บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบ

- กล้วยนางพญาและกล้วยหินระยะการสุกที่ 1 (เปลือกมีสีเขียว ผลแข็ง ยังไม่มีการสุก) (Lii และคณะ, 1982)

2. สารเคมี

- สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสตาร์ช คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์
- สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ กรดซัลฟูริก คอปเปอร์ซัลเฟต โพแทสเซียมซัลเฟต โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก กรดบอริก โพแทสเซียมไฮโดรเจนพธาเลต เมทิลีนบลู เมทิลเรด แอลกอฮอล์ สารละลายไอโอดีน (analytical grade)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับผลิตสตาร์ช

- เครื่องโม่แป้ง ยี่ห้อ central ประเทศไทย
- เครื่องบดผสม ยี่ห้อ Sharp รุ่น EM-11 ประเทศญี่ปุ่น
- ตู้อบลมร้อนแบบถาด ประเทศไทย
- เครื่องเหวี่ยงแยก ยี่ห้อ Hittich รุ่น Universal 16 ประเทศเยอรมัน
- ตะแกรงร่อนขนาด 250 ไมครอน ยี่ห้อ Fritsch ประเทศเยอรมัน

2. อุปกรณ์สำหรับการดัดแปรด้วยวิธีความร้อนชื้นและวิธีการเกิดรีโทรเกรเดชัน

- เครื่องนวดผสมแป้ง ยี่ห้อ Thai mixer รุ่น KV-05 ประเทศไทย
- กระป๋องขนาด 307 x 108
- ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมัน
- เครื่องบดผสม ยี่ห้อ Sharp รุ่น EM-11 ประเทศญี่ปุ่น

3. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ทางด้านเคมีและกายภาพ

- เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Sartorius ประเทศเยอรมัน
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น 1000C ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AL204 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 รุ่น W350 ยี่ห้อ Memmert 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
- เครื่องอินฟาเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Fourier Transfer Infrared Spectrometer, FTIR) ยี่ห้อ Bruker รุ่น IFS-48 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องวัดความหนืด (Rapid Visco Analyzer) ยี่ห้อ Newport Sciencetific รุ่น RVA-4 ประเทศออสเตรเลีย
- เครื่องวัดความหนืด (Rheometer) ยี่ห้อ Haake รุ่น RheoStressRS75 ประเทศเยอรมัน
- เครื่อง Differential Scanning Caloremeter ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น DSC7 ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การผลิตสตาร์ชกล้วย องค์ประกอบทางเคมี ลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชกล้วย

1.1 การผลิตสตาร์ชกล้วย

ทำการผลิตสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหิน ด้วยวิธี Alkaline extraction โดยการปอกเปลือกกล้วยนางพญาดิบและหั่นเป็นแผ่นบางๆบดผสมด้วย NaOH 0.05 N. อัตราส่วน 1:5 (โดยน้ำหนักกล้วยต่อสารละลาย) กวนตลอดเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงขนาด 120 mesh นำส่วนที่กรองได้ไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกรองจำนวน 3 ครั้ง อัตราส่วน 1:2 (โดยน้ำหนักตะกอนต่อน้ำกรอง) โดยแต่ละครั้งทำการเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยน้ำกรองด้วยอัตราส่วน 1:2 (โดยน้ำหนักตะกอนต่อน้ำกรอง) กรองผ่านตะแกรงขนาด 120 mesh ปรับค่า pH ให้ได้เท่ากับ 6.5-7 แล้วนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 3500 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนสตาร์ชที่ได้ ไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C จนมีความชื้นสุดท้าย 10-

12 % (โดยน้ำหนักเปียก) แล้วนำมาบดละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 mesh เก็บใส่ภาชนะที่ป้องกันอากาศและความชื้น (ดัดแปลงจาก Eggleston *et. al* .,1992)

1.2 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชกล้วย

นำสตาร์ชกล้วยที่ผลิตได้จาก ข้อ 1.1 ไปวิเคราะห์ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน เยื่อใย (AOAC, 1999) และปริมาณอะมิโลส (Shanty *et. al.*, 1980)

1.3 ศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง และสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชกล้วย

