



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง: การใช้สารประกอบฟีนอลเป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีน
ในแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
(Use of phenolic compounds as protein cross-linkers
in fish myofibrillar protein films)

โดย: ผศ.ดร. ธรรมบุญ โปรตปราน

ธันวาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการเรื่อง: การใช้สารประกอบฟีนอลเป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีน
ในแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
(Use of phenolic compounds as protein cross-linkers
in fish myofibrillar protein films)

โดย: ผศ.ดร. ธรรมบุญ โปรดปราน
ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ: MRG4880020

ชื่อโครงการ: การใช้สารประกอบฟีนอลเป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนในแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล
จากกล้ามเนื้อปลา

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธรรมนุญ โปรตปราน
ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail address: thummanoon.p@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของสารประกอบฟีนอลชนิดและความเข้มข้นต่างๆ (caffeic acid, catechin, ferullic acid และ tannic acid ที่ระดับร้อยละ 1, 3 และ 5 ของโปรตีน) ต่อการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาทูนา (*Priacanthus tayenus*) ที่พีเอชเท่ากับ 11 พบว่า tannic acid ให้การเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้สารประกอบฟีนอลชนิดอื่นที่ระดับเดียวกัน ซึ่งแสดงได้จากการลดลงของหมู่อะมิโนอิสระและความเข้มข้นของแถบโปรตีนไมโอซินเส้นหลัก (myosin heavy chain: MHC) มากที่สุด นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพของการเชื่อมประสานโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณการใช้สารประกอบฟีนอลเพิ่มขึ้น ฟิล์มที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลมีสมบัติเชิงกลดีขึ้น โดยฟิล์มที่ได้มีค่า ยังก์มอดุลัส (Young's modulus: E) และความต้านทานแรงดึง (tensile strength: TS) สูงขึ้น ส่วนค่าการยืดตัวเมื่อขาด (elongation at break: EAB) ลดลง ($p < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ฟิล์มที่เติม tannic acid มีสมบัติเชิงกลที่ดีกว่าฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลชนิดอื่น นอกจากนี้ ฟิล์มที่เติมสารประกอบฟีนอลมีค่าการซึมผ่านไอน้ำ (water vapor permeability: WVP) ต่ำกว่าฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมสารประกอบฟีนอล การเติมสารประกอบฟีนอลทำให้ความใสของฟิล์มลดลง และมีผลต่อสีของฟิล์มแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลที่ใช้ อย่างไรก็ตามฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลทั้งที่ไม่เติมและที่เติมสารประกอบฟีนอลมีสมบัติในการต้านการส่องผ่านแสงยูวีที่มีความยาวคลื่นในช่วง 200 – 280 นาโนเมตร ได้อย่างดีเยี่ยม การเติมสารประกอบฟีนอลมีผลให้ฟิล์มที่ได้มีสมบัติการต้านการส่องผ่านแสงที่มองเห็น (visible light) ที่มีความยาวคลื่นช่วง 350 – 500 นาโนเมตร ดีขึ้น นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าสภาวะการผสมสารประกอบฟีนอลในสารละลายฟิล์มมีผลต่อประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริล โดยการผสมเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ร่วมกับการให้ออกซิเจนในระหว่างการผสมช่วยให้การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้นและฟิล์มที่ได้มีสมบัติที่ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ให้ออกซิเจนระหว่างการผสม

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ (เปลือกไม้เคี่ยม เปลือกมังคุด กาแฟ และชาเขียว) ต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มจากโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา

พบว่า สารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมให้ประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนสูงสุด ส่งผลให้ฟิล์มโปรตีนที่ได้มีค่าการต้านทานแรงดึง (TS) สูงที่สุดและค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ต่ำที่สุด ปริมาณการเชื่อมประสานโปรตีนโดยสารสกัดพอลิฟีนอลจากไม้เคี่ยมเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารสกัดที่ใช้เติมในสารละลายฟิล์ม โดยพบว่าการเติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมในระดับร้อยละ 0.5 ของโปรตีน กวนผสมพร้อมให้ออกซิเจนเป็นเวลา 30 นาที ให้ฟิล์มโปรตีนที่มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นและยังมีความยืดหยุ่นที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การเติมสารสกัดจากพืชชนิดและปริมาณที่เหมาะสมในสารละลายฟิล์ม ทำให้ได้ฟิล์มโปรตีนที่มีสมบัติต่างๆ ดีขึ้น ได้แก่ สมบัติเชิงกล สมบัติการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำ การต้านทานน้ำ รวมทั้งความคงตัวทางความร้อนและความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาฟิล์ม ดังนั้นสารประกอบฟีนอลหรือสารสกัดฟีนอลจากพืชที่ทำการศึกษานี้สามารถนำมาใช้เป็นสารเชื่อมประสานโปรตีนที่ไม่มีพิษ โดยมีผลช่วยปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก: ฟิล์มโปรตีน โปรตีนไมโอไฟบริล สารประกอบฟีนอล การเชื่อมประสาน สมบัติ

Project Code: MRG4880020

Project Title: Use of phenolic compounds as protein cross-linkers in fish myofibrillar protein films

Investigator: Asst. Prof. Dr. Thummanoon Prodpran
Department of Material Product Technology
Faculty of Agro-Industry
Prince of Songkla University

E-mail address: thummanoon.p@psu.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract

The effects of types (caffeic acid, catechin, ferullic acid and tannic acid) and concentrations (1, 3 and 5% based on protein) of phenolic compounds on cross-linking of myofibrillar proteins from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) muscle at pH 11 were investigated. Among all phenolic compounds used, tannic acid exhibited the highest cross-linking ability on myofibrillar protein as evidenced by the more decreased free amino groups and the lower band intensity of myosin heavy chain (MHC). In addition, the extent of protein cross-linking increased with increasing concentration of phenolic compounds. Addition of phenolic compounds into the film forming solution (1.5% protein, 0.75% glycerol, pH 11) enhanced the mechanical properties of the films. As polyphenol content increased, Young's modulus (E) and tensile strength (TS) of the films increased while their elongation at break (EAB) decreased ($p < 0.05$). At the same concentration, tannic acid rendered the film with higher mechanical properties, compared to others. Water vapor permeability (WVP) of the films added with phenolic compounds was lower than that of the control film (without phenolic compound). Phenolic compounds added decreased the film transparency and affected the color of the films differently, depending on types and concentrations used. However, films from myofibrillar proteins with and without polyphenol had the excellent barrier properties to UV light at the wavelength of 200 – 280 nm. The barrier properties to visible light at the wavelength of 350 – 500 nm were remarkably increased when phenolic compounds were incorporated into myofibrillar protein films. Mixing condition for at least 30 min with oxygen purging rendered the increased protein cross-linking efficiency in film-forming solution and resulting film, compared to that without oxygen purging.

The effect of ethanolic extract of different plants (Keim bark, mangosteen husk, instant coffee and green tea) on protein cross-linking and properties of film from fish

myofibrillar protein was also studied. Keim bark extract exhibited the highest protein cross-linking efficiency. The film with Keim extract processed the highest TS and the lowest WVP. The extent of protein cross-linking increased with increasing the extract incorporated. The film with maximum strength and without deteriorated flexibility was obtained by using Keim extract at 0.5% of protein and mixing time of 30 with oxygen purging. Incorporating with appropriate type and concentration of plant phenolic extract into the film-forming solution provided the film with improved mechanical properties, water-vapor barrier property, water resistant as well as thermal and storage stability. Therefore, selected phenolic compounds or plant phenolic extract could be an alternative non-toxic protein cross-linker, which could improve protein-based film properties.

Keywords: Protein film, myofibrillar proteins, phenolic compound, cross-linking, properties.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา
สำหรับการสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบพระคุณนักวิจัยพี่เลี้ยงศาสตราจารย์ ดร. สุทรวัฒน์ เบญจกุล
สำหรับคำชี้แนะและแลกเปลี่ยนความรู้ตลอดการทำวิจัย

ธรรมบุญ โปรตปราน
ธันวาคม 2552

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

1. ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การใช้สารประกอบฟีนอลเป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนในแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
(ภาษาอังกฤษ) Use of phenolic compounds as protein cross-linkers in fish myofibrillar protein films
2. ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
ผศ.ดร. ธรรมนุญ โปรตปราน
ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
หาดใหญ่ สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-286357 โทรสาร 074-212889
E-mail: thummanoon.p@psu.ac.th
3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย เกษตรศาสตร์
5. ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี
6. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันแผ่นฟิล์มหรือวัสดุเคลือบผิวที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาสิ่งแวดล้อมและลดมลภาวะต่างๆ อันเกิดจากการตกค้างของแผ่นฟิล์มสังเคราะห์ แผ่นฟิล์มที่สามารถย่อยสลายได้สามารถผลิตจากพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) หลายชนิด เช่น โปรตีน พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน รวมทั้งการใช้พอลิเมอร์ต่างๆ ร่วมกัน (Rhim et al., 1999; Shellhammer and Krochta, 1997; Mariniello et al., 2003) ฟิล์มจากโปรตีนแหล่งต่างๆ มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบ รวมทั้งโครงสร้างของโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน คุณสมบัติของฟิล์มจากโปรตีนขึ้นกับชนิดของโปรตีน ชนิดและปริมาณของพลาสติกไซเซอร์ รวมทั้งปัจจัยต่างๆ เช่น พีเอชของสารละลายโปรตีน ชนิดและปริมาณส่วนประกอบที่เติมลงในสารละลายที่ใช้เตรียมฟิล์ม โปรตีนไมโอไฟบริลจากเนื้อปลามีคุณสมบัติการเกิดฟิล์มที่ดี (Shiku et al., 2003; Cuq et al., 1995)

เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่มีคุณสมบัติในการดูดความชื้น เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ชอบน้ำจำนวนมาก ส่งผลให้แผ่นฟิล์มจากโปรตีนมีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ ซึ่งการดัดแปลงทางเคมีกับโปรตีน เช่น การใช้สารเชื่อมประสานโปรตีนสามารถช่วยเพิ่มคุณสมบัติดังกล่าว รวมทั้งเพิ่มความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มโปรตีนได้อีกด้วย (Hernandez-Munoz et al., 2004; de Carvalho and Crosso, 2004) แต่อย่างไรก็ตามสารเชื่อมประสานโปรตีนที่ใช้เพื่อ

ปรับปรุงคุณสมบัติดังกล่าวส่วนมากจะเป็นกลุ่มของสารประกอบอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีพิษและไม่เหมาะสมที่นำมาใช้เพื่อเตรียมแผ่นฟิล์มบริโภคได้

สารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมีอยู่มากในพืชหลายชนิด เช่น ชา เยื่อหุ้มเมล็ดถั่วชนิดต่างๆ กาแฟ และเปลือกไม้บางชนิด เป็นต้น ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของสารต่างๆ เช่น caffeic acid, chlorogenic acid, ferullic acid, catechin, flavonoids และ tannin เป็นต้น (Handique and Baruah, 2002; Shahidi et. al., 1992) สารประกอบฟีนอลมีคุณสมบัติในการเชื่อมประสานโปรตีนได้เช่นกัน แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า รวมทั้งยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Shahidi et. al., 1992; Frankel, 1999) สารประกอบฟีนอลที่ผ่านการออกซิไดซ์มีคุณสมบัติในการเชื่อมหมู่อะมิโนของโปรตีนและส่งผลให้ไฮโดรโฟบิซิตีของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Rawel et. al., 2001; 2002) ดังนั้นการใช้สารประกอบฟีนอลในแผ่นฟิล์มโปรตีนจึงอาจมีผลในการลดการซึมผ่านไอน้ำของแผ่นฟิล์มรวมทั้งส่งผลให้คุณสมบัติเชิงกลดีขึ้น อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลการใช้สารประกอบฟีนอลในสภาวะออกซิไดซ์เพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนในฟิล์มจากโปรตีน ดังนั้นการศึกษาถึงผลของการใช้สารประกอบฟีนอลรวมทั้งสารสกัดฟีนอลจากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนจึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์มโปรตีน และเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์แผ่นฟิล์มโปรตีนให้สูงขึ้น

7. วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอล และปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
- เพื่อศึกษาผลของการใช้สารประกอบฟีนอลและสารสกัดฟีนอลจากพืชชนิดต่างๆต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
- เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและเติมสารสกัดพอลิฟีนอล
- เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดพอลิฟีนอลในระหว่างการเก็บรักษา

8. ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมวัตถุดิบ
2. การแยกโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
3. การวิเคราะห์องค์ประกอบของกล้ามเนื้อปลาและโปรตีนไมโอไฟบริล
4. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบพอลิฟีนอลบริสุทธิ์ต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล
5. ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลของสารประกอบฟีนอลบริสุทธิ์
6. ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

7. ศึกษาสมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
8. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติของฟิล์มในระหว่างการเก็บรักษา

9. ผลงานที่ได้รับการเผยแพร่จากงานวิจัย

การประชุมวิชาการ

1. Prodpran, T., Benjakul, S and Phatcharat, S. 2007. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of fish myofibrillar protein film. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวิจัยอาวุโส สกว. ตุลาคม 2550.

บทความตีพิมพ์ (อยู่ระหว่างดำเนินการ)

1. Prodpran, T., Benjakul, S and Phatcharat, S. 2010. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of fish myofibrillar protein film. In preparation for submitting to Bioresource Technology.
2. Prodpran, T. and Benjakul, S. 2010. Properties and characterization of fish myofibrillar protein film incorporated with plant extract. In preparation for submitting to Food hydrocolloids.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
Executive summary	ฉ
สารบัญ	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
สารบัญตาราง	ฎ
บทนำ	1
บทที่ 1 การตรวจเอกสาร	8
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	17
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์	23
บทที่ 4 สรุป	53
เอกสารอ้างอิง	54
Output	60

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	Mechanism in typical protein film formation.	8
2.	Reactions of a phenolic acid with amino side chains of polypeptides.	14
3.	SDS-PAGE protein patterns of unwashed mince (1) and washed mince (2) of bigeye snapper muscle.	24
4.	SDS-PAGE protein patterns of films from bigeye snapper myofibrillar protein incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols; (a) non-reducing and (b) reducing; MHC=myosin heavy chain.	26
5.	Photographs of bigeye snapper myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.	28
6.	Light transmittance of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.	30
7.	SDS-PAGE protein pattern (reducing) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.	30
8.	SDS-PAGE protein pattern (reducing) of film-forming solutions of fish myofibrillar protein incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.	32
9.	SDS-PAGE protein pattern (reducing) of film-forming solutions of fish myofibrillar protein incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions and standing for various times after mixing.	34
10.	Free amino groups of fish myofibrillar protein in film-forming solution incorporated without and with different plant extracts at 1% of protein. Different letters indicate the significant difference ($p<0.05$).	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11.	Free amino groups of fish myofibrillar protein in film-forming solution (FFS) incorporated without and with Keim bark extract at different concentrations. Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$).	40
12.	TGA thermograms of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.	45
13.	SEM micrographs of surface (A) and cross section (B) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract. Control film (without plant extract) (1), films incorporated with Keim bark extract at 0.5% (2) and 3% (3).	46
14.	Moisture sorption isotherms at 28-30°C of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.	47
15.	Changes in moisture content (A) and water vapor permeability (WVP) (B) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5% during storage at room temperature (28-30°C).	49
16.	Changes in tensile strength (A) and elongation at break (B) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5% during storage at room temperature (28-30°C).	50
17.	Changes in L*, a* and b*-values of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5% during storage at room temperature (28-30°C).	52

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	Water vapor permeability of various protein films.	9
2.	Chemical composition of washed and unwashed mince of bigeye snapper muscle.	23
3.	Free-amino group and sulfhydryl group of film-forming solution of bigeye snapper myofibrillar protein.	25
4.	Tensile strength (TS), elongation at break (EAB) and modulus of films from bigeye snapper myofibrillar protein incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.	27
5.	Color of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.	29
6.	Free amino group in film-forming solution of fish myofibrillar protein incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.	32
7.	Tensile strength (TS), elongation at break (EAB) and modulus of fish myofibrillar protein films incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.	33
8.	Water-vapor permeability (WVP) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.	34
9.	Extraction yield and total phenolic content in crude extract of different plants.	35
10.	Tensile strength (TS) and elongation at break (EAB) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different plant extracts at 1% of protein.	38
11.	Water vapor permeability (WVP) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different plant extracts at 1% of protein.	39
12.	Tensile strength (TS) and elongation at break (EAB) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at different concentrations.	41

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13.	Water vapor permeability (WVP) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at different concentrations.	42
14.	Color of myofibrillar protein film incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.	42
15.	Light transmission of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.	43
16.	Swelling, film solubility and protein solubility of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.	44
17.	Degree of hydrolysis of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.	44

บทนำ

ปัจจุบันแผ่นฟิล์มหรือวัสดุเคลือบผิวที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้รับความสนใจมากขึ้นเนื่องจากมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาสิ่งแวดล้อม และลดมลภาวะต่างๆ อันเกิดจากการตกค้างของแผ่นฟิล์มสังเคราะห์ แผ่นฟิล์มที่สามารถย่อยสลายได้สามารถผลิตจากพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) หลายชนิด เช่น โปรตีน พอลิแซ็กคาไรด์ ไขมัน รวมทั้งการใช้พอลิเมอร์ต่างๆ ร่วมกัน (Rhim et al., 1999; Shellhammer and Krochta, 1997; Mariniello et al., 2003) แผ่นฟิล์มดังกล่าวสามารถใช้ในอาหารเพื่อเพิ่มความคงตัวระหว่างการเก็บรักษา โดยสามารถป้องกันการซึมผ่านของก๊าซ ไอน้ำ รวมทั้งตัวถูกละลายชนิดต่างๆ

ฟิล์มจากโปรตีนแหล่งต่างๆมีสมบัติแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบ รวมทั้งโครงสร้างของโมเลกุลของโปรตีนที่แตกต่างกัน เนื่องจากโปรตีนมีโมเลกุลขนาดใหญ่จำเป็นต้องทำการละลายโปรตีนภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เช่น การปรับพีเอชของสารละลายโปรตีน การให้ความร้อน เพื่อเพิ่มการคลายตัวของโปรตีน ทำให้โมเลกุลโปรตีนสามารถจัดเรียงตัวเป็นโครงข่ายที่มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการผลิตแผ่นฟิล์มจากโปรตีนจำเป็นต้องเติมสารพลาสติกไซเซอร์ (plasticizer) เพื่อลดการจับตัวของโปรตีนรวมทั้งเพิ่มความยืดหยุ่นให้กับฟิล์ม สมบัติของฟิล์มจากโปรตีนขึ้นกับชนิดของโปรตีน ชนิดและปริมาณของพลาสติกไซเซอร์ รวมทั้งปัจจัยต่างๆ เช่น พีเอชของสารละลายโปรตีน ชนิด และปริมาณส่วนประกอบที่เติมลงในสารละลายที่ใช้เตรียมฟิล์ม (Rhim et al., 1999)

โปรตีนจากเนื้อปลาคือแหล่งของกรดอะมิโนที่สำคัญหลายชนิดและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โปรตีนจากเนื้อปลาประกอบด้วยโปรตีนซาร์โคพลาสมิก โปรตีนไมโอไฟบริน และโปรตีนสโตรมา ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดสามารถเกิดเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดย Iwata และคณะ (2000) และ Tanaka และคณะ (2001) เตรียมแผ่นฟิล์มจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากเนื้อปลา นอกจากนี้โปรตีนไมโอไฟบรินจากเนื้อปลาสามารถนำมาผลิตเป็นฟิล์มได้เช่นเดียวกัน (Shiku et al., 2003; Cuq et al., 1995) อย่างไรก็ตาม Paschoalick และคณะ (2003) ใช้เนื้อปลานิลสำหรับผลิตฟิล์มที่รับประทานได้ เพื่อลดขั้นตอนการล้างในการกำจัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิกที่มีสมบัติละลายน้ำ และพบว่าโปรตีนซาร์โคพลาสมิกมีผลต่อสมบัติของแผ่นฟิล์มน้อยมาก

เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่มีสมบัติในการดูดความชื้น เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ชอบน้ำจำนวนมาก ส่งผลให้แผ่นฟิล์มจากโปรตีนมีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ ซึ่งการดัดแปลงทางเคมีกับโปรตีน เช่น การใช้สารเชื่อมประสานโปรตีนสามารถช่วยเพิ่มสมบัติดังกล่าว รวมทั้งเพิ่มความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มโปรตีนได้อีกด้วย (Hernandez-Munoz et al., 2004; de Carvalho and Crosso, 2004) แต่อย่างไรก็ตามสารเชื่อมประสานโปรตีนที่มีการใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติดังกล่าวส่วนมากเป็นกลุ่มของสารประกอบอัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีพิษ และไม่เหมาะสมที่นำมาใช้เพื่อเตรียมแผ่นฟิล์มบริโภคได้

สารประกอบพอลิฟีนอลซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมีอยู่มากในพืชหลายชนิด เช่น ชา กาแฟ เปลือกไม้ และเห็ดเห็ดเมล็ดถั่วชนิดต่างๆ เป็นต้น สารประกอบพอลิฟีนอลที่สามารถพบใน

แหล่งธรรมชาติ ได้แก่ caffeic acid, chlorogenic acid, ferullic acid, catechin, flavonoids และ tannin เป็นต้น (Handique and Baruah, 2002; Shahidi et al., 1992) สารประกอบพอลิฟีนอลมีสมบัติในการเชื่อมประสานโปรตีนได้เช่นเดียวกับกับสารประกอบอัลดีไฮด์แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า รวมทั้งยังมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Shahidi et al., 1992; Frankel, 1999) สารประกอบพอลิฟีนอลที่ผ่านการออกซิไดซ์มีสมบัติในการเชื่อมหมู่อะมิโนของโปรตีนในสภาวะที่เป็นต่าง และส่งผลให้ไฮโดรโฟบิซิตีของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Rawel et al., 2001; 2002) ดังนั้นการใช้สารประกอบพอลิฟีนอลในแผ่นฟิล์มโปรตีนจึงอาจมีผลในการลดการซึมผ่านไอน้ำของแผ่นฟิล์มรวมทั้งส่งผลให้สมบัติเชิงกลดีขึ้น

อย่างไรก็ตามข้อมูลการใช้สารประกอบพอลิฟีนอลในสภาวะออกซิไดซ์เพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนในฟิล์มจากโปรตีนยังมีอยู่จำกัด โดยยังไม่มีรายงานการใช้สารพอลิฟีนอลในแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา ดังนั้นการศึกษาถึงผลการใช้สารประกอบพอลิฟีนอลรวมทั้งสารสกัดพีนอลจากพืชเพื่อใช้เป็นตัวเชื่อมประสานโปรตีนจึงเป็นแนวทางในการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน และเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์แผ่นฟิล์มโปรตีนให้สูงขึ้น

บทที่ 1

การตรวจเอกสาร

1. โปรตีนกล้ามเนื้อปลา

โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญในกล้ามเนื้อปลา โดยมีผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพ และทางประสาทสัมผัส โปรตีนกล้ามเนื้อสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักตามความสามารถในการละลาย คือ โปรตีนไมโอไฟบริล (myofibrillar protein) เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือ โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic proteins) เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ และโปรตีนสโตรมา (stroma proteins) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในน้ำและสารละลายเกลือ (Ziegler and Action, 1984)

1.1 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก

โปรตีนซาร์โคพลาสมิกเป็นโปรตีนของซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) โปรตีนชนิดนี้สามารถละลายน้ำ หรือสารละลายเกลือที่มีความแรงไอออน (ionic strength) น้อยกว่า 0.15 โดยมีอยู่ประมาณร้อยละ 20-30 ของโปรตีนทั้งหมด (Suzuki, 1981) โดยทั่วไปปลาผิวน้ำประกอบด้วยโปรตีนซาร์โคพลาสมิกปริมาณสูงกว่าปลาหน้าดิน โปรตีนชนิดนี้ได้แก่ โปรตีนเม็ดสี เช่น ไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน รวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซิส วัฏจักรกรดซิตริกและลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (Xiong and Brekke, 1989)

1.2 โปรตีนไมโอไฟบริล

โปรตีนไมโอไฟบริลมีประมาณร้อยละ 55-60 ของโปรตีนทั้งหมดในกล้ามเนื้อ เป็นโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้สารละลายเกลือที่มีความแรงของไอออนสูง โดยโปรตีนไมโอไฟบริลแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

