

สมบัติทางโครงสร้างและทางกายภาพของแป้งมันสำปะหลังตัดกิ่ง

วรวิทย์ เกียรติพงษ์ลาภ และ สุนันทา ทองทา*

Worawikunya Kiatponglarp and Sunanta Tongta*. (2007). Structural and Physical Properties of Debranched Tapioca Starch. Suranaree J. Sci. Technol. 14(2):195-204.

Received: Oct 19, 2006; Revised: Mar 6, 2007; Accepted: Mar 8, 2007

Abstract

Tapioca starch gel (5%, 8%, and 10%) was debranched with the pullulanase concentration of 5, 15, and 30 PUN/g of starch for 44 h. The higher enzyme concentration, the greater degree of hydrolysis (DH) at 5 - 8% starch. The constant and maximum DH was found at 8% starch and 15 PUN/g of starch enzyme. The longer reaction time from 30 min to 24 h increased degree of debranching (DB) from 58.9 to 89.3% and average number of chain from 22 to 42, but decreased average chain length from 117 to 51 glucose unit. The association of debranched starch into an order structure was present during debranching process as indicated by XRD and DSC technique. The crystalline type was C_B polymorph. Three regions of the thermal transition temperatures appeared at 50 - 120°C, 140 - 170°C, and 170 - 197°C. In the aspect of retrogradation of debranched starch, WHC, T_m and enthalpy of retrogradation were increased as DB was higher.

Keywords: Debranching, pullulanase, retrogradation, tapioca starch

บทคัดย่อ

การตัดกิ่งโมเลกุลแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์พุลูลาเนส (Pullulanase) ที่ความเข้มข้นของแป้ง 5, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5, 15 และ 30 พุลูลาเนสยูนิต (PUN) ต่อกรัมของแป้งเป็นเวลา 44 ชั่วโมง พบว่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วงปริมาณแป้ง 5 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ระดับการย่อยคงที่และสูงสุดที่ปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ 15 พุลูลาเนสยูนิตต่อกรัมของแป้ง เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มจาก 30 นาที ถึง 24 ชั่วโมง ทำให้ระดับของการตัดกิ่งเพิ่มขึ้นจาก 58.9 เป็น 89.3 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนสายโซ่เฉลี่ยมีมากขึ้นจาก 22 เป็น 42 สายโซ่ แต่ความยาว

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000 E-mail: s-tongta@g.sut.ac.th

* ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ

วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 14(2):195-204

สายโซ่เฉลี่ยลดลงจาก 117 เป็น 51 หน่วยกลูโคส แป้งตัดกึ่งมีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบในระหว่างการจัดตั้งหลังการตรวจสอบด้วย XRD และ DSC โดยแสดงรูปแบบผลึกแบบ C₆ และมีช่วงอุณหภูมิของการเปลี่ยนเฟส 3 ช่วง คือ 50 - 120 องศาเซลเซียส 140 - 170 องศาเซลเซียส และ 170 - 197 องศาเซลเซียส สำหรับการเกิดรีโทรเกรเดชันของแป้งตัดกึ่ง พบว่าความสามารถในการอุ้มน้ำ อุณหภูมิการหลอมเหลวของผลึกและเอนทัลปีของการเกิดรีโทรเกรเดชันสูงขึ้น ในแป้งที่มีระดับการตัดกึ่งมากขึ้น

บทนำ

แป้งมีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วน คือ ส่วนอะมิโลส ที่เป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นโดยมีกิ่งเพียงเล็กน้อย และส่วนอะมิโลเพกตินที่เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่ง โมเลกุลกิ่งก้านเหล่านี้สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์พุลูลานเนส หรือไอโซอะมิเลส ในอุตสาหกรรมมีการนำแป้งที่ได้ตัดกึ่งไปใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เช่น เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง เมื่อยา และแผ่นฟิล์ม (Butler *et al.*, 2004) และแป้งที่ต้านทานต่อการย่อยของเอนไซม์ (enzyme resistant starch) (Lehmann *et al.*, 2002; Gonzalez-Soto *et al.*, 2004) การตัดกึ่งทำให้โครงสร้างโมเลกุลของแป้งเกิดการเปลี่ยนแปลงและเกิดเป็นพอลิเมอร์เรียกว่า อะมิโลเดกรีทรีนซ์ (amylodextrins) ที่ประกอบด้วยส่วนของอะมิโลส และโมเลกุลเส้นตรงสายสั้นที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน (Butler *et al.*, 2004)