1.3.1 ศึกษาชนิดและปริมาณผลึกของสตาร์ชกล้วย

ศึกษาชนิด และปริมาณผลึกของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผลิตได้จากข้อ 1.1 ด้วยเครื่อง X-ray Diffractometer (XRD) โดยบรรจุตัวอย่างสตาร์ช ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำการตรวจสอบการแทรกสอดของรังสี X-ray ที่มุม 2(Theta) ในช่วง 4-34 (40 kv, 30 mA, λ_{α} = 0.154 nm) คำนวณค่าร้อยละปริมาณผลึก โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคที่ปรากฏต่อพื้นที่ทั้งหมดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

1.3.2 ศึกษารูปร่างของเม็ดสตาร์ชกล้วย

ศึกษาลักษณะรูปร่างของเม็ดสตาร์ชล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผลิตได้จากข้อ 1.1 ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) โดยนำตัวอย่างสตาร์ชมากระจายลงบนแท่นตัวอย่าง ทำการเคลือบผิวหน้าของตัวอย่างด้วยทอง นำตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วมาส่องด้วยกล้อง SEM ที่กำลังต่างๆ โดยกำหนดค่า kV เท่ากับ 10

1.3.3 ศึกษาขนาดและการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ชกล้วย

ศึกษาขนาดและการกระจายตัวของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผลิตได้จากข้อ 1.1 ด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer (PSA) ใช้ He-Ne เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงที่ให้ความยาวคลื่นเท่ากับ 630 nm การวัดค่าครอบคลุมขนาดอนุภาค 0.05 ถึง 880 ไมโครเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นดิสเพิร์สเฟส (disperse phases) ทำการเตรียมตัวอย่างโดยนำสตาร์ชประมาณ 0.5 กรัมเติมลงในน้ำกลั่นแล้วทำให้เกิดการกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic) ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดขนาดและการกระจายตัวของขนาดด้วยเครื่อง PSA

1.3.4 ศึกษากำลังการพองตัวและความสามารถในการการละลาย (swelling power and solubility)

ศึกษากำลังการพองตัวและความสามารถในการละลายของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผลิตได้จากข้อ 1.1 โดยเตรียมสตาร์ชความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดส่วนละลายส่วนใสแล้วนำไปอบแห้งที่

อุณหภูมิ 100 °C จากนั้นชั่งน้ำหนักสตาร์ชแห้งที่เหลือค้างอยู่เพื่อนำมาคำนวณค่าร้อยละการละลาย (สมการที่ 1) สำหรับตะกอนเปียกสตาร์ชเปียกในหลอดนำมาชั่งน้ำหนักสตาร์ชที่พองตัวเพื่อคำนวณค่ากำลังการพองตัว (สมการที่ 2) (ดัดแปลงจาก Schoch, 1964 และ Eliasson, 1985)

$$\text{ร้อยละการละลาย} = \frac{\text{น้ำหนักสตาร์ชส่วนที่ละลายได้ในน้ำ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งของสตาร์ช (กรัม)}} \quad (1)$$

$$\text{กำลังการพองตัว} = \frac{\text{น้ำหนักสตาร์ชที่พองตัว (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของสตาร์ช (กรัม)}} \quad (2)$$

ตอนที่ 2 การดัดแปรสตาร์ชกล้วยด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี และการศึกษาลักษณะทางโครงสร้างและสมบัติทางเคมีกายภาพของสตาร์ชกล้วยดัดแปร

2.1 การดัดแปรสตาร์ชกล้วยด้วยวิธีความร้อนชื้น

นำสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหิน มาทำการดัดแปรด้วยวิธีความร้อนชื้น โดยผันแปรระดับความชื้นของสตาร์ชเป็น 4 ระดับ (18%, 21%, 24% และ 27% โดยน้ำหนัก) นำสตาร์ชแต่ละตัวอย่างที่ผ่านการปรับความชื้น น้ำหนัก 200 กรัม ไปบรรจุในกระป๋องขนาด 307 X108 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำสตาร์ชที่ได้ไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C จนมีความชื้นสุดท้าย 10-12 % (โดยน้ำหนักเปียก) แล้วนำไปบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C (Sair, 1964 อ้างโดย Hoover and Manuel, 1996) จากนั้นนำสตาร์ชกล้วยนางพญาที่ผ่านการดัดแปรไปศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง (ข้อ 2.3) สมบัติเชิงหน้าที่ (ข้อ 2.4) ระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์และกรด (ข้อ 2.5 และ 2.6) และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (ข้อ 2.7)

