ส่วนที่ 2 **รายงานความก้าวหน้าการดำเนินงานโครงการวิจัย (Project)**
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2557

โครงการวิจัยรหัส ว-ท(ด) 152.57

(ปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนดัดแปรจากเลือดสุกรเพื่อนำมาใช้เอนแคปซูเลชันสารสกัดตามธรรมชาติ)

(Factor affecting properties of modified plasma protein from porcine to be encapsulated natural extract)

(รังสินี โสธรวิทย์[(1)] และ น้ำฝน สามสาลี[(2)])
(Rungsinee SOTHORNVIT [(1)] and Namfon SAMSALEE[(2)])

บทคัดย่อ

พลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรเป็นแหล่งสำคัญที่มีปริมาณโปรตีนสูง ซึ่งสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ จากการศึกษาผลของวิธีการทำแห้งต่อสมบัติของผงพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร (porcine plasma protein powder, PPP) พบว่าวิธีการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) และวิธีพ่นฝอย (spray drying) มีผลต่อสมบัติของ PPP โดย freeze dried PPP มีความสามารถในการละลายและความสามารถในการจับน้ำมันได้สูงกว่า spray dried PPP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่ออุณหภูมิขาเข้าของการทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยสูงขึ้น (200 °C) PPP จะมีค่าความสามารถในการจับน้ำมันและความสามารถในการจับน้ำสูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยที่อุณหภูมิขาเข้าต่ำกว่า (140°C) นอกจากนี้ freeze dried PPP มีลักษณะปรากฏเป็นสีแดงอมเหลือง สอดคล้องกับค่าความสว่าง (L^*) ต่ำ ส่วนค่าสีแดง (a^*) และค่าสีเหลือง (b^*) สูง เมื่อเทียบกับ spray dried PPP มีลักษณะปรากฏเป็นสีเขียวอมเหลือง ส่วนสมบัติทางด้านวิทยากระแสของพลาสมาโปรตีน พบว่า freeze dried PPP มีค่าความหนืดต่ำกว่า spray dried PPP และสารละลาย freeze dried PPP (2% w/w) มีพฤติกรรมการไหลแบบ Bingham plastic ในขณะที่สารละลาย spray dried PPP (2% w/w) มีพฤติกรรมการไหลแบบ pseudoplastic fluid

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานตามธรรมชาติ (รูติน กรดคาเฟอิก และเจนิพิน) ต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนดัดแปร (modified PPP) ที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบว่าการใช้รูตินมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลพลาสมาโปรตีนสูงสุด ($p < 0.05$) โดยพิจารณาจากการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และหมู่ซัลไฮดริล ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแถบโปรตีนใน SDS-PAGE โดยความเข้มข้นของรูติน กรดคาเฟอิก และเจนิพิน ที่มีประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุล

คำสำคัญ : พลาสมาโปรตีน, การทำแห้ง, การเชื่อมประสาน, พลาสมาโปรตีนดัดแปร, เอนแคปซูเลชัน

[(1)] *ภาควิชาวิศวกรรมการอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (Department of Food Engineering, Faculty of Engineering at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus)*

โปรตีนได้ดีที่สุด คือ 0.6%, 3% และ 0.5% (w/w) ของปริมาณโปรตีน ตามลำดับ นอกจากนี้ชนิดของสารเชื่อมประสานส่งผลต่อสี (L^*, a^* และ b^*) ซึ่งเป็นลักษณะปรากฏของพลาสมาโปรตีนดัดแปร เมื่อคัดเลือกสารเชื่อมประสานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนสูงสุดมาศึกษาผลของวิธีการทำแห้ง พบว่า modified PPP ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dried modified PPP) ด้วยสารเชื่อมประสานทุกชนิด ให้ค่า L^* และ b^* ลดลง แต่ค่า a^* เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับ modified PPP ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried modified PPP) นอกจากนั้น spray dried modified PPP มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสูงกว่า แต่มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ freeze dried modified PPP ยกเว้นเมื่อใช้กรดคาเฟอิก และเจนิพินเป็นสารเชื่อมประสาน

จากการศึกษาวัสดุพอลิเมอร์ห่อหุ้ม (wall material, W) 2 ชนิด (พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูติน) น้ำมันหอมระเหย (core material, C) 3 ชนิด (น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ขมิ้น และยูคาลิปตัส) และที่อัตราส่วน W:C 2 ระดับ คือ 4:1 และ 3:1 ในการเอนแคปซูเลชันสารสกัดตามธรรมชาติที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าอิมัลชันของพลาสมาโปรตีนทุกตัวอย่างมีพฤติกรรมการไหลแบบ Bingham plastic fluid สีของผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยเป็นผลมาจากสีของน้ำมันหอมระเหยและสารเชื่อมประสานที่ใช้ โดยการใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรลดปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวของผงไมโครแคปซูล จึงมีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยดีกว่าการใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของผงไมโครแคปซูลในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ สามารถอธิบายได้ด้วยเทคนิค FT-IR ดังนั้นการใช้สารพอลิฟีนอลซึ่งเป็นสารเชื่อมประสานตามธรรมชาติ และการวิธีการทำแห้งมีผลต่อประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนของพลาสมาโปรตีนและสมบัติของพลาสมาโปรตีนดัดแปร ทั้งพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและดัดแปรสามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารเพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัสหรือใช้เป็นวัสดุไบโอพอลิเมอร์สำหรับผลิตฟิล์มและสารเคลือบเพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงใช้เป็นสารในการเอนแคปซูเลชันสารสกัดตามธรรมชาติเช่นน้ำมันหอมระเหยหรือสารสำคัญจากพืช

ABSTRACT

Porcine plasma is an important source of high protein content which can be used for food products. The effect of drying methods on properties of porcine plasma protein powder (PPP) showed that freeze drying and spray drying affected on properties of PPP. Freeze dried PPP exhibited significantly higher solubility and oil binding capacity (OBC) than spray dried PPP ($p < 0.05$). Higher inlet air temperature of spray drying (200^{o}C) provided slightly higher OBC and water holding capacity (WHC) of PPP, compared with lower inlet air temperature (140^{o}C). Moreover, freeze dried PPP had a red-yellow visual in color corresponding to the lower lightness (L^{*}) with higher redness (a^{*}) and yellowness (b^{*}), compared with spray dried PPP which showed a green-yellow in color. Furthermore, rheological properties of PPP showed that freeze dried PPP had lower viscosity than spray dried PPP. The solution of freeze dried PPP (2% w/w) exhibited Bingham plastic fluid while the solution of spray dried PPP (2% w/w) exhibited pseudoplastic fluid.

The effects of types and concentrations of natural cross-linker (rutin, caffeic acid and genipin) on properties of modified PPP using freeze drying were studied. It was found that rutin exhibited the highest efficiency in cross-linking of PPP ($p < 0.05$) when considering the reduction of free amino group and sulfhydryl group contents including the change in intensity of protein bands by SDS-PAGE. The most efficiency of cross-linking concentrations of rutin, caffeic acid and genipin were 0.6%, 3% and 0.5% (w/w) of protein content, respectively. Moreover, types of cross-linker affected color (L^{*}, a^{*} and b^{*}) as the visual appearance of the modified PPP. Each cross-linker at the most efficiency modification was selected to determine the effect of drying method on properties of modified PPP. It was found that spray dried modified PPP by all cross-linkers decreased L^{*} and b^{*} values but increased a^{*} value, compared with freeze dried modified PPP. Furthermore, spray dried modified PPP had higher free amino group content than freeze dried modified PPP. However, spray dried modified PPP had lower sulhydryl group content, except using caffeic acid and genipin as the cross-linkers.

Two types of polymer (wall material, W) (unmodified PPP and modified PPP with rutin), three types of essential oil (core material, C) (lemongrass oil, turmeric oil and eucalyptus oil) and at two ratios of W:C (4:1 and 3:1) were used to study on the encapsulation of a natural extract using freeze drying. It was found that all emulsions of PPP showed Bingham plastic fluid flow behaviors. The color of microcapsule depended on types of essential oil and cross-linker used. The modified PPP exhibited lower free oil content on a surface of microcapsule; thus, it had higher encapsulation efficiency than using unmodified PPP. The chemical structure of microcapsule encapsulated with different essential oils can be described by using a FT-IR technique. Therefore, the use of polyphenolics as natural cross-linkers and drying methods influenced the efficiency in protein cross-linking of PPP and properties of modified PPP. Both unmodified PPP and modified PPP can be used as food additives to improve food texture, as a biopolymer materials for film and coating to maintain quality of food products as well as encapsulation materials for natural extract such as an essential oil or a plant active compound.

Keywords: plasma protein, drying method, cross-linking, modified plasma protein, encapsulation

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อไทย	(1)
บทคัดย่ออังกฤษ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(5)
สารบัญรูป	(6)
บทนำ	(7)
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	(7)
ขอบเขตของโครงการวิจัย	(7)
ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	(8)
การตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	(9)
วิธีวิจัย	(14)
ผลและวิจารณ์	(21)
สรุปผล	(49)
ข้อเสนอแนะ	(50)
เอกสารอ้างอิง	(51)
สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่	(58)

สารบัญตาราง

Table		Page
1	Chemical compositions of porcine plasma protein powder from different drying methods.	21
2	Color values of porcine plasma protein powder from different drying methods.	22
3	Solubility, water holding capacity (WHC) and oil binding capacity (OBC) of porcine plasma protein powder from different drying methods.	23
4	Steady shear rheological properties of porcine plasma protein powder from different drying methods.	24
5	Color parameters (L*, a* and b*) of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations.	26
6	Free-amino group and sulfhydryl group contents of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations.	28
7	DSC characteristics for porcine plasma protein powder added with various natural cross-linking agents at different concentrations.	35
8	Color parameters (L*, a* and b*) of spray dried porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations.	36
9	Free-amino group and sulfhydryl group contents of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different drying methods.	37
10	Rheological parameters of emulsion unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP incorporated with or without an essential oil as a core material.	40
11	Physicochemical characteristics of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP microcapsules incorporated with or without different essential oils as a core material.	42
12	Free oil and encapsulation efficiency of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP microcapsules.	43

สารบัญรูป

Figure		Page
1	Flow curves of freeze dried PPP (▲) and spray dried PPP at different inlet temperatures: 140 °C (◆) and 200 °C (■).	23
2	Mechanical spectra showing the angular frequency dependence of storage modulus (G', solid lines) and loss modulus (G", dash lines) of spray dried at 140 °C (▲) and 200 °C (■).	24
3	The structure of cross-linking agents used for cross-linking plasma protein.	29
4	FT-IR spectra of porcine plasma protein powder without and with cross-linking agent: a, native; b, control; c, rutin 0.6%; d, caffeic acid 3%; e, genipin 0.50%.	30
5	FT-IR spectra of cross-linking agents: genipin, rutin and caffeic acid.	31
6	SDS-PAGE profiles of standard protein marker (lane 1) and native porcine plasma protein powder (lane 2).	32
7	SDS-PAGE profiles of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations. Lane 1: standard protein marker; lane 2: rutin 0.6%; lane 3: rutin 0.8%; lane 4: rutin 1%; lane 5: caffeic acid 1%; lane 6: caffeic acid 2%; lane 7: caffeic acid 3%; lane 8: genipin 0.15%; lane 9: genipin 0.35%; lane 10: genipin 0.50%.	33
8	FT-IR spectra of spray dried porcine plasma protein powder without and with cross-linking agents: a, native; b, control; c, rutin 0.6%; d, caffeic acid 3%; e, genipin 0.50%.	38
9	SDS-PAGE profiles of spray dried porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations. Lane 1: standard protein marker; lane 2: native; lane 3: the control; lane 4: rutin 0.6%; lane 5: caffeic acid 3%; lane 6: genipin 0.50%.	39
10	FT-IR spectra of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP (MPPP) microcapsules encapsulated eucalyptus (E), turmeric (T) and lemongrass (L) essential oils at different ratios of PPP (wall) and essential oil (core) (W:C).	46
11	SEM image (x2500 magnification) of surface of unmodified porcine plasma protein (PPP) (A) and modified PPP (B) as wall materials for microencapsulation.	46
12	SEM image (x2500 magnification) of surface of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP (MPPP) microcapsules with encapsulated eucalyptus (E), turmeric (T) and lemongrass (L) essential oils at W: C ratio of 3:1.	48

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีทั้งการเพาะปลูกและการเลี้ยงสัตว์ ซึ่งสุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงโดยเฉพาะจังหวัดนครปฐม มีจำนวนสุกรมากเป็นอันดับ 3 ของประเทศ รองจากจังหวัดราชบุรี และชลบุรี ตามลำดับ (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์, 2554) สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2558) คาดการณ์ว่าในปี 2558 จะมีปริมาณการผลิตสุกร 13.083 ล้านตัว เพิ่มขึ้นจาก 12.823 ล้านตัว ของปี 2557 โดยมีอัตราเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.14 จากการผลิตสุกรที่มากขึ้นเป็นผลให้อุตสาหกรรมโรงฆ่าสัตว์มีปริมาณเลือด ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเพิ่มมากขึ้น เลือดส่วนหนึ่งถูกนำมาบริโภคโดยตรงซึ่งเป็นปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณเลือดทั้งหมด โดยทั่วไปสัตว์จะมีปริมาณเลือดประมาณ 3-5 % ของน้ำหนักตัว เลือดส่วนที่เหลือซึ่งมีปริมาณมากจะถูกกำจัดทิ้ง ก่อให้เกิดปัญหามลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งๆ ที่เลือดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากเลือดมีปริมาณพลาสมา (plasma) มากถึงร้อยละ 60 ในปัจจุบันมีการใช้พลาสมาโปรตีนเพิ่มขึ้น เพราะพลาสมาโปรตีนมีสมบัติด้านอิมัลชันที่ดี ไม่ทำให้สี กลิ่นของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลง และราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับโปรตีนจากนมเช่น เคซีน นอกจากนี้ยังสามารถนำพลาสมาโปรตีนมาขึ้นรูปเป็นฟิล์มไบโอพอลิเมอร์เพื่อนำมาใช้รักษาคุณภาพและยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ตามฟิล์มพลาสมาโปรตีนเป็นวัสดุชนิด hydrophilic มีสมบัติดูดซับน้ำ และมีโครงสร้างที่ไม่แข็งแรง ทำให้จำกัดการใช้งานด้านบรรจุภัณฑ์ จึงต้องมีการดัดแปรสมบัติของพลาสมาโปรตีนให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนเช่นชนิดและปริมาณของสารเชื่อมประสาน (cross-linking agent หรือ cross-linker) ขั้นตอนการดัดแปร และวิธีการทำแห้ง เป็นต้น และยังไม่มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารเชื่อมประสานตามธรรมชาติมาใช้แทนสารเชื่อมประสานสังเคราะห์ทั่วไป นอกจากนี้ยังไม่มีการศึกษาการนำพลาสมาโปรตีนมาเอนแคปซูเลท (encapsulate) สารสกัดจากสมุนไพรไทยเช่นน้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มาใช้ประโยชน์ในการรักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหารโดยตรงหรือเป็นส่วนหนึ่งในองค์ประกอบสำหรับฟิล์มและสารเคลือบไบโอพอลิเมอร์ในรูป active packaging เพื่อใช้ยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป ดังนั้นการนำเลือดสุกรซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมโรงฆ่าสัตว์มาใช้ให้เกิดประโยชน์ในการเป็นผลิตพลาสมาโปรตีนดัดแปรจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะลดปัญหาสิ่งแวดล้อมและเพิ่มมูลค่าให้เลือดสุกรโดยนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของวัสดุบรรจุภัณฑ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสาน (cross-linking agent) และวิธีการทำแห้งต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร
2. ศึกษาวิธีการเอนแคปซูเลชัน (encapsulation) สารสกัดตามธรรมชาติด้วยพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร การใช้สารเชื่อมประสาน (cross-linking agent) ในพลาสมาโปรตีน เช่น รูติน, กรดคาเฟอิก และเจนิพิน เป็นต้น เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ใน

การนำสารเชื่อมประสานตามธรรมชาติที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคมาใช้แทนการใช้สารเชื่อมประสานทั่วไป

2. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวกับวิธีการทำแห้งพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร และอุปกรณ์ที่ต้องใช้

3. ทดลองเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญในการดัดแปรพลาสมาโปรตีน เช่น ชนิดและปริมาณสารเชื่อมประสาน เทคนิคการทำแห้งวิธีต่างๆ และสภาวะในการทำแห้ง เพื่อกำหนดขอบเขตในการศึกษาทดลอง

4. ทำการศึกษาผลของชนิดและปริมาณของสารเชื่อมประสาน และวิธีทำแห้งพลาสมาโปรตีนต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีน เช่น ลักษณะปรากฏ ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (free amino groups) ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group) และสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สี (L^*, a^*, b^*) FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) รูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis) และสมบัติทางความร้อน (thermal properties) เพื่อใช้เป็นสารห่อหุ้ม (wall) ในการเอนแคปซูเลชัน (encapsulation) สารสกัดจากสมุนไพรไทย และเป็นองค์ประกอบในการผลิตฟิล์มไบโอพอลิเมอร์ในงานวิจัยต่อไป

5. ศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวกับการทำไมโครเอนแคปซูเลชัน และคัดเลือกสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่จะนำมาใช้ร่วมเช่น น้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน ยูคาลิปตัส และตะไคร้ เป็นต้น เพื่อกำหนดขอบเขตปัจจัยในการศึกษา

6. ทดลองเบื้องต้นในการนำพลาสมาโปรตีนมาใช้ในการเอนแคปซูเลทสารสกัดตามธรรมชาติ

7. ศึกษาผลของการดัดแปรพลาสมาโปรตีนในการทำเอนแคปซูเลทสารสกัดตามธรรมชาติ ต่อสมบัติของสารสกัดตามธรรมชาติที่ผ่านการเอนแคปซูเลชัน เช่น สี (L^*, a^*, b^*) สมบัติการไหลของสารละลาย (rheological property) ปริมาณความชื้น ค่า a_w ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมัน FT-IR และ SEM เป็นต้น

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เลือดจากสุกรเป็นผลพลอยได้หรือวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมโรงฆ่าสัตว์ซึ่งสามารถแยกส่วนของเหลวคือพลาสมาออกมาใช้ประโยชน์ได้ เนื่องจากพลาสมามีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูง และสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนในอาหารสัตว์ อาหารเสริม เป็นต้น พลาสมาโปรตีนมีสมบัติด้านอิมัลชันที่ดี ไม่ทำให้สี กลิ่นของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลง และราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับเคซีน (Jantawat et al., 1996) นอกจากนี้พลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรสามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มไบโอพอลิเมอร์ (พรรณิภา, 2549; Nuthong et al., 2009b) ซึ่งเป็นวัสดุตามธรรมชาติประเภท hydrophilic จึงมีสมบัติในการดูดซับน้ำ ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้เป็นวัสดุบรรจุภัณฑ์ ดังนั้นต้องมีการปรับปรุงสมบัติด้านการแพร่ผ่านของไอน้ำของฟิล์มโปรตีนโดยการดัดแปรด้วยวิธีการเชื่อมประสาน (cross-linking) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้โปรตีนมีโครงสร้างที่แข็งแรง เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนเกิดการเชื่อมประสานทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (inter- and intra-molecular cross-linking) กับสารที่ใช้ สารที่ใช้ในการเชื่อมประสานมีอยู่หลายชนิด เช่น ฟอร์มาลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ กรดแลคติค (Dangaran et al., 2009) ไดอัลดีไฮด์สตาร์ช (Lim et al., 2002, Rhim et al., 1998) กรดแทนนิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก กรดแคเทชิน (Nuthong et al., 2009c; Prodpran et al., 2012) รูติน (rutin) (Yan et al., 2011) และทรานส์กลูตามิเนส (เปรมวดี, 2548) เป็นต้น ซึ่งสารบางชนิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นการศึกษาสารเชื่อมประสานตามธรรมชาติก่อนขั้นตอนการทำแห้งเป็นผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรจึงเป็นงานวิจัยที่น่าสนใจ รวมทั้งวิธีการทำแห้งที่ต่างกันเช่นวิธี spray drying และวิธี freeze drying น่าจะมีผลต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนดัดแปร ซึ่งยังไม่มีงานวิจัยศึกษาในประเด็นนี้ พลาสมาโปรตีนดัดแปรที่ได้จะมีผลต่อสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่จะศึกษาในงานวิจัยต่อไป รวมทั้งการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำพลาสมา

โปรตีนดัดแปรมาใช้ห่อหุ้มสารสกัดจากสมุนไพรไทยเช่นน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน พริกไทย มะกรูด เป็นต้น เพื่อเก็บรักษาสมบัติของน้ำมันหอมระเหยให้นานขึ้น และสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ในรูป active packaging ต่อไป

การตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เลือดเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมโรงฆ่าสัตว์ และเป็นสารละลายคอลลอยด์ (colloidal solution) ของโปรตีน ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 80.9 โปรตีนร้อยละ 17.3 ไขมันร้อยละ 0.23 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 0.07 และแร่ธาตุร้อยละ 0.62 (นิธิยา, 2549) ปริมาณเลือดในสัตว์ต่างๆ มีอยู่ประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักร่างกาย (Mandal et al., 1999) ขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์และอายุของสัตว์ ปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากเลือดอย่างจำกัด โดยนำมาใช้เพียงเป็นส่วนประกอบของอาหารบางชนิด เช่นต้มเลือดหมู ก๋วยเตี๋ยวน้ำตก เป็นต้น ส่วนใหญ่เลือดที่เหลือจากโรงฆ่าสัตว์จะถูกกำจัดเป็นน้ำทิ้ง ก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสียต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเลือดเป็นแหล่งอาหารที่ดีให้กับจุลินทรีย์ ทั้งๆ ที่เลือดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ องค์ประกอบหลักในเลือดคือน้ำและโปรตีน เลือดส่วนใหญ่ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเซลล์ (cellular fraction) ประมาณ 30-40 % โดยปริมาตร ซึ่งประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง (red blood cell) เม็ดเลือดขาว (white blood cell) และเกล็ดเลือด (platelet) และส่วนที่เป็นของเหลวที่เรียกว่าพลาสมา (plasma) มีประมาณ 60-70 % โดยปริมาตร (รัตนา, 2528; Ockerman and Hansen, 2000) และยังมีส่วนที่เป็นสารละลายของโปรตีน น้ำตาล ไขมัน เกลือและวิตามินที่ละลายในน้ำ (Ockerman and Hansen, 1988)

พลาสมาโปรตีน (plasma protein) เป็นผลิตภัณฑ์ที่แยกจากเลือดโดยผ่านการแยกออกจากเม็ดเลือดแดง มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูง จึงมีการนำพลาสมาโปรตีนมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนแหล่งอาหารหลายประเภท เช่น ใช้เป็นแหล่งโปรตีนทดแทนในอาหารสัตว์ อาหารเสริม (functional food) และยังเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (nutrition) ในอาหารควบคุมน้ำหนัก (diet food) ช่วยให้ลักษณะของอาหารมีความคงตัวมากขึ้น และช่วยปรับปรุงสมบัติขององค์ประกอบในอาหารให้ดีขึ้น เช่นใช้เป็นส่วนผสมในซูริมิเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของเจล ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของไส้กรอก ทำให้ไวน์ใส เป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสารเกิดฟองที่ดีในผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น (Ramos-Clamont et al., 2003)

พลาสมาโปรตีนเลือดสุกรสามารถผลิตเป็นฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่มีลักษณะใสและไม่มีกลิ่น โดยชนิดและความเข้มข้นของพลาสติไซเซอร์มีผลต่อสมบัติทางกลและสมบัติการแพร่ผ่านของไอน้ำของฟิล์ม การใช้กลีเซอรอลเป็นพลาสติไซเซอร์ในการผลิตฟิล์มพลาสมาโปรตีน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20-60 โดยน้ำหนักพลาสมาโปรตีน จะให้ฟิล์มที่สามารถขึ้นรูปได้ดีและมีความโปร่งแสง เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอลทำให้ฟิล์มมีความแข็งแรงลดลงแต่ยืดหยุ่นดีขึ้น แต่ความสามารถในการต้านความชื้นลดลง ในขณะที่การใช้ซอร์บิทอลเป็นพลาสติไซเซอร์ทำให้ฟิล์มมีความยืดตัวต่ำ เปราะและแตกง่าย แต่ให้ค่าการแพร่ผ่านของไอน้ำลดลง ส่วนการใช้พอลิเอทิลีนไกลคอล 400 เป็นพลาสติไซเซอร์ไม่สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกได้ และเมื่อใช้ปริมาณมากขึ้นจะเกิดผลึกบนฟิล์ม (พรรณิภา, 2549) จึงมีการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโดยใช้พอลิแซกคาไรด์ เช่นเพคตินมาใช้ร่วมในการผลิตเป็นฟิล์มโปรตีน-พอลิแซกคาไรด์ พบว่าฟิล์มที่เติมเพคตินที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ช่วยปรับปรุงสมบัติของฟิล์มดีที่สุด ฟิล์มมีค่าต้านทานแรงดึงและค่าการยืดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมเพคติน แต่การเติมเพคตินทำให้ฟิล์มมีความโปร่งแสงลดลง และไม่ช่วยปรับปรุงสมบัติการแพร่ผ่านของไอน้ำ (พรรณิภา, 2549) จึงทำการปรับปรุงโดยเตรียมเป็นฟิล์มโปรตีน-ลิปิดอิมัลชัน โดยใช้กรดลอริคและทวีน 80 (tween 80) ซึ่งพบว่าฟิล์มที่เติมทวีน 80 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2 ช่วยปรับปรุงสมบัติการยืดตัวของฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมทวีน 80 และสามารถยืดตัวได้ดีกว่าการใช้กรดลอริค (พรรณิภา, 2549)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความเข้มข้นของโปรตีนและกลีเซอรอลต่อสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร ซึ่งพบว่าฟิล์มที่มีความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 3 และกลีเซอรอลร้อยละ 60 มีค่าการต้านแรงดึง (tensile strength) สูงสุด ส่วนฟิล์มที่มีความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 3 และกลีเซอรอลร้อยละ 70 ให้ค่าการยืดตัว (elongation) สูงสุด โดยปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนและกลีเซอรอลมีผลต่อค่าการแพร่ผ่านไอน้ำและความโปร่งแสงของฟิล์ม

