



รายงานการวิจัย

คุณสมบัติแป้งข้าวที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากข้าวพันธุ์ต่างๆ

เพื่อใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพ

(Resistant Starch Properties from Rice Varieties for Functional Foods)



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

คุณสมบัติแป้งข้าวที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากข้าวพันธุ์ต่างๆ

เพื่อใช้ในอาหารเพื่อสุขภาพ

(Resistant Starch Properties from Rice Varieties for Functional Foods)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

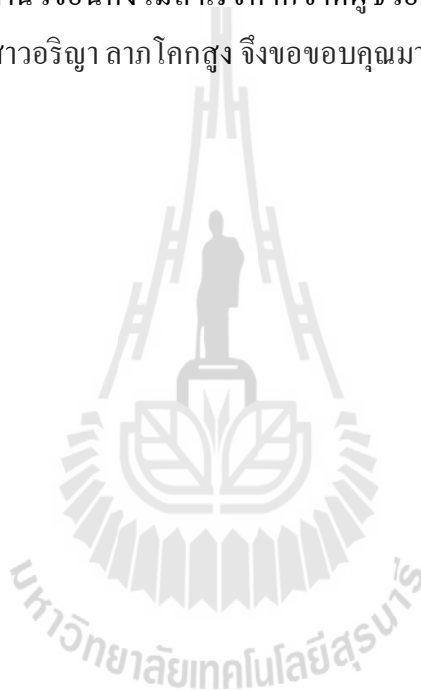
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้งบประมาณทุนอุดหนุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551-2552 ทำให้ผลงานวิจัย โครงการนี้เกิดขึ้นได้ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยข้าว ปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี ศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น และสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว สังกัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้าว เพื่อใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี สำหรับอาคาร สถานที่ และ เครื่องมือในการวิจัย และงานวิจัยนี้คงไม่สำเร็จหากขาดผู้ช่วยวิจัยเหล่านี้ คือ นางสาวรวิภัศรา เกียรติพงษ์ลาภ และ นางสาวอริญา ลาภโคกสูง จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย



บทคัดย่อ

การศึกษาการเกิดแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ชนิดที่ 3 (Resistant starch type III; RS₃) จากสตาร์ชข้าวสามพันธุ์ คือ พันธุ์ กข 6 (RD6) พันธุ์พิษณุโลก 2 (P2) และพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (S90) เมื่อทำการตัดกิ่งตัวอย่างสตาร์ชเข้มข้นร้อยละ 10 ด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสเพียงชนิดเดียวหรือใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (PIDBS) มีระดับการตัดกิ่ง ระดับการย่อย และค่าเบต้าอะมิโลไลซิสสูงกว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูเนส (PDBS) และเมื่อบ่มตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+isoamylase debranched starch (RPIDS) สูงกว่า retrograded pullulanase debranched starch (RPDS) โดย RPIDS ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6, P2 และ S90 มีปริมาณ RS เท่ากับร้อยละ 18.73, 43.44 และ 42.09 ตามลำดับ ในขณะที่ RPDS มีปริมาณ RS เท่ากับร้อยละ 12.01, 23.85 และ 22.65 ตามลำดับ ตัวอย่าง RPIDS และ RPDS แสดงโครงสร้างผลึกแบบ B-type และมีช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลว 54.46-57.38 องศาเซลเซียส ในขณะที่ตัวอย่าง RPIDS พบเอนโดทอมที่สอง มีช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลว 111.15-135.11 องศาเซลเซียส

ผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวแต่ละสายพันธุ์ต่อการเกิด RS ได้ศึกษาโดยเตรียมสตาร์ชข้าวพันธุ์ S 90 ปราศจากอะมิโลสด้วยการผ่านกระบวนการกำจัดอะมิโลสด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P 2 ปราศจากอะมิโลส (P2 free-amylose rice starches; P2-FAM) ผ่านกระบวนการกำจัดอะมิโลสโดยการใช้สารละลายต่าง ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส สตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (free amylose starch : FAM) ของพันธุ์ RD6, P2 และ S90 ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณ RS เท่ากับ 10.35, 14.42 และ 12.05% ตามลำดับ และพบว่า P2-FAM มีปริมาณ RS และค่าอุณหภูมิการหลอมเหลวสูงสุด ส่วน S90-FAM มีปริมาณ RS สูงกว่า RD6

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแป้งทนต่อการย่อยต่อเอนไซม์จากสตาร์ชข้าวตัดกิ่ง โดยศึกษาชนิดของสตาร์ชข้าว 4 สายพันธุ์ คือพันธุ์ กข 6 (RD6) พันธุ์พิษณุโลก 1 (P1) พันธุ์พิษณุโลก 2 (P2) และพันธุ์ชัยนาท (C1) ที่มีความแตกต่างของการกระจายสายโซ่ ความเข้มข้นของปริมาณของแป้งในขั้นตอนการเตรียมและอุณหภูมิการตกผลึกต่อปริมาณแป้งทนต่อการย่อยต่อเอนไซม์ โดยนำสตาร์ชข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ ตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่ปริมาณของแป้งร้อยละ 10 และ 21 จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันหรือ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบว่า แป้งทนต่อการ

ต่อเอนไซม์ที่เตรียมจากสถานะความเข้มข้นของแป้งร้อยละ 10 เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นก้อนรูปร่างไม่แน่นอน (aggregate) ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์และค่าเอนทาลปีสูงขึ้นสัมพันธ์กับการกระจายสายโซ่ยาวของสตาร์ชตัดกิ่ง แสดงผลึกรูปแบบ C+V_n และแสดงอุณหภูมิหลอมเหลวสองช่วงที่ประมาณ 88 และ 110-120 องศาเซลเซียส สัมพันธ์กับการตกผลึกของสายโซ่สั้นและ amylose-lipid complex ตามลำดับ สำหรับการเตรียมแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สถานะความเข้มข้นของแป้งร้อยละ 21 สามารถผลิตแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ได้สูงถึงร้อยละ 55 จากการเก็บที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ของข้าวสตาร์ชพันธุ์กข 6 แสดงรูปแบบผลึก A และอุณหภูมิหลอมเหลวสูงที่ 110 องศาเซลเซียส โดยปริมาณสายโซ่ยาวของสตาร์ชตัดกิ่งไม่เป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จากการเตรียมที่สถานะนี้



สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ข
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
3. วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	3
3.1 สตาร์ช.....	3
3.2 โครงสร้างและองค์ประกอบของสตาร์ช.....	4
3.3 ประเภทของสตาร์ช.....	8
3.4 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์.....	10
3.5 การเกิด resistant starch type III (RS ₃).....	12
3.6 ทฤษฎีการเกิดรีโทรเกรดชันและการเกิดผลึก.....	14
3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS ₃	17
3.8 ประโยชน์ของแป้งที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์.....	22
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
ตอนที่ 1.....	25
2.1.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี.....	25
2.1.2 การจำแนกประเภทข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	28
2.1.3 การเตรียมสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	27
2.1.4 การศึกษาคุณสมบัติของสตาร์ชข้าว.....	27
2.1.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์.....	28
2.1.6 การแยกอะมิโลสออกจากตัวอย่างสตาร์ชข้าว.....	30
2.1.7 การเตรียมสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่ง.....	30
2.1.8 β -amylolysis limit ของสตาร์ชตัดกิ่ง.....	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.1.9 การวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์.....	32
2.1.10 การตรวจสอบลักษณะ โครงสร้างทางผลึก	32
2.1.11 การตรวจวัดคุณสมบัติทางความร้อน.....	33
2.1.12 การศึกษาจลนพลศาสตร์การเกิดรีโทรเกรเดชันด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)	33
2.1.13 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	34
ตอนที่ 2	34
2.2.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี.....	34
2.2.2 การเตรียมแป้งข้าวและการแยกสตาร์ชข้าว.....	35
2.2.3 การเตรียมแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (Resistant starch, RS).....	35
2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์.....	36
2.2.5 ตรวจสอบคุณสมบัติทางโครงสร้าง.....	36
2.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ.....	37
2.2.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	38
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล	39
ตอนที่ 1	39
3.1.1 องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	39
3.1.2 ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	39
3.1.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	42
3.1.4 ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่งต่อระดับการตัดกิ่ง	44
3.1.5 ผลของโครงสร้างสตาร์ชข้าวต่อปริมาณ RS.....	49
3.1.6 ลักษณะ โครงสร้างผลึกของสตาร์ชตัดกิ่ง.....	50
3.1.7 คุณสมบัติทางความร้อน	52
3.1.8 การติดตามจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชัน	59
3.1.9 ผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินต่อการเกิด RS ₃	64
ตอนที่ 2	83
3.2.1 คุณสมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชตัดกิ่ง.....	83

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 ผลของพันธุ์ข้าวต่อการสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่ง ที่สภาวะความเข้มข้นของการเตรียมเจลด่ำ	88
3.2.3 คุณสมบัติทางผลึก คุณสมบัติทางความร้อนและลักษณะโครงสร้างจุลภาค ของผลิตภัณฑ์แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์.....	90
3.2.4 ผลของพันธุ์ข้าวและอุณหภูมิต่อการสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ใน สตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะความเข้มข้นของการเตรียมเจลด่าง.....	94
3.2.5 คุณสมบัติทางผลึกและคุณสมบัติทางความร้อนของผลิตภัณฑ์ แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์.....	95
บทที่ 4 บทสรุป.....	99
บรรณานุกรม.....	101
ภาคผนวก.....	106
ประวัติผู้วิจัย.....	112

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 ประเภทของสตา์ชในอาหารเมื่อพิจารณาตามความสามารถในการถูกย่อย.....	10
2.1 คุณลักษณะบางประการของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับ ไอโอดีนของสตา์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ และ สตา์ชข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Isoamylase และทำการแยกตามขนาดด้วย gel permeation chromatography (GPC) จากสตา์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	26
2.2 Gradient program ของเครื่อง High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detector (HPAEC-PAD).....	29
3.1 องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสตา์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ	39
3.2 ปริมาณอะมิโลสของสตา์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	40
3.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตา์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ.....	43
3.4 ปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase debranched starch: RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch: RPIDS ที่เกิดรีโทรเกร เดชันที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตา์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)	50
3.5 ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบผลึกของ native starch และ retrograded pullulanase debranched starch: RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch: RPIDS ที่เกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตา์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90).....	51
3.6 คุณสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลาตินเซชันชั้นของสตา์ชที่ปราศจาก อะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานาส ร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตา์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90.....	56
3.7 ค่า Avrami exponent (n) และrate constant(k) ของสตา์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วย เอนไซม์พุลูลานาสร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตา์ชข้าวทั้งสามสายพันธุ์ RD 6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90.....	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.8 ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) ของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์.....	67
3.9 ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้างอะมิโลส (Amylose leaching) ร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์.....	68
3.10 ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในสตาร์ชข้าวพันธุ์ พิษณุโลก 2 หลังการชะล้าง อะมิโลส (Amylose leaching) โดยใช้สารละลายด่างร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อน.....	70
3.11 ปริมาณอะมิโลสหลังทำการกำจัดอะมิโลส (Leaching amylose).....	71
3.12 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM).....	73
3.13 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ช กข 6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ด้วยน้ำและ NaOH.....	75
3.14 สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส(Free amylose starch: FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90).....	78
3.15 ปริมาณ RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส(Free amylose starch: FAM)และตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูแนนร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	79
3.16 ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free- amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูแนนร่วมกับเอนไซม์ ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)	81
3.17 สมบัติทางเทอร์โมไดนามิกในการเกิดเจลลาตินในเซชันชั้นของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส(Free amylose starch: FAM)ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูแนนร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S 90 (สุพรรณบุรี 90).....	81

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.18 ข้อมูลการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของสสารซ์ข้าวตัดกึ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPSEC-MALLS-RI	85
3.19 ข้อมูลการกระจายสายโซ่อะมิโนเพคตินของสสารซ์ข้าวตัดกึ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPAEC-PAD	88
3.20 ระดับการย่อย เบต้าอะมิโลไลซิสมิต และปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ของ ตัวอย่างแป้งตัดกึ่งความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ.....	90
3.21 ปริมาณผลึก อัตราส่วนของชนิดผลึกและขนาดผลึกของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อ เอนไซม์ที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่ อุณหภูมิ 25 °ซ	92
3.22 ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสสารซ์ตัดกึ่งที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้น ร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25 °ซ และ 50 °ซ	95
3.23 ปริมาณผลึก อัตราส่วนของชนิดผลึกและขนาดผลึกของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อ เอนไซม์ในสสารซ์ตัดกึ่งที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25 °ซ และ 50 °ซ	97

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1	โครงสร้างอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคติน.....5
1.2	ลักษณะโครงสร้างแบบกิ่งผลึกของเม็ดสตาร์ช..... 8
1.3	โครงสร้างทางผลึกชนิด A และ B รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เรย์ของ สตาร์ชที่มีลักษณะโครงสร้างทางผลึกแบบ A, B และ V _h9
1.4	ลักษณะโครงสร้างของ RS แต่ละชนิด..... 11
1.5	ลักษณะโครงสร้างของ RS 3 ในสารละลายอะมิโลส (a) แบบจำลอง Micelle : สาย เกลียวคู่ถูกจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในส่วนโครงสร้างที่เป็นผลึก (C) นอกเหนือจากบริเวณที่เป็นอสัณฐาน (b) แบบจำลอง Lamella : โครงสร้าง Lamella ถูกสร้างขึ้นจากการพับของสายโซ่ โดยพื้นที่ส่วนที่พับตัวเป็นส่วน อสัณฐาน (A) ขณะที่ส่วนกลางของ Lamella คือ ส่วนที่เป็นผลึก (C)..... 13
1.6	กราฟเศษส่วนผลึกกับล็อกของเวลาของ polypropylene ที่อุณหภูมิต่างๆ.....16
1.7	แสดงลักษณะการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยสตาร์ช..... 19
3.1	ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ กข 6 (a), พิชณุโลก 2 (b), และสุพรรณบุรี 90 (c).....44
3.2	ระดับการตัดกิ่งของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนส (Pullulanase debranched starch : PDBS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสร่วมกับไอโซอะไมเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสาม พันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)..... 46
3.3	ระดับการย่อยของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PDBS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสร่วมกับไอโซอะไมเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสาม พันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)..... 47
3.4	ค่า β - amylolysis limit ของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสเพียง (Pullulanase debranched starch : PDBS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลูลานเนสร่วมกับไอโซ อะไมเลส(Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าว ทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)..... 48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.5 ลักษณะโครงสร้างผลึกของ Native starch (a) และ retrograded pullulanase debranched starch: RPDS) และ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch: RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	57
3.6 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน (a) native starch และ(b) retrograded-pullulanase debranched starch: RPDS) และ retrograded pullulanase+ Isoamylase debranched starch: RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	58
3.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง FTIR ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ pullulanase ร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่ระยะเวลาต่างๆ ของสตาร์ชข้าวทั้งสามสายพันธุ์ (a) RD 6 (กข 6), (b) P2 (พิชญ์โลก 2) และ (c) S 90 (สุพรรณบุรี 90).....	61
3.8 ค่าสัดส่วนอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm ⁻¹ ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ pullulanase ร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ (a) RD6 (กข 6), (b) P2 (พิชญ์โลก 2) และ (c) S90 (สุพรรณบุรี 90) ที่เวลาต่างๆ	62
3.9 กราฟของ $\log [-\ln(E_L - E_\infty)/(E_t - E_\infty)]$ ต่อ $\log t$ ตามสมการ Avrami ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ pullulanase ร่วมกับไอโซอะไมเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ (a) RD6 (กข 6), (b) P2 (พิชญ์โลก 2) และ (c) S90 (สุพรรณบุรี 90).....	65
3.10 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่ขึ้นกับค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (melting enthalpies) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน	72
3.11 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) กับไขมัน LPC ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.12 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin)ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ของสตาร์ช (a) ข้าวพืษณุโลก 2 และ (b) สุพรรณบุรี 90	74
3.13 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin)ของสตาร์ช กข 6 ที่ปราศจากอะมิโลส(Free amylose starch: FAM) ด้วย (a) น้ำ และ (b) NaOH.....	76
3.14 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM)ทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข6), P2 (พืษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	77
3.15 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน สตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข6), P2 (พืษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	77
3.16 ลักษณะโครงสร้างผลึก ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูนาเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พืษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	80
3.17 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM)ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พอลูกลูนาเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะไมเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พืษณุโลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90).....	82
3.18 การกระจายน้ำหนักโมเลกุลของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPSEC-MALLS-RI โดยเส้นทึบแสดงถึงน้ำหนักโมเลกุล (molar mass) และเส้นบางแสดงการตอบสนองของ RI detector	84
3.19 การกระจายสายโซ่อะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPAEC-PAD โดย (ก) คือสตาร์ชข้าวตัดกิ่งจากข้าวพันธุ์ กข6 (ข) คือสตาร์ชข้าวตัดกิ่งจากข้าวพันธุ์พืษณุโลก 1 (ค) คือสตาร์ชข้าวตัดกิ่งจากข้าวพันธุ์พืษณุโลก 2 และ (ง) คือสตาร์ชข้าวตัดกิ่งจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1.....	87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.20 X-ray diffraction pattern ของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สภาวะการเตรียม เจลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ.....	91
3.21 thermogramของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สภาวะการเตรียมเจลความ เข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ.....	93
3.22 ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (A) RS-RD6 (B) RS-P1 (C) RS-P2 (D) RS-CN1 ที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดย น้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ.....	94
3.23 X-ray diffraction pattern ของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่ สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25°ซ และ 50°ซ.....	97
3.24 thermogramของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะการ เตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25 °ซ และ 50 °ซ	98

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากของประเทศไทย ทั้งในด้านการบริโภคภายในประเทศและการส่งออกไปในตลาดโลก โดยในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทย มีการส่งออกข้าว 27.5 ล้านตัน ซึ่งส่งออกในรูปแบบของข้าวสาร ส่วนผลิตภัณฑ์แปรรูปข้าวส่งออกที่สำคัญซึ่งมีมูลค่าเป็นอันดับสองในปี 2544 คือ แป้งข้าว ซึ่งการส่งออกตั้งแต่ปี 2544 ถึงปี 2547 มีแนวโน้มที่เพิ่มมากขึ้น (จักรพันธ์ เกษภิชโย, 2547) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีปริมาณเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการส่งออกข้าว แต่เมื่อคำนวณเป็นราคาต่อตันพบว่า ผลิตภัณฑ์แปรรูปข้าวมีราคาสูงกว่าข้าวอย่างเด่นชัด โดยมีราคา 22,460 บาท/ตัน ในขณะที่ราคาข้าวมี 13,270 บาท/ตัน ดังนั้นหากสามารถพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปข้าวให้กว้างขวางยิ่งขึ้น ย่อมเป็นการเพิ่มมูลค่าของข้าวให้สูงขึ้น

ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยเป็นข้าวอินดิกา (Indica) ซึ่งตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว ได้ดำเนินงานปรับปรุงพันธุ์ข้าวมาอย่างต่อเนื่องจนได้ข้าวพันธุ์รับรองพันธุ์แนะนำและพันธุ์ทั่วไป ซึ่งมีทั้งพันธุ์ข้าวนาสวน ข้าวไร่ ข้าวขึ้นน้ำ ข้าวน้ำลึก ข้าวพื้นเมืองหนาว และข้าวญี่ปุ่น จำนวน 93 พันธุ์ (http://www.ricethailand.go.th/data_002/rice_xx2-03_ricebreed001_0.html) โดยทั่วไปข้าวเจ้าและข้าวเหนียวมีปริมาณอะมิโลสและอะมิโลเพกตินที่แตกต่างกันจึงทำให้คุณภาพของข้าวหุงสุกและแป้งข้าวในด้านสี ความใส ความหนืด และการให้ลักษณะเนื้อสัมผัสแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีการนำแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามแป้งดิบ (native starch) มีคุณสมบัติบางประการที่ไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ดังนั้นจึงมีการนำแป้งมาปรับเปลี่ยนคุณสมบัติบางประการเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งาน ที่เรียกว่าแป้งดัดแปร (modified starch)

แป้งทนการย่อยด้วยเอนไซม์ (enzyme resistant starch หรือ resistant starch) จากคำนิยามของ European Flair Concerted Action on Resistant Starch (EURESTA) หมายถึงแป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์และถูกดูดซึมในลำไส้เล็กของมนุษย์สุขภาพดี (Euresta, 1992) ดังนั้น resistant starch (RS) จึงจัดอยู่ในกลุ่มของเส้นใยอาหาร (dietary fiber) (Yue and Waring, 1998) โดยสามารถผ่านเข้าไปถึงลำไส้ใหญ่และถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ได้ ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ (short-chain fatty acid, SCFA) เช่น acetic acid,

propionic acid และ butyric acid ซึ่งช่วยในการป้องกันโรคในลำไส้ใหญ่ (Akerberg et al., 1998; Bird et al., 2000)

โดยทั่วไป RS แบ่งเป็น 4 ประเภท (Sajilata et al., 2006; Thompson, 2000) คือ type I, II, III และ IV ซึ่ง RS type III เป็น RS ที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ของเจลแป้งหลังการทำให้เย็น และเป็น RS ที่มีความสำคัญมากกว่า RS ประเภทอื่น เนื่องจากมีความเสถียรต่อความร้อนมาก (thermal stability) (Sivak and Preiss, 1998) ทำให้ทนต่อกระบวนการหุงต้มปกติ นอกจากนี้ก็มีรายงานว่า RS type III สามารถถูกหมักและผลิต butyric acid ได้มากกว่า RS type II และ oligosaccharide (Brouns et al., 2002)

จากความสำคัญของ RS ดังที่กล่าวจึงทำให้มีการนำ RS มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น โดยใช้เป็นส่วนผสมแทนการใช้เส้นใยอาหารจากแหล่งอื่นๆ และใช้เพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร (fiber fortified) ซึ่งจะใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ปรุงสุกและผ่านการอบ เช่น เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์ธัญญาหารสำเร็จรูป (RTE Cereal) และขนมขบเคี้ยวอาหารเส้น (pasta/noodle) และอาหารทอด เป็นต้น เนื่องจากทนความร้อนได้สูง ดังนั้นแนวโน้มการใช้ RS เป็นแหล่งใยอาหารในอาหารที่เสริมใยอาหาร (fiber fortification) จึงได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะในประเทศตะวันตกที่ใส่ใจในเรื่องสุขภาพกันมาก

ในปัจจุบันนักวิจัยและโรงงานอุตสาหกรรมอาหารเริ่มให้ความสนใจและศึกษาเกี่ยวกับ RS มากขึ้น เนื่องจาก RS สามารถทำหน้าที่เป็นใยอาหารได้ (Ranhotra et al., 1996) โดยมีการผลิต RS ทั้งชนิด type II และ III โดย type II จะผลิตจากแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ส่วน RS type III จะผลิตจาก retrograded high amylose corn starch และ retrograded maltodextrin ซึ่ง type III เป็น RS ที่ได้รับความสนใจในทางอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีประโยชน์ต่อสุขภาพในด้านการมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่เมื่อถูกใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร (food ingredient) ประกอบกับศักยภาพในการการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม RS ชนิดนี้จึงได้รับความสนใจในการวิจัยอย่างมาก จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS มีหลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งปัจจัยทางด้านคุณสมบัติของสตาร์ชที่ประกอบด้วย ความเป็นผลึกของสตาร์ช โครงสร้างของแกรนูล อัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะไมโลเพคติน การเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลส ความยาวของสายโซ่อะมิโลส และส่วนที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลเพคติน (Goni et al., 1996; Sajilata et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านสภาวะในกระบวนการผลิต รวมถึงระยะเวลาการเก็บ (Tovar, 1992; Sievert and Pomeranz., 1989; Sajilata et al., 2006) ซึ่งล้วนแต่ส่งผลต่อปริมาณ RS ที่เกิดขึ้น โดยปริมาณการเกิด RS ในแป้งจากแหล่งที่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางด้านโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของอะมิโลสและอะไมโลเพคตินภายในสตาร์ช ซึ่งยังคงมีการศึกษาในเชิงเปรียบเทียบปริมาณ RS ในแป้งชนิดต่างๆ เนื่องจากสาเหตุดังกล่าวนี้ และโดยส่วนใหญ่ก็ศึกษาในแป้งชนิดอื่นที่ไม่ใช่แป้งข้าวเจ้า ข้าวก็อาจใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแป้งที่ทนต่อ

การย่อยด้วยเอนไซม์ได้ ถึงแม้ว่าแป้งข้าวส่วนใหญ่จะมีอะมิโลสไม่เกิน 38% หากมีการพัฒนาทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่เหมาะสม ประกอบกับสายพันธุ์ต่างๆ ของข้าวในประเทศไทยมีมากมาย หากมีโครงสร้างโมเลกุลของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินที่เหมาะสม ก็อาจสามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแป้งที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เทียบเท่าหรือดีกว่าแป้งข้าวโพดได้ ดังนั้นการศึกษาสัดส่วนและโครงสร้างโมเลกุลของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินแป้งข้าวจากข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่มีต่อ RS ที่เกิดขึ้น คุณสมบัติในการใช้ประโยชน์ และเชิงสุขภาพ จะช่วยให้เกิดความเข้าใจและสามารถนำไปประยุกต์ในการผลิตแป้งข้าวที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นแหล่งของใยอาหาร และเป็น functional food ingredient เพื่อสุขภาพ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนานวัตกรรมใหม่ของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากข้าว จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มมูลค่าของแป้งข้าวให้มีความหลากหลายมากขึ้น ที่สามารถส่งออกไปยังยุโรปหรือสหรัฐอเมริกาได้

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 2.1 เพื่อศึกษาระดับการย่อยของสตาร์ชข้าวด้วยเอนไซม์ตัดกิ่ง
- 2.2 เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติสตาร์ชข้าวที่มี RS type III สูงที่ผลิตจากข้าวพันธุ์ต่างๆ
- 2.3 เพื่อศึกษาผลของ โครงสร้างอะมิโลเพคตินจากข้าวพันธุ์ต่างๆต่อการเกิดRS

3. วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Reviewed literature)

3.1 สตาร์ช

แป้ง หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีองค์ประกอบของคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจนเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีสิ่งเจือปนอื่นๆ เช่น โปรตีน ไขมัน และเกลือแร่ น้อยมาก สตาร์ชที่ผลิตโดยทั่วไปยังมีส่วนประกอบอื่นๆ อยู่มาก เรียกว่า ฟลาว (flour) ตัวอย่างเช่น ฟลาวข้าวโพด (corn flour), ฟลาวข้าวสาลี (wheat flour), และฟลาวข้าว (rice flour) เป็นต้น ซึ่งมีส่วนประกอบโปรตีนสูง ดังนั้น สตาร์ช หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำฟลาวมาผ่านกระบวนการกำจัดส่วนประกอบทางเคมีอื่นๆ ที่อยู่ร่วมกับสตาร์ชออก เพื่อให้สตาร์ชบริสุทธิ์ เช่น สตาร์ชข้าวโพด (corn starch), สตาร์ชข้าวสาลี (wheat starch) และสตาร์ชข้าว (rice starch) รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ได้เตรียมสตาร์ชข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ ทำได้โดยนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการโม่เปียก (wet milling) เพื่อให้ได้ฟลาวจากนั้นนำมาสกัดโปรตีนโดยการใช้สารเคมีต่างๆ เช่น สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 5 เอทานอลร้อยละ 95 และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.35 พบว่า สตาร์ชที่เตรียมได้มีโปรตีนน้อยกว่าร้อยละ 0.5 มีปริมาณของไขมันน้อยกว่าร้อยละ 0.1 ปริมาณเถ้า

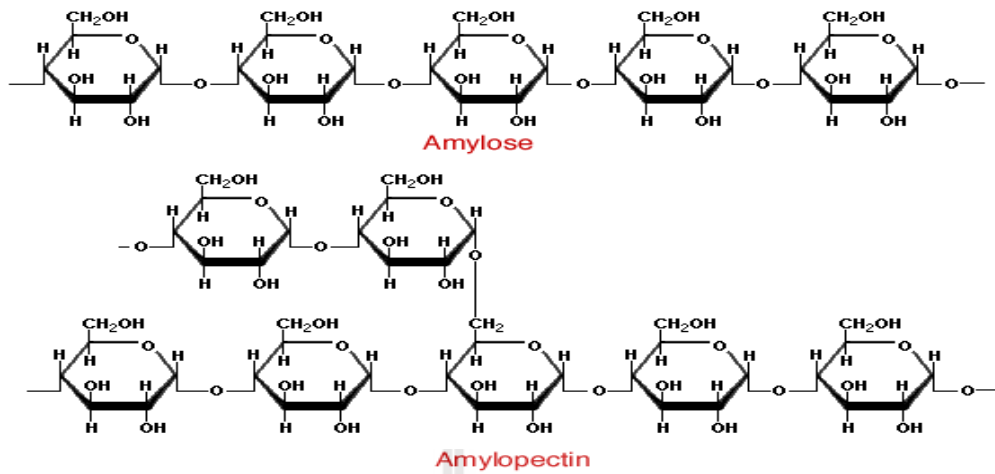
ร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักแห้ง และปริมาณสตาร์ชข้าวของทุกพันธุ์ที่ได้มากกว่าร้อยละ 95 โดยน้ำหนักแห้ง

3.2 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)

3.2.1 อะมิโลส

อะมิโลสเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นของน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสประมาณ 200 ถึง 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-glycosidic linkage ดังภาพที่ 3.1 น้ำหนักโมเลกุลของอะมิโลสอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ซึ่งอะมิโลสในสตาร์ชแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกันออกไปและมีค่าระดับขั้นของพอลิเมอร์ไรเซชัน (degree of polymerization, DP) ที่แตกต่างกันอีกด้วยสำหรับตำแหน่งของอะมิโลส ภายในเม็ดสตาร์ชจะขึ้นอยู่กับชนิดของสตาร์ชโดยอะมิโลสบางส่วนอยู่ในกลุ่มของอะมิโล-เพคติน บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในส่วนอสัณฐาน (amorphous regions) และส่วนผลึก (crystalline regions) อะมิโลสที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะพบเป็นเกลียวคู่กับอะมิโลเพคตินอยู่ใจกลางเม็ดสตาร์ช สำหรับอะมิโลสที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะพบอยู่ตามขอบของเม็ดสตาร์ช (Hizukuri, 1995) อะมิโลสสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีนและสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น บีวทานอล, กรดไขมัน, ฟีนอล, สารลดแรงตึงผิวหลายชนิด และไฮโดรคาร์บอน โดยสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้จะไม่ละลายในน้ำเนื่องจากอะมิโลสจะพันเป็นเกลียวล้อมรอบสารละลายอินทรีย์เหล่านี้ แต่เมื่ออยู่ในสารละลายโครงสร้างอะมิโลสจะมีหลายรูปแบบ คือ ลักษณะเป็นเกลียวม้วน (helix) เกลียวที่คลายตัว (interrupted helix) หรือม้วนอย่างไม่เจาะจง (random coil) การที่อะมิโลสจะอยู่ในรูปแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย อุณหภูมิ และขนาดโมเลกุลของอะมิโลส



ภาพที่ 1.1 โครงสร้างอะมิโลสและโครงสร้างอะมิโลเพคติน

แหล่งที่มา : Tester, Karkalas and Qi (2004)

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาปริมาณอะมิโลสของ ข้าวไทย พันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย concanavalin A หรือ Con-A ซึ่งสามารถ จำแนกสตาร์ชข้าวออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ข้าวพันธุ์อะมิโลสต่ำซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏ (apparent amylose) ปริมาณร้อยละ 3.80 กลุ่มที่ 2 เป็นข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลางซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏประมาณร้อยละ 12.38 ถึง 18.00 และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสสูงซึ่งมี ปริมาณอะมิโลสปรากฏประมาณร้อยละ 20.31 ถึง 26.68 นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสในสตาร์ชข้าวโดยใช้วิธีการเกิดสีกับไอโอดีน (Juliano, 1984) พบว่าจะให้ค่าปรากฏที่สูงกว่า การวิเคราะห์ด้วยวิธี Con-A โดยพบว่าร้อยละความแตกต่างระหว่างค่าปริมาณอะมิโลสที่ได้จากการ วิเคราะห์ทั้งสองวิธีจะอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10 จนถึง 50 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปริมาณอะมิโลสที่วิเคราะห์ได้จะ ขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการรบกวนด้วยโมเลกุลของอะมิโลเพคติน และโมเลกุลที่มีขนาดกลาง (intermedial material)

3.2.2 อะมิโลเพคติน

อะมิโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส โครงสร้างจะประกอบด้วยส่วนที่เป็น เส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,4) glucosidic linkage และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็น พอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) glucosidic linkage (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2546) แสดงดังภาพที่ 3.1 หน่วยย่อยกลูโคสที่มีพันธะ กลูโคซิดิกชนิด α -(1,6) มีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของปริมาณกลูโคสในอะมิโลเพคตินทั้งหมด ขนาด โมเลกุลของอะมิโลเพคตินในสตาร์ชแต่ละชนิดจะมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วย และมีน้ำหนัก

โมเลกุลประมาณ 10^7 ถึง 10^9 คาลตัน 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 (กัลลาณรงค์ และเกื้อกุล, 2546)

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ทำการศึกษาวิจัยการกระจายตัวของกิ่งก้านอะมิโลเพคตินของข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ 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 สำหรับข้าวในกลุ่มสุดท้ายที่จัดว่ามีปริมาณอะมิโลสสูงสามารถจำแนกข้าวออกได้เป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะมีร้อยละการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินสายสั้นซึ่งมี DP 6-12 มากกว่า DP 13-24 ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี 90 และ พันธุ์ชัยนาท 1 สำหรับข้าวกลุ่มที่สองมีร้อยละการกระจายตัวของ DP 6-12 น้อยกว่า DP 13-24 ได้แก่ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ขาวห้าวร้อยละ พันธุ์กข 23 พันธุ์เฉียงพัทลุง และ พันธุ์แจ๊กเชย

3.2.3 ขนาดและรูปร่าง

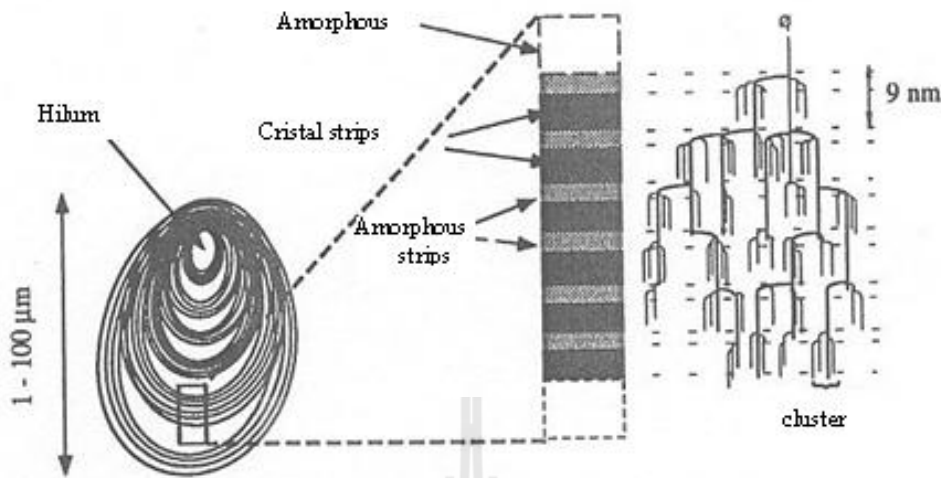
สตาร์ชที่พบในธรรมชาติจะอยู่ในรูปของเม็ดสตาร์ช (granule) ขนาดเล็ก ภายในเม็ดสตาร์ชประกอบด้วยวงแหวน (growth) ลักษณะของเม็ดสตาร์ชชนิดต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) พบว่าเม็ดสตาร์ชจะมีขนาด รูปร่าง และลักษณะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับแหล่งสตาร์ชนั้นๆ เม็ดสตาร์ช ข้าวเจ้ามีลักษณะแบน มีหลายเหลี่ยม มีขนาด

เส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-5 ไมโครเมตร (กล้าณรงค์ และเกื้อกุล, 2546) สตาร์ชข้าวจะมีขนาดอนุภาคเล็กที่สุดในบรรดาสตาร์ชธัญพืช

