

บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

- แป้งมันสำปะหลังตราปลาไทย 5 ดาว

3.1.2 สารเคมี

- 3, 5- dinitrosalicylic acid (Sigma Chemical Co., Ltd., USA)
- Acetone (Lab Scan Asia Co., Ltd., Thailand)
- Butyric anhydride (Sigma Chemical Co., Ltd., USA)
- Dimethylsulfoxide (Merck KGaA, Germany)
- Disodium hydrogen phosphate (Merck KGaA, Germany)
- Ethanol (Lab Scan Asia Co., Ltd., Thailand)
- Glacial acetic acid (Lab Scan Asia Co., Ltd., Thailand)
- Hydrochloric acid (Merck KGaA, Germany)
- Isopropyl alcohol (Lab Scan Asia Co., Ltd., Thailand)
- Octenyl succinic anhydride ; OSA (Sigma Chemical Co., Ltd., USA)
- Oleic acid (Carlo Erba Reagent)
- Palmitic acid (Fluka, Switzerland)
- Pancreatic α -amylase (Megazyme International Ireland Ltd.)
- Phenol crystallized, 99% (detached crystals) (Ajax Finechem)
- Phenolphthalein (LabChem, Australia)
- Potassium sodium tartrate (Sigma Chemical Co., Ltd., USA)
- Sodium chloride (Merck KGaA, Germany)
- Sodium dihydrogen phosphate dehydrate (Quality Reagent Chemical Product, New Zealand)
- Sodium hydroxide (Merck KGaA, Germany)
- Sulphuric acid (Lab Scan Asia Co., Ltd., Thailand)
- Vinyl acetate (Merck KGaA, Germany)

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Erlenmeyer flask
- Duran bottle (Schott, Germany)
- Burettes
- Burette clamp
- Beaker
- Magnetic bar
- Magnetic stirrer
- Pipette
- Auto pipette
- โกร่งบด (mortar)
- ตะแกรงร่อนขนาด 140 เมช (sieve)
- โหลกันความชื้น (desiccator)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (Mettler UM, German)
- เตาไฟฟ้า (hot plate)
- ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
- อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (boiling water bath)
- เครื่องหม้อต้มความดันไอน้ำ (autoclave)
- กล้องจุลทรรศน์ light microscope (Eclipse E200, Nikon, Japan)
- เครื่อง Centrifuge (Centrifuge BR 4I, Jouan Inc., USA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometer, Shimadzu UV-160, Japan)
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius analysis, sartorius AG, Goettingen, Germany)
- เครื่องตรวจวัดค่าพีเอช (Inlab TFK 325, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co., KG. Germany)
- เครื่อง Scanning Electron Microscope ; SEM (JSM-5410LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)
- เครื่อง X-ray diffraction (D8 Discover, Bruker, Germany)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาผลของสถานะในการเตรียมสเฟียรูไลต์

3.2.1.1 การเตรียมสเฟียรูไลต์

1. เตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 10% (W/W) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi โดยใช้เครื่องมือสร้างความดันไอน้ำ (autoclave) เป็นเวลา 30 และ 60 นาที
2. ทำให้แป้งเย็นตัวลงด้วยอัตราเร็วต่างๆ
 - 2.1 การทำให้เย็นอย่างช้า โดยเก็บแป้งเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งอุณหภูมิลดลงถึง 46 °C และเก็บต่อจนครบเวลา 22 ชั่วโมง
 - 2.2 การทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยเก็บแป้งเจลที่อุณหภูมิ -15 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C และ 50 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่าของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 2000 g เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง
4. ตกตะกอนแป้งโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 เท่าของปริมาณตัวอย่างทั้งหมด กวนให้แป้งกระจายตัว จากนั้นค่อยๆเติมเอทานอล 95% ปริมาตร 3 เท่าของปริมาณตัวอย่างทั้งหมด กรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ
5. นำแป้งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
6. บดแป้งให้ละเอียดด้วยโกร่งบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาดรู 63 μm
7. นำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งนับจำนวนสเฟียรูไลต์ โดยใช้ Hemacytometer

