



## รายงานการวิจัย

การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินที่มี  
คุณสมบัติย่อยช้า และต้านทานการย่อยด้วยเอนไซม์

(Cassava Starch Modification with Enzymes to Produce  
Slowly- and Resistant Maltodextrin)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



## รายงานการวิจัย

การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินที่มี  
คุณสมบัติย่อยช้า และต้านทานการย่อยด้วยเอนไซม์

(Cassava Starch Modification with Enzymes to Produce  
Slowly- and Resistant Maltodextrin)

ผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2561-2562

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2563

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้งบประมาณทุนอุดหนุนวิจัยประจำปีงบประมาณ 2561-2562 ทำให้ผลงานวิจัยโครงการนี้เกิดขึ้นได้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือ 3 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับอาคารสถานที่ และเครื่องมือในการวิจัย และงานวิจัยนี้คงไม่สำเร็จหากขาดผู้ช่วยวิจัยเหล่านี้ คือ นางสาววราภรณ์ ศรีเดช และนางสาวผ่องพรรณ นนทมาศ จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัย

31 ตุลาคม 2563



## บทคัดย่อ

เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE) และเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM) ได้ใช้ร่วมกันเพื่อตัดแปรงแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการเจลาติไนเซชันตัดแปรงด้วย BE หรือ AM-->BE หรือ BE-->AM-->BE หรือ การใช้ AM และ BE พร้อมกัน จากนั้นศึกษาลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ คือ ความยาวของสายกลูแคน ปริมาณพันธะกลูโคซิดิกตำแหน่ง 1, 6 น้ำหนักโมเลกุล และความสามารถในการย่อย การตัดแปรงโดยใช้ BE พบว่าปริมาณกิ่งมีค่า 7.8% ตัวอย่าง AM-->BE มีปริมาณกิ่งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง BE-->AM-->BE นอกจากนี้การตัดแปรงโดยใช้ AM-->BE และ BE-->AM-->BE ทำให้อัตราการย่อยของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีค่าลดลง การใช้ BE-->AM-->BE ทำให้เกิดโครงสร้างของกลูแคนที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดต่อการเพิ่มปริมาณกิ่ง และลดอัตราการย่อยได้ดีที่สุด โดยมีค่าคงที่ของอัตราการย่อยต่ำที่สุด

การศึกษาผลของปริมาณอะไมโลสต่อการตัดแปรงแป้งโดยใช้ BE และ BE-->AM-->BE เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า และต้านทาน โดยใช้แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) และแป้งข้าวบาร์เลย์ ที่มีเพียงอะไมโลส (AO) ผสมกันในอัตราส่วนของปริมาณอะไมโลส 0-100% พบว่าตัวอย่าง 0% AO ที่ผ่านการตัดแปรงโดยใช้ BE และ BE-->AM-->BE มีอัตราการสร้างกิ่งน้อยกว่าตัวอย่างที่ใช้ 100% AO รวมทั้งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าเปรียบเทียบกับแป้งที่ไม่ได้ตัดแปรง ปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากมนุษย์ และเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ( $\alpha$ -glucosidase) จากหนูมีค่าลดลงเมื่อใช้ไซบสเตรทที่มีอัตราส่วนของอะไมโลสเพิ่มขึ้น ดังนั้นการใช้ไซบสเตรทที่มีปริมาณอะไมโลเพคตินสูง คาดว่าทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะคลัสเตอร์ของอะไมโลเพคตินที่มีกิ่งมากขึ้น รวมทั้งอะไมโลเพคตินที่เป็นวง ในขณะที่เมื่อใช้ไซบสเตรทที่มีปริมาณอะไมโลสสูง ให้ผลิตภัณฑ์เป็นอะไมโลสที่มีกิ่งเพิ่มขึ้น และอะไมโลสที่เป็นวง ซึ่งลักษณะโมเลกุลทั้งหมดมีคุณสมบัติชะลอ และต้านทานการย่อย

## Abstract

The combination of branching enzyme (BE) and amylopectinase (AM) were selected to modify cassava starch. Cassava starch was gelatinized and incubated with BE or AM→BE or BE→AM→BE or simultaneous AM and BE. The molecular analysis of the products including chain length distribution, content of  $\alpha$ -1,6 glycosidic linkages, absolute molecular weight distribution and digestibility were examined. Only BE catalysis showed 7.8% branching linkages. The sequential AM→BE-treated starch showed lower branching linkages as compared to sequential BE→AM→BE-treated starch. Moreover, the sequential AM→BE and BE→AM→BE-treated starch retarded the digestion rate of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase. The sequential BE→AM→BE catalysis resulted in more extensive branching and the products also exhibited the lowest digestion rate constant.

The effect of amylose content on BE and combinatorial BE→AM→BE chain transfer were studied. Well-defined ratios of amylose only-barley starch (AO) and waxy maize starch (WX) with non-granular AO content varied from 0 to 100% were used as a substrate. For only BE catalysis, an increased rate of branch linkage formation for the 0% AO sample treated with BE and BE→AM→BE were lower than the 100% AO sample and also showed a decrease in compared to native starch. Glucose released from all modified starches after hydrolysis by human pancreatic  $\alpha$ -amylase and further hydrolysis by rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase was decreased with increasing AO ratios. Amylopectin rich substrates were expected to obtain highly branched-amylopectin and cyclo-amylopectin while amylose rich substrates were expected to obtain branched-amylose and cyclo-amylose which retard and suppress the digestion.

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Reviewed literature).....	4
2.1 โครงสร้างของสตาร์ช.....	4
2.2 ประเภทของสตาร์ช.....	7
2.3 การดัดแปรสตาร์ชด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า และต้านทานการย่อย.....	9
2.3.1 เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง.....	10
2.3.2 เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน.....	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
3.1 วัตถุประสงค์.....	14
3.2 วิธีดำเนินงาน.....	14
3.2.1 การศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง, ปริมาณเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE), เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM) รวมทั้งสภาวะการทำงานผลิตที่เหมาะสมต่อการเกิดมอลโตเดกซ์ทรินที่ถูกละลายได้ช้า และต้านทานการย่อย.....	14
3.2.1.1 การหากิจกรรมของ AM และ BE และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสม.....	14
3.2.1.2 การหาค่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อปริมาณการสร้างกิ่งด้วย BE.....	15
3.2.2 การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์.....	15
3.2.2.1 การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วย AM ตามด้วย BE (AM --> BE) .....	15
3.2.2.2 การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) ตามด้วยเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) (BE-->AM-->BE) .....	15
3.2.2.3 การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วย AM ร่วมกับ BE (AM&BE) .....	16
3.2.3 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างอะไมโลส และอะไมโลเพคตินต่อ	

## สารบัญ

	หน้า
การเกิดโครงสร้างกิ่งและคุณสมบัติการย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย.....	16
3.2.3.1 การเตรียมแป้งข้าวบาร์เลย์ จากเมล็ดข้าวบาร์เลย์ชนิดอะไมโลสสูง 99% (AO) .....	16
3.2.3.2 การเตรียม non-granular AO.....	16
3.2.3.3 การศึกษาอัตราส่วนของอะไมโลส (AO): อะไมโลเพคติน (WX) ที่เหมาะสมต่อการตัดแปรโดยใช้ BE (BE).....	17
3.2.3.4 การศึกษาอัตราส่วนของอะไมโลส (AO): อะไมโลเพคติน (WX) ที่เหมาะสมต่อการตัดแปรโดยใช้ BE ตามด้วย AM และตามด้วย BE,(BE-->AM-->BE) .....	17
3.2.4 การวิเคราะห์ลักษณะทางโครงสร้าง และคุณสมบัติการถูกย่อยด้วยการจำลองระบบทางเดินอาหาร.....	17
3.2.4.1 การหาปริมาณ $\beta$ -amylolysis limit.....	17
3.2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1, 6 glycosidic โดยวิธีการใช้ $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance}$ (NMR).....	18
3.2.4.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของสาย amylopectin โดยวิธีการใช้ High Pressure Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detector (PAD).....	18
3.2.4.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีการใช้ Size-Exclusion Chromatography (SEC) .....	18
3.2.4.5 การวิเคราะห์การสร้าง cyclostructure ของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีการใช้ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF).....	19
3.2.4.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปร.....	19
3.2.4.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปรโดยใช้ human pancreatic $\alpha$ -amylase และ rat intestinal $\alpha$ -glucosidases.....	19
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผล.....	20
4.1 การศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง, ปริมาณเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE), เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM) รวมทั้งสภาวะการทำการผลิตที่เหมาะสมต่อการเกิดมอลโตเด็กซ์ทรีนที่ถูกย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย.....	20
4.2 การศึกษาผลของการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) และเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลัง.....	24

สารบัญ

	หน้า
4.2.1 ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic.....	24
4.2.2 ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน.....	25
4.2.2.1 การใช้เอนไซม์ชนิดเดียวในการตัดแปรงแป้งสำหรับหลัง	25
4.2.2.2 การตัดแปรงแป้งสำหรับหลัง ด้วย AM -->BE.....	26
4.2.2.3 การตัดแปรงแป้งสำหรับหลัง ด้วย BE-->AM-->BE.....	26
4.2.2.4 การตัดแปรงแป้งสำหรับหลัง ด้วย AM&BE พร้อมกัน.....	28
4.2.3 ขนาดโมเลกุลและการสร้างโครงสร้างแบบ cyclo-structures.....	30
4.2.4 การศึกษาคุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปรง.....	32
4.3 การศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างอะไมโลส และอะไมโลเพคตินที่เหมาะสมต่อการตัดแปรงโดยใช้เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) และเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) ต่อการเกิดโครงสร้างกิ่งและคุณสมบัติการย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย.....	37
4.3.1 ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic.....	37
4.3.2 ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน.....	39
4.3.3 Molar mass และการสร้างโครงสร้างแบบ cyclo-structures.....	43
4.3.4 โครงสร้าง $\alpha$ -limit dextrin และ $\beta$ -amylolysis limit.....	46
4.3.5 การศึกษาคุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปรง.....	48
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	51
บรรณานุกรม.....	52
ประวัติผู้วิจัย.....	60



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1.1	กิจกรรมของ AM และ BE.....	20
4.1.2	ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic (%) ที่วิเคราะห์โดยวิธีวัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase) ที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่แตกต่างกัน.....	21
4.1.3	ปริมาณของสายกลูแคนที่ degree of polymerization (DP) ต่างๆกัน หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase) หลังการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10.0% (w•v-1) ด้วย AM ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาการบ่มต่างๆ.....	24
4.2.1	ค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุดของ iodine- $\alpha$ -glucan complex และปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic (%) ของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ โดย X แสดงว่าไม่มีตัดแปรด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนนั้น nd: not determined, BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	25
4.2.2	$\beta$ -amylolysis (%) ของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	27
4.2.3	น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย (Mw), polydispersity index (Mw/Mn) และ hydrodynamic volume (Rh) ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์, X แสดงว่าไม่มีตัดแปรด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนนั้น, BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	33
4.2.4	ค่าคงที่อัตราการย่อย (k-value) ของแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลมาจากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ $\pm$ SD ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ตัวอักษรต่างกัน แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ (p<0.05) .....	34
4.3.1	ปริมาณและอัตราการเพิ่มขึ้นของ $\alpha$ -1,6 ของตัวอย่างแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) แป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (AO) และแป้งที่มีอัตราส่วนของ AO:WX ที่แตกต่างกันและตัดแปรด้วยเอนไซม์ด้วย BE และ BE-->AM-->BE.....	38
4.3.2	ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic เริ่มต้นของแป้งผสมระหว่าง AO และ WX ก่อนการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE.....	38
4.3.3	การกระจายตัวของสายกลูแคนของ AO, WX, ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE ตัวอย่างของตัวอย่างประกอบด้วย แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) และแป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (AO).....	42
4.3.4	Molar mass distribution (Mw), hydrodynamic radius (Rh), dispersity	

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
index (Mw/Mn), intrinsic viscosity (IV) และ molecular density ของ แป้งผสมที่มีอัตราส่วนของ AO และ WX ที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ซึ่ง วิเคราะห์โดย SEC (Viscotek-TDA system) ซึ่ง AO และ WX ที่ไม่ผ่านการตัด แปรนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง AF4-MALLS.....	44
4.3.5 พื้นที่ใต้กราฟ (%) ของ $\alpha$ -limit dextrin แบบกึ่ง หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ $\alpha$ - amylase เปรียบเทียบกับ $\beta$ -amylolysis limit.....	48
4.3.6 ปริมาณกลูโคส ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ของ AO, WX และแป้งตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE และ BE-->AM-->BE และนำไปย่อยด้วย $\alpha$ -glucosidases จากลำไส้ของหนู หลังจาก การไฮโดรไลซิสตัวอย่างด้วยเอนไซม์ $\alpha$ -amylase จากตับอ่อนของ มนุษย์.....	49

## สารบัญรูปร่างภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของสตาร์ช A) พันธะไกลโคซิดิก B) อะไมโลส C) อะไมโลเพคติน.....	4
2.2	โครงสร้างของ limit dextrans หลังจากไฮโดรไลซิสด้วย $\beta$ -amylase และ $\alpha$ -amylase; A) $\beta$ -limit dextrans; B) $\alpha$ -limit dextrans; C) $\alpha, \beta$ - limit dextrans โดยวงกลมสีฟ้าคือ A-chain วงกลมสีแดงคือ B-chains วงกลมสีเทาคือโครงสร้างกลูโคสที่มีกิ่ง (ลูกศร) วงกลมสีเหลืองคือส่วนของ B-chains และ (/) คือ internal chain.....	5
2.3	ลักษณะของสตาร์ชมันสำปะหลังภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A) กำลังขยาย 1,000 x, B) กำลังขยาย 6,000 x .....	6
2.4	ลักษณะของบาร์เลย์สตาร์ชปกติ และ Amylose only barley starch (AO) แกรนูล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A) บาร์เลย์สตาร์ชปกติ, B) AO.....	7
2.5	ลักษณะของสตาร์ชมันสำปะหลังภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A) แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว, B) แป้งข้าวโพดปกติ.....	7
2.6	การจำแนกประเภทตามลักษณะการถูกย่อยของแป้ง (a) การย่อยแป้งในหลอดทดลองโดยใช้ Englyst assay และ (b) ในการตอบสนองของระดับน้ำตาลในเลือดของร่างกายต่อ RDS, SDS และ RS.....	9
2.7	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ BE A) สร้างพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic linkage, B) สร้างพันธะ $\alpha$ -1,4 linkage และ C) สร้างโครงสร้างแบบวง (Cycloglucan formation) .....	11
2.8	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ AM A) การ disproportionation ของอะไมโลเพคตินคลัสเตอร์, B) การ disproportionation ของสายอะไมโลเพคติน และ C) การ disproportionation ของสายอะไมโลส และ D) การเกิดไซโคลอะไมโลส และไซโคลอะไมโลเพคติน.....	12
4.1.1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) หลังการดัดแปรแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10.0% ( $w \cdot v^{-1}$ ) ด้วย BE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1,000-5,000 U.....	22
4.1.2	ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน (Average chain length distribution) หลังการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) หลังการดัดแปรแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10.0% ( $w \cdot v^{-1}$ ) ด้วย AM ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาการบ่มต่างๆ.....	23
4.2.1	การกระจายตัวของสายกลูแคน ของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร และ	29

## สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
	ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์.....	
4.2.2	ขนาดโมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน โดยการใช้ size-exclusion chromatography with triple detection array (SEC-TDA) .....	31
4.2.3	การสร้าง cyclostructure ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ โดยใช้ MALDI-TOF.....	32
4.2.4	โปรไฟล์การย่อย ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจนด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic $\alpha$ -amylase (PPA) และ glucoamylase (GA) เปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลัง.....	35
4.2.5	จลนพลศาสตร์อันดับที่หนึ่ง (First-order kinetics model) ของการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน ด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic $\alpha$ -amylase (PPA) และ glucoamylase (GA)...	36
4.3.1	$^1\text{H}$ NMR สเปกตรัมของตัวอย่างแป้งผสมที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE.....	39
4.3.2	การกระจายตัวของสายกลูแคนของ (A) AO และ WX, (B) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE, (C) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE, (D-E) Difference plots; (D) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE เปรียบเทียบกับ AO และ WX, (E) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE เปรียบเทียบกับ AO และ WX.....	41
4.3.3	การเกิด cyclo-structures วิเคราะห์โดย MALDI-TOF.....	45
4.3.4	Molar mass distribution ของตัวอย่างที่วิเคราะห์โดย HPSEC-RI หลังการย่อยด้วย $\alpha$ -amylase.....	47
4.3.5	โมเดลของโครงสร้างแป้งตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE reaction.....	50

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

มันสำปะหลังเป็นพืชสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศที่แปรปรวน สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ผลตอบแทนต่อไร่สูง และมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าพืชอื่นๆหลายชนิด สำหรับประเทศไทยมีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูก ที่ภาคใต้เป็นครั้งแรก เพื่อใช้ทำแป้งและสาชู ต่อมาได้ขยายพื้นที่ปลูกมายังภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง และจังหวัดใกล้เคียง เนื่องจากมีสภาพดิน ฟ้า อากาศ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการปลูก การแปรรูปมันสำปะหลัง ดังนั้น จึงมีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างรวดเร็วไปสู่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งในปัจจุบันนี้ได้กลายเป็นแหล่งปลูกที่ใหญ่ที่สุดของประเทศไทย แป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่มีความบริสุทธิ์สูง สามารถนำไปใช้ได้ ในอุตสาหกรรมหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมไม้อัด อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากแป้งมันสำปะหลังมีทั้งในรูปของแป้งดิบ (native starch) และแป้งดัดแปร (modified starch) โดยการดัดแปรแป้งมันสำปะหลังสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี ทางกายภาพ และทางชีวภาพ เพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะการผลิตและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ปัจจุบันมีการดัดแปรแป้งให้เป็นแป้งเพื่อสุขภาพที่มีคุณสมบัติที่เป็นคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ ได้แก่ แป้งต้านทานต่อเอนไซม์ (resistant starch, RS) และเดกซ์ทรินต้านทานต่อเอนไซม์ (resistant dextrin or indigestible dextrin) ซึ่งสองอย่างนี้แสดงคุณสมบัติเหมือนกับใยอาหารที่ได้จากธรรมชาติ

แป้งที่ถูกล่อยได้ช้า และมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า (Slowly digestible starch, SDS และ slowly digestible maltodextrin) คือส่วนของแป้งที่สามารถถูกล่อยได้อย่างสมบูรณ์ในลำไส้เล็ก แต่ใช้เวลานาน จากการศึกษาของ Englyst และคณะ 1992 ได้จำแนกชนิดของแป้งที่ถูกล่อยได้ช้า โดยศึกษาการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคสหลังจากการย่อยแป้งในช่วงเวลา 20 นาที ถึง 120 นาที กระบวนการผลิตแป้งที่ถูกล่อยได้ช้าสามารถทำได้โดยวิธีการทางกายภาพโดยใช้ความร้อนชื้น (Hydrothermal treatment) ได้แก่กระบวนการ Annealing และ heat-moisture treatment (HMT) (Jacobs และ Delcour, 1998) นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้โดยกระบวนการทำให้เกิดการคืนตัว (Recrystallization, retrograded starch, Leloup, Colonna, Ring, Roberts, และ Wells, 1992), กระบวนการดัดแปรทางเคมี (Wolf, Bauer, และ Fahey, 1999) และยังสามารถเพิ่มปริมาณแป้งที่ถูกล่อยได้ช้าโดยกระบวนการใช้เอนไซม์ดัดแปรได้อีกด้วย (Backer และ Saniez, 2005) ประโยชน์ที่ได้รับจากการบริโภคแป้งที่ถูกล่อยได้ช้าได้แก่ สามารถยืดระยะเวลาการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือด นั่นคือมีค่าดัชนีไกลซีมิกต่ำ (Glycemic index) เหมาะสำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน รวมทั้งนักกีฬาที่ต้องการอาหารที่ปลดปล่อยพลังงานอย่างช้าๆ (Wachters-Hagedoorn และคณะ 2006) นอกจากนี้อาหารที่มีค่าดัชนีไกลซีมิกต่ำยังสัมพันธ์กับการลดการเกิดโรคเบาหวาน และโรคหัวใจล้มเหลว รวมถึงมะเร็งลำไส้ใหญ่ และมะเร็งเต้านมอีกด้วย (Jenkins และคณะ, 2002)



แป้งต้านทานต่อการย่อย และมอลโตเดกซ์ทรินต้านทานต่อการย่อย (Resistant starch, RS และ Resistant maltodextrin) คือแป้งที่ทนต่อการถูกย่อยจากเอนไซม์บริเวณลำไส้เล็กในร่างกายมนุษย์ จากการที่แป้งต้านทานไม่ถูกย่อยเมื่อผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่จะถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) ที่ประกอบด้วย กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทริกและเกิดก๊าซพร้อมออกมาด้วย ซึ่งกรดไขมันทั้งสามชนิดนี้สามารถถูกดูดซึมได้ภายในลำไส้ใหญ่ และขนส่งไปถึงตับได้ โดยกรดไขมันที่เกิดขึ้นจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค เพิ่มปริมาณของเหลวและปรับสภาวะการเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ใหญ่ให้ต่ำลง อีกทั้งกรดไขมันที่สร้างขึ้นจะมีผลในทางสรีรวิทยาโดยกรดบิวทริกจะช่วยปรับสภาวะตอนปลายของลำไส้ใหญ่ให้สมบูรณ์ ยับยั้งการเจริญของ transformed cell ในสิ่งมีชีวิต สามารถไปยับยั้งการเจริญของเนื้องอกและลดเซลล์มะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ (Jenkins และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ ( $Ca^{++}$  และ  $Mg^{++}$ ) เพิ่มการใช้พลังงาน มีผลในเชิงบวกต่อการเผาผลาญน้ำตาลและไขมัน (Cecil และคณะ, 1999)

อย่างไรก็ตาม SDS และ RS มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ ไม่สามารถละลายน้ำได้ ทำการใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารบางชนิดยังไม่กว้างขวาง ดังนั้นการพัฒนาแป้งดัดแปรที่มีคุณสมบัติถูกย่อยได้ช้า และต้านทานต่อการย่อย รวมทั้งละลายน้ำจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในการพัฒนาต่อยอดจากการผลิตโยอาหารเพื่อสุขภาพ การดัดแปรแป้งเพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้าและต้านทานการย่อยโดยใช้วิธีการด้านเอนไซม์เป็นกระบวนการที่ถูกพัฒนาให้มีศักยภาพในการผลิตมากขึ้น เนื่องจากการดัดแปรโดยใช้เอนไซม์จัดเป็นเทคโนโลยีสะอาด (Blennow และคณะ 2013) ลดปัญหาการเกิดสารตกค้างหลังจากการดัดแปรแป้งเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการทางเคมี นอกจากนี้องค์ประกอบของแป้งอันได้แก่อะไมโลส และอะไมโลเพกติน ยังเป็นตัวแปรสำคัญในการดัดแปรโครงสร้างแป้งโดยเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งจะส่งผลให้ได้แป้งดัดแปรที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้จากคุณสมบัติการละลายน้ำสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายประเภท โดยเฉพาะอาหารที่เป็นของเหลวอาหารที่เป็นของแข็งและอาหารกึ่งเหลวกึ่งแข็ง ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ต้องการของท้องตลาด และเป็นตลาดที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะเครื่องดื่ม และลูกกวาด รวมทั้งสามารถนำไปเป็นองค์ประกอบในอาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้อีกด้วย ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตกันมากในประเทศไทย อีกทั้งการบริโภคมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้าและต้านทานการย่อยยังให้คุณประโยชน์ต่อสุขภาพเทียบเท่ากับการบริโภค RS ที่จัดเป็น prebiotic ในด้านของระบบขับถ่ายอีกด้วย (Roberfroid, 2007)

จากศักยภาพในเชิงอุตสาหกรรมของมันสำปะหลังจะเห็นว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่สามารถผลิตและส่งออกแป้งมันสำปะหลังได้มาก และแป้งมันสำปะหลังมีราคาถูกเมื่อเทียบกับแป้งอื่นๆ การใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังโดยการพัฒนาคุณภาพของแป้งมันสำปะหลังและพัฒนาผลิตภัณฑ์จึงเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้น การศึกษากระบวนการแปรรูปมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้าและต้านทานการย่อยได้โดยใช้เอนไซม์จึงเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์แป้งมันสำปะหลังและถือเป็นนวัตกรรมใหม่ในการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากแป้งมันสำปะหลัง ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าและสนับสนุนการค้าให้กับอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง มอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้าและต้านทานการย่อยมีคุณสมบัติเด่นคือสามารถละลายน้ำได้ดีและให้ความหนืดต่ำ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาปริมาณ รวมทั้งขั้นตอนที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง ร่วมกับเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า
- 2) เพื่อศึกษาผลของปริมาณอะไมโลสที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง ร่วมกับเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า
- 3) เพื่อศึกษาโครงสร้าง และสมบัติทางเคมีกายภาพของมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้าที่ผลิตได้
- 4) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า และมอลโตเดกซ์ทรินทนย่อยที่ผลิตได้ในด้านสมบัติเชิงหน้าที่

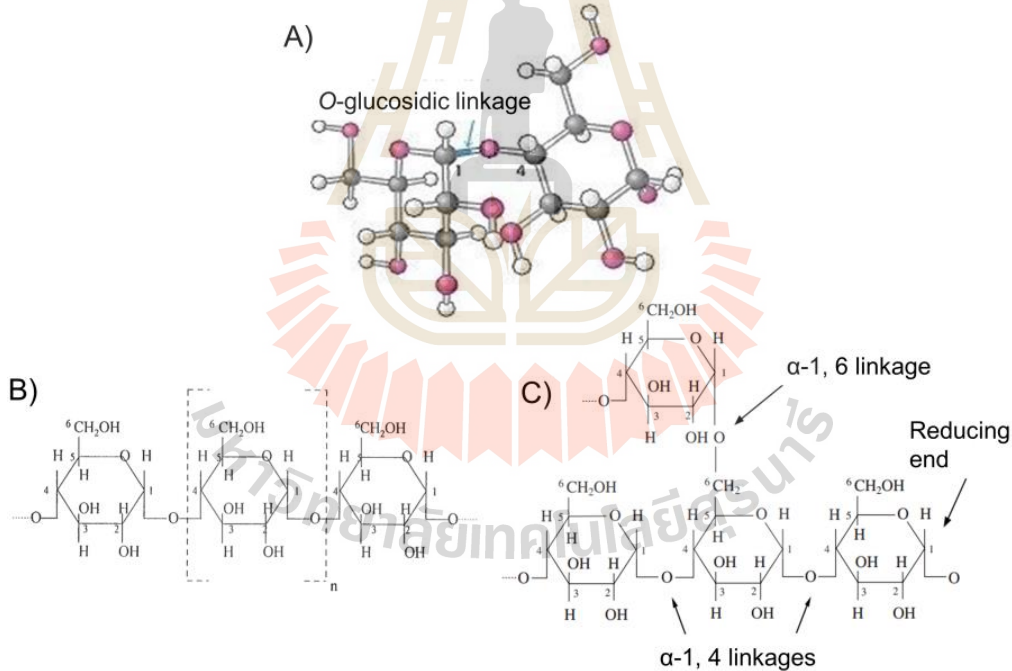


## บทที่ 2

### วรรณกรรมและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง (Reviewed literature)

#### 2.1 โครงสร้างของสตาร์ช

สตาร์ช (starch) เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็นแหล่งอาหารสำคัญ สตาร์ชเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ในพืชชั้น พบอยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ (ในใบ) และในส่วนที่พืชใช้เป็นแหล่งเก็บอาหาร เช่น เมล็ดและหัว และสตาร์ชยังถือเป็นแหล่งอาหารที่ให้พลังงานสูงของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของสตาร์ชจะประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ที่มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ  $(C_6H_{10}O_5)_n$  และจัดเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage, รูปที่ 2.1A) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่าปลายรีดิวซิง (reducing end group) สตาร์ชประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้น และอะไมโลเพกติน (amylopectin) ที่เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (Berg, Tymoczko และ Stryer, 2002) ดังรูปที่ 2.1B, C



