

การตัดแปรรูปฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองด้วยกรดฟีนอลิกและการปลดปล่อยเชิงควบคุม  
ของสารประกอบตัวแบบและสารยับยั้งจุลินทรีย์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2559  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MODIFICATION OF SOY PROTEIN FILM USING PHENOLIC ACIDS AND  
ITS CONTROLLED RELEASE OF MODEL COMPOUNDS AND ANTIMICROBIAL AGENT

Mr. Teerapat Tangsomboon



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตัดแปรรูปฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองด้วยกรดฟีนอลิกและการปลดปล่อยเชิงควบคุมของสารประกอบตัวแบบและสารยับยั้งจุลินทรีย์
โดย	นายธีรภัทร์ ตั้งสมบุญ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบริหารธุรกิจ

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประภคิตชัยวัฒนา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

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

ธีรภัทร์ ตั้งสมบุรณ์ : การตัดแปรฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองด้วยกรดพีนอลิกและการปลดปล่อยเชิงควบคุมของสารประกอบตัวแบบและสารยับยั้งจุลินทรีย์ (MODIFICATION OF SOY PROTEIN FILM USING PHENOLIC ACIDS AND ITS CONTROLLED RELEASE OF MODEL COMPOUNDS AND ANTIMICROBIAL AGENT) อ.ที่ปริญญานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช, อ.ที่ปริญญานิพนธ์ร่วม: ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์, 98 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมกรดพีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและการปลดปล่อยเชิงควบคุมของสารประกอบตัวแบบและสารยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์มดังกล่าว ในขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาผลของชนิด สถานะออกซิเดชัน และความเข้มข้นของกรดพีนอลิก โดยแปรชนิดของกรดพีนอลิกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิกและกรดแทนนิก แปรสถานะออกซิเดชันของกรดพีนอลิกเป็น 2 สถานะ ได้แก่ ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ และแปรความเข้มข้นของกรดพีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าการเติมกรดพีนอลิกทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิก นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ และโดยทั่วไปความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดพีนอลิกเพิ่มขึ้น สมบัติเชิงกลที่ดีขึ้นนี้เป็นผลมาจากการเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยกรดพีนอลิกซึ่งยืนยันโดยรูปแบบของแถบโปรตีนที่ศึกษาโดยใช้ SDS-PAGE ในตัวอย่างที่ศึกษาพบว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์มีความต้านทานแรงดึงขาด (2.34 เมกะพาสคาล) และการยึดตัวถึงจุดขาด (322.59%) สูงสุด ซึ่งสูงกว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เป็นตัวอย่างควบคุม 1.03 และ 114.7% ตามลำดับ การเติมกรดพีนอลิกทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น ในขณะที่ความสามารถในการละลายน้ำและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลง ฟิล์มที่ตัดแปรด้วยกรดพีนอลิกมีความโปร่งแสงและค่า  $L^*$  ลดลง ในขณะที่  $+a^*$  และ  $+b^*$  มีค่าสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามุมสัมผัสมีค่าลดลงโดยมีค่าเข้าใกล้มุมสัมผัสของสีเหลือง-ส้มและความเข้มข้นสีมีค่าสูงขึ้น สำหรับพฤติกรรมการศึกษาความชื้นของฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าฟิล์มมีพฤติกรรมการศึกษาความชื้นแบบ type II และวอเตอร์แอกทีวิตีมีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ในขั้นตอนที่สองเป็นการศึกษารูปแบบการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ แปรชนิดของสารประกอบตัวแบบตามน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ ทริปแฟนบูล (961 ดาลตัน) FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) โดยเติมทริปแฟนบูลที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรของสารละลายฟิล์ม และ FITC-dextran ทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรของสารละลายฟิล์ม ศึกษาการปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยแปรภาวะของตัวกลางทำละลายเป็น 2 ภาวะ ได้แก่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิเนียม (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสารประกอบตัวแบบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถูกปลดปล่อยในปริมาณที่มากกว่าและอัตราที่เร็วกว่าสารประกอบตัวแบบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง โดยร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดของทริปแฟนบูล FITC-Dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-Dextran (70 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 59.0, 47.7 และ 32.5 ตามลำดับ และในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิเนียม (พีเอช 7.4) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 59.5, 57.6 และ 36.0 ตามลำดับ โดยสารประกอบตัวแบบทั้งสามชนิดมีรูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาที่แตกต่างกัน ในขั้นตอนที่สามเป็นการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ (โซเดียมแลกเตต) โดยแบ่งการทดลองเป็น 5 ทริตเมนต์ ได้แก่ (1) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม (C) (2) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง (S) (3) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยกรดพีนอลิก (กรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์) (SP) (4) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเตต (SL) และ (5) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยกรดพีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเตต (SPL) ติดตามการเปลี่ยนแปลงของ total viable count, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่า SP, SL และ SPL ซึ่งเติมกรดแทนนิกและ/หรือโซเดียมแลกเตตมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดย total viable count และ *E. coli* มีปริมาณลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า SL และ SPL ซึ่งเติมโซเดียมแลกเตตสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ได้

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5671988723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: PROTEIN FILM / ANTIMICROBIAL AGENT / CONTROLLED RELEASE / PHENOLIC ACIDS

TEERAPAT TANGSOMBOON: MODIFICATION OF SOY PROTEIN FILM USING PHENOLIC ACIDS AND ITS CONTROLLED RELEASE OF MODEL COMPOUNDS AND ANTIMICROBIAL AGENT. ADVISOR: ASST. PROF.THANACHAN MAHAWANICH, Ph.D., CO-ADVISOR: SIRIMA PUANGPRAPHANT, Ph.D., 98 pp.

The objectives of this study were to investigate the effect of phenolic acid addition on properties of soy protein isolate film and to monitor the controlled release of model compounds and antimicrobial agent from such film. In the first part of the study, the effect of type, oxidation state and concentration of phenolic acids was examined. Gallic and tannic acids, either oxidized or unoxidized, were added to the film-forming solution at three different levels (1.3, 2.6 and 4.0 mM). Tensile strength and elongation at break of the phenolic-added films significantly increased ( $p \leq 0.05$ ) as compared to the control. Tannic-added films exhibited greater tensile strength and elongation at break than those with gallic acid. Films added with oxidized phenolic acid demonstrated higher tensile strength and elongation at break than those with unoxidized phenolic acid. In general, tensile strength and elongation at break tended to increase with increasing phenolic concentration. The improvement in mechanical properties was a result of phenolic-induced protein cross-linking, as confirmed by the protein pattern investigated using SDS-PAGE. Among the film samples studied, the film added with 4.0 mM oxidized tannic acid possessed the highest tensile strength (2.34 MPa) and elongation at break (322.5%), which were 1.03 and 114.7% greater than those of the control. Phenolic addition produced a film with more hydrophobic surface while water solubility and water vapor permeability became decreasing. Upon phenolic acid addition, transparency and  $L^*$  decreased while  $+a^*$  and  $+b^*$  increased. Hue angle became decreasing, approaching a value representing yellow-orange, while chroma was found to increase. Regarding to moisture sorption behavior, the film containing 4.0 mM oxidized tannic acid displayed type II isotherm. Water activity significantly affected tensile strength and elongation at break of the film sample ( $p \leq 0.05$ ). In the second part of this research, release profile of model compounds from the film containing 4.0 mM oxidized tannic acid was monitored. Model compounds with different molecular weight, namely trypan blue (961 Da), FITC-dextran (4 kDa) and FITC-dextran (70 kDa) were used in the study. Trypan blue was added at 1 mg/100 ml of film-forming solution while the FITC-dextrans were added at 10 mg/100 ml of film-forming solution. Time-release profile of the model compounds was monitored in two different dissolution medium conditions, i.e., phosphate buffer (pH6.0) at 4 °C and phosphate-buffered saline (pH7.4) at 37 °C. It was found that the lower the molecular weight of model compound, the greater the amount released and the greater the release rate. Percent maximum release of trypan blue, FITC-dextran (4 kDa) and FITC-dextran (70 kDa) were equal to 59.0, 47.7 and 32.5 in phosphate buffer (pH6.0) at 4 °C and 59.5, 57.6 and 36.0 in phosphate-buffered saline (pH7.4) at 37 °C. The model compounds with different molecular weight demonstrated different time-release profile. In the last part of this study, the films, with or without antimicrobial agent (sodium lactate) was applied to ground pork patties and investigated for their antimicrobial activity. A total of five treatments was used in this study: (1) ground pork patties without wrapping (C), (2) ground pork patties wrapped with soy protein film (S), (3) ground pork patties wrapped with phenolic-added soy protein film (film containing 4.0 mM oxidized tannic acid) (SP), (4) ground pork patties wrapped with sodium lactate-added soy protein film (SL), and (5) ground pork patties with tannic- and sodium lactate-added soy protein film (SPL). Total viable counts, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. were monitored during 12-day storage at 4 °C. It was found that SP, SL and SPL which were added with tannic acid and/or sodium lactate exhibited antimicrobial activity. Total viable counts and *E. coli* were lower in number in those treatments. Moreover, sodium lactate-containing SL and SPL also demonstrated antimicrobial activity against *Salmonella* spp.

Department: Food Technology

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีโดยความกรุณาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี  
ยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ  
อาจารย์ ดร. ศิริมา พ่วงประพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้  
คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการแก้ไขปัญหาและอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนดูแลเอาใจใส่และ  
แก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์อันประกอบด้วย  
รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล  
และ รองศาสตราจารย์ ดร. วรางคณา สมพงษ์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำพร้อมข้อเสนอแนะต่างๆ  
อันเป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความ  
อนุเคราะห์การใช้เครื่องมือวัดมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม รวมทั้ง รองศาสตราจารย์  
ดร. วาณี ชนเห็นชอบ และ อาจารย์ ดร. ภัทรินทร์ ลีลาภวิวัฒน์ สำหรับคำแนะนำในการใช้  
เครื่องมือดังกล่าว

ขอขอบคุณ ดร.บุรฉัตร ศรีทองแท้ คุณอัญชญา อินสวาสดี คุณนันทพร โพธิ์คุณ  
คุณนันทชา ธนธรรวากุล และ คุณบัณฑิตา จิตตประไพ สำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับการวิเคราะห์  
สมบัติของฟิล์มและการวิเคราะห์โปรตีนรวมถึงคำแนะนำในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณครูและอาจารย์ทุกท่าน และขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อนนิสิตภาควิชา  
เทคโนโลยีทางอาหารที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำมาโดยตลอด รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชา  
เทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลา  
ทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย คุณยาย คุณลุง และญาติพี่น้องที่คอย  
สนับสนุนและเป็นกำลังใจมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 ฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (bio-degradable film).....	3
2.2 ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง.....	4
2.2.1 องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลือง.....	4
2.2.2 การเกิดเป็นฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลือง.....	5
2.3 การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน.....	6
2.3.1 วิธีทางกายภาพ.....	6
2.3.1.1 การฉายรังสี.....	6
2.3.1.2 การใช้ความร้อน.....	7
2.3.2 วิธีทางชีวเคมี.....	9
2.4 สารประกอบพีนอลิก.....	12
2.5 วัสดุบรรจุภัณฑ์แอกทีฟ (active packaging material) และการปลดปล่อยแบบควบคุม ....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
3.1 วัสดุดิบและสารเคมี.....	19
3.2 อุปกรณ์.....	21

3.3	ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	22
3.3.1	การศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด.....	22
3.3.1.1	ความหนา.....	26
3.3.1.2	สมบัติเชิงกล.....	26
3.3.1.3	รูปแบบของแถบโปรตีน.....	26
3.3.1.4	สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ.....	30
3.3.1.5	ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility).....	31
3.3.1.6	มุมสัมผัส (contact angle) ระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	31
3.3.1.7	ความโปร่งแสง.....	31
3.3.1.8	ค่าสี.....	32
3.3.1.9	ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง.....	32
3.3.1.10	เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น (moisture sorption isotherm) .....	32
3.3.2	การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบต่อรูปแบบการปลดปล่อย แบบควบคุมของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ดัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก.....	33
3.3.3	การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่ ทำหน้าที่เป็นตัวพาสารยับยั้งจุลินทรีย์.....	34
3.3.4	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ .....	35
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	36
4.1	ผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด .....	36
4.1.1	ความหนา.....	36
4.1.2	สมบัติเชิงกล .....	37
4.1.3	รูปแบบของแถบโปรตีน .....	42
4.1.4	สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ .....	44
4.1.5	ความสามารถในการละลายน้ำ.....	45



4.1.6 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม.....	46
4.1.7 ความโปร่งแสง.....	49
4.1.8 ค่าสี.....	50
4.1.9 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง.....	53
4.1.9 รูปแบบของแถบโปรตีน.....	55
4.1.10 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น.....	57
4.2 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบต่อรูปแบบการปลดปล่อยแบบควบคุมของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก.....	59
4.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาสายยับยั้งจุลินทรีย์.....	63
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	70
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก ก ข้อมูลเฉพาะของผลิตภัณฑ์.....	83
ภาคผนวก ข กราฟเทียบมาตรฐาน.....	84
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง.....	89
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	98

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับเตรียมสารละลายฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด .....	24
ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE .....	29
ตารางที่ 4.1 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์ และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	37
ตารางที่ 4.2 ค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์ และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน .....	51
ตารางที่ 4.4 ปริมาณการปลดปล่อยสูงสุดของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ .....	60
ตารางที่ 4.5 Total viable count ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน .....	65
ตารางที่ 4.6 <i>Escherichia coli</i> ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน .....	66
ตารางที่ 4.7 <i>Staphylococcus aureus</i> ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน .....	67
ตารางที่ 4.8 <i>Salmonella</i> spp. ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน .....	68
ตารางที่ ค.1 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน.....	89
ตารางที่ ค.2 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน .....	90
ตารางที่ ค.3 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน .....	91
ตารางที่ ค.4 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน .....	92

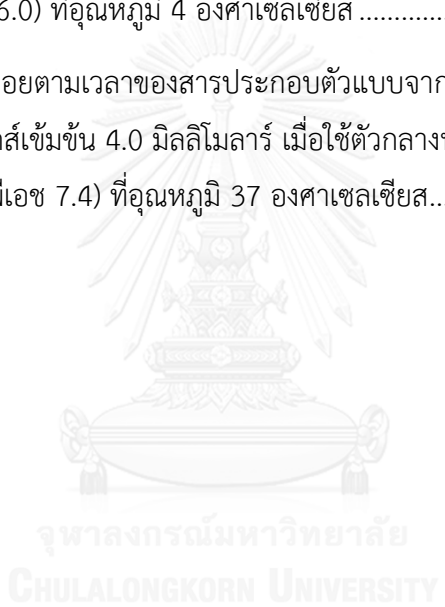
ตารางที่ ค. 5 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก  
และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ..... 93

ตารางที่ ค.6 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก  
และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ..... 94

ตารางที่ ค.7 พฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง  
สกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ..... 95

ตารางที่ ค.8 การปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่  
เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลาย  
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ..... 96

ตารางที่ ค.9 การปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่  
เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลาย  
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... 97



## สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 (ก) ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไฮดรอล-ไดซัลไฟด์ (ข) การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ ของพอลิเพปไทด์.....	8
รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์และกรดอะมิโนของโปรตีน (โซเดียมเคซีเนต, NaCAS).....	11
รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาของกรดฟีนอลิกกับหมู่อะมิโนที่เป็นโซ่ข้างของสายพอลิเพปไทด์.....	14
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดตัวอย่างควบคุม.....	23
รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก .....	25
รูปที่ 3.3 รูปร่างและขนาดของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อน.....	35
รูปที่ 4.1 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลูติกและกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ( $p < 0.05$ ).....	38
รูปที่ 4.2 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลูติกและกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ).....	38
รูปที่ 4.3 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลูติก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ).....	44
รูปที่ 4.4 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลูติก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ).....	46
รูปที่ 4.5 รูปร่างของหยดน้ำที่ผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลูติกและกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน .....	48
รูปที่ 4.6 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดกลูติก และกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ).....	49

รูปที่ 4.7 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	
ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) .....	50
รูปที่ 4.8 ลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน .....	52
รูปที่ 4.9 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า ..	54
รูปที่ 4.10 (บน) รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) และฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (G1.3, G2.6 และ G4.0) และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิก ที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (T1.3, T2.6 และ T4.0) และ (ล่าง) รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) และฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (OG1.3, OG2.6 และ OG4.0) และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (OT1.3, OT2.6 และ OT4.0) โดย M คือ molecular weight marker .....	56
รูปที่ 4.11 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ .....	58
รูปที่ 4.12 รูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบที่ของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ (บน) เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ (ล่าง) เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส .....	62
รูปที่ ข.1 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของทริปแพนบลูในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส .....	84
รูปที่ ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส .....	85

รูปที่ ข.3 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส .....	85
รูปที่ ข.4 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของทริปแฟนบลู ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส .....	86
รูปที่ ข.5 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	86
รูปที่ ข.6 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....	87
รูปที่ ข.7 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry .....	88

## บทที่ 1

### บทนำ

จากความพยายามลดปัญหาสิ่งแวดล้อมและการกำจัดขยะในปัจจุบัน การใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้เป็นทางเลือกเพื่อทดแทนการใช้วัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจากพอลิเมอร์ฐานปิโตรเลียม (petroleum-based polymer) ซึ่งย่อยสลายได้ยาก (González et al., 2011) พลาสติกที่ผลิตจากพอลิเมอร์ชีวภาพโดยทั่วไปนับว่าเป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากสามารถย่อยสลายได้ง่าย ในปัจจุบันมีแหล่งของโปรตีนมากมายที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตฟิล์ม โปรตีนจากถั่วเหลืองเป็นหนึ่งในทางเลือกที่มีศักยภาพ เนื่องจากโปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติในการเกิดฟิล์มได้ (Su et al., 2010) โดยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติเด่นในด้านการต้านทานการซึมผ่านของออกซิเจน ไอสารอินทรีย์ และไขมัน แต่มีข้อจำกัดในด้านความแข็งแรงเชิงกลและการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำ (Chambi and Grosso, 2006) ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองยังมีการใช้งานค่อนข้างจำกัด

เนื่องจากข้อจำกัดในด้านสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองนี้จึงได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงความแข็งแรงโดยการส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนมากขึ้น ในระยะที่ผ่านมาตัวเชื่อมข้ามโปรตีน (protein cross-linker) ที่ได้รับความนิยม ได้แก่ สารกลุ่มแอลดีไฮด์ เช่น กลูทาราลดีไฮด์ และฟอร์มัลดีไฮด์ เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการเชื่อมข้ามโปรตีน อย่างไรก็ตามได้มีการตระหนักถึงความเป็นพิษของแอลดีไฮด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อนำมาใช้ในฟิล์มที่นำมาใช้กับอาหาร จึงมีความพยายามในการใช้ตัวเชื่อมข้ามอื่นที่มีความปลอดภัยสูงกว่า สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารกลุ่มหนึ่งซึ่งมีความสามารถเชื่อมข้ามโปรตีน โดยพบทั่วไปตามธรรมชาติ และมีความเป็นพิษต่ำ จึงมีศักยภาพในการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน ทั้งนี้ความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาและการเชื่อมข้ามโมเลกุลโปรตีนของสารประกอบฟีนอลิกอาจแตกต่างกันได้ ขึ้นกับชนิดและสถานะออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกนั้นๆ (Rawel et al., 2002)

ฟิล์มนอกจากจะใช้ในแง่การเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ทำหน้าที่ปกป้องผลิตภัณฑ์ภายในแต่เพียงอย่างเดียวแล้ว (passive packaging material) ยังอาจพัฒนาให้เป็นตัวพาและปลดปล่อยสารต่างๆ เช่น สารให้กลิ่นรส สารยับยั้งออกซิเดชัน และสารยับยั้งจุลินทรีย์ บรรจุภัณฑ์แอกทีฟนี้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน (Mandal et al., 2009) ซึ่งรูปแบบการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (release profile) นี้มีความสำคัญต่อการนำไปใช้งานเพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ฟิล์มที่เติมสารยับยั้ง

จุลินทรีย์ได้ถูกนำมาประยุกต์เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารโดยยับยั้งการเจริญของทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้  
อาหารเสื่อมเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค (Appendini and Hotchkiss, 2002)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิด สถานะออกซิเดชัน และความเข้มข้นของ  
สารประกอบฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง และเพื่อศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของ  
สารประกอบตัวแบบ (model compound) ต่อรูปแบบการปลดปล่อยแบบควบคุม (controlled  
release) ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งเพื่อศึกษาการ  
ปลดปล่อยแบบควบคุมและฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนของฟิล์มโปรตีนถั่ว  
เหลืองที่ตัดแปรด้วยฟีนอลิกและเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์





## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 พิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (bio-degradable film)

ฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพนับว่าเป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม สมบัติของฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช ความชื้น ออกซิเจน และแสง ทำให้ฟิล์มสามารถถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ และไม่ก่อให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม (Ahmadi et al., 2012) พอลิเมอร์ธรรมชาติหลายชนิดสามารถนำมาประยุกต์เพื่อผลิตเป็นฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เช่น แอลจีเนต เพกทิน คาราจีแนน สตาร์ช เจลาติน เคซีน เวย์โปรตีน รวมทั้งโปรตีนถั่วเหลือง ฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพถูกนำมาใช้เพื่อควบคุมการซึมผ่านของสารต่างๆ เช่น ไอน้ำ ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ไขมัน และสารที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นรส (Ghanbarzadeh and Oromiehi, 2008) นอกจากนี้ฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพยังมีสมบัติให้ความคงตัว (integrity) แก่ผลิตภัณฑ์ ป้องกันหรือชะลอการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น และรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ถูกห่อหุ้มอยู่ภายใน (Ghanbarzadeh et al., 2007)

พอลิเมอร์ชีวภาพจากธรรมชาติที่นิยมนำมาพัฒนาเป็นฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และลิพิด

พอลิแซ็กคาไรด์ที่นิยมนำมาใช้ผลิตฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้แก่ เซลลูโลสและเซลลูโลสดัดแปร สตาร์ชและสตาร์ชดัดแปร พลาัวร์ เพกทิน ไคโทซาน แอลจีเนต คาราจีแนน และกัมอาราบิก (Mariniello et al., 2003; Dias et al., 2010; Kanatt et al., 2012; Harper et al., 2013; Ma et al., 2013; Pelissari et al., 2013; Soazo et al., 2013) โครงสร้างทางเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและอนุพันธ์ซึ่งมีสมบัติชอบน้ำ ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการต้านทานการซึมผ่านของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์สูง มีความแข็งแรงปานกลาง ในขณะที่มีความสามารถในการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ

ฟิล์มโปรตีนมีสมบัติเด่นในด้านการต้านทานการซึมผ่านของไขมัน ออกซิเจนและแก๊สอื่นๆ รวมทั้งไอของสารอินทรีย์ มีความแข็งแรงปานกลางและมีข้อจำกัดในด้านการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำเช่นเดียวกับฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ โครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นกรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีหมู่ข้าง (side group) ที่แตกต่างกัน จากสมบัติดังกล่าวส่งผลให้โปรตีนสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้ด้วยพันธะทางเคมีต่างๆ ได้แก่

พันธะโควาเลนต์ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไอออนิก อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ โดยโปรตีนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตฟิล์ม ได้แก่ โปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนถั่วลิสง ซีน (โปรตีนข้าวโพด) กลูเตน เวย์โปรตีนและเคซีน เจลาติน และโปรตีนไข่ขาว (Kunte et al., 1997; Lim et al., 1998; Rayner et al., 2000; Hernández-Muñoz et al., 2004; Ghanbarzadeh and Oromiehi, 2008; Ma et al., 2013; Soazo et al., 2013)

สำหรับลิปิดมักไม่ใช้ผลิตเป็นฟิล์มโดยตรง แต่จะใช้เป็นสารเคลือบย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (bio-degradable coating) เพื่อป้องกันการเสียดสีของอาหารในระหว่างการขนส่ง หรืออาจใช้ร่วมกับพอลิแซ็กคาไรด์หรือโปรตีนในการผลิตฟิล์มคอมโพสิต (composite film) เพื่อปรับปรุงสมบัติการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำ เนื่องจากลิปิดมีขั้วต่ำ (low polarity) จึงมีสมบัติในการต้านทานการซึมผ่านของความชื้นและสารมีขั้วอื่นๆ ได้ดี ลิปิดที่นำมาใช้ในการผลิตฟิล์มและสารเคลือบ ได้แก่ น้ำมันและไขมันจากพืชและสัตว์ แวกซ์และแล็ก (lac) รวมทั้งน้ำมันหอมระเหย (Kemper and Fennema, 1984; Gontard et al., 1994; McHugh and Krochta, 1994; Shellhammer and Krochta, 1997; Yang and Paulson, 2000; Morillon et al., 2002; Peroval et al., 2002; Fernandez et al., 2006; Han et al., 2006; Perez-Mateos et al., 2007; Bourtoom and Chinnan, 2009; Monedero et al., 2009; Kokoszka et al., 2010; Wu et al., 2010; Zahedi et al., 2010)

## 2.2 ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง

โปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนที่มีศักยภาพในการนำมาพัฒนาเป็นฟิล์มย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติเด่นในด้านการต้านทานการซึมผ่านของออกซิเจน ไอสารอินทรีย์ ไขมันและน้ำมัน แต่มีจุดด้อยในด้านความแข็งแรงเชิงกลและการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำ (Chambi and Grosso, 2006) ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองยังมีข้อจำกัดในการใช้งานอยู่

### 2.2.1 องค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองนับว่าเป็นแหล่งโปรตีนอาหารที่สำคัญ เนื่องจากเมล็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากถึง 40% โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่หลากหลาย ได้แก่ สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สมบัติในการอุ้มน้ำ การให้ความหนืดและความคงตัว การเกิดโฟม การเกิดเป็นเจล และการเกิดเป็นฟิล์ม

โปรตีนถั่วเหลืองสามารถแยกออกเป็นส่ว (fraction) ตามอัตราการตกตะกอน (sedimentation rate) ได้เป็น 4 ส่วน ได้แก่ 2s 7s 11s และ 15s โดยส่วน 2s และ 7s

ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ในขณะที่ส่วน 11s และ 15s ประกอบด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียว (Wijeratne, 1993)

โปรตีนส่วน 2s มีปริมาณประมาณ 22% ของโปรตีนทั้งหมด ประกอบด้วยสารยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) ไซโตโครม-ซี และโปรตีนที่ยังระบุชนิดไม่ได้ โปรตีนส่วน 7s มีปริมาณประมาณ 37% ของโปรตีนทั้งหมด ประกอบด้วยเฮมแอกกลูตินิน 4 ชนิด ไลพอกซีจีเนส 4 ชนิด เบต้า-แอมิเลส และโกลบูลินชนิด 7s ซึ่งเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเบต้า-คอนโกลูซินิน เบต้า-คอนโกลูซินินเป็นโกลโคโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 180,000-210,000 ดาลตัน และมีปริมาณประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนส่วน 7s โปรตีนส่วน 11s มีปริมาณประมาณ 30% ของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนส่วนนี้ประกอบด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียว ได้แก่ โกลบูลินชนิด 11s ซึ่งเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าโกลูซินิน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 350,000 ดาลตัน โปรตีนส่วนสุดท้ายได้แก่ ส่วน 15s มีปริมาณประมาณ 11% ของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนส่วนนี้นักวิจัยคาดว่าเป็พอลิเมอร์ของโกลูซินิน (Wijeratne, 1993)

จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนถั่วเหลืองมีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ โกลูซินิน และเบต้า-คอนโกลูซินิน โดยโปรตีนทั้งสองนี้เป็นโกลบูลาร์โปรตีน โครงสร้างของโปรตีนถั่วเหลืองประกอบด้วยหมู่เคมีที่เป็นหมู่ข้างที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (polar and non-polar side group) จึงสามารถเกิดพันธะและอันตรกิริยาภายในโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลได้ (intra- and inter-molecular interaction) หลายชนิด ได้แก่ พันธะโควาเลนต์ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไอออนิก อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ โดยพันธะและอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นกับโมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองนั้นจะส่งผลต่อสมบัติต่างๆ ของฟิล์มโปรตีนได้ (Zhang et al., 2001)

