

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 วัสดุคืบ

- แป้งข้าวเจ้า ตราช้างสามเศียร (บริษัทชอเฮง จำกัด)
- สตาร์ชมันสำปะหลัง ตราปลาไทย ห้าดาว (บริษัท อี.ที.ซี. เอียบตงจัน จำกัด)
- แป้งข้าวเหนียว ตราช้างสามเศียร (บริษัทชอเฮง จำกัด)
- สตาร์ชข้าวโพดอะไมโลสสูง ตราGELOSE 50[®] (บริษัท Penford Australia Limited)
- เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (1,4- α -D-glucan glucano-hydrolase จาก *Bacillus amyloliquefaciens*) ตราTermamyl BAN 240L[®] (บริษัท Novo Nordisk limited) (ภาคผนวก ง)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

- Hydrochloric acid (Merck) A.R. grade
- Sodium hydroxide (Univar) A.R. grade

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของสตาร์ช

- Selenium mixture (Merck) A.R. grade
- Sulfuric acid (Merck) A.R. grade
- Sodium hydroxide (Univar) A.R. grade
- Boric acid (Univar) A.R. grade
- Methyl red (Merck) A.R. grade

- Methylene blue (Carlo Erba) A.R. grade
- Ethanol (Merck) A.R. grade
- Hydrochloric acid (Merck) A.R. grade
- Petroleum ether (Univar) A.R. grade

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส

- Acetic acid (J.T. Baker) A.R. grade
- Iodine (Carlo Erba) A.R. grade
- Potassium iodide (Univar) A.R. grade
- Potato amylase (Sigma Chemical) Biochemistry grade
- Absolute ethyl alcohol (Mallinckrodt) A.R. grade
- Sodium hydroxide (Univar) A.R. grade

3.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- D – glucose (Univar) A.R. grade
- Anhydrous disodium hydrogen phosphate (Merck) A.R. grade
- Potassium sodium tartrate (Rochelle salt) (Univar) A.R. grade
- Sodium Hydroxide (Univar) A.R. grade
- Copper sulfate pentahydrate (Merck) A.R. grade
- Disodium sulfate (Fluka) A.R. grade
- Ammonium molybdate (Univar) A.R. grade
- Sulfuric acid (Merck) A.R. grade

- Disodium hydrogen arsenate heptahydrates (Fisher) A.R. grade

3.2.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ total carbohydrate

- Phenol (Univar) A.R. grade

- Sulfuric acid (Merck) A.R. grade

3.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องชั่งชนิดหยาบ SARTORIUS รุ่น 1907 MPS

เครื่องชั่งชนิดละเอียด SARTORIUS รุ่น A200S

ตู้อบลมร้อน (ยี่ห้อ Memmert รุ่น Modell 600, Germany)

BÜchi Digestion Unit (ยี่ห้อ BÜchi รุ่น K-424, Switzerland)

BÜchi Distillation Unit (ยี่ห้อ BÜchi รุ่น B-324, Switzerland)

Soxhlet (ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น HC61, Germany)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) PerkinElmer Instrument รุ่น Lambda 25

เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texturometer) รุ่น TA-XT2

เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) Waters 600E (Controller), Walters 2410 (Refractive Index Detector) ของศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ

เครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) DSC Daimond รุ่น DSC 7

3.4 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของสตาร์ชที่ใช้เตรียมไฮโดรไลเสด

เตรียมสตาร์ชจากแป้งข้าวเหนียวโดยแช่แป้งข้าวเหนียวในสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปล้างในน้ำกลั่นและปั่นที่ 7,500 รอบเป็นเวลา 15 นาที จนกว่าแป้งที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นนำสตาร์ชที่สกัดได้ไปอบแห้งที่ 40°C ข้ามคิน แล้วนำสตาร์ชที่แห้งสนิทไปบดให้ละเอียดแล้วผ่านตะแกรงร่อนขนาด 150 mesh เก็บ

สตาร์ชที่ได้ในถ่วงกันความชื้นแบบซิบลิคที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์องค์ประกอบของแป้งและ
สตาร์ชทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองดังนี้