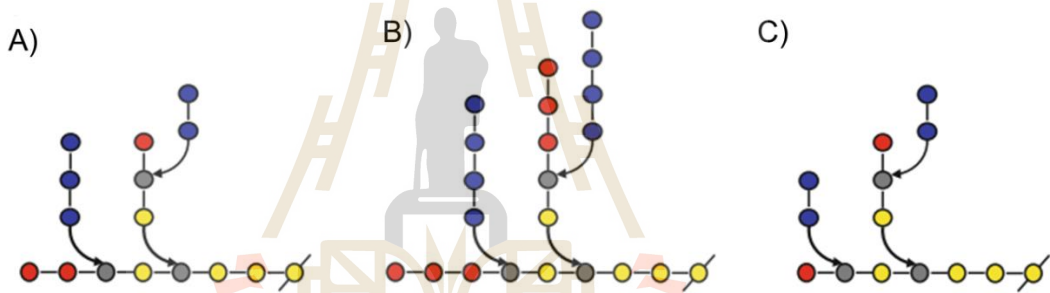
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของสตาร์ช A) พันธะไกลโคซิดิก B) อะไมโลส C) อะไมโลเพกติน (Berg, Tymoczko และ Stryer, 2002)

อะไมโลส (รูปที่ 2.1B) ประกอบด้วยหน่วยของกลูโคสหลายหน่วยต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 ( $\alpha$ -1,4) มีลักษณะเป็นเส้นตรง มีปริมาณ 20-30% (Pérez, และ Bertoft, 2010) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2,000-500,000 เมื่ออยู่ในน้ำจะมีลักษณะบิดตัวเป็นเกลียวแบบฮีลิกซ์ (helix) อะไมโลสในสตาร์ชแต่ละชนิดจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน และมีค่าระดับ



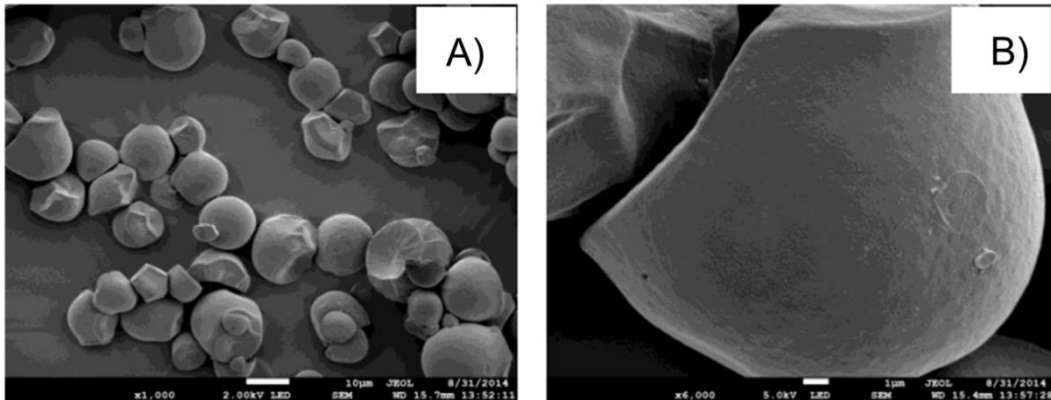
ขั้นของพอลิเมอไรเซชัน (degree of polymerization, DP) แตกต่างกันอย่างยากพ ตำแหน่งของอะมิโลสภายในสตาร์ชแกรนูลขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสตาร์ช โดยอะมิโลสบางส่วนอยู่ในกลุ่มของอะมิโลเพกทิน บางส่วนกระจายอยู่ทั้งในส่วนอสัณฐาน (amorphous region) และส่วนผลึก (crystalline region) โครงสร้างของอะมิโลสมีทั้งแบบสายเดี่ยวและสายคู่ โครงสร้างของอะมิโลสยังขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลด้วย

อะมิโลเพกทิน (รูปที่ 2.1C) เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่มีสายของโมเลกุลต่อกันแบบกิ่งก้าน (branch) ส่วนที่เป็นเส้นตรงของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4-glycosidic linkage และสายอะมิโลสสายสั้นๆ จะต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-6 ( $\alpha$ -1,6 glycosidic bond) เมื่อละลายน้ำจะมีลักษณะเป็นคอลลอยด์ และมีน้ำหนักโมเลกุลไม่แน่นอนอยู่ในช่วง 50,000-1,000,000 (Robyt, 2008) โครงสร้างแบบกิ่งของอะมิโลเพกทินจะประกอบด้วยสายโซ่ 3 ชนิด คือ สาย A (A chain) เชื่อมต่อกับสายอื่นที่ตำแหน่งเดียว ไม่มีกิ่งเชื่อมต่อออกจากสายชนิดนี้ (unbranched structure) สาย B (B chain) มีโครงสร้างแบบกิ่งเชื่อมต่อกับสายอื่น ๆ 2 สายหรือมากกว่า และสาย C (C chain) ซึ่งเป็นสายแกนที่ประกอบด้วยหมู่รีดิวซิง 1 หมู่ แสดงดังรูปที่ 2.2 ในอะมิโลเพกทินแต่ละโมเลกุลจะประกอบด้วยสาย C หนึ่งสายเท่านั้น



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ limit dextrins หลังจากไฮโดรไลซิสด้วย  $\beta$ -amylase และ  $\alpha$ -amylase; A)  $\beta$ -limit dextrins; B)  $\alpha$ -limit dextrins; C)  $\alpha$ ,  $\beta$  - limit dextrins โดยวงกลมสีฟ้าคือ A-chain วงกลมสีแดงคือ B-chains วงกลมสีเทาคือโครงสร้างกลูโคสที่มีกิ่ง (ลูกศร) วงกลมสีเหลืองคือส่วนของ B-chains และ (/) คือ internal chain (Vamadevan and Bertoft, 2015)

สตาร์ชมันสำปะหลังมีลักษณะของสตาร์ชแกรนูลกลม และพื้นผิวเรียบ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 2.3) (Prompiputtanaporn, 2015) โดยเจลาตินในเซชันเป็นพฤติกรรมทางกายภาพที่สำคัญของแป้งที่ได้รับอิทธิพลจากองค์ประกอบหรือสัดส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพกทิน สำหรับสตาร์ชมันสำปะหลังซึ่งมีองค์ประกอบของอะมิโลเพกทิน ส่งผลให้มี swelling power ความหนืด และความแน่นของเจลที่ดี (Charles, Chang, Ko, Sriroth และ Huang, 2005) และทำให้อุณหภูมิเจลาตินในเซชันของสตาร์ชมันสำปะหลังอยู่ในช่วง 58.5-70°C (Balagopalan และคณะ, 1998) แป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในอาหารสำเร็จรูป เนื่องจากมีคุณสมบัติพิเศษในการช่วยการยึดเกาะ การแข็งตัว ทำให้เกิดความเข้มข้นได้เป็นอย่างดี ใช้กับผลิตภัณฑ์เช่น ซอสพายุพุดดิ้ง ฯลฯ นอกจากนี้แป้งมันสำปะหลังสามารถ

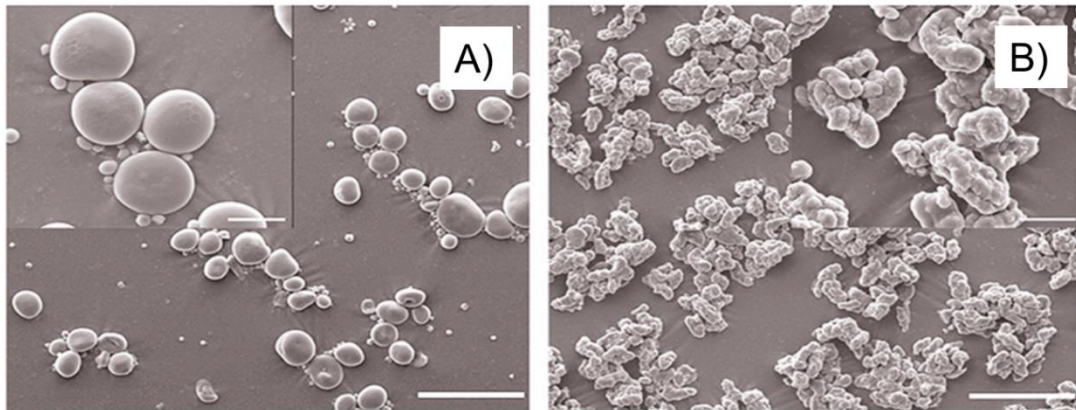


รูปที่ 2.3 ลักษณะของสตาร์ชมันสำปะหลังภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A) กำลังขยาย 1,000x, B) กำลังขยาย 6,000x (Prompiputtanaporn, 2015)

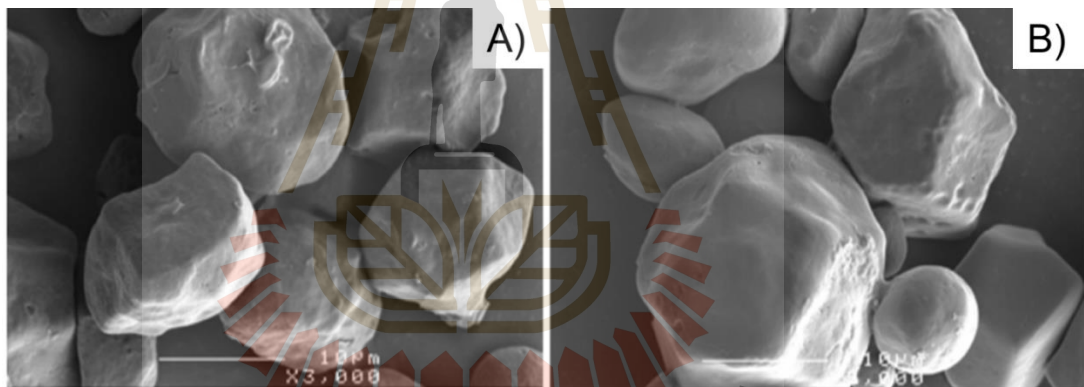
นำมาแปรสภาพเป็นสารให้ความหวาน เช่น กลูโคสไซรัป ฟรุคโตสไซรัป สารให้ความหวานที่มีพลังงานต่ำ เช่น น้ำตาลแอลกอฮอล์ต่างๆ และสารปรุงแต่ง เช่น ผงชูรส เป็นต้น

แป้งข้าวบาร์เลย์เป็นธัญพืชที่จัดอยู่ในตระกูลหญ้า ซึ่งมีบทบาทสำคัญในด้านเศรษฐกิจ และการเกษตรเป็นพืชตระกูลถั่วที่เก่าแก่ที่สุด และส่วนใหญ่ใช้เป็นแบบจำลองพืชเพื่อการศึกษาการสังเคราะห์แป้ง (Purugganan และ Fuller, 2009; Shaik, 2013) Amylose only barley starch (AO) เป็นพืชตัดแปรพันธุกรรมซึ่งทำให้เกิด silence genes สำหรับเอนไซม์ย่อยแป้ง (SBE I, SBE IIa, SBE IIb) ด้วย single RNAi hairpin (Carciofi และคณะ, 2012) ทำให้ AO มีปริมาณอะไมโลสบริสุทธิ์สูง นอกจากนี้ ลักษณะเมล็ด AO เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งข้าวบาร์เลย์พื้นเมืองนั้น เมล็ด AO มีลักษณะเป็นเม็ดยาวเรียวยาว หยาบ และมีรูปร่างกลม (รูปที่ 2.4) (Carciofi และคณะ, 2012) มีความสามารถในการละลายต่ำ ซึ่งสามารถละลายได้ในน้ำที่ 70-80 °C เพียง 20% (Carciofi และคณะ, 2012) ข้าวบาร์เลย์ตัดแปรพันธุกรรมนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้เป็นแหล่งของแป้งโภชนาการที่มีคุณค่าหรือแป้งต้านทาน และใช้เป็นโครงสร้างแบบจำลองของแป้งอะไมโลสบริสุทธิ์ในการศึกษาด้านสตาร์ชได้

แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy maize starch, WX) ได้มาจากข้าวโพดที่มีองค์ประกอบของอะไมโลเพคตินสูงถึง 99% และมีอะไมโลส ประมาณ 1% ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งพฤกษศาสตร์ สภาพภูมิอากาศ และชนิดของดินในช่วงการเจริญเติบโต (S และ hu และ Singh, 2007) ลักษณะสตาร์ชแกรนูลเป็นแบบหลายเหลี่ยม ดังรูปที่ 2.5 โดยโครงสร้างอะไมโลเพคตินของ WX นั้น ทำให้โมเลกุลสตาร์ชมีลักษณะเป็น steric hindrance ทำให้เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ย่อยได้ยาก จึงมีคุณสมบัติเป็นแป้งย่อยช้า (slow digested starch) ได้



รูปที่ 2.4 ลักษณะของบาร์เลย์สตาร์ชปกติ และ Amylose only barley starch (AO) แกรนูล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A) บาร์เลย์สตาร์ชปกติ, B) AO (Carciofi และคณะ, 2012)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของสตาร์ชมันสำปะหลังภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด A) แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว, B) แป้งข้าวโพดปกติ (Dhital และคณะ, 2013)

## 2.2 ประเภทของสตาร์ช

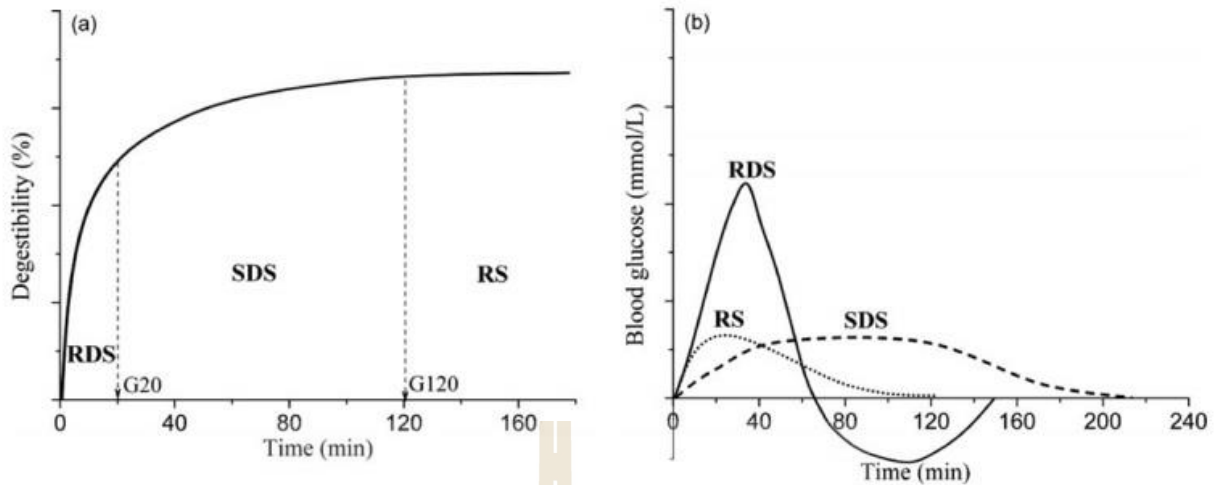
สตาร์ช (starch) สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามอัตราและระยะเวลาในการย่อยได้แก่ สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว (rapidly digestible starch, RDS) สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างช้าๆ (slowly digestible starch, SDS) และแป้งต้านทาน (Englyst, Kingman, และ Hudson, 1992) ซึ่งโครงสร้างหลักของ RDS เป็นส่วนอสัณฐาน (amorphous) ดังนั้นจึงถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้ง่าย การบริโภคอาหารประเภทแป้งที่มีสัดส่วนของ RDS ในปริมาณมาก จึงส่งผลให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลินในกระแสเลือดสูง (Englyst, Englyst, Hudson, Cole, และ Cummings, 1999) ขณะที่การบริโภคอาหารที่มีสัดส่วนของ SDS สูงจะส่งผลให้

มีระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับฮอร์โมนอินซูลินในกระแสเลือดปานกลาง (Zhang, Sofyan, และ Harmaker, 2008) ซึ่งจะลดโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่น โรคอ้วน โรคเบาหวาน หลอดเลือดหัวใจตีบ เป็นต้น ซึ่งแป้งแต่ละชนิดจะมีผลต่อค่า Glycemic Index (GI) แตกต่างกันไป กล่าวคือ GI หรือค่าดัชนีน้ำตาล เป็นค่าบ่งชี้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต หากรับประทานอาหารที่มีค่า GI สูงก็จะยิ่งส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงเร็ว ซึ่งการอ่านค่าดัชนีน้ำตาลอาจเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับผู้ที่ต้องควบคุมระดับน้ำตาล โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเบาหวาน ดังนั้น SDS จึงจัดว่าเป็นแป้งที่มีค่า GI สูง ในขณะที่ SDS มีค่า GI ต่ำ เป็นต้น (รูปที่ 2.6)

แป้งต้านทาน (Resistant starch, RS) คือ แป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่ถูกดูดซึมและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ปกติและจะผ่านเข้าไปถึงส่วนของลำไส้ใหญ่ และถูกเลือกใช้เป็นสารอาหาร ในการเจริญโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ (probiotic microorganisms) จึงจัดได้ว่าเป็น prebiotics (Englyst, Kingman, และ Hudson, 1992) ซึ่ง resistant starch มีผลทำให้ได้ผลผลิตหลังจากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ ในปริมาณมาก โดยหลักๆ ประกอบด้วย กรดอะซิติก (acetic acid) กรดบิวทิริก (butyric acid) และกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นเหล่านี้จะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานสำหรับกระบวนการหายใจของเซลล์เยื่อในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ช่วยเพิ่มการไหลเวียนของโลหิตที่ลำไส้ใหญ่ และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ผิดปกติในลำไส้ใหญ่ (Topping, Fukushima, และ Bird, 2003) นอกจากนี้กรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นยังช่วยให้เกิดสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่จัดเป็นสารเสริมชีวนะ (probiotics) และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganism) ในลำไส้ใหญ่ โดยจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ลดอาการของโรคท้องร่วง (diarrhea) กระตุ้นการเจริญและการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ส่งผลให้ host มีสุขภาพร่างกายที่ดีขึ้น (David และ Peter, 2001)

นอกจากแป้งทนย่อยแล้ว ปัจจุบันยังมีการปรับปรุงกระบวนการเพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินทนย่อย (resistant maltodextrin, ชื่อเรียกในประเทศสหรัฐอเมริกา) หรือเดกซ์ทรินทนย่อย (resistant dextrin, ชื่อเรียกในกลุ่มประเทศยุโรป) หรือเดกซ์ทรินที่ย่อยไม่ได้ (indigestible dextrin, ชื่อเรียกในประเทศญี่ปุ่น) จัดเป็นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ (soluble dietary fiber) ที่เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน มีลักษณะเป็นสายพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ค่อนข้างทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ในลำไส้เล็กของมนุษย์ โดยมีการผลิตที่มีการใช้ความร้อนและกรดในการผลิต เพื่อทำลายพันธะในโมเลกุลของแป้ง ทำให้มอลโตเดกซ์ทรินที่ได้นั้นมีพันธะใหม่เกิดขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถทนทานต่อการย่อยของเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ได้มากขึ้น ซึ่งสามารถใช้เป็นส่วนผสมของอาหารเพื่อสุขภาพ เพื่อเสริมใยอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารสำหรับผู้ป่วยที่ต้องควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด หรือใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารที่ต้องการแคลอรีต่ำ เป็นต้น





**รูปที่ 2.6** การจำแนกประเภทตามลักษณะการถูกย่อยของแป้ง (a) การย่อยแป้งในหลอดทดลองโดยใช้ Englyst assay และ (b) ในการตอบสนองระดับน้ำตาลในเลือดของร่างกายต่อ RDS, SDS และ RS (Miao และคณะ, 2015)

### 2.3 การตัดแปรรสด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า และต้านทานการย่อย

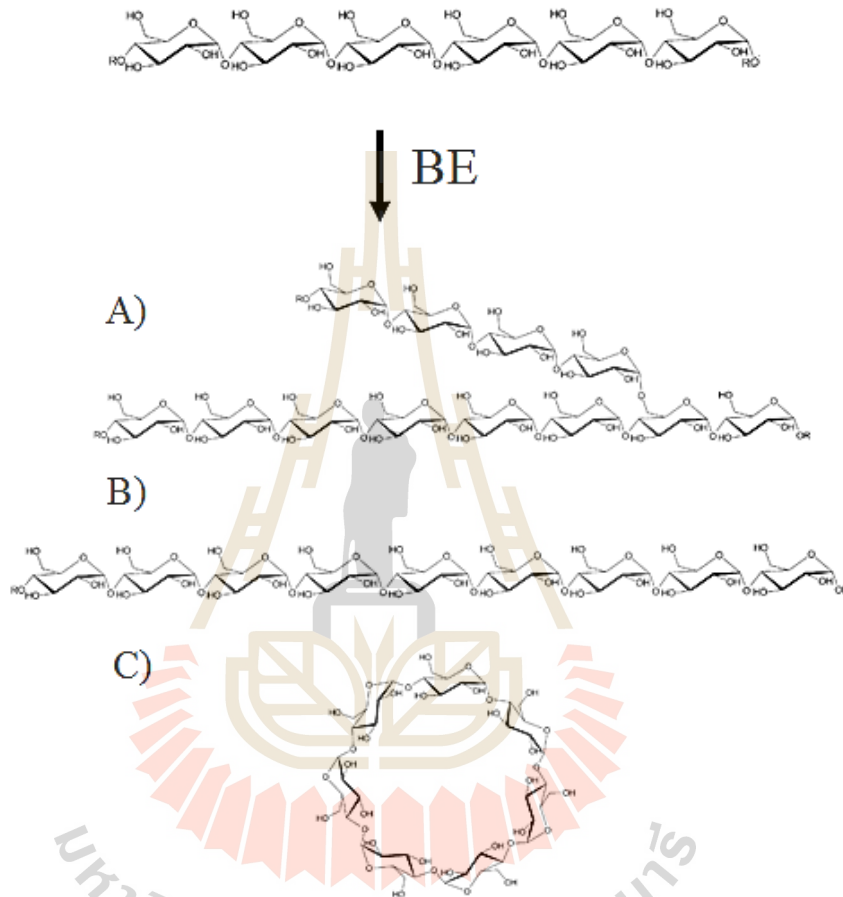
การผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้าที่ศึกษากันในปัจจุบัน ได้แก่ วิธีการทางเอนไซม์ และวิธีการทางเคมี อย่างไรก็ตามวิธีการทางเอนไซม์ได้กลายเป็นเทคโนโลยีสะอาดที่เป็นทางเลือกที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคสำหรับการตัดแปรรส ซึ่งตรงกันข้ามกับวิธีการทางกายภาพและทางเคมีซึ่งมักผลิตผลิตภัณฑ์ที่อาจเป็นอันตรายได้ เช่น ของเหลือทิ้งที่เป็นสารเคมี เป็นต้น ดังนั้นการใช้เอนไซม์ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง จึงช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นอันตรายหรือไม่พึงประสงค์ ในการตัดแปรรสด้วยเอนไซม์นั้น วัตถุประสงค์ที่ใช้นั้นก็มิอย่างแพร่หลาย เช่น มอลโตเดกซ์ทริน (Backer และ Saniez, 2005) และแป้งข้าวเหนียวที่มีปริมาณอะไมโลเพกตินสูง (Takata และคณะ, 1996) เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าวัตถุประสงค์ที่เป็นสารตั้งต้นนั้นมาจากแป้ง หรือแป้งตัดแปรรสชนิดใดก็ได้ การใช้วิธีด้านเอนไซม์เพื่อผลิตมอลโตเดกซ์ทรินย่อยช้า นั้น มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องจำนวนหนึ่ง โดยเอนไซม์หลักที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการนี้ได้แก่ เอนไซม์ต่อกิ่ง (branching enzyme) ซึ่งสามารถพบได้จากสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาในปี 2002 ได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์ต่อกิ่งที่โคลนนิ่งมาจากยีนของต้นมันฝรั่ง มาตัดแปรรสข้าวโพดที่มีปริมาณอะไมโลสสูง แล้วตรวจสอบปริมาณ branched point ที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค High-Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC) โดยเอนไซม์ต่อกิ่งนี้จะทำให้เกิดกระบวนการ transglycosylation ก่อให้เกิดกิ่งที่ glucan molecules สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาการผลิต branched dextrin จากแป้งข้าวโพด โดย Kim และคณะ (2008) โดยใช้เอนไซม์ต่อกิ่ง ซึ่งได้ตรวจสอบคุณสมบัติการคืนตัว (retrogradation), การละลายน้ำ, ความหนืด ฯลฯ รวมทั้งปริมาณอะไมโลสของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ซึ่งพบว่าสามารถลดการคืนตัว รวมทั้งมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และสามารถละลายน้ำได้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งเป็นแป้งข้าวโพดที่ไม่ผ่านการตัดแปรร

นอกจากนี้ ยังมีการนำเอนไซม์ maltogenic amylase ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา transglycosylation สร้าง  $\alpha$ -1,6 linkage และสร้าง  $\alpha$ -1,3 linkage มาใช้ร่วมกับเอนไซม์ต่อกิ่ง (Le และคณะ, 2009) เพื่อตัดแปรรูปแป้งมันสำปะหลังให้มีปริมาณกิ่งเพิ่มมากขึ้น และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น รวมทั้งการคืนตัวมีแนวโน้มลดลง ซึ่งงานวิจัยนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2007) ที่ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ต่อกิ่ง, เอนไซม์ maltogenic amylase และเอนไซม์  $\alpha$ -glucanotransferase มาใช้ร่วมกันในการผลิตแป้งข้าวให้มีลักษณะ highly branched amylose และ amylopectin จากนั้นตรวจสอบลักษณะทางโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิคเช่น TLC, HPAEC, และ SEC-MALLS เป็นต้น รวมทั้งตรวจสอบการเกิดการคืนตัว และการละลายน้ำของผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นชะลอการเกิดการคืนตัว และยังสามารถละลายน้ำได้มากอีกด้วย ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหาร, รวมทั้งอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการแพทย์ที่ต้องการวัตถุดิบที่ละลายน้ำ เช่น ยา เป็นอย่างมาก จึงนำไปสู่การพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อจดสิทธิบัตร โดย Backer และ Saniez (2005) ได้พัฒนากระบวนการผลิต soluble highly branched glucose polymers โดยใช้วิธีการทางเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ ได้แก่ เอนไซม์ต่อกิ่ง (branching enzyme) เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลส รวมทั้งเอนไซม์  $\alpha$ -transglucosidase ในการผลิต และมีกระบวนการ fractionation เข้ามาเกี่ยวข้อง โดยมีเป้าหมายเพื่อนำไปใช้กับอุตสาหกรรมทั้งที่เกี่ยวข้องกับอาหาร และไม่เกี่ยวข้องกับอาหาร โดย soluble highly branched glucose polymers ที่ได้มีปริมาณ reducing sugar น้อยกว่า 1%, มีปริมาณ  $\alpha$ -1,6 glycosidic linkage น้อยกว่า 10% รวมทั้งมีค่า osmolarity อยู่ในช่วง 1 และ 15 mOsm/kg ซึ่งสามารถนำไปใช้ในทางการแพทย์ในการเป็นสารละลายสำหรับล้างไตได้ เป็นต้น

### 2.3.1 เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE, EC 2.4.1.18, GH13, Q-enzyme, 1,4- $\alpha$ -D-glucan: 1,4- $\alpha$ -D-glucan, 6- $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glucano)-transferase)