ในแง่ของความสามารถในการละลาย พีเอชมีความสำคัญต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนถั่วเหลืองเช่นเดียวกับโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยโปรตีนถั่วเหลืองมีจุดไอโซอิเล็กทริกอยู่ในช่วงพีเอชประมาณ 4.2-4.6 (Wijeratne, 1993) ซึ่งที่จุดไอโซอิเล็กทริกนี้โปรตีนจะมีประจุรวมเป็นศูนย์และมีความสามารถในการละลายต่ำที่สุด และเมื่อพีเอชมีค่าห่างออกจากจุดไอโซอิเล็กทริก ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามที่พีเอชต่ำมากๆ หรือสูงมากๆ ได้แก่ พีเอชต่ำกว่า 2 หรือสูงกว่า 9 จะส่งผลให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติได้ (Wijeratne, 1993)

## 2.2.2 การเกิดเป็นฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลือง

โปรตีนถั่วเหลืองเป็นโปรตีนอาหารชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นฟิล์มย่อยสลายได้และฟิล์มบิโภาคได้ โดยโปรตีนมีหมู่เคมีที่สามารถเกิดอันตรกิริยากันทั้งระหว่างโมเลกุลและภายในโมเลกุล (inter- and intra-molecular interaction) (Park et al., 2002) โปรตีนในสภาพ

ธรรมชาติซึ่งอยู่ในภาวะแวดล้อมที่เป็นน้ำ (aqueous environment) จะมีการจัดเรียงตัวของสายพอลิเพปไทด์ในลักษณะที่กรดอะมิโนที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic amino acid) จะมีตำแหน่งอยู่ที่ด้านนอกของโครงรูป (conformation) ของโปรตีน ในขณะที่กรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) จะมีตำแหน่งอยู่ที่แกนด้านใน (core) ของโครงรูป ในการผลิตฟิล์มเพื่อให้ได้โครงสร้างฟิล์มที่มีความเสถียรจึงจำเป็นต้องดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนตามธรรมชาติบางส่วนเพื่อเอื้อต่อการเกิดอันตรกิริยาของหมู่เคมีต่างๆ ในโมเลกุลโปรตีน สำหรับการผลิตฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองในขั้นตอนแรกต้องมีการให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนถั่วเหลืองเพื่อให้โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน (partially denatured) โดยความร้อนจะทำให้โครงรูปของโปรตีนเกิดการคลายตัวออก (unfolding) ทำให้หมู่ซัลไฟไฮไดรลและหมู่ที่ไม่ชอบน้ำซึ่งเดิมมีตำแหน่งอยู่ที่ด้านในของโครงรูปสามมิติปรากฏขึ้นที่ด้านนอกและสามารถเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกกับหมู่เคมีภายในสายพอลิเพปไทด์เดียวกันหรือหมู่เคมีของพอลิเพปไทด์สายอื่นได้ นอกจากนี้ในขั้นตอนการทำแห้ง โปรตีนถั่วเหลืองในสารละลายฟิล์มจะเกิดอันตรกิริยากันได้ด้วยพันธะไดซัลไฟด์และอันตรกิริยานีออน-โควาเลนต์อื่นๆ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก อันตรกิริยาไอออนิก และแรงแวนเดอร์วาลส์ เกิดเป็นโครงสร้างที่เสถียรของฟิล์ม (Liu, 1999)

## 2.3 การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน

ฟิล์มโปรตีนโดยทั่วไปรวมถึงฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีสมบัติเด่นในด้านการต้านทานการซึมผ่านของออกซิเจนและไขมัน แต่ยังคงมีข้อจำกัดสำคัญในด้านสมบัติเชิงกล (Chambi and Grosso, 2006) เพื่อพัฒนาฟิล์มโปรตีนให้สามารถนำไปใช้งานได้อย่างแพร่หลาย จึงต้องมีการปรับปรุงสมบัติเชิงกลโดยการส่งเสริมให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างสายพอลิเพปไทด์ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ วิทยาทายภาพ วิทยาทายชีวเคมี และวิทยาทายเคมี

### 2.3.1 วิทยาทายกายภาพ

การปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองด้วยวิทยาทายกายภาพ ได้แก่ การฉายรังสีและการใช้ความร้อน

#### 2.3.1.1 การฉายรังสี

Fujimori (1965) รายงานว่ารังสีบางชนิดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพันธะเชื่อมข้ามของโปรตีนได้ โดยกรดอะมิโนแอโรมาติก (aromatic amino acid) ได้แก่ ไทโรซีน และเฟนิลอะลานีน มีหมู่ข้างที่สามารถดูดกลืนรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ต และรังสีแกมมา ทำให้

เกิดการรวมตัวกัน (recombination) และเกิดเป็นพันธะเชื่อมข้ามโควาเลนต์ระหว่างสายโปรตีน นอกจากนี้ Galietta et al. (1998) รายงานว่าการฉายรังสีเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนได้ เนื่องจากรังสีสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโน และทำให้เกิดการรวมตัวกัน

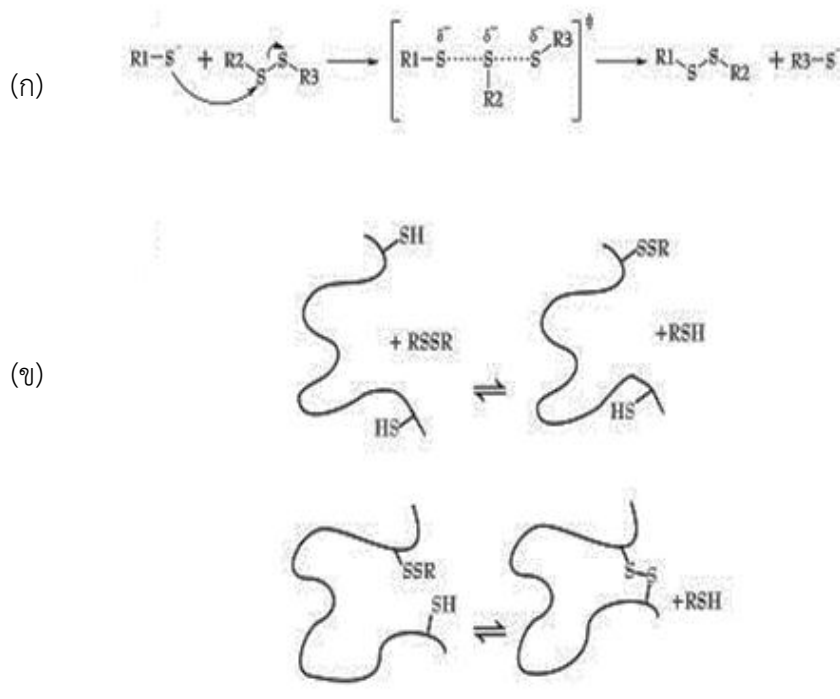
Ressouany et al. (2000) ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาต่อสมบัติของฟิล์มเคซีนต์ ผู้วิจัยรายงานว่า การฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีดูดกลืน (absorbed dose) เท่ากับ 64 กิโลเกรย์ ทำให้ฟิล์มเคซีนต์มีความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ผ่านการฉายรังสี

Salmoral et al. (2000) ศึกษาผลของการฉายรังสีแกมมาต่อสมบัติของฟิล์มจากโปรตีนถั่วเขียวสกัด พลาเวร์ถั่วเขียว โปรตีนถั่วเหลืองสกัด และพลาเวร์ถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาณรังสีดูดกลืนเท่ากับ 50 กิโลเกรย์ พบว่าการฉายรังสีแกมมาทำให้ฟิล์มทั้งสี่ชนิดมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาด (elongation at break) เพิ่มขึ้น ในขณะที่สภาพการให้ซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability) มีค่าลดลง

Sabato et al. (2005) ศึกษาสมบัติของฟิล์มโปรตีนจากปลาไนล (*Oreochromis niloticus*) ที่ผ่านการฉายรังสีแกมมา โดยแปรปริมาณรังสีดูดกลืนเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 25, 50, 100, 150 และ 200 กิโลเกรย์ พบว่าฟิล์มที่ฉายรังสีมีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการฉายรังสี โดยตัวอย่างฟิล์มที่ฉายรังสีที่ระดับปริมาณรังสีดูดกลืน 100 กิโลเกรย์ มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด ในขณะที่การฉายรังสีไม่ส่งผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์ม ( $p > 0.05$ ) ผู้วิจัยสรุปว่าระดับของรังสีแกมมาที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้

### 2.3.1.2 การใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนถือเป็นวิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนได้ (Gennadios et al., 1996; Jangchud and Chinnan, 1999) โดยการใช้ความร้อนเพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนสามารถกระทำได้ 2 วิธี คือ การบ่มสารละลายฟิล์มด้วยความร้อน (heat curing of film-forming solution) และการบ่มแผ่นฟิล์มด้วยความร้อน (heat curing of dry film) Jensen (1959) รายงานว่าการให้ความร้อนแก่โปรตีนในภาวะที่เป็นเบสสามารถส่งเสริมปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไธออล-ไดซัลไฟด์ (thiol-disulfide exchange) ส่งผลให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (รูปที่ 2.1)



รูปที่ 2.1 (ก) ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนไรออล-ไดซัลไฟด์ (ข) การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของพอลิเพปไทด์  
ที่มา: Ágoston et al. (2005)

Gennadios et al. (1996) ศึกษาการบ่มแผ่นฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดด้วยความร้อน โดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 2 ระดับ ได้แก่ 80 และ 90 องศาเซลเซียส และแปรระยะเวลาการบ่มในช่วง 2-24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเพิ่มสูงขึ้นฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้น ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาด สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำและความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) มีค่าลดลง ผู้วิจัยอธิบายว่าอุณหภูมิการบ่มที่สูงกว่าทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนได้มากกว่าและทำให้ฟิล์มที่ได้มีความแข็งแรงมากขึ้น

Jangchud and Chinnan (1999) ศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มโปรตีนถั่วลิสงเข้มข้น (peanut protein concentrate) โดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิการบ่มที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลง

Kim et al. (2002) ศึกษาการบ่มแผ่นฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 60, 72.5 และ 85 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มสูงขึ้น พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มด้วยความร้อน ในทำนองเดียวกัน Hernández-Muñoz et al. (2004) ศึกษาผลของการบ่มแผ่นฟิล์มกลูเตนินด้วยความร้อน โดยแปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 6 ระดับ ได้แก่ 40, 55, 70, 85, 95 และ 115 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มสูงขึ้น พิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น แต่มีการยืดตัวถึงจุดขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

นลินทิพย์ คงแก้ว (2554) ศึกษาการบ่มสารละลายฟิล์มด้วยความร้อน โดยตัวอย่างฟิล์มที่ศึกษาได้แก่ฟิล์มอิมัลชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดและน้ำมันเมล็ดในปาล์มไฮโดรจีเนต (hydrogenated palm kernel oil) แปรอุณหภูมิการบ่มเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 70, 80 และ 85 องศาเซลเซียส และแปรระยะเวลาการบ่มเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 30, 45 และ 60 นาที ผู้วิจัยพบว่าการบ่มสารละลายฟิล์มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ส่งผลให้ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงสุด อย่างไรก็ตามสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำและความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มมีค่าสูงขึ้น

### 2.3.2 วิธีทางชีวเคมี

วิธีทางชีวเคมีที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน ได้แก่ การใช้เอนไซม์ที่เร่งการเกิดพันธะเชื่อมข้ามของโปรตีน เช่น เพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) และ แทรนส์กลูตามิเนส (EC 2.3.2.13)

เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของหน่วยย่อยไทโรซีนบนสายเพปไทด์ของโปรตีน ทำให้เกิดการควบแน่น (condensation) ของวงแอมโรมาติก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดเมอร์ ไตรเมอร์ หรือเตตระเมอร์ ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของไทโรซีนในลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) และความยาวของสายเพปไทด์ของโปรตีน (Michon et al., 1997)

Stuchell and Krochta (1994) ศึกษาผลของการเติมเพอร์ออกซิเดสจากฮอร์สแรดิชต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยใช้อัตราส่วนของเพอร์ออกซิเดสต่อโปรตีนเท่ากับ 1:1000 โดยน้ำหนัก พบว่าการเติมเพอร์ออกซิเดสทำให้ฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้น ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเพอร์ออกซิเดส อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ตั้งข้อสังเกตในการใช้เพอร์ออกซิเดสว่านอกจากเพอร์ออกซิเดสจะช่วยให้เกิดการเชื่อมข้ามระหว่างโปรตีนแล้ว ยังอาจทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติได้ด้วย

แทรนส์กลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มแทรนส์เฟอเรส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิลของแกมมาคาร์บอกซีเอไมด์ของหน่วยย่อยกลูตามีนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้หมู่เอซิล (acyl donor) ไปยังหมู่อะมิโนปฐมภูมิหรือเอพิซิลอน-อะมิโนของหน่วยย่อยไลซีนซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่เอซิล (acyl acceptor) เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์เชื่อมข้ามระหว่างหน่วยย่อยทั้งสองของสายเพปไทด์ (Ha and Luchi, 2003)

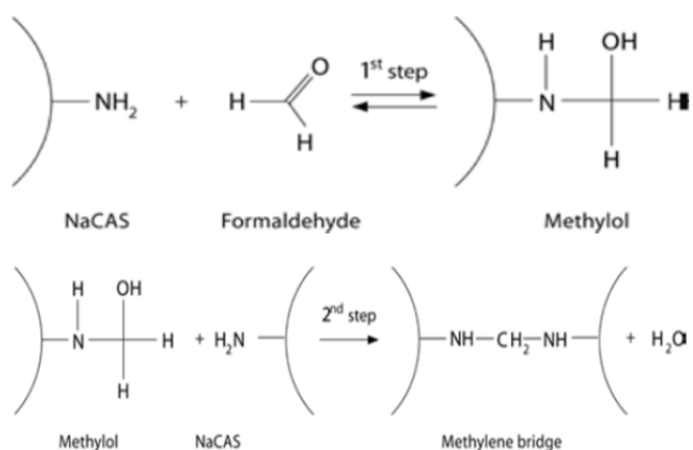
Jiang et al. (2007) ศึกษาผลของการเติมแทรนส์กลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยแปรความเข้มข้นของแทรนส์กลูตามิเนสตั้งแต่ 4-60 หน่วย/กรัมโพรตีน พบว่าการเติมแทรนส์กลูตามิเนสในช่วงความเข้มข้น 4-10 หน่วย/กรัมโพรตีน ทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) อย่างไรก็ตามการใช้แทรนส์กลูตามิเนสที่ความเข้มข้นสูงกว่า 20 หน่วย/กรัมโพรตีน กลับทำให้ฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดลดลง ในส่วนของการยึดตัวถึงจุดขาดพบว่ามีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของแทรนส์กลูตามิเนสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมแทรนส์กลูตามิเนสทำให้สมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น โดยเห็นได้จากมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มที่เพิ่มขึ้น

Su et al. (2007) ศึกษาผลของการเติมแทรนส์กลูตามิเนสต่อสมบัติของฟิล์ม 3 ชนิด ได้แก่ ฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัด ฟิล์มคอมโพสิต (composite film) ของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดและฟลาร์ถั่วเหลือง และฟิล์มคอมโพสิตของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดและเวย์โพรตีน โดยแปรความเข้มข้นของแทรนส์กลูตามิเนสเป็น 0-20 หน่วย/กรัมโพรตีน พบว่าความเข้มข้นของแทรนส์กลูตามิเนสที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มทั้งสามชนิดมีค่าสูงขึ้น

### 2.3.3 วิธีทางเคมี

การใช้สารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมข้ามโพรตีนเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโพรตีน ที่ผ่านมาสารเคมีที่นิยมใช้เป็นตัวเชื่อมข้าม ได้แก่ สารในกลุ่มแอลดีไฮด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น ฟอรัมาลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล โดยแอลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเพปไทด์ทำให้เกิดเป็นพันธะเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลและภายในโมเลกุลของโพรตีน (รูปที่ 2.2)





รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์และกรดอะมิโนของโปรตีน (โซเดียมเคซีเนต, NaCAS)

ที่มา: Gueguen *et al.* (1998)

Orliac *et al.* (2002) ศึกษาผลของการเติมแอลดีไฮด์ 3 ชนิด ได้แก่ ฟอร์มัลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนสกัดจากเมล็ดดอกทานตะวัน (sunflower protein isolate) โดยแปรความเข้มข้นของแอลดีไฮด์ตั้งแต่ 1-6% โดยน้ำหนักของของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด พบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมแอลดีไฮด์ โดยที่ความเข้มข้นเท่ากันตัวอย่างฟิล์มที่เติมกลูทาราลดีไฮด์ ฟอร์มัลดีไฮด์ และไกลออกซัล มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้นตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของแอลดีไฮด์สูงกว่า 3% พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดลดลง ผู้วิจัยอธิบายว่าที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมแอลดีไฮด์สามารถทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมข้ามโปรตีนได้ อย่างไรก็ตามหากแอลดีไฮด์มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจเกิดการรวมตัวกันเองของแอลดีไฮด์และทำให้การเชื่อมข้ามโปรตีนลดลง

Hernández-Muñoz *et al.* (2004) ศึกษาผลของแอลดีไฮด์ต่อสมบัติของฟิล์มกลูเตนิน โดยแปรแอลดีไฮด์เป็น 3 ชนิด ได้แก่ ฟอร์มัลดีไฮด์ กลูทาราลดีไฮด์ และไกลออกซัล และแปรความเข้มข้นของแอลดีไฮด์เป็น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 4 และ 8% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมแอลดีไฮด์ โดยฟิล์มที่เติมฟอร์มัลดีไฮด์มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกลูทาราลดีไฮด์และไกลออกซัล ตามลำดับ ส่วนการยืดตัวถึงจุดขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยฟิล์มที่เติม

พอร์มาลดีไฮด์มีการยึดตัวถึงจุดขาดต่ำที่สุด รองลงมาได้แก่ ฟิล์มที่เติมกลูทาราลดีไฮด์และฟิล์มที่เติมไกลอออกซัล ตามลำดับ ในส่วนของสภาพให้ซึมผ่านของไอน้ำพบว่าฟิล์มที่เติมแอลดีไฮด์ทั้งสามชนิดมีสภาพให้ซึมผ่านของไอน้ำใกล้เคียงกันแต่มีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม

แม้ว่าแอลดีไฮด์จะเป็นตัวเชื่อมข้ามโปรตีนที่มีประสิทธิภาพ แต่ข้อจำกัดสำคัญในการนำแอลดีไฮด์มาใช้งานในฟิล์มย่อยสลายได้คือความกังวลเกี่ยวกับความเป็นพิษของแอลดีไฮด์ (Galietta et al., 1998) O'Brien et al. (2005) รายงานว่าแอลดีไฮด์ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ในด้านต่างๆ มากมาย ได้แก่ ความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง โรคตับ โรคเบาหวาน ภาวะความดันโลหิตสูง ภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity) ภาวะภูมิแพ้ของระบบทางเดินหายใจ โรคความเสื่อมทางระบบประสาท (neurodegenerative disease) โรคที่สัมพันธ์กับความชรา (aging-associated disease) ความเป็นพิษต่อตัวอ่อน (embryotoxicity) และความเป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (teratogenicity) จากปัญหาข้างต้นนักวิจัยจึงหันมาสนใจตัวเชื่อมข้ามโปรตีนชนิดอื่นที่มีความปลอดภัยสูงกว่า เช่น สารประกอบฟีนอลิก

#### 2.4 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยวงแหวนแอโรมาติกอย่างน้อย 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ รวมถึงอนุพันธ์ของสารดังกล่าว โดยอาจมีการแทนที่ด้วยหมู่เคมีต่างๆ ในตำแหน่งออร์โธ เมตา หรือพารา บนวงแหวน (O'Connell and Fox, 2001) สารฟีนอลิกหลายชนิดที่พบตามธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้นมีความสามารถในการเกิดอันตรกิริยากับโปรตีน โดยสามารถเกิดอันตรกิริยาทางเคมีชนิดต่างๆ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะโควาเลนต์ (Strauss and Gibson, 2004; Hoque et al., 2011)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถถูกออกซิไดส์ได้เป็นสารประกอบควิโนนซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนและซัลไฟไฮดริลของกรดอะมิโนที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนได้ ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนด้วยพันธะคาร์บอน-ไนโตรเจนและพันธะคาร์บอน-ซัลเฟอร์ (Strauss and Gibson, 2004)

Rawel et al. (2002) ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนถั่วเหลืองกับกรดฟีนอลิก ฟลาโวนและฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ พบว่าสารต่างชนิดกันมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนที่แตกต่างกัน ในแง่การเกิดการเชื่อมข้ามระหว่างโมเลกุลโปรตีน พบว่าฟลาโวนและเอพิเจนินมีความสามารถในการเชื่อมข้ามที่ต่ำ ในขณะที่กรดคลอโรเจนิค กรดแกลลิก เคมเฟอรอล และไมริเซทิน มีความสามารถในการเชื่อมข้ามที่สูงกว่า ส่วนเคอเวเซทินและกรดแคฟเฟอิกมีความสามารถในการเชื่อมข้ามสูงที่สุด นอกจากนี้การออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลิกไปเป็นสารประกอบควิโนน

สามารถเพิ่มความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนได้ ผู้วิจัยเสนอว่าจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซี รวมทั้งสถานะออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกมีผลต่อความสามารถของสารนั้นในการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน

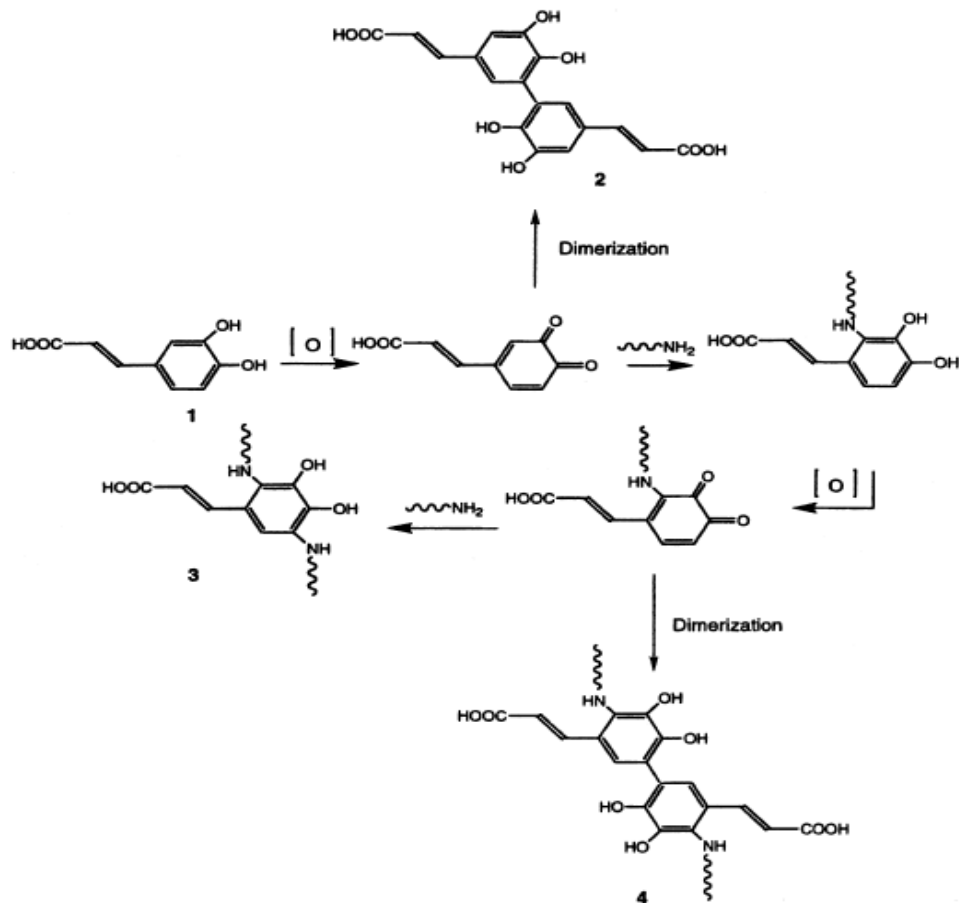
Strauss and Gibson (2004) อธิบายปฏิกิริยาของสารประกอบฟีนอลิกกับหมู่เคมีของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิเพปไทด์ (รูปที่ 2.3) สารประกอบฟีนอลิก (1) สามารถถูกออกซิไดส์ได้เป็นสารประกอบควิโนน โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเป็นปฏิกิริยาแบบอาศัยเอนไซม์หรือไม่อาศัยเอนไซม์ก็ได้ ควิโนนที่เกิดขึ้นสามารถเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) โดยเกิดไดเมอไรเซชันได้เป็นไดเมอร์ (2) ซึ่งในกรณีนี้จะได้สารประกอบฟีนอลิกที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้นโดยไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและโปรตีน ในอีกทางหนึ่งควิโนนสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนหรือหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของพอลิเพปไทด์เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ชนิดคาร์บอน-ไนโตรเจนหรือคาร์บอน-ซัลเฟอร์ และได้ไฮโดรควิโนนกลับคืนมา ไฮโดรควิโนนที่เกิดขึ้นนี้สามารถถูกออกซิไดส์อีกครั้งและเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนหรือหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของพอลิเพปไทด์อีกสายหนึ่ง ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของพอลิเพปไทด์สองสายเข้าด้วยกัน (3) อีกเส้นทางหนึ่ง ที่อาจเกิดขึ้นได้คือควิโนนที่จับอยู่กับสายพอลิเพปไทด์หนึ่งสายแล้วสามารถเกิดไดเมอไรเซชันทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายพอลิเพปไทด์ (4)

ปัจจุบันมีการนำสารประกอบฟีนอลิกและอนุพันธ์มาใช้เป็นตัวเชื่อมข้ามโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ความแข็งแรงขึ้นอยู่กับระดับการเกิดอันตรกิริยาระหว่างสายพอลิเพปไทด์ เช่น ฟิล์มและเจลโปรตีน

Ou et al. (2005) ศึกษาสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดเพรูลิก โดยแปรความเข้มข้นของกรดเพรูลิกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/100 กรัม และแปรพีเอชของสารละลายฟิล์มเป็น 8 และ 9 พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมกรดเพรูลิก โดยที่ความเข้มข้นของกรดเพรูลิกเท่ากับ 100 มิลลิกรัม/100 กรัม และพีเอชเท่ากับ 9 ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด ผู้วิจัยเสนอว่ากรดเพรูลิกทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมข้ามโปรตีนส่งผลให้ฟิล์มโปรตีนมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

Balange and Benjakul (2009) ศึกษาสมบัติของเจลซูริมิปลาแมคเคอเรล (*Rastrelliger kanagurta*) ที่เติมสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และแคทีคิน โดยแปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกในช่วง 0.05-0.25% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมกรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และแคทีคินที่ออกซิไดส์ ปริมาณ 0.4, 0.5, 0.5 และ 0.1% ส่งผลให้ค่าแรงที่ทำให้เจลแตก (breaking force) เพิ่มขึ้น

45.0, 115.0, 46.1 และ 70.3% ตามลำดับ ผู้วิจัยเสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกที่เติมลงไปทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีน ส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลซูริมิเพิ่มขึ้น



รูปที่ 2.3 ปฏิกิริยาของกรดฟีนอลิกกับหมู่อะมิโนที่เป็นโซ่ข้างของสายพอลิเพปไทด์  
ที่มา: Strauss and Gibson (2004)

Nuthong et al. (2009) ศึกษาสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีนจากสุกร (porcine plasma protein) ที่เติมกรดฟีนอลิก โดยแปรชนิดของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพรูลิก และแปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 2 และ 3% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนักของโปรตีน ฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกทั้งสามชนิดมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมกรดฟีนอลิก โดยฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกและฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิก

ตามลำดับ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังศึกษาผลของระดับออกซิเดชันที่ต่างกันของกรดแคฟเฟอิกสำหรับตัวอย่างที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เตรียมโดยฟอนออกซิเจนลงในสารละลายฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกเข้มข้น 3% เป็นเวลา 30 นาที พบว่าฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงขึ้น ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าลดลง ผู้วิจัยได้อธิบายว่ากรดแคฟเฟอิกถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนนซึ่งมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับพอลิเพปไทด์ได้ดี จึงทำให้เกิดการเชื่อมข้ามระหว่างโปรตีนที่สูงขึ้น