3.2.4 โครงสร้างผลึก

เม็ดสตาร์ชมีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline) โดยโมเลกุลของอะมิโลสและอะมิโลเพกตินมีการจัดเรียงตัวกันในเม็ดสตาร์ชเป็นโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นผลึก (crystallite) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous) ส่วนอสัณฐานของเม็ดสตาร์ชจะประกอบด้วยโมเลกุลของอะมิโลสและสายโซ่ยาวของอะมิโลเพกติน แสดงดังภาพ 3.2 (Jane, Wong and McPherson, 1997) ในขณะที่ส่วนที่เป็นผลึกเกิดจากการจัดเรียงตัวกันของสายโซ่ในโมเลกุลของอะมิโลเพกตินในแนวรัศมีเป็นชั้นๆ ต่อกันของคลัสเตอร์อะมิโลเพกติน (series of stacked amylopectin clusters) ซึ่งในแต่ละคลัสเตอร์จะประกอบด้วยชั้นผลึก (Crystalline lamellae) ซึ่งเกิดจากสายโซ่สั้นของอะมิโลเพกตินที่จัดเรียงตัวในลักษณะเกลียวม้วนคู่ (double helix) อย่างเป็นระเบียบสลับกับชั้นอสัณฐาน (amorphous lamellae) ซึ่งเกิดจากบริเวณที่เป็นกิ่งของสายอะมิโลเพกตินที่มีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ จะเห็นได้ว่าสายอะมิโลเพกตินจะเป็นส่วนประกอบทั้งในส่วนโครงสร้างผลึกและส่วนอสัณฐาน และพบว่าร้อยละ 80-90 ของจำนวนอะมิโลเพกตินจะอยู่ในส่วนของชั้นผลึก ส่วนร้อยละ 10-20 ที่เหลือจะอยู่ในส่วนอสัณฐาน โดยส่วนที่เป็นชั้นผลึกจะเป็นส่วนที่ทำให้เม็ดสตาร์ชมีความแข็งแรงคงรูปร่างของเม็ดสตาร์ชไว้ได้ ส่วนอสัณฐานจะเป็นส่วนที่ยึดเกาะชั้นผลึกไว้ด้วยกันและเป็นส่วนที่สร้างความยืดหยุ่นให้กับเม็ดสตาร์ช (Chang et.al, 2009)

เม็ดสตาร์ชจะมีโครงสร้างผลึก 3 แบบ ขึ้นกับความหนาแน่นในการจัดเรียงตัวของเกลียวคู่ ถ้าเกิดการจัดเรียงตัวหนาแน่นจะเกิดเป็นผลึกแบบ A (A-type) เช่น สตาร์ชจากธัญพืชและราก ถ้าจัดเรียงตัวกันอย่างหลวมๆ 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 แล้วบางครั้งยังปรากฏลักษณะผลึกแบบ V (V-type) ซึ่งแสดงถึงโครงสร้างผลึกที่ซับซ้อนที่เกิดจากการจับกันของอะมิโลสกับแอลกอฮอล์ที่เป็นเส้นตรง ไอโอดีน หรือ กรดไขมัน ซึ่งลักษณะผลึกแบบ V จะพบในสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 40 เช่น ในสตาร์ชข้าวโพดที่มีการตัดแปลงพันธุกรรม (Jacobs and Donald, 1998)



ภาพที่ 1.2 ลักษณะโครงสร้างแบบกิ่งผลึกของเม็ดสตาร์ช

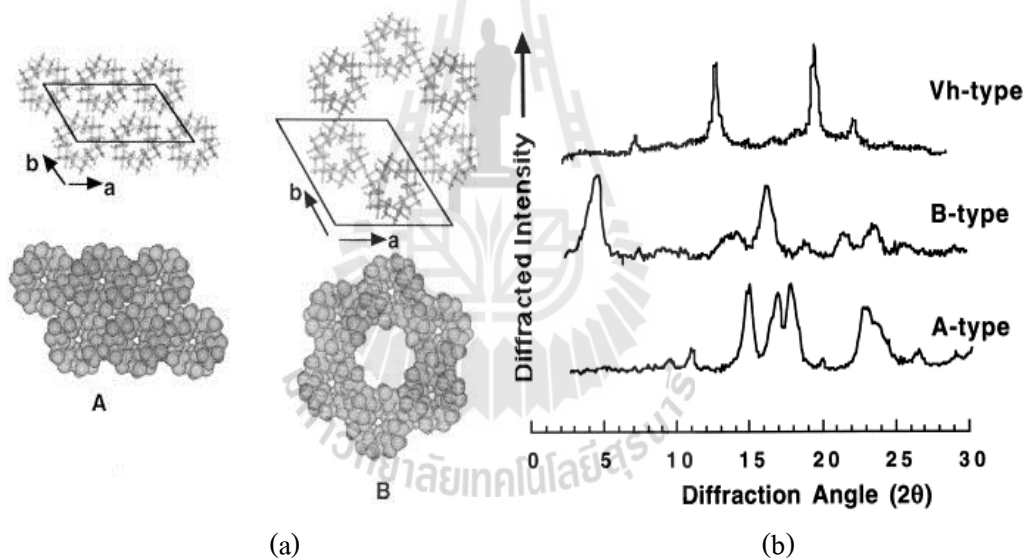
แหล่งที่มา :Jacobs and Donald (1998)

สตาร์ชบางชนิดอาจให้ผลึกมากกว่า 1 แบบ เช่น สตาร์ชมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถตรวจพบลักษณะผลึกทั้งแบบ A และ C โดยโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกันจะให้ลักษณะการกระเจิงแสงต่างกัน และสามารถตรวจสอบชนิดโครงสร้างของเม็ดสตาร์ชได้โดยใช้เทคนิควิเคอร์ซ-เรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction, XRD) สตาร์ชที่มี X-ray diffraction pattern ชนิด A-type จะพบพีกคู่ (double peak) ที่มุมหักเห (diffraction angle) หรือที่ 2θ ที่ 17° และ 18° และพีกเดี่ยวที่ตำแหน่ง 2θ เท่ากับ 23° ส่วนสตาร์ชที่มี X-ray diffraction pattern ชนิด B-type จะพบพีกขนาดเล็กที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 5.6° และ 17° และมีพีกคู่ที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 22° และ 24° และสตาร์ชที่มี X-ray diffraction pattern ชนิด C-type จะมีลักษณะของกราฟอยู่ระหว่าง A-type และ B-type คือ จะมีพีกขนาดเล็กที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 5.6° และมีพีกที่ตำแหน่ง 17° และ 17.9° (กล้านรงค์ และเกื้อกุล, 2546; นิตติ, 2543) นอกจากนี้ลักษณะผลึกแบบ V ซึ่งเป็นรูปแบบที่เกิดจากการรวมตัวกันของอะมิโลสกับไขมันเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของอะมิโลสกับไขมัน (amylose-lipid complex) โดยจะให้พีกเดี่ยวที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 13° และ 20° (Derycke et al., 2005)

3.3 ประเภทของสตาร์ช

ในกระบวนการย่อยอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตหรือสตาร์ช เริ่มตั้งแต่อาหารเข้าสู่ปาก ฟันจะทำหน้าที่เคี้ยวบดอาหารให้มีขนาดเล็กลง ในน้ำลายมีเอนไซม์ชื่อแอลฟาอะมิเลส (α -amylase) ซึ่งสามารถย่อยสตาร์ชให้มีขนาดเล็กลงเป็นเดกซตริน (dextrin) แต่การย่อยอาหารในปากจะเกิดขึ้น

เพียงเล็กน้อย เพราะอาหารอยู่ในปากเป็นช่วงระยะเวลาสั้นๆ จากนั้นอาหารจะถูกกลืนผ่านหลอดอาหารไปยังกระเพาะอาหารซึ่งมีเอนไซม์อะมิเลสอยู่แต่ไม่สามารถทำงานได้เนื่องจากอะมิเลสไม่ทำงานในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง ดังนั้นในกระเพาะอาหารจึงเกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส คือการแตกตัวของคาร์โบไฮเดรตทำให้แป้งโมเลกุลใหญ่มีขนาดเล็กลง จากนั้นกระบวนการย่อยแป้งที่แท้จริงจะเกิดที่ลำไส้เล็กซึ่งมีสภาพเป็นด่างที่เหมาะสมกับสภาวะการย่อย โดยน้ำดีทำให้ลำไส้เล็กสามารถย่อยสตาร์ชจนสุดท้ายได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ ดังนั้นในเชิงโภชนาการสตาร์ช (nutritional starch) โดยทั่วไปแบ่งสตาร์ชออกเป็น 3 ประเภท ตามอัตราและระยะเวลาในการย่อย (Englyst and Hudson, 1992) ได้แก่ สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (rapidly digestible starch, RDS) สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างช้าๆ (Slowly digestible starch, SDS) และสตาร์ชทนย่อยต่อเอนไซม์ (resistant starch, RS)



ภาพที่ 1.3 (a) โครงสร้างทางผลึกชนิด A และ B, (b) รูปแบบการเลี้ยวเบนของรังสีเอ็กซ์เรย์ของสตาร์ชที่มีลักษณะโครงสร้างทางผลึกแบบ A, B และ V_h
แหล่งที่มา : Buleon et al. (1998)

ตารางที่ 1.1 ประเภทของสตาร์ชในอาหารเมื่อพิจารณาตามความสามารถในการถูกย่อย

ประเภทสตาร์ช	แหล่งของสตาร์ช	การย่อยในลำไส้เล็ก
สตาร์ชที่ถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (Rapidly digestible starch : RDS)	อาหารที่มีส่วนประกอบของสตาร์ชเมื่อผ่านการหุงต้มใหม่ๆ	สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วไปเป็นน้ำตาลกลูโคสภายใน 20 นาที
สตาร์ชที่ถูกย่อยได้อย่างช้าๆ (Slowly digestible starch : SDS)	สตาร์ชจากธัญพืชดิบ ผลิตภัณฑ์เส้นที่ทำสุก	สามารถถูกย่อยสลายได้อย่างช้าๆ ไปเป็นน้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์โดยใช้เวลาดั้งแต่ 20 ถึง 110 นาที
สตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ (Resistant starch : RS)	เมล็ดธัญพืชที่ถูกบดหรือสตาร์ชที่เกิดการคืนตัว	ทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก

แหล่งที่มา : Enlyst and Hudson (1992)

3.4 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ (RS)

Resistant starch หรือ RS เป็นสตาร์ชที่จัดอยู่ในกลุ่มสตาร์ชดัดแปร โดยจากคำนิยามของ European Flair Concerted Action on resistant starch (EURESTA) กล่าวว่า สตาร์ชทนย่อยต่อเอนไซม์ หรือ resistant starch หมายถึง สตาร์ชและผลิตภัณฑ์ของสตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์และถูกดูดซึมในลำไส้เล็กของมนุษย์ได้ (Euresta, 1992) RS แสดงพฤติกรรมคล้ายคลึงกับใยอาหาร จากนั้น RS ถูกส่งผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และถูกหมักด้วยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ได้ ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดไขมันสั้นๆ 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 หรือถูกตรึงอยู่ในเซลล์หุ้มเมล็ดพืช ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ ซึ่ง RS ประเภทนี้สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติแต่เป็นส่วนน้อย โดยส่วนใหญ่พบในเมล็ดพืช เช่น ถั่วหรือเมล็ดธัญพืชที่ผ่านการโม่บด โดยเหลือส่วนของเม็ดสตาร์ชติดอยู่กับผนังเซลล์ อาหารที่ทำจากสตาร์ชชนิดนี้ทนต่อความร้อนในการทำอาหารปกติและสามารถใช้เป็นส่วนผสมในอาหารได้หลากหลาย




2. Resistant granular starch (RS₂) เป็นสตาร์ชที่เม็ดสตาร์ชมีคุณสมบัติทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ตามลักษณะของโครงสร้างที่เป็นธรรมชาติของเม็ดสตาร์ชที่ไม่มีรูหรือช่องเปิดให้เอนไซม์เข้าไปในเม็ดสตาร์ช ซึ่งมีลักษณะรวมตัวกันอย่างหนาแน่นในแนวแผ่รัศมี จึงทำให้โครงสร้างมี

ข้อจำกัด ขากต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยส่วนใหญ่ RS ชนิดนี้จะอยู่ในรูของเมล็ดสตาร์ชดิบ (native granular starch) พบได้ในสตาร์ชมันฝรั่ง (potato starch) และกล้วยดิบ (green banana)

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

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

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

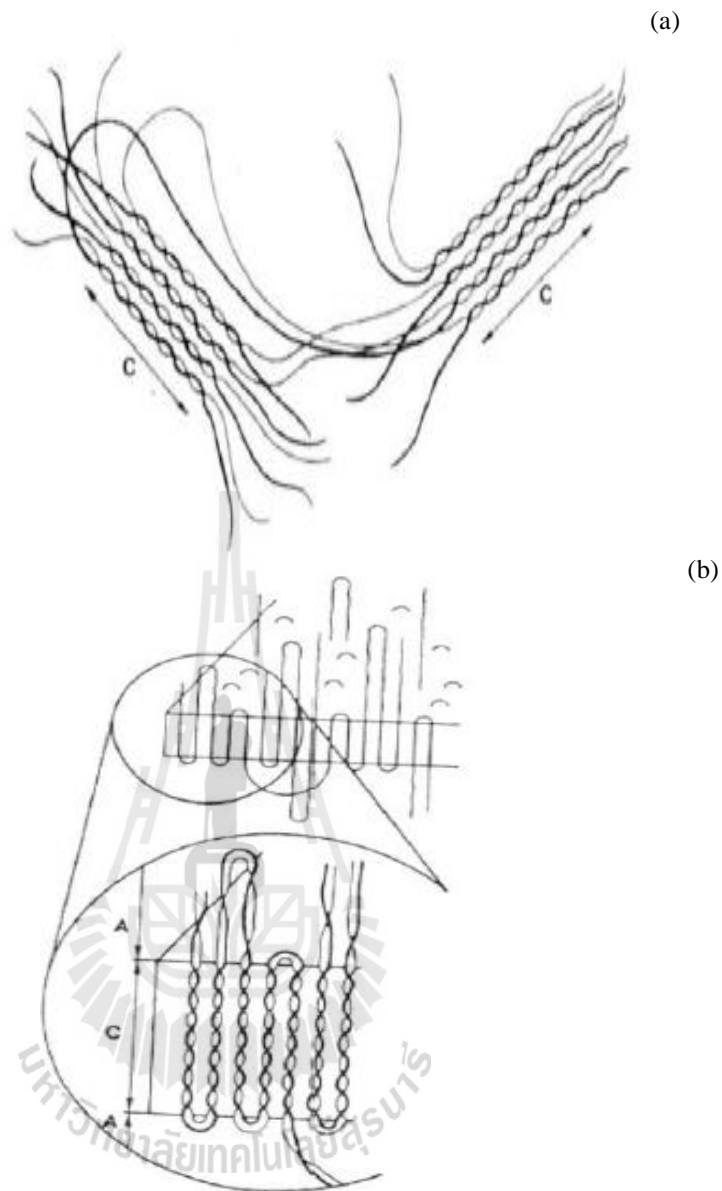
Type of Resistant starch		Occurrence
	RS1 – Physically inaccessible starch	Partially milled grains, seeds and legumes
	RS2 – granular starch	Banana starch, native potato starch
	RS3 – Nongranular, retrograded or crystalline starch	RTE breakfast cereals, cooked and cooled potato
	RS4 – Chemical modified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

แหล่งที่มา : Sajilata et al.(2006) and Jane et al. (2011)

3.5 การเกิด Resistant starch type III (RS₃)

RS₃ส่วนใหญ่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ของโมเลกุลอะมิโลส (Eerlingen, Crombez, and Delcour, 1993) โดยกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันจะเกิดขึ้นเมื่อสตาร์ชได้รับความร้อนจนเกิดการเจลาตีในซ้อย่างสมบูรณ์ ทำให้โมเลกุลของสตาร์ชที่ประกอบด้วยอะมิโลสและอะมิโลเพกติน เกิดการกระจายตัวออกมาซึ่งมีผลทำให้ ความหนืดลดลง และเมื่อปล่อยให้เย็นตัวลงโมเลกุลรูปร่างเกลียวสุ่มของอะมิโลส (random coil) จะเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันและจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็น โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helices) (Eerlingen and Delcour, 1995) รูปแบบโครงสร้างเกลียวคู่เป็นแบบ left-handed, parallel stranded helices โดยหนึ่งสายเกลียวคู่ประกอบด้วยกลูโคส 6 โมเลกุลต่อหนึ่งรอบ (Sajilata, Singhal and Kulkarni, 2006) ทำให้โครงสร้างสามารถอุ้มน้ำและไม่มีการดูดน้ำเข้ามาอีก ส่งผลให้มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดเป็นลักษณะคล้ายเจลเหนียวหรือผลึกและเมื่อระยะเวลาผ่านไปกระบวนการรีโทรเกรเดชันเกิดมากขึ้น ส่งผลให้เกลียวคู่ที่เกิดขึ้นเกิดการจัดเรียงตัวกันในลักษณะที่โครงสร้างหนาแน่นและแข็งแรง ซึ่งได้เป็นผลึกที่แข็งแรงและสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ (Haralampu, 2000) ซึ่งการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสแสดงดังภาพที่ 3.5 Eerlingen and Delcour (1995) ได้เสนอกกลไกของการเกิด RS₃ ในสารละลายอะมิโลสไว้ 2 กลไก คือ การเกิดแบบไมเซลล์ (micelle formation) และการเกิดแบบการม้วนตัวของโมเลกุลสายตรงเป็นชั้นบางๆ (lamellar structure) โดยโครงสร้างแบบ micelle เกิดจากการรวมตัวกันของโมเลกุลอะมิโลสอิสระต่างๆ ที่อยู่นอกเหนือจากบริเวณออสซิลลูมแสดงดังภาพที่ 2.5 ซึ่งมีการจัดเรียงโครงสร้างของเกลียวคู่ในรูปแบบโครงสร้างหกเหลี่ยม (hexagonal structure) และแสดงโครงสร้างผลึกชนิด B ใน X-ray diffraction pattern

การม้วนตัวของสารพอลิเมอร์เหนียวทำให้เกิดโครงสร้างสองมิติ หรือ มีรูปร่างเป็นชั้น ๆ (Lamellar shapes) ซึ่งแสดงในภาพที่ 3.5 สายของโมเลกุลจัดเรียงตัวกันในทิศทางตั้งฉากกับแนวระนาบ ซึ่งตำแหน่งของการม้วนตัวคือของสายพอลิเมอร์ส่วนออสซิลลูมและจุดศูนย์กลางของชั้น lamellar คือ ส่วนที่เป็นผลึก ดังนั้นการย่อยโครงสร้างสตาร์ชด้วยเอนไซม์ ทำให้สามารถกำจัดทั้งส่วนที่เป็นออสซิลลูมและผลึก ได้เป็นโมเลกุลเส้นตรงสายสั้น และเมื่อทำการลดอุณหภูมิลงจะเกิดโครงสร้างของ RS₃ จึงประกอบไปด้วยโมเลกุลที่เป็นสายตรงสั้นๆ จัดเรียงตัวกันเป็น โครงสร้างส่วนผลึกที่แข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์



ภาพที่ 1.5 ลักษณะโครงสร้างของ RS 3 ในสารละลายอะมิโลส (a) แบบจำลอง Micelle: สายเกลียวคู่ถูกจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบในส่วนโครงสร้างที่เป็นผลึก (C) นอกเหนือจากบริเวณที่เป็นอสัณฐาน (b) แบบจำลอง Lamella: โครงสร้าง Lamella ถูกสร้างขึ้นจากการพับของสายโซ่ โดยพื้นที่ส่วนที่พับตัวเป็นส่วนอสัณฐาน (A) ขณะที่ส่วนกลางของ Lamellaคือส่วนที่เป็นผลึก (C)

แหล่งที่มา : Eerlinge and Delcour(1995)

3.6 ทฤษฎีการเกิดรีโทรเกรเดชัน และกระบวนการเกิดผลึก

เมื่อสารละลายสตาร์ชได้รับความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่เกิดเจลลาติไนเซชันแล้วให้ความร้อนต่อไปจะทำให้เม็ดสตาร์ชพองตัวเต็มที่และแตกออก โมเลกุลของอะมิโลสขนาดเล็กลงจะกระจายหลุดออกมาซึ่งทำให้ความหนืดลดลง และเมื่อปล่อยให้เย็นตัวลง โมเลกุลอะมิโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลเกิดเป็นร่างแหสามมิติที่แข็งแรง โดยโครงสร้างใหม่นี้สามารถอุ้มน้ำและไม่มีการคูดน้ำเข้ามาอีก มีความหนืดคงตัวมากขึ้น เกิดลักษณะเจลเหนียวคล้ายฟิล์มหรือผลึก เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) หรือการคืนตัว (Setback) (Sajilata, 2006) เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงไปอีกลักษณะการจัดเรียงตัวของโครงสร้างจะแน่นมากขึ้น โมเลกุลอิสระของน้ำที่อยู่ภายในจะถูกบีบออกมาออกเจล เรียกว่า Syneresis ปรากฏการณ์ทั้งสองนี้จะทำให้เจรมีลักษณะขาวขุ่นและมีความหนืดเพิ่มขึ้น การคืนตัวของสตาร์ชเปียกของสตาร์ชทำให้สารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น ในการคืนตัวของสตาร์ชนั้นเมื่อเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ จะเกิดการตกตะกอน เมื่อเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะทำให้เจลกั้นการตรวจสอบการเกิดรีโทรเกรเดชันมีหลายวิธีเช่น การตรวจวัดสมบัติรีโอโลยี โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า Storage modulus (G') ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความยืดหยุ่น (Elastic) ของสารกับเวลา นอกจากนั้นยังสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจากค่า Instantaneous elastic modulus (G_p) และค่า Retard elastic modulus (G_r) จากการศึกษาการคืบ (Creep) และอีกวิธีการหนึ่งในการติดตามกระบวนการรีโทรเกรเดชันและกระบวนการเกิดผลึกคือ การวัดด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometers (FTIR) โดยอาศัยหลักการที่เมื่อโมเลกุลของสารดูดกลืนแสงอินฟราเรด โมเลกุลจะถูกกระตุ้นเป็นโมเลกุลที่มีพลังงานสูงเพียงพอต่อการทำให้เกิดการยืดตัว (Stretching) หรือเกิดการงอ (Bending) ทำให้ปรากฏเป็นพีคการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (IR absorption peak) ที่ค่าความถี่ต่าง ๆ สำหรับสตาร์ชซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันน้ำตาลที่สำคัญคือ COH นั้นสามารถดูดกลืนแสงอินฟราเรดได้ดีที่ความถี่ในช่วง $1200-1000\text{ cm}^{-1}$ ดังนั้นการตรวจสอบการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจึงติดตามจากการเปลี่ยนแปลงพีคในช่วงความถี่ดังกล่าว โดย Van Soet (1996) ได้ศึกษาจนพบผลของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชมันฝรั่ง (10% และ 18% โดยน้ำหนัก) ด้วยเครื่อง FTIR โดยศึกษาในช่วงความถี่ $1300-800\text{ cm}^{-1}$ สำหรับสตาร์ชมันฝรั่ง (Native potato starch) และพบพีคการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดที่เลขคลื่น (Wave number) 1047, 1018 และ 994 cm^{-1} ในขณะที่สตาร์ชเจลลาติไนเซชันพบว่าเกิดพีคที่เลขคลื่น 1022 cm^{-1} และในระหว่างกระบวนการรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่เก็บรักษาเป็นเวลาหลายสัปดาห์ พบว่าพีคการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดคือที่เลขคลื่น 1053, 1047, 1022 และ 1000 cm^{-1} ดังนั้น Van Soet (1996) ได้ศึกษาการอัตราส่วนของความสูงของพีคที่ 1047 ต่อ 1022 cm^{-1} แสดงถึงสัดส่วนของโมเลกุลที่มีการ

จัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ต่อส่วนอสัณฐาน (Ratio of Short-rang molecular order to Amorphose : RSA) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพีการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 1047 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับปริมาณของผลึก (Crystalline) ในโครงสร้างสตาร์ช ขณะที่พีการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1022 cm^{-1} มีความสัมพันธ์กับส่วนอสัณฐาน (Amorphous) และพบว่าค่า RSA สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาการเกิดรีโทรเกรเดชัน

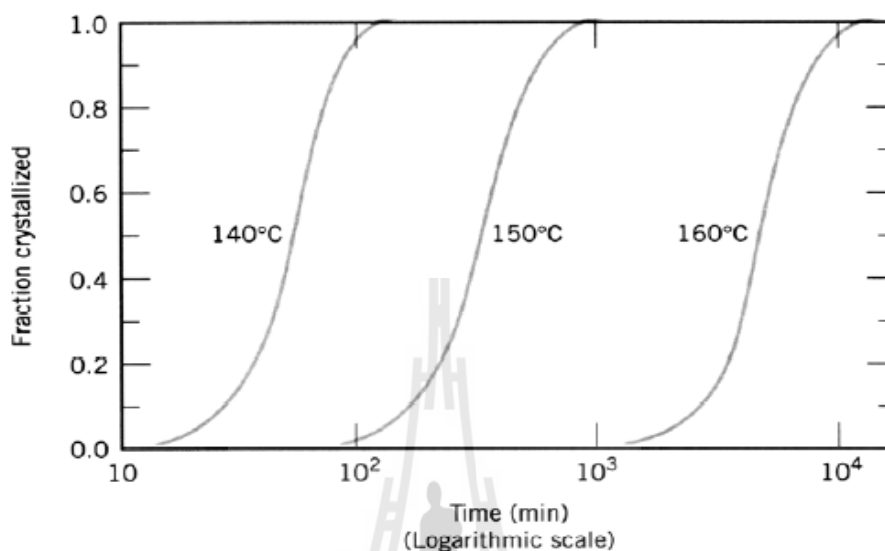
Goodfellow และ Wilson (1990) ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสและ อะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวสาลีด้วยเครื่อง FTIR ในช่วงความถี่ $1300-900\text{ cm}^{-1}$ เป็นเวลา 300 ชั่วโมง พบว่าการเกิดรีโทรเกรเดชันเกิดขึ้น 2 ช่วง โดยช่วงแรกพบการเกิดรีโทรเกรเดชันเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายในครึ่งชั่วโมง โดยพบการเปลี่ยนแปลงของพีการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดที่ความถี่ 1053 และ 1003 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลจากอะมิโลส โดยพบว่ามีารรวมตัวกันเกิดเป็นสายเกลียวคู่ของอะมิโลส จากนั้นจึงมีการรวมตัวกันเพื่อพัฒนาเป็น โครงร่างตาข่ายของเจลอะมิโลส จากนั้นการเกิดรีโทรเกรเดชันอย่างช้า ๆ จนครบเวลา 300 ชั่วโมง โดยพบการเปลี่ยนแปลงพีการดูดกลืนแสงที่เด่นชัดที่ความถี่ 1053 cm^{-1} ซึ่งเป็นผลจากอะมิโลเพคติน โดยพบว่าช่วงแรกการเกิดเป็นเกลียวคู่ของสายอะมิโลเพคติน จากนั้นมีการรวมตัวกันอย่างช้า ๆ เพื่อพัฒนาเป็นผลึกของโครงสร้าง

ในระหว่างการเกิดรีโทรเกรเดชัน นิวเคลียสของผลึกเกิดขึ้นที่ระยะเวลาต่างกัน ระยะเวลาที่แตกต่างกันทำให้เกิดจำนวนผลึก อัตราการเจริญของผลึก และความหนาแน่นของผลึกที่แตกต่างกัน โดยอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันต้องอาศัยเวลาในการเปลี่ยนแปลงสถานะเป็นของแข็ง (Solid-state transformation) ซึ่งสามารถศึกษาได้โดยการนำสัดส่วนของผลึกที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างกันมาพล็อตกราฟเทียบกับค่าล็อก (log) ของเวลาที่อุณหภูมิคงที่ ตามสมการของ Avrami

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

เมื่อ k และ n เป็นค่าคงที่ที่เป็นอิสระจากเวลา (time-independence constant) แต่จะขึ้นอยู่กับระบบของการเกิดผลึก โดยปกติปริมาณของผลึกที่เกิดขึ้นจะวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของความเป็นผลึกต่อโครงสร้างอสัณฐาน เนื่องจากวัฏภาคของเหลวกับวัฏภาคของผลึกมีปริมาตรแตกต่างกัน ส่วนอัตราการเกิดผลึกจะวัด ณ จุดที่มีการเกิดผลึกร้อยละ 50 และอัตราการเกิดผลึกนี้จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิการเกิดผลึก โดยน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์จะแปรผกผันกับอัตราการเกิดผลึก กล่าวคือถ้าพอลิเมอร์มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะส่งผลให้อัตราการเกิดผลึกต่ำ นอกจากนี้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของผลึกที่เกิดขึ้นเมื่อเวลาแตกต่างกันได้ โดยพล็อตกราฟสัดส่วนของผลึกกับล็อกของเวลา เพื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาในการเกิดผลึกของสารบางชนิดได้ เช่น กราฟสัดส่วน

ของผลึกกับลอการิทึมของเวลาของ Polypropylene ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.6 ซึ่งเป็นการเกิดผลึกโดยที่อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน (y) เป็นฟังก์ชันของเวลา t (Barbara, 2002)



ภาพที่ 1.6 กราฟส่วนที่เกิดผลึกกับลอการิทึมของเวลาของ polypropylene ที่อุณหภูมิต่างๆ
แหล่งที่มา : Barbara (2002)

โดยทั่วไปการเกิดกระบวนการรีโทรเกรเดชันของสารผสมระหว่างน้ำและสตาร์ช (Starch-water mixture) มีกระบวนการเกิดผลึกของสายพอลิเมอร์เกิดขึ้น ดังนั้นการเข้าใจถึงกลไกและอัตราการเกิดผลึกของพอลิเมอร์จึงเป็นสิ่งสำคัญ กระบวนการเกิดผลึกของพอลิเมอร์เกี่ยวข้องกับ 3 ขั้นตอน คือ การเกิดนิวเคลียสของผลึก (Nucleation), การเติบโตของผลึก (Propagation) และการเกิดผลึกที่สมบูรณ์หรือการเติบโตของผลึกอย่างช้าๆ (Maturation) ซึ่งอัตราการเกิดผลึกนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิเป็นสำคัญ กล่าวคือเมื่อพอลิเมอร์เกิดการเย็นตัวผ่านอุณหภูมิของการหลอมเหลว (Melting temperature, T_m) จะมีจุดเริ่มเกิดผลึกเป็นบริเวณเล็กๆ จากนั้น โมเลกุลที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังกระบวนการตัดกิ่งจะเริ่มจัดเรียงตัวกัน ซึ่งหากอุณหภูมิลดลงต่ำกว่า T_m ของผลึก กระบวนการ nucleation จะไม่เสถียรจึงมีอัตราการเกิด nucleation เป็นศูนย์ที่ T_m เนื่องจากการสั่นของอะตอมจากความร้อนจะทำให้ลายการจัดเรียงโมเลกุลให้เป็นระเบียบ แต่เมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า T_m จะเกิด nucleation เพิ่มขึ้น และเมื่อทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่า glass temperature (T_g) อัตราการเกิด nucleation จะมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากอยู่ในสถานะของแข็งและมีอัตราการเกิด propagation เป็นศูนย์ ไม่สามารถเคลื่อนที่แพร่ขยายได้ ขณะที่เมื่ออุณหภูมิลดต่ำกว่า T_g อัตราการเกิด propagation เกิดขึ้นได้

เล็กน้อย ส่วนอัตราการเกิด maturation ก็มีทิศทางเกิดผลึกเช่นเดียวกันกับกระบวนการ propagation ซึ่งอัตราการเกิดผลึกทั้งหมด (Overall crystallization) จะขึ้นอยู่กับอัตราการเกิด nucleation และ propagation เท่านั้น สำหรับระบบที่เป็นกึ่งผลึก (Semi-crystallization) การเกิดผลึกนั้นจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิระหว่าง T_g กับ T_m (Eerlingen et al., 1993)

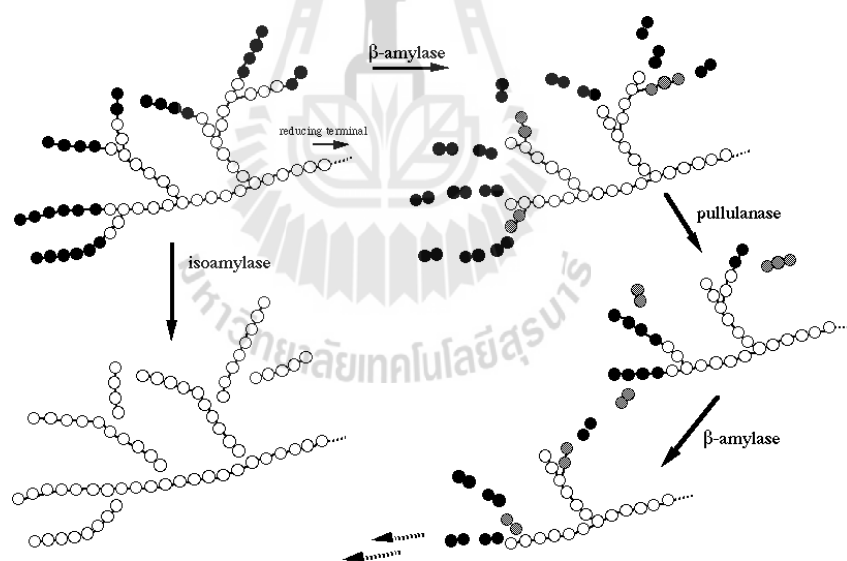
3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS,

RS type III เกิดจากการนำแป้งมาให้ความร้อนจนเกิดเจลาติไนเซชัน ทำให้โมเลกุลของแป้งที่ประกอบด้วยอะมิโลสและอะไมโลเพคตินละลายออกมา เมื่อปล่อยให้เย็น โมเลกุลของอะมิโลสจะสามารถมาจัดเรียงตัวกันใหม่ ได้เป็นผลึกแป้งที่มีความแข็งแรงขึ้น ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า การเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) (Thompson et al., 2000) จากปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้การศึกษาเกี่ยวกับ RS type III มีรากฐานมาจากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช โดยในการนำเสนองานวิจัยเกี่ยวกับการผลิต RS type III ในยุคแรกๆ ใช้แต่ amylo maize VII เป็นวัตถุดิบตั้งต้น (Chiu et al., 1994; Iyengar et al., 1991) เนื่องจากเชื่อว่า RS type III เกิดจากการรีโทรเกรดของโมเลกุลอะมิโลส โดย Lu et al., (1997) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันและโครงสร้างส่วนที่เป็นผลึกของอะมิโลส โดยใช้แป้งมันฝรั่งที่มีอะมิโลสที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน ดูกรีโทรเกรดด้วยอัตราที่ต่างกันด้วยซึ่งแนวโน้มการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของอะมิโลสและความเข้มข้น (Suzuki et al., 1985) โดยหลักการแล้ว การผลิตแป้งให้มี RS ในปริมาณสูงได้นั้น ควรผลิตจากแป้งที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ซึ่งปัจจุบันมีเพียงข้าวโพดเท่านั้นที่เป็นแหล่งที่มีอะมิโลสสูงได้ถึง 50-70% (Hylon V, Hylon VII) โดย Sajilata et al., (2006) รายงานว่า RS ที่ได้จากแป้งข้าวโพดที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (70%) มีปริมาณถึง 20% (dry matter) ซึ่งมากกว่าปริมาณ RS ในแป้งข้าวโพดปกติ (25%อะมิโลส) ที่มีเพียง 3% (dry matter) นอกจากนี้ในส่วนโครงสร้างของแกรนูล ก็พบว่าอะมิโลสมีอิทธิพลต่อการเกิด RS ซึ่งเป็นที่รู้กันดีว่าแป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพดที่มีอะมิโลสสูงมีความทนทานต่อการย่อยและดูดซึมน้ำไม่สมบูรณ์เท่า ถ้าใส่เล็กน้อย ขณะที่แป้งจากธัญพืชส่วนใหญ่จะมีการย่อยและดูดซึมน้ำอย่างช้าๆ แต่สมบูรณ์ ซึ่งอาจเกิดจากแกรนูลที่มีขนาดใหญ่ของแป้งมันฝรั่งมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรน้อยกว่า (Holm et al., 1987) โดยแป้งที่มาจากแหล่งต่างๆกัน ก็จะมีปริมาณ RS แตกต่างกันไป (Goni et al., 1996) นอกจากนี้ อัตราส่วนของอะมิโลสและอะไมโลเพคตินเป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ RS โดยอัตราส่วนดังกล่าวมีปริมาณต่างกัน แป้งเนื่องจากแหล่งที่มาของแป้ง (Tester et al., 2004)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด RS มีหลายปัจจัยด้วยกัน ทั้งปัจจัยทางด้านคุณสมบัติของสตาร์ชที่ประกอบด้วย ความเป็นผลึกของสตาร์ช โครงสร้างของแกรนูล อัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะไมโลเพคติน อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน ความยาวของสายโซ่อะ