2.2 การดัดแปรด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชัน

นำสตาร์ชจากกล้วยจากกล้วยนางพญาและกล้วยหิน มาทำการดัดแปรด้วยวิธีวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชัน โดยเตรียมสตาร์ชความเข้มข้นร้อยละ 40 (โดยน้ำหนักแห้งของสตาร์ช) จากนั้นเติมเกลือโซเดียมซัลเฟต(Na_2SO_4) ปริมาณร้อยละ 15 (โดยน้ำหนักแห้งของสตาร์ช) ทำการกวนและเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 5 เพื่อปรับพีเอชของสารละลายสตาร์ชให้เท่ากับ 10.5 เติมสารโพรพิลีนออกไซด์โดยผันแปรระดับความเข้มข้นเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 8 10 และ 12 (โดยน้ำหนักแห้งของสตาร์ช) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ ครึ่งชั่วโมง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40±2 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Suwanliwong, 1998; Wattanachant *et al.*, 2003 และ Hung and Morita,

2005) จากนั้นนำสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการดัดแปรไปตรวจหาปริมาณของไฮดรอกซีโพรพิล (ข้อ 2.2.1) แล้วนำไปคำนวณระดับการแทนที่ (degree of substitution, DS) และค่าการแทนที่โมลาร์ (molar substitution, MS) ดังข้อ 2.2.2 ศึกษาลักษณะทางโครงสร้าง (ข้อ 2.3) สมบัติเชิงหน้าที่ (ข้อ 2.4) ระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์และกรด (ข้อ 2.5 และ 2.6) และปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (ข้อ 2.7)

2.2.1 การตรวจหาปริมาณของไฮดรอกซีโพรพิล

ชั่งสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการดัดแปร 0.05-0.1 กรัม (โดยน้ำหนักแห้งของสตาร์ช) เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวางในอ่างน้ำเดือดจนกระทั่งสตาร์ชละลายหมด แล้วทำให้เย็นและเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตร ทำการปิเปตสารละลาย 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตรและปิดฝาด้วยกับ glass stopper แล้วจุ่มหลอดลงในน้ำเย็น เติม 8 มิลลิลิตรของกรดซัลฟิวริก ผสมให้เข้ากันดีในหลอดทดลอง แล้วนำไปวางในอ่างน้ำเดือด 3 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำเย็นอย่างรวดเร็ว เมื่อสารละลายเย็นตัวลงเติมสารนินไฮดริน (ninhydrin) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร และเขย่าโดยเร็ว จากนั้นนำหลอดทดลองไปวางในอ่างน้ำที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 100 นาที แล้วปรับปริมาตรในแต่ละหลอดให้เท่ากับ 25 มิลลิลิตรด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จากนั้นเทส่วนที่เป็นสารละลายอย่างรวดเร็วลงในเซลล์ใส่สารขนาด 1 เซนติเมตร หลังจาก 5 นาทีผ่านไป ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (Johnson, 1969 อ้างโดย Suwanliwong, 1998)

ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของสารละลายโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol/ml) ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโพรพิลีนไกลคอลแต่ละความเข้มข้นที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร จากนั้นนำไปสร้างกราฟมาตรฐาน

คำนวณร้อยละของไฮดรอกซีโพรพิล (% HP) โดยใช้สมการที่ (3) ดังนี้

$$\% \text{ HP} = \frac{\text{จำนวนของโพรพิลีนไกลคอล (ไมโครกรัม) x 0.7763 x 100 x 100}}{10^6 \text{ x น้ำหนักแห้งของสตาร์ชที่ผ่านการดัดแปร}} \qquad (3)$$

2.2.2 การคำนวณระดับการแทนที่ (degree of substitution, DS) และค่าการแทนที่โมลาร์ (molar substitution, MS)

ระดับการแทนที่ (DS) และค่าการแทนที่โมลาร์ (MS) ของสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชัน สามารถคำนวณได้จากปริมาณของฟอสฟอรัสและ

ปริมาณของไฮดรอกซีโพรพิลของสตาร์ชที่ผ่านการดัดแปร โดยใช้สมการที่ (4) และ (5) ตามลำดับ (Paschall, 1964; Rutenburg and Solarek 1984 อ้างโดย Suwanliwong, 1998)

$$\text{DS (Disodium salt)} = \frac{162P}{3100 - 124P} \quad (4)$$

เมื่อ ; P = % ฟอสฟอรัส (โดยน้ำหนักแห้งของสตาร์ช)

$$\text{MS (hydroxypropylated starch)} = \frac{\text{จำนวนโมลของไฮดรอกซีโพรพิเลชัน (HP)}}{\text{จำนวนโมลของหน่วยแอนไฮโดรกลูโคส}} = \frac{\%\,HP}{59.08} \times \frac{162}{(100 - \%\,HP)} \quad (5)$$

