สมบัติทางเคมีกายภาพและ Thermo-reversible ของสตาร์ชข้าวดัดแปรด้วยแอมิโลมอลเทส

นางสาวทิพย์สุดา เอ็นดู

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

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.

PHYSICOCHEMICAL AND THERMO-REVERSIBLE PROPERTIES OF RICE STARCH MODIFIED BY AMYLOMALTASE

Miss Thipsuda Endoo

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 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติทางเคมีกายภาพและ Thermo-reversible ของสตาร์ชข้าวดัดแปรด้วยแอมิโลมอลเทส
โดย	นางสาวทิพย์สุดา เอ็นดู
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา เลาหสงคราม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนานุวงศ์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยา เลาหสงคราม)

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

....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ตุลยธัญ)

ทิพย์สุดา เอ็นดู: สมบัติทางเคมีกายภาพและ Thermo-reversible ของสตาร์ชข้าวดัดแปรด้วยแอมิโลมอลเทส (PHYSICOCHEMICAL AND THERMO-REVERSIBLE PROPERTIES OF RICE STARCH MODIFIED BY AMYLOMALTASE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ.ดร. กัลยา เลาหสงคราม, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ.ดร. สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ, 87 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นและเวลาในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าด้วยแอมิโลมอลเทสต่อปริมาณแอมิโลสปรากฏ, การกระจายตัวของแอมิโลเพกติน, การเป็น Thermo-reversible gel, การเกิดรีโทรเกรเดชัน ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) โดยใช้รีคอมบิแนนท์แอมิโลมอลเทส (4-α-glucanotransferase; EC.2.4.1.25) ที่ทำการแสดงออกใน *Escherichia coli* จาก *Corynebacterium glutamicum* โดยแปรความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทส (10, 20 และ40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช) ในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าความเข้มข้น 5% (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสตารชข้าวเจ้าดัดแปรมีปริมาณแอมิโลสปรากฏ, การกระจายตัวของแอมิโลเพกตินสายสั้น (DP≤8), อุณหภูมิในการหลอมผลึกจากการเกิดรีโทรเกรเดชัน (T_o, T_p และ T_c) และความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งเพิ่มขึ้น มีการกระจายตัวของแอมิโลเพกติน DP 9-20 และมีค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึก (ΔH_{retro}) ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า ค่า tan δ สามารถเปลี่ยนกลับไปมาระหว่างอุณหภูมิ 70 และ 4 องศาเซลเซียส คล้ายสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel โดยการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะชัดเจนที่สุดที่การดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช เมื่อแปรเวลา (1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง) ในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าความเข้มข้น 5% (w/v) ด้วยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช พบว่าเมื่อเวลาในการดัดแปรเพิ่มขึ้น สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรมีปริมาณแอมิโลสปรากฏ, โซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสายสั้น, T_o, T_p, T_c และความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งเพิ่มขึ้น มีการกระจายตัวของแอมิโลเพกติน DP 9-20 และค่า ΔH_{retro} ลดลง นอกจากนี้ยังแสดงสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel เฉพาะการดัดแปรที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยเจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร (40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช, 24 ชั่วโมง) ที่ความเข้มข้น 15% (w/v) มีความแข็งแรงของเจลเทียบเท่าเจลาตินความเข้มข้น 1% (w/v) และผลิตภัณฑ์ Panna cotta ที่ใช้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรทดแทนเจลาตินมีความแข็งแรงน้อยกว่าตัวอย่างที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้สตาร์ชข้าวเหนียวดัดแปรด้วยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 10 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการกระจายตัวของ โซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสายสั้นเพิ่มขึ้น แต่ไม่แสดงสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5372253023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS : AMYLOMALTASE, WAXY RICE STARCH, NON-WAXY RICE STARCH, THERMO-REVERSIBLE GEL, RETROGRADATION, FREEZE-THAW STABILITY, GELATIN

THIPSUDA ENDOO : PHYSICOCHEMICAL AND THERMO-REVERSIBLE PROPERTIES OF RICE STARCH MODIFIED BY AMYLOMALTASE. ADVISOR : ASSOC. PROF. KALAYA LAOHASONGKRAM, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SAIWARUN CHAIWANICHSIRI, Ph.D., 87 pp.

The objective of this study were to determine the effect of amylomaltase (AM) (4-α-D-glucanotransferase; EC.2.4.1.25) concentration and modification time on the properties, (i.e. amylose content, branched chain length distribution of amylopectin, thermo-reversible gel property, retrogradation and freeze-thaw stability), of non-waxy rice starches modified by amylomaltase, originated from *Corynebacterium glutamicum* cloned and expressed in *Escherichia coli*. Rice starch slurries (5% w/v) was treated with different amylomaltase concentrations (10, 20 and 40 U of AM/g starch) at 30°C for 24 h. The results show that as the amylomaltase concentration increased, the modified non-waxy rice starch had higher apparent amylose content, short side chain of amylopectin (DP≤8), retrogradation temperatures (T_o, T_p, T_c), resistance to the freezing-thawing cycles and lower amylopectin (DP 9-20), enthalpy of retrogradation (ΔH_{retro}). The tan δ value of the modified rice starch could reverse between 70°C and 4°C similarly to that of a thermo-reversible gel. These changes were obvious at 40 U of AM/g starch. The 5% (w/w) non-waxy rice starch slurries modified with 40 U of AM/g starch at 30°C and various time (1, 6, 12 and 24 h.) had higher apparent amylose content, short side chain of amylopectin, T_o, T_p, T_c, resistance to the freezing-thawing cycles and lower amylopectin (DP 9-20), ΔH_{retro} as the time of modification increased. The modified non-waxy rice starch gel at different modification time demonstrated thermo-reversibility properties, especially at 24 h. The gel strength of the 15% (w/v) modified non-waxy rice starch gel (40 U/g starch at 24 h) was equivalent to 1% (w/v) of gelatin gel. The modified non-waxy rice starch was used to replace gelatin in panna cotta was found to have lower gel strength than that with gelatin. Finally, the modification condition (40 U of AM/g starch) was used in waxy rice starch, it was found that the modified waxy rice had more short chain amylopectin but did not have the thermo-reversibility property indicating that it cannot replace gelatin.

Department : Food Technology Student's Signature
Field of Study : Food Technology Advisor's Signature
Academic Year : 2013 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณในความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.กัลยา เลาหสงคราม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา แนะนำ และแนะแนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลและให้ความช่วยเหลืออย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์ ประธานกรรมการ ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และ ศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่สละเวลามาตรวจสอบ พร้อมทั้งชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการกลุ่มนวัตกรรมวิชาการเชิงบูรณาการ โครงการในแผนพัฒนาวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัย

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้าวเจ้าพันธุ์ ขาวดอกมะลิ 105 และ ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และหน่วยปฏิบัติการวิจัยแป้งและไซโคลเดกซ์ทริน ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดการทำวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ได้ให้การอบรมสั่งสอน กำลังใจ และความห่วงใยมาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ จ
กิตติกรรมประกาศ ฉ
สารบัญ ช
สารบัญตาราง ญ
สารบัญรูปภาพ ฎ
บทที่
1 บทนำ 1
2 วารสารปริทัศน์ 2
2.1 ข้าว 2
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของข้าว 2
2.3 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ช 6
2.3.1 การเกิดเจลาติไนเซชัน 6
2.3.2 การเกิดรีโทรเกรเดชัน 8
2.3.3 สมบัติทางวิทยากระแส 9
2.4 การดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทส 11
2.5 เจลาติน 18
3 วิธีดำเนินงานวิจัย 19
3.1 วัตถุดิบและจุลินทรีย์ 19
3.1.1 วัตถุดิบ 19
3.1.2 จุลินทรีย์ 19
3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย 19
3.2.1 การเตรียมสตาร์ช 19
3.2.2 การเตรียมแอมิโลมอลเทส 20
3.2.2.1 การเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* BL21 (DE3) 20
3.2.2.2 การแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ 21
3.2.2.3 การวิเคราะห์สมบัติเอนไซม์ 21
3.2.3 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าโดยแอมิโลมอลเทส 21

หน้า

3.2.3.1 ความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทส 21
3.2.3.2 เวลาในการดัดแปร 22
3.2.4 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวโดยแอมิโลมอลเทส 23
3.2.5 การนำสตาร์ชข้าวดัดแปรมาใช้ทดแทนเจลาตินในอาหาร 23
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 24
4.1 สมบัติของสตาร์ชข้าว 24
4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าว 24
4.1.2 สมบัติทางความร้อน 25
4.1.3 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 26
4.2 สมบัติของแอมิโลมอลเทส 27
4.3 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าโดยแอมิโลมอลเทส 29
4.3.1 ผลของความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปร 29
4.3.1.1 ปริมาณแอมิโลสปรากฏ 29
4.3.1.2 การกระจายตัวของแอมิโลเพกติน 31
4.3.1.3 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel 33
4.3.1.4 การเกิดรีโทรเกรเดชัน 35
4.3.1.5 ความคงทนต่อการแช่เยืองแข็งและการละลายน้ำแข็ง 35
4.3.2 ผลของเวลาในการดัดแปรสตาร์ช 38
4.4 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวโดยแอมิโลมอลเทส 46
4.5 การใช้สตาร์ชข้าวดัดแปรทดแทนเจลาตินในอาหาร 49
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 50
5.1 สรุปผลการทดลอง 50
5.2 ข้อเสนอแนะ 51
รายการอ้างอิง 52
ภาคผนวก 59
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 60
ภาคผนวก ข การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 61
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์สมบัติเอนไซม์ 63

หน้า

ภาคผนวก ง การวิเคราะห์สมบัติของสตาร์ชข้าว 69
ภาคผนวต จ ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ 83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 87

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ร้อยละของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินของพืชแต่ละชนิด 3

2.2 สมบัติของแอมิโลสและแอมิโลเพกติน 6

2.3 ภาวะในการดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสจากงานวิจัยต่างๆ 17

2.4 ตัวอย่างคุณภาพด้านความหนืดของเจลาตินที่มีค่า Bloom ต่างๆ ในตัวอย่างอาหาร 18

4.1 องค์ประกอบทางเคมีและแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าว 25

4.2 สมบัติทางความร้อนของของการเกิดเจลาติไนเซชันและรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าและสตาร์ชข้าวเหนียว 26

4.3 สมบัติและแอกทิวิตีของแอมิโลมอลเทส 28

4.4 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส 30

4.5 การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 14 วัน 36

4.6 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 40 U/กรัม สตาร์ช ที่เวลาต่าง ๆ 38

4.7 การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่าง ๆ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 14 วัน 43

4.8 ค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรเปรียบเทียบกับเจลาตินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยเครื่อง Texture-analyzer 45

4.9 ค่าความแข็งแรงของ Panna cotta ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบและที่ใช้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรทดแทนเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยเครื่อง Texture-analyzer 49

ค.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน 65

ค.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม 7.5% Separating gel และ 5% Stacking gel (สำหรับ 1 gel) 67

ง.1 สัดส่วนปริมาณแอมิโลสและแอมิโลเพกตินในการเตรียมกราฟมาตรฐาน 74

จ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 83

จ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเวลาต่าง ๆ 83

ตารางที่ หน้า

จ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช ข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 84
จ.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช ข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่าง ๆ 85
จ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการวัดความแข็งแรงของเจลของสตาร์ช ดัดแปรและไม่ดัดแปรเปรียบเทียบกับเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ 86
จ.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการวัดความแข็งแรงของ Panna cotta ที่ใช้สตาร์ชดัดแปรทดแทนเจลาตินและสูตรปกติ 86

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของแอมิโลส 3
2.2 โครงสร้างของแอมิโลเพกติน 4
2.3 ลักษณะโครงสร้างของแอมิโลเพกตินที่ประกอบด้วยสาย A B และ C 5
2.4 แบบจำลองลักษณะโครงสร้างของเม็ดสตาร์ช 5
2.5 การเกิดเจลาติไนเซชันของสตาร์ช 7
2.6 กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องDSC 7
2.7 กลไกการเกิดรีโทรเกรเดชัน 9
2.8 ช่วง Linear Viscoelastic Range (LVR) 10
2.9 ปฏิกิริยา Disproportionation 11
2.10 ปฏิกิริยา Cyclization และ ปฏิกิริยา Coupling 12
2.11 ปฏิกิริยา Hydrolysis 12
2.12 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวโพดดัดแปรที่เวลาต่างๆและสตาร์ชข้าวโพดไม่ดัดแปร โดยเครื่อง HPAEC 15
2.13 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินเมื่อถูกดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส 16
4.1 ปริมาณการปลดปล่อยน้ำจากเจลของสตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียวในระหว่างการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 5 รอบ 27
4.2 SDS-PAGE ของเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 ที่ได้รับยีนแอมิโลมอลเทสจากแบคทีเรีย*Corynebacterium glutamicum* 28
4.3 สีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอดีนกับสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรและไม่ดัดแปร 30
4.4 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ 32
4.5 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเจ้าที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ 34
4.6 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 37
4.7 สีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอดีนกับสตาร์ชข้าวไม่ดัดแปรและดัดแปรที่เวลาต่าง ๆ 39

รูปที่ หน้า

4.8 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร และที่ดัดแปรที่เวลาต่าง ๆ 41
4.9 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเจ้าที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่าง ๆ 42
4.10 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่างๆ 44
4.11 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเหนียวไม่ดัดแปร และที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ 47
4.12 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเหนียวที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ 48
ค.1 กราฟปริมาณโปรตีนมาตรฐาน 65
ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของแอมิโลมอลเทส 68
ง.1 กราฟปริมาณแอมิโลสมาตรฐาน 74
ง.2 ตัวอย่างกราฟการวัดค่าความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture-analyzer 81

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารมีการนำสตาร์ชข้าวมาใช้ประโยชน์เพื่อวัตถุประสงค์ต่างๆ เช่น การเพิ่มความหนืดให้กับอาหาร รักษาความชุ่มชื้นของอาหาร ทำให้เกิดเจลในอาหารบางชนิด หรืออาจใช้เป็นตัวเชื่อมหรือประสานอาหารเข้าด้วยกัน แต่การใช้สตาร์ชข้าวธรรมชาติในอุตสาหกรรมอาหารยังมีข้อจำกัดบางประการ เนื่องจากสตาร์ชข้าวอาจไม่ทนต่อสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความดัน แรง Shear หรือ pH จึงมีการคิดค้นวิธีดัดแปรสตาร์ชข้าว เพื่อเปลี่ยนแปลงหรือปรับปรุงสมบัติบางประการของสตาร์ชข้าวให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งวิธีการดัดแปรสตาร์ชมีหลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพทั้งการใช้ความดันหรือความชื้นในการดัดแปร วิธีทางเคมี ที่มีการใช้สารเคมีในการปรับปรุงโครงสร้างหรือโมเลกุลของสตาร์ช หรือการดัดแปรโดยเอนไซม์ ก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ใช้ เพราะใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง การเกิดปฏิกิริยามีความจำเพาะต่อชนิดผลิตภัณฑ์ ควบคุมการเกิดปฏิกิริยาง่าย โดยแอมิโลมอลเทส (Amylomaltase; AM) เป็นเอนไซม์หนึ่งที่อาจใช้ในการดัดแปรสตาร์ช ซึ่งเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่หลักคือ เร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะที่ตำแหน่ง α-กลูโคซิดิก ที่ปลายสายของโมเลกุลหนึ่ง ได้กลูโคสสายสั้นที่สามารถไปเชื่อมต่อที่ปลายสายกลูโคซิดิกอื่นได้ (Takaha and Smith, 1999) โดยคาดว่าจะได้สตาร์ชดัดแปรที่มีสมบัติพิเศษคือ สามารถเกิดเจลที่มีสมบัติเป็น Thermoreversible gel คือ เจลที่เปลี่ยนกลับเป็นของเหลว เมื่อได้รับความร้อนและเซทตัวเป็นเจลเมื่อได้รับความเย็นคล้ายกับเจลาติน จึงอาจนำสตาร์ชดัดแปรดังกล่าวไปใช้ทดแทนเจลาตินในอาหารสำหรับผู้บริโภคเฉพาะกลุ่ม เช่น กลุ่มคนมุสลิมหรือกลุ่มที่รับประทานมังสวิรัตซึ่งจะไม่สามารถรับประทานอาหารที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากเจลาตินเป็นผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากสัตว์ เช่น หมู วัวหรือควาย เป็นต้น (Morrison et al., 1999) นอกจากนี้ยังคาดหวังว่าการดัดแปรสตาร์ชข้าวโดยแอมิโลมอลเทสจะสามารถปรับปรุงสมบัติอย่างอื่นได้ เช่น ลดการเกิดรีโทรเกรเดชัน และเพิ่มการทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของเจลสตาร์ช เป็นต้น

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นและเวลาในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าต่อปริมาณแอมิโลสปรากฏ, การกระจายตัวของแอมิโลเพกติน, สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel, การเกิดรีโกรเกรเดชัน ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) ความแข็งแรงของเจลสตาร์ชดัดแปรเปรียบเทียบกับเจลาติน ตลอดจนการนำสตาร์ชข้าวดัดแปรไปใช้ทดแทนเจลาตินในผลิตภัณฑ์ Panna cotta และผลของดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวต่อลักษณะการกระจายตัวของแอมิโลเพกตินและสมบัติการเป็น Thermo-reversible ge

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 ข้าว

ข้าวเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูล Oryza เช่นเดียวกับหญ้า แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ *Oryza glaberrima* นิยมปลูกเฉพาะในเขตร้อนของแอฟริกาเท่านั้น และ *Oryza sativa* ซึ่งสามารถแบ่งเป็นออกได้เป็น 3 สายพันธุ์ คือ Indica (อินดิกา) ปลูกบริเวณเขตร้อน เช่น ประเทศไทย, Japonica (จาปอนิกา) ปลูกบริเวณเขตกึ่งร้อน เขตอบอุ่น เขตที่มีอากาศเย็น และJavanica (จาวานิกา) ปลูกทั่วไปบริเวณเส้นศูนย์สูตร (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) โดยข้าวอาจแบ่งตามลักษณะของเมล็ดข้าวเป็น 2 ชนิด (จำรัส โปร่งศิริวัฒนา, 2534) คือ

2.1.1 ข้าวเหนียว เป็นข้าวที่มีเมล็ดข้าวสารเรียวยาว สีขาวขุ่น และเมื่อนำไปหุงให้สุก ข้าวจะเหนียว จับตัวกันแน่นและมีลักษณะใส ข้าวเหนียวจะมีปริมาณแอมิโลสไม่เกิน 9% (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2529)

2.1.2 ข้าวเจ้า เป็นข้าวที่มีเมล็ดข้าวสารเรียวยาว สีขาวใส เมื่อนำไปหุงให้สุก ข้าวจะร่วนและมีสีขาวขุ่น ข้าวเจ้าจะมีปริมาณแอมิโลสไม่ต่ำกว่า 15% (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2529)

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของข้าว

องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของข้าว ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรดถึง 90% (โดยน้ำหนักแห้ง) ซึ่งเป็นสตาร์ชเกือบทั้งหมด นอกจากนี้ยังประกอบด้วย โปรตีน 7% ไขมัน 1.5% วิตามิน เกลือแร่และสารอาหารอื่นๆ รวมเป็น 1.5% (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550) ซึ่งสตาร์ชข้าว (Rice starch) ได้มาจากการนำข้าวหรือแป้งข้าว (Rice flour) มาผ่านกระบวนการกำจัดโปรตีนออกโดยอาศัยความสามารถในการละลายของโปรตีน เช่น อัลบูมิน (Albumin) จะละลายน้ำ, โกลบูลิน (Globulin) ละลายในน้ำเกลือ (NaCl), กลูตีลิน (Glutelin) ละลายในสารละลายด่าง (NaOH) และโปรลามิน (Prolamin) ละลายในเอทานอล (Cagampang et al., 1966) ซึ่งจะทำให้ได้สตาร์ชที่บริสุทธิ์มากขึ้น โดยสตาร์ชบริสุทธิ์ควรมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 1% (Whistler and BeMiller, 2009)

สตาร์ชประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ แอมิโลส (Amylose) และแอมิโลเพกติน (Amylopectin) ซึ่งในสตาร์ชของพืชแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) ที่ส่งผลต่อสมบัติของสตาร์ช

ตารางที่ 2.1 ร้อยละของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินของพืชแต่ละชนิด

ชนิดของพืช	แอมิโลส (% น้ำหนักแห้ง)	แอมิโลเพกติน (% น้ำหนักแห้ง)
ข้าวเจ้า	17	83
มันสำปะหลัง	17	83
มันฝรั่ง	21	79
ข้าวสาลี	28	72
ข้าวโพด (พันธุ์ปกติ)	28	72
ข้าวโพด (พันธุ์เหนียว)	0	100

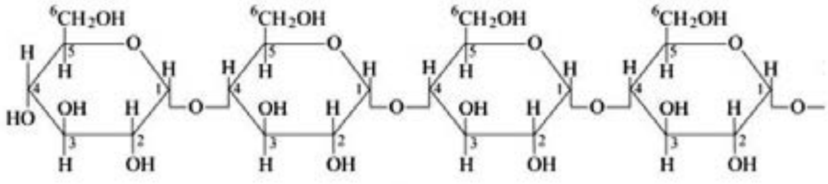
ที่มา: ดัดแปลงจาก Swinkels (1985)

แอมิโลส (Amylose) เป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 1,000-6,000 หน่วย ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1, 4-Glycosidic linkage (รูปที่ 2.1) น้ำหนักโมเลกุลของแอมิโลสอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ขึ้นอยู่กับ Degree of polymerization (DP) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2550) แอมิโลสสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน (Swinkels, 1985) โดยข้าวอาจแบ่งเป็นกลุ่มตามปริมาณแอมิโลส ดังนี้ (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ, 2546)

1) ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสต่ำ (Waxy rice) มีปริมาณแอมิโลสปรากฏประมาณ 0-3.8% เช่น ข้าวเหนียว กข 6 ข้าวเหนียวสันป่าตอง เป็นต้น

2) ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสปานกลาง คือ มีปริมาณแอมิโลสปรากฏประมาณ 12.9–18.0% เช่น ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105, พิษณุโลก 1, ปทุมธานี 1, กข 15 และสังข์หยด

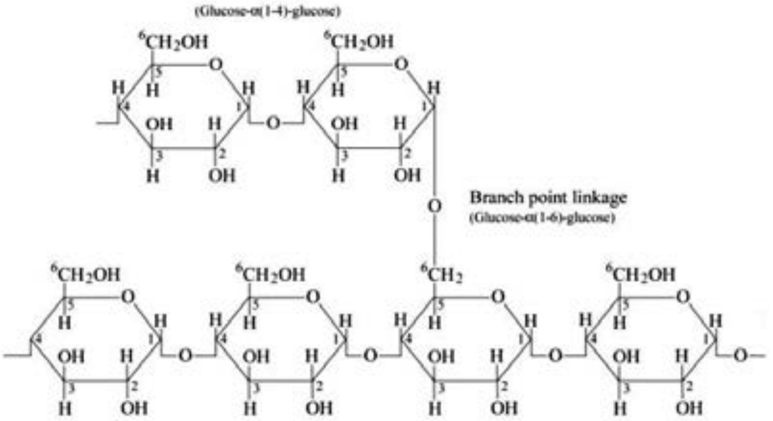
3) ข้าวที่มีปริมาณแอมิโลสสูง คือ มีปริมาณแอมิโลสปรากฏประมาณ 20.3–26.7% เช่น ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2, สุพรรณบุรี 1, สุพรรณบุรี 90, เหลืองประทิว 123, ชัยนาท 1, ข้าวห้าร้อย, กข 23, เฉี้ยงพัทลุง เจ๊กเชย เป็นต้น



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของแอมิโลส

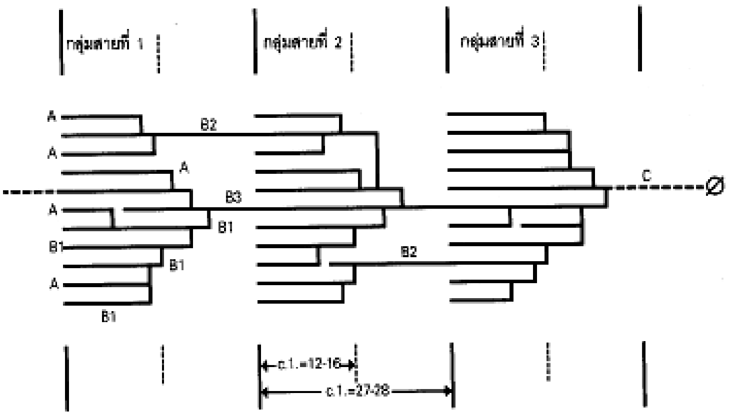
ที่มา: Buleon et al. (1998)

แอมิโลเพกติน (Amylopectin) เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส มีส่วนที่เป็นเส้นตรงที่เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1,4-glycosidic linkage และทุกๆ 20-30 หน่วยของกลูโคสจะมีกิ่งสาขาเป็นพอลิเมอร์สายสั้นที่มี degree of polymerization (DP) อยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมกันด้วยพันธะ α-1,6- glycosidic linkage (รูปที่ 2.2) แอมิโลเพคตินเป็นพอลิเมอร์ขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยประมาณ 1,000 เท่าของแอมิโลส คือประมาณ 10^7 ถึง 10^8 ดาลตัน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2550) แอมิโลเพกตินสามารถทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนได้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำตาลแดง (Swinkels, 1985)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของแอมิโลเพกติน
ที่มา: Buleon et al. (1998)