BE พบได้ทั้งในจุลินทรีย์พืชและสัตว์ มี 2 ชนิดคือ BE ที่พบในแป้ง (starch BE, SBE) และ BE ที่พบในไกลโคเจน (glycogen BE, GBE) SBE พบได้ในพืช ในขณะที่ GBE พบในสัตว์และจุลินทรีย์ ในพืชและสาหร่ายนั้น BE มีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แป้งซึ่งจะสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic เพื่อผลิตเม็ดแป้งเป็นแหล่งพลังงาน (Blennow และคณะ, 2013; Funane และคณะ, 1999) ในสัตว์และจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ BE เร่งการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic (Kim, Ryu, Bae, Huong และ Lee, 2008) เอนไซม์นี้ถูกค้นพบครั้งแรกในมันฝรั่ง (Robyt, 1995) การสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ของ SBE นั้นมีค่าประมาณ 3.5% ในขณะที่ GBE สามารถสร้างได้ถึง 8-9% และความยาวสายโซ่เฉลี่ย กลูโคสพอลิเมอร์ประมาณ 20-23 ยูนิตสำหรับ amylopectin และ 10-12 ยูนิตสำหรับไกลโคเจน (Marshall, 1974) สำหรับ SBE นั้นมีรายงาน SBE 2 ประเภทที่แตกต่างกันโดยกลุ่มวิจัยต่างๆ (Akasaka และคณะ, 2009; และ ersson และคณะ, 2002) หนึ่งในนั้นมีการถ่ายโอนสายกลูแคนที่ยาวกว่า เช่น SBEI จากข้าวโพด ในขณะที่ SBEII จากข้าวโพด สามารถต่อกิ่งที่สั้นกว่าได้ (Funane และคณะ, 1999) การสร้างกิ่งของ BE นั้น เริ่มจาก BE เข้าจับกับสายกลูแคนบริเวณพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic จากนั้นจึงตัดสายกลูแคน ความยาวอย่างน้อย 7 กลูโคสยูนิต ไปสร้างเป็นพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic (Nakamura และคณะ, 2010) โดยมีระยะห่างจากกิ่งที่ใกล้ที่สุดอย่างน้อย 4 กลูโคสยูนิต (Stryer, 1995) Roussel และคณะ (2013) รายงานว่า BE จาก *Rhodothermus obamensis*

สามารถสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic ได้เช่นกัน แต่เกิดในอัตราที่ต่ำกว่าการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic (Roussel และคณะ, 2013) นอกจากนี้ BE สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินเพื่อสร้างกลุ่มไซโคลอะมิโลสและไซโคลอะมิโลเพคติน (Takata, Takaha, Okada, Takagi และ Imanaka, 1996) โดยไซโคลลูแคนขนาดเล็กที่สุด (DP 8) ถูกตรวจพบจากการตัดแปรงแป้งหลังด้วย BE (Sorndech และคณะ, 2015) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ BE แสดงในรูปที่ 2.7

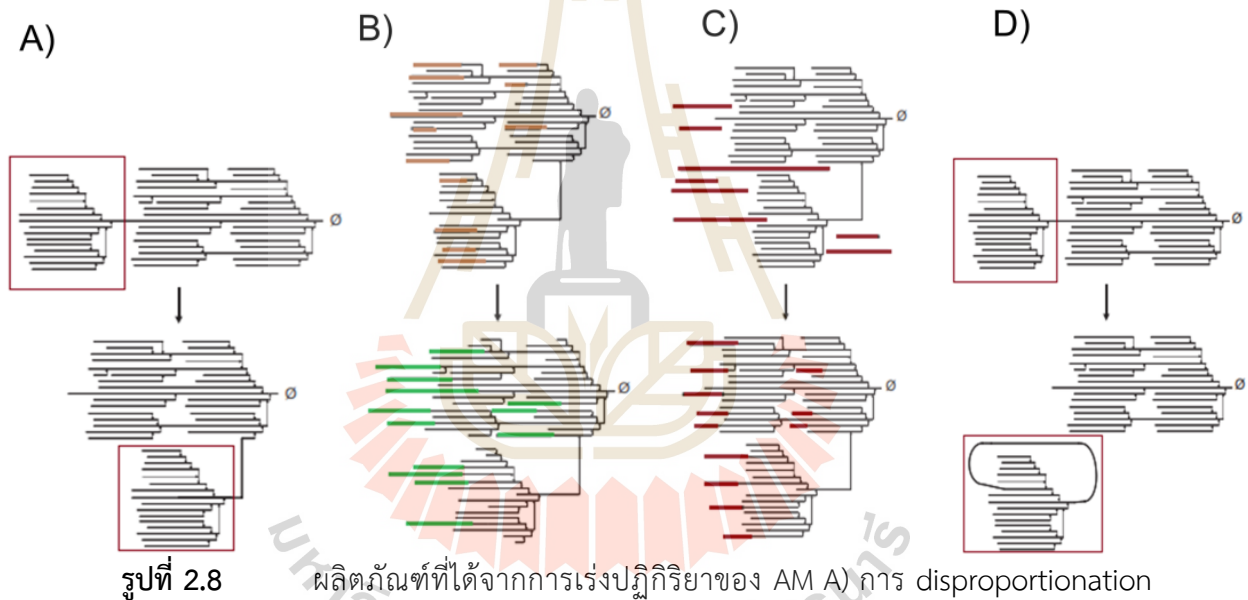


รูปที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ BE A) สร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic linkage, B) สร้างพันธะ  $\alpha$ -1,4 linkage และ C) สร้างโครงสร้างแบบวง (Cycloglucan formation) (Roussel และคณะ, 2013; Sorndech และคณะ, 2015)

### 2.3.2 เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM, E.C. 2.4.1.25, GH77, D-enzymes, 1,4- $\alpha$ -D-glucan: 1,4- $\alpha$ -D-glucan 4- $\alpha$ -D-glycosyltransferase)

AM เป็นเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการเผาผลาญแป้งเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ (Saehu, Srisimarot, Prousoontorn และ Pongsawasdi, 2013) AM ทำหน้าที่ตัดและต่อพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic หรือที่เรียกว่า การ disproportionation (รูปที่ 2.8B) ซึ่ง AM จะใช้สายอะไมโลสเป็นสารตั้งต้นในการเร่งปฏิกิริยา จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่าอะไมโลส และอะไมโลเพคติน

สามารถเป็นได้ทั้ง donor และ acceptor substrate (Palmer, Ryman และ Whelan, 1968; Takaha, Yanase, Takata, Okada และ Smith, 1996) ปฏิกริยาเริ่มต้นจากการที่ AM เข้าจับที่พันธะ glycosidic  $\alpha$ -1,4 ในกลูแคนสารตั้งต้น หลังจากนั้นจึงทำการตัดพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic และนำไปต่อที่สายกลูแคนอื่นๆโดยสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic ใหม่ (Ota, Okamoto และ Wakabayashi, 2009) AM ทำให้สายอะไมโลสและอะไมโลเพคตินมีความยาวลดลงด้วย (Hansen, Blennow, Pedersen, Norgaard และ Engelsen, 2008; Park et al., 2007) นอกจากนี้เอนไซม์นี้ยังสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการสร้างไซโคลอะมิโลส (Bhuiyan, Kitaoka และ Hayashi, 2003) ด้วยระดับการเกิดพอลิเมอร์เชน (DP) ตั้งแต่เจ็ดถึงหลายร้อย นอกจากนี้ AM สามารถกระตุ้นการก่อตัวของไซโคลอะไมโลส และไซโคลอะไมโลเพคติน (Hansen, Blennow, Pedersen, Nørgaard และ Engelsen, 2008; Palmer et al., 1968) ปฏิกริยาร่วมซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของ cyclisation (Jung et al. , 2011) ยิ่งกว่านั้น AM ยังเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้อีกด้วย โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ AM แสดงในรูปที่ 2.8



ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของ AM A) การ disproportionation ของอะไมโลเพคตินคลัสเตอร์, B) การ disproportionation ของสายอะไมโลเพคติน และ C) การ disproportionation ของสายอะไมโลส และ D) การเกิดไซโคลอะไมโลส และไซโคลอะไมโลเพคติน (Roussel และคณะ, 2013; Sorndech และคณะ, 2015)

นอกจากการศึกษาด้านกระบวนการการผลิตมอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และด้านทานการย่อยแล้ว ยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาดังประโยชน์ของแป้งตัดแปรทั้งสองชนิดที่ได้กล่าวถึงข้างต้น จากข้อมูลของ Jenkins และคณะ (2002) และ Wachters-Hagedoorn และคณะ (2006) สามารถสรุปประโยชน์ที่เกิดขึ้นกับสุขภาพของผู้บริโภคได้ เช่น สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งมีการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลองเพื่อทดสอบความสำคัญของมอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และด้านทานการย่อยที่ผลิตด้วยกระบวนการต่างๆ ต่อการลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ผลการศึกษาพบว่า มอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และด้านทานการย่อยที่ละลายน้ำ สามารถลดระดับคอเลสเตอรอล



ในเลือดของมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลได้สูงสุดถึง 25% นอกจากนี้ยังช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด รวมทั้งยังช่วยให้ลำไส้ใหญ่ทำหน้าที่ได้ดีขึ้น โดยอาหารที่มีมอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อยสูง มีผลให้ลดเวลาการอยู่ในลำไส้ใหญ่ เพิ่มน้ำหนักอุจจาระ และขับถ่ายบ่อยขึ้น อีกทั้งยังช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญของมอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย และยังช่วยป้องกันโรคอ้วนได้อีกด้วย

จากรายงานวิจัยเกี่ยวกับกระบวนการการผลิตมอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อยต่อเอนไซม์ เห็นได้ว่าแป้งมันสำปะหลังมีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาผลิตเป็นมอลโตเดกซ์ทรินที่ย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อยต่อเอนไซม์ นอกจากนี้ยังสามารถนำวิธีการต่างๆ มาต่อยอดเพื่อปรับปรุงกระบวนการการผลิตให้เหมาะสมกับแป้งมันสำปะหลังได้



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัตถุดิบ

แป้งมันสำปะหลังได้รับจาก บริษัท สวงวนวงศ์อุตสาหกรรม จำกัด (นครราชสีมา, ประเทศไทย) แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) ได้มาจาก Cerestar-AKV I/S (Vodskov, เดนมาร์ก) แป้งข้าวบาร์เลย์ Amylose-only (AO) ได้มาจาก Aarhus University (Aarhus, Denmark) เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE) จาก *Rhodothermus obamensis* และเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM) จาก *Thermus aquaticus* ได้จาก Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) เอนไซม์ Isoamylase (EC 3.2.1.3, 210 U•mL<sup>-1</sup>) จาก Pseudomonas sp. ได้จาก Megazyme (Wicklow, Ireland) เอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (EC 3.2.1.1, 22 U•mL<sup>-1</sup>), glucoamylase จาก *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.3, 129 U•mg<sup>-1</sup>), PGO (peroxidase และ กลูโคสออกไซด์) และ glycogen type VII จากหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) ซื้อจาก Sigma-Aldrich (Missouri, USA)

#### 3.2 วิธีการดำเนินงาน

3.2.1 การศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง, ปริมาณเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE), เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM) รวมทั้งสถานะการทำงานผลิตที่เหมาะสมต่อการเกิดมอลโตเด็กซ์ทรินที่ถูกย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย

##### 3.2.1.1 การหากิจกรรมของ AM และ BE และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เหมาะสม

การหาปริมาณอะไมโลส ทำได้โดยการวิเคราะห์อะไมโลส - ไอโอดีน เพื่อศึกษากิจกรรมของ BE ตามวิธีการของ Takata และคณะ, (1994) โดยใช้ 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.5) กับอะไมโลส (1 mg•mL<sup>-1</sup>) เติม BE ปริมาตร 100  $\mu$ L นำไปบ่มที่ 60°C เป็นเวลา 20 นาที สุ่มตัวอย่าง ปริมาตร 50  $\mu$ L จากนั้นเติมไอโอดีน 1 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบของ 0.01% I<sub>2</sub>, 0.1% KI, และ 0.38% 1 N HCl ในน้ำ บ่ม 15 นาทีที่อุณหภูมิห้องและวัดการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

การศึกษากิจกรรมการสร้างกิ่งของ BE ทดลองตามวิธีการของ Krisman และคณะ (1985) โดยหาปริมาณกิ่งหลังจาก debranching โดย isoamylase เริ่มจากการเตรียมแป้งมันสำปะหลัง (1% w•v<sup>-1</sup>) ในบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 50 mM (pH 6.5) เติม BE ปริมาตร 100  $\mu$ L นำไปบ่มที่ 60°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที และปรับค่า pH เป็น 4.0 โดยใช้บัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท 50 mM เติม Isoamylase (0.24 U • g starch<sup>-1</sup>) บ่มที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson, 1944) หนึ่งในยูนิตของ BE คือปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิต 1  $\mu$ mole ของน้ำตาลรีดิวซ์ต่อนาที (Krisman, Tolmasky และ Raffo, 1985)

กิจกรรมการ disproportion ของ AM ทดลองตาม Jung และคณะ, (2011) และ Kaper และคณะ, (2007) โดยการหาปริมาณกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยหลังการทำปฏิกิริยาของ AM โดยเตรียม Maltotriose ความเข้มข้น 10 mM ในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท 50 mM (pH 6.0) และบ่มที่ 70 °C

เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 50  $\mu\text{L}$  ของ 1 M HCl และทำให้เป็นกลางด้วย 50  $\mu\text{L}$  ของ 1M NaOH ผสมปฏิกิริยาถูกทำปฏิกิริยากับ 2,500  $\mu\text{L}$  ของสารละลายเอนไซม์ PGO ที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Biochrom Libra S22, Cambridge, UK) หนึ่งยูนิตของ AM คือปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิต 1  $\mu\text{mole}$  ของน้ำตาลกลูโคสต่อนาที (Jung และคณะ, 2011; Kaper และคณะ, 2007)

### 3.2.1.2 การหาค่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อปริมาณการสร้างกิ่งด้วย BE

เตรียมแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นจาก 5 ถึง 30% ( $w \cdot v^{-1}$ ) น้ำปราศจากไอออน จากนั้นปรับเป็น pH 6.5 ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต 50 mM ให้ความร้อนถึง 75°C เป็นเวลา 15 นาที แล้ว autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เติม BE (4,000 U  $\cdot$  g starch<sup>-1</sup>) และบ่มที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (1,500  $\times$  g เป็นเวลา 20 นาที) และเก็บส่วนใสมาทำแห้งที่ 50°C ใน 8 ชั่วโมง จากนั้น debranched ตัวอย่างโดยใช้ 0.24 U ของ isoamylase ต่อ 5 mg ของตัวอย่างที่ 40°C และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson, 1944) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, และ Smith, 1956) จากนั้นคำนวณปริมาณกิ่งโดยใช้สมการต่อไปนี้ (Wood และ Mercier, 1978):

$$\% \text{ Branch points} = \left( \frac{\text{Reducing sugar after debranched} - \text{Reducing sugar before debranched}}{\text{Total sugar after debranched}} \right) \times 100$$

### 3.2.2 การตัดแปรรูปแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์

#### 3.2.2.1 การตัดแปรรูปแป้งมันสำปะหลังด้วย AM ตามด้วย BE (AM $\rightarrow$ BE)

เตรียมตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10%  $w \cdot v^{-1}$  ปรับค่า pH เป็น pH 6.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นนำไป gelatinization โดยให้ความร้อนถึง 75°C เป็นเวลา 15 นาที แล้ว autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) (10 U  $\cdot$  g starch<sup>-1</sup>) และบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ปรับค่า pH เป็น 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM เติมเอนไซม์ BE (4,000 U  $\cdot$  g starch<sup>-1</sup>) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (1,500  $\times$  g เป็นเวลา 20 นาที) และเก็บส่วนใสมาทำแห้งที่ 50°C ใน 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

#### 3.2.2.2 การตัดแปรรูปแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) ตามด้วยเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE), (BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE)

เตรียมตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10%  $w \cdot v^{-1}$  ปรับค่า pH เป็น 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM จากนั้นนำไป gelatinization โดยให้ความร้อนถึง 75°C เป็นเวลา 15 นาที แล้ว autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ BE (4,000 U  $\cdot$  g starch<sup>-1</sup>) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปรับ

ค่า pH เป็น pH 6.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) ( $10 \text{ U} \cdot \text{g starch}^{-1}$ ) และบ่มที่อุณหภูมิ  $70^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ  $100^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที ปรับค่า pH เป็น 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM เติมเอนไซม์ BE ( $4,000 \text{ U} \cdot \text{g starch}^{-1}$ ) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ( $1,500 \times \text{g}$  เป็นเวลา 20 นาที) และเก็บส่วนใสมาทำแห้งที่  $50^\circ\text{C}$  ใน 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

### 3.2.2.3 การตัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วย AM ร่วมกับ BE (AM&BE)

เตรียมตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น  $10\% \text{ w} \cdot \text{v}^{-1}$  ปรับค่า pH เป็น 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM จากนั้นนำไป gelatinization โดยให้ความร้อนถึง  $75^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที แล้ว autoclave ที่  $121^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ BE ( $4,000 \text{ U} \cdot \text{g starch}^{-1}$ ) และเอนไซม์ AM ( $10 \text{ U} \cdot \text{g starch}^{-1}$ ) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง ( $1,500 \times \text{g}$  เป็นเวลา 20 นาที) และเก็บส่วนใสมาทำแห้งที่  $50^\circ\text{C}$  ใน 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป โดยเตรียมตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่างตามสภาวะดังนี้ 1) AM&BE  $60^\circ\text{C}$ , pH 6.5, 3 h; 2) AM&BE  $60^\circ\text{C}$ , pH 6.5, 24 h; 3) AM&BE  $70^\circ\text{C}$ , pH 6.0, 3 h; และ 4) AM&BE  $70^\circ\text{C}$ , pH 6.0, 24 h

### 3.2.3 การศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างอะไมโลส และอะไมโลเพคติน ต่อการเกิดโครงสร้างกิ่ง และคุณสมบัติการย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย

#### 3.2.3.1 การเตรียมแป้งข้าวบาร์เลย์ จากเมล็ดข้าวบาร์เลย์ชนิดอะไมโลสสูง 99% (AO)

นำข้าวบาร์เลย์ชนิดอะไมโลสสูง (Carciofi และคณะ, 2012) บดเป็นผงละเอียด และนำตัวอย่าง 200 กรัมผสมกับ 1 mM DTT (dithiotreitol) ปริมาตร 2 L และ 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) และกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตกตะกอนเม็ดแป้งที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาผสมกับ 1 mM DTT (dithiotreitol) ปริมาตร 2 L และ 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) และกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตกตะกอนเม็ดแป้งที่อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 2 วันอีกครั้ง จากนั้นนำสารละลายกรองผ่านตะแกรงขนาด  $70 \mu\text{m}$  เพื่อกำจัดเศษสิ่งสกปรกและกำจัดโปรตีนโดยใช้  $\beta$ -glucanase และ proteinase K จากนั้นล้างด้วยเอทานอล 96% ทั้งหมด 3 ครั้ง และทำแห้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.2.3.2 การเตรียม non-granular AO

Non-granular AO เตรียมตามวิธีการของ Kong และคณะ (2008) โดยนำ AO (5 กรัม) มาละลายใน 100 mL ของ 90% DMSO (dimethyl sulfoxide) โดยให้ความร้อนตัวอย่างที่  $100^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเติมเอทานอล 95% และกวนต่อเนื่อง จากนั้นเติมเอทานอล 95% อีก 200 mL แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่  $2,500 \times \text{g}$  เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วยเอทานอล 95% อีกสองครั้ง และล้างครั้งสุดท้ายด้วยอะซิโตน จากนั้นทำให้แห้งเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป (Kong, Bertoft, Bao และ Corke, 2008)

### 3.2.3.3 การศึกษาอัตราส่วนของอะไมโลส (AO): อะไมโลเพคติน (WX) ที่เหมาะสมต่อการตัดแปรโดยใช้ BE (BE)

เตรียมตัวอย่าง AO:WX โดยใช้อัตราส่วน AO:WX ดังนี้ 0:100, 20:80, 50:50, 80:20 และ 100:0 ปรับค่า pH เป็น pH 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นนำไป gelatinization ด้วยการใช้อุณหภูมิ 120°C สลับกับการนำมาเขย่าเป็นช่วงเพื่อป้องกันการ aggregation ของ AO จากนั้น เติมเอนไซม์ BE (4,000 U·g starch<sup>-1</sup>) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (1,500 × g เป็นเวลา 20 นาที) และเก็บส่วนใสมาทำแห้งที่ 50°C ใน 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

### 3.2.3.4 การศึกษาอัตราส่วนของอะไมโลส (AO): อะไมโลเพคติน (WX) ที่เหมาะสมต่อการตัดแปรโดยใช้ BE ตามด้วย AM และตามด้วย BE, (BE-->AM-->BE)

เตรียมตัวอย่าง AO:WX โดยใช้อัตราส่วน AO:WX ดังนี้ 0:100, 20:80, 50:50, 80:20 และ 100:0 ปรับค่า pH เป็น pH 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นนำไป gelatinization ด้วยการใช้อุณหภูมิ 120°C สลับกับการนำมาเขย่าเป็นช่วงเพื่อป้องกันการ aggregation ของ AO เติมเอนไซม์ BE (4,000 U·g starch<sup>-1</sup>) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปรับค่า pH เป็น pH 6.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 mM จากนั้นเติมเอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) (10 U · g starch<sup>-1</sup>) และบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 นาที ปรับค่า pH เป็น 6.5 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM เติมเอนไซม์ BE (4,000 U·g starch<sup>-1</sup>) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง (1,500 × g เป็นเวลา 20 นาที) และเก็บส่วนใสมาทำแห้งที่ 50°C ใน 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อไป

## 3.2.4 การวิเคราะห์ลักษณะทางโครงสร้าง และคุณสมบัติการถูกย่อยด้วยการจำลองระบบทางเดินอาหาร

### 3.2.4.1 การหาปริมาณ $\beta$ -amylolysis limit

ปริมาณ  $\beta$ -amylolysis limit วิเคราะห์ตามวิธีการของ Wood และ Mercier (1978) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรมาละลายใน 90% DMSO ให้มีความเข้มข้น 0.5% w·v<sup>-1</sup> จากนั้นสุ่มตัวอย่างปริมาตร 1.5 mL ผสมกับสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 4.8 (0.3 mL, 0.2 M) และเติมเอนไซม์  $\beta$ -amylase (4 ยูนิต) และน้ำ ปราศจากไอออน 2.7 mL จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson, 1944) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, และ Smith, 1956) จากนั้นคำนวณปริมาณ  $\beta$ -amylolysis limit โดยใช้สมการต่อไปนี้ (Wood และ Mercier, 1978):

$$\beta\text{-amylolysis limit} = \left( \frac{\text{Reducing sugar after hydrolysed} - \text{Reducing sugar of blank}}{\text{Total sugar after hydrolysed} - \text{Total sugar of blank}} \right) \times 100$$



### 3.2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1, 6 glycosidic โดยวิธีการใช้ $^1\text{H-Nuclear Magnetic Resonance (NMR)}$

ชั่งตัวอย่างแห้ง 10 mg ละลายใน 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  โดยให้ความร้อนประมาณ 60  $^\circ\text{C}$  เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.3 % (w/v) สัญญาณถูกบันทึกโดยใช้  $^1\text{H}$  NMR spectrometer ซึ่งต่อเข้ากับ TCI CryoProbe และ an 18.7 T magnet ที่ 37 $^\circ\text{C}$  Spectra ถูกบันทึกโดยการสุ่มตัวอย่าง 16,384 จุดข้อมูล ใช้ acquisition time 1.7 วินาที, 32 transients และ recycle delay 10 วินาที เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เชื่อถือได้ ซอฟต์แวร์

### 3.2.4.3 การวิเคราะห์การกระจายตัวของสาย amylopectin โดยวิธีการใช้ High Pressure Anion Exchange Chromatography with Pulse Amperometric Detector (PAD)

ชั่งตัวอย่างแห้ง 5 mg ละลายในน้ำกลั่น ปรับค่า pH เป็น 4.5 จากนั้นเติมเอนไซม์ isoamylase 0.24 U ต่อ 5 mg ของตัวอย่าง และบ่มที่อุณหภูมิ 40 $^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 $^\circ\text{C}$  นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ high-pressure anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) โดยฉีดเข้าคอลัมน์ CarboPac PA-200 โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ตัวอย่างตามวิธีการของ Le และคณะ, (2009) โดยใช้ตัวอย่างของ 20  $\mu\text{L}$  (100  $\mu\text{g}$  ของตัวอย่าง) ฉีดลงสู่คอลัมน์ CarboPac PA-200 โดยใช้อัตราการไหล 0.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 150 mM isocratic NaOH และ NaOAc gradient profile ดังนี้: 0-5 นาที: 0-5 min: 0-110 mM linear gradient, 5-130 min: 110-350 mM convex gradient จะได้โครมาโตแกรมที่มี DP 3-60 (Vikso-Nielsen, Blenow, Nielsen, และ Møller, 1998)

### 3.2.4.4 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีการใช้ Size-Exclusion Chromatography (SEC)

เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 1  $\text{mg}/\text{mL}$  ตัวอย่างที่ได้ นำมากรองผ่าน 0.22  $\mu\text{m}$  และนำไปวิเคราะห์ weight-average molar mass distribution ( $\overline{M}_w$ ), hydrodynamic radius (Rh) และ dispersity ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ) โดยใช้เครื่อง size exclusion chromatography (SEC) แบบ Viscotek system (Malvern, UK) ที่ต่อกับคอลัมน์ประเภท GS-520 HQ column (Shodex, Showa Denko, Japan) ต่อเข้ากับ TDA302 module (Triple detector array) ที่มี refractive index detector (RI), four-bridge visco-meter detector (VIS) และ light scattering detector (LS) สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการ elution คือ 50 mM ammonium formate ( $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ ) buffer, pH 4.5, ใช้อัตราการไหล 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  โดยมี injection volume คือ 50  $\mu\text{L}$  และอุณหภูมิของคอลัมน์คือ 60 $^\circ\text{C}$  การวิเคราะห์ข้อมูลทำโดยใช้โปรแกรม OmniSec Software 4.7 (Malvern Instrument, Ltd.).

### 3.2.4.5 การวิเคราะห์การสร้าง cyclostructure ของผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีการใช้ Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF)

การวิเคราะห์ปริมาณ cyclostructure ตามวิธีการของ Park และคณะ, 2007 โดยละลายตัวอย่างใน DMSO ให้มีความเข้มข้น  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  โดยใช้เมทริกซ์คือ  $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ของ 2,5-dihydroxybenzoic acid ใน 30% acetonitrile ในน้ำปราศจากไอออน ที่มี 0.1% ของ TFA จากนั้นดูดตัวอย่าง  $2 \mu\text{L}$  ผสมกับ matrix  $2 \mu\text{L}$  หลังจากผสมให้เข้ากันแล้วนั้น ดูดตัวอย่างมาปริมาตร  $0.5 \mu\text{L}$  แล้วหยดลงบนแท่นวิเคราะห์ตัวอย่างสำหรับเครื่อง MALDI-TOF MS รอจนแห้งและนำเข้าเครื่อง MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Microflex instrument, USA) และวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลเป็น m/z ด้วยโปรแกรม Bruker Biotyper 3.1 software

### 3.2.4.6 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปร

คุณสมบัติการย่อยของแป้งตัดแปร วิเคราะห์โดยใช้วิธีการของ Englyst, 1992 โดยเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 2% ทำการ gelatinization ที่อุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที ปรับค่า pH เป็น 7.0 จากนั้นเติมเอนไซม์ 20 U ของ  $\alpha$ -amylase from porcine pancreas และ 20 U ของ glucoamylase บ่มที่  $37^{\circ}\text{C}$  และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 10, 30, 60, 120, 240, 360, 480, และ 1440 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม 100 mM HCl ปริมาตร  $30 \mu\text{L}$  จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ถูกย่อยโดยใช้ PGO enzyme®

ปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมา (%) คำนวณโดยใช้สมการต่อไปนี้:

$$\text{Glucose released (\%)} = \left( \frac{\text{Total weight of glucose} \times 0.9}{\text{Weight of enzyme-modified starches}} \right)$$

โดย 0.9 คือ molar mass ที่ใช้เปลี่ยน glucose เป็น anhydroglucose

### 3.2.4.7 การวิเคราะห์คุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปรโดยใช้ human pancreatic $\alpha$ -amylase และ rat intestinal $\alpha$ -glucosidases

เตรียมตัวอย่างในบัฟเฟอร์ 10 mM PBS (pH 6.9) ที่ความเข้มข้น 1% ( $\text{w} \cdot \text{v}^{-1}$ ) โดยการต้มที่อุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 mL แล้วเติม human pancreatic  $\alpha$ -amylase 500 U (Meridian Life Science, Inc., Saco, Maine) บ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มที่อุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ตัวอย่าง  $\alpha$ -limit dextrins ที่ได้ จะถูกวิเคราะห์ molar mass ด้วย HPSEC-RI (Zhang, Ao และ Hamaker, 2006) โดยใช้ pullulans เป็นสารมาตรฐาน (Polymer Laboratories Inc. Amherst, MA) จากนั้นดูดตัวอย่าง  $\alpha$ -limit dextrins ( $200 \mu\text{L}$ ) มาบ่มที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}\text{C}$  และเติมเอนไซม์ rat intestinal  $\alpha$ -glucosidases (500 U) บ่มเป็นเวลา 10 นาที และวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสที่ถูกปลดปล่อยโดยใช้ glucose oxidase/peroxidase (GOPOD) (Vasanthan, 2001).

