



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์  
Study of microstructure and rheological behavior of rice starch and hydrocolloid mixtures

โดย ดร. ปิยะดา อาชายุทธการ และคณะ

พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์  
Study of microstructure and rheological behavior of rice starch and hydrocolloid mixtures

ผู้วิจัย

สังกัด

- |                           |                                      |
|---------------------------|--------------------------------------|
| 1. ดร. ปิยะดา อาชายุทธการ | มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา          |
| 2. รศ.มานพ สุพรรณธริกา    | มหาวิทยาลัยมหิดล (นักวิจัยที่ปรึกษา) |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ :** MRG5180352

**ชื่อโครงการ :** การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้า  
และไฮโดรคอลลอยด์

**ชื่อนักวิจัย :** ดร. ปิยะดา อาชายุทธการ

**E-mail Address :** piyada411@yahoo.com

**ระยะเวลาโครงการ:** 15 พ.ค. 2551 - 15 พ.ค. 2553

แป้งข้าวเจ้าเป็นแป้งที่สำคัญที่สามารถผลิตได้ภายในประเทศไทย การศึกษาโครงสร้างของแป้งและของผสมแป้งและไฮโดรคอลลอยด์สามารถช่วยให้เข้าใจคุณสมบัติทางกายภาพของแป้งและตำแหน่งของไฮโดรคอลลอยด์ในของผสมระหว่างแป้งและไฮโดรคอลลอยด์ ซึ่งมีผลต่ออุณหภูมิในการต้มสุก การบวมตัวของแป้ง และคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมแป้งและไฮโดรคอลลอยด์ Confocal laser scanning microscopy (CSLM) เป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ศึกษาโครงสร้างของของผสมระหว่างแป้งและไฮโดรคอลลอยด์ จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาโครงสร้างของของผสมแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์ ตัวอย่างของผสมระหว่างแป้งและ FITC-dextran ถูกต้มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เครื่อง Bio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow System ที่ excitation wavelength 488 nm ใช้ถ่ายภาพโครงสร้างของของผสมแป้งและไฮโดรคอลลอยด์ จากผลการทดลองพบว่า FD4 (FITC-dextran Mw 4,000) สามารถซึมผ่านรูพรุนของเม็ดแป้งแต่ละเม็ดได้แตกต่างกัน FD4 ไม่สามารถซึมผ่านเม็ดแป้งส่วนใหญ่ FD4 สามารถซึมผ่านเม็ดแป้งบางส่วนหรือทั้งเม็ดในเม็ดแป้งบางเม็ด จากการศึกษาของผสมแป้งและ FD4 ที่ผ่านการต้มสุกที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 วินาที พบว่า FD4 สามารถเข้าสู่บริเวณศูนย์กลางของ starch ghost ได้ ขณะที่ FD10 (FITC-dextran Mw 10,000) ไม่สามารถแทรกซึมเข้าสู่เม็ดแป้งได้ เครื่อง Scanning Electron Microscopy และ CSLM ใช้ในการศึกษารูพรุนที่ผิวของเม็ดแป้งและหาโปรตีนที่อยู่ภายใน channel ของเม็ดแป้ง จากการศึกษาพบว่าไม่พบ protein channel ในแป้งข้าวเจ้าหลังจากการทำปฏิกิริยากับ 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA) วิธีการหรือช่องทางแทรกซึมของ dextran เข้าไปภายในแป้งข้าวเจ้าควรได้รับการศึกษาวิจัยต่อไป

**คำหลัก :** แป้งข้าวเจ้า ไฮโดรคอลลอยด์ โครงสร้าง CSLM

## Abstract

---

**Project Code** : MRG5180352

**Project Title** : Study of microstructure and rheological behavior of rice starch and hydrocolloid mixtures

**Investigator** : Dr. Piyada Achayuthakan

**E-mail Address** : piyada411@yahoo.com

**Project Period**: 15 May 2008 - 15 May 2010

Rice starch is one of the important starches that can be produced in Thailand. The study of starch microstructure helps to understand the physical properties of starches and the location of hydrocolloids in starch and hydrocolloid mixtures which can affect to gelatinization temperature, swelling power and rheological properties of starch and hydrocolloid mixtures. Confocal laser scanning microscopy (CSLM) is used to study starch microstructure of starch-hydrocolloid mixtures. The objective of this research was to study the microstructure of rice starch and hydrocolloid mixtures. The mixtures of rice starch and FITC-dextran were heated in a water bath at different temperatures and time. A Bio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow System was used to image the mixtures at an excitation wavelength of 488 nm. The results showed that FD4 (FITC-dextran Mw 4,000) penetrated through raw rice starch granules at different levels. FD4 could not penetrate through the most of raw rice starch. Whereas, it could be partially or fully absorb on some starch granules. FD4 was found at the holes of rice starch ghost when the samples were cooked at 95°C for 15 s. Whereas, FD10 can not penetrated through rice starch after cooking. The surface pores and protein channels of starch granules were examined by using SEM and CSLM. Rice starch protein channels could not be found after reaction with 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA). The ways of penetration of dextran through starch granules need further study.

**Keywords** : rice starch, hydrocolloid, microstructure, CSLM

## Executive summary

การเติมไฮโดรคอลลอยด์ในแป้งข้าวเจ้าสามารถช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัส เพิ่มความหนืด และช่วยเพิ่มความคงตัวในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็น และช่วยรักษาลักษณะทางกายภาพของอาหารแช่แข็ง (freeze-thaw stability) (Chaisawang & Supphantharika, 2006; Sae-kang and Supphantharika, M, 2006; Satrapai and Supphantharika, 2007) เป็นที่ทราบกันดีว่าคุณสมบัติการละลาย (melting) การสุกของแป้ง (gelatinization) การเกิด retrogradation และการสร้างเครือข่าย (network) ภายในโครงสร้างของแป้งเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมไฮโดรคอลลอยด์ (Achayuthakan, Supphantharika และ Rao, 2006; Lund, 1984; Lai and Kokini, 1991; Kokini et al., 1992; Fanta and Christianson, 1996). ของผสมระหว่างแป้งและไฮโดรคอลลอยด์ที่สุกแล้วประกอบไปด้วยเม็ดแป้ง (disperse phase) กระจายตัวอยู่ในสารละลายไฮโดรคอลลอยด์ (continuous phase) Eidam (1995) พบว่าแป้งข้าวโพดสามารถสร้างเครือข่ายจากอะไมโลส (amylose) ที่อยู่ในสารละลาย (continuous phase) โดยเกิดจากการสร้างพันธะครอสลิงค์ (cross-links) ภายในเครือข่าย และการเติมแซนแทนกัมจะไปยับยั้งการสร้างพันธะครอสลิงค์ภายในเครือข่าย ข้อสรุปดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mandala (2004) ซึ่งพบว่าแซนแทนกัมห่อหุ้มเม็ดแป้ง ซึ่งการห่อหุ้มดังกล่าวทำให้การสร้างพันธะระหว่างเม็ดแป้งกับสารละลายลดลง จากการศึกษาของ Achayuthakan, Supphantharika และ Rao (2006) พบว่าค่าแรงที่ใช้ในการทำลายเครือข่าย (network yield stress) เพิ่มขึ้นเมื่อเติมแซนแทนกัมในแป้งข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy corn starch) และแป้งข้าวโพดชนิดละลายน้ำเย็น (cold water swelling corn starch) แต่ค่าแรงที่ใช้ในการทำลายเครือข่ายจะลดลงเมื่อเติมแซนแทนกัมในแป้งข้าวโพดข้าวเหนียวครอสลิงค์ (cross-linked waxy corn starch) ดังนั้นการเติมแซนแทนกัมสามารถส่งเสริมหรือขัดขวางการสร้างพันธะภายในของผสมโดยขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง

จากการที่ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตแป้งข้าวเจ้าเป็นจำนวนมากในแต่ละปี การศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์จะช่วยส่งเสริมให้ผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมอาหาร ผู้พัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร และนักวิจัยสามารถเข้าใจการสร้างโครงสร้าง (network or microstructure formation) ของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์โดยอาศัยเทคนิคการย้อมของผสมโดยใช้สียฟลูออเรสเซนและนำตัวอย่างมาส่องกล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal scanning laser microscopy ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ที่นักวิจัยจำนวนมากนำมาใช้ในการอธิบายการสร้างโครงสร้างของผลิตภัณฑ์อาหาร (Gonera และ Cornillon, 2002; Peighambardoust, van der Goot, van Vliet, Hamer, และ Boom, 2006) เมื่อนักวิจัยมีความเข้าใจการสร้างโครงสร้างของของผสมแล้วจะช่วยให้การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์อาหารที่มีแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์เป็นส่วนประกอบเป็นไปได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นและช่วยส่งเสริมการนำแป้งข้าวเจ้าซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- Achayuthakan, P., Supphantharika, M., & Rao, M. A. (2006). Yield stress components of waxy corn starch-xanthan mixtures: Effect of xanthan concentration and different starches. *Carbohydrate Polymers*, 65, 469-478.
- Chaisawang, M., & Supphantharika, M. (2006). Pasting and rheological properties of native and anionic tapioca starches as modified by guar gum and xanthan gum. *Food Hydrocolloids*, 20, 641-649.
- Eidam, D., Kulicke, W. M., Kuhn, K., & Stute, R. (1995). Formation of maize starch gels selectively regulated by the addition of hydrocolloids. *Starch/Stärke*, 47(10), 378-384.
- Fanta, G. F., & Christianson, D. D. (1996). Starch-hydrocolloid composites prepared by steam jet cooking. *Food Hydrocolloids*, 10, 173-178.
- Gonera, A., & Cornillon, P. (2002). Gelatinization of starch /gum /sugar systems studied by using DSC, NMR, and CSLM. *Starch/Stärke*, 54(11), 508-516.
- Kokini, J. L., Lai, L. S., & Chedid, L. L. (1992). Effect of starch structure on starch rheological properties . *Food Technology*, 46, 124-139.
- Lai, L.S., & Kokini, J. L. (1991). *Biotechnology Progress*, 7, 251-266.
- Lund, D. (1984). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 20, 249-273.
- Mandala, I. G., & Bayas, E. (2004). Xanthan effect on swelling, solubility and viscosity of wheat starch dispersions. *Food Hydrocolloids*, 18, 191-201.
- Peighambardoust, S. H., van der Goot, A. J., van Vliet, T. ,Hamer, R. J.,& Boom, R. M. (2006). Microstructure formation and rheological behavior of dough under simple shear flow. *Journal of Cereal Science*, 43, 183-197.
- Sae-kang, V. and Supphantharika, M. (2006). Influence of pH and xanthan gum addition on freeze-thaw stability of tapioca starch pastes. *Carbohydrate Polymers*, 65 (3), 371-380.
- Satrapai, S. and Supphantharika, M. (2007). Influence of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucan on gelatinization and retrogradation of rice starch. *Carbohydrate Polymers*, 67 (4), 500-510.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	i
ABSTRACT.....	ii
Executive summary.....	iii
วัตถุประสงค์.....	1
วิธีการทดลอง.....	1
ผลการทดลอง.....	4
เอกสารอ้างอิง.....	14
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต.....	16
Output.....	16
ภาคผนวก.....	17

## วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาผลกระทบของการเติมไฮโดรคอลลอยด์ต่อการสร้างเครือข่ายของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์
- 2) เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์
- 3) เพื่อเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมระหว่างแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์
- 4) เพื่อเพิ่มทักษะในการวิเคราะห์โครงสร้างของตัวอย่างแป้งและไฮโดรคอลลอยด์โดยใช้เครื่อง Confocal scanning laser microscopy (CSLM)
- 5) เพื่อถ่ายทอดความรู้ในการใช้เครื่อง CSLM เพื่อวิเคราะห์ตัวอย่างแป้งและไฮโดรคอลลอยด์แก่นักศึกษาปริญญาตรี

## วิธีทดลอง

### 1. Materials

Native rice starch and waxy rice starch was supplied by Cho Heng Rice Vermicelli Factory Co., Ltd. (Nakornpathom, Thailand). Native tapioca starch was purchased in a local market from Thai Wah Food Product Public Co., Ltd. (Nakornpathom, Thailand). Sorghum starch was kindly supplied by B.R. Hamaker, Whistler Center for Carbohydrate Research, Department of Food Science, Purdue University, USA. Mercury dibromofluorescein (disodium salt, Merbromin) was purchased from Sigma. CBQCA Protein Quantitation Kit (C-6667, Molecular Probes) was purchased from Molecular Probes. FD4 (Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated-dextran Mw 4,000) , FD10 (FITC-dextran Mw 10,000) , FD40 (FITC-dextran Mw 40,000), FD250 (FITC-dextran Mw 250,000) , FD500 (FITC-dextran Mw 500,000) and FD2000 (FITC-dextran Mw  $2 \times 10^6$ ) were purchased from Sigma.

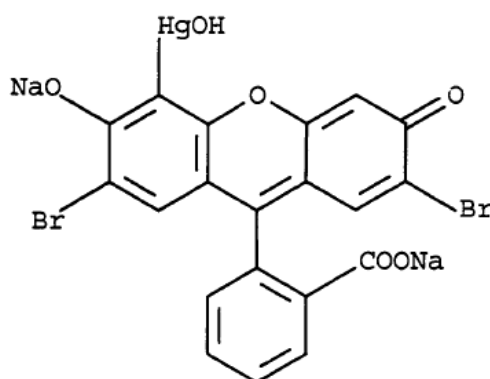
### 2. Preparation of starch-dextran dispersions

Dispersions of rice starch were prepared with 3% (w/v) concentration. A weighed amount of rice starch was poured into an eppendorf tube. Distilled water was pipetted into an eppendorf tube and stirred by using a vortex. Then, the dispersion was mixed with FITC-dextran. The mixture was heated in a water bath at different temperatures and time. After heating, the sample was cooled rapidly in a water-ice bath.



### 3. Merbromin Treatment

Merbromin solution was prepared by dissolving merbromin (1 g) in methanol (12 ml). Starch samples (2.5 mg) were suspended in a merbromin solution and rotated by using a Multi-Wrist Shaker at room temperature (Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, IL) for 90 min. Starch samples were washed with absolute ethanol for few times, recovered by centrifugation, and allowed to air-dry in the dark.



Chemical structure of mercury dibromofluorescein or merbromin.

### 4. CBQCA Treatment

The method for the dye 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA) staining was followed Han et al (2005). Starch (7 mg) was mixed with 0.1 M sodium borate buffer (pH 9.3) (135  $\mu$ l), 20 mM KCN (5  $\mu$ l) and 5mM CBQCA (10  $\mu$ l), respectively. Samples were allowed to incubation for 3-5 hr and observed using CLSM.

### 5. DTAF Treatment

Starch was treated with 5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)-fluorescein (DTAF) followed methods of Whistler et al (1998) and Huber (1998). Starch (10 g) was suspended in triethylamine (18.5 ml) for 30 min. DTAF (0.0025 g) in carbon tetrachloride (15.2 ml) was added to starch suspension and incubated for 7.5 hr. in the dark. The dye was washed with absolute ethanol. Starch was recovered by centrifugation and allowed to air-dry.

### 6. Thermolysin

Thermolysin is used to digest channel proteins on starch granules (Han et al 2005). The method for thermolysin digestion was based on Mu-Forster et al (1996). Starch (50 mg) was treated with 0.2% thermolysin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) in 1 mL of 5 mM  $\text{CaCl}_2$  solution for 30 min. The reactions were terminated by the addition of EDTA (20

mM). Starch was washed with distilled water 5 times, 70% ethanol 1 time and 100% ethanol 1 time. Starch was air dry for overnight.

### **7. Amyloglucosidase**

Starch (10 mg) was treated with 2 unit of amyloglucosidase (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) in 1 ml 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.5 and shaken in a Multi-Whist Shaker at room temperature for 24 hr. The reactions were inactive in boiling water bath for 10 min. Starch samples were washed with distilled water 5 times, 70% ethanol 1 time and 100% ethanol 1 time, recovered by centrifugation, and allowed to air-dry.

### **8. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Samples were mount on stub with double sticky tape and coat with AuPd for 3 min. Samples imaged in a JEOL JSM-840 SEM (JEOL USA Inc., Peabody, MA) using 5 kV accelerating voltage, 10 mm working distance, aperture 3 and probe current  $3 \times 10^{-11}$ . Magnifications were 5,000x and 10,000x. Digital images were captured using 1280×960 resolution and 160 s dwell time.

### **9. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

Starch powder was sprinkled onto a glass slide. The glass slide and cover slip were glued together with a thin film of paraffin wax. A Bio-Rad Radiance 2100 MP Rainbow System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) equipped with a Nikon Eclipse TE2000 (Nikon, Melville, NY, USA) inverted microscope was used to image starch granules at an excitation wavelength of 488 nm. CLSM digital images were acquired using the BioRad Laser Sharp program.

