

ผลของปริมาณอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคตินในสตาร์ชข้าวพันธุ์
ต่าง ๆ ต่อการเกิดแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ชนิดที่ 3

นางสาวอริญา ตากโคกสูง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2555

**EFFECTS OF AMYLOSE CONTENT AND
AMYLOPECTIN STRUCTURE OF DIFFERENT
STARCH VARIETIES ON RESISTANT
STARCH TYPE III FORMATION**

Ariya Lapkhoksung



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2012**

ผลของปริมาณอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคตินในสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการ
เกิดแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ชนิดที่ 3

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

ประธานกรรมการ



(ผศ. ดร.สุนันทา ทองทา)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



(ดร. เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ)

กรรมการ



(ศ. ดร.สุกิจ ลิ้มปิ๋จันงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อริญา ภาภักโสภณ : ผลของปริมาณอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคตินในสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ต่อการเกิดแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ชนิดที่ 3 (EFFECTS OF AMYLOSE CONTENT AND AMYLOPECTIN STRUCTURE OF DIFFERENT STARCH VARIETIES ON RESISTANT STARCH TYPE III FORMATION)
อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา, 88 หน้า.

ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่ง ปริมาณอะมิโลส และโครงสร้างอะมิโลเพคติน มีผลต่อการเกิดแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ชนิดที่ 3 (Resistant starch type III; RS₃) โดยข้าวสามพันธุ์ถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามปริมาณอะมิโลสที่แตกต่างกัน ซึ่งสตาร์ชข้าวพันธุ์ กข 6 (waxy rice; RD6) จัดอยู่ในกลุ่มข้าวเหนียว ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (Phitsanulok 2; P2) อยู่ในกลุ่มข้าวอะมิโลสดำและข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (Suphanburi 90; S90) อยู่ในกลุ่มข้าวอะมิโลสสูง เมื่อทำการตัดกิ่งตัวอย่างสตาร์ชเข้มข้น 10% ด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสเพียงชนิดเดียวหรือใช้เอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพูลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase+isoamylase debranched starch; PIDBS) มีระดับการตัดกิ่ง ระดับการย่อย และค่า β -amylolysis limit สูงกว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพูลูลานเนส (Pullulanase debranched starch; PDBS) และเมื่อต้มตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่งที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+isoamylase debranched starch (RPIDS) สูงกว่า retrograded pullulanase debranched starch (RPDS) โดย RPIDS ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6, P2 และ S90 มีปริมาณ RS เท่ากับ 18.73, 43.44 และ 42.09% ตามลำดับ ในขณะที่ RPDS มีปริมาณ RS เท่ากับ 12.01, 23.85 และ 22.65% ตามลำดับ ตัวอย่าง RPIDS และ RPDS แสดงโครงสร้างผลึกแบบ B-type และมีช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลว 54.46-57.38°C และพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (ΔH) มีค่า 10.64-18.38 J/g ในขณะที่ตัวอย่าง RPIDS เท่านั้นที่พบเอนโดทอมที่สอง โดยมีช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลว 111.15-135.11°C และ ΔH มีค่า 0.28-0.30 J/g การศึกษาจลพลศาสตร์ของการเกิดรีโทรเกรดชันของ PIDBS ที่อุณหภูมิ 4°C ของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ได้ติดตามด้วย Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่า FTIR spectra ของเลขคลื่น (wave number) ที่ 1045 cm^{-1} เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการต้มเพิ่มขึ้นส่งผลให้สัดส่วนของระหว่างเลขคลื่นที่ตำแหน่ง 1045 ต่อ 1037 cm^{-1}

เพิ่มขึ้นด้วยอัตราการเกิดผลึก (rate constant; k) ซึ่งได้จากสมการ Avrami พบว่าสตาร์ช P2 มีอัตราการเกิดผลึกเร็วกว่า S90 และพันธุ์ RD6 ตามลำดับ

ผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่อการเกิด RS ได้ทำการศึกษา โดยเตรียมสตาร์ชข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ปราศจากอะมิโลสด้วยการผ่านกระบวนการกำจัดอะมิโลสด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90°C มีปริมาณอะมิโลสเหลือในตัวอย่างร้อยละ 4.93 ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 ปราศจากอะมิโลส (P2 free-amylose rice starches; P2-FAM) ผ่านกระบวนการกำจัดอะมิโลสโดยการใช้สารละลายต่างที่ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 90°C มีปริมาณอะมิโลสเหลือในตัวอย่างร้อยละ 7.85 นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการกำจัดอะมิโลสมีผลทำให้โมเลกุลสายยาว ($DP \geq 37$) บางส่วนถูกตัดให้สั้นลง สตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (free amylose starch : FAM) ของพันธุ์ RD6, P2 และ S90 ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ฟูลลูแลนร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงปริมาณ RS เท่ากับ 10.35, 14.42 และ 12.05% ตามลำดับ พบว่า P2-FAM มีปริมาณ RS และค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวสูงที่สุด และ S90-FAM มีปริมาณ RS สูงกว่า RD6 เนื่องจากอะมิโลเพคตินของ P2 มีสัดส่วนของสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) มากกว่าของ S90-FAM นอกจากนี้อะมิโลเพคตินของ P2 และ S90 มีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก ในขณะที่ RD6-FAM ไม่มีสัดส่วนดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของอะมิโลเพคตินสายโซ่ที่มีขนาดยาวมากมีผลต่อการรีโทรเกรเดชันและการเพิ่มปริมาณ RS

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา ศศิญา ทวีโตกกุล

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ปวีณ

ARIYA LAPKHOKSUNG : EFFECTS OF AMYLOSE CONTENT AND
AMYLOPECTIN STRUCTURE OF DIFFERENT STARCH VARIETIES ON
RESISTANT STARCH TYPE III FORMATION. THESIS ADVISOR: ASST.
PROF. SUNANTA TONGTA, Ph.D., 88 PP.

RESISTANT STARCH/AMYLOSE CONTENT/AMYLOPECTIN STRUCTURE/
RICE VARIETIES

The type of debranching enzyme, amylose content and amylopectin structure may play an important role on the formation of resistant starch type III. Three varieties of rice starches which were classified by different amylose content, RD6 (waxy rice), Phitsanulok 2 (P2, low amylose rice) and Suphanburi 90 (S90, high amylose rice) were used in this study. The starch suspension of 10% was debranched with pullulanase or pullulanase+isoamylase at 50°C for 24 h. The pullulanase+isoamylase debranched starch (PIDBS) showed higher degrees of debranching, hydrolysis and β -amylolysis than those of the pullulanase debranched starch (PDBS). After being retrograded at 4°C for 24 h, the resistant starch (RS) content of retrograded pullulanase+isoamylase debranched starch (RPIDS) was found to be significantly higher than the retrograded pullulanase debranched starch (RPDS). The RPIDS of RD6, P2 and SP90 showed an RS content of 18.73, 43.44 and 42.09%, respectively, while the RPDS of these rice starches displayed 12.01, 23.85 and 22.65% RS, respectively. The retrogradation kinetics of PIDBS at 4°C was monitored using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). From the FTIR spectrum, the wave number at 1045 cm^{-1} increased with a longer retrogradation time, resulting in a greater absorbance ratio of 1045 to 1037 cm^{-1} . The rate constant (k) from Avrami

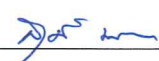
equation of P2 was higher than that of S90 and RD6, respectively.

The effect of amylopectin structure from different rice varieties on RS₃ formation was investigated. The S90 free-amylose rice starch (S90-FAM) with 4.93% amylose content was prepared by the amylose leaching method with water at 90°C. In addition, The P2 free-amylose rice starch (P2-FAM) was prepared by the amylose leaching method with 0.01M NaOH at 90°C with the remaining amylose of 7.85%. The effect of the leaching method decreased the proportion of the super long chain (DP_n≥37). The FAM starches of RD6, P2 and S90 which were debranched with pullulanase+isoamylase and retrograded at 4°C for 24 h showed the RS content of 10.35, 14.42 and 12.05%, respectively. The P2-FAM showed the highest RS content and T_p. The S90-FAM showed a higher RS content than RD6-FAM because P2 had a higher proportion of the super long chain than S90. Furthermore, the amylopectin of P2 and S90 contained super long chain length but the RD6 amylopectin did not. Therefore, a higher proportion of the super long chain of amylopectin affected retrogradation with an increase of RS content.

School of Food Technology

Academic Year 2012

Student's Signature Apiya Lopkhoksung

Advisor's Signature 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. ที่ให้เงินทุนสนับสนุนในการศึกษาและอุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัย และขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุนันทาทองทา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ ให้การดูแลเอาใจใส่ พร้อมทั้งคอยให้คำปรึกษาและคำแนะนำในด้านการศึกษาวิจัยและด้านอื่น ๆ ด้วยดียิ่งตลอดมา ตลอดจนเสียสละเวลาในการตรวจแก้ไขงาน ให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ทั้งคอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และขอกราบขอบพระคุณ ดร. เกื้อกุล ปิยะขอมขวัญ ที่กรุณาเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบ อีกทั้งคอยให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ เกี่ยวกับงานวิจัย และในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอกราบขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านที่มีได้กล่าวชื่อมา ณ ที่นี้ ที่ให้ความรู้ทางด้านวิชาการตลอดระยะเวลาการศึกษาซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำงานวิจัยของวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี และศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ที่อนุเคราะห์พันธุ์ข้าวเพื่อใช้ในการงานวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่อาคารศูนย์เครื่องมือ 1, 2 และ 3 ทุก ๆ ท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านเครื่องมือ และอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำวิจัย และขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายธุรการ สาขาเทคโนโลยีอาหารที่คอยอำนวยความสะดวกในเรื่องเอกสารต่าง ๆ ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ที่ร่วมเรียนปริญญาโทและปริญญาเอกทุก ๆ คน ที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจซึ่งกันและกันตลอดมา สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยให้ความรัก ความเข้าใจ และให้กำลังใจตลอดมา อีกทั้งยังส่งเสริมทางการศึกษาเป็นอย่างดี จึงทำให้ผู้วิจัยประสบผลสำเร็จทั้งในเรื่องการศึกษาและการดำรงชีวิต

อริญา ลากโคกสูง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทัศนั้วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สตาร์ช.....	4
2.2 โครงสร้างและองค์ประกอบของสตาร์ช.....	4
2.3 ประเภทของสตาร์ช.....	9
2.4 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์.....	10
2.5 การเกิด resistant starch type III (RS ₃).....	12
2.6 ทฤษฎีการเกิดรีโทรเกรเดชัน และการเกิดผลึก.....	13
2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS ₃	16
2.8 ประโยชน์ของแป้งที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์.....	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 3 วัตถุประสงค์และวิธีการทดลอง.....	22
3.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี.....	22
3.2 การจำแนกประเภทของข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	22
3.3 การเตรียมสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	23
3.4 การศึกษาคุณสมบัติของสตาร์ชข้าว.....	24
3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์.....	25
3.6 การแยกอะมิโลสออกจากตัวอย่างสตาร์ชข้าว.....	26
3.7 การเตรียมสตาร์ชข้าวตัดกิ่ง (Debranched rice starch, DBRS).....	27
3.8 β – amylolysis limit of debranch starch	28
3.9 การวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์.....	28
3.10 การตรวจสอบลักษณะโครงสร้างทางผลึก.....	29
3.11 การตรวจวัดคุณสมบัติทางความร้อน.....	29
3.13 การศึกษาจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของการเกิดรีโทรเกรดชันด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)	30
3.12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	30
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	31
4.1 องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	31
4.2 ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	31
4.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	34
4.4 ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่งต่อระดับการตัดกิ่ง (Degree of debranching).....	36
4.5 ผลของโครงสร้างสตาร์ชข้าวต่อปริมาณ RS	40
4.6 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชตัดกิ่ง.....	40
4.7 คุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชตัดกิ่ง.....	45
4.8 การติดตามจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเกิดรีโทรเกรดชัน.....	4
4.9 ผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินต่อการเกิด RS ₃	54
4.9.1 การเตรียมสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Amylose Free Starch).....	54
4.9.2 โครงสร้างกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน ของสตาร์ช (Chain length distribution) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM)	60

4.9.3 ลักษณะ โครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส	64
4.9.4 คุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส	65
4.9.5 ปริมาณ RS คุณสมบัติทางผลึกและคุณสมบัติทางความร้อนสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส.....	77
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษา.....	72



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ประเภทของสตาร์ชในอาหารเมื่อพิจารณาตามความสามารถในการถูกย่อย	10
3.1	คุณลักษณะบางประการของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับไอโอดีนของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ และ สตาร์ชข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Isoamylase และทำการแยกตามขนาดด้วย gel permeation chromatography (GPC) จากสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	23
3.2	Gradient program ของเครื่อง High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detector (HPAEC-PAD)	31
4.1	องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	31
4.2	ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	32
4.3	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	34
4.4	ปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase debranched starch: RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch: RPIDS ที่เกิดรีโทรเกรดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	41
4.5	ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบ ผลึกของ native starch และ retrograded pullulanase debranched starch: RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch: RPIDS ที่เกิดรีโทรเกรดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	43
4.6	คุณสมบัติทางความร้อนของ native starch และ retrograded pullulanase debranched starch: RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch: RPIDS ที่เกิดรีโทรเกรดที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	47
4.7	ค่า Avrami exponent (n) และ rate constant (k) ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูลานเนสร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามสายพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.8	ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching)	55
4.9	ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) ร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน	56
4.10	ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในสตาร์ชข้าวพันธุ์ พิษณุโลก 2 หลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) โดยใช้สารละลายต่างร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน	58
4.11	ปริมาณอะมิโลสหลังทำการกำจัดอะมิโลส (Leaching amylose)	59
4.12	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM)	62
4.13	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ช กข 6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ด้วยน้ำ และ NaOH	64
4.14	สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	66
4.15	ปริมาณ RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) และตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูทานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	67
4.16	ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบของสตาร์ช ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูทานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	69
4.17	สมบัติทางเทอร์โมไดนามิกในการเกิดเจลลาติโนเซชัน ชั้นของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูทานเนสร่วม	70

กับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของ
สตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)



สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคติน	5
2.2	ลักษณะโครงสร้างแบบกิ่งผลึกของเม็ดสตาร์ช	8
2.3	โครงสร้างทางผลึกชนิด A และ B รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เรย์ของสตาร์ชที่มีลักษณะโครงสร้างทางผลึกแบบ A, B และ V_h	9
2.4	ลักษณะโครงสร้างของ RS แต่ละชนิด	11
2.5	ลักษณะโครงสร้างของ RS 3 ในสารละลายอะมิโลส (a) แบบจำลอง Micelle : สายเกลียวคู่ถูกจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในส่วนโครงสร้างที่เป็นผลึก (C) นอกเหนือจากบริเวณที่เป็นอสัณฐาน (b) แบบจำลอง Lamella : โครงสร้าง Lamella ถูกสร้างขึ้นจากการพับของสายโซ่ โดยพื้นที่ส่วนที่พับตัวเป็นส่วนอสัณฐาน (A) ขณะที่ส่วนกลางของ Lamella คือ ส่วนที่เป็นผลึก (C)	13
2.6	กราฟเศษส่วนผลึกกับล็อกของเวลาของ polypropylene ที่อุณหภูมิต่างๆ	15
2.7	แสดงลักษณะการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยสตาร์ช	18
4.1	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ กข 6 (a), พิษณุโลก 2 (b), และ สุพรรณบุรี 90 (c)	35
4.2	ระดับการตัดกิ่งของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PDBS) และ สตาร์ชข้าว ตัดกิ่งด้วย พุลูลานเนส ร่วมกับไอโซอะไมเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.3	38
ระดับการย่อยของสตาร์ชข้าว ตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PDBS) และ สตาร์ชข้าว ตัดกิ่งด้วย พุลูลานเนส ร่วมกับไอโซอะไมเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	
4.4	39
ค่า β - amylolysis limit ของสตาร์ชข้าว ตัดกิ่งด้วย พุลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PDBS) และ สตาร์ชข้าว ตัดกิ่งด้วย พุลูลานเนส ร่วมกับไอโซอะไมเลส(Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	
4.5	44
ลักษณะโครงสร้างผลึกของ Native starch (a) และ retrograded pullulanase debranched starch : RPDS) และ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch : RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	
4.6	46
เทอร์โมแกรมการเกิดเจลลาติโนเซชัน (a) native starch และ (b) retrograded pullulanase debranched starch : RPDS) และ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch : RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	
4.7	49
สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ระยะเวลาต่างๆ ของสตาร์ชข้างทั้งสามสายพันธุ์ (a) RD 6 (กข 6), (b) P2 (พิชญ์โลก 2) และ (c) S 90 (สุพรรณบุรี 90)	

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.8	ค่าสัดส่วนอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ของสตาร์ชข้าว ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พลูกลูนาเนสร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ (a) RD 6 (กข 6), (b) P2 (พิชญ โลก 2) และ (c) S 90 (สุพรรณบุรี 90) ที่เวลาต่างๆ	51
4.9	กราฟของ $\log [-\ln(E_L - E_\infty)/(E_L - E_0)]$ ต่อ $\log t$ ตามสมการ Avrami ของสตาร์ชข้าวที่ ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พลูกลูนาเนสร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ (a) RD 6 (กข 6), (b) P2 (พิชญ โลก 2) และ (c) S 90 (สุพรรณบุรี 90)	53
4.10	กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่ขึ้นกับค่าพลังงานที่ใช้ใน การหลอมเหลว (melting enthalpies) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลส และไขมัน	59
4.11	เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาคีโนเซนชัน ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสตาร์ชข้าว ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) กับไขมัน LPC ของสตาร์ชข้าว ทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	60
4.12	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ของ สตาร์ช (a) ข้าวพิชญ โลก 2 และ (b) สุพรรณบุรี 90	61
4.13	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ช กข 6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ด้วย (a) น้ำ และ (b) NaOH	63
4.14	ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	65
4.15	เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาคีโนเซนชัน สตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิชญ โลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)	66
4.16	ลักษณะโครงสร้างผลึก ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พลูกลูนาเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และ	68

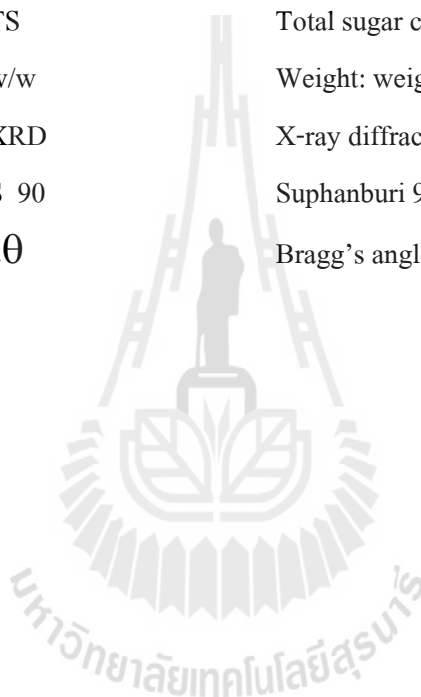
- บ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)
- 4.17 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาคีโนเซชัน RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูทานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90)



คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A°	Angstrom
ANOVA	Analysis of Variance
°C	Degree celsius
CRD	Completely Randomized Design
ConA	Concanavalin-A
DB	Degree of debranching
DH	Degree of hydrolysis
DP	Degree of polymerization
DSC	Differential scanning calorimeter
FAM	Free amylose starch
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectrometers
x g	Gravitational acceleration
GPC	Gel permeation chromatography
ΔH	Enthalpy
HPAEC	High Performance Anionic Exchange Chromatography
LPC	L- α -lysophosphatidylcholine
P 2	Phisanulok 2
PDBS	Pullulanase debranched starch
PIDBS	Pullulanase+ Isoamylase debranched starch
PUN	Pullulanase Unit
R	Reducing sugar content
RD 6	Waxy rice
RD 6-FAM-H ₂ O	RD 6-free amylose with H ₂ O
RD 6-FAM- NaOH	RD 6-free amylose with NaOH
RPDS	Retrograded pullulanase debranched starch
RPIDS	Retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch
RS	Resistant starch
RS ₁	Resistant Starch type I

RS_2	Resistant Starch type II
RS_3	Resistant Starch type III
RS_4	Resistant Starch type IV
T_c	Conclusion temperature
T_g	Glass temperature
T_m	Melting temperature
T_0	Onset temperature
T_p	Peak temperature
TS	Total sugar content
w/w	Weight: weight
XRD	X-ray diffraction
S 90	Suphanburi 90
2θ	Bragg's angle



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบันอาหารเพื่อสุขภาพ หรือ Functional food ซึ่งหมายถึงอาหารหรือส่วนประกอบที่มีอยู่ในอาหารที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค รวมทั้งมีส่วนช่วยในเรื่องของการป้องกันและรักษาโรค ซึ่งจะมีความหมายครอบคลุมทั้งอาหารเสริม สารทดแทนน้ำตาล สารทดแทนไขมัน อาหารที่มีเส้นใยสูง ผัก เนื้อสัตว์ที่มีไขมันต่ำ และอาหารที่มีแคลอรีต่ำ มีแนวโน้มความต้องการจากผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น ทั้งภายในและต่างประเทศ สารสำคัญอีกชนิดหนึ่ง ของสารประกอบอาหาร ที่มีผลต่อการสร้างเสริมสุขภาพ (functional ingredients) และน่าสนใจในปัจจุบัน คือสตาร์ชที่มีพลังงานต่ำ หรือ Resistant starch ซึ่งมีคุณสมบัติต่อสุขภาพเช่นเดียวกับใยอาหาร (dietary fiber) ซึ่งหากบริโภคเป็นประจำจะสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคอายุรกรรมต่าง ๆ ได้ เช่น โรคเบาหวาน, โรคอ้วน, โรคหัวใจ และโรคมะเร็ง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องมาจากข้อมูลจากการศึกษาและงานวิจัยต่าง ๆ ที่แสดงให้เห็นถึงบทบาทของอาหารที่มีต่อการเกิดโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ และทำให้ผู้บริโภคมีแนวโน้มที่จะบริโภคอาหารเพิ่มสุขภาพมากขึ้น เช่น การบริโภคอาหารชีวจิต การบริโภคอาหารเพิ่มเส้นใย เป็นต้น ดังนั้นตลาดของอาหารเพื่อสุขภาพจึงเติบโตอย่างรวดเร็ว

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย ทั้งในด้านการบริโภคภายในและการส่งออกไปในตลาดโลก ปัจจุบันไทยครองส่วนแบ่งการตลาดข้าวโลกเป็นอันดับ 1 ด้วยสัดส่วนร้อยละ 30.48 ตั้งแต่ปี 2545 เป็นต้นมา การส่งออกผลิตภัณฑ์ข้าวแปรรูปของไทยนับว่าเป็นสินค้าดาวรุ่งที่มีการขยายตัวสูงและต่อเนื่องทุกปี พบว่ามีการเติบโตในอัตราเฉลี่ยร้อยละ 2.61 ต่อปี ตั้งแต่ปี 2545-2550 และมีการเติบโตอย่างมากในปี 2551 ซึ่งมีมูลค่าสูงถึง 10,013 ล้านบาท ขยายตัวจากปี 2550 มากถึงร้อยละ 37 โดยผลิตภัณฑ์ส่งออกหลักได้แก่ เส้นก๋วยเตี๋ยว-เส้นหมี่พร้อมปรุงหรือสำเร็จรูป แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า (สมาคมส่งออกข้าวไทย, 2555) เป็นต้น ดังนั้นหากสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปข้าวให้กว้างขวางยิ่งขึ้น ย่อมเป็นการเพิ่มมูลค่าของข้าวให้สูงขึ้น ในปัจจุบันจึงมีการนำสตาร์ชข้าวเจ้าและสตาร์ชข้าวเหนียวมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย ทั้งอุตสาหกรรมอาหารและอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามสตาร์ชดิบ (native starch) จะมีคุณสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ เช่น มีความคงทนต่อแรงเฉือนในกระบวนการผลิตหรือความคงทนต่อสภาวะต่าง ๆ ต่ำ มีช่วงความหนืดที่แคบ ดังนั้นจึงมีการนำสตาร์ชมาปรับเปลี่ยน

คุณสมบัติบางประการเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค ซึ่งเรียกว่า สตาร์ชดัดแปร (modified starch)

สตาร์ชทนการย่อยต่อเอนไซม์ (enzyme resistant starch หรือ resistant starch) เป็นสตาร์ชที่จัดอยู่ในกลุ่มของสตาร์ชดัดแปร โดยจากคำนิยามของ European Flair Concerted Action on resistant starch (EURESTA) กล่าวว่าสตาร์ชทนการย่อยด้วยเอนไซม์ หมายถึง สตาร์ชและผลิตภัณฑ์ของสตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์และถูกดูดซึมในลำไส้เล็กของมนุษย์สุขภาพดี (Euresta, 1992) ดังนั้น resistant starch (RS) จึงจัดอยู่ในกลุ่มของเส้นใยอาหาร (dietary fiber) (Yue and Waring, 1998) RS สามารถผ่านเข้าไปถึงลำไส้ใหญ่และถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดไขมันสายสั้น ๆ เช่น acetic acid, propionic acid และ butyric acid เป็นต้น โดยทั่วไป RS แบ่งเป็น 4 ประเภท (Sajilata et al., 2006) คือ Resistant Starch type I (RS_1) เป็นสตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ เนื่องจากถูกตรึงไว้ในเซลล์หุ้มเมล็ด เป็น RS ที่สามารถเกิดขึ้นเองได้ตามธรรมชาติแต่เป็นส่วนน้อย ส่วนใหญ่พบในเมล็ดข้าว (grain), เมล็ดธัญพืช (seeds) และถั่ว (legume) ส่วน Resistant Starch type II (RS_2) เป็น RS ที่อยู่ในรูปเม็ดสตาร์ชดิบ (native granular starch) พบได้ในสตาร์ชมันฝรั่ง (potato starch) และกล้วยดิบ (green banana) สำหรับ Resistant Starch type III (RS_3) เป็นสตาร์ชที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ของอะมิโลส Resistant Starch type IV (RS_4) เกิดจากการดัดแปรสตาร์ชทางเคมี ในปัจจุบันนักวิจัยและโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเริ่มให้ความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับ RS_3 ซึ่งเป็น RS ที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ของเจลสตาร์ช และเป็น RS ที่มีความสำคัญมากกว่า RS ประเภทอื่น เนื่องจากมีความเสถียรต่อความร้อน (thermal stability) ทำให้ทนต่อกระบวนการหุงต้มปกติ นอกจากนี้ก็มีรายงานว่า RS_3 ยังสามารถถูกหมักและผลิต butyric acid ได้มากกว่า RS_2 และ oligosaccharide อีกด้วย (Brouns et al., 2002; Arrigoni et al., 2001) จากความสำคัญของ RS ดังที่กล่าวจึงทำให้มีการนำ RS มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น โดยใช้เป็นส่วนผสมแทนการใช้เส้นใยอาหารจากแหล่งอื่น ๆ และใช้เพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร (fiber fortified) ซึ่งจะใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ปรุงสุกและผ่านการอบ เช่น เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จรูป (RTE Cereal) และขนมขบเคี้ยว อาหารเส้น (pasta/noodle) และอาหารทอด เป็นต้น เนื่องจากทนความร้อนได้สูงจึงทำให้แนวโน้มการใช้ RS เป็นแหล่งใยอาหารในอาหารที่เสริมใยอาหาร (fiber fortification) ได้รับความสนใจมาก

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการผลิตสตาร์ชที่มี RS สูง มีหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น การเกิดรีโทรเกรเดชันของโมเลกุลอะมิโลส (Eerlinge and Delcour, 1995; Brouns, Kettlitz, and Arrigoni, 2002; Yijun Sang et al., 2006) มีความเสถียรต่อความร้อนสูงจึงสามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการไว้ได้ในกระบวนการหุงต้มปกติ และในช่วง ค.ศ. 1994 – ปัจจุบัน มีรายงานการเตรียมแป้งสตาร์ช RS_3 จาก

การคัดแปรเป้่งโดยการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลลูลานเนส ซึ่งพบว่า การตัดกิ่งทำให้มีปริมาณ RS_3 เพิ่มขึ้น (Chiu, Henley and Altieri, 1994; Guraya, James and Champagne, 2001; Lehmann, Jacobasch and Schmiedl, 2002; Gonzalez-Soto, Agama-Acevedo, Solorza-Feria, Rendon-Villalobos, and Bello-Perez, 2004; Shin et al., 2004; Hamaker and Han, 2004; González et al., 2006; Ozturk et al., 2009) เนื่องจากการตัดกิ่งของแป้งสตาร์ชส่งผลต่อการเกิดโมเลกุลสายโซ่ที่เป็นเส้นตรงที่สนับสนุนให้เกิด RS_3 ในปริมาณสูง (Berry, 1986) อย่างไรก็ตาม การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ของการผลิตข้าวที่มี RS สูงยังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษานิตของพันธุ์ข้าว โครงสร้างของอะมิโลเพคตินในสตาร์ชข้าว ตลอดจนผลของตัวแปรต่าง ๆ เช่น ปริมาณอะมิโลสที่แตกต่างกัน ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่งที่มี ผลต่อการเกิดสตาร์ชข้าวที่มี RS สูงนั้น ก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำไปสู่การประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมในกระบวนการผลิตสตาร์ชข้าวที่มี RS สูงสำหรับภาคอุตสาหกรรมในอนาคต ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้ถือ เป็นพื้นฐานและแนวทางในการ พัฒนาผลิตภัณฑ์นวัตกรรมใหม่ในอุตสาหกรรมแปรรูปข้าว ในประเทศ เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวไทยได้มากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษานิตของเอนไซม์ตัดกิ่ง (debranching enzyme) ที่มีผลต่อระดับการตัดกิ่ง ปริมาณและคุณสมบัติของ RS_3

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของปริมาณอะมิโลส และ โครงสร้างอะมิโลเพคตินในสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ต่อปริมาณและคุณสมบัติของ RS_3

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่ง และการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ตัดกิ่ง มีผลต่อระดับการตัดกิ่ง ซึ่งส่งผลถึงปริมาณและคุณสมบัติของ RS_3 , ปริมาณอะมิโลสและโครงสร้างของอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ มีผลต่อปริมาณ RS_3 ตลอดจนคุณสมบัติทางผลึกและคุณสมบัติทางความร้อน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับ ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่ง โดยตัวแปรที่ทำการศึกษาคือ การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว และ การใช้เอนไซม์ร่วมกันในกระบวนการตัดกิ่ง ต่อระดับการตัดกิ่ง ระดับการย่อย ปริมาณและคุณสมบัติต่าง ๆ ของ RS_3 ศึกษาสตาร์ชข้าว 3 พันธุ์ คือ กข 6, พิชณุโลก 2 และ

สุพรรณบุรี 90 ที่มีปริมาณอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคตินแตกต่างกัน และศึกษาผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวต่อปริมาณและคุณสมบัติของ RS_3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงการทำงานของเอนไซม์ตัดกิ่ง 2 ชนิด ปริมาณอะมิโลสและโครงสร้าง อะมิโลเพคติน ต่อการเกิด RS_3 เพื่อนำองค์ความรู้เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการผลิต RS_3 จากสตาร์ชข้าว ในภาคอุตสาหกรรม และปรับปรุงคุณสมบัติของ RS_3 ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมอาหารต่อไป



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สตาร์ช

แป้ง หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีสิ่งเจือปนอื่น ๆ เช่น โปรตีน ไขมัน และเกลือแร่เล็กน้อยมาก สตาร์ชที่ผลิตโดยทั่วไปยังมีส่วนประกอบอื่น ๆ อยู่มาก เรียกว่า ฟลาว (flour) ตัวอย่างเช่น ฟลาวข้าวโพด (corn flour), ฟลาวข้าวสาลี (wheat flour), และฟลาวข้าว (rice flour) เป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบโปรตีนสูง ดังนั้น สตาร์ช หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำฟลาวมาผ่านกระบวนการกำจัดส่วนประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่อยู่ร่วมกับสตาร์ชออก เพื่อให้สตาร์ชบริสุทธิ์ เช่น สตาร์ชข้าวโพด (corn starch), สตาร์ชข้าวสาลี (wheat starch) และสตาร์ชข้าว (rice starch) รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ได้เตรียมสตาร์ชข้าวไทยพันธุ์ต่าง ๆ ทำได้โดยนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการโม่เปียก (wet milling) เพื่อให้ได้ฟลาวจากนั้นนำมาสกัดโปรตีนโดยการใส่สารเคมีต่าง ๆ เช่น สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5, เอทานอลร้อยละ 95 และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.35 พบว่า สตาร์ชที่เตรียมได้มีโปรตีนน้อยกว่าร้อยละ 0.5 มีปริมาณของไขมันน้อยกว่าร้อยละ 0.1 ปริมาณเถ้าร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักแห้ง และปริมาณสตาร์ชข้าวของทุกพันธุ์ที่ได้มากกว่าร้อยละ 95 โดยน้ำหนักแห้ง