ฟิล์มพลาสมาโปรตีนเป็นชนิด hydrophilic จึงมีสมบัติดูดซับน้ำหรือสารที่มีขั้ว และมีโครงสร้างที่ไม่แข็งแรง จึงต้องมีการปรับปรุงสมบัติของฟิล์มให้ดีขึ้น นอกเหนือจากการใช้สารประเภทพอลิแซกคาไรด์และไขมันร่วมกับฟิล์มพลาสมาโปรตีนดังที่ได้กล่าวมาแล้ว อีกวิธีที่สามารถช่วยปรับปรุงสมบัติของฟิล์มโปรตีนให้มีความต้านทานน้ำเพิ่มขึ้นได้แก่การเชื่อมประสาน (cross-linking) ด้วยไดอัลดีไฮด์สตาร์ช (dialdehyde starch; DAS) ซึ่งเป็นสารประกอบอัลดีไฮด์ชนิดหนึ่งที่สามารถช่วยให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการเชื่อมประสานทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล (inter– and intra–molecular cross-linking) ทำให้ฟิล์มมีโครงสร้างที่แข็งแรง โดยธรรมชาติสารประกอบอัลดีไฮด์จะมีความเป็นพิษ แต่อัตราความเป็นพิษต่ำ ซึ่งการได้รับพิษสามารถรับได้โดยทางปาก สัมผัสผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจ อย่างไรก็ตามสารประกอบอัลดีไฮด์สามารถปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของฟิล์มโปรตีนได้ (Lim et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีสารประกอบประเภทอัลดีไฮด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่นฟอร์มาลดีไฮด์ สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่ม primary amino และกลุ่ม sulfhydryl ในโปรตีนได้ มีการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในสารละลายเพื่อผลิตฟิล์มโปรตีนถั่วเหลือง (soy protein isolate, SPI) หรือใช้การชุบแผ่นฟิล์ม SPI ลงไปในสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ (Park et al., 2002) จากการทดลองพบว่าการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ในฟิล์ม SPI ให้ค่าการต้านแรงดึง (tensile strength) และค่าการต้านแรงทะลุ (puncture strength) เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ในขณะที่ค่าการแพร่ผ่านของไอน้ำและค่าการละลายน้ำลดลง ส่วนค่าการแพร่ผ่านของออกซิเจนเพิ่มเล็กน้อยในฟิล์ม SPI ที่มีการใช้ฟอร์มาลดีไฮด์ (Park et al., 2002) รวมทั้งมีงานวิจัยการใช้สารเชื่อมประสานเช่นฟอร์มาลดีไฮด์ กลูตารัลดีไฮด์ และกรดแลคติคในเวย์โปรตีน (Dangaran et al., 2009) ถึงแม้ว่าสารประกอบอัลดีไฮด์สามารถทำให้เกิดการเชื่อมประสานในโมเลกุลของโปรตีน แต่เนื่องจากความเป็นพิษทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปประยุกต์ใช้ในฟิล์มบริโภคได้ (Park et al., 2002) จึงมีการศึกษาการใช้ genipin ซึ่งเป็นสารสกัดตามธรรมชาติทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่องของความเป็นพิษ มาใช้ในการเชื่อมประสาน (cross-linking) โปรตีน (Bigi et al., 2002) จากการทดลองพบว่าฟิล์มเจลาตินที่ทำการเชื่อมประสานด้วย genipin มีค่าการยืดตัวลดลงและมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้มีการศึกษาการเชื่อมประสานฟิล์มพลาสมาโปรตีนด้วยสารเชื่อมประสานเช่นไกลออกซาลและกรดคาเฟอิก ซึ่งเป็นการเชื่อมประสานโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์และพันธะโควาเลนต์ โดยฟิล์มที่เติมกรดคาเฟอิกมีความคงตัวต่อความร้อนเพิ่มขึ้น สังเกตจากสเปคตรัมของการวัดด้วย FT-IR พบว่าเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเพิ่มขึ้นของพีคของตำแหน่ง amide- I (Nuthong et al., 2009a) นอกจากนี้มีการศึกษาผลของการใช้สารประกอบฟีนอลิกต่อสมบัติของฟิล์มพลาสมาโปรตีนสุกรด้วยสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ กรดแทนนิก กรดคาเฟอิก และกรดเฟอรูลิก พบว่าสามารถปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มได้ แต่ค่าการแพร่ผ่านของไอน้ำลดลงเล็กน้อย โดยฟิล์มที่มีกรดคาเฟอิกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเพิ่มค่าการต้านแรงดึงและค่าการยืดตัว (elongation at break) รวมทั้งการเติมออกซิเจน (oxygenation) ให้กับสารละลายฟิล์ม ที่ pH 10 ช่วยปรับปรุงสมบัติเชิงกลของฟิล์มดีขึ้น แต่ฟิล์มจะมีสีเหลืองและสีแดงมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณกรดแทนนิกหรือกรดคาเฟอิก จึงอาจเป็นข้อเสียของการใช้สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารเชื่อมประสานในฟิล์มโปรตีน ดังนั้นการเลือกสารประกอบฟีนอลิกในการนำมาใช้เป็นสารเชื่อมประสานจึงขึ้นอยู่กับความพึงพอใจต่อสมบัติของฟิล์มที่ได้ (Nuthong et al., 2009c)

พอลิฟีนอล (polyphenol) และฟลาโวนอยด์ (flavonoids) จากพืช เป็นสารที่มีความปลอดภัยสำหรับอาหาร และมีการนำมาใช้เป็นสารเชื่อมประสานในเจลาติน ทำให้เจลจากเจลาตินมีความแข็งแรงมากขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ortho-quinones กับโปรตีน รวมทั้งการเกิด coacervation ระหว่างเจลาตินและเพคตินที่มีขนาดอนุภาคไมโคร เมื่อเกิดการเชื่อมประสานจะทำให้เกิดสมบัติเป็น lipophilic และมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง (Strauss and Gibson, 2004) นอกจากนี้มีการนำสารสกัดเมล็ดกาแฟซึ่งมีปริมาณสารพอลิฟีนอลในรูปของ gallic acid equilvalent (GAE) มาใช้เชื่อมประสานเพื่อปรับปรุงสมบัติของเจลาตินในอัตราส่วนโดยโมลของพอลิฟีนอลต่อกรดอะมิโนอิสระที่ 0.8:1 พบว่าสารละลายเจลาตินมีความหนืดลดลงและมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระลดลง แต่อุณหภูมิของการเกิดเจล และการหลอมละลายไม่เปลี่ยนแปลง (ธริษตรี และคณะ, 2553) งานวิจัยของ Gomez-Estaca et al. (2009) ใช้สารสกัดจากออริกาโนและโรสแมรีเติมในฟิล์มเจลาตินจากหนังปลาทูน่า พบว่าสารสกัดทั้งสองชนิดสามารถเกิดอันตรกิริยากับเจลาตินจากหนังปลาทูน่าได้ โดยมีผลให้ฟิล์มมีอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition temperature) สูงขึ้นและการเสียรูป (deformation) ของฟิล์มลดลง เจลของเจลาตินจากหนังปลา walleye pollock ที่เชื่อมประสานด้วยรูตินที่ความเข้มข้น 8 mg/g ของเจลาติน มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นถึง 76.3% เมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่ไม่ได้เติมรูติน นอกจากนั้นยังทำให้ความเสถียรทางความร้อน (thermal stability)เพิ่มขึ้น อุณหภูมิ shrinkage เพิ่มขึ้นจาก 89 $^{\circ}$C เป็น 100 $^{\circ}$C ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวแสดงถึงมีการเชื่อมประสานเจลาตินกับรูตินเกิดขึ้น และเจลมีความสามารถในการบวมน้ำลดลง (swelling) (Yan et al., 2011) มีการใช้สารประกอบฟีนอลิกจากพืชในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีน เช่น กรดแทนนิก กรดคาเฟอิก กรดเฟอรูลิก และกรดแคเทชิน (ความเข้มข้น 1%, 3% และ 5% ของโปรตีน) ในการเชื่อมประสานฟิล์มโปรตีนไมโอไฟบริล (fish myofibrillar protein) เมื่อเปรียบเทียบฟิล์มที่มีการเติมสารประกอบฟีนอลิกที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน พบว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกจะมีค่า Young's modulus และ tensile strength สูงสุด ตามด้วยฟิล์มที่เติมกรดคาเฟอิก กรดแคเทชิน และกรดเฟอรูลิก ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มที่เติมกรดแทนนิกมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริลลดลงมากสุด ซึ่งแสดงว่ากรดแทนนิกมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโปรตีนไมโอไฟบริลสูงกว่าการใช้กรดคาเฟอิก กรดแคเทชิน และกรดเฟอรูลิก ตามลำดับ (Prodpran et al., 2012) นอกจากนั้นยังพบว่าการเชื่อมประสานฟิล์ม SPI ด้วยเจนิพินช่วยปรับปรุงสมบัติของฟิล์มได้ โดยค่าการละลาย (solubility) การบวมน้ำ (swelling) และค่าการแพร่ผ่านไอน้ำของฟิล์ม SPI ลดลง เมื่อใช้เจนิพินในปริมาณน้อย (ความเข้มข้น 0.1%, 1% และ 2.5% ของโปรตีน) สามารถปรับปรุงสมบัติทางกลของฟิล์ม SPI ได้ โดยค่าการต้านแรงดึงและค่าการยืดตัวของฟิล์มเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้เจนิพินในปริมาณมากขึ้น (ความเข้มข้น 5%, 7.5% และ 10% ของโปรตีน) มีผลให้ฟิล์มมีค่าการยืดตัวลดลง ส่วนค่าการต้านแรงดึงไม่แตกต่างจากการใช้เจนิพินในปริมาณน้อย (Gonzalez et al., 2011)

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอบแห้งเลือดและพลาสมาจากไก่ โดยใช้เครื่องอบแห้งแบบไมโครเวฟสุญญากาศพบว่าสภาวะการอบแห้งที่ความดัน 160 ทอรร์ กำลังคลื่นไมโครเวฟ 110 วัตต์ เป็นเวลา 102 min พลาสมาผงมีสมบัติด้านความสามารถในการละลาย การอุ้มน้ำและน้ำมัน และมีความเสถียรของอิมัลชันดีกว่าเลือดผง ดังนั้นผลิตภัณฑ์จากผลพลอยได้จากสัตว์ปีกชนิดนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำมาใช้ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของไส้กรอกอิมัลชันได้ (วิภาพร และคณะ, 2545) จึงมีการนำผลิตภัณฑ์เลือดผงและพลาสมาผงมาผลิตไส้กรอกโดยเติมเลือดผงร้อยละ 0.5, 1 และ 1.5 โดยน้ำหนักของเนื้อร่วมกับการเติมพลาสมาผงร้อยละ 2, 4 และ 6 โดยน้ำหนักของเนื้อลงไปในไส้กรอกอิมัลชันเปรียบเทียบกับไส้กรอกควบคุม พบว่าการเติมเลือดและพลาสมาผงร้อยละ 1 และร้อยละ 2 ตามลำดับ ช่วยลดการสูญเสียน้ำ ลดการสูญเสียน้ำหนักในระหว่างการหุงต้ม เพิ่มปริมาณผลผลิต ปรับปรุงคุณภาพด้านสีและความแน่นของเนื้อสัมผัสที่ดี (พรรณจิรา และ มณฑิรา,

2546) Chinprahast et al. (1995) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของพลาสมาจากเลือดสุกรที่ทำแห้งด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ การทำแห้งแบบสุญญากาศ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งพบว่าการทำแห้งพลาสมาแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีที่เหมาะสมสุดในการทำแห้ง โดยพลาสมาผงมีความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับน้ำ การเกิดอิมัลชัน (emulsion capacity) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) สูงที่สุด Jantawat et al. (1996) ได้ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของพลาสมาผงที่ทำแห้งแบบสุญญากาศ การทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 27-30 °C พบว่าพลาสมาผงของทั้งสามวิธีมีความชื้นเพิ่มขึ้น และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับน้ำ การเกิดอิมัลชัน ความคงตัวของอิมัลชัน และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนั้นพบว่าเมื่อนำพลาสมาผงของทั้งสามวิธี โซเดียมเคซิเนต และ SPI มาใช้ในการเตรียมอิมัลชันของไส้กรอก ไส้กรอกที่มีส่วนผสมของพลาสมาผงทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งมีค่าการสูญเสียน้ำขณะปรุง (cooking loss) แรงในการตัด (cutting force) น้อยที่สุด และจากการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสด้วยการชิมพบว่าได้คะแนนการยอมรับสูงสุด ดังนั้นสภาวะในการทำแห้งมีผลต่อสมบัติของโปรตีน จึงต้องมีการศึกษาเพื่อจะได้คัดเลือกสภาวะที่ให้สมบัติพลาสมาโปรตีนที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์

การเอนแคปซูเลทสามารถปกป้องสารที่ถูกเคลือบไม่ให้ทำปฏิกิริยากับส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร ลดการเกิดกลิ่นแปลกปลอมที่เกิดจากสารที่ถูกเคลือบทำปฏิกิริยากัน ปกป้องสารที่ถูกเคลือบจากแสง หรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยืดอายุการเก็บรักษา หรือควบคุมการปลดปล่อยสารที่ถูกเคลือบในผลิตภัณฑ์อาหาร ส่วนผสมอาหารที่ใช้เทคนิคเอนแคปซูเลชันได้แก่ กรด (acids) ไขมัน (lipids) เอนไซม์ (enzymes) จุลินทรีย์ (microorganism) สารทดแทนน้ำตาล (artificial sweetener) วิตามิน (vitamins) เกลือแร่ (mineral) สี (colorants) และ เกลือ (salts) (เบญจา, 2550) รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากธรรมชาติ

สมุนไพรไทยหลายชนิดพบว่ามีสรรพคุณทางยาที่ดี รวมทั้งบางชนิดยังมีสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้ เช่นขมิ้น *Curcuma longa* สามารถสกัดสาร turmeric ที่ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร (food additive) และทางเภสัชกรรมอย่างแพร่หลายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย turmeric ประกอบด้วย curcuminoids, กรดไขมันที่จำเป็น น้ำตาล oleoresin และสารประกอบอื่นๆ เช่นวิตามิน เกลือแร่ และโปรตีน เป็นต้น (Leung, 1980) turmeric มีสมบัติเป็นสารต้านเชื้อรา (antifungal) (Apisariyakul et al., 1995) สมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial) (Negi et al., 1999; Oonmetta-aree et al., 2006) และมีการศึกษาการนำน้ำมันหอมระเหยขมิ้นมาใช้ร่วมกับการเตรียม alginate nanocapsules (Lertsutthiwong et al., 2008) จะเห็นว่าสมุนไพรไทยมีสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งน่าจะนำมาใช้แทนสารเคมีที่ใช้อยู่ทั่วไป ประเภทกรดอินทรีย์และเอสเทอร์ เช่นซอร์เบต เบนโซเอต โพรพิโอเนต และเกลือของกรดอินทรีย์ดังกล่าว หรือสารอนินทรีย์ (รังสินี, 2553)

ข้อจำกัดในการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ คือความไม่คงตัวต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อสกัดและตั้งทิ้งไว้ ประกอบกับรูปแบบการนำไปใช้งานไม่สะดวก ดังนั้นหากเปลี่ยนรูปของสารสกัดสดมาอยู่ในรูปของผงจะช่วยให้นำมาใช้งานได้ง่ายขึ้น โดยอาศัยหลักการเอนแคปซูเลท (encapsulation) เพื่อให้สามารถเก็บรักษาสารดังกล่าวได้นานขึ้น และนำมาใช้ประโยชน์ได้สะดวกและหลากหลายยิ่งขึ้น ซึ่งการเอนแคปซูเลทเป็นกระบวนการที่สารหรือส่วนผสมของสารที่ต้องการถูกเคลือบหรือห่อหุ้มด้วยสารชนิดอื่น เช่น พอลิแซกคาไรด์ โปรตีน หรือไขมัน (lipid) โดยชนิดของสารเคลือบมีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลท (Nedovic et al., 2011)

โปรตีนสามารถนำมาใช้เป็นสารห่อหุ้มสำหรับกักเก็บสารให้กลิ่นรสด้วยเทคนิคเอนแคปซูเลชัน เช่น โซเดียมเคซีเนต (sodium caseinate) เวย์โปรตีน (whey protein) โปรตีนถั่วเหลือง (soy protein isolate) และ เจลาติน (gelatin) เป็นต้น มีงานวิจัยนำเวย์โปรตีนมาประยุกต์ใช้เป็นสารห่อหุ้มป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไมโครแคปซูลน้ำมันจากส้ม (Madene et al., 2006) การใช้เวย์โปรตีนและโซเดียมเคซิเนตในการกักเก็บน้ำมันถั่วเหลือง (Faldt and Bergenstahl, 1995) และการเอนแคปซูเลชัน casein hydrolysate โดยการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) โดยใช้โปรตีนถั่วเหลืองเป็นสารห่อหุ้มเพื่อลดความขมของผลิตภัณฑ์ และช่วยลดการดูดซับความชื้นด้วย (Molina Ortiz et al., 2009)

Karaca et al. (2013) ศึกษาการเอนแคปซูเลชันน้ำมัน flaxseed ด้วยโปรตีน chickpea protein isolate (CPI) หรือ lentil protein isolate (LPI) และ MD (DE: 9 และ 18) ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าเมื่อปริมาณน้ำมัน flaxseed ในอิมัลชันมากขึ้น (5.3%-20%) มีผลให้การกระจายตัวของอนุภาค (oil droplet diameter) และปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวของไมโครแคปซูลมากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันลดลง ส่วนที่อัตราส่วนของโปรตีน (CPI หรือ LPI) เท่ากับ 4%, MD (DE 9) เท่ากับ 35.5% และน้ำมัน flaxseed เท่ากับ 10.5% ทำให้ไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันสูงสุด (83.5%) ปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวน้อยสุด (2.8%) และค่าเฉลี่ยของการกระจายตัวของอนุภาคเป็นที่ยอมรับ (3 μm) Quispe-Condori et al. (2011) ศึกษาการใช้ซีนโปรตีน (zein protein) เป็นวัสดุห่อหุ้มพบว่าประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมัน flax ดีที่สุดคือ 93.26% เมื่อทำแห้งแบบพ่นฝอย ส่วนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันเพียง 59.63% ในขณะที่งานวิจัยของ Turasan et al. (2015) ศึกษาการเอนแคปซูเลชันน้ำมันโรสแมรี่ด้วยวัสดุห่อหุ้มเวย์โปรตีน (whey protein, WP) ร่วมกับมอลโตเดกตริน (maltodextrin, DE) 2 ชนิด (DE: 4-7 และ DE: 13-17) แล้วทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเอนแคปซูเลชันคือ ที่อัตราส่วน WP: MD เท่ากับ 3:1 เมื่อใช้ MD ที่มีค่า DE เท่ากับ 13-17 และอัตราส่วนของวัสดุห่อหุ้มต่อน้ำมันโรสแมรี่ที่ 20:1 ให้ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันสูงถึง 96.14% จากการตรวจเอกสารพบว่ายังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับการนำพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรที่ผ่านการดัดแปรมาใช้เป็นสารห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหย จึงเป็นงานวิจัยที่น่าศึกษาต่อไป

วิธีวิจัย

1. ศึกษาผลของชนิดสารเชื่อมประสาน (cross-linking agent) และวิธีการทำแห้งต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

1.1 ศึกษาวิธีการทำแห้งพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

1.1.1 การเตรียมพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

เก็บตัวอย่างเลือดสุกรจากกระบวนการเอาเลือดออกของโรงฆ่าสัตว์ (บริษัท ชินเจริญ (2004) จำกัด, นครปฐม) ในภาชนะที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เติมสารละลายโซเดียมซิเตรท (sodium citrate solution) ความเข้มข้นร้อยละ 3.8% (w/v) ทันทีในเลือดสุกรในอัตราส่วนสารละลายต่อเลือดเท่ากับ 1:9 (Nuthong et al., 2009a) ผสมให้เข้ากันเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด นำตัวอย่างเลือดที่เติมสารละลายโซเดียมซิเตรทแล้ว ใส่ถุงพลาสติกทันที แล้วนำใส่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งทำการขนส่งกลับมายังภาควิชาวิศวกรรมการอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ กำแพงแสน จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ในตู้เย็น ก่อนทำการแยกพลาสมาทันทีต่อไป

นำตัวอย่างเลือดมาทำการปั่นแยกส่วนของพลาสมาและเม็ดเลือดแดงออกจากกันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดปรับอุณหภูมิได้ (Eppendorf centrifuge 5804R, Germany) ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000xg เป็นเวลา 30 min เพื่อแยกส่วนของพลาสมาและเม็ดเลือดแดงออกจากกัน หลังจากการปั่นเหวี่ยงจะนำส่วนใส (พลาสมาโปรตีน) มากรองเพื่อนำไขมันออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 93 (Whatman) นำพลาสมาโปรตีนเก็บใส่ถุงเย็น (LDPE) ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาทำการทดลองต่อไป

1.1.2 การทำแห้งพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

นำพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรที่แช่แข็งในข้อ 1.1.1 มาทำการละลายโดยแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นศึกษาวิธีการทำแห้งพลาสมาโปรตีน 2 วิธีได้แก่วิธีแบบพ่นฝอย (spray drying) และวิธีแช่เยือกแข็งแห้ง (freeze drying)

การทำแห้งวิธีแบบพ่นฝอย เริ่มจากการนำพลาสมาโปรตีนจากการละลายแล้วมาฉีดเข้าเครื่องทำแห้งวิธีแบบพ่นฝอย (spray dryer) (Lab-Plant SD-04, West Yorkshire, England) โดยศึกษาอุณหภูมิขาเข้า 2 ระดับ ได้แก่ 140 °C และ 200 °C โดยควบคุมอุณหภูมิขาออก 70 °C อัตราการฉีดพลาสมาโปรตีน 0.4 L/h จะได้ผงพลาสมาโปรตีน (porcine plasma protein powder, PPP) ซึ่งจะทำการเก็บรักษาไว้ในถุง zip lock (polyethylene, PE) ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำมาใช้ทดสอบต่อไป

การทำแห้งวิธีแช่เยือกแข็ง เริ่มจากการนำพลาสมาโปรตีนมาแช่ในตู้แช่เยือกแข็ง (Elcold DK-9500, Hobro, Denmark) ที่อุณหภูมิ -40°C เป็นเวลา 48 h จากนั้นนำพลาสมาโปรตีนที่แช่แข็งมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Scanvac Coolsafe 100-4 Pro, Lynge, Denmark) ตั้งอุณหภูมิควบแน่นที่ -80 °C ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 1 วัน หรือจนกระทั่งความดันภายใน chamber คงที่ จะได้ PPP ซึ่งจะทำการเก็บรักษาในถุงไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำมาใช้ทดสอบต่อไป

1.1.3 ตรวจสอบสมบัติของผงพลาสมาโปรตีนที่ได้จากการทำแห้งทั้งสองวิธี ดังนี้

1.1.3.1 องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ความชื้น โปรตีน และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (2000)

1.1.3.2 ค่าสี (Color value) ด้วยเครื่องวัดสี Spectro-guide (BYK-Gardner GmbH, Germany) ตามระบบ CIE Lab system ในรูปของ L^* a^* และ b^* โดยใช้ white standard plate (L^* = 97.75, a^* = -0.49, b^* = 1.96)

1.1.3.3 ความสามารถในการละลาย (Solubility) ตามวิธีของ Suzuki and Shimizu (1982) โดยนำตัวอย่างแห้ง 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่นจำนวน 20 mL นำไปเขย่าในเครื่อง water bath shaker ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 1 h นำสารละลายที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองพร้อมสารตกค้างบนกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 3 h จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ คำนวณความสามารถในการละลายตามสูตร

$$Solubility\ (\%) = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} x100$$

โดยที่ W_1 เป็นน้ำหนักของตัวอย่างแห้งเริ่มต้น
W_2 เป็นน้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ไม่ละลายน้ำ

1.1.3.4 ความสามารถในการจับน้ำ (Water holding capacity, WHC) ตามวิธีของ Beuchat (1977) โดยนำตัวอย่างแห้ง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 mL เติมน้ำกลั่น 10 mL ปิดฝาหลอดให้แน่น เขย่าด้วยเครื่อง vortex นาน 2 min ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 h จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000xg เป็นเวลา 20 min รินส่วนใสทิ้ง เอียงให้สะเด็ดน้ำ นำหลอดที่มีตะกอนค้างอยู่ก้นหลอดมาชั่งน้ำหนัก คำนวณค่าความสามารถในการจับน้ำตามสูตร

$$WHC = \frac{(W_2 - W_1)}{W_0}$$

โดยที่ W_0 เป็นน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง
W_1 เป็นน้ำหนักหลอดบวกน้ำหนักตัวอย่างแห้ง
W_2 เป็นน้ำหนักหลอดบวกน้ำหนักตะกอน

1.1.3.5 ความสามารถในการจับน้ำมัน (Oil binding capacity, OBC) ตามวิธีของ Beuchat (1977) โดยนำตัวอย่างแห้ง 0.5 กรัม ใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 15 mL เติมน้ำมันถั่วเหลือง 10 mL ปิดฝาหลอดให้แน่น ผสมด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2 min ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 h จากนั้นนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000xg เป็นเวลา 20 min รินส่วนใสทิ้ง เอียงให้สะเด็ดน้ำมัน จากนั้นนำหลอดที่มีตะกอนค้างอยู่ก้นหลอดมาชั่งน้ำหนัก คำนวณค่าความสามารถในการจับน้ำมันตามสูตร

$$OBC = \frac{(W_2 - W_1)}{W_0}$$

โดยที่ W_0 เป็นน้ำหนักของตัวอย่างแห้ง
W_1 เป็นน้ำหนักหลอดบวกน้ำหนักตัวอย่างแห้ง
W_2 เป็นน้ำหนักหลอดบวกน้ำหนักตะกอน

1.1.3.6 สมบัติด้านวิทยากระแส (Rheological property) ด้วยเครื่อง Rheometer (HAAKE RheoStress 600, Germany) โดยใช้หัววัดแบบ cone and plate (cone and plate geometry) (cone diameter = 60 mm, angle = 1 °, gap = 0.052 mm) เริ่มจากการเตรียมสารละลาย

พลาสมาโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีแบบพ่นฝอย และวิธีแบบแช่เยือกแข็งแห้ง (2% w/w) กวนให้เข้ากันและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 30 min ด้วยเครื่อง shaking water bath (Memmert Water Bath, WNB14, Germany) นำสารละลายออกมาตั้งให้เย็น จนสารละลายมีอุณหภูมิ 25 °C ก่อนนำไปทดสอบสมบัติด้านวิทยากระแสดังนี้

พฤติกรรมการไหล (Flow behavior) โดยวัดค่าความหนืดปรากฏและความเค้นเฉือนในรูปฟังก์ชันของอัตราเฉือนในช่วง 0.1 ถึง 100 s^{-1} เมื่อความเค้นเฉือนเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 20 Pa ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยพฤติกรรมการไหลของสารละลายพลาสมาโปรตีนหาได้จากการนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยการพล็อตกราฟตามสมการของ power law model

$$\eta = k\dot{\gamma}^{n-1}$$

เมื่อ η คือ ความหนืดปรากฏ (Pa.s), $\dot{\gamma}$ คือ อัตราเฉือน (s^{-1}), k คือ ค่าดัชนีเนื้อสัมผัส (Pa. s^{n}) และ n คือ ค่าดัชนีลักษณะการไหล (ไม่มีหน่วย)

สมบัติวิสโคอิลาสติก (Viscoelastic properties) วัด oscillatory stress sweep test หรือ dynamic measurements ในช่วง 0.01-20 Pa ที่ความถี่ (frequency) เท่ากับ 1 Hz ให้ค่า linear viscoelastic region (LVR) และทดสอบ frequency sweep ที่ angular frequency (ω) เท่ากับ 0.1-100 rad/s โดยวัดค่า dynamic viscoelastic parameters ได้แก่ มอดูลัสการสะสม (storage or elastic modulus, G') และ มอดูลัสสูญเสีย (loss or viscous modulus, G") ซึ่งเป็นฟังก์ชันของ ω

1.1.4 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์แบบ ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ รวบรวมผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ โดยคำนวณหา analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวแปรที่มีผลกระทบด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อสรุปผลการทดลอง

1.2 ศึกษาผลของสารเชื่อมประสานต่อสมบัติของผงพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

1.2.1 การดัดแปรพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

สารละลายพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร (native) จะถูกนำมาปรับ pH ของสารละลายให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ (1M NaOH) หรือสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ (1M HCl) (ดัดแปลงจาก Nuthong et al., 2009a; 2009b) จากนั้นให้ความร้อนสารละลายจนมีอุณหภูมิ 50 °C (control) ก่อนเติมสารเชื่อมประสาน (cross-linking agent) ชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดคาเฟอิก (caffeic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 ของปริมาณโปรตีน (โดยทำการเติมกรดคาเฟอิกทีละน้อยๆ ลงในสารละลายพลาสมาพร้อมกับการกวนตลอดเวลาจนสารหมด) (Nuthong et al., 2009a; 2009b; Prodpran et al., 2012) สารละลายรูติน (rutin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.6, 0.8 และ 1 ของปริมาณโปรตีน เตรียมโดยนำสารรูตินละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (0.2M NaOH) (Yan et al., 2011) และสารละลายเจนิพิน (genipin) ความเข้มข้นร้อยละ 0.15, 0.35 และ 0.50 ของปริมาณโปรตีน เตรียมโดยนำสารเจนิพินละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) (Bigi et al., 2002; Jin et al., 2004; Yoo et al., 2011) ลงในสารละลายพลาสมาโปรตีน กวนผสมเป็นเวลา 1 h ที่อุณหภูมิ 50 °C จากนั้นนำสารละลายตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำสารละลายดังกล่าวที่ได้มาทำแห้งด้วยวิธี freeze drying และวิธี spray drying ตามที่ได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 1.1.2 นำผงพลาสมา

โปรตีน (porcine plasma protein powder, PPP) ที่ได้เก็บในถุง zip lock ที่อุณหภูมิ -20 °C ก่อนนำมาตรวจสอบสมบัติ

1.2.2 ตรวจสอบสมบัติของผงพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรที่ผ่านการดัดแปร ดังนี้

1.2.2.1 ค่าสี (Color value) วัดด้วยเครื่อง color spectrophotometer (BYK-Gardner GmbH; Geretsried, Germany) ตามระบบ CIE Lab system ในรูปของ L^* a^* และ b^* โดยใช้ white standard plate (L^* = 97.75, a^* = -0.49, b^* = 1.96)