3.2.1.2 การนับจำนวนสเฟียรูไลต์โดยใช้ Hemacytometer

1. เจือจางสเฟียรูไลต์ให้มีจำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์ที่พอเหมาะในน้ำกลั่น โดยรวมปริมาตรของสารละลายไอโอดีน
2. หยดสารละลายสเฟียรูไลต์ลงตรงร่องของ counting chamber ที่ปิด cover chamber ไว้เรียบร้อยแล้ว โดยให้ปลาย pipetteแตะตรงขอบของ cover chamber และ pipette ทำมุมกับ counting chamber ประมาณ 45° ควบคุมให้สารละลายจาก pipette ค่อยๆ ลงสู่ counting chamber จนเต็มพอดี ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้เม็ดสเฟียรูไลต์หยุดนิ่ง ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้น หรือหยดใหญ่เกินไปจนล้น counting chamber ให้ใช้ผ้าที่สะอาด

ทำความสะอาด counting chamber แล้วจึงหยดสารละลายใหม่ (ต้องเขย่าให้เข้ากันดีก่อน จะหยดใหม่ทุกครั้ง)

3. นับจำนวนเม็ดและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดสเฟียรูไลต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 3.1-3.2) โดยใช้โปรแกรม NIS-Element D 2.30, SP5 ใช้การวัดขนาดแบบ Auto Outer เริ่มจากใช้เลนส์วัตถุกำลังขยายต่ำ (10x) เพื่อหาช่องตรงกลางก่อน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นเลนส์วัตถุกำลังขยายสูง (40x) นับจำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์ในช่อง โดยกำหนดให้เส้นนอกบนกับเส้นนอกขวาเป็นขอบเขตของพื้นที่ในการนับ นับจนครบ 5 ช่อง (ใน 1 ช่อง จะมีช่องเล็กๆ 16 ช่อง) แล้วนำมารวมกันเพื่อใช้คำนวณจำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์ ต่อ 1 ลบ.มม.
4. เมื่อนับจำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์เสร็จให้รีบทำความสะอาด counting chamber และ cover-glass ด้วยผ้าสะอาดและนุ่มทันที

การคำนวณ

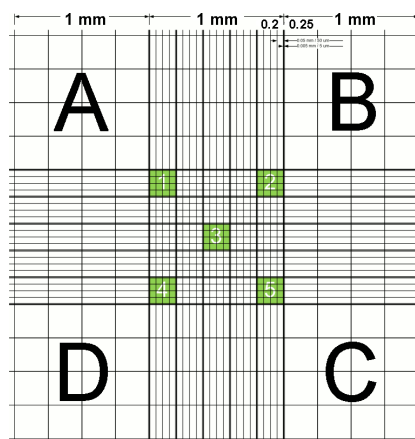
$$\text{จำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์/ลบ.มม.} = \frac{\text{จำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์ที่นับได้} \times \text{dilution factor}}{\text{ปริมาตรที่ใช้ นับ}}$$

เมื่อ dilution factor คือ อัตราส่วนในการเจือจางสเฟียรูไลต์

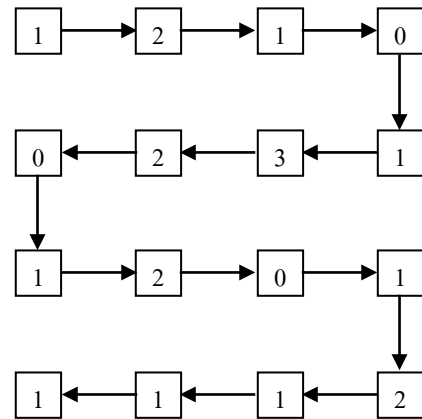
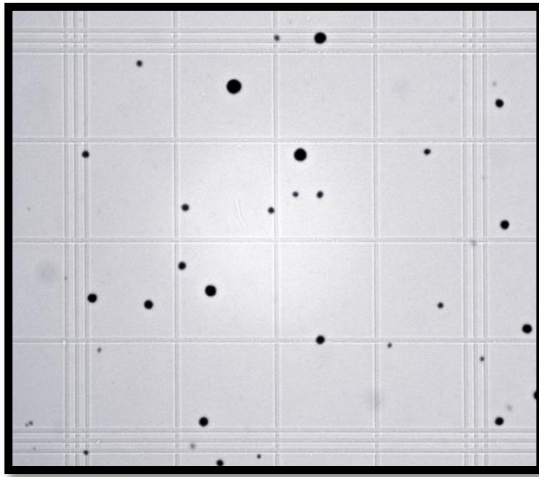
$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรที่ใช้ นับจำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์} &= \text{พื้นที่} \times \text{ความลึก} \times \text{จำนวนช่อง} \\ &= (0.2 \times 0.2) \times 0.1 \times 5 \\ &= 0.02 \text{ ลบ.มม.} \end{aligned}$$

$$\text{ดังนั้น จำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์/ลบ.มม.} = \frac{N \times \text{dilution factor}}{0.02}$$