มิโลสและส่วนที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลเพคติน (Goni et al., 1996; Sajilata et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยทางด้านสภาวะในกระบวนการผลิต รวมถึงระยะเวลาและอุณหภูมิการเก็บ (Sievert and Pomeranz, 1989; Sajilata et al., 2006) ซึ่งล้วนแต่ส่งผลต่อการเกิดและปริมาณ RS ที่เกิดขึ้น โดยหลักการแล้วการผลิตสตาร์ชRS 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) นอกจากนี้ในโครงสร้างของแอมิลูโลสก็พบว่ามิอิทธิพลต่อการเกิด RS ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าสตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ชข้าวโพดที่มีอะมิโลสสูงมีความทนทานต่อการย่อยและดูดซึมน้ำที่ต่ำได้เล็กน้อย ในขณะที่สตาร์ชจากธัญพืชส่วนใหญ่จะมีการย่อยและดูดซึมง่าย แต่สมบรูณ์ซึ่งอาจเกิดจากแอมิลูโลสที่มีขนาดใหญ่ของสตาร์ชมันฝรั่งที่มีพื้นผิวต่อปริมาตรน้อยกว่า (Haralampu, 2000) สตาร์ชที่มาจากแหล่งที่มาแตกต่างกันก็จะให้ปริมาณ RS แตกต่างกันด้วย (Goni et al., 1996) ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินภายในโครงสร้างสตาร์ช ดังนั้นสตาร์ชข้าวโพดที่มีปริมาณอะมิโลสสูงและสตาร์ชมันฝรั่ง จึงเป็นแหล่งของสตาร์ชที่มี RS นอกจากนี้สตาร์ชข้าวโพดก็สามารถใช้เป็นแหล่งของ RS ได้ ถึงแม้ว่าสตาร์ชข้าวโพดส่วนใหญ่จะมีปริมาณอะมิโลสไม่เกิน 38% แต่ได้มีการพัฒนาและดัดแปรสตาร์ชด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อให้มีปริมาณ RS สูงขึ้น เช่น การทำให้สตาร์ชเกิดการรีโทรเกรเดชัน (Retrograded starch) โดยการให้ความร้อนแก่น้ำสตาร์ชเพื่อทำให้สตาร์ชสุก แล้วทิ้งให้สตาร์ชเกิดการเย็นตัวลง โมเลกุลของสตาร์ชที่ละลายออกมามีเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ได้เป็นผลึกที่แข็งแรงและสามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ โดย Silverio et al. (1985) รายงานว่าสตาร์ช ข้าวสาลีที่ผ่านกระบวนการเจลลาติไนซ์ด้วยเครื่องนึ่งความดัน (Autoclave) มีปริมาณ RS เพิ่มขึ้น 9% เมื่อเทียบกับ native starch ที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลลาติไนซ์และการใช้เอนไซม์ในการย่อยสตาร์ชเพื่อเพิ่มอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน 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 สามารถดำเนินกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 3.5-5 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 45-50 °C และเอนไซม์อีกชนิดคือ พูลูลานเนส (Pullulanase : EC 3.2.1.41) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ตัดพันธะ α -1,6 ของพูลูลานและอะมิโลเพคติน แต่การทำกิจกรรมไม่สมบรูณ์เท่ากับการย่อยโดยไอโซอะมิเลส

และทำกิจกรรมกับไกลโคเจนได้ยาก สามารถย่อยได้สายกลูโคสที่มีความยาว 2-3 หน่วยได้โดย Chiu et al. (1994) ได้พัฒนาวิธีการผลิต RS ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้สตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสมา กกว่า 40% เกิดเจลาติโนเซชัน ตามด้วยการใช้เอนไซม์ตัดกิ่ง (Debranching enzyme) เช่น พุลลู ลานเนสและไอโซอะมิเลส ในการลดขนาดโมเลกุลของสตาร์ช ซึ่งพบว่าการตัดกิ่งพันธะกิ่งของ สตาร์ชด้วยเอนไซม์ตัดพันธะกิ่งมีผลในการเพิ่มปริมาณ RS และการแยกสตาร์ช RS ด้วย กระบวนการเอกทูชันให้ปริมาณ RS สูงกว่าการทำสตาร์ชแบบพ่นฝอย (Spray drying) ดังนั้นการ ตัดพันธะกิ่งของสตาร์ชด้วยเอนไซม์ตัดพันธะกิ่งและการทำแห้งสตาร์ชจึงมีผลต่อปริมาณ RS ที่ได้ Shi et al. (2006) ได้ทำการผลิต RS จากสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสดำ (Waxy maize starch และ Waxy potato starch) โดยการใช้ไอโซอะมิเลสในการตัดกิ่งของอะมิโลเพคติน เพื่อให้ได้สายพอลิ เมอร์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง จากนั้นทำการรีโทรเกรดที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำการสร้างผลึกให้กับ สตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่ง (Debranching starch) และทำแห้งด้วยระบบลม (Air-dried) ซึ่งสามารถ สร้าง RS ได้มากกว่า 70% และมีอุณหภูมิในการหลอมเหลว (Melting temperature) สูงกว่า 110 °ซ



ภาพที่ 1.7 แสดงลักษณะการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยสตาร์ช

แหล่งที่มา :Manners and Matheson (1981)

Gonzalez-Soto et al. (2006) ได้ทำการผลิต RS จากสตาร์ชกล้วย โดยวิธีการ autoclave ร่วมกับการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสที่เวลาต่างๆ ซึ่งพบว่าปริมาณ RS ที่ได้จากการตัดกิ่งอะมิโลเพ คตินที่เวลาต่างๆ มีค่ามากกว่าปริมาณ RS ในสตาร์ชกล้วยที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง โดยมีปริมาณ RS

เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (จาก 9% เป็น 18%) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของBerry (1986) ว่าการตัดพันธะกิ่งของสตาร์ชส่งผลให้เกิดโมเลกุลสายโซ่ที่เป็นเส้นตรงที่สนับสนุนให้เกิด RS ในปริมาณสูง การวิจัยเกี่ยวกับการผลิต RS₃ ในยุคแรกๆ ส่วนใหญ่ใช้ amylo maize VII เป็นวัตถุดิบตั้งต้น (Chiu et al., 1994) เนื่องจากเชื่อว่า RS₃ เกิดจากการรีโทรเกรเดชันของอะมิโลส นอกจากนี้โครงสร้างอะมิโลสที่แตกต่างกันก็เกิดการรีโทรเกรเดชันด้วยอัตราที่แตกต่างกัน ซึ่งแนวโน้มการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสขึ้นกับขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นของอะมิโลส (Shamai et al., 2003) โดย Eerlingen, Crombez and Delcour (1993) ได้ทำการศึกษาผลของความยาวของสายโซ่อะมิโลสต่อการเกิด RS₃ ซึ่งพบว่าความยาวของสายโซ่อะมิโลสที่มี DP 10-100 หน่วยกลูโคสสนับสนุนให้เกิด 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 ของโมเลกุลสายโซ่ที่เป็นเส้นตรงมีผลต่อปรากฏการณ์รีโทรเกรเดชันของสตาร์ชเช่นเดียวกับ Schmiedl et al. (2000) ซึ่งพบว่า DP ประมาณ 20 หน่วยกลูโคสเหมาะสมต่อการสร้าง RS ในปริมาณสูง

เป็นที่น่าสนใจว่าทำไมโครงสร้างที่เป็นอะมิโลเพคตินถึงไม่สนับสนุนการเกิด RS₃ ทั้งนี้เนื่องจากอะมิโลเพคตินมีโครงสร้างที่เป็นกิ่งก้าน แต่อย่างไรก็ตามซึ่งได้กล่าวมาข้างต้นว่ากระบวนการตัดกิ่งสามารถเพิ่มปริมาณ RS ได้ ซึ่ง Lechmann, Jacobasch and Schmiedl (2002) ได้สนับสนุนทฤษฎีดังกล่าว โดยทำการตัดกิ่งสตาร์ชกล้วยที่มีอะมิโลเพคติน 91.53% โดยน้ำหนักแห้งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าปริมาณ RS สูงขึ้นถึง 51% และพบว่าในสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งนั้นมีขนาดโมเลกุลเล็กลงและมีสัดส่วนของ DP 6-22 ในปริมาณสูง เช่นเดียวกับ Pongjanta et al. (2008) ซึ่งทำการตัดกิ่งสตาร์ชมันฝรั่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสเพิ่มระดับการรีโทรเกรดของสตาร์ชจาก 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 หลังผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าสตาร์ชจาก waxy potato ที่ผ่านการตัดกิ่งมีสัดส่วนของสายยาว (Long chain length) สูงกว่าของ waxy wheat, waxy maize ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณ RS และอุณหภูมิในการหลอมเหลว (Melting temperature) สูงกว่าของ waxy wheat, waxy maize อีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า waxy potato ที่มีโครงสร้างเป็นโมเลกุลสายยาวสามารถเพิ่มปริมาณ RS ได้ โดยการใช้กระบวนการตัดกิ่งร่วมกับกระบวนการรีโทรเกรเดชัน ซึ่งโครงสร้าง double helices ที่เกิด

จากโมเลกุลสายยาวมีความแข็งแรง ต้านทานต่อการย่อยของเอนไซม์ และมีเสถียรภาพต่อความร้อน ได้ดีกว่า double helices ที่เกิดจากโมเลกุลสายสั้น

การเพิ่มผลผลิตของ RS₃ นอกจากการใช้เอนไซม์ในการตัดกิ่งแล้ว ยังพบว่ามีอิทธิพลอันเนื่องมาจากสภาวะการเก็บ (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) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณของแข็งของเจลดสตาร์ชมันฝรั่งที่มีปริมาณอะมิโลสน้อยกว่า 10% (Waxy potato starch) ที่ผ่านการตัดกิ่งและผ่านการรีโทรเกรดที่อุณหภูมิ 4 °ซ และ 25 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิการบ่มแตกต่างกันมีผลต่อการเพิ่มปริมาณ RS ได้แตกต่างกันด้วยเนื่องจากอุณหภูมิมิผลต่อการจัดเรียงโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกัน โดยเมื่อบ่มที่ระยะเวลาเท่ากันการบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ ส่งผลให้ปริมาณ RS สูงกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เนื่องจากผลึกที่ได้มีความแข็งแรงกว่า ในขณะที่ Gonzalez-Soto et al. (2006) พบว่าระยะเวลาไม่มีผลต่อปริมาณ RS ของสตาร์ชกล้วยที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง ในขณะที่อุณหภูมิในการเก็บมีผลต่อปริมาณ RS ของ debranched banana starch อย่างมีนัยสำคัญ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 60 °ซ แสดงปริมาณ RS ที่น้อยกว่าการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ และ 32 °ซ

Erlingen et al. (1994) ได้ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลด waxy maize starch ที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ pancreatic alpha-amylase และ amyloglucosidase พบว่าสามารถสร้างปริมาณ RS ได้เพียง 5% Lehmann et al. (2002) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ RS type III จากสตาร์ชกล้วย โดยใช้เอนไซม์ตัดกิ่งของอะมิโลเพคติน ทำให้ได้ DP ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กอยู่ระหว่าง 10–35 หน่วยกลูโคส โดยพบว่าสามารถสร้าง RS ได้ปริมาณสูงถึง 50% ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Thompson (2000) ที่ว่าปริมาณ RS ที่เกิดจากการรีโทรเกรดของอะมิโลเพคตินสามารถเพิ่มขึ้นได้ เมื่อมีการตัดกิ่งของอะมิโลเพคตินด้วยเอนไซม์ pullulanase ดังนั้น การตัดกิ่งอะมิโลเพคตินจึงเป็นแนวทางที่จะทำให้สามารถผลิตแป้งที่มี RS สูงขึ้นได้จากสตาร์ชชนิดอื่นที่ไม่ใช่สตาร์ชข้าวโพดอะมิโลสสูง ดังสิทธิบัตรของ Chiu et al. (1994) กล่าวว่าขั้นตอนการตัดกิ่งของสตาร์ชด้วยเอนไซม์ เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง ในกระบวนการทำ amylose resistant starch จากสตาร์ชที่มีอะมิโลสสูง เนื่องจากอะมิโลเพคตินจะไปรบกวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลส จึงทำให้ปริมาณ retrograded amylose เพิ่มขึ้นได้ด้วย

การกำจัดอะมิโลเพคตินออกด้วยเอนไซม์ที่ตัดกิ่งได้ (Berry, 1986) ดังนั้นการตัดกิ่งสตาร์ชจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มปริมาณ RS ให้สูงขึ้นได้

เป็นที่ทราบกันดีว่าอะมิโลสที่มี DP 80-120 หน่วยกลูโคส มีแนวโน้มการเกิดรีโทรเกรเดชันที่สูงสุด (Gidley and Bulpin, 1989) ดังนั้นการเร่งการเกิดรีโทรเกรเดชันจะเป็นการลดระยะเวลาในการสร้าง RS type III ได้ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลสกับอะไมโลเพคตินพบว่า การเกิดผลึก (recrystallization) ของอะไมโลเพคตินจะเกิดได้ช้าและใช้เวลานานกว่าเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของขนาดของสายโซ่ และผลึกที่เกิดขึ้นก็มีความเสถียรน้อยกว่า (Eerlingen et al., 1995) Eerlingen et al. (1993b) ศึกษาผลของความยาวของสายโซ่อะมิโลสที่มีต่อการเกิด RS type III โดยพบว่าความยาวของสายโซ่อะมิโลสเริ่มต้นมีผลต่อปริมาณ RS ซึ่งเมื่อ DP เพิ่มขึ้นถึง 260 หน่วยกลูโคส RS มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามความยาวของสายโซ่อะมิโลส จนถึงค่าคงที่สูงสุดที่มี RS ประมาณ 28% ส่วนสายโซ่ที่มี DP มากกว่า 260 หน่วยกลูโคส ปริมาณ RS จะลดลงน้อยกว่า 28% ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากการเกิด RS ในสารละลายอะมิโลสที่มี DP น้อยกว่า 100 หน่วยกลูโคส ความยาวของสายโซ่ไม่เพียงพอต่อการเกิดผลึกที่มีความทนทาน ในทางตรงกันข้าม อะมิโลสที่มี DP มากกว่า 300 หน่วยกลูโคส ก็ยากต่อการสร้างสายพอลิเมอร์ที่มีความเป็นผลึกที่ทนทานเช่นกัน ส่วนผลการศึกษาของ Schmieidl et al. (2000) พบว่า poly-1, 4- α -D-glucan ที่มี polymer chain lengths 10-35 หน่วยกลูโคส สามารถผลิต RS ได้สูงถึง 94% ซึ่งมีความเสถียรต่อความร้อนถึงอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นจากการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ได้สูงกว่า retrograded high amylose corn starch (Novelose 330, National Starch)

Eerlingen et al. (1994) ได้ศึกษาถึงผลของอุณหภูมิในการเก็บต่อการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลแป้ง waxy maize starch ซึ่งพบว่าสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 6 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามด้วย 40 °ซ เป็นเวลา 29 วัน ทำให้อัตราการรีโทรเกรเดชันมากขึ้น melting temperature เพิ่มขึ้นทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น และสามารถสร้าง resistant starch ได้สูงถึง 42% ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Fredriksson et al. (2000) ที่รายงานว่าการใช้ temperature cycle ในการรีโทรเกรเดชัน waxy maize starch และ high-amylopectin potato starch มีผลทำให้การย่อยอะมิโลเพคตินด้วยเอนไซม์ α -amylase เกิดขึ้นช้าลง

3.8 ประโยชน์ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่สามารถถูกย่อยสลายได้ในลำไส้แต่จะเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ และผลิตกรดไขมันสายสั้น เช่น แอซิเตต (Acetate), บิวทิเรต (Butyrate) และโพรพิโอเนต (Propionate) ซึ่งสารเหล่านี้คือสารตั้งต้นที่สำคัญของเซลล์เยื่อบุผิวใน

ลำไส้ใหญ่ และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเนื้อร้าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ (Arrigono et al., 1992) นอกจากนี้กรดไขมันทั้งสามชนิดยังเป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์ (Probiotic microorganisms) เช่น bifidobacterium เป็นต้น (Sajilata et al., 2006) จากการที่สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะเหมือนกับไฟเบอร์ (Fiber) จึงส่งผลดีต่อสุขภาพของลำไส้ โดยเพิ่มอัตราการผลิตต่อมเซลล์เล็กๆ หรือลดการฝ่อของเยื่อบุผิวที่ลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชทั่วไป แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะคล้าย กัวร์ไฟเบอร์ที่ละลายน้ำ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเกิดเนื้องอก และลดคลอเรสเตอรอลในเลือด และไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) (Haralampu, 2000)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด เนื่องจากมีความสามารถในการถูกย่อยต่ำซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมการปลดปล่อยปริมาณกลูโคส ซึ่งจากงานวิจัยของ Ranhotra et al. (1997) พบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะเกิดการย่อยภายหลังการบริโภคแล้วประมาณ 5-7 ชั่วโมง ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดและอินซูลินหลังบริโภคอาหารลดลงเมื่อเทียบกับการย่อยสตาร์ชปกติที่ผ่านการให้ความร้อนซึ่งจะเกิดการย่อยทันทีหลังการบริโภคอาหาร เช่นเดียวกับงานวิจัยของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดที่ 3 (RS₃) ที่ผลิตโดยบริษัท CrystaLean[®] นำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร พบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสเลือดของผู้ทดสอบภายหลังการบริโภคอาหารมีค่าต่ำกว่าการบริโภคคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ เช่น สตาร์ชชนิดอื่นๆ โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) และน้ำตาล เป็นต้น โดยสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นตัวลดระดับกลูโคสในเลือดภายหลังรับประทานอาหาร เนื่องจากลดการปลดปล่อยกลูโคส และมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการเผาผลาญ (Metabolism) ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (ไม่ขึ้นกับอินซูลิน)

บทบาทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่นั้นมีรายงานว่ากรดไขมันที่เกิดขึ้นจากการหมักของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่จะช่วยเพิ่มปริมาณของเหลวและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ให้ลดต่ำลง เมื่อเกิดสภาวะกรดขึ้นภายในลำไส้ใหญ่จะเกิดการยับยั้งเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถเปลี่ยนน้ำดีให้เกิดเป็นสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การที่จุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่สามารถย่อยสลายเส้นใยอาหารได้ จึงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ และยังช่วยเพิ่มปริมาณอุจจาระ กระตุ้นให้เกิดการขับถ่ายป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (มลศิริ วิโรทัย, 2545) กรดไขมันบิวทิเรตยังช่วยปรับสภาวะตอนปลายของลำไส้ใหญ่ให้สมบูรณ์ด้วย (Arrigoni et al., 2001; Ferguson et al., 2000) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) ซึ่งจะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อ

ร่างกาย และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogenic microorganisms) ในระบบทางเดินอาหาร

นอกจากนี้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ยังช่วยในการยับยั้งการสะสมไขมัน โดย Higgins et al. (2005) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ผู้ทดสอบเพศชายจำนวน 12 คน ให้บริโภคอาหารที่มีการเติมเส้นใยจากสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งพบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ช่วยลดการสะสมของไขมัน เนื่องจากภายหลังการบริโภคเกิดการออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation) เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุที่ละลายได้จากงานวิจัยของ Moates et al. (1996) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของสตาร์ช 2 ชนิด ได้แก่ สตาร์ชที่มีสัดส่วนของสตาร์ชทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมอยู่ร้อยละ 16 โดยน้ำหนักและสตาร์ชที่ไม่มีการผสม โดยตรวจสอบผลต่อการดูดซึมของแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และสังกะสี ซึ่งผลการทดลองพบว่า สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมและเหล็กของลำไส้มีประสิทธิภาพมากขึ้นนอกจากนี้หน้าที่อื่นๆ ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์หรือเส้นใยอาหาร คือ ช่วยป้องกันการลดสภาวะโรคอ้วน มีบทบาทในการลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน เป็นต้น

ในทางอุตสาหกรรมอาหารสตาร์ชทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ถูกประยุกต์ใช้มากมาย เนื่องจากมีขนาดอนุภาคที่เล็ก ลักษณะปรากฏเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่น มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ดี เช่น ลักษณะการพองตัว, สมบัติทางความหนืดที่เพิ่มขึ้น, สมบัติการเป็นเจล และความสามารถในการจับกับน้ำ นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เนื้อสัมผัสของอาหารมีลักษณะหยาบเหมือนกรวดทราย และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านรสชาติและเนื้อสัมผัส สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์แทนการใช้เส้นใยอาหารจากแหล่งอื่นๆ และใช้เพิ่มปริมาณเส้นใยอาหาร (Fiber fortified) ในผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำ ซึ่งจะใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ปรุงสุกและผ่านการอบ เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์ธัญชาติสำเร็จรูป (RTE Cereal) ขนมขบเคี้ยว อาหารเส้น (Pasta / Noodle) และอาหารทอด เป็นต้น ทั้งนี้ RS₃ เป็น RS ที่ได้รับความสนใจมากกว่า RS ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีความเสถียรต่อความร้อน (Thermal stability) จึงสามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการไว้ได้ในระหว่างกระบวนการหุงต้มปกติ (Shamai et al., 2003) และเนื่องจากโครงสร้างส่วนผลึกของ RS₃ แสดงการเปลี่ยนเฟส (Endothermic transition) ที่อุณหภูมิ 120-160 °C (Han et al., 2006) ดังนั้นจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นสารเติมแต่งที่เป็นพรีไบโอติกที่ทนความร้อนในอาหารได้ ซึ่งจะใช้ในอาหารพวกที่ต้องผ่านการให้ความร้อนหรือผลิตภัณฑ์ประเภทขนมอบ

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1

2.1.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (Suphanburi 90, S90) พืชัญโลก 1 (Phitsanulok 1, P1) พืชัญโลก 2 (Phitsanulok 2, P2) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี อำเภอลำลูกเกด จังหวัดปทุมธานี และข้าวพันธุ์กช 6 (RD6) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยข้าวขอนแก่น อำเภอมือทอง จังหวัดขอนแก่น เอนไซม์พูลูลูแลนส (Pullulanase EC 232-983-9, Sigma no P2986), เอนไซม์ไอโซอะไมเลส (Isoamylase from *Pseudomonas* sp. Sigma no I5284), เอนไซม์อะมิโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase: EC 3.2.1.3 from *Aspergillus niger*, Sigma no A7095) เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase: EC 3.2.1.1 type VI-B from porcine pancreas, Sigma no A3716), เอนไซม์เบตาอะไมเลส (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) และสารเคมีพื้นฐานต่างๆ ซื้อจาก Sigma chemical

2.1.2 การจำแนกประเภทของข้าวพันธุ์ต่างๆ

สตาร์ชข้าวทั้งสามชนิดถูกจำแนกออกเป็นกลุ่มๆ ตามปริมาณอะมิโลส ปรากฏ (% Absolute-amylose) ตามวิธีการวิเคราะห์ของรุ่งนภา และคณะ (2546) โดยการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวด้วยวิธี Gel permeation chromatography (GPC) เริ่มจากการนำสตาร์ชมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะกิ่งแล้วนำสตาร์ชที่ผ่านการย่อยมาแยกตามขนาดด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีทำให้ทราบถึงลักษณะโครงสร้างที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลสและสายโซ่ของอะมิโลเพคตินที่เป็นองค์ประกอบได้ซึ่งสามารถทำการวิเคราะห์ความยาวของสายโซ่ที่เป็นองค์ประกอบในสตาร์ชที่ผ่านการย่อยในทางอ้อมได้ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีน โดยจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสตาร์ชที่ผ่านการย่อยด้วย *Pseudomonas isoamylase* และทำการแยกตามขนาดด้วย GPC พบว่าสตาร์ชประกอบด้วยส่วนที่เป็นองค์ประกอบหลัก 4 ส่วน โดยส่วนแรกคือ ส่วนประกอบที่ 1 (Fraction I, Fr. I) ซึ่งจะเป็นส่วนของอะมิโลสและสายโซ่ของอะมิโลเพคตินที่มีขนาดยาวมากมีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคน - 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 คือส่วนประกอบที่ 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 คือส่วนประกอบที่ 3 (Fraction III, Fr. III) มีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนของกลูแคนไอโอดีนสูงสุดน้อยกว่า 525 ($\lambda_{\text{max}} < 525\text{nm}$) ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 2.1 คุณลักษณะบางประการของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยากับไอโอดีนของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ และ สตาร์ชข้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Isoamylase และทำการแยกตามขนาดด้วย Gel permeation chromatography (GPC) จากสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ

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 ที่มีค่าความยาวคลื่นที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (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)

2.1.3 การเตรียมสตาร์ชของข้าวพันธุ์ต่างๆ

ทำการเตรียมสตาร์ชข้าวโดยนำเมล็ดข้าวมาผ่านกรรมวิธีการโม่เปียกเพื่อให้ได้ฟลาวข้าว จากนั้นทำการสกัดโปรตีนตามวิธีการของ Sawai และ Morita (1968) เพื่อให้มีโปรตีนเหลือ น้อยกว่าร้อยละ 0.5 โดยเริ่มจากนำฟลาวมาแชในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 แล้วทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกสารละลายเกลือออก ในขั้นตอนต่อมา นำตะกอน สตาร์ชมาสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 กรองแยกตะกอนสตาร์ช จากนั้นสกัดโดยการแช่ ตะกอนสตาร์ชในสารละลายค่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.25 สกัคนาน 16 ชั่วโมง และทำการ ล้างล้างออกจากตะกอนสตาร์ชจนกระทั่งพีเอชของน้ำล้างตะกอนสตาร์ชมีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ขั้นตอนสุดท้ายล้างตะกอนสตาร์ชด้วยน้ำกลั่น และอบตะกอนสตาร์ชที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และทำการบดและร่อนตัวอย่าง เก็บตัวอย่างสตาร์ชที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้สำหรับ วิเคราะห์ต่อไป

2.1.4 การศึกษาคุณสมบัติของสตาร์ชข้าว

2.1.4.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ โดยทำการวิเคราะห์ โปรตีน, ไขมัน, เยื่อ และเถ้า ตามวิธีของ AOAC (1990)

2.1.4.2 ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการเกิดสีไอโอดีน ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะ มิโลสที่เป็นองค์ประกอบของข้าวพันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธีการเกิดสีไอโอดีน (Julino, 1971) และชุดตรวจ วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสหลังจากทำการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วยวิธี Concanavalin-A หรือ ConA (Amylose/Amylopectin assay kit, Megazyme)

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

เช่นเดียวกันสำหรับตัวอย่างสตาร์ชที่ทำการชั่งน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม (โดยน้ำหนักแห้ง) เติม 3%(w/v) L- α -lysophosphatidylcholine (LPC) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและนำไปให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 20 °ซ ถึง 180 °ซ (heating rate 5 °ซ /นาท) แล้วจึงทำการลดอุณหภูมิลงถึง 4 °ซ (cooling rate 10 °ซ /นาท) และให้ความร้อนอีกครั้งจนถึง 140 °ซ (heating rate 5 °ซ /นาท) 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

2.1.4.4 ศึกษาการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ช (Chain length distribution)

ซึ่งตัวอย่างสตาร์ช 6-7 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 4.69 มิลลิตร ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตรท 1 โมลาร์ (พีเอช 3.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Isoamylase (11,084.31 ยูนิต/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 100 โมลาร์ปริมาตร 200 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์โครงสร้างของ debranched starch ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD (Dionex ICS3000, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) ใช้คอลัมน์ Carbowax PA200 โดยปริมาณสารตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์เท่ากับ 50 ไมโครลิตร สำหรับ mobile phase ที่ประกอบด้วย eluent A คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์และ eluent B คือ โซเดียมอะซิเตรท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.15 โมลาร์โดยการไหลของ mobile phase ควบคุมโปรแกรมให้เป็น gradient แสดงดังตารางที่ 3.2 และอัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที

2.1.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

2.1.5.1 เอนไซม์พูลูลานเนส

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

ตารางที่ 2.2 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 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายเอนไซม์พุลลูแลนเนสที่ทำการเจือจาง 10,000 เท่า ใน 0.1 โมลาร์ acetate buffer พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นระยะเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม Somogyi's copper reagent ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐานตามวิธีการของ Somogyi's method (Somogyi, 1952) สำหรับแบลงค์ทำการเติม Somogyi's copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมพุลลูแลนเนสและเอนไซม์ก่อนการบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตรจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยออกมาได้ ต่อนาที โดยเอนไซม์พุลลูแลนเนสมีกิจกรรมเท่ากับ 483.3 PUN/มิลลิลิตร

2.1.5.2 เอนไซม์ไอโซอะมิเลส

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไอโซอะมิเลสตามวิธีการของ Novo industri A/S (1983) โดยดูดสารละลายอะมิโลเพคตินมันฝรั่งความเข้มข้นร้อยละ 0.4 (w/w) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่ระดับความเจือจาง 10,000 เท่าในสารละลายอะซิเตทรพพ์เฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยเติม Somogyi's copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐานตามวิธีการของ Somogyi's method (Somogyi, 1952) โดยแบลงค์ทำการเติม Somogyi copper reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมระหว่างอะมิโลเพคตินมันฝรั่งและเอนไซม์ก่อนบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ โดย Novo industry AIS (1983) ให้นิยามว่า isoamylase 1 Unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยอะมิโลเพคตินเป็นคาโบไฮเดรตรีดิวซ์ที่มีกำลังรีดิวซ์สมมูลกับกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 °ซ

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

2.1.6 การแยกอะมิโลสออกจากตัวอย่างสตาร์ชข้าว

ซึ่งตัวอย่างสตาร์ชข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (S90) น้ำหนัก 1 กรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 90 °ซ เป็นเวลา 10 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000x g เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งในขณะที่ส่วนของตะกอนถูกล้างอีกครั้ง โดยการเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนอีกครั้งที่อ่างน้ำอุณหภูมิ 90 °ซ 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 ไมครอน ตัวอย่างสตาร์ชถูกเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เพื่อใช้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

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

2.1.7 การเตรียมสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่ง

เตรียมตัวอย่างสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่งทั้งสามพันธุ์ โดยเตรียมเจลสตาร์ชที่ระดับความเข้มข้น 10 โดยน้ำหนัก ในสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์พีเอช 5.0 โดยให้ความร้อนกับสารละลายสตาร์ชที่อุณหภูมิ 85 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำเข้าหม้อนึ่งความดัน

(Autoclaved) ที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้สารละลายสตาร์ชข้าวเกิดเจลอย่างสมบูรณ์ จากนั้นทำให้เย็นจนอุณหภูมิของเจลสตาร์ชอยู่ที่ 50 °ซ ทำการเติมเอนไซม์พุลูลานเนสและเอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส ที่ระดับ 45 PUN/กรัมสตาร์ช และบ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในระหว่างระยะเวลาบ่มทำการสุ่มตัวอย่างสตาร์ชสตาร์ชข้าวตัดกิ่ง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมกับสารละลายเข้มข้น DMSO และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °ซ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ ตัวอย่างถูกทำให้เย็นและทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ (reducing suger content : R) เทียบกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar content :TS) ด้วยวิธีphenol-sulfuric acid (Dubois et al., 1956) โดยแต่ละตัวอย่างทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ เพื่อใช้ในการคำนวณระดับการตัดกิ่ง 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)

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

2.1.8 β -amylolysis limit of debranched starch

วิธีการวิเคราะห์ β -amylolysis limit ดัดแปลงจากวิธีการของ Hood and Mercier (1978) โดยสารละลายของ debranched starch ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ถูกผสมกับอะซิเตรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์พีเอช 4.8 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์เบตาอะมิเลส (β -amylase) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร (20 หน่วย/มิลลิลิตร) และน้ำปราศจากไอออน 1.0 มิลลิลิตร ส่วนผสมทั้งหมด ถูกบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงค์ (reducing suger, R) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar, TS) เพื่อใช้ในการคำนวณ β -amylolysis limit ตามสมการ

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

2.1.9 การวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

การวิเคราะห์ปริมาณ RS ของสตาร์ชข้าวทั้งสามชนิดทั้งก่อนและหลังการตัดแปร โดยวิธีการวิเคราะห์ที่ดัดแปลงจากวิธี AOAC method (2002) โดยทำการชั่งตัวอย่างสตาร์ช 100 มิลลิกรัมลงในหลอดป่นแห้งที่มีฝาปิดขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายอะซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์พีเอช 5.0 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ผสมเอนไซม์แพนกรีเอติกแอลฟาอะมิเลส (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) ค่อยๆ เทส่วนใสทิ้งและรอให้ตะกอนสตาร์ชแห้ง จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์พีเอช 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

2.1.10 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° โดยสภาวะการ

ตั้งค่าเครื่องในการวัดคือ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมป์ ศักย์ไฟฟ้า 40 กิโลโวลต์ ความกว้าง divergence slit 1° ความกว้าง antiscattering slit 1° ความเร็วในการตรวจวัด 0.48 °/นาที ทำการคำนวณหาปริมาณผลึก (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)

2.1.11 การตรวจวัดคุณสมบัติทางความร้อน

ศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง differential scanning calorimeter (DSC) โดยชั่งตัวอย่างสตาร์ชข้าว 7-8 มิลลิกรัม ลงใน stainless steel DSC pan ขนาด 60 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเติมน้ำปราศจากไอออน 22-23 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ขำคืนเพื่อให้เข้าสู่สมดุล จากนั้นทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงเชิงความร้อนด้วยเครื่อง Mettler DSC 1 instrument (Mettler, Naenikon-Uster, Switzerland) โดยตั้งโปรแกรมในการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 25-200 °ซ ที่อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 10 °ซ / นาที โดยใช้ระบบ intracooler ในการให้ความเย็น และใช้ pan เปล่าเป็นตัวอ้างอิง (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)

2.1.12 การศึกษาจลนพลศาสตร์การเกิดรีโทรเกรเดชันด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์ (kinetic) ของการเกิดรีโทรเกรเดชันใน โครงสร้างผลึกของ สตาร์ชข้าวทั้งก่อนและหลังการตัดแปรด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy : FTIR) โดยใช้ GX FTIR spectrometer (Perkin Elmer Inc., Boston, MA, USA) เซลล์วัดตัวอย่าง ชนิด attenuated total reflectance (ATR) ซึ่งทำจากผลึกของ ZnSc ที่มีมุมของแสงตกกระทบตัวอย่าง ที่ 45 °ซ โดยตัวอย่างสตาร์ชข้าวหลังทำการตัดกึ่งตามวิธีในข้อ 3.6 ถูกนำมาลดอุณหภูมิลงจนถึง 4 °ซ แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ 1,200-1,800 cm^{-1} โดยมีค่า resolution เท่ากับ 4 cm^{-1} และ 16 scan ในการวัดแต่ละครั้งและใช้ deconvoluted factor เท่ากับ 1.5 คำนวณอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ความถี่ (wave number) 1047 cm^{-1} ต่อ 1037 cm^{-1} ศึกษา

2.2.2. การเตรียมแป้งข้าวและการแยกสตาร์ชข้าว

นำข้าวที่ผ่านการขัดสีแล้วจากโรงสีข้าวสหกรณ์การเกษตรชุมชน โลกเพชรบ้านสระมโนราห์ จังหวัดนครราชสีมา มาล้างและแช่น้ำในอัตราส่วนข้าวต่อน้ำ 1:2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาไม่เปียก จากนั้นเหวี่ยงแยกน้ำออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตะกร้า นำเข้าอบแห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 1 คืน และนำแป้งหลังอบมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด แป้งแห้งนำมาสกัดแยกสตาร์ชข้าวตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ju และคณะ (2001) โดยนำแป้งข้าว 1000 กรัม แช่ในสารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 0.25% ปริมาตร 4,000 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองและนำมากวนผสมในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 95% ปริมาตร 2,500 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองและนำมากวนผสมกับสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเหวี่ยงแยกสารละลายด่างด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตะกร้า ล้างด้วยน้ำประปาและปั่นเหวี่ยงแยกน้ำจนกระทั่งมี pH ประมาณ 7 และล้างอีกครั้งด้วยน้ำคั้นระบบปริเวอร์ สออสโมลิส นำเข้าอบแห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 1 คืน และนำสตาร์ชหลังอบมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 75-150 เมช

