



การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชชนิดต่าง ๆ  
และการตรวจสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก

**Production of Resistant Starch from Different Types of Starch and  
Determination of Their Prebiotic Properties**

ปาริฉัตร พฤษ์วิวัฒนากุล

**Parichat Phrukwiwattanakul**

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**Prince of Songkla University**

**2556**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**ชื่อวิทยานิพนธ์** การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชชนิดต่าง ๆ และ  
การตรวจสอบคุณสมบัติฟรีไบโอติก

**ผู้เขียน** นางสาวปาริฉัตร พฤษย์วิวัฒนากุล

**สาขาวิชา** วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

---

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก** คณะกรรมการสอบ  
.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสาวคนธ์ วัฒนจันทร์)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม** คณะกรรมการสอบ  
.....กรรมการ  
(ดร. สันหัตถ์ วิเชียร โชติ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา ทองทา)  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และ  
เทคโนโลยีอาหาร

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่าผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน  
เกี่ยวข้องทุกท่านได้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล)

ลงชื่อ.....

(นางสาวปาริฉัตร พฤษวีวัฒนากุล)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวปาริฉัตร พฤษ์วิวัฒนากุล)

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชชนิดต่าง ๆ และ การตรวจสอบคุณสมบัติฟรีไบโอติก
ผู้เขียน	นางสาวปาริฉัตร พุกภัยวิวัฒนากุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

สตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวประกอบด้วยปริมาณอะมิโลสร้อยละ 19.50, 20.82 และ 24.56 และมีปริมาณผลิกร้อยละ 28.62, 29.38 และ 23.71 ตามลำดับ สตาร์ชทั้ง 3 ชนิดมีรูปแบบโครงสร้างผลึกแบบ A (A-type) อุณหภูมิการเกิดเจลลาคีโนเซชันและอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าวและสตาร์ชถั่วเขียว ตามลำดับ ขณะที่ค่า breakdown และค่า setback ของสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าว และสตาร์ชเมล็ดขนุน นอกจากนั้นพบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชเมล็ดขนุน (ร้อยละ 26.99) มีค่าสูงกว่าสตาร์ชถั่วเขียว (ร้อยละ 4.04) และสตาร์ชข้าว (ร้อยละ 0.31) จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนส (5- 40 ยูนิตต่อกรัม) และระยะเวลาการตัดสายกิ่ง (4 - 48 ชั่วโมง) ต่อระดับการย่อย พบว่าระดับการย่อยของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียวมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น โดยระดับการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งที่ความเข้มข้น 40 ยูนิตต่อกรัม และระยะเวลาการตัดสายกิ่ง 36 ชั่วโมง มีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 99.02, 96.19 และ 96.83 ตามลำดับ จากการนำสตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกิ่งทั้ง 3 ชนิดไปผ่านกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4°C และที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ (0 - 15 วัน) พบว่าลักษณะทางโครงสร้าง สมบัติทางความร้อนและปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการในการเก็บรักษา โดยปริมาณผลึก อุณหภูมิ ( $T_0$ ) และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาคีโนเซชัน ( $\Delta H$ ) และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และพบว่ารูปแบบผลึกของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันเปลี่ยนจากแบบ A (A-type) เป็นแบบ B (B-type) จากการศึกษาคุณสมบัติฟรีไบโอติกในการต้านการย่อย พบว่าค่าร้อยละการย่อยรวมของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันหลังผ่านการย่อยด้วยน้ำลายเทียม สภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหาร และสภาวะจำลองในลำไส้เล็ก มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.01, 3.66 และ 2.07 ตามลำดับ

และจากผลการทดสอบความสามารถในการหมักของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทเกรเดชัน และผ่านการย่อยในสภาวะจำลองของทางเดินอาหารส่วนต้นในระบบการหมักแบบกะ พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* โดยมีค่าดัชนีความเป็นพรีไบโอติกสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทเกรเดชัน เท่ากับ 0.17, 0.08 และ 0.07 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลจากการหมักของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด สามารถผลิตเฉพาะกรดแลคติกและกรดไขมันสายสายสั้น โดยเฉพาะกรดอะซิติก

<b>Thesis Title</b>	Production of resistant starch from different types of starch and determination of their prebiotic properties
<b>Author</b>	Miss Parichat Phrukwiwattanakul
<b>Major Program</b>	Science and Food Technology
<b>Academic Year</b>	2013

### Abstract

Starch from rice, jackfruit seed and mung bean consisted of 19.50, 20.82 and 24.56% amylose content, respectively. All starches exhibited A-type crystalline pattern with the crystallinity of 28.62, 29.38 and 23.71%, respectively. Initial gelatinization temperature ( $T_0$ ) and pasting temperature of jackfruit seed starch were higher than that of rice and mung bean starch, respectively. Whereas, mung bean starch had a higher breakdown and setback than rice and jackfruit seed starches. In addition, the resistant starch (RS) content of jackfruit seed starch (26.99% db) was higher than that of mung bean starch (4.04% db) and rice starch (0.31% db). Effect of pullulanase enzyme concentration (5-40 U/g) and debranching time (4-48 h) on degree of hydrolysis (D.H.) were investigated. The D.H. of starches from rice, jackfruit seed and mung bean increased with increasing enzyme concentration and debranching time ( $p < 0.05$ ). The highest D.H. of starches from rice, jackfruit seed, and mung bean after debranching with 40 U/g starch for 36 h were 99.02, 96.19 and 96.83, respectively. All three debranched starches were retrograded at 4 °C for different storage time (0-15 days). It was found that structure, thermal properties and RS content of starches changed depending on storage time. The crystallinity,  $T_0$ , enthalpy of gelatinization ( $\Delta H$ ) and RS content increased with increasing retrogradation time. In addition, crystalline pattern for all there retrograded starches changed from A-type to B-type. Prebiotics property on hydrolysis resistance of three retrograded starches was investigated. The total hydrolysis of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean by artificial saliva, artificial acidic condition in stomach and artificial condition in small intestine were 6.01%, 3.66% and 2.07%, respectively. Selectively fermentation of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean after being digested in upper simulated gastrointestinal were tested in batch

culture system. It was found that all these retrograded starches could stimulate the growth of lactobacilli and bifidobacteria. The prebiotics index of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean were 0.17, 0.08 and 0.07, respectively. In addition, fermentation of all three retrograded starches produced only lactic acid and short-chain fatty acid, particularly acetic acid.



## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. สันต์ วิเชียรโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการค้นคว้าวิจัย และตรวจทานแก้ไขการเขียนวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสาวคนธ์ วัฒนจันทร์ ประธานกรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาให้คำปรึกษา และเสียสละเวลาเป็นกรรมการตรวจสอบและให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย และสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยและค่าใช้จ่ายระหว่างการศึกษា

ขอขอบคุณบุคลากรคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลองทั้งเครื่องมืออุปกรณ์ และวัสดุ รวมทั้งให้คำแนะนำในการปฏิบัติงาน

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่คอยให้กำลังใจในระหว่างทำการทดลองและการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

ขอขอบคุณพ่อ แม่ พี่สาว น้องสาวและญาติพี่น้อง ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาเสมอมาจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

ปาริฉัตร พุกษ์วิวัฒนากุล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(5)
Abstract .....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(9)
สารบัญ.....	(10)
LIST OF TABLES.....	(133)
LIST OF FIGURES .....	(155)
บทที่ .....	1
1    บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง .....	1
การตรวจเอกสาร .....	3
1. ข้าว และสตาร์ชข้าว .....	3
1.1 การผลิตสตาร์ชข้าว .....	5
1.2 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าว.....	5
1.3 สมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชข้าว.....	8
1.4 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชข้าว .....	10
2. เมล็ดขนุน และสตาร์ชเมล็ดขนุน .....	17
2.1 การผลิตสตาร์ชเมล็ดขนุน .....	19
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชเมล็ดขนุน.....	23
2.3 สมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชเมล็ดขนุน.....	24
2.4 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชเมล็ดขนุน .....	25
3. ถั่วเขียว และสตาร์ชถั่วเขียว .....	28
3.1 การผลิตสตาร์ชถั่วเขียว.....	29
3.2 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชถั่วเขียว.....	31
3.3 สมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชถั่วเขียว.....	31
3.4 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชถั่วเขียว .....	32
4. สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch) .....	34

## สารบัญ (ต่อ)

4.1	ประเภทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ .....	35
4.2	ประโยชน์ทางสรีรวิทยาของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ .....	43
4.3	การประยุกต์ใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร .....	44
5.	ฟรีไบโอติก .....	48
5.1	ความหมายและคุณสมบัติของฟรีไบโอติก .....	48
5.2	บทบาทและความสำคัญของฟรีไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร .....	48
5.3	ประเภทของฟรีไบโอติก .....	51
5.4	การทดสอบการเป็นฟรีไบโอติกของสารอาหาร .....	54
5.5	โพรไบโอติก .....	56
5.6	การย่อยคาร์โบไฮเดรตในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ .....	57
5.7	กระบวนการหมักของสารฟรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่ .....	59
5.8	ระบบทางเดินอาหารมนุษย์และจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร .....	60
	วัตถุประสงค์ .....	63
2	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ .....	64
1.	วัสดุอุปกรณ์ .....	64
2.	วิธีดำเนินงานวิจัย .....	67
2.1	การศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว .....	67
2.2	การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีการเกิดรีโทรเกรดชัน และ การศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชที่ทน ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ .....	71
2.3	การศึกษาคุณสมบัติฟรีไบโอติกของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ .....	73
3	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	79
1.	องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชจาก ข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว .....	79
2.	ลักษณะทางโครงสร้างของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว .....	80
2.1	การกระจายตัวของความยาวสายอะมิโลเพกติน (amylopectin chain length distribution) .....	80

## สารบัญ (ต่อ)

2.2 ชนิดและปริมาณผลึกของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว .....	81
3. รูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ชของสตาร์ชข้าว เมล็ดขนุน และถั่ว เขียว .....	83
4. สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว .....	85
4.1 สมบัติทางความร้อน (thermal properties) .....	85
4.2 สมบัติทางรีโอโลยี (rheology properties) .....	86
5. การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และ สตาร์ชถั่วเขียว ด้วยวิธีการเกิดรีโทเกรเดชัน .....	92
5.1 ศึกษาระยะเวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานาสที่ใช้ในการตัดสายกิ่ง .....	92
5.2 ลักษณะทางโครงสร้าง .....	95
5.3 คุณสมบัติทางความร้อน (thermal properties) .....	99
5.4 ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch content) .....	100
6. การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ .....	102
7. การทดสอบความสามารถต่อการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก .....	108
7.1 การประเมินความเป็นพรีไบโอติกของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทเกรเดชันต่อการ เจริญของจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ .....	108
7.2 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) .....	113
<b>4   สรุปและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>116</b>
เอกสารอ้างอิง .....	118
ภาคผนวก .....	137
ภาคผนวก .....	138
ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี .....	138
ข การเตรียมเอนไซม์ .....	148
ค การวิเคราะห์ Linear viscoelastic (Strain sweep test) .....	149
ง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ .....	150
ประวัติผู้เขียน .....	151

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. The rice production for each variety in different region of Thailand. ....	4
2. The nutritional value of jackfruit meat, fibre and jackfruit seed. ....	19
3. Chemical compositions of mung bean. ....	30
4. Type of resistant starch based on the extent of digestibility in small intestine.....	36
5. Chemical compositions of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	80
6. Chain length distribution of amylopectin components for starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	81
7. Relative crystallinity and granule size mean diameter of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	83
8. Gelatinization parameters of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	86
9. Viscosity parameters from Rapid Visco Analyzer (RVA) of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	87
10. Consistency coefficient (k) and Flow behavior index (n) of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	89
11. Viscoelastic parameters of starches from rice, jackfruit seed and mung bean at concentration of 8% (w/w) and at 1 Hz. ....	92
12. Effect of pullulanase concentration and debranching time on degree of pullulanase hydrolysis of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.....	94
13. Crystallinity of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean at various storage times. ....	97
14. Gelatinization parameters of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean at various storage times. ....	100
15. Resistant starch content of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean at various storage times. ....	102
16. Hydrolysis of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean of <i>in vitro</i> upper simulate artificial tract. ....	104

**LIST OF TABLES (Continued)**

17. Changes in bacterial populations during fermentation at 0, 24 and 48 h for different retrograded starches. .... 111

18. Short-chain fatty acid produced during fermentation at 0, 12, 24 and 48 h at pH 6.8 for different retrograded starches. .... 115

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Regions of the human large intestine with corresponding bacterial activities and physiological differences. ....	59
2. Distribution curve of degree of polymerization ( $DP_n$ ) of amylopectin chain length for starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	81
3. Crystallinity pattern of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	82
4. SEM micrographs (x1000) of starches from rice (a), jackfruit seed (b) and mung bean (c). ....	84
5. Granule size mean diameter of starches from rice, jackfruit seed and mung bean starch. ....	844
6. Thermographs of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	85
7. Pasting profile at pH 7.0 of starches from rice, jackfruit seed and mung bean. ....	87
8. Relationship of apparent viscosity and shear rate of starches from rice ( $\diamond$ ), jackfruit seed ( $\circ$ ) and mung bean ( $\square$ ) at 60 °C.....	89
9. Effect of frequency on $G'$ (a) and $G''$ (b) of 8% starch paste starches from rice ( $\diamond$ ), jackfruit seed ( $\circ$ ) and mung bean ( $\square$ ).All samples were measured at 25°C and 0.1-100 Hz.....	91
10. Effect of debranching time on degree of pullulanase hydrolysis (%) of starches from rice, jackfruit seed and mung bean at enzyme concentration 40 U/g starch.....	95
11. Crystallinity pattern of retrograded starches from rice (a), jackfruit seed (b) and mung bean (c) at various storage times.....	98
12. Enzyme (human saliva $\alpha$ -amylase) hydrolysis of retrograded starches from rice (RS), jackfruit seed (JFSS) and mung bean (MBS). ....	103
13. Acid hydrolysis of retrograded starches from rice (RS), jackfruit seed (JFSS) and mung bean (MBS).....	106
14. Enzyme (porcine pancreatic $\alpha$ -amylase) hydrolysis of of retrograded starches from rice (RS), jackfruit seed (JFSS) and mung bean (MBS).....	107
15. Bacterial populations (log CFU/ml) during fermentation at 0, 24 and 48 h using stirred pH-controlled batch cultures for retrograded starches from rice (a), jackfruit seed (b) and mung bean (c). Error bars represent standard error. ....	110

**LIST OF FIGURES (Continued)**

16. Prebiotic Index (PI) scores from stirred pH-controlled batch culture system at 24 and  
48 h for different retrograded starches..... 113



## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันมนุษย์มีการใช้ชีวิตประจำวันที่เน้นความสะดวกสบาย และมีพฤติกรรมการรับประทานอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้มนุษย์มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เช่น โรคเมเร็ง ระบบภูมิคุ้มกันลดลง ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น หรือแม้แต่โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารต่างๆ เช่น ท้องผูก ท้องร่วง และการปนเปื้อนเชื้อโรคในทางเดินอาหาร เป็นต้น ทำให้มนุษย์หันมาให้ความสำคัญต่อสุขภาพกันมากขึ้น เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคต่างๆ เหล่านี้ โดยการหันมาให้ความสำคัญต่อการรับประทานอาหารกันมากขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งที่สามารถลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ เหล่านี้ได้คือ การรักษาสมดุลของจุลชีพที่อยู่ในร่างกาย โดยในร่างกายของมนุษย์มีจุลินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (beneficial microorganism) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก (probiotic) และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganism) โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในลำไส้ใหญ่ ดังนั้นการเจริญของโพรไบโอติกและการส่งเสริมสุขภาพจึงขึ้นอยู่กับอาหารที่รับประทานเข้าไป โดยอาหารที่สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเรียกว่า โพรไบโอติก (prebiotic) มีคุณสมบัติคือ ไม่ถูกย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และเอนไซม์ในลำไส้เล็กและสามารถเคลื่อนไปยังลำไส้ใหญ่ได้ ปัจจุบันโพรไบโอติกทางการค้ามีมากกว่า 10 ชนิด โดยตลาดโลกมีความต้องการประมาณปีละ 167,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 16,770 ล้านบาท โพรไบโอติกที่มีมูลค่าตลาดสูงสุด 6 อันดับแรก ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ อินนูลิน ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ โพลีเด็คซ์โตรส แล็กทูลอส และสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch) (Siró *et al.*, 2008) โพรไบโอติกได้รับการยอมรับทางวิชาการและบางชนิดได้รับอนุญาตให้สามารถกล่าวอ้างประโยชน์ต่อสุขภาพ (health claim) บนฉลากผลิตภัณฑ์ได้ เช่น สุขภาพลำไส้ที่ดี ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ ลดความเสี่ยงต่อโรคเมเร็งลำไส้ใหญ่ ส่งเสริมการเจริญโพรไบโอติก ควบคุมน้ำหนักสำหรับคนอ้วน ลดปริมาณคอเลสเตอรอล และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน เป็นต้น (Qiang *et al.*, 2009)

สตาร์ชเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในทางโภชนาการของมนุษย์และเป็นองค์ประกอบหลักของอาหารหลายชนิด สตาร์ชที่เข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลในลำไส้เล็กและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ถ้าน้ำตาลในกระแสเลือดมีมากเกินไปเกินความต้องการก็จะก่อให้เกิดโรคอ้วนได้ และมีผลต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นสตาร์ชที่ไม่

สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็กของมนุษย์มีสมบัติเทียบเท่ากับใยอาหาร ซึ่งสามารถช่วยป้องกันกระเพาะว่าง และลดเวลาในการเคลื่อนผ่านของอาหารไปยังส่วนที่ย่อย ทำให้รู้สึกอึดม นอกจากนี้สตาร์ชยังมีสมบัติที่เด่นกว่าเส้นใยอาหาร คือมีสมบัติบางประการที่เหมาะสมต่อการแปรรูป สามารถช่วยควบคุมลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์และมีความทนทานระหว่างการแปรรูป จึงสามารถนำสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทำให้สามารถเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้มากขึ้น (Ranhotra *et al.*, 1996) สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แบบที่ 3 (RS type 3) เป็นสตาร์ชที่มีสมบัติทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสายอะมิโลสระหว่างการทำให้เย็นของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดเจลลาทีไนเซชัน (การเกิดรีโทรเกรเดชัน) เกิดเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติที่มีความแข็งแรง และทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้น ดังนั้นสตาร์ชที่มีอัตราส่วนของอะมิโลสที่สูงกว่า จะสามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้มากกว่าสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ ทำให้สตาร์ชที่มีอะมิโลสสูงสามารถนำไปใช้ผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง นอกจากนี้พบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แบบที่ 3 มีความสามารถในการเป็นพรีไบโอติก เนื่องจากไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้เล็ก และถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ อะซิเตท บิวทิเรท และ โพรพิโอเนท โดยกรดไขมันทั้งสามชนิดที่เกิดขึ้นจะมีสัดส่วนแตกต่างกันไปตามชนิดของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และสามารถถูกดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่และขนส่งไปถึงตับได้ ซึ่งกรดไขมันสายสั้นๆ เหล่านี้ มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะบิวทิเรท ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกลไกการเกิดและตายของเซลล์ผนังลำไส้ใหญ่ (apoptosis) เป็นผลให้ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Alexander, 1995)

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในงานวิจัยคือ ข้าว เมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวทางการค้า เนื่องจากวัตถุดิบทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 20-28) ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการนำไปผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แบบที่ 3 นอกจากนี้พบว่าข้าวเลี้ยงเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ที่นิยมปลูกกันมากและมีราคาถูก สำหรับเมล็ดขนุนเป็นวัตถุดิบเศษเหลือจากการบริโภคเนื้อขนุน อีกทั้งมีรายงานวิจัยที่มีปริมาณพรีไบโอติกร้อยละ 10 และจากการสำรวจพบว่าสตาร์ชถั่วเขียวนั้นมีการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มไม่มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แบบที่ 3 จากสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว เพื่อนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ในรูปแบบของเส้นใย (dietary fiber) และพรีไบโอติก โดยใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร (food ingredient) ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์และเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศให้สูงขึ้น

## การตรวจเอกสาร

### 1. ข้าว และสตาร์ชข้าว

ข้าวเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่มีการส่งออกเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศ และผลิตภัณฑ์จากข้าวเป็นอีกหนึ่งในสินค้าอุตสาหกรรมเกษตรที่น่าจับตามอง แม้ว่าตลาดในประเทศจะขยายตัวไม่มากนัก แต่ตลาดส่งออกมีแนวโน้มขยายเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์ข้าวที่น่าสนใจได้แก่ แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว เส้นหมี่ เส้นก๋วยเตี๋ยว และขนมปังขبزเคี้ยว (rice cracker) เป็นต้น แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียว เป็นผลิตภัณฑ์จากข้าวที่ไม่เพียงแต่เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวเท่านั้น ยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวัน ทั้งในแง่การบริโภคโดยตรงและการนำไปประกอบเป็นอาหารคาวหวานชนิดต่างๆ หรือการใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารจากแป้ง โดยเฉพาะขนมขบเคี้ยวต่างๆ ซึ่งตลาดของแป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียวนั้นมีทั้งในประเทศและต่างประเทศ จากการสำรวจของบริษัทผู้ผลิตแป้งข้าวเพื่อการส่งออก ปรากฏว่าประมาณร้อยละ 70-80 ของปริมาณการผลิตแป้งข้าวเจ้า และข้าวเหนียวจะส่งออกจำหน่ายต่างประเทศ และส่วนที่เหลือจะจำหน่ายเพื่อการบริโภคในประเทศ เส้นหมี่ เส้นก๋วยเตี๋ยวเป็นผลิตภัณฑ์จากข้าวชนิดหนึ่งที่เป็นที่รู้จักกันดี และเป็นที่นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายภายในประเทศ การผลิตจะใช้ปลายข้าวหรือข้าวหักเป็นวัตถุดิบในการผลิตที่สำคัญ ดังนั้นการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ประเภทนี้นับว่าเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าวคุณภาพต่ำเป็นอย่างดี

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรโลกมากกว่าครึ่ง โดยเฉพาะชาวเอเชียบริโภคมากถึงร้อยละ 90 ข้าวที่ปลูกสำหรับบริโภคทั่วโลกมี 2 ชนิด คือ ข้าวปลูกเอเชีย (*Oryza sativa* Linn.) และข้าวปลูกแอฟริกา (*Oryza glaberrima* Stued.) มีจำนวนมากกว่า 120,000 สายพันธุ์ที่มีชื่อและลักษณะแตกต่างกัน จากความหลากหลายของข้าวชนิดต่างๆ ที่แพร่กระจายอยู่ทั่วโลก ข้าวเป็นธัญชาติ (เมล็ด) ของพืชใบเลี้ยงเดี่ยววงศ์หญ้า (Family: Grammineae หรือ Poaceae) เรียกว่า ธัญพืชสกุลออริซา (Genus: *Oryza*) เจริญได้ดีในเขตร้อน และเขตอบอุ่น และสามารถขึ้นได้ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับสูงประมาณ 3,000 เมตร นอกจากนี้ยังทนต่อสภาพดินหลากหลายตั้งแต่พื้นดินที่น้ำท่วมสูงจนถึงพื้นที่สูงตามไหล่เขา ทนดินที่มีธาตุเหล็ก อะลูมิเนียม ดินเค็ม เป็นต้นข้าวกลุ่ม *Oryza sativa* ยังแยกออกได้เป็นอินดิกา (*indica*) มีปลูกมากในเขตร้อน และจาปอนิกา (*japonica*) มีปลูกมากในเขตอบอุ่น ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยอยู่ในกลุ่มอินดิกา (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2547) ในประเทศไทยมีการปลูกข้าวทั่วทุกภูมิภาค โดยพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกมีอยู่หลากหลายพันธุ์ การปลูกข้าวในแต่ละภาคของประเทศขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพันธุ์ข้าวต่อสภาวะแวดล้อมในแต่ละภาค และความนิยมในการบริโภคของประชากรที่มีอยู่ตามท้องถิ่นนั้นๆ จึงเห็นได้ว่าข้าวที่นิยมปลูกในภาคต่างๆ ในประเทศมีทั้งข้าวเจ้า และข้าวเหนียว โดยภาคกลางมีการปลูกทั้งข้าวเจ้า และ

ข้าวเหนียว และนิคมบริ โภคข้าวเจ้ากันเป็นส่วนใหญ่ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมปลูกข้าวเหนียว และบริ โภคข้าวเหนียวเป็นอาหารหลัก และภาคใต้นิยมปลูก และบริ โภคข้าวเจ้าซึ่งมีปริมาณอะมิโลสสูงเกือบทั้งหมด ได้แก่ ข้าวสังข์หยด ข้าวเลี้ยงพัทลุง ข้าวพัทลุง 60 ข้าวลูกแดงปัตตานี และข้าวเล็บนกปัตตานี เป็นต้น พันธุ์ข้าวที่น่าสนใจในภาคต่างๆ ของประเทศไทยดัง Table 1 (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2553)

Table 1 The rice production for each variety in different region of Thailand.

Rice Variety	Product (kg/farm)	Amylose content* (%)	Cultivated Area
Khao Dawk Mali 105	363	12.88	All regions, especially the Northeastern
RD 15	560	18.00	Northeast
RD 6	666	3.81	Northern and Northeast
Pathum Thani 1	650-774	12.89	Central
Supanburi 1	579	20.93	Central
Chiang Phatthalung	470	24.89	Southern

Source: สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว (2553)

\*รุ่งนภา พงสวัสดิ์มานิต และคณะ (2546)

### ข้าวเลี้ยงพัทลุง

เลี้ยงพัทลุง เป็นข้าวเจ้านาสวน ไร่ต่อช่วงแสง ลำต้นสูงประมาณ 150 เซนติเมตร ใบสีเขียว ใบธงแผ่เป็นแฉนวนอน คอรวงยาว รวงยาวปานกลาง ระแง่ค่อนข้างถี่ ข้าวเปลือกยาวเรียวยาว ฟางขนาดยาว 9.8 มิลลิเมตร กว้าง 2.5 มิลลิเมตร และหนา 1.8 มิลลิเมตร ข้าวกล้องสีขาวขนาดยาว 6.7 มิลลิเมตร กว้าง 2.1 มิลลิเมตร และหนา 1.6 มิลลิเมตร มีท้องไร่ปานกลาง การรวงของเมล็ดปานกลาง มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณเดือนมกราคม และให้ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 470 กิโลกรัมต่อไร่ ระยะพักตัวของเมล็ด 1 สัปดาห์ โดยเมื่อปี พ.ศ. 2517 นายเลี้ยง ทองเรือง เกษตรกรอำเภอป่าบอน จังหวัดพัทลุง มีภูมิลำเนาเดิมอยู่ที่จังหวัดสงขลา ได้นำพันธุ์ข้าว ซึ่งมีชื่อเดิมหลายชื่อ ได้แก่ ขาวกาหวิน ข้าวเปอร์วิต ขาวมาเล หรือข้าวบางแก้ว จากอำเภอปากพะยูน จังหวัดพัทลุง มาปลูกเพื่อแก้ปัญหาผลผลิตต่ำจากภาวะแห้งแล้ง ฝนทิ้งช่วงปลายฤดูที่อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ปราบกฎว่า

ได้ผลดีเป็นที่สนใจของเกษตรกร และเป็นที่ยอมรับหลายในเวลาต่อมาพร้อมทั้งเรียกชื่อข้าวพันธุ์ดังกล่าวว่า “เลียง” ตามชื่อผู้นำมาปลูกเป็นคนแรก

การปรับปรุงพันธุ์เริ่มดำเนินการโดยสถานีทดลองข้าวปัตตานี ได้เก็บรวบรวมข้าวพันธุ์ดังกล่าวจากแปลงนาเกษตรกรในอำเภอระโนด จังหวัดสงขลา เมื่อปี พ.ศ. 2530 นำมาปลูกคัดเลือกพันธุ์แบบหมู่และปลูกศึกษาพันธุ์ พ.ศ. 2530-2531 เสร็จแล้วนำเข้าแปลงเปรียบเทียบผลผลิตภายในสถานี พ.ศ. 2531-2532 จากนั้นนำไปปลูกเปรียบเทียบผลผลิตระหว่างสถานีเครือข่ายศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง พ.ศ. 2533-2535 หลังจากนั้นจึงนำไปปลูกเป็นพันธุ์คัดและพันธุ์หลัก พ.ศ. 2536 และได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์ให้เป็นพันธุ์แนะนำเมื่อวันที่ 17 มีนาคม พ.ศ. 2537 และใช้ชื่อว่า เลียงพัทลุง (สมพล และระริน, 2537)

### 1.1 การผลิตสตาร์ชข้าว

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) เตรียมสตาร์ชข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ โดยนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการโม่เปียก (wet milling) เพื่อให้ได้ฟลัวร์ข้าว หลังจากนั้นทำการสกัดโปรตีนโดยใช้สารเคมีต่างๆ ได้แก่ สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 เอทานอลร้อยละ 95 และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.35 พบว่าสตาร์ชที่เตรียมได้มีโปรตีนน้อยกว่าร้อยละ 0.5 มีปริมาณของไขมันน้อยกว่าร้อยละ 0.1 (โดยน้ำหนักแห้ง) มีปริมาณเถ้าร้อยละ 0.4 (โดยน้ำหนักแห้ง) และปริมาณสตาร์ชของข้าวทุกพันธุ์ที่ได้มากกว่าร้อยละ 95 (โดยน้ำหนักแห้ง)

Noosuk และคณะ (2003) ทำการสกัดสตาร์ชจากข้าวใหม่ และข้าวที่ผ่านการเก็บที่อุณหภูมิห้อง (30-35°C) เป็นเวลา 5 เดือน ของข้าวพันธุ์กข 6 พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์สุพรรณบุรี 1 โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้เมล็ดข้าวนุ่ม จากนั้นเทน้ำสารละลายเกลือออก นำไปบดเปียกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.3 แล้วนำไปสกัดโปรตีนออกโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.3 เป็นเวลา 9 ชั่วโมง (Yamamoto *et al.*, 1973; Juliano, 1984) พบว่าสตาร์ชที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีน และปริมาณของไขมันน้อยกว่าร้อยละ 0.8 ปริมาณเถ้าร้อยละ 0.5 (โดยน้ำหนักแห้ง)

### 1.2 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชข้าว

#### 1.2.1 อะมิโลส

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ทำการศึกษาปริมาณอะมิโลสของข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ ด้วยการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Concanavalin-A หรือ Con A สามารถจำแนกสตาร์ชข้าวออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามปริมาณอะมิโลสดังนี้ ข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏ (apparent amylose) ประมาณร้อยละ 3.80 ได้แก่ พันธุ์กข 6 และพันธุ์ข้าวเหนียวสันป่าตอง กลุ่มที่ 2 เป็นข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏ

ประมาณร้อยละ 12.88 ถึง 18.00 ได้แก่ พันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 พันธุ์พิษณุโลก 1 พันธุ์ปทุมธานี 1 พันธุ์กข 15 และพันธุ์สังข์หยด และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสปรากฏประมาณร้อยละ 20.31 ถึง 26.68 ได้แก่ พันธุ์พิษณุโลก 2 พันธุ์สุพรรณบุรี 90 พันธุ์เหลืองประทิว 123 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ชัยนาท 1 พันธุ์ข้าวห่าร้อย พันธุ์กข 23 พันธุ์เหลืองพัทลุง และพันธุ์เจ๊กเซย นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสในสตาร์ชข้าวโดยใช้วิธีการเกิดสีกับไอโอดีน พบว่าจะให้ค่าปรากฏที่สูงกว่าวิธีการวิเคราะห์การตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Con A โดยพบว่าร้อยละความแตกต่างระหว่างค่าปริมาณอะมิโลสที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีจะอยู่ในช่วงตั้งแต่น้อยกว่า 10 จนถึง 50 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปริมาณอะมิโลสที่วิเคราะห์ได้จะขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการรบกวนด้วยโมเลกุลของอะมิโลเพคติน และโมเลกุลที่มีขนาดกลาง (intermediate material)

บุญทิวา นิลจันทร์ (2548) ศึกษาปริมาณอะมิโลสของฟลาวัวร์ และสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่างๆ ที่รวบรวมในประเทศไทย จำนวน 29 พันธุ์ ได้แก่ เหนียวสกกลนคร เหนียวสันป่าตอง กข 6 กข 10 หอมคลองหลวง หอมสุพรรณ ข้าวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 ปทุมธานี 60 กข 7 พิษณุโลก 1 พิษณุโลก 2 พิษณุโลก 3 ปราจีนบุรี 1 ปราจีนบุรี 2 เล็บมือนาง 111 ดอกพยอม สังข์หยด ชัยนาท 1 ชัยนาท 2 พลายงามปราจีน กข 15 กข 23 สุพรรณบุรี 1 สุพรรณบุรี 90 เหลืองประทิว 123 เจ๊กเซย เหลืองพัทลุง และข้าวห่าร้อย อาศัยสมบัติความแตกต่างของขนาดโมเลกุลระหว่างอะมิโลสและอะมิโลเพคติน โดยการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วยสาร Concanavalin-A หรือ Con A พบว่าสามารถจำแนกพันธุ์ข้าวออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มที่หนึ่ง คือ ข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ มีจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เหนียวสกกลนคร เหนียวสันป่าตอง กข 6 และกข 10 ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสอยู่ในช่วง ร้อยละ 0.77-3.81 โดยน้ำหนักแห้ง กลุ่มที่สอง คือ ข้าวกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง มีจำนวน 16 พันธุ์ คือ หอมคลองหลวง หอมสุพรรณ ข้าวดอกมะลิ 105 ปทุมธานี 1 ปทุมธานี 60 กข 7 พิษณุโลก 3 ปราจีนบุรี 1 พิษณุโลก 1 เล็บมือนาง 111 ดอกพยอม สังข์หยด ปราจีนบุรี 2 ชัยนาท 2 พลายงามปราจีน กข 15 ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสอยู่ในช่วงร้อยละ 10.01-18.00 โดยน้ำหนักแห้ง กลุ่มที่สาม คือ ข้าวกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสสูง มีจำนวน 9 พันธุ์ คือ กข 23 ชัยนาท 1 สุพรรณบุรี 1 เหลืองประทิว 123 สุพรรณบุรี 90 เจ๊กเซย เหลืองพัทลุง ข้าวห่าร้อย พิษณุโลก 2 ซึ่งมีปริมาณอะมิโลสอยู่ในช่วงร้อยละ 20.31-26.68 (โดยน้ำหนักแห้ง)

ปาริตา ขุนแอ (2550) ศึกษาปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหลือง โดยวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าว ซึ่งวิเคราะห์จากค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะมิโลสกับไอโอดีน 2 แบบ คือการวิเคราะห์ปริมาณเทียบเท่าอะมิโลส (amylose equivalent; AE) หรือปริมาณอะมิโลสปรากฏ และการ

วิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่ละลายได้ (soluble amylose) พบว่าปริมาณเทียบเท่าอะมิโลสมีค่าสูงกว่าปริมาณอะมิโลสที่ละลายได้มาก เนื่องจากปริมาณเทียบเท่าอะมิโลสมีอิทธิพลของอะมิโลเพคตินสายยาว (long B-chain) ซึ่งสามารถจับกับไอโอดีนได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้ปริมาณอะมิโลสที่วัดได้มีค่าสูงเกินจริง ส่วนปริมาณอะมิโลสที่ละลายได้ของสตาร์ชข้าว พบว่าไม่มีผลรบกวนจากอะมิโลเพคตินสายยาว โดยที่ค่าสอดคล้องกับปริมาณอะมิโลสที่แท้จริง (true amylose) ของสตาร์ช ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสหลังจากทำการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Concanavalin-A หรือ Con A และเมื่อจำแนกกลุ่มของสตาร์ชข้าวตามปริมาณอะมิโลสที่ละลายได้ พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ สตาร์ชข้าวเหนียว จัดอยู่ในกลุ่มสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ (ร้อยละ 1.41) สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 จัดอยู่ในกลุ่มสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง (ร้อยละ 14.96) และสตาร์ชข้าวเหนียว จัดอยู่ในกลุ่มสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 20.16)

Noosuk และคณะ (2003) ทำการศึกษาปริมาณอะมิโลสของข้าวไทยพันธุ์กข 6 พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ด้วยวิธีการตกตะกอนอะมิโลเพคตินด้วย Concanavalin-A หรือ Con A ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสที่แท้จริง โดยไม่มีอิทธิพลของอะมิโลเพคตินเข้ามาเกี่ยวข้อง และได้มีการตรวจสอบปริมาณอะมิโลส และ long-B chain amylopectin โดยแสดงเป็นปริมาณเทียบเท่าอะมิโลส (amylose equivalent; AE) ซึ่งโดยทั่วไปเรียกกันว่าปริมาณอะมิโลสทั้งหมด (total amylose) โดยละลายสตาร์ชในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1 นอร์มอล ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำปฏิกิริยากับไอโอดีน และปริมาณอะมิโลสที่ละลายน้ำได้ (soluble amylose; AM) โดยละลายสตาร์ชที่อุณหภูมิ 98°C แล้วนำส่วนสารละลายที่กรองได้ไปทำปฏิกิริยากับไอโอดีน ความแตกต่างระหว่าง AE กับ AM คือค่า AE เป็นค่าที่วัดรวมปฏิกิริยาระหว่างไอโอดีนกับอะมิโลเพคตินสายยาว ซึ่งเรียกว่า ค่าปริมาณเทียบเท่าของอะมิโลส เนื่องจากอะมิโลเพคตินสายยาว (amylase equivalent of long-B chain amylopectin; AE<sub>LBCA</sub>) (Reddy, *et al.*, 1993) จากการทดลองพบว่าปริมาณอะมิโลสที่ละลายน้ำได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณอะมิโลสที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Con A สามารถแบ่งสตาร์ชข้าวไทยออกเป็น 3 กลุ่ม ตามปริมาณอะมิโลสที่ละลายน้ำได้ กลุ่มที่ 1 คือสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ (ร้อยละ 1-3) ประกอบด้วยข้าวพันธุ์กข 6 และสตาร์ชข้าวเหนียว กลุ่มที่ 2 คือสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง (ร้อยละ 14-15) ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กลุ่มที่ 3 คือสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 21-23) ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการเก็บข้าวขาวเป็นเวลา 5 เดือน ไม่ส่งผลต่อปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชข้าว

### 1.2.2 อะมิโลเพคติน

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ทำการศึกษาวิจัยการกระจายตัวของกิ่งก้านอะมิโลเพคตินของข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ ด้วยเครื่อง High Performance Anionic Exchange Chromatography (HPAEC) พบว่าข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ มีค่าร้อยละของการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านอะมิโลเพคตินสามารถแบ่งออกเป็น 4 ช่วง คือ DP 6-12, DP 13-24, DP 25-36 และ DP มากกว่าหรือเท่ากับ 37 สำหรับสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง พบว่าข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พันธุ์พิษณุโลก 1 พันธุ์พิษณุโลก 2 และพันธุ์กข 15 มีค่าร้อยละของการกระจายตัวของ DP 13-24 อยู่ในช่วง 52-55 เมื่อเปรียบเทียบกับน้อยกว่าข้าวพันธุ์ปทุมธานี และพันธุ์สังข์หยด ซึ่งมีร้อยละของการกระจายตัวสูงถึง 59 หากพิจารณาความยาวของกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินในช่วงที่มี DP มากกว่า 37 พบว่าข้าวขาวมะลิ 105 พันธุ์กข 15 และพันธุ์สังข์หยด มีร้อยละการกระจายตัวเท่ากับ 4 สำหรับข้าวในกลุ่มสุดท้ายที่จัดว่ามีปริมาณอะมิโลสสูง สามารถจำแนกข้าวออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะมีร้อยละของการกระจายตัวของความยาวกิ่งก้านของสายอะมิโลเพคตินสายสั้น ซึ่งมี DP 6-12 มากกว่า DP 13-24 ได้แก่ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 พันธุ์สุพรรณบุรี 90 และพันธุ์ชัยนาท 1 สำหรับข้าวกลุ่มที่สอง มีร้อยละการกระจายตัวของ DP 6-12 น้อยกว่า DP 13-24 ได้แก่ ข้าวพันธุ์เหลืองประทิว 123 พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ขาวห้าวร้อย พันธุ์กข 23 พันธุ์เฉียงพัทลุง และพันธุ์แจ๊กเชย

Noosuk และคณะ (2005) ทำการศึกษาวิจัยการกระจายตัวของกิ่งก้านอะมิโลเพคตินข้าวไทยพันธุ์กข 6 พันธุ์ขาวมะลิ และพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ด้วยเครื่อง High Performance Anionic Exchange Chromatography (HPAEC) พบว่าสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูงจะมีสายอะมิโลเพคตินที่มี DP 3-11 น้อยกว่าสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ แต่สตาร์ชที่มีอะมิโลเพคตินต่ำจะมีสายอะมิโลเพคตินที่มี DP 12-22 มากกว่า เมื่อคำนวณค่าสัดส่วนของสายอะมิโลเพคติน (amylopectin chain ratio; ACR) ของสตาร์ชข้าวไทยนี้ พบว่าสามารถแบ่งสตาร์ชข้าวไทยได้เป็น 2 กลุ่ม ตามค่า ACR ได้แก่ อะมิโลเพคตินชนิด “S” ซึ่งมีค่า ACR เท่ากับ 0.25 ได้แก่ สตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลเพคตินต่ำ และปานกลาง ส่วนอะมิโลเพคตินชนิด “L” ซึ่งมีค่า ACR เท่ากับ 0.19 ได้แก่ สตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลเพคตินสูง

## 1.3 สมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชข้าว

### 1.3.1 ขนาดและรูปร่าง

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ศึกษาขนาดและรูปร่างของเม็ดสตาร์ชข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ พบว่าสตาร์ชข้าวทุกพันธุ์มีขนาดและรูปร่างของเม็ดที่คล้ายคลึงกัน โดยมีขนาดอยู่ในช่วง 3-12 ไมโครเมตร และมีลักษณะหลายเหลี่ยม



ปาริดา ขุนแอ (2550) ศึกษาขนาดและรูปร่างของเม็ดสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียวด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าเม็ดสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิด มีขนาดเล็ก รูปร่างหลายเหลี่ยม ผิวของเม็ดสตาร์ชเรียบไม่มีการปนเปื้อนจากองค์ประกอบอื่น และจากการตรวจสอบขนาดของเม็ดสตาร์ช พบว่าสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว มีขนาดเม็ดสตาร์ชเฉลี่ย เท่ากับ 5.21, 4.68 และ 5.65 ไมโครเมตร ตามลำดับ

Noosuk และคณะ (2003) พบว่าลักษณะของเม็ดสตาร์ชข้าวมีขนาดและรูปร่างเหมือนเม็ดสตาร์ชข้าวโดยทั่วไป คือมีขนาดเล็ก มีรูปร่างคล้ายหกเหลี่ยม ผิวหน้าของเม็ดสตาร์ชมีลักษณะเรียบ และไม่มีการปนเปื้อนจากองค์ประกอบอื่นและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3-5 ไมโครเมตร

### 1.3.2 โครงสร้างผลึก

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ศึกษาโครงสร้างผลึกของสตาร์ชข้าวไทย 16 พันธุ์ พบว่าสตาร์ชข้าวทุกพันธุ์มีโครงสร้างผลึกแบบ A เมื่อพิจารณาค่าร้อยละความเป็นผลึกของสตาร์ชข้าว 3 กลุ่ม พบว่าสตาร์ชข้าวกลุ่มที่ไม่มีปริมาณอะมิโลส (waxy type) มีค่าร้อยละความเป็นผลึกสูงสุดอยู่ในช่วง 24-26 สตาร์ชข้าวกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง มีค่าร้อยละความเป็นผลึกอยู่ในช่วง 17-23 ในขณะที่สตาร์ชข้าวกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสสูง มีค่าร้อยละความเป็นผลึกอยู่ในช่วง 17-23 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าข้าวกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง และสูงนั้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในส่วนของค่าร้อยละการเป็นผลึก

ปาริดา ขุนแอ (2550) ศึกษารูปแบบโครงสร้างผลึกของสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) พบว่าสตาร์ชข้าวทุกชนิดมีรูปแบบโครงสร้างผลึกที่มีพีคเด่นชัดที่มุม ( $2\theta$ ) เท่ากับ 15.2, 17.0, 17.9 และ  $21.2^\circ$  ( $2\theta$ ) ซึ่งเป็นรูปแบบของโครงสร้างผลึกแบบ A และเมื่อพิจารณาปริมาณผลึก (relative crystallinity; RC) ของสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่า RC ของสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่าสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 33.53 ขณะที่สตาร์ชข้าวเหนียว มีค่า RC ร้อยละ 29.92 และสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิมีค่า RC ร้อยละ 28.45 สำหรับการศึกษาศักส่วนของโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ต่อส่วนออสัญฐาน (RSA) ซึ่งคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงของสตาร์ชที่ความถี่  $1047\text{ cm}^{-1}$  ต่อ  $1022\text{ cm}^{-1}$  พบว่าค่า RSA ของสตาร์ชข้าวเหนียว (0.74) มีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 (0.70) และสตาร์ชข้าวเหนียว (0.69) ตามลำดับ

Noosuk และคณะ (2003) ทำการศึกษาโครงสร้างผลึกของสตาร์ชจากข้าวไทย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 พันธุ์ขาวดอกมะลิ และข้าวเหนียวกข 6 พบว่ามีโครงสร้างผลึก

แบบ A ปริมาณผลึกของสตาร์ชข้าวมีค่าลดลงแบบเชิงเส้น ( $R^2 = 0.85$ ,  $p \leq 0.01$ ) เมื่อปริมาณอะมิโลสเพิ่มขึ้น เนื่องจากผลึกของสตาร์ชเกิดจากโครงสร้างของอะมิโลเพคติน ดังนั้นสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลเพคตินมากก็จะมีปริมาณผลึกมากขึ้นด้วย สตาร์ชกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ (ร้อยละ 1-3) มีปริมาณผลึกอยู่ในช่วงร้อยละ 33-34 สตาร์ชกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสปานกลาง (ร้อยละ 14-15) มีปริมาณผลึกอยู่ในช่วงร้อยละ 22-28 สตาร์ชกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 21-23) มีปริมาณผลึกอยู่ในช่วงร้อยละ 23-24

#### 1.4 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชข้าว

##### 1.4.1 การเกิดเจลลิตีในเซชัน

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ศึกษาการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชข้าวไทยพันธุ์ต่างๆ ด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) พบว่าอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชข้าวให้ผลที่สอดคล้องกับอุณหภูมิในการเปลี่ยนแปลงความหนืด (pasting temperature) ที่ตรวจสอบด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) โดยอุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature;  $T_o$ ) ของการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ (ร้อยละ 3.8) และสตาร์ชข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 18.00-25.10) อยู่ในช่วง 65.84-72.75 และ 73.85-77.15 $^{\circ}$ C ตามลำดับ ค่าพลังงานสำหรับการเกิดเจลลิตีในเซชัน (enthalpy;  $\Delta H$ ) อยู่ในช่วง 11.86-13.40 J/g สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ และ 13.56-16.91 J/g สำหรับสตาร์ชข้าวพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสสูง

บุญทิวา นิลจันทร์ (2548) ศึกษาสมบัติการเกิดเจลลิตีในเซชันของฟลาวัวร์ และสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่รวบรวมในประเทศไทย จำนวน 29 พันธุ์ ได้แก่ ช่วงอุณหภูมิและปริมาณพลังงานความร้อนที่ใช้ในการทำให้ฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าวเกิดการเปลี่ยนสถานะในสภาพที่มีน้ำมากเกินไป โดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ด้วยการควบคุมอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นอย่างคงที่ ผลที่ได้จะเป็นกราฟเส้นโค้งของอุณหภูมิ 3 ค่าคือ อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดเจลลิตีในเซชัน (onset temperature;  $T_o$ ) อุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันสูงสุด (peak temperature;  $T_p$ ) และอุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (conclusion temperature;  $T_c$ ) และค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (enthalpy;  $\Delta H$ ) ซึ่งกระบวนการเกิดเจลลิตีในเซชันของแป้งเป็นกระบวนการแบบดูดความร้อน (endothermic enthalpy) ผลการวิเคราะห์สมบัติทางเทอร์โมไดนามิกในการเกิดเจลลิตีในเซชันของฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าว พบว่าพันธุ์ข้าวส่วนใหญ่จะให้ลักษณะกราฟที่ประกอบด้วยพีค 2 พีค ยกเว้นพันธุ์เหนียวสกจนคร เหนียวสันป่าตอง กข 6 และกข 10 แสดงให้เห็นถึงลักษณะโครงสร้างภายในของข้าวที่ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ประเภท กล่าวคือ พีคที่หนึ่งจะเป็นพลังงานที่ใช้ในการเปลี่ยนสถานะ หรือเจลลิตีในเซชันของโมเลกุลแป้ง ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นการทำลาย

พันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างที่เป็นระเบียบที่พบในส่วนผลึกของโมเลกุลอะมิโลเพคติน โดยอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันของฟลาวัวร์และสตาร์ชจะเกิดที่ช่วงอุณหภูมิ 64.42-93.57°C และ 63.03-91.18°C ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าฟิสิกที่สอง โดยฟิสิกที่สองเป็นการเปลี่ยนสถานะของสารประกอบเชิงซ้อนของอะมิโลสกับไขมัน (amylose-lipid complex) ซึ่งจะเกิดที่อุณหภูมิ (ช่วงอุณหภูมิ 90-118°C) สูงกว่าการเกิดเจลลิตีในเซชันของโมเลกุลแป้งทั้งในฟลาวัวร์และสตาร์ช ส่วนพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชันของฟลาวัวร์และสตาร์ชในฟิสิกที่หนึ่งมีค่า 5.14-16.16 J/g และ 11.71-18.37 J/g ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในฟิสิกที่สองซึ่งอยู่ในช่วง 0.35-2.89 J/g และ 0.38-3.89 J/g ในฟลาวัวร์และสตาร์ชตามลำดับ

ปาริดา ขุนแอ (2550) ได้ทำการศึกษาสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียวสามารถตรวจวัดด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) พบว่าสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิดแสดงฟิสิกที่มีลักษณะดูดความร้อน (endotherm) ซึ่งแสดงถึงการใช้พลังงานในการหลอมละลายผลึกของสตาร์ช และสามารถวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิเริ่มเกิด เจลลิตีในเซชัน ( $T_o$ ) อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลลิตีในเซชัน ( $T_p$ ) อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลลิตีในเซชัน ( $T_c$ ) ช่วงของอุณหภูมิการเกิดเจลลิตีในเซชัน ( $T_c-T_o$ ) และพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชัน ( $\Delta H$ ) พบว่าค่า  $T_o$  ของสตาร์ชข้าวมีค่าเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ คือ สตาร์ชข้าวเหนียว (69.81°C) สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 (60.75°C) และสตาร์ชข้าวเหนียว (59.44°C) เนื่องจากสตาร์ชข้าวเหนียวมีปริมาณอะมิโลสเป็นองค์ประกอบสูงจึงส่งผลให้ความแข็งแรงของโครงสร้างภายในโมเลกุลของสตาร์ชมีค่าเพิ่มขึ้นจึงต้องใช้อุณหภูมิสูงในการหลอมละลายเม็ดสตาร์ช และเมื่อเปรียบเทียบค่า  $\Delta H$  ของสตาร์ชข้างทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่า  $\Delta H$  ของสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่าสูงสุดทั้งนี้เนื่องมาจากสตาร์ชข้าวเหนียวมีปริมาณอะมิโลเพคตินสูง ส่งผลให้ปริมาณเกลียวคู่ในบริเวณผลึกของเม็ดสตาร์ชมีค่ามากขึ้น ดังนั้นจึงต้องใช้พลังงานปริมาณในการหลอมละลายผลึก นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงของอุณหภูมิการเกิดเจลลิตีในเซชัน ( $T_c-T_o$ ) ของสตาร์ชข้าวเหนียว (13.52°C) สูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 (10.52°C) และสตาร์ชข้าวเหนียว (7.94°C) ตามลำดับ

Noosuk และคณะ (2003) ศึกษาพฤติกรรมการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชข้าวไทย 3 พันธุ์ โดยใช้เครื่อง DSC พบว่าการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชข้าวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามค่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดเจลลิตีในเซชัน ได้แก่ สตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำและปานกลาง ซึ่งมีค่า  $T_o$  ในช่วง 61-63°C สตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ซึ่งมีค่า  $T_o$  ในช่วง 72-73°C นอกจากนั้นพบว่าค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชไม่มีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของข้าว โดยมีค่าอยู่ในช่วง 11.52-14.48 J/g