Salgado et al. (2010) ศึกษาสมบัติของฟิล์มโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันที่มีสารประกอบฟีนอลิกตามธรรมชาติจากเมล็ดดอกทานตะวัน โดยแปรวิธีเตรียมโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัด พบว่าโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดที่เตรียมโดยใช้วิธีที่ต่างกันมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามตัวอย่างฟิล์มโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันที่เตรียมจากโปรตีนสกัดเหล่านั้นไม่มีความแตกต่างกันในด้านสมบัติเชิงกลและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ ในขณะที่เดียวกันพบว่าฟิล์มที่เตรียมจากโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงมีความขุ่นสูงกว่า ผู้วิจัยรายงานว่าอันตรกิริยาหลักในโครงสร้างร่างแหของโปรตีน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์

Hoque et al. (2011) ศึกษาสมบัติของฟิล์มเจลาตินจากหมึก (cuttlefish) ที่เติมสารสกัดที่มีฟีนอลิกจากเครื่องเทศ 3 ชนิด ได้แก่ อบเชย กานพลู และโป๊ยกั๊ก โดยแปรสถานะออกซิเดชันของสารสกัดเป็น 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดที่ออกซิไดส์และสารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ พบว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ออกซิไดส์มีความต้านทานแรงดึงขาดและสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำสูงกว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์

Prodpran et al. (2012) ศึกษาสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่เติมสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก แคทีคิน กรดเพอรูสิก และกรดแทนนิก พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น ในขณะที่มีการยืดตัวถึงจุดขาดลดลง โดยกรดแทนนิกมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเชื่อมข้ามโปรตีนซึ่งเห็นได้จากปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ลดลงมากที่สุดและการลดลงของความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) ที่ติดตามโดย SDS-PAGE โดยพบว่าระดับการเชื่อมข้ามของโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น

Xiong et al. (2012) ศึกษาผลของการเติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ต่อสมบัติของฟิล์มเวย์โปรตีน โดยแปรความเข้มข้นของกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ออกเป็น 2 ระดับ ได้แก่ 2 และ 4% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าฟิล์มเวย์โปรตีนที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์มีสภาพให้ซึมผ่านได้

ของไอน้ำและความโปร่งแสงลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ โดยผู้วิจัยเสนอว่าที่ฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์มีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเนื่องจากกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ช่วยส่งเสริมการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยพันธะไดซัลไฟด์และพันธะโควาเลนต์อื่นๆ

Friesen et al. (2014) ศึกษาผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง โดยแปรชนิดของสารประกอบฟีนอลิกเป็น 2 ชนิดคือ รุทีนและอีพิแคทีคินเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้น 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าฟิล์มที่เติมรุทีนและฟิล์มที่เติมอีพิแคทีคินมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอลิก สำหรับสมบัติด้านการต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำพบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมรุทีนมีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ในขณะที่ฟิล์มที่เติมอีพิแคทีคินมีสภาพให้ซึมผ่านไอน้ำสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ในด้านความทึบแสงพบว่าฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลิกทั้งสองชนิดมีความทึบแสงเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม ผู้วิจัยเสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งสองชนิดทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมข้ามโปรตีน ส่งผลให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีความแข็งแรงมากขึ้น โดยสารประกอบฟีนอลิกต่างชนิดมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงความแข็งแรงของฟิล์มโปรตีนที่ต่างกันไป

## 2.5 วัสดุบรรจุภัณฑ์แอคทีฟ (active packaging material) และการปลดปล่อยแบบควบคุม

ฟิล์มโปรตีนนอกจากจะใช้ในแง่การเป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ที่ทำหน้าที่ปกป้องผลิตภัณฑ์ภายในแต่เพียงอย่างเดียวแล้วยังอาจพัฒนาให้เป็นตัวพาและปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น สารให้กลิ่นรส สารยับยั้งออกซิเดชัน และสารยับยั้งจุลินทรีย์ วัสดุบรรจุภัณฑ์แอคทีฟนี้ได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน (Mandal et al., 2009) ซึ่งรูปแบบการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ (release profile) มีความสำคัญต่อการนำวัสดุบรรจุภัณฑ์ดังกล่าวไปใช้งาน

Hines and Kaplan (2011) ศึกษาการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินจากไหม (silk fibroin) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยเมทานอลและไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเมทานอล สารประกอบตัวแบบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้แก่ ฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต-เด็กซ์แทรน (FITC-dextran) แปรน้ำหนักโมเลกุลของ FITC-dextran เป็น 4 ระดับ ได้แก่ 4, 10, 20 และ 40 กิโลดาลตัน พบว่าสารประกอบตัวแบบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่ามีร้อยละของการปลดปล่อยที่สูงกว่า โดย FITC-dextran ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4, 10, 20 และ 40 กิโลดาลตัน มีร้อยละของการปลดปล่อยเท่ากับ 86.7, 60.8, 41.1 และ 14.8 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มโปรตีนไฟโบรอินจากไหมที่ผ่านการปรับสภาพด้วย

เมทานอลมีร้อยละของการปลดปล่อยสารประกอบตัวแบบต่ำกว่าฟิล์มที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเมทานอลสำหรับทุกน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบ

Mandal et al. (2009) ศึกษาารูปแบบการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบในฟิล์มคอมพอสิตหลายชั้นจากโพรตีนไฟโบรอินจากไหมและเจลาติน โดยแปรชนิดของสารประกอบตัวแบบเป็น 3 ชนิดตามน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ ทริปแพนบลู (961 ดาลตัน) ฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต-อินูลิน (FITC-inulin) (3.9 กิโลดาลตัน) และฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต-โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (FITC-BSA) (66 กิโลดาลตัน) โดยศึกษารูปแบบการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) พบว่าสารประกอบตัวแบบทั้งสามชนิดมีอัตราการปลดปล่อยที่แตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำหนักโมเลกุลมีผลต่ออัตราการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มคอมพอสิตโพรตีนไฟโบรอินจากไหมและเจลาติน

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะพัฒนาฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองให้เป็นตัวพาและปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ ที่ผ่านมาฟิล์มที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ถูกนำมาประยุกต์เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารซึ่งสามารถชะลอหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและที่ก่อโรค (Appendini and Hotchkiss, 2002)

Emiroğlu et al. (2010) ศึกษาพัฒนาฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ โดยเติมน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนและน้ำมันหอมระเหยจากโรสม์ แปรความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยเป็น 1, 2, 3, 4 และ 5% โดยปริมาตรของสารละลายฟิล์ม ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์โดยการทดสอบบริเวณยับยั้งเชื้อ (inhibition zone test) ของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Lactobacillus plantarum* พบว่าฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่เติมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบ โดยสามารถยับยั้ง *E. coli*, *E. coli* O157:H7 และ *S. aureus* ได้มากที่สุด นอกจากนี้ผู้วิจัยยังประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวสดบดบั่นก้อน (fresh ground beef patty) ที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่เติมของผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดเข้มข้น 5% และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่า total viable count จำนวน lactic acid bacteria และจำนวน *Staphylococcus* spp. ในตัวอย่างเนื้อที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่เติมของผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ในขณะที่ coliforms และ *Pseudomonas* spp. ในตัวอย่างเนื้อที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่เติมของผสมของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมีจำนวนต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม

Moditsi et al. (2014) ศึกษาสมบัติของฟิล์มและอัตราการปลดปล่อยสารยับยั้งราซึ่งเป็นผลจากการดัดแปรฟิล์มเวย์โพรตีนสกัดและฟิล์มโซเดียมเคซีนต์โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์

และปรับพีเอช สารยับยั้งราที่ศึกษา ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์และนาตามัยซิน พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 200 มิลลิโมลาร์ ทำให้ฟิล์มมีเยื่อหุ้มเซลล์ลดลงและการยึดตัวถึงจุดขาดเพิ่มขึ้น การปรับพีเอชเป็น 5.0 และ 6.0 ทำให้ฟิล์มมีการยึดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่มีพีเอชเท่ากับ 7.0 ในแง่การปลดปล่อยสารยับยั้งรา พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์และการปรับพีเอชของฟิล์มให้ต่ำลงส่งผลให้สัมประสิทธิ์การแพร่ของสารยับยั้งรามีค่าลดลง โดยการปลดปล่อยนาตามัยซินมีอัตราที่ต่ำกว่าโพลีแซคคาไรด์ ผู้วิจัยเสนอว่าอัตราการแพร่ของสารยับยั้งรามีความสัมพันธ์เชิงผกผันกับน้ำหนักโมเลกุล





### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

##### 3.1 วัสดุดิบและสารเคมี

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

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

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

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

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

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

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

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

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (average molecular weight 4 kDa), AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) (average molecular weight 70 kDa), AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

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

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

Glycerol (Ajax Finechem, Seven Hills, New South Wales, Australia)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Potassium tartrate, AR grade (Univar, Seven Hills, New South Wales, Australia)

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

Sodium bicarbonate, AR grade (Univar, Seven Hills, New South Wales, Australia)

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

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

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

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

Sodium lactate, 60% solution, food grade (บริษัท จันทร์เจ้า ลองจีวิต্ত์ จำกัด, กรุงเทพฯ)

Soy protein isolate, 93.0% protein, food grade (บริษัท ไมท์ตี้ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ)

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

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

Trypan blue (molecular weight 961 Da), AR grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Urea, AR grade (Univar, Seven Hills, New South Wales, Australia)

### 3.2 อุปกรณ์

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

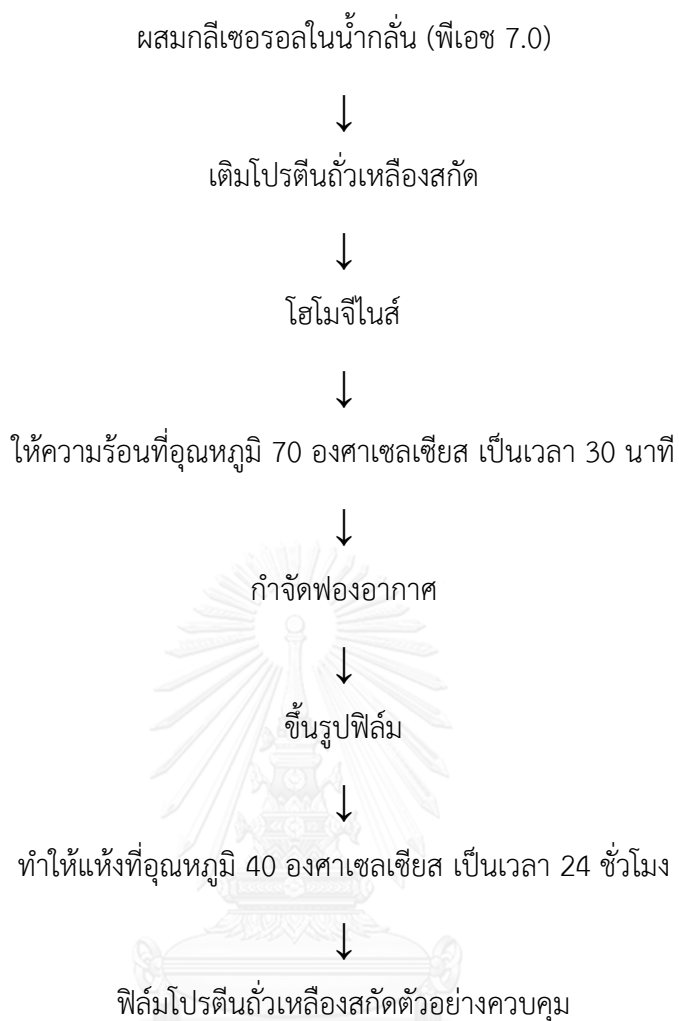
Water bath, model SW23 (Julabolabortechnik, Seelbach, Germany)

### 3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.3.1 การศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

งานวิจัยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของชนิด สถานะออกซิเดชัน และความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด แปรชนิดของกรดฟีนอลิกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิกและกรดแทนนิก แปรสถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกเป็น 2 สถานะ ได้แก่ ไม่ออกซิไดส์ และออกซิไดส์ และแปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ กำหนดให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกเป็นตัวอย่างควบคุม วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ทดลอง 3 ซ้ำ

เตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Jiang et al. (2007) สำหรับการเตรียมตัวอย่างควบคุม (รูปที่ 3.1) เริ่มจากนำน้ำกลั่น (พีเอช 6.0) มาปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนได้พีเอช 7.0 เตรียมสารละลายฟิล์มของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก ในน้ำกลั่น (พีเอช 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีกลีเซอรอลเข้มข้น 55% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเป็นพลาสติกไซเซออร์ (รูปที่ 3.1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้โฮโมจีไนเซอร์ (รุ่น X10/25, Ystral, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 22,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายฟิล์มไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน แล้วกำจัดฟองอากาศโดยใช้อ่างอัลตราโซนิค (รุ่น 136H, Fisher Scientific, Schwerte, Germany) เป็นเวลา 10 นาที ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยบีบอัดสารละลายฟิล์มปริมาตร 45 มิลลิลิตร บรรจุลงในแม่พิมพ์อะคริลิกขนาด 15 เซนติเมตร x 15 เซนติเมตร ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลอกแผ่นฟิล์มออก แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 50% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดตัวอย่างควบคุม

ในการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดฟีนอลิก ขั้นตอนแรกเป็นการเตรียมสารละลายกรดฟีนอลิก สำหรับสารละลายกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ เตรียมโดยชั่งกรดฟีนอลิก ปริมาณที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) ละลายในน้ำกลั่น (พีเอช 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนสารละลายกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ เตรียมโดยดัดแปลงจากวิธีของ Ou et al. (2005) โดยชั่งกรดฟีนอลิก ปริมาณที่กำหนด (ตารางที่ 3.1) ละลายในน้ำกลั่น (พีเอช 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/สารละลาย 100 กรัม ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้กรดฟีนอลิกถูกออกซิไดส์อย่างสมบูรณ์ (อัญชญา อินสวาสดี, 2557) จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เท่ากับ 9.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ส่วนเกิน

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมสำหรับเตรียมสารละลายฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

ส่วนผสม	ตัวอย่างฟิล์ม						
	ตัวอย่าง ควบคุม	ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิก (มิลลิโมลาร์)			ฟิล์มที่เติมกรดแทนนิก (มิลลิโมลาร์)		
		1.3	2.6	4.0	1.3	2.6	4.0
โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (กรัม)	5	5	5	5	5	5	5
สารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนที่ 1* (กรัม)	80	80	80	80	80	80	80
กลีเซอรอล (กรัม)	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75	2.75
กรดฟีนอลิก (กรัม)	0	0.025	0.050	0.075	0.220	0.440	0.680
สารละลายบัฟเฟอร์ ส่วนที่ 2** (กรัม)	12.25	12.25	12.25	12.25	12.25	12.25	12.25
ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์*** (กรัม)	0	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33

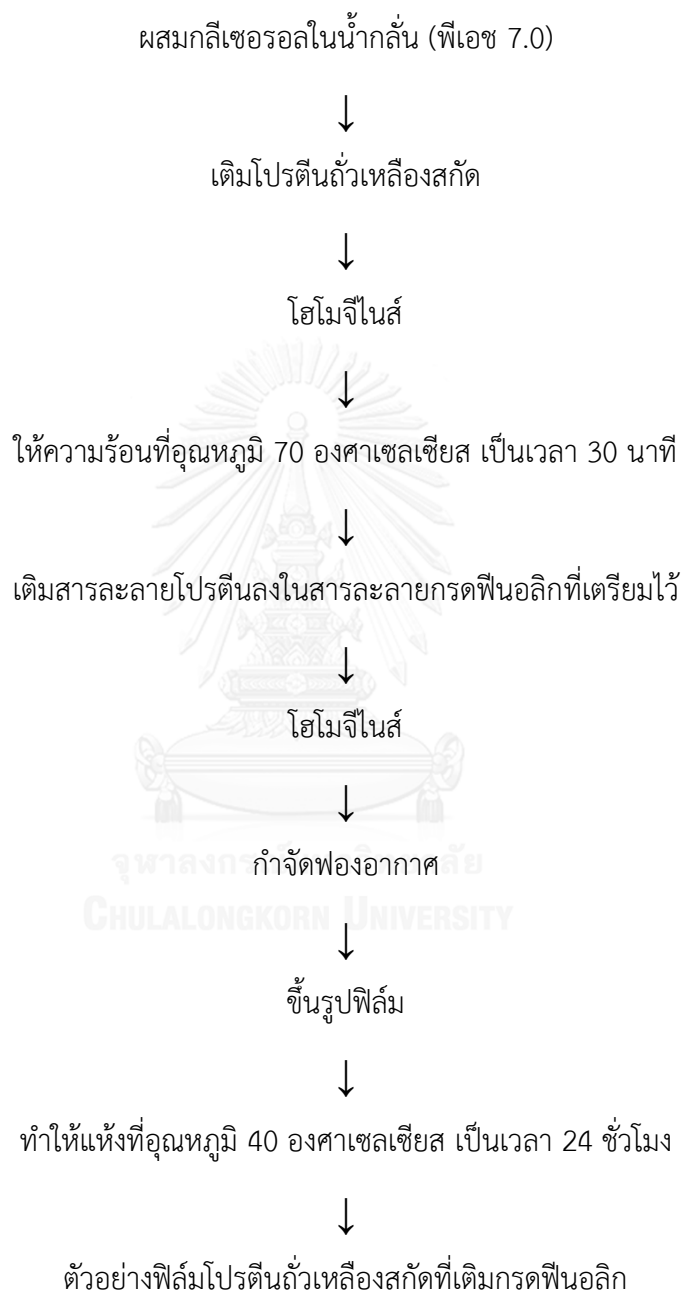
\* สารละลายบัฟเฟอร์ส่วนที่ใช้ละลายโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

\*\* สารละลายบัฟเฟอร์ส่วนที่ใช้ละลายกรดฟีนอลิก

\*\*\* เฉพาะตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์

ในการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดฟีนอลิก (รูปที่ 3.2) ทำโดยเตรียมสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเข้มข้น 5% โดยน้ำหนัก ในน้ำกลั่น (พีเอช 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีกลีเซอรอลเข้มข้น 55% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเป็นพลาสติกไซเซออร์ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ไฮโมจิไนเซอร์ (รุ่น X10/25, Ystral, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 22,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายฟิล์มไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน นำสารละลายโปรตีนที่ได้มาทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายโปรตีนลงในสารละลายกรดฟีนอลิกที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ไฮโมจิไนเซอร์ (รุ่น X10/25, Ystral, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ความเร็ว 22,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วกำจัดฟองอากาศโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก (รุ่น 136H, Fisher Scientific, Schwerte, Germany) เป็นเวลา 10 นาที ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม โดยบีบอัดสารละลายฟิล์มปริมาตร 45 มิลลิลิตร บรรจุลงในแม่พิมพ์อะคริลิกขนาด 15 เซนติเมตร x 15 เซนติเมตร ทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นลอกแผ่นฟิล์มออก แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมความชื้นที่ความชื้น

สัมพัทธ์ 50% อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างฟิล์มมาวิเคราะห์สมบัติต่อไป



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิก

### 3.3.1.1 ความหนา

ตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 3 เซนติเมตร x 10 เซนติเมตร วัดความหนาด้วยเครื่องวัดความหนาระบบดิจิทัล (รุ่น 7301, Mitutoyo, Tokyo, Japan) สุ่มวัดความหนาของตัวอย่างชั้นละ 15 จุด นับเป็น 1 ซ้ำ

### 3.3.1.2 สมบัติเชิงกล

ทดสอบแรงดึง (tensile test) โดยวัดความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของตัวอย่างฟิล์มด้วยเครื่อง universal materials testing machine (รุ่น 5565, Instron, Norwood, MA, USA) ซึ่งติดตั้งด้วยโหลดเซลล์ขนาด 5 กิโลกรัม ใช้หัววัด pneumatic side-action grips ตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 3 เซนติเมตร x 10 เซนติเมตร ติดตั้งลงบนส่วนยึดจับ (grip) ทั้งสองด้าน โดยยึดจับด้านที่มีความกว้าง 3 เซนติเมตร กำหนดระยะห่างของส่วนยึดจับเท่ากับ 30 มิลลิเมตร ดึงตัวอย่างฟิล์มด้วยความเร็ว 5.0 มิลลิเมตร/วินาที จนกระทั่งแผ่นฟิล์มขาดออกจากกัน ได้ผลการวัดในรูปของแรงที่ใช้ในการดึงขึ้นตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (หน่วยเป็นกรัม-แรง) และระยะทางที่สามารถดึงขึ้นตัวอย่างให้ยืดออกมาได้มากที่สุด ก่อนที่จะขาดออกจากกัน (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) คำนวณความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดโดยใช้สมการที่ (3.1) และ (3.2) ตามลำดับ

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

เมื่อ  $F$  คือ แรงที่ใช้ในการดึงขึ้นตัวอย่างให้ขาดออกจากกัน (กรัม-แรง)

$w$  คือ ความกว้างของชิ้นตัวอย่าง (เมตร)

$d$  คือ ความหนาของชิ้นตัวอย่าง (เมตร)

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

เมื่อ  $L_f$  คือ ระยะทางที่สามารถดึงขึ้นตัวอย่างให้ยืดออกมาได้มากที่สุดก่อนที่จะขาดออกจากกัน (มิลลิเมตร)

$L_i$  คือ ความยาวของชิ้นตัวอย่างระหว่างส่วนยึดจับก่อนดึง (มิลลิเมตร)

### 3.3.1.3 รูปแบบของแถบโปรตีน

ศึกษารูปแบบของแถบโปรตีนโดยใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,



SDS-PAGE) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) เปรียบเทียบรูปแบบของแถบโปรตีนของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดพีนอลิกและฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดพีนอลิก

#### *การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีน*

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีน โดยตัดตัวอย่างฟิล์มเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งมา 0.1 กรัม บรรจุลงใน sample buffer (ประกอบด้วย Tris-HCl เข้มข้น 0.5 โมลาร์, sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้น 10%, glycerol เข้มข้น 20%, 2-mercaptoethanol เข้มข้น 3.1% และ bromophenol blue เข้มข้น 1%) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ใน Eppendorf tube ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ 31,154g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วย refrigerated micro-centrifuge (รุ่น 22R, Hettich, Buckinghamshire, England) ที่ติดตั้งด้วย high speed angle rotor (รุ่น A1195-A, Hettich, Buckinghamshire, England) เก็บส่วนใส (supernatant) เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนต่อไป

#### *การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน*

เตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีน ยกเว้นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ไม่มีส่วนประกอบของ bromophenol blue วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี modified Lowry (Peterson, 1983) เตรียมกราฟเทียบมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานของซีรัมอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin, BSA) โดยชั่ง BSA ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตรต่างๆ แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร โดยให้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 5-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เติม sodium deoxycholate เข้มข้น 0.15% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย trichloroacetic acid เข้มข้น 72% ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงแยกที่ 31,154g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กำจัดส่วนใส นำตะกอนที่ได้มาเติม Reagent A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (Reagent A ประกอบด้วยสารละลาย 2 ส่วนผสมกันในอัตราส่วน 1:1 โดยสารละลายส่วนแรกประกอบด้วย sodium deoxycholate เข้มข้น 0.8 นอร์มัล และ SDS เข้มข้น 10% สารละลายส่วนที่สองคือ สารละลาย copper tartrate/ carbonate (CTC) ซึ่งประกอบด้วย copper sulfate เข้มข้น 0.1%, potassium tartrate เข้มข้น 0.2% และ sodium carbonate เข้มข้น 10%) ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

จากนั้นเติม Reagent B ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (Reagent B ประกอบด้วย Folin-Ciocalteu's phenol reagent และน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบล็ก

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มด้วยทำเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟเทียบมาตรฐาน แต่ใช้สารละลายตัวอย่างแทนการใช้สารละลาย BSA เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟเทียบมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณโปรตีนของตัวอย่างฟิล์ม

#### *การตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีน*

ตรวจสอบรูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE เริ่มจากเตรียมเจล โดยล้างแผ่นกระจกสำหรับหล่อเจลด้วยน้ำสะอาด จากนั้นชะด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้วเช็ดด้วยเอทานอล โดยประกอบแผ่นกระจกด้านที่มีรอยเว้าเข้าด้านในของตัวเครื่อง gel electrophoresis system (รุ่น miniVE, Hoefer, Holiston, MA) วางแผ่น spacer ที่มีความหนา 1 มิลลิเมตร คั่นไว้ที่ขอบทั้งสองด้าน ประกบอีกแผ่นเข้าหากัน จากนั้นติดตั้งเข้ากับตัวเครื่อง ปิดเตาสารละลาย separating gel เข้มข้น 10% เติมลงในช่องระหว่างแผ่นกระจกอย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศ จนสารละลายอยู่ต่ำกว่าขอบบนของแผ่นกระจกที่มีรอยเว้าประมาณ 1.5 เซนติเมตร หยดบิวทานอลทับบริเวณผิวหน้า separating gel ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตารางที่ 3.2 แสดงปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียม separating gel และ stacking gel

เมื่อ separating gel เช็ดตัวแล้ว เทบิวทานอลออก ชะด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นปิดเตาสารละลาย stacking gel เข้มข้น 4% (ตารางที่ 3.2) เติมลงในช่องว่างระหว่างแผ่นของกระจกจนถึงขอบกระจก จากนั้นเสียบ comb ลงบนช่องด้านบน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงจนกระทั่ง stacking gel เช็ดตัว จากนั้นถอด comb ออกจะเกิดช่องสำหรับบรรจุตัวอย่าง เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber และช่องระหว่างแผ่นเจลจนสารละลายท่วมแผ่นเจล จากนั้นปิดเตาสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight marker) และสารละลายตัวอย่างที่มีโปรตีนปริมาณ 7 ไมโครกรัม บรรจุลงในช่องของแผ่นเจลช่องละ 1 ตัวอย่าง และต่อ gel electrophoresis system เข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber (electrophoresis buffer) เตรียมโดยผสม Tris เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 9.06 กรัม, glycine เข้มข้น 1.5% ปริมาณ 43.2 กรัม, SDS เข้มข้น 1% ปริมาณ 3 กรัม และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 3000 มิลลิลิตร) กำหนดกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 40 มิลลิแอมแปร์ เปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้าจนกระทั่งสังเกตเห็นแถบโปรตีนเคลื่อน

ลงมาถึงระยะประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากขอบล่างของแผ่นเจลจึงปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ถอดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า แล้วแกะเจลออกจากกระจก นำแผ่นเจลมาแช่ใน staining solution เป็นเวลา 20 นาที (staining solution ประกอบด้วย Coomassie blue R-250 ปริมาณ 1 กรัม, ethanol เข้มข้น 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร, glacial acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปแช่ใน destaining solution จนแถบโปรตีนปรากฏขึ้น (destaining solution ประกอบด้วย ethanol เข้มข้น 95% ปริมาตร 250 มิลลิลิตร, glacial acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 650 มิลลิลิตร) เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลสำหรับการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

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

\*สำหรับเตรียมเป็นแผ่นเจลหนา 1 มิลลิเมตร จำนวน 2 แผ่น

เมื่อ separating gel เซ็ตตัวแล้ว เทบิวทานอลออก ชะด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นเปิดสารละลาย stacking gel เข้มข้น 4% (ตารางที่ 3.2) เดิมลงในช่องว่างระหว่างแผ่นของกระจกจนถึงขอบกระจก จากนั้นเสียบ comb ลงบนช่องด้านบน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมงจนกระทั่ง stacking gel เซ็ตตัว จากนั้นถอด comb ออกจะเกิดช่องสำหรับบรรจุตัวอย่าง เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber และช่องระหว่างแผ่นเจลจนสารละลายท่วมแผ่นเจล จากนั้นเปิดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight marker) และสารละลายตัวอย่างที่มีโปรตีนปริมาณ 7 ไมโครกรัม บรรจุลงในช่องของแผ่นเจล

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

### 3.3.1.4 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

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

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

เมื่อ  $W$  คือ น้ำหนักของขวดทดสอบ (กรัม)

$d$  คือ ความหนาของแผ่นฟิล์ม (เมตร)

$A$  คือ พื้นที่หน้าตัดของแผ่นฟิล์มที่ไอน้ำผ่านได้ (ตารางเมตร)

$t$  คือ เวลาที่น้ำหนักของขวดทดสอบคงที่ (ชั่วโมง)

$P_2 - P_1$  คือ ความแตกต่างของความดันไอน้ำระหว่างสองด้านของแผ่นฟิล์ม (พาสคาล)