## ผลการทดลอง

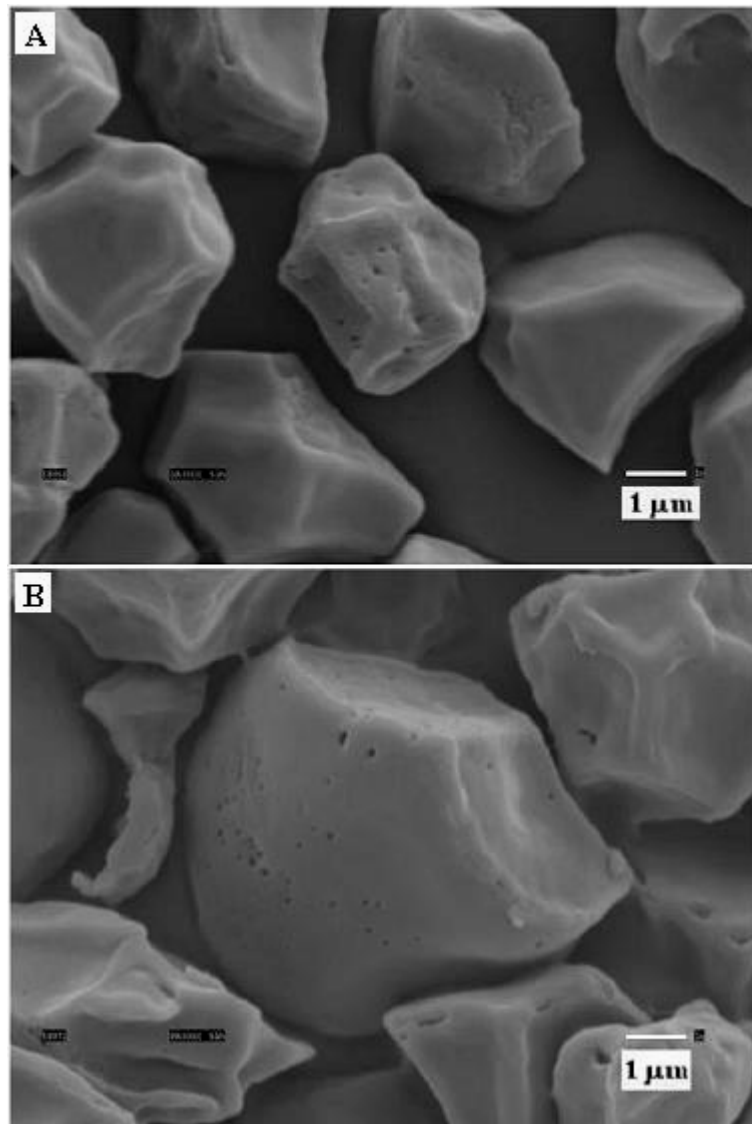


Fig. 1. Scanning electron micrograph of rice (A) and waxy rice starch (B).

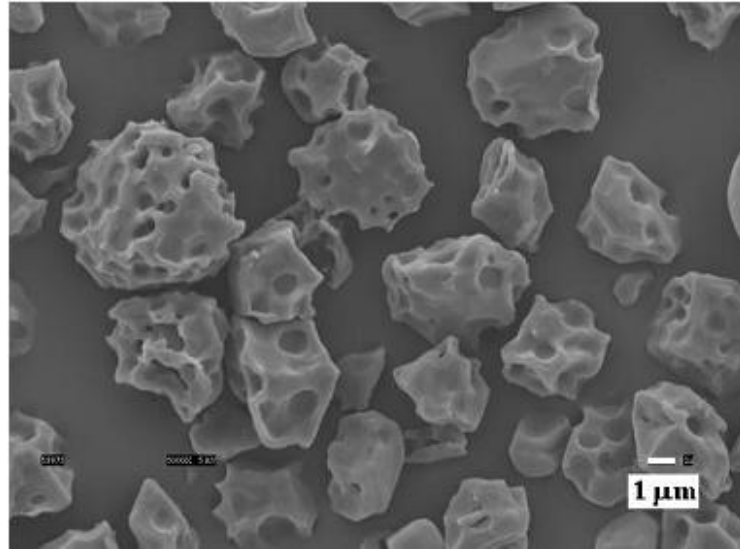


Fig. 2. Scanning electron micrograph of waxy rice starch treated with amyloglucosidase for 24 hr.

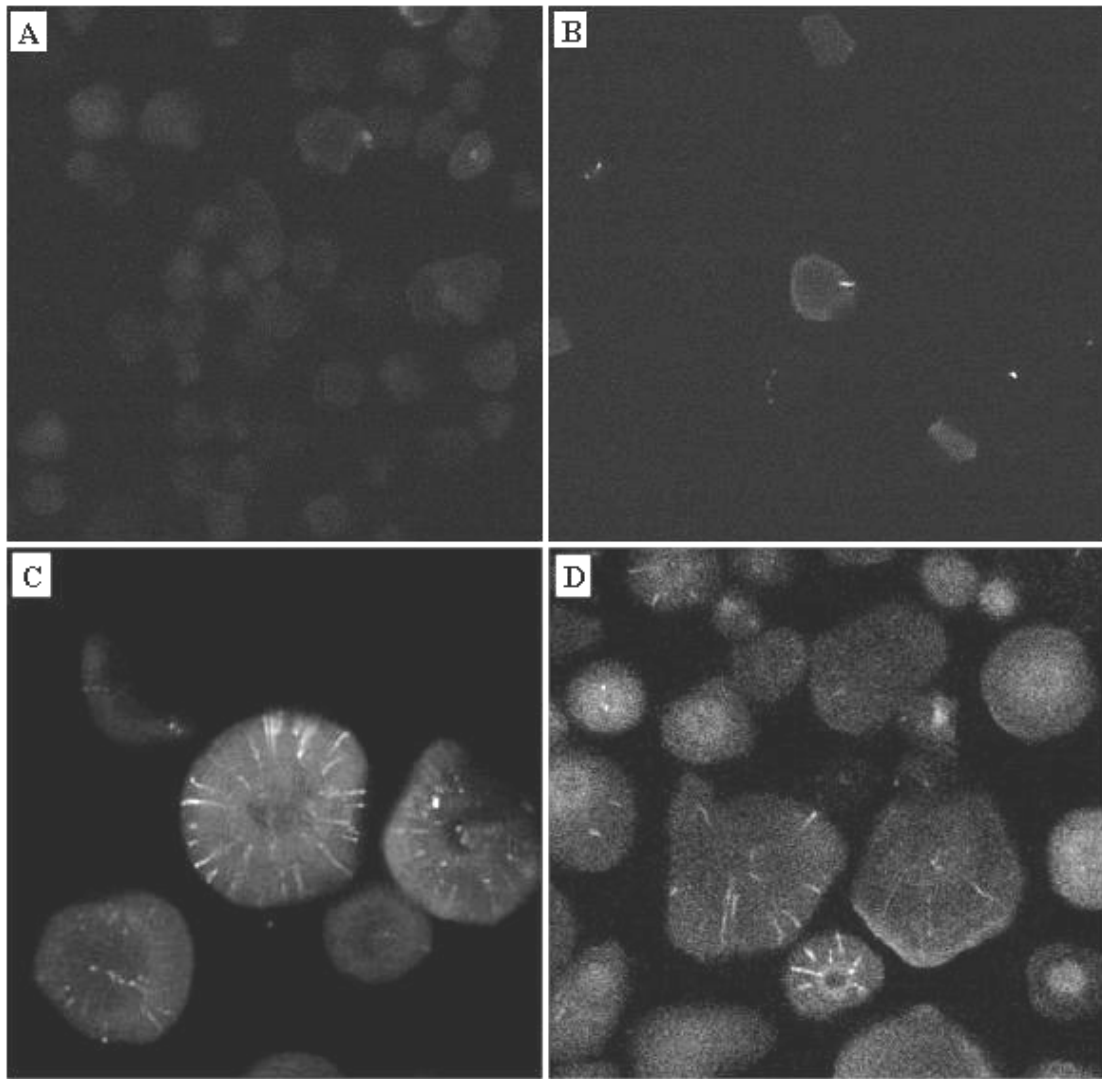


Fig. 3. Confocal laser scanning micrographs of optical sections of commercial rice starch (A), waxy rice starch (B), sorghum starch (C), and corn starch (D) dyed with CBQCA.