โดยทั่วไปสารละลายเจลแป้งไม่เสถียรที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เกิดการตกผลึก เรียกว่าการเกิดรีโทรเกรเดชัน ในระบบที่มีน้ำมากและอุณหภูมิปานกลางนั้น การรวมตัวเป็นเกลียวคู่ของโมเลกุลจะเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกที่มีรูปแบบ B-polymorph ขณะที่อุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกในรูปแบบ A-polymorph โดยส่วนที่เป็นเส้นตรงของโมเลกุลอะมิโลสสามารถจัดเรียงเป็นผลึกได้เร็วกว่าอะมิโลเพกติน (Shamai *et al.*, 2003) การเกิดรีโทรเกรเดชันของโมเลกุลเส้นตรงสายสั้นนั้นขึ้นกับความยาวของสายโซ่ โดยสายโซ่ที่ประกอบด้วยกลูโคส 80 ถึง 100 หน่วยสามารถเกิดรีโทรเกรเดชันได้สูง และสามารถเกิดโครงสร้างร่างแหเป็นเจล (gelation network) ส่วนโมเลกุลที่มีความยาวสายโซ่สั้นนั้น จะเกิดการจัดเรียงเกลียวคู่และตกตะกอน (Gidley and Bulpin, 1989) ดังนั้น แป้งตัดกึ่งที่ประกอบด้วยโมเลกุลที่มี

ลักษณะและขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน อาจมีลักษณะการจัดเรียงตัวของโมเลกุลและการตกผลึกที่แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงกระบวนการตัดกึ่งต่อสมบัติทางโครงสร้างและกายภาพของแป้งมันสำปะหลัง

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุทดลอง

แป้งมันสำปะหลังจาก บริษัท สวณวงษ์ อุตสาหกรรม จำกัด จังหวัดนครราชสีมา และเอนไซม์พุลูลานเนส (EC 3.2.1.41) ชื่อทางการค้า Promozyme D2 จากบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก โดยกิจกรรมของเอนไซม์พุลูลานเนสวิเคราะห์ตามวิธีการของ Novo Industri A/S (1983) โดยเอนไซม์พุลูลานเนส 1 พุลูลานเนสยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยพุลูลานเป็นคาร์โบไฮเดรตรีดิซท์ที่มีกำลังรีดิซท์สมมูลกับกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

การตัดกึ่งแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ให้ความร้อนในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และให้ความร้อนที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปรับปริมาณของแข็งเป็น 5, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ด้วย acetate buffer pH 5.0 เติมเอนไซม์พุลูลานเนสในปริมาณ 5, 15 และ 30 พุลูลานเนสยูนิตต่อแป้ง 1 กรัม บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 44 ชั่วโมง สุ่มเก็บสารละลายตัวอย่างที่เวลา 1.5, 3, 6, 12, 24 และ 44 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952) เทียบกับน้ำตาลมอลโทสมาตรฐาน วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (Dubois *et al.*, 1956) คำนวณระดับการย่อย (degree of hydrolysis) จากสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

สารละลายแป้งที่ความเข้มข้นน้ำแป้ง 8 เปอร์เซนต์ และย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูแลนส 15 พุลลูแลนสยูนิตต่อแป้ง 1 กรัม ถูกเลือกนำไปตรวจสอบสมบัติทางโครงสร้างและสมบัติทางกายภาพโดยหุคปฏิบัติกริยาของเอนไซม์ ณ เวลาต่าง ๆ แล้วทำให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง โดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ความสามารถในการจับกับไอโอดีนและการอุ้มน้ำของสารละลายแป้งตัดกึ่ง ณ เวลาการย่อยต่าง ๆ ส่วนที่เหลือทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง บดและร่อนให้มีขนาดอนุภาค 75 - 105 ไมครอน

การตรวจสอบโครงสร้าง

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารละลายแป้งตัดกึ่ง ณ ระยะเวลาการย่อยต่าง ๆ นำมาหาค่าระดับการตัดกึ่ง (degree of branching, DB) ตามวิธีการของ Shin *et al.* (2004) จากสัดส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของแป้งตัดกึ่งสมบูรณ์ และหาค่าจำนวนสายโซ่เฉลี่ย (average number of chain, NC) จากสัดส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนการย่อย หาคความยาวของสายโซ่เฉลี่ย (average chain length, CL) จากสัดส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหลังการย่อยต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังการย่อย ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Hood and Mercier (1978)

การวิเคราะห์ความสามารถในการจับกับไอโอดีน (Iodine Binding Capacity, IBC)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Knuston (1986) โดยนำสารละลายแป้งตัดกึ่ง ณ เวลาการย่อยต่าง ๆ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ dimethyl sulfoxide 2.0

มิลลิลิตร เติมสารละลายไอโอดีนเข้มข้น 0.6 มิลลิลิตร 5.0 มิลลิลิตร ตั้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water Holding Capacity, WHC)

นำสารละลายแป้งตัดกึ่ง ณ เวลาการย่อยต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เก็บไว้ในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทั้งส่วนใสและน้ำส่วนที่เหลือนำมาชั่งน้ำหนัก คำนวณหาความสามารถการอุ้มน้ำของเจลจากสัดส่วนของน้ำหนักเจลตะกอนต่อน้ำหนักของสารละลายแป้งทั้งหมด