2.3 ศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของสตาร์ชกล้วยที่ผ่านดัดแปรด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี

2.3.1 ศึกษาชนิดและปริมาณผลึกของสตาร์ชกล้วย

ศึกษาชนิด และปริมาณผลึกของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยเครื่อง X-ray Diffractometer (XRD) โดยบรรจุตัวอย่างสตาร์ช ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นทำการตรวจสอบการแทรกสอดของรังสี X-ray ที่มุม 2(Theta) ในช่วง 4-34 (40 kv, 30 mA, λ_α = 0.154 nm) คำนวณค่าร้อยละปริมาณผลึก โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคที่ปรากฏต่อพื้นที่ทั้งหมดด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

2.3.2 ศึกษารูปร่างของเม็ดสตาร์ชกล้วย

ศึกษาลักษณะรูปร่างของเม็ดสตาร์ชของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) โดยนำตัวอย่างสตาร์ชมากระจายลงบนแท่นตัวอย่าง ทำการเคลือบผิวหน้าของตัวอย่างด้วยทอง นำตัวอย่างที่เตรียมเสร็จแล้วมาส่องด้วยกล้อง SEM ที่กำลังต่างๆ โดยกำหนดค่า kV เท่ากับ 10

2.3.3 ศึกษาขนาดและการกระจายตัวของขนาดเม็ดสตาร์ชกล้วย

ศึกษาขนาดและการกระจายตัวของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยเครื่อง Particle Size Analyzer (PSA) ใช้ He-Ne เป็นแหล่งกำเนิดคลื่นแสงที่ให้ความยาวคลื่นเท่ากับ 630 nm การวัดค่าครอบคลุมขนาดอนุภาค 0.05 ถึง 880 ไมโครเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นดิสเพิร์สเฟส (disperse phases) ทำการเตรียมตัวอย่างโดยนำสตาร์ชประมาณ 0.5 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นแล้วทำให้เกิดการกระจายตัวด้วยเครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic) ประมาณ 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดขนาดและการกระจายตัวของขนาดด้วยเครื่อง PSA

2.4 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสตาร์ชกล้วยที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเคมีและกายภาพ

2.4.1 ศึกษากำลังการพองตัวและความสามารถในการการละลาย (swelling power and solubility)

ศึกษากำลังการพองตัวและความสามารถในการละลายของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปร โดยเตรียมสตาร์ชความเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยน้ำหนักแห้ง จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดส่วนละลายส่วนใสแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 °C จากนั้นชั่งน้ำหนักสตาร์ชแห้งที่เหลือค้างอยู่เพื่อนำมาคำนวณค่าร้อยละการละลาย (สมการที่ 1) สำหรับตะกอนเปียกสตาร์ชเปียกในหลอดนำมาชั่งน้ำหนักสตาร์ชที่พองตัวเพื่อคำนวณค่ากำลังการพองตัว (สมการที่ 2) (ดัดแปลงจาก Schoch, 1964 และ Eliasson, 1985)

2.4.2 ศึกษาสมบัติการเกิดเจลาติไนเซชัน (Gelatinization property)

ศึกษาคุณสมบัติการเกิดเจลาติไนเซชันของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปร โดยเตรียมตัวอย่างสตาร์ชต่อน้ำด้วยอัตราส่วน 1: 4 (โดยน้ำหนักแห้ง) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสมดุลเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) ที่อัตรา 10 ^{0}C/min ในช่วงอุณหภูมิ 10-95^{0}C (Lii *et al.*, 1995) ทำการบันทึกค่าอุณหภูมิเริ่มต้น (T_0) อุณหภูมิสูงสุด (T_p) และอุณหภูมิสุดท้าย (T_c) ของการเกิดเจลาติไนเซชัน และพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาติไนเซชัน (ΔH)

2.4.3 ศึกษาสมบัติการเกิดเพสท์ (pasting behavior)