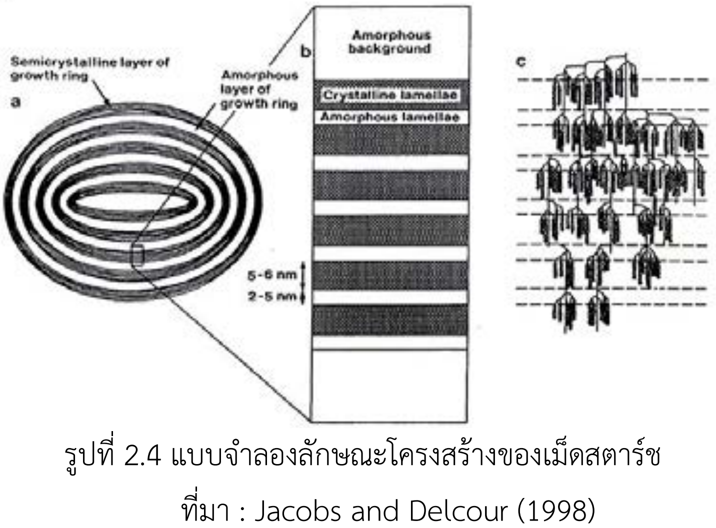
โครงสร้างแบบกิ่งของแอมิโลเพกตินประกอบด้วยสายโซ่ (Chain) 3 ชนิดคือ สาย A ซึ่งเชื่อมต่อกับสายอื่นที่ตำแหน่งเดียวและไม่มีกิ่งเชื่อมต่อออกจากสายโซ่ชนิดนี้, สาย B จะมีโครงสร้างแบบกิ่งเชื่อมต่อกับสายอื่นๆ 2 สายหรือมากกว่า ซึ่งโครงสร้างแอมิโลเพกตินประกอบด้วยสาย A และ B ในอัตราส่วน 0.8-0.9 : 1 สาย B1 เป็นสายที่มีจุดเชื่อม 2 ตำแหน่ง ส่วนสาย B2 และ B3 เป็นสายที่มีจุดเชื่อมมากกว่า 2 ตำแหน่ง ซึ่งลักษณะของสาย A และ B1 จะประกอบเป็นกลุ่มเดี่ยว สำหรับสาย B2 และ B3 ที่มีความยาวแผ่ออกไป ทำให้เกิดเป็นกลุ่มสายที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยสาย A, B1 และ B2 จะมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 6-12, 13-24 และ 25-45 ตามลำดับ และสาย C เป็นสายแกนซึ่งประกอบด้วยหมู่รีดิวซิง 1 หมู่ในโมเลกุล แอมิโลเพกตินแต่ละโมเลกุลจะประกอบด้วยสาย C เพียงหนึ่งสายเท่านั้น (รูปที่ 2.3) (Hizukuri, 1986) กิ่งก้านของแอมิโลเพกตินมีผลต่อการเกิดเจลาติไนเซชันและการเกิดรีโทรเกรเดชัน (Jane et al., 1999) โดยสตาร์ชที่ประกอบด้วยแอมิโลเพกตินสายสั้นจะมีช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไซชันและรีโทรเกรเดชันต่ำกว่าแอมิโลเพกตินสายยาว (Jane et al., 1999; Shi and Seib, 1992)



รูปที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างของแอมิโลเพกตินที่ประกอบด้วยสาย A, B และ C

ที่มา : Hizukuri (1986)

โดยธรรมชาติแล้วการที่โครงสร้างของสตาร์ชมีขนาด รูปร่างและลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งกำเนิดของสตาร์ช จากแบบจำลองโครางสร้างของสตาร์ช (รูปที่ 2.4) มีลักษณะเป็นวงแหวนและมีโครงสร้างเป็นแบบกึ่งผลึก (Semi-crystalline) โดยโครงสร้างของแอมิโลเพกตินมีทั้งส่วนผลึก (Crystallite region) และส่วนอสัณฐาน (Amorphous region หรือ Gel phase) ซึ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียว สายส่วนใหญ่ประมาณ 80-90% จะประกอบเป็นกลุ่มเดี่ยวๆ และสายที่เหลือประมาณ 10-20% จะเชื่อมต่อของแต่ละกลุ่ม ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยสายประมาณ 22-25 สาย ทำให้เกิดเป็นส่วนผลึก ให้ความแข็งแรงและยึดโครงสร้างของสตาร์ชไว้ การจับกันของแอมิโลเพกตินทำให้เกิดเป็นเกลียวคู่ (Double helix) ลักษณะโครงสร้างที่เป็นเกลียวคู่ของแอมิโลเพกตินจะอยู่ในส่วนบริเวณสาย A และสาย B1 (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2550) โดยแอมิโลสและแอมิโลเพกติน มีผลต่อสมบัติที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.4 แบบจำลองลักษณะโครงสร้างของเม็ดสตาร์ช

ที่มา : Jacobs and Delcour (1998)

ตารางที่ 2.2 สมบัติของแอมิโลสและแอมิโลเพกติน

แอมิโลส	แอมิโลเพกติน
1. ประกอบด้วยโมเลกุลกลูโคสที่ต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะ α-1,4-glycosidic	1.โมเลกุลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 และมีการแตกกิ่งด้วยพันธะ α-1,6-glycosidic
2. มี DP 1000-6000	2. มี DP 10^4-10^5แต่ละกิ่งมีกลูโคส 20-25 หน่วย
3. เมื่ออยู่ในสารละลายจะรวมกลุ่มระหว่างสายโซ่เกิดโมเลกุลเกลียวคู่ ทำให้เกิดการรีโทรเกรด	3. เมื่ออยู่ในสารละลายภาวะเป็นกลางจะไม่เกิดรีโทรเกรด โมเลกุลจะเสถียรหรือคงตัว
4. ให้สีน้ำเงินกับสารละลายไอโอดีน	4. ให้สีม่วงแดงหรือสีน้ำตาลแดงกับสารละลายไอโอดีน

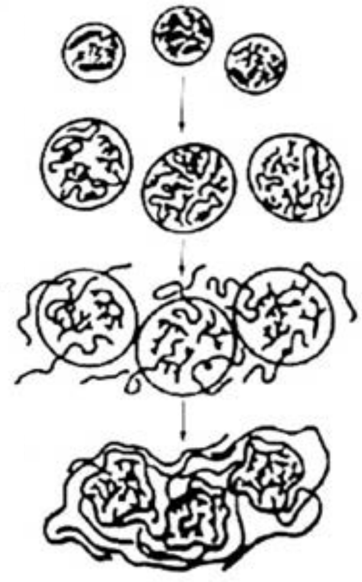
ที่มา: ดัดแปลงจาก Beynum and Roels (1985)

2.3 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ช

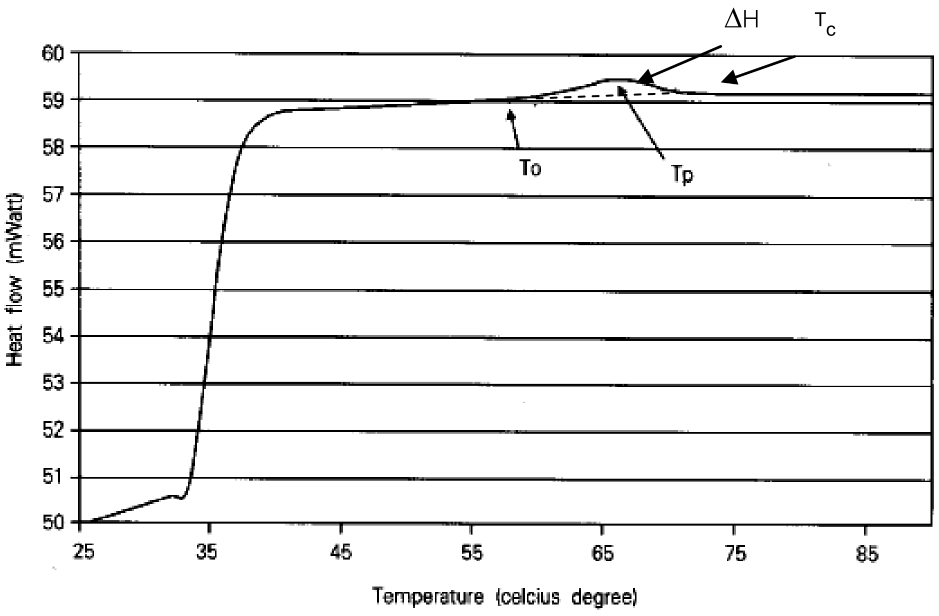
2.3.1 การเกิดเจลาติไนเซชัน (Gelatinization)

โมเลกุลของสตาร์ชประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมากที่ยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและจับกันเป็นร่างแห เมื่อสารแขวนลอยสตาร์ชได้รับความร้อน ความร้อนจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจน ทำให้มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระสามารถจับกับน้ำ ส่งผลให้โมเลกุลของสตาร์ชเกิดการพองตัวและมีความหนืดมากขึ้น เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า เจลาติไนเซชัน (Gelatinization) โดยเม็ดสตาร์ชจะมีการเปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลายโครงสร้างความเป็นระเบียบ (รูปที่ 2.5) (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2550) การเกิดเจลาติไนเซชันไม่ได้เกิดเฉพาะที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง แต่เกิดเป็นช่วงอุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับชนิดของสตาร์ช ปริมาณและการจัดเรียงตัวของแอมิโลสและแอมิโลเพกติน สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimeter (DSC) (Zobel, 1964) ซึ่งสามารถวัดอุณหภูมิที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงพลังงานระหว่างกระบวนการเกิดเจลาติไนเซชัน ประกอบด้วย อุณหภูมิเริ่มต้น (Onset temperature; T_o), อุณหภูมิสูงสุด (Peak temperature; T_p) และอุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลาติไนเซชัน (Conclusion temperature; T_c) และปริมาณความร้อนที่เปลี่ยนแปลงในกระบวนเกิดเจลาติไนเซชัน (Enthalpy; ΔH) ของโมเลกุลสตาร์ช (รูปที่ 2.6) การเกิดเจลาติไนเซชันจะสัมพันธ์กับความแข็งแรงของโครงร่างผลึกและความคงตัวของส่วนอสัณฐาน ซึ่งถ้ามีอุณหภูมิที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงพลังงานสูง บ่งบอกถึงความแข็งแรงของโครงร่างผลึกต่อการเกิดเจลาติไนเซชันที่สูง และค่า ΔH มาก บ่งบอกถึงโครงสร้างของสตาร์ชมีปริมาณและความแข็งแรงของส่วนผลึกมาก (Zeleznak and Hoseney, 1987) โดยพบว่าสตาร์ชข้าวเจ้า (ขาวดอกมะลิ 105) และสตาร์ชข้าวเหนียว (กข 6) มีอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชัน

ประมาณ 62-75 และ 63-75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีค่า ΔH เท่ากับ 12.66 และ 13.95 จูลต่อกรัม ตามลำดับ (ปิยรัตน์ หนูสุก, 2546)



รูปที่ 2.5 การเกิดเจลาติไนเซชันของสตาร์ช
ที่มา: Lai and Kokini (1991)

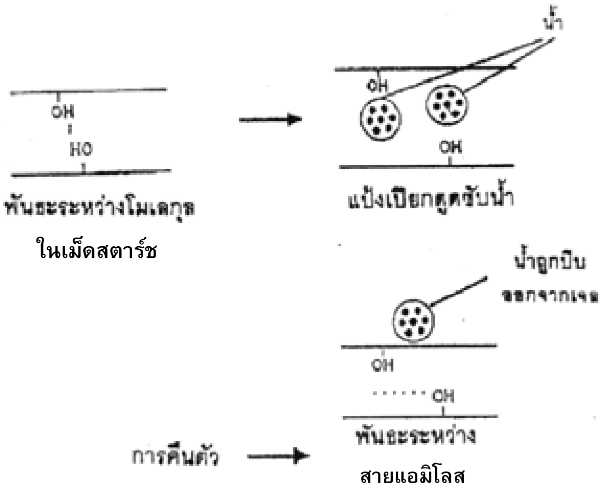


รูปที่ 2.6 กราฟจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง DSC
ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2550)

2.3.2 การเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation)

หลังจากที่เม็ดสตาร์ชถูกทำลายด้วยความร้อนและเกิดเจลาติไนเซชัน เม็ดสตาร์ชจะพองตัวและแตกตัวในที่สุด โมเลกุลของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินภายในเม็ดสตาร์ชจะกระจายตัวออกมา ทำให้ความหนืดลดลงและเมื่อปล่อยให้เย็นตัว โมเลกุลของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินจะเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ ซึ่งแอมิโลสสามารถเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจนเกิดเป็นร่างแห 3 มิติในระยะเวลาอันสั้น เกิดเป็นเจล (Miles et al., 1985; Sievert and Wiirsch, 1993) ในขณะที่แอมิโลเพกตินที่เกิดการจัดเรียงตัวใหม่จะต้องใช้เวลานานกว่าเพื่อเกิดเป็นโครงร่างผลึก (Crystalline) (Eliasson, 1985) การเกิดลักษณะเจลหรือผลึกนี้ เรียกว่า รีโทรเกรเดชัน (Retrogradation) หรือ การคืนตัว (รูปที่ 2.7) โมเลกุลที่มีผลต่อการเกิดรีโทรเกรเดชันคือแอมิโลส ส่วนแอมิโลเพกตินซึ่งมีโมเลกุลที่ใหญ่และค่อนข้างเกาะกะ เนื่องจากมีกิ่งมาก ทำให้เกิดรีโทรเกรเดชันช้ากว่า ชนิดของสตาร์ชมีผลต่อการเกิดรีโทรเกรเดชัน เนื่องจากความแตกต่างของสัดส่วนของแอมิโลสกับแอมิโลเพกติน โดยสตาร์ชที่มีแอมิโลสสูงจะสามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้ดีและเร็วกว่าสตาร์ชที่แอมิโลสต่ำ (Fredrikson et al., 1998) ความยาวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินก็มีผลต่อการเกิดรีโทรเกรเกชันได้ โดยสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินที่มีสายโซ่กิ่งสั้น (DP 6-9) มีผลทำให้เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำ (Shi and Seib, 1992) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่จะส่งผลต่อการเกิดรีโทรเกรเดชัน ได้แก่ ความเข้มข้นของสตาร์ช อุณหภูมิ ปริมาณน้ำในเจลและองค์ประกอบอื่นๆ เช่น น้ำตาล โปรตีน ไขมัน กรด และเกลือ เป็นต้น (วรรณา ตุลยธัญ, 2551) การวัดอุณหภูมิและค่าพลังงานความร้อนในการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช สามารถวัดโดยเครื่อง DSC เช่นเดียวกับการเกิดเจลาติไนเซชัน (Karim, Norziah and Seow, 2000)

ในการเก็บเจลสตาร์ชที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งทำให้เกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของสายโซ่สตาร์ชด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้เจลมีความแน่น (Firmness) หรือแข็งแรงมากขึ้น น้ำที่มีในโมเลกุลจึงอาจถูกขับออกมาจากก้อนเจล เรียกการขับน้ำออกมานี้ว่า “Syneresis” สามารถใช้ในการประเมินสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) ได้ ซึ่งการเกิด Syneresis อาจสัมพันธ์กับการเกิดรีโทรเกรเดชัน คือ สตาร์ชที่เกิดรีโทรเกรเดชันได้ดี จะมีแนวโน้มของความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งต่ำ (Syneresis มาก) ส่วนสตาร์ชที่เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำจะมีความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูง (Syneresis ต่ำ) (Ferrero, Martino and Zaritzky, 1994; Jacobson and BeMiller, 1998; Karim, Norziah and Seow, 2000)



รูปที่ 2.7 กลไกการเกิดรีโทรเกรเดชัน
ที่มา: ดัดแปลงจาก Fruton and Simmonds (1958)

2.3.3 สมบัติทางวิทยากระแส (Rheology)

วิทยากระแสเป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Deformation) หรือการไหล (Flow) ของวัสดุเมื่อมีแรงมากระทำ (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554) สามารถบอกถึงโครงสร้างและพฤติกรรมของวัสดุนั้น ๆ โดยวัสดุที่มีโครงสร้างเป็นของแข็งจะแสดงออกมาในรูปของความยืดหยุ่น (Elastic) ในขณะที่การไหลเป็นพฤติกรรมของวัสดุที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นของเหลว จะแสดงออกมาในรูปของความหนืด (Viscous) หรือแรงต้านทานต่อการไหล (Dobraszczyk and Morgenstern, 2003; Steffe, 1996)

อาหารส่วนใหญ่ มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน จึงอาจมีสมบัติของของแข็งและของเหลวร่วมกัน เรียกว่าสมบัติ Viscoelastic ซึ่งการศึกษาสมบัติ Viscoelastic จะสามารถบ่งบอกพฤติกรรมหรือลักษณะของอาหารว่ามีความเด่นชัดของความเป็นของแข็งหรือของเหลวมากกว่ากัน เครื่องมือที่ใช้วัดมีทั้ง เครื่อง Viscometer และ Rheometer โดย Viscometer จะสามารถวัดได้เพียงค่าความหนืดเท่านั้น ในขณะที่เครื่อง Rheometer สามารถวัดค่าตัวแปรอื่นๆที่ใช้ประเมินสมบัติทางวิทยากระแสได้ จึงนิยมใช้เป็นเครื่องมือในการวัดสมบัติ Viscoelastic ในอาหาร (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554) โดยใช้วิธี Oscillatory หรือ Dynamic shear experiment ซึ่งไม่ทำลายตัวอย่าง ใช้ในการศึกษาความแข็งแรงของเจล (Gel strength) การเกิดเจลติไนเซชันของแป้ง (Starch gelatinization) การเปลี่ยนสถานะของสาร (Phase transition) และค่าที่วัดได้จะเป็นค่า Strorage modulus (G′) ซึ่งบ่งบอกความยืดหยุ่น (Elasticity) และค่า Loss modulus (G″) ซึ่งบ่งบอกถึงความเป็นของเหลว (Viscous) เมื่อตัวอย่างแสดงค่า G′ มากกว่าค่า G″ แสดงว่าตัวอย่างมีสมบัติความเป็นของแข็งมากกว่าของเหลวหรือ

มีลักษณะคล้ายเป็นของแข็ง (Solid-like) แต่ถ้าตัวอย่าง แสดงค่า G″ มากกว่าค่า G′ แสดงว่าตัวอย่างมีสมบัติความเป็นของเหลวมากกว่าของแข็งหรือมีลักษณะคล้ายเป็นของเหลว (Liquid-like) (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554) โดยการคำนวณค่า tan δ

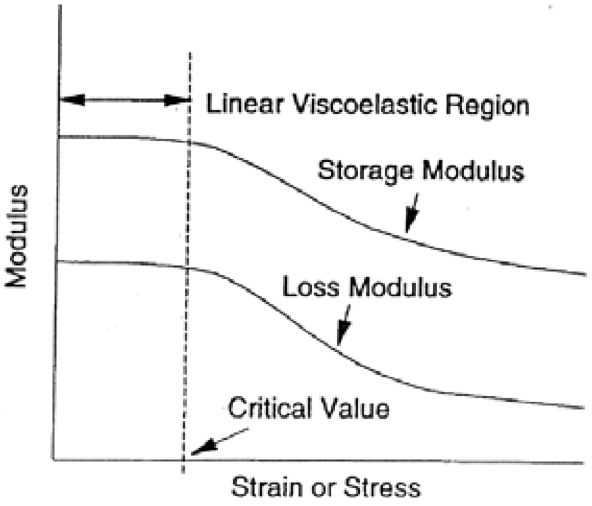
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

ซึ่ง δ คือ Phase shift มีหน่วยเป็นองศา ($^{\circ}$) เป็นค่าที่สามารถใช้ในการบ่งบอกความเป็น Viscoelastic ของตัวอย่าง คือ ถ้าค่า tan δ จะต่ำ แสดงว่าตัวอย่างมีลักษณะเป็นของแข็ง แต่ถ้ามีค่า tan δ สูง แสดงว่าตัวอย่างแสดงลักษณะเป็นของเหลว โดยตัวอย่างอาหารทั่วไป จะมีค่า $0^{\circ} < \delta < 90^{\circ}$

การทดสอบวิธี Oscillatory หรือ Dynamic shear experiment แบ่งเป็น 4 การทดสอบ คือ Amplitude sweep test, Frequency sweep test, Temperature sweep test และ Time sweep test (จิรารัตน์ ทัตติยกุล, 2554) ซึ่งในการทดสอบสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel เลือกใช้การทดสอบ Amplitude sweep test และ Frequency sweep test ดังนี้

Amplitude sweep test เป็นการทดสอบขั้นแรกเพื่อหา Linear viscoelastic range (LVR) (รูปที่ 2.8) ซึ่งเป็นช่วงที่ค่า Modulus ไม่ขึ้นกับความเค้นหรือความเครียด ปกติ LVR ของอาหารจะมีค่าไม่เกิน 1% Strain โดยตัวอย่างที่มีลักษณะเป็น Strong gel จะให้ LVR กว้างกว่า Weak gel

Frequency sweep test เป็นการทดสอบผลของการให้อัตราเฉือน (Shear rate) ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของตัวอย่าง แสดงผลการศึกษาในรูปของค่า G′, G″ และ tan δ



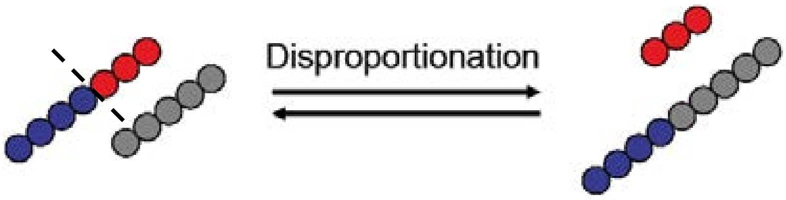
รูปที่ 2.8 ช่วง Linear viscoelastic range (LVR)
ที่มา: Steffe (1996)

2.4 การดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทส

การดัดแปรสตาร์ชอาจใช้วิธีทางเคมี ทางกายภาพ หรือเอนไซม์ เพื่อปรับเปลี่ยนสมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพ ให้มีคุณลักษณะหรือคุณสมบัติที่ต้องการ โดยใช้วิธีการดัดแปรด้วยเอนไซม์เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงในการดัดแปร เกิดปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อชนิดผลิตภัณฑ์และไม่เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียง ซึ่งการดัดแปรแป้งด้วยเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้เอนไซม์หลายชนิดขึ้นอยู่กับลักษณะของแป้งดัดแปรที่ต้องการ

แอมิโลมอลเทส (Amylomaltase ; AM) มีชื่อตามระบบคือ 4-α-D-Glucanotransferase และชื่อตามรหัสคือ EC.2.4.1.25 เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม α-1,4-Glycosyltransferase ในสกุล α-Amylase แอมิโลมอลเทสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Transferase เช่นเดียวกับไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glycolsyltransferase, CGTase; EC 2.4.1.19) ผลิตได้ทั้งจากพืช เช่น มันฝรั่ง ข้าว มันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งจะเรียกว่า D-enzyme และแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Thermus thermophilus*, *Pyrocaculum aeroplilum*, *Thermus scotodutus*, *Thermotoga marittme*, *Escherichia coli*, *Aquifex aeolicus* เป็นต้น (Kaper et al., 2005; Lee et al., 2006; Van der Maarel et al., 2005; Oh et al., 2008; Monod and Torriani, 1950; Bhuiyan, Kitaoka and Hayashi, 2003) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่กลูโคซิลของสาย α-กลูแคนหนึ่งไปยังอีกสายหนึ่ง โดยเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งหมด 4 ปฏิกิริยาดังต่อไปนี้ (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

1) ปฏิกิริยา Disproportionation เป็นปฏิกิริยาที่มีการย้ายหมู่กลูโคซิลระหว่างโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรงจากตัวให้ไปยังตัวรับ (รูปที่ 2.9) ปฏิกิริยา Disproportionation ถือเป็นปฏิกิริยาหลักที่เอนไซม์นี้สามารถเร่งได้



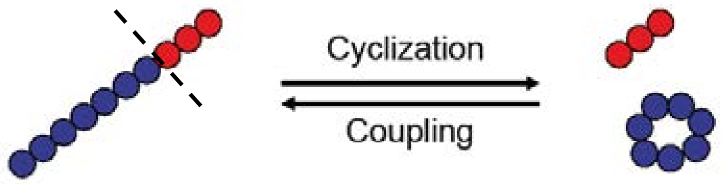
$$(\alpha\text{-1,4 Glucan})_m + (\alpha\text{-1,4 Glucan})_n \rightarrow (\alpha\text{-1,4 Glucose})_{m-x} + (\alpha\text{-1,4 Glucose})_{n+x}$$

รูปที่ 2.9 ปฏิกิริยา Disproportionation
ที่มา: Van der Veen et al. (2000)

2) ปฏิกิริยา Cyclization เป็นปฏิกิริยาที่ตัวให้ซึ่งถูกตัดหมู่กลูโคซิลออกไปเพื่อไปทำหน้าที่เป็นตัวรับ คือ มีการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลภายในสายแซ็กคาไรด์เดียวกัน โดยนำปลายรีดิวซ์ (Reducing

end) ของส่วนที่ถูกตัดมาต่อกับปลายที่ไม่รีดิวซ์ (Non-reducing end) ในสายเดียวกัน (รูปที่ 2.10) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ลักษณะเป็นวงปิดที่เรียกว่า ไซโคลเดกซ์ทริน (Cyclodextrin: CD) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของแอมิโลมอลเทสจะแตกต่างจาก CGTase คือ จะเกิดผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่มีขนาดตั้งแต่ CD17 ขึ้นไป ในขณะที่ผลิตภัณฑ์หลักของการเร่งปฏิกิริยาของ CGTase จะเป็น CD6–CD8

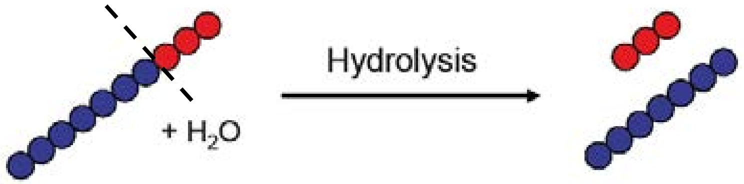
3) ปฏิกิริยา Coupling เป็นปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยา Cyclization คือ สามารถเปลี่ยนไซโคลเดกซ์ทรินให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายตรง (รูปที่ 2.10) แต่แอมิโลมอลเทสจะเร่งปฏิกิริยา Coupling ให้เกิดขึ้นในระดับที่ต่ำมาก



$(\alpha\text{-1,4 Glucan})_m \leftrightarrow$ cyclic $(\alpha\text{-1,4 Glucan})_x$ + $(\alpha\text{-1,4 Glucose})_{m-x}$

รูปที่ 2.10 ปฏิกิริยา Cyclization และ ปฏิกิริยา Coupling
ที่มา: Van der Veen et al. (2000)

4) ปฏิกิริยา Hydrolysis เป็นปฏิกิริยาที่มีการใช้น้ำร่วมเพื่อช่วยในการตัดหมู่กลูโคซิลของสายแซ็กคาไรด์ (Endo-amylolytic activity) (รูปที่ 2.11) ซึ่งทั้งแอมิโลมอลเทสและ CGTase มีแอกทิวิตีนี้ต่ำมาก



