บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เต้าหู้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ผลิตจากถั่วเหลืองมีลักษณะเป็นเจล มีความสามารถในการอุ้มน้ำไว้ได้สูง เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญสำหรับประเทศแถบตะวันออกตั้งแต่เมื่อ 2,000 ปีที่ผ่านมา (Corbin, 1980) Hou และคณะ (1995 อ้างโดย Liu, 1997) กล่าวว่า โดยทั่วไปกระบวนการผลิตเต้าหู้จะประกอบด้วยการแช่ถั่วเหลือง การบดถั่วเหลืองกับน้ำ การกรอง การต้มให้เดือด การตกตะกอนโปรตีนและการบีบอัดเต้าหู้ ซึ่งได้มีการศึกษาพบว่าสภาวะในกระบวนการผลิตเต้าหู้ที่จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของเต้าหู้ ได้แก่ อัตราส่วนของน้ำต่อถั่วเหลือง (Beddows and Wong, 1987a) การให้ความร้อน (Beddows and Wong, 1987b) ชนิดและความเข้มข้นของสารตกตะกอน (Shen *et al.,* 1991) รวมทั้งการบีบอัดและเวลาในการบีบอัดเต้าหู้ (Gandhi and Bourne, 1988)

เต้าหู้อ่อน (Soft tofu หรือ Silken tofu) ผลิตจากน้ำนมถั่วเหลืองที่มีปริมาณของแข็งอยู่ร้อยละ 10-12 (Liu, 1997) ในทางการค้ามักตกตะกอนด้วยกลูโคโนเดลต้าแลคโตน (GDL) (Liu, 1997; Murphy *et al*., 1997) สารละลายแคลเซียมซัลเฟตดีไฮเดรตความเข้มข้นต่ำๆ (Murphy *et al*., 1997) สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตหรือสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (Wang and Hesseltine,1982) ซึ่งเมื่อน้ำนมถั่วเหลืองเกิดการตกตะกอนจะไม่มีการแยกเอาเวย์ออกจากเคิร์ด (Corbin, 1980; Murphy *et al*., 1997) ทำให้มีปริมาณสารอาหารในเต้าหู้สูงและมีเนื้อสัมผัสอ่อนนุ่ม (Murphy *et al*., 1997) คล้ายเนยแข็งชนิดอ่อน (soft cheese like texture) เต้าหู้อ่อน ประกอบด้วยความชื้นประมาณร้อยละ 88-90 และโปรตีนร้อยละ 6 (Liu, 1997)

การผลิตเต้าหู้อ่อนด้วยวิธีดั้งเดิมจะใช้ความร้อนเพื่อให้โปรตีนของถั่วเหลืองสูญเสียสภาพแล้วเกิดเป็นเจล ปัจจุบันนักวิจัยได้ให้ความสนใจการใช้ความดันสูงในการแปรรูปอาหารมากขึ้น กระบวนการใช้ความดันสูงในการแปรรูปและเก็บรักษาอาหารเป็นเทคโนโลยีที่มีการพัฒนา โดยมีจุดมุ่งหมายใช้เพื่อ ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ยับยั้งเอนไซม์ สกัดสารอินทรีย์ การควบคุมสถานะของน้ำ และปฏิกิริยาทางเคมี การใช้ความดันกับวัตถุจะมีผลอย่างสม่ำเสมอ รวดเร็วและไม่ขึ้นอยู่กับขนาดทำให้มีข้อดีที่เหนือกว่าการใช้การแปรรูปด้วยความร้อน โดยสามารถลดการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางอาหาร กลิ่นรส และสี รวมทั้งลดปริมาณการใช้สารเติมแต่งอาหาร

(Vardag and Korner, 1995) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนเนื่องจากการใช้ความดันสูงจะมีผลกระทบต่อเนื้อสัมผัส เช่น การทำให้ไมโอซินเสียสภาพและเกิดลักษณะคล้ายเจลหรือการเกิดลักษณะเนื้อสัมผัสที่ยืดหยุ่นของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่แตกต่างจากการให้ความร้อน (Apichartsrangkoon, 1998) Kajiyama และคณะ (1995) พบว่า เมื่อให้ความดันกับน้ำนมถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 5 ที่ระดับต่ำกว่า 500 เมกกะปาสคาล ต่ำกว่า 10 นาที ความหนืดของน้ำนมถั่วเหลืองจะเพิ่มขึ้น และเมื่อได้รับความดันระดับ 500 เมกกะปาสคาล นาน 30 นาที เปลี่ยนสถานะเป็นโซล นอกจากนี้โปรตีนถั่วเหลืองสามารถเกิดเป็นเจลได้ที่ความดันต่ำสุด 300 เมกกะปาสคาล นาน 10-30 นาที Dumoulin (1998) กล่าวว่าเจลโปรตีนถั่วเหลืองที่เกิดจากความดันสูงจะมีลักษณะเป็นมันวาว (glossy) โปร่งแสง (transparency) เนียน (smooth) และนุ่มกว่าเจลที่เกิดจากความร้อน ดังนั้นการใช้ความดันสูงอาจเป็นแนวทางที่ใช้ในการแปรรูปเต้าหู้และให้ลักษณะ ปรากฏของผลิตภัณฑ์ที่ดีมีเนื้อสัมผัสที่แตกต่างจากกระบวนแปรรูปตามวิธีดั้งเดิม อย่างไรก็ตามการศึกษาแนวทางการใช้ความดันสูงในผลิตภัณฑ์เต้าหู้อ่อนยังมีอยู่จำกัด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงมีเพื่อศึกษาถึงผลของระดับความดันที่เหมาะสม และผลการใช้สารตกตะกอนชนิดต่างๆ ร่วมกับการใช้ความดัน รวมทั้งการใช้ความดันร่วมกับความร้อนที่เหมาะสมในการแปรรูปเต้าหู้อ่อน

การตรวจเอกสาร

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Leguminosae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max (L) Merril* และมีชื่อทั่วไปที่เรียกกันมากมาย ในแต่ละแห่งทั่วโลก เช่น

- Miracle golden bean
- The golden nugget
- Nugget of nutrition
- The cow of China
- Meat of the fields
- The meat that grows on rines
- The Cinderella crop of the century
- The Cinderella crop of the west
- The protein hope of the future
- The amazing soybean

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งของสารอาหารโปรตีน ไขมัน (วันชัย สมชิต, 2522) โดยมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ คือ ความชื้นร้อยละ 6.92 โปรตีนร้อยละ 42.58 ไขมันร้อยละ 20.07 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 25.00 เยื่อใยร้อยละ 1.31 และเถ้าร้อยละ 4.12 โปรตีนจากถั่วเหลืองจัดได้ว่าเป็นโปรตีนที่มีราคาถูกที่สุด นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ เช่น ฟอสฟอรัส โปรตัสเซียม และแคลเซียม ซึ่งเป็นแร่ธาตุที่สำคัญและมักจะขาดแคลนในอาหารที่มีราคาถูก วิตามินในถั่วเหลืองประกอบด้วยวิตามินเอ บี1 บี2 และไบโอติน (Biotin) โดยเฉพาะวิตามินบี 2 จะพบมากกว่าพืชชนิดอื่นๆ และมีมากเกินความต้องการต่อวันของผู้ใหญ่ (ประเทืองศรี สินชัยศรี และวิมลศรี เทวผลิน, 2523) นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยโคลิน (Choline) และอิโนซิทอล (Inositol) (สมชาย ประภาวัต, 2534) น้ำมันถั่วเหลืองมีปริมาณของกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ กรดลิโนเลอิก (Linoleic) ร้อยละ 45 – 62 กรดลิโนเลนิก (Linolenic)ร้อยละ 5 – 11 และประกอบไปด้วยเลคซิทินร้อยละ 3 (สมชาย ประภาวัต, 2534)

เอนไซม์ไลพอกซิจิเนส (Lipoxygenase)

เอนไซม์ไลพอกซิจิเนส (linoleate: oxygen oxidoreductase; EC.1.13.11.12) พบเป็นครั้งแรกในถั่วเหลือง (Maccarrone *et al*., 1992) เอนไซม์ชนิดนี้มีอยู่ในพืชหลายชนิด โดย

เฉพาะในพืชตระกูลถั่ว (legume) แรชดิช อัลฟาร์ฟา และมะเขือเทศ โดยพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุดในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในเนื้อเยื่อสัตว์ (Whitaker, 1994) เอนไซม์ไลพอกซิจิเนสประกอบด้วย 7 ไอโซเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ไลพอกซิจิเนส 1 และ เอนไซม์ไล พอกซิจิเนส 2 มีปริมาณสูงในเมล็ดถั่วเหลือง (Maccarrone *et al*., 1992)

Maccarrone และคณะ (1992) ยังกล่าวว่าเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสเป็นเอนไซม์ไดออกซิจิเนสที่มีเหล็กซึ่งไม่มีอยู่ในหมู่ฮีม (non-heme iron containing dioxygenase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันและไตรกลีเซอไรด์ไม่อิ่มตัวที่ประกอบด้วยหน่วยซิส, ซิส เพนตะ-1,4-ไดอีน (cis, cis penta-1,4 – diene, $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$) ได้เป็นสารประกอบพวกคาร์บอนิล ซึ่งเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ เช่น อะซิทาลดีไฮด์ อะซิโตน เอ็น-เฮ็กซานอล (n-hexanol) รวมทั้งกรดไขมันที่ระเหยได้ (volatile fatty acid) เอมีน แอลกอฮอล์ ฟูราน (furans) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของกลิ่นถั่ว (beany odor) ในถั่วเหลือง (Sessa and Rackis, 1997) Boatright และ Lei (1999) ศึกษาสารให้กลิ่นหลักๆ ในพื้นที่ว่างเหนือสารละลาย soy protein isolate (SPI) โดยใช้วิธี gas chromatografy / olfactometry (GCO) พบว่าสารให้กลิ่นที่มีความเข้มสูงสุดได้แก่ 1) dimetil trisulfide 2) trans, trans-2, 4-decadienal 3) unidentified burnt soy sauce-like odor 4) 2-pentyl pridine 5) trans, trans-2, 4-nonadienal 6) hexanol 7) unidentified charred sweaty feet-like odor 8) acetophenone และ 9) 1-octen-3-one ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ทำให้เกิดกลิ่นรสถั่ว (beany flavor) ขึ้นใน SPI

ผลจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสที่มีต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารมีดังนี้ (Apichartsrangkoon, 1998) คือ

1. การทำลายโครงสร้าง (destruction) ของกรดไขมันจำเป็นได้แก่ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) และ กรดอะราชิโดนิก (arachidonic acid)

2. ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งไปทำลายองค์ประกอบอื่นๆ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ (Morales-Blancas *et al.,* 2002) วิตามิน และเกลือแร่

3. ทำให้เกิดกลิ่นและกลิ่นรสที่ไม่ดี (off-flavor)

โปรตีนในถั่วเหลือง

องค์ประกอบของกรดอะมิโนจากแป้งถั่วเหลืองพร่องไขมันดังแสดงในตารางที่ 1 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นของแป้งถั่วเหลืองพร่องไขมันมีปริมาณเท่ากับที่พบในโปรตีนไข่ยกเว้นกรด อะมิโนที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์ (sulfer-containing amino acid) ได้แก่ เมทไทโอนีน

(methionine) โปรตีนถั่วเหลืองมีปริมาณไลซีน (lysine) อยู่ในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนพืชทั่วไปและยังสามารถนำไปใช้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการร่วมกับโปรตีนจากพืชชนิดอื่นได้อีกด้วย โปรตีนส่วนใหญ่ของถั่วเหลืองเป็นโกลบูลิน (globulin) มีปริมาณร้อยละ 50-90 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด โปรตีนโกลบูลินไม่ละลายที่จุดไอโซอิเล็กตริกซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่าง 4.2-4.6 แต่การละลายจะขึ้นอยู่กับการเติมเกลือ (Wolf and Cowan, 1971 and Yuan *et al.,* 2002) ในการสกัดแป้งถั่วเหลืองด้วยน้ำที่ความเป็นกรดด่างเป็นกลาง ตามด้วยการหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง สามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 4 ส่วนตามสัมประสิทธิ์การตกตะกอน (sedimentation coefficient) คือ 2S 7S 11S และ 15S ซึ่งองค์ประกอบของแต่ละส่วนแสดงดังตารางที่ 2 ในส่วนของ 2S มีอยู่ประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนทั้งหมด ซึ่ง 2S จะประกอบด้วยสารยับยั้งทริปซิน ไซโตโครมซี และโปรตีนที่ไม่ทราบชนิด (Wolf and Cowan, 1971) ส่วนของโปรตีนโกลบูลิน 7S (vicilin, 7.1S-8.7S) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วนหลักๆ ตามคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ (physicochemical properties) คือ β–conglycinin, γ–conglycinin และ basic 7S globulin โดย β–conglycinin จะมีปริมาณมากที่สุด ส่วนทั้ง γ–conglycinin และ basic 7S globulin จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อย β–conglycinin เป็นไตรเมอร์ (trimer) ที่มีมวลโมเลกุล 150-200 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ได้แก่ α (68 kDa.), α′ (72kDa.), β (52kDa.) และ γ ที่มีขนาดใกล้เคียงกับβ โดยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรโฟบิก (Yuan *et al.,* 2002) โปรตีนโกลบูลิน 11S (legumin, 10.1S-14S) เป็นเฮกซะเมอร์ (hexamer) ที่มีมวลโมเลกุล 300-380 กิโลดาลตัน แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ $A_{1a}B_{1b}$(G1), A_2B_{1a}(G2), $A_{1b}B_2$(G3) $A_5A_4B_3$(G4), A_3B_4(G5) แต่ละกลุ่มประกอบด้วย acidic polypeptide และ basic polypeptide โดย acidic และ basic polypeptide จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ทั้งไตรเมอร์และเฮกซะเมอร์รวมตัวกันได้ด้วยพันธะอิเล็กโตรสแตติก และไฮโดรโฟบิก (Yuan *et al.,* 2002) โปรตีน 11S สามารถเตรียมได้โดยการทำเข้มข้นสารละลายสกัดจากกากถั่วเหลือง (soybean meal) ที่ 25-40 องศาเซลเซียส จากนั้นทำเย็นที่อุณหภูมิใกล้ระดับ 0 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ส่วนของ 11S ตกตะกอนออกมาประมาณร้อยละ 69-88 (Orthoefer, 1978) ส่วนของ 15S มีอยู่เพียงร้อยละ 10 ของโปรตีนทั้งหมดและ 15S มีมวลโมเลกุลประมาณครึ่งล้านหรือมากกว่า อีกทั้งโปรตีน 15S ยังตกตะกอนได้โดยการใช้ความเย็นของสารละลายที่สกัดด้วยน้ำเช่นเดียวกันกับโปรตีน 11S โปรตีนถั่วเหลืองสามารถถูกทำให้สูญเสียสภาพได้ด้วยความร้อน ความเป็นกรดด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารทำความสะอาด เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โปรตีนจะมีความสามารถในการละลายต่ำสุด จากนั้นเมื่อให้ความร้อนต่อไปความสามารถในการละลายของโปรตีนจะเพิ่มขึ้น เจลของ

โปรตีนที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8 เมื่อได้รับความร้อนจะเกิดการรวมตัวกันขึ้นเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่และถ้าให้ความร้อนระดับ 125 องศาเซลเซียส กับเจลโปรตีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8-12 จะทำให้เจลโปรตีนถั่วเหลืองเกิดการแตกตัว (break down) เมื่อลดค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายโปรตีนถั่วเหลืองลง 3.8 ถึง 2.0 จะทำให้เกิดการฟอร์มตัวของโปรตีน 2-3S และ 7S ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มของไอออน (ionic strength) การรวมตัวกันของโปรตีน (aggregation) จะมีความว่องไวมากกับความเข้มของไอออนในช่วงความเป็นกรดด่างเป็นกรด (Orthoefer, 1978)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนถั่วเหลือง

Amino acid composition of soybean protein* (based on human requirements)

Eessential amino acids	Meal	Nonessential amino acids	Meal
Lysine	6.9	Arginine	8.4
Methionine	1.6	Histidine	2.6
Cystine	1.6	Tyrosine	3.9
Tryptophan	1.3	Serine	5.6
Threonine	4.3	Glutamic acid	21.0
Isoleucine	5.1	Aspartic acid	12.0
Leucine	7.7	Glycine	4.5
Phenylalanine	5.0	Alanine	4.5
Valine	5.4	Proline	6.3
		Ammonia	2.1

*Grams amino acid per 16 grams nitrogen.