2.2.3. การเตรียมแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (Resistant starch, RS)

เตรียมตัวอย่างเจลสตาร์ชข้าวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 21 โดยน้ำหนัก ในสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.5 โดยให้ความร้อนกับสารละลายสตาร์ชข้าวที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 85 °ซ เป็นระยะเวลา 20 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนในน้ำเดือดนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นถึงอุณหภูมิ 50 °ซ เติมเอนไซม์ไอโซอะมิเลสความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อกรัมของสตาร์ชแห้ง ทำการตัดกึ่งที่สภาวะอุณหภูมิ 50 °ซ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจาก 24 ชั่วโมง แบ่งสารละลายสตาร์ชตัดกึ่งเป็นสองส่วน ดังนี้ (1) ส่วนแรกนำไปทำแช่แข็งแบบรวดเร็วด้วยไนโตรเจนเหลว ก่อนการทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างสตาร์ชตัดกึ่งแห้ง (debranched starch, DBS) ที่ได้ไปบดและร่อนผ่านตะแกรงให้มีความละเอียด 105-75 ไมครอนเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติทางโครงสร้าง วิเคราะห์ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์และตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (2) ส่วนที่สอง นำสารละลายสตาร์ชตัดกึ่งที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ 50 °ซ ในตู้บ่มเป็นระยะเวลา 6 วัน เปรียบเทียบกับการเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยตัวอย่างที่ศึกษาสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ จะถูกนำมาทำให้เย็นอย่างรวดเร็วถึงอุณหภูมิห้องโดยการผ่านน้ำประปាក่อนเก็บในตู้บ่ม จากนั้นนำตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (Resistant starch, RS) ไปทำแห้งโดยตัวอย่างที่เก็บที่อุณหภูมิ 50 °ซ จะนำเข้าอบแห้งในตู้อบร้อนที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 1 คืน และตัวอย่างที่เก็บ

ที่อุณหภูมิ 25 °C จะทำแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืนตัวอย่างเป็งทนย่อยต่อเออนไซม์ที่เตรียมได้นำมาวิเคราะห์ปริมาณเป็งทนย่อยต่อเออนไซม์ และตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

2.2.4. การวิเคราะห์ปริมาณเป็งทนย่อยต่อเออนไซม์

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเออนไซม์ในข้อ 1.9

2.2.5. ตรวจสอบคุณสมบัติทางโครงสร้าง

2.2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสโดยวิธีการวัดสีตัดแปลงจากวิธีของ Juliano, 1971 โดยวัดปริมาณอะมิโลสในสตาร์ชจากการทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ในตัวอย่างเทียบกับปริมาณอะมิโลสต่ออะมิโลเพคตินจากแป้งมันฝรั่งซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐาน

2.2.5.2 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิคการคัดแยกตามขนาดด้วยวิธีการทางโครมาโตกราฟี (High Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC) ร่วมกับ multi-angle light scattering (MALLS) and differential reflective index (DRI) detection) ตัดแปลงจากวิธีของ Pohu และคณะ, 2004 โดยตัวอย่างสตาร์ชตัดกึ่งแห้ง (DBS) 50 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 2 วัน เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 4.5 มิลลิลิตร และทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ HPSEC จะมีค่าเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอนก่อนฉีดเข้าคอลัมน์และควบคุมตัวอย่างที่จะทำการคัดขนาดให้มีปริมาตรเท่ากับ 200 ไมโครลิตร โดยใช้ Water 717 autosample ควบคุมการฉีดตัวอย่าง ใช้คอลัมน์ Hemabio 3 คอลัมน์ (Hemabio 1000, 100 และ 10 ขนาด 250 mm × 8 mm) จากบริษัท Sopares (Gentilly, France) ต่อร่วมกับ guard column จากบริษัท Sopares โดยควบคุมอุณหภูมิในการวิเคราะห์ที่ 40 °C ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Crococol (Bordeux, France) และใช้ปั๊ม P680 HPLC pump ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาทีใช้ดีเทคเตอร์ร่วมกัน 2 ดีเทคเตอร์ ได้แก่ MALLS instrument (Dawn, HELEOS™) ประกอบกับ K5 flow cell และ He-Ne laser ($\lambda=658$ nm) (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA) และ ERC-7515 Refractometer (Erma, Tokyo, Japan) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือ 0.1 N KOH ที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอนและดึงแก๊สออก ระบบจะมีการปล่อยให้ mobile phase ไหลผ่านที่อัตราการไหล 1

มิลลิลิตรต่อนาที่ก่อนการใช้งาน โครมาโตรแกรมที่ได้จะนำมาอ่านออร์มัลไลซ์เพื่อให้มีพื้นที่ใต้พีคเท่ากัน

2.2.5.3 การวิเคราะห์การกระจายสายโซ่ด้วยเทคนิคการคัดแยกตามขนาดด้วยวิธีการทางโครมาโตกราฟีแลกเปลี่ยนประจุ (High performance anion exchange chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD) โดยใช้ดีเทคเตอร์แบบ Pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) ตัวอย่างสตาร์ชตัดกิ่งแห้ง (DBS) 50 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 2 วัน เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 4.5 มิลลิลิตร และทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 เท่า ความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอย่างก่อนวิเคราะห์ HPSEC จะมีค่าเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอนก่อนฉีดเข้าคอลัมน์และควบคุมตัวอย่างที่จะทำการคัดขนาดให้มีปริมาตรเท่ากับ 90 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ PA-200 เพื่อคัดขนาดของสายกลูแคนและควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที่ โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ประกอบด้วย eluent A คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ eluent B คือ โซเดียมอะซิเตรตเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์

2.2.6. การตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

2.2.6.1 ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างทางผลึก ด้วยเทคนิค X-ray diffraction

(XRD)

ตัวอย่างสตาร์ชตัดกิ่งและแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์นำมาปรับความชื้นให้มีความชื้นร้อยละ 17-20 ด้วย water sorption ที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 90 ก่อนทำการวิเคราะห์ โดยตัวอย่างนำมาตัดเทปกาว 2 ด้านเพื่อป้องกันการสูญเสียไอน้ำระหว่างการวิเคราะห์ และตรวจสอบผลึกด้วยเครื่อง X-ray diffractometer รุ่น BRUKER™ D8 Discover (Karlsruhe, Germany) โดยใช้ 1.54\AA Cu K α ในการกำเนิดรังสีเอกซ์ ทำการตรวจวัด diffraction pattern ในช่วงมุม (2θ) $3-35^\circ$ โดยกำหนดสภาพการตรวจวัดดังต่อไปนี้ กระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ ศักย์ไฟฟ้า 40 กิโลโวลต์ รังสีที่กระเจิงจะถูกตรวจจับด้วย two-dimensional GADDS detector โดยใช้ระยะเวลาในการบันทึก 600 วินาที ระยะห่างระหว่างตัวอย่างและดีเทคเตอร์เท่ากับ 100 มิลลิเมตร คำนวณหาปริมาณผลึก (Relative crystallinity) ตามแบบวิธีของ Frost และคณะ, 2009 คำนวณปริมาณผลึกจากสัดส่วนพื้นที่ส่วนผลึกต่อพื้นที่ทั้งหมด

2.2.6.2 วิเคราะห์คุณสมบัติการเกิดเจลด้วยเทคนิค scanning Differential

Calorimetry (DSC)

ซึ่งตัวอย่าง 10 มิลลิกรัมและน้ำปราศจากไอออน 40 มิลลิกรัมลงใน stainless steel DSC pan ที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำไปตรวจ สอบคุณสมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง **Differential Scanning Calorimeters** รุ่น TA Q100 (TA Instruments, New Castles, DE, USA) ที่มีระบบให้ความเย็นด้วย Intracooler และตั้งโปรแกรมในการวิเคราะห์ซึ่งให้อุณหภูมิตั้งแต่ 10 ถึง 200°ซ ที่อัตรา 3°ซต่อนาทีโดยใช้น้ำปราศจากไอออน 40 มิลลิกรัมใน stainless steel pan เป็น reference และ Indium เป็น standard ในการวิเคราะห์จาก DSC thermograms วิเคราะห์ค่าคุณสมบัติทางความร้อนดังนี้ onset temperature (To) peak temperature (Tp) conclusion temperature (Tc) และ enthalpy (ΔH) โดยใช้ Advantage Software v5.4.0 (TA Instruments, New Castles, DE, USA)

2.2.6.3 ตรวจสอบรูปร่างด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron microscope)

ตัวอย่างจะนำมาฉาบเคลือบด้วยทองให้มีความหนา 50 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Fine Coater Ion Sputter รุ่น JFC-1100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) ที่ศักย์ไฟฟ้า 20 กิโลโวลต์และนำมาส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด รุ่น JSM-5800LV (JEOL Ltd., Tokyo, Japan)

2.2.7. 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 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล

ตอนที่ 1

3.1.1 องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ

จากการสกัดสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ตามวิธีการของ Sawai and Morita (1968) และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าวประกอบด้วย ความชื้น โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร 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 แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์ข้าว	องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)			
	ปริมาณคาร์โบไฮเดรต	ปริมาณโปรตีน	ปริมาณไขมัน	ปริมาณเถ้า
RD6	98.78	0.51±0.18	0.22±0.05	0.49±0.00
P2	98.65	0.51±0.10	0.27±0.08	0.57±0.01
S90	98.60	0.46±0.05	0.29±0.08	0.65±0.01

3.1.2 ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ

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% ซึ่งจากการวิเคราะห์ทำให้สามารถจำแนกข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม โดยสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 จัดอยู่ในกลุ่มข้าวพันธุ์ที่มีอะมิโลสต่ำเป็นองค์ประกอบ (Low amylose rice) ซึ่งมีปริมาณอะมิโลส ปากฏ

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

ตารางที่ 3.2 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±0.59	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: ^aวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนตามวิธีการของ 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 สามารถแบ่งพันธุ์ข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยไอโอดีน แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนให้ค่าที่สูงกว่าการวิเคราะห์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วย con A พบว่าร้อยละของอะมิโลสปรากฏเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนและวิธี con A ให้ค่าในช่วง 8.77 ถึง 44.73 และ 4.98 ถึง 24.92 ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2) 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) พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของอะมิโลเพคตินที่แยกจากสตาร์ชและนำมาผ่านการย่อยด้วยด้วย *Pseudomonas isoamylase* และทำการแยกตามขนาดด้วย gel permeation chromatography (GPC) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างสายโซ่ที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลอะมิโลเพคตินได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของข้าวพันธุ์ต่างๆ ทั้ง 4 วิธีคือการเกิดสีกับไอโอดีน, DSC, การตกตะกอนด้วย Con A และคัดแยกขนาดด้วย gel permeation chromatography (GPC) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนเป็นการวัดปริมาณของกลูแคนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอโอดีนและให้สารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ใช้วิเคราะห์ได้ ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงนั้นจึงเป็นผลรวมทั้งหมดของโมเลกุลกลูแคนดังกล่าวซึ่งมีทั้งอะมิโลสและอาจมีบางส่วนของอะมิโลเพคตินจึงรบกวนการวิเคราะห์ได้ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนในกรณีสตาร์ชของข้าวพันธุ์ RD6 ที่ไม่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีนจะให้ค่าปริมาณอะมิโลส 8.77% ซึ่งเป็นผลมาจากการรบกวนของโมเลกุลอะมิโลเพคตินต่อการวิเคราะห์วิธีนี้และจะพบในสตาร์ชข้าวทุกพันธุ์และจะเกิดขึ้นมากเมื่อโมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีโครงสร้างของสายโซ่ที่มีขนาดความยาวมากเป็นองค์ประกอบ(รุ่งนภา และคณะ, 2546) ในขณะที่พันธุ์ข้าวที่โมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (Super long chain) เช่น ข้าวพันธุ์ P2 และ S90 พบว่าปริมาณอะมิโลสที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Con A จะใกล้เคียงกับค่าปริมาณอะมิโลสปรากฏที่ได้จาก GPC ดังแสดงในตารางที่ 3.2 โดยค่าปริมาณอะมิโลสปรากฏที่ได้จากวิธี Con A จะให้ค่าที่สูงกว่าปริมาณอะมิโลสที่แท้จริงที่ได้จาก GPC ทั้งนี้อธิบายได้ว่า Con A จะมีความสามารถในการตกตะกอนโมเลกุลใหญ่ซึ่งได้แก่อะมิโลเพคตินแต่ในกรณีที่สตาร์ชข้าวที่มีโมเลกุลที่ขนาดกลาง (intermediate fraction) จะทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้สูงกว่าเนื่องจากโมเลกุลขนาดกลางบางส่วนอาจไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วย Con A (Sievert and Lausanne, 1993)

รุ่งนภา และคณะ (2546) รายงานว่าปริมาณอะมิโลสที่แท้จริง (Absolute amylose) ของสตาร์ชข้าวสามารถหาได้จากผลต่างของปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในส่วนของ Fr I ของสตาร์ช

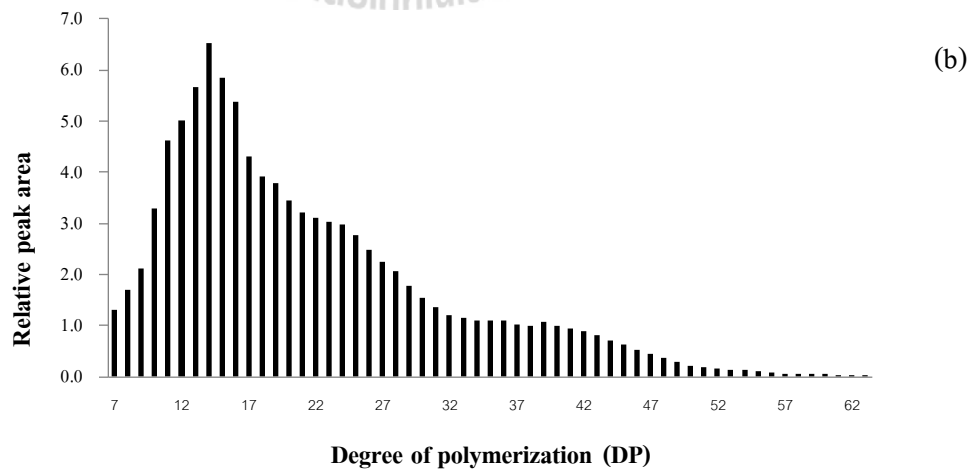
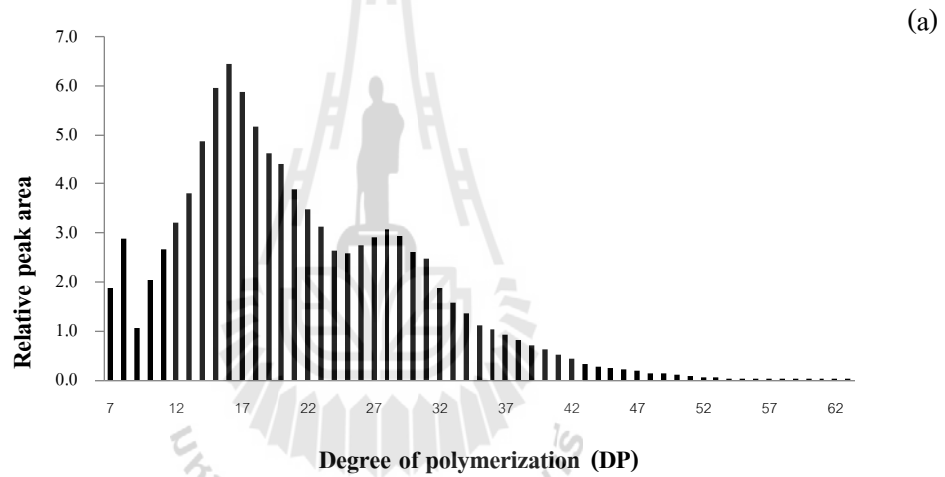
ข้าวกับปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในส่วนของ Fr I ของอะมิโลเพคตินที่แยกจากสตาร์ชข้าว และสามารถจัดกลุ่มตามปริมาณอะมิโลสที่แท้จริงได้เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มที่ไม่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบได้แก่ข้าวพันธุ์ RD6 (โครมาโตแกรมของสตาร์ชและอะมิโลเพคตินที่ผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์ไอโซอะมิเลสประกอบด้วย Fr. II และ Fr. III เท่านั้น) กลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบปานกลางได้แก่พันธุ์ P2 (%Absolute amylose ที่เป็นองค์ประกอบร้อยละ 14.88) และกลุ่มที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบสูงได้แก่ S90 มี %Absolute amylose ที่เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 18.85

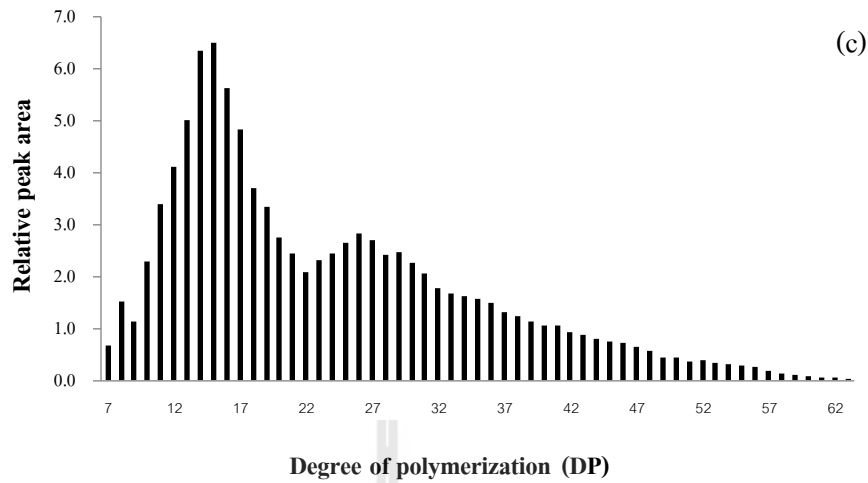
3.1.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ

Hizukuri (1995) ได้เสนอแบบจำลองโครงสร้างอะมิโลเพคตินที่ประกอบไปด้วยกิ่งก้านที่เป็นสายโซ่กลูแคนที่มีขนาดความยาวต่าง 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 3.3 พบว่าความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) สามารถแบ่งออกเป็น 4 ช่วงคือ DP 6-12, DP 13-24, DP 25-36 และ $DP \geq 37$ ซึ่งสตาร์ชทั้งสามชนิดมีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 โดยความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวแต่ละสายพันธุ์แสดงในภาพที่ 3.1 สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และสุพรรณบุรี 90 (S90) มีสัดส่วนร้อยละการกระจายตัวในช่วง DP 6-12 และ $DP \geq 37$ สูงกว่าข้าว RD6 และการกระจายตัวในช่วง DP 13-24 ต่ำกว่า RD6 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของรุ่งนภา และคณะ (2546)

ตารางที่ 3.3 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ

Sample	Branch chain length distribution of amylopectin (%) distribution			
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP \geq 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





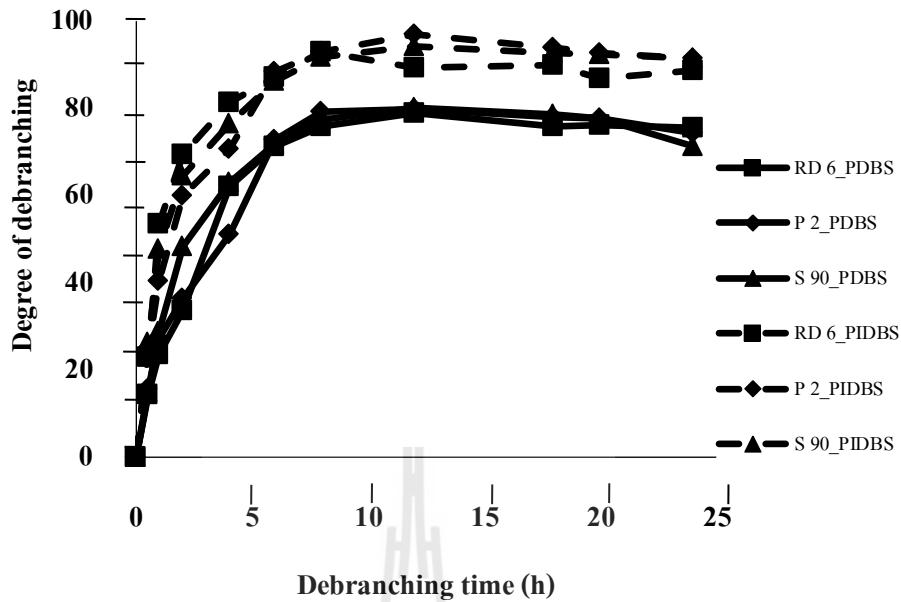
ภาพที่ 3.1 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ (a) RD6, (b)P2 และ (c) S90

3.1.4 ชนิดของเอนไซม์ตัดกิ่งต่อระดับการตัดกิ่ง

โครงสร้างโมเลกุลของสตาร์ชเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิด RS โดยจากงานวิจัยพบว่า RS₃ ส่วนใหญ่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ของโมเลกุลอะมิโลส และอะมิโลเพคตินที่ถูกตัดกิ่ง (Debranched amylopectin) ซึ่งการตัดกิ่งโมเลกุลของอะมิโลเพคตินทำให้สัดส่วนของโมเลกุลเส้นตรงเพิ่มขึ้น จึงส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ resistant starch (RS) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการตัดกิ่งโมเลกุลสตาร์ชด้วยเอนไซม์ตัดกิ่ง (Debranching enzyme) ซึ่งเอนไซม์ตัดกิ่งโดยทั่วไปมี 2 ชนิดคือ ไอโซอะมิเลส (Isoamylase) และเอนไซม์พูลูลานเนส (Pullulanase) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการย่อยสตาร์ชได้แตกต่างกัน ดังนั้นในขั้นตอนแรกจึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการตัดกิ่งของเอนไซม์ทั้งสองชนิดและศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่มีผลต่อปริมาณและคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของ RS₃ โดยเริ่มแรกของการศึกษาได้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิด ซึ่งพบว่าเอนไซม์พูลูลานเนสมีกิจกรรมเท่ากับ 488.43 PUN/ml ในขณะที่เอนไซม์ไอโซอะมิเลสมีกิจกรรมเท่ากับ 11,084.31 U/ml

การหาสถานะที่เหมาะสมในการตัดกิ่งสตาร์ชของการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นจากงานวิจัยเรื่องการพัฒนาระบบการผลิตสตาร์ชข้าวที่ทนต่อการย่อย ที่ทำการศึกษาดัวแปรอิสระที่มีผลต่อการตัดกิ่ง 3 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของสตาร์ชข้าว, ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยและระยะเวลาในการย่อยเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเลือกสถานะในการตัดกิ่งสตาร์ชข้าว และเนื่องจากตัวแปรอิสระที่ทำการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือชนิดของเอนไซม์ ดังนั้นในการทดลองจึงได้ทำการ

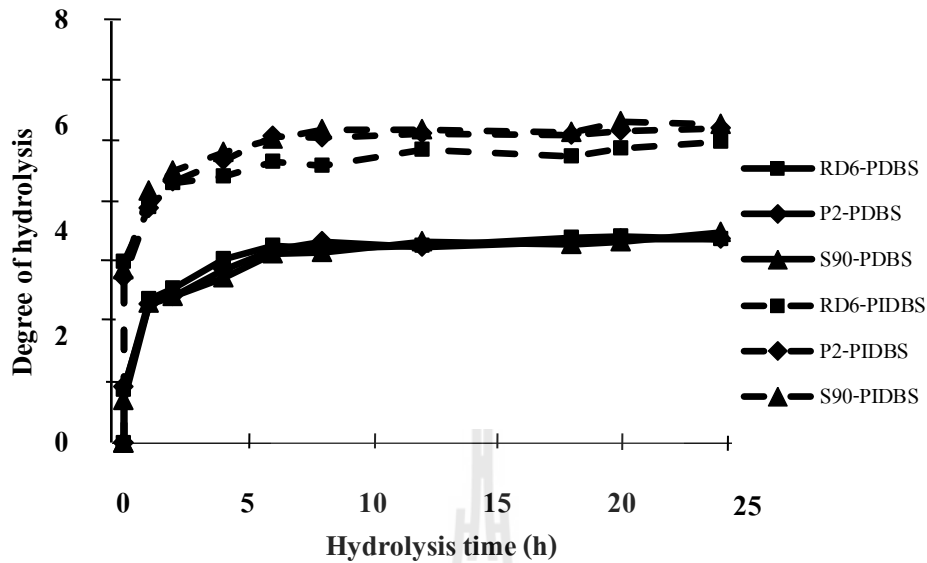
กำหนดตัวแปรตามอื่นๆให้คงที่ โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสตาร์ชทั้งสามชนิดอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10%w/w ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ระดับ 45PUN/g of starch และระยะเวลาในการย่อย 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์และทำการติดตามระดับการตัดกิ่ง (Degree of debranching, DB) และระดับการย่อย (Degree of hydrolysis, DH) ที่เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาในการย่อย โดยทำการเตรียมตัวอย่างเจลสตาร์ชข้าวที่ระดับความเข้มข้น 10%w/w จากนั้นเติมเอนไซม์ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกทำการเติมเอนไซม์พูลลูลานเนส ที่ระดับความเข้มข้น 45PUN/g of starch ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เติมเอนไซม์พูลลูลานเนส ที่ระดับ 41.5PUN/g of starch และเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่ระดับความเข้มข้น 3.5 U/g of starch จากนั้นบ่มตัวอย่างทั้งสองที่อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งตลอดระยะเวลาในการย่อยได้ทำการสุ่มตัวอย่างออกมาเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซิง (Reducing sugar) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) เพื่อใช้ในการคำนวณระดับการตัดกิ่ง และระดับการย่อย ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3.2 และ 3.3 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นระดับการตัดกิ่ง และระดับการย่อยเพิ่มขึ้นในทุกสภาวะการย่อย และเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาในการย่อยมากกว่า 10 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพูลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase + Isoamylase debranched starch : PIDBS) มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยสูงกว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพูลลูลานเนส (Pullulanase debranched starch : PDBS) โดย PIDBS มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยอยู่ที่ 90%DB และ 6%DH ในขณะที่ PDBS มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยอยู่ที่ 80%DB และ 4%DH ตามลำดับ (ดังภาพที่ 3.2 และ 3.3)



ภาพที่ 3.2 ระดับการตัดกิ่งของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนส (Pullulanase debranched starch : PDBS) และสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch : PIDBS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

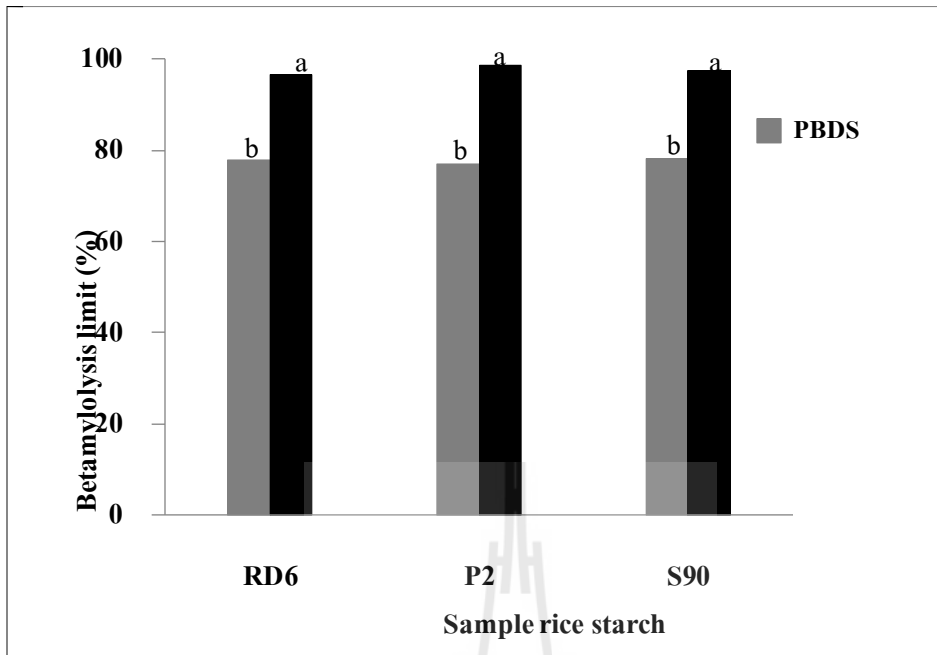
เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยของข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่าเมื่อทำการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสข้าวทั้งสามพันธุ์มีระดับการตัดกิ่งไม่แตกต่างกัน (มีระดับการตัดกิ่งประมาณ 90%) ดังแสดงในภาพที่ 3.2 ในขณะที่ระดับการย่อยของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์แตกต่างกัน (ภาพที่ 3.3) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้เอนไซม์สองชนิดร่วมกัน โดยมีข้าวพันธุ์ S90 และ พันธุ์ P2 มีระดับการย่อยสูงกว่าพันธุ์ RD6 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากทั้งข้าวพันธุ์ S90 และ P2 มีทั้งอะมิโลสและอะมิโลเพกตินอยู่ในโครงสร้างและในระหว่างกระบวนการเจลาติไนเซชัน โมเลกุลของอะมิโลสบางส่วนถูกปลดปล่อยออกมา โครงสร้างของสตาร์ชเกิดการแตกตัว ดังนั้นเมื่อทำการเติมเอนไซม์ลงไปเอนไซม์จึงสามารถเข้าไปในโครงสร้างได้ง่าย ซึ่งแตกต่างจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ที่โครงสร้างมีอะมิโลเพกตินอย่างเดียวและโครงสร้างที่มีความเป็นกิ่งก้านสูง (Highly branch structure) ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ยากกว่า เนื่องจากเอนไซม์จึงเข้าไปในโครงสร้างได้น้อยจึงส่งผลให้มีระดับการย่อยต่ำกว่าพันธุ์ S90 และ P2 ตามลำดับ

ในขณะที่ทั้ง S90 และ P2 มีโครงสร้างแตกต่างกันเล็กน้อย (ตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.1) แต่มีระดับการย่อยที่แตกต่างกันซึ่งสอดคล้องกับผลของระดับการตัดกิ่ง



ภาพที่ 3.3 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 3.4 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 3.4 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 ชนิดสามารถตัดกิ่งกันที่พันธะ α -1,6-glucosidic linkage ได้เช่นเดียวกัน (Hizukuri et al., 2006) แต่เอนไซม์พุลลูลานเนสมีลักษณะการตัดกิ่งโดยตัดกิ่งจากภายนอกเข้ามาข้างในอย่างช้า ในขณะที่เอนไซม์ไอโซอะมิเลสสามารถตัดกิ่งทั้งภายในและภายนอกได้พร้อมๆกัน (Manners and Matheson, 1981) ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เดียวกัน การใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสสามารถตัดกิ่งได้มากกว่าการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสตัวเดียว ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์เบต้าอะมิเลสสามารถย่อยโมเลกุลเหล่านี้เป็นมอลโทสได้มากขึ้นส่งผลให้ค่า β -amylolysis limit สูงกว่าการใช้เอนไซม์พุลลูลานเนสเพียงตัวเดียว

3.1.5 ผลของโครงสร้างสตาร์ชข้าวต่อปริมาณ RS

จากผลการทดลองในตารางที่ 3.4 พบว่าการตัดกิ่งสตาร์ชด้วยเอนไซม์ทำให้ปริมาณ RS เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง (Native starch) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง Gonzalez-Soto et al. (2004) ที่ทำการย่อยสตาร์ชกล้วยด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสที่ระยะเวลาในการย่อยแตกต่างกันและพบว่าสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการย่อยมีปริมาณ 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 3.4 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 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสัมพันธ์กับค่าระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยเนื่องจากการใช้เอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลสพบว่ามีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยสูงกว่า ดังนั้นจึงเกิดเส้นตรงสายสั้นๆ จำนวนมาก (Barry, 1986; Gonzalez-Soto et al., 2004; Leong, Karim and Norziah, 2007) ซึ่งโมเลกุลสายสั้นที่เกิดขึ้นจากกระบวนการตัดกิ่งสามารถจับตัวกันเกิดเป็น โครงสร้างเกลียวม้วนคู่ (double helices) (Gidley, 1987) และจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่มีความเป็นระเบียบและแข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์ได้ทำให้ปริมาณ RS สูงกว่าสตาร์ชข้าวที่ย่อยด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสตัวเดียวที่มีระดับการตัดกิ่งและระดับการย่อยต่ำกว่า

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าว พบว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 มีปริมาณ RS ต่ำกว่าข้าวพันธุ์ P2 และพันธุ์ S90 ทั้ง RPDS และ RPIDS เนื่องจากข้าวพันธุ์ RD6 จัดอยู่ในกลุ่ม waxy rice ซึ่งไม่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง ดังนั้นจึงเกิดการรีโทรเกรทได้น้อยกว่าสตาร์ชพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสอย่างไรก็ตามปริมาณ RS ที่เกิดจากการรีโทรเกรทของอะมิโลเพคตินสามารถเพิ่มขึ้นได้ เมื่อมีการตัดกิ่งของอะมิโลเพคตินด้วยเอนไซม์ตัดกิ่ง (Thompson, 2000) โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ native starch พบว่าสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชันมีปริมาณ RS สูงกว่าสำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และพันธุ์ S90 มีปริมาณ

RS ไม่แตกต่างกันทั้งในส่วนของ RPDS และ RPIDS ถึงแม้ว่าสตาร์ชทั้งสองชนิดจะมีปริมาณอะมิโลสที่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากพันธุ์ P2 มีสัดส่วนของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (Super long chain) มากกว่าพันธุ์ S90 ดังนั้นหลังจากการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ทำให้สายโซ่ที่มีขนาดยาวถูกปลดปล่อยออกมาและเกิดการจับตัวกันเป็น โครงสร้างที่แข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณ RS สูงเท่ากับพันธุ์ S90 ซึ่งเหตุผลดังกล่าวจะถูกศึกษาเพื่อยืนยันผลการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.4 ปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase debranched starch : RPDS และปริมาณ RS ของ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch : RPIDS ที่เกิตรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 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 ($p < 0.05$)

3.1.6 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชตัดกิ่ง

ผลการตรวจสอบลักษณะ โครงสร้างผลึกของสตาร์ชด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) ของสตาร์ชทั้ง 3 พันธุ์ที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง (Native starch) และหลังทำการตัดแปรสตาร์ชข้าวด้วยวิธีการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแสดงดังภาพที่ 3.5 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) นอกจากนี้ยังเกิดพีคเดี่ยวที่ 2θ ที่ 19.7° ที่ถือเป็นตำแหน่งของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไขมัน (Amylose lipid complex) (Derycke et al., 2005) ซึ่งแสดงโครงสร้างผลึกแบบ V_h -type อีกด้วย เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างไม่มีขั้นตอนของการกำจัดไขมันจึงทำให้ไขมันที่มีอยู่ในตัวอย่างสตาร์ชสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอะมิโลสได้ และค่าปริมาณผลึกแสดงดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 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 ($p < 0.05$)

ในขณะที่สตาร์ชที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งและรีโทรเกรตทั้ง 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 ดังนั้น โครงสร้างของเกลียวม้วนคู่

(Double helices) จึงจัดเรียงตัวกันในรูปแบบโครงสร้างหกเหลี่ยม (Hexagonal) ที่ต้องการพลังงานเพียงเล็กน้อยในการเกิดโครงสร้างผลึก (Eerlingen, Crombez and Delcour, 1993) และอุณหภูมิต่ำยังเพิ่มปริมาณผลึกอีกด้วย เนื่องจากอัตราการเกิดผลึก (Crystal nucleation) และจะมีค่าสูงสุดเมื่อเข้าใกล้ glass transition temperature, T_g ดังนั้นอุณหภูมิจึงมีอิทธิพลที่ 4°C ช่วยสนับสนุนการเกิดผลึกและทำให้เกิดโครงสร้างผลึกของ RS เป็น B-type ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Miao et al. (2009) ที่ทำการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว (Waxy maize starch) ด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสมีผลทำให้โครงสร้างผลึกเปลี่ยนจาก A เป็น B เช่นกัน