$(\alpha\text{-1,4 Glucan})_m + H_2O \rightarrow (\alpha\text{-1,4 Glucose})_x + (\alpha\text{-1,4 Glucose})_{m-x}$

รูปที่ 2.11 ปฏิกิริยา Hydrolysis
ที่มา : Van der Veen et al. (2000)

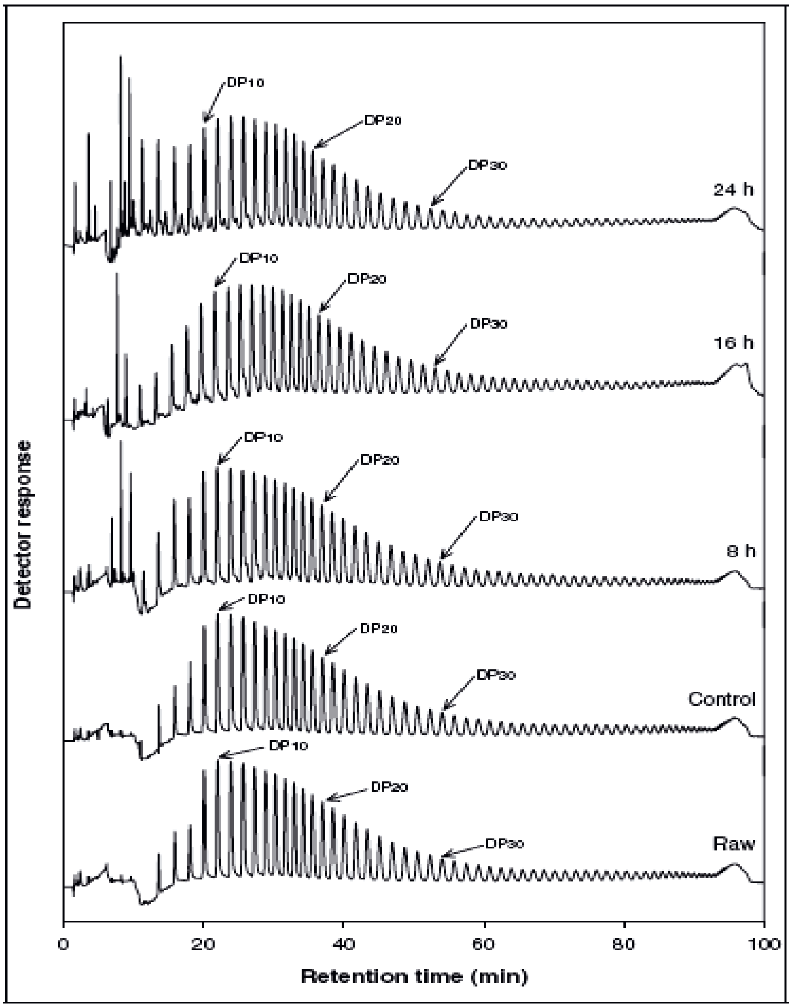
แอมิโลมอลเทสมีความคล้ายคลึงกับ CGTase ในการเร่งปฏิกิริยาทั้ง 4 รูปแบบ แต่แตกต่างกันที่แอมิโลมอสเทสจะเด่นในการเร่งปฏิกิริยา Disproportionation (Van der Maarel et al., 2005) ในขณะที่ CGTase จะเด่นในการเร่งปฏิกิริยา Cyclization ได้ดี (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

แอมิโลมอลเทสถูกพบครั้งแรกใน *Escherichia coli* โดยเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของมอลโทส (Monod and Torriani, 1950) ต่อมามีรายงานการใช้แอมิโลมอลเทสในการดัดแปรสตาร์ช ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ได้รับยีนแอมิโลมอลเทสจากแหล่งต่างๆ เช่น *Pyrobaculum aerophilum* IM2 (Kaper et al., 2005), *Thermus thermophilus* HB8 (Van der Maarel et al., 2005), *Thermus scotoductus* (Seo et al., 2007; Lee et al., 2006 and 2008), *Thermus aquaticus* (Park et al., 2007; Cho et al., 2009) และ *Thermotoga maritime* (Oh et al., 2008) เป็นต้น จากความแตกต่างของแหล่งแอมิโลมอลเทสส่งผลให้ภาวะที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.3)

การศึกษาสมบัติต่างๆของสตาร์ชจากการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส พบว่า สตาร์ชข้าวโพดดัดแปร (Oh et al., 2008) และสตาร์ชข้าวดัดแปร (Seo et al., 2007; Cho et al., 2009) มีปริมาณแอมิโลสปรากฏลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ดัดแปร เมื่อตรวจสอบลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินด้วยเครื่อง HPAEC-PAD พบการเปลี่ยนแปลงการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกติน โดยจากรายงานการดัดแปรสตาร์ชมันฝรั่งของ Van der Maarel และคณะ (2005) พบปริมาณโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสายสั้น (DP 2-5) และสายยาว ($DP \geq 30$) เพิ่มขึ้น, สตาร์ชข้าวดัดแปร (Cho et al., 2007) พบโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินสายสั้น (DP 1-8) และสายยาว ($DP>19$) เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Seo และคณะ (2007) พบโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินสายสั้น (DP 1-9) เพิ่มขึ้น และ $DP>10$ ลดลง และ สตาร์ชข้าวโพดดัดแปร (Oh et al., 2008) พบโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินสายสั้น ($DP<10$) เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ DP1-5 เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 2.12) ทั้งนี้อาจเกิดจากเร่งปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทส โดยเร่งการตัดพันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลส ย้ายไปยังสายกลูแคนของโซ่กิ่งแอมิโลเพกติน ทำให้เกิดแอมิโลเพกตินที่มีสายโซ่กิ่งยาวขึ้น (รูปที่ 2.13) นอกจากเร่งการตัดพันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลส ย้ายไปยังสายกลูแคนของโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินแล้ว แอมิโลมอลเทสยังสามารถเร่งการตัดพันธะ α-กลูโคซิดิกของแอมิโลเพกติน ทำให้โซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสั้นลง จึงพบสายสั้นของแอมิโลเพกตินเพิ่มขึ้น (Park et al., 2007) ส่งผลต่อการเกิดรีโทรเกรเดชัน โดยรายงานของ Seo และคณะ (2007) พบว่าค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึก (ΔH_{retro}) ของเค้กข้าวจากสตาร์ชข้าวดัดแปรมีค่าน้อยกว่าเค้กข้าวจากสตาร์ชข้าวไม่ดัดแปร ซึ่งเป็นผลมาจากการที่มีสายโซ่กิ่งสายสั้นเพิ่มขึ้น คือมีสัดส่วนของสาย A เพิ่มขึ้น สาย B1 ลดลง ทำให้โครงร่างผลึกที่จัดเรียงตัวใหม่มีความแข็งแรงต่ำ พลังงานความร้อนที่ใช้ในการหลอมผลึกน้อยลง การเกิดรีโทรเกรเดชันจึงลดลง (Shi and Seib, 1992) และในการศึกษาสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือก

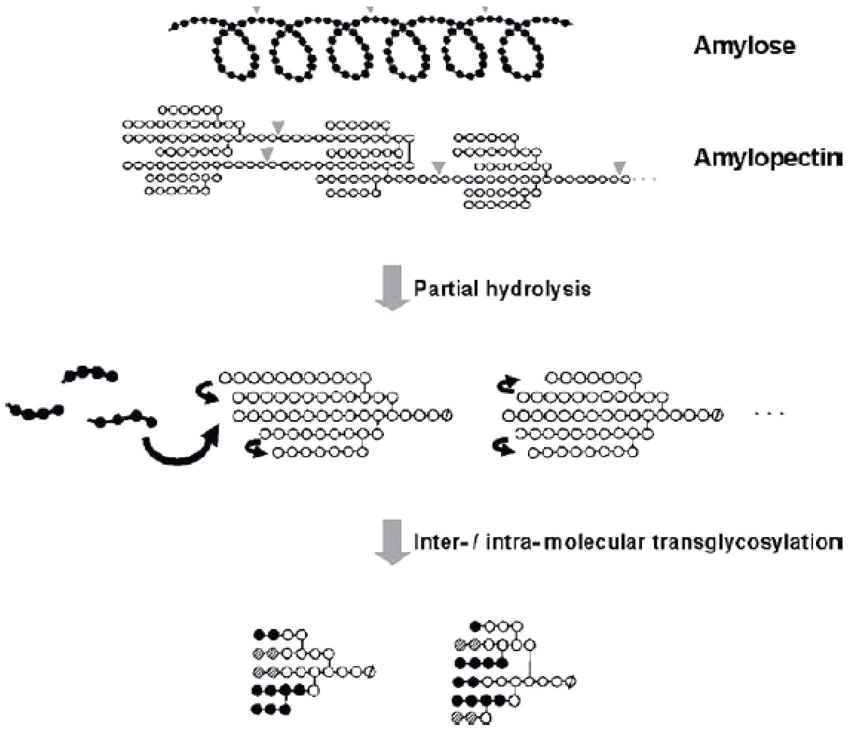
แข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) ของเจลสตาร์ชข้าวดัดแปรของ Lee และคณะ (2006) พบว่าเจลสตาร์ชข้าวที่ไม่ดัดแปรมีการปลดปล่อยน้ำ (%Syneresis) เพิ่มขึ้นมากกว่า 40% ในการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 5 รอบ ในขณะที่เจลสตาร์ชข้าวดัดแปรมีการปลดปล่อยน้ำคงที่ (10%) ตลอดทั้ง 5 รอบ

จากการวิเคราะห์สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel หรือ เจลที่สามารถเปลี่ยนสถานะจากของแข็งเป็นของเหลวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของการดัดแปรสตาร์ชมันฝรั่ง (Kaper et al., 2005; Van der Maarel et al., 2005; Hansen et al., 2009) สตาร์ข้าวโพด (Oh et al., 2008) และสตาร์ชข้าวเจ้า (Lee et al., 2006) พบว่า สตาร์ชดัดแปรสามารถเปลี่ยนสถานะแบบผันกลับได้ระหว่างการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Reversible) คล้ายกับสมบัติของเจลาตินที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งนี้เนื่องจากการเร่งปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทส โดยเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลสไปเชื่อมที่สายกลูแคนอื่น และสามารถเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลเพกติน ทำให้สายโซ่กิ่งสั้นลง มีผลต่อการจัดเรียงตัวของโครงร่างผลึก (Crystalline regions) ที่มีความแข็งแรงต่ำลง ง่ายต่อการทำลายโครงร่างผลึกเมื่อให้ความร้อนทำให้เจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรสามารถหลอมกลับมาเป็นสถานะคล้ายของเหลวได้ง่ายขึ้น (Kohyama et al., 2004) และโมเลกุลของแอมิโลสซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการตัดให้มีสายสั้นลง สามารถเกิดการจัดเรียงตัวด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติได้ง่ายและสามารถเกิดเป็นเจลได้เร็วกว่าการคืนตัวของแอมิโลเพกติน ทำให้เจลของสตาร์ชดัดแปรสามารถเปลี่ยนเป็นสถานะคล้ายของแข็งได้ที่อุณหภูมิต่ำ (Goodfellow and Wilson, 1990) แต่จากรายงายของ Kaper และคณะ (2005) พบว่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชดัดแปรยังไม่สามารถเทียบเท่ากับความแข็งแรงของเจลาตินได้ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยจากรายงานของ Van der Maarel และคณะ (2005) บ่งชี้ว่าเจลสตาร์ชมันฝรั่งดัดแปรความเข้มข้น 8% มีความแข็งแรงใกล้เคียงกับเจลาตินมากที่สุด นอกจากนี้ในรายงานของ Hansen และคณะ (2009) ยังพบว่าสตาร์ชมันฝรั่ง, สตารชขาวโพดและสตารชถั่วเขียวดัดแปรมีจุดหลอมเหลวของเจลสตาร์ชเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสตารชที่ไม่ดัดแปร โดยสตารชมันฝรั่งดัดแปรมีจุดหลอมเหลวเพิ่มขึ้นจาก 65 เปน 74 องศาเซลเซียส, สตารชขาวโพดดัดแปรเพิ่มขึ้นจาก 57 เปน 70 องศาเซลเซียส และสตารชถั่วดัดแปรเพิ่มจาก 63 เปน 79 องศาเซลเซียส สูงกว่าจุดหลอมเหลวของ เจลาติน 120 และ 300 Bloom (จุดหลอมเหลว 27 และ 28 องศาเซลเซียส ตามลำดับ) ซึ่งสามารถละลายได้ดีที่อุณหภูมิร่างกาย ทำให้สตาร์ชดัดแปรสามารถกักเก็บกลิ่นหรือรสชาติของอาหารที่อาจจะลดลงหรือสูญสลายไปในกระบวนการผลิตได้



รูปที่ 2.12 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวโพดดัดแปรที่เวลาต่าง ๆ และสตาร์ชข้าวโพดไม่ดัดแปร โดยเครื่อง HPAEC-PAD

ที่มา: Oh et al. (2008)



รูปที่ 2.13 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอมิโลสและแอมิโลเพกตินเมื่อถูกดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส

ที่มา : Seo et al. (2007)

ตารางที่ 2.3 ภาวะในการดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสจากงานวิจัยต่างๆ

แหล่งของแอมิโลมอลเทส	ชนิดสตาร์ช	ภาวะที่ใช้			ผู้วิจัย
		ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ยูนิต/กรัมสตาร์ช)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	
Pyrobaculum aerophilum IM2	10% (w/v) Potato starch	1, 10, 25	80	4, 24	Kaper et al. (2005)
Thermus scotoductus	Rice cake	50	75	3	Seo et al. (2007)
Thermus aquaticus	5% (w/v) Rice starch	0.1	70	12	Park et al. (2007)
Thermus scotoductus	3, 5, 10, 15% (w/v) Rice starch 5% (w/v) Rice starch	100 µl (1.38 mg/ml) 2, 5, 50, 100 µl	75	4	Lee et al. (2008)
Thermus aquaticus	55.6% (w/v) Rice starch	2.5, 5	75	1	Cho et al. (2009)
Thermus thermophilus	20% (w/w) Potato, Maize, Pea	2, 10, 100	70-85	1.5, 3.5, 5.5, 22	Hansen et al. (2009)
<u>ทดสอบ Thermo-reversible gel</u>					
Thermus thermophilus HB8	20% (w/v) Potato starch	1	70	24	Van der Maarel et al. (2005)
Thermus scotoductus	5% (w/v) Rice starch	100 µl (1.38 mg/ml)	75	4	Lee et al. (2006)
Thermotoga maritime	12.5% (w/v) Corn starch	125	65	8, 16, 24	Oh et al. (2008)

2.5 เจลาติน

เจลาตินเป็นผลิตผลที่ได้จากการย่อยสารประกอบที่เรียกว่า "คอลลาเจน" ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่พบในกระดูก ผิวหนัง และเอ็นจากสัตว์ โดยความร้อน กรด หรือด่าง (Morrison et al., 1999) เป็นโปรตีนที่ไม่ค่อยมีความสำคัญทางโภชนาการเนื่องจากมีกรดอะมิโน จำเป็นอยู่เพียงเล็กน้อยและมีไม่ครบทุกหมู่ตามความต้องการของร่างกาย แต่เจลาตินมีสมบัติพิเศษคือ เมื่อให้ความร้อน จะเป็นของเหลวหนืด และเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็นของเหลวจะกลายเป็นเจล ทำให้สามารถใช้ในอาหารได้หลายวัตถุประสงค์ เช่น ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดเจล (Gelling agent) ที่คืนตัวเป็นของเหลวได้เมื่อได้รับความร้อน (Thermoreversible gel) โดยเจลของเจลาตินจะสามารถหลอมเหลวได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกาย (< 35 องศาเซลเซียส), ใช้เป็นสารที่ทำให้เกิดความคงตัว (Stabilizer), เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ทำให้น้ำกับไขมันรวมตัวกันได้ดี ไม่แยกชั้น, ใช้ทดแทนไขมัน (Fat replacer) ในอาหารไขมันต่ำ, ใช้สำหรับการจับเก็บกลิ่นรส (Flavor encapsulation) และใช้เคลือบผิว แฮม ขนมเค้ก เพื่อรักษาความชุ่มชื้น เป็นต้น (Schrieber and Gareis, 2007) ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างคุณภาพด้านความหนืดของเจลาตินที่มีค่า Bloom ต่างๆในตัวอย่างอาหาร (ตัวอย่างมีเจลาติน 6.67% วัดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

เกรด/คุณภาพ (Bloom)	ความหนืด (cP)	ตัวอย่างอาหาร
130 – 190	1.9 – 3.5	เจลลี ส่วนผสมยาบางชนิด
180 – 210	2.4 – 3.4	เจลลี ซุป ซอส ไอศกรีม
215 – 235	2.8 – 3.4	ซุป ซอส ไอศกรีม โยเกิร์ต ครีมข้น คอนเฟกชันเนอรี
240 – 260	3.2 – 4.0	มาร์ชแมโล อาหารหวานบางชนิดโยเกิร์ต คอนเฟกชันเนอรี เนื้อกระป๋อง
270 – 280	3.4 – 4.4	โยเกิร์ต คอนเฟกชันเนอรี เนื้อกระป๋อง
290 - 310	3.9 – 5.4	โยเกิร์ต คอนเฟกชันเนอรี เนื้อกระป๋อง

ที่มา: จิรารัตน์ ทัตติยกุล (2554)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบและจุลินทรีย์

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.1 ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดขอนแก่น (พันธุ์ข้าวหลักปี 2553/2554)

3.1.1.2 ข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 จากศูนย์วิจัยข้าว จังหวัดขอนแก่น (พันธุ์ข้าวหลักปี 2553/2554)

3.1.2 จุลินทรีย์

ใช้รีคอมบิแนนท์แอมิโลมอลเทสที่ทำการแสดงออกใน *Escherichia coli* BL21 (DE3) จาก *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 (Srisimarat et al., 2010)

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมสตาร์ช

สกัดโปรตีนจากวัตถุดิบข้าวเจ้าและข้าวเหนียวด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Lumdubwong และ Seib (2000) โดยแช่ข้าวในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 เมช ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich zentrifugen, Rotanta 460R, Germany) ที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ขูดส่วนที่เป็นตะกอนสีเหลืองที่เป็นโปรตีนด้านบนออก แล้วล้างตะกอนด้านล่างที่เป็นสีขาวด้วยน้ำกลั่น และปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ขูดตะกอนโปรตีนสีเหลืองด้านบนออก และล้างตะกอนสีขาวด้านล่างด้วยน้ำกลั่น ทำเช่นนี้ 3 รอบ จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบในตู้อบลมร้อน (Yeo Heng, model HAL100S, B, Thailand) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนบดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 120 เมช และเก็บรักษาในถุงลามิเนต (PE/AI/LDPE) ที่มีสมบัติในการป้องกันอากาศ แสงแดด และทนความร้อนได้ดี วัดและวิเคราะห์สมบัติต่างๆของสตาร์ชจากข้าวทั้งสองชนิด โดยวิเคราะห์สมบัติ 3 ซ้ำ ได้แก่

3.2.1.1 ปริมาณโปรตีน ความชื้น เถ้า ไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2005) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.1-4

3.2.1.2 ปริมาณแอมิโลสปรากฏ (Apparent amylose) โดยดัดแปลงวิธีจาก Juliano (1971) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.5

3.2.1.3 สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) โดยดัดแปลงวิธีจาก Cho และคณะ (2009) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.6

3.2.1.4 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) (Lee et al., 2006) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.7

3.2.2 การเตรียมแอมิโลมอลเทส

3.2.2.1 การเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Srisimarat et al., 2010)

นำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้รับยีนแอมิโลมอลเทสจากแบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 ที่เก็บในกลีเซอรอล อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทิ้งให้ละลายที่อุณหภูมิห้องก่อนใช้ จากนั้นเขี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Solid luria Bertani (SLB) ที่เติม Amplicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก.1) บ่มในตู้บ่ม (Callenkamp, Model IPR 150, UK) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB เหลว ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม Amplicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก.1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ใน Incubator shaker (New Brunswick Scientific, Innova^{TM}4000, USA) เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อจากหลอดทดลองปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB เหลว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติม Amplicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ใน Incubator shaker เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อ 3 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด LB เหลว ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่เติม Amplicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ใน Incubator shaker วัดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Beckman, DU Series 650, USA) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อพบว่าค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.4-0.6 จึงเติมสารละลาย Isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.4 มิลลิโมลาร์ 300 ไมโครลิตร เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์มากขึ้น และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ใน Incubator shaker เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Beckman, Model J-30I, USA) ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ครั้งแรกด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ก.2) นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง และล้างเซลล์ครั้งที่สองด้วยสารละลาย Extraction buffer (ภาคผนวก ก.2) และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง จากนั้นเก็บเซลล์ใน

Extraction buffer ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักเซลล์ 1 กรัม ในหลอด Falcon ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2.2.2 การแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ (Srisimarat et al., 2010)

นำเซลล์ *E.coli* BL21 (DE3) ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทิ้งให้ละลาย ก่อนทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator (Bendelin, Germany) โดยใช้ Probe เบอร์ 73 ที่ความถี่ (Cycle) ระดับ 3 เป็นเวลา 1 นาที สลับกับการพักเซลล์ 1 นาที สังเกตการแตกของเซลล์จากการเปลี่ยนสีและลักษณะความหนืดของตัวอย่าง คือถ้าเซลล์แตกสีของตัวอย่างจะเปลี่ยนจากสีขาวนมเป็นสีน้ำตาลแดงและจะมีความหนืดมากขึ้น จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Refrigerated centrifuge (Beckman, Model J-30I, USA) ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนใส (เอนไซม์หยาบ) ไป Dialyze (Regenerated Cellulose Tubular Membrane (Nominal MWCO 12,000-14,000, Wall thickness 20 µl) : Cellu Sep T4, USA) ในสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 2 ครั้ง แล้วจึงทำให้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ ชนิด HisTrap affinity column (Amersham Bioscience HisTrap FF™, HisTrap FF™ DEAE FF™ and HiPrep Phenyl FF™ (High Sub) 16/10) (ภาคผนวก ข) นำเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ไป Dialyze ในสารละลาย Phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วจึงเก็บเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2.3 การวิเคราะห์สมบัติเอนไซม์

วิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธี Starch transglycosylation activity (ดัดแปลงวิธีจาก Park et al., 2007), ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976), และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE (Srisimarat et al., 2010) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค.1-ค.3

3.2.3 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าโดยแอมิโลมอลเทส

เตรียมสารละลายสตาร์ชข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจลาตีไนซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเป็น 30 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงวิธีจาก Lee et al., 2006) ดัดแปรสารละลายสตาร์ช โดยศึกษาผลของปัจจัยดังต่อไปนี้

3.2.3.1 ความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทส

แปรความเข้มข้นแอมิโลมอลเทสเป็น 10, 20, และ 40 U/กรัมสตาร์ช บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

อบสตาร์ชดัดแปรในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 เมช เก็บรักษาสตาร์ชดัดแปรในถุงลามิเนต

วิเคราะห์สมบัติต่างๆของสตาร์ชดัดแปร ดังต่อไปนี้

1) ปริมาณแอมิโลสปรากฏ ดัดแปลงวิธีจาก Juliano (1971) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.5

2) การกระจายตัวของแอมิโลเพคติน โดยใช้ High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection; HPAEC-PAD (Kuakpetoon and Wang, 2006) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.9

3) สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ด้วยเครื่อง Rheometer (Lee et al., 2006) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.8

4) การเกิดรีโทรเกรเดชันจากการวัดค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกด้วยเครื่อง DSC ดัดแปลงวิธีจาก Cho และคณะ (2009) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.6

5) ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Lee et al., 2006) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.7

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยวิเคราะห์สมบัติ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสาเร็จรูป IBM SPSS (IBM, version 16, USA) เลือกสภาวะที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากการมีสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel คือมีค่า tan δ สูง เมื่อให้ความร้อน และ tan δ ต่ำ เมื่อให้ความเย็น, มีค่าพลังงานในการหลอมผลึกของการเกิดรีโทรเกรเดชัน (ΔH_{retro}) ต่ำ และมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวที่ไม่ดัดแปร

3.2.3.2 เวลาในการดัดแปร

ใช้ความเข้มข้นแอมิโลมอลเทสที่เลือกจากข้อ 3.2.3.1 และแปรเวลาในการดัดแปรเป็น 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อบสตาร์ชในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช เก็บรักษาสตาร์ชในถุงลามิเนต วิเคราะห์สมบัติต่างๆของสตาร์ชดัดแปรเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS

เลือกเวลาที่เหมาะสมในการดัดแปรโดยพิจารณาจากผลของการวิเคราะห์สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel , มีค่า ΔH_{retro} ต่ำ และมีความคงทนต่อการแข็งเยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวที่ไม่ดัดแปร โดยนำสตาร์ชดัดแปรที่ได้จากภาวะการดัดแปรที่เลือกในข้อ 3.2.3.1 และ 3.2.3.2 ไปเตรียมเจลที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) วัดความแข็งแรงของเจลเปรียบเทียบกับเจลของเจลาตินความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วยเครื่อง Texture-analyzer (TA-XT2*i* Texture Analyzer รุ่น Plus, United Kingdom) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.11

3.2.4 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวโดยแอมิโลมอลเทส

เตรียมสารละลายสตาร์ชข้าวเหนียวความเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเป็น 30 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงวิธีจาก Lee et al., 2006) ดัดแปรสารละลายสตาร์ชข้าวเหนียวแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 10 และ 40 U/กรัมสตาร์ช บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเดือด เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อบสตาร์ชดัดแปรในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บดและร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 เมช เก็บรักษาสตาร์ชดัดแปรในถุงลามิเนต

วิเคราะห์สมบัติต่างๆของสตาร์ชดัดแปร ดังต่อไปนี้

1) การกระจายตัวของแอมิโลเพคติน โดยใช้ High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection; HPAEC-PAD (Kuakpetoon and Wang, 2006) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.9

2) สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ด้วยเครื่อง Rheometer (Lee et al., 2006) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ง.8

3.2.5 การใช้สตาร์ชข้าวดัดแปรทดแทนเจลาตินในอาหาร

นำสตาร์ชข้าวดัดแปรที่ได้จากภาวะการดัดแปรที่เลือกมาใช้ทดแทนเจลาตินในการทำ Panna cotta (ภาคผนวก ง.12) และวัดความแข็งแรงของเนื้อผลิตภัณฑ์เปรียบเทียบกับ Panna cotta ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ ด้วยเครื่อง Texture-analyzer