1.2.2.2 ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ (Free amino group) ตามวิธีของ Benjakul and Morrissey (1997) โดยชั่งผงพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร 0.05 กรัม เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (50 mM phosphate buffer, pH 8.0) จากนั้นดูดสารละลายพลาสมาโปรตีนมา 125 μL ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 mL (0.2125 M phosphate buffer, pH 8.2) และเติม 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) เข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 1 mL ปิดฝาหลอดและผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 30 min (ปิดตัวอย่างด้วย foil) จากนั้นเติมสารละลาย sodium sulphite เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 mL ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 15 min และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) เทียบกับกราฟมาตรฐานของ L-leucine

1.2.2.3 ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (Sulfhydryl (SH) group) ตามวิธีของ Ellman (1959) โดยเจือจางตัวอย่างพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.1 M phosphate buffer, pH 8.0) ซึ่งสารละลายพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรที่ได้จะมีความเข้มข้นที่ 4 mg/mL จากนั้นดูดสารละลายพลาสมาโปรตีนมา 1 mL เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 9 mL ซึ่งในสารละลายบัฟเฟอร์ประกอบด้วยยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate, SDS) เข้มข้นร้อยละ 2 สารละลายเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (ethylene diamine tetra-acetic acid) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (8M urea, 2% SDS, 10mM EDTA, 0.2% Tris-HCl; pH 6.8) จากนั้นผสมให้เข้ากันและดูดสารละลาย 4 mL ทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5,5'-ไดไธโอบิส (2-กรดไนโตรเบนโซอิก) (5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid); DTNB) เข้มข้นร้อยละ 0.1 (DTNB ละลายใน 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0) โดยดูดสารละลาย DTNB 0.4 mL ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 25 min วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) วิเคราะห์ blank ด้วยสารละลาย KCl เข้มข้น 0.6 M, pH 7.0 แทนตัวอย่าง คำนวณปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (ε) เท่ากับ 13,600 L/mol. cm

1.2.2.4 ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy) ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของผงพลาสมาโปรตีน ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR, Spectrum two, Perkin Elmer, Illinois, USA) โดยวัดค่า transmittance ของรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรด ช่วงเลขคลื่น (Wave number) 4000 – 400 cm^{-1} โดย scan setting ที่ 32 scans และ resolution ที่ 8 cm^{-1} (Nuthong et al., 2009a)

1.2.2.5 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน ตามวิธี Laemmli (1970) โดยการนำพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร 0.02 กรัม ละลายในน้ำ 1 mL จากนั้นทำ serial dilution จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 2 μg/μL ดูดสารละลายพลาสมาโปรตีนมา 10 μL เติม sample buffer 10 μL (laemmli buffer 950 μL, β-mercaptoethanol 50 μL) จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 min นำแผ่นเจลสำเร็จรูป (4-20% precast

polyacrylamide gel, Mini-Protein® TGXTM Precast Gels) ติดตั้งกับชุด electrophoresis แล้วนำใส่ลงใน chamber เติม electrode buffer (Tris-HCl, glycine, SDS) จนท่วมแผ่นเจล หลังจากนั้น load ตัวอย่าง (ที่เติม sample buffer) ลงในหลุมๆ ละ 15 μL และ marker (precision plus protein all blue standards, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA) ปรับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Mini-Protein II unit, Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA, USA) โดยใช้ความต่างศักย์คงที่ที่ 120 โวลต์ ย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลายคูแมสซีบลู (0.125% Coomassie blue R-250) เข้มข้นร้อยละ 0.125 ล้างสีย้อมด้วยสารละลายผสมระหว่าง เมทานอล ร้อยละ 30 และกรดอะซิติก ร้อยละ 10

1.2.2.6 สมบัติทางความร้อน (Thermal properties) โดยใช้เครื่อง differential scanning calorimeter (Diamond DSC, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) โดยทำการสอบเทียบอุณหภูมิ (calibrate) โดยใช้ indium เป็นสารมาตรฐาน ในการวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างน้ำหนัก 4-5 มิลลิกรัม ใส่ลงในอะลูมิเนียม pan ขนาด 40 ไมโครลิตร สแกนอุณหภูมิตั้งแต่ 35 °C ถึง 200 °C ที่อัตราเร็ว 10 °C/min วิเคราะห์หาอุณหภูมิของตัวอย่างที่เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation temperature; T_D), onset temperature (T_{onset}), end temperature (T_{end}) และ ΔT (different denaturation temperature; $T_{end} - T_{onset}$)

1.3 ศึกษาวิธีการเอนแคปซูเลชัน (encapsulation) สารสกัดตามธรรมชาติด้วยพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ สารห่อหุ้ม (wall materials) จำนวน 2 ชนิด (พลาสมาโปรตีนและพลาสมาโปรตีนดัดแปร), สารสกัดตามธรรมชาติคือน้ำมันหอมระเหย (core materials) จำนวน 3 ชนิด (ตะไคร้, ขมิ้นและยูคาลิปตัส) และอัตราส่วนระหว่าง wall materials และ core materials (W: C) จำนวน 2 ระดับ (4: 1 และ 3: 1) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสารละลายพลาสมาแต่ละชนิด และสารละลายอิมัลชันจากสารละลายพลาสมาโปรตีนและน้ำมันหอมระเหย ดังนี้

1.3.1 การเตรียมสารห่อหุ้ม (wall materials)

การเตรียมสารละลายพลาสมาโปรตีนโดยนำพลาสมาโปรตีน (liquid) ปรับ pH ให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ หลังจากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 min (ดัดแปลงจาก Nuthong et al., 2009a; 2009b)

การเตรียมสารละลายพลาสมาโปรตีนดัดแปร ซึ่งคัดเลือกสารละลายพลาสมาโปรตีนดัดแปรจากผลการศึกษาตอนที่ 1.2 โดยเลือกสารดัดแปร คือ สารรูตินที่ความเข้มข้น 0.6% (w/w)

1.3.2 การเอนแคปซูเลชัน (encapsulation)

นำน้ำมันหอมระเหยตามธรรมชาติได้แก่ น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (Lemongrass; *Cymbopogon citratus*) น้ำมันหอมระเหยขมิ้น (Turmeric; *Curcuma longa Linn*.) และน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส (Eucalyptus; *Eucalyptus globulus* Labill) จากบริษัทเครื่องหอมไทยจีน, กรุงเทพ ผสมน้ำมันหอมระเหยกับสารห่อหุ้มจากข้อ 1.3.1 โดยเติม tween 80 (ที่ความเข้มข้น 25% ของน้ำมันหอมระเหย) เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของน้ำมันตะไคร้ (Kim et al., 2014) และ span 20 (ที่ความเข้มข้น 25% ของน้ำมันหอมระเหย) เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของน้ำมันขมิ้นและยูคาลิปตัส (Orafidiya and Oladimeji, 2002; Fernandes et al., 2013) ทำการผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่อง high speed homogenizer ที่ความเร็วรอบ 15,000 rpm เป็นเวลา 3 min จากนั้นนำสารละลายอิมัลชันไปทำแห้งแบบ

แช่เยือกแข็งตามวิธีตอนที่ 1.1 แล้วเก็บผงไมโครแคปซูลที่ได้ ใส่ในถุง zip lock (polyethylene; PE) ที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ก่อนนำมาใช้ทดสอบต่อไป

1.3.3 การตรวจสอบสมบัติของอิมัลชัน

นำสารละลายอิมัลชันจากข้อ 1.3.2 ก่อนนำไปทำแห้งมาตรวจสอบสมบัติด้านวิทยากระแส (Rheological properties) ด้วยเครื่อง Rheometer (HAAKE RheoStress 600, Germany) โดยใช้หัววัดแบบ cone and plate (cone and plate geometry) (cone diameter = 60 mm, angle = 1 $^{\circ}$, gap = 0.052 mm)

พฤติกรรมการไหล (Flow behavior) โดยวัดค่าความหนืดปรากฏและความเค้นเฉือนในรูปฟังก์ชันของอัตราเฉือนในช่วง 0.1 ถึง 100 s^{-1} ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยพฤติกรรมการไหลของสารละลายอิมัลชันพลาสมาโปรตีนหาได้จากการนำข้อมูลมาวิเคราะห์โดยการพล็อตกราฟ

1.3.4 การตรวจสอบสมบัติของผงไมโครแคปซูล

1.3.4.1 ปริมาณความชื้น ตามวิธีการของ Karaca et al. (2013) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างผงไมโครแคปซูล 0.5 กรัม ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 12 h นำตัวอย่างออกจากตู้อบทิ้งให้เย็นในเดสิกเคเตอร์และชั่งน้ำหนักอบแห้งตัวอย่างซ้ำจนมีน้ำหนักที่คงที่ ปริมาณความชื้นของผงไมโครแคปซูลรายงานเป็นกรัมของน้ำต่อ 100 กรัมไมโครแคปซูล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

1.3.4.2 วอเตอร์แอกตีวิตี้ (water activity; a_w) ด้วยเครื่อง AquaLab Model CX3TE (Decagon Devices, Inc. Pullman, WA, USA) ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C

1.3.4.3 ค่าสีของผงไมโครแคปซูล นำตัวอย่างผงไมโครแคปซูลตรวจวัดด้วยเครื่องวัดสี Spectro-guide (BYK-Gardner GmbH, Germany) โดยใช้แหล่งกำเนิดแสง D65 มุมมอง 10° ในระบบค่าสีของ CIE Lab แสดงผลค่าของสี เป็น L* (ค่าความสว่าง) a* (-a* คือค่าความเป็นสีเขียว และ +a* คือค่าความเป็นสีแดง) และ b* (-b* คือค่าความเป็นสีน้ำเงิน และ +b* คือค่าความเป็นสีเหลือง)

1.3.4.4 ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมัน (Encapsulation efficiency) วิเคราะห์หาประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมันในไมโครแคปซูล ดัดแปลงตามวิธีการของ Klinkesorn et al. (2006) โดยแบ่งการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

1.3.4.4.1 ปริมาณน้ำมันอิสระ (Free oil; FO) ชั่งผงไมโครแคปซูล 2.5 กรัม (W_1) ลงในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เติมเฮกเซน 15 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 2 min จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm เป็นเวลา 20 min กรองเอาส่วนใสข้างบนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ล้างกระดาษกรองด้วยเฮกเซนอีกครั้ง นำของเหลวที่ได้ไปทำการระเหยที่อุณหภูมิ 70 °C สังเกตเฮกเซนระเหยหมด จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 5 h นำตัวอย่างออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) อบตัวอย่างซ้ำจนน้ำหนักคงที่แล้วทำการบันทึกผล คำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำมันอิสระตามสูตร

$$FO\,(\%) = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} x100$$

โดยที่ W_1 เป็นน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

W_2 เป็นน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

1.3.4.4.2 ปริมาณน้ำมันที่กักเก็บ (Encapsulated oil; EO) ชั่งผงไมโครแคปซูลที่ผ่านการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันอิสระ 0.5 กรัม (W_1) ลงในหลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง เติมสารละลาย

แอซิเตทบัฟเฟอร์ (100 mM, pH 3.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นเวลา 1 min จากนั้นเติมเฮกเซนและไอโซโพรพานอล (อัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องอัตโนมัตินาน 15 min แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 15 min กรองแยกส่วนบนออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ล้างกระดาษกรองด้วยเฮกเซน นำของเหลวที่ได้ไปทำการระเหยที่อุณหภูมิ 70 °C สังเกตเฮกเซนระเหยหมด จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 5 h นำตัวอย่างออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก (W_2) อบตัวอย่างซ้ำจนน้ำหนักคงที่แล้วทำการบันทึกผล คำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำมันที่กักเก็บตามสูตร

$$EO\,(\%) = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} x100$$

1.3.4.4.3 ประสิทธิภาพการกักเก็บน้ำมัน (Encapsulation Efficiency; EE) คำนวณจากสูตร $EE\,(\%) = \frac{EO}{TO} x100$

โดยปริมาณน้ำมันทั้งหมด (Total oil; TO) หาได้จาก $TO\,(\%) = FO + EO$

1.3.4.5 ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy) ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างของของผงไมโครแคปซูล ด้วยเครื่อง Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR, Spectrum two, Perkin Elmer, Illinois, USA) โดยวัดค่า transmittance ของรังสีที่อยู่ในช่วงอินฟราเรด ช่วงเลขคลื่น (Wave number) 4000 – 400 cm^{-1} โดย scan setting ที่ 32 scans และ resolution ที่ 8 cm^{-1}

1.3.4.6 โครงสร้างระดับจุลภาคของไมโครแคปซูล ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) (Cam Scan MX-2000, UK) โดยนำตัวอย่างผงไมโครแคปซูลวางลงบนแท่นวางตัวอย่างและนำไปเคลือบผิวอนุภาคด้วยทองเพื่อช่วยให้นำประจุอิเล็กตรอนด้วยเครื่องเคลือบทอง (sputter coater) (Cressington, 108, England) โดยใช้เวลาเคลือบ 100 วิmin จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่ค่าอัตราเร่งของความต่างศักย์ไฟฟ้า 15 kV กำลังขยาย x2500 เพื่อตรวจดูผิวของผงไมโครแคปซูล

ผลและวิจารณ์

1. ผลของชนิดสารเชื่อมประสาน (cross-linking agent) และวิธีการทำแห้งต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

1.1 ผลของวิธีการทำแห้งต่อสมบัติของพลาสมาจากเลือดสุกร

วิธีการทำแห้งมีผลต่อลักษณะปรากฏของผงพลาสมาโปรตีน (PPP) โดยพลาสมาโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying (freeze dried PPP) มีลักษณะเป็นผงสีแดงอมเหลือง ส่วนพลาสมาโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธี spray drying (spray dried PPP) ซึ่งมีลักษณะเป็นผงสีเขียวอมเหลือง เมื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าวิธีการทำแห้งและอุณหภูมิในการทำแห้งด้วยวิธี spray drying ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและปริมาณเถ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1) โดยมีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 79.63 - 82.16 % และปริมาณเถ้าอยู่ในช่วง 11.73 -12.41 % โดยปริมาณโปรตีนในพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรมีการเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาและสภาวะในช่วงระหว่างการฆ่า รวมทั้งสภาวะการเก็บรักษาหลังจากการทำแห้ง (พรรณิภา, 2549) ในขณะที่ spray dried PPP ที่อุณหภูมิขาเข้าสูง (200 °C) จะมีปริมาณความชื้นต่ำกว่า spray dried PPP ที่อุณหภูมิขาเข้าต่ำ (140 °C) เนื่องจากอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูงขึ้น ทำให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิที่พื้นผิวของละอองพลาสมาโปรตีนสูงขึ้นส่งผลให้เกิดการถ่ายเทความร้อนได้ดี น้ำจึงระเหยออกมาได้มาก ทำให้ปริมาณความชื้นของพลาสมาโปรตีนลดลงมาก (Jittanit et al., 2010) สอดคล้องกับการลดลงของปริมาณความชื้นของผง black mulberry ที่ทำแห้งด้วยวิธี spray drying เมื่ออุณหภูมิลมร้อนขาเข้าเพิ่มขึ้น (Fazaeli et al., 2012) ส่วนค่าความชื้นของ freeze dried PPP และ spray dried PPP ที่อุณหภูมิขาเข้าสูง (200 °C) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิขาเข้าสูงด้วยวิธีการทำแห้งแบบ spray drying ไม่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีหลักของ PPP ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ แต่การทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ใช้ระยะเวลาในการทำแห้งค่อนข้างนานกว่าการทำแห้งด้วยวิธี spray drying

Table 1 Chemical compositions of porcine plasma protein powder from different drying methods.

Chemical component	Drying method		
	Freeze drying	Spray drying at 140 °C	Spray drying at 200 °C
Ash (% wet basis)	12.37±0.04[a]	12.41±0.13[a]	11.73±0.19[a]
Protein (% wet basis)	80.80±0.35[a]	79.63±0.42[a]	82.16±1.06[a]
Moisture content (% wet basis)	6.10±0.53[a]	10.17±0.18[b]	6.65±0.74[a]

Each value was the mean of three replications ± standard deviation.

[a, b, c] Means in the same row with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

วิธีการทำแห้งน่าจะมีผลต่อค่าสีของ PPP ตามที่สังเกตได้จากลักษณะปรากฏ ซึ่งค่าสีเป็นลักษณะทางประสาทสัมผัสที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการยอมรับในผลิตภัณฑ์อาหาร จากการทดลองพบว่าวิธีการทำแห้งมีผลต่อค่าสี (L^*, a^*, b^*) ของ PPP อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดย freeze dried PPP มีค่า L^* ต่ำสุด

และมีค่า a^* และ b^* สูงสุด (Table 2) สอดคล้องกับลักษณะปรากฏด้วยตาเปล่าที่มีลักษณะเป็นสีแดงอมเหลือง ส่วน spray dried PPP พบว่ามีค่า L^* สูงสุด และมีค่ามากกว่า freeze dried PPP สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาการทำแห้งของ *Rubrivivax gelatinosus* biomass (Espinto Santa et al., 2013) และการทำแห้งโปรตีน lentil protein isolates (LPI) (Joshi et al., 2011) ส่วนการทำแห้งด้วยวิธี spray drying ที่อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูง (200 °C) จะให้ PPP มีค่า L^*, a^* และ b^* ต่ำกว่าที่อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าต่ำ (140 °C) ความแตกต่างดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (non-enzymatic browning) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูง (Sarochwikasit and Tangduangdee, 2011)

Table 2 Color values of porcine plasma protein powder from different drying methods.

Drying method	L^*	a^*	b^*
Freeze drying	59.32 ± 0.80^{c}	4.04 ± 0.53^{a}	15.27 ± 0.36^{a}
Spray drying at 140 °C	77.58 ± 1.89^{a}	0.62 ± 0.05^{b}	12.14 ± 0.17^{b}
Spray drying at 200 °C	64.83 ± 0.49^{b}	0.05 ± 0.06^{b}	9.24 ± 0.22^{c}

Each value in the table was the mean of three replications ± standard deviation.

$^{a, b, c}$ Means in the same column with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

วิธีการทำแห้งมีผลต่อความสามารถในการละลายของ PPP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดย freeze dried PPP มีค่าการละลายสูงสุด (Table 3) เนื่องจากผลิตภัณฑ์หลังการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying มีโครงสร้างที่เป็นรูพรุนเมื่อเติมน้ำจึงเกิดการคืนตัวอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้อาจเกิดจากระดับการเสียสภาพของโปรตีน (denaturation) และการรวมตัวของโปรตีน (aggregation) ในระดับที่ต่ำของผลิตภัณฑ์จาก freeze dried PPP ส่วนการเปลี่ยนอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าไม่มีผลต่อค่าการละลายของ spray dried PPP ผลที่ได้ตรงข้ามกับงานวิจัยของ Fazaeli et al. (2012) ที่พบว่าเมื่ออุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูงขึ้นทำให้ผง black mulberry มีค่าการละลายเพิ่มขึ้น ความแตกต่างดังกล่าวอาจเกิดจากวัตถุดิบที่ใช้และวิธีการทำแห้งที่ใช้ที่ต่างกัน

ปฏิสัมพันธ์ของน้ำและน้ำมันกับโปรตีนมีความสำคัญในระบบอาหาร โดยเฉพาะต่อค่าสีและเนื้อสัมผัสของอาหาร เมื่อพิจารณาผลของการทำแห้งต่อความสามารถในการจับน้ำ พบว่าการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ไม่สามารถหาค่าได้ อาจเนื่องมาจากมีความสามารถในการละลายที่ดี ส่วนการทำแห้งด้วยวิธี spray drying ที่อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า 140 °C และ 200 °C พบว่าความสามารถในการจับน้ำมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนความสามารถในการจับน้ำมันของพลาสมาโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งทั้งสามวิธีมีค่าแตกต่างกัน ($p < 0.05$) ค่าความสามารถในการจับน้ำมันของ freeze dried PPP สูงกว่า spray dried PPP ที่อุณหภูมิ 200 °C และ 140 °C ตามลำดับ เนื่องจากโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของ freeze dried PPP ทำให้สามารถจับและดักปริมาณน้ำมันได้สูงกว่า spray dried PPP (Table 3) นอกจากนี้ความสามารถในการจับน้ำมันของ spray dried PPP เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูงขึ้น โดยค่าความสามารถในการจับน้ำและน้ำมันที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ He et al. (2014) ที่พบว่า peanut protein isolate มีค่าความสามารถในการจับน้ำและน้ำมันสูงขึ้น เมื่อใช้ความดันที่สูง จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูง จะให้ค่าความสามารถในการจับน้ำมันได้เด่นชัดกว่าความสามารถในการจับน้ำ

Table 3 Solubility, water holding capacity (WHC) and oil binding capacity (OBC) of porcine plasma protein powder from different drying methods.

Drying method	Solubility (%)	WHC (g H_2O/g protein)	OBC (g oil/g protein)
Freeze drying	97.11±0.82[a]	-	4.67±0.07[a]
Spray drying at 140 °C	42.06±2.21[b]	3.66±0.41[a]	2.07±0.23[b]
Spray drying at 200 °C	42.46±2.29[b]	3.75±0.27[a]	2.73±0.26[c]

Each value was the mean of three replications ± standard deviation.

[a, b, c] Means in the same column with different superscripts were significantly different ($p<0.05$).

- No data available.

สมบัติทางด้านวิทยากระแสของพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรที่ผ่านการทำแห้ง แสดงพฤติกรรมการไหลแบบ non- Newtonian (Figure 1) พฤติกรรมการไหลของ freeze dried PPP มีลักษณะแบบ Bingham plastic fluid ซึ่งจะเกิดการไหลได้ต้องได้รับความเค้นเฉือนมากกว่า yield stress และเมื่อเกิดการไหลแล้ว ความหนืดของสารละลายจะไม่ขึ้นกับอัตราเฉือน และพบว่า freeze dried PPP มีค่าความหนืดน้อยมากเมื่อเทียบกับ spray dried PPP ที่ 140 °C และ 200 °C ในขณะที่พฤติกรรมการไหลของ spray dried PPP ที่ 140 °C และ 200 °C มีลักษณะแบบ pseudoplastic fluid (Figure 1) นอกจากนี้ค่าความหนืดในทุกตัวอย่างลดลงเมื่อค่า shear rate เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลของ mucilage ที่ทำแห้งวิธี spray drying ที่อุณหภูมิขาเข้าสูงขึ้นจะมีพฤติกรรมการไหลแบบ shear-thinning โดยอุณหภูมิขาเข้าสูงมีผลต่อสถานะของพอลิเมอร์ชีวภาพ (glassy or rubbery state) และทำให้เกิดการสลายตัวเนื่องจากความร้อนของโครงสร้างโมเลกุล (Leon-Martinez et al., 2011) ส่วน spray dried PPP ที่ อุณหภูมิขาเข้า 200 °C มีค่าดัชนีเนื้อสัมผัส (k) สูงสุด (k= 10.483±0.578 Pa.s^n) โดยดัชนีการไหล (n) ของ spray dried PPP มีค่าน้อยกว่าของ freeze dried PPP (Table 4) แสดงให้เห็นว่า spray dried PPP มีพฤติกรรมการไหลแบบ pseudoplastic fluid หรือ shear-thinning ($n<1$) มากกว่า freeze dried PPP จากผลการทดลองสอดคล้องกับผลของ rice flour gels (Meng et al., 2014) และ bovine plasma proteins (Rodriguez Furlán et al., 2010) ที่มีพฤติกรรมการไหลแบบ pseudoplastic fluid

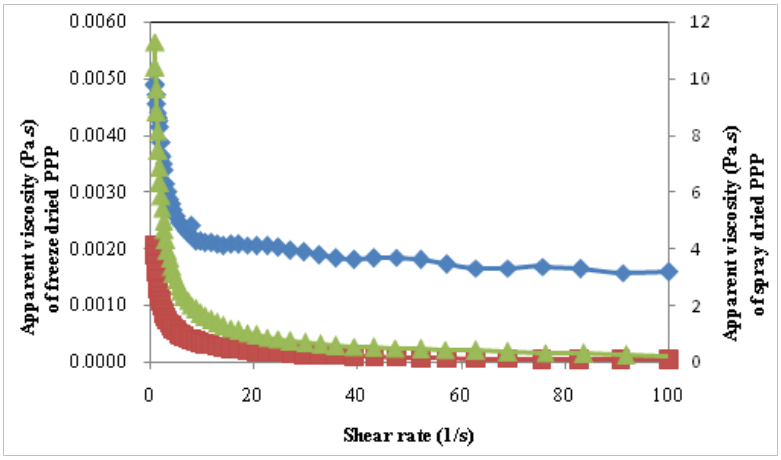


Figure 1 Flow curves of freeze dried PPP (▲) and spray dried PPP at different inlet temperatures: 140 °C (◆) and 200 °C (■).

Table 4 Steady shear rheological properties of porcine plasma protein powder from different drying methods.

Drying method	Flow consistency index, k (Pa.s^n)	Flow behavior index, n	R^2
Freeze drying	0.004±0.001^c	0.792±0.035^a	0.947
Spray drying at 140 °C	4.327±0.119^b	0.128±0.038^b	0.995
Spray drying at 200 °C	10.483±0.578^a	0.131±0.048^b	0.998

Each value was the mean of three replications ± standard deviation.

$^{a, b, c}$ Means in the same row with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

สมบัติทางด้านวิทยากระแสมีความสำคัญต่อการควบคุมคุณภาพ การเก็บรักษา และกระบวนการแปรรูปของอาหาร แสดงถึงความคงตัวและการทำนายลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร (Leon-Martinez et al., 2011) จากการทดสอบ oscillatory stress sweep ที่ความถี่ 1 Hz และนำค่า G' และ G" มาพล็อตกราฟกับ shear stress (ข้อมูลไม่ได้แสดง) จากนั้นเลือก shear stress ที่ 1 Pa ในช่วงของ LVR จากทุกตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบ frequency sweep พบว่า freeze dried PPP (ที่ความเข้มข้น 2%) ไม่สามารถหาช่วง LVR ได้ จึงไม่ได้นำตัวอย่างนี้มาทดสอบ frequency sweep ส่วนทุกตัวอย่างของ spray dried PPP พบว่ามีพฤติกรรมแบบ elastic (G' > G") ตลอดช่วงความถี่ที่ศึกษา พฤติกรรมของ spray dried PPP เป็นแบบเจล และพบว่าค่า G' และ G" ขึ้นอยู่กับความถี่เล็กน้อย (Figure 2) ทุกตัวอย่างของ spray dried PPP มีค่า G' และ G" เพิ่มขึ้นเมื่อความถี่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผลของ rice flour-based batters (Matos et al., 2014)

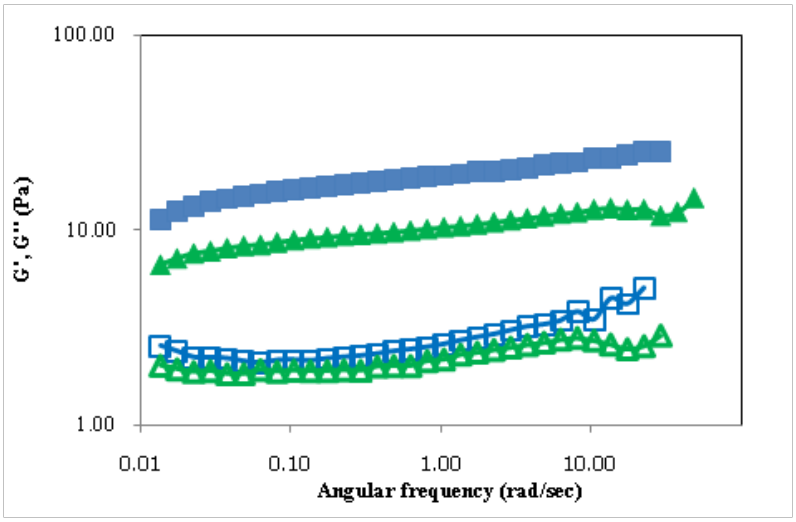


Figure 2 Mechanical spectra showing the angular frequency dependence of storage modulus (G', solid lines) and loss modulus (G", dash lines) of spray dried at 140 °C (▲) and 200 °C (■).