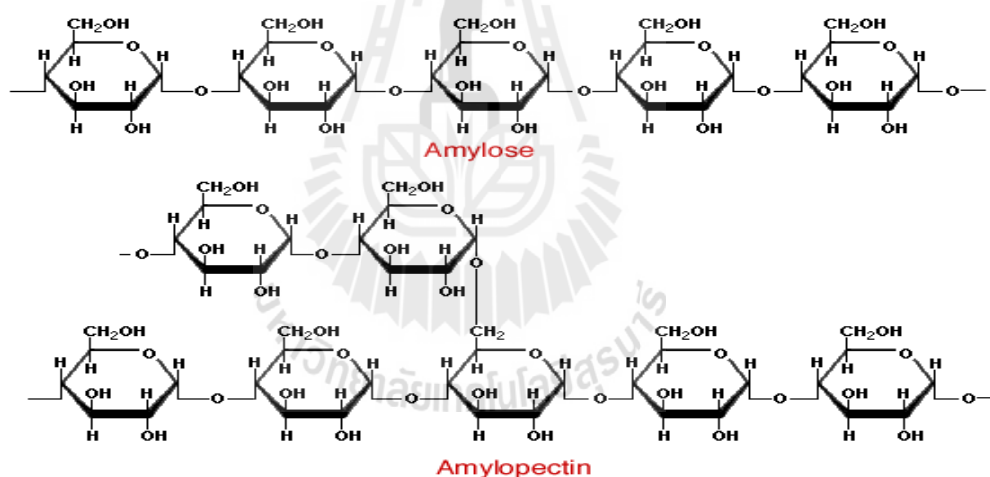
2.2 โครงสร้างและองค์ประกอบของสตาร์ช

สตาร์ช มีสูตรเคมีโดยทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เป็นพอลิเมอร์กลูโคสซึ่งประกอบด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางตอนปลายของสายพอลิเมอร์ มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซิง (reducing end group) สตาร์ชประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะมิโลส, amylose) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะมิโลเพคติน, amylopectin) ซึ่งสตาร์ชจากแหล่งที่แตกต่างกันจึงทำให้คุณสมบัติของสตาร์ชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2546)

2.2.1 อะมิโลส

อะมิโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นของน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสประมาณ 200 ถึง 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วย พันธะ α -1,4-glycosidic linkage ดังภาพที่ 2.1 น้ำหนักโมเลกุลของอะมิโลสอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ซึ่งอะมิโลสในสตาร์ชแต่ละชนิดจะมี

น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันออกไป และมีค่าระดับขั้นของพอลิเมอไรเซชัน (degree of polymerization, DP) ที่แตกต่างกันอีกด้วย สำหรับตำแหน่งของอะมิโลสภายในเม็ดสตาร์ชจะขึ้นอยู่กับชนิดของสตาร์ช โดยอะมิโลสบางส่วนอยู่ในกลุ่มของอะมิโลเพคติน บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในส่วนอสัณฐาน (amorphous regions) และส่วนผลึก (crystalline regions) อะมิโลสที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะพบเป็นเกลียวคู่กับอะมิโลเพคตินอยู่ใจกลางเม็ดสตาร์ช สำหรับอะมิโลสที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะพบอยู่ตามขอบของเม็ด สตาร์ช (Hizukuri, 1995) อะมิโลส สามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีนและสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น บีวทานอล, กรดไขมัน, ฟีนอล, สารลดแรงตึงผิวหลายชนิด และไฮโดรคาร์บอน โดยสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้จะไม่ละลายในน้ำ เนื่องจากอะมิโลสจะพันเป็นเกลียวล้อมรอบสารละลายอินทรีย์เหล่านี้ แต่เมื่ออยู่ในสารละลาย โครงสร้างอะมิโลสจะมีหลายรูปแบบ คือ ลักษณะเป็นเกลียวม้วน (helix) เกลียวที่คลายตัว (interrupted helix) หรือม้วนอย่างไม่เจาะจง (random coil) การที่อะมิโลสจะอยู่ในรูปแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ และขนาดโมเลกุลของอะมิโลส



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคติน

แหล่ง

ที่มา : Tester, Karkalas and Qi (2004)

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาปริมาณอะมิโลสของข้าวไทยพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย concanavalin A หรือ Con-A ซึ่งสามารถจำแนกสตาร์ชข้าวออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ข้าวพันธุ์อะมิโลสต่ำซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏ (apparent amylose) ปริมาณร้อยละ 3.80 กลุ่มที่ 2 เป็นข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลางซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏประมาณร้อยละ 12.38 ถึง 18.00 และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสสูงซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏประมาณร้อยละ 20.31 ถึง 26.68 นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์

ปริมาณอะมิโลสในสตาρχข้าวโดยใช้วิธีการเกิดสีกับไอโอดีน (Juliano, 1984) พบว่าจะให้ค่าปรากฏที่สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธี Con-A โดยพบว่าร้อยละความแตกต่างระหว่างค่าปริมาณอะมิโลสที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10 จนถึง 50 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปริมาณอะมิโลสที่วิเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการรบกวนด้วยโมเลกุลของอะมิโลเพคตินและโมเลกุลที่มีขนาดกลาง (intermedial material)

2.2.2 อะมิโลเพคติน

อะมิโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส โครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,4) glucosidic linkage และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) glucosidic linkage (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2546) แสดงดังภาพที่ 2.1 หน่วยย่อยกลูโคสที่มีพันธะกลูโคซิดิกชนิด α -(1,6) มีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณกลูโคสในอะมิโลเพคตินทั้งหมด ขนาดโมเลกุลของอะมิโลเพคตินในสตาρχแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10^7 ถึง 10^9 ดาลตัน และมีอัตราในการคืนตัวต่ำเนื่องจากอะมิโลเพคตินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง

ลักษณะโครงสร้างแบบกิ่งของอะมิโลเพคตินประกอบด้วยสายโซ่ 3 ชนิด คือ สาย A (A-chain) เป็นสายโซ่ที่เชื่อมต่อกับสายอื่นที่ตำแหน่งเดียวไม่มีกิ่งเชื่อมต่อออกจากสายชนิดนี้ (unbranched structure) สาย B (B-chain) มีโครงสร้างแบบกิ่งเชื่อมต่อกับสายอื่นอีก 2 สายหรือมากกว่า และสาย C (C-chain) เป็นสายแกนซึ่งประกอบด้วยหมู่รีดิวซิง 1 หมู่ที่เป็นอิสระและถูกแทนที่เพียงจุด C-6 (primary hydroxyl group) ซึ่งในอะมิโลเพคตินแต่ละโมเลกุลจะประกอบด้วยสาย C หนึ่งสายเท่านั้น เนื่องจากมีการเชื่อมต่อ A-chain, B-chain และ C-chain ภายในโมเลกุลอะมิโลเพคตินด้วยพันธะ α -(1,6) glycosidic linkage ซึ่งมีสาย C-chain เพียงหนึ่งสายโซ่ต่อโมเลกุล ดังนั้น อัตราส่วนของ A-chain และ B-chain จึงมีความสำคัญเนื่องจากการแสดงถึง degree of multiple branching ของโมเลกุลซึ่งอะมิโลเพคตินหนึ่งโมเลกุลจะมีอัตราส่วนของ A-chain ต่อ B-chain ประมาณ 1.5-2.6 : 1 (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2546)

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ทำการศึกษา ร้อยละการกระจายตัวของกิ่งก้านอะมิโลเพคตินของข้าวไทยพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยเครื่อง High Performance Anionic Exchange Chromatography (HPAEC) พบว่าข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ มีค่าร้อยละของการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านอะมิโลเพคตินสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ช่วง คือ DP (degree of polymerization) 6-12, DP 13-24, DP 25-36 และ $DP \geq 37$ สำหรับข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์พิษณุโลก 1 พันธุ์พิษณุโลก 2 และพันธุ์กข 15 มีค่าร้อยละการกระจายตัวของ DP 13-24 อยู่ในช่วง 52-55 เมื่อเปรียบเทียบแล้วน้อยกว่าข้าวพันธุ์ปทุมธานีและพันธุ์สังข์หยด ซึ่งมีร้อยละการกระจายตัวสูงถึง 59 สำหรับข้าวในกลุ่มสุดท้ายที่จัดว่ามีปริมาณอะมิโลสสูง

สามารถจำแนกข้าวออกได้เป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะมีร้อยละการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินสายสั้นซึ่งมี DP 6-12 มากกว่า DP 13-24 ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี 90 และพันธุ์ชัยนาท 1 สำหรับข้าวกลุ่มที่สองมีร้อยละการกระจายตัวของ DP 6-12 น้อยกว่า DP 13-24 ได้แก่ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ขาวห่าร้อย พันธุ์กข 23 พันธุ์เถียงพันธุ และพันธุ์เจ๊กเซย

2.2.3 ขนาดและรูปร่าง

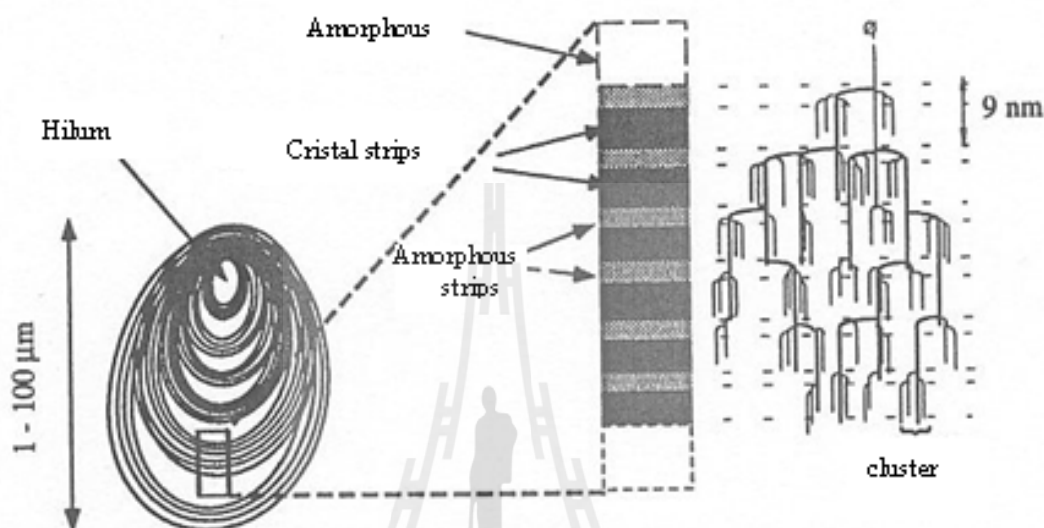
สตาร์ชที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของเม็ดสตาร์ช (granule) ขนาดเล็ก ภายในเม็ดสตาร์ชประกอบด้วยวงแหวน (growth) ลักษณะของเม็ดสตาร์ชชนิดต่าง ๆ จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) พบว่าเม็ดสตาร์ชจะมีขนาด รูปร่าง และลักษณะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับแหล่งสตาร์ชนั้น ๆ เม็ดสตาร์ชข้าวเจ้ามีลักษณะแบน มีหลายเหลี่ยม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-5 ไมโครเมตร (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2546) สตาร์ชข้าวจะมีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดในบรรดาสตาร์ชธัญพืช

2.2.4 โครงสร้างผลึก

เม็ดสตาร์ชมีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline) โดยโมเลกุลของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินมีการจัดเรียงตัวกันในเม็ดสตาร์ชเป็นโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นผลึก (crystallite) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous) ส่วนอสัณฐานของเม็ดสตาร์ชจะประกอบด้วยโมเลกุลของอะมิโลสและสายโซ่ยาวของอะมิโลเพคติน แสดงดังภาพ 2.2 (Jane, Wong and McPherson, 1997) ในขณะที่ส่วนที่เป็นผลึกเกิดจากการจัดเรียงตัวกันของสายโซ่ในโมเลกุลของอะมิโลเพคตินในแนวรัศมีเป็นชั้น ๆ ต่อกันของคลัสเตอร์อะมิโลเพคติน (series of stacked amylopectin clusters) ซึ่งในแต่ละคลัสเตอร์จะประกอบด้วยชั้นผลึก (Crystalline lamellae) ซึ่งเกิดจากสายโซ่สั้นของอะมิโลเพคตินที่จัดเรียงตัวในลักษณะเกลียวม้วนคู่ (double helix) อย่างเป็นระเบียบสลับกับชั้นอสัณฐาน (amorphous lamellae) ซึ่งเกิดจากบริเวณที่เป็นกิ่งของสายอะมิโลเพคตินที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ จะเห็นได้ว่าสายอะมิโลเพคตินจะเป็นส่วนประกอบทั้งในส่วนโครงสร้างผลึกและส่วนอสัณฐาน และพบว่าร้อยละ 80-90 ของจำนวนอะมิโลเพคตินจะอยู่ในส่วนของชั้นผลึก ส่วนร้อยละ 10-20 ที่เหลือจะอยู่ในส่วนอสัณฐาน โดยส่วนที่เป็นชั้นผลึกจะเป็นส่วนที่ทำให้เม็ดสตาร์ชมีความแข็งแรงคงรูปร่างของเม็ดสตาร์ชไว้ได้ ส่วนอสัณฐานจะเป็นส่วนที่ยืดเกาะชั้นผลึกไว้ด้วยกัน และเป็นส่วนที่สร้างความยืดหยุ่นให้กับเม็ดสตาร์ช (Chang et.al, 2009)

เม็ดสตาร์ชจะมีโครงสร้างผลึก 3 แบบ ขึ้นกับความหนาแน่นในการจัดเรียงตัวของเกลียวคู่ ถ้าเกิดการจัดเรียงตัวหนาแน่นจะเกิดเป็นผลึกแบบ A (A-type) เช่น สตาร์ชจากธัญพืชและราก ถ้าจัดเรียงตัวกันอย่างหลวม ๆ จะเกิดผลึกแบบ B (B-type) เช่น สตาร์ชจากพืชหัว และถ้ามีการจัดเรียงตัวทั้งแบบ A และ B รวมกัน จะเกิดผลึกแบบ C (C-type) เช่น สตาร์ชจากพืชตระกูลถั่ว (กล้าณรงค์ และคณะ, 2546) นอกจากผลึกแบบ A, B และ C แล้ว บางครั้งยังปรากฏลักษณะผลึก

แบบ V (V-type) ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างผลึกที่ซับซ้อนที่เกิดจากการจับกันของอะมิโลสกับ แอลกอฮอล์ที่เป็นเส้นตรง ไอโอดีน หรือ กรดไขมัน ซึ่งลักษณะผลึกแบบ V จะพบในสตาร์ชที่มี ปริมาณอะมิโลสมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 40 เช่น ในสตาร์ชข้าวโพดที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม (Jacobs and Donald, 1998)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะ โครงสร้างแบบกึ่งผลึกของเม็ดสตาร์ช

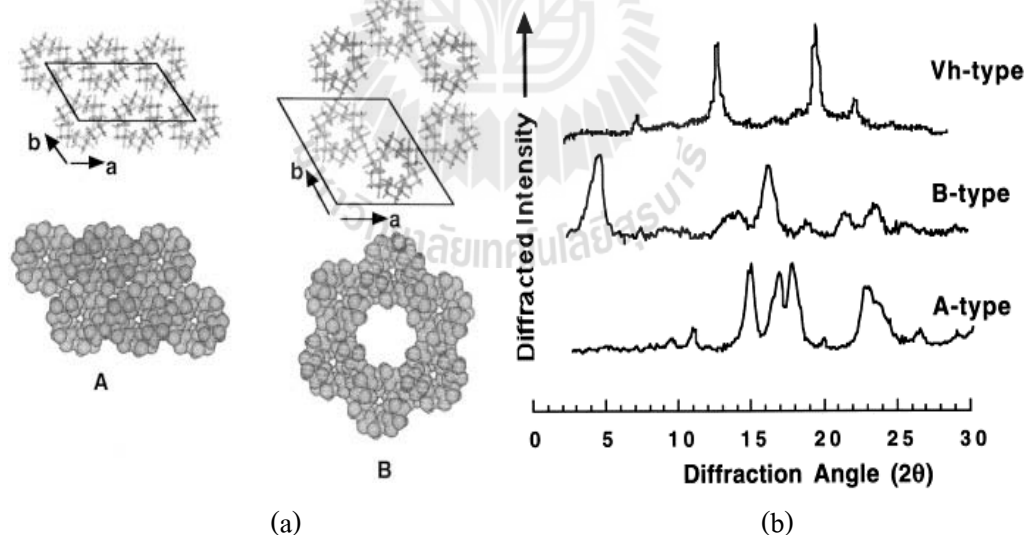
แหล่ง

ที่มา : Jacobs and Donald (1998)

สตาร์ชบางชนิดอาจให้ผลึกมากกว่า 1 แบบ เช่น สตาร์ชมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถตรวจพบ ลักษณะผลึกทั้งแบบ A และ C โดยโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกันจะให้ลักษณะการกระเจิงแสง ต่างกัน และสามารถตรวจสอบชนิดโครงสร้างของเม็ดสตาร์ชได้โดยใช้เทคนิควิธีเอกซ์-เรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction, XRD) สตาร์ชที่มี X-ray diffraction pattern ชนิด A-type จะพบพีคคู่ (double peak) ที่มุมหักเห (diffraction angle) หรือที่ 2θ ที่ 17° และ 18° และพีคเดี่ยวที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 23° ส่วนสตาร์ชที่มี X-ray diffraction pattern ชนิด B-type จะพบพีคขนาดเล็กที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 5.6° และ 17° และมีพีคคู่ที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 22° และ 24° และสตาร์ชที่มี X-ray diffraction pattern ชนิด C-type จะมีลักษณะของกราฟอยู่ระหว่าง A-type และ B-type คือ จะมีพีคขนาดเล็กที่ ตำแหน่ง 2θ ที่ 5.6° และมีพีคที่ตำแหน่ง 17° และ 17.9° (กล้าณรงค์ และ เกื้อกูล, 2546 ; นิติ, 2543) นอกจากนี้ลักษณะผลึกแบบ V ซึ่งเป็นรูปแบบที่เกิดจากการรวมตัวกันของอะมิโลสกับไขมันเกิด เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของอะมิโลสกับไขมัน (amylose-lipid complex) โดยจะให้พีคเดี่ยวที่ ตำแหน่ง 2θ ที่ 13° และ 20° (Derycke et al., 2005)

2.3 ประเภทของสตาร์ช

ในกระบวนการย่อยอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตหรือสตาร์ช เริ่มตั้งแต่อาหารเข้าสู่ปาก ฟันจะทำหน้าที่เคี้ยวบดอาหารให้มีขนาดเล็กกลง ในน้ำลายมีเอนไซม์ชื่อแอลฟา-อะมิเลส (α -amylase) ซึ่งสามารถย่อยสตาร์ชให้มีขนาดเล็กกลงเป็นเดกซ์ทริน (dextrin) แต่การย่อยอาหารในปากจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย เพราะอาหารอยู่ในปากเป็นช่วงระยะเวลาสั้น ๆ จากนั้นอาหารจะถูกกลืนผ่านหลอดอาหารไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งมีเอนไซม์อะมิเลสอยู่แต่ไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากอะมิเลสไม่ทำงานในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ดังนั้นในกระเพาะอาหารจึงเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส คือการแตกตัวของคาร์โบไฮเดรตทำให้แป้งโมเลกุลใหญ่ที่มีขนาดเล็กกลง จากนั้นกระบวนการย่อยแป้งที่แท้จริงจะเกิดที่ลำไส้เล็กซึ่งมีสภาพเป็นด่างที่เหมาะสมกับสภาวะการย่อย โดยน้ำดีทำให้ลำไส้เล็กสามารถย่อยสตาร์ชจนสุดท้ายได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ ดังนั้นในเชิงโภชนาการสตาร์ช (nutritional starch) โดยทั่วไปแบ่งสตาร์ชออกเป็น 3 ประเภท ตามอัตราและระยะเวลาในการย่อย (Englyst and Hudson, 1992) ได้แก่ สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (rapidly digestible starch, RDS) สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างช้า ๆ (Slowly digestible starch, SDS) และสตาร์ชทนย่อยต่อเอนไซม์ (resistant starch, RS)



ภาพที่ 2.3 (a) โครงสร้างทางผลึกชนิด A และ B, (b) รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เรย์ของสตาร์ชที่มีลักษณะโครงสร้างทางผลึกแบบ A, B และ V_h
แหล่งที่มา : Buleon et al. (1998)

ตารางที่ 2.1 ประเภทของสตาร์ชในอาหารเมื่อพิจารณาตามความสามารถในการถูกย่อย

ประเภทสตาร์ช	แหล่งของสตาร์ช	การย่อยในลำไส้เล็ก
สตาร์ชที่ถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (Rapidly digestible starch : RDS)	อาหารที่มีส่วนประกอบของสตาร์ชเมื่อผ่านการหุงต้มใหม่ ๆ	สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วไปเป็นน้ำตาลกลูโคสภายใน 20 นาที
สตาร์ชที่ถูกย่อยได้อย่างช้า ๆ (Slowly digestible starch : SDS)	สตาร์ชจากธัญพืชดิบ ผลิตภัณฑ์เส้นที่ทำสุก	สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างช้า ๆ ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ โดยใช้เวลาดั้งแต่ 20 ถึง 110 นาที
สตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ (Resistant starch : RS)	เมล็ดธัญพืชที่ถูกบด หรือ สตาร์ชที่เกิดการกินตัว	ทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก

แหล่งที่มา : Enlyst and Hudson (1992)

2.4 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ (RS)

Resistant starch หรือ RS เป็นสตาร์ชที่จัดอยู่ในกลุ่มสตาร์ชดัดแปร โดยจากคำนิยามของ European Flair Concerted Action on resistant starch (EURESTA) กล่าวว่า สตาร์ชทนต่อการย่อยของเอนไซม์ หรือ resistant starch หมายถึง สตาร์ชและผลิตภัณฑ์ของสตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์และถูกดูดซึมในลำไส้เล็กของมนุษย์ได้ (Euresta, 1992) RS แสดงพฤติกรรมคล้ายคลึงกับใยอาหาร จากนั้น RS ถูกส่งผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และถูกหมักด้วยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ได้ ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดไขมันสั้น ๆ เช่น acetic acid, propionic acid และ butyric acid เป็นต้น โดยทั่วไป RS สามารถแบ่งได้เป็น 5 ประเภท คือ (Sajilata et al., 2006) ได้แก่




1. Physically inaccessible starch (RS₁) หมายถึง สตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์เนื่องจากเม็ดสตาร์ชถูกห่อหุ้มอยู่ในร่างแหของโปรตีน หรือถูกตรึงอยู่ภายในเซลล์หุ้มเมล็ดพืช ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ ซึ่ง RS ประเภทนี้สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติแต่เป็นส่วนน้อย โดยส่วนใหญ่พบในเมล็ดพืช เช่น ถั่วหรือเมล็ดธัญพืชที่ผ่านการไม่บด โดยเหลือส่วนของเม็ดสตาร์ชติดอยู่กับผนังเซลล์ อาหารที่ทำจากสตาร์ชชนิดนี้ทนต่อความร้อนในการทำอาหารปกติและสามารถใช้เป็นส่วนผสมในอาหารได้หลากหลาย
2. Resistant granular starch (RS₂) เป็นสตาร์ชที่เม็ดสตาร์ชมีคุณสมบัติทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ตามลักษณะของโครงสร้างที่เป็นธรรมชาติของเม็ดสตาร์ชที่ไม่มีรูหรือช่องเปิดให้เอนไซม์เข้าไปในเม็ดสตาร์ช ซึ่งมีลักษณะรวมตัวกันอย่างหนาแน่นในแนวแผ่นระนาบ จึงทำให้โครงสร้างมี

ข้อจำกัด ยกต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยส่วนใหญ่ RS ชนิดนี้จะอยู่ในรูปร่างเม็ดสตาร์ชดิบ (native granular starch) พบได้ในสตาร์ชมันฝรั่ง (potato starch) และกล้วยดิบ (green banana)

3. Retrogradation starch (RS₃) คือ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสายอะมิโลสระหว่างการทำการลดอุณหภูมิของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดเจลลิตีในเซชัน ซึ่งเรียกว่า กระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชัน เกิดเป็นโครงสร้างตาข่ายสามมิติที่มีความแข็งแรง และสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์

4. Chemically modification starch (RS₄) เป็นสตาร์ชชนิดใหม่ เกิดจากการดัดแปรทางเคมีที่ทำให้มีพันธะที่ต่างไปจาก α -(1,4) หรือ α -(1,6) โดยปฏิกิริยาการดัดแปรทางเคมีแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ครอสลิงกิง (cross linking) เอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification) และ อีเทอร์ริฟิเคชัน (etherification)

5 Amylose-lipid complexed starch (RS₅) เป็นสตาร์ชทนต่อการย่อยของเอนไซม์ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลอะมิโลสกับไขมันเกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง มีความเสถียรต่อความร้อนสูงและสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ (Jane et al., 2011)

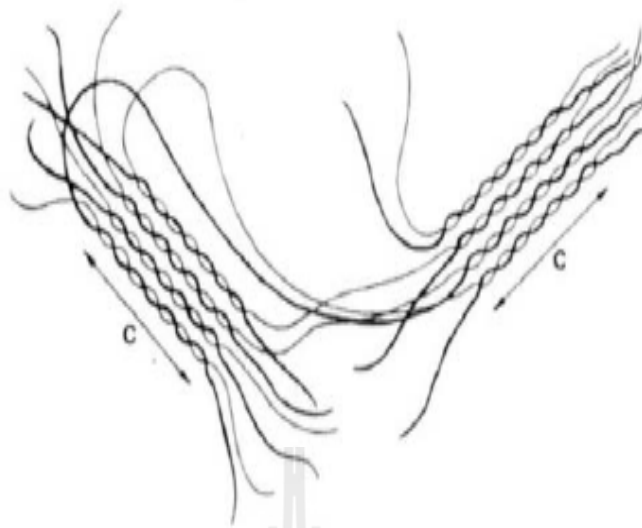
	Type of Resistant starch	Occurrence
	RS1 – Physically inaccessible starch	Partially milled grains, seeds and legumes
	RS2 – granular starch	Banana starch, native potato starch
	RS3 – Nongranular, retrograded or crystalline starch	RTE breakfast cereals, cooked and cooled potato
	RS4 – Chemical modified starch	Cross linking starch, hydroxypropyl starch
	RS5-Amylose-lipid complexed starch	Amylose-lipid complexed starch

2.5 การเกิด Resistant starch type III (RS₃)

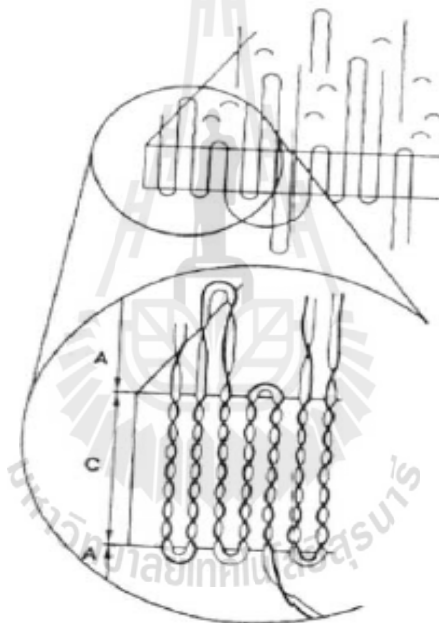
RS₃ ส่วนใหญ่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ของโมเลกุลอะมิโลส (Eerlingen, Crombez, and Delcour, 1993) โดยกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันจะเกิดขึ้นเมื่อสตาร์ชได้รับความร้อนจนเกิดการเจลาติไนซ์อย่างสมบูรณ์ ทำให้โมเลกุลของสตาร์ชที่ประกอบด้วยอะมิโลสและอะมิโลเพคติน เกิดการกระจัดกระจายออกมาซึ่งมีผลทำให้ความหนืดลดลง และเมื่อปล่อยให้เย็นตัวลงโมเลกุลรูปร่างเกลียวสุ่มของอะมิโลส (random coil) จะเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันและจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helices) (Eerlingen and Delcour, 1995) รูปแบบโครงสร้างเกลียวคู่เป็นแบบ left-handed, parallel stranded helices โดยหนึ่งสายเกลียวคู่ประกอบด้วยกลูโคส 6 โมเลกุลต่อหนึ่งรอบ (Sajilata, Singhal and Kulkarni, 2006) ทำให้โครงสร้างสามารถอุ้มน้ำและไม่มีการคุดน้ำเข้ามาอีก ส่งผลให้มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดเป็นลักษณะคล้ายเจลเหนียวหรือผลึก และเมื่อระยะเวลาผ่านไปกระบวนการรีโทรเกรเดชันเกิดมากขึ้น ส่งผลให้เกลียวคู่ที่เกิดขึ้นเกิดการจัดเรียงตัวกันในลักษณะที่โครงสร้างหนาแน่นและแข็งแรง ซึ่งได้เป็นผลึกที่แข็งแรงและสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ได้ (Haralampu, 2000) ซึ่งการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสแสดงดังภาพที่ 2.5 Eerlingen and Delcour (1995) ได้เสนอกลไกของการเกิด RS₃ ในสารละลายอะมิโลสไว้ 2 กลไก คือ การเกิดแบบไมเซลล์ (micelle formation) และการเกิดแบบการม้วนตัวของโมเลกุลสาขตรงเป็นชั้นบาง ๆ (lamellar structure) โดยโครงสร้างแบบ micelle เกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลอะมิโลสอิสระต่าง ๆ ที่อยู่นอกเหนือจากบริเวณออสซิลลูม แสดงดังภาพที่ 2.5 ซึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างของเกลียวคู่ในรูปแบบโครงสร้างหกเหลี่ยม (hexagonal structure) และแสดงโครงสร้างผลึกชนิด B ใน X-ray diffraction pattern

การม้วนตัวของสารพอลิเมอร์เหนียวทำให้เกิดโครงสร้างสองมิติ หรือ มีรูปร่างเป็นชั้น ๆ (Lamellar shapes) ซึ่งแสดงในภาพที่ 2.5 สายของโมเลกุลจัดเรียงตัวกันในทิศทางตั้งฉากกับแนวระนาบ ซึ่งตำแหน่งของการม้วนตัวคือของสายพอลิเมอร์ส่วนออสซิลลูมและจุดศูนย์กลางของชั้น lamellar คือ ส่วนที่เป็นผลึก ดังนั้นการย่อยโครงสร้างสตาร์ชด้วยเอนไซม์ ทำให้สามารถกำจัดทั้งส่วนที่เป็นออสซิลลูมและผลึก ได้เป็นโมเลกุลเส้นตรงสายสั้น และเมื่อทำการลดอุณหภูมิลงจะเกิดโครงสร้างของ RS₃ จึงประกอบไปด้วยโมเลกุลที่เป็นสายตรงสั้น ๆ จัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างส่วนผลึกที่แข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์

(a)



(b)



ภาพที่ 2.5 ลักษณะ โครงสร้างของ RS 3 ในสารละลายอะมิโลส (a) แบบจำลอง Micelle : สายเกลียว
 คู่ถูกจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในส่วน โครงสร้างที่เป็นผลึก (C) นอกเหนือจากบริเวณ
 ที่เป็นอสัณฐาน น (b) แบบจำลอง Lamella : โครงสร้าง Lamella ถูกสร้างขึ้นจากการพับ
 ของสายโซ่ โดยพื้นที่ส่วนที่พับตัวเป็นส่วนอสัณฐาน (A) ขณะที่ส่วนกลางของ Lamella
 คือ ส่วนที่เป็นผลึก (C)

แหล่งที่มา : Eerlinge and Delcour (1995)