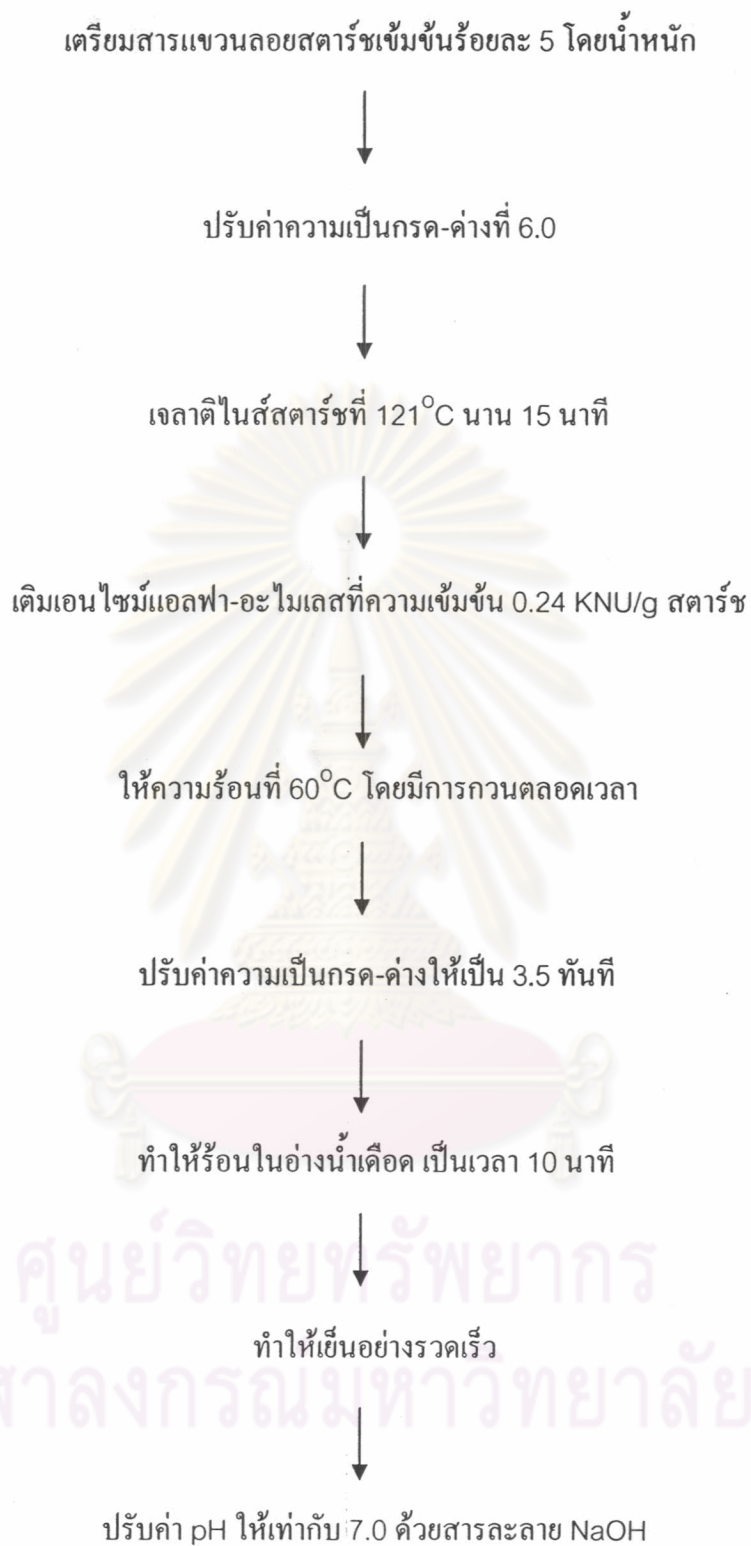
- ความชื้น ตามวิธี AOAC 32.1.03 (2000) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.1)
- โปรตีน ตามวิธี AOAC 32.1.32 (2000) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.2)
- ไขมัน ตามวิธี AOAC 32.1.13 (2000) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.3)
- ปริมาณอะไมโลส ตามวิธีของ Juliano (1971) (รายละเอียดในภาคผนวก ก.4)

ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design ทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.2 ศึกษาการเตรียมไฮโดรไลสจากสตาร์ชชนิดต่างๆ

