

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุดิบ สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุดิบ

แป้งตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีดังนี้

- แป้งพุทธรักษากินได้ (native starch) สายพันธุ์เวียคนาม จากการสกัดภายในห้องปฏิบัติการคาร์โบไฮเดรต สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

- แป้งดัดแปร Hi-cap[®] 100 จากบริษัท National Starch & Chemical (Thailand) Co., Ltd

3.1.2 สารเคมี

- Octenyl succinic anhydride (OSA)
- Sodium hydroxide
- Isopropyl alcohol
- Hydrochloric acid
- Phenolphthalein
- Silver nitrate

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Burettes
- Burette clamp
- Beaker
- Magnetic
- Magnetic stirrer
- Pipette
- Auto pipette

- กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) (Eclipse E200, Nikon, Japan)
- โกร่งบด (mortar)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius analysis, sartorius AG, Goettingen, Germany)
- เครื่องตรวจวัดค่าพีเอช (Inlab TFK 325, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH &

Co., KG. Germany)

- Differential scanning calorimeter (DSC1, Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)
- Fourier transforms infrared spectrometer (Spectrum One, Perkin Elmer, USA)
- Rapid visco analyzer (RVA-4 SA, Newport Scientific Pty Ltd., NSW, Australia)
- Scanning electron microscope (JSM-6400, JEOL, Japan)
- Ultrasonic homogenizer (Hielscher - Ultrasound Technology UP200S (200W, 24 kHz),

Germany)

- เครื่อง X-ray diffraction (D8 Discover, Bruker, Germany)
- ตะแกรงร่อนขนาด 140 เมส (sieve)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Mettler UM, German)
- เตาไฟฟ้า (hot plate)
- ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
- อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (boiling water bath)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมแป้งพืชรักษาดัดแปรด้วยความร้อนชื้น (HMT starch)

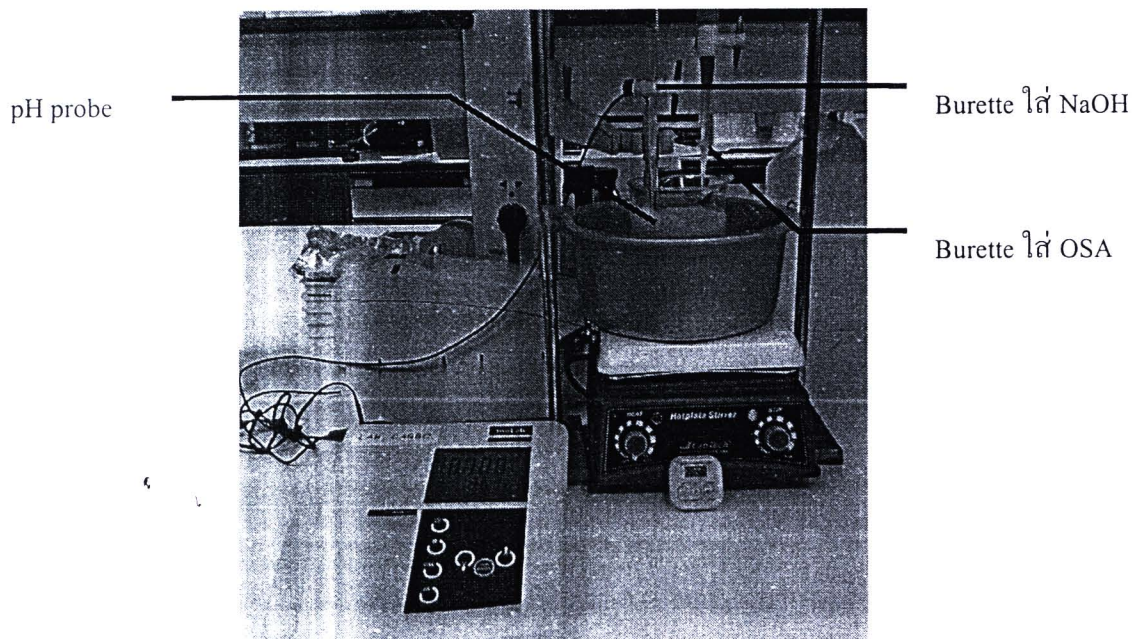
(Watcharatwinkul และคณะ, 2009)