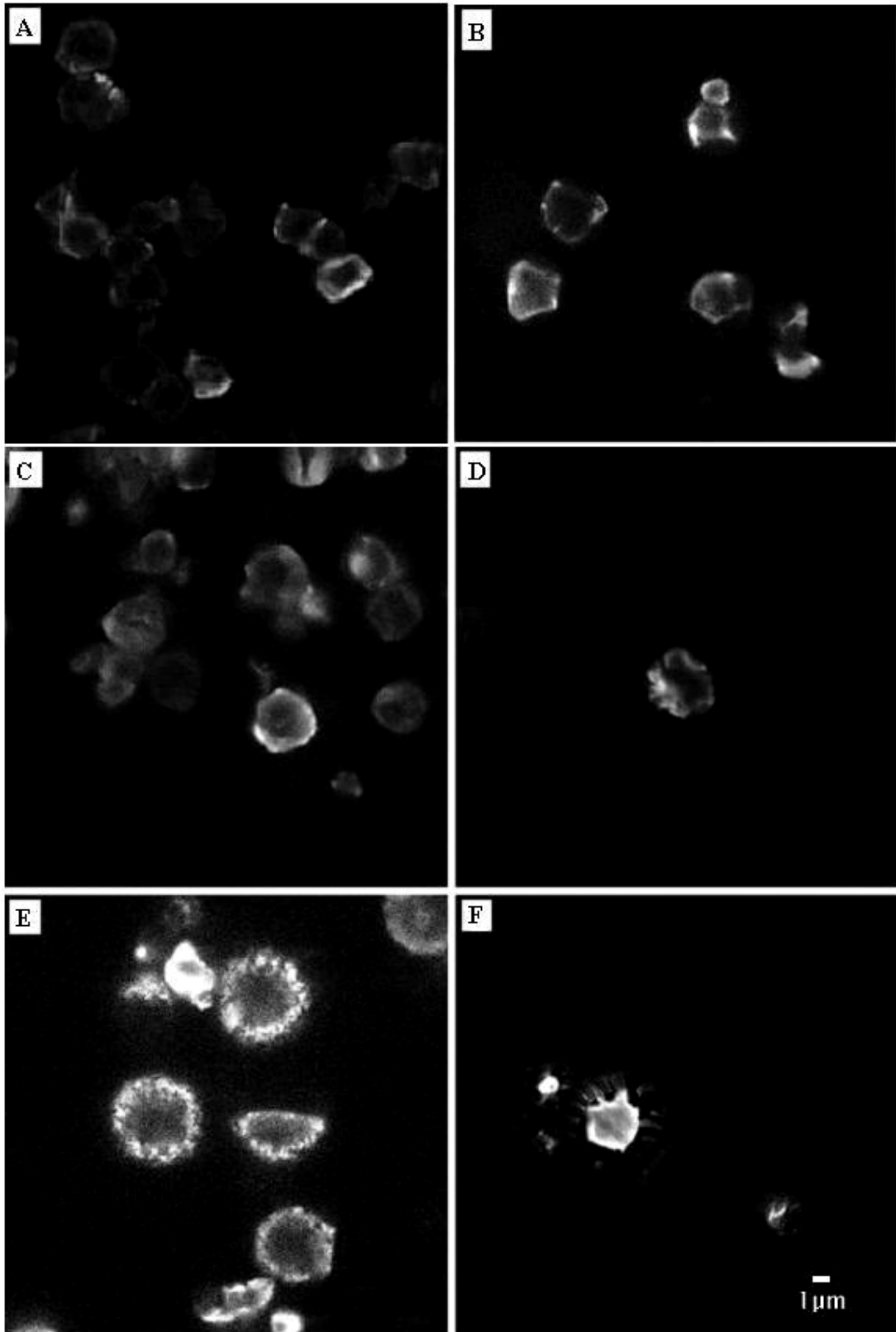


Fig. 4. Confocal laser scanning micrographs of optical sections of commercial rice starch (A), waxy rice starch (B) treated with merbromin. Rice starch (C), waxy rice starch (D), tapioca starch (E), and corn starch (F) after enzymatic digestion with amyloglucosidase for 24 hr. and dyed with merbromin.

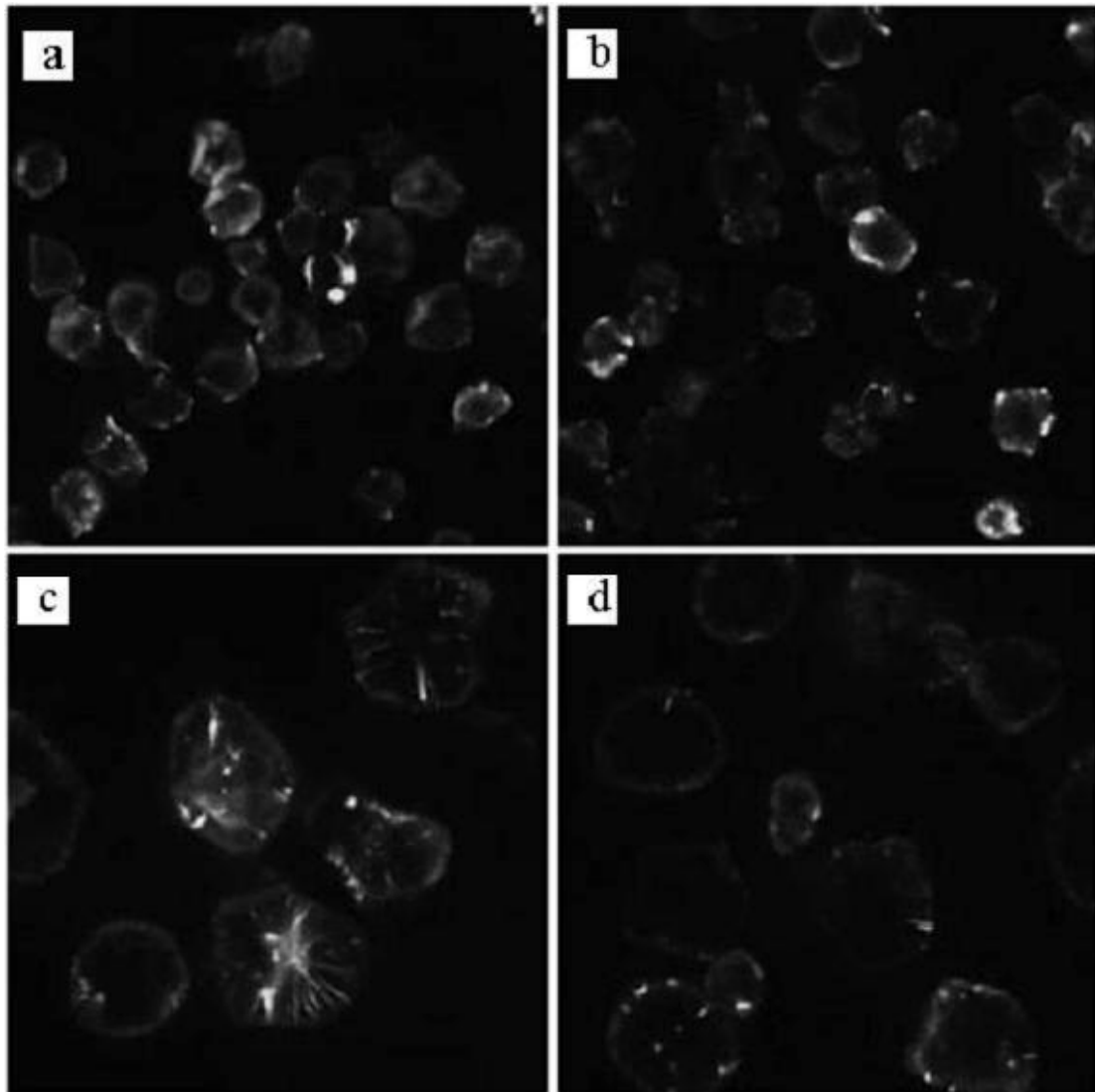


Fig. 5 (a) rice starch, (b) waxy rice starch, (c) sorghum starch and (d) corn starch treated with thermolysin and dyed with Merbromin (60x , zoom 4).

