

การดัดแปรสสารไขมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทส

นางสาวพิชชา สุริยกุล ณ อยุธยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

MODIFICATION OF CASSAVA STARCH BY AMYLOMALTASE

Miss Pitcha Suriyakul Na Ayudhaya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทส
โดย	นางสาวพิชชา สุริยกุล ณ อยุธยา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลาสงคราม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อานเป็รื่อง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลาสงคราม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.กล้าณรงค์ ศรีรอด)

พิชชา สุริยกุล ณ อยุธยา : การดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทส. (MODIFICATION OF CASSAVA STARCH BY AMYLOMALTASE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.กัลยา เลหาสงคราม, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ, 121 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส (1,4- α -glucano-transferase, AM; EC 2.4.1.25) ซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการโคลนดีเอ็นเอจากเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของสตาร์ชมันสำปะหลัง (5, 10 และ 15% (w/v)) ที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์และปริมาณแอมิโลมอลเทส (1, 3 และ 5 unit/สตาร์ช 1 กรัม) ต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปรที่ดัดแปรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสตาร์ชมีผลต่อปริมาณแอมิโลสปรากฏอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อความเข้มข้นของสตาร์ชลดลงปริมาณแอมิโลสปรากฏจะลดลง ในขณะที่ค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึก (ΔH_{retro}) ขึ้นกับความเข้มข้นของสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นสตาร์ช 5% และปริมาณเอนไซม์ 1 และ 3 Unit/สตาร์ช 1 กรัม ให้สตาร์ชดัดแปรที่มีค่าพลังงานในการหลอมผลึกน้อยกว่าที่สภาวะอื่นๆ อุณหภูมิในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรด (T_c , T_p และ T_o) เพิ่มขึ้น ช่วงอุณหภูมิการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรดเดชัน (T_c-T_o) แคบลง มีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็ง-การละลายน้ำแข็ง (freeze-thaw stability) เพิ่มขึ้น อัตราการปลดปล่อยน้ำคางที่ 15-20% ใน 5 รอบ และค่า $\tan \delta$ สามารถเปลี่ยนไปกลับระหว่างอุณหภูมิ 70 และ 4 องศาเซลเซียส คล้ายสมบัติของ thermo-reversible gel เมื่อแปรเวลาที่ใช้ในการดัดแปร (30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง) โดยใช้ความเข้มข้นสตาร์ช 5% และปริมาณเอนไซม์ 3 unit/สตาร์ช 1 กรัม พบว่าเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรเพิ่มขึ้นทำให้ปริมาณแอมิโลสปรากฏ พลังงานในการหลอมผลึกและ (T_c-T_o) ลดลง แต่สตาร์ชดัดแปรมีความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง สมบัติการละลายและสมบัติ thermo-reversibility และ อุณหภูมิในการเจลาติไนซ์ (T_p , T_o) ไม่แตกต่างเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรต่างกัน จากการศึกษาการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์โดยใช้ความเข้มข้นสตาร์ช 5% และปริมาณเอนไซม์ 3 unit/สตาร์ช 1 กรัม พบว่าสตาร์ชดัดแปรที่ได้มีสมบัติไม่แตกต่างจากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร (native starch) จากการวิเคราะห์ amylopectin chain length distribution ของสตาร์ชดัดแปร พบว่ามีปริมาณสายกิ่ง DP 3 ถึง DP 18 เพิ่มขึ้น แต่ DP มากกว่า 22 ลดลง เมื่อเทียบกับสตาร์ชดัดแปรที่ดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ซึ่งลักษณะการกระจายตัวเหมือนกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ.....
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5372299923 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : CASSAVA STARCH / MODIFIED STARCH / AMYLOMALTASE / FREEZE-THAW STABILITY / THERMAL PROPERTIES / THERMO-REVERSIBILITY

PITCHA SURIYAKUL NA AYUDHAYA: MODIFICATION OF CASSAVASTARCH BY AMYLOMALTASE. ADVISOR: ASSOC. PROF. KALAYA LAOHASONGKRAM, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SAIWARUN CHAIWANICH SIRI, Ph.D., 121 pp.

The purpose of this study was to examine properties of cassava starch modified by amyloamaltase (1,4- α -glucano-transferase, AM; EC 2.4.1.25) expressed in recombinant *Escherichia coli* cells from a gene cloned from *Corynebacterium glutamicum*. Cassava starch slurries (5, 10 and 15% w/v) were incubated with 1, 3 and 5 unit of amyloamaltase/g starch at 30°C for 1 h. The results show that the obtained modified starch had lower apparent amylose content as the starch concentration decreased ($p \leq 0.05$). The enthalpy of retrogradation (ΔH_{retro}) depended on the starch and enzyme concentration. Starch modified from 5% starch and 1, 3 unit of amyloamaltase/g starch showed the lowest ΔH_{retro} . The modified starch had higher retrogradation temperatures (T_o , T_p , T_c) and narrower retrogradation temperature range ($T_c - T_o$) than native starch. The percentage of syneresis of the modified starch was approximately 15-20% throughout the 5 cycle of freezing and thawing, indicating a higher freeze-thaw stability as compared to those of the native starch (5-41%). From rheological properties measurement it was found the $\tan \delta$ value of modified starch could reverse between 70°C and 4°C similarly to that of a thermo-reversibility gel. The incubation time was varied (30 min, 1 and 6 h), as the incubation time increased, the apparent amylose and retrogradation enthalpy decreased significantly but gel strength increased. As the incubation time of 5% starch slurry and 3 unit of amyloamaltase/g starch was varied at 30 min, 1h and 6h, it was found that the apparent amylose content, ΔH_{retro} and ($T_c - T_o$) decreased with increasing time while %syneresis, $\tan \delta$ and gel strength were not affected. Comparing between the starch modified from the gelatinized and ungelatinized starch slurry had similar properties to the native one. From the analysis of amylopectin chain length distribution, it was found that the modified starch from gelatinized starch slurry had more DP 3 to DP 18, but lower DP > 22 than those from ungelatinized starch slurry which was similar to the native starch.

Department: Food Technology Student's Signature

Field of Study: Food Technology Advisor's Signature

Academic Year: 2012 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลหาหงคราม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ สายวรุฬห์ ชัยวานิชศิริ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อานเป็รื่อง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานวงส์ และรองศาสตราจารย์ ดร.กัลลัณรงค์ ศรีรอด กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเสียสละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง จังหวัดระยอง ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ น้องและเพื่อน ๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดการวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในการวิจัย

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ได้สั่งสอนให้ผู้วิจัยมีความอดทน ให้กำลังใจ และห่วงใยพร้อมทั้งสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แป้งมันสำปะหลัง.....	3
2.1.1 องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง.....	4
2.1.2 โครงสร้างของเม็ดแป้ง	9
2.4 สมบัติทางเคมีกายภาพ.....	12
2.4.1 กำลังการพองตัวและความสามารถในการละลาย.....	12
2.4.2 การเกิดเจลาตินในเซชัน.....	14
2.4.3 การเกิดรีโทรเกรดชัน.....	16
2.4.4 สมบัติทางกระแสวิทยา.....	19
2.5 การดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทส	24
2.6 เจลาติน.....	33
3.วิธีดำเนินงานวิจัย.....	34
3.1 วัตถุประสงค์.....	34
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย.....	34
3.2.1 วิเคราะห์สมบัติสตาร์ชมันสำปะหลัง.....	34
3.2.2 เตรียม Amylomaltase.....	35
3.2.2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>	35

	หน้า
3.2.2.2 แยกเอโนไซม์.....	36
3.2.2.3 วิเคราะห์สมบัติของเอโนไซม์.....	36
3.2.3 การดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านการเจลาตีไนเซชันโดยแอมิ โลมอลเทส.....	37
3.2.3.1 ความเข้มข้นของสตาร์ชมันสำปะหลังและปริมาณแอมิ โลมอลเทส.....	38
3.2.3.2 เวลาในการดัดแปร.....	38
3.2.4 การดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชันโดยแอมิ โลมอลเทส.....	38
4. ผลการทดลองและวิจารณ์.....	40
4.1 สมบัติของสตาร์ชมันสำปะหลัง.....	40
4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณแอมิโลส.....	40
4.1.2 ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้ง	41
4.1.3 กำลังการพองตัวและการละลาย.....	42
4.1.4 สมบัติทางความร้อน.....	44
4.1.5 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง.....	45
4.2. แอมิโลมอลเทส.....	46
4.3. ผลของความเข้มข้นของสตาร์ชมันสำปะหลังและปริมาณแอมิโลมอลเทสต่อ สมบัติของสตาร์ชดัดแปร.....	49
4.3.1. ปริมาณแอมิโลสปรากฏ.....	49
4.3.2. การเกิดรีโทรเกรเดชัน.....	51
4.3.3. ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็ง และการละลายน้ำแข็ง.....	53
4.3.4. Thermo-reversibility.....	55
4.4. ผลของเวลาที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทสต่อ สมบัติของสตาร์ชดัดแปร.....	57
4.5. ผลของการเจลาตีไนซ์ต่อสมบัติของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรโดยแอมิ โลมอลเทส.....	63

	หน้า
4.5.1. ลักษณะรูปร่าง และสมบัติ Birefringence ของเม็ดสตาร์ช.....	63
4.5.2. ปริมาณแอมิโลสปรากฏ.....	66
4.5.3. การเกิดรีโทรเกรเดชัน.....	67
4.5.4. ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง.....	69
4.5.5. Thermo-reversibility.....	69
4.5.6. การวัดค่าความแข็งแรงของเจล.....	72
4.5.7. ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกติน	73
5. สรุปผลการทดลอง.....	77
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	77
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	78
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก. การเตรียมสารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	89
ภาคผนวก ข. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....	91
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์สมบัติของสตาร์ช.....	92
ภาคผนวก ง. วิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์.....	104
ภาคผนวก จ. ข้อมูลการทดลอง.....	109
ภาคผนวก ฉ. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	118
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	124

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ.....	5
ตารางที่ 2.2 ปริมาณแอมิโลส และแอมิโลเพกตินของแป้งจากแหล่งต่างๆ.....	6
ตารางที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างของแอมิโลเพกติน.....	8
ตารางที่ 2.4 ลักษณะของเม็ดแป้งแต่ละชนิด.....	10
ตารางที่ 2.5 ช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันของแป้งชนิดต่างๆ โดยใช้ DSC.....	16
ตารางที่ 2.6 อัตราการคืนตัวของแป้งแต่ละชนิด.....	18
ตารางที่ 2.7 ร้อยละการปลดปล่อยน้ำของเจลชนิดต่างๆ ระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็ง และการละลายน้ำแข็ง.....	19
ตารางที่ 2.8 ค่า δ , \tan , G' และ G'' ของแต่ละสถานะ.....	21
ตารางที่ 2.9 สภาวะที่ใช้ในการตัดแปรสตาบิลิตีโดยแอมิโลมอลเทสจากแหล่งต่างๆ.....	31
ตารางที่ 2.10 ความหนืดของตัวอย่างเจลลิตีที่มีค่า Bloom ต่างๆ.....	33
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลัง...	40
ตารางที่ 4.2 สมบัติทางความร้อนของสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลัง.....	45
ตารางที่ 4.3 สมบัติของแอมิโลมอลเทสที่เตรียมได้.....	47
ตารางที่ 4.4 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลังและสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลังตัดแปร....	50
ตารางที่ 4.5 สมบัติทางความร้อนของสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลังและสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลังตัด แปรภายหลังการเจลลิตีไนซ์ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....	52
ตารางที่ 4.6 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาบิลิตีตัดแปรเมื่อตัดแปรที่เวลาต่างๆ.....	57
ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลังตัดแปรเมื่อตัด แปรที่เวลาต่างๆ ภายหลังการเก็บที่ 4°C เป็นเวลา 14 วันหลังการเจลลิตีไนซ์ ด้วยเครื่อง DSC.....	60
ตารางที่ 4.8 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาบิลิตีตัดแปรที่ใช้สตาบิลิตีที่ผ่านและไม่ผ่านการ เจลลิตีไนซ์.....	67
ตารางที่ 4.9 สมบัติทางความร้อนของสตาบิลิตีน้ำมันสำปะหลังตัดแปรที่ใช้สตาบิลิตีที่ผ่านและ ไม่ผ่านการเจลลิตีไนซ์ภายหลังการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันหลังการเจลลิตีไนซ์.....	68

	หน้า
ตารางที่ 4.10 การวัดค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปร และเจลาติน...	73
ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารละลายเอมิโลสมาตรฐาน.....	97
ตารางที่ ง.1 ปริมาณสารละลายโปรตีนมาตรฐาน.....	105
ตารางที่ ง.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม Separating gel และ Stacking gel.....	107
ตารางที่ จ.1 ค่ากำลังการพองตัว และค่าการละลายของสตาร์ชมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ ต่างๆ.....	109
ตารางที่ จ.2 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมัน สำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรโดยเอมิโลมอลเทส.....	114
ตารางที่ จ.3 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมัน สำปะหลังของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ผ่าน (Gel) และไม่ผ่านการ เจลาตีไนเซชัน (Granular).....	115
ตารางที่ จ.4 ผลของความเข้มข้นของสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ต่อค่า G' , G'' และ $\tan\delta$ ของสตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปร.....	116
ตารางที่ จ.5 ผลของการเจลาตีไนส์และเวลาที่ใช้ในการดัดแปรต่อค่า G' , G'' และ $\tan\delta$ ของสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชัน.....	117
ตารางที่ ฉ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณเอมิโลสในสตาร์ชดัดแปร ที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้ความเข้มข้นสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ต่างๆ.....	118
ตารางที่ ฉ.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณเอมิโลสแต่ละสภาวะที่ใช้ ปริมาณความเข้มข้นสตาร์ชและเอนไซม์แตกต่างกันในการดัดแปร.....	118
ตารางที่ ฉ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณเอมิโลสในสตาร์ชดัดแปร ที่ผ่านการดัดแปรโดยใช้ความเข้มข้นสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ต่างๆ.....	119
ตารางที่ ฉ.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสมบัติทางความร้อนแต่ละสภาวะที่ ใช้ปริมาณความเข้มข้นสตาร์ชและเอนไซม์แตกต่างกันในการดัดแปร.....	120
ตารางที่ ฉ.5 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของเอมิโลสแต่ละสภาวะที่ใช้เวลาใน การดัดแปรที่แตกต่างกัน.....	121
ตารางที่ ฉ.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสมบัติทางความร้อนแต่ละสภาวะที่ ใช้เวลาในการดัดแปรที่แตกต่างกัน.....	121

	หน้า
ตารางที่ ฉ.7 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแอมิโลสของสตาร์ชดัดแปรที่ผ่าน และไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชันที่ใช้เวลาในการดัดแปรแตกต่างกัน...	122
ตารางที่ ฉ.8 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชดัด แปรที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชันที่ใช้เวลาในการดัดแปร แตกต่างกัน.....	122
ตารางที่ ฉ.9 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชดัด แปรที่ ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชันที่ใช้เวลาในการดัดแปร แตกต่างกัน.....	123

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 การสกัดแป้ง.....	4
รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างแอมิโลเพกตินที่ประกอบด้วยส่วนผลึก และอสัณฐาน.....	7
รูปที่ 2.3 กิ่งก้านของแอมิโลเพกติน.....	8
รูปที่ 2.4 ขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งชนิดต่างๆ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด.....	11
รูปที่ 2.5 ภาพบริเวณส่วนผลึก และส่วนอสัณฐานของเม็ดแป้ง.....	12
รูปที่ 2.6 รูปแบบการพองตัวของแป้งชนิดต่างๆ.....	13
รูปที่ 2.7 รูปแบบการละลายของแป้งชนิดต่างๆ.....	14
รูปที่ 2.8 การเกิดเจลาตินในเซชันของเม็ดแป้ง.....	15
รูปที่ 2.9 การเกิดรีโทรเกรเดชันและการขับน้ำ	17
รูปที่ 2.10 Linear viscoelastic range (LVR).....	21
รูปที่ 2.11 Viscoelastic properties.....	23
รูปที่ 2.12 ปฏิริยาที่เร่งโดย CGTase.....	24
รูปที่ 2.13 ปฏิริยาของแอมิโลมอลเทส.....	27
รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการตัดแปรรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทส.....	37
รูปที่ 4.1 ลักษณะของเม็ดสตาร์ช ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และ กล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงโพลาไรซ์.....	41
รูปที่ 4.2 ค่ากำลังการพองตัวของสตาร์ชมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ.....	43
รูปที่ 4.3 ค่าการละลายของสตาร์ชมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ.....	43
รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำที่ปล่อยออกมาจากเจลาสตาร์ชมันสำปะหลังระหว่างการแช่เยือกแข็ง และการละลายน้ำแข็ง.....	46
รูปที่ 4.5 SDS-PAGE ของแอมิโลมอลเทสจากเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ที่ผ่านการโคลนดี เอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Corynebacterium glutamicum</i> ในการทำให้บริสุทธิ์..	48
รูปที่ 4.6 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส.....	54

	หน้า
รูปที่ 4.7 สมบัติ Thermo-reversibility ของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการตัด แปรรูปโดยแอมิโลมอลเทส.....	56
รูปที่ 4.8 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลัง ตัดแปรรูปโดยแอมิโลมอลเทสที่ใช้เวลาในการตัดแปรรูปต่างๆ.....	61
รูปที่ 4.9 วิเคราะห์สมบัติ Thermo-reversibility ของสตาร์ชมันสำปะหลังตัดแปรรูปโดยแอมิ โลมอลเทสที่ใช้เวลาในการตัดแปรรูปต่างๆ.....	62
รูปที่ 4.10 ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด.....	64
รูปที่ 4.11 ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงโพลาไรส์.....	65
รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์สมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง ของสตาร์ชตัดแปรรูปที่ใช้สตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน.....	70
รูปที่ 4.13 สมบัติ Thermo-reversibility ของสตาร์ชตัดแปรรูปที่ใช้สตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่าน การเจลาติไนเซชัน.....	71
รูปที่ 4.14 ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชที่ไม่ผ่าน และผ่านการตัด แปรรูปที่ใช้สตาร์ชไม่ผ่านการเจลาติไนเซชันด้วยการวัด Chain-length distribution โดยใช้ High performance anion exchange.....	73
รูปที่ 4.15 ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชที่ไม่ผ่าน และผ่านการตัด แปรรูปที่ใช้สตาร์ชผ่านการเจลาติไนเซชันด้วยการวัด Chain-length distribution โดยใช้ High performance anion exchange.....	74
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมิโลส.....	97
รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน.....	106
รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานสำหรับน้ำหนักโมเลกุลของแอมิโลมอลเทส.....	108
รูปที่ จ.1 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดเจลาติไนเซชันและรีโทรเกรดชัน สตาร์ชมันสำปะหลัง.....	110
รูปที่ จ.2 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดรีโทรเกรดชันสตาร์ชมันสำปะหลัง ตัดแปรรูปที่สภาวะต่างๆ.....	111
รูปที่ จ.3 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดรีโทรเกรดชันสตาร์ชมันสำปะหลัง ตัดแปรรูปที่เวลาต่างๆ.....	112

	หน้า
รูปที่ ๑.4 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดรีโทรเกรดชันสตาร์ชมันสำปะหลัง	113
ดัดแปรที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน.....	

บทที่ 1

บทนำ

แป้งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ พืชจะผลิตแป้งและเก็บสะสมไว้ในส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่น ธัญพืชจะเก็บแป้งในเมล็ด, มันฝรั่งเก็บแป้งในลำต้นใต้ดิน และมันสำปะหลังเก็บแป้งในราก โดยแป้งแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้งองค์ประกอบและสมบัติต่างๆ แป้งมันสำปะหลังถือเป็นแป้งที่มีความบริสุทธิ์มากเพราะมีปริมาณโปรตีนอยู่น้อยกว่าแป้งจากพืชชนิดอื่น ทำให้ง่ายต่อการผลิตสตาร์ช ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการผลิตและแปรรูปแป้งมันสำปะหลังมากที่สุดในโลก (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550) โดยมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ เช่น เพิ่มความหนืดในอาหาร, สารเคลือบกระดาษในอุตสาหกรรมกระดาษ และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตผงชูรสและสารให้ความหวาน เป็นต้น (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550) สตาร์ชแต่ละชนิดอาจมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ จึงมีการดัดแปรสตาร์ชเพื่อให้ได้สมบัติที่ต้องการ โดยการดัดแปรสตาร์ชมีหลายวิธีทั้งทางกายภาพเช่น การใช้ความร้อน, การทำพรีเจลาติไนเซชัน ทางเคมีเช่น การเชื่อมข้าม, การทำเอสเทอร์ฟิเคชัน และการดัดแปรสตาร์ชด้วยเอนไซม์ การดัดแปรสตาร์ชด้วยเอนไซม์เป็นทางเลือกหนึ่งในอุตสาหกรรมเพราะเป็นวิธีที่เกิดของเสียน้อย ไม่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ในอุตสาหกรรมมีการใช้ไฮโดรเลสหลายชนิดในการดัดแปรสตาร์ช เช่น α -amylase, β -amylase, pullulanase, glucoamylase และ isoamylase (Van der Maarel et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์กลุ่มอื่น เช่น 1,4-แอลฟา-กลูคาโนทรานส์เฟอเรส (แอมิโลมอลเทส) เพื่อผลิตสตาร์ชดัดแปรที่มีสมบัติเป็น Thermo-reversible gel หรือเจลสตาร์ชที่สามารถผันกลับระหว่างลักษณะเหลวและแข็งเมื่อได้รับความร้อนและทำให้เย็นซึ่งเป็นสมบัติที่พบได้ในเจลาติน นอกจากนี้สตาร์ชดัดแปรที่ได้อาจมี Freeze-thaw stability หรือความคงทนต่อการแช่แข็งและการละลายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง จากงานวิจัยที่ผ่านมาแอมิโลมอลเทสผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Thermus thermophilus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermus scotoductus* และ *Thermus aquaticus* เป็นต้น (Van der Maarel et al., 2005; Kaper et al., 2003, 2005; Hansen et al., 2009a; Lee et al., 2006) เนื่องจากได้มีการค้นพบว่า *Corynebacterium glutamicum* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ไม่ทนความร้อนที่สามารถผลิตแอมิโลมอลเทสได้ (Srisimararat et al., 2010) ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์มีผลให้เอนไซม์ที่ได้มีความแตกต่างกันออกไป อาจส่งผลต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปรที่ได้ งานวิจัยนี้จึง

มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตัดแปรรังผึ้งสำหรับผลิตโดยแอมัลโกลเทสที่ได้จากเชื้อดังกล่าว โดยศึกษาผลความเข้มข้นของรังผึ้ง ปริมาณเอนไซม์ เวลาที่ใช้ในการตัดแปรรัง และผลของการเจลาตินไนซ์ต่อสมบัติของรังผึ้งสำหรับผลิตที่ได้

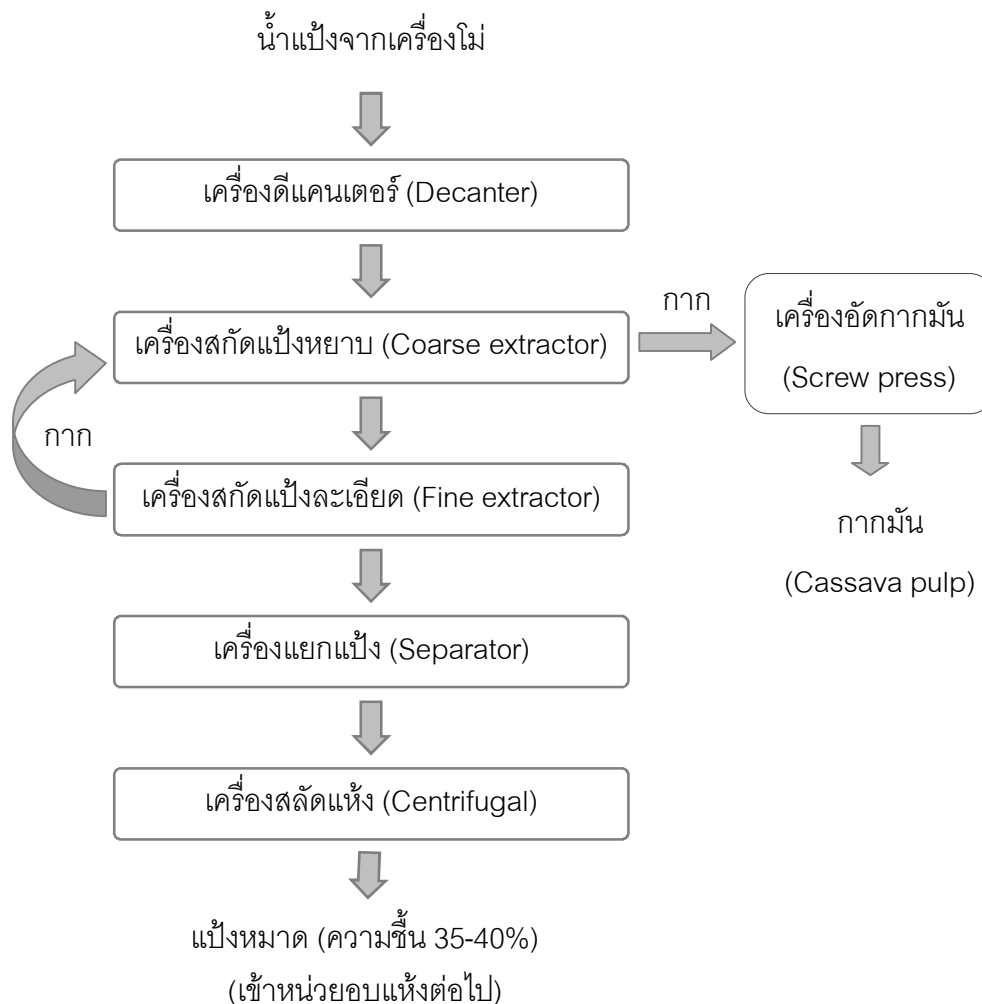
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 แป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัว มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Manihot esculenta* Crantz. มีชื่อสามัญที่เรียกแตกต่างกันตามประเทศ หลายชื่อเช่น cassava, yuca, tapioca, manioc มันสำปะหลังนิยมปลูกตามทีลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญ เป็นแหล่งให้พลังงานสูง มันสำปะหลังประกอบด้วยแป้งหรือคาร์โบไฮเดรต 20-30 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไขมันและโปรตีนน้อยมาก (ศุภชัยวิชัยพืชไร่ระยอง, 2547) แหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญที่สุดของประเทศไทยอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีผลผลิตประมาณร้อยละ 51 ของผลผลิตทั้งหมดภายในประเทศ โดยปลูกมากในจังหวัด นครราชสีมา ชัยภูมิ กาฬสินธุ์ ขอนแก่น อุดรธานี และบุรีรัมย์ ส่วนภาคกลางและตะวันออกมีผลผลิตประมาณร้อยละ 35.4 โดยจังหวัดที่ปลูกมากได้แก่ ฉะเชิงเทรา สระแก้ว ชลบุรี และระยอง (อภิสิทธิ์ ศิริตั้ง, 2546)

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่โรงงานทั่วไปใช้ในปัจจุบันเป็นแบบสไลด์แห้ง โดยมีขั้นตอนผลิตหลัก คือ การล้างหัวมันให้สะอาด โม่หัวมันสำปะหลัง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการสกัดแป้ง (รูปที่ 2.1) สูดทำย่นำมาอบแห้ง ร้อน และบรรจุถุง



รูปที่ 2.1 การสกัดแป้ง

ที่มา: กล้าณรงค์ ศิริรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550)

2.1.1 องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง

แป้งแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบในเม็ดแป้ง โครงสร้างของเม็ดแป้ง (Starch granule) ปริมาณแอมิโลส แอมิโลเพกตินแตกต่างกัน และมีความบริสุทธิ์แตกต่างกัน จึงทำให้มีสมบัติต่างๆ แตกต่างกันทั้งสมบัติการพองตัว การดูดน้ำ การเกิดเจลาตินไนซ์ ความหนืด และการเกิดการคืนตัว

แป้งมันสำปะหลังมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากแป้งชนิดอื่น (ตารางที่ 2.1) โดยปกติแป้งฟลาวร์จะมีโปรตีนเจือปนอยู่ จึงต้องมีกระบวนการแยกโปรตีนออกเพื่อผลิตเป็นสตาร์ชหรือแป้งบริสุทธิ์ แต่จะมีแป้งบางชนิดเช่น แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลังที่สกัดจากหัวมันสำปะหลังเป็นแป้งที่มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างมาก มีปริมาณโปรตีนเจือปนอยู่น้อยกว่า 0.3% จึงจัดว่าเป็น

สตาร์ชมันสำปะหลัง (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2521) สตาร์ชที่ได้หลังจากการแยกโปรตีนออกจะเรียกว่าแป้งดิบ หรือ สตาร์ชดิบ (Native starch) ส่วนสตาร์ชที่ได้ผ่านการดัดแปรเรียกว่า แป้งดัดแปรหรือสตาร์ชดัดแปร (Modified starch) แป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่มีไขมันต่ำ ซึ่งแป้งที่มีไขมันสูง จะมีความสามารถในการพองตัวและความสามารถในการละลายต่ำ และยังส่งผลให้เกิดฟิล์มและแป้งเปียก ที่มีลักษณะทึบแสง เนื่องจากไขมันจะรวมตัวกับแอมิโลสเกิดเป็น Amylose-lipid complex และกรดไขมันไม่อิ่มตัวบริเวณผิวเมล็ดสตาร์ช จะทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณฟอสฟอรัสต่ำ ซึ่งแป้งที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงเช่น แป้งมันฝรั่ง ทำให้ประจุบนพื้นผิวเป็นลบ มีแรงผลักระหว่างประจุ เม็ดแป้งมันฝรั่งจึงสามารถพองตัวได้ง่าย ทำให้มีความหนืดสูง (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่างๆ

ชนิดแป้ง	ความชื้น 65% RH, 20 °C	% ไขมัน	% โปรตีน	% เถ้า	% ฟอสฟอรัส
แป้งข้าวโพด	13	0.6	0.35	0.1	0.015
แป้งมันฝรั่ง	19	0.05	0.06	0.4	0.08
แป้งสาลี	14	0.8	0.4	0.15	0.06
แป้งมันสำปะหลัง	13	0.1	0.1	0.2	0.01
แป้งข้าวโพดเหนียว	13	0.2	0.25	0.07	0.007
แป้งข้าวฟ่าง	13	0.7	0.3	0.08	ไม่มีรายงาน
แป้งข้าวเจ้า	ไม่มีรายงาน	0.8	0.45	0.5	0.1
แป้งสาคู	ไม่มีรายงาน	0.1	0.1	0.2	0.02
แป้งข้าวโพดแอมิโลเมส	13	0.4	ไม่มีรายงาน	0.2	0.07
แป้งมันเทศ	13	ไม่มีรายงาน	ไม่มีรายงาน	0.1	ไม่มีรายงาน

ที่มา: Swinkels (1985)

แป้งประกอบด้วยโมเลกุล 2 ชนิดคือ แอมิโลสและแอมิโลเพกติน ซึ่งปริมาณแอมิโลสและแอมิโลเพกตินของแป้งจากแหล่งต่างกันจะมีอัตราส่วนที่ต่างกัน และส่งผลให้มีสมบัติที่ต่างกันอีก

ด้วย (ตารางที่ 2.2) แอมิโลส เป็นพอลิเมอร์ที่มีสายตรง ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glucosidic linkage มีความยาวประมาณ 500-2000 หน่วย ขึ้นอยู่กับชนิดแป้ง (Beynum and Roels, 1985) เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมากจึงทำให้สามารถจับกับโมเลกุลสสารชนิดอื่นได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน เช่นแอมิโลสจับกับแอมิโลเพกติน ทำให้เกิดโครงสร้างตาข่ายสามมิติ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง (Bower, 1992) และยังสามารถจับกับไขมัน กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Amylose-lipid complex) ซึ่งมีความคงทน ต้องใช้อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียสในการทำลายพันธะดังกล่าว (Kugimiya, Donovan, and Wong, 1980) แอมิโลสจากแป้งมันสำปะหลังไม่มีกิ่งก้าน (Hood, 1982) แตกต่างจาก แอมิโลสของข้าว และข้าวโพดซึ่งมีกิ่งก้านเล็กน้อย ประกอบด้วย long chain และ short side chain ซึ่ง short side chain มีความยาวประมาณ 18 DP (Hizukuri, 1996)

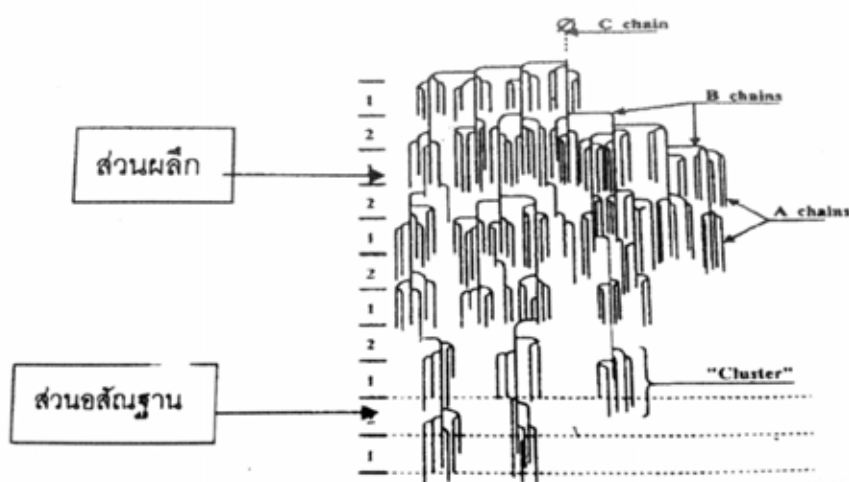
ตารางที่ 2.2 ปริมาณแอมิโลส และแอมิโลเพกตินของแป้งจากแหล่งต่างๆ

ชนิดแป้ง	แอมิโลส (%)	แอมิโลเพกติน (%)
แป้งข้าวโพด	28	72
แป้งมันฝรั่ง	21	79
แป้งสาลี	28	72
แป้งมันสำปะหลัง	17	83
แป้งข้าวโพดเหนียว	0	100
แป้งข้าวฟ่าง	28	72
แป้งข้าวเจ้า	17	83
แป้งสาคู	27	73
แป้งข้าวโพดแอมิโลเมส	50-80	20-50

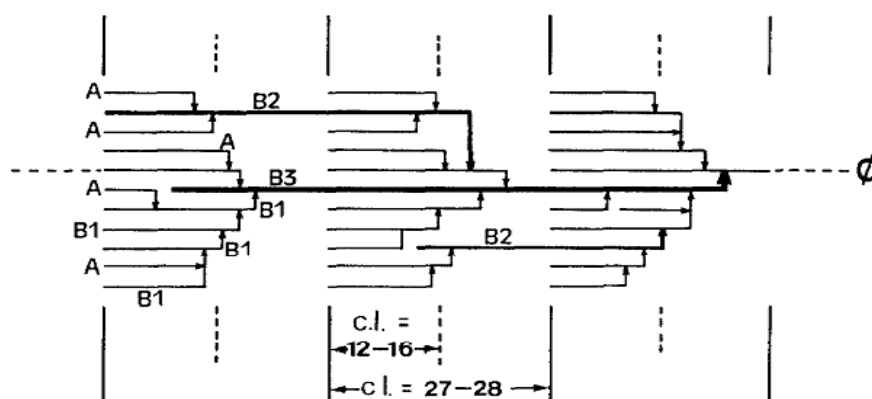
ที่มา: Beynum and Roels (1985)

แอมิโลเพกติน เป็นพอลิเมอร์ที่มีกิ่งก้านจำนวนมาก ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glucosidic linkage 94-96 เปอร์เซ็นต์ และ พันธะ α -1,6 glucosidic linkage 4-6 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวโดยเฉลี่ย 20-26 หน่วย (Hood, 1982) แอมิโลเพกตินมีน้ำหนักมากกว่าแอมิโลสประมาณ 1,000 เท่า เนื่องจากขนาดที่ใหญ่กว่า และมีกิ่งสาขาทำให้มีการคั่นตัวต่ำ