Source : Orthoefer (1978)

ตารางที่ 2 ค่าปริมาณและองค์ประกอบของโปรตีนถั่วเหลืองแต่ละส่วนที่สกัดได้ด้วยน้ำแล้วผ่านการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง

Approximate amounts and components of ultracentrifuge fractions of water extractable soybean proteins

Fraction	Percent of Total	Components	M.W. (KDa)
2S	22	Trypsin inhibitors	8000-21,500
		Cytochrome c	12,000
7S	37	Hemagglutinins	110,000
		Lipoxygenases	102,000
		β-Amylase	61,700
		7S Globulin	180,000-210,000
11S	31	11S Globulin	350,000
15S	11	-	600,000

Source : Adapted from Wolf and Cowan (1971)

เต้าหู้ (Tofu)

เต้าหู้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นเจลสามารถที่จะอุ้มน้ำไว้ในโครงสร้างได้สูง สามารถผลิตโดยนำถั่วเหลืองมาล้าง แช่น้ำ และ บดด้วยน้ำ ได้เป็นถั่วเหลืองบดเหลวข้น นำไปต้มให้เดือดแล้วกรองด้วยผ้า ของเหลวที่ได้มีลักษณะคล้ายน้ำนม เรียกว่า น้ำนมถั่วเหลือง เมื่อเติมสารตกตะกอนโปรตีนได้แก่ สาร bittern สาร nigari สารยิปซัม (gypsum) หรือน้ำส้มสายชูลงในน้ำนมถั่วเหลืองร้อนจะเกิดการฟอร์มตัวของเคิร์ด (curd) จากนั้นนำเคิร์ดที่ได้ไปกดทับก็จะได้เต้าหู้ (Wang and Hesseltine, 1982) เต้าหู้ที่วางจำหน่ายโดยทั่วไปมีหลายชนิด แต่เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำที่ถูกกำจัดออกและคุณลักษณะทางเนื้อสัมผัสของเต้าหู้แล้ว สามารถแบ่งเต้าหู้ออกได้ 3 ชนิดคือ ชนิดอ่อน (soft หรือ silken) ชนิดแข็ง (firm) และชนิดแข็งพิเศษ (extra firm) ปกติแล้วเต้าหู้จะมีขั้นตอนการผลิตที่คล้ายคลึงกันยกเว้นอัตราส่วนของน้ำต่อถั่วเหลือง ชนิดและความเข้มข้นของสารตกตะกอน รวมทั้งปริมาณของเวย์ (whey) ที่ถูกบีบอัดออกไป (Liu, 1997)

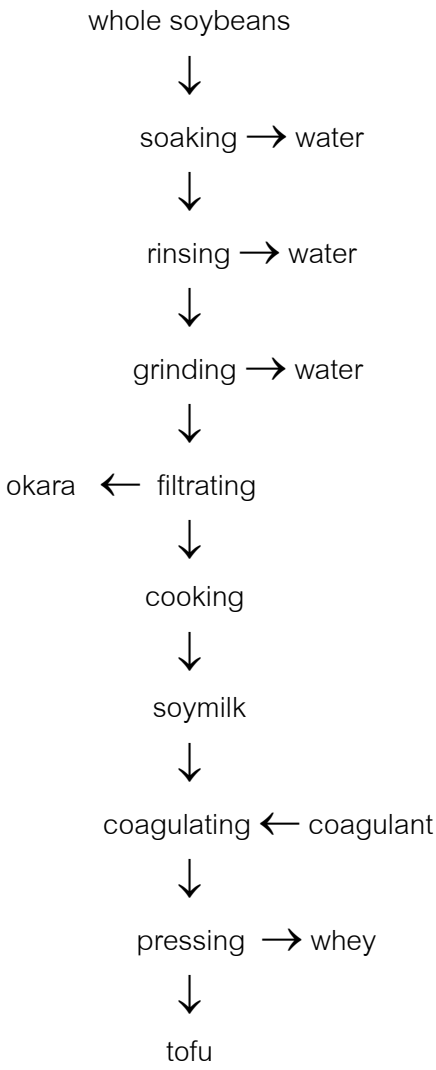
เต้าหู้อ่อน (Soft หรือ Silken tofu หรือ kinugoshi-tofu) ทำจากน้ำนมถั่วเหลืองซึ่งมีปริมาณของแข็งอยู่ร้อยละ 10-12 ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยความชื้นประมาณร้อยละ 88-90 และโปรตีนร้อยละ 6 มีลักษณะเนื้อสัมผัสอ่อนนุ่มคล้ายเนยแข็งชนิดอ่อน แต่ก็ยังมีความแข็งพอที่จะคงรูปร่างอยู่ได้ภายหลังถูกตัด (Liu, 1997) การผลิตเต้าหู้อ่อนทางการค้าสามารถใช้กลูโคโนเดลต้าแลคโตน (glucono-δ-lactone, GDL) (Liu, 1997; Murphy *et al.,* 1997) หรือสารละลายแคลเซียมซัลเฟตไดไฮเดรต (calcium sulfate dihydrate) ความเข้มข้นต่ำๆ (Murphy *et al.,* 1997) โดยผสมสารละลายของสารตกตะกอนกับน้ำนมถั่วเหลืองให้เข้ากัน บรรจุลงภาชนะบรรจุและปิดผนึก หลังจากนั้นแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 80-95 องศาเซลเซียส นานประมาณ 50 นาที เพื่อทำให้โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการตกตะกอนแล้วนำไปแช่ในน้ำเย็น เก็บรักษาในตู้เย็น เต้าหู้ชนิดนี้เมื่อน้ำนมถั่วเหลืองเกิดการตกตะกอนจะไม่มีการแยกเอาเวย์ออกจากเคิร์ด (Corbin, 1980; Murphy *et al.,* 1997) ทำให้มีปริมาณสารอาหารอยู่ในเต้าหู้อ่อนสูงและมีเนื้อสัมผัสอ่อนนุ่ม (Murphy *et al.,* 1997)

เต้าหู้ชนิดแข็ง และชนิดแข็งพิเศษเป็นเต้าหู้ที่ผ่านการบีบอัดเคิร์ด ซึ่งจะมีขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ เริ่มต้นกวนสารตกตะกอนในน้ำนมถั่วเหลืองขณะร้อนอย่างรวดเร็วและทั่วถึง จากนั้นขั้นที่ 2 ทำให้เคิร์ดที่เกิดขึ้นแตก และบีบอัดเคิร์ดนั้น ถ้ามีการปรับน้ำหนักของวัสดุที่ใช้กดจะทำให้แรงกดเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อความแน่นเนื้อของเต้าหู้ เต้าหู้ที่เนื้อสัมผัสมีความแน่นเนื้อสูงจะมีปริมาณน้ำต่ำทำให้ง่ายต่อการจัดการ มีลักษณะคล้ายเนื้อหรือเนยแข็งและช่วยให้เต้าหู้คงรูปอยู่ได้ในขณะให้ความร้อน ดังนั้นเต้าหู้ที่ผ่านการบีบอัดจึงเป็นเต้าหู้ที่เหมาะสมสำหรับการทอดทั้งแบบตื้น (pan-frying) และแบบลึก (deep-frying) และการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) รวมทั้งการใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารอื่นๆ หรือในซุป เมื่อพิจารณาตามวิธีหรือขั้นตอนในการแปรรูปแล้ว สามารถที่จะแบ่งเต้าหู้ออกได้หลายชนิด ได้แก่ เต้าหู้ธรรมดา (plain tofu) เต้าหู้แช่เยือกแข็ง (frozen tofu) เต้าหู้แช่เยือกแข็งแห้ง (dried-frozen tofu) เต้าหู้ทอดน้ำมัน (deep-fried tofu) เต้าหู้ย่าง (grilled tofu) และเต้าหู้หมัก (fermented tofu) เป็นต้น (Liu, 1997)

นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์ packed tofu ซึ่งประยุกต์กระบวนการผลิตจากการผลิตเต้าหู้อ่อนโดยหลังจากทำให้น้ำนมถั่วเหลืองเย็นลง แล้วเติมลงในถุงโพลีสเตียรีน (poly-styrene) หรือโพลีโพพีลีน (polypropylene) ซึ่งบรรจุแคลเซียมซัลเฟตหรือกลูโคโนเดลต้าแลคโตน จากนั้นปิดผนึกถุงให้แน่นแล้วให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที แล้วจึงลดอุณหภูมิลง น้ำนมถั่วเหลืองจะเกิดการตกตะกอนได้เป็น packaged tofu ซึ่งเต้าหู้ชนิดนี้จะง่ายต่อการขนส่งและเก็บรักษามากกว่าเต้าหู้อ่อน (Corbin, 1980)

กระบวนการผลิตเต้าหู้

เมื่อ 2,000 ปีที่ผ่านมาชาวจีนมีขั้นตอนการผลิตเต้าหู้ ตามภาพที่ 1 ดังนี้



ภาพที่ 1 แผนผังกระบวนการผลิตน้ำนมถั่วเหลืองและเต้าหู้ตามวิธีของชาวจีน

Flow diagram for preparation soymilk and tofu according to the Chinese method

Source : Liu (1997)

การแช่น้ำ (soaking) นำถั่วเหลืองแห้งทั้งเมล็ดมาทำความสะอาด ชั่งน้ำหนัก และแช่น้ำทิ้งไว้ข้ามคืน โดยใช้น้ำในการแช่ถั่วประมาณ 2 ถึง 3 เท่าของปริมาตรของถั่วเหลือง

การเทและล้างน้ำ (draining and rinsing) นำถั่วเหลืองที่ผ่านการแช่น้ำแล้วรินน้ำออกและล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ถึง 3 ครั้ง

การบด (grinding) บดถั่วเหลืองเปียกด้วยเครื่องโม่ เติมน้ำสะอาดโดยให้มีอัตราส่วนของน้ำ : ถั่ว ประมาณ 6 : 1 ได้เป็นถั่วเหลืองบดเหลวข้น

การกรอง (filtering) นำถั่วเหลืองบดเหลวข้นมากรองผ่านถุงผ้าโดยการบีบอัดด้วยอุปกรณ์ที่เป็นไม้ ได้กากถั่วเหลือง ซึ่งเรียกว่า okara นำกากมาล้างด้วยน้ำร้อน กวน และบีบอัดอีกครั้งปริมาตรสุดท้ายของน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้จะประมาณ 8-10 เท่าของปริมาตรเดิม

การต้ม (cooking) นำน้ำนมถั่วเหลืองมาต้มให้เดือดหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดการไหม้ของน้ำนมถั่วเหลืองที่ก้นหม้อ ภายหลังน้ำนมถั่วเหลืองเดือดนาน 10 นาที เทใส่อีกภาชนะเพื่อทำให้น้ำนมถั่วเหลืองเย็นตัวลง

การตกตะกอนโปรตีน (coagulation) ทำการเตรียมสารละลายของสารตกตะกอนโปรตีน ในระหว่างการทำเย็นน้ำนมถั่วเหลือง โดยการผสมผงของสารตกตะกอนกับน้ำร้อนให้เข้ากันดี สารตกตะกอนที่นิยมใช้มี 2 ชนิด คือ ยิปซัม (gypsum) ซึ่งเป็นผลึกของสารแคลเซียมซัลเฟตหรือ ไนการิ (nigari) มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) เมื่ออุณหภูมิของน้ำนมถั่วเหลืองลดลงเหลือ 78 องศาเซลเซียส เติมสารละลายของสารตกตะกอนลงไปแล้วกวนให้เข้ากัน ไม่ต่ำกว่า 30 วินาที จากนั้นบรรจุใส่ภาชนะและตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการตกตะกอน

การบีบอัด (pressing) นำเคิร์ดของเต้าหู้มาทำให้แตกจากนั้นเทลงกล่องตื้นซึ่งห่อหุ้มด้วยผ้า จากนั้นดึงผ้าที่อยู่ทั้ง 4 ด้านของกล่องขึ้นแล้วพับไว้บนเคิร์ดภายในกล่อง นำฝาไม้ที่มีขนาดเล็กกว่ากล่องมาปิดทับด้านบนของเคิร์ดและทับฝาไม้ไว้ด้วยก้อนอิฐนานประมาณ 30 นาที เวย์จะถูกแยก ออกมาทำให้เต้าหู้มีความแน่นเนื้อสูงขึ้น ระดับของความแน่นเนื้อจะมีความสัมพันธ์อย่างมากกับแรงกดที่ใช้ในขั้นตอนนี้ สุดท้ายนำก้อนเต้าหู้ที่ได้ใส่ในภาชนะที่บรรจุน้ำเย็นไว้ภายใน เต้าหู้สดสามารถเก็บรักษาไว้ภายในน้ำเย็นได้นาน 1-14 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของแต่ละฤดูกาล ปัจจุบันหากเก็บไว้ในตู้เย็นแล้วเปลี่ยนน้ำบ้างจะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเต้าหู้ออกไปได้ประมาณ 1 สัปดาห์ (Liu, 1997)