1.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

1.2.1 สีของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปร

ค่าความสว่าง (L^*) ความเป็นสีแดง (a^*) และความเป็นสีเหลือง (b^*) ของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรเมื่อใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานต่างๆ ที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying แสดงดัง Table 5 ซึ่งพบว่าค่า L^*, a^* และ b^* ของพลาสมาโปรตีนที่มีการเติมด้วยสารรูติน กรดคาเฟอิก และเจนิพิน แตกต่างกัน โดยพลาสมาโปรตีนที่ดัดแปรด้วยสารรูตินที่ความเข้มข้นระดับต่างกันจะให้ค่า L^* และ a^* ไม่แตกต่างกัน และค่า L^* ที่ได้ไม่แตกต่างกับพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) ($p > 0.05$) การใช้สารเชื่อมประสานรูตินให้ค่า a^* สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาโปรตีนดัดแปร (cross-linking agent) และไม่ดัดแปร (native และ control) ส่วนค่า b^* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อระดับความเข้มข้นของรูตินเพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าค่า b^* มีค่าสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสมาโปรตีนดัดแปร (cross-linking agent) และไม่ดัดแปร (native และ control) สอดคล้องกับลักษณะปรากฏของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยสารรูตินจะมีสีเหลือง เนื่องจากสารรูตินเป็นสารที่มีสีเหลือง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Friesen et al. (2015) ที่พบว่าฟิล์ม SPI ที่เติมรูตินมีลักษณะปรากฏเป็นสีเหลือง

เมื่อเทียบพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยกรดคาเฟอิกกับพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) พบว่ามีค่า L^* ลดลง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าการเติมกรดคาเฟอิกจะมีค่า L^* ต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเชื่อมประสานชนิดอื่นๆ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดคาเฟอิก จะให้ค่า L^*, a^* และ b^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งค่า a^* และ b^* สอดคล้องกับฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่มีการเติมกรดคาเฟอิก (Nuthong et al., 2009b) แต่งานวิจัยดังกล่าวพบว่ามีค่า L^* ลดลงเมื่อปริมาณความเข้มข้นของกรดคาเฟอิกสูงขึ้น ความแตกต่างเกิดจากอุณหภูมิของการเตรียมสารละลายฟิล์มที่สูงถึง 70 °C จึงส่งผลต่อค่าสี แต่ในงานวิจัยนี้เตรียมพลาสมาโปรตีนดัดแปรที่อุณหภูมิต่ำกว่า (50 °C)

พลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยสารเจนิพินที่ความเข้มข้นระดับต่างกันมีค่า L^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และมีค่าไม่แตกต่างจาก native และ control ส่วนค่า a^* และ b^* มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเจนิพินมากขึ้น โดยพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยสารเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน พบว่าค่า L^*, a^* และ b^* มีค่าต่ำที่สุด นอกจากนั้นค่า a^* และ b^* ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน มีค่าแตกต่างจากพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ค่า b^* ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเจนิพินเพิ่มขึ้นเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างสารเจนิพินกับโปรตีน (Gonzalez et al., 2011)

Table 5 Color parameters (L^*, a^* and b^*) of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations.

Cross-linking agents (w/w of protein)	Color		
	L^*	a^*	b^*
*Native	62.99 ± 2.81^{c}	1.07 ± 0.06^{d}	9.97 ± 0.42^{b}
*Control	65.56 ± 5.70^{c}	0.76 ±0.65^{cd}	10.29 ± 2.17^{b}
Rutin 0.6%	59.50 ± 2.70^{c}	2.04 ± 0.26^{e}	36.18 ± 0.58^{c}
Rutin 0.8%	58.53 ± 3.60^{c}	2.11 ± 0.92^{e}	40.45 ± 0.83^{d}
Rutin 1%	60.92 ± 1.33^{c}	2.36 ± 0.64^{e}	47.39 ± 1.31^{e}
Caffeic acid 1%	39.28 ± 2.18^{a}	-0.10 ± 0.01^{abc}	10.21 ± 0.30^{b}
Caffeic acid 2%	42.25 ± 6.71^{a}	-0.11 ± 0.30^{abc}	11.06 ± 0.95^{b}
Caffeic acid 3%	44.53 ± 3.04^{ab}	0.33 ± 0.52^{bcd}	11.27 ± 1.16^{b}
Genipin 0.15%	64.47 ± 2.16^{c}	0.86 ± 0.19^{cd}	10.95 ± 1.05^{b}
Genipin 0.35%	55.76 ± 8.35^{c}	-0.56 ± 0.74^{ab}	9.11 ± 1.42^{ab}
Genipin 0.50%	55.16 ± 14.91^{bc}	-0.87 ± 0.50^{a}	7.89 ± 1.10^{a}

* Without addition of cross-linking agents.

Each value was the mean of three replications ± standard deviation. Means in the same column with different superscripts were significantly different ($p < 0.05$).

1.2.2 ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานพลาสมาโปรตีน

จากการศึกษาพบว่าการเติมสารเชื่อมประสานโดยใช้รูตินทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino group) ของพลาสมาโปรตีนมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีนในชุดควบคุม (control) และพลาสมาโปรตีน native ที่ไม่ได้เติมสารเชื่อมประสาน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (Table 6) และปริมาณกรดอะมิโนอิสระมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้กรดคาเฟอิกและเจนิพิน แต่พบว่าระดับความเข้มข้นของรูตินที่ใช้ไม่มีผลต่อค่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ($p > 0.05$) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระแสดงถึงปริมาณอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ในโปรตีน ถ้ามีเหลืออยู่ในปริมาณที่น้อยแสดงถึงเกิดการเชื่อมประสานหรือดัดแปรโมเลกุลของโปรตีนได้มาก (Carvalho and Gross, 2004; Prodpran et al., 2012) การเชื่อมประสานระหว่างโมเลกุลโปรตีนด้วยสารเชื่อมประสานหรือสารประกอบฟีนอลิกจากพืชเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ของโปรตีนและหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของสารประกอบฟีนอลิกจากพืช (Prodpran et al., 2012) ส่วนปริมาณหมู่ซัลไฮดริล (sulfydryl group, SH) มีแนวโน้มลดลง เมื่อระดับความเข้มข้นของรูตินเพิ่มขึ้น ซึ่งไม่แตกต่างจากพลาสมาโปรตีนในชุดควบคุม (control) และพลาสมาโปรตีน native (Table 6) สารรูตินที่ใช้ในการศึกษาอาจทำปฏิกิริยากับพลาสมาโปรตีนได้ดีโดยเฉพาะที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนอิสระของลิวซีน จึงทำให้กรดอะมิโนอิสระของลิวซีนลดลง นอกจากนั้นแล้วการดัดแปรพลาสมาโปรตีนด้วยรูติน กรดคาเฟอิก หรือเจนิพิน อาจเกิดพันธะไฮโดรโฟบิกระหว่างหมู่อะลิฟาติก (aliphatic) หรือหมู่วงแหวน (aromatic group) ของกรดอะมิโนในโครงสร้างของพลาสมาโปรตีน เช่น กรดอะมิโนโพรลีน (proline) ซึ่งพบในพลาสมาโปรตีน (Ramos-Clamont et al., 2003) และหมู่วงแหวนของสารเชื่อมประสาน (Figure 3) โดยสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่และจำนวนวงแหวนมากจะสามารถสร้างพันธะไฮโดรโฟบิกกับโมเลกุลของโปรตีนได้ดีกว่าสารประกอบพอลิฟีนอลที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็ก (Charton et al., 2002; Prigent

et al., 2003) ซึ่งจาก Figure 3 จะเห็นได้ว่ารูตินมีจำนวนวงแหวนมากที่สุด และยังพบว่าการดัดแปรพลาสมาโปตีนด้วยรูตินมีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงมากกว่าการใช้เจนิพินและกรดคาเฟอิกที่มีจำนวนวงแหวนน้อยกว่า (Table 6)

พลาสมาโปรตีนที่มีการเติมสารเชื่อมประสานโดยใช้กรดคาเฟอิกที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระไม่ต่างจากพลาสมาโปรตีนในชุดควบคุม (control) และพลาสมาโปรตีน native ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณหมู่ซัลไฮดริลพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของกรดคาเฟอิกเพิ่มขึ้นปริมาณหมู่ซัลไฮดริลมีแนวโน้มลดลง โดยที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีนจะมีค่าปริมาณหมู่ซัลไฮดริลลดลงมากที่สุดและมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้สารเชื่อมประสานรูตินและเจนิพิน โดยที่มีการลดลงมากถึง 63% เมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีนในชุดควบคุม (control) การที่ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของโปรตีนลดลงอาจเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างหมู่ซัลไฮดริล (-SH) และหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของสารประกอบฟีนอลิกจากพืช และการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ซัลไฮดริลได้เป็นพันธะไดซัลไฟด์ (disulfilde bond) (Prodpran et al., 2012) โดยที่กรดคาเฟอิกอาจจะเข้าทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ของพลาสมาโปรตีนได้ดีกว่าการใช้สารรูตินและเจนิพิน เนื่องจากในกรดอะมิโนซีสเทอีนมีหมู่ SH ในโมเลกุล และกรดอะมิโนซิสเทอีนเป็นกรดอะมิโนที่พบในเลือดสุกร (Ramos-Clamont et al., 2003) งานวิจัยของ Rawel et al. (2002a) พบว่า soy glycinin ที่เติมกรดคาเฟอิก มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริลลดลงเมื่อเทียบกับ soy glycinin ที่ไม่ได้เติม ซึ่งการลดลงเนื่องมาจากกรดคาเฟอิกเกิดปฏิกิริยากับโซ่ข้าง (side chains) ของ soy glycinin นอกจากนั้นแล้วการใช้กรดคาเฟอิกในการดัดแปรพลาสมาโปรตีนอาจเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างโปรตีนของพลาสมาโปรตีนและกรดคาเฟอิก ผ่านสารควิโนน (quinone) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดคาเฟอิก ทำให้กรดคาเฟอิกมีความสามารถในการรับอิเล็กตรอนจากโซ่ข้างของกรดอะมิโนบางชนิดที่สามารถให้อิเล็กตรอน (Rawel et al., 2002a, 2002b; Prodpran et al., 2012) กรดอะมิโนที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนได้ ได้แก่ ไลซีน (lysine) ซิสเทอีน (cysteine) และ ทริปโตแฟน (tryptophan) (Rawel et al., 2002a, 2002b) ซึ่งสังเกตได้จากสีของพลาสมาโปรตีนในระหว่างการดัดแปรด้วยกรดคาเฟอิกที่มีสีเปลี่ยนไปคือมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นในระหว่างการดัดแปรซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

พลาสมาโปรตีนที่มีการเติมสารเชื่อมประสานโดยใช้เจนิพิน เมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริลจะลดลงมากที่สุด (Table 6) โดยความเข้มข้นของเจนิพินร้อยละ 0.50 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริลลดลงมากที่สุด และแตกต่างจากพลาสมาโปรตีนในชุดควบคุม (control) และพลาสมาโปรตีน native อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) การลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริลแสดงถึงมีการเชื่อมประสานเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในฟิล์มเจลาตินจากงานวิจัยของ Bigi et al. (2002) และในฟิล์ม SPI จากงานวิจัยของ Gonzalez et al. (2011) โดยเมื่อความเข้มข้นของเจนิพินเพิ่มขึ้น จะมีประสิทธิภาพการเชื่อมประสานดีขึ้น รวมทั้งงานวิจัยของ Yoo et al. (2011) ใช้เจนิพินเป็นสารเชื่อมประสานสำหรับการตรึง (fixation) เยื่อหุ้มหัวใจของวัว (bovine pericardial tissues) พบว่าเจนิพินสามารถเป็นตัวเลือกในการใช้เป็นสารเชื่อมประสานสำหรับ pericardial tissues ได้ โดยพิจารณาสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางกล สมบัติทางชีวเคมี และมีความเป็นพิษน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ glutaraldehyde ซึ่งเป็นสารเคมี โดยที่ความเข้มข้นของเจนิพินเพิ่มขึ้นในช่วง 0.1-0.6% ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนที่เหลืออยู่ (residual amino acid) ได้แก่ glutamic acid, aspartic acid, histidine, tyrosine, methionine, valine, arginine, phenylalanine, isoleucine, leucine และ lysine มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ปริมาณกรดอะมิโนไม่แตกต่างกันระหว่างความเข้มข้นของเจนิพินที่ 0.6%

และ 1.0% ส่วน Strauss and Gibson (2004) พบว่าเมื่ออัตราส่วนของสารประกอบฟีนอลิกต่อกรดอะมิโนอิสระในโมเลกุลโปรตีนเจลาตินเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการเชื่อมประสานโปรตีนมากขึ้น จึงมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่ลดลง ส่งผลให้สารละลายโปรตีนมีลักษณะเป็นเจลมากขึ้น

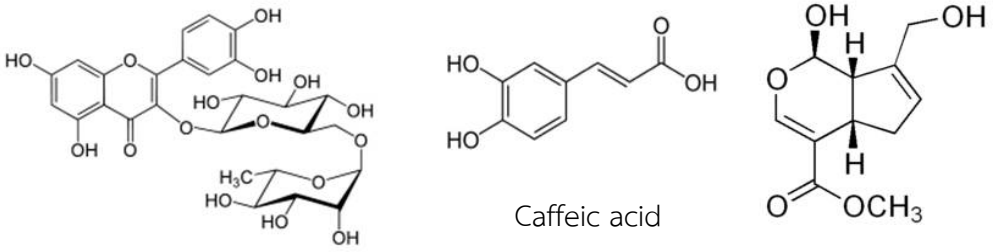
ผลของชนิดสารเชื่อมประสานต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริลของพลาสมาโปรตีนพบว่าการใช้รูตินเป็นสารเชื่อมประสานทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระลดลงมากที่สุด รองลงมาคือการใช้เจนิพินและกรดคาเฟอิก ตามลำดับ โดยการใช้กรดคาเฟอิกเป็นสารเชื่อมประสานทำให้มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลลดลงมากที่สุด รองลงมาคือการใช้เจนิพินและรูติน ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ทั้งนี้ปริมาณหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของโมเลกุลรูติน ($C_{27}H_{30}O_{16}$) มีปริมาณหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าโมเลกุลของเจนิพิน ($C_{11}H_{14}O_5$) และโมเลกุลของกรดคาเฟอิก ($C_9H_8O_4$) (Figure 3) โดยรูตินมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ที่สุด รองลงมาคือเจนิพินและกรดคาเฟอิก ตามลำดับ ถึงแม้ว่ารูตินจะมีโมเลกุลที่ใหญ่มากกว่าแต่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าจึงเกิดอันตรกิริยากับพลาสมาโปรตีนได้มากกว่าเมื่อพิจารณาจากค่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ลดลงมากที่สุด จากงานวิจัยของ Rawel et al. (2002a) ได้รายงานว่าความว่องไวของการเกิดปฏิกิริยาของโมเลกุลโปรตีนกับสารประกอบฟีนอลิกจะเกิดได้สูงเมื่อสารประกอบฟีนอลิกมีหมู่ไฮดรอกซิลในปริมาณมาก นอกจากนั้นยังขึ้นอยู่กับตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลในโครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกด้วย

Table 6 Free-amino group and sulfhydryl group contents of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations.

Cross-linking agents (w/w of protein)	Free-amino group (mM)	Sulfhydryl group ($\times 10^{-5}$ mole)
*Native	1.61 ± 0.06^{d}	5.20 ± 1.17^{de}
*Control	1.42 ± 0.08^{cd}	5.11 ± 1.44^{cde}
Rutin 0.6%	0.66 ± 0.11^{a}	5.47 ± 0.56^{e}
Rutin 0.8%	0.67 ± 0.12^{a}	3.33 ± 1.11^{abcde}
Rutin 1%	0.80 ± 0.18^{a}	3.46 ± 0.27^{abcde}
Caffeic acid 1%	1.48 ± 0.10^{d}	4.47 ± 2.89^{bcde}
Caffeic acid 2%	1.43 ± 0.07^{cd}	2.90 ± 0.63^{abc}
Caffeic acid 3%	1.54 ± 0.01^{d}	1.91 ± 0.33^{a}
Genipin 0.15%	1.42 ± 0.07^{cd}	4.17 ± 1.44^{bcde}
Genipin 0.35%	1.27 ± 0.16^{bc}	3.18 ± 0.70^{abcde}
Genipin 0.50%	1.23 ± 0.07^{b}	2.45 ± 0.41^{ab}

* Without addition of cross-linking agents.

Each value was the mean of three replications ± standard deviation. Means in the same column with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$).



Rutin

Genipin

Figure 3 The structure of cross-linking agents used for cross-linking plasma protein.

1.2.3 FT-IR spectra ของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปร

จากการศึกษาพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรพบพีคที่ตำแหน่งคล้ายๆ กัน เช่น ที่ตำแหน่ง 3278-3280 cm^{-1}, 1637-1640 cm^{-1}, 1525-1541 cm^{-1} และ 1230-1235 cm^{-1} (Figure 4) ซึ่งเป็นพีคที่พบทั่วไปในโปรตีน โดยตำแหน่งดังกล่าวแสดงสเปคตรัมของ amide-A และ free water, amide-I, amide-II และ amide-III ตามลำดับ (Bergo and Sobral, 2007; Schmidt et al., 2005; Muyonga et al., 2004) สเปคตรัมของ amide-I แสดงการยืด-หด (stretching) ของ C=O ของ amide ในโปรตีน สเปคตรัมของ amide-II แสดงการสั่นแบบการงอ (bending vibration) ของ N-H groups และการสั่นแบบการยืด-หด (stretching vibration) ของ C-N groups ส่วนสเปคตรัมของ amide-III ที่ตำแหน่ง 1237 cm^{-1} แสดงการสั่นในระนาบของ C-N และ N-H groups ของพันธะ amide หรือการสั่นของ CH_2 groups ของไกลซีน (glycine) ซึ่งไกลซีนเป็นกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น (nonessential) ที่พบในเลือดสุกร (Ramos-Clamont et al., 2003) สเปคตรัมของ amide-A แสดง NH-stretching coupled ด้วยพันธะไฮโดรเจน (Tonhnuanchan et al., 2012, 2013) จากการทดลองพบพีคของสเปคตรัมของ polyphenolic (Figure 4) ในรูป phenolic ring ที่แสดงการยืด-หด (stretching) ของ –OH ที่ตำแหน่ง wavenumber 3200-3550 cm^{-1} และการงอในระนาบ (plane bending) ของ –OH ที่ตำแหน่ง wavenumber 1365 cm^{-1} ส่วน aromatic ring แสดงการยืด-หด (stretching) ของ C=C ที่ตำแหน่ง wavenumber 1450-1600 cm^{-1} และแสดงการสั่นแบบยืด-หด (stretching vibrations) ของ C-O/C-C ที่ตำแหน่ง wavenumber 1200-1300 cm^{-1} (Bozic et al., 2012; Xu et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 1637 ± 3.0 cm^{-1} แสดงโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนแบบ β-sheet ส่วนที่ตำแหน่ง wavenumber 1641 ± 2.0 cm^{-1} แสดงโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนแบบ 3_{10}-helix และที่ตำแหน่ง wavenumber 1645 ± 4.0 cm^{-1} แสดงโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนแบบ random (Saguer et al., 2012) เช่นเดียวกับการพบสเปคตรัมที่มีลักษณะคล้ายกันที่ตำแหน่ง wavenumber 1630 cm^{-1} และ 1545 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคของ amide-I และ amide-II ในฟิล์ม bigeye snapper และ brownstripe red snapper skin gelatin (Jongjareonrak et al., 2008)

เมื่อนำสารเชื่อมประสานแต่ละชนิดมาวัดสเปคตรัมได้ผลดัง Figure 5 ซึ่งพบพีคของสารรูตินที่ตำแหน่ง 879 cm^{-1} สอดคล้องกับพีคที่ตำแหน่ง 881 cm^{-1} ในผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูติน (Figure 4) แสดงว่ามีรูตินอยู่ในโครงสร้างของพลาสมาโปรตีน และมีพีคใหม่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง wavenumber 1434 cm^{-1} ของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูติน ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยเจนิพินพบพีคใหม่เกิดขึ้นเช่นกัน แต่เกิดขึ้นที่ตำแหน่ง wavenumber 853 cm^{-1} และที่ตำแหน่ง wavenumber 1072 cm^{-1} มี amplitude ที่เด่นชัดขึ้นเมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) ซึ่งพีคใหม่และการ

เปลี่ยนแปลงของพีคที่เกิดขึ้นยืนยันการเกิดอันตรกิริยาของพลาสมาโปรตีนและสารเชื่อมประสาน สอดคล้องกับผลการตรวจสอบปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เหลืออยู่สูงในผงพลาสมาโปรตีนดัดแปร ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยกรดคาเฟอิกไม่พบพีคใหม่เกิดขึ้นเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nuthong et al. (2009a) ซึ่งไม่พบพีคใหม่เกิดขึ้น แต่พบว่ากรดคาเฟอิกเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของโปรตีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพีค amide-I โดยในงานวิจัยนี้พบการเปลี่ยนแปลงของพีค amide-I จากที่ตำแหน่ง 1640 cm^{-1} เป็น 1638 cm^{-1} (Figure 4)

โปรตีนในพลาสมาของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian plasma) ประกอบด้วย อัลบูมิน (albumin) ร้อยละ 60 โกลบูลิน (globulins) ร้อยละ 36 โดยส่วนใหญ่เป็น immunoglobulins และไฟบริโนเจน (fibrinogen) ร้อยละ 4 (Saguer et al., 2008; 2012) โดย Saguer et al. (2008) ศึกษาโครงสร้างของโปรตีนจากการวิเคราะห์ FT-IR ของสารละลายพลาสมา อัลบูมิน และโกลบูลิน (6% protein in D_2O) ที่ pH ของสารละลาย 7.5 พบพีคที่ตำแหน่งของ wavenumber 1638 cm^{-1} เป็นพีคที่โดดเด่นในสเปคตรัมของ immunoglobulins และพบในสเปคตรัมของพลาสมาเช่นกัน นอกจากนั้นยังได้รายงานว่าที่ wavenumber 1638 cm^{-1} แสดงอันตรกิริยาภายในโมเลกุล (intermolecular) ที่มีโครงสร้างแบบ antiparallel β-sheet ซึ่งเป็นพีคที่ใกล้เคียงกับในการทดลองนี้ซึ่งพบที่ 1637-1640 cm^{-1}

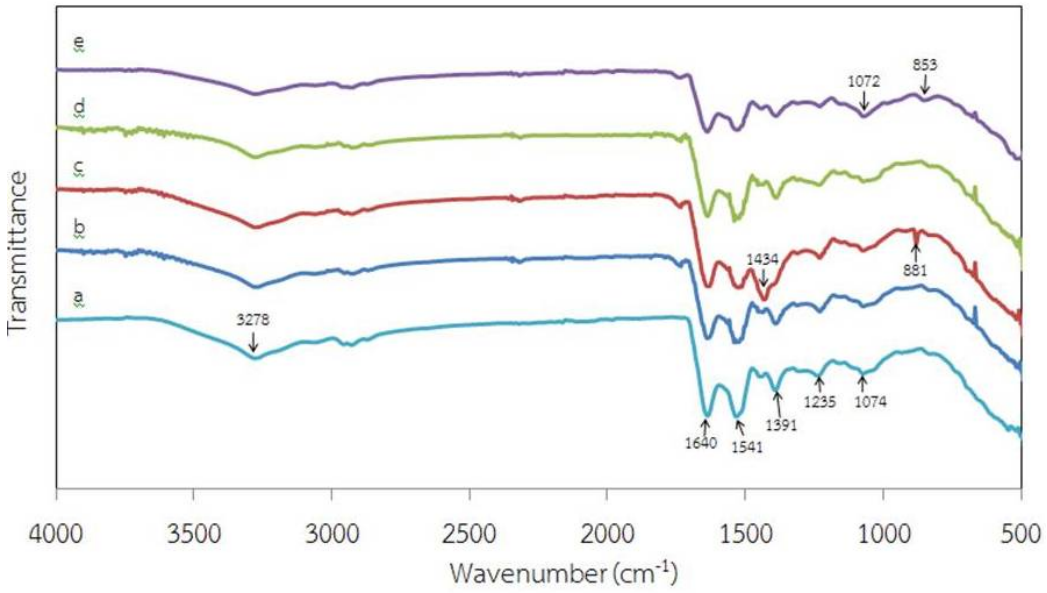


Figure 4 FT-IR spectra of porcine plasma protein powder without and with cross-linking agent: a, native; b, control; c, rutin 0.6%; d, caffeic acid 3%; e, genipin 0.50%.

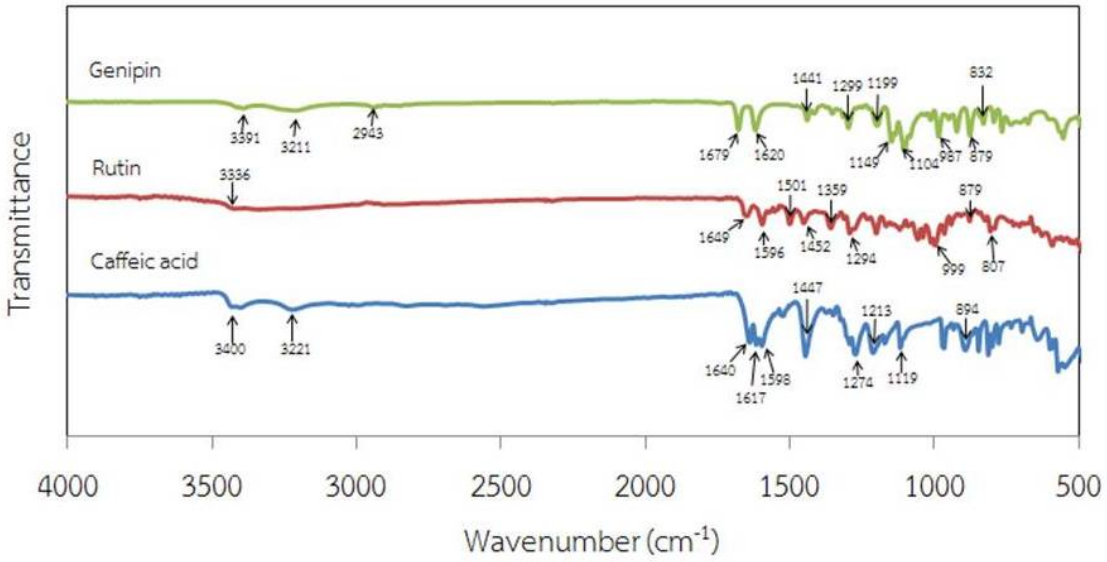


Figure 5 FT-IR spectra of cross-linking agents such as genipin, rutin and caffeic acid.

1.2.4 รูปแบบโปรตีนของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปร

เมื่อนำผงพลาสมาโปรตีน native มาตรวจสอบรูปแบบโปรตีนพบแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 15, 24, 40, 48, 56, 66, 75, 125, 200 และ 250 kDa (Figure 6) คล้ายกับแถบโปรตีนของผงพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (ไม่ได้แสดงรูป) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปรับ pH ของพลาสมาโปรตีนไม่ทำให้รูปแบบโปรตีนเปลี่ยนไป พลาสมาโปรตีนมีรูปแบบโปรตีนสอดคล้องกับแถบโปรตีนที่พบในงานวิจัยของ Lee and Song (2014) ที่พบแถบโปรตีนของพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรมีน้ำหนักโมเลกุล 28, 56, 66 และ 81 kDa และงานวิจัยของ Nuthong et al. (2009a) ที่พบว่าพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรประกอบด้วยอัลบูมินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 kDa ส่วน แอลฟา-โกลบูลิน (α- globulin) มีน้ำหนักโมเลกุล 56 kDa และเบต้า-โกลบูลิน (β-globulin) มีน้ำหนักโมเลกุล 48 kDa

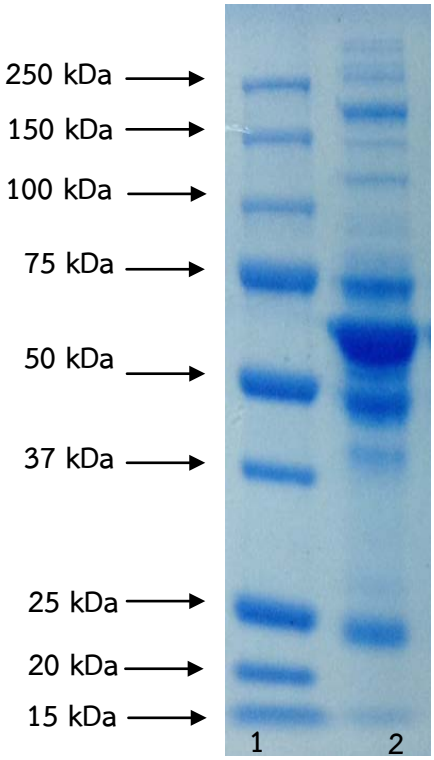


Figure 6 SDS-PAGE profiles of standard protein marker (lane 1) and native porcine plasma protein powder (lane 2).