1.2.1 โปรตีนที่ให้การยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยไมโอซิน (myosin) และแอกติน (actin) ซึ่งมีผลต่อการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อและเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนไมโอไฟบริล ไมโอซินมีประมาณร้อยละ 50 ของโปรตีนไมโอไฟบริล มีองค์ประกอบของฟิลาเมนต์เส้นหนา โมเลกุลของไมโอซินมีส่วนหัวทรงกลม (globular heads) ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ ATPase และเป็นส่วนที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับแอกติน (McCormick, 1994) เมื่อย่อยไมโอซินด้วยเอนไซม์ทริปซิน ไมโอซินจะแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมีน้ำหนักโมเลกุล 200,000 ดาลตัน จำนวน 2 เส้น และส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีน้ำหนักโมเลกุล 20,000 ดาลตัน จำนวน 4 เส้น (Suzuki, 1981; Xiong and Brekke, 1989) ส่วนแอกตินเป็นโปรตีนที่พบในส่วนของฟิลาเมนต์เส้นบาง มีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของโปรตีนไมโอไฟบริลทั้งหมด (Suzuki, 1981) โดยทั่วไปแอกตินและไมโอซินเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ไมโอซินและแอกตินจับรวมตัวกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ซึ่งสามารถแยกออกได้ง่ายโดยองค์ประกอบที่มีพลังงานสูงหรือที่มีความแรงของไอออนสูง (Xiong and Brekke, 1989)

1.2.2 โปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) โทรโปนิน (troponin) และโปรตีนอื่น ๆ ที่มีผลร่วมในการควบคุมการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ โทรโปไมโอซินเป็นโปรตีนที่พบในฟิลาเมนต์เส้นบาง มีอยู่ร้อยละ 8-10 ของโปรตีนไมโอไฟบริล เป็นโมเลกุลที่มีประจุสูง มีการดออะมิโนที่เป็นกรดและด่างจำนวนมาก มีจุดไอโซอิเล็กทริกเท่ากับ 5.1 (Suzuki, 1981; Xiong and Brekke, 1989)

1.2.3 โปรตีนที่มีหน้าที่สนับสนุนหรือรักษาโครงสร้างของไมโอไฟบริลประกอบด้วยไททิน (titin), คอนเนกทิน (connectin), เนบูลิน (nebulin), เดสมิน (desmin) และโปรตีนอื่น ๆ

1.3. โปรตีนสโตรมา

โปรตีนสโตรมาเป็นส่วนเหลือจากการสกัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิก และโปรตีนไมโอไฟบริล สโตรมาเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายทั้งในน้ำและในสารละลายเกลือที่มีความแรงของออสโมสและต่ำ มีอยู่ประมาณร้อยละ 3 ของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนชนิดนี้ได้แก่ โปรตีนที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการหดตัวของกล้ามเนื้อ เช่น คอลลาเจน และอีลาสติน (Xiong and Brekke, 1989)

2. พลาสติกย่อยสลายได้และฟิล์มชีวภาพ (biodegradable films and edible films)

ในปัจจุบันพลาสติกย่อยสลายได้และฟิล์มชีวภาพได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ มากมาย เช่น ลูกอม ขนมหวาน ผักและผลไม้ รวมทั้งอุตสาหกรรมยา เพื่อลดอัตราการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำ ป้องกันการระเหยของสารให้กลิ่นรส ห่อหุ้มอาหารเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ป้องกันการแตกหักเสียหาย และสามารถย่อยสลายได้ง่ายตามธรรมชาติ จึงเป็นการลดปัญหามลพิษและเป็นการรักษาภาวะแวดล้อม (Kester and Fennema, 1986; Herald et al., 1995; Krochta and Mulder-Johnson, 1997)

วัสดุและพอลิเมอร์ชีวภาพได้รับความนิยมนำมาผลิตฟิล์มย่อยสลายได้หรือฟิล์มชีวภาพได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์, โปรตีน และลิปิด ฟิล์มที่เตรียมขึ้นอาจจะใช้พอลิเมอร์ชนิดเดียวหรือพอลิเมอร์หลายชนิดผสมกัน ซึ่งฟิล์มที่ได้จากพอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนจะให้ฟิล์มที่มีสมบัติในการป้องกันการแพร่ผ่านของก๊าซออกซิเจน ไอน้ำของสารอินทรีย์ในอาหาร และน้ำมันได้ดี แต่ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ต่ำ (Jiang et al., 2007; Stuchell and Krochta, 1995) โดยสมบัติของฟิล์มจะขึ้นอยู่กับชนิดของวัสดุที่นำมาผลิตฟิล์ม

3. ฟิล์มโปรตีน

โปรตีนเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีความสนใจนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มเนื่องจากสามารถแปรรูปได้ง่าย (good processability) ทั้งในรูปสารละลายและวัสดุหลอมเหลว ขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ง่าย (good film forming properties) (Alexy et al., 2003) เช่น โปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลือง (Hang Wan et al., 2005; Tang et al., 2003; Rhim et al., 1999) โปรตีนเวย์ไอโซเลท (Stuchell and Krochta, 1995) กลูเตน (Zhang et al., 2004) ไข่ขาว (Gennadios et al., 1996)

รวมทั้งโปรตีนจากกลูเตน โดยเฉพาะโปรตีนไมโอโกลบินจากกลูเตนปลาสามารถใช้ผลิตเป็นฟิล์มได้ (Cuq et al., 1995; Cuq et al., 1996; Chinabark et al., 2007) โดยฟิล์มจากโปรตีนมีสมบัติเชิงกล และสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดีกว่าฟิล์มจากพอลิแซคคาไรด์ เนื่องจากโปรตีนมีโครงสร้างที่จำเพาะ และมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่หลากหลาย และสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะต่างๆ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน พันธะไดซัลไฟด์ พันธะไอออนิก แรงแวนเดอร์วาลส์ และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Cuq, et al., 1995) ความหลากหลายของพันธะระหว่างโมเลกุลโปรตีน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ตัวทำละลาย พีเอช และสารเคมีต่างๆ (Cuq et al., 1995)

3.1 ชนิดของฟิล์มโปรตีน

ฟิล์มโปรตีนแต่ละชนิดมีสมบัติที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของโปรตีน รวมทั้งการจัดเรียงตัวกันของโปรตีน ซึ่งในการจัดประเภทของฟิล์มโปรตีนนั้นจะมีหลายชนิดได้แก่

- ฟิล์มจากโปรตีนกลูเตนข้าวสาลี (wheat gluten film) กลูเตนเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำในข้าวสาลี ประกอบด้วยไกลอะดีน (gliadin) ร้อยละ 75 เป็นส่วนที่ละลายในแอลกอฮอล์ ไกลอะดีนและกลูเตนจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ทำให้เกิดฟิล์มกลูเตนที่เกิดการยึดเกาะ และมีความยืดหยุ่นดี ฟิล์มกลูเตนมีความแข็งแรงสามารถป้องกันการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี แต่เป็นฟิล์มที่ดูดความชื้นได้ง่าย (Gennadios and Weller, 1990) Herald และคณะ (1995) เปรียบเทียบฟิล์มจากโปรตีนข้าวสาลีจากกระบวนการที่แตกต่างกัน คือ การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry: SD) และการทำแห้งแบบเร็ว (flash dry: FD) พบว่าโปรตีนข้าวสาลีที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีขนาดอนุภาคเล็กกว่าการทำแห้งแบบเร็ว ซึ่งฟิล์มที่ได้จะมีสมบัติที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มพลาสติก ยกเว้นสมบัติในด้านการซึมผ่านของไอน้ำ โดยฟิล์มจากโปรตีนข้าวสาลีที่ทำแห้งแบบ SD มีค่าการต้านทานแรงดึงสูงกว่าฟิล์มจากโปรตีนข้าวสาลีที่ทำแห้งแบบ FD แต่ฟิล์มทั้งสองมีอัตราการซึมผ่านไอน้ำใกล้เคียงกัน ส่วนฟิล์มพลาสติกนั้นมีค่าการต้านทานแรงดึงต่ำกว่าฟิล์มที่ได้จากโปรตีนข้าวสาลีที่ทำแห้งแบบ SD และ FD แต่สามารถป้องกันการซึมผ่านไอน้ำได้ดีกว่าฟิล์มจากโปรตีนข้าวสาลีที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองวิธี

- ฟิล์มจากโปรตีนเคซีน (casein film) โปรตีนเคซีนพบมากในน้ำนมสามารถละลายน้ำได้ มีประมาณร้อยละ 80 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม โปรตีนเคซีนสามารถเกิดฟิล์มได้โดยไม่ต้องใช้ความร้อนเพื่อให้สูญเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจากโปรตีนเคซีนมีโครงสร้างเป็นเกลียวแบบสุ่ม ซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนในการเกิดฟิล์ม โดยอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก พันธะไอออนิก และพันธะไฮโดรเจน (Avena- Bustillos and Krochta, 1993)

- ฟิล์มจากโปรตีนเวย์ (whey protein) โปรตีนเวย์พบอยู่ในน้ำนม มีอยู่ประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม เวย์เป็นโปรตีนส่วนที่เหลืออยู่หลังจากการแยกเอาโปรตีนเคซีนออกจากโปรตีนเวย์มีโครงสร้างแบบทรงกลมซึ่งจะมีลักษณะที่ซับซ้อนกว่าโปรตีนที่มีโครงสร้างแบบเส้นใย ดังนั้นการเกิดฟิล์มจึงต้องใช้ความร้อนในการทำให้โปรตีนเวย์เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติโดย

การทำลายพันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัวแล้วเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไดซัลไฟด์และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (McHugh et al., 1994) McHugh และคณะ (1994) พบว่าการเกิดฟิล์มโปรตีนเวย์ที่ตินั้นจะต้องเตรียมที่ค่าพีเอชเป็นกลาง โดยใช้สารละลายโปรตีนเวย์เข้มข้นร้อยละ 10 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำไปขึ้นรูปเป็นฟิล์ม

- ฟิล์มจากโปรตีนข้าวโพด (corn zein film) ซีน (zein) เป็นโปรตีนที่สำคัญในข้าวโพด ประกอบด้วยโปรตีนโพรลามีนที่สามารถละลายได้ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 70-80 โปรตีนซีนประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เช่น ลูซีน (leucine) อะลานีน (alanine) และโพรลีน (proline) อยู่ในปริมาณสูง จึงมีผลทำให้ซีนไม่ละลายน้ำ ไม่ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ และยังประกอบด้วยกรดกลูตามิก (glutamic acid) และกลูตามีน (glutamine) เป็นส่วนใหญ่ (Gennadios and Weller, 1990) ซีนสามารถเตรียมเป็นแผ่นฟิล์มได้ง่าย โดยการเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน และพันธะไดซัลไฟด์ แต่ฟิล์มที่ได้มีลักษณะแข็งเปราะจึงต้องเติมพลาสติกไซเซอร์เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกล สำหรับการประยุกต์ใช้ในงานสิ่งทอและฟิล์มย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ (Ghanbarzadeh et al., 2007)

- ฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา (fish myofibrillar protein film) โปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาประกอบด้วย โปรตีนซาร์โคพลาสมิก โปรตีนไมโอไฟบริล และโปรตีนสโตรมา ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดสามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้ (Garcia and Sobral, 2005; Sobral et al., 2005) ปัจจุบันมีการนำโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลามาขึ้นรูปเป็นฟิล์มบริโภคได้หรือฟิล์มย่อยสลายได้ โดยใช้เทคนิคการหล่อขึ้นรูปจากสารละลาย (solution casting) (Sobral et al., 2005; Cuq et al., 1995) ปัจจัยที่มีผลต่อการขึ้นรูปฟิล์มได้แก่ ความเข้มข้นของโปรตีน ค่าพีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเก็บสารละลายโปรตีนก่อนการขึ้นรูป (Cuq et al., 1995) Chinabark และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอช และปริมาณโปรตีนไมโอไฟบริลซึ่งเตรียมจากซูริมเนื้อปลาทูน่าต่อสมบัติและการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างของฟิล์มโปรตีน พบว่าค่าพีเอชในการเตรียมสารละลายฟิล์ม และปริมาณโปรตีนมีผลต่อสมบัติเชิงกลและสีของฟิล์มโปรตีน ฟิล์มโปรตีนที่เตรียมในสภาวะกรด (ค่า pH = 3) มีค่าร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาด (% elongation at break) และฟิล์มมีสีอมเหลืองมากกว่าฟิล์มโปรตีนที่เตรียมในสภาวะด่าง (ค่า pH = 11) Cuq และคณะ (1995) ศึกษาสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลโดยกำหนดสภาวะในการเตรียมสารละลายฟิล์มคือ โปรตีน 2.0g /100g ของสารละลาย ค่าพีเอชเท่ากับ 3.0 เก็บ ณ อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการทนแรงดึงสูงสุดใกล้เคียงกับฟิล์มสังเคราะห์บางชนิด เช่น LDPE และ HDPE และมีค่าสูงกว่าฟิล์มโปรตีนชนิดอื่นเล็กน้อยได้ (โปรตีนเวย์ โปรตีนถั่วเหลือง โปรตีนจากแป้งสาลี และโปรตีนจากข้าวโพด) ส่วนร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดมีค่าใกล้เคียงกับฟิล์มโปรตีนชนิดอื่นแต่ยังมีค่าน้อยกว่าฟิล์มสังเคราะห์

นอกจากนี้ฟิล์มสามารถผลิตได้จากโปรตีนอื่นๆ เช่น ฟิล์มจากเจลาติน (Simon-Lukasik and Ludescher, 2003) ฟิล์มจากคอลลาเจน และฟิล์มจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Iwata et al., 2000; Tanaka et al., 2001) ฟิล์มที่ได้มีลักษณะใสและยืดหยุ่นดี แต่มีสมบัติในการป้องกันการซึม

ผ่านของไอน้ำต่ำกว่าฟิล์มโปรตีนชนิดอื่นๆ (Iwata et al., 2000) ซึ่งสมบัติของฟิล์มย่อยสลายได้หรือฟิล์มบริโภคนได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น วัตถุประสงค์ที่เป็นพอลิเมอร์ พลาสติกไซเซอร์ ตัวทำละลาย สารต่าง ๆ ที่เติมลงไปในฟิล์ม และสภาวะสำหรับเตรียมแผ่นฟิล์ม (Park et al., 1993; Park and Chinnan, 1995)

3.2 วิธีการเตรียมฟิล์มโปรตีน

สามารถเตรียมฟิล์มโปรตีนด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้ (Stuchell and Krochta, 1995)

1.) การจับกันเป็นก้อนอย่างง่าย (simple coacervation) เมื่อไฮโดรคอลลอยด์เดี่ยว ๆ เกิดการละลาย แล้วมีการระเหยตัวทำละลายออกไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะเกิดเป็นลักษณะฟิล์ม ตัวทำละลายที่ใช้อาจเป็นน้ำ หรือแอลกอฮอล์ หรือการเติมสารอิเล็กโทรไลต์เพื่อทำให้เกิด salting out หรือการเชื่อมไขว้ หรือการเปลี่ยนแปลงของพีเอชเพื่อทำให้เกิดการละลายแล้วจึงทำการระเหยตัวทำละลายออกไป

2.) การจับกันเป็นก้อนแบบซับซ้อน (complex coacervation) เกิดขึ้นเมื่อสารละลาย 2 ชนิดที่มีประจุตรงกันข้ามกันเกิดการรวมตัวกัน ทำให้เกิดอันตรกิริยาต่อกัน และเกิดการตกตะกอนของพอลิเมอร์

3.) การเกิดเจลด้วยความร้อน หรือการตกตะกอน (thermal coacervation) เป็นการให้ความร้อนโปรตีน เพื่อทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน แล้วจึงเกิดเจลหรือการตกตะกอน หรือการให้ความเย็นหลังจากการให้ความร้อนไฮโดรคอลลอยด์เพื่อทำให้เกิดลักษณะโซล-เจล

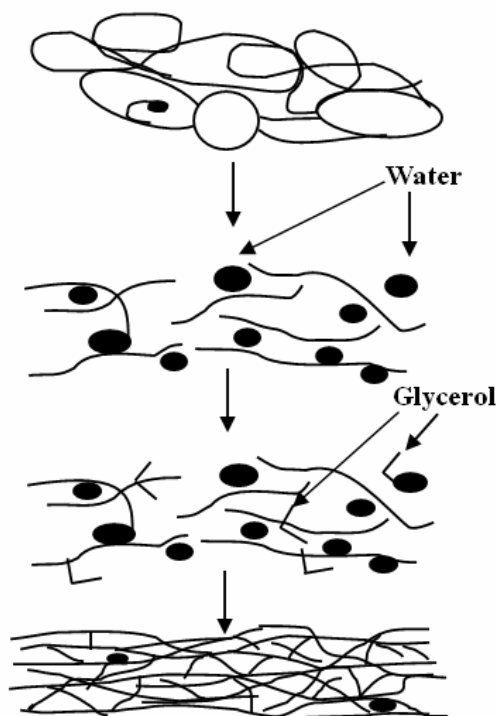
3.3 กลไกการเกิดฟิล์มโปรตีน

การละลายโปรตีนเป็นขั้นตอนเบื้องต้นที่จำเป็นสำหรับการเกิดฟิล์มของโปรตีน โดยโปรตีนแต่ละชนิดจะมีการละลายในตัวทำละลายแตกต่างกัน เช่น โปรตีนไมโอไฟบริลจะไม่ละลายน้ำ จะต้องอาศัยการปรับพีเอชเพื่อให้เกิดการละลายเป็นสารละลายฟิล์ม ผลของการปรับพีเอชทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดการคลายตัว แล้วเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ เมื่อมีการกำจัดน้ำหรือตัวทำละลายออกจะเกิดเป็นลักษณะฟิล์ม กลไกการเกิดฟิล์มประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังภาพที่ 1 (Marquie and Guilbert, 2002)

3.3.1 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน โปรตีนจะต้องเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติโดยเกิดการคลายตัวของโปรตีน อาจจะใช้ความร้อนหรือการปรับพีเอช ซึ่งจะขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของโปรตีน

3.3.2 การจัดเรียงตัวกันใหม่ของโปรตีน เมื่อโปรตีนเกิดการคลายตัวแล้วจะเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ โดยโปรตีนจะจับกันด้วยพันธะต่างๆ เช่น พันธะโควาเลนต์ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก เป็นต้น

3.3.3 การเกิดลักษณะฟิล์ม ในขั้นตอนนี้จะเป็นการกำจัดเอาตัวทำละลายออก เช่น การระเหยตัวทำละลายออกไป เพื่อให้เกิดลักษณะฟิล์ม



ภาพที่ 1 Mechanism in typical protein film formation
ที่มา : ดัดแปลงจาก Marquie and Guilbert (2002)

4. สมบัติและปัจจัยบางประการที่มีผลต่อฟิล์มโปรตีน

4.1 สมบัติที่สำคัญของฟิล์มโปรตีน

ฟิล์มโปรตีนมีสมบัติที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีน และปัจจัยภายในต่างๆ สมบัติที่สำคัญ ได้แก่

4.1.1 สมบัติกั้นการซึมผ่าน (Barrier properties)

ฟิล์มจากพอลิเมอร์ชีวภาพส่วนใหญ่มีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ เนื่องจากสมบัติการชอบน้ำของพอลิเมอร์ (McHugh et al., 1994; Roy et al., 2000) แต่มีสมบัติกั้นการซึมผ่านก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี (Gennadios et al., 1993) Park และ Chinnan (1995) ศึกษาผลของความหนาฟิล์มต่อสมบัติการกั้นการซึมผ่านพบว่า เมื่อฟิล์มมีความหนาเพิ่มมากขึ้นสามารถกั้นการซึมผ่านก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี แต่กั้นการซึมผ่านไอน้ำได้น้อยลง อัตราการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มโปรตีนชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 Water vapor permeability of various protein films.

Film	Water vapor permeability ($\times 10^{-12}$ mol.m/m ² .s.Pa)	Temp (°C)	RH (%)	Thickness ($\times 10^{-6}$ m)
Sodium caseinate film	24.7	25	100	-
Soy protein film (pH = 3)	23.0	25	100	83
Corn zein film	6.45	21	85	200
Wheat gluten film	5.08	30	100	50
Myofibrillar protein film	3.91	25	100	60

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cuq และคณะ (1995)

4.1.2 สมบัติเชิงกล (Mechanical properties) สมบัติเชิงกลเกี่ยวข้องกับความยืดหยุ่น และความแข็งแรงของแผ่นฟิล์ม เช่น การต้านทานแรงดึง ร้อยละการยืดตัวเมื่อขาดของแผ่นฟิล์ม เป็นต้น ซึ่งฟิล์มที่ได้จากโปรตีนนั้นมักมีลักษณะแข็งและเปราะ เนื่องจากอันตรกิริยาของโปรตีนที่เกิดจากพันธะไฮโดรเจน พันธะไดซัลไฟด์ อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และอันตรกิริยาระหว่างประจุ (Krochta, 2002; McHugh et al., 1994) Cuq และคณะ (1996) ศึกษาผลของความหนาฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาต่อสมบัติเชิงกลพบว่า ความหนาของฟิล์มไม่มีผลต่อร้อยละการยืดตัวเมื่อขาด นอกจากนี้ Jangchud และ Chinnan (1999) รายงานว่า แผ่นฟิล์มที่ได้จากโปรตีนถั่วลิสงที่ใช้กลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์ให้สมบัติเชิงกลดีกว่าการใช้ซอร์บิทอล พอลิเอทิลีนไกลคอล และโพรพิลีนไกลคอล คือฟิล์มโปรตีนถั่วลิสงเปราะน้อยลงมีค่าการต้านทานแรงดึงต่ำลงแต่ร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดของฟิล์มเพิ่มขึ้น

4.1.3 สมบัติการละลาย (Solubility properties) Cuq และคณะ (1996) ทำการศึกษาสมบัติการละลายของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่มีความหนาแตกต่างกัน พบว่า ความหนาของฟิล์มไม่มีผลต่อสมบัติการละลาย Cuq และคณะ (1997) รายงานว่าฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลสามารถละลายน้ำได้น้อยลงเมื่อฟิล์มประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง อย่างไรก็ตามการเติม พลาสติกไซเซอร์ในฟิล์มโปรตีน เช่น กลีเซอรอล ซูโครส หรือซอร์บิทอล ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำได้ของฟิล์มเพิ่มขึ้น เนื่องจากสมบัติการชอบน้ำของสารพลาสติกไซเซอร์ดังกล่าว โดยฟิล์มที่ละลายได้ในน้ำเป็นสายโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น พวกลีโนเมอร์และโปรตีนที่มีการจับตัวกันเพียงเล็กน้อย (Cuq et al., 1995)

4.2 ปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีน

4.2.1 พีไอ

การปรับค่าพีไอของสารละลายโปรตีนในขั้นตอนการเตรียมสารละลายฟิล์มให้มีความแตกต่างกันมีผลต่อสมบัติของฟิล์มที่แตกต่างกัน โดยพีไอจะมีผลต่อการละลายของโปรตีน ซึ่งหากพีไอสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ประจุสุทธิของโปรตีนจะมีค่าเป็นลบ และที่ค่าพีไอต่ำกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกประจุสุทธิของโปรตีนจะมีค่าเป็นบวก ทำให้โปรตีนระหว่างสายโซ่

เปปไทด์ที่อยู่ติดกันเกิดการผลัดกัน ทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกตัวระหว่างสายโซ่ของโปรตีนได้มากขึ้น โปรตีนจึงสามารถละลายน้ำได้มากขึ้น แต่หากปรับค่าพีเอชของสารละลายโปรตีนให้เท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริก ประจุสุทธิของโปรตีนมีค่าเท่ากับศูนย์ สายโซ่โปรตีนเกิดการจับกันเองระหว่างประจุบวกและประจุลบทำให้เกิดการตกตะกอนแทนการละลาย (Sikorski, 2001) ซึ่งความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นสมบัติที่สำคัญในการเกิดฟิล์ม Gontard และคณะ (1992) ทำการเตรียมสารละลายฟิล์มจากโปรตีนข้าวสาลี พบว่า พีเอชมีผลต่อสมบัติเชิงกล ความชุ่ม การละลาย และการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มจากโปรตีนข้าวสาลี เมื่อใช้เอทานอลความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 35 ในการเตรียมสารละลายฟิล์มกลูเตน พบว่าเมื่อค่าพีเอชลดลงทำให้ฟิล์มมีความชุ่มลดลง เนื่องจากการที่กลูเตนกระจายตัวได้ดีทำให้ฟิล์มที่ได้เป็นเนื้อเดียวกัน Shiku และคณะ (2003) พบว่าค่าพีเอชของสารละลายฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลมีผลต่อสมบัติการเกิดฟิล์มโปรตีน ค่าพีเอชที่สามารถละลายโปรตีนได้ดีอยู่ในช่วง 2-3 และ 7-12 ส่วนค่าพีเอชเท่ากับ 4-6 โปรตีนสามารถละลายได้ดีที่สุด เมื่อพิจารณาสมบัติเชิงกลของฟิล์มพบว่า ฟิล์มที่เตรียมในสภาวะกรด (พีเอช 2-3) และ ฟิล์มที่เตรียมในสภาวะต่าง (พีเอช 11-12) มีร้อยละการยืดตัวเมื่อขาดสูงสุด เนื่องจากโปรตีนมีโครงข่ายฟิล์มที่แข็งแรง และฟิล์มที่ได้ในสภาวะดังกล่าวให้ฟิล์มใสใกล้เคียงกับฟิล์มสังเคราะห์ Chinabark และคณะ (2007) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลซึ่งเตรียมจากซูริมเนื้อปลาตาหวาน โดยเตรียมสารละลายฟิล์มในสภาวะกรด (ค่าพีเอช = 3) และในสภาวะต่าง (ค่าพีเอช = 11) พบว่า ค่าพีเอชในการเตรียมสารละลายฟิล์มมีผลต่อสมบัติเชิงกลและสีของฟิล์มโปรตีน ฟิล์มโปรตีนที่เตรียมในสภาวะกรด (ค่าพีเอช = 3) มีร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาด (% elongation at break) สูงกว่าและให้ฟิล์มมีสีอมเหลืองมากกว่าฟิล์มโปรตีนที่เตรียมในสภาวะต่าง (ค่าพีเอช = 11) นอกจากนี้ค่าพีเอชมีผลต่อสมบัติกันการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม เช่น ฟิล์มโปรตีนเวย์ที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 สามารถกันการซึมผ่านไอน้ำได้ดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกับที่พีเอชเท่ากับ 8 และ 9 (McHugh et al., 1994)

