิลอน-อะมิโน และซิสเทอีนเกิดปฏิกิริยากับออร์โธ-ควิโนนที่ตำแหน่งหมู่ไทออล ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยานี้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนหรือเพปไทด์ โดยส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล ในแง่วิทยาศาสตร์ สีน้ำตาลหมายถึงคลื่นแสงในช่วงที่ตามองเห็น (visible spectrum) ในช่วงความยาวคลื่นที่สูง ได้แก่ สีเหลือง สีส้ม และสีแดง (Strutt, 1871)

ตารางที่ 4.3 ค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	L^*	a^*	b^*
Control	0	86.93 ^a ± 0.80	-0.97 ^d ± 0.75	16.57 ^g ± 1.96
UNOX	2	79.49 ^b ± 1.40	0.46 ^c ± 0.32	24.18 ^f ± 1.53
	5	74.40 ^c ± 0.93	1.89 ^b ± 0.31	30.53 ^d ± 0.70
	10	69.90 ^d ± 1.27	3.44 ^a ± 0.45	38.12 ^c ± 0.89
MILD-OX	2	77.86 ^b ± 1.38	-1.44 ^d ± 0.45	28.35 ^e ± 1.44
	5	68.29 ^d ± 1.56	0.45 ^c ± 0.65	40.62 ^b ± 0.74
	10	58.00 ^f ± 1.32	1.88 ^b ± 0.41	45.59 ^a ± 0.23
HIGH-OX	2	77.56 ^b ± 0.65	-1.55 ^d ± 0.18	29.24 ^{de} ± 0.78
	5	68.10 ^d ± 0.45	0.09 ^c ± 0.22	40.20 ^b ± 0.19
	10	62.12 ^e ± 1.46	0.16 ^c ± 0.56	46.34 ^a ± 0.50

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ 4.4 มุมสีและความอิมิตัวสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	มุมสี ($^{\circ}$) ^{ns}	ความอิมิตัวสี
Control	0	86.58 ± 0.69	16.60 ^g ± 1.96
UNOX	2	88.95 ± 0.67	24.18 ^f ± 1.53
	5	86.46 ± 0.51	30.58 ^d ± 0.72
	10	84.85 ± 0.55	38.27 ^c ± 0.93
MILD-OX	2	87.07 ± 1.03	28.39 ^d ± 1.42
	5	89.10 ± 0.41	40.63 ^b ± 0.74
	10	87.64 ± 0.51	45.63 ^a ± 0.22
HIGH-OX	2	86.97 ± 0.41	29.29 ^{de} ± 0.78
	5	89.73 ± 0.14	40.20 ^b ± 1.91
	10	89.40 ± 0.32	46.34 ^a ± 0.50

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ns ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

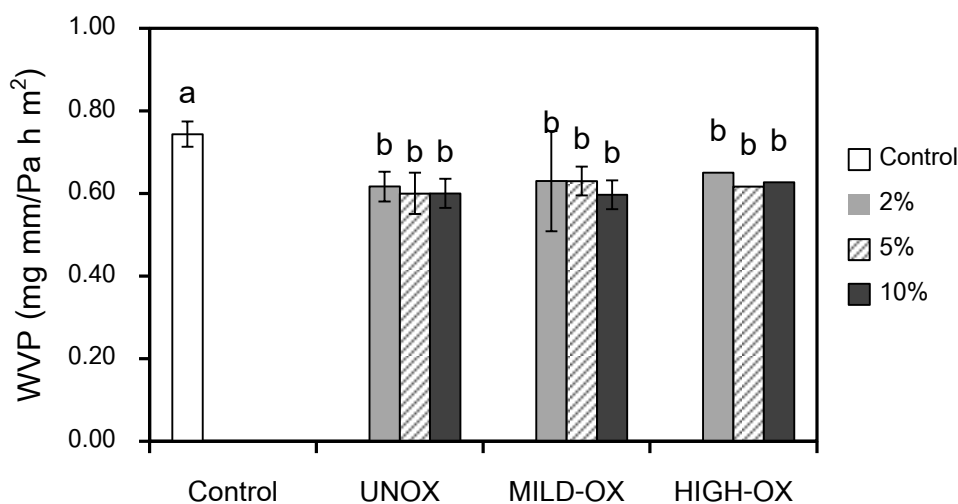
ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับ Hoque และคณะ (2011) ที่รายงานว่าสารสกัดจากเครื่องเทศ ได้แก่ อบเชย กานพลู และโป๊ยกั๊ก มีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อถูกออกซิไดส์ โดยมีค่าความสว่าง (L^*) ลดลง และค่าสีเหลือง ($+b^*$) สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากสมุนไพรที่ไม่ออกซิไดส์ เช่นเดียวกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Pospisila และคณะ (2002) ที่รายงานการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อสารประกอบฟีนอลิกถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนน

Nuthong และคณะ (2009) พบว่าการเติมกรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพรูลิกในฟิล์มพลาสติกโปรตีนจากถั่ว มีผลให้ค่า L^* ลดลง แต่ค่า $+a^*$ และ $+b^*$ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมกรดฟีนอลิก นอกจากนี้ Prodpran และคณะ

(2012) รายงานในทำนองเดียวกันสำหรับฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานที่เติมสารประกอบฟีนอลิก