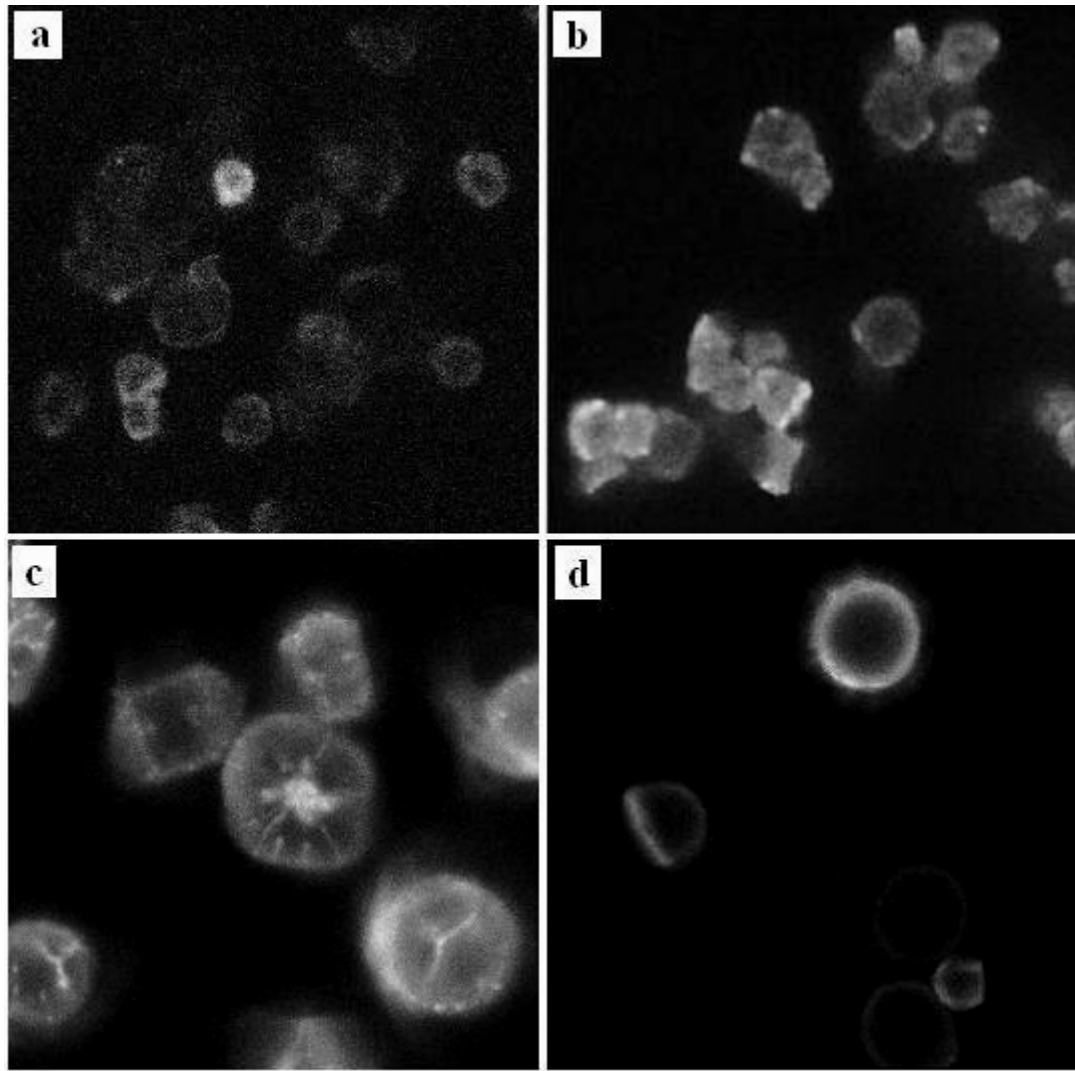


Fig. 6 (a) rice starch, (b) waxy rice starch and (c) sorghum starch and (d) tapioca starch treated with DTAF (60x , zoom 4).



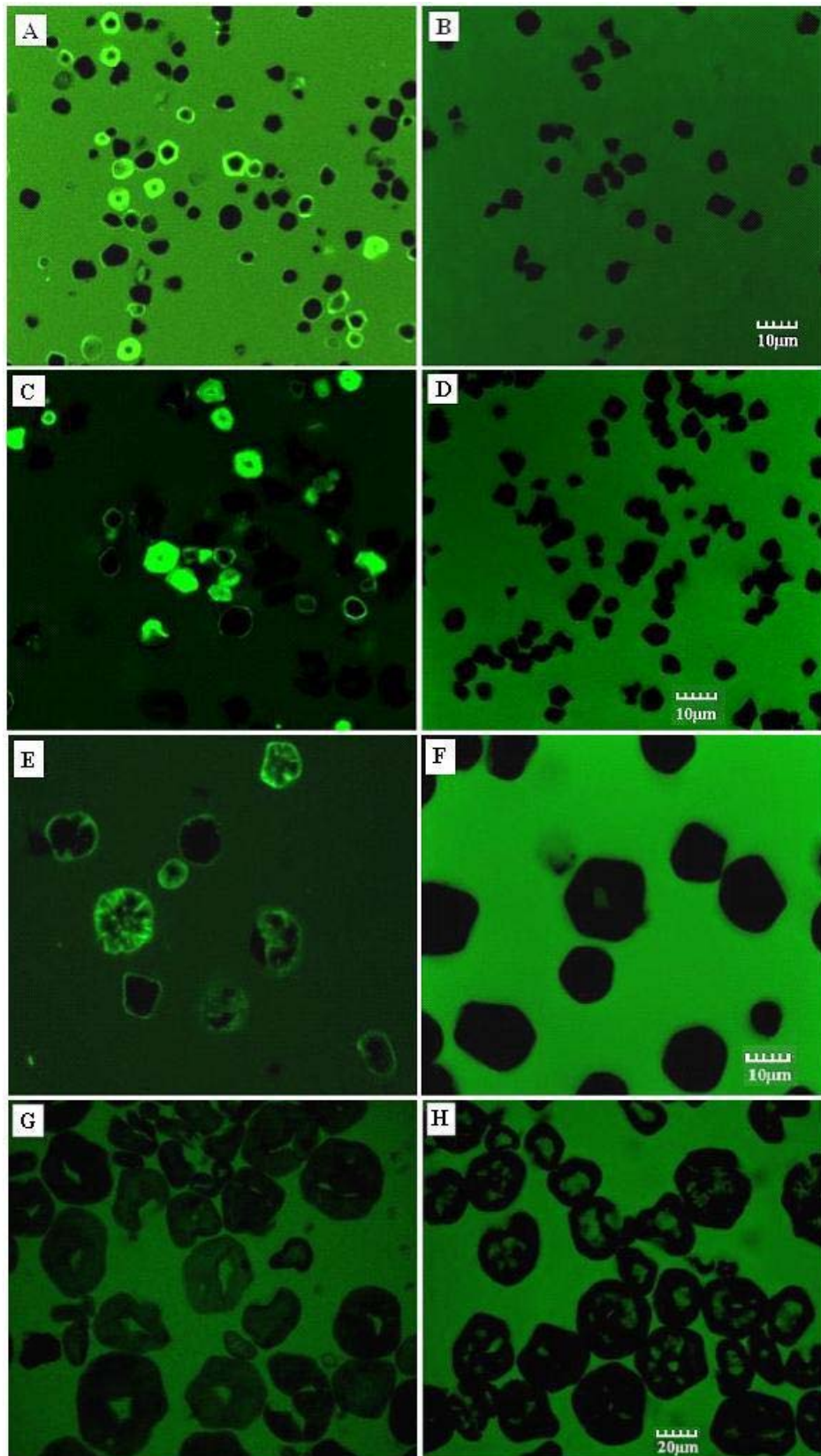


Fig. 7. Confocal laser scanning micrographs of optical sections of rice starch (A-D) and sorghum starch (E-H). Raw rice starch mixed with FD4 (A) and FD10(B). Cooked rice starch mixed with FD4 (C) and FD10 (D). Raw sorghum starch mixed with FD4 (E) and FD10 (F). Cooked sorghum starch mixed with FD4 (G) and FD10 (H).

## **1. Surface pores of starch**

### **1.1 Scanning electron microscopy**

Surface pores of rice starch and waxy rice starch was investigated by using SEM. From scanning electron micrograph of rice starch and waxy rice starch (Fig. 1), the most of rice starch and waxy rice starch granules have no pores. Very few amounts of rice starch and waxy rice starch have some small pores on surface. Fannon et al (1992) reported that no pores were found in rice starch. Our assumption is the pores of rice starch would be too small to observe by using SEM or CSLM. The present of surface pores of rice starch was investigated by using enzyme digestion to observe digestion pattern. Amyloglucosidase was used to enlarge the pores of rice starch. The pattern of enzyme digestion on starch which has surface pores was different from starch which has no pores (Fannon, et al, 1992). Enzyme-treated common corn starch granules showed small pores on starch surface, whereas enzyme-treated potato starch showed a width scratch of enzyme activity on starch surface. The presence of channels affects to enzymatic attack (Gallant et al, 1997). Corn starch treated with microbial glucoamylase for up to 8 h showed small pits (approx. 0.1-0.2  $\mu\text{m}$  in diameter) on starch surface (Imam et al, 2006). From our results, waxy rice starch has more potential to find surface pores compared with native rice starch. When waxy rice starch was treated with amyloglucosidase (Fig. 2), it was more susceptible to enzymatic digestion than rice starch (data do not show). Moreover, the pores of digested waxy rice starch are distributed over the entire granule surface. However, the most of rice starch and waxy rice starch granules have no pores from SEM results.