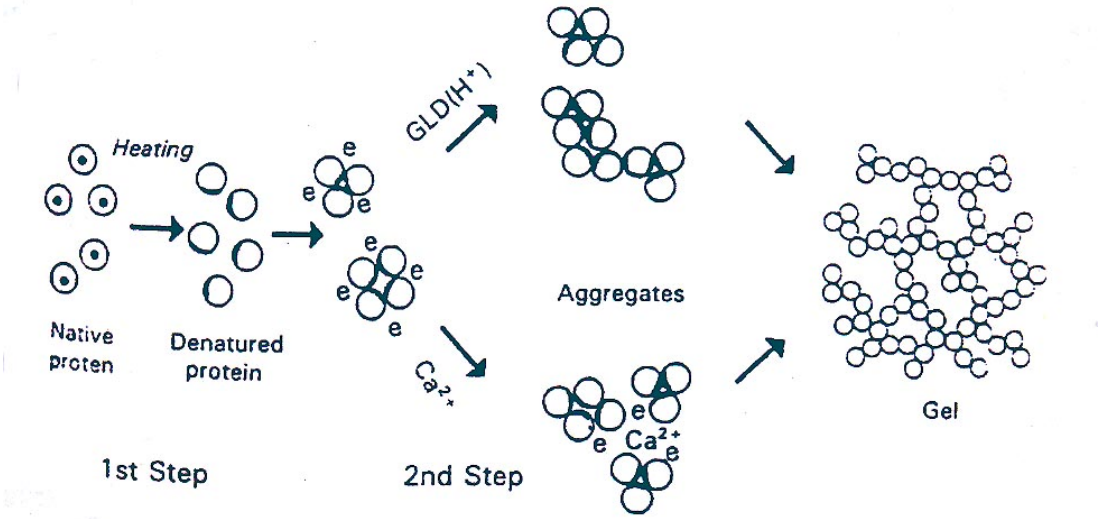
กลไกการเกิดเจลของเต้าหู้ด้วยความร้อน

การให้ความร้อนกับน้ำนมถั่วเหลืองก่อนที่จะเติมสารตกตะกอนโปรตีนถือเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากช่วยในการปรับปรุงคุณภาพทางด้านโภชนาการ และลดกลิ่นรสถั่ว (beany flavor)

ที่เกิดขึ้น อีกทั้งยังเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนทำให้สามารถตกตะกอนกลายเป็นเคิร์ดได้ (Liu, 1997)

Saio (1979) กล่าวว่าการให้ความร้อนกับน้ำนมถั่วเหลืองทำให้เกิดการรวมตัวกัน (aggregation) และการโพลีเมอร์ไรเซชั่นของโปรตีนถั่วเหลือง โดยเฉพาะโปรตีน 11S ซึ่งมีจำนวนของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลและพันธะไดซัลไฟด์เท่ากับ 2 และ 20 ต่อโมเลกุลตามลำดับ (Molina *et al*., 2001) จะเกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างพันธะไดซัลไฟด์กับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl–disulfide interchange) ปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลจะเพิ่มขึ้นทันทีภายหลังได้รับความร้อนจนมีปริมาณสูงสุดจากนั้นจึงลดลง การให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิและช่วงเวลาที่เหมาะสมกับน้ำนมถั่วเหลืองจะช่วยให้ได้ปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลอยู่ในช่วงที่สูง (Saio, 1979) โดย Watanabe และคณะ (1964 อ้างโดย Liu, 1997) ได้กล่าวว่าการต้มน้ำนมถั่วเหลืองให้เดือดนาน 10 นาที เป็นอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม โปรตีน 11S จะมีหมู่ซัลฟ์ไฮดริลเพิ่มขึ้นระหว่างการให้ความร้อนและมีผลทำให้ค่าความแข็ง ค่าความยึดเกาะ และค่าความยืดหยุ่นของเต้าหู้เพิ่มขึ้น แต่โปรตีน 7S จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสเพียงเล็กน้อยในระหว่างการให้ความร้อนแม้ว่าจะมีจำนวนของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลเพิ่มขึ้นก็ตาม (Saio, 1979)

Kohyama และคณะ (1995) พบว่ากลไกการเกิดเจลของเต้าหู้ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกโปรตีนถั่วเหลืองเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพตามธรรมชาติ เนื่องจากได้รับความร้อนและเกิดการรวมตัวกันด้วยพันธะไฮโดรโฟบิกโดยอาศัยโปรตรอนจากกลูโคโนเดลต้าแลคโตนหรือแคลเซียมไอออน โดยในน้ำนมถั่วเหลืองดิบมีพันธะไฮโดรโฟบิกอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีน เมื่อได้รับความร้อนพันธะไฮโดรโฟบิกจะถูกผลักออกสู่ภายนอกโมเลกุล ดังนั้นโปรตีนถั่วเหลืองที่เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติด้วยความร้อนจะมีประจุเป็นลบ (Kohyama and Nishinari, 1993) จากนั้นในขั้นตอนที่สองโปรตรอนที่เกิดจากกลูโคโนเดลต้าแลคโตนหรือแคลเซียมไอออนจะทำให้ประจุสุทธิของโมเลกุลโปรตีนมีค่าเท่ากับศูนย์มีผลทำให้พันธะไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลโปรตีนเด่นขึ้นและนำไปสู่การเกิดการตกตะกอนดังภาพที่ 2 (DeMan *et al*., 1986)



ภาพที่ 2 กลไกการเกิดเจลของโปรตีนถั่วเหลืองที่เกิดจากสารกลูโคโนเดลต้าแลคโตนหรือแคลเซียมซัลเฟต

Gelation mechanism of soybean proteins in the presence of GDL or $CaSO_4$.

Circle=protein molecules; dot=hydrophobic regions

o = protein molecule

● = hydrophobic regions

Source : Kohyama *et al.,* (1995)

นอกจากนี้ยังมีข้อสันนิษฐานว่าพันธะไฮโดรโฟบิก พันธะไฮโดรเจน และพันธะระหว่างประจุ (charge – charge interaction) มีส่วนในการสร้างโครงข่ายร่างแหของโปรตีนเต้าหู้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม Kohyama และคณะ (1995) พบว่าพันธะไดซัลไฟด์มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเกิดของโครงข่ายร่างแหของเจลเต้าหู้ เนื่องจากการเกิดของเจลในตัวกลางที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำจะเกิดขึ้นช้ามาก อีกทั้งเจลของเต้าหู้จะเกิดการแตกสลายอย่างสมบูรณ์ในสารละลายยูเรีย ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่ายูเรียจะไม่ทำลายพันธะโควาเลนซ์ แต่ในทางตรงกันข้าม Obata และ Matsuura (1993) และ Obata และคณะ (1996) กล่าวว่าการเกิดพันธะไดซัลไฟด์จะขึ้นอยู่กับปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลซึ่งมีความสำคัญในการเกิดเจลของเต้าหู้

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกระบวนการผลิตเต้าหู้

1. องค์ประกอบและความแตกต่างของถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีความแตกต่างอย่างมากมายในด้านของลักษณะปรากฏและองค์ประกอบทางเคมี ลักษณะปรากฏ ได้แก่ ขนาดของเมล็ด รูปร่าง สีของสะดือบนเมล็ดถั่วเหลือง (hilum) และ สีใบแรกของต้นอ่อนของถั่วเหลือง (cotyledon) มีผลกระทบเล็กน้อยกับคุณภาพของเต้าหู้ โดยพบว่าขนาดของถั่วเหลืองพันธุ์เดียวกันไม่ได้มีผลกระทบต่อคุณภาพและผลผลิตของเต้าหู้ องค์ประกอบทางเคมีจะมีผลต่อกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และผลผลิตของเต้าหู้ ซึ่งผลกระทบขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของถั่วเหลืองที่มีต่อคุณภาพเต้าหู้มีดังนี้ (Liu, 1997)

1.1 โปรตีน

โปรตีน 11S (glycinin) และ 7S (β - conglycinin) เป็นโปรตีนหลักของโปรตีนในถั่วเหลืองมีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อน แต่มีคุณสมบัติทางกายภาพของเจลเต้าหู้ที่ได้แตกต่างกัน (Liu, 1997) โดยโปรตีน 7S สามารถทนต่อความร้อนได้ต่ำกว่าโปรตีน 11S กล่าวคือโปรตีน 7S และ 11S มีอุณหภูมิของการสูญเสียสภาพที่ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ความเป็นกรดด่างเป็นกลางและไม่เติมเกลือ (Hermansson, 1978)

Wolf และ Cowan (1971) รายงานว่า โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ที่พบในสารสกัดจากน้ำของถั่วเหลืองพร่องไขมัน (water extract of defatted meal) สามารถสร้างโพลีเมอร์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งการโพลีเมอร์ไรเซชั่นที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนทำให้เกิดความขุ่น (turbidity) และความข้นหนืดที่เพิ่มขึ้นของสารละลายโปรตีน โปรตีนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ถูกทำให้แตกสลายเป็นหน่วยย่อยๆ (depolymerized) ได้ง่ายด้วยสารละลายเมอร์แคปโตเอทานอล (mercaptoethanol) สารซิสเทอิน (cysteine) หรือสารโซเดียม ซัลไฟต์ (sodium sulfite) และพบว่าเต้าหู้ที่ผลิตจากโปรตีน 11S (crude 11S protein) จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แน่นเนื้อมากกว่าเต้าหู้ที่ผลิตจากโปรตีน 7S (crude 7S protein)

Saio และคณะ (1979) กล่าวว่า เจลของโปรตีน 11S ซึ่งเกิดจากสารแคลเซียมซัลเฟต มีความแข็งมากกว่าเจลของโปรตีน 7S โปรตีน 11S เป็นองค์ประกอบหลักที่ทำให้เกิดความแข็ง (hardness) ความเปราะ (brittleness) และความหยุ่นตัว (gumminess) ของเต้าหู้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาอนุภาคของโปรตีน โดยใช้ transmission electron microscopy พบว่าอนุภาคของโปรตีน 11S ที่อยู่ในโครงสร้างร่างแหของเต้าหู้ที่ตกตะกอนด้วยแคลเซียมซัลเฟตหรือ กลูโคโนเดลต้าแลคโตนมีลักษณะใหญ่กว่าอนุภาคของโปรตีน 7S อย่างเห็นได้ชัด

Kohyama และ Nishinari (1993) กล่าวว่า อัตราการเกิดเจลจะเพิ่มขึ้น และเวลาในการเกิดเจลจะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคโนเดลต้าแลคโตนขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีน 7S มีค่าคงที่ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดเจลโดยกลูโคโนเดลต้าแลคโตนของโปรตีน 7S จะต่ำกว่า และเวลาในการเกิดเจลจะนานกว่าโปรตีน 11S นอกจากนี้เมื่อเติมสารแคลเซียมซัลเฟตลงในส่วนผสมระหว่าง 11S และ 7S พบว่าโปรตีน 11S เป็นองค์ประกอบหลักในการสร้างโครงข่ายร่างแหของเจล ขณะที่โปรตีน 7S จะขัดขวางการเกิดเจลของโปรตีน 11S (Kohyama *et al*., 1995) Saio (1979) พบว่า ผลของความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อสัมผัสของเจลเต้าหู้จะมีผลในโปรตีน 11S มากกว่าในโปรตีน 7S พันธุ์ถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนอยู่สูงจะสามารถผลิตเต้าหู้ให้มีปริมาณโปรตีนสูงมีความแน่นเนื้อและมีเนื้อสัมผัสที่ยืดหยุ่น (springy texture) ได้มากกว่าถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่มีปริมาณโปรตีนต่ำ นอกจากนี้ถั่วเหลืองที่มีค่า nitrogen solubility index (NSI) สูงมักจะให้น้ำนมถั่วเหลืองและเต้าหู้ที่มีปริมาณโปรตีนสูงด้วย (Liu, 1997) Lim และคณะ (1990) ทำการศึกษาผลของคุณลักษณะของถั่วเหลือง 9 สายพันธุ์และน้ำนมถั่วเหลืองต่อปริมาณผลผลิตของเต้าหู้ที่ตกตะกอนโปรตีนด้วยสารแคลเซียมซัลเฟต พบว่าถั่วเหลืองที่มีปริมาณโปรตีนสูง เถ้าน้อย ฟอสฟอรัสต่ำ รวมทั้งน้ำนมถั่วเหลืองที่มีความเป็นกรดด่างสูง และมีปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงจะสามารถให้ผลผลิตของเต้าหู้ได้ในปริมาณสูง ต่อมา Shen และคณะ (1991) ได้ผลิตเต้าหู้จากถั่วเหลือง 9 สายพันธุ์ และใช้สารกลูโคโนเดลต้าแลคโตนเป็นสารตกตะกอนโปรตีน พบว่าปริมาณผลผลิตและค่าความแข็งของเต้าหู้เพิ่มขึ้นเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองหรือน้ำนมถั่วเหลืองสูง ส่วนค่าความสามารถในการแตกหัก (fracturability) ของเต้าหู้จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากปริมาณของฟอสฟอรัสในถั่วเหลืองสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามขนาดของถั่วเหลืองไม่ได้มีผลต่อปริมาณผลผลิตของเต้าหู้

Scharfer และ Love (1992) ได้ใช้ถั่วเหลือง 3 สายพันธุ์ที่ปลูกภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างกัน 4 สภาวะ นำมาผลิตเป็นเต้าหู้ แล้วศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบ เช่น โปรตีน ไขมัน กรดไฟติก แคลเซียม ทองแดง และเหล็ก กับองค์ประกอบของน้ำนมถั่วเหลืองและเต้าหู้ พบว่าองค์ประกอบทั้งหมด ยกเว้นไขมันที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับองค์ประกอบเดียวกันในน้ำนมถั่วเหลือง แต่มีเพียงกรดไฟติก ทองแดง และเหล็กในเมล็ดถั่วเหลืองที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับเต้าหู้

1.2 กรดไฟติก (phytic acid)

ถั่วเหลืองมีปริมาณกรดไฟติกคิดเป็นปริมาณมากกว่าสองในสามของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่พบในถั่วเหลือง กรดไฟติกถูกสกัดออกจากเมล็ดถั่วเหลืองในระหว่างขั้นตอน