แอมิโลเพกตินสามารถรวมตัวกันทำให้เกิดโครงสร้างทั้งส่วนผลึก (Crystallites region) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous region) (รูปที่ 2.2) ซึ่งรวมตัวเป็นเม็ดสตาร์ชได้ ส่วนแอมิโลสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถเกิดเป็นส่วนผลึกได้ (กัลลาณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550) ส่วนที่เป็นกิ่งก้านของแอมิโลเพกตินแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (รูปที่ 2.3) คือ A chain เชื่อมต่อกับสายอื่นที่ตำแหน่งเดียว ไม่มีกิ่งเชื่อมต่อออกจากสาย, B chain มีโครงสร้างแบบกิ่งเชื่อมต่อกับสายอื่น 2 สาย หรือมากกว่า และ C chain เป็นสายแกนประกอบด้วยหมู่รีดิวซิง 1 หมู่ ในแอมิโลเพกติน 1 โมเลกุล จะมีสาย C เพียง 1 สายเท่านั้น แอมิโลเพกตินของแป้งมันสำปะหลัง มีค่า Degree of polymerization (DP) ของ A chain เท่ากับ 15 และ B chain เท่ากับ 45 อัตราส่วนของ A chain ต่อ B chain เท่ากับ 7.5:1 ซึ่งสูงกว่าแป้งมันฝรั่งแต่ต่ำกว่าแป้งจากธัญพืชอื่นๆ ความยาวสายโซ่เฉลี่ยของแอมิโลเพกตินของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 21 หน่วยกลูโคส (Hizukuri, 1996) ดังตารางที่ 2.3



รูปที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างแอมิโลเพกตินที่ประกอบด้วยส่วนผลึก และอสัณฐาน
ที่มา: Robin et al. (1974)



รูปที่ 2.3 กิ่งก้านของแอมิโลเพกติน : แสดงกิ่งชนิด A, B และ C
 Ø, reducing sugar end: —, (1,4) linkage: →, (1,6) linkage
 ที่มา: Hizukuri (1986)

ตารางที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างของแอมิโลเพกติน

ชนิดแป้ง	Average chain length
แป้งข้าว	19-22
แป้งสาลี	20-21
แป้งข้าวบาร์เลย์	20
แป้งข้าวโพด	22
แป้งข้าวโพดแอมิโลเมส	30-32
แป้งสาคุ	22
แป้งมันเทศ	21-22
แป้งมันสำปะหลัง	21
แป้งมันฝรั่ง	23

ที่มา: ดัดแปลงจาก Hizukuri (1996)

2.1.2 รูปร่างและโครงสร้างของเม็ดแป้ง

สตาร์ชที่พบในธรรมชาติจะมีเม็ดสตาร์ช (Starch granule) ขนาดเล็ก โดยเมื่อตรวจดูลักษณะของเม็ดสตาร์ชชนิดต่างๆ (ดังรูปที่ 2.4) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) พบว่าเม็ดสตาร์ชจะมีขนาด รูปร่าง และลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งของสตาร์ช (Li and Yeh, 2001) ขนาดของเม็ดแป้งของพืชแต่ละชนิดยังมีความแตกต่างกันอีกด้วย โดยแป้งมันฝรั่งถือเป็นแป้งที่มีเม็ดแป้งขนาดใหญ่ที่สุด แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดมีขนาดปานกลาง ส่วนแป้งสาลีจะมีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ (ตารางที่ 2.4)

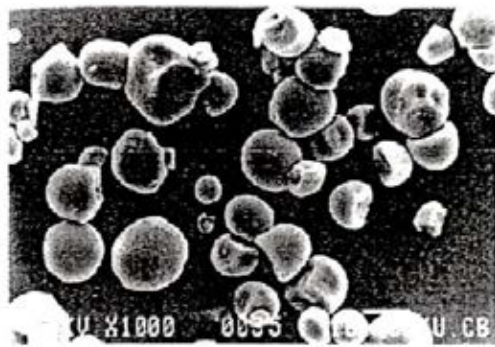
ลักษณะของเม็ดแป้งมันสำปะหลังเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบรูปร่างเม็ดกลมหรือรูปไข่ อาจมีรอยตัดที่ปลายด้านหนึ่งของเม็ดแป้ง เม็ดแป้งส่วนใหญ่จะมีขนาด 5-30 ไมครอน และมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 16 ไมครอน (Huang et al., 2007) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าเม็ดแป้งมันฝรั่ง (5-100 ไมครอน) แต่ใหญ่กว่าแป้งข้าวเจ้า

แป้งแต่ละชนิดมีโครงสร้างของเม็ดแป้งที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้แป้งแต่ละชนิดมีสมบัติต่างกัน ปกติแล้วเม็ดแป้งจะประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นผลึก (Crystallite) ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของแอมิโลเพกตินสายสั้น (A chain และสายโซ่ภายนอกของ B chain) และส่วนที่เป็นอสัณฐาน (Amorphous/ Gel phase) เกิดจากส่วนที่เป็นแอมิโลส และแอมิโลเพกตินสายยาว (รูปที่ 2.5) อัตราส่วนของส่วนที่เป็นผลึกของแป้งจะขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง (Hizukuri, Kaneko and Takeda, 1983) ในส่วนผลึกจะมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และหนาแน่น ทำให้น้ำและสารเคมีเข้าไปในเม็ดแป้งได้ยาก เกิดการพองตัวและเกิดปฏิกิริยาได้ต่ำ แต่ตามบริเวณพื้นผิวของแอมิโลเพกตินจะประกอบด้วยช่องเล็กๆ (Micro channels) ซึ่งจะช่วยให้ น้ำและสารเคมีสามารถแทรกเข้าไปได้ ส่วนที่เป็นอสัณฐานมีการจัดเรียงตัวกันแบบหลวมๆ น้ำและสารเคมีจึงสามารถแทรกเข้าไปได้ง่ายกว่า ซึ่งน้ำถือเป็นส่วนประกอบสำคัญที่จะทำให้เม็ดแป้งบวมและช่วยให้สารเคมีเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น (วชิราพรรณ นุญญาพุทธิพงศ์, 2543) แป้งแต่ละชนิดจะมีการจัดเรียงตัวที่แตกต่างกัน คือ แป้งจากธัญพืชต่างๆจะมีการเรียงตัวที่หนาแน่นมาก แป้งจากพืชหัวจะมีการจัดเรียงตัวแบบหลวมๆ ส่วนแป้งจากพืชตระกูลถั่วจะมีการจัดเรียงตัวปนกันทั้ง 2 แบบ

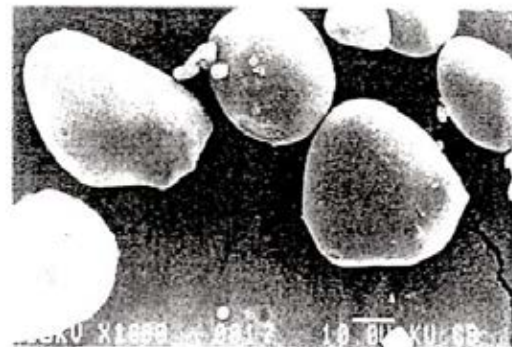
ตารางที่ 2.4 ลักษณะของเม็ดแป้งแต่ละชนิด

	แป้งมันฝรั่ง	แป้งข้าวโพด	แป้งสาลี	แป้งมันสำปะหลัง	แป้งข้าวโพด ข้าวเหนียว
แหล่งของแป้ง	ส่วนหัว	เมล็ดธัญพืช	เมล็ดธัญพืช	ส่วนราก	เมล็ดธัญพืช
เส้นผ่านศูนย์กลาง (ไมครอน)	5 - 100	2 - 30	1 - 45	4 - 35	2 - 30
เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยจำนวน (ไมครอน)	27	10	8	15	10
เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (ไมครอน)	40	15	25	25	15
จำนวนเม็ดแป้ง ($\times 10^6$) ต่อแป้ง 1 กรัม	60	1300	2600	500	1300
จำนวนโมเลกุลของแป้ง ($\times 10^{12}$) ต่อเม็ด แป้ง 1 หน่วย	50	10	5	4	0.01
พื้นที่ผิวจำเพาะ (เมตร ² /กิโลกรัม)	100	300	500	200	300

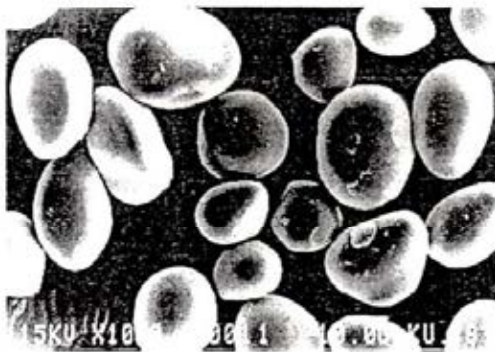
ที่มา: Swinkels (1985)



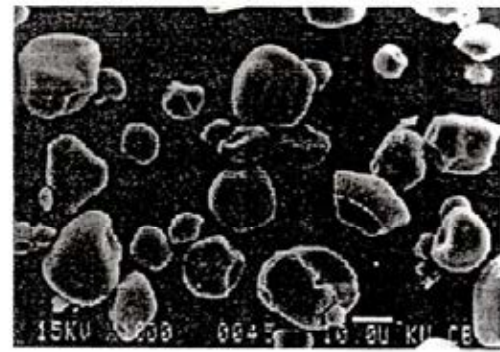
(ก) แป้งกล้วย



(ข) แป้งกล้วย



(ค) แป้ง arrowroot



(ง) แป้งมันเทศ

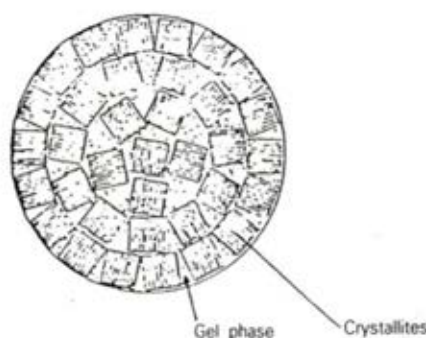


(จ) แป้งเม็ดขนุน (jackfruit)



(ฉ) แป้งข้าวเจ้า

รูปที่ 2.4 ขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งชนิดต่างๆ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยาย (ก)-(จ) 1000 เท่า และ (ฉ) 3000 เท่า
ที่มา: ก้านณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550)



รูปที่ 2.5 ภาพบริเวณส่วนผลึก และส่วนอสัณฐานของเม็ดแป้ง

ที่มา: French (1975)

2.4 สมบัติทางเคมีกายภาพ

2.4.1 การกำลัการพองตัวและความสามารถในการละลาย

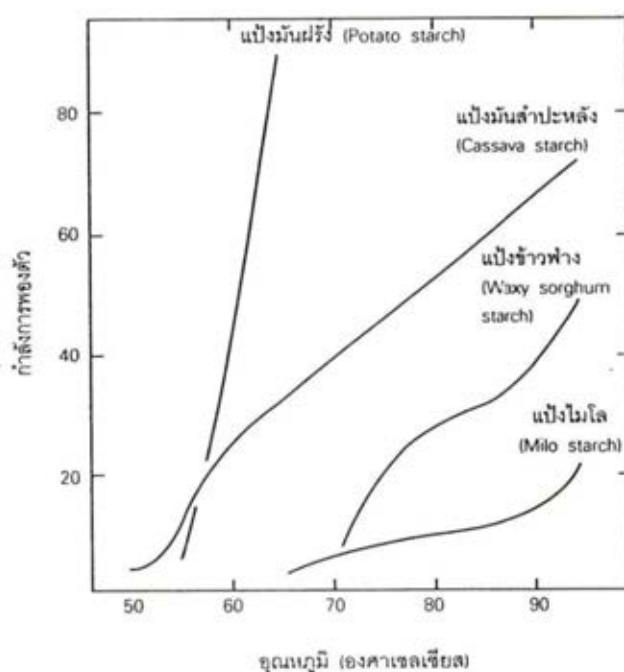
ลักษณะการเรียงตัวของเม็ดแป้งทำให้เม็ดแป้งไม่สามารถละลายในน้ำเย็นได้ เมื่อตั้งแป้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเม็ดแป้งจะดูดน้ำจากบรรยากาศจนเกิดสมดุลระหว่างความชื้นในบรรยากาศและความชื้นในเม็ดแป้ง ปริมาณน้ำที่ถูกดูดซึมจะขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศ โดยปกติแป้งจะเกิดสมดุลที่ความชื้นประมาณ 10-17% (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550) เม็ดแป้งจะประกอบด้วยรูพรุนขนาดเล็ก ทำให้น้ำหรือของเหลวอื่นสามารถแพร่เข้าไปภายในได้ เมื่อละลายแป้งดิบที่อุณหภูมิห้อง เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำได้ในปริมาณหนึ่ง ทำให้เม็ดแป้งเกิดการพองตัวซึ่งเป็นการพองตัวแบบผันกลับได้ (ณัฐญา ปาลวัฒน์, 2545)

แป้งดิบจะละลายได้น้อยมากที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ พันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลภายในเม็ดแป้งจะอ่อนตัวลง ทำให้น้ำเข้าไปจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระ เม็ดแป้งเกิดการพองตัวได้มากขึ้น ทำให้การละลาย และความหนืดเพิ่มมากขึ้น กำลัการพองตัวจะแสดงในรูปน้ำหนักของเม็ดแป้งที่เพิ่มขึ้น และความสามารถในการละลายแสดงในรูปน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารละลายที่สามารถละลายได้

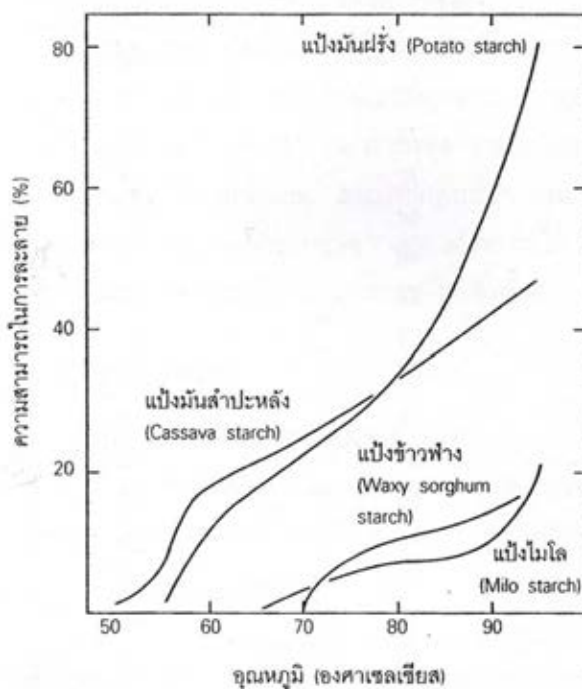
ปัจจัยที่มีผลต่อกำลัการพองตัวและการละลายขึ้นอยู่กับ ชนิดของเม็ดแป้ง, ปริมาณ และโครงสร้างของแอมิโลส และแอมิโลเพกติน, ความแข็งแรงและลักษณะร่างแหในเม็ดแป้ง, สิ่งเจือปนในเม็ดแป้ง เช่น ไขมัน หมู่ฟอสเฟต และปริมาณน้ำในสภาวะที่เกิดการพองตัว แป้งที่มี

แอมิโลสสูงจะมีกำลังการพองตัวต่ำกว่าแป้งที่มีแอมิโลสต่ำ เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของแอมิโลสที่เป็นเส้นตรงทำให้เกิดพันธะกับโมเลกุลน้ำได้ดี และแอมิโลสยังอาจจับตัวกับไขมันทำให้ขัดขวางการพองตัวของเม็ดแป้งได้อีกด้วย แป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่มีแอมิโลสต่ำ จึงมีกำลังการพองตัวที่ดี และมีค่าความสามารถในการละลายสูงสัมพันธ์กับการพองตัว (รูปที่ 2.6-2.7) แป้งมันสำปะหลังมีค่ากำลังการพองตัวประมาณ 70 (กรัม/กรัม) และค่าความสามารถในการละลายประมาณ 48% ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส (Leach, McCowen and Schoch, 1959)

จากรูปที่ 2.6 จะเห็นได้ว่าแป้งจากธัญพืช (แป้งข้าวฟ่าง) จะมีการพองตัว 2 ชั้น เนื่องจากมีความแตกต่างกันสูงระหว่างส่วนเปลือกและส่วนอณูฐาน นอกจากนี้แป้งธัญพืชเช่น แป้งข้าวฟ่าง จะมีความสามารถในการพองตัวต่ำ เพราะการจัดเรียงตัวของผลึกหนาแน่นมาก ทำให้โครงสร้างร่างแหมีความแข็งแรงมาก แป้งจากราก เช่น แป้งมันสำปะหลัง จะมีการพองตัวชั้นตอนเดียว สามารถพองตัวได้ดีกว่าแป้งจากธัญพืช ส่วนแป้งจากหัว เช่น แป้งมันฝรั่ง จะมีการพองตัวได้สูงมากที่สุด เพราะการจัดเรียงตัวของเม็ดแป้งมีการจัดเรียงตัวแบบหลวมๆ



รูปที่ 2.6 รูปแบบการพองตัวของแป้งชนิดต่างๆ
ที่มา: Leach et al. (1959)



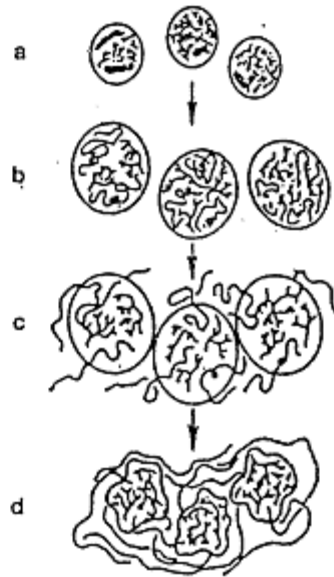
รูปที่ 2.7 รูปแบบการละลายของแป้งชนิดต่างๆ
ที่มา: Leach et al. (1959)

2.4.2 การเกิดเจลลิตินเซชัน

แป้งจะเกิดการเจลาตินเซชันเมื่อมีความชื้นมากกว่า 60% คือมีอัตราส่วนของโมเลกุลกลูโคสต่อปริมาณน้ำอย่างน้อย 1:14 เมื่อให้ความร้อน ความร้อนจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจน และน้ำจะแทรกเข้าไปภายในเม็ดแป้ง ทำให้เกิดการบวม และพองตัวของเม็ดแป้ง ในช่วงแรกน้ำจะแทรกเข้าไปในส่วนอสัณฐานก่อน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นก็จะเกิดการทำลายส่วนผลึก จนถูกทำลายสมบูรณ์ แอมิโลสจะถูกชะออกจากเม็ดแป้ง ส่วนที่เหลือเริ่มหนืดขึ้น และเกิดเป็นเจล (Lai and Kokini, 1991) ดังรูปที่ 2.8

อุณหภูมิที่เกิดการเจลาตินเซชันจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแป้ง เพราะความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของแอมิโลส แอมิโลเพกทินในโครงสร้างของเม็ดแป้ง ทำให้เม็ดแป้งมีขนาดและลักษณะที่ต่างกัน ส่งผลให้อุณหภูมิที่เกิดการเจลาตินเซชันแตกต่างกันไปด้วย โดยอุณหภูมิที่เกิดเจลาตินเซชันจะเกิดเป็นช่วงอุณหภูมิ สามารถตรวจสอบโดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ซึ่งสามารถวัดปริมาณความร้อนที่เปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนการ

เจลาตินในเซชัน (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550) แสดงดังตารางที่ 2.5 ในกรณีของแป้งมันสำปะหลัง อุดมภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชันอยู่ในช่วง 64-92 องศาเซลเซียส



- (a) แกรนูลสตาร์ชดิบประกอบด้วยแอมิโลสและแอมิโลเพกติน
 (b) น้ำที่เติมเข้าไปทำลายส่วนอสัณฐาน แกรนูลเกิดการพองตัว
 (c) ความร้อนและน้ำที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการพองตัวได้มากขึ้น แอมิโลสละลายออกจากแกรนูล
 (d) แกรนูลสตาร์ชประกอบด้วยแอมิโลเพกตินเป็นส่วนใหญ่ซึ่งจับอยู่กับแอมิโลสทำให้เกิดเป็นเจล

รูปที่ 2.8 การเกิดเจลาตินในเซชันของเม็ดแป้ง

ที่มา: Lai และ Kokini (1991)

ตารางที่ 2.5 ช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลลาติไนเซชัน (T_o - T_p) ของแป้งชนิดต่างๆ โดย DSC

แป้ง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
แป้งข้าวโพด	70-89
แป้งมันฝรั่ง	57-87
แป้งสาลี	50-86
แป้งมันสำปะหลัง	64-92
แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว	68-90

หมายเหตุ T_o (Onset temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิด Gelatinization,

T_p (Peak temperature) คือ อุณหภูมิในการเกิด Gelatinization สูงสุด

ที่มา: Swinkels (1985)

2.4.3 การเกิดรีโทรเกรเดชัน

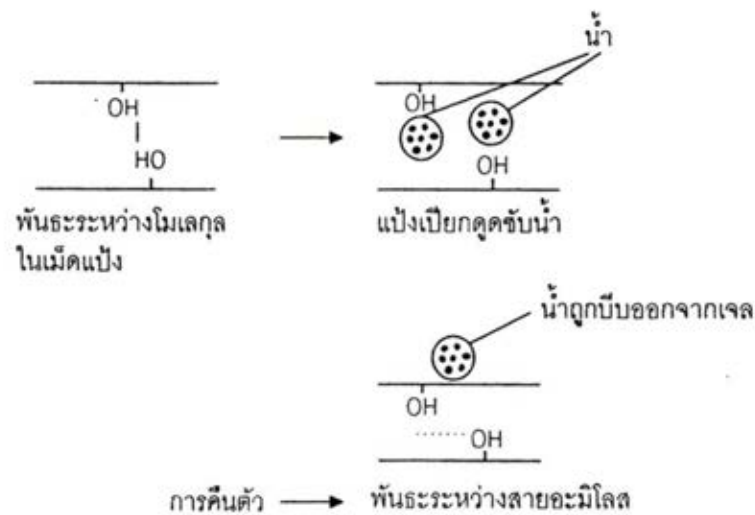
เมื่อแป้งถูกให้ความร้อนถึงอุณหภูมิเจลลาติไนเซชัน เม็ดแป้งเกิดการพองตัวและแตกออก ความหนืดลดลง และเมื่อลดอุณหภูมิลงจนเย็น โมเลกุลของแป้งจะจัดเรียงตัวกันใหม่ โดยเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายแอมิโลสดังรูปที่ 2.9 ให้ความหนืดเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของแอมิโลสจะเร็วกว่าแอมิโลเพกตินมาก เนื่องจากโครงสร้างของแอมิโลเพกตินมีลักษณะเป็นกิ่งก้านทำให้เกิดอุปสรรคในการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ทำให้โมเลกุลไม่สามารถจับกันอย่างแน่นหนาไม่สามารถเกิดการคืนตัวเป็นเจลที่แข็งแรงได้ในเวลาสั้นๆ แต่แอมิโลสมีโครงสร้างที่มีกิ่งก้านเพียงเล็กน้อยทำให้โมเลกุลสามารถมาเชื่อมต่อกันได้ด้วยพันธะไฮโดรเจนได้แน่นหนาเกิดเป็นเจล (วชิราพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์, 2543) อัตราส่วนระหว่างแอมิโลสและแอมิโลเพกตินทำให้แป้งแต่ละชนิดมีลักษณะเจลที่แตกต่างกัน แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณแอมิโลสต่ำทำให้เกิดเจลที่นุ่ม แต่แป้งที่ประกอบด้วยแอมิโลสสูงจะให้เจลที่มีความแข็งแรงมาก แป้งแต่ละชนิดจะเกิดการเรียงตัวใหม่ที่แตกต่างกัน อัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของปริมาณแอมิโลสต่อแอมิโลเพกติน, อุณหภูมิ, ชนิดและความเข้มข้นของแป้ง

ความยาวสายโซ่ของแอมิโลสที่เกิดรีโทรเกรเดชันได้ดีคือประกอบด้วยกลูโคส 80-100 หน่วย ความยาวสายของแอมิโลสที่สั้นที่สุดที่สามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้ดีคือ 8-10 หน่วย ส่วนแอมิโลเพกตินที่ประกอบด้วยกิ่งก้านที่มีสายสั้นๆจะสามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้ แต่ถ้ามีความยาวสั้นกว่า 15 หน่วยจะไม่สามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้ (Eliasson and Gudmundson, 1996)

อัตราส่วนระหว่างแอมิโลสและแอมิโลเพกติน มีผลต่อการเกิดรีโทรเกรดชัน เมื่อมีปริมาณแอมิโลเพกตินมาก จะทำให้เกิดการขัดขวางการจัดเรียงตัวใหม่ของแอมิโลส ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเกิดรีโทรเกรดชัน ทำให้การเกิดรีโทรเกรดชันลดลง (Eliasson and Gudmundson, 1996)

อุณหภูมิในการเก็บเจลแข็งมีผลต่อการเกิดรีโทรเกรดชัน โดยเมื่อเก็บเจลแข็งที่อุณหภูมิต่ำแต่สูงกว่า glass transition temperature (T_g) จะทำให้เกิดการรีโทรเกรดชันเพิ่มมากขึ้นกว่าการเก็บที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า Glass transition temperature (T_g) จะเป็นการยับยั้งการเกิดรีโทรเกรดชัน (Eliasson and Gudmundson, 1996)

แป้งแต่ละชนิดจะมีอัตราการคืนตัวที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2.6) แป้งที่มีปริมาณแอมิโลสสูงจะเกิดการคืนตัวได้มากและเร็วกว่าแป้งที่มีแอมิโลสต่ำ แอมิโลสที่มีขนาดโมเลกุล DP 100-200 จะมีอัตราการคืนตัวสูงสุด และอัตราการคืนตัวจะลดลงเมื่อโมเลกุลของแอมิโลสยาวหรือสั้นมากกว่านี้ แอมิโลเพกตินมีผลในการคืนตัวในระยะสั้นน้อยกว่าแอมิโลสมาก แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณแอมิโลสค่อนข้างต่ำ ทำให้มีอัตราการคืนตัวต่ำกว่าแป้งข้าวโพดและแป้งสาลี เนื่องจากในแป้งธัญพืชมีแอมิโลสสูง และมีแอมิโลสโมเลกุลเล็ก ส่วนแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวมีอัตราการคืนตัวต่ำที่สุด เนื่องจากมีแอมิโลสในแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวน้อย



รูปที่ 2.9 การเกิดรีโทรเกรดชันและการซับน้ำ
ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550)

ตารางที่ 2.6 อัตราการคืนตัวของแป้งแต่ละชนิด

ชนิดของแป้ง	% การตกตะกอนของส่วนที่ไม่ละลาย		
	5 วัน	10 วัน	30 วัน
แป้งมันฝรั่ง	10	15	20
แป้งข้าวโพด	37	48	62
แป้งสาลี	45	48	52
แป้งมันสำปะหลัง	11	12	13
แป้งข้าวโพดข้าวเหนียว	0.2	0.5	1

ที่มา: Swinkels (1985)

จากการที่เกิดการจัดเรียงตัวใหม่เมื่อทำการลดอุณหภูมิ ทำให้เกิดการขับน้ำออกจากเม็ดแป้ง (Syneresis) ซึ่งการขับน้ำถือเป็นข้อเสียของผลิตภัณฑ์แช่แข็ง เพราะจะทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสสูญเสียไป มีน้ำอยู่บนผิวของผลิตภัณฑ์ การแช่แข็งจะช่วยให้น้ำมารวมตัวเป็นผลึกน้ำแข็ง และเมื่อผ่านการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งซ้ำหลายๆ ครั้ง จะมีผลทำให้น้ำแยกออกมาจากเจลแป้งมากขึ้นเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ ขณะเดียวกันเจลแป้งจะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทำให้แอมิโลสซึ่งถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดเจลในเซชันเข้ามาเรียงตัว เกิดโครงสร้างที่สามารถอุ้มน้ำและไม่ละลายอีกหรือการเกิดรีโทรเกรเดชัน ทำให้เจลแป้งมีความแข็งแรงและยืดหยุ่น เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงจึงสามารถแยกส่วนของน้ำออกจากส่วนของเจลแป้งได้ การบีบน้ำให้แยกออกมา แสดงถึงความคงทนต่อการละลายและการแช่เยือกแข็ง (Freeze-thaw stability) (Muadklay and Charoenrein, 2008) เนื่องจากแป้งแต่ละชนิดมีการคืนตัวที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการปลดปล่อยน้ำออกมาต่างกันเช่นกัน (ตารางที่ 2.7) แป้งมันสำปะหลังมีการคืนตัวต่ำ ส่งผลให้มีการปลดปล่อยน้ำออกมาต่ำในรอบแรก และเพิ่มขึ้นในรอบหลัง

ตารางที่ 2.7 ร้อยละการปลดปล่อยน้ำของเจลสตาร์ชนิดต่างๆ ระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็ง และการละลายน้ำแข็ง

ชนิดของสตาร์ช	ร้อยละการปลดปล่อยน้ำ		
	รอบที่ 1	รอบที่ 3	รอบที่ 5
เผือก	20.7	56.7	67.2
มันสำปะหลัง	-	38.9	51.5
มันฝรั่ง	60.0	71.5	75.6
ข้าวโพด	35.4	69.5	73.3
ข้าวโพดข้าวเหนียว	9.6	33.7	53.9
สาคุ	21.7	66.8	68.8
ถั่วเขียว	42.8	64.5	73.1

ที่มา: Srichuwong et al. (2012)

2.4.4 สมบัติทางกระแสวิทยา

สมบัติทางกระแสวิทยา คือสมบัติในการเปลี่ยนรูปร่างและการไหลของวัสดุเมื่อมีแรงมากระทำ การศึกษาทางกระแสวิทยาของวัสดุเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นและความเครียดหรือความสัมพันธ์ระหว่างแรงและการเปลี่ยนรูปร่าง (จิราวัฒน์ ทัตติยกุล, 2554) ซึ่งการเปลี่ยนรูปร่างเป็นพฤติกรรมการแสดงออกของโครงสร้างของแข็งเมื่อมีแรงมากระทำ แสดงออกในรูปความยืดหยุ่น (Elastic) ส่วนการไหลเป็นพฤติกรรมการแสดงออกของโครงสร้างของเหลว แสดงออกในรูปความหนืด (Viscous) (สวנית อิชยาวณิชย, 2545)

อาหารส่วนใหญ่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน ส่งผลให้พฤติกรรมที่แสดงออกเนื่องจากมีแรงมากระทำเป็นพฤติกรรมร่วมระหว่างของแข็งและของเหลว (Fluid-solid) หรือเรียกว่า Viscoelastic ซึ่งการศึกษาทางกระแสวิทยาจะทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าอาหารนั้นมีความเด่นชัดของความเป็นของแข็งหรือของเหลวมากกว่ากัน และผสมกันในลักษณะใด โดยเครื่องมือที่ใช้วัดความหนืดเพียงอย่างเดียวจะเรียกว่า Viscometer แต่หากสามารถวัดค่าตัวแปรอื่นๆ เพื่อการประเมินลักษณะทางกระแสวิทยา จะเรียกว่า Rheometer ซึ่งนิยมใช้ในการทดสอบพื้นฐานกับตัวอย่างของไหลที่มีสมบัติ Viscoelastic การทดสอบจะใช้วิธี Oscillatory หรือ Dynamic shear experiment ซึ่งเป็นการทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง แสดงสมบัติทางการเปลี่ยนรูปร่างเมื่อได้รับ

แรง (Viscous) และสมบัติการต้านทานการไหลของของแข็ง (Elastic) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามองค์ประกอบของตัวอย่าง และปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ เวลา อัตราเฉือน เป็นต้น ค่าที่วัดได้จากการทดลองจะเป็นค่า Storage modulus (G') และ Loss modulus (G'') โดยค่า Storage modulus (G') เป็นค่าที่แสดงถึงความเป็นของแข็งยืดหยุ่น (Elastic solid) ของตัวอย่าง ส่วนค่า Loss modulus (G'') แสดงความเป็นของเหลว (Liquid) ของตัวอย่าง ถ้าตัวอย่างมีค่า Storage modulus (G') มากกว่า Loss modulus (G'') แสดงว่าตัวอย่างมีสมบัติความเป็นของแข็งมากกว่าของเหลว สามารถคงรูปร่างได้ดีเมื่อมีแรงกระทำ ในทางตรงกันข้ามถ้าตัวอย่างมี Loss modulus (G'') มากกว่า Storage modulus (G') จะแสดงว่าตัวอย่างมีสมบัติความเป็นของเหลวมากกว่าของแข็ง สามารถเปลี่ยนรูปร่างได้เมื่อได้รับแรงกระทำ (จิราวัฒน์ ทัตติยกุล, 2554)

สัดส่วนระหว่าง (G') และ (G'') สามารถบ่งถึง Phase shift ได้ตามสมการ

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

เมื่อ δ คือ Phase shift มีหน่วยเป็นองศา ($^{\circ}$) เป็นค่าที่สามารถบอกความเป็น Viscoelastic ของตัวอย่างได้ ค่า δ จะสามารถบ่งบอกสถานะของตัวอย่างได้ดังตารางที่ 2.8 ถ้า $\tan \delta$ มีค่าต่ำ (G' มากกว่า G'') จะแสดงลักษณะเป็นของแข็ง และถ้า $\tan \delta$ มีค่าสูง (G'' มากกว่า G') จะแสดงลักษณะเป็นของเหลว โดยอาหารโดยทั่วไปจะมีค่า $0^{\circ} < \delta < 90^{\circ}$

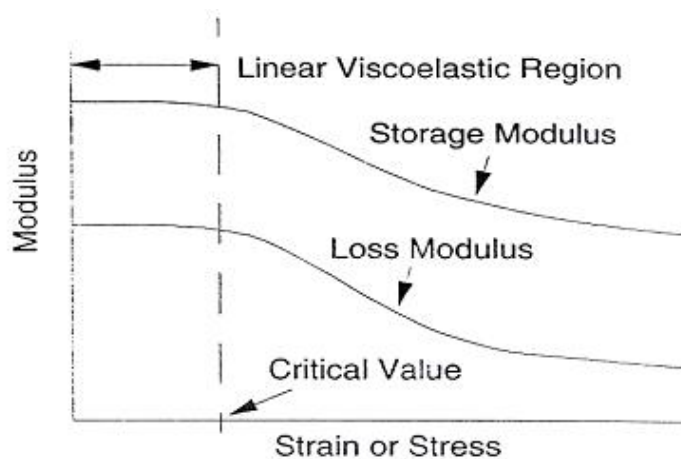
ตารางที่ 2.8 ค่า δ , $\tan \delta$, G' และ G'' ของแต่ละสถานะ

Ideal viscous flow behavior	Behavior of a viscoelastic liquid	Viscoelastic behavior showing 50/50 ratio of the viscous and elastic portions	Behavior of a viscoelastic gel or solid	Ideal elastic deformation behavior
$\delta = 90^\circ$	$90^\circ > \delta > 45^\circ$	$\delta = 45^\circ$	$45^\circ > \delta > 0^\circ$	$\delta = 0^\circ$
$\tan \delta \rightarrow \infty$	$\tan \delta > 1$	$\tan \delta = 1$	$\tan \delta < 1$	$\tan \delta \rightarrow 0$
$G' \rightarrow 0$	$G'' > G'$	$G'' = G'$	$G' > G''$	$G'' \rightarrow 0$

ที่มา: Mezger (2006)

วิธี Oscillatory หรือ Dynamic shear experiment นิยมใช้ศึกษาพฤติกรรมการไหลของน้ำแป้งแบ่งเป็น 4 การทดสอบ ได้แก่ Amplitude sweep test, Frequency sweep test, Temperature sweep test และ Time sweep test