### **1.2 Confocal laser scanning microscopy**

Confocal laser scanning microscopy (CSLM) is used to investigate starch microstructure (Huber and BeMiller, 2000; Kim and Huber, 2008; Choi et al, 2008) and the behavior of starch-hydrocolloid mixtures (van de Velde, F., et al, 2003; Tromp R.H., et al, 2001). CSLM is a useful tool to investigate phase separation of hydrocolloids in starch mixture. The use of fluorescence to dye biopolymers allows visualization of the position of hydrocolloid in starch dispersion (van de Velde, et al, 2003).

From Figure 3, CBQCA was used to dye proteins in channels of starches. Sorghum and corn starch Figure 3 (c and d) showed protein channels that are the white lines arranged radially of starch granules. The same results were reported by Han et al (2005). Sorghum starch obtained from the Purdue University Agronomy Farm showed more protein channels than corn starch. Proteins could not be observed in rice starch (Figure 3, a). White short lines could be observed when rice starch was dyed with Merbromin (Figure 4, a). However, the line looked too short compared with sorghum and corn starch channels (Figure 4, c and d). A white short straight lines could be observed in a waxy rice starch granules (Fig 3, b). However, the line looked too short and it rarely found in other granules. It would be a protein on granule surface.

From Figure 5, thermolysin was used to digest channel proteins on starch granules (Han et al 2005). The method for thermolysin digestion was based on Mu-Forster et al (1996). From our assumption, channels would plugged with channel proteins. Thermolysin was used to digest channel proteins to allow the access of merbromin into starch channels. From Figure 5 (a and b), starch channels could not found in rice starch and waxy rice starch compared with sorghum and corn starch Figure 5 (c and d). Sorghum and corn starch showed a long white lines of starch channels. Rice starch and waxy rice starch showed only short white lines on starch surfaces.

From Figure 6, starch was derivatized with DTAF (5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)-fluorescein) by a method similar to that described by Whistler et al. (1998) for obtaining surface-reacted acylated and carboxymethylated corn starch granules. The granular pattern of reaction for DTAF-reacted starches was observed by CSLM. As anticipated, reacted dye was localized at granule surfaces, including those of both channels and cavities. Starch pores and channels of rice starch, waxy rice starch and tapioca starch could not found when starches were derivatized with DTAF.

## **2. Penetration of hydrocolloids into starch granules**

The surface pores (0.07-0.1  $\mu\text{m}$  in diameter) are the openings of the interior channels. Some starches have surface pores, while the others have none. The surface pores and channels are believed to occur during starch germination. (Fannon et al, 1992). Fanon et al (1992) proposed that the presence of channels facilitate enzyme attack of the granule during germination. The presence of surface pores and channels of sorghum, corn and wheat starch was reported by many researchers (Fannon et al, 1992; Fannon et al, 1993;

Huber and BeMiller, 2000). Fannon et al (1992) found surface pores of corn starch with different quantity. Some granules have many pores, some have a few, and others have none. They also reported that no pores were found in rice and oat starches. However, we found that FD4 can penetrate through raw and cooked rice starch (Figure 7). That would be because of different rice cultivars compared with Fannon et al (1992) results. The channels of rice starch would be void. Since they can absorb FD4 into starch granules. However, rice channel proteins could not be found when dyed with CBQCA. Our results showed that FITC-dextran average Mw 4,000 can pass through raw rice starch with different levels. FD4 could not penetrate through the most of raw rice starch. Whereas, it could be partially or fully absorb on some starch granules. The reasons would be the heterogeneity of starch granules.

The penetration of hydrocolloids or food additives into starch granules was studied by many researchers. Gonera and Cornillon (2002) indicated that xanthan, high Mw additive, absorbed only on the surface of raw corn starch and stabilized the granular shape. Whereas, sucrose, the low Mw additive, can fully penetrate into raw corn starch. Fannon et al (1992) concluded that surface pores of corn starch (approximately 1,000 Å in diameter) can allow the access of enzyme to granule interior. Molecular weight of hydrocolloids affects the penetration of hydrocolloid or food additives into raw starch granule and starch ghost. The results in Fig. 7 showed that FD4 can penetrate through raw and cooked rice starch. Whereas, FITC-dextran Mw 10,000 can not penetrate through raw and cooked rice starch.

The results in Fig. 7 showed the effects of gelatinization on penetration of hydrocolloids into starch granules. Atkin et al (1998) concluded that the small size of surface pore would prevent the leach out of large molecules of amylopectin from starch granule at ambient temperature. When the temperature is increased, surface pore increased and allowed the release of the 400 nm amylopectin from starch ghost. If the enlarged surface pores of cooked starch granules allow the release of amylopectin in the granule. They should also allow the penetration of large hydrocolloids into starch ghost. However, our results showed that only FD4 can penetrate through the cooked rice and sorghum starch. The large molecules of FITC-dextran can not pass through starch ghost.

## เอกสารอ้างอิง

- Atkin, N. J., Abeysekera, R. M., Cheng, S. L., & Robards, A. W. (1998). An experimentally-based model for the separation of amylopectin subunits during starch gelatinisation. *Carbohydrate Polymers*, 36, 173-192.
- Choi, S. J., Woo, H.D., Ko, S. H., and Moon, T. W. (2008). Confocal laser scanning microscopy to investigate the effect of cooking and sodium bisulfite on in vitro digestibility of waxy sorghum flour. *Cereal Chemistry*. 85;65-69.
- Fannon, J. E., Hauber, R. J., and BeMiller, J. N. (1992). Surface pores of starch granules. *Cereal Chemistry*, 69, 284-288.
- Fannon, J. E., Shull, J. M., and BeMiller, J. N. (1993). Interior channels of starch granules. *Cereal Chemistry*, 70, 611-613.
- Gallant, D. J., Bouchet, B., and Baldwin, P. M. (1997). Microscopy of starch: evidence of a new level of granule organization. *Carbohydrate Polymers*, 32, 177-191.
- Gonera, A., & Cornillon, P. (2002). Gelatinization of starch /gum /sugar systems studied by using DSC, NMR, and CSLM. *Starch/Stärke*, 54(11), 508-516.
- Han, X.-Z., Benmoussa, M., Gray, J. A., BeMiller, J. N., and Hamaker, B. R. (2005). Detection of Proteins in Starch Granules Channels. *Cereal Chemistry*, 82(4):351-355.
- Huber, K. C., and BeMiller, J. N. (2000). Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*, 41:269-276.
- Imam, S. H., Gordon, S. H., Mohamed, A., Harry-O'kuru, R., Chiou, B.-S., Glenn, G. M., Orts, W. J. (2006). *Polymer degradation and stability*, 91, 2894-2900.
- Kim, H-S, Huber, K. C. (2008). Channels within soft wheat starch A- and B-type granules. *Journal of Cereal Science*, 48:159-172.
- Mu-Forster, C., Huang, R., Powers, J. R., Harriman, R. W., Knight, M., Singletary, G. W., Keeling, P. L., and Wasserman, B. P. (1996). Physical association of starch biosynthetic enzymes with starch granules of maize endosperm: granule-associated forms of starch synthase I and starch branching enzyme II. *Plant Physiology*, 111:821-829.
- Tromp, R. H., van de Velde, F., van Riel, J., and Paques, M. (2001). Confocal scanning light microscopy (CSLM) on mixtures of gelatine and

- polysaccharides. *Food Research International*, 34:931-938.
- van de Velde, F., Weinbreck, F., Edelman, M. W., van der Linden, E., and Tromp, R. H., (2003). Visualisation of biopolymer mixtures using confocal scanning laser microscopy (CSLM) and covalent labelling techniques. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31:159-168.
- Whistler, R. L., Madson, M. A., Zhao, J., and Daniel, J. R. (1998). Surface derivatization of corn starch granules. *Cereal Chemistry*, 75:72-74.