การตรวจวัดด้วยเทคนิค X-ray Diffraction

ตัวอย่างแป้งตัดกึ่งผงที่มีความชื้นระหว่าง 7 - 10 เปอร์เซนต์ วัดความเป็นผลึกด้วยเครื่อง X-ray diffractometer รุ่น D5005 (Bruker GmbH, Germany) ที่ใช้ 1.54 Å CuK α ในการกำเนิดรังสีเอกซ์ วัดในช่วงมุม (2 θ) 4 - 30 องศา โดยกำหนดกระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์ ศักย์ไฟฟ้า 40 กิโลโวลต์ ความเร็วในการตรวจวัด 0.480 องศาต่อนาที คำนวณปริมาณผลึก (relative crystallinity, (%)) จากสัดส่วนพื้นที่ส่วนผลึกต่อพื้นที่ทั้งหมดตามวิธีของ Herman and Weidinger (1961) ด้วย EVA Diffract Plus#1 software (Bruker GmbH, Germany)

การตรวจวัดด้วยเทคนิค Differential Scanning Calorimetry (DSC)

ชั่งตัวอย่างแป้งตัดกึ่งผง 10 มิลลิกรัม และน้ำปราศจากไอออน 30 มิลลิกรัม ลงใน stainless steel DSC pan ที่มีปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 8 ชั่วโมง ให้ความร้อนด้วยเครื่อง Pyris Diamond DSC (Perkin Elmer, Connecticut, USA) จากอุณหภูมิ 5 ถึง 200 องศาเซลเซียส ที่อัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างไว้ที่ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน เพื่อตรวจสอบการเกิดรีโทรเกรเดชัน ใช้ stainless steel pan เปลาเป็น reference และ Indium เป็น standard ในการทดสอบ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของการทดลอง 3 ซ้ำ ด้วย Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SAS software version 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, NC)

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

สถานะของการตัดกิ่งแป้งมันสำปะหลังต่อระดับการย่อย

Promozyme D2 เป็นเอนไซม์พุลลูลานเนสทางการค้าที่มีความบริสุทธิ์ระดับหนึ่ง โดยพบว่ามีการกัมกับ 570 พุลลูลานเนสยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีการปนเปื้อนของเอนไซม์แอลฟาอะมิเลสบางส่วน (23 U/ml) โดยเอนไซม์พุลลูลานเนสมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับแป้งแต่ละชนิดได้แตกต่างกันขึ้นกับสถานะการย่อย (Kujawski *et al.*, 2003) จากรูปที่ 1 พบว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ระดับการย่อยมีค่าเพิ่มขึ้นในทุกสถานะการย่อย โดยมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่ในช่วง 12 และหลังจากย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับการย่อยไม่แสดงความแตกต่างในทุกสถานะการย่อย ($p > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ Gonzalez-Soto *et al.* (2004) ที่ศึกษาในแป้งกล้วย และ Guraya *et al.* (2001b) ที่ศึกษาในแป้งข้าวพันธ์ ข้าวเหนียวและข้าวเจ้า โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสเพิ่มขึ้นภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาการย่อยนานขึ้น

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแป้งและปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยแสดงด้วยกราฟพื้นผิวตอบสนอง (Response surface plot) ดังรูปที่ 2 ในช่วงแรก (ชั่วโมงที่ 0.5 ถึง 3, รูปที่ 2(a)) พบว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเพิ่มขึ้นมีผลให้ระดับการย่อยมีค่าเพิ่มขึ้น ($p < 0.01$) แต่ความเข้มข้นแป้งไม่มีผลต่อระดับการย่อย เนื่องจากสับสเตรทมีมากเกินไปต่อการทำปฏิกิริยา แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยนานขึ้น (ชั่วโมงที่ 6 ถึง 24, รูปที่

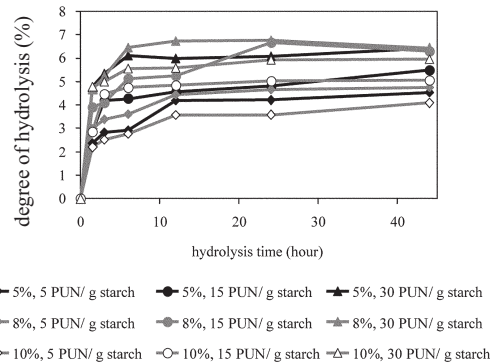


Figure 1. The hydrolysis rate of tapioca starch by pullulanase (Promozyme D2) as a function of time

2(b) และ (2c) ความเข้มข้นแป้งมีผลต่อระดับการย่อย ($p < 0.05$) โดยเมื่อความเข้มข้นแป้งเพิ่มจาก 5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 8 เปอร์เซ็นต์ ระดับการย่อยมีการเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ระดับการย่อยลดลง (รูปที่ (2b) และ (2c) แสดงให้เห็นว่าที่ความเข้มข้นแป้งสูง ๆ เอนไซม์ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งได้อย่างเต็มที่ เนื่องจากระบบมีความหนืดสูง ในช่วงระยะเวลาที่ระดับการย่อยคงที่ (รูปที่ (2c)) ระดับการย่อยที่ความเข้มข้นแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอนไซม์ 15 พุลลูลานเนสยูนิตต่อกรัมแป้ง ไม่แตกต่างจากที่ 30 พุลลูลานเนสยูนิตต่อกรัมแป้ง ($p < 0.01$) ดังนั้น สถานะการย่อยที่ความเข้มข้นของแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอนไซม์ 15 พุลลูลานเนสยูนิตต่อกรัมแป้ง จึงใช้ในการศึกษาโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังตัดกิ่งที่ระดับการย่อยต่าง ๆ