N คือ จำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์ที่นับได้ทั้งหมดใน 5 ช่อง ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 สเกลใน Hemacytometer (Counting chamber) ช่อง 1, 2, 3, 4, 5 (5 ช่อง) คือ ช่องที่ใช้ นับจำนวนเม็ดสเฟียรูไลต์



รูปที่ 3.2 วิธีการนับจำนวนเม็ดสเฟียรู โลดในบริเวณที่ 1

3.2.3 การเตรียมสารประกอบระหว่างแป้งมันสำปะหลังกับกรดไขมันชนิดต่างๆ ดัดแปลงจากวิธีของ Fanta และคณะ (2008)

1. นำกรดอะซิติก 5% (W/W) ของปริมาณอะไมโลสทั้งหมด ละลายในเอทานอล 20 มิลลิลิตร นำไปผสมกับแป้งมันสำปะหลังแห้ง จากนั้นระเหยเอทานอลออก
2. นำแป้งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C ประมาณ 12 ชั่วโมง
3. สำหรับกรดบิวทริก กรดปาล์มมิติก และกรดโอเลอิก ให้ทำตามขั้นตอนที่ 1-2 เช่นเดียวกับกรดอะซิติก

3.2.4 การเตรียมแป้งดัดแปร

3.2.4.1 การเตรียมแป้งแอซิเตด ดัดแปลงจากวิธีของ Wurzburg (1964)

นำแป้งมันสำปะหลังมาดัดแปรโดยวิธีการแอซิทิลเลชันด้วยไวนิลแอซิเตดที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้ไวนิลแอซิเตด 8% (W/W) และควบคุม pH ให้อยู่ในช่วง 9.0-9.4 โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

1. ชั่งแป้ง 170 กรัม โดยน้ำหนักแป้งแห้ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไป 225 กรัม กวนให้เข้ากัน ด้วย Magnetic stirrer
2. ปรับ pH ของน้ำแป้งเป็น 9.0-9.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3%
3. เติมไวนิลแอซิเตดจากบิวเรตผ่านสายยาง โดยปรับให้ค่อยๆ หยดไวนิลแอซิเตดลงในน้ำแป้ง
4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3% เป็นระยะ เพื่อรักษา pH ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ

5. หลังจากเติมไวโนลแอซิเตตตามระยะเวลาที่กำหนดหมดแล้ว กวนน้ำแป้งต่อไปจนกว่า pH จะคงที่ แล้วปรับ pH เป็น 6.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 นอร์มอล
6. นำแป้งไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างแป้งโดยเติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันแล้วกรอง โดยทำการล้างแป้ง 3 ครั้ง
7. นำแป้งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 20 ชั่วโมง
8. บดแป้งให้ละเอียดด้วยโกร่งบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 140 เมช

3.2.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณของหมู่แอซิติลของแป้งแอซิเตตและระดับการแทนที่ (Degree of substitution) (Ogawa และคณะ, 1999)

การวิเคราะห์ปริมาณของหมู่แอซิติลในแป้งที่ดัดแปรด้วยวิธีแอซิติลเลชัน โดยวิธีการไตเตรดแบบย้อนกลับ มีขั้นตอนการวิเคราะห์และคำนวณดังนี้

1. ละลายแป้งแอซิเตต 5 กรัม ลงในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีจุกปิด หยด phenolphthalein เพื่อเป็น indicator
 2. เติม NaOH 0.5 M 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย คนของผสมที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ปิดจุก flask เพื่อป้องกันการระเหยขณะเกิดปฏิกิริยา saponification
 3. หลังจากนั้น ไตเตรดด้วยน้ำที่มากเกินไปในตัวอย่างด้วย HCl ความเข้มข้น 0.5 M
- หมายเหตุ - ทดสอบ blank โดยใช้แป้งที่ไม่ได้ผ่านการดัดแปรด้วยปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน แล้วทำตามขั้นตอนที่ 1-3