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 สมบัติของสตาร์ชข้าว

4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าว

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า ปริมาณความชื้น และแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียว (ตารางที่ 4.1) พบว่า สตาร์ชข้าวเจ้าและสตาร์ชข้าวเหนียว มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.21% และ 0.79% ตามลำดับ และมีปริมาณไขมันเท่ากับ 0.39% และ 0.29% สอดคล้องกับรายงานของ Noosuk และคณะ (2003) ที่พบว่าการสกัดสตาร์ชข้าวโดยแช่เมล็ดข้าวในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.3% (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีปริมาณโปรตีนและไขมันน้อยกว่า 0.8% (โดยน้ำหนักแห้ง) แต่แตกต่างจากรายงานการศึกษาของบุญทิวา นิลจันทร์ (2548) ซึ่งสกัดโปรตีนจากฟลาวร์ข้าวโดยใช้สารละลายถึง 3 ชนิด คือ NaCl 5%, เอทานอล 85% และ NaOH 0.35% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้สตาร์ชข้าวที่ได้มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่า 0.5% ทั้งนี้ เพราะโปรตีนที่มีในข้าวมีหลายชนิด สามารถละลายได้ในสารสกัดต่างชนิดกัน ดังนั้นการใช้สารสกัดทั้ง 3 ชนิด อาจสกัดโปรตีนออกจากสตาร์ชได้มากกว่า นอกจากนี้ปริมาณไขมันก็ต่ำกว่า 0.1% ซึ่งอาจเกิดจากการละลายของไขมันในเอทานอล อย่างไรก็ตาม สตาร์ชข้าวที่ผลิตได้ก็มีปริมาณโปรตีนและไขมันไม่สูงกว่าค่าที่ควรจะมีในสตาร์ช (โปรตีน$<$1%) (Whistler and BeMiller, 2009)

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสปรากฏ พบว่าสตาร์ชข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว กข 6 มีปริมาณแอมิโลสปรากฏ เท่ากับ 16.45% และ 2.48% ในขณะที่รายงานของ Noosuk และคณะ (2003) พบปริมาณแอมิโลสในสตาร์ชข้าวเจ้าขาวดอกมะลิ 105 (15.12%) และสตาร์ชข้าวเหนียว กข 6 (2.56%) ปริมาณแอมิโลสที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มสตาร์ชข้าวไทย (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ, 2546) ซึ่งปริมาณแอมิโลสที่แตกต่างกันนี้จะมีอิทธิพลต่อสตาร์ชข้าว การเกิดเจลาติไนเซชัน รีโทรเกรเดชัน และสมบัติทางวิทยากระแสของสตาร์ชข้าว (Noosuk et al., 2003)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีและแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าว

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%) โดยน้ำหนักแห้ง	
	สตาร์ชข้าวเจ้า	สตาร์ชข้าวเหนียว
โปรตีน	0.21 ± 0.05^{b}	0.79 ± 0.03^{a}
ไขมัน^{ns}	0.29 ± 0.02	0.39 ± 0.33
ความชื้น	7.49 ± 0.01^{a}	7.13 ± 0.04^{b}
เถ้า^{ns}	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.04
แอมิโลสปรากฏ	16.45 ± 0.07^{a}	2.48 ± 0.14^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

^{ns} ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

4.1.2 สมบัติทางความร้อน

จากการวัดสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลาติไนเซชัน ซึ่งเป็นกระบวนการให้ความร้อนเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนในส่วนผลึกให้เกิดการคลายตัว ทำให้เม็ดสตาร์ชสามารถดูดน้ำ เกิดการพองตัว พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นในการเกิดเจลาติไนเซชัน (T_o) ของสตาร์ชข้าวเจ้ามีค่าสูงกว่ากว่าสตาร์ชเหนียว (ตารางที่ 4.2) เนื่องจากสตาร์ชข้าวเจ้ามีปริมาณแอมิโลสูงกว่าสตาร์ชข้าวเหนียว จึงต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าในการทำลายพันธะไฮโดรเจนของแอมิโลสที่เกาะเกี่ยวกันในบริเวณอสัณฐาน (Amorphous zone) มากกว่าสตาร์ชข้าวเหนียว ทำให้มีค่า T_o สูงกว่า ในขณะที่ช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชัน (T_c-T_o) ของสตาร์ชข้าวเจ้าจะแคบกว่าสตาร์ชข้าวเหนียว (12.2 และ 16.3 องศาเซลเซียล ตามลำดับ) บ่งบอกว่าสตาร์ชข้าวเจ้ามีความหลากหลายของรูปแบบผลึกน้อยกว่าสตาร์ชข้าวเหนียว (Heterogeneity น้อยกว่า) (Slade and Levine, 1987) และพบว่ามีค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาติไนเซชัน (ΔH_{gel}) ไม่แตกต่างกัน (13.2 และ 12.3 จูลต่อกรัม ตามลำดับ) ($p>0.05$) บ่งบอกว่าความแข็งแรงโดยรวมของโครงสร้างที่เป็นระเบียบในส่วนผลึกไม่แตกต่างกัน (Whistler and BeMiller, 1997) สอดคล้องกับรายงานของ บุญทิวา นิลจันทร์ (2548) ที่พบว่า ค่า ΔH_{gel} ของสตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียวมีค่าใกล้เคียงกัน (13.17 และ 13.26 จูลต่อกรัม ตามลำดับ)

จากการวัดการเกิดรีโทรเกรเดชันซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของโมเลกุลแอมิโลสและแอมิโลเพกตินหลังการเกิดเจลาติไนเซชันและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 14 วัน พบว่า อุณหภูมิในการเกิดรีโทรเกรเดชัน (T_o, T_p และ T_c) และค่าพลังงานที่ใช้ในการหลอมผลึกจากการเกิดรีโทรเกรเดชัน (ΔH_{retro}) มีค่าต่ำกว่ากระบวนการเกิดเจลาติไนเซชัน บ่งชี้ว่าโครงสร้างผลึกที่เกิดการจัดเรียงตัวใหม่หลังการเกิดเจลาติไนเซชัน มีความสมบูรณ์หรือความแข็งแรงลดลง (Eliasson

and Ljunger, 1988; Russell, 1983; Russell 1987) ซึ่งการเก็บตัวอย่างไว้ 14 วัน เป็นเวลาที่นานพอที่การเกิดรีโทรเกรเดชันส่วนใหญ่จะเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของแอมิโลเพกติน (Eliasson, 1995) โดยสัดส่วนของปริมาณแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเหนียวที่มีมากกว่าข้าวเจ้า ซึ่งควรจะส่งผลให้สตาร์ชข้าวเหนียวมีค่า ΔH_{retro} มากกว่าสตาร์ชข้าวเจ้า (Lii, Tsai, and Tseng, 1996) แต่ในงานวิจัยนี้ค่าพลังงานในการหลอมผลึกของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเหนียวและสตาร์ชข้าวเจ้ามีค่าทางสถิติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เป็นไปได้ว่าโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ของสตาร์ชข้าวเหนียว (ตารางที่ 4.1) ซึ่งจะแทรกตัวอยู่ระหว่างเม็ดสตาร์ชข้าวเหนียว อาจขัดขวางการจัดเรียงตัวของโครงร่างผลึก ทำให้ผลึกมีความแข็งแรงลดลง ค่า ΔH_{retro} ที่วัดได้จึงมีค่าใกล้เคียงกับค่าของสตาร์ชข้าวเจ้า (Chrastil, 1990) สอดคล้องกับรายงานของบุญทิวา นิลจันทร์ (2548) ที่พบว่าสตาร์ชข้าวเหนียวซึ่งมีปริมาณโปรตีนหลงเหลือมากกว่าสตาร์ชข้าวเจ้า (0.15% และ0.02% ตามลำดับ) แสดงค่า ΔH_{retro} ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางความร้อนของการเกิดเจลาติไนเซชันและรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียว

สตาร์ช	T_O (°C)	T_P (°C)	T_C (°C)	T_C-T_O (°C)	ΔH_{gel}, ΔH_{retro} (J/g)
<u>การเกิดเจลาติไนเซชัน</u>					
ข้าวเจ้า	64.1 ± 0.25^{b}	70.0 ± 0.17^{ns}	76.3 ± 0.24^{b}	12.2 ± 0.04^{b}	13.2 ± 0.84^{ns}
ข้าวเหนียว	62.2 ± 0.21^{a}	70.0 ± 0.42^{ns}	78.0 ± 0.45^{a}	16.3 ± 0.60^{a}	12.3 ± 0.38^{ns}
<u>การเกิดรีโทรเกรเดชัน</u>					
ข้าวเจ้า	45.7 ± 0.99^{ns}	54.6 ± 0.28^{ns}	60.3 ± 0.07^{ns}	14.6 ± 0.92^{ns}	3.8 ± 0.57^{ns}
ข้าวเหนียว	45.7 ± 1.55^{ns}	54.1 ± 0.76^{ns}	60.4 ± 0.25^{ns}	14.7 ± 1.30^{ns}	4.1 ± 0.28^{ns}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

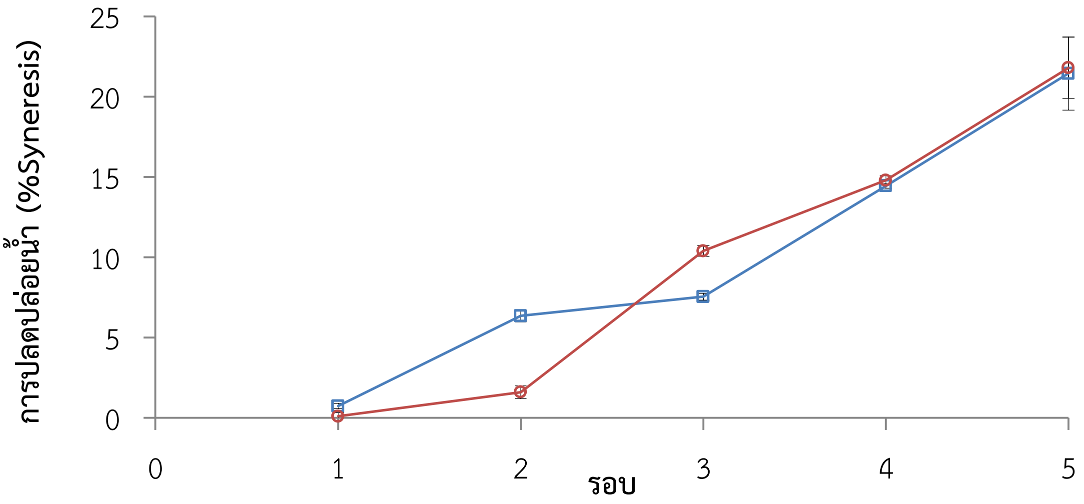
$^{a, b,}$ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันของแต่ละกระบวนการแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

^{ns} ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันของแต่ละกระบวนไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \geq 0.05$)

4.1.3 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability)

จากการวิเคราะห์ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 5 รอบ พบว่าเจลสตาร์ชข้าวเจ้ามีการปลดปล่อยน้ำ (Syneresis) เพิ่มขึ้นในทุกรอบ (0.7, 6.4, 7.6, 14.5 และ 21.5% ตามลำดับ) สอดคล้องกับรายงานของ Charoenrein และ Preechathammawong (2012) ซึ่งพบว่าเจลสตาร์ชข้าวเจ้ามีการปลดปล่อยน้ำเพิ่มขึ้นในทุกรอบของการแช่เยือกแข็งและการละลาย

น้ำแข็ง 5 รอบ ส่วนเจลสตาร์ชข้าวเหนียว พบปริมาณการปลดปล่อยน้ำต่ำใน 2 รอบแรก คือ 0.1 และ 1.6% ตามลำดับ และมีการปลดปล่อยน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมากในรอบที่ 3, 4 และ 5 คือ 10.4, 14.8 และ 21.8 % ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากการวัดค่า ΔH_{retro} ของสตาร์ชข้าวทั้งสองชนิดที่ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีการใช้การวัดความคงตัวต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งในการประเมินความสามารถในการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช (Ferrero, Martino and Zaritzky, 1994; Jacobson and BeMiller, 1998; Varavinit, Anuntavuttikul and Shobsngob, 2000)



รูปที่ 4.1 ปริมาณการปลดปล่อยน้ำจากเจลของสตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียวในระหว่างการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 5 รอบ
(○ = สตาร์ชข้าวเหนียว, □= สตาร์ชข้าวเจ้า)

4.2 สมบัติของแอมิโลมอลเทส

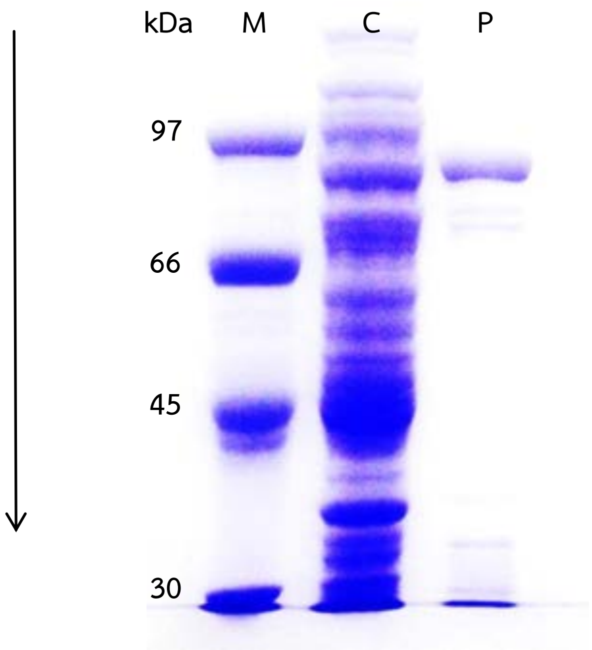
จากการวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธี Starch transglycosylation activity และปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (ตารางที่ 4.3) พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 42.7 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 29.9 เท่าของเอนไซม์หยาบและได้ผลผลิตเป็น 83.9 %

เมื่อวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีนหลักที่มีน้ำหนักโมเลกุล 84 kDa เมื่อเปรียบเทียบกับ Standard protein marker (รูปที่ 4.2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Srisimarat และคณะ (2010) แต่แตกต่างจากน้ำหนักโมเลกุลของแอมิโลมอลเทสจาก *Thermus litoralis*, *Thermus aquaticus* และ *E.coli* IFO03806 ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 79, 57 และ 93 kDa ตามลำดับ (Xavier et al., 1999; Terada

et al., 1999; Kitahata et al., 1989) แสดงว่าแอมิโลมอลเทสจากแหล่งต่างกันอาจมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน นอกจากแถบโปรตีนหลักแล้ว ยังพบแถบโปรตีนอื่นปนอยู่เล็กน้อย หลังผ่าน HisTrap affinity column อาจเป็นไปได้ว่ามีโปรตีนชนิดอื่นสามารถจับกับแอมิโลมอลเทสทำให้หลุดปนออกมากับโปรตีนหลัก จึงปรากฏแถบโปรตีนอื่นด้วย (Srisimarat et al., 2010)

ตารางที่ 4.3 สมบัติและแอกทิวิตีของแอมิโลมอลเทส

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์	ค่าแอกทิวิตี (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีทั้งหมด (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (%)
เอนไซม์หยาบ	26.4±0.21	1279.4±9.05	18.3±0.28	1.5±0.07	1	100
เอนไซม์บริสุทธิ์	49.2±0.04	1098.4±9.48	1.2±0.08	42.7±3.18	29.9±1.49	83.9±0.84



รูปที่ 4.2 SDS-PAGE ของโปรตีนจาก *Escherichia coli* BL21 (DE3) ที่ได้รับการโคลนยีนแอมิโลมอลเทสจาก *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

เมื่อ M = Standard protein marker

C = เอนไซม์หยาบที่มีปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม

P = เอนไซม์ที่ผ่าน HisTrap affinity column ที่มีปริมาณโปรตีน 3 ไมโครกรัม

4.3 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าโดยแอมิโลมอลเทส

4.3.1 ผลของความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสต่อสมบัติของสตาร์ชดัดแปร

จากการแปรความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทส 10, 20, และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช ในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสปรากฏ, การกระจายตัวของแอมิโลเพกติน, สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel, การเกิดรีโทรเกรเดชันและความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) ของสตาร์ชดัดแปร พบว่าความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสมีผลต่อสมบัติของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร ดังนี้

4.3.1.1 ปริมาณแอมิโลสปรากฏ

จากตารางที่ 4.4 พบว่า ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสที่ใช้ในการดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ ($p \le 0.05$) ยกเว้นที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร และเมื่อพิจารณาการเกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนของสารละลายไอโอดีนและสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร พบว่ามีสีที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ดัดแปร ตามความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสที่ใช้ในการดัดแปร (รูปที่ 4.3) ซึ่งการเกิดสีของไอโอดีนสามารถบ่งบอกถึง Degree of polymerization (DP) ของสายแอมิโลสได้ โดยแอมิโลสที่มี DP น้อยกว่า 8 จะไม่สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีนเพื่อให้เกิดสีได้ ในขณะที่แอมิโลสที่มี DP ในช่วง 9-12, 14-28, 31-35, 36-45 และ 47 ขึ้นไป จะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาล, สีแดง, สีม่วงแดง, สีม่วง และสีน้ำเงิน ตามลำดับ (Bailey and Whelan, 1961) ซึ่งการที่สีของสารประกอบเชิงซ้อนของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง แสดงให้เห็นว่าการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าโดยแอมิโลมอลเทสทำให้ DP ของสายแอมิโลสสั้นลง (DP 31-35) เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ดัดแปร (DP>47) ทั้งนี้อาจเกิดจากการเร่งปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทส ในการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลสไปเชื่อมที่ สายกลูแคนอื่น ได้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น (Hansen et al., 2009; Oh et al., 2008; Park et al., 2007; Seo et al., 2007) โดยนอกจากเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลสไปเชื่อมที่สายกลูแคนอื่นแล้ว เป็นไปได้ว่าแอมิโลมอลเทสสามารถเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลเพกตินได้เช่นกัน ได้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น (Park et al., 2007) จึงสามารถเกิดสีกับไอโอดีนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และทำให้มีปริมาณแอมิโลสปรากฏเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีปริมาณแอมิโลสปรากฏลดลงจากสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งความเข้มข้นนี้อาจจะยังไม่เพียงพอให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

ตารางที่ 4.4 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส

ตัวอย่าง	แอมิโลสปรากฏ(%)
สตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร	16.5 ± 0.1[c]
สตาร์ข้าวเจ้าดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช	15.2 ± 0.1[d]
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส 20 ยูนิต/กรัมสตาร์ช	16.8 ± 0.0[b]
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช	18.9 ± 0.1[a]

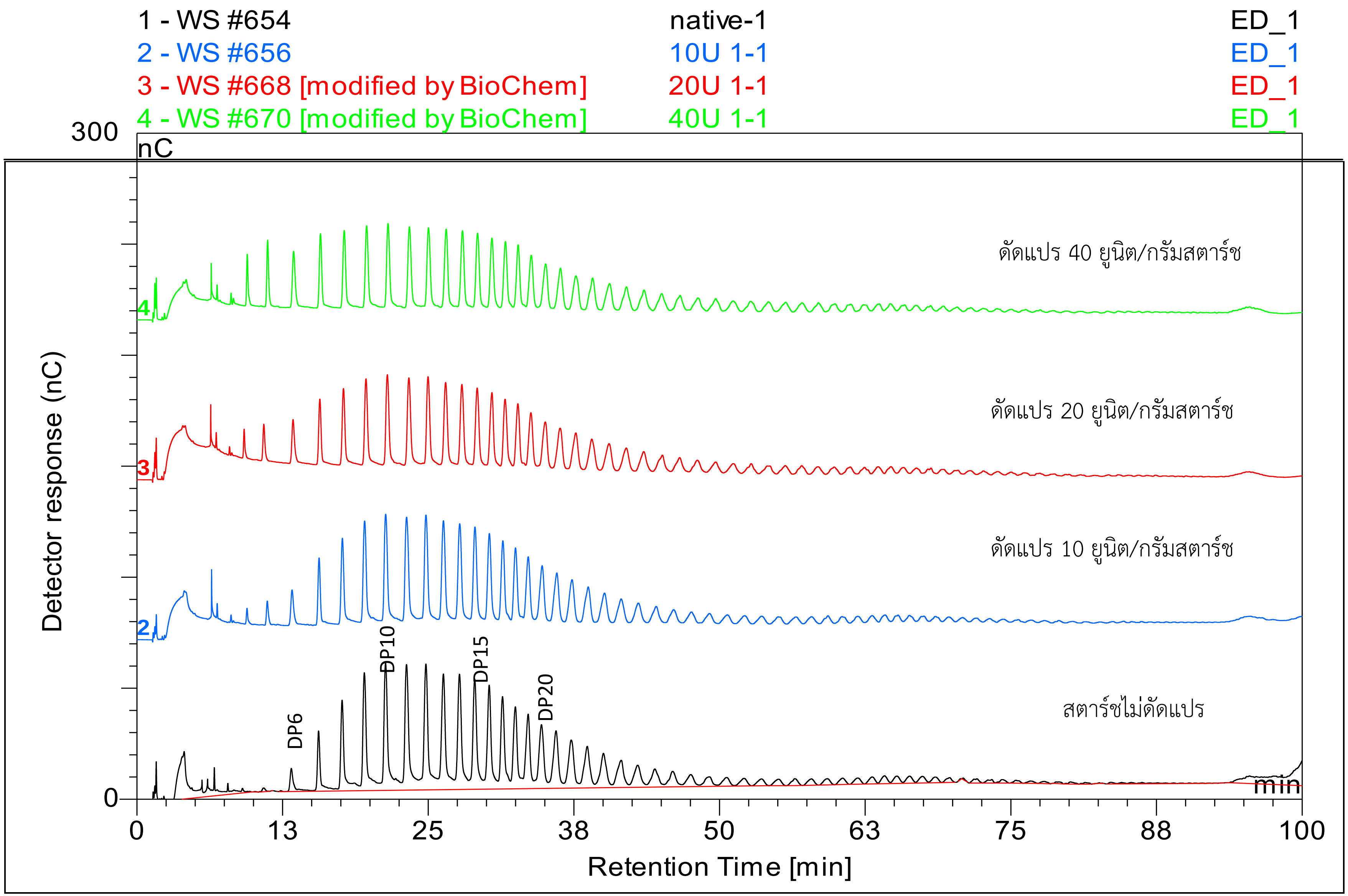
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a, b,...] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

รูปที่ 4.3 สีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอดีนกับสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช

4.3.1.2 การกระจายตัวของแอมิโลเพกติน

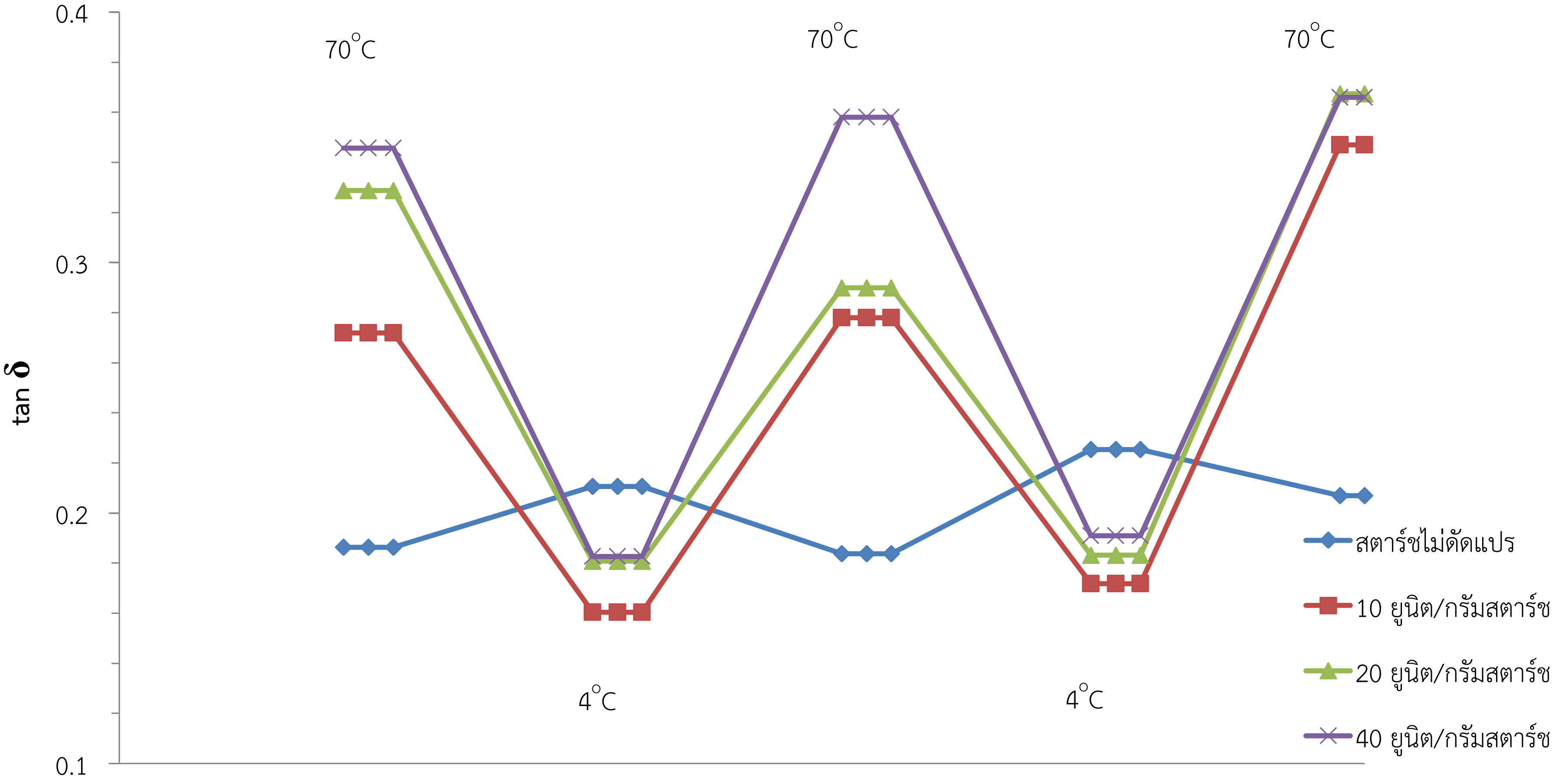
จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าด้วยเครื่อง HPAEC-PAD พบว่า สายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรมีปริมาณสายสั้น (DP ≤ 8) เพิ่มขึ้น และ DP 9-20 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ดัดแปร โดยเฉพาะการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.4) ซึ่งโดยปกติแล้วจะพบขนาดของสายโซ่กิ่งในโครงสร้างของแอมิโลเพกตินตั้งแต่ DP 6 จนถึง DP 50-60 (Piyachomkwan et al., 2000) ทั้งนี้การเร่งปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทส ซึ่งนอกจากจะเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลสไปเชื่อมที่สายกลูแคนอื่นแล้ว ยังสามารถเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลเพกติน ทำให้สายโซ่กิ่งที่เคยเป็นสายยาว (DP 9-20) ถูกตัดให้เป็นสายสั้นลง (Park et al., 2007) จึงพบสายโซ่กิ่งที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า DP 6 เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Seo และคณะ (2007) ซึ่งดัดแปรสตาร์ชข้าวโดยแอมิโลมอลเทส จาก *Thermus scotoductus* พบการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินสายสั้นตั้งแต่ DP 1-9 เพิ่มขึ้น และ DP > 10 ลดลง และในการศึกษาของ Van der Maarel และคณะ (2005) พบการเพิ่มขึ้นของสายโซ่กิ่งสายสั้น (DP 2-5) และสายยาว (DP>30) แต่ในงานวิจัยนี้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของสายยาวดังกล่าวอย่างชัดเจน