4.2.7 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

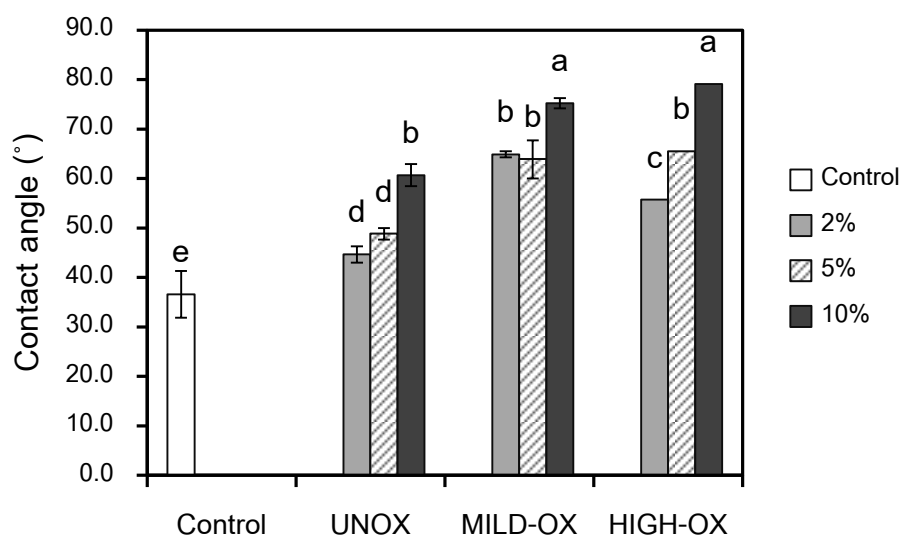
ผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อนต่อ WVP ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดแสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนมี WVP ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัดไม่มีผลต่อ WVP ของตัวอย่างฟิล์ม Gonzalez และคณะ (2011) รายงานว่าการเติมเงินพินซึ่งเป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีนทำให้ WVP ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีค่าลดลง ซึ่งผู้วิจัยให้เหตุผลว่าพันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นทำให้ช่องว่างภายในโครงสร้างของโปรตีนลดลง จึงส่งผลขัดขวางการซึมผ่านของไอน้ำ เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Ou และคณะ (2005) ที่ศึกษาผลของกรดเพรุลิกที่ออกซิไดส์ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าการเติมกรดเพรุลิกที่ออกซิไดส์มีผลทำให้ WVP ของตัวอย่างฟิล์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.8 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

4.2.8 มุมสัมพันธ์ระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม

รูปที่ 4.9 แสดงผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากใบหม่อนต่อมุมสัมผัส มุมสัมผัสคือค่ามุมของหยดน้ำที่สัมผัสกับผิวฟิล์ม โดยค่ามุมสัมผัสสัมพันธ์กับอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม จึงสามารถแสดงถึงสมบัติความชอบน้ำ/ความไม่ชอบน้ำของผิวฟิล์มได้ ค่ามุมสัมผัสที่สูงแสดงถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิว



รูปที่ 4.9 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

จากงานวิจัยนี้พบว่า การเติมสารสกัดจากใบหม่อนสามารถปรับปรุงสมบัติความไม่ชอบน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดได้ โดยพบว่ามุมสัมผัสของหยดน้ำกับผิวฟิล์มที่เติมสารสกัดมีค่าสูงกว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำที่เพิ่มขึ้นของผิวฟิล์ม นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX หรือ HIGH-OX มีค่ามุมสัมผัสที่สูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX และเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มมากขึ้น มุมสัมผัสมีค่าเพิ่มขึ้น ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Orliac และคณะ (2002) ซึ่งรายงานว่า การเติมแทนนินมีผลทำให้พื้นผิวของฟิล์มโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัด (sunflower seed protein isolate) มีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับ Strauss และ Gibson (2004) ที่รายงานว่า โคอะเซอร์เวตของเจลาตินและเพกตินที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น

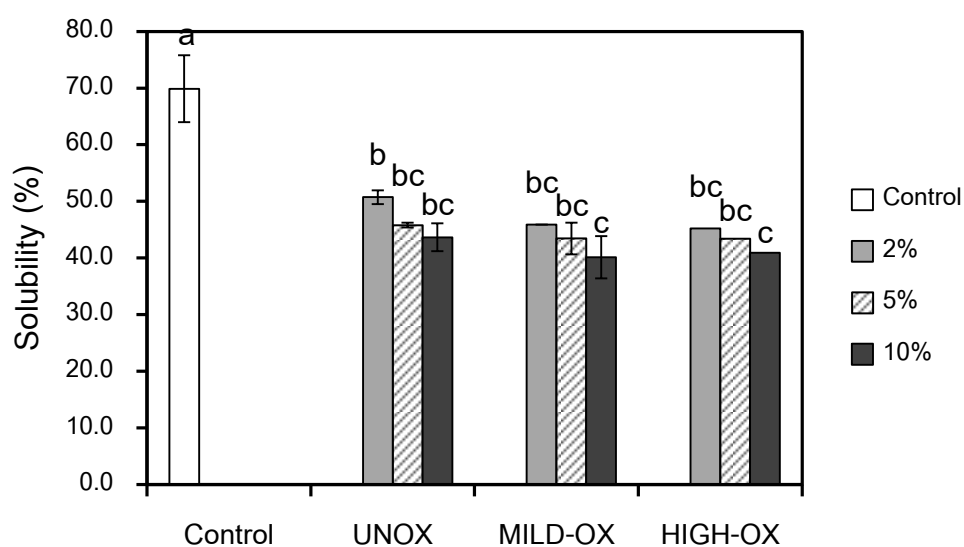
อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการเติมสารสกัดจากไบโหม่อนจะสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติความไม่ชอบน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด แต่ยังคงจัดว่าพื้นผิวของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผลิตในงานวิจัยนี้มีสมบัติชอบน้ำ เนื่องจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทุกตัวอย่างมีมุมสัมผัสผิวน้อยกว่า 90° Förch, Schönherr และ Jenkins (2009) กล่าวว่าโดยทั่วไปหากมุมสัมผัสมีค่าน้อยกว่า 90° จัดว่าพื้นผิวนั้นมีสมบัติชอบน้ำ และหากมุมสัมผัสมีค่ามากกว่า 90° จัดว่าพื้นผิวนั้นมีสมบัติไม่ชอบน้ำ การที่ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีสมบัติชอบน้ำอาจเนื่องมาจากสมบัติความชอบน้ำของโปรตีนถั่วเหลืองเอง รวมทั้งการเติมกลีเซอรอลซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีสมบัติชอบน้ำเพื่อทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ (Rhim และคณะ, 2000)