## 1.4.2 สมบัติรีโอโลยี

### 1.4.2.1 สมบัติการเกิดเพสท์ (pasting properties)

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546) ทำการศึกษาสมบัติความหนืดของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่างกัน ได้แก่ สตาร์ชปริมาณอะมิโลสต่ำ (ร้อยละ 3.8) สตาร์ชปริมาณอะมิโลสปานกลาง (ร้อยละ 12.88-15.95) และสตาร์ชปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 18.00-25.10) ด้วยเครื่องวัดความหนืด Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่าอุณหภูมิที่สารละลายสตาร์ชเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูง สูงกว่าสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ ค่าความหนืดสูงสุดของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำมีแนวโน้มสูงกว่าสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูง เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายอย่างต่อเนื่อง ความร้อนและแรงเฉือนจากการกวนจะทำให้ความหนืดของสารละลายลดลง สตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูงมีแนวโน้มให้ค่าความหนืดต่ำสุดหลังผ่านการต้มสูงกว่าสตาร์ชกลุ่มที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ เมื่อสารละลายสตาร์ชเย็นตัวลงจะมีความหนืดเพิ่มขึ้น (final viscosity) ซึ่งเป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวใหม่ของสตาร์ช (retrogradation) สำหรับสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูงมีแนวโน้มให้ความหนืดสุดท้ายหลังตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และมีการคืนตัวสูงสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ

บุญทิพา นิลจันทร์ (2548) ศึกษาสมบัติทางความหนืดของฟลาวัวร์ และสตาร์ชข้าวพันธุ์ต่าง ๆ ที่รวบรวมในประเทศไทย จำนวน 29 พันธุ์ ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) เมื่อพิจารณาค่าความหนืดสูงสุดของฟลาวัวร์และสตาร์ชของข้าวแต่ละพันธุ์ พบว่าโดยส่วนใหญ่ฟลาวัวร์ข้าวจะมีค่าความหนืดสูงสุด (128-286 RVU) ต่ำกว่าสตาร์ช (110-348 RVU) ของข้าวพันธุ์เดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูงมีแนวโน้มที่จะมีค่าความหนืดสูงสุด (128-259 RVU และ 110-279 RVU ตามลำดับ) ต่ำกว่าฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำและปานกลาง (211-286 RVU และ 136-348 RVU ตามลำดับ) และเมื่อพิจารณาค่าความหนืดต่ำสุดของฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าว พบว่าฟลาวัวร์และสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูงจะมีค่าความหนืดต่ำสุดอยู่ในช่วง 79-148 RVU และ 52-100 RVU ตามลำดับ ส่วนฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าวที่มีอะมิโลสปานกลางมีค่าความหนืดต่ำสุดอยู่ในช่วง 63-178 RVU และ 56-186 RVU ตามลำดับ ส่วนฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าวที่มีอะมิโลสต่ำมีค่าความหนืดต่ำสุดอยู่ในช่วง 72-92 RVU และ 60-83 RVU ตามลำดับ

ปาริศา ขุนแอ (2550) ศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียง ด้วยเครื่องบราเบนเดอร์วิสโคกราฟ พบว่าสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิดก่อนการดัดแปรพบว่าสตาร์ชแต่ละชนิดมีรูปแบบความหนืด (pasting profile) แตกต่างกันไป เมื่อแบ่งตามรูปแบบความหนืดของสตาร์ชตามวิธีของ Schoch และ Maywald (1968) พบว่าสตาร์ช

ข้าวเหนียวมีรูปแบบความหนืดแบบ a คือลักษณะของกราฟความหนืดจะสูงขึ้นแล้วลดลงอย่างรวดเร็วระหว่างการให้ความร้อน สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีรูปแบบความหนืดแบบ b คือลักษณะกราฟความหนืดมีความสูงขึ้น และการสลายตัวของเม็ดสตาร์ชระหว่างการให้ความร้อนน้อยกว่ากราฟความหนืดแบบ a สำหรับสตาร์ชข้าวเหนียวมีรูปแบบของกราฟความหนืดแบบ c คือลักษณะกราฟไม่ปรากฏยอดสูงสุดและค่าความหนืดเพิ่มขึ้นระหว่างการลดอุณหภูมิ สำหรับค่าพารามิเตอร์ทางความหนืด พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดความหนืด ( $T_0$ ) ของสตาร์ชข้าวเหนียวตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ สตาร์ชข้าวเหนียว ( $78.5^{\circ}\text{C}$ ) สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 ( $69.5^{\circ}\text{C}$ ) และสตาร์ชข้าวเหนียว ( $64.0^{\circ}\text{C}$ ) เนื่องมาจากสตาร์ชข้าวเหนียวมีปริมาณอะมิโลสสูงจึงมีความแข็งแรงของโครงสร้างภายในเม็ดสตาร์ชสูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียวจึงต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าในการเกิดเป็นสตาร์ชเพสต์ ในขณะที่ค่าความหนืดสูงสุด ( $P_v$ ) และ Breakdown ( $BD$ ) ของสตาร์ชข้าวเหนียวสูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 เนื่องจากค่า  $P_v$  เป็นค่าความหนืดขณะที่เม็ดสตาร์ชมีกำลังการพองตัวสูงสุด และ  $BD$  บ่งบอกถึงการแตกสลายของเม็ดสตาร์ชระหว่างการให้ความร้อน ดังนั้นสตาร์ชข้าวเหนียวซึ่งมีค่ากำลังการพองตัวต่ำจึงไม่พบค่า  $P_v$  และ  $BD$  ในกราฟความหนืด เมื่อลดอุณหภูมิของสตาร์ชลง พบว่าค่าความหนืดเนื่องมาจากการคืนตัว (setback;  $SB$ ) ของสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิดมีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งค่า  $SB$  แสดงถึงแนวโน้มการกลับมาจัดเรียงใหม่ของสายโมเลกุลของสตาร์ชที่อยู่ในสตาร์ชเพสต์ โดยเฉพาะสายโมเลกุลอะมิโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นสามารถกลับมาจัดเรียงตัวกันใหม่ได้ง่ายกว่าโมเลกุลของอะมิโลเพคติน ดังนั้นสตาร์ชข้าวเหนียวมีปริมาณอะมิโลสที่สูงกว่าจึงมีค่า  $SB$  มากกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียวตามลำดับ

Noosuk และคณะ (2003) ศึกษาพฤติกรรมการเกิดความหนืดของสตาร์ชข้าวขณะได้รับความร้อนจากการตรวจวัดด้วยเครื่อง RVA พบว่าสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ มีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิแคบๆ ซึ่งแสดงถึงระดับการพองตัวที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากค่า breakdown และอุณหภูมิที่เริ่มเปลี่ยนค่าความหนืด (pasting temperature) สามารถแบ่งสตาร์ชจากข้าวออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ และสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสปาน กลาง ซึ่งมีค่า breakdown ในช่วง  $1839\text{--}2282$  mPa.s และมีค่าอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนค่าความหนืดในช่วง  $67\text{--}71^{\circ}\text{C}$  และสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ซึ่งมีค่า breakdown ในช่วง  $1082\text{--}1148$  mPa.s และมีค่าอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืดในช่วง  $77\text{--}80^{\circ}\text{C}$  สำหรับความแตกต่างของค่า setback ของสตาร์ชนั้น พบว่าเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณอะมิโลสโดย setback มีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณอะมิโลสในสตาร์ชข้าว ( $R^2 = 0.96, p \leq 0.01$ )

#### 1.4.2.2 สมบัติความหนืด (viscosity properties)

ปาริดา ขุนแอ (2550) ทำการศึกษาพฤติกรรมการไหลของสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว โดยการเตรียมสตาร์ชสตาร์ชเพสท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนัก) ทำการวัดที่อุณหภูมิ 60°C ในช่วงอัตราเฉือนเท่ากับ 0-300 s<sup>-1</sup> จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นเฉือนและอัตราการเฉือนของสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิด พบว่าเป็นไปตามกฎสมการยกกำลัง (power law equation) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ( $R^2 = 0.99, p \leq 0.05$ ) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าความหนืดปรากฏและความเค้นเฉือนของสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิด ก่อนการตัดแปรด้วยความร้อนขึ้นพบว่าความหนืดปรากฏลดลงเมื่ออัตราการเฉือนเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาค่าดัชนีพฤติกรรมการไหล ( $n$ ) ของสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่ามีพฤติกรรมการไหลแบบ shear-thinning (pseudoplastic) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ทางความหนืด ( $k$ ) พบว่าค่า  $k$  ของสตาร์ชข้าวเหนียว (10.77 Pa.s<sup>n</sup>) สูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 (3.2 Pa.s<sup>n</sup>) และสตาร์ชข้าวเหนียว (1.48 Pa.s<sup>n</sup>) ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความเค้นเฉือนกับอัตราการเฉือนในช่วงที่มีการเพิ่มและลดอัตราการเฉือน พบว่าสตาร์ชข้าวทั้ง 3 ชนิด เกิดฮิสเทอรีซิสลูป (hysteresis loop) แสดงว่ามีพฤติกรรมการไหลที่ขึ้นกับเวลาชนิด thixotropic โดยพบว่าค่า hysteresis loop ของสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว ตามลำดับ

Noosuk และคณะ (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเฉือนและความเค้นเฉือนของสตาร์ชข้าวที่มีความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 1-8 (โดยน้ำหนัก) ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ที่อัตราการเฉือนในช่วง 50-1000 s<sup>-1</sup> พบว่าเป็นไปตามสมการยกกำลัง (power law equation) และมีพฤติกรรมการไหลแบบซูโดพลาสติก (pseudoplastic) และพบว่าสัมประสิทธิ์ค่าความคงตัว ( $k$ ) ของสตาร์ชข้าวเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสตาร์ชเพิ่มขึ้น สามารถพิจารณาได้จากการลดลงของค่า  $n$  เมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีสมบัติการไหลแบบซูโดพลาสติกเพิ่มมากขึ้น และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ซูโดพลาสติก (pseudoplastic constant;  $m$  ซึ่งค่านี้มีค่าเท่ากับ  $n-1$ ) กับค่าความเข้มข้น พบว่าที่ความเข้มข้นของสตาร์ชต่ำๆ ค่า  $m$  มีค่าเข้าใกล้ 0 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงสมบัติการไหลแบบนิวโตเนียน ขณะที่ความเข้มข้นสูงๆ ค่า  $m$  มีค่าเข้าใกล้ค่าคงที่ และแสดงการไหลแบบนอนนิวโตเนียน

#### 1.4.2.3 สมบัติวิสโคอีลาสติก (viscoelastic properties)

ปาริดา ขุนแอ (2550) ศึกษาสมบัติวิสโคอีลาสติกแบบการสั่นทางพลวัต (dynamic oscillation) ของสตาร์ชข้าวเหนียว สตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว พบว่าสตาร์ชข้าวทุกชนิดมีค่า  $G'$  สูงกว่าค่า  $G''$  และพบว่าค่า  $G'$  (ความถี่ 1 Hz) ของสตาร์ชข้าวเหนียว (316 Pa) สูง

กว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 (230 Pa) และสตาร์ชข้าวเหนียว (7.68 Pa) ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเจลของสตาร์ชข้าวเหนียวมีความแข็งแรงกว่าเจลของสตาร์ชข้าวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว นอกจากนี้ยังพบว่าเจลของสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่า  $\tan \delta$  ต่ำสุด (0.09) ซึ่งแสดงว่ามีความยืดหยุ่นของเจลที่สูงกว่าสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียว เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของค่า  $G'$  กับค่าความถี่ พบว่าค่า  $G'$  ของสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความถี่เพิ่มขึ้น ซึ่งคุณลักษณะของเจลที่มีพฤติกรรมคล้ายของไหลหนืด (fluid-like behavior) หรือ เจลอ่อน สำหรับสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และสตาร์ชข้าวเหนียวพบค่า  $G'$  และ  $G''$  ไม่เปลี่ยนแปลงกับค่าความถี่ ซึ่งแสดงคุณลักษณะของเจลที่แท้จริง (true gel)

### 1.4.3 การเกิดรีโทรเกรเดชัน

ปาริดา ขุนแอ (2550) ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) จากผลการทดลองการเก็บรักษาเจลของสตาร์ชข้าวเหนียวและเจลสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นเวลา 74 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  พบว่าพีคการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (FTIR spectra) ที่  $1047\text{ cm}^{-1}$  มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่พบการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลจากสตาร์ชข้าวทั้ง 2 ชนิด สำหรับเจลของสตาร์ชข้าวเหนียว พบว่าพีคที่  $1047\text{ cm}^{-1}$  และค่า RSA มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ซึ่งแสดงถึงการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชข้าวเหนียว โดยพบว่าค่า RSA ของเจลสตาร์ชข้าวเหนียวมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเก็บรักษาและจากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วง 24-74 ชั่วโมง และไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษานานกว่า 74 ชั่วโมง จากการคำนวณอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชโดยใช้สมการ Avrami (Avrami equation) พบว่าอัตราการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเท่ากับ  $0.91 \times 10^{-5}\text{ (s}^{-1}\text{)}$  และ  $0.79 \times 10^{-5}\text{ (s}^{-1}\text{)}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันโดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงการคืบของเจลสตาร์ชข้าวชนิดต่างๆ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่าค่า instantaneous elastic modulus ( $G_0$ ) ของเจลสตาร์ชข้าวเหนียว เจลสตาร์ชข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเจลสตาร์ชข้าวเหนียวมีค่าเท่ากับ 3984.40, 511.52 และ 6.69 Pa ตามลำดับ ซึ่งค่า  $G_0$  แสดงถึงความแข็งแรงของเจล

Lii และคณะ (1995) รายงานว่าระหว่างการลดอุณหภูมิของเจล ค่า  $G'$  มีค่าเพิ่มขึ้นโดยสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (ร้อยละ 25.6) มีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า  $G'$  สูงกว่าสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ (ร้อยละ 14.80) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของสตาร์ชเดียวกัน พบว่าค่า  $G'$  มีค่าเพิ่มขึ้น ระหว่างการลดอุณหภูมิของเจลลง ซึ่งอธิบายได้ว่าเกิดจากอันตรกิริยาของสายโมเลกุลของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินที่อุณหภูมิต่ำ การลดอุณหภูมิของเจลลงส่งผลต่อการ

เกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช โดยในช่วงแรกเป็นการเกิดรีโทรเกรเดชันของอะมิโลส (Billiaderis and Zawistowski, 1990)

Noosuk และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวไทยที่มีปริมาณอะมิโลสแตกต่างกันด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ โดยการตรวจติดตามค่า  $G'$  ในช่วงของการเก็บรักษา พบว่าการเกิดรีโทรเกรเดชันแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ช่วงแรกเป็นช่วงเริ่มต้นที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ช่วงที่ 2 เป็นช่วงที่ค่า  $G'$  เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ช่วงนี้จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 85-90 ชั่วโมง ช่วงที่ 3 เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนมีค่าคงที่ ซึ่งเป็นช่วงที่สายโมเลกุลของสตาร์ชสามารถกลับมาจัดเรียงตัวเป็นผลึกได้สมบูรณ์ และยังได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสตาร์ชข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ซึ่งเป็นสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20-40 (โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 25°C โดยการหาอัตราส่วนของโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ต่อส่วนอสัณฐาน (short-range molecular order to amorphous; RSA) พบว่าการฟอร์มตัวของสายเกลียวคู่แบ่งเป็น 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงการจัดเรียงตัวของสายสตาร์ช การกลับมาจัดเรียงตัวเป็นผลึกและช่วงของการจัดเรียงตัวของสตาร์ชอย่างสมบูรณ์ ช่วงแรกของการกลับมาจัดเรียงตัวของสายสตาร์ชพบที่ช่วงเวลา 10, 20 และ 22 ชั่วโมง สำหรับสตาร์ชที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 30 และ 40 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ ช่วงการจัดเรียงตัวอย่างสมบูรณ์พบที่ช่วงเวลา 55, 90 และ 95 ชั่วโมง สำหรับสตาร์ชที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 30 และ 40 (โดยน้ำหนัก) ตามลำดับ อัตราการเปลี่ยนแปลงของ RSA เพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสตาร์ชทำให้ปริมาณอะมิโลสและสัดส่วนร้อยละของอะมิโลเพคติน DP 12-24 ในโครงข่ายของเจลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การฟอร์มโครงข่ายสามมิติเกิดได้มากขึ้นระหว่างการเกิดรีโทรเกรเดชัน (Levine and Slade, 1986)

Noosuk และคณะ (2005) ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่างกันซึ่งได้ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า  $G'$  และค่า RSA ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C จากการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าทั้งสองสำหรับสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำและอะมิโลสปานกลางในช่วงการเก็บรักษา 70 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากสตาร์ชข้าวทั้งสองมีปริมาณอะมิโลสและสัดส่วนของความยาวสายของอะมิโลเพคตินที่ DP 12-14 ต่ำทำให้โมเลกุลของสตาร์ชไม่สามารถเกิดอันตรกิริยาต่อกันเพื่อเกิดเป็นเจลที่มีโครงร่างตาข่ายสามมิติ นอกจากนี้ยังพบว่าสตาร์ชข้าวอะมิโลสสูงมีสัดส่วนของอะมิโลเพคตินสายสั้น (DP 3-11) สูง ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลได้ ในขณะที่เดียวกันพบว่าเจลของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสสูง (สตาร์ชข้าวสุพรรณบุรี 1 และสตาร์ชข้าวทางการค้า) พบการเปลี่ยนแปลงของค่า  $G'$  และค่า RSA ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 100 ชั่วโมง โดยการเปลี่ยนแปลงแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ช่วงแรก



เป็นช่วงเริ่มต้นที่เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ช่วงที่ 2 เป็นช่วงที่ค่า G' และค่า RSA เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ช่วงนี้จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 85-90 ชั่วโมง ช่วงที่ 3 เป็นช่วงการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นน้อยมากจนมีค่าคงที่ซึ่งในช่วงที่ผลึกเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

## 2. เมล็ดขนุน และสตาร์ชเมล็ดขนุน

ขนุนเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ชนิดผลประกอบ (compound fruit) มีชื่อสามัญว่า Jackfruit เป็นพืชในวงศ์ *Moraceae* มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Artocarpus heterophyllus* L. พบโดยทั่วไปในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบมากในประเทศอินเดีย บังกลาเทศ พม่า ศรีลังกา มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ บราซิล และภาคใต้ของประเทศไทย (Othman and Subhadrabandhu, 1995) ขนุนจัดเป็นผลไม้เมืองร้อนที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยเพราะสามารถปลูกและดูแลง่าย ทนทานต่อโรคและแมลง จัดเป็นไม้ยืนต้นมีความสูง 9-23 เมตร ลำต้นตรง แตกกิ่งบริเวณโคนมาก มีน้ำยางสีขาว ทรงพุ่มทึบ ออกดอกและผลตามส่วนของลำต้นและกิ่งแก่ เปลือกนอกของผลมีลักษณะเป็นหนามแหลม เนื้อในเป็นขวงๆ มีตั้งแต่สีเหลืองอ่อน เหลืองทองจนถึงสีจำปา ห่อหุ้มด้วยขั้ว น้ำหนักผลเฉลี่ยประมาณ 18-50 กิโลกรัม ให้ผลผลิตตลอดทั้งปี และมีปริมาณสูงสุดในช่วงเดือนมิถุนายนถึงธันวาคม อัตราการเจริญเติบโตของต้นรวดเร็ว การตกผลจะใช้เวลาประมาณ 3-5 ปี ขึ้นอยู่กับชนิดของขนุน อาจปลูกโดยใช้เมล็ดซึ่งจะให้ผลช้า หรือใช้ทาบกิ่งและติดตา ขนุนเป็นพืชที่มีทั้งดอกตัวผู้และตัวเมียในต้นเดียวกัน (monoecious) แต่แยกคนละดอก เป็นช่อดอกแบบหวี มีฐานรองดอกดอกตัวผู้มักจะอยู่ปลายกิ่งระหว่างชอกกิ่ง หรือที่ลำต้นแต่อยู่เหนือดอกตัวเมีย ดอกตัวผู้มีจำนวนมาก และมีกลิ่นหอมคล้ายสำเภา ดอกตัวเมียมีขนาดโตกว่า สีเขียว เกิดบนกิ่งสั้นๆ เป็นดอกรวมคล้ายหนามในแต่ละดอกมีรังไข่เดี่ยว ก้านเกสรยาว และยอดเกสรตัวเมียจะกลายเป็นหนามในผล ผลเกิดเป็นผลรวม (multiple fruit) คือมีหลายดอกในช่อเดียวกัน ส่วนที่เป็นเนื้อขนุนแต่ละเมล็ดเกิดมาจากกลีบดอกชั้นนอกของดอกๆ เดียว ปลายสุดของทุกๆ กลีบชั้นนอกจะรวมติดอยู่ด้วยกัน เมล็ดถูกหุ้มด้วยเยื่อ (pericarp) ซึ่งมาจากฐานรองไข่ และดอกตัวเมียที่ไม่พัฒนาจะกลายเป็นขั้วขนุน ส่วนดอกที่พัฒนาจะกลายเป็นขวงขนุน ผลของขนุน โดยทั่วไปจะมีขนาดกลางถึงใหญ่ รสหวาน อาจมีกลิ่นฉุนบ้าง คุณภาพของเนื้อจะมีทั้งและนุ่มจนถึงแข็งกรอบ ตั้งแต่เนื้อบางจนหนา หรือเต็มขวง เมล็ดมีเปลือกหุ้ม 2 ชั้น ชั้นนอกเป็นเยื่อสีครีม (white aril) มีผิวเรียบมัน ส่วนชั้นในเป็นเยื่อบางสีน้ำตาล (brown aril) มีลวดลายเฉพาะตัวคล้ายเนื้อไม้ เนื้อเมล็ดมีสีขาว มีสตาร์ชเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง ลักษณะของขนุนที่ดี ควรจะมีขนาดของผลใหญ่สม่ำเสมอ การผสมเกสรดี ทำให้ผลเมื่อโตไม่คอด หรือบิดเบี้ยว ให้เนื้อมีรสชาติดี หวานกรอบ เนื้อหนา ไม่ละ ขวงใหญ่ ใต้กลางของผลยิ่งเล็กยิ่งดี และเมล็ดเล็ก (Mukprasirt and Sajjaanantakul, 2004)

ขนุนที่มีการปลูกอยู่ทั่วไปในประเทศไทย การจัดแบ่งชนิดยังไม่มีหลักเกณฑ์ที่แน่นอนเนื่องจากในอดีตที่ผ่านมาผู้คนไม่ค่อยให้ความสนใจที่จะคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ขนุนให้ลักษณะที่ดี ประกอบกับวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่ได้ผลดีไม่เป็นที่นิยมและรู้จักกันในหมู่ชาวสวน ซึ่งการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดทำให้ขนุนเกิดการแปรปรวนทางพันธุกรรมมาก มีทั้งลักษณะที่ดีและไม่ดี แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการแบ่งขนุนโดยยึดหลักตามลักษณะคุณภาพ และขนาดของผล ซึ่งในการทำวิจัยได้นำขนุนพันธุ์ทองประเสริฐมาใช้เนื่องจากว่ามีคุณสมบัติต่างๆ ที่ตรงกับความต้องการในการทำวิจัย ซึ่งจะสามารถอธิบายถึงลักษณะและองค์ประกอบของขนุนพันธุ์ทองประเสริฐได้ดังต่อไปนี้ พันธุ์ทองประเสริฐ ผู้ค้นพบขนุนพันธุ์ทองประเสริฐคือ คุณยงยุทธ วงษ์จิราภรณ์ อ.แกลง จ.ระยอง ขนุนพันธุ์ทองประเสริฐเป็นขนุนพันธุ์เบา สามารถออกดอกผลิตผลได้ ผลมีลักษณะเป็นทรงกลม ไม่แป้น ผิวสวย เปลือกมีสีเขียวถึงเขียวอมน้ำตาล เปลือกบาง หนามใหญ่ ฐานกว้าง ผลมีน้ำหนักประมาณ 10-15 กิโลกรัมต่อผล เนื้อขวงมีสีเหลืองทอง เนื้อหนา รสชาติหวานกรอบ มีเนื้อร้อยละ 50 ของน้ำหนักผล มีช้ำน้อย ทรงพุ่มสูงโปร่ง ใบกลมใหญ่ ปลายใบมนมีสีเขียวเข้ม (มานพ เหลืองพันธุ์, 2543)

ผลขนุนสามารถใช้รับประทานได้ทั้งผลดิบและสุก โดยที่ผลดิบหรือขนุนอ่อนนำไปประกอบอาหารได้ สำหรับผลสุกหรือขนุนแก่ใช้รับประทานผลสด ส่วนเมล็ดขนุนต้มใส่เกลือรับประทานเป็นของว่างได้ โดยกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ (2527) ได้รวบรวมคุณค่าทางโภชนาการของผลขนุน ชังขนุน และเมล็ดขนุน มีรายละเอียดดัง Table 2

จากตารางพบว่า เมล็ดขนุนมีคุณค่าทางอาหารไม่น้อยกว่าส่วนของผลขนุน โดยในเมล็ดขนุนมีปริมาณความชื้นเท่ากับร้อยละ 60.7 ไขมันร้อยละ 0.2 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 30.6 โปรตีนร้อยละ 5.5 (Table 2) เนื่องจากเมล็ดขนุนมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ค่อนข้างสูง จึงมีผู้สนใจนำไปใช้ประโยชน์โดยแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เมล็ดขนุนแช่อิ่มเคลือบน้ำเชื่อม และแป้งจากเมล็ดขนุน จากงานวิจัยของ Singh และคณะ (1991) พบว่าแป้งจากเมล็ดขนุนมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 16.3 และละลายได้ดีที่สภาวะเป็นกรดและด่าง มีจุด isoelectric point ที่พีเอช 4.0 นอกจากนี้ Bobbio และคณะ (1978) รายงานว่าความหนืดเมื่อแป้งเกิดความร้อน (hot paste viscosity) พบว่ามีความคงตัวดี เหมาะที่จะนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความคงตัวต่อความร้อนและแรงกวน เช่น ผลิตภัณฑ์ซอสชนิดต่างๆ และได้มีการใช้สตาร์ชดัดแปรโดยทางเคมี (chemical modified starch) เช่น สตาร์ชคลอสลิงก์ (crosslinked modified starch) เพื่อช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านความคงตัวของผลิตภัณฑ์ซอสมะเขือเทศ

Table 2 The nutritional value of jackfruit meat, fibre and jackfruit seed.

Composition	Unit	Jackfruit meat	Fibre	Jackfruit seed
Moisture	%	72.9	66.6	60.7
Fat	%	0.3	0.0	0.2
Carbohydrate	%	23.7	29.2	30.6
Fiber	%๘	0.9	1.8	1.6
Protein	%	1.7	1.4	5.5
Heat energy	kcal/100 g	94.00	122.00	146.00
Calcium	mg/100 g	27.00	21.00	0.00
Phosphorus	mg/100 g	38.00	13.00	105.00
Iron	mg/100 g	0.60	0.20	2.90
Vitamin B1	mg/100 g	0.09	0.08	1.74
Vitamin B2	mg/100 g	0.11	0.15	0.02
Vitamin C	mg/100 g	9.00	13.00	3.25
Niacin	mg/100 g	0.70	-	24.00
Vitamin A	International unit (I.U.)	392.00	-	22.00

Source: กองวิทยาศาสตร์สุขภาพ (2527)

## 2.1 การผลิตสตาร์ชเมล็ดขนุน

จากการที่เมล็ดขนุนมีปริมาณแป้งอยู่มาก และพบว่าการใช้ประโยชน์จากขนุนยังไม่คุ้มค่านัก เนื่องจากการที่มีปริมาณของเหลือทิ้งจากขนุนเฉลี่ยประมาณร้อยละ 50 โดยส่วนที่ใช้ประโยชน์จากเนื้อไม้ประมาณร้อยละ 30 และเมล็ดประมาณร้อยละ 12 แต่ทั้งนี้สตาร์ชจากเมล็ดขนุน ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก (Morton, 1965) สำหรับวิธีการผลิตสตาร์ชจากเมล็ดขนุนสามารถผลิตได้หลายวิธี โดยได้มีผู้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

นฤชิต แว่วศรีผ่อง (2529) ศึกษาวิธีการสกัดสตาร์ชเมล็ดขนุน โดยทำการปอกเปลือกแข็งของเมล็ดขนุนออกเหลือเป็นส่วนที่มีสีน้ำตาลแดง จากนั้นจะนำเมล็ดขนุนไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 30 นาที แล้วนำมาล้างน้ำหลายครั้งเพื่อกำจัดด่างออกก่อน จึงจะนำมาปั่นผสมกับสารละลายโซเดียมไบซัลไฟต์เข้มข้นร้อยละ 0.5

จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเตสสารละลายโซเดียมไบซัลไฟท์ทิ้ง แล้วล้างน้ำและตกตะกอนหลายๆ ครั้งใน 2 ครั้งสุดท้ายล้างด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 นำมาอบในตู้อบจนแห้ง

ยุทธนา พิมลศิริผล และคณะ (2542) ศึกษาวิธีการสกัดสารจากเมล็ดขนุน 2 วิธี คือ วิธีไม่ปอกเปลือก และปอกเปลือกของเมล็ด (โดยปอกจนถึงส่วนที่เป็นสีขาวหรือ โคนทิสคอน) นำเมล็ดขนุนมาปั่นผสมกับสารละลายโซเดียมไบซัลไฟท์เข้มข้นร้อยละ 0.5 ที่ระดับความเร็วสูง นาน 2 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้มากรองกากออกด้วยถุงผ้าที่มีรูขนาด 80 mesh ล้างกากด้วย น้ำกรอง 2 ครั้ง โดยนำมาพร้อมกับสารละลายที่กรองได้ครั้งแรก แล้วกรองผ่านตะแกรงขนาด 170 mesh จากนั้นล้างด้วยน้ำ และตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 3 ครั้ง แล้วนำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียม คลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 และสารละลายโทลูอินเข้มข้นร้อยละ 0.02 แล้วล้างออกด้วยน้ำ และ สุดท้ายล้างด้วยแอลกอฮอล์ ทิ้งให้ตกตะกอนเป็นจำนวน 2 ครั้ง แล้วนำมาเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ก่อนที่จะนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C นาน 24-48 ชั่วโมง จนมีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 13 พบว่าสารสกัดเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกมีความชื้นร้อยละ  $6.10 \pm 0.09$  ปริมาณโปรตีนร้อยละ  $1.04 \pm 0.01$  ปริมาณไขมันร้อยละ  $0.36 \pm 0.05$  ปริมาณเถ้าร้อยละ  $0.22 \pm 0.04$  ปริมาณเยื่อใยร้อยละ  $1.30 \pm 0.03$  และมีปริมาณสารสกัดเท่ากับร้อยละ  $98.23 \pm 0.20$  ขณะที่สารสกัด ขนุนแบบไม่ปอกเปลือกมีความชื้นร้อยละ  $6.21 \pm 0.13$  ปริมาณโปรตีนร้อยละ  $2.10 \pm 0.05$  ปริมาณ ไขมันร้อยละ  $0.40 \pm 0.04$  ปริมาณเถ้าร้อยละ  $0.24 \pm 0.06$  ปริมาณเยื่อใยร้อยละ  $1.43 \pm 0.05$  และมี ปริมาณสารสกัดเท่ากับร้อยละ  $93.67 \pm 0.13$

Bobbio และคณะ (1978) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารและคุณสมบัติทางเคมี ฟิสิกส์จากเมล็ดขนุน (*Artocarpus heterophyllus*) โดยพบว่าจากการสกัดสารนี้ได้ปริมาณ ผลผลิตประมาณร้อยละ 25-40 ของของแข็งทั้งหมด ซึ่งวิธีการสกัดสามารถทำได้โดยปอกเปลือก เมล็ดขนุนออกจนถึงส่วนที่เป็น โคนทิสคอน (cotyledons) จากนั้นนำมาปั่นผสมกับสารละลาย โซเดียมไบซัลไฟท์เข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 2 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อกำจัดกาก ออก แล้วนำสารละลายมาล้างที่อุณหภูมิประมาณ 4-5°C แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดน้ำตาลที่ ละลายได้ออก จากนั้นนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 80 แล้วนำมาทำแห้งที่อุณหภูมิ 30°C นาน 48 ชั่วโมง โดยพบว่าสารที่ผลิตได้มีปริมาณความชื้นร้อยละ 13.0 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.32 ปริมาณไขมันร้อยละ 0.43 และปริมาณเถ้าร้อยละ 0.22

Oates และ Powell (1996) ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารจากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ รวมทั้ง เมล็ดขนุนด้วย ซึ่งวิธีการสกัดทำโดยนำเมล็ดมาปอกเปลือกออกแล้วนำมาแช่น้ำทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมาล้างและปั่นด้วยความเร็วต่ำนาน 2 นาที แล้วจึงนำมากรองออกด้วยถุงผ้าที่มีรูขนาด ประมาณ 80 mesh จากนั้นล้างและตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 3 ครั้ง โดยในครั้งสุดท้ายจะนำมาล้างด้วย

สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 10 และสารละลายโทลูอินเข้มข้นร้อยละ 0.02 แล้วล้างออกด้วยน้ำก่อนที่จะนำไปอบในตู้อบแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50°C ซึ่งได้ปริมาณของสตาร์ชประมาณร้อยละ 12.7-15.4 ของเมล็ดสด

Tulyathan และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาการสกัดสตาร์ชเมล็ดขนุน ซึ่งทำการสกัดฟลาวาร์ โดยการลอกเยื่อต่างๆ (seed coat) ออก จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 2 นาที เพื่อกำจัดส่วนของ spermoderm ออก จากนั้นนำเมล็ดขนุนไปหั่นเป็นชิ้นต่างๆ และนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งลมร้อนแบบถาด (Tray dry) ที่อุณหภูมิ 50-60°C จนมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 13 จากนั้นนำไปบดเป็นผง แล้วนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 70 mesh เก็บใส่ถุงพลาสติก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°C (Bobbio *et al.*, 1978) โดยพบว่าจากการสกัดฟลาวาร์นี้ได้ปริมาณผลผลิตประมาณร้อยละ 36.4 จากนั้นนำฟลาวาร์ไปละลายด้วยน้ำกลั่นและกรองผ่านตะแกรงขนาด 70 mesh เพื่อกำจัดกากออก จากนั้นวางตั้งทิ้งไว้และเทสารละลายส่วนใสทิ้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C ซึ่งขั้นตอนนี้ทำซ้ำหลายๆ ครั้ง จนกระทั่งตะกอนที่ได้สะอาด จากนั้นนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 40-60°C จนมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 13 จากนั้นนำไปบดเป็นผง แล้วนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 70 mesh พบว่าสตาร์ชที่เตรียมได้มีความชื้นเท่ากับร้อยละ  $8.57 \pm 0.25$  ปริมาณโปรตีนร้อยละ  $11.17 \pm 0.21$  ปริมาณไขมันร้อยละ  $0.99 \pm 0.08$  ปริมาณเยื่อใยร้อยละ  $1.67 \pm 0.11$  ปริมาณเถ้าร้อยละ  $3.92 \pm 0.03$  และปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 82.25 (โดยน้ำหนักแห้ง)

Mukaprasirt และ Sajjaanantakul (2004) ได้ทำการศึกษาการสกัดสตาร์ชเมล็ดขนุน ซึ่งวิธีการสกัดสามารถทำได้โดยลอกเยื่อต่างๆ ออก จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 30 นาที เพื่อกำจัดส่วนของ spermoderm ออก ล้างด้วยน้ำจนสะอาดและไม่มีด่างตกค้าง จะได้ส่วนของโคทิลีดอน นำไปแช่ในสารละลายโซเดียมไบซัลไฟท์เข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 30 นาที และล้างซ้ำด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง จะได้เมล็ดขนุนที่มีสีค่อนข้างขาวเพื่อนำไปเตรียมเป็นสตาร์ช นำส่วนโคทิลีดอนไปโม่แห้งโดยใช้เครื่องปั่นที่ความเร็วระดับปานกลางนาน 2 นาที จากนั้นนำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 50°C นาน 8 ชั่วโมง และนำไปบดด้วยเครื่องบดตัวอย่างแบบ ultra centrifugal mill นำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh หรือนำส่วนโคทิลีดอนไปโม่เปียกโดยการนำไปปั่นกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นทำแห้งที่อุณหภูมิ 50°C นาน 8 ชั่วโมง นำฟลาวาร์ที่ได้ไปผลิตเป็นสตาร์ชโดยนำส่วนโคทิลีดอน (cotyledons) มาปั่นผสมกับสารละลายโซเดียมไบซัลไฟท์เข้มข้นร้อยละ 0.5 นาน 2 นาที ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก และนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เพื่อกำจัดกากออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดน้ำตาลที่ละลายได้ออก ซึ่งสารละลายสามารถถูกแยกได้โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 35000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C นำ

ตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่น เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 และน้ำกลั่นอีกครั้ง ตามลำดับ จากนั้นนำไปทำแห้งอุณหภูมิ 50°C นาน 8 ชั่วโมง และนำไปผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh (Bobbio *et al.*, 1978) พบว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีความชื้นเท่ากับร้อยละ 9.94 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.81 ปริมาณไขมันร้อยละ 0.90 และปริมาณเถ้าร้อยละ 0.17

Tongdang (2008) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารจากเมล็ดขนุน โดยการนำเมล็ดขนุนมาปอกส่วนที่เป็นสีน้ำตาลออกและล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเมล็ดที่ได้ไปบดผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 2 นาที นำไปกรองผ่าน nylon cloth จากนั้นนำส่วนที่ไม่ผ่าน nylon cloth ไปผสมและล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 3 ครั้ง นำส่วนที่ผ่าน nylon cloth มาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ และนำไปหมუნเหวียงที่ 1600g นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นจุดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลด้านบนของตะกอนออก นำตะกอนที่ได้ไปหมუნเหวียงที่ 1600g นาน 15 นาที ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ซ้ำจนกระทั่งได้ตะกอนที่สะอาด เติมน้ำกลั่นลงในตะกอนที่ได้ และทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายไปผ่านตะแกรง nylon cloth และทำแห้งที่อุณหภูมิ 45°C พบว่าสารสกัดที่เตรียมได้มีความชื้นเท่ากับร้อยละ 11.66±0.32 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.10±0.00 ปริมาณไขมันร้อยละ 0.02±0.01 และปริมาณเถ้าร้อยละ 0.29±0.01

Dutta และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตสารจากเมล็ดขนุน โดยการนำเมล็ดขนุนมาล้างเช็ดด้านนอกออกด้วยน้ำ จากนั้นนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งลมร้อนแบบถาด (Tray dry) ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน และกำจัดเชื้อบางๆ ออกให้เหลือแต่ส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด (spermoderm) ที่มีสีน้ำตาล และเปลือกหุ้มเมล็ดถูกกำจัดโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.6 โมลาร์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อฟอกสีส่วนโคทิลีดอน และล้างโคทิลีดอนด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งเพื่อกำจัดต่าง นำเมล็ดขนุนไม่เปียกด้วยเครื่องปั่น ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนเมล็ดขนุนต่อน้ำ เป็น 1:3 เป็นเวลา 2 นาที และนำไปผ่านตะแกรงร่อนขนาด 200 ไมโครเมตร นำสารละลายที่ได้ไปหมუნเหวียงที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที นำตะกอนไปละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยมีการกวนตลอดเวลาเพื่อกำจัดโปรตีนที่ติดอยู่ในแกรนูลของเมล็ดสารสกัดออก จากนั้นนำไปหมუნเหวียงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจุดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลด้านบนออก และปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 จำนวน 2 ครั้ง เพื่อกำจัดไออน และนำไปทำแห้งภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30°C จากนั้นนำไปผ่านตะแกรงร่อนขนาด 100 ไมโครเมตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

(Mukaprasirt and Sajjaanantakul, 2004; Bobbio *et al.*, 1978) พบว่าสตาร์ชที่เตรียมได้มีความชื้นร้อยละ  $11.3 \pm 0.03$  ปริมาณโปรตีนร้อยละ  $0.4 \pm 0.02$  ปริมาณไขมันร้อยละ  $0.2 \pm 0.00$  โดยน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณสตาร์ชเท่ากับร้อยละ  $99.2 \pm 0.04$  โดยน้ำหนักแห้ง

Rengsutthi และ Charoenrein (2011) ได้ทำการศึกษาการสกัดสตาร์ชจากเมล็ดขนุน โดยเริ่มจากการกำจัดเปลือกหุ้มเมล็ด (spermoderm) ที่มีสีน้ำตาล ที่ปกคลุมส่วนโคทิลีดอนออก โดยการแช่เมล็ดขนุนในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 5 และแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น นำส่วนโคทิลีดอนมาหั่นเป็นแผ่นบางๆ ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร และนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งลมร้อนแบบถาด (Tray dry) ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 13 นำเมล็ดขนุนที่แห้งแล้วไปบด (hammer mill) และนำไปผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.18 มิลลิเมตร (Tulyathan *et al.*, 2002; Mukaprasirt and Sajjaanantakul, 2004) จากนั้นนำฟลาวร์ที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 M และกวนตลอดเวลา นาน 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมუნเหวียงที่ 3000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นดูดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลด้านบนของตะกอนออก และทำซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 M นำตะกอนที่ล้างด้วยน้ำกลั่น และกรองผ่านตะแกรงขนาด 0.075 มิลลิเมตร เพื่อกำจัดกากออก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 0.1 M จากนั้นนำไปหมუნเหวียงที่ 3000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นดูดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลด้านบนของตะกอนออก และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง และนำไปหมუნเหวียงที่ 3000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งที่อุณหภูมิ  $50^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปบดเป็นผง แล้วนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.15 มิลลิเมตร เก็บใส่ถุงพลาสติก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องตลอดการวิจัย (Bobbio *et al.*, 1978) โดยพบว่าสตาร์ชที่เตรียมได้มีความชื้นเท่ากับร้อยละ  $9.59 \pm 0.10$  ปริมาณโปรตีนร้อยละ  $0.09 \pm 0.03$  ปริมาณไขมันร้อยละ  $0.03 \pm 0.01$  ปริมาณเถ้าร้อยละ  $0.04 \pm 0.04$  ปริมาณเยื่อใยร้อยละ  $0.19 \pm 0.00$  และปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ  $99.65 \pm 0.01$  (โดยน้ำหนักแห้ง)

## 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชเมล็ดขนุน

ยุทธนา พิมลศิริผล และคณะ (2542) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชเมล็ดขนุน โดยวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือก และไม่ปอกเปลือกด้วยเทคนิค HPSEC พบว่าปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกมีค่าเท่ากับร้อยละ  $31.33 \pm 1.53$  ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงมาก โดยสอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของความหนืดที่มีค่า setback ที่สูง และจากการวัดร้อยละของการเกิดรีโทรเกรด-

ชั้นจากเครื่อง DSC ที่มีค่าร้อยละของการเกิดรีโทรเกรเดชันประมาณร้อยละ 52.81-52.84 โดยระดับของการเกิดรีโทรเกรเดชันจะมีความสัมพันธ์อย่างมากกับปริมาณของอะมิโลส และสอดคล้องกับการศึกษาปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนของ Oates และ Powell (1996) ซึ่งพบว่าปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 27.00-28.10 แต่จะเห็นได้ว่าปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบไม่ปอกเปลือกมีปริมาณที่ต่ำ คือประมาณร้อยละ  $19.50 \pm 0.71$  เนื่องจากในสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบไม่ปอกเปลือกนี้จะมีปริมาณบริสุทธิ์อยู่น้อยกว่าส่งผลให้ในระหว่างการวิเคราะห์จะเกิดมีส่วนของตะกอนสีน้ำตาลอยู่มาก ทำให้ไม่สามารถที่จะใช้เทคนิค HPSEC ได้ ดังนั้นจำเป็นต้องทำการกรองส่วนที่เป็นตะกอนนั้นออก ซึ่งในขั้นตอนของการกรองนี้อาจส่งผลต่อปริมาณอะมิโลสที่เหลืออยู่ได้ โดยหากทำการเปรียบเทียบปริมาณอะมิโลสของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนกับสตาร์ชชนิดอื่นๆ พบว่าสตาร์ชจากเมล็ดขนุนจะมีปริมาณอะมิโลสอยู่ค่อนข้างสูงกว่าสตาร์ชจากมันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ ข้าวโพด ข้าว และข้าวสาลี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และวิธีการวิเคราะห์ รวมถึงปัจจัยต่างๆ ด้วย (Hizukuri, 1996; Tian *et al.*, 1991; Zobel and Stephen, 1995) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของสุชญญา แสงสอน (2547) ที่ทำการศึกษ ปริมาณอะมิโลสในแป้งพรีเจลาทีไนซ์เมล็ดขนุนพันธุ์ทองประเสริฐ โดยวิธีของ Juliano (1971) พบว่าแป้งพรีเจลาทีไนซ์เมล็ดขนุนมีปริมาณอะมิโลสร้อยละ  $31.19 \pm 0.01$  และสอดคล้องกับการศึกษาของ Dutta และคณะ (2011) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณอะมิโลสเท่ากับร้อยละ 27.12 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Rengsutthi และ Charoenrein (2011) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณอะมิโลสเท่ากับร้อยละ 32.14

ขณะที่ Tongdang (2008) ศึกษาปริมาณอะมิโลสในสตาร์ชเมล็ดจำปาอะคะ เมล็ดขนุน เมล็ดทุเรียน และถั่วเขียว พบว่าสตาร์ชเมล็ดจำปาอะคะ และสตาร์ชเมล็ดทุเรียนมีปริมาณอะมิโลสใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 22.64 และ 22.76 ตามลำดับ ขณะที่สตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณอะมิโลสร้อยละ 24.40 และสตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณอะมิโลสร้อยละ 28.96

## 2.3 สมบัติทางโครงสร้างของสตาร์ชเมล็ดขนุน

### 2.3.1 ขนาดและรูปร่าง

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของเม็ดแป้งของสตาร์ชจากเมล็ดขนุน พบว่า ลักษณะที่ได้จะแตกต่างกันออกไป นั่นคือมีหลายรูปร่างหรือหลายเหลี่ยม ซึ่งโดยมากจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม (round shape) ซึ่งสอดคล้องกับยุทธนา พิมลศิริผล และคณะ (2542) ซึ่งพบว่าเม็ดแป้งของสตาร์ชที่ทำการศึกษาต่างกันทั้ง 2 วิธีคือ ปอกเปลือก และไม่ปอกเปลือก จะมีความใกล้เคียงกันหรือไม่แตกต่างกันมากนัก และเมื่อพิจารณาถึงขนาดของเม็ดแป้ง พบว่าขนาดเม็ดแป้งที่สกัดได้ของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนมีขนาดเล็ก คือมีขนาดระหว่าง 3-25 ไมโครเมตร นอกจากนี้ Oates และ



Powell (1996) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีขนาดระหว่าง 4.2-48 ไมโครเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยระหว่าง 9.2-11 ไมโครเมตร และสอดคล้องกับการศึกษาของ Dutta และคณะ (2011) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีหลายรูปร่าง เช่น กลม (round), รูปร่างหลายเหลี่ยม (trigonal หรือ tetragonal) และพบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีขนาดระหว่าง 6-12 ไมโครเมตร

### 2.3.2 โครงสร้างผลึก

Dutta และคณะ (2011) ศึกษาโครงสร้างผลึกของสตาร์ชเมล็ดขนุนด้วยเครื่อง X-ray diffractogram พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีโครงสร้างผลึกแบบ A โดยพบพีคที่มุม 15, 18 และ 23° (2 $\theta$ ) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rengsutthi และ Charoenrein (2011) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีโครงสร้างผลึกแบบ A โดยพบที่มุม 15, 17, 17.9 และ 23° (2 $\theta$ ) และมีปริมาณผลึกเท่ากับร้อยละ 28.42

## 2.4 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชเมล็ดขนุน

### 2.4.1 การเกิดเจลลิตินเซชัน

ยูธนา พิมลศิริผล (2542) ศึกษาสมบัติการเกิดเจลลิตินเซชันของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก โดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) พบว่าอุณหภูมิเจลลิตินเซชันของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนมีความใกล้เคียงกัน โดยสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกมีอุณหภูมิเจลลิตินเซชันเท่ากับ 71.90°ซ และ 71.95°ซ ตามลำดับ ซึ่งจะเป็นอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความหนืดอย่างมาก โดยเม็ดแป้งจะพองตัวอย่างรวดเร็ว ร่างแหระหว่างไมเซลล์ (micelles) ภายในเม็ดแป้งจะอ่อนแอลง เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนถูกทำลาย เม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำเข้ามาและเกิดการพองตัวแบบผันกลับไม่ได้ และเม็ดแป้งมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และสูญเสียโครงสร้าง birefringence โดยการเกิดเจลลิตินเซชันจะทำให้หมู่ไฮดรอกซิลของแป้งสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ได้ดีขึ้น รวมทั้งพร้อมที่จะถูกย่อยด้วยน้ำย่อยต่างๆ ได้ดีกว่า ในขั้นของการเกิดเจลลิตินเซชันจะทำให้เกิดลักษณะที่เป็น amorphous โดยส่วนของอะมิโลสจะไหลออกมา ซึ่งเป็นส่วนที่จะส่งผลต่อการเกิดรีโทรเกรเดชัน (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2542) และศึกษาคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกส์ พบว่าสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกมีค่าพลังงานที่ใช้ในการเจลลิตินเซชันเท่ากับ 14.43 และ 15.33 J/g ตามลำดับ

Oates และ Powell (1996) ศึกษาสมบัติการเกิดเจลลิตินเซชันของสตาร์ชเมล็ดขนุนโดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนแสดงพีคที่มีลักษณะดูดความร้อน (endotherm) ซึ่งแสดงถึงการใช้พลังงานในการหลอมละลายผลึกของสตาร์ช และมีอุณหภูมิเจลลิตินเซชันอยู่ในช่วง 30-120°ซ โดยจะให้ลักษณะกราฟที่ประกอบด้วยพีค 2 พีค

คือพีคที่หนึ่ง มีอุณหภูมิเจลาทีไนเซชันประมาณ 65°C ขณะที่พีคที่สองมีอุณหภูมิประมาณ 80°C ซึ่งพีคที่สองเป็นการเปลี่ยนสถานะของสารประกอบเชิงซ้อนของอะมิโลสกับไขมัน (amylose-lipid complex) และสามารถวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิเริ่มเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_o$ ) อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_p$ ) และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $\Delta H$ ) พบว่าค่า  $T_o$  ของสตาร์ชเมล็ดขนุนอยู่ในช่วง 64.7-65.8°C และมีค่า  $\Delta H$  อยู่ในช่วง 2.35-2.87 J/g นอกจากนี้มีการตรวจสอบช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลาทีไนเซชันของแป้งด้วยการวัดอุณหภูมิที่เม็ดแป้งสูญเสียเครื่องหมายกากบาทเมื่อให้ความร้อนกับน้ำแป้งเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) โดยวิเคราะห์ค่าเมื่อเม็ดแป้งในตัวอย่างสูญเสียเครื่องหมายกากบาทไปประมาณร้อยละ 98 จะเรียกเป็นจุดสุดท้ายของเจลาทีไนเซชัน (birefringence end-point temperature) พบว่าค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วย DSC ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 70.6-73.7°C

Mukprasirt และ Sajjaanantakul (2004) ศึกษาสมบัติการเกิดเจลาทีไนเซชันของสตาร์ชเมล็ดขนุน โดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าอุณหภูมิเริ่มเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_o$ ) เท่ากับ 59.96°C อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_p$ ) เท่ากับ 66.84°C อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_c$ ) เท่ากับ 76.76°C และพลังงานในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $\Delta H$ ) เท่ากับ 7.58 J/g

Tongdang (2008) ศึกษาสมบัติการเกิดเจลาทีไนเซชันของสตาร์ชเมล็ดขนุน สตาร์ชเมล็ดจำปาอะ สตาร์ชเมล็ดทุเรียน และสตาร์ชถั่วเขียว ด้วยเครื่องโดยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีอุณหภูมิเริ่มเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_o$ ) เท่ากับ 81.32°C อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_p$ ) เท่ากับ 83.89°C และอุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_c$ ) เท่ากับ 86.98°C ซึ่งมีค่ามากกว่าสตาร์ชเมล็ดจำปาอะ สตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดทุเรียน ตามลำดับ ขณะที่สตาร์ชเมล็ดจำปาอะ และสตาร์ชเมล็ดขนุนมีช่วงของอุณหภูมิการเกิดเจลาทีไนเซชัน เท่ากับ 5.43°C และ 5.66°C ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสตาร์ชเมล็ดทุเรียน และสตาร์ชถั่วเขียว (11.01°C และ 10.15°C ตามลำดับ) ขณะที่สตาร์ชเมล็ดขนุนมีพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $\Delta H$ ) เท่ากับ 16.88 J/g

## 2.4.2 สมบัติรีโอโลยี

### 2.4.2.1 สมบัติการเกิดเพสท์ (pasting properties)

ยุทธนา พิมลศิริผล (2542) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนที่ทำการศึกษาต่างกันนี้ ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่าความหนืดสูงสุดของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกมีค่าเท่ากับ 328.58 RVU และ 301.96 RVU ตามลำดับ โดยมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสตาร์ชมันสำปะหลัง