รูปที่ 4.4 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3.1.3 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel

จากการวิเคราะห์สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel หรือ เจลที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับได้ของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร โดยวิเคราะห์จากค่า tan δ = G″/G′ (รูปที่ 4.5) ด้วยเครื่อง Rheometer พบว่าสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรสามารถเปลี่ยนสถานะแบบผันกลับได้ดีกว่าเจลสตาร์ชข้าวไม่ดัดแปร คือ มีค่า tan δ ต่ำ เมื่อถูกทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงสถานะคล้ายของแข็ง (Solid-like; G′>G″) และมีค่า tan δ สูง เมื่อถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แสดงสถานะคล้ายของเหลว (Liquid-like; G″>G′) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเด่นชัดที่การดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช ทั้งนี้การเร่งปฏิกิริยา Disproportionation ของแอมิโลมอลเทส โดยเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลสไปเชื่อมที่สายกลูแคนอื่น และสามารถเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลเพกติน ทำให้สายโซ่กิ่งสั้นลง มีผลต่อการจัดเรียงตัวของโครงร่างผลึก (Crystalline regions) ซึ่งมีปริมาณของผลึกลดลง ง่ายต่อการทำลายผลึกเมื่อให้ความร้อน ทำให้เจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรสามารถหลอมกลับมาเป็นสถานะคล้ายของเหลวได้ง่ายขึ้น (Kohyama et al., 2004) และโมเลกุลของแอมิโลสซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการตัดให้มีสายสั้นลงสามารถเกิดการจัดเรียงตัวด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติได้ง่ายและสามารถเกิดเป็นเจลได้เร็วกว่าการคืนตัวของแอมิโลเพกติน ทำให้เจลของสตาร์ชดัดแปรสามารถเปลี่ยน เป็นสถานะคล้ายของแข็งได้ที่อุณหภูมิต่ำ (Goodfellow and Wilson, 1990) ส่งผลทำให้สตาร์ชดัดแปรมีสมบัติเป็น Thermo-reversible gel เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Lee et al., 2006; Oh et al., 2008) สอดคล้องกับรายงานการดัดแปรสตาร์ชข้าว (Lee et al., 2006) และสตาร์ชข้าวโพด (Oh et al., 2008) โดยแอมิโลมอลเทสจาก *Thermus scotoductus* และ *Thermotoga maritime* ตามลำดับ สามารถแสดงสมบัตินี้ได้เช่นกัน แต่มีความสามารถในการเป็น Thermo-reversible gel ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแอมิโลมอลเทสจากเชื้อต่างชนิดและสตาร์ชที่ใช้ดัดแปรมีปริมาณแอมิโลสต่างกันอาจส่งผลต่อสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ที่ต่างกัน



รูปที่ 4.5 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเจ้าที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3.1.4 การเกิดรีโทรเกรเดชัน

จากการวิเคราะห์การเกิดรีโทรเกรเดชัน หลังการเก็บตัวอย่างสตาร์ชข้าวเจ้าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าอุณหภูมิในการเกิดรีโทรเกรเดชัน (T_o, T_p) ของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีค่าไม่แตกต่างจากการดัดแปรที่ความเข้มข้น 20 ยูนิต/กรัมสตาร์ช ซึ่งมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช อย่างมีนัยสำคัญ มีค่า ΔH_{retro} ลดลงตามความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสที่เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร (ตารางที่ 4.5) แสดงว่าการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นมาก มีผลทำให้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร เกิดรีโทรเกรเดชันลดลง อาจเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของแอมิโลมอลเทส ซึ่งทำให้ความยาวของสายแอมิโลสลดลง และการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินที่มีสายสั้นเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดผลึกที่มีความแข็งแรงขึ้น จึงส่งผลให้มีค่า T_o และ T_p สูงขึ้น แต่อาจจะมีปริมาณของผลึกลดลง จึงส่งผลให้ค่าพลังงานความร้อนในการการหลอมผลึกต่ำลง (Oh et al., 2008; Shi and Seib, 1992)

4.3.1.5 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability)

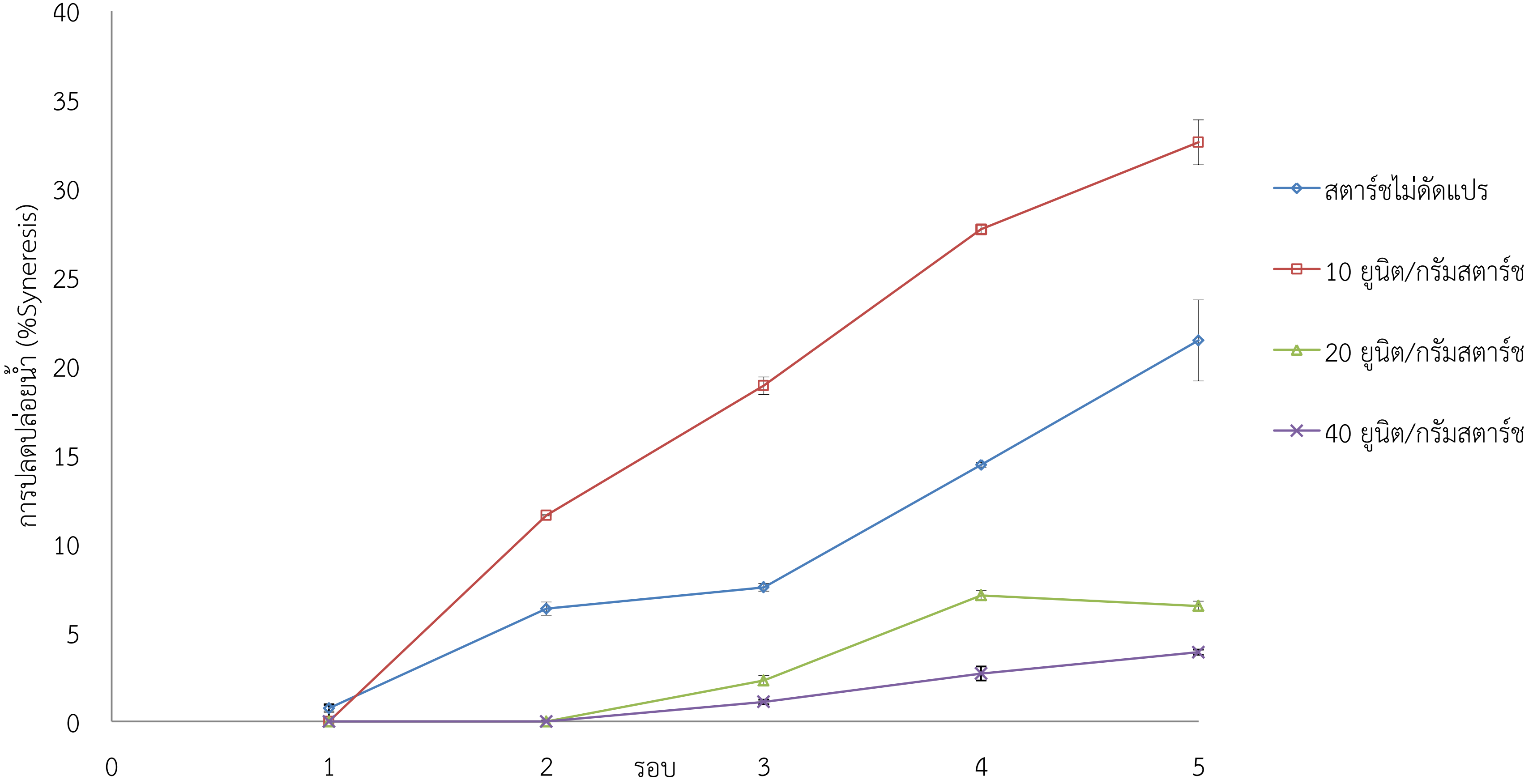
จากการศึกษาความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง พบว่าเจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่ความเข้มข้น 20 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีการปลดปล่อยน้ำจากเจลลดลงทั้ง 5 รอบของการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรที่ความเข้มข้น 10 U/กรัมสตาร์ช (รูปที่ 4.6) อาจเกิดจากสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรมีความยาวของสายแอมิโลสลดลง และมีโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสายสั้นๆเพิ่มขึ้น ทำให้การเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างพอลิเมอร์ของสตาร์ชลดลง แต่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำดีขึ้น เจลจึงอุ้มน้ำมาก เพราะฉะนั้นการขับน้ำเมื่อทำการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งจึงลดลง (%Syneresis ลดลง) แสดงให้เห็นว่าการดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นสูง (20 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช) สามารถปรับปรุงสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งให้ดีขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Lee และคณะ (2006) ซึ่งดัดแปรสตาร์ชข้าวโดยแอมิโลมอลเทสจาก *Thermus scotoductus* พบว่าสตาร์ชข้าวดัดแปรสตาร์ชมีการปลดปล่อยน้ำคงที่ประมาณ 10% ตลอดกระบวนการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง 5 รอบ ในขณะที่สตาร์ชข้าวไม่ดัดแปรมีการปลดปล่อยน้ำมากขึ้นใน 5 รอบของกระบวนการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง

ตารางที่ 4.5 การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 14 วัน

ตัวอย่าง	การเกิดรีโทรเกรเดชัน				
	T_O (°C)	T_P (°C)	T_C (°C)	T_C-T_O (°C)	ΔH_{retro} (J/g)
สตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร	45.70±0.99[bc]	54.60±0.28[c]	60.25±0.07[c]	14.55±0.92[a]	3.80±0.57[a]
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช	44.15±2.05[c]	53.80±0.99[c]	60.65±0.64[bc]	16.50±1.41[a]	3.80±0.14[a]
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร 20 ยูนิต/กรัมสตาร์ช	47.70±0.85[ab]	56.15±0.07[b]	63.30±0.28[b]	14.60±0.57[a]	3.05±0.07[ab]
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช	50.20±0.28[a]	58.30±0.00[a]	65.70±1.13[a]	15.50±1.41[a]	2.45±0.21[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a, b, ...] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.6 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.3.2 ผลของเวลาในการดัดแปรสตาร์ช

จากสมบัติของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร ที่ได้จากการแปรความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทส 10, 20, และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช ในข้อ 4.3.1 พบว่าความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทส 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจากสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่ได้มีสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ดีที่สุด เกิดรีโทรเกรเดชันต่ำที่สุด และมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งดีที่สุด จึงเลือกใช้ความเข้มข้นนี้ในการศึกษาผลของเวลาในการดัดแปรเวลา (1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง) ในการดัดแปรสตาร์ชข้าวที่ความเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และวิเคราะห์ปริมาณแอมิโลสปรากฏ การกระจายตัวของแอมิโลเพกติน สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel การเกิดรีโทรเกรเดชันและความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร

จากการศึกษาพบว่า สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่เวลา 6, 12, และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณแอมิโลสปรากฏสูงกว่าสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร ในขณะที่การดัดแปรที่บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีปริมาณแอมิโลสปรากฏน้อยกว่าสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร (ตารางที่ 4.6) และพบว่าการทำปฏิกิริยาของไอโอดีนกับสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่เวลาต่างๆ ให้สีที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวเจ้าที่ไม่ดัดแปร (รูปที่ 4.7) เกิดเป็นสีม่วงแดง บ่งบอกถึง DP ของสายแอมิโลสที่เปลี่ยนไปได้คือสายแอมิโลสมี DP สั้นลง (DP 31-35) โดยเมื่อเวลาในการดัดแปรมากขึ้น ทำให้การเร่งตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลสและสายแอมิโลเพกตินมากขึ้น จึงเกิดสีกับไอโอดีนได้มากขึ้น และมีผลทำให้ปริมาณแอมิโลสปรากฏเพิ่มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.6 ปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทส ความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช ที่เวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	แอมิโลสปรากฏ (%)
สตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร	16.5 ± 0.1^{d}
สตาร์ชข้าวเจ้าบ่มโดยแอมิโลมอลเทส 1 ชั่วโมง	15.1 ± 0.0^{e}
สตาร์ชข้าวเจ้าบ่มโดยแอมิโลมอลเทส 6 ชั่วโมง	18.1 ± 0.1^{c}
สตาร์ชข้าวเจ้าบ่มโดยแอมิโลมอลเทส 12 ชั่วโมง	20.0 ± 0.1^{a}
สตาร์ชข้าวเจ้าบ่มโดยแอมิโลมอลเทส 24 ชั่วโมง	18.7 ± 0.1^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a, b,...}$ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

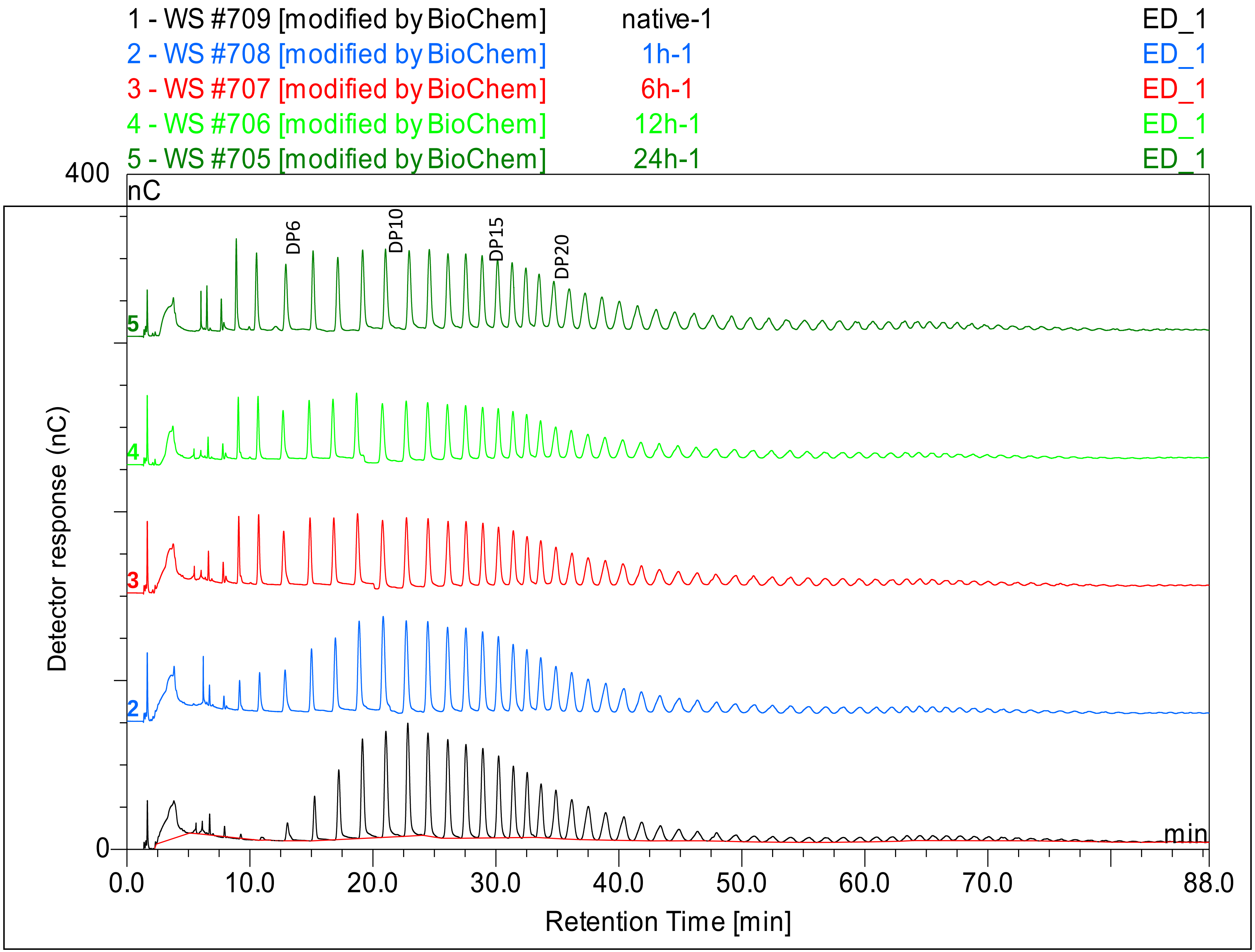
รูปที่ 4.7 สีของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไอโอดีนกับสตาร์ชข้าวไม่ดัดแปรและดัดแปรที่เวลาต่างๆ

จากการศึกษาลักษณะกระจายตัวของสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกติน (รูปที่ 4.8) พบว่า การกระจายตัวของสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวดัดแปรมีปริมาณสายสั้น (DP $\leq$ 8) เพิ่มขึ้น และ DP 9-20 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ดัดแปร โดยเฉพาะเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้า 24 ชั่วโมง มีการเพิ่มขึ้นของโซ่กิ่งสายสั้นอย่างชัดเจน เป็นไปได้ว่าเวลาในการดัดแปรที่มากขึ้น จะสามารถเร่งการตัดที่พันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลเพกตินมากขึ้น ทำให้สายโซ่กิ่งที่สายยาวถูกตัดให้เป็นสายสั้นลง พบสายโซ่กิ่งที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า DP 6 เพิ่มขึ้น

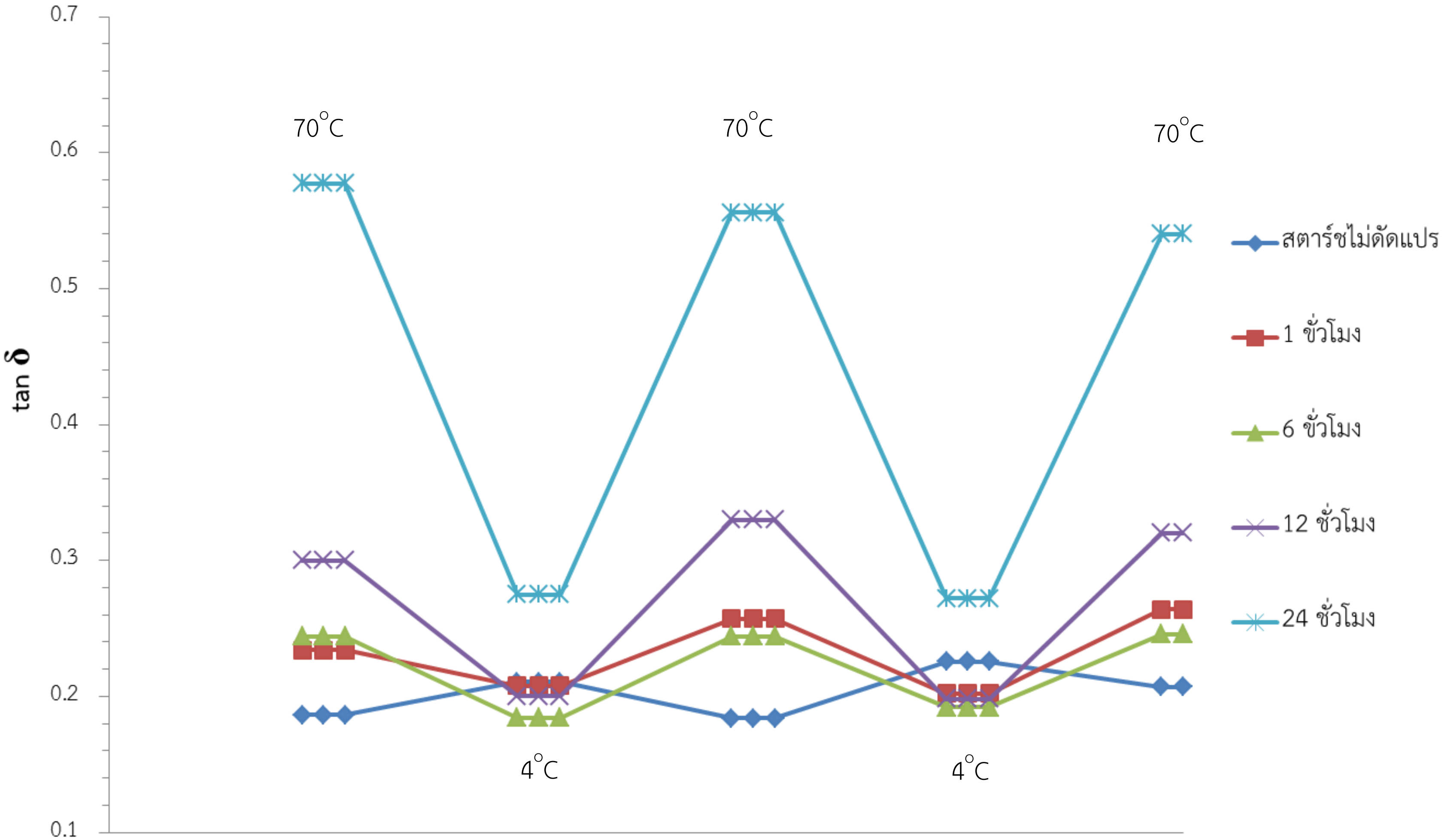
จากการวัดสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของเจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่ได้จากการดัดแปรโดยใช้เวลาต่างๆ (รูปที่ 4.9) พบว่าสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรสามารถเปลี่ยนสถานะจากคล้ายของแข็งเมื่อถูกทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นคล้ายของเหลวเมื่อถูกทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะเมื่อใช้เวลาในการดัดแปร 24 ชั่วโมง แต่ลักษณะการเป็น Thermo-reversible gel จะน้อยลงเมื่อเวลาในการดัดแปรสั้น เนื่องจากการดัดแปรที่ 24 ชั่วโมง มีโซ่กิ่งสายสั้นของแอมิโลเพกตินมากกว่าการดัดแปรที่เวลาอื่นๆ ทำให้เกิดผลึกน้อยลง จึงถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่ายและเปลี่ยนเป็นสถานะคล้ายของเหลวได้ง่ายกว่าการดัดแปรที่เวลาอื่นๆ (Kohyama et al., 2004) และแอมิโลสที่มีสายสั้นลงสามารถเกิดการจัดเรียงตัวเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติและเกิดเป็นเจลได้เร็วกว่า ทำให้สามารถเปลี่ยนเป็นลักษณะคล้ายของแข็งได้ที่อุณหภูมิต่ำ (Goodfellow and Wilson, 1990) ส่งผลทำให้สตาร์ชดัดแปรที่เวลา 24 ชั่วโมง มีสมบัติเป็น Thermo-reversible gel ดีว่าการดัดแปรที่เวลาอื่นๆ

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ใช้เวลาในการดัดแปรต่างๆ พบว่า ค่า ΔH_{retro} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร (ตารางที่ 4.7) โดยสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่า ΔH_{retro} ลดลงมากที่สุด เป็นไปได้ว่าเวลาในการดัดแปรที่นานสุด มีผลทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ α-กลูโคซิดิกของสายแอมิโลเพกติน เป็นโซ่กิ่งสายสั้นเพิ่มขึ้น ผลึกที่เกิดขึ้นมีปริมาณลดลง ทำให้ค่าพลังงานความร้อนในการการหลอมผลึกลดลงมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรที่เวลาอื่นๆ และยังพบว่ามีอุณหภูมิในการเกิดรีโทรเกเดชันสูงขึ้น (T_o, T_p และT_c) ในขณะการดัดแปรที่เวลา 1, 6 และ 12 ชั่วโมง มีค่า ΔH_{retro} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาสมบัติความคงทนของเจลสตาร์ชในการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง ที่พบว่าเจลสตาร์ข้าวเจ้าดัดแปรที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีปริมาณการปลดปล่อยของน้ำที่น้อยกว่าสตาร์ชข้าวไม่ดัดแปร ในขณะที่เจลสตาร์ชดัดแปรที่เวลา 1 และ 6 ชั่วโมงมีการปลดปล่อยน้ำมากกว่าเจลสตาร์ชข้าวไม่ดัดแปร (รูปที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่ายิ่งใช้เวลาในการดัดแปรมาก สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรจะเกิดรีโทรเกรเดชันลดลง และมีสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งดีขึ้น

จากการศึกษาความแข็งแรงของเจล (Gel strength) ของสตาร์ชดัดแปร (40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช, ดัดแปร 24 ชั่วโมง) เปรียบเทียบเจลาติน (160 Bloom) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยเครื่อง Texture-analyzer (ตารางที่ 4.8) พบว่า ลักษณะของเจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรจะมีลักษณะเป็นเจลขุ่น ในขณะที่เจลของเจลาตินจะเป็นเจลใส ซึ่งเจลสตาร์ชดัดแปรจะมีค่าความแข็งแรงของเจลน้อยกว่าเจลาตินที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Hansen et al., 2008; Kaper et al., 2005) โดยเจลของสตาร์ชข้าวดัดแปรที่ความเข้มข้น 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถเทียบเท่ากับความแข็งของเจลเจลาตินความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Van der Maarel และคณะ (2005) ที่ดัดแปรสตาร์ชมันฝรั่งโดยแอมิโลมอลเทสและพบว่าเจลของสตาร์ชดัดแปรที่ความเข้มข้น 5% (โดยน้ำหนักแห้ง) มีความแข็งแรงของเจลเทียบเท่ากับเจลาตินความเข้มข้น 3% (โดยน้ำหนักแห้ง) ดังนั้นจึงนำสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรไปทดแทนเจลาตินในผลิตภัณฑ์ Panna cotta ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ 1.3%