ปริมาณความเป็นผลึก (Relative crystallinity) ของสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งและรีโทรเกรดที่มีค่ามากกว่า native starch เนื่องจากเมื่อทำการตัดกิ่งโมเลกุลสายสั้นที่ถูกปลดปล่อยออกมาสามารถจัดเรียงตัวกันใหม่กลายเป็นผลึกที่มีความแข็งแรง นอกจากนี้ Gunaratne and Hoover (2002) ยังได้อธิบายว่าค่า relative crystallinity ในสตาร์ชแต่ละชนิดยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ด้วย ได้แก่ ขนาดของผลึก, การจัดเรียงตัวเกลียวคู่ในบริเวณผลึก, ค่าเฉลี่ยของความยาวของสายอะมิโลเพคติน และสัดส่วนของอะมิโลเพคตินสายสั้น DP 10-13 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Cai and Shi (2010) พบว่าสตาร์ชมันฝรั่งที่ผ่านการตัดกิ่งและบ่มที่อุณหภูมิต่ำปรากฏพิกเฉียวที่ 2θ ที่ 5° และพิกเฉียวที่ 2θ ที่ 22° และ 24° ชัดเจนกว่าสตาร์ชข้าวสาลีและข้าวโพด แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชมันฝรั่งที่มีสัดส่วนของโมเลกุลสายยาวมากกว่าสามารถเกิดโครงสร้างผลึกได้เร็วกว่าโมเลกุลสายสั้น ในขณะที่ปริมาณความเป็นผลึกแสดงดังตารางที่ 3.5 พบว่าสตาร์ชที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งและรีโทรเกรดทั้ง 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 3.4)

3.1.7 คุณสมบัติทางความร้อน

ผลการศึกษาลักษณะสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชทั้ง 3 ของ native starch และสตาร์ชข้าวหลังทำการตัดแปรด้วยวิธีการตัดกิ่งตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรดชัน (Retrogradation) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแสดงในภาพที่ 3.6 จากการวิเคราะห์ให้ค่าอุณหภูมิเริ่มต้นเกิดเจลลิตีในเซชัน (T_g) อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (T_p) อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลลิตีในเซชัน (T_c) ช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลลิตีในเซชัน ($T_c - T_g$) และพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (ΔH) แสดง

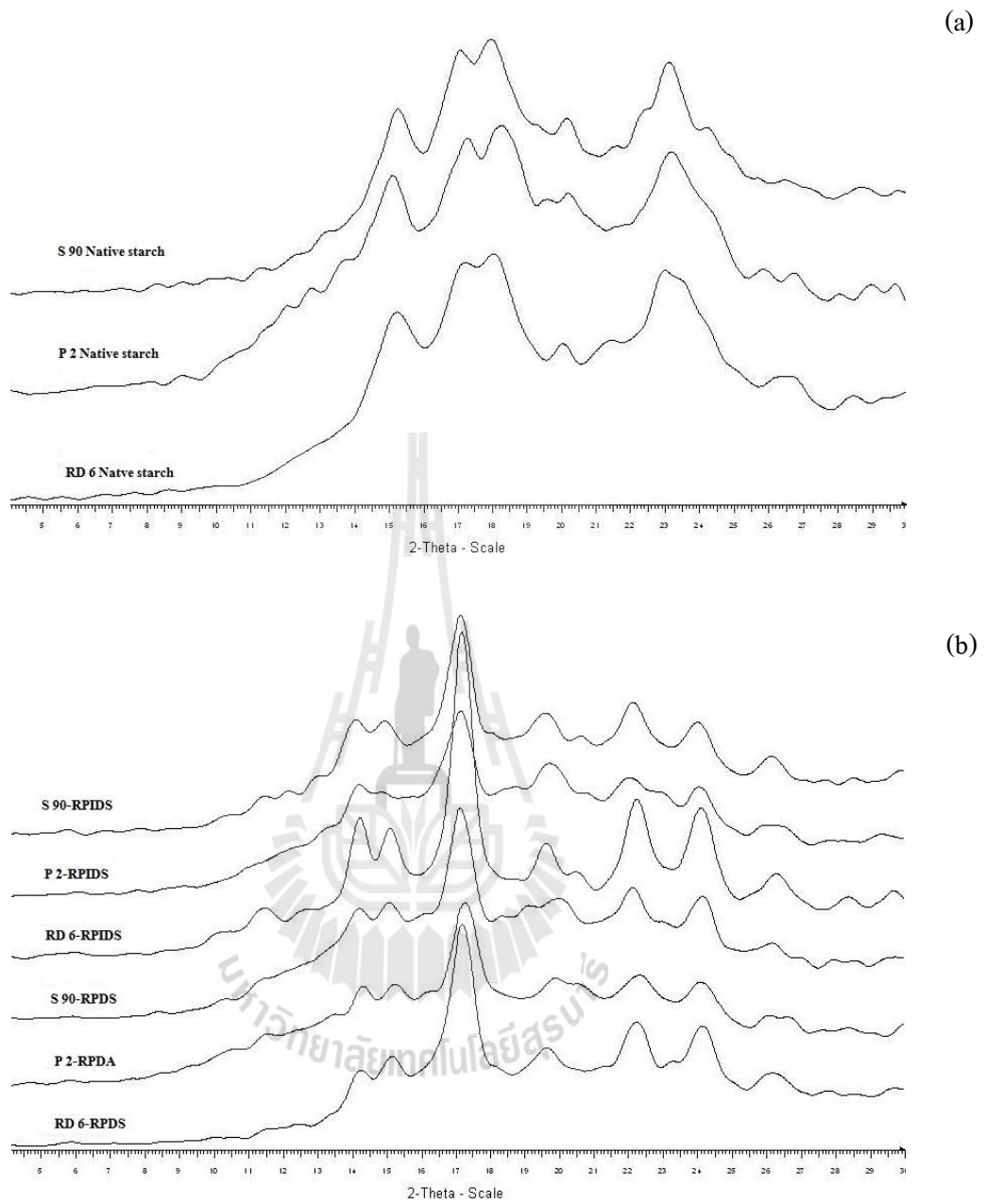
ในตารางที่ 3.6 โดย native starch ทั้งสามพันธุ์มี T_0 ระหว่าง 55.31-58.47 °ซ ซึ่งไม่แตกต่างจาก สตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรดชันทั้ง RPDS และ RPIDS ซึ่งมี T_0 อยู่ระหว่าง 54.46- 57.38 °ซ โดยตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรดชันมี ค่า T_0 ต่ำนั้น เนื่องจากหลังผ่านกระบวนการตัดกิ่งซึ่งโมเลกุลสายสั้นที่เกิดเป็นจำนวนมากถูกกระตุ้น ให้เกิดผลึกที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ผลึกที่เกิดขึ้นไม่สมบูรณ์แข็งแรง (Sievert and Lausanne,1993). ดังนั้นจึงส่งผลให้ T_0 มีค่าต่ำ และเมื่อพิจารณาช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลตาในเซชัน (T_c-T_0) พบว่า ตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่งและตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรดชันมีค่า T_c-T_0 สูงกว่า native starch เนื่องจากขนาดที่หลายหลายของสายโมเลกุลกลูแคนที่เกิดจากกระบวนการตัดกิ่งเหี่ยวน่าให้เกิด ผลึกที่มีความไม่สมบูรณ์ และเกิดความไม่เป็นหนึ่งเดียวกันของ โครงสร้างผลึก (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 °ซ ซึ่งเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (Amylose-lipid complex) (Sievert and Holm 1993) ทำให้โครงสร้างของสตาร์ชมีความแข็งแรงยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมละลายมีค่าสูงเนื่องจากในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ไม่มีขั้นตอนกำจัดไขมัน ดังนั้นในระบบตัวอย่างจึงมีไขมันปะปนอยู่ ซึ่งสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลของอะมิโลสที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังกระบวนการตัดกิ่งได้ ซึ่งจากผลการทดลองภาพที่ 3.2 แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์พุลูลานีสร่วมกับ ไอโซอะมิเลสมีระดับการตัดกิ่งสูงกว่าการใช้เอนไซม์พุลูลานีสเพียงอย่างเดียว ทำให้โมเลกุลอะมิโลสและอะมิโลเพคตินถูกปลดปล่อยจากโครงสร้าง ได้มากกว่าจึงส่งผลให้สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไขมันได้และแสดงการเปลี่ยนแปลงเอนโดเทอมที่สองในขณะที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใน RPDS ซึ่งสอดคล้องกับผลของ XRD ในภาพที่ 3.5 (b) ในตัวอย่าง RPIDS พบพีคที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 19.7° ได้ชัดเจนกว่าใน RPDS นอกจากนี้พบว่า เมื่อ RPIDS มีระดับการตัดกิ่งสูง เป็นผลทำให้สัดส่วนสายยาวของอะมิโลเพคตินถูกตัดและปลดปล่อยโมเลกุลสายตรงออกมา และสามารถเกิดการจับตัวระหว่างโมเลกุลสายยาวของอะมิโลเพคตินด้วยตัวเองได้ จึงทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง มีความคงทนต่อความร้อนสูงจึงเกิด Second transition ขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Cai and Shi (2010) พบว่าสายยาวของสายโซ่อะมิโลเพคตินของสตาร์ชมันฝรั่งที่ผ่านการตัดกิ่งและบ่มที่อุณหภูมิต่ำแสดงค่า T_0 อยู่ที่ 116 °ซ ซึ่งมากกว่าของ

ตารางที่ 3.6 คุณสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลาคีโนในเซชันชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลู-
ลานร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

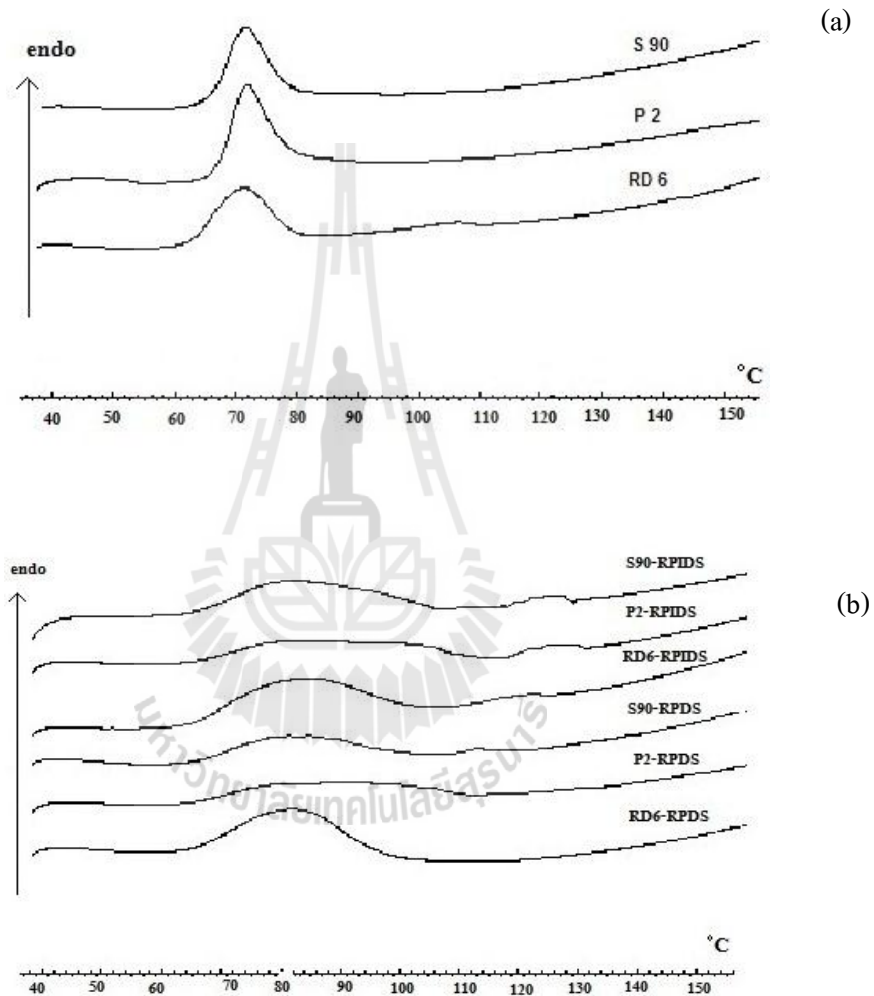
Sample	First transition					Second transition				
	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o (°C)	ΔH (J/g)	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o (°C)	ΔH (J/g)
RD6 rice starch	56.51±0.54 ^b	70.16±0.41 ^c	84.37±0.34 ^c	27.86±0.34 ^c	10.22±0.38 ^d					
P2 rice starch	58.47±0.47 ^a	70.91±0.22 ^c	98.84±0.19 ^d	40.37±0.56 ^d	15.70±0.21 ^b					
S90 rice starch	55.36±0.51 ^b	70.93±0.27 ^c	98.08±0.25 ^d	42.73±0.61 ^d	13.52±0.33 ^c					
RD6 -RPDS	55.48±0.61 ^b	78.74±0.73 ^b	105.49±0.43 ^c	50.01±0.26 ^{bc}	18.38±0.48 ^a					
P2 - RPDS	57.38±0.34 ^{ab}	85.81±0.84 ^a	110.55±0.87 ^{ab}	53.67±0.71 ^b	12.37±0.31 ^b					
S90 - RPDS	55.54±0.71 ^b	78.49±0.55 ^b	102.67±0.41 ^b	47.13±0.30 ^c	10.64±0.63 ^d					
RD6 -RPIDS	54.46±0.52 ^b	80.45±0.57 ^b	101.48±0.19 ^c	47.02±0.54 ^c	16.41±0.54 ^b	111.15±0.41 ^a	118.85±0.52 ^b	121.61±0.37 ^c	10.46±0.31 ^c	0.28±0.75 ^b
P2 - RPIDS	55.39±0.34 ^b	79.66±0.54 ^b	112.07±0.74 ^a	56.68±0.49 ^a	13.30±0.78 ^c	117.47±0.82 ^a	123.68±0.47 ^a	135.11±0.34 ^a	17.64±0.51 ^a	0.30±0.53 ^a
S90 - RPIDS	54.87±0.24 ^b	79.62±0.45 ^b	103.74±0.67 ^c	49.27±0.61 ^c	16.38±1.09 ^b	111.54±0.61 ^a	119.21±0.72 ^b	127.08±0.50 ^b	15.53±0.34 ^b	0.28±0.45 ^b

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



ภาพที่ 3.5 ลักษณะโครงสร้างผลึกของ native starch (a) และ retrograded pullulanase debranched starch : RPDS) และ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch : RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

ข้าวสาลีและข้าวโพดที่มี T_p อยู่ที่ 99.7 และ 99.9 °ซ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลสายยาวของสตาร์ชมันฝรั่งสามารถเกิดโครงสร้างเกลียวม้วนคู่ (Double helix) ได้แข็งแรงกว่าโมเลกุลสายสั้นของข้าวสาลีและข้าวโพด เช่นเดียวกับ Moates et al. (1997) ที่พบว่าอุณหภูมิของผลึกอะมิโลสสายสั้นจะเพิ่มขึ้นจาก 57 ถึง 119 °ซ เมื่อขนาดของสายโมเลกุลเพิ่มขึ้นจาก 12 ถึง 55 หน่วยกลูโคส



ภาพที่ 3.6 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน (a) native starch และ (b) retrograded pullulanase debranched starch : RPDS) และ retrograded pullulanase+Isoamylase debranched starch : RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

เมื่อทำการพิจารณาผลของโครงสร้างสตาร์ชข้าวแต่ละพันธุ์พบว่า P2 มีค่า T_o , T_p , T_c และ (ΔH) สูงกว่า S90 และ RD6 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากโครงสร้างของ P2 (ตารางที่ 3.3) มี

สัดส่วนของโมเลกุลสายยาวที่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไขมันและสามารถเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลสายยาวด้วยกันเองได้มากกว่า S90 และ RD6 นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวพันธุ์ P2 ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลสมีช่วง T_c - T_o สูงกว่าข้าวพันธุ์ P2 ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสออย่างเดี่ยวและ native starch (แสดงในตารางที่ 3.6) ทั้งนี้เนื่องจากหลังจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลส ซึ่งมีระดับการตัดกิ่งสูง ทำให้เกิดการกระจายตัวของสายโมเลกุลกลูแคนในขนาดที่หลายหลาย และสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีปริมาณของโมเลกุลสายยาวสูง จึงส่งผลทำให้มีช่วง T_c - T_o ที่กว้างกว่าตัวอย่างสตาร์ชทั้งสองพันธุ์อีกด้วย

3.1.8 การติดตามจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชัน

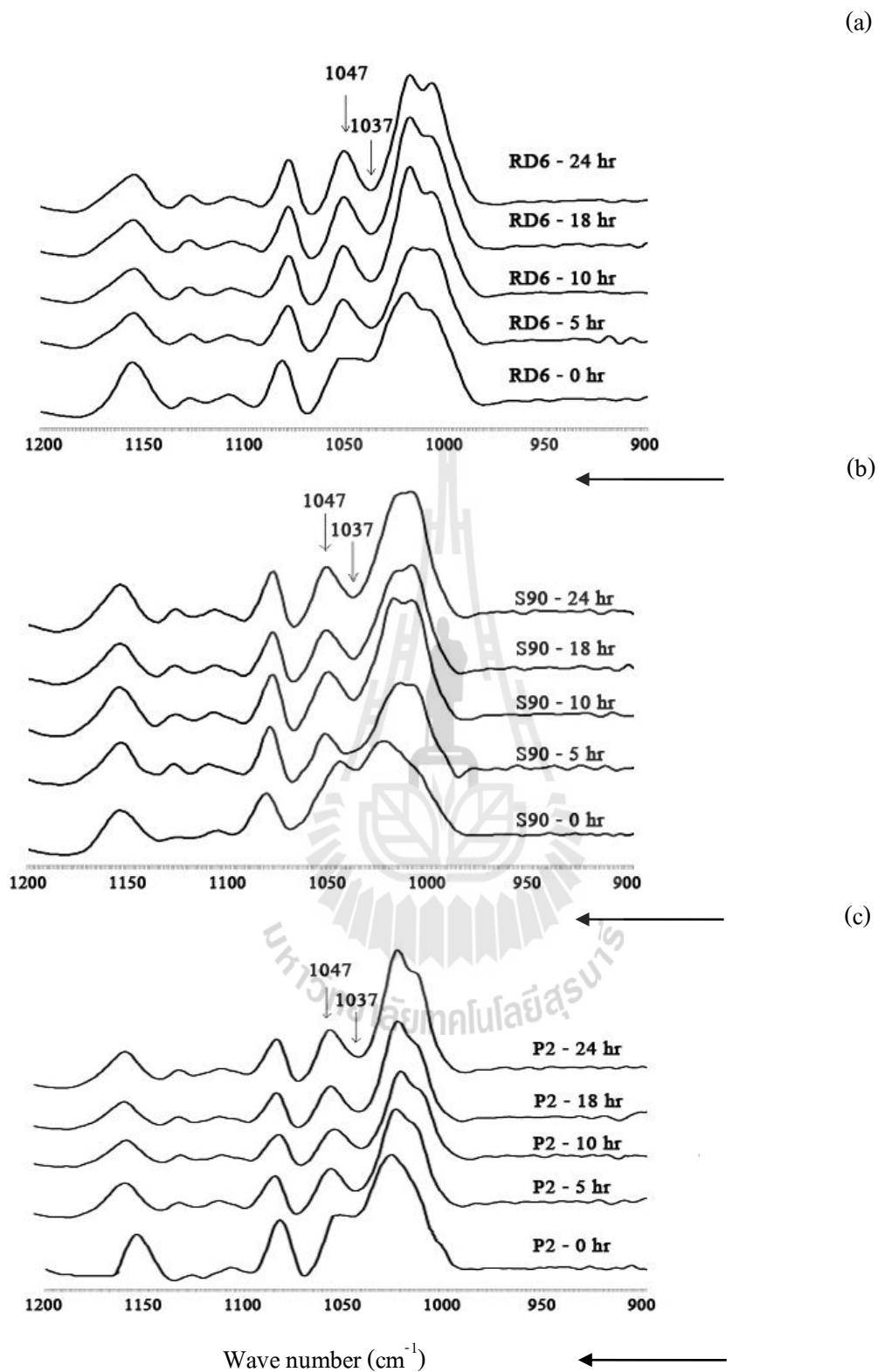
การศึกษาจลนพลศาสตร์ของกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลส โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโมเลกุลระดับโครงสร้างระยะสั้น (short-range molecular order) ด้วย Attenuated Total Reflectance Fourier Transforms Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) ซึ่งเป็นการวัดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณสายเกลียวคู่ต่อสัดส่วน โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงพิการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่วัดการยืด (Stretching) ของหมู่ C-C กับ C-O และการงอ (Bending) ของหมู่ COH ในช่วงจำนวนคลื่น (Wave number) $1200 - 800 \text{ cm}^{-1}$ (Cael et al., 1975) โดยพิการดูดกลืนแสงที่ 1047 cm^{-1} และ 1037 cm^{-1} ที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน ดังนั้นจึงทำการติดตามอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานีสรร่วมกับไอโซอะมิเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากในกระบวนการย่อยทำให้เกิดโมเลกุลสายสั้นเป็นจำนวนมากและในขั้นตอนการย่อยใช้อุณหภูมิสูง อีกทั้งยังมีขั้นตอนการแช่ ทำให้โมเลกุลสายสั้นเกิดการเคลื่อนที่ตลอดเวลาจึงไม่สามารถจัดเรียงตัวกันได้ แต่เมื่อระยะเวลาย่อยที่ 22 ชั่วโมง พบว่าพิการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1047 cm^{-1} มีค่าเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากโมเลกุลบางส่วนสามารถจับตัวกันและเกิดการจัดเรียงตัวได้ หลังจากสตาร์ชข้าวผ่านการตัดกิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิต่ำคือ 4°C โดยได้ทำการตรวจวัดอัตราการเกิดผลึกด้วยเครื่อง FTIR ตลอดระยะเวลาบ่ม พบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น พิกการดูดกลืนแสงอินฟราเรดที่ 1047 cm^{-1} มีค่าสูงขึ้น แสดงดังภาพที่ 3.7 ซึ่งแสดงถึงการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช เมื่อพิจารณาค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ที่ระยะเวลาบ่มต่าง ๆ ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ (ภาพที่ 3.8) พบว่าสามารถ

แบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง โดยช่วงแรกของการเกิดรีโทรเกรเดชันเป็นช่วงที่มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาการบ่ม 4 ชั่วโมง โดยเป็นผลเนื่องมาจากโมเลกุลอะมิโลส ซึ่งเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นจึงสามารถเคลื่อนที่เข้ามาจัดเรียงตัวกันใหม่ได้ง่าย โดยเหี้ยวนำให้เกิดโครงสร้างสามมิติของเจลสตาร์ช (Goodfellow and Wilson, 1990; Van Soet, 1994; Hoover, 2001) จากนั้นช่วงที่ 2 เป็นช่วงที่ค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} เกิดการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยจะเกิดในช่วงระยะเวลาในการบ่มที่ 5-12 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสตาร์ชที่มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งในช่วงนี้เกิดจากการจัดเรียงตัวของสายโมเลกุลอะมิโลเพคตินที่โมเลกุลมีสายยาวเคลื่อนที่เข้ามาจัดเรียงตัวกันใหม่ โดยการเปลี่ยนแปลงในช่วงนี้ยังช่วยให้ผลึกเกิดการจัดเรียงตัวเป็น โครงสร้างที่สมบูรณ์และแข็งแรงขึ้น (Goodfellow and Wilson, 1990; Van Soet, 1994; Hoover, 2001) และช่วงสุดท้าย เป็นช่วงที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงหรือเป็นช่วงที่การเกิดรีโทรเกรเดชันเข้าสู่สมดุล เมื่อระยะเวลาในการบ่มมากกว่า 12 ชั่วโมงซึ่งถือเป็นช่วงที่โครงสร้างผลึกเกิดการจัดเรียงตัวอย่างสมบูรณ์ (Hoover, 2001)

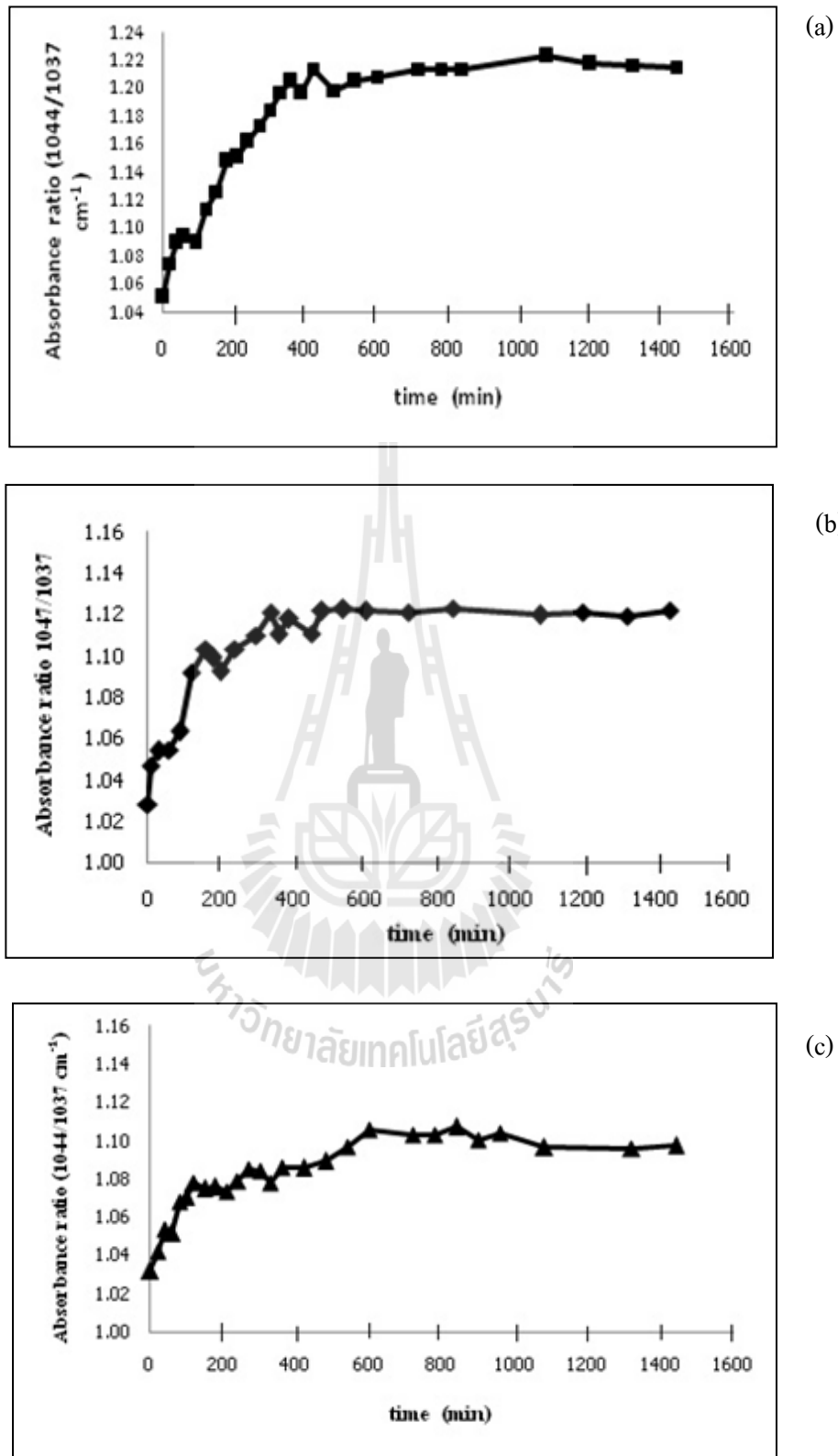
สำหรับอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชสามารถทำนายได้ โดยใช้สมการของ Avrami (Avrami, 1941) ซึ่งเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ที่สามารถทำนายอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ขึ้นกับเวลาการบ่มได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง exponentially linear (n) กับ เวลา (Farhat, Blanshard and Mitchell, 2000; Farhat and Blanshard, 2001)

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

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 เพื่อคำนวณหาอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันได้โดยการหาอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันขึ้นกับระยะเวลาการเก็บ 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 นั้นหมายถึงอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่ามาก ซึ่งค่า k สามารถได้จากค่า $\log k$ ($\log k$ คือ จุดตัดของสมการที่ 2)



ภาพที่ 3.7 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FTIR ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยพุลูลู ลานเสริมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4°C 24 ชั่วโมงที่ระยะเวลาต่างๆ ของ สตาร์ชทั้งสามพันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90



ภาพที่ 3.8 ค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} ของสตาร์ซที่ผ่านการตัดกิ่งด้วย พูลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ 24 ชั่วโมง ของสตาร์ซทั้งสาม พันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90 ที่เวลาต่าง ๆ

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

$$Y = C + mX$$

ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3.9 และตารางที่ 3.7 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 ค่าหรือ Avrami exponent สามารถอธิบายลักษณะของการตกผลึก โดยที่ค่า n ต้องมีค่าอยู่ในช่วง 1-4 จึงจะสอดคล้องกับกระบวนการเกิดผลึก (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 ซึ่งแสดงถึงกระบวนการรีโทรเกรเดชัน โดยเริ่มจากเกิดกระบวนการจุดกำเนิดผลึก (nucleation) ตามด้วยการโตของผลึกแบบ 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 3.7 ค่า Avrami exponent (n) และ rate constant (k) ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดกิ่งด้วย เอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ 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 ^{-3c}
P2	0.727 ^b	-1.516 ^a	3.047 x 10 ^{-2a}
S90	0.735 ^b	-1.898 ^b	1.264 x 10 ^{-2b}

หมายเหตุ : อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

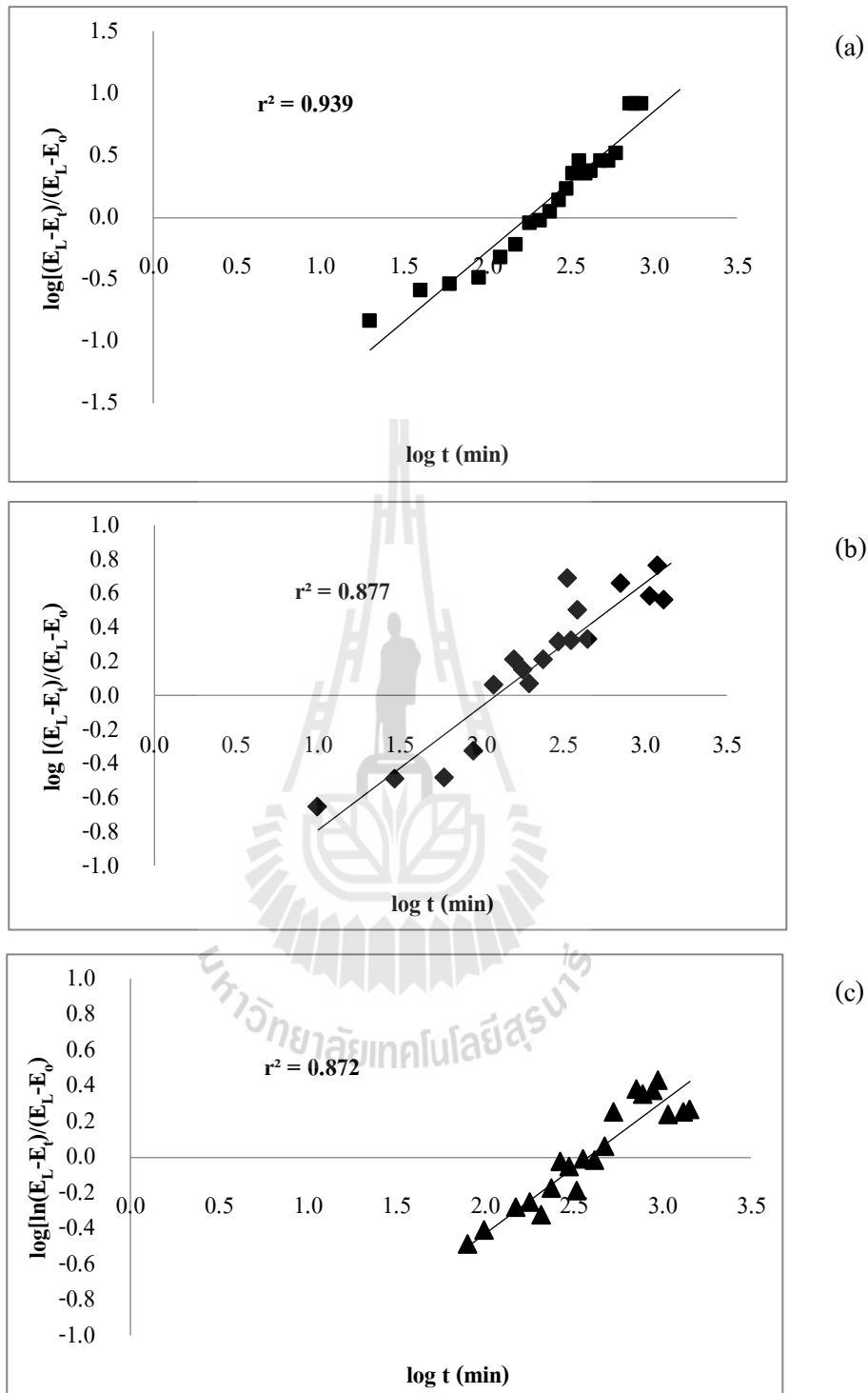
($p < 0.05$)

สำหรับค่า k (rate constant) สามารถคำนวณได้จากค่า $\log k$ ซึ่งเป็นจุดตัดของกราฟภาพที่ 3.9 และแสดงในตารางที่ 3.7 พบว่าค่า k ของสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีค่าสูงกว่า S90 และพันธุ์ RD6 ตามลำดับเนื่องจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และ S90 มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งอะมิโลสสามารถเหนี่ยวนำการจัดเรียงตัวกันในกระบวนการรีโทรเกรเดชันได้ ดังที่ Van Soest et al. (1994) รายงานว่าสตาร์ชมันสำปะหลังมีอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันได้เร็วกว่าสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว เนื่องจากสตาร์ชมันสำปะหลังมีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถจัดเรียงโครงสร้างและแสดงพฤติกรรมเป็นนิวเคลียสของผลึกทำให้สามารถเกิดการรีโทรเกรเดชันและเกิดผลึกได้เร็วกว่าสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียวซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณ RS ในตารางที่ 3.4. ที่พบว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และ S90 มีปริมาณ RS สูงกว่า พันธุ์ RD6 นอกจากนี้พบว่าข้าวพันธุ์ P2 มีอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันได้เร็วที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลจากข้าวพันธุ์ P2 มีสัดส่วนของโมเลกุลสายยาวกว่าพันธุ์ S90 (ดังตารางที่ 3.3) ดังนั้นหลังกระบวนการตัดกิ่งโมเลกุลเส้นตรงสายยาวจึงมีส่วนช่วยให้โมเลกุลสายสั้นสามารถจับตัวกันและเกิดกระบวนการ nucleation ตามด้วย rod-like growth เกิดเป็นโครงสร้างผลึกได้ง่ายขึ้น เนื่องจากโมเลกุลสายยาวเคลื่อนที่ได้ช้าและช้ากว่าโมเลกุลสายสั้น จึงมีทำให้เกิดการจัดเรียงตัวได้ง่ายขึ้นและเหนี่ยวนำให้โมเลกุลสายสั้นจัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างผลึกได้เร็วกว่าสตาร์ชข้าวที่มีสัดส่วนของโมเลกุลสายยาวน้อยกว่าและมีโมเลกุลสายสั้นสูงกว่า (S90 และ RD6) ซึ่งเมื่อทำการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์แล้วทำให้มีจำนวนของโมเลกุลสายสั้นมากขึ้น ซึ่งสามารถเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ทำให้โอกาสที่โมเลกุลสามารถจับตัวกันและจัดเรียงตัวกันน้อยลง ส่งผลให้อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันเกิดได้ช้ากว่าข้าวที่มีสัดส่วนสายยาวสูงกว่าซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Jane et al. (1999) พบว่าสตาร์ชที่มีสัดส่วนของ B1 และ B2 สูงสามารถเกิดโครงสร้างผลึกได้เร็วและโครงสร้างผลึกที่เกิดขึ้นมีความสมบูรณ์สูง