การผลิตน้ำนมถั่วเหลือง Saio (1979) กล่าวว่าค่าความแข็งของเต้าหู้มีค่าลดลงเมื่อเติมกรดไฟติกและเต้าหู้ที่ผลิตจากโปรตีน 11S มีค่าความแข็งลดลงมากกว่าเต้าหู้ที่ผลิตจากโปรตีน 7S เนื่องจากกรดไฟติกทำปฏิกริยากับไดวาเลนซ์ คือ แคทไอออนและโปรตีน อีกทั้งยังทำให้เกิดตะกอนของคอลลอยด์ (colloidal precipitates) ซึ่งสามารถเก็บกักน้ำไว้ในโครงสร้างเจลเต้าหู้ได้มากขึ้น นอกจากนี้กรดไฟติกยังเกิดการแข่งขันกับโปรตีนในการตกตะกอน (Schaefer and Love, 1992) ดังนั้นถ้าถั่วเหลืองมีปริมาณกรดไฟติกอยู่สูงก็จำเป็นที่จะต้องใช้สารตกตะกอนโปรตีนในปริมาณที่สูงขึ้น อีกทั้งถั่วเหลืองที่มีกรดไฟติกในปริมาณสูงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำนมถั่วเหลืองเมื่อเติมแคลเซียมซัลเฟตลดลงมากกว่าถั่วเหลืองที่มีปริมาณกรดไฟติกต่ำกว่า (Tezuka *et al*., 1995)

2. อุณหภูมิในขั้นตอนการบดถั่วเหลือง

Obata และ Matsuura (1993) พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการบดจาก 0 องศาเซลเซียส จนถึง 50 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ความแน่นเนื้อของเต้าหู้ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าหมู่ซัลฟ์ไฮดริลในโปรตีนถั่วเหลืองมีค่าลดลงเช่นกัน เนื่องจากผลของกิจกรรมเอนไซม์ไลพอกซิจิเนส

3. ปริมาณของแข็งทั้งหมดของน้ำนมถั่วเหลือง

ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำนมถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์อย่างมากกับอัตราส่วนระหว่างน้ำ : ถั่วเหลือง และอัตราส่วนระหว่างน้ำนมถั่วเหลือง : ถั่วเหลือง อัตราส่วนน้ำ : ถั่วเหลืองเป็นน้ำหนักรวมของน้ำที่เติมลงไปในถั่วเหลืองแห้งระหว่างขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ ขั้นตอนการแช่ถั่ว การบดและการต้ม รวมถึงน้ำที่ใช้ล้างกากถั่วเหลืองในครั้งแรก หารด้วยน้ำหนักเริ่มต้นของถั่วเหลืองแห้ง อัตราส่วนของน้ำนมถั่วเหลือง : ถั่วเหลือง เป็นน้ำหนักรวมของน้ำนมถั่วเหลืองที่ได้หารด้วยน้ำหนักเริ่มต้นของถั่วเหลืองแห้ง แต่บางครั้งน้ำจะถูกดูดซับอยู่ในกากถั่วเหลือง ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างน้ำนมถั่วเหลืองต่อถั่วเหลืองจึงมีค่าประมาณร้อยละ 92 ของอัตราส่วนระหว่างน้ำต่อถั่วเหลือง (Liu, 1997) มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนในเต้าหู้กับอัตราส่วนของน้ำต่อถั่วเหลือง พบว่า อัตราส่วนที่ให้ปริมาณโปรตีน (protein recovery) ในเต้าหู้สูงที่สุด คือ อัตราส่วนของน้ำต่อถั่วเหลือง เท่ากับ 10 ต่อ 1 (Beddows and Wong, 1987a) นอกจากนี้ Cai และ Chang (1995 อ้างโดย Liu, 1997) ได้ผลิตเต้าหู้แข็ง (pressed tufu) โดยใช้น้ำนมถั่วเหลืองความเข้มข้นต่างๆกันพบว่าปริมาณผลผลิตและค่าความยึดเกาะ (cohesiveness)

ลดลงขณะที่ค่าความเปราะ ค่าความแข็ง และค่าความยืดหยุ่น (elasticity) เพิ่มสูงขึ้น เมื่อน้ำนมถั่วเหลืองมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (องศาบริกซ์) เพิ่มขึ้น

4. ชนิดของสารตกตะกอนโปรตีน

โดยทั่วไปแล้วจะมีสาร 3 ประเภทที่สามารถจะเป็นสารตกตะกอนโปรตีนได้ คือ เกลือ กรด และเอนไซม์ สารตกตะกอนที่ใช้กันทั่วไปในการผลิตเต้าหู้ ได้แก่ แคลเซียมซัลเฟต ไนการิ (nigari หรือ chloride – type) กลูโคโนเดลต้าแลคโตนหรือที่รู้จักกันในชื่อ Lactone และสาร 2 ชนิดรวมกัน (Liu, 1997)

4.1 สารตกตะกอนที่เป็นเกลือ

แคลเซียมซัลเฟตเป็นสารตกตะกอนโปรตีนที่นิยมใช้มากที่สุด เมื่อกว่า 2000 ปีที่ผ่านมาชาวจีนได้นำผลึกของหินสีขาวที่มีชื่อเรียกว่า ยิปซัม (gypsum) ซึ่งอยู่ในรูปไดไฮเดรตของแคลเซียมซัลเฟตมาทำให้แตกและบดเพื่อนำมาทำเต้าหู้ ปัจจุบันในประเทศสหรัฐอเมริกามีการใช้ยิปซัมที่มีความบริสุทธิ์สูงในการผลิตแคลเซียมซัลเฟต

ไนการิหรือเกลือของคลอไรด์ ได้แก่ ไนการิธรรมชาติ (natural nigari) ไนการิบริสุทธิ์ (refined nigari) และแคลเซียมคลอไรด์ ไนการิธรรมชาติสามารถสกัดได้จากสาหร่ายทะเลโดยการกำจัดเกลือแกงและน้ำออกให้หมด ไนการิประกอบไปด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์รวมกับเกลือต่างๆ และแร่ธาตุบางชนิดในสาหร่ายทะเล ไนการิบริสุทธิ์เป็นผลึกบริสุทธิ์ของ $MgCl_2.6H_2O$ (Liu, 1997)

ได้มีการศึกษาถึงผลของสารตกตะกอนโปรตีนต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิตของเต้าหู้ ดังเช่น Tsai และคณะ (1981) กล่าวว่า คุณภาพของเต้าหู้ที่ผลิตโดยใช้สารตกตะกอนชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยแคลเซียมซัลเฟต และไนการิเหมาะสำหรับที่จะเป็นสารตกตะกอนโปรตีนในการผลิตเต้าหู้แบบจีน (Chinese – style tofu) Wang และ Hesseltine (1982) พบว่า จากการทดสอบสารตกตะกอนที่มีคุณสมบัติเป็นเกลือ 4 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และแมกนีเซียมคลอไรด์ ผลปรากฏว่าเกลือแคลเซียมซัลเฟตจะให้เต้าหู้ที่มีน้ำหนักสด (fresh weight) สูงที่สุด เต้าหู้ที่ได้จากการใช้เกลือคลอไรด์ตกตะกอนจะมีความแข็งและความเปราะสูงกว่าเต้าหู้ที่เกิดจากเกลือซัลเฟต ขณะที่ Hou และคณะ (1995 อ้างโดย Liu, 1997) พบว่าเต้าหู้ที่ผลิตจากไนการิจะมีปริมาณผลผลิตสูงแต่มีค่าความแข็ง และค่าความยืดหยุ่นต่ำกว่าแคลเซียมซัลเฟต

โดยทั่วไปสารตกตะกอนโปรตีนแต่ละชนิดจะมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป แคลเซียมซัลเฟตจะเป็นสารตกตะกอนที่ได้รับความนิยมสูงที่สุด สามารถนำไปผลิตเต้าหู้ได้หลายชนิด เช่น เต้าหู้อ่อน (silken tofu) เต้าหู้แข็ง (firm tofu) เต้าหู้แข็งพิเศษ (extra firm tofu) เนื่องจากสารนี้สามารถเก็บน้ำไว้ในเต้าหู้ได้ แต่เต้าหู้ที่ผลิตจากแคลเซียมซัลเฟตจะมีกลิ่นรสที่ด้อยกว่าเต้าหู้ที่ผลิตจากไนการิเล็กน้อย และเมื่อผสมแคลเซียมซัลเฟตกับน้ำจะได้สารแขวนลอยที่ไม่คงตัว เนื่องจากแคลเซียมซัลเฟตมีความสามารถในการละลายจำกัด ทำให้เกิดปัญหาในการผสมกับน้ำนมถั่วเหลืองซึ่งจะมีผลต่อความสม่ำเสมอของเนื้อสัมผัสเต้าหู้ ดังนั้นในขั้นตอนการเตรียมควรนำแคลเซียมซัลเฟตมาผสมกับน้ำก่อนแล้วจึงค่อยใส่ลงในน้ำนมถั่วเหลือง (Liu, 1997)

ไนการิเป็นสารตกตะกอนโปรตีนที่ให้เต้าหู้รสชาติดีมีกลิ่นและกลิ่นรสหวานเล็กน้อย แต่เนื้อสัมผัสของเต้าหู้จะมีลักษณะไม่นุ่มและเนียนเท่ากับเต้าหู้ที่ผลิตจากแคลเซียมซัลเฟต ดังนั้นไนการิจึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็นสารตกตะกอนโปรตีนในการผลิตเต้าหู้อ่อน เนื่องจากไนการิไม่ทำให้เกิดการเก็บกักน้ำไว้ในเต้าหู้ได้มากเท่ากับสารตกตะกอนชนิดอื่น อีกทั้งระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนการิมีช่วงแคบและปฏิกิริยาการตกตะกอนของโปรตีนยังเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การใช้ไนการิเป็นสารตกตะกอนจึงจำเป็นจะต้องอาศัยความชำนาญอย่างมากของผู้ผลิตเต้าหู้ ดังนั้นผู้ผลิตเต้าหู้ในญี่ปุ่นสวนใหญ่จึงนิยมใช้ไนการิร่วมกับแคลเซียมซัลเฟตหรือกลูโคโนเดลต้าแลคโตนมากกว่าที่จะใช้เพียงชนิดเดียว (Liu, 1997)

4.2 สารตกตะกอนที่เป็นกรด (acid coagulants)

กลูโคโนเดลต้าแลคโตนหรือแลคโตน (Gluconodeltalactone, GDL) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกลูโคส ในระบบอุตสาหกรรมสามารถผลิตได้จากแป้งข้าวโพดโดยอาศัยกระบวนการหมัก GDL มีลักษณะผงละเอียด สีขาว ไม่มีกลิ่น และรสหวาน นิยมใช้กันอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้เป็นสารตกตะกอนโปรตีน และใช้เป็นสารที่ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างต่ำลง (pH – lowing agent) โดย GDL เมื่อละลายน้ำจะได้เป็นกรดกลูโคนิก GDL เข้มข้นร้อยละ 1 จะมีค่าความเป็นกรดด่าง 3.6 ภายใน 2 ชั่วโมง GDL มีข้อแตกต่างพื้นฐานกับสารประกอบไนการิและสารประกอบยิปซัม คือ GDL เกิดจากปฏิกิริยาของกรดมากกว่าเกลือ ข้อดีที่สำคัญของ GDL คือสามารถใช้ในปริมาณมากผสมกับน้ำนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทใส่ภาชนะปิดผนึกได้ทันที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำร้อนการตกตะกอนของโปรตีนจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากความร้อนไปกระตุ้นให้เกิดการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของ GDL ในกรดกลูโคนิค สารตกตะกอนชนิดนี้เหมาะสำหรับการผลิตเต้าหู้อ่อนในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเต้าหู้ที่ได้มีลักษณะเนื้อสัมผัสละเอียดเนียน นอกจากนี้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์

ยังทำให้เต้าหู้มีอายุการเก็บนานขึ้นอีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงด้านคุณค่าทางโภชนาการแล้ว เกลือแคลเซียมจะเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเต้าหู้ให้สูงขึ้น แต่ถ้าต้องการเต้าหู้ที่มีคุณภาพดีขึ้นก็มักจะมีการใช้ GDL ร่วมกับเกลือแคลเซียมในการผลิตเต้าหู้ (Liu, 1997)

4.3 สารตกตะกอนที่เป็นเอนไซม์

เอนไซม์ที่ทำให้โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการรวมตัวกัน (clotting) เป็นพวกเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) Scharf (1979 อ้างโดย Liu, 1997) ผลิตเต้าหู้จากเอนไซม์ปาเปน (crude papain) โดยใช้เอนไซม์ปริมาณร้อยละ 1 – 3 ผสมกับน้ำนมถั่วเหลืองดิบที่อุณหภูมิห้องวางทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนจนกระทั่งเกิดการตกตะกอนของโปรตีน เอนไซม์นี้จะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส

ต่อมา Murata และคณะ (1987, 1988) ได้ทดสอบประสิทธิภาพการรวมตัวกันของโปรตีนในน้ำนมถั่วเหลือง (soymilk-clotting efficiency) โดยใช้เอนไซม์โปรติเนสที่ทำงานที่สภาวะเป็นกรด (acidic proteinase) เป็นกลาง (neutral proteinase) และเป็นด่าง (alkaline proteinase) ซึ่งได้จากจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ พบว่าเอนไซม์โปรติเนสสามารถตกตะกอนโปรตีนถั่วเหลืองได้ ความสามารถในการทำให้เกิดการตกตะกอนของเอนไซม์เหล่านี้จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเกลือแคลเซียมคลอไรด์หรือแมกนีเซียมคลอไรด์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเกิดความแตกต่างของประสิทธิภาพในการทำให้เกิดการตกตะกอนและรสชาติของเต้าหู้ โดยมีเพียงเอนไซม์โปรติเนสที่ทำงานที่สภาวะเป็นกลางและเป็นด่างที่ได้จากจุลินทรีย์เท่านั้นที่มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตเต้าหู้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเต้าหู้ที่ได้จากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีเนื้อสัมผัสเนียนอีกทั้งยังมีความคงตัวของอีมัลชั่นอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่กว้าง

5. ความเข้มข้นของสารตกตะกอนโปรตีน

ปริมาณสารตกตะกอนที่เติมจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของเต้าหู้ เมื่อเติมสารตกตะกอนในปริมาณที่เหมาะสม เวย์ที่ได้จะมีลักษณะใสสีเหลืองอัมพันหรือสีเหลืองอ่อน แต่ถ้าเติมในปริมาณมากเกินไปเวย์จะมีสีค่อนข้างเหลือง รสขมเล็กน้อย และเต้าหู้ที่ได้จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสหยาบ ถ้ามีการเติมไนการิเล็กน้อย เวย์จะมีลักษณะขุ่นและยังคงมีน้ำนมถั่วเหลืองที่ไม่ตกตะกอนเหลืออยู่บ้างเล็กน้อย (Liu, 1997)

Skurray และคณะ (1980) พบว่าปริมาณของแคลเซียมที่ใช้ในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนจะมีผลอย่างมากต่อเต้าหู้ มากกว่าสายพันธุ์ของถั่วเหลือง เช่นเดียวกับ Sun และ Breene (1991) ซึ่งกล่าวว่าทั้งปริมาณผลผลิต (bulk yield) และปริมาณโปรตีนในเต้าหู้มีความสัมพันธ์เชิง