รูปที่ 4.8 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรที่เวลาต่างๆ



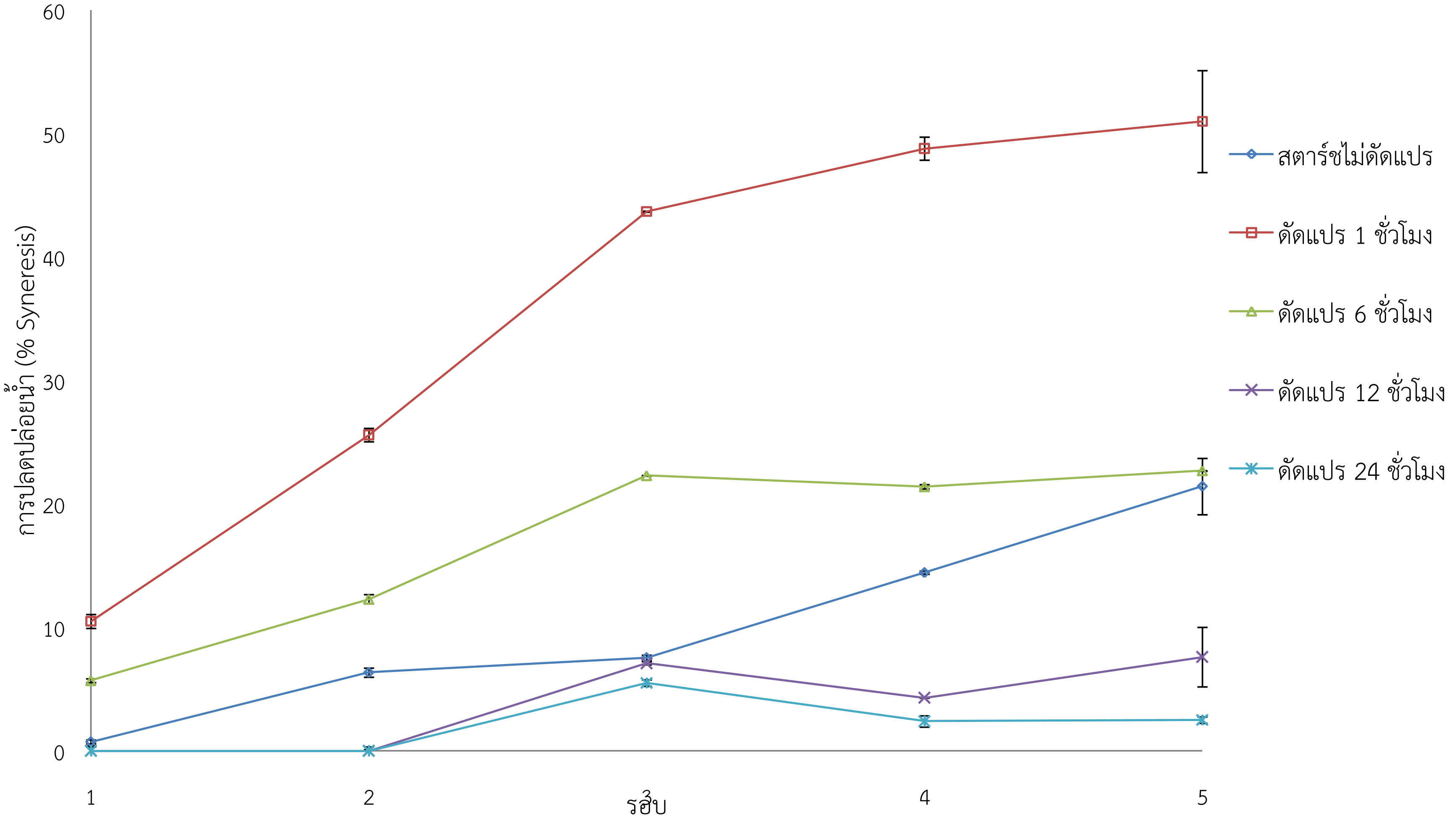
รูปที่ 4.9 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเจ้าที่ไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.7 การเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่างๆ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 14 วัน

ตัวอย่าง	การเกิดรีโทรเกรเดชัน				
	T_O (°C)	T_P (°C)	T_C (°C)	T_C-T_O (°C)	ΔH_{retro} (J/g)
สตาร์ชไม่ดัดแปร	47.73 ± 0.66^{c}	55.94 ± 1.00^{c}	60.39 ± 0.23^{c}	12.66 ± 0.43^{b}	3.51 ± 0.10^{a}
สตาร์ชดัดแปรที่เวลา 1 ชั่วโมง	44.98 ± 0.03^{d}	54.19 ± 0.02^{d}	60.70 ± 0.00^{c}	15.72 ± 0.03^{a}	1.98 ± 0.03^{b}
สตาร์ชดัดแปรที่เวลา 6 ชั่วโมง	49.00 ± 0.57^{c}	57.20 ± 0.28^{b}	65.20 ± 0.42^{b}	16.20 ± 0.99^{a}	2.00 ± 0.14^{b}
สตาร์ชดัดแปรที่เวลา 12 ชั่วโมง	50.95 ± 0.92^{b}	60.95 ± 0.21^{a}	65.70 ± 0.28^{ab}	14.75 ± 0.64^{a}	1.80 ± 0.00^{b}
สตาร์ชดัดแปรที่เวลา 24 ชั่วโมง	53.39 ± 0.02^{a}	61.20 ± 0.00^{a}	66.01 ± 0.01^{a}	12.63 ± 0.04^{b}	1.56 ± 0.08^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[a, b,...] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)



รูปที่ 4.10 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่างๆ

ตารางที่ 4.8 ค่าความแข็งแรงของเจลสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรเปรียบเทียบกับเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยเครื่อง Texture-analyzer

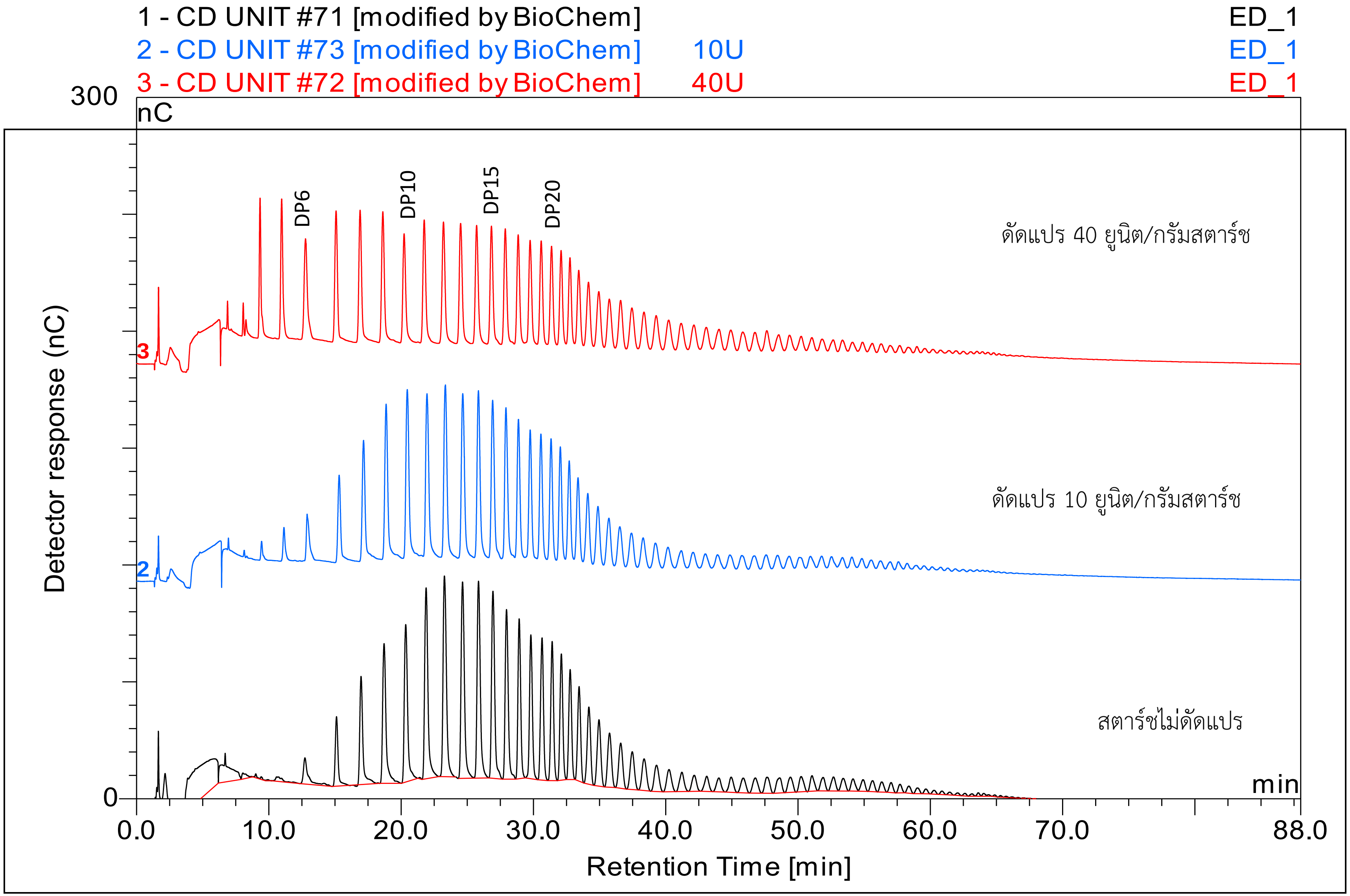
ตัวอย่าง	Force (g)	Distance (mm)	Gel strength (g.mm)
สตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร 5% (w/v)		ไม่สามารถวัดค่าได้	
สตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร 10% (w/v)	5.5 ± 0.7^{f}	4.7 ± 0.2^{c}	25.9 ± 4.4^{f}
สตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปร 15% (w/v)	9.5 ± 0.7^{e}	5.4 ± 0.1^{ab}	51.2 ± 2.8^{e}
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร 5% (w/v)		ไม่สามารถวัดค่าได้	
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร 10% (w/v)		ไม่สามารถวัดค่าได้	
สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปร 15% (w/v)	2.3 ± 0.4^{g}	2.5 ± 0.1^{d}	5.5 ± 0.7^{g}
เจลาติน 1% (w/v)	2.0 ± 0.0^{g}	1.4 ± 0.6^{e}	2.8 ± 1.2^{g}
เจลาติน 2% (w/v)	20.5 ± 0.7^{d}	5.0 ± 0.1^{bc}	102.5 ± 1.6^{d}
เจลาติน 3% (w/v)	67.0 ± 0.0^{c}	5.8 ± 0.1^{a}	390.2 ± 5.8^{c}
เจลาติน 4% (w/v)	97.5 ± 0.7^{b}	5.8 ± 0.1^{a}	566.4 ± 5.5^{b}
เจลาติน 5% (w/v)	120.5 ± 0.7^{a}	5.7 ± 0.0^{a}	683.2 ± 5.7^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

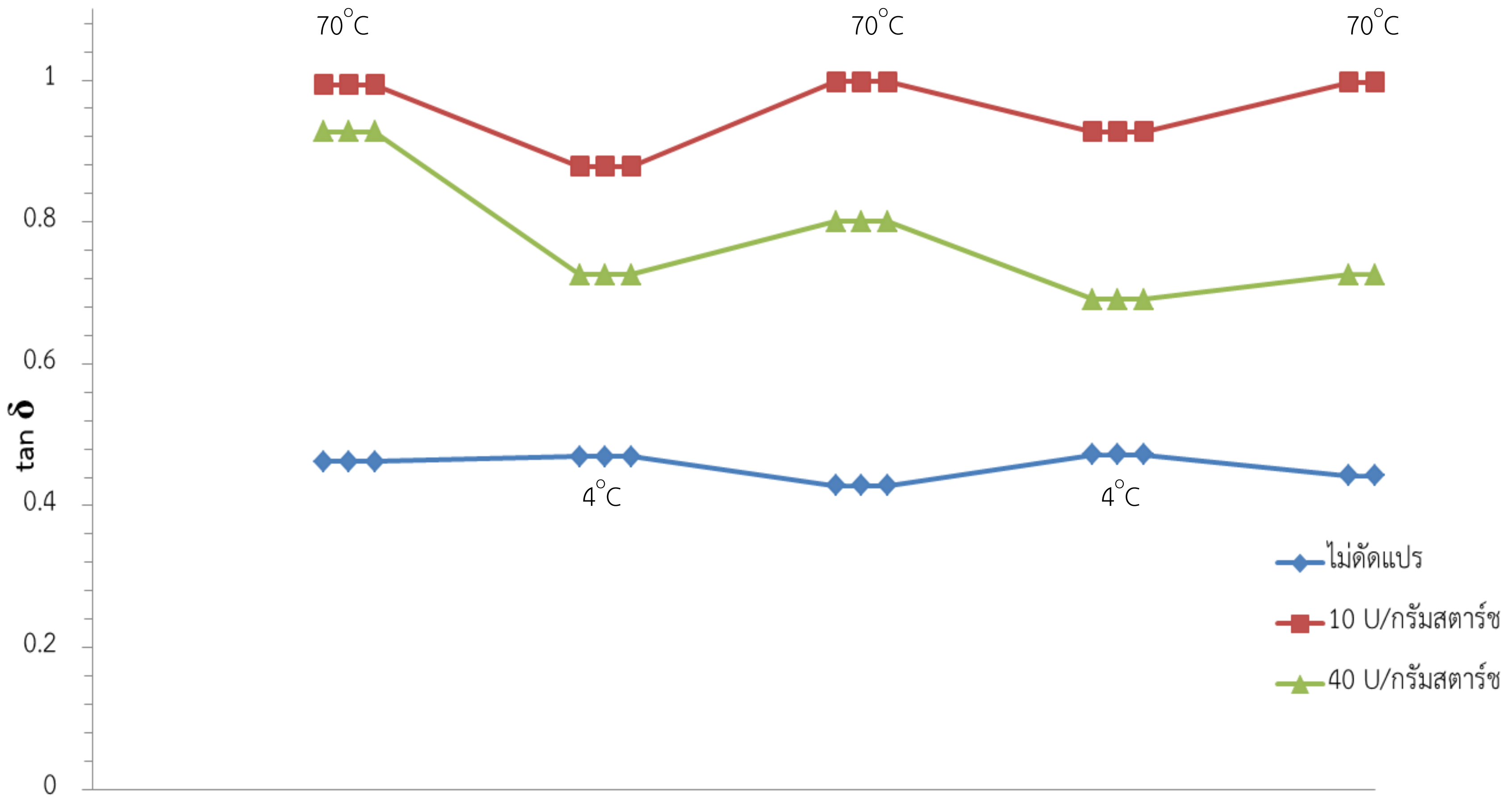
$^{a, b, ...}$ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

4.4 การดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวโดยแอมิโลมอลเทส

การดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวโดยแอมิโลมอลเทสโดยใช้แอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 10 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช และเวลาในการดัดแปร 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับภาวะการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้า และวิเคราะห์การกระจายตัวของสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพคตินของสตาร์ชข้าวเหนียว ด้วยเครื่อง HPAEC-PAD (รูปที่ 4.11) พบว่า สายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเหนียวดัดแปรความเข้มข้น 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีปริมาณสายสั้น (DP ≤ 6) เพิ่มขึ้น ส่วนการดัดแปรความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีปริมาณสายสั้น (DP ≤ 8) เพิ่มขึ้น และ DP 9-20 ลดลง และจากการวิเคราะห์สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเหนียวดัดแปร พบว่าการดัดแปรที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช มีค่า tan δ สูง เมื่อถูกทำให้ร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เจลสตาร์ชสามารถผันกลับเป็นสถานะคล้ายของเหลว (G”>G’) เนื่องจากสายโซ่กิ่งสั้นลง ผลึกที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยลง ง่ายต่อการทำลายผลึกเมื่อให้ความร้อน ทำให้เจลสตาร์ชข้าวเหนียวดัดแปรสามารถหลอมกลับมาเป็นสถานะคล้ายของเหลวได้ง่าย แต่ไม่สามารถเปลี่ยนกลับเป็นสถานะคล้ายของแข็ง (G’>G”) ได้ เมื่อถูกทำให้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส จึงยังคงมีค่า tan δ สูง (รูปที่ 4.12) เป็นไปได้ว่าสตาร์ชข้าวเหนียวเป็นสตาร์ชที่มีแอมิโลสต่ำมาก จึงไม่สามารถเกิดการจัดเรียงตัวเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติของแอมิโลสและเกิดเป็นเจล ดังนั้นจึงไม่สามารถนำสตาร์ชข้าวเหนียวดัดแปรมาเปรียบเทียบความแข็งแรงและนำไปทดแทนเจลาติน อาจกล่าวได้ว่าการดัดแปรสตาร์ชข้าวเหนียวโดยแอมิโลมอลเทส ไม่สามารถปรับปรุงสมบัติของสตาร์ชข้าวเหนียวให้มีสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ได้



รูปที่ 4.11 ลักษณะการกระจายตัวของสายโซ่กิ่งแอมิโลเพกตินของสตาร์ชข้าวเหนียวไม่ดัดแปรและที่ดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4.12 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ของสตาร์ชข้าวเหนียวไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.5 การใช้สตาร์ชข้าวดัดแปรทดแทนเจลาตินในอาหาร

จากการวิเคราะห์สมบัติต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่มีสมบัติตามที่ต้องการพบว่า การดัดแปรสตาร์ชข้าวโดยแอมิโลมอลเทสความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช และดัดแปรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยเฉพาะสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ซึ่งเป็นสมบัติที่คล้ายเจลาติน

จากการใช้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรทดแทนเจลาตินในผลิตภัณฑ์ Panna cotta ด้วยความเข้มข้น 5, 10 และ 15% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เปรียบเทียบกับ Panna cotta ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบประมาณ 1.3% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และวัดค่าความแข็งแรงของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่อง Texture-analyzer (ตารางที่ 4.9) พบว่าสูตร Panna cotta ที่ทดแทนเจลาตินด้วยสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่ความเข้มข้นต่างๆ ยังมีความแข็งแรงต่ำกว่า Panna cotta ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ เนื่องจาก Panna cotta ที่ใช้สตาร์ชดัดแปรทดแทนเจลาตินที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 15% สามารถเทียบเท่าความแข็งแรงกับเจลาติน 1% จากการทดสอบเปรียบเทียบความแข็งแรงของเจลก่อนหน้านี้ ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ทดแทนเจลาตินใน Panna cotta และเปรียบเทียบกับสูตรที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ 1.3% จึงพบว่าความแข็งแรงของ Panna cotta ที่วัดได้มีค่าต่ำกว่า ซึ่งหากเพิ่มความเข้มข้นของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรให้มากกว่า 15% ความแข็งแรงที่วัดได้ อาจมีค่าใกล้เคียงกับ Panna cotta ที่ประกอบด้วยเจลาติน นอกจากนี้ เป็นไปได้ว่าโปรตีนในนมสามารถเกิดเจลได้ ประกอบกับกลไกการเกิดเจลของเจลาติน ซึ่งเกิดจากการจับตัวกันของพันธะไฮโดรเจนแบบ Triple-helix (Karim and Bhat, 2008) ส่งผลให้ Panna cotta มีความแข็งแรงกว่าสูตรที่ใช้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรทดแทนเจลาติน (Fitzsimons, Mulvihill and Morris, 2008)

ตารางที่ 4.9 ค่าความแข็งแรงของ Panna cotta ที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบและที่ใช้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรทดแทนเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆด้วยเครื่อง Texture-analyzer

สูตร Pana cotta	Force (g)	Distance (mm)	Gel strength (g.mm)
สูตรที่มีเจลาติน	8.5 ± 0.71^{a}	4.0 ± 0.17^{b}	33.9 ± 4.27^{a}
ทดแทนด้วยสตาร์ชดัดแปร 5%	2.0 ± 0.00^{c}	3.85 ± 0.07^{b}	7.7 ± 0.14^{c}
ทดแทนด้วยสตาร์ชดัดแปร 10%	3.0 ± 0.00^{c}	3.84 ± 0.02^{b}	11.5 ± 0.07^{c}
ทดแทนด้วยสตาร์ชดัดแปร 15%	5.5 ± 0.71^{b}	4.48 ± 0.12^{a}	24.6 ± 2.53^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

$^{a, b,...}$ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สตาร์ชข้าวเจ้าและข้าวเหนียวที่ใช้ในการทดลอง เป็นสตาร์ชบริสุทธิ์ (โปรตีน<1%) มีปริมาณไขมันต่ำกว่า 0.5% และมีปริมาณแอมิโลสปรากฏ 16.45 และ 2.27% ตามลำดับ โดยแอมิโลมอลเทสหลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HisTrap affinity column พบว่ามีค่าแอกทิวิตีจำเพาะเท่ากับ 42.7 ยูนิต/โปรตีน 1 มิลลิกรัม ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 29.9 เท่าของเอนไซม์หยาบ มีผลผลิต 83.9 % และเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 84 kDa

ความเข้มข้นของแอมิโลมอลเทสที่ใช้ในการดัดแปรสตาร์ชข้าวที่เพิ่มขึ้น (20 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช) มีผลทำให้สตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรมีปริมาณแอมิโลสปรากฏเพิ่มขึ้น การกระจายตัวของสายโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสายสั้น (DP ≤ 8) เพิ่มขึ้น และ DP 9-20 ลดลง มีสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ค่า ΔH_{retro} ต่ำลง และมีสมบัติความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งดีขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้น 10 ยูนิต/กรัมสตาร์ช ไม่สามารถปรับปรุงโครงสร้างและสมบัติของสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรได้

จากการศึกษาผลของเวลาในการดัดแปร พบว่าเมื่อใช้เวลาในการดัดแปรสตาร์ชข้าวเจ้าเพิ่มขึ้น ปริมาณแอมิโลสปรากฏเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การกระจายตัวของโซ่กิ่งของแอมิโลเพคตินสายสั้นเพิ่มขึ้น และ DP 9-20 ลดลง สตาร์ชดัดแปรมีสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ชัดเจนที่เวลา 24 ชั่วโมง มีอุณหภูมิที่ใช้ในการหลอมผลึกของเกิดรีโทรเกรเดชันสูงขึ้น ค่า ΔH_{retro} ต่ำลง และมีความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็งสูงดีขึ้น

จากการทดสอบความแข็งแรงของเจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรที่ความเข้มข้น 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาติน พบว่าเจลสตาร์ชข้าวเจ้าดัดแปรความเข้มข้น 15% (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีความแข็งแรงเทียบเท่ากับ เจลาตินความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเมื่อนำสตาร์ชดัดแปรไปทดแทนเจลาตินใน Panna cotta พบว่า Panna cotta ที่ใช้สตาร์ชดัดแปร (15%) มีความแข็งแรงน้อยกว่า Panna cotta ที่มีเจลาติน (1.3%) เป็นส่วนประกอบ

นอกจากนี้ยังพบว่าสตาร์ชข้าวเหนียวดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ยูนิต/กรัมสตาร์ช เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการกระจายตัวของโซ่กิ่งของแอมิโลเพกตินสายสั้นเพิ่มขึ้น แต่เจลสตาร์ชไม่แสดงสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรดัดแปรสตาร์ชโดยแอมิโลมอลเทสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นเพื่อเร่งการเกิดปฏิกิริยา Disproportionation ให้เกิดดีขึ้น เช่น Branching enzyme เป็นต้น

2) ผลิตแอมิโลมอลเทสจากยีสต์ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ดัดแปรสตาร์ชและนำไปในผลิตภัณฑ์อาหาร

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2550. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กุลพัชร์ กนกวัฒนาวรรณ. 2011. May Made: Sweet book. กรุงเทพมหานคร: Prima Publishing Co., Ltd.

จิรารัตน์ ทัตติยกุล. 2554. วิทยากระแสของอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

บุญทิวา นิลจันทร์. 2548. การศึกษาสมบัติเคมีฟิสิกส์ของฟลาวและสตาร์ชข้าวจากข้าวพันธุ์ต่างๆของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปิยรัตน์ หนูสุก. 2546. การประเมินเชิงปริมาณความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม (Carbohydrate-Modifying Enzyme in Industry). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, กล้าณรงค์ ศรีรอต, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, ไชยรัตน์ เพ็ชรชลานุวัฒน์, รุ่งทิวา วันสุขศรี และบุญทิวา นิลจันทร์. 2546. การศึกษาคุณสมบัติของแป้งข้าวพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยเพื่อเป็นกลยุทธ์ในการสร้างผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม. ในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

วรรณา ตุลยธัญ. 2551. เคมีอาหารของคาร์โบไฮเดรต. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรอนงค์ นัยวิกุล. 2550. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุตสาหกรรม, กระทรวง. 2529. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์แป้งข้าวเหนียว. มอก. ที่ 639-2529. กรุงเทพมหานคร. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

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: 969-973.

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 22: 45–53.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. 1998. Starch granule: Structure and biosynthesis. International Journal of Biological Macromolecule 23: 85-112.

Cagampang, G. B., Cruz, L. J., Espiritu, S. G., Santiago, R. G., and Juliano, B. O. 1966. Studies on the extraction and composition of rice proteins. Cereal Chemistry 43: 145-155.

Chang, S. M., and Liu, L. C. 1991. Retrogradation of rice starches studied by differential scanning calorimetry and Influence of sugars, NaCl and lipids. Journal of Food Science 56: 564-566.

Charoenrein, S., Tatirat, O., and Muadklay, J. 2008. Use of centrifugation–filtration for determination of syneresis in freeze–thaw starch gels. Carbohydrate Polymers 73: 143–147.

Charoenrein, S., and Preechathammawong, N. 2012. Effect of waxy rice flour and cassava starch on freeze -thaw stability of rice starch gels. Carbohydrate Polymers 90: 1032-1037.

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-α-glucanotransferase. Food Hydrocolloids 23: 2403–2409.

Chrastil, J. 1990. Chemical and physiochemical changes of rice during storage at different temperature. Journal of Cereal Science 11: 71-85.

Dodraszczyk, B.J., and Morgenstern, M.P. 2003. Rheology and the breadmaking process.

Journal of Creal Science 38: 229-245.

Eliasson, A. C. 1985. Retrogrduation of starch as measured by differential scanning calorimetry. In R. D. Hill, L. Munck, (Eds.), New Approaches to Research on Cereal Carbohydrates. pp.93-98. Amsterdam: Elsevier.