รูปแบบโปรตีนของผงพลาสมาโปรตีนที่มีการเติมสารเชื่อมประสานแต่ละชนิดและที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน (Figure 7) สอดคล้องกับผลของการวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะมิโนอิสระและหมู่ซัลไฮดริล โดยพบแถบของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 48, 56 และ 66 kDa มีความเข้มของแถบลดลงอย่างเห็นได้ชัด การลดลงของแถบโปรตีนแสดงถึงการเกิดการเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีนกับสารเชื่อมประสาน โดยเฉพาะการใช้รูตินในการดัดแปรพลาสมาโปรตีนในทุกระดับของความเข้มข้น (lane 2-4) พบว่ามีการลดลงของแถบโปรตีนมากที่สุด ส่วนแถบโปรตีนของพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยกรดคาเฟอิก (lane 5-7) และเจนิพิน (lane 8-10) มีลักษณะคล้ายกันและพบแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 และ 75 kDa ซึ่งอาจเป็นผลจากการเกิดเปปไทด์ขนาดเล็กจากการเชื่อมประสานกัน (Fort et al., 2007) นอกจากนั้นการใช้สารเชื่อมประสานกรดคาเฟอิกและเจนิพินยังทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน (aggregated protein) โปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้นจนไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gerrard and Brown (2002) และ Saguer et al. (2007) ที่พบการเกิดพอลิเมอร์หรือการรวมตัวของโปรตีนทำให้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นจนไม่สามารถผ่านเจลเข้าไปแยกได้ ทำให้เห็นแถบของโปรตีนที่ค้างอยู่บน stacking gel ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินพบแถบของโปรตีนเกิดการจางหายหรือไม่ปรากฏ แสดงถึงการเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งมีผลจากการเกิดพอลิเมอไรเซชันของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่ละลายน้ำ จึงไม่ปรากฏแถบ (Gan et al., 2008) สวนงานวิจัยของ Fort et al. (2007) ศึกษา SDS-PAGE profile ของเจลพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรที่เติม microbial transglutaminase (MTGase) พบแถบของโปรตีน 4 bands ที่มีน้ำหนักโมเลกุล > 220, 139, 88 และ 50 kDa มีการจางหายไปอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเจลพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (without MTGase) ซึ่งอาจเกิดจากการเชื่อมประสานของโมเลกุลโปรตีน และการเกิดของพอลิเมอร์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง > 220 kDa เป็นการยืนยันว่าเกิดการเชื่อมประสานพลาสมาโปรตีนกับ MTGase เช่นเดียวกับงานวิจัยของ

Nuthong et al. (2009a) พบว่ารูปแบบโปรตีนของฟิล์มพลาสมาโปรตีนที่เติมกรดคาเฟอิกที่ระดับความเข้มข้น 3% ความเข้มของแถบโปรตีนอัลบูมิน (66 KDa) และแอลฟา-, เบต้า-โกลบูลิน (56 และ 48 KDa) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มชุดควบคุม (control) และพบโปรตีนเกิดการรวมตัวกันโดยพบแถบอยู่บน stacking gel การเชื่อมประสานฟิล์มพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรด้วยกรดคาเฟอิกเป็นพันธะไดซัลไฟด์และพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ (Nuthong et al., 2009a)

จากผลของการดัดแปรพลาสมาโปรตีนด้วยสารรูติน กรดคาเฟอิก และเจนิพิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำแห้งด้วยวิธี freeze drying จึงเลือกรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน กรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน และเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานดีที่สุด โดยพิจารณาจากค่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระของพลาสมาโปรตีน ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของพลาสมาโปรตีน FT-IR และรูปแบบโปรตีนจาก SDS-PAGE เพื่อนำมาทำการดัดแปรพลาสมาโปรตีนและทำแห้งด้วยวิธี spray drying เพื่อเปรียบเทียบผลของพลาสมาโปรตีนดัดแปรที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying

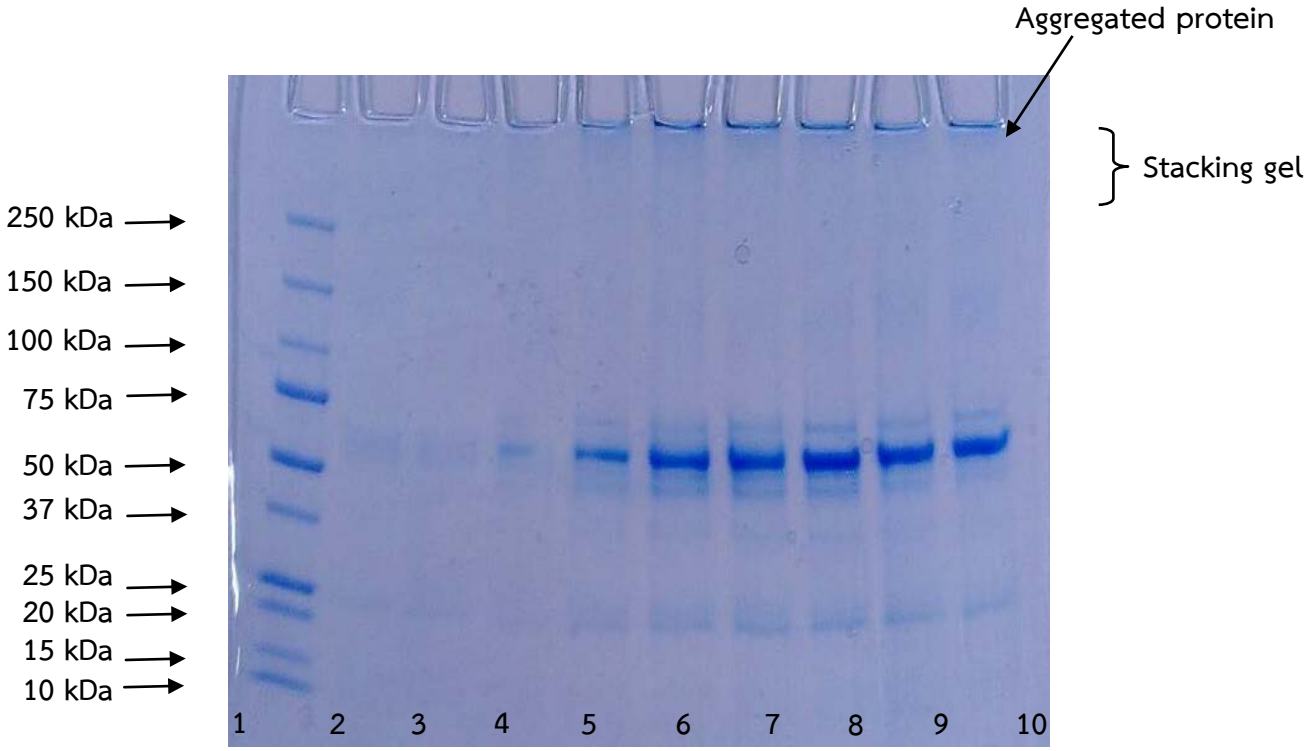


Figure 7 SDS-PAGE profiles of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations. Lane 1: standard protein marker; lane 2: rutin 0.6%; lane 3: rutin 0.8%; lane 4: rutin 1%; lane 5: caffeic acid 1%; lane 6: caffeic acid 2%; lane 7: caffeic acid 3%; lane 8: genipin 0.15%; lane 9: genipin 0.35%; lane 10: genipin 0.50%.

1.2.5 สมบัติทางความร้อนของผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีน

สมบัติทางความร้อนของพลาสมาโปรตีนศึกษาอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 35°C ถึง 200°C พบว่าทั้งผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรมีค่า T_{onset} , T_D และ T_{end} อยู่ในช่วง 164.61-173.50°C, 167.45-187.04°C และ 167.46-196.93°C ตามลำดับ (Table 7) ซึ่งอุณหภูมิของค่า T_D (denaturation temperature) คือการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของโปรตีนเนื่องจากการเสียสภาพธรรมชาติ ส่วนค่า ΔT คือช่วงอุณหภูมิของพีค T_D จากการศึกษางานวิจัยโปรตีนพบว่าโปรตีนของผง camelina glutelin มีค่าอยู่ในช่วง 131-141°C ในขณะที่ globulin fraction พบที่ 115-140°C (Li et al., 2015) ผงของโปรตีน lentil protein isolates (LPIs) มีค่า T_D อยู่ในช่วง 118-123 °C (Joshi et al., 2011) และผงแห้งของโปรตีน chickpea protein concentrate (CPCs) พบว่ามีค่า T_D อยู่ในช่วง 127-135°C (Ghribi et al., 2015) พีคของ T_D สะท้อนให้เห็นถึงการถูกทำลาย (disruption) ของเฟสโมเลกุลของตัวอย่างในระหว่างการให้ความร้อนโดยโครงสร้างของตัวอย่างจะค่อยๆ ถูกทำลาย ซึ่งอาจเกิดจากการสลายตัว/แตกออกของพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลที่ทำหน้าที่ในการเป็น polymeric chain (alpha-helix, beta-structure) (Nuthong et al., 2009a) จากการศึกษาพบว่าตัวอย่างผง control PPP และตัวอย่างผง native PPP มีค่า T_D และ ΔT ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งๆ ที่ตัวอย่างผง control PPP มีการปรับ pH และการให้ความร้อน ซึ่งน่าจะทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ไม่แข็งแรง (weak bond) ถูกทำลายและให้มีค่า T_D ลดลง แสดงว่ากระบวนการดังกล่าวไม่กระทบต่อสมบัติทางความร้อนของผง สอดคล้องกับงานวิจัยที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในฟิล์มพลาสมาโปรตีนของ Nuthong et al. (2009a)

จากการศึกษาการเชื่อมประสานพลาสมาโปรตีนด้วยสารเจนิพินที่ความเข้มข้น 0.35% และ 0.50% พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (transition temperature) ที่สูงขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของค่า T_D และค่า ΔT เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเชื่อมประสานชนิดอื่น ที่ไม่พบความแตกต่างจาก unmodified PPP แสดงว่าการเชื่อมประสานโมเลกุลของโปรตีนด้วยสารเจนิพิน ทำให้เพิ่มความเสถียรทางความร้อน (thermal stability) ส่วนการใช้กรดคาเฟอิกและรูตินในการเชื่อมประสานโมเลกุลของพลาสมาโปรตีน พบว่าค่า T_D ไม่ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ unmodified PPP นอกจากนี้การใช้สารรูตินจะให้ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระลดลงมากที่สุด (Table 6) รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของมวลโมเลกุลที่พบจากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE (Figure 7) ตามที่ได้กล่าวไว้แล้ว ถึงแม้ว่าการใช้สารรูตินเป็นสารเชื่อมประสานจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่า T_D เมื่อเปรียบเทียบกับ unmodified PPP ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Carvalho and Grosso (2004) ที่ศึกษาการเชื่อมประสานฟิล์มเจลาตินด้วยเอนไซม์ transglutaminase อย่างไรก็ตามการใช้รูตินที่ความเข้มข้น 0.8% มีค่า ΔT ที่กว้างและไม่ต่างกับการใช้เจนิพินเป็นสารเชื่อมประสาน (ที่ความเข้มข้น 0.35% และ 0.50%) ในขณะที่การใช้กรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้น 1% มีค่า ΔT ที่มากกว่าการใช้ที่ความเข้มข้น 2% และ 3% ถึงแม้ว่าไม่ได้ทำให้มีค่า T_D สูงขึ้น แต่ทำให้ตัวอย่างมีความสามารถในการทนอุณหภูมิต่อการใช้งานได้ในช่วงที่กว้างขึ้นจึงจะเกิดการเสียสภาพ (denaturation) ทำให้มีความเสถียรทางความร้อนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้รูตินที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.8% และกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 % อาจจะมากเกินไปในการเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีน การใช้ในปริมาณที่มากไม่ได้มีผลทำให้สมบัติทางความร้อนดีขึ้น

Table 7 DSC characteristics for porcine plasma protein powder added with various natural cross-linking agents at different concentrations.

Cross-linking agents	DSC characteristics			
	T_{onset} (°C)	T_D (°C)	T_{end} (°C)	ΔT (°C)
*Native	171.68 ± 6.17^{ab}	172.52 ± 6.33^{ab}	174.80 ± 6.13^{ab}	3.13 ± 0.68^{a}
*Control	169.05 ± 4.42^{ab}	169.78 ± 4.73^{a}	172.41 ± 5.55^{ab}	3.36 ± 1.61^{a}
Rutin 0.6%	166.59 ± 5.37^{ab}	167.45 ± 5.23^{a}	170.79 ± 4.94^{ab}	4.19 ± 2.36^{a}
Rutin 0.8%	168.31 ± 1.60^{ab}	172.23 ± 1.85^{ab}	190.23 ± 6.86^{c}	21.95 ± 8.27^{c}
Rutin 1%	170.73 ± 7.95^{ab}	171.72 ± 8.12^{a}	175.26 ± 8.30^{ab}	4.53 ± 1.69^{a}
Caffeic acid 1%	164.76 ± 2.94^{a}	167.18 ± 3.12^{a}	176.08 ± 2.81^{ab}	11.31 ± 0.61^{b}
Caffeic acid 2%	168.11 ± 1.49^{ab}	168.76 ± 1.86^{a}	174.15 ± 2.68^{ab}	6.04 ± 2.12^{a}
Caffeic acid 3%	164.61 ± 2.06^{a}	165.18 ± 2.42^{a}	167.46 ± 3.29^{a}	2.85 ± 1.28^{a}
Genipin 0.15%	170.85 ± 4.68^{ab}	172.48 ± 5.12^{ab}	178.46 ± 6.98^{b}	7.61 ± 2.86^{ab}
Genipin 0.35%	173.50 ± 6.15^{b}	180.16 ± 2.18^{bc}	196.93 ± 4.51^{c}	23.43 ± 2.41^{c}
Genipin 0.50%	172.42 ± 0.28^{ab}	187.04 ± 11.30^{c}	194.69 ± 9.23^{c}	22.28 ± 9.08^{c}

* Without addition of cross-linking agents.

Each value was the mean of three replications ± standard deviation. Means in the same column with different superscripts were significantly different ($P < 0.05$).

1.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานต่อการเชื่อมประสานโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรโดยทำแห้งด้วยวิธี spray drying

1.3.1 สีของผงโปรตีนพลาสมาดัดแปร

ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานที่ใช้ดัดแปรพลาสมาโปรตีนและผ่านการทำแห้งด้วยวิธี spray drying มีผลต่อค่าสี ได้แก่ ค่าความสว่าง (L^*) ความเป็นสีแดง (a^*) และ ความเป็นสีเหลือง (b^*) ของผงพลาสมาโปรตีน เช่นการใช้รูติน กรดคาเฟอิก และเจนิพิน ทำให้ค่าสี L^* และ a^* ของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรลดลง เมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน มีค่าสี b^* มากที่สุด (Table 8) ในขณะที่พลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน มีค่าสี b^* ไม่แตกต่างจากพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) ซึ่งมีลักษณะปรากฏของผงสีน้ำตาลอมเขียว ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักของปริมาณโปรตีน มีค่าสี b^* น้อยที่สุดค่อนไปทางสีน้ำเงิน สอดคล้องกับลักษณะของผงพลาสมาโปรตีนที่มีสีน้ำเงินอ่อน โดยสีที่เกิดขึ้นเกิดจากการเชื่อมประสานของสารเจนิพินกับพลาสมาโปรตีน (Gonzalez et al., 2011) เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำแห้งพบว่าผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยสารเชื่อมประสาน ทำแห้งด้วยวิธี spray drying จะมีลักษณะผงที่ละเอียดกว่าการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ซึ่งเป็นผงที่มีลักษณะเป็นเกล็ด และผงพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธี spray drying จะให้ค่าสี L^*, a^* และ b^* ต่ำกว่าผงพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ซึ่งการลดลงของค่าสี L^*, a^* และ b^* อาจเป็นผลมาจากกระบวนการทำแห้งด้วยวิธี spray drying เป็นกระบวนการที่ต้องใช้ความร้อนในการระเหยน้ำออกจากตัวอย่างซึ่งใช้อุณหภูมิสูง ทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์

(non-enzymatic browning) จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของตัวอย่างมากกว่าการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ที่ใช้อุณหภูมิในการทำแห้งต่ำกว่า (Sarochwikasit and Tangduangdee, 2011)

Table 8 Color parameters (L^*, a^* and b^*) of spray dried porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations.

Cross-linking agents (w/w of protein)	Color		
	L^*	a^*	b^*
*Native	55.42 ± 0.52^{c}	1.04 ± 0.19^{cd}	7.93 ± 0.42^{b}
*Control	60.74 ± 2.04^{d}	1.31 ± 0.84^{d}	8.76 ± 1.83^{b}
Rutin 0.6%	50.64 ± 0.99^{b}	-1.11 ± 0.37^{b}	27.38 ± 0.40^{c}
Caffeic acid 3%	45.82 ± 2.35^{a}	-0.10 ± 0.52^{bc}	9.01 ± 0.49^{b}
Genipin 0.50%	54.07 ± 0.36^{bc}	-2.41 ± 0.08^{a}	3.52 ± 0.19^{a}

* Without addition of cross-linking agents.

a, b, c, d Different superscripts in the each column were significantly different ($P < 0.05$).

1.3.2 ประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโปรตีนพลาสมา

พลาสมาโปรตีนดัดแปร ทำแห้งด้วยวิธี spray drying จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงกว่า และมีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของพลาสมาโปรตีนน้อยกว่าการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying (Table 9) ยกเว้นการใช้กรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของปริมาณโปรตีน การที่ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของโปรตีนพลาสมาที่ทำแห้งด้วยวิธี spray drying มีค่าน้อยกว่าวิธี freeze drying อาจเป็นเพราะการทำแห้งด้วยวิธี spray drying เป็นกระบวนการทำแห้งที่ใช้ความร้อนสูง (inlet temperature 200 ˚C) ทำให้ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระหว่างการให้ความร้อน ทำให้มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลลดลง (Owusu-Apenten, 2005) นอกจากนั้นความร้อนยังมีผลทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน (aggregation) ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (พันธะ S-S) และ hydrophobic interactions (Guilbert et al., 2002; Perez-Gago and Krochta, 2002) ซึ่งเป็นการเชื่อมประสานที่เกิดทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล ซึ่งเกี่ยวข้องกับปริมาณกรดอะมิโนที่เหลืออยู่ของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) และซีสเทอีน (cysteine) (Park et al., 2002) เมื่อเปรียบเทียบแต่ละวิธีการทำแห้งของแต่ละสารเชื่อมประสานที่ใช้ พบว่า การทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ของพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยที่สุด ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของปริมาณโปรตีน มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลไม่แตกต่างกันและมีค่าน้อยที่สุด ส่วนการทำแห้งด้วยวิธี spray drying พบว่าพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้กรดคาเฟอิกและเจนิพิน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying (Table 8) งานวิจัยของ Owusu-Apenten (2005) พบว่าในนมดิบ (raw milk) มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริล 5.9 μmoles/g เมื่อทำแห้งด้วยวิธี spray drying (inlet temperature 145-150˚C) พบว่ามีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลลดลงเหลือ 3.3 μmoles/g และในงานวิจัยของ Ko et al. (2007) ศึกษาการให้ความร้อน (25-90 ˚C) และเวลาในการให้ความร้อน (10-60 min) แก่โปรตีน tilapia actomyosin พบว่าเมื่อ

อุณหภูมิตั้งแต่ 55 ˚C และให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้น จะทำให้ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของ tilapia actomyosin ลดลง การลดลงของปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่อุณหภูมิ 55 ˚C และ 65 ˚C เกิดจากหมู่ซัลไฮดริลภายในโมเลกุล (intramolecules) เมื่อได้รับความร้อนเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์

Table 9 Free-amino group and sulfhydryl group contents of porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different drying methods.

Cross-linking agents (w/w of protein)	Free-amino group (mM)		Sulfhydryl group ($\times 10^{-5}$ mole)	
	Freeze drying	Spray drying	Freeze drying	Spray drying
*Native	$1.61 \pm 0.06^{a, D}$	$4.13 \pm 0.03^{b, C}$	$5.20 \pm 1.17^{b, B}$	$1.66 \pm 0.25^{a, AB}$
*Control	$1.42 \pm 0.08^{a, C}$	$3.69 \pm 0.07^{b, B}$	$5.11 \pm 1.44^{b, B}$	$1.16 \pm 0.39^{a, A}$
Rutin 0.6%	$0.66 \pm 0.11^{a, A}$	$2.35 \pm 0.03^{b, A}$	$5.47 \pm 0.56^{b, B}$	$2.12 \pm 0.06^{a, BC}$
Caffeic acid 3%	$1.54 \pm 0.01^{a, CD}$	$4.11 \pm 0.20^{b, C}$	$1.91 \pm 0.33^{a, A}$	$2.11 \pm 0.33^{b, BC}$
Genipin 0.50%	$1.23 \pm 0.07^{a, B}$	$3.97 \pm 0.01^{b, C}$	$2.45 \pm 0.41^{a, A}$	$2.71 \pm 0.11^{b, BC}$

* Without addition of cross-linking agents.

$^{a, b}$ Different superscripts in each row were significantly different ($P < 0.05$).

$^{A, B, C}$ Different superscripts in each column were significantly different ($P < 0.05$).

1.3.3 FT-IR spectra ของผงโปรตีนพลาสมาดัดแปร

สเปคตรัมของพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปร ทำแห้งด้วยวิธี spray drying มีลักษณะคล้ายกัน มีพีคที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน ซึ่งพบพีคที่ wavenumber 3280, 2960, 2930, 2870, 1639, 1534, 1394, 1234 และ 1077 cm^{-1} (Figure 8) และพบว่าพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูติน กรดคาเฟอิกและเจนิพิน มีการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง wavenumber 1234 cm^{-1} ไป wavenumber ที่น้อยกว่า 1234 cm^{-1} เล็กน้อย พลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยเจนิพินพบพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 1074 cm^{-1} มี amplitude ของพีคสูงและเด่นชัดที่สุด เมื่อเทียบกับการใช้สารเชื่อมประสานชนิดอื่น และการใช้เจนิพินเป็นสารเชื่อมประสานยังพบพีคที่เกิดขึ้นใหม่เกิดขึ้นคือที่ตำแหน่ง wavenumber 984 และ 849 cm^{-1} (Figure 8) เมื่อเปรียบเทียบสเปคตรัมของพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธี spray drying (Figure 8) และวิธี freeze drying (Figure 4) พบว่าสเปคตรัมของพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธี spray drying จะมี amplitude ของพีคสูงและเด่นชัดมากกว่าการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying นอกจากนั้นการทำแห้งด้วยวิธี spray drying พบพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 2960, 2930 และ 2870 cm^{-1} ที่เด่นชัดกว่า ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการทำแห้งอาจจะมีผลต่อ amplitude ของพีคที่ชัดเจนขึ้น โดยพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 2922-2933 cm^{-1} แสดงโครงสร้างของโปรตีนที่เกิดการยืด-หด (stretching) ของ CH และ $-NH_3^+$ (Muyonga et al., 2004; Tongnuanchan et al., 2013) พีคที่ตำแหน่ง wavenumber 2853.62 และ 2923.58 cm^{-1} แสดงการเกิดการสั่นแบบยืดหด (stretching vibration) ของ methylene แบบ asymmetrical และ symmetrical ของ aliphatic C-H ใน CH_2 และ CH_3 groups (Tongnuanchan et al., 2013)

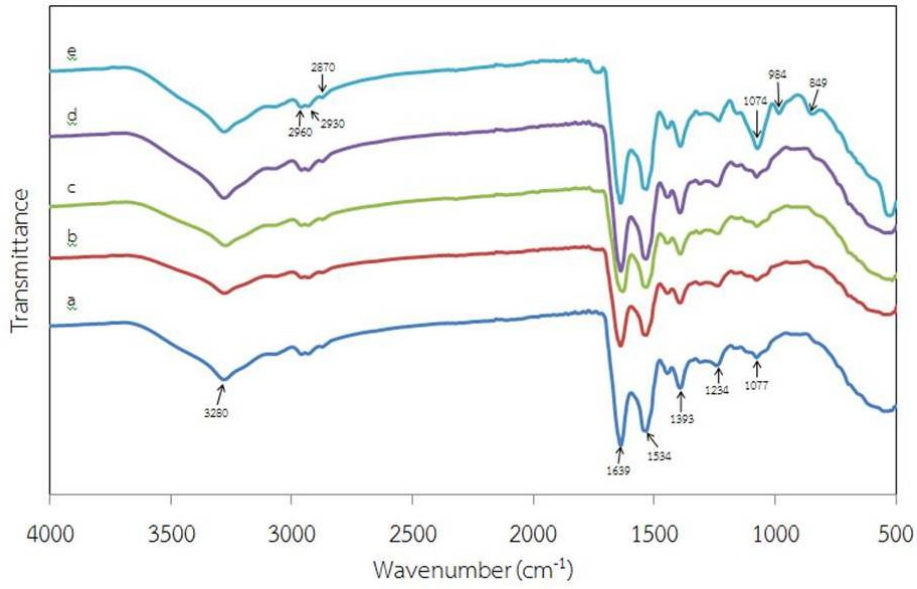


Figure 8 FT-IR spectra of spray dried porcine plasma protein powder without and with cross-linking agents: a, native; b, control; c, rutin 0.6%; d, caffeic acid 3%; e, genipin 0.50%.

1.3.4 รูปแบบโปรตีนของพลาสมาโปรตีนดัดแปร

รูปแบบของโปรตีนของพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) มีแถบโปรตีนคล้ายๆ กัน ที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25, 50, 56, 66, 75 และ 200 kDa (Figure 9) แต่ไม่พบที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 25 kDa ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการทำแห้งด้วยวิธี spray drying เป็นการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ทำให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กเกิดการรวมตัวกันเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นได้ ส่วนพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 กรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.50 ของปริมาณโปรตีน พบแถบของโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 25, 50, 56, 66, 75 และ 200 kDa จางลง และบางแถบของโปรตีนหายไปเมื่อเทียบกับพลาสมาโปรตีน native และพลาสมาโปรตีนชุดควบคุม (control) โดยเฉพาะพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน พบว่าที่น้ำหนักโมเลกุล 50 และ 56 kDa มีการจางหายไปมากที่สุด ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวเป็นตำแหน่งของโปรตีนโกลบูลิน (Nuthong et al., 2009a) และที่น้ำหนักโมเลกุล 66 kDa มีแถบโปรตีนจางลง ซึ่งการลดลงหรือจางลงของแถบโปรตีนแสดงถึงการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีน นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้รูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน และกรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของปริมาณโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกัน (aggregated protein) มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นซึ่งจะสังเกตเห็นแถบของโปรตีนค้างบน stacking gel ผลของแถบโปรตีนที่ได้สอดคล้องกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระของผงพลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน ที่มีค่าน้อยที่สุด (Table 9)

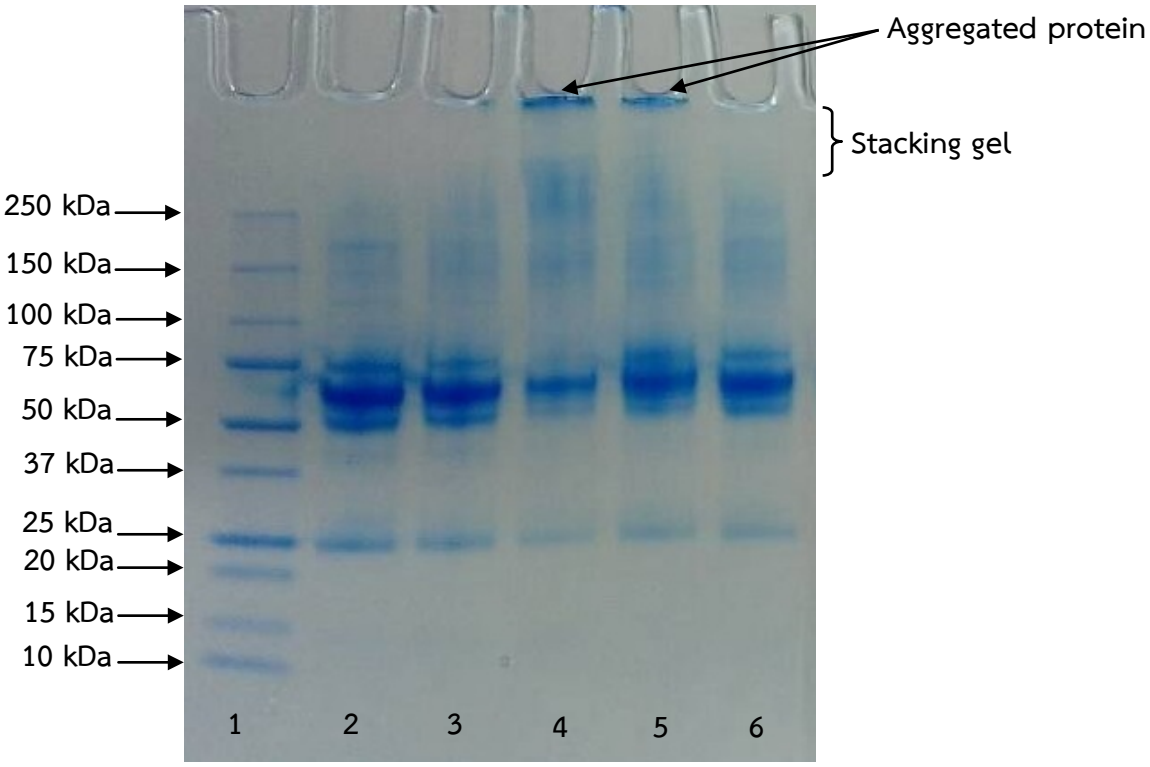


Figure 9 SDS-PAGE profiles of spray dried porcine plasma protein powder added with various cross-linking agents at different concentrations. Lane 1: standard protein marker; lane 2: native; lane 3: the control; lane 4: rutin 0.6%; lane 5: caffeic acid 3%; lane 6: genipin 0.50%.