4.2.2 พลาสติไซเซอร์และไขมัน

การเติมพลาสติไซเซอร์ในขั้นตอนการเตรียมฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลหรือโปรตีนชนิดอื่นนั้นเป็นส่วนที่มีความสำคัญเพื่อปรับปรุงสมบัติฟิล์มให้มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น หรือลดความเปราะของฟิล์ม เนื่องจากพลาสติไซเซอร์เป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กที่สามารถแทรกตัวระหว่างสายโซ่โมเลกุลพอลิเมอร์ ทำให้อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ลดลง สายโซ่พอลิเมอร์สามารถเคลื่อนที่ได้มากขึ้นจึงเกิดฟิล์มที่มีลักษณะยืดหยุ่น ช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีน (Sobral et al., 2005; Srinivasa et al., 2007) พลาสติไซเซอร์มีหลายชนิด ได้แก่ สารจำพวกพอลิออล (polyols) เช่น กลีเซอรอล ซอร์บิทอล แมนนิทอล ซูโครส พอลิเอทิลีนไกลคอล โพรพิลีนไกลคอล และ โพรเพนไดออล (Yang and Paulson, 2000; Irissin- Mangata et al., 2001) รวมทั้งสารจำพวกโมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ หรือโอลิโกแซคคาไรด์ และอนุพันธ์ของลิปิด ได้แก่ กรดไขมัน เป็นต้น (Gonnadios et al., 1994)

การเติมพลาสติไซเซอร์ที่มีสมบัติชอบน้ำในการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มมีผลให้ฟิล์มกันการซึมผ่านไอน้ำได้น้อยลง (Cuq et al., 1997) Paschoalick และคณะ (2003) และ Sobral และ

คณะ (2005) ศึกษาการเติมพลาสติกไซเซอรอลต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลือง (โปรตีนไมโอไฟบริลและคาร์โคพลาสมิก) โดยเติมกลีเซอรอลในสารละลายฟิล์มปริมาณ 15 – 65g/100g โปรตีน พบว่า เมื่อปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มขึ้นทำให้ฟิล์มสามารถกันการซึมผ่านไอน้ำลดลง และมีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มทำให้ฟิล์มยืดหยุ่นมากขึ้น ได้แก่ มีค่าร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดเพิ่มขึ้น แต่มีค่าการทานแรงดึงลดลง และทนแรงที่มทะเล่ได้น้อยลง นอกจากนี้ปริมาณกลีเซอรอลยังมีผลต่อลักษณะปรากฏของฟิล์มโปรตีนคือทำให้ฟิล์มโปรตีนที่ได้ใสมากขึ้น

4.2.3 ตัวเชื่อมประสานโปรตีน

การปรับปรุงสมบัติของแผ่นฟิล์มสามารถทำได้ทั้งทางเคมีและกายภาพ การใช้สารเคมีที่ทำหน้าที่เชื่อมประสานโปรตีน เช่น กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ไกลออกซาล (glyoxal) กอสซิปอล (gossypol) และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) (Hernandez-Munoz et al., 2004) ซึ่งสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่ข้างของกรดอะมิโนในโครงสร้างของโปรตีนได้ โดยสารเคมีแต่ละชนิดมีผลต่อการเพิ่มสมบัติการต้านทานแรงดึงของฟิล์มโปรตีนแตกต่างกัน (Hernandez-Munoz et al., 2004) นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีนโดยการเติม เอนไซม์ ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) เพื่อเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีนเช่น การศึกษาของ Jiang และคณะ (2007) เตรียมฟิล์มโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลืองจากสารละลายฟิล์มที่มีการเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในระดับที่ต่างกัน (4, 10, 20, 30, 40 และ 60 ยูนิต/กรัมของโปรตีน) พบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์ระดับต่ำ (4 และ 10 ยูนิต/กรัมของโปรตีน) ให้ฟิล์มที่ทนแรงดึงได้สูงและมีร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดสูงกว่าที่ระดับเอนไซม์ค่าสูง (60 ยูนิต/กรัมของโปรตีน) เนื่องจากที่ระดับเอนไซม์ค่าสูงการเชื่อมประสานโมเลกุลทำให้โปรตีนเกิดการเกาะกลุ่มกันจึงมีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์ม

4.2.4 อุณหภูมิในการทำแห้งฟิล์ม

ระดับของอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งฟิล์มมีผลต่อสมบัติของฟิล์มพอลิเมอร์ผสม ดังเช่น การเตรียมฟิล์มแป้งที่เติมโมโนกลีเซอไรต์เป็นพลาสติกไซเซอรอลโดยวิธีการหล่อฟิล์ม และทำแห้งที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน (23, 30 และ 50°C) ในกระบวนการทำแห้งฟิล์มส่งผลให้เกิดการแยกเฟส คือส่วนของไขมันลอยขึ้นมาด้านผิวหน้าฟิล์มและมีชั้นของแป้งอยู่ด้านล่าง บริเวณด้านหน้าฟิล์มจึงสามารถกันการซึมผ่านไอน้ำได้ดี การทำแห้งที่อุณหภูมิสูงส่งผลต่อสมบัติของฟิล์มคือความหนาฟิล์มลดลงเล็กน้อย มีลักษณะแข็งเปราะแตกหักได้ง่าย และมีอัตราการซึมผ่านไอน้ำลดลง เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงสายโซ่พอลิเมอร์มีการจัดเรียงตัวใกล้ชิดกัน และยึดเกาะกันอย่างแข็งแรง (Petersson and Stading, 2005) Jiang และคณะ (2007) ศึกษาผลของสภาวะในการเตรียมฟิล์มต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลืองที่เตรียมด้วยเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส การให้ความร้อนในการทำแห้งฟิล์มหลายระดับ (18, 25, 37 และ 50°C) มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาเชื่อมขวางโปรตีนด้วยเอนไซม์ พบว่าการทำแห้งที่อุณหภูมิทำให้ฟิล์มที่สามารถทนแรงดึงได้สูง มีร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดสูง และผิวหน้าฟิล์มมีสภาพไม่ขรุขระสูงกว่าการทำแห้งที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำต้องใช้เวลานาน เอนไซม์ทำงานช้าแต่สามารถสร้างโครงข่ายโปรตีนที่สมบูรณ์ได้ดี

5. การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนเพื่อการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน

การปรับปรุงสมบัติของแผ่นฟิล์มจากโปรตีน สามารถกระทำได้โดยการเพิ่มการเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีน สารที่จะทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วยหมู่ที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาอย่างน้อย 2 หมู่ ซึ่งสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์ภายในหรือระหว่างโมเลกุลของโปรตีน การที่ฟิล์มมีพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นใหม่นี้อาจมีผลทำให้สมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนดีขึ้น โดยเฉพาะความต้านทานต่อแรงเชิงกล สารเคมีที่มักนำไปใช้ในการเชื่อมประสานโปรตีน ได้แก่ สารประกอบอัลดีไฮด์ชนิดต่างๆ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส และสารประกอบพอลิฟีนอล เป็นต้น

5.1 การใช้สารอัลดีไฮด์

การเพิ่มหรือดัดแปลงสมบัติทางด้านกายภาพและสมบัติทางกลของแผ่นฟิล์มจากโปรตีน สามารถกระทำได้โดยการเพิ่มการเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีน โดยอาศัยสารเคมีที่มีสมบัติในการเชื่อมประสานโปรตีน ปัจจุบันมีการศึกษากันมากถึงการใช้อนุพันธ์อัลดีไฮด์ เช่น กลูตาราลดีไฮด์ ไกลออกซาล ฟอรัลดีไฮด์ ในการเชื่อมประสานโปรตีนในฟิล์ม โดยสารแต่ละชนิดให้ผลในการเพิ่มสมบัติความต้านทานแรงดึง (tensile strength) แตกต่างกัน (de Carvalho and Crosso, 2004; Hernandez-Munoz et al., 2004) ฟอรัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมประสานโปรตีนที่สำคัญ โดยสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนของไลซีน รวมทั้งซิสเตอีน ไทโรซีน ฮิสติดีน ทรีโพรเฟน และอาร์จินีน ส่วนไกลออกซาลสามารถเชื่อมประสานโปรตีนที่มีไลซีน และอาร์จินีนเป็นหมู่โซ่ข้าง (Marquie, 2001)

5.2 การใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

ทรานส์กลูตามิเนส (protein-glutaminase γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TGase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานสเฟอเรส (transferase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย้ายกลุ่มเอซิล (acyl-transfer reaction) จาก γ -carboxyamind ของกรดอะมิโนกลูตามีน หรือที่เรียกว่า acyl donor ไปยังกลุ่มสารที่สามารถรับกลุ่มเอซิล (acyl acceptor) ซึ่งได้น้ำ สารประกอบเอมีน หรือกลุ่มอะมิโนของกรดอะมิโนไลซีนบนสายโปรตีน การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จำเป็นต้องมี Ca^{2+} เมื่อ acyl acceptor คือกรดอะมิโนไลซีนบนสายโปรตีน การเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการเชื่อมประสานของโปรตีนก่อให้เกิดเป็นไอโซเปปไทด์ระหว่างกลูตามีน และไลซีนของโมเลกุลโปรตีน จะทำให้เกิดการเชื่อมประสานของสายโปรตีนทั้งภายในโมเลกุล (intramolecular cross-linking) และระหว่างสายโปรตีน (intermolecular cross-linking) ด้วยพันธะ ϵ -(γ -glutamyl) lysine ซึ่งเป็นพันธะไอโซเปปไทด์ (isopeptide) ที่มีค่าพลังงานพันธะ (bond energy) สูง จึงมีความเสถียรสูง ทำให้โครงสร้างของฟิล์มแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Mahmoud and Savello, 1993; Yildirim and Hettiarachchy, 1998; Mariniello et al., 2003)

จากปฏิกิริยา TGase ซึ่งต้องการซับสเตรตที่มีกลูตามีน ไลซีน พบว่าวัตถุดิบที่มีอนุโมลโปรตีนดังกล่าว ได้แก่ เคซีน กลูเทนในแป้งสาลี เจลาติน อัลบูมินในไข่ขาว จึงได้มีการนำไข่ขาวมาทำเป็นฟิล์มโดยใช้ TGase เพิ่มค่าความแข็งแรงเนื่องจาก TGase จะเร่งปฏิกิริยาเชื่อมขวาง

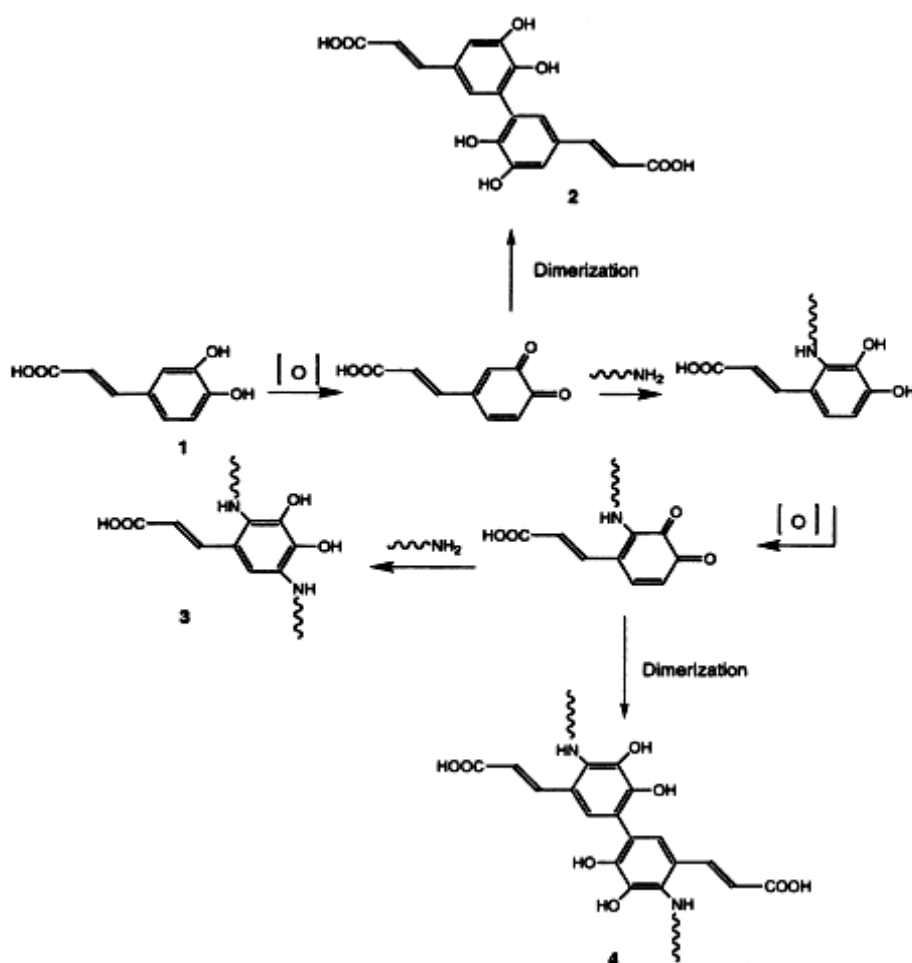
ระหว่างสายโปรตีนอัลบูมิน พบว่าได้เป็นฟิล์มชีวภาพที่แข็งแรงมากขึ้น Yildirim และ Hettaracchchy (1998) พบว่า การใช้เอนไซม์ TGase ในปริมาณ 0.2 units TGase/g ในการเตรียมฟิล์มโปรตีนไอโซเลทจากเวย์ สามารถเพิ่มความต้านทานแรงดึงของฟิล์มได้ประมาณ 2 เท่า

Yi และคณะ (2006) ศึกษาผลของการเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ (MTGase) ต่อระดับการเชื่อมประสานโมเลกุลของเจลาตินในสารละลายเจลาตินจากปลา พบว่าระดับการเชื่อมประสานโมเลกุลของเจลาตินเพิ่มขึ้นจาก 0% เป็น $11.01\% \pm 4.43\%$ และความหนืดของสารละลายเจลาตินเพิ่มขึ้นจาก 6.80 ± 0.65 cP เป็น 32.59 ± 2.36 cP หลังจากทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ De Carvalho และ Grosso (2004) พบว่าฟิล์มเจลาตินจากวัวที่เชื่อมประสานโปรตีนด้วย TGase มีค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำกว่าฟิล์มที่ไม่เชื่อมประสานโปรตีนประมาณ 40%

5.3 การใช้สารประกอบพอลิฟีนอล

นอกจากสารประกอบอัลดีไฮด์และเอนไซม์บางชนิดสามารถทำให้เกิดการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนได้แล้ว สารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นในธรรมชาติพบมากในพืชยังมีสมบัติในการเชื่อมประสานโปรตีนเช่นกัน โดยสารประกอบพอลิฟีนอลสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์และพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์กับโมเลกุลของโปรตีน (Chen and Hagerman, 2004) สารประกอบพอลิฟีนอลในสภาวะออกซิไดซ์ (oxidized form or quinone) สามารถเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยพันธะโควาเลนต์ได้ โดยมีกลไกดังแสดงในภาพที่ 2 สารควิโนนที่เกิดจากการออกซิไดซ์ของสารพอลิฟีนอลสามารถเกิดพันธะโควาเลนต์กับหมู่ที่ชอบนิวเคลียส (nucleophilic functional groups) ของโปรตีน เช่น lysine, methionine, histidine, cystine, tyrosine และ tryptophan ที่เป็กรตกอะมิโนของกรดอะมิโนในโมเลกุลโปรตีน (Rawel et al., 2001) ควิโนนที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโน (NH_2 group) หรือหมู่ซัลไฮดริล (SH group) ในการเกิดพันธะโควาเลนต์ (C-N หรือ C-S) ของโปรตีนได้ (Strauss and Gibson, 2004) ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานอาจขึ้นกับสภาพขั้วของพอลิฟีนอล (Siebert et al, 1996; Rawel et al., 2003) นอกจากนี้พอลิฟีนอลอาจเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลโปรตีนด้วยพันธะที่ไม่ใช่โควาเลนต์ (non-covalent interactions) ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน และพันธะไฮโดรโฟบิกได้ ซึ่งมักเกิดขึ้นในสภาวะ non-oxidizing (Chen and Hagerman, 2004)

การเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนและพอลิฟีนอลอาจเป็นแบบ multisite interaction คือ โมเลกุลพอลิฟีนอลมากกว่าหนึ่งโมเลกุลเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนโมเลกุลเดียว หรือเป็นแบบ multidentate interaction คือ พอลิฟีนอลหนึ่งโมเลกุลเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนมากกว่าหนึ่งโมเลกุล ซึ่งขึ้นกับชนิดพอลิฟีนอลและอัตราส่วนโดยโมลระหว่างสารพอลิฟีนอลและโปรตีน (Prigent et al., 2003)



ภาพที่ 2 Reactions of a phenolic acid with amino side chains of polypeptides.

ที่มา: Strauss and Gibson (2004)

Frazier และคณะ (2003) รายงานว่า แทนนิน (tannin) สามารถเกิดอันตรกิริยาแบบไม่จำเพาะ (non-specific interaction) กับโปรตีนบางชนิด เช่น bovine serum albumin หรือเกิดอันตรกิริยาแบบจำเพาะ (specific interaction) กับโปรตีนบางชนิด เช่น เจลาติน

Strauss และ Gibson (2004) พบว่า สารประกอบฟีนอลจากพืชและสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่ผ่านการออกซิไดซ์มีสมบัติในการเชื่อมประสานโมเลกุลเจลาติน ส่งผลให้สมบัติเชิงกลของเจลาตินเจลเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกลางเชื่อมประสานเจลาตินด้วยพันธะไฮโดรเจน (Wu et al., 2001) อันตรกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลกับโปรตีนส่งผลให้การละลายของโปรตีนลดลงและสมบัติไฮโดรโฟบิซิตีเพิ่มขึ้น เนื่องจากโปรตีนมีหมู่อะมิโนอิสระลดลง (Rawel et al., 2001; 2002)

ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาการนำสารฟีนอลชนิดต่างๆ มาใช้เพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีน Cao และคณะ (2007) ศึกษาการใช้ ferulic acid และ tannin acid ที่สกัดได้จากพืชมาเป็นส่วนผสมในการเตรียมฟิล์มเจลาติน พบว่า ฟิล์มเจลาตินที่ได้มีสมบัติเชิงกลดีขึ้นเนื่องจากการเชื่อม

ประสานของโมเลกุลโปรตีนในฟิล์ม นอกจากนี้ Ou และคณะ (2005) พบว่า การใช้ ferulic acid ในปริมาณที่เหมาะสมสามารถเพิ่มความต้านทานแรงดึง ระยะยืดเมื่อขาด และกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของฟิล์มโปรตีนไอโซเลทถั่วเหลืองได้ และสมบัติของฟิล์มจะดีขึ้นเมื่อใช้ ferulic acid ที่ถูกออกซิไดซ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นอกจากนี้ยังมีการใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งพอลิฟีนอลเพื่อเติมในฟิล์มโปรตีน Rattaya และคณะ (2009) ศึกษาการใช้สารสกัดจากสาหร่ายทะเล (seaweed extract) ที่พีเอช 9 และ 10 ผสมในฟิล์มเจลาตินจากหนังปลาในปริมาณร้อยละ 1 ของโปรตีน พบว่า ฟิล์มที่ได้มีระยะยืดเมื่อขาดสูงขึ้น ส่วนการซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำของฟิล์มลดลง Gómez-Estaca และคณะ (2009) ใช้สารสกัดจากออริกานและโรสแมรี่ผสมในฟิล์มเจลาตินจากหนังปลาทูน่า และฟิล์มเจลาตินจากหนังวัว พบว่า พอลิฟีนอลในสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถเกิดอันตรกิริยากับเจลาตินจากหนังปลาทูน่าได้ดีกว่าเจลาตินจากหนังวัว มีผลให้ฟิล์มเจลาตินจากหนังปลาทูน่ามีอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) สูงขึ้นและการเสียรูปลดลง และการใช้สารสกัดจากออริกานให้ประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานและการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าสารสกัดจากโรสแมรี่

6. ความคงตัวของฟิล์มย่อยสลายได้

หน้าที่ของฟิล์มบรรจุภัณฑ์คือ สามารถชะลออัตราการซึมผ่านไอน้ำจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่สินค้าภายใน ฟิล์มแต่ละชนิดมีสมบัติเป็นตัวกั้นการซึมผ่านแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายและการแพร่ของโมเลกุลน้ำผ่านแผ่นฟิล์ม (Srinivasa et al., 2003; Srinivasa et al., 2007) สามารถพิจารณาสมบัติดังกล่าวได้จากการศึกษารูปแบบการดูดซับความชื้นที่อุณหภูมิคงที่ (sorption isotherm) ของฟิล์ม โดยเก็บฟิล์มในสภาพบรรยากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์แตกต่างกัน ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ค่าสูงฟิล์มจะดูดซับไอน้ำและมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น (Srinivasa et al., 2007) ไอน้ำจะซึมผ่านเข้าสู่สินค้าภายในทำให้มีผลต่อคุณภาพ ความคงตัวของอาหารและฟิล์มบรรจุภัณฑ์ระหว่างการจัดเก็บ (Srinivasa et al., 2003; Srinivasa et al., 2007)

Cuq และคณะ (1996) ศึกษาผลของการเก็บรักษาฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาต่อสมบัติของแผ่นฟิล์มที่อุณหภูมิ 20°C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 58.7 เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติการละลาย อัตราการซึมผ่านไอน้ำ และสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มโปรตีน แต่มีผลทำให้ฟิล์มมีสีเหลืองเพิ่มมากขึ้นซึ่งอาจมีผลมาจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่อาศัยเอนไซม์ Lawton (2004) ศึกษาผลของการเก็บรักษาแผ่นฟิล์มโปรตีนจากข้าวโพดที่อุณหภูมิ 25°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ระดับต่างกัน คือ ร้อยละ 3, 20, 50, 70, 81 และ 93 เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเมื่อระดับความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นทำให้ฟิล์มยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น โดยฟิล์มโปรตีนสามารถทนแรงดึงได้น้อยลง แต่มีร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดเพิ่มขึ้น

Srinivasa และคณะ (2007) พบว่าระดับอุณหภูมิ (4°C ถึง 50°C) และปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ที่แตกต่างกัน (ร้อยละ 40, 60 และ 80) มีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มไคโตแซนระหว่างการ

เก็บรักษาในระยะเวลา 3-9 วันแตกต่างกัน โดยฟิล์มที่เก็บ ณ อุณหภูมิ 20°C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 40 ระยะเวลาประมาณ 7 วันให้ฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด คือ ทนแรงดึงได้ 35.8 MPa ร้อยละการยืดตัว ณ จุดขาดเท่ากับ 29.9 และมีค่ามอดูลัสเท่ากับ 896.7 MPa .