4.2.9 ความสามารถในการละลายน้ำ

รูปที่ 4.10 แสดงความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดจากไบโหม่อนมีผลทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยตัวอย่างฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมีความสามารถในการละลายน้ำสูงที่สุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 69.88% ความสามารถในการละลายน้ำมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น และสารสกัดที่ออกซิไดส์ (MILD-OX และ HIGH-OX) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลงได้มากกว่าสารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ (UNOX) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hoque และคณะ (2011) ที่ศึกษาผลของการเติมสารสกัดที่ออกซิไดส์จากอบเชย กานพลู และโป๊ยกั๊ก ต่อความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดอง พบว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัดมีความสามารถในการละลายน้ำสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

Rawel, Kroll และ Hohl (2001) ศึกษาปฏิกริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิก (กรดเฟรูลิก กรดคลอโรเจนิค กรดแคฟเฟอิก และกรดแกลลิก) สารที่เกี่ยวข้อง (กรดควินิก พาราควิโนน) และสารสกัด (สารสกัดจากกาแฟ ชา มันฝรั่ง และผลแพร์) กับเวย์โปรตีน ผู้วิจัยรายงานว่สารประกอบฟีนอลิกสามารถทำปฏิกริยากับเวย์โปรตีนและส่งผลให้ความสามารถในการละลายของเวย์โปรตีนลดลง โดยการลดลงของความสามารถในการละลายขึ้นอยู่กับชนิดของสาร เช่น กรดคลอโรเจนิค กรดแคฟเฟอิก กรดแกลลิก และพาราควิโนนส่งผลให้ความสามารถในการละลายของเวย์โปรตีนในช่วงความเป็นกรดต่าง 4-5 ลดลงถึง 60-70% ในขณะที่กรดควินิกและ

กรดฟลูอิกไม่มีผลสำคัญต่อความสามารถในการละลายของเวียโปรตีน ผู้วิจัยให้เหตุผลว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของสารประกอบเชิงซ้อนของเวียโปรตีนและสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงปริมาณของหมู่ที่มีประจุ (เช่น หมู่อะมิโนอิสระ) และการเปลี่ยนแปลงปริมาณของหมู่คาร์บอกซิลอันเนื่องมาจากการจับกันของโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิก

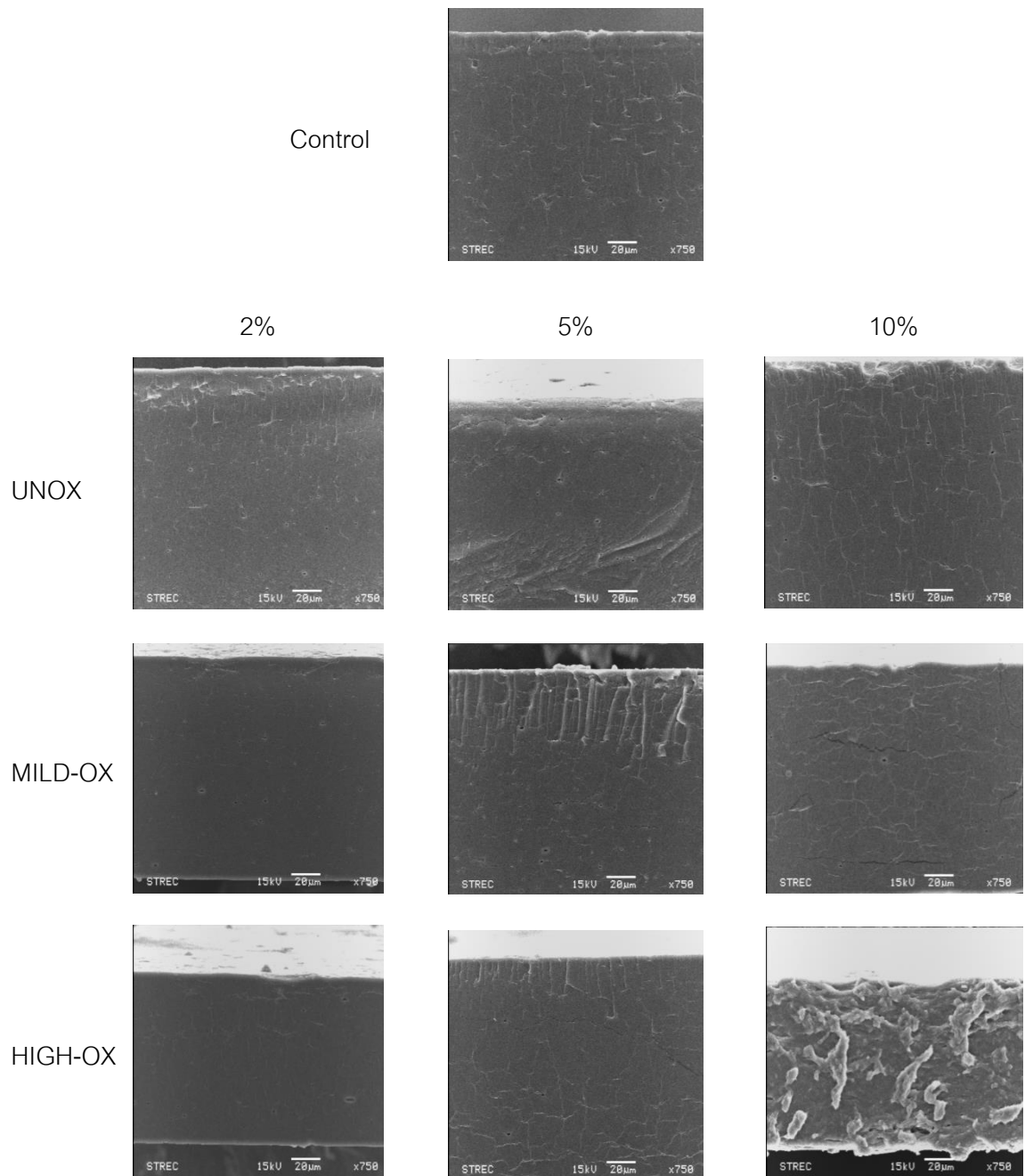


รูปที่ 4.10 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

4.2.10 ลักษณะภาคตัดขวาง

ลักษณะภาคตัดขวางของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อน โดยแปรความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดแสดงดังรูปที่ 4.11 พบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX ปริมาณ 2% มีลักษณะภาคตัดขวางที่เรียบและมีความหนาแน่นสูง สัมพันธ์กับ TS ที่สูงของตัวอย่างฟิล์มทั้งสอง เป็นที่น่าสังเกตว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด HIGH-OX ปริมาณ 10% มีลักษณะภาคตัดขวางที่มีความเรียบต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการรวมตัวกันของสารประกอบฟีนอลิกทำให้ได้โครงสร้างที่มีความเป็นระเบียบต่ำ ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ González และคณะ (2011) ที่ศึกษาการเติมเจนิพินในฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด และพบว่าการรวมตัวกันของเจนิพินในบริเวณที่เกิด

การเชื่อมข้าม และการรวมตัวเพิ่มมากขึ้นที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ของเจนิพิน Emmambux, Stading และ Taylor (2004) ศึกษาการเติมแทนนินในฟิล์มโปรตีนคาพิรินจากข้าวฟ่างและรายงานผลในทำนองเดียวกัน



รูปที่ 4.11 ลักษณะภาคตัดขวางของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

สำหรับการเตรียมสารสกัดฟีนอลิกจากใบหม่อน ในงานวิจัยนี้ได้แปรระดับออกซิเดชันของสารสกัดออกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ สารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ (UNOX) สารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับต่ำ (MILD-OX) และสารสกัดที่ออกซิไดส์ในระดับสูง (HIGH-OX) พบว่าเมื่อระดับออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ผงสารสกัดจากใบหม่อนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยผงสารสกัด UNOX, MILD-OX และ HIGH-OX มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 75.3, 72.4 และ 59.2 mg gallic acid equivalent/g โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกในใบหม่อนสามารถถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนและออกซิไดซิงเอนไซม์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในใบหม่อนและได้ควิโนนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา

ในการศึกษาผลของความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันที่แตกต่างกันของสารสกัดจากใบหม่อนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด พบว่าความเข้มข้นของสารสกัด (0, 2, 5 และ 10%) และระดับออกซิเดชันของสารสกัด (UNOX, MILD-OX และ HIGH-OX) ไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์ม โดยพบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างมีความหนาใกล้เคียงกันโดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.129-0.133 mm

สำหรับสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ในงานวิจัยนี้พบว่าการเติมสารสกัดจากใบหม่อนมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาด (TS) โดยการเติมสารสกัด UNOX เข้มข้น 10%, MILD-OX เข้มข้น 2% และ HIGH-OX เข้มข้น 2% ทำให้ TS ของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด การที่สามารถใช้สารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสารสกัด UNOX เพื่อทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ TS ที่สังเกตได้ เป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อถูกออกซิเดชันไปเป็นควิโนนซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าในการเป็นสารเชื่อมข้ามโปรตีน การเชื่อมข้ามของโปรตีนสามารถยืนยันได้จากการศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนโดย SPS-PAGE โดยพบการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในตัวอย่างฟิล์มดังกล่าว อย่างไรก็ตาม การเติมสารสกัด MILD-OX และ HIGH-OX ที่ระดับความเข้มข้นสูง คือ 5 และ 10% ส่งผลให้ TS

มีค่าลดต่ำลง เนื่องจากการรวมตัวกันของสารประกอบฟีนอลิก ในขณะที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันของสารสกัดไม่ส่งผลต่อการยึดตัวถึงจุดขาด (EB) ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

สำหรับความโปร่งแสง พบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดมีความโปร่งแสงต่ำกว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และการเติมสารสกัดยังทำให้ความสว่าง (L^*) ของฟิล์มมีค่าลดลง ในขณะที่สีแดง ($+a^*$) และสีเหลือง ($+b^*$) มีค่าเพิ่มขึ้น ฟิล์มทุกตัวอย่างมีมุมสีใกล้เคียงกันโดยมีค่าประมาณ 90° ซึ่งเป็นค่ามุมสีของสีเหลือง อย่างไรก็ตามการเติมสารสกัดมีผลต่อความอิมิตัวสีของฟิล์ม โดยฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์ (MILD-OX และ HIGH-OX) มีความอิมิตัวสีสูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด UNOX และฟิล์มควบคุม ค่าสีแดง ค่าสีเหลือง และความอิมิตัวสีที่เพิ่มขึ้นนี้เนื่องมาจากการเปลี่ยนสีของสารประกอบฟีนอลิกเมื่อถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนน รวมทั้งการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีเมื่อสารประกอบฟีนอลิกทำปฏิกิริยากับโปรตีน

การเติมสารสกัดจากไบโหม่อนสามารถช่วยปรับปรุงสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง ซึ่งเห็นได้จากค่ามุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มที่เพิ่มขึ้นในตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้การเติมสารสกัดจากไบโหม่อนยังมีผลให้ฟิล์มมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (WVP) และความสามารถในการละลายน้ำลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม สมบัติการต้านทานความชื้นที่เพิ่มขึ้นนี้เนื่องมาจากการเกิดการเชื่อมข้ามโปรตีนที่มากขึ้นทำให้ฟิล์มมีโครงสร้างที่หนาแน่นขึ้นซึ่งเห็นได้จากลักษณะภาคตัดขวางของฟิล์ม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมหม่อนไหม. 2554. พื้นที่ปลูกหม่อน จำนวนเกษตรกร และผลผลิตเส้นไหม [ออนไลน์] จาก:
http://www.qsds.go.th/qthaisilk/upload_page/datasilk_page_1.jpg [18 ตุลาคม 2554]