การคำนวณหาร้อยละของหมู่แอซิติล (% acetyl group) และระดับการแทนที่ (DS)

$$\% \text{ Acetyl group} = \frac{(\text{value for blank} - \text{value for sample})(\text{ml}) \times \text{normality of HCl} \times 0.043 \times 100}{(\text{sampling weight})(\text{g})}$$

$$\text{DS} = \frac{162 \times (\% \text{ Acetyl group})}{4300 - \{42 \times (\% \text{ Acetyl group})\}}$$

$$\% \text{ ประสิทธิภาพของการเกิดปฏิกิริยา} = \frac{\text{experimental DS} \times 100}{\text{theoretical DS}}$$

3.2.4.3 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังดัดแปรด้วย OSA (ดัดแปลงจากวิธีของ Hui และคณะ (2009))

นำแป้งมันสำปะหลังมาดัดแปรโดยใช้แป้งที่ความเข้มข้น 35% อุณหภูมิ 30 °C ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ควบคุม pH ระหว่างการทำปฏิกิริยาให้อยู่ในช่วง 8.0-8.5 โดยใช้ OSA ที่ความเข้มข้น 3% โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้

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 กวนน้ำแป้งต่อไปจนกว่า pH จะคงที่แล้วปรับ pH เป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3%
6. ล้างแป้งด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ตามด้วยเอทานอล 70% ประมาณ 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง และนำมากรองด้วยเครื่องปั๊มสุญญากาศ
7. นำแป้งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C ประมาณ 12 ชั่วโมง
8. บดแป้งให้ละเอียดด้วยโกรंबด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 140 เมช

3.2.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณของหมู่ออกทินิลซัคซินิกของแป้งมันสำปะหลังดัดแปรและระดับการแทนที่ (degree of substitution) (ดัดแปลงจากวิธีของ Kweon และคณะ (2001))

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

$$DS = \frac{0.162 \times (A \times M)/W}{1 - [0.210 \times (A \times M)/W]}$$

A = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

M = ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างแป้งออกเทนิลซัคซินเนตที่นำมาไทเทรต (กรัม)

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

3.2.5 การเตรียมแป้งที่ผ่านการย่อย

3.2.5.1 การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยกรด ดัดแปลงจากวิธีของ Chung และคณะ (2003)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2.2 M ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 35 °C พร้อมทั้งเขย่า ตามเวลาที่กำหนด
2. นำไปกรองผ่าน glass filter G4 ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งจนกระทั่ง pH เท่ากับ 7.0 และล้างด้วยอะซิโตน 2-4 ครั้ง
3. นำแป้งไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C ประมาณ 12 ชั่วโมง
4. บดแป้งให้ละเอียดด้วยโกรนบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 140 เมช

3.2.5.2 การตัดกิ่งแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ pullulanase ดัดแปลงจากวิธีของ Yotsawimonwat และคณะ (2004)

วิธีการทดลอง

1. เตรียมแป้งมันสำปะหลัง 10% (w/w) ในสารละลาย acetate buffer pH 5.0 นำไปต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi โดยใช้เครื่องมือหนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) เป็นเวลา 60 นาที
2. ทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิ 55 °C จากนั้นเติม pullulanase 22.5 PUN/กรัมแป้ง นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 55 °C กวนตลอดจนครบเวลาที่กำหนด
3. เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเติมเอทานอล 99% ปริมาตร 3 เท่าของปริมาณตัวอย่าง เพื่อหยุดปฏิกิริยา และตกตะกอนด้วยเอทานอล 95%

4. นำไปกรองและอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C ประมาณ 12 ชั่วโมง
5. บดแป้งให้ละเอียดด้วยโกร่งบด แล้วนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 63 μm