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาชนิดของสารประกอบพีนอล และปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารประกอบพีนอลและสารสกัดพีนอลจากพืชชนิดต่างๆต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา
3. เพื่อศึกษาสมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและเติมสารสกัดพอลิพีนอล
4. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดพอลิพีนอลในระหว่างการเก็บรักษา

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของสารประกอบพอลิพีนอลบริสุทธิ์ชนิดและความเข้มข้นต่างๆต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาในสารละลายฟิล์ม และสมบัติของฟิล์มที่ได้ ศึกษาผลของสภาวะบางประการต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลและสมบัติของฟิล์มที่เติมสารประกอบพอลิพีนอลบริสุทธิ์ ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชชนิดต่างๆต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา วิเคราะห์สมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เติมและไม่เติมสารสกัดพอลิพีนอลจากพืช ตลอดจนศึกษา moisture sorption isotherm ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล และศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เติมสารสกัดพอลิพีนอลจากพืชในระหว่างการเก็บรักษา

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

1. วัสดุและสารเคมี

- ปลาตาหวานหนังหนา (*Priacanthus tayenus*)
- สารพอลิฟีนอลบริสุทธิ์ชนิดต่างๆทางการค้า ได้แก่ caffeic acid, catechin, ferullic acid และ tannic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- High molecular weight protein markers (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)
- Glycerol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Sodium dodecyl sulphates (SDS) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- Coomassie Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- *N, N, N', N'*- tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- α -Chymotrypsin (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan)

2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

Equipments	Model	Company/ Country
-Homogenizer	T25	Ultra turrax, Malaysia
-Electrophoresis	Mini-Protean II	Bio-Rad, USA
-Magnetic stirrer	RO 15 power	IKA labortechnik, Germany
-pH meter	CG 842	SCHOTT, Germany
-Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries Inc., USA
-Microcentrifuge	MIKRO20	ZENTRIFUGEN, Germany
-Shaker	Heidolph Inkubator 10000	Schwabach, Germany
-Universal testing machine	LR 30K	LLOYD, England
-Environmental chamber	KBF 115	WTB BINDER, Germany
-CIE colorimeter	Color Flex	Hunter, USA
-UV-Vis spectrophotometer	UV-16001	SHIMADZU, australia
-FTIR spectrometer	Bruker Model Equinox 55	Bruker Co., Germany
-Thermogravimetric analyzer	TGA 7	PERKIN ELMER, USA
-Scanning electron microscope	JSM-5800 LV	JEOL, Japan

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ

ซื้อปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) จากท่าเทียบเรือจังหวัดสงขลา บรรจุลงโฟมที่มีน้ำแข็งโดยใช้อัตราส่วนปลา:น้ำแข็ง เท่ากับ 1:2 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ขนส่งมายังคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา และแยกเนื้อเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3.2 การแยกโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา

ทำการแยกโปรตีนไมโอไฟบริลตามวิธีของ Benjakul และคณะ (2003) โดยนำกล้ามเนื้อปลามาบดและผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 โฮโมจิไนซ์เป็นเวลา 2 นาที ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนที่เป็นตะกอนโปรตีนมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:5 โดยโฮโมจิไนซ์ส่วนผสมเป็นเวลา 5 นาที ทำการล้าง 2 ครั้ง เก็บรักษาโปรตีนไมโอไฟบริลในน้ำแข็งเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกล้ามเนื้อปลาและโปรตีนไมโอไฟบริล

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาที่ไม่ผ่านการล้าง และกล้ามเนื้อปลาที่ผ่านการล้าง (โปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่แยกได้จากข้อ 3.2) ดังต่อไปนี้ คือ

- ความชื้น (AOAC, 1999)
- โปรตีน (AOAC, 1999)
- เถ้า (AOAC, 1999)
- ไขมัน (AOAC, 1999)
- Trichloroacetic acid soluble peptide (Benjakul et al., 2004)
- รูปแบบโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ 4% stacking gel และ 10% running gel

3.4 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบพอลิฟีนอลบริสุทธิ์ต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

3.4.1 การเตรียมสารละลายฟิล์มและแผ่นฟิล์มจากโปรตีนไมโอไฟบริล

เตรียมสารละลายฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาตาหวาน (เนื้อปลาที่ผ่านการล้าง) ตามวิธีของ Prodpran และ Benjakul (2004) โดยผสมโปรตีนไมโอไฟบริลในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.5 (w/v) และเติมกลีเซอรอลในปริมาณร้อยละ 50 ของปริมาณโปรตีนกวนผสมเป็นเวลา 30 นาที แล้วปรับพีเอชของสารละลายฟิล์มให้เท่ากับ 11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ หลังจากนั้นเติมสารประกอบพอลิฟีนอลบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ

(caffeic acid, catechin, ferullic acid และ tannic acid) ที่ระดับแตกต่างกัน (ร้อยละ 1, 3 และ 5 ของปริมาณโปรตีน) ลงในสารละลายฟิล์ม กวนผสมพร้อมให้ออกซิเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายฟิล์มส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์ในข้อ 3.4.2 และนำสารละลายฟิล์มที่เหลือไปขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มตามวิธีของ Prodpran และ Benjakul (2004) โดยนำสารละลายฟิล์มที่ได้ปริมาณ 4 กรัม เติมนลงในพิมพ์ซิลิโคน ขนาด 5x5 ตารางเซนติเมตร ทำการระเหยน้ำบางส่วนออกโดยการเป่าลมที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 50 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลอกแผ่นฟิล์มออกจากพิมพ์ซิลิโคน นำแผ่นฟิล์มที่ได้ไปตรวจสอบสมบัติตามวิธีการในข้อ 3.4.3

3.4.2 การวิเคราะห์การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนในสารละลายฟิล์ม ดังนี้

- ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (TNBS reactive amino group) ตามวิธีของ Benjakul และ Morrissey (1997)
- ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (Sulfhydryl (SH) group) ตามวิธีของ Ellman (1959)
- รูปแบบโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970)

3.4.3 การวิเคราะห์สมบัติของฟิล์ม ดังนี้

- ความหนาของแผ่นฟิล์ม โดยการวัดด้วยไมโครมิเตอร์
- สมบัติเชิงกล โดยการตรวจสอบค่าความต้านทานแรงดึง (tensile strength: TS) และการยืดตัวเมื่อขาด (elongation at break: EAB) โดยใช้เครื่องทดสอบความแข็งแรงของวัสดุ ตามวิธีของ Iwata และคณะ (2000) โดยทำการปรับสภาพของแผ่นฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนการตรวจสอบ
- สีและการส่องผ่านแสงของฟิล์ม ตรวจสอบสีโดยใช้ระบบ CIE $L^*a^*b^*$ โดยใช้เครื่องวัดสี และตรวจสอบการส่องผ่านแสงของฟิล์มโดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer ในช่วงความยาวคลื่น 200 – 800 nm

คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบพอลิฟีนอลบริสุทธิ์ที่ให้การเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่น้อยที่สุด และการลดลงของแถบโปรตีนสูงที่สุด ร่วมกับให้ฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.5 ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟ

บริลของสารประกอบพอลิฟีนอลบริสุทธิ์

เตรียมสารละลายฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 โดยใช้สารประกอบพอลิฟีนอลชนิดและความเข้มข้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาทำการศึกษาผลของเวลาการผสมและการเติมออกซิเจนในระหว่างการผสมต่อการเชื่อมประสานโปรตีน คือ

- เวลาผสม: 30, 60, 90 และ 120 นาที
- การเติมออกซิเจน: เติมออกซิเจน และ ไม่เติมออกซิเจน (กวนผสมในสภาวะอากาศปกติ)

นำสารละลายฟิล์มที่ได้มาวิเคราะห์ค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และรูปแบบโปรตีนเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.4.2 เตรียมแผ่นฟิล์มและวิเคราะห์สมบัติของแผ่นฟิล์มดังนี้

- ความหนาของแผ่นฟิล์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3
- สมบัติเชิงกล เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3
- สีและการส่องผ่านแสงของฟิล์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3
- ค่าการซึมผ่านไอน้ำ (water vapor permeability: WVP) ของแผ่นฟิล์ม โดยใช้วิธี ASTM (1989) ซึ่งดัดแปลงโดย Shiku และคณะ (2004)

3.6 ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

3.6.1 การเตรียมและวิเคราะห์สารสกัดฟีนอลจากพืช

นำส่วนของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ชาเขียว กาแฟผง เปลือกมังคุดแห้ง และเปลือกไม้เคี่ยม มาสกัดด้วยเอทานอลในอัตราส่วน 1:3 (น้ำหนัก:ปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องตามวิธีของ Yen และ Duh (1995) กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรอง Whatman-No.41 แล้วทำแห้งด้วยการระเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดที่เตรียมได้ โดยการหาปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ตามวิธีของ Singleton และคณะ (2001) ผสมสารสกัด 0.2 มิลลิลิตร ในสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent (เจือจาง 1:10 ในน้ำ) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐานของสารฟีนอลมาตรฐาน Catechin

3.6.2 ศึกษาผลของชนิดสารสกัดฟีนอลจากพืชต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

เตรียมสารละลายฟิล์มเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.4.1 โดยใช้สารสกัดฟีนอลจากพืชชนิดต่างๆ (ข้อ 3.6.1) เติมนลงในสารละลายฟิล์มไมโอไฟบริลในปริมาณร้อยละ 1 ของโปรตีน กวนผสมพร้อมให้ออกซิเจนเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายฟิล์มส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 และนำสารละลายฟิล์มที่เหลือไปทำการขึ้นรูปฟิล์มเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 และวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3 ดังนี้

- ความหนาของแผ่นฟิล์ม
- สมบัติเชิงกล
- การซึมผ่านไอน้ำ

3.6.3 ศึกษาผลของความเข้มข้นสารสกัดพอลิฟีนอลจากพืชต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

เตรียมสารละลายฟิล์มเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.4.1 โดยใช้สารสกัดพีนอลจากพืชชนิดที่ให้สมบัติของฟิล์มดีที่สุด (จากข้อ 3.6.2) เติมนลงในสารละลายฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลในปริมาณต่างๆ คือ ร้อยละ 0.5, 1, 3 และ 5 ของปริมาณโปรตีน กวนผสมพร้อมให้ออกซิเจนเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายฟิล์มส่วนหนึ่งไปวิเคราะห์การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนเช่นเดียวกับข้อ 3.4.2 และนำสารละลายฟิล์มที่เหลือไปทำการขึ้นรูปฟิล์มเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 และวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2

3.7 ศึกษาสมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากถั่วเหลือง

นำฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากพืชชนิดและปริมาณที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากข้อ 3.6 มาวิเคราะห์สมบัติบางประการเพิ่มเติม ดังต่อไปนี้

3.7.1 สีและการส่องผ่านแสงของฟิล์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3

3.7.2 การละลายของฟิล์มและการละลายของโปรตีนในฟิล์ม

ตรวจสอบการละลายของฟิล์มในน้ำกลั่นตามวิธีการของ Gennadios และคณะ (1998) โดยแช่แผ่นฟิล์ม (ขนาด 2x2 ตารางเซนติเมตร ที่ทราบความชื้นเริ่มต้น และ ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน) ในน้ำกลั่นที่เติม Na-azide ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำการกวนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 xg เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนที่ไม่ละลายออกแล้วนำส่วนที่ไม่ละลายไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 105°C นาน 24 ชั่วโมง แล้วคำนวณหาน้ำหนักของฟิล์มที่ละลาย ตรวจสอบปริมาณโปรตีนในส่วนใสโดยวิธี Biuret (Robinson and Hodgen, 1940) เปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดในฟิล์ม โดยทำละลายฟิล์มด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ เพื่อละลายโปรตีนทั้งหมด

3.7.3 สมบัติการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรตีเอส

ตรวจสอบการย่อยสลายโดยเอนไซม์โคโมทรูปซิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อน (100 องศาเซลเซียส) นาน 3 นาที กรองด้วยแผ่นกระดาษกรอง ตรวจสอบ Degree of hydrolysis ตามวิธีของ Yildirim และ Hettiarachchy (1998)

3.7.4 สมบัติทางความร้อน

วิเคราะห์อุณหภูมิการสลายตัวทางความร้อนของฟิล์มโดยใช้เครื่อง TGA (Thermogravimetric analyzer) โดยมีช่วงอุณหภูมิการทดสอบระหว่าง 30-600 องศาเซลเซียส และอัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที

3.7.5 โครงสร้างจุลภาคของฟิล์ม โดยใช้เครื่อง Scanning electron microscope (SEM)

3.7.6 Moisture sorption isotherm ของฟิล์ม

วิเคราะห์ moisture sorption isotherm ของแผ่นฟิล์ม ตามวิธีของ Kim และ Ustunol (2001) โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแผ่นฟิล์มที่เก็บในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ จนกระทั่งถึงจุดสมดุลที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) โดยใช้สารละลายอิ่มตัวต่างๆ เพื่อให้ได้ความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆ ได้แก่

เกลือ	ความชื้นสัมพัทธ์
$\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$	18
$\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	23
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	34
$\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	46
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	54
NaNO_2	64
NaCl	73
KCl	90

เขียนกราฟ moisture sorption isotherm ของแผ่นฟิล์ม

3.8 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติของฟิล์มในระหว่างการเก็บรักษา

นำแผ่นฟิล์มที่เต็มและไม่เต็มสารสกัดจากพืชที่ให้ฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลดีที่สุด (จากข้อ 3.6) มาเก็บรักษาที่สภาวะบรรยากาศปกติ เป็นเวลานาน 2 เดือน ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสมบัติบางประการของฟิล์มที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์ ดังนี้

- ความชื้นของฟิล์ม (AOAC, 1999)
- การซึมผ่านของไอน้ำ เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3
- สมบัติเชิงกลของฟิล์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3
- สีของฟิล์ม เช่นเดียวกับข้อ 3.4.3

3.9 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดอย่างสมบูรณ์ (CRD; completely randomized design) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดย Analysis of Variance (ANOVA) และความแตกต่างโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Window Version 10.0

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. องค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่ไม่ผ่านและที่ผ่านการล้าง

องค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) ที่ไม่ผ่านและผ่านการล้าง (โปรตีนไมโอไฟบริล) แสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนื้อปลาเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญ และพบว่าการล้างเนื้อปลาด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (เข้มข้น 50 mM) และน้ำกลั่น มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาที่ได้มีค่าสูงขึ้น และช่วยกำจัดองค์ประกอบพวกไขมันและเถ้าให้ลดลง จากการตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนโดยใช้วิธี SDS-PAGE ให้ผลดังภาพที่ 3 พบว่าโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่ผ่านการล้างประกอบด้วยไมโอซินและแอกตินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งโปรตีนทั้งสองเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนไมโอไฟบริล และยังพบองค์ประกอบโปรตีนขนาดเล็ก (~36 kDa) ซึ่งเป็นพวกโปรตีนซาร์โคพลาสมิก การล้างมีผลทำให้โปรตีนซาร์โคพลาสมิกถูกกำจัดออกไป ทำให้ค่า TCA-soluble peptide ที่ตรวจพบในกล้ามเนื้อปลาที่ผ่านการล้างมีค่าลดลง ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) ซึ่งมีผลทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนไมโอไฟบริลในกล้ามเนื้อปลาที่ผ่านการล้างสูงขึ้น ดังนั้นโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาที่ผ่านการล้างที่เตรียมได้จะประกอบด้วยโปรตีนไมโอไฟบริลเป็นองค์ประกอบหลัก (ร้อยละ 95.94 โดยน้ำหนักแห้ง)

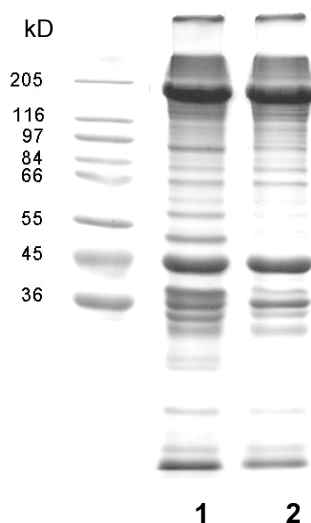
ตารางที่ 2 Chemical composition of washed and unwashed mince of bigeye snapper muscle.

Composition	Unwashed mince	Washed mince
Moisture (% wt)	80.41 $\pm$ 0.03 ^{b*#}	87.43 $\pm$ 0.12 ^{a*#}
Protein (% wt)	17.63 $\pm$ 0.09 ^a (90.00 [‡])	12.06 $\pm$ 0.19 ^b (95.94 [‡])
Fat (% wt)	0.79 $\pm$ 0.01 ^a (4.03)	0.35 $\pm$ 0.06 ^b (2.78)
Ash (% wt)	1.17 $\pm$ 0.01 ^a (5.97)	0.16 $\pm$ 0.01 ^b (1.27)
TCA-soluble peptide (μ mol Tyrosine/g sample)	70.39 $\pm$ 0.73 ^a	28.00 $\pm$ 1.63 ^b

* Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

‡ Numbers in the parenthesis indicate % dry-basis weight.



ภาพที่ 3 SDS-PAGE protein patterns of unwashed mince (1) and washed mince (2) of bigeye snapper muscle.

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลบริสุทธิ์ต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลและสมบัติของฟิล์ม

2.1 ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริล

จากการศึกษาผลของชนิด (caffeic acid, ferullic acid, catechin และ tannic acid) และ ความเข้มข้น (ร้อยละ 1, 3 และ 5 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน) ของสารประกอบพอลิฟีนอลบริสุทธิ์ ในสารละลายฟิล์มโปรตีนเข้มข้นร้อยละ 1.5 พีเอช 11 ที่เติมกลีเซอรอล (ร้อยละ 50 ของปริมาณโปรตีน) ในสภาวะที่มีการเติมออกซิเจนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริล กล้ามเนื้อปลาตาหวาน พบว่า การเติมพอลิฟีนอลมีผลทำให้ค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (free amino group) ของโปรตีนไมโอไฟบริลมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนในชุดการทดลองที่ไม่เติมพอลิฟีนอล ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) โดยที่ปริมาณ free-amino แสดงถึงปริมาณอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ ถ้ามีปริมาณ free-amino น้อย แสดงว่าสารละลายฟิล์มโปรตีนนั้นเกิดการเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีนได้มาก การเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยสารพอลิฟีนอลเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนและหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิฟีนอล (ภาพที่ 2) Strauss และ Gibson (2004) ศึกษาการเชื่อมประสานโปรตีนโดยพอลิฟีนอลและเมื่ออัตราส่วนของสารพอลิฟีนอลต่อหมู่อะมิโนในโมเลกุลโปรตีนเพิ่มขึ้น มีผลทำให้การเชื่อมประสานโปรตีนมากขึ้นหมู่อะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ลดลง ทำให้สารละลายโปรตีนมีลักษณะเป็นเจลได้มากขึ้น

นอกจากนี้พบว่าการเติมพอลิฟีนอลยังมีผลทำให้ค่าปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl (SH) group) ของโปรตีนลดลง (ตารางที่ 3) ซึ่งอาจเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างหมู่ซัลไฮดริลและหมู่ไฮดรอกซิลของสารพอลิฟีนอล รวมทั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ซัลไฮดริลได้เป็นพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ขึ้นร่วมด้วย

เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน พบว่า tannic acid ให้ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลสูงกว่าการใช้ caffeic acid, catechin และ ferulic acid ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งสังเกตได้จากการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระมากที่สุด (ตารางที่ 3) ทั้งนี้อาจเนื่องจากโมเลกุลของ tannic acid มีปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าพอลิฟีนอลชนิดอื่น จึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนได้มากกว่า Rowel และคณะ (2001; 2002) รายงานว่า พอลิฟีนอลที่มีปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลมากจะมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลโปรตีนได้สูงกว่า นอกจากนี้ความว่องไวของพอลิฟีนอลยังขึ้นกับตำแหน่งหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของพอลิฟีนอลด้วย จากการทดลองยังพบว่าพอลิฟีนอลแต่ละชนิดให้ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลสูงมากขึ้นตามความเข้มข้นของพอลิฟีนอลที่เพิ่มขึ้น

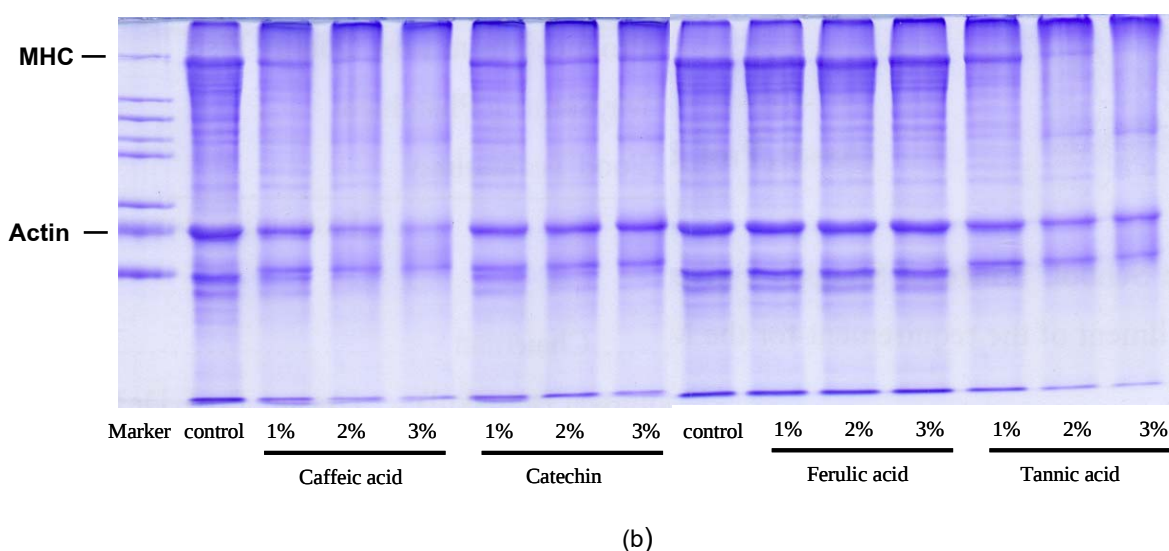
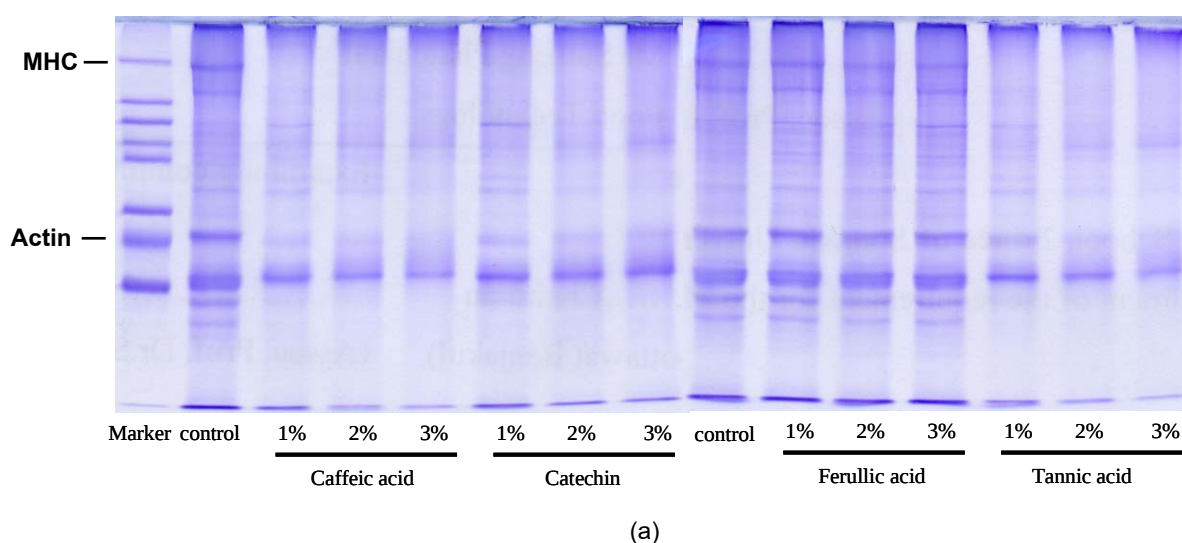
ตารางที่ 3 Free-amino group and sulfhydryl group of film-forming solution of bigeye snapper myofibrillar protein.