2.6 ทฤษฎีการเกิดรีโทรเกรเดชัน และกระบวนการเกิดผลึก

เมื่อสารละลายสตาร์ชได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลาตินในเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไปจะทำให้เม็ดสตาร์ชพองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของอะมิโลสขนาดเล็กลงจะกระจายหลุดออกมาซึ่งผลทำให้ความหนืดลดลง และเมื่อปล่อยให้เย็นตัวลง โมเลกุลอะมิโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจับเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลเกิดเป็นร่างแหสามมิติที่แข็งแรง โดยโครงสร้างใหม่นี้สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) หรือการคืนตัว (Setback) (Sajilata, 2006) เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงไปอีกลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้น โมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมาจนเจลา เรียกว่า Syneresis ปรากฏการณ์ทั้งสองนี้จะทำให้เจลาที่มีลักษณะขาวขุ่นและมีความหนืดเพิ่มขึ้น การคืนตัวของสตาร์ชเปียกของสตาร์ชทำให้สารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น ในการคืนตัวของสตาร์ชนั้นเมื่อเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ จะเกิดการตกตะกอน เมื่อเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะทำให้เจลาขุ่น การตรวจสอบการเกิดรีโทรเกรเดชันมีหลายวิธีเช่น การตรวจวัดสมบัติรีโอโลยี โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า Storage modulus (G') ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความยืดหยุ่น (Elastic) ของสารกับเวลา นอกจากนั้นยังสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจากค่า Instantaneous elastic modulus (G_0) และค่า Retard elastic modulus (G_r) จากการศึกษาการคืบ (Creep) และอีกวิธีการหนึ่งในการติดตามกระบวนการรีโทรเกรเดชันและกระบวนการเกิดผลึกคือ การวัดด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometers (FTIR) โดยอาศัยหลักการที่เมื่อโมเลกุลของสารดูดกลืนแสงอินฟราเรด โมเลกุลจะถูกกระตุ้นเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานสูงเพียงพอต่อการทำให้เกิดการยืดตัว (Stretching) หรือเกิดการงอ (Bending) ทำให้ปรากฏเป็นพีการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR absorption peak) ที่ค่าความถี่ต่าง ๆ สำหรับสตาร์ชซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันน้ำตาลที่สำคัยคือ COH นั้นสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ดีที่ความถี่ในช่วง $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ ดังนั้นการตรวจสอบการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจึงติดตามจากการเปลี่ยนแปลงพีคในช่วงความถี่ดังกล่าว โดย Van Soet (1996) ได้ศึกษาจนวนพลศาสตร์ของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชมันฝรั่ง (10% และ 18% โดยน้ำหนัก) ด้วยเครื่อง FTIR โดยศึกษาที่ช่วงความถี่ $1300-800\text{ cm}^{-1}$ สำหรับสตาร์ชมันฝรั่ง (Native potato starch) และพบพีการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดที่เลขคลื่น (Wave number) 1047, 1018 และ 994 cm^{-1} ในขณะที่สตาร์ชเจลาตินในเซชัน พบว่าเกิดพีคที่เลขคลื่น 1022 cm^{-1} ด้วย และในระหว่างกระบวนการรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่เก็บรักษาเป็นเวลาหลายสัปดาห์ พบว่าพีการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดคือที่เลขคลื่น 1053, 1047, 1022 และ 1000 cm^{-1} ดังนั้น Van Soet (1996) ได้ศึกษาการอัตราส่วนของความสูงของพีคที่ 1047 ต่อ 1022 cm^{-1} แสดงถึงสัดส่วนของโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ต่อส่วนอสัณฐาน (Ratio of Short-rang molecular order to Amorphose : RSA) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 1047 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับ

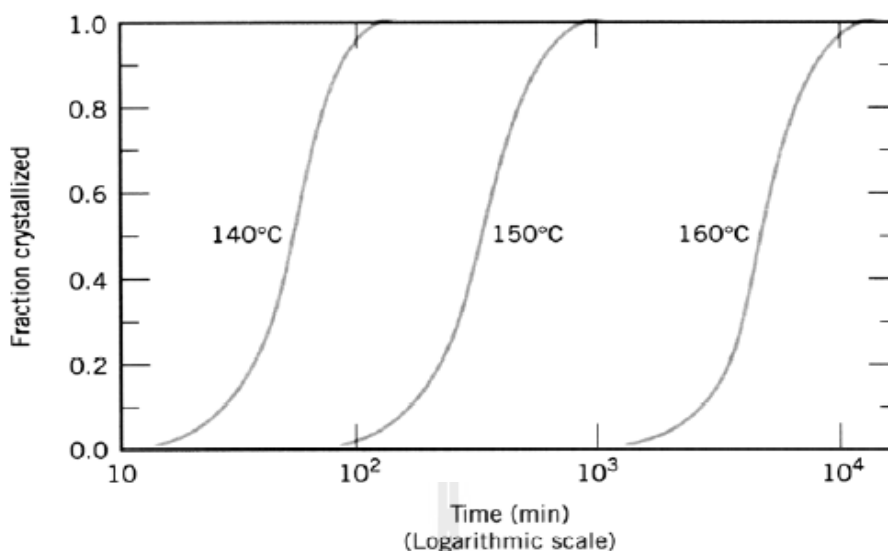
ปริมาณของผลึก (Crystalline) ในโครงสร้างสตาร์ช ขณะที่ทำการดูคลื่นแสงที่ความถี่ 1022 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับส่วนอสัณฐาน (Amorphous) และพบว่าค่า RSA สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาการเกิดรีโทรเกรเดชัน

Goodfellow และ Wilson (1990) ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสและอะมิโล เพคตินของสตาร์ชข้าวสาลีด้วยเครื่อง FTIR ในช่วงความถี่ $1300-900\text{ cm}^{-1}$ เป็นเวลา 300 ชั่วโมง พบว่าการเกิดรีโทรเกรเดชันเกิดขึ้น 2 ช่วง โดยช่วงแรกพบการเกิดรีโทรเกรเดชันเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในครึ่งชั่วโมง โดยพบการเปลี่ยนแปลงของฟิสิกการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดที่ความถี่ 1053 และ 1003 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลจากอะมิโลส โดยพบว่ามีการรวมตัวกันเกิดเป็นสายเกลียวคู่ของอะมิโลส จากนั้นจึงมีการรวมตัวกันเพื่อพัฒนาเป็นโครงร่างตาข่ายของเจลอะมิโลส จากนั้นการเกิดรีโทรเกรเดชันอย่างช้า ๆ จนครบเวลา 300 ชั่วโมง โดยพบการเปลี่ยนแปลงฟิสิกการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดที่ความถี่ 1053 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลจากอะมิโลเพคติน โดยพบว่าช่วงแรกการเกิดเป็นเกลียวคู่ของสาย อะมิโลเพคติน จากนั้นมีการรวมตัวกันอย่างช้า ๆ เพื่อพัฒนาเป็นผลึกของโครงสร้าง

ในระหว่างการเกิดรีโทรเกรเดชัน นิวเคลียสของผลึกเกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่างกัน ระยะเวลาที่แตกต่างกันทำให้เกิดจำนวนผลึก อัตราการเจริญของผลึก และความหนาแน่นของผลึกที่แตกต่างกัน โดยอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน ต้องอาศัยเวลาในการเปลี่ยนแปลงสถานะเป็นของแข็ง (Solid-state transformation) ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยการนำสัดส่วนของผลึกที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ มาพล็อตกราฟเทียบกับค่าล็อก (log) ของเวลาที่อุณหภูมิคงที่ ตามสมการของ Avrami

$$y = 1 - \exp(-kt^n)$$

เมื่อ k และ n เป็นค่าคงที่ที่เป็นอิสระจากเวลา (time-independence constant) แต่จะขึ้นอยู่กับระบบของการเกิดผลึก โดยปกติปริมาณของผลึกที่เกิดขึ้นจะวัดได้จากการเปลี่ยนแปลง สัดส่วนของความเป็นผลึกต่อโครงสร้างอสัณฐาน เนื่องจากวัฏภาคของเหลวกับวัฏภาคของผลึกมีปริมาตรแตกต่างกัน ส่วนอัตราการเกิดผลึกจะวัด ณ จุดที่มีการเกิดผลึกร้อยละ 50 และอัตราการเกิดผลึกนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิการเกิดผลึก โดยน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จะแปรผกผันกับอัตราการเกิดผลึก กล่าวคือถ้าพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะส่งผลให้อัตราการเกิดผลึกต่ำ นอกจากนี้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของผลึกที่เกิดขึ้นเมื่อเวลาแตกต่างกันได้ โดยพล็อตกราฟสัดส่วนของผลึกกับล็อกของเวลา เพื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาในการเกิดผลึกของสารบางชนิดได้ เช่น กราฟสัดส่วนของผลึกกับล็อกของเวลาของ Polypropylene ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งเป็นการเกิดผลึกโดยที่อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน (y) เป็นฟังก์ชันของเวลา t (Barbara, 2002)



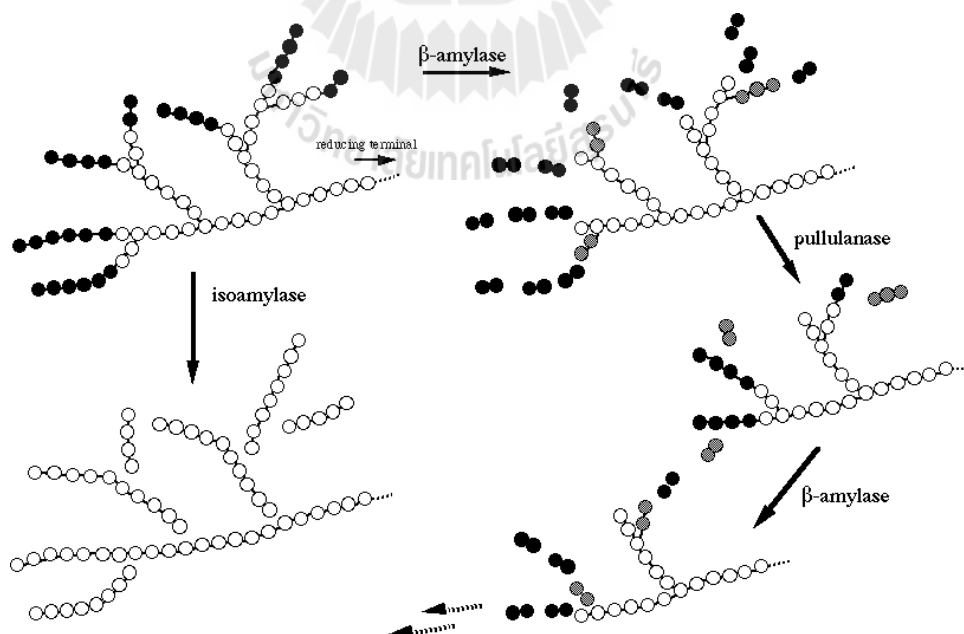
ภาพที่ 2.6 กราฟส่วนที่เกิดผลึกกับลือกของเวลาของ polypropylene ที่อุณหภูมิต่าง ๆ
แหล่งที่มา : Barbara (2002)

โดยทั่วไปการเกิดกระบวนการรีโทรเกรเดชันของสารผสมระหว่างน้ำและสตาร์ช (Starch-water mixture) มีกระบวนการเกิดผลึกของสายพอลิเมอร์เกิดขึ้น ดังนั้นการเข้าใจถึงกลไกและอัตราการเกิดผลึกของพอลิเมอร์จึงเป็นสิ่งสำคัญ กระบวนการเกิดผลึกของพอลิเมอร์เกี่ยวข้องกับ 3 ขั้นตอน คือ การเกิดนิวเคลียสของผลึก (Nucleation), การเติบโตของผลึก (Propagation) และการเกิดผลึกที่สมบูรณ์หรือการเติบโตของผลึกอย่างช้า ๆ (Maturation) ซึ่งอัตราการเกิดผลึกนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิเป็นสำคัญ กล่าวคือเมื่อพอลิเมอร์เกิดการเย็นตัวผ่านอุณหภูมิของการหลอมเหลว (Melting temperature, T_m) จะมีจุดเริ่มเกิดผลึกเป็นบริเวณเล็ก ๆ จากนั้นโมเลกุล ที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังกระบวนการตัดกิ่ง จะเริ่มจัดเรียง ตัวกัน ซึ่งหากอุณหภูมิเกิน จุด T_m ของผลึก กระบวนการ nucleation จะไม่เสถียรจึงมีอัตราการเกิด nucleation เป็นศูนย์ที่ T_m เนื่องจากการสั่นของอะตอมจากความร้อนจะทำลายการจัดเรียงโมเลกุลให้เป็นระเบียบ แต่เมื่ออุณหภูมิลดลง ต่ำกว่า T_m จะเกิด nucleation เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า glass temperature (T_g) อัตราการเกิด nucleation จะมีค่าเพิ่มขึ้น เล็กน้อย เนื่องจากอยู่ในสถานะของแข็ง และมีอัตราการเกิด propagation เป็นศูนย์ ไม่สามารถเคลื่อนที่แพร่ขยายได้ ขณะที่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า T_g อัตราการเกิด propagation เกิดขึ้นได้เล็กน้อย ส่วนอัตราการเกิด maturation ก็มีทิศทางในการเกิดผลึกเช่นเดียวกันกับกระบวนการ propagation ซึ่งอัตราการเกิดผลึกทั้งหมด (Overall crystallization) จะขึ้นอยู่กับอัตราการเกิด nucleation และ propagation เท่านั้น สำหรับระบบที่เป็นกึ่งผลึก (Semi-crystallization) การเกิดผลึกนั้นจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิระหว่าง T_g กับ T_m (Eerlingen et al., 1993)

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS,

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS มีหลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งปัจจัยทางด้านคุณสมบัติของสตาร์ชที่ประกอบด้วย ความเป็นผลึกของสตาร์ช โครงสร้างของแกรนูล อัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน อัตราการเกิดรีโทรเกรดชัน ความยาวของสายโซ่อะมิโลสและส่วนที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลเพคติน (Goni et al., 1996; Sajilata et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านสภาวะในกระบวนการผลิต รวมถึงระยะเวลาและอุณหภูมิการเก็บ (Sievert and Pomeranz, 1989; Sajilata et al., 2006) ซึ่งล้วนแต่ส่งผลต่อการเกิดและปริมาณ RS ที่เกิดขึ้น โดยหลักการแล้วการผลิตสตาร์ช RS ให้มีปริมาณสูงนั้นควรผลิตจากสตาร์ชที่มีอะมิโลสสูง ซึ่งปัจจุบันมีเพียงข้าวโพดเท่านั้นที่เป็นแหล่งที่มีอะมิโลสสูงถึง 50-70 % คือ Hylon V, Hylon VII โดย Sajilata et al. (2006) รายงานว่า RS ที่ได้จากสตาร์ชข้าวโพดที่มีปริมาณอะมิโลสสูง มีปริมาณถึงร้อยละ 20 (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งมีมากกว่าปริมาณ RS ในสตาร์ชข้าวโพดปกติ (25% อะมิโลส) ซึ่งมีปริมาณ RS เพียงร้อยละ 3 (น้ำหนักแห้ง) นอกจากนี้ในโครงสร้างของแกรนูลก็พบว่ามีอิทธิพลต่อการเกิด RS ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าสตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ชข้าวโพดที่มีอะมิโลสสูงมีความทนทานต่อการย่อยและดูดซึมน้ำได้ดี ในขณะที่สตาร์ชจากธัญพืชส่วนใหญ่จะมีการย่อยและดูดซึมน้ำ ๓-๕ เท่า แต่สมบรูณ์ ซึ่งอาจเกิดจากแกรนูลที่มีขนาดใหญ่ของสตาร์ชมันฝรั่งที่มีพื้นผิวต่อปริมาตร น้อยกว่า (Haralampu, 2000) สตาร์ชที่มาจากแหล่งที่มาแตกต่างกันก็จะให้ปริมาณ RS แตกต่างกันได้ด้วย (Goni et al., 1996) ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินภายในโครงสร้างสตาร์ช ดังนั้นสตาร์ชข้าวโพดที่มีปริมาณอะมิโลสสูงและสตาร์ชมันฝรั่ง จึงเป็นแหล่งของสตาร์ชที่มี RS นอกจากนี้สตาร์ชข้าวโพดก็สามารถใช้เป็นแหล่งของ RS ได้ ถึงแม้ว่าสตาร์ชข้าวโพดส่วนใหญ่จะมีปริมาณอะมิโลสไม่เกิน 38 % แต่ได้มีการพัฒนาและตัดแปรสตาร์ชด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อให้มีปริมาณ RS สูงขึ้น เช่น การทำให้สตาร์ชเกิดการรีโทรเกรดชัน (Retrograded starch) โดยการให้ความร้อนแก่น้ำสตาร์ชเพื่อทำให้สตาร์ชสุก แล้วทิ้งให้สตาร์ชเกิดการเย็นตัวลง โมเลกุลของสตาร์ชที่ละลายออกมาจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ได้เป็นผลึกที่แข็งแรงและสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ โดย Silverio et al. (1985) รายงานว่าสตาร์ชข้าวสาลีที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ด้วยเครื่องนึ่งความดัน (Autoclave) มีปริมาณ RS เพิ่มขึ้น 9% เมื่อเทียบกับ native starch ที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ และการใช้เอนไซม์ในการย่อยสตาร์ชเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดรีโทรเกรดชัน เช่น การใช้เอนไซม์ α -amylase เพื่อลดขนาดโมเลกุลของสตาร์ชได้เป็น maltodextrin ชนิดที่มีระดับการย่อยต่ำ หรือการใช้เอนไซม์ตัดกิ่ง (Debranching enzyme) (Chiu et al., 1994) ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพในการเตรียม RS จากสตาร์ชชนิดที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ โดยเอนไซม์ตัดกิ่งโดยทั่วไปมี 2 ชนิดคือ ไอโซอะมิเลส (Isoamylase : EC 3.2.1.68) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยจุดที่เป็นกิ่งก้านของไกลโคเจนและอะมิโลเพคตินได้ดี ซึ่งแสดงการทำงานดังภาพที่

3.7 ไม่จำเป็นต้องมี cofactor ในการทำกิจกรรม สามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วง พีเอช 3.5-5 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45-50 °C และเอนไซม์อีกชนิดคือ พูลูลานเนส (Pullulanase : EC 3.2.1.41) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะ α -1,6 ของพุลูลแลนและอะมิโลเพคติน แต่การทำกิจกรรมไม่สมบูรณ์เท่ากับการย่อยโดยไอโซอะมิเลส และทำกิจกรรมกับไกลโคเจนได้ยาก สามารถย่อยได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2-3 หน่วยได้ โดย Chiu et al. (1994) ได้พัฒนาวิธีการผลิต RS ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้สตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสมากกว่า 40 % เกิดเจลาตินในเซชัน ตามด้วยการใช้เอนไซม์ตัดกิ่ง (Debranching enzyme) เช่น พูลูลานเนส และไอโซอะมิเลส ในการลดขนาดโมเลกุลของสตาร์ช ซึ่งพบว่าการตัดกิ่งพันธะกิ่งของสตาร์ชด้วยเอนไซม์ตัดพันธะกิ่งมีผลในการเพิ่มปริมาณ RS และการแยกสตาร์ช RS ด้วยกระบวนการเอกทรูชันให้ ปริมาณ RS สูงกว่าการทำสตาร์ชแบบพ่นฝอย (Spray drying) ดังนั้นการตัดพันธะกิ่งของสตาร์ชด้วยเอนไซม์ตัดพันธะ กิ่งและการทำแห้งสตาร์ช จึงมีผลต่อปริมาณ RS ที่ได้ Shi et al. (2006) ได้ทำการผลิต RS จากสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ (Waxy maize starch และ Waxy potato starch) โดยการใช้ไอโซอะมิเลส ในการตัดกิ่งของอะมิโลเพคติน เพื่อให้ได้สายพอลิเมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง จากนั้นทำการรีโทรเกรดที่อุณหภูมิห้อง เพื่อทำการสร้างผลึกให้กับ สตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่ง (Debranching starch) และทำแห้งด้วยระบบลม (Air-dried) ซึ่งสามารถสร้าง RS ได้มากกว่า 70 % และมีอุณหภูมิในการหลอมเหลว (Melting temperature) สูงกว่า 110°C



ภาพที่ 2.7 แสดงลักษณะการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยสตาร์ช
แหล่งที่มา : Manners and Matheson (1981)

Gonzalez-Soto et al. (2006) ได้ทำการผลิต RS จากสตาร์ชกล้วย โดยวิธีการ autoclave ร่วมกับการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนส ที่เวลาต่าง ๆ ซึ่งพบว่าปริมาณ RS ที่ได้จากการตัดกิ่งอะมิโล เพคตินที่เวลาต่าง ๆ มีค่ามากกว่าปริมาณ RS ในสตาร์ชกล้วยที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง โดยมีปริมาณ RS เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (จาก 9% เป็น 18%) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน ของ Berry (1986) ว่าการตัดพันธะกิ่งของสตาร์ชส่งผลให้เกิดโมเลกุลสายโซ่ที่เป็นเส้นตรงที่สนับสนุนให้เกิด RS ในปริมาณสูง

การวิจัยเกี่ยวกับการผลิต RS_3 ในยุคแรก ๆ ส่วนใหญ่ใช้ amylo maize VII เป็นวัตถุดิบตั้งต้น (Chiu et al., 1994) เนื่องจากเชื่อว่า RS_3 เกิดจากการรีโทรเกรดชันของอะมิโลส นอกจากนี้ โครงสร้างอะมิโลสที่แตกต่างกัน ก็เกิดการรีโทรเกรดชันด้วยอัตราที่แตกต่างกัน ซึ่งแนวโน้มการเกิดรีโทรเกรดชันของอะมิโลสขึ้นกับขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นของอะมิโลส (Shamai et al., 2003) โดย Eerlingen, Crombez and Delcour (1993) ได้ทำการศึกษาผลของความยาวของสายโซ่อะมิโลสต่อการเกิด RS_3 ซึ่งพบว่าความยาวของสายโซ่อะมิโลสที่มี DP 10-100 หน่วยกลูโคส สนับสนุนให้เกิด RS ในปริมาณที่สูงขึ้นและจะมีปริมาณลดลงเมื่อ DP>100 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gidley et al. (1995) ที่รายงานว่า DP ต่ำสุดที่สามารถเกิดการจัดเรียงตัวของ double helix คือ DP=10 และ DP ที่สูงสุดคือ DP=100 หน่วยกลูโคส โดย Eerlingen et al. (1995) รายงานว่า DP ของโมเลกุลสายโซ่ที่เป็นเส้นตรงมีผลต่อปรากฏการณ์รีโทรเกรดชันของสตาร์ช เช่นเดียวกับ Schmiedl et al. (2000) ซึ่งพบว่า DP ประมาณ 20 หน่วยกลูโคสเหมาะสมต่อการสร้าง RS ในปริมาณสูง

เป็นที่น่าสนใจว่าทำไมโครงสร้างที่เป็นอะมิโลเพคติน ถึงไม่สนับสนุนการเกิด RS_3 ทั้งนี้ เนื่องจากอะมิโลเพคตินมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน แต่อย่างไรก็ตามซึ่งได้กล่าวมาข้างต้นว่า กระบวนการตัดกิ่งสามารถเพิ่มปริมาณ RS ได้ ซึ่ง Lechmann, Jacobasch and Schmiedl (2002) ได้สนับสนุนทฤษฎีดังกล่าว โดยทำการตัดกิ่งสตาร์ชกล้วยที่มีอะมิโลเพคติน 91.53% โดยน้ำหนักแห้ง ด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าปริมาณ RS สูงขึ้นถึง 51% และพบว่าในสตาร์ช ที่ผ่านการตัดกิ่งนั้นมีขนาดโมเลกุลเล็กลงและ มีสัดส่วนของ DP 6-22 ในปริมาณสูง เช่นเดียวกับ Pongjanta et al. (2008) ซึ่งทำการตัดกิ่งสตาร์ชมันฝรั่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส ซึ่งจากการศึกษา พบว่าการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสเพิ่มระดับการรีโทรเกรดชันของสตาร์ชจาก 28.10 เป็น 54.53 % ซึ่งเป็นผลทำให้ปริมาณ RS เพิ่มขึ้นจาก 4.80 ถึง 12.33%

Cai and Shi (2010) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างและความสามารถในการย่อยของสตาร์ชจาก waxy wheat, waxy maize, และ waxy potato หลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสและบ่มที่ อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าสตาร์ชจาก waxy potato ที่ผ่านการตัดกิ่งมีสัดส่วน ของสายยาว (Long chain length) สูงกว่าของ waxy wheat, waxy maize ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณ RS และอุณหภูมิในการหลอมเหลว (Melting temperature) สูงกว่าของ waxy wheat, waxy maize อีก

ด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า waxy potato ที่มีโครงสร้างเป็น โมเลกุลสายยาวสามารถเพิ่มปริมาณ RS ได้ โดยการใช้กระบวนการตัดกิ่งร่วมกับกระบวนการรีโทรเกรเดชัน ซึ่งโครงสร้าง double helices ที่เกิดจากโมเลกุลสายยาวมีความแข็งแรง ต้านทานต่อการย่อยของเอนไซม์ และมีเสถียรภาพต่อความร้อน ได้ดีกว่า double helices ที่เกิดจากโมเลกุลสายสั้น

การเพิ่มผลผลิตของ RS₃ นอกจากการใช้เอนไซม์ในการตัดกิ่งแล้ว ยังพบว่ามียธิพิลอันเนื่องมาจากสภาวะการเก็บ (Storage-condition) ซึ่งโดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บ ทั้งนี้เพราะ RS₃ จัดเป็น retrograded starch ซึ่งปริมาณ RS จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเก็บ โดยเฉพาะการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่ง Agama-Acevedo et al. (2004) ได้รายงานไว้ว่า tortillas ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณ available starch ลดลง ในขณะที่ปริมาณ RS ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากการเกิดรีโทรเกรเดชันเป็นหลัก ในขณะที่ Schmiedel et al. (2003) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณของแข็งของเจลสตาρχมันฝรั่งที่มีปริมาณอะมิโลสน้อยกว่า 10% (Waxy potato starch) ที่ผ่านการตัดกิ่งและผ่านการรีโทรเกรดที่อุณหภูมิ 4 °C และ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิการบ่มแตกต่างกัน มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ RS ได้แตกต่างกันด้วย เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการจัดเรียงโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกัน โดยเมื่อบ่มที่ระยะเวลาเท่ากัน การบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C ส่งผลให้ปริมาณ RS สูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เนื่องจากผลึกที่ได้มีความแข็งแรงกว่า ในขณะที่ Gonzalez-Soto et al. (2006) พบว่าระยะเวลาไม่มีผลต่อปริมาณ RS ของสตาร์ชกล้วยที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง ในขณะที่อุณหภูมิในการเก็บมีผลต่อปริมาณ RS ของ debranched banana starch อย่างมีนัยสำคัญ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 60 °C แสดงปริมาณ RS ที่น้อยกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และ 32 °C

2.8 ประโยชน์ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ในลำไส้แต่จะเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ และผลิตกรดไขมันสายสั้น เช่น แอซิเตต (Acetate), บิวทิเรต (Butyrate) และโพรพิโอเนต (Propionate) ซึ่งสารเหล่านี้คือสารตั้งต้นที่สำคัญของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ใหญ่ และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเนื้อร้าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ (Arrigono et al., 1992) นอกจากนี้กรดไขมันทั้งสามชนิดยังเป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ (Probiotic microorganisms) เช่น bifidobacterium เป็นต้น (Sajilata et al., 2006) จากการที่สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะเหมือนกับไฟเบอร์ (Fiber) จึงส่งผลดีต่อสุขภาพของลำไส้ โดยเพิ่มอัตราการผลิตต่อมเซลล์เล็ก ๆ หรือลดการฟุ้งของเยื่อบุผิวที่ลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชทั่วไป แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะคล้าย ยากัวร์ ไฟเบอร์ที่ละลายน้ำ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเกิดเนื้องอก และลดคลอเรสเตอรอลในเลือด และ

ไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) (Haralampu, 2000)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากมีความสามารถในการถูกย่อยต่ำ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมการปลดปล่อยปริมาณกลูโคส ซึ่งจากงานวิจัยของ Ranhotra et al. (1997) พบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะเกิดการย่อยภายหลังการบริโภคแล้วประมาณ 5-7 ชั่วโมง ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินหลังบริโภคอาหารลดลงเมื่อเทียบกับการย่อยสตาร์ชปกติที่ผ่านการให้ความร้อนซึ่งจะเกิดการย่อยทันทีหลังการบริโภคอาหาร เช่นเดียวกับงานวิจัยของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดที่ 3 (RS₃) ที่ผลิตโดยบริษัท CrystaLean® นำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร พบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสเลือดของผู้ทดสอบภายหลังการบริโภคอาหารมีค่าต่ำกว่าการบริโภคคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ เช่น สตาร์ชชนิดอื่น ๆ โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) และน้ำตาล เป็นต้น โดยสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นตัวลดระดับกลูโคสในเลือดภายหลังรับประทานอาหาร เนื่องจากลดการปลดปล่อยกลูโคส และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการเผาผลาญ (Metabolism) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (ไม่ขึ้นกับอินซูลิน)

บทบาทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ นั้น มีรายงานว่า กรดไขมันที่เกิดขึ้นจากการหมักของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่จะช่วยเพิ่มปริมาณของเหลวและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ให้ลดต่ำลง เมื่อเกิดสภาวะกรดขึ้นภายในลำไส้ใหญ่จะเกิดการยับยั้งเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถเปลี่ยนน้ำดีให้เกิดเป็นสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การที่จุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่สามารถย่อยสลายเส้นใยอาหารได้ จึงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และยังช่วยเพิ่มปริมาณอุจจาระ กระตุ้นให้เกิดการขับถ่าย ป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (มลศิริ วิโรทัย, 2545) กรดไขมันบิวทิเรตยังช่วยปรับสภาวะตอนปลายของลำไส้ใหญ่ให้สมบูรณ์ด้วย (Arrigoni et al., 2001; Ferguson et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) ซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogenic microorganisms) ในระบบทางเดินอาหาร

นอกจากนี้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ยังช่วยในการยับยั้งการสะสมไขมัน โดย Higgins et al. (2005) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ผู้ทดสอบเพศชายจำนวน 12 คน ให้บริโภคอาหารที่มีการเติมเส้นใยจากสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งพบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ช่วยลดการสะสมของไขมัน เนื่องจากภายหลังการบริโภคเกิดการออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุที่ลำไส้ จากงานวิจัยของ Moates et al. (1996) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสตาร์ช 2 ชนิด ได้แก่ สตาร์ชที่มีสัดส่วนของสตาร์ชทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมอยู่ร้อยละ 16.4 (w/w) และสตาร์ช

ที่ไม่มีการผสม โดยตรวจสอบผลต่อการดูดซึมของแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และสังกะสี ซึ่งผลการทดลองพบว่า สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มี ช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมและเหล็กของลำไส้มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้หน้าที่อื่น ๆ ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์หรือเส้นใยอาหาร คือ ช่วยป้องกันการลดสถานะโรคอ้วน มีบทบาทในการลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน เป็นต้น ในทางอุตสาหกรรมอาหารสตาร์ชทนย่อยด้วยเอนไซม์ถูกประยุกต์ใช้มากมาย เนื่องจากมีขนาดอนุภาคที่เล็ก ลักษณะปรากฏเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่น มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ดี เช่น ลักษณะการพองตัว , สมบัติทางความหนืดที่เพิ่มขึ้น , สมบัติการเป็นเจล และความสามารถในการจับกับน้ำ นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เนื้อสัมผัสของอาหารมีลักษณะหยาบเหมือนกรวดทราย และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านรสชาติและเนื้อสัมผัส สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์แทนการใช้เส้นใยอาหารจากแหล่งอื่น ๆ และใช้เพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร (Fiber fortified) ในผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำ ซึ่งจะใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ปรุงสุกและผ่านการอบ เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จรูป (RTE Cereal) ขนมขบเคี้ยว อาหารเส้น (Pasta / Noodle) และอาหารทอด เป็นต้น ทั้งนี้ RS₃ เป็น RS ที่ได้รับความสนใจมากกว่า RS ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมีความเสถียรต่อความร้อน (Thermal stability) จึงสามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการไว้ได้ในระหว่างกระบวนการหุงต้มปกติ (Shamai et al., 2003) และเนื่องจากโครงสร้างส่วนผลึกของ RS₃ แสดงการเปลี่ยนเฟส (Endothermic transition) ที่อุณหภูมิ 120-16 °C (Han et al., 2006) ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นสารเติมแต่งที่เป็นพรีไบโอติกที่ทนความร้อนในอาหารได้ ซึ่งจะใช้อาหารพวกที่ต้องผ่านการให้ความร้อนหรือผลิตภัณฑ์ประเภทขนมอบ

บทที่ 3

วัตถุดิบและวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (S90) และ ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (P2) ได้รับการอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อำเภอรัญบุรี จังหวัดปทุมธานี และข้าวพันธุ์กข 6 (RD6) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น เอนไซม์พูลูลานเนสระดับห้องปฏิบัติการ (Pullulanase lab grade EC 232-983-9, Sigma no P2986), เอนไซม์ไอโซอะมิเลสระดับห้องปฏิบัติการ (Isoamylase : from *Pseudomonas* sp. Sigma no I5284), เอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase : EC 3.2.1.3 from *Aspergillus niger*, Sigma no A7095), เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (α -amylase : EC 3.2.1.1 type VI-B from porcine pancreas, Sigma no A3716), เอนไซม์เบตาอะมิเลส (β -amylase EC 3.2.1.2 type II-B from barley, Sigma no A7130), อะมิโลส (amylose type 3 from potato, Sigma no A0512), pullulan, glucose oxidase peroxidase reagent (G3660) และ สารเคมีพื้นฐานต่าง ๆ ที่ซื้อจาก Sigma chemical