3.2.6 การศึกษาผลของแป้งมันสำปะหลังในรูปแบบต่างๆ ต่อการเกิดสเฟียรูไลต์

1. เตรียมสเฟียรูไลต์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.1 จากตัวอย่างดังนี้
 - สารประกอบระหว่างแป้งมันสำปะหลังกับกรดไขมันชนิดต่างๆ (กรดอะซิติก กรดบิวทิริก กรดปาล์มมิก และกรดโอเลอิก)
 - แป้งมันสำปะหลังดัดแปร (แป้งอะเซททิลเลตและแป้งออกทิลลัคซิเนต)
 - แป้งที่ผ่านการย่อย (ย่อยด้วยกรดและตัดกึ่งด้วยเอนไซม์)
2. ทำการเปรียบเทียบปริมาณและขนาดของสเฟียรูไลต์ที่ได้โดยใช้ Hemacytometer นับจำนวนสเฟียรูไลต์

3.2.7 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งมันสำปะหลัง

3.2.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและขนาดของเม็ดแป้งด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (Sahai และ Jackson, 1996)

1. นำแป้งตัวอย่างปริมาณเล็กน้อยมาโรยบนเทปทาสองหน้าที่ติดอยู่บนแท่ง aluminium stub
2. นำแท่ง aluminium stub ที่ติดแป้งตัวอย่างแล้วเข้าเครื่องเคลือบทองที่ผิวของแป้งตัวอย่าง
3. ส่องดูตัวอย่าง โดยควบคุมสภาวะในการทดลองดังนี้ ค่าอัตราเร่งความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 10 หรือ 15 kV และใช้กำลังขยายที่ 1,000 หรือ 3,500 เท่า

3.2.7.2 การศึกษาโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งโดยเครื่อง X - ray diffractometer

1. ชั่งตัวอย่างแป้งประมาณ 1-2 กรัม บรรจุลงในจานสำหรับตรวจวิเคราะห์ และปิดผิวหน้าของจานด้วยแผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความชื้น
2. วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้ง โดยทดสอบที่สภาวะดังต่อไปนี้คือ ใช้ target เป็นโลหะทองแดงที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ 45.0 kV ใช้กระแสไฟฟ้า 30 mA เริ่ม scan ที่มุม 5.0 และหยุดที่มุม 45.0 โดยมีค่า step angle เท่ากับ 0.04
3. วิเคราะห์ X-ray diffraction pattern โดยเทียบค่า 2θ , d-spacing และ intensity ที่ได้กับลักษณะโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งที่เป็น 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 (+)

3.2.8 การทดสอบความสามารถในการทนย่อยต่อกรดหรือเอนไซม์

1. เตรียมตัวอย่างแป้ง 0.1 กรัม เติมน้ำละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 M pH 1.2 หรือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 10U/100 มิลลิกรัมแป้ง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
2. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมทั้งเขย่า
3. เก็บตัวอย่างปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อครบเวลา 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที นำตัวอย่าง ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
4. นำสารละลายส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS)

3.2.9 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งทั้งหมด (total starch; TS) โดยวิธี Phenol-sulfuric acid

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแป้ง 50 มิลลิกรัม แล้วจึงเติม 80% (v/v) เอทานอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการกระจายตัว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้นเติม 90% DMSO ปริมาตร 5 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดจนตัวอย่างละลายหมด
2. คูณสารละลายแป้งที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เตรียม blank ในทำนองเดียวกันโดยเปลี่ยนจากสารละลายตัวอย่างเป็นน้ำกลั่น
3. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณแป้งโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร

3.2.10 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี DNS

1. คูณสารละลายแป้งที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิตร เติมสารละลาย DNS 0.5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นอีก 5 นาที
3. เติมน้ำ 2 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เตรียม blank ในทำนองเดียวกันโดยเปลี่ยนจากสารละลายตัวอย่างเป็นน้ำกลั่น
4. นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

3.2.11 การวิเคราะห์เชิงสถิติ (STATISTICAL ANALYSIS)

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มาวิเคราะห์เชิงสถิติเพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 17.0) **กรณีที่มีกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่ม** – ใช้การวิเคราะห์ Compare Means แบบ Independent-Samples T-Test ($P < 0.05$) **กรณีที่มีกลุ่มตัวอย่างมากกว่า 2 กลุ่ม** – ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) โดยใช้วิธี Duncan's multiple-range test ($P < 0.05$)