ลบกับความเข้มข้นของสารแคลเซียมซัลเฟตและความสัมพันธ์นี้ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วเหลืองด้วยในจำนวนถั่วเหลือง 9 สายพันธุ์ พันธุ์ Vinton เป็นพันธุ์ที่มีความว่องไวต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟตมากที่สุด ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟตเท่ากับ 0.02 นอร์มอล จะทำให้เต้าหู้ที่ได้มีปริมาณโปรตีนและปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงที่สุด แต่จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟตสูงขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากถ้าระดับความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟตต่ำจะส่งผลให้ปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนซึ่งเกิดขึ้นจากแคลเซียมไอออนไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวเป็นเจลที่แข็งแรงได้ แต่ถ้ามีความเข้มข้นของแคลเซียมซัลเฟตสูงเกินไปทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลสูงขึ้น นำไปสู่การอัดตัวแน่นของโครงสร้างร่างแหของโปรตีนมีผลให้เพิ่มการสูญเสียน้ำโปรตีนเวย์และของแข็งที่ละลายได้ชนิดอื่นๆ เมื่อใช้แคลเซียมซัลเฟตที่ระดับ 0.01 นอร์มอล พบว่าเต้าหู้มีลักษณะอ่อนนุ่มเกินกว่าที่จะวัดลักษณะเนื้อสัมผัสได้และที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.02 นอร์มอล เต้าหู้ที่ได้มีค่าความสามารถในการแตกหัก (facturability) และค่าความแข็งเพิ่มสูงขึ้นจนถึงที่ระดับความเข้มข้น 0.05 นอร์มอล Wang และ Hesseltine (1982) ผลิตเต้าหู้จากถั่วเหลืองสายพันธุ์เดียวด้วยสารตกตะกอนชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นในช่วงกว้างกว่า จากการศึกษาของ Sun และ Breene (1991) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารตกตะกอนต่ำกว่า 0.01 โมลาร์ หรือสูงกว่า 0.1 โมลาร์ จะไม่เกิดเคิร์ดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.02 – 0.04 โมลาร์

6. **อุณหภูมิในการตกตะกอน**

อุณหภูมิของน้ำนมถั่วเหลืองในขณะเติมสารตกตะกอนโปรตีน จะส่งผลกระทบต่ออัตราการตกตะกอนและคุณภาพของเต้าหู้ โดยที่อุณหภูมิสูงโปรตีนจะมีพลังงานมากทำให้เกิดการตกตะกอนอย่างรวดเร็ว เต้าหู้ที่ได้จะมีโครงข่ายร่างแหขนาดเล็ก ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง เนื้อสัมผัสแข็ง และมีปริมาณผลผลิตต่ำส่วนที่อุณหภูมิต่ำจะมีผลตรงกันข้าม ยิ่งถ้าอุณหภูมิต่ำมากๆ จะทำให้การตกตะกอนของโปรตีนเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์ เต้าหู้ที่ได้มีน้ำมากจนไม่สามารถคงรูปร่างอยู่ได้ ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิในการตกตะกอนโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารตกตะกอน การเติมสารตกตะกอน และชนิดของเต้าหู้ที่จะผลิต (Liu, 1997)

Wang และ Hesseltine (1982) ได้ผลิตเต้าหู้โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พบว่าน้ำหนักทั้งหมด (gross weight) และปริมาณความชื้นของเคิร์ดลดลง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการตกตะกอนจาก 60 เป็น 80 องศาเซลเซียส ขณะที่ปริมาณของแข็งทั้งหมดยังคงมี

ปริมาณเท่าเดิม นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของค่าความแข็งและค่าความยืดหยุ่น (elasticity) ของเคิร์ดยังเกิดจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอีกด้วย แม้ว่าค่าความยืดเกาะยังคงเท่าเดิม

Beddows และ Wong (1987b) กล่าวว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรตีนอยู่ในช่วง 70 – 80 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส เต้าหู้ที่ได้จะมีลักษณะนิ่มและเละ (watery) ส่วนที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส เต้าหู้มีลักษณะแข็งและไม่สม่ำเสมอ รวมทั้งเกิดการสูญเสียของปริมาณผลผลิตของเต้าหู้

7. อัตราการผสมสารตกตะกอน

Beddows และ Wong (1987c) ศึกษาอัตราการผสมในระหว่างการเติมสารตกตะกอนโปรตีน โดยกำหนดช่วงของอัตราการผสมจาก 0 ถึง 500 รอบต่อนาที ที่เวลาคงที่คือ 30 วินาที เพื่อไม่ให้เคิร์ดแตกพบว่าเมื่ออัตราการผสมเพิ่มขึ้นปริมาณของแข็งและปริมาณโปรตีนในเต้าหู้เพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณน้ำและการดูดซึมน้ำในเต้าหู้ลดลง ทำให้เต้าหู้มีความแน่นเพิ่มสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ได้เป็นแบบเส้นตรง โดยที่อัตราการกวนต่ำกว่า 250 รอบต่อนาที เต้าหู้ที่ได้จะนิ่มเละมีปริมาณของแข็งรวมและโปรตีนต่ำ ขณะที่อัตราการกวนสูงกว่า 250 รอบต่อนาที เต้าหู้จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสหยาบและปริมาณผลผลิตต่ำ

Hou และคณะ (1995 อ้างโดย Liu, 1997) ศึกษาผลของความเร็วในการกวนที่ 285 หรือ 207 รอบต่อนาที และที่เวลา 5 10 15 20 หรือ 30 วินาที ขณะเติมสารละลายตกตะกอน (แคลเซียมคลอไรด์หรือแคลเซียมซัลเฟต) ต่อปริมาณผลผลิตและคุณภาพของเต้าหู้อ่อนพบว่าเต้าหู้ที่ผลิตด้วยความเร็วในการกวนสูงจะให้ค่าความแข็งและค่าความยืดหยุ่น ปริมาณผลผลิตของเต้าหู้ไม่มีความแตกต่าง ($p > 0.05$) เมื่อใช้เวลาในการกวนระหว่าง 5 – 25 วินาที แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการกวนเป็น 30 วินาที ปรากฏว่าปริมาณผลผลิตจากสารตกตะกอนทั้ง 2 ลดลง ($p < 0.05$)

8. ระยะเวลาในการตกตะกอน

ช่วงเวลาในการทำให้เกิดการตกตะกอนมีผลต่อคุณภาพของเต้าหู้ โดยช่วงเวลาสั้นมีผลให้การตกตะกอนไม่สมบูรณ์ แต่ถ้าเวลานานอุณหภูมิของระบบการตกตะกอนจะลดลงทำให้เกิดการตกตะกอนยากยิ่งขึ้น ปกติแล้วสำหรับเต้าหู้อ่อนจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที สำหรับเต้าหู้แข็งใช้เวลา 20 – 25 นาที และเต้าหู้แข็งพิเศษจะใช้เวลา 10 – 15 นาที (Liu, 1997)

9. **สภาวะในการเทใส่แบบพิมพ์** (molding condition)

หลังจากตกตะกอนโปรตีน เคิร์ดของเต้าหู้จะถูกทำให้แตก นำไปใส่ในแม่พิมพ์และกดทับเพื่อเอาเวย์ออกจากเคิร์ด มีผลทำให้เต้าหู้ที่ได้มีความแน่นเนื้อสูงขึ้น ขั้นตอนนี้มีปัจจัยต่างๆ มีผลต่อคุณภาพเต้าหู้ ได้แก่ อุณหภูมิของเคิร์ด แรงกดที่ใช้ และเวลาที่ใช้ในการกด ถ้าอุณหภูมิของเคิร์ดสูงเกินไป เจลโปรตีนจะไม่รวมตัวกันอย่างสมบูรณ์ และยังคงมีน้ำเหลืออยู่ในเคิร์ดแต่ถ้าอุณหภูมิต่ำมากจะส่งผลให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันไม่สมบูรณ์ แม้ว่าเวย์จะถูกกำจัดออกได้ง่าย ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 68 – 70 องศาเซลเซียส และไม่ควรต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียส ส่วนแรงกดที่สูงจะช่วยให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันและทำให้ความแน่นเนื้อเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าแรงกดสูงเกินไปส่งผลให้เกิดการแตกของโครงร่างตาข่ายของเต้าหู้ วิธีแก้คือใช้แผ่นพลาสติกหนาปิดทับด้านบนของเคิร์ดไว้ นอกจากนี้ในการกดทับเคิร์ดถ้าใช้เวลานานเกินไปจะทำให้เกิดการสูญเสียเวย์มากโดยปกติเวลาในการกดทับเคิร์ดจะอยู่ในช่วง 15 – 25 นาที (Liu, 1997)

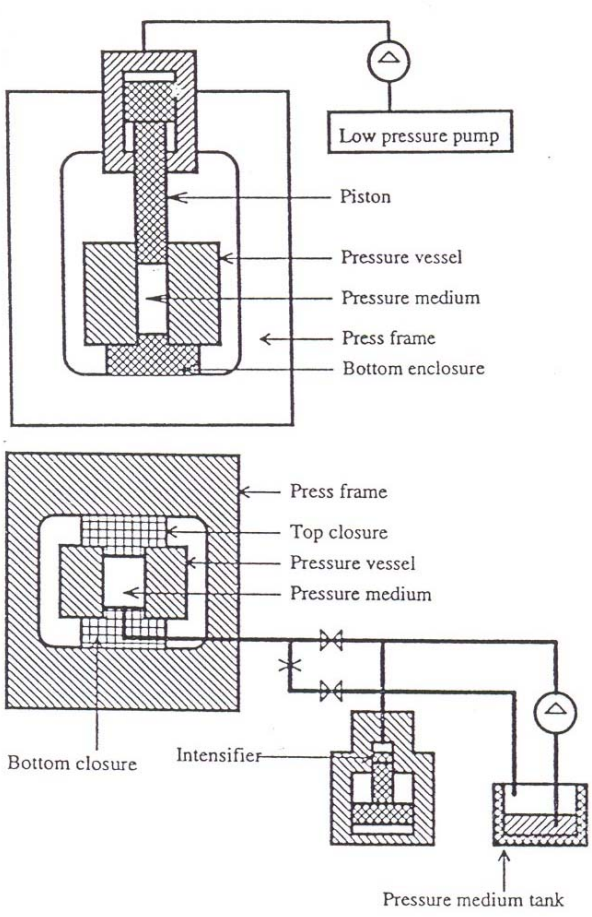
กระบวนการใช้ความดันสูง (Hydrostatic Pressure Treatment)

เริ่มแรกเทคโนโลยีความดันสูงได้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเซรามิก เหล็กและซุปเปอร์อัลลอยค์ ระบบความดันสูงประกอบด้วยช่องใส่ตัวอย่าง (high pressure vessel) และฝา ระบบกำเนิดความดัน ระบบควบคุมอุณหภูมิ และระบบการปฏิบัติกับวัสดุ(material-handling system) เมื่อใส่ตัวอย่างหรือวัตถุดิบลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วปิด ตัวกลางส่งผ่านความดันจะถูกสูบเข้าสู่ช่องใส่ตัวอย่าง อากาศจะถูกกำจัดออกจากช่องใส่ตัวอย่างโดยอาศัยปั๊มความดันต่ำที่ทำให้เกิดการเติมและการถ่ายเทออกอย่างรวดเร็ว (low-pressure fast-fill-and-drain pump) ร่วมกับวาล์วกำจัดอากาศอัตโนมัติ (automatic deaeration valve) จากนั้นความดันสูงจะเกิดขึ้นในช่องใส่ตัวอย่างซึ่งสามารถทำให้เกิดได้ทั้งทางตรงหรือทางอ้อม (Palou *et al*.,1999)

การให้ความดันทางตรง (Direct compression) เกิดจากตัวกลางส่งผ่านความดันได้รับความดันจากปลายด้านเล็กของลูกสูบ (ภาพที่ 3 ภาพบน) ส่วนที่ปลายด้านใหญ่ของลูกสูบจะถูกขับดันโดยปั๊มความดันต่ำ การสร้างความดันสูงวิธีนี้ทำให้เกิดความดันขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดของ high - pressure dynamic seal ระหว่างลูกสูบกับพื้นผิวภายในของช่องใส่ตัวอย่าง ทำให้วิธีนี้สามารถใช้ได้เฉพาะในการทดลอง (small-diameter laboratory) หรือในโรงงานต้นแบบเท่านั้น (pilot plant system) (Barbosa – Canovas *et al.,* 1997)

การให้ความดันทางอ้อม (Indirect compression) เป็นการทำให้เกิดความดันเพิ่มขึ้นโดยการสูบตัวกลางส่งผ่านความดันจากภาชนะที่เก็บตัวกลางไว้ไปยังช่องใส่ตัวอย่างจนกระทั่งได้

ความดันที่ต้องการ (ภาพที่ 3 ภาพล่าง) ซึ่งอุตสาหกรรมส่วนมากใช้วิธีนี้ในกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความดันสูง การให้ความร้อนกับตัวกลางส่งผ่านความดัน ทำให้เกิดจากการขยายตัวของตัวกลางส่งผ่านความดัน จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิภายในช่องใส่ตัวอย่างอย่างแม่นยำ (Barbosa – Canovas *et al.*, 1997)



ภาพที่ 3 การสร้างสภาวะความดันสูงโดยทางตรง (ภาพบน) และทางอ้อม (ภาพล่าง) ของตัวกลางส่งผ่านความดัน

Generation of high pressure by direct (top) and indirect (bottom) compression of the pressure-transmitting medium

Source : Adapted from Barbosa - Canovas *et al*. (1997)

ระบบ isostatic pressing system มีการใช้งาน 3 ลักษณะ คือ cold isotatic, warm isostatic และ hot isostatic system (Mertens and Deplace, 1993 อ้างโดย Palou *et al.,* 1999) ขึ้นอยู่กับการใช้งาน

Cold isostatic pressing ใช้ในการขึ้นรูปสำหรับอุตสาหกรรมเหล็ก เซรามิก คาร์บอนกราไฟต์ และพลาสติก โดยผงของวัตถุดิบจะถูกใส่ลงผ่านความดันเป็นของเหลวเช่น อิมัลชั่นของน้ำ (emuislified water) หรือน้ำมัน ความดันที่ใช้อยู่ในช่วง 50-600 เมกกะปาสคาล

Warm isostatic pressing ใช้สำหรับการขึ้นรูปสามารถใช้ร่วมกับอุณหภูมิระดับอุณหภูมิห้องจนถึง 250 องศาเซลเซียส ระบบ warm isostatic pressing นี้เหมาะสมที่จะใช้กับปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างการให้ความดัน

Hot isostatic pressing เริ่มแรกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเหล็กและเซรามิก อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 2,000-2,200 องศาเซลเซียส ที่ความดันระดับ 100-400 เมกกะปาสคาล ตัวส่งผ่านความดันที่ใช้เป็นแก๊ส เช่น อาร์กอน ไนโตรเจน ฮีเลียม หรืออากาศ (Deplace and Mertans,1992)