3.1.9 ผลของโครงสร้างอะมิโลเพคตินต่อการเกิด RS₃

3.1.9.1 การเตรียมสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

เนื่องจากวัตถุประสงค์ที่สองในครั้งนี เพื่อศึกษาโครงสร้างอะมิโลเพคติน ของสตาร์ชข้าวแต่ละชนิดที่มีผลต่อการเกิดและคุณสมบัติต่าง ๆ ของ RS₃ ดังนั้นในส่วนแรกของการศึกษาจึงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและสามารถกำจัดอะมิโลสออกไปให้ได้มากที่สุด ซึ่งปริมาณอะมิโลสที่เหลืออยู่ในตัวอย่างถูกวัดด้วยวิธีการเกิดสีกับไอโอดีน โดยข้างต้นของวัตถุประสงค์ต้องการกำจัดอะมิโลสออกไปให้ได้มากที่สุดโดยที่โครงสร้างของสตาร์ชถูกทำลายน้อยที่สุด ดังนั้นจึงทำการทดลองกำจัดอะมิโลสที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชันเพื่อให้โครงสร้างของสตาร์ชวมและแกรนูลของสตาร์ชไม่แตกตัว แต่เนื่องจากโครงสร้างสตาร์ชไม่แตกตัว ปริมาณอะมิโลสที่เหลือ



ภาพที่ 3.9 กราฟของ $\log [-\ln(E_L-E_t)/(E_L-E_0)]$ ต่อ $\log t$ ตามสมการ Avrami ของสตาร์ชที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยพุลูลูทานร่วมกับไอโซอะมิเลสและบ่มที่ 4°C 24 ชั่วโมง ของสตาร์ชทั้งสามพันธุ์ (a) RD6, (b) P2 และ (c) S90

ออกมาค่อนข้างต่ำ (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้นจึงทำการศึกษาที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน โดยศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดอะมิโลส 2 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการให้ความร้อน โดยทำการทดลองหาสภาวะที่ใช้ในการกำจัดอะมิโลส ที่ระดับความความร้อน 80 และ 90°C และระยะเวลาในการให้ความร้อนที่ระดับ 10, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อหาระดับของตัวแปรเบื้องต้น โดยคิดตามปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างหลังการชะล้าง (Leaching)

ผลการทดลองดังตารางที่ 3.8 พบว่าระดับความร้อนที่ 90°C มีปริมาณอะมิโลสหลงเหลืออยู่ในตัวอย่างต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 80°C และเมื่อระยะเวลาที่ให้ความร้อนเพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างมีค่าต่ำกว่าที่ระยะเวลาสั้นๆ แต่เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนยาวนานขึ้นมีผลทำให้อะมิโลส และอะมิโลเพคตินสูญเสียโครงสร้างมากขึ้นเช่นกัน เนื่องจากผลของการให้ความร้อนที่ยาวนานร่วมกันพลังงานกลที่ใช้ในการกวนตัวอย่าง มีผลทำให้โมเลกุลอะมิโลเพคตินถูกตัดให้สั้นลงไปด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกสภาวะในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาทีในการกำจัดอะมิโลสออกจากตัวอย่างสตาร์ชเนื่องจากที่อุณหภูมิสูง โครงสร้างของสตาร์ชเกิดการแตกตัวได้ดีทำให้อะมิโลสที่อยู่ภายในโครงสร้างหลุดออกมาจึงสามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างได้มากขึ้น ในขณะที่อะมิโลเพคตินไม่สูญเสียโครงสร้างมากนักเนื่องจากให้ความร้อนในระยะเวลาที่สั้น

จากตารางที่ 3.8 พบว่าตัวอย่างข้าวพันธุ S90 ที่ผ่านการกำจัดอะมิโลสยังคงมีปริมาณอะมิโลสค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการกำจัดอะมิโลส หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาทีแล้ว ตัวอย่างถูกนำไปแยกตะกอนด้วยการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 1500g เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งโมเลกุลของอะมิโลสบางส่วนอาจตกตะกอนไปพร้อม ๆ กับอะมิโลเพคติน จึงทำให้ปริมาณอะมิโลสในตัวอย่างมีค่าสูง ดังนั้นในขั้นตอนต่อมาของการศึกษาได้ทำการล้างตะกอนตัวอย่างด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดอะมิโลสที่อาจหลงเหลืออยู่ในตะกอน จากผลการทดลองตารางที่ 3.9 พบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการล้าง โดยที่สตาร์ชข้าวพันธุ S90 ปริมาณอะมิโลสลดลงมาก ซึ่งหลังจากทำการล้างตะกอนครบ 3 ครั้ง พบว่าปริมาณอะมิโลสเหลืออยู่ในตัวอย่างเพียงร้อยละ 7.07 เมื่อเทียบกับเริ่มต้นและเมื่อทำการล้างตะกอนมากขึ้น (4-5 ครั้ง) พบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลือไม่เปลี่ยนแปลง (ไม่แสดงข้อมูล) แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการล้างตะกอนด้วยน้ำร้อนเป็นจำนวน 3 ครั้งสามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างของสตาร์ชข้าวพันธุสุพรรณบุรี 90 ได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 3.8 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 3.9 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 ($p < 0.05$)

ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 พบว่าหลังทำการให้ความร้อนและทำการล้างตะกอน ปริมาณอะมิโลสลดลงไม่มากนัก (40.24%) เมื่อเทียบกับปริมาณอะมิโลสเริ่มต้น เนื่องจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 หลังจากผ่านการกำจัดอะมิโลสด้วยการให้ความร้อนที่ 90 °ซ มีลักษณะเป็นสตาร์ชเพสต์ที่มีความหนืดสูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างอะมิโลเพคตินที่มีสายโซ่ขนาดยาวมากเป็นองค์ประกอบ (Super long chain) ซึ่งกึ่งกันของอะมิโลเพคตินที่มีความยาวมาก สามารถพันเกลียวกับไขมันได้เช่นเดียวกับอะมิโลส รวมทั้งการเกิดอันตรกิริยาคู่กันเองของสายกิ่ง ส่งผลทำให้เกรนูลของเมล็ดสตาร์ชมีความแข็งแรง ดังนั้นเมล็ดสตาร์ชจึงมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ลดลง (รุ่งนภา และคณะ 2546) เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายสตาร์ชจึงทำให้เมล็ดสตาร์ชเกิดการแตกตัวได้น้อย อะมิโลสจึงยังคงอยู่ในโครงสร้างสตาร์ช สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ปริมาณอะมิโลสหลงเหลือไม่แตกต่างกันเนื่องจากในโครงสร้างไม่มีอะมิโลสเป็นส่วนประกอบ

เนื่องจากขั้นตอนการให้ความร้อนที่ 90 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการล้างตะกอน ไม่สามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างของสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 ได้ในปริมาณมากนัก ยังเหลือปริมาณอะมิโลสสูงถึง 40% ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปของการศึกษาได้ทำการประยุกต์วิธีการกำจัดอะมิโลส โดยการใส่สารละลายต่างเพื่อช่วยให้โครงสร้างของสตาร์ชเกิดการแพร่กระจายตัวได้มากขึ้น (Yu and Rollings, 1987) โดยเริ่มจากการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายต่างที่เหมาะสมและยังคงอุณหภูมิและระยะเวลาในการกำจัดเช่นเดิม (ความร้อนที่ 90 °ซ เป็นเวลา 10 นาที) ระดับความเข้มข้นของค่าที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในช่วง 0.005-1 โมลาร์ และทำการล้างตะกอนด้วยน้ำเป็นจำนวน 3 ครั้ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.10 พบว่าที่ ระดับความเข้มข้นค่าที่ 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 และยากแก่การแยกตะกอนหลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งจะพบว่ามีส่วนที่เป็นของเหลวขุ่นอยู่บนตะกอนสตาร์ชที่ไม่สามารถแยกออกได้ จึงส่งผลให้ปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างมีค่าสูง สำหรับที่ความเข้มข้นต่างเท่ากับ 1 โมลาร์ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากโครงสร้างของสตาร์ชละลายอยู่ในสารละลายต่างจนไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (Bennow, Bay-Smith, and Bauer, 2001; Kennedy et al., 1992) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดอะมิโลสในสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 คือ การใช้สารละลายต่างที่ความเข้มข้นที่ 0.01 โมลาร์ ที่ความร้อน อุณหภูมิ 90 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ร่วมกับการล้างตะกอนเป็นจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งพบว่าปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่างร้อยละ 16.09 เมื่อเทียบกับปริมาณอะมิโลสเริ่มต้นในตัวอย่างสตาร์ช

เนื่องจากปริมาณอะมิโลสที่หลงเหลืออยู่ในตัวอย่าง (Remained amylose) ถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีการเกิดสีกับ ไอ โอดีน จึงทำให้ค่าที่ได้สูงกว่าเกินความเป็นจริง เนื่องจากถูกรบกวนจากโมเลกุลอะมิโลเพคติน ดังนั้นจึงทำการตรวจสอบปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีที่มีความจำเพาะมากขึ้น คือ วิธีการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Con A ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.11 โดยพบว่า RD6, P2 และ S90 มีปริมาณอะมิโลสเท่ากับ 5.01, 10.12 และ 5.17 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนในกรณีที่สตาร์ชข้าวมีโมเลกุลที่เป็นสารประกอบขนาดกลาง (Intermediate) จะทำให้ค่าที่วิเคราะห์ได้สูงเนื่องจากสารประกอบขนาดกลางบางส่วนอาจไม่สามารถตกตะกอนได้ด้วย Con A (รุ่งนภา และคณะ, 2546)

ตารางที่ 3.10 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

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีที่จำเพาะเจาะจงต่อปริมาณอะมิโลสอีกวิธีหนึ่งคือวิธีการวิเคราะห์อะมิโลสด้วยวิธีทาง Differential Scanning Calorimeter ซึ่งปริมาณอะมิโลสสามารถคำนวณได้จากค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (Melting enthalpy) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (Amylose lipid complex) โดยเทียบกับสมการกราฟมาตรฐานของอัตราส่วนระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน ซึ่งแสดงในรูปที่ 3.10 โดยมีสมการเส้นตรงคือ $y = 0.164x - 0.243$ ($r^2 = 0.987$) ซึ่งปริมาณอะมิโลส ของทั้งสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 ที่ปราศจากอะมิโลส (P2-free amylose or P2-FAM) และสตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 ที่ปราศจากอะมิโลส (S90-free amylose or S90-FAM) คำนวณจากสมการ $Amylose (\%) = \Delta H + 0.243 / 0.164$ เมื่อ ΔH หมายถึงค่า melting enthalpy (J/g) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (Amylose lipid complex) ที่ทำการวัดระหว่างการให้ความร้อนอีกครั้ง (Reheating) ภายในเครื่อง DSC ค่าปริมาณอะมิโลสของแสดงดังตารางที่ 3.11 พบว่าเมื่อทำการวัดด้วยวิธีทาง DSC ปริมาณอะมิโลสของ P2-FAM และ S90-FAM มีค่าเท่ากับ 7.85 และ 4.93 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณอะมิโลส

เริ่มต้นพบว่าสามารถกำจัดอะมิโลสออกจากโครงสร้างได้ถึง 82 และ 80% สำหรับ P2-FAM และ S90-FAM ตามลำดับ ซึ่งถือว่าเพียงพอต่อวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้

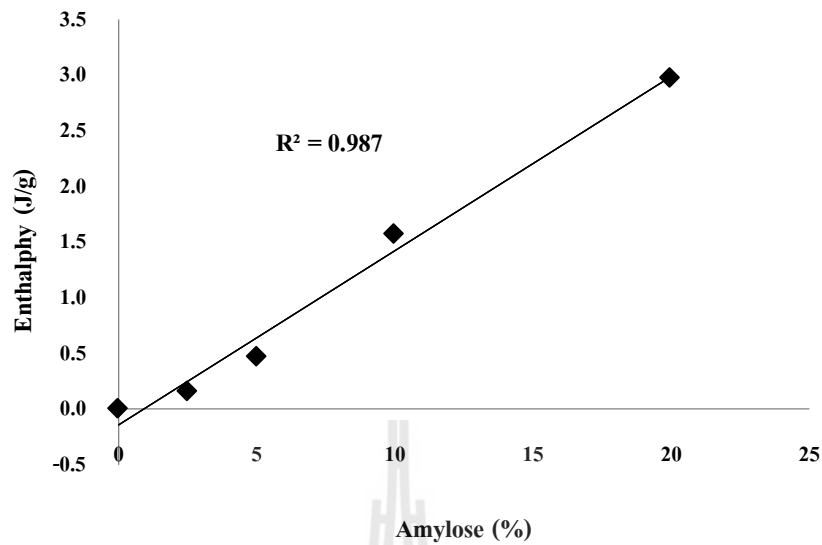
ตารางที่ 3.11 ปริมาณอะมิโลสหลังทำการกำจัดอะมิโลส (Leaching amylose)

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

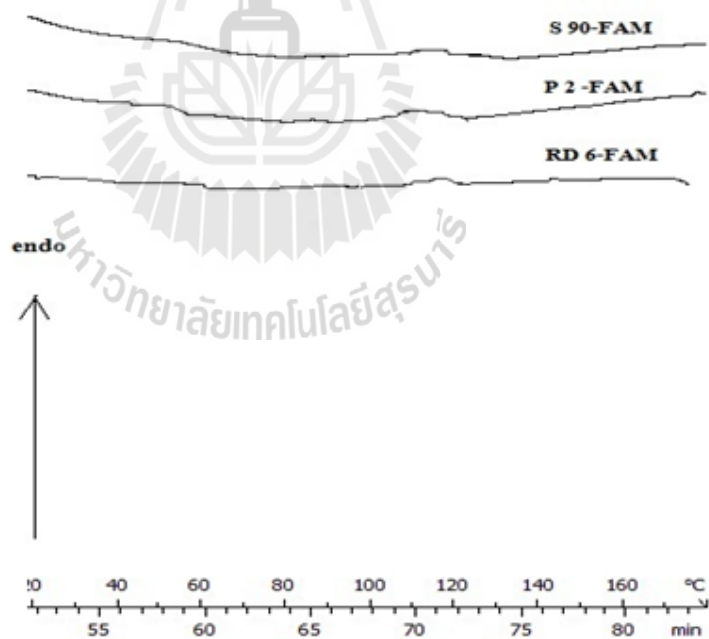
หมายเหตุ : ^x วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยชุดวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสหลังจากทำการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Concanavalin A (Con A)(Amylose/amylopectin assay kit, Megazyme)

^y วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสด้วยวิธีทาง Differential Scanning Calorimeter ซึ่งปริมาณอะมิโลสคำนวณจากค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (melting enthalpy) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (amylose lipid complex) อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ debranched starch ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลสและผ่านการย่อยด้วย Pseudomonas isoamylase และทำการแยกขนาดด้วย Ion Exchange Chromatography ผลการวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 3.12 พบว่าความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) มีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ native starch ซึ่งแสดงในภาพที่ 3.12 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



ภาพที่ 3.10 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่ขึ้นกับค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมเหลว (melting enthalpies) ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน



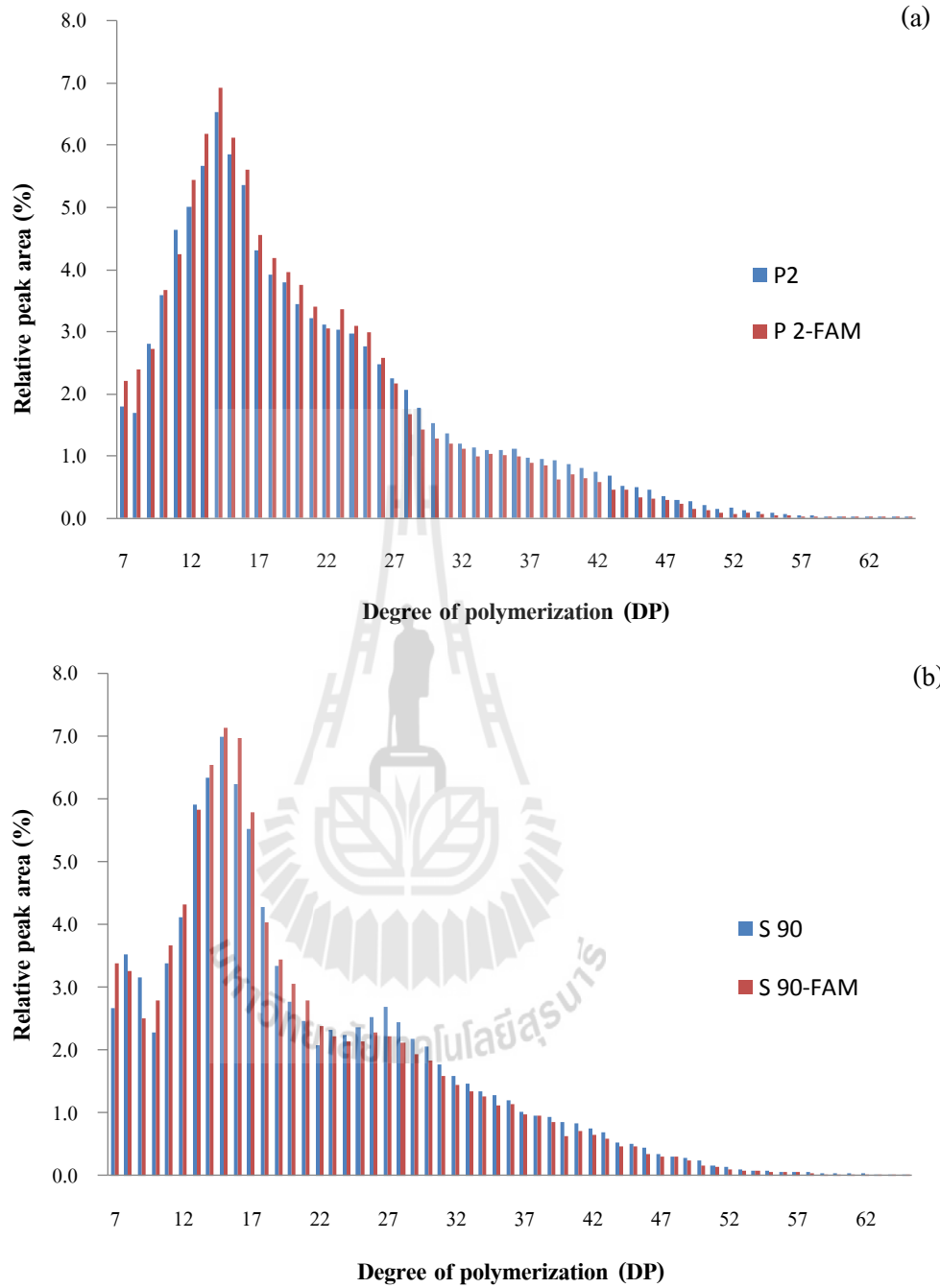
ภาพที่ 3.11 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซชัน ของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) กับไขมัน LPC ของสตาร์ชข้างทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

3.1.9.2 โครงสร้างกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

ตารางที่ 3.12 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM)

Branch chain length distribution of amylopectin				
Sample	(%) distribution			
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP ≥ 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 (H_2O) เช่นเดียวกับวิธีการสกัดอะมิโลสของสตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 และใช้ NaOH เข้มข้น 0.01 โมลาร์ซึ่งเป็นวิธีเดียวกันกับสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และทำการตรวจวัดความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) โดยผ่านการย่อยด้วย *Pseudomonas isoamylase* และทำการแยกขนาดด้วย Ion Exchange Chromatography ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3.13 เมื่อทำการเปรียบเทียบกับ native starch พบว่าโครงสร้างของข้าวพันธุ์ RD6 ที่กำจัดอะมิโลสด้วยน้ำ (RD6-free amylose with H_2O :



ภาพที่ 3.12 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ของสตาร์ช (a) ข้าวพันธุ์ P2 และ (b) S90

RD6-FAM-H₂O) และข้าวพันธุ RD6 ที่กำจัดอะมิโลสด้วย NaOH(RD6-free amylose with NaOH : RD6-FAM-NaOH) มีรูปแบบความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินแตกต่างจาก native starch โดยมีการกระจายตัวส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP 13-24 สูง และมีการกระจายตัวโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง DP \geq 37 ลดลง แต่การกระจายตัวในช่วง DP 6-12 และ DP 13-24 มีค่าเพิ่มขึ้น (แสดงในตารางที่ 3.13) 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 ของข้าวพันธุ 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

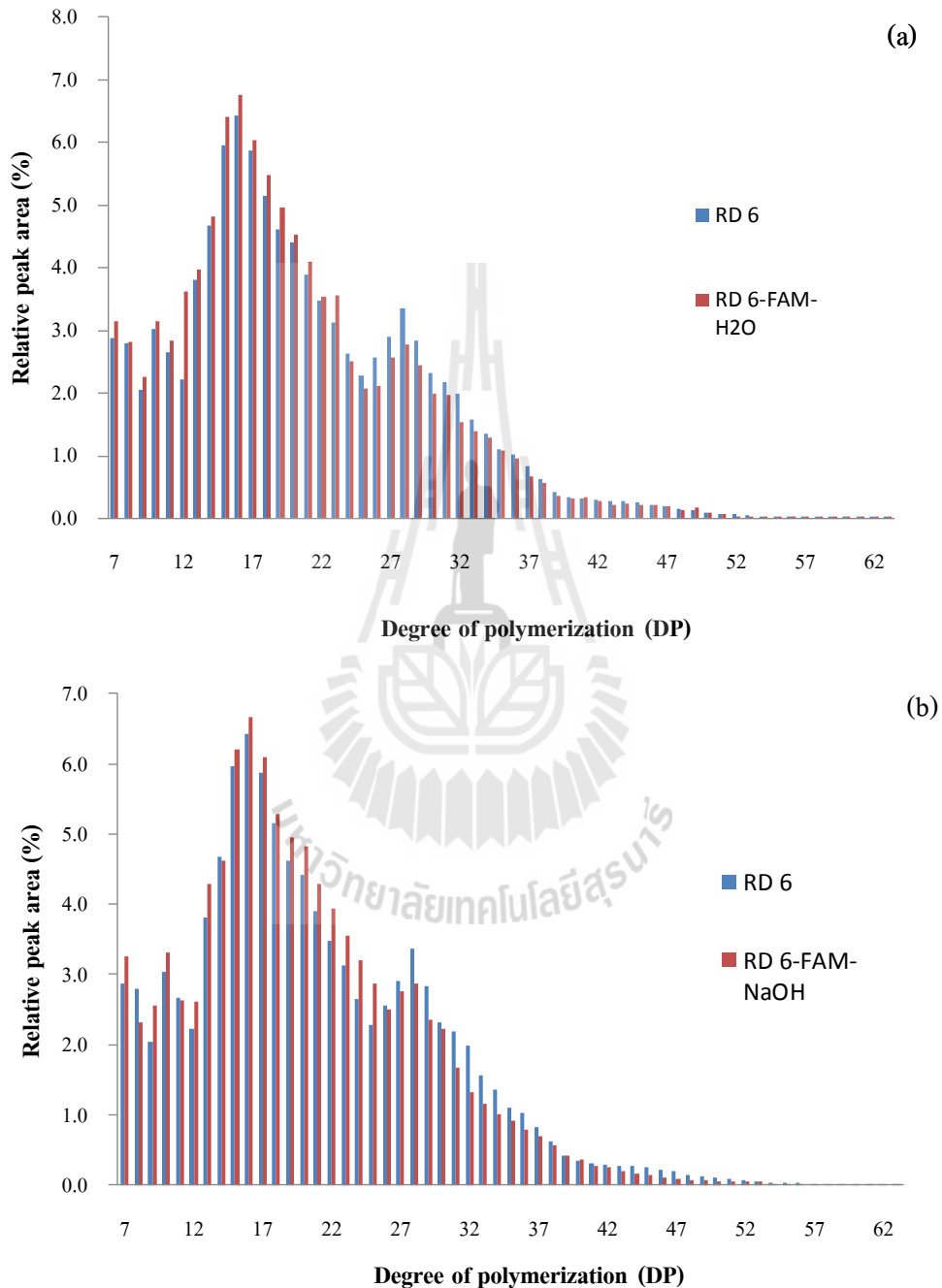
ตารางที่ 3.13 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ชข้าวพันธุ RD6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ด้วยน้ำและNaOH

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

3.1.9.3 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

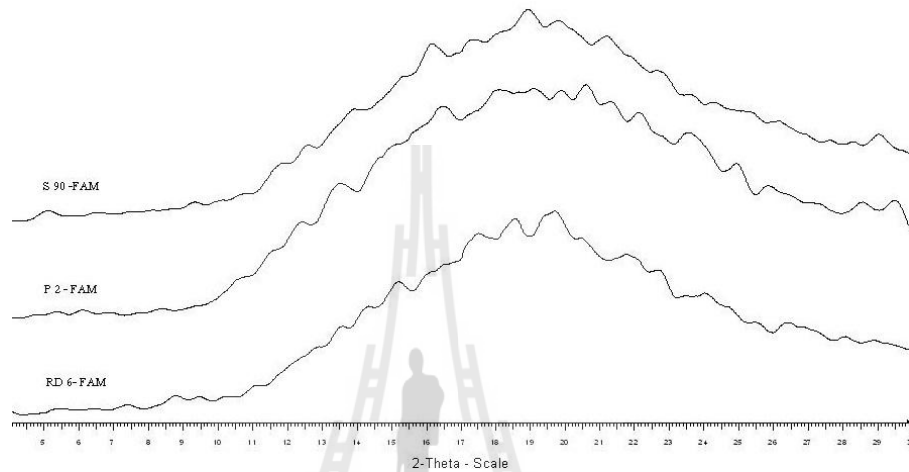
ภาพที่ 3.14 แสดงผลการตรวจสอบลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชหลังทำการกำจัดอะมิโลส ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) พบว่า X-diffraction pattern ของสตาร์ชทั้งสาม

ชนิดที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ไม่แสดงโครงสร้างทางผลึก เนื่องจากในขั้นตอนของการกำจัดอะมิโลส โครงสร้างในส่วนที่เป็นผลึกถูกทำลายด้วย

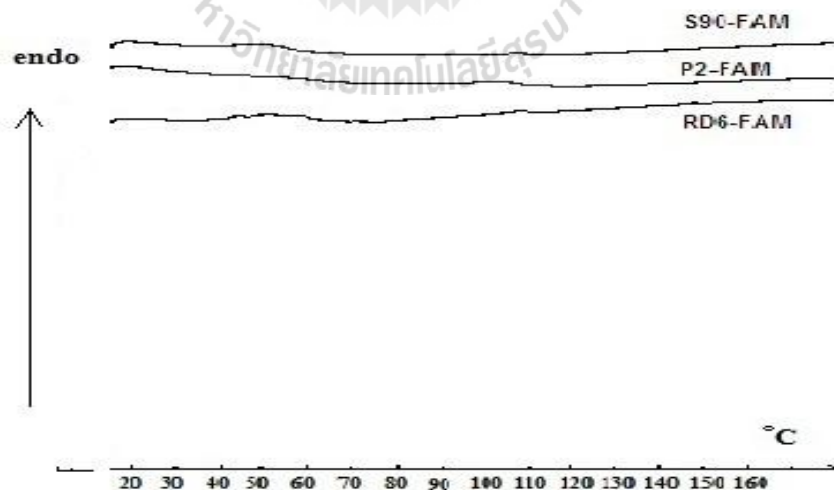


ภาพที่ 3.13 ความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคติน (Branch chain length distribution of amylopectin) ของสตาร์ช RD6 ที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ด้วย (a) น้ำ และ (b) NaOH

ความร้อนและพลังงานกลที่ใช้ในการกวนตัวอย่าง ดังนั้น X-diffraction pattern จึงแสดงโครงสร้างอสัณฐาน (amorphous) และมีส่วนของผลึกเหลืออยู่เล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง DSC และโครงสร้างของสตาร์ชเปลี่ยนจาก A เป็น B-type นอกจากนี้ยังปรากฏพีคเดี่ยวที่ 2θ ที่ 19.7° เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างอะมิโลสและไขมัน ซึ่งแสดงโครงสร้างแบบ V_h -type



ภาพที่ 3.14 ลักษณะโครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ทั้งสามพันธุ์ RD6 (กข 6), P2 (พิชญ์โลก 2) และ S90 (สุพรรณบุรี 90)



ภาพที่ 3.15 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลาตินในเซนชัน สตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

3.1.9.4 คุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

หลังจากที่สตาร์ชผ่านการกำจัดอะมิโลส ได้ทำการศึกษาสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter แสดงในภาพที่ 3.15 โดยค่า T_0 , T_p , T_c , $(T_c - T_0)$ และ ΔH แสดงในตารางที่ 3.14 ซึ่งพบว่าหลังผ่านการกำจัดอะมิโลสสตาร์ชทั้งสามพันธุ์มีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลว (T_m) ระหว่าง 52.61-66.23 °ซ และมี ΔH อยู่ระหว่าง 4.01-4.76 (J/g) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับสตาร์ชเริ่มต้น (native starch) พบว่ามี T_m อยู่ในช่วงอุณหภูมิเดียวกัน แต่สตาร์ชที่ผ่านการกำจัดอะมิโลสมีค่า ΔH น้อยกว่า เนื่องจากโครงสร้างส่วนผลึกของสตาร์ชบางส่วนถูกทำลายในขั้นตอนการกำจัดอะมิโลสจึงมีผลทำให้โครงสร้างไม่แข็งแรง การใช้พลังงานในการเกิดเจลาติไนเซชันต่ำกว่า native starch ซึ่งสอดคล้องกับผล XRD ที่แสดงโครงสร้างผลึกต่ำ

ตารางที่ 3.14 สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	T_0 (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	$T_c - T_0$ (°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

1.9.5 ปริมาณ RS คุณสมบัติทางผลึกและคุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส

สตาร์ชปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) หลังผ่านกระบวนการกำจัดอะมิโลสที่อุณหภูมิ 90 °ซ ร่วมกับการล้างตะกอน ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) และบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณ RS แสดงดังตารางที่ 3.15 พบว่า RD6-FAM มีปริมาณ RS ต่ำกว่า S90-FAM และ P2-FAM ตามลำดับ เนื่องจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 ไม่มีสัดส่วนของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) เป็นองค์ประกอบในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และพันธุ์ S90 มีโครงสร้างที่เป็น super long chain จึงเป็นผลทำให้สตาร์ชทั้งสองพันธุ์มีปริมาณ RS สูงกว่าข้าวพันธุ์ RD6 และเมื่อทำการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) ทำให้ super long

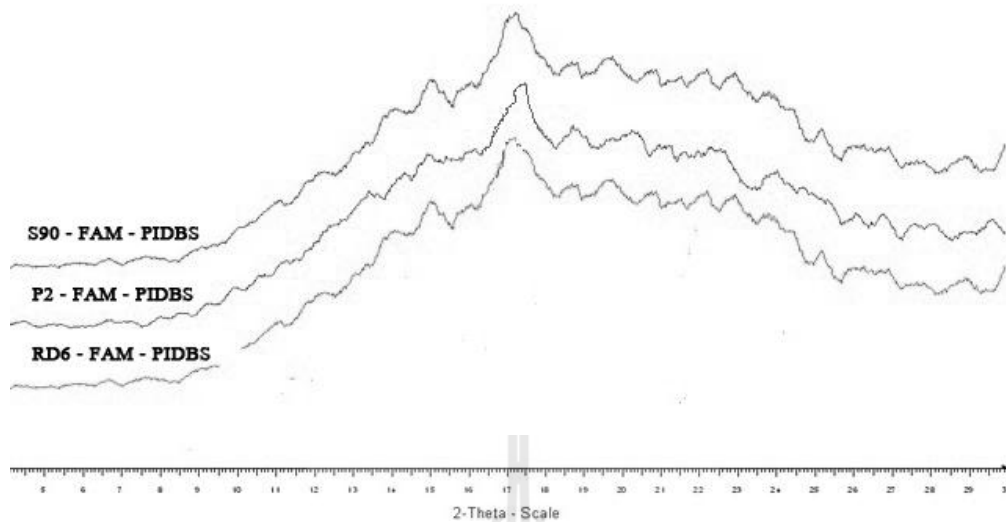
chain ถูกตัดและถูกปลดปล่อยออกจากโครงสร้างและเกิดการจับตัวกันเป็น โครงสร้างที่ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีปริมาณ RS สูงกว่าพันธุ์ S90 ถึงแม้ว่าสตาร์ชทั้งสองชนิดจะมี super long chain เช่นเดียวกันแต่มีในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีสัดส่วน super long chain มากกว่าพันธุ์สุพรรณบุรี 90 (ตารางที่ 3.15) ดังนั้นหลังจากการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ สายโซ่ที่มีขนาดยาวถูกปลดปล่อยออกมาและเกิดการจับตัวกันเป็น โครงสร้างที่แข็งแรงทนต่อการย่อยของเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณ RS มากกว่าดังนั้นแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ RS

ตารางที่ 3.15 ปริมาณ RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) และตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสรวมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ 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)

สำหรับลักษณะโครงสร้างทางผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) หลังถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสรวมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 3.16 ซึ่งพบ single / double peak ที่ตำแหน่ง 2θ ที่ 17° 22° และ 24° แสดงถึงโครงสร้างผลึกแบบ B-type (Buleon et al., 1998) นอกจากนี้ยังปรากฏพีคเดี่ยวที่ 2θ ที่ 19.7° เกิดจากอันตรกิริยาระหว่างอะมิโลสและไขมัน ซึ่งแสดงโครงสร้างแบบ V_h-type อีกด้วย ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตัดกิ่งสตาร์ชข้าวด้วยเอนไซม์และบ่มที่อุณหภูมิต่ำส่งผลทำให้โครงสร้างผลึกของสตาร์ชเปลี่ยนเป็น B-type (Eerlingen et al., 1993) เมื่อพิจารณาปริมาณความเป็นผลึกที่แสดงในตารางที่ 3.16



ภาพที่ 3.16 ลักษณะ โครงสร้างผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

พบว่าหลังทำการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ตามด้วยกระบวนการรีโทรเกรท ปริมาณผลึกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ผ่านการกำจัดอะมิโลสที่ยังไม่ผ่านกระบวนการตัดกิ่ง (Native-free amylose starch) ทั้งนี้ตัวอย่างในตารางที่ 3.16 นั้น โครงสร้างกิ่งก้านของอะมิโลเพคตินที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์และกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างผลึกด้วยการรีโทรเกรทที่อุณหภูมิต่ำทำให้โมเลกุลของสายกลูแคนสามารถเคลื่อนที่และเกิดการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างผลึกได้ และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างพันธุ์ข้าวพบว่าปริมาณผลึกที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากหลังถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์โครงสร้างกิ่งก้านของอะมิโลเพคตินจึงเกิดเป็นกลูแคนสายตรงที่สามารถจัดเรียงตัวเกิดเป็นโครงสร้างผลึกได้เมื่อทำการรีโทรเกรท และผลจากการกำจัดอะมิโลสทำให้ส่วนของสายยาว (Long chain) และ super long chain ของสตาร์ชข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 และสุพรรณบุรี 90 ถูกตัดให้สั้นลง เป็นผลทำให้ปริมาณความเป็นผลึกไม่แตกต่างจากสตาร์ชข้าวพันธุ์ RD6 นอกจากนี้พบว่าปริมาณความเป็นผลึกไม่ขึ้นกับปริมาณ RS เช่นเดียวกับผลการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว

ตารางที่ 3.16 ปริมาณความเป็นผลึกและรูปแบบผลึกของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