3.2 การจำแนกประเภทของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

สตาร์ชข้าวทั้งสามชนิดถูกจำแนกออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามปริมาณอะมิโลสปรากฏ (% Absolute-amylose) ตามวิธีการวิเคราะห์ของ รุ่งนภา และคณะ (2546) โดยการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวด้วยวิธี Gel permeation chromatography (GPC) เริ่มจากการนำสตาร์ชมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะกิ่งแล้วนำสตาร์ชที่ผ่านการย่อยมาแยกตามขนาดด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ทำให้ทราบถึงลักษณะโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลสและสายโซ่ของอะมิโลเพคตินที่เป็นองค์ประกอบได้ ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์ความยาวของสายโซ่ที่เป็นองค์ประกอบในสตาร์ชที่ผ่านการย่อยในทางอ้อมได้ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีน โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสตาร์ชที่ผ่านการย่อยด้วย *Pseudomonas* isoamylase และทำการแยกตามขนาดด้วย GPC พบว่าสตาร์ชประกอบด้วยส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลัก 4 ส่วน โดยส่วนแรก คือ ส่วนประกอบที่ 1 (Fraction I, Fr. I) ซึ่งจะเป็น ส่วนของอะมิโลสและสายโซ่ของอะมิโลเพคตินที่มีขนาดยาวมาก มีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคน - ไอโอดีนสูงสุดมากกว่าหรือเท่ากับ 620 ($\lambda_{max} > 620\text{nm}$), ส่วนที่ 2 คือ ส่วนประกอบ Intermediate (Intermediate Fraction, Int. Fr.) มีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน

ของกลูแคนไอโอดีนสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 600 ถึง 620 นาโนเมตร ($620\text{nm} > \lambda_{\text{max}} > 600\text{nm}$), ส่วนที่ 3 คือ ส่วนประกอบที่ 2 (Fraction II, Fr. II) มีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคนไอโอดีนสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 525 ถึง 600 นาโนเมตร ($600\text{nm} > \lambda_{\text{max}} > 525\text{nm}$) ซึ่งเกิดจากสายโซ่ของอะมิโลเพคตินที่มี DP ประมาณ 45 และส่วนที่ 4 คือ ส่วนประกอบที่ 3 (Fraction III, Fr. III) มีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคนไอโอดีนสูงสุดน้อยกว่า 525 ($\lambda_{\text{max}} < 525\text{nm}$) ซึ่งแสดงผลดัง ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณลักษณะบางประการของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับไอโอดีนของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ และ สตาร์ชข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Isoamylase และทำการแยกตามขนาดด้วย Gel permeation chromatography (GPC) จากสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

Sample	Debranched starch			Debranched amylopectin			Absolute amylose ^c (%)	
	GPC ^a	Fr I	Fr II	Fr III	Fr I ^b	Fr II		Fr III
RD6	0	-	30.97	69.03	-	31.64	68.36	0
P2	24.06	24.06	19.83	47.54	9.17	21.23	46.12	14.88
S90	25.24	25.24	19.88	46.38	6.39	18.58	47.77	18.85

หมายเหตุ : ^a GPC หมายถึง การวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยการแยกตามขนาดโดย gel permeation chromatography ตามวิธีของ Inouchi et al. (1987)

^b ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ที่แยกได้จากอะมิโลเพคตินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน ให้สารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคน - ไอโอดีน ที่มีความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) มากกว่า 620 นาโนเมตร ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอะมิโลเพคตินที่เป็นกิ่งก้านที่มีขนาดยาวมาก (super long chain, SLC)

^c % Absolute amylose คำนวณจากผลต่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดใน Fr I ของ Debranched starch และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดใน Fr I ของ Debranched amylopectin

แหล่งที่มา : รุ่งนภา และคณะ (2546)

3.3 การเตรียมสตาร์ชของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

ทำการเตรียมสตาร์ชข้าวโดยนำเมล็ดข้าวมาผ่านกรรมวิธีการไม่เปียกเพื่อให้ได้ฟลาวข้าว จากนั้นทำการสกัดโปรตีนตามวิธีการของ Sawai และ Morita (1968) เพื่อให้มีโปรตีนเหลือน้อยกว่าร้อยละ 0.5 โดยเริ่มจากนำฟลาวมาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกสารละลายเกลือออก ในขั้นตอนต่อมา นำตะกอนสตาร์ช มาสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 กรองแยกตะกอนสตาร์ช จากนั้นสกัดโดยการแช่ตะกอนสตาร์ชในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.25 สักนาน 16 ชั่วโมง และทำการล้างล้างออกจากตะกอนสตาร์ชจนกระทั่ง พีเอช ของน้ำล้างตะกอนสตาร์ชมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ขั้นตอนสุดท้ายล้างตะกอนสตาร์ชด้วยน้ำกลั่น และอบตะกอนสตาร์ชที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และทำการอบและร่อนตัวอย่าง เก็บตัวอย่างสตาร์ชที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

3.4 การศึกษาคุณสมบัติของสตาร์ชข้าว

3.4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ โดยทำการวิเคราะห์โปรตีน, ไขมัน, เยื่อ และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990)

3.4.2 ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการเกิดสี ไอโอดีน ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่เป็นองค์ประกอบของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธีการเกิดสี ไอโอดีน (Julino, 1971) และชุดตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสหลังจากทำการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วยวิธี Concanavalin-A หรือ ConA (Amylose / Amylopectin assay kit, Megazyme)

3.4.3 ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการทาง Differential Scanning calorimeter (DSC) ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่เป็นองค์ประกอบของสตาร์ชข้าว และสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch) ตามวิธีของ Sievert and Lausanne (1993) ด้วยเครื่อง Mettler DSC 1 instrument (Mettler, Naenikon-Uster, Switzerland) ซึ่งการวิเคราะห์ข้อมูล ได้เตรียมกราฟมาตรฐานของอัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน (w/w) ที่ระดับความเข้มข้น 2.5:97.5, 5:95, 10:90, และ 20:80 โดยผสมอะมิโลสและอะมิโลเพคติน ประมาณ 10 มิลลิกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) ลงใน Mettler medium pressure aluminum pan (120 ไมโครลิตร) จากนั้นเติม 3%(w/v) L- α -lysophosphatidylcholine (LPC) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำตัวอย่างไปให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 20°C ถึง 180°C (heating rate 5°C / นาที) แล้วจึงทำการลดอุณหภูมิลงถึง 4°C (cooling rate 10°C / นาที) และให้ความร้อนอีกครั้งจนถึง 180°C (heating rate 5°C / นาที) เพื่อติดตาม melting enthalpy ของแต่ละความเข้มข้นเพื่อนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

เช่นเดียวกันสำหรับตัวอย่างสตาร์ชที่ทำกรชั่งน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) เติม 3%(w/v) L- α -lysophosphatidylcholine (LPC) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปให้ความร้อนจาก

อุณหภูมิ 20°C ถึง 180°C (heating rate 5°C/นาที) แล้วจึงทำการลดอุณหภูมิลงถึง 4°C (cooling rate 10°C/นาที) และให้ความร้อนอีกครั้งจนถึง 140°C (heating rate 5°C/นาที) ซึ่งค่าคุณสมบัติทางความร้อนที่ทำการวิเคราะห์ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นของการเปลี่ยนเฟส (onset temperature, T_0), อุณหภูมิสูงสุดของการเปลี่ยนเฟส (peak temperature, T_p), อุณหภูมิสุดท้ายของการเปลี่ยนเฟส (conclusion temperature, T_c), ช่วงอุณหภูมิของการเปลี่ยนเฟส ($T_c - T_0$) และค่าพลังงานในการเปลี่ยนเฟส (ΔH) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไขมัน (amylose lipid complex) คำนวณปริมาณอะมิโลสโดยแทนค่าลงในสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของอัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน

3.4.4 ศึกษาการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ช (Chain length distribution)

ชั่งตัวอย่างสตาร์ช 6-7 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 4.69 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต รท 1 โมลาร์ (พีเอช 3.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Isoamylase (11,084.31 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 100 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์โครงสร้างของ debranched starch ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD (Dionex ICS3000, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) ใช้คอลัมน์ Carbowax PA200 โดยปริมาตรสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 50 ไมโครลิตร สำหรับ mobile phase ที่ประกอบด้วย eluent A คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์ และ eluent B คือ โซเดียมอะซิเตตรท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์ โดยการไหลของ mobile phase ควบคุมโปรแกรมให้เป็น gradient แสดงดังตารางที่ 3.2 และอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที

3.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.5.1 เอนไซม์พูลูลานเนส

กิจกรรมของเอนไซม์พูลูลานเนสวิเคราะห์ตามวิธีการของ Novo industri A/S (1983) โดยเอนไซม์พูลูลานเนส 1 Pullulanase Unit (PUN) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยพูลูลานเป็นคาร์โบไฮเดรตรีดิซที่มีกำลังรีดิซสมมูลกับกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50°C ทำการวิเคราะห์โดยเตรียมสารละลายพูลูลานในน้ำปราศจากไอออนความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 3.2 Gradient program ของเครื่อง High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detector (HPAEC-PAD)

เวลา (นาที)	Eluent A (%)	Eluent B (%)
0	10	90
10	20	80
25	50	50
30	40	60
40	80	20
45	100	0
60	100	0

ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร วางในอ่างน้ำอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์พุลูลูลานีสที่ทำการเจือจาง 10,000 เท่า ใน 0.1 โมลาร์ acetate buffer พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม Somogyi's copper reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐานตามวิธีการของ Somogyi's method (Somogyi, 1952) สำหรับแบบลงค์ทำการเติม Somogyi's copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมพุลูลูลานีสและเอนไซม์ก่อนการบ่มที่อุณหภูมิ 50°C คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยออกมาได้ ต่อหน้าที่ โดยเอนไซม์พุลูลูลานีส มีกิจกรรมเท่ากับ 483.3 PUN/มิลลิลิตร

3.5.2 เอนไซม์ไอโซอะมิเลส

ทำการวิเคราะห์ กิจกรรมของเอนไซม์ไอโซอะมิเลส ตามวิธีการของ Novo industri A/S (1983) โดยดูดสารละลายอะมิโลเพคติน มันฝรั่ง ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (w/w) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่ระดับความเจือจาง 10,000 เท่าในสารละลายอะซิเตร ทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม Somogyi's copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐานตามวิธีการของ Somogyi's method (Somogyi, 1952) โดยแบบลงค์ทำการเติม Somogyi copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมระหว่าง อะมิโลเพคตินมันฝรั่ง และเอนไซม์ก่อนบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C โดย Novo industry AIS (1983) ให้นิยามว่า isoamylase 1 Unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยอะมิโลเพคติน เป็นคาโบไฮเดรตรีดิวซ์ที่มีกำลังรีดิวซ์สมมูลกับกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อหน้าที่ ที่อุณหภูมิ 50 °C

คั่งน้ำกิจกรรมของเอนไซม์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยออกมาได้ต่อ นาที โดยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสกิจกรรมเท่ากับ 11,084.31 ยูนิต/ มิลลิลิตร

3.6 การแยกอะมิโลสออกจากตัวอย่างสตาร์ชข้าว

ซึ่งตัวอย่างสตาร์ชข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (S90) น้ำหนัก 1 กรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งในขณะที่ส่วนของตะกอนถูกล้างอีกครั้ง โดยการเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนอีกครั้งที่อ่างน้ำอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำการล้างตะกอนซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นตะกอนสตาร์ชถูกทำให้แห้งด้วยวิธีระเหิด (Freeze drying) (Heto FD8, Heto-Holten A/S, Denmark) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตัวอย่างสตาร์ชข้าวถูกบดจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคเท่ากับ 75-105 ไมโครเมตร ตัวอย่างสตาร์ชถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (P2) ทำการชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และทำการล้างตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 90 °C นาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงและเทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างตะกอนซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นตะกอนสตาร์ชถูกล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนจนกระทั่งมีพีเอชเท่ากับ 7 สุดท้ายตะกอนตัวอย่างสตาร์ชถูกทำให้แห้งด้วย เครื่องระเหิดแห้ง (Heto FD8, Heto-Holten A/S, Denmark) จากนั้นบดจนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคเท่ากับ 75-105 ไมโครเมตร โดยตัวอย่างสตาร์ชข้าวที่ผ่านกระบวนการนี้เรียกว่า สตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Amylose-free starch) และเก็บตัวอย่างสตาร์ชที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

3.7 การเตรียมสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่ง

เตรียมตัวอย่างสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่งทั้งสามพันธุ์ โดยเตรียมเจลสตาร์ชที่ระดับความเข้มข้น 10% (w/w) ในสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 โดยให้ความร้อนกับสารละลายสตาร์ชที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเข้าหม้อนึ่งความดัน (Autoclaved) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้สารละลายสตาร์ชข้าวเกิดเจลอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำ

ให้เย็นจนอุณหภูมิของเจลสตาร์ชอยู่ที่ 50 °C ทำการเติมเอนไซม์พอลูกลูทานเนส และเอนไซม์พอลูกลูทานร่วมกับไอโซอะมิเลส ที่ระดับ 45 PUN/กรัมสตาร์ช และบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในระหว่างระยะเวลาบ่มทำการสุ่มตัวอย่างสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่งปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมกับสารละลายเข้มข้น DMSO และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ ตัวอย่างถูกทำให้เย็นและทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ (reducing suger content : R) เทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar content : TS) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (Dubois et al., 1956) โดยแต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำเพื่อใช้ในการคำนวณระดับการตัดกิ่ง และระดับการย่อยตามสมการข้างล่าง

ระดับการตัดกิ่ง (Degree of debranching : DB)

$$D.B.\% = \left[\frac{R \text{ ของตัวอย่างหลังการย่อย} - R \text{ ของเอนไซม์} - R \text{ ของตัวอย่างเริ่มต้น}}{R \text{ ของตัวอย่างที่ตัดกิ่งอย่างสมบูรณ์} - R \text{ ของตัวอย่างเริ่มต้น} - R \text{ ของเอนไซม์}} \right] \times 100$$

ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis : DH)

$$D.H.\% = \left[\frac{R \text{ ของตัวอย่างหลังการย่อย} - R \text{ ของเอนไซม์} - R \text{ ของตัวอย่างเริ่มต้น}}{TS \text{ ของตัวอย่าง} - TS \text{ ของเอนไซม์}} \right] \times 100$$

3.8 β -amylolysis limit of debranched starch

วิธีการวิเคราะห์ β -amylolysis limit ดัดแปลงจากวิธีการของ Hood and Mercier (1978) โดยสารละลายของ debranched starch ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ถูกผสมกับอะซิเตร ทบัพเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 4.8 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์เบตาอะมิเลส (β -amylase) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (20 ยูนิต/มิลลิลิตร) และน้ำปราศจากไอออน 1.0 มิลลิลิตร ส่วนผสมทั้งหมดถูกบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ (reducing suger, R) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar, TS) เพื่อใช้ในการคำนวณ β -amylolysis limit ตามสมการ

$$\beta\text{-amylolysis limit} = \left[\frac{R \text{ ของตัวอย่างหลังการย่อย} - R \text{ ของเอนไซม์เริ่มต้น}}{TS \text{ ของตัวอย่างหลังการย่อย} - TS \text{ ของเอนไซม์เริ่มต้น}} \right] \times \frac{1}{19} \times 100$$

3.9 การวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

การวิเคราะห์ปริมาณ RS ของสตาร์ชข้าวทั้งสามชนิดทั้งก่อนและหลังการตัดแปร โดยวิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจากวิธี AOAC method (2002) โดยทำการชั่งตัวอย่างสตาร์ช 100 มิลลิกรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายอะซิเตร ทบัพเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ผสมเอนไซม์แพนครีเอติกแอลฟาอะมิเลส (pancreatic alpha-amylase) ที่มีเอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase; AMG, 3 ยูนิต/มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมเอทานอล 99 % ปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 x g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยเอทานอล 50% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 x g เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ค่อย ๆ เทส่วนใสทิ้งและรอให้ตะกอนสตาร์ชแห้ง จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ พีเอช 3.8 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร จากนั้นเติม AMG 3300 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาโดยชุดทดสอบ PGO เอนไซม์ (Sigma, P7119) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ RS จากสมการ

$$RS \text{ (g/100 g สตาร์ช)} = \frac{F}{W} \times \frac{162}{180} \times 100$$

โดย F = ปริมาณกลูโคสที่วิเคราะห์ได้

W = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g)

$\frac{162}{180}$ = แฟกเตอร์สำหรับเปลี่ยน free glucose เป็น anhydro-glucose

3.10 การตรวจสอบลักษณะโครงสร้างทางผลึก

การศึกษาชนิดและลักษณะโครงสร้างทางผลึกของตัวอย่างสตาร์ชข้าวด้วยเทคนิค x-ray diffraction (XRD) โดยบรรจุตัวอย่างสตาร์ชข้าวมาอัดในเซลล์ใส่ตัวอย่างและวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Powder X-ray diffractometer รุ่น D5005 (Bruker GmbH, Germany) โดยใช้ 1.54 Å Cu K_α ในการกำเนิดรังสีเอ็กซ์ จากนั้นทำการตรวจวัด diffraction pattern ที่มุม 2θ ในช่วง 4-30° โดยสภาวะการตั้งค่าเครื่องในการวัดคือ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์ ศักย์ไฟฟ้า 40 กิโลโวลต์ ความกว้าง divergence slit 1° ความกว้าง antiscatterring slit 1° ความเร็วในการตรวจวัด 0.480 °C / นาที ทำการ

คำนวณหาปริมาณผลึก (Relative crystallinity) ตามวิธีของ Herman และ Weidinger (1961) โดยปรับ baseline และความเรียบของ diffraction pattern แล้ววัดพื้นที่ใต้กราฟของ diffraction pattern ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม EVA Diffract Plus #1 และปริมาณความเป็นผลึก (relative crystallinity) คำนวณจากอัตราส่วนของพื้นที่พีค (diffraction peak area) ต่อพื้นที่ทั้งหมด (total diffraction area) (Hermans and Weidinger, 1961)

3.11 การตรวจวัดคุณสมบัติทางความร้อน

ศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) โดยชั่งตัวอย่างสตาร์ชข้าว 7-8 มิลลิกรัม ลงใน stainless steel DSC pan ขนาด 60 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำปราศจากไอออน 22-23 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ซ้ำคืนเพื่อให้เข้าสู่สมดุล จากนั้นทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงเชิงความร้อนด้วยเครื่อง Mettler DSC 1 instrument (Mettler, Naenikon-Uster, Switzerland) โดยตั้งโปรแกรมในการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25-200 °C ที่อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 10°C/นาที โดยใช้ระบบ intracooler ในการให้ความเย็น และใช้ pan เปล่าเป็นตัวอย่างอิง (reference) ซึ่งค่าคุณสมบัติทางความร้อนที่ทำการวิเคราะห์ คือ อุณหภูมิเริ่มต้นของการเปลี่ยนเฟส (onset temperature, T_0), อุณหภูมิสูงสุดของการเปลี่ยนเฟส (peak temperature, T_p), อุณหภูมิสุดท้ายของการเปลี่ยนเฟส (conclusion temperature, T_c), ช่วงอุณหภูมิของการเปลี่ยนเฟส ($T_c - T_0$) และค่าพลังงานในการเปลี่ยนเฟส (ΔH)

3.12 การศึกษาจลนพลศาสตร์การเกิดรีโทรเกรเดชันด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของการเกิดรีโทรเกรเดชัน ในโครงสร้างผลึกของสตาร์ชข้าวทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy : FTIR) โดยใช้ GX FTIR spectrometer (Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA) เซลล์วัดตัวอย่างชนิด attenuated total reflectance (ATR) ซึ่งทำจากผลึกของ ZnSe ที่มีมุมของแสงตกกระทบตัวอย่างที่ 45°C โดยตัวอย่างสตาร์ชข้าวหลังทำการตัดกึ่งตามวิธีในข้อ 3.6 ถูกนำมาลดอุณหภูมิลงจนถึง 4°C แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 1200-800 cm^{-1} โดยมีค่า resolution เท่ากับ 4 cm^{-1} และ 16scan ในการวัดแต่ละครั้ง และใช้ deconvoluted factor เท่ากับ 1.5 คำนวณอัตราส่วนของ การดูดกลืนแสงที่ความถี่ (wave number) 1047 cm^{-1} ต่อ 1037 cm^{-1} ศึกษาความสัมพันธ์จลนพลศาสตร์ของการเกิดรีโทรเกรเดชัน และคำนวณค่าอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันโดยใช้สมการ Avrami (Avrami, 1941)

3.13 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล Analysis of Variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) version 6.12 (SAS Institute Inc, Carry, NC., USA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple' Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

จากการสกัดสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ตามวิธีการของ Sawai and Morita (1968) และทำการวิเคราะห์ องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าว ประกอบด้วย ความชื้น โปรตีน ไขมัน โยอาหาร และเถ้า แสดงผลดังตารางที่ 4.1 พบว่าสตาร์ชข้าวมีปริมาณความชื้นร้อยละ 10.35-11.02 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.41-0.46 ปริมาณไขมันร้อยละ 0.20-0.26 และปริมาณเถ้าร้อยละ 0.44-0.58 เนื่องจากสตาร์ชมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าร้อยละ 0.5 และมีปริมาณไขมันต่ำ แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

พันธุ์ข้าว	องค์ประกอบทางเคมี			
	ความชื้น (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)	ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)	ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)
RD6	10.35±0.12	0.46±0.18	0.20±0.05	0.44±0.00
P2	10.87±0.08	0.45±0.10	0.24±0.08	0.51±0.01
S90	11.02±0.10	0.41±0.05	0.26±0.08	0.58±0.01

4.2 ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

โมเลกุลของสายอะมิโลสมีความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารละลายไอโอดีนได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ให้สีน้ำเงิน ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่บ่งบอกถึงสตาร์ชที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่มีอยู่ในสตาร์ชได้ ดังนั้นจึงใช้ปริมาณอะมิโลสเป็นพื้นฐานในการแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ข้าว โดย International Rice Research Institute (1971) แบ่งข้าวตามปริมาณอะมิโลสออกเป็น 4 กลุ่ม คือ ข้าวอะมิโลสต่ำ มีปริมาณอะมิโลสต่ำกว่า 20%, ข้าวอะมิโลสปานกลาง มีปริมาณอะมิโลส 20-25%, ข้าวอะมิโลสสูงปานกลาง มีปริมาณอะมิโลส 25-27% และข้าวอะมิโลสสูง โดยมีปริมาณอะมิโลสสูงกว่า 27% ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ ทำให้สามารถจำแนกข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม โดย สตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 จัด

อยู่ในกลุ่มข้าวพันธุ์ที่มีอะมิโลสต่ำเป็นองค์ประกอบ (Low amylose rice) ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏ (%Apparent amylose) อยู่ร้อยละ 8.77 ในขณะที่ข้าวพันธุ์ P2 และข้าวพันธุ์ S90 มี %apparent amylose เท่ากับ 44.73 และ 24.86 ตามลำดับจึงจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของรุ่งนภา และคณะ (2546)

ตารางที่ 4.2 ปริมาณอะมิโลสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

พันธุ์ข้าว	Apparent amylose (%)			
	Iodine ^a	Con A ^b	DSC ^c	Absolute amylose ^d (%)
RD6	8.77±0.07	4.98±0.14	2.41±0.04	0
P2	44.73.59	24.92±0.30	20.26±0.14	14.88
S90	24.86±0.12	19.49±0.04	16.30±1.01	18.85

หมายเหตุ : ^a วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนตามวิธีการของ Juliano (1971)

^b วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยชุดวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลส Con A

^c การวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยเครื่อง DSC โดยคำนวณจากค่าเอนโทรปีของ amylose-lipid complex ที่เกิดขึ้นเทียบกับสารมาตรฐานอะมิโลส

^d % Absolute amylose คำนวณจากผลต่างปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดใน Fr I ของ Debranched starch และปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดใน Fr I ของ Debranched amylopectin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Isoamylase และแยกตามขนาดโดย gel permeation chromatography (GPC)

ที่มา : รุ่งนภา และคณะ (2546)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการตกตะกอนอะมิโลเพคติน ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ถูกพัฒนาเพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลส โดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของขนาดโมเลกุลระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน ซึ่งโมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลของอะมิโลส จึงสามารถตกตะกอนและแยกออกจากอะมิโลสได้ด้วยวิธี Amylose/amylopectin assay kit, Megazyme (con A) แล้วจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่เหลืออยู่ในสารละลายด้วยวิธีทางเอนไซม์ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีนี้ สามารถแบ่งพันธุ์ข้างออกเป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยไอโอดีน แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนให้ค่าที่สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย con A พบว่าร้อยละของอะมิโลสปรากฏเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนและวิธี con A ให้ค่าในช่วง 8.77 ถึง 44.73 และ 4.98 ถึง 24.92 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ปริมาณอะมิโลสปรากฏที่ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนมีค่าสูงอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของอะมิโลเพคตินที่มีขนาดสายโซ่บางส่วนยาวซึ่งสามารถจับกับไอโอดีนได้ เช่นเดียวกับอะมิโลสจึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของวิธีการวัดได้ (Noosuk et al., 2003) การวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยเครื่อง DSC เป็นอีกหนึ่งวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลส ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของ RD6, P2 และ S90 มีค่าเท่ากับร้อยละ 2.41, 20.26 และ 16.30 ตามลำดับ นอกจากนี้ รุ่งนภา และคณะ (2546) พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของอะมิโลเพคตินที่แยกจากสตาร์ชและนำมาผ่านการย่อยด้วย *Pseudomonas isoamylase* และทำการแยกตามขนาดด้วย gel permeation chromatography (GPC) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างสายโซ่ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลอะมิโลเพคตินได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ทั้ง 4 วิธี คือ การเกิดสีกับไอโอดีน, DSC, การตกตะกอนด้วย Con A และคัดแยกขนาดด้วย gel permeation chromatography (GPC) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนเป็นการวัดปริมาณของกลูแคนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและให้สารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ใช้วิเคราะห์ได้ ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงนั้นจึงเป็นผลรวมทั้งหมดของโมเลกุลกลูแคนดังกล่าว ซึ่งมีทั้งอะมิโลสและอาจมีบางส่วนของอะมิโลเพคตินจึงรบกวนการวิเคราะห์ได้ ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีสตาร์ชของข้าวพันธุ์ RD6 ที่ไม่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีน จะให้ค่าปริมาณอะมิโลส 8.77% ซึ่งเป็นผลมาจากการรบกวนของโมเลกุลอะมิโลเพคตินต่อการวิเคราะห์วิธีนี้ และจะพบในสตาร์ชข้าวทุกพันธุ์และจะเกิดขึ้นมากเมื่อโมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีโครงสร้างของสายโซ่ที่มีขนาดความยาวมากเป็นองค์ประกอบ (รุ่งนภา และคณะ, 2546) ในขณะที่พันธุ์ข้าวที่โมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (Super long chain) เช่น ข้าวพันธุ์ P2 และ S90 พบว่าปริมาณอะมิโลสที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Con A จะใกล้เคียงกับค่าปริมาณอะมิโลสปรากฏที่ได้จาก GPC ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยค่าปริมาณอะมิโลสปรากฏที่ได้จากวิธี Con A จะให้ค่าที่สูงกว่าปริมาณอะมิโลสที่แท้จริงที่ได้จาก GPC ทั้งนี้อธิบายได้ว่า Con A จะมีความสามารถในการตกตะกอนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งได้แก่ อะมิโลเพคติน แต่ในกรณีที่สตาร์ชข้าวที่มีโมเลกุลที่ขนาดกลาง (intermediate fraction) จะทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้สูงกว่า เนื่องจากโมเลกุลขนาดกลางบางส่วนอาจไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วย Con A (Sievert and Lausanne, 1993)

รุ่งนภา และคณะ (2546) รายงานว่าปริมาณอะมิโลสที่แท้จริง (Absolute amylose) ของสตาร์ชข้าวสามารถหาได้จากผลต่างของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในส่วนของ Fr I ของสตาร์ชข้าวกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในส่วนของ Fr I ของอะมิโลเพคตินที่แยกจากสตาร์ชข้าว และสามารถจัดกลุ่มตามปริมาณอะมิโลสที่แท้จริงได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่มีอะมิโลสเป็น

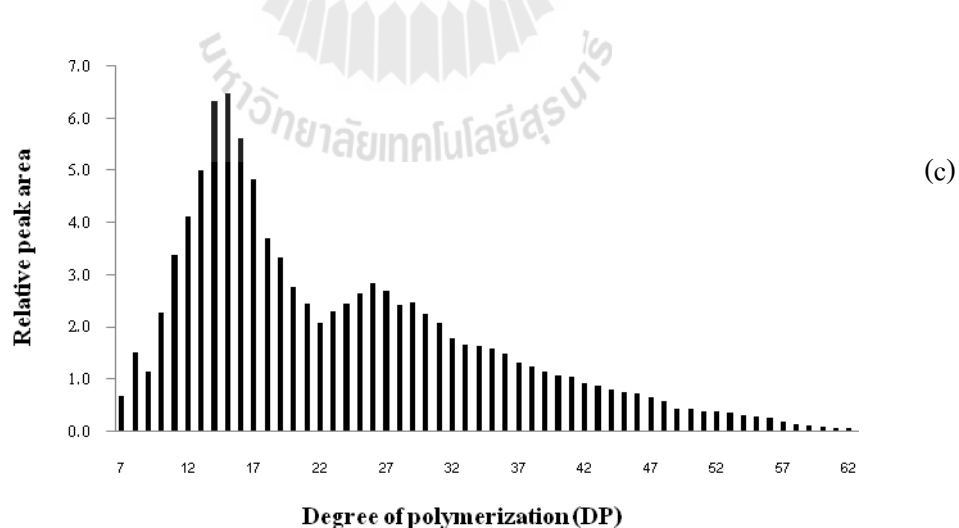
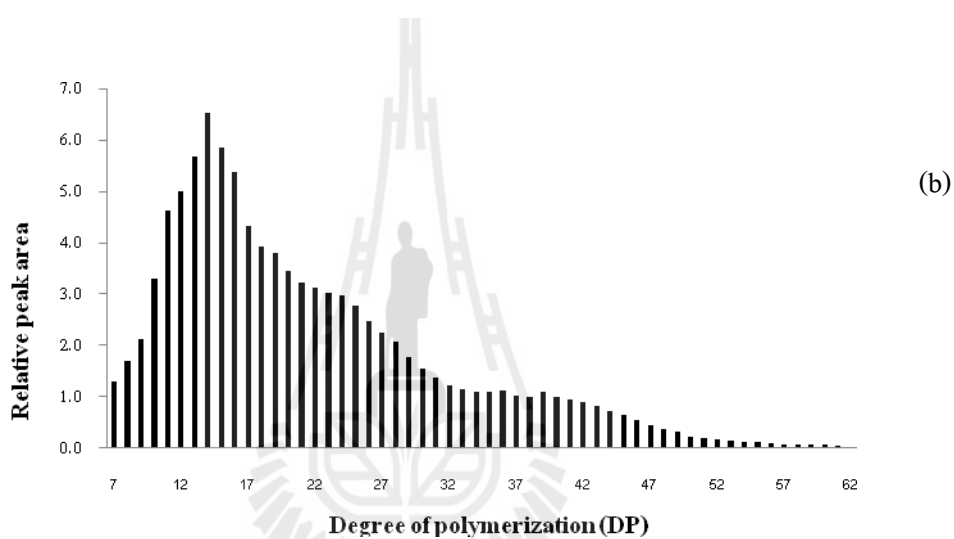
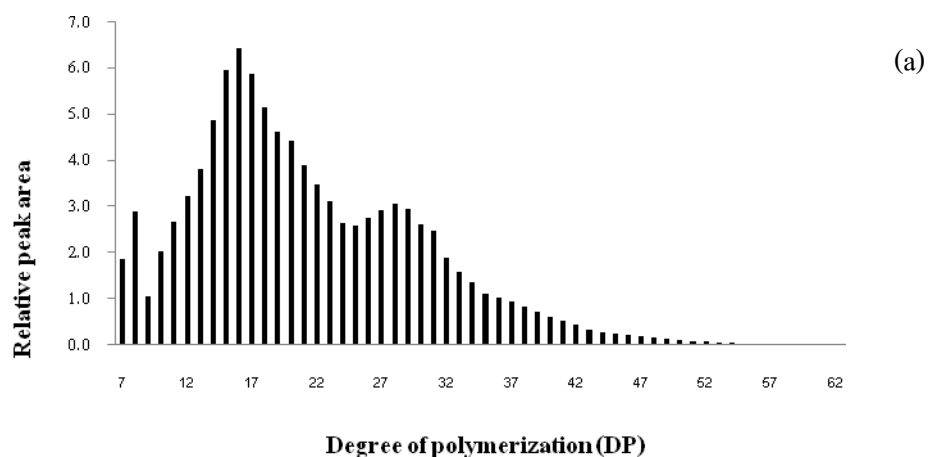
องค์ประกอบ ได้แก่ ข้าวพันธุ์ RD6 (โครมาโตแกรมของสตาร์ชและอะมิโลเพคตินที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสประกอบด้วย Fr. II และ Fr. III เท่านั้น) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบปานกลาง ได้แก่ พันธุ์ P2 (%Absolute amylose ที่เป็นองค์ประกอบร้อยละ 14.88) และกลุ่มที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบสูง ได้แก่ S90 มี %Absolute amylose ที่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 18.85