หลักการของการใช้ความดันสูง

หลักการของการใช้ความดันสามารถอธิบายได้โดยอาศัยหลักการสำคัญๆ 2 หลักการ ได้แก่ หลักการของ Le Chatelier ซึ่งกล่าวว่าปรากฏการณ์ใดๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงเฟส (phase transfer) การเปลี่ยนรูปแบบโมเลกุล (molecular transformation) หรือการเกิดปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเมื่อมีการลดปริมาตรจะสามารถส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวโดยการเพิ่มความดัน (Hoover *et al*., 1989) ดังนั้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้นปฏิกิริยาเคมีที่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรที่มีค่าเป็นบวก ($+\Delta V$) มีผลให้สมดุลของระบบเลื่อนไปทางที่จะทำให้พันธะเกิดการแตกสลายและในทางตรงกันข้ามการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรที่เป็นลบ ($-\Delta V$) มีผลทำให้เกิดการสร้างพันธะ (Balny and Masson, 1993)

หลักการที่ 2 คือ กฎของ Isostatic ซึ่งกล่าวว่า ความดันจะถูกส่งผ่านไปยังทุกส่วนตัวอย่างอย่างทันทีทันใดและเท่ากัน โดยไม่ขึ้นกับเวลาและขนาดของตัวอย่างรวมทั้งการสัมผัสของตัวอย่างกับตัวกลางส่งผ่านความดัน (pressure medium) โดยตรง หรืออยู่ในวัสดุห่อหุ้มที่สามารถยืดหยุ่นได้ ซึ่งหมายความว่า ผลิตภัณฑ์จะได้รับความดันทุกทิศทุกทาง และเท่ากันโดยสมบูรณ์ ที่ระดับความดันสูงขึ้นมีผลลดปริมาตรของน้ำเพิ่มขึ้นโดยปริมาตรของน้ำจะลดลงร้อยละ 4 ร้อยละ 10 ร้อยละ 15 และร้อยละ 19 ที่ความดัน 100 300 600 และ 1000 เมกกะปาสคา

ล ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในขณะที่ปริมาตรของเฮกเซนลดลงร้อยละ 20 และร้อยละ 25 ที่ความดัน 300 และ 600 เมกกะปาสคาล ตามลำดับ Isaac (1981) และ Mertens และ Deplace(1993) แสดงให้เห็นว่าน้ำสามารถที่คงสถานะของเหลวจนถึงอุณหภูมิ –22 องศาเซลเซียส ที่ความดันไม่เกิน 210 เมกกะปาสคาล การใช้อุณหภูมิและความดันควบคุมการเปลี่ยนสถานะของน้ำระหว่างของเหลวและของแข็งทำให้เกิดผลขึ้น 2 ประการ คือ ประการแรกอาหารแช่เยือกแข็งสามารถเกิดการละลายขึ้นทันทีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง –22 องศาเซลเซียส เมื่อมีการให้ความดัน ประการที่สองอาหารที่เสื่อมเสียง่ายสามารถที่จะเก็บรักษาไว้ได้ที่ –5 องศาเซลเซียส ความดัน 61 เมกกะปาสคาลโดยไม่เกิดการแช่เยือกแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าที่ความดันสูงกว่า 210 เมกกะปาสคาล จุดหลอมเหลวของน้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นและโครงสร้างผลึกน้ำแข็งจะสามารถเกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความดันกับน้ำที่ระดับ 884 และ 1036 เมกกะปาสคาล ตามลำดับ

โดยทั่วไปหน่วยของความดันที่นิยมใช้ได้แก่ 1 atm = 1 $kg \cdot cm^{-2}$ = 1.01325 bar = 0.101325 MPa = 14.6 $lb \cdot in^{-2}$ ซึ่งปาสคาล (Pa) เป็นหน่วยในระบบ SI (Geankoplis, 1995)

ผลของความดันสูงต่อโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน

ความดันสูงจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของโปรตีนและนำไปสู่การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ การรวมตัวกัน (aggregation) หรือการเกิดเจล ซึ่งจะขึ้นอยู่กับระบบของโปรตีน เช่น ชนิดของโปรตีน ความเป็นกรดด่าง ความเข้มของประจุ (ionic strength) ระดับของความดันและอุณหภูมิ รวมถึงช่วงเวลาที่มีการให้ความดัน (Masson, 1992) เมื่อโปรตีนได้รับความดันสูง พันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนซ์จะเกิดการแตกสลายเป็นอันดับต้นๆ จากนั้นจะเกิดการสร้างพันธะขึ้นมาใหม่ภายในและระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (intra- and intermolecular bonds) ดังนั้นความดันสูงจึงมีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิของโปรตีน (Cheftel *et al.*, 1985) ความคงตัวของพันธะต่างๆ ในโครงสร้างของโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติด้านความคงตัวของพันธะในโครงสร้างโปรตีนขั้นทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ

Properties of the interactions stabilizing the secondary, tertiary and quaternary structures of proteins

Type of interaction	Energy (kJ-mol^{-1})	Interaction distance (Å)	Functional groups involved	Destabilizing conditions	Stabilizing conditions
Covalent and semi-covalent	330–400 (peptide bond) 200 (S-S bond)	1–2	-NH-CO- (peptide bond) Cystine S-S	Reducing agents: β-mercaptoethanol, dithiothreitol (S-S bonds)	Increased reactivity of SH groups above pH 7
Electrostatic	42–84	2–3	Amino acid residues with carboxyl COO^- (e.g. Asp, Glu) and amino NH_4^+ (e.g. His, Arg, Lys) groups	Salt solutions, high or low pH values, pressure	
Hydrogen bonds	8–40	2–3	H atom of OH or NH (proton donor) group shared with CO (proton acceptor) group, e.g. -N-H••••O=C -O-H••••O=C	Solutions with guanidine HCl, urea or detergents, heating	Cooling
Hydrophobic	4–12	3–5	Amino acid residues with aliphatic (e.g. Leu, Ile, Val) or aromatic (e.g. Phe, Tyr) side chains	Detergents, pressure (aliphatic side chains), heating at high temperatures	Moderate heating, pressure (stacking of aromatic side chains)
Van der Waals	1–9		Permanent, induced and instantaneous dipoles		

Source : Cheftel *et al*., (1985)

พันธะอิเล็กโตรสแตติก (electrostatic interaction) เกิดขึ้นระหว่างหมู่ที่มีประจุของสายโซ่กรดอะมิโน และระหว่างปลาย C และปลาย N ของกรดอะมิโน โดยทั่วไปโมเลกุลโปรตีนจะประพฤติตัวเป็นสวิทเทอร์ไอออน (Zwitherion) ที่มีทั้งขั้วบวกและลบอยู่ในโมเลกุล การที่โมเลกุลจะมีประจุเป็นบวกหรือลบขึ้นอยู่กับจุดไอโซอิเล็กตริกของโปรตีนและค่าความเป็นกรดด่างของสภาวะแวดล้อม เมื่อหมู่ที่มีประจุในตัวกลางที่มีประจุ (ionic medium) ประจุที่กระจายอยู่จะเกิดการรวมตัวกลายเป็นชั้นของประจุล้อมรอบอนุภาคที่มีประจุ (charged particle) เกิดเป็นชั้นของประจุไฟฟ้า 2 ชั้น (electrical double layer) ซึ่งชั้นดังกล่าวทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาตร (ประมาณ 10-20 มิลลิตรต่อโมลต่อหมู่ที่มีปฏิสัมพันธ์) ดังนั้นการเพิ่มความดันจึงสามารถทำลายพันธะอิเล็กโตรสแตติกได้ (Masson, 1992)

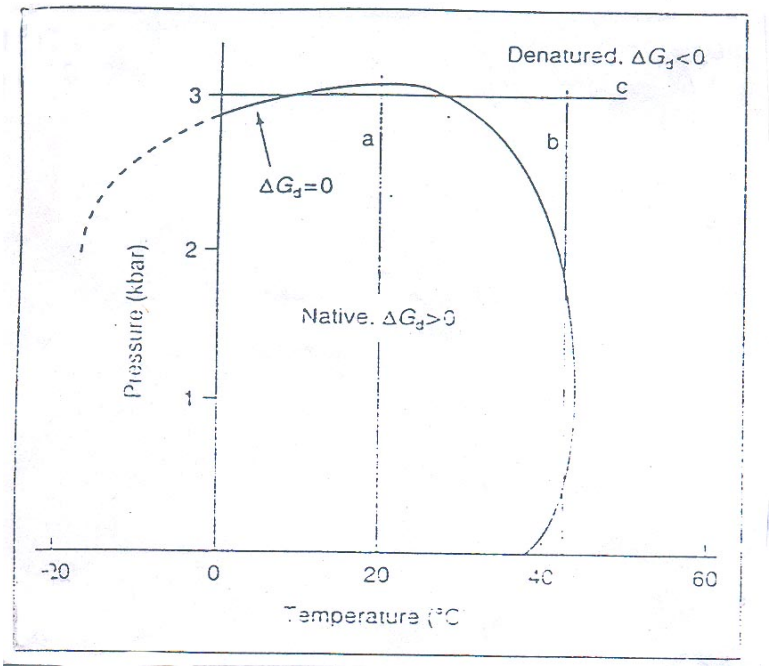
การสร้างพันธะไฮโดรโฟบิกระหว่างหมู่อะลิฟาติกมีค่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรเป็นบวก ดังนั้นพันธะดังกล่าวจึงไม่คงตัวเมื่อเพิ่มความดัน อย่างไรก็ตามการรวมตัวกัน (stacking) ของวงแหวนอะโรมาติกแสดงค่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรเป็นลบเล็กน้อยดังนั้นความดันจึงส่งเสริมทำให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว (Hereman, 1987 อ้างโดย Mozhaev, 1994) พันธะไฮโดรโฟบิกเป็นพันธะหลักที่สำคัญต่อความคงตัวของโครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีน (Miller, 1989 อ้างโดย Apichartsrangkoon, 1998) ดังนั้นโปรตีนโอลิโกเมอร์ริกจึงมีความว่องไวอย่างมากต่อความดันโดยที่ความดันระดับปานกลาง (น้อยกว่า 150-200 เมกกะปาสคาล) ส่งผลให้โปรตีนโอลิโกเมอร์แตกตัว (Weber, 1987 อ้างโดย Apichartsrangkoon, 1998)

พันธะไฮโดรเจนจะเกิดการสร้างและสลายพันธะ เมื่อปริมาตรมีการเปลี่ยนแปลงเกือบเป็นศูนย์ ดังนั้นพันธะไฮโดรเจนจึงไม่ได้รับผลกระทบจากความดันสูง (Heremans, 1992; Gross and Jaenicke, 1994)

พันธะโควาเลนซ์และโครงสร้างขั้นปฐมภูมิของโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และโพลีแซคคาไรด์ จะไม่เกิดการแตกสลายด้วยความดัน เนื่องจากพันธะโควาเลนต์สามารถยืดหยุ่นได้เล็กน้อย (Gross and Jaenicke, 1994) ดังนั้นความดันจึงไม่มีผลต่อโครงสร้างปฐมภูมิของโมเลกุลขนาดใหญ่ โครงสร้างเกลียวคู่ (double-helix structure) ของดีเอ็นเอจะมีความคงตัวต่อความดันจนกระทั่งถึงระดับ 1000 เมกกะปาสคาล (Mozhaev *et al*., 1994) Heremans (1992) และ Pfeil (1981) กล่าวว่า ความดันระดับสูงกว่า 300 เมกกะปาสคาลสามารถทำให้เกิดการออกซิเดชั่นของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลในสภาวะมีอากาศ นำไปสู่การสร้างพันธะไดซัลไฟด์ในสายโพลีเปปไทด์โดยเป็นผลมาจากความสามารถของความดันที่ส่งผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิ ในขณะที่พันธะโควาเลนซ์จำนวนมากไม่แตกสลาย ซึ่งกระบวนการแปรรูปโดยการใช้ความดันสูงทำให้โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่สูญเสียสภาพทางธรรมชาติและโครงสร้างของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ในขณะที่โมเลกุลที่มีน้ำหนักเบา เช่น กรดอะมิโน วิตามิน กลิ่นรส และรงควัตถุ จะไม่ได้รับผลกระทบจากความดัน (Ledward, 1995)

ความดันและความร้อนสามารถทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติได้ ซึ่งโครงสร้างตามธรรมชาติของโปรตีนจะถูกจำกัดอยู่ภายในไดอะแกรมของความดันและอุณหภูมิ (pressure-temperature diagram) (ภาพที่ 4) สำหรับไดอะแกรมของการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและความคงตัวของโปรตีน (Mozhaev *et al*., 1994) นอกจากนี้ยังมีข้อมูลว่าการเปลี่ยนแปลงระหว่าง

โซลกับเจลของโพลีแซคคาไรด์มีเฟสไดอะแกรม (phase diagram) คล้ายกับไดอะแกรมดังกล่าวของโปรตีนอีกด้วย (Hawley, 1971)



ภาพที่ 4 แสดงไดอะแกรมการเปลี่ยนแปลงระหว่างความดันกับอุณหภูมิของไคโมทริปซิโนเจน เอ (chymotrypsinogen A)

Source : Hawley (1971)

จากภาพที่ 4 ความเข้มข้นที่จุดสมดุลของโปรตีนรูปธรรมชาติและรูปที่สูญเสียสภาพตามธรรมชาติของโปรตีนจะมีค่าเท่ากันตรงตำแหน่งที่พลังงานอิสระของการสูญเสียสภาพ (ΔG) มีค่าเป็นศูนย์ ส่วนบริเวณที่ต่ำกว่าเส้นดังกล่าวโปรตีนจะอยู่ในรูปธรรมชาติ ซึ่งมีความคงตัว (ΔG>0) และบริเวณเหนือเส้นไดอะแกรมเป็นโปรตีนที่เกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ (ΔG<0) จากกราฟเส้น a และ b คือ เส้นแบ่งบริเวณที่มีอุณหภูมิเท่ากัน(isothermal cross-section) และเส้น C คือเส้นแบ่งบริเวณที่มีความดันเท่ากัน (isobaric cross-section) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เมื่อความดันเพิ่มขึ้นสูงกว่า 300 เมกกะปาสคาล (เส้น a) จะทำให้เกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีน และที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ความดันบรรยากาศ (เส้น b) จะพบพฤติกรรมเชิงซ้อนของโปรตีน โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ และถ้าเพิ่มความดันขึ้นมากกว่า 50 เมกกะปาสคาล จะทำให้โปรตีนเกิดการผันกลับไปอยู่ในรูปของโปรตีน