### 3.3.1.5 ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility)

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำตามวิธีของ Perez-Gago and Krochta (2001) โดยตัดตัวอย่างฟิล์มให้มีขนาด 2 เซนติเมตร x 2 เซนติเมตร นำตัวอย่างฟิล์มไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (รุ่น 5200, Kubota, Fujioka, Japan) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างฟิล์มมาชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักเริ่มต้นของตัวอย่างฟิล์ม บรรจุตัวอย่างฟิล์มที่ชั่งน้ำหนักแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เขย่าอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องเขย่า (รุ่น INNOVA 2050, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสม ที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman หมายเลข 4 ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว ชะด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำกระดาษกรองและสิ่งที่ยังอยู่บนกระดาษกรองไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก เมื่อหักน้ำหนักกระดาษกรองออกแล้วได้เป็นน้ำหนักของตัวอย่างฟิล์มหลังอบ คำนวณความสามารถในการละลายน้ำโดยใช้สมการที่ (3.6)

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

เมื่อ  $W_i$  คือ น้ำหนักตัวอย่างฟิล์มเริ่มต้น (กรัม)

$W_f$  คือ น้ำหนักของตัวอย่างฟิล์มหลังอบ (กรัม)

### 3.3.1.6 มุมสัมผัส (contact angle) ระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม

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

### 3.3.1.7 ความโปร่งแสง

ติดตามการเปลี่ยนแปลงของความโปร่งแสงของตัวอย่างฟิล์มโดยตัดแปลงจากวิธีของ Tang et al. (2005) โดยความโปร่งแสงแสดงในรูปร้อยละของแสงส่องผ่านที่วัดที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ด้วย UV/Vis spectrophotometer (รุ่น V-530, Jasco, Easton, MD) โดยตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาด 1 เซนติเมตร x 4 เซนติเมตร ติดตั้งแผ่นฟิล์มลงบนพื้นผิวด้านในของ

ด้านที่แสงส่องผ่านด้านหนึ่งของควิเวตต์ โดยใช้ควิเวตต์เปล่าบรรจุลงใน reference cell (ใช้อากาศเป็นแบล็ก) กำหนดให้แบล็กมีร้อยละของแสงส่องผ่านกับ 100

### 3.3.1.8 ค่าสี

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

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

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

### 3.3.1.9 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง

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

### 3.3.1.10 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น (moisture sorption isotherm)

ศึกษาพฤติกรรมการดูดความชื้นของตัวอย่างฟิล์ม โดยคัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดสูงมาศึกษา นำตัวอย่างฟิล์มมาเก็บไว้ในภาชนะปิดสนิทที่บรรจุสารละลายเกลืออิ่มตัวที่มีผลึกเกลือเหลืออยู่ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ ได้แก่ 11, 22, 33, 43, 53, 69, 84 และ 94% ที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้อยู่ในสมดุลของไอน้ำ (ภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ดังกล่าวควบคุมโดยใช้สารละลายอิ่มตัวของ LiCl, CH<sub>3</sub>COOK, MgCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, KI, KCl และ KNO<sub>3</sub> ตามลำดับ) นำตัวอย่างฟิล์มมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2000) โดยชั่งตัวอย่างฟิล์มประมาณ 5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน บรรจุลงในจานอลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำตัวอย่างเข้าอบในตู้อบลมร้อน (รุ่น 5200, Kubota, Fujioka, Japan) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องในโถดูดความชื้นแล้วนำมาชั่ง

น้ำหนัก คำนวณปริมาณความชื้นเป็นร้อยละโดยฐานเปียก นำข้อมูลของปริมาณความชื้นที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตีมาสร้างเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้น

สำหรับการวิเคราะห์สมบัติเชิงกลที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตีทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.1.2

### 3.3.2 การศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบต่อรูปแบบการปลดปล่อยแบบควบคุมของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบพินอลิก

คัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงสูงสุดจากข้อ 3.3.1 มาศึกษาการปลดปล่อยแบบควบคุมของสารประกอบตัวแบบ ใช้สารประกอบตัวแบบ 3 ชนิดซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ได้แก่ ทริปแฟนบูล (น้ำหนักโมเลกุล 961 ดาลตัน) ฟลูออเรสซินไอโซไซโธไซยานเนต-เด็กซ์แทรน (FITC-dextran, น้ำหนักโมเลกุล 4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (น้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน) โดยเติมในปริมาณ 1, 10 และ 10 มิลลิกรัม/100 มิลลิตรของสารละลายฟิล์ม ตามลำดับ ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม แล้วติดตามการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบ โดยตัดแปลงจากวิธีของ Mandal *et al.* (2009) โดยนำตัวอย่างฟิล์มมาบ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (phosphate-buffered saline) (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามรูปแบบการปลดปล่อยตามเวลา (time-release profile) ของสารประกอบตัวแบบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยการวัดค่าการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 595, 490 และ 490 นาโนเมตร สำหรับทริปแฟนบูล FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ตามลำดับ โดยเมื่อสุ่มตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงตามช่วงเวลาแต่ละครั้งแล้วจะเทสารละลายบัฟเฟอร์ทิ้ง และเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ใหม่ นำค่าการดูดกลืนแสงไปหาความเข้มข้นของสารประกอบตัวแบบ จากกราฟเทียบมาตรฐาน ได้เป็นปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด และนำปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด มาคำนวณปริมาณการปลดปล่อยสะสมตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง ณ เวลาที่ตรวจวัด คำนวณร้อยละการปลดปล่อยโดยใช้สมการที่ (3.7)

$$\text{ร้อยละการปลดปล่อย} = \frac{\text{ปริมาณการปลดปล่อยสะสม}}{\text{ปริมาณของสารประกอบตัวแบบที่เติมในตัวอย่าง}} \times 100 \quad (3.7)$$

### 3.3.3 การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาสายยับยั้งจุลินทรีย์

ในขั้นตอนนี้ศึกษาการประยุกต์ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก โดยให้ฟิล์มทำหน้าที่เป็นตัวพาสายยับยั้งจุลินทรีย์และศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มดังกล่าว สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ โซเดียมแลกเตต โดยแบ่งเป็น 5 ทริตเมนต์ ได้แก่ (1) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม (C) (2) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง (S) (3) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก (SP) (คัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดสูงที่สุดจากข้อ 3.3.1 มาศึกษา) (4) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเตต (SL) และ (5) เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเตต (SPL)

สำหรับตัวอย่างฟิล์มที่เติมโซเดียมแลกเตต (ทริตเมนต์ที่ 4 และ 5) เตรียมสารละลายฟิล์มด้วยวิธีในข้อ 3.3.1 จากนั้นเติมโซเดียมแลกเตตเข้มข้น 60% โดยน้ำหนัก ปริมาณ 2.21 กรัม/200 มิลลิลิตร แล้วขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม

เนื้อหมูสดซื้อจากห้างค้าปลีกเทสโก้ โลตัส (กรุงเทพฯ) บรรจุในถาด PET และห่อหุ้มด้วยฟิล์มยืดตัวได้ PE ขนส่งมายังห้องปฏิบัติการโดยบรรจุในกล่องรักษาอุณหภูมิ (insulated container) ที่มีน้ำแข็ง ตัวอย่างเนื้อหมูสดคนนำมาทดลองทันทีที่ขนส่งถึงห้องปฏิบัติการ โดยชั่งเนื้อหมูสดบด ปริมาณ 50 กรัม บรรจุลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อแบบใช้แล้วทิ้ง (sterile disposable petri dish) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร สูง 15 มิลลิเมตร สำหรับฟิล์มที่ใช้ห่อหุ้มตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อน นำมาตัดแต่งให้มีขนาดเท่ากับพื้นที่ผิวด้านบนด้านล่าง และด้านข้างของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อน แล้วติดตั้งลงบนก้อนเนื้อหมูสดบด จากนั้นนำตัวอย่างก้อนเนื้อหมูสดบดที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มบรรจุในถุงพลาสติกชนิด LDPE ปิดผนึก แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยสุ่มตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 5, 8 และ 12 มาวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ดังนี้

- (1) Total viable count ตามวิธีของ FDA BAM (2001) (Chapter 3)
- (2) *Escherichia coli* ตามวิธีของ ISO 7251: 2005
- (3) *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ FDA BAM (2001) (Chapter 12)
- (4) *Salmonella* spp. ตามวิธีของ FDA BAM (2014) (Chapter 5)





รูปที่ 3. 3 รูปร่างและขนาดของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อน

#### 3.3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1957)



## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด

สำหรับการศึกษาผลของกรดฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด ในงานวิจัยนี้ได้แปรชนิดของกรดฟีนอลิกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิกและกรดแทนนิก แปรสถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกเป็น 2 สถานะ ได้แก่ ไม่ออกซิไดส์ และออกซิไดส์ และแปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ โดยกำหนดให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิกเป็นตัวอย่างควบคุม ผลการวิเคราะห์สมบัติของตัวอย่างฟิล์มมีดังนี้

##### 4.1.1 ความหนา

ความหนาของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าฟิล์มทุกตัวอย่างมีความหนาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.15-0.17 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์มเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อสมบัติด้านอื่นๆ เช่น สมบัติเชิงกล ความโปร่งแสง และสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ ดังนั้นสำหรับงานวิจัยนี้สามารถกล่าวได้ว่าหากตัวอย่างฟิล์มมีสมบัติด้านในด้านหนึ่งที่แตกต่างกัน ความแตกต่างนั้นไม่ได้เป็นผลมาจากความหนาของฟิล์ม

Mahmoud and Savello. (1992), Cuq et al. (1996) และ Galus et al. (2012) เสนอว่าปัจจัยที่มีผลต่อความหนาของฟิล์ม ได้แก่ ปริมาณของแข็ง และภาวะที่ใช้ในการผลิตฟิล์ม สำหรับงานวิจัยนี้ปริมาณของแข็งในตัวอย่างฟิล์มมีค่าที่ใกล้เคียงกันและใช้ภาวะในการผลิตที่เหมือนกัน ความหนาของตัวอย่างฟิล์มจึงมีค่าไม่แตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) สำหรับการเติมตัวเชื่อมข้ามโปรตีน ในการศึกษาที่พบว่าชนิด ปริมาณ และสถานะออกซิเดชันของตัวเชื่อมข้ามไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์ม ( $p > 0.05$ ) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nuthong et al. (2009) ซึ่งพบว่าการเติมตัวเชื่อมข้าม ได้แก่ กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพอรูลิก ที่ความเข้มข้น 1-3% โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อความหนาของฟิล์มพลาสมาโปรตีนจากสุกร (porcine plasma protein) ( $p > 0.05$ ) โดยผู้วิจัยรายงานว่าตัวอย่างฟิล์มมีความหนาอยู่ในช่วง 0.067-0.072 มิลลิเมตร นอกจากนี้ González et al. (2011) ยังรายงานผลในทำนองเดียวกันสำหรับฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมเจนิพิน (genipin) เข้มข้น 0-10% โดยน้ำหนักของโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยพบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติม

เจนิพินมีความหนาไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมเจนิพินและความเข้มข้นของเจนิพินไม่มีผลต่อความหนาของตัวอย่างฟิล์ม ( $p>0.05$ )

ตารางที่ 4.1 ความหนาของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

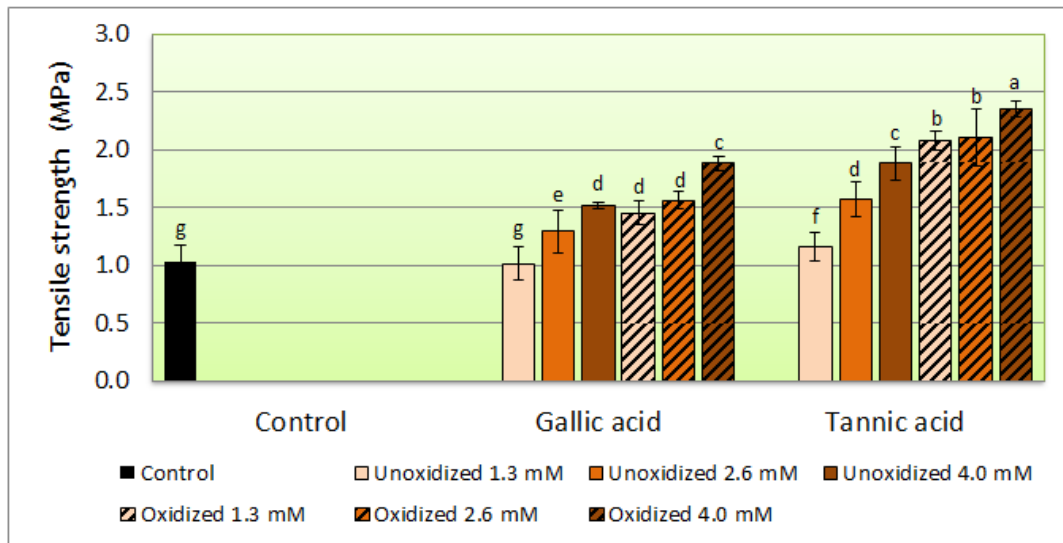
ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้นของกรดฟีนอลิก (มิลลิโมลาร์)	ความหนา (มิลลิเมตร) <sup>ns</sup>
Control	0	0.15 ± 0.00
Unoxidized gallic acid	1.3	0.15 ± 0.00
	2.6	0.15 ± 0.01
	4.0	0.15 ± 0.01
Oxidized gallic acid	1.3	0.16 ± 0.01
	2.6	0.16 ± 0.01
	4.0	0.15 ± 0.01
Unoxidized tannic acid	1.3	0.16 ± 0.01
	2.6	0.16 ± 0.01
	4.0	0.17 ± 0.01
Oxidized tannic acid	1.3	0.17 ± 0.01
	2.6	0.16 ± 0.00
	4.0	0.16 ± 0.00

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

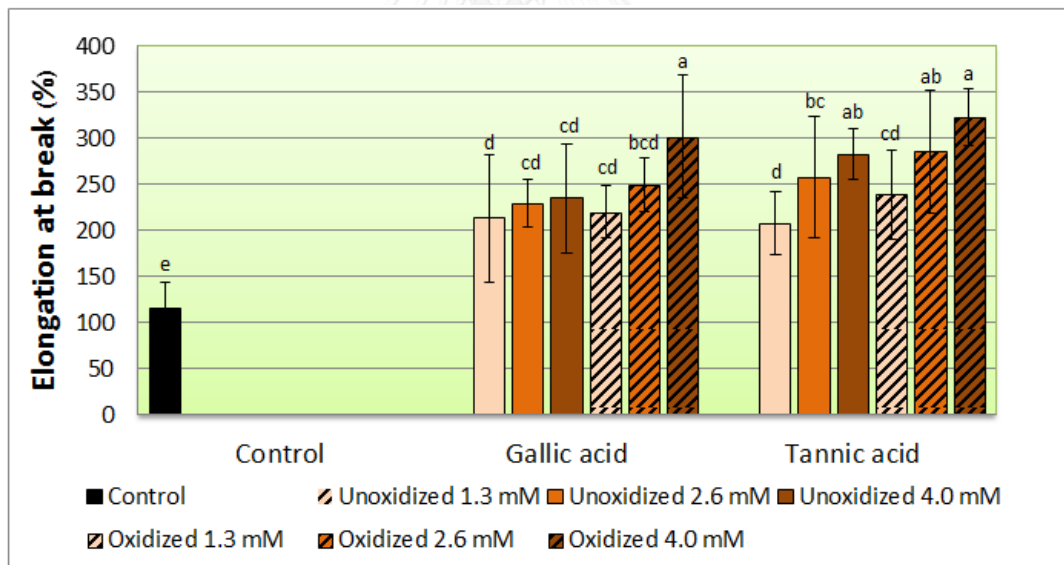
<sup>ns</sup> ค่าเฉลี่ยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ )

#### 4.1.2 สมบัติเชิงกล

ในงานวิจัยนี้วัดสมบัติเชิงกลของฟิล์มโดยการทดสอบแรงดึง รูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของตัวอย่างฟิล์มตามลำดับ พบว่าการเติมกรดฟีนอลิกมีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด โดยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแกลลิกหรือกรดแทนนิกมีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p<0.05$ ) ยกเว้นตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3 มิลลิโมลาร์ซึ่งมีความต้านทานแรงดึงขาดไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ )



รูปที่ 4.1 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.2 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ความเข้มข้นเท่ากันพบว่ากรดแกลลิกและกรดแทนนิกมีความสามารถในการเพิ่มความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่ต่างกัน โดยฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกอย่างมี

นัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) (รูปที่ 4.1) ในขณะที่โดยทั่วไปพบว่าชนิดของกรดฟีนอลิกไม่มีผลต่อการยึดตัวถึงจุดขาด (รูปที่ 4.2)

สำหรับสถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิก พบว่ากรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความสามารถในการเพิ่มความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสูงกว่ากรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ ( $p \leq 0.05$ ) ในขณะที่สถานะออกซิเดชันที่ต่างกันของกรดฟีนอลิกไม่มีผลต่อการยึดตัวถึงจุดขาด ( $p > 0.05$ )

ในแง่ความเข้มข้นของกรดฟีนอลิก พบว่าความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้พบว่าฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.35 เมกะพาสคาล และ 322.56% ตามลำดับ

สาเหตุที่กรดแทนนิกสามารถเพิ่มความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองได้มากกว่ากรดแกลลิกอาจเนื่องมาจากการที่กรดแทนนิกมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซีที่มากกว่า Rawel et al. (2002) เสนอว่าสารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับโพรตีนและทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโพรตีนที่แตกต่างกัน โดยปัจจัยประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับโพรตีน ได้แก่ จำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซีสำหรับกรดแทนนิกมีโครงสร้างเป็นพอลิฟีนอลิก มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 500-3000 ดาลตัน (เฉลี่ย 1701.206 ดาลตัน ซึ่งมีสูตรเคมี  $C_{76}H_{52}O_{46}$ ) ประกอบด้วยวงไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซีจำนวนมาก โดยมีหมู่ไฮดรอกซี 1-2 หมู่ต่อทุก 100 ดาลตัน ในขณะที่กรดแกลลิกหรือ 3,4,5-ไตรไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิด ( $C_7H_6O_5$ ) เป็นมอนอฟีนอล มีน้ำหนักโมเลกุล 170.12 ดาลตันมีโครงสร้างเป็นวงไฮโดรคาร์บอนหนึ่งวงที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซีเพียง 3 หมู่

นอกจากนี้ Rawel et al. (2002) ยังเสนอว่าปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับโพรตีนคือความสามารถของสารประกอบฟีนอลิกนั้นที่จะถูกออกซิไดส์ไปเป็นควิโนนซึ่งเป็นตัวเชื่อมข้ามโพรตีนที่มีประสิทธิภาพสูง โดยควิโนนสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่ซัลโฟนิลหรือซัลไฟไฮไดรลบนสายเพปไทด์ เกิดเป็นพันธะเชื่อมข้ามคาร์บอน-ไนโตรเจนหรือคาร์บอน-ซัลเฟอร์ (Strauss and Gibson, 2004) พันธะดังกล่าวเป็นพันธะโควาเลนต์ซึ่งมีพลังงานพันธะสูงกว่าพันธะไฮโดรเจนที่เป็นอันตรกิริยานีออน-โควาเลนต์หลายเท่า ตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์จึงมีความต้านทานแรงดึงขาดที่สูง

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Prodpran et al. (2012) ซึ่งศึกษาผลของการเติมสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ กรดแคฟเฟอิก กรดเพรูลิก กรดแทนนิก

และแคทีคิน ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน โดยแปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 3 และ 5% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าฟิล์มที่ได้มีความต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผู้วิจัยยังรายงานไว้ในบรรดาสารประกอบฟีนอลิกทั้ง 4 ชนิด พบว่ากรดแทนนิกมีประสิทธิภาพสูงสุดในการปรับปรุงความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์ม

ในงานวิจัยของ Nuthong et al. (2009) ซึ่งศึกษาผลของการเติมกรดฟีนอลิก 3 ชนิด ได้แก่ กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพรูลิก ต่อสมบัติของฟิล์มพลาสติกโปรตีนจากสุกร โดยแปรความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเป็น 3 ระดับ ได้แก่ 1, 2 และ 3% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) อย่างไรก็ตามงานวิจัยดังกล่าวพบว่ากรดแคฟเฟอิกมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความต้านทานแรงดึงขาดสูงสุด รองลงมาได้แก่กรดแทนนิกและกรดเพรูลิกตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีรายงานการปรับปรุงความแข็งแรงเชิงกลของฟิล์มโปรตีนโดยใช้สารสกัดจากพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิก เช่น Hoque et al. (2011) ศึกษาผลของสารสกัดจากอบเชย กานพลู และไพล์กัก ต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มเจลลาตินจากหนังหมึกกระดอง พบว่าการเติมสารสกัดจากพืชสามารถเพิ่มความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์ม นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดดังกล่าวไปออกซิไดส์ยังสามารถเพิ่มความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มให้สูงขึ้นจากฟิล์มที่เติมสารสกัดที่ไม่ออกซิไดส์ ตัวอย่างเช่น ตัวอย่างควบคุม ฟิล์มที่เติมสารสกัดจากอบเชยที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1% โดยน้ำหนักของโปรตีน และฟิล์มที่เติมสารสกัดจากอบเชยที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1% โดยน้ำหนักของโปรตีน มีความต้านทานแรงดึงขาดเท่ากับ 32.78, 39.11 และ 44.06 เมกะพาสคาล ตามลำดับ

นอกจากระบบของฟิล์มแล้ว ยังมีการนำสารประกอบฟีนอลิกไปใช้เพื่อทำให้เกิดการเชื่อมข้ามในระบบฐานโปรตีน (protein-based system) อื่น เช่น เจลโปรตีน ตัวอย่างได้แก่ งานวิจัยของ Balange and Benjakul (2009) ซึ่งศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ต่อความแข็งแรงของเจลซูริมิปลาแมคเคอเรล สารประกอบฟีนอลิกที่ใช้ในงานวิจัยดังกล่าว ได้แก่ กรดเพรูลิก กรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และแคทีคิน แปรความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกที่ออกซิไดส์ในช่วง 0.05-0.25% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าแรงที่ทำให้เจลแตกออก (breaking force) มีค่าสูงสุดในตัวอย่างที่เติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์ กรดแทนนิกที่ออกซิไดส์ กรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์ และแคทีคินที่ออกซิไดส์ ในปริมาณ 0.4, 0.5, 0.5 และ 0.1% ตามลำดับ โดยตัวอย่างดังกล่าวมีค่าแรงที่ทำให้เจลแตกออกเพิ่มขึ้น 45.0, 115.0, 46.1 และ 70.3% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

แม้ว่าการเติมกรดฟีนอลิกจะมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลือง ในทางตรงกันข้ามกลับไม่มีผลเด่นชัดต่อการยืดตัวถึงจุดขาด โดยในงานวิจัยนี้พบว่าชนิดของและสถานะออกซิเดชันของกรดฟีนอลิกไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์ม ในขณะที่ความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้นได้บ้าง Siripatrawan and Harte (2010) เสนอว่าความต้านทานแรงดึงขาดขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลพอลิเมอร์ ในขณะที่การยืดตัวถึงจุดขาดมีได้ขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของอันตรกิริยา หากแต่ขึ้นอยู่กับระยะระหว่างหมู่ที่เกิดอันตรกิริยาของโมเลกุลพอลิเมอร์ ดังนั้นการที่กรดฟีนอลิกมีผลค่อนข้างน้อยต่อการยืดตัวถึงจุดขาด อาจเนื่องมาจากการเกิดพันธะเชื่อมข้ามทำให้ความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโพรตีนเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลทำให้ระยะระหว่างหมู่ที่เกิดอันตรกิริยาเกิดการเปลี่ยนแปลง

สำหรับงานวิจัยที่ผ่านมาในแง่ผลของสารประกอบฟีนอลิกต่อการยืดตัวถึงจุดขาด มีการรายงานที่แตกต่างกันไป Prodpran et al. (2012) รายงานว่าฟิล์มโพรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาหวานที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม โดยการยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกยังมีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาด โดยฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำที่สุด ตามด้วยฟิล์มที่เติมกรดแคฟเฟอิก แคทีคิน และกรดเพอรูลิก ตามลำดับ

ในทางกลับกัน Nuthong et al. (2009) รายงานว่าการเติมกรดฟีนอลิกทำให้การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มพลาสติกโพรตีนจากสุกรมี่ค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้น และฟิล์มที่เติมกรดเพอรูลิกมีการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำที่สุด ตามด้วยฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกและกรดแคฟเฟอิก ตามลำดับ ในขณะที่ Hoque et al. (2011) รายงานว่าฟิล์มเจลาตินจากหนังหมึกกระดองที่เติมสารสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลิกจากอบเชย กานพลู และโป๊ยกั๊ก มีการยืดตัวถึงจุดขาดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามชนิดและสถานะออกซิเดชันของสารสกัดไม่มีผลต่อการยืดตัวถึงจุดขาดของตัวอย่างฟิล์ม

### 4.1.3 รูปแบบของแถบโปรตีน

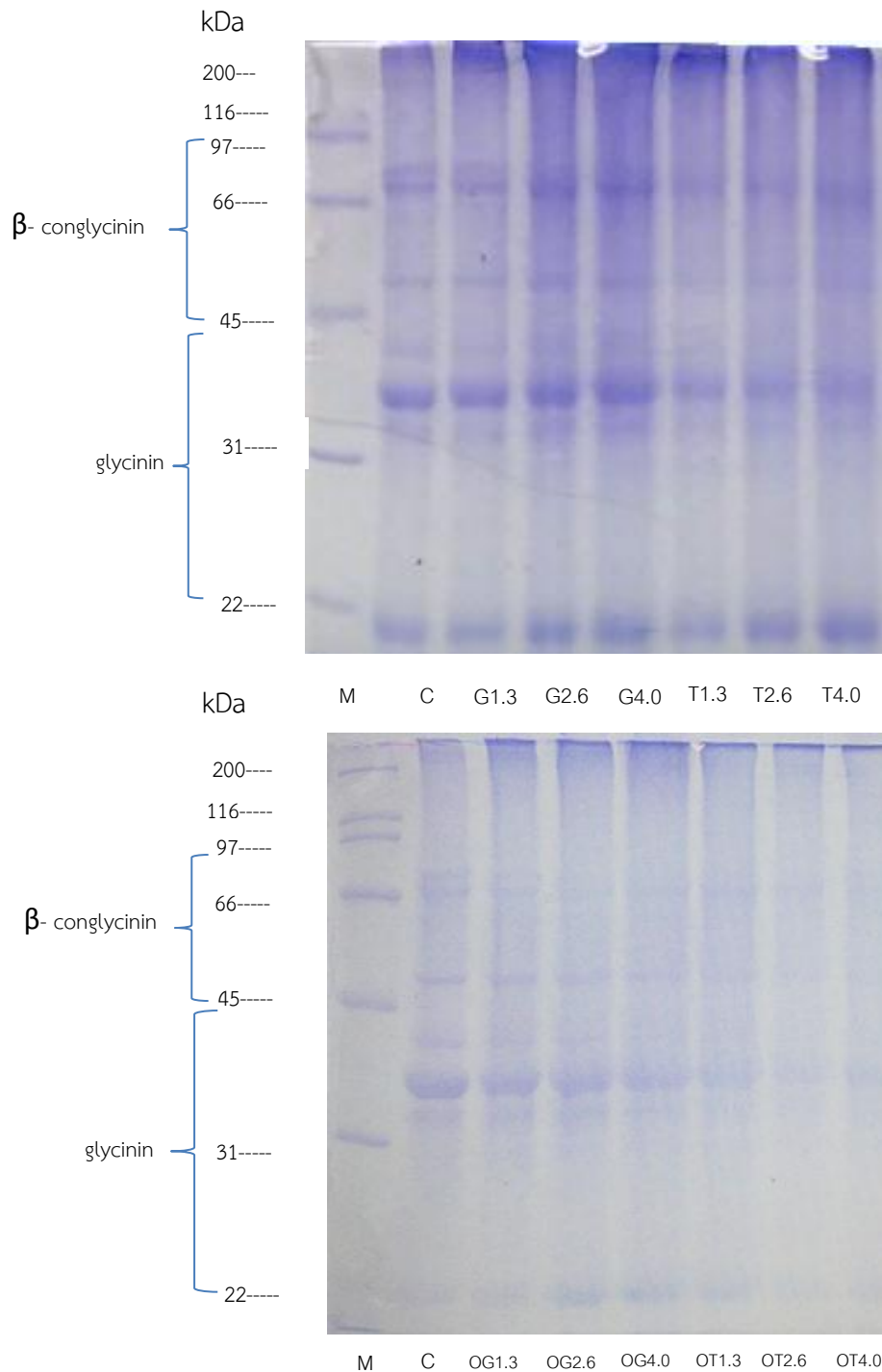
เพื่อยืนยันการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิก ในงานวิจัยนี้ จึงติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ โดยวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE รูปที่ 4.10 แสดงรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