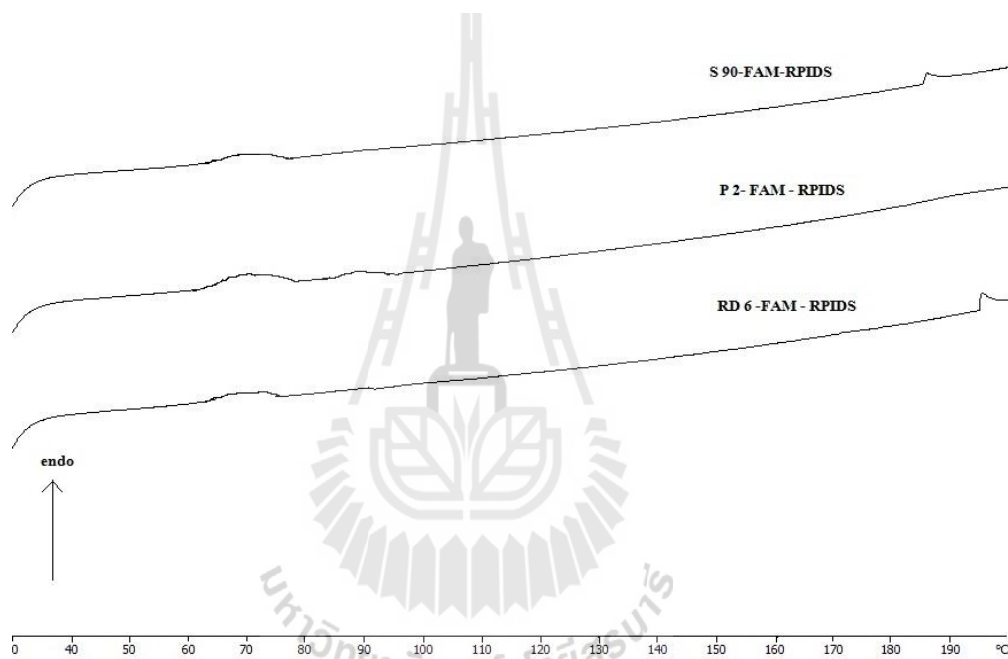
Sample	Relative crystallinity (%)	Crystalline pattern
RD6-FAM-RPIDS	6.87±0.45 ^a	B+V _h
P2-FAM-RPIDS	6.97±0.22 ^a	B+V _h
S90-FAM-RPIDS	6.91±0.15 ^a	B+V _h

ตารางที่ 3.17 คุณสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลาคีโนเซชันชั้นของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

Sample	First transition					Second transition				
	T ₀	T _p	T _c	T _c -T ₀	ΔH (J/g)	T ₀	T _p	T _c	T _c -T ₀	ΔH (J/g)
	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)	(°C)	(°C)	(°C)	(°C)	(J/g)
RD6-FAM-RPIDS	55.1 6 ^a	66.5 0 ^a	73.3 8 ^a	17.9 2 ^b	1.00 a					
P2-FAM-RPIDS	55.5 2 ^a	67.5 2 ^a	79.4 5 ^a	27.1 3 ^a	1.08 a	79.6 9	86.1 1	93.9 9	14.3 1	0.31
S90-FAM-RPIDS	55.3 9 ^a	66.6 7 ^a	72.5 1 ^a	15.1 2 ^b	1.05 a					

เทอร์โมแกรมของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch: FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+ Isoamylase debranched starch :PIDBS) และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 3.17 โดยค่า T₀, T_p, T_c, T_c-T₀ และ ΔH แสดงในตารางที่ 3.17 พบว่าสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์มีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลว (T_m)

ระหว่าง 55.16-79.4 °ซ และมี ΔH อยู่ระหว่าง 1.00-1.08 (J/g) โดยตัวอย่างทั้งสามมี T_0 ต่ำเนื่องจากหลังทำการตัดกิ่งทำให้เกิดโมเลกุลสายสั้นเป็นจำนวนมาก อีกทั้งการกระตุ้นให้เกิดผลึกที่อุณหภูมิต่ำทำให้ผลึกที่เกิดขึ้นไม่แข็งแรง จึงใช้อุณหภูมิในการหลอมเหลวต่ำ นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่า P 2-FAM เท่านั้นที่เกิด second transition ซึ่งอาจเกิดจากอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลสายยาวของอะมิโลเพคตินที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังผ่านกระบวนการตัดกิ่ง เกิดการจัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างผลึกที่มีความแข็งแรงยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้เกิด second transition ในขณะที่ไม่พบใน S90 -FAM- RPIDS และ RD6 -FAM-RPIDS



ภาพที่ 3.17 เทอร์โมแกรมการเกิดเจลลาติโนเซชัน RS ของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส และบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (RPIDS) ของสตาร์ชข้าวทั้งสามพันธุ์ RD6, P2 และ S90

การติดตามกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลสด้วย ATR-FTIR ได้ทำการติดตามอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 ต่อ 1037 cm^{-1} แสดงถึงสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างส่วนที่เป็นระเบียบที่เกิดขึ้นที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาบ่มเพิ่มขึ้นค่าสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของผลึกไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งเวลาผ่านไปถึง 96 ชั่วโมงหรือ 4 วัน ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 1047 (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้น

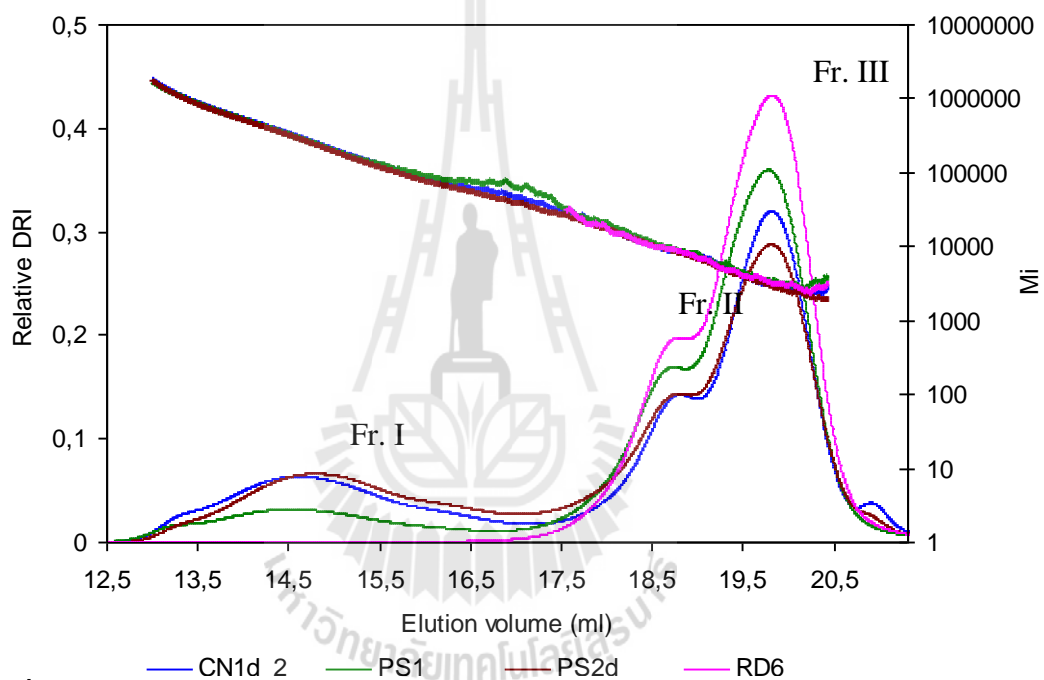
จึงไม่สามารถติดตามกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ด้วยวิธีทาง IR ได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลจากกระบวนการกำจัดอะมิโลส และกระบวนการตัดกิ่ง ก่อให้เกิดความยาวที่หลากหลายของสายเส้นตรงกลูแคน มีผลทำให้เกิดผลึกที่มีขนาดแตกต่างกันเป็นจำนวนมาก อีกทั้งไม่มีโครงสร้างในส่วนที่เป็นอะมิโลสที่คอยเหนี่ยวนำให้เกิดการรีโทรเกรเดชัน พร้อมทั้งโมเลกุลสายยาว (Long chain) และ super long chain ไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างที่เป็นระเบียบคั่งนั้นจึงไม่สามารถติดตามการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ที่ผ่านกระบวนการตัดกิ่งและบ่มที่อุณหภูมิ 4 °ซ ด้วยเทคนิค FTIR ได้

ตอนที่ 2

3.2.1 คุณสมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชตัดกิ่ง

จากการตรวจสอบคุณลักษณะทางโครงสร้างของสตาร์ชตัดกิ่งจากสตาร์ชข้าว 4 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิค HPSEC-MALLS-DRI แสดงดังภาพที่ 3.18 และตารางที่ 3.18 พบว่า สตาร์ชข้าวตัดกิ่งจากสตาร์ชข้าวเหนียว กข 6 มีการกระจายตัวน้ำหนักโมเลกุล 2 ช่วงประกอบด้วยช่วงที่ 3 (fraction III, Fr. III) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักประมาณ 3,500 g/mol (DP 21) โดยเป็นส่วนของสายโซ่สั้นของ cluster มีความยาวสูงสุดประมาณ DP 36 และช่วงที่ 2 (fraction II, Fr. II) มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักประมาณ 11,000 g/mol (DP 67) ซึ่งเป็นส่วนของกิ่งก้านสายโซ่ยาวซึ่งเป็นสายเชื่อมต่อระหว่าง cluster (Singh และคณะ, 2007) สำหรับสตาร์ชตัดกิ่งจากสตาร์ชข้าวเจ้าพันธุ์ พันธุ์ชัชนาท 1 (CN1) พิชณุโลก 1 (P1) และพิชญ์โลก 2 (P2) มีการกระจายตัวน้ำหนักโมเลกุล 3 ช่วงประกอบด้วยช่วงที่ 3 (Fr. III) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักประมาณ 3,700 g/mol (DP 23) ตามลำดับช่วงที่ 2 (Fr. II) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักประมาณ 13,000- 15,000 (DP 82-95) และช่วงที่ 1 (fraction I, Fr. I) น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนักประมาณ 270,000-410,000g/mol (DP 1,600-2,500) โดย Fr. I มีน้ำหนักโมเลกุลเทียบเท่ากับอะมิโลส (Inouchi และคณะ, 1999) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะมิโลสในสตาร์ชข้าวเจ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันในปริมาณอะมิโลสปรากฏโดย $CN1 < P2 < P1$ ตามลำดับ และให้ผลไม่สอดคล้องกับพื้นที่ใต้พีคของพีคการกระจายตัวน้ำหนักโมเลกุลในช่วง Fr. I จากการจากรายงานของรุ่งนภา และคณะ (2546) รายงานว่า ข้าวเจ้าพันธุ์พิชญ์โลก 2 จัดอยู่ในกลุ่มข้าวอะมิโลสสูงปานกลาง ส่วนข้าวเจ้าพันธุ์ชัชนาท 1 จัดอยู่ในกลุ่มข้าวอะมิโลสสูง โดยข้าวเจ้าพันธุ์พิชญ์โลก 2 มีกิ่งก้านของอะมิโลเพคตินที่มีความยาวมาก (Super long chain) จำนวนมากเมื่อเทียบกับข้าวเจ้าพันธุ์ชัชนาท 1 (ร้อยละ 10 ของปริมาณสตาร์ชทั้งหมดโดยน้ำหนัก) ดังนั้น เมื่ออะมิโลเพคตินถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสทำให้กิ่ง

ก้านของอะมิโลเพคตินที่มีความยาวมาก (Super long chain) ถูกชะออกมาในช่วงเดียวกับอะมิโลส โดยผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของรุ่งนภา และคณะ (2546) เมื่อเปรียบเทียบดัชนีการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งจากแป้งข้าว 4 สายพันธุ์ พบว่า มีดัชนีการกระจายน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ น้ำหนักโมเลกุลในส่วน Fr. II และ Fr. III และอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีค Fr. III/ Fr. II ของสตาร์ชทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ น่าจะมีโครงสร้างน้ำหนักโมเลกุลของอะมิโลเพคตินในส่วนสายโซ่สั้น A-chain สายโซ่ยาว B1-B3 chain ใกล้เคียงกัน



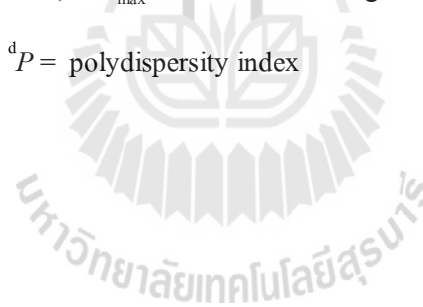
ภาพที่ 3.18 การการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของสตาร์ชข้าวตัดกิ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPSEC-MALLS-RI โดยเส้นทึบแสดงถึงน้ำหนักโมเลกุล (molar mass) และเส้นบางแสดงการตอบสนองของ RI detector

ตารางที่ 3.18 ข้อมูลการกระจายน้ำหนักโมเลกุลของสตาร์ชข้าวตังที่ตรวจวิเคราะห์โดย HPSEC-MALLS-RI

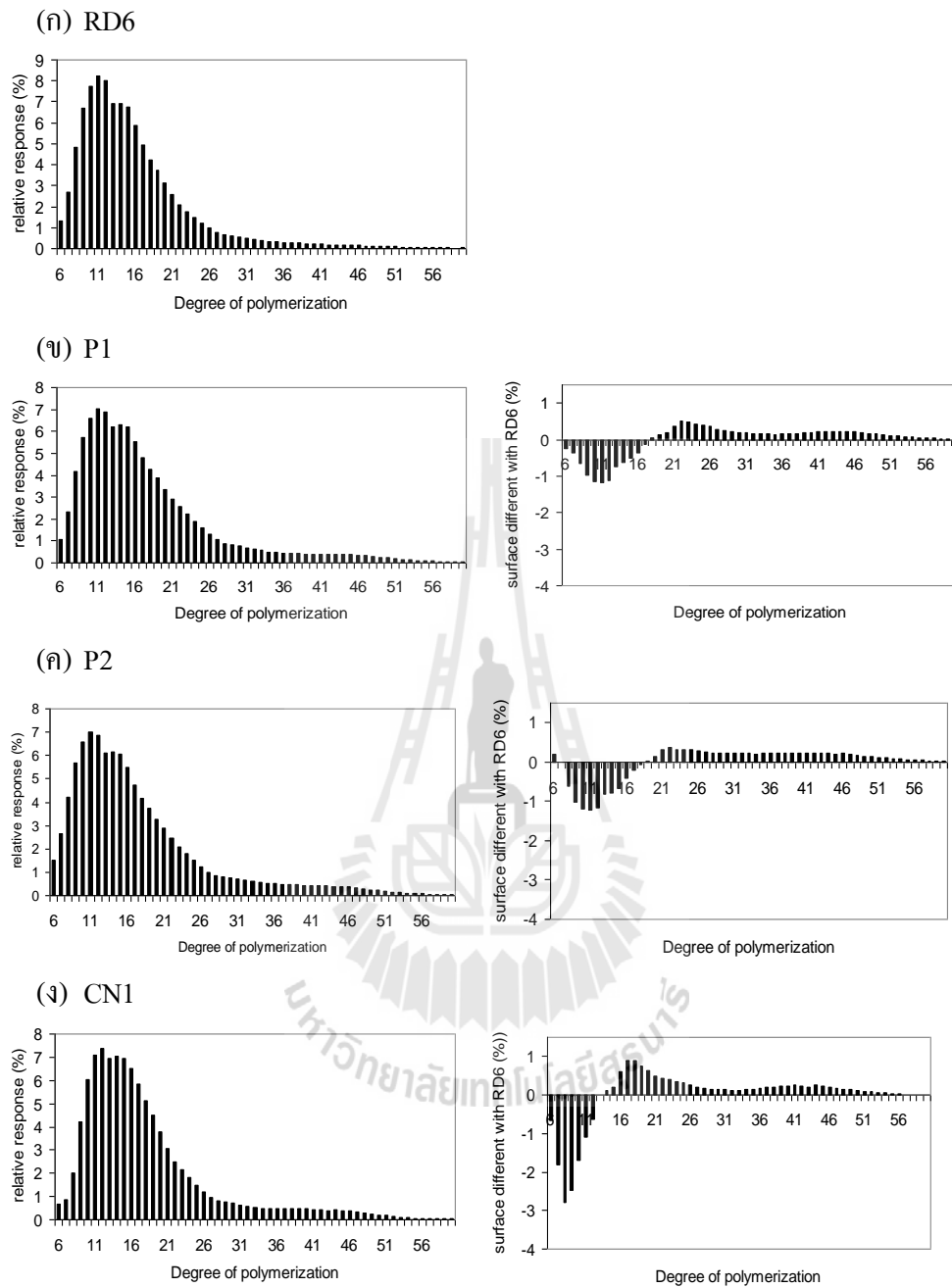
parameter	RD6		P1			P2			CN1		
	Fr. II	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. III	Fr. I	Fr. II	Fr. III
AL content (%) ^a	0		12.63			25.57			29.57		
Area (%)	22.2	76.8	14.7	20.0	65.3	28.4	17.9	53.7	26.5	16.5	57.0
DP_{\max}^b	53.8	19.6	2011	55.3	20.2	1422	58.1	20.3	1781	55.6	19.8
DP_w^c	67.3	21.8	2556	81.8	23.6	1684	94.8	23.9	1959	88.1	22.9
P^d	1.1	1.1	2.4	1.1	1.2	2.1	1.2	1.2	2.3	1.2	1.2

^a The amylose content was determined by CLI method, ^b DP_{\max} = the maximum degree of polymerization;

^c DP_w = weight-average degree of polymerization; ^d P = polydispersity index



การศึกษาโครงสร้างรายละเอียดการกระจายสายโซ่ของอะมิโลเพคตินที่มี DP<60 สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค HPAEC-PAD ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มสายโซ่ออกเป็น 4 กลุ่มตามความยาวของสายโซ่ ได้แก่ fa, fb1, fb2 และ fb3 โดย fa แสดงถึงสายโซ่สั้น A-chain มี DP 6-12, fb1 แสดงถึงสายโซ่สั้นของ B1-chain มี DP 13-24, fb2 แสดงถึงสายโซ่สั้นของ B2-chain มี DP 25-36 และ fb3 แสดงถึงสายโซ่ยาวของ B-chain มี DP>37 (Hanashiro และคณะ, 1996) การกระจายสายโซ่ของอะมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวตัดกึ่งจากสตาร์ชข้าว 4 สายพันธุ์แสดงดังภาพที่ 3.19 และตารางที่ 3.19 พบว่า สตาร์ชข้าวตัดกึ่งจากข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ประกอบไปด้วยสายโซ่สั้นของ A-chain (fa, DP 6-12) มากกว่าสตาร์ชข้าวตัดกึ่งจากข้าวเจ้าทุกสายพันธุ์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Koroteeva และคณะ 2007 ที่พบว่าสตาร์ชข้าวเหนียวจะมีส่วนของ fa มากกว่าสตาร์ชข้าวที่มีอะมิโลสเป็นส่วนประกอบ สตาร์ชข้าวตัดกึ่งจากข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท 1 (CNI) พิษณุโลก 1(P1) และพิษณุโลก 2 (P2) มีการกระจายสายโซ่ fb2 และ fb3 ไม่แตกต่างกัน และการกระจายของสายโซ่ fb1 ไม่แตกต่างกับสตาร์ชตัดกึ่งข้าวเหนียว กข 6 ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์การกระจายน้ำหนักโมเลกุลและอัตราส่วนพื้นที่ Fr. III/Fr. II จากเทคนิค HPSEC-MALLS-DRI แสดงให้เห็นได้ว่า โครงสร้างโมเลกุลอะมิโลเพคตินของสตาร์ชตัดกึ่งจากสตาร์ชทั้ง 4 สายพันธุ์ในส่วน interconnection cluster chain ของสายโซ่ B-chain มีโครงสร้างโมเลกุลไม่แตกต่างกันความแตกต่างของการกระจายสายโซ่ของสตาร์ชข้าวเจ้าพันธุ์ต่างๆ เทียบกับสตาร์ชข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ดังภาพที่ 3.19 แสดงสตาร์ชข้าวเจ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการกระจายของสายโซ่ยาวตั้งแต่ DP17 มากกว่าสตาร์ชข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 โดยการกระจายสายโซ่ยาวของอะมิโล เพคตินในสตาร์ชข้าวเจ้าทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย



ภาพที่ 3.19 การกระจายสายโซ่โอะมิโนเพคตินของสารสกัดกิ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPAEC-PAD โดย (ก) คือสารสกัดกิ่งจากข้าวพันธ์ กข6 (ข) คือสารสกัดกิ่งจากข้าวพันธุ์พินธุโลก 1 (ค) คือสารสกัดกิ่งจากข้าวพันธุ์พินธุโลก 2 และ (ง) คือสารสกัดกิ่งจากข้าวพันธุ์ชยันนาท 1

ตารางที่ 3.19 ข้อมูลการกระจายสายโซ่อะมิโลเพคตินของสารข้าวจัดกึ่งตรวจวิเคราะห์โดย HPAEC-PAD

Starch	Chain length distribution (%)			
	fa (DP6-12)	fb ₁ (DP13-24)	fb ₂ (DP25-36)	fb ₃ (DP>37)
RD6	39.50	50.38	7.04	3.07
P1	33.85	50.13	9.68	6.34
P2	34.50	48.86	9.88	6.76
CN1	28.34	56.18	9.15	6.33

3.2.2 ผลของพันธุ์ข้าวจัดกึ่งต่อการสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะความเข้มข้นของการเตรียมเจลต่ำ

3.2.2.1 ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์มีหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสตาร์ช ปริมาณอะมิโลส การกระจายน้ำหนักโมเลกุลอะมิโลเพคติน วิธีการย่อยโดยสามารถย่อยสตาร์ชด้วยเอนไซม์หรือกรด ความเข้มข้นของของแข็ง สภาวะและอุณหภูมิในการเก็บ ในการวิจัยขั้นที่ 2 นี้ ศึกษาผลของพันธุ์ข้าวจัดกึ่ง 4 สายพันธุ์ที่มีการกระจายน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันต่อปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ โดยทำการตัดกึ่งด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่ความเข้มข้นของของแข็งร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน แสดงผลดังตารางที่ 3.20 พบว่า สตาร์ชตัดกึ่งมีระดับการย่อยร้อยละ 4-4.5 และมีค่าเบต้า อะมิโลไลซิส (β -amylolysis limit) ร้อยละ 97-99 แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชตัดกึ่งจากสตาร์ชทั้ง 4 พันธุ์ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสเกือบสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากย่อยส่วนใหญ่เป็นสายโมเลกุลเส้นตรง (linear chain) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและการกระจายสายโซ่แตกต่างกันตามโครงสร้างโมเลกุลอะมิโลเพคติน (ตารางที่ 3.18 และ 3.19) การกระจายของของโมเลกุลสัมพันธ์กับการปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ทั้งในตัวอย่าง DBS และตัวอย่าง RS โดยพบว่าแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์มีปริมาณสูงในแป้งตัดกึ่งที่มีสัดส่วนของโมเลกุลสายโซ่ยาว Fr.I สูง จากงานวิจัยของ Cai และ Shi (2010) รายงานว่า การสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในปริมาณผลผลิตสูงได้จากการตกผลึกของผลึกอะมิโลสสายสั้น (crystalline short-chain amylose, CSCA) จากแป้งตัดกึ่งจากสตาร์ชมันฝรั่งซึ่งมีสัดส่วนของสายโซ่ยาวสูง การวิจัยของ Eerligen และคณะ (1993) รายงานว่า ปริมาณของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ขึ้นกับความยาวโดยเฉลี่ยของสายอะมิโลส อะมิโลส DP<100 ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จะแปรผัน โดยตรงกับความยาวของสายโซ่ อะมิโลสขนาด DP>100 ปริมาณของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ค่อนข้างคงที่ แต่อะมิโลส DP400-600

ปริมาณของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ลดลง การวิจัยนี้ศึกษาปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จากการตกผลึกของโมเลกุลตัดกิ่งที่มีการกระจายขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน ไม่ได้ควบคุมความยาวของสายโซ่เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Eerligen และคณะ (1993) ผลงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า การตกผลึกร่วมของสายโซ่โมเลกุลสายยาวร่วมกับสายโซ่โมเลกุลสั้นให้ผลเชิงบวกกับปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ โดยโมเลกุลสายโซ่ยาว ($DP > 110$) จะพัวพันเป็นโครงสร้าง lamella ที่มีความเป็นระเบียบยากต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์อะมิเลส ในขณะที่สายโซ่โมเลกุลสั้น ($DP 6-110$) จะพันกันเป็นเกลียวคู่ double helices เกิดโครงสร้างแบบ micelle (Eerligen และ Delcour, 1994) อัตราส่วนของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในตัวอย่าง RS(fresh gel): DBS มีค่า 1-2 สำหรับสตาร์ชที่มีโมเลกุลสายโซ่ยาว Fr. I ($DP \sim 2,000$) เป็นส่วนประกอบสำหรับสตาร์ชตัดกิ่งจากสตาร์ชข้าวเหนียวที่ประกอบไปด้วยสายโซ่สั้น Fr. II ($DP 67$) และ Fr. III ($DP 22$) แสดงอัตราส่วนของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในตัวอย่าง RS(fresh gel): DBS เท่ากับ 17 แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างโมเลกุลเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ ตัวอย่าง DBS ของสตาร์ชตัดกิ่งจากสตาร์ชมีปริมาณแป้งย่อยต่อเอนไซม์ต่ำ ($0.9 \text{ g} / 100 \text{ g dry starch}$) เนื่องจากสายโซ่สั้นของสตาร์ชตัดกิ่งจะมี Glass transition temperature (T_g) ต่ำและ melting temperature (T_m) ประมาณ $50-60^\circ\text{C}$ ดังนั้นในสภาวะการตัดกิ่งที่อุณหภูมิ 50°C ใกล้กับ T_m จึงเกิดแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์น้อย อย่างไรก็ตาม เมื่อนำสตาร์ชตัดกิ่งมาเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิระหว่าง T_g และ T_m เหนียวทำให้เกิดการตกผลึกทำให้โมเลกุลสายโซ่เกิดการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ผลการตัดกิ่งต่อปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในแป้งข้าวให้ผลเช่นเดียวกับแป้งชนิดอื่น เช่น การรายงานของ Gonzalez-soto และคณะ (2004) รายงานว่า แป้งกล้วยที่ถูกตัดกิ่งมีปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์เพิ่มจากร้อยละ 9.1 เป็นร้อยละ 18 เมื่อใช้ระยะเวลาในการตัดกิ่ง 5 ชม. และพบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่ระยะเวลาการตัดกิ่งนานขึ้น (5-22 ชม.) เช่นเดียวกับการรายงานของ Guraya และคณะ (2001) ทำการตัดกิ่งแป้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียวเป็นระยะเวลา 24 ชม. และพบว่าให้ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 40 ถึงแม้ว่าการตัดกิ่งจะส่งผลให้ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น แต่ปริมาณและระดับการเกิดในแป้งแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางโมเลกุลของแป้งแต่ละชนิด นอกจากนี้จากผลการวิจัย พบว่า การทำแห้งด้วยการตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง ไม่มีผลต่อปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์

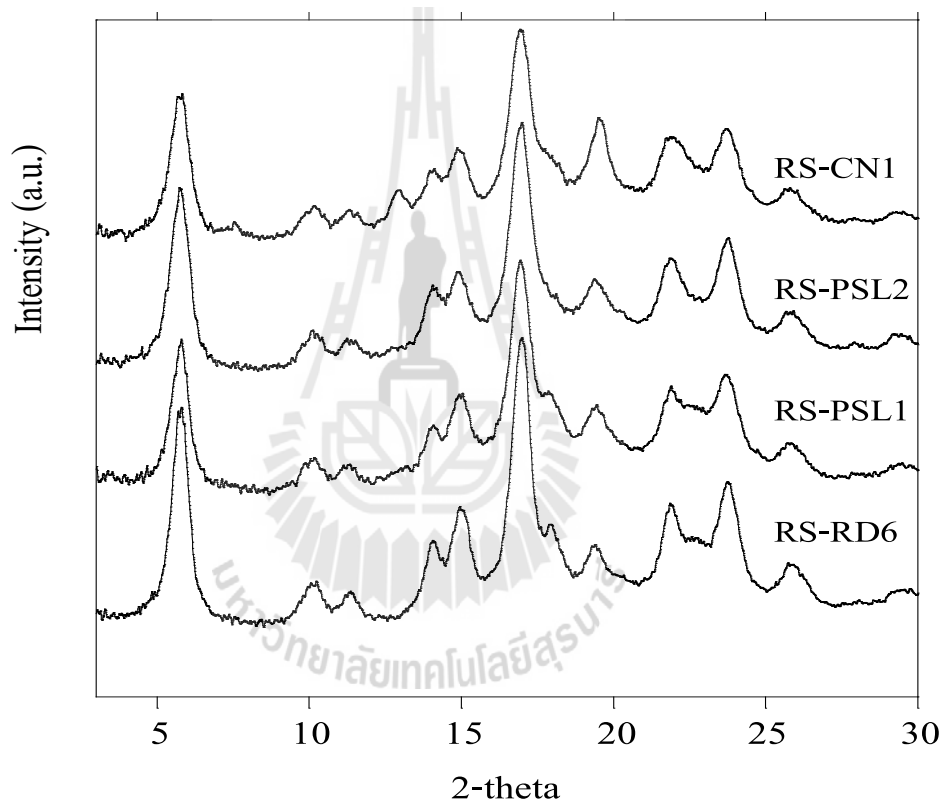
ตารางที่ 3.20 ระดับการย่อย เบต้าอะมิโลไลซิสลิमित และปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ของ ตัวอย่างแป้งตัดกึ่งความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25°C

ชนิด ตัวอย่าง	Degree of hydrolysis (%)	Beta-amylolysis limit (%)	RS content (g/100 g dry sample)		
			DBS	RS (fresh gel)	RS (dry sample)
RS-RD6	4.46	99.45	0.91	17.36	27.1
RS-P1	4.16	97.24	11.83	28.01	30.2
RS-P2	4.32	99.03	28.01	36.06	39.2
RS-CN1	4.44	98.03	22.22	36.49	36.4

3.2.3 คุณสมบัติทางผลึก คุณสมบัติทางความร้อนและลักษณะโครงสร้างจุลภาคของผลิตภัณฑ์แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์

คุณสมบัติทางผลึก โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค X-ray diffraction ในแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ แสดงดังภาพที่ 3.20 และตารางที่ 3.21 พบว่า แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จากสตาร์ชตัดกึ่งของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงลักษณะผลึกรูปแบบ B เป็นลักษณะเด่น อย่างไรก็ตาม พบลักษณะผลึกรูปแบบ A ที่เด่นชัดในตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6, RS-PSL1 และ RS-CN1 (ภาพที่ 3.20) ในปริมาณร้อยละ 5-10 (ตารางที่ 3.21) โดยแสดงพีคที่ตำแหน่ง 2-theta 17.1° ซึ่งเป็นตำแหน่งของพีคลักษณะเฉพาะของผลึกรูปแบบ A อัตราส่วนของรูปแบบผลึก A:B สัมพันธ์กับการกระจายของโมเลกุลสายโซ่สั้นที่มีโมเลกุลขนาด DP 22-23 (Fr. III) โดยทั่วไป โมเลกุลที่มีความยาวสายโซ่สั้น ความเข้มข้นสูง และอุณหภูมิในการตกผลึกสูงทำให้เกิดการตกผลึกในรูปแบบ A ในขณะที่อุณหภูมิต่ำและสายโซ่ยาวจะเกิดการตกผลึกในรูปแบบ B ซึ่งการแสดงผลึกรูปแบบ A ในตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในการวิจัยนี้ สันนิษฐานได้ว่าโมเลกุลสายสั้นของสตาร์ชตัดกึ่ง DP 22-23 เกิดการรวมตัวกันของสายโซ่แบบเกลียวคู่ในระหว่างการตัดกึ่งด้วยเอนไซม์ไอโซอะมิเลสที่อุณหภูมิ 50°C ซึ่งผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการวิจัยของ Pohu และคณะ (2004) ที่รายงานว่า มอลโตเดคริซทรินที่ตัดกึ่งในระบบความเข้มข้นสูงที่อุณหภูมิ 52°C เกิดการเปลี่ยนแปลงผลึกจากรูปแบบ B เป็น A ในระหว่างการตัดกึ่ง นอกจากนี้ ยังพบลักษณะผลึกรูปแบบ Vh ในทุกตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ โดยแสดงพีคที่ตำแหน่ง 2-theta 14.2° และ 19.7° (ภาพที่ 3.20) ที่เป็นตำแหน่งเอกลักษณ์เฉพาะของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไขมัน (amylose lipid complex) (Derycke et al., 2005) เมื่อพิจารณาถึงขนาดผลึกของตำแหน่งพีค 2-theta 5.4° reflection(100)

พบว่า ขนาดผลึกมีขนาดใหญ่สุดในตัวอย่าง RS-RD6 ตามด้วย RS-P1, RS-P2 และ RS-CN1 ตามลำดับโดยขนาดผลึกสัมพันธ์กับความยาวสายโซ่ สายโซ่สั้นทำให้ผลึกที่ได้มีขนาดใหญ่ สอดคล้องกับความสามารถของสายโซ่สั้นในการจัดเรียงผลึกให้มีขนาดใหญ่ขึ้นจากระบบที่มีความ หนืดต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสายโซ่ยาว (Buleon และคณะ 2007) อัตราส่วนรูปแบบผลึก A:B สัมพันธ์กับปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ เมื่อสัดส่วนรูปแบบผลึก B มากขึ้นปริมาณแป้งทนย่อย ต่อเอนไซม์จะมากขึ้น ของสนับสนุนงานวิจัยที่ผ่านมาว่าผลึกรูปแบบ B ทนต่อการย่อยมากกว่าผลึก รูปแบบ A (Planchot และคณะ 1997)



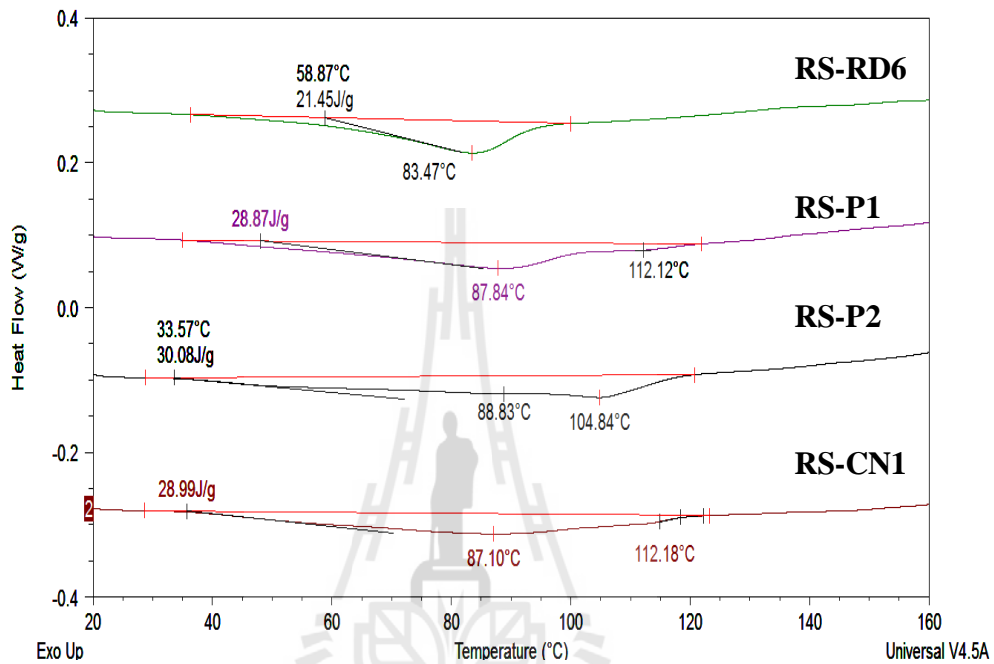
ภาพที่ 3.20 X-ray diffraction pattern ของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สภาวะการ เตรียมเจล ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25°C

ตารางที่ 3.21 ปริมาณผลึก อัตราส่วนของชนิดผลึกและขนาดผลึกของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25°C

ชนิดตัวอย่าง	ชนิดผลึก	ปริมาณผลึก (%)	อัตราส่วนA:B	ขนาดผลึก(nm)
RS-RD6	C+Vh	73.1	9:91	12.2
RS-PSL1	C+Vh	67.5	7:93	11.4
RS-PSL2	C+Vh	67.0	4:96	10.6
RS-CN1	C+Vh	61.2	5:95	10.8