ผลของการตัดกิ่งต่อโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลัง

การตัดกิ่งแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังเมื่อระยะเวลาในการย่อยนานขึ้น ระดับการตัดกิ่ง (degree of debranching) สูงขึ้น โมเลกุลส่วนที่เป็นกิ่งก้านถูกตัดที่ตำแหน่งกิ่ง ทำให้ความยาวสายโซ่เฉลี่ยลดลง และจำนวนสายโซ่เฉลี่ยเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) นอกจากนั้น ความสามารถในการจับกับไอโอดีน (IBC) มีสหสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับการตัดกิ่งและจำนวนสายโซ่เฉลี่ย ($r^2 = 0.97$

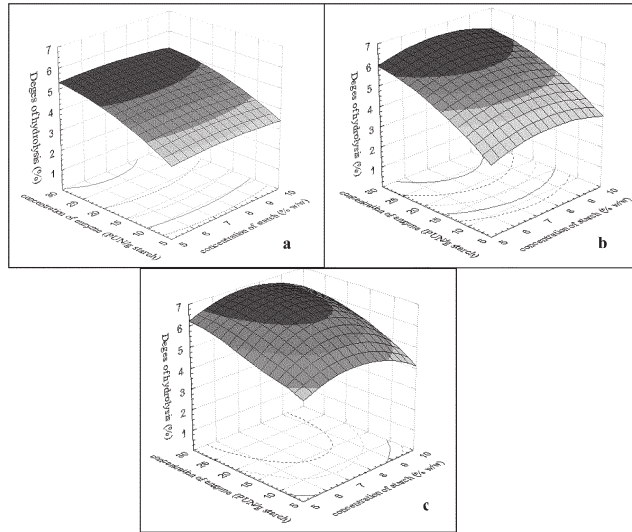


Figure 2. Effect of enzyme and tapioca concentration on the degree of hydrolysis by pullulanase (Promozyme D2) at the time of (a) 0.5 - 3.0 h (b) 6 - 12 h and (c) 12 - 24 h

และ 0.85 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า IBC สามารถใช้วิเคราะห์เพื่อแสดงทางอ้อมของสัดส่วนของกิ่งก้านที่ผลิตออกมาได้ โดย IBC เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสารประกอบเชิงซ้อนอะมิโลสกับไอโอดีน ดังนั้น จำนวนสายโซ่เฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงโมเลกุลเส้นตรง (linear fragment) ถูกปล่อยออกมามากขึ้น โดยโมเลกุลที่เกิดขึ้นประกอบด้วยสายสั้นของ A chain และสายยาวของ B chain ซึ่ง Takeda and Hizukuri (1987) ได้รายงานไว้ว่า A chain มีความสามารถในการจับกับไอโอดีนต่ำ แต่ B chain เป็นสายที่เชื่อมระหว่าง cluster มีความสามารถในการจับกับไอโอดีนได้สูงกว่า แสดงว่าการตัดกิ่งเป็นเวลานานขึ้นทำให้สัดส่วนของ B chain เพิ่มขึ้น ทำให้การจับกับไอโอดีนของโมเลกุลแอลฟาไกลูแคนเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการอธิบายของ Knutson (1999) และ Guraya *et al.* (2001b) ว่า เกลียว (helix) 1 รอบต้องการน้ำตาลกลูโคส 6 โมเลกุล ดังนั้นสายโซ่ที่ยาวจึงสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีนโดยพันเป็นเกลียวรอบไอโอดีนได้หลายรอบ อย่างไรก็ตาม เมื่อระดับการตัดกิ่งเป็น 88.5 เปอร์เซ็นต์พบว่า IBC

ลดลง อาจเป็นผลเนื่องจากอะมิโลเพกตินถูกตัดจนได้สายโซ่สั้นมากขึ้น ดังสังเกตได้จากความยาวสายโซ่เฉลี่ยที่ลดลงมาก จึงทำให้ความสามารถในการจับกับไอโอดีนลดลง