Tongdang (2008) ศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชเมล็ดขนุน สตาร์ชเมล็ดจำปาและ สตาร์ชเมล็ดทุเรียน และสตาร์ชถั่วเขียว ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่า สตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดทุเรียน มีอุณหภูมิการเกิดเพสท์เท่ากับ  $74.05^{\circ}\text{C}$  และ  $76.03^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ ซึ่งมีอุณหภูมิการเกิดเพสท์ต่ำกว่าสตาร์ชเมล็ดจำปาและ สตาร์ชเมล็ดขนุน ( $82.43^{\circ}\text{C}$  และ  $86.33^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ) โดยที่สตาร์ชถั่วเขียวมีค่าความหนืดสูงที่สุดมากที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $5089.2 \text{ mPa} \cdot \text{s}^{-1}$  รองลงมาคือ สตาร์ชเมล็ดจำปาและ สตาร์ชเมล็ดทุเรียน และสตาร์ชเมล็ดขนุน ( $3307.25$ ,  $2847.60$  และ  $2705.25 \text{ mPa} \cdot \text{s}^{-1}$  ตามลำดับ) และสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าความหนืดสุดท้ายสูงกว่าสตาร์ชเมล็ดทุเรียน สตาร์ชเมล็ดจำปาและ สตาร์ชเมล็ดขนุน ( $4232.05$ ,  $4114.76$ ,  $4088.19$  และ  $3853.11 \text{ mPa} \cdot \text{s}^{-1}$  ตามลำดับ)

Mukprasirt และ Sajjaanantakul (2004) ศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชเมล็ดขนุนด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีความหนืดสูงสุด (peak viscosity) เท่ากับ  $432.43 \text{ RVU}$  ความหนืดสุดท้าย (final viscosity) เท่ากับ  $489.21 \text{ RVU}$  ค่า setback เท่ากับ  $214.52 \text{ RVU}$  และค่า breakdown เท่ากับ  $56.78 \text{ RVU}$  และมีอุณหภูมิการเกิดเพสท์ เท่ากับ  $85.83^{\circ}\text{C}$

Dutta และคณะ (2011) ศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชเมล็ดขนุนด้วย เครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีความหนืดสูงสุด (peak viscosity) เท่ากับ  $3483 \text{ cP}$  ค่า hot peak viscosity (HPV) เท่ากับ  $2658 \text{ cP}$  ค่า cold peak viscosity (CPV) เท่ากับ  $5073 \text{ cP}$  ค่า setback เท่ากับ  $2440 \text{ cP}$  และค่า breakdown เท่ากับ  $824 \text{ cP}$

Rengsutthi และ Charoenrein (2011) ศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชเมล็ดขนุน สตาร์ชข้าวโพด และสตาร์ชมันฝรั่ง ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีอุณหภูมิการเกิดเพสท์สูงกว่าสตาร์ชข้าวโพด และสตาร์ชมันฝรั่ง ( $81.58$ ,  $77.60$  และ  $69.43^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ) เนื่องจากในสตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณอะมิโลสสูง ขณะที่สตาร์ชมันฝรั่งมีความหนืดสูงสุดเท่ากับ  $831.05 \text{ RVU}$  ซึ่งมีค่ามากกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าวโพด ( $255.58$  และ  $223.88 \text{ RVU}$  ตามลำดับ) และสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่า breakdown ต่ำกว่าสตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ชข้าวโพด ( $39.67$ ,  $66.25$  และ  $695.30 \text{ RVU}$  ตามลำดับ) เนื่องจากสตาร์ชเมล็ดขนุนสามารถทนต่อความร้อนและแรงทางกายภาพได้ดีกว่า ดังนั้นความหนืดจึงมีแนวโน้มน้อยกว่าสตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ชข้าวโพด สำหรับค่าความหนืดสุดท้าย ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการจัดเรียงตัวของอะมิโลสระหว่างการทำให้เย็นหลังจากการเกิดเจลาทีไนเซชัน พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าความหนืดสุดท้ายสูงกว่าสตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ชข้าวโพด ( $364.13$ ,  $335.30$  และ  $228.88 \text{ RVU}$ )

ตามลำดับ) โดยที่ปริมาณอะมิโลสมีความสัมพันธ์กับค่าความหนืดสุดท้าย (สตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณอะมิโลสสูงกว่าสตาร์ชมันฝรั่ง และสตาร์ชข้าวโพด ตามลำดับ)

### 2.4.3 การเกิดรีโทรเกรเดชัน

ยูทหนา พิมลศิริผล (2542) ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก หลังจากการเกิดเจลาทีไนซ์แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชัน สตาร์ชจากเมล็ดขนุนมีค่าพลังงานที่ใกล้เคียงกันทั้งแบบที่ปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก คือ 7.62 และ 8.10 J/g ตามลำดับ และเมื่อนำมาคำนวณเพื่อหาระดับของการเกิดรีโทรเกรเดชันจากสูตร (ค่าเอนทัลปีของการเกิดรีโทรเกรเดชัน / ค่าเอนทัลปีของการเกิดเจลาทีไนซ์ แล้วคูณด้วย 100) พบว่าร้อยละของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกจะมีค่าเท่ากับ 52.81 และ 52.84 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชมันเทศที่ทำการวัดค่าด้วยเครื่อง DSC เช่นกัน พบว่าสตาร์ชมันเทศมีร้อยละของการเกิดรีโทรเกรเดชันเพียงร้อยละ 34.64 (ลัดดาวัลย์ เนียมพิก, 2542) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสตาร์ชจากเมล็ดขนุนจะมีความสามารถในการเกิดรีโทรเกรเดชันได้ดี โดยค่าที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติด้วยเครื่อง RVA ที่พบว่าสตาร์ชจากเมล็ดขนุนนี้มีปริมาณอะมิโลสสูงจึงทำให้สามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้ดี

### 3. ถั่วเขียว และสตาร์ชถั่วเขียว

ถั่วเขียวเป็นพืชในสกุล (Genus) *Vigna* มีอยู่ทั้งสิ้น 7 subgenera ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ใน 3 ทวีป ได้แก่ ทวีปเอเชีย แอฟริกา และอเมริกา (Tomooka *et al.*, 1991) ถั่วเขียวอยู่ในตระกูล Leguminosae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Vigna radiates* (L.) Wilzek, *Phaseolus aureus* Roxb. หรือ *Phaseolus radiates* L. (Daisy, 1979) ถั่วเขียวเป็นพืชในตระกูลถั่วที่มีระบบรากแก้ว และรากแขนงเช่นเดียวกับถั่วเหลือง เป็นพืชที่มีรากแขนงเจริญลงไปใต้ผิวดินได้ค่อนข้างลึก และแตกแขนงมาก จึงทำให้ถั่วเขียวสามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่มีความชื้นจำกัด และค่อนข้างจะทนแล้ง แต่ไม่ทนต่อน้ำขัง ถั่วเขียวมีลำต้นตั้งตรงลักษณะเป็นพุ่ม บางพันธุ์มีลักษณะเลื้อยแตกกิ่งก้านได้ดี โดยแตกกิ่งก้านจากข้อข้างล่างขึ้นไปบน ลำต้นส่วนใหญ่จะมีขนปกคลุม แต่บางพันธุ์ไม่มีขนหรือมีขนน้อย มีทั้งสีเขียวและม่วงปนกัน มีความสูงตั้งแต่ 25-125 เซนติเมตร ใบปกติถั่วเขียวจะมีใบเลี้ยง 1 คู่ ใบเดี่ยว 1 คู่ นอกนั้นเป็นใบประกอบ ส่วนใหญ่มี 3 ใบประกอบจะหมุนสลับเวียนรอบต้น ลักษณะใบเขียวรูปไข่ ปลายใบแหลม โคนใบมน ก้านใบมีลักษณะยาวสีเขียวหรือเขียวปนม่วง ขนาดใบกว้าง 1.5-10 เซนติเมตร ยาว 2-15 เซนติเมตร ที่ฐานของใบหุ้มใบ 2 อัน ใบย่อย ใบกลางจะมีหูใบย่อย 2 อัน ส่วนใบย่อยอีก 2 ใบ มีหูใบย่อยใบละ 1 อัน มีขนปกคลุมทั่วไป ขนมากน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์ (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2543)

ถั่วเขียวสามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับรูปร่าง ลักษณะของเมล็ด (ณัฐ โชคจิรัฐติกา, 2550) ดังนี้

- 1) ถั่วเขียวธรรมดา หรือถั่วเขียวเมล็ดด้าน เป็นพันธุ์ที่นิยมใช้ทำถั่วงอก วุ้นเส้น และจัดส่งจำหน่ายยังต่างประเทศ ซึ่งได้ผลผลิตต่อไร่สูงกว่าพันธุ์อื่นๆ คือ 300-350 กิโลกรัมต่อไร่
- 2) ถั่วทอง หรือถั่วเขียวสีทอง เป็นพันธุ์ที่มีเมล็ดสีเหลือง หรือสีทอง เนื้อข้างในเป็นสีเหลือง นิยมใช้ทำขนม เพราะเนื้อสีเหลือง น่ารักรับประทาน
- 3) ถั่วเขียวมันเมล็ดใหญ่ เป็นพันธุ์ที่มีเมล็ดมัน และมีขนาดโตกว่าพันธุ์อื่น ได้ผลผลิตต่อไร่สูงอยู่ระหว่าง 250-300 กิโลกรัมต่อไร่
- 4) ถั่วเขียวพิวคำ เป็นพันธุ์ที่มีเมล็ดสีดำ มักใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ หรือถมที่ทำเป็นปุ๋ย เนื่องจากเมื่อนำมาทำอาหารแล้วรสชาติไม่ดี ปัจจุบันใช้เพาะถั่วงอก เนื่องจากถั่วงอกที่เพาะจากถั่วเขียวพิวคำจะมีความอวบอ้วนน่ารักรับประทาน และคงความสดไว้ได้นานกว่าถั่วงอกที่เพาะจากถั่วเขียวธรรมดา

ถั่วเขียวเป็นพืชเศรษฐกิจอีกประเภทหนึ่งที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศเนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ด้วยการทำเป็นอาหารโดยตรงในระดับครัวเรือน ตัวอย่างเช่น ถั่วเขียวต้มน้ำตาล เต้าส่วน ถั่วกวน ถั่วแปบ และเมล็ดขนุน เป็นต้น และการทำเป็นอาหารชนิดอื่นซึ่งทำได้ทั้งในระดับครัวเรือนและอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ถั่วงอก วุ้นเส้น แป้งถั่วเขียว และแป้งซ่าหริ่ม เป็นต้น (วุฒิชัย นาครักษา, 2526) ส่วนปริมาณการใช้ถั่วเขียวในประเทศนั้นมีประมาณร้อยละ 50 ของผลผลิตทั้งหมด โดยส่วนใหญ่ขี้นเข้าโรงงานทำวุ้นเส้น ทำแป้งซ่าหริ่ม ใช้เพาะเป็นถั่วงอก และใช้เป็นอาหารโดยตรง สตาร์ชถั่วเขียวเป็นวัตถุดิบที่ผู้บริโภครู้จักเห็นว่าเหมาะในการนำมาทำวุ้นเส้น เนื่องจากได้เส้นที่มีความใส มีการพองตัวน้อย มีปริมาณอะมิโลสสูง มีความคงตัวและการคืนตัวสูง (Singh *et al.*, 1989; Kim and Wiesenborn, 1996)

อรอนงค์ นัยวิกุล และคณะ (2531) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วเขียว 20 สายพันธุ์ ดังแสดง Table 3 พบว่ามีโปรตีนอยู่ระหว่างร้อยละ 19.0-23.9 มีเถ้าอยู่ระหว่างร้อยละ 3.88-4.71 ไขมันร้อยละ 1.04-1.37 เยื่อใยร้อยละ 0.82-3.24 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 59.8-65.7

### 3.1 การผลิตสตาร์ชถั่วเขียว

สมชาย ประภาวัต (2523) ได้ทดลองผลิตโปรตีนสกัด และสตาร์ชถั่วเขียวพร้อมกัน โดยวิธีการบดถั่วเขียวแบบบดเปียกกับน้ำ แล้วจึงกรองด้วยผ้าขาวบางหรือตะแกรงตาถี่แยกส่วนที่เป็นเปลือกให้ค้างอยู่บนตะแกรง และปล่อยให้ส่วนที่เป็นสตาร์ชและสารละลายโปรตีนผ่านไป แล้วจึงแยกสตาร์ชออกจากโปรตีน โดยการเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่ง หรือการปล่อยให้สตาร์ชตกลงมาเอง (sedimentation) เป็นชั้นสีขาว ในปริมาณมากขึ้นขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการปล่อยให้สตาร์ช

Table 3 Chemical compositions of mung bean.

Chemical compositions	Content (%)
Moisture	6.98-9.45
Protein	19.00-23.70
Fat	1.04-1.37
Ash	3.80-4.71
Carbohydrate	59.80-65.70
Fiber	0.82-3.24
Starch	37.0-53.6
Amylose	20-28
Amylopectin	20-80

Source: คัดแปลงจากอรอนงค์ นัยวิกุล และคณะ (2531)

ตกตะกอนซึ่งมีตั้งแต่ 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมงขึ้นไป หรือใช้วิธีการปล่อยให้สตาร์ช และสารละลาย โปรตีนไหลไปตามรางไม้ยาวแทนการทิ้งให้ตกตะกอนเองในภาชนะ ซึ่งจะทำให้ใช้เวลาน้อยกว่า วิธีแรกที่กล่าวมาแล้ว สตาร์ชที่ได้จากการตกตะกอนหลายๆ ครั้งนี้จะขาวบริสุทธิ์และทำแห้งได้โดยการตากแห้งที่อุณหภูมิ 50-60°C เวลา 5 ชั่วโมง บดให้ละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 80 mesh ได้ สตาร์ชประมาณร้อยละ 20.9 (คิดจากน้ำหนักถั่วเขียวที่ใช้)

Schoch และ Maywald (1968) ทำการสกัดสตาร์ชจากถั่วเขียวโดยแช่ถั่วเขียวใน น้ำอุ่นผสมโซลูอินเล็กน้อยเป็นเวลา 1 คืน แล้วรินน้ำแช่ออก ถั่วเขียวที่ได้จะพองตัวและนิ่ม นำถั่วเขียวเหล่านี้มาล้างด้วยน้ำ และบด (ground) ในน้ำกลั่น 3 นาที ในอัตราส่วนถั่วเขียว 1 ส่วนต่อน้ำ 2 ลิตร ด้วยเครื่องตีปั่นที่ความเร็วต่ำ นำของผสมที่ได้มากรองผ่านผ้ากรองไหม (silk blothing cloth) แล้วใช้มือบีบให้ส่วนที่ค้างอยู่บนผ้ากรองไหมแห้งมากที่สุดเท่าที่จะทำได้โดยส่วนที่บดละเอียด (pulp) จะรอดผ่านผ้ากรองไปกับน้ำกลั่น ต่อจากนั้นนำส่วนที่ค้างอยู่บนผ้ากรองมาบดกับน้ำด้วย เครื่องตีปั่นเป็นเวลา 3 นาที แล้วกรองผ่านผ้ากรองไหมขนาด 60 mesh อีกครั้งหนึ่ง นำส่วนที่กรอง ได้ทั้ง 2 ครั้งมารวมกันแล้วกรองผ่านผ้ากรองไนลอน (nylon blothing cloth) ขนาด 220 mesh ลงสู่ ภาชนะขนาด 10 แกลลอน ซึ่งวิธีนี้จะให้ปริมาณสตาร์ชที่สูงกว่าการกรองผ่านผ้ากรองขนาดละเอียด (fine blothing cloth) โดยตรง ส่วนที่กรองได้นี้ (suspension) จะปล่อยให้แห้งให้สตาร์ชตกตะกอน เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง แล้วจึงแยกส่วนที่เป็นชั้นสตาร์ช นำมาล้างด้วยน้ำ และปล่อยให้ตกตะกอนใน น้ำล้างนี้ 2-3 ครั้ง จนได้สตาร์ชขาว สำหรับการล้างสตาร์ชครั้งสุดท้ายนั้นได้ปรับความเป็นกรด-ด่าง

ของสารละลายให้เท่ากับพีเอช 6 แล้วจึงกรองแยกสสารบริสุทธิ์ที่ได้นำมา ร้อยละ 32-43 ขึ้นอยู่กับชนิดของถั่วเขียวที่นำมาใช้สกัด

สำหรับ Naivikul และ D'Appolonia (1979) ได้คิดแปลงวิธีการสกัดสสารจากแป้งถั่วเขียวให้ง่ายขึ้น โดยการใช้สารละลายต่าง โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.016 นอร์มอล ผสมกับแป้งถั่วเขียวที่บดแบบบดแห้งด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 2 นาที เหยี่ยงด้วยเครื่องเหยี่ยงที่ความเร็ว 2000g นาน 20 นาที แล้วแยกส่วนที่ละลายน้ำค้างได้ออกไป ล้างส่วนที่เป็นสสารด้วยน้ำ 3 ครั้ง ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 จำนวน 2 ครั้ง และล้างน้ำอีก 2 ครั้ง แต่ละครั้งพยายามแยกส่วนที่ไม่ใช่สสารออกจนหมดโดยการเข้าเครื่องเหยี่ยง นำสสารบริสุทธิ์ที่แยกได้มาตากแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วบดผ่านตะแกรงขนาด 70 mesh ได้สสารสกัดร้อยละ 34.5 ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์หาความบริสุทธิ์ พบว่ามีไนโตรเจนร้อยละ 0.06 ไขมันร้อยละ 0.5 เถ้าร้อยละ 0.27 และเยื่อใยร้อยละ 0.3 (ค่าที่ได้คิดความชื้นร้อยละ 14) จึงนับได้ว่าสสารที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง

### 3.2 องค์ประกอบทางเคมีของสสารถั่วเขียว

Naivikul และ D'Appolonia (1979) ได้ศึกษาปริมาณอะมิโนสในสสารถั่ว 5 ชนิด คือ ถั่วเนวี ถั่วพินโต ถั่วฟาบ่า ถั่วเลนทิล และรวมถึงสสารถั่วเขียว โดยวิธีของ Montgomery และ Senti (1958) พบว่า ในสสารถั่วเขียวมีปริมาณอะมิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่น้อยที่สุดคือ เท่ากับร้อยละ 19.5 ถั่วพินโตมีปริมาณอะมิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่มากที่สุดคือ ร้อยละ 25.8 ในขณะที่ถั่วเลนทิลมีปริมาณอะมิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 20.7 ถั่วเนวีมีปริมาณอะมิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 22.1 และถั่วฟาบ่ามีปริมาณอะมิโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 24.0 ขณะที่ Hoover และคณะ (1997) ได้ศึกษาปริมาณอะมิโนสในสสารถั่วเขียว พบว่าสสารถั่วเขียวมีปริมาณอะมิโนสปรากฏประมาณร้อยละ  $39.8 \pm 0.5$

### 3.3 สมบัติทางโครงสร้างของสสารถั่วเขียว

#### 3.3.1 ขนาดและรูปร่าง

Naivikul และ D'Appolonia (1979) ทำการศึกษาขนาดและรูปร่างของเม็ดสสารถั่วเขียว ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงธรรมดา (Light micrograph) และกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์ (Polarized-light micrograph) พบว่าเม็ดสสารของถั่วเขียวมีรูปร่างบางเม็ดค่อนข้างกลม บางเม็ดยาวรี และบางเม็ดก็โค้งงอไม่สม่ำเสมอ ขนาดของเม็ดสสารจากถั่วเขียวมีขนาดความกว้าง 8-16 ไมโครเมตร และความยาว 12-32 ไมโครเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Hoover และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษานขนาดและรูปร่างของเม็ดสสารถั่วเขียว ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าเม็ดสสารถั่วเขียวมีลักษณะกลมรี ผิวของเม็ดสสารไม่มีกักรปนเปื้อนจากองค์ประกอบอื่น และมีขนาดเม็ดสสารเฉลี่ยเท่ากับ 7.1-26.1 ไมโครเมตร

### 3.3.2 โครงสร้างผลึก

Hoover และคณะ (1997) ศึกษาโครงสร้างของสตาร์ชถั่วเขียว ด้วยเครื่อง X-ray Diffraction (XRD) พบว่าสตาร์ชถั่วเขียวมีรูปแบบโครงสร้างผลึก แบบ C ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chang และคณะ (2006) ขณะที่ Kittipongpatana และคณะ (2006) พบว่าสตาร์ชถั่วเขียวมีรูปแบบโครงสร้างผลึกที่มีฟิเคเด่นชัดที่มุม  $(2\theta)$  เท่ากับ 15, 17 และ  $23^\circ (2\theta)$  แบบ A ซึ่งเป็นรูปแบบของโครงสร้างผลึกแบบ A ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Liu และ Shen (2007) พบว่าสตาร์ชถั่วเขียวมีรูปแบบโครงสร้างผลึกที่มีฟิเคเด่นชัดที่มุม  $(2\theta)$  เท่ากับ 15.13, 16.98 และ  $17.94^\circ (2\theta)$  แบบ A ซึ่งเป็นรูปแบบของโครงสร้างผลึกแบบ A

## 3.4 สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชถั่วเขียว

### 3.4.1 การเกิดเจลลิตีในเซชัน

Califano และ Anon (1990) ศึกษาผลของความชื้นต่อการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชถั่วเขียว ด้วยเครื่อง DSC โดยแปรความชื้นในช่วงร้อยละ 13.69-90.20 โดยน้ำหนัก พบว่าเมื่อปริมาณน้ำสูงกว่าร้อยละ 67 โดยน้ำหนัก พบว่าปรากฏฟิเค endotherm 1 ฟิเค เนื่องจากแกรนูลสตาร์ชได้รับความร้อนเมื่อน้ำมากพอ ทำให้พันธะไฮโดรเจนคลายตัว แกรนูลสตาร์ชจึงเกิดการพองตัวและเกิดเจลลิตีในเซชันสมบูรณ์ ขณะที่ปริมาณความชื้นในช่วงร้อยละ 37.7-67.0 โดยน้ำหนัก พบฟิเค endotherm 2 ฟิเค ซึ่งบ่งบอกว่าโครงสร้างส่วนของ amorphous และส่วน crystalline ถูกทำลายบางส่วน และที่ระดับความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 37.3 โดยน้ำหนัก ไม่ปรากฏฟิเคของ endotherm เนื่องจากความชื้นไม่พอเพียงต่อการเกิดเจลลิตีในเซชัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนภมณี มงคลประเสริฐ (2544) ที่ศึกษาผลของความชื้นต่อการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชถั่วเขียว จากการศึกษาการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชถั่วเขียวที่ระดับความชื้นในช่วงร้อยละ 30-80 โดยน้ำหนัก ด้วยเครื่อง DSC โดยให้ความร้อนแก่ตัวอย่างจาก  $40-120^\circ\text{C}$  ในอัตรา  $10^\circ\text{C}$  ต่อนาที พบว่าฟิเคของการเกิดเจลลิตีในเซชันไม่ปรากฏที่ความชื้นร้อยละ 30 โดยน้ำหนัก แต่ปรากฏในช่วงความชื้นตั้งแต่ร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก โดยในช่วงความชื้นร้อยละ 50-61 โดยน้ำหนัก มี 2 ฟิเค และในช่วงความชื้นร้อยละ 64-80 มี 1 ฟิเค ในกรณีที่มีการเกิดเจลลิตีในเซชันพบว่าอุณหภูมิที่เจลลิตีในเซชันเริ่มเกิด (onset temperature;  $T_o$ ) และอุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (peak temperature,  $T_p$ ) ไม่ขึ้นกับความชื้น และมีค่าเท่ากับ  $62.62 \pm 1.45^\circ\text{C}$  และ  $68.42 \pm 0.65^\circ\text{C}$  ตามลำดับ

### 3.4.2 สมบัติรีโอโลยี

#### 3.4.2.1 สมบัติการเกิดเพสต์ (Pasting properties)

Hoover และคณะ (1997) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชถั่วเขียว ความเข้มข้นร้อยละ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่พีเอช 5.5 ด้วยเครื่อง Brabender viscoamylograph



พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้สตาร์ชเริ่มเกิดความหนืดคือ  $80^{\circ}\text{C}$  เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น  $95^{\circ}\text{C}$  ความหนืดเท่ากับ 200 BU เมื่อคงอุณหภูมิที่  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 30 นาที ความหนืดของเพสต์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งให้เห็นว่าเพสต์ค่อนข้างคงตัว และแกรนูลสตาร์ชไม่แตกระหว่างกวน เมื่อลดอุณหภูมิเป็น  $50^{\circ}\text{C}$  ความหนืดของเพสต์เพิ่มขึ้นเป็น 360 BU โดยรูปแบบความหนืดของสตาร์ชถั่วเขียวเป็นแบบ C คือ ลักษณะความหนืดไม่ปรากฏเป็นยอดสูงสุด

Chung และคณะ (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชถั่วเขียวด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) พบว่าอุณหภูมิการเกิดเพสต์มีค่าเท่ากับ  $71.9^{\circ}\text{C}$  ความหนืดเมื่อสตาร์ชพองตัวสูงสุดเท่ากับ 249 RVU ความหนืดเมื่อสตาร์ชเย็นตัวเท่ากับ 260 RVU

#### 3.4.2.2 สมบัติความหนืด (viscosity properties)

นภมณี มงคลประเสริฐ (2544) ศึกษาความเข้มข้นของสตาร์ชต่อลักษณะการไหลของสตาร์ชถั่วเขียว โดยทดลองวัดค่า apparent viscosity ของเพสต์ถั่วเขียวที่ระดับความเข้มข้นของสตาร์ช 5 ระดับ คือ 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 กรัมต่อเดซิลิตรของตัวทำละลาย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ด้วย rotational viscometer ในช่วงอัตราเฉือนระหว่าง  $0.6-12 \text{ นาที่}^{-1}$  ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$  พบว่าลักษณะการไหลของเพสต์ถั่วเขียวเป็นไปตาม power law (สมการของ Ostwald De Waele) ซึ่งมีค่า flow behavior index ต่ำกว่า 1 เป็นลักษณะการไหลแบบซูโดพลาสติก (pseudoplastic)

#### 3.4.2.3 สมบัติวิสโคอิลาสติก (viscoelastic properties)

นภมณี มงคลประเสริฐ (2544) ศึกษาลักษณะทางวิสโคอิลาสติกของเจลสตาร์ชถั่วเขียว โดยเมื่อกดเจลสตาร์ชถั่วเขียว (ความเข้มข้นของสตาร์ช 10.18 กรัมต่อเดซิลิตร) ด้วยแรงดันคงที่ 30 N (เท่ากับความกด  $0.014 \times 10^6 \text{ Pa}$  โดยเจลสตาร์ชถั่วเขียวมีพื้นที่  $2124.57 \text{ mm}^2$ ) นาน 300 วินาที ผลความสัมพันธ์ของ respond strain กับเวลา พบว่าเมื่อมีแรงดัน เจลที่ถูกกดแสดงพฤติกรรม การไหลแบบ Hookian spring สำหรับ ideal elastic คือ บางส่วนของเจลเกิดการเปลี่ยนรูปทันทีที่เวลา 0 วินาที หลังจากนั้นการเปลี่ยนรูปของเจลเป็นฟังก์ชันของเวลา เนื่องจากการยืดหยุ่นแบบ retard elastic พร้อมกับการไหลแบบนิวโตเนียน เมื่อแรงดันที่กระทำออก ส่วนที่ยืดหยุ่น ideal elastic คืนตัวกลับทันที หลังจากนั้นการคืนตัวกลับจะเป็นฟังก์ชันของเวลาของส่วนที่เป็น retard elastic จนส่วนนี้กลับคืนตัวจนหมด (คิดเป็นร้อยละ 88 ของการเปลี่ยนรูปทั้งหมด) และคงเหลือส่วนที่เปลี่ยนรูปถาวรของส่วนที่เป็นของไหลแบบนิวโตเนียน (คิดเป็นร้อยละ 12 ของการเปลี่ยนรูปทั้งหมด)

### 3.4.3 การเกิดรีโทรเกรเดชัน

นภมณี มงคลประเสริฐ (2544) ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชถั่วเขียว ที่ระดับความชื้นร้อยละ 70 โดยน้ำหนัก ด้วยวิธี Differential scanning calorimetry โดยให้ความร้อนแก่ตัวอย่างที่อุณหภูมิจาก 40-110°C ในอัตรา 10°C ต่อนาที เมื่อนำสตาร์ชที่เกิดเจลที่ในเซชันแล้ว ไปให้ความร้อนอีกภายหลังการเก็บ ถ้าเกิดฟิคของ regelatinization ก็บ่งบอกถึงการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชระหว่างการเก็บ และ  $\Delta H_R$  (enthalpy of regelatinization) ของฟิคนี้แสดงปริมาณการเกิดรีโทรเกรเดชัน แสดงว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เจลสตาร์ชถั่วเขียวเกิดรีโทรเกรเดชันทันทีเมื่อเก็บไว้ 1 วัน และเกิดเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บนานขึ้นในช่วง 7 วัน เมื่อเก็บต่อไปอีก 7 วัน การเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชถั่วเขียวไม่เพิ่มขึ้น ส่วนการเก็บที่ -20°C ช่วยชะลอการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชถั่วเขียวให้เกิดภายหลังการเก็บมากกว่า 3 วัน (คือเริ่มเกิดรีโทรเกรเดชันในช่วงการเก็บ 4-7 วัน) อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บไว้ 14 วัน การเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชถั่วเขียวก็เท่ากับการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 14 วัน เช่นกัน

Hoover และคณะ (1997) ศึกษาผลของระยะเวลาที่เก็บต่อการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลสตาร์ชถั่วเขียวด้วยเครื่อง DSC ที่ความชื้นร้อยละ 60 โดยน้ำหนัก โดยเก็บเจลสตาร์ชถั่วเขียวที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1, 2, 4, 6, 8, 16 และ 20 วัน พบว่า endotherm ของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชถั่วเขียว ปรากฏให้เห็นหลังจากเก็บไปแล้วเป็นเวลา 1 วัน โดยอุณหภูมิที่เริ่มเกิดเจลที่ในเซชัน (onset temperature,  $T_o$ ) เท่ากับ 44°C อุณหภูมิที่  $\Delta H$  สูงสุด (peak temperature,  $T_p$ ) เท่ากับ 52°C และอุณหภูมิที่เจลที่ในเซชันสิ้นสุด (final temperature,  $T_f$ ) เท่ากับ 63°C และไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเก็บ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของเกลียวคู่ของอะมิโลเพคตินและสายของอะมิโลสที่อยู่ใกล้กันเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีความแข็งแรง เมื่อเก็บเวลานานขึ้น แต่ค่า  $\Delta H_R$  เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเก็บ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการเก็บ (20 วัน) ค่า  $\Delta H_R$  เท่ากับ 10.5 J/g เนื่องจากโมเลกุลของสตาร์ชจัดเรียงตัวกันใหม่เป็นโครงสร้างผลึกที่แข็งแรงขึ้นเมื่อเก็บนานขึ้น

### 4. สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch) ตามคำนิยามของ European FLAIR- Concerted Action on Resistant Starch หมายถึง ส่วนของสตาร์ชหรือผลิตภัณฑ์จากสตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยในลำไส้เล็กทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในร่างกาย และผ่านไปที่ลำไส้ใหญ่ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่สามารถเกิดกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ได้เป็นกรดไขมันสายสั้นๆ (short chain fatty acid; SCFA) เช่น อะซิเตท (acetate) โพรพิโอเนท (propionate) และบิวทิเรท (butyrate) โดยกรดไขมันทั้งสามชนิดที่เกิดขึ้นจะมีสัดส่วนแตกต่างกันไปตามชนิดของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และสามารถถูกดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่และ

ขนส่งไปถึงตับได้ ซึ่งกรดไขมันสายสั้นเหล่านี้ มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะบิวทิเรท ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกลไกการเกิดและตายของเซลล์ผนังลำไส้ใหญ่ (apoptosis) เป็นผลให้ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Alexander, 1995) รวมทั้งความเป็นพิษของสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น ไนโตรซามีน และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในเซลล์ลำไส้คน ก็สามารถถูกยับยั้งโดยบิวทิเรท นอกจากนี้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ยังมีคุณสมบัติเทียบเท่ากับเส้นใยอาหาร (fiber) ซึ่งเมื่อบริโภคเข้าไปจะทำให้ระบบขับถ่ายทำงานได้ดีขึ้น โดยช่วยเพิ่มปริมาณอุจจาระ เพิ่มความถี่ในการขับถ่าย และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคท้องผูก โรคผนังลำไส้ใหญ่อักเสบและมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ช่วยป้องกันหรือลดภาวะโรคอ้วน และมีบทบาทในการลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคเบาหวาน (Ranhotra *et al.*, 1996) นอกจากนี้พบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะที่เด่นกว่าเส้นใยอาหาร คือมีสมบัติบางประการที่เหมาะสมต่อการแปรรูป สามารถช่วยควบคุมลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร ไม่ทำให้เนื้อสัมผัสมีลักษณะหยาบ ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ และมีความทนทานระหว่างการแปรรูป นอกจากนี้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะให้ปริมาณบิวทิเรทสูงกว่าแหล่งเส้นใยอาหารอื่น จึงสามารถนำสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ไปประยุกต์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง

#### 4.1 ประเภทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

ประเภทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ สามารถพิจารณาจากคุณลักษณะต่างๆ ได้ดังนี้

##### 4.1.1 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พิจารณาจากความสามารถในการถูกย่อย

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พิจารณาจากความสามารถในการถูกย่อยสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างรวดเร็ว สตาร์ชที่สามารถถูกย่อยได้อย่างช้าๆ และสตาร์ชที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ แสดงใน Table 4

##### 4.1.2 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พิจารณาจากปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

Goni และคณะ (1996) ได้แบ่งประเภทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยพิจารณาจากปริมาณของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ กลุ่มที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ต่ำ ปานกลาง สูง และสูงมาก ดังนี้

Table 4 Type of resistant starch based on the extent of digestibility in small intestine.

Type of resistant starch	Source	Digestibility
Rapidly digestible starch; RDS	starchy food after cooking	rapidly digested to glucose within 20 minutes.
Slowly digestible starch; SDS	native starch from cereals and cooked noodle products	slowly digested to glucose from 20 to 110 minutes.
Enzyme-resistant starch; RS	crushed cereal grains and retrograded starches	resistant to digest by enzyme in small intestine

Source: Englyst และ Hudson (1996)

- กลุ่มที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ต่ำ (low) คือ มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ อยู่ในช่วงร้อยละ 1-2.5 เช่น บิสกิต ขนมปัง พาสต้า มันฝรั่ง และข้าวที่ผ่านการต้มแล้วทำให้เย็น

- กลุ่มที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ปานกลาง (Intermediate) คือ มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ อยู่ในช่วงร้อยละ 2.5-5 เช่น มันฝรั่ง ถั่วที่ผ่านการเอ็กซ์ทรูด

- กลุ่มที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูง (High) คือ มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ อยู่ในช่วงร้อยละ 5-15 เช่น ถั่ว (peas) ข้าวคืบ สตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน

- กลุ่มที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงมาก (Very high) คือ มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 15 เช่น มันฝรั่งคืบ ถั่วคืบ ถั่วข้าวโพดข้าวเหนียว

#### 4.1.3 สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พิจารณาจากลักษณะและแหล่งที่มา

Sajilata และคณะ (2006) ได้แบ่งประเภทของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พิจารณาจากลักษณะและแหล่งที่มา โดยสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ สตาร์ชที่ลักษณะทางกายภาพขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ เม็ดสตาร์ชคืบที่ทนต่อการทำงานของเอนไซม์ สตาร์ชที่เกิดจากการคืนตัว และสตาร์ชที่ผ่านการตัดแปรทางเคมี ดังนี้

- สตาร์ชที่ลักษณะทางกายภาพขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (Physically inaccessible starch; RS type 1)

สตาร์ชที่เม็ดแป้งถูกห่อหุ้มอยู่ภายในร่างแห โพรตีน หรือถูกตรึงอยู่ภายในเซลล์หุ้ม เมล็ดพืช ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาในเม็ดแป้งได้ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วย เอนไซม์ชนิดนี้เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ จะพบสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดนี้ใน โครงสร้างของพืชที่ถูกทำลายไปบางส่วน เช่น ถั่ว หรือเมล็ดธัญพืชที่ผ่านการโม่บด โดยเหลือส่วนของ เม็ดแป้งติดอยู่กับผนังเซลล์ อาหารที่ทำจากสตาร์ชชนิดนี้ทนต่อความร้อนในการทำอาหารปกติ และสามารถเป็นส่วนผสมในอาหารได้หลากหลาย

- เม็ดสตาร์ชดิบที่ทนต่อการทำงานของเอนไซม์ (Resistant granular starch; RS type 2)

สตาร์ชที่เม็ดแป้งมีคุณสมบัติทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ตามลักษณะของ โครงสร้างที่เป็นธรรมชาติของเม็ดแป้งที่ไม่มีรู หรือช่องเปิดให้เอนไซม์เข้าไปในเม็ดแป้ง ซึ่งมี ลักษณะรวมตัวกันหนาแน่นในแนวแผลัสมิ จึงทำให้โครงสร้างมีข้อจำกัด ยากต่อการย่อยด้วย เอนไซม์ พบได้ในสตาร์ชกล้วย สตาร์ชมันฝรั่ง หรือสตาร์ชที่ได้จากการดัดแปรทางพันธุกรรม เช่น สตาร์ชข้าวโพดสายพันธุ์ที่มีปริมาณอะมิโลสสูง เป็นต้น

- สตาร์ชที่เกิดจากการคืนตัว (Retrogradation starch; RS type 3)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะ ไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสายอะมิโลสระหว่างการทำให้เย็นของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดเจลลา ทินเซชัน (การเกิดรีโทรเกรเดชัน) เกิดเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติที่มีความแข็งแรง และสามารถ ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ได้น้อยลง ดังนั้นสตาร์ชที่มีอัตราส่วนของอะมิโลสที่สูงกว่า จะสามารถเกิด รีโทรเกรเดชันได้มากกว่าสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสต่ำ ทำให้สตาร์ชที่มีอะมิโลสสูงสามารถ นำไปใช้ผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ในระดับสูง

การเกิด RS type 3 เป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวใหม่ของโครงสร้างผลึก จาก อิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาในการบ่ม โดยขั้นตอนการจัดเรียงตัวของผลึกใหม่ของสายพอลิเมอร์ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ประกอบด้วย 1) การเกิดนิวเคลียส (nucleation) 2) การเติบโตของผลึก (propagation) และ 3) ผลึกเกิดอย่างสมบูรณ์ (maturation) โดยทั่วไปขั้นตอนการเกิดนิวเคลียสจะ เกิดอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิการบ่มเข้าใกล้อุณหภูมิ glass transition (T<sub>g</sub>) ของสตาร์ชซึ่งมี ค่าประมาณ -5°C (Gray and Bemiller, 2003; Chung *et al.*, 2006)

Erlingen และคณะ (1993) ศึกษาการเกิดสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (RS type 3) ของสตาร์ชข้าวสาลีที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และควบคุมสภาวะการเกิดรีโทรเกรเดชันโดยทำให้สตาร์ชที่ผ่านการเจลลา ทินเซชันเย็นลงที่ อุณหภูมิ 0, 68 และ 100°C จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

พบว่าที่อุณหภูมิการเกิดรีโทรเกรเดชันต่ำสุด ( $0^{\circ}\text{C}$ ) พบปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ในช่วงเวลาเริ่มต้นของการเก็บรักษา (ประมาณ 15 นาที) ขณะที่อุณหภูมิการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ สูงสุด ( $100^{\circ}\text{C}$ ) พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เมื่อระยะเวลาการเก็บนานกว่า 10 ชั่วโมง อธิบายได้ว่าที่อุณหภูมิ  $0^{\circ}\text{C}$  (สูงกว่าอุณหภูมิ glass transition;  $T_g$  ของสตาร์ช) พบอัตราการ เกิดนิวเคลียส (nucleation) ของฟลิกอะมิโลส แต่มีข้อจำกัดของการเกิดโพรพาเกชัน ดังนั้นสตาร์ช ที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เกิดอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้น เมื่อเก็บรักษาสตาร์ชที่ผ่านการเกิด เจลาทีไนซ์ที่อุณหภูมิ  $100^{\circ}\text{C}$  (ต่ำกว่าอุณหภูมิการหลอมตัวของฟลิกอะมิโลส) พบอัตราการเกิด โพรพาเกชันของฟลิก แต่มีข้อจำกัดของอัตราการเกิดนิวเคลียส ดังนั้นจึงใช้เวลานานในการเกิด สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

Chung และคณะ (2006) ศึกษาผลของการเกิดเจลาทีไนเซชันบางส่วน และการ เกิดรีโทรเกรเดชันต่อความสามารถในการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าว โดยนำสารละลาย สตาร์ชที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักแห้ง) มาผ่านการเกิดเจลาทีไนซ์ที่อุณหภูมิ แดกต่างกัน ( $60$ ,  $65$ , และ  $70^{\circ}\text{C}$ ) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสตาร์ชไปเก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็น ระยะเวลา 2, 4 และ 7 วัน พบว่ารูปแบบการถูกย่อยด้วยเอนไซม์แตกต่างกันในช่วงแรก (ที่เวลาน้อย กว่า 60 นาที) และเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนเพิ่มมากขึ้น เวลาที่ใช้ในการถูกย่อยจะลดลง จากการศึกษารูปแบบการย่อยของสตาร์ชข้าวเหนียวก่อนการให้ความร้อน (native waxy rice starch) สตาร์ชข้าวเหนียวที่เจลาทีไนซ์โดยสมบูรณ์ (gelatinized waxy rice starch) และสตาร์ชที่ผ่านการให้ ความร้อนบางส่วน ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าตัวอย่างสตาร์ชข้าวเหนียวที่เกิดเจลาทีไนซ์โดย สมบูรณ์ มีอัตราการย่อยประมาณ 20 นาที ซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าตัวอย่างสตาร์ชข้าวเหนียวก่อนการให้ ความร้อนซึ่งใช้เวลาประมาณ 90 นาที

Miao และคณะ (2009) ได้ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพด เหนียวด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสที่ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 0, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ต่อปริมาณ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณ เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสเพิ่มขึ้น เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น การตัดสายกิ่งจะสมบูรณ์มากขึ้น ส่งผลต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อย ด้วยเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน และได้ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่ง สตาร์ชข้าวโพดเหนียวที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 10, 20 และ 40 ASPU/g ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทน ต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อ ความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผล ของการตัดสายกิ่งต่อการเกิดผลึกใหม่ของสตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกิ่ง โดยการเกิดผลึกใหม่ (การ

เกิดรีโทรเกรเดชัน) สามารถเกิดได้เมื่อลดอุณหภูมิและการเก็บรักษาสตาร์ชที่ผ่านการเจลาติไนเซชัน พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (มากกว่า 2 วัน) ส่งผลทำให้ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น โดยสตาร์ชข้าวโพดเหนียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บรักษาเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C พบปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 24.4 เมื่อนำสตาร์ชข้าวโพดเหนียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บรักษาเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ -20°C พบปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 18.5 และเมื่อนำสตาร์ชข้าวโพดเหนียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และเก็บรักษาเป็นเวลา 2 วัน ที่อุณหภูมิ 20°C พบปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 50.1

Ozturk และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพดอะมิโลสสูงด้วยเอนไซม์พุลลานเนสที่ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ สมบัติทางความร้อน สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการเกิดเพสท์ ในสตาร์ชข้าวโพดอะมิโลสสูง พบว่าเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) โดยที่ระยะเวลาการตัดสายกิ่ง 48 ชั่วโมง จะเหมาะสมที่สุดในการเกิดปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 42.5 สำหรับผลต่อสมบัติทางความร้อน พบว่าอุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature;  $T_o$ ) ของตัวอย่างสตาร์ชที่ไม่ผ่านและผ่านการตัดสายกิ่งที่ระยะเวลาต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง ( $p \geq 0.05$ ) สำหรับอุณหภูมิในการเกิดเจลาติไนเซชันสูงสุด (peak temperature;  $T_p$ ) ของตัวอย่างสตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกิ่งที่ระยะเวลาต่างๆ โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้นค่า  $T_p$  ลดลง ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง พบว่าการตัดสายกิ่งที่เวลา 3-48 ชั่วโมง จะสนับสนุนให้  $T_p$  ของตัวอย่างสตาร์ชมีค่าลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างกันในระยะเวลาในการตัดสายกิ่ง ( $p \geq 0.05$ ) ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาติไนซ์ ( $\Delta H$ ) ของตัวอย่างสตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกิ่ง (0 ชั่วโมง) จะมีค่า  $\Delta H$  ลดลงเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง ( $p < 0.05$ ) และเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น (3-48 ชั่วโมง) พบว่าค่า  $\Delta H$  จะเพิ่มขึ้น โดยมีความแตกต่างกันในบางชุดการทดลอง สำหรับผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ โดยสมบัติเชิงหน้าที่ที่ทำการศึกษา คือความสามารถในการละลายน้ำ และความสามารถในการจับน้ำ พบว่าการตัดสายกิ่งทำให้ความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง ( $p < 0.05$ ) ซึ่งความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้น จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่ง สำหรับความสามารถในการจับกับน้ำของตัวอย่างสตาร์ช พบว่าการตัดสายกิ่งทำให้ความสามารถในการจับกับน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง ( $p < 0.05$ ) ซึ่งความสามารถในการจับกับน้ำ

มีแนวโน้มที่จะลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อระยะเวลาในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น โดยสังเกตได้จากที่ระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ใช้ในการตัดสายกิ่ง ความสามารถในการจับกับน้ำของตัวอย่างที่ลดลงอาจเนื่องมาจากโครงสร้างของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีความหนาแน่นมากขึ้น และสำหรับผลต่อสมบัติการเกิดเพสต์ โดยสมบัติการเกิดเพสต์สามารถวิเคราะห์ด้วยเครื่อง RVA (Rapid Visco Analyzer) โดยทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างสตาร์ชที่ไม่ผ่านและผ่านการตัดสายกิ่งที่ระยะเวลาต่างๆ โดยสตาร์ชข้าวโพดอะมิโลสสูงที่ผ่านการตัดสายกิ่งเป็นเวลา 0 ชั่วโมง พบว่ากราฟความหนืดที่วัดได้ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง RVA ในทุกชุดการทดลองมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง ถึงแม้ว่าในตัวอย่างสตาร์ชที่เกิดการเจลาทิไนเซชัน ซึ่งคาดว่าจะให้พีคของความหนืดที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง แต่จากการศึกษาไม่พบลักษณะดังกล่าว ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากแกรนูลของสตาร์ชถูกย่อย และความสามารถในการละลายของสตาร์ชเพิ่มขึ้น ดังนั้นผลของความร้อน และความดันระหว่างการให้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave สำหรับความสามารถในการจับกับน้ำ และความสามารถในการละลายของตัวอย่างสตาร์ชที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave จะมีค่าสูงขึ้น สำหรับค่า cold viscosity ของตัวอย่างสตาร์ชในทุกชุดการทดลองที่ผ่านการตัดสายกิ่งจะมีค่าสูงกว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านการตัดสายกิ่ง และระยะเวลาในการตัดสายกิ่งไม่มีผลต่อค่า cold viscosity สำหรับค่าความหนืดอื่นๆ (peak, breakdown และ final) ของตัวอย่างสตาร์ช พบว่าจะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของสตาร์ชถูกย่อยมากเกินไป นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่เริ่มเปลี่ยนค่าความหนืด (pasting temperature) มีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากโครงสร้างมีความแข็งแรงมากขึ้น

Pongjanta และคณะ (2009) ได้ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 8, 10, 12 และ 16 U/g ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ระดับการย่อย ระดับการคืนตัว อัตราการถูกย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase การประเมินค่าดัชนีการย่อย และค่าดัชนีน้ำตาล และปริมาณและรูปแบบของผลิตภัณฑ์ พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงสุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 19.81 เมื่อใช้เอนไซม์พุลูลานเนส 12 U/g ในการตัดสายกิ่ง และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีค่าลดลงเป็นร้อยละ 17.31 และ 13.16 เมื่อใช้เอนไซม์พุลูลานเนส 14 และ 16 U/g ในการตัดสายกิ่ง สำหรับผลต่อระดับการย่อย พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นจาก 8 U/g เป็น 14 U/g ทำให้ระดับของการย่อยเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 2.46 เป็นร้อยละ 5.27 แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์พุลูลานเนส 16 U/g จะทำให้ระดับของการย่อยตัวอย่างสตาร์ชข้าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย



( $p \leq 0.05$ ) แสดงว่าการใช้สตา์รซ์ข้าวเข้มน้้นร้อยละ 15 โดยน้้าหนัก ที่เกิดการเจลาทิไนซ์ และถูกตัดสายกึ่งโดยสมบูรณ้ โดยใช้เอนไซม์พูลูลานเนส 14 U/g ในการย่อยเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งจะถูกย่อยอย่างสมบูรณ้ไปเป็นน้้าตาลมอลโตส โดยเอนไซม์  $\beta$ -amylase โดยซึ่คจำกัคของเอนไซม์  $\beta$ -amylase อยู่ทีร้อยละ 98.82 สตา์รซ์ข้าวเกิดการตัดสายกึ่งอย่างสมบูรณ้เมือซึ่คจำกัคของเอนไซม์  $\beta$ -amylase มีค่าอย่างน้อยทีสุดร้อยละ 95 (Nagamura, *et al.*, 2002) สำหรั้ผลต่อระดับการคีนตัว พบว่าการเกิดรีโทรเกรเดชันโดยการย่อยสตา์รซ์ข้าว เมือใช้ปริมาณเอนไซม์พูลูลานเนส 8-12 U/g จะมีการสูญเสียน้้าอย่างมาก โดยมีระดับการคีนตัวอยู่ทีร้อยละ 35.01-54.80 หลังจากนั้นเมือใช้ปริมาณเอนไซม์พูลูลานเนส 12-16 U/g ระดับการคีนตัวจะมีค่าคงที่ คือร้อยละ 54.80-54.85 สำหรั้ผลต่ออัตราการถูกย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ในสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตา์รซ์ข้าว ซึ่งอัตราการถูกย่อยของสตา์รซ์ถูกวิเคราะห์ในหลอดทดลอง เป็นระยะเวลา 0-180 นาที เมือใช้ปริมาณเอนไซม์พูลูลานเนส 12 U/g สตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีอัตราการถูกย่อยต่ำสุด โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 2.64-46.24 สำหรั้ระยะเวลาในการถูกย่อยตั้งแต่ 0-180 นาที ขณะที่สตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ซุคควบคุม (สตา์รซ์ข้าวทีไม่ผ่านการตัดสายกึ่ง) จะมีอัตราถูกย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 4.70-64.43 ทีระยะเวลาในการถูกย่อยตั้งแต่ 0-180 นาที ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห้นว่าสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทีผ่านการตัดสายกึ่งอย่างไม่สมบูรณ้จะสามารถทนต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์  $\alpha$ -amylase ได้ และอัตราการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของสตา์รซ์ข้าวจะลดลงหลังจากเกิดการรีโทรเกรเดชัน สำหรั้ผลต่อการประเมินค่าดัชนีการย่อยและค่าดัชนีน้้าตาลของสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยซุคการทดลองทีใช้เอนไซม์พูลูลานเนส 12 U/g ในการย่อย จะมีดัชนีการย่อยเท่ากับร้อยละ 42.63 ซึ่งมึ่ค่าน้อยกว่าเมือเทียบกับซุคการทดลองทีใช้เอนไซม์พูลูลานเนส 14, 16, 10, 8 และ 0 U/g โดยมีดัชนีการย่อยเท่ากับร้อยละ 44.25, 45.79, 51.51 และ 55.35 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าดัชนีน้้าตาลของสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดที่ 3 มีค่าเท่ากับร้อยละ 72.58, 70.31, 69.65, 61.43, 65.99 และ 66.90 เมือใช้ปริมาณเอนไซม์พูลูลานเนส 0, 8, 10, 12, 14 และ 16 U/g ตามลำดับ และสำหรั้ผลต่อปริมาณและรูปแบบของผลึก โดยเมือน้้าสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ทีได้จากการตัดสายกึ่งทีความเข้มน้้นของเอนไซม์พูลูลานเนส 12 U/g เมือน้้าไปผ่านเครื่อง X-ray diffraction พบว่าสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ มีรูปแบบของผลึกเปลี่ยนจากชนิด A เป็นชนิด V โดยมีปริมาณผลึกเท่ากับร้อยละ 19.74 ซึ่งคุณสมบัตินี้แสดงถึงการตัดสายกึ่งและการเกิดรีโทรเกรเดชัน โดยสตา์รซ์จะมีการจัดเรียงตัวใหม่เป็น helical complex ทำให่มึ่โครงสร้างผลึกแบบ V และสตา์รซ์ทีทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ มีการจัดเรียงตัวใหม่โดยมึ่ลักษณะเหมือนรังผึ้ง และมีโครงสร้าง filamentous network ซึ่งสังเกตได้จาก Scanning electron micrograph โดยโครงสร้างของสตา์รซ์ทีผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันจะมีลักษณะ

ใหญ่กว่าสตาร์ชที่ไม่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน รูปร่างมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบ มีสีชาวลักษณะเหมือนฟองน้ำ และมีรูพรุน โดยโครงสร้างมีลักษณะเป็นเส้นใยที่ต่อเนื่องกัน ประกอบด้วยอะมิโลส และอะมิโลเพคติน ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดผลึกใหม่ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชข้าวที่ผ่านการตัดสายกิ่ง