โปรตีนกล้ามเนื้อประกอบด้วยส่วน (fraction) หลัก 2 ส่วน คือ ไกลซินิน และเบตา-คอนไกลซินิน โดยไกลซินินของกล้ามเนื้อประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) จำนวน 2 หน่วย ได้แก่ หน่วยย่อยชนิดที่เป็นกรด (acidic subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36 กิโลดาลตัน และหน่วยย่อยชนิดที่เป็นเบส (basic subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตัน (Ly et al., 1998; Liu, 1999) ส่วนเบตา-คอนไกลซินินประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวน 3 หน่วย ได้แก่ แอลฟา แอลฟา-ไพรม์ และเบตา ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 84, 66 และ 45 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Tang et al., 2006)

จากรูปที่ 4.10 (บน) ซึ่งแสดงรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีความเข้มของแถบโปรตีนไกลซินินลดลง ในขณะที่ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่มีความเข้มของแถบโปรตีนใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้เมื่อพิจารณารูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์ (รูปที่ 4.10 ล่าง) พบว่าแถบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนกล้ามเนื้อไกลซินินและเบตา-คอนไกลซินินมีความเข้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ โดยตัวอย่างที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ มีการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุด การลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนที่เป็นที่องค์ประกอบหลักของโปรตีนกล้ามเนื้อนี้อาจเนื่องมาจากการเชื่อมข้ามของโปรตีนทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีปริมาณลดลง (Rawel et al., 2002)

ก่อนหน้านี้ Prodpran et al. (2012) ซึ่งศึกษาผลของการเติมสารประกอบพีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน และติดตามการเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยวิเคราะห์รูปแบบของแถบไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ พบว่าการเติมสารประกอบพีนอลิกมีผลทำให้แถบโปรตีนมีความเข้มลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบพีนอลิก และความเข้มของแถบโปรตีนลดลงตามความเข้มข้นของสารประกอบพีนอลิกที่เพิ่มขึ้น ผู้วิจัยอธิบายว่าสารประกอบพีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนและทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีปริมาณลดลง

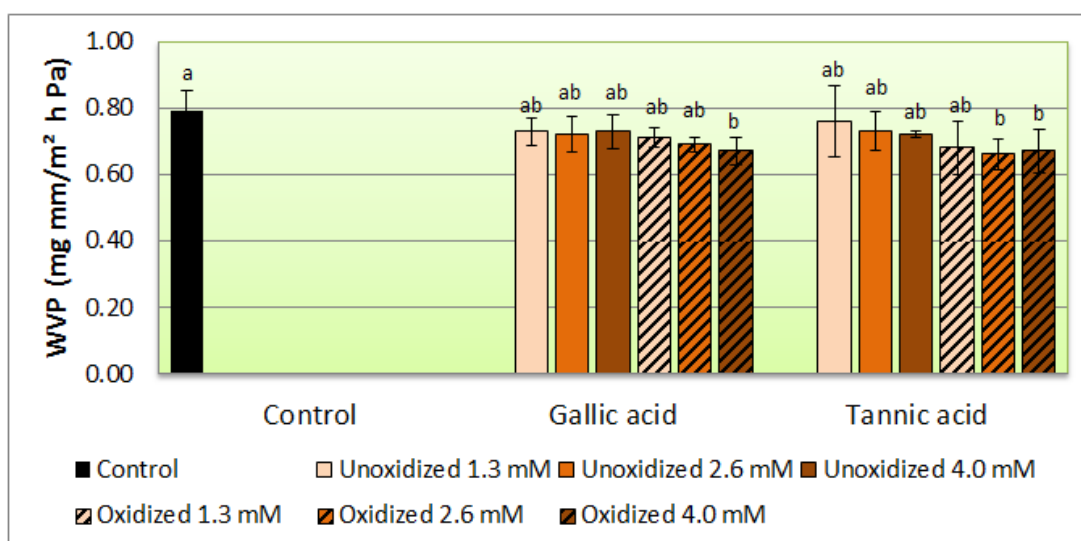




รูปที่ 4.3 (บน) รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) และฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (G1.3, G2.6 และ G4.0) และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (T1.3, T2.6 และ T4.0) และ (ล่าง) รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) และฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์ ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (OG1.3, OG2.6 และ OG4.0) และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (OT1.3, OT2.6 และ OT4.0) โดย M คือ molecular weight marker

#### 4.1.4 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ

สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกแสดงดังรูปที่ 4.3 พบว่าสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ( $p>0.05$ ) ยกเว้นฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p\leq 0.05$ ) อย่างไรก็ตามยังสามารถเห็นได้ว่าสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการเชื่อมข้ามกันของโปรตีนซึ่งมีผลให้โครงสร้างของฟิล์มมีความหนาแน่นมากขึ้น โดยสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดอันตรกิริยาประเภทต่างๆ กับโปรตีน ทั้งที่เป็นพันธะโควาเลนต์และอันตรกิริยานีออน-โควาเลนต์ ทำให้โครงร่างตาข่ายของโปรตีนมีปริมาตรอิสระ (free volume) ลดลง ไอน้ำจึงเคลื่อนที่ผ่านเมทริกซ์ของฟิล์มในอัตราที่ช้าลง (Cisneros-Zevallos and Krochta, 2002; González et al., 2011)



รูปที่ 4.4 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p\leq 0.05$ )

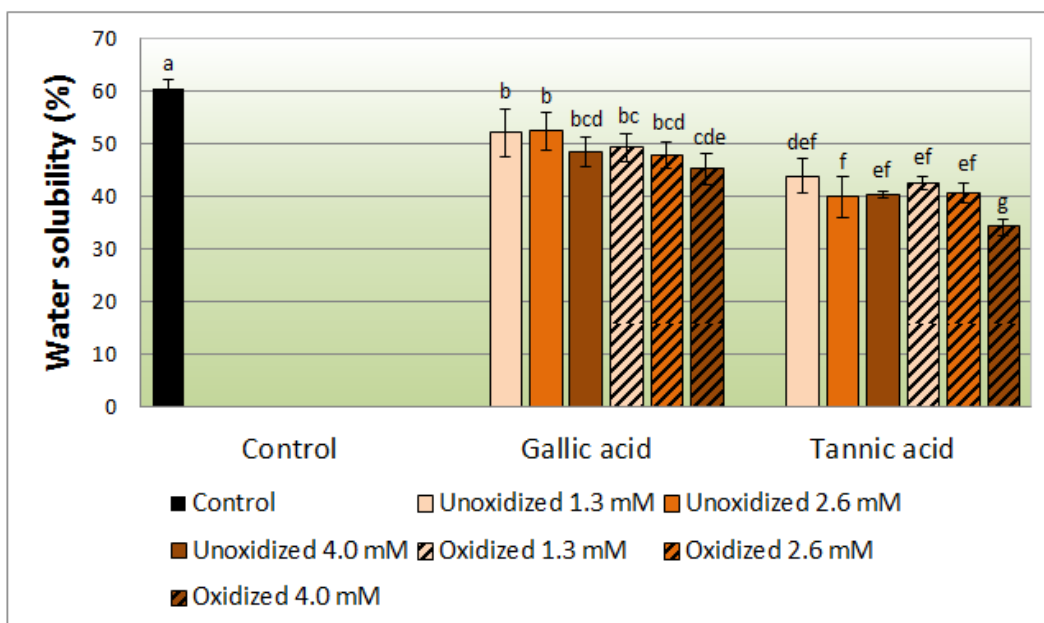
ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ou et al. (2005) ซึ่งศึกษาผลของกรดเพรูลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง พบว่าฟิล์มที่เติมกรดเพรูลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 50-150 มิลลิกรัม/100 กรัม มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) แต่การเติมกรดเพรูลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 50 มิลลิกรัม/100 กรัม มีผลทำให้

สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) นอกจากนี้ Siripatrawan and Harte (2010) รายงานว่าฟิล์มโคโทซานที่เติมสารสกัดจากชาเขียวเข้มข้น 2-20% มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดจากชาเขียวเพิ่มขึ้น

#### 4.1.5 ความสามารถในการละลายน้ำ

ความสามารถในการละลายน้ำของตัวอย่างฟิล์มแสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าการเติมกรดฟีนอลิกทำให้ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีความสามารถในการละลายน้ำลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนินก็มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นเท่ากัน และเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองมีแนวโน้มลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ สาเหตุที่ฟิล์มโปรตีนที่เติมกรดฟีนอลิกมีความสามารถในการละลายน้ำลดลง เนื่องจากกรดฟีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับหมู่มีซิวของโปรตีนทำให้ปริมาณของหมู่มีซิวซึ่งมีสมบัติชอบน้ำลดลง ประกอบกับการเชื่อมข้ามทำให้โปรตีนมีโครงร่างที่หนาแน่นมากขึ้นและมีน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น โปรตีนจึงมีความสามารถในการละลายน้ำลดลง (Rhim et al., 2000; Hoque et al., 2011)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Hoque et al. (2011) ซึ่งศึกษาสมบัติการละลายของฟิล์มเจลาตินจากหมึกกระดองลายเสือ (*Sepia pharaonis*) ที่เติมสารสกัดจากอบเชยโป๊ยกั๊ก และกานพลูที่ออกซิไดส์ พบว่าฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และงานวิจัยของ González et al. (2011) ซึ่งศึกษาผลของเงินฟีนต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง โดยแปรความเข้มข้นเงินฟีนในช่วง 0.1-10% โดยน้ำหนักของโปรตีน พบว่าการเติมเงินฟีนในปริมาณ 1% ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลงได้ถึง 45% จากตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามการเติมเงินฟีนในปริมาณสูงกว่า 1% ไม่มีผลทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ )



รูปที่ 4.5 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.1.6 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์ม

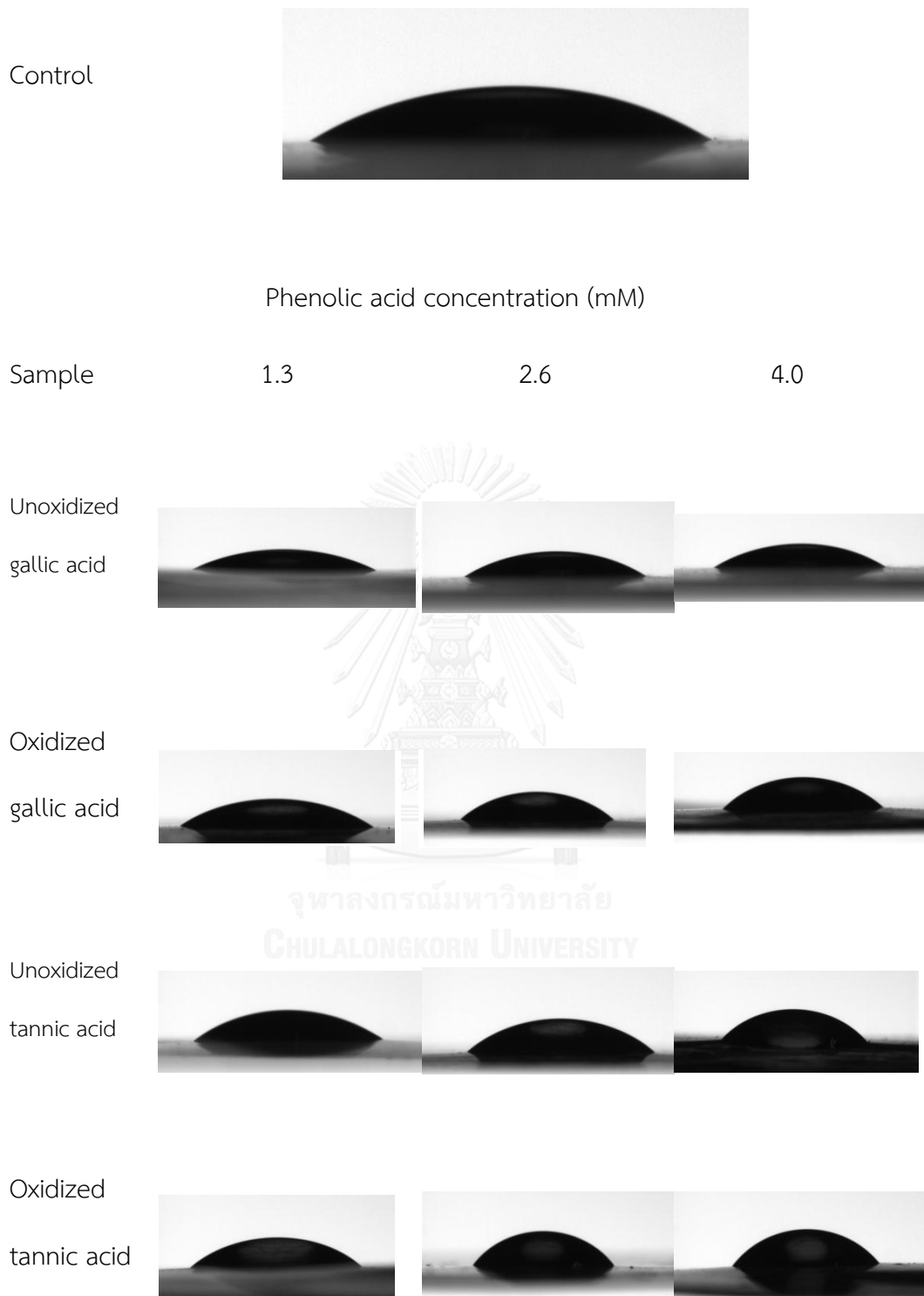
มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มแสดงถึงสมบัติความชอบน้ำ (hydrophilicity) หรือความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของผิวฟิล์ม ในกรณีของผิวที่เปียกโดยสมบูรณ์ (complete wetting) มุมสัมผัสจะมีค่าเท่ากับ 0 องศา หากมุมสัมผัสมีค่าระหว่าง 0-90 องศา ผิวนั้นจัดว่ามีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic or wettable) มุมสัมผัสที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงสมบัติความไม่ชอบน้ำของผิวที่เพิ่มขึ้น มุมสัมผัสที่มากกว่า 90 องศาเป็นลักษณะของผิวที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่วนมุมสัมผัสที่มีค่าตั้งแต่ 150 องศาไปจนถึงมุมสูงสุดเชิงทฤษฎี (theoretical limit) ที่ 180 องศาเป็นลักษณะเฉพาะของผิวที่ไม่ชอบน้ำสูงยิ่ง (ultrahydrophobic or superhydrophobic)

รูปที่ 4.5 และ 4.6 แสดงรูปร่างของหยดน้ำที่ผิวฟิล์มและมุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิก พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ มีมุมสัมผัสสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) แม้ตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกทั้งที่ออกซิไดส์

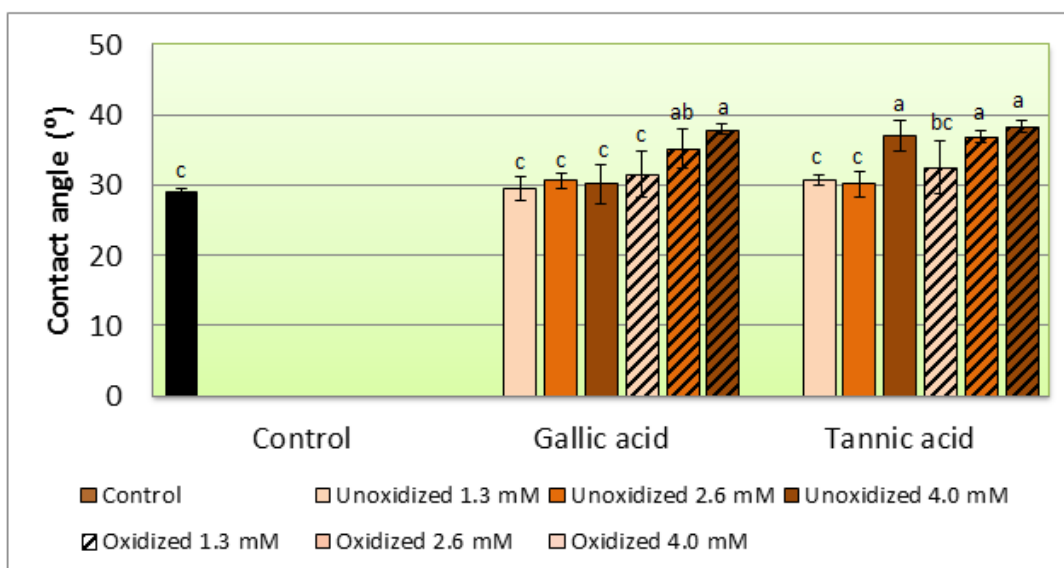
และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ มีมุมสัมผัสไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) แต่สามารถเห็นแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของมุมสัมผัสเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น

Insaward et al. (2014) รายงานว่าการเติมกรดแกลลิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพอรูสิกในฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นเนื่องจากกรดฟีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนและหมู่ซัลไฟไฮดริลของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดซึ่งเป็นการลดปริมาณหมู่เคมีที่มีสมบัติชอบน้ำและส่งผลให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ลดลง และก่อนหน้านี้ Orliac et al. (2002) รายงานว่าการเติมแทนนินทำให้มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันมีค่าเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการเติมแทนนินลงในฟิล์มโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันให้มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มมีค่าสูงถึง 51.2 องศา เมื่อเทียบตัวอย่างควบคุมซึ่งมีค่ามุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มเพียง 17.9 องศา

นอกจากนี้ Strauss and Gibson (2004) ซึ่งศึกษาสมบัติความไม่ชอบน้ำของโคแอเซอร์เวต (coacervate) จากเจลาตินที่เติมสารประกอบฟีนอลิก โดยในงานวิจัยได้เลือกใช้สีย้อมชนิดไม่ชอบน้ำ (hydrophobic dye) ได้แก่ Sudan III เติมลงในสารแขวนลอยของโคแอเซอร์เวต พบว่าโคแอเซอร์เวตที่เติมสารประกอบฟีนอลิกสามารถดูดซับ Sudan III ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ดูดซับ Sudan III ผู้วิจัยอธิบายว่าโคแอเซอร์เวตที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงขึ้น จึงสามารถดูดซับ Sudan III ไว้ได้



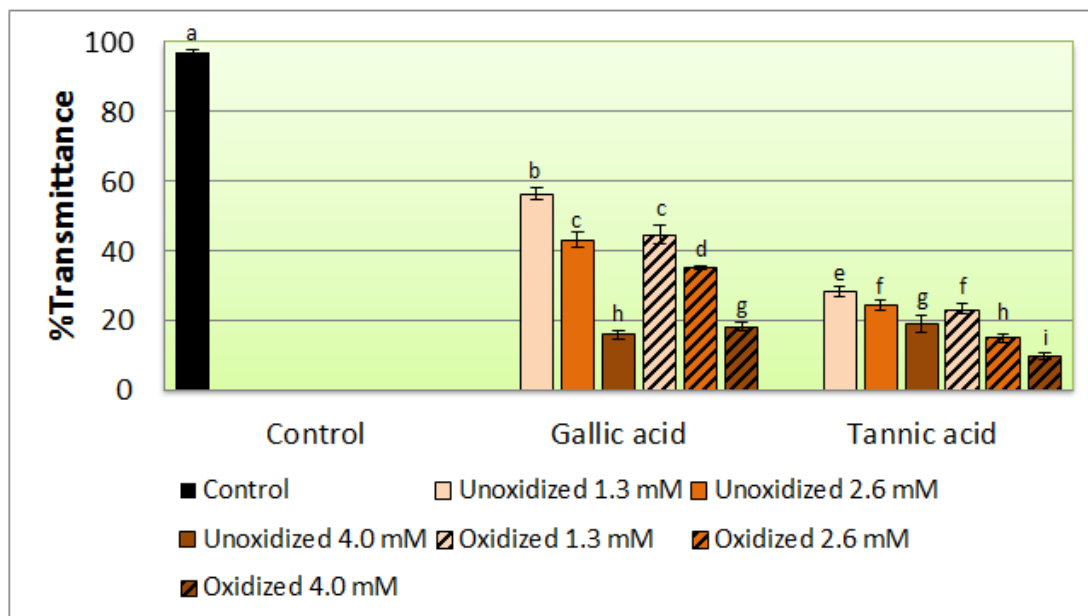
รูปที่ 4.6 รูปร่างของหยดน้ำที่ผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน



รูปที่ 4.7 มุมสัมผัสระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.1.7 ความโปร่งแสง

รูปที่ 4.7 แสดงความโปร่งแสงของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกโดยแสดงในรูปร้อยละของแสงส่องผ่าน พบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่าร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) และโดยทั่วไปตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีค่าร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ความเข้มข้นเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีค่าร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำกว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ โดยฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ มีร้อยละของแสงส่องผ่านต่ำที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 9.7 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งมีร้อยละของแสงส่องผ่านเท่ากับ 96.8 การที่ความโปร่งแสงของฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่าลดลงอาจเป็นผลมาจากการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนทำให้เมทริกซ์ของฟิล์มมีความหนาแน่นมากขึ้น (Tang et al., 2005; González et al., 2011) รวมทั้งการเกิดสารประกอบที่มีสีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและโปรตีน (Pierpoint, 1969)



รูปที่ 4.8 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Prodpran et al. (2012) ซึ่งพบว่าฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานมีค่าแสงส่องผ่านลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดแคฟเคอิก กรดเพรูลิก กรดแทนนิก และแคทีคิน เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Salgado et al. (2010) ซึ่งศึกษาการผลิตฟิล์มจากโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลิกตามธรรมชาติจากเมล็ดดอกทานตะวันในปริมาณ 1.82-2.51% พบว่าฟิล์มที่ผลิตจากโปรตีนเมล็ดดอกทานตะวันสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูงกว่ามีความขุ่นมากกว่า

#### 4.1.8 ค่าสี

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าสีในระบบ CIELAB และรูปที่ 4.8 แสดงลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ จากตารางที่ 4.2 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิก มีความสว่าง ( $L^*$ ) ลดลง ในขณะที่สีแดง ( $+a^*$ ) และสีเหลือง ( $+b^*$ ) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ( $p \leq 0.05$ ) และเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น  $L^*$  ของตัวอย่างฟิล์มมีค่าลดลง ในขณะที่  $+a^*$  มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเท่ากันพบว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีค่า  $L^*$  ต่ำกว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิก สำหรับมุมสีพบว่าตัวอย่างควบคุมมีมุมสีประมาณ 90 องศา ซึ่งเป็นมุมสีของสีเหลือง (McGuire, 1992) ส่วนตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีมุมสีลดต่ำลงจากตัวอย่างควบคุมจนมีค่าเข้าใกล้ประมาณ 50 องศา ซึ่งเป็นมุมสีของสีเหลือง-ส้ม (McGuire, 1992) โดยความเข้มสีของ



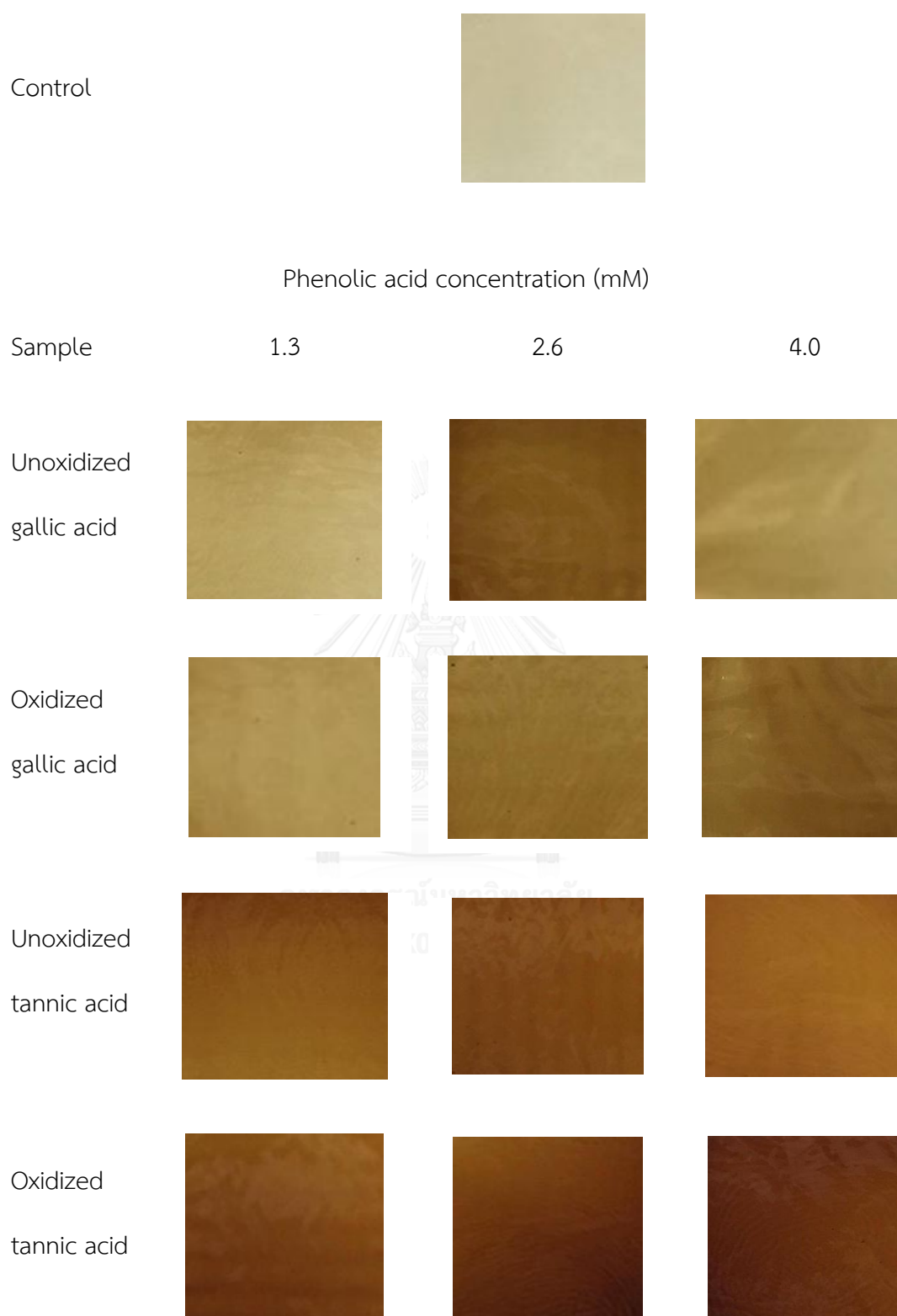
ตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกทั้งสองชนิด มีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) สอดคล้องกับลักษณะปรากฏที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า (รูปที่ 4.2) สีของตัวอย่างฟิล์มที่เปลี่ยนแปลงไปนี้อาจเกิดจากสารประกอบที่มีสีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกและโปรตีน สีของควิโนนที่เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิก รวมทั้งสีของสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่ได้จากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันของสารประกอบฟีนอลิกหรือควิโนน (Pierpoint, 1969)