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลการทดลองพบว่าไม่พบรูที่ผิวและ channel ของแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเจ้าข้าวเหนียว โดยการใช้เครื่องมือ SEM และ CSLM จากการใช้สารเคมี 3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde (CBQCA) ทำปฏิกิริยากับ channel protein พบว่าแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเจ้าข้าวเหนียวไม่มี channel protein เด็กซ์แทรนซึ่งเป็นไฮโดรคอลลอยด์ชนิดหนึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี จากการทดลองพบว่าเด็กซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็ก (Mw 4,000) สามารถแทรกซึมเข้าไปในเม็ดแป้งข้าวเจ้าดิบหรือสุกได้ ขณะที่เด็กซ์แทรนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 ไม่สามารถแทรกซึมเข้าสู่เม็ดแป้งข้าวเจ้าดิบหรือสุกได้ การแทรกซึมของไฮโดรคอลลอยด์เข้าสู่เม็ดแป้งอาจมีผลต่อคุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมแป้งข้าวเจ้าและไฮโดรคอลลอยด์ ซึ่งจากงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถวิเคราะห์คุณสมบัติทางรีโอโลยีของของผสมได้ เนื่องจากตัวอย่างเด็กซ์แทรนที่คอนจูเกตกับ FITC มีปริมาณน้อยมาก (น้อยกว่า 100 mg) ไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์คุณสมบัติทางรีโอโลยี ซึ่งผู้วิจัยวางแผนจะทำการปรับปรุงวิธีการเตรียมเด็กซ์แทรนที่คอนจูเกตกับ FITC ให้มีปริมาณมากขึ้น

### Output

นักวิจัยกำลังดำเนินการจัดเตรียมผลงานวิจัยเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

วารสารที่คาดว่าจะตีพิมพ์: Cereal Chemistry

หัวข้อ : Confocal laser scanning microscopy to investigate the location of dextran in dextran-rice starch mixtures

ภาคผนวก



Submit to: Cereal Chemistry

Confocal laser scanning microscopy to investigate the location of dextran in dextran-rice starch mixtures

Piyada Achayuthakan,<sup>1,4</sup> Manop Supphantharika,<sup>2</sup> and James N. BeMiller<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Program, Faculty of Science and Technology,  
Suan Sunandha Rajabhat University, 1, U-Thong Nok Road, Wachira, Dusit,  
Bangkok, Thailand 10300.

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University,  
Rama 6 Road, Bangkok, Thailand 10400.

<sup>3</sup> Whistler Center for Carbohydrate Research and Department of Food Science,  
745 Agriculture Mall Drive, Purdue University, West Lafayette, IN, USA  
47907-2009.

<sup>4</sup> Corresponding author. Phone: 66-81-554-2814. Fax: 66-2-243-2248.  
E-mail: piyaa@rocketmail.com

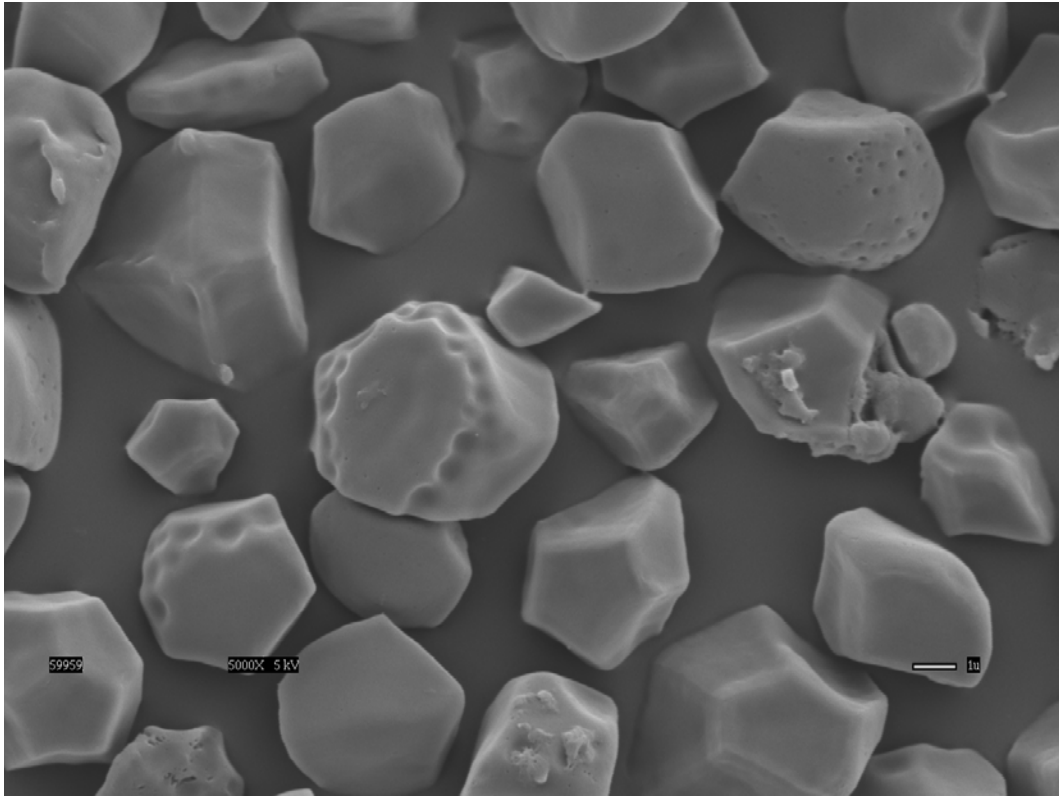


Fig. 8 Scanning electron micrograph of rice starch. (5,000 X) (scale bar is 1  $\mu\text{m}$ )

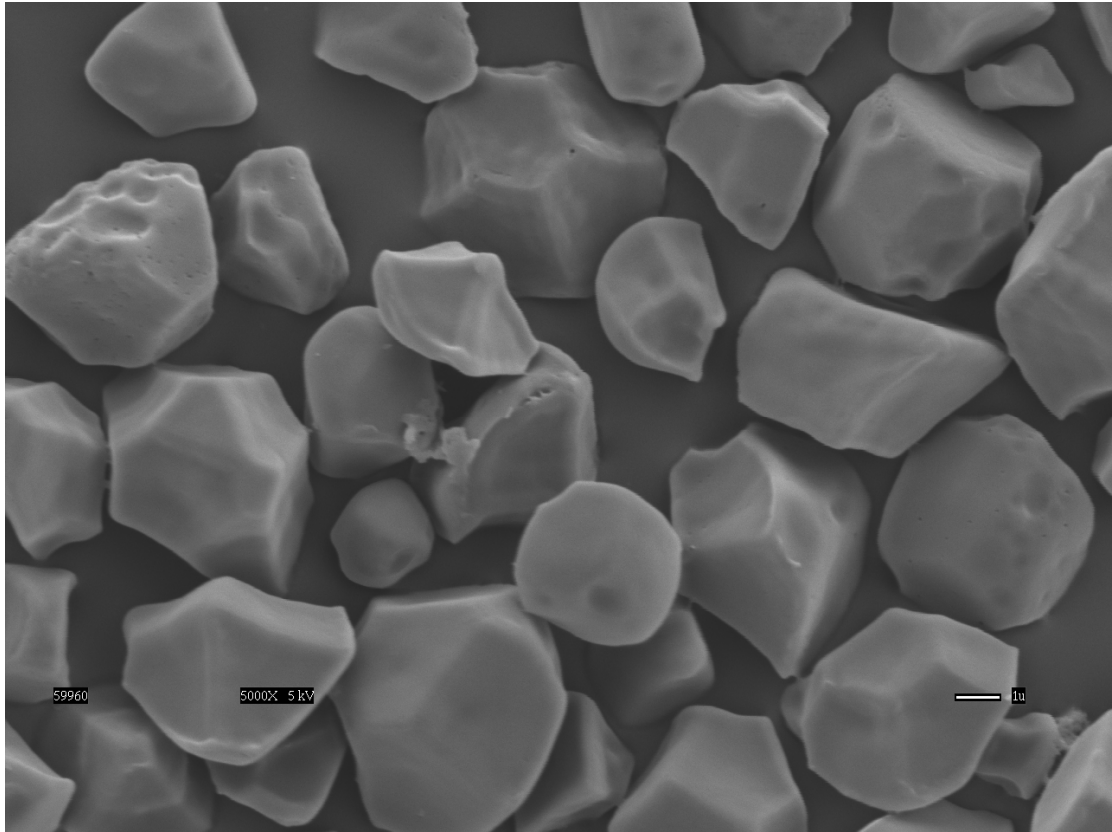


Fig. 9 Scanning electron micrograph of rice starch (Magnification 5,000 X)  
(scale bar is 1  $\mu\text{m}$ )