Zhang และ Jin (2011) ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพดด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสที่ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 8, 16, 24, 32, 40 และ 48 ชั่วโมง ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ใน 16 ชั่วโมงแรก มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เมื่อเวลาอยู่ในช่วง 16-24 ชั่วโมง โดยหลังจากผ่านชั่วโมงที่ 24 จะมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากที่สุดคือ 32.1 g/100 g ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการย่อย คือที่เวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพดที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 ASPU/g ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยผลของความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพด พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสน้อยกว่า 12 ASPU/g ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะค่อยๆ มีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นโดยปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีค่ามากที่สุดอยู่ที่ 44.7 g/100 g เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนส 12 ASPU/g ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ระดับของเอนไซม์ที่ระดับนี้เพียงพอที่จะใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพด และได้ทำการศึกษาพีเอชที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพดด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสที่พีเอชต่างๆ กัน คือ 4, 4.5, 5, 5.5, 6 และ 6.5 ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่า พีเอชมีอิทธิพลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์พุลูลานเนส และการตัดสายกิ่งของสตาร์ชข้าวโพด ซึ่งผลของ พีเอชที่แตกต่างกันคืออยู่ในช่วง 4.5-5.5 ในการทำปฏิกิริยาเพื่อตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพดด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส โดยที่พีเอชเท่ากับ 5.0 จะมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากที่สุดคือ 36.3 g/100 g นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตาร์ชข้าวโพดด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 42, 44, 46, 48, 50 และ 52°C ต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าที่อุณหภูมิ 46°C จะมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากที่สุดคือ 40.2 g/100 g

- สตาร์ชที่ผ่านการดัดแปรทางเคมี (Chemically modification starch; RS type 4)

เป็นสตาร์ชชนิดใหม่ เกิดจากการดัดแปรทางเคมีทำให้พันธะที่ต่างไปจาก  $\alpha$ -D-(1-4) หรือ  $\alpha$ -D-(1-6) โดยปฏิกิริยาดัดแปรทางเคมีแบ่งออกเป็น 3 ชนิด คือ ครอสลิงกิง (cross linking) เอสเทอร์ริฟิเคชัน (esterification) และอีเทอร์ริฟิเคชัน (etherification) ส่วนใหญ่เป็น

สตาร์ชที่เกิดจากการคลอสลิง (crosslink) ได้มาจากปฏิกิริยาของสตาร์ชกับสาร bi-orpolyfunctional เช่น sodium trimetaphosphate, phosphorus oxychloride หรือ การผสม anhydrides ของ acetic acid และ dicarboxylic acids เช่น adipic acid ครอสลิงกิง (cross linking) จะเกิดโดยหมู่ sulphonate และ phosphate ระหว่างโมเลกุลของสตาร์ชร่วมกับหมู่ไฮดรอกซิลทำให้ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

## 4.2 ประโยชน์ทางสรีรวิทยาของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

### 4.2.1 สมบัติเทียบเท่าเส้นใยอาหาร (dietary fiber)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าสามารถทนต่อเอนไซม์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้สูง และจัดเป็นองค์ประกอบของเส้นใยอาหารได้ ตามคำจำกัดความของ dietary fiber โดย AACC (2000) แม้ว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ใช่องค์ประกอบของเซลล์พืช แต่สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีคุณค่าทางโภชนาการคล้ายกับ non-starch polysaccharide (NSP) มากกว่า digestible starch และยังมีโครงสร้างทางสรีรวิทยาคือคล้ายกับเส้นใยอาหาร สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จัดเป็นเส้นใยอาหารที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ (insoluble fiber) แต่มีคุณสมบัติที่เหมือนกับเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำได้ (soluble fiber) คือทำให้ระดับการย่อย และการเผาผลาญกลูโคสได้ช้าลง ซึ่งส่งผลดีต่อลำไส้ใหญ่ ป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ลดคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือด โดยเพิ่มอัตราการผลิตต่อมเซลล์เล็กๆ หรือลดการฟุ้งของเยื่อผิวที่ลำไส้เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่มีเส้นใยอาหารแสดงให้เห็นว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีลักษณะคล้ายกับกัวร์ เส้นใยอาหารที่ละลายน้ำ ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเกิดเนื้องอก และลดคอเลสเตอรอลในเลือด และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) แต่ยังคงรักษาระดับปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด (total dietary fiber; TDF) ไว้ (Haralampu, 2000)

### 4.2.2 อัตราการถูกย่อยต่ำ (hypoglycaemic effects)

อาหารที่ประกอบด้วยสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยส่วนใหญ่มีอัตราการถูกย่อยต่ำจึงสามารถนำไปใช้ควบคุมการปลดปล่อยกลูโคสได้ โดยทั่วไปการเผาผลาญ (metabolism) ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เกิดขึ้นภายหลังการบริโภค 5-6 ชั่วโมง ตรงกันข้ามกับสตาร์ชที่ผ่านการทำอาหารตามปกติ ซึ่งโดยส่วนมากมีการย่อยทันที และจากการที่สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ใช้เวลาในการย่อยมากกว่า 5-6 ชั่วโมง จึงทำให้สามารถลดภาวะที่มีกลูโคสในเลือดสูงภายหลังรับประทานอาหาร (postprandial glycemia) และภาวะที่มีอินซูลินมากเกินไปในร่างกาย (insulinemia) (Raben *et al.*, 1994; Reader *et al.*, 1997) ดังนั้นสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จึงลดค่าดัชนีน้ำตาล (glycemic index) ได้ จากการศึกษาโดยให้ผู้ชายที่มีสุขภาพดีและมีน้ำหนักปกติ จำนวน 10 คน รับประทานอาหารที่ประกอบด้วยสตาร์ช 50 กรัม ที่ไม่มีส่วนประกอบของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และมีส่วนประกอบของสตาร์ชที่

ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 54 พบว่าภายหลังการรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้ระดับกลูโคสในเลือด (blood glucose), อินซูลิน (insulin), epinephrine มีความเข้มข้นต่ำอย่างมีนัยสำคัญ (Raben *et al.*, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจากการให้คนรับประทานที่มีส่วนผสมของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า (RS type 3, CrystaLean®) พบว่าระดับกลูโคสในเลือดสูงสุดที่พบมีค่าต่ำกว่าคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โอลิโกแซคคาไรด์ และสตาร์ชทั่วไป) โดยสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะเป็นตัวขัดขวาง จึงช่วยลดระดับกลูโคสในเลือดภายหลังรับประทานอาหารและมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการเผาผลาญ (metabolism) ในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (ไม่ขึ้นกับอินซูลิน)

#### 4.2.3 เป็นสารตั้งต้นของโพรไบโอติก (prebiotic)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ไม่สามารถย่อยได้ในลำไส้เล็ก แต่จะไปห่อหุ้มโมเลกุลของไขมัน และถูกส่งผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ โดยทั่วไปสตาร์ชไม่พบในอุจจาระของคนหรือสัตว์ แสดงให้เห็นว่ามีกระบวนการหมักที่สมบูรณ์ จากการทดลองในอุจจาระของคนในหลอดทดลอง (*In vitro*) ทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) ได้แก่ อะซิเตท บิวทิเรท และโพรพิโอเนต โดยพบว่าปริมาณบิวทิเรท (butyrate) ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณสูง ซึ่งบิวทิเรทนี้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของเซลล์เยื่อผิวในลำไส้ใหญ่ และยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเนื้อร้าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ (Asp and Bjorck, 1992) นอกจากนี้ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถให้พลังงานแก่แบคทีเรียโพรไบโอติก (probiotic) เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *Bifidobacterium* และลดจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย เช่น *Escherichia coli*, *Clostridia* (Brown *et al.*, 1996) โดยสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะผ่านลำไส้เล็กอย่างสมบูรณ์ และไปเป็นสารตั้งต้นในลำไส้ใหญ่โดยถูกนำไปเป็นแหล่งพลังงาน เพื่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

#### 4.3 การประยุกต์ใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันอาหารประเภทเส้นใยอาหารสูง (high fiber) ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ แต่อาหารที่มีการเติมเส้นใยอาหาร มักจะไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากมีเนื้อสัมผัสหยาบ และมีกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ ดังนั้นจึงมีการใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อเป็นแหล่งของเส้นใยอาหารแทน ทั้งนี้เพราะสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นแป้งที่สามารถใช้การวิเคราะห์แบบ Total dietary fiber (TDF) โดยใช้วิธีของ AOAC ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกาใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ (enzymatic-gravimetric) ที่กำหนดให้ใช้จาก Nutrition Labeling and Education Act (NLEA) ได้กำหนดถึงการมีเส้นใยอาหารเพื่อระบุบน

ฉลาดอาหารไว้ว่า อาหารที่สามารถระบุได้ว่าเป็นแหล่งของเส้นใยอาหาร (good source) ได้ต้องมีเส้นใยอยู่ 2.5 กรัมต่อหน่วยบริโภค หรือ TDF ร้อยละ 5 และจะระบุว่าเป็นเส้นใยสูง (high fiber) ต้องมีเส้นใยอยู่ 5 กรัมต่อหน่วยบริโภค (หน่วยบริโภคขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร) หรือ TDF ร้อยละ 5 (Baghurst *et al.*, 1996; Sajilata *et al.*, 2006) และใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่ออ้างถึงปริมาณเส้นใยอาหารได้ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจำหน่ายในทางการค้าเพื่อใช้เป็นส่วนผสมอาหารเพื่อสุขภาพ มีคุณลักษณะไม่แตกต่างจากแป้ง หรือสตาร์ชทั่วไป คือ เป็นผงละเอียด สีขาว ไม่มีรสชาติ นำไปใช้ผสมกับส่วนผสมอื่นได้ง่าย โดยไม่ทำให้เนื้อสัมผัสอาหารหรือรูปร่างของผลิตภัณฑ์อาหารเปลี่ยนแปลง และสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่แนะนำต่อวันเพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพคือ ประมาณ 20 กรัม (วารสาร สกลไซ, 2551)

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยทั่วไปมีขนาดอนุภาคที่เล็กและละเอียด (เป็นสาเหตุทำให้มีผลต่อเนื้อสัมผัสน้อย) ลักษณะปรากฏเป็นสีขาว ไม่มีกลิ่น มีคุณสมบัติทางเคมีกายภาพที่ดี (Fausto *et al.*, 1997) เช่น มีอุณหภูมิการเกิดเจลในเซชันสูง มีสมบัติในการอุ้มน้ำต่ำ ลักษณะการพองตัว สมบัติทางความหนืดที่เพิ่มขึ้น สมบัติการเป็นเจล และความสามารถในการจับกับน้ำ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายในอาหาร สมบัติเหล่านี้ทำให้่ง่ายในการใช้แทนที่แป้ง (flour) (Tharanathan and Mahadevamma, 2003) โดยมีการอนุญาตให้นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อเสริมคุณค่าทางเส้นใยอาหาร เพื่อช่วยในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และความรู้สึกภายในปาก เทียบกับผลิตภัณฑ์ที่มีเส้นใยอาหารสูงดั้งเดิม พบว่าผลิตภัณฑ์มีความกรอบเพิ่มขึ้น โดยสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทำหน้าที่เป็นส่วนผสมในอาหาร ทำให้ค่าพลังงาน (calorific) ต่ำ จากสมบัติของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เหล่านี้ทำให้ประสบความสำเร็จในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ดังนี้

#### 4.3.1 การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ

จากสมบัติทางกายภาพของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในการทำขนมปัง และทำให้ความกรอบเพิ่มขึ้น ช่วยในการขยายตัว และปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยทั่วไปขนมปังที่เสริมคุณค่าโดยใช้เส้นใยอาหาร เช่น เซลลูโลส ข้าวโอ๊ต และและข้าวสาลี จะมีสีคล้ำ ปริมาตรขนมปังลดลง ให้เนื้อสัมผัสหยาบ ความรู้สึกภายในปากแ่ มีกลิ่นของธัญชาติที่ไม่พึงประสงค์และบดบังกลิ่น ทั้งนี้เป็นผลมาจากปริมาณเส้นใยอาหารที่สูงในขนมปัง ดังนั้นการใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นส่วนผสมในการทำขนมปัง ทำให้ได้ขนมปังที่มีสีขาวขึ้น ปริมาตรสูงขึ้น ให้เนื้อสัมผัสและความรู้สึกในปากดีขึ้นกว่าการใช้เส้นใยอาหารทั่วไป จากการศึกษาที่ American

Inst. Of Baking (AIB) โดยประเมินผลของปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อลักษณะของขนมปังเทียบกับขนมปังที่ทำจากเส้นใยอาหารแบบดั้งเดิม โดยการศึกษาประกอบด้วยเซลลูโลส เส้นใยอาหารข้าวโอ๊ต เส้นใยอาหารข้าวสาลี และสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ ร้อยละ 23 (Hylon VII starch) และ TDF ร้อยละ 40 (Novelose 240 starch) และผสมเส้นใยอาหารข้าวโอ๊ตกับ Novelose 240 starch ในอัตราส่วน 50:50 เปรียบเทียบเส้นใยอาหารข้าวโอ๊ต เซลลูโลส และเส้นใยอาหารข้าวสาลี พบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้าทั้ง 2 ชนิด มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำ ซึ่งคล้ายกับแป้ง (flour) แม้ว่าความสามารถในการอุ้มน้ำของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ต่ำกว่าแหล่งของเส้นใยอาหารอื่นๆ แต่ปริมาณเส้นใยอาหารทั้งหมด (TDF) ที่ได้รับมีมากกว่า อย่างไรก็ตามการดูดซับของโคที่ทำจากสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับโคที่ทำจากเส้นใยอาหารอื่น แต่มีการใช้น้ำในปริมาณที่มากกว่า และพบอีกว่าขนมปังที่มีปริมาณ TDF ร้อยละ 40 (Novelose 240 starch) มีปริมาตรมากกว่า และมีโครงสร้างของเซลล์ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับเส้นใยอาหารแบบดั้งเดิม (Baghurst *et al.*, 1996)

การใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในการทำเค้ก และมัฟฟิน จากการประเมินการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าเค้ก และมัฟฟินที่ใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ให้กลิ่นรสดีกว่าที่ใช้เส้นใยอาหารจากข้าวโอ๊ต และเส้นใยจากข้าวโอ๊ตผสมสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และมัฟฟินสูตรที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ยังมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มกว่า และหลังจากการเก็บ 2 สัปดาห์ มัฟฟินที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ มีการสูญเสียน้ำน้อยกว่ามัฟฟินสูตรที่ใช้เส้นใยอาหารทั่วไป ทำให้มีความชื้นในช่วงการเก็บมากกว่ามัฟฟินสูตรอื่น (Yue and Waring, 1998)

#### 4.3.2 การประยุกต์ใช้เป็นสารช่วยเพิ่มความกรอบ

สามารถใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นส่วนผสมเพื่อปรับปรุงความกรอบให้ผิวหน้าอาหารที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงในอาหารจำพวกมันฝรั่งปิ้ง และวาฟเฟิล อาหารแช่แข็งที่ต้องให้ความร้อนซ้ำ ซึ่งเป็นอาหารที่ต้องการให้ผิวหน้ามีความกรอบ จึงได้มีการทดสอบเปรียบเทียบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และเส้นใยอาหารต่างๆ ในวาฟเฟิล โดยประเมินความกรอบเริ่มต้น และความกรอบภายหลังการปิ้ง 3 นาที ความชื้น และเนื้อสัมผัส จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าวาฟเฟิลที่ทำจากสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีความกรอบมากกว่าวาฟเฟิลที่ทำจากเส้นใยอาหารแบบดั้งเดิม นอกจากนี้ยังมีการใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นสารช่วยเพิ่มความกรอบในแครกเกอร์ โดยแครกเกอร์สูตรที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อเป็นแหล่งของเส้นใย (functional fiber) พบว่ามีเนื้อสัมผัสที่ไม่แข็ง และมีความกรอบมากกว่าแครกเกอร์สูตรที่ใช้เซลลูโลส เส้นใยจากข้าวโอ๊ต หรือ

เส้นใยจากข้าวสาลี และจากการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าแครกเกอร์สูตรที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีคะแนนการยอมรับรวมไม่ต่างจากตัวอย่างสูตรควบคุม (Yue and Waring, 1998)

#### 4.3.3 การประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารอื่นๆ

สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถนำมาช่วยในการปรับปรุงการพองตัวของอาหารจำพวกธัญพืชอบกรอบและขนมขบเคี้ยว ธัญพืชที่นำมาใช้มีหลากหลาย ประกอบด้วย TDF ร้อยละ 40 (Novelose 240 starch) เพียงอย่างเดียว และการผสมระหว่างเส้นใยอาหารข้าวโอ๊ตกับ TDF ร้อยละ 40 (Novelose 240 starch) ในอัตราส่วน 50:50 และ 25:75 พบว่าธัญพืชที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และไม่มีเส้นใยอาหารข้าวโอ๊ตมีการพองตัวได้มากที่สุด ส่วนการผสมเส้นใยอาหารข้าวโอ๊ตกับธัญพืชที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 75 มีการพองตัวได้มากกว่า การผสมเส้นใยอาหารข้าวโอ๊ตกับธัญพืชที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 50 นอกจากนี้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สามารถใช้เพื่อเพิ่มความข้นหนืดในเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพเป็นเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ โดยทั่วไปเส้นใยอาหารที่ละลายน้ำในเครื่องดื่ม มีความข้นเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำคือสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ จะมีความรู้สึกเหมือนกรวดทราย (gritty) ในปากและบดบังกลิ่นน้อยกว่า

การใช้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทำเส้นพาสต้า พบว่าพาสต้าที่มีสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มากถึงร้อยละ 15 ไม่ทำให้มีผลกระทบต่อการไหล (rheology) ของโดหรือน้อยมากในระหว่างผ่านการอัดพอง และพาสต้าที่ได้จะมีสีสว่างกว่า ให้เนื้อสัมผัสที่แน่นและเหนียวกว่าตัวอย่างควบคุม และเวลาที่ใช้ในการทำให้สุกเหมือนกันกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมเส้นใยอาหาร (Yue and Waring, 1998)

การเติมสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดที่ 3 ลงไปในเส้นสปาเกตตี โดยทำการเปรียบเทียบกับเส้นสปาเกตตีควบคุมและเส้นสปาเกตตีที่ใส่รำข้าว การเปรียบเทียบคุณภาพในการหุงต้ม พบว่าเส้นสปาเกตตีที่มีการใส่สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จะใช้เวลาในการให้ความร้อนนานกว่า และอุณหภูมิในการเกิดเจลสูงกว่าเส้นสปาเกตตีที่ใส่รำข้าวและตัวอย่างควบคุม ซึ่งมีเวลาในการให้ความร้อนมีผลต่อเนื้อสัมผัสของเส้นสปาเกตตีในด้านความแข็ง การเกาะตัว ความเหนียว และการเคี้ยว อย่างมีนัยสำคัญ (Sozer *et al.*, 2007)

## 5. โปรไบโอติก

### 5.1 ความหมายและคุณสมบัติของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก หมายถึงอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบน โดยสามารถทนต่อการย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และมีผลในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคโดยเป็นอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ หรือ โปรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้โดยไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Gibson and Roberfroid, 1995) โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์หรือเรียกว่าจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น จุลินทรีย์โปรไบโอติก และโปรไบโอติกมีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิด โปรไบโอติกเป็นสารอาหารที่สามารถส่งเสริมให้จุลินทรีย์โปรไบโอติกมีการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวน และแข็งแรงมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นสารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร และลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง และไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อที่จุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้สารเหล่านี้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gibson, 2004) และส่งผลให้สุขภาพของผู้บริโภคดีขึ้น เช่น ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Lopez *et al.*, 2000) และสามารถป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่รู้จักกันดีมักเป็นสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เช่น แลคตูโลส (lactulose) แรฟฟิโนส (raffinose) สตาคีโอส (starchyose) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่เป็นพวกสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch: RS), Non-starch polysaccharide (NSP) รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพนคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และไซแลน นอกจากนี้ mucine glycoprotein ซึ่งผลิตโดย goblet cell ในลำไส้ใหญ่และโคโตแซน โอลิโกแซคคาไรด์ (COS) แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้เช่นกัน (นิริญา บุญดี, 2550)

### 5.2 บทบาทและความสำคัญของโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร

สารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกไม่ได้ไปมีผลโดยตรงต่อสุขภาพแต่จะใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักภายในลำไส้ใหญ่ โดยไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้โปรไบโอติก และผลิตสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกัน สารประกอบที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจากการย่อยและหมักโปรไบโอติก ได้แก่ กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid; SCFA) สารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะ SCFA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ จะมีปริมาณร้อยละ 40-



60 (กรัม SCFA/100 กรัมสับสเตรท) ในแต่ละวันจะผลิตออกมาประมาณ 300-500 มิลลิโมล ประกอบไปด้วย อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทิเรท (Chummings and Englyst, 1995) ปริมาณของ SCFA จะมีปริมาณสูงสุดในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัม (caecum) และส่วนต้น และมีปริมาณลดลงในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ซึ่งกรดไขมันสายสั้นทั้ง 3 ชนิด จะมีบทบาทการทำงานที่แตกต่างกัน อะซิเตท จะถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ ไต และหัวใจ โพรพิโอเนทจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์ ลำไส้ใหญ่ บิวทิเรทเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ใหญ่ กรดไขมันสายสั้นสามารถควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cellular proliferation) และการตายของเซลล์ (program cell death) แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่จะมีประสิทธิภาพในการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน ดังนั้นบทบาทของฟรีไบโอติกต่อสุขภาพของผู้บริโภคมีดังนี้ (นิธิญา บุญดี, 2550)

### 5.2.1 การป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่

การเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่มีโอกาสเกิดขึ้นสูง และมากกว่าที่ลำไส้เล็กถึง 10 เท่า (Morotomi *et al.*, 1990) เนื่องจากลำไส้ใหญ่เป็นแหล่งของสะสมของเสีย และเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด ดังนั้นมีโอกาสเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ได้มากกว่าในทางเดินอาหารส่วนอื่น ซึ่งมีการศึกษาพบว่าสารฟรีไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Hylla *et al.*, 1998) นอกจากนี้สารที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ยังเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นแนวทางในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่จึงเจาะจงไปที่ฟรีไบโอติก ซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียโดยบทบาทของฟรีไบโอติกในการป้องกันมะเร็งมีดังนี้

- เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบิวทิเรท ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังถูกใช้ในการเจริญของเซลล์ได้อีกด้วย โดยบทบาทของบิวทิเรทและกรดไขมันสายสั้นชนิดอื่นๆ คือ โพรพิโอนิก และอะซิติก จะส่งผลโดยตรงต่อเซลล์ลำไส้ใหญ่ในการป้องกันมะเร็ง (Scheppach *et al.*, 1995)

- เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ให้เป็นไป แนวโน้มทางที่จะลดการเกิดสารที่ส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น เมทาบอลิซึมของไขมัน และโปรตีนจะทำให้เกิดสารก่อมะเร็งขึ้น โดยอาจจะเปลี่ยนเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย *Clostridia* และ *Bacteroides* จากการเกิด Proteolysis ไปเป็น Saccharolysis นอกจากนี้ฟรีไบโอติกยังมีบทบาทในการส่งเสริมให้แบคทีเรียแลคติกผลิตสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่จะผลิตสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ และยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า ฟรีไบโอติกยังมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น azoreductase, nitroreductase และ  $\beta$ -glucuronidase เป็นต้น (Reddy, 1998) จาก

กระบวนการหมักแบบไร้อากาศของคาร์โบไฮเดรตในลำไส้ใหญ่ จะมีการสร้างสารต่างๆ ออกมาซึ่งมีบทบาทต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งได้โดยมีกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้กลไกต่างๆ ในการป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่นั้นยังมีกลไกต่างๆ ที่เกิดร่วมกันทั้งจากแบคทีเรียโพรไบโอติกและพรีไบโอติก

### 5.2.2 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกสามารถไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) โดยไปกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ซึ่งภายในลำไส้ใหญ่มีจุลินทรีย์อยู่หลายกลุ่มทั้งก่อโรคและกลุ่มที่มีประโยชน์ คือเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งสามารถสร้างสารมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น กรดไขมันสายสั้น ซึ่งมีผลให้พีเอชในลำไส้ลดลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ยังทำให้โพรไบโอติกมีการผลิต antibiotics และ antimicrobial สูงขึ้น ดังนั้นอาหารพรีไบโอติกซึ่งเลือกส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว จึงเป็นการส่งเสริมการผลิตสารยับยั้งด้วย นอกจากนี้กระบวนการเมตาบอลิซึมของ พรีไบโอติกยังส่งผลให้ค่าพีเอชภายในลำไส้ต่ำลงจึงทำให้มีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อีกทางหนึ่ง (Fuller, 1997 อ้างโดย Ziemer and Gibson, 1998)

### 5.2.3 เพิ่มการดูดซึมของแคลเซียม

พรีไบโอติกสามารถเพิ่มการดูดซึมของสารอาหาร โดยเฉพาะการดูดซึมของแคลเซียม ถึงแม้ว่าการดูดซึมของแคลเซียมจะเกิดขึ้นเป็นหลักในลำไส้เล็กแต่ยังคงมีการดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่อยู่ และยังคงได้รับความสนใจอยู่ซึ่งกลไกในการเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่มีดังนี้

- จากกระบวนการหมักของพรีไบโอติกจะทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) ซึ่งทำให้พีเอชในลำไส้ใหญ่ลดลง จึงทำให้แคลเซียมละลายได้ดี ทำให้มีการดูดซึมที่ดีขึ้นด้วย
- สารที่อยู่ในกลุ่ม Phytate (myoinositol hexaphosphate) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืช โดยสารดังกล่าวเป็นสารที่มีความเสถียรสูง และไม่ละลายน้ำทำให้เมื่อไปจับกับแคลเซียมทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมแคลเซียมได้และจากกระบวนการหมักของ Phytate โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ทำให้แคลเซียมถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระและมีการดูดซึมเข้าร่างกายได้
- เกิดกลไกในการแลกเปลี่ยนแคลเซียมภายในลำไส้โดยที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนโปรตอนระหว่างแคลเซียมและไขมันสายสั้น (SCFA) ที่มีอยู่ในลำไส้

#### 5.2.4 ลดระดับคอเลสเตอรอล

การลดระดับคอเลสเตอรอล พบว่ากระบวนการหมักสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่มีผลให้สามารถไปลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ Tuohy และคณะ (2003) พบว่า *L. acidophilus* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ซึ่งจะช่วยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ได้

- ไปลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล สารกลุ่มแพคติน กัวกัม (gum) และ  $\beta$ -glucan ที่มีเส้นใยอาหารสูง จะสามารถลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลได้ โดยลักษณะเหนียวหนืดของเส้นใยอาหาร จะไปเคลือบผนังลำไส้ทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอลในร่างกายลดลง
- ในกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันสายสั้น พบว่าโพรพิโอเนตสามารถลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซลล์ตับได้
- เพิ่มการขับถ่ายเกลือน้ำดี (bile acid) ซึ่งเกลือน้ำดีเป็นตัวช่วยละลายไขมันทำให้การดูดซึมไขมัน และคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น (Conway, 2001)

#### 5.2.5 ช่วยลดอาการท้องผูก

กรดไขมันซึ่งผลิตโดย *Bifidobacteria* จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้อุจจาระนิ่มขึ้นขับถ่ายได้ง่ายขึ้น ซึ่งสารพรีไบโอติกสามารถเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้นในจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้

### 5.3 ประเภทของพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่มีการใช้อยู่ในขณะนี้อยู่ในกลุ่ม oligosaccharides ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) โดยพันธะที่เชื่อมกันของน้ำตาลจะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกว่าสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยพันธะดังกล่าวได้หรือไม่ เช่น ความสามารถของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* ที่สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -fructofuranosidase มาย่อยพันธะภายใน fructooligosaccharide ได้ เป็นต้น ในขณะที่พรีไบโอติกที่มีขนาดใหญ่และน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรียได้น้อยลง หรืออาจกล่าวได้ว่า พรีไบโอติกที่ดีควรมีขนาดเล็ก (degree of polymerization น้อย) (Manning and Gibson, 2004) ซึ่งพรีไบโอติกดังกล่าวสามารถพบได้ในผักและผลไม้ หรืออาจจะได้จากการสังเคราะห์โดยการย่อยสารในกลุ่ม โพลีแซคคาไรด์ หรือการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ (นันทนาเชิญทอง, 2550) โดยสารพรีไบโอติกชนิดโพลิโกแซคคาไรด์ทางการค้าในปัจจุบันมีดังต่อไปนี้ (Wichienchot and Chinachoti, 2011)

### 5.3.1 แลกทูโลส (Lactulose)

แลกทูโลส เป็นน้ำตาลเชิงคู่ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตสและฟรุกโตสต่อกันด้วยพันธะเบต้า สามารถผลิตการสังเคราะห์ทางเคมีโดยวิธีเร่งทำให้เกิดไอโซเมอไรเซชัน (catalytic isomerization) โดยใช้กาแลคโตสเป็นสารตั้งต้น มีการผลิตในประเทศเยอรมัน เดนมาร์ก ออสเตรเลีย อิตาลี ญี่ปุ่น อังกฤษ และเนเธอร์แลนด์ (Schumann, 2000) พบว่ามีการใช้แลกทูโลสในทางการแพทย์มาตั้งแต่ปีค.ศ. 1950 และจากการทดสอบพบว่าแลกทูโลสเป็นสารพรีไบโอติกแต่ในทางการค้าไม่ได้ใช้ในแง่ของการเป็นอาหารเสริม แต่ใช้เป็นยาช่วยในการขับถ่ายอุจจาระ (laxative) แลกทูโลสไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก และถูกหมักโดยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้อากาศ โดยเฉพาะเชื้อ Bacteroides spp. ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลิตภัณฑ์ของการหมักได้แก่ กรดแลคติก อะซิติก และบิวทิริก

### 5.3.2 อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Inulin and Fructooligosaccharide)

อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า 2, 1 ที่มีทั้งโอลิโกแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ อินนูลินจากหัวชิกอรี ในธรรมชาติประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันตั้งแต่ 2 หน่วย จนถึงมากกว่า 60 หน่วย โดยพบร้อยละ 88 ของอินนูลิน และโอลิโกฟรุกโตสสามารถต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลายและในลำไส้เล็ก ทำให้สามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้ นอกจากนี้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์ ทำให้สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่

### 5.3.3 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galato-oligosaccharides; GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือทรานสกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (transgalacto-oligosaccharides; TOS) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกาแลคโตส กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก ทำให้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ให้แคลอรีต่ำคือ 1.73 กิโลแคลอรีต่อกรัม นอกจากนี้การศึกษาในมนุษย์ยังพบว่า GOS มีผลกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria เมื่อบริโภคในปริมาณ 2.5-15 กรัมต่อวัน แบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli สามารถใช้ GOS เป็นสับสเตรทในการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือกรดไขมันสายสั้น เช่น แลกเตท อะซิเตท และโพนพิเนท นอกจากนี้พบว่า GOS ถูกหมักอย่างสมบูรณ์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

### 5.3.4 ขอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharides; SOS)

ขอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่สำคัญในถั่วเหลืองคือ raffinose (ซึ่งเป็นน้ำตาล 3 หน่วยต่อกัน) และ stachyose (ซึ่งเป็นน้ำตาล 4 หน่วยต่อกัน) SOS

สามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่และกระตุ้นการเจริญของ Bifidobacteria การทดลองในห้องทดลองโดยใช้จุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ พบว่า SOS ถูกใช้โดยแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli นอกจากนี้ Benno และคณะ (1987) อธิบายว่าการให้ raffinose 15 กรัมต่อวันกับผู้ถูกทดสอบ 7 คน พบว่าจำนวนของกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้น ในขณะที่จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เปลี่ยนแปลง และการเติม SOS ที่ความเข้มข้นต่ำในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง พบว่าจำนวนกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า

### 5.3.5 แลกโตซูโครส (Lactosucrose; LS)

แลกโตซูโครส เป็นการรวมกันของน้ำตาลแลกโตสและซูโครส โดยมีการศึกษาในอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง 3 คน โดยการให้บริโภคน้ำตาลแลกโตสประมาณ 3 กรัมต่อวัน พบว่าจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $0.7 \log$ ) ในขณะที่จำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroides ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $0.6 \log$ ) และพบว่าปริมาณของกรดไขมันสายสั้นไม่เปลี่ยนแปลง (Ohkusa *et al.*, 1995) นอกจากนี้ Kumemura และคณะ (1992) ให้อาสาสมัครที่ท้องผูกบริโภคแลกโตซูโครส 0.32 กรัมต่อน้ำหนักตัวต่อวัน พบว่าจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $0.7 \log$ ) และจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม Clostridia ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $4.5 \log$ ) ส่วนกรดไขมันสายสั้นชนิดอะซิเตท และบิวทิเรท เพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณของไอโซบิวทิเรท (isobutyrate) วาเลิเรท (valerate) และไอโซวาเลิเรท (isovalerate) ไม่เปลี่ยนแปลง

### 5.3.6 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharide; IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ บางส่วนสามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ไอโซเมอเรส (isomerase) ซึ่งอยู่ในลำไส้เล็กของมนุษย์ส่วนเจริญ และ IMO ที่เหลือจะถูกหมักโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ โดยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria แต่ไม่ส่งเสริมการเจริญของ *E. coli* และ *Clostridium* (Olana-Martin *et al.*, 2000)

### 5.3.7 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharides)

กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์สามารถผลิตได้โดยการย้ายโมเลกุลของกลูโคส ซึ่งอยู่ในโมเลกุลของซูโครส (ตัวให้) ไปยังมอลโตส (ตัวรับ) โดยอาศัยเอนไซม์ glucosyl-transferase จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteriodes* ทำให้ได้กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้น กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีพันธะเบต้า อาจสกัดได้จากกลูแคนที่มีในข้าวโอ๊ต และในปัจจุบัน องค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration; FDA) ให้การรับรองว่ากลูโคโอลิโกแซคคาไรด์จัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ แม้ว่ายังไม่มียืนยันว่ามีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก

### 5.3.8 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides; XOS)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สามารถผลิตโดยการย่อยไซแลน (xylan) ที่ได้จากชั่งข้าวโพด ข้าวโอ๊ต และ wheat arabinoxylan ด้วยเอนไซม์ไซแลนเนส (xylanase) การบริโภค XOS ปริมาณ 1-2 กรัมต่อวัน ทำให้ผู้บริโภคมียาจำนวนเชื้อ Bifidobacteria ในอุจจาระสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญคือ ร้อยละ 10-31 และจำนวนเชื้อ Bacteroides ลดลง (Okazaki *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria ที่เพิ่มขึ้น เมื่อผู้บริโภคอาสาสมัครได้รับ XOS 5 กรัมต่อวัน โดย XOS สามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ได้ดีกว่าฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Campbell *et al.*, 1997)

### 5.3.9 อื่นๆ

น้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น lactitol, sorbitol และ maltitol โยอาหาร เช่น โยจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวเจ้า ถั่วเหลือง ถั่วกัม และเพคติน เป็นต้น นอกจากนี้สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ สามารถทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและถูกหมักโดย Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่

## 5.4 การทดสอบการเป็นพรีไบโอติกของสารอาหาร

การกล่าวอ้างคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหารจำเป็นต้องมีการพิสูจน์ที่ชัดเจน โดยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ซึ่งในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส่วนใหญ่แล้วเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหาร ในการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ชนิดนี้มีอยู่หลายแบบดังนี้ (ทิพรรัตน์ หงภัทรศิริ และคณะ, 2551)

- การใช้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการศึกษาคุณสมบัติการเป็น พรีไบโอติกของสาร โดยการใส่แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เลือกมาศึกษาโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีการเติมสารอาหารที่ต้องการทดสอบแล้วนำมาวัดการเจริญในช่วงเวลาต่างๆ ของการบ่มเชื้อ เปรียบเทียบการเจริญกับเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมสารอาหารที่ทดสอบ (Gibson and Wang, 1994) วิธีการนี้ทำให้ทราบเมตาบอลิซึมของสารอาหารที่ศึกษาที่เกิดในสภาวะที่มีจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวแต่ไม่สามารถสะท้อนถึงสภาวะการแข่งขันของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่มีอยู่จริงในลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีอยู่มากกว่า 500 สายพันธุ์ โดยข้อมูลล่าสุดรายงานว่ามียามากกว่า 1,000 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นการทดสอบโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ทำให้ไม่สามารถระบุความจำเพาะ (selectivity) ในการเสริมการเจริญของสารอาหารที่ทดสอบได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถทราบสภาวะในการแข่งขันการเจริญของเชื้อได้และไม่เพียงพอที่จะสะท้อนสภาวะอันตรกิริยาเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจริงในลำไส้ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นประโยชน์ในการแสดงแนวโน้มว่าการใช้สารพรีไบโอติกไปส่งเสริมการแข่งขันของจุลินทรีย์พรีไบโอติกและจุลินทรีย์ก่อโรคอย่างไร

- การใช้เชื้อผสม (mixed culture) จัดเป็นวิธีสามัญที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของ จุลินทรีย์ในลำไส้โดยใช้การหมักแบบกะที่ใช้จุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ (Wang and Gibson, 1993) ในสถานะไร้อากาศโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน และควบคุมพีเอชพร้อมกับการกวนผสม ตลอดเวลา แต่วิธีนี้ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารจำกัด จึงเหมาะสมกับการศึกษาระยะสั้น ซึ่งแตกต่างกับสถานะจริงของลำไส้ใหญ่ที่มีสารอาหารใหม่ผ่านอยู่ตลอดเวลา จึงจำเป็นต้องมีการ พัฒนาระบบหมักที่มีการเติมสารอาหารใหม่เข้าสู่ระบบหมักอย่างต่อเนื่อง โดยควบคุมอัตราการ ไหลเข้า-ออก และตัวแปรต่างๆ ที่มีผลต่อกระบวนการหมักในลำไส้ เช่น พีเอช และเวลาที่อาหารอยู่ใน ลำไส้ ซึ่งยังไม่สามารถให้ผลการทดสอบที่สะท้อนระบบ heterogeneous microbial system ที่มี อยู่ในลำไส้ใหญ่จริงๆ ได้

- ระบบลำไส้ใหญ่จำลอง (*In vitro* colon model) เนื่องจากลำไส้ใหญ่มนุษย์เป็น ระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย ซึ่งแหล่งอาหารที่สำคัญมาจากอาหารที่รับประทานและ ผ่านมาจากลำไส้เล็ก ในลำไส้ใหญ่ของคนทั่วไปมีเศษอาหารอยู่ประมาณ 200 กรัม ซึ่งกระจายอยู่ทั่ว ส่วนต่างๆ ของลำไส้ โดยที่ประมาณร้อยละ 60 ของน้ำหนักแห้งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ และดังที่กล่าวไว้ ข้างต้นว่าเศษอาหารที่ส่งผ่านจากลำไส้ใหญ่ส่วนต้นนั้นมีสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์อยู่มาก จึงมี การเจริญของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว และมีพีเอชค่อนข้างต่ำเป็นกรด เมื่อเศษอาหารผ่านไปลำไส้ ใหญ่ส่วนกลางสารอาหารก็ลดน้อยลง และมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง ดังนั้นในการพัฒนาระบบ ลำไส้ใหญ่จำลองจึงต้องเลียนแบบส่วนต่างๆ ของลำไส้ใหญ่ที่มีค่าตัวแปรต่างกัน โดยประกอบด้วย ภาชนะหมักที่ 1 (Vessel 1) ซึ่งแทนส่วนลำไส้ใหญ่ส่วนต้นที่มีสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์อยู่สูง และมีพีเอชต่ำ ส่วนภาชนะหมักที่ 2 และ 3 ซึ่งแทนลำไส้ใหญ่ส่วนกลางและส่วนปลายมีสารอาหาร ลงน้อยลง และมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง ทำการควบคุมตัวแปรต่างๆ ตามที่ได้จากการรับรองผลกับ เศษอาหารที่ได้จากร่างกายผู้ที่เพิ่งเสียชีวิตใหม่ๆ ทำการเติมเชื้อเริ่มต้นจากอุจจาระของอาสาสมัครที่ มีสุขภาพดีและไม่ได้รับประทานยาปฏิชีวนะ (Egert *et al.*, 2006; Macfarlane *et al.*, 1998) ข้อมูลที่ได้จาก ระบบจำลองนี้สามารถสะท้อนสถานะที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ได้จริง จึงสามารถนำมาใช้ในการ ประเมินความเป็นพรีไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงและต้องใช้เวลาาน ประมาณ 3 สัปดาห์

- การใช้สัตว์ทดลอง โดยมากมักใช้หนูในการทดสอบการเป็นพรีไบโอติกของ สาร ซึ่งมีข้อเสียคือสัตว์ทดลองมีลักษณะทางสรีระวิทยาของทางเดินอาหารที่แตกต่างไปจากมนุษย์

- การทดลองกับมนุษย์ (human trials) ซึ่งมักเป็นในลักษณะการให้อาสาสมัคร รับประทานสารที่ต้องการทดสอบแล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาในอุจจาระ ซึ่ง เป็นวิธีเดียวที่จะสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงในลำไส้ได้ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ต้องมีการวิเคราะห์

ตัวอย่างอุจจาระที่รอไม่ได้ เนื่องจากสภาวะการเก็บสามารถเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในอุจจาระไปจากเดิมได้ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบติดตามที่รวดเร็ว และแม่นยำ

### 5.5 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก หมายถึงจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) โดยมีผลในการปรับดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่มีสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติก และมีบทบาทในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มี 2 กลุ่ม ทั้งที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* กับกลุ่มที่ให้โทษต่อร่างกาย เช่น *Clostridia* และ *Staphylococci* ซึ่งการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มในทางเดินอาหารนั้นมีผลต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน โดยถ้ากลุ่มของจุลินทรีย์ที่ให้โทษมีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จะทำให้ร่างกายเกิดโรคต่างๆ เช่น ท้องเสีย ท้องร่วง แต่โดยปกติกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะทำหน้าที่ในการรักษาสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร โดยไปแย่งพื้นที่บริเวณผนังลำไส้ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเข้าเกาะ และเพิ่มจำนวนได้ทำให้กลุ่มของจุลินทรีย์ที่ให้โทษมีปริมาณน้อยไม่สามารถก่อโรคในร่างกาย หรืออาจจะสร้างสารออกมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน นอกจากนี้การเข้าแย่งอาหารกับจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ ส่งผลให้สุขภาพของเจ้าบ้านดีขึ้นด้วยในระบบทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์อาหารมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora หรือ normal microbiota) แตกต่างกันทั้งชนิดและจำนวน เริ่มตั้งแต่ในช่องปาก ซึ่งมักพบจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็น facultative และ strictly anaerobes ซึ่งเป็นพวก *Streptococcus*, *Lactobacillus* และยีสต์ (Saarela et al., 2002) ในกระเพาะอาหารมักเป็นพวก *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Helicobacter pylori* และ *Candida albicans* จะมีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ  $10^4$  CFU ต่อกรัม โดยในลำไส้เล็กแต่ละส่วนจะมีจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน พบว่าบริเวณดูโอดินัม (duodenum) มีประมาณ  $10^3$ - $10^4$  CFU ต่อกรัม ส่วนเจจูนัม (jejunum) มีประมาณ  $10^5$ - $10^7$  CFU ต่อกรัม และบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) พบในจำนวน  $10^7$ - $10^8$  CFU ต่อกรัม และในส่วนของลำไส้ใหญ่จะมีจำนวนของจุลินทรีย์หนาแน่นที่สุด คือประมาณ  $10^{10}$ - $10^{11}$  CFU ต่อกรัม (Isolauri et al., 2004) โดยที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีคุณสมบัติที่สำคัญดังนี้



1) สามารถสร้างกรดแลกติก ทำให้กระเพาะอาหารเป็นกรดมากขึ้นจึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น และปรับสภาพของทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์โคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (Isolauri *et al.*, 2004)

2) สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula and Thelappurate, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway, 1996) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตมากที่พีเอช 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 และ *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงที่สุดที่พีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000) ซึ่งในกระเพาะอาหารมีพีเอชเท่ากับ 2 แต่เมื่อรับประทานอาหารเช้าเข้าไปแล้ว พีเอชจะเพิ่มเป็น 3 ภายหลังจากการรับประทานอาหารเช้า 2-4 ชั่วโมง

3) ควรเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่ได้รับโพรไบโอติก เช่น เพิ่มการเจริญเติบโตของสัตว์ หรือต้านทานการเกิดโรคในสัตว์ และไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค

4) เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเพิ่มจำนวนได้มาก สามารถมีชีวิตอยู่รอดและทำงานได้ในลำไส้ใหญ่

5) มีความคงทนและสามารถรอดชีวิตได้ในสภาพการเก็บรักษา และในขณะทำการทดลอง

6) ทนต่อกรด โดยเฉพาะกรดจากน้ำย่อยหรือจากกระเพาะอาหาร

7) มีคุณสมบัติในการเจริญรวดเร็ว คือต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนน้อย และมีความสามารถในการมีชีวิตอยู่ได้ในลำไส้สัตว์ ช่วยย่อยสลายกากอาหารแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดอะมิโน กรดไขมัน และวิตามิน

8) ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดพันธุกรรมการต้านยา

9) สามารถสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocin)

10) สามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อก่อโรคจะเข้าเกาะ และต่อต้านการเคลื่อนที่ลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาการเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) ซึ่งการเคลื่อนที่ของโพรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปได้ดี

## 5.6 การย่อยคาร์โบไฮเดรตในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

ส่วนต่างๆ ของระบบทางเดินอาหารมนุษย์ มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโต และหน้าที่ของส่วนนั้น ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1) ปาก (Mouth) ปากของคนประกอบด้วย ริมฝีปาก ช่องแก้ม ช่องปาก ต่อมน้ำลาย  
ลิ้น และฟัน

2) คอหอย (Pharynx) เป็นท่อที่อยู่ระหว่างด้านหลังของช่องปาก และหลอดลม  
อาหารและลมหายใจจะพบกันตรงนี้ ช่องคอหอยแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ nasopharynx, oropharynx  
และ laryngopharynx

3) หลอดอาหาร (Esophagus) มีลักษณะเป็นท่อตรงที่วางตัวอยู่หลังหลอดลมและ  
หัวใจ อยู่ในช่องอก เป็นหลอดที่ประกอบด้วยกล้ามเนื้อ ยาวประมาณ 23-25 เซนติเมตร ส่วน  
แรกเป็นกล้ามเนื้อลาย ส่วนสุดท้ายเป็นกล้ามเนื้อเรียบ ส่วนตรงกลางเป็นกล้ามเนื้อเรียบและ  
กล้ามเนื้อลาย มีหน้าที่เป็นทางผ่านของอาหารจากคอหอยไปยังกระเพาะอาหาร โดยการบีบรัดตัว  
ของผนังกล้ามเนื้อ

4) กระเพาะอาหาร (Stomach) เป็นส่วนของทางเดินอาหารที่ใหญ่ที่สุดมีลักษณะ  
เป็นถุงขนาด 5 × 10 นิ้ว กระเพาะแบ่งเป็น 3 ส่วน ตามลักษณะของเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างใน คือ cardius  
fundus และ pylorus ในกระเพาะอาหารมีกรดเกลือเข้มข้นประมาณ 0.2% น้ำ, เมือก (mucin)  
สำหรับหล่อลื่นและน้ำย่อยอาหาร เช่น pepsin และ rennin ซึ่งย่อยพวกโปรตีน

5) ลำไส้เล็ก (Small intestine) ยาวประมาณ 20 ฟุต กว้าง 1 นิ้ว แบ่งออกได้เป็น 3  
ตอน คือลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ยาวประมาณ 10 – 12 นิ้ว, ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum)  
ยาวประมาณ 8 -9 ฟุต และ ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ยาวประมาณ 12 -13 ฟุต

6) ลำไส้ใหญ่ (Large intestine) เป็นท่อทางเดินอาหารต่อจากส่วนของลำไส้เล็ก มี  
ความยาวประมาณ 5 ฟุต กว้าง 2.5 นิ้ว แบ่งออกเป็น 4 ส่วนคือ caecum (ช่วงต่อระหว่างลำไส้เล็ก  
และลำไส้ใหญ่), colon (ช่วงที่ยาวที่สุดของลำไส้ใหญ่ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ ลำไส้ตั้งตรงด้านซ้าย  
หรือที่เรียกว่า proximal, ลำไส้ตรงแนวราบ หรือที่เรียกว่า transverse และลำไส้ตั้งตรงด้านขวา หรือ  
ที่เรียกว่า distal

ระยะเวลาที่อาหารเคลื่อนที่อยู่ในส่วนต่างๆ ของระบบทางเดินอาหาร หลังจาก  
กลืนอาหาร อาหารจะเคลื่อนไปยังกระเพาะอาหาร และใช้เวลา 2- 3 ชั่วโมง อยู่ในกระเพาะอาหาร  
อาหารเคลื่อนที่มาถึงลำไส้เล็กส่วน ileum ซึ่งใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง และเคลื่อนที่มาถึงลำไส้เล็ก  
ส่วน caecum โดยใช้เวลา 5.5 ชั่วโมง ก่อนจะเคลื่อนไปยัง colon ส่วนต่างๆ โดยใช้เวลาประมาณ 28  
ชั่วโมง อาหารจะเคลื่อนที่อย่างช้าๆ อยู่ใน colon ส่วนต่างๆ นี้อีกประมาณ 10 – 20 ชั่วโมง จึงจะเกิด  
แรงบีบ (propulsive movement) เพื่อให้กากอาหารเคลื่อนที่ ดังนั้นหลังจากมนุษย์กินอาหาร  
อาหารจะเคลื่อนที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารซึ่งใช้เวลาประมาณ 50 – 60 ชั่วโมง

### 5.7 กระบวนการหมักของสารพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่

ในลำไส้ใหญ่ของคนประกอบไปด้วย caecum, ascending colon, transverse colon, descending colon, sigmoid colon และ rectum โดยที่ในแต่ละส่วนของลำไส้ใหญ่จะเกิดกระบวนการในการย่อยที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงใน Figure 1.

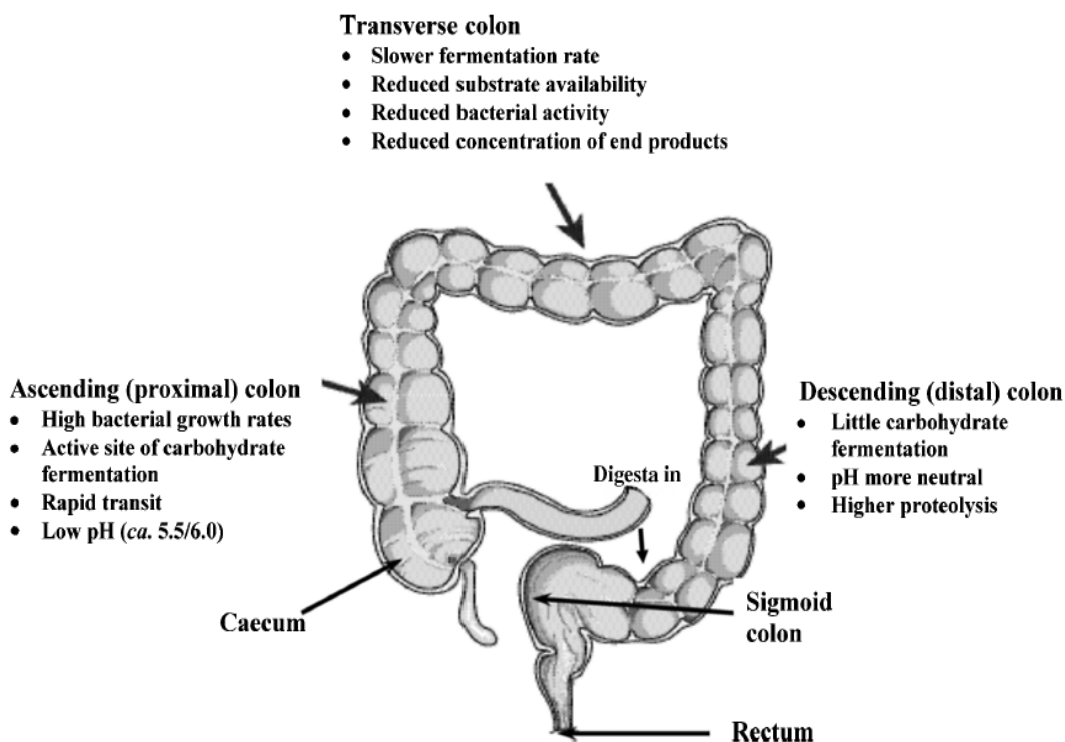


Figure 1 Regions of the human large intestine with corresponding bacterial activities and physiological differences.