ตารางที่ 4.2 ค่าสีของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	$L^*$	$a^*$	$b^*$	มุมสี (องศา)	ความเข้มสี
Control	0	82.74 ± 0.37 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.05 <sup>h</sup>	15.27 ± 0.92 <sup>h</sup>	89.37 ± 0.2 <sup>a</sup>	15.27 ± 0.92 <sup>i</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	62.88 ± 1.63 <sup>d</sup>	7.27 ± 1.14 <sup>f</sup>	24.42 ± 1.11 <sup>f</sup>	73.53 ± 1.73 <sup>d</sup>	15.27 ± 0.92 <sup>g</sup>
	2.6	54.74 ± 1.28 <sup>f</sup>	10.34 ± 0.55 <sup>d</sup>	24.43 ± 0.70 <sup>f</sup>	67.08 ± 2.71 <sup>e</sup>	26.53 ± 0.57 <sup>g</sup>
	4.0	45.46 ± 0.19 <sup>j</sup>	13.58 ± 0.35 <sup>c</sup>	17.32 ± 0.21 <sup>g</sup>	51.92 ± 0.86 <sup>g</sup>	22.01 ± 0.25 <sup>h</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	67.93 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.74 ± 0.26 <sup>g</sup>	29.46 ± 1.03 <sup>d</sup>	82.81 ± 0.30 <sup>b</sup>	29.69 ± 1.06 <sup>ef</sup>
	2.6	62.70 ± 0.68 <sup>d</sup>	4.31 ± 0.61 <sup>g</sup>	30.69 ± 0.54 <sup>c</sup>	82.05 ± 0.97 <sup>b</sup>	30.99 ± 0.86 <sup>d</sup>
	4.0	52.09 ± 0.41 <sup>h</sup>	10.28 ± 0.94 <sup>d</sup>	34.55 ± 1.00 <sup>b</sup>	73.47 ± 1.29 <sup>d</sup>	36.05 ± 1.10 <sup>b</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	55.10 ± 0.49 <sup>f</sup>	13.82 ± 0.17 <sup>bc</sup>	27.54 ± 0.5 <sup>e</sup>	63.38 ± 0.58 <sup>f</sup>	30.81 ± 0.43 <sup>de</sup>
	2.6	54.99 ± 0.30 <sup>f</sup>	14.66 ± 0.13 <sup>ab</sup>	27.45 ± 0.24 <sup>e</sup>	61.94 ± 1.20 <sup>f</sup>	31.12 ± 0.22 <sup>d</sup>
	4.0	52.75 ± 0.19 <sup>g</sup>	14.68 ± 0.08 <sup>ab</sup>	24.72 ± 0.27 <sup>f</sup>	59.32 ± 0.19 <sup>h</sup>	28.74 ± 0.27 <sup>f</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	64.13 ± 1.48 <sup>c</sup>	8.75 ± 1.03 <sup>e</sup>	37.74 ± 0.82 <sup>a</sup>	77.01 ± 1.26 <sup>c</sup>	38.75 ± 1.01 <sup>a</sup>
	2.6	57.22 ± 0.65 <sup>e</sup>	13.91 ± 0.70 <sup>bc</sup>	30.60 ± 0.38 <sup>c</sup>	65.59 ± 5.13 <sup>e</sup>	33.62 ± 3.15 <sup>c</sup>
	4.0	50.57 ± 0.83 <sup>g</sup>	15.53 ± 0.87 <sup>a</sup>	35.30 ± 1.04 <sup>b</sup>	66.28 ± 1.15 <sup>e</sup>	38.57 ± 1.12 <sup>a</sup>

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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



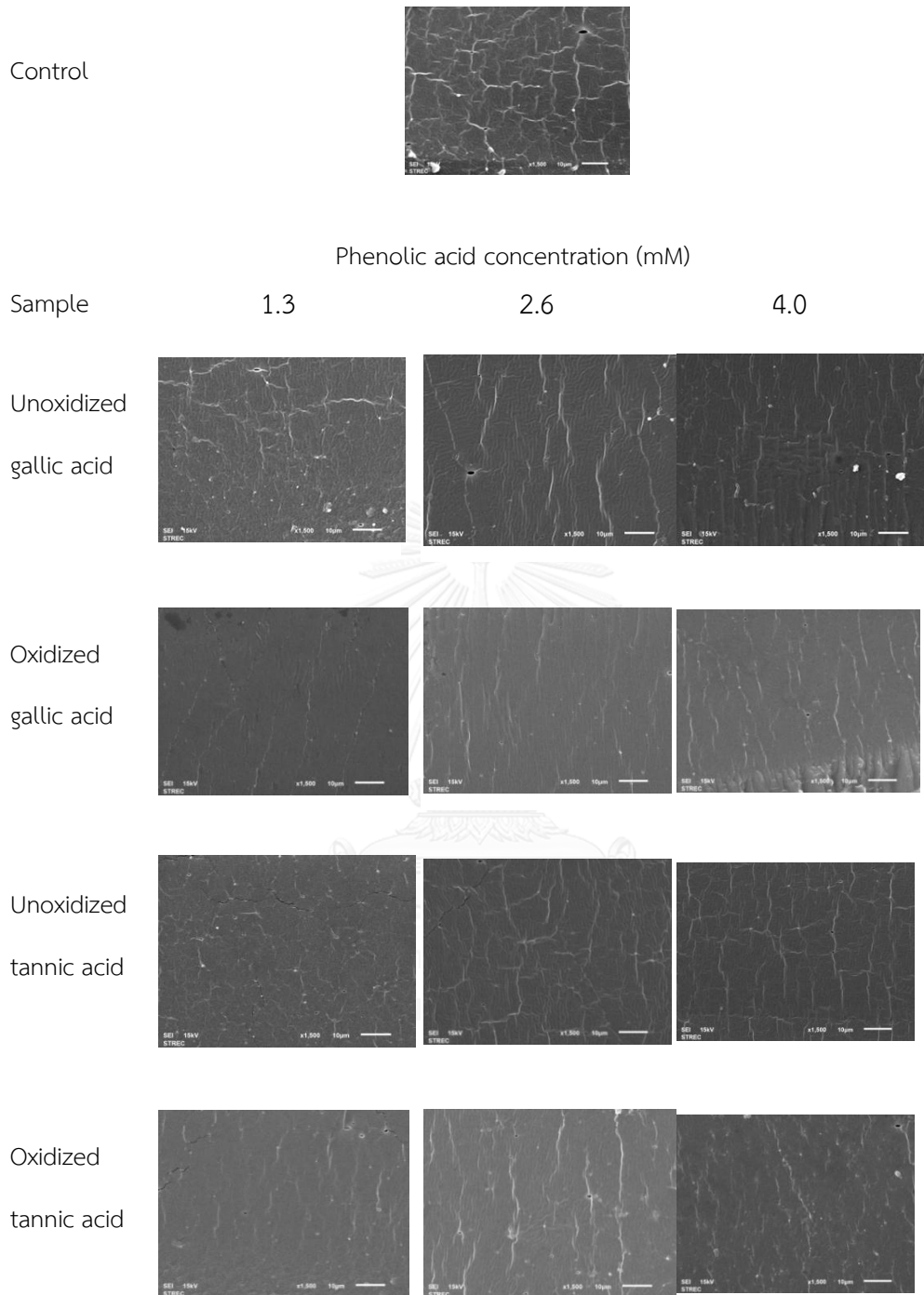
รูปที่ 4.9 ลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nuthong *et al.* (2009) ซึ่งศึกษาผลของการเติมกรดแทนนิก กรดแคฟเฟอิก และกรดเพรูอิก ต่อสมบัติด้านสีของฟิล์มพลาสติกโปรตีนจากสุกร พบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่า  $L^*$  ลดลง ในขณะที่  $+a^*$  และ  $+b^*$  มีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Prodpran *et al.* (2012) รายงานในทำนองเดียวกันว่าฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวานที่เติมสารประกอบฟีนอลิกมีค่า  $+a^*$  และ  $+b^*$  เพิ่มขึ้น ในขณะที่  $L^*$  มีค่าลดลง และ Hoque *et al.* (2011) พบว่าการเติมสารสกัดจากเครื่องเทศที่มีสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งได้แก่ อบเชย กานพลู และโป๊ยกั๊ก ในฟิล์มเจลาตินจากหนังหมึกกระดองทำให้ฟิล์มที่ได้มีค่า  $L^*$  ลดลง ในขณะที่  $+b^*$  มีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

#### 4.1.9 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวาง

ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางที่ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าตัวอย่างควบคุมมีโครงสร้างภาคตัดขวางที่ไม่หนาแน่นนัก ในขณะที่ตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกมีโครงสร้างที่มีความหนาแน่นกว่าตัวอย่างควบคุม และเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่ได้มีโครงสร้างที่หนาแน่นมากขึ้น และตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีโครงสร้างภาคตัดขวางที่มีความหนาแน่นกว่าตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ อย่างไรก็ตามการศึกษาโครงสร้างภาคตัดขวางโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนี้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกและตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดแทนนิก ความหนาแน่นของเมทริกซ์ฟิล์มที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นผลมาจากการเกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างที่เติมกรดฟีนอลิก (Haslam, 1989)

ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานของ Nuthong *et al.* (2009) ซึ่งพบว่าฟิล์มโปรตีนพลาสติกจากสุกรที่เติมกรดแคฟเฟอิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 3% มีลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางที่มีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม



รูปที่ 4.10 ลักษณะโครงสร้างภาคตัดขวางของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า

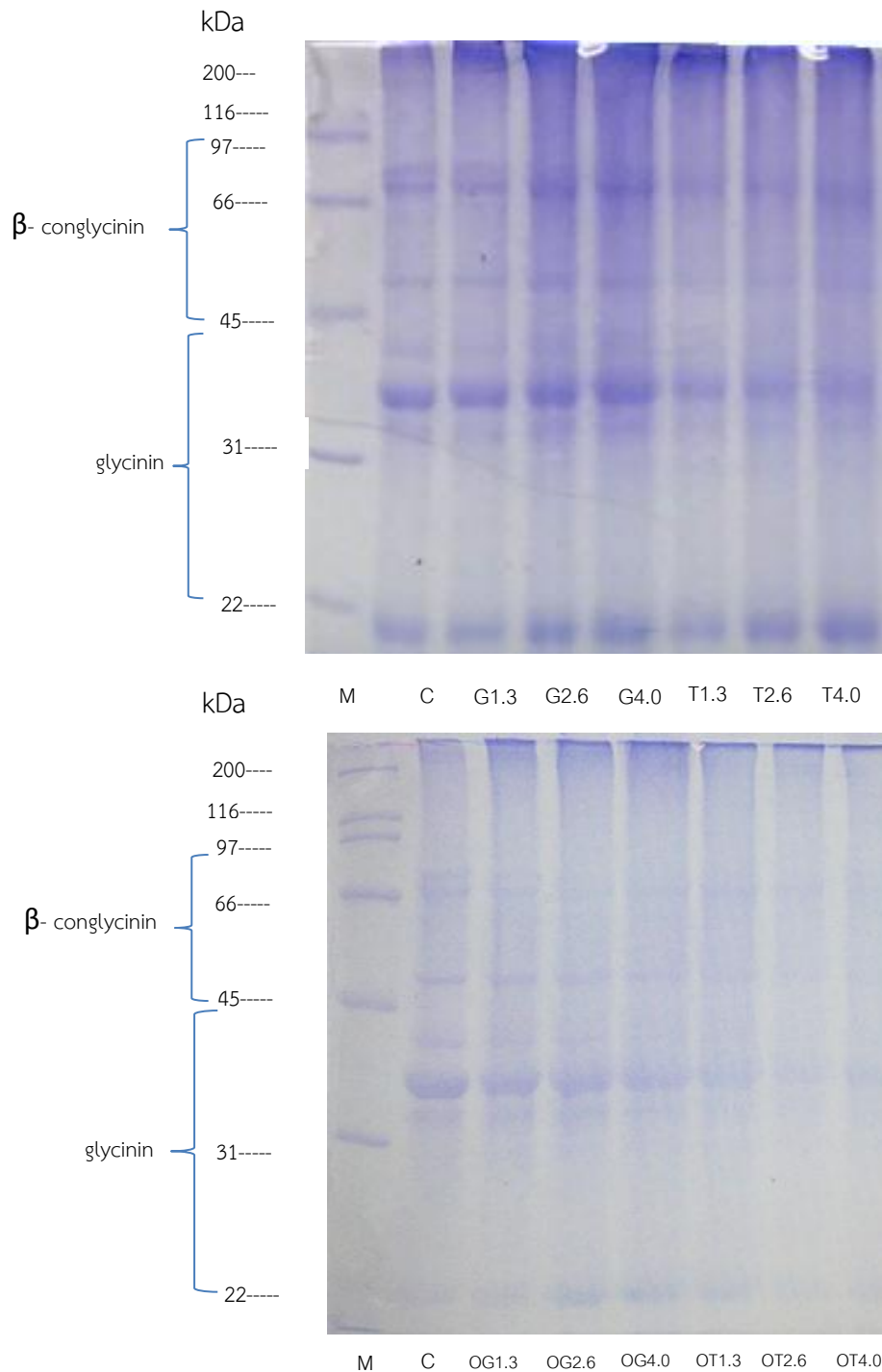
#### 4.1.9 รูปแบบของแถบโปรตีน

เพื่อยืนยันการเชื่อมข้ามของโปรตีนในตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิก ในงานวิจัยนี้ จึงติดตามการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ โดยวิเคราะห์รูปแบบของแถบโปรตีนด้วย SDS-PAGE รูปที่ 4.10 แสดงรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

โปรตีนกล้ามเนื้อประกอบด้วยส่วน (fraction) หลัก 2 ส่วน คือ ไกลซินิน และเบตา-คอนไกลซินิน โดยไกลซินินของกล้ามเนื้อประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) จำนวน 2 หน่วย ได้แก่ หน่วยย่อยชนิดที่เป็นกรด (acidic subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36 กิโลดาลตัน และหน่วยย่อยชนิดที่เป็นเบส (basic subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตัน (Ly et al., 1998; Liu, 1999) ส่วนเบตา-คอนไกลซินินประกอบด้วยหน่วยย่อยจำนวน 3 หน่วย ได้แก่ แอลฟา แอลฟา-ไพรม์ และเบตา ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 84, 66 และ 45 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Tang et al., 2006)

จากรูปที่ 4.10 (บน) ซึ่งแสดงรูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีความเข้มของแถบโปรตีนไกลซินินลดลง ในขณะที่ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่มีความเข้มของแถบโปรตีนใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้เมื่อพิจารณาารูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์ (รูปที่ 4.10 ล่าง) พบว่าแถบโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนกล้ามเนื้อไกลซินินและเบตา-คอนไกลซินินมีความเข้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ โดยตัวอย่างที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ มีการลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนมากที่สุด การลดลงของความเข้มของแถบโปรตีนที่เป็นที่องค์ประกอบหลักของโปรตีนกล้ามเนื้อนี้อาจเนื่องมาจากการเชื่อมข้ามของโปรตีนทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีปริมาณลดลง (Rawel et al., 2002)

ก่อนหน้านี้ Prodpran et al. (2012) ซึ่งศึกษาผลของการเติมสารประกอบพีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากปลาตาหวาน และติดตามการเชื่อมข้ามของโปรตีนโดยวิเคราะห์รูปแบบของแถบไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ พบว่าการเติมสารประกอบพีนอลิกมีผลทำให้แถบโปรตีนมีความเข้มลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบพีนอลิก และความเข้มของแถบโปรตีนลดลงตามความเข้มข้นของสารประกอบพีนอลิกที่เพิ่มขึ้น ผู้วิจัยอธิบายว่าสารประกอบพีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของโปรตีนและทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีปริมาณลดลง



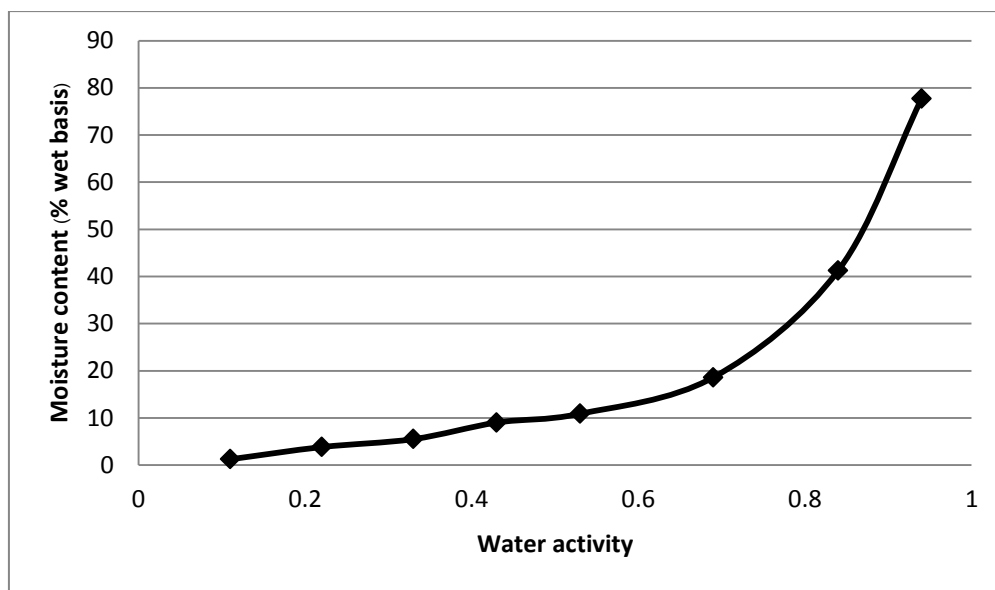
รูปที่ 4.11 (บน) รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) และฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดพีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (G1.3, G2.6 และ G4.0) และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ไม่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (T1.3, T2.6 และ T4.0) และ (ล่าง) รูปแบบของแถบโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (C) และฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดพีนอลิกที่ออกซิไดส์ ได้แก่ ฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (OG1.3, OG2.6 และ OG4.0) และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 1.3, 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ (OT1.3, OT2.6 และ OT4.0) โดย M คือ molecular weight marker

#### 4.1.10 เส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้น

เนื่องจากสมบัติที่รายงานในหัวข้อ 4.1.1-4.1.9 เป็นค่าสำหรับตัวอย่างฟิล์มที่ทำให้ อยู่ในสมดุล (equilibrate) ในภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์คงที่ที่ 50% หรือกล่าวได้ว่าตัวอย่างฟิล์ม มีวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.50 แต่ในทางปฏิบัติการนำฟิล์มไปใช้งานในภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์หรือ วอเตอร์แอกทิวิตีที่ต่างกันอาจทำให้สมบัติของฟิล์มแตกต่างกันไป นอกจากนี้ฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองมี สมบัติที่ชอบน้ำจึงสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงของวอเตอร์แอกทิวิตีได้เนื่องจากเกิดการถ่ายเท ของความชื้น (moisture migration) ระหว่างฟิล์มกับสิ่งแวดล้อม (เช่น ผลิตภัณฑ์ภายใน และ บรรยากาศโดยรอบ) ซึ่งอาจส่งผลต่อสมบัติต่างๆ ของฟิล์มได้ ในขั้นตอนนี้จึงศึกษาพฤติกรรมการณ์การดูด ความชื้นของฟิล์ม โดยคัดเลือกตัวอย่างฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาด สูงสุดมาใช้ในการทดลอง ซึ่งได้แก่ฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ นำมาทำ ให้อยู่ในสมดุลกับบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ตั้งแต่ 11-94% (หรือวอเตอร์แอกทิวิตีตั้งแต่ 0.11-0.94) ที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียส เพื่อติดตามพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้น รวมทั้งวิเคราะห์ สมบัติเชิงกลของฟิล์มที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทิวิตี

รูปที่ 4.11 แสดงเส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นของฟิล์มที่เติมกรดแทนนิก ที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และตารางที่ 4.3 แสดงความต้านทานแรงดึงขาดและการยึดตัวถึงจุดขาดของตัวอย่างฟิล์มดังกล่าวที่เป็นฟังก์ชันของ วอเตอร์แอกทิวิตี พบว่าเมื่อจำแนกตามวิธีของ Brunauer et al. (1940) ตัวอย่างฟิล์มมีพฤติกรรม การณ์การดูดความชื้นแบบ type II ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปตัวเอส (sigmoidal isotherm) (รูปที่ 4.11) แม้ว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณความชื้นในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำ (0.1-0.4) จะไม่ชัดเจนนัก พฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นแบบ type II นี้เป็นลักษณะของระบบที่ประกอบด้วยองค์ประกอบทั้งที่เป็น พอลิเมอร์ขนาดใหญ่ (เช่น โพรตีน) และตัวถูกละลายขนาดเล็ก (เช่น กลีเซอรอล) โดยฟิล์มที่ได้ จากการทดลองนี้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณความชื้นในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตี 0.1-0.4 หลังจากนั้น ปริมาณความชื้นมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงวอเตอร์แอกทิวิตี 0.4-0.5 และปริมาณความชื้นกลับเพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วเมื่อวอเตอร์แอกทิวิตีสูงกว่า 0.5

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rachtanapun et al. (2012) ซึ่งศึกษา เส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นของฟิล์มเดี่ยวและฟิล์มคอมพอสิตที่ผลิตจากโพรตีนถั่วเหลืองสกัดและ คาร์บอกซีเมทิลไคโทซาน โดยผู้วิจัยพบว่าฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัด และฟิล์มคาร์บอกซีเมทิลไคโทซาน และฟิล์มคอมพอสิตของโพรตีนถั่วเหลืองสกัดและ คาร์บอกซีเมทิลไคโทซาน มีรูปแบบของเส้นพฤติกรรมการณ์การดูดความชื้นแบบ type II ทั้งหมด



รูปที่ 4.12 เส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์

สำหรับสมบัติเชิงกลที่สัมพันธ์กับวอเตอร์แอกทिवิตี (ตารางที่ 4.3) พบว่าวอเตอร์แอกทिवิตีมีผลต่อสมบัติเชิงกลอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) โดยพบว่าเมื่อวอเตอร์แอกทिवิตีสูงขึ้น ตัวอย่างฟิล์มมีความต้านทานแรงดึงขาดลดต่ำลงสำหรับการยืดตัวถึงจุดขาดพบว่าที่วอเตอร์แอกทिवิตีต่ำหรือสูงมากๆ ตัวอย่างฟิล์มมีความสามารถในการยืดตัวถึงจุดขาดลดลง โดยที่วอเตอร์แอกทिवิตีเท่ากับ 0.53 เป็นช่วงที่ฟิล์มมีการยืดตัวถึงจุดขาดสูงสุด นอกจากกลีเซอรอลที่เติมลงไปเป็นพลาสติกไซเซอร์แล้ว โมเลกุลน้ำที่มีอยู่ในเมทริกซ์ฟิล์มยังทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์ร่วมด้วยที่วอเตอร์แอกทिवิตีต่ำๆ เมื่อฟิล์มเกิดสูญเสียความชื้นออกไป ฟิล์มที่ได้จึงมีลักษณะแข็งและเปราะ กล่าวคือมีความต้านทานแรงดึงขาดสูงและการยืดตัวถึงจุดขาดต่ำ ในขณะที่เมื่อทำให้อยู่สมดุลในภาวะที่มีวอเตอร์แอกทिवิตีสูงๆ ฟิล์มจะดูดความชื้นจากบรรยากาศรอบๆ น้ำที่เพิ่มเข้ามาจะทำให้เกิดการเจือจางของโปรตีนซึ่งเป็นโครงสร้างที่สำคัญของเมทริกซ์ฟิล์ม ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดจึงมีค่าลดลง ดังนั้นการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการนำฟิล์มโปรตีนไปใช้จำเป็นต้องคำนึงถึงภาวะของสิ่งแวดล้อมของฟิล์มด้วย เช่น วอเตอร์แอกทिवิตีของผลิตภัณฑ์ที่นำฟิล์มไปห่อหุ้ม และความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศโดยรอบ



ตารางที่ 4.3 ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่วอเตอร์แอกทิวิตีต่างๆ

วอเตอร์แอกทิวิตี	ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)	การยืดตัวถึงจุดขาด (%)
0.11	7.34 ± 0.22 <sup>a</sup>	11.74 ± 2.84 <sup>e</sup>
0.22	5.45 ± 0.24 <sup>b</sup>	55.55 ± 7.14 <sup>d</sup>
0.33	4.57 ± 0.03 <sup>c</sup>	71.23 ± 18.43 <sup>d</sup>
0.43	3.52 ± 0.06 <sup>d</sup>	78.42 ± 9.38 <sup>d</sup>
0.53	2.65 ± 0.10 <sup>e</sup>	163.9 ± 30.29 <sup>a</sup>
0.69	2.26 ± 0.16 <sup>f</sup>	126.75 ± 18.68 <sup>b</sup>
0.84	1.81 ± 0.06 <sup>g</sup>	82.59 ± 12.06 <sup>d</sup>
0.94	1.37 ± 0.06 <sup>h</sup>	85.58 ± 5.64 <sup>d</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

#### 4.2 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบต่อรูปแบบการปลดปล่อยแบบควบคุมของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก

ในขั้นตอนนี้ได้เลือกฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ จากหัวข้อ 4.1 มาใช้ศึกษาการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด โดยในขั้นตอนนี้ศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบต่อรูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก โดยแปรชนิดของสารประกอบตัวแบบเป็น 3 ชนิด ตามน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ได้แก่ ทริปแทนบลู (961 ดาลตัน) FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) โดยเติมสารประกอบตัวแบบในปริมาณ 1, 10 และ 10 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตรของสารละลายฟิล์ม ตามลำดับ และแปรภาวะของตัวกลางทำละลาย (dissolution medium) เป็น 2 ภาวะ ได้แก่ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลีน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร้อยละการปลดปล่อยสูงสุด (%maximum release) และรูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบแสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.12 ตามลำดับ

จากการศึกษาร้อยละการปลดปล่อยสูงสุด (ตารางที่ 4.4) พบว่าเมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าทริปแทนบลู ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดถึง 59.0 เมื่อสารประกอบตัวแบบมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงขึ้น ร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดมีค่าลดลง โดย FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) มีร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดเท่ากับ 47.7 และ 32.5 ตามลำดับ

เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดก็แสดงผลเป็นไปในแนวทางเดียวกัน โดยพบว่าร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดของทริปแทนบลูมีค่าเท่ากับ 59.5 รองลงมาได้แก่ FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ซึ่งมีร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดเท่ากับ 57.6 และ 36.0 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณการปลดปล่อยสูงสุดของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์

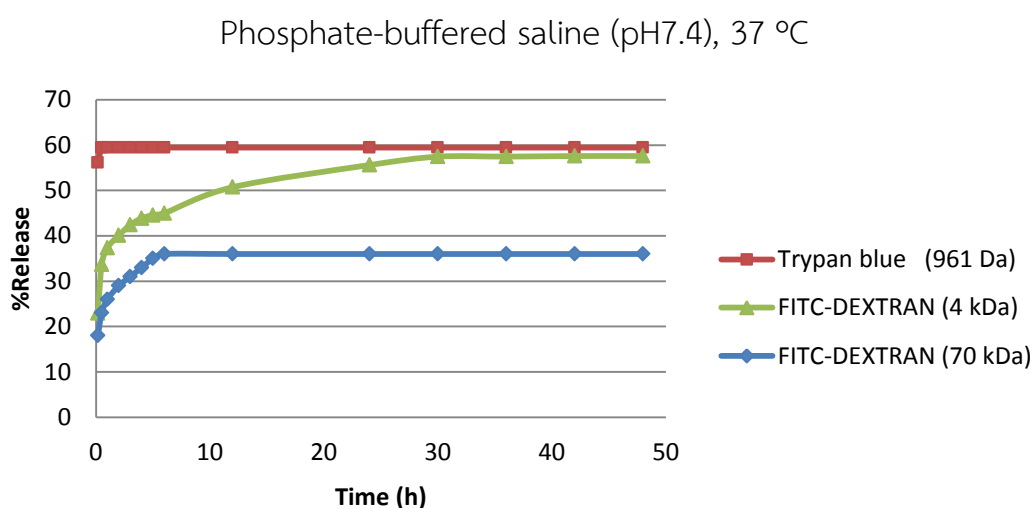
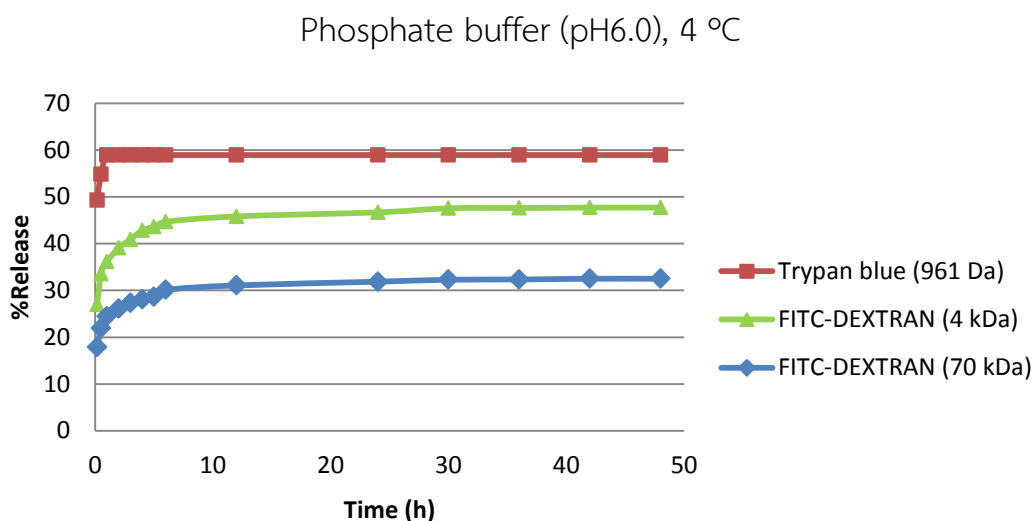
ภาวะของตัวกลาง ทำละลาย	สารประกอบตัวแบบ	ความเข้มข้นของ สารประกอบตัวแบบ ในสารละลายฟิล์ม (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	ร้อยละการปลดปล่อย สูงสุด
สารละลาย	ทริปแทนบลู	1	59.0
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0),	FITC-Dextran (4 kDa)	10	47.7
4 องศาเซลเซียส	FITC-Dextran (70 kDa)	10	32.5
สารละลาย	ทริปแทนบลู	1	59.5
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เซลิน (พีเอช 7.4),	FITC-Dextran (4 kDa)	10	57.6
37 องศาเซลเซียส	FITC-Dextran (70 kDa)	10	36.0

ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hines and Kaplan (2011) ซึ่งศึกษารูปแบบการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบ FITC-dextran จากฟิล์มโพรตีนไฟโบรอินจากไหม โดยแปรชนิดของ FITC-dextran เป็น 4 ชนิดตามน้ำหนักโมเลกุล ได้แก่ 4, 10, 20 และ 40 กิโลดาลตัน ผู้วิจัยรายงานว่าสารประกอบตัวแบบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าถูกปลดปล่อยได้ในอัตราที่เร็วกว่าด้วยร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดที่มากกว่า โดยร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดของ FITC-dextran ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4, 10, 20 และ 40 กิโลดาลตัน มีค่าเท่ากับ 81.9, 59.7, 40.7 และ 9.9 ตามลำดับ

ในแง่รูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบจากตัวอย่างฟิล์ม สำหรับกรณีที่ใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.12 บน) พบว่าทริปแฟนบลูซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (961 ดาลตัน) มีการปลดปล่อยออกจากเมทริกซ์ของฟิล์มอย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 1 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ระดับการปลดปล่อยสูงสุดและคงที่ที่ประมาณ 59% ในขณะที่ FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) และ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยอัตราที่ช้ากว่าทริปแฟนบลูเนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่า โดยในช่วง 4 ชั่วโมงแรก สารประกอบตัวแบบทั้งสองชนิดมีอัตราการปลดปล่อยระดับหนึ่ง หลังจากนั้นจึงมีการปลดปล่อยในอัตราที่ช้ามาก

สำหรับกรณีที่ใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิเนียม (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.12 ล่าง) พบว่าทริปแฟนบลูถูกปลดปล่อยอย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 30 นาทีเพื่อให้ได้ระดับการปลดปล่อยสูงสุดและคงที่ที่ประมาณ 59% ในขณะที่ FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยอัตราที่ช้ากว่า จนกระทั่งเวลา 30 ชั่วโมงเป็นต้นไปจึงได้ระดับการปลดปล่อยสูงสุดและคงที่ที่ประมาณ 57% ส่วน FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ จนกระทั่งเวลา 6 ชั่วโมงเป็นต้นไปจึงได้ระดับการปลดปล่อยคงที่ค่าเพียง 36%

รูปแบบการปลดปล่อยที่แตกต่างกันของสารประกอบตัวแบบทั้ง 3 ชนิด เป็นผลมาจากน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าจะถูกปลดปล่อยได้ช้ากว่าและมีระดับการปลดปล่อยที่ต่ำกว่า เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลที่สูงส่งผลให้เคลื่อนที่ผ่านเมทริกซ์ของฟิล์มโพรตีนได้ช้า และอาจมีโมเลกุลบางส่วนที่ถูกกักไว้ภายในโครงสร้างแหของโพรตีน ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้เป็นไปแนวทางเดียวกันกับรายงานก่อนหน้านี้โดย Mandal *et al.* (2009)



รูปที่ 4.13 รูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบที่ของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ (บน) เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ (ล่าง) เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิเนียม (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สำหรับภาวะที่ใช้ในการศึกษาการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบจากตัวอย่างฟิล์มในงานวิจัยนี้ พบว่าสารประกอบตัวแบบถูกปลดปล่อยได้ต่ำกว่าในกรณีที่ใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลที่ได้นี้อาจเป็นผลร่วมกันจากอุณหภูมิและพีเอช โดยอุณหภูมิที่ต่ำและพีเอชที่เข้าใกล้จุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนถั่วเหลือง อาจทำให้ตัวอย่างฟิล์มละลายได้น้อยลง นอกจากนี้ อุณหภูมิที่ต่ำยังจำกัดการแพร่ของ

สารประกอบตัวแบบ การใช้ฟิล์มโปรตีนเพื่อเป็นตัวพาและปลดปล่อยสารใดๆ จึงต้องคำนึงถึงภาวะของระบบที่นำฟิล์มนั้นไปประยุกต์ด้วย

Deng *et al.* (2010) ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการปลดปล่อยของอินโดเมธาซินในไฮโดรเจลปิดที่ผลิตจากแคลเซียมอัลจิเนตและพอลิ(เอีน-อะครีโลอิลไกลซีน) พบว่าเมื่อตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ิน (พีเอช 7.4) อินโดเมธาซินสามารถถูกปลดปล่อยจากไฮโดรเจลปิดได้สูงถึง 83.5% ในระยะเวลา 650 นาที ในขณะที่เมื่อตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 2.1) อินโดเมธาซินสามารถถูกปลดปล่อยจากไฮโดรเจลปิดได้เพียง 16.6% ที่เวลาเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อินโดเมธาซินมีอัตราการปลดปล่อยจากไฮโดรเจลปิดสูงกว่าที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

#### 4.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาสารยับยั้งจุลินทรีย์

ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่ทำหน้าที่เป็นตัวพาสารยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งได้แก่ โซเดียมแลกเตต ในขั้นตอนนี้ได้เลือกฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ จากหัวข้อ 4.1 มาใช้ศึกษาเนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีสมบัติเชิงกลที่ดีที่สุด โดยในการทดลองแบ่งเป็น 5 ทริตเมนต์ ได้แก่ (1) เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม (C) (2) เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง (S) (3) เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก (SP) (4) เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเตต (SL) และ (5) เนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเตต (SPL) โดยเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 12 วัน

ตารางที่ 4.5 แสดง total viable count ของตัวอย่างเนื้อหุสติดบดปั่นก้อนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าในช่วง 2 วันแรก ทริตเมนต์ C มีการเพิ่มขึ้นของ total viable count อย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ S มี total viable count คงที่ ส่วน SP, SL และ SPL มี total viable count ลดลง ณ วันที่ 5 ของการเก็บรักษาพบว่า C มีการลดลงของ total viable count อย่างไรก็ดีตามในช่วง 8-12 วัน total viable count ของ C มีการเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่ง ในขณะที่ทริตเมนต์ S มี total viable count ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลา 8 วันแรก และจุลินทรีย์มีปริมาณลดลงในวันที่ 12 ในส่วนของทริตเมนต์ SP, SL และ SPL มีการเพิ่มขึ้น

ของ total viable count ในช่วงวันที่ 5-12 สามารถสังเกตเห็นได้ว่า SPL มีการเพิ่มขึ้นของ total viable count ต่ำกว่าทรีตเมนต์อื่น

การที่ทรีตเมนต์ S มีปริมาณ total viable count ต่างจาก C อาจเนื่องมาจาก โปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีไอโซฟลาโวนตามธรรมชาติของถั่วเหลืองซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ USDA (2017) รายงานว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีปริมาณไอโซฟลาโวนทั้งหมด 91.05 มิลลิกรัม/100 กรัม และ Hong et al. (2006) และ Dhayakaran (2014) รายงานว่า ไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

สารประกอบฟีนอลิกหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ Scalbert (1991) เสนอว่าสารในกลุ่มแทนนินมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ แย่งจับกับสารอาหารที่จุลินทรีย์ใช้ในการเจริญ หรือยับยั้งเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในขั้นตอน oxidative phosphorylation ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่ใช้ในการสร้าง ATP ของเซลล์ มีงานวิจัยมากมายที่รายงานว่าแทนนินที่ไฮโดรไลส์ได้ (hydrolysable tannin) เช่น กรดแทนนิก และเอพิแกลโลแคทีกินแกลเลตมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Chung et al., 1998; Kaur et al., 1998; Akiyama et al., 2001; Taguri et al., 2004; Kim et al., 2010; Payne et al., 2013) จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า SP มีปริมาณ total viable count ต่ำกว่า S โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 8 วันแรกของการเก็บรักษา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดแทนนิกที่เติมลงไป

เมื่อเปรียบเทียบ SL กับ S และเปรียบเทียบ SPL กับ SP จะเห็นได้ว่าทรีตเมนต์ที่เติมโซเดียมแลกเตตมีปริมาณ total viable count ต่ำกว่า โดยโซเดียมแลกเตตเป็นวัตถุเจือปนอาหารประเภทสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในเนื้อสัตว์ (Shelef, 1994)

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณ *Escherichia coli* ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่า ณ วันที่ 0 นั้น ทรีตเมนต์ C มีปริมาณ *E. coli* น้อยกว่า 11,000 MPN/g ในช่วง 2 วันแรกของการเก็บรักษา พบว่า SP, SL และ SPL มีปริมาณของ *E. coli* ต่ำกว่า C ในช่วงวันที่ 8-12 พบว่า C ยังคงมีปริมาณ *E. coli* สูงสุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับปริมาณ total viable count ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกและฟิล์มที่เติมโซเดียมแลกเตตมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ตารางที่ 4.5 Total viable count ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

Day	Total viable count (CFU/g)				
	C	S	SP	SL	SPL
0	$1.4 \times 10^8$				
1	$2.6 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$4.2 \times 10^7$	$3.6 \times 10^7$	$2.5 \times 10^6$
2	$3.4 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$2.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$5.5 \times 10^6$
5	$6.0 \times 10^7$	$2.1 \times 10^8$	$6.6 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$
8	$9.5 \times 10^7$	$2.3 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$
12	$1.1 \times 10^8$	$8.0 \times 10^7$	$2.6 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$	$9.1 \times 10^7$

C เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม

S เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง

SP เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก

SL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเตต

SPL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเตต

ตารางที่ 4.6 *Escherichia coli* ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

Day	<i>E. coli</i> (MPN/g)				
	C	S	SP	SL	SPL
0	$<1.1 \times 10^4$				
1	$>1.1 \times 10^6$	$>1.1 \times 10^6$	$4.6 \times 10^5$	$4.6 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$
2	$>1.1 \times 10^6$	$>1.1 \times 10^6$	$4.6 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$
5	$9.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^6$	$2.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^3$
8	$4.6 \times 10^6$	$2.1 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$9.3 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$
12	$1.5 \times 10^6$	$9.3 \times 10^5$	$4.3 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$2.3 \times 10^4$

C เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม

S เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง

SP เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก

SL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเทต

SPL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเทต

Wit and Rombouts (1990) รายงานว่าโซเดียมแลกเทตเข้มข้น 5% สามารถลดวอเตอร์แอกทิวิตีส่งผลให้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ Lactic acid bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Salmonella* Typhimurium โดยโซเดียมแลกเทตทำให้ช่วง lag phase ของจุลินทรีย์เหล่านี้เพิ่มขึ้น รวมทั้งลดอัตราการเจริญและปริมาณจุลินทรีย์ด้วย แม้จะพบว่าโซเดียมแลกเทตไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของ *E. coli* แต่ยังมีความสามารถในการลดปริมาณของ *E. coli* ได้

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณ *Staphylococcus aureus* พบว่า ทุกตัวอย่างตรวจพบ *S. aureus* ในปริมาณน้อยกว่า 10 CFU/g ตลอดระยะเวลา 12 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มตัวอย่างไม่มีการปนเปื้อนจากมนุษย์ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง



ตารางที่ 4.7 *Staphylococcus aureus* ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

Day	<i>S. aureus</i> (CFU/g)				
	C	S	SP	SL	SPL
0	<10				
1	<10	<10	<10	<10	<10
2	<10	<10	<10	<10	<10
5	<10	<10	<10	<10	<10
8	<10	<10	<10	<10	<10
12	<10	<10	<10	<10	<10

C เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม

S เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง

SP เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ดัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิก

SL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเตต

SPL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ดัดแปรด้วยสารประกอบฟีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเตต

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณ *Salmonella* spp. พบว่าในวันที่ 0 นั้น มีการตรวจพบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อน โดยในวันที่ 1 2 และ 5 มี 2 ทริตเมนต์ คือ SL และ SPL เป็นทริตเมนต์ที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ในวันที่ 8 พบว่ามี 3 ทริตเมนต์ที่ตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ได้แก่ SP, SL และ SPL ในวันที่ 12 พบว่าทุกทริตเมนต์ตรวจไม่พบ *Salmonella* spp.

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า C และ S ตรวจพบ *Salmonella* spp. ในทุกวันที่ตรวจสอบ ยกเว้นวันที่ 12 ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการตายลงโดยธรรมชาติของจุลินทรีย์ในช่วง death phase ในขณะที่ตัวอย่าง SP ซึ่งเดิมกรดแทนนิกพบว่าตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ตั้งแต่วันที่ 8 จนถึงวันที่ 12 โดยผลที่ได้นี้น่าจะเกิดจากกรดแทนนิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของฟิล์มที่ใช้ในการห่อหุ้ม เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนทำให้เชื้อตายลงเร็วกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมกรดแทนนิก ส่วนทริตเมนต์ SL และ SPL ไม่พบ *Salmonella* spp. ในทุกวันที่ตรวจ

ตารางที่ 4.8 *Salmonella* spp. ของตัวอย่างเนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่เก็บรักษาไว้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

Day	<i>Salmonella</i> spp. (CFU/g)				
	C	S	SP	SL	SPL
0	Detect				
1	Detect	Detect	Detect	ND	ND
2	Detect	Detect	Detect	ND	ND
5	Detect	Detect	Detect	ND	ND
8	Detect	Detect	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND

C เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม

S เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง

SP เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบพีนอลิก

SL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่เติมโซเดียมแลกเตต

SPL เนื้อหมูสดบดปั้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ตัดแปรด้วยสารประกอบพีนอลิกและเติมโซเดียมแลกเตต

ND, not detected in 25 grams

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวพา โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมและปลดปล่อยสารตามที่ต้องการ เช่น สารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Emiroğlu *et al.*, 2010; Moditsi *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามการนำฟิล์มที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้ไปใช้จริงในผลิตภัณฑ์อาหาร ยังคงต้องคำนึงถึงลักษณะปรากฏและรสชาติของผลิตภัณฑ์ด้วย เนื่องจากสีที่เข้มของฟิล์มและรสชาติของกรดฟีนอลิกอาจมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่ากรดฟีนอลิกสามารถใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัด การเติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์มีผลทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น โดยกรดแทนนิกมีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มสูงกว่ากรดแกลลิก และกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลสูงกว่ากรดฟีนอลิกที่ไม่ออกซิไดส์ โดยทั่วไปความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น ในงานวิจัยนี้พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ มีความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาดสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 2.34 เมกะพาสคาล และ 322.5% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่เติมกรดฟีนอลิก) 1.03 และ 114.7% ตามลำดับ ความสามารถในการปรับปรุงสมบัติเชิงกลของกรดฟีนอลิกนี้เนื่องมาจากกรดฟีนอลิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์สามารถทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมข้ามโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการติดตามรูปแบบของแถบโปรตีนโดย SDS-PAGE

นอกจากนี้ยังพบว่ากรดฟีนอลิกทำให้ผิวฟิล์มมีสมบัติความไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นและฟิล์มมีความสามารถในการละลายน้ำลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์สำหรับสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ พบว่าสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของตัวอย่างฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ( $p > 0.05$ ) ยกเว้นฟิล์มที่เติมกรดแกลลิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ และฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 2.6 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ที่มีสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) อย่างไรก็ตามสภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดฟีนอลิกเพิ่มขึ้น

การเติมกรดฟีนอลิกทั้งที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ในฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดมีผลอย่างมากต่อสมบัติเชิงแสง โดยพบว่าฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีความโปร่งแสงต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) สำหรับสมบัติด้านสีฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่า  $L^*$  ลดลง ในขณะที่  $+a^*$  และ  $+b^*$  มีค่าเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีมุมสีลดต่ำลงจากตัวอย่างควบคุมจนมีค่าเข้าใกล้ประมาณ 50 องศา ซึ่งเป็นมุมสีของสีเหลือง-ส้ม นอกจากนี้ความเข้มสีของตัวอย่างฟิล์มที่เติมกรดฟีนอลิกมีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

สำหรับพฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิคงที่ 25 องศาเซลเซียสของฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าตัวอย่างฟิล์มมีเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นแบบ type II โดยมอเตอร์แอกทิวิตีของฟิล์มมีผลต่อความต้านทานแรงดึงขาดและการยืดตัวถึงจุดขาด ดังนั้นการนำฟิล์มดังกล่าวไปใช้งานกับผลิตภัณฑ์ที่มีมอเตอร์แอกทิวิตีแตกต่างกันไปจึงต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงกลที่อาจเปลี่ยนแปลงไปด้วย

สำหรับการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบตัวแบบต่อรูปแบบการปลดปล่อยแบบควบคุมของฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันของสารประกอบตัวแบบส่งผลต่อร้อยละการปลดปล่อยสูงสุดและรูปแบบการปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์ม นอกจากนี้ภาวะที่ใช้ในการทดสอบการปลดปล่อย ได้แก่ พีเอชและอุณหภูมิ ยังส่งผลต่อรูปแบบการปลดปล่อยของสารประกอบตัวแบบด้วย

สำหรับการศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมูสดบดขึ้นก้อนที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่เติมโซเดียมแลกเตต พบว่าการเติมกรดแทนนิกและ/หรือโซเดียมแลกเตตมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดย total viable count และจำนวน *Escherichia coli* มีค่าลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าทรีตเมนต์ที่เติมโซเดียมแลกเตต (SL และ SPL) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ได้

## รายการอ้างอิง

เอกสารอ้างอิงภาษาไทย

นลินทิพย์ คงแก้ว. (2554). ผลของลิพิดและการบ่มด้วยความร้อนต่อสมบัติของฟิล์มอิมัลชันโปรตีน ถั่วเหลือง. (บัณฑิตศึกษา), จุฬาลงกรณ์วิทยาลัย.

เอกสารอ้างอิงภาษาอังกฤษ

Ágoston, V., Cemazar, M., Kaján, L., & Pongor, S. (2005). Graph-representation of oxidative folding pathways. *BMC Bioinformatics*, 6, 1-7.

Ahmadi, R., Kalbasi-Ashtari, A., Oromiehie, A., Yarmand, M.-S., & Jahandideh, F. (2012). Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk). *Journal of Food Engineering*, 109, 745-751.

Akiyama, H., Fujii, K., Yamasaki, O., Oono, T., & Iwatsuki, K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 487-491.

AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis, 17th ed.* Washington, D. C: The Association of Analytical Chemists.

Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126.

ASTM. (1999). *Annual Book of ASTM Standards*. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

Balange, A. K., & Benjakul, S. (2009). Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1059-1064.

Bourtoom, T., & Chinnan, M. S. (2009). Improvement of water barrier property of rice starch-chitosan composite film incorporated with lipids. *Food Science and Technology International.*, 15, 149-158.

- Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E., & Teller, E. (1940). On a theory of Van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62, 1723-1732.
- Chambi, H., & Grosso, C. (2006). Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase. *Food Research International*, 39, 458-466.
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 38, 421-464.
- Cisneros-Zevallos, L., & Krochta, J. M. (2002). Internal modified atmospheres of coated fresh fruits and vegetables: understanding relative humidity effects. *Journal of Food Science*, 67, 1990-1995.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1996). Rheological Model for the Mechanical Properties of Myofibrillar Protein-Based Film. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1116-1122.
- Dhayakaran, R. P. A. (2014). Investigation of the Antimicrobial Activity of Soy based Isoflavones and Peptides against Pathogenic Biofilms.
- Dias, A. B., Müller, C. M. O., Larotonda, F. D. S., & Laurindo, J. B. (2010). Biodegradable film based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51, 213-219.
- Emiroğlu, Z. K., Yemis, G. P., Coskun, B. K., & Candogan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci*, 86, 283-288.
- Fernandez, L., de Apodaca, E. D., Cebrian, M., Villaran, M. C., & Mate, J. I. (2006). Effect of the unsaturation degree and concentration of fatty acids on the properties of whey protein isolate edible films. *European Food Research and Technology* 224, 415-420.
- Friesen, K., Chang, C., & Nickerson, M. (2014). Incorporation of phenolic compounds rutin and epicatechin, into soy protein isolate films: mechanical, barrier and cross-linking properties. *Food Chemistry*, 172, 18-23.
- Fujimori, E. (1965). Ultraviolet light-induced changes in collagen macromolecules. *Biopolymers*, 3, 115-119.

- Galiotta, G., Gioia, L. D., Guilbert, S., & 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, 3123-3130.
- Galus, S., Mathieu, H., Lenart, A., & Debeaufort, F. (2012). Effect of modified starch or maltodextrin incorporation on the barrier and mechanical properties, moisture sensitivity and appearance of soy protein isolate-based edible films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 148-154.
- Gennadios, A., Ghorpade, V. M., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (1996). Heat curing of soy protein films. *Biological Systems Engineering*, 39, 575-579.
- Ghanbarzadeh, B., Musavi, M., Oromiehie, A. R., Rezayi, K., Rad, E. R., & Milanib, J. (2007). Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 1191-1197.
- Ghanbarzadeh, B., & Oromiehi, A. R. (2008). Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein: barrier, mechanical properties and AFM analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43, 209-215.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. L., & Guilbert, S. (1994). Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 39-50.
- González, A., Strumia, M. C., & Alvarez Igarzabal, C. I. (2011). Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation. *Journal of Food Engineering*, 106, 331-338.
- Ha, C. R., & Iuchi, I. (2003). Transglutamiase. In J. R. Whitaker, A. G. J. Voragen & D. W. S. Wong (Eds.), *Handbook of Food Enzymology* (pp. 367-655). New York, NY: Marcel Dekker.
- Han, J. H., Seo, G. H., Park, I. M., Kim, G. N., & Lee, D. S. (2006). Physical and mechanical properties of pea starch edible films containing beeswax emulsions. *Journal of Food Science* 71, E290-E296.
- Harper, B. A., Barbut, S., Lim, L. T., & Marcone, M. F. (2013). Characterization of 'wet' alginate and composite films containing gelatin, whey or soy protein. *Food Research International*, 52, 452-459.



- Haslam, E. (1989). Vegetable tannins revisited. In J. D. Phillipson, D. C. Ayres & H. Baxter (Eds.), *Plant Polyphenols*. Cambridge, UK: Cambridge University.
- Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., & Chiralt, A. (2004). Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids*, 18, 403-411.
- Hernández-Muñoz, P., Villalobos, R., & Chiralt, A. (2004). Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. *Food Hydrocolloids*, 18, 647-654.
- Hines, D. J., & Kaplan, D. L. (2011). Mechanisms of controlled release from silk fibroin films. *Biomacromolecules*, 12, 804-812.
- Hong, H., Landauer, M. R., Foriska, M. A., & Ledney, G. D. (2006). Antibacterial activity of the soy isoflavone genistein. *J Basic Microbiol*, 46, 329-335.
- Hoque, M. S., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2011). Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*, 25, 1085-1097.
- Jangchud, A., & Chinnan, M. S. (1999). Properties of peanut protein film: sorption isotherm and plasticizer effect. *LWT- Food Science and Technology*, 32, 89-94.
- Jensen, E. V. (1959). Thiol-disulfide interchange. *Science*, 130, 1319-1323.
- Jiang, Y., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., Li, L., & Yang, X.-Q. (2007). Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 218-225.
- Kamper, S. L., & Fennema, O. R. (1984). Water vapor permeability of an edible fatty acid bilayer films. *Journal of Food Science*, 49, 1482-1485.
- Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2012). Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29, 290-297.
- Kaur, S., Grover, I. S., Singh, M., & Kaur, S. (1998). Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from *Terminalia chebula* in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 479, 169-179

- Kim, K. M., Weller, C. L., Hanna, M. A., & Gennadios, A. (2002). Heat curing of soy protein films at selected temperatures and pressures. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 140-145.
- Kim, T. J., Silva, J. L., Kim, M. K., & Jung, Y. S. (2010). Enhanced antioxidant capacity and antimicrobial activity of tannic acid by thermal processing. *Food Chem*, 118, 740-746.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A., & Voilley, A. (2010). Liquid and water vapor transfer through whey protein/lipid emulsion films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1673-1680.
- Kunte, L. A., Gennadios, A., Cuppet, S. L., Hanna, M. A., & Weller, C. L. (1997). Cast films from soy protein isolates and fractions. *Cereal Chemistry*, 74, 115-118.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lim, L.-T., Mine, Y., & Tung, M. A. (1998). Transglutaminase cross-linked egg white protein films: tensile properties and oxygen permeability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4022-4029.
- Liu, K. S. (1999). *Soybeans: Chemistry*. New York, NY: Aspen Publishers.
- Ly, Y. T. P., Johnson, L. A., & Jane, J. (1998). Soy protein as biopolymer. In D. L. Kaplan (Ed.), *Biopolymers from Renewable Resources*, (pp. 144-176). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Ma, W., Tang, C.-H., Yang, X.-Q., & Yin, S.-W. (2013). Fabrication and characterization of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolate–chitosan composite films at acidic pH. *Food Hydrocolloids*, 31, 237-247.
- Mahmoud, R., & Savello, P. (1992). Mechanical properties of and water vapor transferability through whey protein film. *Journal of Dairy Science* 75, 942-946.
- Mandal, B. B., Mann, J. K., & Kundu, S. C. (2009). Silk fibroin/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. *Eur J Pharm Sci*, 37, 160-171.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P., & Porta, R. (2003). Preparation and mechanical properties of edible pectin–soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 102, 191-198.

- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *Hortscience*, 27, 1254-1255.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsion films. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 307-312.
- Michon, T., Chenu, M., Kellershon, N., Desmadril, M., & Guequen, J. (1997). Horseradish peroxidase oxidation of tyrosine-containing peptides and their subsequent polymerization: a kinetic study. *Biochemistry* 36, 8504-8513.
- Moditsi, M., Lazaridou, A., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2014). Modifying the physical properties of dairy protein films for controlled release of antifungal agents. *Food Hydrocolloids*, 39, 195-203.
- Monedero, F. M., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91, 509-515.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42, 67-89.
- Nuthong, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2009). Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. *Food Hydrocolloids*, 23, 736-741.
- O'Brien, P. J., Siraki, A. G., & Shangari, N. (2005). Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology* 35, 209-662.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F., & 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, 5417-5425.
- Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C., & Jackson, M. G. (2005). Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *Journal of Food Engineering*, 70, 205-210.

- Park, S. K., Hettiarachchy, N. S., Ju, Z. Y., & Aristippos., G. (2002). Formation and Properties of Soy Protein Films and Coatings. Faculty of Engineering Chulalongkorn University. *Chapter 4*.
- Payne, D. E., Martin, N. R., Parzych, K. R., Rickard, A. H., Underwood, A., & Bolesa, B. R. (2013). Tannic Acid Inhibits Staphylococcus aureus Surface Colonization in an IsaA-Dependent Manner. *Infection and Immunity*, 81, 496-504.
- Pelissari, F. M., Andrade-Mahecha, M. M., Sobral, P. J. A., & Megegalli, F. C. (2013). Comparative study on the properties of flour and starch films of plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *Food Hydrocolloids*, 30, 681-690.
- Perez-Gago, M. B., & Krochta, J. M. (2001). Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Food Engineering and Physical Properties*, 66, 705-710.
- Perez-Mateos, M., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. (2007). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 25, 53-61.
- Peroval, C., Debeaufort, F., Despre, D., & Voilley, A. (2002). Edible arabinoxylan-based films, effects of lipid type on water vapor permeability, film structure, and other physical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3977-3983.
- Peterson, G. L. (1983). Determination of total protein. *Methods in Enzymology* 91, 95-119.
- Pierpoint, W. S. (1969). *o*-Quinones formed in plant extracts their reaction with bovine serum albumin. *Biochemical Journal*, 112, 619-629.
- Prodpran, T., Benjakul, S., & Phatcharat, S. (2012). Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. *International Journal of Biological Macromolecule*, 51, 774-782.
- Rachtanapun, P., Luangkamin, S., Tanprasert, K., & Suriyatem, R. (2012). Carboxymethyl cellulose film from durian rind. *LWT - Food Science and Technology*, 48, 52-58.