1. แช่แป้งพืชรักษาในน้ำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน
2. นำน้ำแป้งไปกรองด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ จากนั้นผึ่งไว้ และนำไปวัดความชื้นเป็นระยะๆ โดยกำหนดให้มีความชื้นสุดท้าย 25%
3. นำแป้งใส่ขวดพลาสติกแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. เทแป้งออกจากขวดพลาสติกแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง
5. นำแป้งที่ได้มาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 140 เมส

3.2.2 การเตรียมแป้งพวทรักษาตัดแปรด้วย OSA (ดัดแปลงจากวิธีของ Hui และคณะ, 2009)

นำแป้งพวทรักษาและแป้งพวทรักษาตัดแปรด้วยความร้อนขึ้นมอดัดแปรโดยใช้แป้งที่ความเข้มข้น 35% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ควบคุม pH ระหว่างการทำปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วง 8.0-8.5 โดยใช้ OSA ที่ความเข้มข้น 1% และ 3% โดยจัดเตรียมอุปกรณ์สำหรับการดัดแปรดังรูปที่ 3.1 และมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. เตรียมแป้ง 35 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง (w/v) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 65 กรัม กวนให้เข้ากัน
2. ปรับ pH ของน้ำแป้งเป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3%
3. ค่อยๆ หยดสารละลาย OSA (โดยเจือจาง OSA ด้วย isopropyl alcohol ปริมาตร 5 เท่า) จากบิวเรต ลงในน้ำแป้ง
4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3% เป็นระยะ เพื่อรักษา pH ให้อยู่ในระดับ 8.0-8.5
5. หลังจากเติม OSA ตามระยะเวลาที่กำหนดหมดแล้ว กวนน้ำแป้งต่อไปอีก 1 นาที หรือจนกว่า pH จะคงที่ แล้วปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3%
6. ต้มแป้งด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตามด้วยเอทานอล 70% ประมาณ 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และนำมากรองด้วยเครื่องปั่นสุญญากาศ
7. นำแป้งไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง
8. บดแป้งให้ละเอียดด้วยโกร่งบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 140 เมส



รูปที่ 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการดัดแปรแป้งพุดรึกษา

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธี Direct Heating Method ตามวิธีของ AOAC (2000)

1. นำ aluminium dish พร้อมฝาปิดมาอบในเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 20 นาที แล้วนำออกมาทิ้งให้เย็นใน desiccator นำไปชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วประมาณ 2 กรัม ใส่ใน aluminium dish บันทึกน้ำหนักของ aluminium dish พร้อมฝาปิดและตัวอย่าง (W_1)
3. นำไปอบในเตาอบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยเปิดฝา aluminium dish ไว้เล็กน้อย นาน 1 ชั่วโมง ปิดฝาแล้วนำมาทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนักของ aluminium dish พร้อมฝาปิดและตัวอย่างหลังอบแห้งแล้ว
4. อบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนน้ำหนักคงที่หรือต่างกันไม่เกิน 0.1% (เทคนิคตำแหน่งที่ 3) น้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของ aluminium dish และตัวอย่างหลังอบแห้งแล้ว (W_2)

วิธีคำนวณ

Moisture content (%) = $\frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W}$

เมื่อ	W	คือ น้ำหนักของตัวอย่าง
	W1	คือ น้ำหนักของ aluminium dish และตัวอย่างก่อนอบ
	W2	คือ น้ำหนักของ aluminium dish และตัวอย่างหลังอบ

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณของหมู่ออกทินิลซัคซินิกของแป้งพุทธรักษาตัดแปรและระดับการแทนที่ (degree of substitution) (ดัดแปลงจากวิธีของ Kweon และคณะ, 2001)