Treatment	Free-amino group (mM)	Sulfhydryl group ($\times 10^{-5}$ mole/g protein)
Control (No polyphenol)	$4.78 \pm 0.07^{g*#}$	7.06 ± 0.21^e
1% Caffeic acid	1.42 ± 0.02^d	0
3% Caffeic acid	1.14 ± 0.02^b	0
5% Caffeic acid	0.98 ± 0.04^a	0
1% Catechin	1.47 ± 0.11^d	0.23 ± 0.02^a
3% Catechin	1.39 ± 0.02^d	0
5% Catechin	1.27 ± 0.11^c	0
1% Ferulic acid	4.73 ± 0.04^g	6.67 ± 0.08^d
3% Ferulic acid	4.58 ± 0.10^f	6.23 ± 0.05^c
5% Ferulic acid	4.30 ± 0.11^e	5.73 ± 0.14^b
1% Tannic acid	1.25 ± 0.04^{bc}	0
3% Tannic acid	0.99 ± 0.03^a	0
5% Tannic acid	0.93 ± 0.02^a	0

* Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

ภาพที่ 4 แสดงรูปแบบโปรตีนของสารละลายฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมและเติมพอลิฟีนอลชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่ารูปแบบของโปรตีนที่ได้ให้ผลที่สอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริล โดยพบว่าแถบของโปรตีนไมโอซินเส้นหลัก (Myosin heavy chain: MHC) มีความเข้มลดลงอย่างเห็นได้ชัดตามปริมาณของพอลิฟีนอลที่เติม โดยที่ tannic acid ให้ความเข้มของแถบ MHC ลดลงมากที่สุด การลดลงของแถบ MHC แสดงถึงการเกิดการเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้นจนไม่สามารถเคลื่อนผ่านเจลได้



ภาพที่ 4 SDS-PAGE protein patterns of films from bigeye snapper myofibrillar protein incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols; (a) non-reducing and (b) reducing; MHC=myosin heavy chain.

2.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารประกอบพอลิฟีนอลต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

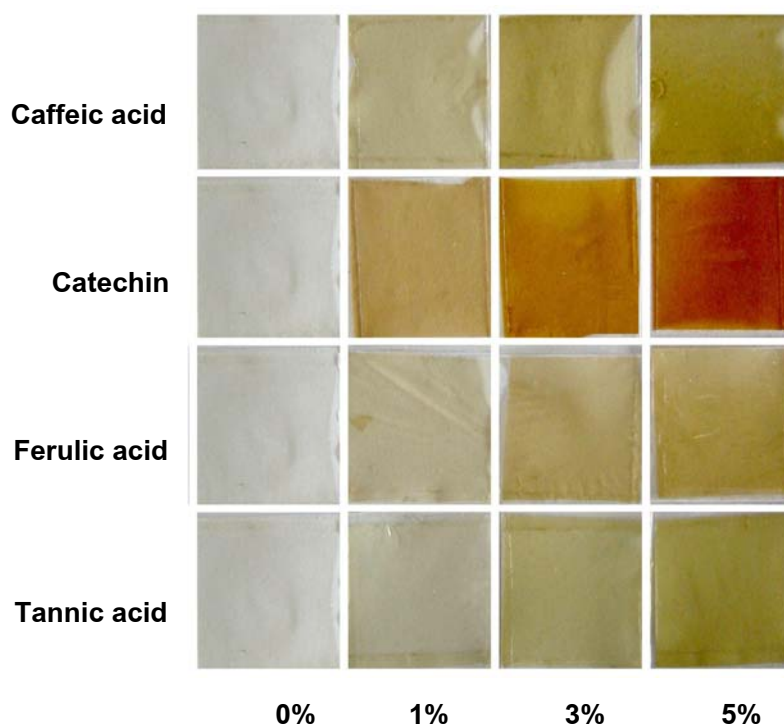
ตารางที่ 4 แสดงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานที่ไม่เติมและเติมพอลิฟีนอลชนิดและความเข้มข้นต่างๆ พบว่า การเติมพอลิฟีนอลมีผลทำให้ค่า modulus (E) , tensile strength (TS) ของฟิล์มมีค่าสูงขึ้น ส่วนค่า elongation at break (EAB) มีค่าลดลง ดังนั้นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เติมพอลิฟีนอลมีความแข็งแรงมากกว่าฟิล์มที่ไม่เติมพอลิฟีนอล ($p<0.05$) ชนิดและความเข้มข้นพอลิฟีนอลที่แตกต่างกันมีผลให้ค่า E, TS และ EAB ของฟิล์มแตกต่างกัน ($p<0.05$) โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน การใช้ tannic acid ให้ฟิล์มที่มีค่า TS และ E สูงที่สุด ส่วน ค่า EAB ต่ำที่สุด ในขณะที่ ferulic acid มีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มน้อยที่สุด การใช้ ferulic acid ที่ระดับร้อยละ 1 ให้ผลที่ไม่แตกต่างจากฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมพอลิฟีนอล ($p>0.05$) ปริมาณของพอลิฟีนอลที่เพิ่มขึ้นทำให้ความแข็งแรง (ค่า TS และ E) ของฟิล์มที่เติมพอลิฟีนอลเพิ่มขึ้น แต่ความยืดหยุ่น (ค่า EAB) ของฟิล์มลดลง ($p<0.05$) ความแข็งแรงของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลโปรตีนเกิดเป็นโครงสร้างร่างแหที่แข็งแรง ทำให้สามารถต้านทานต่อแรงกระทำได้มากขึ้นและมีความคงตัวมากขึ้น ความแข็งแรงของฟิล์มจึงเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4 Tensile strength (TS), elongation at break (EAB) and modulus of films from bigeye snapper myofibrillar protein incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.

Treatment	TS (MPa)	EAB (%)	Modulus (MPa)
Control (No polyphenol)	$3.88 \pm 0.23^{a\#}$	92.65 ± 2.80^g	163.91 ± 2.93^a
1% Caffeic acid	4.23 ± 0.17^c	66.29 ± 3.23^e	202.84 ± 7.85^{cd}
3% Caffeic acid	4.45 ± 0.07^d	56.42 ± 3.43^d	213.94 ± 6.36^e
5% Caffeic acid	4.60 ± 0.10^{de}	54.08 ± 2.91^d	239.82 ± 5.33^{gh}
1% Catechin	4.11 ± 0.10^{bc}	74.81 ± 4.17^f	193.75 ± 1.76^{bc}
3% Catechin	4.44 ± 0.04^d	59.08 ± 4.11^d	211.56 ± 2.79^{de}
5% Catechin	4.61 ± 0.13^{de}	42.13 ± 3.40^b	224.49 ± 5.74^f
1% Ferulic acid	3.95 ± 0.05^{ab}	94.75 ± 2.22^g	172.12 ± 9.14^a
3% Ferulic acid	4.15 ± 0.12^c	77.69 ± 2.50^f	185.02 ± 2.82^b
5% Ferulic acid	4.20 ± 0.14^c	68.90 ± 2.73^e	205.08 ± 3.76^{de}
1% Tannic acid	4.50 ± 0.10^{de}	57.00 ± 1.79^d	225.81 ± 2.31^f
3% Tannic acid	4.68 ± 0.10^e	47.90 ± 3.44^c	231.29 ± 7.17^{fg}
5% Tannic acid	4.90 ± 0.03^f	28.30 ± 1.30^a	241.64 ± 4.74^h

^a Mean $\pm$ SD from triplicate determinations. [#] Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p<0.05$)

ภาพที่ 5 และตารางที่ 5 แสดงภาพถ่ายตัวอย่างฟิล์มและค่าสี [L^* (มืด-สว่าง) , a^* (แดง-เขียว) และ b^* (ม่วง-เหลือง)] ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ไม่เติมและเติมพอลิฟีนอลชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ การเติมพอลิฟีนอลมีผลต่อสีของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของพอลิฟีนอล การเติมพอลิฟีนอลมีผลทำให้ความสว่าง (L^* -value) ของฟิล์มลดลงตามปริมาณพอลิฟีนอลที่เติม โดยเฉพาะการใช้ catechin จะทำให้ฟิล์มมีความสว่างลดลงมากที่สุดและทำให้ฟิล์มที่ได้มีสีเขียวเหลือง caffeic acid ให้ฟิล์มที่มีสีเหลืองอมเขียว ferulic acid ให้ฟิล์มที่มีสีเหลืองอมม่วงเล็กน้อย ส่วน tannic acid ให้ฟิล์มที่มีสีเหลือง ความเข้มของสีเพิ่มขึ้นตามปริมาณของพอลิฟีนอลที่ใช้



ภาพที่ 5 Photographs of bigeye snapper myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.

ตารางที่ 5 Color of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.

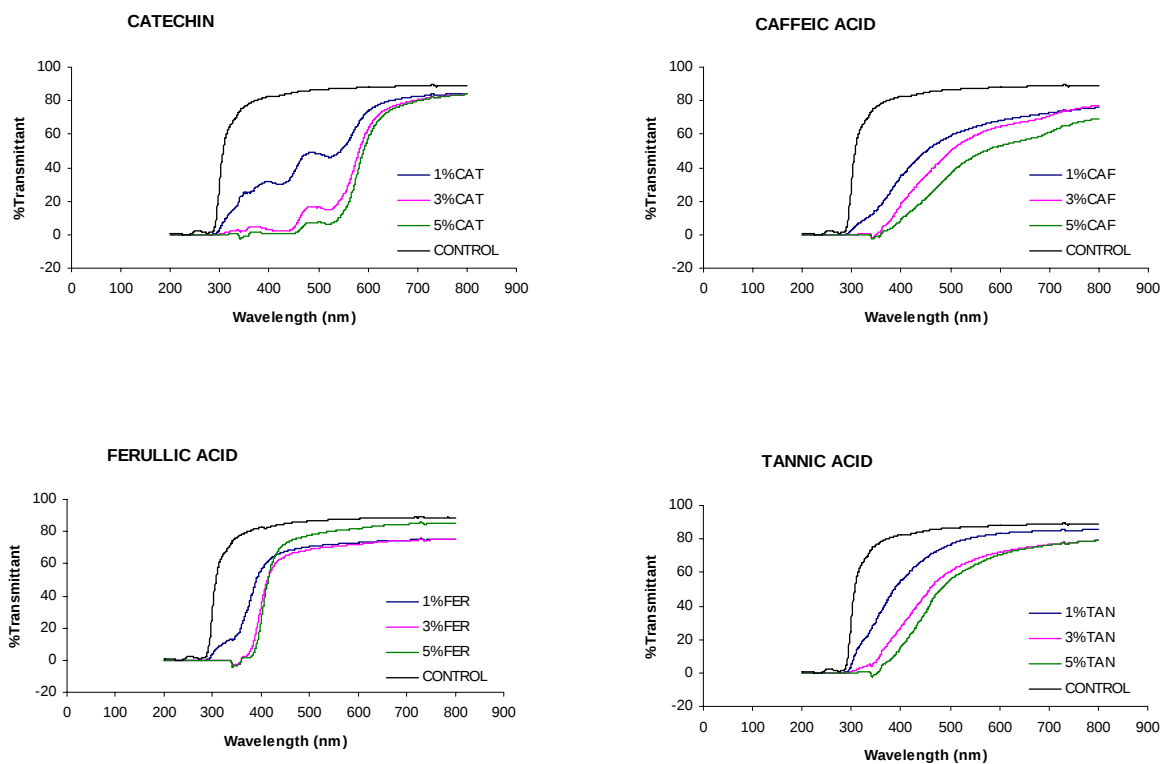
Treatment	L*	a*	b*
Control (No polyphenol)	90.07 $\pm$ 0.21 ^{a ##}	-1.47 $\pm$ 0.04 ^c	2.15 $\pm$ 0.04 ⁱ
1% Caffeic acid	80.12 $\pm$ 0.56 ^d	-0.95 $\pm$ 0.13 ^d	23.45 $\pm$ 1.13 ^g
3% Caffeic acid	70.65 $\pm$ 0.67 ^f	2.37 $\pm$ 0.27 ^f	38.96 $\pm$ 0.81 ^e
5% Caffeic acid	59.69 $\pm$ 0.39 ^h	7.87 $\pm$ 0.12 ^g	52.83 $\pm$ 0.12 ^c
1% Catechin	64.07 $\pm$ 0.40 ^g	24.36 $\pm$ 0.49 ^h	34.34 $\pm$ 0.31 ^f
3% Catechin	44.25 $\pm$ 0.49 ⁱ	51.79 $\pm$ 0.22 ⁱ	66.47 $\pm$ 0.43 ^a
5% Catechin	38.04 $\pm$ 0.44 ^j	55.07 $\pm$ 0.20 ^j	55.54 $\pm$ 2.36 ^b
1% Ferulic acid	89.78 $\pm$ 0.11 ^a	-2.03 $\pm$ 0.10 ^b	4.81 $\pm$ 0.10 ^k
3% Ferulic acid	88.57 $\pm$ 0.07 ^b	-2.99 $\pm$ 0.13 ^a	9.58 $\pm$ 0.30 ^j
5% Ferulic acid	87.85 $\pm$ 0.26 ^b	-3.26 $\pm$ 0.11 ^a	11.59 $\pm$ 0.58 ⁱ
1% Tannic acid	85.46 $\pm$ 0.11 ^c	-1.92 $\pm$ 0.10 ^b	18.70 $\pm$ 0.41 ^h
3% Tannic acid	80.12 $\pm$ 0.48 ^d	-1.38 $\pm$ 0.02 ^c	34.58 $\pm$ 1.58 ^f
5% Tannic acid	75.41 $\pm$ 0.85 ^e	1.37 $\pm$ 0.63 ^e	45.66 $\pm$ 1.94 ^d

[#] Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

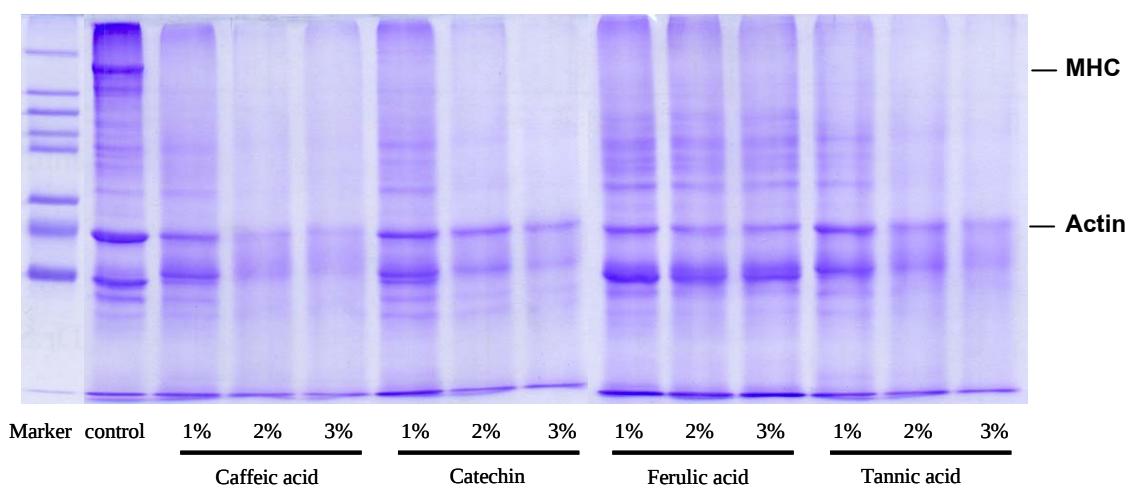
^{*} Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$).

ภาพที่ 6 แสดงการส่องผ่านแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง 800 – 200 nm ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เติมและไม่เติมพอลิฟีนอล พบว่า การเติมพอลิฟีนอลมีผลทำให้ฟิล์มโปรตีนมีการส่องผ่านของแสงได้ลดลง (ความใสลดลง) โดยเฉพาะการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่น 350 – 500 nm ฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลทั้งที่เติมและไม่เติมพอลิฟีนอลมีความสามารถในการป้องกันการส่องผ่านของแสงยูวี (ความยาวคลื่น 200 – 280 nm) ได้ดีเยี่ยม

ภาพที่ 7 แสดงรูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริลของตัวอย่างแผ่นฟิล์มที่เติมและไม่เติมพอลิฟีนอล โดยวิธี SDS-PAGE แบบรีดิวซิง (reducing) พบว่า แถบโปรตีนของตัวอย่างฟิล์มมีความเข้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างสารละลายฟิล์ม โดยที่ไม่พบแถบของโปรตีนไมโอซินเส้นหลัก (MHC) ในตัวอย่างฟิล์มที่มีการเติมพอลิฟีนอล แสดงให้เห็นว่าเกิดการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนเพิ่มมากขึ้นกลายเป็นโครงข่ายของฟิล์มในระหว่างขั้นตอนของการทำแห้งฟิล์ม และการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนในระหว่างการทำแห้งฟิล์มที่เกิดขึ้นน่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลโปรตีนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยสารประกอบพอลิฟีนอล



ภาพที่ 6 Light transmittance of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.



ภาพที่ 7 SDS-PAGE protein pattern (reducing) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different types and concentrations of polyphenols.

3. ผลของปัจจัยบางประการที่มีต่อประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโปรตีนของสารพอลิฟีนอลและสมบัติของฟิล์ม

จากการศึกษาผลของปัจจัยบางประการ ได้แก่ เวลาการผสม และสภาวะการผสม (สภาวะบรรยากาศและสภาวะที่ให้ออกซิเจน) ของ tannic acid ต่อการเชื่อมประสานโปรตีนในสารละลายฟิล์ม ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

3.1 ผลต่อการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลในสารละลายฟิล์ม

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของสารละลายฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมและเติม tannic acid ปริมาณร้อยละ 1 ที่เวลาการผสมต่างๆ ในสภาวะไม่เติมออกซิเจน (บรรยากาศปกติ) และในสภาวะที่ให้ออกซิเจน พบว่า การเติม tannic acid ในสภาวะที่ไม่ให้ออกซิเจนให้ค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติม tannic acid ($p > 0.05$) ในขณะที่การเติม tannic acid ร่วมกับการให้ออกซิเจนเป็นเวลา 30 - 120 นาที มีผลให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีนไมโอไฟบริลในสารละลายฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายฟิล์มโปรตีนชุดควบคุมที่ไม่เติม tannic acid ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตามการกวนผสมพร้อมให้ออกซิเจนเป็นเวลา มากกว่า 30 นาที ให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระไม่แตกต่างจากการกวนผสมพร้อมให้ออกซิเจนเป็นเวลา 30 นาที แสดงว่าการเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนและหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิฟีนอลจำเป็นต้องมีการเติมออกซิเจนร่วมด้วยเพื่อเปลี่ยนพอลิฟีนอลในรูปรีดิวซ์ (reduced form) ไปเป็นควิโนน (quinone) ที่มีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของสายโซ่โปรตีนดังกล่าวก่อนที่แสดงในภาพที่ 2 (Strauss and Gibson, 2004)

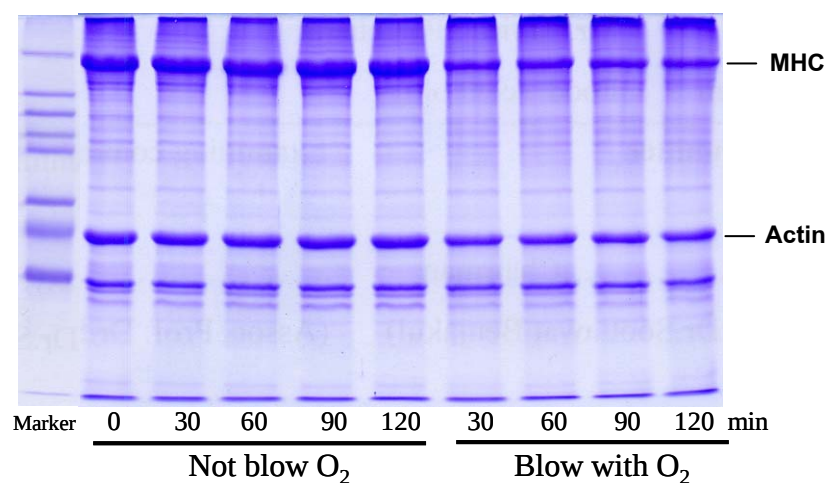
ภาพที่ 8 แสดงรูปแบบโปรตีนไมโอไฟบริลในสภาวะรีดิวซ์ของสารละลายฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมและเติม tannic acid ปริมาณร้อยละ 1 ที่เวลาการผสมต่างๆ ในสภาวะบรรยากาศปกติและในสภาวะที่ให้ออกซิเจน พบว่า ที่เวลาเดียวกัน การเติมออกซิเจนมีผลทำให้แถบโปรตีนไมโอซินเส้นหลัก (MHC) มีความเข้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมในสภาวะบรรยากาศปกติและชุดควบคุม (ไม่เติมพอลิฟีนอล) แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชุดควบคุมและชุดการทดลองที่กวนผสมในสภาวะบรรยากาศ (ไม่เติมออกซิเจน) แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่ไม่เติมออกซิเจนพอลิฟีนอลไม่สามารถเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนได้หรืออาจเกิดขึ้นได้น้อยไม่มีประสิทธิภาพ ในขณะที่การเติมออกซิเจนมีผลให้พอลิฟีนอล (tannic acid) สามารถเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการเชื่อมประสานโปรตีนเกิดขึ้นสูงสุดได้ตั้งแต่การผสมเป็นเวลา 30 นาที การผสมในเวลาที่มากขึ้นไม่มีผลต่อการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลโดยสารพอลิฟีนอล โดยสังเกตจากความเข้มของแถบ MHC ที่ไม่แตกต่างกันของการผสมที่เวลาต่างๆ ผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนดังกล่าวสอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 Free amino group in film-forming solution of fish myofibrillar protein incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.

Treatment	Free-amino group* (mM)
Control (No polyphenol)	$6.05 \pm 0.12^{b**}$
1% Tannic acid, without O ₂	
30 min	6.00 ± 0.03^b
60 min	5.86 ± 0.10^b
90 min	5.91 ± 0.03^b
120 min	6.02 ± 0.05^b
1% Tannic acid, with O ₂	
30 min	2.78 ± 0.04^a
60 min	2.81 ± 0.11^a
90 min	2.76 ± 0.05^a
120 min	2.74 ± 0.07^a

Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$).



ภาพที่ 8 SDS-PAGE protein pattern (reducing) of film-forming solutions of fish myofibrillar protein incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.

3.2 ผลต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

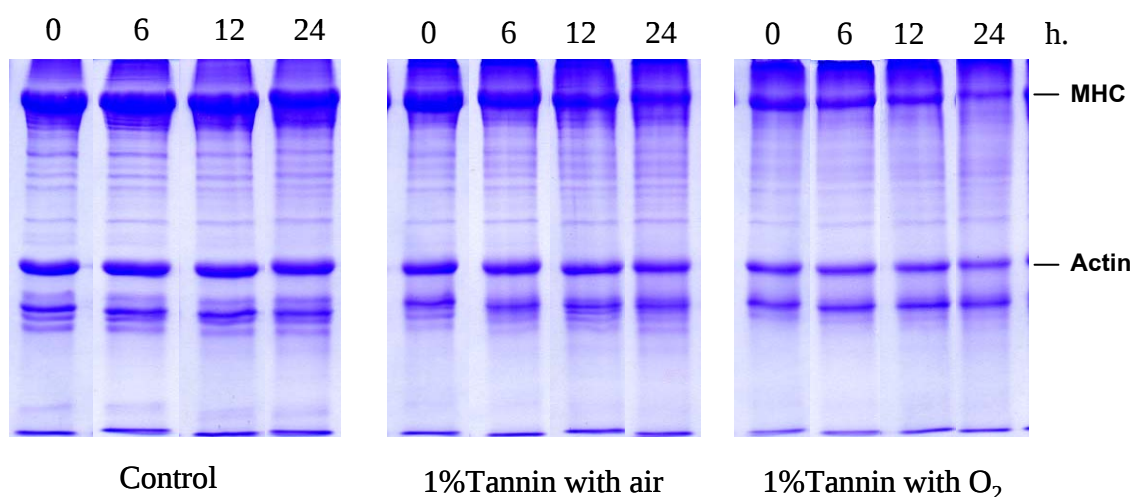
เมื่อนำสารละลายฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ไม่เติมและเติม tannic acid ปริมาณร้อยละ 1 ที่ผสมเป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะบรรยากาศปกติและในสภาวะที่ให้ออกซิเจนมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม และทดสอบสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มให้ผลการทดลองดังตารางที่ 7 แผ่นฟิล์มที่เติม tannic acid มีความแข็งแรงกว่า (ค่า TS และ modulus สูงกว่า) แต่ยืดหยุ่นน้อยกว่า (ค่า EAB ต่ำกว่า) ฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติม tannic acid นอกจากนี้พบว่า การเติม tannic acid และผสมในสภาวะที่ให้ ออกซิเจนให้แผ่นฟิล์มที่มีความแข็งแรงสูงกว่าการผสมในสภาวะบรรยากาศ (ไม่ให้ออกซิเจน) อันเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนที่เกิดขึ้นโดยสารประกอบพอลิฟีนอลที่เกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่ให้ออกซิเจนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

นอกจากนี้จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นว่าฟิล์มที่เติม tannic acid และผสมในสภาวะที่ไม่ให้ออกซิเจนมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นแต่ความยืดหยุ่นลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มชุดควบคุม ทั้งๆ ที่จากผลการวิเคราะห์ค่าปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและรูปแบบโปรตีนในสารละลายฟิล์ม (ตารางที่ 6 และภาพที่ 8 ตามลำดับ) ของตัวอย่างทั้งสองให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในระหว่างการทำแห้งฟิล์มซึ่งใช้เวลานาน จึงอาจทำให้ออกซิเจนสามารถเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนได้มากขึ้นโดยอาศัยออกซิเจนจากอากาศ รวมทั้งในระหว่างการทำแห้งฟิล์มโมเลกุลโปรตีนมีโอกาสเกิดการจัดเรียงตัวใกล้ชิดกันมากขึ้น ทำให้สามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยพันธะชนิดต่างๆ ได้อีกด้วยโดยเฉพาะพันธะไดซัลไฟด์ และพันธะไฮโดรเจน (Cuq et al., 1996) ซึ่งจากภาพที่ 9 แสดงรูปแบบโปรตีนของสารละลายฟิล์มโปรตีนที่เตรียมในสภาวะบรรยากาศและสภาวะที่ให้ ออกซิเจนที่ทิ้งไว้ที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. ภายหลังการผสม พบว่า แถบโปรตีนไมโอซินเส้นหลัก (MHC) มีความเข้มลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยในสภาวะที่เติมออกซิเจนการลดลงของแถบ MHC จะมากกว่าที่เวลาเดียวกัน ในขณะที่การผสมในสภาวะบรรยากาศปกติความเข้มของแถบ MHC จะค่อยๆ ลดลงเมื่อหากตั้งสารละลายฟิล์มทิ้งไว้นานขึ้นภายหลังการผสม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนจะค่อยๆ เกิดขึ้นได้เมื่อตั้งสารละลายฟิล์มทิ้งไว้ เช่นเดียวกับในระหว่างการทำแห้งฟิล์ม

ตารางที่ 7 Tensile strength (TS), elongation at break (EAB) and modulus of fish myofibrillar protein films incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.