สมบัติความเป็นผลึกของแป้งตัดกิ่ง

สารละลายแป้งที่ทำการตัดกิ่งเป็นระยะเวลา มากกว่า 3 ชั่วโมง มีความขุ่นเกิดขึ้นและเกิดการรวมตัวของสารแขวนลอยที่มีความขุ่นมากขึ้นแยกเฟสลงมาส่วนล่างของสารละลาย แสดงให้เห็นว่า ในระหว่างการตัดกิ่ง โมเลกุลที่ถูกตัดกิ่งเกิดการรวมตัวและมีการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่มีความเป็นผลึกขึ้น โดยเมื่อตรวจสอบความเป็นผลึกด้วย XRD พบว่า แป้งตัดกิ่งทุกระดับการตัดกิ่งแสดง diffraction peak ที่มุม 2θ ที่ 17.1, 21.1 และ 23.9 องศา (รูปที่ 3) ซึ่งเป็นรูปแบบผลึกแบบ C_B ของแป้ง (Cheetham and Tao, 1998) และพบว่าแป้งตัดกิ่งมีการเปลี่ยนรูปแบบผลึกจากแป้งธรรมชาติที่เป็นแบบ A เป็นแบบ C_B โดยรูปแบบผลึกแบบ B นั้น พบทั่วไปในแป้งที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่ำถึงปานกลาง (Eerlingen *et al.*, 1993; Shamai *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตาม สัดส่วนอะมิโลสและความยาวของสายโมเลกุล

เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการจัดเรียงโครงสร้างผลึกรูปแบบต่าง ๆ (Cheetham and Tao, 1998) ดังนั้น สัดส่วนโมเลกุลเส้นตรงที่เพิ่มขึ้น จึงมีผลให้โมเลกุลแป้งมันสำปะหลังที่ถูกตัดกิ่งมีการจัดเรียงรูปแบบผลึกแบบ C ในระหว่างการตัดกิ่ง

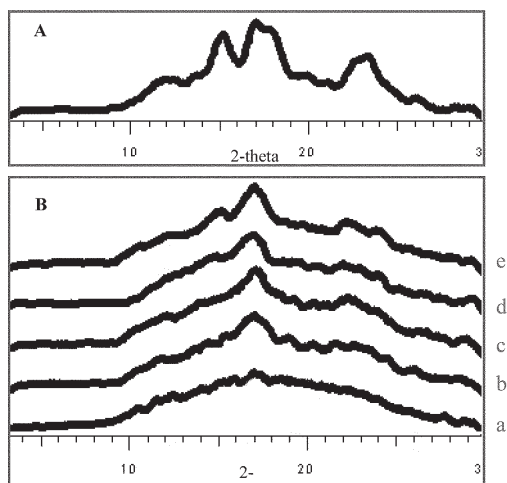


Figure 3. XRD diffraction spectra of (A) native tapioca starch and (B) debranched starch with different degree of debranching (DB) of a: 0%DB or gelatinized starch, b: 58.9%DB, c: 68.5%DB, d: 80.6%DB, e: 89.3%DB

สมบัติทางความร้อนของแป้งตัดกิ่งที่ระดับการตัดกิ่งต่าง ๆ ซึ่งตรวจสอบด้วย DSC แสดงช่วงอุณหภูมิในการหลอมเหลวของโครงสร้างที่เป็นระเบียบ 3 ช่วงอุณหภูมิ คือ 50 - 120 องศาเซลเซียส 140 - 170 องศาเซลเซียส และ 170 - 197 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อระดับการตัดกิ่งมากขึ้น อุณหภูมิพีคของการหลอมเหลว (T_p) และค่าเอนทัลปี (ΔH) ของอุณหภูมิการหลอมเหลวช่วงที่ 1 (first transition) มีค่ามากขึ้น นอกจากนี้ ที่ first transition แสดงความแตกต่างของอุณหภูมิการหลอมเหลว ($T_c - T_o$) ที่กว้างถึง 64.5 องศาเซลเซียส โดย $T_c - T_o$ แสดงถึงการเกิดผลึกขนาดเล็กแต่ละผลึกที่มีความแข็งแรงของโครงสร้างผลึกแตกต่างกัน (Vansanathan and Bhatt, 1996) ดังนั้น อาจอธิบายได้ว่า ที่ first transition แสดงสมบัติการหลอมเหลวของผลึกที่เกิดจากการจัดเรียงตัวกันของโมเลกุลตัดกิ่งที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยเมื่อระดับการตัดกิ่งมากขึ้น โมเลกุลตัดกิ่งมีความยาวสายโซ่ลดลง เกิดเป็นโมเลกุลเส้นตรงที่มีขนาดสั้นลง ทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของผลึกที่มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้นในระหว่างการตัดกิ่ง ดังเห็นได้จากค่า T_p ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ปริมาณผลึกสัมพัทธ์ (% relative crystallinity, ตารางที่ 2) ได้แสดงสหสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าเอนทัลปี