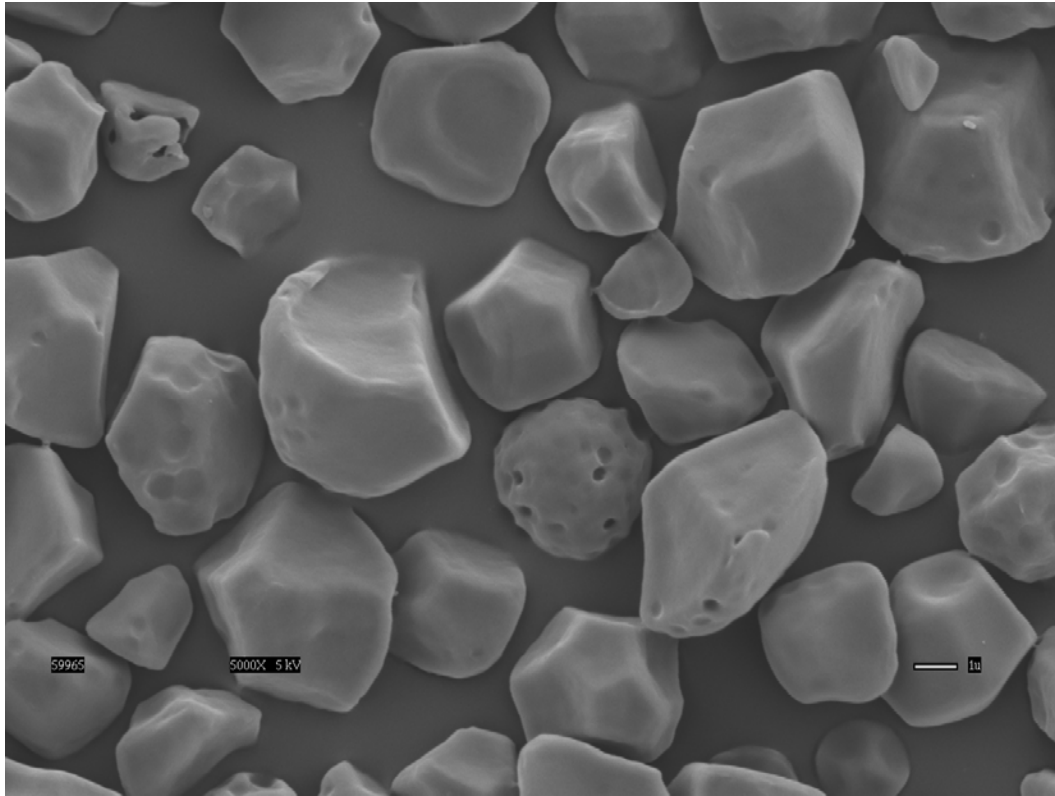


Fig. 10 Scanning electron micrograph of rice starch treated with amyloglucosidase 4 unit/ml at room temperature for 24 hr. (5,000 X) (scale bar is 1  $\mu\text{m}$ )

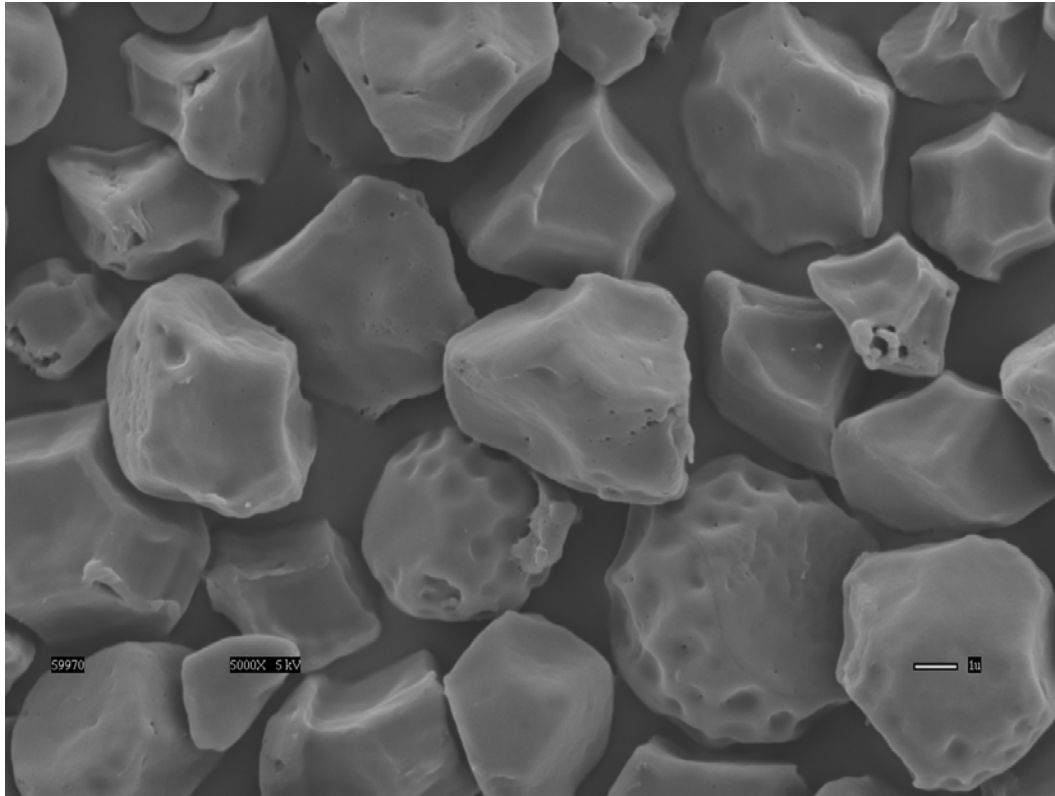


Fig. 11 Scanning electron micrograph of waxy rice starch (5,000 X) (scale bar is 1  $\mu\text{m}$ )

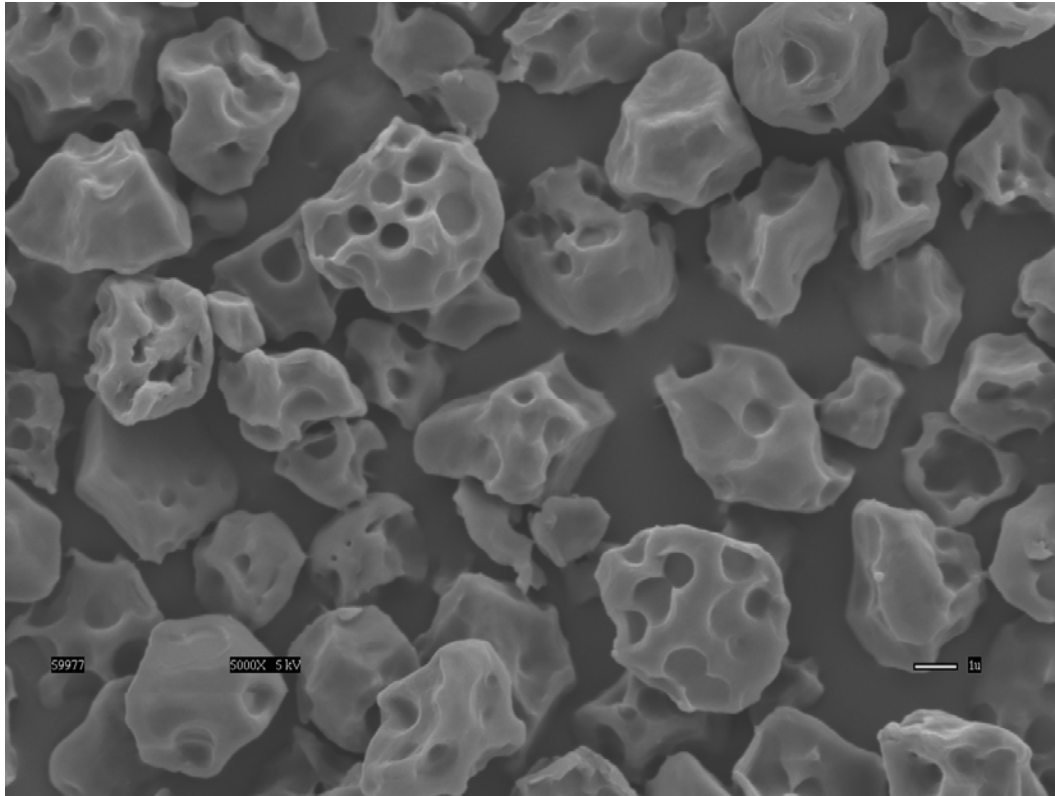


Fig. 12 Scanning electron micrograph of waxy rice starch treated with amyloglucosidase 4 unit/ml at room temperature for 24 hr. (5,000 X) (scale bar is 1  $\mu\text{m}$ )