## บทที่ 4

### ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง, ปริมาณเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (Branching enzyme, BE), เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (Amylomaltase, AM) รวมทั้งสถานะการทำการผลิตที่เหมาะสมต่อการเกิดมอลโตเด็คซ์ทรินที่ถูกละลายได้ช้า และต้านทานการย่อย

กิจกรรมเอนไซม์รายงานตามนิยามของ “The International Union of Biochemistry” ซึ่งถูกกำหนดให้เป็นหน่วยมาตรฐานของกิจกรรมของเอนไซม์ โดยกิจกรรมหนึ่งหน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะมาตรฐาน (Units of Enzyme Activity, 1979) กิจกรรมของ AM วิเคราะห์จากปริมาณกลูโคสที่ปล่อยออกมาหลังจากการทำปฏิกิริยา ในขณะที่กิจกรรมของ BE สามารถวิเคราะห์ได้จากสองวิธี ประกอบด้วย 1. การวัดการลดลงของปริมาณอะไมโลส โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไอโอดีน - อะไมโลสคอมเพล็กซ์ (iodine-amylose complex) และ 2. การวัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ โดยกิจกรรมของ AM และ BE แสดงในตารางที่ 4.1.1

ตารางที่ 4.1.1 กิจกรรมของ AM และ BE

เอนไซม์	การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์	ยูนิตของเอนไซม์ (U·ml <sup>-1</sup> of enzymes)
AM	การเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคส	4,763.45
BE	การลดลงของปริมาณอะไมโลส	7,240.27
BE	การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase)	12,067.11

กิจกรรมของ AM คือ 4,763.45 U · ml<sup>-1</sup> ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีวัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคส ในขณะที่กิจกรรมของ BE ที่วิเคราะห์โดยการวัดปริมาณอะไมโลสที่ลดลงคือ 7,240.27 U · ml<sup>-1</sup> เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของ BE ด้วยการวัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) มีค่าเท่ากับ 12,067.11 U · ml<sup>-1</sup> ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าความแม่นยำของการวิเคราะห์กิจกรรมของ BE ทั้งสองวิธีนั้นแตกต่างกัน วิธีการที่แม่นยำกว่าคือการวัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ เนื่องจากการวัดปริมาณอะไมโลสที่ลดลงนั้นขึ้นอยู่กับความยาวสายโซ่อะไมโลสที่มีผลต่อการเกิดอะไมโลส-ไอโอดีน คอมเพล็กซ์ ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถตรวจสอบสายอะไมโลสที่มี DP ≤ 40 ได้ ตามทฤษฎี BE จะเร่งการสร้างพันธะ α-1,6 glycosidic และปลดปล่อยสายกลูแคนสั้นๆ ออกมา ทำให้เกิดน้ำตาลรีดิวิซ์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการวิเคราะห์การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ หลังจากการตัดกิ่ง

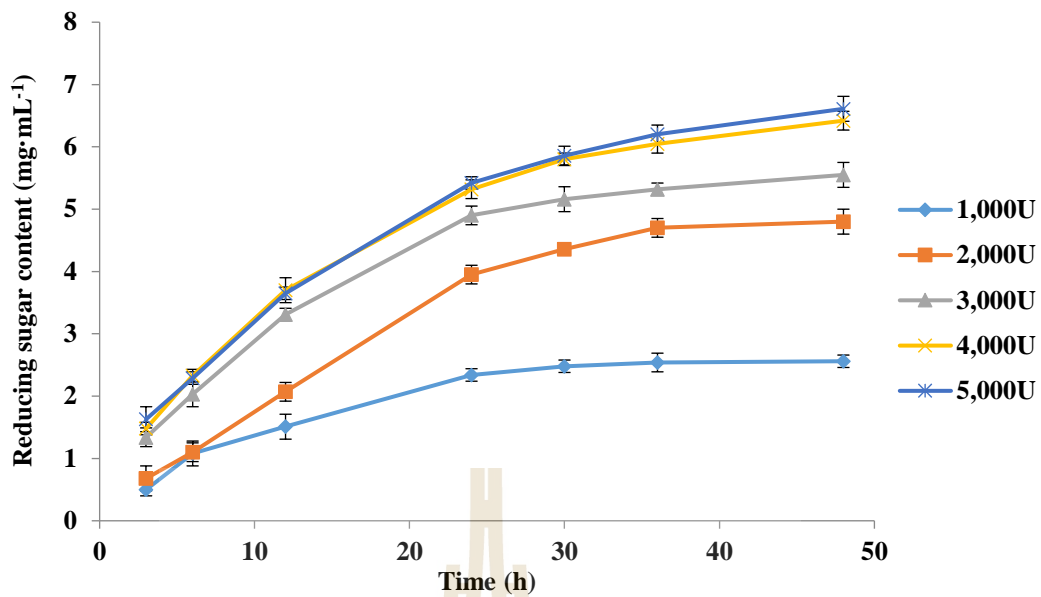


(debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กิจกรรมของ BE

**ตารางที่ 4.1.2** ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic (%) ที่วิเคราะห์โดยวิธีวัดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) ที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่แตกต่างกัน

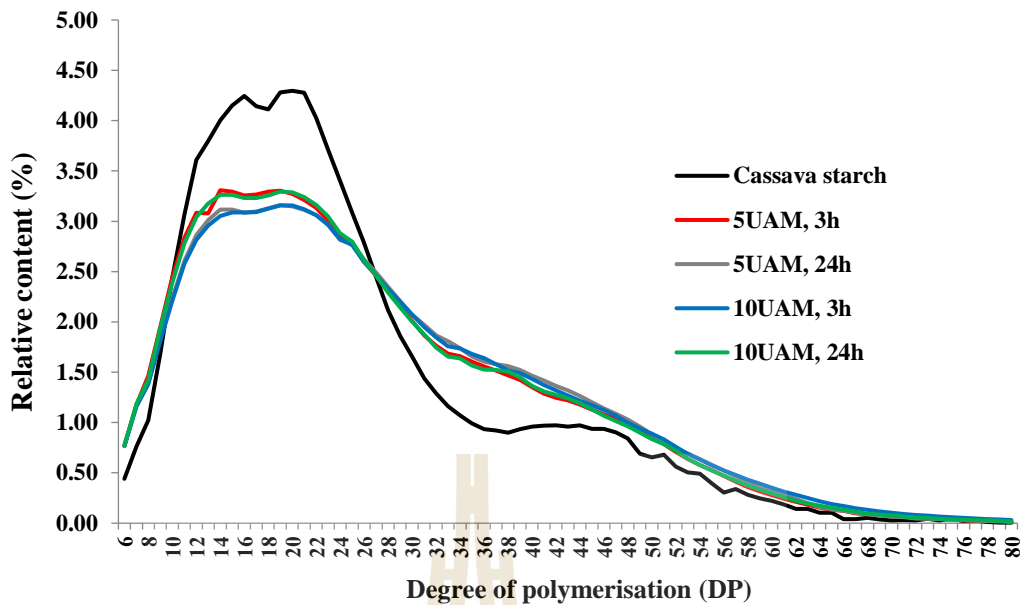
ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (% w·v <sup>-1</sup> )	$\alpha$ -1,6 glycosidic (%)
5.0	5.9±1.1
7.5	7.9±0.4
10.0	9.0±0.3
15.0	8.2±0.9
20.0	5.8±0.9
25.0	5.5±0.9
30.0	5.2±0.7

ตารางที่ 4.1.2 แสดงผลของการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังร่วมกับการตัดแปรโดยใช้ BE เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ตามทฤษฎีนั้น โดยทั่วไป BE ทำหน้าที่ในการตัดสายกลูแคนที่บริเวณพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic เพื่อผลิต  $\alpha$ -glucan สายสั้น และนำไปต่อกิ่งโดยสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ซึ่งอาจเกิดการสร้างกิ่งดังกล่าวภายในหรือระหว่างโมเลกุลก็ได้ การทดลองนี้ใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5.0-30.0 % (w·v<sup>-1</sup>) ผลการวิจัยพบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 10.0% ทำให้เกิดพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ที่สุด นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของแป้งจาก 10.0 % (w·v<sup>-1</sup>) เป็น 30.0 % (w·v<sup>-1</sup>) ส่งผลให้ปริมาณ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ลดลง ดังนั้น แป้งที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้มีความหนืดมากขึ้น ทำให้เอนไซม์เกิดกิจกรรมการตัดต่อกิ่งได้ยากขึ้น และทำให้กิจกรรมของ BE ช้าลง นอกจากนี้ความเข้มข้นของแป้งจาก 5.0% (w·v<sup>-1</sup>) เป็น 10.0% (w·v<sup>-1</sup>) แสดงให้เห็นว่าการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ของแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 10.0% (w·v<sup>-1</sup>) สูงกว่าของสารตั้งต้น 5.0% (w·v<sup>-1</sup>) และ 7.5% (w·v<sup>-1</sup>) เนื่องจากความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 10.0% (w·v<sup>-1</sup>) จะถูก BE ใช้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆเพื่อสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ซึ่งข้อมูลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งใช้ความเข้มข้นของแป้งตั้งแต่ 5.0% (w·v<sup>-1</sup>) -10.0% (w·v<sup>-1</sup>) (Kasprzak และคณะ, 2012; Le และคณะ, 2009)



รูปที่ 4.1.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) หลังการตัดแปรงแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10.0% (w·v<sup>-1</sup>) ด้วย BE ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1,000-5,000 U

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง เวลาการบ่ม และปริมาณของ BE แสดงดังรูปที่ 4.1.1 โดยใช้ BE ความเข้มข้น 1,000 U-5,000 U และเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆตั้งแต่ 0-48 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากการตัดกิ่งโดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลสเพิ่มขึ้นเมื่อเวลา และความเข้มข้นของ BE เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าไม่มี ความแตกต่างของปริมาณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ระหว่าง 4,000 U และ 5,000 U ที่เวลาการเก็บ ตัวอย่าง 0-24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากข้อมูลนี้ แสดงให้เห็นว่าเวลาในการบ่มและปริมาณ BE ที่เหมาะสมคือ 48 ชั่วโมงและ 4,000 U อย่างไรก็ตามเนื่องจาก BE ยังมีกิจกรรมการไฮโดรไลซิสที่สามารถเกิดขึ้นได้มากขึ้น เมื่อระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น จึงอาจส่งผลให้เกิดการสร้างสายกลูแคนสั้นๆเพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นเวลาที่ เหมาะสมของการใช้ BE คือเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งทำให้สามารถลดการสร้างสายกลูแคนสั้นๆให้น้อยลง และประหยัดพลังงานสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมเมื่อเทียบกับ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.1.2 ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน (Average chain length distribution) หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) หลังการตัดแปรงแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10.0% ( $w \cdot v^{-1}$ ) ด้วย AM ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาการบ่มต่างๆ

ศึกษาปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการบ่มที่เหมาะสมของ AM เพื่อตรวจสอบการกระจายตัวของสาย กลูแคน ที่มีจำนวน Degree of polymerization (DP) 6-24 และ  $DP > 25$  โดยผลจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่คาดหวังคือ การสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic ที่เพิ่มขึ้น ทำการทดลองโดยนำแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10.0% ( $w \cdot v^{-1}$ ) ตัดแปรงด้วย AM ความเข้มข้น 5 U และ 10 U โดยบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคนมีการเพิ่มขึ้นของสายกลูแคนในช่วง DP 6-10 และ  $DP > 27$  เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปรง (รูปที่ 4.1.2 และตารางที่ 4.1.3) ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่า AM มีความสามารถในการต่อสายกลูแคนด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic และปล่อยสายกลูแคนสั้นๆ โดยเฉพาะ DP 6-24 ออกมาได้ นอกจากนี้ AM ยังสามารถสร้างสายกลูแคนที่มี  $DP > 27$  ซึ่งเป็นสายกลูแคนที่มีความยาวมากพอที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ BE ในการทดลองต่อไปได้ (รูปที่ 4.1.2)

**ตารางที่ 4.1.3** ปริมาณของสายกลูแคนที่ degree of polymerization (DP) ต่างๆกัน หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซ-อะไมเลส (isoamylase) หลังการตัดแปรรูปแป้งสำหรับความเข้มข้น 10.0% ( $w \cdot v^{-1}$ ) ด้วย AM ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาการป้อนต่างๆ

DP	Relative content (%)				
	Cassava starch	5U, 3h	5U, 24h	10U, 3h	10U, 24h
DP 6-12	13.04	13.54	12.90	12.72	13.73
DP 13-24	48.43	38.27	36.82	36.68	38.33
DP 25-36	20.83	24.45	25.16	25.03	24.31
DP > 36	16.78	22.04	23.54	23.99	22.29

อ้างอิงจากข้อมูลของ Hizukuri และคณะ, (1981) เรื่องการกระจายตัวของสายกลูแคนที่ DP ต่างๆ ตารางที่ 4.1.3 แสดงปริมาณของสายกลูแคน DP 6-12, DP13-24, DP 25-36 และ DP > 36 ซึ่งคำนวณจากรูปที่ 2 (Hizukuri, Takeda, Yasuda และ Suzuki, 1981) ปริมาณของสายกลูแคนที่สูงสุดของกลุ่ม DP 6-24 นั้นมาจากตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยเอนไซม์ AM ความเข้มข้น 10 U เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแสดงการเกิดปฏิกิริยา disproportion และการไฮโดรไลซิสของสายกลูแคน ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยเอนไซม์ AM ความเข้มข้น 10 U เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ BE ในการทดลองต่อไป นอกจากนี้ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วยเอนไซม์ AM ความเข้มข้น 10 U เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดลองด้วย BE ต่อไปด้วย เนื่องจากตัวอย่างนี้มีปริมาณของสายกลูแคน DP > 25 สูงที่สุด ซึ่งเหมาะสมต่อกิจกรรมของ BE ในขั้นต่อไป (ตารางที่ 4.1.3)

#### 4.2 การศึกษาผลของการตัดแปรรูปแป้งหลังโดยใช้เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) และเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้งหลัง

##### 4.2.1 ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic

ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ของแป้งหลังผ่านการตัดแปรรูปด้วย AM ร่วมกับ BE ใน 3 ลักษณะคือ 1) การตัดแปรรูปด้วย AM ตามด้วย BE (AM  $\rightarrow$  BE) 2) การตัดแปรรูปด้วย BE ตามด้วย AM และตามด้วย BE (BE  $\rightarrow$  AM  $\rightarrow$  BE) และ 3) การตัดแปรรูปด้วย BE และ AM พร้อมกัน (AM&BE) ผลการวิเคราะห์  $\lambda_{max}$  และปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic แสดงในรูปที่ 4.2.1 และตารางที่ 4.2.1 ค่า  $\lambda_{max}$  ของ iodine- $\alpha$ -glucan ของตัวอย่างที่ถูกตัดแปรรูปด้วยเอนไซม์ทั้งหมด มีค่าใกล้เคียงกับค่า  $\lambda_{max}$  ของไกลโคเจน (ตารางที่ 4.2.1) การที่  $\lambda_{max}$  นั้นต่ำกว่า 440 นาโนเมตร แสดงให้เห็นถึงการสร้างโครงสร้างใหม่ของสายกลูแคนที่มีความเป็นกิ่งมากขึ้น แป้งตัดแปรรูปได้จาก AM $\rightarrow$ BE และ BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE มีปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สูงกว่าแป้งหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูปและไกลโคเจน นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดแปรรูปด้วย BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE มีปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สูงกว่าการตัดแปรรูปด้วย BE $\rightarrow$ X $\rightarrow$ BE ดังแสดงในตารางที่ 4 โดย X แสดง

ว่าไม่มีตัดแปรด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนนั้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นบทบาทสำคัญของ AM ในการสร้างสารตั้งต้นที่มีประสิทธิภาพสำหรับ BE เพื่อใช้ในการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic จากการทดลองนี้ ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรจำนวนห้าตัวอย่างที่มีพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สูงที่สุด ได้รับการคัดเลือกสำหรับการวิเคราะห์โมเลกุลเพิ่มเติม ประกอบด้วยตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย 1) AM (3 ชั่วโมง) -->BE, 2) AM (24 ชั่วโมง) -->BE, 3) BE-->AM (3 ชั่วโมง) -->BE, 4) BE-->AM (24 ชั่วโมง) -->BE, และ 5) AM&BE (60°C, ค่า pH 6.5, 24 ชั่วโมง)

**ตารางที่ 4.2.1** ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ iodine- $\alpha$ -glucan complex และปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic (%) ของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ โดย X แสดงว่าไม่มีตัดแปรด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนนั้น nd: not determined, BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\alpha$ -(1,6) linkages (%)
แป้งมันสำปะหลัง	565	4.9
Glycogen	440	9.7
Potato amylose (ตัวอย่างควบคุม)	630	nd
Potato amylopectin (ตัวอย่างควบคุม)	540	nd
BE	525	7.8
AM 3 h-->BE	500	9.9
AM 24 h-->BE	470	10.0
BE-->X-->BE	415	8.3
BE-->AM 3 h-->BE	420	13.1
BE-->AM 24 h-->BE	410	10.9
AM&BE 60°C, pH 6.5, 3 h	560	5.1
AM&BE 60°C, pH 6.5, 24 h	425	8.7
AM&BE 70°C, pH 6.0, 3 h	560	4.7
AM&BE 70°C, pH 6.0, 24 h	540	6.4

#### 4.2.2 ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน

##### 4.2.2.1 การใช้เอนไซม์ชนิดเดียวในการตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง (Single catalysis)

ผลของการเร่งปฏิกิริยาการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ AM และ BE ต่อค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน (DP) ของแป้งมันสำปะหลังตัดแปร โดยใช้ HPAEC-PAD แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นการลดลงของสายกลูแคนที่มี DP  $\geq$  20 ในขณะที่สัดส่วนของสายกลูแคนที่สั้นกว่า DP 20 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร (รูปที่ 4.2.1B) ปริมาณของสายกิ่งที่เป็นสายกลูแคนสั้นๆ ของตัวอย่างที่ถูกตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับไกลโคเจน ซึ่งจากการทดลองดังกล่าว มีการรายงานโครงสร้างของแป้งตัดแปรที่ใช้ BE จาก *Bacillus subtilis* และ



*Rhodothermus obamensis* (Kim, Ryu, Bae, Huong และ Lee, 2008; Le และคณะ, 2009) ที่ให้ลักษณะเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า BE มีกิจกรรมหลักคือเร่งให้เกิดการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic นอกจากนี้ BE ยังมีกิจกรรมย่อยที่สามารถสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,4 glycosidic ด้วยปฏิกิริยา transglycosidation ในลักษณะเดียวกันกับ AM (Roussel และคณะ, 2013) แต่เกิดได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ AM นอกจากนี้เมื่อนำแป้งมันสำปะหลังมาตัดแปรด้วย AM และวิเคราะห์การกระจายตัวของสายกลูแคนที่ DP ต่างๆ พบว่าโปรไฟล์ความยาวของสายกลูแคนจะเพิ่มขึ้นเฉพาะใน  $DP \leq 7$  และ  $DP \geq 25$  ในขณะที่  $DP$  7-25 ลดลง (รูปที่ 4.2.1C) การเพิ่มขึ้นของการสร้างสายกลูแคนแบบสั้น แสดงให้เห็นการเกิดกิจกรรม hydrolysis และ disproportion ที่เกิดจากกิจกรรมของ AM (รูปที่ 4.2.1C) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลก่อนหน้านี้ (Hansen, Blennow, Pedersen และ Engelsen) 2009) การเพิ่มขึ้นของการสร้างสายกลูแคนแบบสั้น หรือ  $DP$  ต่ำนั้น มาจากสายกลูแคนส่วนที่เหลือจากหลังจากกิจกรรม transglycosylation และจากกิจกรรม hydrolysis ของ BE และ AM ซึ่งกิจกรรม hydrolysis ของ AM นั้นถือว่าเกิดขึ้นได้น้อย (Kaper และคณะ, 2007; Kaper และคณะ, 2004; van der Maarel และคณะ, 2005) และจากการศึกษาในการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์ BE และ AM มีกิจกรรมการ hydrolysis ประมาณ 0.73% และ 0.13% ตามลำดับ

#### 4.2.2.2 การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง ด้วย AM $\rightarrow$ BE (AM $\rightarrow$ BE sequential catalysis)

การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง ด้วย AM  $\rightarrow$ BE โดยนำแป้งมันสำปะหลังไปตัดแปรโดยใช้ AM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงตัดแปรต่อด้วย BE โดยมีสมมติฐานว่าการใช้ AM จะสามารถปรับเปลี่ยนการกระจายตัวของสายกลูแคนให้มีปริมาณกลูแคนสายยาวมากขึ้น เพื่อเป็นสารตั้งต้นให้ BE เกิดการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ได้มากขึ้น ตัวอย่างที่ได้รับการตัดแปรแบบ AM $\rightarrow$ BE ทั้งหมด แสดงการเพิ่มขึ้นของจำนวนของสายกลูแคนที่มีความยาวน้อยกว่า  $DP$  25 และมีการลดลงของสายกลูแคนที่ยาวกว่า  $DP$  25 (รูปที่ 4.2.1E) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า BE ใช้สายกลูแคน  $DP \geq 25$  ใน amylopectin เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกิ่ง (รูปที่ 4.2.1C) ผลการกระจายตัวของสายกลูแคนที่เวลาการบ่มด้วยเอนไซม์ AM 3 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงนั้น (AM 3 h $\rightarrow$ BE และ AM 24 h $\rightarrow$ BE) แตกต่างกันเล็กน้อย (รูปที่ 4.2.1C) กิจกรรมการ disproportion ของ AM แสดงให้เห็นว่า AM สามารถสร้างสายกลูแคนที่ยาวขึ้นได้ เพื่อสนับสนุนกิจกรรมของ BE ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น การสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic จากการตัดแปรด้วย AM $\rightarrow$ BE (รูปที่ 4.2.1E) แสดงให้เห็นว่า BE สามารถใช้สายกลูแคนที่เป็น outer chains ของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการตัดแปรด้วย AM เพื่อสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ใหม่ (ตารางที่ 4.2.1)

#### 4.2.2.3 การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง ด้วย BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE (BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE sequential catalysis)

การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง ด้วย BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE ศึกษาโดยการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังตามลำดับ โดยตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, AM เป็นเวลา 3 หรือ 24 ชั่วโมง และสุดท้ายด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE, รูปที่ 4.2.1F) วิธีการนี้จะก่อให้เกิดการสร้างสายกลูแคนที่มีความยาวต่างๆขึ้นใหม่ ซึ่งมีศักยภาพสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นให้ BE ในขั้นตอนสุดท้ายในการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ให้มากขึ้นได้ เพื่อที่จะตรวจสอบประสิทธิภาพของการสร้างกิ่งที่เกิดขึ้น

มีการใช้เอนไซม์ isoamylase เพื่อตัดพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic หลังจากการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และตรวจสอบความสมบูรณ์ของการตัดพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic โดยวิเคราะห์ด้วยวิธีทำ  $\beta$ -amylolysis (ตาราง 4.2.2) ผลการทดลองพบว่า การทำ  $\beta$ -amylolysis ของแป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE มีค่าประมาณ 92.8-93.0% เมื่อเทียบกับไกลโคเจนซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุม (98.4%) และแป้งตัดแปรด้วย BE เพียงอย่างเดียว (99.4%) แสดงให้เห็นว่า isoamylase ไม่สามารถตัดพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการตัดแปรได้อย่างสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตำแหน่งพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ที่ถูกสร้างอยู่ใกล้ชิดกันมากกว่า 2 พันธะ สำหรับตัวอย่างที่ได้รับการตัดแปรด้วย BE -->AM 3 h--> BE นั้น มีปริมาณของสายกลูแคน DP 3-12 ในปริมาณที่สูง และมีการสร้างกิ่งสั้นๆจำนวนมากดังแสดงในโครมาโตแกรม (รูปที่ 4.2.1F) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง BE -->AM 24 h--> BE พบว่าตัวอย่าง BE -->AM 3 h--> BE แสดงการสะสมของสายกลูแคน DP 3-15 น้อยกว่ายิ่งกว่านั้นยังพบว่า AM ทำหน้าที่อย่างไม่มีประสิทธิภาพในการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE มาแล้ว (ซึ่งเกิดโครงสร้างกิ่งแล้ว) (รูปที่ 4.2.1D) เมื่อพิจารณาตัวอย่าง BE-->X-->BE พบว่าการสร้าง  $\alpha$ -1,6 glycosidic นั้นเกิดได้น้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ AM ในภาคตัดแปรแบบ BE-->AM-->BE นั้นเกิดจาก AM เร่งปฏิกิริยาการ disproportion และการสร้างไซโคลอะไมโลเพกติน (cyclization of amylopectin) (Hansen, Blennow, Pedersen) , Norgaard และ Engelsen, 2008) ซึ่งจะทำให้เกิดการสร้างสารตั้งต้นที่เหมาะสม และเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาของ BE ให้เกิดการสร้าง  $\alpha$ -1,6 glycosidic ทำให้เกิดโครงสร้างคล้ายไกลโคเจน (Kajiura, Kakutani, Akiyama, Takata และ Kuriki, 2008)

**ตารางที่ 4.2.2**  $\beta$ -amylolysis (%) ของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร และผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	$\beta$ -amylolysis (%)
แป้งมันสำปะหลัง	94.9
ไกลโคเจน	98.4
BE	99.4
AM 3 h --> BE	96.5
AM 24 h --> BE	93.6
BE --> AM 3 h --> BE	92.8
BE --> AM 24 h --> BE	92.9
AM&BE 60°C, pH 6.5, 24 h	96.9

ตามทฤษฎี ไกลโคเจนมีปริมาณกิ่งมากกว่า amylopectin ประมาณสองเท่า (Kajiura และ คณะ, 2011) และวิธีการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วย AM และ BE สามารถทำให้เกิดโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายไกลโคเจน แป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE สร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ได้สูงที่สุด และมีการกระจายความยาวสายกลูแคนแตกต่างจากแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร (ตารางที่ 4.2.2) ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้จากการเกิดปฏิกิริยาของ BE-->AM จะทำให้เกิด

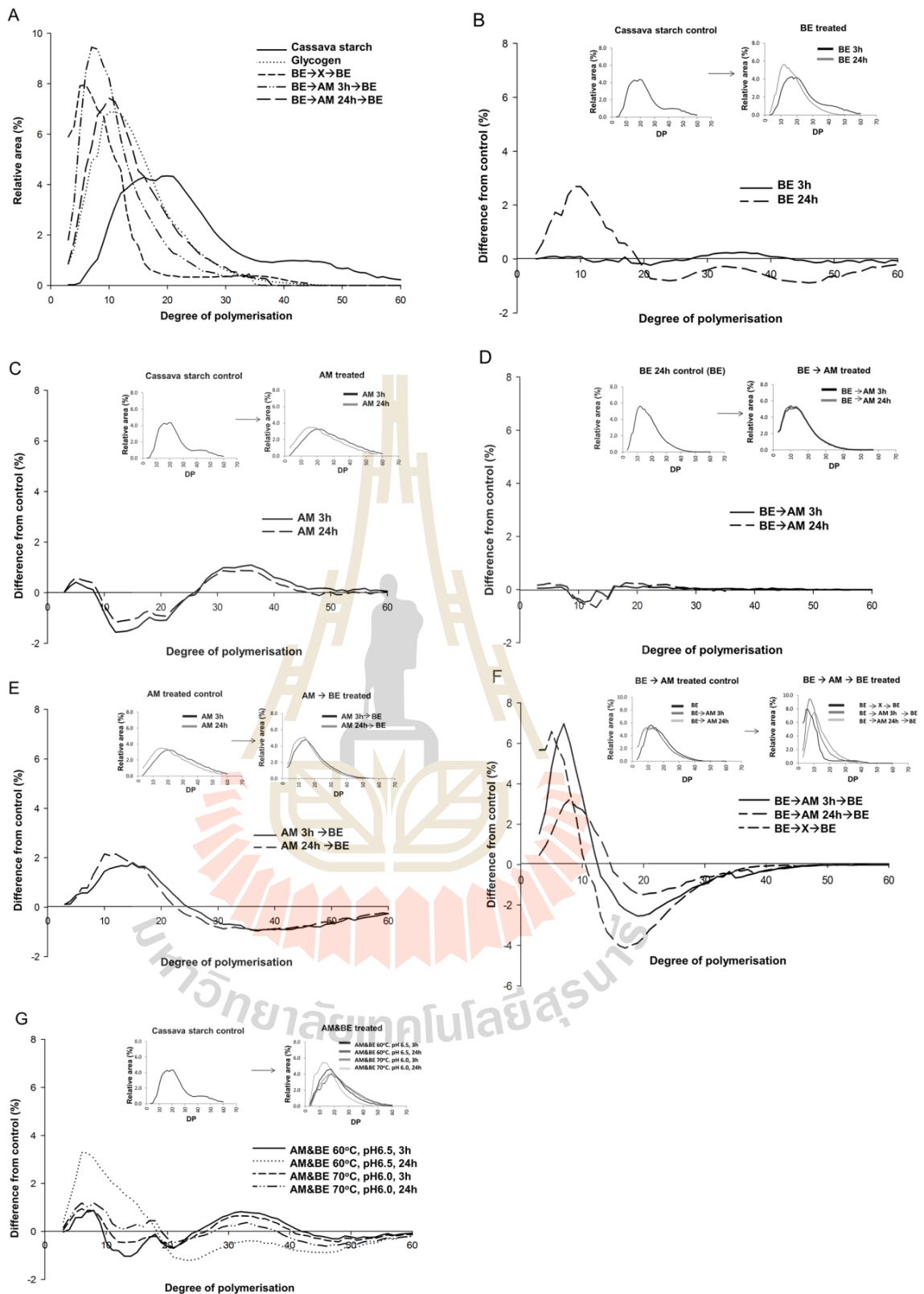
การเร่งปฏิกิริยาให้สร้างสายกลูแคนที่มีความยาวที่เหมาะสม โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า AM สามารถเร่งปฏิกิริยา disproportion เพื่อสร้างโมเลกุลที่มีลักษณะคล้ายอะไมโลสได้ (Bhuiyan, Kitaoka และ hayashi, 2003) ดังนั้นสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ BE--> AM มีข้อจำกัดคือ การเร่งปฏิกิริยา disproportion ของ AM จะไปเกิดขึ้นที่คลัสเตอร์อะไมโลเพคติน ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนคือ ความแตกต่างเล็กน้อยของโครมาโตแกรมของตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM (รูป 4.2.1D) ดังนั้น AM อาจเกี่ยวข้องกับการ disproportion ของสายกลูแคนที่มีความยาวมากเป็นหลัก เช่น การตัด/ต่ออะไมโลเพคตินคลัสเตอร์ใหม่ และการถ่ายโอนของสายอะไมโลสไปยังอะไมโลเพคตินคลัสเตอร์ เป็นต้น (Hansen และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตาม การตัด/ต่ออะไมโลเพคตินคลัสเตอร์ใหม่ สามารถทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายที่ใช้ BE ได้ โดยการจัดเรียงโมเลกุลของสายกลูแคนใหม่ ทำให้ลดการเกิด steric hindrance ซึ่งทำให้ BE สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้าง  $\alpha$ -1,6 glycosidic ได้ ดังนั้น การตัดแปรโดยใช้ BE-->AM-->BE จะทำให้เกิดความหนาแน่นของกิ่งในโครงสร้างสตาร์ช ที่คล้ายกับโครงสร้างของไกลโคเจนอย่างมาก

#### 4.2.2.4 การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง ด้วย AM&BE พร้อมกัน (Simultaneous AM&BE catalysis)

การตัดแปรแป้งมันสำปะหลัง ด้วย AM&BE พร้อมกัน เป็นการวิเคราะห์ผลของการใช้ AM และ BE ในการตัดแปรแป้งพร้อมกัน โดยบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2.1G) โดยสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ BE จาก *Rhodothermus obamensis* คือ 60°C ที่ pH 6.5 ในขณะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ AM จาก *Thermus thermophilus* คือที่ 70°C ที่ pH 6.0 ผลการทดลองพบว่า การบ่มที่สถานะที่เหมาะสมของ BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเพิ่มสัดส่วนของสายกลูแคน ขนาดเล็ก (DP 3-20) ได้มากกว่า โดยสายกลูแคนที่ยาวกว่า (DP > 20) จะถูกใช้เป็นสารตั้งต้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สถานะที่เหมาะสมของ AM ในขณะที่การบ่มที่สถานะอื่น (60°C, 3 ชั่วโมง หรือ 70°C, 3 ชั่วโมงหรือ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ) สายกลูแคนที่มีความยาวช่วง DP 25-40 มีปริมาณเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การบ่มที่เวลานานกว่าเหมาะสมสำหรับ BE ในการเร่งการสร้างกิ่งมากกว่าการบ่มที่ระยะเวลาสั้น (ตารางที่ 4.2.1) อย่างไรก็ตาม AM และ BE ยังคงเร่งปฏิกิริยาการการตัด/ต่อสายกลูแคน แม้ว่าสถานะการบ่มจะไม่เหมาะสม นั้นแสดงให้เห็นว่าทั้งอะไมโลสและอะไมโลเพคตินเป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับ AM และ BE ในการเร่งปฏิกิริยา อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะกับอะไมโลส มากกว่าอะไมโลเพคติน (Shinohara และคณะ, 2001) นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า การเร่งปฏิกิริยาพร้อมกันของ AM และ BE ไม่ได้ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สูง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ตัดแปรด้วยเอนไซม์เป็นลำดับขึ้น (ตารางที่ 4.2.1)

จากการทดลองแสดงให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างการเร่งปฏิกิริยาพร้อมกันและต่อเนื่องแบบ AM&BE และการตัดแปรเป็นลำดับขั้นของเอนไซม์ (AM-->BE และ BE-->AM-->BE) โดยพบว่าการตัดแปรแบบ AM&BE เพิ่มพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ในผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร แต่ผลที่เกิดขึ้นนั้นไม่ตีไปกว่าการตัดแปรแบบ AM-->BE และ BE-->AM-->BE ตามลำดับ ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าเกิดการแข่งขันในการจับกับสารตั้งต้นระหว่าง AM และ BE ในระหว่างการเร่งปฏิกิริยา ที่สถานะที่เหมาะสมสำหรับ AM (70°C, pH 6.0),



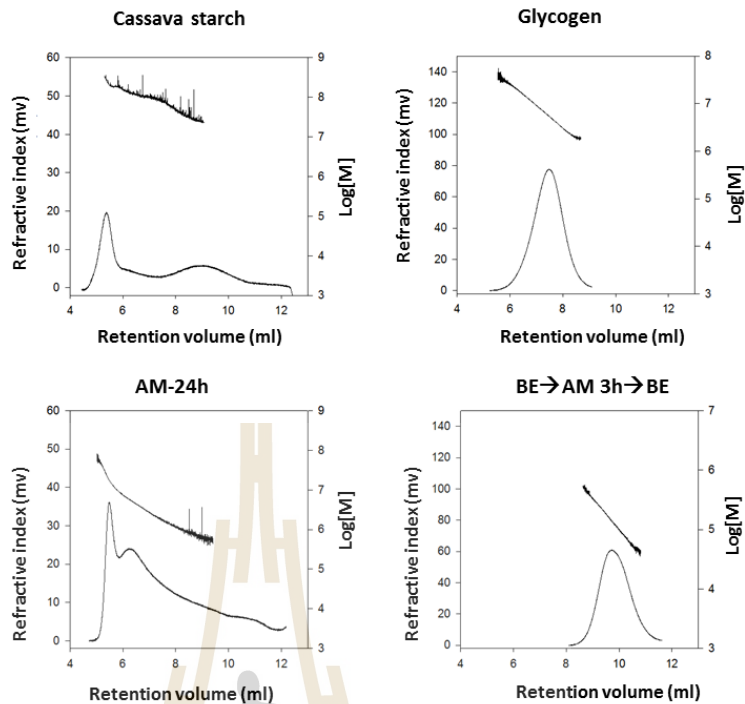


รูปที่ 4.2.1 การกระจายตัวของสายกลูแคน ของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร และผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ (A) การกระจายตัวของสายกลูแคนของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร และผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน, (B-G) Difference plots: (B) ตัวอย่างที่

กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของ BE นั้นเกิดขึ้นได้ไม่ดี ซึ่งทำให้ AM เกิดกิจกรรมการตัด/ต่ออะไมโลเพกตินคลัสเตอร์ใหม่ และการถ่ายโอนของสายอะไมโลสไปยังอะไมโลเพกตินคลัสเตอร์ (Bhuiyan และคณะ, 2003; Fujii และคณะ, 2007) ซึ่งทำให้การสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic เกิดขึ้นได้น้อย ในตัวอย่าง AM&BE (ตารางที่ 4.2.1) ผ่านการตัดแปรด้วย BE เปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร, (C) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย AM, (D) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย AM เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE, (E) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย AM, (F) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM (G) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย AM&BE เปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร

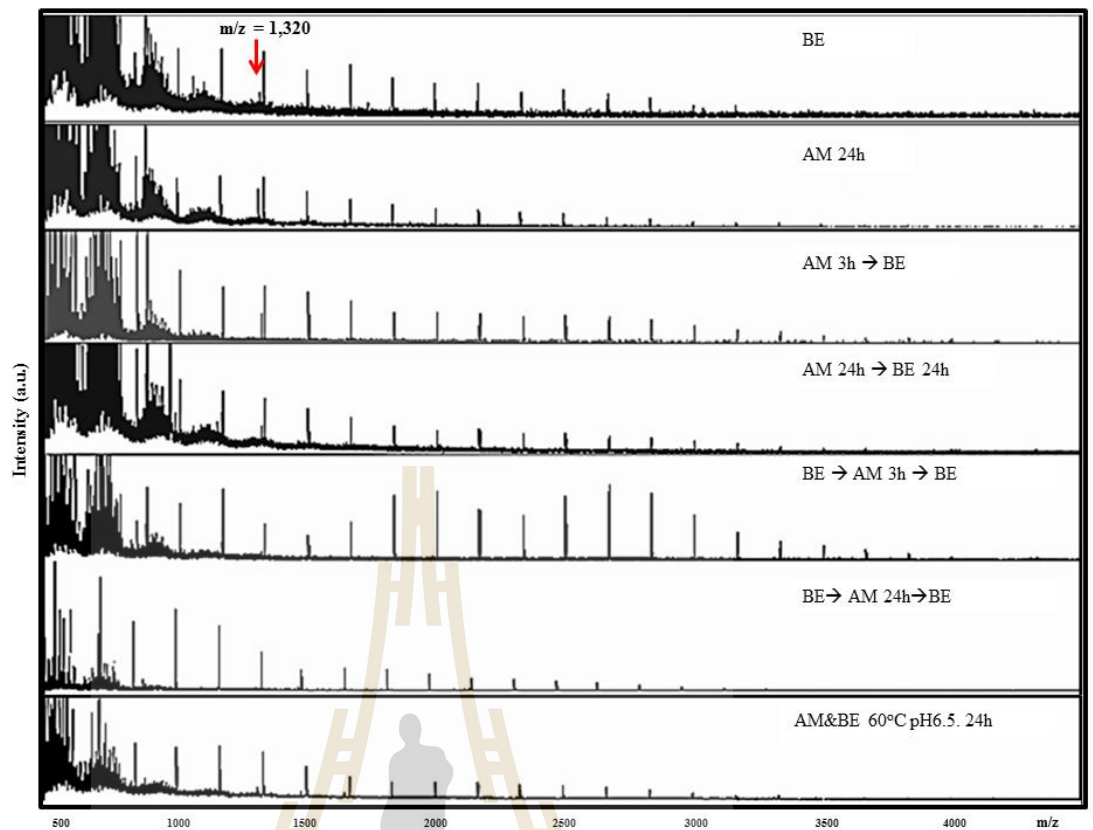
#### 4.2.3 ขนาดโมเลกุลและการสร้างโครงสร้างแบบ cyclo-structures (Molecular size และ cyclo-structures)

การถ่ายโอนตำแหน่งของสายกลูแคนจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายในสายกลูแคนนำไปสู่การเกิด cyclisation และการลดลงของขนาดโมเลกุล เพื่อทดสอบว่าการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ส่งผลให้เกิดการสร้างอะไมโลเพกตินคลัสเตอร์ และ/หรือการสร้างโครงสร้างแบบ cyclo-structures หรือไม่นั้น จึงทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดด้วยเครื่อง size-exclusion chromatography with triple detection array (SEC-TDA) ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างที่ได้รับการตัดแปรด้วย AM และ BE ทั้งหมด มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยลดลง ยกเว้นแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วย AM เพียงอย่างเดียว (AM-24h, รูปที่ 4.2.2) เมื่อเทียบกับโปรไฟล์ของไกลโคเจน พบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของตัวอย่างนั้นต่ำกว่าไกลโคเจนแสดงถึงการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะ  $\alpha$ -1,4 ระหว่างกลุ่มอะไมโลเพกติน พร้อมกับ การสร้างอะไมโลเพกตินคลัสเตอร์ การลดขนาดโมเลกุลหลังการตัดแปรด้วย BE ได้รับการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว (Kim และคณะ, 2008; Le และคณะ, 2009) และข้อมูลจากการทดลองนี้เป็นหลักฐานแรกสำหรับการที่ BE จาก *Rhodothermus obamensis* เร่งการสร้าง cyclo-amylopectin สำหรับการเร่งปฏิกิริยาของ AM พบว่ามีการสร้าง cyclization ของ amylopectin ได้เช่นกัน (Hansen และคณะ, 2008)



**รูปที่ 4.2.2** ขนาดโมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร และผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน โดยการใช้ size-exclusion chromatography with triple detection array (SEC-TDA)

เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างโดย MALDI-TOF (รูปที่ 4.2.3) สิ่งที่น่าสนใจที่สุดคือ การเกิด  $\gamma$ -cyclodextrin (DP 8-cyclodextrin,  $m/z = 1320$ ) และตรวจพบสารประกอบนี้ในแป้งดัดแปรทั้งหมดและโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างที่ผ่านการดัดแปรด้วย AM ค่า Polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) และ hydrodynamic volume ( $R_h$ ) (ตารางที่ 4.2.3) แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างแป้งดัดแปร มีค่า  $M_w/M_n$  ใกล้เคียงกับ glycogen และผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นลำดับขั้น มีค่า  $R_h$  ลดลง สอดคล้องกับการลดลงของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย



รูปที่ 4.2.3 การสร้าง cyclostructure ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วย เอนไซม์ โดยใช้ MALDI-TOF

จากตารางที่ 4.2.3 พบว่า cyclo- $\alpha$ -glucan ที่เล็กที่สุดที่พบ คือ DP 8 ( $\gamma$ -cyclodextrin) ซึ่งแตกต่างกับการทดลองก่อนหน้านี้โดย Bhuiyan และคณะ, (2003) และ Park และคณะ, (2007) ที่รายงานว่าไม่พบ  $\gamma$ -cyclodextrin นอกจากนี้ อะไมโลสที่ตัดแปรด้วย AM จาก *Thermus aquaticus* สามารถสร้าง cyclo-อะไมโลส ขนาด DP 19 ได้อีกด้วย (Park และคณะ, 2007)

#### 4.2.4 การศึกษาคุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปร (Amylolytic susceptibility evaluated *in vitro*)

เพื่อเลียนแบบการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งส่งผลต่อการย่อยของตัวอย่างแป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ AM และ BE จึงได้ทำการคัดเลือกตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง (รวมตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร) เพื่อนำไปทดสอบการย่อยโดยเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase, GA) จากการทดลองพบว่า แป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ AM และ BE ถูกย่อยด้วย PPA และ GA น้อยกว่าแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร โปรไฟล์การย่อยของตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปร เมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังและไกลโคเจนแสดงในรูปที่ 4.2.4 ถูกนำมา fit กับแบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง  $C = 1 - e^{-kt}$  โดยที่  $t$  คือเวลาการย่อย (min)  $C$  คือส่วนของแป้งที่ถูกย่อยที่เวลาหนึ่ง และ  $k$  คือค่าคงที่อัตราการย่อย ( $\text{min}^{-1}$ ) ค่า  $k$  ได้มาจากความชัน (slope) ของ linear-least-squares fit โดยการพล็อต  $\ln(1 - C)$

**ตารางที่ 4.2.3** น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย ( $M_w$ ), polydispersity index ( $M_w/M_n$ ) และ hydrodynamic volume (Rh) ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วย เอนไซม์, X แสดงว่าไม่มีตัดแปรด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนนั้น, BE: การตัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Samples	$M_w$ (kDa)	$M_w/M_n$	Rh (nm)
Cassava starch	128,800	2.9	137.8
Glycogen	6,870	1.5	45.5
BE	138	1.5	12.4
AM 3 h-->BE	137	1.7	12.3
AM 24 h-->BE	153	1.8	12.7
BE -->X-->BE	155	1.6	12.9
BE -->AM 3 h-->BE	206	1.6	14.1
BE --> AM 24 h-->BE	179	1.5	13.5
AM&BE 60°C, pH 6.5, 24 h	179	1.5	13.5

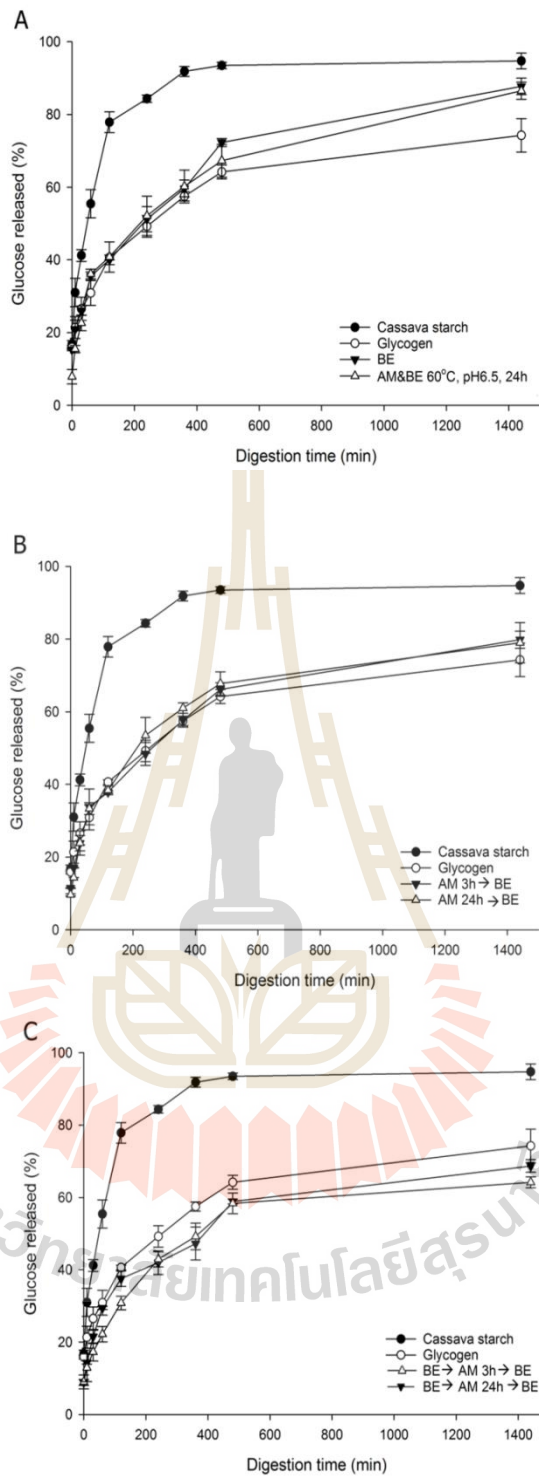
เทียบกับ  $t$  (Butterworth, Warren, Grassby, Patel และ Ellis, 2012; Zhang, Dhital, และ Gidley, 2013) (ตารางที่ 4.2.4 และรูปที่ 4.2.7) จากการทดลองตัวอย่างที่ตัดแปรด้วยเอนไซม์ ทั้งหมดมีค่าคงที่อัตราการย่อยต่ำกว่าแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร แสดงให้เห็นว่ามีสัดส่วนของสายกลูแคนที่ต้านทานการย่อยด้วยเอนไซม์ PPA และ GA ตัวอย่างแป้งตัดแปรโดยเอนไซม์ AM และ BE สามารถ fit กับจลนพลศาสตร์อันดับที่หนึ่ง ( $R^2 > 0.930$ , รูปที่ 4.2.7) ที่บ่งบอกถึง rate-limitation ในการเกิด enzyme-substrate complex เนื่องจาก steric hindrance ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่า อาจเกิดจากการที่ เอนไซม์ PPA และ GA ไม่สามารถเข้าไปจับกับโมเลกุลของ มอลโตส และมอลโตไตรโอส (maltotriose) ได้ ทำให้เกิดการย่อยที่ไม่มีประสิทธิภาพ ค่าคงที่อัตราการย่อย ( $k$ ) ของแป้งตัดแปรนั้นต่ำกว่าแป้งมันสำปะหลังอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสนับสนุนการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการตัดแปรแป้งด้วยการใช้ร่วมกับ BE ร่วมกับ  $\beta$ -amylase (Le และคณะ, 2009; Lee และคณะ, 2007) ค่า  $k$ -value ที่สูงแสดงว่ามีความไวสูงต่อการเร่งปฏิกิริยา -ของเอนไซม์ PPA และ GA โดยค่า  $k$ -value ของแป้งมันสำปะหลังและไกลโคเจนเท่ากับ  $5.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  และ  $1.7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  ตามลำดับ ในขณะที่ค่า  $k$ -value ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดแปรแบบ BE--> AM 3 h-->BE และ BE-->AM 24 h-->BE คือ  $1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  และ  $1.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  ตามลำดับและสำหรับ AM 3 h-->BE และ AM 24 h-->BE คือ  $1.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  และ  $2.1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  ตามลำดับ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดแปรแบบ BE-->AM-->BE จึงมีค่า  $k$  ต่ำกว่าตัวอย่างอื่นๆ



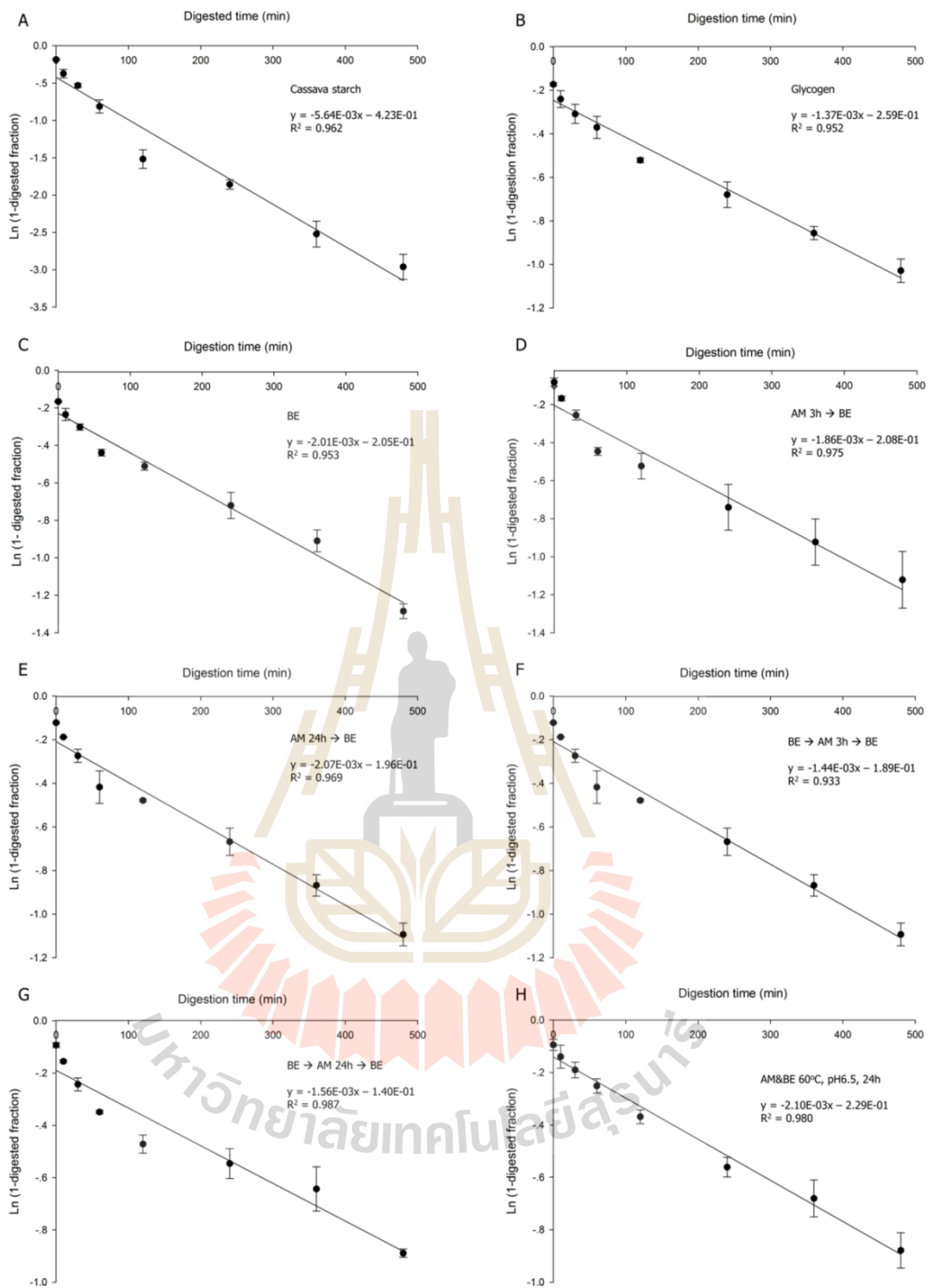
อย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นสำหรับไกลโคเจน ความแตกต่างนั้นเด่นชัดมากขึ้นเมื่อพิจารณาปริมาณ กลูโคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง (รูปที่ 4.2.5) ระดับของกลูโคสที่ปล่อยออกมา จากตัวอย่างทั้งหมดมีค่า 64.7-87.7% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างแห้ง โครงสร้างของสายกลู แคนที่เหลือสามารถพิจารณาได้ว่ามีความต้านทานต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารได้มาก

**ตารางที่ 4.2.4** ค่าคงที่อัตราการย่อย (k-value) ของแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการ ดัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน BE: การดัดแปรด้วย BE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ข้อมูลมาจากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ  $\pm$ SD ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่ ตัวอักษรต่างกัน แสดงให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ( $p < 0.05$ )

ตัวอย่าง	k (min <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>-3</sup>
แป้งมันสำปะหลัง	5.7±0.2 <sup>a</sup>
ไกลโคเจน	1.7±0.2 <sup>bc</sup>
BE 24 h	2.0±0.3 <sup>b</sup>
AM 3 h-->BE	1.9±0.1 <sup>bc</sup>
AM 24 h-->BE	2.1±0.2 <sup>b</sup>
BE-->AM 3 h-->BE	1.4±0.9 <sup>c</sup>
BE-->AM 24 h-->BE	1.6±0.2 <sup>c</sup>
AM&BE 60°C, pH 6.5, 24 h	2.1±0.1 <sup>b</sup>



รูปที่ 4.2.4 โพรไฟล์การย่อย ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน ด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA) และ glucoamylase (GA) เปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลัง



รูปที่ 4.2.5 จลนพลศาสตร์อันดับที่หนึ่ง (First-order kinetics model) ของการย่อยแป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ และไกลโคเจน ด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase (PPA) และ glucoamylase (GA)

### 4.3 การศึกษาหาอัตราส่วนระหว่างอะไมโลส และอะไมโลเพคตินที่เหมาะสมต่อการตัดแปรโดยใช้ เอนไซม์ตัดต่อสายกลูแคน (AM) และเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (BE) ต่อการเกิดโครงสร้างกิ่งและ คุณสมบัติการย่อยได้ช้า และต้านทานการย่อย

#### 4.3.1 ปริมาณพันธะ $\alpha$ -1,6 glycosidic

ตัวอย่างแป้งที่มีอัตราส่วนระหว่างอะไมโลส และอะไมโลเพคตินตั้งแต่ 0, 20, 40, 60, 10 และ 100% ได้การผสมแป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (amylose only barley starch, AO) และแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy maize starch, WX) ได้รับการตัดแปรด้วยเอนไซม์ด้วย BE และ BE-->AM-->BE และวิเคราะห์ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ของ AO, WX และแป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ โดย  $^1\text{H-NMR}$  (ตารางที่ 4.3.1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแป้งตัดแปรด้วยเอนไซม์มีปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ AO และ WX โดยตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE มีปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ในช่วง 7.0-8.7% และตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE มีปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ในช่วง 8.0 -9.7% ในขณะที่ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ของ AO คือ 0.2% และ WX คือ 3.5% นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ AO ในสัดส่วนที่ใช้เป็นสารตั้งต้นมากขึ้น จะทำให้เอนไซม์มีอัตราการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic มากขึ้น (ตารางที่ 4.3.1) การเพิ่มขึ้นของการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สำหรับตัวอย่าง 0% AO ที่ตัดแปรด้วย BE เท่ากับ 1.5 เท่า ในขณะที่ตัวอย่าง 100% AO แสดงการเพิ่มขึ้น 34.0 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งก่อนตัดแปร (ตารางที่ 4.3.1) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลจาก Shinohara และคณะ (2001) ที่รายงานว่าเอนไซม์ BE จาก *R. obamensis* สามารถเร่งปฏิกิริยาการตัดต่อกิ่งของอะไมโลสสูงกว่าอะไมโลเพคติน 6 เท่า (Shinohara และคณะ, 2001) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Roussel และคณะ, (2013) ที่ทดลองโดยใช้อะไมโลสสังเคราะห์ DP 2-60 เป็นสารตั้งต้นให้กับเอนไซม์ BE จาก *R. obamensis* พบว่า BE สามารถใช้สายกลูแคนที่มีลักษณะกิ่งเป็น acceptor ได้ ดังนั้นจากการทดลองจึงอภิปรายได้ว่าตัวอย่างที่ได้จากการตัดแปรแบบ BE-->AM-->BE นั้น การใช้ BE ในขั้นตอนสุดท้าย สามารถใช้สายกลูแคนที่มีลักษณะกิ่ง นั่นคือ AO ที่มีลักษณะกิ่งจากการตัดแปรด้วย BE ในขั้นตอนแรก เป็นทั้งสารตั้งต้นแบบ donor และ acceptor ได้ อย่างไรก็ตาม การเร่งปฏิกิริยาการตัดต่อกิ่งของ BE กับ WX นั้นอาจถูกจำกัด ด้วยลักษณะของ WX มีกิ่งยาวจำนวนมากซึ่งทำให้เกิด branching steric hindrance ที่ขัดขวางการทำงานของ BE ได้ ทำให้อัตราการเพิ่มของพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic น้อยกว่าการใช้ AO เป็นสารตั้งต้นในอัตราที่มากกว่า อย่างไรก็ตาม ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ที่ได้จากการตัดแปร WX มีค่ามากกว่า AO เนื่องจาก WX มีปริมาณ  $\alpha$ -1,6 glycosidic เริ่มต้นมากกว่า AO ซึ่งผลการทดลองนี้อาจเป็นแนวทางในการเลือกใช้ประเภทของแป้งในการตัดแปรด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม  $\alpha$ -transglucosidases ได้

**ตารางที่ 4.3.1** ปริมาณและอัตราการเพิ่มขึ้นของ  $\alpha$ -1,6 ของตัวอย่างแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) แป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (AO) และแป้งที่มีอัตราส่วนของ AO:WX ที่แตกต่างกันและตัดแปรด้วยเอนไซม์ด้วย BE และ BE-->AM-->BE

ตัวอย่าง	ปริมาณ AO (%)	ปริมาณ $\alpha$ -1,6 (%)	อัตราการเพิ่มขึ้นของ $\alpha$ -1,6 (เท่า)**
WX	0	3.5	-
AO	100	0.2*	-
BE	0	8.7	1.5
	20	8.4	2.0
	50	8.2	3.4
	80	7.2	7.4
	100	7.0	34.0
BE-->AM-->BE	0	9.7	1.8
	20	8.9	2.1
	50	8.7	3.7
	80	8.5	8.9
	100	8.0	39.0

\*ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 คำนวณจาก  $^1\text{H-NMR}$  ยกเว้น AO ที่คำนวณจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

\*\*อัตราการเพิ่มขึ้นของพันธะ  $\alpha$ -1,6 คำนวณเปรียบเทียบกับสารตั้งต้น ตามตารางที่ 4.3.2

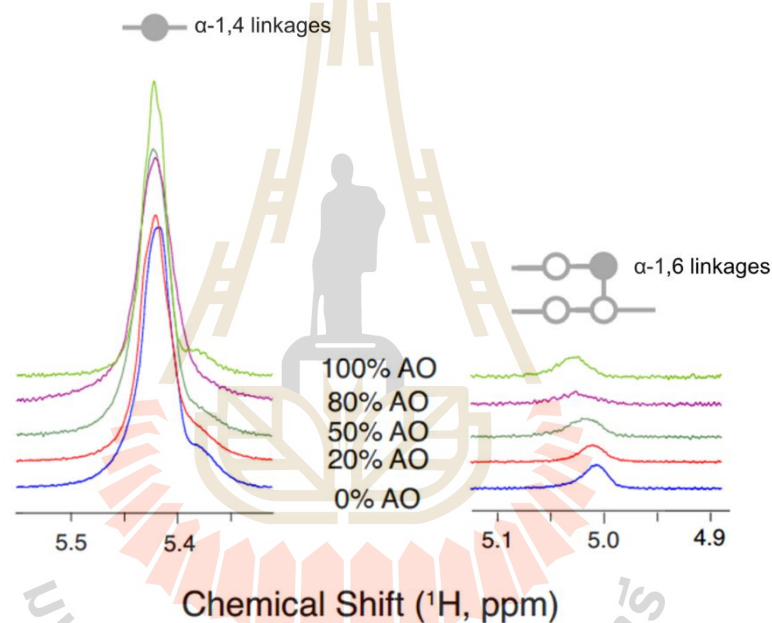
**ตารางที่ 4.3.2** ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic เริ่มต้นของแป้งผสมระหว่าง AO และ WX ก่อนการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE

ตัวอย่าง	ปริมาณ AO (%)	ปริมาณ $\alpha$ -1,6 เริ่มต้น (%)
WX	0	3.5
AO	100	0.2*
BE or BE-->AM-->BE	0	3.5
	20	2.8
	50	1.9
	80	0.9
	100	0.2*

\*คำนวณจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



แป้งผสมที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE แสดงให้เห็นว่ามีปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตัดแปรด้วย BE เพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 4.3.1) ข้อมูลนี้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น (Sorndech และคณะ, 2015) การเพิ่มขึ้นของปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic สำหรับ 0% AO (เฉพาะ WX, amylopectin) ที่ ได้รับการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE คือ 1.8 เท่า เมื่อเทียบกับสารตั้งต้น WX ในขณะที่ 100% AO เพิ่มขึ้น 39.0 เท่า การเพิ่มขึ้นเหล่านี้จะสูงกว่าการใช้ BE เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า AM ตัดแปรแป้งผสมให้เกิดโครงสร้างที่เหมาะสมสำหรับ BE ในการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic การตัดแปรแป้งผสมด้วย BE และ BE-->AM-->BE แสดงให้เห็นว่าปริมาณ AO ที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดการสร้าง น้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นด้วย จึงสามารถอธิบายได้ว่าเอนไซม์มีการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ด้วย ซึ่ง ข้อมูลจาก  $^1\text{H-NMR}$  แสดงให้เห็นพีคของ  $\alpha$ -กลูโคส ที่ 5.30 ppm (รูปที่ 4.3.1)

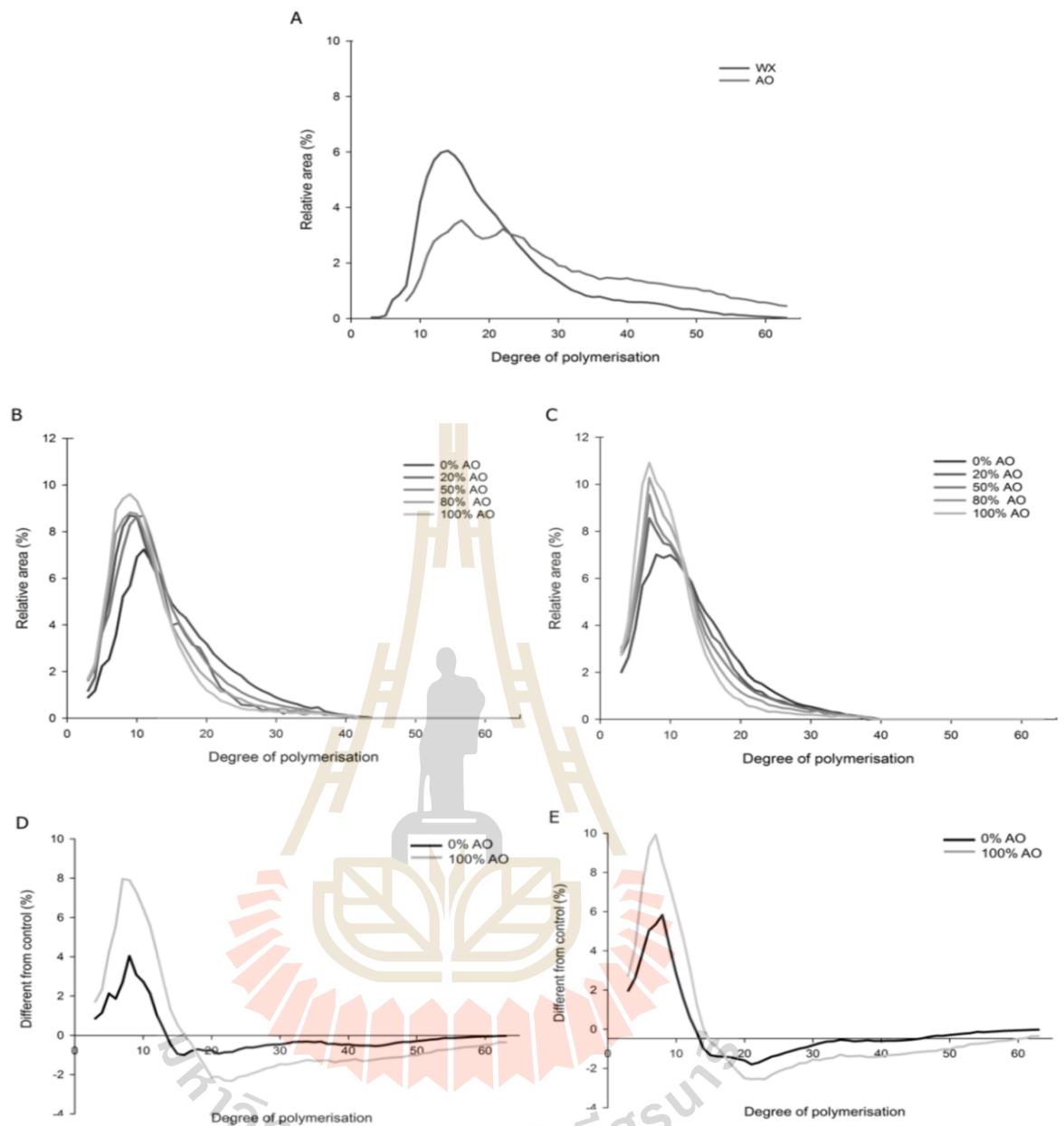


**รูปที่ 4.3.1**  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของตัวอย่างแป้งผสมที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE โดยวงกลมสีเขียวแสดงถึงกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,4 linkages และวงกลมสีเทาแสดงถึงกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1,6 linkages และตัวอย่างของตัวอย่าง ประกอบด้วย แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) และแป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (AO)

#### 4.3.2 ค่าเฉลี่ยการกระจายตัวของสายกลูแคน (Average chain-length distribution)

แป้งผสมระหว่าง AO และ WX ที่อัตราส่วนต่างๆ และแป้งผสมที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE หลังจากการตัดกิ่ง (debranching) โดยเอนไซม์ไอโซอะไมเลส (isoamylase) เพื่อวิเคราะห์การกระจายตัวของสายกลูแคนระหว่าง DP 3-65 โดยใช้ HPAEC-PAD การกระจายของสายกลูแคนสามารถแบ่งกลุ่มได้ดังนี้ A-chain (DP 6-12), B1-chain (DP 13-24), B2-chain (DP 25-36) และ B3-chains ยาว (DP > 37) (Hanashiro, Abe และ Hizukuri, 1996) แป้งผสมที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE มีจำนวนสายกลูแคนแบบ A-chain, DP 3-12 สูงกว่า เมื่อ

เปรียบเทียบกับ AO และ WX (รูปที่ 4.3.2A ตารางที่ 4.3.3) สำหรับแบ่งที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE นั้น พบว่าการลดลงของสายกลูแคนที่มี DP > 12 (ตารางที่ 4.3.3) แสดงให้เห็นว่า BE ใช้สายกลูแคนในกลุ่มของ B1, B2 และสายยาวเป็นสารตั้งต้นในการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 linkages ด้วยการสร้าง A-chain เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ สายกลูแคนที่ยาว (ส่วนใหญ่เป็นสายโซ่ B3) ไม่สามารถตรวจพบได้จากโครมาโตแกรมหลังจากการตัดแปรแบ่งผสมด้วยเอนไซม์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า BE และ AM ใช้สายกลูแคนในกลุ่ม B3 เป็นสารตั้งต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับแบ่ง AO 0% ที่ได้รับการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE เท่านั้น ทำให้สายกลูแคน DP 3-13 มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่สายกลูแคน DP  $\geq$  14 ลดลง (รูปที่ 4.3.2D) อย่างไรก็ตามสำหรับแบ่ง AO 100% ที่ผ่านการตัดแปรนั้น พบว่ามีการลดลงของสายกลูแคนที่มี DP  $\geq$  17 เพียงเล็กน้อย (รูปที่ 4.3.2D) จากข้อมูลนี้จะสังเกตเห็นว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วน AO ในแบ่งผสม ทำให้ BE มีความจำเพาะกับการเลือก donor substrate ที่มีความยาวมากขึ้น โดยจะพบว่ามีการใช้ donor substrate ที่ความยาว DP 13 สำหรับ 0% AO และที่ความยาว DP 16 สำหรับ 100% AO ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า BE ชอบสายกลูแคนยาวเมื่อใช้ AO เป็น donor substrate (รูปที่ 4.3.5C) อย่างไรก็ตาม พบว่ามีปริมาณของสายกลูแคน DP 3-12 เกิดขึ้นก่อนการตัดกิ่งด้วยเอนไซม์ไอโซอะไมเลส ซึ่งสายกลูแคนสั้นที่เกิดขึ้นนี้ มีปริมาณมากขึ้นเมื่อตัดแปรแบ่งผสมที่มีอัตราส่วนของ AO เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการสายกลูแคนที่เหลือจากการเร่งปฏิกิริยาของ BE และทั้งส่วนของสายสั้นไว้ เนื่องจาก BE ไม่สามารถนำไปทำปฏิกิริยาต่อได้ จากข้อมูลของเรานั้นความยาวสายกลูแคนที่เหมาะสมสำหรับ BE คือ DP 16 และสำหรับการถ่ายโอนสายกลูแคนเพื่อสร้างกิ่งคือ DP 6-7 จากปลาย non-reducing end (รูปที่ 4.3.2D) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Kittisuban, Lee, Suphantharika และ Hamaker, 2014; Roussel และคณะ, 2013) ที่ใช้ BE จาก *R. obamensis* ในการตัดแปรแบ่งชนิดต่างๆ นอกจากนี้การตัดแปรแบ่งผสมโดยใช้ BE-->AM-->BE แสดงให้เห็นการเพิ่มขึ้นของ DP 3-12 อย่างชัดเจน และมีการลดลงของ DP  $\geq$  12 เมื่อตัดแปรแบ่งที่มีอัตราส่วนของ AO ที่สูงขึ้น (รูปที่ 4.3.2C) สำหรับการใส่ 100% AO นั้นพบว่ามี การลดลงของสายกลูแคน DP  $\geq$  15 (รูปที่ 4.3.2C และ E) อย่างไรก็ตาม แบ่งที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE-->AM-->BE แสดงให้เห็นว่าความยาวของ donor substrate ที่เหมาะสมคือ DP 15 ซึ่งสั้นกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแบ่งผสมที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์โดย BE (DP 17) ซึ่งบ่งชี้ว่าการเร่งปฏิกิริยาด้วย AM ที่มีประสิทธิภาพกับสารตั้งต้นชนิด AO จากการทดลองของ Kaper และคณะ, (2007) พบว่าการเร่งปฏิกิริยาของ AM จาก *Thermus thermophilus* สามารถ transfer สายกลูแคนที่มีความยาวอย่างน้อย DP 3 ได้ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับแบ่งที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์โดย BE เพียงอย่างเดียว สายกลูแคนที่ทำหน้าที่เป็น donor substrate ที่เหมาะสมที่สุดของ BE นั้น จะถูกนำไปใช้หลังจากการตัดแปรด้วย BE-->AM ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสายกลูแคนสั้นๆ ในขั้นตอนสุดท้ายที่ตัดแปรด้วย BE อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้แตกต่างจากข้อมูลที่ได้จากการตัดแปรแบ่งด้วย BE จาก *Bacillus* sp. ซึ่งความยาวของ donor substrate ที่เหมาะสมนั้นคือ DP 12 (Kiel, Boels, Beldman และ Venema, 1991)



รูปที่ 4.3.2

การกระจายตัวของสายกลูแคนของ (A) AO และ WX, (B) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE, (C) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE, (D-E) Difference plots; (D) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE เปรียบเทียบกับ AO และ WX, (E) ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE เปรียบเทียบกับ AO และ WX และตัวอย่างของตัวอย่างประกอบด้วย แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) และ แป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (AO)

**ตารางที่ 4.3.3** การกระจายตัวของสายกลูแคนของ AO, WX, ตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE-->AM-->BE ตัวอย่างของตัวอย่างประกอบด้วย แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (WX) และแป้งอะไมโลสบาร์เลย์ (AO)

% Distribution	WX	AO	BE treated					BE-->AM-->BE treated				
			0% AO	20% AO	50% AO	80% AO	100% AO	0% AO	20% AO	50% AO	80% AO	100% AO
DP 3-12	20.5	14.6	42.2	58.6	58.5	62.5	67.8	54.3	61.9	65.0	70.6	77.7
DP 13-24	54.2	37.8	45.6	36.7	40.0	31.9	28.4	37.9	32.8	29.8	25.3	19.8
DP 25-36	16.6	22.0	11.2	4.1	7.2	5.1	3.3	6.5	5.2	5.1	3.8	2.3
DP > 37	8.7	25.6	1.0	0.7	0.7	0.5	0.7	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2

### 4.3.3 Molar mass และการสร้างโครงสร้างแบบ cyclo-structures (Molar mass distribution และ cyclo-structures formation)

การเปลี่ยนแปลงของ molar mass distribution ( $\overline{M}_w$ ) hydrodynamic radius ( $R_h$ ), dispersity ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ) และ intrinsic viscosity (IV) ของแป้งผสมที่มีอัตราส่วนของ AO และ WX ที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ ได้รับวิเคราะห์โดยเครื่อง SEC-TDA ส่วนแป้ง AO และ WX ถูกวิเคราะห์โดย AF4-MALLS ดังสรุปในตารางที่ 4.3.4 ผลการทดลองพบว่า molar mass ของ WX เท่ากับ  $3.99 \times 10^8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  ในขณะที่ AO มีค่า  $5.50 \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  แป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE ทั้งหมดมีค่า  $\overline{M}_w$  ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ WX และ AO ข้อมูลนี้บ่งชี้ว่าในระหว่างปฏิกิริยาการ transfer มีกิจกรรมการไฮโดรไลซิสเกิดขึ้น อาจเกิดในลักษณะของการสร้างอะไมโลเพกตินคลัสเตอร์ (ตารางที่ 3.4 และรูปที่ 4.3.3) จากตัวอย่างทั้งหมดพบว่าค่า intrinsic viscosity ไม่มีมีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรทั้งหมด และพบว่า molar mass ของตัวอย่างแป้งผสมที่มีอัตราส่วนของ AO สูง นั้น มีความหนาแน่นของโมเลกุลสูงตามไปด้วย เมื่อเทียบกับการใช้อะไมโลสสังเคราะห์ DP 2-60 และอะไมโลเพกตินจากแป้งมันฝรั่ง เป็นสารตั้งต้น และตัดแปรด้วย BE จาก *R. obamensis* แสดงให้เห็นว่าอะไมโลเพกตินจากแป้งมันฝรั่งเป็นสารตั้งต้นที่ดีกว่าอะไมโลสสังเคราะห์ และสายกลูแคนที่มียาวกว่า DP 11 ทำหน้าที่เป็น donor substrate ที่เหมาะสมในการสร้างกิ่ง (Roussel และคณะ, 2013) ข้อมูลนี้สอดคล้องกับข้อมูลของเราเนื่องจากการใช้ BE ในขั้นตอนสุดท้าย (BE-->AM-->BE) มีการเร่งปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อ AO ที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE ในขั้นตอนแรก (BE-->AM-->BE) นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้ BE และได้โครงสร้างของแป้งตัดแปรที่มีขนาดโมเลกุลลดลง (Kim, Ryu, Bae, Huong และ Lee, 2008; Le และคณะ, 2009) อย่างไรก็ตามผลกระทบที่สำคัญที่สังเกตได้จากการทดลองคือ แป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วย BE และ BE-->AM-->BE มีการเพิ่มขึ้นของ molar mass เมื่อเพิ่มสัดส่วนของ AO:WX substrate (ตารางที่ 4.3.4) ผลที่ได้สามารถอธิบายได้ว่า BE นั้นมีความจำเพาะที่จะใช้ AO เป็นทั้ง donor และ acceptor substrate

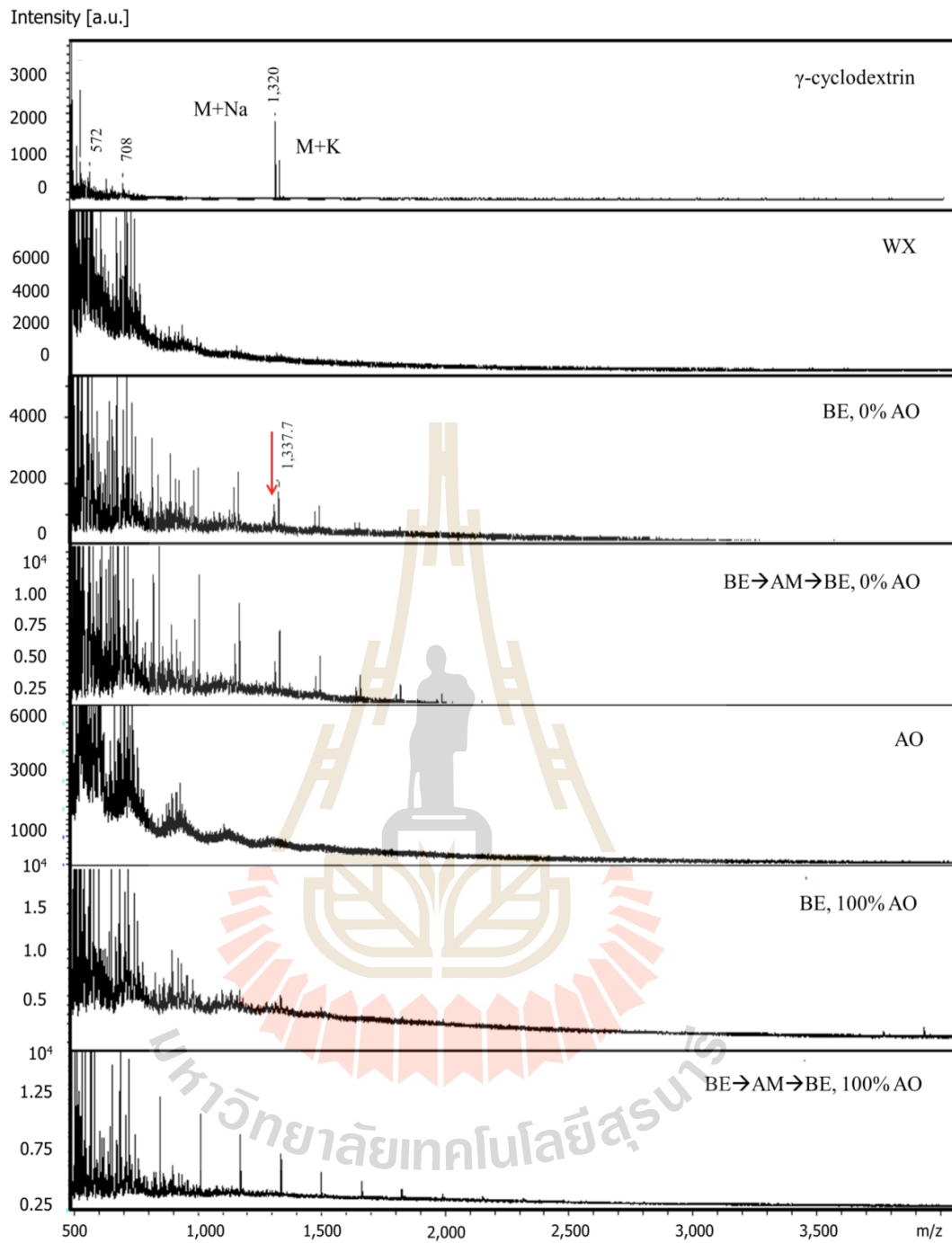


**ตารางที่ 4.3.4** Molar mass distribution ( $\bar{M}_w$ ), hydrodynamic radius ( $R_h$ ), dispersity index ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n$ ), intrinsic viscosity (IV) และ molecular density ของแป้งผสมที่มีอัตราส่วนของ AO และ WX ที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ซึ่งวิเคราะห์โดย SEC (Viscotek-TDA system) ซึ่ง AO และ WX ที่ไม่ผ่านการตัดแปรนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง AF4-MALLS

ตัวอย่าง	ปริมาณ AO (%)	$\bar{M}_w$ ( $\times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$R_h$ (nm)	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	IV ( $\text{dL}\cdot\text{g}^{-1}$ )	Molecular density ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{nm}^{-3}$ )
WX*	0	399,000	N.A.	1.4	N.A.	N.A.
AO*	100	5,500	N.A.	6.2	N.A.	N.A.
BE	0	154	12.5	1.7	1.0	18.8
	20	175	13.3	1.6	1.0	17.8
	50	261	15.2	1.6	1.0	17.7
	80	426	17.9	1.6	1.0	17.7
	100	1,000	27.1	1.6	1.0	12.0
BE-->AM-- >BE	0	166	13.0	2.9	1.0	18.0
	20	291	15.9	2.6	1.0	17.3
	50	368	17.3	1.4	1.0	17.0
	80	517	19.1	1.8	1.0	17.7
	100	912	23.9	2.0	1.0	15.9

\*ค่า radius of gyration,  $R_g$  สำหรับ WX และ AO เท่ากับ 281.0 และ 139.0 nm, ตามลำดับ.  
N.A.; Not Available.

ผลของเอนไซม์ในการสร้าง cyclodextrins ขนาดเล็กได้รับการทดสอบโดย MALDI-TOF (รูปที่ 4.3.3) โดยสามารถตรวจพบ  $\gamma$ -cyclodextrin (DP8,  $m/z$  1,320) จากการทดลองที่มีการตัดแปรด้วย AM ซึ่งการลดลงของ molar mass ของตัวอย่างสอดคล้องกับการพบ cyclodextrin, cyclo-amylose (รูปที่ 3.5D) และ cyclo-amylopectin clusters (รูปที่ 4.3.5B) ดังนั้นการลดลงของอัตราการลดลงของ AO จึงเป็นผลมาจากการผลิต cyclo-amylopectin อย่างไรก็ตามควรพิจารณาถึงการเกิด aggregation ของ AO หลังจากการตัดแปรด้วยเอนไซม์ด้วย (รูปที่ 4.4.5E) ดังนั้นการลดลงของ  $\bar{M}_w$  ของตัวอย่างหลังจากการทำปฏิกิริยากับ AM และ BE อาจเป็นผลมาจากการรวมตัวกันของสายกลูแคนที่ได้จากการไฮโดรไลซิส การเกิดอะไมโลเพคตินคลัสเตอร์ และ cyclo-structures อย่างไรก็ตามค่า dispersity index ที่แสดงการเป็น monodispersity ของตัวอย่างแป้งตัดแปร แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเกิดขึ้นน้อยมาก

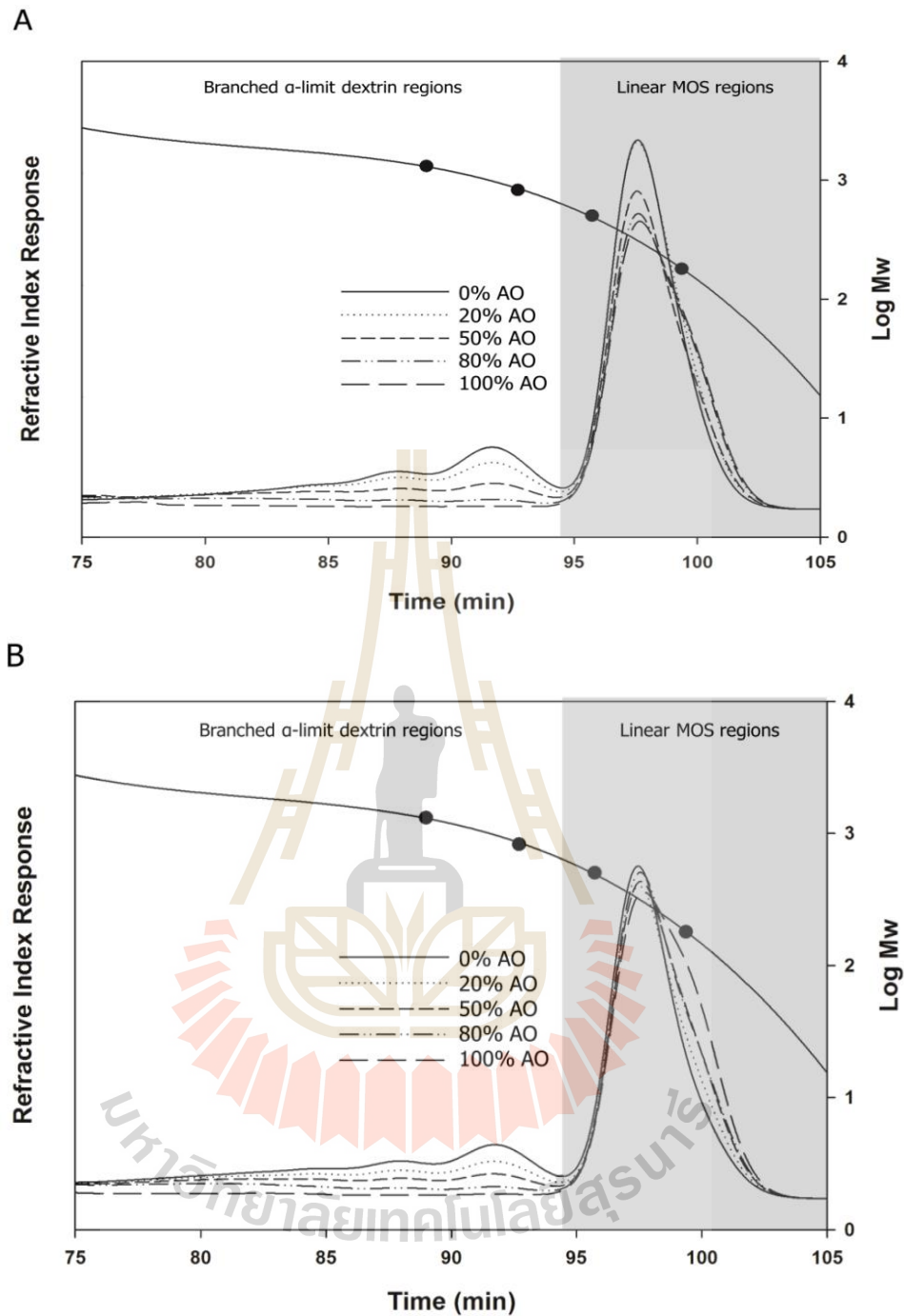


รูปที่ 4.3.3 การเกิด cyclo-structures วิเคราะห์โดย MALDI-TOF (ลูกศรสีแดงแสดงการเกิด cyclo-structures)

#### 4.3.4 โครงสร้าง $\alpha$ -limit dextrin และ $\beta$ -amylolysis limit

ปริมาณ  $\alpha$ -limit dextrin และ  $\beta$ -amylolysis limit ได้ถูกวิเคราะห์เพื่ออธิบายโครงสร้างโมเลกุลของตัวอย่างแปงตัดแปรรูป  $\alpha$ -limit dextrin วิเคราะห์โดย HPSEC-RI ในขณะที่  $\beta$ -amylolysis limit ถูกวิเคราะห์โดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังจากย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์  $\beta$ -amylase (Nelson, 1944) ตัวอย่างแปงตัดแปรรูปที่มีปริมาณกิ่งมาก สอดคล้องกับปริมาณ  $\alpha$ -limit dextrin ที่มากขึ้นด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับ AO และ WX ที่ไม่ผ่านการตัด (ตารางที่ 4.3.5) อย่างไรก็ตาม  $\beta$ -amylolysis limit ของตัวอย่างมีค่าลดลงซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์หลังจากการตัดแปรรูปด้วย BE และ AM สามารถถูกย่อยด้วย  $\beta$ -amylase ต่ำกว่าแปงที่ไม่ผ่านการตัดแปรรูป แปงที่ผ่านการตัดแปรรูปด้วย BE และ BE-->AM-->BE นั้นมีการสร้าง  $\alpha$ -limit dextrin เล็กน้อย และ  $\beta$ -amylolysis limit ที่ต่ำเมื่ออัตราส่วน AO เพิ่มขึ้น การลดลงของ  $\alpha$ -limit dextrin นั้นคล้ายคลึงกันสำหรับการตัดแปรรูปด้วย BE และ BE-->AM-->BE ตัวอย่างที่ตัดแปรรูปด้วย BE แสดงให้เห็นว่ามีค่าตั้งแต่ 32.3% (0% AO) ถึง 6.5% (100% AO) สำหรับตัวอย่างที่ตัดแปรรูปด้วย BE--> AM-->BE มีค่าตั้งแต่ 34.5% (0% AO) ถึง 7.3% (100% AO) (ตารางที่ 3.5, รูปที่ 3.4) ข้อมูลที่ได้บ่งบอกว่ามีปริมาณโครงสร้างกิ่งน้อยลงเมื่อมีปริมาณ AO เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ในตารางที่ 4.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณ  $\alpha$ -limit dextrin นั้นต้องทำการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ซึ่งความจำเพาะของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase คือ จะย่อยสายกลูแคนแบบสุ่ม (Bijttebier, Goesaert และ Delcour, 2008) และต้องการสายกลูแคนที่มีความยาวอย่างน้อย 4 กลูโคสยูนิตที่คั่นอยู่ระหว่างโครงสร้างกิ่งสองตำแหน่ง เพื่อทำการย่อยออกเป็นกลูแคนสายสั้น (Damager และคณะ, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Kและรา, Gyémánt, Remenyik, Hovánszki และ Lipták, 2002) ที่แสดงให้เห็นว่า  $\alpha$ -amylase จะย่อยสายกลูแคนที่ยาวจากปลาย reducing end เมื่อพิจารณาผลการทดลองของเราที่พบว่าค่า  $\alpha$ -limit dextrin ของตัวอย่างแปงตัดแปรรูปนั้นลดลงเมื่อ AO เพิ่มขึ้น อาจเกิดจากการเกิดโครงสร้างของสายกลูแคนที่มีกิ่ง และขัดขวางการทำงานของ  $\alpha$ -amylase ดังนั้นข้อมูลของเราจึงยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนว่า ตัวอย่างแปงตัดแปรรูปมีความห่างระหว่างกิ่งเท่ากับที่กลูโคสยูนิต ซึ่งประมาณการว่าแปงตัดแปรรูปมีความห่างระหว่างกิ่งนั้นสั้นกว่าหรือเท่ากับสี่หน่วยกลูโคส (รูปที่ 4.3.5C)

การย่อยตัวอย่างแปงตัดแปรรูปด้วย  $\beta$ -amylase พบว่า แปงตัดแปรรูปที่เกิดจากการใช้ BE มีค่า  $\beta$ -amylolysis limit ลดลงจาก 20.0% เป็น 33.3% เมื่อเพิ่มปริมาณ AO จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า BE มักใช้ AO เป็น donor substrate โดยนำไปสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ที่บริเวณใกล้ปลาย non-reducing end ของสายกลูแคนที่ทำหน้าที่เป็น acceptor substrate ซึ่งทำให้  $\beta$ -amylase ไม่สามารถย่อยได้ (รูปที่ 4.3.5C) นอกจากนี้ค่า  $\beta$ -amylolysis limit จากตัวอย่างที่ตัดแปรรูปด้วย BE มีค่ามากกว่าตัวอย่างที่ตัดแปรรูปด้วย BE-->AM-->BE ซึ่งมีค่าลดลงจาก 21.4% เป็น 12.2% เมื่อเพิ่มปริมาณ AO (ตารางที่ 4.3.5) ผลการทดลองนี้ยืนยันว่า AM เร่งปฏิกิริยาการเกิด disproportion ในตัวอย่างที่ตัดแปรรูปด้วย BE--> AM-->BE ซึ่งทำให้เกิดโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแปงตัดแปรรูปที่เกิดจากการใช้ BE เพียงอย่างเดียว จากข้อมูลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าหากใช้แปงที่มีปริมาณอะไมโลสสูงกว่าอะไมโลเพกติน จะทำให้ระยะห่างระหว่างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic นั้นยาวมากขึ้น และโครงสร้างกิ่งนั้นมักจะเกิดที่ปลาย non-reducing end ของสายกลูแคนที่ทำหน้าที่เป็น acceptor substrate



รูปที่ 4.3.4 Molar mass distribution ของตัวอย่างที่วิเคราะห์โดย HPSEC-RI หลังการย่อยด้วย  $\alpha$ -amylase พื้นที่สีเทาแสดงถึงโครงสร้าง  $\alpha$ -limit dextrin แบบเส้นตรง และพื้นที่สีขาวแสดงถึงโครงสร้าง  $\alpha$ -limit dextrin แบบกิ่ง โดย  $\text{Log } \overline{M}_w$  คือ  $\overline{M}_w$  ที่คำนวณจากการใช้ linear pullulan เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 4.3.5 พื้นที่ใต้กราฟ (%) ของ  $\alpha$ -limit dextrin แบบกึ่ง หลังการย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase เปรียบเทียบกับ  $\beta$ -amylolysis limit

ตัวอย่าง	ปริมาณ AO (%)	พื้นที่ใต้กราฟของ $\alpha$ -limit dextrin แบบกึ่ง (%)	$\beta$ -amylolysis limit (%)
WX	0	27.0	47.9
AO	100	3.8	64.8
BE	0	32.3	33.3
	20	27.8	29.3
	50	23.6	25.8
	80	14.3	21.1
	100	6.5	20.0
BE-->AM-->BE	0	34.5	21.4
	20	29.5	18.7
	50	23.1	14.7
	80	14.9	13.2
	100	7.3	12.2

#### 4.3.5 การศึกษาคุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปร

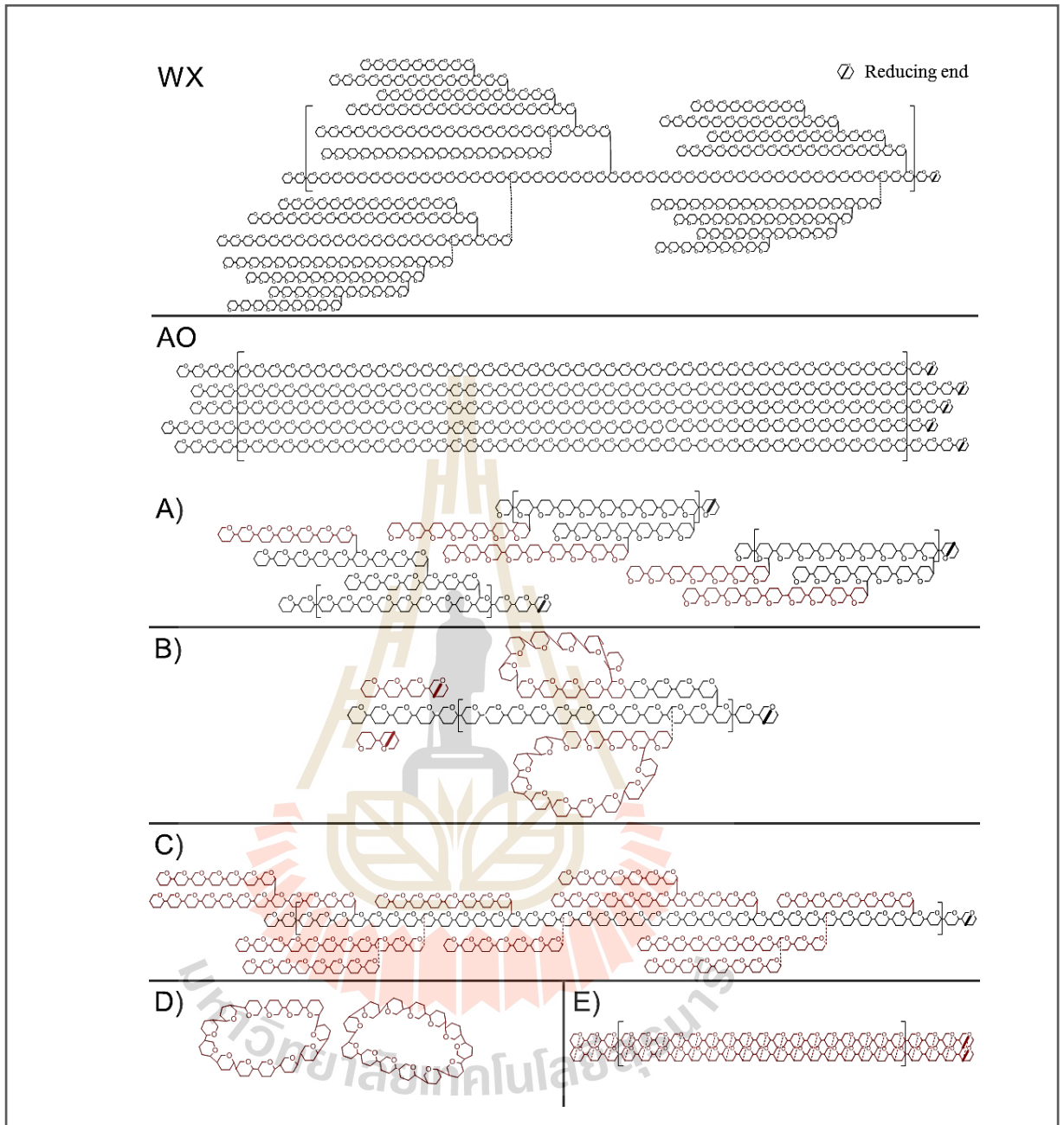
การศึกษาคุณสมบัติด้านการย่อยของตัวอย่างแป้งตัดแปร เพื่อตรวจสอบลักษณะการสร้างกิ่งที่ได้จาก  $\alpha$ -limit dextrins (รูปที่ 4.3.2) โดยการย่อยด้วย  $\alpha$ -glucosidases จากลำไส้ของหนู หลังจากการไฮโดรไลซิสตัวอย่างด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จากตับอ่อนของมนุษย์ โดย  $\alpha$ -glucosidases จากลำไส้ของหนู ประกอบด้วย maltase-glucoamylase (MGAM) และ sucrase-isomaltase (SI) และเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยพันธะ  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,6 ตามลำดับ (Lin และคณะ, 2012) ผลการทดลองพบว่าปริมาณกลูโคสที่ปลดปล่อยออกมาจากแป้งที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE และ BE-->AM-->BE ทั้งหมด และผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จากตับอ่อนของมนุษย์ และ  $\alpha$ -glucosidases จากลำไส้ของหนู คือ  $4.3-5.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  และ  $3.8-5.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ตามลำดับ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของ AO (ตารางที่ 4.3.6) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างปริมาณของ  $\alpha$ -limit dextrins แบบกึ่ง และปริมาณของกลูโคส  $\alpha$ -limit dextrins ที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE-->AM-->BE เมื่อนำมาย่อยด้วย  $\alpha$ -glucosidases พบว่ามีปริมาณกลูโคสน้อยกว่าตัวอย่างที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE เพียงอย่างเดียว ผลลัพธ์นี้แสดงให้เห็นว่า AM มีกิจกรรมการ disproportion ทำให้เกิดโครงสร้างที่ซับซ้อน และยากต่อการย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidases นอกจากนี้จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าอัตราการย่อยสลายแป้งตัดแปร



โดย MGAM-SI จะซ้าลงเมื่อโครงสร้างแป้งตัดแปรนั้นมีปริมาณ  $\alpha$ -1,6 glycosidic มาก (Kittisuban และคณะ, 2014; Lee และคณะ, 2013; Lin และคณะ, 2010)

**ตารางที่ 4.3.6** ปริมาณกลูโคส ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ของ AO, WX และแป้งตัดแปรด้วยเอนไซม์ BE และ BE--> AM --> BE และนำไปย่อยด้วย  $\alpha$ -glucosidases จากลำไส้ของหนู หลังจากการไฮโดรไลซิสตัวอย่างด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จากตับอ่อนของมนุษย์

ตัวอย่าง	ปริมาณ AO (%)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
WX	0	$5.1\pm 0.3^{\text{bcd}}$
AO	100	$2.6\pm 0.3^{\text{g}}$
BE	0	$5.8\pm 0.0^{\text{a}}$
	20	$5.6\pm 0.2^{\text{ab}}$
	50	$5.3\pm 0.1^{\text{abc}}$
	80	$5.0\pm 0.1^{\text{bcd}}$
	100	$4.3\pm 0.1^{\text{ef}}$
BE-->AM-->BE	0	$5.1\pm 0.1^{\text{bcd}}$
	20	$4.8\pm 0.2^{\text{cde}}$
	50	$4.5\pm 0.1^{\text{ef}}$
	80	$4.3\pm 0.1^{\text{ef}}$
	100	$3.8\pm 0.1^{\text{f}}$



รูปที่ 4.3.5 โมเดลของโครงสร้างแป้งตัดแปรด้วย BE และ BE $\rightarrow$ AM $\rightarrow$ BE reaction โครงสร้างแบบวงสี่ดำ คือ  $\alpha$ -D-glucose unit สีแดงคือสายกลูแคนที่ถูกสร้างขึ้นมาหลังจากการตัดแปร A-B คือโครงสร้างที่ได้จากการตัดแปร WX ประกอบด้วย A: branched-amylopectin cluster; B: cyclo-amylopectin cluster และ short  $\alpha$ -glucan chains. C-E: คือโครงสร้างที่ได้จากการตัดแปร AO ประกอบด้วย; C: branched-amylose; D: cyclo-amylose และ E: amylose double helix.

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย

แป้งตัดแปรโครงสร้างที่มีปริมาณกิ่งสูง (highly branched-  $\alpha$ -glucans) มีลักษณะโมเลกุลแบบ monodisperse และละลายน้ำได้ สามารถผลิตได้จากการตัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ตัดต่อสาย กลูแคน (amylomaltase, AM) ร่วมกับเอนไซม์ตัดต่อกิ่ง (branching enzyme, BE) ที่สภาวะและขั้นตอนการตัดแปรต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเร่งปฏิกิริยาแบบลำดับขั้นโดยการใช้ BE-->AM-->BE จะทำให้เกิดการสร้างกิ่ง หรือพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ และผลิตภัณฑ์นั้นปริมาณกิ่งสูงกว่าไกลโคเจน การค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของวิธีการเร่งปฏิกิริยาโดยการใช้เอนไซม์ร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่ม  $\alpha$ -glucantransferases โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งหมดมีอัตราการถูกย่อยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารที่ช้ากว่าเมื่อเทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร เมื่อพิจารณาผลของอัตราส่วนอะไมโลส (AO) และอะไมโลเพกติน (WX) เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการตัดแปรด้วย AM และ BE โดยสภาวะการตัดแปรที่ทำให้เกิดการสร้างกิ่งที่ดีที่สุดคือ การเร่งปฏิกิริยาแบบลำดับขั้นโดยการใช้ BE-->AM-->BE ซึ่งสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดอัตราการสร้างพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ที่ดีที่สุดคือ 100%AO แต่ปริมาณพันธะ  $\alpha$ -1,6 glycosidic ที่สูงสุดเกิดจากการตัดแปร 0%AO โดยใช้ BE-->AM-->BE ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถทนย่อยต่อเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารได้เป็นอย่างดี

### บรรณานุกรม

- Ao, Z., Simsek, S., Zhang, G., Venkatachalam, M., Reuhs, B. L., และ Hamaker, B. R. (2007). Starch with a slow digestion property produced by altering its chain length, branch density, และ crystalline structure. **Journal of Agricultural และ Food Chemistry**. 55(11): 4540-4547.
- และ ersson, L., Rydberg, U., Larsson, H., และ ersson, R., และ Åman, P. (2002). Preparation และ characterisation of linear dextrans และ their use as substrates in in vitro studies of starch branching enzymes. **Carbohydrate Polymers**. 47(1): 53-58.
- Bailey, J. M., และ Whelan, W. J. (1957). The mechanism of carbohydrase action. 3. The action pattern of  $\beta$ -amylase. **Biochemical Journal** 67(4): 540-547.
- Bello-Pérez, L. A., Colonna, P., Roger, P., และ Octavio, P. L. (1998). Laser light scattering of high amylose และ high amylopectin materials in aqueous solution, effect of storage time. **Carbohydrate Polymers**. 37(4): 383-394.
- Bijttebier, A., Goesaert, H., และ Delcour, J. (2008). Amylase action pattern on starch polymers. **Biologia**. 63(6): 989-999.
- Blennow, A., Jensen, S. L., Shaik, S. S., Skryhan, K., Carciofi, M., Holm, P. B., Hebelstrup, K. H., และ Tanackovic, V. (2013). Future cereal starch bioengineering: Cereal ancestors encounter gene technology และ designer enzymes. **Cereal Chemistry Journal**. 90(4): 274-287.
- Bhuiyan, S. H., Kitaoka, M., และ hayashi, K. (2003). A cycloamylose forming hyperthermostable 4- $\alpha$ -glucanotransferase of *Alifex aeolicus* expressed in *Escherichia coli*. **Journal of molecular Catalysis B-Enzymatic**. (22): 45-53.
- Boos, W., และ Shuman, H. (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, และ regulation. **Microbiology และ Molecular Biology Reviews**. (62 ): 204-229.
- Butler, D. P., Van der Maarel, M. J. E. C., และ Steeneken, P. A. M. (2004). Starch-acting enzymes. In A. C. Eliasson (ed.), **Starch in food – Structure function และ applications**. Cambridge: Woodhead Publishing.

- Butterworth, P. J., Warren, F. J., Grassby, T., Patel, H., และ Ellis, P. R. (2012). Analysis of starch amylolysis using plots for first-order kinetics. **Carbohydrate Polymers**. 87(3): 2189-2197.
- Carciofi, M., Blennow, A., Jensen, S., Shaik, S., Henriksen, A., Buleon, A., Holm, P. B., และ Hebelstrup, K. H. (2012). Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. **BMC Plant Biology**. 12(1): 223.
- Damager, I., Engelsen, S. B., Blennow, A., Møller, B. L., และ Motawia, S. M. (2010). First principles insight into the  $\alpha$ -glucan structures of starch: Their synthesis, conformation, และ hydration. **Chemical Reviews**. (110): 2049-2080.
- Damager, I., Jensen, M. T., Olsen, C.-E., Blennow, A., Møller, B. L., Svensson, B., และ Motawia, M. S. (2005). Chemical synthesis of a dual branched malto-decasaccharide investigated as potential substrate for  $\alpha$ -amylases. **ChemBioChem : A European Journal of Chemical Biology**. 6: 1224-1233.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., และ Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars และ related substances. **Analytical Chemistry**. 28(3): 350-356.
- Englyst, H. N., และ Hudson, G. J. (1996). The classification และ measurement of dietary carbohydrates. **Food Chemistry**. (57): 15-21.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., และ Cummings, J. H. (1992). Classification และ measurement of nutritionally important starch fractions. **European Journal of Clinical Nutrition**. 46: 33-50.
- Fujii, K., Minagawa, H., Terada, Y., Takaha, T., Kuriki, T., Shimada, J., และ Kaneko, H. (2007). Function of second glucan binding site including tyrosines 54 และ 101 in *Thermus aquaticus* amyloamylase. **Journal of Bioscience และ Bioengineering**. 103(2): 167-173.
- Gropper, S. S., Smith, J. L., และ Groff, J. L. (2009). **Advanced nutrition และ human metabolism (5 ed.)**. Canada: Cengage learning.
- Hansen, M. R., Blennow, A., Pedersen, S., และ Engelsen, S. B. (2009). Enzyme modification of starch with amyloamylase results in increasing gel melting point. **Carbohydrate Polymers**. 78(1): 72-79.