Table 1. Structural characteristics of debranched tapioca starch

Hydrolysis time (h)	Degree of debranching (DB, %)	Number average of chain (NC)	Average chain length (CL)	IBC ¹ at 620 nm
0	0 ^a	9 ^a	263 ^a	0.224 ^a
0.5	58.9 ^b	22 ^b	117 ^b	0.480 ^b
1	66.2 ^c	26 ^{bc}	102 ^{bc}	0.536 ^c
2	68.5 ^c	28 ^{cd}	93 ^{bc}	0.590 ^d
3	76.0 ^d	32 ^{de}	82 ^{bc}	0.604 ^{de}
5	80.6 ^e	35 ^{ef}	73 ^c	0.617 ^e
7	79.1 ^f	38 ^{ef}	67 ^c	0.623 ^e
13	85.6 ^{ef}	37 ^{ef}	69 ^c	0.642 ^e
16	88.5 ^{fg}	40 ^{ef}	60 ^c	0.638 ^e
24	89.3 ^g	42 ^f	51 ^c	0.624 ^e

Means with different letters within a column are significantly different ($p < 0.01$)

¹ IBC: Iodine binding capacity

และ Tp ของ first transition โดยมีค่า correlation coefficient เป็น 0.97 และ 0.98 ตามลำดับ จึงสนับสนุนแนวคิดของการจัดเรียงเป็นระเบียบของผลึกมากขึ้นเมื่อระดับการตัดกิ่งเพิ่มขึ้น การจัดเรียงตัวของโมเลกุลตัดกิ่งอาจเป็นไปได้ 2 กลไก คือ การจัดเรียง double helices จากโมเลกุลกิ่งก้านขนาดเล็ก และโมเลกุลเส้นตรงที่ผลึกมากขึ้นหลังการตัดกิ่ง และการจัดเรียงตัวในส่วนผลึกอีกครั้งให้มีความสมบูรณ์เมื่อระยะเวลาในการตัดกั้้นนานขึ้น จึงทำให้อุณหภูมิในการหลอมเหลวเพิ่มสูงขึ้น

การจัดเรียงตัวของโมเลกุลตัดกั้้นนั้น มีส่วนทำให้เอนไซม์พอลูลูแนนสไม่สามารถตัดกั้้นของอะมิโลเพกตินได้อย่างสมบูรณ์ แม้ว่าระยะเวลาในการตัดกั้้นจะเพิ่มขึ้น ซึ่งเห็นได้จากระดับการตัดกั้้นเริ่มคงที่ในเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 1) เนื่องจากการจัดเรียง double helices ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเข้าตัดกั้้นก้านของโมเลกุลแป้งได้ทั้งหมด นอกจากนี้ ยังเป็นผลร่วมจากการปนเปื้อนของเอนไซม์แอลฟาอะมิเลสที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์พอลูลูแนนสลดลง (Bello-Perez *et al.*, 1996)

ผลของการให้ความเย็นต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งตัดกั้้น

สารละลายแป้งตัดกั้้นเก็บไว้ที่ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความข้นและเกิดตะกอนมากขึ้น แสดงให้เห็น การเกิดเจลของอะมิโลสสายยาว (amylose gelation) จากการเกิดพันธะเชื่อมข้าม

ระหว่างสายทำให้เกิดเป็นโครงสร้างร่างแห และการรวมตัวของ double helices ของโมเลกุลสายสั้นเป็นโครงสร้างผลึกที่เป็นระเบียบเกิดการตกตะกอน (Gidley and Bulphin, 1989) การตัดกั้้นส่งผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) ต่ำลง ดังตารางที่ 4 เนื่องจากการตัดกั้้นจะมีโลเพกติน ทำให้พันธะเชื่อมข้ามระหว่างสายโซ่เพื่อเกิดเป็นโครงสร้างร่างแหน้อยลง อย่างไรก็ตาม เมื่อระดับการตัดกั้้นเพิ่มมากขึ้น WHC สูงขึ้น สามารถอธิบายได้ว่าการตัดกั้้นที่ระดับ 58.9 เปอร์เซนต์นั้น ยังเกิดโมเลกุลสายยาวของ B chain น้อย ทำให้เกิดเจลที่มีโครงสร้างไม่แข็งแรงและอุ้มน้ำต่ำ แต่เมื่อการตัดกั้้นมากขึ้นเกิดโมเลกุลสายยาว B chain เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดพันธะเชื่อมข้ามระหว่างสายโซ่เป็นโครงสร้างร่างแหที่มีความแข็งแรงและอุ้มน้ำไว้เพิ่มขึ้น ดังผลการศึกษาของ Guraya *et al.* (2001a) ที่พบว่าการเกิดเจลของแป้งตัดกั้้นจากแป้งข้าวพันธุ์ข้าวเจ้านั้นแข็งแรงกว่าแป้งข้าวพันธุ์ข้าวเหนียว

ผลของการเกิดรีโทรเกรเดชันของแป้งตัดกั้้นตรวจสอบโดย DSC ดังตารางที่ 4 พบว่า อุณหภูมิเริ่มต้นของการหลอมเหลว (To) แสดงในช่วง 39 - 46 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าแป้งตัดกั้้นก่อนการเกิดรีโทรเกรเดชัน (ตารางที่ 3) โดยในช่วงอุณหภูมิเริ่มต้นของการหลอมเหลวของ amylopectin crystallites ที่เกิดจากการจัดเรียง double helices ของโมเลกุลกิ่งก้านหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (Karim