Source: Varnazza และคณะ (2006)

ภายในลำไส้ใหญ่มีกระบวนการหมักของสารที่เหลือจากการย่อยโดยกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก โดยที่กระบวนการในการหมักจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ saccharolytic ซึ่งเป็นการหมักสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต และ proteolytic ซึ่งเป็นการหมักสารในกลุ่มโปรตีน โดยที่ saccharolytic จะเกิดมากกว่า proteolytic ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการเกิด saccharolytic จะได้กรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acid; SCFA) ซึ่งกรดสามตัวหลักที่ได้คือ อะซิติก โพรพิโอนิก และบิวทิริก โดยมีอัตราส่วนประมาณ 60: 25: 10 มิลลิโมลต่อลิตร โดยที่อัตราส่วนสามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยจะขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ในการหมัก ซึ่งกรดไขมันดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในรูปแบบต่างๆ ซึ่งที่สำคัญคือมีบทบาทต่อเซลล์ในลำไส้โดยตรง นอกจากบทบาทต่อเซลล์ในลำไส้

ใหญ่แล้วยังมีบทบาทต่ออวัยวะส่วนอื่น เช่น อะซิเตตจะถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ ในขณะที่โพธิโธเนตจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP ส่วนบิวทิเรตมีความสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานในการแบ่งเซลล์ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งกระบวนการในการใช้สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตในการเป็นสารตั้งต้นในการผลิตบิวทิเรตนั้นมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลายชนิด ที่มีอยู่ในลำไส้ใหญ่ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย นอกจากนี้บิวทิเรตยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านมะเร็ง ซึ่งสารตั้งต้นแต่ละตัวจะให้บิวทิเรตที่แตกต่างกัน ในขณะที่ผลผลิตของกระบวนการ proteolytic จะได้สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น เอมีน และ แอมโมเนีย ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารก่อมะเร็ง

### 5.8 ระบบทางเดินอาหารมนุษย์และจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารมนุษย์มักมีกลุ่มจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์อาศัยกระจายไปทุกส่วนของทางเดินอาหาร โดยถัดจากส่วนปากเป็นต้นไป การเกาะตัวของจุลินทรีย์ขึ้นกับค่าพีเอชและเวลาการพักของอาหารในการเคลื่อนตัวไปยังลำไส้ใหญ่ ซึ่งการเคลื่อนตัวของอาหารจากกระเพาะอาหารไปยังลำไส้เล็กใช้เวลาค่อนข้างเร็ว (ประมาณ 4 - 6 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบกับเวลาที่พักอยู่ในลำไส้ใหญ่ที่ใช้เวลาประมาณ 48 - 70 ชั่วโมง ในผู้ใหญ่ปกติทั่วไป (Macfarlane and Gibson, 1994) เวลาที่ยาวนานนี้ ประกอบกับสภาวะที่มีพีเอชเป็นกลางและมีการดูดซึมน้ำทำให้เกิดการก่อตัวของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่ซับซ้อนและมีความคงตัวขึ้นในลำไส้ใหญ่

ในทางเดินอาหารของทารกแรกเกิดจะไม่มีจุลินทรีย์อยู่ในลำไส้เลยแต่จำนวนจุลินทรีย์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังคลอด ทั้งนี้เนื่องจากความเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมภายในลำไส้ใหญ่เนื่องมาจากน้ำนมแม่ หรืออาหารที่กินเข้าไป โดยที่ความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นนั้นจะเปลี่ยนแปลงตามส่วนต่างๆ ของลำไส้โดยจำนวนจุลินทรีย์จะพบมากที่สุด ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งภายในลำไส้ใหญ่จะมีแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนมากที่สุด เช่น *Bacteroides*, *Eubacteria*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* และ *Peptococcus* (Gibson and Roberford, 1995) ซึ่งในช่วงแรกจุลินทรีย์ที่พบจะเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *E. coli* หรือ *Streptococcus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่จะปรับสภาพภายในลำไส้ใหญ่ให้เป็นสภาวะที่ไร้อากาศ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งต่อมากลายเป็นจุลินทรีย์จุลินทรีย์ที่เป็นกลุ่มหลักและมีบทบาทในการป้องกันลำไส้จากจุลินทรีย์ก่อโรคที่เข้ามาในลำไส้ใหญ่ โดยในทางเดินอาหารของพวกเราจะมีจุลินทรีย์ประมาณ  $10^{14}$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร และมีความหลากหลายถึงประมาณ 500 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Gibson and Roberford, 1995) โดยที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนบน ได้แก่ กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก จะมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า  $10^5$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร ส่วนลำไส้เล็กส่วนปลายจะมีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ  $10^7$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร (Mikelsaar *et al.*, 1993 อ้างโดย Arunachalam, 1999) จุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่เกือบทั้งหมดเป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการ

เจริญ โดยที่ภายในลำไส้ใหญ่ส่วนกลางเป็นส่วนที่มีการย่อยอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ซึ่งในขณะที่มีการเจริญของจุลินทรีย์อย่างเต็มที่จะมีความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นประมาณ 127 มิลลิโมลต่อลิตร มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.4-5.9 และในลำไส้ใหญ่ส่วนปลายนั้นค่าพีเอชประมาณ 6.2 และมีค่ากรดไขมันสายสั้นประมาณ 117 มิลลิโมลต่อลิตร โดยที่การหมักสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตจะลดลง และจะมีจุลินทรีย์กลุ่มที่สามารถย่อยสารอาหารในกลุ่มโปรตีนเป็นกลุ่มหลักแทน และจากกระบวนการดังกล่าวจะมีการสร้างสารในกลุ่ม phenol indole และ ammonia และมีปริมาณกรดไขมันสายสั้นประมาณ 90 มิลลิโมลต่อลิตร โดยมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.6-6.9

จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่พัฒนาขึ้นมาในลำไส้ใหญ่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอาหาร โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน โปรตีนบางชนิดที่ไม่ถูกย่อยสลายในทางเดินอาหารส่วนต้น โดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์อะมิเลสจากตับอ่อน และผ่านลงมาสู่ลำไส้ใหญ่ ซึ่งอาหารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกแป้ง ใยอาหารพวกเพคติน ไชแลน ที่เอนไซม์จากตับอ่อนย่อยไม่ได้ ส่วนที่พบในปริมาณน้อยมักเป็น โอลิโกแซคาไรด์ และน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ร่างกายดูดซึมไม่ได้ จึงเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับแบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้ใหญ่ โดยปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลงเรื่อยๆ เมื่อผ่านจากลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) มายังลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (transverse colon) และลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) โดยปกติแล้วจุลินทรีย์ในลำไส้สามารถแบ่งออกได้เป็นกลุ่มที่ส่งเสริมสุขภาพ กลุ่มที่เป็นอันตรายระดับต่ำ และกลุ่มที่ศักยภาพที่เป็นอันตรายต่อ host โดยสารคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่จัดเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับแบคทีเรียในลำไส้คือถูกย่อยสลายในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) ในขณะที่โปรตีนและกรดอะมิโนจัดเป็นแหล่งพลังงานหลักของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย (distal colon) โดยสารอาหารเหล่านี้ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไกลโคซิเดส โปรติเอส และอะมิโนเปปติเดสไปเป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลง เช่น กรดไขมันสายสั้นชนิดต่างๆ (short chain fatty acid; SCFA), กรดอินทรีย์ (hydroxyl and dicarboxylic organic acids), ก๊าซไฮโดรเจน, คาร์บอนไดออกไซด์ และ other neutral, acidic and basic end products ซึ่งทิศทางของกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่นั้นขึ้นกับปัจจัยทั้งทางกายภาพ เคมี ชีวภาพ และปัจจัยแวดล้อมต่างๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหาร ปริมาณสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ลักษณะทางกายภาพของสารอาหาร เวลาที่ตกค้างอยู่ในลำไส้ องค์ประกอบของแบคทีเรียในลำไส้ ปัจจัยทางนิเวศวิทยาโดยรวมถึงการแข่งขันและปฏิสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย อัตราการย่อยสลายพอลิเมอร์ของสารอาหาร ความจำเพาะต่อสารอาหารและกลไกการควบคุมการย่อยสลายของแบคทีเรียในลำไส้ การมีสารอนินทรีย์ที่สามารถรับอิเล็กตรอนได้ พีเอช และการใช้ยาปฏิชีวนะ (Gibson and Macfarlane, 1994; Gibson *et al.*, 2000; Gibson and Rastall, 2006)

Vulevic และคณะ (2004) ได้ศึกษาค่าดัชนีความเป็นพรีไบโอติก (PI) ของสารสกัดพรีไบโอติกทางการค้าหลายชนิด ได้แก่ ซูโครส, กวักัม, Sunfiber, Partially-hydrolyzed guar gum (PHGG), Isomaltooligosaccharides (IMO), Soya-oligosaccharides (SOS), Fructo-oligosaccharides (FOS), *trans*-galacto-oligosaccharides (TOS) โดยทำการศึกษาในระบบการหมักแบบกะ (batch culture) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า IMO, SOS, FOS, TOS, FOS : TOS, FOS : PHGG และ TOS : PHGG มีค่า PI เท่ากับ 0.1, 0.1, 0.2, 0.8, 1.3, 0.3 และ 0.3 ตามลำดับ ขณะที่ ซูโครส, กวักัม sunfiber และ PHGG มีค่า PI เท่ากับ -0.9, -0.8, -0.3 และ -0.1 ตามลำดับ

Rycroft และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาระดับไขมันสายสั้นจากการหมักพรีไบโอติกทางการค้า ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ อินนูลิน แลกทูโรส ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และซอยบินโอลิโกแซคคาไรด์ โดยทำการศึกษาในระบบการหมักแบบกะ (batch culture) ที่ระยะเวลา 0, 5 และ 24 ชั่วโมง พบว่าพรีไบโอติกทางการค้าทุกชนิด เมื่อถูกหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้น (กรดแลคติก, กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก) และพบว่าปริมาณกรดไขมันสายสั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0 ชั่วโมงเป็น 24 ชั่วโมง โดยพบว่าพรีไบโอติกทางการค้าสามารถผลิตกรดแลคติก, กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริกมีค่าอยู่ในช่วง 0-24.34, 2.42-39.47, 0.71-7.43 และ 0.77-4.20 mM ตามลำดับ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 ชั่วโมงเป็น 24 ชั่วโมง

Wichienchot และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาระดับแบคทีเรียจากสารสกัด Gluco-oligosaccharide ที่ผลิตโดย *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 โดยทำการศึกษาในระบบการหมักแบบกะ (batch culture) ที่ระยะเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัด Gluco-oligosaccharide ที่ผลิตโดย *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่ม Bifidobacterium โดยมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 7.74 log CFU/ml เป็น 8.32 log CFU/ml เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 ชั่วโมงเป็น 48 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาปริมาณและชนิดกรดไขมันสายสั้นด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากการหมัก Gluco-oligosaccharide ที่ผลิตโดย *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 และเมื่อถูกหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่าไม่ผลิตกรดแลคติก แต่สามารถผลิตกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 24 เป็น 48 ชั่วโมง ปริมาณกรดไขมันสายสั้นมีค่าเพิ่มขึ้น โดยกรดอะซิติกมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 55.39 mM เป็น 62.03 mM กรดโพรพิโอนิกมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 24.25 mM เป็น 28.06 mM และกรดบิวทีริกมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 10.03 mM เป็น 13.44 mM

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แบบที่ 3 จากสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมลิคขุ่น และสตาร์ชถั่วเขียว โดยศึกษาผลของระยะเวลาในการตัดสายกิ่งและระยะเวลาในการเกิดรีโทรเกรเดชันต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ และสมบัติทางความร้อน ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด ในการต้านการย่อยด้วยสภาวะจำลองในปาก ภาวะอาหารและลำไส้เล็กของมนุษย์ และทดสอบความสามารถต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกในการหมักด้วยจุลินทรีย์จากอุจจาระแบบกะ

## บทที่ 2

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

#### 1. วัสดุอุปกรณ์

##### 1.1 วัตถุดิบ

- ข้าวเหนียว (หลังการเก็บเกี่ยว 9 เดือน, ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง จ.พัทลุง)
- เมล็ดขนุน (พันธุ์ทองประเสริฐ)
- สตาร์ชถั่วเขียวทางการค้า (ยี่ห้อต้นสน, บริษัท สิทธิพันธ์ จำกัด)

##### 1.2 สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสตาร์ช คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคลอไรด์ เอทานอล เข้มข้นร้อยละ 95
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ กรดซัลฟูริก คอปเปอร์ซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟต โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก กรดบอริก โพแทสเซียมไฮโดรเจนพธา-เลต เมทิลีนบลู เมทิลเรด แอลกอฮอล์ สารละลายไอโอดีน (analytical grade)

##### 1.3 เอนไซม์

- เอนไซม์ pullulanase จากเชื้อ *Bacillus acidopullulyticus* (Sigma chemical, activity 456 U/ml)
- เอนไซม์ amyloglucosidase (Sigma chemical, activity 3300 U/ml)
- เอนไซม์ human salivary  $\alpha$ -amylase type XIII-A (Sigma A1031, 10.2 mg solid; 98.3 unit/mg solid)
- เอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase type VI-B (Sigma A3176, 26.0 unit/mg solid)

##### 1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับผลิตสตาร์ช

- เครื่องโม่แป้ง ยี่ห้อ Central ประเทศไทย
- เครื่องบดผสม ยี่ห้อ Sharp รุ่น EM-11 ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้อบลมร้อนแบบถาด ประเทศไทย
- เครื่องโฮโมจิไนส์เซอร์ ยี่ห้อ IKA รุ่น RW20.n ประเทศเยอรมัน
- เครื่องเหวี่ยงแยก ยี่ห้อ Hittich รุ่น Universal 16 ประเทศเยอรมัน
- ตะแกรงร่อนขนาด 250 ไมครอน ยี่ห้อ Retsch GmbH ประเทศเยอรมัน
- เครื่อง autoclave ยี่ห้อ VISION รุ่น VS1221



- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer)

### 1.5 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ทางด้านเคมีและกายภาพ

- เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Sartorius ประเทศเยอรมัน
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น 1000C ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น LA204 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องกวน (magnetic stirrer) ยี่ห้อ Fisher Scientific รุ่น LR 49683C ประเทศอังกฤษ
- เครื่อง vortex mixer ยี่ห้อ IKA รุ่น MS1 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ ThermoSpectronic รุ่น G-20 ประเทศอังกฤษ
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350 ประเทศเยอรมัน
- นาฬิกาจับเวลา
- กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy) ยี่ห้อ SEM รุ่น JSM-5800LV ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องวัดขนาดอนุภาค (Particle Size Analyser) ยี่ห้อ COULTER รุ่น LS230 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวัดปริมาณผลึก (X-ray Diffractometer) ยี่ห้อ Phillips รุ่น X'Pert MPD ประเทศเนเธอร์แลนด์
- เครื่องวัดความหนืด (Rapid Visco Analyzer) ยี่ห้อ Newport Scientific รุ่น RVA-4 ประเทศออสเตรเลีย
- เครื่องวัดความหนืด (Rheometer) ยี่ห้อ Haake รุ่น RheoStress RS75 ประเทศเยอรมัน
- เครื่อง Differential Scanning Calorimeter ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น DSC7 ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 1.6 อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์คุณสมบัติฟิสิกส์

- เครื่องควบคุมพีเอช (pH controllers) ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสหรัฐอเมริกา
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบระบบหมุนเวียนน้ำ ยี่ห้อ Eyella ประเทศญี่ปุ่น
- เครื่องตีบดตัวอย่าง (stomacher) ยี่ห้อ Seward รุ่น M.400 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่อง slide dryer ยี่ห้อ Amersham รุ่น ZLE151 ประเทศสหราชอาณาจักร
- เครื่อง hybridization oven ยี่ห้อ Grant Instrument รุ่น Boekel ISO20 ประเทศอังกฤษ
- ถังแก๊สไนโตรเจน
- เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich Zentrifugen รุ่น Mikro 22R ประเทศเยอรมัน

- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1200 ประเทศเยอรมัน
- สายยางซิลิโคน, สายยางท่อน้ำ และสายยางท่อแก๊ส
- แผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน ยี่ห้อ Sartorius ประเทศเยอรมัน
- กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 2. วิธีดำเนินงานวิจัย

### 2.1 การศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว

#### 2.1.1 การเตรียมสตาร์ชจากข้าว และเมล็ดขนุน

##### • การเตรียมสตาร์ชข้าว

นำข้าวมาคัดแยกสิ่งสกปรกออก จากนั้นนำไปแช่สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 2 เท่า โดยแช่ประมาณ 5 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกรอง 2 ครั้ง (ปริมาตร 2 เท่า) นำไปโม่เปียกด้วยน้ำกรอง ปริมาตร 2 เท่า นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นนำแป้งไปอบที่อุณหภูมิ 45°C จนความชื้นสุดท้ายน้อยกว่าร้อยละ 13 โดยน้ำหนักเปียก นำไปบดเป็นผง เก็บใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

นำแป้งที่ได้จากการโม่เปียกแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 (โดยน้ำหนัก) ปริมาตร 4 เท่าของแป้ง ทำการกวน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนแป้งที่ได้แช่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 4 เท่าของแป้ง ทำการกวน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำตะกอนแป้งที่ได้แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.40 (โดยน้ำหนัก) ปริมาตร 5 เท่าของแป้ง ทำการกวน 19 ชั่วโมง จากนั้นวางทิ้งไว้ประมาณ 10 ชั่วโมง ให้แป้งตกตะกอน เเทสารละลายส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนแป้งด้วยน้ำกลั่น (2 ครั้ง) โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 เท่าของตะกอนแป้ง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 เท่าของตะกอนแป้งแล้วปรับพีเอชเป็น 7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 2500 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นนำสตาร์ชไปอบที่อุณหภูมิ 45°C จนความชื้นสุดท้ายน้อยกว่าร้อยละ 13 โดยน้ำหนักเปียก นำไปบดเป็นผง แล้วนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh (ดัดแปลงจากวิธีของรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ, 2546) เก็บใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตลอดการวิจัย

##### • การเตรียมสตาร์ชเมล็ดขนุน

นำเมล็ดขนุนมาปอกเปลือกหุ้มเมล็ด (spermoderm) ที่มีสีน้ำตาลออก และล้างด้วยน้ำกลั่น นำส่วนโคทิลีดอนมาหั่นเป็นแผ่นบางๆ ขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 45°C จนกระทั่งมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 13 นำเมล็ดขนุนที่แห้งแล้วไปบดให้ละเอียด จากนั้นนำฟลาวร์ที่ได้มาละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ ทำการกวน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เเทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นขูดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลด้านบนของตะกอนออก และทำซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

0.05 โมลาร์ นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น และกรองผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh เพื่อกำจัดกากออก จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 โมลาร์ จากนั้นนำไปหมუნเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นจุดส่วนที่เป็นสีน้ำตาลด้านบนของตะกอนออก และล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง และนำไปหมუნเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสออก จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 45°C จนความชื้นสุดท้ายน้อยกว่าร้อยละ 13 โดยน้ำหนักเปียก นำไปบดเป็นผง แล้วนำมาผ่านตะแกรงร่อนขนาด 60 mesh เก็บใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องตลอดการวิจัย (ดัดแปลงจาก Rengsutthi and Charoenrein, 2011)

- นำสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน ที่เตรียมได้ และสตาร์ชถั่วเขียวทางการค้าไปศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (ข้อ 2.1.2), ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (2.1.3), ลักษณะทางโครงสร้าง (ข้อ 2.1.4-2.1.6) และสมบัติทางเคมีกายภาพ (ข้อ 2.1.7)

### 2.1.2 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

นำสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไชมัน เยื่อใย ความชื้น และเถ้า (AOAC., 2000) และปริมาณอะมิโลส (Shanthly *et al.*, 1980)

### 2.1.3 การศึกษาปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch content)

ศึกษาปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีของ McCleary และ Monaghan (2002) โดยชั่งตัวอย่างสตาร์ช 0.1 กรัมในหลอดที่มีฝาปิด จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ pancreatic  $\alpha$ -amylase ที่มีเอนไซม์ amyloglucosidase (AMG, 300 U/ml) 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°C ที่ความเร็ว 200 stroke/min เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอทานอล (99%) 4 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) นำตะกอนที่ได้มาเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (ใส่ magnetic stirred bar ขนาด 5×15 mm) จากนั้นนำไปกวน เป็นเวลา 20 นาที ในอ่างน้ำแข็ง เมื่อครบเวลาเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ 1.2 โมลาร์ พีเอช 3.8 ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ amyloglucosidase (AMG, 3300 U/ml) 0.1 มิลลิลิตร โดยทันที ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมუნเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว (ทำ 3 ซ้ำ) เติมสารละลาย glucose oxidase/oxidase reagent (GOPOD)

3 มิลลิลิตร แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วย reagent blank จำนวนปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (RS) ด้วยสมการที่ (1)

$$\text{ปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (RS \%)} = \Delta E \times (F/W) \times 90 \quad (1)$$

เมื่อ	$\Delta E$	=	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 nm
	F	=	100 ( $\mu\text{g}$ of D-glucose) / ค่าการดูดกลืนแสงของ 100 $\mu\text{g}$ D-glucose ที่ความยาวคลื่น 510 nm
	W	=	น้ำหนักแห้งของตัวอย่างสาร (กรัม)

#### 2.1.4 การศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง

- การกระจายตัวของความยาวสายอะมิโลเพคติน (**amylopectin chain length distribution**)

ละลายตัวอย่างสารด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide, DMSO) และเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ไอโซอะมิเลสเข้มข้น 700 unit โดยปรับให้เอนไซม์ทำงานในสภาวะที่มีโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.01 โมลาร์ (พีเอช 3.5) แล้วจึงบ่มสารละลายตัวอย่างทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มตัวอย่างในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลานาน 5 นาที และใช้เทคนิคการวิเคราะห์ขนาดสายโซ่กลูแคน (chain length distribution) ด้วยเครื่อง High performance anion exchange chromatography โดยใช้ดีเทคเตอร์แบบ Pulsed amperometric detector (HPAEC-PAD) กรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอนก่อนฉีดเข้าคอลัมน์และควบคุมตัวอย่างที่จะทำการคัดขนาดจะให้ปริมาตรเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ PA-100 เพื่อคัดแยกขนาดของสายโซ่กลูแคนและควบคุมอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที โดยเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้จะประกอบด้วย eluent A คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ และ eluent B คือ โซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ควบคุมให้มีร้อยละสัดส่วนของ eluent B เป็นองค์ประกอบในเฟสลงที่ ดังนี้ นาทีที่ 0 ถึง 9 มีร้อยละสัดส่วนของ eluent B เพิ่มขึ้นจาก 15 ถึง 36% นาทีที่ 9 ถึง 18 มีร้อยละสัดส่วนของ eluent B เพิ่มขึ้นจาก 36 ถึง 45% และนาทีที่ 18 ถึง 110 มีร้อยละสัดส่วนของ eluent B เพิ่มขึ้นจาก 45 ถึง 100% (Bertoft, 2004)

### • ชนิดและปริมาณผลึก

ศึกษาชนิด และปริมาณผลึก ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) โดยบรรจุตัวอย่างสตาร์ชลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำการตรวจสอบการแทรกสอดของรังสี X-ray ที่มุม  $2\theta$  ในช่วง 4-34 (40 kV, 30 mA,  $\lambda_{\alpha} = 0.154$  nm) ทำการคำนวณค่าร้อยละปริมาณผลึก โดยคำนวณอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้พีคที่ปรากฏต่อพื้นที่ทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ชนิดของผลึก โดยเปรียบเทียบมุมที่ปรากฏพีคกับค่าจากทฤษฎีของ Zobel (1964)

### 2.1.5 รูปร่างของเม็ดสตาร์ช

ศึกษาลักษณะรูปร่างของเม็ดสตาร์ช ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) โดยนำตัวอย่างสตาร์ชมากระจายลงบนแท่นตัวอย่าง ทำการเคลือบผิวหน้าของตัวอย่างด้วยทอง นำตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วมาส่องด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 500, 1000 และ 2500 เท่า โดยกำหนดค่า kV เท่ากับ 10

### 2.1.6 ขนาดและการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ช

ศึกษาขนาด และการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ช ด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer (PSA) โดยใช้ He-Ne เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงที่ให้ความยาวคลื่นเท่ากับ 750 นาโนเมตร การวัดค่าครอบคลุมขนาดอนุภาค 0.04 ถึง 2,200 ไมโครเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นดิสเพิร์สเฟส (disperse phases) ทำการเตรียมตัวอย่างโดยนำสตาร์ชประมาณ 0.5 กรัม เติมลงในน้ำกลั่น จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดขนาดและการกระจายตัวของขนาดด้วยเครื่อง PSA

### 2.1.7 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

#### • คุณสมบัติการเกิดเจลลาทีโนเซชัน (gelatinization properties)

โดยการเตรียมตัวอย่างสารแขวนลอยสตาร์ชในน้ำด้วยอัตราส่วน 1:4 (โดยน้ำหนักแห้ง) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสมดุลเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) ที่อัตรา 10°ซ/นาที ช่วงอุณหภูมิ 20-95°ซ ทำการบันทึกค่าอุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature) อุณหภูมิสูงสุด (peak temperature) และอุณหภูมิสุดท้าย (conclusion temperature) ของการเกิดเจลลาทีโนเซชัน และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาทีโนเซชัน (enthalpy of gelatinization) (Lii *et al.*, 1995)

#### • คุณสมบัติทางรีโอโลยี (rheological properties)

##### 1) คุณสมบัติการเกิดเพสท์ของสตาร์ช (pasting properties)

ศึกษาคูณสมบัติการเกิดเพสท์ของสตาร์ช ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) โดยเตรียมสตาร์ชความเข้มข้นร้อยละ 12 (โดยน้ำหนักแห้ง) ใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียม ซึ่งตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ และเวลาให้ความร้อนดังนี้ ช่วงแรกเพิ่มอุณหภูมิจาก 50°ซ ให้สูงขึ้นในอัตรา

1.5°ซ/นาที่ จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 95°ซ และคงอุณหภูมิไว้นาน 3 นาที จากนั้นค่อยๆ ลดอุณหภูมิลง ในอัตราเดียวกันจนถึงอุณหภูมิ 50°ซ และคงอุณหภูมิไว้นาน 5 นาที บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลง ความหนืดที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ วิเคราะห์ค่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดความหนืด (pasting temperature) ค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity) ค่า breakdown และค่าการคืนตัว (setback) (Whalen *et al.*, 1997)

## 2) พฤติกรรมการไหล (flow behavior)

ศึกษาพฤติกรรมการไหลของสตาร์ช โดยเตรียมสตาร์ชความเข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนักแห้ง) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าความหนืด และความเค้นเฉือนที่อัตราการเฉือนในช่วง 10-1000 s<sup>-1</sup> ที่อุณหภูมิ 60°ซ ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ (RheoStress, HAKKE., Germany) ซึ่งต่อกับหัววัดชนิด Coaxial cylinder (Z41) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืด และความเค้นเฉือนกับอัตราเฉือน ในรูปแบบสมการคณิตศาสตร์ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคงตัว (consistency efficient) และค่าดัชนีพฤติกรรมการไหล (flow behavior index) (Noosuk *et al.*, 2005)

## 3) คุณสมบัติวิสโคอิลาสติก (viscoelastic properties)

ศึกษาคุณสมบัติวิสโคอิลาสติกของสตาร์ชโดยการวิเคราะห์การสั่นทางพลวัต (dynamic oscillation) ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ (RheoStress, HAKKE., Germany) ซึ่งต่อกับหัววัดชนิด cone and plate (CP4/40) โดยเตรียมสตาร์ชที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 8 (โดยน้ำหนักแห้ง) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่า storage modulus (G') loss modulus (G'') และค่า loss tangent (tan δ) ในช่วง linear viscoelastic ที่ช่วงความถี่ 0.1-1.0 Hz และที่อุณหภูมิ 25°ซ

### 2.1.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

## 2.2 การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีการเกิดรีโทรเกรดชัน และการศึกษา ลักษณะทางโครงสร้าง และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

### 2.2.1 การศึกษาระยะเวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูนาเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่ง

เตรียมสารแขวนลอยสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว เข้มข้นร้อยละ 8 โดยชั่งสตาร์ชตัวอย่างละ 8 กรัม ใส่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ปริมาตร 100

มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50°C และเติมเอนไซม์พุลูลานเนสที่ความเข้มข้น 5, 15, 30 และ 40 หน่วยต่อกรัม เพื่อตัดสายกิ่ง (debranching) แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 4, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายสตาร์ชที่ได้ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (González-Soto *et al.* 2006; Pongjanta *et al.* 2009) นำสตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกิ่งที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ไปวิเคราะห์หาระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส (degree of pullulanase hydrolysis; D.H.) โดยวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1994) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric (Dubios *et al.*, 1956) แล้วคำนวณค่า D.H. ดังสมการที่ (2) คัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งที่สตาร์ชแต่ละชนิดมีระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสสูงสุด ไปใช้ในการทดลองข้อ (2.2.2)

ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส (D.H. %) =

$$\frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสตาร์ชหลังการถูกย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส} \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสตาร์ชหลังการถูกย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส}} \quad (2)$$

### 2.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดรีโทรเกรเดชัน

นำสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว จากการทดลองข้อ (2.2.1) โดยใช้เวลาในการตัดสายกิ่งที่สตาร์ชแต่ละชนิดมีระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสสูงสุด จากนั้นไปต้มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 6, 10 และ 15 วัน แล้วนำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dryer) จากนั้นนำไปบดให้ละเอียด ร้อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ตลอดการวิจัย จากนั้นนำสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ผลิตได้ไปศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง โดยตรวจสอบชนิด และปริมาณผลึก (ข้อ 2.1.4) สมบัติทางเคมีกายภาพ โดยตรวจสอบสมบัติการเกิดเจลลาทีนในเซชัน (ข้อ 2.2.3) และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (ข้อ 2.1.3)

### 2.2.3 การศึกษาคุณสมบัติการเกิดเจลลาทีนในเซชัน (gelatinization properties)

โดยการเตรียมตัวอย่างสารแขวนลอยสตาร์ชในน้ำด้วยอัตราส่วน 1:4 (โดยน้ำหนักแห้ง) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสมมูลเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) ที่อัตรา 10°C/นาที ช่วงอุณหภูมิ 20-200°C ทำการบันทึกค่าอุณหภูมิเริ่มต้น (onset temperature) อุณหภูมิสูงสุด (peak temperature) และอุณหภูมิสุดท้าย



(conclusion temperature) ของการเกิดเจลลาคีโนเซชัน และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาคีโนเซชัน (enthalpy of gelatinization) (Lii *et al.*, 1995)

#### 2.2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สำหรับข้อ 2.2.1 ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดยจัดชุดการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Experimental Design) โดยมีระดับความเข้มข้นของเอนไซม์พาลูตาเนส 4 ระดับ และระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายถึง 5 ระดับ สำหรับข้อ 2.2.2 และข้อ 2.2.3 วางแผนการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ 3 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

### 2.3 การศึกษาคุณสมบัติฟิสิกส์ของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

2.3.1 การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว

เป็นการทดสอบที่ทำในหลอดทดลอง (*In vitro*) โดยเลียนแบบสภาวะที่เกิดขึ้นในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์ ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนคือ การย่อยที่เกิดในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก การทดลองเป็นแบบต่อเนื่องตามลำดับการย่อยที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อให้มีสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย โดยดัดแปลงวิธีทดสอบจาก สันตัก วิเชียร โชติ และคณะ (2553) ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังต่อไปนี้

#### 1) การทดสอบการย่อยในสภาวะจำลองในปาก

นำสตาร์ชที่ผลิตได้จากข้อ (2.2.2) โดยคัดเลือกตัวอย่างสตาร์ชแต่ละชนิดที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงที่สุด (สตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชัน ที่อุณหภูมิ 4°C ระยะเวลาการเก็บรักษา 15 วัน) ตัวอย่างละ 30 กรัม นำมาผสมกับน้ำลายเทียม (artificial saliva) พีเอช 6.8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (สารเคมีที่ใช้และวิธีเตรียมน้ำลายเทียมแสดงดังภาคผนวก ข ข้อ 1.) เติมเอนไซม์ human salivary  $\alpha$ -amylase ปริมาตร 1.65 มิลลิลิตร (เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.33 หน่วย/มิลลิลิตร และวิธีการเตรียมเอนไซม์แสดงดังภาคผนวก ข ข้อ 2.1) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 5, 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที หลังจากเก็บตัวอย่างนำไปต้มทันทีในน้ำเดือด นาน 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำสตาร์ชที่ผ่านการทดสอบการย่อยในสภาวะจำลองในปากที่ระยะเวลาต่างๆ กัน เพื่อวิเคราะห์ระดับการย่อย (degree of hydrolysis) โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1994)

และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-sulfuric (Dubios *et al.*, 1956) เพื่อคำนวณระดับการย่อย ดังสมการที่ (3)

### 2) การทดสอบการย่อยในสถานะจำลองในกระเพาะอาหาร

หลังจากบ่มสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C จนครบ 2 ชั่วโมง (จากข้อ 1) เติมสารละลาย HCl buffer (ประกอบด้วย NaCl 1.703 กรัมต่อลิตร, KCl 0.199 กรัมต่อลิตร, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.150 กรัมต่อลิตร และ NaHCO<sub>3</sub> 0.300 กรัมต่อลิตร) (Fässler *et al.*, 2006) เพื่อปรับสภาพของสารละลายให้ใกล้เคียงกับสภาพของสารละลายอิลิคโตรไลต์ในกระเพาะอาหาร กวนผสมจนตัวอย่างละลายหมด จึงปรับพีเอชของสารละลายเป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หลังจากนั้นบ่มสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 4 ชั่วโมง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 นาที หลังจากเก็บตัวอย่างนำไปปรับพีเอชเป็น 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อปรับพีเอชเป็นกลาง นำสารที่ผ่านการทดสอบการย่อยในสถานะจำลองในกระเพาะอาหารที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ไปวิเคราะห์หาระดับการย่อย โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เพื่อวิเคราะห์หาระดับการย่อย ดังสมการที่ (3)

### 3) การทดสอบการย่อยในสถานะจำลองในลำไส้เล็ก

หลังจากบ่มสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C พีเอช 2 จนครบ 4 ชั่วโมง (จากข้อ 2) แล้วปรับพีเอชสารละลายเป็น 6.9 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อเลียนแบบสภาพการย่อยในลำไส้เล็ก เติมเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase ปริมาตร 0.665 มิลลิลิตร (เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.75 ยูนิต/มิลลิลิตร และวิธีการเตรียมเอนไซม์แสดงดังภาคผนวก ข ข้อ 2.2) บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37°C นาน 6 ชั่วโมง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 และ 360 นาที หลังจากเก็บตัวอย่างนำไปต้มทันทีในน้ำเดือด นาน 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ นำสารที่ผ่านการทดสอบการย่อยในสถานะจำลองในลำไส้เล็กที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ไปวิเคราะห์หาระดับการย่อย โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เพื่อคำนวณระดับการย่อย ดังสมการที่ (3)

นำตัวอย่างหลังการบ่มในสถานะจำลองในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กนาน 1, 120 และ 240 นาที ตามลำดับ มาตกตะกอนสารละลายตัวอย่างด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 80) ที่ไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้ง และนำมาตกตะกอนซ้ำอีกครั้งเพื่อแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกจากสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างตกตะกอนไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ และทำแห้งตัวอย่างโดยใช้เครื่อง freeze dry เก็บตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ทดลองในข้อ 2.3.2

นำร้อยละของการย่อยที่ได้จากการทดสอบการย่อยในสภาวะจำลองในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก มาคำนวณร้อยละการย่อยรวมโดยใช้สมการที่ (4)

• การคำนวณร้อยละการย่อย (% Hydrolysis)

$$\text{การย่อย (\%)} = \frac{(\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังย่อย} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนย่อย}) \times 100}{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนย่อย}} \quad (3)$$

$$\text{การย่อยรวม (\%)} = \text{การย่อยในปาก (\%)} + \text{การย่อยในกระเพาะอาหาร (\%)} + \text{การย่อยในลำไส้เล็ก (\%)} \quad (4)$$

### 2.3.2 การทดสอบความสามารถต่อการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก

#### 1) วิธีการเตรียมตัวอย่างอุจจาระ (fecal slurry)

ใช้ตัวอย่างอุจจาระ เป็นตัวแทนจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่โดยใช้อุจจาระของคนที่มิ สุขภาพดี ไม่มีประวัติเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 เดือน ก่อนที่จะนำมาศึกษา โดยเตรียม fecal slurry ความเข้มข้นร้อยละ 10 สำหรับใช้เป็นจุลินทรีย์ เริ่มต้น (inoculum) ในการหมัก โดยนำมาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 และนำไปตีปั่นด้วย stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมากรองของแข็ง ออกเพื่อนำไปใช้งานต่อไป

#### 2) การทดสอบการหมักแบบกะ (Batch culture) โดยมีการควบคุมพีเอช

(ประกอบด้วย peptone water 2 กรัมต่อลิตร, yeast extract 2 กรัมต่อลิตร, NaCl 0.1 กรัมต่อลิตร,  $K_2HPO_4$  0.04 กรัมต่อลิตร,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 กรัมต่อลิตร,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01 กรัมต่อลิตร,  $NaHCO_3$  2 กรัมต่อลิตร, Tween 80 2 มิลลิลิตรต่อลิตร, Hemin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร, วิตามิน  $K_1$  10 ไมโครลิตรต่อลิตร, Cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร และ Bile salts 0.5 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 100 พีเอชเป็น  $6.8 \pm 0.1$  ด้วยเครื่องควบคุมพีเอชและควบคุมอุณหภูมิที่  $37^\circ\text{C}$  (โดยใช้ระบบน้ำอุ่น ไหลวนผ่าน jacket ซึ่งต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิตลอดระยะเวลาการทดลอง) ในสภาวะไร้อากาศ (โดยการพ่นแก๊สไนโตรเจนตลอดระยะเวลาการทดลองลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรทันที โดยใช้ปิเปตปลอดเชื้อเพื่อนำมาเตรียมเซลล์สำหรับตรวจนับจุลินทรีย์โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) ที่เวลาเริ่มต้น (Inoculum) และทิ้งไว้ให้เกิดการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยยังไม่เริ่มป้อนอาหารเมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มป้อนตัวอย่างสตาร์ชแต่ละชนิด ที่ผ่านการย่อย (จากข้อ 2.3.1) ปริมาณ 8 กรัม เก็บตัวอย่าง (5 มิลลิลิตร) เพื่อนำมานับจุลินทรีย์ และ

วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมันสายสั้น โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปคำนวณค่าดัชนีความเป็นพรีไบโอติก ดังสมการที่ (5)

### 3) การตรวจนับจุลินทรีย์ด้วยวิธี Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

ตรวจนับการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มและจำนวนแบคทีเรีย โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) จำนวน 5 โพรบ คือ Bif 164, Bac 303, Lab 158, Chis 150 และ Eub 338 เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียในระดับจีโนส *Bifidobacteria*, *Bacteroids*, *Lactobacillus*, *Clostridium* และ *Eubacterium* ตามลำดับ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

นำตัวอย่างปริมาตร 375 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายพาราฟอร์มัลดีไฮด์ (paraformaldehyde solution) เข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนัก) พิเอช 7.2 ผสมให้เข้ากันเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำมึน เพื่อตรึงเซลล์จุลินทรีย์ นำเซลล์ที่ผ่านการตรึงล้างด้วย PBS 2 ครั้ง และนำมาละลายด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C อย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าต้องการใช้แต่ไม่ควรเก็บไว้เกิน 3 เดือน นำเซลล์ที่ผ่านการตรึงมาทำการเจือจางให้มีปริมาณเชื้อที่เหมาะสม แล้วปิเปตมา ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เคลี่ยลงบนหลุมสไลด์ที่มีการเคลือบ TEFLON/Poly-L-Lysine นำวางบน slide warmer ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 45°C เป็นเวลานาน 10-12 นาที จนตัวอย่างแห้ง นำสไลด์มาจุ่มในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 80 และ 96 (โดยปริมาตร) ตามลำดับ โดยจุ่มที่แต่ละความเข้มข้นนาน 3 นาที เพื่อทำลายผนังเซลล์ นำสไลด์ไปทำแห้งบน slide warmer ส่วนสไลด์ของตัวอย่างเพื่อนับ *Lactobacillus* ต้องนำมาหยด lysozyme ก่อนหลุมละ 20 ไมโครลิตร และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ก่อนจะนำไปจุ่มเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50, 80 และ 96 โดยจุ่มที่แต่ละความเข้มข้นนาน 3 นาที

ทำการ prewarmed hybridization buffer ที่อุณหภูมิที่ใช้สำหรับการไฮบริดไคเซชันของโพรบแต่ละชนิด คือ Bif 164, Lab 158, และ Chis 150 ใช้อุณหภูมิ 50 °C และโพรบ Bac 303 และ Eub 338 ใช้อุณหภูมิ 48°C โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการตรึงเซลล์แล้วมา 45 ไมโครลิตร ผสมกับ 5 ไมโครลิตร ของสารละลายดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ต้องการตรวจนับ นำส่วนผสมของบัฟเฟอร์และโพรบ (50 ไมโครลิตร) ใส่ในหลุมบนสไลด์ที่เตรียมไว้ข้างต้น บ่มสไลด์ไว้ในเครื่อง hybridization oven ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของการไฮบริดไคเซชันกับดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะกับแบคทีเรียแต่ละชนิด บ่มทิ้งไว้วัน 4 ชั่วโมง

ในขณะที่รอการไฮบริดไคเซชันให้เตรียม washing buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อ 2 สไลด์ นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมกับแต่ละโพรบ จากนั้นเตรียมหลอดเช่นเดียวกับ washing buffer แต่ใส่น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรแทน แช่ไว้ในอ่างน้ำแข็งเมื่อครบเวลาการ

บ่ม นำสไลด์มาจุ่มในหลอดที่มี washing buffer ที่เตรียมไว้ทันที บ่มไว้ที่อุณหภูมิเดียวกับการไฮบริดไคเซชันในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสไลด์มาจุ่มในหลอดน้ำกลั่นเย็นที่เตรียมไว้ 2-3 วินาที ทำสไลด์ให้แห้งทันที โดยใช้ลมเป่า เดิมสาร antifade ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมของสไลด์ ปิดด้วย cover slide นำสไลด์ไปนับเซลล์ผ่านกล้อง fluorescence microscope โดยนับหลุมละ 15 fields นำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ (cell/ml) แต่ละกลุ่มตามชนิดของโพรบที่ใช้ การนับจำนวนจุลินทรีย์สามารถทำได้ 2 ลักษณะ คือ นับโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ หรือถ่ายภาพไว้แล้วจึงมานับในภายหลัง โดยที่การนับในวิธีหลังมีข้อดีกว่า เนื่องจาก การคิดสีจะจางลงอย่างรวดเร็วหากตัวอย่างได้รับแสงฟลูออเรสเซนซ์จากกล้องเป็นเวลานาน ทำให้การนับโดยตรงต้องนับอย่างเร่งรีบ (บัญชา อุไรกุล และคณะ, 2551)

#### 4) การคำนวณค่าดัชนีความเป็นพรไบोटิก (Prebiotic index; PI)

นำปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดที่นับได้โดยเทคนิค FISH ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ ชนิดฟลูออเรสเซนซ์ มาคำนวณค่า Prebiotic index จากสมการที่ (5) (Palframan *et al.*, 2002)

$$\begin{aligned} \text{Prebiotic index (PI)} &= \alpha + \beta - \gamma - \delta & (5) \\ \alpha &= (\text{Bif}_t / \text{Bif}_0) / \text{Total} \\ \beta &= (\text{Lac}_t / \text{Lac}_0) / \text{Total} \\ \gamma &= (\text{Bac}_t / \text{Bac}_0) / \text{Total} \\ \delta &= (\text{Clos}_t / \text{Clos}_0) / \text{Total} \end{aligned}$$

เมื่อ Total คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้ (โพรบ Eub 338) ในชั่วโมงที่ t/จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในชั่วโมงที่ 0

Bif<sub>t</sub> คือ จำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacteria* ในชั่วโมงที่ t (ชั่วโมงที่ 24 หรือ 48) เป็นต้น

Lac<sub>t</sub> คือ จำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* ในชั่วโมงที่ t (ชั่วโมงที่ 24 หรือ 48) เป็นต้น

Bac<sub>t</sub> คือ จำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroids* ในชั่วโมงที่ t (ชั่วโมงที่ 24 หรือ 48) เป็นต้น

Clos<sub>t</sub> คือ จำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* ในชั่วโมงที่ t (ชั่วโมงที่ 24 หรือ 48) เป็นต้น

#### 5) การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) โดย

ใช้เทคนิค High Performance Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทิเรท และแลคเตท การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างที่ได้จากการหมักแบบกะของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดเซน มาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำตัวเซลล์ออกจากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ที่ได้กรองผ่านแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และนำไปวิเคราะห์หา

ปริมาณของกรดไขมันสายสั้นด้วยเครื่อง High Performance Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ BIO-RAD Aminex HPX-87H Ion Exclusion column ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร โดยใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เป็น mobile phase ให้อัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50°C และใช้ UV detector ที่ 215 นาโนเมตร คำนวณปริมาณของกรดไขมันสายสั้นแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีค (peak) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดไขมันสายสั้นแต่ละชนิด การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแลคติก ที่ความเข้มข้น 2.5, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริกความเข้มข้น 1, 10, 20, 40, 80 และ 100 มิลลิโมลาร์ (Olano-Martin *et al.*, 2000)

### 2.3.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ (Analysis of Variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสารจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว

องค์ประกอบทางเคมีของสารจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว แสดงดัง Table 5 โดยสารทั้ง 3 ชนิด มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 9.42 ถึง 9.84 (โดยน้ำหนักแห้ง) ปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 0.11 ถึง 0.49 (โดยน้ำหนักแห้ง) ปริมาณไขมันอยู่ในช่วงร้อยละ 0.05 ถึง 0.50 (โดยน้ำหนักแห้ง) ปริมาณเถ้าอยู่ในช่วงร้อยละ 0.03 ถึง 0.43 (โดยน้ำหนักแห้ง) ปริมาณเยื่อใยอยู่ในช่วงร้อยละ 0.08 ถึง 0.29 (โดยน้ำหนักแห้ง) จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้าในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าน้อยกว่าร้อยละ 0.5 แสดงให้เห็นว่ามีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารสำหรับปริมาณอะมิโลสของสารจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียวมีค่าร้อยละ 19.50, 20.82 และ 24.56 ตามลำดับ (Table 5) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่มีปริมาณอะมิโลสสูง นอกจากนี้พบว่าสารเมล็ดขนุนมีปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงกว่าสารถั่วเขียว และสารข้าว ตามลำดับ โดยสารเมล็ดขนุนจัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงมาก (very high) สารถั่วเขียวจัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ปานกลาง (Intermediate) และสารข้าวจัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณสารที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (Negligible) (Goni *et al.*, 1996)

Table 5 Chemical compositions of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Chemical composition (% db)	Starch		
	Rice	Jackfruit seed	Mung bean
Protein	0.49 ± 0.04	0.11 ± 0.04	0.13 ± 0.01
Fat	0.50 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Moisture	9.45 ± 0.27	9.84 ± 0.09	9.42 ± 0.03
Ash	0.43 ± 0.04	0.09 ± 0.02	0.03 ± 0.02
Fiber	0.29 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.24 ± 0.01
Amylose	19.50 ± 0.14	20.82 ± 0.07	24.56 ± 0.06
Resistant starch	0.31 ± 0.02	26.99 ± 0.37	4.04 ± 0.10

Note: Each value is mean of triplicate ± SD.

## 2. ลักษณะทางโครงสร้างของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว

### 2.1 การกระจายตัวของความยาวสายอะมิโลเพคติน (amylopectin chain length distribution)

การวิเคราะห์การกระจายตัวของความยาวสายอะมิโลเพคตินของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว แสดงดัง Figure 2 และ Table 6 เมื่อพิจารณาจากร้อยละการกระจายตัวของความยาวสายอะมิโลเพคติน พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือสายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสอยู่ในช่วง DP 6-12 (very short chains) สายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสอยู่ในช่วง DP 13-24 (medium length chains) สายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสอยู่ในช่วง DP 25-36 (long chain) สายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสอยู่ในช่วง DP มากกว่า 37 (very long chains) (Hanashiro *et al.*, 1996) โดยสตาร์ชข้าวมีปริมาณสายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสในช่วง DP 6-12 และ DP 13-24 มากกว่าสตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดขนุนตามลำดับ ขณะที่สตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณสายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสในช่วง DP 25-36 สูงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าวตามลำดับ สำหรับสตาร์ชเมล็ดขนุนพบว่ามีปริมาณสายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคส DP ≥ 37 มากกว่าสตาร์ชข้าว และสตาร์ชถั่วเขียวตามลำดับ Gidly และ Bulpin (1987) พบว่าความยาวของสายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไปเหมาะสมสำหรับการเกิดอันตรกิริยาของสายโมเลกุลเป็น โครงสร้างแบบเป็นเกลียวคู่เพื่อพัฒนาเป็น โครงสร้างผลึก ขณะที่ความยาวของสายอะมิโลเพคตินที่มีความยาวกลูโคสในช่วง DP 6-9 จะขัดขวางการเกิดอัน-



ตรรกิริยาของสายโมเลกุลเป็นโครงสร้างแบบเป็นเกลียวคู่ (Levin and Slade, 1986; Shi and Seib, 1992)

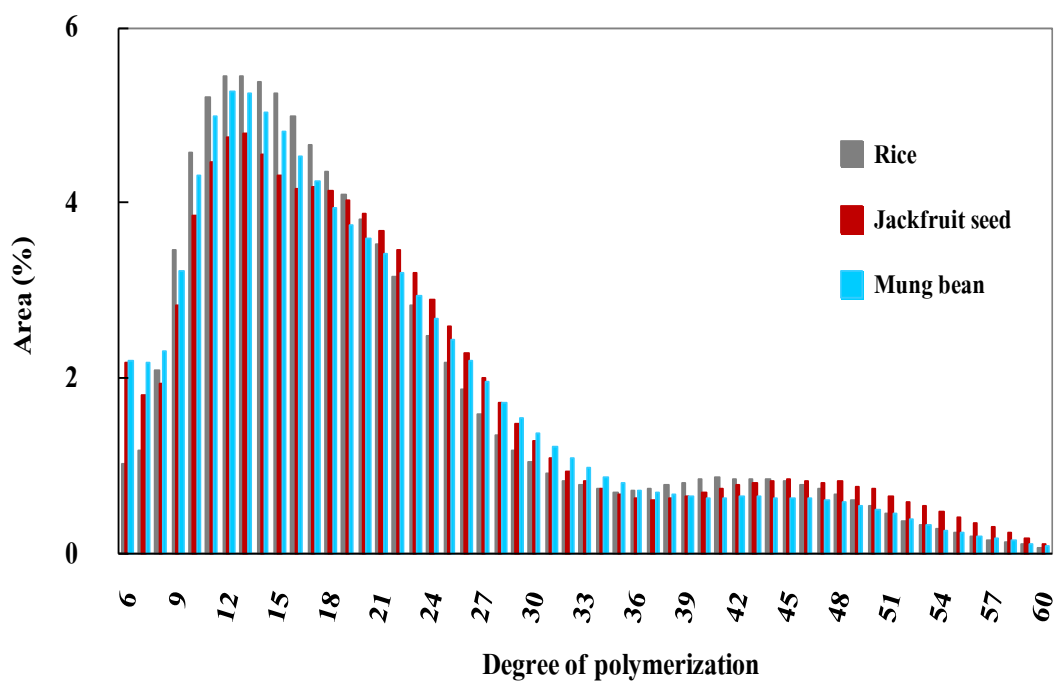


Figure 2 Distribution curve of degree of polymerization ( $DP_n$ ) of amylopectin chain length for starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Table 6 Chain length distribution of amylopectin components for starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Starch	Area (%) for $DP_n$			
	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP $\geq$ 37
Rice	22.12	52.90	13.36	11.62
Jackfruit seed	20.68	49.63	15.68	14.62
Mung bean	20.75	49.66	18.38	1.21

## 2.2 ชนิดและปริมาณผลึกของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว

จากการตรวจสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว ด้วยเครื่อง X-ray diffractometer (XRD) พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีรูปแบบโครงสร้างผลึกที่มีพิกัดเด่นชัดที่มุม ( $2\theta$ ) เท่ากับ 15.03, 17.23, 18.08 และ 23.03 แสดงดัง Figure 3 ซึ่งเป็นรูปแบบของ

โครงสร้างผลึกแบบ A (Zobel, 1988) ผลการทดลองสอดคล้องกับรูปแบบโครงสร้างผลึกที่ได้จากข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ, 2546; ปาริคา ขุนแอ, 2550 และ Noosuk *et al.*, 2003) สตาร์ชเมล็ดขนุนพันธุ์ทองสุคใจ (Rengsutthi and Charoenrein, 2011) และสตาร์ชถั่วเขียว (Liu and Shen, 2007) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าสตาร์ชถั่วเขียวบางสายพันธุ์มีรูปแบบโครงสร้างผลึกแบบ C (Hoover *et al.*, 1997; Chung *et al.*, 2006) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ จากการพิจารณาปริมาณผลึก (relative crystallinity: RC) ของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด (Table 7) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน มีค่ามากกว่าสตาร์ชข้าวและสตาร์ชถั่วเขียว โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 29.38, 28.62 และ 23.71 ตามลำดับ ปริมาณ RC มีความสอดคล้องกับปริมาณอะมิโลเพกตินของสตาร์ช โดยอะมิโลเพกตินเป็นสายโมเลกุลหลักที่จัดเรียงตัวเป็นเกลียวคู่ในบริเวณผลึกของเม็ดสตาร์ช (French, 1984) นอกจากนี้ Gunaratne และ Hoover (2002) อธิบายว่าปริมาณ RC ของสตาร์ชแต่ละชนิดยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ (1) ขนาดของผลึก (2) การจัดเรียงตัวของเกลียวคู่ในบริเวณผลึก (3) ค่าเฉลี่ยของความยาวสายของอะมิโลเพกติน และ (4) สัดส่วนของอะมิโลเพกตินสายสั้น

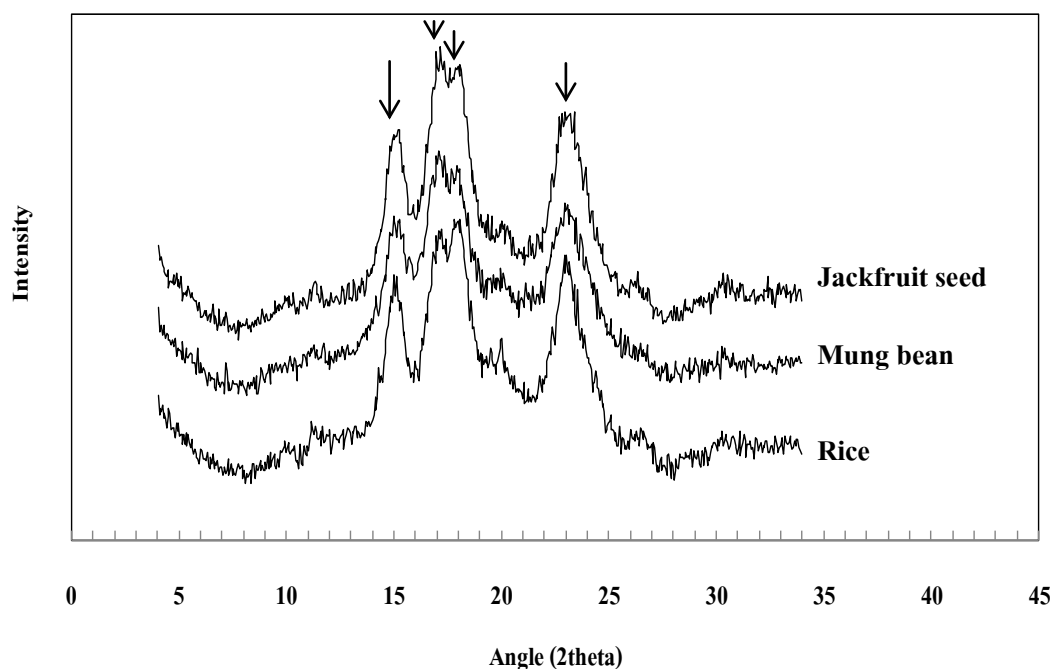


Figure 3 Crystallinity pattern of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Table 7 Relative crystallinity and granule size mean diameter of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Starch	Relative crystallinity (%)	Granule size mean diameter (µm)
Rice	28.62 <sup>a</sup> ± 1.35	8.63 ± 8.473
Jackfruit seed	29.38 <sup>a</sup> ± 0.97	10.48 ± 7.46
Mung bean	23.71 <sup>b</sup> ± 0.77	22.09 ± 10.10

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences (p<0.05).