เตรียมสตาร์ชไฮโดรไลสจากสตาร์ชมันสำปะหลัง สตาร์ชข้าวเหนียว และ
สตาร์ชข้าวโพดอะไมโลสสูงทำการเตรียมขึ้นตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 2 แปลเวลาการย่อย 0.5 1
4 และ 7 ชั่วโมง ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design ทดลอง 2 ซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 : กระบวนการเตรียมสตาร์ชไฮโดรไลสได้จากสตาร์ชมันสำปะหลัง สตาร์ชข้าวเหนียว และสตาร์ชข้าวโพดอะไมโลสสูง

3.4.3 ศึกษาสมบัติทางเคมีของสตาร์ชไฮโดรไลเสด

3.4.3.1 วิเคราะห์ปริมาณ reducing sugars ของสตาร์ชไฮโดรไลเสด ตามวิธีของ Nelson (1944) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณ total carbohydrates ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)(ภาคผนวก ค) เพื่อกำหนดค่า DE ของสตาร์ชไฮโดรไลเสดที่เตรียมขึ้น ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design ทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.3.2 วิเคราะห์การกระจายตัวของโมเลกุลแป้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆของสตาร์ชไฮโดรไลเสดที่เตรียมขึ้นด้วยเครื่อง GPC โดยมีสภาวะที่ใช้ในการทดสอบดังนี้

Eluent : Deionized water

Flow rate : 0.6 ml/min

Injection volume : 20 μ l

Temperature : 30 $^{\circ}$ C

Column set : Ultrahydrogel linear (Waters) (MW resolving range = 1,000-20,000,000) 1 column + Asahipak GS-220 HQ (Shodex) (MW resolving range = 100-3,000) 1 column + Guard column

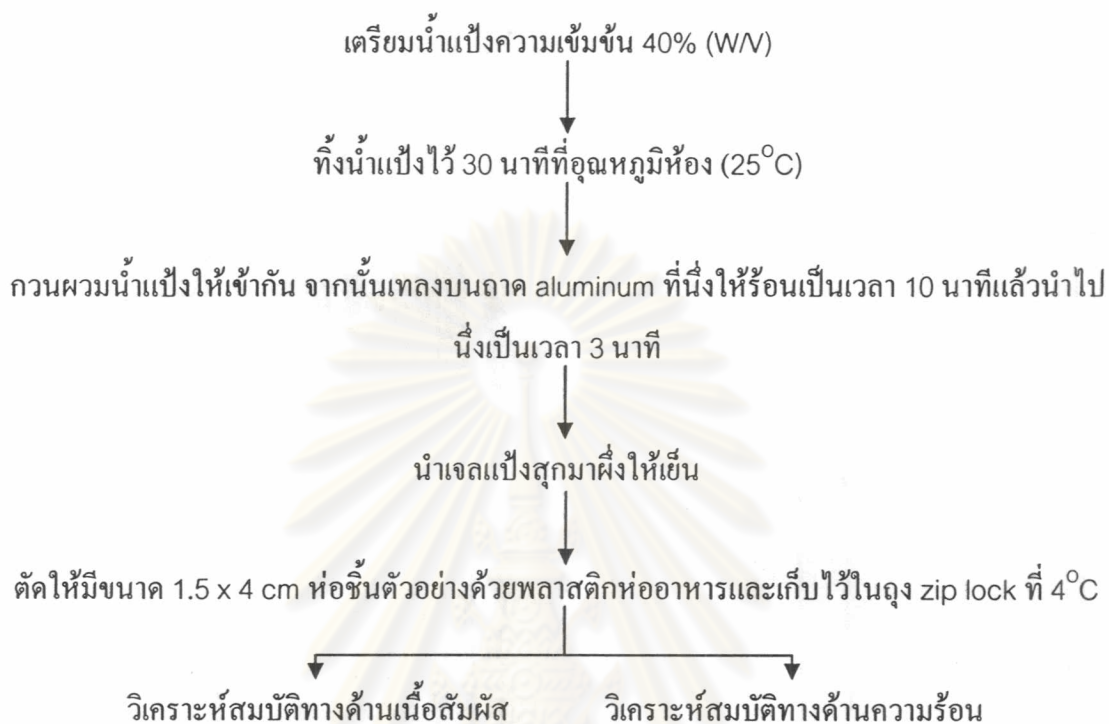
Polymer standard : Pullulans

Calibration methods : Pullulan standard calibration (MW 180-788,000)