Table 2. Relative crystallinity of debranched tapioca starch

Debranching time (h)	Degree of debranching (DB, %)	% Relative crystallinity
0	0	0.968 ^a
0.5	58.9	5.566 ^b
2	68.5	6.803 ^c
5	80.6	7.123 ^d
24	89.3	7.985 ^e
Native cassava starch		28.705 ^f

Means with different letters within a column are significantly different ($p < 0.01$)

Table 3. Thermal transition properties¹ of debranched starch

DB ² (%)	First transition					Second transition					Third transition				
	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc - To (°C)	ΔH (J/g)	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc - To (°C)	ΔH (J/g)	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc - To (°C)	ΔH (J/g)
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	N.D.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	N.D.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	N.D.
58.9	54.6	78.7	113.5	58.9	14.7	140.8	153.7	171.5	30.7	3.1	180.0	188.2	196.3	16.3	1.8
68.5	54.1	88.2	121.9	62.8	24.6	126.5	148.5	157.7	31.2	4.8	173.1	184.4	196.9	23.8	3.8
80.6	56.4	100.1	120.9	64.5	31.1	136.1	147.8	161.3	25.2	1.3	170.1	182.0	196.8	26.7	6.1
89.3	55.5	105.1	119.5	64.0	35.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	N.D.	172.1	184.1	193.2	21.1	4.8
NT ³	66.3	72.3	79.8	13.5	12.8										

¹ To: onset temperature (°C), Tp: peak temperature (°C), Tc: conclusion temperature (°C) and ΔH: enthalpy (J/g dry starch)² DB: Degree of debranching (%)³ NT: Native cassava starch.

N.D.: not determined; n.d.: not detected.

et al., 2000) แสดงให้เห็นว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 วัน โมเลกุลทุกส่วนที่ประกอบด้วยโมเลกุลเส้นตรงและโมเลกุลกิ่งก้านขนาดเล็กที่ถูกปล่อย รวมทั้งโมเลกุลกิ่งก้านขนาดใหญ่เกิดการจัดเรียงตัว โดยโมเลกุลกิ่งก้านขนาดใหญ่ยังคงเหลืออยู่มากที่ระดับการตัดกิ่ง 58.9 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ To และ Tp มีค่าต่ำกว่าที่ระดับการตัดกิ่ง 89.3 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) นอกจากนั้น ΔH_r มีค่ามากขึ้นที่ระดับการตัดกิ่งเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลกิ่งก้านขนาดใหญ่ที่ระดับการตัดกิ่งต่ำ (58.9 เปอร์เซ็นต์) นั้น ยังมีการจัดเรียงตัวเป็นผลึกเกิดขึ้นน้อย เมื่อระดับการตัดกิ่งมากขึ้น โมเลกุลกิ่งก้านลดลง โมเลกุลสามารถเกิดการการจัดเรียงได้ดีขึ้น ทำให้เกิดการจัดเรียงของโครงสร้างที่มีระเบียบทั้งส่วนโมเลกุลเส้นตรงและโมเลกุลกิ่งก้านขนาดเล็กเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม แป้งตัดกิ่งที่เกิดการรีโทรเกรเดชันแสดงการเปลี่ยนเฟสเพียงช่วงอุณหภูมิ 39 - 115 องศาเซลเซียส อาจเกิดเนื่องจากการให้ความร้อนถึง 200 องศาเซลเซียส ได้ทำลายโครงสร้างโมเลกุลเส้นตรงสายสั้นที่จัดเรียง double helices ในช่วงระหว่างการตัดกิ่งจนไม่สามารถเกิดการการจัดเรียงตัวใหม่ได้ ทำให้ไม่แสดงช่วงอุณหภูมิในการหลอมเหลวในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 140 องศาเซลเซียส

บทสรุป

ระดับการตัดกิ่งในการย่อยโมเลกุลแป้งด้วยเอนไซม์ฟูลลูแตนสนั้น ขึ้นกับปริมาณสับสเตรทต่อเอนไซม์ และเวลาในการย่อย การตัดกิ่งทำให้เกิดโมเลกุลเส้นตรงและโมเลกุลกิ่งก้านขนาดเล็ก โดยโมเลกุลเหล่านี้สามารถจัดเรียงตัวเป็นผลึกในระหว่างการตัดกิ่ง โดยแสดงรูปแบบผลึกแบบ C_b ที่มีปริมาณผลึกและค่าเอนทาลปีเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการตัดกิ่งเพิ่มขึ้น แป้งที่ผ่านการตัดกิ่งมีคุณสมบัติในการกักเก็บน้ำลดลง แต่เมื่อมีการตัดกิ่งมากขึ้น ทำให้เกิดการการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้น ทำให้มีคุณสมบัติการกักเก็บน้ำเพิ่มขึ้น มีความเป็นผลึกมากขึ้น และสมบัติที่ทนต่อความร้อนสูงขึ้น