### 3. รูปร่าง ขนาด และการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ชของสตาร์ชข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว

จากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเม็ดสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าลักษณะรูปร่าง และขนาดของเม็ดสตาร์ช ทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะที่แตกต่างกัน (Figure 4a, 4b และ 4c) โดยสตาร์ชข้าวมีขนาดเล็ก รูปร่างหลายเหลี่ยม สตาร์ชเมล็ดขนุนมีขนาดเล็ก รูปร่างกลม หรือรูปร่างหลายเหลี่ยม และสตาร์ชถั่วเขียวมีรูปร่างค่อนข้างใหญ่ รูปร่างกลมรี โดยที่ลักษณะพื้นผิวของเม็ดสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะพื้นผิวที่เรียบแสดงว่าเม็ดสตาร์ชที่สกัดได้มีความสมบูรณ์ ไม่ถูกทำลายในระหว่างขั้นตอนการสกัดหรือการบด และไม่มีการปนเปื้อนจากองค์ประกอบอื่นๆ และจากการตรวจสอบการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด ด้วยเครื่อง Laser Particle Size Analyzer (LPSA) แสดงดัง Figure 5 โดยพบว่า สตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียวมีขนาดเม็ดสตาร์ชเฉลี่ยเท่ากับ 8.63, 10.48 และ 22.09 ไมโครเมตร ตามลำดับ (Table 7) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเม็ดสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียวที่ศึกษาโดย รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต และคณะ (2546), Dutta และคณะ (2011) และ Naivikul และ D'Appolonia (1979)

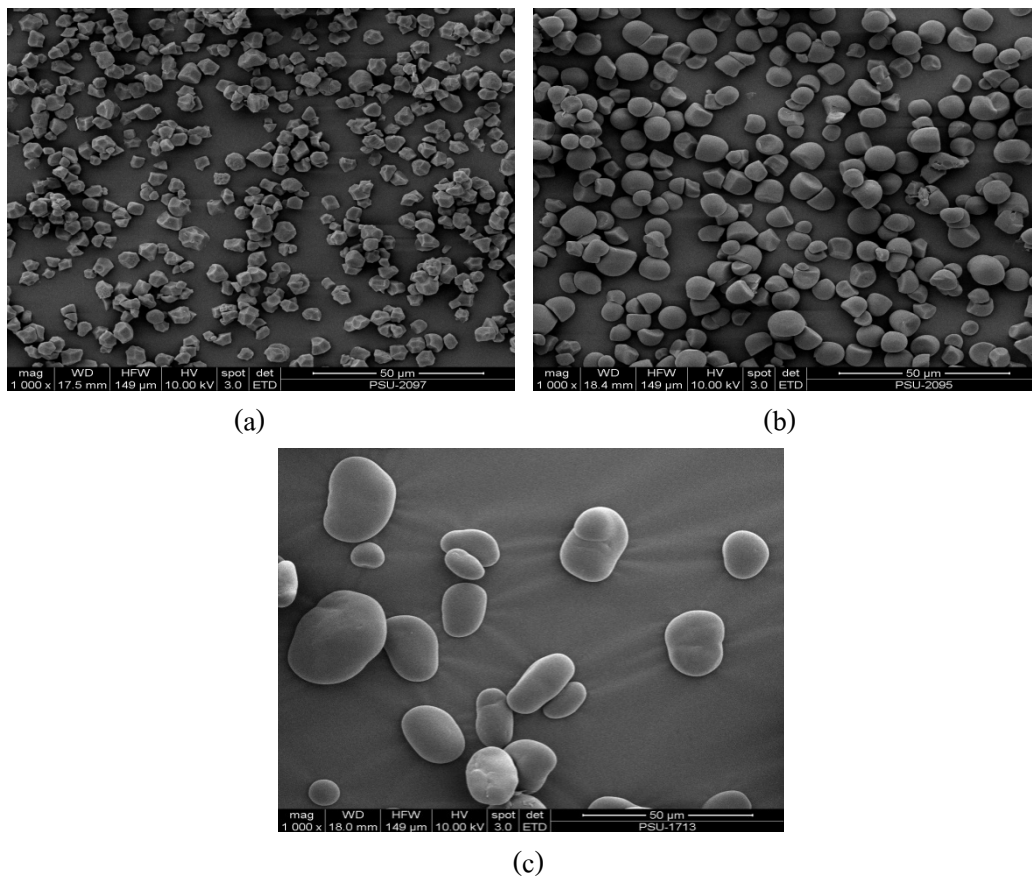


Figure 4 SEM micrographs (x1000) of starches from rice (a), jackfruit seed (b) and mung bean (c).

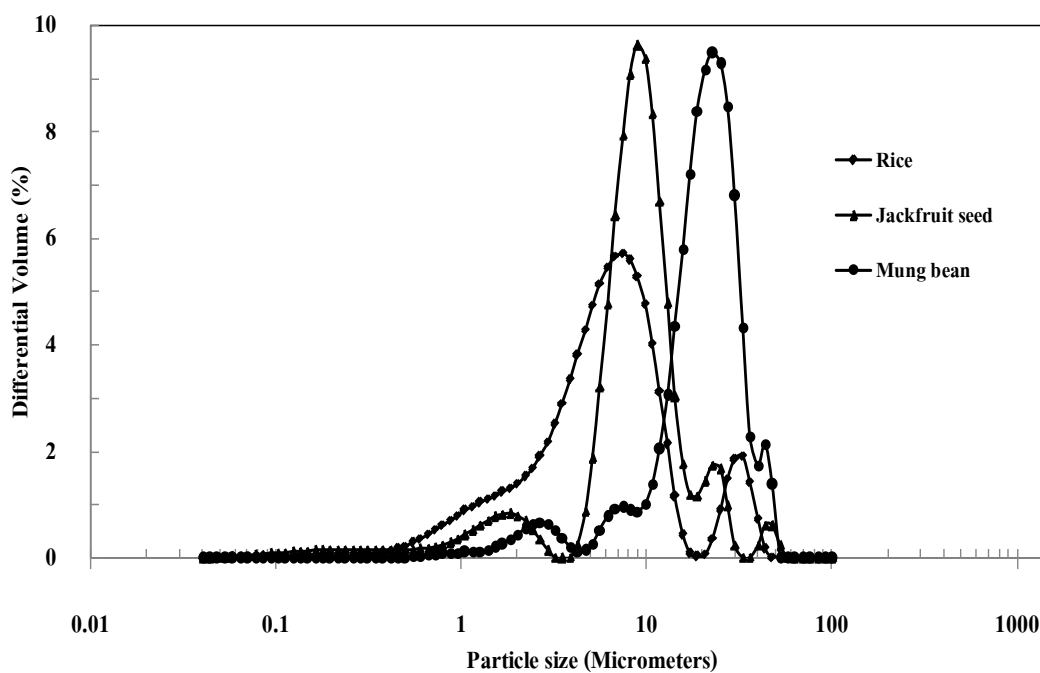


Figure 5 Granule size mean diameter of starches from rice, jackfruit seed and mung bean starch.

#### 4. สมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว

##### 4.1 สมบัติทางความร้อน (thermal properties)

การศึกษาสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียวด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 แสดงพีคการดูดความร้อน (endotherm) ซึ่งแสดงถึงการใช้พลังงานในการหลอมละลายผลึกของสตาร์ช (Figure 6) จากการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิเริ่มเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_o$ ) อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_p$ ) อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_c$ ) ช่วงของอุณหภูมิของการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_c - T_o$ ) และพลังงานในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $\Delta H$ ) แสดงดัง Table 8 โดยพบว่าค่า  $T_o$ ,  $\Delta H$  และ ( $T_c - T_o$ ) ของสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าสูงสุด รองลงมาคือสตาร์ชข้าว และสตาร์ชถั่วเขียวตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่า  $\Delta H$  ของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด พบว่าค่า  $\Delta H$  ของสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าสูงสุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณผลึกมากจึงส่งผลให้ต้องใช้พลังงานมากในการหลอมละลายผลึก (Gunaratne and Hoover, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงของอุณหภูมิ ( $T_c - T_o$ ) ของสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าสูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดความหลากหลายไม่เป็นหนึ่งเดียวกันของโครงสร้างผลึก (heterogeneity of the crystallites) มากกว่าของสตาร์ชข้าว และสตาร์ชถั่วเขียวตามลำดับ

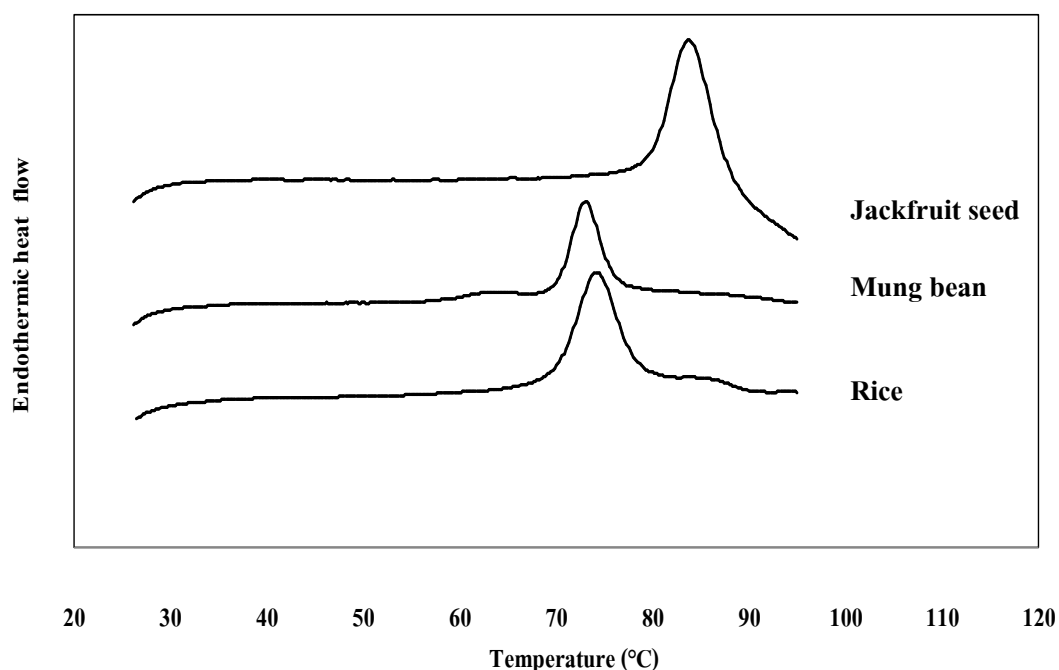


Figure 6 Thermographs of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Table 8 Gelatinization parameters of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Starch	Gelatinization temperature (°C)				Enthalpy (ΔH) (J/g)
	To	Tp	Tc	Tc-To	
Rice	70.57 <sup>b</sup> ± 0.40	74.44 <sup>b</sup> ± 0.25	78.61 <sup>b</sup> ± 0.31	8.04 <sup>b</sup> ± 0.30	14.31 <sup>b</sup> ± 1.07
Jackfruit seed	79.32 <sup>a</sup> ± 0.30	84.06 <sup>a</sup> ± 0.25	89.52 <sup>a</sup> ± 0.72	10.20 <sup>a</sup> ± 0.89	26.14 <sup>a</sup> ± 2.25
Mung bean	70.11 <sup>b</sup> ± 0.31	72.83 <sup>c</sup> ± 0.44	75.80 <sup>c</sup> ± 0.59	5.70 <sup>c</sup> ± 0.29	7.51 <sup>c</sup> ± 0.46

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences ( $p < 0.05$ ).

## 4.2 สมบัติทางรีโอโลยี (rheology properties)

### 4.2.1 สมบัติการเกิดเพสท์ของสตาร์ช (pasting properties)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการประเมินและติดตามสมบัติทางความหนืดในขณะที่สารละลายได้รับความร้อนรวมไปถึงความคงตัวของสารละลายสตาร์ชในช่วงการลดอุณหภูมิ จากการศึกษาสมบัติทางความหนืดของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด ในสภาวะที่เป็นกลาง รูปแบบความหนืด (pasting profile) แสดงดัง Figure 7 ซึ่งเมื่อแบ่งรูปแบบความหนืดของสตาร์ชตามวิธีของ Schoch และ Mayward (1968) พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีรูปแบบความหนืดแบบ b คือลักษณะกราฟความหนืดที่มีความสูงชัน และเกิดการแตกตัวของเม็ดสตาร์ชระหว่างการให้ความร้อนในระดับปานกลาง สำหรับค่าพารามิเตอร์ทางความหนืดของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด (Table 9) พบว่าอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืด (pasting temperature) ของสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าสูงสุด (87.40°C) ซึ่งมีค่าสูงกว่าของสตาร์ชข้าว (78.45°C) และสตาร์ชถั่วเขียว (77.40°C) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับค่า To ขณะที่สตาร์ชถั่วเขียวมีค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity) มากที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสตาร์ชถั่วเขียวมีขนาดของเม็ดสตาร์ชใหญ่สุด ซึ่งสามารถดูดซึมน้ำและเกิดการพองตัวได้มากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จึงทำให้ความหนืดของสตาร์ชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว สำหรับค่า breakdown พบว่าสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าว และสตาร์ชเมล็ดขนุน ตามลำดับ ค่าความหนืดสูงสุด และค่า breakdown สามารถอธิบายถึงการพองตัวและการแตกตัวของเม็ดสตาร์ช โดยเมื่อเม็ดสตาร์ชเกิดการพองตัว ทำให้มีความหนืดสูงขึ้น (Mohan *et al.*, 2005) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเม็ดสตาร์ชเกิดการแตกตัว อะมิโลสและอะมิโลเพคตินหลุดออกมาในสารละลาย ทำให้ความหนืดลดลงจากนั้นเมื่อลดอุณหภูมิลง พบว่าความหนืดมีค่าเพิ่มขึ้นนี้อาจเนื่องจากสายโมเลกุลของอะมิโลส/

อะมิโลเพคติน เกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่เกิดเป็นร่างแหสามมิติ เรียกว่าการคืนตัว (setback) โดยพบว่าสตาร์ชถั่วเขียวมีค่า setback สูงสุด (3306.33 mPa.s) รองลงมาคือ สตาร์ชข้าว (2104 mPa.s) และสตาร์ชเมล็ดขนุน (1383.33 mPa.s) ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณอะมิโลส โดยสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูง ก็สามารถเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ของอะมิโลสได้มากกว่า (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

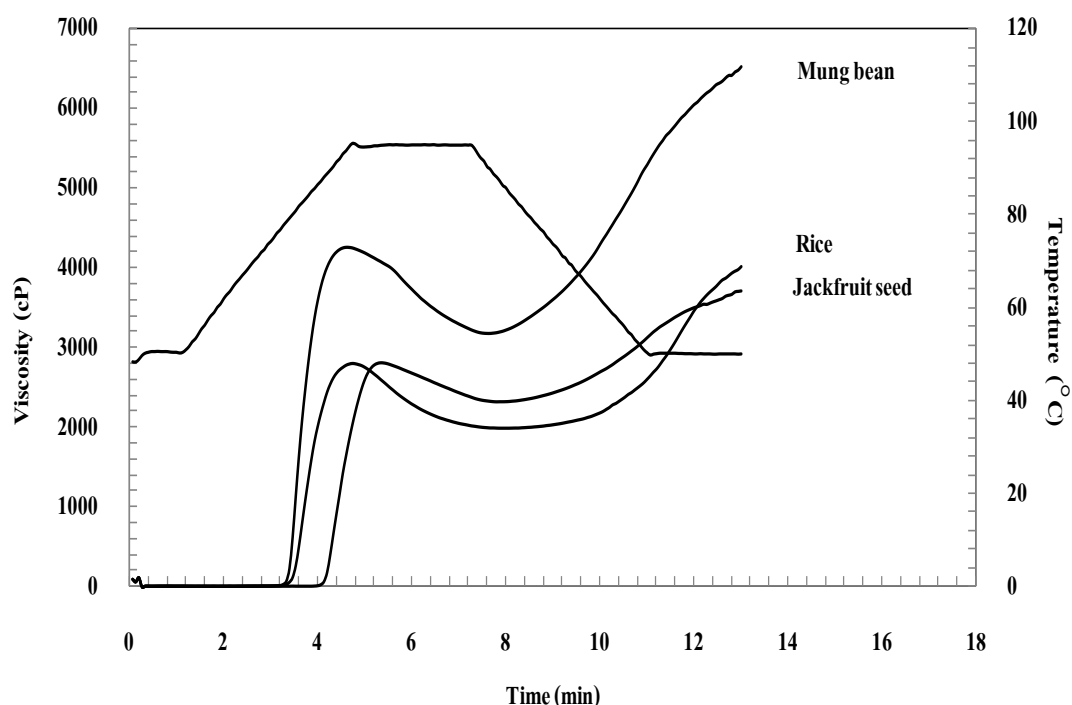


Figure 7 Pasting profile at pH 7.0 of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Table 9 Viscosity parameters from Rapid Visco Analyzer (RVA) of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Starch	Pasting temperature (°C)	Peak viscosity (mPa.s)	Breakdown (mPa.s)	Setback (mPa.s)
Rice	78.45 <sup>b</sup> ± 0.00	2781.67 <sup>b</sup> ± 2.10	807.67 <sup>b</sup> ± 7.77	2014.00 <sup>b</sup> ± 6.08
Jackfruit seed	87.40 <sup>a</sup> ± 0.00	2802.67 <sup>b</sup> ± 2.52	480.33 <sup>c</sup> ± 8.08	1383.33 <sup>c</sup> ± 7.23
Mung bean	77.40 <sup>c</sup> ± 0.52	4261.67 <sup>a</sup> ± 7.77	1072.67 <sup>a</sup> ± 7.94	3306.33 <sup>a</sup> ± 1.15

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences (p<0.05)

#### 4.2.2 พฤติกรรมการไหล (flow behavior)

การศึกษาพฤติกรรมการไหลของสตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียว โดยการเตรียมสตาร์ชเพสท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนักแห้ง) ทำการวัดที่อุณหภูมิ 60°C ในช่วงอัตราการเฉือนเท่ากับ 0-300 s<sup>-1</sup> จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเค้นเฉือนและอัตราการเฉือนของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด พบว่าเป็นไปตามกฎสมการยกกำลัง (power law) ดังสมการที่ 6 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สูง ( $R^2 = 0.99$ ,  $p < 0.05$ )

$$\sigma = k \dot{\gamma}^n \quad (6)$$

เมื่อ  $\sigma$  คือความเค้นเฉือน (Pa),  $\dot{\gamma}$  คืออัตราการเฉือน (s<sup>-1</sup>),  $k$  คือค่าสัมประสิทธิ์ความคงตัว (consistency coefficient) (Pa.s<sup>n</sup>) และ  $n$  คือดัชนีพฤติกรรมการไหล (flow behavior index)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าความหนืดปรากฏและอัตราการเฉือนเฉือนของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด พบว่าความหนืดปรากฏมีค่าลดลงเมื่ออัตราการเฉือนเพิ่มขึ้น (Figure 8) เมื่อพิจารณาค่าดัชนีพฤติกรรมการไหล ( $n$ ) ของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าน้อยกว่า 1 (Table 10) แสดงว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีพฤติกรรมการไหลแบบ shear-thinning (pseudoplastic) (Evan and Haisman, 1979; Doublier, 1981; Colas, 1986; Ellis *et al.*, 1989; Noel *et al.*, 1993) เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ทางความหนืด ( $k$ ) พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่า  $k$  สูงกว่าสตาร์ชข้าว และสตาร์ชถั่วเขียว ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาระหว่างเม็ดสตาร์ช (granule-granule interaction) และระหว่างสายโมกุลอะมิโลสที่หลุดออกมากับเม็ดสตาร์ช (amylose-granule interaction) ของสตาร์ชเมล็ดขนุนเกิดขึ้นได้มากกว่าสตาร์ชจากข้าวและถั่วเขียว จึงส่งผลให้ความหนืดมีค่าสูงกว่า



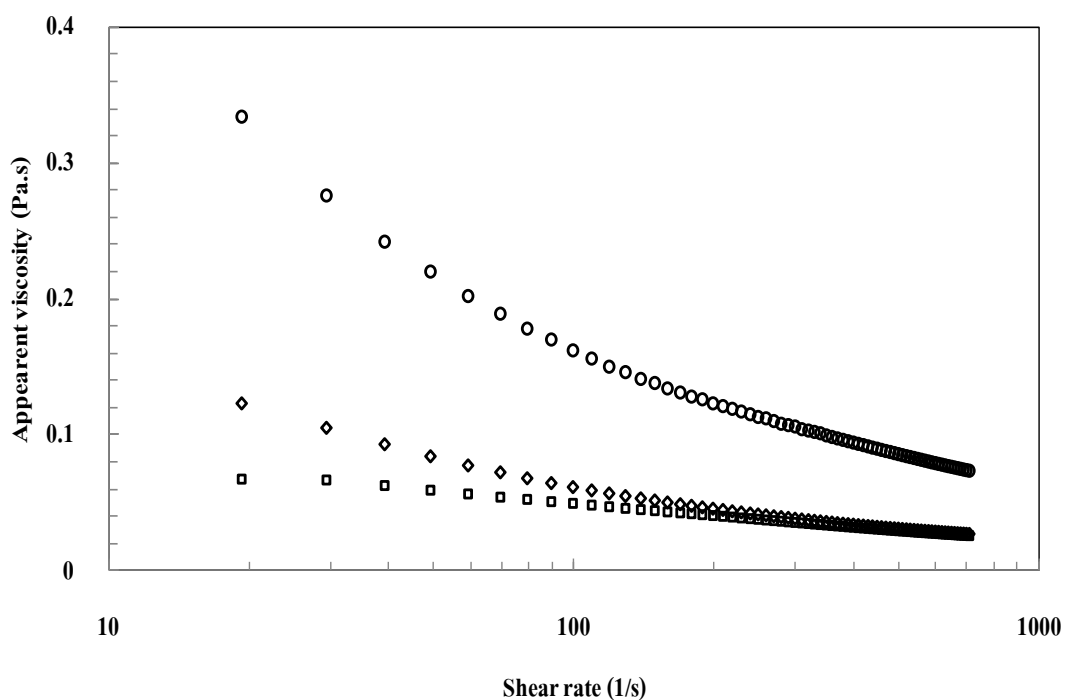


Figure 8 Relationship of apparent viscosity and shear rate of starches from rice ( $\diamond$ ), jackfruit seed ( $\circ$ ) and mung bean ( $\square$ ) at 60 °C.

Table 10 Consistency coefficient (k) and Flow behavior index (n) of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Starch	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n
Rice	0.38 <sup>b</sup> ± 0.00	0.60 <sup>b</sup> ± 0.00
Jackfruit seed	1.17 <sup>a</sup> ± 0.0	0.58 <sup>c</sup> ± 0.00
Mung bean	0.20 <sup>c</sup> ± 0.01	0.66 <sup>a</sup> ± 0.01

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences (p<0.05).

#### 4.2.3 สมบัติวิสโคอิลาสติก (viscoelastic properties)

การวิเคราะห์สมบัติวิสโคอิลาสติกแบบการสั่นทางพลวัต (dynamic oscillation) เป็นการวิเคราะห์การตอบสนองต่อความเค้น (stress) หรือความเครียด (strain) ภายใต้การเคลื่อนที่แบบสั่นของวัสดุวิสโคอิลาสติก โดยพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา ได้แก่ storage modulus (G'), loss

modulus ( $G''$ ) และ loss tangent ( $\tan \delta$ ) สำหรับค่า  $G'$  หมายถึง ปริมาณของพลังงานที่ถูกเก็บไว้ในวัสดุ เมื่อได้รับความเค้นหรือความเครียด ค่า  $G''$  หมายถึง พลังงานที่สูญเสียไปเนื่องจากความหนืด และค่า  $\tan \delta$  หมายถึงสัดส่วนของการแสดงสถานะการเป็นวัสดุไหลหนืดต่อสถานะยืดหยุ่น ( $G''/G'$ ) โดยการวิเคราะห์สมบัติวิสโคอีลาสติกนี้เป็นการศึกษา frequency sweep test ของสตาร์ชเพสท์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 (โดยน้ำหนักแห้ง) ที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  โดยทำการทดลองในช่วง linear viscoelastic

จากการวิเคราะห์พารามิเตอร์ของสมบัติวิสโคอีลาสติก พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีค่า  $G'$  สูงกว่าค่า  $G''$  แสดงดัง Figure 9 ซึ่งเป็นคุณลักษณะของเจล (Biliaderis, 1992) นอกจากนี้พบว่าค่า  $G'$  มีการเปลี่ยนแปลงกับค่าความถี่น้อย ซึ่งแสดงถึงคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับเจลที่แท้จริง (true gel) (Clark and Ross-Murphy, 1987) เมื่อพิจารณาค่า  $G'$  ที่ความถี่ 1 Hz (Table 11) พบว่าค่า  $G'$  ของสตาร์ชถั่วเขียว มีค่ามากกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าว โดยมีค่าเท่ากับ 759.25, 556.33 และ 372.37 Pa ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเจลของสตาร์ชถั่วเขียวมีความแข็งแรงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าว นอกจากนี้พบว่าเจลของสตาร์ชถั่วเขียวมีค่า  $\tan \delta$  ต่ำสุด (0.08) ซึ่งแสดงถึงสถานะการเป็นวัสดุไหลหนืดต่อสถานะยืดหยุ่นของเจลมีค่าต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากสตาร์ชถั่วเขียวซึ่งมีปริมาณอะมิโลสสูง เมื่อผ่านการเจลาทิไนเซชันพบว่าสายโมเลกุลอะมิโลสสามารถหลุดออกมาอยู่ในสารละลายได้มาก และเมื่อลดอุณหภูมิของสารละลายลงจึงสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างสายโมเลกุลอะมิโลส หรืออะมิโลสกับอะมิโลเพคติน หรืออะมิโลส/อะมิโลเพคตินกับเม็ดสตาร์ช ได้มากขึ้น (Balliaderis and Julino, 1993; Lii *et al.*, 1995 and Tsai *et al.*, 1997) จึงส่งเสริมให้เจลของสตาร์ชถั่วเขียวมีความแข็งแรงกว่าเจลของสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าว

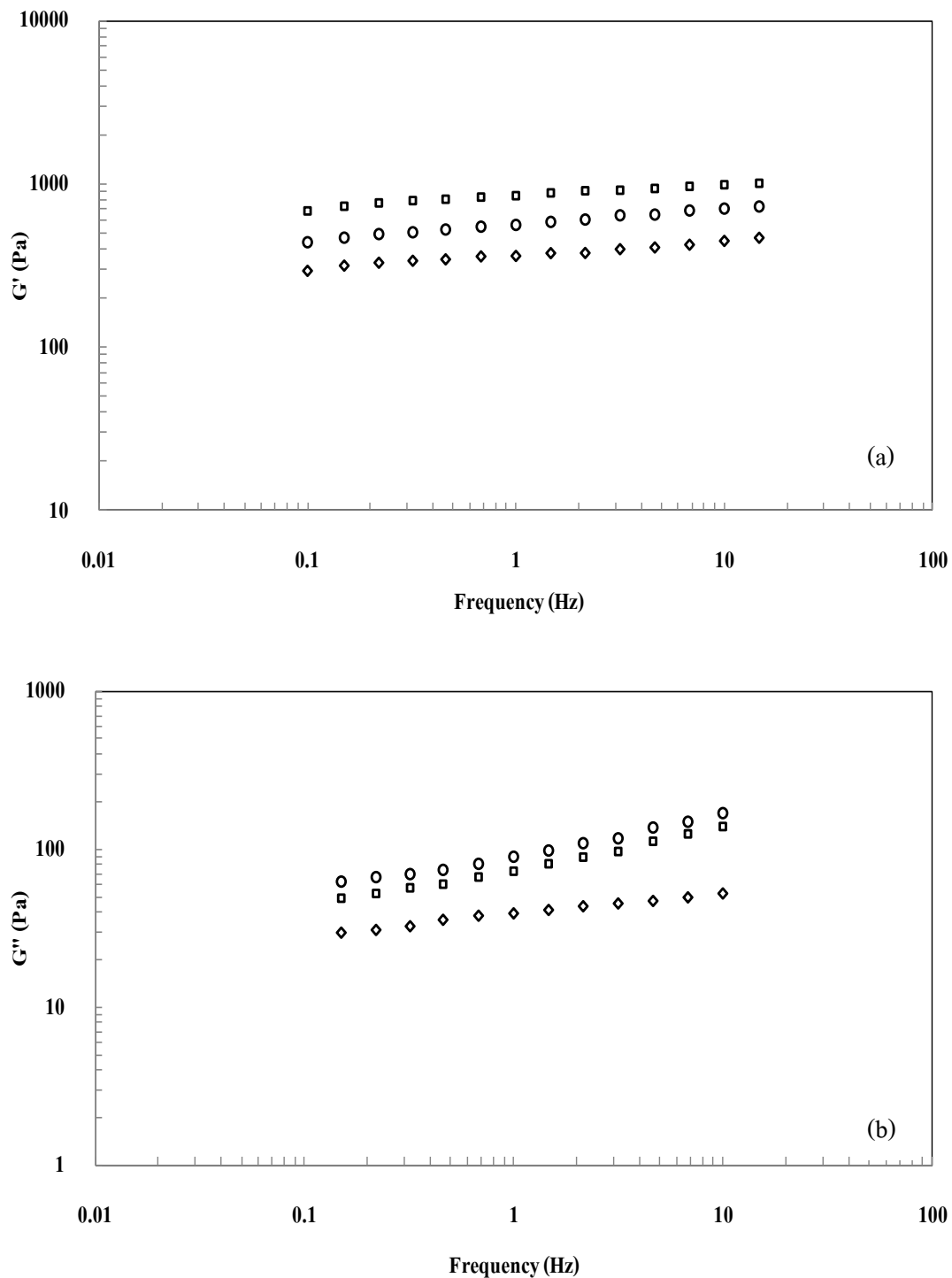


Figure 9 Effect of frequency on  $G'$  (a) and  $G''$  (b) of 8% starch paste starches from rice ( $\diamond$ ), jackfruit seed ( $\circ$ ) and mung bean ( $\square$ ). All samples were measured at 25°C and 0.1-100 Hz.

Table 11 Viscoelastic parameters of starches from rice, jackfruit seed and mung bean at concentration of 8% (w/w) and at 1 Hz.

Starch	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan $\delta$
Rice	372.37 <sup>c</sup> ± 10.33	34.33 <sup>b</sup> ± 2.14	0.10 <sup>b</sup> ± 0.01
Jackfruit seed	556.33 <sup>b</sup> ± 22.82	77.43 <sup>a</sup> ± 0.29	0.14 <sup>a</sup> ± 0.01
Mung bean	879.80 <sup>a</sup> ± 28.65	75.03 <sup>a</sup> ± 0.68	0.08 <sup>c</sup> ± 0.00

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences (p<0.05).

## 5. การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว ด้วยวิธีการเกิดรีโทรเกรดชัน

### 5.1 ศึกษาระยะเวลาและความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ใช้ในการตัดสายกิ่ง

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ความเข้มข้น 5-40 หน่วยต่อกรัมสตาร์ช และระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งต่อระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชจากข้าว สตาร์ชจากเมล็ดขนุน และสตาร์ชจากถั่วเขียวแสดงดัง Table 12 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนส และระยะเวลาที่ใช้ตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสเพิ่มขึ้นจาก 5 หน่วยต่อกรัม เป็น 40 หน่วยต่อกรัม ที่ระยะเวลาตัดสายกิ่ง 36 ชั่วโมง ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชข้าวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 55.91 เป็นร้อยละ 99.65 ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชเมล็ดขนุนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 40.73 เป็นร้อยละ 96.19 และระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชถั่วเขียวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 53.18 เป็นร้อยละ 96.83 และเมื่อระยะเวลาตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้นจาก 4 ชั่วโมง เป็น 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนส 40 หน่วยต่อกรัม ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชข้าวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 71.76 เป็นร้อยละ 99.65 ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชเมล็ดขนุนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 62.41 เป็นร้อยละ 96.19 และระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชถั่วเขียวเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 46.38 เป็นร้อยละ 96.83 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาการตัดสายกิ่ง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์พุลูลานเนส ที่จะเข้าไปทำการย่อยตรงบริเวณที่เป็นสายกิ่งของอะมิโลเพคติน ( $\alpha$ -1, 6 glucosidic bond) ทำให้ได้พอลิเมอร์สายตรง (linear polymer) ของอะมิโลส (Tester *et al.*, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในสตาร์ชถั่ว

(González-Soto *et al.* 2004) สตาร์ชสาคุ (Leong *et al.*, 2007) สตาร์ชมันสำปะหลัง (Tongta and Kiatpongarp, 2009) สตาร์ชข้าว (Pongjanta *et al.*, 2009) และสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว (Miao, *et al.*, 2009) และเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของเอนไซม์พุลลูนาเนส และระยะเวลาการตัดสายกิ่งเท่ากัน พบว่าระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูนาเนสของสตาร์ชข้าว มีค่าสูงกว่าสตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดขนุน ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสตาร์ชข้าวมีปริมาณสายอะมิโลเพคตินที่เป็นสายสั้นซึ่งมีความยาวกลูโคสในช่วง DP 6-12 และ 13-24 มากกว่าสตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดขนุน นอกจากนี้พบว่าสตาร์ชข้าวมีค่าความแข็งแรงของเจล ( $G'$ ) ต่ำสุด (Table 11) จึงส่งผลให้เอนไซม์สามารถเข้าไปทำการย่อยได้ง่ายกว่า

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยพิจารณาค่า F-value (Table Appendix 1, 2, และ 3) พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์พุลลูนาเนสมีอิทธิพลต่อระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูนาเนส และระยะเวลาในการตัดสายกิ่งในสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว โดยระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูนาเนสที่ระยะเวลาการตัดสายกิ่ง 4-36 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของเอนไซม์พุลลูนาเนส และระยะเวลาการตัดสายกิ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูนาเนสอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตาม F-value ของปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์พุลลูนาเนส และระยะเวลาการตัดสายกิ่ง (C x D) ก็ยังมีอิทธิพลน้อยกว่าอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์พุลลูนาเนส หรือระยะเวลาการตัดสายกิ่งเพียงอย่างเดียว

Table 12 Effect of pullulanase concentration and debranching time on degree of pullulanase hydrolysis of starches from rice, jackfruit seed and mung bean.

Starch	Concentration (U/g starch)	Debranching Time (h)				
		4	12	24	36	48
Rice	5	30.90 <sup>Dd</sup> ± 0.38	38.22 <sup>Dc</sup> ± 0.37	48.78 <sup>Db</sup> ± 0.23	55.91 <sup>Da</sup> ± 0.51	56.22 <sup>Da</sup> ± 0.44
	15	54.58 <sup>Cd</sup> ± 0.45	60.04 <sup>Cc</sup> ± 0.42	63.82 <sup>Cb</sup> ± 0.84	64.05 <sup>Ca</sup> ± 0.15	65.38 <sup>Ca</sup> ± 0.43
	30	72.13 <sup>Bd</sup> ± 0.50	80.45 <sup>Bc</sup> ± 0.66	83.35 <sup>Bb</sup> ± 0.68	85.87 <sup>Ba</sup> ± 0.43	86.20 <sup>Ba</sup> ± 0.52
	40	71.76 <sup>Ad</sup> ± 0.26	87.41 <sup>Ac</sup> ± 0.78	99.02 <sup>Ab</sup> ± 0.08	99.65 <sup>Aa</sup> ± 0.15	99.78 <sup>Aa</sup> ± 0.17
Jackfruit seed	5	25.18 <sup>Dd</sup> ± 0.22	30.05 <sup>Dc</sup> ± 0.11	36.35 <sup>Db</sup> ± 0.59	40.73 <sup>Da</sup> ± 0.50	41.06 <sup>Da</sup> ± 0.80
	15	48.73 <sup>Cd</sup> ± 0.13	52.22 <sup>Cc</sup> ± 0.26	56.25 <sup>Cb</sup> ± 0.53	56.60 <sup>Ca</sup> ± 0.14	57.04 <sup>Ca</sup> ± 0.49
	30	62.11 <sup>Bd</sup> ± 0.34	65.78 <sup>Bc</sup> ± 0.61	67.00 <sup>Bb</sup> ± 0.57	83.44 <sup>Ba</sup> ± 0.55	83.78 <sup>Ba</sup> ± 0.14
	40	62.41 <sup>Ad</sup> ± 0.46	74.22 <sup>Ac</sup> ± 0.48	88.67 <sup>Ab</sup> ± 0.23	96.19 <sup>Aa</sup> ± 0.46	96.52 <sup>Aa</sup> ± 0.33
Mung bean	5	9.83 <sup>Dd</sup> ± 0.42	16.19 <sup>Dc</sup> ± 0.20	26.29 <sup>Db</sup> ± 0.74	53.18 <sup>Da</sup> ± 0.64	53.52 <sup>Da</sup> ± 0.43
	15	34.76 <sup>Cd</sup> ± 0.66	36.40 <sup>Cc</sup> ± 0.48	64.98 <sup>Cb</sup> ± 0.42	66.28 <sup>Ca</sup> ± 0.70	66.61 <sup>Ca</sup> ± 0.54
	30	44.26 <sup>Bd</sup> ± 0.11	57.04 <sup>Bc</sup> ± 0.17	76.94 <sup>Bb</sup> ± 0.34	80.56 <sup>Ba</sup> ± 0.59	80.90 <sup>Ba</sup> ± 0.67
	40	46.38 <sup>Ad</sup> ± 0.46	65.19 <sup>Ac</sup> ± 0.66	95.67 <sup>Ab</sup> ± 0.67	96.83 <sup>Aa</sup> ± 0.35	97.16 <sup>Aa</sup> ± 0.29

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The different capital letters within each column for each starch denote significant different ( $p < 0.05$ ). The different small letters within each row denote significant different ( $p < 0.05$ ).

รูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว กับเวลา ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 40 ยูนิตต่อกรัม แสดงดัง Figure 10 โดยพบว่าระดับการย่อยด้วยเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (two-stage pattern) โดยช่วงแรกสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดถูกย่อยด้วยเอนไซม์อย่างรวดเร็วภายในช่วง 4 ชั่วโมงแรก จากนั้นการย่อยดำเนินไปอย่างช้าๆ จนเข้าสู่สมดุล หลังจากระยะเวลาการตัดสายกิ่งผ่านไป 36 ชั่วโมง โดยมีระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสสูงสุดสำหรับสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว เท่ากับร้อยละ 99.65, 96.19 และ 96.83 ตามลำดับ วรวิภัตยา เกียรติพงษ์ลักษณ์ และสุนันทา ทองทา (2550) ได้ศึกษาการตัดสายกิ่งสตาร์ชมันสำปะหลังพบว่าเมื่อระยะเวลาการตัดสายกิ่งเพิ่มขึ้น ระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสมีค่าเพิ่มขึ้น โดยมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 12 และหลังจากการตัดสายกิ่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับการย่อยไม่แสดงความแตกต่างในทุกสภาวะการย่อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ González-Soto และคณะ (2004) ที่ศึกษาในสตาร์ชกล้วย และ Guraya และคณะ (2001) ที่ศึกษาในสตาร์ชข้าวเหนียวข้าวเจ้า โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ

จากการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสเพิ่มขึ้นภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาการย่อยนานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสของสตาร์ชแต่ละชนิด ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการตัดสายกิ่ง พบว่าสตาร์ชข้าวมีระดับการย่อยสูงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาการตัดสายกิ่งนานกว่า 12 ชั่วโมง ค่าระดับการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชถั่วเขียวมีแนวโน้มสูงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสและระยะเวลาการตัดสายกิ่งต่อระดับการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส ได้เลือกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสที่ 40 ยูนิตต่อกรัม และระยะเวลาการตัดสายกิ่ง 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งที่สตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีระดับการย่อยสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

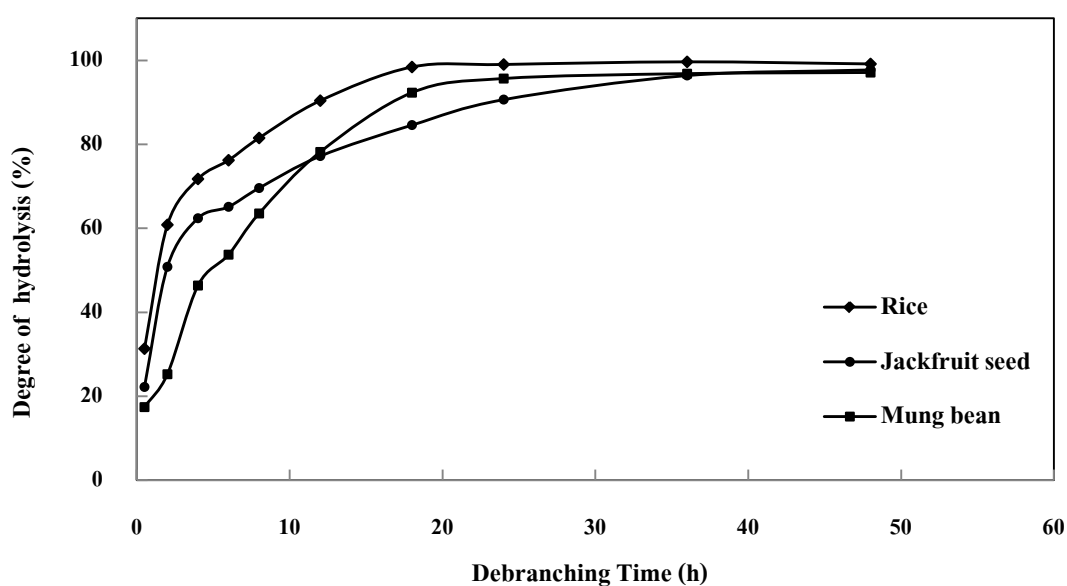


Figure 10 Effect of debranching time on degree of pullulanase hydrolysis (%) of starches from rice, jackfruit seed and mung bean at enzyme concentration 40 U/g starch.

## 5.2 ลักษณะทางโครงสร้าง

จากการตรวจสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่ง (ระยะเวลาการตัดสายกิ่ง 36 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนส 40 (ยูนิตต่อกรัม) ซึ่งเป็นสถานะที่สตาร์ชมีระดับการย่อยสูงสุด) และผ่านการเกิดรีโทรเกรดชันที่อุณหภูมิ 4°C โดยมีระยะเวลาการเก็บรักษา 0, 1, 3, 6, 10 และ 15 วัน (Figure 11)

พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 วัน สตาร์ชทั้ง 3 ชนิด ปรากฏพีคที่มุม 14.4, 17.2, 19.5, 22.2 และ 24.0° (2θ) ซึ่งมีรูปแบบโครงสร้างผลึกคล้ายคลึงกับแบบ B โดยเปลี่ยนจากรูปแบบโครงสร้างผลึกแบบ A ของสตาร์ชดิบ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นพบว่าลักษณะโครงสร้างผลึกมีการพัฒนามากขึ้น โดยพีคมีลักษณะเด่นชัดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว (Miao *et al.*, 2009) สตาร์ชสาเก (Leong *et al.*, 2007) และสตาร์ชมันสำปะหลัง (Tongta and Kiatpongarp, 2009) ซึ่งพบว่าสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ รูปแบบโครงสร้างผลึกเปลี่ยนจากแบบ A เป็นแบบ B นอกจากนี้ Pongjanta และคณะ (2009) ได้รายงานว่าสตาร์ชข้าวทางการค้า เมื่อผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 4°C เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง พบว่ารูปแบบโครงสร้างผลึกมีการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบ V การเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้างผลึกนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา โดยรูปแบบโครงสร้างผลึกแบบ B สามารถเกิดที่อุณหภูมิการเก็บรักษาต่ำ เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาของสายโมเลกุลเป็นโครงสร้างแบบเกลียวคู่ (double helices) ที่มีการจัดเรียงโครงสร้างแบบ hexagonal ซึ่งสามารถเกิดที่อุณหภูมิต่ำ และมีการใช้พลังงานกระตุ้นน้อย (Eerlingen *et al.*, 1993)

จากผลการศึกษาปริมาณผลึก (crystallinity) พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณผลึกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) แสดงดัง Table 13 Figure 11 โดยพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 21.71 เป็นร้อยละ 25.06 ในสตาร์ชข้าว เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 19.90 เป็นร้อยละ 25.05 ในสตาร์ชเมล็ดขนุน และเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 18.93 เป็นร้อยละ 28.22 ในสตาร์ชถั่วเขียว เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจาก 1 วัน เป็น 15 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eerlingen และคณะ 1993 พบว่าสตาร์ชข้าวสาลีที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 0°C ปริมาณผลึกมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าปริมาณผลึกที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาเป็นผลจากการเกิดอันตรกิริยาของสายโมเลกุลอะมิโลสและ/หรืออะมิโลเพคตินเป็นโครงสร้างแบบเกลียวคู่ (double helix) และโครงสร้างแบบเกลียวคู่เกิดการรวมกลุ่มกันเป็นโครงร่างสามมิติที่มีความแข็งแรง (Miles *et al.*, 1985; Orford *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1989; Gidley, 1989) Fredriksson และคณะ (1998) และ Miles และคณะ (1985) รายงานว่า กระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ 1) ระยะสั้น เป็นการเกิดผลึกเนื่องจากปริมาณอะมิโลส ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ภายในไม่กี่ชั่วโมง และ 2) ระยะยาว เป็นการเกิดผลึกเนื่องจากปริมาณอะมิโลเพคติน ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ระหว่างการเก็บรักษาสตาร์ช เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลึกระหว่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษานาน 15 วัน พบว่าสตาร์ชข้าวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีปริมาณผลึกต่ำกว่า สตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดขนุน ตามลำดับ



ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสตาร์ชข้าวมีปริมาณสายอะมิโลเพคตินที่เป็นสายสั้น ซึ่งมีความยาวกลูโคสในช่วง DP 6-12 มากกว่าสตาร์ชถั่วเขียว และสตาร์ชเมล็ดขนุน ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาของสายโมเลกุลไปเป็นโครงสร้างแบบเป็นเกลียวคู่เพื่อพัฒนาเป็นโครงสร้างผลึกนั้น ความยาวของสายอะมิโลเพคตินต้องมีความยาวกลูโคสมากกว่า 10 หน่วยขึ้นไป (Levine and Slade, 1986; Gidly and Bulpin, 1987; Shi and Seib, 1992) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณผลึกที่เกิดจากกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชัน อาจเป็นผลมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาณอะมิโลสและ / หรือปริมาณอะมิโลเพคติน ความเข้มข้นของสตาร์ช ระยะเวลา และอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา (Lu *et al.*, 1997)

Table 13 Crystallinity of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean at various storage times.

Storage Time (day)	Relative Crystallinity (%)		
	Rice	Jackfruit seed	Mung bean
1	21.71 <sup>d</sup> ± 0.27	19.90 <sup>d</sup> ± 0.40	21.71 <sup>d</sup> ± 0.68
3	22.25 <sup>c</sup> ± 0.40	22.99 <sup>c</sup> ± 0.45	20.42 <sup>c</sup> ± 0.76
6	22.57 <sup>bc</sup> ± 0.28	23.59 <sup>bc</sup> ± 0.76	21.65 <sup>bc</sup> ± 0.86
10	22.67 <sup>b</sup> ± 0.24	24.54 <sup>b</sup> ± 0.91	22.64 <sup>b</sup> ± 0.81
15	25.06 <sup>a</sup> ± 0.14	28.26 <sup>a</sup> ± 0.12	26.98 <sup>a</sup> ± 0.85

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences (p<0.05).

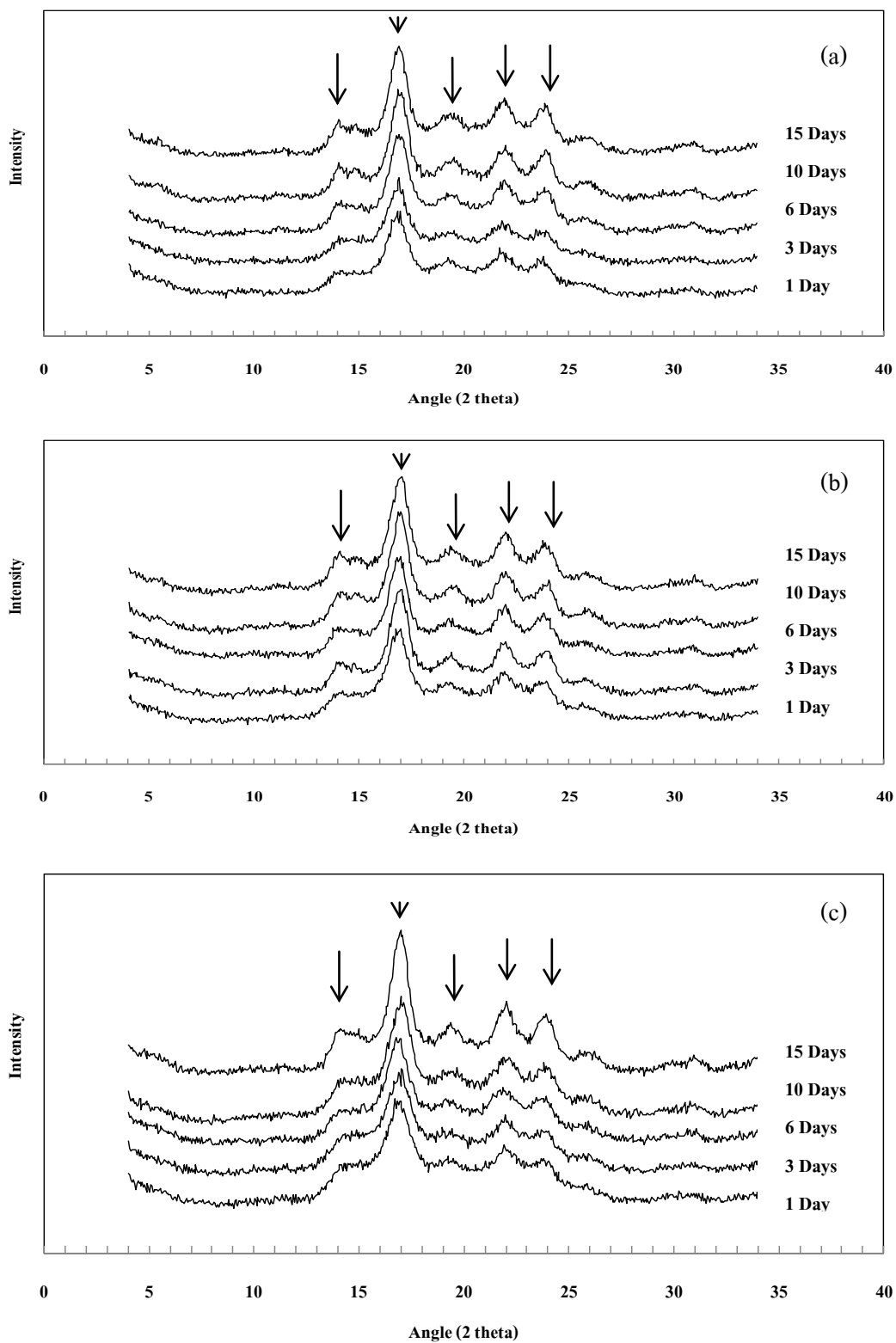


Figure 11 Crystallinity pattern of retrograded starches from rice (a), jackfruit seed (b) and mung bean (c) at various storage times.