1. ชั่งตัวอย่างแป้งตัดแปร 5 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง ใส่ลงในสารละลาย HCl ความเข้มข้น 2.5 นอร์มอล ใน isopropyl alcohol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วตั้งบนเครื่อง magnetic stirrer กวนนาน 30 นาที
2. เติม isopropyl alcohol ร้อยละ 90 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกวนอีก 10 นาที
3. กรองน้ำแป้งผ่าน glass filter และล้างแป้งด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งเมื่อใช้สารละลายซิลเวอร์ไนเตรด เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ทดสอบกับน้ำล้างแล้วไม่เกิดตะกอนขุ่น จากนั้นล้างครั้งสุดท้ายด้วย isopropyl alcohol 90%
4. เติมน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร และนำไปต้มนาน 20 นาที จากนั้นทำการไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล หยด phenolphthalein เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วคำนวณค่าระดับการแทนที่ตามสมการ

DS = $\frac{162 \times (A \times M)/W}{1 - [0.210 \times (A \times M)/W]}$

A = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)
M = ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)
W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างแป้งออกทินิลซัคซินิกที่นำมาไทเทรต (กรัม)

$$\text{ประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยา (\%)} = \frac{\text{Actual DS} \times 100}{\text{Theoretical DS}}$$

3.2.5 การศึกษาสมบัติทางกายภาพ

3.2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของเม็ดแป้งด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (Sahai และคณะ, 1996)

1. นำแป้งตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยมาโรยบนเทปขาวสองหน้าทีติดอยู่บนแท่ง aluminium stub
2. นำแท่ง aluminium stub ที่ติดแป้งตัวอย่างแล้วเข้าเครื่องเคลือบทองที่ผิวของแป้งตัวอย่าง
3. ส่องดูตัวอย่าง โดยควบคุมสภาวะในการทดลองดังนี้ ค่าอัตราเร่งความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 10 หรือ 15 kV และใช้กำลังขยายที่ 350 หรือ 500 เท่า

3.2.5.2 การวิเคราะห์หาโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้ง โดยเครื่อง X-ray diffractometer (Song และคณะ, 2006)

1. นำตัวอย่างแป้งโรยบน sample plate แล้วกด sample plate ให้เม็ดแป้งเรียงตัวอัดกันแน่นและทำผิวหน้าให้เรียบ
2. นำ sample plate ใส่เข้าเครื่อง X-ray diffractometer ที่ช่อง sample holder แล้วปิดฝาช่องตัวอย่าง
3. สั่งให้เครื่องทำงานและวัดค่าในช่วงมุมที่ต้องการ โดยใช้คอมพิวเตอร์ควบคุม ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Target :	Cu
kV :	45.0 kV
mA :	35.0 , mA
Start angle:	5.00 deg.
Stop angle:	45.00 deg.
Step angle:	0.020 deg.

M. time : 1.50 sec.

Smoothing points: 7

4. วิเคราะห์ X-ray diffraction pattern โดยเทียบค่า 2θ , d-Spacing และ Intensity ที่ได้กับ ลักษณะโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งที่เป็น pattern มาตรฐาน (Zobel, 1964) ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลักษณะโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งที่เป็นแบบ A, B, และ C-type

Starch X-ray powder diffraction pattern								
A-type			B-type			C-type		
d-Spacing, A°	Intensity*	2θ	d-Spacing, A°	Intensity*	2θ	d-Spacing, A°	Intensity*	2θ
8.72	w-	10.1	<u>15.8</u>	m	5.59	<u>15.4</u>	w	5.73
7.70	w-	11.5	8.90	w-	9.93	8.82	w-	10.0
<u>5.78</u>	s	15.3	7.94	w-	11.1	7.66	w-	11.5
<u>5.17</u>	s	17.1	6.14	m	14.4	<u>5.78</u>	s	15.3
<u>4.86</u>	s-	18.2	<u>5.16</u>	s	17.2	<u>5.12</u>	s	17.3
4.37	m	20.3	4.54	w+	19.5	<u>4.85</u>	m	18.3
3.78	s	23.5	<u>4.00</u>	m	22.2	4.35	w-	20.4
3.30	w+	27.0	<u>3.70</u>	m-	24.0	<u>3.78</u>	m+	23.5
2.88	w	31.0	3.38	w	26.3	3.32	w	26.8
			2.60	w	34.4			