Table 4. Physical and thermal properties¹ of debranched starch after Retrogradation

DB ² (%)	To (°C)	Tp (°C)	Tc (°C)	Tc - To (°C)	ΔH _R (J/g)	WHC ³ (%)
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0 ^a	99.63 ^c
58.9	39.1 ^a	60.88 ^a	101.3 ^a	62.2 ^a	18.13 ^b	49.52 ^a
68.5	43.86 ^{ab}	70.76 ^{ab}	107.72 ^a	63.86 ^b	18.246 ^b	55.62 ^b
80.6	44.08 ^b	75.56 ^{ab}	107.15 ^a	63.07 ^b	21.344 ^b	60.00 ^c
89.3	46.43 ^b	86.24 ^b	115.46 ^a	69.03 ^c	27.745 ^c	71.43 ^d

Means with different letters within a column are significantly different ($p < 0.01$)

¹ To: onset temperature (°C), Tp: peak temperature (°C), Tc: conclusion temperature (°C) and ΔH: enthalpy of retrograded debranched starch (J/g dry starch)

² DB: Degree of debranching (%)

³ WHC: water holding capacity

n.d.: not detected.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2547 และความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้รับทุน สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

เอกสารอ้างอิง

- Bello-Perez, L.A., Paredes-Lopez, O., Roger, P., and Colonna, P. (1996). Amylopectin-properties and fine structure. *Food Chemistry*, 56(2):171-176.
- Butler, D.P., Marc, J.E.C., and Steeneken, P.A.M. (2004). Starch-acting enzymes. In: *Starch in Food Structure, Function and Applications*. Eliasson, A.C. (ed). Woodhead Publishing Limited, England, p. 128-149.
- Cheetham, N.W.H. and Tao, L. (1998). Variation in crystalline type with amylose content in maize starch granules: an X-ray powder diffraction study. *Carbohydrate Polymers*, 36:277-284.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3):350-356.
- 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 Chemistry*, 70(3): 339-344.
- Gonzalez-Soto, R.A., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Rendon-Villalobos, R., and Bello-Perez, L.A. (2004). Resistant starch made from Banana starch by Autoclave and debranching. *Strach/Starke*, 56:495-499.
- 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.
- Guraya, H.S., James, C., and Champagne, E.T. (2001a). Effect of cooling, and freezing on the digestibility of debranched rice starch and physical properties of the resulting material. *Strach/Starke*, 53:64-74.
- Guraya, H.S., James, C., and Champagne, E.T. (2001b). Effect of enzyme concentration and storage temperature on the formation of slowly digestible starch from cooked debranched rice starch. *Strach/Starke*, 53:131-139.
- Herman, P.H. and Weidinger, A. (1961). On the determination of the crystalline fraction of polyethylenes form X-ray diffraction. *Macromolecular Chem.*

- 24:24-36.
- Hood, L.F. and Mercier, C. (1978). Molecular structure of unmodified and chemically modified manioc starches. *Carbohydrate Research*, 61:53-66.
- Karim, A.A., Norziah, M.H., and Seow, C.C. (2000). Method for study of starch retrogradation. *Food Chemistry*, 71:9-36.
- Knuston, C.A. (1986). A simplified colorimetric procedure for determination of amylose in maize starches. *Cereal Chemistry*, 63(2):89-92.
- Knutson, C.A. (1999). Evaluation of variations in amylose-iodine absorbance spectra. *Carbohydrate Polymers*, 42:65-72.
- Kujawski, M., Ziobro, R., and Gamgus, H. (2003). Preparation of unbranched glucans by hydrolysis of starch of various botanical origin with pullulanase. *Polish Agricultural Universities, Food Science and Technology*. [serial online]; 6(2). Available from: Polish Agricultural Universities via the Internet. Accessed date: Jan 20, 2004.
- Lehmann, U., Jacobasch, G., and Schmiedl, D. (2002). Characterization of resistant starch typeIII from banana (*Musa acuminata*). *JAFRC.*, 50:5,236-5,240.
- McCleary, B.V. and Monaghan, D.A. (2002). Measurement of resistant starch. *JAOAC.*, 85(3):665-675.
- Shamai, K., Bianco-Peled, H., and Shimoni, E. (2003). Polymorphism of resistant starch typeIII. *Carbohydrate Polymers*, 54:363-369.
- Shin, S.I., Choi, H.J., Chung, K.M., Hamaker, B.R., Park, K.H., and Moon, T.W. (2004). Slowly digestible starch from debranched waxy sorghum starch: preparation and properties. *Cereal Chemistry*, 81(3): 404-408.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *JBC.*, 195:19-23.
- Takeda, Y. and Hizukuri, S. (1987). Structure of rice amylopectins with low and high affinities for iodine. *Carbohydrate Research*, 168:79-88.
- Vansanathan, T. and Bhatta, R.S. (1996). Physicochemical properties of small and large-granules starches of waxy, regular and high-amylose barleys. *Cereal Chemistry*, 73:199-207