2. ผลของการเอนแคปซูเลชัน (encapsulation) สารสกัดตามธรรมชาติด้วยพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกร

2.1 สมบัติทางด้านวิทยากระแสของอิมัลชัน

ลักษณะปรากฏของอิมัลชันทุกสูตรมีลักษณะเนื้ออิมัลชันที่เนียนละเอียด โดยอิมัลชันสูตรที่ใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้นและยูคาลิปตัสมีสีขาวนวล มีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหย ส่วนสูตรที่ใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้และพลาสมาโปรตีนดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ยูคาลิปตัส และขมิ้น อิมัลชันมีสีเหลืองนวลและมีกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยเช่นกัน โดยสีของอิมัลชันเป็นผลมาจากสีของน้ำมันหอมระเหยและสีของพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูติน

สมบัติทางด้านวิทยากระแสของอิมัลชันทุกสูตรของพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้น ตะไคร้ และยูคาลิปตัส ที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 4:1 และ 3:1 มีพฤติกรรมการไหลแบบ non-Newtonian โดยมีลักษณะแบบ Bingham plastic fluid (Table 10) สามารถอธิบายได้ตามสมการ $\sigma = \sigma_0 + \eta\gamma^{\circ}$ ซึ่งอิมัลชันจะเกิดการไหลได้ต้องได้รับความเค้นเฉือน (σ) มากกว่าความเค้นคราก (yield stress; σ_0) จึงจะเกิดการไหล และความหนืดของอิมัลชันไม่ขึ้นกับอัตราเฉือน เช่นเดียวกับที่พบว่าสารละลายพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ความเข้มข้น 2 % มีพฤติกรรมการไหลแบบ Bingham plastic fluid (Samsalee and Sothornvit, 2014) ส่วนสารละลายของพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร

(control) ที่ไม่ได้กักเก็บน้ำมันหอมระเหยมีค่า σ_0 มากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ทั้ง 2 อัตราส่วน (4:1 และ 3:1) แสดงว่าการเติมน้ำมันหอมระเหยช่วยลดค่า σ_0 ทำให้อิมัลชันเกิดการไหลดีขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางด้านวิทยากระแสของอิมัลชันอาจเกิดจากน้ำมันหอมระเหยทำหน้าที่เป็นพลาสติไซเซอร์เข้าไปแทรกตัวระหว่างโมเลกุลของพลาสมาทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของพลาสมาโปรตีนเกิดการอ่อนตัวลงจึงไหลได้ง่าย ทำให้ใช้แรงเริ่มต้นเพื่อให้เกิดการไหลลดลง ส่วน η คือสัมประสิทธิ์ความหนืด (coefficient of viscosity) หรือเรียกทั่วไปว่า ความหนืด (viscosity) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อนำพลาสมาโปรตีนดัดแปรมาใช้กักเก็บน้ำมันหอมระเหยพบว่าอิมัลชันของน้ำมันหอมระเหยขมิ้นและน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสทั้งสองอัตราส่วน มีค่า σ_0 ลดลง ส่วนค่า η ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับ control ส่วนอิมัลชันพลาสมาโปรตีนดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มีค่า σ_0 มากกว่าอิมัลชันชนิดอื่น รวมถึงมีค่า η เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 3:1 จะมีค่า σ_0 มากกว่าที่อัตราส่วน 4:1 แสดงให้เห็นว่าการใช้วัสดุห่อหุ้มเป็นพลาสมาโปรตีนดัดแปรร่วมกับการใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต้องได้รับแรงเริ่มต้นในการไหลมากขึ้น เมื่อพิจารณาน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บโดยวัสดุห่อหุ้มต่างกันพบว่าน้ำมันหอมระเหยขมิ้นและน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 4:1 และ 3:1 มีค่า σ_0 และค่า η ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่พบว่าเมื่อวัสดุห่อหุ้มเป็นพลาสมาโปรตีนดัดแปรจะมีค่า σ_0 และ η เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันตะไคร้ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นพวก citral โดย citral สามารถทำปฏิกิริยากับพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรทำให้ได้โมเลกุลขนาดใหญ่ส่งผลให้มีความหนืดเพิ่มขึ้น รวมทั้งองค์ประกอบอื่นๆ ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้เช่น myrcene และ oleific terpene เมื่อมีการสัมผัสอากาศหรือแสงจะทำให้เกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน (Skaria et al., 2012)

Table 10 Rheological parameters of emulsion unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP incorporated with or without an essential oil as a core material.

Emulsion		W: C	Parameters		
Wall (W)	Core (C)		σ_0 (mPa)	η (mPa.s)	R^2
PPP	-	-	30.15 ± 8.47^{bc}	4.78 ± 1.48^{a}	0.9843
	Turmeric oil	4:1	3.26 ± 0.36^{a}	4.59 ± 0.24^{a}	0.9983
		3:1	3.13 ± 0.47^{a}	4.58 ± 0.37^{a}	0.9982
	Lemongrass oil	4:1	8.58 ± 8.55^{a}	4.58 ± 0.77^{a}	0.9954
		3:1	2.13 ± 2.03^{a}	4.55 ± 1.67^{a}	0.9991
	Eucalyptus oil	4:1	1.77 ± 0.70^{a}	4.27 ± 0.40^{a}	0.9985
		3:1	1.85 ± 0.49^{a}	4.46 ± 0.15^{a}	0.9979
Modified PPP	-	-	32.38 ± 1.59^{c}	3.10 ± 0.07^{a}	0.9832
	Turmeric oil	4:1	5.87 ± 1.50^{a}	7.92 ± 0.64^{a}	0.9980
		3:1	5.82 ± 1.75^{a}	8.56 ± 0.79^{a}	0.9983
	Lemongrass oil	4:1	22.21± 11.55^{b}	19.98 ± 12.89^{b}	0.9912
		3:1	45.70 ± 14.89^{d}	16.68 ± 2.33^{b}	0.9873
	Eucalyptus oil	4:1	1.23 ± 0.21^{a}	5.93 ± 0.24^{a}	0.9995
		3:1	1.13 ± 0.08^{a}	6.30 ± 0.57^{a}	0.9995

Each value is the mean of three replications ± SD.

Means in each column with different lowercase superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2.2 สมบัติทางเคมีกายภาพของผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีน

กรณีไม่มีน้ำมันหอมระเหยพบว่าปริมาณความชื้นของพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและพลาสมาโปรตีนดัดแปรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (Table 11) ส่วนค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (a_w) ของพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรแตกต่างจากพลาสมาโปรตีนดัดแปร ($p < 0.05$) การเติมน้ำมันหอมระเหยทำให้ปริมาณความชื้นของไมโครแคปซูลจากพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและดัดแปรมีค่าลดลง ยกเว้นไมโครแคปซูลของทั้งพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ได้ดัดแปรและดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้น (W:C เท่ากับ 3:1) มีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างจากพอลิเมอร์ที่ไม่กักเก็บน้ำมันหอมระเหย จากการศึกษาพบว่าผงไมโครแคปซูลทั้งหมดมีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วง 7.54-12.60 % โดยทั่วไปปริมาณความชื้นของอาหารแห้งอยู่ในช่วง 3-10 % ปริมาณความชื้นของผงไมโครแคปซูลและอุณหภูมิในการเก็บรักษามีผลต่ออายุในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ (Quispe-Condori et al., 2011) ผงไมโครแคปซูลของทั้งพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ได้ดัดแปรและดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัส ขมิ้น และตะไคร้ (W:C เท่ากับ 3:1 และ 4:1) มีค่า a_w ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อยู่ในช่วง 0.380-0.427 (Table 11) ถึงแม้ว่าจะใช้พอลิเมอร์ต่างชนิดกันในการกักเก็บก็ตาม โดยค่า a_w ของผงน้อยกว่า 0.6 ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Laokuldilok and Kanha, 2015)

กรณีไม่มีน้ำมันหอมระเหยพบว่าผงพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรให้ค่า L* และ a* ไม่แตกต่างกัน แต่ค่า b* ต่างกัน โดยที่พลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินมีค่า b* สูงกว่าพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร เนื่องจากสีของรูติน ส่วนผงไมโครแคปซูลของพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด มีค่าสี L* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนค่า a* และ b* มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บ ส่วนผงไมโครแคปซูลจากพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ทั้งสองอัตราส่วนของ W:C มีค่า L*, a* และ b* ไม่แตกต่างกัน และพบว่ามีค่า a* และ b* สูงกว่าผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสและขมิ้น ซึ่งแตกต่างจากพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ได้ดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ (Table 11)

Table 11 Physicochemical characteristics of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP microcapsules incorporated with or without an essential oil as a core material.

Microcapsules	Encapsulated oil	W: C	Moisture (%)	a_w	Color		
					L^*	a^*	b^*
PPP	-	-	10.98 ± 1.49^{cd}	0.427 ± 0.012^{c}	65.56 ± 5.70^{ab}	0.76 ± 0.65^{a}	10.29 ± 2.17^{a}
	Turmeric oil	4:1	10.78 ± 1.10^{cd}	0.408 ± 0.008^{bc}	75.67 ± 1.07^{b}	3.07 ± 0.37^{ab}	17.12 ± 1.65^{b}
		3:1	12.60 ± 2.12^{d}	0.398 ± 0.013^{ab}	68.73 ± 9.01^{ab}	2.82 ± 0.82^{ab}	15.87 ± 2.61^{b}
	Lemongrass oil	4:1	7.54 ± 0.84^{a}	0.398 ± 0.008^{ab}	64.74 ± 9.49^{ab}	6.03 ± 3.15^{c}	36.30 ± 1.75^{de}
		3:1	9.36 ± 0.63^{abc}	0.412 ± 0.015^{bc}	64.39 ± 4.47^{ab}	5.88 ± 3.53^{c}	34.94 ± 2.14^{cde}
	Eucalyptus oil	4:1	8.71 ± 0.76^{abc}	0.407 ± 0.004^{bc}	67.50 ± 9.02^{ab}	3.24 ± 0.59^{ab}	15.04 ± 1.14^{b}
		3:1	9.41 ± 0.45^{abc}	0.415 ± 0.009^{bc}	74.11 ± 7.54^{b}	3.19 ± 0.74^{ab}	15.86 ± 2.36^{b}
Modified PPP	-	-	10.68 ± 0.17^{bcd}	0.380 ± 0.002^{a}	59.50 ± 2.70^{a}	2.04 ± 0.26^{a}	36.18 ± 0.58^{de}
	Turmeric oil	4:1	9.43 ± 0.80^{abc}	0.417 ± 0.009^{bc}	64.70 ± 3.66^{ab}	2.35 ± 0.14^{ab}	31.56 ± 0.93^{c}
		3:1	12.43 ± 1.92^{d}	0.413 ± 0.016^{bc}	65.72 ± 1.90^{ab}	1.55 ± 0.18^{a}	35.06 ± 3.19^{cde}
	Lemongrass oil	4:1	8.26 ± 1.25^{ab}	0.402 ± 0.013^{ab}	60.69 ± 2.78^{a}	4.92 ± 0.28^{bc}	39.20 ± 1.90^{e}
		3:1	9.66 ± 0.41^{abc}	0.408 ± 0.008^{bc}	59.23 ± 6.48^{a}	5.79 ± 1.46^{c}	38.13 ± 2.98^{e}
	Eucalyptus oil	4:1	8.58 ± 2.05^{abc}	0.406 ± 0.017^{bc}	64.28 ± 6.65^{ab}	1.46 ± 0.30^{a}	33.27 ± 4.49^{cd}
		3:1	10.21 ± 1.72^{bcd}	0.401 ± 0.019^{ab}	68.56 ± 5.39^{ab}	0.95 ± 0.06^{a}	37.16 ± 2.73^{de}

Each value is the mean of three replications ± SD.

Means in each column with different lowercase superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

2.3 ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยของผงไมโครแคปซูล

ปริมาณน้ำมันอิสระคือปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่อยู่ที่ผิวหรือภายนอกของผงไมโครเอนแคปซูล (Karaca et al., 2013) ซึ่งสามารถบ่งบอกประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยของผงไมโครเอนแคปซูล จากการทดลองพบว่าผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนที่ไม่ได้ดัดแปรที่ใช้ในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้น (W:C เท่ากับ 4:1) น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (W:C เท่ากับ 4:1 และ 3:1) และพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดของทั้งสองอัตราส่วนมีปริมาณน้ำมันอิสระน้อยที่สุดและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสพบว่ามีปริมาณน้ำมันอิสระมากขึ้น แต่อัตราส่วน W:C ไม่ทำให้ปริมาณน้ำมันอิสระแตกต่างกัน ยกเว้นกรณีการกักเก็บน้ำมันขมิ้นด้วยพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 3:1 ที่มีปริมาณน้ำมันอิสระมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนของ W:C มีผลต่อปริมาณน้ำมันอิสระ โดยควรมีปริมาณพอลิเมอร์ที่ใช้และปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่จะกักเก็บในสัดส่วนที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้มีปริมาณน้ำมันอิสระที่ไม่กักเก็บในโครงสร้างของพอลิเมอร์มากไป

Table 12 Free oil and encapsulation efficiency of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP microcapsules.

Microcapsules	Encapsulated oil	W: C	Free oil (%)	Encapsulation efficiency (%)
PPP	Turmeric oil	4:1	0.63 ± 0.15^{a}	86.05 ± 0.07^{b}
		3:1	2.78 ± 0.39^{c}	71.07 ± 7.17^{a}
	Lemongrass oil	4:1	0.37 ± 0.26^{a}	95.35 ± 3.66^{c}
		3:1	0.40 ± 0.11^{a}	95.48 ± 1.55^{c}
	Eucalyptus oil	4:1	1.53 ± 0.67^{b}	86.18 ± 6.19^{b}
		3:1	1.96 ± 0.34^{b}	93.33 ± 7.89^{bc}
Modified PPP	Turmeric oil	4:1	0.17 ± 0.08^{a}	95.32 ± 2.59^{c}
		3:1	0.37 ± 0.04^{a}	92.48 ± 2.40^{bc}
	Lemongrass oil	4:1	0.20 ± 0.1^{a}	96.58 ± 2.29^{c}
		3:1	0.10 ± 0.02^{a}	98.44 ± 0.54^{c}
	Eucalyptus oil	4:1	0.27 ± 0.14^{a}	92.33 ± 3.88^{bc}
		3:1	0.50 ± 0.16^{a}	90.85 ± 3.86^{bc}

Each value is the mean of three replications ± SD.

Means in each column with different lowercase superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหย (Table 12) โดยคำนวณจากปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ถูกกักเก็บภายในไมโครแคปซูลและปริมาณน้ำมันอิสระพอลิเมอร์ที่ใช้และน้ำมันหอมระเหยชนิดเดียวกัน พบว่าประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยไม่ต่างกันที่อัตราส่วน W:C ต่างกัน ยกเว้นที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 3:1 ของพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้นมีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันน้อยที่สุด (71.07 %) ซึ่งเป็นผลมาจากมีปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวของไมโครแคปซูลมาก ส่งผลให้มีปริมาณน้ำมันที่ถูกกักเก็บภายในไมโครแคปซูลน้อย จึงทำให้ได้ประสิทธิภาพที่ต่ำ ส่วนผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ที่อัตราส่วน W:C

เท่ากับ 4:1 และ 3:1 พบว่ามีปริมาณน้ำมันอิสระไม่แตกต่างกัน และมีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้มากกว่า 90 % ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรที่ใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยได้ดีขึ้น โดยเฉพาะประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้นเพิ่มขึ้นเป็น 95.32% และ 92.48% จาก 86.05% และ 71.07% ที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 4:1 และ 3:1 ตามลำดับ รวมถึงการใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรเป็นวัสดุห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดพบว่ามีปริมาณน้ำมันอิสระน้อยลง จึงช่วยลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำมันที่ถูกกักเก็บไว้ภายในผงไมโครแคปซูลได้ดีกว่า ทำให้ลดการเหม็นหืนและยืดอายุในการเก็บรักษา (Quispe-Condori et al., 2011; Karaca et al., 2013) ดังนั้นจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องควบคุมให้มีปริมาณน้ำมันอิสระน้อยที่สุด

จากงานวิจัยของ Liu et al. (2010) พบว่าการกักเก็บน้ำมัน flaxseed ด้วยเจลาตินร่วมกับกัมอะราบิก แคปซูลที่ได้มีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันได้ถึง 84% และพบว่ามีปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวของแคปซูล 7.7 % ซึ่งเป็นปริมาณน้ำมันอิสระที่มากกว่าในงานวิจัยนี้ที่พบเพียง 2.78 % ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการใช้อัตราส่วน W:C ที่ต่างกัน โดย Liu et al. (2010) ศึกษาอัตราส่วน W:C ที่ 1: 1 ซึ่งปริมาณพอลิเมอร์ที่ใช้ห่อหุ้มอาจมีปริมาณที่ไม่เพียงพอที่จะเกิดโครงสร้างเมตทริกซ์ที่ความหนาเพียงพอในการห่อหุ้มน้ำมันทั้งหมดในการเอนแคปซูเลทได้ จึงมีปริมาณน้ำมันที่เหลือที่ไม่ได้ถูกกักเก็บไว้ในโครงสร้างมากกว่า เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Karaca et al. (2013) ที่ได้ศึกษาโปรตีน 2 ชนิดเป็นวัสดุห่อหุ้มได้แก่ chickpea isolate และโปรตีน lentil isolate ร่วมกับมอลโตเดกตรินในการกักเก็บน้ำมัน flaxseed พบว่าที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 8.43:1 มีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมัน 89% แต่เมื่ออัตราส่วน W:C ลดลงเป็น 1.38:1 ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันลดลงเป็น 53% เช่นกัน

2.4 FT-IR spectra ของผงไมโครแคปซูล

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของผงไมโครแคปซูลโดยใช้เทคนิค FT-IR ซึ่งเส้นสเปคตรัมของผงไมโครแคปซูลกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้น ตะไคร้ และยูคาลิปตัส ในพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปร ที่อัตราส่วน W:C ที่ 4:1 และ 3:1 แสดงดัง Figure 10 พบว่าสเปคตรัมของพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร (PPP) และดัดแปร (MPPP) มีลักษณะที่คล้ายกัน แต่พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรพบพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 879 cm^{-1} และ 1435-1449 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคที่เกิดขึ้นใหม่เนื่องจากการเชื่อมประสานพลาสมาโปรตีนด้วยรูติน ดังนั้นผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยหากใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรเป็นวัสดุห่อหุ้มจะพบพีคที่ตำแหน่งดังกล่าวหรือใกล้เคียง

ทุกตัวอย่างของผงไมโครแคปซูลพบพีคหลักที่ตำแหน่ง wavenumber คล้ายกัน คือพบที่ wavenumber 1632-1640 cm^{-1}, 1533-1541 cm^{-1} และ 1235-1243 cm^{-1} ซึ่งเป็นพีคที่พบทั่วไปในโปรตีน โดยตำแหน่งดังกล่าวจะแสดงสเปคตรัมของ amide-I, amide-II และ amide-III ตามลำดับ ซึ่งสเปคตรัมของ amide-I แสดงการยืด-หด (stretching) ของ C=O ของ amide ในโปรตีน สเปคตรัมของ amide-II แสดงการสั่นแบบการงอ (bending vibration) ของ N-H groups และการสั่นแบบการยืด-หด (stretching vibration) ของ C-N groups ส่วนสเปคตรัมของ amide-III ที่ตำแหน่ง wavenumber 1237 cm^{-1} แสดงการสั่นในระนาบของ C-N และ N-H groups ของพันธะ amide หรือการสั่นของ CH_2 groups ของไกลซีน (glycine) (Muyonga et al., 2004) ผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ทั้งพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและดัดแปรในการเป็นพอลิเมอร์ห่อหุ้มมี amplitude ของพีคน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้นและยูคาลิปตัส

ในทุกตัวอย่างพบพีคของ amide-A ที่ตำแหน่ง wavenumber 3278-3279 cm^{-1} และพีคของ amide-B ที่ตำแหน่ง wavenumber 2926-2927 cm^{-1} ซึ่ง amide-A แสดงถึง NH- stretching coupled ด้วยพันธะไฮโดรเจน ในขณะที่ amide-B แสดงถึง CH stretching และ $–NH_3^+$ (Muyonga et al., 2004; Ahmad et al., 2012; Tongnuanchan et al., 2013) โดยผงไมโครแคปซูลกักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสและขมิ้น พบพีคที่ตำแหน่ง amide-A และ amide-B มี amplitude สูงขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่น ซึ่งแสดงลักษณะของ polyphenolic ในรูปของ phenolic ring ที่แสดงการยืด-หด (stretching) ของ –OH (3200-3550 cm^{-1}) (Bozic et al., 2012; Xu et al., 2005) ส่วน amplitude ของ amide-B ที่สูงแสดงถึงน้ำมันหอมระเหยที่กักเก็บในพอลิเมอร์ เกิดการขัดขวางปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Tongnuanchan et al., 2013) ผงไมโครแคปซูลที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสและขมิ้นทั้งสองอัตราส่วนพบพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 2958-2964 cm^{-1} เด่นชัดเมื่อเทียบกับผงไมโครแคปซูลกักเก็บน้ำมันตะไคร้และพอลิเมอร์ที่ไม่ได้กักเก็บน้ำมัน โดยพีคดังกล่าวเกิดจากการสั่นแบบยืดหด (stretching vibration) ของ methyl groups ($-CH_3$) (Herculano et al., 2015)

นอกจากนี้ในทุกตัวอย่างที่มีการใช้พอลิเมอร์ทั้งสองชนิดในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดที่สองอัตราส่วน W:C พบว่าพีคที่ตำแหน่ง wavenumber 1743 cm^{-1} ซึ่งแสดงถึง C=O stretching vibration ของ aldehyde หรือ ester carbonyl groups ของน้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบหลักของสารในกลุ่มของ aldehyde, ketone และ ester (Tongnuanchan et al., 2013; Herculano et al., 2015)

2.5 โครงสร้างระดับจุลภาค (Morphology)

การวิเคราะห์ลักษณะของพื้นผิวของพอลิเมอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยายวัตถุ x2500 พบว่าโครงสร้างระดับจุลภาคของพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร (PPP) มีลักษณะของพื้นผิวที่เรียบ (smooth) มีความเป็นเนื้อเดียวกันและไม่พบเม็ดเล็กๆ (grainy) ที่ผิวของพอลิเมอร์เมื่อเทียบกับพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปร (MPPP) ที่มีลักษณะพื้นผิวที่ขรุขระ (rough) (Figure 11) โดยลักษณะที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการรูตินเป็นสารเชื่อมประสานทำให้เกิดปฏิกิริยาควิโนนทำให้เกิดการรวมตัวของโปรตีน (aggregation of protein) ผ่านกลไก multidentate (multidentate mechanism) (Nuthong et al., 2009c)

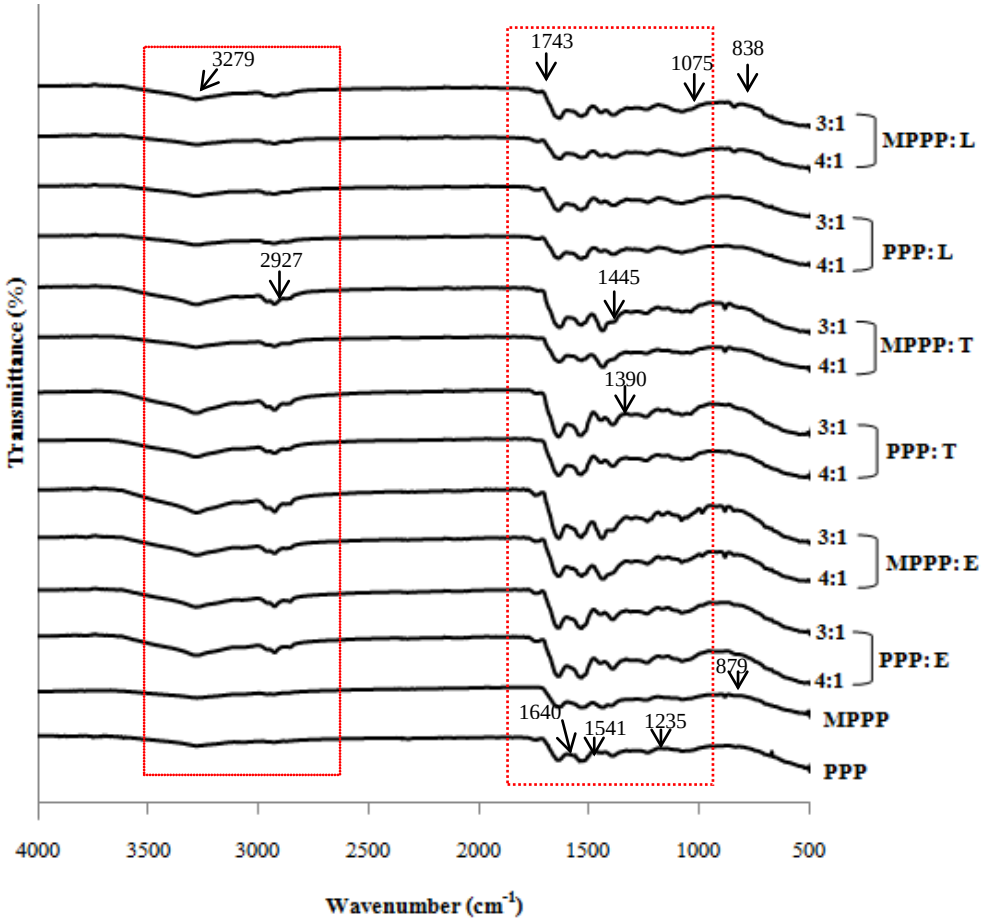
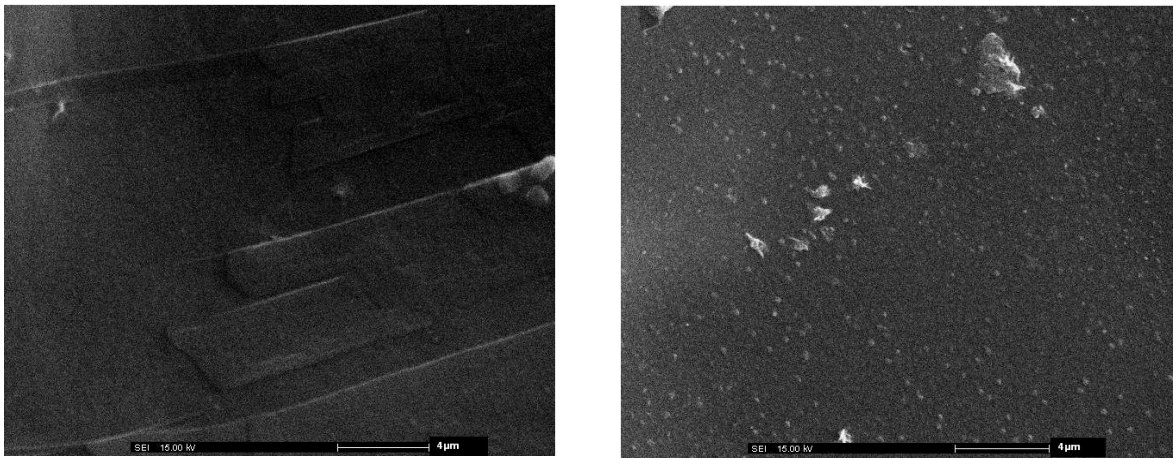


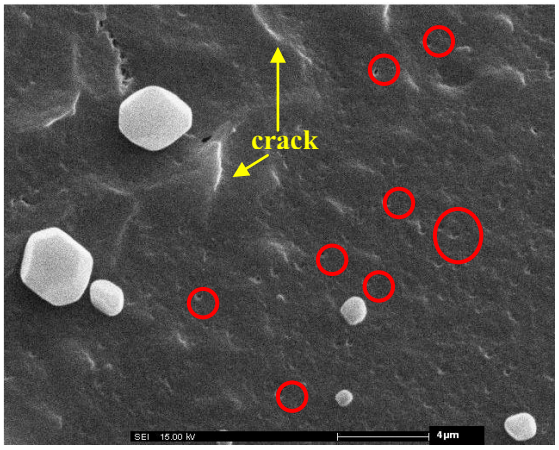
Figure 10 FT-IR spectra of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP (MPPP) microcapsules encapsulated eucalyptus (E), turmeric (T) and lemongrass (L) essential oils at different ratios of PPP (wall) and essential oil (core) (W:C).