ศึกษาสมบัติการเกิดเพสท์ของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) ในสภาวะที่เป็นกลาง(พีเอช 7.0) โดยใช้สารละลาย NaOH เข้มข้น 0.1 M และสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 3.5) โดยใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 30 โดยเตรียมสตาร์ชเข้มข้นร้อยละ 12 (โดยน้ำหนักแห้ง) ใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียม ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาให้ความร้อนดังนี้ ช่วงแรกเพิ่มอุณหภูมิจาก25 °C ให้สูงขึ้นในอัตรา 1.5 °C/min จนกระทั่งถึงอุณหภูมิ 95 °C คงไว้ที่อุณหภูมินี้นาน 3 นาที จากนั้นค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงในอัตราเดียวกันจนถึงอุณหภูมิ 25 °C คงไว้ที่อุณหภูมินี้นาน 5 นาที บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงความหนืดที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ วิเคราะห์อุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดความหนืด(pasting temperature) ค่าความหนืดสูงสุด (peak viscosity) ค่า breakdown และค่า setback (Whalen *et al.*, 1997)

2.4.4 ศึกษาพฤติกรรมการไหล (Flow behavior)

ศึกษาพฤติกรรมการไหลของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรโดยเตรียมสตาร์ชที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนักแห้ง) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ

95 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าความหนืดและค่าความเค้นเฉือนที่อัตราการเฉือนในช่วง 10-1000 s^{-1} ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ (RheoStress, HAKKE, Germany) ซึ่งต่อกับหัววัดชนิด coaxial cylinder (Z41) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่าความหนืดและความเค้นเฉือนกับอัตราการเฉือน ในรูปแบบสมการคณิตศาสตร์ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคงตัว (consistency coefficient) และค่าดัชนีพฤติกรรมการไหล (flow behavior index)

2.4.5 ศึกษาสมบัติวีสโคอีลาสติก (viscoelastic properties)

ศึกษาสมบัติสโคอีลาสติกของเจลสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปร โดยเตรียมสตาร์ชที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 8 (โดยน้ำหนักแห้ง) แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 ^{0}C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่า storage modulus (G′) loss modulus (G″) และค่า loss tangent (tan δ) ที่ช่วงความถี่ 0.1-10 Hz ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C ด้วยเครื่องรีโอมิเตอร์ (RheoStress, HAKKE., Germany) ซึ่งต่อกับหัววัดชนิด cone and plate (CP4/40) (ทำการทดลองในช่วง linear viscoelastic ซึ่งมีค่า strain เท่ากับร้อยละ 2)

2.4.6 ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation)

ศึกษาการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยเครื่อง FT-IR (Van Soest et. al., 1995) โดยเตรียมสารละลายสตาร์ชที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 (โดยน้ำหนักแห้ง) นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นลงจนกระทั่งอุณหภูมิเท่ากับ 30°C นำตัวอย่างไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 0, 2, 5, 8, 26,50 และ 70 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอินฟาเรดที่ความถี่ช่วง 1200-800 cm^{-1} คำนวณสัดส่วนของโมเลกุลที่จัดเรียงตัวแบบเกลียวคู่ต่อส่วนอสัณฐาน (RSA) โดยคำนวณจากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความถี่ 1047 cm^{-1} ต่อ 1022 cm^{-} ศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงค่า RSAกับเวลา

2.5 ศึกษาความสามารถในการถูกย่อยด้วยกรด

ศึกษาระดับการถูกย่อยด้วยกรดของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปร (Hoover and Manuel, 1996) โดยชั่งตัวอย่างสตาร์ช 0.25 กรัม เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2.2 โมล 10 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นทำตัวอย่างให้เป็นกลางด้วย 1 N NaOH นำตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1944) แสดงดังภาคผนวก ก คำนวณระดับการถูกย่อยด้วยกรด ด้วยสมการที่ (6)

ระดับการถูกย่อยด้วยกรด = (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ X 100) / (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด) (6)

2.6 ศึกษาความสามารถในการถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์

ศึกษาระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปร (Zhang and Oates, 1999) โดยชั่งตัวอย่างสตาร์ช 0.2 กรัม เติมสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (pH 7) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ *alpha*-amylase (porcine pancrease) 2520 U/g starch จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็วรอบของการเขย่า 150 รอบต่อนาที โดยเก็บตัวอย่างที่ 5, 10, 24, 30, 48, 54 และ 72 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ด้วยสารละลาย $HgCl_2$ 0.4 mM นำหลอดตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายส่วนใส 1 มิลลิลิตร ไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (1944) แสดงดังภาคผนวก ก แล้วคำนวณระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ด้วยสมการที่ (7)

ระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ = (ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ X 100) / (ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด) (7)

2.7 ศึกษาปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์

ศึกษาปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชกล้วยนางพญาทั้งก่อนและหลังการดัดแปรด้วยวิธีการเกิดรีโทรเกรเดชัน ด้วยวิธีของ McCleary and Monaghan (2002) โดยชั่งตัวอย่างสตาร์ช 0.1 กรัม ในหลอดที่มีฝาปิด จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ pancreatic *alpha*-amylase ที่มีเอนไซม์ amyloglucosidase (AMG, 3 U/ml) 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็ว 200 stroke/min เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอทานอล (99%) 4 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยเอทานอล (50%) 8 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) นำตะกอนที่ได้มาเติม 2 โมล KOH ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปกวนเป็นเวลา 20 นาที ในอ่างน้ำแข็ง เมื่อครบเวลาเติม 1.2 โมล sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ amyloglucosidase (AMG, 3,300 U/ml) 0.1 มิลลิลิตร โดยทันที ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว (ทำ 3 ซ้ำ) เติมสารละลาย GOPOD 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็น

เวลา 20 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ด้วยสารลายควบคุม คำนวณปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (RS) ด้วยสมการที่ (8)

$$\text{ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (RS \%)} = \Delta E \times (F/W) \times 90 \qquad (8)$$

ΔE = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

F = 100 (mg D-glucose) / ค่าการดูดกลืนแสงของ 100 (mg D-glucose๗ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

W = น้ำหนักแห้งของตัวอย่างสตาร์ช (กรัม)

2.8 ศึกษาความใสของแป้งเปียก (paste clarity)

ศึกษาความใสของแป้งเปียกสตาร์ชที่ผ่านการดัดแปรและที่ไม่ผ่านการดัดแปร โดยเตรียมแป้งเปียกสตาร์ชข้าวให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักแห้งของสตาร์ช) จากนั้นนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือด นาน 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ณ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจหาค่าความใสของแป้งเปียกสตาร์ชจากค่าร้อยละของการส่องผ่านที่ความยาวคลื่น 650 nm (% Transmittance, T_{650}) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank (Kerr and Cleveland, 1959 อ้างโดย Suwanliwong, 1998)

2.9 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองโดยใช้ (Analysis of variance, ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range test (DMRT)

ตอนที่ 3 การศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สตาร์ชกล้วยดัดแปรด้วยวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี

3.1 การประยุกต์ใช้สตาร์ชกล้วยดัดแปรด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชันในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่ผลิตจากโดแช่เยือกแข็ง

คัดเลือกสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชันที่ระดับความเข้มข้นสารโพรพิลีนออกไซด์ร้อยละ 12 ซึ่งเป็นสตาร์ชดัดแปรที่มีการค่า setback และค่า RSA (short-range molecular order to amorphous) ที่ต่ำ ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มการเกิดการคืนตัว (retrogradation) ได้ต่ำ มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่ผลิตจากโดแช่เยือกแข็ง

3.1.1 การผลิตขนมปังสูตรมาตรฐาน

ทำการผลิตขนมปังสูตรมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้ แป้งขนมปัง 300 กรัม น้ำตาล 10.8 กรัม นมผงปราศจากไขมัน 15 กรัม เนยขาว 18 กรัม ยีสต์แห้ง 4.2 กรัม เกลือ 4.5 กรัม น้ำ 180 กรัม โดยมีวิธีการผลิตดังนี้ ละลายยีสต์ด้วยน้ำปริมาณเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส แล้วเตรียมส่วนผสมของโดโดยใช้ส่วนผสมตามสูตรมาตรฐาน และใช้วิธีผสมแบบขั้นตอนเดียว (straight dough) โดยทำการผสมส่วนผสมต่างๆ ที่ใช้ในสูตรพร้อมกันพร้อมทั้งเติมสารละลายยีสต์ลงไปในชามผสม ทำการผสมด้วยความเร็วปานกลาง จนได้โดที่เรียบเนียน แห้งและมีความยืดหยุ่นดี ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 นาที เสร็จแล้วนำโดมาหมักครั้งที่ 1 เป็นเวลา 50 นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำโดมาม้วนใส่พิมพ์ แล้วหมักครั้งที่ 2 เป็นเวลา 40 นาที อบในตู้อบอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส จนได้ขนมปังที่สุกดี ซึ่งขนมปังที่ผลิตได้จะเป็นชุดควบคุมของการทดลอง (จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ นัยวิกุล, 2546) นำโดที่ผ่านการหมักครั้งที่ 2 และผลิตภัณฑ์ขนมปังที่ผลิตได้ไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ดังข้อ 3.1.3 และข้อ 3.1.2 ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาการประยุกต์ใช้สตาร์ชกล้วยดัดแปรด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชันในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่ผลิตจากสูตรมาตรฐาน ทำได้โดยการเติมสตาร์ชกล้วยดัดแปรที่ระดับความเข้มข้นสารโพรพิลีนออกไซด์ร้อยละ 12 ทดแทนแป้งสาลีร้อยละ 15 โดยส่วนผสมอื่น ๆ วิธีการผลิต และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ยังคงเดิม