- Rawel, H. M., Czajka, D., Rohn, S., & Kroll, J. (2002). Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecule*, 30, 137-150.
- Rawel, H. M., Czajka, D. r., Rohn, S., & Kroll, J. r. (2002). Interaction of diffent phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal Biological Macromolecules*, 30, 137-150.
- Rayner, M., Ciolfi, V., Maves, B., Stedman, P., & Mittal, G. (2000). Development and application of soy-protein films to reduce fat intake in deep-fried foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 777-782.
- Ressouany, M., Vachon, C., & Lacroix, M. (2000). Microbial resistance of caseinate films crosslinked by gamma irradiation. *Journal of Dairy Research*, 67, 119-124.
- Rhim, J., Gennadios, A., Handa, A., Weller, C., & Hanna, M. (2000). Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4937-4941.
- Sabato, S. F., Nakamurakare, N., & Sobral, P. J. (2005). Effect of ionizing radiation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein biofilms. *International symposium on utilization of acellerators*, 37, 115-123.
- Salgado, P. R., Molina Ortiz, S. E., Petruccelli, S., & Mauri, A. N. (2010). Biodegradable sunflower protein films naturally activated with antioxidant compounds. *Food Hydrocolloids*, 24, 525-533.
- Salmoral, E. M., Gonzalez, M. E., Mariscal, M. P., & Medina, L. F. (2000). Comparison of chickpea and soy protein isolate and whole flour as biodegradable plastics. *Industrial Crops and Products*, 11, 227-236.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemisrry*, 30, 3875-3883.
- Shelef, L. A. (1994). Antimicrobial effects of lactates: A Review. *Food Protection*, 57, 445-450.
- Shellhammer, T. H., & Krochta, J. M. (1997). Whey protein emulsion films performance as affected by lipid type and amount. *Journal of Food Science*, 66, 390-394.

- Siripatrawan, U., & Harte, B. R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770-775.
- Soazo, M., Pérez, L. M., Rubiolo, A. C., & Verdini, R. A. (2013). Effect of freezing on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocolloids*, 31, 256-263.
- Strauss, G., & Gibson, S. M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18, 81-89.
- Strauss, G., & Gibson, S. M. (2004). Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids*, 18, 81-89.
- Stuchell, Y. M., & Krochta, J. M. (1994). Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films. *Journal of Food Science*, 59, 1332-1337.
- Su, G., Cai, H., Zhou, C., & Wang, Z. (2007). Formation of edible soybean and soybean-complex protein films by a cross-linking treatment with a new streptomyces transglutaminase. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 381-388.
- Taguri, T., Tanaka, T., & Kouno, I. (2004). Antimicrobial Activity of 10 Different Plant Polyphenols against Bacteria Causing Food-Borne Disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1965-1969.
- Tang, C.-H., Jiang, Y., Wen, Q.-B., & Yang, X.-Q. (2005). Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates. *Journal of Biotechnology*, 120, 296-307.
- Tang, C.-H., Wu, H., Chen, Z., & Yang, X.-Q. (2006). Formation and properties of glycinin-rich and bata-conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase. *Food Research International* 39, 87-97.
- USDA. (2017). Basic Report 16122, Soy protein isolate. *National Nutrient Database for Standard Reference*.

- Wijeratne, W. B. (1993). Functional properties of soy proteins in food systems. In: I. K. Tanteerataarm (ed.) *Soybean Processing for Food Uses*. p 29-42. Urbana, IL: *International Soybean Program*.
- Wit, J. C. d., & Rombouts, F. M. (1990). Antimicrobial activity of sodium lactate. *Food Microbiology*, 7, 113-120.
- Wu, K., Wang, Y., & Zhitomirsky, I. (2010). Electrophoretic deposition of TiO<sub>2</sub> and composite TiO<sub>2</sub>-MnO<sub>2</sub> films using benzoic acid and phenolic molecules as charging additives. *Journal of Colloid and Interface Science*, 352, 371-378.
- Xiong, Y.-L., Wang, Y.-S., & Chen, J. (2012). Oxidized caffeic acid cross-linked whey protein films: thermal properties, light transmittance, water barrier properties and in vitro digestibility. *Food Science* 33, 133-137.
- Yang, L., & Paulson, A. T. (2000). Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. . *Food Research International*, 33, 571-578.
- Zahedi, Y., Ghanbarzadeh, B., & Sedaghat, N. (2010). Physical properties of edible emulsified films based on pistachio globulin protein and fatty acids. *Journal of Food Engineering*, 100, 102-108.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



## ภาคผนวก ก

## ข้อมูลเฉพาะของผลิตภัณฑ์

## ก.1 โพรตีนถั่วเหลืองสกัด

ผลิตภัณฑ์ของ: บริษัท ไมท์ตี้ อินเทอร์เน็ตเนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ

ข้อมูลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์:

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

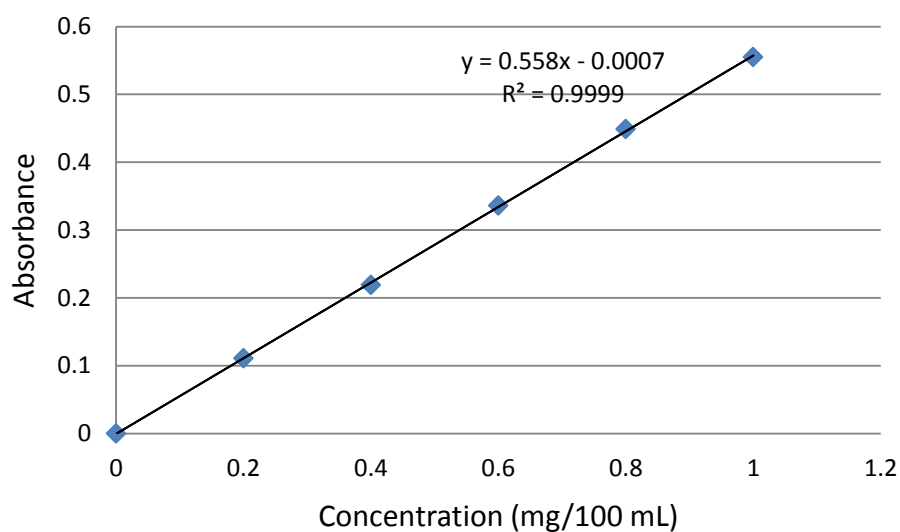
ข้อมูลวิเคราะห์จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์:

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

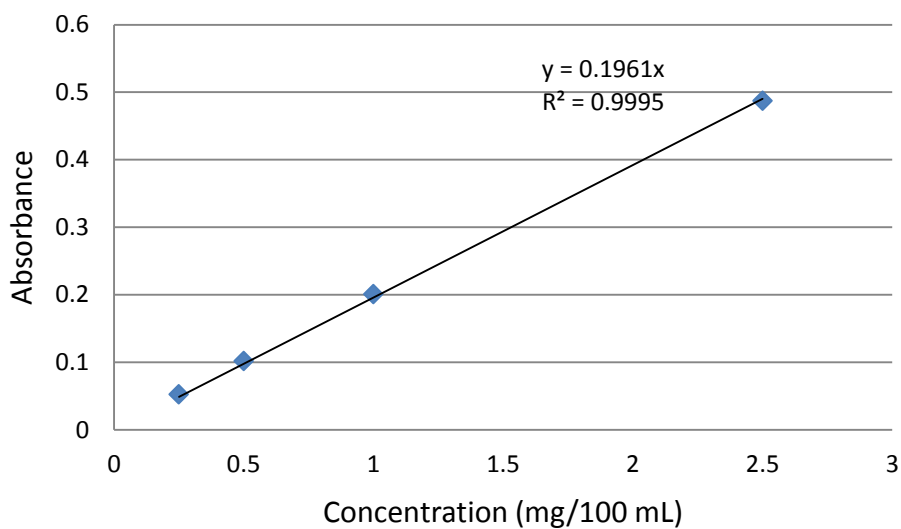
## ภาคผนวก ข

## กราฟเทียบมาตรฐาน

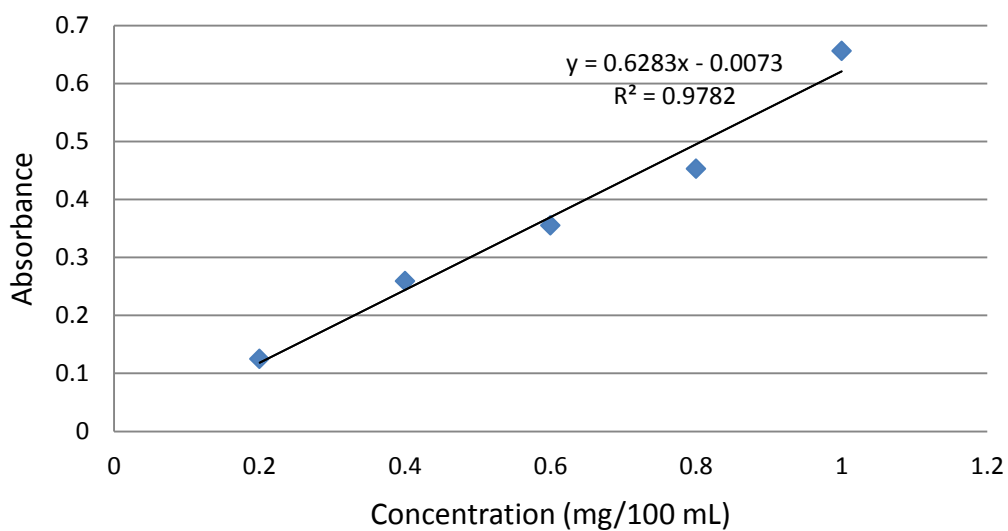
ข.1 การวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของสารประกอบตัวแบบในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ ข.1 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของทริปแฟนบลู ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

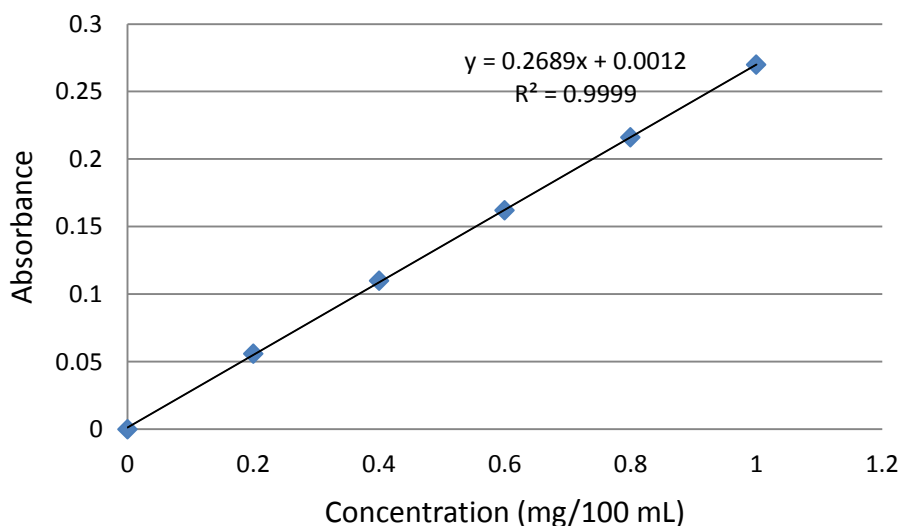


รูปที่ ข.2 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน) ในสารละลายพอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

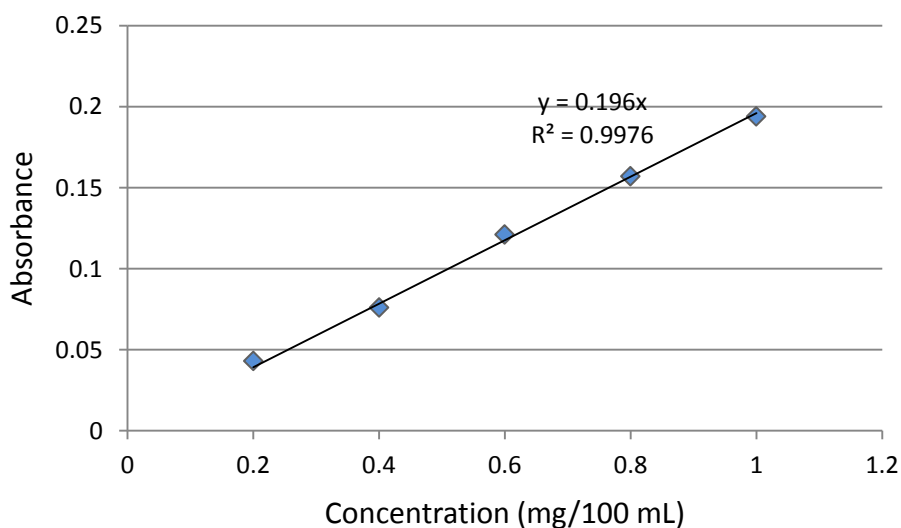


รูปที่ ข.3 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ในสารละลายพอสเฟตบัฟเฟอร์เซลล์ิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

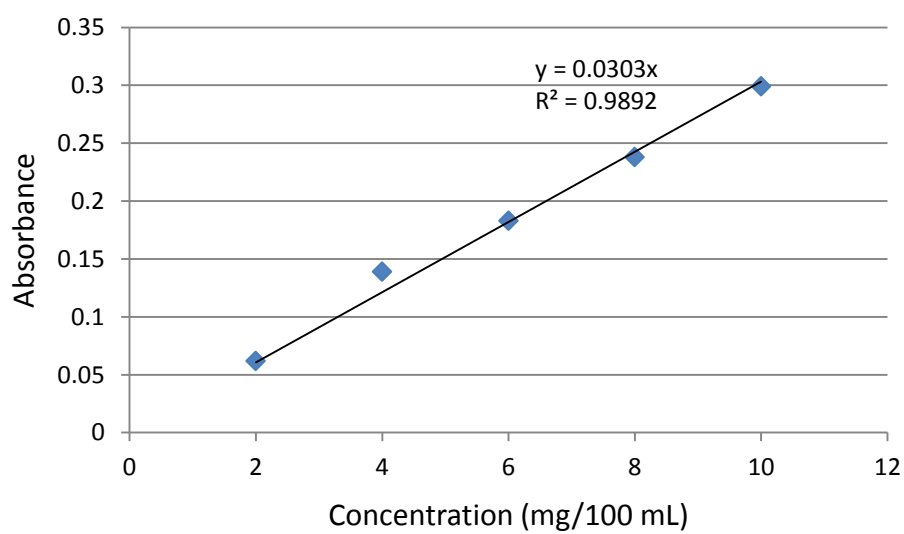
ข.2 การวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของสารประกอบตัวแบบในสารละลาย  
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



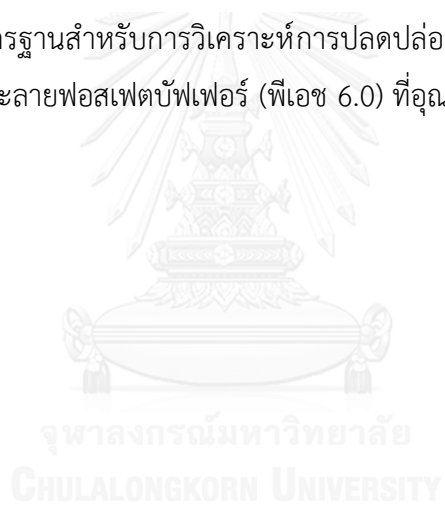
รูปที่ ข.4 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของทริปแฟนบลู  
ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



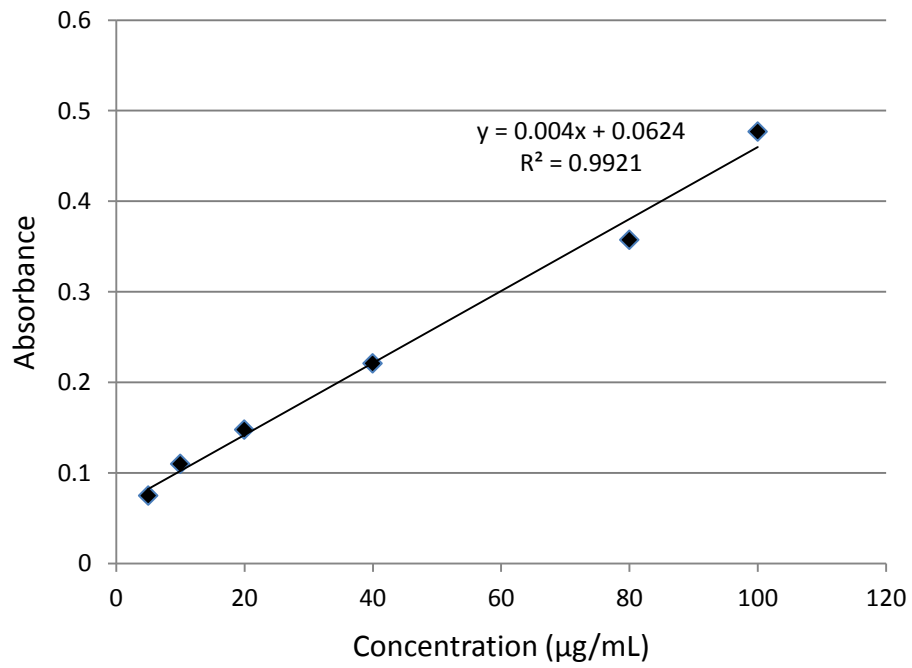
รูปที่ ข.5 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran  
(4 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



รูปที่ ข.6 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์การปลดปล่อยแบบควบคุมของ FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



### ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry



รูปที่ ข.7 กราฟเทียบมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี modified Lowry



## ภาคผนวก ค

## ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ค.1 ความต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ความต้านทานแรงดึงขาด (เมกะพาสคาล)
Control	0	1.03 ± 0.10 <sup>g</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	1.02 ± 0.06 <sup>g</sup>
	2.6	1.29 ± 0.03 <sup>e</sup>
	4.0	1.52 ± 0.04 <sup>d</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	1.45 ± 0.05 <sup>d</sup>
	2.6	1.56 ± 0.06 <sup>d</sup>
	4.0	1.88 ± 0.03 <sup>c</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	1.16 ± 0.08 <sup>f</sup>
	2.6	1.57 ± 0.02 <sup>d</sup>
	4.0	1.88 ± 0.04 <sup>c</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	2.08 ± 0.02 <sup>b</sup>
	2.6	2.11 ± 0.18 <sup>b</sup>
	4.0	2.35 ± 0.05 <sup>a</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.2 การยืดตัวถึงจุดขาดของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	การยืดตัวถึงจุดขาด (%)
Control	0	114.70 ± 10.24 <sup>e</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	212.88 ± 29.70 <sup>d</sup>
	2.6	229.46 ± 13.15 <sup>cd</sup>
	4.0	235.04 ± 22.60 <sup>cd</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	219.96 ± 28.49 <sup>cd</sup>
	2.6	249.79 ± 25.59 <sup>bcd</sup>
	4.0	301.57 ± 11.49 <sup>a</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	207.68 ± 7.84 <sup>d</sup>
	2.6	257.67 ± 39.59 <sup>bc</sup>
	4.0	282.45 ± 29.64 <sup>ab</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	239.11 ± 16.72 <sup>cd</sup>
	2.6	286.00 ± 18.49 <sup>ab</sup>
	4.0	322.56 ± 25.41 <sup>a</sup>

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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



ตารางที่ ค.3 สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	สภาพให้ซึมผ่านได้ของไอน้ำ (กรัม เมตร/ตารางเมตร ชั่วโมง พาสคาล)
Control	0	0.79 ± 0.06 <sup>a</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	0.73 ± 0.04 <sup>ab</sup>
	2.6	0.72 ± 0.05 <sup>ab</sup>
	4.0	0.73 ± 0.05 <sup>ab</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	0.71 ± 0.03 <sup>ab</sup>
	2.6	0.69 ± 0.02 <sup>ab</sup>
	4.0	0.67 ± 0.04 <sup>b</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	0.76 ± 0.10 <sup>ab</sup>
	2.6	0.73 ± 0.06 <sup>ab</sup>
	4.0	0.72 ± 0.01 <sup>ab</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	0.68 ± 0.08 <sup>ab</sup>
	2.6	0.66 ± 0.05 <sup>b</sup>
	4.0	0.67 ± 0.06 <sup>b</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

<sup>a, b</sup> ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ค.4 ความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ความสามารถในการละลายน้ำ (%)
Control	0	60.53 ± 1.67 <sup>a</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	51.96 ± 4.62 <sup>b</sup>
	2.6	52.33 ± 3.56 <sup>b</sup>
	4.0	48.28 ± 2.87 <sup>bcd</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	49.23 ± 2.64 <sup>bc</sup>
	2.6	47.66 ± 2.48 <sup>bcd</sup>
	4.0	45.11 ± 2.91 <sup>cde</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	43.81 ± 3.41 <sup>def</sup>
	2.6	39.81 ± 3.94 <sup>f</sup>
	4.0	40.24 ± 0.56 <sup>ef</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	42.35 ± 1.20 <sup>ef</sup>
	2.6	40.47 ± 1.88 <sup>ef</sup>
	4.0	34.06 ± 1.54 <sup>g</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค. 5 มุมสัมพัทธ์ระหว่างหยดน้ำกับผิวฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิกและกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	มุมสัมพัทธ์ (องศา)
Control	0	28.87 ± 0.60 <sup>c</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	29.48 ± 1.76 <sup>c</sup>
	2.6	30.59 ± 2.79 <sup>c</sup>
	4.0	30.15 ± 0.68 <sup>c</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	31.44 ± 3.27 <sup>c</sup>
	2.6	35.11 ± 2.76 <sup>ab</sup>
	4.0	37.92 ± 0.68 <sup>a</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	30.65 ± 0.68 <sup>c</sup>
	2.6	30.08 ± 1.71 <sup>c</sup>
	4.0	36.95 ± 2.26 <sup>a</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	32.51 ± 3.82 <sup>bc</sup>
	2.6	36.93 ± 0.84 <sup>a</sup>
	4.0	38.34 ± 0.76 <sup>a</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.6 ร้อยละของแสงส่องผ่านของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแกลลิก และกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์และไม่ออกซิไดส์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ตัวอย่างฟิล์ม	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	ค่าแสงส่องผ่าน (%)
Control	0	96.83 ± 0.63 <sup>a</sup>
Unoxidized gallic acid	1.3	56.3 ± 1.82 <sup>b</sup>
	2.6	43.15 ± 2.08 <sup>c</sup>
	4.0	15.8 ± 1.20 <sup>h</sup>
Oxidized gallic acid	1.3	44.55 ± 2.85 <sup>c</sup>
	2.6	34.98 ± 0.41 <sup>d</sup>
	4.0	18.28 ± 1.09 <sup>g</sup>
Unoxidized tannic acid	1.3	28.38 ± 1.46 <sup>e</sup>
	2.6	24.23 ± 1.33 <sup>f</sup>
	4.0	19.05 ± 2.51 <sup>g</sup>
Oxidized tannic acid	1.3	23.18 ± 1.39 <sup>f</sup>
	2.6	14.93 ± 1.24 <sup>h</sup>
	4.0	9.72 ± 0.92 <sup>i</sup>

ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ ค.7 พฤติกรรมการดูดความชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ของฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่  
เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์

วอเตอร์แอกทิวิตี	ปริมาณความชื้น (% โดยฐานเปียก)
0.11	1.25 ± 0.15
0.22	3.84 ± 0.43
0.33	5.52 ± 0.44
0.43	9.03 ± 0.92
0.53	10.89 ± 0.61
0.69	18.61 ± 0.53
0.84	41.28 ± 1.33
0.94	77.69 ± 1.09

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ค.8 การปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทริปแทนบลู

เวลา (ชั่วโมง)	0.17	0.5	1	2	3	4	24	48
ปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด (มิลลิกรัม/100 มิลลิตร)	0.009794	0.00118	0.000817	0.000245	0.000737	0.0000133	0.00000133	0
ปริมาณการปลดปล่อยสะสม (มิลลิกรัม/100 มิลลิตร)	0.009854	0.010974	0.011791	0.012035	0.012772	0.012785	0.012787	0.012787
ร้อยละการปลดปล่อย	49.27	54.87	58.95	58.95	58.95	58.95	58.95	58.95

FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน)

เวลา (ชั่วโมง)	0.17	0.5	1	2	3	4	24	48
ปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด (มิลลิกรัม/100 มิลลิตร)	0.053401	0.013776	0.005102	0.005952	0.003571	0.003912	0.005952	0.003741
ปริมาณการปลดปล่อยสะสม (มิลลิกรัม/100 มิลลิตร)	0.054025	0.067177	0.072279	0.078231	0.081803	0.085714	0.091667	0.095408
ร้อยละการปลดปล่อย	27.01	33.59	36.14	39.12	40.90	42.86	45.83	47.70

FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน)

เวลา (ชั่วโมง)	0.17	0.5	1	2	3	4	24	48
ปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด (มิลลิกรัม/100 มิลลิตร)	0.035314	0.008581	0.00495	0.00341	0.00242	0.00143	0.006051	0.00286
ปริมาณการปลดปล่อยสะสม (มิลลิกรัม/100 มิลลิตร)	0.035754	0.043894	0.048845	0.052255	0.054675	0.056106	0.062156	0.065017
ร้อยละการปลดปล่อย	17.88	21.95	24.42	26.13	27.34	28.05	31.08	32.51

ตารางที่ ค.9 การปลดปล่อยตามเวลาของสารประกอบตัวแบบจากฟิล์มโพรตีนถั่วเหลืองสกัดที่เติมกรดแทนนิกที่ออกซิไดส์เข้มข้น 4.0 มิลลิโมลาร์ เมื่อใช้ตัวกลางทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซลิน (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทริปแทนบลู

เวลา (ชั่วโมง)	0.17	0.5	1	2	3	4	24	48
ปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.045851	0.00431	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
ปริมาณการปลดปล่อยสะสม (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.08699	0.0913	0.0913	0.0913	0.0913	0.0913	0.0913	0.0913
ร้อยละการปลดปล่อย	56.13	59.47	59.47	59.47	59.47	59.47	59.47	59.47

FITC-dextran (4 กิโลดาลตัน)

เวลา (ชั่วโมง)	0.17	0.5	1	2	3	4	24	48
ปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.045851	0.02151	0.007378	0.005469	0.002622	0.004913	0.001372	0.000816
ปริมาณการปลดปล่อยสะสม (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.04851	0.07002	0.077398	0.082867	0.085489	0.090402	0.091774	0.09259
ร้อยละการปลดปล่อย	22.92	33.68	37.37	40.10	42.41	43.87	55.62	57.60

FITC-dextran (70 กิโลดาลตัน)

เวลา (ชั่วโมง)	0.17	0.5	1	2	3	4	24	48
ปริมาณการปลดปล่อย ณ เวลาที่ตรวจวัด (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.024829	0.004527	0.002587	0.002626	0.001719	0.001467	0.00182	0.0001
ปริมาณการปลดปล่อยสะสม (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	0.024829	0.029356	0.031943	0.034569	0.036288	0.037756	0.039576	0.039576
ร้อยละการปลดปล่อย	18.3	23.16	26.91	29.08	31.3	33.67	35.44	36.0

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธีรภัทร์ ตั้งสมบุญ เกิดเมื่อวันที่ 11 กันยายน พ.ศ. 2533 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2555 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2556

นายธีรภัทร์ ตั้งสมบุญ ได้นำเสนอผลงานภาคบรรยายในการประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 42 ณ เซ็นทาราแกรนด์ แอท เซ็นทรัลพลาซ่า ลาดพร้าว กรุงเทพมหานคร ระหว่างวันที่ 30 ตุลาคม ถึงวันที่ 2 ธันวาคม พ.ศ. 2559

ผลงานตีพิมพ์

Tangsomboon, T., Puangpraphant, S. and Mahawanich, T. 2016. Modification of soy protein film using phenolic compounds. Proceedings of the 42th Congress on Science and Technology of Thailand (STT42), Centara Grand at Central Plaza Ladprao, Bangkok, November 30-December 2.