* Intensity scale: strong (S), medium (m), weak (w), less than (-), and more than (+)

3.2.5.3 การศึกษาหมู่ฟังก์ชันภายในโครงสร้างเม็ดแป้ง

นำแป้งที่บดละเอียดมาผสมกับสารโพแทสเซียมโบรไมด์ในอัตราส่วน 1:100 (โดยประมาณ) แล้วบดผสมรวมกันจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปอัดเป็นแผ่น (pellet) แล้วนำไปวิเคราะห์หาสเปกตรัมด้วย

เครื่อง Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR) โดยตั้งค่าของเครื่องที่ค่า resolution = 4.0 cm⁻¹ และจำนวน Scan = 16

3.2.6 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งพุดรักษาตัดแปร

3.2.6.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดโดยใช้เครื่อง Rapid visco analyzer

ศึกษารูปแบบพฤติกรรมความหนืดของแป้งพุดรักษาที่ไม่ผ่านการตัดแปรและผ่านการตัดแปรด้วยเครื่อง RVA มีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. กำหนด profile ดังตาราง

Time	Type[Temp/Speed]	Value [°C] or RPM
00:00:00	Temp	40
00:00:00	Speed	960
00:00:10	Speed	160
00:01:00	Temp	40
00:18:30	Temp	92.5
00:33:30	Temp	92.5
00:51:00	Temp	40

- 2. เตรียมตัวอย่างแป้งที่ความเข้มข้น 8% โดยน้ำหนัก ให้มีน้ำหนักรวม 25 กรัม โดยชั่งน้ำกลั่นใส่แคนอลูมิเนียม จากนั้นจึงชั่งแป้งเทใส่ในแคนอลูมิเนียม ใช้ใบพัดกวนผสมให้เข้ากัน
- 3. ใส่แคนอลูมิเนียมลงในเครื่อง RVA แล้วเดินเครื่อง
- 4. เมื่อสิ้นสุดการทำงานของเครื่องจะได้กราฟของตัวอย่างและค่าต่างๆที่วิเคราะห์ได้

หมายเหตุ

1) อุณหภูมิเริ่มเกิดความหนืด (pasting Temperature) คือ อุณหภูมิเริ่มเกิดความหนืดมีหน่วยเป็น องศาเซลเซียส

2) ความหนืดสูงสุด (peak Viscosity) คือ ความหนืดสูงสุดของแป้งในช่วงตั้งแต่เริ่มให้ความร้อนจนถึงสิ้นสุดการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 92.5 องศาเซลเซียส มีหน่วยเป็น RVU

3) Breakdown เป็นค่าผลต่างระหว่างค่าความหนืดสูงสุดกับค่าความคงตัวต่อการกวนมีหน่วยเป็น RVU

4) Setback เป็นค่าผลต่างระหว่างค่าความหนืดสุดท้ายลบด้วยค่าความหนืดสูงสุด มีหน่วยเป็น RVU

3.2.6.2 การศึกษาลักษณะของเจลแป้ง

นำเจลแป้งที่ได้จากข้อ 3.2.6.1 มาศึกษาลักษณะของเจล โดยหยดไอโอดีนแล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.6.3 การศึกษาสมบัติทางความร้อนในการเกิดเจลไตไนซ์ของแป้งโดยเครื่อง Differential scanning calorimeter (Thitipraphunkul และคณะ, 2003)