ภาษาอังกฤษ

- Anonymous. 1997. Edible films solve problems. Food Technology 51 (2): 60-64.
- Appel, H. M. 1993 Phenolics in ecological interactions: the importance of oxidation. Journal of Chemical Ecology 19 (7): 1521-1552.
- Arcan, I. D. and Yemenicioğlu, A. M. 2011. Incorporating phenolic compounds opens a new perspective to use zein films as flexible bioactive packaging materials. Food Research International 44 (2): 550-556.
- Asano, K., Shinagawa, K. and Hashimoto, N. 1982. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. Journal of the American Society of Brewing Chemists 40 (4): 147-154.
- ASTM. 1999. Annual Book of ASTM Standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Balange, A. J. and Benjakul, S. W. 2009. Enhancement of gel strength of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi using oxidised phenolic compounds. Food Chemistry 113 (1): 61-70.
- Brown, W. H., Foote, C. S., Iverson, B. L. and Anslyn, E. V. 2012. Organic Chemistry, 6th ed. Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning.
- Cao, N., Fu, Y. and He, J. 2007. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. Food Hydrocolloids 21 (7): 1153-1162.

- Carvalho, R. A. and Grosso, C. R. F. 2004. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. Food Hydrocolloids 18 (5): 717-726.
- Cochran, W. G. and Cox, G. M. 1957. Experimental Designs, 2nd ed. Oxford: John Wiley & Sons.
- Comar, C. L. and Zscheile, F. P. 1942. Analysis of plant extracts for chlorophylls a and b by a photoelectric spectrophotometric method. Plant Physiology 17 (2): 198-209.
- de Freitas, V. and Mateus, N. 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (2): 940-945.
- Emmambux, M. N., Stading, M. and Taylor, J. R. N. 2004. Sorghum kafirin film property modification with hydrolysable and condensed tannins. Journal of Cereal Science 40 (2): 127-135.
- Förch, R., Schönherr, H. and Jenkins, A. T. A. 2009. Surface Design: Applications in Bioscience and Nanotechnology. Weinheim: Wiley-VCH.
- Fujimori, E. 1965. Ultraviolet light-induced change in collagen macromolecules. Biopolymers 3 (2): 115-119.
- Galletta, G., Di Gioia, L., Guilbert, S. and Cuq, B. 1998. Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents. Journal of Dairy Science 81 (12): 3123-3130.
- Gennadios, A., Rhim, J. W., Handa, A., Weller, C. L. and Hanna, M. A. 1998. Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. Journal of Food Science 63 (2): 225-228.
- González, A., Strumia, M. C. and Igarzabal, C. A. 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: synthesis, characterization and biodegradation. Journal of Food Engineering 106 (4): 331-338.
- Guilbert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. In M. Mathlouthi (ed.), Food Packaging and Preservation, pp. 371-394. New York: Elsevier Applied Science.

- Ha, C. R. and Iuchi, I. 2003. Transglutaminase. In J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen and D. W. S. Wong (eds.), Handbook of Food Enzymology, pp. 637-655. New York: Marcel Dekker.
- Handprint Media. 2001. Color Models & Color Wheels [Online]. Available from: http://personales.upv.es/gbenet/teoria%20del%20color/water_color/color6.html [2009, March 10]
- Hernandez-Munoz, P., Villalobos, R. and Chiralt, A. 2004a. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. Food Hydrocolloids 18 (4): 647-654.
- Hernandez-Munoz, P., Villalobos, R. and Chiralt, A. 2004b. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. Food Hydrocolloids 18 (3): 403-411.
- Hoque, S. D., Benjakul, S. W. and Prodpran, T. N. 2011. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. Food Hydrocolloids 25 (6): 1085-1097.
- Jangchud, A. and Chinnan, M. S. 1999. Peanut protein film as affected by drying temperature and pH of film forming solution. Journal of Food Science 64 (1): 153-157.
- Jensen, E. V. 1959. Sulfhydryl-difulfide interchange. Science 130 (3385): 1319-1323.
- Jiang, Y., Tang, C. H., Wen, Q. B., Li, L. and Yang, X. Q. 2007. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. Innovative Food Science & Emerging Technologies 8 (2): 218-225.
- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T. and Yamasaki, Y. 2009. Effect of air drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. Food Chemistry 113 (4): 964-969.
- Krochta, J. M. and De Mulder-Johnston, C. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. Food Technology 51 (2): 61-74.

- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 (5259): 680-685.
- Lee, M., Lee, S. and Song, K. B. 2005. Effect of γ -irradiation on the physicochemical properties of soy protein isolate films. Radiation Physics and Chemistry 72 (1): 35-40.
- Loomis, W. D. and Battaile, J. 1966. Plant phenolic compounds and isolation of plant enzymes. Phytochemistry 5 (3): 423-438.
- Marquié, C. 2001. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49 (10): 4676-4681.
- Marquié, C., Tessier, A. M., Aymard, C. and Guilbert, S. 1997. HPLC determination of the reactive lysine content of cottonseed protein films to monitor the extent of cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45 (3): 922-926.
- May, P. 2012. Chlorophyll [Online]. Available from http://www.chm.bris.ac.uk/motm/chlorophyll/chlorophyll_h.htm [2012, December 8]
- Michon, T., Chenu, M., Kellershon, N., Desmadril, M. and Guequen, J. 1997. Horseradish peroxidase oxidation of tyrosine-containing peptides and their subsequent polymerization: a kinetic study. Biochemistry 36 (28): 8504-8513.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. and Waldron, K. C. 2004. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. BioTechniques 37 (5): 790-802.
- Murphy, P. A. and Resurreccion, A. P. 1984. Varietal and environmental differences in soybean glycinin and β -conglycinin content. Journal of Agricultural and Food Chemistry 32 (4): 911-915.
- Naczki, M., Townsend, M., Zadernowski, R. and Shahidi, F. 2011. Protein-binding and antioxidant potential of phenolics of mangosteen fruit (*Garcinia mangostana*). Food Chemistry 128 (2): 292-298.