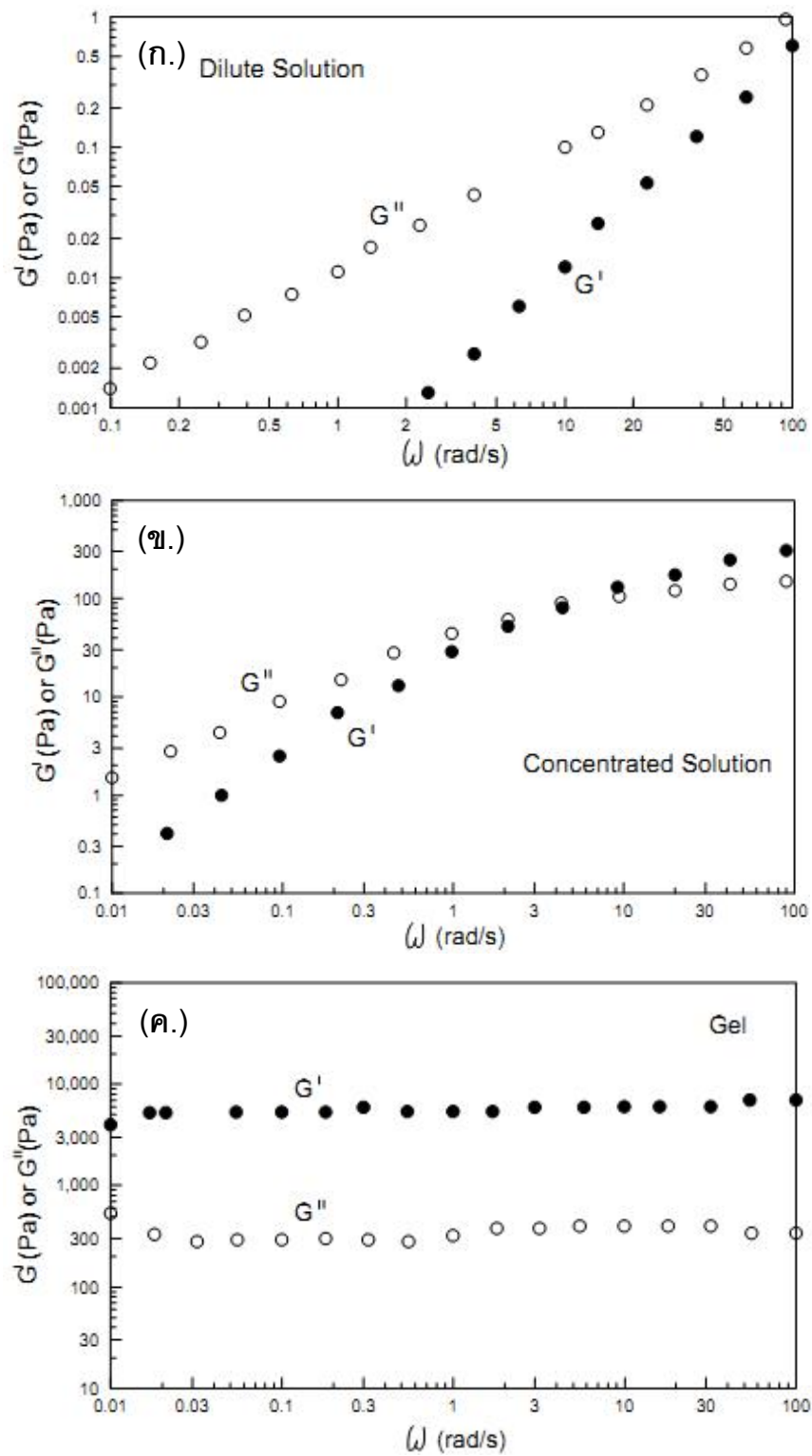
1. Amplitude sweep test เป็นการทดสอบในขั้นแรกของ Dynamic shear experiment เพื่อหาช่วง Linear viscoelastic range (LVR) ดังรูปที่ 2.10 เป็นช่วงที่ค่า Modulus ไม่ขึ้นกับความเค้นหรือความเครียด ทดสอบโดยการแปรค่าความเค้น (Strain) หรือค่าความเครียด (Stress) จากต่ำไปถึงสูง สังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงค่า Modulus



รูปที่ 2.10 Linear viscoelastic range (LVR)

ที่มา: Steffe (1996)

2. Frequency sweep test เป็นการทดสอบผลของอัตราเฉือนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของตัวอย่าง โดยศึกษาจากการเปลี่ยนตำแหน่งของค่า G' และ G'' หรือสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงค่า Phase shift (δ) โดยสามารถแบ่งรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างเป็น 3 แบบ ดังรูปที่ 2.11(ก.-ค.) โดยรูปที่ 2.11(ก.)แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า G' และ G'' ตามแรงเฉือนของสารละลายเจือจาง ซึ่งค่า G'' มากกว่า G' ตลอดทั้งการทดลอง ค่า G'' และ G' เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีค่าเข้าใกล้ G'' เมื่อให้แรงเฉือนสูง รูปที่ 2.11(ข.) แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า G' และ G'' ตามแรงเฉือนของสารละลายเข้มข้น โดยค่า G'' มีค่ามากกว่าค่า G' ในช่วงแรงเฉือนต่ำ แสดงถึงความเป็นของเหลวซัดกว่าของแข็ง แต่เมื่อเพิ่มแรงเฉือนพบว่าค่า G' มีค่ามากกว่าค่า G'' ซึ่งแสดงถึงความเป็นของแข็งยืดหยุ่น (Viscoelastic) ที่แรงเฉือนสูงๆ ส่วนรูปที่ 2.11(ค.) แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า G' และ G'' ตามแรงเฉือนของเจล โดยค่า G' มีค่ามากกว่าค่า G'' และมีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดทั้งการทดลอง
3. Temperature sweep test ใช้ในการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อลักษณะการไหลของตัวอย่าง เมื่อทำการเพิ่มหรือลดอุณหภูมิ โดยใช้แรงเฉือนคงที่
4. Time sweep test เป็นการทดสอบอิทธิพลของเวลาในการทดสอบ โดยควบคุมแรงเฉือน และอุณหภูมิให้คงที่ ใช้ในการติดตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับตัวอย่าง



รูปที่ 2.11 Viscoelastic properties ของ (ก.) สารละลายเจือจาง

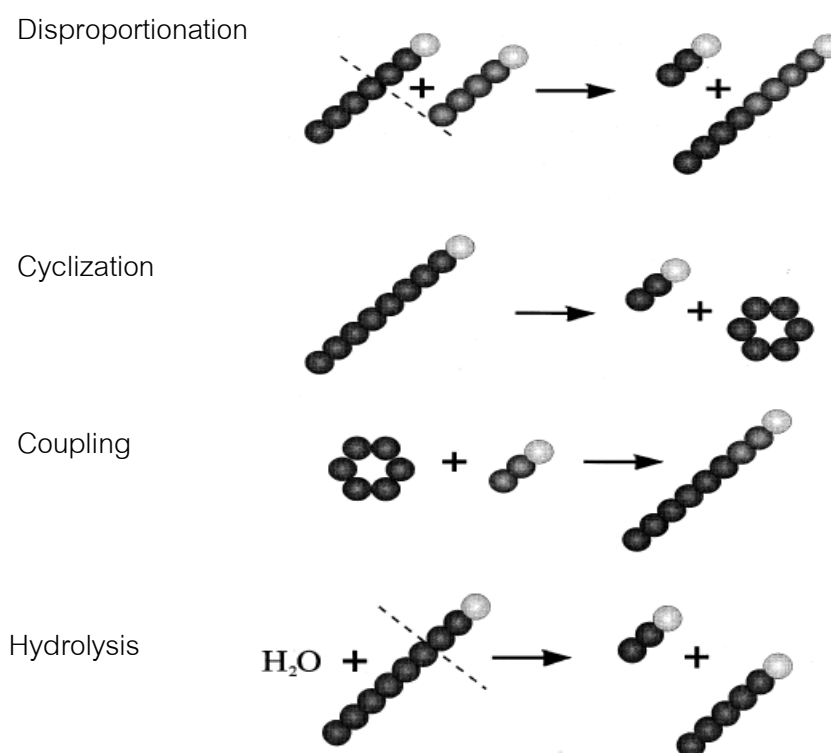
(ข.) สารละลายเข้มข้น (ค.) เจล

ที่มา: Steffe (1996)

2.5 การตัดแปรรสตา์ชด้วยแอมิโลมอลเตส

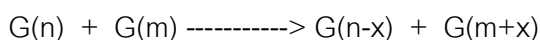
ปัจจุบันการตัดแปรรสตา์ชด้วยเอนไซม์ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้ไฮโดรเลสหลายชนิด เช่น α -amylase, β -amylase, pullulanase, glucoamylase และ isoamylase (Van der Maarel et al., 2002) โดยเอนไซม์ดังกล่าวตัดพันธะ α -1,4 หรือ α -1,6-glycosidic bond ของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินและใช้น้ำเป็นตัวรับ นอกจากนี้อาจใช้เอนไซม์กลุ่มอื่น เช่น กลุ่มไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส ซึ่งประกอบด้วย Branching enzyme (1,4- α -D-glucan branching enzyme; E.C. 2.4.1.18), Cyclodextrin glycosyltransferase (E.C. 2.4.1.19) และ Amylomaltase (α -glucanotransferase, Disproportional enzyme, D-enzyme E.C. 2.4.1.25)

ปฏิกิริยาของไซโคลเด็กซ์ตรินไกลโคซิลทรานส์เฟอเรส (CGTase) และ แอมิโลมอลเตส (AM) จะแตกต่างจากเอนไซม์ย่อยแป้งตัวอื่น โดยเอนไซม์ทั้งคู่ต่างมีปฏิกิริยาเหมือนกัน โดยสามารถเกิดได้ 4 ปฏิกิริยาดังรูปที่ 2.12



รูปที่ 2.12 ปฏิกิริยาที่เร่งโดย CGTase
 โดย ● แทนหน่วยกลูโคส และ ○ แทนน้ำตาลที่ปลายรีดิวซ์
 ที่มา : Van der Veen et al. (2000)

1. ปฏิกริยา Disproportionation คือการตัดและย้ายหมู่กลูโคซิลระหว่างอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง จากตัวให้ไปยังตัวรับ

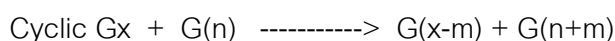


โดยที่ G คือกลูโคส / n,m คือจำนวนหมู่ไกลโคซิลของซัปสเตรต / x คือจำนวนหมู่ที่ถูกโยกย้าย ปฏิกริยานี้จะเกิดได้ดีเมื่อซัปสเตรตมีขนาดใหญ่ (ความยาวมากกว่า 100 หน่วยกลูโคส) ซึ่งปฏิกริยานี้จะเป็นปฏิกริยาหลักของแอมิโลมอลเตส

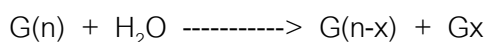
2. ปฏิกริยา Cyclization คือการย้ายหมู่กลูโคซิลภายในสายแซ็กคาไรด์เดียวกัน คือตัวให้ซึ่งถูกตัดหมู่กลูโคซิลออกไปกลายเป็นตัวรับด้วย โดยนำปลายรีดิวซ์ของส่วนที่ถูกตัดมาต่อกับส่วนไม่รีดิวซ์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นวงปิด Cyclodextrin ซึ่ง Cyclodextrin ที่ได้จากเอนไซม์ทั้งสองตัวจะมีขนาดที่แตกต่างกัน โดย CGTase จะเกิด Cyclodextrin ที่มีขนาด 6-8 หน่วยกลูโคส ส่วน AM จะเกิด Cyclodextrin ขนาดใหญ่ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 9-61 หน่วย



3. ปฏิกริยา Coupling เป็นปฏิกริยาผันกลับของ Cyclization โดย cyclodextrin เป็นตัวให้ และ อลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นเป็นตัวรับ

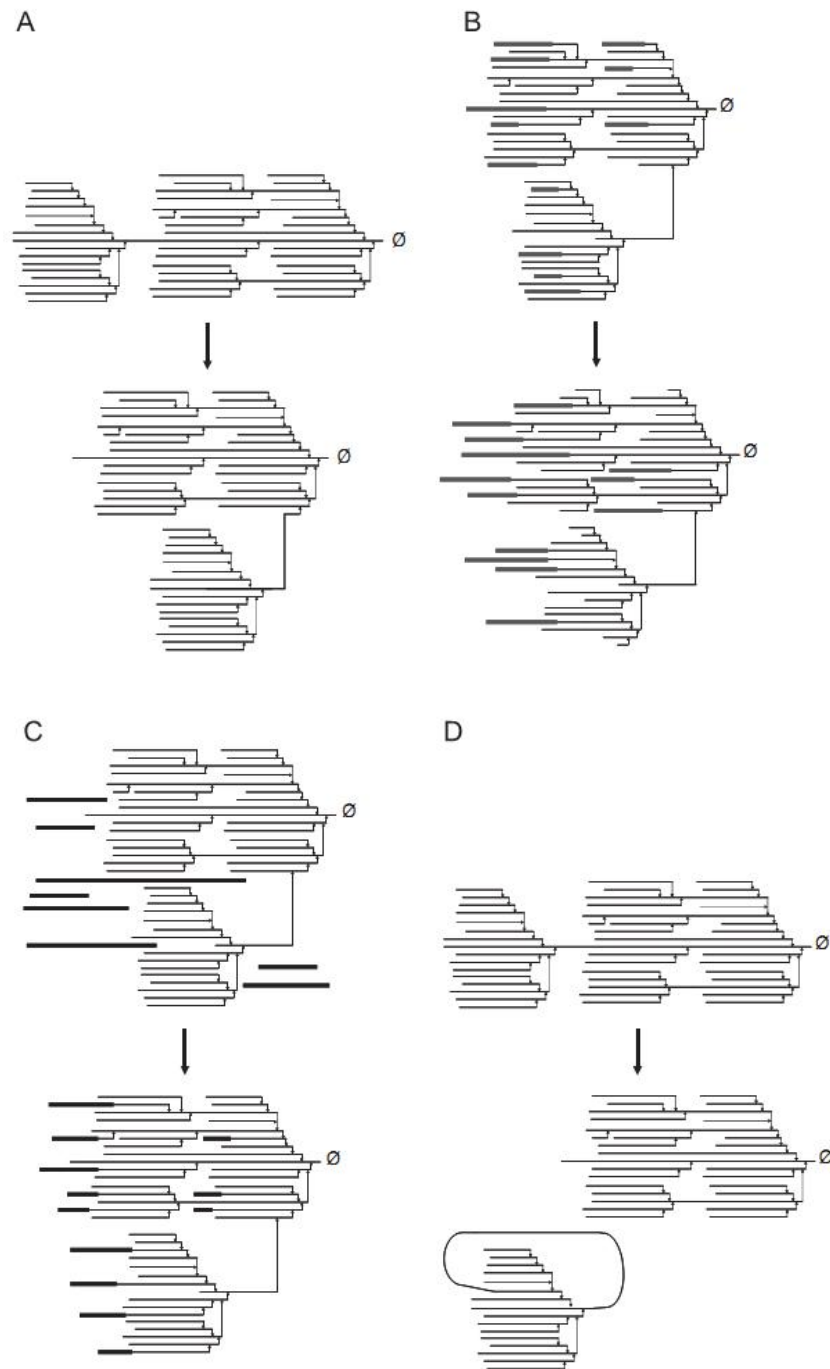


4. ปฏิกริยาการย่อยแบ่ง (hydrolysis) เป็นการย้ายหมู่กลูโคซิลไปยังโมเลกุลน้ำ แต่จะเร่งปฏิกริยานี้ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับเอนไซม์ α -amylase



แต่ปฏิกริยาของ CGTase จะแตกต่างจาก แอมิโลมอลเตสที่อัตราส่วนของปฏิกริยา โดย CGTase จะเกิดปฏิกริยา Cyclization เป็นหลัก ส่วนแอมิโลมอลเตสจะเกิดปฏิกริยา Disproportionation เป็นหลักโดยปฏิกริยาหลักของแอมิโลมอลเตสเมื่อทำปฏิกริยากับสตาร์ช คือ

ทำหน้าที่ตัดพันธะ α -1,4 ในสายแอมิโลสและแอมิโลเพกติน แต่ไม่ตัดบริเวณโซ่กิ่ง (α -1,6) ได้ α -1,4-glucan ซึ่งจะถูกนำไปต่อกับสายโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เป็นโซ่กิ่งของแอมิโลเพกติน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นแอมิโลเพกตินที่มีสายโซ่กิ่งยาวขึ้น ดังรูปที่ 2.13 และอาจได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงของปฏิกิริยาเป็นไซโคลเดกซ์ตริน (Cyclodextrin : CD) (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)



รูปที่ 2.13 ปฏิกริยาของแอมิโลมอลเทส; A ปฏิกริยา Disproportionation ของชั้นของแอมิโลเพกติน (amylopectin cluster) , B ปฏิกริยา Disproportionation ของสาขากลูแคนภายในแอมิโลเพกติน, C ปฏิกริยา Disproportionation ของสาขากลูแคนจากแอมิโลสไปยังแอมิโลเพกติน, D การเกิด Cyclicization ของแอมิโลเพกติน

ที่มา: Hansen et al. (2008)

แอมิโลมอลเทสพบครั้งแรกใน *Escherichia coli* เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในเมตาบอลิซึมของมอลโทส (Srisimarath et al., 2010) จากงานวิจัยที่ผ่านมาแอมิโลมอลเทสผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Thermus thermophilus*, *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermus scotoductus* และ *Thermus aquaticus* เป็นต้น (Van der Maarel et al., 2005; Kaper et al., 2003, 2005; Hansen et al., 2009a,b; Lee et al., 2006) เนื่องจากได้มีการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่ (*Corynebacterium glutamicum*) ที่มีความสามารถในการผลิตแอมิโลมอลเทส (Srisimarath et al., 2010) ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์มีผลให้เอนไซม์ที่ได้มีความแตกต่างกันออกไป จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของแอมิโลมอลเทสที่ได้จาก *Corynebacterium glutamicum* พบว่ามีความเหมือนกับแอมิโลมอลเทสจากแหล่งอื่นๆ (*Thermus* และ *Aquifex*) ในระดับที่ต่ำ (17% เปรียบเทียบกับ *T.aquaticus* (Terada et al., 1999), 18% เปรียบเทียบกับ *T. thermophilus* (Terada et al., 1999), 13% เปรียบเทียบกับ *A.aeolicus* (Bhuiyan, Kitaoka and Hayashi, 2003) และที่มากที่สุด 26% เปรียบเทียบกับ *E.coli* K12 (Pugsley and Dubreuil, 1988)) จากความแตกต่างของแอมิโลมอลเทสที่ได้จากแต่ละแหล่งส่งผลให้สภาวะที่ใช้ในการตัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสจะแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตแอมิโลมอลเทส (ตารางที่ 2.9) และอาจส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดแปรสตาร์ชมีความแตกต่างกันอีกด้วย

จากการศึกษาสมบัติสตาร์ชตัดแปรจากการตัดแปรด้วยแอมิโลมอลเทสจากแหล่งต่างๆ พบว่าการตัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสส่งผลให้สมบัติของสตาร์ชข้าว และเค้กข้าวตัดแปรแตกต่างจากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดแปร โดย Oh และคณะ (2008) และ Seo และคณะ (2007) รายงานถึงปริมาณแอมิโลสที่ลดลงของสตาร์ชตัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสจาก *Thermotoga maritime* และ *Thermus scotoductus* ตามลำดับ, สตาร์ชข้าวตัดแปรยังมี Freeze-thaw stability ที่อุณหภูมิ -70-22 องศาเซลเซียส ดีขึ้น มีการ Syneresis น้อยมากเมื่อเทียบกับสตาร์ชข้าวที่ไม่ได้ผ่านการตัดแปร (Lee et al., 2006) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกันในสตาร์ชข้าวโพด (Oh et al., 2008)

ปฏิกิริยา Disproportionation ทำให้เกิดการต่อสายแซ็กคาไรด์เส้นตรงในตำแหน่ง α -1,4 (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551) ทำให้โซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินยาวขึ้น ส่งผลให้สตาร์ชมีสมบัติที่สามารถเกิดเป็น Thermo-reversible gel หรือเจลที่สามารถแปรผันสถานะกลับตามอุณหภูมิ คล้ายเจลาตินคือเมื่ออุณหภูมิต่ำจะเกิดเป็นเจล และเมื่ออุณหภูมิสูงจะเปลี่ยนเป็นสารละลาย (Kaper et al., 2003) จากการทดลองตัดแปรสตาร์ชด้วยแอมิโลมอลเทสจากสตาร์ชแหล่งต่างๆ พบว่าสตาร์ชตัดแปรมีสมบัติเป็น Thermo-reversible gel คล้ายเจลาติน ทั้งในสตาร์ชมันฝรั่งตัด

แปร (Van der Maarel et al., 2005), สตาร์ชข้าวตัดแปร (Lee et al., 2006), สตาร์ชข้าวโพดตัดแปร (Oh et al., 2008) และสตาร์ชถั่วเขียวตัดแปร (Hansen et al., 2008) แต่สตาร์ชตัดแปรทุกตัวมีจุดหลอมเหลวของเจลเพิ่มขึ้นจากสตาร์ชดิบ สตาร์ชมันฝรั่งตัดแปรมีจุดหลอมเหลวเพิ่มขึ้นจาก 65 องศาเซลเซียส เป็น 70 องศาเซลเซียส, สตาร์ชข้าวโพดตัดแปรมีจุดหลอมเหลวเพิ่มขึ้นจาก 57 องศาเซลเซียส เป็น 70 องศาเซลเซียส ส่วนสตาร์ชถั่วตัดแปรจุดหลอมเหลวเพิ่มจาก 62 องศาเซลเซียส เป็น 78 องศาเซลเซียส (Hansen et al., 2009) เมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินซึ่งมีจุดหลอมเหลว 30 องศาเซลเซียส สตาร์ชตัดแปรทุกตัวมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าเจลาติน (Bloom 120, Sigma) ซึ่งสามารถละลายได้ที่อุณหภูมิร่างกาย ทำให้สตาร์ชตัดแปรสามารถกักเก็บกลิ่นรสของอาหารที่อาจลดลงเนื่องจากการละลาย และจากการศึกษาการตัดแปรสตาร์ชข้าวในเค้กข้าวด้วยแอมิโลมอลเทส (Seo et al., 2007) พบว่าสตาร์ชตัดแปรที่มีปริมาณแอมิโลสลดลง จำนวนสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินสายสั้น (DP 1-5) เพิ่มขึ้น จำนวนสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินสายยาว (DP > 30) เพิ่มขึ้น และหลังเก็บเค้กข้าวที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกของสตาร์ชที่เกิดจากการรีโทรเกรดมีค่าน้อยกว่าเค้กข้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปร แสดงว่าการตัดแปรสตาร์ชทำให้เค้กข้าวเกิดการรีโทรเกรดลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าสมบัติการอุ้มน้ำ และความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชตัดแปรเพิ่มขึ้น

โดยทั่วไปการตัดแปรสตาร์ชด้วยเอนไซม์มักทำในสตาร์ชที่ถูกเจลาติไนซ์แล้วมากกว่าสตาร์ชดิบ เนื่องจากการเรียงตัวของสายแอมิโลเพกตินอย่างแน่นหนา และผิวของเม็ดสตาร์ชซึ่งสัมพันธ์กับการเข้าไปทำปฏิกิริยาของโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น แอมิเลส (Fannon, Hauber and BeMiller, 1992) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยากับสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนซ์ได้ง่ายกว่าสตาร์ชดิบ เมื่อให้ความร้อนในสภาวะที่มีน้ำเพียงพอ เม็ดสตาร์ชจะเกิดการพองตัวและเจลาติไนซ์ ระหว่างกระบวนการเจลาติไนเซชัน โครงร่างผลึกและการจัดเรียงตัวของเม็ดสตาร์ชจะถูกรบกวน และเปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้เอนไซม์สามารถเข้าไปเกิดปฏิกิริยาได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการเจลาติไนเซชันส่งผลต่อต้นทุนพลังงาน, สมบัติของสตาร์ชตัดแปร และปัญหาด้านความหนืด ดังนั้นการตัดแปรสตาร์ชโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่ากระบวนการเจลาติไนเซชันจึงเป็นที่น่าสนใจ (Kelly et al., 1995, Singh and Soni, 2001, Goyal, Gupta and Soni, 2005) จากงานวิจัยของ Oh et al. (2008) ซึ่งศึกษาการตัดแปรสตาร์ชข้าวโพดด้วย α -glucanotransferase โดยไม่เจลาติไนซ์สตาร์ชก่อนการตัดแปร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการตัดแปร 8, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าสตาร์ชที่ตัดแปรด้วยเอนไซม์นาน 24 ชั่วโมงยังคงมี Maltese cross อยู่ โดยลักษณะผิวของเม็ดสตาร์ชเมื่อ

ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด จะถูกทำลายโดยเริ่มเป็นรูและเกิดรอยร้าวมากขึ้น เมื่อใช้
เวลาในการตัดแปรรานขึ้น สตาร์ชตัดแปรมีค่า Apparent amylose และค่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า
สตาร์ชดิบ สตาร์ชตัดแปรมีแอมิโลเพกตินสายยาว (DP >30) มากขึ้น มีช่วงในการหลอมเหลวของ
การรีโทรเกรดกว้างขึ้น และมีค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรดลดลง
นอกจากนี้สตาร์ชตัดแปรที่ได้ยังมีความสามารถในการเป็น Thermo-reversible gel ที่อุณหภูมิ 4
ถึง 75 องศาเซลเซียส แสดงว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถเกิดขึ้นได้แม้สตาร์ชที่ใช้เป็นสารตั้งต้น
จะไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ ทำให้สตาร์ชที่ได้ยังคงลักษณะเป็นแกรนูล ทำให้ง่ายต่อการนำมาอบแห้ง
เป็นสตาร์ชตัดแปร

ตารางที่ 2.9 สภาวะที่ใช้ในการตัดแปรรสตา์ชโดยแอมิโลมอลเลสจากแหล่งต่างๆ

ชนิดเชื้อ	ชนิดแป้ง	สภาวะ			ผู้วิจัย
		Unit of AM / g starch	อุณหภูมิ(°C)	เวลา (h)	
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	10% (w/v) Potato starch	1.0, 10 และ 25	80	4, 24	Kaper et al. (2005)
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	20% (w/v) Potato starch	1	70	24	Van der Maarel et al. (2005)
<i>Thermus scotoductus</i>	5% (w/v) Rice starch	100 μ L (1.38 mg/mL)	75	4	Lee et al. (2006)
<i>Thermus scotoductus</i>	Rice cake	50	75	3	Seo et al. (2007)
<i>Thermus scotoductus</i>	rice starch	(1.38 mg/mL)			Lee et al. (2008)
	3, 5, 10, 15% starch	100 μ L	75	4	
	5%starch	2, 5, 50, 100 μ L	75	4	
<i>Thermotoga maritima</i>	12.5% (w/v) Granular Corn Starch	6.25	65	8, 6 และ 24	Oh et al. (2008)

ตารางที่ 2.9 สภาวะที่ใช้ในการตัดแปรรสคาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสจากแหล่งต่างๆ (ต่อ)

ชนิดเชื้อ	ชนิดแป้ง	สภาวะ			ผู้วิจัย
		unit of AM	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (h)	
<i>Thermus aquaticus</i>	55.56% (w/v) Rice starch	2.5 และ 5	75	1	Cho et al. (2009)
Hyperthermophilic bacterium <i>T. Thermophilus</i>	15% (w/v) starch	2, 10 และ 100	70-85	1.5, 3.5, 5.5 และ 22	Hansen et al. (2008,2009a,b)
	Potato				
	High amylose Potato				
	Maize				
	Waxy maize				
Wheat					
	Pea				

2.6 เจลาติน

เจลาติน เป็นโปรตีนที่ได้จากการแปรรูปคอลลาเจนที่มีอยู่ในผิวหนัง กระดูก รวมทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์เช่น โคกระบือ สุกร และปลา เป็นต้น โดยใช้ความร้อน กรดหรือด่างในการไฮโดรไลซ์ เจลาตินได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น โยเกิร์ต ขนมหวาน ไอศกรีม โดยเจลาตินมีคุณสมบัติเป็น Thermo-reversible gel คือสามารถหลอมกลายเป็นของเหลวหนืดที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส (Hansen, 2008) และเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เกิดลักษณะก่อดัวเป็นเจล ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้จากเครื่อง Rheometer โดยสังเกตได้จากค่า Storage modulus (G'), Loss modulus (G'') และ $\tan\delta$ มีการเปลี่ยนแปลงเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะใช้เจลาตินที่มีค่า Bloom number 180-250 (Cole, 2000)

ตารางที่ 2.10 ความหนืดของตัวอย่างเจลาตินที่มีค่า Bloom ต่างๆ

Grade	ความหนืด (cP)	ตัวอย่างอาหาร
130-190 Bloom	1.9-3.5	เจลลี่ ส่วนผสมยาบางชนิด
180-210 Bloom	2.4-3.4	เจลลี่ ชูป ซอส ไอศกรีม
215-235 Bloom	2.8-3.4	ชูป ซอส ไอศกรีม โยเกิร์ต ครีมชั้น
240-260 Bloom	3.2-4.0	โยเกิร์ต มาร์ชแมลโลว อาหารหวานบางชนิด เนื้อกระป๋อง
270-280 Bloom	3.4-4.4	โยเกิร์ต คอนเฟกชันนารี เนื้อกระป๋อง
290-310 Bloom	3.9-5.4	โยเกิร์ต คอนเฟกชันนารี เนื้อกระป๋อง

หมายเหตุ ตัวอย่างมีเจลาติน 6.67 เปอร์เซ็นต์ วัดที่ 60 องศาเซลเซียส

ที่มา: จีรารัตน์ ทัตติยกุล (2554)

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุประสงค์

- 1) สตาร์ชมันสำปะหลัง พันธุ์ ระยะเวลา 9 (ศูนย์วิจัยพืชไร่ จ.ระยอง)
- 2) เชื้อแบคทีเรีย recombinant *Escherichia coli* BL21(DE13) ผ่านการโคลนดีเอ็นเอ (plasmid p19AM) จากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Srisimararat et al., 2010)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การวิเคราะห์สมบัติสตาร์ชมันสำปะหลัง

- 1) ความชื้น ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.03 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.1) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 2) โปรตีน ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.22 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.2) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 3) เถ้า ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.05 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.3) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 4) ไขมัน ตามวิธี AOAC (2005) section 32.1.14 (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.4) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 5) ปริมาณแอมิโลสปรากฏ (Apparent Amylose) ตามวิธี Juliano (1971) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.5) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 6) ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้แสงโพลาไรส์ ตามวิธี นิติ เต็มเวชศยานนท์ (2543) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.7) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

- 7) ลักษณะพื้นผิวของเม็ดสตาร์ชด้วย Scanning electron microscope (SEM) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
- 8) การพองตัวและการละลาย ตามวิธี Collado and Cork (1997) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.6) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 9) สมบัติทางความร้อน โดย Differential Scanning Calorimeter (DSC) ตามวิธี Cho et al. (2009) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.8) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ
- 10) สมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง ตามวิธี Lee et al. (2006) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.9) ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

3.2.2 การเตรียมแอมมิโลมอลเทส

3.2.2.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ตามวิธีของ Srisimarath (2010)

นำเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการโคลนดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* จาก glycerol stock ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ให้นำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง เชื้อเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani ที่มี Ampicillin (LB+amp) (ภาคผนวก ข.) จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวใส่ลงในหลอดทดลองที่มี LB+amp broth 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก.) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter ปิเปต 200 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี LB+amp broth 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 rpm ใน Incubator shaker (Innova™ 4080, New Brunswick Scientific, USA) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต 3 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี LB+amp broth 300 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 250 rpm ใน Incubator shaker จนค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.4-0.6 จากนั้นเติม 0.4mM Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranoside (IPTG) 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 rpm ใน Incubator shaker เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้างส่วนขุ่น(เซลล์) ด้วย 0.85% NaCl (w/v) 2 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย Extraction buffer (ภาคผนวก ก.) เก็บเซลล์ใน Extraction buffer ปริมาณ 2 เท่าของน้ำหนักเซลล์ที่ได้ เก็บหลอด Falcon ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2.2 การแยกเอนไซม์ (Srisimarat, 2010)

นำสารละลายเซลล์จากข้อ 3.2.2.1 มาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทำให้เซลล์แตกด้วย Sonicator (Bendelin, Germany) โดยใช้ความถี่ cycle=3 ใช้ probe ขนาดเบอร์ 76 เป็นเวลา 2 นาที ประมาณ 20 รอบ สังเกตการแตกของเซลล์ การเปลี่ยนสีของตัวอย่างจากสีขาวนมเป็นสีน้ำตาล แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงใน Refrigerated centrifuge (Model J2-21, Beckman Instrument Instrument Inc., USA) ที่ 12000 rpm 45 นาที 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปผ่าน Dialysis (Regenerated Cellulose Tubular Membrane (Norminal MWCO 12,000-14,000, Wall thickness 20 μ m) : Cellu Sep T4, USA) ใน 50mM phosphate buffer pH 7.4 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 2 รอบ เอนไซม์หยาบที่ได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดย Histrap affinity column (Amersham Biosciences Histrap FFTM, Histrap FFTM DEAE FFTM and HiPrep Phenyl FFTM (High Sub)16/10) (รายละเอียดตามภาคผนวก ข.) จากนั้นนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปผ่าน Dialysis ใน 50mM phosphate buffer pH 7.4 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงอีกครั้ง เพื่อกำจัด Imidazole ที่อาจเจือปนมาจากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ เก็บเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

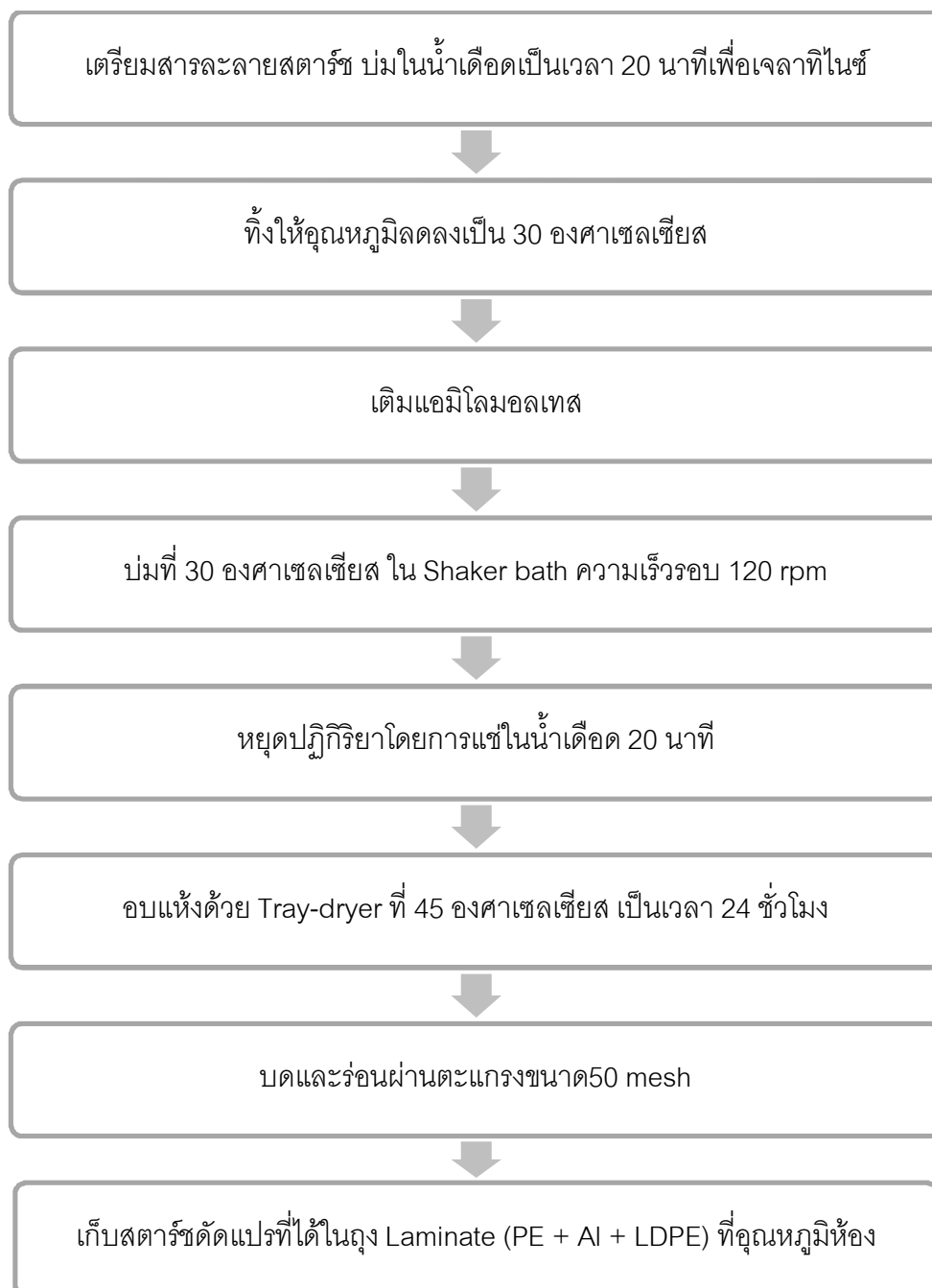
3.2.2.3 การวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์