3.1.2 การผลิตขนมปังจากโดแช่ยืดแข็ง

สูตรการผลิตเช่นเดียวกับการผลิตขนมปังสูตรมาตรฐาน(ข้อ 3.1.1) โดยมีวิธีการผลิตดังนี้ ละลายยีสต์ด้วยน้ำปริมาณเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส แล้วเตรียมส่วนผสมของโดโดยใช้ส่วนผสมตามสูตรมาตรฐาน และใช้วิธีผสมแบบขั้นตอนเดียว (straight dough) โดยทำการผสมส่วนผสมต่างๆ ที่ใช้ในสูตรพร้อมกันพร้อมทั้งเติมสารละลายยีสต์ลงไปในชามผสม ทำการผสมด้วยความเร็วปานกลาง จนได้โดที่เรียบเนียน แห้งและมีความยืดหยุ่นดี ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10 นาที เสร็จแล้วนำโดมาหมักครั้งที่ 1 เป็นเวลา 50 นาที ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำโดมาม้วนใส่พิมพ์ ห่อด้วยฟิล์มพลาสติก นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C แล้วเก็บรักษาเป็นเวลา 0 1 2 3 และ 4 สัปดาห์ นำ ตัวอย่างโดออกจากช่องแช่แข็ง ละลายน้ำแข็งด้วยไมโครเวฟที่ระดับความร้อนต่ำสุด เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปหมักครั้งที่ 2 เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 200 °C จนได้ขนมปังที่สุกดี นำโดที่ผ่านการหมักครั้งที่ 2 และผลิตภัณฑ์ขนมปังที่ผลิตได้ไปตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ดังข้อ 3.1.3 และข้อ 3.1.2 ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาการประยุกต์ใช้สตาร์ชกล้วยดัดแปรด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรพิเลชันในผลิตภัณฑ์ขนมปังที่ผลิตจากโดแช่เยือกแข็ง ทำได้โดยการเติมสตาร์ชกล้วยดัดแปรที่ระดับความเข้มข้นสารโพรพิลีนออกไซด์ร้อยละ 12 ทดแทนแป้งสาลีร้อยละ 15 โดยส่วนผสมอื่น ๆ วิธีการผลิต และการตรวจสอบสมบัติทางกายภาพ ยังคงเดิม

3.1.3 ศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของโด

3.1.3.1 ค่าความสามารถในการยืดขยายตัว (extensibility) ของโด

โดยนำโดมาวางบนแท่งแล้วนำมาวัดค่าความสามารถในการยืดขยายตัวด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA.XT2i) โดยใช้หัววัด Kieffer extensibility (Stable Micro Systems,UK,1995) โดยแปลผลแรงสูงสุด (positive peak force) เป็นค่าแรงต้านทานแรงดึง (resistance to extension) และระยะทางที่ตัวอย่างแยกออกจากกันเป็นค่าความสามารถในการยืดขยายตัว (extensibility)

3.1.3.2 ค่าความเหนียวของโด

วัดด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA.XT2i) โดยนำโดใส่ลงในภาชนะแล้วปิดฝาซึ่งที่ฝาจะ มีรูเล็ก ๆ สำหรับให้โดไหลออกมา หมุนสกรูด้านล่างของภาชนะเพื่อดันให้โดไหลผ่านสูง 1 มม. จากนั้นหมุนสกรูย้อนกลับเบา ๆ ใช้พลาสติกใสปิดโดไว้ ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วนำพลาสติกออก วัดความเหนียวของตัวอย่างโดยใช้หัวเข็มรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มม.(P/ 25) แตะสัมผัสโด ประมวลผลโดยวัดค่าแรงจากจุดสูงสุดของกราฟ (Stable Micro Systems,UK,1995)