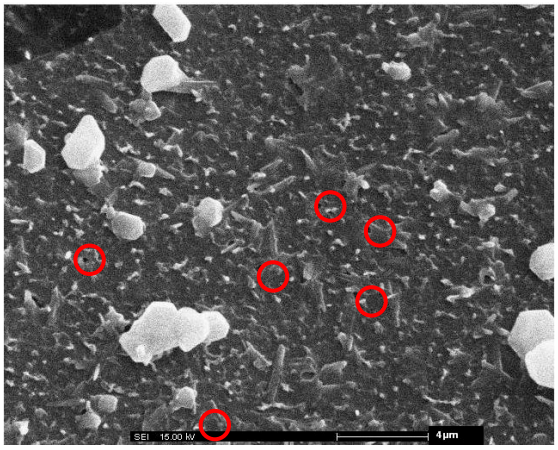
(A) PPP (B) Modified PPP

Figure 11 SEM image (x2500 magnification) of surface of unmodified porcine plasma protein (PPP) (A) and modified PPP (B) as wall materials for microencapsulation.

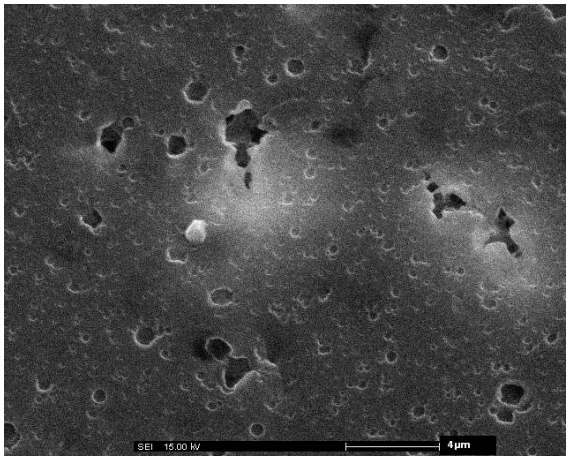
เมื่อพิจารณาโครงสร้างจุลภาคของผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปรและไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ยูคาลิปตัส และขมิ้น ที่อัตราส่วน W: C เท่ากับ 3:1 (Figure 12) พบว่าพื้นผิวของผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปร (MPPP) ที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดมีปริมาณผลึกน้ำแข็งที่เกาะที่ผิวของผงไมโครแคปซูลมากกว่าผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร โดยในการเอนแคปซูเลชันน้ำมันหอมระเหยทำให้ผิวของผงไมโครแคปซูลมีลักษณะหยาบ หรือขรุขระขึ้น ซึ่งพบลักษณะดังกล่าวในผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปรเช่นเดียวกับลักษณะพลาสมาโปรตีนดัดแปร (Figure 11) ลักษณะผิวหยาบที่เกิดขึ้นเกิดจากน้ำมันหอมระเหยไปลดหรือขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนในระบบอิมัลชันส่งผลให้โครงสร้างจุลภาคมีลักษณะหยาบ (Tongnuanchan et al., 2013) นอกจากนั้นยังพบการเกิดรอยแตก (cracks) ที่ผิวของผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (Figure 12; A) และยังพบรู (pore) และรอยรั่ว (wrinkle) ของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ผิวไมโครแคปซูล (Figure 12; A, B) มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับผงไมโครแคปซูลชนิดอื่นที่มีขนาดรูและรอยรั่วที่ชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันอิสระของไมโครแคปซูลของน้ำมันตะไคร้ (Table 12) ที่มีปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวของไมโครแคปซูลน้อยที่สุดและมีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันที่สูง ถึงแม้ว่าผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยทั้งสามชนิดมีปริมาณน้ำมันอิสระไม่แตกต่างกัน (Table 12) แต่เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างระดับจุลภาคพบว่าขนาดของรูและรอยรั่วของผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสและขมิ้นมีขนาดที่ใหญ่กว่าการกักเก็บน้ำมันตะไคร้ และผงไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันยูคาลิปตัสและขมิ้นพบว่ามีรูและรอยรั่วของน้ำมันที่ใหญ่และขนาดที่ไม่สม่ำเสมอ จากงานวิจัยของ Turasan et al. (2015) ได้ทำการศึกษาการเอนแคปซูเลชันน้ำมันโรสแมรี่โดยศึกษาวัสดุห่อหุ้มสองชนิดร่วมกันคือเวย์โปรตีนและมอลโตเดกตรินและทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง พบอนุภาคของไมโครแคปซูลที่ได้มีรูหรือหลุม (holes) ที่ผิวของไมโครแคปซูลเช่นกัน รูและรอยรั่วที่เกิดขึ้นเกิดจากน้ำมันอิสระที่ผิวของไมโครแคปซูลเกิดการระเหยไปในระหว่างการทำแห้งหรือในระหว่างการเก็บรักษา (Ahmad et al., 2012; Turasan et al., 2015) จากงานวิจัยของ Ahmad et al. (2012) พบรูและช่องว่าง (cavities) จากถ่ายภาพตัดขวางของฟิล์มเจลาตินร่วมกับการเติมน้ำมันหอมระเหยด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราดเช่นกัน ลักษณะที่เกิดขึ้นเป็นเพราะน้ำมันหอมระเหยได้ระเหยไป ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ ถึงแม้ว่าจะเป็นฟิล์มแต่ในการเตรียมสารละลายฟิล์มก่อนการทำแห้งได้เตรียมในรูปของสารละลายอิมัลชันของฟิล์มเช่นกัน



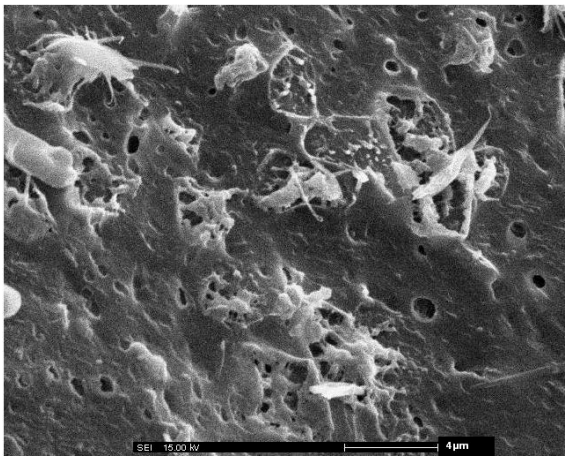
(A) PPP: L



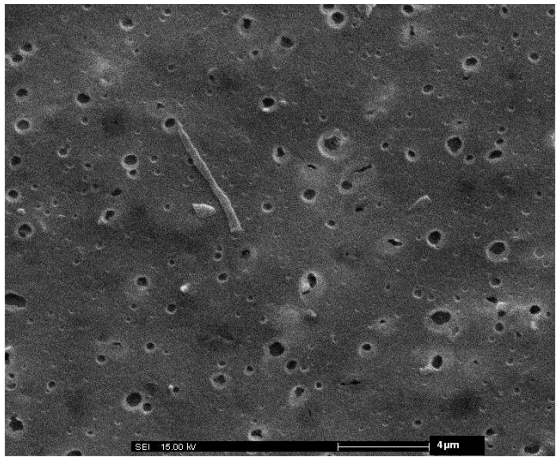
(B) MPPP: L



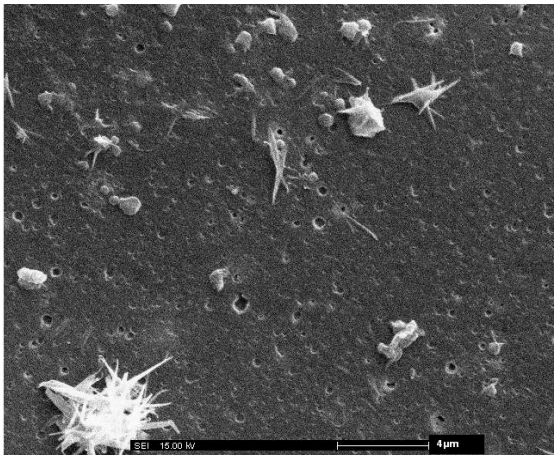
(C) PPP: E



(D) MPPP: E



(E) PPP: T



(F) MPPP: T

Figure 12 SEM image (x2500 magnification) of surface of unmodified porcine plasma protein (PPP) and modified PPP (MPPP) microcapsules with encapsulated eucalyptus (E), turmeric (T) and lemongrass (L) essential oils at W: C ratio of 3:1.

สรุปผล

วิธีการทำแห้งมีผลต่อสมบัติทางเคมี สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางด้านวิทยากระแสของพลาสมาโปรตีน โดยพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze dried PPP) มีค่าการละลายและความสามารถในการจับน้ำมันสูงกว่าและมีความหนืดต่ำกว่าพลาสมาโปรตีนที่ทำแห้งด้วยวิธีแบบพ่นฝอย (spray dried PPP) นอกจากนี้เมื่อใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้าสูงในการทำแห้งด้วยวิธีแบบพ่นฝอย จะให้พลาสมาโปรตีนที่มีค่าความสามารถในการจับน้ำมันและจับน้ำค่อนข้างสูง

ชนิดและความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานจากสารประกอบฟีนอลิกตามธรรมชาติต่างๆ มีผลต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนดัดแปรที่ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง โดยการใช้รูตินมีประสิทธิภาพการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนของพลาสมาโปรตีนสูงสุด เมื่อเทียบกับสารเชื่อมประสานชนิดอื่น สังเกตได้จากการลดลงของปริมาณหมู่อะมิโนอิสระ และปริมาณหมู่ซัลไฮดริล รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแถบโปรตีนที่พบใน SDS-PAGE ส่วนความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานแต่ละชนิดที่มีประสิทธิภาพในการเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนดีที่สุดจะคัดเลือกมาศึกษาต่อด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งได้แก่การใช้รูตินที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน การใช้กรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของปริมาณโปรตีน และการใช้เจนิพินที่ความเข้มข้น 0.5 ของปริมาณโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของสารเชื่อมประสานที่ใช้ส่งผลต่อค่าสีของพลาสมาโปรตีนดัดแปร นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทำแห้ง 2 ชนิด และชนิดและความเข้มข้นของสารเชื่อมประสานต่างๆ ที่ใช้ พบว่า spray dried PPP ที่ดัดแปรด้วยรูตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ของปริมาณโปรตีน กรดคาเฟอิกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ของปริมาณโปรตีน และเจนิพินที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของปริมาณโปรตีน มีค่าสี L^* และ b^* ลดลง ส่วนค่า a^* มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ freeze dried PPP ที่ดัดแปร นอกจากนั้น spray dried PPP ที่ดัดแปร มีปริมาณหมู่อะมิโนอิสระสูง แต่มีปริมาณหมู่ซัลไฮดริลน้อยกว่า freeze dried PPP ยกเว้นการใช้กรดคาเฟอิกและเจนิพิน แสดงว่าสารพอลิฟีนอลสามารถใช้เป็นสารเชื่อมประสานโมเลกุลโปรตีนของพลาสมาโปรตีนได้

เมื่อนำพลาสมาโปรตีนดัดแปรมาใช้ในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ได้แก่ ตะไคร้ ยูคาลิปตัส และขมิ้น ที่อัตราส่วน W:C เท่ากับ 4:1 และ 3:1 พบว่าอิมัลชันมีพฤติกรรมการไหลแบบ non-Newtonian โดยมีลักษณะเป็น Bingham plastic fluid สีของอิมัลชันสูตรที่เป็นพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยยูคาลิปตัสและขมิ้นมีลักษณะเป็นสีขาวนวล ในขณะที่สีของอิมัลชันสูตรที่เป็นพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและดัดแปรในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ยูคาลิปตัส และขมิ้น มีลักษณะเป็นสีเหลืองนวล โดยสีของอิมัลชันเป็นผลมาจากสีของน้ำมันหอมระเหยและสีของสารเชื่อมประสานรูติน การใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรเป็นสารห่อหุ้มมีปริมาณน้ำมันอิสระที่ผิวของผงไมโครแคปซูลน้อยกว่าจึงมีประสิทธิภาพในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าการใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร แต่อัตราส่วน W:C ไม่มีผลต่อปริมาณความชื้น ค่า a_w ของผงไมโครแคปซูล และประสิทธิภาพในการเอนแคปซูเลชันน้ำมันหอมระเหย ยกเว้นผงไมโครแคปซูลในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยขมิ้นที่ใช้พอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปร ซึ่งการใช้เทคนิค FT-IR สามารถบ่งบอกโครงสร้างทางเคมีของผงไมโครแคปซูลในการกักเก็บน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ได้ ดังนั้นสภาวะในการผลิตมีผลต่อสมบัติพลาสมาโปรตีน ซึ่งพลาสมาโปรตีนไม่ดัดแปรและดัดแปรสามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารเพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัส หรือใช้เป็นวัสดุไบโอพอลิเมอร์สำหรับผลิตฟิล์มและสารเคลือบเพื่อรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงใช้เป็นวัสดุไบโอพอลิเมอร์ห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหย หรือสารสำคัญจากพืชได้ โดยพอลิเมอร์พลาสมาโปรตีนดัดแปรด้วยรูตินมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเป็นวัสดุห่อหุ้ม

ข้อเสนอแนะ

1. การเลือกใช้สารประกอบพอลิฟีนอล ในการเชื่อมประสานหรือดัดแปรโปรตีน ควรเลือกสารประกอบพอลิฟีนอลที่เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีนแล้วให้สีซึ่งเป็นที่ยอมรับในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. วิธีการดัดแปรพลาสมาโปรตีนสามารถทำได้หลายวิธี หากจะไม่เลือกการใช้สารเชื่อมประสานจากธรรมชาติ เช่น การใช้สารเคมี การให้ความร้อน การใช้เอนไซม์ หรือการฉายรังสี และอาจมีผลต่อสมบัติของพลาสมาโปรตีนดัดแปรต่างกัน ซึ่งเป็นงานวิจัยที่สามารถศึกษาเพิ่มเติมภายหลัง

3. ควรมีการศึกษาการนำไมโครแคปซูลพลาสมาโปรตีนดัดแปรที่กักเก็บน้ำมันหอมระเหยมาใช้ในการเป็นวัสดุเสริมสมบัติของไบโอพอลิเมอร์ฟิล์มชนิดแอกทีฟ เพื่อใช้ยืดอายุการเก็บรักษาอาหารแห้ง

เอกสารอ้างอิง

ธริษตรี พรพิชญา, พิชญ์ ศุภผล, และ จิรารัตน์ ทัตติยกุล. 2553. สมบัติทางกายภาพและเคมีกายภาพของเจลาตินที่ผ่านการเชื่อมขวางด้วยสารฟีนอลิกจากกาแฟ, น. 187-194. *ใน* **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48. (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. **เคมีอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

เบญจา ชุตินทราศร. 2550. **เทคโนโลยีส่วนผสมอาหารสังเคราะห์**. มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ.

เปรมวดี เทพวงศ์. 2548. **ผลของเอนไซม์ทรานส์กลูทามิเนสจากจุลินทรีย์ต่อคุณสมบัติของเจลซูริมิที่ผลิตจากปลาแป้น (*Leiognathus* spp.)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์ และ มณฑิรา นพรัตน์. 2546. ผลการใช้เลือดไก่และพลาสมาผงต่อคุณภาพของไส้กรอกอิมัลชัน. **วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ**. ปีที่ 26 (3): 351-366.

พรรณิภา ปงกองแก้ว. 2549. **การพัฒนาฟิล์มพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรและการประยุกต์ใช้.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยนเรศวร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. **สถานการณ์สุกรปี 2557 และแนวโน้ม ปี 2558**. แหล่งที่มา: www.oae.go.th/download/bapp/2558/13.pptx, 29 เมษายน 2558.

รังสินี โสธรวิทย์. 2553. **เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รัตนา จิระรัตนานนท์. 2528. **การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการใช้ประโยชน์จากโรงงานฆ่าสัตว์ (เลือดวัว/ควาย) รวมทั้งความต้องการในงานวิจัยและพัฒนาในประเทศไทย**, ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ.

วิภาพร ดวงจรัส, สุกัญญา นนทคำจันทร์, อรอุมา เหงี่ยมครบุรี, พรรณจิรา วงศ์สวัสดิ์ และ มณฑิรา นพรัตน์. 2545. คุณสมบัติของเลือดไก่และพลาสมาที่ได้จากกระบวนการอบแห้งแบบไมโครเวฟสุญญากาศ, น. 445-453. *ใน* **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40. (สาขาอุตสาหกรรมเกษตร)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์. 2554. **สรุปข้อมูลและสถิติจำนวนสุกรและเกษตรกรผู้เลี้ยงประจำปี 2554**. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/ict/th/images/stories/stat_web/yearly/2554/pig54/report pig_54.pdf, 4 กันยายน 2555.

Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Agustini, T.M. 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. **Food Hydrocolloids,** 28, 189-199.

Apisariyakul, A., Vanittanakorn, N. and Buddhasukh, D. 1995. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, 49, 163-169.

Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 3423-3430.

Bergo, P. and Sobral, P.J.A. 2007. Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids,** 21, 1285-1289.

Beuchat, L.R. 1977. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 25, 258–261.

Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N. and Rubini, K. 2002. Stabilization of gelation films by crosslinking with genipin. **Biomaterials**, 23(24), 4827-4832.

Bozic, M., Gorgieva, S. and Kokol, V. 2012. Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. **Carbohydrate Polymers,** 87, 2388-2398.

Carvalho, R.A. and Grosso, C.R.F. 2004. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids,** 18, 717-726.

Chartlon, A.J., Haslam, E. and Williamson, M.P. 2002. Multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallate complex determined by time-averaged nuclear overhauser effects. **Journal of the American Chemists' Society,** 124, 9899-9905.

Chinprahast, N., Jantawat, P. and Kristavee, D. 1995. Functional property of vacuum – dried, freeze – dried and spray – dried porcine blood plasma. **ASEAN Food J,** 10(1), 10–14.

Dangaran, K., Tomasula, P.M. and Qi, P. 2009. Structure and function of protein-based edible films and coatings, pp 25-56. *In* Embuscado, M.E. and Huber, K.C., eds. **Edible Films and Coatings for Food Applications**. Springer Science+Business Medai, New York.

Ellman G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** 82, 70-77.

Espinto Santa, E.F.D., Lima, L.K.F., Torres, A.P.C., Oliveira, G. and Ponsano, E.H.G. 2013. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Science and Technology,** 33(1), 47–51.

Faldt, P. and Bergenstahl, B. 1995. Fat encapsulation in spray dried food powders. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 72, 171-176.

Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Ashtari, A.K. and Omid, M. 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing,** 90(4), 667–675.

Fernandes, C.P., Mascarenhas, M.P., Zibetti, F.M., Lima, B.G., Oliveira, R.P., Rocha, L., and Falcão, D. Q. 2013. HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 23(1), 108-114.

Fort, N., Carretero, C., Pares, D., Toldra, M. and Saguer, E. 2007. Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: Effects on the heat-induced gel properties. **Food Hydrocolloids,** 21, 463-471.

Friesen, K., Chang, C. and Nickerson, M. 2015. Incorporation of phenolic compounds, rutin and epicatechin into soy protein isolate films: mechanical, barrier and cross-linking properties. **Food Chemistry,** 172, 18-23.

Gan, C.Y., Cheng, L.H. and Easa, A.M. 2008. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protain isolate-based microcapsules containing fish oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies,** 9, 563-569.

Gerrard, J.A. and Brown, P.K. 2002. Protein cross-linking in food: mechanisms, consequences, applications. **International Congress Series,** 1245, 211-215.

Ghribi, A. M., Gafsi, I. M., Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., and Besbes, S. 2015. Effect of drying methods on physico-chemical and functional properties of chickpea protein concentrates. **Journal of Food Engineering,** 165, 179-188.

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-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts**. Food Hydrocolloids,** 23, 1334-1341.

Gonzalez, A., Cristina Strumia, M. and Ines Alvarez Igarzabal, C. 2011. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: synthesis, characterization and biodegradation. **Journal of Food Engineering,** 106, 331-338.

Guilbert, S., Gontard, N., Morel, M.H., Chalier, P., Micard, V. and Redl, A. 2002. Formation and properties of wheat gluten films and coatings, pp 69-122. *In* Gennadios, A., ed. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, New York.

He, X-H., Liu, H-Z. Liu, L., Zhao, G.-L. Wang, Q. and Chen, Q-L. 2014. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates**. Food Hydrocolloids,** 36, 123–129.

Herculano, E. D., Haroldo, C.B.P., Evania, A.T.F., Flayanna, G.B.D. and Vanessa, A. P. 2015. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT - Food Science and Technology,** 61, 484-491.

Jantawat, P., Chinprahast, N. and Kristavee, D. 1996. Functional property of stored dried porcine plasma powders and its effect on sausage quality. **ASEAN Food Journal**, 11, 69-73.

Jin, J., Song, M. and Hourston, D.J. 2004. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules,** 5, 162-168.

Jittanit, W., Niti-Att, S. and Techanuntachaikul, O. 2010. Study of spray drying of pineapple juice using maltodextrin as an adjunct. **Chiang Mai Journal of Science,** 37(3), 498–506.

Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M. 2008. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and **α**- tocopherol. **Food Hydrocolloids,** 22(3), 449-458.

Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J.F. and Kasapis, S. 2011. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. **Food Chemistry,** 129, 1513–1522.

Karaca, A.K., Nickerson, M. and Low, N.H. 2013. Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. **Food Chemistry,** 139, 448-457.

Kim, I.H., Oh, Y.A., Lee, H., Song, K.B. and Min, S.C. 2014. Grape berry coatings of lemongrass oil-incorporating nanoemulsion. **LWT-Food Science and Technology,** 58, 1-10.

Klinkesorn, U., Sophanodora, P., Chinachoti, P., Decker, E.A. and McClements, D.J. 2006. Characterization of spray-dried tuna oil emulsified in two-layered interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. **Food Research International,** 39, 449-457.

Ko, W-C., Yu, C-C. and Hsu, K-C. 2007. Changes in conformation and sulfhydryl groups of tilapia actomyosin by thermal treatment. **LWT-Food Science and Technology,** 40, 1316-1320.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 860-865.

Laokuldilok, T. and Kanha, N. 2015. Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying. **LWT - Food Science and Technology,** 64, 405-411.

Lee, J.H., and Song, K.B. 2014. Preparation of a porcine plasma protein composite film and its application. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,** 79, 68-73.

Leon-Martinez, F.M., Rodriguez-Ramirez, J., Medina-Torres, L.L., Mendez Lagunas, L.L. and Bernad-Bernad, M.J. 2011. Effects of drying conditions on the rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). **Carbohydrate Polymers,** 84, 439–445.

Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P. and Nimmannit, U. 2008. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. **Carbohydrate Polymers**, 74, 209-214.

Leung, A.Y. 1980. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. New York: John Wiley & Sons.

Li, N., Qi, G., Sun, X.S., Xu, F. and Wang, D. 2015. Adhesion properties of camelina protein fractions isolated with different methods. **Industrial Crops and Products,** 69, 263-272.

Lim, L.-T., Mine, Y., Britt, I.J. and Tung, M.A. 2002. Formation and properties of egg white films and coatings. pp 233-252. *In* Gennadios, A. ed. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, New York.

Liu., S., Low, N.H. and Nickerson, M.T. 2010. Entrapment of flaxseed oil within gelatin-gum arabic capsules. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** 87, 809-815.

Madene, A., Muruek J., Joel S. and Desobry, S. 2006. Flavour encapsulation and controlled release-a review. **International Journal of Food Science and Technology**, 41, 1-21.

Mandal, P.K., Rao, V.K., Kowale, B.N. and Pal, U.K. 1999. Utilization of slaughter house in human food. **Journal of Food Science**, 63(2), 91-105.

Matos, M.E., Sanz, T. and Rosell, C.M. 2014. Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. **Food Hydrocolloids,** 35, 150–158.

Meng, Y.C., Sun, M.H., Fang, S., Chen, J. and Li, Y.H. 2014. Effect of sucrose fatty acid esters on pasting, rheological properties and freeze-thaw stability of rice flour. **Food Hydrocolloids,** 40, 64–70.

Molina Ortiz, S.E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., Trindade, M.A., Santana, A.S. and Favaro-Trindade, C.S. 2009. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **LWT-Food Science and Technology**, 42, 919–923.

Muyonga, J.H., Cole, C.G.B. and Duodu, K.G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (Lates niloticus). **Food Chemistry,** 86(3), 325–332.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. and Bugarski, B. 2011. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science,** 1, 1806-1815.

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Rao, L.J.M. and Sakariah, K.K. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: A byproduct from curcumin manufacture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4297-4300.

Nuthong, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2009a. Characterzation of porcine plasma protein-based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, 44, 143-148.

Nuthong, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2009b. Effect of some factors and pretreatment on the properties of porcine plasma protein-based films. **Journal of Food Science and Technology**, 42, 1545-1552.

Nuthong, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2009c. Effect of phenolic compounds on the properties of porcine plasma protein-based film. **Food Hydrocolloids**, 23, 736-741.

Ockerman, H.W. and Hansen, C.L. 1988. Blood utilization. *In* **Animal by Product Processing**; Horwood, E., ed. VCH Publishing, United state, pp. 232-255.

Ockerman, H.W. and Hansen, C.L. 2000. Animal by-product processing and utilization. **Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster**. Basel, USA.

Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P. and Eumkeb, G. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal on *Staphylococcus aureus*. **LWT-Food Science and Technology,** 39, 1214-1220.

Orafidiya, L. O., and Oladimeji, F. A. 2002. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International journal of pharmaceutics,** 237(1), 241-249.

Owusu-Apenten, R. 2005. Colorimetric analysis of protein sulfhydyl groups in milk: applications and processing effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition,** 45, 1-23.

Park, S.K., Hettiarachchy, N.S., Ju, Z.Y. and Gennadios. A. 2002. Formation and properties of soy protein films and coatings, pp 123-137. *In* Gennadios, A., ed. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, New York.

Perez-Gago, M.B. and Krochta, J.M. 2002. Formation and properties of whey protein films and coatings, pp 159-180. *In* Gennadios, A., ed. **Protein-Based Films and Coatings**. CRC Press, New York.

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-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** 51, 5088-5095.

Prodpran, T., Benjakul, S. and Phatcharat, S. 2012. Effect of phenolic compounds on protein cross-linking and properties of film from fish myofibrillar protein. **International Journal of Biological Macromolecules,** 51, 774–782.

Quispe-Condori, S., Saldana, M.D.A. and Temelli, F. 2011. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT-Food Science and Technology**, 44, 1880-1887.

Ramos-Clamont, G., Fernandez-Michel, S., Carrillo-Vargas, L., Martinez-Calderon, E. and Vazquez-Moreno, L. 2003. Functional properties of protein fraction isolated from porcine blood. **Journal of Food Science**, 4, 1196-1200.