4.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

Hizukuri (1995) ได้เสนอแบบจำลองโครงสร้างอะมิโลเพคตินที่ประกอบไปด้วย กิ่งก้านที่เป็นสายโซ่กลูแคนที่มีขนาดความยาวต่าง ๆ กับ เช่น A-chains, Short B-chains, และ Long B-chains ประกอบกันเป็นคัสเตอร์ ซึ่งการวิเคราะห์ debranched starch ที่ผ่านการย่อยด้วย Pseudomonas isoamylase และทำการแยกขนาดด้วย Ion Exchange Chromatography ทำให้สามารถอธิบายลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กลูแคนขนาดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบของอะมิโลเพคตินอีกวิธีหนึ่ง จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของ debranched starch โดยเครื่อง HPAEC-PAD ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) สามารถแบ่งออกเป็น 4 ช่วงคือ DP 6-12, DP 13-24, DP 25-36 และ DP ≥ 37 ซึ่งสตาร์ชทั้งสามชนิดมีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 โดยความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวแต่ละสายพันธุ์แสดงในภาพที่ 4.1 สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และสุพรรณบุรี 90 (S90) มีสัดส่วนร้อยละการกระจายตัวในช่วง DP 6-12 และ DP ≥ 37 สูงกว่าข้าว RD6 และการกระจายตัวในช่วง DP 13-24 ต่ำกว่า RD6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของรุ่งนภา และคณะ (2546)

ตารางที่ 4.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

Sample	Branch chain length distribution of amylopectin			
	(%) distribution			
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP ≥ 37
RD6	15.62	54.07	25.52	4.84
P2	19.53	51.21	19.87	9.60
S90	19.11	50.43	22.86	9.51



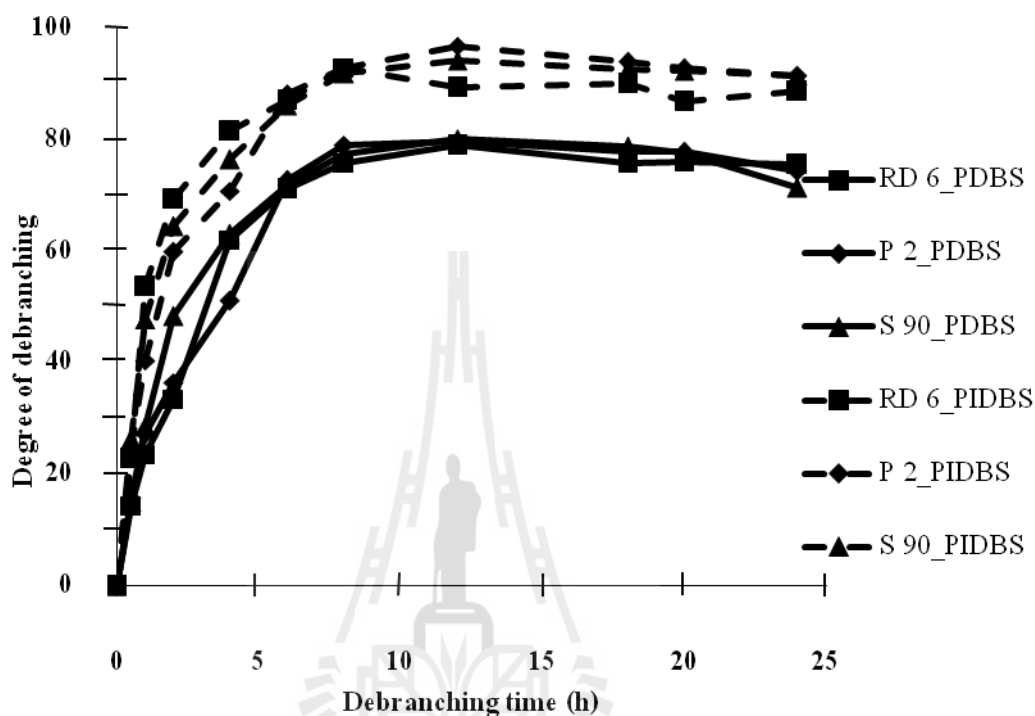
ภาพที่ 4.1 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ (a) RD6, (b) P2, และ (c) S90

4.4 ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่งต่อระดับการตัดกิ่ง

โครงสร้างโมเลกุลของสตาร์ชเป็นปัจจัยสำคัญในการ เกิด RS โดยจากงานวิจัยพบว่า RS₃ ส่วนใหญ่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ของโมเลกุลอะมิโลส และอะมิโลเพคตินที่ถูกตัดกิ่ง (Debranched amylopectin) ซึ่งการตัดกิ่งโมเลกุล ของอะมิโลเพคตินทำให้สัดส่วนของโมเลกุลเส้นตรงเพิ่มขึ้น จึงส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ resistant starch (RS) ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้ทำการศึกษาการตัดกิ่งโมเลกุลสตาร์ชด้วยเอนไซม์ ตัดกิ่ง (Debranching enzyme) ซึ่งเอนไซม์ตัดกิ่งโดยทั่วไปมี 2 ชนิดคือ ไอโซอะมิเลส (Isoamylase) และเอนไซม์พูลลูลานาส (Pullulanase) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยสตาร์ชได้แตกต่างกัน ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการตัดกิ่งของเอนไซม์ทั้งสองชนิดและศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่มีผลต่อปริมาณและคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของ RS₃ โดยเริ่มแรกของการศึกษา ได้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ซึ่งพบว่าเอนไซม์พูลลูลานาส มีกิจกรรมเท่ากับ 488.43 PUN/ml ในขณะที่เอนไซม์ไอโซอะมิเลสมีกิจกรรมเท่ากับ 11,084.31 U/ml

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการตัดกิ่งสตาร์ชของการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นจากงานวิจัยเรื่องการพัฒนากระบวนการผลิตสตาร์ชข้าวที่ทนต่อการย่อย ที่ทำการศึกษาดัวแปรอิสระที่มีผลต่อการตัดกิ่ง 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของสตาร์ชข้าว , ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย และระยะเวลา ในการย่อย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือก สภาวะในการตัดกิ่งสตาร์ชข้าว และเนื่องจากตัวแปรอิสระที่ ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือชนิดของเอนไซม์ ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการกำหนดตัวแปรตามอื่น ๆ ให้คงที่ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสตาร์ชทั้งสามชนิดอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10%w/w ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ระดับ 45 PUN/g of starch และระยะเวลาในการย่อย 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ และทำการ ติดตามระดับการตัดกิ่ง (Degree of debranching, DB) และระดับการย่อย (Degree of hydrolysis, DH) ที่เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาในการย่อย โดยทำการเตรียมตัวอย่างเจลสตาร์ชข้าวที่ระดับความเข้มข้น 10%w/w จากนั้นเติมเอนไซม์ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกทำการเติมเอนไซม์พูลลูลานาส ที่ระดับความเข้มข้น 45 PUN/g of starch ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เติมเอนไซม์พูลลูลานาส ที่ระดับ 41.5 PUN/g of starch และเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่ระดับความเข้มข้น 3.5 U/g of starch จากนั้นบ่มตัวอย่างทั้งสอง ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งตลอดระยะเวลาในการย่อยได้ทำการสุ่มตัวอย่างออกมาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิง (Reducing sugar) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) เพื่อใช้ในการคำนวณระดับการตัดกิ่ง และระดับการย่อย ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2 และ 4.3 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ระดับการตัดกิ่ง และระดับการย่อย เพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการย่อย และเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาในการย่อยมากกว่า 10 ชั่วโมง นอกจากนั้นพบว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพูลลูลานาสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) มีระดับการตัด

กิ่งและระดับการย่อยสูงกว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนส (Pullulanase debranched starch : PDBS) โดย PIDBS มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยอยู่ที่ 90%DB และ 6%DH ในขณะที่ PDBS มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยอยู่ที่ 80%DB และ 4%DH ตามลำดับ (ดังภาพที่ 4.2 และ 4.3)

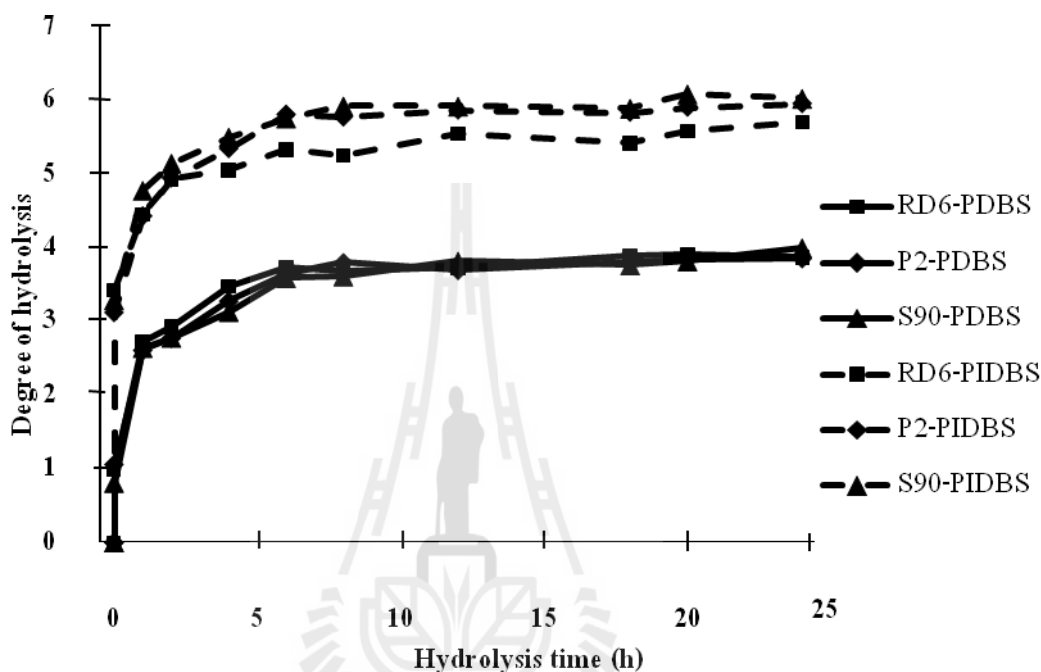


ภาพที่ 4.2 ระดับการตัดกิ่งของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนส (Pullulanase debranched starch : PDBS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยของข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่าเมื่อทำการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสข้าวทั้งสามพันธุ์มีระดับการตัดกิ่งไม่แตกต่างกัน (มีระดับการตัดกิ่งประมาณ 90%) ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ในขณะที่ระดับการย่อยของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.3) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้เอนไซม์สองชนิดร่วมกันโดยมีข้าวพันธุ์ S90 และ พันธุ์ P2 มีระดับการย่อยสูงกว่าพันธุ์ RD6 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งข้าวพันธุ์ S90 และ P2 มีทั้งอะมิเลสและอะมิโลเพคตินอยู่ในโครงสร้างและในระหว่างกระบวนการเจลาติไนเซชันโมเลกุลของอะมิโลสบางส่วนถูกปลดปล่อยออกมา โครงสร้างของสตาร์ชเกิดการแตกตัว ดังนั้นเมื่อทำการเติมเอนไซม์ลงไปเอนไซม์จึงสามารถเข้าไปในโครงสร้างได้ง่าย ซึ่งแตกต่างจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ที่โครงสร้างมีอะมิโลเพคตินอย่างเดี่ยวและโครงสร้างที่มีความเป็นกิ่งก้านสูง (Highly branch structure) ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ยากกว่า

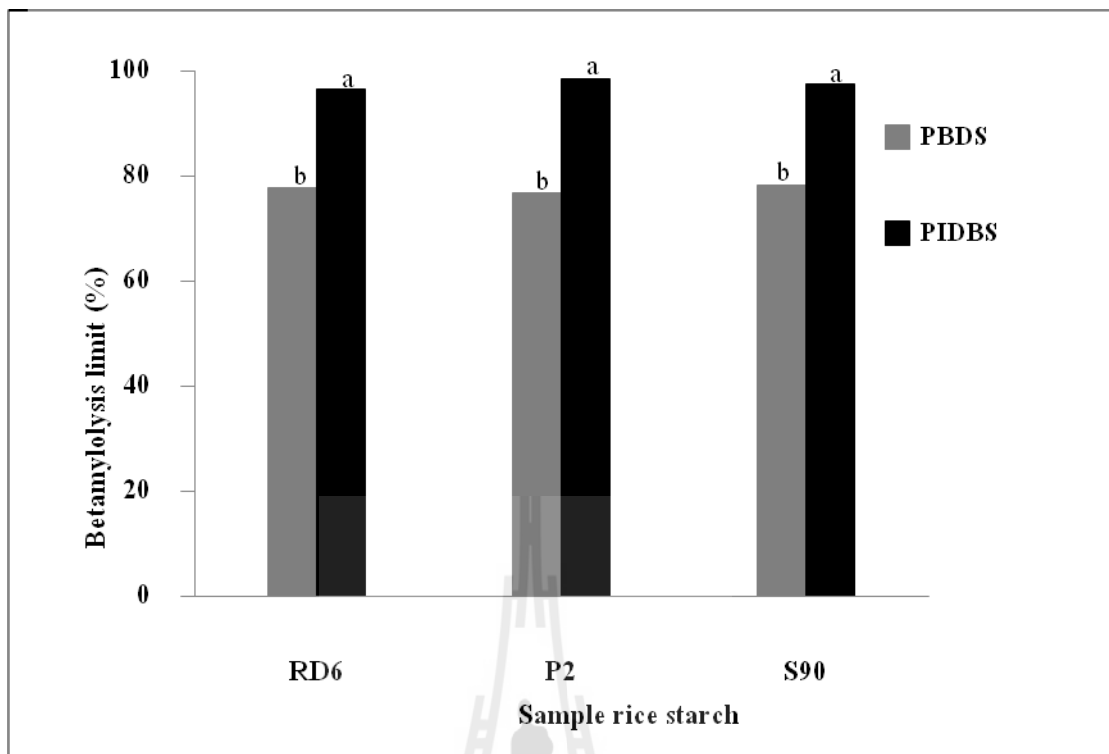
เนื่องจากเอนไซม์จึงเข้าไปในโครงสร้างได้น้อยจึงส่งผลให้มีระดับการย่อยต่ำกว่าพันธุ์ S90 และ P2 ตามลำดับ

ในขณะที่ทั้ง S90 และ P2 มีโครงสร้างแตกต่างกันเล็กน้อย (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.1) แต่มีระดับการย่อยที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับผลของระดับการตัดกิ่ง



ภาพที่ 4.3 ระดับการย่อยของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PDBS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

เนื่องจากการทดลองได้ศึกษาการเปรียบเทียบระดับการตัดกิ่งของเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่ม ดังนั้น เพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มมีความเป็นโมเลกุลเส้นตรง มากน้อยแค่ไหน จึงศึกษา β -amylolysis limit โดยค่า β -amylolysis limit คือ ปริมาณของมอลโทส (Maltose) หลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าอะมิเลส (β -amylase) เนื่องจากเอนไซม์เบต้าอะมิเลส เป็น exo-enzyme ที่ย่อยพันธะ α -1,4-glucosidic linkage ของสตาร์ชจากตำแหน่ง non-reducing end ครั้งละ 2 โมเลกุลกลูโคส (Kenedy et al., 1987; Saha and Zeikus, 1989) ดังนั้นพอลิเมอร์ของ กลูโคสที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงเพียงอย่างเดียวควรมีค่า β -amylolysis limit เท่ากับร้อยละ 100 เนื่องจากไม่มีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านทำให้เอนไซม์เบต้าอะมิเลสสามารถย่อยได้ทั้งหมด



ภาพที่ 4.4 ค่า β -amylolysis limit ของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PBDS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90 : อักษรที่แตกต่างกันบนกราฟ หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากภาพที่ 4.4 พบว่าเมื่อทำการย่อย PIDBS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างสตาร์ชทั้ง 3 สายพันธุ์คือ RD6, P2 และ S90 มีค่า β -amylolysis limit มากกว่า 90% ในขณะที่ PBDS ที่ระยะเวลาย่อยเท่ากันให้ค่า β -amylolysis limit ประมาณ 80% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสเกิดการย่อยได้มากกว่าการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสตัวเดียว เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถตัดกิ่งก้านที่พันธะ α -1,6-glycosidic linkage ได้เช่นเดียวกัน (Hizukuri et al., 2006) แต่เอนไซม์พุลลูลานเนสมีลักษณะการตัดกิ่งโดยตัดกิ่งจากภายนอกเข้ามาข้างในอย่างช้า ในขณะที่เอนไซม์ไอโซอะมิเลสสามารถตัดกิ่งทั้งภายในและภายนอกได้พร้อม ๆ กัน (Manners and Matheson, 1981) ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เดียวกันการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสสามารถตัดกิ่งได้มากกว่าการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสตัวเดียว ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์เบต้าอะมิเลสสามารถย่อยโมเลกุลเหล่านี้เป็นมอลโทสได้มากขึ้น ส่งผลให้ค่า β -amylolysis limit สูงกว่าการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสเพียงตัวเดียว

4.5 ผลของโครงสร้างสตาร์ชข้าวต่อปริมาณ RS

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 พบว่าการตัดกิ่งสตาร์ชด้วยเอนไซม์ทำให้ปริมาณ RS เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง (Native starch) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง Gonzalez-Soto et al. (2004) ที่ทำการย่อยสตาร์ชกล้วยด้วยเอนไซม์ pullulanase ที่ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกันและพบว่าสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการย่อยมีปริมาณ RS เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยยาวนานขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เนื่องจากเมื่อเกิดการตัดกิ่งของสตาร์ชมากขึ้นทำให้เกิดเพิ่มขึ้นของโมเลกุลสายสั้น ๆ ที่สามารถเกิดการรีโทรเกรทจัดเรียงตัวกันอย่างแข็งแรงและทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้มากกว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านกระบวนการตัดกิ่ง แต่เมื่อระยะเวลาในการย่อยมากกว่า 5 ชั่วโมงปริมาณ RS ไม่มีความแตกต่างกัน

หลังทำการตัดแปรสตาร์ชข้าวด้วยวิธีการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ RS ของตัวอย่าง Retrograded pullulanase debranched starch (RPDS) และ Retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch (RPIDS) แสดงผลดังตารางที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่า RPIDS ให้ปริมาณ RS สูงกว่า RPDS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งในข้าวพันธุ์ RD6, P2 และ S90 โดย RPIDS ของข้าวทั้งสามพันธุ์มีปริมาณ RS เท่ากับ 18.73, 43.44 และ 42.09 ตามลำดับ ในขณะที่ RPDS ให้ปริมาณ RS เพียง 12.01, 23.85 และ 22.65 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสัมพันธ์กับค่าระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อย เนื่องจากการใช้เอนไซม์ pullulanase ร่วมกับเอนไซม์ isoamylase พบว่ามีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยสูงกว่า ดังนั้นจึงเกิดเส้นตรงสายสั้น ๆ จำนวนมาก (Barry, 1986; Gonzalez-Soto et al., 2004; Leong, Karim and Norziah, 2007) ซึ่งโมเลกุลสายสั้นที่เกิดขึ้นจากกระบวนการตัดกิ่งสามารถจับตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างเกลียวม้วนคู่ (double helices) (Gidley, 1987) และจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่มีความเป็นระเบียบและแข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ทำให้ปริมาณ RS สูงกว่าสตาร์ชข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ pullulanase ตัวเดียวที่มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยต่ำกว่า

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าว พบว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 มีปริมาณ RS ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ P2 และพันธุ์ S90 ทั้ง RPDS และ RPIDS เนื่องจากข้าวพันธุ์ RD6 จัดอยู่ในกลุ่ม waxy rice ซึ่งไม่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ดังนั้นจึงเกิดการรีโทรเกรทได้น้อยกว่าสตาร์ชพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลส อย่างไรก็ตามปริมาณ RS ที่เกิดจากการรีโทรเกรทของอะมิโลเพคตินสามารถเพิ่มขึ้นได้ เมื่อมีการตัดกิ่งของอะมิโลเพคตินด้วยเอนไซม์ ตัดกิ่ง (Thompson, 2000) โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ native starch พบว่าสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชันมีปริมาณ RS สูงกว่า สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และพันธุ์ S90 มีปริมาณ RS ไม่แตกต่างกันทั้งในส่วนของ RPDS และ RPIDS ถึงแม้ว่าสตาร์ชทั้งสองชนิดจะมี

ปริมาณอะมิโลสที่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากพันธุ์ P2 มีสัดส่วนของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (Super long chain) มากกว่าพันธุ์ S90 ดังนั้นหลังจากการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ทำให้สายโซ่ที่มีขนาดยาวถูกปลดปล่อยออกมาและเกิดการจับตัวกันเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณ RS สูงเท่ากับพันธุ์ S90 ซึ่งเหตุผลดังกล่าวจะถูกศึกษาเพื่อยืนยันผลการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.4 ปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase debranched starch : RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch : RPIDS ที่เกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	Resistant content (%)		
	Native starch	RPDS	RPIDS
RD6	4.00±0.31 ^{aA}	12.01±0.54 ^{bA}	18.73±0.03 ^{cA}
P2	6.06±0.21 ^{aB}	23.85±0.13 ^{bB}	43.44±0.14 ^{cB}
S90	6.23±0.04 ^{aB}	22.65±0.02 ^{bB}	42.09±0.57 ^{cB}

หมายเหตุ : อักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
อักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.6 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชตัดกิ่ง

ผลการตรวจสอบลักษณะ โครงสร้างผลึกของสตาร์ชด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) ของสตาร์ชทั้ง 3 พันธุ์ที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง (Native starch) และหลังทำการตัดแปรสตาร์ชข้าวด้วยวิธีการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.5 พบว่า X-diffraction pattern ของ native starch ปรากฏพีกคู่ (Double peak) ที่ 2θ ที่ 17° และ 18° และพีกเดี่ยวที่ (Single peak) 2θ ที่ 15° และ 23° ซึ่งแสดงลักษณะโครงสร้างแบบ A-type ที่เป็นรูปแบบผลึกที่พบได้ทั่วไปในสตาร์ชจากธัญพืช (Cheetham and Tao, 1998) นอกจากนี้ยังเกิดพีกเดี่ยวที่ 2θ ที่ 19.7° ที่ถือเป็นตำแหน่งของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไขมัน (Amylose lipid complex) (Derycke et al., 2005) ซึ่งแสดงโครงสร้าง

ผลึกแบบ V_h -type อีกด้วย เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างไม่มีขั้นตอนของการกำจัดไขมันจึงทำให้ไขมันที่มีอยู่ในตัวอย่างสตาร์ชสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอะมิโลสได้ และค่าปริมาณผลึกแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบผลึกของ native starch และ retrograded pullulanase debranched starch : RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starchb : RPIDS ที่เกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	Relative crystallinity (%)	Crystal pattern
RD6 native starch	18.61±0.40 ^{cd}	A+V _h
P2 native starch	16.295±0.40 ^d	A+V _h
S90 native starch	18.665±0.21 ^{cd}	A+V _h
RD6-RPDS	20.10±0.55 ^b	B+V _h
P2-RPDS	20.79±1.11 ^b	B+V _h
S90-RPDS	20.96±0.06 ^b	B+V _h
RD6-RPIDS	27.08±0.07 ^a	B+V _h
P2-RPIDS	27.20±0.11 ^a	B+V _h
S90-RPIDS	28.96±0.06 ^a	B+V _h

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ในขณะที่สตาร์ชที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งและรีโทรเกรททั้ง RPDS และ RPIDS ปรากฏ single peak ที่ 2θ ที่ 5° และ 17° พร้อมทั้งพบ double peak ที่ 22° และ 24° ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างผลึกแบบ B-type (Buleon et al., 1998) นอกจากนี้ยังเกิดพีคเดี่ยวที่ 2θ ที่ 19.7° ที่ถือเป็นตำแหน่งของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไขมัน (Amylose lipid complex) (Derycke et al., 2005) ซึ่งแสดงโครงสร้างผลึกแบบ V_h -type จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวส่งผลทำให้โครงสร้างผลึกของสตาร์ชเปลี่ยนจาก A เป็น B-type เนื่องจากสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์และทำให้เกิดกระบวนการรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นโครงสร้างของเกลียวม้วนคู่ (Double helices) จึงจัดเรียงตัวกันในรูปแบบโครงสร้างหกเหลี่ยม (Hexagonal) ที่ต้องการพลังงานเพียงเล็กน้อยในการเกิดโครงสร้างผลึก (Eerlingen, Crombez and Delcour, 1993) และอุณหภูมิต่ำยังเพิ่มปริมาณผลึกอีกด้วย เนื่องจากอัตราการเกิดผลึก (Crystal nucleation) และจะมี

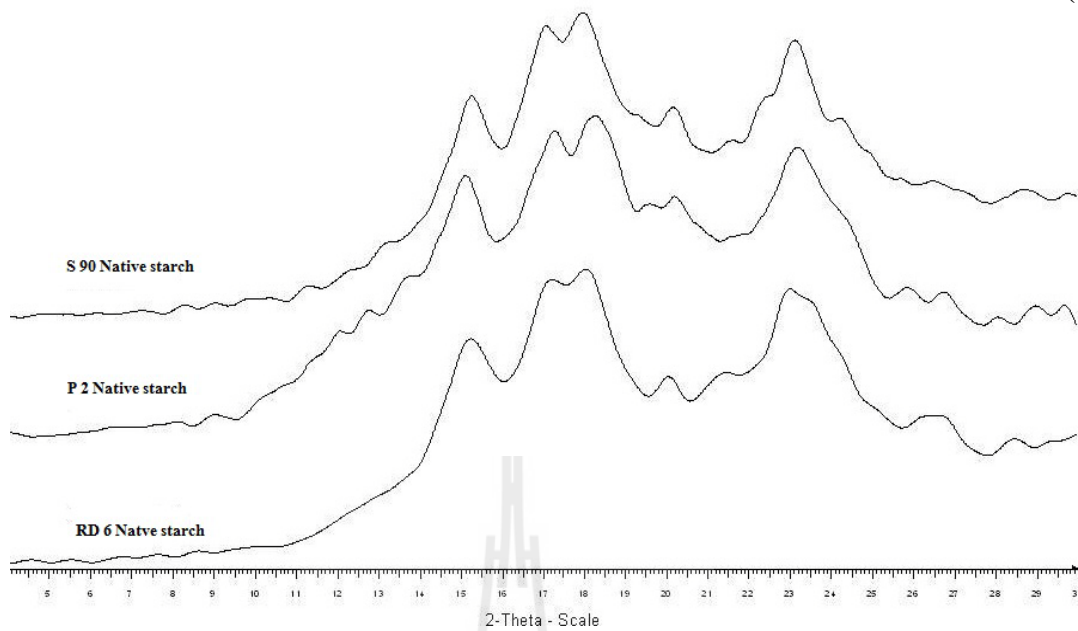
ค่าสูงสุดเมื่อเข้าใกล้ glass transition temperature , T_g ดังนั้นอุณหภูมิรีโทรเกรทที่ 4°C ช่วยสนับสนุนการเกิดผลึกและทำให้เกิดโครงสร้างผลึกของ RS เป็น B-type ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Miao et al. (2009) ที่ทำการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว (Waxy maize starch) ด้วย เอนไซม์พอลลูทานาสมิผลทำให้โครงสร้างผลึกเปลี่ยนจาก A เป็น B เช่นกัน

ปริมาณความเป็นผลึก (Relative crystallinity) ของสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งและรีโทรเกรทมีค่ามากกว่า native starch เนื่องจากเมื่อทำการตัดกิ่งโมเลกุลสายสั้นที่ถูกปลดปล่อยออกมาสามารถจัดเรียงตัวกันใหม่กลายเป็นผลึกที่มีความแข็งแรง นอกจากนี้ Gunaratne and Hoover (2002) ยังได้อธิบายว่าค่า relative crystallinity ในสตาร์ชแต่ละชนิดยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย ได้แก่ ขนาดของผลึก, การจัดเรียงตัวเกลียวคู่ในบริเวณผลึก, ค่าเฉลี่ยของความยาวของสายอะมิโลเพคติน และ สัดส่วนของอะมิโลเพคตินสายสั้น DP 10-13 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cai and Shi (2010) พบว่าสตาร์ชมันฝรั่งที่ผ่านการตัดกิ่งและบ่มที่อุณหภูมิค่าปรากฏพิคเดี่ยวที่ 2θ ที่ 5° และพิคคู่ที่ 2θ ที่ 22° และ 24° ชัดเจนกว่าสตาร์ชข้าวสาลีและข้าวโพด แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชมันฝรั่งที่มี สัดส่วนของโมเลกุลสายยาวมากกว่าสามารถเกิดโครงสร้างผลึกได้เร็วกว่าโมเลกุลสายสั้น ในขณะที่ปริมาณความเป็นผลึกแสดงดังตารางที่ 4.5 พบว่าสตาร์ชที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งและรีโทรเกรท ทั้ง RPDS และ RPIDS มีปริมาณความเป็นผลึกสูงกว่า native starch ในขณะที่ปริมาณความเป็นผลึกของ RPIDS สูงกว่า RPDS เนื่องจาก RPIDS มีค่าระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยสูง ดังนั้นจึงเกิดโมเลกุลสายตรงจำนวนมาก (Barry, 1986; Gonzalez-Soto et al., 2004) ซึ่งโมเลกุลสายสั้นที่เกิดขึ้นจากกระบวนการตัดกิ่งสามารถจับตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างเกลียวม้วนคู่ และจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผลึกที่มีความเป็นระเบียบและแข็งแรง ส่งผลให้ปริมาณความเป็นผลึกที่มากกว่าซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ RS ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 4.4)

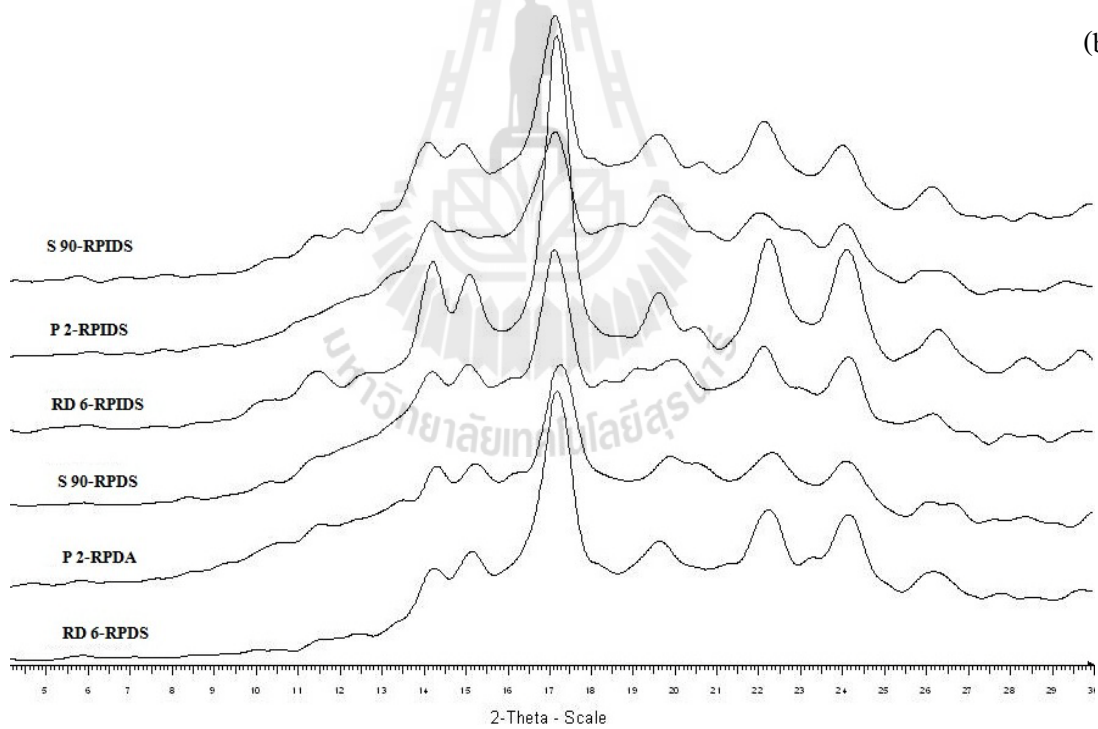
4.7 คุณสมบัติทางความร้อน

ผลการศึกษาสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชทั้ง 3 ของ native starch และสตาร์ชข้าวหลังทำการตัดแปรด้วยวิธีการตัดกิ่งตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 4.6 จากการวิเคราะห์ให้ค่าอุณหภูมิเริ่มต้นเกิดเจลาติไนเซชัน (T_0) อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาติไนเซชัน (T_p) อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลาติไนเซชัน (T_c) ช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลาติไนเซชัน ($T_c - T_0$) และพลังงานในการเกิดเจลาติไนเซชัน (ΔH) แสดงในตารางที่ 4.6 โดย native starch ทั้งสามพันธุ์มี T_0 ระหว่าง $55.31-58.47^{\circ}\text{C}$ ซึ่งไม่แตกต่างจากสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชันทั้ง RPDS และ RPIDS ซึ่งมี T_0

(a)