3.1.3.3 เวลาในการหมักโด (proofing time)

โดยนำโดบรรจุในกล่องหมักโดโดยให้ความสูงของโดเสมอกับขอบของกล่องหมัก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 แล้วจับเวลาการหมักจนกระทั่งความสูงของโดสูงกว่าขอบด้านบนของกล่องหมักโดประมาณ 3 เซนติเมตร (Bhattacharya, *et al.*, 2003)

3.1.4 ศึกษาคุณลักษณะทางกายภาพของขนมปัง

3.1.4.1 ค่าสีของเปลือกนอกและเนื้อในของขนมปัง

ค่าสีของเปลือกนอกและเนื้อในของขนมปังจากโดแช่เยือกแข็งและขนมปังสูตรมาตรฐานในระบบ CIE Hunter Lab โดยใช้เครื่องวัดสี Hunter Lab

3.1.4.2 ความแน่นเนื้อ

ความแน่นเนื้อของขนมปังจากโดแช่เยือกแข็งและขนมปังสูตรมาตรฐาน โดยนำขนมปังมาผ่านสไลด์ ให้มีความหนา 25 มม. ตัดหัวและท้ายออก นำตัวอย่างมาทดสอบค่าแรง

กดด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA.XT2i) โดยใช้หัววัดcylinder probe รัศมี 36 มม. (P/ 36R) กดทับร้อยละ 40 ของความสูงของตัวอย่างและอ่านค่าแรงกดที่ระยะกดร้อยละ 25 ของความสูงของตัวอย่าง (Stable Micro Systems,UK,1995)

3.1.4.3 ปริมาตรจำเพาะ

ปริมาตรจำเพาะ (specific volume) ของขนมปังจากโดแช่เยือกแข็งและขนมปังสูตรมาตรฐานโดยนำขนมปังที่ผ่านการอบมาชั่งน้ำหนักทันที จากนั้นวางขนมปังทิ้งไว้ให้เย็นลงแล้วนำไปวัดปริมาตรโดยวิธีการแทนทีด้วยเมล็ดงา (Nemeth , *et al* .,1996)

3.2 การประยุกต์ใช้สตาร์ชกล้วยที่ผ่านดัดแปรด้วยวิธีความร้อนชื้นในการเสริมความแข็งแรงให้กับฟิล์มที่ผลิตจากสตาร์ชข้าว

คัดเลือกสตาร์ชจากกล้วยนางพญาและกล้วยหินที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีความร้อนชื้นที่ระดับความชื้นที่สตาร์ชดัดแปรมีความแข็งแรงของโครงสร้างสูงสุด มาประยุกต์ใช้เพื่อเสริมความแข็งแรงให้กับฟิล์มที่ผลิตจากสตาร์ชข้าว

ทำการเตรียมฟิล์มสตาร์ชข้าวหอมมะลิ โดยเตรียมสารละลายสตาร์ชที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 แล้วทำการเจลาติไนซ์ที่อุณหภูมิ 85 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที พร้อมกวนตลอดเวลา เติมพลาสติไซเซอร์ (ซอร์บิทอล) ในปริมาณ ร้อยละ 50 ของสตาร์ช และเติมสตาร์ชกล้วยดัดแปรด้วยความร้อนชื้นที่ระดับความชื้นร้อยละ 27 (HMT_{27}) ในปริมาณร้อยละ 15 ของสตาร์ชข้าว พร้อมกวนตลอดเวลาเป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายฟิล์มที่ได้มาไล่ฟองอากาศ (vacuum dryer) แล้วทำการขึ้นแผ่นฟิล์มบนกะทะ Teflon และทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 ^{0}C องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 – 15 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการลอกแผ่นฟิล์มและเก็บที่ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60 $\pm$ 2 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ ดังนี้ (Bourtoom และคณะ, 2008)

- ค่าการต้านทานแรงดึงสูงสุด ตามวิธี ASTM D882-91 (ASTM ,1995)
- ค่าการยืดตัวของแผ่นฟิล์มตามวิธี ASTM D882-91 (ASTM ,1995)
- ค่าความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำ ดัดแปลงจาก McHugh และคณะ (1993)
- วัดความใสของแผ่นฟิล์ม (Han and Floros, 1997)

3.3 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลการทดลองโดยใช้ (Analysis of variance, ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ‘s Multiple Range test (DMRT)