โดยวิเคราะห์ทั้งเอนไซม์หยาบและเอนไซม์บริสุทธิ์

- 1) Amylomaltase activity assay ตามวิธีของ Fuwa (1984) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.1) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
- 2) ปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie blue ตามวิธีของ Bradford (1976) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.2) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
- 3) ขนาดของโปรตีนโดย Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ ตามวิธีของ Srisimarat (2010) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.3) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.3 การดัดแปรสสารไขมันสำปะหลังที่ผ่านการเจลาติไนเซชันโดยแอมิโลมอลเทส

นำสสารไขมันสำปะหลังมาดัดแปรด้วยเอนไซม์แอมิโลมอลเทสที่เตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 โดยดัดแปลงวิธีของ Cho et al. (2009) (รูปที่ 3.1) โดยศึกษาปัจจัยในการดัดแปรดังนี้



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการดัดแปรสสารไขมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทส

3.2.3.1 การแปรความเข้มข้นของสตาร์ชมันสำปะหลังและปริมาณแอมิโลมอลเทส

ตัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแปรความเข้มข้นของสตาร์ชมันสำปะหลังและปริมาณแอมิโลมอลเทส เป็น 5, 10 และ 15% (w/v) และ 1, 3 และ 5 unit/g starch อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลาในการตัดแปร 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส, สมบัติทางความร้อนด้วย DSC, ความคงทนต่อการเยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (ตามวิธีที่ใช้ใน 3.2.1) และสมบัติ Thermo-reversibility โดย Rheometer ตามวิธี Lee et al. (2006) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.10) ของสตาร์ชตัดแปรที่ได้ เปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดแปร

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3x3 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เลือกสภาวะที่ทำให้สตาร์ชตัดแปรมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำ และมีสมบัติ Thermo-reversibility เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป (3.2.3.2)

3.2.3.2 การแปรเวลาในการตัดแปร

ตัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยใช้ความเข้มข้นสารละลายสตาร์ชมันสำปะหลัง และปริมาณแอมิโลมอลเทสจากสภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.3.1 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และแปรเวลาในการตัดแปรเป็น 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ติดตามผลดังข้อ 3.2.3.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.2.4 การตัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ด้วยแอมิโลมอลเทส

ตัดแปรสารละลายสตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ ตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 3.1 โดยไม่ผ่านขั้นตอนการบ่มในน้ำเดือดเพื่อเจลาติไนซ์ขึ้น โดยใช้ความเข้มข้นสารละลายสตาร์ชมันสำปะหลัง และปริมาณแอมิโลมอลเทสจากสภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.3.1 ตัดแปรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ติดตามผลดังข้อ 3.2.3.1 และลักษณะ

และรูปร่างของเม็ดแป้งด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้แสงโพลาไรส์ (นิตี เต็มเวชศยานนท์, 2543) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.7), ลักษณะพื้นผิวของเม็ดสตาร์ชด้วย Scanning electron microscope (SEM), ค่าความแข็งแรงของเจล (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.11) และลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินโดยใช้ High performance anion exchange chromatography (Kuakpetoon and Wang., 2006) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.12) เปรียบเทียบกับตัวอย่างในข้อ 3.2.3.2

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) ทำการทดลอง 2 ครั้ง วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DNMR T ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1. สมบัติของสตาร์ชมันสำปะหลัง

4.1.1. องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณแอมิโลสปรากฏ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชมันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 9 (ตารางที่ 4.1) พบว่าสตาร์ชมันสำปะหลัง พันธุ์ระยอง 9 มีค่าปริมาณความชื้น, โปรตีน, เถ้า และไขมัน ใกล้เคียงกับสตาร์ชมันสำปะหลังจากการทดลองของ Mishra และ Rai (2006) ซึ่งมีปริมาณความชื้น 7.54% (น้ำหนักแห้ง), โปรตีน 0.51%, เถ้า 0.2% และไขมัน 0.51% และ Swinkels (1985) ซึ่งพบว่ามีปริมาณโปรตีน 0.1%, เถ้า 0.2% และไขมัน 0.1% ปริมาณโปรตีนที่พบต่ำกว่า 0.3% ซึ่งอยู่ในช่วงมาตรฐานของสตาร์ชมันสำปะหลัง (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2521) แต่มีปริมาณแอมิโลสปรากฏสูงกว่าปริมาณแอมิโลสของสตาร์ชมันสำปะหลังที่วิเคราะห์โดย Beynum and Roels (1985) (17%) และศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง (2547) (20.32-21.94%) ส่วนสตาร์ชมันสำปะหลัง (*Manihot utilissima*) พบว่ามีปริมาณแอมิโลสปรากฏ 23% (Freitas et al., 2004) ซึ่งปริมาณแอมิโลสปรากฏที่แตกต่างกันนี้อาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สายพันธุ์ของมันสำปะหลัง สถานที่เพาะชำ สภาพภูมิอากาศ วิธีการเพาะชำ เวลาที่ใช้ในการเพาะชำ ตลอดจนกระบวนการผลิตสตาร์ช (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550))

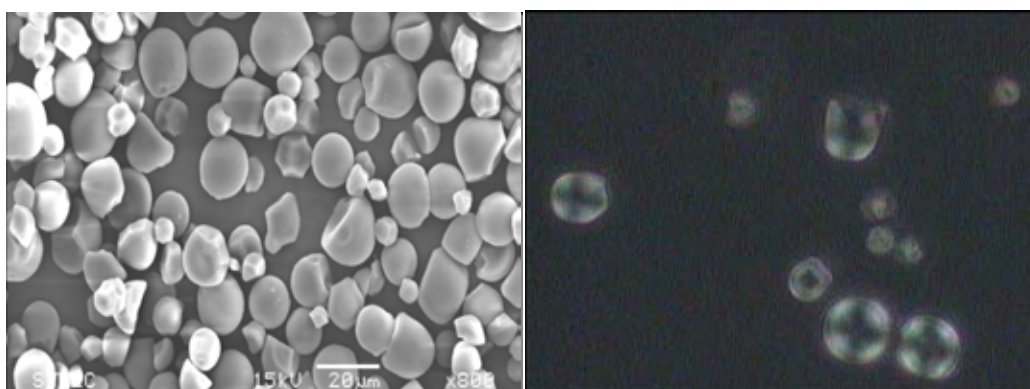
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%น้ำหนักแห้ง)
ความชื้น	7.5 ± 0.23
ปริมาณโปรตีน	0.13 ± 0.05
ปริมาณเถ้า	0.19 ± 0.06
ปริมาณไขมัน	0.12 ± 0.06
แอมิโลสปรากฏ	26.85 ± 0.35

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.1.2. ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้ง

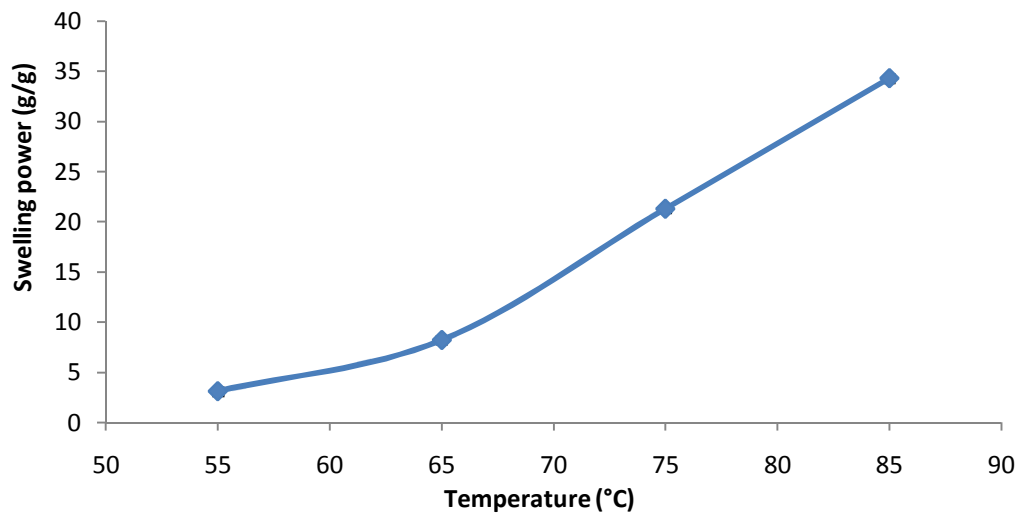
จากการศึกษาลักษณะของเม็ดสตาร์ชมันสำปะหลังด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงโพลาไรซ์ (รูปที่ 4.1) พบว่าเม็ดสตาร์ชมันสำปะหลังมีหลายรูปร่าง มีขนาดประมาณ 5-30 ไมครอน มีทั้งลักษณะกลม และรูปถ้วย ผิวเรียบ สอดคล้องกับการศึกษาของ Srirotha et al. (1999) ที่รายงานว่ามีเม็ดแป้งมันสำปะหลังมีขนาดปานกลาง รูปทรงกลม และเม็ดแป้งบางเม็ดมีลักษณะรูปถ้วย หรือทรงกลมคล้ายไข่ที่มีรอยตัด และเมื่อศึกษาภายใต้แสงโพลาไรซ์ เม็ดสตาร์ชมันสำปะหลังจะแสดงความสามารถในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ เกิดเงาดำรูปกากบาทตัดกันที่ Hilum เรียกว่า Maltese cross แสดงสมบัติ Birefringence การที่เม็ดสตาร์ชสามารถบิดระนาบแสงโพลาไรซ์ได้นั้น เนื่องจากลักษณะโครงสร้างบางส่วนของเม็ดสตาร์ชมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ หรือเม็ดสตาร์ชมีโครงสร้างบางส่วนเป็นผลึก (Semi-crystalline) เมื่อแสงโพลาไรซ์ผ่านผลึกบางส่วนที่มีโครงสร้างขนาดหรือตั้งฉากกับระนาบแสง จะเกิดการบิดระนาบแสงขึ้น (Oates, 1997) โดย Maltese cross จะตัดกันที่ตำแหน่ง Hilum ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์เม็ดสตาร์ช เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ นิติ เต็มเวชชยานนท์ (2543) ที่พบสมบัติ Birefringence ภายใต้แสงโพลาไรซ์ในตัวอย่างแป้งมันสำปะหลังดิบ



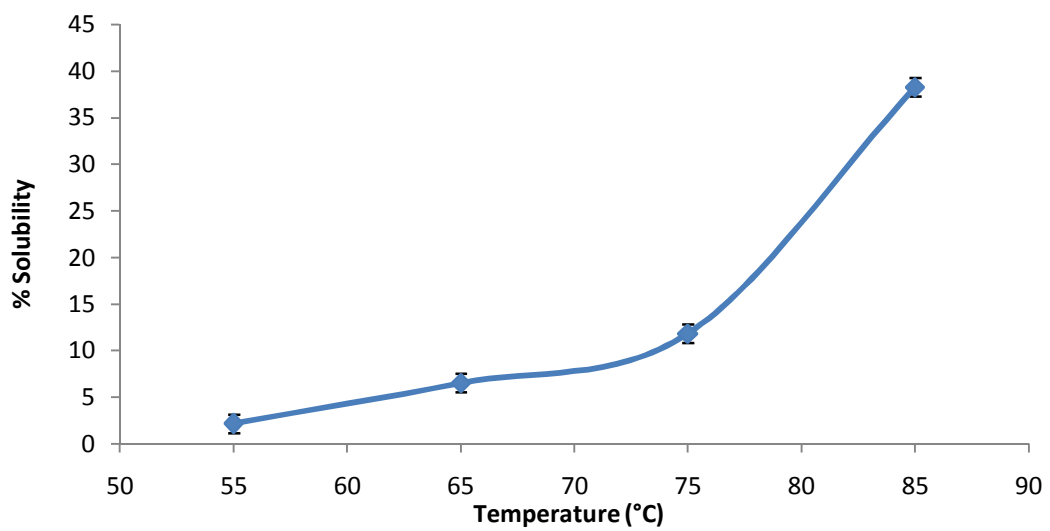
รูปที่ 4.1 ลักษณะของเม็ดสตาร์ชมันสำปะหลัง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 800 เท่า (ซ้าย) และกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงโพลาไรซ์ กำลังขยาย 40 เท่า (ขวา)

4.1.3. กำลังการพองตัวและการละลาย

จากการวิเคราะห์ค่ากำลังการพองตัวและการละลายที่อุณหภูมิตั้งแต่ 55-85 องศาเซลเซียส ของสตาร์ชมันสำปะหลัง (รูปที่ 4.2 และ 4.3) พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่ากำลังการพองตัวและการละลายเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสตาร์ชมันสำปะหลังมีอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน 61-81 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน (55-65 องศาเซลเซียส) ค่ากำลังการพองตัวจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิการเกิดเจลาติไนเซชัน ค่ากำลังการพองจะตัวเพิ่มขึ้นมาก ส่วนค่าการละลายก็เช่นเดียวกันคือที่อุณหภูมิ 55-75 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิการเจลาติไนเซชัน ค่าการละลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิการเกิดเจลาติไนเซชันค่าการละลายจะเพิ่มขึ้นมาก เนื่องจากที่อุณหภูมิเจลาติไนเซชันความร้อนจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจน และน้ำจะแทรกเข้าไปภายในเม็ดแป้ง ทำให้เกิดการบวม และพองตัวของเม็ดแป้ง ในช่วงแรกน้ำจะแทรกเข้าไปในส่วนอัดฐานก่อน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นสูงกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชันจะเกิดการทำลายส่วนผลึก จนส่วนผลึกถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ (Lai and Kokini, 1991) ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และ Yeh (2001) ที่ศึกษาการพองตัวของสตาร์ชชนิดต่างๆ และพบว่าสตาร์ชมันสำปะหลังมีค่ากำลังการพองตัว (ประมาณ 3, 10, 29 และ 35 (g/g) ที่อุณหภูมิ 55, 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส) และนิติ เต็มเวศยานนท์ (2543) ที่พบว่ากำลังการพองตัวของสตาร์ชมันสำปะหลัง (5.0, 31.3, 40.6 และ 51.4 (g/g) ที่อุณหภูมิ 55, 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส) และค่าการละลาย (2.3, 17.0, 20.3 และ 29.9 (g/g) ที่อุณหภูมิ 55, 65, 75 และ 85 องศาเซลเซียส) เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.2 ค่ากำลังการพองตัวของสตาร์ไขมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 4.3 ค่าการละลายของสตาร์ไขมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ

4.1.4. สมบัติทางความร้อน

จากการวัดสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชมันสำปะหลังและสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน ด้วย DSC (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ ๑.1 ในภาคผนวก จ.)พบว่า Thermogram ประกอบด้วยพีคเดียว แสดงว่าตัวอย่างสตาร์ชมีความบริสุทธิ์สูงไม่มีการเจือปนของสตาร์ชชนิดอื่นๆ และจากขนาดของพีคซึ่งแสดงพลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยนสถานะ พบว่าพลังงานที่ต้องการใช้ในการเกิดเจลลาตินในเซชันมีค่าเท่ากับ 9.55 จูล/สตาร์ช 1 กรัม ซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้ในการทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างที่เป็นระเบียบที่พบในส่วนผลึก (Whistler and BeMiller, 1997) โดยอุณหภูมิในการเกิดเจลลาตินในเซชันอยู่ในช่วง 61– 82 องศาเซลเซียส ส่วนพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันมีค่าเท่ากับ 7.41 จูล/สตาร์ช 1 กรัม โดยอุณหภูมิในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันอยู่ในช่วง 42-66 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าต่ำกว่าอุณหภูมิในการเกิดการเจลลาตินในเซชัน ทั้ง Onset temperature (T_o), Peak temperature(T_p) และ Conclusion temperature (T_c) และพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันก็ต่ำกว่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาตินในเซชันแสดงว่าโครงสร้างผลึกที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่อยู่ในสภาพที่เป็นผลึกสมบูรณ์น้อยลง ความแข็งแรงของผลึกลดลง ทำให้สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงสถานะได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า และใช้พลังงานน้อยกว่า (บุญทิวา นิลจันทร์, 2548) ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ นิติ เต็มเวชศยานนท์ (2543) ที่ศึกษาสมบัติการเกิดเจลลาตินในเซชัน และรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชมันสำปะหลัง และพบว่าค่า T_o , T_p , T_c และ Enthalpy ของการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ 7 วัน (44.11, 52.48, 62.27 องศาเซลเซียส และ 4.11 จูล/สตาร์ช 1 กรัม ตามลำดับ) มีค่าต่ำกว่าการเกิดเจลลาตินในเซชัน (60.86, 65.74, 80.69 องศาเซลเซียส และ 14.54 จูล/สตาร์ช 1 กรัม ตามลำดับ)

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชมันสำปะหลัง

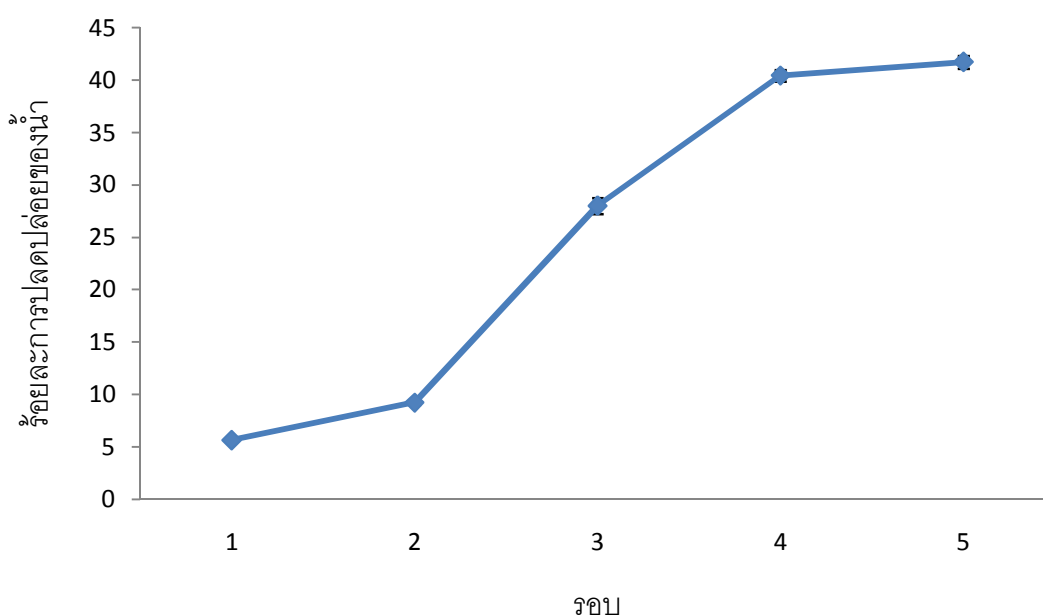
สมบัติทาง ความร้อน	T_o (°C)	T_p (°C)	T_c (°C)	$T_c - T_o$	Enthalpy (J/g)
Gelatinization	61.26±0.55	66.52±0.13	81.47±0.87	20.21±0.71	9.55±0.60
Retrogradation 14 days	42.64±1.24	54.88±0.29	65.65±0.40	23.01±0.83	7.41±0.41

หมายเหตุ Onset temperature (T_o) คือ อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิด Gelatinization/ Retrogradation, Peak temperature (T_p) คือ อุณหภูมิในการเกิด Gelatinization / Retrogradation สูงสุด, Conclusion temperature (T_c) คือ อุณหภูมิสุดท้ายในการเกิด Gelatinization / Retrogradation และ Delta enthalpy (Delta H) คือ ค่าพลังงานที่ใช้ในการ Gelatinization / Retrogradation
ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.1.5. ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง

จากการวิเคราะห์ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งซึ่งแสดงด้วยร้อยละการปลดปล่อยของน้ำระหว่างการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (%syneresis) พบว่า เจลสตาร์ชจะมีค่า %syneresis ต่ำในการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 2 รอบแรก (5.66% และ 9.24% ตามลำดับ) แต่หลังผ่านการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งในรอบที่ 3 และ 4 พบว่า %syneresis เพิ่มขึ้น (27.99% และ 40.39% ตามลำดับ) และเริ่มคงที่ในรอบที่ 5 (41.70%) ซึ่งน้ำที่ถูกละลายออกมาเกิดจากการที่สตาร์ชจัดเรียงตัวใหม่ ทำให้เกิดการขับน้ำออกมาจากผลึก (Lee et al., 2006) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Muadklay และ Charoenrein (2008) ที่พบว่าสตาร์ชมันสำปะหลังมีการปล่อยน้ำเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบของการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งและเริ่มคงที่หลังรอบที่ 3 (11%, 55%, 58%, 60% และ 62% ตามลำดับ) แตกต่างจากงานวิจัยของ Srichuwong et al., (2012) ที่พบว่าสตาร์ชมันสำปะหลังมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งดีในรอบแรก (ไม่พบการปล่อยน้ำ) และเพิ่มขึ้นมากในรอบที่ 3 และ 5 (38.9% และ 51.5% ตามลำดับ) ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกัน อาจเนื่องจาก

สายพันธุ์อายุ และกระบวนการผลิตสตาร์ชมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2550)



รูปที่ 4.4 ปริมาณน้ำที่ปล่อยออกมาจากเจลสตาร์ชมันสำปะหลังระหว่างการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง

4.2. แอมิโลมอลเทส

จากการวิเคราะห์ Activity ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ด้วย Amylomaltase activity assay และปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie blue พบว่าเอนไซม์หลังการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23 เท่า มีค่า Activity 48.68 unit/มิลลิลิตร และมีค่าร้อยละผลผลิต เป็น 73.19 (ตารางที่ 4.3)

นอกจากนี้จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีนของเอนไซม์ด้วย Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์หยาบมีแถบโปรตีนหลายแถบ ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Histrap affinity column มีแถบโปรตีนที่เด่นชัดเพียงแถบเดียว โดยมีขนาดประมาณ 84 kDa (รูปที่ 4.5) ผลที่ได้สอดคล้องกับ Srisimar et al. (2010) ได้วิเคราะห์แอมิโลมอลเทส ที่ได้จาก recombinant *Escherichia coli* BL21(DE13) ผ่านการโคลนดีเอ็นเอ (plasmid p19AM) จากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum*

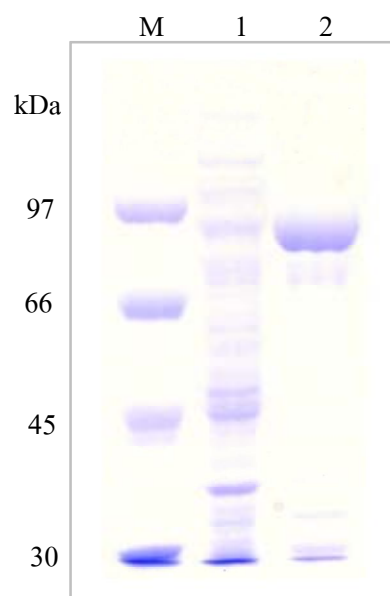
ATCC 13032 ด้วย SDS-PAGE และพบว่าโปรตีนมีขนาดประมาณ 84 kDa แตกต่างจากขนาดโมเลกุลของแอมิโลมอลเตสจาก *Thermus litoralis* (79 kDa, Xavier et al., 1999), *Thermus aquaticus* (57 kDa, Terada et al., 1999), *Synechocystis* sp. PCC6803 (57 kDa, Lee, Oh and Yoo, 2009) และใน *E. coli* IFO3806 (93 kDa, Kitahata, Murakami, and Okada, 1989) แสดงถึงแอมิโลมอลเตสที่ได้จากแหล่งที่ต่างกันอย่างมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่ต่างกัน จากน้ำหนักโมเลกุลที่พบจึงสามารถยืนยันได้ว่าโปรตีนที่พบดังกล่าวหลังการทำบริสุทธิ์เป็นแอมิโลมอลเตสจาก *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

นอกจากนี้ในการทดลองยังพบแถบโปรตีนแถบอื่น แต่ไม่ชัดเจน อาจเป็นเพราะในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วย Histrap affinity column มีหลักการแยกโปรตีนโดยการอาศัยการจับกันระหว่าง Histidine ในเอนไซม์ที่ต้องการ ซึ่งมีการตัดต่อ Histidine ลงไปให้มากกว่าโปรตีนในธรรมชาติเพื่อระบุโปรตีนที่ต้องการ และนิเกิลในคอลัมน์ อาจทำให้โปรตีนชนิดอื่นที่ประกอบด้วย Histidine หลุดออกมาด้วยเล็กน้อย จึงเกิดลักษณะแถบโปรตีนอื่นๆ (Srisimarath, 2010)

ตารางที่ 4.3 สมบัติของแอมิโลมอลเตสที่เตรียมได้

ขั้นตอน	ค่า activity (Unit/มิลลิลิตร)	ปริมาณ โปรตีน (มิลลิกรัม/ มิลลิลิตร)	ค่า activity จำเพาะ (Unit/โปรตีน 1 มิลลิกรัม)	ความ บริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (%)
เอนไซม์หยาบ	27.52±1.25	19.13±0.16	1.44	1	100
เอนไซม์บริสุทธิ์	48.68±1.09	1.61±0.07	30.24	23.26	73.19

หมายเหตุ กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแป้งและไอโอดีนลดลง 1% ต่อเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (ภาคผนวก ง. 1)



รูปที่ 4.5 SDS-PAGE ของแอมิโดมอลเทสจากเชื้อ *Escherichia coli* ที่ผ่านการโคลนดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* ในการทำให้บริสุทธิ์

- | | | |
|--------|---|--|
| Lane M | = | Protein Low Molecular Weight Marker |
| Lane 1 | = | Crude extract 15 μg |
| Lane 2 | = | Purified enzyme (Histrap TM column) 5 μg |

4.3. ผลของความเข้มข้นของสตาร์ชมันสำปะหลังและปริมาณแอมิโลมอลเทสต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปร

จากการแปรความเข้มข้นสตาร์ชมันสำปะหลัง(5, 10 และ 15% (w/v)) และปริมาณแอมิโลมอลเทส (1, 3 และ 5 unit/g starch) ที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลัง และ วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส, การเกิดรีโทรเกรดชัน, ความคงทนต่อการเยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง และสมบัติ Thermo-reversibility พบว่าความเข้มข้นของสตาร์ชและปริมาณแอมิโลมอลเทสมีผลต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปรดังต่อไปนี้

4.3.1. ปริมาณแอมิโลสปรากฏ

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสของตัวอย่างแบ่งที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปร (ตารางที่ 4.4) พบว่าแป้งดัดแปรที่มีปริมาณแอมิโลสลดลง ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Seo et al. (2007), Cho et al. (2009), และ Oh et al. (2008) เนื่องจากปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทสสามารถตัด α -1,4-glucocidic linkage และสามารถย้ายโมเลกุลกลูโคสที่ตัดไปยังสายแอมิโลเพกติน มีผลให้สายของแอมิโลสสั้นลง (Oh et al., 2008) โดยแอมิโลสที่มี DP ต่ำกว่า 8 จะไม่สามารถเกิดสีกับไอโอดีน ส่วนแอมิโลสที่มี DP ระหว่าง 9-12, 21-24 และ 25-29 จะเกิดสีเหลืองน้ำตาล, น้ำตาล และแดงตามลำดับ ในขณะที่อิมิโลสที่มีค่า DP 30-38, 39-46 และ 47ขึ้นไปจะเกิดสีม่วงแดง, น้ำเงิน-ม่วง และน้ำเงินตามลำดับ เมื่อความยาวสายโซ่สั้นจะทำให้จับกับไอโอดีนหลวม เมื่อย่อยแอมิโลสด้วยกรดหรือเอนไซม์ α -amylase พบว่าความสามารถในการจับกับไอโอดีนลดลง สีของแอมิโลสเปลี่ยนจากสีน้ำเงิน เป็นสีม่วง สีแดง สีน้ำตาล จนกระทั่งไม่ปรากฏสี (Bates, French, and Rundle, 1943; Bailey and Whelan, 1961; Foster, 1965; Hollo and Szeitil, 1968; John, Schmidt, and Kneifel, 1983; Richter and Rehbrucke, 1994) ในการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส ได้วัดจากสีน้ำเงิน (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร) ที่เกิดจากการจับระหว่างสายแอมิโลสและไอโอดีน แอมิโลสที่มีความยาวสายสั้นลง เมื่อจับกับไอโอดีนทำให้เกิดสีที่ไม่สามารถวัดได้ที่ 620 นาโนเมตร ดังนั้นปริมาณแอมิโลสในสตาร์ชดัดแปรที่วิเคราะห์ได้จึงมีค่าลดลง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) พบว่า ความเข้มข้นของสตาร์ชที่ใช้ในการดัดแปร มีผลต่อปริมาณแอมิโลส ($p \leq 0.05$) เท่านั้น (ตารางที่ จ.1 ภาคผนวก) โดยเมื่อความเข้มข้นของสตาร์ชต่ำลง ปริมาณแอมิโลสจะลดลงมากขึ้น ที่ความเข้มข้นสตาร์ช 5%

ให้สตาร์ชดัดแปรที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำที่สุด (ลดลงมากที่สุด) ในทางตรงข้ามสตาร์ชดัดแปรที่ดัดแปรที่ความเข้มข้น 15% มีปริมาณแอมิโลสสูงที่สุด (ลดลงน้อยที่สุด) และสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 5% ด้วยแอมิโลมอลเทส 3 หน่วย/สตาร์ช 1 กรัม มีแอมิโลสลดลงมากที่สุด ซึ่งอาจแสดงว่าสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่แอมิโลมอลเทสเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุด

ตารางที่ 4.4 ปริมาณแอมิโลสของสตาร์ชมันสำปะหลังและสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปร

ตัวอย่าง	% แอมิโลส	% แอมิโลส ที่ลดลง
Native	26.85±0.35 ^d	-
5% starch with 1 Unit AM/ g starch	19.15±1.05 ^b	7.70
10% starch with 1 Unit AM/ g starch	21.70±1.24 ^{bc}	5.15
15% starch with 1 Unit AM/ g starch	24.15±0.21 ^{cd}	2.70
5% starch with 3 Unit AM/ g starch	17.45±1.06 ^a	9.40
10% starch with 3 Unit AM/ g starch	21.80±0.28 ^{bc}	5.05
15% starch with 3 Unit AM/ g starch	21.40±0.85 ^{bc}	5.45
5% starch with 5 Unit AM/ g starch	21.20±0.85 ^{bc}	5.65
10% starch with 5 Unit AM/ g starch	21.50±0.71 ^{bc}	5.35
15% starch with 5 Unit AM/ g starch	22.00±0.14 ^{bc}	4.85

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.3.2. การเกิดรีโทรเกรเดชัน

จากการวิเคราะห์การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปร พบว่า สตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรหลังการเก็บ 14 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.5) มีอุณหภูมิที่ใช้ในการห่อมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (T_o , T_p) ของสตาร์ชดัดแปรทั้งหมดสูงกว่าสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร โดย T_o ของการเกิดการห่อมผลึกของสตาร์ชดัดแปรมีค่าประมาณ 46-48 องศาเซลเซียส ส่วนสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปรมีค่า 42.6 องศาเซลเซียส และ T_p ของสตาร์ชดัดแปรมีค่าอยู่ในช่วง 57-59 องศาเซลเซียส ส่วนสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปรมีค่าประมาณ 55 องศาเซลเซียส แต่ค่าพลังงานในการห่อมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชดัดแปรมีค่าลดลง โดยมีค่าประมาณ 2-4 มิลลิจูลต่อมิลลิกรัม ซึ่งต่ำกว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร (7 มิลลิจูล/มิลลิกรัม) ซึ่งค่าพลังงานในการห่อมผลึกที่ลดลงของสตาร์ชดัดแปรแสดงว่าการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสทำให้สตาร์ชดัดแปรที่ได้เกิดรีโทรเกรเดชันลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากปฏิกิริยาของแอมิโลมอลเทสทำให้ปริมาณแอมิโลสซึ่งมีผลต่อการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่าลดลง และยังคงอาจไปเชื่อมต่อกับกิ่งของแอมิโลเพกตินทำให้ลักษณะการกระจายตัวของกิ่งของแอมิโลเพกตินเปลี่ยนไป นอกจากนี้แอมิโลมอลเทสยังอาจเกิดปฏิกิริยาตัด α -1,4 ของแอมิโลเพกติน ทำให้แอมิโลเพกตินมีสายกิ่งสั้นเพิ่มขึ้น โดยแอมิโลเพกติน DP6-12 จะมีผลต่อความแข็งแรงของผลึก โดยจะทำให้เกิดผลึกที่มีความแข็งแรงต่ำ ส่งผลให้ใช้พลังงานความร้อนในการห่อมผลึกลดลง (Levine และ Slade., 1986) นอกจากนี้อุณหภูมิเริ่มต้นในการห่อมผลึก (T_o) ที่สูงขึ้น และช่วงของอุณหภูมิในการห่อมผลึกที่แคบลง อาจเกิดจากแป้งดัดแปรที่มีปริมาณแอมิโลสลดลง มีผลให้สัดส่วนของปริมาณแอมิโลเพกตินเพิ่มขึ้น และมีความหลากหลายของโครงสร้างผลึกลดลง (Oh et al., 2008)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสตาร์ช, ปริมาณเอนไซม์ และอันตรกิริยาของความเข้มข้นสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ มีผลต่อค่าพลังงานที่ใช้ในการห่อมผลึกอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลต่อ T_o , T_p และ T_c ($p > 0.05$) (ตารางที่ ๓.3-4 ภาคผนวก ข.) โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นสตาร์ช 5% ดัดแปรโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1, 3 Unit/สตาร์ช 1 กรัม และความเข้มข้นสตาร์ช 10, 15% ดัดแปรโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 5 Unit/สตาร์ช 1 กรัม จะมีค่าพลังงานในการห่อมผลึกน้อยกว่าที่สภาวะอื่นๆ

ตารางที่ 4.5 สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชมันสำปะหลังและสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรภายหลังการเจลาติไนซ์ และเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