### 5.3 คุณสมบัติทางความร้อน (thermal properties)

จากการศึกษาคุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งและผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดแสดงพีคที่มีลักษณะดูดความร้อน (endotherm) และเมื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น อุณหภูมิเริ่มต้นการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_o$ ) อุณหภูมิสุดท้ายของการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $T_c$ ) และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาทีไนเซชัน ( $\Delta H$ ) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แสดงดัง Table 14 ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าเป็นผลจากการจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึกใหม่เพิ่มมากขึ้นระหว่างกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชัน เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น (Table 2) ดังนั้นจึงต้องใช้พลังงานมากขึ้นในการหลอมละลายโครงสร้างของผลึกที่เกิดขึ้นใหม่ (Bello-Perez *et al.*, 1998) สอดคล้องกับการศึกษาของ Chung และคณะ (2006) ที่พบวาค่า  $\Delta H$  ของสตาร์ชข้าวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา  $4^{\circ}\text{C}$  มีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น เมื่อพิจารณาค่า  $\Delta H$  ของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 15 วัน พบว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่า  $\Delta H$  เท่ากับ 11.61 (J/g) ซึ่งสูงกว่าสตาร์ชถั่วเขียว (6.80 J/g) และสตาร์ชข้าว (5.69 J/g) โดยสอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณผลึก ดัง Table 13 นอกจากนี้พบว่าค่า  $T_o$  ของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่าสูงกว่าสตาร์ชดิบมาก ( $30\text{-}70^{\circ}\text{C}$ ) แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึกใหม่ และมีปริมาณผลึกเพิ่มขึ้น ทำให้โครงสร้างของสตาร์ชมีความแข็งแรงมากขึ้น เนื่องจากสตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกิ่งและผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีการจัดเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโมเลกุลของโพลีเมอร์สายตรง (สายอะมิโลส) เกิดเป็นโครงสร้างแบบเกลียวคู่ (double helix) ซึ่งโครงสร้างแบบเกลียวคู่นี้เกิดขึ้นจำนวนมาก จนสามารถเกิดการรวมกลุ่มกันเป็นโครงร่างสามมิติที่มีความแข็งแรง ส่งผลให้อุณหภูมิการเกิดเจลาทีไนเซชันของสตาร์ชสูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ต้องผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน โดยจะยังคงรักษาลักษณะทางโครงสร้างของสตาร์ชไว้ได้ (Lehmann *et al.*, 2002) สำหรับสตาร์ชดิบนั้นมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างเป็นแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline) โดยโมเลกุลของสายอะมิโลสและอะมิโลเพคตินเกิดการจัดเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างส่วนผลึกและส่วนอสัณฐานสลับชั้นกันอยู่ภายในเม็ดสตาร์ช ซึ่งมีผลให้อุณหภูมิการเกิดเจลาทีไนเซชันของสตาร์ชดิบมีค่าต่ำกว่าสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน

Table 14 Gelatinization parameters of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean at various storage times.

Starch	Storage Time (day)	Gelatinization temperature (°C)			Enthalpy ( $\Delta H$ ) (J/g)
		To	Tp	Tc	
Rice	1	119.71 <sup>c</sup> ± 0.53	120.75 <sup>c</sup> ± 0.63	121.19 <sup>c</sup> ± 0.91	2.31 <sup>c</sup> ± 0.20
	3	123.07 <sup>b</sup> ± 1.72	123.71 <sup>bc</sup> ± 0.24	124.81 <sup>b</sup> ± 0.09	2.52 <sup>c</sup> ± 0.15
	6	123.13 <sup>b</sup> ± 1.14	123.42 <sup>b</sup> ± 2.00	124.17 <sup>b</sup> ± 1.89	2.79 <sup>c</sup> ± 0.29
	10	123.50 <sup>b</sup> ± 2.14	123.86 <sup>b</sup> ± 2.13	124.47 <sup>b</sup> ± 2.14	3.81 <sup>b</sup> ± 0.53
	15	128.32 <sup>a</sup> ± 1.01	129.33 <sup>a</sup> ± 1.54	130.41 <sup>a</sup> ± 2.03	5.69 <sup>a</sup> ± 0.67
Jackfruit seed	1	122.19 <sup>b</sup> ± 0.94	123.78 <sup>b</sup> ± 0.42	126.39 <sup>b</sup> ± 1.13	2.28 <sup>d</sup> ± 0.86
	3	130.85 <sup>a</sup> ± 2.36	131.75 <sup>a</sup> ± 2.04	132.98 <sup>a</sup> ± 1.74	6.18 <sup>c</sup> ± 1.54
	6	131.67 <sup>a</sup> ± 3.47	132.83 <sup>a</sup> ± 3.17	134.07 <sup>a</sup> ± 3.28	8.88 <sup>b</sup> ± 0.83
	10	133.69 <sup>a</sup> ± 0.91	135.06 <sup>a</sup> ± 1.67	136.23 <sup>a</sup> ± 2.14	9.76 <sup>b</sup> ± 0.21
	15	134.15 <sup>a</sup> ± 1.75	135.00 <sup>a</sup> ± 1.04	135.73 <sup>a</sup> ± 0.76	11.61 <sup>a</sup> ± 0.36
Mung bean	1	117.52 <sup>c</sup> ± 1.97	118.44 <sup>b</sup> ± 1.85	119.37 <sup>b</sup> ± 1.87	3.49 <sup>b</sup> ± 0.12
	3	118.53 <sup>bc</sup> ± 0.54	121.13 <sup>ab</sup> ± 0.63	123.66 <sup>ab</sup> ± 0.46	3.86 <sup>b</sup> ± 0.85
	6	119.73 <sup>abc</sup> ± 2.42	120.89 <sup>ab</sup> ± 2.69	122.03 <sup>a</sup> ± 2.94	4.82 <sup>b</sup> ± 0.05
	10	121.29 <sup>ab</sup> ± 1.28	122.39 <sup>a</sup> ± 1.55	122.92 <sup>a</sup> ± 1.09	5.10 <sup>ab</sup> ± 1.80
	15	122.69 <sup>a</sup> ± 1.98	123.50 <sup>a</sup> ± 1.56	124.24 <sup>a</sup> ± 1.61	6.80 <sup>a</sup> ± 0.98

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column for each starch denote the significant differences ( $p < 0.05$ )

#### 5.4 ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch content)

จากการศึกษาปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งและผ่านการเกิดรีโทรเกรดชัน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (Table 15) สอดคล้องกับการศึกษาในสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียว (Miao *et al.*, 2009) และสตาร์ชข้าวโพด (Zhou *et al.*, 2013) ที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรด-

ชั้นที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 4°C โดยพบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ มีค่าสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าวมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 10.52 เป็นร้อยละ 24.65 สตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.10 เป็นร้อยละ 27.66 และสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3.90 เป็นร้อยละ 32.58 เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจาก 1 วันเป็น 15 วัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณผลึกที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (Table 2) Shi และคณะ (2013) รายงานว่าสตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส และผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณผลึกเพิ่มขึ้น และมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้พบว่าในระหว่างการเก็บรักษา (3-15 วัน) สตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าว ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากปริมาณอะมิโลส เนื่องจากสตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณอะมิโลสสูงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุนและสตาร์ชข้าว ตามลำดับ ซึ่งสตาร์ชที่มีปริมาณอะมิโลสสูงส่งผลให้โครงสร้างภายหลังการเกิดรีโทรเกรเดชันมีความแข็งแรงมากขึ้น (ปิยรัตน์ หนูสุก, 2546) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าวและสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ระยะเวลา 15 วัน มีค่ามากกว่าของสตาร์ชดิบ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเกิดอันตรกิริยาของโพลีเมอร์สายตรงเกิดเป็นโครงร่างสามมิติที่มีความแข็งแรง ส่งผลให้สตาร์ชสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้น สำหรับสตาร์ชเมล็ดขนุนเมื่อผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ระยะเวลา 15 วัน พบว่าปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าสูงกว่าของสตาร์ชดิบเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างของเมล็ดสตาร์ชดิบตามธรรมชาติไม่มีช่องเปิดให้เอนไซม์เข้าไป และโครงสร้างภายในมีการจัดเรียงตัวกันหนาแน่น จึงทำให้ยากต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิการเกิดเจลาทีไนเซชันของสตาร์ชเมล็ดขนุนที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่าสูงกว่าของสตาร์ชเมล็ดขนุนดิบถึง 1.5 เท่า ซึ่งทำให้สามารถทนต่อกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนได้มากกว่า

ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งและผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ระยะเวลาการเก็บรักษานานกว่า 3 วัน จัดอยู่ในกลุ่มของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในระดับสูงมาก (very high) และจัดเป็นสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ประเภทที่ 3 (RS type 3) Silverio และคณะ (2000) และ Ozturk และคณะ (2009) ได้รายงานว่าการเพิ่มปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันเป็นผลมาจากปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ความเข้มข้นของสตาร์ช อัตราส่วนของปริมาณอะมิโลสและอะมิโลเพคติน ความยาว

ของสายโมเลกุล (chain length) ของอะมิโลเพคติน และสภาวะการตัดสายกิ่งของอะมิโลเพคติน โดย Lin และ Chang (2006) ได้รายงานว่าการตัดสายกิ่งของอะมิโลเพคตินด้วยเอนไซม์พุลูลานเนสก่อนทำการรีโทรเกรเดชัน ส่งผลทำให้ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดที่ 3 (resistant starch type 3) เพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์พุลูลานเนสจะเข้าไปทำการย่อยตรงบริเวณที่เป็นสายกิ่งของอะมิโลเพคติน ( $\alpha$ -1, 6 glucosidic bond) ทำให้ได้พอลิเมอร์สายตรง (linear polymer) ของอะมิโลส ซึ่งสามารถจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างสามมิติ (three dimension network) ขณะสตาร์ชเกิดรีโทรเกรเดชัน เกิดเป็นโครงสร้างผลึกที่มีความแข็งแรงมากขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Guraya *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Ozturk และคณะ (2009) ได้รายงานว่าเมื่อระยะเวลาการตัดสายกิ่งนานขึ้น ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น ขณะที่ Pongjanta และคณะ (2009) ได้รายงานว่าความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสส่งผลต่อปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนส

Table 15 Resistant starch content of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean at various storage times.

Storage Time (day)	Resistant starch content (%)		
	Rice	Jackfruit seed	Mung bean
1	10.52 <sup>c</sup> ± 0.11	4.10 <sup>c</sup> ± 0.28	3.90 <sup>d</sup> ± 0.27
3	14.50 <sup>d</sup> ± 0.27	16.61 <sup>d</sup> ± 0.36	26.65 <sup>c</sup> ± 0.13
6	21.71 <sup>c</sup> ± 0.09	21.35 <sup>c</sup> ± 0.11	27.95 <sup>b</sup> ± 0.09
10	22.69 <sup>b</sup> ± 0.08	25.99 <sup>b</sup> ± 0.25	28.12 <sup>b</sup> ± 0.50
15	24.65 <sup>a</sup> ± 0.13	27.66 <sup>a</sup> ± 0.23	32.58 <sup>a</sup> ± 0.32

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences ( $p < 0.05$ )

## 6. การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองกระเพาะอาหาร และค่าได้เล็กของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

จากการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในระบบทางเดินอาหารของตัวอย่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน โดยแสดงผลร้อยละการย่อย (% Hydrolysis) ที่เวลาต่างๆ ดัง Figure 12-14 จาก โดย Figure 12 และ

Table 16 เป็นการทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human saliva  $\alpha$ -amylase เป็นระยะเวลา 120 นาที ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการย่อยที่เกิดในปาก โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ดังนี้ คือ 0, 1, 5, 15, 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าการย่อยตัวอย่างด้วยเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (two-stage pattern) โดยภายใน 60 นาทีแรก สตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีระดับการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนเข้าสู่สมดุล โดยสตาร์ชข้าว สตาร์ชถั่วเขียว และ สตาร์ชเมล็ดขนุน ที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน มีระดับการย่อยสูงสุด เท่ากับร้อยละ 1.81, 1.24 และ 0.50 ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าตัวอย่างสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีระดับการย่อยต่ำกว่าอินนูลิน ซึ่งเป็นพรีไบโอติกทางการค้าที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์อาหาร โดย Wichienchot และคณะ (2010) พบว่าเมื่อย่อยอินนูลินด้วยเอนไซม์ human saliva  $\alpha$ -amylase ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 30 นาที (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ เท่ากับ 1 unit/ml) มีระดับการย่อยสูงสุดของอินนูลิน เท่ากับร้อยละ 12.32 ขณะที่สันต วิเชียร โขติ และคณะ (2553) ได้รายงานว่าเมื่อย่อยสารสกัดจากเนื้อขนุนด้วยเอนไซม์ human saliva  $\alpha$ -amylase พบว่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 15 นาทีแรก จากนั้นระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงนาทีที่ 30 โดยมีระดับการย่อยสูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 7.68

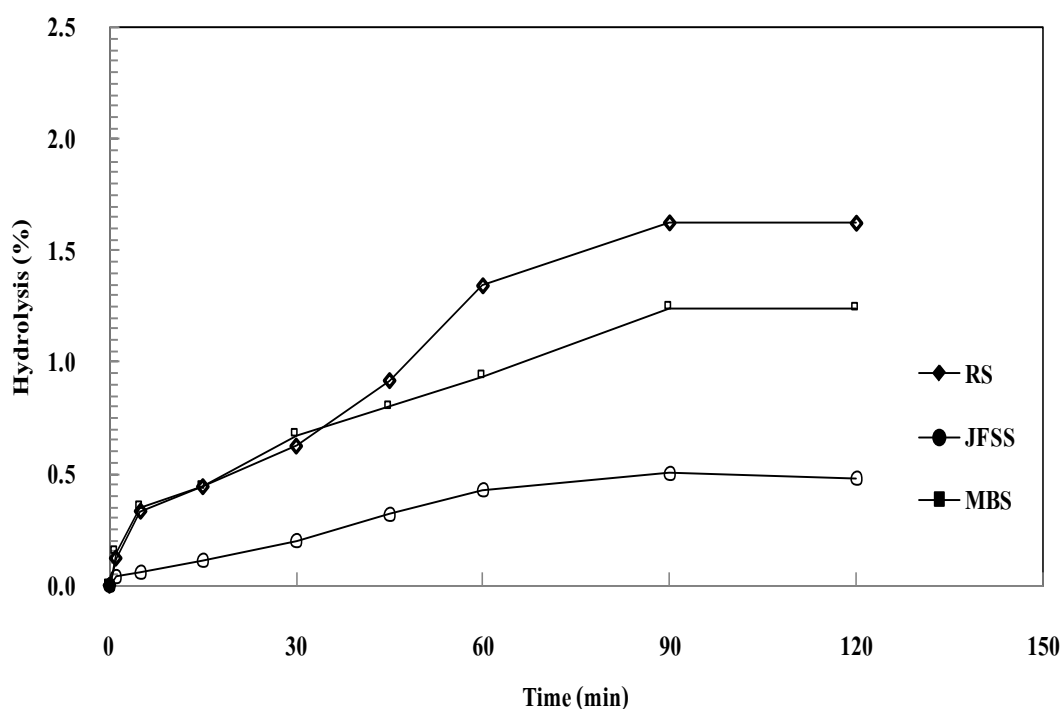


Figure 12 Enzyme (human saliva  $\alpha$ -amylase) hydrolysis of retrograded starches from rice (RS), jackfruit seed (JFSS) and mung bean (MBS).

Table 16 Hydrolysis of retrograded starches from rice, jackfruit seed and mung bean of *in vitro* upper simulate artificial tract.

Artificial tract	Time (min)	Degree of hydrolysis (%)		
		Rice starch	Jackfruit seed starch	Mung bean starch
Mouth	0	0.00 <sup>g</sup> ± 0.00	0.00 <sup>e</sup> ± 0.00	0.00 <sup>f</sup> ± 0.00
	1	0.12 <sup>fg</sup> ± 0.03	0.04 <sup>e</sup> ± 0.01	0.15 <sup>f</sup> ± 0.03
	5	0.33 <sup>ef</sup> ± 0.06	0.06 <sup>e</sup> ± 0.04	0.35 <sup>ef</sup> ± 0.02
	15	0.44 <sup>dc</sup> ± 0.05	0.11 <sup>dc</sup> ± 0.06	0.44 <sup>dc</sup> ± 0.05
	30	0.62 <sup>d</sup> ± 0.04	0.20 <sup>cd</sup> ± 0.10	0.68 <sup>de</sup> ± 0.03
	45	0.89 <sup>c</sup> ± 0.04	0.32 <sup>bc</sup> ± 0.05	0.80 <sup>cd</sup> ± 0.04
	60	1.34 <sup>b</sup> ± 0.04	0.43 <sup>ab</sup> ± 0.04	0.94 <sup>bc</sup> ± 0.05
	90	1.62 <sup>a</sup> ± 0.02	0.48 <sup>a</sup> ± 0.07	1.17 <sup>ab</sup> ± 0.04
	120	1.81 <sup>a</sup> ± 0.04	0.50 <sup>a</sup> ± 0.09	1.24 <sup>a</sup> ± 0.05
Stomach	0	0.00 <sup>b</sup> ± 0.00	0.00 <sup>a</sup> ± 0.00	0.00 <sup>a</sup> ± 0.00
	30	0.02 <sup>b</sup> ± 0.01	0.04 <sup>a</sup> ± 0.02	0.06 <sup>a</sup> ± 0.01
	60	0.05 <sup>b</sup> ± 0.02	0.07 <sup>a</sup> ± 0.06	0.13 <sup>a</sup> ± 0.01
	90	0.12 <sup>ab</sup> ± 0.06	0.13 <sup>a</sup> ± 0.04	0.16 <sup>a</sup> ± 0.01
	120	0.20 <sup>a</sup> ± 0.01	0.19 <sup>a</sup> ± 0.09	0.18 <sup>a</sup> ± 0.01
	180	0.22 <sup>a</sup> ± 0.07	0.22 <sup>a</sup> ± 0.08	0.20 <sup>a</sup> ± 0.01
	240	0.22 <sup>a</sup> ± 0.02	0.22 <sup>a</sup> ± 0.04	0.20 <sup>a</sup> ± 0.01
Small intestine	0	0.00 <sup>e</sup> ± 0.00	0.00 <sup>e</sup> ± 0.00	0.00 <sup>e</sup> ± 0.00
	30	1.72 <sup>d</sup> ± 0.05	1.17 <sup>d</sup> ± 0.15	0.67 <sup>d</sup> ± 0.02
	60	3.12 <sup>c</sup> ± 0.04	1.68 <sup>cd</sup> ± 0.11	1.01 <sup>c</sup> ± 0.05
	90	3.47 <sup>c</sup> ± 0.07	2.12 <sup>bc</sup> ± 0.11	1.28 <sup>bc</sup> ± 0.03
	120	4.14 <sup>b</sup> ± 0.02	2.50 <sup>b</sup> ± 0.16	1.53 <sup>ab</sup> ± 0.03
	180	5.20 <sup>a</sup> ± 0.03	3.32 <sup>a</sup> ± 0.22	1.58 <sup>ab</sup> ± 0.05
	240	5.69 <sup>a</sup> ± 0.09	3.43 <sup>a</sup> ± 0.15	1.71 <sup>a</sup> ± 0.02
	300	5.85 <sup>a</sup> ± 0.03	3.58 <sup>a</sup> ± 0.15	1.84 <sup>a</sup> ± 0.04
	360	5.85 <sup>a</sup> ± 0.09	3.57 <sup>a</sup> ± 0.13	1.83 <sup>a</sup> ± 0.03

Note: Each value is mean of triplicate  $\pm$  SD. The difference superscripts in each column for each starch denote the significant differences ( $p < 0.05$ )



เมื่อทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยกรด (HCl buffer, พีเอช 2) ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการย่อยที่เกิดในกระเพาะอาหาร เป็นระยะเวลา 240 นาที โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที พบว่ารูปแบบการย่อยด้วยกรดของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน แสดงดัง Figure 13 และ Table 16 โดยพบว่าความสามารถในการถูกย่อยด้วยกรดแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (two-stage pattern) เช่นเดียวกับรูปแบบการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ human saliva  $\alpha$ -amylase ซึ่งตัวอย่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่าระดับการย่อยด้วยกรดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 120 นาทีแรก จากนั้นระดับการย่อยเริ่มเข้าสู่สมดุล โดยสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน มีระดับการย่อยสูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.22, 0.22 และ 0.20 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยกรดได้สูง Mun และ Shin (2006) ได้ทำการศึกษาสตาร์ชข้าวโพดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าความสามารถในการถูกย่อยด้วยกรด(HCl 0.1 M) แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน (three-stage pattern) โดยสตาร์ชข้าวโพดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ภายใน 7 วันแรก มีระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 10 วัน จากนั้นการย่อยเริ่มเข้าสู่สมดุล เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อการย่อยด้วยกรดของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันกับโอลิโกแซคคาไรด์อื่นๆ พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันนี้มีระดับการย่อยด้วยกรดในกระเพาะต่ำกว่า Gluco-oligosaccharide ที่ผลิตโดย *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร และโอลิโกแซคคาไรด์จากจากเนื้อขนุน ซึ่งมีระดับการย่อยสูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.6, 2.43 และ 33.03 (Wichienchot *et al.*, 2006; Wichienchot *et al.*, 2010; สันตติวิเชียร โชติ และคณะ, 2553)

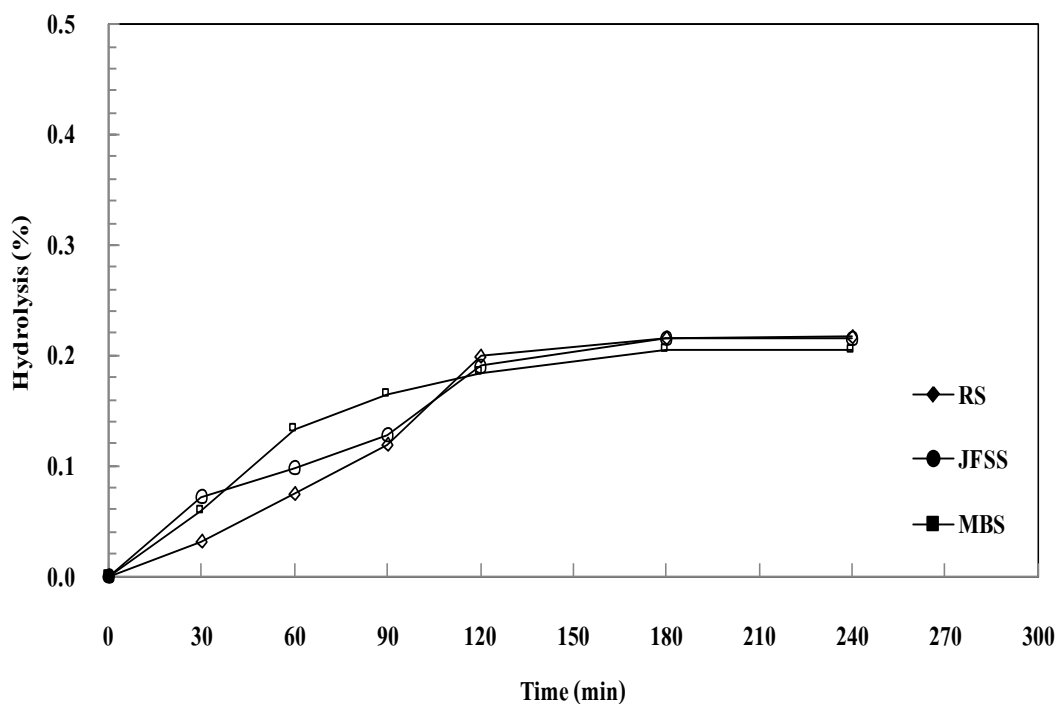


Figure 13 Acid hydrolysis of retrograded starches from rice (RS), jackfruit seed (JFSS) and mung bean (MBS).

เมื่อทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการย่อยที่เกิดในลำไส้เล็ก เป็นระยะเวลา 360 นาที โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที พบว่ารูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase ของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดเดชัน แสดงดัง Figure 14 และ Table 16 โดยพบว่าความสามารถในการย่อยด้วยเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (two-stage pattern) เช่นเดียวกับรูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์ human saliva  $\alpha$ -amylase และการย่อยด้วยกรด ซึ่งสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดเดชันมีระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 180 นาทีแรก จากนั้นระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนเข้าสู่สมดุล โดยมีระดับการย่อยสูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.85, 3.57 และ 1.83 ตามลำดับ Gonzalez-Soto และคณะ (2007) ได้รายงานไว้เมื่อเปรียบเทียบสตาร์ชกล้วยดิบ และสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดเดชันที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ระดับการย่อยด้วยเอนไซม์ hog pancreatic  $\alpha$ -amylase ลดลงจากร้อยละ 75 เป็นร้อยละ 35 เมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชกล้วยดิบนอกจากนั้น Cui และ Oates (1997) พบว่าระดับการย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase ของสตาร์ชสาเกที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดเดชันที่อุณหภูมิ 5°C เป็นระยะเวลา 4 วัน มีค่าเท่ากับร้อยละ 41.5

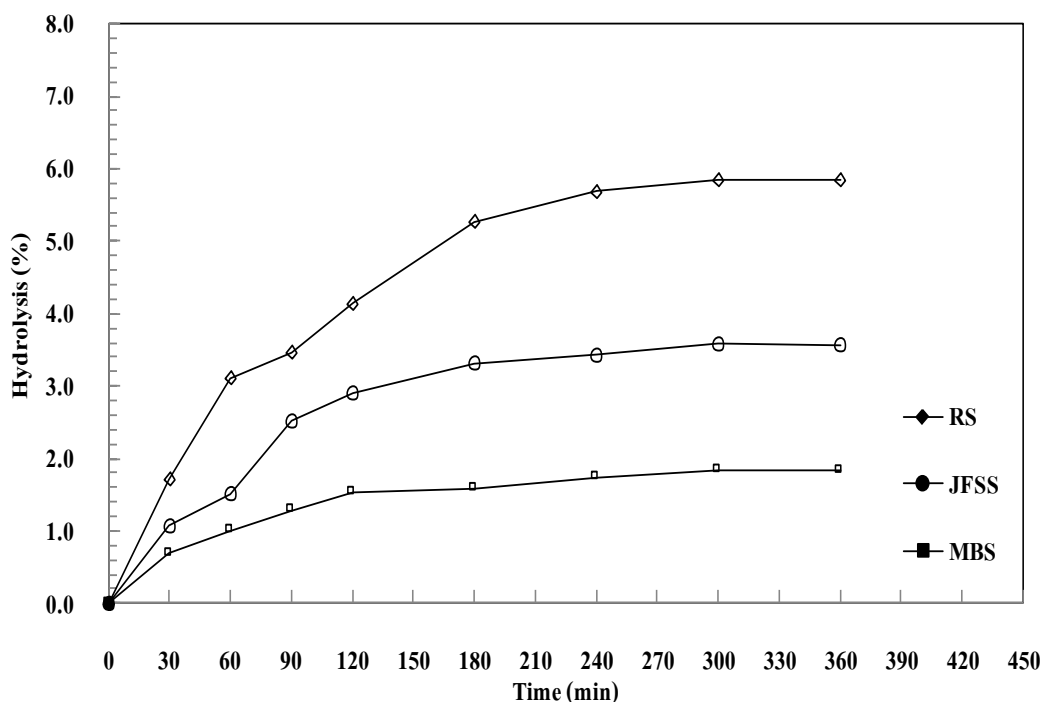


Figure 14 Enzyme (porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase) hydrolysis of of retrograded starches from rice (RS), jackfruit seed (JFSS) and mung bean (MBS).

จากการศึกษาคุณสมบัติฟรีไบโอติกเบื้องต้น โดยทดสอบในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนคือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก พบว่าสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว ที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีค่าระดับการย่อยรวมเท่ากับร้อยละ 6.01, 3.66 และ 2.07 ตามลำดับ (โดยคัดเลือกลักษณะจำลองในปากที่เวลา 1 นาที ลักษณะจำลองในกระเพาะอาหารที่เวลา 120 นาที และลักษณะจำลองในลำไส้เล็กที่เวลา 240 นาที) โดยมีค่าต่ำกว่าสตาร์ชดิบซึ่งมีค่าระดับการย่อยรวมเท่ากับร้อยละ 9.48, 9.84 และ 12.14 สำหรับสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว ตามลำดับ (ไม่แสดงข้อมูล) เนื่องจากโครงสร้างของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน จึงทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ยากขึ้น นอกจากนี้พบว่าสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชข้าว ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน มีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครงสร้างผลึกทำให้มีความแข็งแรงมากขึ้น จึงทำให้สตาร์ชถูกย่อยด้วยเอนไซม์และกรดได้ยากขึ้น เป็นผลให้มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Ring *et al.*, 1987; Mile *et al.*, 1985) นอกจากนั้นการทดลองสามารถอธิบายได้ว่ามีองค์ประกอบบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมโดยทางเดินอาหารส่วนต้น และมีโอกาสเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่าร้อยละ 90 จากการทดลองสามารถยืนยันเบื้องต้นได้ว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน มีคุณสมบัติ

เป็นพรีไบโอติกในแง่การต้านการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น และมีคุณสมบัติคล้ายกับใยอาหาร (dietary fiber) เนื่องจากมีองค์ประกอบที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนต้นได้มากกว่าร้อยละ 60 (Wichienchot *et al.*, 2010) โดย Cumming และคณะ (2001) รายงานว่าโอลิโกฟรุคโตส (oligofructose) และอินนูลิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดี สามารถทนต่อการถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบน และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ถึงร้อยละ 85-89

## 7. การทดสอบความสามารถต่อการส่งเสริมการเจริญของพรีไบโอติก

### 7.1 การประเมินความเป็นพรีไบโอติกของสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันต่อการเจริญของจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์

ในการศึกษาระบบการหมักแบบกะ (batch culture) เพื่อประเมินความสามารถของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันและผ่านการย่อยภายใต้สภาวะจำลองในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็กต่อการส่งเสริมการเจริญ และการแข่งขันของแบคทีเรียที่มีประโยชน์โดยวัดเป็นค่าดัชนีพรีไบโอติก (Prebiotic Index; PI) การประเมินทำในถังหมักที่มีปริมาณของอาหารและสภาวะที่ใกล้เคียงกับสภาวะจริงในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย

ผลการทดสอบการหมักแบบกะ โดยใช้ตัวแทนเชื้อจากลำไส้ใหญ่มนุษย์คือใช้ fecal slurry จากอาสาสมัครเป็นเชื้อผสมเริ่มต้นในการหมักใช้สตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเก็บตัวอย่างที่เวลาที่ 0, 24 และ 48 ชั่วโมง มาตรวจนับการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) โดยนับแบคทีเรีย 5 กลุ่ม คือ *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* และ *Eubacterium* เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดสภาวะคงที่ (steady state) จากนั้นเริ่มป้อนสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันและไม่ผ่านการให้ความร้อน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างโดยนับเป็นเวลา 0 และทำการหมักต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง (Figure 15 และ Table 17) พบว่าปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ในตัวอย่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 48 ชั่วโมง โดยในสตาร์ชข้าวมีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* เพิ่มขึ้นจาก 6.91 log CFU/ml เป็น 7.37 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* เพิ่มขึ้นจาก 7.73 log CFU/ml เป็น 8.43 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroides* ลดลงจาก 7.88 log CFU/ml เป็น 7.61 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* ลดลงจาก 8.21 log CFU/ml เป็น 7.80 log CFU/ml และปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacterium* ลดลงจาก 9.14 log CFU/ml เป็น 8.59 log CFU/ml ในขณะที่

ที่สตาร์ชเมล็ดขนุน มีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* เพิ่มขึ้นจาก 6.80 log CFU/ml เป็น 7.22 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* เพิ่มขึ้นจาก 7.98 log CFU/ml เป็น 8.30 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroides* ลดลงจาก 6.73 log CFU/ml เป็น 6.48 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* ลดลงจาก 8.10 log CFU/ml เป็น 7.89 log CFU/ml และปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacterium* ลดลงจาก 8.96 log CFU/ml เป็น 8.38 log CFU/ml นอกจากนี้ในสตาร์ชถั่วเขียว มีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* เพิ่มขึ้นจาก 6.76 log CFU/ml เป็น 7.08 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* เพิ่มขึ้นจาก 8.12 log CFU/ml เป็น 8.43 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroides* ลดลงจาก 6.68 log CFU/ml เป็น 6.60 log CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* ลดลงจาก 8.14 log CFU/ml เป็น 7.88 log CFU/ml และปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacterium* ลดลงจาก 8.69 log CFU/ml เป็น 8.05 log CFU/ml ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Wichienchot และคณะ (2010) พบว่าในสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร มีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *L. delbrueckii* BCC13296 เพิ่มขึ้นจาก  $9.02 \times 10^7$  cell/ml เป็น  $6.17 \times 10^9$  cell/ml เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 48 ชั่วโมง และปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium bifidum* NCIMB702715 เพิ่มขึ้นจาก  $1.70 \times 10^8$  cell/ml เป็น  $2.51 \times 10^9$  cell/ml เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 72 ชั่วโมง ขณะที่อินนูลินมีปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *L. delbrueckii* BCC13296 เพิ่มขึ้นจาก  $9.14 \times 10^7$  cell/ml เป็น  $8.24 \times 10^8$  cell/ml เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 48 ชั่วโมง และปริมาณแบคทีเรียในกลุ่ม *B. bifidum* NCIMB702715 เพิ่มขึ้นจาก  $1.23 \times 10^8$  cell/ml เป็น  $2.76 \times 10^9$  cell/ml เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 72 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองดังกล่าวเลี้ยงด้วยเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ข้างต้น และสอดคล้องกับการศึกษาจากสารสกัด Gluco-oligosaccharide ที่ผลิตโดย *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 (Wichienchot *et al.*, 2006) สารสกัดฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) เช่น อินนูลิน, โอลิโกฟรุคตอส, ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์, เจนทิโอโอลิโกแซคคาไรด์ (gentio-oligosaccharide), ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์, แลคโตซูโครส, แลคทูโลส, ราฟฟิโนส, โซโลโอลิโกแซคคาไรด์ และสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (soybean oligosaccharide) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* (Sako *et al.*, 1999) ได้

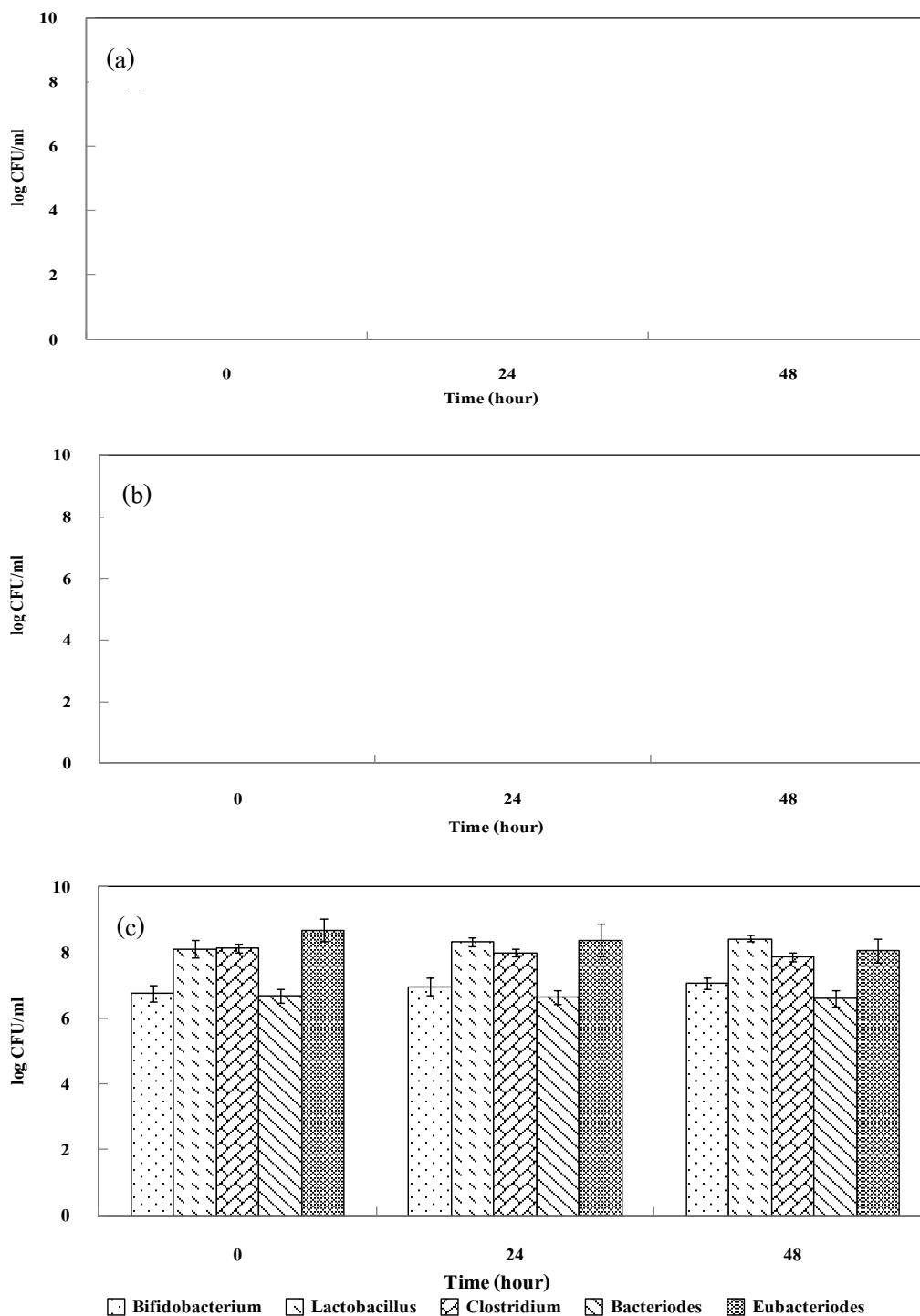


Figure 15 Bacterial populations (log CFU/ml) during fermentation at 0, 24 and 48 h using stirred pH-controlled batch cultures for retrograded starches from rice (a), jackfruit seed (b) and mung bean (c). Error bars represent standard error.

Table 17 Changes in bacterial populations during fermentation at 0, 24 and 48 h for different retrograded starches.

Bacteria Group	Rice starch			Jackfruit seed starch			Mung bean starch		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
<i>Bifidobacterium</i>	6.91 ± 0.28 <sup>c</sup>	7.16 ± 0.20 <sup>b</sup>	7.37 ± 0.15 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.25 <sup>b</sup>	6.95 ± 0.25 <sup>b</sup>	7.22 ± 0.14 <sup>a</sup>	6.76 ± 0.26 <sup>b</sup>	6.97 ± 0.27 <sup>a</sup>	7.08 ± 0.17 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus</i>	7.73 ± 0.12 <sup>c</sup>	8.22 ± 0.12 <sup>b</sup>	8.43 ± 0.06 <sup>a</sup>	7.98 ± 0.30 <sup>b</sup>	8.12 ± 0.13 <sup>b</sup>	8.30 ± 0.07 <sup>a</sup>	8.12 ± 0.26 <sup>b</sup>	8.33 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.43 ± 0.10 <sup>a</sup>
<i>Clostridium</i>	8.21 ± 0.13 <sup>c</sup>	8.01 ± 0.21 <sup>b</sup>	7.80 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.10 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.99 ± 0.12 <sup>b</sup>	7.89 ± 0.07 <sup>c</sup>	8.14 ± 0.14 <sup>a</sup>	7.99 ± 0.12 <sup>b</sup>	7.88 ± 0.13 <sup>c</sup>
<i>Bacteroides</i>	7.88 ± 0.13 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.19 <sup>b</sup>	7.61 ± 0.24 <sup>b</sup>	6.73 ± 0.31 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.19 <sup>ab</sup>	6.48 ± 0.26 <sup>b</sup>	6.68 ± 0.22 <sup>a</sup>	6.65 ± 0.22 <sup>a</sup>	6.60 ± 0.26 <sup>a</sup>
<i>Eubacterium</i>	9.14 ± 0.05 <sup>a</sup>	8.80 ± 0.25 <sup>b</sup>	8.59 ± 0.35 <sup>c</sup>	8.96 ± 0.12 <sup>a</sup>	8.52 ± 0.48 <sup>b</sup>	8.38 ± 0.29 <sup>b</sup>	8.69 ± 0.35 <sup>a</sup>	8.38 ± 0.49 <sup>b</sup>	8.05 ± 0.36 <sup>c</sup>

Note: Number is mean log CFU/ml of triplicate ± SD. The difference superscripts in each row denote the significant differences (p<0.05).

เมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ที่ระยะเวลาต่างๆ กันมาคำนวณค่าดัชนีความเป็นฟรีไบโอติก (PI) พบว่าในสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชัน มีค่า PI ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 0.17, 0.08 และ 0.07 ตามลำดับ ขณะที่เวลา 48 ชั่วโมง สตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีการเกิดรีโทรเกรดชัน มีค่า PI เพิ่มขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 0.27, 0.16 และ 0.12 ตามลำดับ (Figure 16) แสดงว่าสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชันมีคุณสมบัติในการเสริมการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ได้ดีกว่ากลุ่มแบคทีเรียที่มีโทษ โดยที่สตาร์ชข้าวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชันมีคุณสมบัติในการเป็นฟรีไบโอติกมากกว่าสตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชัน ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบค่า PI กับสารฟรีไบโอติกอื่นๆ ที่วิเคราะห์ในสภาวะแบบกะที่มีรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สตาร์ชข้าวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชันมีค่าดัชนีฟรีไบโอติกสูงกว่า Isomaltooligosaccharides (IMO), Soyaoligosaccharides (SOS) และมีค่าเท่ากับ Fructo-oligosaccharides (FOS) ขณะที่สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรดชันมีค่า PI เท่ากันกับ Isomaltooligosaccharides (IMO) และ Soyaoligosaccharides (SOS) แต่มีค่าน้อยกว่า Fructooligosaccharides (FOS) โดยโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 3 ชนิด คือ Isomalto-oligosaccharides (IMO), Soyaoligosaccharides (SOS) และ Fructo-oligosaccharides (FOS) เป็นฟรีไบโอติกที่ใช้กันแพร่หลายทางการค้า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีขนาดโมเลกุลใหญ่และน้ำหนักโมเลกุลสูง จึงทำให้ยากต่อการถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรีย ขณะที่ฟรีไบโอติกทางการค้าส่วนใหญ่เป็นพวกโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กและน้ำหนักโมเลกุลต่ำ แบคทีเรียจึงสามารถนำไปใช้ได้มากกว่า จึงทำให้มีค่า PI สูงกว่า (Manning and Gibson, 2004)



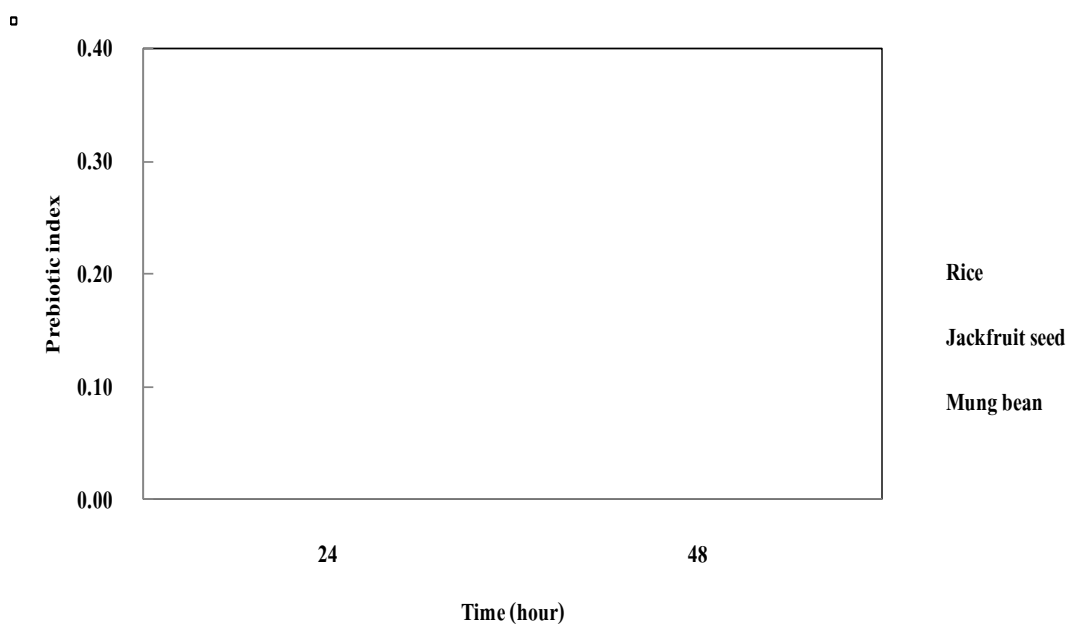


Figure 16 Prebiotic Index (PI) scores from stirred pH-controlled batch culture system at 24 and 48 h for different retrograded starches.

## 7.2 การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid)

การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดกรดไขมันสายสั้นด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จากตัวอย่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน สตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน ผ่านการย่อยในระบบจำลองในปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก และเมื่อถูกหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่าการหมักไม่มีการผลิตกรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก แต่สามารถผลิตกรดอะซิติก และกรดแลคติก (Table 18) เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 12 ชั่วโมง เป็น 48 ชั่วโมง กรดอะซิติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) พบว่าผลจากการหมักตัวอย่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน สตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน พบปริมาณกรดอะซิติกอยู่ในช่วง 0.24-0.30 mM, 0.21-0.35 mM และ 0.37-0.48 mM ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณกรดแลคติกมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 4.79-5.80 mM, 7.26-8.06 mM และ 5.69-7.08 mM ในตัวอย่างสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน สตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันทั้ง 2 ชนิดที่ผลิตขึ้น พบว่ามีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่ากรดอะซิติก จากการศึกษาของ Zampa และคณะ (2004) พบว่าแบคทีเรียกลุ่มแลคติก เช่น Bifidobacterium และ Lactobacilli เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในการผลิตกรดอะซิติก โพรพิโอนิก และ บิวทิริก เมื่อใช้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารตั้งต้นในการหมัก และจาก

การศึกษาของ Lehman และคณะ (2002) ได้รายงานว่ปริมาณกรดไขมันสายสั้นของสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการตัดแปรด้วยวิธีการเกิดรีโทรเกรดชันมีค่าสูงกว่าสตาร์ชกล้วยการตัดแปร ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกลุ่ม Clostridia และ Eubacteria คือ กรดบิวทีริก ซึ่งกรดบิวทีริกไม่ได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria และ Latobacilli (Pryde *et al.*, 2002) Rycroft และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาปริมาณกรดไขมันสายสั้นในตัวอย่างฟรีไบโอติกทางการค้าหลายชนิด ได้แก่ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides; FOS), อินนูลิน, แลกทูโรส, ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides; XOS), ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides; IMO), กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharides; GOS) และ soybean oligosaccharides (SOS) เมื่อถูกหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่าฟรีไบโอติกทางการค้าทุกชนิด เมื่อถูกหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้น (กรดอะซิติก, กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทีริก) และกรดแลคติก โดยพบว่าปริมาณกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติก มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0 ชั่วโมงเป็น 24 ชั่วโมง

Table 18 Short-chain fatty acid produced during fermentation at 0, 12, 24 and 48 h at pH 6.8 for different retrograded starches.

Time (h)	Concentration (mM) organic acid nproduced during fermentation											
	Rice starch				Jackfruit seed starch				Mung bean starch			
	Lactic	Acetic	Propionic	Butyric	Lactic	Acetic	Propionic	Butyric	Lactic	Acetic	Propionic	Butyric
0	0.07 <sup>d</sup> ± 0.00	0.09 <sup>c</sup> ± 0.01	ND	ND	0.27 <sup>d</sup> ± 0.00	0.09 <sup>d</sup> ± 0.01	ND	ND	0.34 <sup>d</sup> ± 0.00	0.14 <sup>d</sup> ± 0.01	ND	ND
12	5.80 <sup>a</sup> ± 0.00	0.24 <sup>b</sup> ± 0.01	ND	ND	8.06 <sup>a</sup> ± 0.01	0.21 <sup>c</sup> ± 0.00	ND	ND	7.08 <sup>a</sup> ± 0.01	0.37 <sup>c</sup> ± 0.00	ND	ND
24	4.84 <sup>b</sup> ± 0.01	0.25 <sup>b</sup> ± 0.02	ND	ND	7.88 <sup>b</sup> ± 0.00	0.27 <sup>b</sup> ± 0.00	ND	ND	6.21 <sup>b</sup> ± 0.00	0.42 <sup>b</sup> ± 0.00	ND	ND
48	4.79 <sup>c</sup> ± 0.01	0.30 <sup>a</sup> ± 0.01	ND	ND	7.26 <sup>c</sup> ± 0.01	0.35 <sup>a</sup> ± 0.01	ND	ND	5.69 <sup>b</sup> ± 0.01	0.48 <sup>a</sup> ± 0.01	ND	ND

Note: Each value is mean of triplicate ± SD. The difference superscripts in each column denote the significant differences (p<0.05). ND = not detected

## บทที่ 4

### สรุปและข้อเสนอแนะ

#### สรุป

1. สตาร์ชจากข้าว เมล็ดขนุน และถั่วเขียวประกอบด้วยปริมาณอะมิโลสร้อยละ 19.50, 20.82 และ 24.56 ตามลำดับ ซึ่งสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด มีรูปร่างโครงสร้างผลึกเป็นแบบ A (A-type) โดยสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว มีปริมาณผลึกร้อยละ 28.62, 29.38 และ 23.71 ตามลำดับ อุณหภูมิการเกิดเจลลาคีโนเซชันและอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลงความหนืดของสตาร์ชเมล็ดขนุนมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าวและสตาร์ชถั่วเขียว ตามลำดับ ขณะที่ค่า breakdown และค่า setback ของสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าสูงกว่าสตาร์ชข้าว และสตาร์ชเมล็ดขนุน ตามลำดับ นอกจากนี้ สตาร์ชเมล็ดขนุนมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงถึงร้อยละ 26.99 ซึ่งมีค่าสูงกว่าสตาร์ชถั่วเขียว (ร้อยละ 4.04) และสตาร์ชข้าว (ร้อยละ 0.31) ตามลำดับ

2. การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์พุลูลานเนสและระยะเวลาการตัดสายกึ่งสามารถเพิ่มระดับการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 99.02, 96.19 และ 96.83 ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 40 ยูนิตต่อกรัม และระยะเวลาการตัดสายกึ่ง 36 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่ารูปแบบการย่อยด้วยเอนไซม์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (two-stage pattern) โดยขั้นแรกสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดถูกย่อยด้วยเอนไซม์อย่างรวดเร็วภายในช่วง 4 ชั่วโมงแรก จากนั้นการย่อยดำเนินไปอย่างช้าๆ จนเข้าสู่สมดุล เมื่อระยะเวลาการตัดสายกึ่งผ่านไป 36 ชั่วโมง สตาร์ชที่ผ่านการตัดสายกึ่งเมื่อนำไปผ่านกระบวนการเกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4°C ในช่วงระยะเวลา 0 - 15 วันพบว่ารูปแบบโครงสร้างผลึกของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดเปลี่ยนแปลงจากแบบ A เป็นแบบ B และพบว่าปริมาณผลึก อุณหภูมิการเกิดเจลลาคีโนเซชัน และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น โดยสตาร์ชที่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันทั้ง 3 ชนิดจัดอยู่ในกลุ่มของสตาร์ชที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในระดับสูงมาก ดังนั้นสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดนี้จึงมีศักยภาพที่จะนำไปเป็นผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป โดยเฉพาะสตาร์ชถั่วเขียวซึ่งมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงสุด โดยสามารถนำไปประยุกต์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ในรูปแบบของเส้นใย (dietary fiber) โดยใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร (food ingredient) ที่สามารถผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนสูงได้

3. สตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการเกิดรีโทเกรเดชันสามารถทนต่อการย่อยของกรดและเอนไซม์ในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารส่วนต้น (ปาก กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก) ได้มากกว่าร้อยละ 90 โดยสตาร์ชข้าวมีค่าร้อยละการย่อยรวมสูงกว่า สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 6.01, 3.66 และ 2.07 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่เรียกลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ได้ดีซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่เรียกลุ่มที่ ให้โทษได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacteroides* และ *Clostridium* โดยค่าดัชนีความเป็นฟรีไบโอติก (PI) ของสตาร์ชข้าว (0.17) มีค่าสูงกว่าของสตาร์ชเมล็ดขนุน (0.08) และสตาร์ชถั่วเขียว (0.07) ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับฟรีไบโอติกทางการค้า แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สตาร์ชทั้ง 3 ชนิดที่ด้านการย่อยในระบบสภาวะจำลองทางเดินอาหารส่วนต้นสามารถผลิตกรด แลคติกและกรดไขมันสายสั้นโดยเฉพาะกรดอะซิติกได้ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นไปได้ที่จะนำ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจากสตาร์ชทั้ง 3 ชนิดนี้ โดยเฉพาะสตาร์ชข้าวซึ่งมีค่า PI สูงสุด ไปประยุกต์ใช้สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในรูปแบบของฟรีไบโอติก

### ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อให้การประยุกต์ใช้สตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งและผ่านการเกิดรีโทเกรเดชันเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง ควรศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

2. การศึกษาสมบัติความเป็นฟรีไบโอติก (prebiotics) ของสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งและผ่านการเกิดรีโทเกรเดชัน ควรทำการศึกษาในระบบลำไส้ใหญ่จำลองแบบต่อเนื่อง ซึ่งสามารถศึกษาการหมักในสภาวะจำลองของลำไส้ใหญ่ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลายที่มีการให้อาหารต่อเนื่องในระบบเช่นเดียวกับในร่างกายมนุษย์ ทั้งนี้เพื่อความถูกต้องแม่นยำของข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิจัยอาหารเพื่อสุขภาพต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. 2546. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. 2527. ผลิตภัณฑ์ขนุน. กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.
- ณัฐ โชติจิรัฎฐิตกาล. 2550. ผลของการตัดแปรโดยการย่อยด้วยกรด ออกซิเดชัน และการเชื่อมข้ามต่อคุณสมบัติของสตาร์ชถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ทิพรัตน์ หงษ์ทรี, เบญจมาศ เขียรศิลป์ และสันทัต วิเชียรโชติ. 2551. รายงานการวิจัยเรื่อง “การศึกษาและพัฒนาระบบลำไส้ใหญ่จำลอง”. สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นันทินา เจริญทอง. 2550. การคัดเลือก ลักษณะ และคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นฤชิต แว่วศรีพ่อง. 2529. การปลูกขนุน. สำนักพิมพ์บริษัทพิมพ์สวย จำกัด. กรุงเทพฯ. หน้า 78.
- นิรัญญา บุญดี. 2550. การคัดเลือกโพรบิโอดีทจากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นภมณี มงคลประเสริฐ. 2544. สมบัติทางกรไพลและสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชจากถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บดินทร์ บุตรอินทร์ .2543. การย่อยสลายโปรตีนจากแป้งถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

บัญชา อุไรกุล, ไพบุลย์ ธรรมรัตน์ วาสิก, ทิพย์รัตน์ หงษ์ทรี, ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์, เบญจมาศ วิเชียรศิลป์, งาม แยมแสงสังข์, ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์, กุลชนาฐ ประเสริญสิทธิ์, วิวัฒน์ แซ่หลี่, เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์ และสันศักดิ์วิเชียร โชติ. 2551. รายงานการวิจัยเรื่อง “การออกแบบและพัฒนาเครื่องสกัดไหลสวนทางแบบต่อเนื่อง การพัฒนาระบบลำไส้ใหญ่จำลอง และการศึกษาฟรีไบโอดีทในระดับโรงงานต้นแบบ” สถาบันวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

บุญทิวา นิลจันทร์. 2548. การศึกษาสมบัติเคมีฟิสิกส์ของฟลาวัวร์และสตาร์ชข้าวจากข้าวพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปาริตา ขุนแอ. 2550. ผลของการตัดแปรด้วยวิธีความร้อนขึ้นต่อสมบัติทางรีโอโลยีและการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะมิโลสแตกต่างกัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปิยรัตน์ หนูสุก. 2546. การประเมินเชิงปริมาณของความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างกับสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มานพ เหลืองพันธุ์. 2543. การปลูกขนุน. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์อักษรการพิมพ์ กรุงเทพฯ. หน้า 9.