- Naowaratwattana, W., De-Eknamkul, W. and De Mejia, E. G. 2010. Phenolic-containing organic extracts of mulberry (*Morus alba* L.) leaves inhibit HepG2 hepatoma cells through G2/M phase arrest, induction of apoptosis, and inhibition of topoisomerase IIa activity. Journal of Medicinal Food 13 (5): 1045-1056.
- Nuthong, P. P., Benjakul, S. W. and Prodpran, T. N. 2009. Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. Food Hydrocolloids 23: 736-741.
- Oakenfull, D., Pearce, J. and Burley, W. R. 1997. Protein gelation. In S. Damodaran and A. Paraf (eds.), Food Proteins and Their Applications, pp. 111-142. New York: Marcel Dekker.
- O'Brien, P. J., Siraki, A. G. and Shangari, N. 2005. Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. Critical Reviews in Toxicology 35 (7): 209-662.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. and Rigal, L. 2002. Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate. Polymer 43 (1): 5417-5425.
- Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, M.G. and Jackson, M.G. 2005. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. Journal of Food Engineering 70 (2): 205-210.
- Park, S. K., Hettiarachchy, N. S., Ju, Z. Y. and Gennadios, A. 2002. Formation and properties of soy protein films and coatings. In A. Gennadios (ed.), Protein-Based Films and Coatings, pp. 123-137. Boca Raton: CRC Press.
- Perez-Gago, M. B. and Krochta, J. M. 2001. Denaturation time and temperature effect on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. Journal of Food Science 66 (5): 705-710.
- 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 reactions with amino acids and peptides. Biochemical Journal 112 (5): 609-616.

- Pospisila, J., Nespurek, S., Zweifelb, H. and Kuthanc, J. 2002. Photo-bleaching of polymer discoloration caused by quinone methides. Polymer Degradation and Stability 78 (2): 251-255.
- Prodpran, T. N., Benjakul, S. W. and Phatcharat, S. R. 2012. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. International Journal of Biological Macromolecules 51 (5): 774-782.
- Rawel, H. M., Kroll, J. and Hohl, U. C. 2001. Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. Nahrung/Food 45 (2): 72-81.
- Rawel, H. M., Czajka, D., Rohn, S. and Kroll, J. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. International Journal of Biological Macromolecules 30 (3-4): 137-150.
- Rhim, J. W., Wu, Y., Weller, C. L. and Schnepf, M. 1999. Physical characteristics of a composite Film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. Journal of Food Science 64 (1): 149-152.
- Rhim, J. W., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C. L. and Hanna, M. A. 2000. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (10): 4937-4941.
- Rutkowski, A., Barylko-Pikielna, N., Kozłowska, H., Borowski, J. and Zawadzka, L. 1977. Evaluation of Soybean Protein Isolates and Concentrates as Meat Additives to Provide a Basis for Increasing Utilization of Soybean. Olsztyn: Agriculture-Technical University of Olsztyn.
- Shahidi, F. and Naczk, M. 1995. Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. Lancaster: Technomic.
- Siebert, K. J., Troukhanova, N. V. and Lynn, P. Y. 1996. Nature of polyphenol-protein interactions. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44 (1): 80-85.
- Sikwese, F. E. 2005. Sorghum phenolic extracts: their storage stability and antioxidant activity in sunflower oil. M. Sc. Thesis. Department of Food Science, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, South Africa.

- Strauss, G. and Gibson, S. M. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. Food Hydrocolloids 18 (1): 81-89.
- Strutt, J. W. 1871. Some experiments on colour. Nature 3: 234-236.
- Stuchell, Y. M. and Krochta, J. M. 1994. Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. Journal of Food Science 59 (6): 1332-1337.
- Tang, C.H. and Jiang, Y. 2007. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment. Food Research International 40 (4): 504-509.
- Tang, C. H., Jiang, Y., Wen, Q. B. and Yang, X. Q. 2005. Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. Journal of Biotechnology 120 (3): 296-307.
- United Soybean Board. 2004. Soy Protein Isolate [Online]. Available from: <http://talksoy.com> [2005, January 14].
- Van Sumere, C. F. 1989. Phenols and phenolic acids. In J. B. Harborne (ed.), Methods in Plant Biochemistry, Vol. I. Plant Phenolics, pp. 29-73. London: Academic Press.
- Wanyo, P., Siriamornpun, S. and Meeso, N. 2009. Changes in phenolic compounds, antioxidant and physical properties of mulberry tea influenced by intensity of far-infrared radiation. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences 6 (4): 470-479.
- Waterhouse, A. L. 2005. Polyphenolics. In R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith and P. Sporns (eds.), Handbook of Food Analytical Chemistry, pp. 461-470. London: Wiley Interscience.
- Wijeratne, W. B. 1993. Composition of soybean. In K. Tanteerataworn (ed.), Soybean Processing for Food Uses, pp. 9-17. Urbana: International Soybean Program.
- Yan, M., Li, B., Zhao, X. and Yi, J. 2011. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. Food Hydrocolloids 25 (5): 907-914.

- Yi, J. B., Kim, T. Y., Bae, J. H., Whiteside, W. C. and Park, H. J. 2006. Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin film. Journal of Food Science 71 (9): 376-382.
- Zayas, J. F. 1997. Functionality of Proteins in Food. New York: Springer-Verlag.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ (PRODUCT SPECIFICATION)

ก. 1 โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (ที่มา: บริษัท ไมท์ดี อินเทอร์เน็ต เนชั่นแนล จำกัด)

PRODUCT NAME: Isolated soy protein

DESCRIPTION: Isolated soy protein is a soluble, dispersible product developed for use in food systems where a highly functional protein is required.