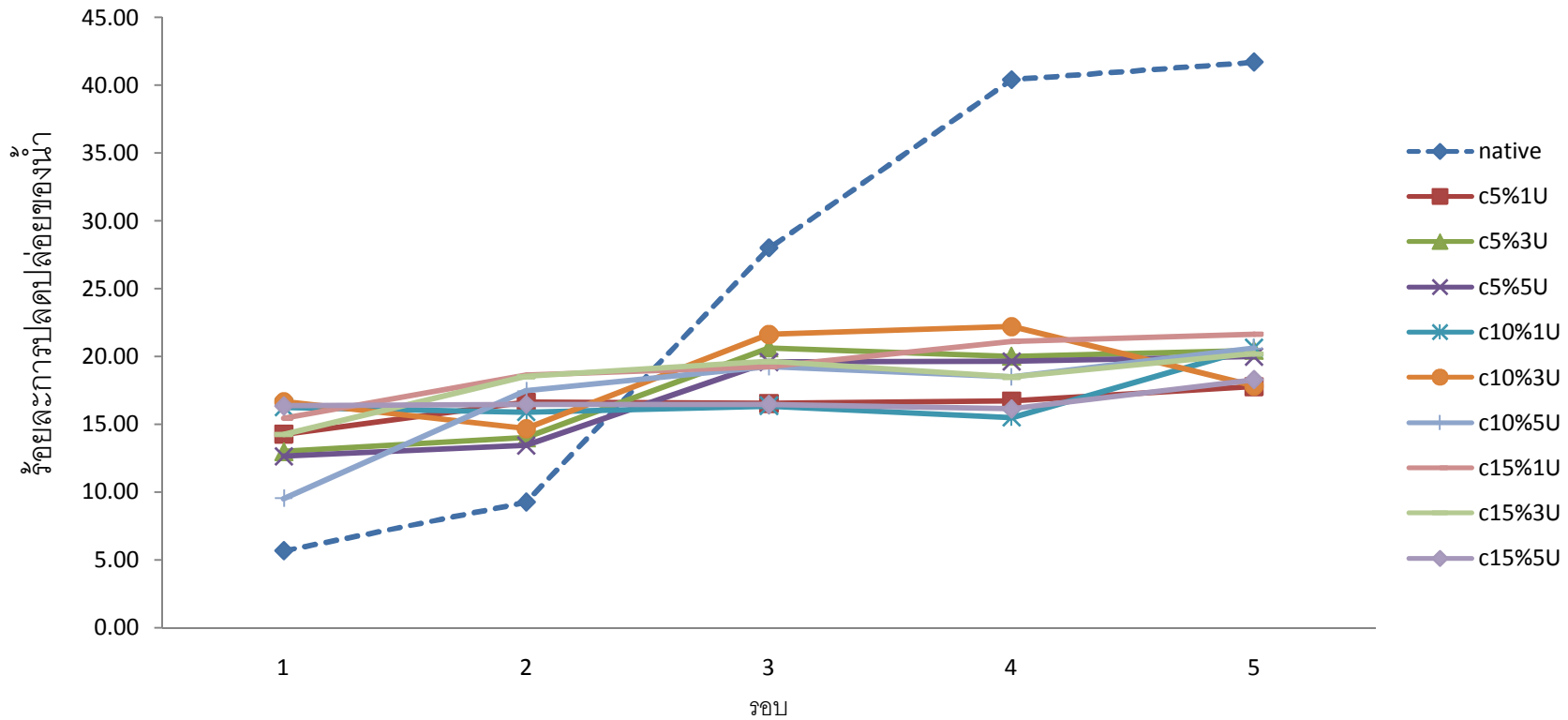
Condition	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o	Enthalpy (mJ/mg)
Native	42.64±1.24 ^a	54.88±0.29 ^a	65.65±0.40 ^a	23.01±0.83 ^e	7.41±0.04 ^d
5% starch with 1U AM/g starch	47.62±0.11 ^{bc}	58.45±0.08 ^b	64.49±0.13 ^a	16.88±0.02 ^{ab}	3.07±0.21 ^a
5% starch with 3U AM/g starch	48.54±0.60 ^c	58.73±0.12 ^b	64.38±0.22 ^a	15.84±0.38 ^a	2.82±0.05 ^a
5% starch with 5U AM/g starch	48.29±0.34 ^c	58.91±0.25 ^b	64.30±0.03 ^a	16.01±0.31 ^a	3.62±0.14 ^b
10% starch with 1U AM/g starch	47.05±1.10 ^{bc}	58.08±0.45 ^b	64.41±0.02 ^a	17.36±1.12 ^{abcd}	4.29±0.29 ^c
10% starch with 3U AM/g starch	47.85±0.86 ^{bc}	58.12±0.04 ^b	64.43±0.32 ^a	16.58±1.17 ^{ab}	4.19±0.17 ^c
10% starch with 5U AM/g starch	48.46±0.93 ^c	58.48±1.38 ^b	65.55±1.16 ^a	17.09±0.23 ^{abc}	2.98±0.04 ^a
15% starch with 1U AM/g starch	46.97±1.60 ^{bc}	58.86±0.62 ^b	65.41±1.21 ^a	18.44±0.39 ^{cd}	4.13±0.16 ^c
15% starch with 3U AM/g starch	46.98±0.46 ^{bc}	57.78±1.36 ^b	64.84±0.33 ^a	17.87±0.13 ^{bcd}	4.13±0.27 ^c
15% starch with 5U AM/g starch	45.92±0.56 ^b	58.82±0.92 ^b	64.66±0.85 ^a	18.75±0.29 ^d	3.10±0.07 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a, b, c} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p ≤ 0.05)

4.3.3. ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง

จากการวิเคราะห์ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส แสดงในรูปของร้อยละการปลดปล่อยของน้ำระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (%syneresis) (รูปที่ 4.6) พบว่าสตาร์ชตัดแปรที่ได้ มีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งเพิ่มขึ้น สตาร์ชตัดแปรมีค่า %syneresis คงที่ที่ 15-20% ตลอดการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งทั้ง 5 รอบ ซึ่งอาจเป็นเพราะสตาร์ชตัดแปรมีแอมิโลสสายยาวน้อยลง และความยาวสายกิ่งของแอมิโลเพกตินเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดรีโทรเกรเดชันลดลง เนื่องจากแอมิโลสสายยาวที่ไม่มีกิ่งมีแนวโน้มที่จะเกิดรีโทรเกรเดชันมากกว่าแอมิโลสสายที่มีกิ่งและแอมิโลเพกตินสายสั้นๆ (Park, 2003) จึงเกิดการปลดปล่อยน้ำลดลง ส่งผลให้มีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งมากขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Lee et al. (2006) ซึ่งพบว่าสตาร์ชข้าวที่ไม่ผ่านการตัดแปรมีการปลดปล่อยน้ำมากกว่า 40% ของน้ำหนักเจลภายใน 2 รอบแรกของการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง ซึ่งเป็นลักษณะปกติของสตาร์ชทุกชนิด (Jobling et al., 2002) ส่วนสตาร์ชข้าวตัดแปรด้วย TSGT (แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus scotoductus*) มีอัตราการปลดปล่อยน้ำคงที่ที่ 10% ตลอด 4 รอบการแช่แข็งและการละลาย (Lee et al., 2006) ทั้งนี้เพราะปฏิกิริยาของแอมิโลมอลเทสทำให้เกิดการลดลงของแอมิโลสและการเปลี่ยนแปลงลักษณะของแอมิโลเพกติน ส่งผลให้การตัดแปรสตาร์ชด้วยแอมิโลมอลเทสสามารถปรับปรุงสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งได้

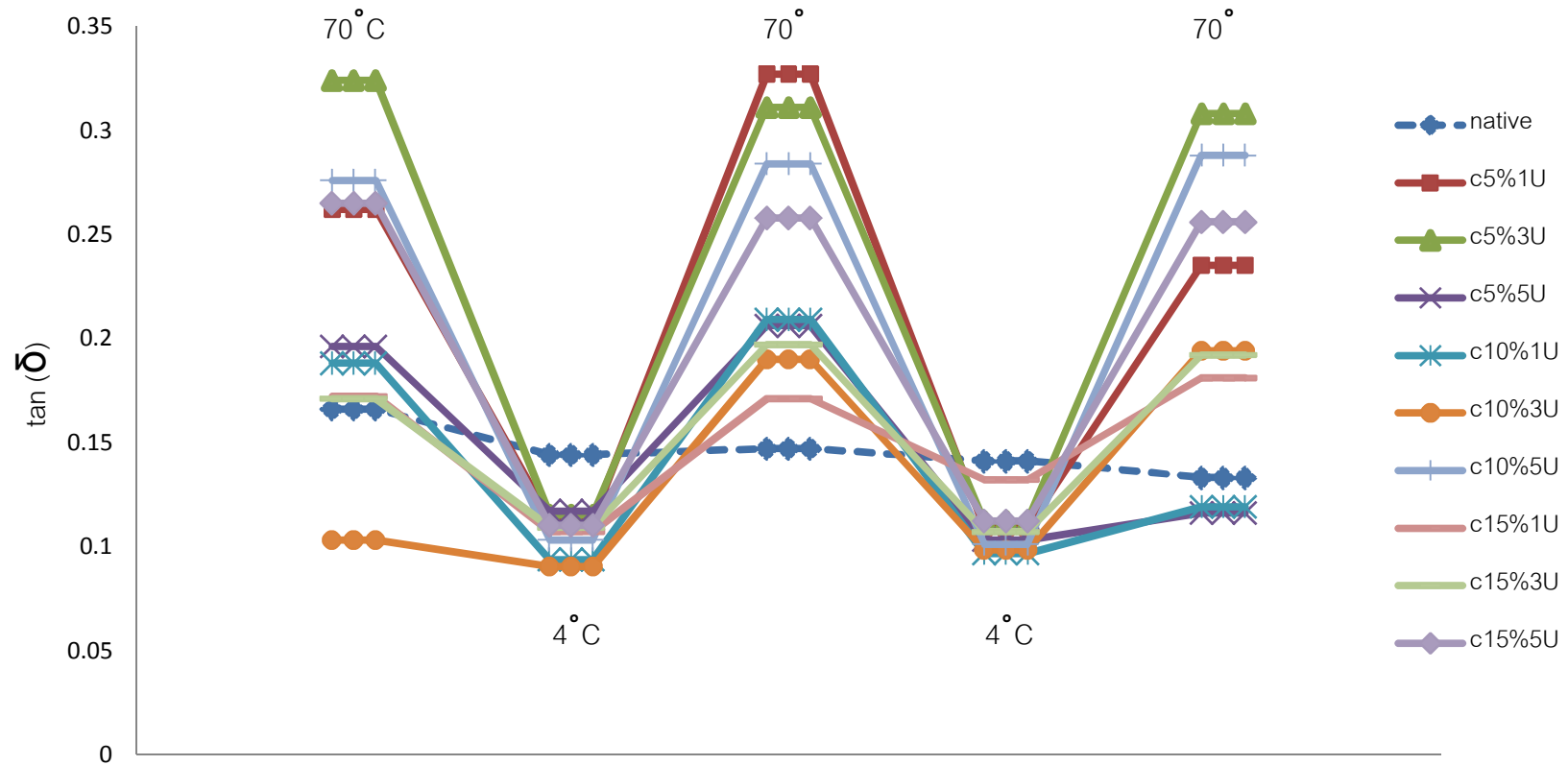


รูปที่ 4.6 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส c5%, c10% และ c15% หมายถึง ความเข้มข้นสตาร์ช 5, 10 และ 15% (w/v) ตามลำดับ 1U, 3U และ 5U หมายถึง ปริมาณแอมิโลมอลเทสที่ใช้ในการดัดแปร 1, 3 และ 5 Unit/g starch ตามลำดับ

4.3.4. Thermo-reversibility

จากการวัดสมบัติทางกระแสวิทยาของตัวอย่างสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านการดัดแปรและไม่ผ่านการดัดแปรด้วย Rheometer พบว่า สมบัติทางกระแสวิทยาของสตาร์ชดัดแปรต่างจากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปรในทิศทางเดียวกับการทดลองของ Oh et al. (2008) (รูปที่ 4.7) คือ สตาร์ชดัดแปรที่มีค่า $\tan\delta$ สูงซึ่งแสดงถึงลักษณะเป็นเจลอ่อนเมื่อให้ความร้อน (70 องศาเซลเซียส) และมีค่า $\tan\delta$ ต่ำซึ่งแสดงลักษณะเป็นเจลแข็งที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และสามารถเปลี่ยนกลับไปมาเมื่อให้ความร้อน หรือความเย็นซ้ำ ซึ่งการดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสส่งผลให้จำนวนแอมิโลเพกตินมีความยาวสายกิ่งสั้นๆ (DP 1 ถึง 5) เพิ่มมากขึ้น (Oh et al., 2008) ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่เป็นโครงสร้างผลึกที่ไม่แข็งแรง ทำให้ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง (70 องศาเซลเซียส) สตาร์ชดัดแปรจึงมีความเป็นของเหลวมากขึ้น หรือมีลักษณะเจลอ่อนมากขึ้นเมื่อให้ความร้อน และเมื่อลดอุณหภูมิลง (4 องศาเซลเซียส) โมเลกุลของแป้งจะมาจัดเรียงตัวกันใหม่ เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายแอมิโลสเกิดเป็นเจล โดยอัตราการการคืนตัวของแอมิโลสจะเร็วกว่าแอมิโลเพกตินมาก เนื่องจากแอมิโลสมีโครงสร้างที่มีกิ่งก้านเพียงเล็กน้อยทำให้โมเลกุลสามารถมาเชื่อมต่อกันได้ด้วยพันธะไฮโดรเจนได้ง่ายกว่าและแน่นหนาเกิดเป็นลักษณะเจล (วชิราพรพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์, 2543) ในขณะที่สตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปรที่มีค่า $\tan\delta$ เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อให้ความร้อน (70 องศาเซลเซียส) หรือความเย็น (4 องศาเซลเซียส) แสดงว่าสตาร์ชดัดแปรที่มีสมบัติที่อาจเป็น Thermo-reversible gel ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Lee et al. (2006) ซึ่งได้ทดลองผลิต Thermo-reversible starch gel โดยดัดแปรสตาร์ชข้าวโดยแอมิโลมอลเทสที่ผลิตจาก *Thermus scotoductus*

สภาวะที่มีความแตกต่างระหว่างค่า $\tan\delta$ ที่อุณหภูมิ 4 และ 70 องศาเซลเซียสมากที่สุดคือสภาวะที่ใช้สารละลายสตาร์ชความเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาณแอมิโลมอลเทส 3 unit/สตาร์ช 1 กรัม



รูปที่ 4.7 สมบัติ Thermo-reversibility ของสตาร์ซมันส์ลิปโซลหลังจากที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรโดยแอมิโนโมลเทส

4.4. ผลของเวลาที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทสต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปร

จากการศึกษาผลของเวลาที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลัง (30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง) โดยใช้สภาวะที่เลือกจากผลการทดลอง 4.3 (เลือกสภาวะที่ทำให้สตาร์ชดัดแปรมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำ และมีสมบัติ Thermo-reversibility) คือสารละลายสตาร์ชความเข้มข้น 5% (w/v) และ ปริมาณแอมิโลมอลเทส 3 unit/g starch ต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปร วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส, การเกิดรีโทรเกรเดชัน, ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง และสมบัติ Thermo-reversibility พบว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรส่งผลต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปรดังต่อไปนี้

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชดัดแปร (ตารางที่ 4.6) พบว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรส่งผลต่อปริมาณแอมิโลสปรากฏในสตาร์ชดัดแปร โดยเมื่อเวลาที่ใช้ในการดัดแปรเพิ่มขึ้น ปริมาณแอมิโลสปรากฏมีแนวโน้มลดลง ซึ่ง %แอมิโลสปรากฏที่ลดลงจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการดัดแปรเพิ่มจาก 30 นาที เป็น 1 ชั่วโมง แต่การเพิ่มเวลาจาก 1 ชั่วโมง เป็น 6 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างของค่า%แอมิโลสปรากฏที่ลดลง

ตารางที่ 4.6 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชดัดแปรเมื่อดัดแปรที่เวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	% แอมิโลสปรากฏ	% แอมิโลสปรากฏที่ลดลง
Native	26.85±0.35 ^c	-
Modified 30 นาที	19.40±0.42 ^b	7.45
Modified 1 ชั่วโมง	16.70±0.42 ^a	10.15
Modified 6 ชั่วโมง	16.60±0.14 ^a	10.25

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรหลังดัดแปรหลังการเก็บ 14 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.7) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (T_r , T_p) ของสตาร์ชดัดแปรทั้งหมดสูงขึ้นโดยอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดการหลอมผลึกของสตาร์ชดัดแปรมีค่าประมาณ 47-48 องศาเซลเซียส ส่วนสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร มีค่า 42.64 ± 1.24 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิในการเกิดการหลอมผลึกสูงสุดของสตาร์ชดัดแปรมีค่าอยู่ในช่วง 56-59 องศาเซลเซียส ส่วนสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปรมีค่า 54.88 ± 0.29 องศาเซลเซียส แต่ค่าพลังงานในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชดัดแปรมีค่าลดลง โดยสตาร์ชดัดแปรมีค่าประมาณ 2-3 มิลลิจูลต่อมิลลิกรัม น้อยกว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร (7.41 ± 0.04 มิลลิจูลต่อมิลลิกรัม) จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติพบว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรที่ 30 นาที และ 1 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการดัดแปรเป็น 6 ชั่วโมง ค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้เวลาในการดัดแปรไม่มีผลต่อค่า T_r , T_p , T_c และ $T_c - T_r$ อย่างมีนัยสำคัญอีกด้วย

ส่วนความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านการดัดแปรที่เวลาต่างๆและไม่ผ่านการดัดแปร (รูปที่ 4.8) พบว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสไม่มีผลต่อความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง โดย %syneresis ของสตาร์ชดัดแปรทั้งหมดจะคงที่ที่ 13-20% ตลอด 5 รอบของการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง

การวิเคราะห์สมบัติทางกระแสวิทยาของตัวอย่างสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านการดัดแปรและไม่ผ่านการดัดแปรด้วย Rheometer (รูปที่ 4.9) พบว่าเมื่อใช้เวลา 1 และ 6 ชั่วโมงในการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทสจะได้สตาร์ชดัดแปรที่มีความสามารถเปลี่ยนแปลงค่า $\tan\delta$ เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิได้ดีกว่าการดัดแปรสตาร์ชที่ใช้เวลา 30 นาที

เมื่อพิจารณาสมบัติของสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากการแปรเวลาในการดัดแปร พบว่าเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ได้สตาร์ชดัดแปรที่มีลักษณะตามที่ต้องการ(ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำ และความสามารถเปลี่ยนแปลงค่า $\tan\delta$ เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิ) แต่เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการดัดแปรที่ 1 และ 6 ชั่วโมง พบว่า

สมบัติของสตาร์ชดัดแปรไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเกิดจากความจำเพาะของ เอนไซม์ต่อสารตั้งต้น หลังจากสตาร์ชเกิดปฏิกิริยากับแอมิโลมอลเทสทำให้โครงสร้างของสตาร์ช เปลี่ยนแปลงไป ความจำเพาะต่อปฏิกิริยาเอนไซม์อาจลดลง ส่งผลให้เอนไซม์ทำงานได้น้อยลง จน ไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงระหว่าง 1 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมงได้ เมื่อพิจารณาจากผล Thermoreversibility, สมบัติทางความร้อน และ ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลาย ตามลำดับ จึงอาจสรุปได้ว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรที่ทำให้สตาร์ชดัดแปรมีความคงทนต่อการแช่ เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง เกิดรีโทรเกรดชันต่ำ และมีสมบัติ Thermo-reversibility คือ 1 ชั่วโมง

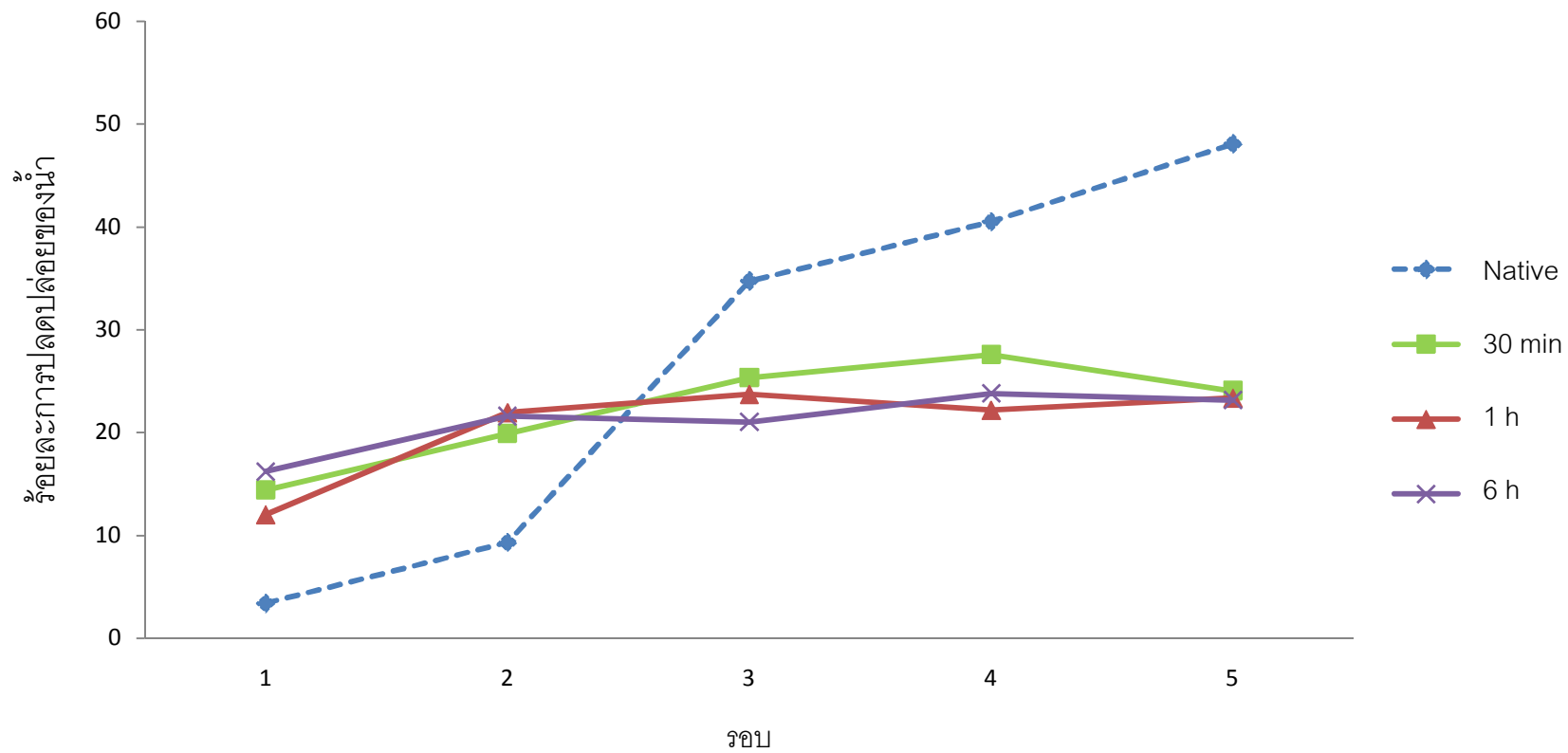
ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรเมื่อดัดแปรที่เวลาต่างๆ ภายหลังจากการเก็บที่ 4°C เป็นเวลา 14 วัน หลังการเจลาติไนซ์ ด้วยเครื่อง DSC

	T _o (°C)	T _p (°C) ^{ns}	T _c (°C) ^{ns}	T _c -T _o	Enthalpy (mJ/mg)
Native	42.64±1.24 ^a	54.88±0.29	65.65±0.40	23.0±0.83 ^b	7.41±0.04 ^c
Modified 30 นาที	47.10±0.18 ^b	56.38±0.04	64.10±1.12	17.00±1.30 ^a	2.79±0.14 ^b
Modified 1 ชั่วโมง	47.12±1.17 ^b	58.80±0.05	64.36±0.30	17.24±0.86 ^a	2.54±0.10 ^b
Modified 6 ชั่วโมง	48.48±1.69 ^b	59.00±0.86	65.24±1.92	16.76±0.23 ^a	2.10±0.19 ^a

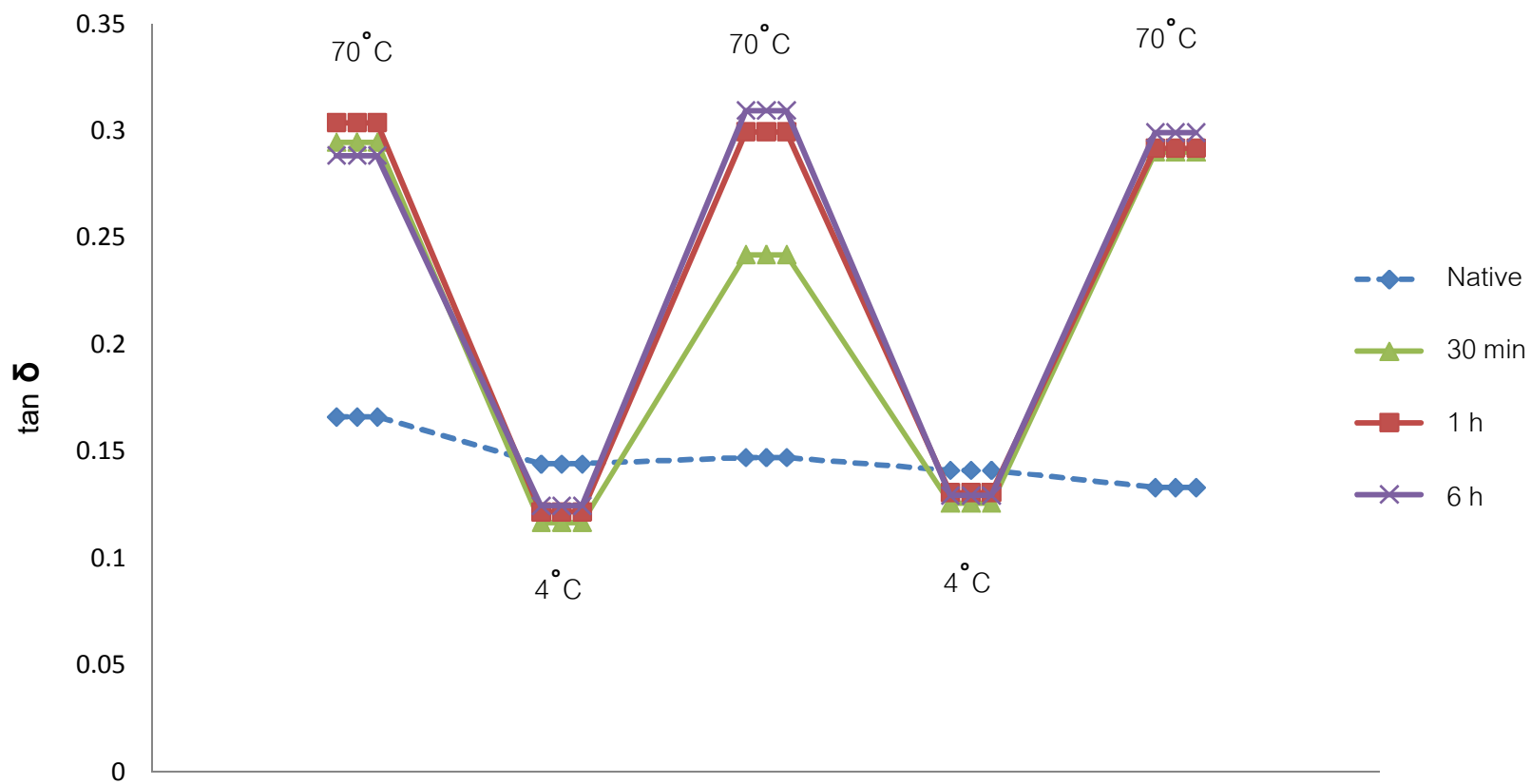
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ns คือ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแนวตั้งเดียวกัน ($p > 0.05$)



รูปที่ 4.8 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรเมื่อดัดแปรที่เวลาต่างๆ



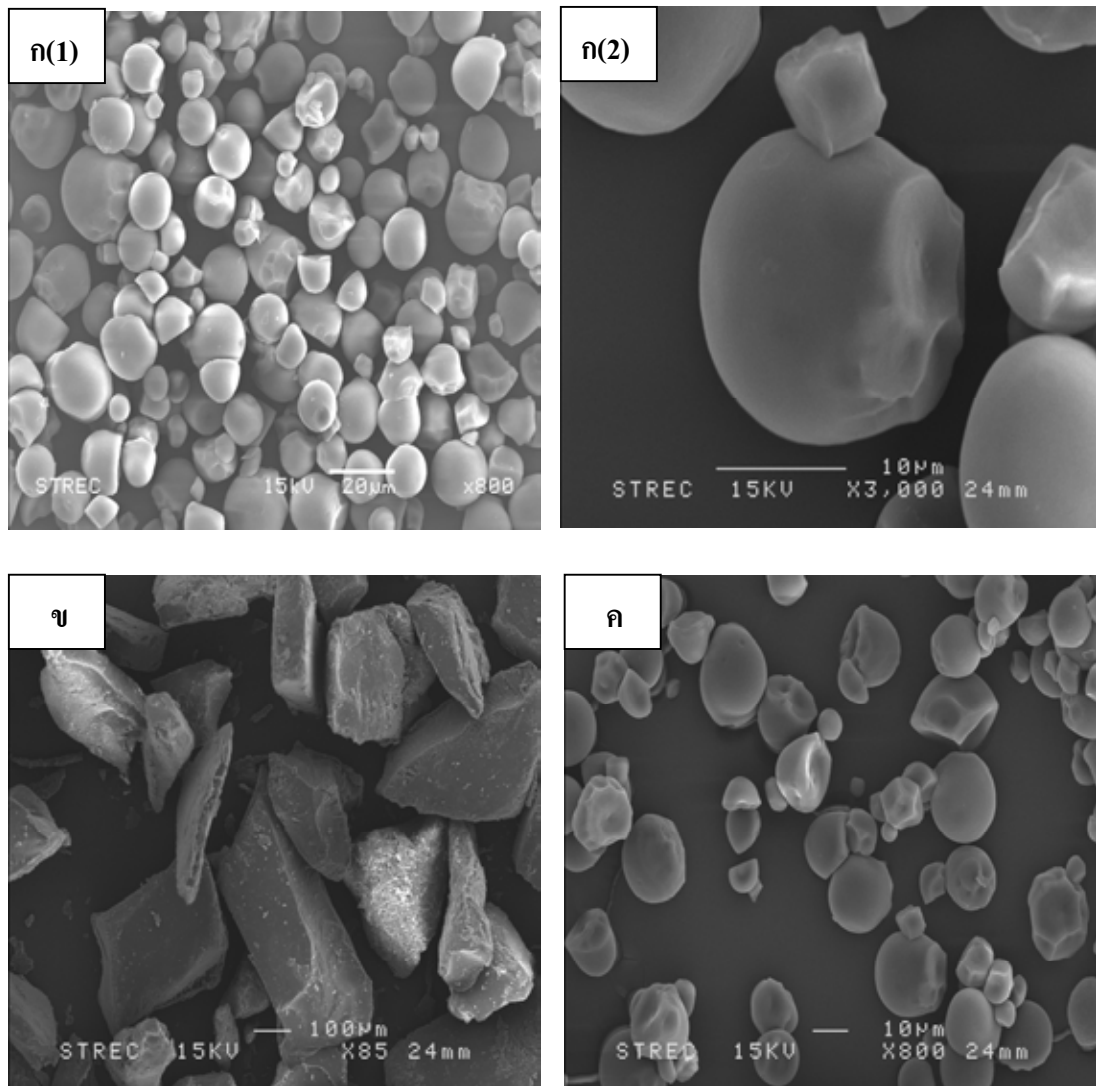
รูปที่ 4.9 สมบัติ Thermo-reversibility ของสตาร์พอลิเมอร์หลังจากดัดแปรโดยเอมิโอมอลเทสเมื่อดัดแปรที่เวลาต่างๆ

4.5. ผลของการเจลาตินไนซ์ต่อการสมบัติของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรโดยเอมิโลมอลเทส

โดยทั่วไปการดัดแปรสตาร์ชด้วยเอนไซม์มักทำในสตาร์ชที่ถูกเจลาตินไนซ์แล้ว เพื่อเพิ่มความสามารถในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสตาร์ช แต่กระบวนการเจลาตินไนซ์เป็นกระบวนการที่สิ้นเปลืองพลังงาน และสตาร์ชที่ผ่านกระบวนการเจลาตินไนซ์แล้วจะทำให้เสียลักษณะความเป็นแกรนูลซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่ออุตสาหกรรมบางประเภท ในขั้นตอนนี้จึงทำการศึกษาผลของการดัดแปรสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการเจลาตินไนซ์โดยเอมิโลมอลเทส ต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปรเปรียบเทียบกับสมบัติของสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากข้อ 4.4 โดยใช้สภาวะในการดัดแปร สารละลายสตาร์ชมันสำปะหลัง 5% (w/v), ปริมาณเอนไซม์ 3 Unit/สตาร์ช 1 กรัม และใช้เวลาในการดัดแปร 30 นาที, 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง

4.5.1. ลักษณะรูปร่าง และสมบัติ Birefringence ของเม็ดแป้ง

จากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างและขนาดของแกรนูลสตาร์ชด้วยกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) (รูปที่ 4.10) พบว่าแกรนูลของสตาร์ชดัดแปรจากการดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาตินไนซ์ จะคงมีลักษณะเป็นแกรนูล (รูป 4.10ค) ไม่แตกต่างจากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร (รูป 4.10 ก(1-2)) ส่วนแกรนูลของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรจากการดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลาตินไนซ์ จะถูกทำลายด้วยความร้อนเกิดเป็นลักษณะผลึกขนาดใหญ่ (รูป 4.11ข) สอดคล้องกับผลที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงโพลาไรส์ ที่พบว่าแกรนูลของสตาร์ชดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาตินไนซ์ (รูปที่ 4.11) ยังคงแสดงสมบัติ Birefringence เช่นเดียวกับสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร ในขณะที่สตาร์ชดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลาตินไนซ์ จะไม่พบสมบัติ Birefringence ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะ Birefringence ของเม็ดสตาร์ชเป็นการตรวจสอบความเสียหายของเม็ดสตาร์ช หากโครงสร้างผลึกภายในเม็ดสตาร์ชถูกทำลาย ลักษณะ Birefringence จึงหายไป (Kuakpetoon and Wang, 2006) แสดงให้เห็นว่าการเจลาตินไนซ์ มีผลต่อการจัดเรียงตัวของบริเวณผลึก (Crystalline) และบริเวณอสัณฐาน (Amorphous) ทำให้ความสามารถในการเป็ยงเบนระนาบสูญเสียไป