Eliasson, A. C., and Ljunger, G. 1988. Interactions between amylopectin and lipid additives during retrogradation in a model system. Journal of the Science of Food and Agriculture 44: 353-361

Ferrero, C., Martino, M. N., and Zaritzky, N. E. 1994. Corn starch-xanthan gum interaction and its effect on the stability during storage of frozen gelatinized suspensions. Starch/Stärke 46: 481–498.

Fitzsimons, S. M., Mulvihill, D. M., and Morris, E. R. 2008. Segregative interactions between gelatin and polymerised whey protein. Food Hydrocolloids 22: 485 – 491.

Fredrikson, H. K., Silverio, J., Anderson, R., Eliasson, A. C., and Aman, P. 1998. The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. Carbohydrate Polymers 35: 119–134.

Fruton, J. S., and Simmonds, S. 1958. General Biochemistry. 2nd ed. John Wiley, New York.

Goodfellow, B., and Wilson, R.H. 1990. A Fourier transform IR study of the gelation of amylose and amylopectin. Biopolymers 30: 1183-1189.

Hansen, M.R., Blennow, A., Pedersen, S., Norgaard, L., and Engelsen, S. 2008. Texture and chain structure of amylomaltase-modified starches compared gelatin. Food Hydrocolloids 22: 1551-1566.

Hansen, M.R., Blennow, A., Pedersen, S., and Engelsen, S. 2009. Enzyme modification of starch with amylomaltase results in increasing gel melting point. Carbohydrate Polymers78: 72–79.

Hizukuri, S. 1986. Polymodol distribution of the chain length of amylopectins and its significance. Cabohydrate Research 147: 342-347.

Jacobs, H., and Delcour, J. A. 1998. Hydrothermal modification of granular starch, with retention of the granular structure: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 2895-2905.

Jacobson, H.R., and BeMiller, J.N. 1998. Method of determining the rate and extent of accelerated starch retrogradation. Cereal Chemistry 75: 22-29.

Jane, J., Chen, Y. Y., Lee, L. F., McPherson, A. E., Wong, K. S., Radosavljevic, M., and Kasemsuwan, T. 1999. Effect of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. Cereal Chemistry 76: 629-637.

Juliano, B. O. 1971. A simplified assay for milled-rice amylose. 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.

Karim, A. A., Norziah, M. H., and Seow, C. C. 2000. Methods for the study of starch retrogradation. Food Chemistry 71: 9-36.

Karim, A. A., and Bhat, R. 2008. Gelatin alternatives for the food industry: Recent developments, challenges and prospects. Trends in Food Science & Technology 19: 644 – 656.

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.

Kohyama. K., Matsuki. J., Yasui, T., and Sasaki. T. 2004. A differential thermal analysis of the gelatinization and retrogradation of wheat starches with different amylopectin chain lengths. Carbohydrate Polymers 58: 71–77.

Kuakpetoon, D., and Wang, Y. J. 2006. Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content. Carbohydrate Research 341: 1896–1915.

Lai, L.S., and Kokini, J. L. 1991. Physiochemical changes and rheological properties of starch during extrusion (a review). Biotechnology Progress 7: 251 266.

Lanier, T. C. 1992. Measurement of surimi composition and function properties. In T.C., Lanier and C.M., Lee. (eds.). Surimi Technology. New York: Marcel Dekker, Inc.

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 Polymers 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 4-α-glucanotransferase. International Journal of 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 Polymers 6: 213–244.

Lii, C. Y., Tsai, M. L., and Tseng, K. H. 1996. Effect of amylose content on the rheological properties of rice starch. Cereal Chemistry 73: 415-420.

Lumdubwong, N., and Seib, P. A. 2000. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour. Journal of Cereal Science 31: 6374.

Miles, M. J., Morris, V. J., Orford, P. D., and Ring, S.G. 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. Carbohydrate Research 135: 271-281.

Monod, J., and Torriani, A. M.. 1950. Amylomaltase of *Escherichia coli*. Annales de Institut Pasteur (Paris). 78: 65-77.

Morrison, N. A., Clark, R. C., Chen, Y. L., Talashek, T., and Sworn, G. 1999. Gelatin alternatives for the food industry. In K. Nishinari, F. Kremer, & G.Lagaly (Eds.), Physical chemistry and industrial application of gellan gum. pp. 127-131. Heidelberg: Springer-Verlag.

Noosuk, P., Hill, S. E., Pradipasena, P., and Mitchell, J. R. 2003. Structure-viscosity relationships for Thai rice starches. Starch/Stärke 55: 337-344.

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 maritima*: Effects on structural and physical properties. Journal of Food Science 73: C158-166.

Park, J. H., Kim, H. J., Kim, Y. H., Cha, H. J., Kim, Y. W., Kim, T. J., Kim, Y. R., and Park, K. H. 2007. The action mode of *Thermus aquaticus* YT-I 4-α-glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin. Carbohydrate Polymers 67: 164–173.

Piyachomkwan, K. Chotineeranat, S. Kijkhunasatain, C., and Sriroth, K. 2000. Effect of drought on structure and hydrating properties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 1-3 November 2000. Kanchanaburi, Thailand.

Russell, P. L., 1983. A kinetic study of bread staling by differential scaning calorimetry and compressibility measurements : The effect of added monoglyceride. Journal of Cereal Science 1: 297-303.

Russell, P. L. 1987. Aging of gels from starches of different amylose/amylopectin content studied by differential scanning calorimetry. Journal of Cereal Science 6: 147-158.

Saehu, S., Srisimarat, W., Prousoontorn, M. H., and Pongsawasdi, P. 2013. Transglucosylation reaction of amylomaltase for the synthesis of anticariogenic oligosaccharides. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 88: 77– 83.

Schreiber, R., and Gareis, H. 2007. The raw material 'Ossein'. In. R. Schreiber and H. Gareis.(eds.). Gelatin Handbook: Theory and Industrial Practice. pp. 63-71. Weinham: Wiley-VCH.

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 (TSαGTase). Journal of Food Science 72: C331-336.

Shi, Y. C., and Seib, P. A. 1992. The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. Carbohydrate. Research 227: l3l- 145.

Sievert, D., and Wiirsch, P. 1993. Amylose chain association based on differential scanning calorimetry. Jourmal of Food Science 58: 1332- 1345.

Slade, L., and Levine, H. 1987. Recent advances in starch retrogradation. In S. S. Stivala, V. Crescenzi, I. C. M. Dea (Eds.), Indusfrial polysaccharides-ihe impact of biotechnology and advanced methodologies. pp. 387-430. New York: Gordon and Breanch.

Srisimarat, W., Powviriyakul, A., Kaulpiboon, J., Krusong, K., Zimmermann, W., and Pongsawasdi, P. 2010. A novel amylomaltase 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 Method in Food Process Engineering. East Lansing, Michigan, USA: Freeman Press.

Swinkels, J. J. M. 1985. Composition and properties of commercial native starches. Starch/Stärke 37: 1-5.

Takaha, T., and Smith, S. M. 1999. The function of 4-α–glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 16: 257-280.

Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T., and Okada, S. 1999. *Thermus aquticus* ATCC 33923 amylomaltase 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., Euverink, 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 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.

Varavinit, S., Anuntavuttikul, S., and Shobsngob, S. 2000. Influence of freezing and thawing techniques on stability of sago and tapioca starch pastes. Starch/Stärke 52: 214–217.

Whistler, R. L., and BeMiller, J. N. 2009. Starch: Chemistry and Technology. pp. 569–578. 3rd ed. New York: Academic Press,

Xavier, K. B., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W., and Santos, H. 1999. Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litosalis*: Purification and characterization of key enzymes. Journal of Bacteriology 181: 3358-3367.

Zeleznak, K. J., and Hoseney, R. C. 1987. The transition in starch. Cereal Chemistry 64: 121-124.

Zobel, H. F. 1964. X-ray analysis of starch granules. In: Whistler RL, (ed.). Methods in Carbohydrate Chemistry. pp.109–113. New York: Academic Press.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

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

1) การเตรียม Luria Bertani (LB) medium ที่เติม Amplicillin

ละลาย Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม ในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water ; DI) และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง Autoclave (Kokusan Ensinki, H-8LL, Japan) แล้วจึงเติม Amplicillin ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2) การเตรียม Solid Luria Bertani (LB) medium plate ที่เติม Amplicillin

ละลาย Tryptone 10 กรัม, Yeast extract 5 กรัม, NaCl 5 กรัม และ Agar 5 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยเครื่อง Autoclave แล้วเติม Amplicillin ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนเทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเลี้ยง

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

1) สารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ละลาย KH_2PO_4 17.01 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร และละลาย K_2HPO_4 43.55 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร จากนั้นใช้สารละลาย KH_2PO_4 เพื่อปรับค่า pH ของสารละลาย K_2HPO_4 ให้เป็น 7.4

2) สารละลาย Extraction buffer

ผสมสารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร, Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ pH 8.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ β-Mercaptoethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในขวดวัดปริมาตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เป็น 500 มิลลิลตร

3) สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลาย NaCl 2.13 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

ข.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Srisimarat et al., 2010)

1) Binding buffer

ละลาย NaCl 14.61 กรัม, Imidazole 0.68 กรัม, สารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในน้ำบริสุทธิ์ (Ultrapure water; UP) และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

2) Elution buffer

ละลาย NaCl 2.92 กรัม, Imidazole 3.40 กรัม, สารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำ UP และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3) Stripping buffer

ละลาย NaCl 2.92 กรัม, เติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ สารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำ UP และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4) Recharge solution (สารละลาย Nickel sulfate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์)

ละลาย Nickel sulfate 0.744 กรัม ในน้ำ UP และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

5) Ethanol ความเข้มข้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ผสม Absolute ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในน้ำ UP และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

หมายเหตุ: สารเคมีทุกตัวจะต้องกรองผ่านกระดาษกรอง Polyethersulfone (PES) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Whatman, England) ก่อนการนำไปใช้

ข.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Srisimarat et al., 2010)

1) Recharge ประจุของคอลัมน์ (HisTrap affinity column (Amersham Bioscience HisTrap FF^{TM}, HisTrap FF^{TM} DEAE FF^{TM} and HiPrep Phenyl FF^{TM} (High Sub) 16/10)) ใหม่ทุกครั้งก่อนการใช้งาน ด้วย Stripping buffer ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร หรือจนกว่าคอลัมน์เปลี่ยนจากสีฟ้าเขียวเป็นสีขาว

2) ชะคอลัมน์ด้วย Binding buffer ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยน้ำ UP 5-10 มิลลิลิตร

3) เติมประจุใหม่ให้คอลัมน์ด้วย Recharge solution ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร หรือจนกว่าคอลัมน์เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีฟ้าเขียว จากนั้นชะด้วยน้ำ UP อีก 5-10 มิลลิลิตร เพื่อไล่สารละลาย Recharge ที่อาจจะค้างอยู่ในคอลัมน์

4) Equilibrate คอลัมน์ด้วย Binding buffer ปริมาตร 5-10 มิลลิลิตร แล้วนำเอนไซม์หยาบมาผ่านคอลัมน์ จากนั้นชะด้วย Binding buffer จนกว่าค่า OD_{280} ของสารละลายที่ผ่านคอลัมน์จะมีค่าเป็นศูนย์ (ใช้ Binding buffer เป็น blank)

6) ชะคอลัมน์ด้วย Elution buffer จนสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มีค่า OD_{280} เป็นศูนย์ (ใช้ Elution buffer เป็น blank) และเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์

7) นำตัวอย่างสารละลายที่เก็บจากข้อ 6) ไปตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธี
Starch transglycosylation activity (ภาคผนวก ค.1)

8) นำสารละลายทั้งหมดที่ตรวจสอบแล้วว่ามีแอกทิวิตี ไป Dialyze ใน Potassium phosphate buffer, pH 7.4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ด้วยเมมเบรนชนิดเดียวกับที่ทำ Dialyze เอนไซม์หยาบ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อกำจัด Imidazole หลังขั้นตอนนี้เอนไซม์ที่ได้หลังการ Dialyze คือเอนไซม์บริสุทธิ์

9) เก็บคอลัมน์โดยการชะด้วยน้ำ UP 10-20 มิลลิลิตร แล้วชะด้วย Ethanol ความเข้มข้น 20% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์สมบัติเอนไซม์

ค.1 Starch transglycosylation activity (ดัดแปลงวิธีจาก Park et al., 2007)

สารเคมี

1) สารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 6.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

ละลาย KH_2PO_4 0.34 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร และ ละลาย K_2HPO_4 0.44 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นใช้สารละลาย KH_2PO_4 เพื่อปรับค่า pH ของสารละลาย K_2HPO_4 ให้ได้ pH เป็น 6.0

2) สารละลาย Soluble starch ความเข้มข้น 0.2% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลาย Soluble starch 0.05 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

3) สารละลาย Maltose ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลาย Maltose 0.25 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

4) สารละลายไอโอดีน (0.02% I_2 (w/v), 0.2% KI (w/v))

ละลาย Potassium iodide (KI) 0.2 กรัม และ Iodine (I_2) 0.02 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีทดสอบ

1) เตรียมหลอดทดลองตามจำนวนของการเก็บหลอดทดลองจากการชะคอลัมน์ด้วยสารละลาย Elution buffer (การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในภาคผนวก ข)

2) เติมสารเคมีในหลอดทดลองแต่ละหลอด ดังต่อไปนี้

ก.	สารละลาย Potassium phosphate buffer, pH 6.0	=	600	ไมโครลิตร
ข.	สารละลาย Soluble starch	=	250	ไมโครลิตร
ค.	สารละลาย Maltose	=	50	ไมโครลิตร

3) นำหลอดทดลองไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4) เติมสารละลายจากการชะด้วย Elution buffer ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 2 หลอดละ 100 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5) หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที

6) ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายไอโอดีน 900 ไมโครลิตร

7) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายของน้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและสารละลายไอโอดีน 900 ไมโครลิตร เป็น blank ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Beckman, DU Series 650, USA)

หมายเหตุ เตรียมตัวควบคุม (Control) โดยเตรียมสารละลายดังข้อ 2) แต่เปลี่ยนสารละลาย ข้อ 4) เป็น Elution buffer ที่ไม่ผ่านคอลัมน์

8) คำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ เอนไซม์ 1 หน่วย (U; ยูนิต) คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้สีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างสารละลายไอโอดีนและสารละลายแป้งลดลง 1% ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที)

<u>ตัวอย่างการคำนวณแอกทิวิตีของเอนไซม์</u>

สมมติให้ ค่า A_{600} ของ Control = 0.450

ค่า A_{600} ของ Elution buffer ที่ชะผ่านคอลัมน์ = 0.255

เพราะฉะนั้น % Reduction = $\frac{0.450-0.255}{0.450}$X100 = 43.33%

เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 10 นาที

ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา = 100 µl หรือ 0.1 ml

เพราะฉะนั้นแอกทิวิตีของสารละลายคิดเป็น 43.33 U/ml

ค.2 ปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 (Bradford, 1976)

สารเคมี

1) Bradford stock solution

ผสม Coomassie brilliant blue R-250 350 มิลลิกรัม, 95% Ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ สารละลาย 85% Phosphoric acid ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กวนทิ้งไว้บน Magnetic stirrer ข้ามคืน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 (Whatman, England) แล้วเก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2) Bradford reagent : Bradford working buffer

ผสม Bradford stock solution ปริมาตร 30 มิลลิลิตร, 95% Ethanol ปริมาตร 15 มิลลิลิตร, สารละลาย 85% Phosphoric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 425 มิลลิลิตร

วิธีทดลอง

1) สร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (สัดส่วนตามตารางที่ ค.1) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Beckman, DU Series 650, USA) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

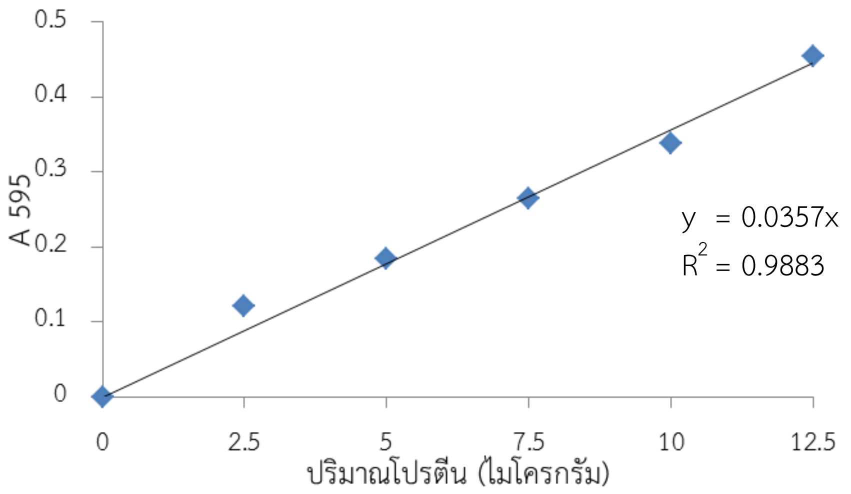
ตารางที่ ค.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัม)	สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) (ไมโครลิตร)	Phosphate buffer, pH 7.4, 50 mM (ไมโครลิตร)	Bradford reagent (มิลลิลิตร)
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

2) เติมเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองที่มี Bradford reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

3) คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ ค.1)

จากสมการ x = ปริมาณโปรตีน (ไมใครกรัม) และ y = ค่า A_{595}



รูปที่ ค.1 กราฟปริมาณโปรตีนมาตรฐาน

ค.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (Srisimarat et al., 2010)

สารเคมี

1) สารละลาย Tris-HCl, pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

ละลาย Tris (Hydroxymethyl)-aminomethane 18.2 กรัม ด้วยน้ำ DI และปรับ pH ด้วยสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้ได้ pH 8.8 และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI

2) สารละลาย Tris-HCl, pH 6.8 ความเข้มข้น 1 และ 0.5 โมลาร์

ละลาย Tris (Hydroxymethyl)-aminomethane 12.1 กรัม สำหรับความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ 6.1 กรัม สำหรับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ด้วยน้ำ DI และปรับ pH ด้วยสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ให้ได้ pH 6.8 และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI

3) สารละลาย SDS (Sodium dodecyl sulfate) ความเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลาย Sodium dodecyl sulfate 10 กรัม ด้วยน้ำ DI ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4) สารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 50% (ปริมาตรต่อปริมาตร)

นำ 100% Glycerol ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ DI

5) สารละลาย Bromophenol blue ความเข้มข้น 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลาย Bromophenol blue 0.1 กรัม ในน้ำ DI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กวนจนละลายหมด แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, England)

6) สารละลาย 2-Mercaptoethanol

7) SDS dye

ผสมสารละลาย Tris-HCl, pH 6.8 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 0.6 มิลลิลิตร, สารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 50% 5 มิลลิลิตร, สารละลาย SDS ความเข้มข้น 10% 2 มิลลิลิตร, สารละลาย Bromophenol blue ความเข้มข้น 1% 1 มิลลิลิตร, สารละลาย 2-Mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร และน้ำ DI 0.9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8) Coomassie gel stain

ละลาย Coomessie Blue R-250 1 กรัม ด้วย Methanol 450 มิลลิลิตร และ Glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำ DI

9) Coomassie gel destain

ผสม Methanol 100 มิลลิลิตร, Glacial acetic acid 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำ DI

การเตรียมเจล

1) เตรียมสารละลายสำหรับ 7.5% Separating gel และ 5% Stacking gel โดยใช้ส่วนประกอบที่แสดงในตารางที่ ค.2

ตารางที่ ค.2 ปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียม 7.5% Separating gel และ 5% Stacking gel (สำหรับ 1 gel)

สารเคมี	7.5% Separating gel	5% Stacking gel
Solution A : 40% Acrylamide	0.705 ml	0.16 ml
Solution B : 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 ml	-
Solution C : 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.25 ml
H_2O	1.74 ml	0.825 ml
10% Ammoniumpersulfate	50 µl	12.5 µl
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminoethane (TEMED)	5 µl	1.5 µl
Total volume	3.74 ml	1.25 ml

2) เตรียม Electrophoresis buffer โดยละลาย Tris 3 กรัม, Glycine 14.4 กรัม, SDS 1 กรัม ในน้ำ DI และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้น 10X ก่อนนำไปใช้จะต้องเจือจางเป็น 1X ในปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3) ยึดแผ่นแม่แบบที่ประกอบด้วยแผ่นกระจกกับแผ่นที่ใช้เตรียมเจลให้แน่น มีแผ่นพลาสติกสอดกั้นกระจกเพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับเทเจล ทดสอบการรั่วด้วยน้ำกลั่น และซับน้ำออก

4) เทสารละลายสำหรับ 7.5% Separating gel ลงในแม่แบบให้เหลือพื้นที่ประมาณ 1 นิ้ว แล้วเทน้ำ DI ตาม ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เจลในส่วน Separating gel จะแข็งตัว แล้วจึงเทน้ำ DI ที่เติมลงไปออก

5) เทสารละลายสำหรับ 5% Stacking gel จนเต็มพื้นที่ที่เหลืออยู่จากชั้น Separating gel แล้วปักโคมบ์ (comb) เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับการเติมตัวอย่าง ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เจลในส่วน Stacking gel จะแข็งตัว แล้วดึงโคมบ์ออก

6) นำเจลที่แข็งตัวแล้วออกจากแม่แบบและนำไปติดตั้งเข้ากับชุด Electrophoresis โดยเติม Electrophoresis buffer ที่เตรียมไว้ลงในอ่างบัฟเฟอร์จนท่วมแผ่นเจล

การเตรียมสารละลายเอนไซม์

ผสมเอนไซม์กับ SDS dye ในอัตราส่วน 4:1 แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด ประมาณ 5 นาที

การทำ Gel Electrophoresis

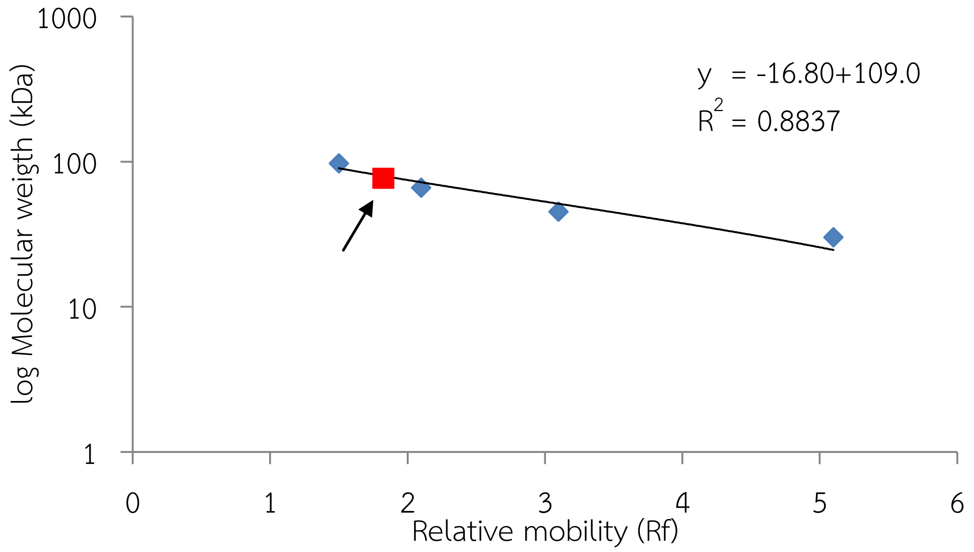
ทำการโหลดตัวอย่างโดยมี Standard protein marker, สารละลายเอนไซม์ทั้งเอนไซม์หยาบและเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ ลงในหลุมเจลจากการปักโคมบ์ ผ่านกระแสไฟฟ้าในการทำ Gel Electrophoresis ประมาณ 20-25 mA จนสังเกตเห็นว่าแถบสีอยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร จึงปิดการให้กระแสไฟฟ้า

การติดตามแถบสีโปรตีน

นำแผ่นเจลออกจากกระจกแล้วนำไปย้อมสีด้วย Coomassie gel stain เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นเท Coomassie gel stain ออก แล้วเติมสารละลาย Coomassie gel destain เปลี่ยนถ่ายสารละลาย Coomassie gel destain จนกว่าจะเห็นว่าสีย้อมที่ติดบนแผ่นเจล ออกหมด เหลือไว้เพียงแถบสีของ Standard protein marker สารละลายเอนไซม์ทั้งเอนไซม์หยาบและเอนไซม์บริสุทธิ์ คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากสมการกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ค.2)

จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่าง log MW และ Rf

เมื่อ y = ขนาดโมเลกุล และ x = ระยะการเคลื่อนที่ของแถวโปรตีน (Rf)



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของแอมิโลมอลเทส

1 = Phosphorylase b (MW = 97 kDa)

2 = Bovine serum albumin (MW = 66 kDa)

3 = Ovalbumin (MW = 45 kDa)

4 = Carbonic anhydrase (MW = 30 kDa)

หมายเหตุ ลูกศร แสดงถึง น้ำหนักโมเลกุลของแอมิโลมอลเทส

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์สมบัติของสตาร์ชข้าว

ง.1 ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl (ดัดแปลงวิธีจาก AOAC, 2005, section 32.1.22)

วัสดุและอุปกรณ์

1) ชุดย่อยโปรตีน (Protein digestion set) ประกอบด้วย
   1.1) Digestion unit (BUCHI, K-424, Switzerland)
   1.2) Scrubber (BUCHI, B-414, Switzerland)
2) เครื่องสกัด/กลั่นโปรตีน (Protein distillation) (BUCHI, B-324, Switzerland)
3) หลอดย่อย (Digestion tube)

สารเคมี

1) สารละลายกรด Boric ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร)
2) สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 45% (น้ำหนักต่อปริมาตร)
3) สารละลายกรด HCl ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
4) สารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น
5) Catalyst : Selenium agent mixture
6) Indicator (Methylene blue : Methyl red) (อัตราส่วน 1: 2)

วิธีทดลอง

1) เปิดชุดย่อยโปรตีนก่อนประมาณ 15 นาที เพื่ออุ่นเครื่อง ในขณะที่ชั่งตัวอย่างสตาร์ชข้าวให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม (รู้น้ำหนักแน่นอน) ลงบนกระดาษกรอง เบอร์ 41 (Whatman, England) ห่อกระดาษกรองแล้วใส่ลงในหลอดย่อย