Treatment	TS* (MPa)	EAB* (%)	Modulus* (MPa)
Control (No polyphenol)	4.96 ± 0.32 ^a	90.08 ± 1.25 ^c	264.27 ± 4.13 ^{a**}
1% Tannic acid, without O ₂ for 30 min	5.67 ± 0.35 ^b	62.40 ± 2.65 ^b	305.31 ± 5.02 ^b
1% Tannic acid, with O ₂ for 30 min	7.12 ± 0.83 ^c	41.08 ± 2.03 ^a	340.67 ± 7.44 ^c

* Mean ± SD from triplicate determinations. ** Different superscripts in the same column indicate the significant difference (p<0.05)



ภาพที่ 9 SDS-PAGE protein pattern (reducing) of film-forming solutions of fish myofibrillar protein incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions and standing for various times after mixing.

สมบัติการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เติม tannic acid ผสมในสถานะที่ไม่ให้ออกซิเจน (บรรยากาศปกติ) และในสถานะที่ให้ออกซิเจน แสดงในตารางที่ 8 พบว่า การเติม tannic acid และผสมในสถานะให้ออกซิเจนให้ฟิล์มที่มีค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำกว่าการเติม tannic acid และผสมในสถานะที่ไม่ให้ออกซิเจนและฟิล์มหุดควบคุม ตามลำดับ ($p < 0.05$) ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนที่เกิดขึ้นมากกว่าในสถานะที่เติมออกซิเจน ทำให้สมบัติชอบน้ำของโปรตีนในแผ่นฟิล์มลดลงเนื่องจากหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำของโปรตีนลดลง

ตารางที่ 8 Water-vapor permeability (WVP) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with 1% tannic acid at different mixing conditions.

Treatment	WVP* ($\times 10^{-10} \text{ g.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)
Control (No polyphenol)	$1.72 \pm 0.05^{\text{c**}}$
1% Tannic acid, without O_2 for 30 min	$1.31 \pm 0.02^{\text{b}}$
1% Tannic acid, with O_2 for 30 min	$0.82 \pm 0.03^{\text{a}}$

* Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

4. การเตรียมและวิเคราะห์สารสกัดพอลิฟีนอลจากพืชชนิดต่าง ๆ

จากการเตรียมสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ โดยใช้เอธานอลเป็นตัวทำละลาย ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 9 โดยพบว่า พืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กาแฟผง เปลือกมังคุด เปลือกไม้เคี่ยม และชาเขียว ให้ปริมาณสารสกัดร้อยละ 0.32 17.43 1.18 และ 4.05 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ โดยในสารที่สกัดได้พบว่ามีสารประกอบพอลิฟีนอลทั้งหมด (คิดในรูป catechin) อยู่ในปริมาณ 0.234 0.598 0.397 และ 0.284 g/g สารสกัดแห้ง ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณสารพอลิฟีนอลที่ได้จากสารสกัดจากเปลือกมังคุดมากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดจากไม้เคี่ยม ($p < 0.05$) ส่วนสารสกัดจากกาแฟและชาเขียวมีปริมาณพอลิฟีนอลที่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) สารสกัดพอลิฟีนอลจากพืชที่ได้จะนำไปใช้เพื่อการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนในการเตรียมฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาต่อไป

ตารางที่ 9 Extraction yield and total phenolic content in crude extract of different plants.

Crude extract	Yield* (%)	Phenolic content* (g/g dried extract)
Coffee	$0.32 \pm 0.01^{c**}$	0.284 ± 0.003^c
Mangosteen husk	17.43 ± 0.30^a	0.598 ± 0.003^a
Keim bark	1.18 ± 0.01^c	0.397 ± 0.009^b
Green tea	4.05 ± 0.11^b	0.234 ± 0.009^c

* Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

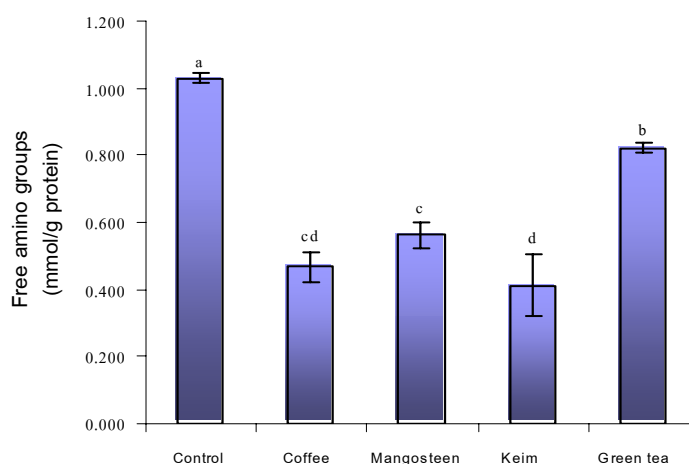
5. ผลของการใช้สารสกัดจากพืชต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา

5.1 ผลของชนิดสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ

5.1.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ในการเชื่อมประสานโปรตีน

สารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมได้นำมาเติมในสารละลายฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาเพื่อการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีน (ในปริมาณร้อยละ 1 ของปริมาณโปรตีน) ตรวจวัดประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ภายหลังการทำปฏิกิริยา (เป็นเวลา 30 นาที ร่วมกับการให้ออกซิเจน) ในสารละลายฟิล์มโปรตีน ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 10 พบว่า สารละลายฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ในปริมาณร้อยละ 1 ของปริมาณโปรตีน เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะเดิมออกซิเจน มีปริมาณหมู่อะ

มีโนอิสระน้อยกว่าในสารละลายฟิล์มโปรตีนที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากพืช ($p<0.05$) โดยสารละลายฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่น้อยที่สุดที่มีความแตกต่างจากการใช้สารสกัดจากพืชชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระแสดงถึงปริมาณอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ ถ้ามีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระน้อย แสดงว่าสารละลายฟิล์มโปรตีนนั้นเกิดการเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีนได้มาก การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยสารประกอบพอลิฟีนอลเกิดเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบพอลิฟีนอลกับหมู่อะมิโนในสายโซ่พอลิเปปไทด์โดยมีกลไกดังแสดงในภาพที่ 2 (Strauss and Gibson, 2004)



ภาพที่ 10 Free amino groups of fish myofibrillar protein in film-forming solution incorporated without and with different plant extracts at 1% of protein. Different letters indicate the significant difference ($p<0.05$).

จากผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดจากไม้เคี่ยมให้ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาได้มากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดจากกาแฟและเปลือกมังคุดที่ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ส่วนสารสกัดจากชาเขียวให้ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลต่ำสุด ประสิทธิภาพของการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลที่แตกต่างกันนี้อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบ (ชนิด) ของสารประกอบพอลิฟีนอลในสารสกัดที่ได้จากพืชชนิดต่างๆ ซึ่งสารประกอบพอลิฟีนอลต่างชนิดกันอาจมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนแตกต่างกัน

5.1.2 ผลของสารสกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ ต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

5.1.2.1 สมบัติเชิงกล

จากการทดลองหาค่าการต้านทานแรงยืดดึง (TS) และค่าระยะยืดเมื่อขาด (EAB) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ไม่เติมและเติมสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ในปริมาณร้อยละ 1 ของโปรตีน ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า ฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมให้ค่าการต้านทานแรงดึงสูงที่สุด ซึ่งให้ค่าการต้านทานแรงดึงที่แตกต่างจากฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ให้ค่าที่ไม่แตกต่างจากฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากชาเขียวและฟิล์มที่เติมสารสกัดจากเปลือกมังคุด ($p > 0.05$) สำหรับฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากกาแฟให้ค่าการต้านทานแรงดึงที่ไม่แตกต่างจากฟิล์มโปรตีนชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด ($p > 0.05$) สำหรับระยะยืดเมื่อขาดของฟิล์ม พบว่า ค่า EAB ของฟิล์มที่เติมสารสกัดทุกชนิดมีค่าต่ำกว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยฟิล์มที่เติมสารสกัดชนิดต่างๆ มีค่า EAB ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ความแข็งแรงของฟิล์มโปรตีนที่สูงขึ้นเมื่อมีการเติมสารสกัดพอลิฟีนอลจากพืชชนิดต่างๆ เป็นผลมาจากการเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลโปรตีนโดยสารประกอบพอลิฟีนอลในสารสกัด (Orliac *et al.*, 2003) โดยสารสกัดจากไม้เคี่ยมให้ประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนได้สูงที่สุด (ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงมากที่สุด ดังภาพที่ 10) ฟิล์มที่ได้จึงมีความต้านทานแรงดึงสูงที่สุด อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าสมบัติของฟิล์มโปรตีนสุดท้ายที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยม เปลือกมังคุด และชาเขียวไม่แตกต่างกันทั้งๆที่จากผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในสารละลายฟิล์มก่อนการขึ้นรูปพบว่าการใช้สารสกัดพอลิฟีนอลจากไม้เคี่ยมให้ผลการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สารสกัดจากเปลือกมังคุดและชาเขียว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของโปรตีนอาจเกิดการเชื่อมประสานกันโดยสารประกอบพอลิฟีนอลเพิ่มมากขึ้นในระหว่างการทำแห้งฟิล์ม รวมทั้งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของโครงสร้างและสัดส่วนของสารประกอบพอลิฟีนอลแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดจากพืชที่ต่างชนิดกัน ซึ่งมีผลต่อความแข็งแรงของพันธะหรือการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังอาจมีผลมาจากการเกิดอันตรกิริยาในรูปแบบอื่นๆ เช่น พันธะไดซัลไฟด์ พันธะไฮโดรเจน และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ที่มักเกิดขึ้นในการเกิดฟิล์มโปรตีนทั่วๆ ไป (Cuq *et al.*, 1995; Gennadios *et al.*, 1996) เป็นผลให้สมบัติความแข็งแรงของฟิล์มสุดท้ายที่ได้ไม่แตกต่างกัน โดยค่าการต้านทานแรงดึง และค่าระยะยืดเมื่อขาด นั้นจะแสดงถึงสมบัติเชิงกลของฟิล์ม ฟิล์มที่มีค่าการต้านทานแรงยืดดึงสูง แสดงว่าฟิล์มนั้นมีความแข็งแรงจึงสามารถทนต่อแรงดึงได้มาก และฟิล์มที่มีค่าระยะยืดเมื่อขาดสูง แสดงว่าฟิล์มนั้นมีความยืดหยุ่นสูงสามารถยืดดึงได้มาก ซึ่งฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลที่ดีนั้นควรต้องมีค่าการต้านทานแรงยืดดึงสูง และค่าระยะยืดเมื่อขาดสูง ถึงจะเป็นฟิล์มที่มีความแข็งแรงและยืดหยุ่นทนทานต่อการนำไปใช้งาน

ตารางที่ 10 Tensile strength (TS) and elongation at break (EAB) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different plant extracts at 1% of protein.

Films	TS* (MPa)	EAB* (%)
Control	7.14 ± 1.23 ^{d**}	52.08 ± 4.79 ^a
1% Coffee extract	7.70 ± 1.13 ^{cd}	13.02 ± 4.93 ^{bc}
1% Mangosteen extract	9.82 ± 0.87 ^{ab}	11.24 ± 2.05 ^c
1% Keim bark extract	10.82 ± 0.93 ^a	9.82 ± 1.73 ^c
1% Green tea extract	10.18 ± 0.95 ^{ab}	9.58 ± 0.24 ^c

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference (p<0.05)

5.1.2.2 สมบัติการซึมผ่านไอน้ำ

จากการทดลองหาค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบิลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดพอลิฟีนอลจากพืชชนิดต่างๆ ในปริมาณร้อยละ 1 ของโปรตีน (ตารางที่ 11) พบว่า ฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ มีค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ต่ำกว่าฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดจากพืชมีผลในการปรับปรุงสมบัติการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบิลได้ อันเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีน ทำให้หมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำของโปรตีนในฟิล์มลดน้อยลง จากผลการทดลองจะเห็นว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมีค่า WVP ต่ำที่สุด รองลงมาคือฟิล์มที่เติมสารสกัดจากกาแฟ เปลือกมังคุด และชาเขียว ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ได้จากเปลือกไม้อาจมีองค์ประกอบของสารพอลิฟีนอลขนาดใหญ่ เช่น tannin ที่มีปริมาณของหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) อยู่มากกว่าสารพอลิฟีนอลชนิดอื่น จึงมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนได้สูงกว่าการใช้สารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ (ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตาม พฤติกรรม การซึมผ่านไอน้ำในแผ่นฟิล์มยังขึ้นกับปริมาตรอิสระ (free volume) ในแผ่นฟิล์มที่อาจเป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนในแผ่นฟิล์มระหว่างการทำแห้งฟิล์ม ปริมาตรอิสระดังกล่าวมีผลต่อกลไกการแพร่ (diffusion) ของโมเลกุลน้ำในฟิล์ม ซึ่งอาจส่งผลต่อค่า WVP ของฟิล์มโปรตีน ทำให้ฟิล์มที่เติมสารสกัดชนิดต่างๆ มีค่า WVP ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 11 Water vapor permeability (WVP) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with different plant extracts at 1% of protein.

Films	WVP* ($\times 10^{-10} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)
Control	$1.46 \pm 0.13^{\text{a**}}$
1% Coffee extract	$0.73 \pm 0.05^{\text{c}}$
1% Mangosteen extract	$0.76 \pm 0.04^{\text{c}}$
1% Keim bark extract	$0.59 \pm 0.12^{\text{d}}$
1% Green tea extract	$0.83 \pm 0.14^{\text{b}}$

* Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

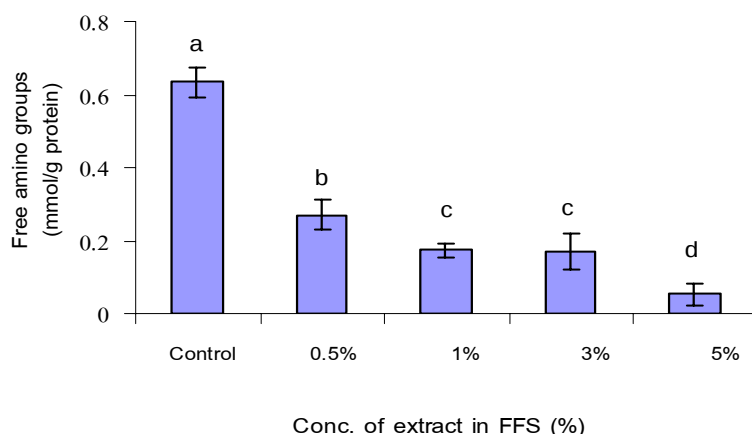
** Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมีผลต่อการเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีน ช่วยทำให้เกิดการเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีนสูงที่สุดและให้ฟิล์มที่มีสมบัติเชิงกลและสมบัติการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมเพื่อใช้ในการศึกษาผลของความเข้มข้นสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อการเชื่อมประสานโปรตีนและสมบัติของฟิล์มต่อไป

5.2 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา

5.2.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริล

จากการทดลองหาปริมาณหมู่อะมิโนอิสระในสารละลายฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ร้อยละ 0.5 1 3 และ 5 ของปริมาณโปรตีน) ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่า สารละลายฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมจะมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระน้อยกว่าสารละลายฟิล์มโปรตีนชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากไม้เคี่ยม ($p < 0.05$) ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ โดยสารละลายฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ของโปรตีน ให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระน้อยที่สุด สารละลายฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 3 ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)



ภาพที่ 11 Free amino groups of fish myofibrillar protein in film-forming solution (FFS) incorporated without and with Keim bark extract at different concentrations. Different letters indicate the significant difference ($p < 0.05$).

5.2.2 ผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา

5.2.2.1 สมบัติเชิงกล

จากการทดลองหาค่าการต้านทานแรงดึง (TS) และค่าระยะยืดเมื่อขาด (EAB) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ความเข้มข้นต่างๆ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งพบว่า การใช้สารสกัดไม้เคี่ยมที่ระดับร้อยละ 5 ของโปรตีน ให้ฟิล์มที่มีค่าการต้านทานแรงดึงสูงที่สุด รองลงมาเป็นที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 1 0.5 และชุดควบคุม (ร้อยละ 0) ตามลำดับ โดยที่ความเข้มข้นสารสกัดร้อยละ 0.5 และ 1 ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อพิจารณา ค่าระยะยืดเมื่อขาด พบว่า ที่ความเข้มข้นสารสกัดร้อยละ 5 ให้ค่าระยะยืดเมื่อขาดต่ำที่สุด รองลงมาเป็นที่ความเข้มข้นสารสกัดร้อยละ 3 1 และ 0.5 ตามลำดับ โดยค่าระยะยืดเมื่อขาดของฟิล์มที่ความเข้มข้นสารสกัดร้อยละ 1 3 และ 5 มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) การเติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมในทุกๆ ระดับความเข้มข้นให้ฟิล์มที่มีค่าระยะยืดเมื่อขาดต่ำกว่าฟิล์มโปรตีนชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองสังเกตเห็นว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 1 3 และ 5 ฟิล์มมีความยืดหยุ่นน้อยลงมากจนค่อนข้างเปราะและหักง่าย ไม่สามารถนำมาใช้งานได้จริง ถึงแม้ว่าจะมีความต้านทานแรงดึงสูงก็ตาม ในขณะที่ฟิล์มที่เติมสารสกัดไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 ฟิล์มที่ได้ยังมีความยืดหยุ่นที่ดีอยู่

ตารางที่ 12 Tensile strength (TS) and elongation at break (EAB) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at different concentrations.

Treatment	TS* (MPa)	EAB* (%)
Control	7.84 ± 0.56 ^f	42.11 ± 5.35 ^a
0.5% Keim bark extract	8.86 ± 0.96 ^{bc}	17.92 ± 2.06 ^{cd}
1% Keim bark extract	11.16 ± 0.93 ^b	9.82 ± 1.73 ^d
3% Keim bark extract	10.74 ± 1.48 ^b	9.58 ± 1.02 ^d
5% Keim bark extract	10.93 ± 0.77 ^b	9.00 ± 5.09 ^d

* Mean ± SD from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference (p<0.05)

5.2.2.2 สมบัติการซึมผ่านไอน้ำ

จากการทดลองหาค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ของฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ความเข้มข้นสารสกัดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 13 พบว่าฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีค่า WVP ต่ำกว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยม ($p < 0.05$) ค่า WVP ของฟิล์มมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้เพิ่มขึ้นจนถึงร้อยละ 1 ของโปรตีน ซึ่งเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นสารสกัดที่ใช้เพิ่มสูงขึ้น (ร้อยละ 3 และ 5 ของโปรตีน) ค่า WVP ของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการใช้สารสกัดในปริมาณที่มากเกินไปอาจมีผลต่อความสม่ำเสมอของโครงสร้างร่างแหของฟิล์ม สารสกัดที่เติมอาจขัดขวางการจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนซึ่งทำให้เกิดช่องว่างขนาดเล็กระหว่างโมเลกุลในโครงสร้างของฟิล์มมากขึ้น เป็นผลให้การแพร่ของไอน้ำผ่านฟิล์มได้ง่ายขึ้น

จากการทดลองพบว่าการใช้สารสกัดจากไม้เคี่ยมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของโปรตีน ให้ฟิล์มโปรตีนไม่โอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่มีสมบัติเชิงกลและสมบัติการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำดีที่สุด จึงเลือกใช้สำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 13 Water vapor permeability (WVP) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at different concentrations.

Treatment	WVP* ($\times 10^{-10} \text{ gm}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$)
Control	$1.58 \pm 0.13^{a**}$
0.5% Keim bark extract	0.63 ± 0.08^{bc}
1% Keim bark extract	0.43 ± 0.05^c
3% Keim bark extract	0.72 ± 0.11^b
5% Keim bark extract	0.90 ± 0.10^b

* Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

6. สมบัติทางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม

เมื่อนำฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 ของโปรตีน ไปวิเคราะห์สมบัติทางประการเพิ่มเติม ให้ผลการทดลองดังต่อไปนี้

6.1 สีและการส่องผ่านแสงของฟิล์ม

ค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม (ร้อยละ 0.5 ของโปรตีน) แสดงในตารางที่ 14 พบว่า การเติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีผลให้ค่าความสว่าง (L^*) ของฟิล์มลดลง แต่มีผลให้ค่า a^* (สีเขียว-แดง) และค่า b^* (สีน้ำเงิน-เหลือง) ของฟิล์มเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยฟิล์มที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมให้สีค่อนข้างเหลืองอมแดงเล็กน้อย

ตารางที่ 15 แสดงค่าการส่องผ่านแสงของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยม (ร้อยละ 0.5 ของโปรตีน) ฟิล์มที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีค่าการส่องผ่านแสงลดลงเมื่อเทียบกับฟิล์มชุดควบคุมโดยเฉพาะการส่องผ่านแสงในช่วงแสงยูวี (200-350 nm)

ตารางที่ 14 Color of myofibrillar protein film incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.

Treatment	$L^{*†}$	$a^{*†}$	$b^{*†}$
Control	$88.23 \pm 0.24^{a††}$	-1.53 ± 0.03^b	2.36 ± 0.20^b
0.5% Keim extract	83.44 ± 0.10^b	0.47 ± 0.31^a	7.66 ± 0.27^a

[†] Mean $\pm$ SD from triplicate determinations.

^{††} Different superscripts in the same column indicate the significant difference ($p < 0.05$)

ตารางที่ 15 Light transmission of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.

Treatment	Transmission (%) at different wavelength (nm)							
	200	280	350	400	500	600	700	800
Control	1.5	1.8	44.2	56.9	61.6	63.8	65.0	65.2
0.5% Keim extract	0.1	0.4	18.1	40.3	49.1	52.7	54.8	55.1

6.2 สมบัติการบวมตัว การละลายของฟิล์ม และการละลายของโปรตีนในฟิล์ม

ตารางที่ 16 แสดงสมบัติการบวมตัวของฟิล์มที่แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ฟิล์มโปรตีนที่มีการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมีค่าร้อยละการบวมตัวน้อยกว่าฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมสารสกัด ($p < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากฟิล์มโปรตีนที่มีการเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมีการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์มากกว่า ทำให้สมบัติการชอนน้ำของโปรตีนที่เกิดจากหมู่ฟังก์ชันที่ชอบน้ำ (หมู่อะมิโน) ลดลง (Cuq *et al.*, 1995) ส่งผลให้การดูดซับน้ำของฟิล์มเกิดขึ้นได้น้อยกว่าฟิล์มที่ไม่เติมสารสกัด

ตารางที่ 16 แสดงค่าการละลายน้ำที่เวลา 24 ชั่วโมง ของฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมและเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมที่ระดับร้อยละ 0.5 พบว่า ฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมให้ค่าการละลายของฟิล์มมากกว่าฟิล์มโปรตีนชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด ทั้งๆที่การเติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมช่วยให้โมเลกุลโปรตีนในโครงสร้างฟิล์มเกิดการเชื่อมประสานกันมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการวัดการละลายเป็นการวัดการละลายของฟิล์มซึ่งอาจเป็นสารต่างๆในฟิล์มที่ไม่ใช่โปรตีนอย่างเดียว ดังนั้นการที่ฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดมีค่าการละลายของฟิล์มมากกว่าอาจเนื่องมาจากมีองค์ประกอบอื่นๆในสารสกัดที่ไม่เกี่ยวข้องกับการเชื่อมประสานโมเลกุลสามารถถูกชะและหลุดออกจากแผ่นฟิล์ม โดยที่การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนอาจทำให้โครงสร้างร่างแหฟิล์มที่ไม่สม่ำเสมอเกิดลักษณะเป็นช่องว่างขึ้นในแผ่นฟิล์ม เนื่องจากสารประกอบพอลิฟีนอลในสารสกัดมีขนาดใหญ่ที่ประอบด้วยวงแหวนเบนซีน จึงอาจขัดขวางการจัดเรียงตัวใกล้ชิดกันของโมเลกุลโปรตีนในการเกิดโครงสร้างร่างแหของฟิล์ม นอกจากนี้การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนเนื่องจากสารประกอบพีนอลในสารสกัดอาจมีผลทำให้ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของฟิล์มเพิ่มขึ้น ซึ่งสาเหตุดังกล่าวข้างต้นอาจมีผลทำให้พลาสติกไซเซอร์ที่มีสมบัติชอบน้ำที่เติมในฟิล์มถูกชะและหลุดออกจากฟิล์มได้ง่ายขึ้น

เมื่อนำส่วนที่ละลายน้ำของฟิล์มมาวิเคราะห์หาค่าการละลายของโปรตีน พบว่า การละลายของโปรตีนในฟิล์มที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมมีค่าน้อยกว่าของฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด (ตารางที่ 16) อันเป็นผลมาจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนที่เกิดจากสารพอลิฟีนอลในสารสกัดที่เติม ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนจึงลดลง นอกจากนี้จะสังเกตเห็นว่าการ

ละลายของโปรตีนในฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลทั้งที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับค่าการละลายของฟิล์ม ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดโครงสร้างฟิล์ม โปรตีนไมโอไฟบริลสามารถเกิดพันธะที่มีความแข็งแรงที่ไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยน้ำ ได้แก่ พันธะไดซัลไฟด์ รวมทั้งพันธะโควาเลนต์ชนิดอื่นๆที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ได้อีกด้วย (Cuq et al., 1996) ดังนั้นการละลายของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลส่วนใหญ่เกิดจากการละลายของพลาสติกไซเซอร์ที่เป็นส่วนผสมในแผ่นฟิล์ม

ตารางที่ 16 Swelling, film solubility and protein solubility of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.

Treatment	Swelling* (%)	Film solubility* (%)	Protein solubility* (%)
Control	488.75 ± 51.50 ^{a**}	28.03 ± 1.03 ^{b**}	8.79 ± 0.59 ^{a**}
0.5% Keim extract	179.73 ± 13.00 ^b	33.08 ± 1.64 ^a	6.18 ± 0.75 ^b

* Mean ± SD (dried basis weight) from triplicate determinations.

** Different superscripts in the same column indicate the significant difference (p<0.05)

6.3 สมบัติการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอส

ตารางที่ 17 แสดงความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ไคโมทริปซิน (α -chymotrypsin) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 พบว่า ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis: DH) มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ฟิล์มควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีค่า DH สูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด (p<0.05) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดมีผลทำให้ฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ได้มีความสามารถในการต้านทานต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนของสารพอลิฟีนอลในสารสกัดที่เติม ทำให้โมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลเกิดการเชื่อมประสานด้วยพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์มากขึ้น Chinabark (2005) รายงานการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเอสของฟิล์มโปรตีนจากซูริมิปลาตาหวานอยู่ในช่วงร้อยละ 59.70 – 81.92

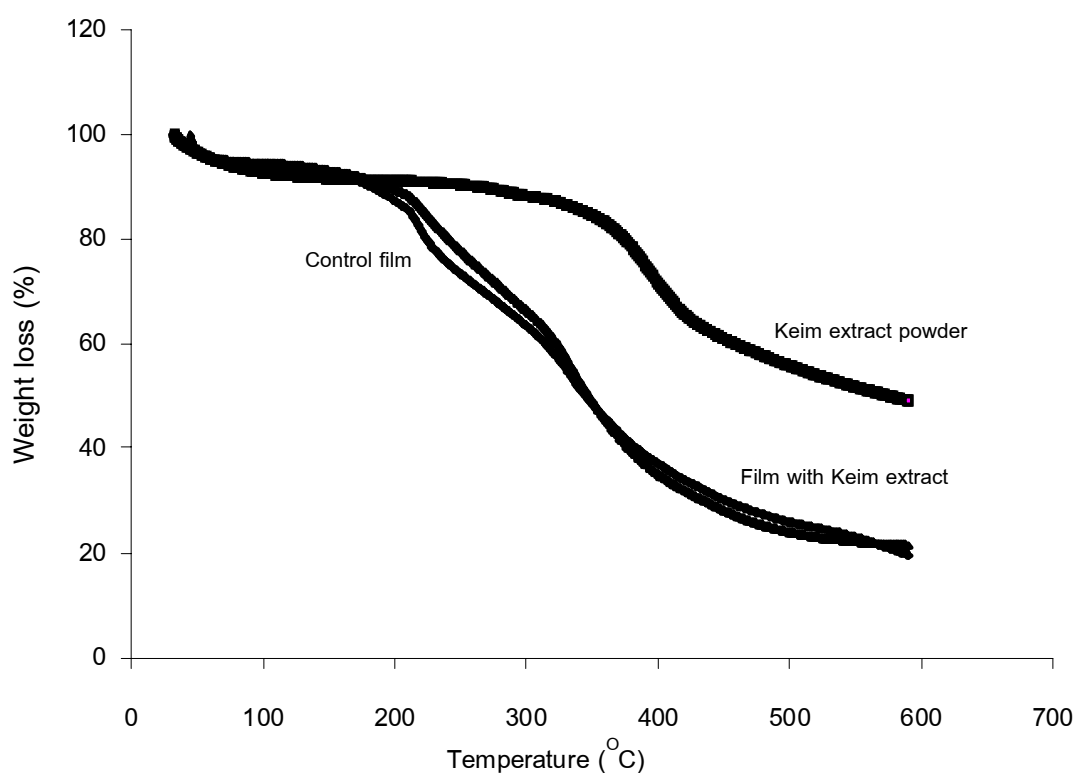
ตารางที่ 17 Degree of hydrolysis of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.

Treatment	Degree of hydrolysis* (%) at different times (min)			
	30 min	60 min	90 min	120 min
Control	44.35 ± 0.57 ^{a**}	56.68 ± 0.93 ^a	65.12 ± 0.84 ^a	68.68 ± 2.49 ^a
0.5% Keim extract	31.51 ± 0.37 ^b	42.31 ± 1.58 ^b	52.73 ± 1.84 ^b	53.82 ± 1.10 ^b

* Mean ± SD from triplicate determinations. ** Different superscripts in the same column indicate the significant difference (p<0.05)

6.4 สมบัติทางความร้อนของฟิล์ม

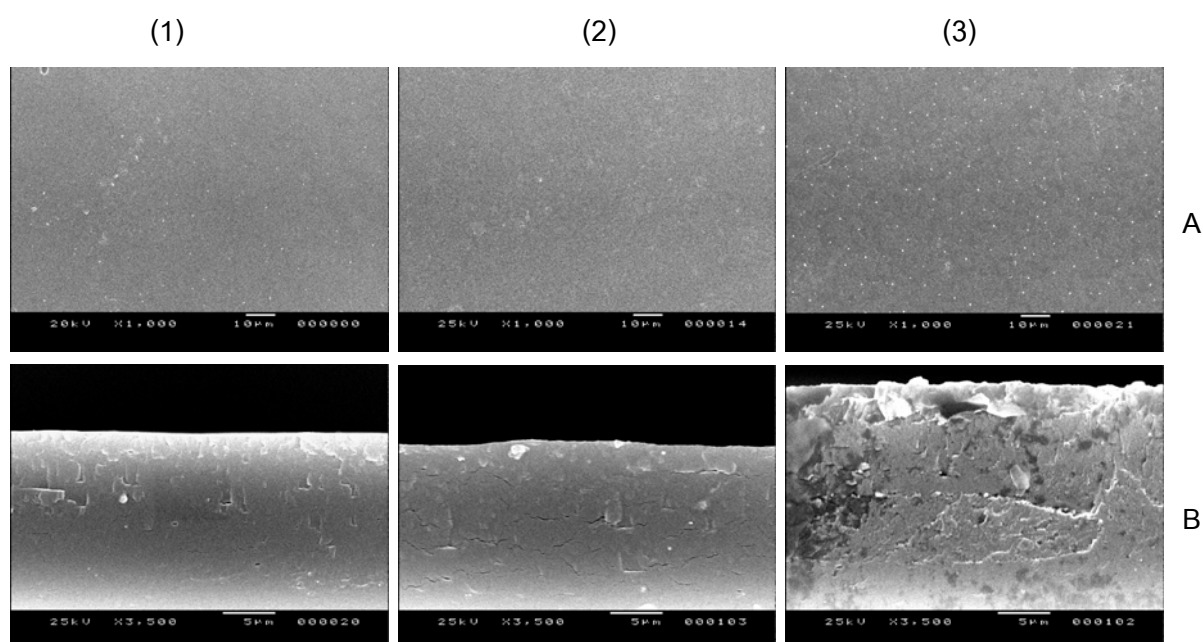
จากการศึกษาสมบัติการย่อยสลายเนื่องจากความร้อนโดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TGA (Thermogravimetric analysis) ของแผ่นฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาคาร์ปที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 ของโปรตีน ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่าในช่วงแรกที่ยุณหภูมิระหว่าง 50-100 องศาเซลเซียส มีการสูญเสียน้ำหนักประมาณร้อยละ 5 เนื่องมาจากการสูญเสียความชื้นในฟิล์มเริ่มต้น หลังจากนั้นน้ำหนักเริ่มคงที่แล้วเริ่มมีการลดลงของน้ำหนักตัวอย่างอย่างเห็นได้ชัดที่อุณหภูมิประมาณ 160-193 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิประมาณ 250-270 องศาเซลเซียส โดยช่วงนี้อาจเกิดจากการสลายตัวของสารโมเลกุลเล็กซึ่งอาจเป็นกลีเซอรอลรวมทั้งโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ส่วนการลดลงของน้ำหนักตัวอย่างในช่วงต่อมาที่อุณหภูมิมากกว่า 270 องศาเซลเซียส น่าจะเกิดจากการสลายตัวของโครงสร้างร่างแหโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของแผ่นฟิล์ม สารสกัดจากไม้เคี่ยมมีความคงตัวทางความร้อนโดยจะเกิดการสลายตัวที่อุณหภูมิ 300-320 องศาเซลเซียส ฟิล์มโปรตีนที่มีการเติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมมีความคงตัวต่อความร้อนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย



ภาพที่ 12 TGA thermograms of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.

6.5 โครงสร้างจุลภาคของฟิล์ม

จากการศึกษาโครงสร้างจุลภาคโดยเทคนิค SEM (scanning electron microscopy) ของพื้นผิวและภาคตัดขวางของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากไม้เคียมในปริมาณร้อยละ 0.5 ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 13 โดยทั่วไปพื้นผิวของฟิล์มมีลักษณะเรียบ สำหรับภาคตัดขวางของฟิล์มจะเห็นว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดจากไม้เคียมมีลักษณะที่หยาบและพบว่ามีรอยแยกหรือช่องว่างมากกว่าฟิล์มชุดควบคุม โดยฟิล์มที่มีการเติมสารสกัดในปริมาณที่มากขึ้นยิ่งสังเกตเห็นช่องว่างภายในตัวฟิล์มมากขึ้น (ภาพที่ 13B(3)) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเติมสารสกัดมีผลขัดขวางการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบของโมเลกุลโปรตีนในระหว่างการเกิดฟิล์มในขณะทำแห้งฟิล์ม การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยสารประกอบฟีนอลในสารสกัดอาจจำกัดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนทำให้การจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนมาใกล้ชิดกันเกิดได้น้อยลง ทำให้โครงสร้างร่างแหของฟิล์มมีความเป็นระเบียบน้อยลงด้วย โครงสร้างจุลภาคภายในของฟิล์มอาจส่งผลต่อสมบัติด้านต่างๆของฟิล์มที่ได้ ได้แก่ สมบัติการแพร่ของไอน้ำในฟิล์ม และสมบัติเชิงกลของฟิล์มอีกด้วย โดยการเติมสารสกัดในปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้ได้ฟิล์มที่มีโครงสร้างภายในที่ไม่สม่ำเสมอ ส่งผลให้ฟิล์มที่ได้อาจมีสมบัติเชิงกล และสมบัติการต้านทานต่อการซึมผ่านด้อยลงได้

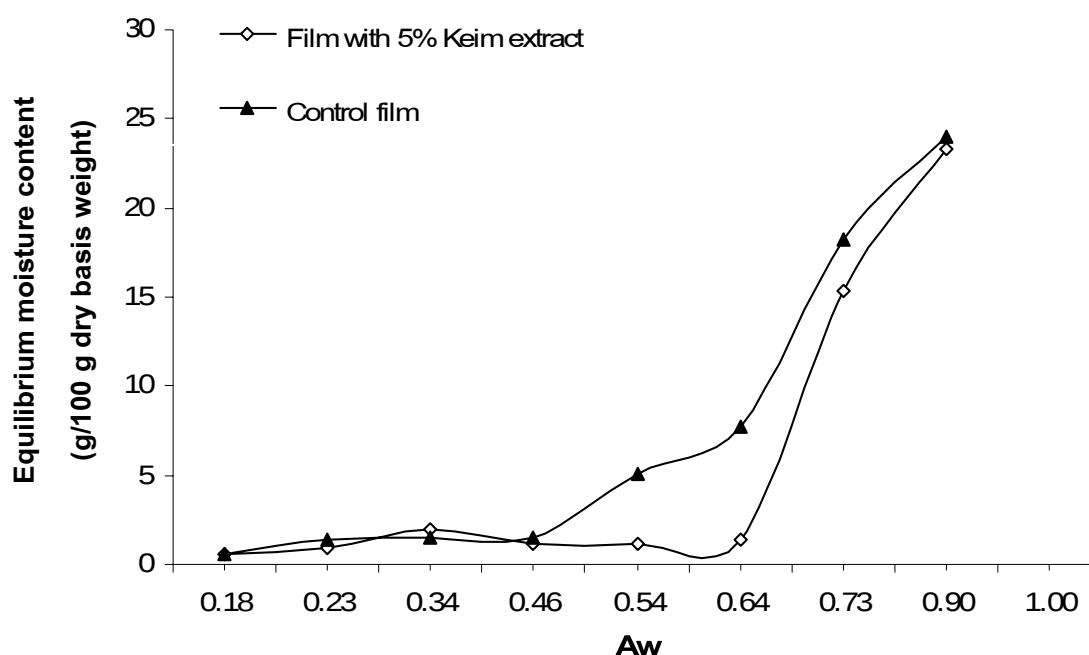


ภาพที่ 13 SEM micrographs of surface (A) and cross section (B) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract. Control film (without plant extract) (1), films incorporated with Keim bark extract at 0.5% (2) and 3% (3).

6.6 การดูดซับความชื้นที่อุณหภูมิคงที่ (moisture sorption isotherm)

ภาพที่ 14 แสดง moisture sorption isotherm (MSI) (ที่อุณหภูมิห้อง) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากไม้เคียมในปริมาณร้อยละ 0.5 MSI ของฟิล์มมีลักษณะของ type-II adsorption ซึ่งเป็นลักษณะพฤติกรรมการดูดซับความชื้นที่พบโดยทั่วไปสำหรับอาหารและฟิล์มที่มีความชอบน้ำ (hydrophilic film) โดยที่ความชื้นสมดุลของตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้นในลักษณะ sigmoidal (Perdomo et al., 2009; Sudhamani et al., 2005)

จากการทดลองจะเห็นว่าความชื้นของฟิล์มทั้งสองมีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วง A_w (water activity) ต่ำ (0.18 – 0.46) และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดที่ค่า A_w ในช่วง 0.64 – 0.90 ฟิล์มโปรตีนที่เติมสารสกัดจากไม้เคียมมีอัตราการดูดซับความชื้นที่ต่ำกว่าฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัด เนื่องจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยสารประกอบพอลิฟีนอลในสารสกัดทำให้สมบัติความชอบน้ำของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลลดลง



ภาพที่ 14 Moisture sorption isotherms at 28-30°C of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5%.

7. การเปลี่ยนแปลงของฟิล์มระหว่างการเก็บรักษา

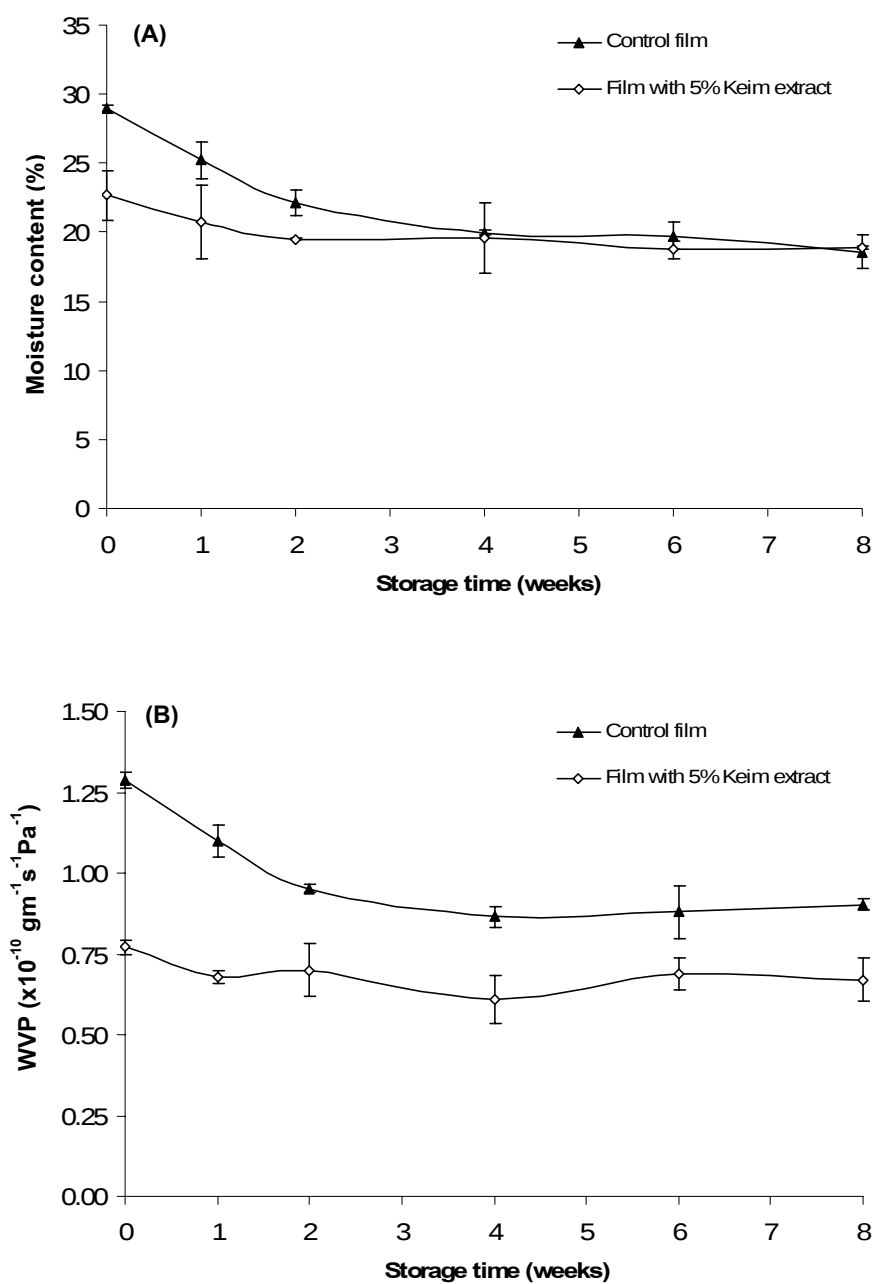
7.1 การเปลี่ยนแปลงความชื้นและการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม

ภาพที่ 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นและค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ที่อุณหภูมิห้อง) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 ความชื้นของฟิล์มชุดควบคุมและฟิล์มที่เติมสารสกัดมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วงการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ หลังจากนั้นความชื้นของฟิล์มมีแนวโน้มคงที่ ฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมีปริมาณความชื้นในช่วงแรก (0-2 สัปดาห์) สูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยม สำหรับค่า WVP ของฟิล์มทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงความชื้นของฟิล์ม ค่า WVP ของฟิล์มที่เติมสารสกัดมีค่าน้อยกว่าของฟิล์มชุดควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา การลดลงของความชื้นและค่า WVP ของฟิล์มอาจเนื่องจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลที่เป็นระเบียบมากขึ้น ทำให้มีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Anker และคณะ (2001) ที่ทำการศึกษาในฟิล์มโปรตีนเวย์

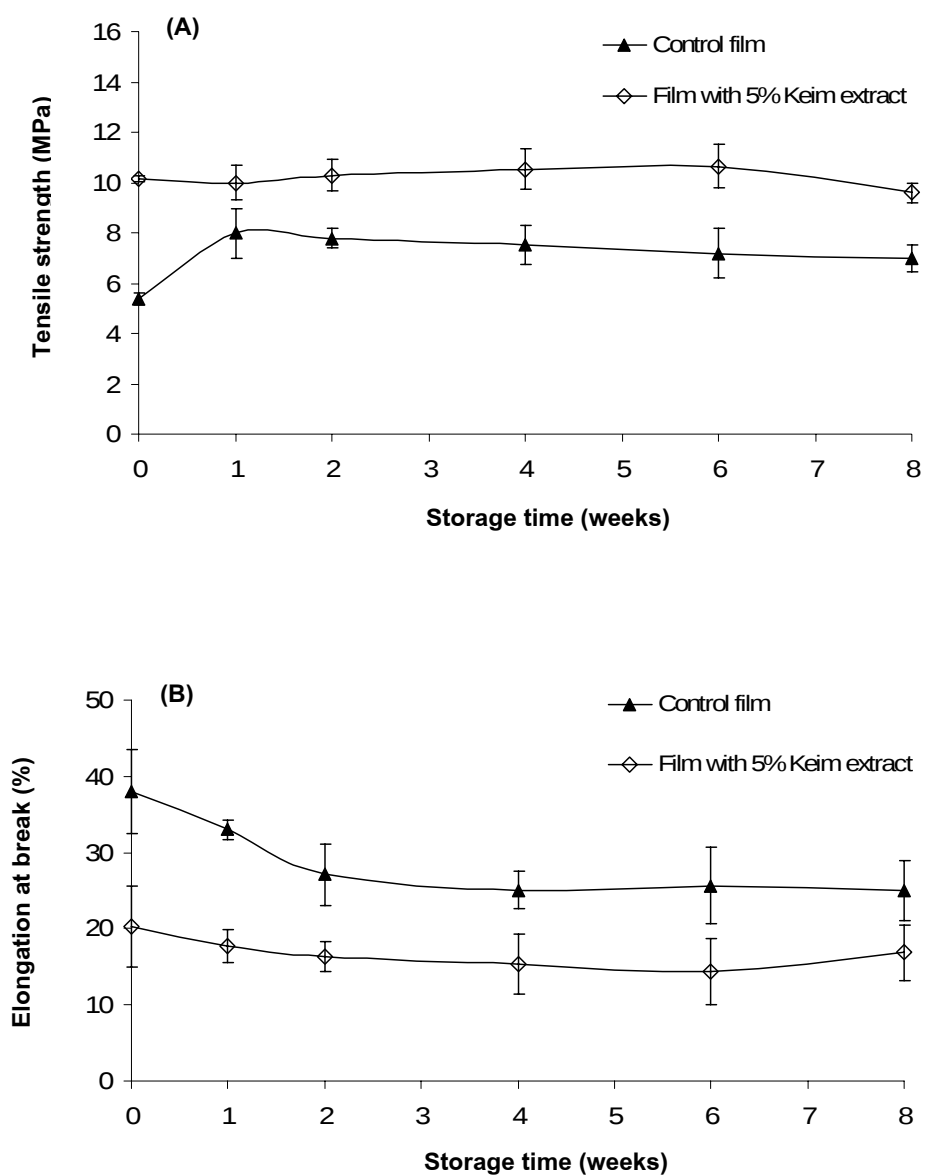
7.2 การเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงกลของฟิล์ม