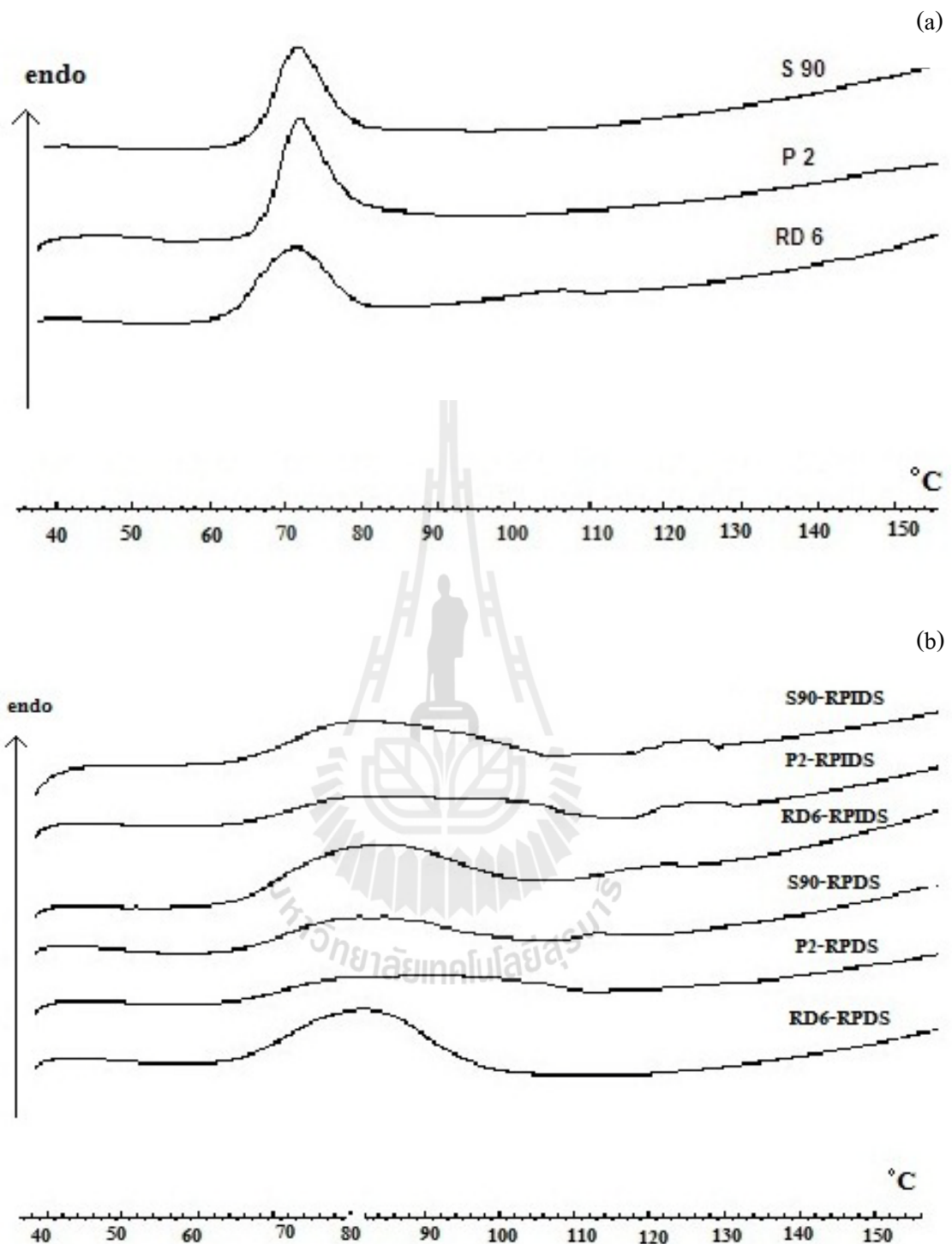
(b)



ภาพที่ 4.5 ลักษณะ โครงสร้างผลึกของ native starch (a) และ retrograded pullulanase debranched starch : RPDS) และ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch : RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

อยู่ระหว่าง $54.46-57.38^{\circ}\text{C}$ โดยตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชันมีค่า T_0 ต่ำนั้น เนื่องจากหลังผ่านกระบวนการตัดกิ่งซึ่งโมเลกุลสายสั้นที่เกิดเป็นจำนวนมากถูกกระตุ้นให้เกิดผลึกที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ผลึกที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์แข็งแรง (Sivert and Lausanne, 1993). ดังนั้นจึงส่งผลให้ T_0 มีค่าต่ำ และเมื่อพิจารณาช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลลาติไนเซชัน (T_c-T_0) พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชันมีค่า T_c-T_0 สูงกว่า native starch เนื่องจากขนาดที่หลายหลายของสายโมเลกุลกลูแคนที่เกิดจากกระบวนการตัดกิ่งเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกที่มีความไม่สมบูรณ์ และเกิดความไม่เป็นหนึ่งเดียวกันของโครงสร้างผลึก (Heterogeneous crystalline) (Zhang and Jin, 2011) ดังนั้นจึงมีผลทำให้เกิดเอนโดเทอมที่กว้าง และมีช่วงอุณหภูมิในการให้ความร้อนสูงกว่าเมื่อเทียบกับ native starch

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง RPDS และ RPIDS ของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ พบว่าเฉพาะ RPIDS เท่านั้นที่พบการเปลี่ยนแปลงขั้นที่สอง (Second transition) โดยมี T_0 ระหว่าง $111.15-117.47^{\circ}\text{C}$ ซึ่งเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (Amylose-lipid complex) (Sivert and Holm 1993) ทำให้โครงสร้างของสตาร์ชมีความแข็งแรงยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมละลายมีค่าสูง เนื่องจากในกระบวนการเตรียมตัวอย่างไม่มีขั้นตอนกำจัดไขมัน ดังนั้นในระบบตัวอย่างจึงมีไขมันปะปนอยู่ ซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลของอะมิโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังกระบวนการตัดกิ่งได้ ซึ่งจากผลการทดลองภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์พุลลูแลนสรว่มกับไอโซอะมิเลสมีระดับการตัดกิ่งสูงกว่าการใช้เอนไซม์พุลลูแลนสเพียงอย่างเดียว ทำให้โมเลกุลอะมิโลสและอะมิโลเพคตินถูกปลดปล่อยจากโครงสร้างได้มากกว่าจึงส่งผลให้สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไขมันได้และแสดงการเปลี่ยนแปลงเอนโดเทอมที่สองในขณะที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใน RPDS ซึ่งสอดคล้องกับผลของ XRD ในภาพที่ 4.5 (b) ในตัวอย่าง RPIDS พบพีคที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 19.7° ได้ชัดเจนกว่าใน RPDS นอกจากนี้พบว่าเมื่อ RPIDS มีระดับการตัดกิ่งสูง เป็นผลทำให้สัดส่วนสายยาวของอะมิโลเพคตินถูกตัดและปลดปล่อยโมเลกุลสายตรงออกมา และสามารถเกิดการจับตัวระหว่างโมเลกุลสายยาวของอะมิโลเพคตินด้วยตัวเองได้ จึงทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง มีความคงทนต่อความร้อนสูงจึงเกิด Second transition ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Cai and Shi (2010) พบว่าสายยาวของสายโซ่อะมิโลเพคตินของสตาร์ชมันฝรั่งที่ผ่านการตัดกิ่งและบ่มที่อุณหภูมิต่ำแสดงค่า T_0 อยู่ที่ 116°C ซึ่งมากกว่าของข้าวสาลีและข้าวโพดที่มี T_0 อยู่ที่ 99.7 และ 99.9 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลสายยาวของสตาร์ชมันฝรั่งสามารถเกิดโครงสร้าง เกลียวม้วนคู่ (Double helix) ได้แข็งแรงกว่าโมเลกุลสายสั้นของข้าวสาลีและข้าวโพด เช่นเดียวกับ Moates et al. (1997) ที่พบว่าอุณหภูมิของผลึกอะมิโลสสายสั้นจะเพิ่มขึ้นจาก 57 ถึง 119°C เมื่อขนาดของสายโมเลกุลเพิ่มขึ้นจาก 12 ถึง 55 หน่วยกลูโคส

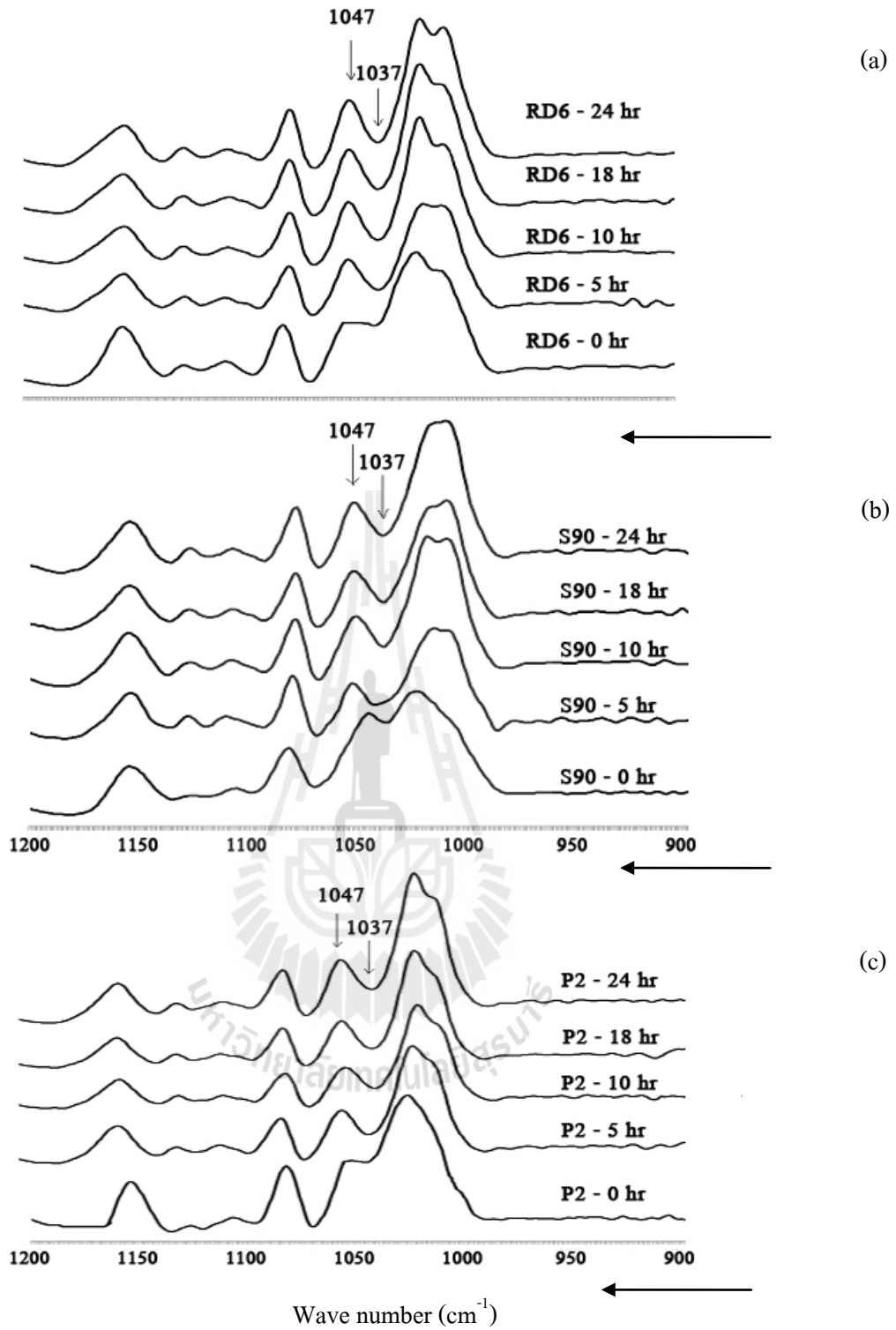


ภาพที่ 4.6 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน (a) native starch และ (b) retrograded pullulanase debranched starch : RPDS) และ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch : RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

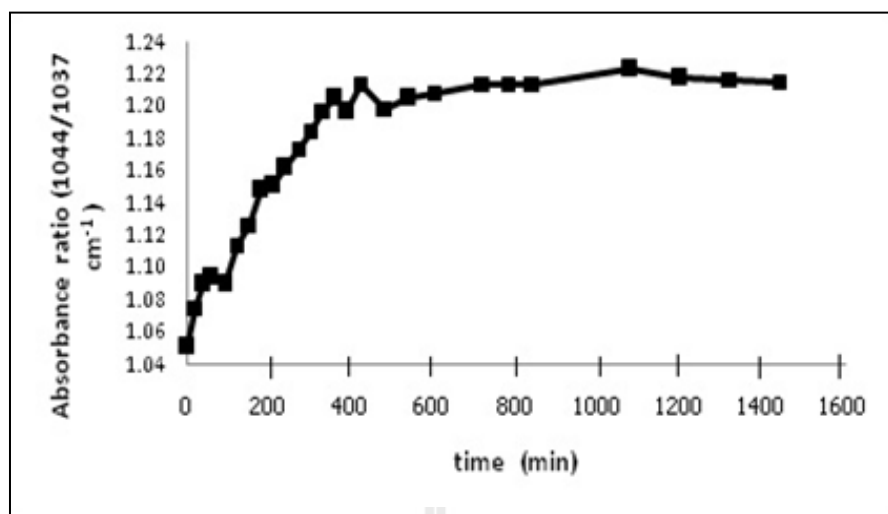
เมื่อทำการพิจารณาผลของโครงสร้างสตา์ซข้าวแต่ละพันธุ์พบว่า P2 มีค่า T_o , T_p , T_c และ (ΔH) สูงกว่า S90 และ RD6 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างของ P2 (ตารางที่ 4.3) มีสัดส่วนของโมเลกุลสายยาวที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไขมันและสามารถเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลสายยาวด้วยกันเองได้มากกว่า S90 และ RD6 นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวพันธุ์ P2 ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลสมีช่วง T_c-T_o สูงกว่าข้าวพันธุ์ P2 ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสอย่างเดียวและ native starch (แสดงในตารางที่ 4.6) ทั้งนี้เนื่องจากหลังจากสตา์ซข้าวพันธุ์ P2 ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลส ซึ่งมีระดับการตัดกิ่งสูง ทำให้เกิดการกระจายตัวของสายโมเลกุลกลูแคนในขนาดที่หลายหลาย และสตา์ซข้าวพันธุ์ P2 มีปริมาณของโมเลกุลสายยาวสูง จึงส่งผลทำให้มีช่วง T_c-T_o ที่กว้างกว่าตัวอย่างสตา์ซทั้งสองพันธุ์อีกด้วย

4.8 การติดตามจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชัน

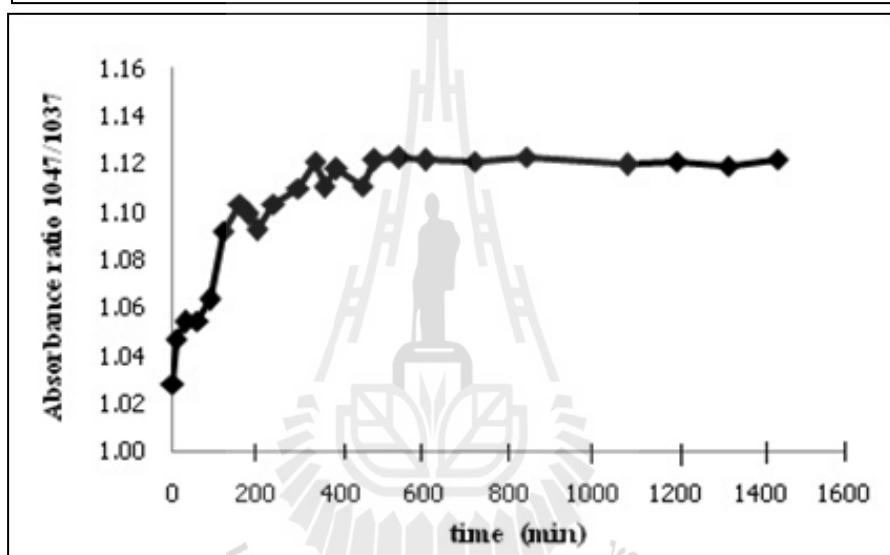
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตา์ซข้าวที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลส โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลระดับโครงสร้างระยะสั้น (short-range molecular order) ด้วย Attenuated Total Reflectance Fourier Transforms Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) ซึ่งเป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณสายเกลียวคู่ต่อออสันฐาน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงพิคการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่วัดการยืด (Stretching) ของหมู่ C-C กับ C-O และการงอ (Bending) ของหมู่ COH ในช่วงจำนวนคลื่น (Wave number) $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$ (Cael et al., 1975) โดยพิคการดูดกลืนแสงที่ 1047 cm^{-1} และ 1037 cm^{-1} ที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน ดังนั้นจึงทำการติดตามอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตา์ซที่ทำกรย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากในกระบวนการย่อยทำให้เกิดโมเลกุลสายสั้นเป็นจำนวนมากและในขั้นตอนการย่อยใช้อุณหภูมิสูง อีกทั้งยังมีขั้นตอนการเขย่า ทำให้โมเลกุลสายสั้นเกิดการเคลื่อนที่ตลอดเวลา จึงไม่สามารถจัดเรียงตัวกันได้ แต่เมื่อระยะเวลาย่อยที่ 22 ชั่วโมง พบว่าพิคการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1047 cm^{-1} มีค่าเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากโมเลกุลบางส่วนสามารถจับตัวกันและเกิดการจัดเรียงตัวได้ หลังจากสตา์ซข้าวผ่านการตัดกิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิต่ำคือ 4°C โดยได้ทำการตรวจวัดอัตราการเกิดผลึกด้วยเครื่อง FTIR ตลอดระยะเวลาบ่ม พบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่ม



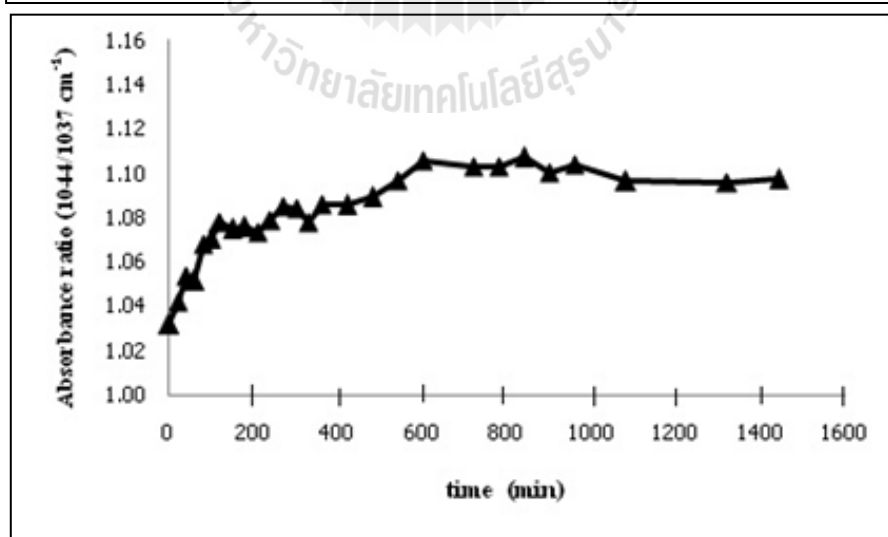
ภาพที่ 4.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FTIR ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยพุลูลู ลานร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C 24 ชั่วโมงที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของ สตาร์ชทั้งสามพันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90



(a)



(b)



(c)

ภาพที่ 4.8 ค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ของสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งด้วย พูลูลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชทั้งสาม พันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90 ที่เวลาต่าง ๆ

เพิ่มขึ้น พิกการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1047 cm^{-1} มีค่าสูงขึ้น แสดงดังภาพที่ 4.7 ซึ่งแสดงถึงการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช เมื่อพิจารณาค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ที่ระยะเวลาบ่มต่าง ๆ ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ (ภาพที่ 4.8) พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง โดยช่วงแรกของการเกิดรีโทรเกรเดชันเป็นช่วงที่มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาการบ่ม 4 ชั่วโมง โดยเป็นผลเนื่องมาจากโมเลกุลอะมิโลส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นจึงสามารถเคลื่อนที่เข้ามาจัดเรียงตัวกันใหม่ได้ง่าย โดยเหนี่ยวนำให้เกิดโครงสร้างสามมิติของเจลสตาร์ช (Goodfellow and Wilson, 1990; Van Soet, 1994; Hoover, 2001) จากนั้นช่วงที่ 2 เป็นช่วงที่ค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยจะเกิดในช่วงระยะเวลาในการบ่มที่ 5-12 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสตาร์ชที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งในช่วงนี้เกิดจากการจัดเรียงตัวของสายโมเลกุลอะมิโลเพคตินที่โมเลกุลมีสายยาวเคลื่อนที่เข้ามาจัดเรียงตัวกันใหม่ โดยการเปลี่ยนแปลงในช่วงนี้ยังช่วยให้ผลึกเกิดการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่สมบูรณ์และแข็งแรงขึ้น (Goodfellow and Wilson, 1990; Van Soet, 1994; Hoover, 2001) และช่วงสุดท้าย เป็นช่วงที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหรือเป็นช่วงที่การเกิดรีโทรเกรเดชันเข้าสู่สมดุล เมื่อระยะเวลาในการบ่มมากกว่า 12 ชั่วโมงซึ่งถือเป็นช่วงที่โครงสร้างผลึกเกิดการจัดเรียงตัวอย่างสมบูรณ์ (Hoover, 2001)

สำหรับอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชสามารถทำนายได้ โดยใช้สมการของ Avrami (Avrami, 1941) ซึ่งเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ที่สามารถทำนายอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ขึ้นกับเวลาการบ่มได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง exponentially linear (n) กับ เวลา (Farhat, Blanshard and Mitchell, 2000; Farhat and Blanshard, 2001)

$$\theta = \frac{E_L - E_t}{E_L - E_0} = \text{Exp}(-kt^n)$$

เมื่อ θ เป็นจำนวนของผลึกที่ได้จากการทดสอบด้วยเครื่อง FTIR, E_0 และ E_L เป็นค่าของผลึกที่ระยะเวลาเริ่มต้น และที่ระยะเวลาที่ผลึกเกิดขึ้นมากที่สุดหรือคงที่ตามลำดับ, E_t เป็นค่าของผลึกที่เวลาใด ๆ, k เป็นค่าอัตราคงที่ (time^{-1}), และ n เป็นค่า Avrami exponent ซึ่งจากสมการที่ 1 สามารถแปลงเป็นสมการที่ 2 เพื่อคำนวณหาอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันได้ โดยการหาอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันขึ้นกับระยะเวลาการเก็บ สามารถคำนวณจากสมการที่ 2 โดยค่า n หรือ Avrami exponent ได้จากความชันของกราฟระหว่าง $\log [-\ln (E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ กับค่า $\log t$ และสามารถหาค่า k ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของตัวอย่างสตาร์ช โดยถ้าค่า k มีค่ามาก

นั่นหมายถึงอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่ามาก ซึ่งค่า k คำนวณได้จากค่า $\log k$ ($\log k$ คือ จุดตัดของสมการที่ 2)

$$\log \left[-\ln \frac{E_L - E_t}{E_L - E_\infty} \right] = \log k + n \log t \quad (2)$$

$$Y = C + mX$$

ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.9 และตารางที่ 4.7 พบว่าเมื่อทำการพล็อตกราฟตามสมการของ Avrami (สมการที่ 2) ได้เป็นสมการเส้นตรงที่มีค่า r^2 อยู่ในช่วง 0.872-0.939 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า exponentially linear มีความสัมพันธ์กับเวลา (Koo et al., 2005) โดยค่า Avrami exponent (n) มีค่าใกล้เคียง 1.0 ซึ่งโดยทั่วไปเป็นที่ยอมรับว่า ค่า หรือ Avrami exponent สามารถอธิบายลักษณะของการตกผลึก โดยที่ค่า n ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 1-4 ซึ่งจะสอดคล้องกับกระบวนการเกิดผลึก (nucleation) และการโต (growth) ของผลึก (Martins and Silva, 2000; Labuza, 1982) ค่า Avrami exponent ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2, S90 และ RD6 ให้ค่า n เท่ากับ 0.727 0.735 และ 1.127 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1.0 ซึ่งแสดงถึง กระบวนการรีโทรเกรเดชัน โดยเริ่มจากเกิดกระบวนการจุดกำเนิดผลึก (nucleation) ตามด้วยการโตของผลึก แบบ Rod (rod-like growth) ที่สภาวะดังกล่าว เช่นเดียวกับผลการทดลอง Kim (1976) ที่รายงานว่าสตาร์ชข้าวสาลีในขนมปัง และ waxy และ non-waxy rice starch แสดง retrogradation kinetics โดยเกิดกระบวนการเกิดผลึก (nucleation) ตามด้วย rod-like growth ของผลึก

ตารางที่ 4.7 ค่า Avrami exponent (n) และ rate constant (k) ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วย เอนไซม์พอลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	n	$\log k$ (min)	k
RD6	1.127 ^a	-2.534 ^c	2.924 x 10 ^{-3 c}
P2	0.727 ^b	-1.516 ^a	3.047 x 10 ^{-2 a}
S90	0.735 ^b	-1.898 ^b	1.264 x 10 ^{-2 b}

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p < 0.05$)

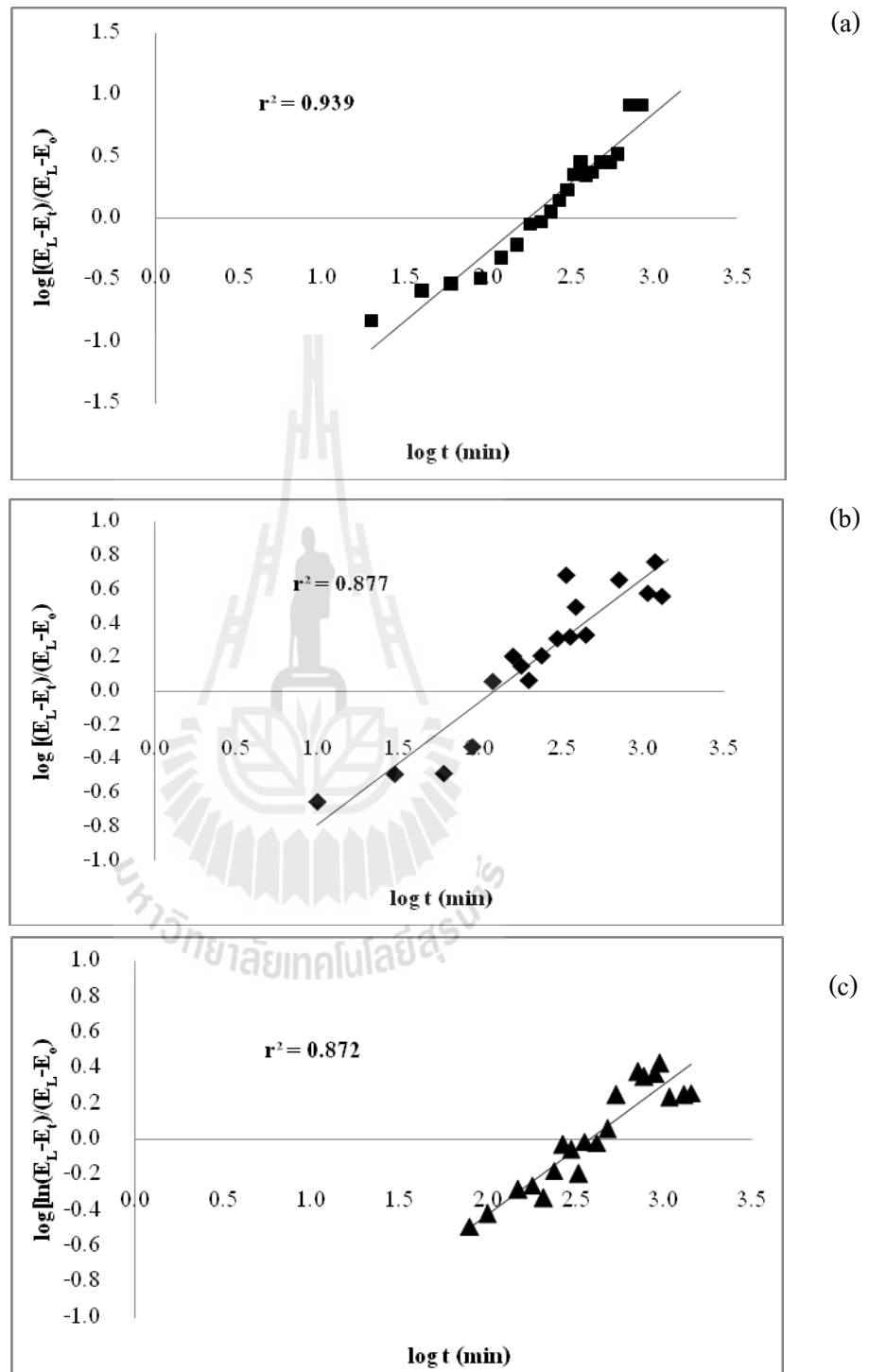
สำหรับค่า k (rate constant) สามารถคำนวณได้จากค่า $\log k$ ซึ่งเป็นจุดตัดของกราฟภาพที่ 4.9 และแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าค่า k ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีค่าสูงกว่า S90 และพันธุ์ RD6 ตามลำดับ เนื่องจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และ S90 มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งอะมิโลสสามารถเหนี่ยวนำการจัดเรียงตัวกันในกระบวนการรีโทรเกรเดชันได้ ดังที่ Van Soest et al. (1994) รายงานว่าสตาร์ชมันสำปะหลังมีอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันได้เร็วกว่าสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว เนื่องจากสตาร์ชมันสำปะหลังมีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถจัดเรียงโครงสร้างและแสดงพฤติกรรมเป็นนิวเคลียสของผลึกทำให้สามารถเกิดการรีโทรเกรเดชันและเกิดผลึกได้เร็วกว่าสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียวซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณ RS ในตารางที่ 4.4. ที่พบว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และ S90 มีปริมาณ RS สูงกว่า พันธุ์ RD6 นอกจากนี้พบว่าข้าวพันธุ์ P2 มีอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันได้เร็วที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลจากข้าวพันธุ์ P2 มีสัดส่วนของโมเลกุลสายยาวกว่าพันธุ์ S90 (ดังตารางที่ 4.3) ดังนั้นหลังกระบวนการตัดกิ่งโมเลกุลเส้นตรงสายยาวจึงมีส่วนช่วยให้โมเลกุลสายสั้นสามารถจับตัวกันและเกิดกระบวนการ nucleation ตามด้วย rod-like growth เกิดเป็นโครงสร้างผลึกได้ง่ายขึ้น เนื่องจากโมเลกุลสายยาวเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลสายสั้น จึงมีทำให้เกิดการจัดเรียงตัวได้ง่ายขึ้นและเหนี่ยวนำให้โมเลกุลสายสั้นจัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างผลึกได้เร็วกว่าสตาร์ชข้าวที่มีสัดส่วนของโมเลกุลสายยาวน้อยกว่าและมีโมเลกุลสายสั้นสูงกว่า (S90 และ RD6) ซึ่งเมื่อทำการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์แล้วทำให้มีจำนวนของโมเลกุลสายสั้นมากขึ้น ซึ่งสามารถเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วทำให้โอกาสที่โมเลกุลสามารถจับตัวกันและจัดเรียงตัวกันน้อยลง ส่งผลให้อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันเกิดได้ช้ากว่าข้าวที่มีสัดส่วนสายยาวสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jane et al. (1999) พบว่าสตาร์ชที่มีสัดส่วนของ B1 และ B2 สูงสามารถเกิดโครงสร้างผลึกได้เร็วและโครงสร้างผลึกที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์สูง

4.9 ผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินต่อการเกิด RS_3

4.9.1 การเตรียมสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

เนื่องจากวัตถุประสงค์ที่สองในครั้งนี เพื่อศึกษาโครงสร้างอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวแต่ละชนิดที่มีผลต่อการเกิดและคุณสมบัติต่าง ๆ ของ RS_3 ดังนั้นในส่วนแรกของการศึกษาจึงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและสามารถกำจัดอะมิโลสออกไปให้ได้มากที่สุด ซึ่งปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างถูกวัดด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีน โดยข้างต้นของวัตถุประสงค์ต้องการกำจัดอะมิโลสออกไปให้ได้มากที่สุดโดยที่โครงสร้างของสตาร์ชถูกทำลายน้อยที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดลองกำจัดอะมิโลสที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชันเพื่อให้โครงสร้างของสตาร์ชวมและแอมูลของสตาร์ชไม่แตกตัว แต่เนื่องจาก โครงสร้างสตาร์ชไม่แตกตัว ปริมาณอะมิโลสที่หลุดออกมาค่อนข้างต่ำ (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงทำการศึกษาที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน โดยศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดอะมิโลส 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการให้ความร้อน โดยทำการ

ทดลองหาสภาวะที่ใช้ในการกำจัดอะมิโลส ที่ระดับความความร้อน 80 และ 90°C และระยะเวลาในการให้ความร้อนที่ระดับ 10, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อหาระดับของตัวแปรเบื้องต้น



ภาพที่ 4.9 กราฟของ $\log [-\ln(E_L - E_t)/(E_L - E_0)]$ ต่อ $\log t$ ตามสมการ Avrami ของสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยพอลิกลูทานนร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่ 4°C 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90

โดยติดตามปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้าง (Leaching)