ยุทธนา พิมพ์ศิริผล. 2542. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสตาร์ชจากเมล็ดขนุนที่สกัดด้วยวิธีปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, กล้าณรงค์ ศรีรอด, เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, ไชยรัตน์ เพ็ชรชลาณวัฒน์, รุ่งทิวา วันสุขศรี และบุญทิวา นิลจันทร์. 2546. การศึกษาคุณสมบัติของแป้งข้าวพันธุ์ต่างๆ ในประเทศไทยเพื่อเป็นกลยุทธิ์ในการสร้างผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

- ลัดดาวัลย์ เนียมพีก. 2542. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของแป้งมันเทศ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วราภรณ์ สกลไชย. 2551. การเกิดสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โดยใช้กระบวนการความร้อน และการใช้ทดแทนในผลิตภัณฑ์คุกกี้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- วรวิถัลยา เกียรติพงษ์ลาภ และสุนันทา ทองทา. 2550. สมบัติทางโครงสร้างและทางกายภาพของแป้งมันสำปะหลัง. ว. เทคโนโลยีสุรนารี. 14: 195-204.
- วุฒิชัย นาครักษา. 2526. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและทางฟิสิกส์ของพันธุ์ถั่วเขียวที่เหมาะสมต่อการใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สันทัต วิเชียรโชติ, วรพนิต จันทร์สุวรรณ และปรีชา หมวดหลู. 2553. รายงานการวิจัยเรื่อง “การศึกษาชนิดและปริมาณโอลีโอแซคคาไรด์ในผลแก้งม้งรต่อคุณสมบัติการเป็นสารฟรีไบโอติก”. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร.
- สุชญญา แสงสอน. 2547. การใช้แป้งฟรีเจลาติโนซ์เมล็ดขนุนทดแทนสตาร์ชถั่วเขียวในขนมถั่มกลืน. ปัญหาพิเศษ โปรแกรมวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์.
- สมชาย ประภาวัต. 2523. การใช้ประโยชน์จากถั่วเขียว. เอกสารประกอบการอบรมวิชาชีพ ประชาชนภาคฤดูร้อน. สถานีค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมพล อูชชิน และระริน บุญดวง. 2537. ข้าวเจ้าเลี้ยงพัทลุง. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร เอกสารของศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
- อรอนงค์ นัยวิกุล, จิตธนา แจ่มเมฆ, อรพิน ภูมิภมร และวุฒิชัย นาครักษา. 2531. งานปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 22: 330-337.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. 2547. ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 147: 342-347.
- AACC. 2000. Approved methods of the AACC. 10<sup>th</sup> Ed. American Association of Cereal Chemist.



- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis: 16<sup>th</sup>Ed. Association of Official Analytical Chemists.
- Alexander, R. J. 1995. Resistant starch-new ingredient for the food industry. *Cereal Foods World*. 40: 455-458.
- Arunachalam, K. D. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutri. Res.* 10: 1559-1597.
- Asp, N. G. and Bjorck, I. 1992. Resistant starch. *Trends Food Sci Technol.* 3: 111-114.
- Baghurst, P. A., Baghurst, K. I. and Record, S. J. 1996. Dietary fiber, non-starch polysaccharides and resistant starch-a review. *Food Aust.* 48: S3-S35.
- Balliaderis, C. G. and Juliano, B. O. 1993. Thermal and mechanical-properties of concentrated rice starch gels of varying composition. *Food Chem.* 48: 243-250.
- Bello-Pérez, L. A., León, Y. P., Agama-Acevedo, E. and Paredes-López, O. 1998. Isolation and partial characterization of amaranth and banana starches. *Starch/Stärke.* 50: 409-413.
- Benno, Y., Endo, K., Shiragami, N., Sayama, K. and Mitsuoka, T. 1987. Effects of raffinose intake on human faecal microflora. *Bif. Microflora.* 6: 59-63.
- Bertoft, Eric. 2004. On the nature of categories of chains in amylopectin and their connection to the super helix model. *Carbohydr. Polym.* 57: 211-224.
- Billiaderis, C. G. and Zawistowski, J. 1990. Viscoelastic behavior of aging starch gels: effect of concentration, temperature and starch hydrolyzates on network properties. *Cereal Chem.* 67: 240-246.
- Billiaderis, C. G. 1992. Characterization of starch network: by small strain dynamic rheometry. In R. J. Alexander and H. F. Zobel (ed.), *Developments in carbohydrate chemistry*, 87-135. Minnesola: American Association of Cereal Chemists.

- Bobbio, A. A., Bobbio, P. A. and Rodrigues, L. R. 1978. Isolation and characterization of the physicochemical properties of the starch of jackfruit seeds (*Artocarpus heterophyllus*). *Cereal Chem.* 55: 505-511.
- Brown, I. L., McNaught, K. J., Ganly, R. N., Conway, P. L., Evans, A. J., Topping, D. L. and Wang, X. 1996. Probiotics compositions. Int'l. Patent WO 96/08261/A1. Issued Mar 21, 1996; Univ New South Wales; Burns Philip and Co. Limited; Burns Philip Res and Dev Pty.
- Califano, A. N. and Anon, M. C. 1990. Differential scanning calorimetry of mung bean starch. *J. Food Sci.* 55: 771-773.
- Campbell, J. M., Bauer, L. L., Fahey, G. C., and Jr, F. 1997. Selected fructooligosaccharide (1-ketose, nystose and 1- $\beta$ -fructofuranosylnystose) composition of foods and feeds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3076-3082.
- Chumming, J. H. and Englyst, H. N. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *Am J. Clin. Nutr.* 61: 938S-945S.
- Chung, K. M., Moon, T. W. and Chun, J. K. 2000. Influence of annealing on gel properties of mung bean starch. *Cereal Chem.* 77: 567-571.
- Chung, H. J., Lim, H-S. and Lim, S-T. 2006. Effect of partial gelatinization and retrogradation on the enzymatic digestion of waxy rice starch. *Carbohydr. Polym.* 55: 9-15.
- Clark, A. H. and Ross-Murphy, S. B. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. *Advanced polymer Science.* 85: 57-192.
- Colas, B. 1986. Flow behavior of crosslinked corn starch. *Lebensmittel wissenschaft U. Technol.* 19: 308-311.
- Conway, P. L. 1996. Development of intestinal microbiota. In *Gastrointestinal microbes and host interaction.* (Mackie, R. I., White, B.A. and Isaacson, R. E., eds.). p. 3-38. Chapman and Hall. New York.

- Conway, P. L. 2001. Prebiotics and human health: the state of the art and future perspectives. *Scand. J. Nutr.* 45: 13-21.
- Cooke, D. and Gidley, M. J. 1992. Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinization: origin of enthalpic transition. *Carbohydr. Res.* 227: 103-112.
- Cui, R. and Oates, C. G. 1997. The effect of retrogradation on enzyme susceptibility of sago starch. *Carbohydr. Polym.* 32: 65-72.
- Cummings, J. H., George T. M. and Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 415s-420s.
- Daisy, E. K. 1979. Food legumes. London: Tropical product institute.
- Doublier, J. L. 1981. Rheological studies on starch. Flow behavior of wheat starch pastes. *Starch.* 33: 415-420.
- Dubois, M., Gilles, J. K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1965. Calorimetric method for determination of sugars related substance. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Dutta, H., Paul, S. K., Kalita, D. and Mahanta, C. L. 2011. Effect of acid concentration and treatment time on acid-alcohol modified jackfruit seed starch properties. *Food Chem.* 128 : 284-291.
- Eerlingen, R. C., Crombez, M. and Delcour, J. A. 1993. Enzyme-resistant starch. I. Quantitative and qualitative influence of incubation time and temperature of autoclaved starch on resistant starch formation. *Cereal Chem.* 70: 339-344.
- Egert, M., Graaf, A. A., Smidt, H., De Vos, W. M. and Venema, K. 2006. Beyond diversity: Functional microbiomics of the human colon. *Trends Microbiol.* 14: 86-91.
- Elliasson, A-C. 1985. Retrogradation of starch as measured by differential scanning calorimetry. In *New Approaches to research on Cereal Carbohydrates.* (Hill, R.D. and Munck, L., eds). p. 93-98. Elsevier Science Publisher. Amsterdam.

- Ellis, H. S., Ring, S. G. and Whittam, M. A. 1989. A comparison of the viscous behavior of wheat and maize starch pastes. *J. Cereal sci.* 10: 33-44.
- Englyst, H. N. and Cummings, J. H. 1987. Digestion of polysaccharides of potato in the small intestine of man. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 423-431.
- Englyst, H. N. and Hudson, G. J. 1996. The classification and measurement of dietary carbohydrate. *Am J. Clin. Nutr.* 57: 15-21.
- Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter culture at low pH in the presence of bile salts for potential probiotics use. *Meat Sci.* 55: 297-300.
- Evans, I. D. and Haisman, D. R. 1979. Rheology of gelatinized starch suspension. *J. Texture stud.* 10: 347-370.
- Fässler, C., Arrigoni, E., Venema, K., Hafner, V., Brouns, F. and Amadò, R. 2006. Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. *Eur. J. Clin. Nutr.* 45: 445-453.
- Fausto, F. D., Kacchi, A. I. and Mehta, D. 1997. Starch products in confectionery. *Bev. Food World.* 24: 4-16.
- French, D. 1984. Organization of starch granules. In R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Passcall (eds.), *Starch chemistry and Technology*. 183-247. New York: Academic Press.
- Fredriksson, H., Silverio, J., Andemon, R., Eliasson, A-C. and Aman, P. 1998. The influence of amylose and amylopectin characteristics on gelatinization and retrogradation properties of different starches. *Carbohydr. Polym.* 35. 119-134.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1994. Intestinal bacteria and disease. In human health: The contribution of microorganism. (Gibson, S. A. W. ed.). p. 53-62. Springer-Varlag, London.
- Gibson, G. R. and Wang. E. R. 1994. Enrichment of *Bifidobacteria* from human gut content by FOS using continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 121-128

- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Gibson, G. R., Ottaway, P. B. and Rastall, R.A. 2000. *Prebiotics: New developments in functional foods.* Oxford. Chandos Publishing Limited.
- Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. *J. Gastroenterol. Suppl.* 18: 287-298.
- Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2006. *Prebiotics: Development and application.* Chicchester: John Willey & Sons Press.
- Gidley, M. J. and Bulpin, P. V. 1987. Crystallization of mato-oligosaccharides as models of the crystalline forms of starch: minimum chain length requirement of the formation of double helices. *Carbohydr. Res.* 161: 291-300.
- Gidley, M. J. and Bulpin, P. V. 1989. Aggregation of amylose in aqueous systems: the effect of chain length on phase behavior and aggregation kinetics. *Macromolecules.* 22: 341-346.
- Gidley, M. J., Cook, D., Darke, A. A. H., Hoffmann, R. A., Russell, A. L. and Greenwell, P. 1995. Molecular order and structure in enzyme-resistant retrograded starch. *Carbohydr. Polym.* 28: 23-31.
- Goni, I., Garcia-Diz, L., Manas, E. and Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chem.* 56: 445-449.
- González-Soto, R. A., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Rendón-Villalobos, R. and Bello-Pérez, L. A. 2004. Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. *Starch/Stärke.* 56: 495-499.
- González-Soto, R. A., Sanchez-Hernandez, L., Solorza-Feria, J., Nunez-Santiago, C., Flores-Huicochea, E. F. and Bello-Pérez, L. A. 2006. Resistant starch production from non-conventional starch sources by extrusion. *Food Sci. Technol. Int.* 12: 5-11.

- Gonzalez-Soto, R. A., Mora-Escobedo, R., Hernandez-Sanchez, H., Sanchez-Rivera, M. and Bello-Perez, L. A. 2007. The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. *Food Res. Int.* 40: 304-310.
- Gray, J. A. and Bemiller, J. N. 2003. Bread staling: molecular basis and control. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 2: 1-19.
- Gunaratne, A. and Hoover, R. 2002. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydr Polym.* 49: 425-437.
- Guraya, H. S., James, C. and Champagne, E. T. 2001. Effect of cooling, and freezing on the digestibility of debranched rice starch and physical properties of the resulting material. *Starch/Stärke* 53: 64-74.
- Hanashiro, I., Abe, J. and Hizukuri, S. 1996. A periodic distribution of the chain length of amylopectin as revealed by high-performance anion-exchange chromatography. *Carbohydr. Res.* 238: 151-159.
- Haralampu, S. G. 2000. Resistant starch-a review of the physical properties and biological impact of RS3. *Carbohydr. Polym.* 41: 285-292.
- Hizukuri, S. 1996. Starch: Analytical aspects. *In Carbohydrate in food.* (Eliason, A., ed.), p. 347-429. Marcel Dekker. New York.
- Hoover, R., Li, Y. X., Hynes, G. and Senanayake, N. 1997. Physicochemical characterization of mung bean starch. *Food hydrocolloids.* 11: 401-408.
- Hoover, P. 2001. Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and roots starches: a review. *Carbohydr. Polym.* 45: 253-267.
- Hylla, S., Gostner, A. and Dusel, G. 1998. Effect of resistant starch on the colon in healthy volunteers: positive implication for cancer prevention. *Amer. J. Clin. Nutr.* 67: 136-142.
- Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Probiotics. *Best Practice and Research Clin. Gastroenterol.* 18: 299-313.

- Juliano, B. O. 1971. Simplified assay for milled rice amylase. *Cereal Sci. Today*. 16: 334-336.
- Juliano, B. O. 1984. Rice starch: Production, properties and uses. In *starch: Chemistry and Technology*. (Whister, R. L., BeMiller, J. N. and Paschall, E. F. eds). p. 507-528. Academic press inc. New York.
- Kim, Y. S. and Wiesenborn, D. P. 1996. Starch noodle quality as related to potato genotypes. *J. Food Sci.* 61: 248-252.
- Kittipongpatana, O. S., Sirithunyaluy, J. and Laerger, R. 2006. Preparation and physicochemical properties of sodium carboxymethyl mungbean starches. *Carbohydr. Polym.* 63: 105-112.
- Kontula, K. L. and Thelappurate, R. 1998. Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solution. *J. Food Prot.* 57: 66-670.
- Lærke, H. N., Hedemann, M. S., Knudsen, K. E. B., Laurinen, P., Lindberg, J -E and Pedersen, C. 2007. Association between butyrate and short-chain fatty acid concentrations in gut contents and faeces in weaning piglets. *Livestock Science*. 108: 163-166.
- Leeman, A. M., Karlsson, M. E., Eliasson, A-C. and Björck, I. M. E. 2006. Resistant starch formation in temperature treated potato starches varying in amylose/amylopectin ratio. *Carbohydr. Polym.* 65: 306-313
- Lehmann, U., Jacobasch, G. and Schmiedl, D. 2002. Characterization of resistant starch type III from banana (*Musa acuminata*). *J. Agric. Food Chem.* 50: 5236-5240.
- Leong, Y. H., Karim, A. A. and Norziah M. H. 2007. Effect of pullulanase debranching of sago (*Metroxylon sagu*) starch at subgelatinization temperature on the yield of resistant starch. *Starch/Stärke*. 59: 21-32.
- Levine, H. and Slade, L. 1986. A polymer physicochemical approach to the study of commercial starch hydrolysis products (SHPs). *Carbohydr. Polym.* 6: 213-244.
- Lii, C. Y., Shao, Y. Y. and Tseng, K. H. 1995. Gelation mechanism and rheological properties of rice starch. *Cereal Chem.* 72: 393-400.

- Lin, J-H. and Chang, Y-H. 2006. Effects of type and concentration of polyols on the molecular structure of corn starch kneaded with pullulanase in a Farinograph. *Food Hydrocolloids*. 20 : 340-347.
- Liu, W. and Shen, Q. 2007. Structure analysis of mung bean starch from sour liquid processing and centrifugation. *J. Food Eng.* 79: 1310-1314.
- Lopez, H. W., Coudray, C., Levrat-Verny, M. A., Coudray, F. C., Demigne, C. and Remesy, C. 2000. Fructooligosaccharides enhance mineral absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 11: 500-508.
- Lu, S., Chen, L-N. and Lii, C-Y. 1997. Correlations between the fine structure, physicochemical properties and retrogradation of amylopectins from Taiwan rice varieties. *Cereal Chem.* 74: 34-39.
- Macfarlane, G. T. and Gibson, G. R. 1994. Metabolic activities of the normal colonic flora. *In* Human Health: The contribution of Microorganisms. (Gibson, S. A. W. ed.). p. 17-52. Springer-Verlag, London.
- Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. and Gibson, G. R. 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb. Ecol.* 35: 180-187.
- Manning, T. S. and Gibson, G. R. 2004. Prebiotics. *Best Practice Res. Clinic. Gastroenterol.* 18: 287-298.
- McCleary, B. V. and Monaghan, D. A. 2002. Measurement of resistant starch. *J. AOAC international.* 85: 665-675.
- Miao, M., Jiang, B. and Zhang, T. 2009. Effect of pullulanase debranching and recrystallization on structure and digestibility of waxy maize starch. *Carbohydrate Polymers.* 76: 214-221.
- Miles, M. J., Morris, V. J., Paul, M., Orford, D. and Ring, S. G. 1985. The roles of amylose and amylopectin in the gelation and retrogradation of starch. *Carbohydr. Res.* 135: 271-281.



- Mohan, B. H., Gopal, A., Malleshi, N. G. and Tharanathan, R. N. 2005. Characteristics of native and enzymatically hydrolyzed ragi (*Eleusine coracana*) and rice (*Oryza sativa*) starches. *Carbohydr. Polym.* 59: 43-50.
- Montgomery, E. M. and Senti, F. R. 1958. Separation of amylase from amylopectin of starch by an extraction-sedimentation procedure. *J. Polymer Sci.* 28: 1.
- Morotomi, M., Guillem, J. G., Logerfo, P. and Weinstein, I. P. 1990. Production of diacylglycerol an activator of protein kinase C by human intestinal microflora. *Cancer Res.* 50: 3595-3599.
- Morton, J. F. 1965. The jack fruit, its culture, varieties and utilization. *Proc Florida State Hort Soc.* 78: 336-344.
- Mukprasirt, A. and Sajjaanantakul, K. 2004. Physico-chemical properties of flour and starch from jackfruit seeds (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) compared with modified starches. *Int. J. Food Sci. Technol.* 39: 271-276.
- Mun, S-H. and Shin, M. 2006. Mild hydrolysis of resistant starch from maize. *Food Chem.* 96(1): 115-121.
- Naivikul, O. and D'Appolonia, B. L. 1979. Comparison of legume and wheat flours carbohydrate I. Sugar analysis. *Cereal Chem.* 55: 913-918.
- Nagamura, C. A., Tolaba, M. R. and Suare, C. 2002. Modeling starch gelatinization kinetics of milled rice flour. *Cereal Chem.* 77: 145-147.
- Nelson, N. 1994. Determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- Noel, T. R., Ring, S. G. and Whittam, M. A. 1993. Physical properties of starch products. Structure and functional. In E. Dickinson, and P. Walstra (ed.), *Food colloids and polymer: stability and mechanical properties*, 126-135. Cambridge, Royal Society of Chemistry.

- Noosuk, P., Hill, S. E., Pradipasena, P. and Mitcheli, J. R. 2003. Structure-viscosity relationships for thai rices starches. *Starch*. 55: 337-344.
- Noosuk, P., Hill, S. E., Farhat, I. A., Pradipasena, P. and Mitcheli, J. R. 2005. Relationship between viscoelastic properties and starch structure in rice from Thailand. *Starch*. 57: 387-598.
- Oates, C. G. and Powell, A. D. 1996. Bioavailability of carbohydrate material stored in tropical fruit seeds. *Food Chem*. 56: 405.
- Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K. and Ikeda, H. 1995. Long term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Int. J. Gastr*. 56: 415-420.
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H. 1990. High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by *trans*-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*. 18: 6485-6489.
- Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G. B. and Rastall, R. A. 2000. Development of prebiotic based on dextran and oligodextran. *Brit. J. Nutr*. 83: 247-255.
- Orford, P. D., Ring, S. G., Carroll, V., Miles, M. J. and Morris, V. J. 1987. The effect of concentration and botanical source on the gelation and retrogradation of starch. *J. Sci. Food Agr*. 39: 169-177.
- Othman, Y. and Subhadrabandhu, S. 1995. *The Production of economic fruits in south east asia*. Oxford university press. p. 122-128.
- Ozturk, S., Koksel, H. and Kahraman, K. 2009 Effect of debranching and heat treatments on formation and functional properties of resistant starch from high-amylose corn starches. *Food Res Technol*. 229: 115-125.

- Palframan, R. J., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2002. Effect of pH and Dose on the Growth of Gut Bacteria on Prebiotic Carbohydrates *in vitro*. *Anaerobe*. 8: 287-292.
- Pongjanta, J., Utaipattanaceep, A., Naivikul, O. and Piyachomkwan, K. 2009. Debranching enzyme concentration effected on physicochemical properties and  $\alpha$ -amylase hydrolysis rate of resistant starch type III from amylose rice starch. *Carbohydr. Polym.* 78: 5-9.
- Pryde, S. E., Duncan, S. H., Hold, G. L., Stewart, C. S. and Flint, H. J. 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS. Microbiol. Rev.* 217: 133-139.
- Qiang, X., YongLie, C. and QianBing, W. 2009. Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 77: 435-441.
- Raben, A., Tagliabue, A., Christensen, N. J., Madsn, J., Holst, J. J. and Astrup, A. 1994. Resistant starch: the effect on postprandial glycemia, hormonal response and satiety. *Am J. Clin Nutr.* 60: 544-551.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J. A. and Glaser, B. K. 1996. Effect of resistant starch on blood and liver lipids in hamsters. *Cereal Chem.* 73: 176-178.
- Reader, D., Johnson, M. L., Hollander, P. and Franz, M. 1997. Response of resistant starch in a food bar vs. two commercially available bars in persons with type II diabetes mellitus. *Diabetes.* 46: 254A.
- Reddy, R. K., Zakiuddin, S. and Bhattacharya, K. R. 1993. The fine structure of rice starch amylopectin and its relation to the texture of cooked rice. *Carbohydr. Polym.* 22: 267-275.
- Reddy, B. S. 1998. Prevention of colon cancer by pre- and probiotic: evidence from laboratory studies. *Brit. J. Nutr.* 80: S219-S223.
- Rengsutthi, K. and Charoenrein, S. 2011. Physico-chemical properties of jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) and its application as a thickener and stabilizer in chilli sauce. *J. Food Sci. Technol.* 44: 1309-1313.

- Ring, S. G., Colonna, P., I'Anson, K. J., Kalichevsky, M. T., Miles, M. J., Morris, V. J. and Orford, P. D. 1987. The gelation and crystallisation of amylopectin. *Carbohydr. Res.* 162: 277-293.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2001. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 91: 878-887.
- Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health foods-the European perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 78: 99-117.
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S. and Kulkarni, P. R. 2006. Resistant starch-A Review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* 5: 1-17.
- Sako, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int. Dairt. J.* 9: 69-80.
- Scheppach, W., Bartram, H. P. and Richter, F. 1995. Role of short-chain fatty acids in the of colorectal cancer prevention. *Eur. J. Cancer.* 11: 1077-1080.
- Schoch, T. J. 1964. Swelling power and solubility of granular starch. In *Methods on carbohydrate chemistry.* (Whistler, R. L., ed) p. 106-108. Academic Press. New York.
- Schoch, T. J. and Maywald, F. C. 1968. Preparation and properties of various legume starch. *Cereal Chem.* 45: 564-573.
- Schumann, C. 2000. Lactulose. *In Prebiotics and probiotics.* (Gibson, G. R. and Angus, F. eds.). p. 47-67. Leatherhead.
- Shanthy, A. P., Sowbhagya, C. M. and Bhattacharya, K. R. 1980. Simplified determination of water-insoluble amylase content of rice. *Starch.* 12: 409-411.
- Shi, Y. C. and Seib, P. 1992. The structure of four waxy starches related to gelatinization and retrogradation. *Carbohydr. Res.* 227: 131-145.

- Silverio, J., Fredriksson, H., Andersson, R., Eliasson, A. C. and Åman, P. 2000. The effect of temperature cycling on the amylopectin retrogradation of starches with different amylopectin unit-chain length distribution. *Carbohydr. Polym.* 42: 175-184.
- Singh, U., Voraputhaporn, W., Rao, P. V. and Jambunathan, R. 1989. Physicochemical characteristic of pigeonpea and mungbean starches and their noodle quality. *J. Food Sci.* 54: 1293-1297.
- Singh, A., Kumar, S. and Singh, I. S. 1991. Functional properties of jackfruit seed flour. *J. LWT.* 24: 373-374.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. and Lugasi, A. 2008. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *J. Appetite.* 51: 456-467.
- Sowhagya, C. M. and Bhattacharya, K. R. 1979. Simplified determination of amylose in milled rice. *Starch/starke.* 31: 159-163.
- Sozer, N., Dalgic, A. C. and Kaya, A. 2007. Thermal, textural and cooking properties of spaghetti enriched with resistant starch. *J. Food Eng.* 81: 476-484.
- Tester, R. F., Karkalas, J. and Qi, X. 2004. Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship. *World's Poultry Science Journal.* 60: 186-195.
- Tian, S. J., Rickard, J. E. and Blanshard, J. M. V. 1991. Physicochemical properties of sweet potato starch. *J. Sci. Food Agric.* 57: 459.
- Tharanathan, R. N. and Mahadevamma, S. 2003. Grain legumes-a boon to human nutrition. *Trends Food Sci Technol.* 14: 507-518.
- Tomooka, T., Lairungreang, C., Nakeeraks, P., Egawan, Y. and Thaverasook, C. 1991. Mungbean and the genetic resources. TARC/DOA.
- Tongdang, T. 2008. Some properties of starch extracted from three thai aromatic fruit seeds. *Starch.* 60: 199-207.

- Tongta, S. and Kiatpongarp. 2009. Impact of enzyme concentration and hydrolysis time on resistant starch formation from cassava starch. In Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Starch Technology. 24-25 September 2009. P. 231-236.
- Touhy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. and Gibson, G. R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug. Discov. Today*. 8:692-700.
- Tsai, M., Li, C. and Lii, C. C. 1997. Effect of granular structures on the pasting behaviors of starches. *Cereal Chem.* 74: 750-757.
- Tulyathan, V., Tananuwong, K., Songjinda, P. and Jaiboon, N. 2002. Some physicochemical properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) seed flour and starch. *Science Asia*. 28: 37-41.
- Vernazza, C. L., Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2006. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to prebiotics. *In Prebiotics: Development and Application*. (Gibson, G. R. and Rastall, R. A. eds.). p. 1-28. John Wiley & Son.
- Vulevic, J., Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2004. Developing a quantitative approach for determining the in vitro prebiotic potential of dietary oligosaccharides. *FEMS. Microbiol. Rev.* 236: 153-159.
- Wang, X. and Gibson, G. R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 373-380.
- Whalen, P. J., Bason, R. I., Walliams, P.J. 1997. Measurement of extrusion effects by viscosity profile using the rapid visco analyzer. *Cereal Foods World*. 42: 469-475.
- Wichienchot, S., Prasertsan, P., Hongpattarakere, T., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2006. *In vitro* three-stage continuous fermentation of gluco-oligosaccharides produced by *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 by the human colonic microflora. *CIIM*. 7(1): 13-18.

- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem.* 120: 850-857.
- Wichienchot, S. and Chinachoti, P. 2011. Prebiotic oligosaccharides: origins and production, health benefits and commercial applications. *In Oligosaccharides: Sources, properties and applications.* (Gordon, N. S., ed.). p. 59-83. Nova Science. New York.
- Yamamoto, K., Sumie, S. and Toshio, O. 1973. Properties of rice starch prepared by alkali method with various condition. *Denpun kagaku.* 20: 99-102.
- Yue, P. and Waring, S. 1998. Functionality of resistant starch in food applications. *Food Aust.* 50: 615-621.
- Zampa, A., Silvi, S., Fabiani, R., Morozzi, G., Orpianesi, C. and Cresci, A. 2004. Effects of different digestible carbohydrates on bile acid metabolism and SCFA production by human gut micro-flora grown in an in vitro semi-continuous culture. *Anaerobe.* 10: 19-26.
- Zhang, H. and Jin, Z. 2011. Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize starch with pullulanase. *Carbohydr. Polym.* 83: 865-867.
- Zhou, X., Chung, H-J., Kim, J-Y. and Lim, S-T. 2013. In vitro analyses of resistant starch in retrograded waxy and normal corn starches. *Int. J. Biol. Macromol.* 55: 113-117.
- Ziemer, C. J. and Gibson, G. R. 1998. An overview of probiotics prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8: 473-479.
- Zobel, H. F. 1964. X-ray analysis of starch granules. *In Method in Carbohydrate Chemistry.* (Whistler, R. L. Smith, R. J. and Bemiller, J. N., eds). P. 109-113. Academic press. Inc., New York.
- Zobel, H. F., Young, S. N. and Socca, L. A. 1988. Starch gelatinization: An x-ray diffraction study. *Cereal Chem.* 65: 443.

Zobel, H. F. and Stephen, A. M. 1995. Starch: structure, analysis and application. *In* Food polysaccharides and their applications. (Stephan, A. M., ed.). p. 19-66. Marcel Dekker. New York.



ภาคผนวก

## ภาคผนวก

### ภาคผนวก ก การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี

#### 1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC., 2000)

##### เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. ภาชนะอะลูมิเนียมมีฝาปิด (moisture can)

##### วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำเช่นข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้น ชั่งทราบน้ำหนักแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลาประมาณ 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำกลับเข้าไปในตู้อบอีกครั้ง
5. ทำซ้ำเช่นข้อที่ 4 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
6. คำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

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

กำหนดให้  $W_1$  คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)  
 $W_2$  คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC., 2000)

### เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกั่นกลม (สำหรับใส่ตัวทำละลาย) ซอกเลต (soxhlet) อุปกรณ์ควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี
4. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
6. โถดูดความชื้น (desiccator)

### สารเคมี

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether)

### วิธีการ

1. อบขวดกั่นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของขวดกั่นกลมลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำเช่นข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มีดชิด แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง กลุ่มด้วยสำลีเพื่อให้สารตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
4. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอกเลตเติมสารตัวทำละลายปีโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับเตาความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอกเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารทำละลายในขวดกั่นกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยสูญญากาศ
7. นำขวดหาไขมันอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ  $80-90^{\circ}\text{C}$  จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของขวดกั่นกลมลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

8. ทำซ้ำเช่นข้อที่ 7 จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
9. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

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

กำหนดให้  $W_1$  คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)  
 $W_2$  คือ น้ำหนักไขมันหลังอบ (กรัม)

### 3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC., 2000)

#### เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีนขนาด 200 มิลลิลิตร
2. อุปกรณ์ให้ความร้อน
3. อุปกรณ์กลั่น โปรตีน (semi-microdistillation)
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
7. บิวเรต
8. ตู้ดูดควัน
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
10. ลูกแก้ว (glass bead)
11. เตาย่อย (VELP DK6)
12. เครื่องดักจับไอกรด (scrubber)

#### สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.  $H_2SO_4$ )
2. ตัวเร่งผสม (catalyst) ระหว่าง  $CuSO_4$  กับ  $K_2SO_4$  อัตราส่วน (Cu :  $K_2SO_4$ ) คือ 1 : 10
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (HCl 0.1 N)
5. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
6. โพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต

7. อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator ระหว่าง Methylene blue 0.1 กรัม กับ Methyl red 0.2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 90 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

### วิธีการ

#### การทำมาตรฐานสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต
  - 1.1. ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตที่ผ่านการอบแห้ง (อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง) ให้ได้น้ำหนักอยู่ในช่วง 2.0-2.2 กรัม โดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บนที่ก้นน้ำหนักที่ชั่ง
  - 1.2. นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าขวดให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
  - 1.3. คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน
2. การเตรียมสารละลาย 0.1 M HCl จากกรดเกลือเข้มข้น
  - 2.1. รินกรดเกลือเข้มข้นจากขวดลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร (ทำในตู้ควัน)
  - 2.2. ตวงกรดเข้มข้นให้มีปริมาตร 4.0-4.5 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวงขนาด 10 มิลลิลิตร
  - 2.3. เทกรดเกลือเข้มข้นที่ตวงแล้วลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร คนให้สารละลายเข้ากันดี
  - 2.4. สารละลาย HCl ที่เตรียมขึ้นนี้มีความเข้มข้นประมาณ 0.1 M ถ่ายเก็บในขวดแก้วเพื่อเก็บสารละลายนี้ไว้ใช้ต่อไป
3. การทำมาตรฐานสารละลายกรดเกลือ
  - 3.1. ปิเปตสารละลายกรดเกลือมา 25 มิลลิลิตร ใสลงในขวดรูปกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร
  - 3.2. เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เขย่าสารละลายในขวดให้เข้ากัน
  - 3.3. ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานทุติยภูมิโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนกระทั่งสารละลายในขวดเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์
  - 3.4. ไทเทรตซ้ำ 2 ครั้ง
  - 3.5. คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดเกลือ

### วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใสลงในขวดย่อยโปรตีน
2. การย่อย

- 2.1. เติมตัวเร่งผสม (catalyst) ระหว่าง  $\text{CuSO}_4$  กับ  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ( $\text{CuSO}_4$  0.5 กรัม และ  $\text{K}_2\text{SO}_4$  5 กรัม) ในขวดย่อยโปรตีนเพื่อเร่งปฏิกิริยาการย่อย
- 2.2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร (ค่อยๆ ไหลตามข้างขวด) เขย่าเบาๆ จนแป้งไม่จับเป็นก้อน ปิดปากขวดด้วยกระดาษแก้วกลม
- 2.3. ย่อยบนอุณหภูมิให้ความร้อนอ่อนๆ จนได้สารละลายสีเขียวใส
- 2.4. ปลดยทิ้งให้เย็น
3. การกลั่น
  - 3.1. เมื่อสารละลายมีอุณหภูมิลดลงแล้ว จึงเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
  - 3.2. จัดอุปกรณ์กลั่น
  - 3.3. เติมกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ แล้วหยดอินดิเคเตอร์ 5-6 หยด นำไปรองรับของเหลวสารละลายที่กลั่นได้ โดยใช้อุปกรณ์ควมแน่นจุ่มในสารละลายกรดบอริก
  - 3.4. กลั่นจนกระทั่งไม่มีแอมโมเนียเหลือ ให้ได้สารละลายที่กลั่นได้ประมาณ 150 มิลลิลิตร
4. การไทเทรต
  - 4.1. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน สังกะสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงอ่อน จดปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้
  - 4.2. ทำ blank โดยใส่สารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์เช่นเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่ใส่ตัวอย่าง

#### สูตรคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)} = \frac{1.4004 \times N \times (A - B) \times F}{W}$$

กำหนดให้ A คือ ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับ blank

W	คือ	น้ำหนักตัวอย่าง
N	คือ	ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล)
F	คือ	แฟลคเตอร์เท่ากับ 5.95

#### 4. การวิเคราะห์ปริมาณแฉ่ำ (AOAC., 2000)

##### เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. ถ้วยครุชเชิล
2. เตาไฟฟ้า
3. เตาเผา
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. โถดูดความชื้น (desiccator)

##### วิธีการ

1. เตาครุชเชิลเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ครุชเชิล นำไปเผาบนเตาไฟฟ้าจนควันหมด
3. นำไปเผาต่อในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550°C นานประมาณ 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้แก่สีขาวหรือเทา
4. จากนั้นนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง เตาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิลิกรัม
5. คำนวณหาปริมาณแฉ่ำจากสูตร

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

กำหนดให้	W	คือ	น้ำหนักของครุชเชิล (กรัม)
	W <sub>1</sub>	คือ	น้ำหนักของครุชเชิลและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)
	W <sub>2</sub>	คือ	น้ำหนักของครุชเชิลและตัวอย่างหลังเผาจนน้ำหนักคงที่ (กรัม)

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณอะมิโลส (amylase content)

### เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

### สารเคมี

1. เอทานอล
2. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 0.2
4. กระจกทรงเบอร์ 4
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

### วิธีการ

1. ชั่งสตาร์ช 100 มิลลิกรัม นำไปละลายในเอทานอล 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. ให้ความร้อนแก่สตาร์ชที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วยกระจกทรงเบอร์ 4
4. ดูดสารละลายสตาร์ชมา 5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มอล
5. เติมสารละลายไอโอดีน 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร แล้วคำนวณค่าปริมาณอะมิโลสที่ละลายได้
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของอะมิโลสมาตรฐาน (standard amylose) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 1-5 แต่ใช้สารละลายอะมิโลสมาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายสตาร์ช 5 มิลลิลิตร ในข้อที่ 4
7. คำนวณหาปริมาณอะมิโลสจากสูตร

$$\text{amylose content} = \frac{R \times a \times 20}{A \times r}$$

กำหนดให้ amylose content คือ ปริมาณอะมิโลส  
R คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง



A	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ standard amylose
r	คือ	น้ำหนักตัวอย่าง (db)
a	คือ	น้ำหนักของ standard amylase

## 6. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) (Somogyi-Nelson, 1994)

### สารเคมี

1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
2. Alkaline copper reagent
3. Nelson reagent

### วิธีการ

- 1.1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
  - 1.1.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
  - 1.1.2 เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นเป็น 40, 80, 120, 160 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางข้างล่าง

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาณสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (ml)
40	48	2
80	46	4
120	44	6
160	42	8
200	40	10

- 1.1.3 ดูดสารละลายที่เตรียมได้ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง
- 1.1.4 เติม Alkaline copper reagent 1 ml ผสมให้เข้ากัน
- 1.1.5 นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95°C เป็นเวลา 15 นาที
- 1.1.6 ทำให้เย็นใน Ice bath
- 1.1.7 เติม Nelson reagent 1 ml ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
- 1.1.8 เติมน้ำกลั่น 5 ml ผสมเข้ากัน

- 1.1.9 นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
- 1.1.10 plot graph ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาล โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน y และความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่แกน x หาค่าความชันจากกราฟที่ได้
- 1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง
- 1.2.1 ดูดตัวอย่าง (สารละลายสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวก่อนและหลังการถูกย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส ดังข้อ 2.2.1/ สารละลายสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์หรือกรด ดังข้อ 2.3.1) อย่างละ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง
- 1.2.2 ทำการทดลองดังข้อ 1.1.4 – 1.1.9
- 1.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Ab}_{520} \times \text{Dil}}{\text{Slope}}$$

กำหนดให้  $\text{Ab}_{520}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

$\text{Dil}$  คือ Dilution

$\text{Slope}$  คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

## 7. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol-Sufuric Reaction (Dubios *et al.*, 1956)

### สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. Phenol Solution ความเข้มข้นร้อยละ 5

### วิธีการ

- 2.1. การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด
  - 2.1.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
  - 2.1.2 เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้นเป็น 40, 60, 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงดังตารางข้างล่าง

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ( $\mu\text{g/ml}$ )	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ปริมาณสารละลายน้ำตาลกลูโคส 100 $\mu\text{g/ml}$ (ml)
20	8	2
40	6	4
60	4	6
80	2	8

2.1.3 คูดสารละลายที่เตรียมได้ 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.1.4 เติมสารละลาย Phenol เข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วย mixer

2.1.5 ตั้งทิ้งไว้ในตู้ดูดควันเป็นเวลา 30 นาที

2.1.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

2.1.7 plot graph ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาล โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่แกน y และความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่แกน x หาค่าความชันจากกราฟที่ได้

## 2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่าง

2.2.1 คูดตัวอย่าง (สารละลายสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียว ก่อนและหลังการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pullulanase ดังข้อ 2.2.1/ สารละลายสตาร์ชข้าว สตาร์ชเมล็ดขนุน และสตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการถูกย่อยด้วยเอนไซม์หรือกรด ดังข้อ 2.3.1)

2.2.2 ทำการทดลองดังข้อ 2.1.3 – 2.1.7

## 2.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{Ab}_{485} \times \text{Dil}}{\text{Slope}}$$

กำหนดให้  $\text{Ab}_{520}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร

$\text{Dil}$  คือ Dilution

$\text{Slope}$  คือ ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานกลูโคสของการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

## ภาคผนวก ข การเตรียมเอนไซม์

### 1. การเตรียมน้ำลายเทียม

1.1 ชั่งสารเคมีตามรายการที่แสดงใน Table Appendix 1 และนำมาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 450 มิลลิลิตร โดยกวนตลอดเวลาจนกระทั่งสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

1.2 ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 6.8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์

1.3 ปรับปริมาตรของสารละลายเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

Table Appendix 1. Composition of artificial saliva

Chemicals	Formular	Quantity (g/500ml)
Sodium chloride	NaCl	0.797
Ammonium nitrate	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.164
Potassium phosphate	KHPO <sub>4</sub>	0.318
Potassium chloride	KCl	0.101
Potassium citrate monohydrate	K <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> •H <sub>2</sub> O	0.154
Uric acid sodium salt	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Na	0.0105
Urea	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	0.099
Lactic acid sodium salt	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na	0.073
DI water	H <sub>2</sub> O	Make up volume

### 2. การเตรียมเอนไซม์

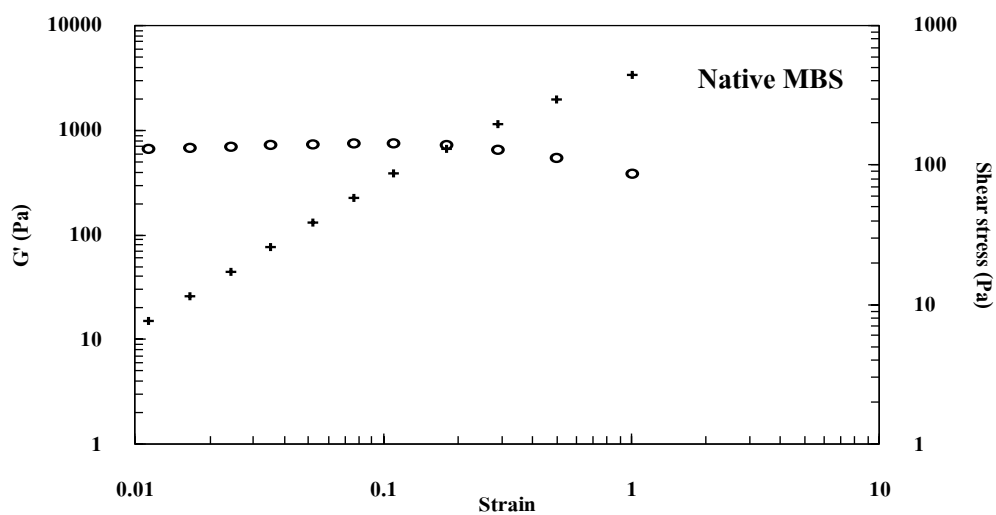
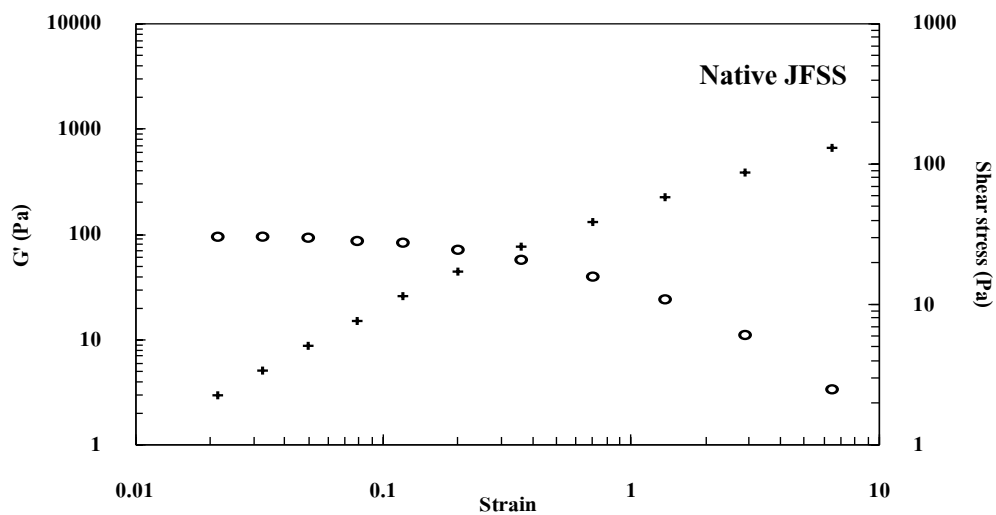
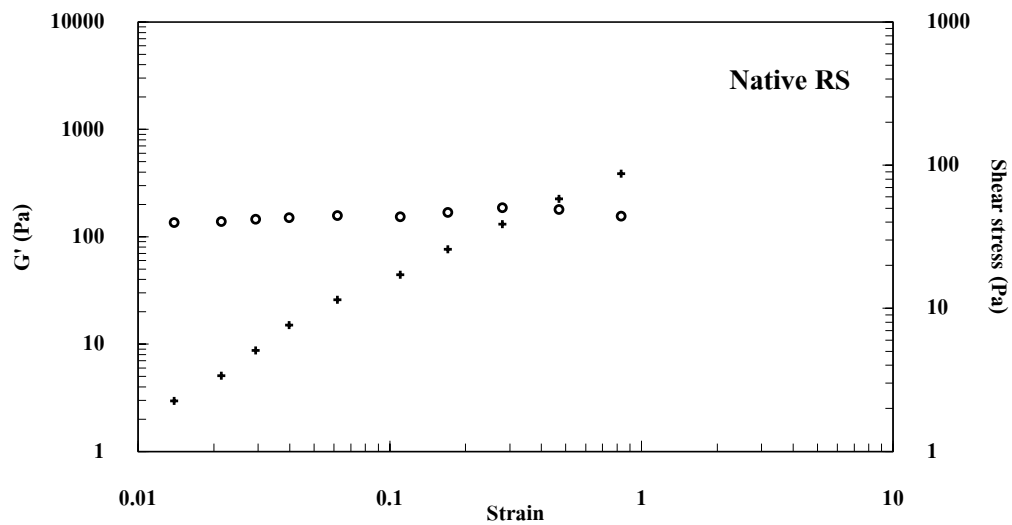
#### 2.1 การเตรียมเอนไซม์ human salivary $\alpha$ -amylase

เตรียมเอนไซม์ human salivary  $\alpha$ -amylase type XIII-A (Sigma A1031, 10.2 mg solid; 98.3 unit/mg solid) โดยชั่งเอนไซม์ 2.04 mg ละลายในน้ำกลั่นแช่เย็นปริมาตร 2 ml (เอนไซม์มีความเข้มข้นเท่ากับ 100.27 unit/ml)

#### 2.2 การเตรียมเอนไซม์ porcine pancreatic $\alpha$ -amylase

เตรียมเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase type VI-B (Sigma A3176, 26.0 unit/mg solid) โดยชั่งเอนไซม์ 20 mg ละลายในสารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 5 ml (เอนไซม์มีความเข้มข้นเท่ากับ 104 unit/ml)

ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ Linear viscoelastic (Strain sweep test)



ภาคผนวก ง การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

Table Appendix 2. Analysis of variance of degree of hydrolysis (D.H.) of rice starch and debranching time and concentration of pullulanase enzyme.

	Source	df	Mean Square	F <sub>calculate</sub>
D.H.	Concentration pullulanase enzyme (C)	3	5086.684	15682.599*
	Debranching Time (D)	3	871.485	2686.848*
	C x D	9	58.651	180.825*
	Error	32	0.324	

\*Significant at  $p < 0.05$

Table Appendix 3. Analysis of variance of degree of hydrolysis (D.H.) of jackfruit seed starch and debranching time and concentration of pullulanase enzyme.

	Source	df	Mean Square	F <sub>calculate</sub>
D.H.	Concentration pullulanase enzyme (C)	3	5084.694	29677.924*
	Debranching Time (D)	3	858.913	5013.236*
	C x D	9	90.859	530.319*
	Error	32	0.171	

\*Significant at  $p < 0.05$

Table Appendix 4. Analysis of variance of degree of hydrolysis (D.H.) of mung bean starch and debranching time and concentration of pullulanase enzyme.

	Source	df	Mean Square	F <sub>calculate</sub>
D.H.	Concentration pullulanase enzyme (C)	3	5494.006	19355.022*
	Debranching Time (D)	3	4259.476	14990.348*
	C x D	9	144.978	510.222*
	Error	32	0.284	

\*Significant at  $p < 0.05$

## ประวัติผู้เขียน

<b>ชื่อ-สกุล</b>	นางสาวปาริฉัตร พฤษชัยวัฒนากุล		
<b>รหัสประจำตัวนักศึกษา</b>	5311020022		
<b>วุฒิการศึกษา</b>			
<b>วุฒิ</b>	<b>ชื่อสถาบัน</b>	<b>ปีที่สำเร็จการศึกษา</b>	
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552	

### ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

- ทุนการศึกษาจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัย  
แห่งชาติของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

### การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Phrukwiwattanakul, P., Wichienchot, S. and Sirivongpaisal, P. 2013. Comparative studies on  
physico-chemical properties of starches from jackfruit seed and mung bean. Int. J. Food  
Prop. xx: xxx-xxx. (Inpress)