ภาพที่ 16 แสดงสมบัติเชิงกลของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (ที่อุณหภูมิห้อง) ฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมีค่าความต้านทานแรงดึงเพิ่มขึ้นและค่าระยะยืดเมื่อขาดลดลงระหว่างการเก็บเป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ หลังจากนั้นค่าทั้งสองค่อนข้างคงที่ ความแข็งแรงที่เพิ่มขึ้นและการยืดหยุ่นที่ลดลงของฟิล์มชุดควบคุมนี้ มีความสอดคล้องกับการลดลงของความชื้นในแผ่นฟิล์มระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนที่เป็นระเบียบมากขึ้น โมเลกุลอยู่ใกล้ชิดกันมากขึ้นหรือเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลได้มากขึ้น จึงทำให้โครงสร้างของฟิล์มมีความแข็งแรงมากขึ้น Anker และคณะ (2001) รายงานว่าฟิล์มโปรตีนเวย์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากการย้ายที่ (migration) ของพลาสติกไซเซอร์จากภายในแผ่นฟิล์มมายังด้านนอกของตัวฟิล์มมากขึ้น ทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดอันตรกิริยากันมากขึ้น

สำหรับฟิล์มที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยม พบว่า ค่าการต้านทานแรงดึงและระยะยืดเมื่อขาดของฟิล์มไม่เปลี่ยนแปลงมากนักระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนโดยสารประกอบพอลิฟีนอลในสารสกัดที่เกิดขึ้นในโครงสร้างฟิล์มจำกัดการเคลื่อนไหวของโมเลกุลโปรตีน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลเกิดขึ้นได้น้อยในระหว่างการเก็บรักษา จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมค่อนข้างมีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษามากกว่าฟิล์มโปรตีนที่ไม่เติมสารสกัด



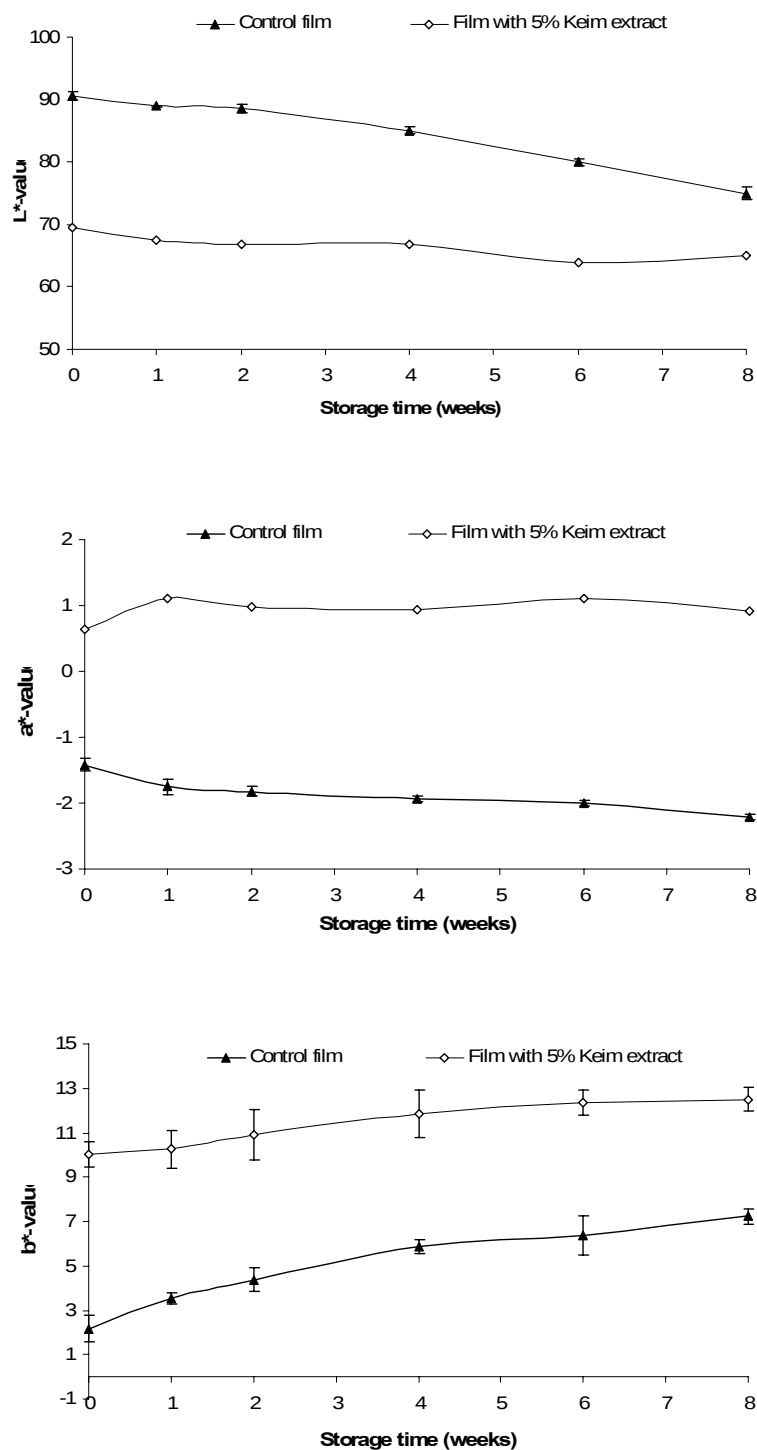
ภาพที่ 15 Changes in moisture content (A) and water vapor permeability (WVP) (B) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5% during storage at room temperature (28-30°C).



ภาพที่ 16 Changes in tensile strength (A) and elongation at break (B) of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5% during storage at room temperature (28-30°C).

7.3 การเปลี่ยนแปลงสีของฟิล์ม

ค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาที่ไม่เติมและที่เติมสารสกัดจากไม้เคี่ยมในปริมาณร้อยละ 0.5 ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงในภาพที่ 17 พบว่า ค่า a^* (สีเขียว-แดง) ของฟิล์มทั้งสองมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา สำหรับค่า L^* (ความสว่าง) พบว่า ค่า L^* ของฟิล์มชุดควบคุมมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ส่วนค่า L^* ของฟิล์มที่เติมสารสกัดมีค่าค่อนข้างคงที่ นอกจากนี้พบว่าฟิล์มตัวอย่างทั้งสองมีค่า b^* (สีเหลือง) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่า b^* สูงกว่าฟิล์มที่เติมสารสกัด การเปลี่ยนแปลงสีของฟิล์มโปรตีนมีความสอดคล้องกับผลการทดลองของ Arthan และคณะ (2009) ซึ่งพบว่าฟิล์มจากกล้ามเนื้อปลาทูแซกมีสีเหลืองและคล้ำขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น การเกิดสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่ใช่เอนไซม์ (Maillard reaction) ระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนและหมู่คาร์บอนิลของสารอื่นที่อยู่ในฟิล์ม เช่น กลีเซอรอล รวมทั้งสารอัลดีไฮด์ต่างๆจากการย่อยสลายของสารไขมันในกล้ามเนื้อปลา ในระหว่างการเก็บรักษาโปรตีนและองค์ประกอบอื่น เช่น สารไขมัน (ฟอสโฟลิปิด) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในกล้ามเนื้อปลาอาจเกิดการย่อยสลายขึ้น ทำให้มีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยา Maillard ได้มากขึ้น ฟิล์มโปรตีนจึงมีสีเหลืองมากขึ้น (Arthan et al., 2009; Cuq et al., 1996)



ภาพที่ 17 Changes in L*, a* and b*-values of fish myofibrillar protein films incorporated without and with Keim bark extract at 0.5% during storage at room temperature (28-30°C).

บทที่ 4

สรุป

1. สารประกอบพอลิฟีนอลทั้งในรูปของสารบริสุทธิ์และสารสกัดจากพืชมีสมบัติในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา โดยประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของสารประกอบพอลิฟีนอล ชนิดของสารสกัด ปริมาณการใช้ และสภาวะของการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีน
2. การเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาโดยสารประกอบพอลิฟีนอลจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นในสภาวะที่มีการเติมออกซิเจน
3. การใช้สารประกอบพอลิฟีนอลทั้งในรูปของสารบริสุทธิ์และสารสกัดจากพืชชนิดและปริมาณที่เหมาะสม สามารถปรับปรุงสมบัติบางประการของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาให้ดีขึ้น ได้แก่ สมบัติเชิงกล การป้องกันการซึมผ่านไอน้ำ การต้านทานการดูดซับน้ำและการละลายน้ำ และความคงตัวทางความร้อน เป็นต้น รวมทั้งทำให้ฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริลที่ได้มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น
4. สารประกอบพอลิฟีนอลจากพืชจึงมีศักยภาพที่นำมาใช้เป็นสารเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนไมโอไฟบริลทดแทนการใช้สารเชื่อมประสานสังเคราะห์ที่มีความเป็นพิษ ในการดัดแปร/ปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล

เอกสารอ้างอิง

- Alexy, P., Bakos, D., Hanzelova, S., Kukolikova, L., Kupec, J., Charvatova, K., Chiellini, E. and Cinelli, P. 2003. Poly(vinyl alcohol)-collagen hydrolysate thermoplastic blends: I. experimental design optimisation and biodegradation behaviour. *Polym. Testing*. 22: 801–809.
- American Society for Testing and Materials. 1989. Annual Book of ASTM Standards. ASTM, Philadelphia, PA. USA.
- Anker, M., Stading, M. and Hermansson, A.M. 2001. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *J. Agric. Food Chem.* 49: 989-995.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. 16th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Arthan, A., Prodpran, T. and Benjakul, S. 2009. Round scad protein-based film: storage stability and its effectiveness for shelf-life extension of dried fish powder. *LWT-Food Sci. Technol.* 42: 1238-1244.
- Avena-Bustillos, R.J. and Krochta, J.M. 1993. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. *J. Food Sci.* 58: 904-907.
- Benjakul, S., Chantarasuwan, C. and Visessanguan, W. 2003. Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from some tropical fish. *Food Chem.* 8: 567 – 574.
- Benjakul, S., Visessanguan, W. and Chantarasuwan, C. 2004. Effect of porcine plasma protein and setting on gel properties of surimi produced from fish caught in Thailand. *Lebensm.-Wiss. U.-Tcehnol.* 37: 177-185.
- Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3423-3430.
- Cao, N., Fu, Y. and He, J. 2007. Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid. *Food Hydrocol.* 21: 578-584.
- Chawla, S.P., Venugopol, V. and Nair, P.M. 1996. Gelation of proteins from washed muscle of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) under mild acidic conditions. *J. Food Sci.* 54: 362-366.
- Chen, Y. and Hagerman, A.E. 2004. Quantitative examination of oxidized polyphenol-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6061-6067.
- Chinabark, K., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2007. Effect of pH on the properties of protein-based film from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi. *Biores. Technol.* 98: 221-225.
- Chinabark, K. 2005. Effect of pH lipids and protein crosslinkers on the properties of surimi film from tropical fish. Master Thesis. Prince of Songkla University.

- Cuq, B., Aymard, C., Cuq, J. and Guilbert, S. 1995. Edible packaging films based on fish myofibrillar proteins: formulation and functional properties. *J. Food Sci.* 60: 1369-1374.
- Cuq, B., Gontard, N., Cuq, J. and Guilbert, S. 1996. Stability of myofibrillar protein-based biopackagings during storage. *Lebensm. LWT–Food Sci. Technol.* 29: 344-348.
- Cuq, B., Gonthard, N., Cuq, J.L. and Guilbert, S. 1997. Selected functional properties of fish myofibrillar protein-base films as affected by hydrophilic plasticizers. *J. Agric. Food Chem.* 45: 622-626.
- De Carvalho, R.A. and Grosso, C.R.F. 2004. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids.* 18(5): 717–726.
- Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- Frankel, E.N. 1999. Natural phenolic antioxidants and their impact on health. In *Antioxidant Food Supplements in Human Health*. Packer, L., Hiramatsu, M. and Yoshikawa, T. (Eds.) Academic Press. New York. pp. 385-392.
- Frazier, R.A., Papadopoulou, A., Mueller-Harey, I., Kisson, D. and Green, R.J. 2003. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5189-5195.
- Garcia, F.T. and Sobral, P.J.A. 2005. Effect of the thermal treatment of the filmogenic solution on the mechanical properties, color and opacity of films based on muscle proteins of two varieties of tilapia. *Swiss Soc. Food Sci. Technol.* 38: 289-296.
- Gennadios, A., Handa, A., Froning, G.W., Weller, C.L. and Hanna, M.A. 1998. Physical properties of egg white-dialdehyde starch films. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1297-1302.
- Gennadios, A., McHugh, T.H., Weller, C.L. and Krochta, J.M. 1994. Edible coatings and films based on protein, *In* J.M. Krochta, E.A. Baldin, and M. Nisperos-Carriedo (Eds.). *Edible coating and films to improve food quality*. Lancaster: Technomic Pub. Co., Inc. p. 210-278.
- Gennadios, A. and Weller, C.L. 1990. Edible films and coating from wheat and corn proteins. *Food Technol.* 44: 63-69.
- Gennadios, A., Weller, C.L., Hanna, M.A. and Froning, G.W. 1996. Mechanical and barrier properties of egg albumin films. *J. Food Sci.* 61: 585-589.
- Gennadios, A., Weller, C.L. and Testin, R.F. 1993. Modification of physical and barrier properties of edible wheat gluten-based films. *Cereal Chem.* 70: 426-429.
- Ghanbarzadeh, B., Musavi, M., Oromiehie, A.R., Rezayi, K., Razmi Rad, E. and Milani, J. 2007. Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films. *Swiss Soc. Food Sci. Technol.* 40: 1191–1197.
- Gomez-Estaca, J., Montero, P., Fernandez-Martin, F., Aleman, A. and Gomez-Guillen, M.C. 2009. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hidegelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. *Food Hydrocol.* 23: 1334-1341.

- Han, J.H. and Floros, J.D. 1997. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *J. Plastic film Sheet*. 13: 287-298.
- Handique, J.G. and Baruah, J.B. 2002. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive Functional Polymers*. 52: 163-188.
- Hang Wan, V.M., Kim, M.S. and Lee, S.Y. 2005. Water vapor permeability and mechanical properties of soy protein isolate edible films composed of different plasticizer combinations. *J. Food Sci*. 70: 387-391.
- Herald, T.J. Gnanasambandam, R., McGuire, B.H. and Hachmeister, K.A. 1995. Degradable wheat gluten film: preparation, properties and application, *J. Food Sci*. 60: 1147-1331.
- Hernandez-Munoz, P., Villalobos, R. and Chiralt, A. 2004. Effect of cross-linking using aldehydes on properties of glutenin-rich films. *Food Hydrocolloids*. 18:403-411.
- Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B. and Gontard, N. 2001. New plasticizers for wheat gluten films. *Eur. Polym. J*. 37: 1533-1541.
- Iwata, K., Ishizaki, S., Handa, A. and Tanaka, M. 2000. Prepration and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. *Fish. Sci*. 66: 372-378.
- Jangchud, A. and Chinan, M.S. 1999. Peanut protein film as affected by drying temperature and pH film forming solution. 64: 153-157.
- Jiang, Y., Tang, C.H., Wen, Q.B., Li, L. and Yang, X.Q. 2007. Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films. *Innov. Food Sci. Eng. Technol*. 8: 218-225.
- Kester, J. J. and Fennema, O. R. 1986. Edible film and coatings : A review. *Food Technol*. 40: 47-59.
- Kim, S.J. and Ustunol, Z. 2001. Solubility and mositure sorption isotherms of whey-protein-based edible films as influenced by lipid and plasticizer incorporation. *J. Agric. Food Chem*. 49: 4388-4391.
- Krochta, J.M. 2002. Protein as raw materials for films and coatings: definitions, current status and opportunities. *In Protein-Based Films and Coating* (Gennadios, A., Ed.) CRC Press. New York. p. 1-39.
- Krochta, J.M. and Mulder-Johnson, J. 1997. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. *Food Technol*. 51: 61-74.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lawton, J.W. 2004. Plasticizers for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein films. *Cereal Chem*. 81: 1-5.
- Marquie, C. 2001. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. *J. Agric. Food Chem*. 49: 4676-4681.

- Marquie, C. and Guilbert, S. 2002. Formation and properties of cotton seed protein films and coating. *In Protein-Base Films and Coating* (Gennadios, A., Ed.) CRC Press. New York. P. 143-149.
- Mariniello, L., Pierro, P.D., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P. and Porta, R. 2003. Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase. *J. Biotechnol.* 102: 191-198.
- Mccormick, R.T. 1994. Structure and properties of tissues, *In Muscle Food* (Kinsman, D.M., Kotula, A.W., Breidenstein, B.C., Eds.) Chapman & Hall. New York. P. 25-62.
- McHugh, T.H., Aujard, J.F. and Krochta, J.M. 1994. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. *J. Food Sci.* 59: 416-419.
- McHugh, T.H., Avena-Bustillos, R. and Krochta, J.M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J. Food Sci.* 58: 899-903.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M. H. and Guilbert, S. 2000. Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2948-2953.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. and Rigal, L. 2003. Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins. *Ind. Crops Prod.* 18: 91-100.
- Ou, S., Wang, Y., Tang, S., Huang, C. and Jackson, M.G. 2005. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate. *J. Food Eng.* 70: 205-210.
- Park, H. J., Weller, C. L., Vergano, P. J. and Testin, R. F. 1993. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *J. Food Sci.* 58: 1361-1364.
- Park, H.J. and Chinnan, M.S. 1995. Gas and water vapor barrier properties of edible films from protein and cellulosic materials. *J. Food Eng.* 25: 497-507.
- Paschoalick, T.M., Garcia, F.T., Sorbal, P.J.A. and Habitante, A.M.Q.B. 2003. Characterization of some functional properties of edible films based on muscle proteins of Nile tilapia. *Food Hydrocolloids.* 17: 419-427.
- Perez-Gaco, M.B. and Krochta, J.M. 1999. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. *J. Food Sci.* 64: 695-698.
- Perez-Gaco, M.B. and Krochta, J.M. 2001. Lipid particle size effect on the water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion film. *J. Agric. Food Chem.* 49: 996-1002.
- Perdomo, J., Cova, A., Sandoval, A.J., Garcia, L., Laredo, E. and Muller, A.J. 2009. Glass transition temperatures and water sorption isotherms of cassava starch. *Carb. Polym.* 76: 305-313.
- Petersson, M. and Stading, M. 2005. Water vapour permeability and mechanical properties of mixed starch-monoglyceride films and effect of film forming conditions. *Food Hydrocol.* 19: 123 -132.
- Prigent, S.V.E., Gruppen, H., Visser, A.J.W.G., van Koningsveld, G.A., de Jong, G.A.H. and Voragen, A.G.J. 2003. Effects of non-covalent interactions with 5-O-cafferoylquinic acid

- (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5088-5095.
- Prodpran, T. and Benjakul S. 2004. Effect of acid and alkaline solubilization on the properties of surimi based film. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27: 563-574.
- Rattaya, S., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2009. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. *J. Food Eng.* 95: 151-157.
- Rawel, H.M., Kroll, J. and Rohn, S. 2001. Reactions of phenolic substances with lysozyme—physicochemical characterisation and proteolytic digestion of the derivatives. *Food Chem.* 72: 59-71.
- Rawel, H.M., Czajka, D., Rohn, S. and Kroll, J. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *Inter. J. Biol. Macromol.* 30: 137-150.
- Rawel, H.M., Rohn, S. and Kroll, J. 2003. Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-o-position on the reactivity of quercetin with whey proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 32: 109-120.
- Rhim, J.W., Wu, Y., Weller, C.L. and Schnepf, M. 1999. Physical characteristics of a composite film of soy protein isolate and propyleneglycol alginate. *J. Food Sci.* 64: 149-152.
- Robinson, H.W. and Hodgen, C.G. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein. I. A study of the condition necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *J. Biol. Chem.* 135: 707-725.
- Roy, S., Gennadios, A., Weller, C.L. and Testin, R.F. 2000. Water vapor transport parameters of a cast wheat gluten film. *J. Ind. Crops Prod.* 11: 43-50.
- Shahidi, F., Janitha, P.K. and Wanasundara, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 67-103.
- Shellhammer, T.H. and Krochta, J.M. 1997. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount. *J. Food Sci.* 62: 390-394.
- Shiku, Y., Hamaguchi, P.Y. and Tanaka, M. 2003. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fish. Sci.* 69: 1026-1032.
- Shiku, Y., Hamaguchi, P.Y., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M. 2004. Effect of surimi quality on properties of edible films based on Alaska pollack. *Food Chem.* 86: 493-499.
- Siebert, K.J., Troukhanova, N.V. and Lynn, P.Y. 1996. Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.* 44: 80-85.
- Sikorski, Z. E. 2001. *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. Technomic, Inc. USA.
- Simon-Lukasik, K.V. and Ludescher, R.D. 2003. Erythrosin B phosphorescence as a probe of oxygen diffusion in amorphous gelatin films. *Food Hydrocol.* 15: 114-123.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. 2001. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *In* L. Packer(Ed.), (vol. 299) (pp. 152-178). *Methods in enzymology*, San Diego: Academic Press.
- Sorbal, P.J.A., Santos, J.S.D., Garcia, F.T. 2005. Effect of protein and plasticizer concentrations in film forming solutions on physical properties of edible films based on muscle proteins of a Thai Tilapia. *J. Food Eng.* 70: 93-100.

- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N., Kumar, K.R. and Tharanathan, R.N. 2003. Properties and sorption studies of chitosan- polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydr. Polym.* 53: 431-438.
- Srinivasa, P.C., Ramesh, M.N. and Tharanathan, R.N. 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food hydrocol.* 21: 1113-1122.
- Steel, R.D.D. and Torrie, J.H. 1980. Principles and Procedures of Statistic: a Biometrical Approach. 2nd Ed. Pp. 862, McGraw-Hill, New York.
- Strauss, G. and Gibson, S.M. 2004. Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients. *Food Hydrocolloids.* 18: 81-89.
- Stuchell, Y.M. and Krochta, J.M. 1995. Edible coatings on frozen king salmon: effect of whey protein isolate and acetylated monoglycerides on moisture loss and lipid oxidation. *J. Food Sci.* 60: 28-31.
- Sudhamani, S.R., Eugene Raj, A., Baldev Raj, and Prasad, M.S. 2005. Moisture sorption characteristics of microbially produced polysaccharide and polyvinyl alcohol blends. *J. Polym. Environ.* 13: 253-260.
- Suzuki, T. 1981. Fish and Krill Protein: Processing Technology. Applied Science Publishers. London.
- Tanaka, M., Iwata, K. and Sanguandeeikul, R. 2001. Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. *Fish. Sci.* 67: 346-351.
- Tang, R., Du, Y., Zheng, H. and Fan, L. 2003. Preparation and characterization of soy protein isolate-carboxymethylated konjac glucomannan blend films. *J. Appl. Polym. Sci.* 88: 1095-1099.
- Wu, J., Chiu, S-C., Pearce, E.M. and Kwei, T.K. 2001. Effects of phenolic compounds on gelation behavior of gelatin gels. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 39: 224-231.
- Xiong, Y. L., Brekke, C. J. 1989. Changes in protein solubility and gelation properties of chicken myofibrils during storage. *J. Food Sci.* 54: 1141 – 1146.
- Yang, L. and Paulson, A.T. 2000. Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films. *Food Res. Int.* 33: 563-570.
- Yen, G.C. and Duh, P.D. 1995. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72: 1065-1067.
- Yi, J.B., Kim, Y.T., Whiteside, W.S. and Park, H.J. 2006. Influence of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin films *J. Food Sci.* 71(9): 376-383.
- Yildirim, M. and Hettiarachchy, N.S. 1998. Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase. *J. Food Sci.* 63: 248-252.
- Zhang, X., Burgar, I., Lourbakos, E. and Beh, H. 2004. The mechanical property and phase structures of wheat proteins/polyvinyl alcohol blends studied by high-resolution solid-state NMR. 2004. *Polymer.* 45: 3305-3312.
- Ziegler, G. R. and Action, J.C. 1984. Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. *Food Technol.* 38: 77-88.

Output

ผลงานที่ได้รับการเผยแพร่จากงานวิจัย

การประชุมวิชาการ

1. Prodpran, T., Benjakul, S and Phatcharat, S. 2007. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of fish myofibrillar protein film. การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวิจัยอาวุโส สกว. ตุลาคม 2550.

บทความตีพิมพ์ (อยู่ระหว่างดำเนินการ)

1. Prodpran, T., Benjakul, S and Phatcharat, S. 2010. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of fish myofibrillar protein film. In preparation for submitting to Bioresource Technology.
2. Prodpran, T. and Benjakul, S. 2010. Properties and characterization of fish myofibrillar protein film incorporated with plant extract. In preparation for submitting to Food hydrocollids.