ธรรมชาติ จากปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้สามารถอธิบายสาเหตุที่ทำให้โปรตีนที่สูญเสียสภาพทางธรรมชาติเนื่องจากความร้อนมีความคงตัวที่ความดันสูง และเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยความร้อนจึงสามารถกลับมามีกิจกรรมได้อีกครั้งหนึ่ง เมื่อได้รับความดันสูง สุดท้ายเมื่อความดันสูงกว่า 200 เมกกะปาสคาล โปรตีนก็จะกลับมาอยู่ในรูปสูญเสียสภาพอีกครั้ง ซึ่งคล้ายกับการเปลี่ยนแปลงระหว่างการผันกลับและการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (reactivation-inactivation transition) ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้โดยการเพิ่มอุณหภูมิที่ความดันคงที่ (เส้น C) (Hawley, 1971) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการเกิดการรวมตัวกัน และการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติของโปรตีนด้วยความร้อนเปรียบเทียบกับความดันสูง แม้ว่าโปรตีนพลาสมาในเลือดและไข่ขาวจะมีความว่องไวต่อความร้อน และเกิดเป็นเจลอย่างรวดเร็วที่ความร้อนระดับปานกลาง (80 องศาเซลเซียส / 30 นาที) แต่จะไม่เกิดเจลเมื่อให้ความดันระดับ 400 เมกกะปาสคาล 30 นาที (Van Camp and Huyghebaert, 1995)

ผลของความดันสูงและความร้อนต่อการเกิดเจล

ขั้นตอนในการเกิดเจลเป็นผลมาจากการสูญเสียสภาพของโปรตีนหรือโมเลกุลชีวภาพขนาดใหญ่ เช่น โพลีแซคคาร์ไรด์ สภาวะของการเกิดการสูญเสียสภาพจะเกิดเป็นเจลหรือตกตะกอน ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมทางกายภาพและทางเคมี (Palou *et al.,* 1999)

Okamoto และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบ force-deformation profile ของทั้งการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที และให้ความดันสูงที่ 500-700 เมกกะปาสคาล นาน 30 นาที ในการทำให้ไข่ขาวเกิดเป็นเจล พบว่าค่าความแข็งและค่า elastic modulus ของเจลเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความดัน แต่จะมีค่าน้อยกว่าค่าของเจลที่ได้จากการใช้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญ และในกรณีของโปรตีนถั่วเหลือง Matsumoto และ Hayashi (1990) พบว่าความดันระดับต่ำสุด คือ 300 เมกกะปาสคาล เป็นเวลา 10-30 นาที สามารถทำให้โปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้นเกิดเป็นเจลได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่เกิดจากการใช้ความร้อนที่ระดับ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เจลที่ได้จากความดันสูงจะมีความนุ่มกว่าเจลที่เกิดจากการใช้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่เกิดจากความดันพบว่าความแข็งแรงของเจล (gel strength) ที่เกิดจากความดันจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีน ผลที่เกิดขึ้นนี้อาจจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนรูปแบบพันธะทั้งหมดภายในโครงสร้างเจล ซึ่งจะมีโอกาสมากในการ

สร้างพันธะในสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูง โดยเมื่อได้รับความร้อนหรือความดันสูงก็จะทำให้สารละลายโปรตีนเกิดการคลายตัวได้มาก (Heremans, 1992)

ในการทดลอง oscillation experiment แสดงชนิดของพันธะที่ทำให้โครงสร้างของเจลแข็งแรงผลที่ได้พบว่าพันธะที่คงตัวและไม่คงตัวในโครงสร้างเจลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนและจะมีความแข็งแรงมากขึ้นในกรณีของเจลที่ขึ้นรูปด้วยความร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่ขึ้นรูปด้วยความดันสูง นอกจากนี้ storage moduli มีค่าสูงกว่า loss moduli และเจลที่ได้จากความดันสูงจะมีอัตราส่วนของ loss กับ storage modulus (G":G') จะมีค่าสูงกว่าเจลที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยความร้อน จะประกอบด้วยพันธะจำนวนมากที่ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้กับโครงสร้าง ส่วนเจลที่ขึ้นรูปด้วยความดันสูงจากประกอบด้วยพันธะที่ไม่มั่นคงจำนวนมากทั้งระหว่างโมเลกุลและภายในโมเลกุล กลไกการทำให้เกิดเจลโดยใช้ความดันสูงแตกต่างจากการเกิดเจลโดยใช้ความร้อน โดยการเกิดเจลด้วยความร้อนเกิดจากการเคลื่อนที่อย่างรุนแรงของโมเลกุลโปรตีน ทำให้พันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนท์ถูกทำลายเกิดการสูญเสียสภาพและการจัดเรียงตัวแบบสุ่มกลายเป็นโครงข่ายร่างแหของเจล แต่สำหรับการเกิดเจลด้วยความดันสูงเป็นผลจากการลดลงของปริมาตรของสารละลายโปรตีน เมื่อโมเลกุลของโปรตีนได้รับความดันสูงแล้วปลดปล่อยความดัน โมเลกุลของน้ำจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่อีกครั้งรอบกรดอะมิโน ทำให้เกิดลักษณะเป็นเงามัน (glossy) และโปร่งแสง (transparent) ของเจล เมื่อเปรียบเทียบกับเจลที่มีมีลักษณะขุ่นทึบที่เกิดจากการใช้ความร้อนระดับสูง (Palou *et al.,* 1999) นอกจากนี้ Mozhaev และคณะ (1994) ได้กล่าวว่า เจลที่ได้จากการใช้ความดันสูงจะมีค่าความนุ่ม (softness) และค่าความเค้น (strength) ที่ดีกว่าเจลที่เกิดจากการใช้ความร้อนสูง

ผลของความดันสูงต่อเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดพิเศษที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งกลไกของปฏิกิริยาสามารถอธิบายได้ด้วยความสัมพันธ์แบบแม่กุญแจ (Marild, 1981; Johnston, 1995) ผลของความดันสูงที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์จะเกิดขึ้นระหว่างปฏิสัมพันธ์ของสารตั้งต้นกับเอนไซม์ โดยความดันสูงจะส่งผลต่อโครงสร้างของสารตั้งต้นที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ทำให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยาได้ง่ายหรือยากขึ้นก็ได้ (Heremans, 1995) การยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยความดันสูงยังสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายในโมเลกุลหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตรงบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ (Palou *et al*., 1999) ความดันสูงที่อุณหภูมิห้องสามารถทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับได้หรือผันกลับไม่ได้ รวมถึง

การยับยั้งบางส่วนหรือทั้งหมดขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ระดับความดัน อุณหภูมิ ระยะเวลาในการให้ความดัน (Hara *et al*., 1990) ความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Hoover *et al*., 1989) รวมทั้งระดับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลเอนไซม์ (Palou *et al*., 1999) ยกตัวอย่างเช่น กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) ทางการค้าที่สกัดได้จากเห็ด จะลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความดันตั้งแต่ระดับ 100-800 เมกกะปาสคาล เป็นเวลา 1-20 นาที ที่ความเป็นกรดด่าง 6.5 และจะถูกยับยั้งได้โดยสมบูรณ์เมื่อได้รับความดันระดับ 800 เมกกะปาสคาล เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 5 นาที (Gomes and Ledward, 1996) โดยทั่วไปการยับยั้งเอนไซม์ในผักผลไม้มักจะใช้วิธีการลวกในน้ำร้อน ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อเนื่องจากความร้อน การสูญเสียคุณค่าทางอาหาร และบางครั้งยังก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเกิดน้ำเสียซึ่งการใช้ความดันสูงจะไม่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าว (Eshtiaghi and Knorr, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลไกของปฏิกิริยาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetic reaction) ซึ่งประโยชน์ที่ได้ไม่ว่าจะเป็นการเร่ง หรือลดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยความดันสูงสามารถที่จะรักษาหรือเพิ่มคุณภาพของอาหารได้ (Palou *et al*., 1999)

Indrawati และคณะ (2000) ได้ศึกษาเกี่ยวกับกลไกในการยังยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสในถั่วเขียว (green bean) ด้วยความดันสูง (0.1-650 เมกกะปาสคาล) ร่วมกับอุณหภูมิในช่วง 10-70 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ ในระบบอาหารที่แตกต่างกัน คือ น้ำถั่วเขียว และเมล็ดถั่วเขียว พบว่าเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสถูกยับยั้งกิจกรรมแบบไม่ผันกลับด้วยความดันสูง 450 เมกกะปาสคาล ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Tangwongchai และคณะ (2000) ศึกษาสารละลายของเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสทางการค้าความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ที่ความดัน 0.1 200 400 และ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที พบว่าที่ความดันบรรยากาศเอนไซม์มีความคงตัวที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5-9 ในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์และจะมีความคงตัวสูงที่สุดในช่วงความเป็นกรดด่าง 5-8 เมื่อได้รับความดันระดับ 200 เมกกะปาสคาล ส่งผลให้ความคงตัวต่อความเป็นกรดด่างจะอยู่ในช่วงแคบลง คือ อยู่ในช่วงความเป็นกรดด่างระหว่าง 7-8 เอนไซม์ไลพอกซิจิเนสจะว่องไวในกรดมากกว่าด่าง และที่ความเป็นกรดด่าง 9.0 ในบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด เอนไซม์จะถูกยับยั้งกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ภายใต้ความดันระดับ 600 เมกกะปาสคาล 20 นาที และเอนไซม์ไลพอกซิจิเนสสกัดจากมะเขือเทศจะมีกิจกรรมลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อได้รับความดันระดับ 400 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที

กลไกของความดันสูงต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยความดันสูงมีผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (Hoover *et al*., 1989) เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งยึดจับด้วยพันธะไฮโดรเจนประกอบด้วยเยื่อบางๆ 2 ชั้น ของฟอสโฟ ลิปิดที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ คือ กรดไขมัน และส่วนที่ชอบน้ำ คือ กลีเซอรอล (glyceral) เป็นองค์ประกอบ และมีชั้นของโปรตีนอยู่ระหว่างชั้นของฟอสโฟลิปิดทั้ง 2 ชั้น (Chong and Cossius, 1983) เยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งสาร (active transport) หรือ การซึมผ่านของสาร (passive permeability) และการหายใจ สภาวะทางกายภาพของไขมันที่อยู่รอบๆเยื่อโปรตีนมีบทบาทสำคัญในกิจกรรมของไอนไซม์ที่จับอยู่กับเยื่อหุ้ม (membrane-bound enzyme) กลไกสำคัญในการยับยั้งจุลินทรีย์ของความดันสูงคือการทำให้เอนไซม์กับเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการจับกันอย่างหลวมๆ มีผลให้สภาวะทางกายภาพของไขมันซึ่งเป็นตัวควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Heremans, 1992) และความดันสูงมีผลทำให้โมเลกุลของฟอสโฟลิปิดเกิดการแตกออก โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติและเกิดการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการส่งผ่านสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) (Chong and Cossius, 1983)

นอกจากนี้ความดันยังสงผลต่อกิจกรรมหลักของเอนไซม์ในเซลล์ และการเพิ่มจำนวน (replication) รวมทั้งการคัดลอกข้อมูล (transcription) ของ DNA (Hoover *et al*., 1989) Shimada และคณะ (1993) กล่าวว่าความดันสูงจะส่งผลโดยตรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่ถูกทำลายจากการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างเนื่องจากการแตกตัวของไอออนของน้ำในระหว่างการให้ความดัน (Cheftel, 1992) Knorr (1995) พบว่ากิจกรรมของ Na/K ATPase ลดลงภายหลังการให้ความดัน ซึ่งจะสัมพันธ์กับการไหลได้ของของเหลวระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ทั้ง2 ชั้น (bilayer membrane fluidity) Smelt (1995) รายงานว่าความดันสูงมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพตามธรรมชาติหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ยกตัวอย่างเช่นเอนไซม์ ATPase ที่จับกับเยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่ในการควบคุมไอออนเข้าออกเซลล์ ดังนั้นภายหลังได้รับความดันเซลล์ของจุลินทรีย์จะตายเนื่องจากสภาวะความเป็นกรดภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (internal acidification)

Jaenicke (1981) พบว่าความดันในช่วง 101-304 เมกกะปาสคาล ทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพตามธรรมชาติ และที่ความดัน 304 เมกกะปาสคาล เกิดการสูญเสียสภาพแบบไม่ผันกลับของกิจกรรมของเอนไซม์ซัคซิเนท ดีไฮโดรจิเนส (succinate dehydrogenase) ฟอร์เมท ดีไฮโดรจิเนส (formate dehydrogenase) และ มาเลท ดีไฮโดรจิเนส (malate dehydrogenase) ของ *E.coli* ลดลง Perrier-Comet และคณะ (1995) พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์

ยีสต์ในระหว่างการให้ความดัน 250 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 เกิดการลดลงของปริมาตรในระหว่างช่วงที่ความดันกำลังเพิ่มขึ้น ช่วงที่ 2 ปริมาตรของเซลล์ยังคงลดลงในช่วงระยะเวลาที่คงความดันไว้ การลดลงของปริมาตรส่งผลให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างภายนอกและสารภายในเซลล์ ช่วงสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงปริมาตรส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยปริมาตรเริ่มต้นของเซลล์จะกลับคืนมาภายหลังลดความดันลงสู่ความดันบรรยากาศ

ผลของความดันสูงต่อจุลินทรีย์

Zobel (1970) กล่าวว่า แบคทีเรียส่วนมากสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความดัน 20-30 เมกกะปาสคาล ส่วนพวกที่เจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่มีความดัน (barophile) สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ถึงความดันระดับ 40-50 เมกกะปาสคาล และมีจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถทนความดันสูงได้ (baroduric หรือ barolerant) ซึ่งสามารถที่จะมีชีวิตรอดอยู่ได้ภายหลังได้รับความดันเป็นเวลานานที่ความดันสูงกว่า 200 เมกกะปาสคาล