Rawel, H.M., Czajka, D., Rohn, S. and Kroll, J. 2002a. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. . **International Journal of Biological Macromolecules,** 30,137-150.

Rawel, H.M., Rohn, S. and Kroll, J. 2002b. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of Chlorogenic acid. **Food Chemistry,** 78,443-455.

Rhim, J.W., Gennadios, A., Weller, C.L., Cezeirat, C. and Hanna, M.A. 1998. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. **Industrial Crops and Products,** 8, 195-203.

Rodriguez Furlán, L.T., Pérez Padilla, A. and Campderrós, M.E. 2010. Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH, application in a food formulation. **Advance Journal of Food Science and Technology,** 2(5), 256–267.

Sarochwikasit, S. and Tangduangdee, C. 2011. Effect of drying temperature and drying aids on qualities of spray dried pineapple juice. **KMUTT Research and Development Journal,** 34(3), 203–215.

Saguer, E., Fort, N., Pares, D., Toldra, M. and Carretero, C. 2007. Improvement of gelling properties of porcine blood plasma using microbial transglutaminase. **Food Chemistry**, 101, 49-56.

Saguer, E., Fort, N., Alvarez, P.A., Sedman J. and Ismail, A.A. 2008. Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. **Food Hydrocolloids**, 22, 459-467.

Saguer, E., Alvarez, P. and A Ismail, A.A. 2012. Heat-induced denaturation/aggregation of porcine plasma and its fractions studied by FTIR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, 18, 81-89.

Samsalee, N. and Sothornvit, R. 2014. Effects of drying methods on physicochemical and rheological properties of porcine plasma protein. **Kasetsart J. (Nat. Sci),** 48, 629-636.

Schmidt, V., Giacomelli, C. and Soldi, V. 2005. Thermal stability of films formed by soy protein isolate- sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability,** 87, 25-31.

Skaria, B.P., Joy, P.P, Mathew, G., Mathew, S. and Joseph, A. 2012. Lemongrass, pp. 348-370. *In* Peter, K.V., ed. **Handbook of Herbs and Spices Volume 2.** Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.

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.

Suzuki and Shimizu. 1982. **Method for reducing the bacterial population of blood powder**. U.S. Patent. 4,347,259.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2013. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. **Journal of Food Engineering,** 117, 350-360.

Turasan, H., Sahin, S. and Sumnu, G. 2015. Encapsulation of rosemary essential oil. **LWT-Food Science and Technology**, 64, 112-119.

Xu, P., Uyama, H., Whitten, J.E., Kobayashi, S. and Kaplan, D.L. 2005. Peroxidase-catalyzed in situ polymerization of surface orientated caffeic acid. **Journal of the American Chemical Society,** 127, 11745-11753.

Yan, M., Li, B., Zhao, X. and Yi, J. 2011. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. **Food Hydrocolloids**, 25(5), 907-917.

Yoo, J.S., Kim, J.Y., Kim, S.H. and Choi, S.H. 2011. Study on genipin: a new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. **The Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery,** 44, 197-207.

สรุปผลการนำผลการวิจัยไปเผยแพร่

ได้นำผลงานบางส่วนนำเสนอในที่ประชุมวิชาการ และได้มีการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการดังนี้

1. Samsalee, N. and Sothornvit, R. 2014. Effects of Drying Methods on Physicochemical and Rheological Properties of Porcine Plasma Protein. *In:* **16th Food Innovation Asia Conference, June 12-13, 2014, Bangkok, Thailand.**

2. Samsalee, N. and Sothornvit, R. 2014. Effects of drying methods on physicochemical and rheological properties of porcine plasma protein. **Kasetsart J. (Nat. Sci),** 48, 629-636.

Kasetsart J. (Nat. Sci.) 48 : 629 - 636 (2014)

Effects of Drying Methods on Physicochemical and Rheological Properties of Porcine Plasma Protein

Namfon Samsalee[1] and Rungsinee Sothornvit[1, 2,*]

ABSTRACT

Porcine plasma is an important source of high protein content which can be used for food products. The objective of this study was to determine the effect of drying methods on the properties of porcine plasma protein powder (PPP). The effects of freeze drying, and spray drying at two levels of inlet air temperature (140 and 200 °C) were studied on the physicochemical and rheological properties of PPP. It was found that freeze-dried PPP showed significantly ($P < 0.05$) higher solubility and oil binding capacity (OBC) than spray-dried PPP. The higher inlet air temperature provided slightly higher OBC and water holding capacity of PPP. Moreover freeze-dried PPP had a red-yellow color as indicated by the lower values for lightness (L^*), higher redness (a^*) and higher yellowness (b^*), compared with spray-dried PPP which was green-yellow in color. As expected, the lower inlet temperature with spray drying exhibited higher values for L^*, a^* and b^* of PPP. All dried PPP showed a typical non-Newtonian flow behavior. Freeze-dried PPP exhibited Bingham plastic fluid behavior while spray-dried PPP exhibited pseudoplastic fluid behavior. Therefore, the drying method affected different PPP properties which can be tailored to food processing and application to improve food quality.

Keywords: porcine plasma protein, freeze drying, spray drying, physicochemical, rheological

INTRODUCTION

Pig production in Thailand has increased 1.90% from the previous year due to higher consumption (Office of Agricultural Economics, 2013). Therefore, porcine blood—a by-product from slaughterhouses—is available in a large volume though its utilization has been limited as in general terms, animal blood is 3–5% of the body weight (Mandal *et al*., 1999; Ofori and Hsieh, 2011) and generally consists of 60% plasma and 40% red blood cells (Ockerman and Hansen, 2000; Toldra *et al*., 2004). Blood is a good source of protein, containing essential and non-essential amino acids (Ockerman and Hansen, 2000; Ramos-Clamont *et al*., 2003). Porcine plasma protein consists of various proteins, mainly albumin and globulins, which have good emulsification properties (Jantawat *et al*., 1996; Cofrades *et al*., 2000; Ramos-Clamont *et al*., 2003; Ofori and Hsieh, 2011). The spray drying technique is a short dehydration process and is widely used in the food industry to produce food powder (Jittanit *et al*., 2010; Anandharamakrishnan *et al*.,

[1] Department of Food Engineering, Faculty of Engineering at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhonpathom 73140, Thailand.
[2] Center of Advanced Studies in Industrial Technology, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhonpathom 73140, Thailand.
* Corresponding author, e-mail: fengrns@ku.ac.th

Received date : 01/04/14 Accepted date : 16/06/14

2007). The drying air temperature and feed rate have been reported to be factors influencing the quality of spray- dried food powder (Jittanit *et al*., 2010). Freeze drying is a process involving low temperature and a long dehydration period which results in less damage than other dehydration methods. However, freeze drying may affect the functionality of protein because of partial protein denaturation. Chinprahast *et al*. (1995) studied the functional properties of freeze-dried and spray-dried porcine blood plasma and found that the functional properties decreased as the temperature of drying increased. Parés *et al*. (1998) found that spray drying affected the consistency of porcine blood plasma gels as the water holding capacity (WHC) and consistency of porcine blood plasma gels decreased when the pH decreased. Yu *et al*. (2007) reported that spray-dried peanut protein concentrate (PPC) exhibited better functional properties, particularly emulsifying capacity and foaming capacity, than PPC dried in a vacuum oven. However, no research has been reported on the rheological properties of porcine plasma protein powder (PPP). The objective of this study was to determine the effect of drying methods on the physicochemical and rheological properties of PPP.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of porcine plasma protein

Porcine blood was obtained from a slaughterhouse in Nakhon Pathom province, Thailand. Sodium citrate solution (3.8% weight per volume) was used to prevent blood coagulation during collection (Nuthong *et al*., 2009). The porcine blood was kept in ice and transported to the Department of Food Engineering, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus. Porcine blood was centrifuged at 3,000×*g* for 30 min at 4 °C using a refrigerated centrifuge (Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Germany) to separate the plasma protein (supernatant) from blood cells by decantation.

Effect of drying methods on porcine plasma protein powder

Three drying methods (freeze drying, and spray drying at two levels of inlet air temperature, T_i) were studied to produce porcine plasma protein powder (PPP).

PPP was lyophilized using a freeze drier (Elcold DK-9500; Hobro/Scanvac Coolsafe 100-4 Pro; Lynge, Denmark). On the other hand, PPP was dried using a spray drier (Lab-Plant SD-04 spray dryer; West Yorkshire, England) at two levels of T_i (140 and 200 °C) with an outlet air temperature of 70 °C and a feed rate of 0.4 $L.hr^{-1}$. PPP samples were kept at -20 °C until used.

Characterization of porcine plasma protein powder

Chemical composition

The chemical composition (the moisture, protein and ash contents) of PPP were determined by the method of Association of Official Analytical Chemists (2000).

Color measurements

The PPP color values (L^*, a^* and b^*) in the CIE system (International Organization for Standardization, 2008) were measured using a Spectro-guide (BYK-Gardner GmbH; Geretsried, Germany). A white standard plate (L^*= 97.75, a^*= -0.49 and b^* = 1.96) was used.

Solubility

Solubility was determined according to the method of Suzuki and Shimizu (1982). Briefly, 0.5 g of PPP was dissolved in 20 mL of deionized water and shaken in a shaking water bath (WNB14; Memmert; Duesseldorf, Germany) for 1 hr at room temperature (25 °C). Insoluble matter was obtained by filtration and later dried at 105 °C for 3 hr until a constant weight was reached. The solubility (%) was calculated by a weight difference as follows: Solubility as a percentage = $[(W_1 - W_2)/W_1] \times 100$, where W_1 is the initial weight of the dry matter measured in grams and W_2 is the weight of the insoluble dry matter measured in grams.

Water holding capacity and oil binding capacity

The water holding capacity (WHC) was determined according to the method of Beuchat (1977). Each PPP sample of 0.5 g was suspended in 10 mL of deionized water, vortexed for 2 min, allowed to stand at room temperature (25 °C) for 1 hr and then centrifuged with a refrigerated centrifuge (5804R; Eppendorf; Hamburg, Germany) at 8,000×*g* for 20 min. The supernatant was decanted and the centrifuge tube containing the water-absorbed sample was weighed. The WHC (measured in grams of water per gram of PPP) was calculated as WHC = $(W_2-W_1)/W_0$, where W_0 is the weight of the dry sample measured in grams, W_1 is the weight of the tube plus the dry sample measured in grams and W_2 is the weight of the tube plus the water absorbed sample measured in grams. Triplicate samples were analyzed for each measurement. The oil binding capacity (OBC) was also determined for samples by dispersing 0.5 g of PPP in 10 mL of vegetable oil similar to the method used for determining the WHC (Beuchat, 1977). The OBC was expressed in grams of oil absorbed sample per gram of PPP.

Rheological measurements

Steady state flow and dynamic viscoelasticity measurements were carried out in a controlled stress rheometer (HAAKE RheoStress 600; Thermo Electron Ltd.; Karlsruhe, Germany) using cone-plate geometry (cone diameter = 60 mm, angle = 1°, gap = 0.052 mm).

Steady shear measurements

The PPP (2% weight per weight (w/w) of freeze dried or spray dried sample) was dissolved in deionized water, stirred using a magnetic stirrer and then heated at 70 °C for 30 min in the shaking water bath. The solutions were cooled to room temperature (25 °C).

The apparent viscosity and the shear stress were obtained by performing the shear rate (1 to 100 s^{-1}) when the shear stress was increased from 0 to 20 Pa at 25 °C.

The flow behavior of the PPP solutions was analyzed by fitting the experimental data with a power law model as $\eta = k.\dot{\gamma}^{n-1}$, where η is the apparent viscosity (measured in pascal.seconds), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (per second), k is the consistency index (pascal.seconds^n) and n is the flow behavior index (dimensionless).

Dynamic measurements of viscoelastic properties

The PPP sample (2% w/w of spray dried sample) was dissolved in deionized water, stirred using a magnetic stirrer and then heated at 70 °C for 30 min in the shaking water bath. The solution was then cooled to room temperature (25 °C). An oscillatory stress sweep test was performed from 0.01 to 20 Pa. Based on the stress sweep results, a frequency of 1 Hz was selected to set the upper limit of the linear viscoelastic region (LVR) for frequency sweep measurements at a range in the angular frequency (ω) of 0.1–100 rad.s^{-1}. Dynamic viscoelastic parameters—the storage or elastic modulus (G') and the loss or viscous modulus (G")— were determined as a function of ω.

Statistical analysis

A completely randomized design was used to study the main factors (drying methods and inlet temperatures). Three replications were used to determine each property. Data were subjected to analysis of variance and Duncan's multiple range test was used to determine significant differences at the 95% confidence interval. Analysis was performed using the SPSS package (SPSS 11.0 for Windows; SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical properties of porcine plasma protein powder

Freeze-dried PPP had a red-yellow color compared with spray-dried PPP which was green-yellow in color. Table 1 shows the chemical composition of PPP. None of the drying methods

affected the protein and ash contents of PPP, which ranged from 79.63 to 82.16% and 11.73 to 12.41%, respectively. Variations in chemical composition came from the physical conditions of the pig and the time of slaughter (Pongkongkaew, 2006). As expected, spray-dried PPP at the higher T_i (200 °C) had a lower moisture content than at the lower T_i (140 °C). This was due to the higher temperature gradient on the surface of feed drops at the higher T_i resulting in a higher heat transfer rate (Jittanit *et al.*, 2010). This corresponded to a decrease in the moisture content of spray-dried black mulberry powder with increasing T_i (Fazaeli *et al.*, 2012). Freeze-dried and spray-dried PPP samples at the higher T_i had similar moisture contents. This indicated that the higher T_i of spray drying in this study did not affect the chemical composition of PPP when compared to using a low temperature and a longer time for freeze drying.

Color is an important sensory attribute for food acceptance. Thus, the different drying methods might reflect different color values of PPP. It was found that the drying method significantly affected the color values (L^*, a^* and b^*) of PPP. Freeze-dried PPP had the lowest L^* and the highest a^* and b^* values among all drying methods (Table 2) as shown by its red-yellow color. The higher L^* value of spray-dried PPP than that of freeze-dried PPP was similar to the findings of Espinto Santa *et al.* (2013) and Joshi *et al.* (2011). Spray drying at the higher T_i provided lower L^*, a^* and b^* values than those at the lower T_i. Such a difference was probably due to the higher degree of Maillard reaction or non-enzymatic browning at the higher T_i (Sarochwikasit and Tangduangdee, 2011).

Drying methods significantly affected the solubility of PPP. The higher solubility of freeze-dried PPP not only resulted from the porous structure but also possibly came from the lowered degree of protein denaturation or aggregation in the freeze-dried sample compared to in the spray-dried one, resulting in a higher solubility (Table 3). There was no effect of T_i on the solubility of spray-dried PPP. This result was contrary to another study that reported a higher T_i increased the solubility of spray-dried black mulberry powder (Fazaeli *et al.*, 2012). The variation might have been due to the difference in the raw material and the drying conditions used.

Interactions of water and oil with proteins are important in food systems and can affect the flavor and texture of foods. Unfortunately, the

Table 1 Composition of porcine plasma protein powder.

Chemical component	Drying method		
	Freeze drying	Spray drying at 140 °C	Spray drying at 200 °C
Ash (%)	12.37±0.04[a]	12.41±0.13[a]	11.73±0.19[a]
Protein (%)	80.80±0.35[a]	79.63±0.42[a]	82.16±1.06[a]
Moisture content (%)	6.10±0.53[a]	10.17±0.18[b]	6.65±0.74[a]

Table 2 Color values of porcine plasma protein powder.

Drying method	L^*	a^*	b^*
Freeze drying	59.32±0.80[a]	4.04±0.53[b]	15.27±0.36[c]
Spray drying at 140 °C	77.58±1.89[c]	0.62±0.05[a]	12.14±0.17[b]
Spray drying at 200 °C	64.83±0.49[b]	0.05±0.06[a]	9.24±0.22[a]

Each value is the mean of three replications ± SD.
Means in the same row with different lowercase superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

WHC of freeze-dried PPP could not be determined. This might have been due to the greater solubility of freeze-dried PPP. There was no significant difference in the WHC of spray-dried PPP at the different levels of T_i. However, the OBC of freeze-dried PPP was the highest followed by spray-dried PPP at a T_i of 200 °C and then 140 °C, respectively. It was hypothesized that the porous structure of freeze-dried PPP might bind and entrap a higher volume of oil—more than in the spray-dried PPP (Table 3). The OBC of spray-dried PPP increased with increase in T_i. Similarly, the WHC and OBC of peanut protein isolate increased as a high pressure was applied (He *et al.*, 2014). Moreover, the T_i was more pronounced on the OBC of spray-dried PPP than with WHC.

Rheological properties of porcine plasma protein powder

Steady shear

The viscosity decreased with an increase in the shear rate for all dried PPP. The steady shear rheological properties of PPP are shown in Figure 1. All dried PPP showed a typical non-Newtonian flow behavior. Freeze-dried PPP exhibited Bingham plastic fluid behavior, which required a shear stress of a certain value (yield stress) to flow at which stage the viscosity of the freeze-dried PPP was independent of the shear rate. Clearly, the viscosity of freeze-dried PPP was very small, compared to spray-dried PPP. However, spray-dried PPP (140 °C and 200 °C) exhibited pseudoplastic fluid behavior. The high

Table 3 Solubility, water holding capacity (WHC) and oil binding capacity (OBC) of porcine plasma protein powder.

Drying method	Solubility (%)	WHC (g H_2O/g protein)	OBC (g oil/g protein)
Freeze drying	97.11±0.82^b	-	4.67±0.07^c
Spray drying at 140 °C	42.06±2.21^a	3.66±0.41^a	2.07±0.23^a
Spray drying at 200 °C	42.46±2.29^a	3.75±0.27^a	2.73±0.26^b

Each value is the mean of three replications ± SD.
Means in the same row with different lowercase superscripts are significantly different ($P < 0.05$).
- = No data available.

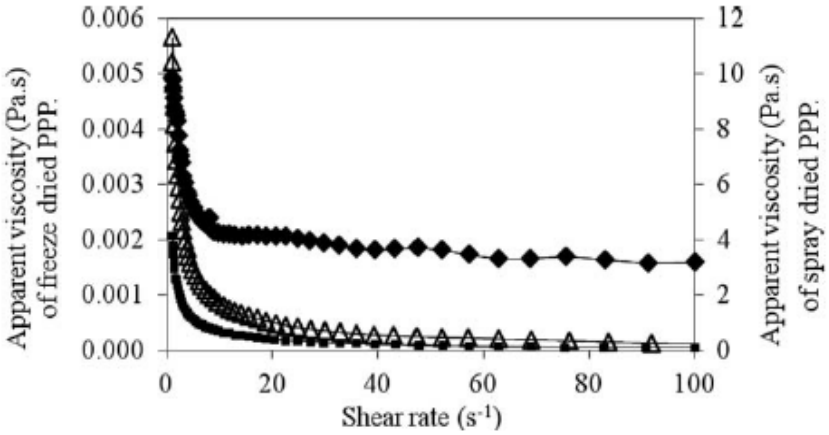


Figure 1 Flow curves of freeze-dried porcine plasma protein powder (PPP) (◆) and spray-dried PPP at different inlet temperatures: 140 °C (■) and 200 °C (△).

T_i affected the biopolymer state (glassy or rubbery state) and induced a thermal degradation of the molecular structure (Leon-Martinez *et al*., 2011). The spray-dried PPP at a T_i level of 200 ºC had significantly greater consistency index (k) values (Table 4). The k value of freeze-dried PPP was the lowest, corresponding to the lowest viscosity. The flow behavior index (n) of spray-dried PPP was less than for freeze dried PPP, indicating that spray dried PPP exhibited more pseudoplastic fluid or shear-thinning behavior ($n < 1$) than did freeze-dried PPP. This was similar to the reported pseudoplastic fluid behavior of rice flour gels (Meng *et al*., 2014) and the pseudoplastic fluid behavior of bovine plasma proteins (Rodriguez Furlán *et al*., 2010).

Viscoelastic properties

Rheological properties are important in the quality control, storage and processing of foods as these properties can indicate the stability and predict texture (Leon-Martinez *et al*., 2011). The linear viscoelastic region (LVR) value was determined from oscillatory stress sweep tests at an angular frequency of 1 Hz. Shear stress at 1 Pa showed LVR in all samples for frequency sweep measurements. LVR could not be detected in the freeze-dried PPP (2% w/w); therefore, no data were determined in this study.

A predominantly elastic behavior (G' > G") was observed in the spray-dried PPP solutions throughout the frequency range studied. This indicated that the behavior of the spray-dried PPP was comparable to a gel-like material. Both the G' and G" values showed a slight dependency on frequency similar to the finding reported with rice flour-based batters (Matos *et al*., 2014). The G' and G" values of dried PPP increased with an increase in the angular frequency (Figure 2).

Table 4 Steady shear rheological properties of porcine plasma protein powder.

Drying method	Flow consistency index, k ($Pa.s^n$)	Flow behavior index, n	R^2
Freeze drying	0.004 ± 0.001^c	0.792 ± 0.035^a	0.947
Spray drying at 140 ºC	4.327 ± 0.119^b	0.128 ± 0.038^b	0.995
Spray drying at 200 ºC	10.483 ± 0.578^a	0.131 ± 0.048^b	0.998

Each value is the mean of three replications ± SD.
Means in the same row with different lowercase superscripts are significantly different ($P < 0.05$).
R^2 = Correlation coefficient.

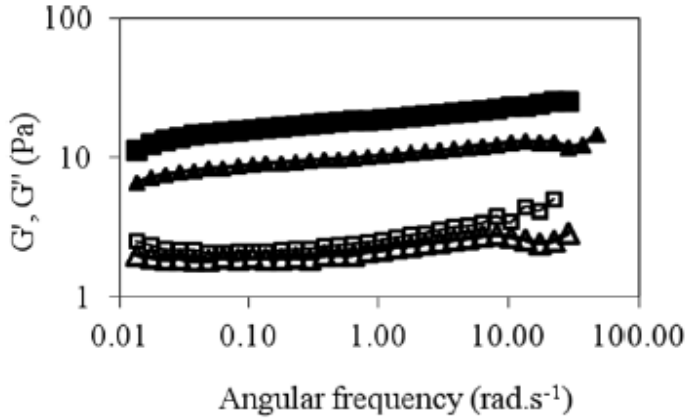


Figure 2 Mechanical spectra showing the angular frequency dependence of storage modulus (G', solid squares) and loss modulus (G", unfilled squares) of spray-dried PPP at 140 ºC (■) and 200 ºC (△).

CONCLUSION

Different drying methods affected the physicochemical and rheological properties of PPP. Freeze-dried PPP exhibited significantly higher solubility and OBC than spray-dried PPP. The higher inlet air temperature in spray drying provided a slightly higher OBC and WHC of PPP. Moreover, the drying methods produced different rheological properties of PPP. Freeze-dried PPP had a much lower viscosity than spray-dried PPP. The results showed that dried PPP might be used as a food additive to improve the food texture or as a biopolymer material for edible film and coating to maintain the quality of food products.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the Thailand Research Fund through the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program (Grant No. PHD/0104/2554) and the Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) for financial support. Thanks are recorded to Shincharoen (2004) Co., Ltd for the donation of the porcine blood.

LITERATURE CITED

Anandharamakrishnan C., C.D. Rielly and A.G.F. Stapley. 2007. Effects of process variables on the denaturation of whey proteins during spray drying. **Dry. Technol.** 25: 799–807.

Association of Official Analytical Chemists. 2000. **Official Methods of Analysis of AOAC International.** 17h ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, WD, U.S.A. Vol. 1. 1143 pp.

Beuchat, L.R. 1977. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour proteins. **J. Agr. Food Chem.** 25: 258–261.

Chinprahast, N., P. Jantawat and D. Kristavee. 1995. Functional property of vacuum-dried, freeze-dried and spray-dried porcine blood plasma. **ASEAN Food J.** 10(1): 10–14.

Cofrades, S., M.A. Guerra, J. Carballo, F. Fernández-Martín and F. Jiménez Colmenero. 2000. Plasma protein and soy fiber content effect on bologna sausage properties as influenced by fat level. **J. Food Sci.** 65 (2): 281–287.

Espinto Santa, E.F.D., L.K.F. Lima, A.P.C. Torres, G. Oliveira and E.H.G. Ponsano. 2013. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Sci. Technol.** 33(1): 47–51.

Fazaeli, M., Z. Emam-Djomeh, A.K. Ashtari and M. Omid. 2012. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food Bioprod. Process.** 90: 667–675.

He X.H., H.Z. Liu, L. Liu, G. L. Zhao, Q. Wang and Q.L. Chen. 2014. Effects of high pressure on the physicochemical and functional properties of peanut protein isolates. **Food Hydrocolloids** 36: 123–129.

International Organization for Standardization. 2008. Colorimetry-Part 4: CIE 1976 L*a*b* Colour Space. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland. 8 pp.

Mandal, P.K., V.K. Rao, B.N. Kowale, and U.K. Pal. 1999. Utilization of slaughter house in human food. **J. Food Sci.** 63(2): 91–105.

Matos, M.E., T. Sanz and C.M. Rosell. 2014. Establishing the function of proteins on the rheological and quality properties of rice based gluten free muffins. **Food Hydrocolloids** 35: 150–158.

Meng, Y.C., M.H. Sun, S. Fang, J. Chen and Y.H. Li. 2014. Effect of sucrose fatty acid esters on pasting, rheological properties and freeze-thaw stability of rice flour. **Food Hydrocolloids** 40: 64–70.

Nuthong, P., S. Benjakul and T. Prodpran. 2009. Characterization of porcine plasma protein-

based films as affected by pretreatment and cross-linking agents. **Int. J. Biol. Macromol.** 44: 143–148.

Leon-Martinez, F.M., J. Rodriguez-Ramirez, L.L. Medina-Torres, L.L. Mendez Lagunas and M.J. Bernad-Bernad. 2011. Effects of drying conditions on the rheological properties of reconstituted mucilage solutions (*Opuntia ficus-indica*). **Carbohydr. Polym.** 84: 439–445.

Jantawat, P., N. Chinprahast and D. Kristavee. 1996. Functional property of stored dried porcine plasma powders and its effect on sausage quality. **ASEAN Food J.** 11: 69–73.

Jittanit, W., S. Niti-Att and O. Techanuntachaikul. 2010. Study of spray drying of pineapple juice using maltodextrin as an adjunct. **Chiang Mai J. Sci.** 37(3): 498–506.

Joshi, M., B. Adhikari, P. Aldred, J.F. Panozzo and S. Kasapis. 2011. Physicochemical and functional properties of lentil protein isolates prepared by different drying methods. **Food Chem.** 129: 1513–1522.

Ockerman, H.W. and C.L. Hansen. 2000. **Animal By-Product Processing and Utilization.** Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster, PA, USA. 523 pp.

Office of Agricultural Economics. 2013. **Agricultural Economy in 2013 and Agricultural Economic Outlook in 2014.** [Available from: http://www.oae.go.th/download/bapp/OutlookFull_2556-2557.pdf] [Sourced: 12 March 2014].

Ofori, J.A. and Y.H. P. Hsieh. 2011. Blood-derived products for human consumption. **Revelation and Science.** 1: 14–21.

Parés, D., E. Saguer, J. Saurina, J. J. Suñol, and C. Carretero. 1998. Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influenced by pH. **J. Food Sci.** 63: 958–961.

Pongkongkaew, P. 2006. **Development of Plasma Protein Film from Porcine Blood and Its Application.** MSc. thesis, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

Ramos-Clamont, G., S. Fernandez-Michel, L. Carrillo-Vargas, E. Martinez-Calderon and L.Vazquez-Moreno. 2003. Functional properties of protein fraction isolated from porcine blood. **J. Food Sci.** 68: 1196–1200.

Rodriguez Furlán, L.T., A. Pérez Padilla and M.E. Campderrós. 2010. Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH, application in a food formulation. **Adv. J. Food Sci. Technol.** 2(5): 256–267.

Sarochwikasit, S. and C. Tangduangdee. 2011. Effect of drying temperature and drying aids on qualities of spray dried pineapple juice. **KMUTT Research and Development J.** 34(3): 203–215.

Suzuki, Y. and M. Shimizu. 1982. **Method for Reducing the Bacterial Population of Blood Powder.** U.S. Patent. 4,347,259.

Toldra, M., A. Elias, D. Pares, E. Saguer and C. Carretero. 2004. Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. **Food Chem.** 88: 461–468.

Yu, J., M. Ahmedna and I. Goktepe. 2007. Peanut protein concentrate: production and functional properties as affected by processing. **Food Chem.** 103: 121–129.