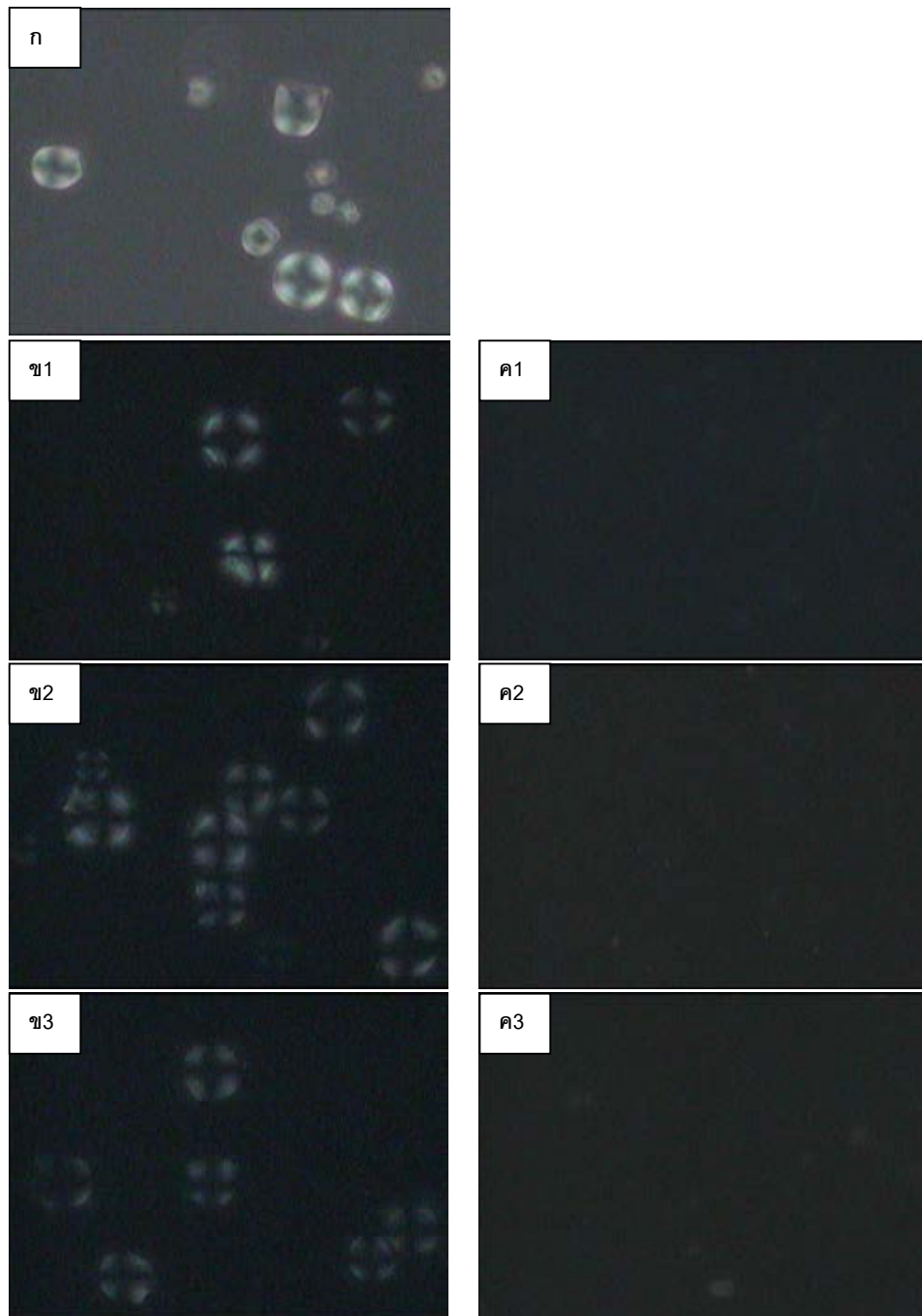


รูปที่ 4.10 ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ก(1-2) สตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร กำลังขยาย 800 และ 3000 เท่า

ข สตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสจากการดัดแปรสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนซ์ (เวลาในการดัดแปร 1 ชั่วโมง) กำลังขยาย 85 เท่า;

ค สตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสจากการดัดแปรสตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ (เวลาในการดัดแปร 1 ชั่วโมง) กำลังขยาย 800 เท่า



รูปที่ 4.11 สมบัติ Birefringence ของเม็ดแบ่ง ด้วยกล้องจุลทรรศน์ภายใต้แสงโพลาไรส์ กำลังขยาย 40 เท่า (ก สตาร์ไขมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการตัดแปร, ข(1-3) สตาร์ไขมัน สำปะหลังตัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน, ค(1-3) สตาร์ไขมัน สำปะหลังตัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนเซชัน ใช้เวลาในการตัดแปร 30 นาที 1 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ)

4.5.2 ปริมาณแอมิโลสปรากฏ

จากตารางที่ 4.8 พบว่า สตาร์ชดัดแปรที่ไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน (Granular) พบว่า ปริมาณแอมิโลสปรากฏลดลงเพียงเล็กน้อย ส่วนสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านการเจลาติไนเซชัน (Gel) มี ปริมาณแอมิโลสปรากฏลดลงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์จากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร ทั้งนี้คาดว่า เป็นเพราะสตาร์ชที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนเซชัน แอมิโลมอลเทสจะเข้าไปเกิดปฏิกิริยากับ ส่วนออสซิลลูมได้ยากกว่าในสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนเซชัน ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Oh et al. (2008) ซึ่งได้วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสของสตาร์ชข้าวโพดความเข้มข้น 12.5% (w/v) ที่ไม่ ผ่านการเจลาติไนซ์ ดัดแปรด้วย TMOGTase (แอมิโลมอลเทสจาก *Thermotoga maritime*) ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และพบว่าปริมาณแอมิโลสมีค่าลดลงเป็น 7.6% เมื่อเทียบกับสตาร์ชข้าวโพดที่ไม่ผ่านการดัดแปร (19.1%) ทั้งนี้อาจเกิดจากชนิดของสตาร์ช แหล่งที่มาของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการดัดแปร ซึ่งแกรนูลสตาร์ชที่ได้จากพืชหัว, ราก (เช่น สตาร์ชมันฝรั่ง สตาร์ชมันสำปะหลัง) จะมีผิวที่เรียบปราศจากรู (pinholes) ในขณะที่สตาร์ชจาก ธัญพืช (เช่น สตาร์ชข้าวโพด) มักมีรูพรุนกระจายอยู่จำนวนมาก ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปทำ ปฏิกิริยาภายในได้ง่าย (Fannon, Hauber, and BeMiller, 1992, Planchot et al., 1995) และ อุณหภูมิที่ใช้ในการดัดแปรที่แตกต่างกัน โดย Oh et al. (2008) ดัดแปรที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับ อุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชัน (อุณหภูมิเจลาติไนเซชันของสตาร์ชข้าวโพด 70 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้สตาร์ชมีความสามารถในการพองตัวและการละลายดีมากขึ้น ซึ่งในการทดลองได้ดัดแปร สตาร์ชมันสำปะหลังที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมของแอมิโลมอลเทส จาก *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 ซึ่งสตาร์ชจะมีค่ากำลังการพองตัวและการ ละลายที่ต่ำ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงเกิดได้ยากกว่า นอกจากนี้ความยาวสายโซ่กิ่งของ แอมิโลเพกตินของสตาร์ชที่ได้จากธัญพืชจะสั้นกว่าสตาร์ชที่ได้จากแหล่งอื่นๆ จึงถูกย่อยด้วย เอนไซม์ได้ง่ายกว่าสตาร์ชที่ได้จากแหล่งอื่นๆ (เช่น มันฝรั่ง มันสำปะหลัง) ซึ่งมีโครงสร้าง ประกอบด้วยสายเกลียวคู่ที่มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบมากกว่า จึงทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ ยากกว่า (Jane et al, 2003)

ตารางที่ 4.8 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติโนเซชัน

ตัวอย่าง	%แอมิโลสปรากฏ	%แอมิโลสปรากฏที่ลดลง
Native	26.85±0.35 ^d	-
Granular 30 min	23.60±0.85 ^c	3.25
Granular 1 h	23.55±0.21 ^c	3.30
Granular 6 h	23.40±0.71 ^c	3.45
Gel 30 min	19.40±0.42 ^b	7.45
Gel 1 h	16.70±0.42 ^a	10.15
Gel 6 h	16.60±0.14 ^a	10.25

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

($p \leq 0.05$)

4.5.3. การเกิดรีโทรเกรดชัน

จากการวิเคราะห์การเกิดรีโทรเกรดชันของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเจลาติโนเซชัน จะพบว่าสตาร์ชดัดแปรที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติโนเซชันหลังการเก็บ 14 วันที่ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.9) มีค่าพลังงานในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรดชัน (Enthalpy) ต่ำกว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมผลึก (T_o , T_p , T_c) ไม่แตกต่างจากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร และเวลาในการดัดแปรสตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติโนเซชันไม่มีผลต่อ T_o , T_p , T_c , T_c-T_o และ Enthalpy ซึ่งต่างจากสตาร์ชดัดแปรจากสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติโนเซชันที่มีอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรดชัน (T_o , T_p) สูงขึ้น และค่าพลังงานในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรดชันลดลงจากความแตกต่างดังกล่าวคาดว่าเป็นเพราะการที่สตาร์ชไม่ผ่านกระบวนการเจลาติโนเซชัน ส่งผลให้แอมิโลมอลเทสเข้าไปเกิดปฏิกิริยากับส่วนสัณฐานได้ยากกว่าในสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติโนเซชัน

ตารางที่ 4.9 สมบัติทางความร้อนของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติไนเซชันภายหลังจากการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วันหลังการเจลาติไนซ์

	T _o (°C)	T _p (°C)	T _c (°C)	T _c -T _o	Enthapy (mJ/mg)
Native	42.64±1.24 ^a	54.88±0.29 ^a	65.65±0.40 ^a	23.01±0.83 ^c	7.41±0.04 ^e
Granular 30 min	42.81 ±0.63 ^a	55.22±0.06 ^{ab}	64.64±1.01 ^a	21.83±0.38 ^{ab}	5.68±0.38 ^c
Granular 1 h	43.46 ±0.69 ^a	57.28±0.17 ^{ab}	64.57±0.46 ^a	21.11±0.23 ^b	5.24±0.29 ^c
Granular 6 h	43.49 ±0.51 ^a	54.82±0.76 ^a	64.98±0.08 ^a	21.49±0.43 ^{ab}	5.09±0.22 ^c
Gel 30 min	47.10±0.18 ^b	55.38±4.04 ^{ab}	64.10±1.12 ^a	17.00±1.30 ^a	2.79±0.14 ^b
Gel 1 h	47.12±1.17 ^b	58.80±0.05 ^{ab}	64.36±0.30 ^a	17.24±0.86 ^a	2.54±0.10 ^{ab}
Gel 6 h	49.48±1.69 ^b	59.00±0.86 ^b	65.24±1.92 ^a	15.76±0.23 ^a	2.10±0.19 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

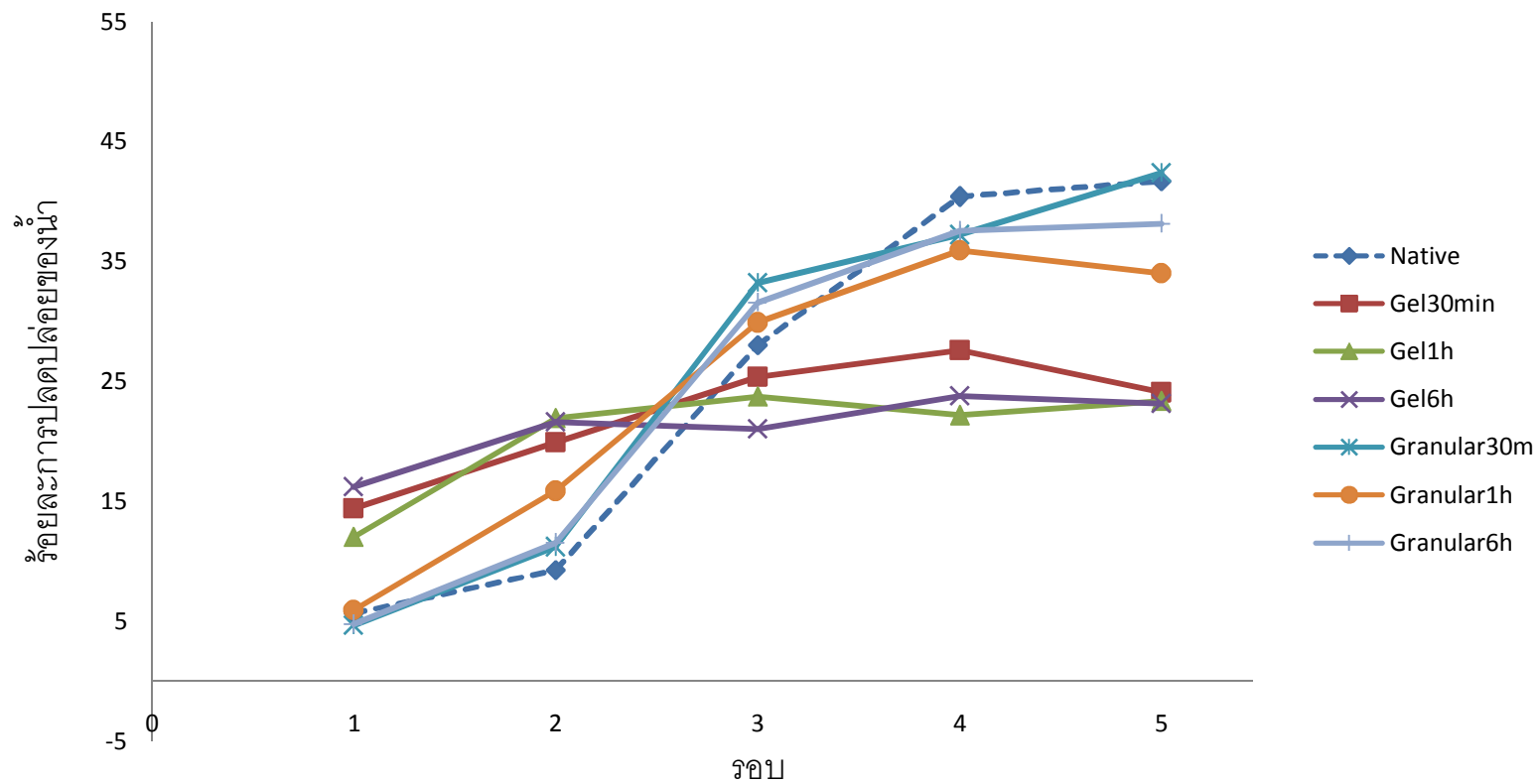
^{a, b, c} ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.5.4. ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง

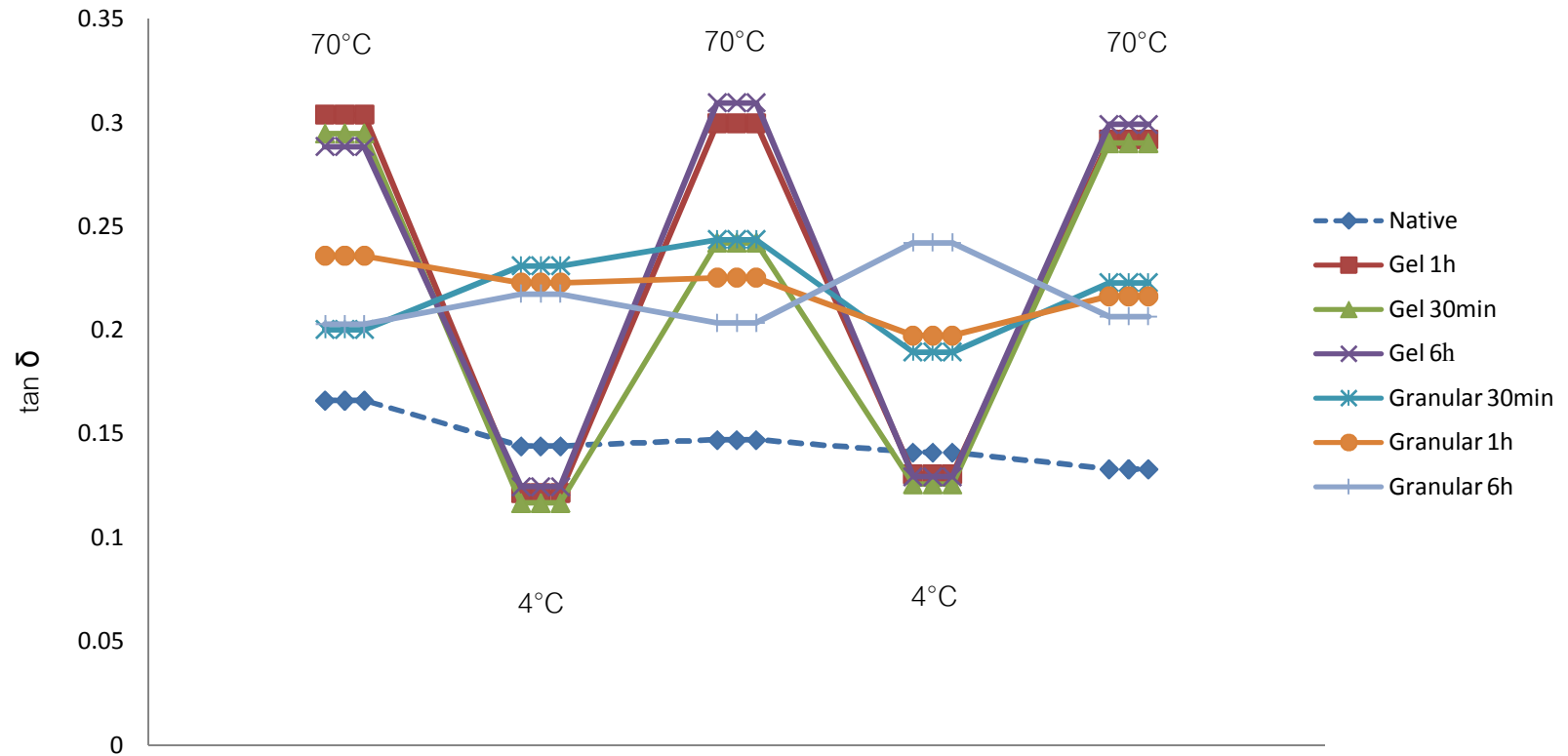
จากการวิเคราะห์สมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ดัดแปรโดยสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ แสดงด้วย %syneresis (รูป 4.12) พบว่าสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรสตาร์ชที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ และสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร มีค่า %syneresis เพิ่มขึ้นมากหลังรอบที่ 2 ต่างจากสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรสตาร์ชที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ ซึ่งมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งเพิ่มขึ้นโดย %syneresis มีค่าเกือบคงที่ (10-20%) ตลอดการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งทั้ง 5 รอบ ซึ่งอาจเนื่องจากแอมิโลมอลเทสเข้าไปเกิดปฏิกิริยากับส่วนสัณฐานของสตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ได้ยากกว่าสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนซ์

4.5.5. Thermo-reversibility

จากการวิเคราะห์สมบัติทางกระแสวิทยาของสตาร์ชดัดแปร (รูปที่ 4.13) พบว่าสมบัติทางกระแสวิทยาของสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ต่างจากสตาร์ชดัดแปรที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ โดยที่สตาร์ชดัดแปรที่ไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงค่า $\tan\delta$ คล้ายกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร คือมีการเปลี่ยนแปลงของค่า $\tan\delta$ เพียงเล็กน้อยให้ความร้อน หรือ ความเย็น ตรงข้ามกับทดลองของ Oh และคณะ (2008) ที่พบว่าสตาร์ชข้าวโพดดัดแปรที่ดัดแปรสตาร์ชโดยไม่ผ่านกระบวนการเจลาติไนซ์ มีสมบัติเป็น Thermo-reversible gel สามารถเปลี่ยนค่า $\tan\delta$ หรือเปลี่ยนสถานะได้เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยน ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะแกรนูลของสตาร์ชข้าวโพดมีรูพรุนเล็กๆ (Micro pore) อยู่ทั่วบริเวณผิวทำให้แอมิโลมอลเทสสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาภายในส่วนสัณฐานได้ (Oh et al., 2008) ตรงข้ามกับแกรนูลของสตาร์ชมันสำปะหลังซึ่งมีผิวเรียบไม่มีรูพรุน นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชไม่มีผลต่อสมบัติทางกระแสวิทยาของสตาร์ชดัดแปรได้



รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์สมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ผ่าน (Gel) และไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชัน (Granular)



รูปที่ 4.13 สมบัติ Thermo-reversibility ของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ผ่าน (Gel) และไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน (Granular)

4.5.6. การวัดค่าความแข็งแรงของเจล

จากการวัดค่าความแข็งแรงของเจลจากสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรสตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชัน พบว่าเจลของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชันมีค่าความแข็งแรง ($32-36 \text{ g}\cdot\text{mm}$) ใกล้เคียงกับเจลของสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร ($34 \text{ g}\cdot\text{mm}$) ส่วนเจลของสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรสตาร์ชที่ผ่านการเจลาตีไนเซชันมีค่าความแข็งแรง ($51-63 \text{ g}\cdot\text{mm}$) เพิ่มขึ้น ผลที่ได้สอดคล้องกับ Hansen et al. (2008) ที่ศึกษาผลของการดัดแปรสตาร์ชชนิดต่างๆ ด้วยเอมิโลมอลเทสต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล และพบว่าสตาร์ชดัดแปรที่มีค่าความแข็งแรงของเจลสูงกว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร อาจเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสตาร์ชทำให้ความเป็นร่างแหเพิ่มมากขึ้น (Hansen et al., 2008)

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าเวลาที่ใช้ในการดัดแปรไม่มีผลต่อค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชดัดแปรที่ไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชัน แต่เวลาที่ใช้ในการดัดแปรมีผลต่อค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านการเจลาตีไนเซชัน โดยสตาร์ชดัดแปรที่ใช้เวลาดัดแปร 30 นาทีที่มีค่าความแข็งแรงของเจลต่ำที่สุด ($51 \text{ g}\cdot\text{mm}$) และเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรรานขึ้น ค่าความแข็งแรงของเจลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

เมื่อเปรียบเทียบค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชมันสำปะหลังทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรเทียบกับเจลาตินพบว่า สตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปรและสตาร์ชดัดแปรที่ไม่ผ่านการเจลาตีไนเซชัน จะมีค่าความแข็งแรงของเจลใกล้เคียงกับเจลาติน 1.5% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ($25 \text{ g}\cdot\text{mm}$) ส่วนสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านการเจลาตีไนเซชันจะมีค่าความแข็งแรงของเจลใกล้เคียงกับเจลาติน 2% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ($71 \text{ g}\cdot\text{mm}$)

ตารางที่ 4.10 การวัดค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปร และเจลาติน

	Force (g)	Distance (mm)	Gel strength (g·mm)
Native	8.97±0.19 ^b	3.78±0.03 ^{ab}	33.92±0.84 ^b
Granular30min	7.29±0.33 ^a	4.79±0.12 ^d	34.89±2.00 ^b
Granular1h	7.31±0.23 ^a	4.45±0.21 ^{cd}	32.56±2.61 ^b
Granular6h	7.74±0.21 ^a	4.69±0.16 ^d	36.31±1.29 ^b
Gel30min	9.87±0.26 ^b	5.19±0.15 ^e	51.23±0.32 ^c
Gel1h	11.77±0.26 ^c	5.26±0.47 ^e	61.96±6.79 ^d
Gel6h	11.81±0.21 ^c	5.37±0.13 ^{ef}	63.48±2.48 ^d
Gelatin1.5%	7.00±1.00 ^a	3.61±0.40 ^a	25.11±3.11 ^a
Gelatin2%	17.33±0.58 ^d	4.08±0.02 ^{bc}	70.75±2.07 ^e
Gelatin3%	33.33±1.53 ^e	5.69±0.15 ^f	189.61±5.49 ^f

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^{a, b, c} ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

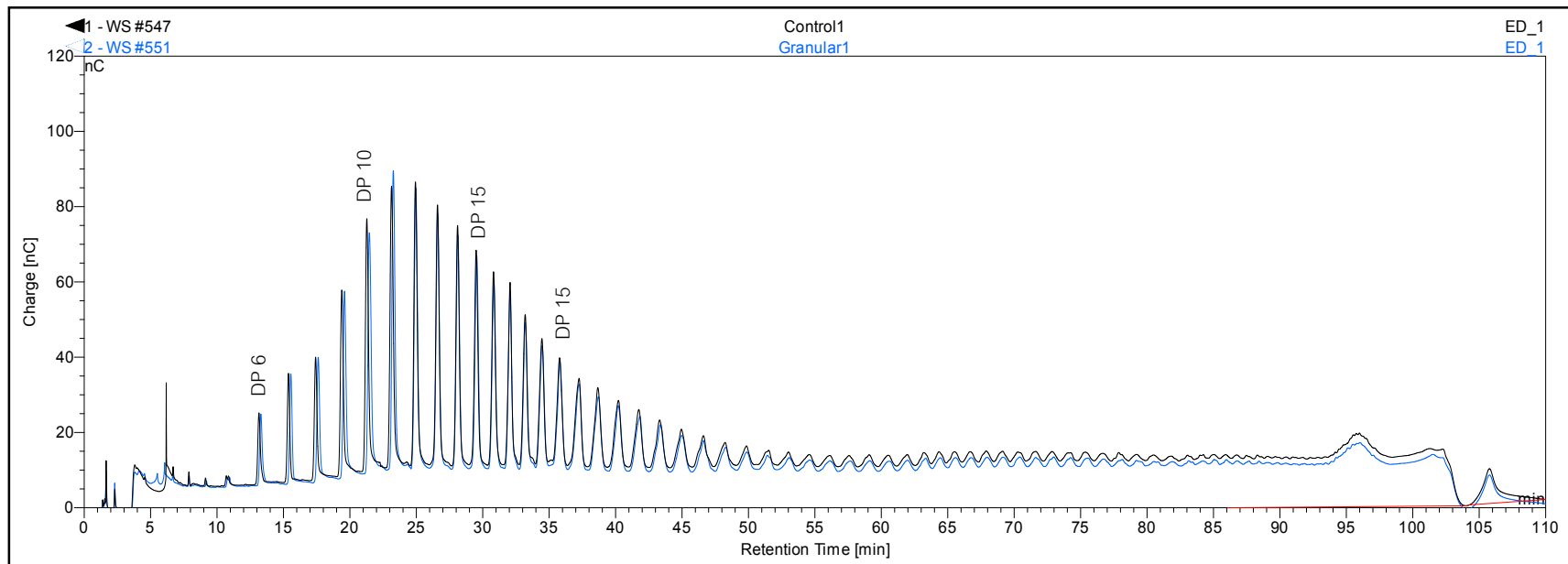
4.5.7. ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกติน

จากการวิเคราะห์ Side chain distribution ของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ใช้สตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ พบว่าลักษณะ Side chain distribution ของสตาร์ชดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ มีลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินในรูปแบบใกล้เคียงกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร (รูปที่ 4.14) ส่วนลักษณะ Side chain distribution ของสตาร์ชดัดแปรที่ใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนซ์ (รูปที่ 4.15) เปลี่ยนไปจากสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร คือมีปริมาณแอมิโลเพกตินสายกิ่ง DP 3-5 และ 6 ถึง 18 เพิ่มขึ้น เกิดจากปฏิกิริยาการตัดกิ่งของแอมิโลมอลเทส (Hansen, 2008) นอกจากนี้สายกิ่ง DP มากกว่า 22 ลดลงเล็กน้อย เกิดจากปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทส เมื่อนำมาทำปฏิกิริยา

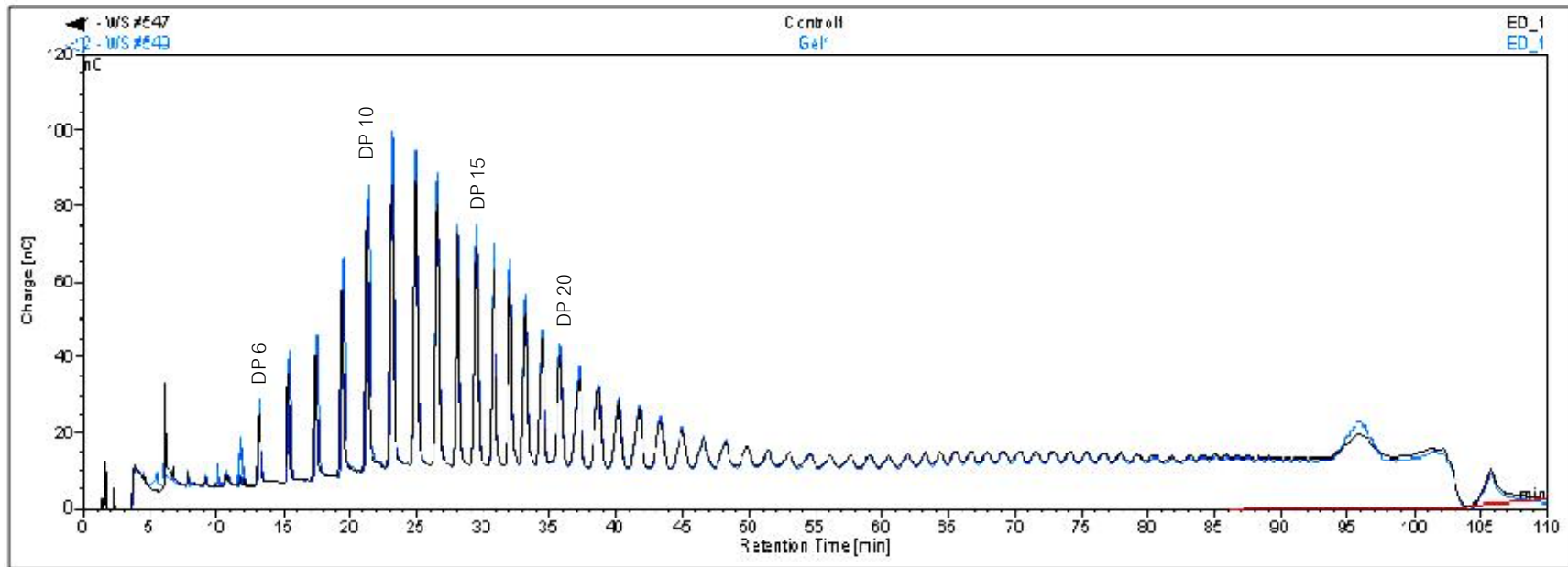
กับสตาร์ช แอมิโลมอลเทสจะย้ายสายกลูโคสจากแอมิโลสไปยังแอมิโลเพกติน (Kaper et al., 2004) แต่จากรูป 4.15 ไม่พบลักษณะของสายกิ่งยาวที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ตรงข้ามกับงานวิจัยของ van der Maarel และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าสตาร์ชมันฝรั่งดัดแปรมีสายกิ่งยาว $DP \geq 30$ เพิ่มขึ้น ซึ่งไม่สามารถสังเกตได้จากรูป 4.15 การที่ไม่พบสายแอมิโลเพกตินสายยาวเพิ่มขึ้นนั้น อาจเกิดจากภายใต้สภาวะการดัดแปรของแอมิโลมอลเทสจาก *Corynebacterium glutamicum* ที่ใช้ อาจทำให้เกิดปฏิกิริยา Hydrolysis หรือเกิดการย้ายสายกลูโคสภายในโมเลกุล (Intramolecular transglycosylation)

นอกจากนี้ลักษณะของแอมิโลเพกตินที่เปลี่ยนไปอาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสตาร์ช แหล่งที่มาของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการดัดแปร โดย Kaper และคณะ (2005) พบว่าสตาร์ชมันฝรั่งดัดแปรมีลักษณะของ Side chain distribution ที่กว้างขึ้น มีสายกิ่ง DP 5 ถึง 15 เพิ่มขึ้น พบกิ่งขนาด DP 2 ถึง 5 ในสตาร์ชดัดแปร และสายกิ่ง DP มากกว่า 30 มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน ในขณะที่ Seo และคณะ (2007) พบว่าสายกิ่ง DP 1 ถึง 9 เพิ่มขึ้น และ สายกิ่ง DP มากกว่า 10 ลดลง และ Oh และคณะ (2008) ศึกษาการดัดแปรสตาร์ชข้าวโพดโดยไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ ในสตาร์ชดัดแปรพบสายกิ่ง DP 1-5 มากขึ้น และสายกิ่ง DP มากกว่า 10 มีปริมาณลดลง

การเปลี่ยนแปลงลักษณะการกระจายตัวเนื่องจากการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส จะส่งผลให้สมบัติของสตาร์ชเปลี่ยนแปลงไป โดยลักษณะ Chain length distribution ที่เกิดขึ้นจากการดัดแปรอาจส่งผลให้สตาร์ชดัดแปรเกิดรีโทรเกรเดชันลดลง เนื่องจากสายกิ่งสั้นๆ DP 6 ถึง 12 ที่เพิ่มขึ้นจากการดัดแปรจะลดการเกิดรีโทรเกรเดชัน (Levine and Slade, 1986) นอกจากนี้สายกิ่ง DP 1 ถึง 5 จะทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่เป็นโครงสร้างผลึกที่ไม่แข็งแรง ทำให้ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง (Oh et al., 2008) ทำให้สตาร์ชดัดแปรที่ได้มีสมบัติ Thermo-reversibility



รูปที่ 4.14 ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่าน และผ่านการดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน ด้วยการวัด Chain-length distribution โดยใช้ High performance anion exchange chromatography สีดำ; สตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร สีน้ำเงิน; สตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน



รูปที่ 4.15 ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่าน และผ่านการดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนเซชัน ด้วยการวัด Chain-length distribution โดยใช้ High performance anion exchange chromatography
 สีดำ; สตาร์ชมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการดัดแปร
 สีน้ำเงิน; สตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนเซชัน

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สตาร์ชมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 9 ที่ใช้ในการทดลองมีความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน เท่ากับ 7.5, 0.13, 0.19 และ 0.12% (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ปริมาณแอมิโลสปรากฏ 26.85% เม็ดสตาร์ชมันสำปะหลังมีทั้งลักษณะกลม และรูปถ้วย ผิวเรียบ มีขนาดประมาณ 5-30 ไมครอน มีสมบัติ Birefringence ค่ากำลังการพองตัวและการละลายของสตาร์ชมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันอยู่ในช่วง 61.26 – 81.47 องศาเซลเซียส พลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลิตีในเซชันเท่ากับ 9.55 mJ/1 mg starch ส่วนอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันอยู่ในช่วง 61– 81 องศาเซลเซียส พลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันเท่ากับ 7.41 มิลลิจูล/มิลลิกรัม มีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งต่ำ

แอมิโลมอลเทสหลังการทำให้บริสุทธิ์มี Activity เพิ่มขึ้น 23.26 เท่า มีค่า Activity 48.68 unit/มิลลิลิตร และมีค่าร้อยละผลผลิต เป็น 73.19 เอนไซม์ที่ได้เป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 85 kDa

สตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ดัดแปรโดยใช้สตาร์ชที่ผ่านการเจลลิตีในซีมีปริมาณแอมิโลสปรากฏลดลง ความเข้มข้นของสตาร์ชมีผลต่อปริมาณแอมิโลสปรากฏอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อความเข้มข้นของสตาร์ชลดลงปริมาณแอมิโลสปรากฏจะลดลง อุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชัน (T_o , T_p) สูงขึ้น ค่าพลังงานในการหลอมผลึกที่เกิดจากการรีโทรเกรเดชันมีค่าลดลงขึ้นกับความเข้มข้นของสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ โดยที่ความเข้มข้นสตาร์ช 5% และปริมาณเอนไซม์ 1 และ 3 Unit/สตาร์ช 1 กรัม จะให้สตาร์ชดัดแปรที่มีค่าพลังงานในการเกิดผลึกน้อยกว่าที่สภาวะอื่นๆ สตาร์ชดัดแปรที่มีสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งมากขึ้น ค่า $\tan \delta$ ของสตาร์ชดัดแปรสามารถเปลี่ยนกลับไปมาเมื่อให้ความร้อนหรือความเย็นซ้ำซึ่งไม่พบในสตาร์ชที่ไม่ผ่านการดัดแปร และเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้สตาร์ชดัดแปรมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำ และความสามารถเปลี่ยนแปลงค่า $\tan \delta$ เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส $\tan \delta$ จะมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการดัดแปรที่ 1 และ 6 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

สภาวะที่ทำให้สสารตัดแปรมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำ และค่า $\tan\delta$ สามารถเปลี่ยนแปลงได้มากที่สุด คือการใช้สารละลาย สสารความเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาณแอมิโลมอลเทส 3 unit/สสาร 1 กรัม และเวลาที่ใช้ในการ ตัดแปร 1 ชั่วโมง

นอกจากนี้จากการศึกษาการตัดแปรสสารมันสำปะหลังตัดแปรโดยใช้สสารที่ไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ พบว่าสสารตัดแปรมีสมบัติคล้ายกับสสารที่ไม่ผ่านการตัดแปรหรือสสารดิบ กระบวนการเจลาติไนเซชันจำเป็นต่อการตัดแปรสสารมันสำปะหลังโดยแอมิโลมอลเทส

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. เพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดแปร
2. การตัดแปรสสารมันสำปะหลังโดยใช้แอมิโลมอลเทสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น ช่วยในการ ตัดสายแอมิโลส หรือแอมิโลเพกติน เพื่อให้แอมิโลมอลเทสสามารถเกิดปฏิกิริยาการย้าย/การต่อ สาย กลูแคนได้ดีมากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2550. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จิราวัฒน์ ทัดติยกุล. 2554. วิทยากระแสน้ำของอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ณัฐญา ปาลวัฒน์. 2545. อิทธิพลของอุณหภูมิ เวลา และการบดย่อยต่อสมบัติทางกายภาพของ เม็ดแป้งมันสำปะหลังและอัตราการสังเคราะห์ไซโคลเด็กซ์ทรีน. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิตติ เต็มเวชศยานนท์. 2543. การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธี Ball-Mill และศึกษาสมบัติของ แป้งดัดแปร. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บุญทิวา นิลจันทร์. 2548. การศึกษาศักยภาพเคมีฟิสิกส์ของฟลาวและสตาร์ชข้าวจากข้าวพันธุ์ต่างๆ ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วชิราพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์. 2543. การดัดแปรแป้งมันสำปะหลังโดยเอนไซม์พุลลูแลเนสเพื่อใช้ ในการทำแผ่นฟิล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศุภชัยวิชัยพีชไร่ระยอง. 2547. มันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ. สถาบันพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- สวณิต อิชยาวณิชย์. 2545. แนวทางการปรับปรุงคุณสมบัติทางรีโอโลยีของแป้งข้าวเจ้าไม่แห้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- อภิสิทธิ์ ศิริตัง. 2546. ศักยภาพการส่งออกของมันสำปะหลังแปรรูป. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต สาขาวิชาเศรษฐศาสตร์ธุรกิจ คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

อุตสาหกรรม, กระทรวง. 2521. ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 359 เรื่อง มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลัง เล่มที่ 95 ตอนที่ 139 ราชกิจจานุเบกษา ลงวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2521.