ผลการทดลองดังตารางที่ 4.8 พบว่าระดับความร้อนที่ 90°C มีปริมาณอะมิโลสหลงเหลืออยู่ในตัวอย่างต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 80°C และเมื่อระยะเวลาที่ให้ความร้อนเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างมีค่าต่ำกว่าที่ระยะเวลาสั้น ๆ แต่เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนยาวนานขึ้นมีผลทำให้อะมิโลส และอะมิโลเพคตินสูญเสียโครงสร้างมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากผลของการให้ความร้อนที่ยาวนานร่วมกันพลังงานกลที่ใช้ในการกวนตัวอย่าง มีผลทำให้โมเลกุลอะมิโลเพคตินถูกตัดให้สั้นลงไปด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสภาวะในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาทีในการกำจัดอะมิโลสออกจากตัวอย่างสตาร์ช เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง โครงสร้างของสตาร์ชเกิดการแตกตัวได้ดีทำให้อะมิโลสที่อยู่ภายในโครงสร้างหลุดออกมาจึงสามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างได้มากขึ้น ในขณะที่อะมิโลเพคตินไม่สูญเสียโครงสร้างมากนักเนื่องจากให้ความร้อนในระยะเวลาที่สั้น

จากตารางที่ 4.8 พบว่าตัวอย่างข้าวพันธุ์ S90 ที่ผ่านการกำจัดอะมิโลสยังคงมีปริมาณอะมิโลสค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการกำจัดอะมิโลส หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้ว ตัวอย่างถูกนำไปแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 1500g เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งโมเลกุลของอะมิโลสบางส่วนอาจตกตะกอนไปพร้อม ๆ กับอะมิโลเพคติน จึงทำให้ปริมาณอะมิโลสในตัวอย่างมีค่าสูง ดังนั้นในขั้นตอนต่อมาของการศึกษาได้ทำการล้างตะกอนตัวอย่างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดอะมิโลสที่อาจหลงเหลืออยู่ในตะกอน จากผลการทดลองตารางที่ 4.9 พบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการล้าง โดยที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 ปริมาณอะมิโลสลดลงมาก ซึ่งหลังจากทำการล้างตะกอนครบ 3 ครั้ง พบว่าปริมาณอะมิโลสเหลืออยู่ในตัวอย่างเพียงร้อยละ 7.07 เมื่อเทียบกับเริ่มต้นและเมื่อทำการล้างตะกอนมากขึ้น (4-5 ครั้ง) พบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลือไม่เปลี่ยนแปลง (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนเป็นจำนวน 3 ครั้งสามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างของสตาร์ชข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 ได้เป็นอย่างดี

ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 พบว่าหลังทำการให้ความร้อนและทำการล้างตะกอน ปริมาณอะมิโลสลดลงไม่มากนัก (40.24%) เมื่อเทียบกับปริมาณอะมิโลสเริ่มต้น เนื่องจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 หลังจากให้ความร้อนแล้วพบว่ามีค่าความหนืดสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างอะมิโลเพคตินที่มีสายโซ่ขนาดยาวมากเป็นองค์ประกอบ (Super long chain) ซึ่งกึ่งกันของอะมิโลเพคตินที่มีความยาวมาก สามารถพันเกลียวกับไขมันได้เช่นเดียวกับอะมิโลส รวมทั้งการเกิดอันตักิริยาด้วยกันเองของสายกึ่ง ส่งผลทำให้แกรนูลของเมล็ดสตาร์ชมีความแข็งแรง ดังนั้นเมล็ดสตาร์ชจึงมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ลดลง (รุ่งนภาและคณะ 2546) เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายสตาร์ชจึงทำให้เมล็ดสตาร์ชเกิดการแตกตัวได้น้อย อะมิโลสจึงยังคงอยู่ในโครงสร้างสตาร์ช สำหรับ

สตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ปริมาณอะมิโลสหลงเหลือไม่แตกต่างกันเนื่องจากในโครงสร้างไม่มีอะมิโลสเป็นส่วนประกอบ

ตารางที่ 4.8 ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) ของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90

Sample	Temperature (°C)	Time (minutes)	Remained amylose (%)
RD6	80	10	1.01±0.03
		30	0.98±0.01
		60	0.99±0.00
		120	0.97±0.04
	90	10	0.98±0.01
		30	0.97±0.01
		60	0.99±0.02
		120	0.90±0.01
P2	80	10	86.47±0.00
		30	84.21±0.00
		60	80.48±0.03
		120	80.01±0.01
	90	10	60.14±0.02
		30	58.46±0.02
		60	57.67±0.03
		120	55.84±0.01
S90	80	10	72.46±0.02
		30	70.45±0.03
		60	70.01±0.02
		120	68.75±0.02
	90	10	40.57±0.01
		30	39.62±0.00
		60	37.88±0.01
		120	37.13±0.03

ตารางที่ 4.9 ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) ร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90

Sample	Remained Amylose (%)		
	Washing time		
	1	2	3
RD6	0.97±0.04 ^a	0.95±0.02 ^a	0.95±0.08 ^a
P2	50.72±0.02 ^a	44.79±0.12 ^b	40.24±0.09 ^c
S90	31.21±0.10 ^a	17.73±0.06 ^b	7.07±0.03 ^c

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เนื่องจากขั้นตอนการให้ความร้อนที่ 90°C เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการล้างตะกอน ไม่สามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างของสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 ได้ ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปของการศึกษาได้ทำการประยุกต์วิธีการกำจัดอะมิโลส โดยการใช้สารละลายต่างเพื่อช่วยให้โครงสร้างของสตาร์ชเกิดการแพร่กระจายตัวได้มากขึ้น (Yu and Rollings, 1987) โดยเริ่มจากการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายต่างที่เหมาะสมและยังคงอุณหภูมิและระยะเวลาในการกำจัดเช่นเดิม (ความร้อนที่ 90°C เป็นเวลา 10 นาที) ระดับความเข้มข้นของต่างที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในช่วง 0.005–1 โมลาร์ และทำการล้างตะกอนด้วยน้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.10 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่างที่ 0.005 โมลาร์ ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลือในตัวอย่างค่อนข้างสูง เนื่องจากความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปทำให้โครงสร้างของสตาร์ชเปิดตัวได้น้อยอะมิโลสจึงหลุดออกมาได้เพียงบางส่วน และเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายต่างเป็น 0.01 โมลาร์ พบว่าปริมาณอะมิโลสในตัวอย่างลดลงจำนวนมาก เนื่องจากสารละลายต่างเพียงพอต่อการเปิดโครงสร้างของสตาร์ชอะมิโลสจึงหลุดออกมาและถูกกำจัดออกไปได้มากขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการล้างตะกอน แต่พบว่าเมื่อทำการล้างตะกอนมากขึ้น (4-5 ครั้ง) ปริมาณอะมิโลสไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (ไม่แสดงข้อมูล) ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายต่างเป็น 0.35 และ 0.5 โมลาร์ พบว่าปริมาณอะมิโลสที่กำจัดได้มีค่าลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายต่างที่มากขึ้นมีผลทำให้โครงสร้างของสตาร์ชบางส่วนละลายปะปนอยู่กับสารละลายต่าง และยากแก่การแยกตะกอน หลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งจะพบว่ามีส่วนที่เป็นของเหลวอยู่บนตะกอนสตาร์ชที่ไม่สามารถแยกออกได้ จึงส่งผลให้ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างมีค่าสูง สำหรับที่ความเข้มข้นต่างเท่ากับ 1 โมลาร์ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากโครงสร้างของสตาร์ชละลายอยู่ใน

สารละลายต่างจันไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (Bennow, Bay-Smith, and Bauer, 2001; Kennedy et.al., 1992) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดอะมิโลสในสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 คือ การใช้สารละลายต่างที่ความเข้มข้นที่ 0.01 โมลาร์ ที่ความร้อน อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการล้างตะกอนเป็นจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าปริมาณอะมิโลสที่เหลืออยู่ในตัวอย่างร้อยละ 16.09 เมื่อเทียบกับปริมาณอะมิโลสเริ่มต้นในตัวอย่างสตาร์ช

ตารางที่ 4.10 ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 หลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) โดยใช้สารละลายต่างร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน

Sample	Concentration of NaOH (M)	Washing precipitate time	Remained amylose (%)
P2	0.005	1	38.15±0.10
		2	36.29±0.04
		3	33.07±0.01
	0.01	1	18.41±0.13
		2	19.36±0.03
		3	16.09±0.02
	0.35	1	23.20±0.06
		2	20.96±0.04
		3	19.24±0.06
	0.5	1	24.96±0.04
		2	23.34±0.04
		3	22.15±0.05

เนื่องจากปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่าง (Remained amylose) ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนจึงทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าเกินความเป็นจริง เนื่องจากถูกรบกวนจาก โมเลกุลอะมิโลเพคติน ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีที่มีความจำเพาะมากขึ้น คือ วิธีการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Con A ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.11 โดยพบว่า RD6, P2 และ S90 มีปริมาณอะมิโลสเท่ากับ 5.01, 10.12 และ 5.17 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนใน กรณีที่สตาร์ชข้าวมีโมเลกุลที่เป็นสารประกอบขนาดกลาง (Intermediate) จะทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้สูง เนื่องจากสารประกอบขนาดกลางบางส่วนอาจไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วย Con A (รุ่งนภา และคณะ, 2546)

ดังนั้นในการศึกษาคั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีที่จำเพาะเจาะจงต่อปริมาณอะมิโลสอีกวิธีหนึ่งคือวิธีการวิเคราะห์อะมิโลสด้วยวิธีทาง Differential Scanning Calorimeter ซึ่งปริมาณอะมิโลสสามารถคำนวณได้จากค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (Melting enthalpy) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (Amylose lipid complex) โดยเทียบกับสมการกราฟมาตรฐานของอัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.10 โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.164x - 0.243$ ($r^2 = 0.987$) ซึ่งปริมาณอะมิโลส ของทั้งสตาร์ชข้าวพันธุ P2 ที่ปราศจากอะมิโลส (P2-free amylose or P2-FAM) และสตาร์ชข้าวพันธุ S90 ที่ปราศจากอะมิโลส (S90-free amylose or S90-FAM) คำนวณจากสมการ $\text{Amylose (\%)} = \Delta H + 0.243 / 0.164$ เมื่อ ΔH หมายถึงค่า melting enthalpy (J/g) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (Amylose lipid complex) ที่ทำการวัดระหว่างการให้ความร้อนอีกครั้ง (Reheating) ภายในเครื่อง DSC ค่าปริมาณอะมิโลสของแสดงดังตารางที่ 4.11 พบว่าเมื่อทำการวัดด้วยวิธีทาง DSC ปริมาณอะมิโลสของ P2-FAM และ S90-FAM มีค่าเท่ากับ 7.85 และ 4.93 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณอะมิโลสเริ่มต้นพบว่าสามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างได้ถึง 82 และ 80% สำหรับ P2-FAM และ S90-FAM ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเพียงพอต่อวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 4.11 ปริมาณอะมิโลสหลังทำการกำจัดอะมิโลส (Leaching amylose)

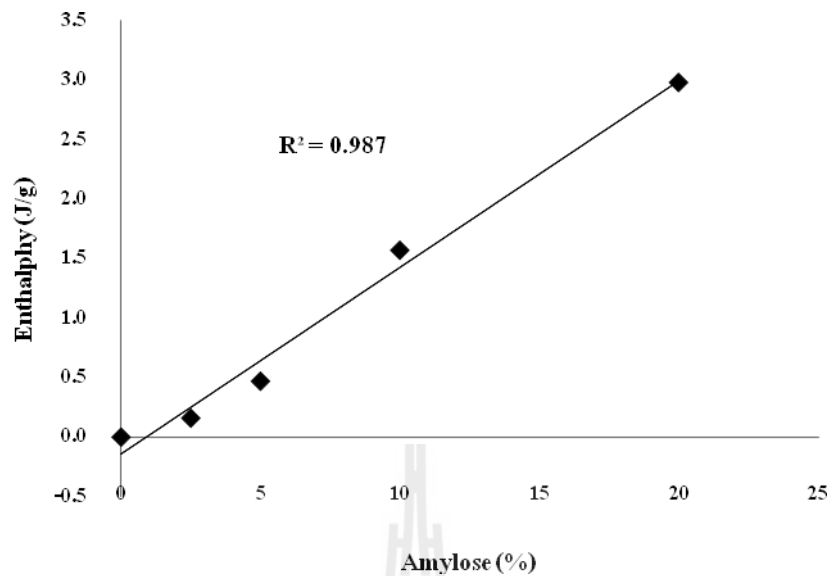
Sample	Amylose content (%)	
	Con A ^x	DSC ^y
RD6-FAM	5.01±0.03 ^a	4.71±0.08 ^b
P2-FAM	10.12±0.02 ^a	7.85±0.30 ^b
S90-FAM	5.17±0.02 ^a	4.93±0.30 ^b

หมายเหตุ :^x วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยชุดวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสหลังจากทำการ

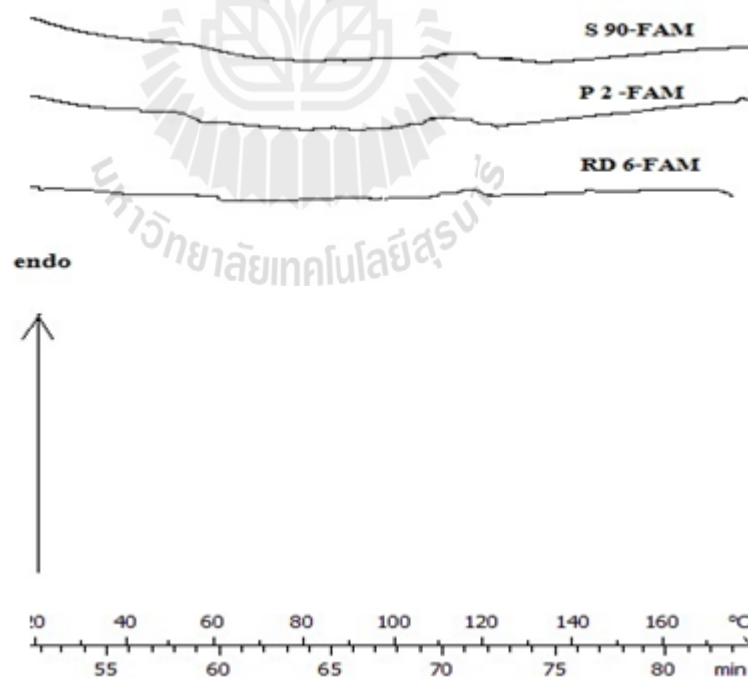
ตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Concanavalin A (Con A)(Amylose/amylopectin assay kit, Megazyme)

^y วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีทาง Differential Scanning Calorimeter ซึ่งปริมาณอะมิโลสคำนวณจากค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (melting enthalpy) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (amylose lipid complex)

อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.10 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่ขึ้นกับค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (melting enthalpies) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน



ภาพที่ 4.11 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาคีโนเซนชัน ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) กับไขมัน LPC ของสตาร์ชข้างทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

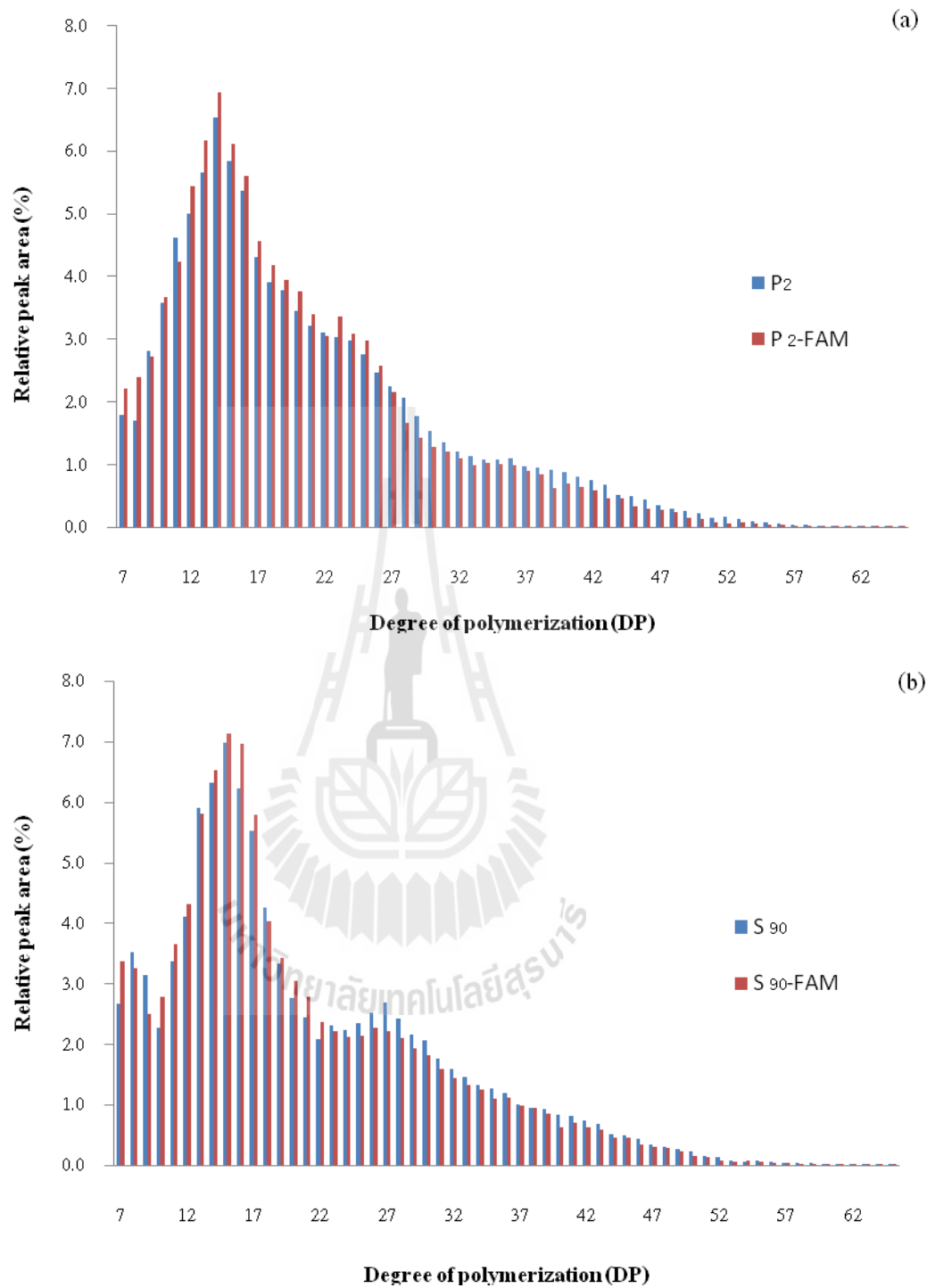
4.9.2 โครงสร้าง กระจายตัวของความยาวกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

จากการวิเคราะห์ debranched starch ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลสและผ่านการย่อยด้วย *Pseudomonas isoamylase* และทำการแยกขนาดด้วย Ion Exchange Chromatography ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 4.12 พบว่าความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) มีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ native starch ซึ่งแสดงในภาพที่ 4.12 พบว่าหลังทำการกำจัดอะมิโลสตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น P2-FAM มีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 สูงและมีการกระจายตัวอยู่ในช่วง DP \geq 37 ลดลง เมื่อเทียบกับ P2 (native starch) เช่นเดียวกับ S90-FAM ที่มีการกระจายตัวส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 สูงและการกระจายตัวในช่วง DP \geq 37 ต่ำกว่า เมื่อเทียบกับ S90 (native starch) แสดงให้เห็นว่าวิธีการกำจัดอะมิโลสมีผลทำให้โมเลกุลสายยาว (DP \geq 37) บางส่วนถูกตัดให้สั้น

ตารางที่ 4.12 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM)

Sample	Branch chain length distribution of amylopectin (%) distribution			
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP \geq 37
P2 Native starch	19.53	51.21	19.87	9.60
S90 Native starch	19.11	50.43	22.86	9.51
P2-FAM	20.71	54.22	18.48	7.37
S90-FAM	19.89	52.24	20.38	8.31

เนื่องจากตัวอย่างทั้งสองมีวิธีการกำจัดอะมิโลสด้วยขั้นตอนที่แตกต่างกัน เพื่อให้มั่นใจว่าทั้งสองกระบวนการมีผลต่อโครงสร้างของสตาร์ชแตกต่างกันหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองกำจัด อะมิโลส ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ด้วยน้ำ (H₂O) เช่นเดียวกับวิธีการสกัดอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 และใช้ NaOH เข้มข้น 0.01 โมลาร์ ซึ่งเป็นวิธีเดียวกันกับสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และทำการตรวจวัดความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) โดยผ่านการย่อยด้วย *Pseudomonas isoamylase* และทำการแยกขนาดด้วย Ion Exchange Chromatography ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.13 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ native starch พบว่าโครงสร้างของข้าวพันธุ์ RD6 ที่กำจัดอะมิโลสด้วยน้ำ (RD6-free amylose with H₂O :



ภาพที่ 4.12 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ของสตาร์ช (a) ข้าวพันธุ์ P2 และ (b) S90

RD6-FAM-H₂O) และข้าวพันธ์ RD6 ที่กำจัดอะมิโลสด้วย NaOH (RD6-free amylose with NaOH : RD6-FAM-NaOH) มีรูปแบบความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน แตกต่างจากจาก native starch โดยมีการกระจายตัวส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 สูง และมีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP \geq 37 ลดลง แต่การกระจายตัวในช่วง DP 6-12 และ DP 13-24 มีค่าเพิ่มขึ้น (แสดงในตารางที่ 4.13) เนื่องจากในกระบวนการกำจัดอะมิโลสมีการใช้ความร้อนร่วมกับการกวน ซึ่งมีผลทำให้โมเลกุลสายยาวของอะมิโลเพคตินถูกตัดให้สั้นลง ส่งผลให้ค่าการกระจายตัวในช่วง DP \geq 37 ลดลง แต่การกระจายตัวในช่วง DP 6-12 และ DP 13-24 มีค่าสูงขึ้น

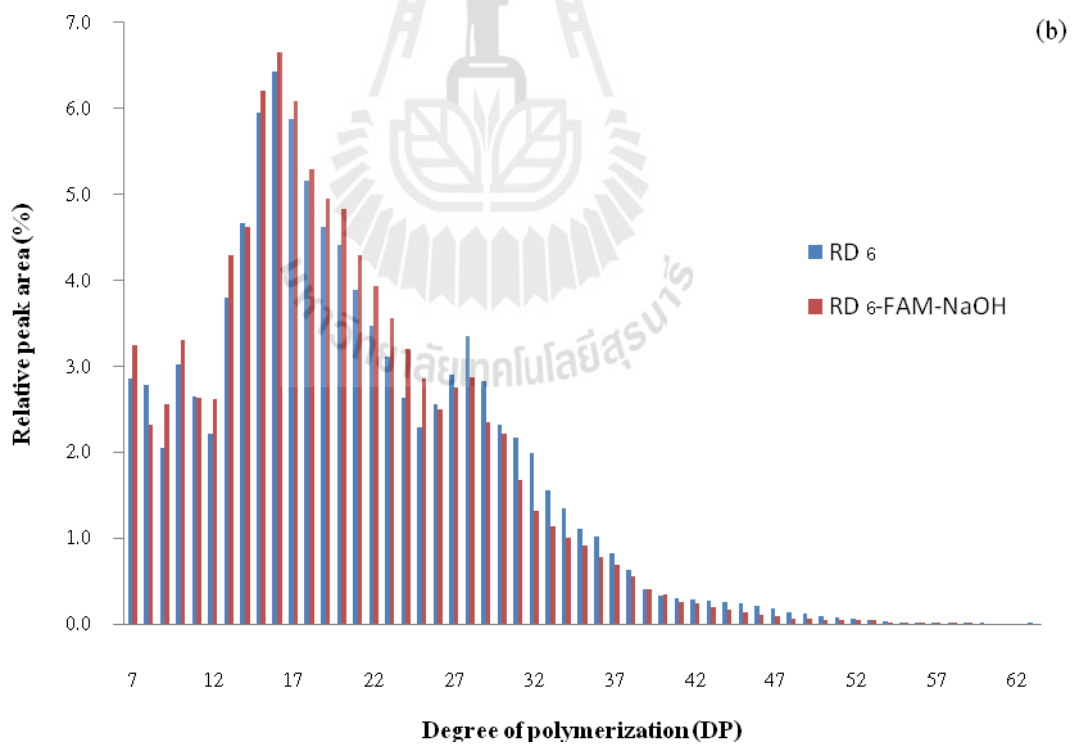
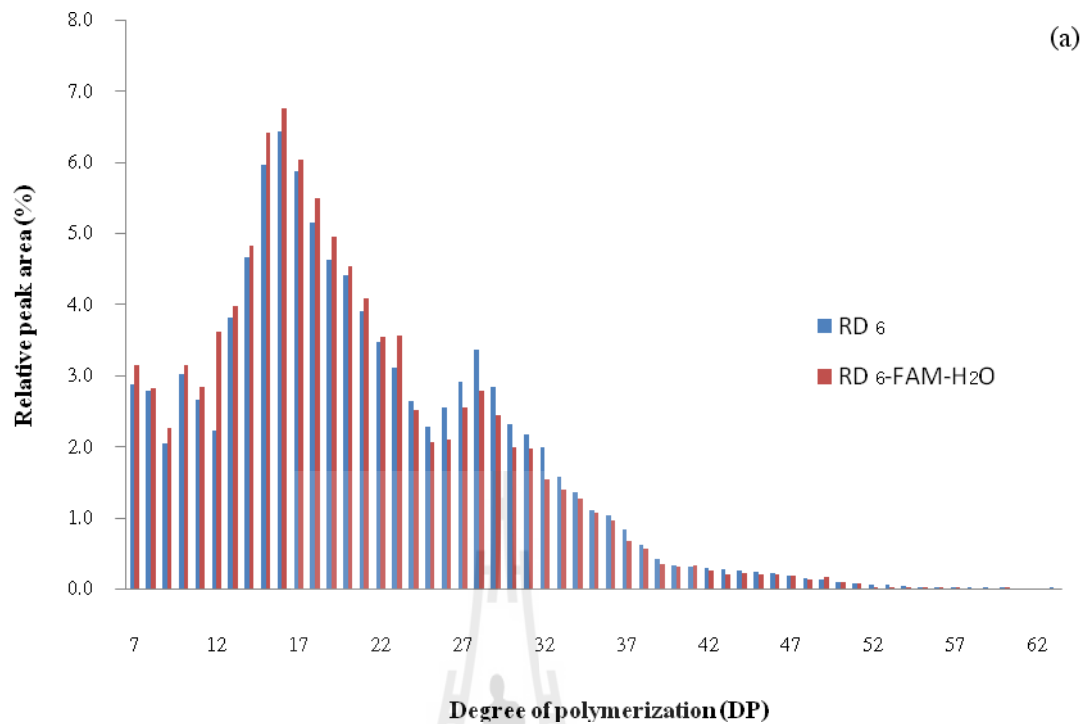
เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างสารละลายที่ใช้ในกระบวนการสกัดพบว่าการใช้สารละลายต่างเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ทำให้โมเลกุลสายยาวถูกตัดให้สั้นลงมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้น้ำ โดยพิจารณาจากค่าการกระจายตัวในช่วง DP \geq 37 ของข้าวพันธ์ RD6 พบว่า RD6-FAM-NaOH มีค่าน้อยกว่า RD6-FAM-H₂O ซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก (3.81 และ 4.42 ตามลำดับ) เนื่องจากสารละลายต่างมีความสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจน ส่งผลให้โครงสร้างสตาร์ชไม่แข็งแรงและเมื่อได้รับความร้อนร่วมกับแรงเฉือนจากการกวนทำให้พันธะ 1-4 linkage ถูกทำลายได้ จึงมีผลให้สัดส่วนการกระจายตัวในช่วง DP \geq 37 ลดลง

ตารางที่ 4.13 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธ์ RD6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ด้วยน้ำ และ NaOH

Sample	Branch chain length distribution of amylopectin (% distribution)			
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP \geq 37
RD6-Native	15.62	54.07	25.52	4.84
RD6-FAM-H ₂ O	17.84	56.70	22.20	4.24
RD6-FAM-NaOH	16.70	58.01	22.56	3.81

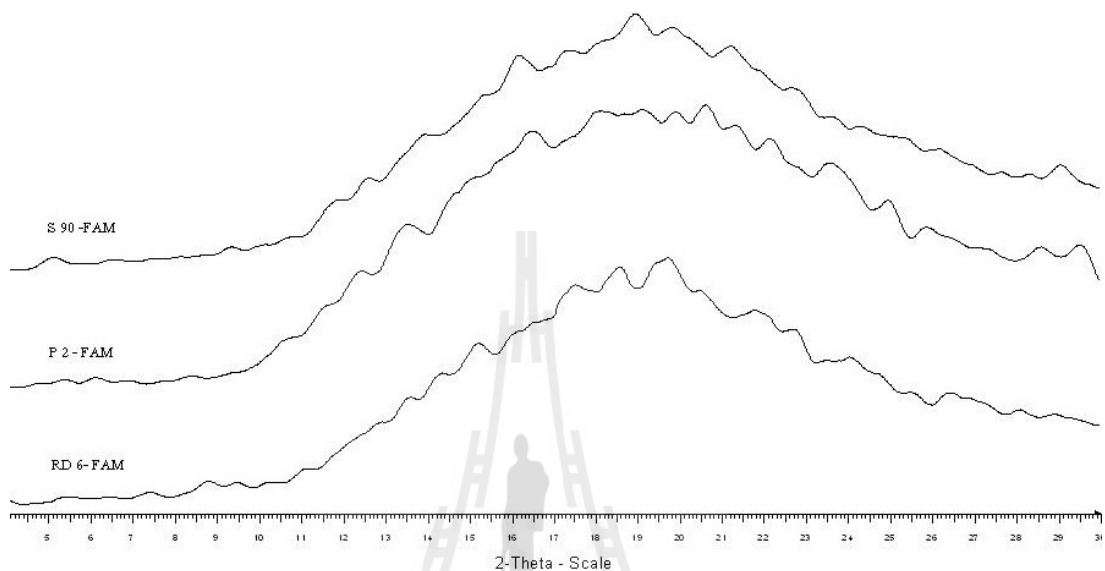
4.9.3 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

ภาพที่ 4.14 แสดงผลการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชหลังทำการกำจัดอะมิโลส ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) พบว่า X-diffraction pattern ของสตาร์ชทั้งสามชนิดที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ไม่แสดงโครงสร้างทางผลึก เนื่องจากในขั้นตอนของการกำจัดอะมิโลสโครงสร้างในส่วนที่เป็นผลึกถูกทำลายด้วยความร้อนและพลังงานกลที่ใช้ในการกวนตัวอย่าง ดังนั้น X-diffraction pattern จึงแสดงโครงสร้างอสัณฐาน (amorphous) และมีส่วนของผลึก

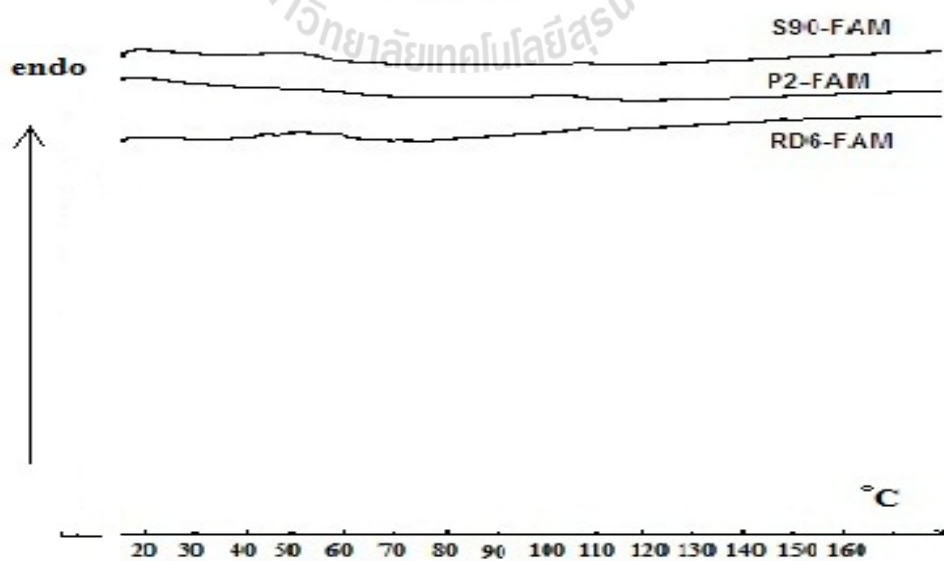


ภาพที่ 4.13 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ช RD6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ด้วย (a) น้ำ และ (b) NaOH

เหลืออยู่เล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง DSC และโครงสร้างของสตาร์ชเปลี่ยนจาก A เป็น B-type นอกจากนี้ยังปรากฏพีกเดี่ยวที่ 2θ ที่ 19.7° เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างอะมิโลสและไขมัน ซึ่งแสดง โครงสร้างแบบ V_h -type



ภาพที่ 4.14 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พินูโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)



ภาพที่ 4.15 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน สตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