3.4.4 ศึกษาผลของสตาร์ชไฮโดรไลเสดจากสตาร์ชมันสำปะหลังต่อการชะลอการเกิดสตาร์ชรีโทรเกรเดชันของเจลแป้งข้าวเจ้า

3.4.4.1 เตรียมเจลแป้งข้าวเจ้าโดยมีการทดแทนแป้งข้าวเจ้าด้วยสตาร์ชไฮโดรไลเสดที่ผ่านการย่อยเป็นระยะเวลา 0.5 1 4 และ 7 ชั่วโมง ในระดับร้อยละ 1 5 และ 10 ของน้ำหนักของแข็งตามขั้นตอนที่แสดงในรูปที่ 4 โดยคำนวณปริมาตรของสตาร์ชไฮโดรไลเสดที่ต้องใส่ลงไปจากปริมาณ total carbohydrates ที่ทดลองจากขั้นตอนที่ 3.4.2 ออกแบบการทดลองแบบ factorial design ทดลอง 2 ซ้ำ

การเตรียมเจลแป้งข้าวเจ้า



รูปที่ 3 : กระบวนการเตรียมเจลแป้งข้าวเจ้า

3.4.4.2 ติดตามการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลแป้งข้าวเจ้าโดยการทดสอบสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง texturometer และสมบัติทางด้านความร้อนด้วยเครื่อง DSC

- การทดสอบสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสของเจลแป้งข้าวเจ้า

นำชิ้นตัวอย่างมาทดสอบสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง texture analyser รุ่น TA-XT2 พร้อมหัวดึงแบบ tensile grip (TG/A) โดยใช้สภาวะการทดสอบเนื้อสัมผัสดังนี้

Tensile Deformation Test

Mode	: Measure Force In Tension
Option	: Return to Start
Pretest Speed	: 3.0 mm/s
Test Speed	: 3.0 mm/s
Posttest Speed	: 5.0 mm/s
Trigger type	: Auto 10 g
Data Acquisition Rate	: 200 PPS

ค่า Tensile strength สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Tensile strength} = \frac{\text{Force}}{\text{พท. หน้าตัดของเจลแป้ง}}$$

$$\text{Extensibility} = \text{ระยะที่เจลแป้งข้าวเจ้าสามารถยืดออก}$$

- การทดสอบเจลแป้งด้วยเครื่อง DSC

ตัดเจลแป้งที่เก็บรักษาไว้เป็นชิ้นเล็กๆขนาดเท่ากัน น้ำหนักประมาณ 45-50 mg ใส่ลงใน stainless steel DSC pan จากนั้นปิด pan ให้สนิทแล้วนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง DSC จาก 30°C ถึง 95°C ที่อัตรา 10°C/นาทีโดยใช้ DSC panเปล่าเป็น reference ค่าที่วัดได้จากการทดลองคือค่า onset temperature (T_o) peak temperature (T_p) และ final temperature (T_f) ค่า enthalpy ของการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลแป้งข้าวเจ้าจะถูกวัดอย่างอัตโนมัติด้วยโปรแกรมของเครื่อง DSC

3.4.5 ศึกษาผลของสตาร์ชไฮโดรไลสเสตจากสตาร์ชข้าวเหนียวต่อการชะลอการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลแป้งข้าวเจ้า ตามวิธีในข้อ 3.4.4.1 โดยเปลี่ยนสตาร์ชไฮโดรไลสเสตจากสตาร์ชมันสำปะหลังเป็นสตาร์ชข้าวเหนียวและติดตามการเกิด retrogradation เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2

3.4.6 ศึกษาผลของสตาร์ชไฮโดรไลสเสตจากสตาร์ชข้าวโพดอะไมโลสสูงต่อการชะลอการเกิดรีโทรเกรเดชันของเจลแป้งข้าวเจ้า ตามวิธีในข้อ 3.4.4.1 โดยเปลี่ยนสตาร์ชไฮโดรไลสเสตจากสตาร์ชมันสำปะหลังเป็นสตาร์ชข้าวโพดอะไมโลสสูงและติดตามการเกิด retrogradation เช่นเดียวกับข้อ 3.4.4.2