ภาษาอังกฤษ

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 17th ed. Washington, D.C : Association of Official Analytical Chemists.
- Bailey, J.M. and Whelan, W.J. 1961. Physical properties of starch I. Relationship between iodine stain and chain length. The Journal of Biological Chemistry. 236(4): 969-973.
- Bates, L.F., French, D. and Rundle, R.E. 1943. Amylose and amylopectin content of starches determined by their iodine complex formation. Journal of the American Chemical Society. 65: 142-148.
- Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. 1985. Starch Conversion Technology. New York: Marcel Dekker, Inc.,
- Bhuiyan, S.H., Kitaoka, M. and Hayashi, K. 2003. A cycloamylose-forming hyperthermostable 4- α -glucanotransferase of *Aquifex aeolicus* expressed in *Escherichia coli*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 22: 45-53.
- Bowers, J. 1992. Food Theory and Applications. New York: Macmillian Publishing Company.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the qualitatively of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry.15: 48-58.
- Cho, K.-H., Auh, J.-H., Ryu, J.-H., Kim, J.-H., Park, K.H., Park, C.-S. and Yoo, S.-H. 2009. Structural modification and characterization of rice starch treated by *Thermus aquaticus* 4- a –glucanotransferase. Food Hydrocolloids. 23: 2403–2409.
- Cole, C.G.B. 2000. Gelatin. In 2nd ed. Encyclopedia of Food Science and Technology, pp. 1183-1188. New York: John Wiley & Sons.

- Eliasson, A.C. and Gudmundson, M. 1996. Starch: Physicochemical and functional aspects, In A.C. Eliasson (ed.). Carbohydrates in Food. pp. 431-503. New York. Marcel Dekker, Inc.
- Fannon, J.E., Hauber, R.J. and BeMiller, J.N. 1992. Surface pores of starch granules. Cereal Chemistry. 69: 284–288.
- Foster, J.F. 1965. Physical properties of amylose and amylopectin in solution, In R.L. Whistler and E.F. Paschall (eds.) Starch Chemistry and Technology. pp. 349-391. New York: Academic Press.
- Freitas, R.A., Paula, R.C., Feitosa, J.P.A., Rocha, S. and Sierakowskic, M.-R. 2004. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. Carbohydrate Polymers. 55: 3–8.
- French, D. 1975. Chemistry and biochemistry of starch. In W.J. Whelan (ed.), Biochemistry of Carbohydrates. pp. 267-335. London: Butterworths.
- Fuwa, H. 1984. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. Journal of Biochemistry. 41: 583-603.
- Goyal, N., Gupta, J.K. and Soni, S.K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology. 37:723–734.
- Hansen, M.R. 2008. Food Uses of Enzyme-Modified Starches. Doctoral dissertation, Faculty of life sciences, University of Copenhagen.
- Hansen, M.R., Blennow, A., Pedersen, S., Norgaard, L. and Engelsen, S.B. 2009a. Enzyme modification of starch with amyloamylase results in increasing gel melting point. Carbohydrate Polymers. 78: 72–79.
- Hansen, M.R., Blennow, A., Pedersen, S., Norgaard, L. and Engelsen, S.B. 2009b. Comparative NMR relaxometry of gels of amyloamylase-modified starch and gelatin. Food Hydrocolloids. 23: 2038–2048

- Hansen, M.R., Blennow, A., Pedersen, S., Norgaard, L. and Engelsen, S.B. 2008. Gel texture and chain structure of amyloamylase-modified starches compared to gelatin. Food Hydrocolloids. 22: 1551–1566.
- Hizukuri, S. 1986. Polymodal distribution of the chain lengths of amylopectins and its significance. Carbohydrate Research. 14: 342-347.
- Hizukuri, S. 1996. Starch: analytical aspects. In A.C. Eliasson (ed.). Carbohydrate in Food. pp. 347-429. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Hizukuri, S., Kaneko, T. and Takeda, Y. 1983. Measurement of the chain length of amylopectin and its relevance to the origin of crystalline polymorphism of starch granules. Biochimica et Biophysica Acta 760: 188-191.
- Hollo, J. and Szeittli, J. 1968. The reaction of starch with iodine, pp.203-216. In J.A. Radley (ed.) Starch and Its Derivatives. Chapman and Hall, London.
- Hood, F.L. Current concept of starch structure. In D.R. Lineback and G.E. Inglett (eds.). Food carbohydrates. pp 217-236. Westport, USA: The AVI Publishing Company, Inc., 1982.
- Huang, Z.Q., Lu, J.P., Li, X.H. and Tong, Z.F. 2007. Effect of mechanical activation on physico-chemical properties and structure of cassava starch. Carbohydrate Polymers. 68: 128–135.
- Jane, J. Ao, Z., Duvick, S.A., Wiklund, M., Yoo, S., Wong, K. and Gardner, C. 2003. Structure of amylopectin and starch granules: How are they synthesised?" Journal of Applied Glycoscience. 50: 167-172.
- Jobling, S. A., Tayal, R. J. A., Jeffcoat, R. and Schwall, G. P. 2002. Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase gene. Nature Biotechnology. 34: 695-703.
- John, M., Schmidt, J. and Kneifel, H. 1983. Iodine-maltosaccharide complex: Relation between chain-length and colour. Carbohydrate Research. 119: 254-257
- Juliano, B.O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylase. Cereal Science Today. 16: 334-336,338, 360.

- Kaper, T., Talik, B., Ettema, T.J., Bos, H., Van der Maarel, M.J.E.C. and Dijkhuizen, L. 2005. Amylomaltase of *Pyrobaculum aerophilum* IM2 produces thermoreversible starch gels. Applied and Environmental Microbiology. 71: 5098–5106.
- Kaper, T., Van der Maarel, M.J.E.C., Euverinka, G.J.W. and Dijkhuizen, L. 2003. Exploring and exploiting starch-modifying amylomaltases from thermophiles. Biochemical Society Transaction. 32: 279-282.
- Khaton, S., Sreerama, Y.N., Raghavendra D., Bhattacharya, S. and Bhat, K.K. 2009. Properties of enzyme modified corn, rice and tapioca starches. Food Research International. 42: 1426–1433.
- Kelly, C.T., McTigue, M.A., Doyle, E.M. and Forgarty, W.M. 1995. Raw starch-degrading alkaline amylase of *Bacillus* sp IMD 370. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 15:446–8.
- Kitahata, S., Murakami, H. and Okada, S. 1989. Purification and some properties of amylomaltase from *Escherichia coli* IFO 3806. Agricultural and Biological Chemistry. 53: 2653-2659.
- Kuakpetoon, D. and Wang, Y. 2006. Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content. Carbohydrate Research. 341 :1896–1915.
- Kugimiya, M., Donovan, J.W. and Wong, R.Y. 1980. Phase transition of amylose-lipid complexes in starch: A calorimetric study. Starch/Stärke. 32: 265.
- Lai, L.S. and Kokoni, J.L. 1991. Physicochemical changes and rheology properties of starch during extrusion. Biotechnology Progress. 7: 251-266.
- Lanier, T.C. 1992. Measurement of surimi composition and functional properties. In Lanier, T.C. and Lee, C.M., Surimi Technology. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Leach, H.W., McCowen, L.D. and Schoch, T.J. 1959. Structure of the starch granule I. Swelling and solubility patterns of various starches. Cereal Chemistry. 36: 534-544.

- Lee, B.H., Oh, D.K. and Yoo, S.H. 2009. Characterization of 4- α -glucanotransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its application to various corn starches. New Biotechnology. 26: 29-36.
- Lee, K. Y., Kim, Y. R., Park, K. H. and Lee, H. G. 2006. Effects of α -glucanotransferase treatment on the thermo-reversibility and freeze-thaw stability of a rice starch gel. Carbohydrate Polymer. 63: 347-354.
- Lee, K. Y., Kim, Y. R., Park, K. H. and Lee H. G. 2008. Rheological and gelation properties of rice starch modified with α -glucanotransferase. Biological Macromolecules. 42: 298-304.
- Levine, H. and Slade, L. 1986. A polymer physicochemical approach to study of commercial starch hydrolysis products (SHP's). Carbohydrate Polymer. 6:213–44.
- Li, J.Y. and Yeh, A.I. 2001. Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. Journal of Food Engineering. 50: 141-148.
- Mezger, G.T. 2006. The Rheology Handbook for Users of Rotational and Oscillatory Rheometers. Germany: Vincentz Network GmbH & Co KG.
- Mishra, S. and Rai, T. 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. Food Hydrocolloids. 20: 557–566.
- Muadklay, J. and Charoenrein, S. 2008. Effects of hydrocolloids and freezing rates on freeze–thaw stability of tapioca starch gels. Food Hydrocolloids. 22: 1268 – 1272.
- Oates, C.G. 1997. Towards and understanding of starch granule structure and hydrolysis. Trends in Food Science and Technology. 8: 375-382.
- Oh, E.J., Choi, S.J., Lee, S.J., Kim, C.H. and Moon T.W. 2008. Modification of granular corn starch with 4- α - glucanotransferase from *Thermotoga maritime*: Effects on structural and physical properties. Journal of Food Science. 73(3): 158-166.

- Park, K.H. 2003. Structured and modified starch for food industry-how far can microbial enzymes and transgenics plant cooperatively work with? Acta Alimentaria. 32(1): 3-5.
- Planchot, V., Colonna, P., Gallant, D.J. and Bouchet, B. 1995. Extensive degradation of native starch granules by α -amylase from *Aspergillus fumigatus*. Journal of Cereal Science. 21:163–71.
- Pugsley, A.P. and Dubreuil, C. 1988. Molecular characterization of malQ, the structural gene for the *Escherichia coli* enzyme amyloamylase. Molecular Microbiology. 2: 473-479.
- Richter, M. and Rehbrücke, P. 1994. Spectrophotometric titration of starch polysaccharides with iodine. Starch/Stärke. 46(11): 422-434.
- Robin, J.P., Mercier, C., Charbonneire, R. and Guilbot, J.A. 1974. Lintnerized starches, gel filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. Cereal Chemistry. 51: 389-406
- Robin, R.W. 1980. Foodstuffs containing crosslinking starches using STMP. U.S.patent 4,183,969. January 15.
- Seo, N.-S., Roh, S.-A., Auh, J.-H., Park, J.-H., Kim, Y.-R. and Park K.H. 2007. Structural characterization of rice starch in rice cake modified by *Thermus scotoductus* 4- α -glucanotransferase (TS α GTase). Journal of Food Science. 72(6): 331-336.
- Singh, H. and Soni, S.K. 2001. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. Process Biochemistry. 37:453–459.
- Srichuwong, S., Isono, N., Jiang, H., Mishima, T. and Hisamatsu, M. 2012. Freeze-thaw stability of starches from different botanical sources: Correlation with structural features. Carbohydrate Polymers. 87: 1275–1279.

- Sriroth, K., Santisopasri, V., Petchalanuwat, C., Kurotjanawonga, K., Piyachomkwan, K. and Oates, C.G.. 1999. Cassava starch granule structure function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. Carbohydrate Polymers. 38: 161-170.
- Srisimarat Wiraya. 2010. Cloning and Characterization of Amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Doctoral dissertation, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Srisimarat, W., Powviriyakul, A., Kaulpiboon, J., Krusong, K., Zimmermann, W. and Pongsawasdi, P. 2010. A novel amyloamylase from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the large-ring cyclodextrin products. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry. 70: 369–375.
- Steffe, J.F. 1996. Rheological Methods in Food Process Engineering. East Lansing, MI, USA: Freeman Press.
- Swinkels, J.J.M. 1985. Composition and properties of commercial native starch. Starch/Stärke. 37: 1-5.
- Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T. and Okada, S. 1999. *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization: Production of cycloamylose. Applied and Environmental Microbiology. 65: 910-915
- Van der Maarel, M.J.E.C., Caprona, I., Euverinka, G.J.W., Herman, T.B., Kaper, T., Binnema, D.J. and Steeneken, P. A.M. 2005. A novel thermoreversible gelling product made by enzymatic modification of starch. Starch/Stärke. 57: 465–472.
- Van der Maarel, M.J.E.C., Van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. Journal of Biotechnology. 94: 137-155.
- Van der Veen, B.A., Uitdehaag, J.C.M., Dijkstra, B.W. and Dijkhuizen, L. 2000. Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. Biochimica et Biophysica Acta. 1543: 336-360

- Whistler, R. L. and BeMiller, J. N. 1997. Carbohydrate Chemistry for Food Scientists. pp. 117 – 151. St. Paul, USA: Eagan Press.
- Xavier, K.B., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. and Santos, H. 1999. Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: Purification and Characterization of key enzymes. Journal of Bacteriology. 181: 3358-3367.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับเลี้ยงเชื้อ (Srisimarat et al., 2010)

0.5 M Potassium phosphate buffer, pH 7.4

ชั่ง K_2HPO_4 26.127 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) ให้มีปริมาตร 300 มิลลิลิตร และชั่ง KH_2PO_4 6.0845 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วใช้สารละลาย KH_2PO_4 ในการปรับ pH ของสารละลาย K_2HPO_4 เป็น 7.4

Extraction buffer

ผสม 0.5 M Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, 100 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, 100% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

ก.2 การเตรียมสารเคมีสำหรับการทำแอนไทม์ให้บริสุทธิ์ (Srisimarat et al., 2010)

Binding buffer

ผสม 0.5 M Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร, NaCl 14.63 กรัม และ Imidazole 681 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

Elution buffer

ผสม 0.5 M Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร, NaCl 14.63 กรัม และ Imidazole 17.02 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

Stripping buffer

ผสม 0.5 M Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร, NaCl 14.63 กรัม และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

20% EtOH (v/v)

นำ Absolute ethanol 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

Rechart solution (0.1 M Nickle sulphate)

ละลาย Nickle sulphate 0.774 กรัมในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน

หมายเหตุ: สารเคมีทุกตัวที่ผ่านคอลัมน์ต้องกรองผ่านกระดาษกรอง Polyethersulfone (PES), pore size 0.45 μm , Whatman, England ก่อนใช้

ก.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**Luria Bertani ที่มี Ampicillin (LB+Amp) medium**

ผสม Bacto tryptone from meat 10 กรัม, NaCl 5 กรัม และ Yeast extract 5 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วย Autoclave (Kokusen Ensinki Co., Ltd., Model H-88LL, Japan) (เติม Ampicillin 100 ไมโครลิตร/ LB 1 ลิตรก่อนใช้งาน)

Solid Luria Bertani (LB+Amp) medium

ผสม Bacto tryptone from meat 10 กรัม, NaCl 5 กรัม, Yeast extract 5 กรัม และ agar 15 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วย Autoclave (เติม Ampicillin 100 ไมโครลิตร/ LB 1 ลิตรก่อนเทลงจานเพาะเชื้อ)

ภาคผนวก ข

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย Histrap affinity column (Amersham Biosciences Histrap FFTM, Histrap FFTM DEAE FFTM and HiTrep Phenyl FFTM (High Sub)16/10) ตามวิธีของ Srisimarat, 2010

1. Recharge ประจุคอลัมน์ใหม่โดยการชะคอลัมน์ด้วย Stripping buffer 6-9 มิลลิลิตรเพื่อไล่ประจุที่ค้างอยู่ออกก่อน
2. ชะคอลัมน์ด้วย Binding buffer 9 มิลลิลิตร เพื่อไล่ Stripping buffer ที่ค้างอยู่ในคอลัมน์ออก
3. เติมประจุใหม่ด้วยการชะด้วย Recharge solution 6 มิลลิลิตร หรือจนกว่าคอลัมน์จะเป็นสีฟ้า
4. จากนั้น Equilibrated คอลัมน์ด้วย Binding buffer 12-15 มิลลิลิตร
5. นำเอนไซม์หยาบผ่านคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลงในหลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัด OD_{280nm} จนค่า OD_{280nm} คงที่ (ใช้ Binding buffer เป็น Blank)
6. ชะคอลัมน์ด้วย Elution buffer เพื่อไล่เอนไซม์ที่ต้องการ ทำการเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบ Amylomaltase activity (ภาคผนวก ง.) จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ (เฉพาะหลอดที่มี Activity) ไปผ่าน Dialysis ใน 50mM Phosphate buffer pH 7.4 ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงอีกครั้ง เพื่อกำจัด Imidazole
7. หลังจากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ชะคอลัมน์ด้วย 20% EtOH ก่อนเก็บ

หมายเหตุ การเตรียมสารเคมีสำหรับทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์รายละเอียดตามภาคผนวก ก.2

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์สมบัติของสตาร์ช

ค.1 ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005, section 32.1.03)

1. อบชุด Aluminum pan ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นใน Desiccator ประมาณ 30 นาที จึงถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก Aluminum pan และ ฝา
2. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงใน Aluminum pan เชื้อยให้กระจายโดยทั่ว
3. อบตัวอย่างในตู้อบลมร้อน (WTB Binder, E53, Germany) ที่อุณหภูมิ 105±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน Desiccator จนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนักหลังอบ
4. อบซ้ำ (3.) จนน้ำหนักคงที่

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

ค.2 ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005, section 32.1.22)

วัสดุอุปกรณ์

1. ชุดสกัดโปรตีน (Protein digestion set)
 - Digestion unit, K-424, BUCHI, Switzerland
 - Scrubber, B-414, BUCHI, Switzerland
2. ชุดย่อยโปรตีน Protein distillation: B-324, BUCHI, Switzerland

สารเคมี

1. 4% Boric acid (A.R Grade)
2. 50% NaOH (A.R Grade)
3. 0.1 N HCl (A.R Grade) ที่ปรับมาตรฐานด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH
4. Selenium mixture

5. Indicator (Methyl red: Methylene blue, 2:1)

ละลาย Methyl red 1 กรัมใน EtOH 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษเบอร์ 42
ละลาย Methylene blue 0.5 กรัมใน EtOH 50 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษเบอร์ 42
ผสมสารละลาย Methyl red และสารละลาย Methylene blue ให้เข้ากัน เก็บในขวดสี
ชาให้พ้นแสง

วิธีทดลอง

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ในกระดาษกรองที่ปราศจากเถ้า (Whatman™, Ashless No.41)
ใส่ลงในหลอดสำหรับย่อย (digestion tube) (blank ใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)
2. เติม Selenium reagent mixer 5 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
3. ย่อยจนได้สารละลายใสสีน้ำตาลแดง ปล่อยให้เย็น
4. เจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดย่อยต่อเข้ากับเครื่องกลั่น
เติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 50% จนสารละลายกลายเป็นสีดำ
5. รองรับสารที่กลั่นด้วยสารละลาย Boric acid เข้มข้น 4% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
6. หยดสารละลาย Indicator (Methyl red : Methylene blue) ลงในสารละลายที่กลั่น
ได้ 2-3 หยด
7. นำไปไตเตรตกับ 0.1 N HCl จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{(V-B) \times N \times 1.4}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

V: ปริมาณ 0.1 N HCl ของตัวอย่าง

B: ปริมาณ 0.1 N HCl ของ Blank

N: ความเข้มข้นของ HCl

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \text{ปริมาณไนโตรเจน(\%)} \times 6.25$$

ค.3 ปริมาณเถ้า (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005, section 32.1.05)

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นใน Desiccator ประมาณ 30 นาที จึงถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 3-5 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เขี่ยให้กระจายโดยทั่ว
3. เผาบน Hot plate 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะกระทั่งกลายเป็นสีดำ
4. เผาใน Furnace 550 องศาเซลเซียส จนเถ้ากลายเป็นสีขาว
5. รอให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}} \times 100$$

ค.4 ปริมาณไขมัน (ดัดแปลงจาก AOAC, 2005, section 32.1.14)

วัสดุอุปกรณ์

1. Rotary evaporator:
 - Vacuum pump, BUCHI, V-700, Switzerland
 - Rotavapor, BUCHI, RII, Switzerland
2. Soxhlet extraction apparatus: Gerhardt, Germany

สารเคมี

1. Petroleum ether

วิธีทดลอง

1. อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นใน Desiccator และชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่าง 1-2 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรองใส่ลงใน Cellulose thimble
3. นำ Thimble ใส่ลงใน Soxhlet extraction apparatus

4. เติมตัวทำละลาย Petroleum ether 250 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลม วางลงบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำขวดก้นกลมไประเหย Petroleum ether ด้วย Rotary Evaporator
6. นำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันในขวดก้นกลม}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

ค.5 ปริมาณ Apparent amylose (ดัดแปลงจาก Juliano, 1971)

สารเคมี

1. 2N NaOH
2. 95% Ethanol
3. 1N Acetic acid
4. Iodine reagent (I_2 0.02% (w/v), KI 0.2% (w/v))

ซึ่ง KI 1 กรัม และ I_2 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น กวนด้วย magnetic stirrer ทิ้งไว้ข้ามคืน ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า

วิธีทดลอง

1. ชั่งสตาร์ช 100 ± 2.0 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้สตาร์ชกระจายตัว
3. เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
4. นำขวดวัดปริมาตรลงไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

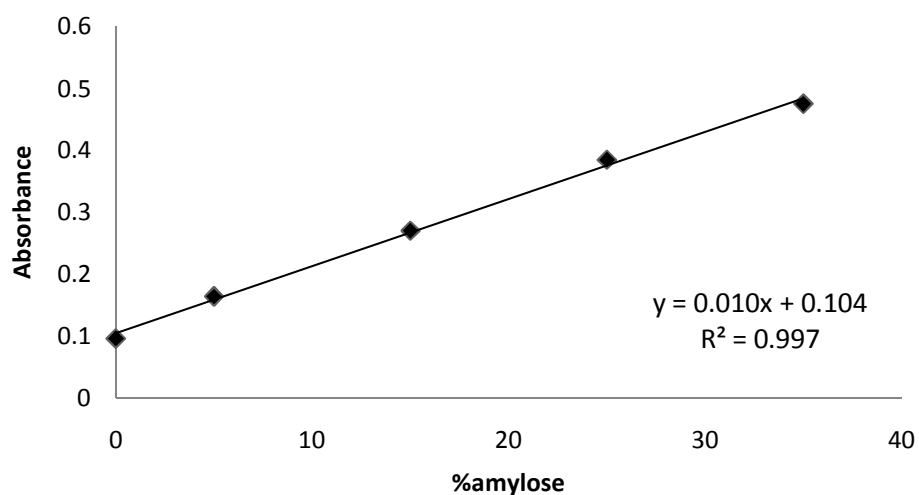
5. เตรียมขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ขวดใหม่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร, สารละลาย Acetic acid ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน ($0.2\%I_2$, $2\%KI$) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
6. เติมสารละลายสตาร์ชที่เตรียมไว้ (จากข้อ 5.) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เขย่าให้เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Beckman, DU Series 650, USA) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ชั่งแอมิโลสและแอมิโลเพกตินมาตรฐาน ปริมาณตามตารางที่ ค.1 ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้แอมิโลสและแอมิโลเพกตินกระจายตัว
3. เติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 N ปริมาตร 9 มิลลิลิตร
4. นำขวดวัดปริมาตรลงไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
5. เตรียมขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ขวดใหม่ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร, สารละลาย Acetic acid ความเข้มข้น 1 N ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายไอโอดีน ($0.2\%I_2$, $2\%KI$) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
6. เติมสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ (จากข้อ 5.) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างปริมาณแอมิโลสและค่าการดูดกลืนแสง

ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารละลายแอมิโลสมาตรฐาน

standard	Amylose		Amylopectin	
	%	mg	%	mg
1	0	0	100	100
2	5	5	95	95
3	15	15	85	85
4	25	25	75	75
5	35	35	65	65



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณแอมิโลส

ค.6 สมบัติการพองตัวและการละลาย (ดัดแปลงจาก Collado and Cork, 1997)

1. อบหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก
2. เตรียมตัวอย่างแป้ง โดยชั่งสตาร์ช 0.1 กรัม ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3. ทำการผสมด้วยเครื่อง Vortex (Scientific Industried, Inc, Model K-550-GE, US) ก่อนที่จะนำตัวอย่างไปบ่มใน Water bath (New Brunswick Scientific Co., Inc., Model G-76, USA) ที่อุณหภูมิ 55, 65, 75, และ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. บั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็ว 8000g (Refrigerated centrifuge: Beckman Instrument Inc., Model J2-21, USA) เป็นเวลา 20 นาที
5. เทส่วนใสลงใน Aluminum pan ที่ทราบน้ำหนักแล้ว ออบในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้ง ชั่งน้ำหนักตัวอย่างเพื่อใช้ในการคำนวณค่าการละลายน้ำ
6. ชั่งน้ำหนักส่วนตะกอนสตาร์ชเพื่อใช้ในการคำนวณหาความสามารถในการพองตัวและการละลาย

$$\text{การละลายน้ำ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็งที่ละลายในส่วนใส} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

$$\text{ความสามารถในการพองตัว (กรัม/กรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักของตะกอนในหลอดปั่นเหวี่ยง}}{[0.1(100\% - \text{เปอร์เซ็นต์การละลายน้ำ})]}$$

ค.7 สมบัติ Birefringence ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์ (ดัดแปลงจาก นิตี เต็ม เวชศยานนท์, 2543)

วัสดุอุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS รุ่น BX51 ติดกล้อง Panasonic wv-CP240/G, Japan)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมแผ่นสไลด์ตัวอย่าง โดยกระจายตัวอย่างสตาร์ชลงบนแผ่นสไลด์ให้ได้มากที่สุด
2. หยด 50% กลีเซอรอลปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงบนตัวอย่าง ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
3. นำแผ่นสไลด์ตัวอย่างมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์

- ติดตั้งเลนส์โพลาไรซ์ พร้อมหมุนปรับที่ตัวเลนส์เพื่อให้เกิดระนาบแสงโพลาไรซ์ โดยแกนขูดแบ่งจะสามารถเบี่ยงเบนระนาบแสงโพลาไรซ์ เกิด Cross pattern ที่เรียกว่า สมบัติ Birefringence

ค.8 สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง DSC (ดัดแปลงจาก Cho et al.,2009)

วัสดุอุปกรณ์

- Differential Scanning Calorimeter (DSC: , Perkin Elmer, Diamond DSC, USA)

วิธีการทดลอง

- ชั่งตัวอย่างสตาร์ช 2.0 มิลลิกรัม ใส่ลงใน Aluminum volatile pan (Perkin-elmer, Kit no.0219-0062, USA) เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิกรัม (ใช้อัตราส่วนน้ำต่อตัวอย่างเป็น 3:1)
- ปิดฝัก Aluminum volatile pan แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำตัวอย่างเข้าเครื่อง DSC ให้ความร้อนจาก 30-90 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยใช้ Aluminum volatile pan เปล่าเป็นตัวอ้างอิง (ข้อมูลที่ได้คือสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลลิตีในเซชัน)
- เก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน เพื่อให้เกิดรีโทรเกรดชัน
- นำตัวอย่างเข้าเครื่อง DSC อีกครั้ง ให้ความร้อนจาก 20-90 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (ข้อมูลที่ได้คือสมบัติทางความร้อนในการเกิดรีโทรเกรดชัน)
- ตรวจวัดค่าสมบัติทางความร้อนที่ได้จากการวิเคราะห์ของเครื่อง DSC โดยใช้โปรแกรม Pyris ดังนี้
 - T_o = อุณหภูมิที่จุดเริ่มต้น (Onset temperature) หน่วยเป็นองศาเซลเซียส
 - T_p = อุณหภูมิที่จุดสูงสุด (Peak temperature) หน่วยเป็นองศาเซลเซียส
 - T_c = อุณหภูมิที่จุดสุดท้าย (Conclusion temperature) หน่วยเป็นองศาเซลเซียส
 - ΔH = ค่าพลังงานความร้อนที่ใช้ในการหลอมผลึก หน่วยเป็นมิลลิจูลต่อมิลลิกรัม

ค.9 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (ดัดแปลงจาก Lee et al., 2006)

1. เตรียมสารละลายแป้ง 5% (น้ำหนัก/น้ำหนัก) แล้วทำให้เป็นเจลในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที
2. ตักเจลสตาร์ชประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิกรัม และชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนทำการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง
3. นำตัวอย่างไปแช่ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง
4. นำมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000g (Refrigerated centrifuge: Hettich, Model MIKRO 22R, Germany) เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำบริเวณผิวหน้าของเจล ออกโดยใช้ Micropipett และนำตัวอย่างเจลไปชั่งน้ำหนักสุดท้าย ก่อนนำไปแช่เยือกแข็งอีกครั้ง
6. ทำซ้ำข้อ 3-5 จนครบ 5 รอบ โดยแต่ละรอบทำการทดสอบ 5 ซ้ำ

$$\% \text{ syneresis} = \frac{(\text{น้ำหนักเจลก่อนแช่แข็ง} - \text{น้ำหนักเจลหลังถ่ายน้ำออก})}{\text{น้ำหนักเจลก่อนแช่แข็ง}} \times 100$$

ค.10 Thermo-reversibility ด้วยเครื่อง Rheometer (ดัดแปลงจาก Lee et al., 2006)

วัสดุอุปกรณ์

1. Rheometer: Thermoscientific, HAAKE MARS Rotational rheometer, USA

วิธีการทดลอง

1. เตรียมสารละลายแป้ง 5% (w/w) แล้วทำให้เป็นเจลในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดเป็นเจล
2. วัดด้วยเครื่อง Rheometer ด้วยหัวกดแบบ Parallel plate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร และกำหนด Gap size ที่ 1 มิลลิเมตร กำหนดความเครียดที่ 1 % strain

- และความถี่ที่ 1 Hz ในการทดลอง Time sweep วัดหาค่าโมดูลัสสะสม (Storage modulus, G') และค่าโมดูลัสสูญเสีย (Loss modulus, G'')
3. นำตัวอย่างไปควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ให้ได้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่า G' , G'' และ $\tan \delta$ (G''/G')
 4. นำตัวอย่างไปควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ให้ได้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่า G' , G'' และคำนวณค่า $\tan \delta$ (G''/G')
 5. ทำซ้ำข้อ 3-4 เป็นจำนวน 3 รอบ

ค.11 ค่าความแข็งแรงของเจล (ดัดแปลงจาก Lanier, T.C. 1992)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมตัวอย่าง 12% (w/v) สตาร์ชตัดแปรที่ผ่านการเจลาติไนซ์ด้วย Rapid Visco-Analyzer (RVA) และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่างขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร สูง 3 เซนติเมตร วัดค่าความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture (TA-XT รุ่น Plus, Stable Micro System, Surrey, United Kingdom)

โดยใช้หัววัดแบบลูกตุ้ม P.O.25s

TA-XT2 setting mode : Measurement force in compression

Option : Return to start

Pre-test speed 1.0 mm/sec

Test speed 1.0 mm/sec

Post-test speed 10.0 mm/sec

Defoemation 30%

Trigger Force 3g

Data Acquisition Rate 100 pps

3. วัดค่าน้ำหนักที่กด (Force) และระยะทางของหัวกดที่กดลงในตัวอย่างจนแตกออก (Deformation)
4. คำนวณค่าความแข็งแรงของเจล = ค่าน้ำหนักที่กด x ระยะทางของหัวกด

ค.12 ลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินด้วยการวัด Chain-length distribution โดย High performance anion exchange chromatography (HPAEC) (Kuakpetoon and Wang, 2006)

วัสดุอุปกรณ์

HPAEC DX-600: Dionex Corp., Sunnydale, USA

- Column: Carbopac PA-1TM 4 x 250 mm
- Pulsed amperometry detector: DIONEX ED40
- Autosampler: DIONEX AS40
- Column oven: DIONEX ICS-3000 SP

สารเคมีสำหรับ HPAEC

0.1M Acetate buffer pH 3.5

เตรียมสารละลาย 0.1M Acetic acid โดยผสม Acetic acid เข้มข้น ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตรใน Ultrapure (UP) 49.95 มิลลิลิตร และสารละลาย 0.1 M CH₃COONa โดยละลาย CH₃COONa 2.05 กรัม ใน น้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร นำสารละลาย 0.1 M CH₃COONa มาปรับ pH ของสารละลาย 0.1 M Acetic acid จนได้ pH 3.5

150 mM NaOH

นำน้ำ Ultrapure (UP) 1.5 ลิตร นำไปไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วย Sonicator ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาทีจากนั้นเติม 50% NaOH 11.88 มิลลิลิตร

600 mM Sodium acetate ใน 150 mM NaOH

ละลาย CH₃COONa 73.8 กรัม ใน น้ำ Ultrapure (UP) 1.5 ลิตร จากนั้นนำไปไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย Sonicator ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงเติม 50% NaOH 11.88 มิลลิลิตร

500 mM NaOH

นำน้ำ UP 1 ลิตร นำไปไล่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วย Sonicator ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นเติม 50% NaOH 26.4 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งสตาร์ชตัวอย่าง 9 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำ DI 3.2 มิลลิลิตร
3. ให้ความร้อน 90°C โดยใส่ใน Heat box ตั้งบน Hot plate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. ทิ้งให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง
5. เติม 0.1 M acetate buffer pH 3.5, Isoamylase 1770 Unit
6. บ่มให้เกิดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 40°C 48 ชั่วโมง
7. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มในน้ำเดือด 20 นาที
8. บั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. ดูดส่วนใสใส่ Vial พร้อมฉีดยุติ

การตั้งค่า HPAEC

1. Equilibrate คอลัมน์ ด้วย 150 mM NaOH
2. ตัวอย่างจะถูก Elute ใน Gradient ที่แตกต่างกันของ 600 mM Sodium acetate ใน 150 mM NaOH ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที
3. Linear gradients ของ Sodium acetate

Sodium acetate	เวลา (นาที)
0% - 20%	0 – 5
20% - 45%	6 – 30
45% - 55%	31 – 60
56% - 60%	61 – 80
61% - 65%	81 – 90
66% - 80%	91 – 95
81% - 100%	96 - 100

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์สมบัติของเอนไซม์

ง.1 Amylomaltase activity (Dextrinizing activity) (Fuwa, 1984)

การเตรียมสารเคมี

Iodine reagent (KI 0.2% (w/v), I₂ 0.02% (w/v))

ชั่ง KI 1 กรัม และ I₂ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น กวนด้วย Magnetic stirrer ที่ใช้ข้ามคืน ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา ก่อนใช้เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 เท่า

วิธีทดลอง

1. เตรียมหลอดทดลอง ตามจำนวนตัวอย่าง Binding และ Elution (จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ตามภาคผนวก ข.)
2. เติมสารต่อไปนี้ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด

- Phosphate buffer pH 6.0, 50mM	ปริมาณ 600 ไมโครลิตร
- 0.2% soluble starch	ปริมาณ 250 ไมโครลิตร
- 1% maltose	ปริมาณ 50 ไมโครลิตร
3. นำหลอดทดลองไปตั้งในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 5 นาที
4. เติมตัวอย่างจาก Binding และ Elution 100µl บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 10 นาที
5. หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที
6. ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละหลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร เติม Iodine reagent 900 ไมโครลิตร
7. วัดค่าการดูดกลืนสารที่ 600 nm ด้วย Spectrophotometer (Beckman, DU Series 650, USA)
8. กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มข้นของสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างแป้งและไอโอดีนลดลง 1% ต่อเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ง.2 ปริมาณโปรตีนโดยใช้ Coomassie blue (Bradford, 1976)

การเตรียมสารเคมี

Bradford's reagent

- Bradford stock solution

ผสม 95% Ethanol 100 มิลลิลิตร, 85% Phosphoric acid 200 มิลลิลิตร และ Coomassie brilliant blue G-250 350 มิลลิกรัม กวนด้วย Magnetic stirrer ที่ใช้ข้ามคั้น กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

- Bradford working buffer

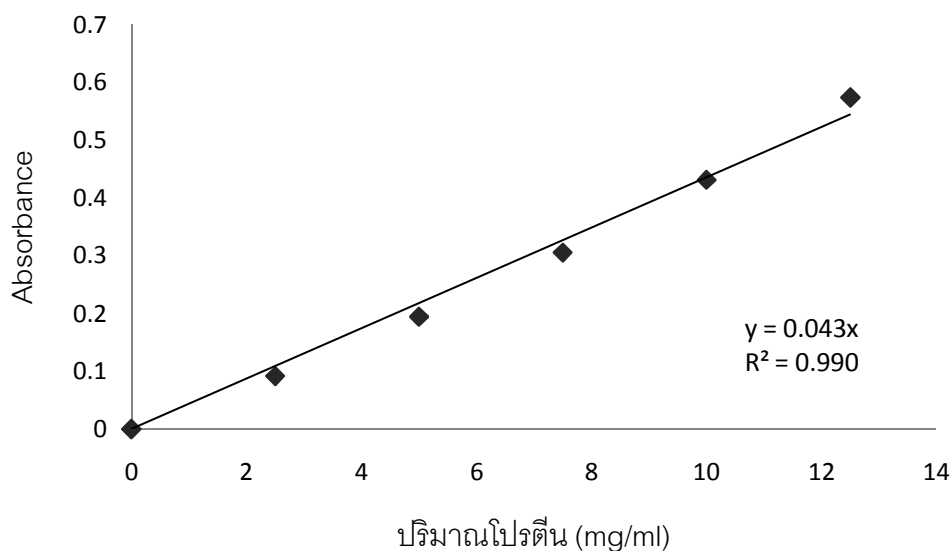
ผสมน้ำกลั่น 42.5 มิลลิลิตร, 95% Ethanol 1.5 มิลลิลิตร, 85% Phosphoric acid 3 มิลลิลิตร และ Bradford stock solution 3 มิลลิลิตร

วิธีทดลอง

1. เตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ตามตารางที่ ง.1
2. นำเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร เติม Bradford reagent (Bradford working buffer) 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
4. คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ง.1 ปริมาณสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	µg protein	Standard solution (BSA 1 mg/ml)	Buffer (µl)	Bradford's reagent (ml)
Blank	0	0	100	1
1	2.5	2.5	97.5	1
2	5	5	95	1
3	7.5	7.5	92.5	1
4	10	10	90	1
5	12.5	12.5	87.5	1



รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีน

ง.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE (Srisimarot, 2010)

การเตรียมเจล

เตรียม 7.5% Separating gel และ 5% Stacking gel (แสดงดังตารางที่ ง.2) จากนั้นทำการไหลด 7.5% Separating gel และ 5% Stacking gel

เตรียม Electrode buffer เข้มข้น 5 เท่า (Tris 45 กรัม, Glycine 216 กรัม, SDS 15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 3 ลิตร) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้เจือจาง Electrode buffer ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 350 มิลลิลิตร

1. ยึดแม่แบบที่ประกอบด้วยแผ่นกระจกกับแท่นที่ใช้เตรียมเจลให้แน่น โดยมีแผ่นพลาสติกบางสอดที่ระหว่างกระจกและเซรามิก เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับเทเจล
2. เท 7.5% Separating gel ลงในแม่แบบให้มีพื้นที่เหลืออยู่ประมาณ 1 นิ้ว ปล่อยให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง
3. เท 5% Stacking gel ทับลงบน Separating gel จนสุดขอบด้านบนของแม่แบบ จากนั้นสอดแผ่นพลาสติกที่มีลักษณะเป็นซี่ฟันลงในส่วน Stacking gel ที่ยังไม่แข็งตัว เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับใส่ตัวอย่าง ปล่อยให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

4. ถอดแผ่นพลาสติกที่มีลักษณะเป็นซี่ออก นำเจลที่แข็งตัวออกจากแม่แบบและติดตั้งเข้าสู่ชุด Electrophoresis โดยให้ด้านล่างของเจลจุ่มอยู่ใน Electrode buffer และเติม Electrode buffer จนท่วมผิวด้านบนบนเจล

ตารางที่ ง.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม Separating gel และ Stacking gel

สาร	7.5% Separating gel	5% Stacking gel
Solution A (40% Acrylamide)	1.41 ml	0.32 ml
Solution B (4X separating gel buffer)	2.5 ml	-
Solution C (4X stacking gel buffer)	-	0.5 ml
H ₂ O	3.48 ml	1.652 ml
10% Ammonium persulphate	100 µl	25 µl
TEMED	10 µl	3 µl
Total volume	7.5 ml	2.5 ml

การเตรียมสารละลายเอนไซม์

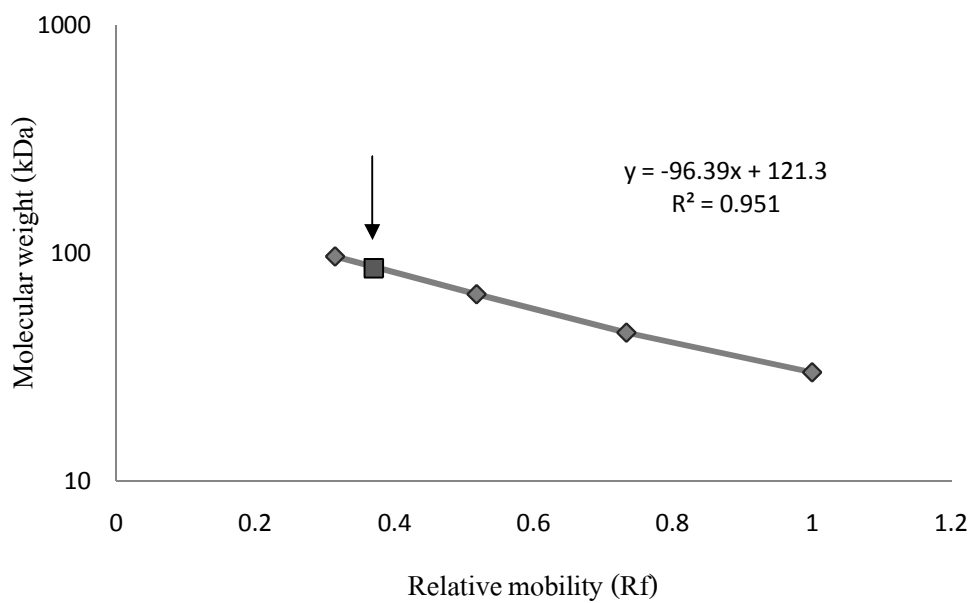
นำสารละลายเอนไซม์แอมิโลมอลเทส ทั้งเอนไซม์หยาบ และเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาผสมกับ Sample buffer ในอัตราส่วน 4:1 แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

บรรจุลงในอ่างบัฟเฟอร์ในแนวตั้ง ที่มีอิเล็กโทรโฟรีซิสบัฟเฟอร์อยู่ ทำการ load ตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในหลุมเจล แล้วผ่านกระแสไฟฟ้า 30 mA/ 1 เจล จนกระทั่งแถบสี (tracking dye) อยู่ห่างจากขอบล่างประมาณ 5 มิลลิเมตรจึงปิดกระแสไฟฟ้า

การติดตามแถบโปรตีน (Comassie blue staining)

นำแผ่นเจลออกจากกระจก นำไปย้อมด้วย Comassie blue เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จากนั้น นำแผ่นเจลไปล้างสีส่วนที่เกินออกด้วย Destaining solution (Acetic acid 100 มิลลิลิตร, Methylalcohol 500 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร) หลายๆครั้ง จนกระทั่งแผ่นเจลใส และเห็นแถบน้ำเงินของโปรตีน



รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานสำหรับน้ำหนักโมเลกุลของแอมิโดมอลเทส

- 1) Phosphorylase b (MW 97,000 Da)
- 2) Bovine serum albumin (MW 66,000 Da)
- 3) Ovalbumin (MW 45,000 Da)
- 4) Carbonic anhydrase (MW 30,000 Da)

ลูกศรหมายถึงน้ำหนักโมเลกุลของแอมิโดมอลเทสที่เตรียมได้

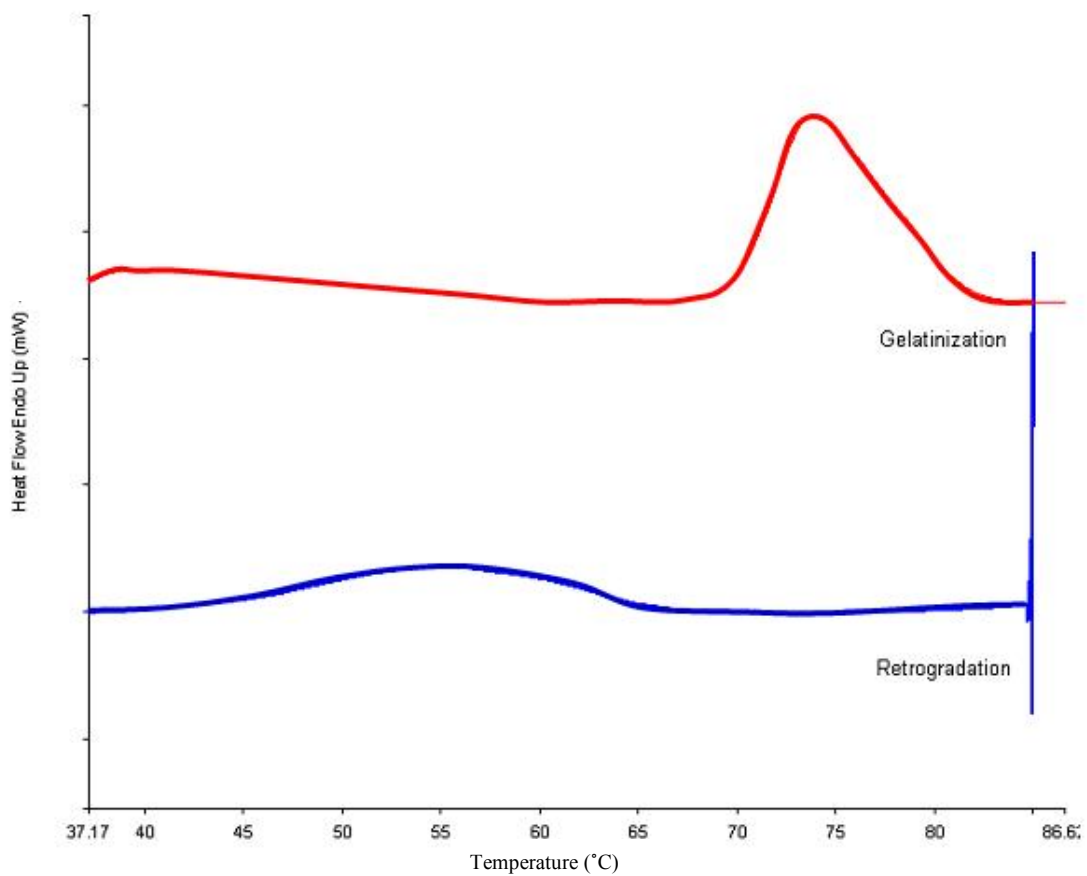
ภาคผนวก จ

ข้อมูลการทดลอง

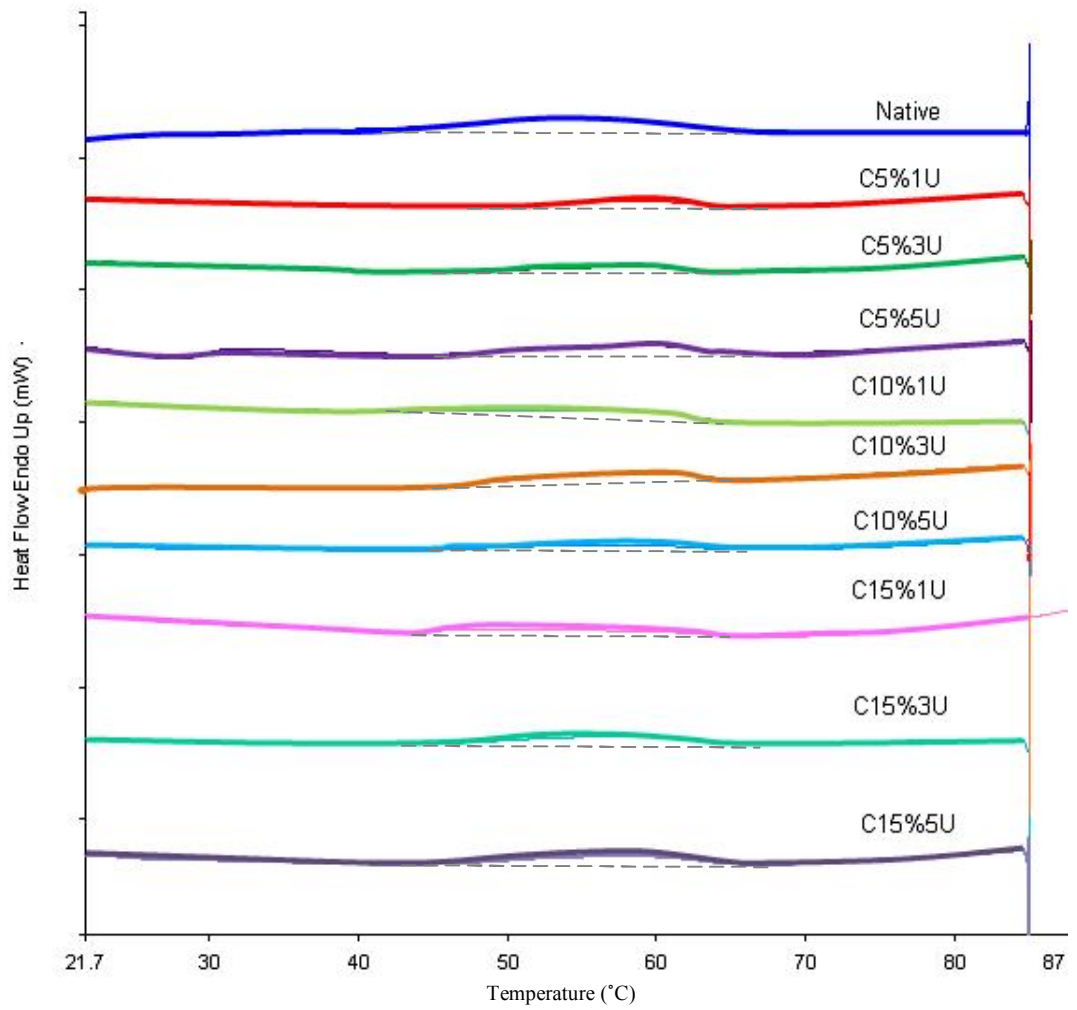
ตารางที่ จ.1 ค่ากำลังการพองตัว และค่าการละลายของสตาร์ชมันสำปะหลังที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	ค่ากำลังการพองตัว	ค่าการละลาย
55	3.11 ± 0.23	2.19 ± 0.27
65	8.23 ± 0.45	6.54 ± 0.43
75	21.30 ± 0.53	11.86 ± 0.83
85	34.29 ± 0.58	38.28 ± 0.31

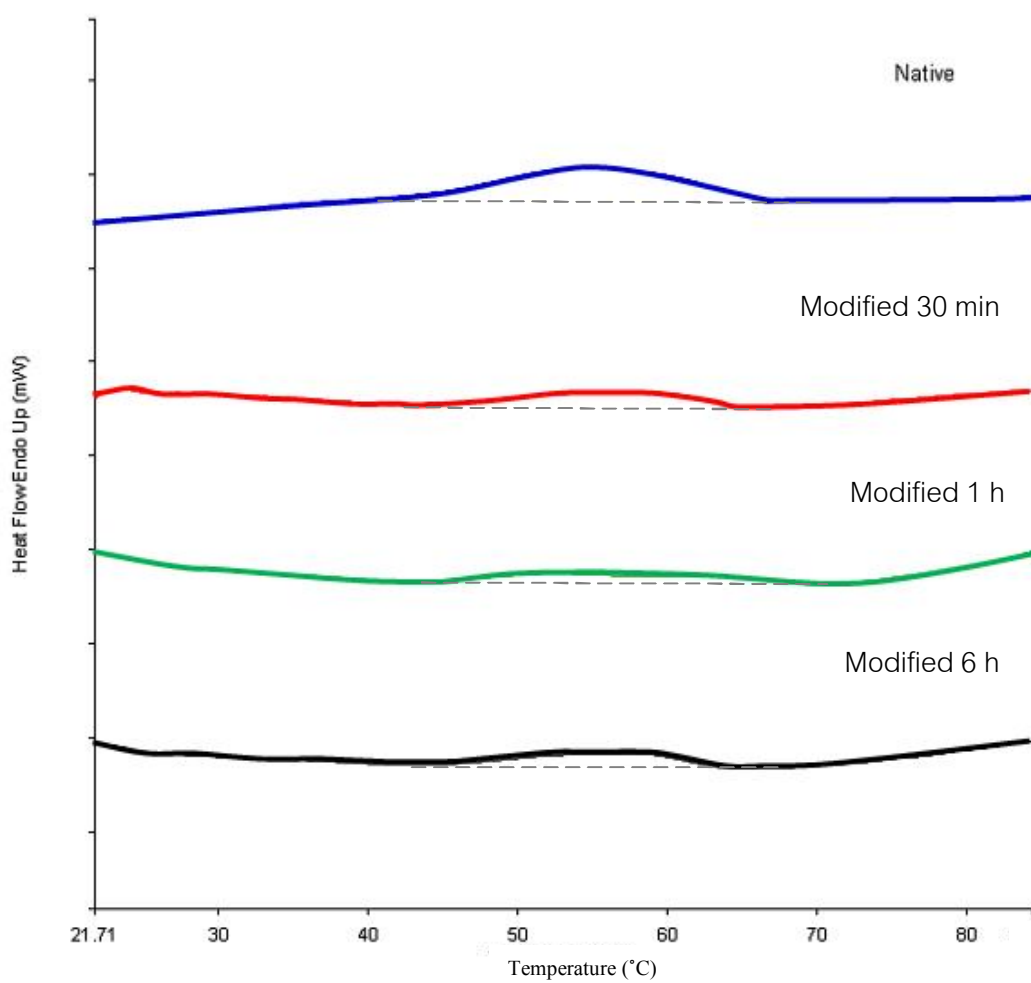
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน



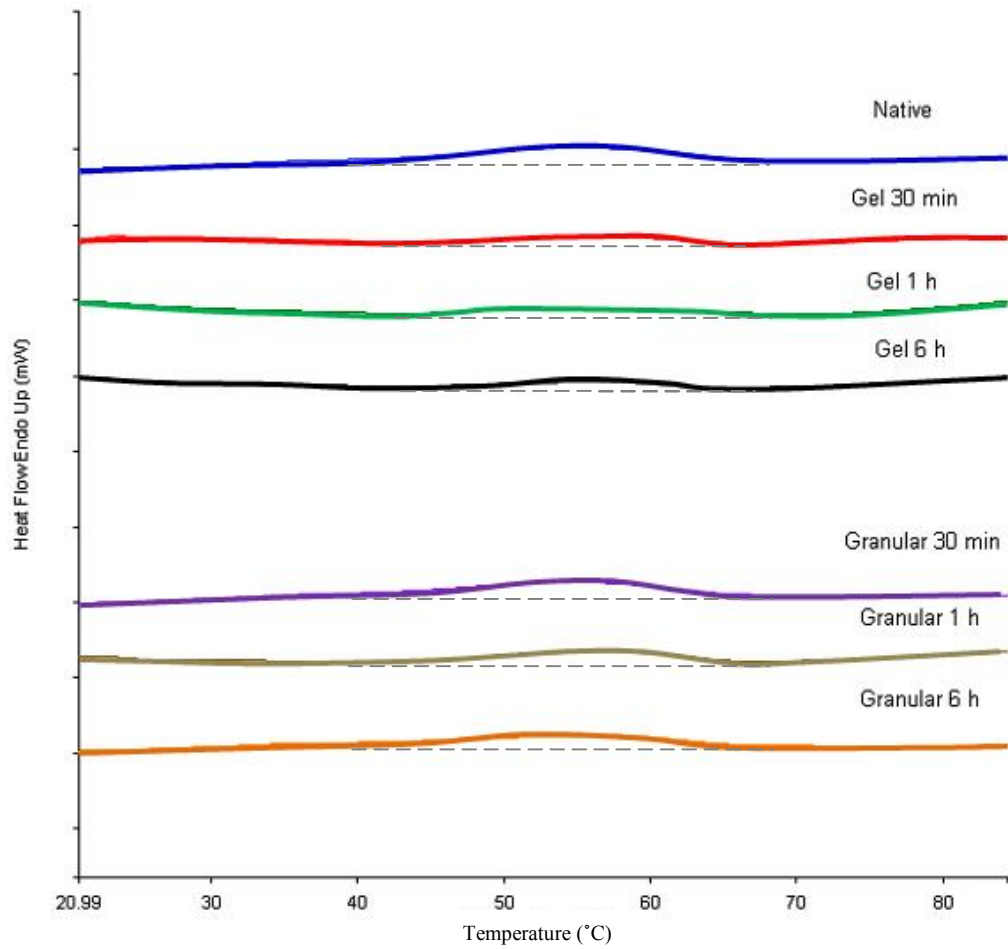
รูปที่ ๑.1 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดเจลลาตินในเซชันและรีโทรเกรดชันของ
สตาร์ชมันสำปะหลัง



รูปที่ ๑.๒ ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ซมัน
 สำปะหลัง ที่ผ่านการดัดแปรที่สภาวะต่างๆ



รูปที่ ๑.3 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดรีโทรเกรดชันของสตาร์ชมัน
สำหรับหลังจากผ่านการดัดแปรที่เวลาต่างๆ



รูปที่ ๑.4 ลักษณะเทอร์โมแกรมจาก DSC ของการเกิดรีโทรเกรดชันของสตาร์ชมัน
 สำปะหลังดัดแปรที่ผ่าน (Gel) และไม่ผ่านการเจลาติไนเซชัน (Granular)

ตารางที่ ๑.2 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลังที่ผ่านและไม่ผ่านการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส

	%syneresis ของสตาร์ชที่ผ่านการแช่แข็งและการละลายน้ำแข็ง				
	1	2	3	4	5
Native	5.66±0.22	9.24±0.19	27.99±0.77	40.39±0.55	41.70±0.63
c5%1U	14.26±0.81	16.63±0.20	16.54±0.36	16.72±0.28	17.78±0.32
c5%3U	12.99±0.25	13.99±0.52	20.62±0.33	20.00±0.59	20.44±0.20
c5%5U	12.63±0.94	13.42±0.52	19.60±0.67	19.63±0.04	19.98±0.48
c10%1U	16.27±0.28	15.88±0.25	16.36±0.35	15.50±0.84	20.63±0.17
c10%3U	16.65±0.34	14.68±0.23	21.63±0.50	22.20±0.56	17.83±0.20
c10%5U	9.52±0.18	17.46±0.28	19.25±0.54	18.47±0.34	20.61±0.52
c15%1U	15.42±0.26	18.61±0.28	19.25±0.18	21.09±0.51	21.64±0.20
c15%3U	14.25±0.35	18.52±0.26	19.62±0.51	18.48±0.14	20.20±0.35
c15%5U	16.36±0.43	16.47±0.37	16.47±0.13	16.14±0.29	18.28±0.28

ตารางที่ ๑.3 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชมันสำปะหลัง
ของสตาร์ชมันสำปะหลังดัดแปรที่ผ่าน (Gel) และไม่ผ่านการเจลาตินไนเซชัน
(Granular)

	%syneresis ของสตาร์ชที่ผ่านการแช่แข็งและการละลายน้ำแข็ง				
	1	2	3	4	5
Native	5.66±0.22	9.24±0.19	27.99±0.77	40.39±0.55	41.70±0.63
Gel30min	14.41±1.50	19.90±0.67	25.35±0.64	27.59±1.49	24.07±0.46
Gel1h	12.01±0.50	21.92±0.90	23.71±1.29	22.16±0.67	23.33±1.75
Gel6h	16.19±1.82	21.58±1.56	21.01±2.60	23.79±1.06	23.15±1.41
Granular30m	2.65±1.28	11.19±1.12	33.20±1.28	33.21±1.98	44.38±0.57
Granular1h	4.91±1.68	15.85±1.10	29.90±0.31	35.90±1.74	34.02±2.24
Granular6h	1.76±0.35	11.53±1.34	31.59±2.02	37.53±0.67	38.15±0.40

ตารางที่ ๑.4 ผลของความเข้มข้นของสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ต่อค่า G' , G'' และ $\tan\delta$ ของสตาร์ชที่ผ่านและไม่ผ่านการตัดแปรร

อุณหภูมิ	Parameter	Native Starch	5%1U	5%3U	5%5U	10%1U	10%3U	10%5U	15%1U	15%3U	15%5U
70°C	G'	16370.00	364.30	208.60	385.80	436.50	160.40	615.10	109.90	102.80	260.10
	G''	2399.00	95.34	67.56	75.70	125.20	16.48	169.77	18.94	17.58	68.93
	$\tan\delta$	0.166	0.262	0.324	0.196	0.188	0.103	0.276	0.172	0.171	0.265
4°C	G'	113.60	120.50	108.70	85.75	154.00	157.30	187.00	132.90	133.20	93.99
	G''	17.03	13.60	12.50	10.02	14.98	17.89	19.35	14.26	14.57	10.34
	$\tan\delta$	0.144	0.113	0.115	0.117	0.094	0.090	0.103	0.107	0.109	0.110
70°C	G'	121.90	857.50	313.20	589.20	356.75	293.60	254.10	2430.00	204.30	250.97
	G''	18.13	280.50	97.51	121.40	103.10	55.89	72.16	415.80	10.36	64.75
	$\tan\delta$	0.147	0.327	0.311	0.206	0.209	0.190	0.284	0.171	0.197	0.258
4°C	G'	119.80	82.74	79.31	95.44	156.40	155.80	139.20	76.88	108.30	113.30
	G''	17.34	9.03	8.87	9.80	15.30	15.28	14.04	10.10	11.62	12.67
	$\tan\delta$	0.141	0.109	0.112	0.103	0.097	0.098	0.101	0.132	0.107	0.112
70°C	G'	97.10	1390.00	247.73	122.70	410.10	505.20	1388.00	226.50	766.10	606.90
	G''	13.48	327.00	83.75	14.19	80.81	88.30	145.50	40.98	146.80	155.80
	$\tan\delta$	0.133	0.235	0.308	0.116	0.119	0.194	0.288	0.181	0.192	0.256

ตารางที่ ๑.5 ผลของการเจลาติไนซ์และเวลาที่ใช้ในการตัดแปรต่อค่า G' , G'' และ $\tan\delta$ ของสตาร์ชตัดแปรที่ผ่านและไม่ผ่านการเจลาติไนซ์ชั้น

อุณหภูมิ	Parameter	Native starch	Gelatinized starch			Granular starch		
			30 min	1 h	6 h	30 min	1 h	6 h
70°C	G'	16370.00	171.94	235.20	299.42	2825.45	114.81	42.63
	G''	2399.00	52.23	69.30	80.19	565.54	27.07	8.64
	$\tan\delta$	0.166	0.304	0.295	0.288	0.200	0.236	0.203
4°C	G'	113.60	53.32	63.98	65.51	23.42	26.01	26.98
	G''	17.03	9.68	10.02	10.12	5.41	5.80	5.86
	$\tan\delta$	0.144	0.122	0.117	0.125	0.231	0.223	0.217
70°C	G'	121.90	99.14	68.44	48.56	23.80	24.88	24.41
	G''	18.13	29.70	16.57	15.03	5.80	5.61	4.97
	$\tan\delta$	0.147	0.300	0.242	0.309	0.244	0.225	0.203
4°C	G'	119.80	58.03	68.83	60.94	31.66	22.95	16.82
	G''	17.34	9.32	10.03	8.49	6.00	4.53	4.07
	$\tan\delta$	0.141	0.131	0.126	0.129	0.189	0.197	0.242
70°C	G'	97.10	89.50	196.65	369.66	24.51	58.36	36.66
	G''	13.48	26.12	57.03	110.54	5.46	12.62	7.57
	$\tan\delta$	0.133	0.292	0.290	0.299	0.223	0.216	0.207

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ จ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอมิโลสในสตาร์ชตัดแปรที่ผ่านการตัดแปรโดยใช้ความเข้มข้นสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ต่างๆ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
enz	17.114	2	8.557	3.030	.099
starch	27.001	2	13.501	4.781	.038
enz * starch	25.312	4	6.328	2.241	.145
Error	25.415	9	2.824		
Total	8231.470	17			

ตารางที่ จ.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของปริมาณแอมิโลสแต่ละสภาวะที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นสตาร์ชและเอนไซม์แตกต่างกันในการตัดแปร

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Amylose	Treatment	125.652	9	13.961	5.466	.007
	Error	25.540	10	2.554		
	Total	151.192	19			

ตารางที่ ๑.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอมิโลสในสตาร์ชตัดแปรที่ผ่านการตัดแปรโดยใช้ความเข้มข้นสตาร์ชและปริมาณเอนไซม์ต่างๆ

Source	Dependent Variable	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
starch	T ₀	7.637	2	3.819	5.383	.029
	T _p	.671	2	.335	.574	.583
	T _c	1.062	2	.531	1.258	.330
	T _c -T ₀	13.643	2	6.821	19.249	.001
	enthalpy	1.600	2	.800	25.231	.000
enz	T ₀	.999	2	.499	.704	.520
	T _p	.832	2	.416	.712	.516
	T _c	.275	2	.137	.325	.730
	T _c -T ₀	1.949	2	.974	2.750	.117
	enthalpy	1.188	2	.594	18.735	.001
starch * enz	T ₀	3.399	4	.850	1.198	.376
	T _p	1.071	4	.268	.458	.765
	T _c	2.084	4	.521	1.234	.362
	T _c -T ₀	.701	4	.175	.494	.741
	enthalpy	3.007	4	.752	23.715	.000
Error	T ₀	6.385	9	.709		
	T _p	5.259	9	.584		
	T _c	3.799	9	.422		
	T _c -T ₀	3.189	9	.354		
	enthalpy	.285	9	.032		
Total	T ₀	40660.376	17			
	T _p	61539.323	17			
	T _c	75395.666	17			
	T _c -T ₀	5344.258	17			
	enthalpy	238.452	17			

ตารางที่ ๑.4 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสมบัติทางความร้อนแต่ละสภาวะที่ใช้
ปริมาณความเข้มข้นสตาร์ชและเอนไซม์แตกต่างกันในการตัดแปรร

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T _o	Treatment	54.940	9	6.104	7.711	.002
	Error	7.916	10	.792		
	Total	62.857	19			
T _p	Treatment	25.802	9	2.867	5.365	.007
	Error	5.343	10	.534		
	Total	31.145	19			
T _c	Treatment	4.972	9	.552	1.395	.305
	Error	3.962	10	.396		
	Total	8.934	19			
T _c -T _o	Treatment	77.065	9	8.563	22.037	.000
	Error	3.886	10	.389		
	Total	80.951	19			
Enthalpy	Treatment	31.972	9	3.552	123.815	.000
	Error	.287	10	.029		
	Total	32.259	19			

ตารางที่ ๑.5 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแอมิโลสแต่ละสภาวะที่ใช้เวลาในการตัดแปรที่แตกต่างกัน

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Amylose	Treatment	139.364	3	46.455	367.957	.000
	Error	.505	4	.126		
	Total	139.869	7			

ตารางที่ ๑.6 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสมบัติทางความร้อนแต่ละสภาวะที่ใช้เวลาในการตัดแปรที่แตกต่างกัน

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T_o	Treatment	48.991	3	16.330	11.302	.020
	Error	5.780	4	1.445		
	Total	54.771	7			
T_p	Treatment	28.723	3	9.574	2.228	.227
	Error	17.190	4	4.297		
	Total	45.913	7			
T_c	Treatment	3.188	3	1.063	.819	.547
	Error	5.191	4	1.298		
	Total	8.379	7			
T_c-T_o	Treatment	62.881	3	20.960	26.329	.004
	Error	3.184	4	.796		
	Total	66.065	7			
Enthalpy	Treatment	36.946	3	12.315	726.758	.000
	Error	.068	4	.017		
	Total	37.014	7			

ตารางที่ ๑.7 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแอมิโลสของสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเจลาตีไนเซชันที่ใช้เวลาในการดัดแปรแตกต่างกัน

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Amylose	Treatment	184.564	6	30.761	121.653	.000
	Error	1.770	7	.253		
	Total	186.334	13			

ตารางที่ ๑.8 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเจลาตีไนเซชันที่ใช้เวลาในการดัดแปรแตกต่างกัน

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
T_o	Treatment	87.571	6	14.595	14.774	.001
	Error	6.915	7	.988		
	Total	94.487	13			
T_p	Treatment	41.016	6	6.836	2.689	.111
	Error	17.795	7	2.542		
	Total	58.811	13			
T_c	Treatment	3.420	6	.570	.620	.711
	Error	6.431	7	.919		
	Total	9.851	13			
T_c-T_o	Treatment	98.974	6	16.496	32.338	.000
	Error	3.571	7	.510		
	Total	102.544	13			
Enthalpy	Treatment	53.195	6	8.866	180.427	.000
	Error	.344	7	.049		
	Total	53.539	13			

ตารางที่ ๑.9 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชดัดแปรที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเจลาตีไนเซชันที่ใช้เวลาในการดัดแปรแตกต่างกัน

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Force	Treatment	1769.296	9	196.588	480.211	.000
	Error	8.188	20	.409		
	Total	1777.484	29			
Distance	Treatment	13.410	9	1.490	27.756	.000
	Error	1.074	20	.054		
	Total	14.483	29			
Gel strength	Treatment	62893.844	9	6988.205	637.414	.000
	Error	219.267	20	10.963		
	Total	63113.111	29			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพิชชา สุริยกุล ณ อยุธยา เกิดวันที่ 25 มิถุนายน 2531 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

ผลงานวิจัย

เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง EFFECT OF AMYLOMALTASE TREATMENT ON THERMAL PROPERTIES, FREEZE-THAW STABILITY AND THERMO-REVERSIBILITY OF CASSAVA STARCH ในการประชุมทางวิชาการนานาชาติ 13th FAOBMB Congress หัวข้อเรื่อง Discovery of Life Processes: From Biomolecular to System Biology ระหว่างวันที่ 25-29 พฤศจิกายน 2555 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค จังหวัดกรุงเทพฯ

เสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย เรื่อง EFFECT OF AMYLOMALTASE TREATMENT ON THERMAL PROPERTIES, FREEZE-THAW STABILITY AND THERMO-REVERSIBILITY OF CASSAVA STARCH ใน The 1st International Joint Symposium Thai-Japan ระหว่างวันที่ 5-6 มกราคม 2556 ณ ศูนย์ฝึกอบรมและสัมมนา สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี