

ผลของการผลิตสตาร์ชทนย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลาเนส
และการเกิดรีโทรเกรเดชันร่วมกับการดัดแปรความร้อน-ความชื้น
ของสตาร์ชถั่ว

EFFECT OF PRODUCTION RESISTANT STARCH
BY USING PULLULANASE ENZYME AND RETROGRADATION
WITH HEAT-MOISTURE TREATMENT ON LEGUME STARCH

ศศิพร รัตนสุวรรณ^{1*} และ สุนีย์ โชติเนียรนาท²

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
กรุงเทพมหานคร 10220

²หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
กรุงเทพมหานคร 10900

Sasiporn Rattanasuwan^{1*} and Sunee Chotineeranat²

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Science and Technology,
Phranakhon Rajabhat University, Bangkok 10220

²Cassava and Starch Technology Research Unit, National Center for Genetic Engineering
and Biotechnology, Bangkok 10900

*E-mail: sasiporn@pnru.ac.th

บทคัดย่อ

แป้งและสตาร์ช เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของมนุษย์ เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลและดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งหากมีน้ำตาลในกระแสเลือดปริมาณมากส่งผลให้เกิดภาวะโรคอ้วน อาหารเพื่อสุขภาพโดยเฉพาะเส้นใยอาหารมีการใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อสุขภาพ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาผลของการผลิต สตาร์ชทนต่อการย่อยประเภทที่ 3 (Resistant Starch Type 3: RS3) จากสตาร์ชถั่วเขียว ถั่วดำและถั่วแดงหลวง โดยผ่านการตัดกิ่งตัวอย่างสตาร์ชถั่วด้วยเอนไซม์พุลูลาเนสปริมาณ 0.02 มิลลิลิตรต่อกรัมสตาร์ชที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสตาร์ชทนย่อยลดลง และเมื่อต้มตัวอย่างที่ผ่านการตัดกิ่ง

ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 3 7 และ 14 วัน ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) พบว่าสตาร์ชจากถั่วทั้งสามชนิด มีแนวโน้มของปริมาณสตาร์ชทนย่อยเพิ่มสูงขึ้น จากนั้นนำตัวอย่างสตาร์ชถั่วที่ผ่านการตัดกิ่งมาดัดแปรร่วมด้วยกระบวนการความร้อน - ความชื้น พบว่าสตาร์ชถั่วทั้งสามชนิดมีปริมาณสตาร์ชทนย่อยเพิ่มสูงขึ้น ($p \leq 0.05$)

คำสำคัญ: แป้งทนย่อย สตาร์ชถั่ว เอนไซม์พูลูลูลานเนส การคืนตัว การดัดแปรความร้อนร่วมกับความชื้น

ABSTRACT

Flour and starch are importance of human energy source. It was digested to be sugar and absorbed while consuming to body. A high content of sugar in blood vessel caused an obesity. Functional food, especially food fiber have been used to be an ingredient in healthy food. The objective of this study was study of production of resistant starch (RS3) from mung bean, black bean and red kidney bean. Legume starches were debranched by Pullulanase enzyme of 0.02 ml/g of starch at the temperature of 50 °C for 36 h. The study found that resistant starch was reduced ($p \leq 0.05$). The debranched starches were then aged at 4 °C for 0, 1, 3, 7 and 14 days and were dried using freeze drying. The result showed that starch from 3 types of legume were higher of resistant starch ($p \leq 0.05$). The debranched starch was modified with heat-moisture treatment process and the result showed that increasing of resistant starch were observed in 3 type of legume starches.

Keywords: resistant starch, legume starch, pullulanase enzyme, retrogradation, heat-moisture treatment

บทนำ

ปัจจุบัน ผู้บริโภคมีวิถีการใช้ชีวิตที่เน้นความสะดวกสบาย ส่งผลให้มีพฤติกรรม การบริโภคเปลี่ยนแปลง โดยมีการบริโภคอาหารแบบตะวันตกมากขึ้น ทำให้มีโอกา สเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคอ้วนและโรค มะเร็ง บางชนิดทำให้ผู้บริโภคให้ความสนใจในสุขภาพมากขึ้น เพื่อลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคดังกล่าว ข้างต้น การเลือกผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการหรืออาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) จึงมีแนวโน้มได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นคาร์โบไฮเดรตที่จัดอยู่ในอาหารสุขภาพ เช่น อาหารที่มี

ใยอาหารสูงหรืออาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตต่ำ สตार्ชเป็นแหล่งที่เก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญของมนุษย์ เมื่อเกิดการย่อยจะให้พลังงาน แต่สตार्ชมีองค์ประกอบที่ทำให้เกิดการย่อยและการดูดซึมพลังงานในลำไส้เล็กมีความเร็วหรือช้าที่แตกต่างกัน จึงทำให้สตार्ชและผลิตภัณฑ์จากสตार्ชสามารถจำแนกตามระดับการย่อยได้ ความแตกต่างในการย่อยของสตार्ชสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ในอาหาร เช่น อาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

สตार्ชหรือแป้งทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ หรือสตार्ชที่ให้พลังงานต่ำ (Resistant starch, RS) คือ แป้งและผลิตภัณฑ์ของแป้งที่ไม่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์และถูกดูดซึมในลำไส้เล็กของมนุษย์ Resistant starch จึงมีคุณสมบัติเทียบเท่าเส้นใยอาหาร สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้มากขึ้น (Ranhotra et al., 1996b) โดยสตार्ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์แบบที่ 3 (RS type 3) เป็นสตार्ชที่มีสมบัติทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เกิดจากการเรียงตัวใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสายแอมิโลสระหว่างการทำให้เย็นของสตार्ชที่ผ่านการเกิดเจลในเซชัน (การเกิดรีโทรเกรดชัน) เกิดเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติที่มีความแข็งแรงและทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้มากขึ้น ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยกรดไขมันที่เกิดขึ้นจากการหมักของจุลินทรีย์ในลำไส้จะช่วยปรับค่าความเป็นกรดต่างภายในลำไส้ให้ลดต่ำลง (Alexander, 1995 : Ferguson et al., 2000) นอกจากนี้ สตार्ชทนย่อยยังจัดอยู่ในกลุ่มอาหารประเภทพรีไบโอติก และเป็นส่วนประกอบอาหารประเภทลดพลังงาน (low-calorie food ingredient) สตार्ชทนย่อยสามารถพบได้ในธรรมชาติในอาหารประเภทธัญพืช มันฝรั่ง เผือก ผักและผลไม้ อาหารจำพวกถั่ว (legume) ถั่วลิสงและอาหารที่ผ่านการแปรรูปบางชนิด เป็นต้น (Phakdeesriphan & Uriyaponson, 2010; Lunnand Buttriss, 2007) สำหรับพืชตระกูลถั่ว นอกจากเป็นพืชที่ให้โปรตีนแล้ว ยังมีปริมาณสตार्ชทนย่อยสูง Katyal et al. (2005) รายงานว่า อาหารประเภทถั่วที่ผ่านการแปรรูปจะมีปริมาณสตार्ชทนย่อยสูงกว่าที่พบในธัญพืช เช่นเดียวกันกับการรายงานของ Yadav et al. (2010) พบว่า พืชตระกูลถั่วมีปริมาณสตार्ชทนย่อยสูงกว่าธัญพืชประเภทข้าวสาลี ข้าวและข้าวบาร์เลย์ พืชตระกูลถั่วจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจสำหรับใช้ศึกษาถึงปริมาณสตार्ชทนย่อยในประเทศไทยมีพืชตระกูลถั่วมากมายหลายชนิด เนื่องจากมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตอยู่ระหว่างร้อยละ 55 - 60) และมีปริมาณแอมิโลสในปริมาณสูง (ร้อยละ 48 - 50) การเพิ่มปริมาณสตार्ชทนย่อยโดยใช้เอนไซม์พอลูลูกลานสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยพันธะ α - 1, 6 glucosidic linkages ของโมเลกุลแป้งมีผลให้ปริมาณสตार्ชทนย่อยเพิ่มขึ้น (Surendra & Parimalavalli, 2018) โดย Zhang & Jin (2011) ได้ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการตัดสายกิ่งสตार्ชข้าวโพดด้วยเอนไซม์พอลูลูกลานสที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (8, 16, 24, 32, 40 และ 48) พบว่าปริมาณสตार्ชทนย่อยมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 24 ชั่วโมง

ที่มีผลให้ปริมาณสตาร์ชทนย่อยสูงสุดคือร้อยละ 32.1 และการเพิ่มปริมาณสตาร์ชทนย่อยนอกจากการใช้เอนไซม์พุลูลาเนสตัดสายกิ่งสตาร์ชแล้ว ยังพบว่ามียธิพลอันเนื่องมาจากสภาวะการเก็บ (storage condition) สัมพันธ์กันระหว่างระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาซึ่งมีผลให้สตาร์ชเกิดรีโทรเกรเดชันโดยเฉพาะการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ Gonzalez-Soto et al. (2007) พบว่าระยะเวลาไม่มีผลต่อปริมาณสตาร์ชทนย่อยของสตาร์ชกล้วยที่ไม่ผ่านการตัดกิ่ง ในขณะที่อุณหภูมิในการเก็บมีผลต่อปริมาณสตาร์ชทนย่อยของ debranched banana starch อย่างมีนัยสำคัญ โดยการเก็บที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แสดงปริมาณสตาร์ชทนย่อยน้อยกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 และ 32 องศาเซลเซียส

ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณสตาร์ชทนย่อยในพืชตระกูลถั่วและผลของการผลิตสตาร์ชทนย่อยด้วยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์พุลูลาเนสซึ่งทำหน้าที่ตัดกิ่งของโพลีแซคคาไรด์ (de-branching) และผ่านการคั้นตัวร่วมกับการดัดแปรด้วยความร้อน-ความชื้นเพื่อตัดแปรสตาร์ชจากถั่วให้มีปริมาณสตาร์ชทนย่อยเพิ่มขึ้น เพื่อสามารถเพิ่มมูลค่าของพืชตระกูลถั่วที่ปลูกในไทยให้เป็นส่วนประกอบอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และยังมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อสุขภาพ (functional foods)

วิธีการ

1. ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดรีโทรเกรเดชันต่อปริมาณสตาร์ชทนย่อย

นำสตาร์ชถั่วเขียว สตาร์ชถั่วดำและสตาร์ชถั่วแดงหลวง มาผลิตเป็นสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (RS 3) โดยเตรียมสารแขวนลอยสตาร์ชถั่วเขียว สตาร์ชถั่วแดงหลวง และสตาร์ชถั่วดำ เข้มข้น ร้อยละ 5 ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที และให้ความร้อนต่อที่ระดับ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) (Hirayama, HVE-50, Japan) ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเติมเอนไซม์พุลูลาเนส (Pullulanase: Promozyme[®] D2, expressed in *Bacillus subtilis*) ปริมาณ 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมสตาร์ช จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายสตาร์ชที่ได้ตั้งทิ้งไว้จนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจาก Pongjanta et al., 2009) นำสตาร์ชทั้งสามชนิดมาศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดรีโทรเกรเดชัน โดยนำสารละลายสตาร์ชถั่วเขียว สตาร์ชถั่วดำและสตาร์ชถั่วแดงหลวงที่ผ่านการตัดสายกิ่งด้วยเอนไซม์พุลูลาเนส มาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 1 3 7 และ 14 วัน แล้วนำตัวอย่างสตาร์ชไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dried) (FreeZone, Labconco, USA) นำมาบดให้ละเอียด ร่อนผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นสตาร์ชที่ผ่านกระบวนการเกิดการรีโทรเกรเดชัน

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชจากถั่วเขียว ถั่วดำและถั่วแดงหลวง ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน (AOAC, 2000) และคาร์โบไฮเดรต โดยวิธีการคำนวณจากสูตร = $100 - (\text{ความชื้น} + \text{ร้อยละ} + \text{ถั่ว} (\text{ร้อยละ}) + \text{ไขมัน} (\text{ร้อยละ}) + \text{โปรตีน} (\text{ร้อยละ}) + \text{เยื่อใย} (\text{ร้อยละ}))$

วิเคราะห์ปริมาณแอมิโลส ตามวิธี colorimetric method (Juliano, 1971) และวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชทนย่อย (resistant starch) ด้วยชุดตรวจสอบปริมาณสตาร์ชทนย่อย (resistant starch assay procedure K-RSTAR 05/2008, 100 assays per kit) บริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์ (AACC.1995)

2. ศึกษาการผลิตสตาร์ชทนย่อยที่ผ่านการตัดกิ่ง (de-branching) และเกิดรีโทรเกรเดชัน ร่วมกับการดัดแปรด้วยความร้อนความชื้นของสตาร์ชถั่ว

นำสตาร์ชจากข้อ 1 มาปรับให้มีระดับความชื้นร้อยละ 20 ด้วยน้ำกลั่น ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันใส่ในภาชนะปิดสนิท บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Hoover and Manuel, 1996) จากนั้นนำออกจากภาชนะ อบแห้งให้มีความชื้นประมาณร้อยละ 10 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชทนย่อย (resistant starch) ด้วยชุดตรวจสอบปริมาณสตาร์ชทนย่อย (resistant starch assay procedure K-RSTAR 05/2008, 100 assays per kit) บริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์ (AACC, 1995)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำวางแผนการทดลอง สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดรีโทรเกรเดชันต่อปริมาณสตาร์ชทนย่อย

สตาร์ชจากถั่วเขียว ถั่วดำและถั่วแดงหลวง (ผ่านกรรมวิธีการผลิตแบบไม่เปียก) มีองค์ประกอบทางเคมี (ดังแสดงตารางที่ 1) พบว่า สตาร์ชจากถั่วเขียว มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน ถั่ว และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับร้อยละ 7.67 0.19 0.13 0.26 91.74 ตามลำดับ สตาร์ชจากถั่วดำมีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน ถั่ว และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับร้อยละ 9.06 0.25 0.11 0.35 และ 90.17 ตามลำดับ และสตาร์ชจากถั่วแดงหลวง มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน ถั่ว และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับร้อยละ 7.79 0.31 0.12 0.39 และ 91.46 ตามลำดับ พืชตระกูลถั่วจัดว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก มีโปรตีนสูงและไขมันต่ำ

(Division of soil Biotechnology, 2007) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ช ถั่วเขียว สตาร์ชถั่วแดงหลวงและสตาร์ชถั่วดำ โดยวิธีการสกัดสตาร์ชนี้ส่งผลให้ปริมาณของ โปรตีน และไขมันมีปริมาณลดลง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างองค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ช ถั่วเขียว ถั่วแดงหลวงและถั่วดำ พบว่า สตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าสตาร์ช ถั่วแดงหลวงและถั่วดำ ($p \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (โปรตีน ไขมัน และเถ้า) ของสตาร์ชทั้ง 3 ชนิด พบว่ามีค่าน้อยกว่าร้อยละ 0.5 เป็นไปตามมาตรฐานของสตาร์ช จากถั่วเขียวซึ่งกำหนดปริมาณโปรตีนไม่เกินร้อยละ 0.4 (Ministry of Public health, 2013) และ องค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของสตาร์ชจากถั่วทั้งสามชนิด เนื่องจากความแตกต่างกัน ของสายพันธุ์ถั่ว พื้นที่เพาะปลูก และสภาพแวดล้อม

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของสตาร์ชถั่วเขียว สตาร์ชถั่วดำและสตาร์ชถั่วแดงหลวง

ค่าที่วิเคราะห์	สตาร์ชถั่วเขียว	สตาร์ชถั่วดำ	สตาร์ชถั่วแดงหลวง
ความชื้น	7.67 ^c ±0.03	9.06 ^a ±0.03	7.79 ^b ±0.05
โปรตีน ^{ns}	0.19±0.02	0.25±0.10	0.31±0.05
ไขมัน ^{ns}	0.13±0.05	0.11±0.03	0.12±0.05
เถ้า	0.26 ^c ±0.01	0.35 ^b ±0.01	0.39 ^a ±0.02
คาร์โบไฮเดรต	91.74 ^a ±0.05	90.17 ^c ±0.09	91.46 ^b ±0.04
แอมิโลส	52.83 ^a ±1.92	49.76 ^b ±0.47	48.85 ^b ±1.28
สตาร์ชทนย่อย	27.70 ^c ±0.35	33.95 ^b ±1.05	43.36 ^a ±0.60

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่กำกับแตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

^{ns} หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสตาร์ชทนย่อยของสตาร์ชถั่วทั้งสามชนิด พบว่า สตาร์ช ถั่วแดงหลวงมีปริมาณสตาร์ชทนย่อยสูงกว่าสตาร์ชถั่วดำและสตาร์ชถั่วเขียว ($p \leq 0.05$) ซึ่งสตาร์ชจากถั่วทั้งสามชนิดจัดอยู่ในกลุ่มที่มีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ สูงมาก (มากกว่าร้อยละ 15) (Goni et al., 1996) ผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับ Photinam (2016) ซึ่งเตรียมสตาร์ชจากถั่วเขียวด้วยวิธีการไม่เปียกและผ่านการปอกเปลือกออก ส่งให้สตาร์ชที่ได้มีความบริสุทธิ์ เป็นปริมาณคาร์โบไฮเดรตเท่ากับร้อยละ 99.12 และมีปริมาณ สตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงถึงร้อยละ 55.87

จากการศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดรีโทรเกรเดชันต่อปริมาณสตาร์ชทนน้อยของสตาร์ชถั่วที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดกิ่ง (de-branching) พลูลูแลนสที่ความเข้มข้น 0.02 มิลลิลิตรต่อกรัมสตาร์ช เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงและเกิดรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 1 3 7 และ 14 วัน (ดังแสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณสตาร์ชทนน้อยของสตาร์ชถั่วเขียว สตาร์ชถั่วดำและสตาร์ชถั่วแดงหลวงที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดกิ่งและเกิดรีโทรเกรเดชันที่ 4 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ระยะเวลา	ปริมาณสตาร์ชทนน้อย (ร้อยละ)		
	สตาร์ชถั่วเขียว	สตาร์ชถั่วดำ	สตาร์ชถั่วแดงหลวง
0	24.16 ^{Ab} ±0.22	22.93 ^{ABc} ±0.15	21.55 ^{Bc} ±0.82
1	25.56 ^{Ab} ±0.48	23.22 ^{ABc} ±0.68	22.97 ^{Bb} ±0.40
3 ^{NS}	26.93 ^a ±0.92	25.57 ^b ±0.11	25.27 ^a ±0.63
7	27.17 ^{Aa} ±0.11	26.01 ^{ABb} ±0.56	25.12 ^{Ba} ±0.26
14 ^{NS}	28.28 ^a ±1.24	27.11 ^a ±0.36	25.44 ^a ±0.03

หมายเหตุ: ตัวอักษร^{a, b} ที่กำกับแตกต่างกันในแนวดังแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
ตัวอักษร^{A, B} ที่กำกับแตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
^{NS} หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากตาราง พบว่า สตาร์ชถั่วเขียว สตาร์ชถั่วดำและสตาร์ชถั่วแดง มีปริมาณสตาร์ชทนน้อยแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น พบว่าสตาร์ชทั้งสามชนิดมีปริมาณสตาร์ชทนน้อยเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) สอดคล้องกับ Phrukkiwattanakul (2013) ที่รายงานว่า ปริมาณสตาร์ช ทนต่อการย่อยของสตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณสตาร์ชทนน้อยของสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 24.16 เป็น 28.28 ($p \leq 0.05$) สตาร์ชถั่วดำมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 22.93 เป็น 27.11 ($p \leq 0.05$) และสตาร์ชถั่วแดงหลวงมีค่าเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 21.55 เป็น 25.44 ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก 0 วัน เป็น 14 วัน ปริมาณของสตาร์ชทนน้อยของสตาร์ชถั่วทั้งสามชนิด จัดอยู่ในกลุ่มของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในระดับสูงมาก

ซึ่งกำหนดไว้ว่า มากกว่าร้อยละ 15) (Goni et al. 1996) และอยู่ในกลุ่มของสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ประเภทที่ 3 (Sajilata et al, 2006) ปริมาณสตาร์ชทนย่อยที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายสตาร์ชเพื่อทำให้สตาร์ชสุก แล้วทิ้งให้สตาร์ชเกิดการเย็นตัวลง โมเลกุลของสตาร์ชที่ละลายออกมาจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ได้เป็นผลึกที่แข็งแรงและสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ได้ส่งผลให้ปริมาณสตาร์ชทนย่อยเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเกิดรีโทรเกรเดชันเพิ่มขึ้น (Sriroth & Piyajomkwan, 2003) นอกจากนี้ Shi et al. (2013) ได้รายงานไว้ว่า สตาร์ชข้าวโพดข้าวเหนียวที่ผ่านการตัดสายกิ่งด้วยเอนไซม์พลูลูลาเนสและผ่านการรีโทรเกรเดชันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีผลให้ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสตาร์ชดิบ (ไม่ผ่านการตัดสายกิ่งและการรีโทรเกรเดชัน) เมื่อพิจารณาระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 14 วัน พบว่า ปริมาณสตาร์ชทนย่อยของสตาร์ชทั้งสามชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) โดยสตาร์ชถั่วเขียวมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์สูงกว่าสตาร์ชถั่วดำและถั่วแดงหลวง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณแอมิโลสของสตาร์ชถั่วเขียวมีค่าสูงกว่าสตาร์ชถั่วดำและถั่วแดงหลวง ซึ่งสตาร์ชที่มีปริมาณแอมิโลสสูงส่งผลให้โครงสร้างภายหลังจากการเกิดรีโทรเกรเดชันมีความแข็งแรงมากขึ้น (Noosuk, 2003) และสอดคล้องกับการทดลองของ Raddy et al. (2014) ซึ่งได้ทำการศึกษาปริมาณสตาร์ชทนย่อยของหัวบุก โดยนำสตาร์ชจากบุกมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์พลูลูลาเนส (40U/g) เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บรักษาที่สภาวะแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณสตาร์ชทนย่อยมีปริมาณเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$)

2. ผลการศึกษาการผลิตสตาร์ชทนย่อยที่ผ่านการตัดกิ่ง (de-branching) และเกิดรีโทรเกรเดชัน ร่วมกับการดัดแปรด้วยความร้อนความชื้นของสตาร์ชถั่ว

จากตารางที่ 3 แสดงปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ของสตาร์ชถั่วเขียว ถั่วดำและถั่วแดงหลวงซึ่งผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดกิ่งไม่ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชัน และผ่านการดัดแปรด้วยความร้อนชื้น พบว่า ปริมาณสตาร์ชทนย่อยของสตาร์ชถั่วเขียวเพิ่มขึ้นประมาณ 2.2 เท่า (จากร้อยละ 24.16 เป็นร้อยละ 53.62) สตาร์ชถั่วดำมีปริมาณสตาร์ชทนย่อยเพิ่มขึ้นประมาณ 1.82 เท่า (จากร้อยละ 22.93 เป็นร้อยละ 41.64) และสตาร์ชถั่วแดงหลวงมีปริมาณสตาร์ชทนย่อยเพิ่มขึ้นประมาณ 2.42 เท่า (จากร้อยละ 21.55 เป็นร้อยละ 52.18) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อสตาร์ชผ่านการดัดแปรด้วยความร้อนชื้นแล้วส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวใหม่ โครงสร้างมีความแข็งแรงขึ้น ทำให้ปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Suling et al., (2011) ซึ่งดัดแปรสตาร์ชถั่วเขียวที่ระดับความชื้น 5 ระดับ คือร้อยละ 15 20 25 30 และ 35 ของน้ำหนักสตาร์ช รายงานว่า สตาร์ชถั่วเขียวที่ผ่านการดัดแปรด้วยความร้อนชื้นมีปริมาณสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยสูงขึ้น (จากสตาร์ชดิบเท่ากับ

ร้อยละ 11.2 เป็น 45.2) และที่ระดับความชื้นร้อยละ 20 มีปริมาณสารสกัดที่น้อยที่สุด เช่นเดียวกับ Sankhon et.al. (2014) ศึกษาผลของการดัดแปรด้วยความร้อนขึ้นของสารสกัด (African locust bean) ที่ระดับความชื้นร้อยละ 15 20 25 และ 30 ของน้ำหนักสารสกัด พบว่า ปริมาณสารสกัดที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณสูงสุดที่ระดับความชื้นร้อยละ 20 (จากสารสกัดดิบเท่ากับร้อยละ 33.38 เป็น 50.14) นอกจากนี้ Jacobasch et. al. (2006) รายงานว่า แป้ง Novolose 330 ที่ผ่านการดัดแปรด้วยความร้อนขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณของ สารสกัดที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากร้อยละ 40.4 เป็น 74.7

ตารางที่ 3 ปริมาณสารสกัดของสารสกัดถั่วเขียว ถั่วดำและถั่วแดงหลวงที่ผ่านการย่อย ด้วยเอนไซม์ตัดกิ่งและไม่เกิดรีโทรเกรเดชันร่วมกับการดัดแปรด้วยความร้อนขึ้น

แหล่งของสารสกัด	ปริมาณสารสกัด (ร้อยละ)
สารสกัดถั่วเขียว	53.62 ^a ±0.74
สารสกัดถั่วดำ	41.64 ^c ±0.22
สารสกัดถั่วแดงหลวง	52.18 ^b ±0.48

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่กำกับแตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

นอกจากนี้ ผลการทดลองยังสอดคล้องกับการทดลองของ Pancha-arnon (2012) ศึกษาการดัดแปรแป้งข้าว พลาวันข้าวและเม็ดข้าวด้วยความร้อนร่วมกับความชื้น พบว่า ที่ความชื้นร้อยละ 20 ให้มีผลให้ปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลที่ทำให้เม็ดแป้งมีความแข็งแรงมากขึ้นโดยเกิดจากกระบวนการรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ของสารสกัด (Lunn & Buttriss, 2007) ซึ่งจะเห็นว่าการเกิดรีโทรเกรเดชันแสดงในรูปของค่าการคืนตัวของเม็ดแป้ง (setback) ส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับปริมาณ สารสกัด โดยสารสกัดจากพืชตระกูลถั่วที่มีค่าการคืนตัวสูง มีแนวโน้มที่ปริมาณสารสกัด จะสูงตามไปด้วย (Kim et al., 2006) นอกจากนี้เหตุผลดังกล่าวข้างต้น ยังมีอีกเหตุผล บางประการที่ส่งผลให้ปริมาณสารสกัดมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยการนำสารสกัดมาผ่าน กระบวนการรีโทรเกรเดชันซ้ำหลาย ๆ รอบ ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Jagannadham et al., (2017) ศึกษาจำนวนครั้งของการเกิดรีโทรเกรเดชันของสารสกัดถั่วพุ่มคือ 24 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่า เมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น ปริมาณสารสกัดเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$)

สรุป

การผลิตสตาร์ชที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์จากถั่วเขียว ถั่วดำและถั่วแดงหลวง ด้วยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์พอลิกลูกลาเนสที่ระดับความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อกรัมสตาร์ช เป็นผลให้ปริมาณสตาร์ชทนย่อยมีปริมาณที่ลดลง เมื่อเทียบกับสตาร์ชดิบ สตาร์ชที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผ่านการเกิดรีโทรเกรเดชันที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 1 3 7 และ 14 วัน พบว่า ปริมาณสตาร์ชทนย่อยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเกิดรีโทรเกรเดชันเพิ่มขึ้น เลือกระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 0 วัน (ไม่เกิดรีโทรเกรเดชัน) มาศึกษาการดัดแปรด้วยความร้อน ร่วมกับความร้อน (Heat moisture treatment) ที่ระดับความชื้นร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงพบว่า กระบวนการให้ความร้อนร่วมกับความชื้นมีผลให้สตาร์ชจากถั่วทั้งสามชนิดมีปริมาณ สตาร์ชทนย่อยเพิ่มขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในกลุ่มของเส้นใยอาหาร (dietary fiber) มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ส่งเสริมประโยชน์ต่อสุขภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2558 และขอขอบคุณสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- AACC. (1995). *Test kit Resistant starch (AOAC official Method 2002.02; AACC Method 32-40.01)*. Ireland: Megazyme International.
- Alexander, R.J. (1995). Resistant starch - new ingredient for the food industry. *Cereal Foods World*. 40(6), 455 - 458.
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 17th ed. William Horwitz. U.S.A. Association of Official Analytical Chemist, Inc
- Division of soil Biotechnology. (2007). Protein, Fat and Calcium content from vegetable. Division of soil Biotechnology. Land Development Department. [in Thai].
- Ferguson, L.R., Tasman-Jones, C., Englyst, H. & Harris, P.J. (2000). Comparative effects of three resistant starch preparation on transit time and short chain fatty acid product in rats. *Nutrition and Cancer*. 36, 230 - 237.