4.9.4 คุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

หลังจากที่สตาร์ชผ่านการกำจัดอะมิโลส ได้ทำการศึกษาสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter แสดงในภาพที่ 4.15 โดยค่า T_o , T_p , T_c , (T_c-T_o) และ ΔH แสดงในตารางที่ 4.14 ซึ่งพบว่าหลังผ่านการกำจัดอะมิโลสสตาร์ชทั้งสามพันธุ์มีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลว (T_m) ระหว่าง 52.61-66.23°C และมี ΔH อยู่ระหว่าง 4.01-4.76 (J/g) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสตาร์ชเริ่มต้น (native starch) พบว่ามี T_m อยู่ในช่วงอุณหภูมิเดียวกัน แต่สตาร์ชที่ผ่านการกำจัดอะมิโลสมีค่า ΔH น้อยกว่า เนื่องจากโครงสร้างส่วนผลึกของสตาร์ชบางส่วนถูกทำลายในขั้นตอนการกำจัดอะมิโลสจึงมีผลทำให้โครงสร้างไม่แข็งแรง การใช้พลังงานในการเกิดเจลาติในเซชันต่ำกว่า native starch ซึ่งสอดคล้องกับผล XRD ที่แสดงโครงสร้างผลึกต่ำ

ตารางที่ 4.14 สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	T_c-T_o (°C)	ΔH (J/g)
RD6-FAM	62.33	58.10	67.66	5.33	4.12
P2-FAM	55.19	58.34	68.13	12.94	4.01
S90-FAM	52.61	58.78	66.23	13.62	4.76

4.9.5 ปริมาณ RS คุณสมบัติทางผลึกและคุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

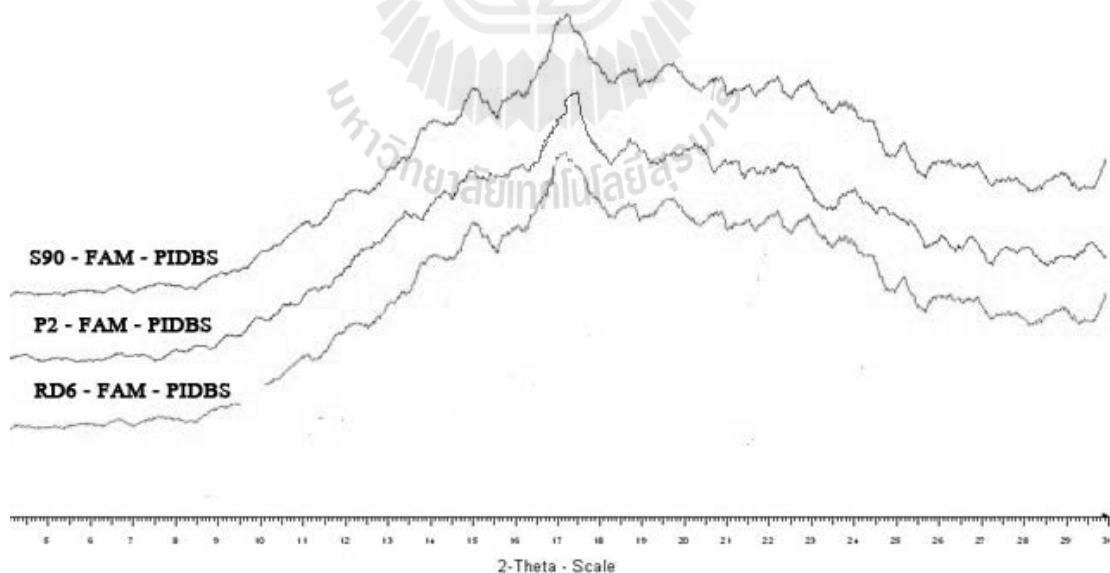
สตาร์ชปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) หลังผ่านกระบวนการกำจัดอะมิโลสที่อุณหภูมิ 90°C ร่วมกับการล้างตะกอน ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลูนาเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณ RS แสดงดังตารางที่ 4.15 พบว่า RD6-FAM มีปริมาณ RS ต่ำกว่า S90-FAM และ P2-FAM ตามลำดับ เนื่องจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ไม่มีสัดส่วนของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และพันธุ์ S90 มีโครงสร้างที่เป็น super long chain จึงเป็นผลทำให้สตาร์ชทั้งสองพันธุ์มีปริมาณ RS สูงกว่าข้าวพันธุ์ RD6 และเมื่อทำการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลูนาเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) ทำให้ super long chain ถูกตัดและถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้างและเกิดการจับตัวกันเป็นโครงสร้างที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีปริมาณ RS สูงกว่าพันธุ์ S90 ถึงแม้ว่าสตาร์ชทั้งสองชนิดจะ

มี super long chain เช่นเดียวกันแต่มีในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีสัดส่วน super long chain มากกว่าพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (ตารางที่ 4.15) ดังนั้นหลังจากการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ สายโซ่ที่มีขนาดยาวถูกปลดปล่อยออกมาและเกิดการจับตัวกันเป็นโครงสร้างที่แข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณ RS มากกว่า ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของ อะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ RS

ตารางที่ 4.15 ปริมาณ RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) และตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	Resistant content (%)
RD6-FAM	10.35±0.13 ^c
P2-FAM	14.42±0.23 ^a
S90-FAM	12.05±0.19 ^b

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.16 ลักษณะ โครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

สำหรับลักษณะโครงสร้างทางผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) หลังถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.16 ซึ่งพบ single / double peak ที่ตำแหน่ง 2 θ ที่ 17° 22° และ 24° แสดงถึงโครงสร้างผลึกแบบ B-type (Buleon et al., 1998) นอกจากนี้ยังปรากฏพีกเดี่ยวที่ 2 θ ที่ 19.7° เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างอะมิโลสและไขมัน ซึ่งแสดงโครงสร้างแบบ V_h-type อีกด้วย ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวด้วยเอนไซม์และบ่มที่อุณหภูมิต่ำส่งผลทำให้โครงสร้างผลึกของสตาร์ชเปลี่ยนเป็น B-type (Eerlingen et al., 1993) เมื่อพิจารณาปริมาณความเป็นผลึกที่แสดงในตารางที่ 4.16 พบว่าหลังทำการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรท ปริมาณผลึกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ผ่านการกำจัดอะมิโลสที่ยังไม่ผ่านกระบวนการตัดกิ่ง (Native-free amylose starch) ทั้งนี้ตัวอย่างในตารางที่ 4.16 นั้น โครงสร้างกิ่งก้านของอะมิโลเพคตินที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์และกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างผลึกด้วยการรีโทรเกรทที่อุณหภูมิต่ำทำให้โมเลกุลของสายกลูแคนสามารถเคลื่อนที่และเกิดการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผลึกได้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวพบว่าปริมาณผลึกที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากหลังถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์โครงสร้างกิ่งก้านของอะมิโลเพคตินจึงเกิดเป็นกลูแคนสายตรงที่สามารถจัดเรียงตัวเกิดเป็นโครงสร้างผลึกได้เมื่อทำการรีโทรเกรท และผลจากการกำจัดอะมิโลสทำให้ส่วนของสายยาว (Long chain) และ super long chain ของสตาร์ชข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และสุพรรณบุรี 90 ถูกตัดให้สั้นลง เป็นผลทำให้ปริมาณความเป็นผลึกไม่แตกต่างจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD 6 นอกจากนี้พบว่าปริมาณความเป็นผลึกไม่ขึ้นกับปริมาณ RS เช่นเดียวกับผลการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว

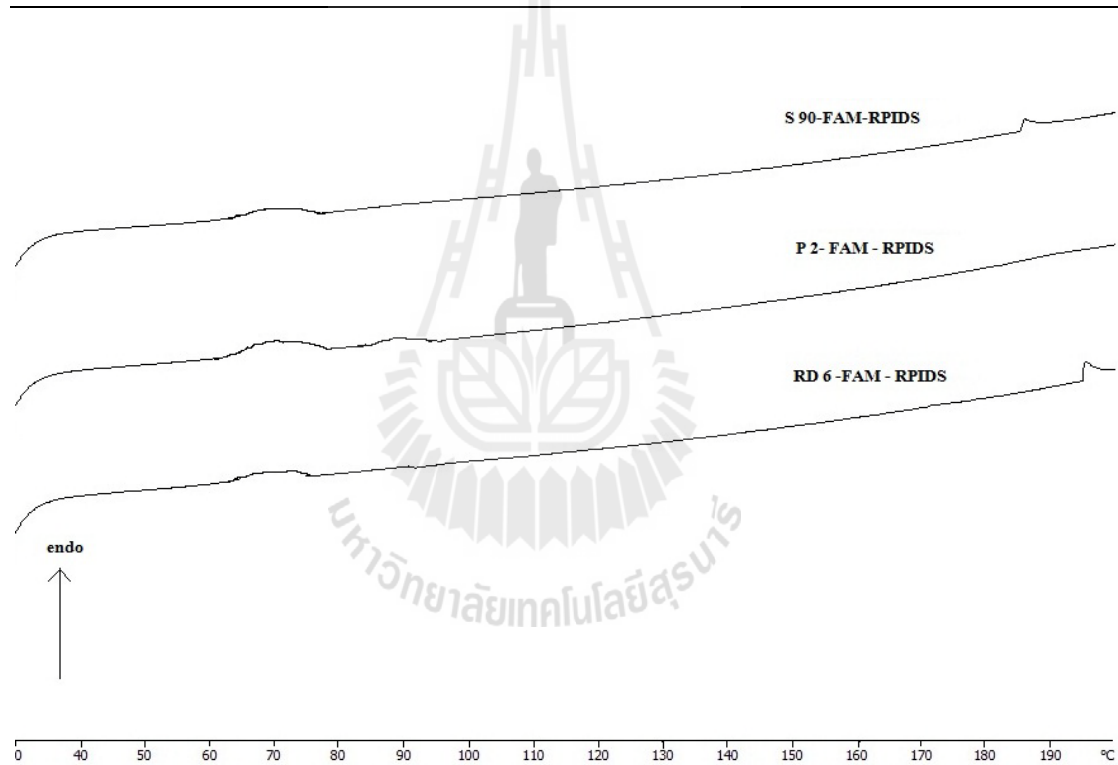
ตารางที่ 4.16 ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	Relative crystallinity (%)	Crystalline pattern
RD6-FAM-RPIDS	6.87±0.45 ^a	B+V _h
P2-FAM-RPIDS	6.97±0.22 ^a	B+V _h
S90-FAM-RPIDS	6.91±0.15 ^a	B+V _h

เทอร์โมแกรมของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched

ตารางที่ 4.17 คุณสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลลาตินในเซชันชั้นของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูแลนร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	First transition					Second transition				
	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o (°C)	ΔH (J/g)	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o (°C)	ΔH (J/g)
RD6-FAM-RPIDS	55.16 ^a	66.50 ^a	73.38 ^a	17.92 ^b	1.00 ^a					
P2-FAM-RPIDS	55.52 ^a	67.52 ^a	79.45 ^a	27.13 ^a	1.08 ^a	79.69	86.11	93.99	14.31	0.31
S90-FAM-RPIDS	55.39 ^a	66.67 ^a	72.51 ^a	15.12 ^b	1.05 ^a					



ภาพที่ 4.17 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลลาตินในเซชัน RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูแลนร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

starch : PIDBS) และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 4.17 โดยค่า T_o, T_p, T_c, T_c-T_o และ ΔH แสดงในตารางที่ 4.17 พบว่าสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์มีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลว (T_m) ระหว่าง 55.16-79.45°C และมี ΔH อยู่ระหว่าง 1.00-1.08 (J/g) โดยตัวอย่างทั้งสามมี T_o ต่ำเนื่องจาก

หลังทำการตัดกิ่งทำให้เกิดโมเลกุลสายสั้นเป็นจำนวนมาก อีกทั้งการกระตุ้นให้เกิดผลึกที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ผลึกที่เกิดขึ้นไม่แข็งแรง จึงใช้อุณหภูมิในการหลอมเหลวต่ำ นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า P 2-FAM เท่านั้นที่เกิด second transition ซึ่งอาจเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลสายยาวของอะมิโลเพคตินที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังผ่านกระบวนการตัดกิ่ง เกิดการจัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างผลึกที่มีความแข็งแรงยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้เกิด second transition ในขณะที่ไม่พบใน S90 -FAM-RPIDS และ RD6 -FAM-RPIDS

การติดตามกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส ด้วย ATR-FTIR ได้ทำการติดตามอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} แสดงถึงสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างส่วนที่เป็นระเบียบที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาบ่มต่าง ๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาบ่มเพิ่มขึ้นค่าสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของผลึกไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง จนกระทั่งเวลาผ่านไปถึง 96 ชั่วโมงหรือ 4 วัน ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงไม่สามารถติดตามกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ด้วยวิธีทาง IR ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลจากกระบวนการกำจัดอะมิโลส และกระบวนการตัดกิ่ง ก่อให้เกิดความยาวที่หลากหลายของสายเส้นตรงกลูแคน มีผลทำให้เกิดผลึกที่มีขนาดแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก อีกทั้งไม่มีโครงสร้างในส่วนของเป็นอะมิโลสที่คอยเหนี่ยวนำให้เกิดการรีโทรเกรเดชัน พร้อมทั้งโมเลกุลสายยาว (Long chain) และ super long chain ไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างที่เป็นระเบียบ ดังนั้นจึงไม่สามารถติดตามการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ด้วยเทคนิค FTIR ได้

บทที่ 5

บทสรุป

เมื่อระยะเวลาในการตัดกิ่งสตาร์ชพันธุ์ RD6, P2 และ S90 ด้วยเอนไซม์ยาวนานขึ้น ระดับการตัดกิ่ง และระดับการย่อยมีการเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาในการย่อยมากกว่า 10 ชั่วโมง นอกจากนั้นสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (pullulanase+isoamylase debranched starch : PIDBS) มีระดับการตัดกิ่ง, ระดับการย่อย และค่า β -amylolysis limit สูงกว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนส (Pullulanase debranched starch : PDBS) ซึ่งส่งผลให้ปริมาณ RS หลังผ่านกระบวนการรีโทรเกรดชันของ PIDBS สูงกว่า PDBS อีกด้วย แสดงให้เห็นว่า การใช้เอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสมีประสิทธิภาพในกระบวนการตัดกิ่งสูงกว่าการใช้เอนไซม์พุลูลานเนสเพียงตัวเดียว ในขณะที่สตาร์ชข้าวเหนียว คือ พันธุ์ RD6 (waxy rice) มีปริมาณ RS ต่ำกว่าพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสเป็น องค์ประกอบทั้งสตาร์ชทั้ง 2 พันธุ์ แต่สตาร์ชข้าวพันธุ์ที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบทั้งสองสายพันธุ์มีปริมาณ RS ไม่แตกต่างกัน และเมื่อทำการติดตามการเกิดรีโทรเกรดชันด้วยเครื่อง FTIR พบว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีอัตราการเกิดรีโทรเกรดชันเร็วกว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 และ RD6 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของ อะมิโลเพคตินที่มีสายโซ่ขนาดยาวมาก (Super long chain) มีผลต่ออัตราการเกิดรีโทรเกรดชัน

การบ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำให้ Retrograded pullulanase + isoamylase debranched starch (RPIDS) และ Retrograded pullulanase debranched starch (RPDS) เปลี่ยนโครงสร้างผลึกจากชนิด A+V เป็นชนิด B+V type และมีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลว อยู่ระหว่าง 54.46-110.55°C และ ΔH อยู่ระหว่าง 10.64-18.38 (J/g) ในขณะที่ตัวอย่าง RPIDS เท่านั้นที่พบ second transition โดยมี T_m อยู่ระหว่าง 111.15-135.11°C ซึ่งเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (amylose-lipid complex) และจากอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลสายยาวและสายยาวมากของอะมิโลเพคตินทำให้โครงสร้างผลึกที่แข็งแรง จึงส่งผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลวมีค่าสูง

การเตรียมสตาร์ชข้าวปราศจากอะมิโลสด้วยวิธีชะล้างอะมิโลส (amylose leaching) ที่เหมาะสมนั้น ทำได้โดยการใช้ น้ำที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 3 ครั้งสำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 ปราศจากอะมิโลส (S90-free amylose or S90-FAM) โดยทำให้มีปริมาณอะมิโลสเหลือในตัวอย่างร้อยละ 4.93 ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 ปราศจากอะมิโลส (P2-FAM) จำเป็นต้องใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง โดยมี ปริมาณอะมิโลสเหลือในตัวอย่างร้อยละ 7.85 นอกจากนี้

วิธีการกำจัดอะมิโลสมีผลทำให้โมเลกุลสายยาว ($DP \geq 37$) บางส่วนถูกตัดให้สั้นลง และโครงสร้างผลึกส่วนใหญ่ถูกทำลาย และ เมื่อสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) พบว่า P2-FAM และ S90-FAM มีปริมาณ RS สูงกว่า RD6-FAM เนื่องจาก สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และ S90 มี super long chain ในขณะที่ RD6 ไม่มีสัดส่วนดังกล่าว ในขณะที่ P2-FAM มีปริมาณ RS สูงกว่า S90-FAM เนื่องจากมีสัดส่วนของ super long chain มากกว่า แสดงให้เห็นว่า โมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ RS



รายการอ้างอิง

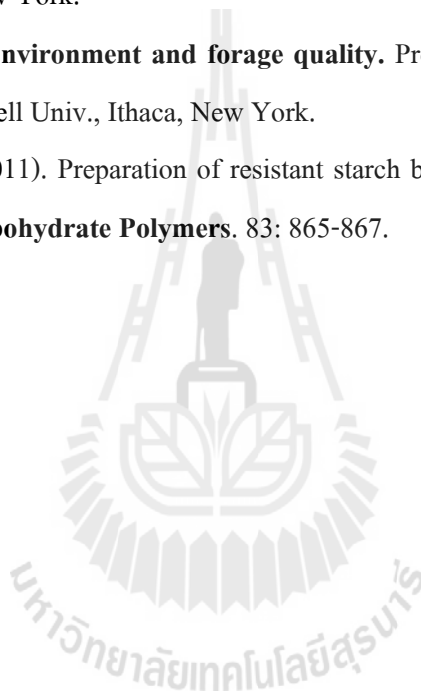
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. (2546). **เทคโนโลยีของแป้ง**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ. (2546). การศึกษาคุณสมบัติของแป้งข้าวพันธุ์ต่างๆในประเทศไทยเพื่อเป็นกลยุทธ์ในการสร้างผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม. รายงานการวิจัยตีพิมพ์ลงหนังสือ **สัมมนาวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43**. วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2546. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. 2555. สถิตินำเข้า-ส่งออกข้าวไทย (สื่ออิเล็กทรอนิกส์). ที่มา : <http://www.customs.go.th/wps/wcm/connect/8c960143-06cb-4db8-b817-a5c04b94d31d/CustomsReportsAugust2012.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=8c960143-06cb-4db8-b817-a5c04b94d31d>.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2002). **Official Method of Analysis. Method 2002.2 (18th ed.)** Arlington VA.
- Avrami, M. (1941). **Kinetics of Phase Change. III. Granulation, Phase Change, and Microstructure**. *Ibid.* 9:177-184 .
- Barbara, H.S. (2002). **Polymer analysis**. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Bennow, A., Bay-Smith, A.M. and Bauer, R. (2001). *Size exclusion chromatography and on-line refractive index and light scattering*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 28: 409-420.
- Berry, C.S. (1986). Resistant starch: Formation and measurement of starch that survives exhaustive digestion with amylolytic enzymes during the determination of dietary fiber. **Journal of Cereal Science**. 4: 301-314.
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V. and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. 23: 85-112.
- Cael, J.J., Koenig, J.L.J. and Blackwell. (1975). Infrared and Raman Spectroscopy of Carbohydrates. Part VI: Normal Coordinate Analysis of V-Amylose. **Biopolymers**. 14(9): 1185-1903.

- Cai, L., Shi, Y.-C., Rong, L. and Hsiao, B.S. (2010). Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility. **Carbohydrate Polymers**. 81: 385-393.
- Chang, H.-J. and Liu, Q. (2009). Impact of molecular structure of amylopectin and amylose on amylose chain association during cooling. **Carbohydrate Polymers**. 77: 807-815.
- Cheetham, N.W.H. and Tao, L. (1998). Solid state NMR studies on the structural and conformational properties of natural maize starches. **Carbohydrate Polymers**. 36: 277-284.
- Chung, H.-J., Liu, Q. and Hoover, R. (2009). Effect of single and dual hydrothermal treatments on the crystalline structure, thermal properties, and nutritional fractions of pea, lentil, and navy bean starches. **Food Research International**. 43(2): 501-508.
- Derycke, V. et al. (2005). Starch gelatinization and amylose-lipid interactions during rice parboiling investigated by temperature resolved wide angle X-ray scattering and differential scanning calorimetry. **Journal of Cereal Science**. 42: 334-343.
- Eerlingen, R.C., Crombez, M. and Delcour, J.A. (1993). Enzyme-resistant starch. I. Qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. **Cereal Chemistry**. 70: 339-344.
- Eerlingen, R.C. and Delcour, J.A. (1995). Formation, analysis, structure and properties of type III enzyme resistant starch. **Journal of Cereal Science**. 22(2): 129-138.
- Englyst, H.N. and Hudson, G.J. (1992). The classification and measurement of dietary carbohydrates. **Food Chemistry**. 57: 15-21.
- Farhat, I.A., Blanshard, J.M.V. and Mitchell, J.R. (2000). The retrogradation of waxy maize starch extrudates : Effect of storage temperature and water content. **Biopolymers**. 53: 411.
- Farhat, I.A. and Blanshard, J.M.V. (2001). **Modeling the kinetics of starch retrogradation**. In Chinachoti, P. and Vodovotz, J., ed. Bread Staling. CRC Press LTC. 163-172.
- Gidley, M.J. (1987). Factors affecting the crystalline type (A-C) of native starches and model compounds : A rationalization of observed effects in terms of polymorphic structure. **Carbohydrate Research**. 161: 301-304.
- Goodfellow, B.J. and Wilson, R.H. (1990). A Fourier transform infrared study of the gelation of amylose and amylopectin. **Biopolymers**. 30: 1183-1189.

- Gunaratne, A. and Hoover, R. (2002). Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydrate Polymers**. 49 (4): 425–437.
- Haralampu, S.G. (2000). Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS₃. **Carbohydrate Polymer**. 41: 285-292.
- Herman, P.H. and Weidinger, A. (1961). On the determination of the crystalline fraction of polyethylene from X-ray diffraction. **Macromolecular Chemistry**. 24: 24-36.
- Hizukuri, S. (1995). Analytical aspects. **In Carbohydrates in food**. Edited by Ann-Charlotte. Eliasson Marcel Dekker. Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp: 347-429.
- Hood, L.F. and Mercier, C. (1978). Molecular structure of unmodified and chemically modified manioc starches. **Carbohydrate Research**. 61: 53–66.
- Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and root starches : A review. **Carbohydrate Polymers**. 45: 253–267.
- Inouchi et al. (1987). Chain Length Distribution of Amylopectins of Double- and Triple-Mutants Containing the Waxy Gene in the Inbred Oh43 Maize Background. **Starch – Stärke**. 39: 295-298.
- Jacobs, H. and Delcour, J.A. (1998). Hydrothermal modification of granular starch with retention of the granular structure : A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 2895-2905.
- Jane, J.-L., Wong, K.-S. and McPkerson, A.E. (1997). Branch-structure difference in starch of A- and B-type X-ray patterns revealed by their naegeli dextrans. **Carbohydrate Research**. 300: 219-227.
- Jane et al. (1999). Effect of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. **Cereal Chemistry**. 76: 629-637.
- Jane et al. (2011). Resistant food starches and methods related thereto. **US patent#60/955,049**.
- Juliano, B.O. (1984). Rice starch : production, properties and uses. In R.L. Whistler, J.N. Bemiller, and E.F. Paschall (Eds.). **Starch chemistry and technology**. pp: 507-529. 2th Ed. Academic Press, Florida.

- Kennedy, J.F., Cabral, J.M.S., Sa-Correia, I. and White, C.A. (1987). Starch biomass : a chemical feedstock for enzyme and fermentation processes. T. Gaillard (ed.). Wiley & Sons, New York. **Starch : Properties and Potential**. 13: 115-130.
- Kim, S.K., Ciacco, C.F. and D'apponia, B.L. (1976). A Research Note Kinetics study of retrogradation of cassava starch gels. **Journal of Food Science**. 41: 1249–1250.
- Koo, H.Y., Park, S.H., Jo, J.S., Kim, B.Y. and Baik, M.Y. (2005). Gelatinization and retrogradation of 6-year-old Korean ginseng starches studied by DSC. **Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie**, 38: 59–65.
- Labuza, T. (1982). Shelf-life dating of foods. **Wesport, Connecticut: Food & Nutrition Press**.
- Leong, Y.H., Karim, A.A. and Norziah, M.H. (2007). Effect of pullulanase debranching of sago (Metroxylon sagu) starch at subgelatinization temperature on the yield of resistant starch. **Starch/Starke**. 59: 21-32.
- Manners, D.J. and Matheson, N.K. (1981). The fine structure of amylopectin. **Carbohydrate Research**. 90-99.
- Martins, R.C. and Silva, C.L.M. (2002). Modelling colour and chlorophyll's losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). **International Journal of Refrigeration**. 25: 987–995.
- Miao, M., Zhang, T. and Jiang, B. (2009). Characterizations of kabuli and desi chickpea starches cultivated in China. **Food Chemistry**. 113(4): 1025-1032.
- Moates, G.K., Noel, T.R., Parker, R. and Ring, S.G. (1997). The effect of chain length and solvent interactions on the dissolution of the B-type crystalline polymorph of amylose in water. **Carbohydrate Research**. 298: 327-333.
- Noosuk, P., Hill, S.E., Pradipasena, P., and Mitchell, J.R. (2003). Structure–viscosity relationships for Thai rice starches. **Starch/Stärke**. 55(8): 337–344.
- Saha, B.G. and Zeikus, J.G. (1989). Microbial glucoamylase : Biochemical and biotechnological features. **Starch/Stärke**. 41: 57-61.
- Sajilata, M.G., Singhal, R.S. and Kulkarni, P.K. (2006). Resistant starch a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 5: 1-17.
- Sawai, H. and Morita, Y. (1968). Studies on rice glutelin. Part I. Isolation and purification of glutelin from rice endosperm. **Agricultural Chemistry**. 32(1): 76-80.

- Sievert, D. and Lausanne, J.H. (1993). Determination of amylose by differential scanning calorimetry. **Starch/Stärke**. 45: 136-139.
- Tester, R.F., Karkalas, J. and Qi, X. (2004). Starch structure and digestibility enzyme substrate relationship. **World's Poultry Science Journal**. 60: 185-195.
- Thompson, D.B. (2000). Strategies for the manufacture of resistant starch. **Trends in Food Science and Technology**. 11: 245–253.
- Van Soest, P.J. (1994). **Nutritional Ecology of the Ruminant (2nd Ed.)**. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Van Soest, P.J. (1996). **Environment and forage quality**. Proc. Cornell Nutr. Conf. for Feed Manuf. p 1. Cornell Univ., Ithaca, New York.
- Zhang, H. and Jin, Z. (2011). Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase. **Carbohydrate Polymers**. 83: 865-867.





การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. เดซิเคเตอร์ (desiccators)
4. ภาชนะอะลูมิเนียมมีฝาปิด (moisture can)

วิธีการ

1. อบอุ่นสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 1-2 ใสลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้ไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105° C เป็นเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีกครั้ง
5. ทำซ้ำข้อที่ 4 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_1} \times 100$$

โดย W_1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2002)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhelt apparatus) ประกอบด้วยขวดกลม (สำหรับใส่ตัวทำละลาย) ซอกเลต (soxhlet) อุปกรณ์ควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สาลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น (desiccators)

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ถึงวันกระทั่งอุณหภูมิของขวดกลมลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มีชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสาลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
4. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอกเลต เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับเตาความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอกเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารทำละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ
7. นำขวดหาไขมันอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 80-90°C จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ถึงวันกระทั่งอุณหภูมิของขวดกลมลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
8. ทำซ้ำข้อที่ 7 จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
9. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)} = \frac{W_2}{W_1} \times 100$$

โดย $W_1 =$ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)
 $W_2 =$ น้ำหนักไขมันหลังอบ (กรัม)

3. การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2002)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน ขนาด 200 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน
3. อุปกรณ์กลั่น โปรตีน (Semi-microdistillation)
 4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
5. ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 5, 10 มิลลิลิตร
7. บิวเรต
8. ตู้ดูดควัน
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
10. ลูกแก้ว (Glass bead)
 11. เตาย่อย (VELP DK6)
 12. เครื่องดักจับ ไอกรด (scrubber)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)
2. ตัวเร่งผสม (Catalyst) ระหว่าง $CuSO_4$ กับ K_2SO_4 อัตราส่วน (Cu : K_2SO_4) คือ 1 : 10
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40%
4. กรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (HCl 0.1 นอร์มอล)
5. กรดบอริกเข้มข้น 4%
6. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต
7. อินดิเคเตอร์ผสม (Mixed indicator ระหว่าง Methylene blue 0.1 กรัม กับ Methyl red 0.2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 90% 100 มิลลิลิตร)

วิธีการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต
 - 1.1 ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลตที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ $120^\circ C$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ให้ได้น้ำหนักอยู่ในช่วง 2.0-2.2 กรัม โดยเครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักที่ชั่ง

1.2 นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100

มิลลิลิตร เขย่าขวดให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.3 คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน

2. การเตรียมสารละลาย HCl 0.1 โมลาร์ จากกรดเกลือเข้มข้น

2. 1 ตวงกรดเกลือเข้มข้นให้มีปริมาตร 4.0-4.5 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร

2. 2 เทกรดเกลือเข้มข้นที่ตวงแล้วลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากันดี เก็บสารละลายในขวดแก้วเพื่อนี้ไว้ใช้ต่อไป

3. การทำมาตรฐานสารละลายกรดเกลือ

3.1 ปิเปตสารละลายกรดเกลือมา 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร

3.2 เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เขย่าสารละลายในขวดให้เข้ากัน

3.3 ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานทูดียมกมุไซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายในขวดเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรไฮดรอกไซด์

3.4 ไทเทรตซ้ำ 2 ครั้ง

3.5 คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดเกลือ

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. การย่อย

2.1 เติมตัวเร่งผสม (Catalyst) ระหว่าง CuSO_4 กับ K_2SO_4 (CuSO_4 0.5 กรัม และ K_2SO_4 5 กรัม) ในขวดย่อยโปรตีน เพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อย

2.2 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร (ค่อย ๆ ใสตามข้างขวด) เขย่าเบา ๆ จนแป้งไม่จับกันเป็นก้อน ปิดปากขวดด้วยกระดาษแก้วกลม

2.3 ย่อยบนอุปกรณ์ให้ความร้อนอ่อน ๆ จนได้สารละลายสีเขียวใส

2.4 ปลดอxygenให้เย็น

3. การกลั่น

3.1 เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิลดลงแล้ว จึงเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และเติมสารละลายไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40%

3.2 จัดอุปกรณ์กลั่น

3.3 เติมกรดบอริกเข้มข้น 4% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วหยดอินดิเคเตอร์ 5-6 หยด นำไปกรองรับของเหลวรองรับสารละลายที่กลั่นได้ โดยใช้อุปกรณ์ความแน่นจุ่มในสารละลายกรดบอริก

3.4 กลั่นจนกระทั่งไม่มีแอมโมเนียเหลือ ให้ได้สารละลายที่กลั่นได้ประมาณ 150 มิลลิลิตร

4. การไทเทรต

4.1 ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน สังเกตสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน จดปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

4.2 ทำ blank โดยใส่สารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่ใส่ตัวอย่าง

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{1.4007 \times N \times (A-B) \times F}{W}$$

โดย A = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W = น้ำหนักตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

F = แฟกเตอร์เท่ากับ 5.95

4. การวิเคราะห์ปริมาณถ้ำ

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยครุชเชิล
2. เตาไฟฟ้า
3. เตาเผา
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
5. เคซิเคเตอร์

วิธีการ

1. เเผาครุชเชิลเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ครุชเชิล นำไปเผาบนเตาไฟฟ้าจนควันหมด

3. นำไปเผาจนได้ต่อในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550°C นานประมาณ 2-3 ชั่วโมงจนกระทั่งได้
 เถ้าสีขาวหรือสีเทา

4. จากนั้นนำมาใส่เครื่องเคเตอร์ ที่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งเผาตัวอย่างซ้ำนานครั้ง
 ละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)} = \frac{(W_1 - W_2)}{(W_1 - W)} \times 100$$

โดย W = น้ำหนักของครุชิวีต (กรัม)

W_1 = น้ำหนักของครุชิวีตและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของครุชิวีตและตัวอย่างหลังเผาจนน้ำหนักคงที่ (กรัม)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอรุญา ลากโลกสูง เกิดเมื่อ วันที่ 4 พฤษภาคม 2529 ที่อำเภอเมือง จังหวัด นครราชสีมา จบการศึกษาระดับมัธยมต้นและมัธยมปลายจากโรงเรียนบุญเหลือวิทยานุสรณ์ จากนั้น เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำเร็จการศึกษาด้วยเกียรตินิยมอันดับสอง ในปี พ.ศ. 2551 หลังจากจบการศึกษาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2551 จนถึงปัจจุบัน