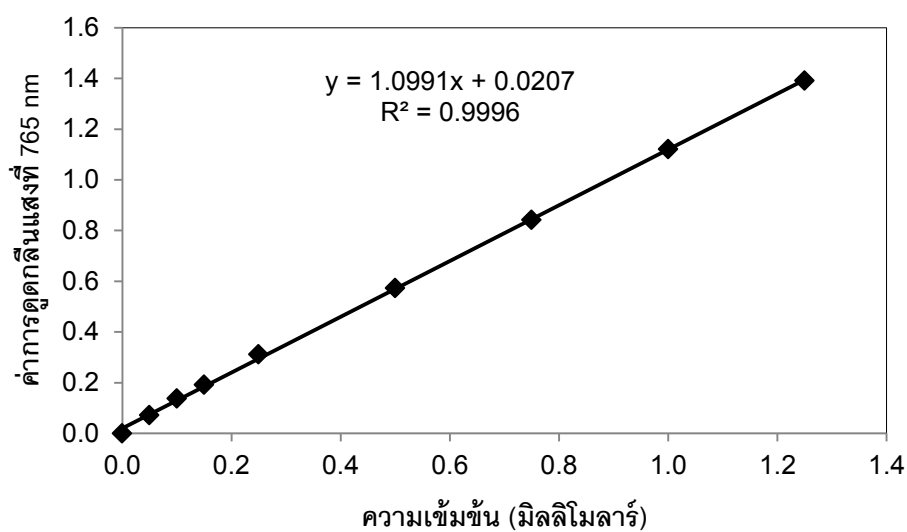
ANALYSIS:

Moisture:	Max 6.0%
Protein:	Min 90%
Fat (petroleum ether):	Max 1%
Fat (acid hydrolysis):	Max 4%
Ash:	Max 5%
pH (10% solution):	7.0-7.4
Calories (per 100 g):	380
Sieve test (pass through #100):	Min 90%
Standard plate count:	Max 10,000/g
Salmonella:	Negative
<i>E. coli</i> :	Negative

ภาคผนวก ข

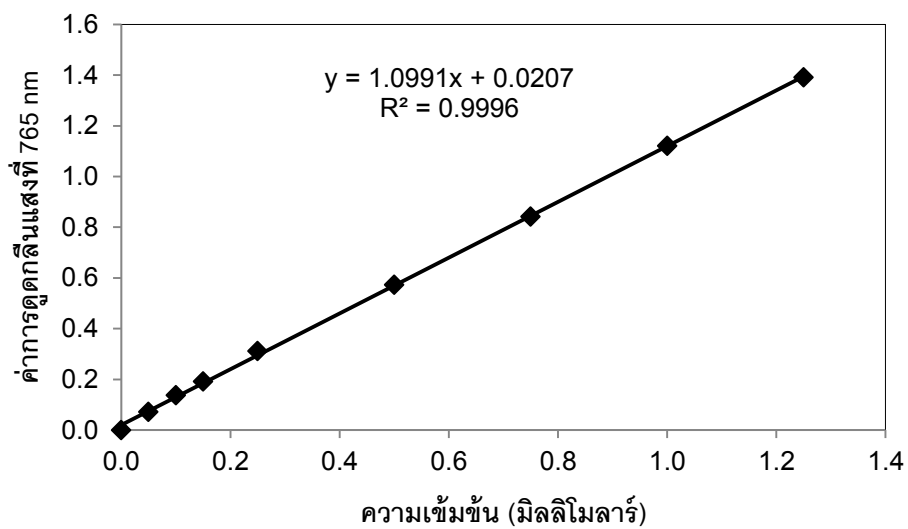
กราฟเทียบมาตรฐาน

ข.1 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu



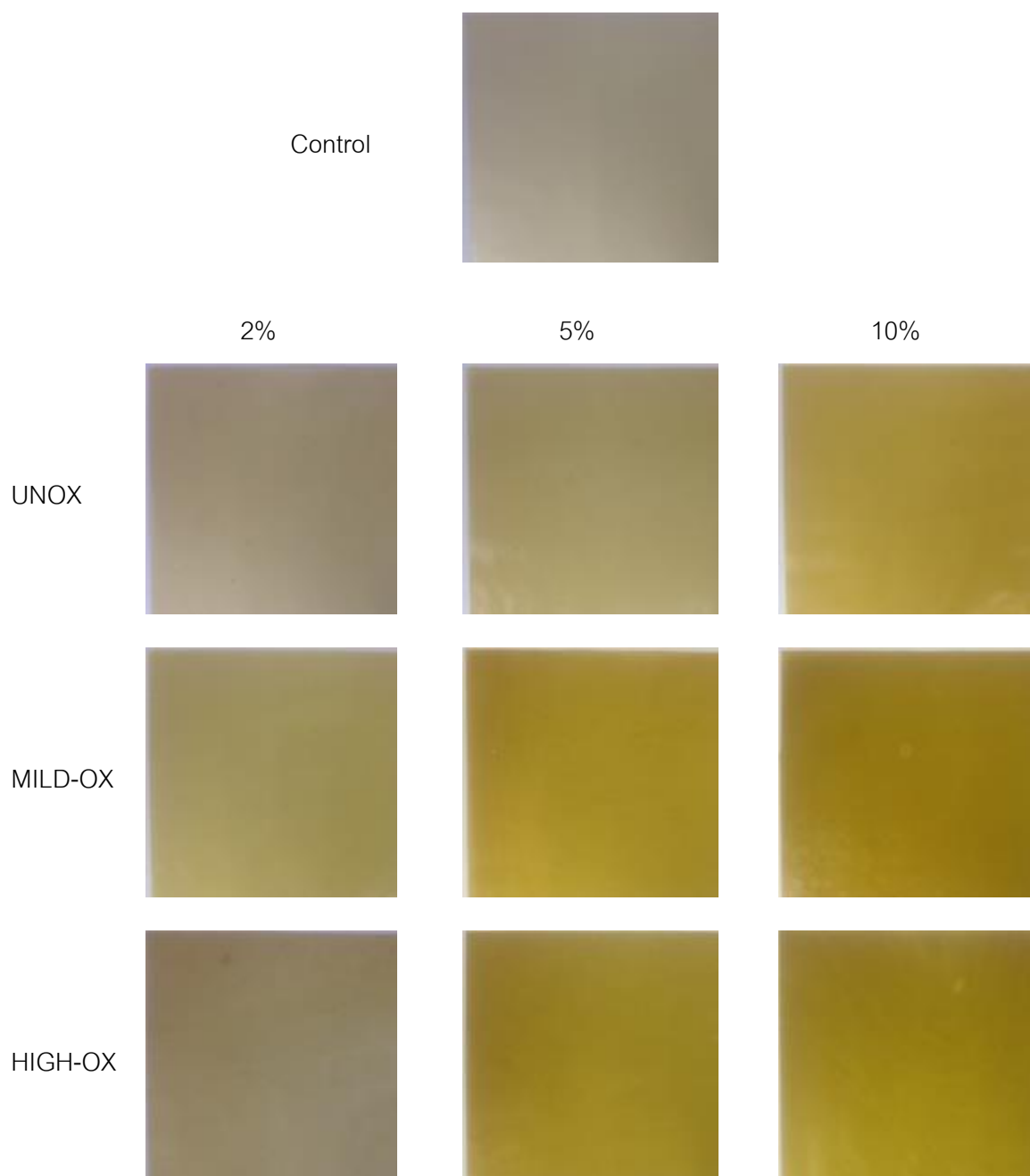
รูปที่ ข.1 กราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu

ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry



รูปที่ ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry

ข.3 รูปตัวอย่างฟิล์ม



รูปที่ ข.3 ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ภาคผนวก ค

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ค.1 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อน ที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	ความต้านทานแรงดึงขาด (MPa)
Control	0	0.77 ^d ± 0.05
UNOX	2	0.77 ^d ± 0.02
	5	0.78 ^d ± 0.03
	10	0.95 ^b ± 0.04
MILD-OX	2	0.98 ^b ± 0.09
	5	0.86 ^c ± 0.01
	10	0.86 ^c ± 0.02
HIGH-OX	2	1.24 ^a ± 0.04
	5	0.78 ^d ± 0.02
	10	0.76 ^d ± 0.02

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.2 การยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่
ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	การยึดตัวถึงจุดขาด (%) ^{ns}
Control	0	93.03 ± 1.15
UNOX	2	93.40 ± 13.53
	5	92.36 ± 16.31
	10	88.38 ± 8.46
MILD-OX	2	89.08 ± 5.94
	5	93.63 ± 17.31
	10	94.86 ± 3.35
HIGH-OX	2	87.04 ± 0.45
	5	91.70 ± 1.60
	10	91.70 ± 1.60

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ns ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ ค.3 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	ค่าแสงส่องผ่าน (%)
Control	0	67.56 ^a ± 0.96
UNOX	2	58.66 ^b ± 1.82
	5	49.46 ^d ± 0.96
	10	42.09 ^e ± 1.69
MILD-OX	2	55.11 ^c ± 0.20
	5	33.92 ^f ± 1.40
	10	24.40 ^g ± 1.98
HIGH-OX	2	59.43 ^b ± 3.10
	5	35.82 ^f ± 2.33
	10	26.46 ^g ± 1.73

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.4 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อนที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (g mm/m ² h Pa)
Control	0	0.743 ^a ± 0.031
UNOX	2	0.617 ^b ± 0.021
	5	0.600 ^b ± 0.056
	10	0.600 ^b ± 0.056
MILD-OX	2	0.630 ^b ± 0.036
	5	0.630 ^b ± 0.050
	10	0.597 ^b ± 0.035
HIGH-OX	2	0.650 ^b ± 0.121
	5	0.617 ^b ± 0.035
	10	0.627 ^b ± 0.035

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.5 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากใบหม่อน ที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม (°)
Control	0	36.57 ^e ± 4.726
UNOX	2	44.64 ^d ± 2.332
	5	48.78 ^d ± 3.268
	10	60.66 ^b ± 4.205
MILD-OX	2	64.88 ^b ± 1.670
	5	63.86 ^b ± 1.161
	10	75.20 ^a ± 2.230
HIGH-OX	2	55.72 ^c ± 0.609
	5	65.47 ^b ± 3.869
	10	79.08 ^a ± 1.030

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.6 ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมสารสกัดจากไบโหม่อน ที่ความเข้มข้นและระดับออกซิเดชันแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ปริมาณสารสกัด (%)	ความสามารถในการละลายน้ำ (%)
Control	0	69.88 ^a ± 5.921
UNOX	2	50.73 ^b ± 1.725
	5	45.80 ^{bc} ± 4.124
	10	43.66 ^{bc} ± 1.845
MILD-OX	2	45.89 ^{bc} ± 1.217
	5	43.46 ^{bc} ± 0.431
	10	40.13 ^c ± 2.445
HIGH-OX	2	45.23 ^{bc} ± 0.020
	5	43.38 ^{bc} ± 2.801
	10	40.91 ^c ± 3.732

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภารัตน์ แสงเนตร เกิดเมื่อวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดสระแก้ว สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2553

รายการสิ่งตีพิมพ์และเผยแพร่

Sangnate, S., Duangmal, K. and Mahawanich, T. 2013. Mechanical and moisture barrier properties of soy protein isolate film incorporated with phenolic-containing extracts from mulberry leaves. Proceedings of the Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON) 2013. The Tide Resort, Chon Buri, Thailand. January 23-25.