- Goni, I., Garcia-Diz, L., Manas, E. & Saura-Calixto, F. (1996). Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chemistry**. 56, 445 - 449.
- Gonzalez-Soto, R. A., Mora-Escobedo, R., Hernandez-Sanchez-Rivera, M. and Bello-Perez, L.A. (2007). The influence of time and storage temperature on resistant starch formation from autoclaved debranched banana starch. **Food Research International**, 40(2). 304 - 310.
- Hoover, R. & Manuel, H. (1996). Effect of heat - moisture treatment on the structure and physicochemical properties of legume starches. **Food Research International**. 29(8), 731 - 750.
- Jagannadham, K., Parimalavalli, R. & Surendra Babu, A. (2017). Effect of triple retrogradation treatment on chickpea resistant starch formation and its characterization. **Journal of Food Science and Technology**. 54 (4), 901 - 908.
- Jacobasch, G., Dongowski, G., Schmiedl, D. & Muller-Schmehl, K. (2006). Hydrothermal treatment of Novelose 330 results in high yield of resistant starch type 3 with beneficial prebiotic properties and decreased secondary bile acid formation in rats. **British Journal of Nutrition**. 95, 1063-1074.
- Juliano, B.O., (1971). A Simplified Assay for Milled-rice Amylose, **Cereal Science Today**. 16, 334 - 340.
- Kim, J.H., Tanhehco, E.J. & P.K.W. Ng. (2006). Effect of extrusion conditions on resistant starch formation from pastry wheat flour. **Food Chemistry**. 99, 718 - 723.
- Katyal, D., Ghugre, P.S. & Udipi, S.A. (2005). Resistant starch in selected raw and processed legumes. **Journal of Food Science and Technology**. 42, 506 - 510.
- Li, S., Gao. & Ward, R. (2011). Physicochemical properties and in vitro digestibility of resistant starch from mung bean (*Phaseolus radiates*) starch. **Starch/Starke**. 63, 171 - 178.
- Lunn, J. & Buttriss, J. (2007). Carbohydrates and dietary fibre. **Journal of Compilation, British Nutrition Foundation, Nutrition Bulletin**. 32, 21 - 64.
- Ministry of Public health. (2013). Mung bean starch. No. 948-2556. Ministry of Public health. Thai industrial standards institute (TISI), Bangkok. [in Thai].
- Phrukwiwattankul, P. (2013). **Production of resistant starch from different types of starch and determination of their prebiotic properties**. Master of Science in Food Technology, Prince of Songkla University. 151p. [in Thai].

- Phakdeesriphan, S. & Uriyapongson, J. (2010). Effect of harvest season and variety on resistant content and pasting properties of Taro flour and starch. **Agricultural Science Journal**. 41(3/1) Supplement : 261-264. [in Thai].
- Photinam, R., Moongngram, A. & Paseephol, T. (2016). Chemical compositions and physical properties of mungbean and cowpea starch and application in cellophane noodles. **Khonkaen agricultural Journal**. 44 supplement 1, 1073 - 1079. [in Thai].
- Noosuk, P. (2003). **The assessment of the relationship between structure and functional properties of rice starch**. Ph.D. Science (Food Technology), Chulalongkorn University. Bangkok. 183p. [in Thai].
- Pongjanta, J., Utaipattanaceep, A., Naivikul, O. & Piyachomkwan, K. (2009). Debranching enzyme concentration effected on physicochemical properties and α -amylase hydrolysis rate of resistant starch type III from amylase rice starch. **Carbohydrate Polymer**. 78, 5 - 8.
- Raddy, C.K., Haripriya, S., Mohamad, A. & Suriya, M. (2014). Preparation and characterization of resistant starch III from elephant foot yam (*Amorphophallus paeonifolius*) starch. **Food Chemistry**. 155(15), 38 - 44.
- Ranhotra, G. S., Gelroth, J.A. & Glaser, B.K. (1996b). Energy value of resistant starch. **Journal of Food Science**. 61(2), 453 - 455.
- Sajilata, M. G., Singhal, R.S. & Kulkarni, P.R. (2006). Resistant starch - a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 5,1 - 17.
- Sankhon, A., Amadou, I., Yao, W., Wang, H., Qian, H. & Mlyuka, E. (2014). Effect of Different Heat-moisture Treatment on the Physicochemical properties of African Locust Bean (*Parkia biglobosa*) Starches. **Journal of Agricultural Science and Technology**. 16, 331-342.
- Puncha-arnon, S. (2012). **Hydrothermal treatment of rice starch/flour to reduce swelling and increase resistant content**. Bangkok: The Thailand Research Fund. [in Thai].
- Shi, M., Chen, Y., Yu, S. & Gao, Q. (2013). Preparation and properties of RS III from waxy maize starch with pullulanase. **Food Hydrocolloids**. 33, 19-25.
- Sriroth, K. & Piyachomkwan (2003). **Starch Technology**. 3rd Ed. Bangkok: Kasetsart University Publisher. [in Thai].

- Surendra, B.A. & Parimalavalli, R. (2018). Effect of pullulanase debranching and storage temperatures on structural characteristics and digestibility of sweet potato starch. **Journal of the Saudi Society of Agriculture Sciences**. 17, 208 - 216.
- Yadav, R.B., Sharma, A. & Yadav, R.B. (2010). Effect of storage on resistant starch content and in vitro starch digestibility of some pressure-cooked cereals and legumes commonly used in India. **International Journal of Food Science and Technology**. 45(12), 2449 - 2455.
- Zhang, H. & Jin, Z. (2011). Preparation of resistant starch by hydrolysis of maize with pullulanase. **Carbohydrate Polymers**. 83, (2), 865 - 867.
-