เตรียมตัวอย่างแป้งที่ทราบค่าความชื้นแน่นอน ชั่งแป้ง 3 มิลลิกรัมโดยน้ำหนักแห้งลงใน pan อลูมิเนียมของเครื่อง DSC และเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 6 มิลลิกรัม ปิด pan อลูมิเนียม แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำ pan ใส่ในช่อง sample ของเครื่อง DSC-Pyris 1 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) และวาง reference pan (pan เปล่า) ให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 25-100 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที คำนวณค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์โดยใช้ระบบ autocalculation และบันทึกค่าต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเจลไตไนซ์ ได้แก่

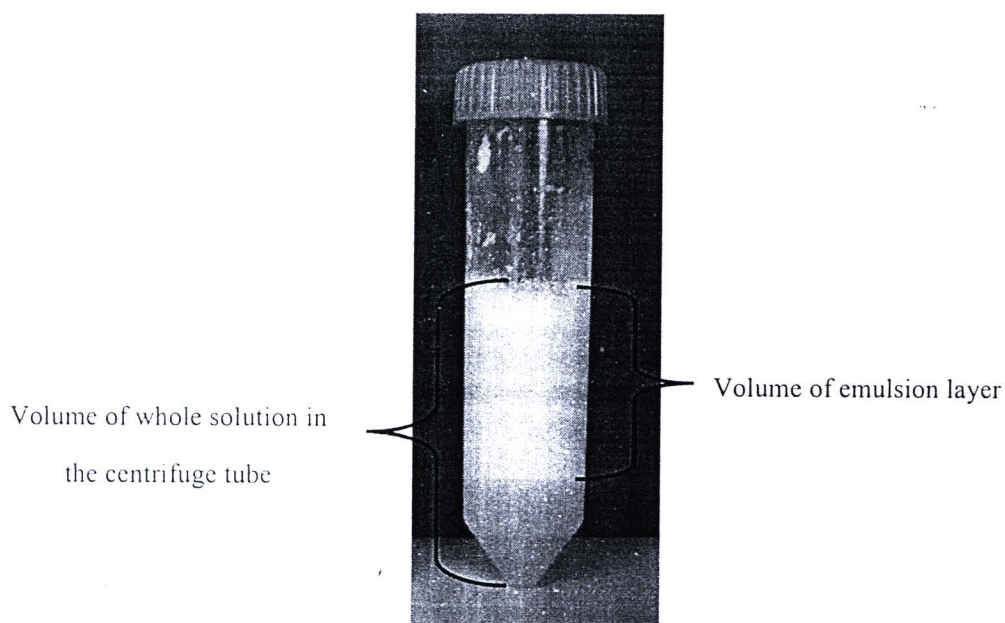
- อุณหภูมิเริ่มต้นในการเกิดเจลไตไนซ์ (onset temperature, T_o , °C)
- อุณหภูมิที่ทำให้เกิดเจลไตไนซ์สูงสุด (peak temperature, T_p , °C)
- อุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลไตไนซ์ (conclusion temperature, T_c , °C)
- พลังงานที่เปลี่ยนแปลงระหว่างเกิดเจลไตไนซ์ (enthalpy, ΔH , J/g)

3.2.7 ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsification capacity) (ดัดแปลงจากวิธีของ Beuchat และคณะ, 1975)

มีขั้นตอนการวิเคราะห์และคำนวณดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างแป้งดัดแปร 0.5 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง ลงในสารละลาย NaCl 0.5 M ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใน centrifuge tube แล้วนำไปให้ความร้อนอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
2. เติมน้ำมันปาล์ม 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปโฮโมจิไนส์ด้วยเครื่อง Ultrasonic homogenizer นาน 30 วินาที
3. จดปริมาตรที่แยกชั้นหลังจากตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 5 วัน แล้วการคำนวณค่า emulsifying capacity ตามสมการ

$$\text{Emulsifying capacity (EC)} = \frac{(\text{Volume of emulsion layer}) \times 100}{\text{Volume of whole solution in the centrifuge tube}}$$



รูปที่ 3.2 การวัดปริมาณการแยกชั้นของอิมัลชัน