2) เติม Catalyst ประมาณ 5 กรัม ลงในหลอดย่อย

3) เติมสารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย

4) ทำ Blank โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง

5) ต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับชุดย่อยโปรตีน ย่อยจนได้สารละลายใสสีน้ำตาลแดง (ประมาณ 20-40 นาที) โดยตรวจสอบลักษณะสารในหลอดย่อยเป็นระยะๆ

6) ปิดชุดย่อยโปรตีน แล้วจึงแยกหลอดย่อยออกมาวางไว้ในตู้ดูดควัน ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

7) เติมสารละลายกรด Boric ความเข้มข้น 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ เติม Indicator 2-3 หยด เพื่อรองรับสารที่กลั่นได้จากหลอดย่อย (สารละลายที่เติม Indicator แล้วจะมีสีม่วงแดง)

8) กลั่นตัวอย่างโดย

8.1) Preheat เครื่องกลั่นก่อนใช้โดยนำหลอดย่อยที่สะอาด เติมน้ำกลั่นประมาณ 3 ใน 4 ของหลอด ต่อเข้ากับเครื่องแล้วเลือก “Preheat mode”

8.2) ทำความสะอาดชุดกลั่นโดยนำหลอดย่อยที่สะอาดต่อเข้ากับเครื่องแล้วเลือก “Clean mode”

8.3) เริ่มกลั่นตัวอย่างโดยนำหลอดย่อยที่ได้จากข้อ 7 ต่อเข้ากับเครื่องและนำขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายกรด Boric จากข้อ 7 ต่อเข้ากับเครื่องด้านนอกที่จะรองรับสารที่กลั่น เลือก “Digestion mode” และกำหนดภาวะกลั่นดังนี้

- น้ำกลั่น : 50 มิลลิลิตร
- สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 45% : 60 มิลลิลิตร
- เวลาที่ใช้ในการกลั่น : 5 นาที
- Steam 100%
- Aspiration : SAM

ในระหว่างการกลั่นจะเกิดก๊าซแอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งจะถูกจับไว้ด้วยสารละลายกรด Boric ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว ทำการกลั่นจนได้สารละลายทั้งหมดประมาณ 200 มิลลิลิตร

9) นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ ที่ได้จากการกลั่นไปไทเทรตด้วยสารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน) จนกระทั่งถึงจุดยุติ (สารละลายสีม่วงแดง) คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน}(\%) = \frac{(A\text{-}B) \times C \times 1.4}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน } (\%) = \text{ปริมาณไนโตรเจน } (\%) \times 5.95$$

เมื่อ A = ปริมาตรของสารละลาย HCl ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง

B = ปริมาตรของสารละลาย HCl ที่ใช้ในการไทเทรต blank

C = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย HCl

ง.2 ปริมาณความชื้น (Moisture content) (ดัดแปลงวิธีจาก AOAC, 2005, section 32.1.03)

1) อบถ้วยอลูมิเนียมที่ล้างสะอาดในตู้อบลมร้อน (WTB Binder, E53, Germany) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นใน Desiccator ก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก

2) ชั่งตัวอย่างสตาร์ชประมาณ 2 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ในถ้วยอลูมิเนียม

3) อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมตัวอย่างในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก

4) อบตัวอย่างซ้ำอีก 30 นาที ทิ้งให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักและอบซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่หรือต่างไม่เกิน 0.1% (ทศนิยมตำแหน่งที่ 3)

5) คำนวณปริมาณความชื้นจากสมการ

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

เมื่อ W = น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

W_1 = น้ำหนักของตัวอย่าง + น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมก่อนอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของตัวอย่าง + ถ้วยอลูมิเนียมหลังอบ (กรัม)

ง.3 ปริมาณเถ้า (Ash) (ดัดแปลงวิธีจาก AOAC, 2005, section 32.1.05)

1) เผาถ้วยกระเบื้อง (Crucible) ใน furnace ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นใน Desiccator ก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก

2) ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ใส่ในถ้วยกระเบื้อง

3) นำถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างไปวางบน Hot plate ที่อุณหภูมิประมาณ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือจนตัวอย่างเริ่มเป็นสีดำทั้งหมด

4) นำถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างที่เป็นสีดำ ไปเผาใน Furnace ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหรือจนตัวอย่างเปลี่ยนเป็นเถ้าสีขาวหรือสีเทา

5) นำออกมาทิ้งให้เย็นใน Desiccator แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยกระเบื้องพร้อมตัวอย่างที่เป็นเถ้าสีขาว/เทา

6) คำนวณปริมาณเถ้าจากสมการ

$$\text{เถ้า (\%)} = \frac{(W_1-W_2) \times 100}{W}$$

เมื่อ W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

W_1 = น้ำหนักของตัวอย่าง + น้ำหนักถ้วยกระเบื้องก่อนอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักของตัวอย่าง + น้ำหนักถ้วยกระเบื้องหลังอบ (กรัม)

ง.4 ปริมาณไขมัน (Total fat) (ดัดแปลงวิธีจาก AOAC, 2005, section 32.1.14)

วัสดุและอุปกรณ์

1) ชุด Soxhlet extraction (Gerhardt, Germany)
2) Rotary evaporator ประกอบด้วย
   2.1) Vacumn pump (BUCHI, V-700, Switzerland)
   2.2) Rotavapor (BUCHI, RII, Switzerland)
3) ขวดก้นกลม
4) กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Whatman, England)

สารเคมี

1) สารละลาย Petroleum ether

วิธีทดลอง

1) อบขวดก้นกลมในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นใน Desiccator ก่อนนำไปชั่งน้ำหนัก

2) ชั่งตัวอย่างสตาร์ชประมาณ 2 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) ห่อด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 และใส่ลงใน Cellulose thimble

3) ใส่ Cellulose thimble ลงในชุด Soxhlet extraction

4) เติมสารละลาย Petroleum ether ปริมาตร 250 มิลลิลิตรลงในขวดก้นกลม ต่ออุปกรณ์ให้เรียบร้อยและนำไปวางบนเตาให้ร้อน

5) ใช้เวลาในการสกัดไขมันประมาณ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำขวดก้นกลมไประเหยสารละลาย Petroleum ether ออกด้วยเครื่อง Rotary evaporator

6) นำขวดก้นกลมไปอบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิประมาณ 90-100 องศาเซลเซียส จนแน่ใจว่าระเหยสารละลาย Petroleum ether ออกไปหมด จากนั้นทิ้งให้เย็นใน Desiccator แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

7) คำนวณปริมาณไขมันจากสมการ

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

ง.5 ปริมาณแอมิโลสปรากฏ (Apparent amylose) (ดัดแปลงวิธีจาก Juliano (1971))

สารเคมี

1) สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 นอร์มัล
2) สารละลาย Acetic acid ความเข้มข้น 1 นอร์มัล
3) Ethanol ความเข้มข้น 95% (ปริมาตรต่อปริมาตร)
4) สารละลายไอโอดีน (0.2% I_2 (น้ำหนักต่อปริมาตร), 2% KI (น้ำหนักต่อปริมาตร)
5) แอมิโลสมาตรฐานจากมันฝรั่ง (Sigma-Aidrich, USA)
6) แอมิโลเพกตินมาตรฐานจากข้าวโพด (Sigma-Aidrich, USA)

วิธีทดลอง

1) สร้างกราฟมาตรฐาน โดยชั่งแอมิโลสและแอมิโลเพกตินตามสัดส่วน ดังแสดงในตารางที่ ง.1 ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2) เติม Ethanol ความเข้มข้น 95% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 2 นอร์มัล ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ

3) นำไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที ทิ้งให้เย็น และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

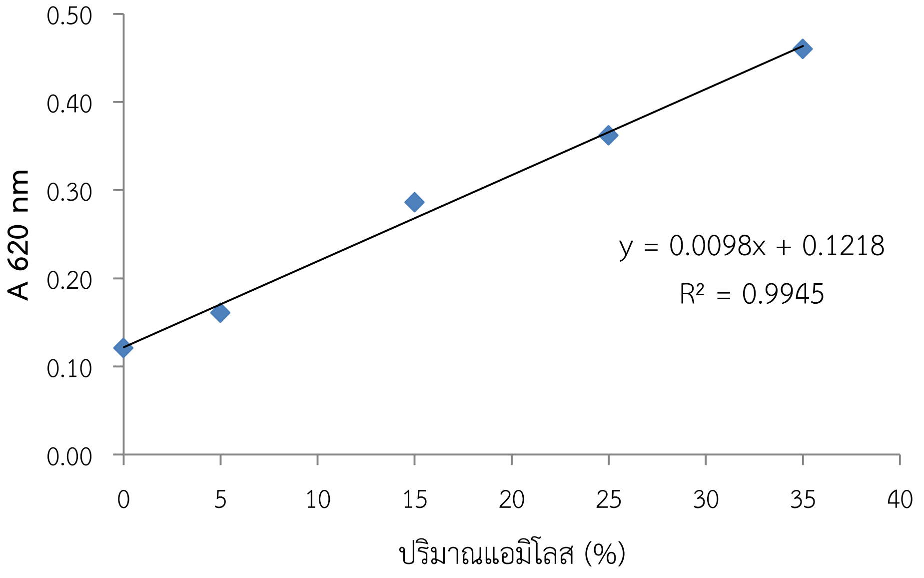
4) เตรียมขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรขวดใหม่ โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร , สารละลาย acetic acid ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, สารละลายไอโอดีนปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่างจากข้อ 3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Beckman, DU Series 650, USA) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปที่ ง.1

6) เตรียมตัวอย่างสตาร์ชข้าว โดยชั่งสตาร์ช 100±2 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และดำเนินการตามขั้นตอนข้อ 2-6 โดยคำนวณปริมาณแอมิโลสปรากฏจากสมการของกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ง.1)

ตารางที่ ง.1 สัดส่วนแอมิโลสและแอมิโลเพกตินในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

ตัวอย่างที่	แอมิโลส		แอมิโลเพกติน	
	%	ปริมาณ (mg)	%	ปริมาณ (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 ง.1 กราฟปริมาณแอมิโลสมาตรฐาน

เมื่อ x = ปริมาณแอมิโลส (%) และ y = A_{620}

ง.6 สมบัติทางความร้อน ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) (ดัดแปลงวิธีจาก Cho และคณะ (2009))

วัสดุอุปกรณ์

1) Aluminium volatile pan (Perkin Elmer, Kit NO.0219-0062, USA)
2) DSC (Perkin Elmer, Diamond DSC, USA)

วิธีทำ

1) ชั่งตัวอย่างสตาร์ชประมาณ 2.0 ±1.0 มิลลิกรัม ใส่ลงใน Aluminium volatile pan และเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิกรัม (อัตราส่วน สตาร์ช : น้ำกลั่น เป็น 1:3)

2) ปิดผนึก Aluminium volatile pan และ Equilibrate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) นำ Aluminium volatile pan ที่เตรียมไว้เข้าเครื่อง DSC ให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยใช้ Aluminium volatile pan เปล่าเป็นตัวอ้างอิง (จากข้อ 1-3 เป็นการวัดสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลาติไนเซชัน)

4) นำ Aluminium volatile pan หลังจากการให้ความร้อนไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

5) นำ Aluminium volatile pan ไปให้ความร้อนจากอุณหภูมิ 25-85 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนในการเกิดรีโทรเกรเดชัน)

6) วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนจากเครื่อง DSC ด้วยโปรแกรม Pyris version 7.0 ด้วยค่าดังต่อไปนี้

T_O = อุณหภูมิเริ่มต้น (Onset temperature) : องศาเซลเซียส

T_P = อุณหภูมิสูงสุด (Peak temperature) : องศาเซลเซียส

T_C = อุณหภูมิสุดท้าย (Conclusion temperature) : องศาเซลเซียส

ΔH = ค่าพลังงานที่ใช้ในหลอมผลึก : จูลต่อกรัม

ง.7 ความคงทนต่อการแช่เยือกแข็งและการละลายน้ำแข็ง (Freeze-thaw stability) (ดัดแปลงวิธีจาก Lee และคณะ (2006))

วิธีทดลอง

1) เตรียมสารละลายสตาร์ชความเข้มข้น 5% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2) ตักเจลสตาร์ชปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 กรัม และชั่งน้ำหนัก

3) นำ Eppendorf tube ตัวอย่างไปแช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

4) แช่ตัวอย่างใน Eppendorf tube ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5) นำ Eppendorf tube ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ดูดน้ำที่ปรากฏบริเวณผิวหน้าของเจลออก และชั่งน้ำหนักสุดท้ายก่อนการนำไปแช่เยือกแข็งอีกครั้ง

6) ทำซ้ำจากข้อ 3-5 อีก 4 รอบ

$$\%\ \text{Syneresis} = \frac{(\text{น้ำหนักเจลสตาร์ชก่อนแช่เยือกแข็ง} - \text{น้ำหนักเจลหลังเอาน้ำออก}) \times 100}{\text{น้ำหนักเจลก่อนแช่เยือกแข็ง}}$$

ง.8 สมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ด้วยเครื่อง Rheometer (ดัดแปลงวิธีจาก Lee และคณะ (2006))

วัสดุอุปกรณ์

1) Rheometer (Thermo HAAKE รุ่น MARS II, Japan)

วิธีทดลอง

1) เตรียมสารละลายสตาร์ชความเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยการเจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้อุณหภูมิลดลงมาเป็น 70 องศาเซลเซียสใน Water bath จากนั้นนำไปวัดสมบัติการเป็น Thermo-reversible gel ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Rheometer โดยใช้หัววัดแบบ Parallel plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ใช้การวัดแบบ Oscillatory shear test เพื่อหาค่า tan δ โดยกำหนดค่าการวัดดังนี้

Gap size = 1 mm

% strain = 1

Frequency = 1 Hz

และ $\tan \delta = \frac{G''}{G'}$

2) นำตัวอย่างสตาร์ชจากข้อ 1. ไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดเป็นเจล จากนั้นนำเจลสตาร์ชการวัดค่า tan δ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำเจลไปแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวัดค่าอีกครั้ง ทำการวัดเพื่อหาค่า tan δ อุณหภูมิ 4 และ 70 องศาเซลเซียสอีกซ้ำ 2 รอบ

ง.9 การกระจายตัวของแอมิโลเพคติน โดยใช้ High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometry detection : HPAEC-PAD (Kuakpetoon and Wang, 2006)

สารเคมี

1) สารละลาย Acetate buffer pH 3.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

เตรียมสารละลาย Acetic acid ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และสารละลาย Sodium acetate (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลาย Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa) 0.41 กรัม ด้วยน้ำ UP ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร และสารละลาย Acetic acid ความเข้มข้น 17 โมลาร์ (100%) ปริมาตร 0.29 มิลลิลิตร กับน้ำ UP และปรับเป็น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลาย Sodium acetate เป็น 3.5 ด้วยสารละลาย Acetic acid

2) Mobile phase A: สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์

นำน้ำ UP ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ไปไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator ประมาณ 45 นาที แล้วเติมสารละลาย NaOH ที่มีความเข้มข้น 50% ปริมาตร 7.92 มิลลิลิตร

3) Mobile phase B: สารละลาย Sodium acetate ความเข้มข้น 600 มิลลิโมลาร์ ในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์

ละลาย Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa) 49.22 กรัม ด้วยน้ำ UP ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 7.92 มิลลิลิตร

4) Mobile phase C: สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์

นำน้ำ UP ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ไปไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator ประมาณ 45 นาที แล้วเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 50% ปริมาตร 26.40 มิลลิลิตร

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1) HPAEC DX-600 (Dionex corp., Sunnydale, USA)

Column: Carbopac PA-1^{TM}

Pulsed amperometry detector: Dionex ED40

Autosampler: Dionex AS40

Column oven: Dionex ICS-3000 SP

วิธีทดลอง

1) การเตรียมตัวอย่าง

ก. ชั่งสตาร์ชข้าว 9 มิลลิกรัมลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ UP ปริมาตร 3.2 มิลลิลิตร

ข. นำไปกวนและให้ความร้อนบน Heating block (Thermo Scientific, Model 2078Q, Japan) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ทิ้งตัวอย่างให้เย็น

ค. เติมสารละลาย Acetate buffer pH 3.5 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร

ง. เติม Isoamylase (จากเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas amyloderamosa* (Hayashibara, Japan)) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

จ. บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ฉ. หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาทีและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองตัวอย่างผ่านตัวกรอง (Tisch Scientific, Nylon Syringe Filters 0.22 um, 30 mm diameter, USA) ลงใน vial สำหรับการนำไปฉีดในเครื่อง HPAEC

2) การฉีดตัวอย่างในเครื่อง HPAEC

ก. Equilibrate คอลัมน์ด้วย Mobile phase A

ข. ตั้ง Linear gradients ของ Mobile phase B ที่จะใช้ใน การชะตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

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

ค. เครื่องจะฉีดตัวอย่างอัตโนมัติโดยจะชะตัวอย่างด้วย Mobile phase B ในอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ง. เมื่อชะตัวอย่างแล้ว เครื่องจะทำการชะคอลัมน์สุดท้ายด้วย Mobile phase C

จ. ผลที่ได้จะแสดงออกมาในรูป Chromatogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง แกน x คือ Rentention time (min) และ แกน y คือ Detector response (nC)

ง.11 ค่าความแข็งแรงของเจล (Gel strength) ด้วยเครื่อง Texture-analyzer (ดัดแปลงวิธีจาก Lanier (1992))

วิธีทดลอง

1) เตรียมเจลของสตาร์ชความเข้มข้น 5, 10 และ 15% และเจลาติน 160 bloom BP. (บริษัทรวมเคมี, ประเทศไทย) ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5% โดยเจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นและบรรจุลงในถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ให้เจลมีความสูง 3 เซนติเมตร และเก็บเจลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

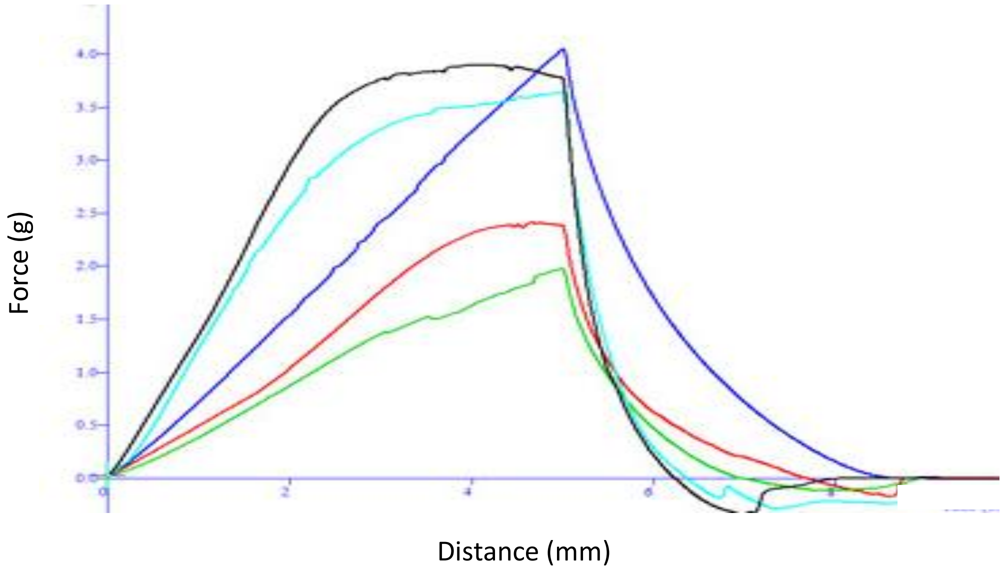
2) นำตัวอย่างมาวัดค่าความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture-analyzer (TA-XT2*i* Texture Analyzer รุ่น Plus, United Kingdom) โดยเลือกใช้หัววัดแบบลูกตุ้ม (P.O.25s) ตั้งค่าโปรแกรมโดยเลือกที่ Setting mode เป็น “Measurement force in compression” เลือก option เป็น “Return to start” และตั้งค่าต่อไปนี้

3)

Pre-test speed	:	1.0 mm/s
Test speed	:	1.0 mm/s
Post-test speed	:	10.0 mm/s
Deformation (Strain)	:	30 %
Trigger force	:	2 g
Data Acquisition	:	100 pps

เครื่องจะวัดแรงที่ใช้ในการกด (Force) และระยะการกดตัวอย่างที่ทำให้เกิดแรงต้านของ Trigger force 2 g (Distance) ดังรูปที่ ง.2

ค่าความแข็งแรงของเจล (Gel strength) = แรงที่ใช้ในการกด (Force; g) x ระยะการกด (Distance; mm)



รูปที่ ง.2 ตัวอย่างกราฟการวัดค่าความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture-analyzer

เมื่อ y = แรงที่ใช้ในการกด (Force; g)

X = ระยะการกด (Distance; mm)

ง.12 วิธีทำ Panna cotta (ดัดแปลงวิธีจาก กุลพัชร์ กนกวัฒนาวรรณ, 2011)

ส่วนผสม

1)	เจลาตินผง	3.5	กรัม
2)	นมสด	110.0	กรัม
3)	วิปปิ้งครีม	110.0	กรัม
4)	น้ำตาลทราย	35.0	กรัม
5)	กลิ่นวานิลา	2.5	กรัม

วิธีทำ

1) เทนมสดที่ตวงไว้ลงชาม จากนั้นโรยเจลาตินผงที่ตวงไว้ให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าจะเห็นว่าเจลาตินผงพองตัว

2) นำวิปปิ้งครีม น้ำตาลทราย และกลิ่นวานิลาที่ตวงไว้ เทลงหม้อ ตั้งไฟอ่อนๆ จนกระทั่งน้ำตาลทรายละลาย แล้วจึงยกออกจากเตา จากนั้นนำนมสดที่โรยผงเจลาตินทิ้งไว้มาผสม

3) คนจนเจลาตินละลาย แล้วกรองผ่านตะแกรง แล้วเทลงพิมพ์หรือภาชนะตามต้องการ แช่เย็นในตู้เย็นเพื่อให้เซตตัว

จากสูตรข้างต้น ความเข้มข้นของเจลาตินคิดเป็น 1.3% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งการนำสตาร์ชดัดแปรมาทดแทนเจลาตินจะใช้ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) แล้วนำไปวัดความแข็งแรงเปรียบเทียบกับ Panna cotta สูตรที่ใส่เจลาติน

ภาคผนวก จ

ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ จ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	14.094	3	4.698	1252.778	.000
Error	.015	4	.004		
Total	14.109	7			

ตารางที่ จ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของปริมาณแอมิโลสปรากฏของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่าง ๆ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Treatment	28.870	4	7.218	1031.071	.000
Error	.035	5	.007		
Total	28.905	9			

ตารางที่ จ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่ความเข้มข้นต่างๆ

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
To	Treatment	41.054	3	13.685	9.146	.029
	Error	5.985	4	1.496		
	Total	47.039	7			
Tp	Treatment	23.564	3	7.855	29.501	.003
	Error	1.065	4	.266		
	Total	24.629	7			
Tc	Treatment	36.925	3	12.308	27.815	.004
	Error	1.770	4	.442		
	Total	38.695	7			
Tc-To	Treatment	5.064	3	1.688	1.307	.388
	Error	5.165	4	1.291		
	Total	10.229	7			
ΔH	Treatment	2.565	3	.855	8.769	.031
	Error	.390	4	.098		
	Total	2.955	7			

ตารางที่ จ.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเจ้าไม่ดัดแปรและดัดแปรโดยแอมิโลมอลเทสที่เวลาต่างๆ

	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
To	Treatment	81.171	4	20.293	63.098	.000
	Error	1.608	5	.322		
	Total	82.779	9			
Tp	Treatment	76.690	4	19.172	85.629	.000
	Error	1.120	5	.224		
	Total	77.809	9			
Tc	Treatment	63.049	4	15.762	250.471	.000
	Error	.315	5	.063		
	Total	63.363	9			
Tc-To	Treatment	22.600	4	5.650	17.958	.004
	Error	1.573	5	.315		
	Total	24.173	9			
ΔH	Treatment	4.751	4	1.188	162.055	.000
	Error	0.037	5	.007		
	Total	4.788	9			

ตารางที่ จ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการวัดความแข็งแรงของเจลของสตาร์ชดัดแปรและไม่ดัดแปรเปรียบเทียบกับเจลาตินที่ความเข้มข้นต่างๆ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Distance	Treatment	128.846	10	12.885	305.651	.000
	Error	0.464	11	0.042		
	Total	129.309	21			
Force	Treatment	38955.61	10	3895.561	16324.26	.000
	Error	2.625	11	0.239		
	Total	38958.24	21			
Gel strength	Treatment	1300074	10	130007.4	11120.2	.000
	Error	128.602	11	11.691		
	Total	1300202	21			

ตารางที่ จ.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการวัดความแข็งแรงของ Panna cotta ที่ใช้สตาร์ชดัดแปรทดแทนเจลาตินและสูตรปกติ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Distance	Treatment	.547	3	.182	15.165	.012
	Error	.048	4	.012		
	Total	.595	7			
Force	Treatment	50.500	3	16.833	67.333	.001
	Error	1.000	4	.250		
	Total	51.500	7			
Gel strength	Treatment	871.481	3	290.494	47.190	.001
	Error	24.623	4	6.156		
	Total	896.104	7			

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทิพย์สุดา เอ็นดู เกิดวันที่ 23 มีนาคม 2530 ที่จังหวัดศรีสะเกษ สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

<u>การนำเสนอผลงานวิจัย</u>

เสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ เรื่อง EFFECTS OF AMYLOMALTASE TREATMENT ON THE THERMO-REVERSIBILITY AND RETROGRADATION OF WAXY AND NON-WAXY RICE STARCHES ในงานประชุมทางวิชาการนานาชาติ 13th FAOBMB Congress ในหัวข้อเรื่อง Discovery of Life Processes : From Biomolecular to System Biology ระหว่างวันที่ 25-29 พฤศจิกายน 2555 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพมหานคร

เสนอผลงานวิจัยแบบบรรยาย เรื่อง RICE STARCH MODIFICATION BY AMYLOMALTASE ในงาน The 1st International Joint Symposium Thai-Japan ระหว่างวันที่ 5-6 มกราคม 2556 ณ ศูนย์ฝึกอบรมและสัมมนา สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี

<u>ผลงานตีพิมพ์</u>

Endoo, T., Laohasongkram, K., Chaiwanichsiri, S. 2012. Effects of amylomaltase treatment on the thermo-reversibility and retrogradation of waxy and non-waxy rice starches. <u>The 13th FAOBMB Congress: Discovery of Life Processes from Biomolecular to System Biology</u>. 25-29 November 2012. Bangkok, Thailand.