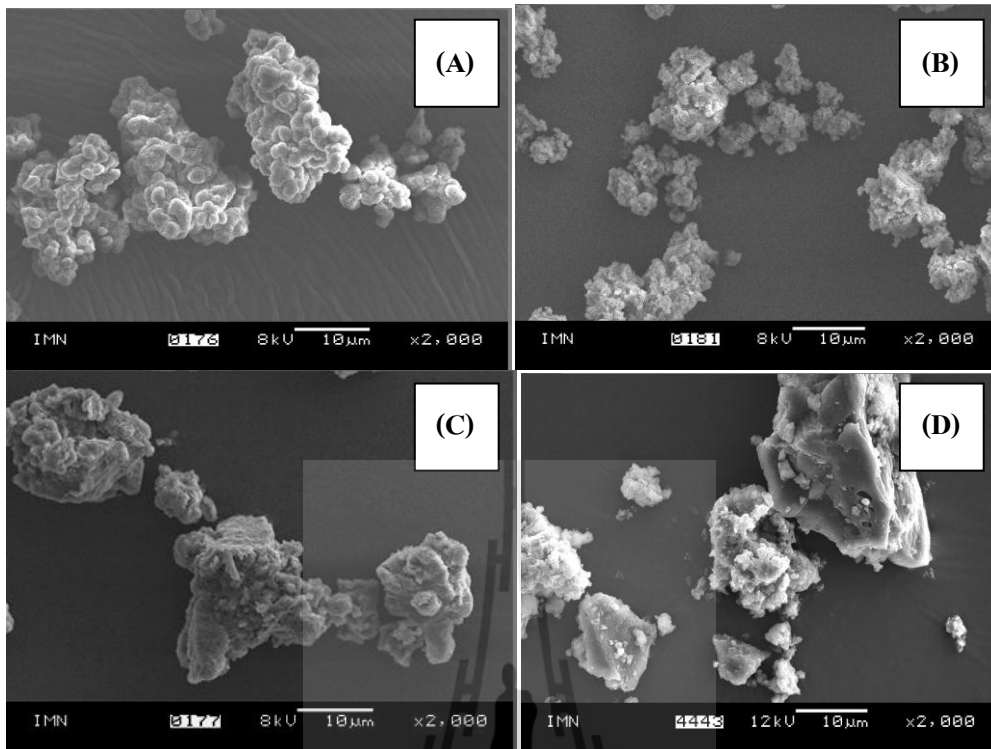
คุณสมบัติทางความร้อนจากการตรวจวัดอุณหภูมิในการหลอมเหลว และปริมาณเอนทาลปีด้วยเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) ในแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จากจากสตาร์ชตัดกิ่งของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงดังภาพที่ 3.21 พบว่า ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 แสดงอุณหภูมิหลอมเหลวในช่วงแคบที่อุณหภูมิ 59-100°C ในขณะที่ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-PSL1, RS-PSL2 และ RS-CN1 แสดงอุณหภูมิหลอมเหลวช่วงกว้างที่อุณหภูมิ 34-120°C โดยมีอุณหภูมิหลอมเหลวสูงสุด 2 อุณหภูมิ คืออุณหภูมิแรกประมาณ 87-89°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิของการรวมตัวของเกลียวคู่ของสายโซ่สั้นที่มีโมเลกุล DP_w 22-95 (Fr. II และ Fr. III) และที่อุณหภูมิที่สองประมาณ 104-112°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิของ amylose-lipid complex เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิหลอมเหลวสูงสุด (Tp) ในช่วงอุณหภูมิการหลอมเหลวแรกของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 พบว่ามี Tp ต่ำกว่า RS-PSL2, RS-PSL1 และ RS-CN1 สอดคล้องกับความยาวสายโซ่ในส่วน Fr. II โดย RS-RD6 แสดง Tp 83.5°C ซึ่งมี DP_{max} 53 ขณะที่ RS-PSL2 แสดง Tp 88.8°C ซึ่งมี DP_{max} 58 ขณะที่ RS-PSL1 และ RS-CN1 แสดง Tp 87.8°C และ 87.1°C ซึ่งมี DP_{max} 56 เช่นเดียวกันกับเมื่อพิจารณาอุณหภูมิหลอมเหลวสูงสุดของ amylose-lipid complex ที่พบว่ามีสอดคล้องกับความยาวสายโซ่ในส่วน Fr. I โดย RS-PSL1 และ RS-CN1 แสดง Tp 112.1°C ซึ่งมี DP_{max} 1,800-2,000 ขณะที่ RS-PSL2 แสดง Tp 104.8°C ซึ่งมี DP_{max} 1,400 โดยอุณหภูมิในการหลอมเหลวจะแปรผันตามความยาวของสายโซ่ซึ่งบ่งชี้ถึงความยาวสายโซ่ที่จัดเรียงเกลียวคู่และ/หรือม้วนพับในส่วนของชั้นผลึก (Buleon และคณะ, 2007) เอนทาลปีเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (ตารางที่ 3.20) ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากค่าเอนทาลปีแสดงถึงค่าพลังงานความร้อนที่ใช้ในการทำลายพันธะไฮโดรเจนของการรวมตัวแบบเกลียวคู่ของสายโซ่ซึ่งบ่งบอกถึงปริมาณผลึกและความหนาของชั้นผลึก (Zobel และคณะ, 1984) อย่างไรก็ตาม จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ ความแข็งแรงของผลึกกับปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์แต่ไม่สัมพันธ์กับปริมาณผลึก จาก

งานวิจัยนี้ เห็นได้ว่า ความยาวสายโซ่แป้งที่มีมีความสำคัญมากต่อความแข็งแรงของผลึก ปริมาณผลึกส่งผลถึงปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ นอกจากนี้ amylose-lipid complex เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อความแข็งแรงของผลึกและส่งผลถึงปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์



ภาพที่ 3.21 Thermogram ของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สภาวะการเตรียมเจลดความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักและเก็บที่อุณหภูมิ 25°C

โครงสร้างจุลภาคของผลิตภัณฑ์แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จากการถ่ายภาพด้วยเทคนิค SEM แสดงดังภาพที่ 3.22 พบว่า ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 แสดงลักษณะรูปร่างทรงกลมที่เกาะรวมตัวกัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมครอน ในขณะที่ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-P1, RS-P2 และ RS-CN1 ไม่มีลักษณะรูปร่างที่แน่นอน มีลักษณะเป็น aggregate ที่มีโครงสร้างแน่น การตกผลึกของ RS-RD6 เป็นรูปร่างทรงกลม อาจเป็นไปได้ว่า โมเลกุลสายสั้นเกิดจากจัดเรียงตัวรูปแบบทรงกลมเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของความเยื่ออย่างรวดเร็วในช่วงของการลดอุณหภูมิจาก 50°C เป็น 25°C โดยการเกิดผลึกที่มีรูปร่างลักษณะทรงกลม (spherocrystal) และมีโครงสร้างผลึกแบบ B เคยรายงานโดย Ring และคณะ (1987) จากการตกผลึกของอะมิโลสสายสั้น DP22 ความเข้มข้นร้อยละ 5-20 โดยน้ำหนักในสารละลายน้ำ (aqueous solution)



ภาพที่ 3.22 ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ (A) RS-RD6 (B) RS-P1 (C) RS-P2 (D) RS-CN1 ที่สภาวะการเตรียมเจลดความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก และเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ

3.2.4 ผลของพันธุ์ข้าวและอุณหภูมิต่อการสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะความเข้มข้นของการเตรียมเจลดสูง

3.2.4.1 ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์

ในการวิจัยขั้นที่ 3 ศึกษาผลของพันธุ์ข้าว 2 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ กข6 (ข้าวเหนียว) และ พิษณุโลก 2 (อะมิโลสร้อยละ 12.63) ต่อปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่สภาวะการเตรียมเจลดความเข้มข้นสูงร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิการเก็บที่ 25°ซ และ 50°ซ ทั้งนี้ เนื่องจากสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูง เจลที่ได้หลังการเจลดในน้ำที่ความเข้มข้นสูงมีความแข็งมาก ทำให้เอนไซม์ไอโซอะมิเลสไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาย่อยได้ ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 ที่อุณหภูมิการเก็บ 50°ซ มีปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์สูงสุด (55.4 กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง) และมีปริมาณมากกว่า RS-P1 ที่อุณหภูมิการเก็บเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า การเตรียมแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ที่ความเข้มข้นสูงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิการเก็บสูงผลความแตกต่างของการกระจายน้ำหนักโมเลกุลไม่มีผลต่อการสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ สำหรับการเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ ของสตาร์ชตัดกึ่งที่ความเข้มข้นสูงให้ผลเช่นเดียวกับการเก็บที่ความเข้มข้นต่ำ โดยเห็นได้ว่า

ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อสัดส่วนของโมเลกุลสายโซ่ยาวน้ำหนักโมเลกุลสูงมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิการเก็บจะเห็นความแตกต่างของการเพิ่มปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์อย่างชัดเจน การเก็บที่ 50°C สามารถสร้างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์มากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ประมาณ 2-3 เท่า เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิสูง แต่ต่ำกว่า T_m เป็นอุณหภูมิที่สนับสนุนการเติบโตของผลึก (propagation) ที่อุณหภูมินี้จำนวนนิวเคลียสในการเกิดผลึกจะต่ำ แต่ผลึกจะเติบโตอย่างรวดเร็วเนื่องจากระบบมีความหนืดต่ำ โมเลกุลสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ การแพร่สูง (diffusion) ผลึกจึงมีขนาดใหญ่และมีความแน่นสูง ส่งผลให้ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์สูง การเตรียมตัวอย่างเจลแป้งที่ความเข้มข้นสูงให้ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ต่ำกว่าเล็กน้อยจากการเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากระบบที่มีความหนืดมากกว่า

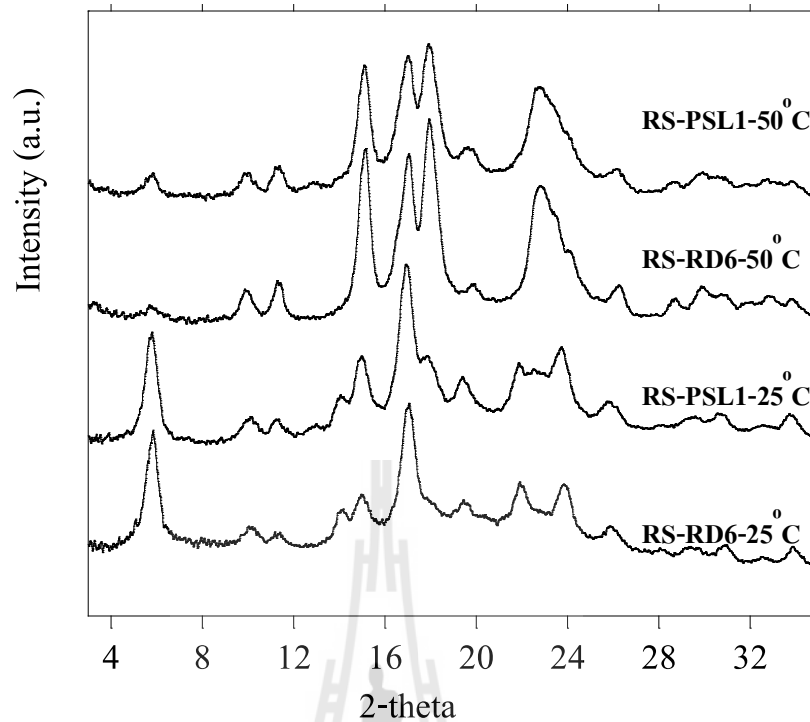
ตารางที่ 3.22 ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะการเตรียมเจล ความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25°C และ 50°C

ชนิดตัวอย่าง	อุณหภูมิ (°C)	RS content (g/ 100g dry starch)
RS-RD6	25	27.9
RS-RD6	50	55.4
RS-P1	25	27.7
RS-P1	50	49.8

3.2.5 คุณสมบัติทางผลึกและคุณสมบัติทางความร้อนของผลิตภัณฑ์แป้งทนย่อยต่อเอนไซม์

ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 และ RS-P1 เก็บที่อุณหภูมิ 25°C แสดงลักษณะผลึกรูปแบบ B เป็นลักษณะเด่น อย่างไรก็ตามพบผลึกรูปแบบ A โดยแสดงพีคที่ตำแหน่ง 17.2° ในขณะที่ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 และ RS-P1 เก็บที่อุณหภูมิ 50°C แสดงลักษณะผลึกรูปแบบ A เป็นลักษณะเด่นและพบผลึกรูปแบบ B เล็กน้อย (อัตราส่วนร้อยละ 3-5, ตารางที่ 3.22) โดยแสดงพีคเอกลักษณ์ที่ตำแหน่ง 5.1° (ภาพที่ 3.23) ผลการวิจัยสนับสนุนการตกผลึกโดยทั่วไป ที่พบว่า โมเลกุลที่มีความยาวสายโซ่สั้น ความเข้มข้นสูง และอุณหภูมิในการตกผลึกสูงทำให้เกิดการตกผลึกในรูปแบบ A ในขณะที่อุณหภูมิต่ำและสายโซ่ยาวจะเกิดการตกผลึกในรูปแบบ B อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการตกผลึกเป็นปัจจัยสำคัญต่อรูปแบบผลึกมากกว่าโครงสร้างโมเลกุล การเปลี่ยนรูปแบบผลึกเนื่องจากที่สัมพันธ์กับโครงสร้าง

โมเลกุลรายงาน โดย Pohu และคณะ (2004) พบว่า ช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการตัดกิ่ง ผลึกเริ่มต้นแสดงลักษณะผลึกรูปแบบ B เนื่องจากการเกิดโครงสร้างเจลของโมเลกุลสายโซ่ยาวและโมเลกุลกิ่งก้าน จากนั้นผลึกจะเกิดการเปลี่ยนผลึกจากผลึกรูปแบบ B ไปเป็นผลึกรูปแบบ A แบบค่อยเป็นค่อยไปจากการตกผลึกของโมเลกุลสายโซ่สั้น โดยผลึกจะเปลี่ยนเป็นผลึกรูปแบบ A ทั้งหมดใช้เวลาทั้งสิ้น 48 ชั่วโมง สำหรับการวิจัยนี้ พบว่า หลังการเก็บที่อุณหภูมิ 50°C เป็นระยะเวลา 6 วันยังคงแสดงผลึกรูปแบบ B ซึ่งเป็นผลึกที่เหลืออยู่จากการเกิดโครงสร้างเจลของโมเลกุลสายโซ่ยาวและโมเลกุลกิ่งก้าน และเนื่องจากโมเลกุลสายโซ่ยาวไม่ได้ถูกย่อยเป็นโมเลกุลสั้นๆ เมื่อทำการตัดกิ่งและตกผลึกต่อรูปแบบผลึก B จึงยังคงปรากฏอยู่ ส่วนโมเลกุลสายสั้นที่ปลดปล่อยมากจากการตัดกิ่งเมื่อนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 50°C เกิดการตกผลึกต่อเป็นรูปแบบผลึก A ในการวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลึกและขนาดผลึกต่อปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ พบว่า มีความสัมพันธ์กัน (ตารางที่ 3.22 และตารางที่ 3.23) โดยปริมาณผลึกสูงและผลึกมีขนาดใหญ่มีผลให้ปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์สูง และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบผลึกกับปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ พบว่า รูปแบบผลึก A มีการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากกว่ารูปแบบผลึก B ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานโดยทั่วไป ที่รายงานว่าผลึกรูปแบบ B มีความสามารถในการทนต่อการย่อยมากกว่าผลึกรูปแบบ A ใดๆก็ตาม จากการวิจัยนี้ไม่สามารถระบุได้ว่ารูปแบบผลึก A มีการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากกว่ารูปแบบผลึก B เนื่องจากความสามารถในการทนต่อการย่อยยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ รูปร่าง (morphology) ขนาด (particle size) ปริมาณและความแน่นของผลึก นอกจากนี้ ยังพบลักษณะผลึกรูปแบบ Vh ในตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-P1 ที่อุณหภูมิการเก็บที่ 25°C และ 50°C โดยแสดงพีคที่ตำแหน่ง 2-theta 14.2° และ 19.7° (ภาพที่ 3.23) ที่เป็นตำแหน่งเอกลักษณ์เฉพาะของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไขมัน (amylose-lipid complex) (Derycke และคณะ, 2005) และเมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับปริมาณแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์จะเห็นได้ว่า amylose-lipid complex ไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการทนย่อยต่อเอนไซม์ได้



ภาพที่ 3.23 X-ray diffraction pattern ของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ใน สตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะ การเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25°C และ 50°C

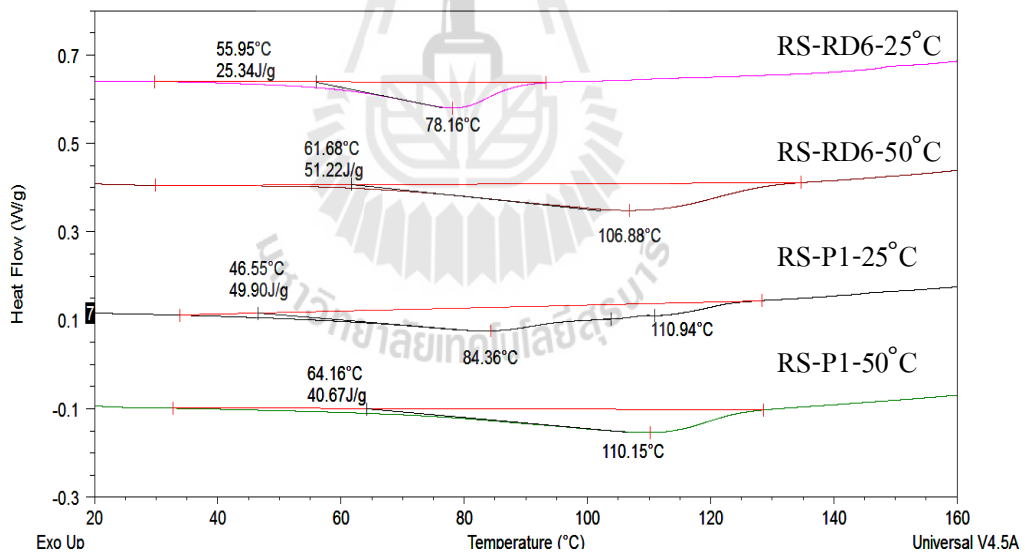
ตารางที่ 3.23 ปริมาณผลึก อัตราส่วนของชนิดผลึกและขนาดผลึกของตัวอย่างแป้งทนย่อย ต่อ เอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25°C และ 50°C

ชนิดตัวอย่าง	ชนิดผลึก	ปริมาณผลึก (%)	อัตราส่วนA:B	ขนาดผลึก(nm)
RS-RD6-25°C	C+Vh	60.3	1:99	12.3
RS-RD6-50°C	C+Vh	80.0	97:3	12.8
RS-P1-25°C	C+Vh	69.1	12:88	12.3
RS-P1-50°C	C+Vh	70.9	95:5	12.6

คุณสมบัติทางความร้อนของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกึ่งที่สภาวะการเตรียม เจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25°C และ 50°C แสดงดังภาพที่ 3.24 พบว่า ตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์RS-RD6 ที่อุณหภูมิการเก็บ 25°C แสดงอุณหภูมิหลอมเหลว ในช่วงแคบที่ 56-100°C ซึ่งเป็นการอุณหภูมิหลอมเหลวของผลึกรูปแบบ B ที่เกิดจากการรวมตัว ของโมเลกุลสายโซ่สั้น ในขณะที่ตัวอย่าง RS-P1 ที่อุณหภูมิการเก็บ 25°C แสดงอุณหภูมิหลอมเหลว

ในช่วงกว้างตั้งแต่ 50-130°ซ โดยมีอุณหภูมิหลอมเหลวสูงสุด 2 อุณหภูมิที่ 84°ซ ซึ่งเป็นการอุณหภูมิหลอมเหลวของผลึกรูปแบบ B ที่เกิดจากการรวมตัวของโมเลกุลสายโซ่สั้นและ 111°ซ ซึ่งเป็นการอุณหภูมิหลอมเหลวของผลึกรูปแบบ Vh ที่เกิดจาก amylose-lipid complex ถึงแม้ว่า amylose-lipid complex จะไม่มีผลในการเพิ่มความสามารถทนย่อยต่อเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน (Thermal stability) ให้สูงถึง 130°ซ

การเพิ่มคุณสมบัติทนต่อความร้อนของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์สามารถเหนี่ยวนำได้โดยการเก็บที่อุณหภูมิสูงซึ่งเป็นอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิหลอมเหลว (T_m) ของแป้งตัดกิ่ง ที่อุณหภูมิใกล้เคียง T_m จะสนับสนุนการเติบโตของผลึก ผลึกจะถูกจำกัดการเกิดนิวเคลียสแต่จะสามารถเติบโตอย่างเป็นระเบียบ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นในเคลื่อนที่ของโมเลกุลสายโซ่ (Erlingen และคณะ, 1993) ผลการวิจัย แสดงให้เห็นว่า การเก็บสตาร์ชตัดกิ่งที่อุณหภูมิใกล้เคียง T_m สามารถปรับปรุงคุณสมบัติทางความร้อนของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ โดยตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ RS-RD6 และ RS-P1 ที่อุณหภูมิการเก็บ 50°ซ แสดงอุณหภูมิหลอมเหลวในช่วงกว้างที่อุณหภูมิ 62-130°ซ โดยมีอุณหภูมิหลอมเหลวสูงสุดที่ประมาณ 110°ซ



ภาพที่ 3.24 thermogram ของตัวอย่างแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์ในสตาร์ชตัดกิ่งที่สภาวะการเตรียมเจลความเข้มข้นร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิการเก็บ 25°ซ และ 50°ซ

บทที่ 4

บทสรุป

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ RS มีหลากหลายปัจจัย ได้แก่ ระดับการตัดกิ่ง เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดกิ่ง สายพันธุ์ การกระจายสายโซ่ ปริมาณอะมิโลส ปริมาณของแข็งของสตาร์ช และอุณหภูมิในการเก็บ โดยพบว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับไอโซอะมิเลส (pullulanase+isoamylase debranched starch: PIDBS) มีระดับการตัดกิ่ง, ระดับการย่อย และค่า β -amylolysis limit สูงกว่าสตาร์ชข้าวตัดกิ่งด้วยพูลูลานเนส (Pullulanase debranched starch: PDBS) ซึ่งส่งผลให้ปริมาณ RS หลังผ่านกระบวนการรีโทรเกรเดชันของ PIDBS สูงกว่า PDBS แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส มีประสิทธิภาพในกระบวนการตัดกิ่งสูงกว่าการใช้เอนไซม์พูลูลานเนสเพียงตัวเดียว

ในส่วนปัจจัยด้านสายพันธุ์ สตาร์ชข้าวเหนียวพันธุ์ RD6 (waxy rice) ซึ่งไม่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบให้ปริมาณ RS ต่ำกว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 และ S90 ที่มีอะมิโลสเป็นองค์ประกอบ เมื่อทำการติดตามการเกิดรีโทรเกรเดชันด้วยเครื่อง FTIR พบว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 มีอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันเร็วกว่าสตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 และ RD6 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของอะมิโลเพคตินที่มีสายโซ่ขนาดยาวมาก (Super long chain) มีผลต่ออัตราการเกิดรีโทรเกรเดชัน หลังกระบวนการตัดกิ่งเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4^oซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำให้ Retrograded pullulanase + isoamylase debranched starch (RPIDS) และ Retrograded pullulanase debranched starch (RPDS) เปลี่ยนโครงสร้างผลึกจากชนิด A+V เป็นชนิด B+V type และมีช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลวอยู่ระหว่าง 54.46-110.55^oซ ในขณะที่ตัวอย่าง RPIDS เท่านั้นที่พบ second transition โดยมี T_m อยู่ระหว่าง 111.15-135.11^oซ ซึ่งเกิดจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสและไขมัน (amylose-lipid complex) และจากอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลสายยาวและสายยาวมากของอะมิโลเพคตินทำให้โครงสร้างผลึกที่แข็งแรง จึงส่งผลให้อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมเหลวมีค่าสูง เมื่อเตรียมสตาร์ชข้าวปราศจากอะมิโลสด้วยวิธีชะล้างอะมิโลส (amylose leaching) สตาร์ชข้าวพันธุ์ S90 ปราศจากอะมิโลส (S90-free amylose or S90-FAM) มีปริมาณอะมิโลสเหลือในตัวอย่างร้อยละ 4.93 ในขณะที่สตาร์ชข้าวพันธุ์ P2 ปราศจากอะมิโลส (P2-FAM) มีปริมาณอะมิโลสเหลือในตัวอย่างร้อยละ 7.85 และเมื่อสตาร์ชที่ปราศจากอะมิโลส (Free amylose starch : FAM) ถูกตัดกิ่งด้วยเอนไซม์พูลูลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไอโซอะมิเลส (Pullulanase+Isoamylase debranched starch : PIDBS) พบว่า P2-FAM และ S90-FAM มีปริมาณ RS สูงกว่า RD6-FAM ผลการทดลอง

ยืนยันว่าโมเลกุลของอะมิโลเพคตินมีสายโซ่ที่มีขนาดยาวมาก (super long chain) มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ RS

การเตรียมสตาร์ชทนย่อยต่อเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของปริมาณของแป้งต่ำ และเก็บที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณ RS และคุณสมบัติทนต่อความร้อนที่สูงขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณของสายโซ่ยาวที่มีในสตาร์ช รูปแบบผลึกของ RS ปรากฏรูปแบบผลึกทั้งแบบ A จากการตกผลึกระหว่างการตัดกิ่งของสายโซ่สั้นและแบบ B จากการตกผลึกในระหว่างการตัดกิ่ง อุณหภูมิในการหลอมเหลวของ RS แบ่งออกเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกที่อุณหภูมิประมาณ 88 °C จากการตกผลึกของโมเลกุลสายสั้นและช่วงอุณหภูมิที่สองประมาณ 110-120 °C จาก amylose-lipid complex นอกจากนี้ การเก็บที่อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการสร้างสตาร์ชทนย่อยต่อเอนไซม์ปริมาณสูงและเกิดการพัฒนาคูสมบัติทางความร้อนของ RS โดยแสดงอุณหภูมิหลอมเหลวที่ 110 °C เนื่องจากผลของการแอนนิล รูปแบบผลึกของแป้งทนย่อยต่อเอนไซม์แสดงรูปแบบ A เมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงและแสดงรูปแบบ A+B เมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำ



บรรณานุกรม

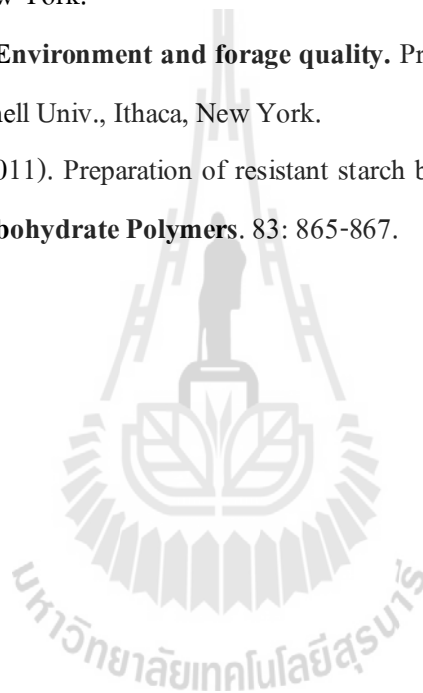
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. (2546). **เทคโนโลยีของแป้ง**. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ. (2546). การศึกษาคุณสมบัติของแป้งข้าวพันธุ์ต่างๆในประเทศไทยเพื่อเป็นกลยุทธ์ในการสร้างผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม. รายงานการวิจัยตีพิมพ์ลงหนังสือ **สัมมนาวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 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.
- Benbow, 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.



ภาคผนวก

การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

เครื่องมือและอุปกรณ์

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

วิธีการ

1. อบอุ่นสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 1-2 ใสลงในภาชนะหาความชื้น ซึ่งทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้ไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ทิ้งไว้ในอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีกครั้ง
5. ทำซ้ำข้อที่ 4 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

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

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. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น (desiccators)

สารเคมี

1. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)

วิธีการ

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

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

โดย W_1 = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

W_2 = น้ำหนักไขมันหลังอบ (กรัม)

3. การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2002)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน ขนาด 200 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน
3. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน (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. เครื่องดักจับไอกรด (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. โฟแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต
7. อินดิเคเตอร์ผสม (Mixed indicator ระหว่าง Methylene blue 0.1 กรัม กับ Methyl red 0.2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 90% 100 มิลลิลิตร)

วิธีการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต
 - 1.1 ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟตที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ให้ได้น้ำหนักอยู่ในช่วง 2.0-2.2 กรัม โดยเครื่องชั่งละเอียด บันทึกน้ำหนักที่ชั่ง
 - 1.2 นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
 - 1.3 กำหนดหาความเข้มข้นที่แน่นอน
2. การเตรียมสารละลาย HCl 0.1 โมลาร์จากกรดเกลือเข้มข้น
 - 2.1 ตวงกรดเกลือเข้มข้นให้มีปริมาตร 4.0-4.5 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
 - 2.2 เทกรดเกลือเข้มข้นที่ตวงแล้วลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากันดีเก็บสารละลายในขวดแก้วเพื่อนี้ไว้ใช้ต่อไป
3. การทำมาตรฐานสารละลายกรดเกลือ
 - 3.1 ปิเปตสารละลายกรดเกลือมา 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร
 - 3.2 เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เขย่าสารละลายในขวดให้เข้ากัน
 - 3.3 ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานทอติยมุมิโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายในขวดเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์
 - 3.4 ไทเทรตซ้ำ 2 ครั้ง
 - 3.5 กำหนดหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดเกลือ

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 ไหลตามข้างขวด) เขย่าเบา ๆ จนแป้งไม่จับกันเป็นก้อน ปิดปากขวดด้วยกระเปาะแก้วกลม
 - 2.3 ย่อยบนอุณหภูมิให้ความร้อนอ่อน ๆ จนได้สารละลายสีเขียวใส
 - 2.4 ปล่อยทิ้งให้เย็น

3. การกลั่น

3.1 เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิลดลงแล้ว จึงเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40%

3.2 จัดอุปกรณ์กลั่น

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

3.4 กลั่นจนกระทั่งไม่มีแอมโมเนียเหลือ ให้ได้สารละลายที่กลั่นได้ประมาณ 150 มิลลิลิตร

4. การไทเทรต

4.1 ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน สังเกตสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน จุดปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้

4.2 ทำ blank โดยใส่สารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่ได้ตัวอย่าง

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

โดย A = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W = น้ำหนักตัวอย่าง

N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)

F = แฟกเตอร์เท่ากับ 5.95

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถา

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ถ้วยครุชชีเบล
2. เตาไฟฟ้า
3. เตาเผา
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
5. เติชเคเตอร์

วิธีการ

1. เตาครุชชีเบลเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ครุชชีเบล นำไปเผาบนเตาไฟฟ้าจนควันหมด
3. นำไปเผาจนได้ต่อในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550°C นานประมาณ 2-3 ชั่วโมงจนกระทั่งได้เถาสีขาวหรือสีเทา
4. จากนั้นนำมาใส่เตชเคเตอร์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่งเตาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม

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

โดย W = น้ำหนักของครุชชีเบล (กรัม)

W_1 = น้ำหนักของครุชชีเบลและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของครุชชีเบลและตัวอย่างหลังเผาจนน้ำหนักคงที่ (กรัม)

ประวัติผู้วิจัย

นางสุนันทา ทองทา

นางสุนันทา ทองทา เกิดเมื่อวันที่ 27 ตุลาคม 2506 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (พัฒนาผลิตภัณฑ์) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2529 จบการศึกษาระดับปริญญาโท วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปี พ.ศ. 2533 จากนั้นเข้ารับราชการบรรจุตำแหน่งอาจารย์ที่ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีเดียวกัน ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 ได้รับทุน Fulbright จากมูลนิธิการศึกษาไทย-อเมริกัน ไปศึกษาต่อในระดับปริญญาเอก ที่ University Of Illinois at Urbana-Champaign สหรัฐอเมริกา และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2541

นางสุนันทา ทองทา ได้มีผลงานทางวิชาการดังต่อไปนี้

1. ผลงานตีพิมพ์ / การประชุมระดับชาติและนานาชาติ

- Chaisiricharoenkul, J. and **Tongta, S.** 2009. Effect of extrusion parameters on starch digestion and physicochemical properties of Job's Tear (*Coix lacryma jobi* L.) flour. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2009. Physicochemical properties of waxy and high amylose rice flour during storage. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Kiatponglarp, W. and **Tongta, S.** 2009. Comparative effect of different temperature cycling on resistant starch formation. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Boonna, S. 2009. Physical modification of rice flour by extrusion. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Kiatponglarp, W. 2009. Impact of enzyme concentration and hydrolysis time on resistant starch formation. Poster presentation in Starch Update 2009: The 5th International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2009. Physiochemical and textural properties of high amylose rice during storage. Poster presentation in Food Innovation Asia Conference 2009. June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand.
- Boonna, S., **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. Effect of aging condition on resistant starch formation of rice starch. Poster presentation in 2009 IFT Annual Meeting. June 6-9, 2009. Anaheim, CA, USA.
- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2008. Comparative study on physical properties of waxy and non-waxy rice during storage. Poster presentation in The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.
- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2008. Effect of starch content and aging temperature on slowly digestible starch and resistant starch formation in debranched rice starch. Oral presentation in The 34th Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.
- Apirattanusorn, S., **Tongta, S.**, Cui, S.W., and Wang, Q. 2008. Chemical, molecular, and structural characterization of alkali extractable polysaccharides from Job's Tears. *J. Agric. Food. Chem.* 56:8549-8557.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul, J. 2008. Effect of soy protein isolate on chemical and physical characteristics of meat analog. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 1(02):97-104.
- Phoungchandand, S., Bhulaidok, S., Nantachai, K., Woraphuttaporn, W., **Tongta, S.** and Suvannason, V. 2007. Influence of various cereal flours on physical properties of expanded extrudates. *Khon Kaen University Research Journal*. 12(4):431-441.
- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2007. Effect of drum drying parameters on physical properties of pregelatinized rice flour. Poster presentation in Starch Update 2007: The 4th International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.
- Kiatponglar, W. and **Tongta, S.** 2007. Structural and physical properties of enzyme-resistant starch produced from debranched and retrogradation of cassava starch. Poster presentation in Starch Update 2007: The 4th International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.

- Siriboon, B. and **Tongta, S.** 2007. Effect of annealing on physicochemical properties of waxy and normal rice starches. Poster presentation in Starch Update 2007: The 4th International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.
- Chaisiricharoenkul, J. and **Tongta, S.** 2007. Physicochemical and antioxidant properties of Job's Tear Flour. Poster presentation in The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul, J. 2007. Effect of soy protein isolate on chemical and physical characteristics of meat analog. Oral presentation in The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.
- Siriboon, B. and **Tongta, S.** 2007. Effect of Annealing on Physicochemical Properties of Waxy Rice. Poster presentation in The 9th Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.
- Kiatponglar, W. and **Tongta, S.** 2007. Structural and Physical Properties of Debranched Tapioca Starch. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 14(2):195-204.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul. 2007. Effect of full fat soy flour on characteristics of soy protein meat analog. *Suranaree Journal of Science and Technology*, 14(2):185-193.
- Pakdeechanuan, P., Intarapichet, K. and **Tongta, S.** 2007. Effect of extrusion parameters on conjugated linoleic acids of corn extrudate. *J. Agric. Food. Chem.*, 55: 1463-1468.
- Apirattanusorn, S., Cui, S.W., Wang, Q. and **Tongta, S.** 2006. Extraction and composition of water-unextractable arabinoxylans from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L.) (Abstract. pp. 238 and Poster presentation). 2006 CIFST/AAFC Joint Conference, May 28-30, 2006. Montreal, Canada.
- Kiatponglar, W. and **Tongta, S.** 2006. Effect of debranching on enzyme resistant starch formation in tapioca starch. Poster presentation in The 8th Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.**, Ningsanond, S. and Boonna, S. 2006. Influence of hydrocolloids and soy milk solid on physical and textural qualities of soy yoghurt. Poster presentation in The 8th Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.

- Tongta, S.**, Kiatpongarp, W. and K. Sriroth, K. 2004. Effect of aging temperature on retrogradation of concentrated cassava starch gel. In ‘ Starch: Progress in Structural studies, Modifications and Applications’ Tomasik, P., Yuryev, V.P. and Bertoft, E. (eds.). pp. 357-364. Drukarnia GS, Cracow.
- Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul. 2004. Structure and texture characteristic of soy protein meat analog. Poster presentation The 6th Agro-Industrial Conference. May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.
- Sottirattanapan, P. and **Tongta, S.** 2003. Effect of extrusion parameters on physical characteristics of rice extrudate. Suranaree Journal of Science and Technology. 10(3):220-229.

สถานที่ติดต่อ: สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 โทรศัพท์ (044) 22-4266 โทรสาร (044) 22-4150