- Hansen, M. R., Blennow, A., Pedersen, S., Norgaard, L., และ Engelsen, S. B. (2008). Gel texture และ chain structure of amyloamylase-modified starches compared to gelatin. **Food Hydrocolloids**. 22(8): 1551-1566.
- Hebelstrup, K. H., Sagnelli, D., และ Blennow, A. (2015). The future of starch bioengineering: GM microorganisms or GM plants? **Frontiers in Plant Science**. 6: 247.
- Hizukuri, S., Takeda, Y., Yasuda, M., และ Suzuki, A. (1981). Multi-branched nature of amylose และ the action of debranching enzymes. **Carbohydrate Research**. 94(2): 205-213.
- Jiang, H., Miao, M., Ye, F., Jiang, B., และ Zhang, T. (2014). Enzymatic modification of corn starch with 4- $\alpha$ -glucanotransferase results in increasing slow digestible และ resistant starch. **International Journal of Biological Macromolecules**. 65: 208-214.
- Jung, J. H., Jung, T. Y., Seo, D. H., Yoon, S. M., Choi, H. C., Park, B. C., Woo, E. J. (2011). Structural และ functional analysis of substrate recognition by the 250s loop in amyloamylase from *Thermus brockianus*. **Proteins: Structure, Function, และ Bioinformatics**. 79(2): 633-644.
- Kajiura, H., Kakutani, R., Akiyama, T., Takata, H., และ Kuriki, T. (2008). A novel enzymatic process for glycogen production. **Biocatalysis และ Biotransformation**. 26(1-2): 133-140.
- Kajiura, H., Takata, H., Akiyama, T., Kakutani, R., Furuyashiki, T., Kojima, I., และ Kuriki, T. (2011). *In vitro* synthesis of glycogen: the structure, properties, และ physiological function of enzymatically-synthesized glycogen. **Biologia**. 66(3): 387-394.
- Kállásra, L., Gyémánt, G., Remenyik, J., Hovánszki, G., และ Lipták, A. (2002). Action pattern และ subsite mapping of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates. **FEBS Letters**. 518(1-3): 79-82.
- Kaper, T., Leemhuis, H., Uitdehaag, J. C. M., van der Veen, B. A., Dijkstra, B. W., van der Maarel, M. J. E. C., และ Dijkhuizen, L. (2007). Identification of acceptor substrate binding subsites +2 และ +3 in the amyloamylase from *Thermus thermophilus* HB8†. **Biochemistry**. 46(17): 5261-5269.

- Kaper, T., van der Maarel, M. J. E. C., Euverink, G. J., และ Dijkhuizen, L. (2004). Exploring และ exploiting starch-modifying amylomaltases from thermophiles. **Biochemical Society Transactions.** (32): 279-282.
- Kasprzak, M. M., Lærke, H. N., Hofmann Larsen, F., Bach Knudsen, K. E., Pedersen, S., และ Jørgensen, A. S. (2012). Effect of enzymatic treatment of different starch sources on the *in vitro* rate และ extent of starch digestion. **International Journal of Molecular Sciences.** 13(1): 929-942.
- Kelly, R. M., Dijkhuizen, L., และ Leemhuis, H. (2009). Starch และ  $\alpha$ -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution. **Journal of Biotechnology.** 140(3-4): 184-193.
- Kiel, J. A., Boels, J. M., Beldman, G., และ Venema, G. (1991). Molecular cloning และ nucleotide sequence of the glycogen branching enzyme gene (glgB) from *Bacillus stearothermophilus* และ expression in *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis*. **Molecular Genetics และ Genomics.** 230(1-2): 136-144.
- Kim, E. J., Ryu, S. I., Bae, H. A., Huong, N. T., และ Lee, S. B. (2008). Biochemical characterisation of a glycogen branching enzyme from *Streptococcus mutans*: Enzymatic modification of starch. **Food Chemistry.** 110(4): 979-984.
- Krisman, C. R., Tolmasky, D. S., และ Raffo, S. (1985). Branching enzyme assay: Selective quantitation of the  $\alpha$ 1,6-linked glucosyl residues involved in the branching points. **Analytical Biochemistry.** 147(2): 491-496.
- Kittisuban, P., Lee, B. H., Suphantharika, M., และ Hamaker, B. R. (2014). Slow glucose release property of enzyme-synthesized highly branched maltodextrins differs among starch sources. **Carbohydrate Polymers.** 107: 182-191.
- Kong, X., Bertoft, E., Bao, J., และ Corke, H. (2008). Molecular structure of amylopectin from amaranth starch และ its effect on physicochemical properties. **International Journal of Biological Macromolecules.** 43(4): 377-382.
- Le, Q. T., Lee, C. K., Kim, Y. W., Lee, S. J., Zhang, R., Withers, S. G., Park, K. H. (2009). Amylolytically-resistant tapioca starch modified by combined treatment of branching enzyme และ maltogenic amylase. **Carbohydrate Polymers.** 75(1): 9-14.
- Lee, B. H., Yan, L., Phillips, R. J., Reuhs, B. L., Jones, K., Rose, D. R., และ Hamaker, B. R. (2013). Enzyme-synthesized highly branched maltodextrins have slow glucose

- generation at the mucosal  $\alpha$ -glucosidase level and are slowly digestible *in vivo*. **PLoS ONE**. 8(4): 1-5.
- Lee, B. H., Bello-Pérez, L. A., Lin, A. H. M., Kim, C. Y., and Hamaker, B. R. (2013). Importance of location of digestion and colonic fermentation of starch related to its quality. **Cereal Chemistry Journal**. 90(4): 335-343.
- Lee, C. K., Le, Q. T., Kim, Y. H., Shim, J. H., Lee, S. J., Park, J. H., Park, K. H. (2007). Enzymatic synthesis and properties of highly branched rice starch amylose and amylopectin cluster. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(1): 126-131.
- Lehmann, U., and Robin, F. (2007). Slowly digestible starch – its structure and health implications: a review. **Trends in Food Science and Technology**. 18(7): 346-355.
- Lin, A. H. M., Nichols, B. L., Quezada-Calvillo, R., Avery, S. E., Sim, L., Rose, D. R., Naim, H.Y., and Hamaker, B. R. (2012). Unexpected high digestion rate of cooked starch by the Ct-maltase-glucoamylase small intestine mucosal  $\alpha$ -glucosidase subunit. **PLoS ONE**. 7(5): 35473.
- Lin, A. H. M., Nichols, B. L., Quezada-Calvillo, R., Rose, D. R., Sim, L., and Hamaker, B. R. (2010). Specific starch digestion of maize alpha-limit dextrins by recombinant mucosal glucosidase enzymes. **The FASEB Journal**. 24: 231-236.
- Miller, M. C., Klyosov, A., Platt, D., and Mayo, K. H. (2009). Using pulse field gradient NMR diffusion measurements to define molecular size distributions in glycan preparations. **Carbohydrate Research**. 344(10): 1205-1212.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**. 153(2): 375-380.
- Okada, S., Kitahana, S., Yoshikawa, S., Sugimoto, T., and Sugimoto, K. (1984). Process for the production of branching enzyme, and method for improving the qualities of food products therewith. **U. S. patent# 4,454,161**
- Park, J. H., Kim, H. J., Kim, Y. H., Cha, H., Kim, Y. W., Kim, T. J., Park, K. H. (2007). The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4- $\alpha$ -glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin. **Carbohydrate Polymers**. 67(2): 164-173.

- Park, J. T., และ Rollings, J. E. (1994). Effects of substrate branching characteristics on kinetics of enzymatic depolymerization of mixed linear and branched polysaccharides: I. Amylose/amylopectin  $\alpha$ -amylolysis. **Biotechnology and Bioengineering**. 44(7): 792-800.
- Patil, N. B. (1976). Beta-amylase-resistant amylose. Effect of urea on the limited hydrolysis of amylose by beta-amylase. **Biochemical Journal**. 153(2): 339-342.
- Pérez, S., และ Bertoft, E. (2010). The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. **Starch – Stärke**. 62(8): 389-420.
- Pazur, J. H., และ และ, T. (1960). The Hydrolysis of glucosyl oligosaccharides with  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) and  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 6) bonds by fungal amyloglucosidase. **Journal of Biological Chemistry**. 235: 297-302.
- Rolland-Sabaté, A., Guilois, S., Jaillais, B., & Colonna, P. (2011). Molar mass and mass distributions of native starches using complementary separation methods: Asymmetrical flow field flow fractionation (A4F) and hydrodynamic and size exclusion chromatography (HDC-SEC). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 399(4): 1493-1505.
- Roussel, X., Lancelon-Pin, C., Viksø-Nielsen, A., Rolland-Sabaté, A., Grimaud, F., Potocki-Véronèse, G., และ D'Hulst, C. (2013). Characterization of substrate and product specificity of the purified recombinant glycogen branching enzyme of *Rhodothermus obamensis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. 1830(1): 2167-2177.
- Shaik, S. S., Carciofi, M., Martens, H. J., Hebelstrup, K. H., และ Blennow, A. (2014). Starch bioengineering affects cereal grain germination and seedling establishment. **Journal of Experimental Botany**. 65(9): 2257-2270.
- Shinohara, M. L., Ihara, M., Abo, M., Hashida, M., Takagi, S., และ Beck, T. C. (2001). A novel thermostable branching enzyme from an extremely thermophilic bacterial species, *Rhodothermus obamensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. (57): 653-659.
- Sim, L., Willemsma, C., Mohan, S., Naim, H. Y., Pinto, B. M., และ Rose, D. R. (2010). Structural basis for substrate selectivity in human maltase-glucoamylase and

- sucrase-isomaltase N-terminal domains. **Journal of Biological Chemistry.** 285(23): 17763-17770.
- Sorndech, W., Meier, S., Jansson, A. M., Sagnelli, D., Hindsgaul, O., Tongta, S., และ Blennow, A. (2015). Synergistic amyloamylase และ branching enzyme catalysis to suppress cassava starch digestibility. **Carbohydrate Polymers.** 132: 409-418.
- Takata, H., Takaha, T., Kuriki, T., Okada, S., Takagi, M., และ Imanaka, T. (1994). Properties และ active center of the thermostable branching enzyme from *Bacillus stearothermophilus*. **Applied และ Environmental Microbiology.** 60(9): 3096-3104.
- Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Hizukuri, S., Takagi, M., และ Imanaka, T. (1996). Structure of the cyclic glucan produced from amylopectin by *Bacillus stearothermophilus* branching enzyme. **Carbohydrate Research.** 295(0): 91-101.
- Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Takagi, M., และ Imanaka, T. (1996). Cyclization reaction catalyzed by branching enzyme. **Journal of Bacteriology.** 178: 1600-1606.
- Tharanathan, R. N. (2005). Starch - Value addition by modification. **Critical Reviews in Food Science และ Nutrition.** 45(5): 371-384.
- Units of Enzyme Activity. (1979). **European Journal of Biochemistry.** 97(2): 319-320.
- van der Maarel, M. J. E. C., Capron, I., Euverink, G. J. W., Bos, H. T., Kaper, T., และ Binnema, D. J. (2005). A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch. **Starch - Stärke.** 57: 465-472.
- Vasanthan, T. (2001). **Current protocols in food analytical chemistry.** New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Vikso-Nielsen, A., Blennow, A., Nielsen, T. H., และ Møller, B. L. (1998). Phosphorylated  $\alpha(1 \rightarrow 4)$ glucans as substrate for potato starch-branching enzyme I. **Plant Physiology.** 117: 869-875.
- Wickramasinghe, H. A. M., Blennow, A., และ Noda, T. (2009). Physico-chemical และ degradative properties of in-planta re-structured potato starch. **Carbohydrate Polymers.** 77(1): 118-124.

- Wood, L. F., และ Mercier, C. (1978). Molecular structure of unmodified และ chemically modified manioc starches. **Carbohydrate Research**. 61(1): 53-66.
- Yu, X., Houtman, C., และ Atalla, R. H. (1996). The complex of amylose และ iodine. **Carbohydrate Research**. 292(0): 129-141.
- Zhang, B., Dhital, S., และ Gidley, M. J. (2013). Synergistic และ antagonistic effects of  $\alpha$ -amylase และ amyloglucosidase on starch digestion. **Biomacromolecules**. 14(6): 1945-1954.





## 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

- Keeratiburana, T., Hansen, A. R., Soontaranon, S., Blennow, A. and **Tongta, S.** 2020. Pre-treatment of granular rice starch to enhance branching enzyme catalysis. *Carbohydrate Polymers*, 247: 116741. (IF 7.182)
- Sarifudin, A., Keeratiburana, T., Soontaranon, S., Tangsathitkulchai, C. and **Tongta, S.** 2020. Pore characteristics and structural properties of ethanol-treated starch in relation to water absorption capacity. *LWT-Food Science and Technology*, 129: July 2020: 109555. (IF 3.714) <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109555>
- Sarifudin, A., Soontaranon, S., Peerapattana, J. and **Tongta, S.** 2020. Mechanical strength, structural and hydration properties of ethanol-treated starch tablets and their impact on the release of active ingredients. *Journal of Biological Macromolecules*, 149:541-551. (IF 4.784)
- Keeratiburana, T., Hansen, A. R., Soontaranon, S., **Tongta, S.** and Blennow, A. 2020. Porous rice starch produced by combined ultrasound-assisted ice recrystallization and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145:100-107. (IF 4.784)
- Keeratiburana, T., Hansen, A. R., Soontaranon, S., Blennow, A. and **Tongta, S.** 2020. Porous high amylose rice starch modified by amyloglucosidase and maltogenic  $\alpha$ -amylase. *Carbohydrate Polymers*, 230: 15 February 2020: 115611. (IF 6.044)

- Prompiputtanapon, K., Sorndech, W. and **Tongta, S.** 2020. Surface Modification of Tapioca Starch by Using the Chemical and Enzymatic Method. *Starch/Stärke*, 72 (3-4): 1-6. doi: 10.1002/star.201900133. (IF 1.795)
- Na-Nakorn, K., Kulrattanak, T., Hamaker, B. R. and **Tongta, S.** 2019. Starch digestion kinetics of extruded reformed rice is changed in different ways with added protein or fiber. *Food & Function*, 10: 4577-4583. (IF 3.241)
- Sarifudin, A., Soontaranon, S., Rugmai, S. and **Tongta, S.** 2019. Structural transformations at different organizational levels of ethanol-treated starch during heating. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132:1131-1139. (IF 4.784)
- Sorndech, W., Rodtong, S., Blennow, A. and **Tongta, S.** 2019. Impact of resistant maltodextrins and resistant starch on human gut microbiota and organic acids production. *Starch/Stärke*, 71:1-8. doi: 10.1002/star.201800231. (IF 1.795)
- Boonna, S., Rolland-Sabatéb, A., Lourdin, D. and **Tongta, S.** 2019. Macromolecular characteristics and fine structure of amyloamylase-treated cassava starch. *Carbohydrate Polymers*, 204: 143-150. (IF 6.044)
- Waraporn, S., Na Nakorn, K., **Tongta, S.** and Blennow, A. 2018. Isomalto-oligosaccharides: Recent insights in production technology and their use for food and medical applications. *LWT-Food Science and Technology*, 95:135-142. (IF 3.714)
- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2018. Structural transformation of crystallized debranched cassava starch during dual hydrothermal treatment in relation to enzyme digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 191: 1-7. (IF 6.044)
- Yuwang, P., Sulaeva, I., Hell, J., Henniges, U., Böhmendorfer, S., Rosenau, T., Chitsomboon, B. and **Tongta, S.** 2018. Phenolic compounds and antioxidant properties of arabinoxylan hydrolysates from defatted rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98:140-146. (IF 2.422)
- Sorndech, W., **Tongta, S.** and Blennow, A. 2018. Slowly digestible- and non-Digestible  $\alpha$ -glucans: An enzymatic approach to starch modification and nutritional effects. *Starch/Stärke*, 70 (9-10): 1-11.
- Sorndech, W., Sagnelli, D., Blennow, A., and **Tongta, S.** 2017. Combination of amylase and transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity. *LWT-Food Science and Technology*, 79:479-486. (IF 3.714)

- Sorndech, W., Sagnelli, D., Meier, S., Jansson, A.M., Lee, B-H., Hamaker, B.R., Rolland-Sabaté, A., Hebelstrup, K.H., **Tongta, S.**, and Blennow, A. 2016. Structure of branching enzyme- and amyloamylase modified starch produced from well-defined amylose to amylopectin substrates. *Carbohydrate Polymers*, 152: 51-61. (IF 6.044)
- Kiatponglarpa, W., Rugmai, S., Rolland-Sabaté, A., Buléon, A., and **Tongta, S.** 2016. Spherulitic self-assembly of debranched starch from aqueous solution and its effect on enzyme digestibility. *Food Hydrocolloids*, 55:235-243. (IF 5.839)
- Sorndech, W., Meier, S., Jansson, A. M., Sagnelli, D., Hindsgaul, O., **Tongta, S.**, and Blennow, A. 2015. Synergistic Amyloamylase and Branching Enzyme Catalysis to Suppress Cassava Starch Digestibility. *Carbohydrate Polymers*, 132:409-418. (IF 6.044)
- Prompiputtanapon, K. and **Tongta, S.** 2015. Modification of tapioca starch granule surfaces on soluble fiber formation. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 1(1): 116-121.
- Tananchai, C., **Tongta, S.** and Rodtong, S. 2015. Evaluation of different resistant starch types for stimulating growth of the dominant lactic acid bacteria inhabiting human colon. *Journal of Food Science and Agricultural Technology*. 1(1): 197-200.
- Kiatponglarpa, W., **Tongta, S.**, Rolland-Sabaté, A., and Buléon, A. 2015. Crystallization and chain reorganization of debranched rice starches in relation to resistant starch formation. *Carbohydrate Polymers*. 122:108-144. (IF 6.044)
- Chaisiricharoenkul, J., **Tongta S.** and Intarapichet, K. 2011. Structure and chemical and physicochemical properties of Job's tear (*Coix lacryma-jobi* L.) kernels and flours. *Suranaree J. Sci. Technol.* 18(2):109-122.
- Boonna, S., **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. 2010. Effect of dehydration methods on digested starch fractions of retrograded debranched rice starch. *Suranaree J. Sci. Technol.* 17(4):359-368.
- Apirattananusorn, 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. (IF 3.571)
- 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.
- Kiatpongarp, 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. (IF 3.571)
- 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.
- 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.
- Nantachai, K. Srijesdaruk, V., **Wiriyapirom, S.** and Tungwongchai, R. 1997. Sensory perceptions of sugarcane juices. *Khon Kaen University Research Journal*. 2(1):10-17.

## 2. ทรัพย์สินทางปัญญา

1. อนุสิทธิบัตร ชื่อ กระบวนการผลิตแป้งที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำและทนต่อสภาวะการหุงต้มและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรรมวิธีดังกล่าว เลขที่คำขอ 15033001693 ยื่นจดปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทย
2. อนุสิทธิบัตร ชื่อ กระบวนการผลิตแป้งต้านทานชนิด 4 เลขที่อนุสิทธิบัตร 1303006876 วันออกอนุสิทธิบัตร 20 มกราคม 2559 ยื่นจดปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทย
3. อนุสิทธิบัตร ชื่อ กระบวนการผลิตแป้งสตาร์ชข้าวที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิด 3 เลขที่อนุสิทธิบัตร 1303000062 วันออกอนุสิทธิบัตร 3 สิงหาคม 2558 ยื่นจดปี พ.ศ. 2556 ประเทศไทย

## 3. การประชุมระดับนานาชาติ

- Sarifudin, A., Soontaranon, S., Rugmai, S., & Tongta, S. 2019. Alterations on the structural and morphological properties of ethanol-treated starch before and

after hydration. The 21st Food Innovation ASIA Conference. June 13-15, 2019. Bangkok, Thailand.

Sarifudin, A., Soontaranon, S., Rugmai, S., & Tongta, S. 2018. Effect of storage humidity on the structural, morphological properties and water adsorption capacity of ethanol-treated starch. The 4th International Symposium on Applied Chemistry (ISAC) 2018. November 1-2, 2018. Bumi Serpong Damai (BSD) City, Tangerang, Indonesia.

Boonna, S., Rolland-Sabaté, A., Lourdin, D. and **Tongta, S.** 2018. Crystallization of debranched amylomaltase-treated cassava starches in relation to thermal stability and enzyme digestibility. Starch Round Table EU (SRTEU) 2018. October 18-19, 2018. Norwich, United Kingdom.

Boonna, S., Rolland-Sabaté, A., Lourdin, D. and **Tongta, S.** 2018. Macromolecular characteristics and fine structure of amylomaltase-treated cassava starch. 2018 AACC International's Annual Meeting (Cereals & Grains 18). October 21-23, 2018. London, United Kingdom.

Nontamas, P. and **Tongta, S.** 2017. Effect of conditioning time and starch granule surface modification on starch citrate formation. Starch Update 2017: The 9<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. February 27-28, 2017. Bangkok, Thailand.

Boonna, S., Lourdin, D and Tongta, S. Enzymatic Modification and Hydrothermal Treatments on Starch Digestibility of Cassava Starch. EU-Starch Round Table 2016. November 17-18, 2016. Lille, France.

W. Sorndech, D. Sagnelli, S. Meier, A. M. Jansson, B. H. Lee, B. R. Hamaker, A. Rolland-Sabaté, K. H. Hebelstrup, **S. Tongta** and A. Blennow. 2016. Effect of Amylose Content on Branching Enzyme and Amylomaltase Chain Transfer. 2016 IFT Annual Meeting, July 17-19, 2016. Chicago, USA.

Nontamas, P. and **Tongta, S.** 2015. Resistant starch and properties of the native and cross-linked starch exposed to electron beam irradiation. In Proceeding of Starch Update 2015: The 8<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p.147-151. December 3-4, 2015. Bangkok, Thailand.

- Sorndech, W., Meier, S., Hebelstrup, K. H., **Tongta, S.** & Blennow, A. 2015. Effect of amylose content on amylomaltase and branching enzyme catalysis to produce soluble indigested  $\alpha$ -glucan fraction. In Proceeding of Starch Update 2015: The 8<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p.71-76. December 3-4, 2015. Bangkok, Thailand.
- Sorndech, W., Meier, S., Hebelstrup, K. H., Tongta, S. & Blennow, A. (2015). Correlation between starch modified by enzymes and soluble-, slowly- and indigested  $\alpha$ -glucan formation. The 41<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, November 6-8, 2015, Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2015. Improvement of resistant starch content and cooking stability of debranched cassava starch by hydrothermal treatment. AACC International Centennial Meeting. October 18-21, 2015. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
- Kiatpongarp, W., Rugmai, S., Buléon, A, and **Tongta, S.** 2015. Crystallization behaviour of debranched rice starches monitored by time-resolved synchrotron wide-angle X-ray scattering. AACC International Centennial Meeting. October 18-21, 2015. Minneapolis, Minnesota, U.S.A.
- Prompiputtanapon, K., and **Tongta, S.** 2014. Modification of tapioca starch granule surface on soluble fiber formation. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Agricultural and Agro-Industry. November 20-21, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- Tananchai, C., **Tongta, S.**, and Rodtong, S. 2014. Evaluation of different resistant starch types for stimulating growth of the dominant lactic acid bacteria inhabiting human colon. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Agricultural and Agro-Industry. November 20-21, 2014. Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.
- Kiatpongarp, W., **Tongta, S.**, and Buleon, A. 2013. Resistant starch formation of rice from different varieties. The 5<sup>th</sup> ASIAHORCs Joint Symposium. November 26-28, 2013. Nusa Dua, Bali, Indonesia
- Kiatpongarp, W., **Tongta, S.**, and Buleon, A. 2013. Formation of sperulites from debranched rice starches and their digestibility. In Proceeding of Starch Update



2013: The 7<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 182-187. November 21-22, 2012. Bangkok, Thailand.

Jampatesh, S, and **Tongta, S.** 2013. Impacts of Heating Processes on Physical Properties of Resistant Citrate Rice Starch. In Proceeding of Starch Update 2013: The 7<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p.219-226. November 21-22, 2012. Bangkok, Thailand.

Thanompolkrung, T., Tongta, S. and Yongsawatdigul, J. Effect of sodium sulfite on pasting and textural properties of aged rice. AACC International Meeting, September 29-October 2, 2013. Albuquerque, New Mexico U.S.A.

Kiatpongarp, W., **Tongta, S.** and Buléon, A. 2012. Crystallization behavior of debranched waxy rice starch in relation to enzyme digestibility, thermal properties and microstructure. XIX International Starch Convention. September 18-20, 2012. Moscow, Russia.

Kiatpongarp, W., **Tongta, S.**, Rugmai, S., and Soontaranon, S. 2012. Preliminary study of starch granular structure using synchrotron radiation WAXS and SAXS techniques. AOFSSR 2012, the 6<sup>th</sup> Asia Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research. August, 8-12, 2012. Bangkok, Thailand

Yuwang, P. and **Tongta, S.** 2012. Enzymatic extraction of rice bran arabinoxylans and antioxidant property. Plant and Seaweed Polysaccharides workshop. July 17-20, 2012. Nantes, France.

**Tongta, S.** and Boonna, S. 2012. Effect of resistant rice starch supplementation on characteristics of rice noodle. Plant and Seaweed Polysaccharides workshop. July 17-20, 2012. Nantes, France.

Lapkhoksung, A. and **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. 2012. Effects of pullulanase and isoamylase and rice varieties on resistant starch type III formation. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 90-95. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.

Charoenporn, S. and **Tongta, S.** 2012. Physicochemical and rheological properties of extruded high amylose rice flour. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 244-249. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.

- Kiatpongarp, W. and **Tongta, S.** 2012. Formation of resistant starch type II and type III with hydrolysis of alpha-amylase. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 340-345. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.**, Boonna, S., Kitiratanakornkul, C. and Nular, T. 2012. Dough and bread characteristics with supplementation of resistant rice starch. In Proceeding of Starch Update 2011: The 6<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology, p 346-351. February 13-14, 2012. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Boonna, S. 2011. Characteristics of rice-based extruded snack with resistant starch supplementation. Poster presentation in IFT Annual Meeting, June 11-14, 2011, New Orleans, LA USA.
- Tongta, S.** and Kiatpongarp, W. 2010. Effect of acid dextrinization and annealing on resistant starch type III formation. Oral presentation XVIII International Starch Convention. June 21-25, 2010. Cracow, Poland.
- Thanompolkrung, T., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul, J. 2010. Conformational changes of rice proteins affecting on pasting and textural properties of rice. Poster presentation in Food Innovation Asia Conference 2010. June 17-18, 2010. BITEC, Bangkok, Thailand.
- 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. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> 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. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Kiatpongarp, W. and **Tongta, S.** 2009. Comparative effect of different temperature cycling on resistant starch formation. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.

- Tongta, S.** and Boonna, S. 2009. Physical modification of rice flour by extrusion. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Tongta, S.** and Kiatpongarp, W. 2009. Impact of enzyme concentration and hydrolysis time on resistant starch formation. In Proceeding of Starch Update 2009: The 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. September 24-25, 2009. Bangkok, Thailand.
- Dalai, N. and **Tongta, S.** 2009. Physicochemical and textural properties of high amylose rice during storage In Proceeding of Food Innovation Asia Conference 2009. June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand.
- Boonna, S., **Tongta, S.** and Piyachomkwan, K. 2009. 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. . In Proceeding of The 34<sup>th</sup> 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. . In Proceeding of The 34<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand. October 31-November 2, 2008. Bangkok, Thailand.
- Boonna, S. and **Tongta, S.** 2007. Effect of drum drying parameters on physical properties of pregelatinized rice flour. In Proceeding of Starch Update 2007: The 4<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. November 6-7, 2007. Bangkok, Thailand.
- Kiatpongarp, W. and **Tongta, S.** 2007. Structural and physical properties of enzyme-resistant starch produced from debranched and retrogradation of cassava starch. In Proceeding of Starch Update 2007: The 4<sup>th</sup> 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. In Proceeding of Starch Update 2007: The 4<sup>th</sup>

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. In Proceeding of The 9<sup>th</sup> 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. In Proceeding of The 9<sup>th</sup> 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. In Proceeding of The 9<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference, Food Innovation Asia 2007. June 14-15, 2007. Bangkok, Thailand.

Apirattananusorn, 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.

Kiatpongarp, W. and **Tongta, S.** 2006. Effect of debranching on enzyme resistant starch formation in tapioca starch. In Proceeding of The 8<sup>th</sup> 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. In Proceeding of The 8<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference. June 15-16, 2006. Bangkok, Thailand.

Rareunrom, K., **Tongta, S.** and Yongsawatdigul. 2004. Structure and texture characteristic of soy protein meat analog. In Proceeding of The 6<sup>th</sup> Agro-Industrial Conference. May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

**Wiriyapirom, S.**, Wei, L.S. and Padua, G.W. 1996. Effect of soy protein isolates on physical characteristics of extruded expanded half-products. A presentation In Annual IFT Meeting. June 26, 1996. New Orleans, USA

**Wiryapirom,S.**, Padua, G.W. and Wei, L.S. 1996. Effect of extrusion parameters on physical properties of half-products fortified with soy protein. A presentation In Annual IFT Meeting. June 15,1997. Orlando, USA

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