ความว่องไวต่อความดันของจุลินทรีย์อาจจะแปรผันตามชนิด (species) และอาจรวมถึงสายพันธุ์ (strain) ของจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันด้วย และระยะ (stage) ของวงจรการเจริญเติบโต (growth cycle) โดยปกติเซลล์ในช่วงอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ (exponential phase) จะมีความว่องไวต่อความดันมากกว่าเซลล์ในช่วงอัตราการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) (Patterson *et al.,* 1995; Earnshaw, 1995; Zobell, 1970; Mackey, 1995) การยับยั้งจุลินทรีย์อย่างไม่สมบูรณ์จะทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บและสามารถกลับมาเป็นปกติได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ถ้าแบคทีเรียมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากขึ้นก็จะยิ่งว่องไวต่อความดันสูงขึ้นด้วย (Hoover, 1993) โดยทั่วไปเซลล์จุลินทรีย์จะถูกยับยั้งที่ความดันสูงช่วง 400-600 เมกกะปาสคาล แบคทีเรียแกรมบวกจะมีความทนทานต่อความดันได้มากกว่าแกรมลบ (Cheftel, 1992) Shigehisa และคณะ (1991) พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างที่ซับซ้อนอย่างมากส่งผลให้แบคทีเรียมีความว่องไวอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม ซึ่งรวมถึงสภาวะที่ให้ความดันสูง โดย Earnshaw (1995) รายงานว่าเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มของจุลินทรีย์ประเภทแกรมบวก *Staphylococcus* จะมีความทนทานต่อความดันสูงที่สุด และสามารถมีชีวิตรอดภายหลังได้รับความดันระดับ 500 เมกกะปาสคาล นานกว่า 60 นาที ส่วนยีสต์, แบคทีเรียแลคติกแอซิด (lactic acid bacteria) และราจะมีความว่องไวอย่างมาก ในขณะที่สปอร์ของแบคทีเรียจะมีความทนทานสูงที่สุด โดยสามารถมีชีวิตรอดภาย

หลังได้รับความดันสูงกว่า 1000 เมกกะปาสคาล (Cheftel, 1992) โดยโครงสร้างและความหนาของสิ่งที่ห่อหุ้มสปอร์ไว้เป็นตัวช่วยให้สปอร์สามารถทนต่อความร้อน การทำแห้ง ความดัน การฉายรังสี กรด และสารเคมีได้มากกว่าเซลล์ สปอร์ของจุลินทรีย์ที่แขวนลอยในอาหาร หรือในระบบจำลองของการทดลองสามารถที่จะถูกยับยั้งได้ด้วยความดันสูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ใช้กับเซลล์ จะต้องใช้สภาวะที่รุนแรงกว่า กล่าวคือ ใช้ความดันสูงเป็นเวลานานที่อุณหภูมิสูง (Hoover, 1993) และพบว่าสปอร์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตได้ก็ต่อเมื่อเกิดการงอกของสปอร์แล้วเท่านั้น ดังนั้นการให้ความดันซ้ำๆ ระหว่างความดันสูงกับความดันต่ำจะสามารถกำจัดสปอร์ได้ การยับยั้งการเจริญเติบโตของสปอร์ที่งอกแล้วและแบคทีเรียที่เจริญเต็มที่จะถูกยับยั้งได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิห้อง และจะยับยั้งได้อย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง ดังนั้นการจะทำลายเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นจึงต้องใช้ความดันร่วมกับอุณหภูมิ Sale และคณะ (1970) และ Knorr (1995) กล่าวว่า กระบวนการยับยั้งสปอร์ของจุลินทรีย์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือขั้นตอนแรกใช้ความดันและอุณหภูมิต่ำ เพื่อทำให้สปอร์เกิดการงอก และขั้นตอนที่ 2 จึงเพิ่มความดันและอุณหภูมิในการยังยั้งจุลินทรีย์ที่งอกแล้ว ซึ่งวิธีการนี้สามารถยับยั้ง *B. cereus* ลงได้ $4x10^{-5}$ endospores/ml. ภายหลังได้รับความดันระดับ 200 เมกกะปาสคาล นาน 1 นาที (Fonberg-Broczek *et al.,* 1995) นอกจากนี้ Palou และคณะ (1999) ได้ใช้ความดัน 60-200 เมกกะปาสคาล กระตุ้นใหสปอร์ของ *Bacillus subtilis* และ *B. stearothermophilus* เกิดการงอกจากนั้นได้ใช้ความดันที่สูงขึ้น คือ 300 เมกกะปาสคาลในการยับยั้งสปอร์ที่งอกแล้ว Mozhaev และคณะ (1994) พบว่าความดันสูงยังสามารถใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เช่น คลื่นอัลตราโซนิค แรงเฉือน สนามแม่เหล็กไฟฟ้า หรือการใช้กระแสไฟฟ้ากำลังสูงเป็นช่วงๆ รวมทั้งการใช้สารเอททานอล ไลโซไซม์ ไคโตแซน กรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค และสารเติมแต่งอื่นๆ ซึ่งช่วยเสริมประสิทธิภาพของความดันในการยับยั้งจุลินทรีย์ และมีรายงานว่าความดันจะมีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกรดได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นด่าง เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในน้ำกลั่นจะมีความว่องไวต่อความดันมากกว่าเซลล์ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ (Arroyo *et al*., 1997; Hoover *et al*., 1989)

นอกจากนี้ส่วนประกอบต่างๆ ภายในอาหารสามารถที่จะปกป้องจุลินทรีย์จากผลของความดันสูงได้ (Hoover *et al*., 1989; Oxen and Knorr, 1993; Patterson *et al*., 1995; Pothakamury *et al*., 1995; Palou *et al*., 1999) Marquis (1976) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารอาหาร (enriched media) เช่น กรดอะมิโนและวิตามินจะช่วยปกป้องเซลล์ของ

จุลินทรีย์ได้ Hashizume และคณะ (1975) พบว่าราจะมีความสามารถในการทนต่อความดันได้สูงขึ้นเมื่อมีการเติมน้ำตาล ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคสเข้มข้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การลดค่า Aw มีผลป้องกันจุลินทรีย์จากความดันได้ Oxen และ Knorr (1993) พบว่าสภาวะความดันสูงที่ 400 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้องสามารถยับยั้งยีสต์ *Phodotorula rubra* เมื่อค่า Aw ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่า 0.96 ขณะจำนวนของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจะสูงขึ้นเมื่อค่า Aw มีค่าต่ำลง ซึ่งผลที่เกิดขึ้นคล้ายกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยจุลินทรีย์จะลดจำนวนลง 7 log cycle ที่ Aw = 0.96, ลดลง 2 log cycle เมื่อ Aw ลดลงเหลือ 0.94 และไม่มีการลดลงของจุลินทรีย์เมื่อ Aw = 0.91 (Knorr, 1995) การเพิ่มความสามารถในการทนต่อความดันของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีค่า Aw ต่ำเป็นผลมาจากการสูญเสียน้ำของเซลล์ในกระบวนการออสโมติกระหว่างของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง เยื่อหุ้มหนาขึ้นและลดความสามารถในการส่งผ่านและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Knorr, 1995; Palou *et al.,* 1999) จากผลการป้องกันจุลินทรีย์จากความดันของค่า Aw ที่ลดลง พบว่า การยับยั้งจุลินทรีย์โดยความดันสูง ไม่เพียงแต่จะขึ้นอยู่กับระดับความดัน และเวลาในการให้ความดัน ยังขึ้นอยู่กับปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยภายในและภายนอกเซลล์ที่มีผลต่อการตอบสนองของจุลินทรีย์ (Palou *et al.,* 1999)

ผลของความดันต่อโปรตีนถั่วเหลือง

Molina และ Ledward (2003) ศึกษาผลกระทบของการใช้ความดันสูงระดับ 200-600 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที ต่อค่า emulsifying activity index (EAI) และ ค่า emulsifying stability index (ESI) ของโปรตีน 7S 11S โกลบูลิน และ โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (soy protein isolate, SPI) ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 และ 6.5 ความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน (ร้อยละ 0.25-0.75) พบว่าโปรตีน 7S มีค่า EAI และ ค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิว (surface hydrophobicity) สูงสุดภายหลังได้รับความดัน 400 เมกกะปาสคาล และโปรตีน 11S มีค่า EAI และ ค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิวสูงสุดเมื่อได้รับความดัน 200 เมกกะปาสคาล ส่วนโปรตีน SPI มีค่า EAI อยู่ในระดับปานกลาง สูงสุดภายหลังได้รับความดัน 200 เมกกะปาสคาล แต่มีค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิวต่ำแสดงให้เห็นว่าความดันสูงระดับ 400 เมกกะปาสคาล สามารถทำให้โปรตีน 7S เกิดการแยกตัวบางส่วนหรือทั้งหมดกลายเป็นโมโนเมอร์ ทำให้ค่ากิจกรรมพื้นผิว (surface activity) มีค่าสูงขึ้น ในขณะเดียวกันการคลายตัวของสายโพลีเปปไทด์ในโปรตีน 11S จะนำไปสู่การรวมตัวกันทำให้ค่าไฮโดรโฟบิกพื้นผิวมีค่าลดลง

Okamoto และคณะ (1990) เปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสของเจลโปรตีนถั่วเหลืองความเข้มข้นร้อยละ 16.7 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ที่เกิดจากการได้รับความดันสูงระดับ 101.33-709.28 เมกกะปาสคาล ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และความร้อน 100 องศาเซลเซียส 10 นาที พบว่า โปรตีนถั่วเหลืองเมื่อได้รับความดันระดับ 202.65 เมกกะปาสคาล จะเกิดเป็นเจลที่ไม่คงรูปร่าง และที่ความดันระดับ 303.98 เมกกะปาสคาล โปรตีนถั่วเหลืองสามารถเกิดเป็นเจลที่คงรูปร่างได้ ซึ่งเจลที่ได้มีลักษณะมันวาวและมีความเรียบเนียนสูง เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสพบว่า เจลที่เกิดจากความดันมีลักษณะนุ่มกว่าและมีค่าความหยุ่นตัว (gumminess) ต่ำกว่าเจลที่เกิดจากความร้อน นอกจากนี้ Okamoto และคณะ (1990) รายงานว่าระดับความดันต่ำสุดที่สามารถทำให้โปรตีนถั่วเหลืองสามารถเกิดเจลได้เท่ากับ 300 เมกกะปาส คาล ใช้เวลานาน 10-30 นาที เมื่อเปรียบเทียบเจลที่ได้จากการใช้ความดันสูงกับเจลที่เกิดจากการใช้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที พบว่าการใช้ความดันสูงทำให้เจลมีลักษณะนุ่ม (soft) และมีค่า elastic modulus ต่ำกว่าเจลที่เกิดจากการใช้ความร้อนอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ Kajiyama และคณะ (1995) พบว่าน้ำนมถั่วเหลืองสามารถเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งได้เมื่อได้รับความดันระดับ 500 เมกกะปาสคาล นาน 30 นาที และที่ความดันต่ำกว่าหรือเท่ากับ 500 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที น้ำนมถั่วเหลืองยังคงสถานะของเหลวอยู่แต่จะแสดงคุณสมบัติ emulsifying activily และความคงตัวที่ดีขึ้น นอกจากนี้ Molina และ Ledward (2003) ยังพบว่าการให้ความดันสูงระดับ 300-700 เมกกะปาสคาล นาน 15 นาที สามารถทำให้โปรตีน SPI โปรตีน 7S และ 11S ความเข้มข้นร้อยละ 20 เกิดเป็นเจลที่คงรูปร่างได้ เจลโปรตีนถั่วเหลืองที่เกิดจากความดันสูงมีค่าความยืดติดและค่าความแข็งต่ำกว่าเจลที่เกิดจากการได้รับความร้อน (95 องศาเซลเซียส นาน 15 หรือ 30 นาที) อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อให้ความดันสูงขึ้นค่าประสิทธิภาพการอุ้มน้ำของเจล (water holding capacity, WHC) ของโปรตีน 7S จะมีค่าเพิ่มขึ้น

แต่เมื่อเปรียบเทียบเจลเต้าหู้แข็งที่ได้จากการให้ความร้อน โดยน้ำนมถั่วเหลืองจะถูกให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วเติมแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ลงไปจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ตกตะกอนที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กับเจลเต้าหู้แข็งที่เกิดจากการให้ความดันซึ่งเตรียมโดยให้ความดันกับน้ำนมถั่วเหลืองก่อนการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในปริมาณเท่ากันทิ้งให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที โดยกดทับเคิร์ดของทุกชุดการทดลองที่ได้ด้วยด้วยความดัน 3.5 กรัมต่อตารางเซนติเมตร จนเคิร์ดมีความหนา 20 มิลลิเมตร พบว่าที่ความดันระดับ 100 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที ไม่สามารถทำให้

เกิดเจลได้ และเจลเต้าหู้แข็งที่ผลิตโดยใช้ความดันระดับ 300 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที มีความแข็งเทียบเท่ากับเจลเต้าหู้แข็งที่ผลิตโดยใช้ความร้อน ในขณะที่ความดันระดับ 500 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที จะให้เจลที่มีความแข็งแรงเป็น 2 เท่าของเจลเต้าหู้แข็งที่ได้จากการใช้ความร้อน (Kajiyama *et al*., 1995)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของความดันสูงต่อลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของเต้าหู้อ่อน
2. ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารตกตะกอนร่วมกับการใช้ความดันสูงและความร้อนที่มีต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเต้าหู้อ่อน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. เมล็ดถั่วเหลือง [*Glycine max(L) merril*] พันธุ์เชียงใหม่ 1 จากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดสงขลา
2. ถุงไนลอนจากบริษัท เอเชียอุตสาหกรรมโฟม จำกัด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
3. เต้าหู้อ่อนทางการค้า โดยควบคุมยี่ห้อและแหล่งที่ซื้อเดียวกันตลอดการทดลอง
4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการตกตะกอนโปรตีนในน้ำนมถั่วเหลือง ได้แก่ กลูโคโนเดลต้าแลคโตน (Glucono delta lactone, GDL) แคลเซียมซัลเฟต (Calcium sulfate, $CaSO_4.2H_2O$) จากบริษัท Fluka และแมกนีเซียมคลอไรด์ (Magnesium chloride, $MgCl_2$) จากบริษัท Carlo Erba โดยใช้เกรดสำหรับวิเคราะห์
5. สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เกรดสำหรับวิเคราะห์

อุปกรณ์

<u>อุปกรณ์สำหรับผลิตเต้าหู้อ่อน</u>

1. เครื่องปั่นละเอียด (blender) ยี่ห้อ National รุ่น MX-T2G ประเทศไต้หวัน
2. เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Sorvall รุ่น RC-5B plus ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. เครื่องปิดผนึก ยี่ห้อ FJ รุ่น SFM300 ประเทศมาเลเซีย
4. เครื่องกำเนิดความดันสูง (High pressure) ยี่ห้อ SFP รุ่น S-FL-850-9-W ประเทศอังกฤษ
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350 ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่องผสม ยี่ห้อ IKA LABTECHNIK รุ่น RW20 DZMn ประเทศมาเลเซีย

<u>อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพ</u>

1. เครื่องเขย่ายี่ห้อ Vortex-Genie2 รุ่น G-560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น AB204 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ SARTORIUS รุ่น BP2100S ประเทศเยอรมันนี
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV-16001 ประเทศออสเตรเลีย
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง ยี่ห้อ Scientific รุ่น Denver15 ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. เครื่อง Texture Analyser ยี่ห้อ TA-XT2i รุ่น Stable Micro System ประเทศอังกฤษ